



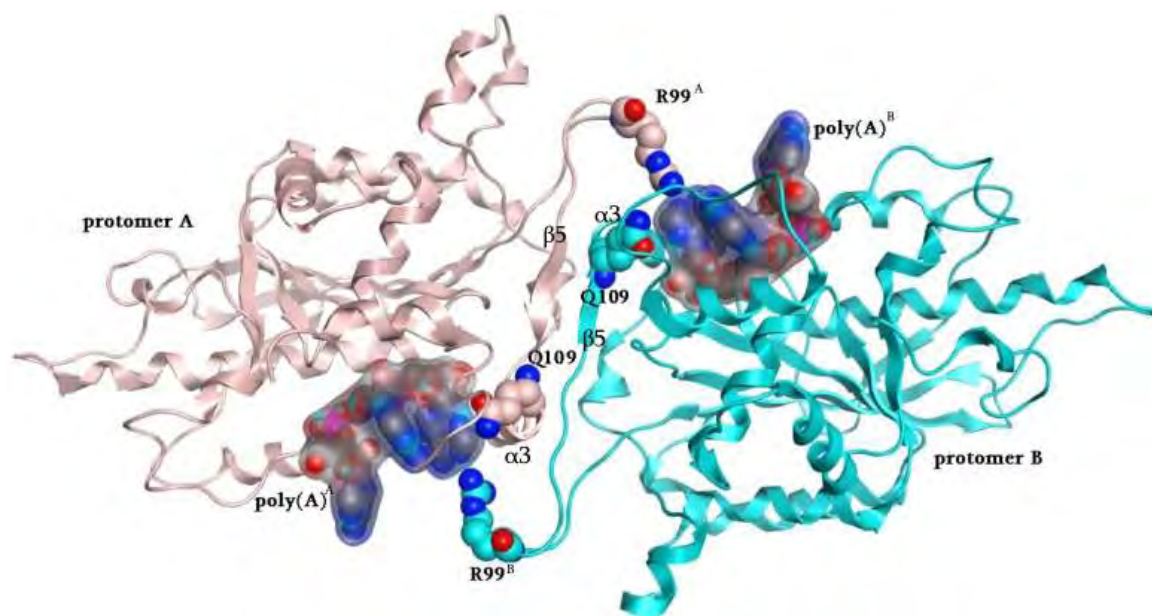
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ-ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

**ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ R99 ΚΑΙ Q109 ΤΗΣ ΠΟΛΥ(A)
ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ ΣΤΗ ΔΟΜΗ, ΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΚΑΙ ΤΟΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΤΗΣ ΡΟΛΟ**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΣΧΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2015

*“ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ R99 ΚΑΙ Q109 ΤΗΣ ΠΟΛΥ(A)
ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ ΣΤΗ ΔΟΜΗ, ΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΚΑΙ ΤΟΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΤΗΣ ΡΟΛΟ”*

*“THE IMPACT OF R99 AND Q109 ON POLY(A) SPECIFIC RIBONUCLEASE
STRUCTURE, ACTIVITY AND BIOLOGICAL ROLE”*

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Επιβλέπων καθηγητής:

Νικόλαος Μπαλατσός, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τριμελής Επιτροπή:

Νικόλαος Μπαλατσός, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δημήτριος Λεωνίδας, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σοφία Κοσσίδα, Professor, MGT, Laboratoire d'ImmunoGénétique Moléculaire, Université de Montpellier, France

...Η επιστήμη πάντοτε κάνει λάθη.

Ποτέ δεν έλυσε ένα πρόβλημα, χωρίς να θέσει ένα άλλο...

"Τζορτζ Μπέρναρντ Σο"

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία είναι το αποτέλεσμα μιας σειράς αλληλεπιδράσεων με διάφορα άτομα, καθένα από τα οποία έπαιξε ένα σημαντικό ρόλο στην εξέλιξή της. Αξίζει, λοιπόν, να αφιερώσω την παρούσα σελίδα για να ευχαριστήσω ειλικρινά τα άτομα αυτά για τη βοήθειά που μου προσέφεραν. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της παρούσας μελέτης του Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλαο Μπαλατσό για την παρότρυνση στην επιλογή του συγκεκριμένου θέματος, την συνεχή καθοδήγηση και ενθάρρυνση για την επίτευξη του βέλτιστου δυνατού αποτελέσματος, καθώς και για το χρόνο που μου αφιέρωσε. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτρη Λεωνίδα για τις εύστοχες παρατηρήσεις και τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές της σε όλη τη διάρκεια της εργασίας, την Επίκουρο Καθηγήτρια κα. Άννα-Μαρία Ψαρρά για την βοήθεια της και την Καθηγήτρια κα. Σοφία Κοσσιδά καθώς χάρη σε αυτή έγινε η αρχή για την μελέτη των συγκεκριμένων αμινοξέων. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους Διδάκτορες Α. Κυρίτση και Δ. Χατζηλεοντιάδου για τις σημαντικές συμβουλές τους και τη βοήθεια τους. Ένα ιδιαίτερο, μεγάλο «ευχαριστώ» στον υποψήφιο Διδάκτορα Βύρων Τοργουγίετα όχι μόνο για της συμβουλές του σε επιστημονικά ζητήματα αλλά και για την στήριξη του σε όλα. Βαθιά ευχαριστώ όλα τα μέλη της ομάδας του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, τόσο για τις πολύτιμες συμβουλές τους στα διάφορα στάδια της εργασίας αυτής, όσο και για τον τρόπο που με υποδέχτηκαν και με βοήθησαν να ενταχθώ στην ερευνητική ομάδα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη στήριξη που μου προσφέρει από τα πρώτα χρόνια των σπουδών μου, ώστε να μπορώ να αφιερώνω όσο περισσότερο χρόνο και ενέργεια γίνεται, στην πρώιμη ερευνητική μου δραστηριότητα.

Λάσχου Βασιλική

Ιούλιος 2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βράχυνση της πολυ(A) ουράς είναι συνήθως το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμηση του ευκαρυωτικού mRNA, και καταλύεται από μια οικογένεια ενζύμων που είναι γνωστή ως αποαδενυλάσες. Μεταξύ των αποαδενυλασών, η πολυ(A) εξειδικευμένη-ριβονουκλεάση, PARN, είναι μοναδική καθώς είναι ολιγομερής και αλληλεπιδρά με την 5' καλύπτρα για να μειώσει αποτελεσματικά τις πολυ(A) ουρές. Έχουμε ήδη εντοπίσει το δυνητικό ρόλο των δύο αμετάβλητων καταλοίπων, Αργινίνη⁹⁹ (R99) και Γλουταμίνη¹⁰⁹ (Q109), για τον διμερισμό της PARN. Στη παρούσα μελέτη, εξετάζουμε τον ρόλο των R99 και Q109 σχετικά με τη δομή, τη δραστηριότητα και τις επιπτώσεις της έκφρασης επιλεγμένων παραγόντων στην PARN. Δημιουργήσαμε μονά μεταλλάγματα, όπου η R99 μεταλλάχθηκε είτε σε αλανίνη, είτε σε φαινολαλανίνη ή σε τρυπτοφάνη, η Q109 προς αλανίνη και ένα διπλό μετάλλαγμα R99A/Q109A. Τα μεταλλάγματα απομονώθηκαν με ρητίνες Ni²⁺ σεφαρόζης και γ-Aminophenyl m⁷GTP αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες και ανάλυση κατά Western έδειξε την ύπαρξη των μονομερών, ενώ η PARN αγρίου τύπου παρέμεινε ολιγομερής. Η δραστηριότητα της PARN μετρήθηκε βασιζόμενη σε μια χρωματομετρική δοκιμασία και έδειξε ότι το ποσοστό αποικοδόμησης του πολυ(A) μειώθηκε στα μεταλλάγματα όταν συγκρίθηκε με το ένζυμο αγρίου τύπου. Στην κινητική ανάλυση, όπως αντανάκλατε από τις τιμές των K_M και V_{max} , αμφότερα τα κατάλοιπα επηρεάζουν τη δραστηριότητα · η R99 έχει περισσότερη συμβολή σε σχέση με το Q109, ενώ στο διπλό μετάλλαγμα έχει το μεγαλύτερο αντίκτυπο. Η PARN είναι γνωστό ότι ρυθμίζει την σταθερότητα mRNAs αρκετών γονιδίων που συσχετίζονται με τον καρκίνο, αλλά από παλιότερες μελέτες του εργαστηρίου μας και η έκφραση κάποιων miRNAs. Για την μελέτη της επίδρασης των μεταλλάξεων στην έκφρασή αυτών των mRNAs και miRNAs, υπερεκφράσαμε την αγρίου τύπου PARN και το μετάλλαγμα R99A/Q109A στην κυτταρική σειρά NCI-H520, όπου προέρχονται

από κύτταρα του καρκίνου του πνεύμονα. Βρήκαμε ότι η παρουσία της PARN μείωσε τα επίπεδα των διάφορων mRNAs, συμπεριλαμβανομένου και των k-ras, c-jun, c-fos, ενώ η υπερέκφραση του διπλού μεταλλάγματος σταθεροποιεί τα επίπεδα αυτών των mRNAs. Η μείωση στα επίπεδα των υπόλοιπων mRNAs (CyclinD1, p53, c-myc) υπήρξε ομοίως με την υπερέκφραση της αγρίου τύπου PARN. Υπήρξαν τα ίδια αποτελέσματα και στα επίπεδα των miRNAs (miR-29a-3p και miR-1207-5p). Τα αποτελέσματα αυτά μας αποκάλυψαν, ότι τα κατάλοιπα R99 και Q109 είναι σημαντικά για τη δομή την δραστικότητα και την σταθερότητα επιλεγμένων mRNAs και miRNAs.

ABSTRACT

The shortening of poly(A) tails is usually the first and rate-limiting step of eukaryotic mRNA degradation and it is catalyzed by a family of enzymes known as deadenylases. Among deadenylases, Poly(A)-specific ribonuclease, PARN, is unique as it is oligomeric and it interacts with the 5'-cap to degrade efficiently poly(A) tails. We have previously identified the potential role of two invariant residues, Arginine99 (R99) and Glutamine109 (Q109), on PARN dimerization. In the present study, we examine the role of R99 and Q109 on PARN structure, activity and the impact of the expression of selected factors. We prepared single mutants, where R99 was mutated either to alanine, phenylalanine or tryptophane, Q109 to alanine, and a double mutant R99A/Q109A. The mutants were purified with Ni²⁺ Sepharose and γ -Aminophenyl m⁷GTP Agarose resins. Native electrophoresis and western blot analysis of the mutants showed the presence of monomers, while wild-type PARN remained mainly oligomeric. PARN activity was measured based on a colorimetric assay and revealed that the rates of poly(A) degradation were reduced in the mutants compared to the wild type enzyme. The kinetic analysis, as reflected on the calculated K_m and V_{max} values, showed that both residues affect activity; R99 has stronger contribution compared to Q109, while the double mutant had the strongest impact. PARN is known to regulate the stability of mRNAs of several cancer-related genes and from old experiments in our laboratory regulate the stability of miRNAs. To study the impact of the mutations on the expression of such mRNAs and miRNAs, we overexpressed wild type PARN and the R99A/Q109A mutant in NCI-H520 cells of lung cancer origin. We found that the increased presence of PARN reduced the levels of several mRNAs, including k-ras, c-jun and c-fos, while the overexpression of the double mutant stabilized these mRNAs. Reducing expression levels of mRNAs (Cyclin D1, p53, c-myc) there are when PARN WT over expressed. There were the same results in miRNAs(miR-29a-3p και miR-1207-5p). Our results

revealed R99 and Q109 as important residues for PARN structure and activity that also contribute to the stability of selected mRNAs and miRNAs.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	12
1.1 Σύνθεση του RNA και μετάφρασή του	12
1.2 Το ευκαρυωτικό mRNA τροποποιείται κατά τη διάρκεια ή μετά το πέρας της μεταγραφής του	13
1.3 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA	14
1.3.1 Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει καλύπτρα	14
1.3.2 Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται	16
1.4 Αποικοδόμηση του mRNA	18
1.4.1 Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA	18
1.5 Μηχανισμοί ελέγχου της ποιότητας του mRNA	21
1.6 Αποαδενυλίωση	23
1.7 Σύμπλοκα αποαδενυλασών	25
1.8 Ρύθμιση της αποαδενυλίωσης	26
1.9 Ένζυμα και έλεγχος αποαδενυλίωσης	27
1.10 Ηπολυ(A)-Εξειδικευμένη Ριβονουκλεάση [Poly(A)-specific Ribonuclease , PARN]	29
1.11 Φυλογενετική ανάλυση της PARN και σημαντικός ρόλος της R99	32
2. Σκοπός της εργασίας	35
3. Υλικά και Μέθοδοι	36
3.1 Στοχευόμενη Μεταλλαξιγένεση	36
3.2 Μελέτη των προφίλ έκφρασης των PARN, PARN R99A, PARN Q109A, PARN R99F, PARN R99W, PARN R99A/Q109A	39
3.3 Διαδικασία υπερέκφρασης και απομόνωσης των PARN, PARN R99A, PARN Q109A, PARN R99F, PARN R99W, PARN R99A/Q109A	44
3.4 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blotting)	48
3.5 Ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native-PAGE)	51
3.6 Μέτρηση της ενεργότητας της PARN με κυανό του μεθυλενίου	53
3.7 Κλωνοποίηση των PARN και PARN R99A/Q109A στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA TM ₄ /TO	54
3.8 Κυτταρική σειρά-Χειρισμοί	59

3.9 Διαμόλυνση κύτταρων θηλαστικών με χρήση λιποσωμάτων	62
3.10 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών	64
3.11 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)	65
4. Αποτελέσματα	71
4.1 Δημιουργία στοχευόμενων μεταλλάξεων στην αγρίου τύπου PARN	71
4.2 Συνθήκες προφίλ έκφρασης των πρωτεϊνών (PARN, PARN R99A, PARN Q109A, PARN R99F, PARN R99W, PARN R99A/Q109A)	72
4.3 Υπερέκφραση και απομόνωση των πρωτεϊνών (PARN, PARNR99A, PARNQ109A, PARN R99F, PARN R99W, PARN R99A/Q109A) με χρήση της στήλης HisTrap Ni ⁺ Sepharose	75
4.4 Απομόνωση των PARN και PARN R99A/Q109A με τη στήλη Immobilized γ -Aminophenyl m ⁷ GTP Agarose	77
4.5 Ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών	79
4.6 Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native-PAGE)	80
4.7 Μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας των πρωτεϊνών σε σύγκριση με την αγρίου τύπου PARN	81
4.8 Κλωνοποίηση της PARN αγρίου τύπου και της PARN R99A/Q109A στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA TM ₄ /TO	85
4.9 Υπερέκφραση των PARN και PARN R99A/Q109A σε NCI-H520 και έλεγχος των επιπέδων τους αλλά και των επιπέδων διάφορων mRNAs και miRNAs	88
5. Συζήτηση-Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων	103
6. Βιβλιογραφία	110

1. Εισαγωγή

Το DNA αποθηκεύει τις γενετικές πληροφορίες σε μια σταθερή μορφή, η οποία μπορεί εύκολα να αντιγραφεί. Ωστόσο, η έκφραση αυτών των γενετικών πληροφοριών προϋποθέτει τη ροή της από το DNA στο RNA στις πρωτεΐνες. Το RNA είναι ένα μόριο κεντρικής σημασίας για τη γονιδιακή έκφραση. Η εμπλοκή του RNA σε πολλές λειτουργίες που αφορούν τη γονιδιακή έκφραση υποστηρίζει τη γενική άποψη ότι ολόκληρη η διαδικασία μπορεί να έχει εξελιχθεί σε έναν «κόσμο RNA», στον οποίο αρχικά το RNA ήταν το ενεργό συστατικό του μηχανισμού διατήρησης και έκφρασης της γενετικής πληροφορίας. Αργότερα οι πρωτεΐνες υποβοήθησαν ή ανέλαβαν αποκλειστικά πολλές από αυτές τις λειτουργίες, γεγονός που έχει ως συνέπεια την αύξηση της προσαρμοστικότητας και πιθανόν της αποτελεσματικότητας.

Οι τρεις κύριες τάξεις RNA που εμπλέκονται άμεσα στην παραγωγή πρωτεϊνών είναι: το αγγελιοφόρο RNA (mRNA), το μεταφορικό RNA (tRNA) και το ριβοσωμικό RNA (rRNA). Η γονιδιακή έκφραση πραγματοποιείται σε δύο στάδια: στη μεταγραφή όπου παράγει ένα μονόκλωνο μόριο RNA όμοιο στην αλληλουχία με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA και στη μετάφραση όπου μετατρέπει τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του mRNA στην αλληλουχία των αμινοξέων που αποτελούν μια πρωτεΐνη.

1.1 Σύνθεση του RNA και μετάφραση του

Η σύνθεση του RNA, ή μεταγραφή, είναι η διεργασία της μεταγραφής των πληροφοριών της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA σε πληροφορίες αλληλουχίας RNA. Η σύνθεση του RNA καταλύεται από ένα μεγάλο ένζυμο που ονομάζεται RNA πολυμεράση. Η σύνθεση του RNA, όπως σχεδόν όλες οι βιολογικές αντιδράσεις πολυμερισμού, πραγματοποιείται σε τρία στάδια: την έναρξη την επιμήκυνση και τον τερματισμό. Η χημεία της σύνθεσης του RNA είναι ίδια για όλες τις μορφές RNA, η συνθετική διεργασία διαφέρει κυρίως στη ρύθμιση, στη μετα-μεταγραφική επεξεργασία και στην ειδική πολυμεράση η οποία συμμετέχει. Ένα μόριο mRNA δε μεταφράζεται σε ολόκληρο το μήκος του, αλλά κάθε mRNA περιέχει

τουλάχιστον μία κωδική περιοχή, η οποία σχετίζεται σε μια πρωτεϊνική αλληλουχία μέσω του γενετικού κώδικα: κάθε νουκλεοτιδική τριπλέτα (κωδικόνιο) της κωδικής περιοχής αντιστοιχεί σε ένα αμινοξύ. Η αλυσίδα του DNA που φέρει την ίδια αλληλουχία με το mRNA (με εξαίρεση ότι περιέχει T αντί για U) και ονομάζεται κωδική αλυσίδα ή αντισημαινούσα αλυσίδα.

1.2 Το ευκαρυωτικό mRNA τροποποιείται κατά τη διάρκεια ή μετά το πέρας της μεταγραφής του

Η παραγωγή του ευκαρυωτικού mRNA περιλαμβάνει επιπρόσθετα στάδια μετά τη μεταγραφή. Η μεταγραφή γίνεται με το συνήθη τρόπο, ξεκινώντας με τη δημιουργία ενός μεταγράφου με 5' τριφωσφορικό άκρο. Ωστόσο, το 3' άκρο δημιουργείται αποκόπτοντας ένα τμήμα του μεταγράφου και όχι τερματίζοντας τη μεταγραφή σε μια καθορισμένη θέση. Όσα RNA προέρχονται από γονίδια που περιέχουν ιντρόνια πρέπει να υποστούν μάτισμα, ώστε να αφαιρεθούν τα ιντρόνια και να παραχθεί ένα μικρότερο mRNA που περιέχει μία άθικτη κωδική αλληλουχία. Τροποποιούνται και οι δύο άκρες του μεταγράφου με την προσθήκη επιπλέον νουκλεοτιδίων. Το 5' άκρο του RNA τροποποιείται αμέσως μετά την εμφάνιση του, εξαιτίας της προσθήκης μιας καλύπτρας. Το 3' άκρο τροποποιείται εξαιτίας της προσθήκης μιας σειράς νουκλεοτιδίων αδενυλικού οξέος [πολυαδενυλικό οξύ ή πολυ(A), poly(A)] αμέσως μετά την αποκοπή του. Μόνο μετά την ολοκλήρωση όλων των τροποποιήσεων και της επεξεργασίας μπορεί το mRNA να εξαχθεί από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Κατά μέσο όρο, το mRNA καθυστερεί ~20 λεπτά για να εξέλθει από τον πυρήνα. Μόλις το mRNA εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα και μεταφράζεται. Το ευκαρυωτικό mRNA αποτελεί μόνο ένα μικρό ποσοστό το συνολικού κυτταρικού RNA (~3% της μάζας του). Ο χρόνος ημιζωής των mRNA στους ζυμομύκητες είναι σχετικά μικρός και κυμαίνεται από 1 έως 60 λεπτά. Υπάρχει μια αξιοσημείωτη αύξηση της σταθερότητας στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς: το mRNA των ζωικών κυττάρων είναι σχετικά σταθερό, με χρόνο ημιζωής μεταξύ 1 και 24 ωρών. Τα ευκαρυωτικά πολυσώματα είναι σχετικά σταθερά. Οι τροποποιήσεις και στα δυο άκρα του mRNA συνεισφέρουν σε αυτή τη σταθερότητα.

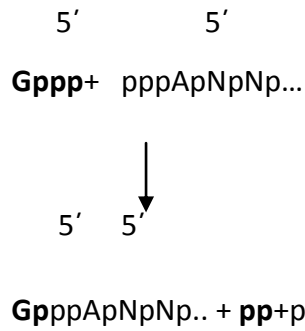
1.3 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA

1.3.1 Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει καλύπτρα

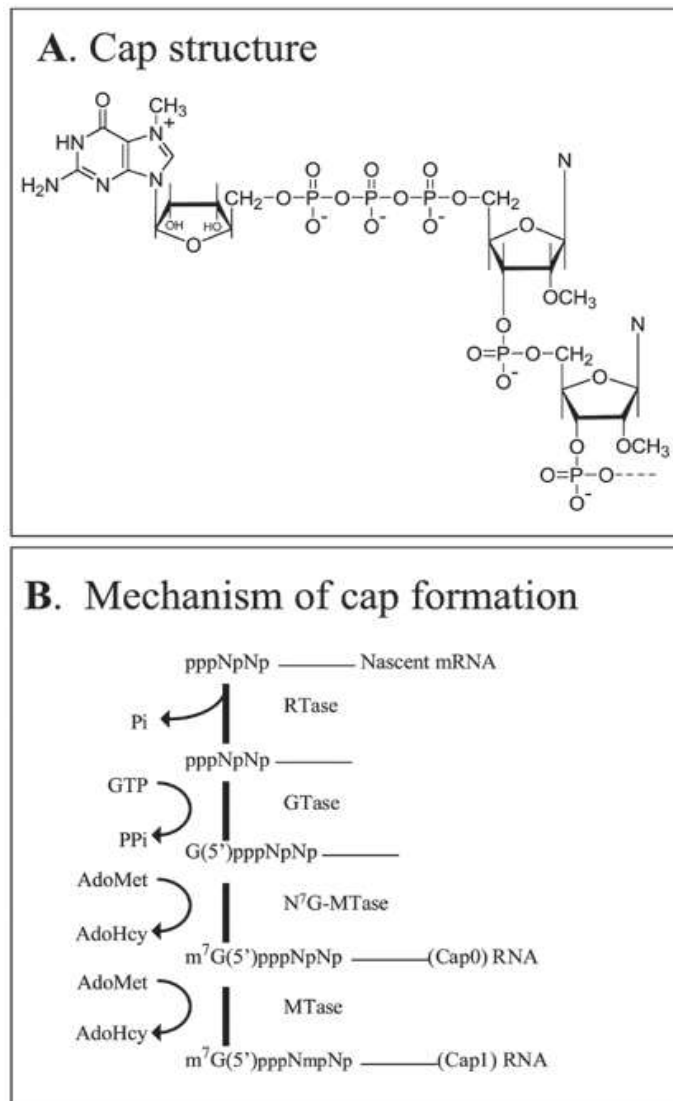
Τα ευκαρυωτικά πολυσώματα είναι σχετικά σταθερά. Οι τροποποιήσεις και στα δύο άκρα του mRNA συνεισφέρουν σε αυτή τη σταθερότητα. Η μεταγραφή αρχίζει μένα τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο (συνήθως μία πουρίνη, A ή G). Το πρώτο νουκλεοτίδιο διατηρεί την 5' τριφωσφορική ομάδα του και δημιουργεί το συνήθη φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ της 3' θέσης του και της 5' θέσης του επόμενου νουκλεοτιδίου [2]. Η αρχική αλληλουχία του μεταγράφου μπορεί να αναπαρασταθεί ως:



Ωστόσο, αν το ώριμο mRNA επεξεργαστεί *in vitro* με ένζυμα τα οποία θα έπρεπε να το αποικοδομήσουν σε μεμονωμένα νουκλεοτίδια, το 5' άκρο δεν παράγει το αναμενόμενο τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο. Αντίθετα, περιλαμβάνει δύο νουκλεοτίδια συνδεδεμένα με 5'-5' τριφωσφορικό δεσμό, ενώ φέρει και μεθυλομάδες. Η ακραία βάση είναι πάντα μια γουανίνη, η οποία προστίθεται στο αρχικό μόρια RNA μετά τη μεταγραφή. Η προσθήκη της G στο 5' άκρο καταλύεται από ένα πυρηνικό ένζυμο, τη γουανυλυλο-τρανφεράση. Η αντίδραση αυτή συμβαίνει τόσο σύντομα μετά την έναρξη της μεταγραφής, που δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθούν παρά μόνο ίχνη του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου στο πυρηνικό RNA. Η συνολική αντίδραση μπορεί να αναπαρασταθεί ως μια συμπύκνωση μεταξύ του GTP και του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου του RNA. Συνεπώς:

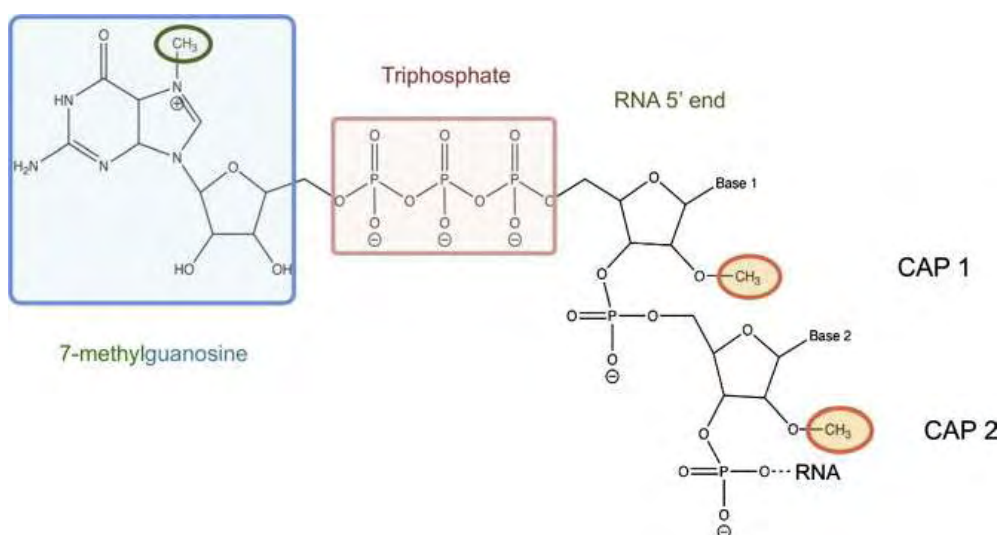


Το νέο κατάλοιπο **G**, που προστίθεται στο άκρο του RNA, έχει τον αντίστροφο προσανατολισμό από όλα τα άλλα νουκλεοτίδια. Αυτή η δομή ονομάζεται καλύπτρα (cap) και αποτελεί υπόστρωμα για αρκετές αντιδράσεις μεθυλίωσης (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Α) Χημική δομή της καλύπτρας και Β) Μηχανισμός δημιουργίας της καλύπτρας.

Οι τύποι των καλυπτρών διακρίνονται από το πλήθος των μεθυλίσεων που έχουν συμβεί. Το N-7 της τελικής γουανίνης μεθυλιώνεται από την S-αδενοσυλομεθειονίνη για να σχηματιστεί η καλύπτρα στη θέση 0. Οι παρακείμενες ριβόζες μπορούν να μεθυλιωθούν και να σχηματιστεί το κάλυμμα 1 ή το κάλυμμα 2 (Εικόνα 2). Τα καλύμματα συμβάλουν στη σταθερότητα των μορίων mRNA, προστατεύοντας τα 5'-άκρα τους από τη δράση φωσφατασών και νουκλεασών. Επιπλέον, τα καλύμματα ενισχύουν τη μετάφραση του mRNA από τα ευκαρυωτικά συστήματα σύνθεσης πρωτεϊνών.

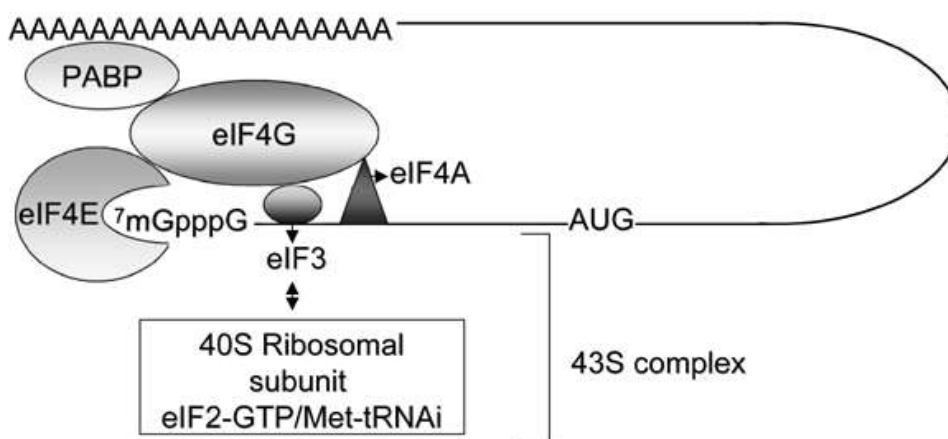


Εικόνα 2. Οι διάφοροι τύποι καλυπτρών διακρίνονται ανάλογα με το πλήθος των μεθυλίσεων που έχουν συμβεί. Η θέση μεθυλίωσης 0 της N-7 είναι στο κυανό πλαίσιο σε κύκλο, οι θέσεις μεθυλίωσης 1 και 2 δείχνονται ως CAP1 και CAP2, αντίστοιχα.

1.3.2 Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται

Η 3' τερματική αλληλουχία από κατάλοιπα A συχνά περιγράφεται ως ουρά πολύ(A), ενώ το mRNA που έχει αυτό το χαρακτηριστικό δηλώνεται ως πολυ(A)⁺ [poly(A)⁺]. Η αλληλουχία πολυ(A) δεν κωδικοποιείται στο DNA, αλλά προστίθεται στο RNA, μέσα στο πυρήνα, μετά τη μεταγραφή. Η προσθήκη της πολυ(A) καταλύεται από το ένζυμο πολυ(A) πολυμεράση [poly(A) polymerase], η οποία προσθέτει ~200 νουκλεοτίδια μονοφωσφορικής αδενοσίνης (A) στο ελεύθερο 3'-OH άκρο του mRNA [3]. Η αλληλουχία πολυ(A) είναι συνδεδεμένη με μία πρωτεΐνη που

ονομάζεται πολύ(A)-συνδεόμενη πρωτεΐνη (PABP, Poly(A)-Binding Protein). Συγγενικές μορφές αυτής της πρωτεΐνης απαντώνται σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ένα μονομερές PABP των ~70kD συνδέεται σε κάθε 10-20 βάσεις της ουράς πολυ(A). Έτσι, ένα κοινό χαρακτηριστικό σε πολλούς ή στους περισσότερους ευκαρυώτες είναι ότι το 3' άκρο του mRNA αποτελείται από μία αλληλουχία πολυ(A), η οποία είναι προσδεμένη σε μία μεγάλη πρωτεϊνική μάζα. Η προσθήκη της πολυ(A) πραγματοποιείται ως μέρος μιας αντίδρασης στην οποία το 3' άκρο του mRNA δημιουργείται και τροποποιείται από ένα σύμπλοκο ενζύμων. Η πρόσδεση της PABP στον παράγοντα έναρξης eIF4G δημιουργεί ένα κλειστό βρόχο, στον οποίο τα 5' και 3' άκρα του mRNA συγκρατούνται στο ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο (Εικόνα 3). Ο σχηματισμός αυτού του συμπλόκου μπορεί να ευθύνεται για κάποιες από τις επιδράσεις της πολυ(A) στις ιδιότητες του mRNA. Η πολυ(A) συνήθως σταθεροποιεί το mRNA. Η ικανότητα της πολυ(A) να προστατεύει το mRNA από την αποικοδόμηση απαιτεί τη σύνδεση της με την PABP.



Εικόνα 3. Η πρόσδεση της PABP στον παράγοντα έναρξης eIF4G δημιουργεί ένα κλειστό βρόχο, στον οποίο τα 5' και 3' άκρα του mRNA συγκρατούνται στο ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο [53].

Η αφαίρεση της πολυ(A) αναστέλλει την έναρξη της μετάφρασης *in vitro* και η μείωση της PABP έχει το ίδιο αποτέλεσμα στο ζυμομύκητα *in vivo*. Αυτές οι επιδράσεις μπορεί να εξαρτώνται από την πρόσδεση της PABP στο σύμπλοκο έναρξης, στο 5' άκρο του mRNA. Υπάρχουν πολλά παραδείγματα στην πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη όπου η αποαδενυλίωση ενός συγκεκριμένου μορίου mRNA

συσχετίζετε με τη μετάφραση του. Σε μερικές περιπτώσεις, τα mRNA αποθηκεύονται σε μη αποαδενυλιωμένη μορφή και η πολυ(A) προστίθεται όταν είναι απαραίτητη η μετάφρασή τους. Σε άλλες περιπτώσεις, τα πολυ(A)⁺ mRNA αποαδενυλιώνονται, με συνέπεια τη μείωση της μετάφρασής τους.

1.4 Αποικοδόμηση του mRNA

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι μια σύνθετη διαδικασία που περιλαμβάνει τον έλεγχο του ρυθμού μεταγραφής, την επεξεργασία και σταθερότητα του mRNA, τον ρυθμό της μετάφρασης και την σταθερότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Στο επίπεδο του mRNA το σημαντικότερο σημείο ελέγχου αφορά την σταθερότητα του μορίου. Ανάλυση μικροσυστοιχιών έχει αποκαλύψει ότι το 40–50% των αλλαγών γονιδιακής έκφρασης σε απόκριση σε διάφορα κυτταρικά σήματα συμβαίνει σε επίπεδο σταθερότητας του mRNA [4,5]. Αυτές οι αλλαγές προκαλούνται συνήθως από μεταβολές στην σύσταση των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων με αποτέλεσμα είτε να αναστέλλεται είτε να διευκολύνεται η αποικοδόμηση. Πολλοί κυτταρικοί παράγοντες και μηχανισμοί είναι αφιερωμένα στον συντονισμό του ρυθμού της αποικοδόμησης του mRNA. Κατά την διάρκεια των τελευταίων πέντε ετών, τα περισσότερα από τα ένζυμα που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση του mRNA έχουν ταυτοποιηθεί και ξεκινάει η διαλεύκανση της σύνθετης ρύθμισης που καθορίζει την πορεία και τον ρυθμό της αποικοδόμησης του mRNA [1].

1.4.1 Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA

Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αποαδενυλίωση

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το μεγαλύτερο ποσοστό των mRNAs αποικοδομείται μέσω του μονοπατιού αποικοδόμησης εξαρτώμενο από αποαδενυλίωση, το οποίο ξεκινά με τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς. Στον πυρήνα, με τη διαδικασία της αποαδενυλίωσης περιορίζονται οι νέο-προστιθέμενες πολυ(A) ουρές, στο κατάλληλο μήκος, ώστε το mRNA να εξαχθεί στο κυτταρόπλασμα και να ξεκινήσει η μετάφραση του, ενώ η εκτεταμένη αποαδενυλίωση του mRNA στο

κυτταρόπλασμα πέρα από ένα συγκεκριμένο μήκος, σηματοδοτεί την αποικοδόμηση του. Η αποαδενυλίωση καταλύεται από τις αποαδενυλάσες, που είναι μαγνήσιο-εξαρτώμενες εξωριβονουκλεάσες, δηλαδή υδρολύουν RNA με κατεύθυνση 3'→5' και πραγματοποιείται κυρίως από το σύμπλοκο Ccr4-Not καθώς και από το σύμπλοκο PARN. Μετά την αποαδενυλίωση, δύο μηχανισμοί μπορούν να οδηγήσουν στην αποικοδόμηση του mRNA: είτε αφαίρεση της 5' καλύπτρας και αποικοδόμηση με κατεύθυνση 5'→3', είτε αποικοδόμηση 3'→5'. Στο πρώτο μονοπάτι, το σύμπλεγμα πρωτεϊνών Lsm 1-7 αλληλεπιδρά με το 3' άκρο του μεταγράφου επάγωντας την αφαίρεση της καλύπτρας μέσω του συμπλόκου Dcp1-Dcp2 και εκθέτωντας έτσι το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την Xrn1p, μια 5'→3' εξωνουκλεάση. Εναλλακτικά, το αποαδενυλιωμένο mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών. Στη περίπτωση αυτή η καλύπτρα υδρολυεται από το ένζυμο Dcp5 [6]. Να σημειωθεί ότι ο ρυθμός της αποαδενυλίωσης ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων mRNAs και εξαρτάται από τη σίγηση miRNA, την ύπαρξη πρόωρων κωδικονίων τερματισμού και καθοριστών σταθερότητας που βρίσκονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή, όπως είναι οι περιοχές πλούσιες σε AU αλληλουχίες ή ARE (Εικόνα 4).

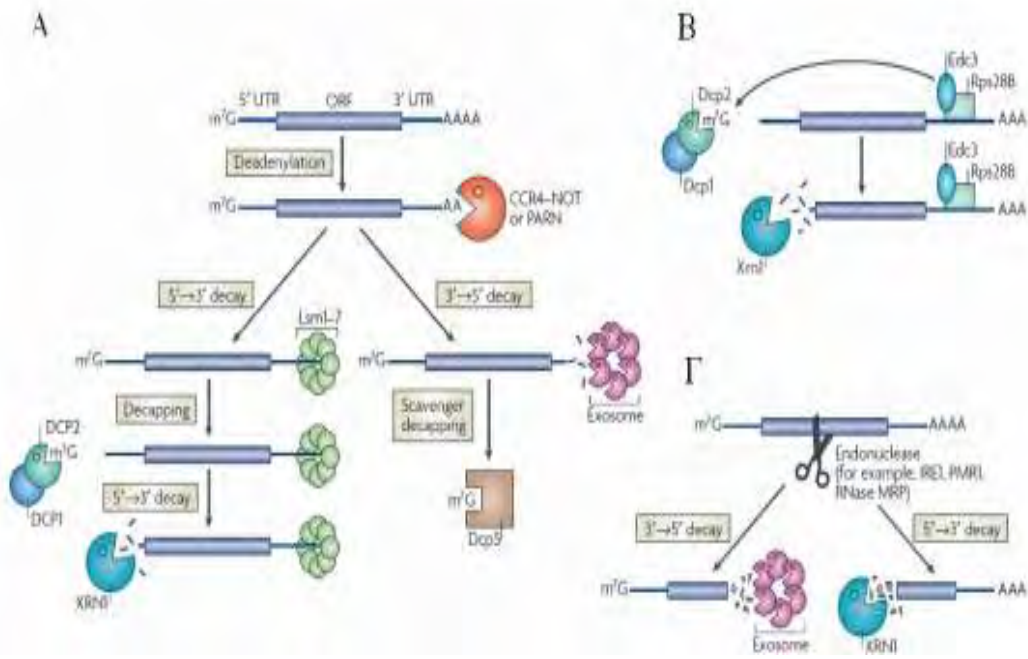
Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αφαίρεση της καλύπτρας

Δύο μετάγραφα που δεν σχετίζονται μεταξύ τους, τα RPS28B και EDC1, παρακάμπτουν το στάδιο της αποαδενυλίωσης, και αφαιρείται η καλύπτρα με έναν αυτορυθμιστικό μηχανισμό (Εικόνα 4). Η πρωτεΐνη Rps28B προσδένεται σε μία δομή θηλιάς στην 3' αμετάφραστη περιοχή του δικού της μεταγράφου και στρατολογεί την Edc3, έναν προαγωγέα της αφαίρεσης της. Αυτό επιφέρει σύνδεση και άλλων παραγόντων αφαίρεσης της καλύπτρας και επιτρέπει την αποικοδόμηση που είναι ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση [5]. Επίσης, Το EDC1 mRNA του *S.Cerevisiae* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Edc1 που ρυθμίζει την αφαίρεση της καλύπτρας, αποικοδομείται με πορείες ανεξάρτητες της αποαδενυλίωσης. Στην περίπτωση αυτή η αποαδενυλίωση φαίνεται να προλαμβάνεται από την αλληλεπίδραση της πολυ(A) ουράς και μία περιοχή πολυ(U) που βρίσκεται στο 3' UTR. Αυτό το ενδομοριακό ζευγάρωμα βάσεων εμποδίζει την πρόσβαση των

αποαδενυλασών. Ο μηχανισμός αυτός είναι ένας μηχανισμός ανατροφοδοτικής ρύθμισης όπου το προϊόν της μετάφρασης αποικοδομεί το μετάγραφο του. Η αφαίρεση του EDC1 mRNA απαιτεί την παρουσία υπομονάδων του συμπλόκου Ccr4–Not γεγονός που υποδηλώνει συσχέτιση μεταξύ αφαίρεσης της καλύπτρας και αποαδενυλίωσης.

Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση

Ένας αποτελεσματικός τρόπος αποικοδόμησης του mRNA είναι μέσω ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης, όπου παράγονται δύο τμήματα που είναι ευάλωτα σε εξωνουκλεάσες (Εικόνα 4). Διάφορες ενδονουκλεάσες που στοχεύουν το mRNA έχουν χαρακτηριστεί πρόσφατα συμπεριλαμβανομένου τις PMR1, IRE1 και το ένζυμο επεξεργασίας του ριβοσωμικού RNA (RNase MRP) το οποίο φαίνεται να επιτελεί επιπρόσθετο ρόλο αφού επιτίθεται και σε συγκεκριμένα μόρια mRNA. Επιπλέον ενδονουκλεάσες φαίνεται να εμπλέκονται στην αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNAs [8,9] ενώ τα siRNAs ξεκινούν την αποικοδόμηση μέσω ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης όπου εμπλέκεται η Argonauteprotein-2 (Ago2) [10,11].



Εικόνα 4. Α. Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από αποαδενυλίωση. Β. Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αφαίρεση της καλύπτρας. Γ. Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση [7].

1.5 Μηχανισμοί ελέγχου της ποιότητας του mRNA

Κάθε βήμα στην παραγωγή ενός ώριμου μεταγράφου παρέχει δυνατότητες εισαγωγής λαθών. Για να εξασφαλίζεται η πιστότητα της μεταγραφής το κύτταρο έχει αναπτύξει την ικανότητα να εντοπίζει τα ελαττωματικά μετάγραφα και να τα αποικοδομεί, προφυλάσσοντας το κύτταρο από τοξικές πρωτεΐνες. Ο έλεγχος της ωρίμανσης του mRNA συμβαίνει στον πυρήνα, ενώ οι πορείες ελέγχου που αναφέρονται παρακάτω σχετίζονται με την μετάφραση και ανιχνεύουν ελαττωματικά ριβονουκλεϊνικά σύμπλοκα στο κυτταρόπλασμα.

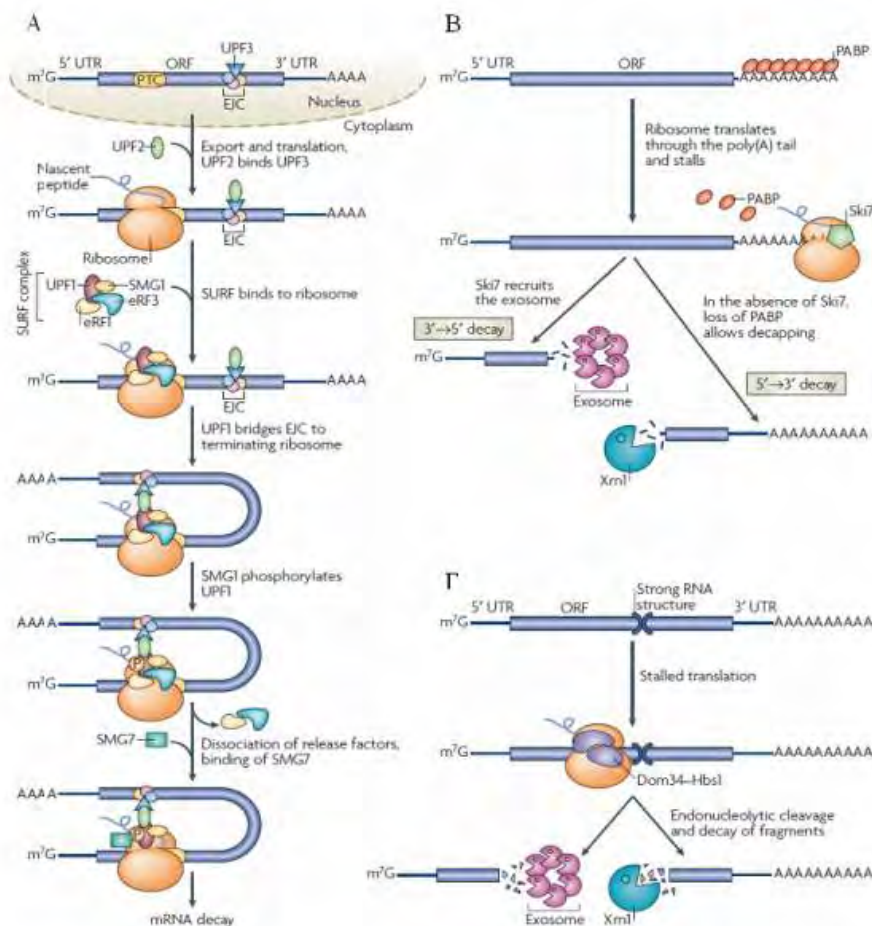
A.Nonsense-mediated decay: Στην διαδικασία αυτή (NMD) τα mRNA που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται (Εικόνα 5). Η πρόωρη αλληλουχία τερματισμού μπορεί να προκύψει από σημειακές μεταλλάξεις, μετατοπίσεις αναγνωστικού πλαισίου, ελαττωματική ωρίμανση του μεταγράφου, προβληματική έναρξη της μετάφρασης [12] και εκτενή 3' αμετάφραστη περιοχή. Τα μετάγραφα αυτά θα οδηγούσαν στην παραγωγή ελαττωματικής πρωτεΐνης. Το μονοπάτι αυτό έχει βρεθεί σε όλους τους

ευκαρυωτικούς οργανισμούς ενώ τα κυριότερα συστατικά του NMD συμπλόκου UPF1, UPF2 και UPF3, είναι διατηρημένα.

B.Non-stop decay: Παρομοίως σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως non-stop decay (NSD) τα mRNA στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'-5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα [13,14]. Τέτοια μετάγραφα μπορούν να προκύψουν από διάσπαση, από την απουσία αλληλουχίας τερματισμού μέσα στην κωδικοποιούμενη περιοχή καθώς επίσης και από πρόωρη πολυαδενυλίωση κατά την μεταγραφή (Εικόνα 5).

Γ.No-go decay: Ένας τελευταίος μηχανισμός επιτήρησης είναι ο no-go decay (NGD) [15] (Εικόνα 5), ο οποίος ανακαλύφθηκε πρόσφατα στον ζυμομύκητα και δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως.

Κατά την διαδικασία αυτή ανιχνεύονται ριβοσώματα τα οποία έχουν κολλήσει πάνω σε ένα mRNA με αποτέλεσμα να διασπάται το mRNA μόριο με ενδονουκλεοτιδική διάσπαση κοντά στο σημείο αυτό. Τα ριβοσώματα απελευθερώνονται και τα παραγόμενα τμήματα RNA αποικοδομούνται από το εξώσωμα και την Xrn1.

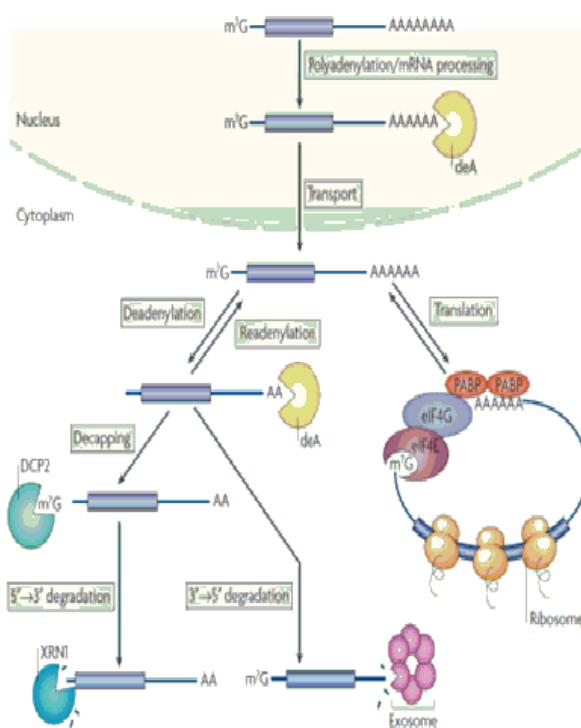


Εικόνα 5. A. Nonsense-mediated decay. Στην διαδικασία αυτή τα mRNA που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται. B. Non-stop decay. Τα mRNA στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα. Γ. No-go decay Κατά την διαδικασία αυτή ανιχνεύονται ριβοσώματα τα οποία έχουν κολλήσει πάνω σε ένα mRNA με αποτέλεσμα να διασπάται το mRNA μόριο με ενδονουκλεοτιδική διάσπαση κοντά στο σημείο αυτό [7].

1.6 Αποαδενυλίωση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η αποικοδόμηση του mRNA υπό φυσιολογικές συνθήκες συνήθως ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ(A) ουράς. Η αποαδενυλίωση είναι το σημαντικότερο στάδιο που καθορίζει το ρυθμό της αποικοδόμησης και της μεταφραστικής αποσιώπησης του mRNA. Το γεγονός αυτό καθιστά την αποαδενυλίωση ως το κυριότερο σημείο ελέγχου για τις δύο αυτές διαδικασίες. Τα ένζυμα που καταλύουν την αποαδενυλίωση είναι εξωνουκλεάσες εξαρτώμενες από Mg^{2+} που υδρολύουν το mRNA με κατεύθυνση 3'-5', παράγοντας

5'-AMP. Οι πολυ(A) ουρές είναι το κυριότερο υπόστρωμα των ενζύμων αυτών, ωστόσο μερικές αποαδενυλάσες μπορούν να διασπούν και άλλα μόρια RNA in vitro [16,17]. Από την στιγμή που η πολυ(A) ουρά έχει αφαιρεθεί από το mRNA, άλλα υδρολυτικά ένζυμα ξεκινούν την διάσπαση του (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Η αποαδενυλίωση είναι συνήθως το στάδιο που καθορίζει το ρυθμό της αποικοδόμησης και της αποσιώπησης του mRNA [7].

Ο αριθμός των γνωστών αποαδενυλασών έχει επεκταθεί πρόσφατα, κυρίως μέσω βιοχημικών και γενετικών μελετών. Υποψήφιες αποαδενυλάσες έχουν ταυτοποιηθεί με χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής, ωστόσο η δράση τους δεν έχει αποδειχθεί. Σύμφωνα με συγκριτικές μελέτες των περιοχών με δράση ριβονουκλεάσης των ενζύμων αυτών, όλες οι γνωστές αποαδενυλάσες ανήκουν σε μία από της δύο ομάδες, την DEDD ή την εξωνουκλεάση-ενδονουκλεάση-φωσφατάση (EEP) υπέρ-οικογένεια. Οι DEDD νουκλεάσες ονομάστηκαν έτσι εξαιτίας των συντηρημένων καταλυτικών αμινοξικών καταλοίπων Asp και Glu τα οποία είναι διάσπαρτα σε τρία μοτίβα εξωνουκλεάσης που δεσμεύουν ιόντα

μαγνησίου. Μέλη της ομάδας αυτής περιλαμβάνουν τις οικογένειες της Pop2 (γνωστή και ως Caf1), της πολυ(A) εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN), την Caf1Z, και την Pan2. Τα ένζυμα της ομάδας EEP περιλαμβάνουν την Ccr4, την Nocturinin, την ANGEL και 2' phosphodiesterase (2' PDE) και έχουν συντηρημένα κατάλοιπα Asp και His στην περιοχή με δράση νουκλεάσης. Είναι πιθανό να υπάρχουν και άλλες νουκλεάσες εκτός των υπέρ-οικογενειών DEDD και EEP ωστόσο δεν έχει ταυτοποιηθεί καμία ακόμη [18].

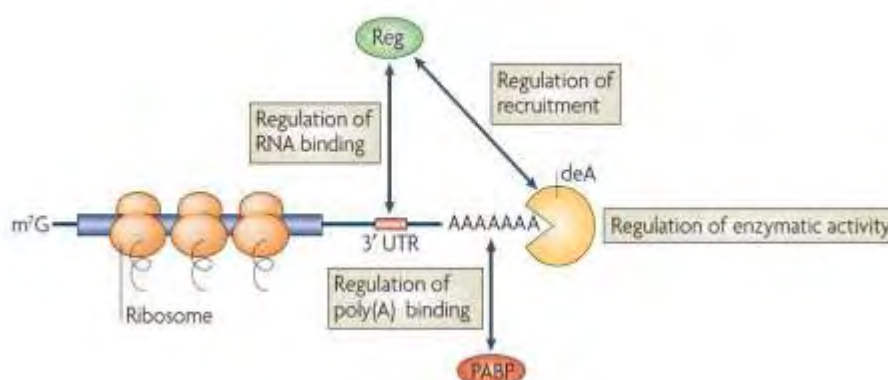
1.7 Σύμπλοκα αποαδενυλασών

Οι αποαδενυλάσες συνήθως σχηματίζουν σύμπλοκα. Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα σύμπλοκα αυτά μπορεί να επηρεάζουν την δραστηριότητα των αποαδενυλασών. Για παράδειγμα, η αποαδενυλάση Pan2 προσδένεται στην Pan3 η οποία με την σειρά της αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη PABP 4. Η PABP ρυθμίζει την δράση του συμπλόκου Pan2-Pan3 προσελκύοντας το στην πολυ(A) ουρά. Κάποιες πολυαδενυλάσες σχηματίζουν ομο- ή ετερο-διμερή (Εικόνα 7). Σε κάποιες περιπτώσεις ο ομοδιμερισμός είναι απαραίτητος για την ενεργότητα της [19]. Η Ccr4 και η Pop2 σχηματίζουν ετεροδιμερή στο *S. Cerevisiae* [20]. Επίσης ο ετεροδιμερισμός επεκτείνει το ρεπερτόριο των αποαδενυλασών στα θηλαστικά. Επτά διακριτά σύμπλοκα μεταξύ των αποαδενυλασών έχουν καταγραφεί [21,22]. Διάφορα ετεροδιμερή μπορεί να έχουν διαφορετική ενζυμική ή ρυθμιστική ικανότητα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η CNOT8 η οποία είναι μέλος της Pop2 οικογένειας και έχει την ικανότητα να προσδένεται στην PUF ρυθμιστική πρωτεΐνη περισσότερο από ότι προσδένεται η CNOT7, ένα άλλο μέλος της Pop2 οικογένειας [23]. Ανώτερα σύμπλοκα όσον αφορά το επίπεδο οργάνωσης προσθέτουν επιπλέον λειτουργίες και ρυθμιστική δυνατότητα. Υπάρχουν ειδικά ετεροδιμερή αποτελούμενα από την Ccr4 και την Pop2 πρωτεΐνη σε διάφορα είδη, συνδέονται με πρωτεΐνες Not για να σχηματίσουν μεγάλα συμπλέγματα πολλαπλών υπομονάδων [20,21]. Το σύμπλοκο Ccr4-Pop2-NOT εμφανίζεται σε διαφορετικές μορφές με μοριακά βάρη να κυμαίνονται από 0,65 έως 2 MDa [20]. Οι πρωτεΐνες Not μπορούν να δρουν ως συνδέτες: η NOT4 της *D. Melanogaster* συνδέει το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης σε μία 3'UTR ρυθμιστική πρωτεΐνη. Μεταξύ

ετεροδιμερών και υψηλού επιπέδου πολυπλοκότητας συμπλόκων στα οποία μπορούν να προσδένονται διαφορετικά, το ρεπερτόριο των αποαδενυλασών και του βιολογικού τους ρόλου είναι αρκετά εκτενές.

1.8 Ρύθμιση της αποαδενυλίωσης

Η ρύθμιση της δράσης των αποαδενυλασών είναι αναγκαία, καθώς μη φυσιολογική αποαδενυλίωση επιφέρει γενική απορρύθμιση. Σταθερά και μεταφραζόμενα mRNA πρέπει να προστατεύονται από την αφαίρεση της πολυ(A) ουράς, ενώ μη σταθερά ή προβληματικά mRNA πρέπει να αποαδενυλιώνονται και να αποικοδομούνται [24,25]. Ταχεία αποαδενυλίωση συγκεκριμένων στόχων ξεχωρίζει σημαντικά από την φυσιολογική αποαδενυλίωση. Έτσι οι αποαδενυλάσες πρέπει να ρυθμίζονται γενικά αλλά και ειδικά σύμφωνα με τον στόχο.



Εικόνα 7. Οι αποαδενυλάσες ρυθμίζονται γενικά αλλά και ειδικά σύμφωνα με το στόχο [7].

Οι αποαδενυλάσες και οι ρυθμιστές τους εκφράζονται σε δεδομένη χρονική στιγμή και τόπο όταν μπορεί να υπάρχει και η ρύθμιση τους. Άλλες αποαδενυλάσες, όπως μέλη της Pop2 και Ccr4 οικογένειας εκφράζονται ευρέως και σταθερά. Ένας δεύτερος μηχανισμός για γενική ρύθμιση της αποαδενυλίωσης είναι η αναστολή της ενζυμικής δράσης. Ειδικά στρεσογόνα, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, οξειδωτικά, οσμωτική πίεση ή θερμικό στρες, έλλειψη γλυκόζης αναστέλλουν την αποαδενυλίωση, ενώ μελέτες επί της ανθρώπινης PARN δείχνουν ότι αναστέλλεται από νουκλεοτίδια και συνθετικά τους ανάλογα. Η αποαδενυλίωση επηρεάζεται από

δύο τοπολογικά διακριτές μορφές ελέγχου: α) πυρηνική - κυτταροπλασματική και β) εντοπισμός σε κοκκία [26]. Διάφορες αποαδενυλάσες κινούνται παλινδρομικά από τον πυρήνα στον κυτταρόπλασμα. Αλλαγές στην διαμερισματοποίηση επιφέρουν δραματικά αποτελέσματα. Στα αμφίβια, αποσύνθεση του πυρήνα κατά την μείωση απελευθερώνει την PARN στο κυτταρόπλασμα όπου και αποαδενυλιώνει μητρικά mRNA. Διάφορες αποαδενυλάσες εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά κοκκία. Τα γαμετοκύτταρα, τα νευρωνικά κοκκία και τα σωματίδια P (P bodies) περιέχουν mRNA μόρια σε καταστολή τα οποία μπορούν να ενεργοποιηθούν [28]. Ο συνεντοπισμός των ενζύμων με τα υποστρώματα μπορεί να διεγείρει την αποαδενυλίωση αλλά αυτό δεν έχει αποδειχθεί πλήρως. Από την άλλη η αποαδενυλίωση δεν φαίνεται να περιορίζεται στα κοκκία γιατί οι ίδιες αποαδενυλάσες έχουν βρεθεί και στο κυτταρόπλασμα [27].

Η αποαδενυλίωση μπορεί να επηρεάζεται από χαρακτηριστικά του mRNA. Η 5' καλύπτρα διεγείρει την ενεργότητα και την διαρκή εξωνουκλεοτιδική δράση δηλαδή την συνεχή αποαδενυλίωση από την PARN, ενώ δεν έχει επίδραση στην δράση άλλων αποαδενυλασών. Αυτή η ιδιαίτερη ιδιότητα της PARN οφείλεται στην ικανότητα πρόσδεσης του ενζύμου αυτού στην 5' καλύπτρα του mRNA μέσω μια ειδικής περιοχής πρόσδεσης. Σε κάποια mRNA η πολυ(A) ουρά μπορεί να προστατευθεί από τις αποαδενυλάσες μέσω ζευγαρώματος βάσεων. Για παράδειγμα το πυρηνικό RNA της PAN στο σάρκωμα Karosi, προκαλούμενο από ερπιτιό, αποτρέπει την αποαδενυλίωση του με ζευγάρι των βάσεων μεταξύ της πολυ(A) ουράς και μίας περιοχής πλούσιας σε ουριδίνη [29].

1.9 Ένζυμα και έλεγχος αποαδενυλίωσης

Η ρύθμιση ειδικών mRNA οφείλεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες που συχνά βρίσκονται στο 3'UTR και προάγουν την αποαδενυλίωση. Στις αλληλουχίες αυτές προσδένονται παράγοντες που στρατολογούν αποαδενυλάσες και διεγείρουν την αποαδενυλίωση. Διάφορες RNA προσδενόμενες πρωτεΐνες (CUG-BP, PUF και CREB), στρατολογούν τις αποαδενυλάσες αλληλεπιδρώντας άμεσα με αυτές [30,31]. Ακόμα και η PABP μπορεί να ενεργοποιήσει την αποαδενυλίωση έλκοντας το σύμπλοκο Pan2-Pan3 στο mRNA. Στα θηλαστικά η PABP μπορεί να στρατολογήσει

σύμπλοκα μελών των οικογενειών Pcp2-Ccr4 μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που συσχετίζονται με TOB πρωτεΐνες [31]. Η συνδυαστική δράση των ρυθμιστών επεκτείνει την πολυπλοκότητα των διαδικασιών αποαδενυλίωσης. Πολλαπλοί καταστολείς είτε πρωτεΐνες είτε miRNAs, συχνά προσδένονται στο ίδιο mRNA 3'UTR. Για παράδειγμα, οι κατασταλτικές πρωτεΐνες του ζυμομύκητα Puf4 και Puf5 προσδένονται στο 3'UTR του HOmRNA και κάθε πρωτεΐνη επιστρατεύει τα σύμπλοκα Ccr4-Pcp2 για να επιταχυνθεί η αποαδενυλίωση [32]. Επιπλέον σύμπλοκα που προσδένονται στο 3'-UTR μπορούν μέσω διαφορετικών υπομονάδων να προσελκύσουν αποαδενυλάσες.

Το υπόστρωμα των αποαδενυλασών, η πολυ(A) ουρά του mRNA είναι καλυμμένη με μόρια PABP που εμποδίζουν την πρόσβαση σε αυτήν. Η ρυθμιζόμενη αποδέσμευση της PABP από την πολυ(A) του mRNA ή η αλληλεπίδραση της PABP με μία αποαδενυλάση μπορεί να διεγείρει την αποαδενυλίωση [33]. Στον άνθρωπο υπάρχουν τουλάχιστον 6 μορφές της PABP, ενώ υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες που επίσης προσδένονται στη πολυ(A) ουρά (όπως η NAB2), για τις οποίες δεν είναι γνωστό εάν επηρεάζουν την αποαδενυλίωση. Οι ρυθμιστές είναι δυνατόν να μπλοκάρουν την αποαδενυλίωση με το να σταθεροποιούν σύμπλοκα PABP-mRNA. Το α-CP σύμπλοκο των RNA προσδενόμενων πρωτεϊνών σταθεροποιεί το mRNA της α-globin με το να προσδένεται στην PABP. Συγχρόνως άλλες πρωτεΐνες προσδέτες μπορούν να επηρεάζουν την αποαδενυλίωση. Η CBP80, μία υπομονάδα του πυρηνικού συμπλόκου πρόσδεσης στο 5' κάλυμμα προσδένεται και ανταγωνίζεται την δράση της PARN, πιθανόν περιορίζοντας την δράση της σε νεοσυντιθέμενα pre-mRNAs [34]. Επιπλέον ρυθμιστικές πρωτεΐνες μπορούν να δρουν μέσω της PABP για να διεγείρουν την αποαδενυλίωση του mRNA. Πρωτεΐνες συσχετιζόμενες με ελικάση όπως η RHAU μπορούν να διεγείρουν την αποαδενυλίωση αντικαθιστώντας την PABP από την πολυ(A) ουρά. Η TOB των θηλαστικών διεγείρει την αποαδενυλίωση με το να στρατολογεί μέλη της Ccr4-Pcp2 οικογένειας μέσω αλληλεπιδράσεων με την C-τελική περιοχή (non-RNA-binding) της PABP. Η TOB λειτουργεί ως γέφυρα συνδέοντας την PABP με σύμπλοκα αποαδενυλίωσης [35, 31].

Πολλοί ρυθμιστές (όπως PUF, CPEB, KSRP, Smaug, TTP και miRNAs)

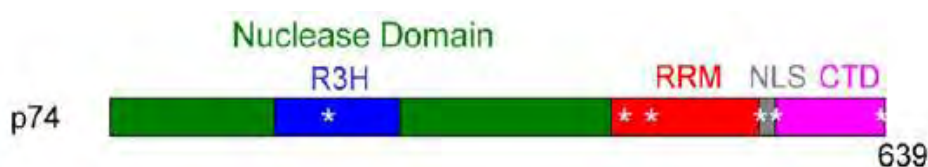
στρατολογούν ειδικές αποαδενυλάσες και συμπαράγοντες τους, που είτε αναστέλλουν την μετάφραση (όπως Dhh1, Maskin, CUPand 4EHP), είτε προάγουν την απομάκρυνση της καλύπτρας (όπως η DCP1 και DCP2) είτε αποικοδομούν ταχεία το mRNA (όπως το εξώσωμα και η εξωριβονουκλεάση -1 (XRN1).

Τα miRNAs δρουν με ποικίλο τρόπο πάνω στα μόρια mRNA. Μπορούν να καταστείλουν την μετάφραση ενός mRNA, να διεγείρουν την αποικοδόμηση του, και να προκαλέσουν αποαδενυλίωση [36]. Τα miRNAs αλληλεπιδρούν με την Argonaute πρωτεΐνη για να σχηματίσουν τα RNA-induced silencing complexes (RISCs) [37]. Αυτά τα σύμπλοκα διεγείρουν την αποαδενυλίωση του mRNA μέσω του Ccr4–Pop2–Not συμπλόκου, καταστέλλουν την μετάφραση μέσω ενός μηχανισμού αλληλεπίδρασης Argonaute - 5' - καλύπτρα και προάγουν την αφαίρεση της καλύπτρας του mRNA μέσω του συμπλόκου αφαίρεσης της καλύπτρας Dcp1–Dcp2 [36, 38]. Επιπλέον, συστατικά του RISC σχετίζονται με ελικάση RCK (p54), μία ορθόλογη της Dhh1 που απαιτείται για την καταστολή μέσω miRNA [36]. Πρόσφατη μελέτη αναδεικνύει τον μοναδικό ρόλο των αποαδενυλασών και των πολυ(A) ουρών στην γονιδιακή αποσιώπηση με miRNA όπου υποστηρίζεται η άποψη ότι όλοι οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αποσιώπηση ακόμα και αυτοί που δεν ξεκινούν με την αποαδενυλίωση απαιτούν την παρουσία πολυ(A) με σύμπλοκο αποαδενυλάσης [39].

1.10 Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A)-specific ribonuclease, PARN]

Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), όπου θα μελετήσουμε στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, είναι μία από τις καλύτερα χαρακτηριζόμενες αποαδενυλάσες στα θηλαστικά. Φαίνεται πως είναι παρούσα τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Ανήκει στην DNAQ-like υπεροικογένεια των 3'-5' εξωνουκλεασών. Η DNAQ-like υπεροικογένεια περιλαμβάνει μια ποικιλία από εξωνουκλεάσες, συμπεριλαμβανμένων τόσο DNases και RNases [44]. Η επιτυχής κλωνοποίηση της PARN στον άνθρωπο και στο *X. laevis* αποκάλυψε ότι αποτελείται από 639 (μοριακό βάρος 73,5 kDa) και 631 αμινοξέα (μοριακό βάρος 72,8kDa),

αντίστοιχα. Είναι μέλος της τάξης DEDD μιας κατηγορίας εξωνουκλεασών που περιέχουν τα διατηρημένα κατάλοιπα Asp-Glu-Asp-Asp στην ενεργό της περιοχή [42]. Μετάλλαξη σε οποιαδήποτε από αυτά τα τέσσερα αμινοξέα ουσιαστικώς μειώνει τη συνολική ενζυματική δραστικότητα της PARN. Ακόμη, η PARN μπορεί να ταξινομηθεί ως μέλος της οικογένειας Caf1 ριβονουκλεασών, λόγω του τομέα νουκλεάσης [45]. Η PARN υπάρχει ως διμερές, αλληλεπιδρά με δισθενές μέταλλο-ίόν, κυρίως Mg^{+2} , που αποικοδομεί αποκλειστικά πολυ(A) ουρές ευκαρυωτικών mRNA. Το Mg^{+2} παίζει σημαντικό ρόλο στη δομική σταθερότητα της PARN [43]. Είναι η μόνη αποαδενυλάση που έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά άμεσα κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης πολυ(A) τόσο με τη δομή της καλύπτρας m7-G και της πολυ(A) ουράς του mRNA [40]. Αυτή η αλληλεπίδραση αυξάνει τη λειτουργία του ενζύμου, αυξάνοντας το ποσοστό της αφαίρεσης πολυ(A). Παραδόξως, η PARN δεν εμπλέκεται αποκλειστικά σε ρύθμιση της λειτουργίας mRNA, καθώς συμμετέχει επίσης στην επεξεργασία ορισμένων μη κωδικοποιημένων RNAs, όπως τα μικρά πυρηνικά RNAs (snoRNAs) και των μικρών RNAs στα σωμάτια Cajal (ScRNAs)[41].

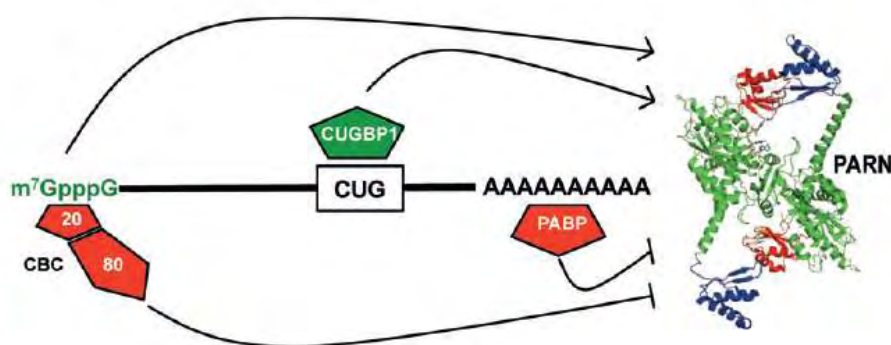


Εικόνα 8. Η PARN αποτελείται από RNA-δεσμευτικές περιοχές. Η NLS (nuclearlocalizationsignal) ευθύνεται και για την μετακίνηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα [49].

Ανάλυση αλληλουχίας αποκαλύπτει ότι κάθε υπομονάδα περιέχει τρεις RNA-δεσμευτικές περιοχές, τον τομέα αναγνώρισης RNA (RRM), τον τομέα νουκλεάσης και τον τομέα R3H ο οποίος είναι μία πρωτεϊνική περιοχή όπου περιέχει ένα μη μεταβλητό κατάλοιπο αργινίνης και υψηλά διατηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης και ένα C-τερματικό τομέα (CTD) (Εικόνα 8). Ο τομέας νουκλεάσης και ο τομέας RRM έχουν υψηλή προτίμηση στη σύνδεση με πολυ(A) και ο RMM έχει υψηλή σύνδεση με την καλύπτρα. Δεν ήταν σαφές γιατί η PARN απαιτεί τρεις περιοχές σύνδεσης και αν οι τρεις τομείς συμβάλουν στην αποτελεσματικότητα και στην καταλυτική δράση του ενζύμου. Σε πρόσφατη μελέτη κατασκεύασαν μια σειρά από μεταλλάγματα που

στερούνται είτε τον έναν είτε δύο από τους τρεις τομείς RNA-σύνδεσης. Ο τομέας R3H έχει την ικανότητα να δεσμεύει διάφορα ολιγονουκλεοτίδια χωρίς προτίμηση, όταν έλειπε ο τομέας αυτός η PARN υπήρχε ως μονομερές και κατείχε την ιδιότητα της αποαδενυλίωσης. Άρα ο τομέας αυτός είναι απαραίτητος για τη δομή του ενζύμου. Η περιοχή RRM παίζει ρόλο στην αναγνώριση της καλύπτρας. Κρυσταλλικές δομές δείχνουν ότι η περιοχή αυτή συνδέεται με τη 7-μεθυλογουανοσίνη καλύπτρα μέσω ενός καταλοίπου τρυπτοφάνης [49].

Η πολυ(A) ουρά του mRNA συνδέεται στον πυρήνα με την πυρηνική πολυ(A)-δεσμευτική πρωτεΐνη 1 (PABPN1) ενώ στο κυτταρόπλασμα, η PABP1 αντικαθίσταται από την PABPC. Εκτός από αυτά τα δύο μεγάλα PABPs, έχουν εντοπιστεί και άλλα PABPs που συνδέονται με την πολυ(A), αυξάνοντας την ετερογένεια των συμπλόκων πολυ(A)/PABP [46]. Η σύνδεση της PABP με την πολυ(A) αναστέλλει τη δραστηριότητα της PARN (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Η σύνδεση της PABP αναστέλλει τη δραστηριότητα της PARN [46].

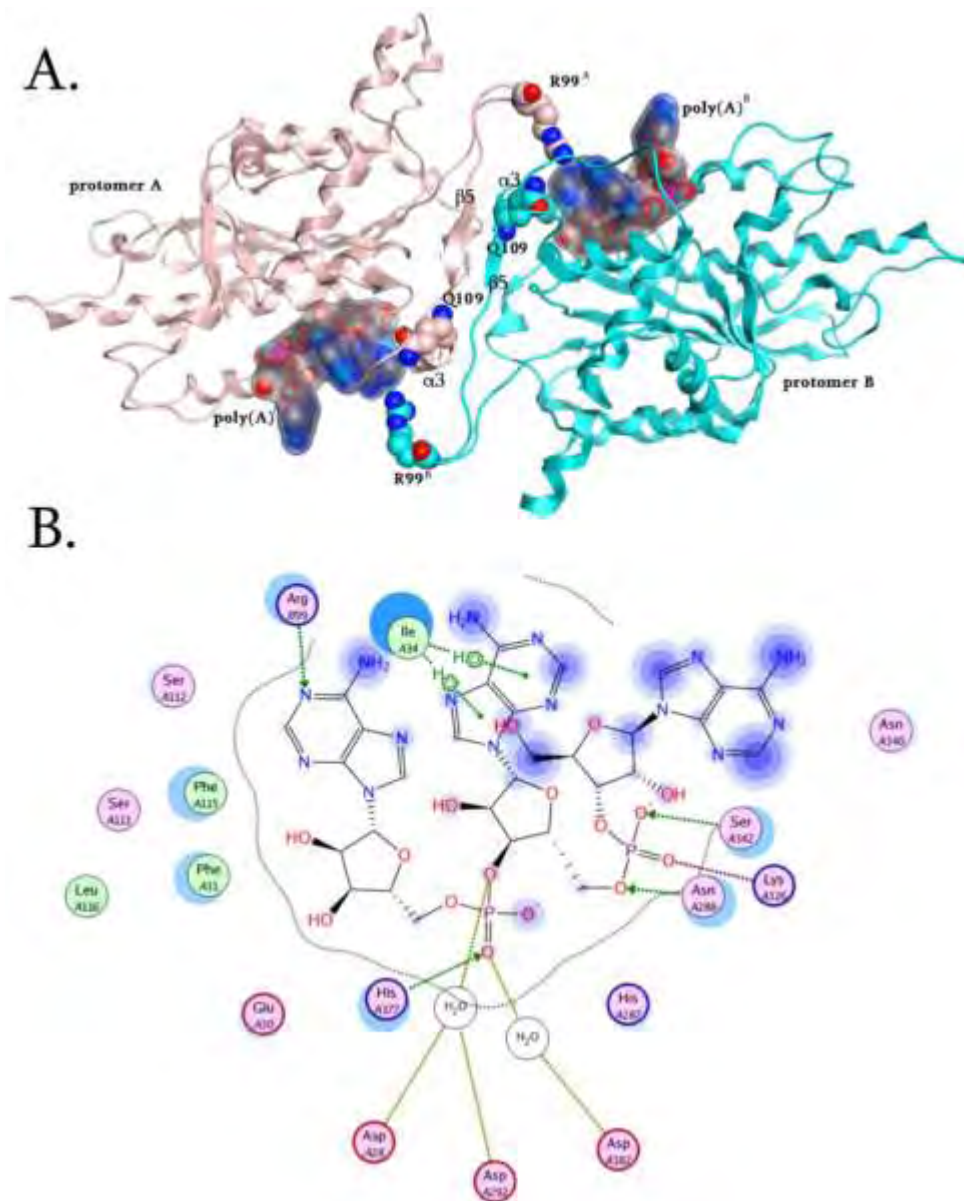
Πρόσφατα έχει δειχθεί πως η PARN μπορεί να συμμετέχει στον έλεγχο ενός υποσυνόλου mRNAs αντί για το μεγαλύτερο μέρος του mRNA πληθυσμού [47]. Επίσης, φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη πρόωρη ανάπτυξη καθώς ίσως και σε ορισμένους καρκίνους. Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι η έκφραση της PARN ήταν υψηλότερη 2,2 φορές σε οξεία λεμφαικοκυτταρική λευχαιμία (ALL) και 2 φορές σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML) σε σύγκριση με άλλους ασθενείς [48].

1.11 Φυλογενετική ανάλυση της PARN και ο σημαντικός ρόλος της R99 και Q109

Εκτενής φυλογενετική ανάλυση, βασισμένη στο σύνολο των διαθέσιμων γονιδιωμάτων, έδειξε μια ευρεία κατανομή για την PARN στα ευκαρυωτικά είδη, και αποκάλυψε δομικά σημαντικά αμινοξέα, τα οποία δυνητικά θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στη ρύθμιση του καταλυτικού μηχανισμού της PARN [50]. Συνολικά εντοπίστηκαν 32 ομόλογες πρωτεϊνικές αλληλουχίες της PARN στα γονιδιώματα των ειδών, οι οποίες αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ταξινομικές ευκαρυωτικές ομάδες (σύμφωνα με την ταξινομική βάση δεδομένων του NCBI). Ομόλογα της PARN δεν βρέθηκαν στο αρθρόποδο *Drosophila melanogaster* και στο μύκητα *S.Cerevisiae*, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Εναλλακτικά μεταβολικά μονοπάτια μπορεί να υπάρχουν σε αυτούς του δύο οργανισμούς για την αποικοδόμηση του πολυ(A). Παρόλα αυτά, οι θεωρούμενες ομόλογες αλληλουχίες της PARN ανιχνεύονται σε άλλα αρθρόποδα και μύκητες. Περαιτέρω, πρωτεϊνικά μοτίβα αντλούνται από πολλαπλές συστοιχίσεις των αμινοξικών αλληλουχιών της PARN. Εκτός από το συντηρημένο καταλυτικό μοτίβο (Asp29, Glu30, Asp292 και Asp382), ένα δεύτερο μοτίβο που περιέχει τα αμετάβλητα κατάλοιπα R99 και Q109 ανιχνεύθηκε μόνο στα μετάζωα. Μετά από προσεκτική εξέταση της πρωτοταγούς αλληλουχίας αμινοξέων των άλλων ειδών εκτός των μετάζων, βρέθηκε ότι στη γειτονική περιοχή της R99, είτε υπάρχουν κατάλοιπα Arg ή η Arg έχει αντικατασταθεί από την επίσης πολική Lys.

Με βάση τη φυλογενετική ανάλυση, η έρευνα επικεντρώθηκε στους πιθανούς ρόλους των αμετάβλητων καταλοίπων R99 και Q109, εκτός των άλλων. Δομική υπέρθεση των δύο μονομερών της PARN και των δύο αντίστοιχων ολιγονουκλεοτιδίων πολυ(A) αποκάλυψε μικρές αποκλίσεις (max Ca RMSD <2Å). Η δομική ανάλυση *in silico* έδειξε ότι η R99 του μονομερούς Ala (R99A) υποστηρίζεται από το συμπληρωματικό μονομερές με συμμετρικό τρόπο κατά τη διάρκεια της κατάλυσης. Συγκεκριμένα, η R99^A εκτείνεται μέσα στο ενεργό κέντρο της αλυσίδας B, όπως και η R99^B στο ενεργό κέντρο της αλυσίδας A. Αυτά τα κατάλοιπα Arg σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τη βάση αδενίνης του τελευταίου 3' νουκλεοσιδίου της πολυ(A) αλυσίδας. Ο δεσμός υδρογόνου επιτυγχάνεται με τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ της ομάδας -NH₂ (δότης) της Arg και την ομάδα -N=

(δέκτης) του δακτυλίου της αδενίνης (Εικόνα 10Α). Η ουσιαστική συμβολή της R99 επιβεβαιώνεται επίσης από μελέτες μετάλλαξης στην α3 έλικα της PARN, η οποία σχηματίζει έναν ευέλικτο βρόχο, ο οποίος υποστηρίζει τον βρόχο που βρίσκεται η Arg του άλλου μονομερούς ώστε να βρίσκεται στην εγγύτητα της καταλυτικής περιοχής. Η βέλτιστη καταλυτική τοποθέτηση του σχιζόμενου δεσμού κατευθύνεται από την His377, η οποία σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο της ομάδας $P=O$ του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Κατά συνέπεια, δεδομένου ότι η His377 και η R99 σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το πρώτο νουκλεοσίδιο από διαφορετικές κατευθύνσεις, παίζουν σημαντικό ρόλο στην τρισδιάστατη του σταθεροποίηση και τοποθέτηση στο ενεργό κέντρο της PARN (Εικόνα 10Β). Συμπερασματικά, η R99 μπορεί να αντιπροσωπεύει ακόμα ένα σημαντικό κατάλοιπο καθώς συνδέει τα δύο μονομερή, συμβάλλει στη συνολική σταθερότητα και κατευθύνει το υπόστρωμα σε μια βέλτιστη θέση για την αντίδραση διάσπασης [50]. Από την άλλη η Q109 βρίσκεται στις δύο αντιπαράλληλες έλικες β5της ομοδιμερούς περιοχής επαφής. Δημιουργήθηκαν *insilico* μεταλλάξεις τόσο Q109A αλλά και Q109Tr για την κατανόηση του ρόλου της. Η πρώτη μετάλλαξη αποκάλυψε μια σημαντική απώλεια στο πακετάρισμα και στη σύνδεση των δύο σκελών β5 (4 φορές ενεργειακή απώλεια) ενώ το Q109Tr συνεχώς αποτυγχάνει της δημιουργίας του λόγω του ογκώδους υπολείμματος και δεν μπορεί να φιλοξενηθεί στην περιοχή διεπαφής ομοδιμερισμού της pARN (Εικόνα 10 Α). Είναι επίσης προφανές πως το Q109 καθορίζει το σχήμα του καταλυτικού θύλακα που είναι διαθέσιμη για να φιλοξενήσει το υπόστρωμα πολυ(Α)



Εικόνα 10. Θέση της Αργινίνης 99 και Γλουταμίνης 109 στην PARN και πως την επηρεάζει [50].

2. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας είναι η σύνθεση και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός μεταλλαγμάτων των αμινοξέων R99 και Q109 της PARN. Μετά την επιτυχή διαδικασία της μετάλλαξης επιλεκτικά σε Ala, Phe και Trp εξετάζεται καταρχήν η επίδρασή αυτών στις κινητικές και δομικές ιδιότητες του ενζύμου. Συγκεκριμένα, εξετάζονται οι πιθανές επιπτώσεις στην δραστηριότητα του μεταλλαγμένου ενζύμου σε σύγκριση με αυτό του αγρίου τύπου, καθώς και την επίδραση στον ομοδιμερισμό της πρωτεΐνης. Ακόμα, μελετάται ο βιολογικός ρόλος των μεταλλάξεων της PARN εξετάζοντας την επίδραση της υπερέκφρασής της σε γνωστά γονίδια – στόχους σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Στοχευόμενη Μεταλλαξιγένεση

Η στοχευόμενη μεταλλαξιγένεση είναι invitro μέθοδος η οποία δημιουργεί συγκεκριμένες μεταλλάξεις σε γνωστή αλληλουχία και βασίζεται σε PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) μεθόδους. Για την συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) και η αλληλουχία cDNA της PARN, η οποία βρέθηκε στο NCBI με κωδικό (Accession Number) NM_002582. Δημιουργήθηκαν τέσσερις μονές μεταλλάξεις, η Αργινίνη99 σε Αλανίνη99 (R99A), στην αλληλουχία cDNA αντικαταστήθηκε το AGA₂₉₅ σε GCA₂₉₅, η Γλουταμίνη109 σε Αλανίνη109 (Q109A), στην αλληλουχία cDNA αντικαταστήθηκε το CAG₃₂₅ σε GCA₃₂₅, η Αργινίνη99 σε Φαινυλαλανίνη99 (R99F), στην αλληλουχία cDNA αντικαταστήθηκε το AGA₂₉₅ σε TTC₂₉₅, η Αργινίνη99 σε Τρυπτοφάνη99 (R99W), στην αλληλουχία cDNA αντικαταστήθηκε το AGA₂₉₅ σε TGG₂₉₅ και μία διπλή μετάλλαξη, Αργινίνη99 σε Αλανίνη99/ Γλουταμίνη109 σε Αλανίνη109 (R99A/Q109A). Χρησιμοποιήθηκε ένα διαδικτυακό πρόγραμμα, PRIMER-X, για την σχεδίαση των εκκινητών (Πίνακας 1) με κατευθυντήριες γραμμές του stratagene Quikchange II site-directed mutagenesis kit. Οι εκκινητές επιβεβαιώθηκαν στο το ExPASy πρόγραμμα.

Πίνακας 1. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των μεταλλάξεων.

Εκκινητές (primers)		
PARNR99A	Forward	CCGAAACCCTTCAATGCATCCTCACCAGATG
	Reverse	CATCTGGTGAGGATGCATTGAAGGGTTTCG
PARNQ109A	Forward	CCAGATGTCAAATTTGTTTGTGCAAGCTCCAGCATTGACTT TC
	Reverse	GAAAGTCAATGCTGGAGCTTGCACAAACAAATTTGACATC TGG
PARN R99F	Forward	CCCGAAACCCTTCAATTTCTCCTCACCAGATGTC
	Reverse	GACATCTGGTGAGGAGAAATTGAAGGGTTTCGGG
PARN R99W	Forward	CCGAAACCCTTCAATTGGTCCTCACCAGATGTC
	Reverse	GACATCTGGTGAGGACCAATTGAAGGGTTTCGG
PARN R99A/Q09A	Forward	Χρησιμοποιήθηκε σαν υπόστρωμα η PARNR99A και χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές όπου δημιουργούν τη μοναδιαία μετάλλαξη Q09A.
	Reverse	

Η αλληλουχία της PARNεμπεριέχεται στον πλασμιδιακό φορέα pET-33b₍₊₎. Πραγματοποιήσαμε δύο αντιδράσεις ενίσχυσης, μία για την ενίσχυση της κωδικής αλυσίδας και μία για την ενίσχυση της μη κωδικής αλυσίδας. Χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες από το πρωτόκολλο του QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit.

Αντίδραση Ενίσχυσης για την κωδική αλυσίδα

ρET-33b ₍₊₎	1,5μL
εκκινητής για τη δημιουργία μετάλλαξης στην κωδική αλυσίδα	1,3μL
dNTPs	0,5μL
10x Buffer της PFU Ultra	5μL
ddH ₂ O	40,7μL
PFU Ultra	1μL

Αντίδραση Ενίσχυσης για την κωδική αλυσίδα

ρET-33b ₍₊₎	1,5μL
εκκινητής για τη δημιουργία μετάλλαξης στην κωδική αλυσίδα	1,2μL
dNTPs	0,5μL
10x Buffer της PFU Ultra	5μL
ddH ₂ O	40,8μL
PFU Ultra	1μL

Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται όσες φορές είναι και οι μεταλλάξεις που θέλουμε να δημιουργήσουμε.

Το θερμικό προφίλ του κυκλοποιητή της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση των δύο αλυσίδων απεικονίζεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2.Θερμικόπροφίλενίσχυσης.

Type of reaction	Cycling condition
Initial Denaturation	95°C (3min)
Denaturation	98°C (20sec)
Annealing	60°C (15sec)
Extension	72°C (8min)
Hold	4°C

10 Cycles

Μετά το πέρας των αντιδράσεων ενίσχυσης παραλαμβάνουμε 25μL από κάθε αντίδραση και τα ενώνουμε σε ένα νέο erpendorf. Σε αυτό προσθέτουμε και 0,75μL PFU Ultra και πραγματοποιούμε εκ νέου αντίδραση ενίσχυσης (Πίνακας 3).

Πίνακας 3.Θερμικόπροφίλενίσχυσης.

Type of reaction	Cycling condition
Initial Denaturation	95°C (3min)
Denaturation	98°C (20sec)
Annealing	63°C (15sec)
Extension	72°C (8min)
Final Extension	72°C (5min)
Hold	4°C

15 Cycles

Παραλαμβάνουμε 44μL από κάθε αντίδραση (R99A, Q09A, R99F, R99W, R99A/Q109A) και προσθέτουμε 5μL από το 10x Buffer της NEB και 1μL DpnI (Ένζυμο περιορισμού που αποικοδομεί το πατρικό DNA που είναι μεθυλιωμένο) ώστε να έχουν τελικό όγκο 50μL. Οι αντιδράσεις επωάστηκαν για 5 ώρες στους 37°C.

Στο προϊόν της πέψης ακολουθήθηκε κατακρήμιση με αιθανόλη (Ethanol Precipitation).

- 1) Προσθήκη 5M NaCl (Cτελ = 0,25M)
- 2) Προσθήκη 3xV EtOH 100% cold
- 3) Vortex (προαιρετικά στους -20°C για 30min)
- 4) Φυγοκέντρηση στους 4°C, 30min, 11.000rpm – Αφαιρώ το υπερκείμενο
- 5) Προσθήκης 200μL EtOH 70% cold
- 6) Φυγοκέντρηση στους 4°C, 5min, 11.000rpm – Αφαιρώ το υπερκείμενο
- 7) Στέγνωμα ιζήματος στο Heat Block
- 8) Επαναδιάλυση σε 10μL αποστειρωμένο ddH₂O
- 9) Vortex

Μετασχηματισμός χημικών επιδεκτικών κυττάρων (Escherichia coli strain XL1- Blue)

Χρησιμοποιούμε τα 5μL του προϊόντος μετά την κατακρήμιση με αιθανόλη.

Διαδικασία (Υπό φλόγα):

- Προσθήκη 5μL σε 100μL χημικών επιδεκτικών κυττάρων. Ελαφρά ανάδευση με το χέρι
- Επώαση για 30min στο πάγο
- Θερμικό σοκ για 45sec στους 45°C
- Επώαση στον πάγο για 1-2min
- Προσθήκης 900μL LB Broth
- Επώαση για 1 ώρα, 37°C και 210rpm

Από το κάθε ένα παραλαμβάνουμε 100μL και τα επιστρώνουμε σε τριβλίο όπου περιέχει LB Agar και ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη. Επωάζονται για 12-16 ώρες στους 37°C.

Δημιουργία μικρών καλλιιεργειών

Από κάθε τριβλίο παραλαμβάνουμε περισσότερες των μία αποικιών. Έχουμε falcons όπου περιέχουν θρεπτικό υλικό LB Broth με ανθεκτικότητα στη καναμυκίνη. Στο κάθε ένα προσθέτουμε και από μία διαφορετική αποικία. Τα επωάζουμε για 12-16 ώρες, στους 37°C και στα 210rpm. Να τονιστεί, ότι τόσο η παρασκευή των μικρών και μεγάλων καλλιιεργειών όσο και η φασματοφωτομέτρηση, γίνονται σε στείρες συνθήκες και παρουσία αυτόκαυστου. Χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα υλικά και σκεύη, και το πείραμα διεξάγεται σε πάγκους οι οποίοι έχουν καθαριστεί με αιθανόλη. Όσες από τις μικρές καλλιιεργειες έχουν θολώσει θα εισέλθουν στη διαδικασία απομόνωσης πλασμιδίου. Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας Nucleo Spin Plasmid MACHEREY-NAGEL kit.

Όλα τα πλασμίδια όπου απομονώθηκαν στάλθηκαν για αλληλούχιση ώστε να δούμε ποια από αυτά φέρουν τις μεταλλάξεις όπου μας ενδιαφέρουν. Επίσης, ηλεκτροφορήθηκαν σε 1% πηκτή Αγαρόζης για την επιβεβαίωση των πλασμιδίων. Το ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση που χρησιμοποιήθηκε είναι το TAE 1x, με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 90Volt και παρακολούθηση του μετώπου των χρωστικών που ενυπάρχουν στο Loading Buffer.

Υλικά - Αντιδραστήρια

- ❖ **TAE 50x**: Tris Base 24,2% v/w, ακετοξικό οξύ 5,71% w/w, EDTA 0,05M pH 8,6
- ❖ **Loading Buffer 6x**: Bromophenol Blue 0,09%, Xylene Cyanol 0,09%, Γλυκερόλη 60%, EDTA 60mM.
- ❖ QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit
- ❖ pET-33b₍₊₎ PARN
- ❖ dNTPs (HT Biotechnology LTD)
- ❖ PFU Ultra, 10x Buffer PFU Ultra (Life Technologies)
- ❖ ddH₂O
- ❖ DpnI, 10x Buffer DpnI (Life Technologies)
- ❖ NaCl (Panreac)
- ❖ EtOH – Αιθανόλη (Panreac)
- ❖ Escherichia coli strain XL1- Blue (χημικά επιλεκτικά)
- ❖ LB Broth (Scharlau)
- ❖ LB Agar (Scharlau)
- ❖ Καναμικίνη (Panreac)
- ❖ NucleoSpin Plasmid MACHEREY-NAGEL kit
- ❖ Αγαρόζη (Sigma)
- ❖ DNA μοριακός μάρτυρας 100bp (Fermentas)
- ❖ Midori Green DNA strain (Nippon Genetics)
- ❖ Bromophenol Blue (Research Organics)
- ❖ Xylene Cyanol (Merck)
- ❖ Γλυκερόλη (Panreac)
- ❖ Tris (Merck)
- ❖ Ακετοξικό οξύ (Merck)
- ❖ EDTA (Panreac)

3.2 Προφίλ έκφρασης των PARN R99A, PARN Q109A, PARN R99F, PARN R99W, PARN R99A/Q109A

Μετασηματισμός χημικών επιλεκτικών κυττάρων (Escherichia coli strain BL21- Gold (DE3)).

Διαδικασία (Υπό φλόγα):

- Προσθήκη 1,5μL πλασμιδίου σε 100μL χημικών επιδεικτικών κυττάρων. Ελαφρά ανάδευση με το χέρι
- Επώαση για 30min στο πάγο
- Θερμικό σοκ για 45sec στους 45°C
- Επώαση στον πάγο για 1-2min
- Προσθήκης 900μL LB Broth
- Επώαση για 1 ώρα, 37°C και 210rpm

Από το κάθε ένα παραλαμβάνουμε 100μL και τα επιστρώνουμε σε τριβλίο όπου περιέχει LB Agar και ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη. Επωάζονται για 12-16 ώρες στους 37°C.

Δημιουργία μικρών καλλιιεργειών

Από κάθε τριβλίο παραλαμβάνουμε περισσότερες των μία αποικιών. Έχουμε falcons όπου περιέχουν θρεπτικό υλικό LB Broth 5mL με ανθεκτικότητα στη καναμυκίνη. Στο κάθε ένα προσθέτουμε και από μία διαφορετική αποικία. Επωάζονται για 12-16 ώρες, στους 37°C και στα 210rpm. Από αυτά που έχουν θολώσει γίνεται αποθήκευση τους με 30% αποστειρωμένης Γλυκερόλης 50% (700μL υγρής καλλιέργειας και 300μL αποστειρωμένης Γλυκερόλης 50%). Άρα στους -80°C έχουμε αποθήκευση PARN, PARN R99A, PARN Q109A, PARN R99F, PARN R99W, PARN R99A/Q09A. Κύτταρα τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την υπερέκφραση αυτών.

Δημιουργία μικρών και μεγάλων καλλιιεργειών

Έχουμε falcons όπου περιέχουν θρεπτικό υλικό LB Broth 10mL με ανθεκτικότητα στη καναμυκίνη. Στο κάθε ένα ενοφθαλμίζεται μετά από παραλαβή με το τιπ με κάποια ποσότητα στοκ Γλυκερόλης με τα κύτταρα τα οποία περιέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη. Η διαδικασία πραγματοποιείται για όλα τα κύτταρα με τις διαφορετικές πρωτεΐνες που εκφράζουν. Επωάζονται για 12-16 ώρες, στους 37°C και στα 210rpm. Την επόμενη μέρα, έχουν ήδη ετοιμάσει τα διπλά φάλκον όπου περιέχουν θρεπτικό υλικό LB Broth 15mL με ανθεκτικότητα στη καναμυκίνη, ανά δύο προσθέτω 1,5mL από την μικρή καλλιέργεια. Μετά από 3 ώρες το OD₆₀₀ έχει φτάσει 0,5 – 0,7 η τιμή του. Αυτή τη στιγμή, στα ανά δύο στο ένα προσθέτω 1mM IPTG. Οπότε για την κάθε μία ξεχωριστά πρωτεΐνη έχω ένα φάλκον όπου περιέχει 1mM IPTG και ένα χωρίς. Επώαστηκαν για 4 ώρες, στους 37°C και στα 210rpm. Να τονιστεί, ότι τόσο η παρασκευή των μικρών και μεγάλων καλλιιεργειών όσο και η φασματοφωτομέτρηση, γίνονται σε στείρες συνθήκες και παρουσία αυτόκαυστου. Χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα υλικά και σκεύη, και το πείραμα διεξάγεται σε πάγκους οι οποίοι έχουν καθαριστεί με αιθανόλη.

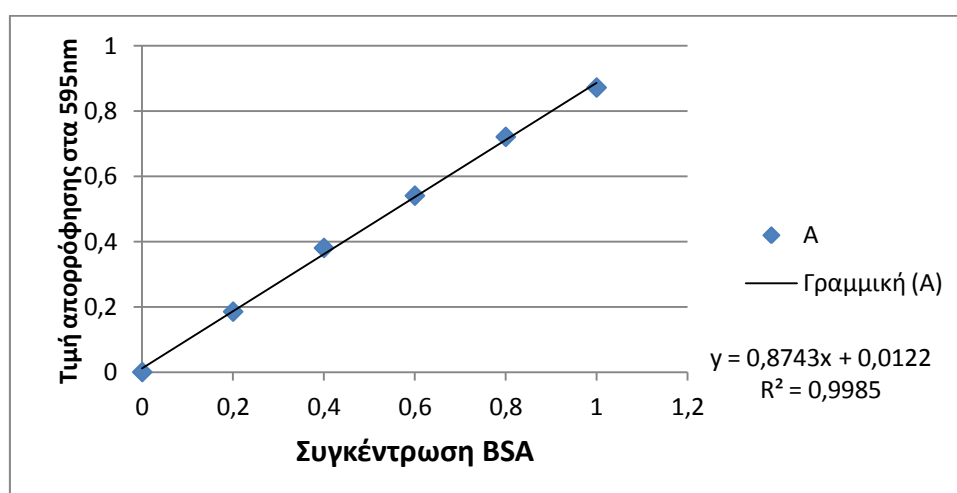
Όλα τα φάλκον θα υποστούν την παρακάτω διαδικασία:

- Φυγοκέντρηση στα 4.000rpm, για 15min και στους 4°C. Πετάω το υπερκείμενο

- Διαλυτοποίηση των κυττάρων με 250μL Lysis Buffer
- Sonication με υπερηχούς. 1 Cycle/40 Amplitude για 3φορές. Ενδιάμεσα έχω παύση 20sec στον πάγο. Κρατάω 20μL
- Φυγοκέντρηση στα 18.000rpm, για 30sec και στους 4°C. Κρατάω το υπερκείμενο.
- Διαλυτοποίηση ιζήματος με 200μL Lysis Buffer.
- Sonication με υπερηχούς. 1 Cycle/40 Amplitude για 3φορές. Ενδιάμεσα έχω παύση 20sec στον πάγο.

Πρότυπη καμπύλη Bradford με BSA (bovine serum albumin)

Από stock διαλύματος πρωτεΐνης BSA 2mg/mL, παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης (0 μέχρι 1,00mg/mL) και στη συνέχεια έγινε επώαση των διαλυμάτων με το αντιδραστήριο Bradford για 15min, σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι. Η πρότυπη καμπύλη έγινε μετρώντας τις απορροφήσεις των διαλυμάτων στα 595nm με τη βοήθεια του φωτόμετρου. Όπως φαίνεται στην εικόνα, προκύπτει μια γραμμική σχέση με την εξίσωση: $Y=0,874x + 0,012$



Εικόνα 11. Η γραφική παράσταση της BSA αφού έχει επωαστεί με το διάλυμα Bradford και φωτομέτρηση στα 595nm.

Με τη βοήθεια της εξίσωσης που προέκυψε, υπολογίστηκε η ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών στα δείγματα της πειραματικής διαδικασίας.

Φωτομέτρηση δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης πρωτεϊνών

- Επώαση 10μL δείγματος πρωτεΐνης σε 990μL αντιδραστηρίου Bradford για 15min, στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου
- Φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 595nm

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή Ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών υπό ανάλυση δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου δύο φάσεων (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Η μία φάση του πηκτώματος

αποτελεί το Stacking gel (5%), στην οποία έγινε η φόρτωση των δειγμάτων των πρωτεϊνών και το «πακετάρισμά» τους στο ίδιο ύψος προκειμένου όλες οι διαδρομές να τρέξουν σύγχρονα. Τη δεύτερη φάση αποτελεί το πήκτωμα διαχωρισμού ή Separating gel (7,5%), όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, κάτω από εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου.

Η παρασκευή του διφασικού πηκτώματος έγινε σύμφωνα με τα συστατικά των παρακάτω πινάκων (Πίνακας 4 και 5):

Πίνακας 4. Stacking gel 5%

Components	mL
30% acryl – Bisacrylamide mix	0,85
1,5M Tris HCl pH 8,8	0,625
10% SDS	0,05
dH ₂ O	3,4
TEMED	0,008
APS 10%	0,05

Πίνακας 5. Separating gel 7,5%

Components	mL
30% acryl – Bisacrylamide mix	2,5
1M Tris HCl pH 8,8	2,5
10% SDS	0,1
dH ₂ O	4,8
TEMED	0,008
APS 10%	0,1

Προσθέτουμε τελευταίους τους καταλύτες APS και TEMED προκειμένου για την πήξη των πηκτωμάτων.

Στα δείγματα έγινε η προσθήκη Loading Buffer 4x, προκειμένου να έχουμε συγκέντρωση 1x στο τελικό πρωτεϊνικό διάλυμα. Προκειμένου να γίνει αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών και διαχωρισμό των πρωτεϊνών, χωρίς διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού, ακολουθεί βρασμός των δειγμάτων στους 95°C για 5min. Μετά από πλήρη διαλυτοποίηση των δειγμάτων, έγινε εμφύσηση του πηκτώματος σε Running Buffer 1x μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα. Οι ποσότητες των δειγμάτων που φορτώθηκαν υπολογίστηκαν βάσει της καμπύλης Bradford που κατασκευάστηκε. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 120Volt, ενώ ο χρόνος εφαρμογής προσδιορίστηκε με βάση την παρακολούθηση του μετώπου της διαδρομής της χρωστικής που ενυπάρχει στο Loading Buffer (Bromophenol Blue).

Χρώση πηκτής με Coomassie Brilliant Blue

- Εμβάπτιση πηκτής πολυακρυλαμιδίου μετά την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε 50mL ακετοξικό οξύ 10%
- Βρασμός (σε φούρνο μικροκυμάτων) μέχρι να παρατηρήσουμε την ανάπτυξη φυσαλίδων
- Απομάκρυνση οξικού οξέος και εμβάπτιση της πηκτής στο διάλυμα βαφής (Staining Buffer)
- Βρασμός
- Ανάδευση υπό το Staining Buffer για 5min σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση περίσσειας του Staining Buffer με ξέπλυμα πηκτής με απεσταγμένο dH₂O
- Εμβάπτιση της πηκτής σε 50mL ακετοξικό οξύ 10%
- Βρασμός
- Εμβάπτιση πηκτής σε νέο ακετοξικό οξύ 10%
- Ανάδευση έως ότου γίνει απομάκρυνση περίσσειας της βαφής

Υλικά - Αντιδραστήρια

- ❖ **Running Buffer 10x:** 25mM Tris, 192mM Glycine, SDS 0,1%, 500mL dH₂O
- ❖ **Protein Loading Buffer 4x:** 1M Tris pH 6,8, 10% Glycerol, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% Bromophenol Blue
- ❖ **Lysis Buffer:** 20mM Tris pH 8-8,5, 0,5M NaCl, 1M PMSF
- ❖ Escherichia coli strain BL21- Gold (DE3)
- ❖ LB Broth (Scharlau)
- ❖ LB Agar (Scharlau)
- ❖ Καναμυκίνη (Panreac)
- ❖ Γλυκερόλη (Panreac)
- ❖ Isopropyl ThioGalactosyl (IPTG) (Fermentas)
- ❖ Tris (Merck)
- ❖ NaCl (Panreac)
- ❖ Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) (SERVA)
- ❖ BSA (bovine serum albumin (New England Biolabs)
- ❖ Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent (BioRad)
- ❖ Acryl-bisacrylamidemix (Merck)
- ❖ SDS (SIGMA)
- ❖ APS (Merck)
- ❖ TEMED (Merck)
- ❖ β-μερκαπτοαιθανόλη (Merck)
- ❖ Glycine (Merck)
- ❖ Bromophenol Blue (Rasearch Organics)
- ❖ Protein Ladder (Nippon Genetics)
- ❖ Ακετοξικό οξύ (Merck)
- ❖ Coomassie Brilliant Blue (Fluka)

3.3 Διαδικασία υπερέκφρασης και απομόνωσης των PARN, PARN R99A, PARN Q109A, PARN R99F, PARN R99W, PARN R99A/Q109A

Δημιουργία μικρών καλλιιεργειών

Σε falcons προστίθεται 10mL LB Broth και 10μL του αντιβιοτικού καναμυκίνης. Με το tip της πιπέτας παραλαμβάνονται από το stock κυττάρων λίγα και ενοφθαλμίζονται στο φάλκον. Επάζονται για 12-16 ώρες στους 37°C και 210rpm (Αναλυτικά στην ενότητα 3.2).

Δημιουργία μεγάλων καλλιιεργειών

Σε τέσσερις αποστειρωμένες φλάσκες των δύο λίτρων με 800mL LB Broth και 800μL του αντιβιοτικού καναμυκίνη, εμβολιάζονται στην κάθε μία 8mL από την μικρή καλλιέργεια. Πριν πραγματοποιηθεί ο εμβολιασμός φυλάσσεται 1mL LB Broth με την προσθήκη αντιβιοτικού καναμυκίνη, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως τυφλό στη διαδικασία της φασματοφωτομέτρησης. Ακολούθως, γίνεται επάση των τεσσάρων κωνικών φλασκών στους 37°C και στα 210rpm, μέχρι $OD_{600} \sim 0,5-0,7$. Στην πειραματική διεργασία που περιγράφεται στη διπλωματική αυτή, η επάση διήρκτησε τέσσερις ώρες, καθώς μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος η OD_{600} πήρε τις απαιτούμενες τιμές στις τέσσερις κωνικές φιάλες. Μόλις φτάσει στο επιθυμητό OD_{600} προστέθηκε 800μL IPTG στη κάθε μία κωνική φλάσκα. Επάζονται για τέσσερις ώρες στους 37°C και 210rpm. Το σύνολο της καλλιέργειας φυγοκεντρείται στους 4°C, στα 4.000rpm για 30 min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται καθώς στο ίζημα περιέχονται τα κύτταρα. Αποθηκεύονται στους -80°C. Να τονιστεί, ότι τόσο η παρασκευή των μικρών και μεγάλων καλλιιεργειών όσο και η φασματοφωτομέτρηση, γίνονται σε στείρες συνθήκες και παρουσία αυτόκαυστου. Χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα υλικά και σκεύη, και το πείραμα διεξάγεται σε πάγκους οι οποίοι έχουν καθαριστεί με αιθανόλη.

Απομόνωση των πρωτεϊνών με τη χρήση της στήλης HisTrap Ni⁺ Sepharose

Ομογενοποίηση των κυττάρων

Το ίζημα των κυττάρων διαλύεται σε ρυθμιστικό Lysis Buffer (περίπου 50mL). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διαδικασία του σπασίματος των κυττάρων με υπέρηχους (sonication) μέσα στον πάγο. Πραγματοποιείται

φυγοκέντρηση στις 12.000rpm, για 60min στους 4°C. Διαχωρίζεται το υπερκείμενο από το ίζημα και ακολουθεί η διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης η οποία βρίσκεται στο υπερκείμενο.

Καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας (ÄKTA - GE Healthcare) με τη στήλη HisTrap HP Ni⁺ Sepharose

Για τον καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας, χρειάστηκε να προσθέσουμε 20μL DNase 20Units για μερικά λεπτά (2-3 min). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε φίλτρο Minisart μιας χρήσης των 0,45μm. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η HisTrap HP Ni⁺ Sepharose καθώς η πρωτεΐνη δεσμεύεται στη ρητίνη μέσω σύνδεσης των ιστιδινών που περιέχει το αμινοτελικό άκρο με τα μόρια του νικελίου. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) για την απομόνωση. Η στήλη μπορεί και δέχεται πίεση μέχρι 0,8MPa. Τα διαλύματα εξισορρόπησης και έκλουσης έχουν περαστεί από φίλτρο και απαερωθεί πριν χρησιμοποιηθούν. Αναλυτικά, καθαρίσαμε τη στήλη Ni⁺ Sepharose και την ÄKTA με 20% αιθανόλη, μετά περάστηκε το Equilibration Buffer από το σύστημα για περίπου 10 λεπτά με flow 10,00mL/min, η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για το Elution Buffer. Γίνεται η σύνδεση του συστήματος με την στήλη ενώ ταυτόχρονα περνάει Equilibration Buffer με 0,300mL/min. Ανοίγουμε την UV λάμπα του συστήματος και την αφήνουμε να σταθεροποιηθεί στο μηδέν με τη στήλη συνδεδεμένη στο μηχάνημα και να περνάει το Equilibration Buffer. Με το που σταθεροποιηθεί το UV πραγματοποιείται και η σύνδεση της loop όπου φέρει την πρωτεΐνη με τη στήλη. Αφήνουμε να περαστεί όλη η ποσότητα της πρωτεΐνης, με το που τελειώσει ξεπλένουμε τη στήλη με Equilibration Buffer ώστε ότι δεν έχει συνδεθεί στη στήλη να μπορέσει να πέσει. Το Elution Buffer χρησιμοποιήθηκε για την έκλυση της πρωτεΐνης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω σταδιακής αύξησης της ιονικής ισχύος. Η ροή του Elution Buffer ήταν 0,300mL/min. Όσο αυξάνεται η ιονική ισχύς, απομακρύνονται πρωτεΐνες από τη στήλη ανάλογα με την ισχύ πρόσδεσης τους σε αυτή. Επομένως, αρχικά θα παρατηρηθεί έκλυση των ασθενώς προσδεδεμένων πρωτεϊνών και στη συνέχεια εκλούνται οι ισχυρότερα προσδεδεμένες. Τα κλάσματα συλλέγονται ανά 1mL. Μετά το πέρας της διαδικασίας τόσο η στήλη, όσο και το μηχάνημα

καθαρίζονται με 20% Αιθανόλη. Τα κλάσματα αυτά φυλάσσονται στο ψυγείο (4°C) προκειμένου να υποβληθούν σε έλεγχο καθαρότητας στο επόμενο στάδιο του πειράματος. Πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων σε πηκτή ακρυλαμιδίου 7,5% και χρώση πηκτής με Coomassie Brilliant Blue. Τα δείγματα όπου φέρουν την πρωτεΐνη όπου μας ενδιαφέρει μπαίνουν σε μια διαδικασία συμπύκνωσης και διαπίδυσης.

Διαπίδυση

Ένα κομμάτι μεμβράνης διαπίδυσης βράζεται σε υψηλή θερμοκρασία σε NaHCO₃ και EDTA για 25min και ξεπλένεται με αποστειρωμένο νερό. Συνεχίζεται ο βρασμός για 25min σε απεστεγμένο νερό, αφού ξεπλυθούν καλά φυλάσσονται σε καθαρή αλκοόλη στους 4°C. Παραλαμβάνουμε μία μεμβράνη, ξεπλένεται πολύ καλά με απεσταγμένο ddH₂O. Σφραγίζεται η μεμβράνη από τη μία πλευρά με έναν κόμπο και ένα πιαστράκι και στη συνέχεια μεταφέρονται με την πιπέτα τα κλάσματα από την στήλη στην μεμβράνη. Η μεμβράνη σφραγίζεται και από την άλλη πλευρά με κόμπους και με ειδικό μικρό μανταλάκι. Έπειτα αυτή στηρίζεται στο πάνω μέρος ποτηριού ζέσεως των 500mL, το οποίο περιέχει Equilibration Buffer της Immobilized γ -Aminophenyl m⁷GTP Agarose column έτσι ώστε το τμήμα της μεμβράνης που περιέχει τα δείγματα να βρίσκεται μέσα στο διάλυμα. Το ποτήρι ζέσεως τοποθετείται σε συσκευή μαγνητικής ανάδευσης με ένα μαγνήτη έτσι ώστε να αναδεύεται το διάλυμα στους 4°C για 12-16 ώρες. Οι πρωτεΐνες όπου δε θα μπουν στη διαδικασία απομόνωσης με την στήλη Immobilized γ -Aminophenyl m⁷GTP Agarose θα υποστούν διαπίδυση με το διάλυμα αντίδρασης και συμπύκνωση όπως περιγράφεται παρακάτω .

Απομόνωση των πρωτεϊνών με τη χρήση της στήλης Immobilized γ -Aminophenyl m⁷GTP Agarose

Την επομένη εξισορροπώ τη στήλη m⁷GTP με 5mL Equilibration Buffer 2. Λίγο πριν στεγνώσει η στήλη προσθέτω το κλάσμα (ενωμένα τα κλάσματα από την πρώτη στήλη απομόνωσης) το οποίο έχει υποστεί διαπίδυση. Κλείνω τη στήλη πολύ καλά με πάραφιλμ και την τοποθετώ στο ρότορα κυκλικής ανάδευσης και επωάζεται με ταχύτητα 10 για 12 ώρες στους 4°C. Με το πέρας αυτών των ωρών αφήνουμε το διάλυμα με το βάρος του να πέσει, το συλλέγουμε και το

ονομάζουμε Flow Through. Μέσα στη ρητίνη έχει προσδεθεί η πρωτεΐνη όπου θέλω να καθαρίσω. Προσθέσαμε 4mL Equilibration Buffer 2 για ξέπλυμα της στήλης. Για να πραγματοποιηθεί η έκλυση της καθαρής πλέον πρωτεΐνης έγινε η προσθήκη 5mL Elution Buffer 2, τα οποία συλλέγονται σε κλάσματα των 1mL. Τέλος για καθαρισμό της στήλης έγινε η προσθήκη ακόμη 5mL Elution Buffer 2, 5mL υπερκάθαρο ddH₂O και τέλος η αποθήκευση πραγματοποιήθηκε με 20% Αιθανόλη. Πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων σε πηκτή ακρυλαμιδίου 7,5% και χρώση πηκτής με Coomassie Brilliant Blue. Τα δείγματα όπου φέρουν την πρωτεΐνη όπου μας ενδιαφέρει μπαίνουν σε μια διαδικασία συμπύκνωσης και διαπίδυσης.

Συμπύκνωσης και Διαπίδυσης με τη χρήση φίλτρακι Vivaspin 4 santorius με cutoff 10.000 Da

Το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 3.000g, στους 4°C ανά 3min ώστε να συμπυκνωθεί μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Στη συνέχεια προστίθεται 10 φορές ο όγκος όπου έχουμε φτάσει την πρωτεΐνη διαλύματος αντίδρασης χωρίς την προσθήκη DTT. Τα δείγματα μοιράζεται σε erpendorf tubes των 1,5mL αφού έχει μετρηθεί η συγκέντρωσή με τη χρήση του αντιδραστήριου Bradford και αποθηκεύονται με αποστειρωμένη 50% γλυκερόλη με 50% του όγκου του δείγματος στους -80°C.

Υλικά - Αντιδραστήρια

- ❖ **Stock Hepes 20mM, pH 7,9(1L):** 4,76gr Hepes, KOH, 37,28gr KCl, 100mL Glycerol
- ❖ **Lysis Buffer:** 0,1% Triton X-100, 1mM PMSF, 2mMβ-μερκαπτοαιθανόλη, λυσοζύμη, 20mM Hepes pH 7,9
- ❖ **Equilibration Buffer:** 20mM Hepes pH 7,9, 0,5M KCl, 10% Glycerol, 20mM Imidazole
- ❖ **Elution Buffer:** 20mM Hepes pH 7,9, 0,5M KCl, 10% Glycerol, 500mM Imidazole
- ❖ **Stock Hepes 20mM, pH 7 (1L):** 4,76gr Hepes, KOH, 37,28gr KCl, 100mL Glycerol
- ❖ **Equilibration Buffer 2:** 20mM Hepes pH 7, 0,2mM EDTA, 10% Glycerol, 50mM KCl
- ❖ **Elution Buffer 2:** 20mM Hepes pH 7, 0,2mM EDTA, 10% Glycerol, 2M KCl

- ❖ **Διάλυμα Αντίδρασης(100mL):** 10mL 0,1M KCl, 0,476gr Hepes, KOH, 20mL 50% Glycerol, 0,3mL MgCl₂ 0,5M, 0,2mM EDTA, Diethylpyrocarbonate
- ❖ HisTrap HP (Ni⁺ Sepharose) (GE Healthcare)
- ❖ Immobilized γ-Aminophenyl m⁷GTP Agarose (Jena Bioscience)
- ❖ Hepes (SERVA)
- ❖ KCl(Merck)
- ❖ Glycerol (Panreac)
- ❖ KOH (Merck)
- ❖ β-μερκαπτοαιθανόλη (Merck)
- ❖ Diethylpyrocarbonat (DEPC) (Research Organics)
- ❖ EDTA (Panreac)
- ❖ MgCl₂ (Panreac)
- ❖ Triton X-100 (Merck)
- ❖ Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) (SERVA)
- ❖ Λυσοζύμη(Serva)
- ❖ Imidazole (Sigma)
- ❖ Αιθαλόλη (Panreac)

Για τις καλλιέργειες και για την ηλεκτροφόρηση η μεθοδολογία παραμένει η ίδια με παραπάνω.

3.4 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blotting)

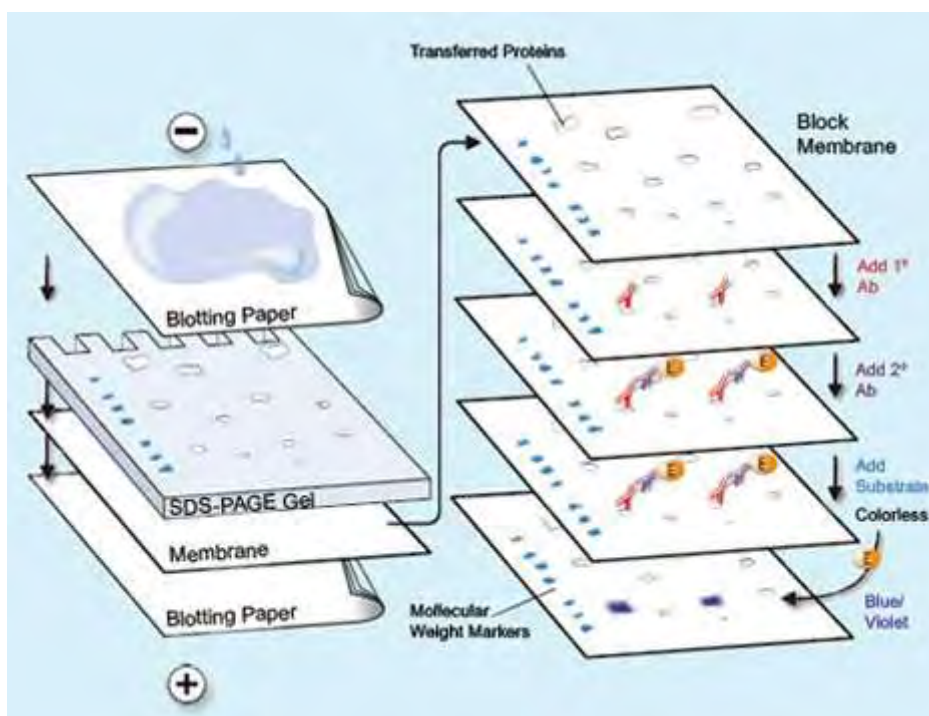
Αρχικά πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η παρασκευή του διφασικού πηκτώματος έγινε σύμφωνα με τους πίνακες 4 και 5. Φορτώθηκε η ίδια συγκέντρωση από όλες τις πρωτεΐνες, PARN, PARN R99A, PARN Q109A, PARN R99F, PARN R99W, PARN R99A/Q109A.

Ανοσοαποτύπωση – Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών και διαχωρισμό τους με βάση το μοριακό τους βάρος, ακολουθεί ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη PVDF, είναι γνωστή ως Western Blotting. Η ηλεκτρομεταφορά βασίζεται στο γεγονός ότι τα σύμπλοκα πρωτεϊνών – SDS που είναι αρνητικά φορτισμένα, μετακινούνται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου προς την άνοδο, εξέρχονται από την πηκτή και καθιλώνονται στη μεμβράνη λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η μεμβράνη και η πηκτή μεταφέρονται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer). Στην περίπτωση της PVDF προηγείται ένα στάδιο ενεργοποίησης της μεμβράνης σε μεθανόλη 100% πριν βυθιστεί στο διάλυμα μεταφοράς.

Η τοποθέτηση της πηκτής και της μεμβράνης στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (χρησιμοποιήθηκε Semidry Transfer System για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας)

γίνεται ανάμεσα σε δύο ζεύγη από χαρτιά Whatman, με τη μεμβράνη προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και την αρνητική στον αρνητικό πόλο (Εικόνα 12). Η επαφή μεταξύ της ηλεκτρικής και της μεμβράνης πρέπει να είναι άμεση χωρίς την παρεμβολή φυσαλίδων που παρεμποδίζουν την διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η μεταφορά των πρωτεϊνών στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία έγινε κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος στα 0,35A για 60min. Η επιβεβαίωση της μεταφοράς έγινε με βαφή της μεμβράνης PVDF με χρωστική Ponceau Red. Αντίστοιχα, η επιβεβαίωση της μεταφοράς όλης της ποσότητας πρωτεϊνών στη μεμβράνη, έγινε με βάψιμο της ηλεκτρικής με Coomassie Brilliant Blue.



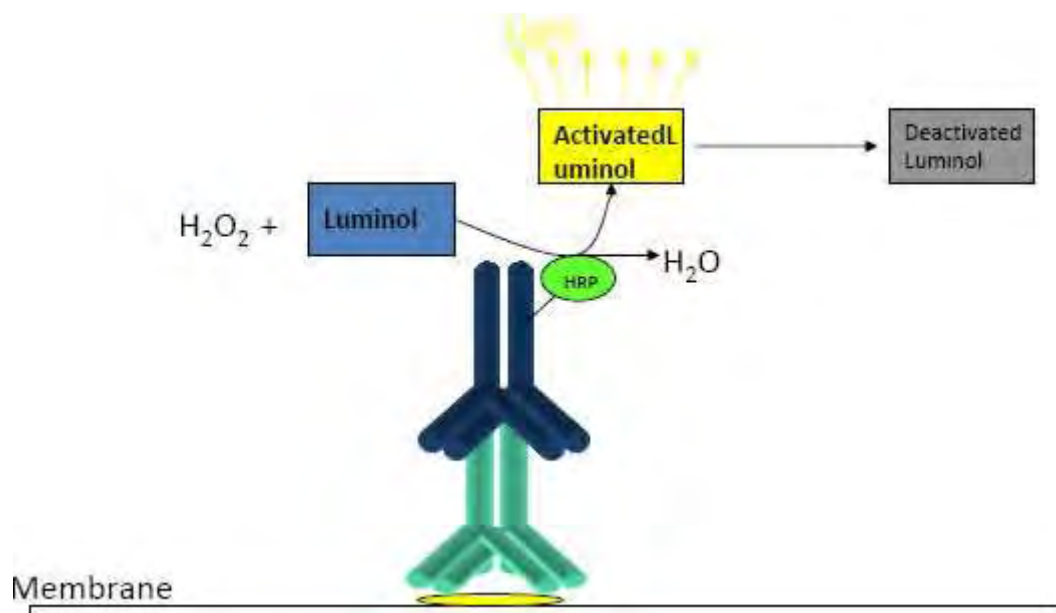
Εικόνα 12. Συναρμολόγηση συσκευής ηλεκτρομεταφοράς.

Ανοσοανίχνευση

Αφού μεταφερθούν οι πρωτεΐνες στη μεμβράνη PVDF, γίνεται οπτικοποίηση τους με ανοσοανίχνευση. Η ανοσοανίχνευση είναι μία τεχνική που επιτρέπει τον εντοπισμό μιας καθηλωμένης στη μεμβράνη πρωτεΐνη με τη βοήθεια αντισώματος. Η τεχνική βασίζεται στο γεγονός ότι όταν η καθηλωμένη πρωτεΐνη – «αντιγόνο» αλληλεπιδράσει με το αντίσωμα, μπορεί να ανιχνευτεί με τη βοήθεια ενός δεύτερου αντισώματος, ειδικού για το πρώτο. Αρχικά η μεμβράνη PVDF μετά την ηλεκτρομεταφορά εμβαπτίζεται υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα σε Blocking Buffer ώστε να κορεστεί η μεμβράνη από την καζεΐνη του γάλακτος, η οποία δεσμεύει τις μη ειδικές θέσεις πάνω στη μεμβράνη. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγονται οι μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα που είναι ειδικό για την επιθυμητή πρωτεΐνη. Κατόπιν η μεμβράνη επωάζεται με το πρώτο αντίσωμα (στη προκειμένη περίπτωση ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε ορός μετά από ανοσοποίηση κουνελιού με PARN (rabbitanti-

PARN) σε αραιώση 1:1.000 σε Blocking Buffer) υπό συνεχή ανάδευση 12-16 ώρες στους 4°C. Ακολουθούν τέσσερις πλύσεις της μεμβράνης με PBS-T (Washing Buffer) έκαστης 15min υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, και στη συνέχεια επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα παρουσία του δευτέρου αντισώματος (φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένη υπεροξειδάση), υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ως δεύτερο αντίσωμα στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε goat anti-rabbitIgG-HRP αραιωμένο 1:10.000. Επαναλαμβάνονται οι τέσσερις πλύσεις τις μεμβράνης με PBS-T των 15min.

Η ανίχνευση του ειδικού σήματος στη συνέχεια οφείλεται στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας, καθώς το δεύτερο αντίσωμα που είναι ειδικό έναντι rabbit IgG ανοσοσφαιρινών, μετά τη προσθήκη κατάλληλου αντιδραστηρίου δίνει προϊόν που παράγει έντονο φως (συγκεκριμένα ως αποτέλεσμα οξείδωσης της λουμινόλης από την υπεροξειδάση). Η εμφάνιση γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο του συστήματος ανοσοανίχνευσης ECL Plus και με τη βοήθεια του μηχανήματος Floar ChemE imaging system με διάρκεια εμφάνισης 3min (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Συνοπτική διαδικασία ανοσοανίχνευσης και εμφάνισης του σήματος.

Υλικά - Αντιδραστήρια

- ❖ **Transfer Buffer 1x:** 10% Running Buffer 10x, 10% Methanol (100%), dH₂O
- ❖ **PBS 1x (Phosphate Buffer Salts):** 137mM NaCl, 2,7mm KCl, 4,3mM Na₂HPO₄, 1,47mM KH₂PO₄
- ❖ **Blocking Buffer:** 0,1% Tween, 5% γάλα, PBS 1x
- ❖ **Washing Buffer (PBS-T):** 0,1% Tween, PBS 1x
- ❖ NaCl (Merck)
- ❖ KCl (Merck)
- ❖ Na₂HPO₄ (Merck)
- ❖ KH₂PO₄ (Merck)

- ❖ Methanol (Merck)
- ❖ Tween (EuroClone)
- ❖ Γάλα σε σκόνη
- ❖ Ponceau Red (Sigma)
- ❖ Rabbit anti-PARN serum (ευγενική παραχώρηση κ. Α. Virtanen)
- ❖ Goat anti-rabbit IgG-HRP (Chemicon)
- ❖ ECL Plus (Amersham)
- ❖ PVDF

3.5 Ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native-PAGE)

Native-PAGE

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών (pH, θερμοκρασία, ένταση ηλεκτρικού πεδίου, είδος του ηλεκτροφορητικού πεδίου, αναλογία ακρυλαμιδίου προς δισακρυλαμιδίου στην πηκτή (crosslinking), μέγεθος και σχήμα βιομορίου και φύση του ρυθμιστικού διαλύματος). Στην ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες η πηκτή τρέχει με την απουσία SDS και DTT, δηλαδή με την απουσία αποδιατακτικών παραγόντων και οι πρωτεΐνες δε μετουσιώνονται στους 95°C. Στην ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες ο διαχωρισμός βασίζεται στο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης ενώ στην ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες με βάση το εσωτερικό τους φορτίο, στο μέγεθος και το σχήμα τους. Οι πρωτεΐνες με αυτή τη διαδικασία συγκροτούν τη τριτοταγή τους διαμόρφωση. Το ισοηλεκτρικό φορτίο της υπό μελέτη πρωτεΐνης, PARN, είναι 5,68 άρα με βάση αυτό το δεδομένο ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία για όλες τις πρωτεΐνες μας (PARN, PARN R99A, PARN Q109A, PARN R99F, PARN R99W, PARN R99A/Q109A). Αρχικά, παρασκευάσαμε την πηκτή όπου θα χρησιμοποιήσουμε. Η μία φάση του πηκτώματος αποτελεί το Stacking gel (5%), στην οποία έγινε η φόρτωση των δειγμάτων των πρωτεϊνών και το «πακετάρισμά» τους στο ίδιο ύψος προκειμένου όλες οι διαδρομές να τρέξουν σύγχρονα. Τη δεύτερη φάση αποτελεί το πήκτωμα διαχωρισμού ή Separating gel (5%), όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν ανάλογα με τα ολιγομερή που αποτελούνται

Η παρασκευή του διφασικού πηκτώματος έγινε σύμφωνα με τα συστατικά των παρακάτω πινάκων 6 και 7:

Πίνακας 6. Stacking gel 5%

Components	mL
40% acryl – Bisacrylamide mix	0,4
4x Stacking Buffer (Tris HCl pH 8,8)	1
dH ₂ O	2,6
TEMED	0,010
APS 10%	0,020

Πίνακας 7.Separating gel 5%

Components	mL
40% acryl – Bisacrylamide mix	1,25
4x Running Buffer (Tris HCl pH 8,8)	2,5
dH ₂ O	6,25
TEMED	0,010
APS 10%	0,050

Προσθέτουμε τελευταίους τους καταλύτες APS και TEMED προκειμένου για την πήξη των πηκτωμάτων.

Στα δείγματα έγινε η προσθήκη Loading Buffer N.P. 2x, προκειμένου να έχουμε συγκέντρωση 1x στο τελικό πρωτεϊνικό διάλυμα. Πραγματοποιήθηκε η εμφάνιση του πηκτώματος σε Electrophoresis Buffer 1x μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα. Οι ποσότητες των δειγμάτων που φορτώθηκαν υπολογίστηκαν βάσει της καμπύλης Bradford που κατασκευάστηκε. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 90Volt, στους 4°C για 3 ώρες αλλά ο χρόνος μπορεί να είναι διαφορετικός οπότε πραγματοποιήθηκε και η παρακολούθηση του μετώπου της διαδρομής της χρωστικής που ενυπάρχει στο Loading Buffer (Bromophenol Blue). Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση και ανοσοανίχνευση όπως αναλύθηκε παραπάνω (Ενότητα 3.4).

Υλικά - Αντιδραστήρια

- ❖ **4x Running Buffer (200mL):** 36,3gr Tris, HCl, ρύθμιση pH 8,8
- ❖ **4x Stacking Buffer(50mL):**15,1gr Tris, HCl, ρύθμιση pH 6,8
- ❖ **Electrophoresis Buffer 1x(1L):** 0,192M Glycine, 0,025M Tris
- ❖ **Loading Buffer N.P. 2x(10mL):** 4x Stacking Buffer, 20% Glycerol, 0,02% Bromophenol Blue
- ❖ Tris (Merck)
- ❖ HCl (Merck)
- ❖ Glycerol (Panreac)
- ❖ Acryl-bisacrylamidemix (Merck)
- ❖ SDS (SIGMA)
- ❖ APS (Merck)
- ❖ TEMED (Merck)
- ❖ Glycine (Merck)
- ❖ Bromophenol Blue (Rasearch Organics)
- ❖ Kit for Molecular Weights 14.000-500.000 Non-denaturing PAGE (SIGMA-ALDRICH)

3.6 Μέτρηση της ενεργότητας της PARN με κυανό του μεθυλενίου

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στη μείωση της διαφοράς απορρόφησης (ΔA) του πολυ(A) στα 662nm όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του [51,52]. Σύμφωνα με την αρχή αυτή και με βάση την πρότυπη καμπύλη γίνεται η μέτρηση της συγκέντρωσης σε μία αντίδραση των 100μl, με προσθήκη 900μl διαλύματος κυανού του μεθυλενίου. Το τελευταίο περιέχει κυανό του μεθυλενίου το οποίο προσδένεται στο πολυμερές πολυ(A) και EDTA σε συγκέντρωση 2mM το οποίο δεσμεύει τα ιόντα μαγνησίου. Τα ιόντα μαγνησίου είναι απαραίτητα για την λειτουργία του ενζύμου και έτσι το EDTA δεσμεύοντας τα ιόντα σταματάει την αντίδραση. Μείωση της συγκέντρωσης του πολυ(A), που οφείλεται σε ενζυμική δράση έχει ως συνέπεια την αύξηση της απορρόφησης. Έτσι για την μέτρηση της ενεργότητας προστίθεται ίδια ποσότητα πολυ(A) στο τυφλό και στην αντίδραση, όπου η τιμή της απορρόφησης, μετά από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα στην αντίδραση, είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας πολυ(A) που αποικοδομήθηκε.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης πολυ(A)

Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης ετοιμάστηκαν σύμφωνα με τον Πίνακα . Μετά την προσθήκη του διαλύματος κυανού του μεθυλενίου τα δείγματα επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 30°C στο σκοτάδι και η φωτομέτρηση έγινε στα 662nm. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυ(A) (10μg/ml τελική συγκέντρωση). Υπολογίστηκε η διαφορά απορρόφησης (ΔA) θέτοντας το τυφλό ως 0. Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει η εξίσωση από την οποία μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα πολυ(A) που υδρολύεται κατά τις ενζυμικές αντιδράσεις (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Πρότυπη καμπύλη πολυ(A)

Τελική συγκέντρωση πολυ(A) (10μg/ml)	0	2	4	6	8	10 (T)
πολυ(A) 100μg/ml (μl)	0	20	40	60	80	100
Διάλυμα αντίδρασης (μl)	100	80	60	40	20	0

Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου (μl)	900	900	900	900	900	900
------------------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30°C. Η αντίδραση αποτελείται από το διάλυμα αντίδρασης, πολυA), Dithiothreitol (DTT), RNase Inhibitor και κυανό του μεθυλενίου (Methylene Blue). Όλα αυτά μαζί επωάζονται στο σκοτάδι για 15min στους 30°C, με το πέρας του χρόνου πραγματοποιήθηκε η προσθήκη του ενζύμου, τόσο του αγρίου τύπου όσο και αυτών που φέρουν τις μεταλλάξεις. Ακολουθεί φωτομέτρηση του διαλύματος στα 662nm, επώαση για 5min στο σκοτάδι, στους 30°C, φωτομέτρηση στα 662nm, επώαση για 10min, φωτομέτρηση, επώαση για 20min, φωτομέτρηση. Έτσι έχουμε σε τακτά χρονικά διαστήματα την τιμή της απορρόφησης και μέσα από αυτή και τη δράση του ενζύμου. Με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος *GraFit 6* υπολογίστηκαν οι τιμές των K_M και V_{max} και οι αναπαραστάθηκαν οι γραφικές παραστάσεις των MichaelisMenten και Lineweaver-Burk ή των διπλών αναστροφών.

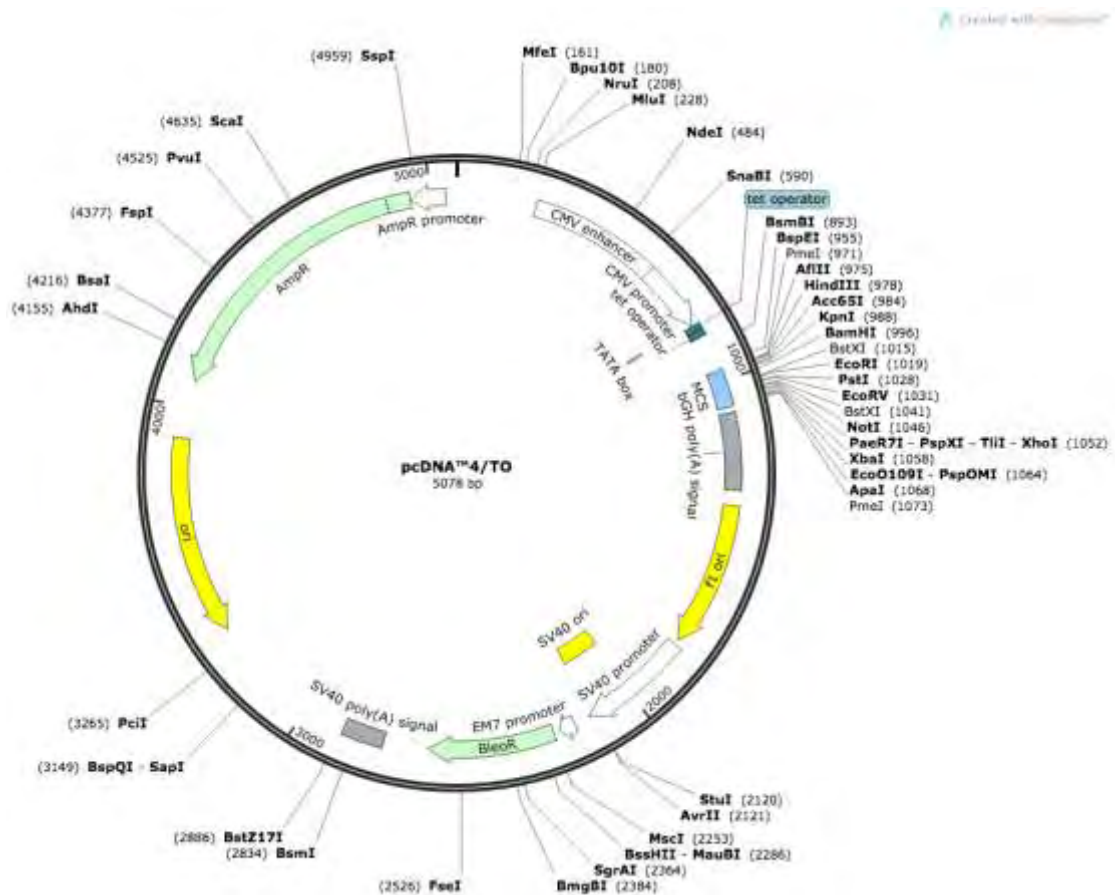
Υλικά - Αντιδραστήρια

- ❖ **Methylene Blue 0,01% (20mL):** 0,476mL Methylene Blue, Diethylpyrocarbonat (DEPC)
- ❖ **Methylene Blue 0,0012%:** 0,1M Mops, Diethylpyrocarbonat (DEPC), KOH, 12mL Methylen Blue 0,01%, 0,4mL EDTA 0,5M
- ❖ Methylene Blue (Merck)
- ❖ Diethylpyrocarbonat (DEPC) (Research Organics)
- ❖ EDTA (Panreac)
- ❖ Mops (Aesar)
- ❖ KOH (Merck)
- ❖ Dithiothreitol (DTT) (SERVA)
- ❖ RNase Inhibitor (Biolabs)

3.7 Κλωνοποίηση των PARN και PARN R99A/Q109A στον πλασμιδιακό φορέα $\text{pcDNA}^{\text{TM}}_4/\text{TO}$.

$\text{pcDNA}^{\text{TM}}_4/\text{TO}$

Ο πλασμιδιακός φορέας $\text{pcDNA}^{\text{TM}}_4/\text{TO}$ (Εικόνα 14) είναι ένας φορέας υπερέκφρασης με 5,1Kb και χρησιμοποιείται με το σύστημα T-RexTM. Ο φορέας επιτρέπει την επαγόμενη έκφραση μέσω τετρακυκλίνης του γονιδίου που μας ενδιαφέρει σε θηλαστικά κύτταρα με συνδιαμόλυνση τους με τον φορέα $\text{pcDNA}^{\text{TM}}_6/\text{TR}$. Ο φορέας $\text{pcDNA}^{\text{TM}}_4/\text{TO}$ περιέχει δύο θέσεις χειρισμού τετρακυκλίνης (TetO_2) με CMV (cytomegalovirus) υποκινητή για έκφρασή του γονιδίου εξαρτώμενη από τετρακυκλίνη. Οι TetO_2 αλληλουχίες χρησιμεύουν ως θέσεις πρόσδεσης για τέσσερα μόρια καταστολέα Tet (περιλαμβάνει δύο ομοδιμερή καταστολέα Tet) και προσδίδουν ανταπόκριση στη τετρακυκλίνη για το γονίδιο ενδιαφέροντος. Ο καταστολέας Tet εκφράζεται από το πλασμιδιακό φορέα $\text{pcDNA}^{\text{TM}}_6/\text{TR}$. Απουσία τετρακυκλίνης, η έκφραση του γονιδίου που σας ενδιαφέρει καταστέλλεται από την πρόσδεση του Tet καταστολέα ομοδιμερών στις TetO_2 αλληλουχίες. Προσθήκη τετρακυκλίνης στα κύτταρα καταστέλλει το υβρίδιο CMV/ TetO_2 και υποκινητής ο $\text{pcDNA}^{\text{TM}}_4/\text{TO}$ επιτρέποντας την έκφραση του γονιδίου.



Εικόνα 14. Απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pcDNATM₄/TO.

Κλωνοποίηση των PARN και PARN R99A/Q109A στον φορέα pcDNATM₄/TO

Ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα για την κλωνοποίηση και την έκφραση των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν.

- ✓ Με βάση την αλληλουχία πολυσυνδέτη του φορέα βρίσκουμε τη θέση εισαγωγής του γονιδίου
- ✓ Σύνδεση του επιθυμητού γονιδίου-ενθέματος στον φορέα pcDNATM₄/TO και διαμόλυνση του σε E.coli. Η επιλογή των διαμολυσμένων κυττάρων έγινε χρησιμοποιώντας αντιβιοτικό 100μg/mL Αμπικυλίνης
- ✓ Ανάλυση των δειγμάτων για την παρουσία του ενθέματος με πέψη περιορισμού
- ✓ Επιλογή των δειγμάτων με τις σωστά θραύσματα και χρήση της αλληλούχισης για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

Αναλυτικά για την περάτωση της κλωνοποίησης χρησιμοποιήσαμε το In - Fusion[®] HDCloningKit (Clonitech[®]). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε πέψη του

pcDNATM₄/TO με EcoRI (Πρωτόκολλο TaKaRa BIOINC). Οι αλληλουχία όπου αναγνωρίζει το συγκεκριμένο ένζυμο περιορισμού είναι GAATTC. Συνθήκες στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Συνθήκες πέψης

Πρωτόκολλο TaKaRa EcoRI	
EcoRI	1μL
10x HBuffer	2μL
pcDNA TM ₄ /TO	10μL
ddH ₂ O	7μL
V τελικό	20μL

Πραγματοποιήσαμε δύο αντιδράσεις πέψων. Το EcoRI προστέθηκε τη τελευταία στιγμή. Έπειτα οι δύο αντιδράσεις επώαστηκαν για 2 ώρες στους 37°C. Για να σταματήσει η αντίδραση προστέθηκαν 5μL Loading Buffer 6x. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε ενίσχυση της PARN και της PARN R99A/Q109A. Οι εκκινητές όπου χρησιμοποιήθηκαν είναι ίδιοι και για τις δύο αλληλουχίες αλλά στα άκρα των εκκινητών υπάρχουν οι βάσεις από τη πέψη ώστε να πραγματοποιηθεί ο ομόλογος ανασυνδιασμός, ο σχεδιασμός των εκκινητών πραγματοποιήθηκε με ένα tool της Clontech και σαν φορέας επιλέχθηκε ο pcDNATM₄/TO και του ενθέμα η PARN (όσο αφορά τους εκκινητές οι μεταλλάξεις βρίσκονται σε τέτοιο σημείο όπου δεν επηρεάζει την δημιουργία τους (Πίνακας 9).

Πίνακας 9. Εκκινητές ενίσχυσης της PARN και PARNR99A/Q109A.

Εκκινητές (primers)		
PARN	Forward	CAGTGTGGTGGGAATTCATGGAGATAATCAGGAGCAA
EcoRI	Reverse	GATATCTGCAGAATTCCTACCATGTGTCAGGAACCTTA

Η αντίδραση ενίσχυσης ήταν των 50μL. Χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση KAPA HiFi HotStart Ready Mix. Στο παρακάτω πίνακα (Πίνακα 10) αναγράφονται οι συνθήκες ενίσχυσης των αλληλουχιών.

Πινάκας 10. Θερμικό προφίλ ενίσχυσης.

Αντίδραση Ενίσχυσης αλληλουχίας των PARN και PARN R99A/Q109A

2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix	25μL
PARN EcoRI Fwd	1,5μL
PARN EcoRI Rev	1,5μL
Plasmid - DNA	1μL
ddH ₂ O	21μL

Το θερμικό προφίλ του κυκλοποιητή της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση των PARN και PARN R99A/Q109A.

Type of reaction	Cycling condition
Initial Denaturation	95°C (3min)
Denaturation	98°C (20sec)
Annealing	65°C (15sec)
Extension	72°C (2min)
Final Extension	72°C (10min)
Hold	4°C

25 Cycles

Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης και της PCR ενίσχυσης σε πηκτή αгарόζης 1%. Όλα τα προϊόντα της πέψης υπέστησαν καθαρισμό με το PCR clean-up gel extraction MACHEREY-NAGEL.

Μετά την απομόνωση από τη πηκτή, πραγματοποιήθηκε σύνδεση του pcDNATM₄/TO και του επιθυμητού ενθέματος. Όπως είχαμε αναφέρει το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το In - Fusion[®] HD Cloning Kit (Clonitech[®]). Η αναλογία του ενθέματος : pcDNATM₄/TO είναι 3 : 1. Στο Πίνακα 11 απεικονίζονται οι συνθήκες της σύνδεσης.

Πίνακας 11. Συνθήκες της σύνδεσης pcDNATM₄/TO – PARN (pcDNATM₄/TO PARN) και pcDNATM₄/TO – PARN R99A/Q109A (pcDNATM₄/TO PARN R99A/Q109A)

pcDNA TM ₄ /TO	1,25μL
PARN (WT / R99A/ Q109A)	6,75μL
Enzyme	2μL
ddH ₂ O	-

Οι δύο αντιδράσεις επώαστηκαν για 30min στους 50°C. Χημικός μετασχηματισμός στη κυτταρική σειρά E.coli XL1-Blue τόσο για το pcDNATM₄/TO PARN όσο και για το pcDNATM₄/TO PARN R99A/Q109A. Το αντιβιοτικό ανθεκτικότητας ήταν η αμπικιλίνη. Κατά τη διάρκεια του μετασχηματισμού το θρεπτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν SOC Media (μετατροπή του SOB Media σε SOC Media). Έπειτα επιστρώθηκαν τριβλία με ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη.

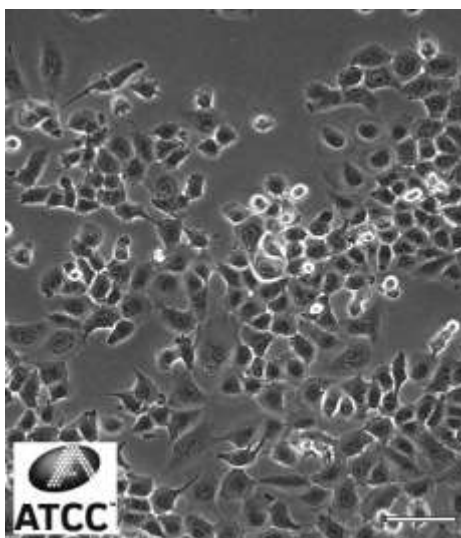
Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν, παραλάβαμε όσες περισσότερες μπορούσαμε για την ανάπτυξή τους σε υγρή μικρή καλλιέργεια. Απομονώθηκαν τα πλασμίδια (Nucleo Spin Plasmid MACHEREY-NAGEL kit). Ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%, υπέστησαν πέψη με τις ίδιες συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%, για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του ενθέματος. Επίσης στάλθηκαν για αλληλούχηση για την μη τυχόν ύπαρξη μεταλλάξεων.

Υλικά - Αντιδραστήρια

- ❖ Φορέας pcDNATM₄/TO
- ❖ In - Fusion[®] HD Cloning Kit (Clonitech[®])
- ❖ EcoRI TaKaRa BIO INC (TAKARA BIOTECHNOLOGY)
- ❖ Πολυμεράση KAPA HiFi HotStart Ready Mix (KAPA BIOSYSTEMS)
- ❖ PCR clean-up gel extraction MACHEREY-NAGEL
- ❖ SOB (1 L): 20gr. Tryptone, 5gr Yeast Extract, 0,5gr NaCl, 10mL filter-sterilized 1M MgCl₂, 10mL filter-sterilized 1M MgSO₄
- ❖ SOC (100mL): 2mL filter-sterilized 20% (w/v) glucose, SOB Medium to a final volume of 100mL
- ❖ **TAE 50x**: Tris Base 24,2% v/w, ακετοξικόξύ 5,71% w/w, EDTA0,05M pH 8,6
- ❖ **Loading Buffer 6x**: Bromophenol Blue 0,09%, Xylene Cyanol 0,09%, Γλυκερόλη 60%, EDTA 60mM.
- ❖ ddH₂O
- ❖ Escherichia coli strain XL1- Blue (χημικάεπιλεκτικά)
- ❖ Tryptone (Fluka)
- ❖ Yeast Extract
- ❖ NaCl (Merck)
- ❖ MgCl₂ (Alpha Aesar)
- ❖ MgSO₄ (Applichem)
- ❖ LB Broth (Scharlau)
- ❖ LB Agar (Scharlau)
- ❖ Αμπικιλίνη(AppliChem)
- ❖ NucleoSpinPlasmidMACHEREY-NAGELkit
- ❖ Αγαρόζης (Sigma)
- ❖ DNA μοριακός μάρτυρας 100bp (Fermentas)
- ❖ Midori Green DNA strain (Nippon Genetics)
- ❖ Bromophenol Blue (Research Organics)
- ❖ Xylene Cyanol (Merck)
- ❖ Γλυκερόλη (Panreac)
- ❖ Tris (Merck)
- ❖ Ακετοξικό οξύ (Merck)
- ❖ EDTA (Panreac)

3.8 Κυτταρική Σειρά –Χειρισμοί

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά NCI-H520. Πρόκειται για ανθρώπινη κυτταρική σειρά από καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα. Τα κύτταρα της κυτταρικής αυτής σειράς σχηματίζουν μονόστιβες επιφάνειες στο τάπητο ανάπτυξης (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Κύτταρα NCI-H520

Απόψυξη κυττάρων

- Τα φιαλίδια (cryovials) που περιέχουν τα κύτταρα από τους -80°C (ή υγρό άζωτο) όπου ήταν αποθηκευμένα, εμβαπτίζονται σε υδατόλουτρο (37°C) με ήπια ανάδευση.
- Αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα, γίνεται καθαρισμός του φιαλιδίου με αιθανόλη 70% εξωτερικά.
- Ακολουθεί μεταφορά του αιωρήματος των κυττάρων σε φάλκον 15mL με επιπλέον προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού μέχρι το 10mL.
- Φυγοκέντρηση του αιωρήματος στα 1500rpm για 2min
- Μεταφορά στον απαγωγό και απομάκρυνση του υπερκειμένου, προκειμένου να αποβάλουμε το DMSO που περιέχεται στο αρχικό κρυοπροστατευτικό θρεπτικό υλικό των κυττάρων και δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη τους.
- Προσθήκη 10mL θρεπτικού RPMI (10% FBS) και μεταφορά σε T25 flask.
- Επώαση των κυττάρων στους 37°C μέχρι να προσκολληθούν στο ταπήτιο της φλάσκας
- Αφού η πληρότητα των κυττάρων φτάσει 90-100%, μεταφέρουμε τα κύτταρα μετά από τρυψινοποίηση σε T25 flask.

Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων είναι απαραίτητη η διαδικασία της τρυψινοποίησης. Για να προβούμε σε τρυψινοποίηση, η πληρότητα των κυττάρων στο ταπήτιο της φλάσκας ανάπτυξης θα πρέπει να είναι 90-100%. Έτσι λοιπόν ακολουθούμε τα εξής βήματα:

- Παρατηρούμε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο. Ελέγχουμε και σημειώνουμε μορφολογία κυττάρων και πληρότητα ταπήτιου (confluency).
- Απομακρύνουμε (με αναρρόφηση) το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας.
- Ξεπλένουμε τα κύτταρα με διάλυμα PBS 1x (*).
- Προσθέτουμε διάλυμα τρυψίνης – EDTA 0,05% (0,5mL για φιάλη 75cm²).
- Ανακινούμε τη φιάλη έτσι ώστε το διάλυμα τρυψίνης να καλύψει όλο το ταπήτιο.
- Μεταφέρουμε τα κύτταρα στον επωαστήρα (κλίβανος 37°C) για περίπου 1-2min. Παρατηρούμε το σχήμα των κυττάρων στο μικροσκόπιο, και ελέγχουμε αν έχουν αποκτήσει σφαιρική μορφή.
- Προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού RPMI, 1% Antibiotic-Antimycotic (10mL θρεπτικού για φιάλη 75cm²).
- Επαναιωρούμε τα κύτταρα και τα διασπείρουμε ομοιόμορφα με πιπέτα (των 10mL)
- Στο σημείο αυτό μπορούμε να χωρίσουμε τα κύτταρα σε δύο ή περισσότερες φλάσκες ή απλά να απομακρύνουμε μέρος των κυττάρων στην ήδη υπάρχουσα φιάσκα.
- Κάθε φορά που γίνεται η τρυψινοποίηση, καταγράφεται ως πέρασμα (π.χ. πέρασμα p11-passage 11)

(*).Σημείωση: το PBS διάλυμα που χρησιμοποιείται στον χειρισμό των κυττάρων, είναι φιλτραρισμένο και αποστειρωμένο.

Συλλογή των κυττάρων

- *Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων με παγωμένο και αποστειρωμένο PBS 1x (3 φορές)
- *Τρυψινοποίηση των κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε παραπάνω
- *Ομογενοποίηση των αποκολλημένων κυττάρων με πιπετάρισμα σε PBS 1x (ή RPMI), και μεταφορά σε erpendorfs 1,5mL.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5min στις 3.000rpm στους 4°C.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου προσεκτικά και φύλαξη του ιζήματος στους -80°C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν πειραματικά.

*Τα βήματα αυτά πραγματοποιούνται σε επαγωγό καθέτου νηματικής ροής.

Ψύξη των κυττάρων

- Τρυψινοποίηση κυττάρων

- Προσθήκη θρεπτικού υλικού (10mL για T75 flask)
- Μεταφορά αιωρήματος σε φάλκον 10mL
- Φυγοκέντρηση στις 1.500rpm για 3min στους 4°C.
- Μεταφορά στον απαγωγό και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 1800μLRPMI (10% FBS).
- Προσθήκη 200μL κρουοπροστατευτικού DMSO (τελικό κρουοπροστατευτικό διάλυμα 20% DMSO).
- Μεταφορά σε cryovial.
- Αργή ψύξη μέσα σε cryobox (1°C/1min) στους -80°C.
- Αποθήκευση στους -80°C ή σε υγρό άζωτο.

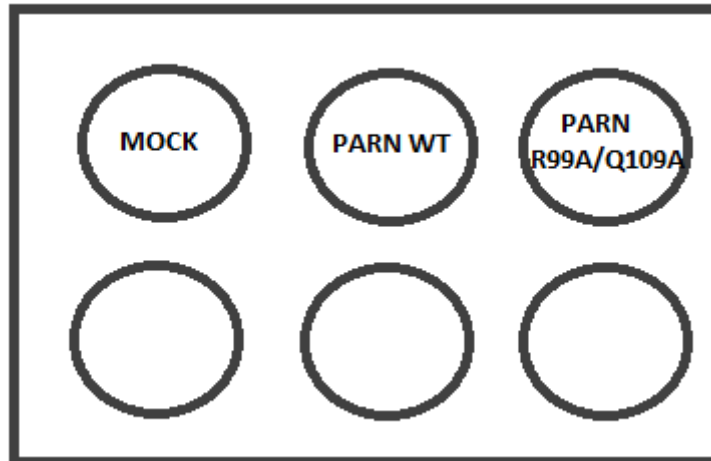
Υλικά - Αντιδραστήρια

- ❖ Θρεπτικούλικό: RPMI, 10% FBS, 1% Antibiotic-antimycotic
- ❖ PBS 1x (Phosphate Buffer Salts): 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3 Na₂HPO₄, 1,47mM KH₂PO₄
- ❖ RPMI (Biosera)
- ❖ FBS (Biosera)
- ❖ Antibiotic-antimycotic (Gibco)
- ❖ DMSO (Sigma)
- ❖ Τρυψίνη (Biosera)
- ❖ EDTA (Merck)
- ❖ NaCl (Merck)
- ❖ KCl (Merck)
- ❖ Na₂HPO₄ (Merck)
- ❖ KH₂PO₄ (Merck)
- ❖ Αιθανόλη (Sigma)

3.9 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με χρήση λιποσωμάτων

Πρωτόκολλο διαμόλυνσης

1. Πρώτο βήμα αποτελεί η τρυψινοποίηση των κυττάρων μιας φλάσκας T75 flask στην οποία η πληρότητα των κυττάρων 95-100%. Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίζονται μετά από μέτρηση σε πλάκα Neubauer, και σε αυτή τη φλάσκα μπορούν να φτάσουν ως και 42,5x10⁵ κύτταρα.
2. Σε κάθε well ενός 6-well προσθέτουμε το 1/24 από τα παραπάνω τρυψινοποιημένα κύτταρα έτσι ώστε σε κάθε well να έχουμε πληρότητα περίπου 70-75% μετά από επώαση στους 37°C. Η πληρότητα αυτή ενδείκνυται για τη διαμόλυνση (Εικόνα 15).



Εικόνα 16. 6-wellplate για υπερέκφραση αποαδενυλασών.

3. Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε το X-fect reagent, το οποίο περιέχει το X-fect Polymer και το X-fect Reaction Buffer. Το X-fect Polymer σχηματίζει κατιονικά λιποσώματα και επιτρέπει τη διαμόλυνση πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα των θηλαστικών με πολύ μεγάλη απόδοση. Το αντιδραστήριο αυτό συνδυαζόμενο με DNA, σχηματίζει λιποσώματα που συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων και αποχύνουν το περιεχόμενο DNA στο εσωτερικό του κυττάρου (στην περίπτωση μας μιλάμε για συνδιαμόλυνση δύο πλασμιδίων, το ένα φέρει το επιθυμητό γονίδιο υπερέκφρασης). Επίσης, είναι αναγκαία στα πειράματα υπερέκφρασης και η ύπαρξη κυττάρων που χρησιμεύουν ως control και τα οποία δε διαμολύνονται, καθώς και ως αρνητικό control κύτταρα τα οποία διαμολύνονται με πλασμιδιακό φορέα ο οποίος είναι άδειος χωρίς κανένα γονίδιο να υπερέκφραση, τα ονομάζουμε MOCK κύτταρα. Έτσι, η σύγκριση στα επίπεδα εκφρασης θα γίνει και με τα MOCK κύτταρα.
4. Για το σχηματισμό των λιποσωμάτων ετοιμάζουμε δύο διαλύματα: ένα DNA mix και ένα X-fect mix σύμφωνα με τις εξής ενδείξεις:
 - DNA mix: 6μg πλασμιδίου (6/7 pcDNATM₆/TR, 1/7 pcDNATM₄/TO PARN ή pcDNATM₄/TO PARN R99A/Q109A) σε 100μL X-fect Reaction Buffer ανά well. Οι συγκεντρώσεις των πλασμιδίων μετρήθηκε με το QubitTMDNAAssayKits
 - X-fect mix: 1,8μL X-fect Polymer σε 100μL X-fect Reaction Buffer ανά well
5. Παρασκευή του transfection mix: Αναμιγνύουμε το DNA mix και το X-fect mix και τα αφήνουμε να επωαστούν για 10min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Παράλληλα απομακρύνουμε από κάθε well το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και ξεπλένουμε τα κύτταρα με κρύο και αποστειρωμένο PBS 1x (1mL) δύο φορές. Πριν την προσθήκη του transfection mix προσθέτουμε θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά-αντιμυκητωτικά σε κάθε well (0,75mL RPMI/well)

7. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης του transfection mix, μοιράζουμε το τελευταίο με κυκλικό τρόπο (dropwise) στα κύτταρα που προορίζονται για διαμόλυνση και αφήνουμε το 6-well να επωαστεί στους 37°C.
8. Μετά από 5 ώρες απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από τα διαμολυσμένα κύτταρα και το αντικαθιστούμε μετά από 2 πλύσεις με 0,5mL PBS 1x, με 1mL φρέσκο θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά-αντιμυκητοκικά σε κάθε well.

Υπερέκφραση PARN και PARN R99A/Q109A

Μετά τη διαδικασία της διαμόλυνσης τα εξής βήματα ακολουθήθηκαν για την υπερέκφραση:

1. Μετά από 24 ώρες από τη διαμόλυνση των κυττάρων γίνεται αλλαγή θρεπτικού υλικού μετά από 2 πλύσεις με 0,5mL PBS 1x, με 1mL φρέσκο θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά-αντιμυκητοκικά αλλά τη προσθήκη δοξακυκλίνης 0,5μg/well (ανάλογο της τετρακυκλίνης). Επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C.
2. Ακολουθείται η διαδικασία συλλογής των κυττάρων όπως περιγράφηκε παραπάνω.





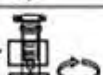
Υλικά - Αντιδραστήρια









- ❖ Qubit™ DNA Assay Kits
- ❖ Θρεπτικού υλικό: RPMI, 10% FBS, 1% Antibiotic-antimycotic
- ❖ PBS 1x (Phosphate Buffer Salts)
- ❖ Τρυψίνη
- ❖ X-fectreagent (Clontech)
- ❖ Δοξακυκλίνη (Sigma)
- ❖ Neubauer (Poly Optik GmbH)

3.10 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών


Για την απομόνωση του RNA από τα κύτταρα NCI-H520 όπου έγινε η υπερέκφραση των αποαδενυλασών, έγινε η χρήση του DNA, RNA and protein purification NucleoSpin® TriPrep MACHEREY-NAGEL (Εικόνα 17).

NucleoSpin® TriPrep

1	Homogenize sample		Up to 30 mg
2	Lyse sample		350 µL RP1 3.5 µL β-mercaptoethanol (or comparable reducing agent)
3	Filtrate lysate		1 min, 11,000 x g
4	Adjust DNA and RNA binding conditions		350 µL ethanol (70%)
5	Bind DNA and RNA		Load sample 30 s, 11,000 x g

DNA and RNA Purification (both bound to the silica membrane)		Protein Purification (protein in the column flow-through)	
6	Wash silica membrane		1 st and 2 nd wash each: 500 µL DNA Wash 1 min, 11,000 x g
7	Dry membrane		RT, 3 min (with open lid)
8	Elute DNA		100 µL DNA Elute Incubate 1 min 1 min, 11,000 x g
9	Digest residual DNA		95 µL DNase reaction mixture RT, 15 min
10	Wash and dry silica membrane		1 st wash 200 µL RA2 2 nd wash 600 µL RA3 30 s, 11,000 x g 3 rd wash 250 µL RA3 2 min, 11,000 x g
11	Elute highly pure RNA		60 µL H ₂ O (RNase-free) 1 min, 11,000 x g
12	Precipitate protein		10–700 µL flow-through 1 vol PP RT, 10 min 5 min, 11,000 x g
13	Wash protein pellet		500 µL ethanol (50%) 1 min, 11,000 x g
14	Dry protein pellet		RT, 5–10 min
15	Prepare protein sample		20–100 µL PSB-TCEP 3 min, 95–98 °C 1 min, 11,000 x g

MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG · Neumann-Neander-Str. 6–8 · 52355 Düren · Germany
Tel.: +49 24 21 969-270 · Fax: +49 24 21 969-199 · tech-bio@mn-net.com · www.mn-net.com



Εικόνα 17. Διαδικασία απομόνωσης RNA.

3.11 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

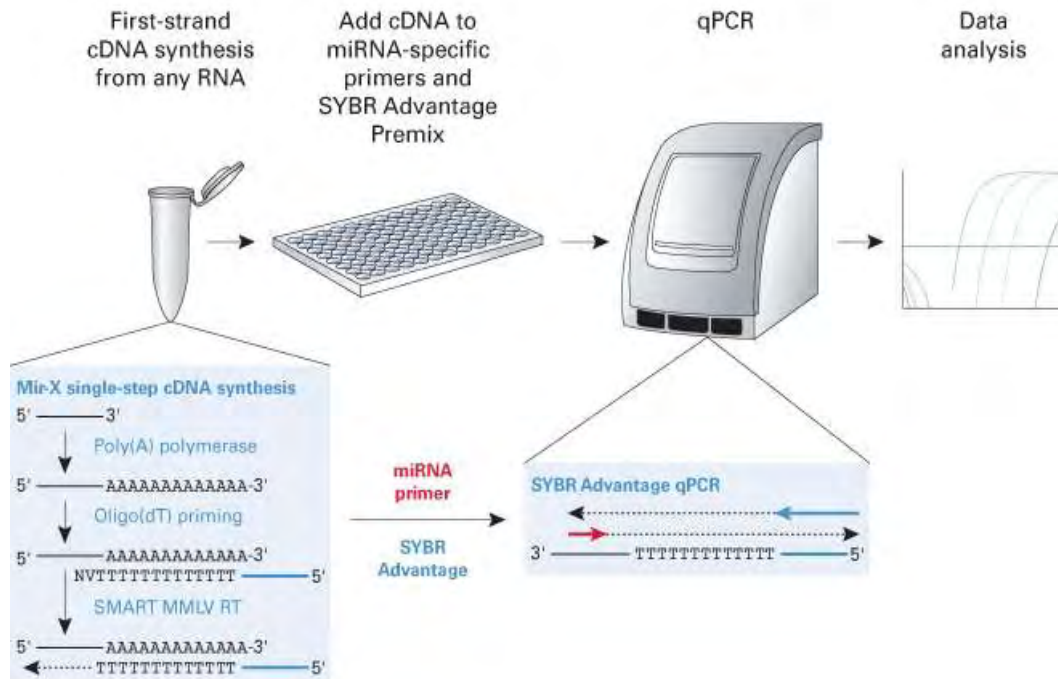
Η Real Time PCR είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού γονιδιακής έκφρασης. Είναι μια ιδιαίτερη ευαίσθητη και εξειδικευμένη τεχνική καθώς μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και ένα αντίγραφο ενός μεταγράφου ή ακόμα να ανιχνεύσει διαφορετικής έντασης έκφραση μεταξύ δύο δειγμάτων σε ποσοστό έως και 23%. Μπορεί να διεξαχθεί σε ένα βήμα (one step reaction), όπου όλη η διαδικασία από τη σύνθεση στο cDNA μέχρι την αντίδραση πολυμεράσης συμβαίνει στο ίδιο tube ή σε δύο βήματα (two-steps) όπου η αντίστροφη μεταγραφή και η ενίσχυση του παραγόμενου cDNA πραγματοποιούνται σε διαφορετικά tubes. Η one step Real Time θεωρείται ότι μειώνει την πειραματική απόκλιση γιατί οι ενζυμικές αντιδράσεις συμβαίνουν στο ίδιο tube. Ωστόσο αυτή η

μέθοδος χρησιμοποιεί μία αρχική RNA μήτρα η οποία είναι επιρρεπής σε αποικοδόμηση.

Η Real Time PCR επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου σε όλη τη διάρκεια της PCR. Ύστερα από μια αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR λόγω ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα, ακολουθεί μία εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα του προϊόντος σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Αν υπάρχουν περισσότερα μόρια στόχοι στο tube, θα χρειαστούν λιγότεροι κύκλοι για να ξεκινήσει η εκθετική φάση. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την έλευση της εκθετικής φάσης σε διαφορετικές αντιδράσεις, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα στις αντιδράσεις.

Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό του προϊόντος της PCR που υπάρχει στο τέλος κάθε κύκλου, αλλά όλες βασίζονται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας ετικέτας (tag), η οποία συνδέεται σε κάθε μόριο που συντίθεται. Οι πρώτες ετικέτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το βρωμιούχο αιθίδιο και το SYBR Green I. Και τα δύο εισχωρούν στις αύλακες του δίκλωνου DNA.

Στην παρούσα πειραματική εργασία εφαρμόσαμε την ποσοτική two-step RT-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Clontech cDNA synthesis kit και SYBR[®] qRT-PCR. Το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να γίνει σύνθεση cDNA στο πρώτο βήμα, με μήτρα RNA οι ποσότητες των οποίων μετρήθηκαν με τη βοήθεια του Qubit[™] RNA Assay Kits, ενώ στο δεύτερο βήμα έγινε η ποσοτικοποίηση των μορίων με ενίσχυση qRT-PCR. Το Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit χρησιμοποιείται για τη μετατροπή των μορίων mRNA σε cDNA, και των εξειδικευμένων μορίων miRNAs, τα οποία δε φέρουν πολυ(A) ουρά, σε αντίθεση με τα mRNAs, και η ποσοτικοποίηση με RT-PCR θα ήταν αδύνατη σε ένα μόνο βήμα. Έτσι λοιπόν, σε μία μονή αντίδραση όλα τα μόρια RNA πολυαδενυλιώνονται με την πολυ(A) πολυμεράση, και ακολουθεί αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA, με τη βοήθεια αντίστροφης μεταγραφάσης, η οποία χρησιμοποιεί ως εκκινητή τον oligo-dT primer που έχει συμπληρωματική με την πολυ(A) ουρά. Προκύπτουν έτσι μόρια cDNA από τα miRNAs αλλά και από τα mRNA του δείγματος, τα οποία μπορεί να αποτελούν στόχους των miRNAs. Με αυτό τον τρόπο, μπορούμε να εξετάσουμε τις αλλαγές στα επίπεδα τους λόγω δυναμικών αλληλεπιδράσεων σε ένα δείγμα, με qRT-PCR (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Βήματα που ακολουθούνται για τη σύνθεση του cDNA και την qRT-PCR.

Σύνθεση cDNA

Το πρωτόκολλο για τη σύνθεση cDNA ακολουθεί την παρακάτω διαδικασία:

- Σε ένα tube 0,2mL ελευθέρων ριβονουκλεασών (RNase-free), γίνεται συνδυασμός των εξής αντιδραστηρίων:

Πίνακας 12. Ποσότητες για την διαδικασία σύνθεσης cDNA

Reagent	Volume(μL)
mRQ Buffer (2x)	5
RNA sample (0,25-8μg)	3,75
mRQ enzyme	1,25
Total Volume	10

- Επιάζουμε σε θερμοκυκλοποιητή για 1 ώρα στους 37°C, και τερματίζουμε για 5min στους 85°C, για την αδρανοποίηση των ενζύμων.
- Αραιώνουμε το νεοσυντιθέμενο δείγμα cDNA προσθέτοντας 90μLddH₂O, φέροντας τον στο τελικό όγκο 100μL.
- Το δείγμα cDNA που προκύπτει είναι έτοιμο προς χρήση στην qRT-PCR. Αποθηκεύσαμε το δείγμα cDNA στους -20°C, έως ότου γίνει προετοιμασία της PCR, ή αν επιθυμούμαι η τελευταία να γίνει άλλη χρονική στιγμή.

qRT-PCR

Για την ποσοτικοποίηση των mRNAs (ή miRNA) τόσο των αποαδενυλασών όσο και των μεταγραφικών παραγόντων που επηρεάζονται από την PARN, εφαρμόστηκε συγκριτική ποσοτική Real Time PCR (Comparative qRT-PCR) με τη

μέθοδο Livak, με την οποία η κανονικοποίηση γίνεται με τη βοήθεια ιδιοσυστατικών γονιδίων αναφοράς. Με την εν λόγω μέθοδο, τα επίπεδα των mRNAs καθορίστηκαν συγκριτικά με τα επίπεδα του γονιδίου αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε (β-ακτίνη).

Μέθοδο Livak

Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με αυτή τη μέθοδο χρειάστηκε στο Amplification plot να επιλέξουμε ένα threshold όπου όλα είναι γραμμικά. Από το παράρτημα textreport παίρνουμε τις τιμές των Ct για όλα τα δείγματα. Αρχικά βρίσκουμε τη διαφορά ΔCt τόσο για το μόριο που μελετάμε όσο για το μόριο κανονικοποίησης. Δηλαδή:

$$-\Delta Ct(\text{Calibrator}) = Ct(\text{target, cal}) - Ct(\text{reference, cal})$$

$$-\Delta Ct(\text{test}) = Ct(\text{target, test}) - Ct(\text{reference, test})$$

Οι τιμές των Ct είναι ο μέσος όρος των Ct καθώς τα δείγματα έχουν μελετηθεί τριπλικά.

Έπεται η κανονικοποίηση του ΔCt. Άρα βρίσκουμε το ΔΔCt.

$$-\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{test}) - \Delta Ct(\text{calibrator})$$

Μέτρηση σε folds τη διαφορά έκφρασης,

$$-2^{-\Delta \Delta Ct} = \text{Normalize expression ratio}$$

Η τιμή όπου βρίσκουμε είναι πόσα περισσότερα folds είναι πιο ψηλά η έκφραση του mRNA (ή miRNA) όπου μελετάμε. Αν η τιμή όπου θα βρούμε είναι αρνητική την υπολογίζουμε 1/χ, με χ η απόλυτη αρνητική τιμή. Έτσι βρίσκουμε πόσα folds έχει μειωθεί η έκφραση του mRNA (ή miRNA) όπου μελετάμε.

Για το κάθε μόριο όπου μελετήσαμε υπολογίσαμε και την τυπική απόκλιση. Με τη βοήθεια του Microsoft Excel υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση κάθε συνθήκης για όλα τα μόρια-στόχους.

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων των δύο παραμέτρων που εξετάσαμε στο ίδιο δείγμα - των επιλεγμένων mRNAs, miR-29a-3p και miR-1207-5p, και των mRNAs των PARN, k-Ras, c-fos, c-Jun, c-myc, p-53, CyclinD1 μετά από υπερέκφραση της PARN- έγινε σε ξεχωριστές αντιδράσεις PCR, όπου οι συνθήκες θερμικού προφίλ και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων ήταν διαφοροποιημένες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες 13 και 14.

Πίνακας 13. Ενίσχυση miRNAs και U6

Reagent	Volume(μL)
K-SYBR mix	10
miRNA-specific 5' primer (10μM)	0,2
mRQ 3' primer (10μM)	0,2
ROX dye low	0,4
ddH ₂ O	8,2
cDNA	1
Total volume	20

Πίνακας 14. Ενίσχυση PARN, k-Ras, c-fos, c-Jun, c-myc, p53, Cd1, b-actin

Reagent	Volume(μL)
K-SYBR mix	10
Forward primer (10μM)	0,2
Reverse primer (10μM)	0,2
ROX dye low	0,4
ddH ₂ O	8,2
cDNA	1
Total volume	20

Όπου:

K-SYBRmix αποτελεί μίγμα πολυ(A) πολυμεράσης, dNTPs, ιόντων Mg²⁺ και χρωστικής παρακολούθησης SYBRGreen.

ROXdye, η χρωστική αναφοράς, η οποία μειώνει το θόρυβο του μηχανήματος(θερμοκυκλοποιητή).

miRNA-specific 5' primer ο 5' εκκινήτης, ειδικός για τα miRNA.

mRQ 3' primer αποτελεί τον 3'-oligo-dT εκκινήτη, ο οποίος είναι συμπληρωματικός με την πολυ(A) ουρά των miRNAs.

Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα, οι αντιδράσεις για την ποσοτικοποίηση των mRNAs πραγματοποιήθηκαν triplicates. Για κάθε διαφορετικό ζεύγος εκκινήτων, στην αντίδραση συμπεριλήφθηκε ως αρνητικό control, NTC αντίδραση που στερούνταν δείγματος cDNA (No Template Control).

Οι εκκινήτες σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος PRIMER 3. Ο κάθε εκκινήτης ελέγχθηκε ως προς την εξειδίκευση του για το αντίστοιχο cDNA-στόχο με Blastn.

Οι αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15. Εκκινήτες των παραγόντων που μελετήθηκαν.

Εκκινήτες (primers)		
PARN	Forward	GCACAACCGATTTTCCACT
	Reverse	CTCTTGTGAGGCCTTTCCTG
k-Ras	Forward	TGTGGTAGTTGGAGCTGGTG
	Reverse	AAAGAAAGCCCTCCCCAGT
c-fos	Forward	GCTTCAACGCAGACTACGAG
	Reverse	AGTGACCGTGGGAATGAAGT
c-Jun	Forward	AACGTGACAGATGAGCAGGA
	Reverse	CTGGGTTGAAGTTGCTGAGG
c-myc	Forward	CAGCGACTCTGAGGAGGAAC
	Reverse	TCGGTTGTTGCTGATCTGTC
p-53	Forward	ACCAGAACCTCTCGGTGATG
	Reverse	TGTCCAATGCTCTGAAGTGG
Cyclin D1	Forward	GTGGCCTCTAAGATGAAGGAGA
	Reverse	GCATTTTGGAGAGGAAGTGTC

miR-1207-5-	5' specific primer	TGGCAGGGAGGCTGGGAGG
miR-29a-3p	5' specific primer	TAGCACCATCTGAAATCGGTTA
U6 snRNA	Forward	GGAATGACACAGTGAAGATTGG
	Reverse	TTTCCTGTCATCCTTGCACA
b-actin	Forward	GGACTTCGAGCAAGAGATGG
	Reverse	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

Το θερμικό προφίλ του κυκλοποιητή της αντίδρασης PCR για την ποσοτικοποίηση των δύο παραμέτρων ορίστηκε ως εξής:

Πίνακας 16. Θερμικό προφίλ ενίσχυσης miRNA και U6.

Type of reaction	Cycling conditions
Denaturation (1 cycle)	95°C (10sec)
Amplification (40 cycle)	95°C (5sec)
	60°C (20sec)
	95°C (60sec)
Dissociation	55°C (30sec)
	95°C (30sec)

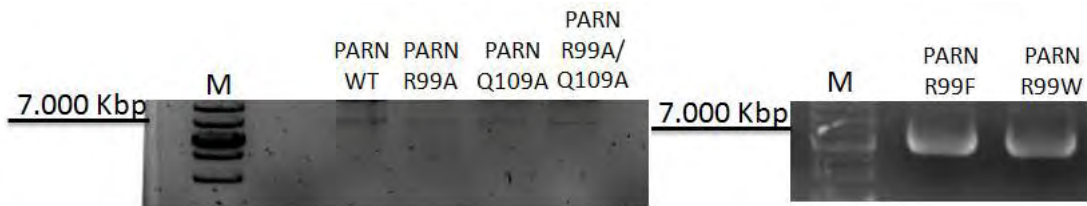
Πίνακας 17. Θερμικό προφίλ ενίσχυσης mRNAs.

Type of reaction	Cycling conditions
Denaturation (1 cycle)	95°C (3min)
Amplification (40 cycle)	95°C (3sec)
	60°C (30sec)
	72°C (11sec)
	95°C (1min)
Dissociation	55°C (30sec)
	95°C (30sec)
(1 cycle)	25°C (3min)

Η ανάλυση των δεδομένων μετά την ενίσχυση των δειγμάτων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος MxPro.

Υλικά - Αντιδραστήρια

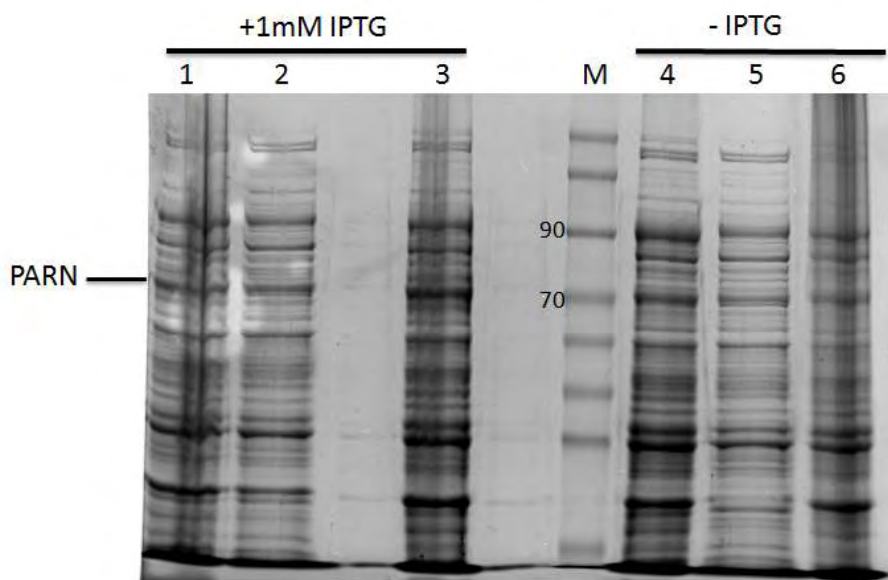
- ❖ Mir-X™ miRNA First-Strand synthesis kit (Clontech)
- ❖ K-SYBR® qRT-PCR kit (KAPA)
- ❖ Qubit™ RNA Assay Kits



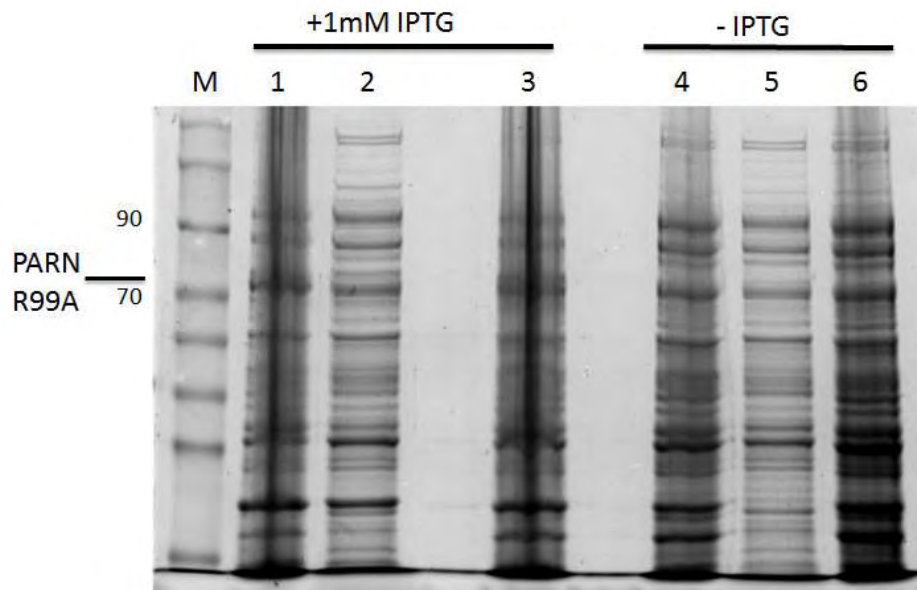
Εικόνα 20. Δημιουργία μεταλλάξεων στην PARN αγρίου τύπου. Ηλεκτροφόρηση σε 1% πηκτή Αγαρόζης μετά την απομόνωση πλασμιδίων όπου φέρουν τις μεταλλάξεις (PARN R99A, PARN Q109A, PARN R99A/Q109A, PARN R99F και PARN R99W) αλλά και η PARN WT.

4.2 Συνθήκες προφίλ έκφρασης των πρωτεϊνών PARN, PARN R99A, PARN Q109A, PARN R99A/Q109A, PARN R99W, PARN R99F

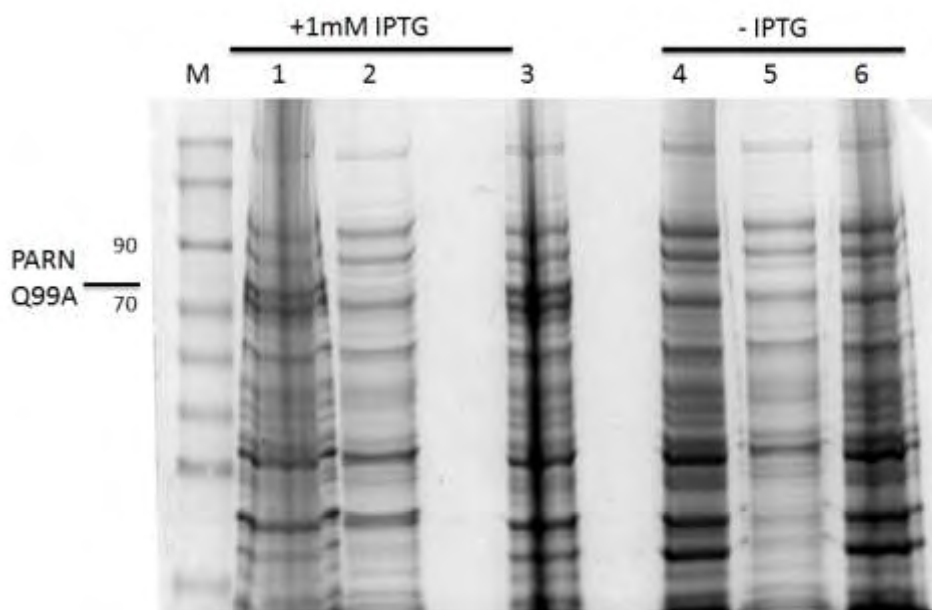
Είναι γνωστό για τις συνθήκες υπερέφρασης της αγρίου τύπου PARN. Θελήσαμε να τις επιβεβαιώσουμε αλλά και να αποδείξουμε ότι και οι πρωτεΐνες όπου φέρουν μεταλλάξεις δεν αλλάζει το προφίλ έκφρασης σε σύγκριση με την PARN. Έτσι τα δείγματα αναλύθηκαν σε 7,5% πηκτή ακρυλαμιδίου, το input το οποίο είναι τα διαλυτοποιημένα κύτταρα μετά τους υπερήχους, το υπερκείμενο μετά τη φυγοκέντρηση και το ίζημα το οποίο το είχαμε διαλυτοποιήσει πρώτα στο Lysis Buffer με 1mM IPTG και χωρίς. Όλα τα δείγματα πριν φορτωθούν στη πηκτή είχαν θερμανθεί πολύ καλά. Στην Εικόνα 21 βλέπουμε τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης μετά από χρώση με Coomassie Blue. Παρατηρούμε ότι σε κάθε περίπτωση, η πρωτεΐνη μας υπερεκφράζεται στο υπερκείμενο.



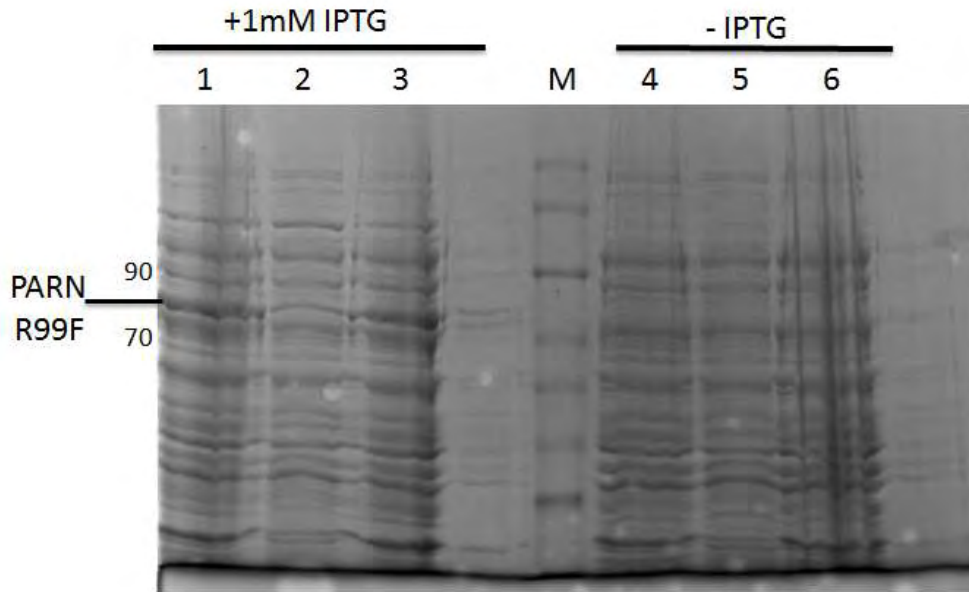
Εικόνα 21α. Προφίλ έκφρασης PARN. M: Marker, 1,4: input με και χωρίς IPTG αντίστοιχα. 2,5: υπερκείμενο με IPTG και χωρίς αντίστοιχα, 3,6: ίζημα με και χωρίς IPTG αντίστοιχα.



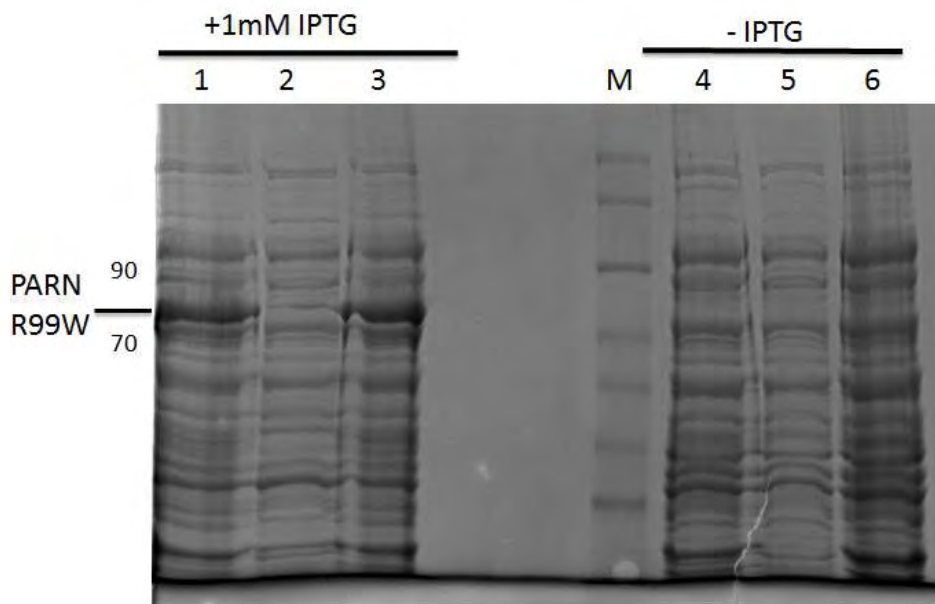
Εικόνα 21β. Προφίλ έκφρασης PARN R99A. M: Marker, 1,4: με και χωρίς IPTG, αντίστοιχα. 2,5: υπερκείμενο με IPTG και χωρίς αντίστοιχα, 3,6: ίζημα με και χωρίς IPTG, αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη μας υπερεκφράζεται στο υπερκείμενο.



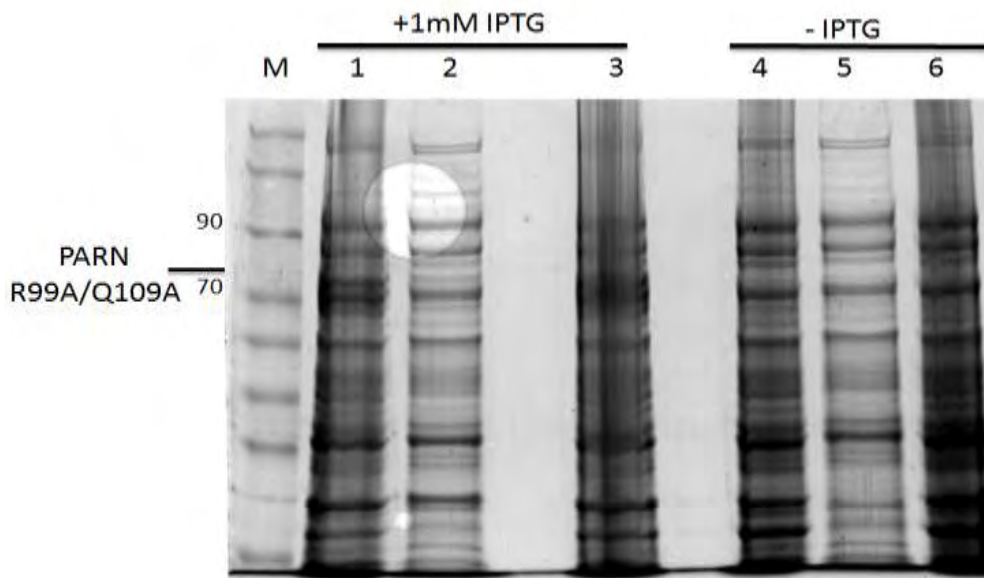
Εικόνα 21γ. Προφίλ έκφρασης PARN Q109A. M: Marker, 1,4: input με και χωρίς IPTG αντίστοιχα. 2,5: υπερκείμενο με IPTG και χωρίς αντίστοιχα, 3,6: ίζημα με και χωρίς IPTG αντίστοιχα.



Εικόνα 21δ. Προφίλ έκφρασης PARN R99F. M: Marker, 1,4: input με και χωρίς IPTG αντίστοιχα. 2,5: υπερκείμενο με IPTG και χωρίς αντίστοιχα, 3,6: ίζημα με και χωρίς IPTG αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη μας υπερεκφράζεται στο υπερκείμενο.



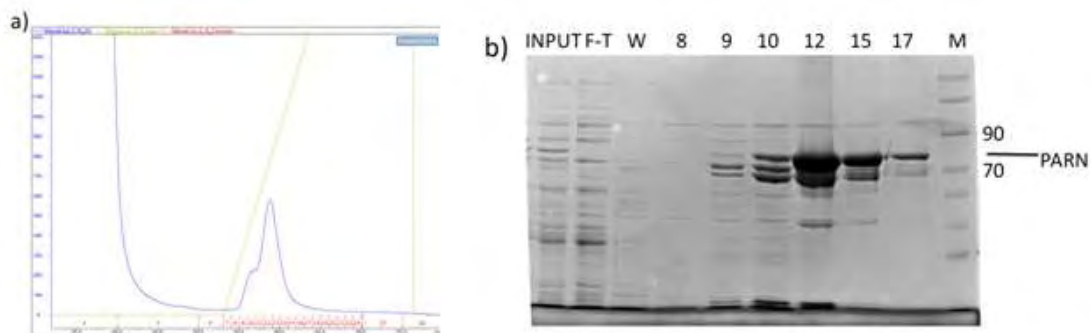
Εικόνα 21ε. Προφίλ έκφρασης PARN R99W. M: Marker, 1,4: input με και χωρίς IPTG αντίστοιχα. 2,5: υπερκείμενο με IPTG και χωρίς αντίστοιχα, 3,6: ίζημα με και χωρίς IPTG αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη μας υπερεκφράζεται στο υπερκείμενο.



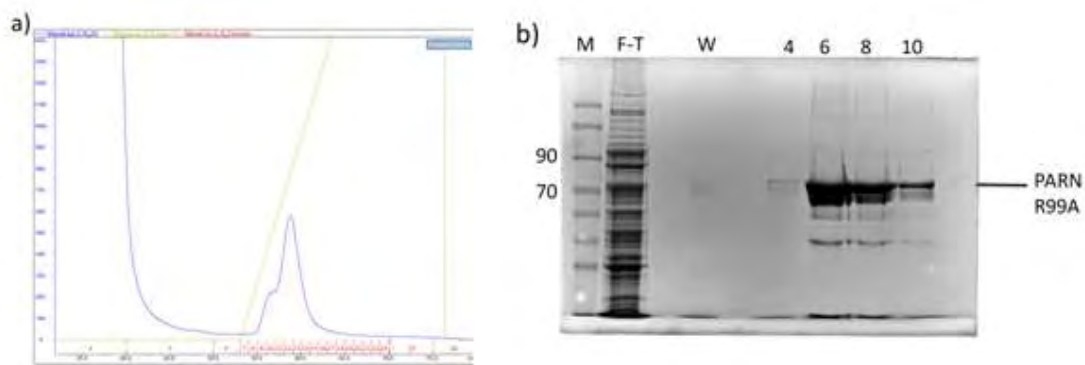
Εικόνα 21ζ. Προφίλ έκφρασης PARN R99A/Q109A. M: Marker, 1,4: input με και χωρίς IPTG αντίστοιχα 2,5: υπερκείμενο με IPTG και χωρίς αντίστοιχα, 3,6: ίζημα με και χωρίς IPTG αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη μας υπερεκφράζεται στο υπερκείμενο.

4.3 Υπερέκφραση και απομόνωση των πρωτεϊνών PARN, PARN R99A, PARN Q109A, PARN R99W, PARNR 99W, PARN R99A/Q109A με χρήση της στήλης HisTrap Ni⁺ Sepharose

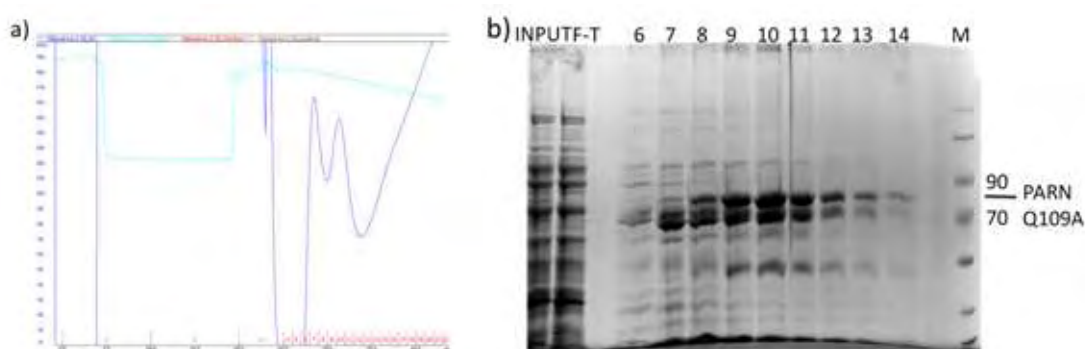
Εφόσον επιβεβαιώσαμε τις συνθήκες υπερέκφρασης των πρωτεϊνών ακολουθήσαμε την ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήσαμε ήταν περισσότερο σε ποσότητα. Στην εικόνα 22(1,2,3,4,5,6), στο a παρατηρούμε το διάγραμμα κατά την διάρκεια της απομόνωσης, στο πικ όπου βλέπουμε είναι πολύ πιθανόν εκεί να βρίσκεται η επιθυμητή πρωτεΐνη και στο b η ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων απομόνωσης σε 7.5% πηκτή ακρυλαμιδίου και χρώση με Coomassie Blue. Τα κλάσματα όπου φέρουν την επιθυμητή πρωτεΐνη παραλαμβάνονται συμπυκνώνονται υφίστανται διαπίδυση με το διάλυμα αντίδρασης.



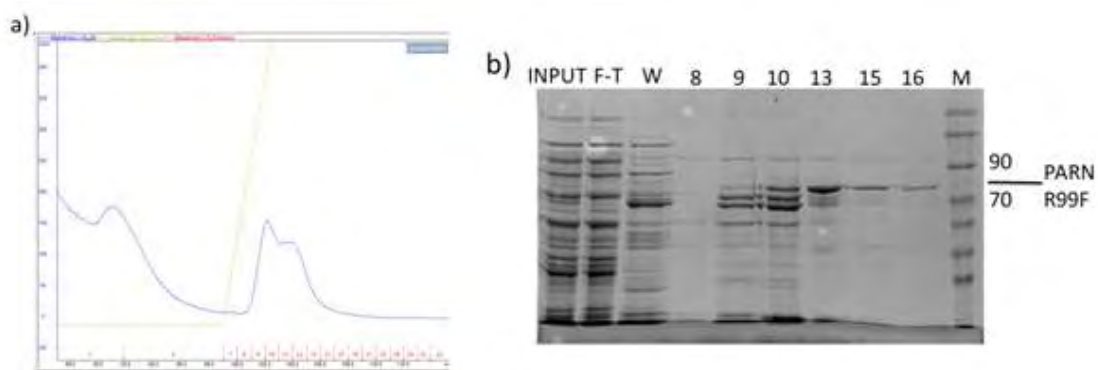
Εικόνα 22.1.a) Το διάγραμμα απομόνωσης της PARN. **b)** Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης (F-T: Flow-Through, W: wash, M: Marker). Τα κλάσματα 9-18 συμπυκνώθηκαν και υπέστησαν διαπίδυση με το διάλυμα αντίδρασης. Τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης είναι 4,5mg/mL.



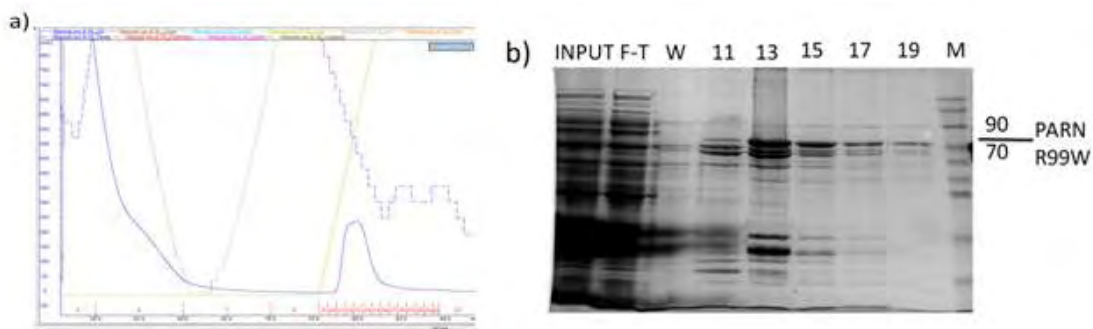
Εικόνα 22.2. a) Το διάγραμμα απομόνωσης της PARN R99A. b) Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης (F-T: Flow-Through, W: wash, M: Marker). Τα κλάσματα 5-10 συμπυκνώθηκαν και υπέστησαν διαπίδυση με το διάλυμα αντίδρασης. Τελική συγκέντρωσης πρωτεΐνης είναι 0,79mg/mL.



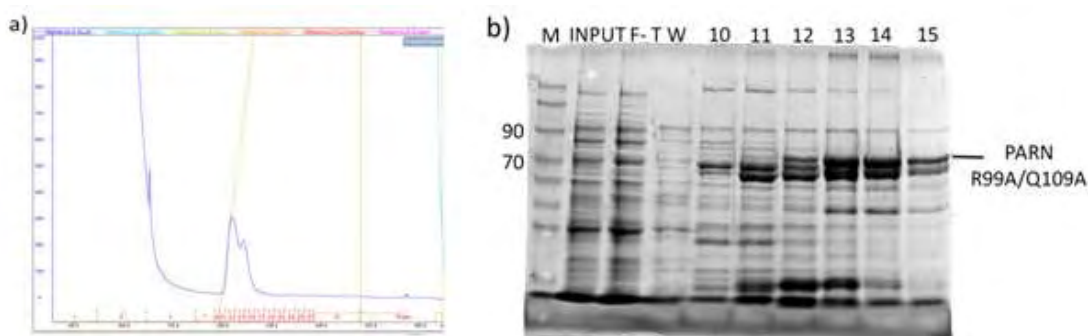
Εικόνα 22.3. a) Το διάγραμμα απομόνωσης της PARN Q109A. b) Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης (F-T: Flow-Through, W: wash, M: Marker). Τα κλάσματα 7-14 συμπυκνώθηκαν και υπέστησαν διαπίδυση με το διάλυμα αντίδρασης. Τελική συγκέντρωσης πρωτεΐνης είναι 2,1mg/mL.



Εικόνα 22.4. a) Το διάγραμμα απομόνωσης της PARN R99F. b) Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης (F-T: Flow-Through, W: wash, M: Marker). Τα κλάσματα 10-16 συμπυκνώθηκαν και υπέστησαν διαπίδυση με το διάλυμα αντίδρασης. Τελική συγκέντρωσης πρωτεΐνης είναι 1,4mg/mL.



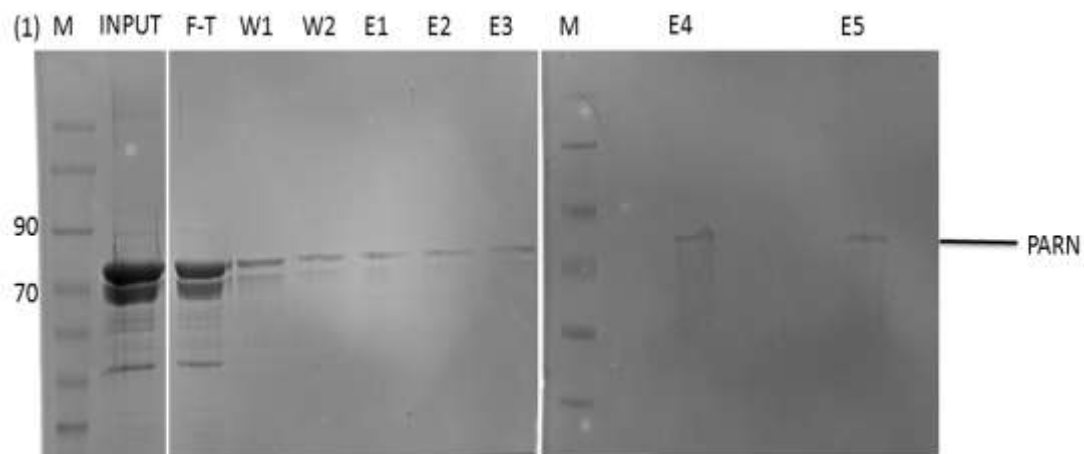
Εικόνα 22.5. a) Το διάγραμμα απομόνωσης της PARN R99W. b) Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης (F-T: Flow-Through, W: wash, M: Marker). Τα κλάσματα 12-19 συμπυκνώθηκαν και υπέστησαν διαπίδυση με το διάλυμα αντίδρασης. Τελική συγκέντρωσης πρωτεΐνης είναι 1,9mg/mL.



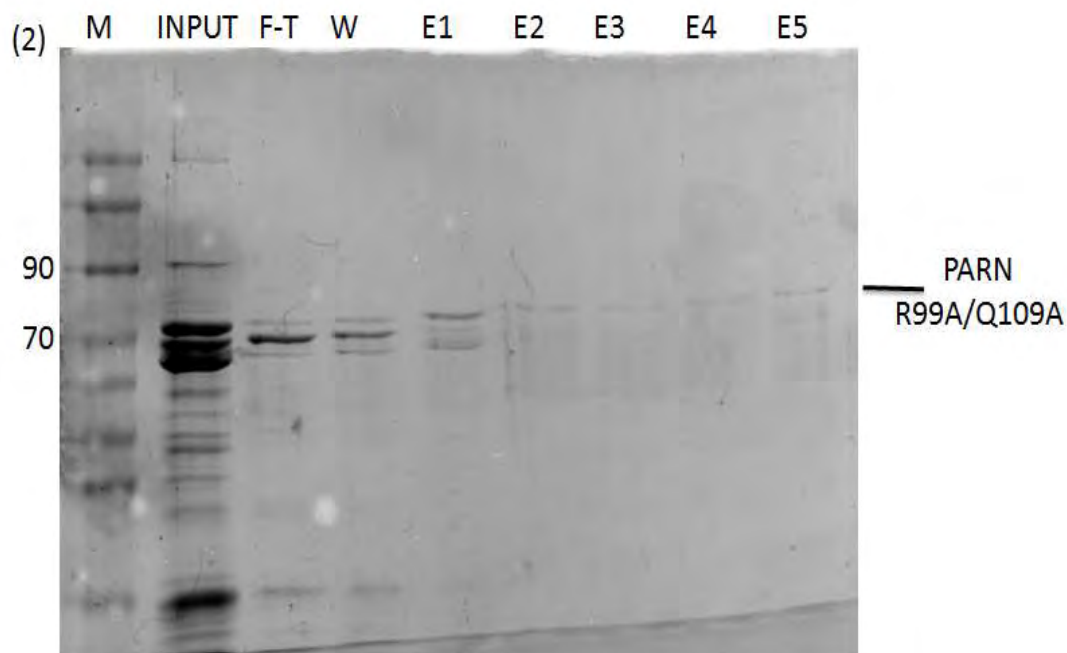
Εικόνα 22.6. a) Το διάγραμμα απομόνωσης της PARN R99A/Q109A. b) Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης (F-T: Flow-Through, W: wash, M: Marker). Τα κλάσματα 12-15 συμπυκνώθηκαν και υπέστησαν διαπίδυση με το διάλυμα αντίδρασης. Τελική συγκέντρωσης πρωτεΐνης είναι 1,8mg/mL.

4.4 Απομόνωση των PARN και PARN R99A/Q109A με τη στήλη Immobilized γ -Aminophenyl m^7 GTP Agarose

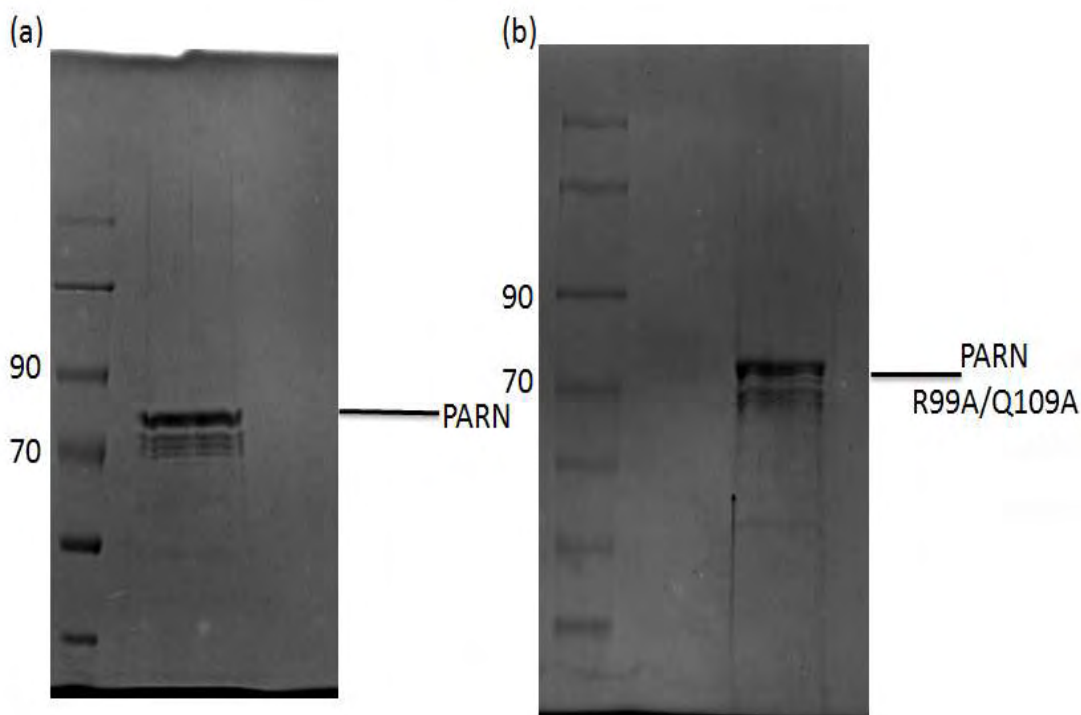
Ακολούθησε ένα βήμα καθαρισμού με χρήση της στήλης γ -Aminophenyl m^7 GTP Agarose. Η ρητίνη φέρει την καλύπτρα (5' cap) και βασίζεται στην ιδιότητα της PARN να προσδένει την καλύπτρα στο 5'-άκρο των mRNA, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή. Το 1mL ρητίνης όπου είχαμε διαχωρίστηκε ώστε να προκύψουν 2 στήλες. Η πρώτη χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση της PARN και η δεύτερη για την απομόνωση της PARN R99A/Q109A. Σε αυτήν την περίπτωση η απομόνωση έγινε στους 4°C (coldroom). Στην εικόνα 24 (1,2) απεικονίζεται η απομόνωση της PARN και της PARN R99A/Q109A σε 7,5% πηκτή ακρυλαμιδίου και χρώση με Coomassie Blue. Τα κλάσματα όπου φέρουν την απομονωμένη πρωτεΐνη συμπυκνώθηκαν και υπέστησαν διαπίδυση με το διάλυμα αντίδρασης. Καταφέραμε να τις φτάσουμε σε καθαρότητα περίπου 70% (Εικόνα 25).



Εικόνα 24.1 . Απομόνωση της PARN WT. Πηκτή ακρυλαμιδίου 7,5% (M: Marker, F-T: Flow-Through, W: Wash, E: Elution). Τα κλάσματα έκλουσης E1-E5 περιέχουν την πρωτεΐνη απομονωμένη, οπότε λήφθηκαν και υπέστησαν την διαδικασία διαπίδυσης και συμπύκνωσης με το διάλυμα αντίδρασης.



Εικόνα 24.2 . Απομόνωση της PARN R99A/Q109A. Πηκτή ακρυλαμιδίου 7,5% (M: Marker, F-T: Flow-Through, W: Wash, E: Elution). Τα κλάσματα έκλουσης E1-E5 περιέχουν την πρωτεΐνη απομονωμένη, οπότε λήφθηκαν και υπέστησαν την διαδικασία διαπίδυσης και συμπύκνωσης με το διάλυμα αντίδρασης.



Εικόνα 25. Ηλεκτροφόρηση των PARN και PARN R99A/Q109A μετά την απομόνωση με τις δύο στήλες, σε πηκτή 7,5% ακρυλαμιδίου-Συμπύκνωσης-Διαπίδυσης.

4.5 Ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών

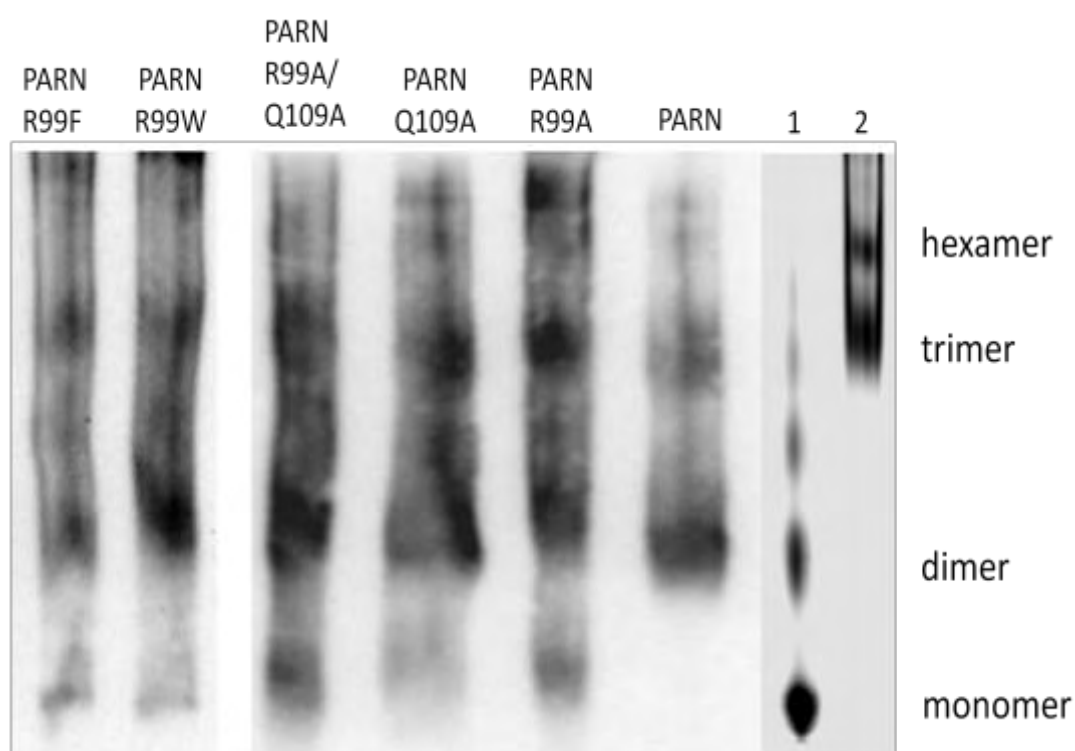
Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των PARN, PARN R99A, PARN Q109A, PARN R99F, PARN R99W και PARN R99A/Q109A σε 7,5% πηκτή ακρυλαμιδίου. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά western, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της PARN για την επιβεβαίωση όλων των πρωτεϊνών. Η εμφάνιση της μεμβράνης PVDF έγινε με ECL και χρησιμοποιώντας το Floar ChemE imaging system. Στην εικόνα 26 απεικονίζεται το αποτέλεσμα αυτής, όπου παρατηρείται η θετικότητα αυτών έναντι του αντισώματος της PARN.



Εικόνα 26. Ηλεκτροφόρηση των PARN, PARN R99A, PARN Q109A, PARN R99A/Q109A, PARN R99F και PARN R99W σε 7,5% ακρυλαμίδιο και εμφάνιση αυτών με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της PARN αγρίου τύπου.

4.6 Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (NativePAGE)

Οι προηγούμενες παρατηρήσεις μας οδήγησαν να εξεταστεί αν τα αμινοξέα αυτά επηρεάζουν τη δομή του ενζύμου. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκε η κατατομή των μεταλλαγμάτων χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Όλες οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν σε 7,5% πηκτή ακρυλαμιδίου, η οποία δεν έφερε SDS. Φορτώθηκε ίση ποσότητα πρωτεϊνών σε μg, ώστε αν υπάρχει κάποια διαφορά να μπορέσουμε να την διακρίνουμε. Η εμφάνιση της πηκτής έγινε με ανοσοαποτύπωση-ανοσοανίχνευση χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της PARN. Η εμφάνιση της μεμβράνης PVDF έγινε με ECL και χρησιμοποιώντας το Floar ChemE imaging system (Εικόνα 27). Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έδειξαν πως επηρεάζεται ο ολιγομερισμός της πρωτεΐνης: η μονομερής μορφή της πρωτεΐνης παρατηρείται σε όλες τις μεταλλαγμένες μορφές, ενώ δεν ήταν εμφανής στην αγρίου τύπου. Μορφές με αριθμό υπομονάδων μεγαλύτερο του 2 παρατηρούνται τόσο στις μεταλλαγμένες όσο και την αγρίου τύπου μορφές. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν πως η R99 και η Q109 επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία της PARN, με την πρώτη να έχει επηρεάζει πιο έντονα τη συμπεριφορά του ενζύμου.



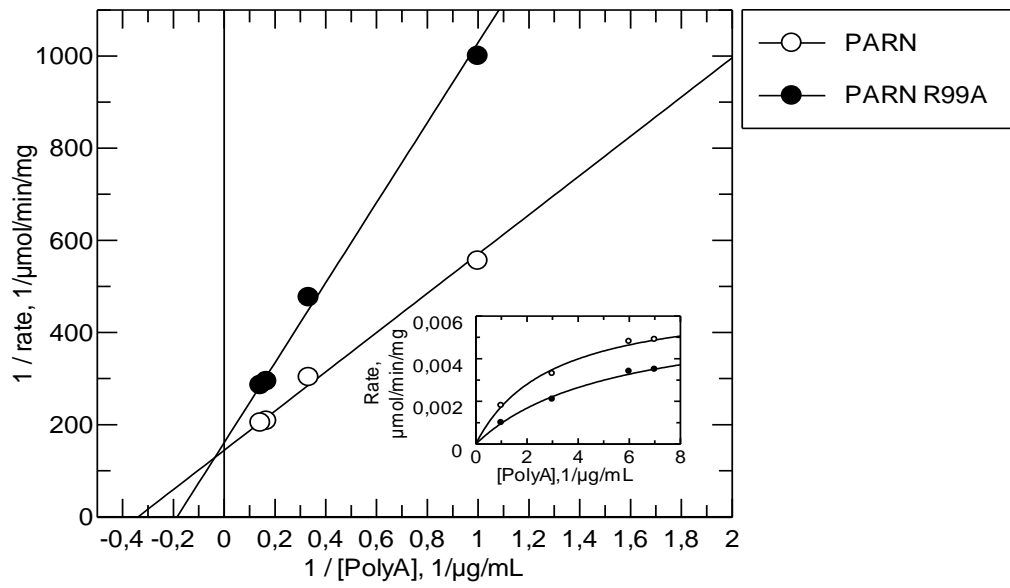
Εικόνα 27. Επίδραση των μεταλλάξεων στον ολιγομερισμό της PARN. Ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες των PARN, PARN R99A, PARN Q109A, PARN R99A/Q109A, PARN R99F και PARN R99W. Διαδρομές. 1: Albumin bovine serum (monomer–dimer), 2: Urease (trimer–hexamer).

4.7 Μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας των πρωτεϊνών σε σύγκριση με την αγρίου τύπου PARN

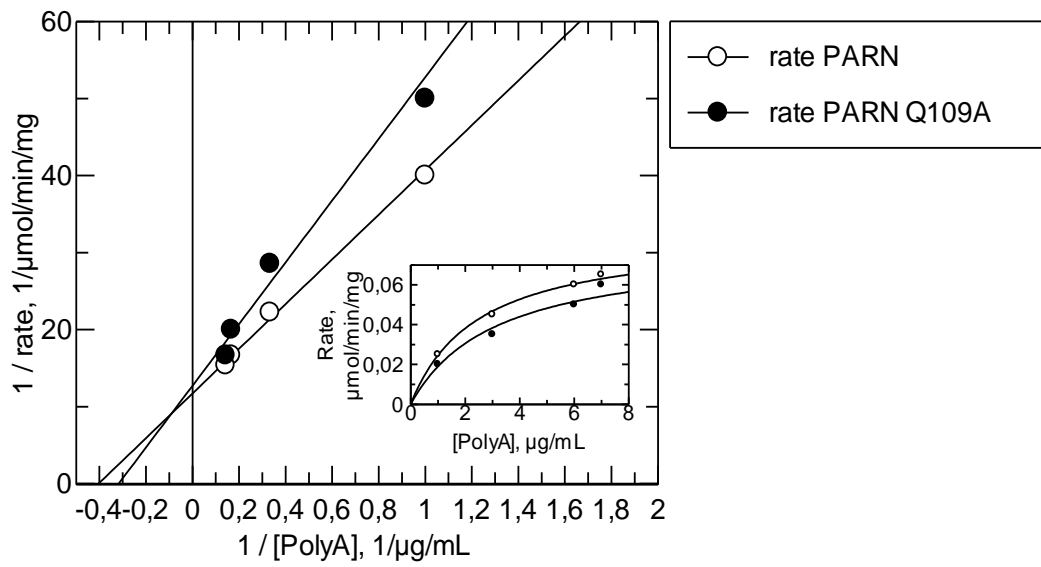
Για την διαδικασία μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας, πρώτο βήμα ήταν να υπολογίζουμε τις συγκεντρώσεις και τις ποσότητες του υποστρώματος πολυ(A). Επίσης, πρέπει να ισχύει για την μικρότερη συγκέντρωση πολυ(A) ο λόγος [Ενζύμου]/[Υποστρώματος] $\geq 1/5$. Με βάση αυτό το λόγο υπολογίζεται η συγκέντρωση του ενζύμου, όπου και παραμένει σταθερή για τις διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος. Βασικό αντιδραστήριο για την αντίδραση είναι το Methylene Blue, η ουσία αυτή προσδένεται στους δεσμούς όπου κάνει το πολυ(A). Έτσι προσθέτοντας μία πρωτεΐνη αποικοδομεί το υπόστρωμα, με τη χρήση του φωτόμετρου παρατηρούμε μία μείωση της απορρόφησης. Κάθε φορά υπήρχε σύγκριση της δραστηριότητας μιας υπό εξέταση μεταλλαγμένης PARN με την αγρίου τύπου PARN, καθώς και μία αντίδραση όπου δε φέρει ένζυμο. Κάθε διαφορετική αντίδραση πραγματοποιήθηκε δύο φορές και την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Για την απεικόνιση των γραφικών παραστάσεων Michaelis Menten και Lineweaver-Burk αλλά και για τον υπολογισμό των τιμών K_M και V_{max} χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα *GraFit 6*. Στην εικόνα 28 (a,b,c,d,e) απεικονίζονται τα αποτελέσματα αυτών. Ένας συγκεντρωτικός πίνακας (Πίνακας 18) των τιμών K_M και V_{max} απεικονίζεται παρακάτω. Η επίδραση των μεταλλάξεων στην ενεργότητα των ενζύμων απεικονίζεται στην Εικόνα 29. Οι πρωτεΐνες όπου φέρουν την μετάλλαξη και συγκρίθηκαν με την αγρίου τύπου είναι η PARN R99A, PARN Q109A, PARN R99F, PARN R99W, PARN R99A/Q109A (η μετάλλαξη PARNR99A είχε δημιουργηθεί σε προηγούμενη εργαστηριακή μελέτη). Μετά την μελέτη των συνθηκών έκφρασης τους και απομόνωσης τόσο αυτών όσο και της αγρίου τύπου PARN σε καλλιέργειες *E.coli*, ακολούθησε η σύγκριση της ενεργότητας των ενζύμων όπου φέρουν τις μεταλλάξεις με αυτή του ενζύμου αγρίου τύπου. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι τιμές των K_M και V_{max} είναι μειωμένες σε σύγκριση με του αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα παρατηρούμε μία μεγαλύτερη αύξηση της τιμής της K_M στις πρωτεΐνες όπου φέρουν μετάλλαξη στο

αμινοξύ Αργινίνη σε σύγκριση με αυτό της Γλουταμίνης (Πίνακας 18). Επίσης, αν γίνει σύγκριση των μεταλλάξεων της Αργινίνης, παρατηρούμε ότι οι πρωτεΐνες όπου έχουμε αντικαταστήσει με Φαινυλαλανίνη και Τρυπτοφάνη η τιμή της K_M είναι ακόμα υψηλότερη. Ακόμη το φαινόμενο της αύξησης της τιμής της K_M παρατηρείται σε πολύ υψηλό βαθμό και στην πρωτεΐνη όπου φέρει τη διπλή μετάλλαξη (PARN R99A/Q109A). Η ενεργότητα του ενζύμου είναι μειωμένη σε όλων των ειδών των μεταλλάξεων όπου δημιουργήθηκαν. Συνοψίζοντας τα παραπάνω, η αύξηση της K_M υπαινίσσεται πως τα αμινοξέα επιδρούν στην αποτελεσματικότητα της πρόσδεσης του υποστρώματος από το ένζυμο. Ακολουθούν τα διαγράμματα Michaelis-Menten και Lineweaver-Burk των παραπάνω πειραμάτων.

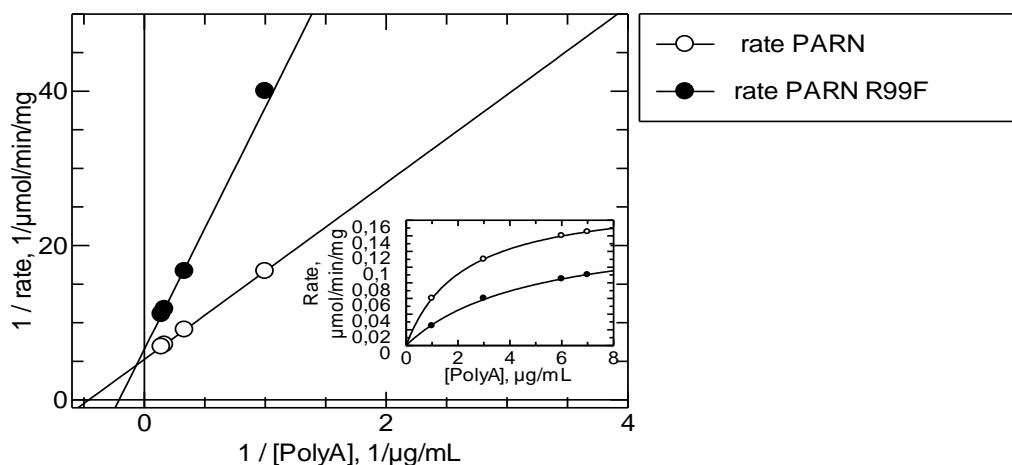
a.



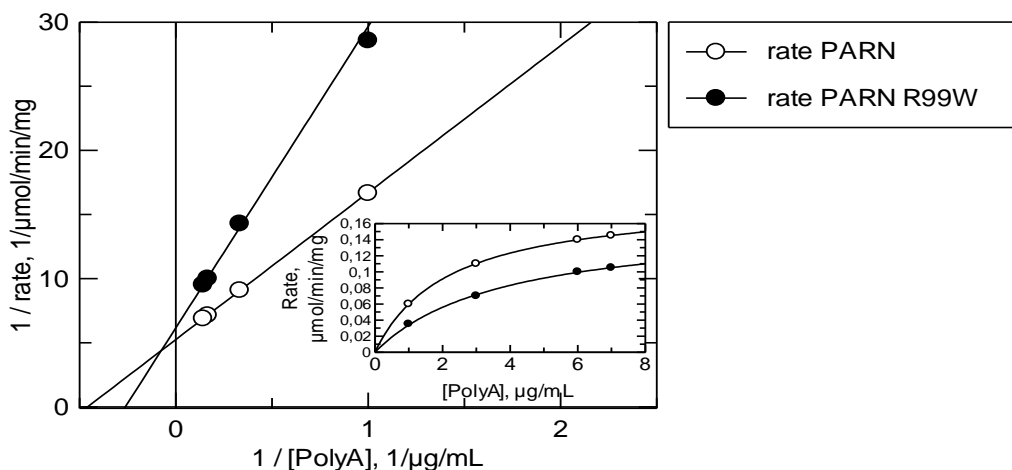
b.



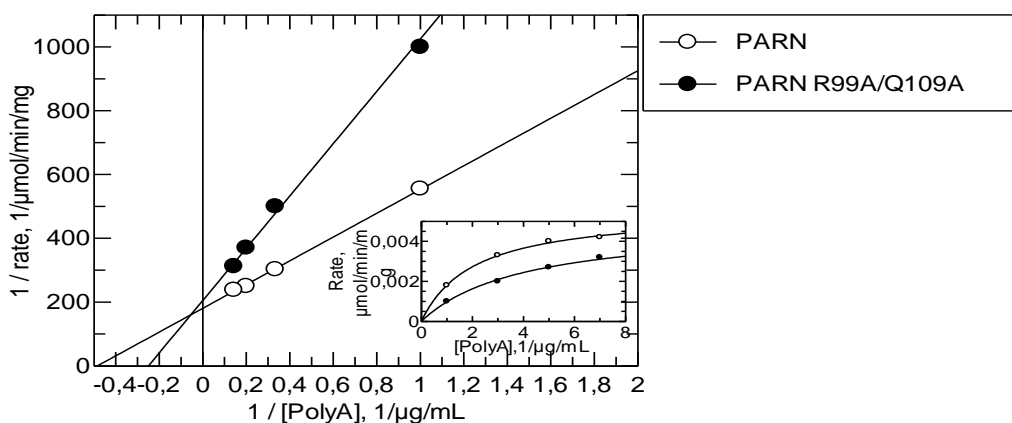
c.



d.



e.

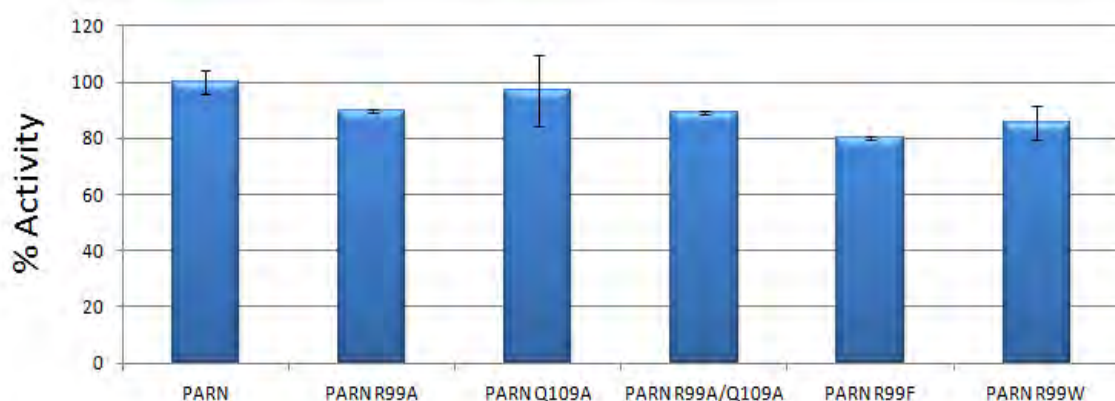


Εικόνα 28. Οι γραφικές παραστάσεις των Michaelis Menten (1) και Lineweaver-Burk (2). a) PARN – PARN R99A, b) PARN – PARN Q109A, c) PARN – PARN R99F, d) PARN – PARN R99W, e) PARN – PARN R99A/Q109A.

Πίνακας 18. Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών K_M και V_{max} . Παρατηρούμε ότι στις πρωτεΐνες όπου φέρουν τις μεταλλάξεις η τιμή της K_M είναι μεγαλύτερη αν συγκριθεί με αυτή της PARN αγρίου

τύπου. Επίσης, οι πρωτεΐνες όπου φέρουν μετάλλαξη στο αμινοξύ Αργινίνη η τιμή της K_M είναι μεγαλύτερη αν συγκριθεί με αυτής όπου φέρει μετάλλαξη στο αμινοξύ Γλουταμίνη. Οι PARN R99F και PARN R99W έχουν μεγαλύτερη επίδραση στη σύνδεση ενζύμου υποστρώματος σε σύγκριση με την PARN R99A.

	PARN	PARN R99A	PARN Q109A	PARN R99F	PARN R99W	PARN R99A/Q109A
K_M μg poly(A)/mL	2.4 ± 0.2	4.5 ± 0.8	3.2 ± 0.9	5.4 ± 0.4	4.4 ± 0.3	4.8 ± 0.5
V_{max} ng poly(A)/ (mL×min)	81.3 ± 4.2	73.1 ± 0.6	78.6 ± 12.6	65.16 ± 0.7	69.5 ± 5.9	72.43 ± 0.4

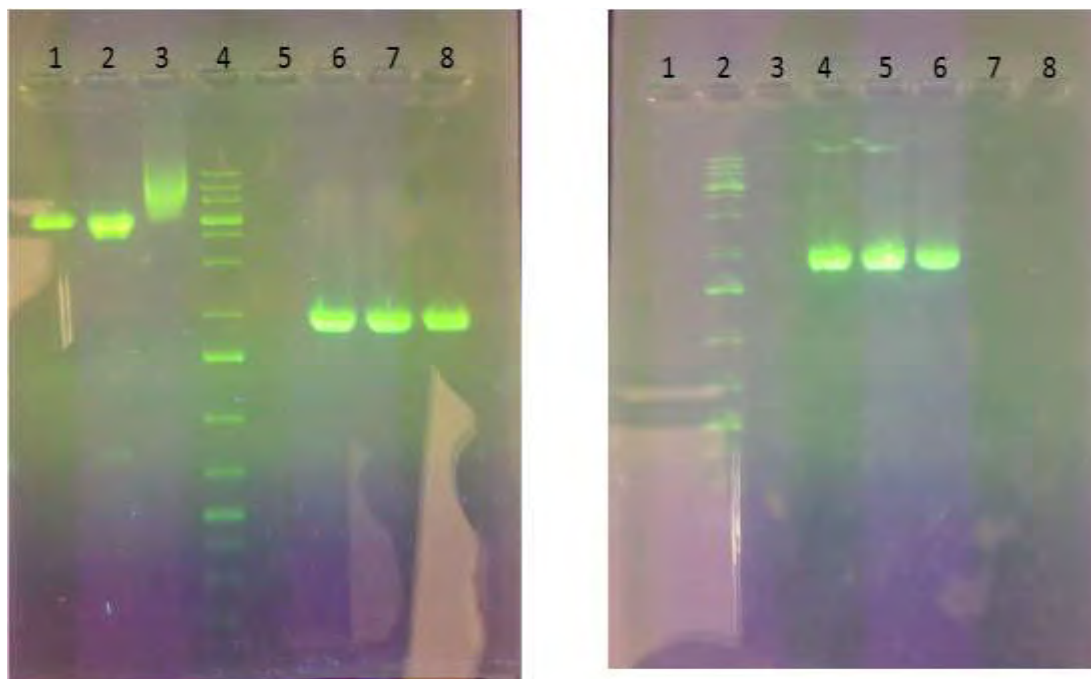


Εικόνα 29. Στην παραπάνω γραφική παράσταση απεικονίζεται η επίπτωση των μεταλλάξεων στην ενεργότητα του ενζύμου.

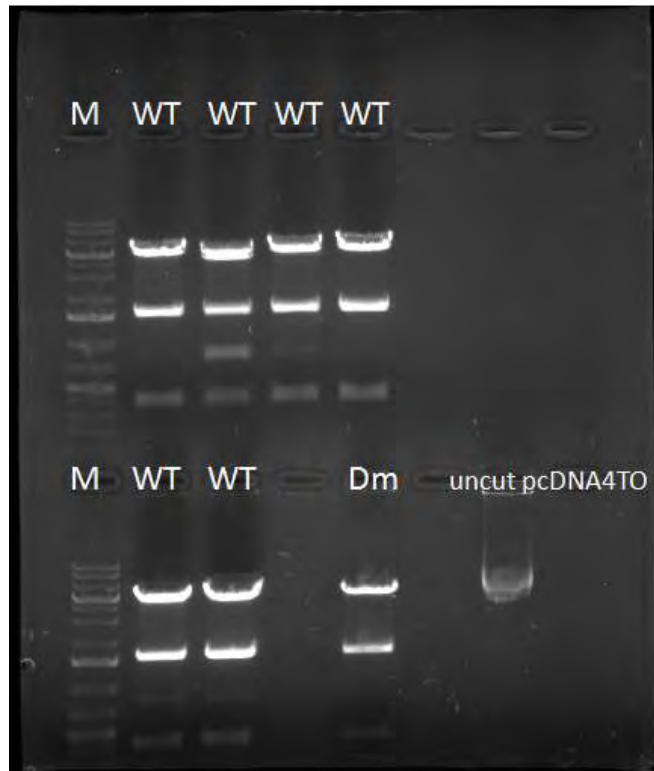
4.8 Κλωνοποίηση της PARN αγρίου τύπου και της PARN R99A/Q109A στον πλασμιδιακό φορέα pcDNATM₄/TO

Εφόσον, παρατηρήσαμε από τα προηγούμενα αποτελέσματα ότι αυτά τα δύο αμινοξέα παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη δομή όσο και την κινητική της πρωτεΐνης, θελήσαμε να μελετήσουμε αν έχουν και κάποιον βιολογικό ρόλο στην PARN. Για το σκοπό αυτό αναζητήσαμε παράγοντες που έχει αναφερθεί πως η PARN επηρεάζει την έκφρασή τους. Έτσι προχωρήσαμε σε υπερέκφραση τόσο της PARN όσο και της PARN R99A/Q109A σε κυτταρική σειρά. Επιλέξαμε την NCI-H520 καρκινική κυτταρική σειρά όπου προέρχεται από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, μιας και αρκετοί στόχοι της PARN είναι προϊόντα ογκογονιδίων [61]. Για να μπορέσει να γίνει η διαδικασία της υπερέκφρασης έπρεπε να χρησιμοποιηθεί φορέας υπερέκφρασης, ο pcDNATM₄/TO. Αρχικά, έγινε η πέψη του πλασμιδιακού φορέα και ενίσχυση των αλληλουχιών όπου μας ενδιαφέρουν και

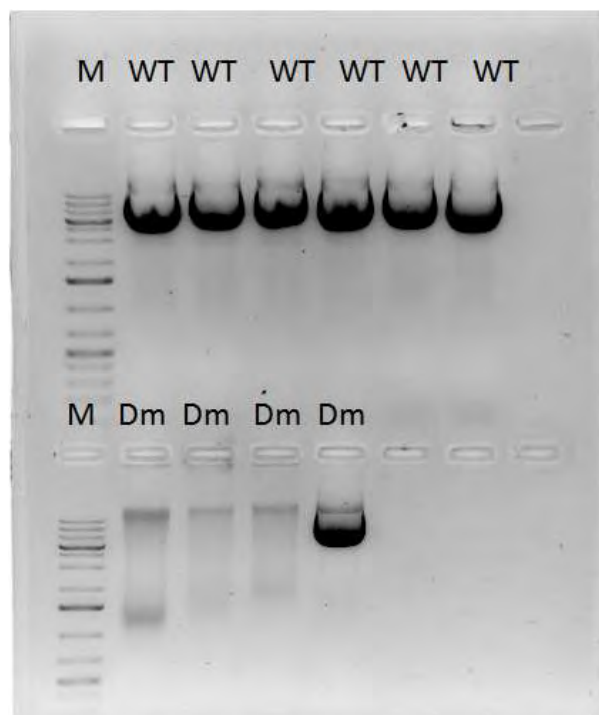
ηλεκτροφορήθηκαν σε 1% πηκτή αγαρόζης (Εικόνα 30). Πραγματοποιήθηκε η σύνδεση των αλληλουχιών στον πολυσυνδέτη του φορέα και η επιβεβαίωση αυτών περατώθηκε με πέψη του πλασμιδίου με EcoRI και ηλεκτροφόρηση αυτών σε 1% πηκτή αγαρόζης και αλληλούχιση των πλασμιδίων (Εικόνα 31). Στην Εικόνα 32 φαίνεται σε *in vitro* τα πλασμίδια.



Εικόνα 30. Κλωνοποίηση των PARN και PARN R99A/Q109A στον φορέα pcDNATM₄/TO. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πέψης και ενίσχυσης της PCR. Στην αριστερή εικόνα: 1,2 είναι το pcDNATM₄/TO το οποίο έχει υποστεί πέψη, 3 το control της πέψης καθώς είναι πλασμίδιο χωρίς, 4 είναι ο marker και στις διαδρομές 6,7 και 9 είναι το ενισχυμένο προϊόν της PCR, PARN WT. Στην δεξιά εικόνα: στη διαδρομή 2 είναι ο marker και στις διαδρομές 4,5 και 6 είναι το ενισχυμένο προϊόν της PCR, PARN R99A/Q109A.



Εικόνα 31. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων όπου έχουν υποστεί πέψη. Τόσο ο πλασμιδιακός φορέας όπου φέρει την PARN όσο και την PARN R99A/Q109A μετά τη πέψη χωρίζεται και τρία μέρη. Το πρώτο είναι στις 5.000bp ο πλασμιδιακός φορέας και τα επόμενα δύο κομμάτια είναι της PARN όπου το ένζυμο EcoRI βρίσκει την ειδική αλληλουχία. Το ένα από τα δύο είναι ~400bp και το άλλο στα ~1.600bp.



Εικόνα 32. Απομόνωση των πλασμιδίων από μικρές καλλιέργειες και ηλεκτροφόρηση σε 1% πηκτή αгарόζης. M: marker, WT: pcDNATM₄/TO PARN, Dm: pcDNATM₄/TO PARN R99A/Q109A. Σε όλα από τα WT υπάρχει το επιθυμητό πλασμίδιο ενώ από το Dm μόνο στο τελευταίο.

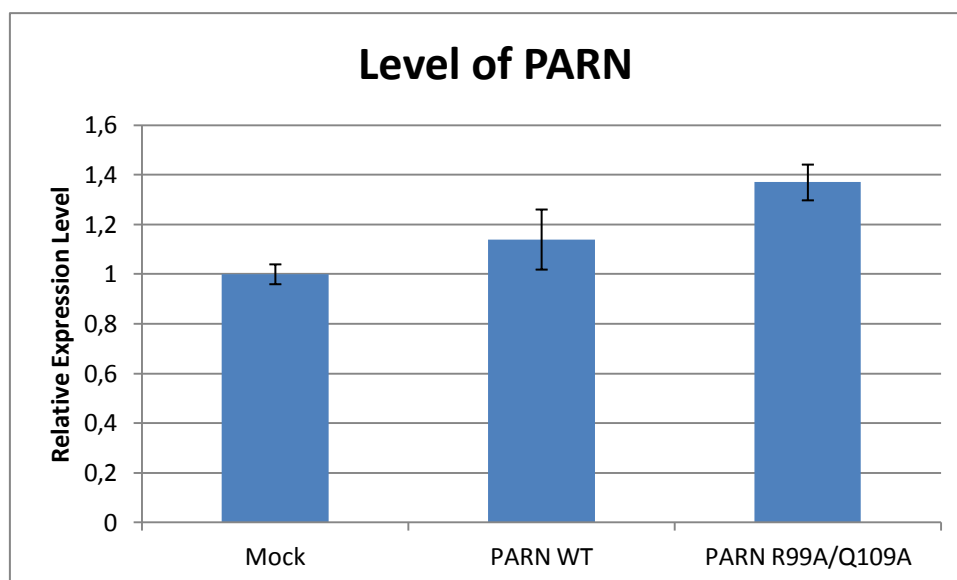
4.9 Υπερέκφραση των PARN και PARN R99A/Q109A σε NCI-H520 και έλεγχος των επιπέδων τους αλλά και των επιπέδων διάφορων mRNAs και miRNAs.

Στη συνέχεια, θελήσαμε να εξετάσουμε το αντίκτυπο που θα μπορούσαν να έχουν τα αμινοξέα αυτά στο βιολογικό ρόλο του ενζύμου. Για το σκοπό αυτό κλωνοποιήσαμε τόσο την αγρίου τύπου PARN όσο και την PARNR99A/Q109A σε έναν φορέα υπερέκφρασης για ευκαρυωτικά κύτταρα. Η PARN και η PARN R99A/Q109A υπερεκφράστηκαν σε καρκινικά κύτταρα NCI-H520, ξεχωριστά κάθε φορά, μέσω εισαγωγής πλασμιδίων pcDNA₄TM/TO, στο οποίο είχαν κλωνοποιηθεί οι δύο αυτές πρωτεΐνες. Στην Εικόνα 33 φαίνεται η επιβεβαίωση της υπερέκφρασης των PARN και PARN R99A/Q109A με ποσοτικοποίηση των επιπέδων τους με qRT-PCR. Επίσης στις παρακάτω εικόνες απεικονίζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της υπερέκφρασης στα διάφορα μόρια που μελετήσαμε (η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Livak). Απεικονίζονται τόσο τα γραφήματα με το αποτέλεσμα αλλά και οι Dissociation curves όπου παραλάβαμε από το πρόγραμμα MxPro.

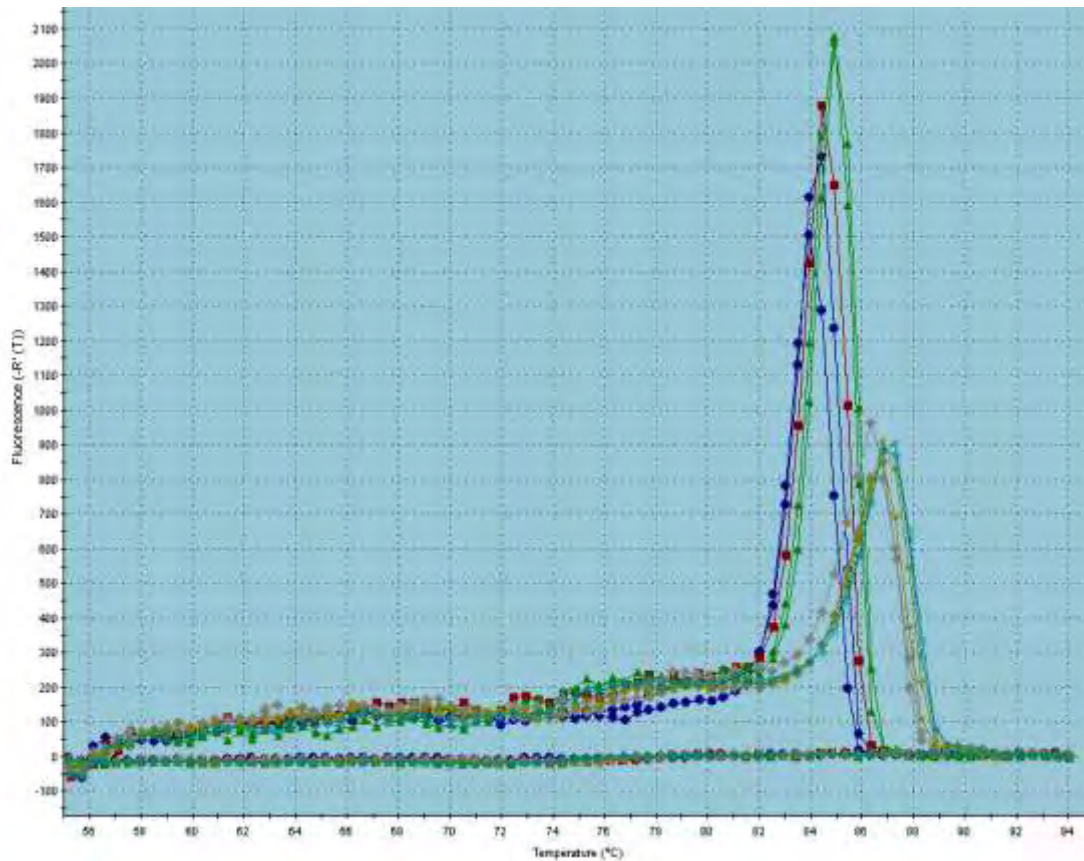
Από δημοσιευμένες εργασίες και προκαταρκτικές μελέτες από το εργαστήριό μας έχουν βρεθεί mRNAs αλλά και miRNAs, τα επίπεδα έκφρασής τους επηρεάζονται από την PARN [48]. Εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης επιλεγμένων mRNAs με ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο. Παρατηρήσαμε ότι η έκφραση των mRNAs, k-Ras, c-Fos και c-Jun μειώνεται με την υπερέκφραση της αγρίου τύπου PARN ενώ με την υπερέκφραση της PARN R99A/Q109A τα επίπεδα αυτών δεν επηρεάζονται. Τα επίπεδα έκφρασης των CyclinD1, c-myc και p53 δείχνουν μείωση με την υπερέκφραση της PARN αγρίου τύπου αλλά υπάρχει ακόμα μεγαλύτερη με την υπερέκφραση της PARN R99A/Q109A. Όσον αφορά τα miRNAs μελετήσαμε δύο, το miR1207-5p και το miR29a-3p, που από προκαταρκτικές εργασίες του εργαστηρίου φαίνεται πως η PARN πιθανόν συμμετέχει στη βιογένεσή τους. Τα επίπεδα έκφρασης του miR1207-5p μειώνονται με την υπερέκφραση της PARN αγρίου τύπου ενώ η υπερέκφραση της PARN R99A/Q109A τα επίπεδα του να είναι μειωμένα αλλά είναι αυξημένα αν συγκριθεί με αυτό του αγρίου τύπου. Όσον αφορά το miR29a-3p, παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα έκφρασής του με την υπερέκφραση της PARN, ενώ υπερέκφραση της PARN R99A/Q109A προκάλεσε ακόμα πιο αυξημένη μείωση των επιπέδων του.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν πως οι μεταλλάξεις των R99 και Q109, που επηρεάζουν την δομή και τη δραστικότητα της PARN, συμφωνούν με προηγούμενες εργασίες που δείχνουν πως η PARN ρυθμίζει την έκφραση παραγόντων μεταξύ αυτών και γνωστά ογκογονίδια.

Υπερέκφραση της PARN και PARN R99A/Q109A

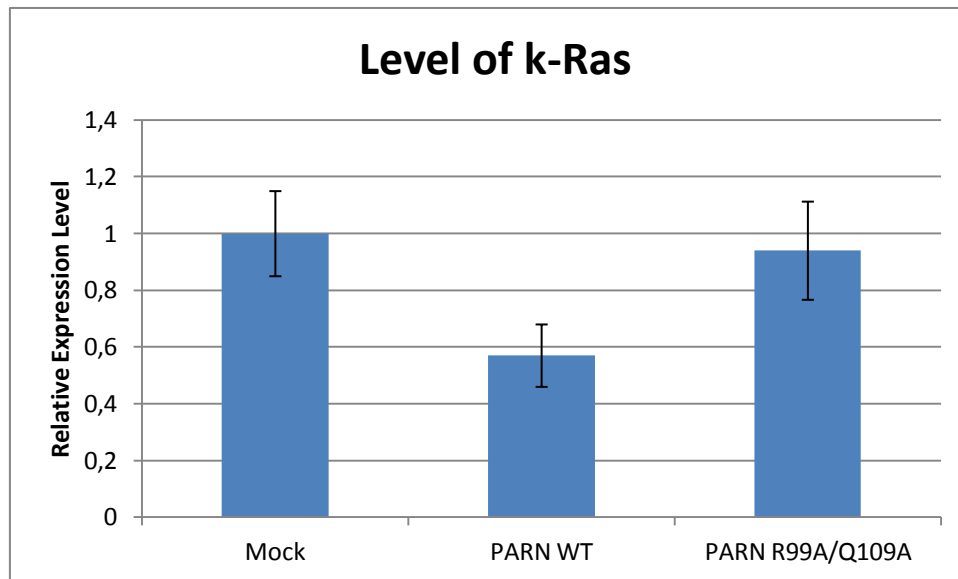


Εικόνα 33. Επίπεδα έκφρασης του mRNA της PARN μετά από υπερέκφραση της σε κύτταρα NCI-H520. Mock: κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με άδειο φορέα. Τα PARN WT είναι κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με την αγρίου τύπου PARN και το μετάλλαγμα PARN R99A/Q109A, αντίστοιχα.

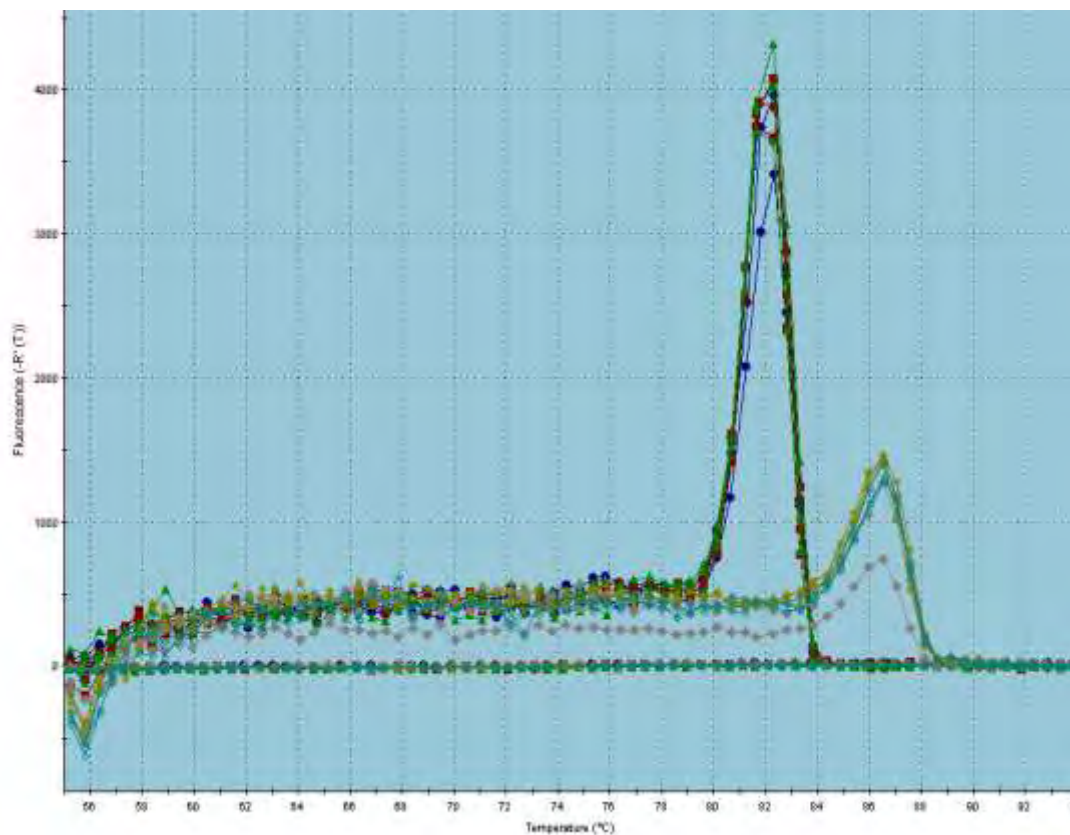


Εικόνα 34. Dissociation curve: Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού. Οι καμπύλες με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 84°C αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε υπερέκφραση της PARN WT και PARN R99A/Q109A, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 87°C, αντιστοιχεί τα προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75°C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR

Επίδραση της υπερέκφρασης των PARN και PARN R99A/Q109A στα επίπεδα Mrna του k-Ras



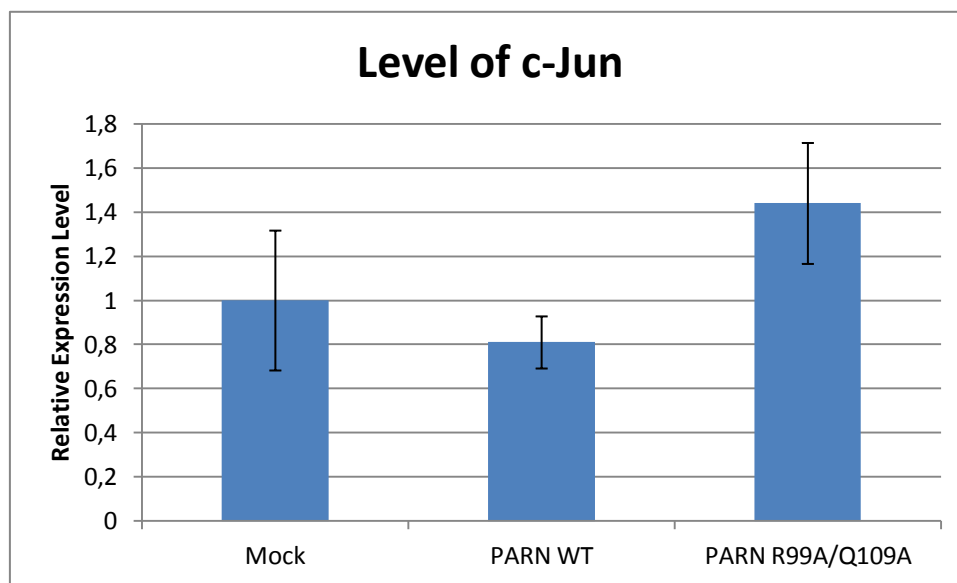
Εικόνα 35. Επίπεδα του mRNA k-Ras μετά από υπερέκφραση της σε κύτταρα NCI-H520. Mock είναι τα κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με άδειο φορέα. Τα PARN WT είναι κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με την αγρίου τύπου PARN και αντίστοιχα τα τελευταία με την PARN R99A/Q109A.



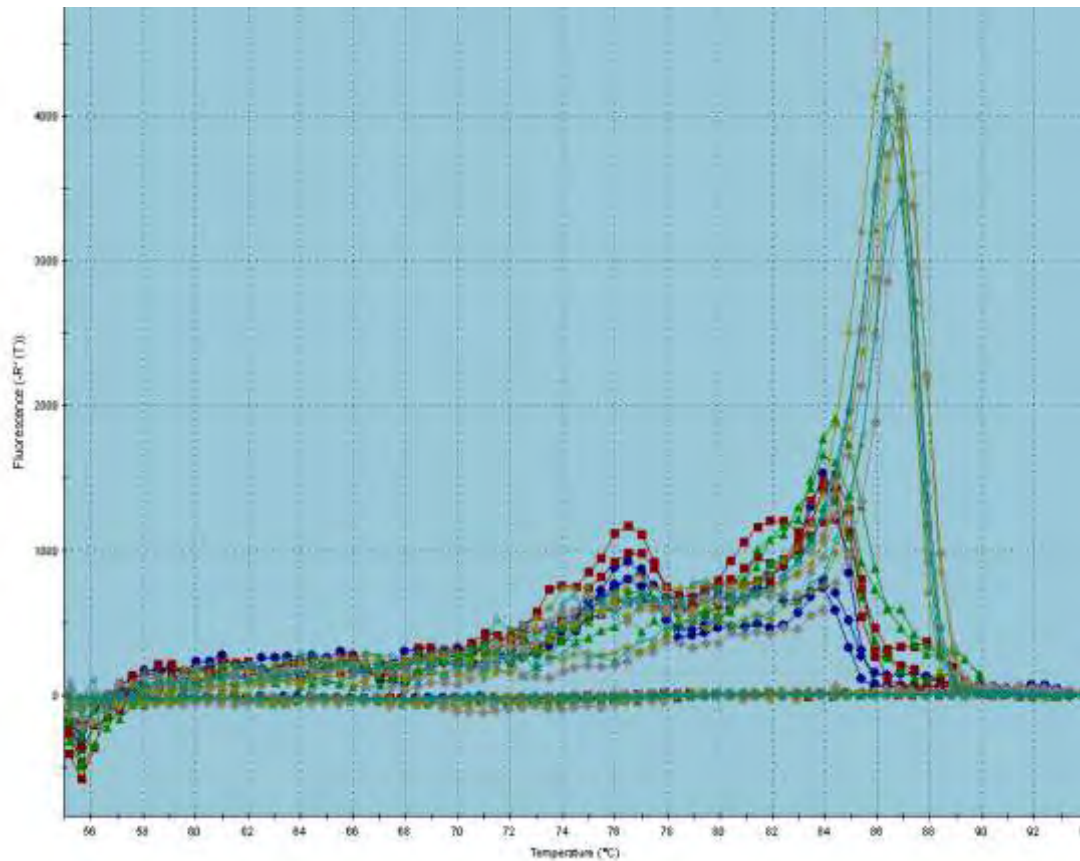
Εικόνα 36. Dissociation curve: Διάγραμμα διάσπασης σήματος φθορισμού. Οι καμπύλες με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 82°C αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε υπερέκφραση της PARN WT και PARN R99A/Q109A, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση

φθορισμού σε θερμοκρασία 87°C, αντιστοιχεί τα προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75°C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

Επίδραση της υπερέκφρασης των PARN και PARN R99A/Q109A στα επίπεδα mRNA του c-Jun

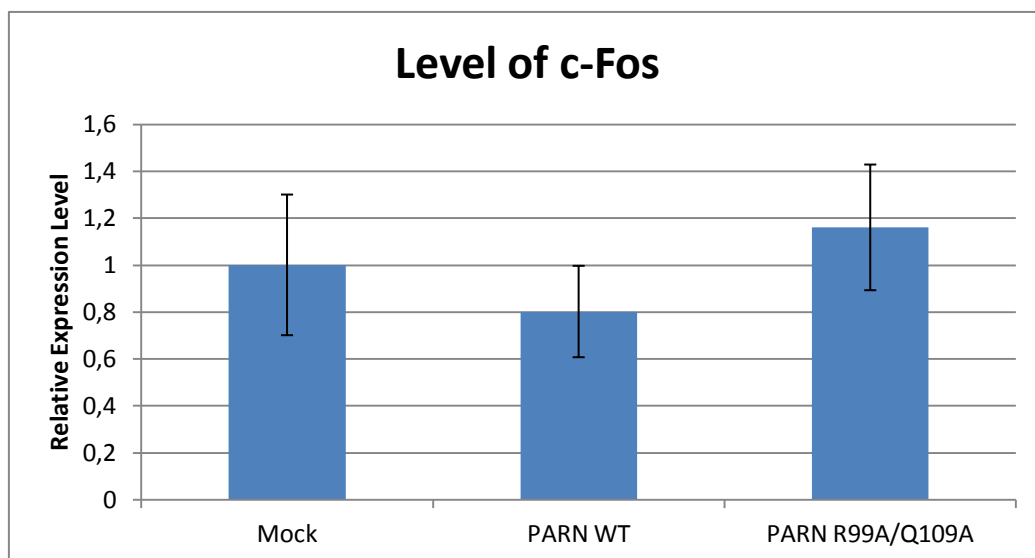


Εικόνα 37. Επίπεδα του mRNA c-Jun μετά από υπερέκφραση της σε κύτταρα NCI-H520. Mock είναι τα κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με άδειο φορέα. Τα PARN WT είναι κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με την αγρίου τύπου PARN και αντίστοιχα τα τελευταία με την PARN R99A/Q109A.

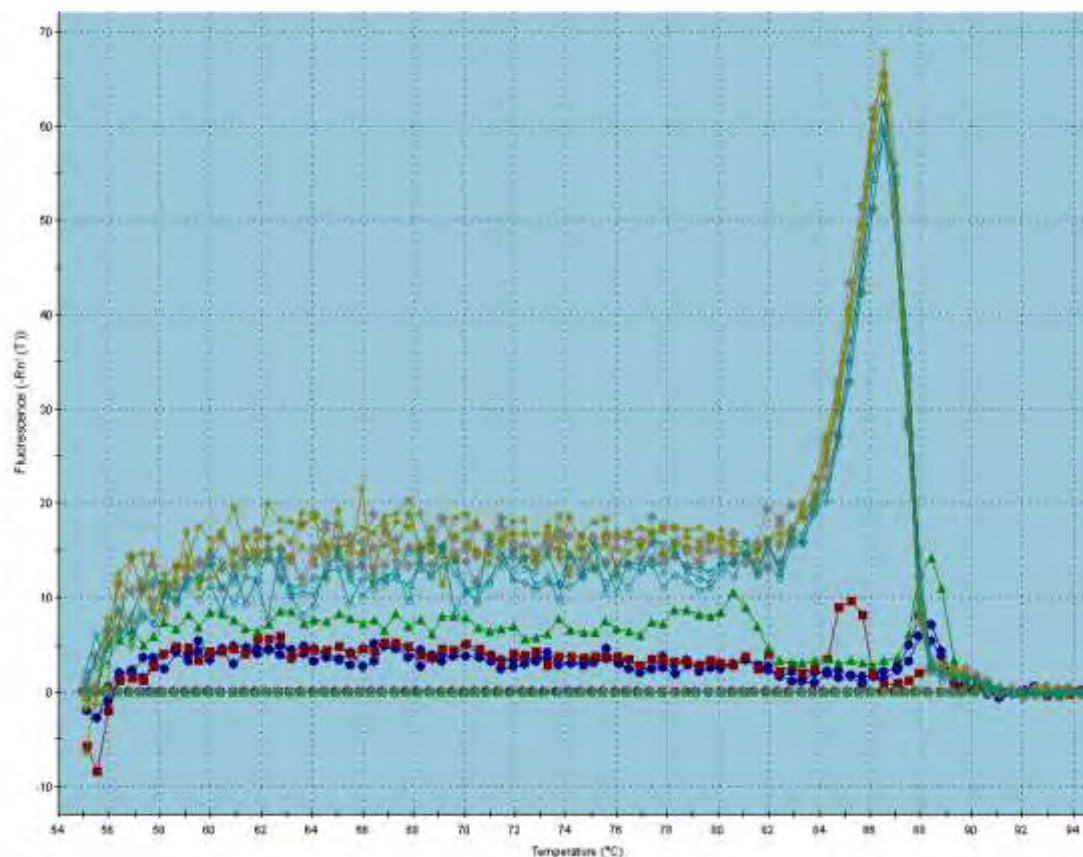


Εικόνα 38. Dissociation curve: Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού. Οι καμπύλες με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 84°C αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε υπερέκφραση της PARN WT και PARN R99A/Q109A, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 87°C, αντιστοιχεί τα προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75°C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

Επίδραση της υπερέκφρασης των PARN και PARN R99A/Q109A στα επίπεδα mRNA του c-Fos

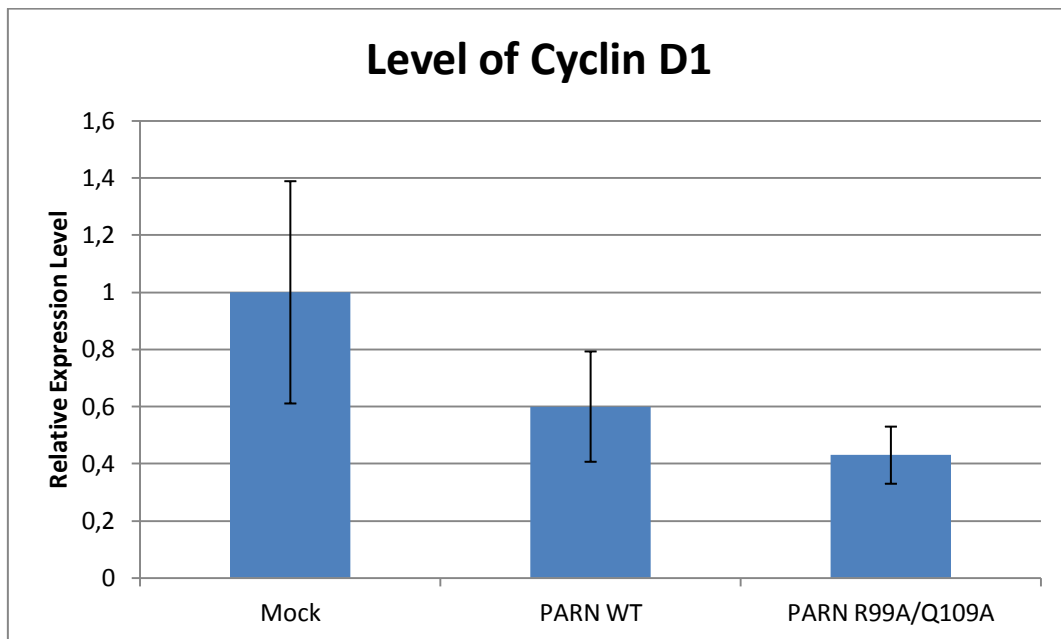


Εικόνα 39. Επίπεδα του mRNA c-Fos μετά από υπερέκφραση της σε κύτταρα NCI-H520. Mock είναι τα κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με άδειο φορέα. Τα PARN WT είναι κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με την αγρίου τύπου PARN και αντίστοιχα τα τελευταία με την PARN R99A/Q109A.

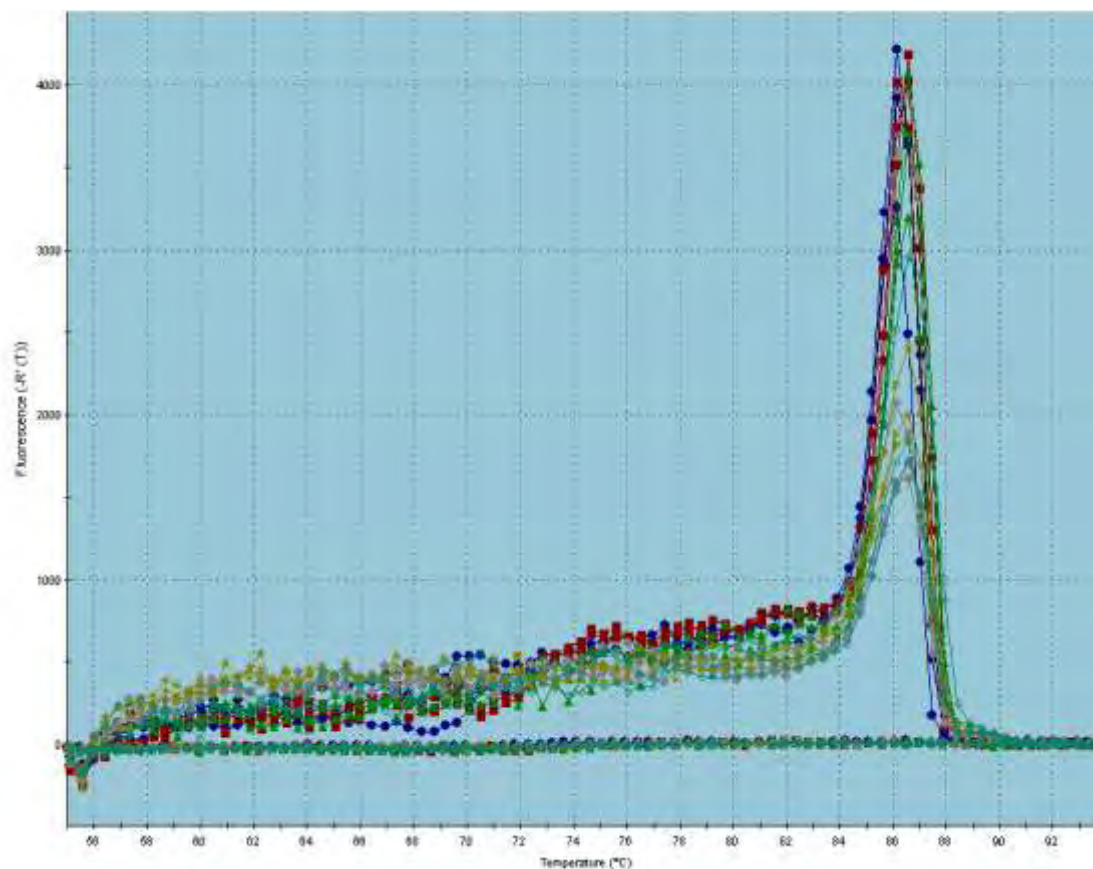


Εικόνα40. Dissociation curve: Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού. Οι καμπύλες με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 88°C αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε υπερέκφραση της PARN WT και PARN R99A/Q109A, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 86°C, αντιστοιχεί τα προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75°C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

Επίδραση της υπερέκφρασης των PARN και PARN R99A/Q109A στα επίπεδα mRNA του CyclinD1



Εικόνα 41. Επίπεδα του mRNA CyclinD1 μετά από υπερέκφραση της σε κύτταρα NCI-H520. Mock είναι τα κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με άδειο φορέα. Τα PARN WT είναι κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με την αγρίου τύπου PARN και αντίστοιχα τα τελευταία με την PARN R99A/Q109A.

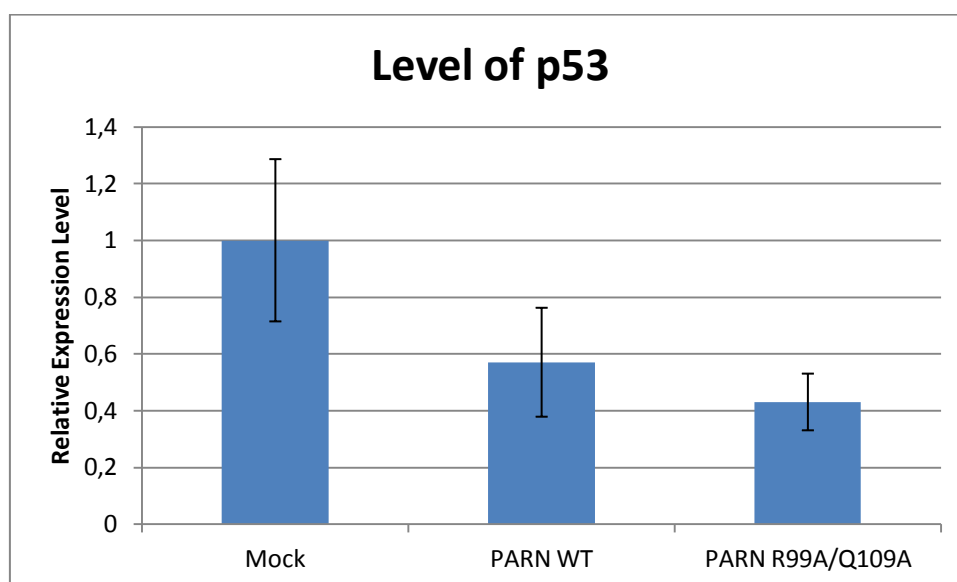


Εικόνα42. Dissociation curve: Διάγραμμα διάσπασης σήματος φθορισμού. Οι καμπύλες με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 86°C αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία

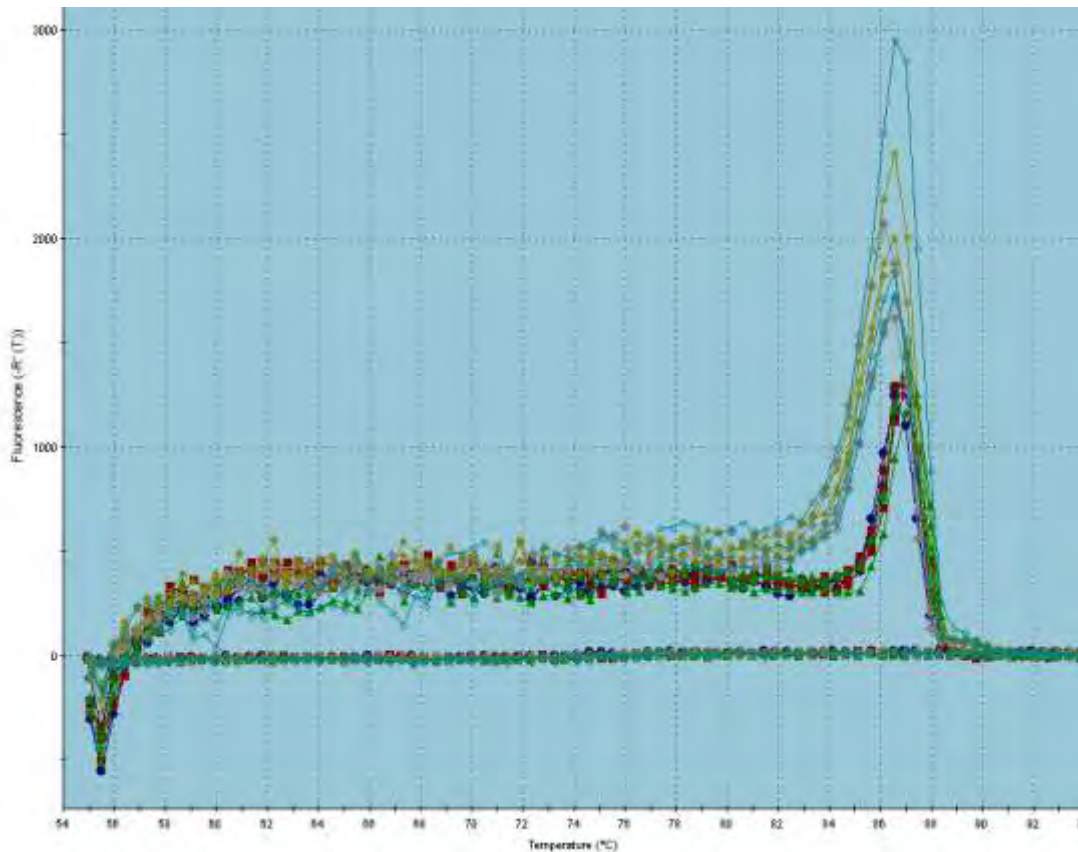
έγινε υπερέκφραση της PARN WT και PARN R99A/Q109A, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 86°C, αντιστοιχεί τα προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75°C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

Επίδραση της υπερέκφρασης των PARN και PARN R99A/Q109A στα επίπεδα mRNA του p53

Προηγούμενες μελέτες σε κυτταρικές σειρές από καρκίνο παχέος εντέρου έδειξαν πως αποσιώπηση της PARN επέφερε αύξηση των επιπέδων mRNA του p53 [60]. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως η υπερέκφραση της PARN μείωσε τα επίπεδα του mRNA του p53, ενώ το διπλό μετάλλαγμα επέφερε πιο έντονη μείωση. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με την προηγούμενη εργασία όπου η έκφραση του mRNA της p53 φαίνεται να επηρεάζεται από την PARN.

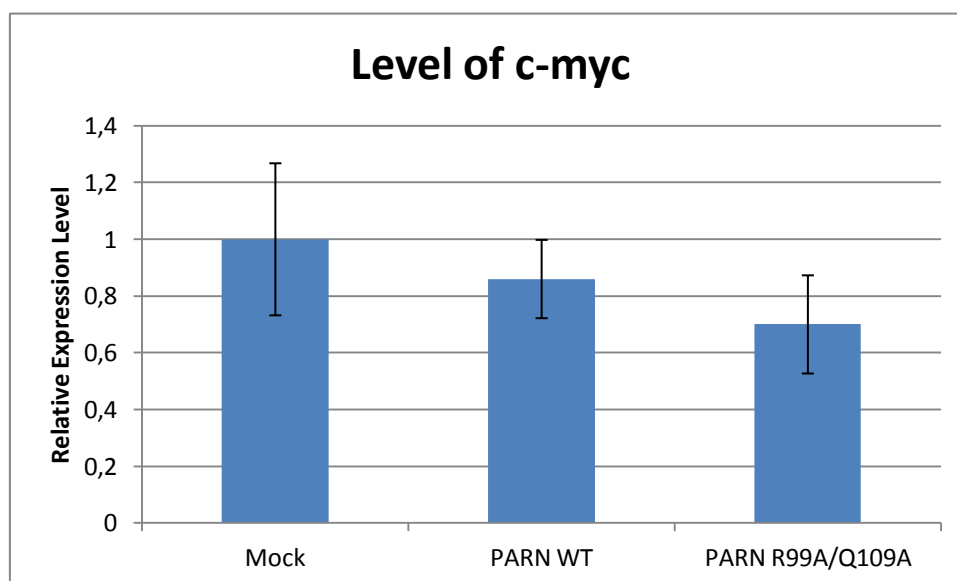


Εικόνα 43. Επίπεδα του mRNA p53 μετά από υπερέκφραση της σε κύτταρα NCI-H520. Mock είναι τα κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με άδειο φορέα. Τα PARN WT είναι κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με την αγρίου τύπου PARN και αντίστοιχα τα τελευταία με την PARN R99A/Q109A.

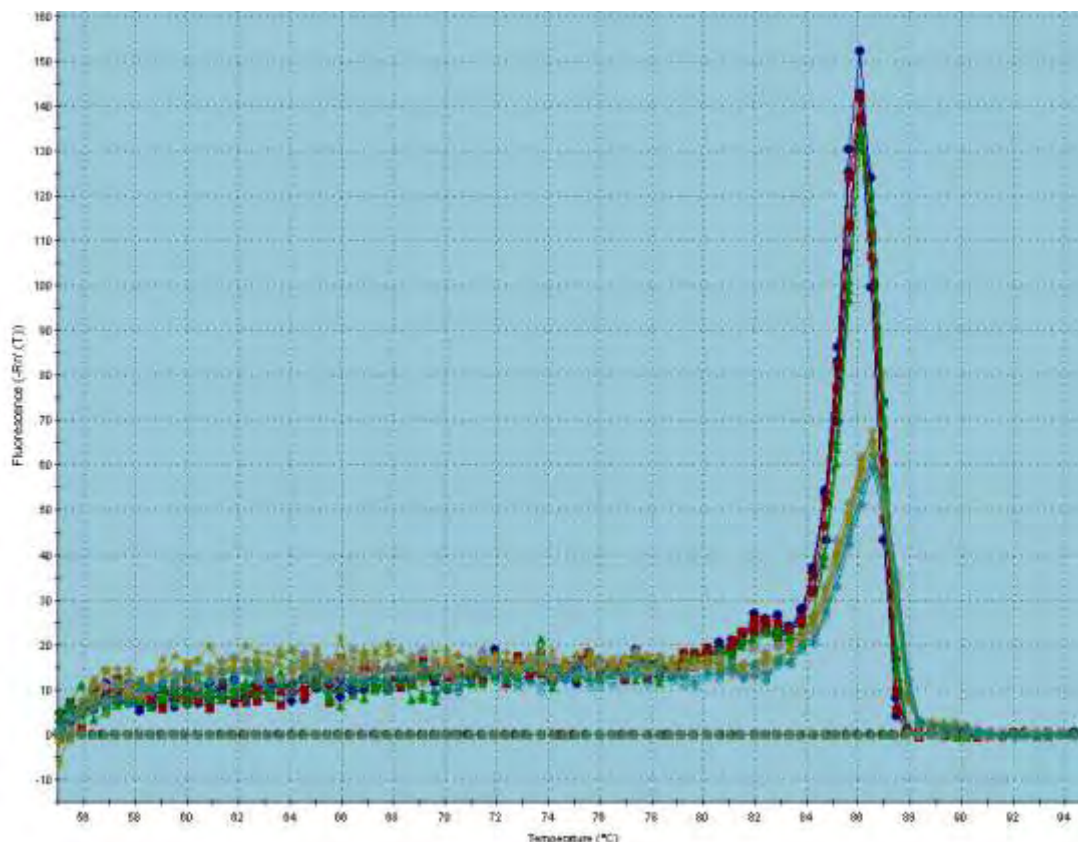


Εικόνα44. Dissociation curve: Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού. Οι καμπύλες με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 87°C αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε υπερέκφραση της PARN WT και PARN R99A/Q109A, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 86°C, αντιστοιχεί τα προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75°C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

Επίδραση της υπερέκφρασης των PARN και PARN R99A/Q109A στα επίπεδα mRNA του c-myc



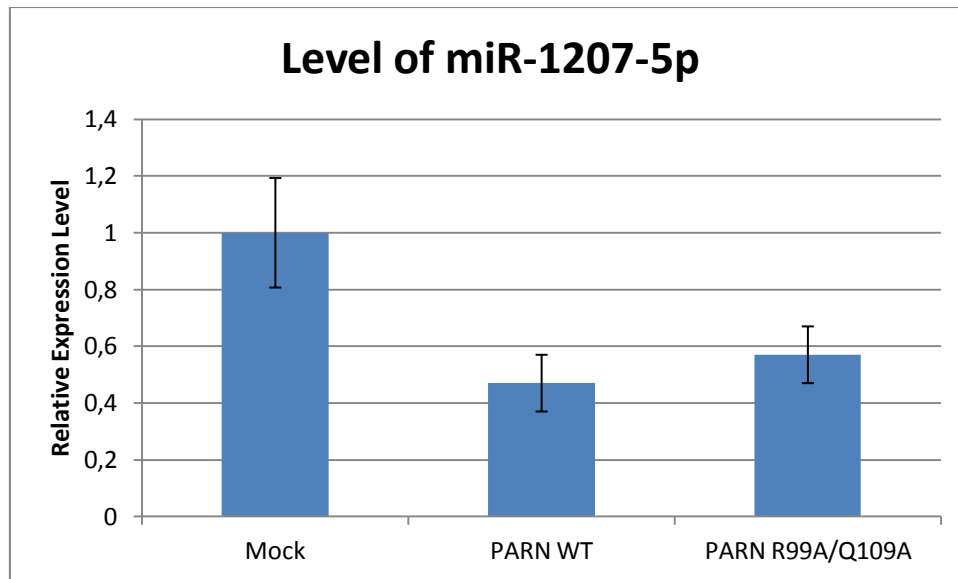
Εικόνα 45. Επίπεδα του mRNA c-μγς μετά από υπερέκφραση της σε κύτταρα NCI-H520. Mock είναι τα κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με άδειο φορέα. Τα PARN WT είναι κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με την αγρίου τύπου PARN και αντίστοιχα τα τελευταία με την PARN R99A/Q109A.



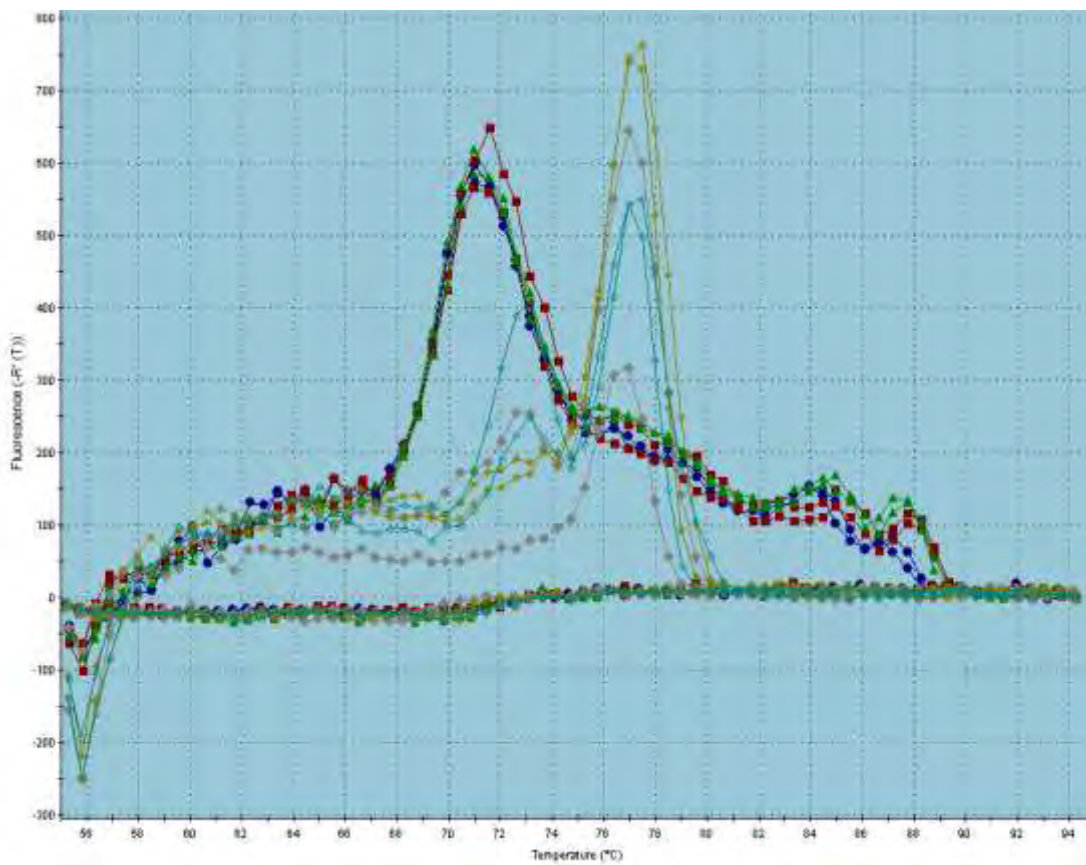
Εικόνα46. Dissociation curve: Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού. Οι καμπύλες με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 87°C αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε υπερέκφραση της PARN WT και PARN R99A/Q109A, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 86°C, αντιστοιχεί τα προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75°C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

Επίδραση της υπερέκφρασης των PARN και PARN R99A/Q109A στα επίπεδα miRNA του miR-1207-5p

Τα αποτελέσματα δείχνουν πως η PARN μειώνει τα επίπεδα του miR-1207a, ενώ το διπλό μετάλλαγμα έχει λιγότερη επίδραση. Αυτό θα μπορούσε να σημαίνει πως η PARN έχει ρόλο στην ωρίμανση του miR-1207a. Τα μεγαλύτερα επίπεδα που παρατηρούνται όταν εκφράζεται το διπλό μετάλλαγμα πιθανόν να σημαίνει πως το ένζυμο δεν λειτουργεί σωστά.



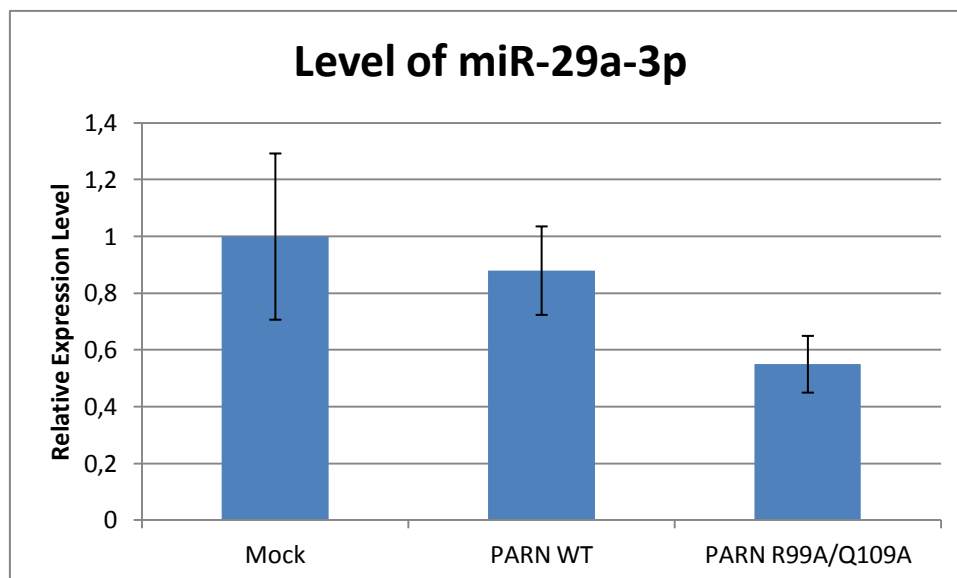
Εικόνα 47. Επίπεδα του miR-1207-5p μετά από υπερέκφραση της σε κύτταρα NCI-H520. Mock είναι τα κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με άδειο φορέα. Τα PARN WT είναι κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με την αγρίου τύπου PARN και αντίστοιχα τα τελευταία με την PARN R99A/Q109A.



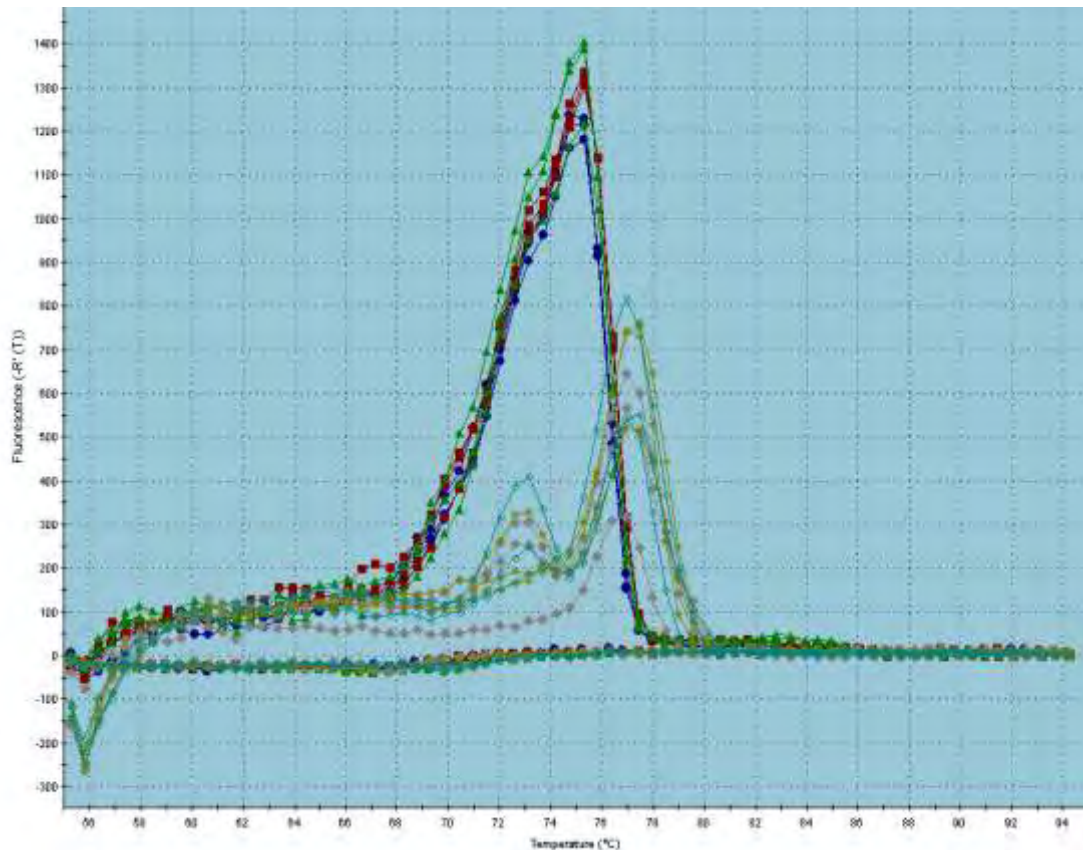
Εικόνα48. Dissociation curve: Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού. Οι καμπύλες με ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 71°C αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε υπερέκφραση της PARN WT και PARN R99A/Q109A, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 76°C, αντιστοιχεί τα προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 65°C αντιστοιχούν σε μη

ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 70°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

Επίδραση της υπερέκφρασης των PARN και PARN R99A/Q109A στα επίπεδα miRNA του miR-29a-3p



Εικόνα 49. Επίπεδα του miR-29a-3p μετά από υπερέκφραση της σε κύτταρα NCI-H520. Mock είναι τα κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με άδειο φορέα. Τα PARNWT είναι κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με την αγρίου τύπου PARN και αντίστοιχα τα τελευταία με την PARN R99A/Q109A.



Εικόνα50. Dissociation curve: Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού. Οι καμπύλες με ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 74°C αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε υπερέκφραση της PARN WT και PARN R99A/Q109A, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 78°C, αντιστοιχεί τα προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 65°C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 70°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν πως η υπερέκφραση του μεταλλάγματος επηρεάζει την έκφραση των επιλεγμένων παραγόντων. Επίσης, στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 19) αναγράφονται σε ποσοστά η επίδραση της υπερέκφρασης τόσο της PARN WT όσο και της PARN R99A/Q109A στους παραπάνω παράγοντες.

Πίνακας 19. Συγκεντρικός πίνακας των επί τοις εκατό επιπέδων των mRNA που μετρήθηκαν με τη Real Time PCR.

	PARN	PARN R99A/Q109A
PARN	↑20%	↑40%
k-Ras	↓42%	↓2%
c-Jun	↓20%	↑40%
c-Fos	↓20%	↑18%
Cyclin D1	↓40%	↓59%
P53	↓42%	↓59%
c-myc	↓17%	↓25%
miR-1207-5p	↓57%	↓42%

miR-29a-3p	↓16%	↓43%
-------------------	------	------

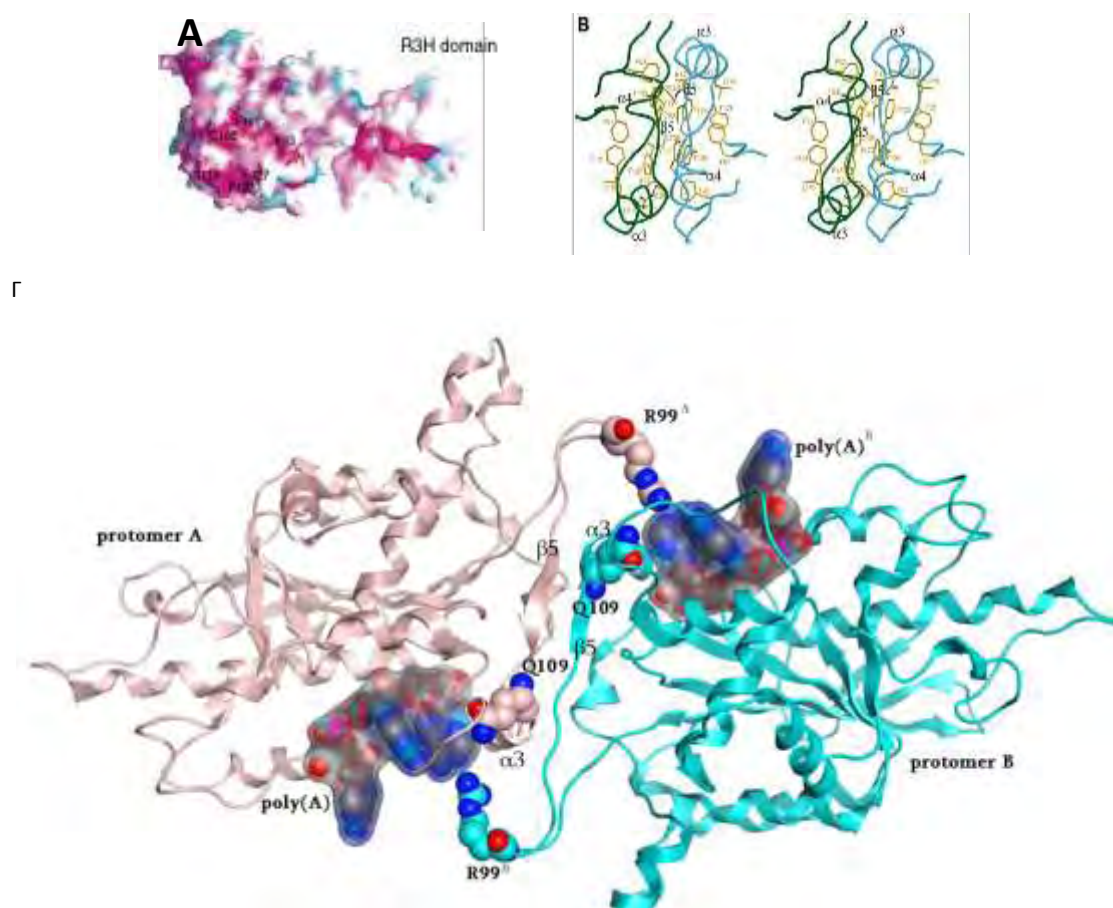
5. Συζήτηση – Αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Βιοχημικές και δομικές μελέτες αποκάλυψαν ότι η PARN συγκροτείται από δύο ίδιες υπομονάδες μάζας 74kDa. Το ενεργό της κέντρο αποτελείται από πέντεαμινοξέα (Asp28, Glu30, Asp292, Asp382 και His377). Έτσι, η PARN κατατάσσεται στις DEDDh νουκλεάσες [43]. Δομικές μελέτες έχουν δείξει πως η καταλυτική περιοχή της PARN συμμετέχει στο σχηματισμό του διμερούς, όπου η πτύχωση b5 και οι έλικες a3 και a4 συνεισφέρουν καίρια στην μεσεπιφάνεια του διμερούς (Εικόνα 51A, Γ). Ειδικότερα, οι έλικες a3 και a4 του ενός μονομερούς βρίσκονται απέναντι στις έλικες a4 και a3 του άλλου μονομερούς. Η πτύχωση b5 του ενός μονομερούς σχηματίζει με την αντίστοιχή της από το άλλο μονομερές μια αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια. Οι πλευρικές αλυσίδες των συντηρημένων αμινοξέων Phe93, Cys108, Phe106, Ile113, Phe123 και Phe127 (Εικόνα 51B), του ενός μονομερούς σχηματίζει εκτενείς υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις με την ίδια ομάδα αμινοξέων από το άλλο μονομερές. Ας σημειωθεί πως η Phe123 (που είναι απaráλλακτη σε όλα τα είδη), εντοπίζεται στο κέντρο του υδρόφοβου πυρήνα που σχηματίζεται από τις πλευρικές αλυσίδες των Phe67, Ile113, Leu116, Ala117, Phe121 και Phe127 στο ίδιο μόριο και την πλευρική αλυσίδα της Phe127 και της μεθυλομάδας της Arg128 του άλλου μονομερούς (Εικόνα 51B). Αυτή η εκτενής μεσεπιφάνεια του διμερούς και η συμμετοχή σε αυτή πολλών υψηλά συντηρημένων αμινοξέων της PARN υπαινίσσεται πως η ομοδιμερής PARN είναι η δομική μονάδα της ενζυματικής ενεργότητας πρέπει δύο μονομερή να διμεριστούν για να δώσουν μια πλήρως δραστική ενζυμική μονάδα.

Έτσι, η αντικατάσταση της Ile113 ή της Phe123 από Αλανίνη απενεργοποίησε το ένζυμο, ενώ η μετάλλαξη της Phe127 σε Ala μείωσε σημαντικά την ενζυμική δραστηριότητα [43]. Πρέπει να σημειωθεί, όμως, πως οι παρατηρήσεις των επιδράσεων των μεταλλάξεων αυτών στη δραστηριότητα, αφορούν σε μεταλλάγματα της PARN τα οποία διατηρούν ενζυμική ενεργότητα, αλλά τους έλειπαν σημαντικά τμήματα από το καρβόξυ τελικό τους άκρο, και τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής της δομής. Έτσι, ενώ η μετάλλαξη Phe123Ala στην πλήρους μεγέθους πρωτεΐνη έδειξε να μειώνει κατά τουλάχιστο 150 φορές τη δραστηριότητα, η μετάλλαξη Phe127Ala δεν έδειξε

σημαντική αλλαγή.

Αυτό υπαινίσσεται πως άλλες περιοχές στην καρβόξυ-τελική περιοχή σταθεροποιούν τη δομή διμερούς του ενζύμου [43]. Επιπλέον, τα μεταλλάγματα Ile113Ala, Phe123Ala και Phe127Ala της PARN(1-537) είχαν ελάχιστη συγγένεια ή πρόσδεση για υπόστρωμα πολυ(A). Περαιτέρω αναλύσεις χρωματογραφίας της PARN(1-537) έδειξαν πως το μετάλλαγμα Phe127Ala απαντά κύρια σε μονομερή κατάσταση, ενώ τα Ile113Ala και Phe123Ala μετατρέπουν πλήρως την PARN από διμερή σε μονομερή κατάσταση [43]. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι οι μεταλλάξεις διαταράσσουν τη διμερή μορφή και αποσταθεροποιούν την αρχιτεκτονική της κοιλότητας όπου προσδέεται το RNA, επηρεάζοντας έτσι την δραστικότητα του ενζύμου η μεσεπιφάνεια διμερισμού και το δραστικό κέντρο της PARN(1-431) ακολουθούν η μια την άλλη, όπου η έλικα α3 εμπλέκεται τόσο στο διμερισμό, όσο και το σχηματισμό της κοιλότητας που προσδένει το RNA [43].



Εικόνα 51. Α.Μοριακή επιφάνεια της PARN(1-431) που εμπλέκεται στο διμερισμό του ενζύμου. Η εικόνα δείχνει υψηλά και χαμηλά συντηρημένες περιοχές που απαντώνται στην PARN και δείχνονται με χρωματική διαβάθμιση από το κόκκινο προς το κυανό, αντίστοιχα. Τα συντηρημένα αμινοξέα είναι αριθμημένα στην εικόνα. Β. Στερεοδιάγραμμα της μεσεπιφάνειας διμερισμού της PARN(1-431). Τα

δύο μόρια δείχνονται με βαθύ πράσινο και κυανό, αντίστοιχα. Τα αμινοξέα που εμπλέκονται στο διμερισμό δείχνονται με απεικόνιση stick model. [43]. Γ. Ρόλος της R99 στο διμερισμό του ενζύμου. Οι δύο R99 έχουν επισημανθεί ενώ είναι συνδεδεμένες με δεσμούς υδρογόνου με την αζωτούχο βάση του πρώτου νουκλεοτιδίου πολυ(A) [50].

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, όπου βασίζεται η παρούσα εργασία, η R99 και Q109 αντιπροσωπεύουν σημαντικά αμινοξέα. Κυρίως η R99 η οποία συμβάλλει στη σύνδεση των δύο μονομερών της PARN, συνεισφέρει στη σταθερότητα του ενζύμου και κατευθύνει το υπόστρωμα στη βέλτιστη θέση για την αντίδραση διάσπασης της πολυ(A) ουράς [50]. Η R99 μαζί με τη His377 (που όπως προαναφέρθηκε συμμετέχει άμεσα στη κατάλυση) σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το πρώτο νουκλεοτίδιο αδενοσίνης της πολυ(A) ουράς από διαφορετικές διευθύνσεις. Τα δύο αυτά αμινοξέα έχουν κρίσιμο ρόλο στη σταθερότητα της PARN και στον προσανατολισμό του υποστρώματος συμβάλλοντας έτσι στην ενζυμική αντίδραση. Όπως αναφέρθηκε και σε άλλες εργασίες που μελετούν σημειακές μεταλλάξεις στην PARN, ενώ οι μεταλλάξεις σε κολοβωμένες μορφές επηρέασαν τη λειτουργικότητα του ενζύμου, δεν έκαναν το ίδιο στο πλήρους μήκους ένζυμο [43]. Είναι λοιπόν πιθανό πως η μεταλλάξεις που μελετήσαμε στο πλήρες ένζυμο, και συγκεκριμένα τα αμινοξέα R99 και Glu 109 να έχουν συμμετοχή στο διμερισμό και λειτουργία του ενζύμου και ακόμα το αμινοξύ Αργινίνη να έχει πιο ισχυρή επίδραση, όπως φαίνεται από την αύξηση της K_M και λιγότερο στην αποτελεσματικότητα της αντίδρασης, όπως φαίνεται από την μικρότερη μεταβολή της V_{max} . Εφόσον, λόγω των μεταλλάξεων, διαταράσσεται η συνοχή του διμερούς, η μετάλλαξη τόσο της Αργινίνης όσο και της Γλουταμίνης επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος στο άλλο, επίσης και σε αυτή την περίπτωση η Αργινίνη έχει ισχυρότερη επίδραση. Σημειώνεται εδώ, πως το προτεινόμενο μοντέλο κατάλυσης από την PARN, προτείνει πως το διμερές της PARN προσδένει ένα υπόστρωμα για κάθε αντίδραση που καταλύει, δηλαδή πολυ(A) ουρά, και όχι κάθε διμερές προσδένει από ένα υπόστρωμα. Με άλλα λόγια, δύο μονομερή PARN διμερίζονται και καταλύουν τη βράχυνση μιας πολυ(A) ουράς ενός μορίου mRNA και όχι δύο mRNAs ταυτόχρονα, κάθε μονομερές όμως διατηρεί την ικανότητα να προσδένει και να καταλύει την αντίδραση [55]. Με αυτές τις παρατηρήσεις ερμηνεύονται οι αλλαγές στις κινητικές σταθερές ως συνέπεια των μεταλλάξεων.

Με βάση τον σημαντικό διαφαινόμενο ρόλο της R99 και της Q109 στη δομή και στη λειτουργία της PARN, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η δημιουργία μεταλλάξεων PARN Q109A, PARN R99F, PARN R99W και PARN R99A/Q109A (η μετάλλαξη PARN R99A είχε δημιουργηθεί σε προηγούμενη εργαστηριακή μελέτη). Έγινε η μελέτη των συνθηκών έκφρασης τους και απομόνωση τόσο αυτών όσο και της αγρίου τύπου PARN σε καλλιέργειες E.coli. Ακολούθως συγκρίθηκε η ενεργότητα των ενζύμων όπου φέρουν τις μεταλλάξεις με αυτή του ενζύμου αγρίου τύπου. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι τιμές των K_M και V_{max} είναι μειωμένες σε σύγκριση με του αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα παρατηρούμε μία μεγαλύτερη αύξηση της τιμής της K_M στις πρωτεΐνες όπου φέρουν μετάλλαξη στο αμινοξύ Αργινίνη σε σύγκριση με αυτό της Γλουταμίνης (Πίνακας 18). Επίσης, αν γίνει σύγκριση των μεταλλάξεων της Αργινίνης, παρατηρούμε ότι οι πρωτεΐνες όπου έχουμε αντικαταστήσει με Φαινυλαλανίνη και Τρυπτοφάνη η τιμή της K_M είναι ακόμα υψηλότερη. Ακόμη το φαινόμενο της αύξησης της τιμής της K_M παρατηρείται σε πολύ υψηλό βαθμό και στην πρωτεΐνη όπου φέρει τη διπλή μετάλλαξη (PARN R99A/Q109A). Η ενεργότητα του ενζύμου είναι μειωμένη σε όλων των ειδών των μεταλλάξεων όπου δημιουργήθηκαν. Συνοψίζοντας τα παραπάνω, η αύξηση της K_M υπαινίσσεται πως τα αμινοξέα επιδρούν στην αποτελεσματικότητα της πρόσδεσης του υποστρώματος από το ένζυμο.

Οι προηγούμενες παρατηρήσεις μας οδήγησαν να εξεταστεί αν τα αμινοξέα αυτά επηρεάζουν τη δομή του ενζύμου. Για το σκοπό αυτό εξατάστηκε η κατατομή των μεταλλαγμάτων χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έδειξαν πως επηρεάζεται ο ολιγομερισμός της πρωτεΐνης (Εικόνα 27)· η μονομερής μορφή της πρωτεΐνης παρατηρείται σε όλες τις μεταλλαγμένες μορφές, ενώ δεν ήταν εμφανής στην αγρίου τύπου. Μορφές με αριθμό υπομονάδων μεγαλύτερο του 2 παρατηρούνται τόσο στις μεταλλαγμένες όσο και την αγρίου τύπου μορφές. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν πως η R99 και η Q109 επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία της PARN, με την πρώτη να έχει επηρεάζει πιο έντονα τη συμπεριφορά του ενζύμου.

Πρόσφατες μελέτες από το εργαστήριό μας έδειξαν πως οι R99 και Q109 θα μπορούσαν να εμπλέκονται στη ρύθμιση της κατάλυσης. Στην εργασία ταυτοποιήθηκαν ορισμένα अपαράλλακτα (invariant) αμινοξέα και με βάση τη φυλογενετική ανάλυση (Εικόνα 52), το ενδιαφέρον εστιάστηκε στις R99 και Q109. Η ανάλυση *insilico* έδειξε πως η R99 του μονομερούς A εκτείνεται στο καταλυτικό κέντρο του μονομερούς B, θυμίζοντας την Phe123, που αναφέρθηκε παραπάνω. Οι μεταλλάξεις που δημιουργήθηκαν και που μελετήσαμε στην εργασία έγιναν στην PARN πλήρους μήκους (αγρίου τύπου). Είναι γνωστό πως μεταλλάξεις σε κολοβωμένες μορφές της PARN είχαν σημαντική επίδραση στη δραστηριότητά τους, όχι όμως στην πλήρους μήκους PARN [43].

Τα μεταλλάγματα των R99 και Q109 της παρούσας εργασίας δείχνουν πως έχουν σημαντικό ρόλο στη δομή και την ενεργότητα του ενζύμου. Η αύξηση των τιμών των σταθερών K_M δείχνει πως επηρεάζεται η ικανότητα πρόσδεσης του υποστρώματος από το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Πίνακας 18). Παρόλα αυτά, η ενεργότητα δεν μειώνεται δραματικά και το ένζυμο διατηρεί μέρος της ενεργότητάς του. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες ενισχύουν τις προηγούμενες παρατηρήσεις. Έτσι, σε όλα τα μεταλλάγματα, παρατηρείται το μονομερές της PARN, ενώ δεν παρατηρείται στο αγρίου τύπου ένζυμο. Διμερείς, τριμερείς, αλλά μορφές που απαρτίζονται από περισσότερες υπομονάδες, παρατηρούνται τόσο στα μεταλλάγματα, όσο και στην αγρίου τύπου PARN. Είναι πιθανό, η μειωμένη δραστηριότητα των μεταλλαγμάτων της PARN να οφείλεται στην ύπαρξη των μονομερών, παράλληλα με διμερείς και τριμερείς μορφές, μιας και είναι γνωστό πως ο διμερισμός είναι απαραίτητος για την πλήρη δραστηριότητα [43]. Η τριμερής μορφή δεν είναι άγνωστη στην PARN· πριν τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής του ενζύμου, δεδομένα απομόνωσης της PARN με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (size exclusion chromatography) έδειχναν πως το ένζυμο απαρτίζεται από τρεις όμοιες υπομονάδες [57]. Επίσης, πρόσφατα δεδομένα δείχνουν πως σε διαλύματα η PARN σχηματίζει ομοτετραμερή με υψηλότερη ενζυμική δραστηριότητα από αυτή του διμερούς, ή και ανώτερης τάξης ολιγομερή, ενώ αυτές οι δομές παρατηρούνται τόσο *in vitro*, όσο και σε κύτταρα [58]. Έτσι, τα δεδομένα μας υποστηρίζονται από

τις παραπάνω παρατηρήσεις και επιπλέον, αναδεικνύουν το σημαντικό ρόλο των R99 και Q109 στη λειτουργία του ενζύμου.



Εικόνα 52. Sequence logo των μοτίβων που εντοπίζονται στην αλληλουχία αμινοξέων της PARN. Οι αριθμοί πάνω από τα αμινοξέα (συμβολίζονται με ένα γράμμα) είναι σύμφωνα με την αρίθμηση της ανθρώπινης PARN. Το ύψος κάθε γράμματος είναι ανάλογο της συχνότητας του αμινοξέος σε αυτή τη θέση. Τα γράμματα είναι τοποθετημένα με σειρά ώστε το πιο συχνά απαντώμενο να είναι ψηλότερα. Τα αμινοξέα που είναι απαράλλακτα φέρουν μια τελεία στο κάτω μέρος [50].

Βασισμένοι σε μελέτες για το ρόλο της PARN στην έκφραση διαφόρων παραγόντων, μεταξύ αυτών και ογκογονιδίων, παρατηρήσαμε ότι η έκφραση των mRNAs, k-Ras, c-Fos και c-Jun μειώνεται με την υπερέκφραση της αγρίου τύπου PARN ενώ με την υπερέκφραση της PARN R99A/Q109A τα επίπεδα αυτών δεν επηρεάζονται. Όσον αφορά στα miRNAs μελετήσαμε δύο, το miR1207-5p και το miR29a-3p και φαίνεται πως τα επίπεδα έκφρασης του miR1207-5p μειώνονται με την υπερέκφραση της PARN αγρίου τύπου ενώ η υπερέκφραση της PARN R99A/Q109A τα επίπεδα του να είναι μειωμένα αλλά είναι αυξημένα αν συγκριθεί με αυτό του αγρίου τύπου. Αυτό μπορεί να συμβαίνει επειδή το μετάλλαγμα λόγω του ότι υπάρχει σε περίσσεια σε σχέση με την ενδοκυττάρια PARN επηρεάζει την σωστή ωρίμανση των εν λόγω miRNAs. Όσον αφορά το miR29a-3p στα επίπεδα έκφρασής του παρατηρήθηκε μείωση με την υπερέκφραση της PARN, με την υπερέκφραση της PARN R99A/Q109A παρατηρήθηκε ακόμα πιο αυξημένη μείωση των επιπέδων του.

Μελέτες του εργαστηρίου και άλλων ομάδων έχουν δείξει πως η PARN είναι αυξημένη σε διάφορους τύπους καρκίνου [48,59]. Επίσης, πρόσφατα δεδομένα συνδέουν την PARN με κληρονομήσιμες ασθένειες. Όπως αναλύθηκε, ένας σημαντικός αριθμός αμινοξέων έχει μελετηθεί για το χαρακτηρισμό της καταλυτικής δραστηριότητας, αλλά και της δομής του ενζύμου [43, 54, 55]. Τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν τη σημασία των αμινοξέα R99 και Q109, και συμφωνούν με προηγούμενες εργασίες, που δείχνουν πως η PARN ρυθμίζει την έκφραση παραγόντων μεταξύ αυτών και γνωστά ογκογονίδια. Μια ενδιαφέρουσα

πρόκληση θα ήταν η αναζήτηση μεταλλαγμάτων της PARN στις ασθένειες αυτές σε σχέση με τις επιπτώσεις στη δομή και τη λειτουργία του ενζύμου.

Συνοψίζοντας, η εργασία μας αναδεικνύει το ρόλο των R99 και Q109 στη δομή, τη δραστηριότητα, καθώς και τις πιθανές επιπτώσεις τους στη βιολογική λειτουργία του ενζύμου.

6. Βιβλιογραφία

- 1) Garneau N, Wilusz J, Wilusz C (2007). "The high ways and byways of mRNA decay". *Nature reviews, Molecular cell Biology* vol.8
- 2) Banerjee, A.K. 5'-Terminal cap structure in eukaryotic messenger ribonucleic acids. (1980) *Microbiol. Rev.* 44: 175–205
- 3) Darnell JE, Philipson L, Wall R, Adesnik M. Polyadenylic acid sequences: role in conversion of nuclear RNA into messenger RNA. (1971) *Science* 29:174(8):507–5
- 4) Fan J., Yang X., Wang W., Wood WH 3rd, Becker K.G., Gorospe M. Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays. (2002) *Proc Natl Acad Sci USA.* 16: 10611-10616
- 5) Cheadle C., Fan J., Cho-Chung Y.S., Werner T., Ray J., Do L., Gorospe M., Becker K.G. Control of gene expression during T cell activation: alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability. (2005) *BMC Genomics.*
- 6) Cougot N, Babajko S, Seraphin B (2004). "Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells". *J Cell Biol* 165, 31-40
- 7) Goldstrohm A.C., Wickens M.. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 337–344
- 8) He F., Li X., Spatrick P., Casillo R., Dong S., Jacobson A. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. (2003) *Mol Cell* . 6: 1439–1452
- 9) Houalla R., Devaux F., Fatica A., Kufel J., Barrass D., Torchet C., Tollervey D. Microarray detection of novel nuclear RNA substrates for the exosome. (2006) *Yeast.* 6: 439–454

- 10) Liu J., Carmell MA., Rivas FV., Marsden C.G., Thomson J.M., Song J.J., Hammond S.M., Joshua-Tor L. & Hannon G.J. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. (2004) *Science*. 305: 1437–1441
- 11) Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J. & Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. (2004) *Science*. 305: 1434–1437
- 12) Conti E. & Izaurralde E. Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. (2005) *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 316–325
- 13) Van Hoof A., Frischmeyer P.A., Dietz H.C. & Parker R. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. (2002) *Science*. 295: 2262–2264
- 14) Frischmeyer P.A., van Hoof A., O'Donnell K., Guerrierio A.L., Parker R. & Dietz H.C. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. (2002) *Science*. 295: 2258–2261
- 15) Doma M. K. & Parker R. RNA quality control in eukaryotes. (2007) *Cell*. 131: 660–668
- 16) Bianchin C., Mauxion F., Sentis S., Séraphin B., Corbo L. Conservation of the deadenylase activity of proteins of the Caf1 family in human. (2005) *RNA*. 11: 487-94
- 17) Thore S., Mauxion F., Seraphin B. & Suck D. X-ray structure and activity of the yeast Pop2 protein: a nuclease subunit of the mRNA deadenylase complex. (2003) *EMBO Rep.* 4: 1150–1155

- 18) Doidge R, Mittal S, Aslam A, Winkler GS. Deadenylation of cytoplasmic mRNA by the mammalian Ccr4-Not complex. (2012) *Biochem Soc Trans*
- 19) Faber A. W., Van Dijk M., Raue H. A. & Vos J.C. Ngl2p is a Ccr4p-like RNA nuclease essential for the final step in 3'-end processing of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. (2002) *RNA*. 8: 1095–1101
- 20) Deni C. L. & Chen J. The CCR4–NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism. (2003) *Prog. NuCleic Acid Res.* 73: 221–250
- 21) Wagner E., Clement S.L. & Lykke-Andersen J. An unconventional human CCR4–CAF1 deadenylase complex in nuClear cajal bodies. (2007) *Mol. Cell Biol.* 27: 1686–1695
- 22) Morita M. et al. Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers elevation of the p27Kip1 mRNA level and impairs cell growth. (2007) *Mol. Cell Biol.* 27: 4980–4990
- 23) Goldstrohm A.C., Hook B.A., Seay D.J. & Wickens, M. PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs. (2006) *Nature Struct. Mol. Biol.* 13: 533–539
- 24) Lejeune F., Li, X. & Maquat, L. E. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. (2003) *Mol. Cell.* 12: 675–687
- 25) Chen C.Y. & Shyu, A.B. Rapid deadenylation triggered by a nonsense codon precedes decay of the RNA body in a mammalian cytoplasmic nonsense-mediated decay pathway. (2003) *Mol. Cell Biol.* 23: 4805–4813
- 26) Hilgers V, Teixeira D, Parker R. Translation-independent inhibition of mRNA deadenylation during stress in *Saccharomyces cerevisiae*. (2006) *RNA*

- 27) Conrad N.K., Shu M.D., Uyhazi K.E. & Steitz J.A. Mutational analysis of a viral RNAelement that counteracts rapid RNA decay by interaction with the polyadenylate tail. (2007) *Proc. Natl Acad. Sci.* 104: 10412–10417
- 28) Eulalio A., Behm-Ansmant I. & Izaurralde E. P bodies: at the crossroads of posttranscriptional pathways. (2007) *Mol. Biol. Cell.* 8: 9–22
- 29) Conrad N.K., Shu M.D., Uyhazi K.E. & Steitz J.A. Mutational analysis of a viral RNAelement that counteracts rapid RNA decay by interaction with the polyadenylate tail. (2007) *Proc. Natl Acad. Sci.* 104: 10412–10417
- 30) Kim J.H. & Richter J.D. Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic polyadenylation. (2006) *Mol. Cell.* 24: 173–183
- 31) Ezzeddine N. et al. Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a PABPdependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation. (2007) *RNA.* 27: 1084–1091
- 32) Hook B.A., Goldstrohm, A.C., Seay, D. J. & Wickens, M. Two yeast PUF proteinsnegatively regulate a single mRNA. (2007) *J. Biol. Chem.* 282: 15430–15438
- 33) Voeltz G.K., Ongkasuwan J., Standart N. & Steitz J. A novel embryonic poly(A) binding protein, ePAB, regulates mRNA deadenylation in *Xenopus* egg extracts. (2001) *Genes Dev.* 15: 774–788
- 34) Balatsos N.A., Nilsson P., Mazza C., Cusack S. & Virtanen A. Inhibition of mRNA deadenylation by the nuClear cap binding complex (CBC). (2006) *J. Biol. Chem.* 281: 4517–4522

- 35) Funakoshi Y. et al. Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. (2007) *Genes Dev.* 21: 3135–3148
- 36) Standart N. & Jackson R. J. MicroRNAs repress translation of m7Gppp-capped target mRNAs in vitro by inhibiting initiation and promoting deadenylation. (2007) *Genes Dev.* 21: 1975–1982
- 37) Colegrove-Otero L.J., Minshall N. & Standart N.. RNA-binding proteins in early development. (2005) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40: 21–73
- 38) Behm-Ansmant I. et al. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4: NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. (2006) *Genes Dev.* 20: 1885–1898
- 39) Emiliano P. Ricci et al. Activation of a microRNA response in trans reveals a new role for poly(A) in translational repression. (2011) *NuCleic Acids Res.* 17: 1093
- 40) Alan R. Godwin, Shihoko Kojima, Carla B. Green, Jeffrey Wilusz. Kiss your tail goodbye: The role of PARN, Nocturnin, and Angel deadenylases in mRNA biology(2013) *Biochimica et Biophysica Acta*
- 41) Berndt H, Harnisch C, Rammelt C, et al. (2012). Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA*18:958–72.
- 42) A.C. Goldstrohm, M. Wickens, Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 337–344.

- 43) M. Wu, M. Reuter, H. Lilie, Y. Liu, E. Wahle, H. Song, Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN, *EMBO J.* 24 (2005) 4082–4093.
- 44) Yang W. (2011). NuCleases: diversity of structure, function and mechanism. *Q Rev Biophys* 44:1–93.
- 45) Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, et al. (2011). CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. *NuCleic Acids Res* 39:D225–9.
- 46) Eckmann CR, Rammelt C, Wahle E. (2011). Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2:348–61.
- 47) Lee JE, Lee JY, Trembly J, et al. (2012). The PARN deadenylase targets a discrete set of mRNAs for decay and regulates cell motility in mouse myoblasts. *PLoS Genet* 8:e1002901.
- 48) P. Maragozidis, M. Karangeli, M. Labrou, G. Dimoulou, K. Papaspyrou, E. Salataj, S.Pournaras, P. Matsouka, K.I. Gourgoulialis, N.A. Balatsos, Alterations of deadenylase expression in acute leukemias: evidence for poly(a)-specific ribonuClease as a potential biomarker, *Acta Haematol.* 128 (2012) 39–46.
- 49) T. Nagata, S. Suzuki, R. Endo, M. Shirouzu, T. Terada, M. Inoue, T. Kigawa, N. Kobayashi, P. Güntert, A. Tanaka, Y. Hayashizaki, Y. Muto, S. Yokoyama, The RRM domain of poly(A)-specific ribonuClease has a noncanonical binding site for mRNA cap analog recognition, *NuCleic Acids Res.* 36 (2008) 47544767.
- 50) Vlachakis D., Pavlopoulou A., Tsiliki G., Komiotis D., Stathopoulos C., Balatsos N.A.A., Kossida S. An Integrated *In Silico* Approach to Design Specific Inhibitors Targeting Human Poly(A)-Specific RibonuClease. *PLoS ONE* 7(12): e51113 (2012)

- 51) Copeland PR and Wormington M. The mechanism and regulation of deadenylation: Identification and characterization of *Xenopus* PARN. *RNA* 7,875–886 (2001).
- 52) Cheng Y, Liu WF, Yan YB, Zhou HM. A nonradioactive assay for poly(A)-specific ribonuclease activity by methylene blue colorimetry. *Protein Pept. Lett.* 2006;13(2):125-8.
- 53) Marcelo Lopez-Lastra, Andrea Rivas and Maria Ines Barria. Protein synthesis in eukaryotes: The growing biological relevance of cap-independent translation initiation.
- 54) Balatsos N.A.A., Anastasakis D., Stathopoulos C. Inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by purine nucleotides: kinetic analysis. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2009; 48(26):6044-51
- 55) Virtanen A, Henriksson N, Nilsson P, Nissbeck M. Poly(A)-specific ribonuclease (PARN): an allosterically regulated, processive and mRNA cap-interacting deadenylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2013; 48:192-209.
- 56) Matthew J. Betts and Robert B. Russell. Amino Acids Properties and Consequences of Substitutions. *Bioinformatics for Geneticists*. Edited by Michael R. Barnes and Ian C. Gray. Copyright 2003 John Wiley & Sons, Ltd. ISBNs: 0-470-84393-4 (HB); 0-470-84394-2 (PB)
- 57) Martínez J, Ren YG, Nilsson P, Ehrenberg M, Virtanen A. The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation. *J Biol Chem.* 2001 Jul 27;276(30):27923-9.
- 58) He GJ, Yan YB. Self-association of poly(A)-specific ribonuclease (PARN) triggered by the R3H domain. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Sep 16;1844(12):2077-2085.
- 59) Zhang LN, Yan YB. Depletion of poly(A)-specific ribonuclease (PARN) inhibits

proliferation of human gastric cancer cells by blocking cell cycle progression. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Feb;1853(2):522-34.

60) Zhang and Yan. Depletion of poly(A)-specific ribonuclease (PARN) inhibits proliferation of human gastric cancer cells by blocking cell cycle progression. *Biochim Biophys Acta*.

61) Kim WC1, The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Dec;1796(2):99-113.