



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Βιοχημικός χαρακτηρισμός της πολυ(Α)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης v1, PARN_v1



Γεωργούλα Νίκη
Λάρισα, 2024



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

DIPLOMA THESIS

Biochemical characterization of poly(A)-specific ribonuclease v1, PARN_v1



Georgoula Niki
Larissa, 2024

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μπαλατσός Νικόλαος

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λεωνίδας Δημήτριος

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

DIMITRIOS LEONIDAS

12.06.2024 13:13

Βλαχάκης Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

DIMITRIOS VLACHAKIS

13.06.2024 11:43

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία έχει πραγματοποιηθεί με την ερευνητική ομάδα του κ. Μπαλατσού , “RNA expedition group”, στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Πρώτα από όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Μπαλατσό Νικόλαο, που επέβλεπε την πτυχιακή μου εργασία, για την δυνατότητα να εργαστώ με την ερευνητική του ομάδα, καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά του και την στήριξή του στις δυσκολίες και όχι μόνο που εμφανίστηκαν κατά το διάστημα πραγματοποίησης της.

Επιπλέον ένα μεγάλο ευχαριστώ ανήκει και στον διδακτορικό Λάμπρο Μπαλή για την καθοδήγησή και πολύτιμη βοήθειά που μου πρόσφερε πάνω σε θέματα τα οποία αφορούσαν την διπλωματική μου εργασία. Σημαντική ήταν και η συμβολή των υπόλοιπων μελών της ομάδας και του εργαστηρίου γενικότερα τος για την στήριξη και τις συμβουλές τους όσο και για την διατήρηση της όμορφης και ευχάριστης διάθεσης μέσα στο εργαστήριο.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Δ. Βλαχάκη, του τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την συνδρομή του στο ερευνητικό κομμάτι του θέματος.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για ψυχολογική και ηθική στήριξή τους όλο αυτόν τον καιρό και την προτροπή τους να μην τα παρατήσω ακόμα και στις πιο δύσκολες στιγμές του πειράματος και να ακολουθώ τα όνειρά μου όσο δύσκολα και αν φαντάζουν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

Περίληψη	6
Abstract	7
1. Εισαγωγή	8
1.1 Ευκαρυωτικά mRNA και η ωρίμανση τους.....	8
1.2 Αποικοδόμηση μέσω απαδενυλίωσης των mRNA	11
1.3 Απαδενυλάσεις και απαδενυλίωση	12
1.4 Πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN).....	13
1.5 Το εναλλακτικό μάτισμα	16
1.6 Έναλλακτικό μετάγραφο της PARN (PARN_V1)	21
2. Σκοπός της εργασίας.....	21
3. Υλικά – Μέθοδοι	21
3.1 Υπερέκφραση της PARN_v1 και του μεταλλάγματός της	21
3.2 Απομόνωση PARN_v1 και μεταλλάγματος	23
3.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....	25
3.4 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blot)	28
3.5 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας.....	30
4. Αποτελέσματα.....	33
4.1 Υπερέκφραση και απομόνωση της PARN_v1 και του μεταλλάγματός της σε στήλη Talon metal affinity	33
4.2 Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών.....	34
4.3 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας.....	35
5. Συζήτηση	36
6. Βιβλιογραφία	38

Περίληψη

Ένα καταλυτικό βήμα στην αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNA και κατ'επέκταση της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης είναι η αποδόμηση της ουράς πολυ(A) τους. Τα ένζυμα που επιτελούν αυτή την διαδικασία ονομάζονται απαδενυλάσες και αυτή την οποία μελετάμε στο εργαστήριο είναι η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN). Η PARN αλληλεπιδρά με την 5' καλύπτρα των mRNA για μια αποτελεσματικότερη βράχυνση των πολυ(A) ουρών, λειτουργώντας ως 3'→5' εξωνουκλεάση. Ωστόσο σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου βρέθηκε η PARN_v1, το οποίο είναι ένα εναλλακτικό μετάγραφο της PARN. Η PARN_v1 απομονώθηκε από κυτταρική σειρά κακοήθους πλευριτικού μεσοθηλιώματος και σχετίστηκε με αυτόν τον τύπο καρκίνου.

Στην παρούσα εργασία, απομονώθηκε ξανά η PARN_v1 και ένα μετάλλαγμα της, στο οποίο έχει αντικατασταθεί το γλουταμινικό οξύ της θέσης 378 του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου με μια αλανίνη (PARN_v1 E378A). Στηριζόμενοι σε ένα βιοπληροφορικό μοντέλο υποστηρίζεται ότι το E378 του εναλλακτικού μεταγράφου μπορεί να αντικαταστήσει το E30 του καταλυτικού κέντρου της PARN, προσδίδοντάς του δραστηριότητα. Στην αρχή έγινε υπερέκφραση τους σε βακτηριακά κύτταρα και ύστερα απομόνωσή τους σε στήλες χρωματογραφίας συγγένειας. Για να ελεγχθεί η καθαρότητά τους πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση υπο αποδιατακτικές συνθήκες. Στο τέλος έγινε ανοσοανίχνευση και έλεγχος δραστηριότητας και της PARN_v1 και του PARN_v1 E378A.

Από την απομόνωση προέκυψαν σχετικά καθαρά κλάσματα, όπου ανιχνευθήκαν οι PARN_v1 και PARN_v1 E378A. Από τον έλεγχο δραστηριότητας βρέθηκε ότι τόσο η PARN_v1 όσο και το μετάλλαγμα δεν αποικοδομούν υποστρώματα RNA.

Abstract

A catalytic step in the degradation of eukaryotic mRNAs and thus the regulation of gene expression is the degradation of their poly(A) tail. The enzymes that carry out this process are called deadenylases and the one we study in the lab is poly(A)-specific ribonuclease (PARN). PARN interacts with the 5' cap of mRNA, increasing the efficiency of poly(A) tails shortening, acting as a 3'→5' exonuclease. However in past laboratory studies an alternative transcript of PARN (PARN_v1) was isolated from a malignant pleural mesothelioma cell line and was associated with this type of cancer.

In this work, PARN_v1 and a mutant in which the glutamic acid residue 378 of the catalytic centre of the variant has been replaced by an alanine residue (PARN_v1 E378A) were isolated again to test their ability to degrade a RNA substrate. First, they were overexpressed in bacterial cells and then isolated on affinity chromatography columns. To check their purity, electrophoresis was carried out under denaturing conditions. Finally, immunodetection and activity assay of both PARN_v1 and PARN_v1 E378A was performed.

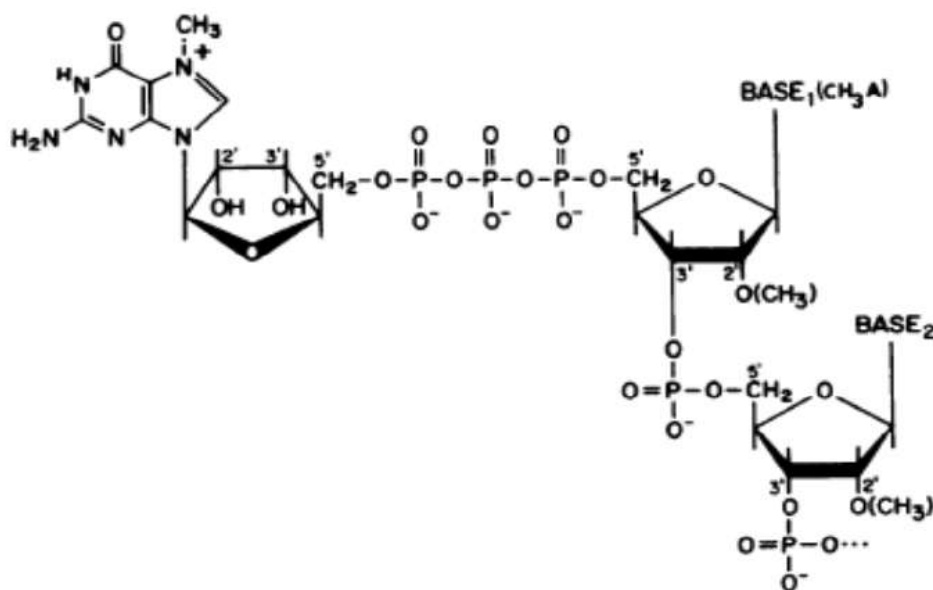
The isolation resulted in relatively pure fractions, where PARN_v1 and PARN_v1 E378A were detected. In the activity assay was shown that both PARN_v1 and PARN_v1 E378A were unable to degrade RNA substrates.

1. Εισαγωγή

1.1 Ευκαρυωτικά mRNA και η ωρίμανσή τους

Τα mRNA των ευκαρυωτικών κυττάρων μετά την σύνθεσή τους υφίστανται δυο σημαντικές τροποποιήσεις στο 5' και 3' άκρο τους, που σχετίζονται άμεσα με την σταθερότητα και τον χρόνο ζωής τους. Αυτές οι τροποποιήσεις είναι η προσθήκη της 5' καλύπτρας (5' cap) και της ουράς πολυ(A).

Όπως είναι γνωστό η έναρξη της μεταγραφής γίνεται συνήθως από μια 5' τριφωσφορική πουρίνη. Η επιμήκυνση του μεταγράφου γίνεται με την δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των νουκλεοτιδίων, ενώ το νουκλεοτίδιο στο 5' άκρο διατηρεί την τριφωσφορική του ομάδα. Στο πρώτο νουκλεοτίδιο προστίθεται, στην αρχή της μεταγραφής, μια γουανίνη ο προσανατολισμός της οποίας είναι αντίθετος με αυτό των υπόλοιπων νουκλεοτιδίων ($3' \rightarrow 5'$). Η προσθήκη αυτή πραγματοποιείται με την βοήθεια του ενζύμου γουανυλο-τρανσφεράση, που βρίσκεται στον πυρήνα. Η νεοσχηματισμένη αυτή δομή αποτελεί την 5' καλύπτρα και είναι υπόστρωμα μεθυλοτρανσφερασών με στόχο την προσθήκη μεθυλομάδων [1]. Βέβαια εκτός από την κλασική δομή καλύπτρας (Cap0) , όπως φαίνεται στην εικόνα 1, έχουν βρεθεί και άλλες διαφορετικές καλύπτρες όπως τα Cap1, Cap2, Cap4. Επιπλέον υπάρχουν και οι μη κανονικές καλύπτρες [29].

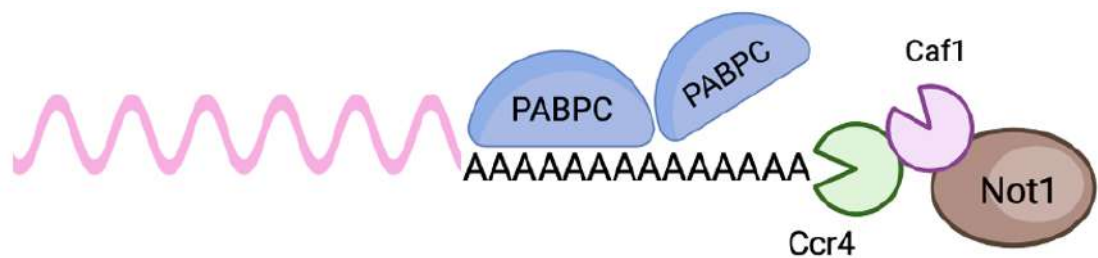


Εικόνα 1. Χημική δομή 5' καλύπτρας [1]

Η 5' καλύπτρα είναι ιδιαίτερα σημαντική διότι αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της ωρίμανσης του mRNA και εμπλέκεται στην έναρξη της μετάφρασης, καθώς και στην προστασία του 5' άκρου του mRNA από την δράση διάφορων νουκλεασών. Με τους τρόπους αυτούς η καλύπτρα συμβάλλει στην σταθερότητα των ευκαρυωτικών mRNA/[1,2].

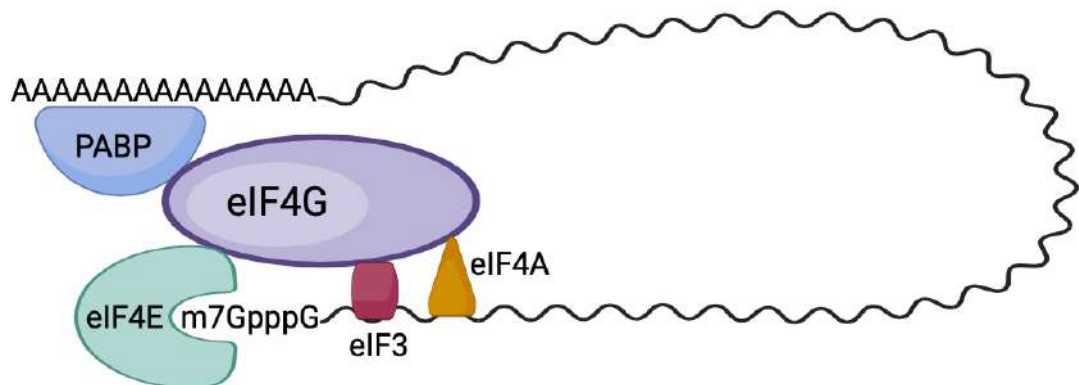
Σε σχέση με το 5' άκρο, στο 3' άκρο των mRNA γίνεται πολυαδενυλίωση. Πιο συγκεκριμένα, όλα τα πρόδρομα mRNA (pre-mRNA) διαθέτουν ένα σήμα αποαδενυλίωσης (PAS, polyadenylation signal), που συνήθως είναι η ιδιαίτερα συντηρημένη αλληλουχία AAUAAA ή, σπανιότερα, κάποια παραλλαγή της. Καθοδικά αυτής υπάρχει άλλη μια αλληλουχία πλούσια σε GU ή U, οι οποίες αλληλοεπιδρούν και στρατολογούν τα απαραίτητα για την επεξεργασία του του 3' άκρου ένζυμα και πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Καθοδικά της PAS πραγματοποιείται θραύση 10-30 νουκλεοτιδίων από την πολυ(A) πολυμεράση (PAP, poly(A) polymerase). Η PAP προσθέτει περίπου 11-14 νουκλεοτίδια αδενίνης στο 3' άκρο του mRNA, τα οποία αποτελούν την ουρά πολυ(A) που τελικά αποκτά μήκος 200-250 νουκλεοτιδίων. Πάνω στην ουρά πολυ(A) συνδέονται πρωτεΐνες γνωστές ως πολυ(A)-συνδεόμενες πρωτεΐνες (PABP, poly(A) binding protein). Οι πρωτεΐνες αυτές υπάρχουν τόσο στο πυρήνα

(PABPN), που συνδέει την ουρά πολυ(A) με το pre-mRNA, όσο και στο κυτταρόπλασμα (PABPC), που προστατεύει την ουρά πολυ(A) από ένζυμα αποικοδομησης (εικόνα 2) [20,15,10]. Γενικότερα η διαδικασία δημιουργίας της ουράς πολυ(A) πραγματοποιείται από το σύμπλοκο CPAC, που αποτελείται από περισσότερες από 20 επιμέρους πρωτεΐνες και ελέγχεται από τις PABPs [25]. Η ουρά πολυ(A) υπάρχει σε όλα σχεδόν τα RNA, ακόμα και στα lncRNA ή στα small non-coding RNA. Εξαιρέση αποτελούν τα RNA που προέρχονται από γονίδια πρωτεϊνών των ιστονών που εξαρτώνται από την αντιγραφή [20,25]. Ακόμη το μήκος ουράς ποικίλει ανάμεσα στα μετάγραφα και εξαρτάται τις περισσότερες φορές από την έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου [20].



Εικόνα 2. Προστασία mRNA και ουράς πολυ(A) από σύμπλοκο απαδενυλίωσης Ccr4-Not, μέσω πρωτεϊνών PABP. (δημιουργήθηκε με το <https://www.biorender.com>)

Η ουρά πολυ(A) είναι ιδιαίτερα σημαντική στην σταθερότητα του mRNA, καθώς καθορίζει και τον χρόνο ημιζωής του [20,25]. Οι πρωτεΐνες PABP έχουν την επιπλέον ικανότητα να αλληλεπιδρούν με παράγοντες έναρξης της μετάφρασης του συμπλόκου eIF4G, όπως φαίνεται στην εικόνα 3. Αυτοί οι παράγοντες αλληλοεπιδρούν ταυτοχρόνως και με την 5' καλύπτρα, φέρνοντας κοντά τις δυο δομές που σχηματίζουν έναν κλειστό βρόχο, ώστε να γίνεται πιο εύκολη στρατολόγηση του ριβοσώματος [22,18,8].



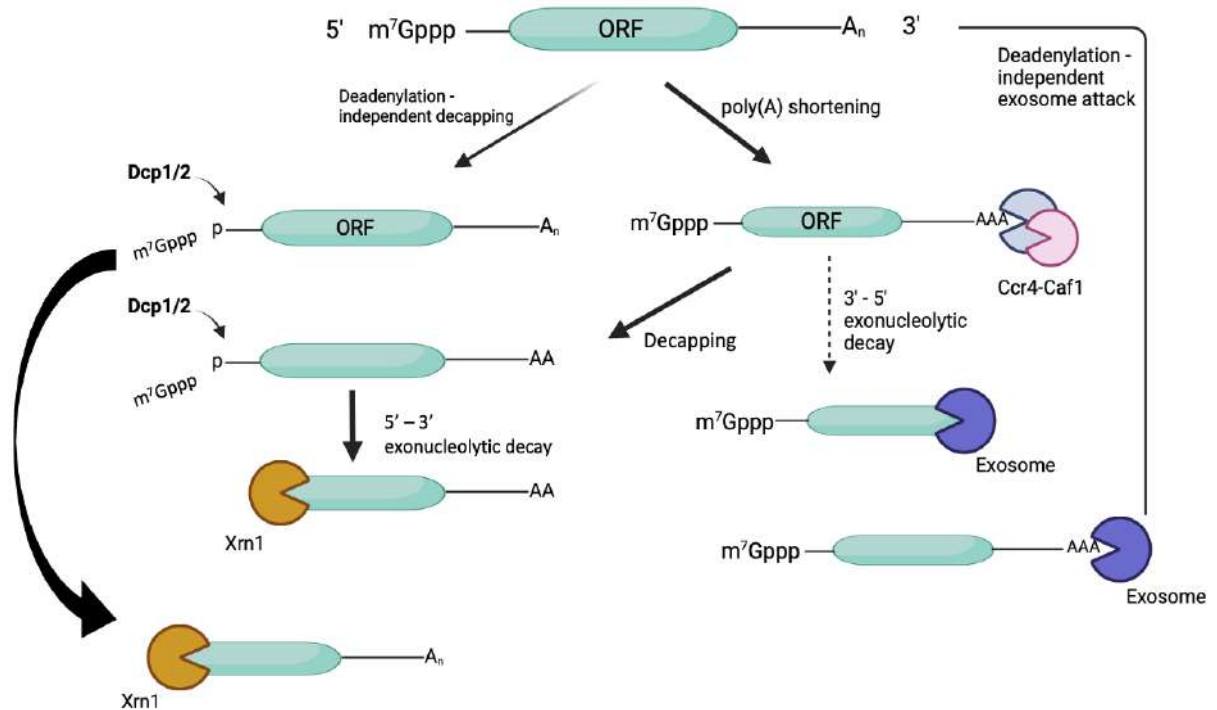
Εικόνα 3. Σύνδεση PABP με παράγοντες έναρξης μετάφρασης και δημιουργία του κλειστού βρόχου. (δημιουργήθηκε με το <https://www.biorender.com>)

1.2 Αποικοδόμηση μέσω απαδενυλίωσης των mRNA

Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης συμβαίνει σε πολλά και διαφορετικά επίπεδα με κύρια το στάδιο της έναρξης και το στάδιο της αποικοδόμησης. Η σταθερότητα του μορίου αποτελεί καθοριστικό σημείο ελέγχου. Η απαδενυλίωση αποτελεί τον κυριότερο τρόπο ρύθμισης της σταθερότητας των ευκαρυωτικών mRNA και για αυτόν τον λόγο η ρύθμισή της είναι εξαιρετικά σημαντική για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης.

Το μήκος της ουράς πολυ(A) εξαρτάται από το ίδιο το mRNA, τον κυτταρικό τύπο και τις συνθήκες που επικρατούν. Ο ρυθμός αποικοδόμησης εξαρτάται από την ικανότητα πρόσδεσης των απαδενυλασών και συμπαραγόντων τους καθώς και την θέση του mRNA [25]. Στο κυτταρόπλασμα η αποικοδόμηση των πολυ(A) ουρών γίνεται από δύο πρωτεϊνικά σύμπλοκα, το PAN2-PAN3 και το Ccr4-Not. Το πρώτο απομακρύνει το μεγαλύτερο μέρος της ουράς με αργό ρυθμό, ενώ το δεύτερο δρά με μεγαλύτερη ταχύτητα στα τελευταία νουκλεοτίδια προωθώντας και την αποσύνθεση όλου του mRNA [15]. Από το σημείο αυτό και μετά η αποικοδόμηση ενός μορίου mRNA μπορεί να ακολουθήσει δύο μονοπάτια, είτε με κατεύθυνση 5' → 3', είτε με κατεύθυνση 3' → 5'. Στο πρώτο μονοπάτι αρχικά θα γίνει αφαίρεση της κανονικής 5' καλύπτρας από το σύμπλοκο Dcp1-Dcp2, υδρολάσες της κατηγορίας NUDIX, με την βοήθεια ορισμένων πρωτεϊνικών συμπαραγόντων [2,4]. Μετά γίνεται αφαίρεση νουκλεοτιδίων με κατεύθυνση 5' → 3' από την εξωριβονουκλεάση Xrn1. Όλη αυτή η διαδικασία αφαίρεσης της 5' καλύπτρας ονομάζεται decapping και είναι τις περισσότερες φορές μη αναστρέψιμο [4]. Στο δεύτερο μονοπάτι, μετά την απομάκρυνση της ουράς πολυ(A), η αποικοδόμηση θα πραγματοποιηθεί με

κατεύθυνση 3' → 5' από το κυτταροπλασματικό σύμπλοκο του εξωσώματος (εικόνα 4) [2,5].



Εικόνα 4. Μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA. (δημιουργήθηκε με το <https://www.biorender.com>)

1.3 Απαδενυλάσες και απαδενυλίωση

Η διαδικασία της απαδενυλίωσης καταλύεται από συγκεκριμένα ένζυμα, τις απαδενυλάσες. Τα ένζυμα αυτά είναι εξωνουκλεάσες που αποικοδομούν την ουρά πολυ(A) με κατεύθυνση 3' → 5'. Η δραστηριότητά τους έχει βρεθεί ότι εξαρτάται από ιόντα μαγνησίου (Mg^{+2}), στο ενεργό κέντρο όμως μπορεί να συνδεθούν και άλλα μεταλλικά ιόντα όπως Mn^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} [16]. Το τελικό προϊόν της διάσπασης της ουράς πολυ(A) είναι το 5'-AMP [31,32].

Οι απαδενυλάσες χωρίζονται σε δύο μεγάλες υπερικογένειες : την DEDD και την EEP. Η κατάταξη αυτή γίνεται με βάση την συντηρημένη αλληλουχία του ενεργού κέντρου. Τα μέλη της υπερικογένειας EEP για

την κατάλυση χρησιμοποιούν ένα συντηρημένο γλουταμινικό οξύ (E) και μια ιστιδίνη (H). Σε αυτή την οικογένεια ανήκουν οι Ccr4, Nocturnin, ANGEL και 2' PDE. Από την άλλη η υπερικογένεια DEDD πήρε το όνομά της από τα συντηρημένα όξινα κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος (D) και γλουταμινικού οξέος (E). Εδώ ανήκουν οι POP2, PARN, CAF1Z και PAN2 [23,12]. Οι απαδενυλάσες αυτής της οικογένειας διακρίνονται στις DEDDh και DEDDy, ανάλογα με το αν το πέμπτο συντηρημένο καταλυτικό αμινοξύ είναι His (H) ή Tyr (T). Αξίζει να αναφέρουμε ότι το πέμπτο αυτό αμινοξύ δεν βρίσκεται στο καταλυτικό κέντρο και δεν αντιδρά απευθείας με το υπόστρωμα [33]. Το κύριο και προτιμότερο υπόστρωμα είναι οι ουρές πολυ(A), όμως υπάρχουν περιπτώσεις που μπορούν να αποικοδομούν μη αδενοσινικά ριβοπολυμερή *in vitro* με μειωμένη αποτελεσματικότητα [23].

Να σημειωθεί ότι συγκεκριμένες απαδενυλάσες στοχεύουν μοναδικές ομάδες mRNAs, ενώ ταυτόχρονα πολλαπλός αριθμός απαδενυλασών επηρεάζουν τα ίδια mRNA με αλληλεπικαλυπτόμενες λειτουργίες [12]. Επίσης αυτά τα ένζυμα είναι ιδιαίτερα συντηρημένα ανάμεσα στους οργανισμούς, όπου όμως μπορεί να παρατηρείται έλλειψη λειτουργίας και να διαφοροποιείται το όνομα [27].

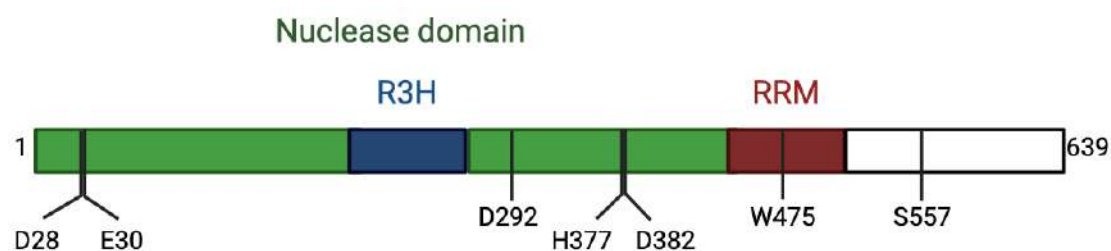
1.4 Πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN)

Από τις διάφορες απαδενυλάσες που έχουν βρεθεί, εμείς σε αυτή την εργασία ασχολούμαστε με την πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση PARN που συμμετέχει στην αποτελεσματική απομάκρυνση της ουράς πολυ(A) των mRNA με κατεύθυνση 3' → 5' [21,30]. Η PARN λοιπόν είναι ιδιαίτερα συντηρημένη ανάμεσα στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, αφού έχουν βρεθεί ομόλογά της σε μύκητες, νηματώδη, φυτά και θηλαστικά μέσα στα οποία ανήκει και ο άνθρωπος. Από την άλλη σε οργανισμούς μοντέλα όπως η *Drosophila melanogaster* και ο μύκητας *S. cerevisiae* δεν υπάρχει η PARN [31]. Ακόμη και στο *Arabidopsis thaliana* η αλληλουχία της PARN που έχει βρεθεί έχει ομοιότητες με την ορθόλογη της στα σπονδυλωτά μόνο κατά 20% κυρίως στην περιοχή της νουκλεάσης, δείχνοντας ότι μπορεί να μην είναι πραγματικά ομόλογες [19]. Αυτά τα

στοιχεία υποδηλώνουν ότι η δράση του ενζύμου ίσως αντικαθίσταται από τις δράσεις άλλων που υπάρχουν σε αυτούς τους οργανισμούς.

Στον άνθρωπο έχουν παρατηρηθεί δυο ισομορφές της PARN. Η μία με μοριακό βάρος 74kD και 639 αμινοξέα συνολικά. Η άλλη, με βάρος 54kD και θεωρείται ότι προέρχεται από την πρωτεόλυση της μορφής των 74kD, διατηρώντας την ενζυμική της δραστηριότητα. Δεν έχει προσδιοριστεί η λειτουργία του θραύσματος 20kD που απομένει από την πρωτεολυτική διάσπαση. Η πλήρους μήκους ισομορφή εντοπίζεται στον πυρήνα, ενώ η υδρολυμένη είναι στο κυτταρόπλασμα [31].

Η PARN είναι μοναδική ανάμεσα στις απαδενυλάσες γιατί εκτός από την άμεση πρόσδεσή της με την ουρά πολυ(A), αλληλοεπιδρά και με την 5' καλύπτρα [21]. Η αλληλουχία του ενζύμου περιέχει τρεις βασικές δομές : i) την περιοχή νουκλεάσης, ii) την περιοχή RRM και iii) την περιοχή R3H [31,30]. Η περιοχή της νουκλεάσης περικλείεται από τις άλλες δύο και περιέχει τα αμινοξέα Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382 του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου [21,31]. Η R3H είναι σημαντική για την σύνδεση του ενζύμου με το υπόστρωμα, αυξάνοντας την συγγένεια και την εξειδίκευση στην δέσμευση της ουράς πολυ(A) [31,30]. Το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτής της περιοχής είναι η ύπαρξη ενός αμετάβλητου καταλοίπου αργινίνης και ενός εξαιρετικά συντηρημένου καταλοίπου ιστιδίνης, που απέχουν μεταξύ τους κατά τρία κατάλοιπα [31]. Η περιοχή RRM αλληλοεπιδρά ταυτόχρονα με την ουρά πολυ(A) και με την 5' καλύπτρα. Οι θέσεις πρόσδεσης αυτών των δομών έχει αποδειχθεί ότι δομικά και λειτουργικά είναι ξεχωριστές. Έχει βρεθεί ένα κατάλοιπο τρυπτοφάνης εντός του RRM, στον άνθρωπο στην θέση 475, που έχει αναφερθεί ως απαραίτητο για την σύνδεση της καλύπτρας [21,31]. Πιο συγκεκριμένα, η 5' καλύπτρα συνδέεται με την αρωματική ομάδα του αμινοξέος, που βρέθηκε μέσω πειραμάτων φασματοσκοπίας NMR και κρυσταλλικών δομών [31]. Επιπλέον αυτή η περιοχή είναι κινητή καθώς μπορεί να μετακινηθεί από την θέση της κατά 30° σε σχέση με την περιοχή της νουκλεάσης και σταθεροποιεί την συνολική δομή της PARN [30]. Οι παραπάνω περιοχές απεικονίζονται στην εικόνα 5.

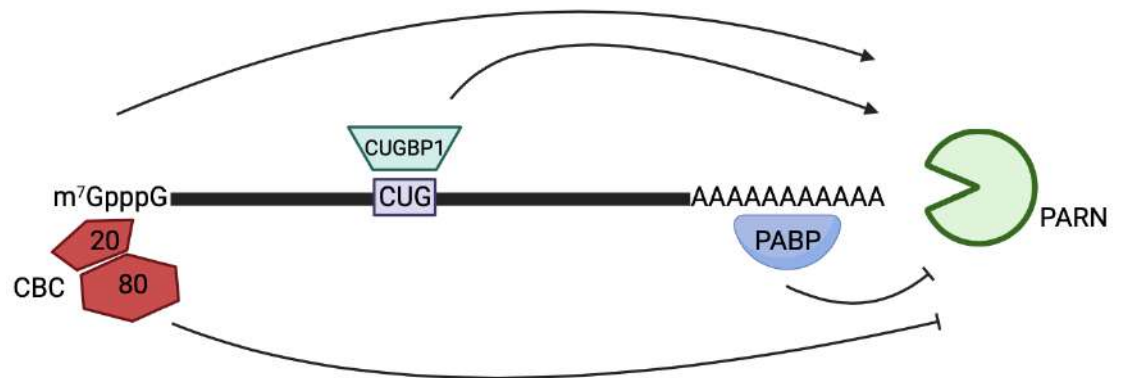


Εικόνα 5. Αναπαράσταση ανθρώπινου PARN πλήρους μήκους, 74kD με τις τρεις ρυθμιστικές περιοχές της και τα αμινοξικά κατάλοιπα του ενεργού κέντρου (D28, E30, D292, D382, H377).

Η PARN ανήκει στην υπεροικογένεια εξωνουκλεασών 3'-5' DEDD και συγκεκριμένα στην κατηγορία των DEDDh, εφόσον η ιστιδίνη που υπάρχει στην θέση 377 (His377) αποδείχτηκε να έχει συμμετοχή στην καταλυτική δράση του ενζύμου [19,30]. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι δρά ως ομοδιμερές [21]. Από βιοχημικές μελέτες ανακαλύφθηκε ότι η δραστηριότητα της PARN εξαρτάται από δισθενή ιόντα Mg, τα οποία και συνδέονται στο ενεργό κέντρο συνεισφέροντας στην κατάλυση [7,31]. Τα ιόντα Mg^{+2} διαπιστώθηκε ότι βοηθούν στην σταθερότητα του ενζύμου και ταυτόχρονα το προστατεύουν από την θερμική αδρανοποίηση, αυξάνοντας το μέσο σημείο αδρανοποίησης και μειώνοντας τον ρυθμό της [16].

Η PARN, όπως συμβαίνει με κάθε σχεδόν ένζυμο, ρυθμίζεται μέσω παραγόντων trans ή/και cis που έχουν την ικανότητα να την ενεργοποιούν ή να την καταστέλλουν. Η ρύθμιση στην λειτουργία της μπορεί να συμβεί με κάποιους από τους παρακάτω τρόπους : α) η σύνδεσή της στην ουρά πολυ(A) ενεργοποιεί την PARN, όπως και η σύνδεση της 5' καλύπτρας η οποία επιπλέον διεγείρει τον ρυθμό δράσης του ενζύμου ευνοώντας την επεξεργασιμότητα (processivity) της, [31], β) μέσω των υποομάδων του πυρηνικού συμπλόκου σύνδεσης της 5' καλύπτρας (CBC), το οποίο επηρεάζει την ωρίμανση του mRNA, τον σχηματισμό του 3' άκρου, την πυρηνική μεταφορά και την αποικοδόμηση της ουράς πολυ(A) καθώς αναστέλλει την δράση της PARN [7,21], γ) άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες σύνδεσης της 5' καλύπτρας και ο παράγοντας έναρξης της 4E (eIF4E) που αντικαθιστούν τις CBC στο κυτταρόπλασμα και αναστέλλουν

την PARN [21], δ) αναστολή του ενζύμου μέσω της σύνδεσης στην ουρά πολυ(A) των πρωτεϊνών της μεγάλης οικογένειας PABP τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα, ε) μέσω στοιχείων στην 3' αμετάφραστη περιοχή διότι οι πρωτεΐνες που συνδέονται με αυτά οδηγούν στην στρατολόγηση και κατ' επέκταση στην ενεργοποίηση της PARN [30]. Στην εικόνα 5 φαίνονται κάποιοι από τους παραπάνω μηχανισμούς.



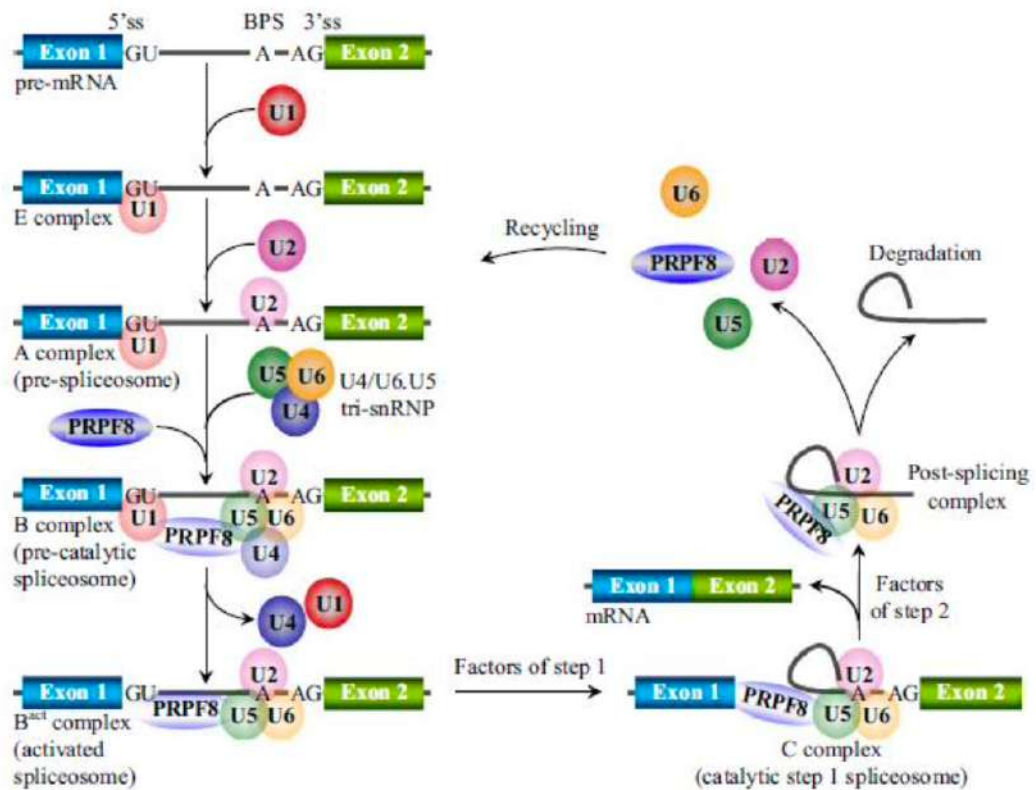
Εικόνα 6. Μηχανισμοί ρύθμισης της λειτουργίας της PARN. (δημιουργήθηκε με το <https://www.biorender.com>)

Σε πρόσφατες έρευνες βρέθηκε ότι η PARN συμμετέχει στην ρύθμιση της έκφρασης και της σταθερότητας διάφορων non-coding RNA όπως το ανθρώπινο RNA της τελομεράσης (hTR), scaRNAs, piRNA, YRNA, rRNA, snoRNA και snRNA [26,8]. Ακόμη ρυθμίζει και την έκφραση διάφορων miRNA καθώς τα προστατεύει από την αποικοδόμηση αφαιρώντας τις αδενοσίνες από το άκρο 3' τους που έχει προσθέσει η πολυ(A) πολυμεράση PAPD5 [26,19]. Γενικά, η PARN ρυθμίζει την σταθερότητα πολλών mRNA που σχετίζονται με την καρκινογένεση, όπως της p53, ενώ τα επίπεδα ποικίλουν ανάλογα με τον κυτταρικό υπότυπο, γεγονός που υποστηρίζει την εν δυνάμει μελλοντική χρήση της ως βιοδείκτη με διαγνωστική και προγνωστική αξία [12]. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι η PARN παρουσιάζει και χαρακτηριστικά ογκοκατασταλτικού γονιδίου, συμμετέχοντας στην ρύθμιση της έκφρασης ογκογονιδίων [17,19].

1.5 Το εναλλακτικό μάτισμα

Γενικές πληροφορίες

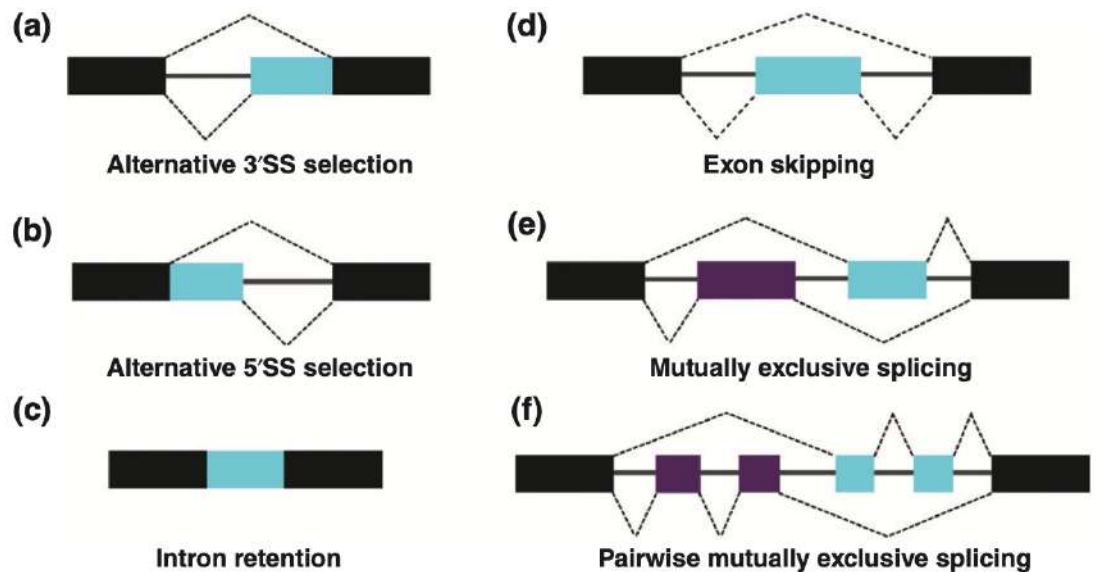
Τα περισσότερα γονίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων και κυρίως αυτών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες είναι ασυνεχή. Με τον όρο ασυνεχή γίνεται αναφορά στο ότι οι κωδικοποιούσες περιοχές, που ονομάζονται εξόνια, διακόπτονται από μη κωδικοποιούσες περιοχές, τα ιντρόνια. Μετά το στάδιο της μεταγραφής και πριν από αυτό της μετάφρασης, υπάρχει η διαδικασία της ωρίμανσης. Κατά την ωρίμανση απομακρύνονται τα ιντρόνια από το πρώιμο mRNA (pre-mRNA), τα εξόνια συρράπτονται μεταξύ τους και δίνουν τελικά το ώριμο mRNA που χρησιμοποιείται στην πρωτεϊνσύνθεση [11]. Οι περισσότεροι τύποι ματίσματος πραγματοποιούνται εντός του ματισματοσώματος (spliceosome), που είναι ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο αποτελούμενο από ριβονουκλεοπρωτεΐνες (RNPs) που περιέχουν τα μικρά πυρηνικά RNAs (snRNA) U1, U2, U4, U5/U6. Ο αριθμός πρωτεϊνών που το αποτελούν φτάνει τις 150 περίπου συνολικά [11,28,13]. Ο μηχανισμός ματίσματος αναγνωρίζει τα ιντρόνια-εξόνια μέσω σημάτων. Τα κύρια σήματα που οριοθετούν τα σωστά όρια μεταξύ των εξονίων και των ιντρονίων είναι τέσσερα. Αυτά είναι : 1) περιοχή ωρίμανσης 5' (5ss) και 2) περιοχή ωρίμανσης 3' (3ss) οι οποίες βρίσκονται ανοδικά και καθοδικά των διασταυρώσεων εξονίου-ιντρονίου αντιστοίχα, 3) η περιοχή διακλάδωσης (BS) και 4) η περιοχή πολυπυριμιδίνης που βρίσκεται ανοδικά της 3ss [11]. Το πρώτο βήμα γίνεται από το U1 που αναγνωρίζει την θέση GU στο 5' άκρο του ιντρονίου και ύστερα το σύμπλοκο U2 αναγνωρίζει μια πλούσια σε αδενίνες περιοχή στο 3' άκρο του ιντρονίου. Η ωρίμανση προχωρά καθώς τα υπόλοιπα σύμπλοκα στρατολογούνται στο pre-mRNA, γίνεται υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών, απομακρύνεται το ιντρόνιο και τέλος συρράπτονται τα εξόνια μεταξύ τους (εικόνα 7) [24,28].



Εικόνα 7. Διαδικασία ματίσματος από το spliceosome [24]

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα περίπου το 95% των γονιδίων υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα (alternative splicing, AS). Με άλλα λόγια από κάθε ένα από τα γονίδια αυτά μπορούν να παραχθούν πάνω από ένα μετάγραφο, που ονομάζονται εναλλακτικά μετάργραφα. Το εναλλακτικό μάτισμα πιστεύεται ότι αποτελεί σημαντική πηγή της φαινοτυπικής ποικιλότητας στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς [11].

Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες εναλλακτικού ματίσματος : α) παράλειψη εξονίου (exon skipping), β) διατήρηση ιντρονίου (intron retention), γ) χρήση εναλλακτικών 5' και 3' θέσεων ματίσματος (selection of alternative splice sites), δ) αμοιβαίως ασύμβατα εξόνια (mutually exclusive splicing/exons) [11,9]. Στην εικόνα 8 παρουσιάζονται αυτές οι κατηγορίες.



Εικόνα 8. Μηχανισμοί εναλλακτικού ματίσματος.(9)

Ρόλος εναλλακτικού ματίσματος

Μέσω του εναλλακτικού ματίσματος, λοιπόν, ένα πρόδρομο mRNA μπορεί να δώσει πολλά και διαφορετικά ώριμα mRNAs, από τα οποία στην συνέχεια θα παραχθούν λειτουργικά διαφορετικές πρωτεΐνες [11]. Με αυτόν τον τρόπο το εναλλακτικό μάτισμα εμπλέκεται στην γονιδιακή έκφραση και συνεπώς στην ποικιλομορφία όπως αναφέραμε και παραπάνω, ενώ πιθανολογείται η συσχέτισή του με την πολυπλοκότητα του οργανισμού [13].

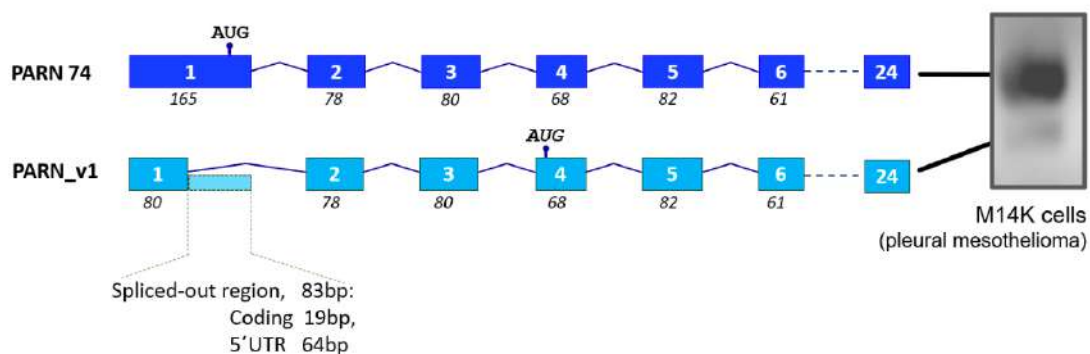
Γενικά το μάτισμα έχει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική διαίρεση, κυτταρικό θάνατο, διαφοροποίηση των ιστών στο έμβρυο και σε ενήλικους οργανισμούς ακόμα και στην κυτταρική απόκριση σε πληθώρα περιβαλλοντικών παραγόντων [24].

Εναλλακτικό μάτισμα στις ασθένειες

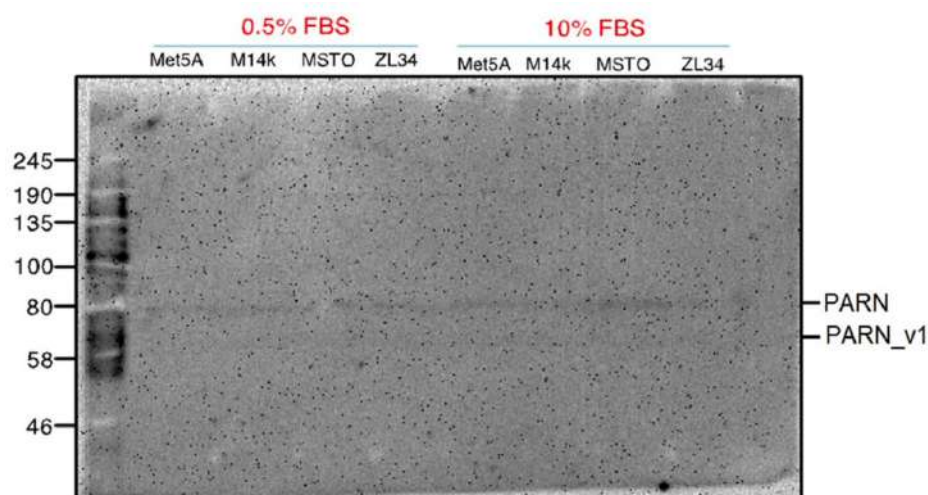
Όπως γίνεται αντιληπτό, η απορρύθμιση του ματίσματος οδηγεί στην εμφάνιση διάφορων ασθενειών. Αυτό μπορεί να προκληθεί από μεταλλάξεις στις θέσεις ματίσματος και σε ρυθμιστικές αλληλουχίες των εξονίων – ιντρονίων των γονιδίων, παράγοντας εναλλακτικά μετάγραφα με μη φυσιολογική λειτουργία ή δομή [11].

1.6 Το εναλλακτικό μετάγραφο της PARN (PARN_v1)

Από προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο [34,35] βρέθηκε ένα εναλλακτικό μετάγραφο της PARN, το οποίο και κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα. Το καινούργιο αυτό μετάγραφο προέρχεται μέσω εναλλακτικού ματίσματος, από το ίδιο γονίδιο που παράγει και την ισομορφή της πλήρους μεγέθους PARN και χαρακτηρίζεται ως PARN_v1. Από το μετάγραφο αυτό λείπουν 83 ζεύγη βάσεων από το εξόνιο 1 του πλήρους μεταγράφου, 64 από τα οποία αντιστοιχούν στην 5' αμετάφραστη περιοχή και τα υπόλοιπα 19 συμμετέχουν στην σύνθεση της πρωτεΐνης, περιλαμβάνοντας και το εναρκτήριο κωδικόνιο. Το επόμενο κωδικόνιο έναρξης εντοπίζεται στο εξόνιο 4 (εικόνα 9). Έτσι λοιπόν η PARN_v1 έχει συνολικό μήκος 578 αμινοξέων, από τα οποία όμως λείπουν τα καταλυτικά αμινοξέα Asp28 και Glu30 της PARN. Το συνολικό μοριακό της βάρος υπολογίζεται στα 67 kD και έχει ανοσοανιχνευθεί σε καρκινικές σειρές του πλευριτικού μεσοθηλιώματος (Εικόνα 10) [34,35].

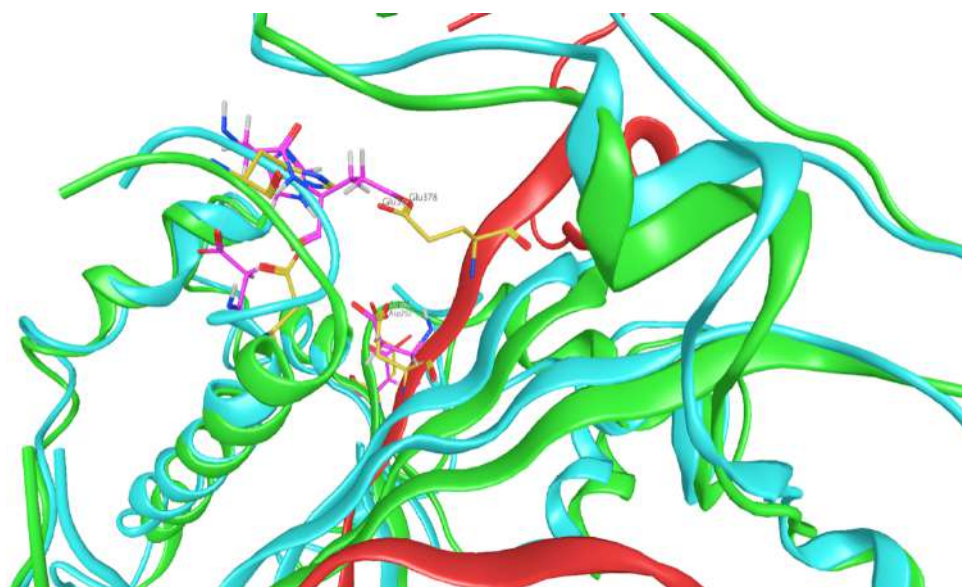


Εικόνα 9. Απεικόνιση των μεταγράφων PARN (μπλε) και PARN_v1 (γαλάζιο). Δεξιά απεικονίζεται η έκφραση στη καρκινική σειρά πλευριτικού μεσοθηλιώματος M14K [34,35].



Εικόνα 10α. Ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών PARN και PARN_V1 με Western blot σε καρκινικές σειρές πλευριτικού μεσοθηλιώματος [34,35].

Προκαταρκτικά πειράματα συγκριτικής μοντελοποίησης έδειξαν ότι ο C τελικός τομέας της PARN_v1 αναδιπλώνεται έτσι ώστε να υποκαθιστά τη δομή του N-τελικού που λείπει από την πρωτεΐνη [35]. Φαίνεται πως το D28 υποκαθίσταται από το D292 και το E30 από το E378, όπου η αρίθμηση των αμινοξέων αναφέρεται στην πλήρους μήκους PARN 74kD (Εικόνα 10β). Δηλαδή, θα μπορούσε η C-τελική περιοχή της PARN_v1 να αναδιπλώνεται και να δημιουργεί μια νέα δομή ενεργού κέντρου στην PARN_v1.



Εικόνα 10β. Συγκριτική μοντελοποίηση του ενεργού κέντρου της PARN_v1 σε σχέση με της PARN. Πράσινο απεικονίζεται η PARN, με κυανό η PARN_v1 και με

κόκκινο έχει σημειωθεί N-τελικός επίτοπος νουκλεάσης της PARN μήκους 61 αμινοξέων που λείπει από την PARN_v1.

2. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η υπερέκφραση και η απομόνωση του εναλλακτικού μεταγράφου της πολυ(A)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN_v1) και ενός μεταλλάγματος αυτού, όπου το E378 έχει μεταλλαθεί σε αλανίνη (PARN_v1 E378A), καθώς και η διερεύνηση της δραστηριότητας τόσο του μεταλλάγματος όσο και του εναλλακτικού μεταγράφου.

3. Μέθοδοι και Υλικά

3.1 Υπερέκφραση PARN_v1 και του μεταλλάγματος της PARN_v1 E378A

Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων E.coli BL21-Gold (D3)

Για την υπερέκφραση του ενζύμου μας PARN_V1 και του μεταλλάγματος του χρησιμοποιήθηκαν αυτά τα βακτηριακά στελέχη του E.coli. Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε μέσω θερμικού σοκ (Heat shock) ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία :

- ◆ Σε 100 μl βακτηριακών κυττάρων γίνεται προσθήκη 1 μl πλασμιδίου (ήπια ανάδευση-finger flick)
- ◆ Επώαση στους 4°C για 30 λεπτά
- ◆ Heat block για 45 δευτερόλεπτα στους 42°C
- ◆ Επώαση για 2 λεπτά στον πάγο (4°C)
- ◆ Προσθήκη 900 μl από αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB Broth
- ◆ Επώαση για 1 ώρα, στους 37°C υπο ανάδευση 210 rpm (φάση outgrowth)

Στην συνέχεια γίνεται φυγοκέντριση για 3 λεπτά, στα 1000 g και επιστρέφουμε σε τρυβλία petri 200 μl από το ίζημα. Στα τρυβλία έχει τοποθετηθεί θρεπτικό μέσο LB Agar με καναμυκίνη συγκέντρωσης 40 μg/ml. Έπειτα επωάζονται τα τρυβλία στους 37°C χωρίς ανάδευση για 18 ώρες. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες γίνονται υπό φλόγα για να

εξασφαλιστούν ασηπτικές συνθήκες και να αποφευχθούν επιμολύνσεις. Τα υλικά που χρησιμοποιούμε έχουν πρώτα αποστειρωθεί.

Καλλιέργειες βακτηρίων

Από αυτά τα τρυβλία συλλέγεται μια αποικία με την βοήθεια ενός tip και τοποθετείται σε falcon, όπου περιέχεται 50 ml θρεπτικού LB broth μαζί με καναμυκίνη συγκέντρωσης 40 mg/ml. Αφήνονται για επώαση 16 ώρες (O/N) στους 37°C, υπο ανάδευση 210 rpm. Ύστερα χρησιμοποιούμε τέσσερις φλάσκες όγκου 2 λίτρων, στην καθεμία από τις οποίες προσθέτουμε 750 ml θρεπτικού LB Broth και καναμυκίνη συγκέντρωσης 40 µg/ml. Από κάθε falcon παραλαμβάνονται 8 ml καλλιέργειας και προστίθενται σε κάθε μια από τις φλάσκες. Ύστερα ακολουθείται επώαση στους 37°C, 210 rpm. Πριν από την προσθήκη φυλάσσουμε 1 ml από το θρεπτικό μας, ώστε να το χρησιμοποιήσουμε ως μάρτυρα για τις μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας (OD). Η μέτρηση του OD γίνεται με φωτόμετρο στα 600 nm, ώστε να βρεθεί το OD = 0,5-0,8 όπου θεωρείται ότι η καλλιέργεια είναι στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Η επαγωγή ξεκινά σε OD= 0,6 προσθέτοντας επαγωγέα (IPTG), σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Οι φλάσκες μετά την επαγωγή, αφήνονται overnight για 18 ώρες στους 18°C, υπο συνεχή ανάδευση 210 rpm. Οι παραπάνω διαδικασίες έγιναν υπο ασηπτικές συνθήκες.

Υλικά

- E. coli BL21-Gold (DE3) (Agilent Technologies)
- Πλασμίδιο (Biocat)
- LB Agar (Sigma)
- LB Broth (Applichem)
- Καναμυκίνη (Panreac)
- Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Serva)
- K₂HPO₄ (Merck)
- KH₂PO₄ (Merck)
- Tryptone (Fluka)
- Yeast extract (Applichem)
- Glycerol (Applichem)

3.2 Απομόνωση PARN_v1 και μεταλλάγματος PARN E378A

Λύση κυττάρων

Μετα την επώαση τοποθετούμε τις φλάσκες στον πάγο στους 4°C, με σκοπό να ανασταλεί η ανάπτυξη των βακτηρίων. Στην συνέχεια το περιεχόμενό τους φυγοκεντρείται σε δοχεία συλλογής για 20 λεπτά στα 6.000 rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και κρατάμε το ίζημα που περιέχει τα βακτηριακά κύτταρα. Το κυτταρικό αυτό ίζημα που συλλέχθηκε περνά από την εξής διαδικασία :

- ✓ Προσθήκη 40 ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (Lysis Byffer) για το σπάσιμο των τοιχωμάτων των κυττάρων.
- ✓ Μηχανική λύση των κυττάρων με υπερήχους (σε 1 κύκλο – 70% amplitude για 9 φορές). Προκειμένου να μην υπάρξει αύξηση της θερμοκρασίας του διαλύματος, υπάρχουν ενδιάμεσες παύσεις των 10 δευτερολέπτων όπου το διάλυμα διατηρείται σε πάγο. Κρατήθηκε 30 μl δείγμα από το διάλυμα (ονομάστηκε total) για να συγκριθεί στα επόμενα στάδια της απομόνωσης.
- ✓ Φυγοκέντρηση των λυμένων κυττάρων για 30 λεπτά, στους 4°C και 16.000 rpm.
- ✓ Διατηρούμε το υπερκείμενο που περιέχει τις πρωτεΐνες και απορρίπτουμε το ίζημα (ονομάστηκε input).

Απομόνωση με Talon metal affinity resin (gravity-flow purification of his-tagged proteins)

Χρησιμοποιήθηκε στήλη ρητίνης Talon metal affinity, προκειμένου η PARN_v1 και το μέταλλο της να δεσμευτούν στην ρητίνη, μέσω της ετικέτας ιστιδίνων που υπάρχει στην αμινοτελική περιοχή τους. Η ετικέτα αυτή αλληλεπιδρά με το κοβάλτιο που υπάρχει στην συγκεκριμένη ρητίνη. Το είδος αυτό της χρωματογραφίας ανήκει στην χρωματογραφία συγγένειας μετάλλων (IMAC) και δεσμεύει αυτές τις πρωτεΐνες με his-tag με μεγαλύτερη εξειδίκευση σε σχέση με τις ρητίνες που περιέχουν νικέλιο. Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα εξισορρόπησης-έκπλυσης

και έκλουσης που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο. Η διαδικασία που θα παρατεθεί παρακάτω πραγματοποιήθηκε δύο φορές, μια για την PARN_v1 και μια για το μετάλλαγμά της.

Το bed volume επιλέξαμε να είναι στα 2ml. Αρχικά ανακινούμε έντονα και τοποθετούμε 1ml από το resin σε ένα falcon. Το αφήνουμε για 10 λεπτά ώστε να διαχωριστεί η στήλη από το ήδη υπάρχων διάλυμα και με μια πιπέτα και πολύ προσοχή απορρίπτουμε το υπερκείμενο που έχει σχηματιστεί. Στην συνέχεια προσθέτουμε 20ml ($10 \times \text{bed volume}$) από το διάλυμα εξισορρόπησης, το ανακινούμε, το αφήνουμε για 10 λεπτά και στο τέλος απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 2 φορές για να έχουμε καλύτερο αποτέλεσμα. Ύστερα προσθέτουμε το υπερκείμενο που διατηρήσαμε από την φυγοκέντρωση που ακολούθησε την λύση των κυττάρων (input) που έχει όγκο περίπου 40 ml. Το τοποθετούμε στον πάγο για 2-3 λεπτά και μετά το κουνάμε για 10 λεπτά. Το βήμα αυτό γίνεται τρεις φορές ώστε να προσδεθεί όσο το δυνατόν καλύτερα η πρωτεΐνη μας. Μετα το αφήνουμε να καθίσει για 15 λεπτά εκτός πάγου και απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Από το υπερκείμενο αυτό όμως κρατάμε 50 μl που ονομάζεται flow through. Βάζουμε 40 ml από το διάλυμα εξισορρόπησης, το κουνάμε για 10 λεπτά αφού πρώτα το έχουμε στον πάγο για 3 λεπτά, το αφήνουμε άλλα 15 λεπτά εκτός πάγου και απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Το βήμα αυτό εκτελείται 2 φορές. Έπειτα προσθέτουμε 2ml από το διάλυμα εξισορρόπησης, κάνω vortex, μεταφέρω το διάλυμα που δημιουργείται στην στήλη και ανοίγω το καπάκι της ώστε να αρχίσει να τρέχει το διάλυμα εξισορρόπησης. Προσέχω πάντα να μην ξεραθεί η στήλη μου εσωτερικά. Προσθέτω 10 ml από το διάλυμα εκπλυσης και το αφήνω να τρέξει. Από αυτό αποθηκεύουμε 50 μl που ονομάζεται wash. Τελος προσθέτουμε 10 ml από το διάλυμα έκλουσης και το αφήνουμε να τρέξει μαζεύοντας τα κλάσματα (elution) σε eppendorfs ανα 1 ml.

Αποθήκευση στήλης

Βάζω στην στήλη 20ml διαλύματος MES και NaCl συγκέντρωσης 0,3M και το αφήνω να τρέξει. Στην συνέχεια 10ml απιονισμένο νερό κα τέλος 5 μl από ένα διάλυμα 20% αιθανόλης που περιέχει 0,1% Sodium Azide. Κλείνω με πάραφιλμ και αποθηκεύω στους 4°C.

Υλικά

- Διάλυμα Λύσης (100ml) : 4.000 μ l HEPES (pH 7,9), 20 mL KCL, 10 ml glycerol 10%, 100 μ l triton X-100, 14 μ l β -μερκαπτοαιθανόλη, 500 μ l PMSF (από στοκ των 200mM), 65 ml νερό, ίχνη λυσοζύμης
- Διάλυμα εξισορρόπησης (600ml): 24ml HEPES (pH 7,9, C= 0,5M), 120ml KCl (C= 2,5M) , 60ml glycerol (100%)
- Διάλυμα έκλουσης (200ml): 8ml HEPES (pH 7,9, C=0,5M), 40ml KCl (C= 2,5M), 20ml glycerol (100%), 0,2M imidazole
- HEPES (Serva)
- KCl (Merck)
- Glycerol (Applichem)
- β -μερκαπτοαιθανόλη (Riedel de Haen)
- Triton X-100 (Merck)
- PMSF (Phenylmethanesulfonylfluoride) (Applichem)
- Λυσοζύμη (Serva)
- Imidazole (Sigma)
- MES (Sigma)
- NaCl (sigma)
- Ethanol (sigma)
- Sodium Azide (sigma)

3.3 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Με σκοπό να εξακριβωθεί η καθαρότητα των πρωτεϊνών, ύστερα από την απομόνωσή τους πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρησή τους υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Το SDS είναι ένας παράγοντας που διασπά την δευτεροταγή και τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών, όπου δεν υπάρχουν ούτε δισουλφιδικοί δεσμοί καθώς τους διασπά η β -μερκαπτοαιθανόλη. Επίσης το SDS προσδίδει αρνητικό φορτίο σε όλες τις πρωτεΐνες, κάνοντας τες να κινούνται προς την ίδια κατεύθυνση ανεξαρτήτως του πραγματικού τους φορτίου. Η πηκτή αποτελείται από δύο φάσεις διαφορετικής πυκνότητας. Η πρώτη φάση είναι η πηκτή

επιστοίβαξης με πυκνότητα 5% και ο ρόλος της είναι να στοιβάξει όλες τις πρωτεΐνες στην ίδια κοινή ζώνη και στην συνέχεια να κινηθούν ταυτόχρονα στην δεύτερη φάση της πηκτής, αυτή του διαχωρισμού με πυκνότητα 10%. Στην φάση διαχωρισμού οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται υπο την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, ανάλογα το μοριακό τους βάρος.

Η κατασκευή της πηκτής πολυακρυλαμιδίου παραθέτετε στους πίνακες 1 και 2.

Πίνακας 1. Πηκτή επιστίβαξης (5%)

Συστατικά	Ποσότητα (μl)
dH ₂ O	1400
30% acryl-bisacrylamide mix	330
Tris-HCL (1M, pH 6,8)	250
10% SDS	20
10% APS	20
TEMED	2

Πίνακας 2. Πηκτή διαχωρισμού (10%)

Συστατικά	Ποσότητα (μl)
dH ₂ O	1900
30% acryl-bisacrylamide mix	1700
Tris-HCL (1M, pH 6,8)	1300
10% SDS	50
10% APS	50
TEMED	2

Η τελική μορφή που παίρνει η πηκτή οφείλεται στην αντίδραση πολυμερισμού μεταξύ ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου σε θερμοκρασία δωματίου και παρουσία των παραγόντων υπερθεϊκό αμμώνιο (APS) και TEMED. Το TEMED είναι καταλύτης για την αντίδραση πολυμερισμού μεταξύ των ελεύθερων ριζών του θείου που δημιουργούνται από το APS και την επιταχύνει. Να σημειωθεί ότι και οι παράγοντες TEMED και APS προστίθενται στο τέλος ώστε να πραγματοποιηθεί η πήξη της κάθε φάσης.

Στα δείγματα που είναι για ηλεκτροφόρηση προστίθεται loading buffer 4×, ώστε η τελική τους αραίωση να είναι 1x. Στην συνέχεια τα δείγματα θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 95°C, με σκοπό την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Η πηκτή τοποθετείται σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1× (running buffer 1×). Το διάλυμα αυτό πρέπει να καλύπτει την πηκτή παντού σε μήκος και πλάτος. Μετά φορτώνονται τα δείγματα (15 μl από το καθένα) στα πηγαδάκια που έχουν σχηματιστεί στην πηκτή, παράλληλα με έναν μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών. Η συσκευή της ηλεκτροφόρησης συνδέεται με τροφοδοτικό που διοχετεύει ρεύμα τάσης 100V στο κλειστό σύστημα μεταξύ δεξαμενής και της συσκευής. Ο χρόνος ηλεκτροφόρησης καθορίστηκε από την παρακολούθηση της χρωστικής bromophenol blue, που υπάρχει στο ρυθμιστικό διάλυμα 4× που είχαμε προσθέσει στα δείγματα.

Χρώση των πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue

Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή πολυακρυλαμίδιου εμβαπτίζεται σε διάλυμα οξικού οξέος 10% και γίνεται βρασμός για περίπου 1 λεπτό μέχρι να παρατηρηθούν φυσαλίδες. Ύστερα το οξικό οξύ απορρίπτεται και η πηκτή εμβαπτίζεται στην χρωστική Coomassie Brilliant Blue, στην οποία πάλι ακολουθεί βρασμός μέχρι την παρατήρηση φυσαλίδων και ανάδευσή της για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια απορρίπτεται η χρωστική και η πηκτή ξεπλένεται με νερό. Τέλος επαναλαμβάνονται κύκλοι εμβάπτισης της πηκτής σε οξικό οξύ 10% και απόρριψης μέχρι να απομακρυνθεί η περισσευούμενη χρωστική.

Υλικά

- Tris (Applichem)
- Acrylamide (Serva)
- N'N' methylene- bis Acrylamide (Serva)
- SDS (sodium dodecyl sulfate) (Serva)
- TEMED (N,N,N'N'- tetramethylethylenediamin) (Invitrogen)
- 10% APS (ammonium persulfate) (Sigma)

- Ρυθμιστικό διάλυμα 4x: 500mM Tris-HCl pH 6.8, 40% γλυκερόλη, 8% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 0,04% Bromophenol blue
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 4x: 250mM Tris, 1,92M γλυκίνη
- Γλυκερόλη (Applichem)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel de Haen)
- Bromophenol blue (Research Organics)
- Γλυκίνη (Serva)
- Coomassie Brilliant Blue 0.05% (40% Methanol, 10% Acetic Acid, dH₂O, CoomassieBlue R-250 ~0.1%)
- Coomassie Blue R-250 (Fluka)
- Methanol (Applichem)
- Acetic acid (Merck)
- dH₂O

3.4 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)

SDS-PAGE

Αρχικά πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, όπως ακριβώς περιγράφηκε στην ενότητα 2.3. Φορτώθηκαν 15μl δείγματος πρωτεΐνης PARN_v1 και μl δείγματος για το μετάλλαγμα.

Ηλεκτρομεταφορά

Κατά την διαδικασία αυτή οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από την πηκτή σε μεμβράνη PVDF. Η μεταφορά αυτή βασίζεται στο γεγονός οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες (λόγω του SDS) θα μεταφερθούν από τον αρνητικό πόλο της συσκευής προς τον θετικό. Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή εμβαπτίζεται σε transfer buffer. Η μεμβράνη προτού εμβαπτιστεί και αυτή στο transfer buffer, εμβαπτίζεται για 30 δευτερόλεπτα σε μεθανόλη ώστε να ενεργοποιηθεί. Ακόμη, τα χαρτιά Whattman που χρησιμοποιούμε στην μεταφορά εμβαπτίζονται και αυτά σε transfer buffer. Η σειρά που τοποθετούνται τα υλικά στην συσκευή ηλεκτρομεταφοράς είναι αρχικά τρία χαρτιά Whattman, μετά η πηκτή, η μεμβράνη PVDF και τέλος άλλα τρία χαρτιά Whattman. Να σημειωθεί ότι η πηκτή είναι προς τον αρνητικό πόλο

και η μεμβράνη PVDF προς τον θετικό πόλο. Μετά από κάθε προσθήκη το σύστημα περιβρέχεται με transfer buffer και απομακρύνονται με προσοχή οι φυσαλίδες. Η ηλεκτρομρταφορά πραγματοποιήθηκε με ένταση ρεύματος στα 0,27 A για 50 λεπτά.

Ανοσοανίχνευση

Με την τεχνική αυτή μπορεί να ανιχνευτεί μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη πάνω στην μεμβράνη PVDF. Η αρχή στην οποία βασίζεται είναι η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης αυτής με ένα συγκεκριμένο αντίσωμα. Πιο συγκεκριμένα η υπό μελέτη πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με ένα πρώτο αντίσωμα και έπειτα αυτό ανιχνεύεται με την βοήθεια ενός δεύτερου αντισώματος, που αναγνωρίζει το πρώτο. Η μεμβράνη PVDF επωάζεται για 1 ώρα με 5% blocking buffer με σκοπό να καλυφθούν όλες οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης του πρώτου αντισώματος, αφού πρώτα έχουν γίνει τρεις διαδοχικές δεκαπεντάλεπτες πλύσεις με TBS-T. Έπειτα η μεμβράνη επωάζεται με rabbit monoclonal PARN (1:500) αντίσωμα για 36 ώρες στους 4°C, υπό ανάδευση. Στην συνέχεια ακολουθούν τρεις δεκάλεπτες πλύσεις με TBS-T και γίνεται επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα (anti-rabbit IgG-HRP, 1:25.000) για 1 ώρα. Ύστερα γίνονται άλλες 3 πεντάλεπτες πλύσεις με TBS-T και ακολουθεί ανίχνευση του σήματος. Όλες οι πλύσεις και η επώαση με το δεύτερο αντίσωμα γίνονται υπο ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η εμφάνιση γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο του συστήματος ανοσοανίχνευσης ECL Plus και με τη βοήθεια του Uvitec Alliance 4 Imaging System (Cambridge) του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Υλικά

- Transfer buffer (100ml): 1x Towbin, 20% μεθανόλη, dH₂O
- Towbin 10×: 25mM Tris, 192mM γλυκίνη, dH₂O
- TBS-T: 1x TBS, 0,1% Tween20
- 5% blocking buffer: 5% γάλα, TBS-T
- Tris (Applichem)
- Acrylamide (Serva)
- N'N' methylene- bis Acrylamide (Serva)

- SDS (sodium dodecyl sulfate) (Serva)
- TEMED (N,N,N',N'- tetramethylethylenediamin) (Invitrogen)
- 10% APS (ammonium persulfate) (Sigma)
- Loading buffer 4×: 500mM Tris-HCl pH 6.8, 40% γλυκερόλη, 8% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 0,04% Bromophenol blue
- Running buffer 4×: 250mM Tris, 1,92M γλυκίνη
- Coomassie Brilliant Blue 0.05% (40% Methanol, 10% Acetic Acid, dH₂O, CoomassieBlue R-250 ~0.1%)
- Coomassie Blue R-250 (Fluka)
- Methanol (Applichem)
- Acetic acid (Merck)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel de Haen)
- Bromophenol blue (Research Organics)
- Γλυκερόλη (Applichem)
- TBS 10× (1L): 24g Tris, 88g NaCl, dH₂O
- Tween 20 (EuroClone)
- Σκόνη γάλακτος (Regilait)
- Γλυκίνη (Serva)
- Μembrάνη PVDF (Macherey-Nagel)
- Χαρτιά Whatman
- Rabbit monoclonal PARN ab188333 (Abcam)
- goat anti-rabbitIgG-HRP (Chemicon)
- dH₂O

3.5 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας

Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ηλεκτροφόρησης του RNA σε αποδιατακτικές συνθήκες, σε πηκτή ακρυλαμίδιου που έχει αναμιχθεί με ουρία. Η ουρία χρησιμοποιείται διότι αποδιατάσσει δευτεροταγείς δομές του RNA, καταστρέφοντας τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις του μορίου. Το RNA μεταφέρεται στην άνοδο, λόγω του αρνητικού του φορτίου. Στην 20% πηκτή ακρυλαμίδιου τρέχουν και διαχωρίζονται τμήματα RNA μήκους 6-100 νουκλεοτιδίων. Ως υπόστρωμα RNA χρησιμοποιήθηκε το 5'Cy3RNA, ένα 17-μερές (5'- CCU UUC CAA AAA AAA AA -3') που περιέχει μια φθορίζουσα χρωστική CY3 στο άκρο 5' του.

Πηκτή Ουρίας

Για να ελεγχθεί εάν η PARN_v1 έχει ενζυμική δραστηριότητα, δηλαδή αν έχει την ικανότητα να αποικοδομεί ουρές πολυ(Α), χρησιμοποιήθηκε πηκτή ουρίας με την σύσταση που φαίνεται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Πηκτή ουρίας 8M

Συστατικά	Ποσότητα
40% acryl-bisacrylamide mix	25ml
TBE 10×	5ml
Ουρία	24,024gr
APS	100μl
TEMED	10μl

Να σημειωθεί ότι η ουρία προστίθεται στο τέλος σε 60°C και υπο ανάδευση ώστε να διαλυθεί. Λόγω της υψηλής πυκνότητας της πηκτής, χρειάζεται να πραγματοποιηθεί pre-run σε κατακόρυφη συσκευή ηλεκτροφόρησης για 30 λεπτά στα 200V. Τέλος, φορτώνονται τα δείγματα που προέρχονται από τις ενζυμικές αντιδράσεις που περιγράφονται στην επόμενη υποενότητα.

Ενζυμικές αντιδράσεις

Πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές αντιδράσεις με τα ένζυμα PARN, PARN_v1 και το μετάλλαγμα της PARN_v1, ώστε να αποικοδομηθούν τα υποστρώματα 5'Cy3RNA και να ελεγχθεί αν η PARN_v1 και το μετάλλαγμα της έχουν αυτή την ικανότητα αποικοδόμησης. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι η PARN_v1 και το μετάλλαγμα της που απομονώθηκαν σε αυτή την εργασία και η PARN που ήταν ήδη αποθηκευμένη στους -80°C με συγκέντρωση 0,24mg/ml.

Υλικά

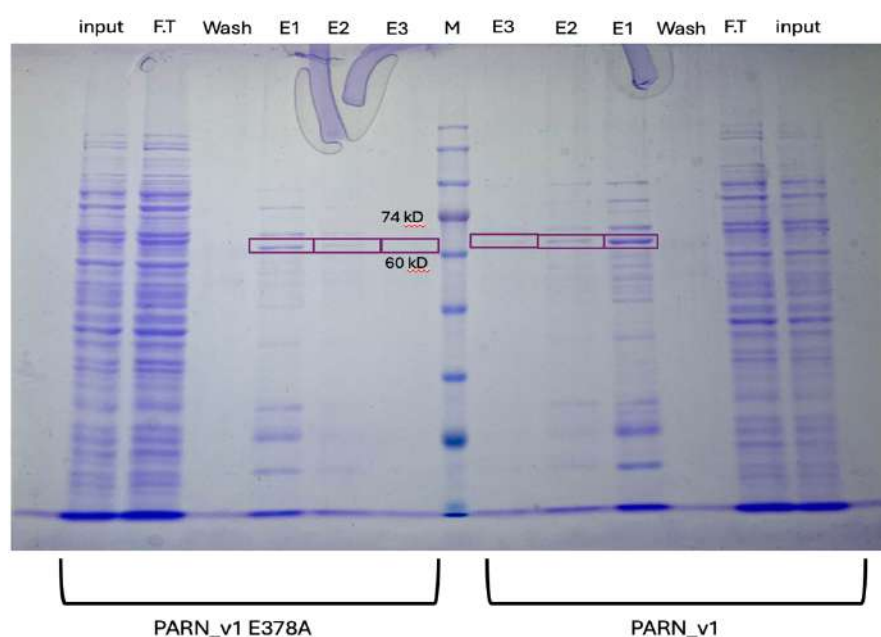
- TBE 10× (500ml): 53,905gr Tris, 27,515gr βορικό οξύ, 3,72gr EDTA (50mM), νερό DEPC.

- 40% acryl-bisacrylamide mix (100ml): 38gr acrylamide, 2gr bisacrylamide, DEPC, dH₂O.
- Πηκτή ουρίας 20% acrylamide mix-8M ουρία (50ml): πίνακας 3, DEPC, dH₂O.
- Reaction buffer pH 7 (20ml): 20mM HEPES, 10mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM EDTA, 10% γλυκερόλη, DEPC, dH₂O (φιλτράρεται με φίλτρο των 0,20μm).
- Master mix (100 μl): 1mM DTT, 0,1 U/ μl RNAsin, reaction buffer.
- 2× RNA sample buffer (10ml): 95% formamide, 5mM EDTA, 0,025% SDS, DEPC, dH₂O (φιλτράρεται με φίλτρο των 0,20μm).
- Tris (Applichem)
- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) (Merck)
- Βορικό οξύ (Calbiochem)
- Acrylamide (Serva)
- N'N' methylene- bis Acrylamide (Serva)
- Ουρία (Serva)
- HEPES (Serva)
- KCl (Merck)
- MgCl₂ (Panreac)
- Γλυκερόλη (Applichem)
- DTT (dithiothreitol) (Applichem)
- RNAsin 40U/μl (Takara)
- Formamide (Sigma)
- SDS (sodium dodecyl sulfate) (Serva)
- TEMED (N,N,N',N'- tetramethylethylenediamin) (Invitrogen)
- 10% APS (ammonium persulfate) (Sigma)
- Φίλτρο 0,20μm (EMD Millipore)
- DEPC (diethylpyrocarbonate) (Serva)
- dH₂O

4. Αποτελέσματα

4.1 Υπερέκφραση και απομόνωση της PARN_v1 και του PARN_v1 E378A σε στήλη Talon metal affinity

Αφου πρώτα έγινε η υπερέκφραση των ενζύμων σε βακτηριακά κύτταρα BL21-Gold, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση τους σε στήλη Talon και τα κλάσματα που συλλέξαμε ελέγχθηκαν για την καθαρότητά τους με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Στην εικόνα 11 παρατίθενται τα αποτελέσματα μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης και ύστερα από χρώση με Coomassie blue.

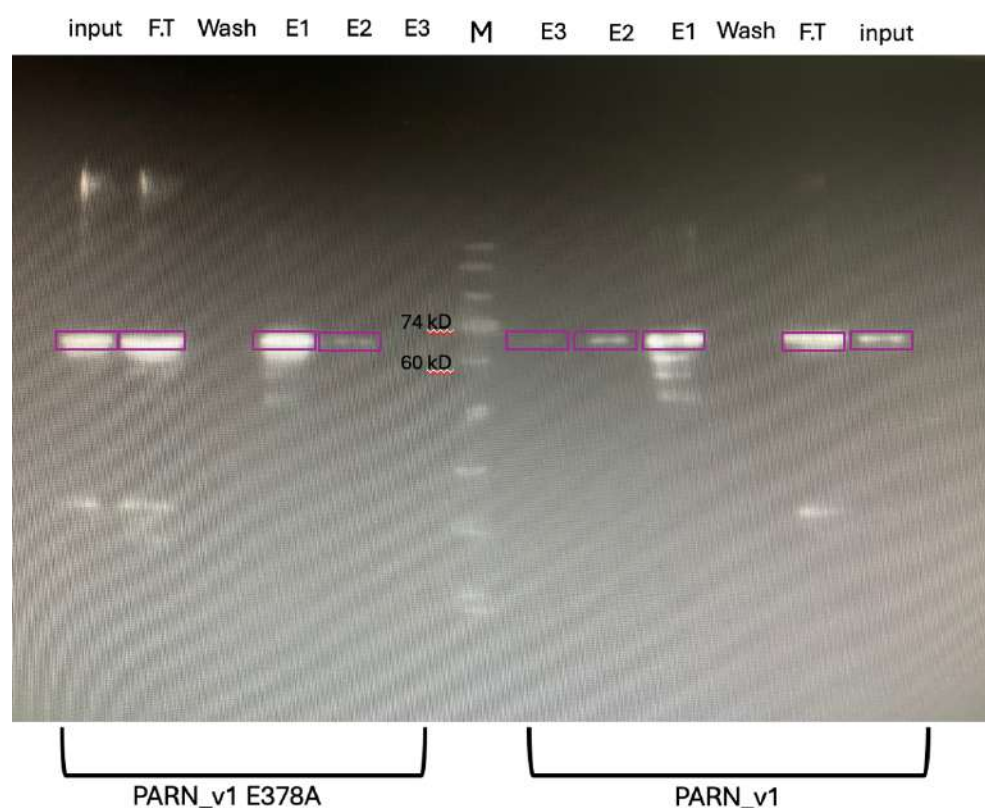


Εικόνα 11. Ανάλυση του πρότυπου έκφρασης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου της πρωτεΐνης PARN_v1 και του PARN_v1 E378A. (input: υπερκείμενο μετά την φυγοκέντρηση που ακολούθησε την λύση των κυττάρων, F.T: διερχόμενο κλάσμα, E1, E2, E3: κλάσματα έκλουσης, M: δείκτης μοριακής μάζας)

Όπως μπορούμε να διακρίνουμε στην εικόνα 11, ανάμεσα στις ζώνες του δείκτη που αντιστοιχούν σε μοριακές μάζες 60kD και 74kD, παρατηρείται μια ζώνη σε όλα σχεδόν τα δείγματα. Όμως πιο έντονη η ζώνη αυτή φαίνεται στα δείγματα έκλουσης E1-3, όπου στην εικόνα σημειώνεται μέσα σε ένα πλαίσιο.

4.2 Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών

Τα δείγματα της έκλουσης που προήλθαν από την απομόνωση των ενζύμων χρησιμοποιήθηκαν για western blot. Στην εικόνα 12 φαίνονται τα αποτελέσματα του western blot με τα αντίσωμα rabbit monoclonal PARN.



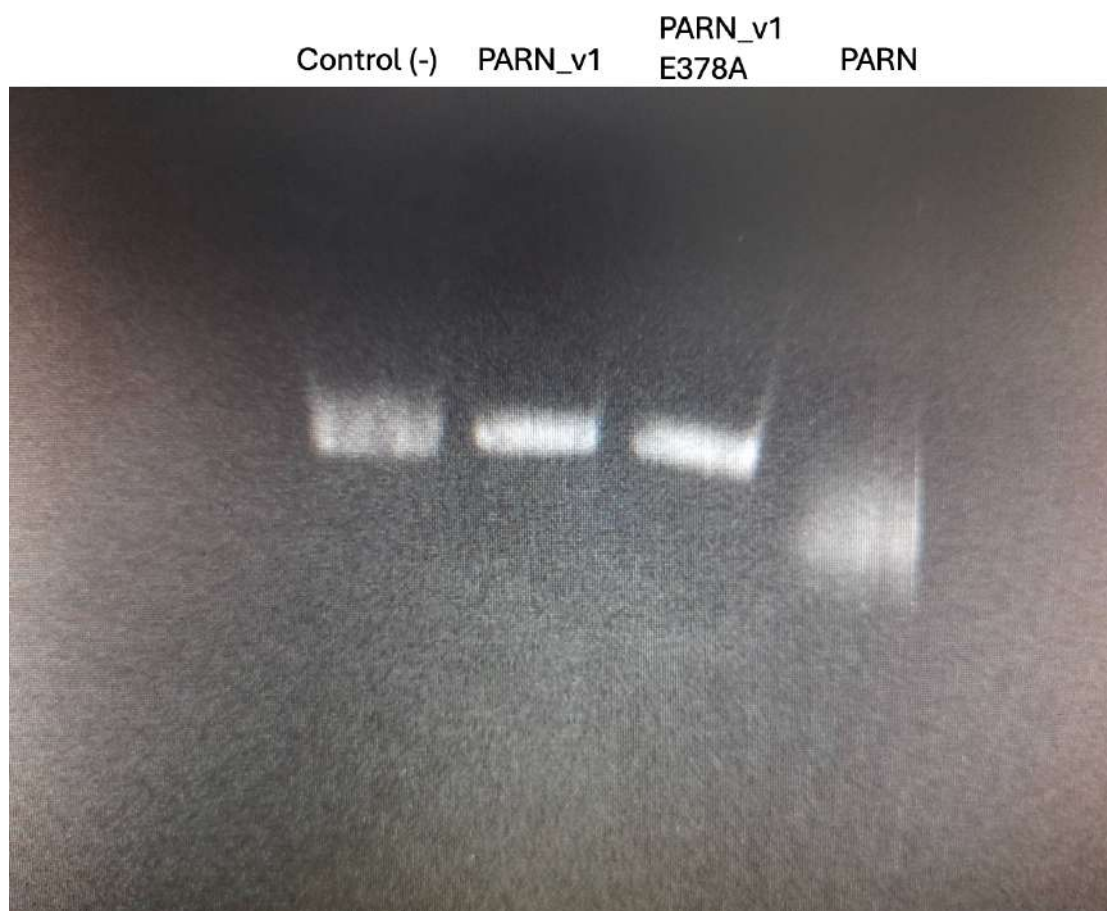
Εικόνα 12. Ανοσοανίχνευση western blot της *PARN_v1* και του μεταλλάγματος *PARN_v1 E378A* με το αντίσωμα rabbit monoclonal *PARN*. (input: υπερκείμενο μετά την φυγοκέντρηση που ακολούθησε την λύση των κυττάρων, F.T: διερχόμενο κλάσμα, E1, E2, E3: κλάσματα έκλουσης, M: δείκτης μοριακής μάζας)

Σε αυτή την εικόνα ανιχνεύονται ζώνες ανάμεσα στα μοριακά βάρη 74kD και 60kD, οι οποίες αντιστοιχούν στην *PARN_v1* και στο *PARN_v1 E378A*. Η εικόνα αυτή προήλθε αφού είχαμε επώασε με rabbit monoclonal *PARN* την μεμβράνη για 36 ώρες, και ακολούθησε επώαση μίας ώρας με το δεύτερο αντίσωμα.

4.3 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας

Προηγούμενα πειράματα της ομάδας μας έχουν δείξει ότι η *PARN_v1* διατηρεί την ενζυμική της δραστηριότητα. Για να επαληθεύσουμε την παρατήρηση αυτή, χρησιμοποιήσαμε τα δείγματα από την δική μας

απομόνωση σε ενζυμικές αντιδράσεις με το υπόστρωμα 5' Cy3RNA. Έπειτα έγινε ηλεκτροφόρηση του υποστρώματος σε πηκτή ουρίας. Στην εικόνα 13 φαίνονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση αυτή.



Εικόνα 13 *Ανάλυση δραστηριότητας σε πηκτή ουρίας 8M-πολυακρυλαμίδη 20%*

Στην εικόνα 13 φαίνονται οι ζώνες του υποστρώματος της διαδρομής με την PARN_v1 και την PARN E378A να είναι στο ίδιο ύψος με αυτό του control (-). Ενώ αντίθετα η ζώνη του υποστρώματος στην διαδρομή με την PARN εμφανίζεται χαμηλότερα, υποδεικνύοντας την αποικοδόμησή του. Επομένως, τόσο η PARN_v1 όσο και το μετάλλαγμα της φαίνεται να μην έχουν την δυνατότητα να αποικοδομούν το υπόστρωμα.

5. Συζήτηση

Η PARN είναι ένα ένζυμο που ανήκει στην κατηγορία των αποδενυλασών και συγκεκριμένα είναι ομόλογη των νουκλεασών RNase D [31]. Πιο συγκεκριμένα έχει δράση 3'→5' εξωνουκλεάσης που συμμετέχει στην

αποικοδόμηση της ουράς πολυ(A) των mRNA, αποτελώντας με αυτόν τον τρόπο ένα σημαντικό στάδιο στην γονιδιακή ρύθμιση [21,31]. Τόσο η PARN όσο και γενικότερα οι απαδενυλάσες σχετίζονται με την ρύθμιση της σταθερότητας μεταγράφων που σχετίζονται με τον καρκίνο, επομένως οποιαδήποτε αλλαγή στην έκφρασή της μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικές ανωμαλίες [12] και γι'αυτό αποτελούν δυνητικά μελλοντικούς στόχους αντικαρκινικών φαρμάκων [27]. Το εναλλακτικό μάτισμα είναι μια διαδικασία που συμβαίνει φυσιολογικά στους οργανισμούς και οδηγεί σε παραγωγή πολλών ισομορφών μια πρωτεΐνης που προέρχονται από το ίδιο γονίδιο. Επομένως, απορρύθμιση και λάθη κατά το μάτισμα οδηγούν σε μη φυσιολογικά μετάγραφα και σχετίζονται με την εμφάνιση ασθενειών [11,24]. Γι'αυτόν τον λόγο, στην παρούσα εργασία απομονώθηκε το εναλλακτικό μετάγραφο της PARN, η PARN_v1 αλλά και ένα μετάλλαγμα αυτού η PARN_v1 E378A. Το εναλλακτικό μετάγραφο και η PARN προέρχονται από το ίδιο γονίδιο μέσω εναλλακτικού ματίσματος [34,35]. Σκοπός της εργασίας επομένως ήταν η απομόνωσή τους και ο έλεγχος της δραστηρότητάς τους.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η υπερέκφραση των ενζύμων PARN_v1 και PARN_v1 E378A σε καλλιέργειες βακτηρίων E.coli του στελέχους BL21-GOLD (DE3) και απομονώθηκαν σε στήλες Talon metal affinity, με ακόλουθο έλεγχο της καθαρότητάς του με SDS-page ηλεκτροφόρηση. Αναλυτικότερα, στην εικόνα 11, οι ζώνες που υπάρχουν μεταξύ των 60kD και 70kD του marker αντιστοιχούν το εναλλακτικό μετάγραφο και το μετάλλαγμα του. Η PARN_v1 έχει υπολογιστεί σε προηγούμενες εργασίες να έχει μοριακό βάρος στα 67kD, άρα αναμένεται και στο συγκεκριμένο ύψος στην πηκτή [34,35]. Ακόμη για δείγματα έκλυσης (E1-3) είναι αυτά στα οποία αναμένεται η PARN_v1 και το μετάλλαγμα της καθώς έχει κρατηθεί ήδη στην ρητίνη, λόγω της αλληλεπίδρασης της ετικέτας ιστιδίνων της αμινοτελικής πλευράς με το κοβάλτιο της στήλης και στην συνέχεια αντικαθιστάται με το ιμιδαζόλιο του διαλύματος έκλυσης με αποτέλεσμα την τελική της έκλυση.

Ύστερα, τα αποθηκευμένα δείγματα της PARN_v1 και της PARN_v1 E378A, χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοανίχνευση (western blot). Στην εικόνα 12, παρατηρούμε την μεμβράνη η οποία πρώτα επώαστηκε με το αντίσωμα rabbit

monoclonal PARN και έπειτα με το αντίσωμα anti-rabbit. Το μονοκλωνικό αντίσωμα έχει κατασκευαστεί για να αναγνωρίζει την περιοχή ανάμεσα στα 400-500 αμινοξέα της ανθρώπινης PARN. Το γεγονός ότι στην μεμβράνη μας εμφανίζονται και κάποιες άλλες ζώνες κάτω ακριβώς πιο κάτω απο την επιθυμητή στα 67kD μπορεί να οφείλεται είτε σε θραύσματα του ενζύμου είτε σε διασταυρούμενη αντίδραση του αντισώματος με κάποια βακτηριακή πρωτεΐνη.

Μετά την ανοσοανίχνευση τα αποθηκευμένα δείγματα των PARN_v1 και PARN_v1 E378A, χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ενζυμικής τους δραστηριότητας, δηλαδή την ικανότητά τους να αποικοδομούν το υπόστρωμα 5'Cy3RNA με ακόλουθη ηλεκτροφόρηση του υποστρώματος σε πηκτή ουρίας. Στην εικόνα 13 παρατηρείται πως τόσο το εναλλακτικό μετάγραφο της PARN όσο και το μετάλλαγμα PARN_v1 E378A δεν αποικοδομούν το υπόστρωμά. Η PARN είναι γνωστό ότι είναι ένζυμο που καταλύει την βράχυνση των ουρών πολυ(A) των μεταγράφων. Λόγω της έλλειψης των 61 αμινοξέων από το αμινοτελικό της άκρο, όπου περιλαμβάνονται και δύο από τα αμινοξέα του καταλυτικού της κέντρου, η δραστηριότητα του ενζύμου χάνεται. Το φαινόμενο αυτό δεν είναι περίεργο, διότι κατά κανόνα η απώλεια αμινοξέων του ενεργού κέντρου στα ένζυμα συνεπάγεται με την απώλεια της λειτουργίας τους. Φαίνεται λοιπόν, ότι καταρχήν το κατάλοιπο E378 δεν μπορεί να αναπληρώσει την ενζυμική δραστηριότητα των απολεσθέντων D28 και E30. Εντούτοις, πρέπει να αποσαφηνιστούν μερικά σημεία ακόμη, όπως ο έλεγχος της δραστηριότητας των PARN_v1 και PARN_v1 E378A μετά την αφαίρεση της ετικέτας 6× His. Επίσης, πρέπει να γίνει επιπλέον διερεύνηση των συνθηκών απαδενυλίωσης, κυρίως το ρυθμιστικό διάλυμα που πραγματοποιείται η αντίδραση, μιας και είναι πιθανό να επιδρούν στην αναδίπλωση των μορφών και άρα στην λειτουργικότητά τους.

Αξίζει να τονιστεί ότι η PARN_v1 έχει ανιχνευθεί και απομονωθεί από κυτταρικές σειρές κακοήθους πλευρικού μεσοθηλιώματος (M14K, MSTO, ZL34). Αυτό ενδεχομένως υποδεικνύει ότι κατέχει κάποιο διαφορετικό ρόλο στην κυτταρική φυσιολογία πέραν της ενζυμικής δραστηριότητας [3]. Παρόλ' αυτά εάν δεν διαθέτει ενζυμική δραστηριότητα δεν αναμένεται να συμμετέχει

στις διαδικασίες ωρίμανσης και σταθεροποίησης μη κωδικών RNA, όπως και στην αποικοδόμηση της ουράς πολυ(A) mRNAs [22,26]. Μελλοντικοί στόχοι του εργαστηρίου είναι η αποσαφήνιση του βιολογικού ρόλου της PARN_v1, η διερεύνηση των μηχανισμών που κατευθύνουν την έκφραση και τα επίπεδα των μορφών της PARN, από την πλήρους μεγέθους στην εναλλακτική ισομορφή PARN_v1, καθώς και ο ρόλος του σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις.

Βιβλιογραφία

1. Banerjee A.K. 5'- terminal cap structure in eukaryotic messenger ribonucleic acids (1980). *Microbiol. Rev.*, 44(2): 175-205.
2. Borbolis, F., & Syntichaki, P. (2022). Biological implications of decapping: beyond bulk mRNA decay. In *FEBS Journal* (Vol. 289, Issue 6, pp. 1457–1475). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/febs.15798>
3. Bradley, R. K., & Anczuków, O. (2023). RNA splicing dysregulation and the hallmarks of cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 23, Issue 3, pp. 135–155). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00541-7>
4. Charenton, C., & Graille, M. (2018). mRNA decapping: Finding the right structures. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 373, Issue 1762). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0164>
5. Chen, C. Y. A., & Shyu, A. bin. (2011). Mechanisms of deadenylation-dependent decay. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 2, Issue 2, pp. 167–183). <https://doi.org/10.1002/wrna.40>
6. Godwin, A. R., Kojima, S., Green, C. B., & Wilusz, J. (2013). Kiss your tail goodbye: The role of PARN, Nocturnin, and Angel deadenylases in mRNA biology. In *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* (Vol. 1829, Issues 6–7, pp. 571–579). <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.12.004>
7. Gomez-Cambronero, J., Fite, K., & Miller, T. E. (2018). How miRs and mRNA deadenylases could post-transcriptionally regulate expression of tumor-

- promoting protein PLD. In *Advances in Biological Regulation* (Vol. 68, pp. 107–119). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.08.002>
8. Huynh, T. N., & Parker, R. (2023). The PARN, TOE1, and USB1 RNA deadenylases and their roles in non-coding RNA regulation. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 299, Issue 9). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105139>
 9. Jin, Y., Dong, H., Shi, Y., & Bian, L. (2018). Mutually exclusive alternative splicing of pre-mRNAs. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 9, Issue 3). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/wrna.1468>
 10. Kajjo, S., Sharma, S., Chen, S., Brothers, W. R., Cott, M., Hasaj, B., Jovanovic, P., Larsson, O., & Fabian, M. R. (2022). PABP prevents the untimely decay of select mRNA populations in human cells. *The EMBO Journal*, 41(6). <https://doi.org/10.15252/emj.2021108650>
 11. Kim, E., Goren, A., & Ast, G. (2008). Alternative splicing: Current perspectives. In *BioEssays* (Vol. 30, Issue 1, pp. 38–47). <https://doi.org/10.1002/bies.20692>
 12. Kyritsis, A., Papanastasi, E., Kokkori, I., Maragozidis, P., Chatzileontiadou, D. S. M., Pallaki, P., Labrou, M., Zarogiannis, S. G., Chrousos, G. P., Vlachakis, D., Gourgoulialis, K. I., & Balatsos, N. A. A. (2022). Integrated Deadenylase Genetic Association Network and Transcriptome Analysis in Thoracic Carcinomas. *Molecules*, 27(10). <https://doi.org/10.3390/molecules27103102>
 13. Lee, Y., & Rio, D. C. (2015). Mechanisms and regulation of alternative Pre-mRNA splicing. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 84, pp. 291–323). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034316>
 14. Lin, J. C., Tsao, M. F., & Lin, Y. J. (2016). Differential impacts of alternative splicing networks on apoptosis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms17122097>
 15. Liu, J., Lu, X., Zhang, S., Yuan, L., & Sun, Y. (2022). Molecular Insights into mRNA Polyadenylation and Deadenylation. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms231910985>
 16. Liu, W. F., Zhang, A., Cheng, Y., Zhou, H. M., & Yan, Y. bin. (2007). Effect of magnesium ions on the thermal stability of human poly(A)-specific

- ribonuclease. *FEBS Letters*, 581(5), 1047–1052.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.02.008>
17. Maragozidis, P., Papanastasi, E., Scutelnic, D., Totomi, A., Kokkori, I., Zarogiannis, S. G., Kerenidi, T., Gourgoulialis, K. I., & Balatsos, N. A. A. (2015). Poly(A)-specific ribonuclease and Nocturnin in squamous cell lung cancer: Prognostic value and impact on gene expression. *Molecular Cancer*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0457-3>
18. Merrick, W. C., & Pavitt, G. D. (2018). Protein synthesis initiation in eukaryotic cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033092>
19. Nanjappa, D. P., Babu, N., Khanna-Gupta, A., O'Donohue, M. F., Sips, P., & Chakraborty, A. (2021). Poly (A)-specific ribonuclease (PARN): More than just “mRNA stock clearing.” In *Life Sciences* (Vol. 285). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119953>
20. Nicholson, A. L., & Pasquinelli, A. E. (2019). Tales of Detailed Poly(A) Tails. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 29, Issue 3, pp. 191–200). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.11.002>
21. Nilsson, P., Henriksson, N., Niedzwiecka, A., Balatsos, N. A. A., Kokkoris, K., Eriksson, J., & Virtanen, A. (2007). A multifunctional RNA recognition motif in poly(A)-specific ribonuclease with cap and poly(A) binding properties. *Journal of Biological Chemistry*, 282(45), 32902–32911. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702375200>
22. Passmore, L. A., & Collier, J. (2022). Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 23, Issue 2, pp. 93–106). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00417-y>
23. Pavlopoulou, A., Vlachakis, D., Balatsos, N. A. A., & Kossida, S. (2013). A comprehensive phylogenetic analysis of deadenylases. *Evolutionary Bioinformatics*, 2013(9), 491–497. <https://doi.org/10.4137/EBO.S12746>
24. Ramanouskaya, T. v., & Grinev, V. v. (2017). The determinants of alternative RNA splicing in human cells. In *Molecular Genetics and Genomics* (Vol. 292, Issue 6, pp. 1175–1195). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1350-0>

25. Rodríguez-Molina, J. B., & Turtola, M. (2023). Birth of a poly(A) tail: mechanisms and control of mRNA polyadenylation. In *FEBS Open Bio* (Vol. 13, Issue 7, pp. 1140–1153). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13528>
26. Shukla, S., Bjerke, G. A., Muhlrads, D., Yi, R., & Parker, R. (2019). The RNase PARN Controls the Levels of Specific miRNAs that Contribute to p53 Regulation. *Molecular Cell*, 73(6), 1204-1216.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.010>
27. Skeparnias, I., Anastasakis, D., Shaukat, A. N., Grafanaki, K., & Stathopoulos, C. (2017). Expanding the repertoire of deadenylases. In *RNA Biology* (Vol. 14, Issue 10, pp. 1320–1325). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1300222>
28. Ule, J., & Blencowe, B. J. (2019). Alternative Splicing Regulatory Networks: Functions, Mechanisms, and Evolution. In *Molecular Cell* (Vol. 76, Issue 2, pp. 329–345). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.017>
29. Vidya, E., & Duchaine, T. F. (2022). Eukaryotic mRNA Decapping Activation. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.832547>
30. Virtanen, A., Henriksson, N., Nilsson, P., & Nissbeck, M. (2013). Poly(A)-specific ribonuclease (PARN): An allosterically regulated, processive and mRNA cap-interacting deadenylase. In *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 48, Issue 2, pp. 192–209). <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.771132>
31. Wu, M., Nilsson, P., Henriksson, N., Niedzwiecka, A., Lim, M. K., Cheng, Z., Kokkoris, K., Virtanen, A., & Song, H. (2009). Structural Basis of m7GpppG Binding to Poly(A)-Specific Ribonuclease. *Structure*, 17(2), 276–286. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.11.012>
32. Wu, M., Reuter, M., Lilie, H., Liu, Y., Wahle, E., & Song, H. (2005). Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO Journal*, 24(23), 4082–4093. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600869>
33. Zuo, Y., & Deutscher, M. P. (2001). SURVEY AND SUMMARY Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 29, Issue 5). <http://expasy.cbr.nrc.ca/cgi-bin/>

34. Άννα Πολίτη. Διερεύνηση εναλλακτικών μεταγράφων της πολυ(Α) εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης, PARN, στο μεσοθηλίωμα (2018). Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας – Μοριακή Γενετική, Διαγνωστικοί Δείκτες, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
35. Διονύσης Αντωνόπουλος. Αναζήτηση εναλλακτικών μεταγράφων της Πολυ(Α)- εξειδικευμένης Ριβονουκλεάσης και διερεύνηση της βιολογικής τους σημασίας (2015). Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας – Μοριακή Γενετική, Διαγνωστικοί Δείκτες, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.