

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Απομόνωση και βιοχημικός καθαρισμός εναλλακτικού
μεταγράφου της πολυ(Α)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης**

Πτυχιακή Εργασία – Αντονέλα Κατσάνι του Μπασκίμ Κατσάνι
Λάρισα, 2025



UNIVERSITY OF
THESSALY

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

**Isolation and Biochemical Purification of an Alternative
Transcript of the Poly(A)-specific Ribonuclease**

Undergraduate Thesis – Antonela Kacani, Baskim Kacani
Larissa, 2025

Η πτυχιακή εργασία μου εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και
Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
Υπεύθυνος καθηγητής: κ. Μπαλάτσος Νικόλαος

Τριμελής Επιτροπή:

Νικόλαος Μπαλάτσος (επιβλέπων καθηγητής), Αναπληρωτής
Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Λεωνίδας Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Βλαχάκης Αναπληρωτής Καθηγητής στο Γεωπονικό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον καθηγητή κ. Νικόλαο Μπαλατσό, επιβλέποντα της πτυχιακής μου εργασίας, για την πολύτιμη καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη και τη στήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω και στον διδάκτορα Λαμπρό Μπαλή για την αμέριστη υποστήριξη, τη συνεργασία και τις ουσιαστικές συμβουλές του, οι όποιες συνέλαβαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της εργασίας. Ευχαριστώ επίσης θερμά όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας για την πρόθυμη βοήθεια και τη φιλική ατμόσφαιρα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την οικογένειά μου για την διαρκή ηθική και ψυχολογική υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια και για την πίστη τους σε εμένα και στα όνειρά μου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Μενέλαο για την αμέριστη στήριξη και ενθάρρυνση σε κάθε μου βήμα.

Περιεχόμενα:

Περίληψη

Abstract

1. Εισαγωγή
 - 1.1 Η Ωρίμανση της 5' καλυπτρα και 3' πολύ(Α)ουράς
 - 1.2 Αποικοδόμηση των mRNA από αποδενυλάσεις
 - 1.3 Απαδενυλάσεις
 - 1.4 Η πολυ(Α)- εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN)
 - 1.5 Μηχανισμός δράσης PARN: distributive μοντέλο αποικοδόμησης
 - 1.6 Εναλλακτικό Μάτισμα
 - 1.7 Η σύνδεση του Εναλλακτικού ματίσματος με τις ασθένειες
 - 1.8 Εναλλακτικό μετάγραφο της PARN (PARN_V1)
 - 1.9 Μελέτη του μεταλλάγματος E317A στην PARN_V1
2. Σκοπός
3. Υλικά και Μέθοδοι
 - 3.1 Μετασχηματισμός χημειοδεκτικών βακτηρίων E.coli BL21-Gold
 - 3.2 Μεταφορά και επαγωγή καλλιέργειας
 - 3.3 Καθαρισμός και απομόνωση της PARN_V1
 - 3.4 Απομόνωση με τη στήλη HisPur™ Cobalt Resin με Batch Method
 - 3.5 Διαπίδυση
 - 3.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)
 - 3.7 Western Blotting
 - 3.8 Ποσοτικοποίηση
 - 3.9 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας
4. Αποτελέσματα
 - 4.1 Υπερεκφράση της PARN_V1 και της PARN
 - 4.2 Καθαρισμός με HisPur™ Cobalt Resin

4.3 Καθαρισμός Πρωτεϊνών και Ανάλυση με SEC μετά από

Πρωτεόλυση His-tag

4.4 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας

4.5 Μελέτη της ενζυμικής Δραστηριότητας του Εναλλακτικού

Μεταγράφου PARN_V1 υπό διαφορετικές συνθήκες pH και
χρόνου

4.6 Σύγκριση Ενζυμικής Δραστηριότητας της PARN, του Εναλλακτικού

Μεταγράφου RARN-V1 και του Μεταλλάγματος E317A

5. Συζήτηση

6. Βιβλιογραφία

Περίληψη

Στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης περιλαμβάνεται και η αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNA. Η έναρξη της αποικοδόμησης της πολυ(Α)- ουράς πραγματοποιείται από απαδενυλάσες, στην προκειμένη εργασία δίνεται έμφαση στην πολυ(Α)- Εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN). Η PARN είναι συντηρημένη στους διάφορους οργανισμούς και είναι η μονή απαδενυλάση που προσδένεται τόσο στην πολυ(Α) ουρά όσο και στην 5' καλύπτρα με αποτέλεσμα να δρα ως 3' – 5' εξωνουκλεάση. Στο Εργαστήριο της Λειτουργικής και Δομικής Βιοχημείας στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας εντοπίστηκε ένα εναλλακτικό μεταγράφο της PARN, η PARN_V1¹. Η PARN_V1 παράγεται από το ίδιο γονίδιο με την PARN μέσω εναλλακτικού ματίσματος, που απομονώθηκε από καρκινικά κύτταρα πλευριτικού μεσοθηλιώματος και στερείται δύο από τα πέντε αμινοξέα επαφής της πλήρους μήκους PARN.

Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία στοχεύει στην απομόνωση της PARN_V1 και ενός μεταλλάγματός της, καθώς και στον χαρακτηρισμό της ενζυμικής δραστηρότητάς τους σε υποστρώματα RNA. Αρχικά, υπερεκφράστηκε η PARN_V1 χρησιμοποιώντας ένα ειδικά σχεδιασμένο πρωτόκολλο και ακολουθήσε επαγωγή σε μικρή και μεγάλη κλίμακα. Στην συνέχεια απομονώθηκε η επιθυμητή πρωτεΐνη με χρωματογραφία συγγένειας συγκεκριμένα με την στήλη HisPur™ Cobalt Resin με Batch Method και σε όλες τις φάσεις πραγματοποιείται έλεγχος μέσω SDS-PAGE και Western Blot. Παράλληλα, αξιοποιώντας δεδομένα μοριακής μοντελοποίησης και βιοπληροφορικής ανάλυσης, προσδιορίστηκε ένα κατάλοιπο αμινοξέος, Glu317, που πιθανόν να συμμετέχει στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου της PARN_V1. Τέλος πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της δραστηρότητας του ένζυμου χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλα σημειωμένο υπόστρωμα RNA.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερεκφράση της PARN_V1 έγινε με επιτυχία και απομονώθηκε επαρκής ποσότητα της πρωτεΐνης για να ακολουθήσει ο έλεγχος της ενζυμικής δραστηρότητας. Ακολούθως η PARN_V1 έχει ενζυμική δραστηρότητα έναντι RNA υποστρωμάτων, ενώ το μετάλλαγμα της PARN_V1 E317A δεν εκδηλώνει ανιχνεύσιμη καταλυτική δράση.

¹ Διονύσιος Αντωνόπουλος, «Χαρακτηρισμός Εναλλακτικού Μεταγράφου της Πολυ(Α) Εξειδικευμένης Ριβονουκλεάσης PARN και Διερεύνηση του Βιολογικού της Ρόλου.», Διδακτορική διατριβή, Λάρισα 2024.

Abstract

Regulation of gene expression includes the degradation of eukaryotic mRNA. The initiation of poly(A)tail degradation is carried out by deadenylases, and in this study, particular emphasis is placed on the poly(A)-specific ribonuclease (PARN). PARN is conserved across various organisms and is the only deadenylase that binds both the poly(A) tail and the 5' cap, enabling it to function as a 3'-5' exonuclease. In the Laboratory of Functional and Structural Biochemistry at the University of Thessaly, an alternative transcript of PARN, named PARN_V1, is produced from the same gene mesothelioma cells, and lacks two of the five amino acid residues responsible for RNA binding found in the full-length PARN.

This undergraduate thesis aims to isolate PARN_V1 and a mutant from of it, as well as to characterize their enzymatic activity against RNA substrates. Initially, PARN_V1 was overexpressed using a specially designed protocol, followed by induction on both small and large scales. The target protein was then purified using affinity chromatography, specifically with the HisPur™ Cobalt Resin column using the Batch Method. At each stage, verification was carried out using SDS-PAGE and Western Blot analysis. In parallel, molecular modeling and bioinformatics analysis identified an amino acid residue, Glu317, that is likely involved in using an appropriately labeled RNA substrate.

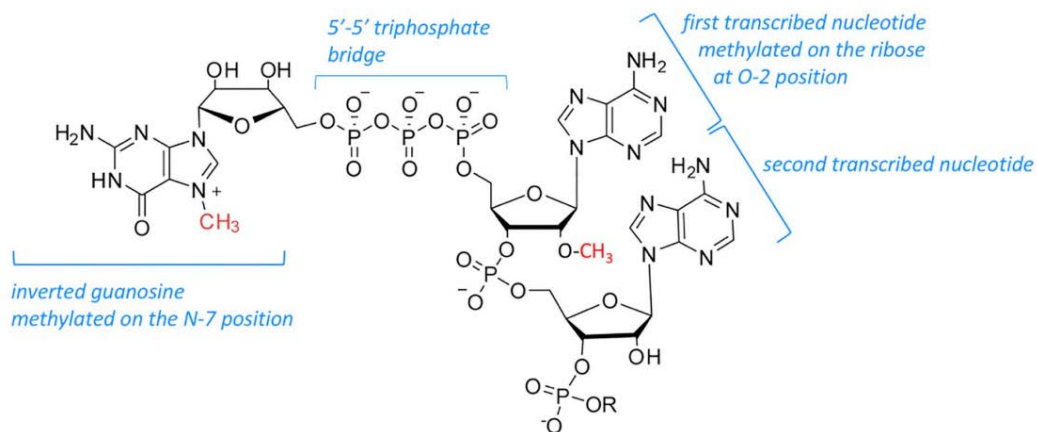
The results demonstrated that PARN_V1 was successfully overexpressed and that a sufficient quantity of the protein was purified to proceed with enzymatic activity assays. PARN_V1 exhibited enzymatic activity against RNA substrates, whereas its mutant form, PARN_V1 E317A, showed no detectable catalytic activity.

1. Εισαγωγή

1.1 Η Ωρίμανση της 5' καλύπτρας και 3' ουράς πολυ(A)

Το ευκαρυωτικό mRNA συντίθενται στον πυρήνα του κυττάρου από την RNA πολυμεράση II (Pol II) στο πλαίσιο των πρόδρομων μεταγραφικών διεργασιών και ονομάζεται pre-mRNA. Το pre-mRNA υφίσταται μετα- μεταγραφικές τροποποιήσεις πριν να σχηματιστεί το ώριμο mRNA το οποίο μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα. Οι μετα – μεταγραφικές τροποποιήσεις περιλαμβάνουν κυρίως την προσθήκη της 5' καλύπτρας, την 3' πολύ(A) ουρά και το μάτισμα. (Banerjee AK et al.,1980)

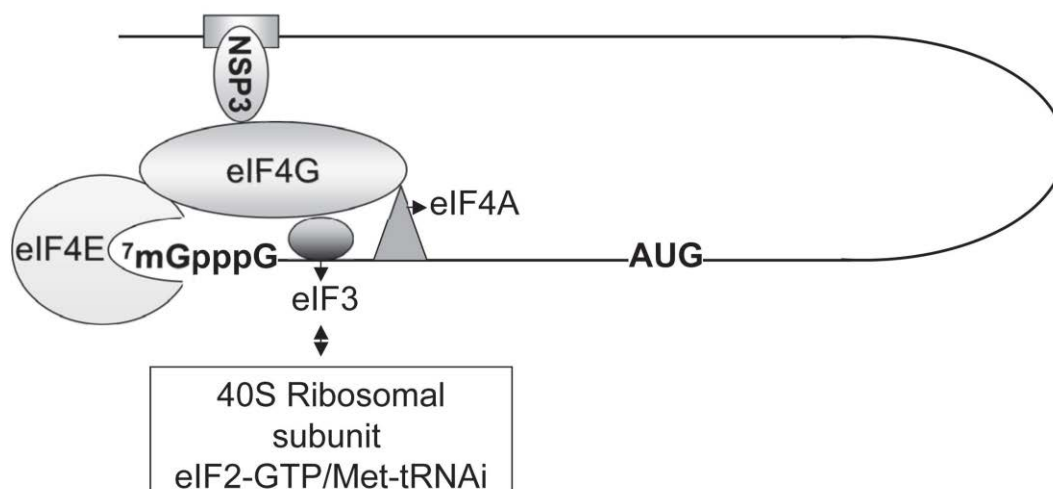
Το 5' άκρο του νεοσυντιθέμενου RNA τροποποιείται μετά την προσθήκη των 25 νουκλεοτιδίων με την προσθήκη της 5' καλύπτρας. Η τροποποίηση αυτή γίνεται σε τρία βήματα, αρχικά υπάρχει η υδρόλυση από την RNA τριφωσφατάση με αποτέλεσμα να αφαιρείται μια φωσφορική ομάδα. Έπειτα, το διφωσφορικό 5' άκρο του RNA σχηματίζει δεσμό με το άτομο του α φωσφόρου του μορίου GTP με συνεπεία να σχηματιστεί ένας 5'-5' τριφωσφορικός σύνδεσμος, αυτή η αντίδραση καταλύεται από την γουανυλυλοτρανσφεράση. Τέλος, η γουανίνη μεθυλιώνεται από μεθυλοτρανσφεράσες, οι οποίες χρησιμοποιούν ως δοτή μεθυλομάδων την S-αδενοσυλμεθειονίνη. (Tymoczko, J. L, et al,2015), (Galloway, et al., 2019)



Εικόνα 1 Δομή της 5' καλύπτρας (Galloway, et al, 2019)

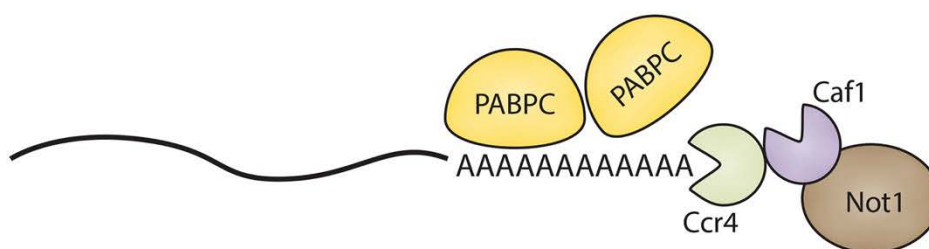
Η 5' καλύπτρα προστατεύει τα mRNAs από την δράση νουκλεασών και φωσφατασών, προσδίδοντας έτσι στα mRNAs μεγαλύτερη σταθερότητα. Επίσης, η καλύπτρα παίζει ουσιαστικό ρόλο στην έναρξη της μετάφρασης της πρωτεΐνης καθώς αναγνωρίζεται από τον eIF4E και έτσι διευκολύνεται η πρόσδεση του προενακτήριου συμπλόκου. Μετά την πρόσδεση του PIC, το mRNA γίνεται ένα κυκλικό μόριο καθώς το 5' άκρο συνδέεται με τον eIF4E, ο οποίος είναι σε σύνδεση με τον eIF4G. Ο eIF4G είναι ενωμένος με την πρωτεΐνη δέσμευσής της πολύ(A) ουράς (PABP), αυτή η κυκλοποίηση

του mRNA πιθανών να βοηθάει στην εμπόδιση της μετάφρασης mRNAs που δεν έχουν ολόκληρη την ουρά πολυ(A). (Tymoczko, J. L, et al,2015)



Εικόνα 2 Η σύνδεση της PABP με τον eIF4G σχηματίζοντας έναν κλειστό βρόχο (López et al., 2005)

Η RNA πολυμεράση II αναγνωρίζει την αλληλουχία PAS και κόβει το mRNA 10- 30 νουκλεοτίδια καθοδικά από την αλληλουχία PAS. Έπειτα, η πολυ(A) πολυμεράση (PAP) προσθέτει 200-250 νουκλεοτίδια αδενοσίνης. Αφού σχηματιστεί το ώριμο mRNA και μεταφερθεί από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα τότε στην πολυ(A)-ούρα θα προσδεθεί το PABPC, το οποίο βοηθάει να πραγματοποιηθούν σημαντικές αλληλεπιδράσεις για την μετάφραση και για την σύνδεση του eIF4G με την πολυ(A)-ούρα. (Nicholson et al., 2019)



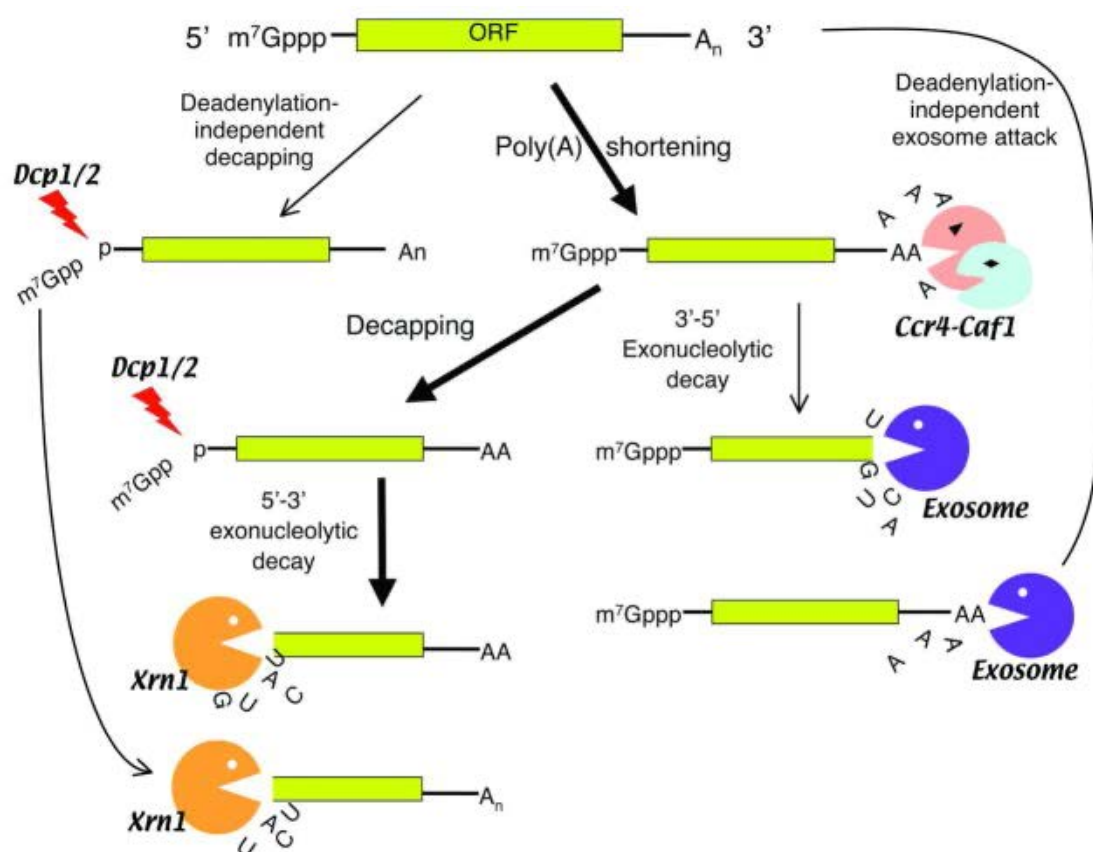
Εικόνα 3 Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών PABP με την ουρά πολυ(A)

Η πολυ(A)-ούρα προσφέρει σταθερότητα στο mRNA. Μόρια mRNA's από όπου εκλείπει η πολυ(A)-ούρα μπορούν να εξαχθούν στο κυτταρόπλασμα ωστόσο η μετάφρασή τους καθίστανται λιγότερο αποτελεσματική. (Nicholson et al., 2019), (Tymoczko, J. L, et al,2015)

1.2 Αποικοδόμηση των mRNA από αποδενυλάσεις

Το μήκος της ουράς πολυ(A) είναι καθοριστικός παράγοντας για την σταθερότητα και την μεταφραστικότητα του mRNA. Αφού μεταφερθεί το mRNA στο κυτταρόπλασμα, οι πολυ(A)-ουρές υφίσταται απαδενυλίωση προκαλώντας την αποικοδόμηση του. Η απαδενυλίωση γίνεται ανεξάρτητα από το εάν υπάρχει στοιχείο σταθεροποίησης ή αποσταθεροποίησης στο mRNA.

Η αποδενυλίωση ξεκινά στα ευκαρυωτικά κύτταρα κυρίως με το σύμπλεγμα Ccr4-Caf1 που αφαιρεί ένα μέρος της ουράς πολυ(A) έπειτα αναλαμβάνει το σύμπλεγμα Dcp1-Dcp2 το οποίο αφαιρεί την 5' καλυπτρά και συνεχίζει το Xrn1 που κόβει με 5' και 3' εξωνουκλεολυτική πέψη. Ωστόσο, μπορεί μετά το σύμπλεγμα Ccr4-Caf1 να ακολουθήσει αποικοδόμηση του mRNA από το 3' άκρο από το σύμπλεγμα του εξωσώματος. (Chen et al., 2010)



Εικόνα 4 Μονοπάτια αποικοδόμησης ευκαρυωτικού mRNA στο κυτταρόπλασμα. Με έντονα βέλη απεικονίζεται το κύριο μονοπάτι αποικοδόμησης του mRNA (Chen et al., 2010)

1.3 Αποδενυλάσεις

Η PARN ανήκει στην υπερικογένεια DEDD που αποτελείται από RNases και DNases τα όποια έχουν τέσσερα διατηρημένα όξινα αμινοξέα τα όποια παίζουν σημαντικό ρολό στην δομή του ενεργού κέντρου: τρία κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος (D) και ένα γλουταμινικού (E) με την εξής σειρά Asp-Glu-Asp-Asp. Αυτά τα τέσσερα αμινοξέα σχηματίζουν το καταλυτικό κέντρο της πρωτεΐνης και συνδέονται με δύο ιόντα μετάλλου που χρειάζονται για την πραγματοποίηση της κατάλυσης. Η υπερικογένεια DEDD μπορεί να χωριστεί σε δύο κατηγορίες, την DEDDy και DEDDh, οι όποιες διαφοροποιούνται στο πέμπτο κατάλοιπο, αν θα είναι Tyr ή His, αντίστοιχα. (Wu et al., 2005)

Family	Sc	Ce	Dm	Xl	Mm	Hs	Active	Notes	Protein domains	Local-ization	Biological functions	Ref
<i>DEDD nucleases</i>												
POP2	Pop2	CCF-1	POP2	CNOT7	CNOT7	CNOT7	Sc, Dm, Mm, Hs	Inhibited by PABP	DEDD	C, PB, Sh	DNA damage, cell cycle (Sc) Development, fertility (Ce) Cell size, miRNA control (Dm) Spermatogenesis, bone mass (Mm)	4, 10, 20, 22, 28, 32, 33, 34, 36, 66, 68, 69
				CNOT8	CNOT8	CNOT8	Hs		DEDD		ND	
CAF1Z		CAF-1z	CAF1Z	CAF1Z	CAF1Z	CAF1Z	Hs		DEDD, C3H Znf, NLS	N, CB, Sh	ND	16
PARN		PARN		PARN	PARN	PARN	Xl, Hs	Binds and stimulated by cap; inhibited by PABP and CBP80	DEDD, R3H, NBD, NLS	N, C, Sh	Oocyte maturation (Xl) NMD (Hs)	4, 20, 27, 38, 61
					PARNL	PARNL	ND		DEDD			
PAN2	Pan2	PAN-2	PAN2	PAN2	PAN2	PAN2	Sc, Mm, Hs	Stimulated by PABP	DEDD, WD40, UCH	N, C, Sh	Nuclear poly(A) shortening, replication stress (Sc)	4, 20, 70

Εικόνα 5 Αποδενυλάσεις της υπερικογένειας DEDD (Goldstrohm et al., 2008)

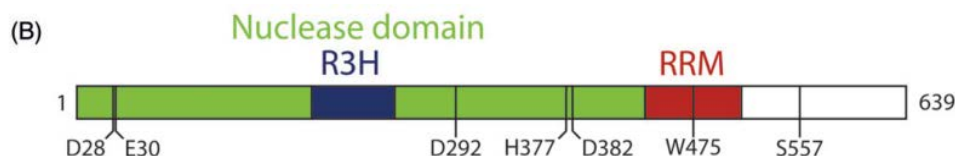
1.4 Η πολυ(A)- εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN)

Η πολυ(A)- ειδική ριβονουκλεάση PARN είναι ένα ένζυμο που αποτελείται από 639 αμινοξέα με μοριακό βάρος 74kDa και αποικοδομεί εξειδικευμένα την ουρά πολυ(A) των RNA αφαιρώντας αδενosίνες με κατεύθυνση 3' προς 5'. Η PARN απαιτεί να υπάρχει ελεύθερο το 3'-OH στο RNA-στόχο για να εκδηλώσει τη δράση της. Το ένζυμο εντοπίζεται σχεδόν σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, από τα φυτά μέχρι τους ανθρώπους, ωστόσο απουσιάζει από τους οργανισμούς *Saccharomyces cerevisiae* και *Drosophila melanogaster*. Η απουσία της PARN από αυτούς τους δύο οργανισμούς δείχνει ότι η λειτουργία αυτού του ενζύμου είτε δεν είναι απαραίτητη για την επιβίωση του οργανισμού είτε αντικαθίσταται από άλλες απαδενυλάσες όπως το POP2. (Parker, et al., 2004)

Η PARN είναι η μοναδική γνωστή απαδενυλάση που δεσμεύεται απευθείας τόσο στην ουρά πολυ(A) όσο και στη 5'- καλύπτρα των mRNA. Το ένζυμό έχει τρεις κύριες επικράτειες:

- Την επικράτεια της νουκλεάσης που είναι υπεύθυνη για την καταλυτική δράση.
- Την επικράτεια R3H σχετιζόμενη με την πρόσδεση της PARN στην πολυ(A)- ουρά.
- Την επικράτεια RRM που είναι απαραίτητη τόσο για την πρόσδεση στην ουρά πολυ(A) όσο και στην αναγνώριση της 5'-καλύπτρας.

(Balatsos et al, 2012),



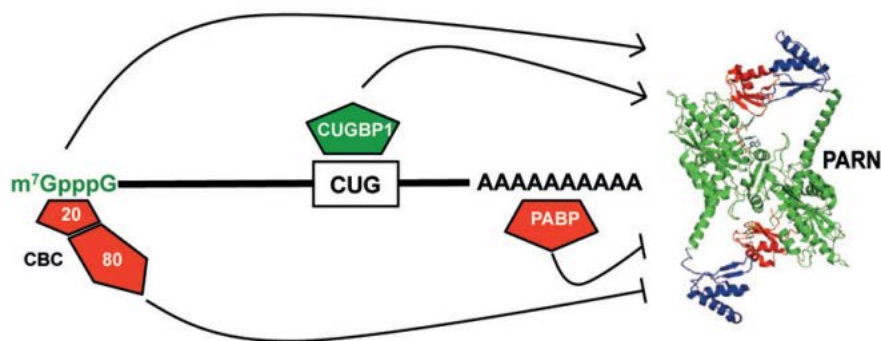
Εικόνα 6 Η ανθρώπινη PARN όπου απεικονίζονται και οι τρεις ρυθμιστικές περιοχές της (Virtanen et al., 2013)

Η PARN ανήκει στην υπερικογένεια των DEDD αποδενυλασών και ειδικότερα στην DEDDh αποδενυλάσες διότι μελέτες έχουν δείξει ότι η His377 έχει πιθανότητα καταλυτικό ρόλο. Έρευνες έχουν δείξει ότι η PARN δρα ως ομοδιμερές καθώς και ότι η δραστηριότητα της εξαρτάται από τα ιόντα Mg^{2+} . Τα ιόντα μπορεί να έχουν πολλαπλούς ρόλους (Wu M., et al., 2005):

- Συμβάλλουν στην κατάλυση αφού βρίσκονται στο καταλυτικό κέντρο
- Βοηθούν στην σταθερότητα του ενζύμου
- Προστατεύουν από την μετουσίωση σε υψηλές θερμοκρασίες

(Liu WF, et al., 2007)

Η ρύθμιση της PARN πραγματοποιείται από διάφορους *cis* παράγοντες. Αρχικά έχουμε την αναστολή είτε από την PABPC που δεσμεύεται στην ουρά πολυ(A) είτε από πρωτεΐνες που προσδένονται στην 5' καλύπτρα (CBPs). Επιπλέον, η αποικοδόμηση της ουράς πολυ(A) μπορεί να υπάρξει είτε από την αλληλεπίδραση της PARN με την CUG-BP είτε μέσω πρωτεϊνών που δεσμεύονται σε AU (AREs). (Virtanen et al., 2013)



Εικόνα 7 Η ρύθμιση της δραστηριότητας της PARN από *cis-acting* και *trans-acting* παράγοντες (Virtanen et al., 2013)

1.5 Μηχανισμός δράσης PARN

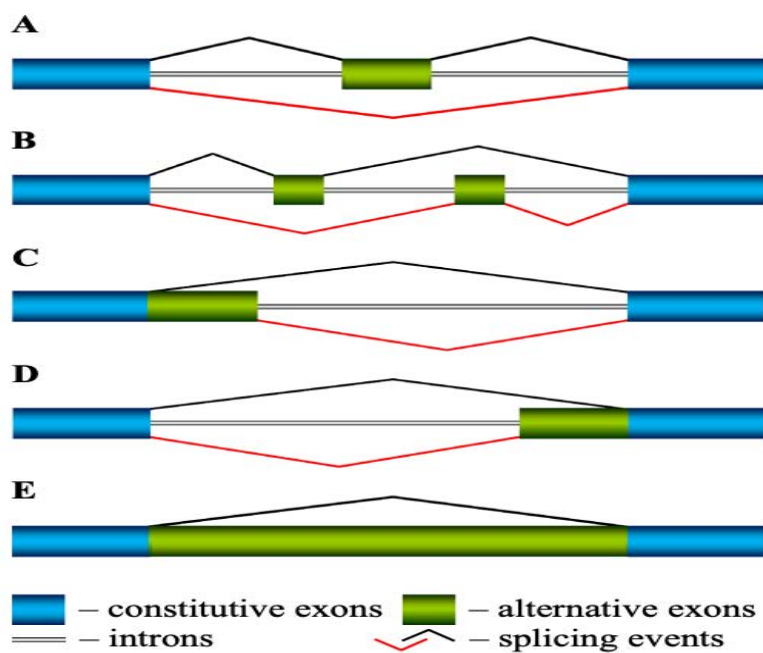
Η PARN είναι μια 3'-5' εξωνουκλεάση που αποικοδομεί επιλεκτικά τις ουρές πολυ(A) των mRNA μορίων, συμβάλλοντας στη ρύθμιση της σταθερότητας και μετάφρασης τους. Ο μηχανισμός δράσης της βασίζεται σε αλλοστερική ρύθμιση και επηρεάζεται έντονα από την παρουσία ή απουσία του 5' cap (m7GpppN) στο υπόστρωμα.

Συγκεκριμένα, όταν υπάρχει cap, η PARN υιοθετεί έναν διεκπεραιωτικό μηχανισμό, κατά τον οποίο η αποικοδόμηση προχωρά συνεχόμενα χωρίς απομάκρυνση από το υπόστρωμα. Το κάλυμμα ενισχύει τη σταθεροποίηση του συμπλόκου ενζύμου – RNA και προάγει την αποδοτική αφαίρεση της poly (A) ουράς. Αντίθετα, απουσία καλύμματος, η PARN λειτουργεί με επιμεριστικό μηχανισμό, δηλαδή αποσυνδέεται συχνά από το RNA μετά από κάθε αποικοδόμηση λίγων νουκλεοτιδίων, οδηγώντας σε συσσώρευση ενδιάμεσων προϊόντων.

1.6 Εναλλακτικό Μάτισμα

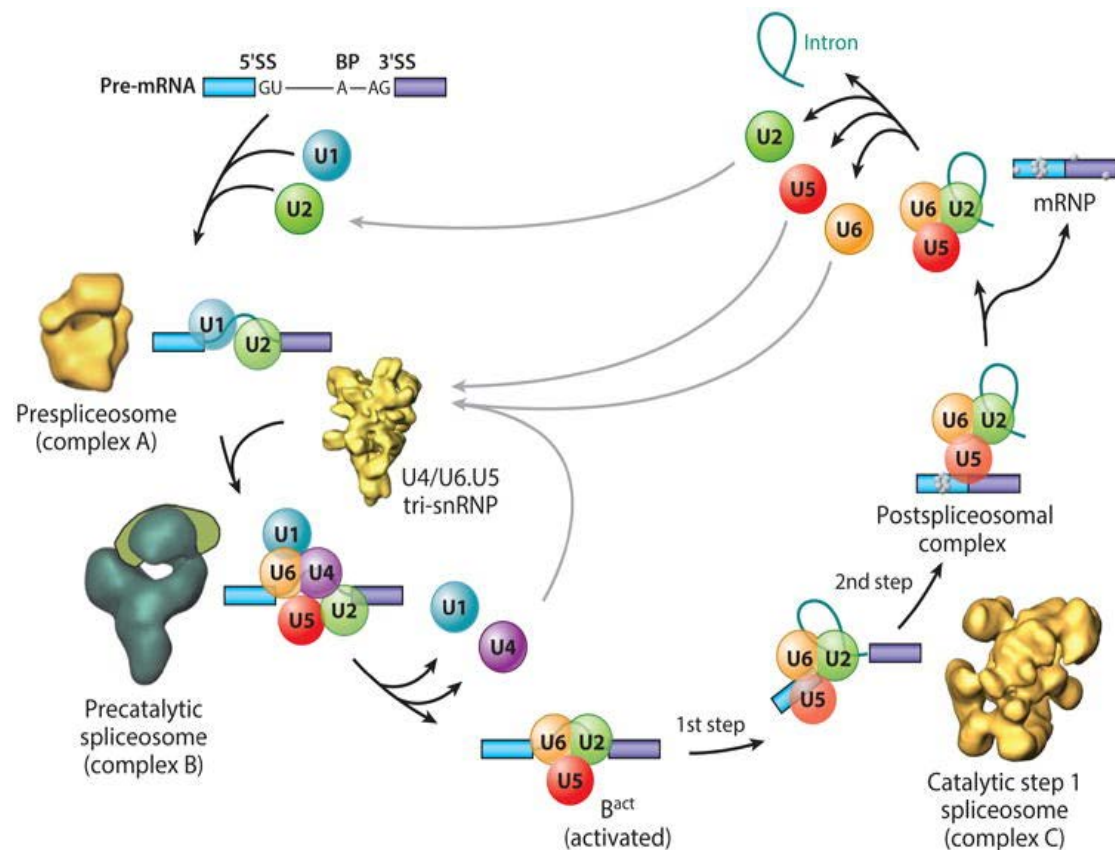
Ένα από τα σπουδαιότερα ευρήματα της Μοριακής Βιολογίας είναι ότι τα ευκαρυωτικά γονίδια είναι ασυνεχή, δηλαδή τα εξόνια διακόπτονται από μη κωδικοποιητικές περιοχές που ονομάζονται ιντρόνια. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι το εναλλακτικό μάτισμα του pre-mRNA αυξάνει κατακόρυφα την πολυπλοκότητα των οργανισμών. Στο γονιδίωμα του ανθρώπου, ο αριθμός των γονιδίων που υφίσταται το εναλλακτικό μάτισμα στα πρόδρομα mRNA εμφανίζεται σε ποσοστό που 95%. (Jin Y, et al., 2018)

Υπάρχουν τέσσερις κύριοι τύποι εναλλακτικού ματίσματος, οι οποίοι απεικονίζονται στην εικόνα 8. Ο πρώτος τύπος αφορά την εισαγωγή ή παράλειψη ενός εξωνίου. Ο δεύτερος τύπος περιλαμβάνει αμοιβαία αποκλειόμενα εξώνια. Οι δύο τελευταίες περιπτώσεις αφορούν εναλλακτικές 5' ή 3' θέσεις ματίσματος. Η τελευταία περίπτωση είναι η κατακράτηση ιντρονίων, η οποία είναι χαρακτηριστική σε φυτά και μονοκύτταρους οργανισμούς. (Lee et al.,2015), (Lin JC, et al., 2016)



Εικόνα 8 Οι συνδυασμοί εναλλακτικού ματίσματος στα ανθρώπινα γονίδια (Ramanouskaya et al, 2017)

Το μάτισμα επιτελείται από ένα μεγάλο σύμπλοκο ριβονουκλεοπρωτεϊνών δηλαδή είναι ριβόενζυμο όπως το ριβόσωμα που ονομάζεται σωμάτιο ματίσματος, το οποίο αποτελείται από πέντε μικρά πυρηνικά RNA (U1, U2, U4, U5, U6) και περισσότερες από εκατό πρωτεΐνες. Το ιντρόνιο έχει τρία βασικά σημεία για το μάτισμα: την 5' θέση ματίσματος, το σημείο διακλάδωσης, και την 3' θέση ματίσματος. Το 5' άκρο κάθε ιντρονίου έχει ένα δινουκλεοτίδιο GU και το 3' άκρο έχει δινουκλεοτίδιο AG. Αυτά τα τρία σημεία είναι σημαντικά για την αναγνώριση από το σωμάτιο ματίσματος. Στην αρχή θα συνδεθεί το U1 με το 5' άκρο και το U2 με το σημείο διακλάδωσης. Στο σύμπλοκο που έχει σχηματιστεί προστίθεται το U6, U2 και U5, έπειτα για να ενεργοποιηθεί το σύμπλοκο θα πρέπει να απομακρυνθούν το U1 και U4. Το ενεργό σύμπλοκο περιέχει το U6,U2, και το U5 που αλληλοεπιδρά άμεσα με το pre-mRNA και ενεργοποιεί το σωμάτιο ματίσματος. Στο πρώτο καταλυτικό βήμα, το σωμάτιο ματίσματος κόβει το 5' άκρο του ιντρονίου και μετά ακολουθεί η αποκοπή του 3' άκρου του pre-mRNA με συνεπεία την απομάκρυνση του ιντρονίου και την ένωση των εξονίων (Lee et al.,2015)



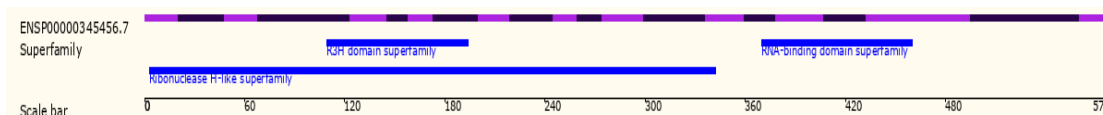
Εικόνα 7 Μάτισμα (Lee et al.,2015)

1.7 Η σύνδεση του Εναλλακτικού ματίσματος με τις ασθένειες

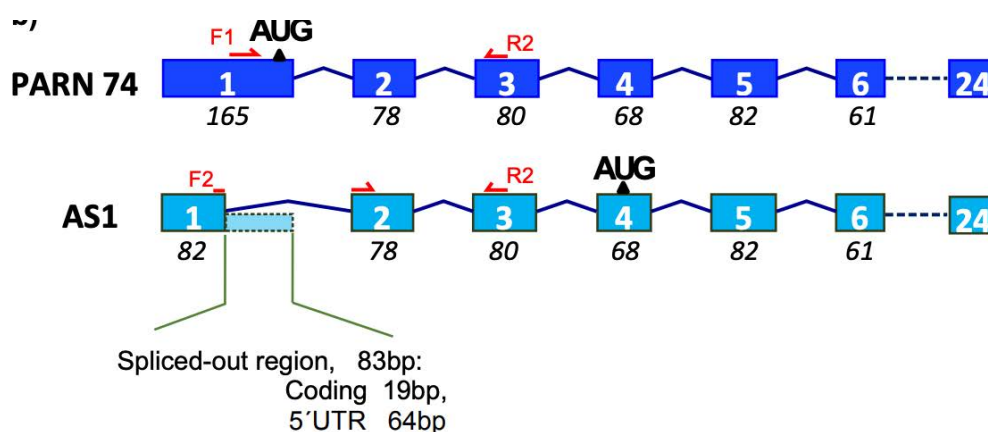
Το πρόδρομο mRNA υφίσταται την διαδικασία του εναλλακτικού ματίσματος δημιουργώντας διαφορές ισόμορφες της πρωτεΐνης. Ωστόσο μεταλλάξεις που επηρεάζουν τα σημεία ματίσματος ή τα ρυθμιστικά στοιχεία του RNA, όπως είναι οι ενισχυτές και οι αποσιωπητές, μπορούν να διαταράξουν αυτή την διαδικασία και να συμβάλουν στην εμφάνιση ασθενειών. Έρευνες έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο SMN-2 προκαλούν νωτιαία μυϊκή ατροφία όπως επίσης και λάθη στο μάτισμα της β-σφαιρίνης οδηγούν σε θαλασσαιμίες. Καρκίνος μπορεί να προκληθεί και από μεταλλάξεις σε βασικούς παράγοντες ματίσματος, όπως το U2AF1, SRSF2 κ.α., διότι επηρεάζεται η φυσιολογική κυτταρική λειτουργία. Επιπλέον, η υπερεκφράση του παράγοντα SRF1 έχει αποδειχθεί ότι δρα ως ογκογονίδιο προάγοντας την ανάπτυξη όγκων μέσω της κυτταρικής οδού mTORC1. (Lee et al.,2015),

1.8 Εναλλακτικό μετάγραφο της PARN (PARN_V1)

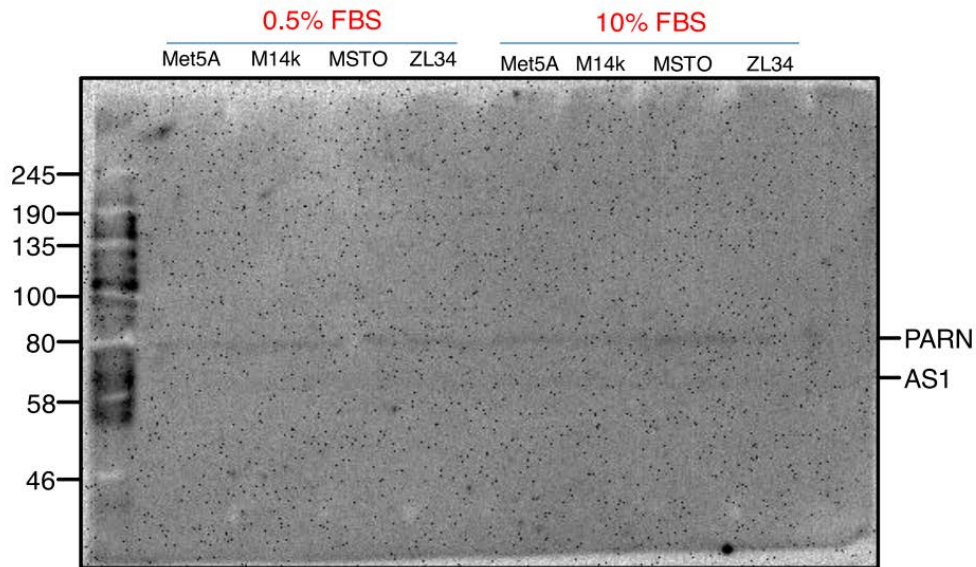
Ο Διονύσης Αντωνόπουλος στο πλαίσιο πολύ διδακτορικής του διατριβής εντόπισε ένα εναλλακτικό μετάγραφο της PARN. Το εναλλακτικό μετάγραφο είναι η PARN_V1 (Homo sapiens poly(A)-specific ribonuclease, transcript variant 2), το οποίο παράγεται από το ίδιο γονίδιο αλλά μεσώ εναλλακτικού ματίσματος κωδικοποιεί για νέα πρωτεΐνη. Από το μετάγραφο λείπουν 83 ζεύγη βάσεων από το εξόνιο 1. Τα 64 ζεύγη βάσεων ανήκουν στην 5' αμετάφραστη περιοχή και τα υπόλοιπα 19 ζεύγη βάσεων κωδικοποιούν αμινοξέα (συμπεριλαμβανομένου το κωδικόνιο έναρξης) με αποτέλεσμα να χαθούν τα καταλυτικά αμινοξέα Asp28 και Glu30. Το κωδικόνιο έναρξης του εναλλακτικού μεταγράφου βρίσκεται στο εξόνιο 4 στην αλληλουχία της PARN. Η PARN_V1 απαρτίζεται από 578 αμινοξέα, με μοριακή μάζα 67kD. Ανιχνεύθηκε αρχικά σε καρκινικές σειρές του πλευριτικού μεσοθηλιώματος. (Αντωνόπουλος Δ., et al., 2024)



Εικόνα 9 Απεικόνιση των δομικών υπερ-οικογενειών (superfamilies) της PARN_V1 (Ensembl Genome Browser)



Εικόνα 10 Απεικόνιση των μεταγραφών PARN (μπλε) και PARN_V1 (γαλάζιο). (Αντωνόπουλος Δ., et al., 2024)



Εικόνα 11 Ανίχνευση πρωτεϊνών PARN και PARN_V1 με Western Blot σε καρκινικές σειρές πλευρικού μεσοθηλώματος (Αντωνόπουλος Δ., *et al.*, 2024)

1.9 Μελέτη του μεταλλάγματος E317A στην PARN_V1

Στο πλαίσιο πολύ πειραμάτων μας, εστίασαμε σε μία συγκεκριμένη μεταλλαγή της PARN_V1, στόχο την κατανόηση της λειτουργικής σημασίας στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η μετάλλαξη γλουταμινικού οξέος σε αλανίνη στη θέση 317 (E317A), η οποία εντοπίζεται εντός της καταλυτικής περιοχής. Η επιλογή του συγκεκριμένου καταλοίπου δεν ήταν τυχαία· αξιοποιήθηκαν δεδομένα μοντελοποίησης τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης μέσω του προγράμματος AlphaFold (Δρ. Δ. Βλαχάκης, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών), που έδωσαν ισχυρές ενδείξεις για τον κεντρικό ρόλο του E317 στη χωρική διαμόρφωση του ενεργού κέντρου και την ενδεχομένη συμμετοχή του στη δέσμευση των ιόντων μαγνησίου ή/και του RNA υποστρώματος, που είναι απαραίτητη για την καταλυτική λειτουργία της PARN_V1. Με βάση τα μοντέλα, το εν λόγω αμινοξύ βρίσκεται σε στενή επαφή με άλλες συντηρημένες καταλυτικές περιοχές και ενδεχομένως συμβάλλει στη σταθεροποίηση της δομής μέσω ιοντικών ή δεσμών υδρογόνου. Επομένως, η αντικατάστασή του με αλανίνη, που είναι μικρότερη και ουδέτερη, αναμένεται να διαταράσσει τη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου και να οδηγήσει σε μειωμένη ή πλήρη απώλεια της καταλυτικής ικανότητας της πρωτεΐνης. Η έκφραση *in vitro* και μελέτη αυτής της μεταλλαγμένης μορφής της PARN_V1 προσφέρει ένα σχυρό εργαλείο για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης της, επιτρέποντας παράλληλα τη διάκριση μεταξύ των καταλυτικών λειτουργιών της, όπως πιθανή συμμετοχή σε ρυθμιστικά σύμπλοκα ή κυτταρικούς μηχανισμούς απόκρισης στο στρες.

301	SAEGFPSYDTASEQLH E AGYDAYITGLCFISMANYLGSFLSPPKIHVSARSKLIEPFFNK	360
362	SAEGFPSYDTASEQLH E AGYDAYITGLCFISMANYLGSFLSPPKIHVSARSKLIEPFFNK	421

3. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η έκφραση, ο καθαρισμός και η βιοχημική μελέτη της PARN_V1 και του μεταλλάγματος E317A. Συγκεκριμένα, επολύχεται η ένταση της ενζυμικής δραστηριότητας της PARN_V1, καθώς και η συμπεριφορά της σε διαφορετικά pH για την εύρεση συνθηκών βέλτιστης λειτουργίας. Παράλληλα, γίνεται σύγκριση με το μετάλλαγμα E317A, ώστε να διερευνηθεί πως η μετάλλαξη επηρεάζει τη δραστηριότητα και τη σταθερότητα της πρωτεΐνης.

3. Υλικά και Μέθοδοι

Υλικά: Υπερεκφράση PARN_V1

E. coli BL21-Gold

Πλασμίδιο

LB Agar

LB Broth

Καναμυκίνη (c=50 µg/ml)

Υπερεκφράση της PARN_V1

3.1 Μετασχηματισμός χημειοδεκτικών βακτηρίων *E.coli* BL21-Gold

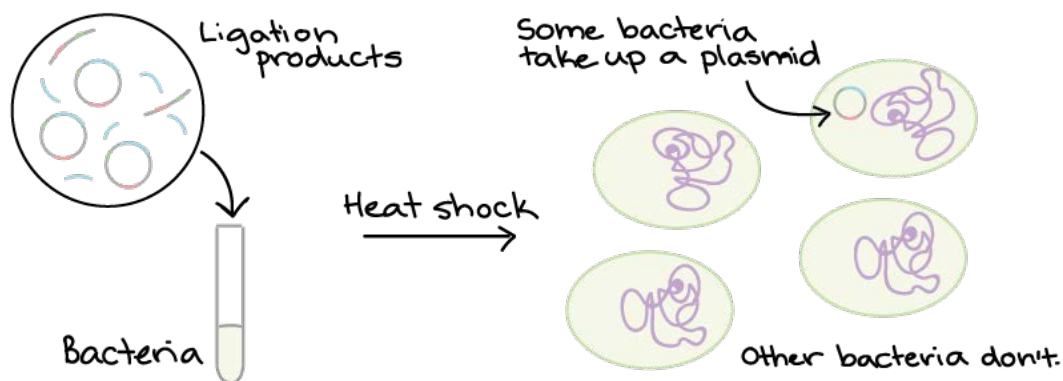
Ο μετασχηματισμός των χημειοδεκτικών βακτηρίων *E.coli* πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο του θερμικού σοκ, προκειμένου να εισαχθεί το πλασμιδιακό DNA που κωδικοποιεί την PARN_V1.

Αρχικά προστεθήκαν 2µl από το πλασμίδιο (c= 50 µg/µl) στο Eppendorf που έχουμε 100 µl βακτηριακών κυττάρων, τα οποία είχαν καταστεί χημειοδεκτικά μέσω προηγούμενης επεξεργασίας. Στην συνέχεια, έγινε ήπια ανάδευση ώστε να διασφαλιστεί η ομοιόμορφη κατανομή του DNA και επωάστηκε για 30 λεπτά στον πάγο για να επιτευχθεί η προσκόλληση του DNA στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων.

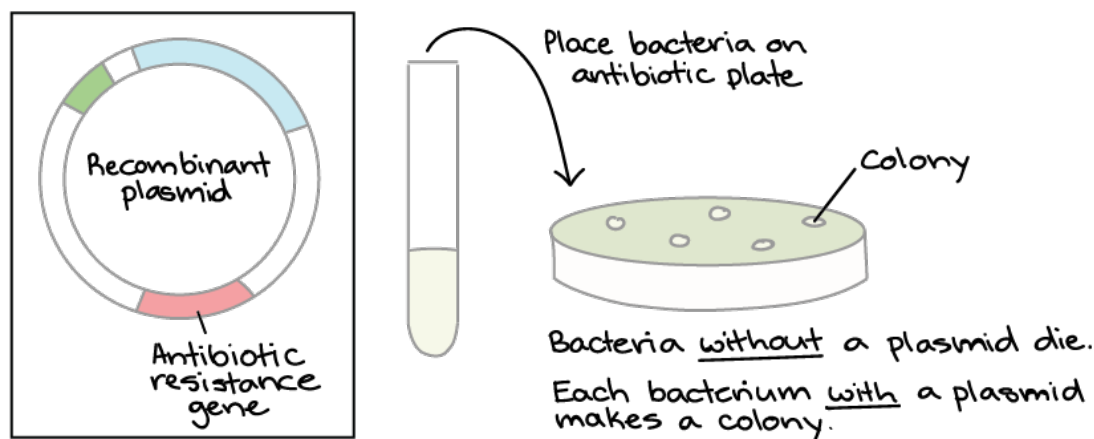
Έπειτα, εφαρμόστηκε θερμικό σοκ, όπου τα κύτταρα εκτέθηκαν σε θερμοκρασία 42°C για 45 δευτερόλεπτα ώστε να εισέλθει το DNA στο εσωτερικό των βακτηρίων μέσω

των οπών που δημιουργήθηκαν στην μεμβράνη. Αμέσως μετά, τα κύτταρα μεταφερθήκαν στον πάγο για 2 λεπτά ώστε να σταθεροποιηθεί ξανά η μεμβράνη. Για την ανάπτυξη των κυττάρων, προστέθηκαν πολύ μl αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού υλικού LB και έπειτα ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση στα 210 rpm ώστε να μπορέσουν σε αυτό το χρόνο τα μετασχηματισμένα βακτήρια να πολύσουν το γονίδιο ανθεκτικότητας, καναμυκίνη.

Μετά την επώαση, φυγοκεντρείτε το Eppendorf στους 25°C και 2.500 rpm για 2 λεπτά και απομακρύνετε το υπερκείμενο (800μl) και επαναδιαλυτοποιείτε το ίζημα με 200 μl LB. Επιστρώθηκε το διάλυμα σε τρυβλίο Petri πολυερίχει θρεπτιπολύλικό LB Agar και 50 μg/ml καναμυκίνης. Τέλος ακολουθεί επώαση του τρυβλίου στους 37°C για 14 ώρες. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες γίνονται υπό αυστηρές ασηπτικές συνθήκες, χρησιμοποιώντας φλόγα και αποστειρωμένα υλικά, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης.



Εικόνα 12 Βακτηριακό μετασχηματισμό Khan Academy. (2015). *Bacterial Transformation & Selection* <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/overview-dna-cloning>



Εικόνα 13 Βακτηριακό μετασχηματισμό και επιλογή μετασχηματισμένων αποικιών Khan Academy. (2015). Bacterial Transformation & Selection. Khan Academy. <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/overview-dna-cloning>

3.2 Μεταφορά και επαγωγή καλλιέργειας

Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο Petri επιλέχθηκε μία αποικία (μικρή και κυκλική) χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο άκρο πιπέτας (tip) και να μεταφερθεί σε ένα αποστειρωμένο falcon (50 ml). Το Falcon περιείχε 10ml αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό υλικό LB Broth και καναμυκίνη 7μl ($c = 50\mu\text{l/ml}$). Η καλλιέργεια επώαστηκε για 14 ώρες στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση στα 2100 rpm για να αναπτυχθούν τα βακτήρια. Μετά την επώαση, το διάλυμα ήταν θολό γεγονός που είναι επιθυμητό καθώς συμβολίζει την ικανοποιητική βακτηριακή ανάπτυξη.

Στην συνέχεια, προετοιμάστηκαν τέσσερις αποστειρωμένες φλάσκες χωρητικότητας 2 λίτρων στις οποίες προστέθηκαν 750 ml από θρεπτικό υλικό LB Broth διατηρώντας τον συνολικό όγκο καλλιέργειας κάτω από το 1/3 της συνολικής χωρητικότητας της κάθε φλάσκας, πράγμα που βοηθά στον ικανοποιητικό αερισμό και συνεπώς την ανάπτυξη βακτηρίων. Σε κάθε φλάσκα προστέθηκε καναμυκίνη 500 μl ($c=50\mu\text{l/ml}$) για να αναπτύσσονται μόνο τα μετασχηματισμένα βακτήρια.

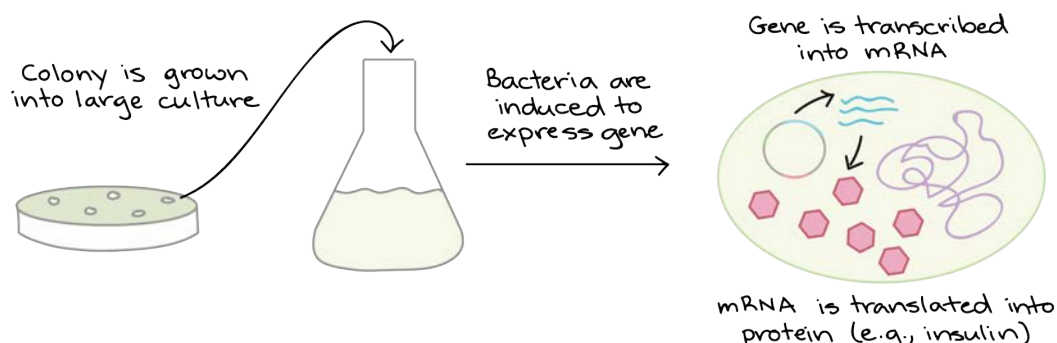
Από την αρχική καλλιέργεια που αναπτύχθηκε μέσα στο falcon παραλήφθηκαν 10 ml που προστέθηκαν 2.5 ml στην κάθε φλάσκα για να πραγματοποιηθεί ο εμβολιασμός με αναλογία περίπου 1/100 του συνολικού όγκου της νέας καλλιέργειας. Ωστόσο, πριν την προσθήκη βακτηρίων πάρθηκαν 2ml από τις φλάσκες έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί ως τυφλό στην φωτομέτρηση της οπτικής πυκνότητας (ΠολύD) στην συνέχεια.

Έπειτα όλες οι φλάσκες τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα στους 37°C, υπό συνεχή ανάδευση στις 210 rpm και γίνονταν τακτός έλεγχος της βακτηριακής ανάπτυξης

μέσω μέτρησής της απορρόφησης στα 600nm (OD 600). Η εκθετική φάση της καλλιέργειας βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές 0.5 – 0,7 της OD600. Στην δικιά μας όπου είχαμε την ανάπτυξη της πρωτεΐνης PARN_V1, η τιμή OD600 έφτασε 0,570 μετά από 2 ώρες και 45 λεπτά επώασης.

Μόλις η καλλιέργεια έφτασε στην επιθυμητή πυκνότητα, προστέθηκε 375 μl IPTG 1mg/ml που είναι επαγωγέας της πρωτεΐνης στόχου και έτσι υπάρχει η υπερεκφράση της. Οι καλλιέργειες συνέχισαν της επώαση τους για 16 ώρες στους 18°C υπό ανάδευση 2100 rpm.

Μετά την επώαση, οι φλάσκες διατηρήθηκαν στο πάγο, ώστε να σταματήσει η περαιτέρω ανάπτυξη των βακτηρίων. Στην συνέχεια έγινε φυγοκεντρήθηκαν τα διαλύματα στους 4°C στα 6000 rpm για 15 λεπτά και έπειτα τα βακτήρια που καθιζάνουν στον πυθμένα και σχηματίζεται το ίζημα. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα το μεταφέρουμε σε ένα αποστειρωμένο falcon και ζυγίζεται η ποσότητα ήταν 2.8gr. Έπειτα το falcon αποθηκεύεται στους -80°C. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες γίνονται υπό αυστηρές ασηπτικές συνθήκες, χρησιμοποιώντας φλόγα και αποστειρωμένα υλικά, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης.



Εικόνα 14. Επαγωγή καλλιέργειας. Khan Academy. (2015). Bacterial Polύnsformation & Selection. Khan Academy. <https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/bacterial-transformation-selection>

Διέγραψε: 14

Υλικά: Καθαρισμός και απομόνωση της PARN_V1

HEPES (Serva)

KCl (Merck)

Glycerol (Applichem)

B- μερκαπτοαιθανόλη, Riedel de Haen)

PMSF (Phenylmethanesulfonylfluoride)

Triton X-100 (Merck)

Λυσοζύμη (Serva)

Imidazole (Sigma)

EDTA (ethylenediaminetetraacetic) (Merck)

MgCl₂

dH₂O

3.3 Καθαρισμός και απομόνωση της PARN_V1

Lysis Buffer (30ml)		Διάλυμα εξισορρόπησης		Διάλυμα Έκλουσης (20ml)	
Αντιδραστήρια	Όγκος	Αντιδραστήρια	Όγκος	Αντιδραστήρια	Όγκος
HEPES (c=20mM)	1,2ml	HEPES (c=20mM)	6ml	HEPES (c=20mM)	0,8ml
KCl (c=0,5M)	6ml	KCl (c=0,5M)	30ml	KCl (c=0,5M)	4ml
Triton X	30μl	Triton X	-	Triton X	-
Γλυκερόλη	3ml	Γλυκερόλη	15ml	Γλυκερόλη	2ml
β- Mercaptoethanol	2μl	β- Mercaptoethanol	-	β- Mercaptoethanol	-
PMSF (c=2mM)	75μl	PMSF (c=2mM)	-	PMSF (c=2mM)	-
Λυσοζύμη	Ίχνη	Λυσοζύμη	-	Λυσοζύμη	-
Ιμιδαζόλιο (c=5mM)	-	Ιμιδαζόλιο	0,05gr	Ιμιδαζόλιο (c=180mM)	0,245gr
H ₂ O	19,8ml	H ₂ O	99ml	H ₂ O	13ml

Τα κύτταρα που αποθηκευτήκαν στους -80°C τα μεταφέρονται στο πάγο και προστίθεται το διάλυμα Lysis Buffer (30ml) για να διαλυτοποιηθούν τα βακτήρια. Έπειτα γίνεται μηχανική λύση με υπερήχους 9 φορές επανάληψη με 70% amplitude και στην συνέχεια στο διάλυμα προστίθεται 1,5μl Benzonase, ένα ένζυμο που διασπά το DNA και το RNA, ώστε να απομακρυνθούν τα νουκλεϊκά οξέα από το διάλυμα. Αμέσως μετά έγινε φυγοκέντρηση στα 19.500 rpm για 40 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε σε ένα άλλο falcon ενώ το ίζημα απορρίφθηκε. Τέλος, το υπερκείμενο διηθήθηκε μεσώ φίλτρου διαμέτρου 0,45 μm.

3.4. Απομόνωση με τη στήλη HisPur™ Cobalt Resin με Batch Method

Για την απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με ετικέτα His, εφαρμόστηκε η μέθοδος παρτίδας, κάνοντας χρήση της ρητίνης κοβαλτίου HisPur Cobalt Resin (Thermo Scientific). Αρχικά, προστέθηκαν 2ml ρητίνης σε falcon και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 19.500 rpm για 5 λεπτά, με σκοπό την απομάκρυνση του διαλύματος αποθήκευσης. Στο ίζημα προστεθήκαν 20 ml ρυθμιστικού διαλύματος

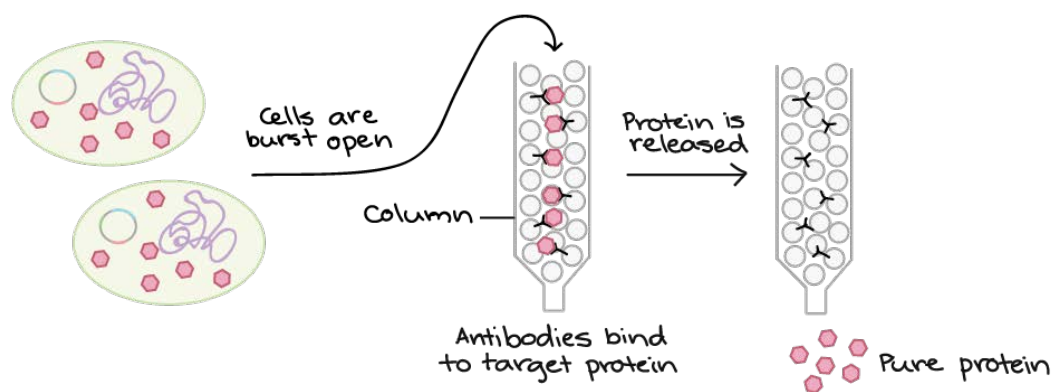
εξισορρόπησης/ Equilibration, μέχρι να σχηματιστεί ομοιογενές εναιώρημα, και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε εκ νέου υπό τις ίδιες συνθήκες. Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε 2 φορές ώστε να εξασφαλιστεί η πλήρης εξισορρόπηση της ρητίνης.

Στην συνέχεια, το πρωτεϊνικό διάλυμα αναμίχθηκε με ίσο όγκο από το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης/ Equilibration για την προετοιμασία του δείγματος προς καθαρισμό. Το διάλυμα αυτό προστέθηκε στο falcon που περιείχε τη ρητίνη, και το μίγμα επωάστηκε υπό ανάδευση σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα (end-over-end rotator) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να διευκολυνθεί η ειδική δέσμευση της His-tagged πρωτεΐνης στη ρητίνη.

Μετά την επώαση, το falcon υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση στις 2.000 rpm για 5 λεπτά και το υπερκείμενο (flow-through) συλλέχθηκε. Ακολούθησαν δύο στάδια πλύσης της ρητίνης, αρχικά με 30 ml Equilibration Buffer για 10 λεπτά και επαναλαμβάνουμε την ίδια διαδικασία.

Έπειτα προσθέτουμε 2ml Equilibration Buffer και το μεταφέρουμε στην στήλη όπου την αφήνουμε να σχηματιστεί η στήλη. Στην συνέχεια προσθέτουμε 10 ml Equilibration Buffer και το συλλέγουμε καθώς σε αυτό το σημείο απομακρύνονται οι συνδεδεμένες πρωτεΐνες.

Η έκλυση των δεσμευμένων His-tagged πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 10ml διαλύματος έκλυσης (Elution Buffer) και συλλέχθηκαν 10 κλάσματα των 500μl.



Εικόνα 15 Απομόνωση επιθυμητής πρωτεΐνης με στήλη HisPur™ Cobalt Resin με Batch Method.

Khan Academy. (2015). *Bacterial Transformation & Selection*. Khan Academy.

<https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/bacterial-transformation-selection>

Υλικά: Διαπίδυση

HEPES (Serva)

KCl (Merck)

MgCl₂

EDTA

H₂O

3.5 Διαπίδυση

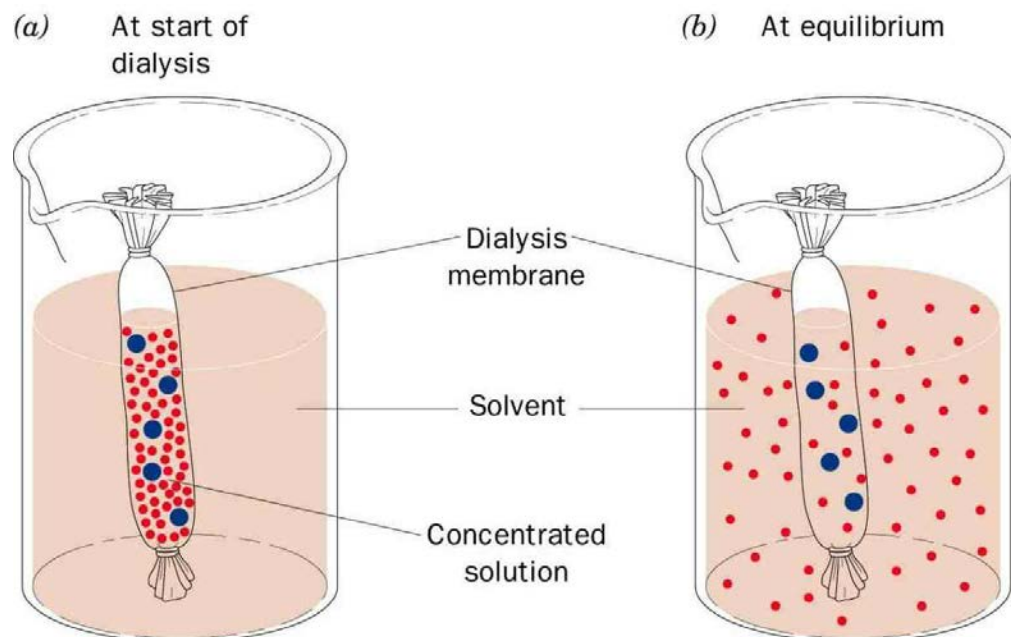
Reaction Buffer (Διαπίδυση)	
Αντιδραστήρια	Όγκος
HEPES ($c=20mM$)	20ml
KCl ($c=0,1mM$)	2ml
MgCl ₂ ($c=100mM$)	7,5ml
EDTA ($c=0,5M$)	200μl
H ₂ O	470ml

Πίνακας 1 Διάλυμα Διαπίδυσης

Πριν την έναρξη της διαδικασίας διαπίδυσης, η μεμβράνη πλένεται επιμελώς με απεσταγμένο νερό και κλείνουμε την μία άκρη της μεμβράνης με κλιπάκια εργαστηριακά. Στο εσωτερικό της μεμβράνης προστίθενται τα κλάσματα της έκλουσης. Αφού γεμίστηκε η μεμβράνη, σφραγίζεται και από την άλλη πλευρά με αντίστοιχο τρόπο, ώστε να δημιουργηθεί ένα κλειστό σύστημα.

Η πλήρως σφραγισμένη μεμβράνη τοποθετείται σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο χωρητικότητας 500ml, ο οποίος γεμίζεται με το reaction buffer και η μεμβράνη παραμένει σε αυτό το διάλυμα για 16 ώρες, υπό ψύξη στους 4°C και συνεχή ανάδευση.

Καθ' όλη την διάρκεια της διαπίδυσης, η θερμοκρασία διατηρείται χαμηλή θερμοκρασία (4°C) για τη σταθερότητα των πρωτεϊνών, ενώ η ανάδευση εξασφαλίζει την ομοιόμορφη κατανομή των διαλυμένων ουσιών.



Εικόνα 16 Διαπίδυση. *lfields12, A. (2019, January 25). Protein Purification: Dialysis. <https://masteringcollegebiochemistry.wordpress.com/2019/01/25/protein-purification-dialysis/>*

Υλικά: Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)

HEPES (Serva)

KCl (Merck)

Glycerol (Applichem)

B- μερκαπτοαιθανόλη (Riedel de Haen)

PMSF (Phenylmethanesulfonylfluoride)

Triton X-100 (Merck)

Λυσοζύμη (Serva)

Imidazole (Sigma)

EDTA (ethylenediaminetetraacetic) (Merck)

MgCl₂

dH₂O

3.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)

Separating Buffer (10% - 5ml)	
Αντιδραστήρια	Όγκος
Ακρυλαμίδιο 30%	1,700μl
Tris-HCl 1,5% (pH=8,8)	1,300μl
SDS 10%	50μl
TEMED	2μl
APS 10%	50μl
ddH ₂ O	1,900μl

Πίνακας 2 Πηκτή Διαχωρισμού (10%)

Stalking Buffer (2ml)	
Αντιδραστήρια	Όγκος
Ακρυλαμίδιο 30%	330μl
Tris-HCl 1,5% (pH=6,8)	250μl
SDS 10%	20μl
TEMED	2μl
APS 10%	20μl
ddH ₂ O	1,400μl

Πίνακας 3 Πηκτή επιστίβαξης (5%)

Loading Buffer 4x (10ml)	
Αντιδραστήρια	Όγκος
Tris-HCl 1 M (pH=6,8)	2ml
Bromophenol Blue	0,013gr
SDS 10%	0,8gr
DTT 1M	4ml
Γλυκερόλη 40%	1,6ml
ddH ₂ O	2,4ml

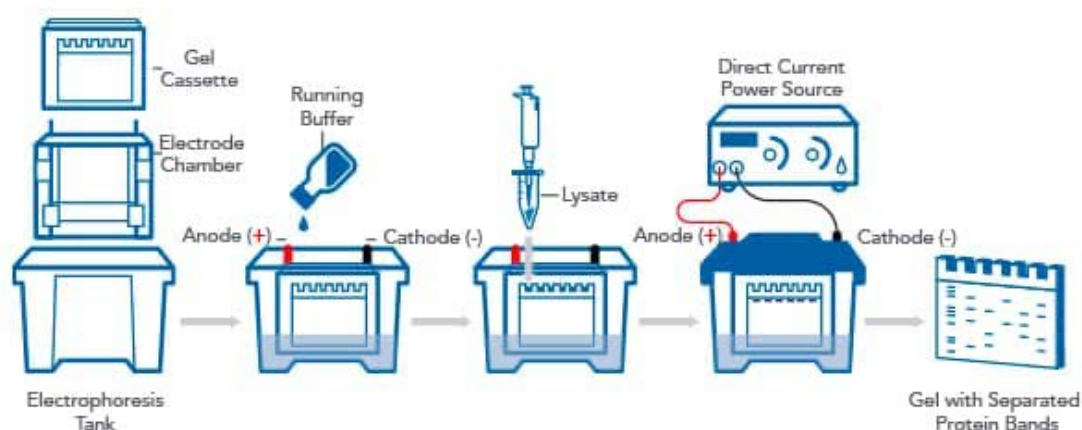
Πίνακας 4 Διάλυμα Loading Buffer (Laemmli 4x Buffer)

Μετά τον καθαρισμό πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση του αποδιατακτικού παράγοντα SDS, ο οποίος καταστρέφει τη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών και προσδίδει σε όλα τα μόρια αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός τους να γίνεται αποκλειστικά βάσει του μοριακού τους βάρους. Επιπλέον, για τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών προστίθεται β-μερκαπτοαιθανόλη.

Η πηκτή SDS-PAGE αποτελείται από δύο φάσεις διαφορετικής συγκέντρωσης πολυακρυλαμίδιου. Η πρώτη φάση ονομάζεται Stalking (5%), σκοπός της είναι να ευθυγραμμιστούν τα δείγματα πρωτεϊνών σε μία ζώνη για να ξεκινήσουν την δεύτερη φάση ταυτόχρονα. Η δεύτερη φάση πολυακρυλαμίδιο (10%), όπου γίνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθος τους καθώς εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο (100 Volt)

Τα δείγματα που θα τρέξουν προετοιμάζονται κατάλληλα, αρχικά αναμειγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης 4x (loading buffer), ώστε να υπάρχει τελική αναλογία 1x. Άρα προσθέσαμε 30μl διάλυμα δείγματος (έκλουσης) και 10μl loading buffer, έπειτα τοποθετήθηκαν τα δείγματα στους 95°C για 5 λεπτά για να αποδιάταχουν οι πρωτεΐνες. Η πηκτή τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα (running buffer 1x). Στην συνέχεια προστέθηκε το κάθε δείγμα στις οπές της πηκτής και στην πρώτη οπή προστέθηκε ο μάρτυρας μοριακού βάρους (protein ladder). Τέλος, συνδέεται το τροφοδοτικό με τάση 100 Volt.

Η μέθοδος Coomassie Brilliant Blue βασίζεται στη δέσμευση της χρωστικής στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων και ιοντικών αλληλεπιδράσεων, το οποίο αποτελείται από 0,1% Coomassie Brilliant Blue, 50% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ και απεσταγμένο νερό και υπάρχει και το διάλυμα αποχρωματισμού το οποίο αποτελείται από 40% αιθανόλη, 10% οξικό οξύ και απεσταγμένο νερό. Αρχικά η πηκτή καλύπτεται με το διάλυμα διαχωρισμού και βράζεται 1 λεπτό στο φούρνο μικροκυμάτων και έπειτα απομακρύνεται το διάλυμα και προστίθεται το διάλυμα της Coomassie το οποίο επωάζετε με ανάδευση 15 λεπτά. Τέλος ξεπλένεται με νερό το πήκτωμα και φαίνονται μόνο οι χρωματισμένες ζώνες των πρωτεϊνών.



Εικόνα 17 Διάγραμμα σταδίων ηλεκτροφόρησης SDS- PAGE. *Novus Biologicals. (2024). Western blot SDS-PAGE. Novus Biologicals. <https://www.novusbio.com/support/support-by-application/western-blot-sds-page>*

Υλικά: Western Blotting

Tris- HCl

Acrylamide (Serva)

N'N' methylene-bis- Acrylamide (Serva)

SDS (Sodium dodecyl sulfate) (Serva)

TEMED (N,N,N',N'- tetramethylethylenediamin) (Invitrogen)

10% APS

TBS-T: TBS, Tween20

PBS-T: PBS, Tween20

Γλυκίνη (Serva)

Σκόνη γάλακτος (Regilait)

Μεμβράνη PVDF (Macherey-Nagel)

Χαρτιά Whatman

Rabbit polyclonal PARN (A42) Antibody #3894 (Cell Signaling)

Rabbit monoclonal PARN ab188333 (Abcam)

dH₂O

Methanol (Applichem)

3.7 Western Blotting

Blocking B. 5%	Stripping B. pH 2,2 (50ml)	Running B. 4x	Transfer B. (100ml)
Γάλα 5%	1,5% Γλυκίνη	250mM Tris	1x Towbin
TBS-T	0,1% SDS	1,92M Γλυκίνη	20% μεθανόλη
-	Tween20	-	dH ₂ O

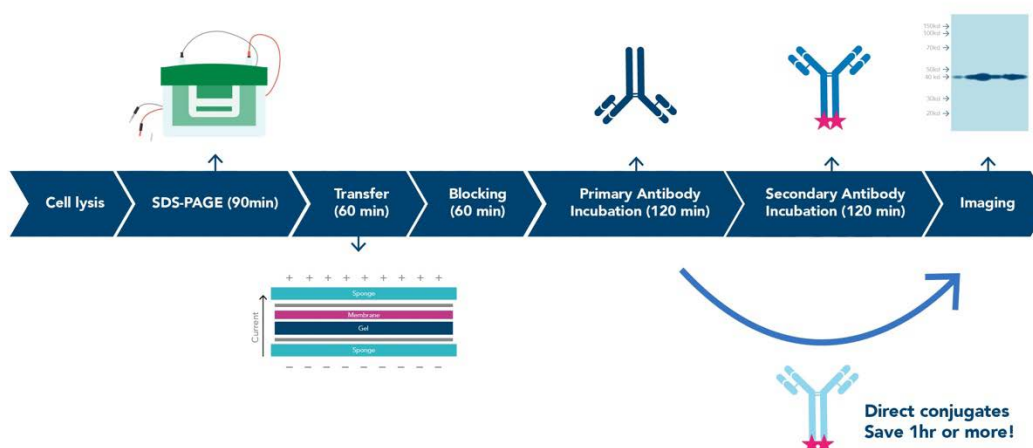
Η τεχνική Western Blotting αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Αρχικά θα πρέπει να γίνει διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) και στη συνέχεια η μεταφορά τους σε μεμβράνη PVDF, που ανιχνεύονται μεσώ ειδικών αντισωμάτων. Εφόσον έχει γίνει παρασκευή του separating gel, stacking gel και η προετοιμασία των δειγμάτων (30μl δείγμα και 10μl loading buffer), τα δείγματα φορτώνονται στα πηγαδάκια του gel και το δοχείο συμπληρώνεται με το Running Buffer και τέλος συνδέεται το τροφοδοτικό σε τάση 100Volt για περίπου 1ώρα.

Η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε ένα δοχείο που περιέχει 100% μεθανόλη για 2 λεπτά για να ενεργοποιηθεί η μεμβράνη PVDF. Στην συνέχεια, παρασκευάζουμε το Transfer buffer (100ml) που αποτελείται από 10ml Running Buffer, 20 ml μεθανόλης και 70ml

νερό. Αρχικά τοποθετούνται τρία φύλλα χαρτιού Whatman εμποτισμένα με Transfer buffer στο αρνητικό ηλεκτρόδιο, ακολουθεί η μεμβράνη PVDF, το gel και τέλος άλλα τρία φύλλα Whatman, συνεχώς δίνεται προσοχή στην αποφυγή παγίδευση φυσαλίδων αέρα μεταξύ όλων αυτών στρωμάτων. Κλείνεται η συσκευή και τοποθετείται το τροφοδοτικό σε 0,27A για 52 λεπτά.

Έχοντας τρέξει το gel και έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες στην PVDF μεμβράνη μετά ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης με TBS-T 10x (450ml H₂O, 50ml TBS και 500μl Tween) για 5 λεπτά. Η PVDF μεμβράνη, πλέον με τις πρωτεΐνες καθηλωμένες στην επιφάνεια της, τοποθετείται σε Blocking Buffer για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση για να παρεμποδιστεί η μη ειδική δέσμευση του αντισώματος.

Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το 1^ο αντίσωμα, overnight στους 4°C με συνεχή ανάδευση. Την επομένη μέρα το αντίσωμα απομακρύνεται και πραγματοποιούνται τρεις πλύσεις διάρκειας 5 λεπτά με κατάλληλο διάλυμα έκπλυσης TBS-T. Έπειτα, η μεμβράνη επωάζεται με το 2^ο αντίσωμα για 1 ώρα, το οποίο συνδέεται με το 1^ο αντίσωμα και γίνονται τρεις πλύσεις των 5 λεπτών με TBS-T και έπειτα ανιχνεύεται το σήμα. Η εμφάνιση γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο του συστήματος ανοσοανίχνευσης ECL Plus και με τη βοήθεια του Uvitec Alliance 4 Imaging System (Cambridge) που υπάρχει στην Ιατρική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.



Εικόνα 18 Διάγραμμα Western Blot. *How to save time on your immunoassay experiments. (n.d.).* [Www.ptglab.com. https://www.ptglab.com/news/blog/seizing-the-day-how-to-save-time-on-your-immunoassay-experiments/](https://www.ptglab.com/news/blog/seizing-the-day-how-to-save-time-on-your-immunoassay-experiments/)

Υλικά:

Tris (Applichem)

Acrylamide (Serva)

N'N' methylene-bis- Acrylamide (Serva)

SDS (Sodium dodecyl sulfate) (Serva)

TEMED (N, N,N',N'm- tetramethylethylenediamin) (Invitrogen)

10% APS

Ουρία (Serva)

HEPES (Serva)
KCl (Merck)
MgCl ₂ (Panreac)
Γλυκερόλη (Applichem)
DTT (dithiothreitol) (Applichem)
RNAsin (Takara)
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) (Merck)
Βορικό οξύ (Calbiochem)
dH ₂ O
Φίλτρο 0,20μm (EMD Millipore)

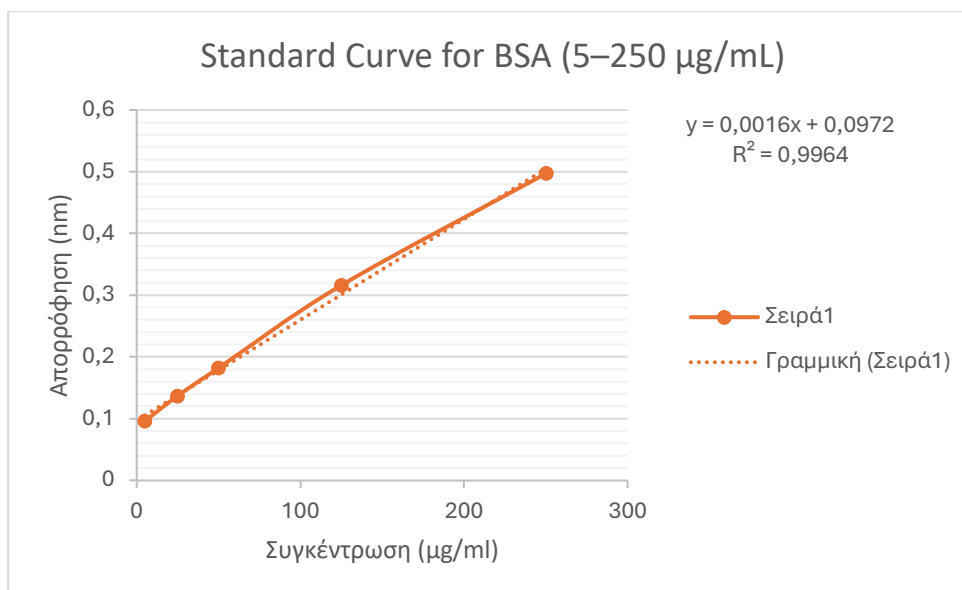
3.8 Ποσοτικοποίηση

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) στο εύρος 5-250 μg/ml, το οποίο βασίζεται στην αντίδραση του χαλκού (Biuret) και στην έγχρωμη ένωση του ιόντος Cu⁺ με το αντιδραστήριο BCA. Ακολουθήθηκε το enhanced πρωτόκολλο της test tube μεθόδου με επώαση στους 60°C για 30 λεπτά.

Αρχικά παρασκευάστηκε το αντιδραστήριο εργασίας (Working Reagent, WR) με ανάμιξη των BCA Reagent A και B σε αναλογία 50:1. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε σειρά πρότυπων διαλυμάτων λευκωματίνης ορού βόειου (BSA) σε γνωστές συγκεντρώσεις.

Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 562nm με φασματοφωτόμετρο, ενώ οι τελικές τιμές προέκυψαν με αφαίρεση της απορρόφησης του blank από τις υπόλοιπες.

Φιαλίδιο	Διάλυμα (WFI)	Πρόσθεση από BSA	Τελική [BSA] (μg/ml)	Abs
A	700 μL	100 μL από το stock	250	0,497
B	400 μL	400 μL από A	125	0,316
C	450 μL	300 μL από B	50	0,182
D	400 μL	400 μL από C	25	0,137
E	400 μL	100 μL από D	5	0,096
F	400 μL	0 μL (μόνο διαλύτης)	0	0,05



	Abs	Συγκέντρωση (µg/ml)	Συγκέντρωση (µg/µl)
PARN	0,156	36,75µg/ml	0,037µg/µl
PARN- V1	0,45	220,5 µg/ml	0,22 µg/µl
E378A	0,195	61,125 µg/ml	0,06 µg/µl

3.9 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας

Reaction Buffer (2ml)	
Αντιδραστήρια	Όγκος
HEPES	80µl
KCl	8µl
MgCl	30µl
EDTA	0,8µl
ddH2O	1881,2µl

Πηκτή ουρίας 20% acrylamide mix- 8M ουρία (50ml)	
Αντιδραστήρια	Όγκος
Acrylamide	24,5gr
Ουρία	24gr
TBE 10x	5ml
ddH2O	2,5ml
10% APS	100µl
TEMED	10µl

TBE 10x (250ml)	
Αντιδραστήρια	Όγκος
Tris	27gr
Βορικό οξύ	13,75 gr
EDTA (50mM)	1,86gr
dH ₂ O	230ml

40% acry-bisacrylamide mix (100ml)	
Αντιδραστήρια	Όγκος
Acrylamide	38gr
Bisacrylamide	2gr
ddH ₂ O	80ml

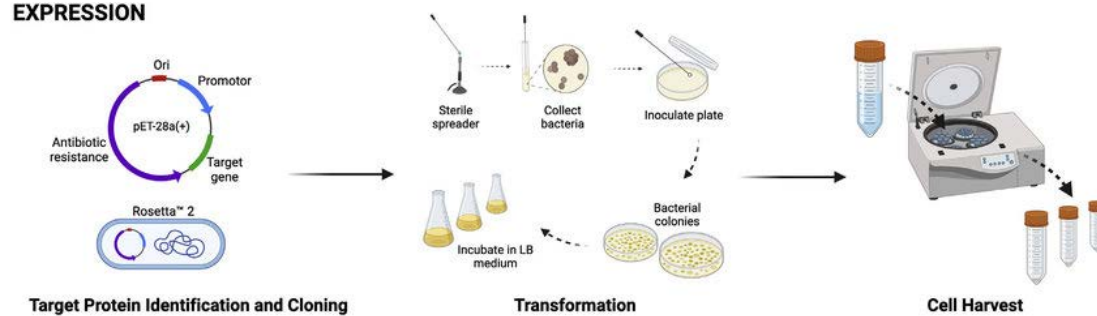
2xRNA sample buffer (10ml)	
Αντιδραστήρια	Όγκος
Acrylamide	38gr
Bisacrylamide	2gr
ddH ₂ O	80ml

Η μελέτη της αποδενυλιωτικής δραστηριότητας της PARN_V1 (Homo sapiens poly(A)-specific ribonuclease, transcript variant 2), εξετάστηκε με *in vitro* RNA activity assay, χρησιμοποιώντας συνθετικό υπόστρωμα RNA σημασμένο που φέρει φθορίζουσα ομάδα Cy3 στο 5' άκρο (5'-Cy3-RNA). Το υπόστρωμα αναμίχθηκε με την PARN_V1 στο ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (Reaction Buffer). Στην συνέχεια ετοιμάσαμε το Master Mix το οποίο περιέχει 95μl Reaction Buffer, 3μl DTT καθώς διατηρεί το αναγωγικό περιβάλλον και 2μl RNasin (10 U/μl) για την προστασία του RNA από την μη ειδική αποικοδόμηση. Για τον τερματισμό της αντίδρασης προστέθηκε ίσος όγκος 2x RNA sample buffer και επώαστηκε για 3 λεπτά στους 85°C και διατηρούνται στον πάγο μέχρι την ηλεκτροφόρηση.

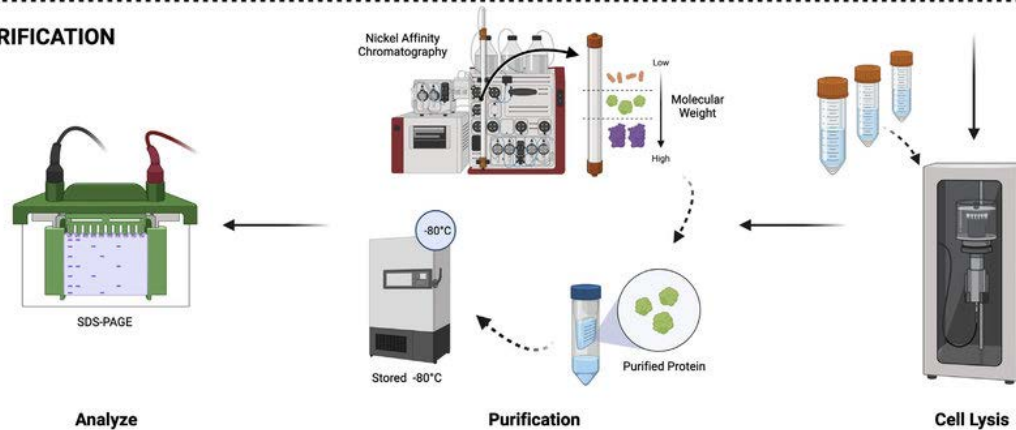
Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, συγκεκριμένα σε πηκτή 20% ακρυλαμίδιο/8M ουρία. Η πηκτή τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται TBE 1x. Στην συνέχεια προσθέτουμε το κάθε δείγμα (20μl) στις υποδοχές της πηκτής και εφαρμόζεται τάση 150 Volt. Τέλος, η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη χρήση λευκού φωτός και χρήση του φίλτρου ανίχνευσης του φθορισμού της χρωστικής Cy3 του μηχανήματος αρχειοθέτησης Uvitec Alliance 4 (Cambridge) στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Master Mix (100μl)	
Αντιδραστήρια	Όγκος
Reaction Buffer	95μl
DTT	3μl
RNAsin	2μl

EXPRESSION



PURIFICATION



Εικόνα 19 Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας έκφρασης και καθαρισμού ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε βακτηριακό σύστημα. *Ertem, F. B., Guven, O., Buyukdag, C., Gocenler, O., Ayan, E., Yuksel, B., ... DeMirci, H. (2022). Protocol for structure determination of SARS-CoV-2 main protease at near-physiological temperature by serial femtosecond crystallography. STAR Protocols, 3(1). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101158>*

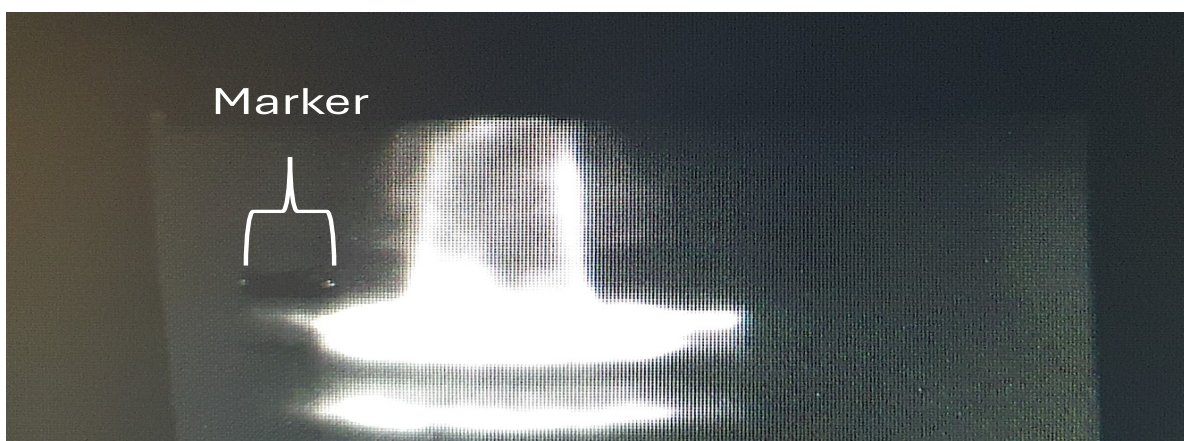
4. Αποτελέσματα

4.1 Υπερεκφράση της PARN_V1 και της PARN

Η υπερεκφράση των PARN (74kDa) και PARN_V1 (67kDa) και του μεταλλάγματος E378A επιτεύχθηκε σε κύτταρα *E.coli* μέσω μετασχηματισμού με κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα έκφρασης. Η επαγωγή της έκφρασης έγινε με την προσθήκη IPTG, και η επιτυχία της διαδικασίας αξιολογήθηκε τόσο φαινοτυπικά όσο και με ανάλυση κατά Western Blot. Στην εικόνα 23 παρουσιάζεται η ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών σε αποστειρωμένο τρυβλίο Petri, γεγονός που επιβεβαιώνει την επιτυχή ενσωμάτωση του πλασμιδίου. Επιπλέον, τα αποτελέσματα του Western Blot (εικόνα 24) για την PARN_V1 έδειξε μια καθαρή και έντονη ζώνη στην μοριακή μάζα των 67kDa, η οποία αντιστοιχεί στην PARN_V1. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν την επιτυχή υπερεκφράση των γονιδίων και παραγωγή των πρωτεϊνών, και καθιστούν εφικτή τη συνέχιση των λειτουργικών αναλύσεων.



Εικόνα 20 Καλλιέργειες βακτηρίων σε τρυβλίο Petri

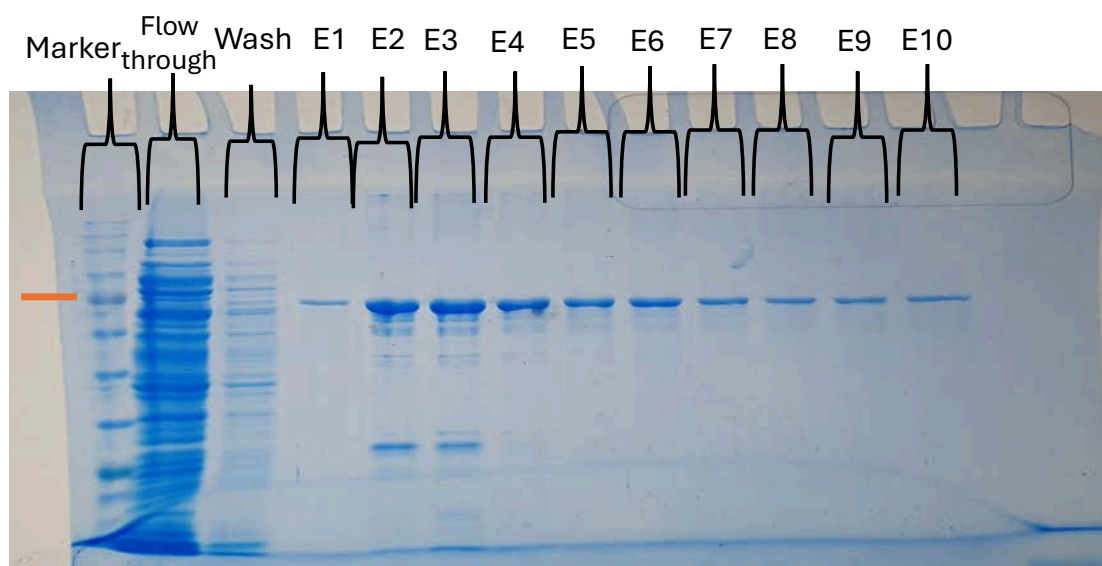


Εικόνα 21 Ανάλυση κατά Western Blot για την επιβεβαίωση της έκφρασης της πρωτεΐνης PARN_V1 (67kDa) σε μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli*, με χρήση αντισώματος anti-His

4.2 Καθαρισμός με HisPur TM Cobalt Resin

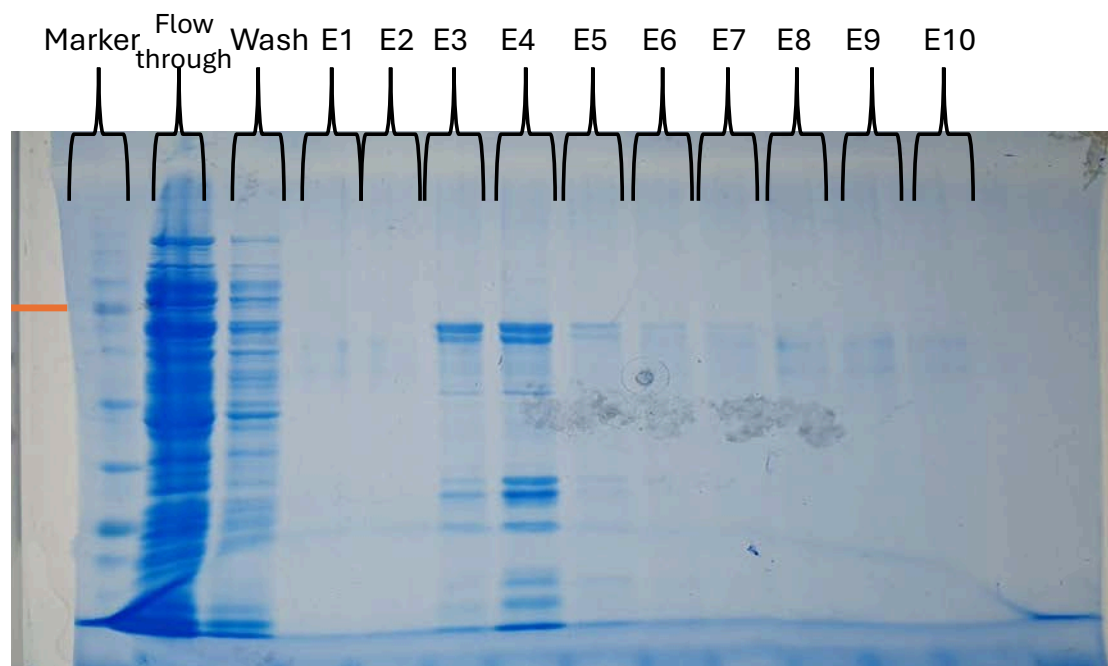
Ο καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών PARN και PARN_V1, οι οποίες φέρουν ετικέτα πολυϊστιδινική (His-tag), πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της ρητίνης κοβαλτίου HisPur TM Cobalt Resin, ακολουθώντας τη Batch Method. Μετά από τρεις διαδοχικές πλύσεις της ρητίνης με ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης, το πρωτεϊνικό εκχύλισμα επώαστηκε με τη ρητίνη υπό ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, επιτρέποντας τη δέσμευση της His-tagged PARN και PARN_V1. Μετά την απομάκρυνση του μη δεσμευμένου υλικού (flow-through), πραγματοποιήθηκε η έκλυση με Elution Buffer και συλλέχθηκαν συνολικά 10 κλάσματα.

Η επιτυχία της διαδικασίας καθαρισμού τεκμηριώνεται μέσω ανάλυσης SDS-PAGE και χρώσης Coomassie Blue, όπως φαίνεται στην Εικόνα 22.



Εικόνα 22 Ο καθαρισμός της PARN σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. FT (Flow Through) διερχόμενο, μη κατακρατημένο από τη στήλη δείγμα. W (Wash), δείγμα έκπλυσης στήλης. E1 – E10, κλάσματα έκλουσης (E, elution). Ο Marker που χρησιμοποιούμε έχει ζώνη στα 74kDa και φαίνεται την πορτοκαλί ζώνη.

Στον καθαρισμό της PARN παρατηρείται κυρίως η έντονη και ευδιάκριτη ζώνη στα κλάσματα E3-E6, περίπου στην περιοχή των 74kDa, αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη- στόχο PARN και επιβεβαιώνει την επιτυχή έκφραση και έκλουσή της από τη ρητίνη (σε διαδοχικά κλάσματα). Επιπλέον, εμφανίζονται ζώνες χαμηλότερης μοριακής μάζας (30kDa), που μπορεί να οφείλονται είτε σε μερική αποικοδόμηση της πρωτεΐνης από πρωτεάσες, είτε σε μη ειδικές πρωτεΐνες των βακτηρίων.



Εικόνα 23 Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης PARN_V1 σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Marker, δείκτες μοριακής μάζας. FT (Flow Through) διερχόμενο, μη κατακρατημένο από τη στήλη δείγμα. W (Wash), δείγμα έκπλυσης

στήλης. E1 – E10, κλάσματα έκλουσης (E, elution). Ο Marker που χρησιμοποιούμε έχει ζώνη στα 74kDa και φαίνεται την πορτοκαλί ζώνη.

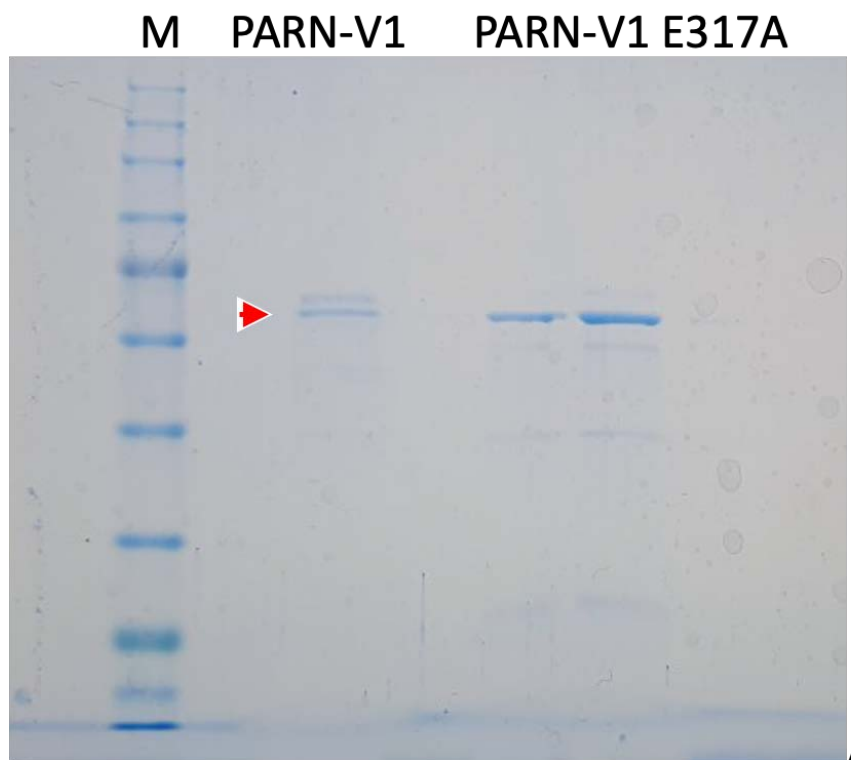
Στον καθαρισμό της PARN_V1 παρατηρείται κυρίως στα κλάσματα E3 έως E5 δύο ζώνες στην περιοχή 67kDa. Η παρουσία αυτών πιθανόν να οφείλεται σε πρωτεολυτικό κατακερματισμό της PARN_V1 ή στην ύπαρξη μερικώς μεταφρασμένων ισόμορφων, γεγονός που παρατηρείται σε διαδικασίες υπερέκφρασης, ή σε μη ειδικές πρωτεΐνες των βακτηρίων. Η κύρια ζώνη που αντιστοιχεί στην πλήρη πρωτεΐνη ενισχύει την επιτυχία της έκφρασης και του καθαρισμού, ενώ η δευτερεύουσα ζώνη ενδέχεται να διατηρεί την ικανότητα δέσμευσης μέσω της His-tag. Στα κλάσματα έκλουσης παρατηρούνται επίσης ζώνες αρκετά χαμηλότερου μοριακού βάρους, οι οποίες μπορούν να αντιστοιχούν είτε σε πρωτεολυτικά παράγωγα της πρωτεΐνης είτε σε μη ειδικές πρωτεΐνες της *E.coli*.

4.3 Καθαρισμός Πρωτεϊνών και Ανάλυση με SEC μετά από Πρωτεόλυση His-tag

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση της ετικέτας His-tag μέσω πρωτεόλυσης με την πρωτεάση TEV, η οποία είχε προστεθεί εκ των προτέρων στο διάλυμα της πρωτεΐνης. Ακολούθησε διαπίδυση (dialysis) τόσο στην PARN_V1 όσο και στο μετάλλαγμα PARN_V1 E317A για την απομάκρυνση της His-tag και την αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος, προκειμένου να καταστεί κατάλληλο για καθαρισμό για την μοριακή διήθηση.

Τα δείγματα του V1 και του μεταλλάγματος PARN_V1 E317A εφαρμόστηκαν σε στήλη κοβαλτίου HisPur™ cobalt Resin. Εφόσον η His-tag είχε αποκοπεί από την TEV πρωτεάση, οι πρωτεΐνες δεν προσδέθηκαν στη ρητίνη και συλλέχθηκαν στο κλάσμα flow-through. Στη συνέχεια, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε συμπύκνωση με Centrifugal Filter.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης (Size -Exclusion Chromatography, SEC) σε στήλη Superdex 200pg, με χρήση του συστήματος ÄKTA-FPLC, για την περαιτέρω καθαρότητα και ανάλυση της ολιγομερούς κατάσταση των πρωτεϊνών.



Εικόνα 24 Καθαρισμός των πρωτεϊνών V1 (με SEC σε σύστημα ÄKTA) και E317A, μετά από απομάκρυνση της His-tag με TEV

Κατά τη Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης, το δείγμα της πρωτεΐνης PARN_V1 παρουσίασε δύο διακριτές ζώνες. Η παρουσία αυτών πιθανόν να οφείλεται σε πρωτεολυτικό κατακερματισμό της PARN_V1.

Αντίθετα, το μετάλλαγμα E317A, μετά την αποκοπή His-tag με TEV πρωτεάση, εμφανίζεται ως μία κυρία ζώνη.

Το flow-through κλάσμα από τη στήλη κοβαλτίου HisPur™ Cobalt Resin επιβεβαιώνει ότι, μετά την απομάκρυνση του His-tag, καμία από τις δύο πρωτεΐνες δεν προσδέθηκε στη ρητίνη, όπως αναμενόταν, και συλλέχθηκαν επιτυχώς στο flow-through, αποφεύγοντας επιμολύνσεις από άλλες πρωτεΐνες που διατηρούν His-tag.

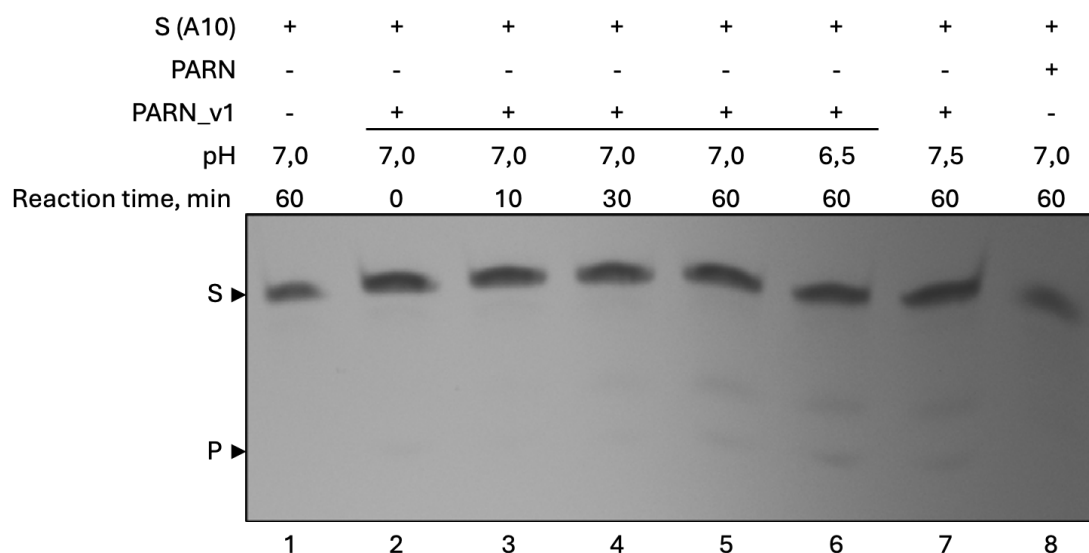
4.4 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας

Ο έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας της ανασυνδυασμένης PARN_V1, πραγματοποιήθηκε *in vitro* RNA activity assay. Το πείραμα βασίστηκε στη χρήση συνθετικού υποστρώματος RNA που φέρει αλληλουχία δέκα (10) αδενοσινών στο άκρο 3' και φθορίζουσα ομάδα Cy3 στο άκρο 5'. Η αποδενυλίωση από την ενεργή μορφή της PARN_V1 οδηγεί σε διάσπαση της ουράς των 10 αδενοσινών του υποστρώματος RNA γεγονός που αποτυπώνεται από τις ζώνες στην Εικόνα 25.

	PARN_V1- Διαδρομή 1	Αρνητικός μάρτυρας- Διαδρομή 2
Master Mix	11 μl	15 μl
Υπόστρωμα	5 μl	5 μl
Πρωτεΐνη	4 μl	-
Master Mix (50μl): 47,5 μl Reaction Buffer + 1,5 μl DTT + 2 μl RNasin		

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/09/2026 09:39:37 EEST - 216.73.216.156

4.5 Μελέτη της Ενζυμικής Δραστικότητας του Εναλλακτικού Μεταγράφου PARN_V1 υπό διαφορετικές συνθήκες pH και χρόνου



Εικόνα 26 Μελέτη ενζυμικής δραστικότητας για το εναλλακτικό μετάγραφο PARN_V1 σε pH και χρόνους επώασης. Η αποικοδόμηση του RNA αυξάνεται με τον χρόνο, με μεγαλύτερη δραστικότητα σε pH 7 και 7,5.

	Αρνητικός μάρτυρας	Θετικός μάρτυρας	Δείγματα
Υπόστρωμα	5 μl	5 μl	5 μl
Master Mix	15 μl	14 μl	11 μl
Πρωτεΐνη	-	1 μl PARN	4 μl PARN_V1
Master Mix (50μl): 47,5 μl Reaction Buffer + 1,5 μl 1mM DTT + 2 μl RNAsin			

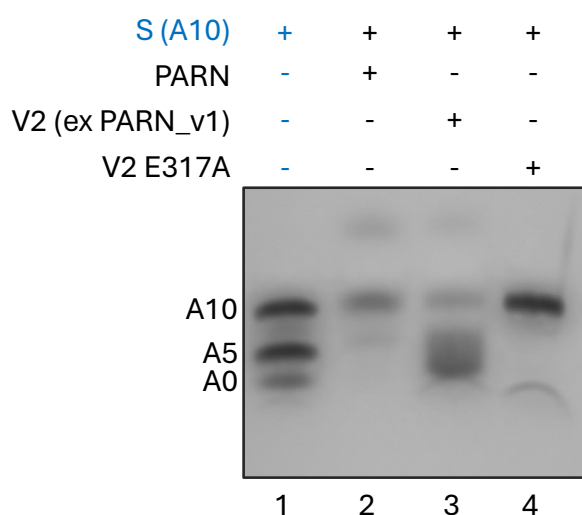
Θέλοντας να ελέγξουμε σε ποιο pH το ένζυμο PARN_V1 δρα καλύτερα πραγματοποιήθηκε in vitro RNA activity assay. Ελέγξαμε την ενζυμική δραστικότητα του ενζύμου στα pH 6,5 – 7 – 7,5, (διαδρομή 5-6-7) το pH 7 (διαδρομή 8) φαίνεται να έχουμε την εντονότερη αποικοδόμηση και έπειτα ακολουθεί το pH 6,5 (διαδρομή 6) και μετά το pH 7,5 (διαδρομή 7). Συνεπώς το ένζυμο παρουσιάζει βέλτιστη δράση σε ουδέτερο περιβάλλον.

Η χρονική εξέλιξη της αντίδρασης σε pH 7 καταγράφεται με δείγματα από 0 έως 60 λεπτά επώασης (διαδρομή 2-5). Στα 60 λεπτά (διαδρομή 5) παρατηρείται έντονη διάχυση του RNA, ένδειξη σημαντικής αποπολυαδενυλίωσης. Στα 30 λεπτά (διαδρομή 4) η αποικοδόμηση είναι επίσης εμφανής, αν και λιγότερο έντονη. Στα 10 λεπτά (διαδρομή 3) υπάρχει ήδη μερική αποικοδόμηση, ενώ σε χρόνο 0 λεπτά (διαδρομή 2) η ζώνη παραμένει άθικτη, όπως αναμένονταν λόγω μηδενικού χρόνου επώασης. Ο αρνητικός έλεγχος (διαδρομή 1) δεν παρουσιάζει ένδειξη

αποικοδόμησης, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η παρατηρούμενη δράση οφείλεται αποκλειστικά στην ενεργή PARN_V1.

Συνολικά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αποπολυαδενυλίωση από την PARN_V1 είναι εξαρτώμενη από το pH και τον χρόνο. Η έντονη αποικοδόμηση σε pH 7 (διαδρομή 8) και pH 6,5 (διαδρομή 6) υποδηλώνει την δραστικότητα του ενζύμου στο συγκεκριμένο εύρος pH, ενώ η σταδιακή αποικοδόμηση με την πάροδο του χρόνου επιβεβαιώνει την κινητική συμπεριφορά του ενζύμου. Οι έλεγχοι λειτουργούν ως σημαντικά σημεία αναφοράς για την επιβεβαίωση της ειδικότητας και της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης.

4.6 Σύγκριση Ενζυμικής Δραστικότητας της PARN, του Εναλλακτικού Μεταγράφου PARN_V1 και του Μεταλλάγματος E317A



Εικόνα 27 Σύγκριση Ενζυμικής Δραστικότητας της PARN, PARN_V1, Μεταλλάγματος E317A. Διαδρομή 1, υποστρώματα RNA με 10, 5 και καμία αδενοσίνες (A10, A5, A0, αντίστοιχα) στο άκρο 3'.

	PARN	PARN_V1	E317A	Αρνητικός μάρτυρας	PARN	PARN_V1	E317A
Υπόστρωμα, μl	2,5	2,5	2,5	5	2,5	2,5	2,5
Master Mix	12,5	12,5	12,5	15	-	-	-
DTT	-	-	-	-	0,6	0,6	0,6
RNasin	-	-	-	-	0,4	0,4	0,4
Ένζυμο	5	5	5	-	16,5	16,5	16
Master Mix (50μl): 47,5 μl Reaction Buffer + 1,5 μl 1mM DTT + 2 μl RNasin							

Στην εικόνα απεικονίζεται η σύγκριση της ενζυμικής δραστικότητας της PARN, του εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1, καθώς και του σημειακού μεταλλάγματος

E317A, υπό ρυθμιστικές συνθήκες pH7. Για την πρόοδο της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα RNA με 10, 5 και καμία αδενοσίνες (A10, A5, A0, αντίστοιχα) στο άκρο 3' και την ομάδα Cy3 στο άκρο 5'. Η PARN και το εναλλακτικό μετάγραφο PARN_V1 διατηρούν πλήρως τη λειτουργικότητά τους, υποδηλώνοντας ότι οι διαφορές στη μεταγραφική εναλλαγή δεν επηρεάζουν τη καταλυτική δράση, ενώ η απώλεια ενζυμικής δραστηριότητας του μεταλλάγματος E317A καταδεικνύει ότι το γλουταμινικό οξύ στη θέση 317 είναι κρίσιμο για τη δομή ή/και τη λειτουργία του καταλυτικού κέντρου της PARN. Επιπλέον, η PARN_V1 αφαίρεσε πλήρως την ουρά των 10 αδενοσινών, όπως φαίνεται με την ανίχνευση προϊόντων που αντιστοιχούν σε RNA A0, ενώ η PARN σε προϊόντα κυρίως στην περιοχή A5 και αρκετά λιγότερα στην περιοχή A0. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι η PARN απαιτεί την παρουσία καλύμματος στο άκρο 5' για να εκδηλώσει επεξεργαστική (processive) δράση, ενώ η PARN_V1 δεν απαιτεί την παρουσία καλύμματος. Σημειώνεται πως τα υποστρώματα A10, A5, A0, δεν φέρουν κάλυμμα 5' μιας και στη θέση του υπάρχει η ομάδα Cy3 για την οπτικοποίηση της αντίδρασης. Ο αρνητικός έλεγχος δεν παρουσίασε καμία δραστηριότητα, επιβεβαιώνοντας την ειδικότητα και αξιοπιστία του πειράματος.

5. Συζήτηση

Η πολυ(Α)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση αποτελεί σημαντικό ρυθμιστικό ένζυμο στην αποικοδόμηση των mRNA μέσω αποδενυλίωσης. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία διερευνήθηκε κυρίως η ενζυμική δραστηριότητα του εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1, το οποίο εντοπίστηκε σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του πλευριτικού μεσοθηλιώματος. Η ισόμορφη αυτή διαφοροποιείται από το κλασικό καταλυτικό μοτίβο DEDD της PARN, λόγω της απώλειας δύο βασικών κατάλοιπων (Asp28 και Glu30).

Το πρόδρομο mRNA υφίσταται τη διαδικασία του εναλλακτικού ματίσματος, δημιουργώντας διαφορετικές ισόμορφες της πρωτεΐνης που μπορεί να επιτελούν τροποποιημένες ή εξειδικευμένες λειτουργίες. Ωστόσο, μεταλλάξεις που επηρεάζουν τα σημεία ματίσματος ή τα ρυθμιστικά στοιχεία του RNA, όπως είναι οι ενισχυτές και οι αποσιωπητές, μπορούν να διαταράξουν αυτή τη διαδικασία κι να συμβάλλουν στην εμφάνιση ασθενειών. Ενδεικτικά, μεταλλάξεις στο γονίδιο SMN2 οδηγούν σε νωτιαία μυϊκή ατροφία λόγω ανεπαρκούς ματίσματος και μειωμένης παραγωγής της λειτουργικής πρωτεΐνης SMN. Αντίστοιχα, σφάλματα στο μάτισμα του γονιδίου της β-σφαιρίνης προκαλούν θαλασσαιμίες, καθώς επηρεάζουν την κανονική σύνθεση της αιμοσφαιρίνης.

Ιδιαίτερη σημασία αποδίδεται στη διαταραχή του ματίσματος και στην ανάπτυξη καρκίνου, καθώς μεταλλάξεις σε βασικούς παράγοντες ματίσματος, όπως U2AF1 και

SRSF2, μεταβάλλουν την κανονική εναλλακτική έκφραση και επηρεάζουν τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Επιπλέον, η υπερεκφράση του παράγοντα SRSF1 έχει αποδειχθεί ότι δρα ως ογκογονίδιο, προάγοντας την ανάπτυξη όγκων μέσω ενεργοποίησης της κυτταρικής οδού mTORc1. Τα παραπάνω δεδομένα αναδεικνύουν τη σημασία της μελέτης εναλλακτικών μεταγραφών, όπως το PARN_V1, ιδιαίτερα σε καρκινικά κύτταρα όπου το εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να συμβάλλει σε δυσλειτουργίες.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία είχε ως στόχο την αξιολόγηση της ενζυμικής δραστηριότητας της PARN_V1 σε σύγκριση με την κλασική μορφή της PARN και να εντοπιστούν κατάλοιπα στα οποία μπορεί να οφείλεται η δραστηριότητα της PARN_V1. Για το σκοπό αυτόν εκφράστηκαν, απομονώθηκαν και αναλύθηκαν η PARN, το εναλλακτικό μετάγραφο της PARN, PARN_V1 και το μετάλλαγμα PARN_V1 E317A.

Η υπερεκφράση της PARN_V1 και του μετάλλαγματος PARN_V1 E317A πραγματοποιήθηκε επιτυχώς σε κύτταρα *E.coli* BL21-Gold μέσω χημειομετασχηματισμού με κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα. Στην συνέχεια, ο καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μέσω ρητίνης κοβαλτίου HisPur™ Cobalt Resin, αξιοποιώντας την His-tag αλληλουχία στην C-τελική περιοχή της πρωτεΐνης. Ο έλεγχος για τους σωστούς καθαρισμούς έγινε με SDS_PAGE και χρώση Coomassie, όπου παρατηρήθηκαν καθαρές ζώνες στα επιθυμητά κλάσματα έκλυσης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρουσία δύο διακριτών ζωνών πλησίον των 67kDa, αυτό πιθανόν να οφείλεται σε πρωτεολυτικό κατακερματισμό της PARN_V1 ή στην ύπαρξη μερικώς μεταφρασμένων ισόμορφων, γεγονός που παρατηρείται στην υπερεκφράση πρωτεϊνών. Στα κλάσματα έκλυσης παρατηρούνται επίσης ζώνες αρκετά χαμηλότερου μοριακού βάρους, οι οποίες μπορούν να αντιστοιχούν είτε σε πρωτεολυτικά παράγωγα της πρωτεΐνης είτε σε μη ειδικές πρωτεΐνες της *E.coli*.

Η διαπίδυση της πρωτεΐνης αποτέλεσε κρίσιμο βήμα για την απομάκρυνση των αλάτων και την εξισορρόπηση του πρωτεϊνικού δείγματος πριν την εξέταση ενζυμικής δραστηριότητας. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές αποδενυλίωσης *in vitro* για την αξιολόγηση της ενζυμικής δραστηριότητας των τριών πρωτεϊνών: της φυσιολογικής PARN, του εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1 και του μετάλλαγματος E317A. Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES, pH7, και περιλάμβαναν θετικό έλεγχο (PARN), αρνητικό έλεγχο καθώς και αντιδράσεις μηδενικού χρόνου για την επιβεβαίωση της ειδικότητας του ενζύμου. Όπως αναμενόταν, η PARN εμφάνισε υψηλή αποδενυλιωτική δραστηριότητα, επιβεβαιώνοντας τη λειτουργικότητα του ενζυμικού πρωτοτύπου.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι το εναλλακτικό μετάγραφο PARN_V1, παρότι διαφοροποιείται από την κλασική καταλυτική τετράδα DEDD λόγω της

απουσίας των Asp28 και Glu30, διατηρεί σημαντικό βαθμό ενζυμικής δραστηριότητας. Η δραστηριότητά του μελετήθηκε σε διάφορους χρόνους επώασης (0, 10, 30 και 60 λεπτών), με σταδιακή αύξηση της αποδενυλίωσης του υποστρώματος, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι το ένζυμο παραμένει λειτουργικό. Παράλληλα, η δραστηριότητα του PARN_V1 αξιολογήθηκε και υπό διαφορετικές τιμές pH (6,5, 7 και 7,5), με βέλτιστη απόδοση στο pH=7.

Αντίθετα, το μετάλλαγμα E317A παρουσίασε πλήρη απώλεια ενζυμικής δραστηριότητας σε όλες τις συνθήκες δοκιμής, γεγονός που υποδεικνύει τον κρίσιμο ρόλο του Glu317 για τη λειτουργικότητα της PARN_V1. Η σύγκριση μεταξύ των τριών μορφών ενισχύει την υπόθεση ότι, παρά την απώλεια των Asp28 και Glu30, η PARN_V1 διατηρεί ενεργό κέντρο μέσω άλλων κρίσιμων καταλοίπων, εκ των οποίων το Glu317 φαίνεται απαραίτητο.

Η παρουσία ζωνών που αντιστοιχούν σε αποικοδομημένα προϊόντα στα πειράματα με την PARN και το PARN_V1, σε αντίθεση με την απουσία τέτοιων σημάτων στους αρνητικούς ελέγχους, επιβεβαιώνει την ειδικότητα της αποδενυλιωτικής δράσης και υποστηρίζει την ενζυμική λειτουργικότητα του εναλλακτικού μεταγράφου.

6. Βιβλιογραφία

1. Balatsos NA, Maragozidis P, Anastasakis D, Stathopoulos C. Modulation of poly(A)-specific ribonuclease (PARN): current knowledge and perspectives. *Curr Med Chem*. 2012;19(28):4838-49. doi: 10.2174/092986712803341539. PMID: 22834816.
2. Balatsos, N. A. A., Anastasakis, D., & Stathopoulos, C. (2009). Inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by purine nucleotides: kinetic analysis. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(2), 516–523. <https://doi.org/10.1080/14756360802218763>
3. Banerjee AK. 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol Rev*. 1980 Jun;44(2):175-205. doi: 10.1128/mr.44.2.175-205.1980. PMID: 6247631; PMCID: PMC373176.
4. Chen CY, Shyu AB. Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2011 Mar-Apr;2(2):167-83. doi: 10.1002/wrna.40. Epub 2010 Sep 15. PMID: 21957004; PMCID: PMC3624885.
5. Galloway A, Cowling VH. mRNA cap regulation in mammalian cell function and fate. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. 2019 Mar;1862(3):270-279. doi: 10.1016/j.bbagr.2018.09.011. Epub 2018 Oct 9. PMID: 30312682; PMCID: PMC6414751.
6. Goldstrohm AC, Wickens M. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Apr;9(4):337-44. doi: 10.1038/nrm2370. Epub 2008 Mar 12. PMID: 18334997.
7. Homo sapiens poly(A)-specific ribonuclease (PARN), transcript variant - Nucleotide -NCBI.(n.d.). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001134477.3?report=graph
8. Huynh TN, Parker R. The PARN, TOE1, and USB1 RNA deadenylases and their roles in non-coding RNA regulation. *J Biol Chem*. 2023 Sep;299(9):105139. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105139. Epub 2023 Aug 6. PMID: 37544646; PMCID: PMC10493513.
9. Jin Y, Dong H, Shi Y, Bian L. Mutually exclusive alternative splicing of pre-mRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2018 May;9(3):e1468. doi: 10.1002/wrna.1468. Epub 2018 Feb 9. PMID: 29423937.
10. Kim E, Goren A, Ast G. Alternative splicing: current perspectives. *Bioessays*. 2008 Jan;30(1):38-47. doi: 10.1002/bies.20692. PMID: 18081010.
11. Lee Y, Rio DC. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu Rev Biochem*. 2015; 84–291-323. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034316. Epub 2015 Mar 12. PMID: 25784052; PMCID: PMC4526142.

12. Lin JC, Tsao MF, Lin YJ. Differential Impacts of Alternative Splicing Networks on Apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2016 Dec 14;17(12):2097. doi: 10.3390/ijms17122097. PMID: 27983653; PMCID: PMC5187897.
13. Liu WF, Zhang A, Cheng Y, Zhou HM, Yan YB. Effect of magnesium ions on the thermal stability of human poly(A)-specific ribonuclease. *FEBS Lett*. 2007 Mar 6;581(5):1047-52. doi: 10.1016/j.febslet.2007.02.008. Epub 2007 Feb 14. PMID: 17306797.
14. López-Lastra M, Rivas A, Bar-íá MI. Protein sy-thesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res*. 2005;38(2-3):121-46. doi: 10.4067/s0716-97602005000200003. PMID: 16238092.
15. Madadlou A, O'Sullivan S, Sheehan D. Fast Protein Liquid Chromatography. *Methods Mol Biol*. 2017;1485:365-373. doi: 10.1007/978-1-4939-6412-3_19. PMID: 27730563.
16. Nanjappa DP, Babu N, Khanna-Gupta A, O'Donohue MF, Sips P, Chakraborty A. Poly (A)-specific ribonuclease (PARN): More than just "mRNA stock clearing". *Life Sci*. 2021 Nov 15;285:119953. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119953. Epub 2021 Sep 11. PMID: 34520768.
17. Nguyen D, Grenier St-Sauveur V, Bergeron D, Dupuis-Sandoval F, Scott MS, Bachand F. A Polyadenylation-Dependent 3' End Maturation Pathway Is Required for the Synthesis of the Human Telomerase RNA. *Cell Rep*. 2015 Dec 15;13(10):2244-57. doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.003. Epub 2015 Nov 25. PMID: 26628368.
18. Nicholson AL, Pasquinelli AE. Tales of Detailed Poly(A) Tails. *Trends Cell Biol*. 2019 Mar;29(3):191-200. doi: 10.1016/j.tcb.2018.11.002. Epub 2018 Nov 29. PMID: 30503240; PMCID: PMC7083203.
19. Parker, R., Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 121–127 (2004). <https://doi.org/10.1038/nsmb724>
20. *PARN poly(A)-specific ribonuclease [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI*. (n.d.-b). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5073>
21. Ramanouskaya, T. V., & Grinev, V. V. (2017). The determinants of alternative RNA splicing in human cells. *Molecular Genetics and Genomics*, 292(6), 1175–1195. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1350-0>
22. Rath A, Deber CM. Correction factors for membrane protein molecular weight readouts on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 2013 Mar 1;434(1):67-72. doi: 10.1016/j.ab.2012.11.007. Epub 2012 Nov 29. PMID: 23201391.
23. Roake CM, Chen L, Chakravarthy AL, Ferrell JE Jr, Raffa GD, Artandi SE. Disruption of Telomerase RNA Maturation Kinetics Precipitates Disease. *Mol*

- Cell. 2019 May 16;74(4):688-700.e3. doi: 10.1016/j.molcel.2019.02.033. Epub 2019 Mar 28. PMID: 30930056; PMCID: PMC6525023.
24. Transcript: *ENST00000341484.11 (PARN-201) - Protein* *συποπλού - Homo_sapiens -Ensembl genome browser 113.* (n.d.). https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000140694;r=16:14435700-14632728;t=ENST00000341484
 25. Tymoczko, J. L., Berg, J. M., & Stryer, L. (2015). *Biochemistry* (3rd ed.). W.H. Freeman and Company.
 26. 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>
 27. Vorländer MK, Pacheco-Fiallos B, Plaschka C. Structural basis of mRNA maturation: Time to put it together. *Curr Opin Struct Biol.* 2022 Aug; 75:102431. doi: 10.1016/j.sbi.2022.102431. Epub 2022 Aug 2. PMID: 35930970.
 28. Wu M, Reuter M, Lilie H, Liu Y, Wahle E, Song H. Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO J.* 2005 Dec 7;24(23):4082-93. doi: 10.1038/sj.emboj.7600869. Epub 2005 Nov 10. PMID: 16281054; PMCID: PMC1356309.
 29. Άννα Πολίτη, Διερεύνηση εναλλακτικών μεταγραφών της πολυ(Α) εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης, PARN, στο μεσοθηλίωμα. Διπλωματική εργασία, Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. (2018).
 30. Αντωνόπουλος Διονύσιος (2024 Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας) Χαρακτηρισμός εναλλακτικού μεταγράφου της πολυ(Α)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης, PARN, και διερεύνηση του βιολογικού του ρόλου. (n.d.). <https://freader.ekt.gr/eadd/index.php?doc=55844&lang=el#p=1>