



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΓΕΝΗΤΣΕΦΤΣΗ ΑΘΑΝΑΣΙΑ

**«Επίδραση του μετάγραφου v1 της πολύ(A) εξειδικευμένης
ριβονουκλεάσης (PARN_v1) στη σταθερότητα mRNA σε κύτταρα
ινοβλαστών πνεύμονα»**

ΛΑΡΙΣΑ 2025

Επίδραση του μετάγραφου v1 της πολύ(A) εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN_v1) στη σταθερότητα mRNA σε κύτταρα ινοβλαστών πνεύμονα.

Effect of poly(A)-specific ribonuclease PARN_v1 on mRNA stability in lung fibroblast cells.

Τριμελής Επιτροπή

Νικόλαος Μπαλατσός (επιβλέπων) Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας
του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας.

Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης Καθηγητής του Τμήματος Ιατρικής του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

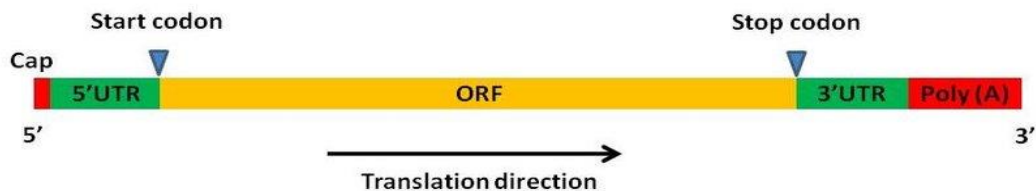
Δημήτριος Βλαχάκης Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος
Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	5
1.2. Μεταγραφή	6
1.3. Τα κύτταρα παράγουν διαφορετικούς τύπους RNA	11
1.3.1. Ριβόσωμα- Περιοχή που πραγματοποιείται η μετάφραση	12
1.4. Μετάφραση	14
1.5. Μάτισμα	18
1.6 Αποδενυλάσες	21
1.7. Πολυ(A) ριβονουκλεάση - Poly(A)-specific ribonuclease (PARN)	22
1.7.1. Βιοχημικός ρόλος PARN	23
1.7.2. Parn και ασθένειες	26
1.8. Εναλλακτικό μετάγραφο της PARN (PARN_v1)	27
1.9. Σκοπός της εργασίας	28
2.0. Υλικά και μέθοδοι	28
2.1. Αποκόλληση προσκολλημένων κυττάρων	28
3. Western Blotting	29
3.1. Αποτελέσματα	31
4. Συζήτηση	33
Βιβλιογραφία	35

1. Εισαγωγή

Το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας υποστηρίζει ότι η ροή της γενετικής πληροφορίας προέρχεται από το DNA μέσω του mRNA προς την πρωτεΐνη. Ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης στα ευκαρυωτικά κύτταρα μεσολαβείται σε πολλαπλά επίπεδα, συμπεριλαμβανομένου του επιπέδου mRNA, όπου η σύνθεση και η σταθερότητα διαδραματίζουν ζωτικούς ρόλους. Γενικά, τα περισσότερα ευκαρυωτικά mRNA συμμορφώνονται με μια διατηρημένη αρχιτεκτονική όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1 (Nanjappa, D. P., et. Al., 2021).



Σχήμα 1.1.: Εικονογραφική αναπαράσταση ενός ωριμασμένου και πλήρως επεξεργασμένου ευκαρυωτικού mRNA που δείχνει το 5'-άκρο, αμετάφραστες περιοχές, κωδικοποιητικές περιοχές και το 3'-άκρο.

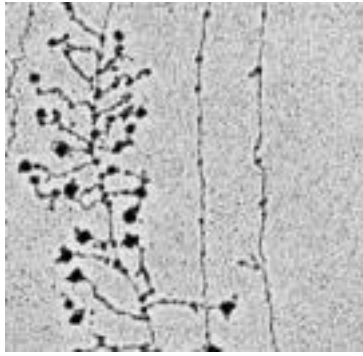
Τα αρθρωτά λειτουργικά τμήματα του mRNA συμβάλλουν στη σταθερότητα και την αποικοδόμηση του mRNA. Η διαδικασία αποικοδόμησης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση και οποιοδήποτε ελάττωμα κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας θα μπορούσε ενδεχομένως να συμβάλει σε μια νοσηρή κατάσταση με συσσώρευση mRNAs για διαστήματα πέρα των απαιτήσεων του κυττάρου. Ως εκ τούτου, η λεπτή ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης και της διάσπασης του mRNA είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της ομοιόστασης. Οι ειδικές αλληλουχίες αναγνώρισης στις αμετάφραστες περιοχές του επιτρέπουν τον έλεγχο αυτών των διεργασιών και ρυθμίζουν τη σταθερότητα σε κάθε μόριο mRNA.

Τα ένζυμα που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση του RNA ονομάζονται συλλογικά **ριβονουκλεάσες (RNase)**. Η υπεροικογένεια των RNAσων περιλαμβάνει τις αποαδενυλάσες, τις εξωνουκλεάσες και τις ενδονουκλεάσες. Αποτελούν υδρολυτικά ένζυμα και είναι υπεύθυνα για τη διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών στο RNA. Εκτός από την αποικοδόμηση του RNA, είναι επίσης γνωστές οι μη κανονικές λειτουργίες των RNAσων. Σχετίζονται με διάφορες λειτουργίες όπως τη καταστολή όγκων, τη διέγερση του σχηματισμού των αιμοφόρων αγγείων έως τον πολλαπλασιασμό των κινητικών νευρώνων .

Το μήκος της ουράς πολυ(A) του mRNA στο 3' άκρο του μορίου ρυθμίζεται από πολυ(A) πολυμεράσες και αποαδενυλάσες. Η ύπαρξη πολυάριθμων αποαδενυλασών στα ευκαρυωτικά κύτταρα υποδηλώνει ότι η ρύθμιση της πολυ(A) ουράς είναι ζωτικής σημασίας για την κυτταρική ομοιόσταση. Πράγματι, η ρύθμιση της είναι γνωστό ότι ελέγχει σχεδόν όλες τις λειτουργικές πτυχές των mRNAs συμπεριλαμβανομένης της μεταγραφής, της μετάφρασης, της σταθερότητας, της ενδοκυτταρικής μεταφοράς και της αποικοδόμησης. Η ρυθμιστική λειτουργία των αποαδενυλασών διέπεται από μια σύνθετη σειρά παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της υποκυτταρικής τους θέσης και της συσχέτισης με ειδικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες δέσμευσης RNA (Nanjappa, D. P., et. Al., 2021).

1.2.Μεταγραφή

Η διαδικασία της μεταγραφής, παρατηρήθηκε για πρώτη φορά με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου το 1970. Σε αυτές τις πρώιμες ηλεκτρονικές μικρογραφίες, τα μόρια DNA εμφανίζονται ως «κορμοί», με πολλά «κλαδιά» RNA να εκτείνονται έξω από αυτά. Όταν στα μόρια προστέθηκαν DNase και RNase (ένζυμα που αποικοδομούν το DNA και το RNA αντίστοιχα), η εφαρμογή της DNase εξάλειψε τις δομές του κορμού, ενώ η χρήση RNase εξαφάνισε τους κλάδους (ClansyS.,2008).

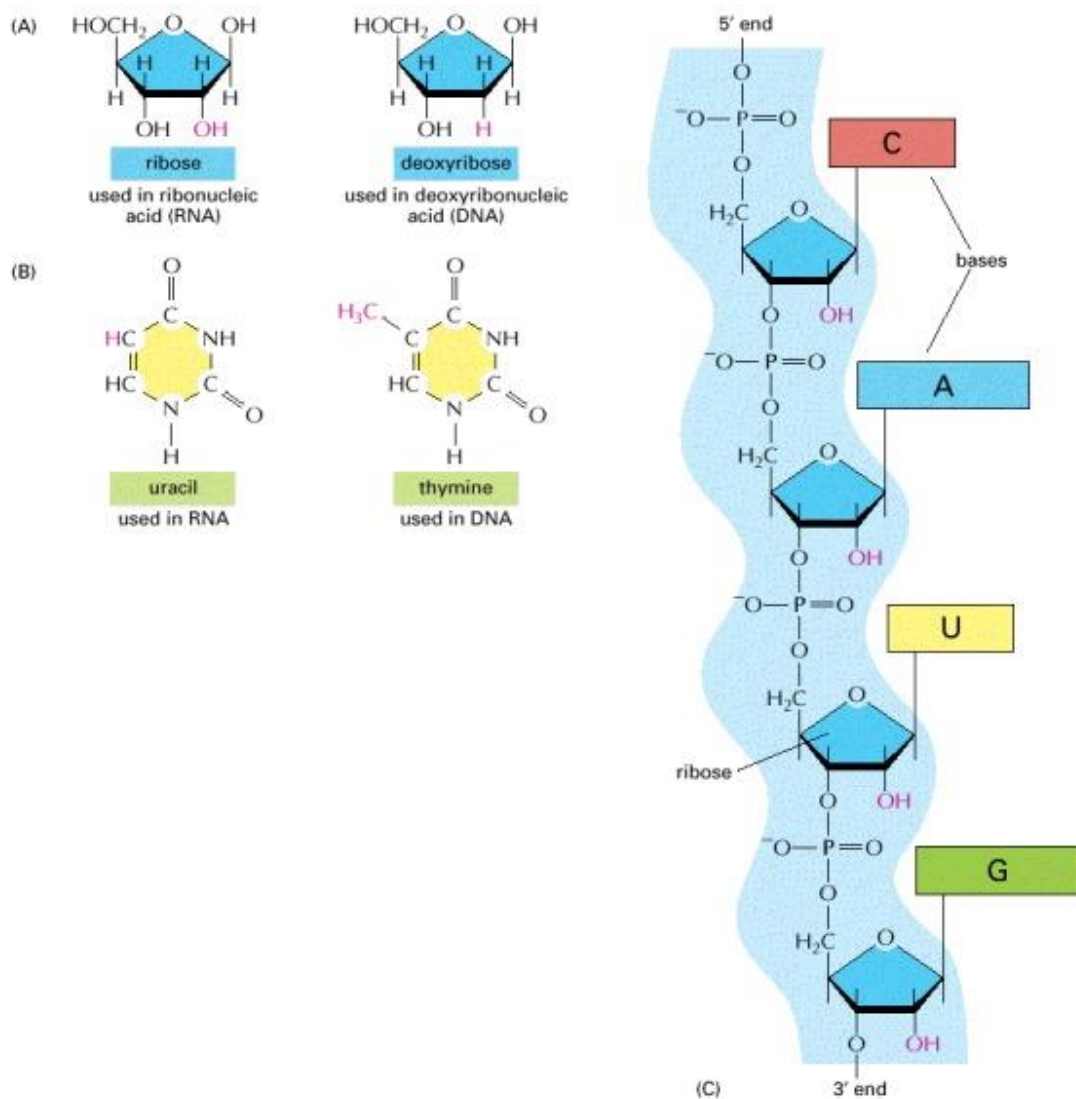


Εικόνα 1.2.: Η διαδικασία της μεταγραφής μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Clancy, S., 2008).

Όπως το DNA, έτσι και το RNA είναι ένα γραμμικό πολυμερές που αποτελείται από τέσσερις διαφορετικούς τύπους νουκλεοτιδικών καταλοίπων που συνδέονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Διαφέρει από το DNA χημικά από δύο απόψεις:

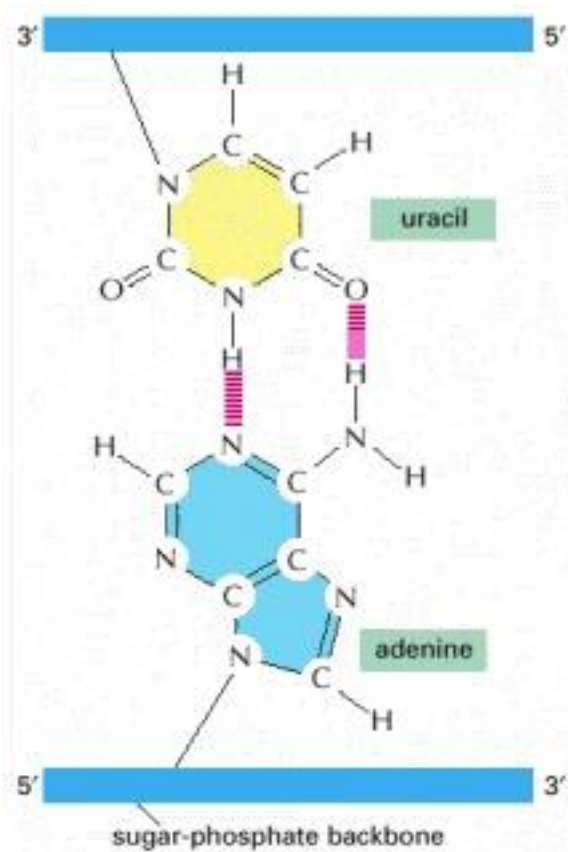
1. τα νουκλεοτίδια στο RNA είναι ριβονουκλεοτίδια—δηλαδή περιέχουν το σάκχαρο ριβόζη αντί για δεοξυριβόζη.
2. όπως το DNA, το RNA περιέχει τις βάσεις αδερίνη (A), γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C), όμως περιέχει τη βάση ουρακίλη (U) αντί για τη θυμίνη (T).

Δεδομένου ότι η ουρακίλη, όπως και η θυμίνη, μπορεί να ζευγαρώσει με δεσμούς υδρογόνου με την αδερίνη, οι συμπληρωματικές ιδιότητες ζεύγους βάσεων που περιγράφονται για το DNA ισχύουν και για το RNA (σε RNA, ζεύγη G με C, και το A ζευγαρώνει με το U). Δεν είναι ασυνήθιστο, ωστόσο, να σχηματίζονται άλλα μοτίβα ζευγών βάσεων στο RNA όπως η γουανίνη να ζευγαρώνει με ουρακίλη.



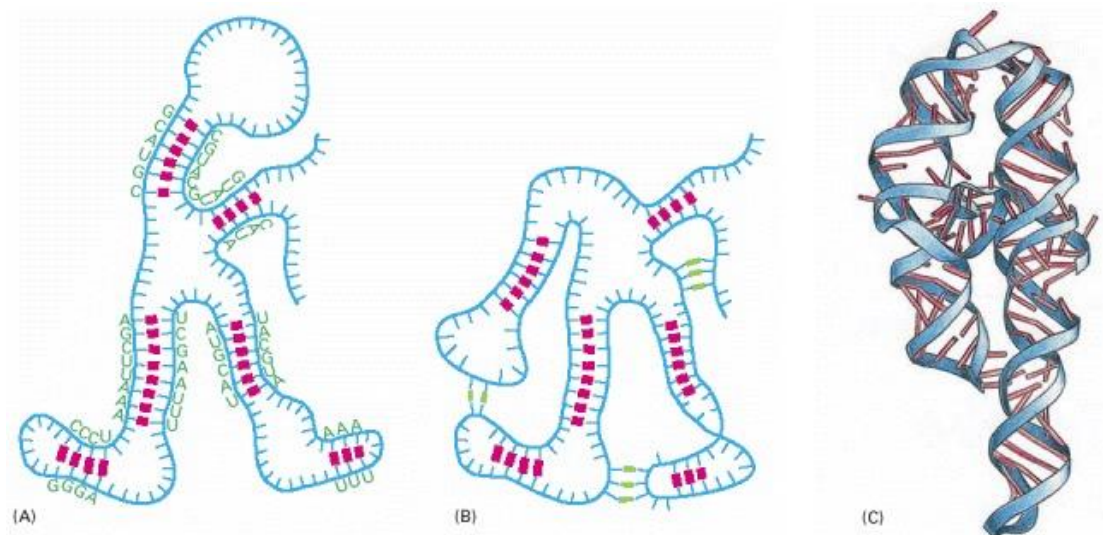
Σχεδιάγραμμα 1.2.1. : Η χημική δομή του RNA

A) Το RNA περιέχει τη ριβόζη, η οποία διαφέρει από τη δεοξυριβόζη, το σάκχαρο που χρησιμοποιείται στο DNA, με την παρουσία μιας επιπλέον ομάδας $-OH$ στον 2' άνθρακα του σακχάρου. B) Το RNA περιέχει τη βάση ουρακίλη, η οποία διαφέρει από τη θυμίνη, την ισοδύναμη βάση στο DNA, λόγω της απουσίας μιας ομάδας $-CH_3$ στο 5' άνθρακα του δακτυλίου πυριμιδίνης. Γ) Μόριο RNA. Οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί μεταξύ των νουκλεοτιδίων στο RNA είναι η ίδια με αυτή στο DNA (Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al, 2002).



Σχεδιάγραμμα 1.2.2.: Η ουρακίλη σχηματίζει ζεύγη βάσεων με την αδερίνη. Η απουσία μεθυλομάδας στην ουρακίλη δεν έχει επίδραση στο ζευγάρωμα βάσεων. Έτσι, τα ζεύγη βάσεων ουρακίλη-αδερίνη μοιάζουν πολύ με τα ζεύγη βάσεων θυμίνη-αδερίνη (Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al, 2002).

Παρά αυτές τις μικρές χημικές διαφορές, το DNA και το RNA διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό στη συνολική δομή. Ενώ το DNA εμφανίζεται πάντα στα κύτταρα ως μια δίκλωνη έλικα, το RNA είναι κατά βάσει μονόκλωνο. Επομένως, οι αλυσίδες RNA αναδιπλώνονται σε μια ποικιλία σχημάτων, όπως μια πολυπεπτιδική αλυσίδα διπλώνεται για να σχηματίσει το τελικό σχήμα μιας πρωτεΐνης (Σχεδιάγραμμα 1.2.3). Η ικανότητα αναδίπλωσης σε πολύπλοκα τρισδιάστατα σχήματα επιτρέπει σε ορισμένα μόρια RNA να έχουν δομικές και καταλυτικές λειτουργίες (AlbertsB., et.al, 2002).



Σχεδιάγραμμα 1.2.3.: (Α) Διάγραμμα μιας δομής διπλωμένου RNA που δείχνει μόνο συμβατικές αλληλεπιδράσεις ζευγών βάσεων. (Β) δομή με συμβατικές (κόκκινες) και μη συμβατικές (πράσινες) αλληλεπιδράσεις ζεύγους βάσεων. (Γ) δομή ενός ιντρονίου της ομάδας I. Κάθε συμβατική αλληλεπίδραση ζεύγους βάσεων υποδεικνύεται με ένα «σκέλος» στη διπλή έλικα. Οι βάσεις σε άλλες διαμορφώσεις υποδεικνύονται με σπασμένα σκαλοπάτια (Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al, 2002).

Όπως αναφέρθηκε το DNA είναι δίκλωνο, αλλά μόνο ο ένας κλώνος χρησιμεύει ως εκμαγείο για τη μεταγραφή κάθε δεδομένη στιγμή. Αυτός ο κλώνος ονομάζεται μη κωδικοποιητικός κλώνος. Ο συμπληρωματικός κλώνος αναφέρεται ως ο κωδικοποιητικός κλώνος επειδή η αλληλουχία του είναι ίδια με αυτή του νέου μορίου RNA. Στους περισσότερους οργανισμούς, ο κλώνος του DNA που χρησιμεύει ως εκμαγείο για ένα γονίδιο μπορεί να είναι ο συμπληρωματικός (κωδικός) κλώνος για άλλα γονίδια μέσα στο ίδιο χρωμόσωμα (Clansy S., 2008).

Επειδή πολλά πανομοιότυπα αντίγραφα RNA μπορούν να δημιουργηθούν από το ίδιο γονίδιο και κάθε μόριο RNA μπορεί να κατευθύνει τη σύνθεση πολλών πανομοιότυπων πρωτεϊνικών μορίων, τα κύτταρα μπορούν να συνθέσουν μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης γρήγορα όταν είναι απαραίτητο. Αλλά κάθε γονίδιο μπορεί επίσης να μεταγραφεί και να μεταφραστεί με διαφορετική αποτελεσματικότητα, επιτρέποντας στο κύτταρο να παράγει τεράστιες ποσότητες ορισμένων πρωτεϊνών και ελάχιστες ποσότητες άλλων. Επιπλέον, ένα κύτταρο μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση καθενός από τα γονίδια του σύμφωνα με τις ανάγκες, ελέγχοντας την παραγωγή του RNA.

1.3. Τα κύτταρα παράγουν διαφορετικούς τύπους RNA

Τα μόρια του RNA που κατευθύνουν τελικά τη σύνθεση των πρωτεϊνών ονομάζονται μόρια **αγγελιοφόρου RNA (mRNA)**. Μια μειοψηφία γονιδίων ωστόσο, παράγει μη κωδικοποιούντα μόρια RNA. Η ανάλυση της πλήρους αλληλουχίας του DNA του γονιδιώματος του ζυμομύκητα *S. cerevisiae* έχει αποκαλύψει πολύ περισσότερα από 750 γονίδια (κάπως περισσότερα από το 10% του συνολικού αριθμού γονιδίων ζυμομύκητα) που παράγουν μη κωδικοποιητικά RNAs, αν και αυτός ο αριθμός περιλαμβάνει πολλαπλά αντίγραφα ορισμένων επαναλαμβανόμενων γονιδίων. Αυτά τα RNAs, χρησιμοποιούνται ως ενζυμικά και δομικά συστατικά για μια μεγάλη ποικιλία διεργασιών στο κύτταρο. Αν και δεν είναι γνωστές όλες οι λειτουργίες τους, βλέπουμε ότι μερικά μικρά μόρια **πυρηνικού RNA (snRNA)** κατευθύνουν το μάτισμα του pre-mRNA για να σχηματίσουν το ώριμο mRNA, ότι τα μόρια του **ριβοσωματικού RNA (rRNA)** απαρτίζουν μέρος των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων των ριβοσωμάτων και ότι τα **μεταφορικά RNAs (tRNA)** συνδέονται με ένα συγκεκριμένο αμινοξύ, μεταφέροντας το στη θέση της πρωτεϊνοσύνθεσης (AlbertsB., et.al., 2002).

Συνολικά, το RNA αποτελεί μερικές ποσοστιαίες μονάδες του ξηρού βάρους ενός κυττάρου. Το rRNA αποτελεί το μεγαλύτερο κλάσμα. Το mRNA αποτελεί μόνο το 3-5% του συνολικού RNA σε ένα τυπικό κύτταρο θηλαστικού. Ο πληθυσμός του mRNA απαρτίζεται από δεκάδες χιλιάδες διαφορετικά είδη και υπάρχουν κατά μέσο όρο μόνο 10-15 μόρια ενός μετάγραφου σε κάθε κύτταρο.

ΤΥΠΟΣ RNA	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
mRNAs	αγγελιοφόρο RNA, κωδικεύει για πρωτεΐνες rRNAs
rRNAs	Τα ριβοσωμικά RNA, σχηματίζουν τη βασική δομή του ριβοσώματος
tRNAs	Κεντρικά στη σύνθεση πρωτεϊνών ως προσαρμογείς μεταξύ mRNA και αμινοξέων
snRNAs	μικρά πυρηνικά RNA, λειτουργούν σε μια ποικιλία πυρηνικών διεργασιών,

	συμπεριλαμβανομένου του ματίσματος του pro-mRNA
snoRNAs	μικρά πυρηνικά RNAs, που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία και τη χημική τροποποίηση των rRNAs
Άλλα μη κωδικοποιημένα RNA	λειτουργούν σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης τελομερώντης απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X και της μεταφοράς πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο

Πίνακας 1.3.: Κύριοι τύποι RNA που παράγονται στα κύτταρα.

Ειδικές αλληλουχίες του DNA κατευθύνουν την RNA πολυμεράση στις θέσεις έναρξης της μεταγραφής. Ο τρόπος με τον οποίο οι RNA πολυμεράσες εκτελούν αυτές τις εργασίες διαφέρει μερικώς μεταξύ βακτηρίων και ευκαρυωτών. Τρεις RNA πολυμεράσες υπάρχουν στα ευκαρυωτικά κύτταρα, ενώ τα βακτήρια έχουν μόνο μια. Στους ευκαρυώτες, η **RNA pol I** μεταγράφει τα γονίδια που κωδικοποιούν τα περισσότερα από τα ριβοσωμικά RNA (rRNAs) και το **RNA pol III** μεταγράφει το γονίδιο του 5S rRNA, των tRNAs, καθώς και άλλα μικρά ρυθμιστικά μόρια RNA. Τα mRNAs μεταγράφονται από την **RNA pol II**.

1.3.1. Ριβόσωμα - Περιοχή που πραγματοποιείται η μετάφραση

Η μετάφραση πραγματοποιείται από ένα εξειδικευμένο οργανίδιο που ονομάζεται ριβόσωμα. Στους ευκαρυώτες, τα ώριμα μόρια mRNA πρέπει να εξέλθουν από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα, όπου απαντώνται τα ριβοσώματα. Από την άλλη πλευρά, στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, τα ριβοσώματα μπορούν να προσκολληθούν στο mRNA ενώ αυτό εξακολουθεί να μεταγράφεται. Σε αυτήν την περίπτωση, η μετάφραση ξεκινά στο 5' άκρο του mRNA ενώ το 3' άκρο είναι ακόμα συνδεδεμένο με το DNA.

Σε όλους τους τύπους κυττάρων, το ριβόσωμα αποτελείται από δύο υπομονάδες: τη μεγάλη υπομονάδα και τη μικρή υπομονάδα. Κάθε υπομονάδα

απαντάνται χωριστά στο κυτταρόπλασμα, αλλά συγκροτούνται σε ένα πλήρες ριβόσωμα κατά τη μετάφραση. Οι ριβοσωμικές υπομονάδες περιέχουν πρωτεΐνες και εξειδικευμένα μόρια RNA - συγκεκριμένα, **ριβοσωμικόRNA (rRNA)** και **RNA μεταφοράς (tRNA)**. Τα μόρια tRNA είναι μόρια προσαρμογής, έχουν ένα άκρο που συνδέονται μέσω του βρόγχου αντικωδικονίου στο mRNA μέσω συμπληρωματικού ζευγαρώματος βάσεων και ένα άκρο που συνδέεται με ένα συγκεκριμένο αμινοξύ. Η ιδέα ότι το tRNA ήταν ένα μόριο προσαρμογής προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Francis Crick, συν-εφευρέτη της δομής του DNA, ο οποίος έκανε μεγάλο μέρος της βασικής δουλειάς στην αποκρυπτογράφηση του γενετικού κώδικα (Clancy, S. & Brown, W. 2008). Μέσα στο ριβόσωμα, τα σύμπλοκα mRNA και αμινοακυλο-tRNA συγκροτούνται στενά, γεγονός που διευκολύνει το ζευγάρωμα βάσεων.

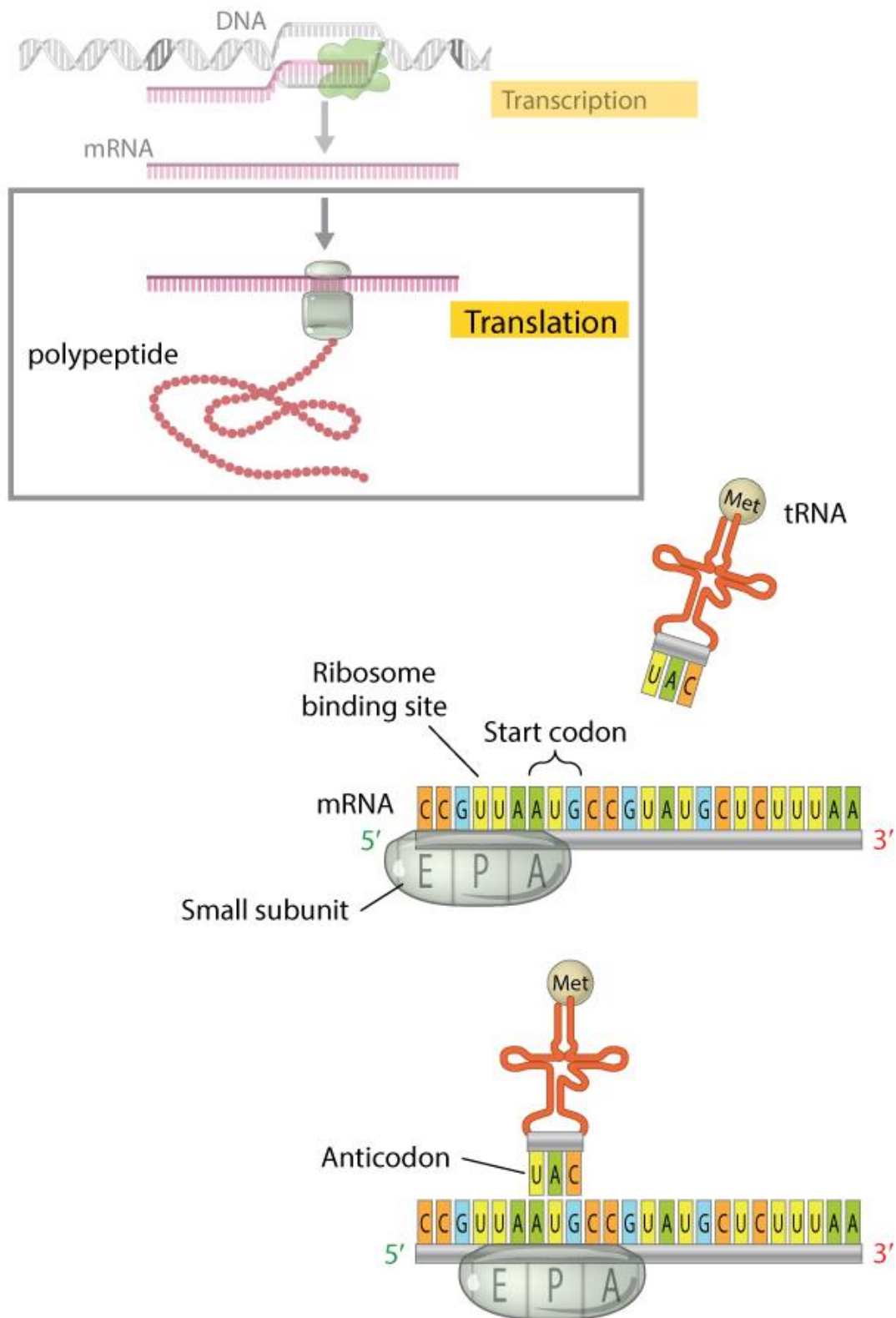
1.4. Μετάφραση

Κατά τη μετάφραση, το mRNA «διαβάζεται» σύμφωνα με τον γενετικό κώδικα. Κάθε ομάδα τριών βάσεων στο mRNA αποτελεί ένα κωδικόνιο και κάθε κωδικόνιο προσδιορίζει ένα συγκεκριμένο αμινοξύ. Η αλληλουχία mRNA χρησιμοποιείται ως εκ τούτου ως πρότυπο για τη συναρμολόγηση αλυσίδας αμινοξέων που σχηματίζουν μια πρωτεΐνη (Clansy,S.&Brown, W., 2008).

		Second nucleotide					
		U	C	A	G		
First nucleotide	U	UUU Phe	UCU	UAU Tyr	UGU Cys	Third nucleotide	U
		UUC	UCC Ser	UAC	UGC		C
		UUA Leu	UCA	UAA STOP	UGA STOP		A
		UUG	UCG	UAG STOP	UGG Trp		G
	C	CUU	CCU	CAU His	CGU		U
		CUC Leu	CCC Pro	CAC	CGC Arg		C
		CUA	CCA	CAA Gln	CGA		A
		CUG	CCG	CAG	CGG		G
	A	AUU	ACU	AAU Asn	AGU Ser		U
		AUC Ile	ACC Thr	AAC	AGC		C
		AUA	ACA	AAA Lys	AGA Arg		A
		AUG Met	ACG	AAG	AGG		G
	G	GUU	GCU	GAU Asp	GGU		U
		GUC Val	GCC Ala	GAC	GGC Gly		C
		GUA	GCA	GAA Glu	GGA		A
		GUG	GCG	GAG	GGG		G

Εικόνα 1.4.1.: Τα αμινοξέα που αντιστοιχούν σε κάθε κωδικόνιο mRNA. Πολλαπλά κωδικόνια μπορούν να κωδικοποιήσουν το ίδιο αμινοξύ (Clansy S., & Brown, W., 2008)

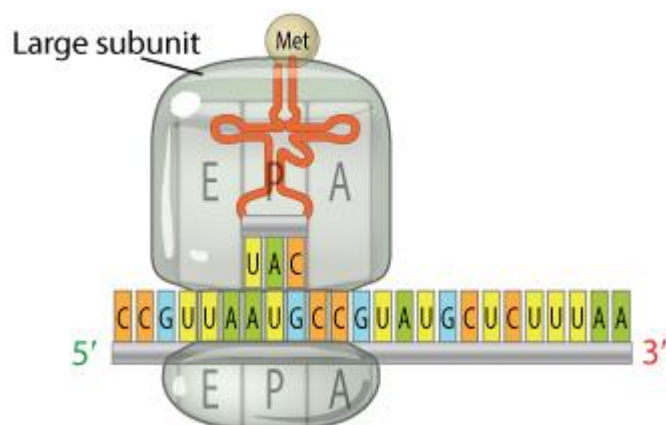
Είναι ενδιαφέρον ότι δεν αντιστοιχούν όλες οι περιοχές ενός μορίου mRNA σε συγκεκριμένα αμινοξέα. Συγκεκριμένα, υπάρχει μια περιοχή κοντά στο 5' άκρο του μορίου που είναι γνωστή ως αμετάφραστη περιοχή (UTR) ή αλληλουχία οδηγός. Αυτό το τμήμα του mRNA βρίσκεται μεταξύ του πρώτου νουκλεοτιδίου που μεταγράφεται και του κωδικονίου έναρξης (AUG) της κωδικεύουσας περιοχής και δεν συμμετέχει στην αλληλουχία των αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη. Η μετάφραση του mRNA ξεκινά με το σχηματισμό ενός συμπλόκου στο mRNA- μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας (Εικόνα 1.4.2). Πρώτον, τρεις πρωτεΐνες που δρουν ως παράγοντας έναρξης (γνωστές ως IF1, IF2 και IF3) συνδέονται με τη μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος. Αυτό το σύμπλοκο προεκκίνησης και ένα tRNA που φέρει μεθειονίνη στη συνέχεια συνδέονται με το mRNA, κοντά στο κωδικόνιο έναρξης AUG, σχηματίζοντας το σύμπλοκο έναρξης.



Εικόνα 1.4.2: Το σύμπλεγμα έναρξης μετάφρασης

Αν και η μεθειονίνη (Met) είναι το πρώτο αμινοξύ σε οποιαδήποτε νέα πρωτεΐνη, δεν είναι πάντα το πρώτο αμινοξύ σε ώριμες πρωτεΐνες. Σε πολλές πρωτεΐνες, η μεθειονίνη αφαιρείται μεταμεταφραστικά. Στην πραγματικότητα, εάν ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών αναλυθεί σε αλληλουχία και συγκριθεί με τις γνωστές τους γονιδιακές αλληλουχίες, η μεθειονίνη (ή φορμυλομεθειονίνη) εμφανίζεται στο N-άκρο όλων αυτών. Ωστόσο, το δεύτερο αμινοξύ επηρεάζει το εάν η αρχική μεθειονίνη αφαιρείται ενζυματικά. Για παράδειγμα, πολλές πρωτεΐνες ξεκινούν με μεθειονίνη ακολουθούμενη από αλανίνη. Τόσο στους προκαρυωτικούς όσο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς απομακρύνεται η μεθειονίνη, έτσι ώστε η αλανίνη να γίνει το N-τερματικό αμινοξύ. Ωστόσο, εάν το δεύτερο αμινοξύ είναι η λυσίνη, κάτι που συμβαίνει επίσης συχνά, η μεθειονίνη συνήθως δεν αφαιρείται.

Μόλις σχηματιστεί το προεναρκτήριο σύμπλοκο, συνδέεται η μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα, γεγονός που προκαλεί την απελευθέρωση των IFs. Η μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος έχει τρεις θέσεις στις οποίες μπορούν να συνδεθούν τα μόρια tRNA. Η θέση A (αμινοξύ) είναι η θέση στην οποία η βάση αντικωδικονίου-αμινοακυλ-tRNA ζευγαρώνει με το κωδικόνιο mRNA, διασφαλίζοντας ότι το σωστό αμινοξύ προστίθεται στην αναπτυσσόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα. Η θέση P (πολυπεπτίδιο) είναι η θέση στην οποία το αμινοξύ μεταφέρεται από το tRNA του στην αναπτυσσόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα. Τέλος, η θέση E (έξοδος) είναι η θέση από την οποία εξέρχεται το απακυλιωμένο tRNA στο κυτταρόπλασμα. Το tRNA έναρξης της μεθειονίνης είναι το μόνο αμινοακυλο-tRNA που μπορεί να συνδεθεί στη θέση P του ριβοσώματος και η θέση A ευθυγραμμίζεται με το δεύτερο κωδικόνιο mRNA. Το ριβόσωμα είναι έτσι έτοιμο να δεσμεύσει το δεύτερο αμινοακυλο-tRNA στη θέση A, το οποίο θα ενωθεί με τη μεθειονίνη εκκινητή με τον πρώτο πεπτιδικό δεσμό (Clancy, S. & Brown, W., 2008).



Εικόνα 1.4.3.: Η μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα συνδέεται με τη μικρή ριβοσωματική υπομονάδα για να ολοκληρωθεί το σύμπλεγμα έναρξης

Η επόμενη φάση στη μετάφραση είναι γνωστή ως η φάση επιμήκυνσης. Πρώτον, το ριβόσωμα κινείται κατά μήκος του mRNA στην κατεύθυνση 5'-προς-3', η οποία απαιτεί τον παράγοντα επιμήκυνσης G, σε μια διαδικασία που ονομάζεται μετατόπιση. Το tRNA που αντιστοιχεί στο δεύτερο κωδικόνιο μπορεί στη συνέχεια να συνδεθεί στη θέση A, ένα βήμα που απαιτεί παράγοντες επιμήκυνσης (στην *E. coli*, αυτοί ονομάζονται EF-Tu και EF-Ts), καθώς και τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP) ως πηγή ενέργειας για τη διαδικασία.

Στη συνέχεια, σχηματίζονται πεπτιδικοί δεσμοί μεταξύ του γειτονικού πρώτου και δεύτερου αμινοξέος μέσω της δραστηριότητας μιας πεπτιδυλ-τρανσφεράσης. Αφού σχηματιστεί ο πεπτιδικός δεσμός, το ριβόσωμα μετατοπίζεται, αναγκάζοντας έτσι το tRNA να καταλάβει τη θέση E. Το tRNA στη συνέχεια απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα για να συνδεθεί με ένα άλλο αμινοξύ. Επιπλέον, η θέση A είναι τώρα άδεια και έτοιμη να λάβει το tRNA για το επόμενο κωδικόνιο. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου το ριβόσωμα συναντήσει ένα κωδικόνιο τερματισμού.

Υπάρχουν τρία κωδικόνια τερματισμού, το UAA, το UAG και το UGA τα οποία δεν είναι συμπληρωματικά για κανένα αντικωδικόνιο των tRNA. Έτσι, τερματίζεται η σύνθεση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Διάφοροι παράγοντες απελευθέρωσης, δεσμεύονται και διευκολύνουν την απελευθέρωση του mRNA από το ριβόσωμα και την επακόλουθη διάσπαση του ριβοσώματος.

Η διαδικασία της μετάφρασης είναι παρόμοια σε προκαρυώτες και ευκαρυώτες. Αν και χρησιμοποιούνται διαφορετικοί παράγοντες επιμήκυνσης, έναρξης και τερματισμού, ο γενετικός κώδικας είναι γενικά πανομοιότυπος. Όπως σημειώθηκε προηγουμένως, στα βακτήρια, η μεταγραφή και η μετάφραση λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα και τα mRNA είναι σχετικά βραχύβια. Στους ευκαρυώτες, ωστόσο, τα mRNA έχουν πολύ μεταβλητούς χρόνους ημιζωής, υπόκεινται σε τροποποιήσεις και πρέπει να εξέλθουν από τον πυρήνα για να μεταφραστούν. Αυτά τα πολλαπλά στάδια προσφέρουν πρόσθετες ευκαιρίες για τη ρύθμιση των επιπέδων παραγωγής πρωτεϊνών και, ως εκ τούτου, τη βελτίωση της γονιδιακής έκφρασης (Clancy, S & Brown W., 2008) .

1.5. Μάτισμα

Η ανακάλυψη του φαινομένου ότι οι ιογενείς αλληλουχίες αφαιρούνται από ένα προ-mRNA και οι υπόλοιπες αλληλουχίες ενώνονται μεταξύ τους οδήγησε σε μια θεμελιώδη αρχή που διέπει τη βιολογία, γνωστή ως **μάτισμα RNA**. Ο Gilbert πρότεινε για πρώτη φορά την έννοια του εναλλακτικού ματίσματος το 1978, ο οποίος είναι σήμερα ο μηχανισμός που εξηγεί την απόκλιση μεταξύ του αριθμού των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (~25.000) στον άνθρωπο και των >90.000 διαφορετικών πρωτεϊνών που παράγονται πραγματικά. Περισσότερο από το 95% των ανθρώπινων γονιδίων έχει βρεθεί ότι υφίστανται μάτισμα κατά τρόπο αναπτυξιακό, ιστοειδικό ή εξαρτώμενο από τη μεταγωγή σήματος (WangY., et. Al., 2014).

Για τα περισσότερα ευκαρυωτικά γονίδια (και μερικά προκαρυωτικά), το νεοσυντιθέμενο mRNA πρέπει να υποβληθεί σε επεξεργασία πριν γίνει ένα ώριμο αγγελιαφόρο RNA (mRNA). Ένα από τα στάδια αυτής της επεξεργασίας είναι το **μάτισμα RNA** και περιλαμβάνει την αφαίρεση ορισμένων αλληλουχιών που αναφέρονται ως παρεμβλλόμενες αλληλουχίες ή ιντρόνια. Το τελικό mRNA αποτελείται επομένως από τις υπόλοιπες αλληλουχίες, που ονομάζονται εξόνια, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους μέσω της διαδικασίας ματίσματος.

Ο βιοχημικός μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει το μάτισμα έχει μελετηθεί σε διάφορα συστήματα και τώρα έχει αρκετά καλά χαρακτηριστεί. Τα εσώνια αφαιρούνται από τα πρωτεύοντα μεταγραφήματα με διάσπαση σε διατηρημένες αλληλουχίες που ονομάζονται θέσεις ματίσματος. Αυτές οι θέσεις βρίσκονται στα άκρα 5' και 3' των εσώνων.

Το μάτισμα λαμβάνει χώρα σε διάφορα στάδια και καταλύεται από μικρές πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (snRNPs). Εκτός από τα κλασικά ιντρόνια, ταυτοποιήθηκαν δύο άλλες κατηγορίες ιντρονίων που μπορούν να αφαιρεθούν με αυτοκαταλυτικό τρόπο. Αυτός ο τύπος ματίσματος ονομάζεται **αυτό-μάτισμα** και πραγματοποιείται από την ενζυμική ικανότητα των αλληλουχιών RNA ιντρονίων. Τα αυτοσυνδυαζόμενα εσώνια ταξινομούνται σε δύο ομάδες που ορίζονται ως ιντρόνια της ομάδας I και της ομάδας II. Αν και οι δομές τους είναι αρκετά διαφορετικές, η καταλυτική περιοχή και ο μηχανισμός ματίσματος των ιντρονίων της ομάδας II μοιράζονται ομοιότητες με εκείνες του σωμάτιου συναρμογής. Τα ιντρόνια του ματίσματος και της ομάδας II έχουν προταθεί ότι έχουν εξελιχθεί από ένα κοινό προγονικό αυτοσυνδυαζόμενο ιντρόνιο που μοιάζει με τα τρέχοντα ιντρόνια της

ομάδας II. Τα εσώνια της ομάδας I θεωρείται ότι έχουν εξελιχθεί ανεξάρτητα. Η δομή και η λειτουργία των ιντρονίων της ομάδας I έχουν μελετηθεί εκτενώς καθώς το εσώνιο της ομάδας I του *Tetrahymenathermophila* (IntronTetrahymena, Εικόνα 1) ήταν το πρώτο ένζυμο RNA που ανακαλύφθηκε και αποδείχθηκε ότι παρουσίαζε εξαιρετική καταλυτική ικανότητα που υποστηρίζεται από την πολύπλοκη τριτογενή δομή του (UedaT., et. Al.,2023)

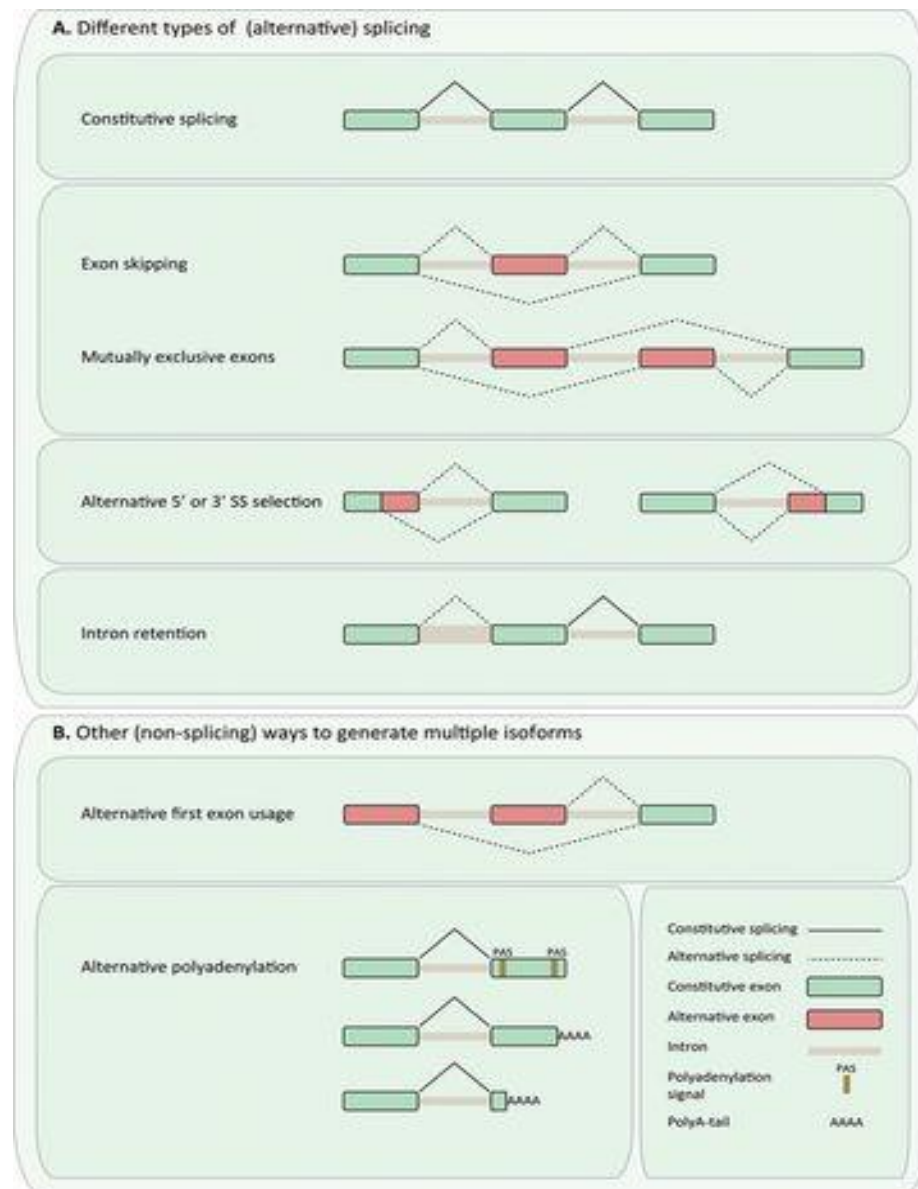
Το **συστατικό μάτισμα** είναι η διαδικασία αφαίρεσης ιντρονίων και απολίνωσης της πλειονότητας των εξονίων με τη σειρά με την οποία εμφανίζονται σε ένα γονίδιο. Το **εναλλακτικό μάτισμα** είναι μια απόκλιση από αυτήν την προτιμώμενη αλληλουχία όπου ορισμένες θέσεις ματίσματος παραλείπονται με αποτέλεσμα διάφορες μορφές ώριμου mRNA. Ασθενέστερα σήματα ματίσματος σε εναλλακτικές θέσεις ματίσματος, μικρότερο μήκος εξονίου ή υψηλότερη διατήρηση αλληλουχίας που περιβάλλει ορθόλογα εναλλακτικά εξόνια επηρεάζουν τα εξόνια που τελικά περιλαμβάνονται στο ώριμο mRNA . Αυτή η διαδικασία διαμεσολαβείται από μια δυναμική και εύκαμπτη μακρομοριακή μηχανή, το σωματίο ματίσματος, το οποίο λειτουργεί με συνεργιστικό τρόπο. Τρεις πιθανοί μηχανισμοί, ανακάτεμα εξονίων, εξωνοποίηση μετατιθέμενων στοιχείων και συστατικά ματισμένα εξόνια, έχουν προταθεί για την προέλευση του εναλλακτικού ματίσματος (WangY. et. Al., 2014).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν επαναλάβει τον κρίσιμο και θεμελιώδη ρόλο του εναλλακτικού ματίσματος στα βιολογικά συστήματα. Το **εναλλακτικό μάτισμα (AS)** είναι ένας από τους κύριους κινητήρες που οδηγούν την ποικιλομορφία των πρωτευνόντων και εκτιμάται ότι έως και το 94% των γονιδίων εναλλακτικά ματίζονται στον άνθρωπο. Το εναλλακτικό μάτισμα εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες όπως κατά τη διάρκεια της κυτταρικής ανάπτυξης, διαφοροποίησης και ανάπτυξης ιστών (OlteanS. &BatesD., 2014). Τα είδη των ανώτερων ευκαρυωτών έχουν ανακαλυφθεί ότι παρουσιάζουν υψηλότερη αναλογία εναλλακτικά ματισμένων γονιδίων, κάτι που αποτελεί υποκείμενη ένδειξη ενός εξέχοντος ρόλου του μηχανισμού στην εξέλιξη. Το εναλλακτικό μάτισμα μεσολαβεί σε διάφορες βιολογικές διεργασίες καθ' όλη τη διάρκεια ζωής των οργανισμών. Το συντηρημένο μάτισμα σε ειδο-ειδικές παραλλαγές παίζει σημαντικό λειτουργικό ρόλο στη διαφοροποίηση των ειδών και στην εξέλιξη του γονιδιώματος. Το εναλλακτικό μάτισμα είναι μέρος της επεξεργασίας του RNA, από τα προ- έως τα μετα- μεταγραφικά στάδια. Έτσι, το εναλλακτικό μάτισμα παίζει ρόλο σχεδόν σε κάθε

πτυχή της πρωτεϊνικής λειτουργίας. Συνολικά, το εναλλακτικό μάτισμα είναι ένα κεντρικό στοιχείο στη γονιδιακή έκφραση (Wang Y., et. Al., 2014).

Τέσσερις τρόποι εναλλακτικού ματίσματος παρατηρούνται γενικά:

- (1) παράκαμψη εξονίου,
- (2) αμοιβαία αποκλειστική χρήση εξονίων,
- (3) επιλογή εναλλακτικής θέσης ματίσματος και
- (4) διατήρηση ιντρονίων .



Εικόνα 1.5: Διαφορετικοί τύποι εναλλακτικού ματίσματος (Maarten M.G. vandenHoogenhof, et. al., 2016)

Η παράκαμψη εξονίου, η πιο διαδεδομένη μορφή εναλλακτικού ματίσματος σε ανώτερους ευκαρυώτες, υποδηλώνει την εκτομή ≥ 1 εξονίων και των

περιβαλλόντων εσωνίων του από ένα προ-mRNA. Η αμοιβαία αποκλειστική χρήση εξονίων αντιπροσωπεύει μια μορφή παράλειψης εξονίων όπου είτε το ένα είτε το άλλο εξόνιο, αλλά ποτέ και τα δύο, περιλαμβάνεται στο ώριμο mRNA. Η εναλλακτική επιλογή θέσης ματίσματος βασίζεται στη δυνατότητα χρήσης διαφορετικών θέσεων ματίσματος στο 5' και 3' άκρο ενός εξονίου, με αποτέλεσμα μακρύτερα ή μικρότερα εξόνια από το ίδιο μετάγραφο. Η τελευταία μορφή είναι η διατήρηση ιντρονίου, μια διαδικασία κατά την οποία (μέρος) ενός ιντρονίου διατηρείται στο ώριμο mRNA.

1.6 Αποδενυλάσεις

Ο έλεγχος της διάσπασης του mRNA είναι ένα θεμελιώδες βήμα για τον προσδιορισμό της ποσότητας της πρωτεΐνης που παράγεται από το mRNA μέσω της μετάφρασης και η διάσπαση του mRNA συνδέεται στενά και ρυθμίζεται από τη μετάφραση. Στους ευκαρυώτες, η αποικοδόμηση των περισσότερων mRNAs ξεκινά με τη βράχυνση της πολυ(A)-ουράς στο 3' άκρο, η οποία ακολουθείται από δύο γενικές οδούς: το 5'-προς-3' και το 3'-προς-5' εξωνουκλεολυτικό μονοπάτι αποικοδόμησης. Η διαδικασία βράχυνσης της ουράς πολυ(A), που αναφέρεται ως αποαδενυλίωση, είναι το πρώτο, ταχέο-περιοριστικό και πιο αποτελεσματικό βήμα στον έλεγχο της αποικοδόμησης του mRNA (FunakoshiY, et. Al., 2007). Αυτή η διαδικασία καταλύεται από τα ένζυμα απαδενυλίωσης. Ταξινομούνται σε 2 υπεροικογένειες, την DEDD και την εξωνουκλεάση-ενδονουκλεάση-φωσφατάση (EEP). Η υπεροικογένεια DEDD περιλαμβάνει τις οικογένειες POP2, πολυ(A)-ειδική ριβονουκλεάση (PARN), CAF1Z και PAB-εξαρτώμενη από πολυ(A)-ειδική υπομονάδα ριβονουκλεάσης 2 (PAN2). Από την άλλη πλευρά η υπεροικογένεια EEP περιλαμβάνει τις οικογένειες καταστολέα άνθρακα 4 (CCR4), Νοκτουρνίνη, ANGEL και 2' φωσφοδιεστεράση (2'PDE) (Pavlopoulou et al., 2013)

Τα 3' άκρα όλων των mRNA εκτός από τα mRNA των ιστονών περιέχουν μια ουρά πολυ(A). Το μήκος της ουράς πολυ(A) παίζει κρίσιμο ρόλο στον προσδιορισμό της σταθερότητας του mRNA και της αποτελεσματικότητας της μετάφρασης. Οι ουρές πολυ(A) των νεοσυντιθέμενων mRNA που εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα έχουν μήκος 200–250 νουκλεοτίδια (nt). Οι ουρές πολυ(A) στη συνέχεια υφίστανται αποαδενυλίωση με διαφορετικούς ρυθμούς μέχρι το μήκος τους να φτάσει τους 10-60

nt .Η πρόσφατη ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός τουλάχιστον οκτώ διακριτών αποαδενυλασών σε μεταζώα υπογραμμίζει τις ποικίλες βιολογικές λειτουργίες των αποαδενυλασών και συνεπώς της αποαδενυλίωσης στη γονιδιακή ρύθμιση. (ChenCY&Shyu AB, 2013).

Δεδομένου ότι η αποαδενυλίωση είναι το περιοριστικό βήμα για τη διάσπαση του mRNA, οι ενζυματικές δραστηριότητες των δύο υπεροικογενειών αποαδενυλασών αποτελούν κύριο στόχο για τον έλεγχο της διάσπασης του mRNA. Πλήθος δεδομένων έχει αποκαλύψει μια άμεση σχέση μεταξύ του τερματισμού της μετάφρασης και της αποικοδόμησης του mRNA (Funakoshi Y, et. Al., 2007).

1.7. Πολυ(A) ριβονουκλεάση - Poly(A)-specific ribonuclease (PARN)

Η πολυ(A) ειδική ριβονουκλεάση(PARN) είναι μια εξοριβονουκλεάση που εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους ιστούς των ευκαρυωτικών οργανισμών. Είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με την ουρά πολυ(A) του mRNA και θεωρείται σημαντική ριβονουκλεάση λόγω του κεντρικού της ρόλου στην αποικοδόμηση του mRNA. Ένα από τα πιο σημαντικά παραδείγματα μεταφραστικής αποσιώπησης που συμβαίνει κατά την ωρίμανση και την ανάπτυξη των ωαρίων είναι όταν η ουρά πολυ(A) αφαιρείται από τα μητρικά mRNA. Η PARN είναι μοναδική μεταξύ των ριβονουκλεασών λόγω της ασυνήθιστης ικανότητάς της να αλληλοεπιδρά με το άκρο 5' και την ουρά πολυ(A) των mRNAs. Η αλληλεπίδραση της PARN με το 5'-άκρο του mRNA πιστεύεται ότι ενισχύει τον ρυθμό αποικοδόμησης του mRNA.

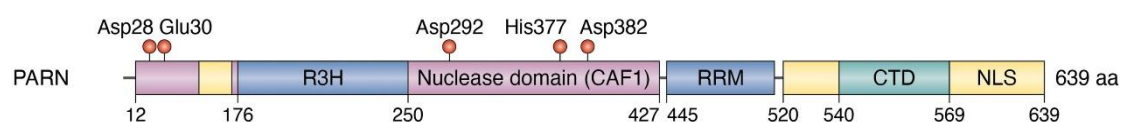
Η PARN ανήκει στην οικογένεια νουκλεασών DEDD (Death effect domain που περιέχει σύνδεση DNA), η οποία συνδέεται με ένα δισθενές μεταλλικό ιόν και περιέχει δύο περιοχές πρόσδεσης στο RNA, την περοχή R3H και την περιοχή RRM (Nanjappa, D. P., et. Al., 2021). Συνοπτικά, είναι μια εξαρτώμενη από ιόντα δισθενούς πολυ(A)-ειδική, διεργατική και αλληλεπιδρούσα με καλύπτρα 3'-5' εξοριβονουκλεάση που αποικοδομεί αποτελεσματικά τις ουρές πολυ(A) των ευκαρυωτικών mRNAs.

Η επιτυχής κλωνοποίηση του ανθρώπινου (hPARN) και του *X. laevis* PARN (xPARN) αποκάλυψε ότι αποτελούνται από 639 αμινοξέα (προβλεπόμενο μοριακό βάρος 73,5 kDa) και 631 αμινοξέα αντίστοιχα. Οι αλληλουχίες των δύο

πολυπεπτιδίων μοιράζονται μια συνολική ταυτότητα 72% σε επίπεδο αμινοξέων αλλά οι C-τερματικές περιοχές τους είναι λιγότερο καλά διατηρημένες. Η χαμηλότερη διατήρηση της C τερματικής περιοχής φαίνεται να είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ των ομόλογων PARN και παρατηρείται εύκολα εάν συγκριθούν εξελικτικά τα απομακρυσμένα πολυπεπτίδια PARN στο επίπεδο αλληλουχίας αμινοξέων, π.χ. κατά τη σύγκριση του hPARN με την PARN από τα κουνούπια *Aedes aegypti* ή *Anopheles gambiae*.

Η PARN αποτελείται από τρεις επικράτειες (Huynh, T. N., & Parker, R., 2023):

- 1) την περιοχή μοτίβου αναγνώρισης RNA (RRM) που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του ενζύμου στην πολύ (A) ουρά και την 5' καλύπτρα την περιοχή νουκλεάσης,
- 2) στην περιοχή της νουκλεάσης υπάρχουν τέσσερα διατηρημένα κατάλοιπα (Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382) τα οποία είναι απαραίτητα για την καταλυτική δράση της PARN και απαιτούνται για τη σύνδεση δισθενών ιόντων μετάλλων
- 3) και την περιοχή R3H είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του ενζύμου στην πολύ (A) ουρά



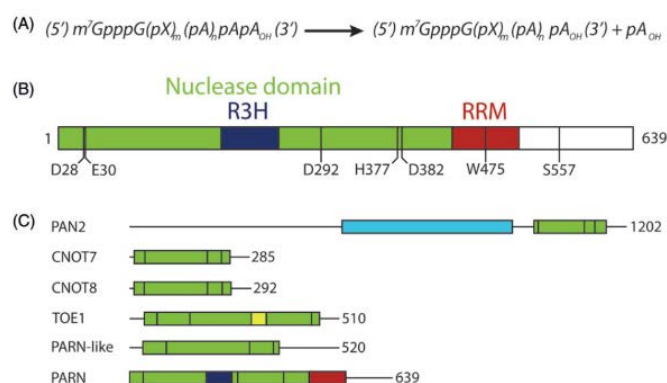
Σχεδιάγραμμα 1.7 : Σχηματική απεικόνιση των τομέων του PARN (Huynh, T. N., & Parker, R., 2023)

1.7.1. Βιοχημικός ρόλος PARN

Η PARN είναι μια πολυ(A) ειδική ριβονουκλεάση, που αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά σε εκχυλίσματα ωοκυττάρων *Xenopus*. Αφαιρεί τις ουρές πολυ(A) από τα RNA και απελευθερώνει το 5' AMP ως προϊόν αντίδρασης. Προτείνεται ότι το ομοδιμερές της PARN λειτουργεί ως δομική και λειτουργική μονάδα διότι από την υποκατάσταση των Ile113, Phe123 ή Phe127, σημαντικών καταλοίπων για ομοδιμερισμό, παρατηρείται αδρανοποίηση ή σημαντικά μειωμένη δραστηριότητα της

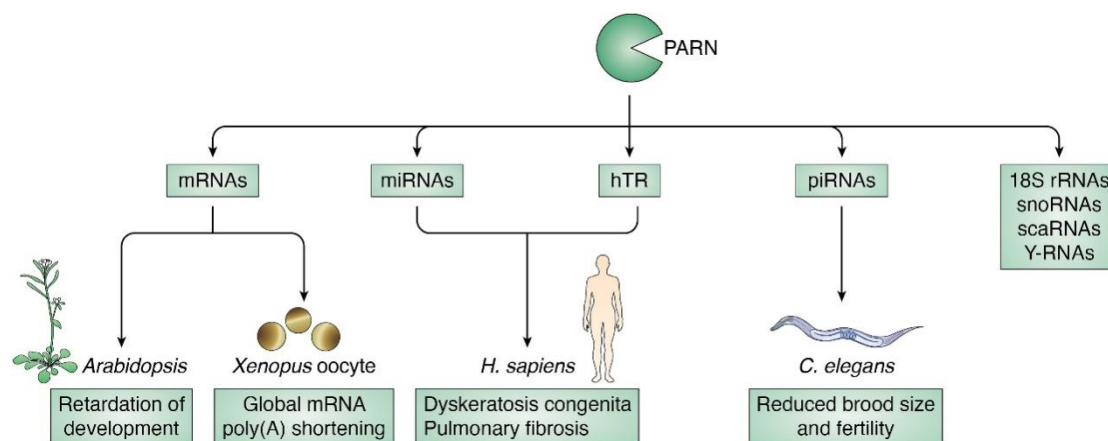
PARN. HPARN έχει αποδειχθεί ότι διασπά κατά προτίμηση ένα υπόστρωμα πολυ(A) με μια ελεύθερη ομάδα 3'-OH. Αυτό το συμπέρασμα υποστηρίχθηκε από την κρυσταλλική δομή που δείχνει ότι το Glu30 αλληλοεπιδρά ειδικά με την 3' υδροξυλομάδα της ριβόζης (PDBID 2A1R). Αυτή η παρατήρηση πρότεινε ότι το Glu30 μπορεί να δρα και ως καταλυτικό υπόλειμμα και επίσης να προσδίδει ειδικότητα για την αναγνώριση της ουράς πολυ(A) 3'.

Μεταξύ όλων των αποαδενυλασών, η PARN είναι μοναδική καθώς μπορεί να δεσμεύσει τόσο τη δομή του καλύμματος όσο και την ουρά πολυ(A) κατά τη διάρκεια της αποαδενυλίωσης. Η PARN αναγνωρίζει και δεσμεύει το m7GpppG μέσω του καταλοίπου Trp στην περιοχή RRM (Trp475 στον άνθρωπο και Trp468 στον ποντικό) ενώ ο τομέας R3H βοηθά στη σταθεροποίηση της PARN. Η δραστηριότητα της PARN ήταν υψηλότερη κατά την επεξεργασία του RNA με δομή 5'-καλύπτρας σε σύγκριση με υποστρώματα RNA χωρίς καλύπτρα και η προσθήκη ελεύθερου ανάλογου καλύπτρας m7GpppG ανέστειλε την αποικοδόμηση του πολυ(A) *in vitro*, υποδηλώνοντας ότι η αφαίρεση της ουράς πολυ(A) συνδέεται με τη δομή 5'-καλύμματος των υποστρωμάτων RNA. Μια ασαφής λειτουργική ιδιότητα της PARN είναι η ειδικότητά της για τις ουρές πολυ(A). Βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η PARN αποικοδομεί το πολυ(A) πιο αποτελεσματικά και το πολυ(U) υπό ορισμένες συνθήκες, αλλά ουσιαστικά δεν έχει δραστηριότητα στο πολυ(C) ή το πολυ(G). Ο τρόπος με τον οποίο η PARN επιτυγχάνει την εξειδίκευση για το πολυ(A) είναι ασαφής καθώς δεν υπάρχουν αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου μεταξύ των καταλοίπων αδερίνης και του ενζύμου (PDB ID 2A1R). Είναι ενδιαφέρον ότι το ένζυμο Pan2 σε σύμπλοκο με RNA επίσης δεν εμφανίζει κανονικές επαφές ειδικές ως προς συγκεκριμένα κατάλοιπα βάσεων (PDB ID 6R9O) και αντ' αυτού επιτυγχάνει εξειδίκευση ως προς την ουρά πολυ(A) μέσω ενδογενούς στοιβαγμένης, ελικοειδούς διάταξης του RNA. Αυτό υποδηλώνει ότι αντί για τους κανονικούς μηχανισμούς αναγνώρισης ειδικών αλληλουχιών στο RNA, η PARN μπορεί να χρησιμοποιήσει έναν μηχανισμό που βασίζεται στη δομή των RNA παρόμοιο με το Pan2 για να επιτύχει εξειδίκευση για ουρές πολυ(A).



Σχεδιάγραμμα 1.7.1.: Το μονοπάτι της αντίδρασης για την αποικοδόμηση του πολυ(A) που προκαλείται από PARN (Virtanen A., et. Al., 2013).

Πρόσφατες μελέτες έχουν εντοπίσει αρκετούς στόχους της PARN. Αν και η PARN ήταν ύποπτη ως βασικός ρυθμιστής για τα mRNA λόγω της προτίμησής του για τη m7G-καλύπτρα και του ρόλου της στη βράχυνση της ουράς πολυ(A) κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του ωοκυττάρου στον *Xenopus*, η PARN αποδείχθηκε ότι εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα και επεξεργάζεται άκρο 3' μη κωδικών RNAs, όπως 18S rRNA, snoRNA, hTR, scaRNA, piRNA, Y RNA και miRNA (Huynh N.T. & Roy P., 2023).



Εικόνα 1.7.1: Υποστρώματα PARN και σχετιζόμενων με PARN φαινοτύπων. Η PARN αφαιρεί τις ουρές πολυ(A) από mRNA, miRNA, hTR, piRNA, 18S rRNA, snoRNA, scaRNA και Y RNA. Τα μεταλλάγματα PARN παρουσιάζουν απορύθμιση αυτών των RNA και οδηγούν σε αναπτυξιακά ελαττώματα σε ανώτερα φυτά, στο ψάρι-ζέβρα, *C.elegans* και δυσκεράτωση και πνευμονική ίνωση στον άνθρωπο (Huynh N.T. & Roy P., 2023).

Η PARN παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη (Εικόνα 1.7.1). Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις της PARN σε έμβρυα ανώτερων φυτών εμφάνισαν αναπτυξιακά ελαττώματα, τα οποία έχουν προταθεί ότι οφείλονται σε αποτυχία

αφαίρεσης των ουρών πολυ(A) 3' σε συγκεκριμένα υποσύνολα mRNA. Στο *C. elegans*, τα μεταλλάγματα της PARN εμφανίζουν μειωμένο μέγεθος γόνου και γονιμότητα σε σύγκριση με ζώα άγριου τύπου και συσσωρευμένα, μη επεξεργασμένα piRNA με επιπλέον κατάλοιπα στο άκρο 3'. Κατά την ωρίμανση του ωοκυττάρου *Xenopus*, η PARN αποδείχθηκε ότι προκαλεί ολική βράχυνση των ουρών πολυ(A). Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι η δραστηριότητα της απαδενυλάσης PARN είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη διαφόρων ειδών.

1.7.2. Parn και ασθένειες

Η πολυ(A)-ειδική ριβονουκλεάση (PARN) είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη διαδικασία της αποαδενυλίωσης. Αν και η PARN είναι κυρίως γνωστή ως ο ρυθμιστής της σταθερότητας του mRNA, πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν σαφώς αρκετές άλλες λειτουργίες της PARN, συμπεριλαμβανομένου του ρόλου του στην εμβρυογένεση, την ωρίμανση των ωαρίων, την προώθηση του κυτταρικού κύκλου, τη βιολογία των τελομερών, την ωρίμανση μη κωδικοποιητικών RNA και τη βιογένεση των ριβοσωμάτων. Η απορυθμισμένη δραστηριότητα της PARN αποδεικνύεται ότι είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα συγκεκριμένων παθήσεων. Παθογόνες παραλλαγές στο γονίδιο PARN έχουν παρατηρηθεί σε διάφορους καρκίνους και σε σύνδρομο κληρονομικής ανεπάρκειας μυελού των οστών (Nanjappa, D. P., et. Al., 2021).

Γίνεται πλέον όλο και πιο σαφές ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της τροποποιημένης ρύθμισης του mRNA και του καρκίνου. Για παράδειγμα, η μειωμένη δραστηριότητα RNAsών που συσχετίζονται με τη σταθερότητα ογκογόνων mRNAs ή η ενισχυμένη δραστηριότητα των RNAsών που είναι ειδικές για ογκοκατασταλτικά mRNA μπορεί άμεσα να οδηγήσει σε ανώμαλη ανακύκλωση ή υπερέκφραση, συμβάλλοντας έτσι στην κακοήθεια. Πράγματι, αρκετές RNάσες θεωρείται τώρα ότι έχουν ρόλους κατασταλτικού ή/και ογκοκατασταλτικού ρόλου. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η PARN εμπλέκεται στο πρώτο στάδιο της αποικοδόμησης του mRNA, δηλαδή στην αφαίρεση της ουράς πολυ(A), η διερεύνηση της έκφρασης της PARN έχει κλινική σημασία στον καρκίνο. Είναι ενδιαφέρον ότι η έκφραση της PARN είναι ανώμαλη σε πολλούς τύπους καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων των συμπαγών όγκων και των κακοηθειών του αιμοποιητικού. Επιπρόσθετα, η PARN έχει αποδειχθεί ότι

ρυθμίζει τη σταθερότητα των mRNA που εμπλέκονται στην απόκριση βλάβης στο DNA.

1.8. Εναλλακτικό μετάγραφο της PARN (PARN_v1)

Σε προηγούμενες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί το εργαστήριο έχει αποδειχτεί ότι η PARN εμφανίζει διαφορετική έκφραση στο άκανθο κυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα και επηρεάζει γονιδιακές οντολογίες που ελέγχουν την κυτταρική προσκόλληση, τις διακυτταρικές συνδέσεις και τη μυϊκή συστολή. Οι Antonopoulos, Politiet. al., διερεύνησαν την έκφραση της PARN στο κακόηθες μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα (PMM), έναν επιθετικό τύπο καρκίνου του πνεύμονα που έχει ισχυρή συσχέτιση με την έκθεση στον αμίαντο. Εντοπίστηκε μια προηγουμένως μη χαρακτηρισμένη παραλλαγή ματίσματος της PARN, η PARN_v1, που εκφράζεται σε κυτταρικές σειρές M14K, MSTO και ZL34 που προέρχονται και από τους τρεις υποτύπους PMM: σαρκοματοειδής, διφασικός και επιθηλιοειδής, αντίστοιχα. Το mRNA της PARN_v1 στερείται μιας περιοχής στο εξόνιο 1 που περιλαμβάνει μέρος της 5'-αμετάφραστης περιοχής και τμήματος του αμινοτελικού άκρου του ενζύμου, συμπεριλαμβανομένου και του κωδικονίου έναρξης. Η παραλλαγή ακολουθεί διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στο PMM: οι πιο επιθετικοί υπότυποι εκφράζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα της παραλλαγής, ενώ ήταν μόλις ανιχνεύσιμη σε κύτταρα MET-5A από μη παθολογικό υπεζωκοτικό επιθήλιο. Οι αναλύσεις στυπώματος Western αποκάλυψαν μία ζώνη που αντιστοιχεί στην PARN_v1, υποδηλώνοντας έτσι ρυθμιστικούς ρόλους της δραστηριότητας της PARN. Αυτά τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν μια νέα παραλλαγή ματίσματος της PARN στο PMM και προτείνουν έναν μηχανισμό για τη ρύθμιση της δραστηριότητας, παρέχοντας έτσι τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζει την έκφραση γονιδίων στον καρκίνο του πνεύμονα.

1.9. Σκοπός της εργασίας

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε ο ρόλος του εναλλακτικού μεταγράφου PARN_v1 στην κυτταρική σειρά πνευμονικών ινοβλαστών MRC5. Πραγματοποιήθηκε αποσιώπιση του γονιδίου με ειδικά για την PARN shRNAs και ακολούθησε ανάλυση σε πρωτεϊνικό επίπεδο με φωτομετρία μάζας.

2.0. Υλικά και μέθοδοι

Υλικά:

- Φλάσκες 75cm² (Thermo Fischer Scientific)
- Πιάτα καλλιέργειας κυττάρων έξι φρεατίων (Thermo Fischer Scientific)
- DMEM High Glucose (Biosera)
- FBS – heat inactivated (Biosera)
- Αντιβιοτικό (Am/Ab – Biosera)
- Τρυψίνη 2,5% - EDTA (Biosera)
- Σιφόνια καλλιέργειας (Sarstedt)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της PARN(Abcam)

2.1. Αποκόλληση προσκολλημένων κυττάρων

Τα κύτταρα MRC5 καλλιεργήθηκαν αρχικά σε φλάσκα T75. Όταν έφθασαν να καλύπτουν >90% της επιφάνειας, αφαιρέθηκε και απορρίφθηκε το χρησιμοποιημένο μέσο καλλιέργειας από το δοχείο καλλιέργειας και τα κύτταρα πλύθηκαν με τη βοήθεια ενός ισορροπημένου διαλύματος άλατος χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο (PBS). Η πλύση αφαιρεί τυχόν ίχνη ορού, ασβεστίου και μαγνησίου που θα μπορούσαν να αναστείλουν τη δράση της τρυψίνης.

Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε και απορρίφθηκε το διάλυμα πλύσης από το δοχείο καλλιέργειας και προστέθηκε το προθερμασμένο αντιδραστήριο διάστασης (τρυψίνη). Επώαστηκε το δοχείο καλλιέργειας στους 37°C για περίπου 5 λεπτά. Έπειτα παρατηρήθηκαν τα αποκολλημένα τα κύτταρα με τη βοήθεια του μικροσκοπίου. Εάν τα κύτταρα ήταν <90% αποκολλημένα, τότε αυξάνονταν ο χρόνος επώασης για λίγα

λεπτά ακόμη. Όταν $\geq 90\%$ των κυττάρων είχαν αποκολληθεί τότε προστίθεται το ισοδύναμο 4 όγκων προθερμασμένου πλήρους μέσου ανάπτυξης. Με τη βοήθεια μιας πιπέτας διασκορπίστηκε το μέσο πάνω από την επιφάνεια του κυτταρικού στρώματος αρκετές φορές.

Έπειτα, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε κωνικό σωλήνα 15 mL και φυγοκεντρήθηκαν τα στα 200 g για 5-10 λεπτά. Το ίζημα κυττάρων επαναιωρήθηκε σε ελάχιστο όγκο προθερμασμένου πλήρους μέσου ανάπτυξης και αφαιρέθηκε ένα δείγμα για μέτρηση των κυττάρων. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε ο συνολικός αριθμός των κυττάρων και το % βιωσιμότητας χρησιμοποιώντας μία πλάκα Neubauer. Προστέθηκε το μέσο ανάπτυξης στα κύτταρα ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση κυττάρων ($0,3 \times 10^6$ κύτταρα/mL). Τέλος τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτο έξι φρεατίων.

3. Western Blotting

Αρχικά γίνεται λύση των κυττάρων ώστε να γίνει εκχύλιση των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες θα πρέπει να διαχωριστούν μεταξύ τους με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης. Για να καταστραφεί η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών, γίνεται υπό μετουσιωτικές συνθήκες. Υπάρχει επίσης παρουσία του αποδιατακτικού παράγοντα SDS. Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό το οποίο καταστρέφει τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών και δεσμεύεται στις πρωτεΐνες, προσδίδοντας τους μεγάλο αρνητικό φορτίο. Το φορτίο που αποκτά το σύμπλοκο SDS – αποδιαταγμένη πρωτεΐνη είναι μεγαλύτερο από το αρχικό φορτίο της πρωτεΐνης, καθιστώντας το δεύτερο αμελητέο. Έτσι με την μετουσίωση και την δέσμευση του SDS εξασφαλίζεται ότι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται ανάλογα με το μοριακό τους μέγεθος.

Έπειτα, ετοιμάζεται το gel ηλεκτροφόρησης. Έτσι η ηλεκτροφόρηση ετελείται σε πήκτωμα SDS - πολυακρυλαμιδίου. Το πήκτωμα SDS – πολυακρυλαμιδίου αποτελεί, τρισδιάστατο πλέγμα, προϊόν του πολυμερισμού μονομερούς ακρυλαμιδίου σε πολυμερείς αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου διασυνδεδεμένες μεταξύ τους με N,N'-μεθυλενο-δισακρυλαμίδιο. Το ποσοστό πολυακρυλαμιδίου καθορίζει την ικανότητα του διαχωρισμού του gel καθώς και από αυτό εξαρτάται το μέγεθος των

πόρων του πηκτώματος. Στην περίπτωση μας χρησιμοποιήθηκε ένα πήκτωμα 10% το οποίο είναι κατάλληλο για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών μεσαίου μεγέθους.

Η παρασκευή του πηκτώματος γίνεται σε επίπεδη κατακόρυφη μορφή σε σύστημα δυο κάθετων γυάλινων πλακών και αποτελείται από δυο επιμέρους πηκτώματα. Ο όρος ασυνεχής ηλεκτροφόρηση οφείλεται στη διαφορετική σύσταση και το διαφορετικό pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του πηκτώματος SDS πολυακρυλαμιδίου. Πρώτον παρασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού και πάνω από αυτό επιστοιβάζεται ένα πήκτωμα χαμηλότερης συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου, περόπου 3-5% και χαμηλότερου Ph που ονομάζεται πήκτωμα επιστοίβασης. Αρχικά το πρωτεϊνικό δείγμα κατά την ασυνεχή ηλεκτροφόρηση περνά διαμέσω του πηκτώματος επιστοίβασης, το οποίο έχει μεγάλους πόρους και περιέχει ιόντα χλωρίου. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των ιόντων χλωρίου είναι μεγαλύτερη από αυτή των πρωτεϊνών του δείγματος. Όμως, το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιέχει γλυκίνη, της οποίας η κινητικότητα είναι μικρότερη από αυτή των πρωτεϊνών. Έτσι, ο διαφορετικός βαθμός κινητικότητας γλυκίνης και χλωρίου στο πήκτωμα επιστοίβασης οδηγεί στο σχηματισμό μιας ζώνης χαμηλότερης αγωγιμότητας μεταξύ τους. Καθώς και σε συνάρτηση με το χαμηλό ρυθμό εισόδου στο πήκτωμα διαχωρισμού λόγω του μικρότερου μεγέθους πόρων, την υψηλότερη ιοντική συγκέντρωση και το υψηλότερο pH σε σύγκριση με το πήκτωμα επιστοίβασης συντελεί στην επιστοίβαση όλων των πρωτεϊνών στη ζώνη ανάμεσα στα δυο πηκτώματα. Ως αποτέλεσμα λοιπόν όλες οι πρωτεΐνες του εξεταζόμενου δείγματος, εκκινούν από το ίδιο σημείο την είσοδο τους στο πήκτωμα διαχωρισμού, ανεξάρτητα από τις διαφορές στην συγκέντρωση και τον όγκο των πρωτεϊνικών δειγμάτων που φορτώνονται στο πήκτωμα SDS πολυακρυλαμιδίου.

Ωστόσο τα δείγματα φορτώνονται στα φρεάτια και εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο κατά μήκος του gel. Έτσι, οι πρωτεΐνες κατευθύνονται προς το θετικό ηλεκτρόδιο λόγω του αρνητικού τους φορτίου. Οι μικρότερες πρωτεΐνες κινούνται πιο γρήγορα μέσα στο gel ενώ οι μεγαλύτερες κινούνται πιο αργά. Συνεπώς οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κατά μέγεθος μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα καθώς κινούνται μέσα στο gel. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα ξεχωριστό σχέδιο ζωνών με κάθε ζώνη να αντιπροσωπεύει μια πρωτεΐνη συγκεκριμένου μοριακού βάρους.

Επομένως, το επόμενο βήμα είναι η μεταφορά πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μια στερεή μεμβράνη όπως νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη και το

gel τοποθετούνται σε μια στοίβα μεταξύ εμποτισμένων με ρυθμιστικό διάλυμα διηθητικών χαρτιών και η διάταξη συμπιέζεται μεταξύ δυο ηλεκτροδίων. Οι Έτσι δεσμεύονται μη αντιστρεπτά οι πρωτεΐνες στην επιφάνεια της μεμβράνης με μη ομοιοπολικούς δεσμούς.

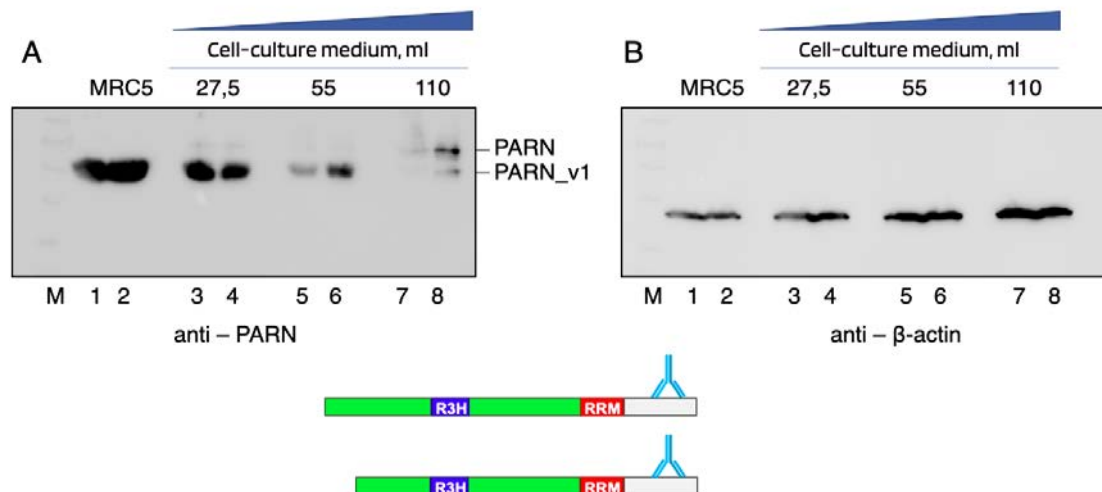
Έπειτα από την μεταφορά των πρωτεϊνών, το σύνολο αυτών είναι προσδεδεμένο στην μεμβράνη. Οι υπόλοιπες θέσης πρόσδεσης πρωτεϊνών στην μεμβράνη καλύπτονται με τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων αποκλεισμού που περιέχουν σκόνη άπαχου γάλακτος.

Στην συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με αντίσωμα έναντι της εξεταζόμενης πρωτεΐνης (πρωτεύον αντίσωμα), το οποίο την εντοπίζει κατά ειδικό τρόπο δεσμεύοντας την. Η μεμβράνη εκπλένεται, μετά την επώαση με διάλυμα έκπλυσης και επωάζεται διαδοχικά με αντίσωμα (δευτερεύον αντίσωμα) έναντι του πρωτεύοντος. Τα δευτερεύοντα αντισώματα που χρησιμοποιούνται αναγνωρίζουν ανοσοσφαιρίνες του είδους προέλευσης του πρωτεύοντος αντισώματος, διασφαλίζοντας έτσι την ειδική πρόσδεση στο πρωτεύον. Όμως, το δευτερεύον αντίσωμα φέρει συζευγμένο ένα ένζυμο, που εκπέμπει φθορισμό και καθίσταται δυνατή η χρωμογόνο ανίχνευση της εξεταζόμενης πρωτεΐνης.

Τέλος, έχοντας ολοκληρώσει την ενζυμική αντίδραση, η μεμβράνη εκτίθεται σε σύστημα ψηφιακής λήψης εικόνας σε σκοτεινό θάλαμο και μέσω εκπομπής φθορισμού ή χημειοφωταύγειας ανιχνεύεται η εξεταζόμενη πρωτεΐνη.

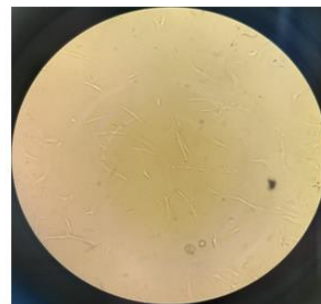
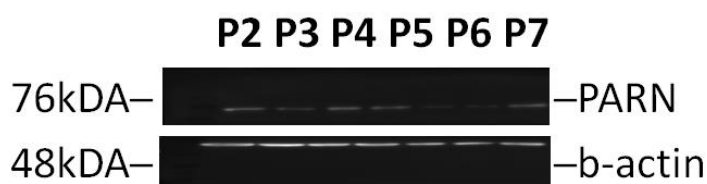
3.1. Αποτελέσματα

Κύτταρα ινοβλαστών MRC5 επωάστηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις εξωσωμάτων. Στην εικόνα φαίνεται ότι απουσία εξωσωμάτων κυριαρχεί εναλλακτική μορφή της PARN_v1 ενώ στην υψηλότερη συγκέντρωση κυριαρχεί κύρια μορφή της PARN.

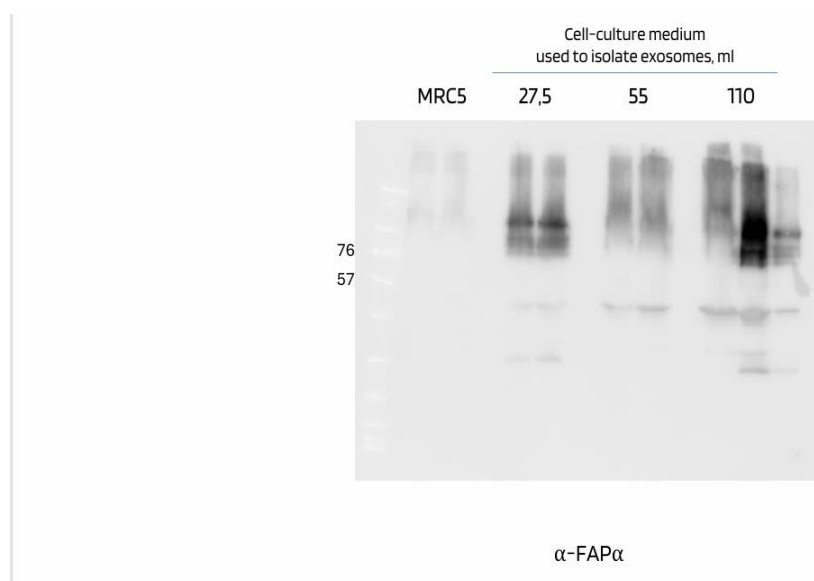


Εικόνα 3.1.: Η επώαση MRC5 με εξωσώματα Mcf7 μειώνει τα επίπεδα PARN_v1 και ενεργοποιεί την έκφραση PARN με δόσεως-εξαρτώμενο τρόπο.

Προσπαθώντας να εξηγήσουμε το φαινόμενο αυτό ελέξαμε την επίδραση της γήρανσης στην παρουσία των μεταφράφων της PARN. Φαίνεται όταν τα κύτταρα MRC5 καλλιεργούνται σε μέσσο που περιέχει FBS, κυριαρχεί η κύρια ισομορφή της PARN ανεξάρτητα από πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων. Αυτό μας ώθησε να ελέξουμε αν η αλλαγή στα μετάγραφα της PARN εξαρτάται από το εάν οι ινοβλάστες βρίσκονται σε κατάσταση εφησυχασμού ή πρόκειται για ενεργοποιημένους ινοβλάστες.



Σαν δείκτης χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη ενεργοποιημένων ινοβλαστών FAP. Στην εικόνα φαίνεται ότι απουσία εξωσωμάτων, οι ινοβλάστες βρίσκονται σε κατάσταση εφησυχασμού και ουσιαστικά δεν ανιχνεύεται η έκφραση της FAP. Αντίθετα όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των εξωσωμάτων τόσο αυξάνεται και η έκφραση της FAP, με αποκορύφωμα την τελευταία διαδρομή που φαίνεται εντονότερο από όλες τις άλλες.



Εικόνα 3.2. Ενεργοποίηση ινοβλαστών, επίπεδα FAPα έκθεση κυττάρων MRC5 σε εξωσώματα από κύτταρα MCF7.

4. Συζήτηση

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η αναλογία των μεταγράφων της PARN σε κύτταρα ινοβλαστών τουλάχιστον εξαρτάται από την ενεργοποιημένη ή όχι κατάσταση των ινοβλαστών. Μελλοντικά στοχεύουμε να διευκρινίσουμε την βιολογική σημασία της εναλλακτικά ματισμένης ισομορφής της PARN.

Βιβλιογραφία

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al, (2002).From DNA to RNA. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science.. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26887/>
2. Chen CY, Shyu AB, (2013). Deadenylation and P-bodies. Adv Exp Med Biol. 768:183-95. doi: 10.1007/978-1-4614-5107-5_11. PMID: 23224971; PMCID: PMC3804309.
3. Clancy, S. & Brown, W. (2008) Translation: DNA to mRNA to Protein. Nature Education 1(1):101
4. Clancy, S. (2008) RNA splicing: introns, exons and spliceosome. Nature Education 1(1):31
5. Funakoshi Y, Doi Y, Hosoda N, Uchida N, Osawa M, Shimada I, Tsujimoto M, Suzuki T, Katada T, Hoshino S. Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. Genes Dev. 2007 Dec 1;21(23):3135-48. doi: 10.1101/gad.1597707. PMID: 18056425; PMCID: PMC2081979 (Accessed 8 Nov 2023).
6. Van den Hoogenhof , M. M. G., Pinto, Y. M., & Creemers, E. E. (2016). RNA splicing. Circulation Research, 118(3), 454–468.<https://doi.org/10.1161/circresaha.115.307872>
7. WANG, Y., LIU, J., HUANG, B., XU, Y.-M., LI, J., HUANG, L.-F., LIN, J., ZHANG, J., MIN, Q.-H., YANG, W.-M., & WANG, X.-Z. (2014). Mechanism of alternative splicing and its regulation. Biomedical Reports, 3(2), 152–158. <https://doi.org/10.3892/br.2014.407>
8. Virtanen, A., Henriksson, N., Nilsson, P., & Nissbeck, M. (2013). Poly(A)-specific ribonuclease (PARN): An allosterically regulated, processive and mrna Cap-interacting deadenylase. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 48(2), 192–209. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.771132>
9. Lewis KA and Tollefsbol TO (2016).Regulation of the Telomerase ReverseTranscriptase Subunit through Epigenetic Mechanisms. Front. Genet. 7:83.doi: 10.3389/fgene.2016.00083

10. Huynh, T. N., & Parker, R. (2023). The Parn, TOE1, and USB1 RNA deadenylases and their roles in non-coding RNA regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 299(9), 105139. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105139>
11. 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.” *Life Sciences*, 285, 119953. doi:10.1016/j.lfs.2021.119953
12. Oltean, S., Bates, D. Hallmarks of alternative splicing in cancer. *Oncogene* 33, 5311–5318 (2014). <https://doi.org/10.1038/onc.2013.533>
13. Pavlopoulou, A., Vlachakis, D., Balatsos, N. A. A., & Kossida, S. (2013). A comprehensive phylogenetic analysis of deadenylases. *Evolutionary Bioinformatics*, 9. <https://doi.org/10.4137/ebo.s12746>
14. Ueda, T., Nishimura, K., Nishiyama, Y., Tominaga, Y., Miyazaki, K., Furuta, H., Matsumura, S., & Ikawa, Y. (2023). Pairwise Engineering of Tandemly aligned self-splicing group I introns for analysis and control of their alternative splicing. *Biomolecules*, 13(4), 654. <https://doi.org/10.3390/biom13040654>

+