



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Επίδραση νουκλεοτιδίων και αναλόγων τους στην
πολυ(Α)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN)



Διπλωματική Εργασία - Μαραγκοζίδης Παναγιώτης
Λάρισα 2008



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 6598/1
Ημερ. Εισ.: 31-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2008
ΜΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087320

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Μπαλατσός Νικόλαος, *Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.*

Τριμελής Επιτροπή:

Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, *Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.,*

Κομιώτης Δημήτριος, *Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.,*

Μπαλατσός Νικόλαος, *Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ..*

Ευχαριστίες,

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων οι υποδείξεις, η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για την διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Τους καθηγητές μου για την αμέριστη συμπαράσταση και εμπιστοσύνη τους κατά τη διάρκεια της πτυχιακής εργασίας, τους διδακτορικούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές του Εργαστηρίου Λειτουργικής Βιοχημείας για τις συμβουλές και υποδείξεις τους, καθώς και τους συμφοιτητές μου με τους οποίους η συνεργασία ήταν παραπάνω από ευχάριστη και εποικοδομητική.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
Το mRNA παράγεται με μεταγραφή και μεταφράζεται.....	5
Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA.....	6
Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει κάλυμμα.....	7
Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται.....	7
Αποικοδόμηση του mRNA.....	9
Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA.....	9
Ένζυμα και έλεγχος αποαδενυλίωσης.....	12
Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A)-specific ribonuclease, PARN].....	13
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	17
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
Υλικά.....	18
Διαλύματα.....	20
Μέθοδοι.....	22
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	26
Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης.....	26
Έκφραση και απομόνωση PARN 74.....	26
Έκφραση και απομόνωση PARN 54.....	27
Πρότυπη καμπύλη πολυ(A).....	28
Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης.....	29
Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας παρουσία νουκλεοτιδίων και συνθετικών νουκλεοσιδίων.....	30
Τα νουκλεοτίδια κυτοσίνης αναστέλλουν την PARN ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής.....	31
Το συνθετικό νουκλεοσίδιο 3-deoxy-3-fluoro-glucopyranose (B6) αναστέλλει την PARN ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής.....	32
Η επίδραση των νουκλεοτιδίων κυτοσίνης αναστέλλεται από την αυξανόμενη συγκέντρωση ιόντων Mg(II).....	33
Η επίδραση του συνθετικού νουκλεοτιδίου 3-deoxy-3-fluoro-glucopyranose (B6) δεν επηρεάζεται από την αυξανόμενη συγκέντρωση ιόντων Mg(II).....	34
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	36
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	38

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ώριμα mRNAs των ευκαρυωτικών κυττάρων δημιουργούνται από μακρύτερα πρόδρομα μόρια με μια σειρά διεργασιών, όπως η προσθήκη του καλύμματος στο 5'-άκρο, το μάτισμα και η προσθήκη της πολυ(A) ουράς στο 3'-άκρο. Η αποικοδόμηση των mRNAs ξεκινά συνήθως με τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς. Ένα ένζυμο-κλειδί σε αυτή τη διεργασία της βράχυνσης είναι η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN, τη δραστικότητα της οποίας βοηθά η παρουσία του καλύμματος στο 5'-άκρο. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η πιθανή δράση νουκλεοτιδίων κυτοσίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα νουκλεοτίδια αυτά μπορούν να αναστείλουν αποτελεσματικά την PARN και έγινε κινητική ανάλυση για να προσδιορισθεί το είδος της αναστολής. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε μια σειρά ουσιών με αντικαρκινική δράση, ανάλογα νουκλεοσιδίων πυριμιδίνης που φέρουν τροποποιήσεις στο σάκχαρο και στη βάση. Μια από αυτές τις ενώσεις, μειώνει αποτελεσματικά τη δραστικότητα της PARN. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η δραστικότητα του ενζύμου μπορεί να ελεγχθεί από φυσικά νουκλεοτίδια *in vitro*, και υπαινίσσονται έναν απλό μηχανισμό ρύθμισης της αποικοδόμησης της πολυ(A) ουράς. Επιπλέον, τα ανάλογα νουκλεοσιδίων που εξετάστηκαν στην εργασία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αρχικές ενώσεις για ανάπτυξη νέων ενώσεων που θα μπορούν να ρυθμίζουν την PARN.

ABSTRACT

Mature eukaryotic messenger RNAs are generated from larger precursors, by a series of processing steps, i.e. capping, splicing and polyadenylation. mRNA degradation usually begins with the shortening of poly(A) tail. Poly(A)-specific ribonuclease, PARN, is a key enzyme in this process: it is a poly(A)-specific and cap-interacting 3'-exoribonuclease that efficiently degrades mRNA poly(A) tails. In this work, we study the effect of cytosine nucleotides and they could effectively inhibit PARN. We further synthesized and used modified nucleoside analogues with known anti-tumor growth effects. One of the modified nucleosides tested could effectively inhibit PARN activity. Furthermore, Mg(II) ions had no effect to the inhibitory effect of the nucleoside. Our data imply that PARN activity can be modulated by natural nucleotides *in vitro*, thus providing a simple regulatory mechanism of poly(A) tail degradation. Moreover, the analogues used in this work can serve as leading compounds for the development of novel regulators of PARN.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

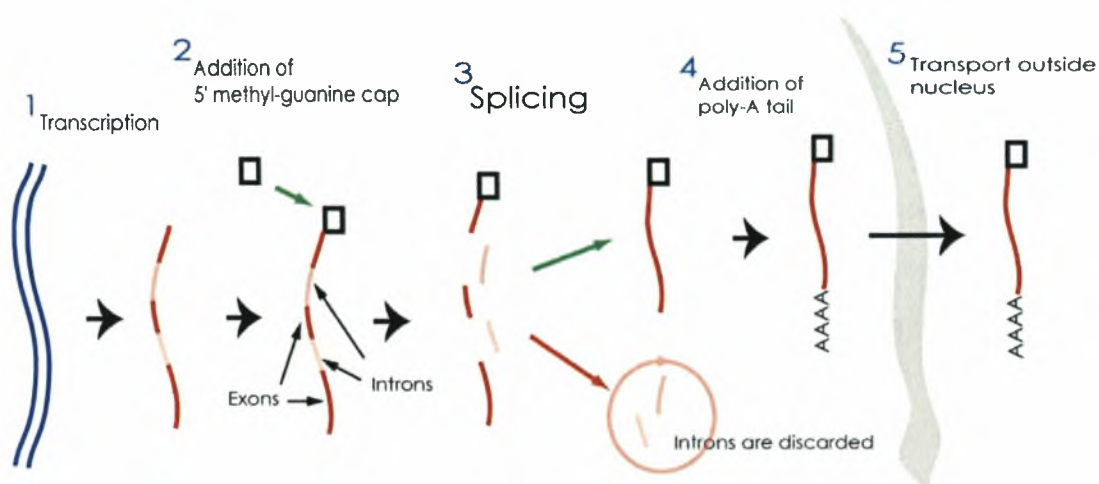
Το ριβονουκλεϊκό οξύ, RNA, είναι ένα μόριο κεντρικής σημασίας για τη γονιδιακή έκφραση. Αρχικά χαρακτηρίστηκε ως ενδιάμεσο προϊόν της πρωτεϊνσύνθεσης, όμως έχουν ανακαλυφθεί πολλά είδη RNA που έχουν δομικούς ή λειτουργικούς ρόλους σε άλλα στάδια της γονιδιακής έκφρασης. Η εμπλοκή του RNA σε πολλές λειτουργίες που αφορούν την γονιδιακή έκφραση υποστηρίζει την 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 είχε ως συνέπεια την αύξηση της προσαρμοστικότητας και πιθανόν της αποτελεσματικότητας. Οι τρεις κύριες τάξεις RNA είναι το αγγελιαφόρο (*mRNA*), το μεταφορικό (*tRNA*) και το ριβοσωμικό (*rRNA*) [1].

Το mRNA παράγεται με μεταγραφή και μεταφράζεται.

Η μεταγραφή (*transcription*) παράγει ένα μονόκλωνο μόριο RNA όμοιο στην αλληλουχία με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA, ενώ η μετάφραση (*translation*) μετατρέπει τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του mRNA στην αλληλουχία αμινοξέων που αποτελούν μια πρωτεΐνη. Ένα μόριο mRNA δε μεταφράζεται σε ολόκληρο το μήκος του, αλλά κάθε mRNA περιέχει τουλάχιστον μία κωδική περιοχή (*coding region*), η οποία σχετίζεται με μια πρωτεϊνική αλληλουχία μέσω του γενετικού κώδικα: κάθε νουκλεοτιδική τριπλέτα (*κωδικόνιο, codon*) της κωδικής περιοχής αντιστοιχεί σε ένα αμινοξύ. Μόνο η μία αλυσίδα του δίκλωνου DNA μεταγράφεται σε αγγελιαφόρο RNA. Η μία αλυσίδα του DNA η οποία κατευθύνει τη σύνθεση του mRNA δημιουργώντας ζεύγη συμπληρωματικών βάσεων αποκαλείται αλυσίδα-μήτρα ή αντινοσηματική αλυσίδα (*template - antisense strand*). Ο όρος «αντινοσηματική» χρησιμοποιείται γενικά για την περιγραφή μιας αλληλουχίας του DNA ή του RNA που είναι συμπληρωματική με το mRNA ενώ η αλυσίδα του DNA που φέρει την ίδια αλληλουχία με το mRNA (με εξαίρεση ότι περιέχει T αντί U) ονομάζεται κωδική ή νοσηματική αλυσίδα (*coding - sense strand*).

Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA.

Μετά τη σύνθεση του πρώιμου ευκαρυωτικού mRNA ακολουθεί η ωρίμανση που δίνει το τελικό ώριμο mRNA. Η ωρίμανση περιλαμβάνει την προσθήκη του καλύμματος στο 5' άκρο (*capping*), την προσθήκη της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο (*polyadenylation*) και το μάτισμα (*splicing*), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1. 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 περίπου 20min για να εξέλθει από τον πυρήνα. Μόλις το mRNA εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα και μεταφράζεται.



Εικόνα 1 Στάδια ωρίμανσης mRNA

Ο κύκλος ζωής του ευκαρυωτικού mRNA είναι πιο παρατεταμένος από αυτόν του βακτηριακού. Η μεταγραφή στα ζωικά κύτταρα συμβαίνει με τη ίδια περίπου ταχύτητα που συμβαίνει και στα βακτήρια, δηλαδή περίπου 40 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο. Πολλά ευκαρυωτικά γονίδια είναι μεγάλα: ένα γονίδιο 10.000bp χρειάζεται περίπου 5min για να μεταγραφεί. Η μεταγραφή του mRNA δεν τερματίζεται με την αποδέσμευση του ενζύμου της RNA πολυμεράσης από το DNA, αντίθετα, το ένζυμο συνεχίζει τη μεταγραφή και μετά το τέλος του γονιδίου. Μια συντονισμένη σειρά γεγονότων δημιουργεί το 3' άκρο του mRNA με αποκοπή ενός τμήματος και προσθήκη μιας αλληλουχίας πολυ(A) στο πρόσφατα δημιουργημένο 3' άκρο.

Το ευκαρυωτικό mRNA αποτελεί μόνο ένα μικρό ποσοστό το συνολικού κυτταρικού RNA, περίπου 3% της μάζας του. Ο χρόνος ημιζωής των mRNA στους ζυμομύκητες είναι

σχετικά μικρός και κυμαίνεται από 1 έως 60min. Υπάρχει μια αξιοσημείωτη αύξηση της σταθερότητας στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς: το mRNA των ζωικών κυττάρων είναι σχετικά σταθερό, με χρόνο ημιζωής μεταξύ 1 - 24 ωρών. Οι τροποποιήσεις και στα δυο άκρα του mRNA συνεισφέρουν σε αυτή τη σταθερότητα.

Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει κάλυμμα.

Το 5' κάλυμμα σχηματίζεται με την προσθήκη μιας τριφωσφορικής γουανοσίνης (*GTP*) στην πρώτη βάση του μεταγράφου μέσω ενός 5'-5' δεσμού, που είναι ένα τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο (συνήθως μια πουρίνη, A ή G). Η αρχική αλληλουχία του μεταγράφου μπορεί να αναπαρασταθεί ως:



Η προσθήκη της G στο 5' άκρο καταλύεται από ένα πυρηνικό ένζυμο, τη γουανυλυλο-τρανσφεράση. Η αντίδραση αυτή συμβαίνει τόσο γρήγορα 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 μία συμπύκνωση μεταξύ του GTP και του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου του RNA όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα:

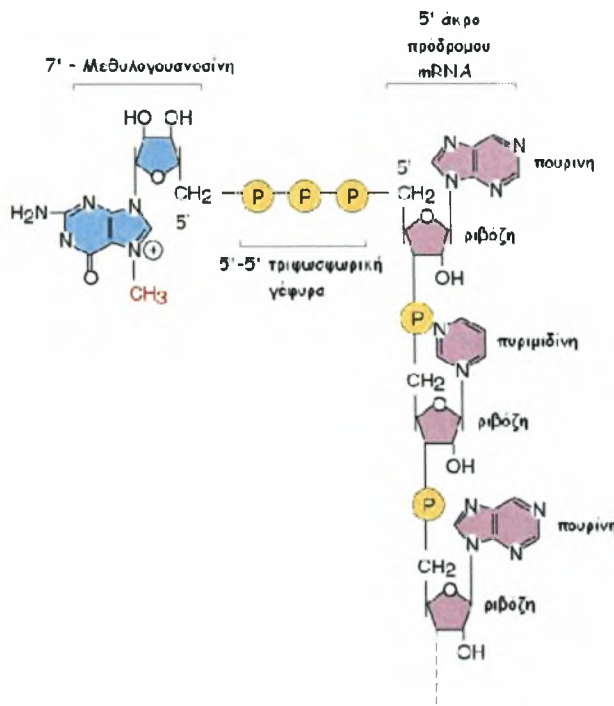


Το νέο κατάλοιπο G, που προστίθεται στο άκρο του RNA, έχει αντίστροφο προσανατολισμό (5'-5') από όλα τα άλλα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας. Το κάλυμμα αποτελεί υπόστρωμα για αρκετές αντιδράσεις μεθυλίωσης. Οι τύποι των καλυμμάτων διακρίνονται από το πλήθος των μεθυλιώσεων που φέρουν. Η πρώτη μεθυλίωση γίνεται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και αποτελείται από την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στη θέση N7 της ακραίας γουανίνης, μια αντίδραση που καταλύεται από την 7-μεθυλο-τρανσφεράση της γουανίνης. Ένα κάλυμμα που έχει μόνο αυτή τη μεθυλομάδα ονομάζεται κάλυμμα 0 (*cap 0*). Στην Εικόνα 2 παρουσιάζεται η δομή του καλύμματος μετά την προσθήκη μεθυλομάδων.

Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται.

Τα πρόδρομα mRNAs λαμβάνουν στο 3' άκρο τους μια χαρακτηριστική αλληλουχία από 250-300 νουκλεοτίδια αδενοσίνης, γνωστής ως πολυ(A) ουρά. Η μετα-μεταγραφική αυτή

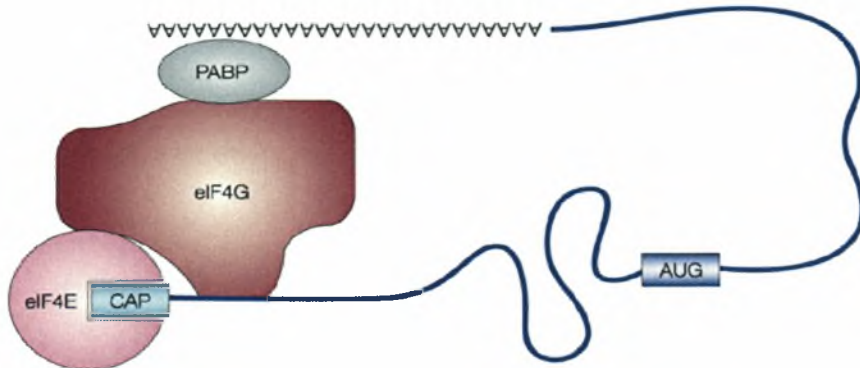
τροποποίηση ονομάζεται διεργασία του 3' άκρου (*3' end processing*) και είναι μια πολύπλοκη αντίδραση σε δύο στάδια όπου συμμετέχουν τουλάχιστον επτά πρωτεϊνικοί παράγοντες. Η αντίδραση της προσθήκης καταλύεται από το ένζυμο πολυ(A)-πολυμεράση.



Εικόνα 2 Το κάλυμμα στο 5' άκρο του mRNA

Ο ρόλος της πολυ(A) ουράς είναι κεντρικής σημασίας για το mRNA. Προστατεύει το 3' άκρο του mRNA από εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, συμμετέχει σε διεργασίες όπως η έξοδος στο κυτταρόπλασμα και από αυτή ξεκινά και το κύριο μονοπάτι αποικοδόμησης του mRNA. Στις διαδικασίες αυτές η πολυ(A) ουρά συμμετέχει κυρίως μέσω των πρωτεϊνικών παραγόντων που προσδένονται σε αυτή, και κυρίως την πολυ(A) προσδενόμενη πρωτεΐνη [*poly(A)-binding protein, PABP*]. Ομόλογα αυτής της πρωτεΐνης απαντώνται σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ένα μονομερές PABPC των 70 kDa συνδέεται σε περίπου 24 βάσεις της πολυ(A) ουράς. Έτσι, μια πολυ(A) ουρά από 240 νουκλεοτίδια φέρει περίπου 10 μόρια PABPC, δηλαδή περίπου 700 kDa. Ο βασικότερος ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι αφενός να προστατεύει την ίδια την ουρά από αποικοδόμηση και αφετέρου να αλληλεπιδρά με άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες ρυθμίζοντας έτσι την βιωσιμότητα του mRNA, όπως φαίνεται και σε επόμενες παραγράφους. Για παράδειγμα, η αλληλεπίδραση της PABP στον

παράγοντα έναρξης της μεταγραφής eIF4G δημιουργεί έναν κλειστό βρόχο, στον οποίο τα 5' και 3' άκρα του mRNA συγκρατούνται από το ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο και έτσι προσλαμβάνεται από τη μεταφραστική μηχανή όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.



Εικόνα 3 Η πρόσδεση της PABP στον παράγοντα έναρξης eIF4G δημιουργεί έναν κλειστό βρόχο

Η αφαίρεση της πολυ(A) ουράς αναστέλλει την έναρξη της μετάφρασης *in vitro* και η μείωση των επιπέδων της PABP έχει το ίδιο αποτέλεσμα σε ζυμομύκητες *in vivo*. Αυτές οι επιδράσεις μπορεί να εξαρτώνται από την πρόσδεση της PABP στο σύμπλοκο έναρξης, στο 5' άκρο του mRNA. Σε μερικές περιπτώσεις, τα mRNA αποθηκεύονται σε μη πολυαδενυλιωμένη μορφή και η πολυ(A) προστίθεται όταν είναι απαραίτητη η μετάφραση τους. Σε άλλες περιπτώσεις, τα πολυαδενυλιωμένα mRNA αποαδενυλιώνονται, με συνέπεια τη μείωση της μετάφρασής τους.

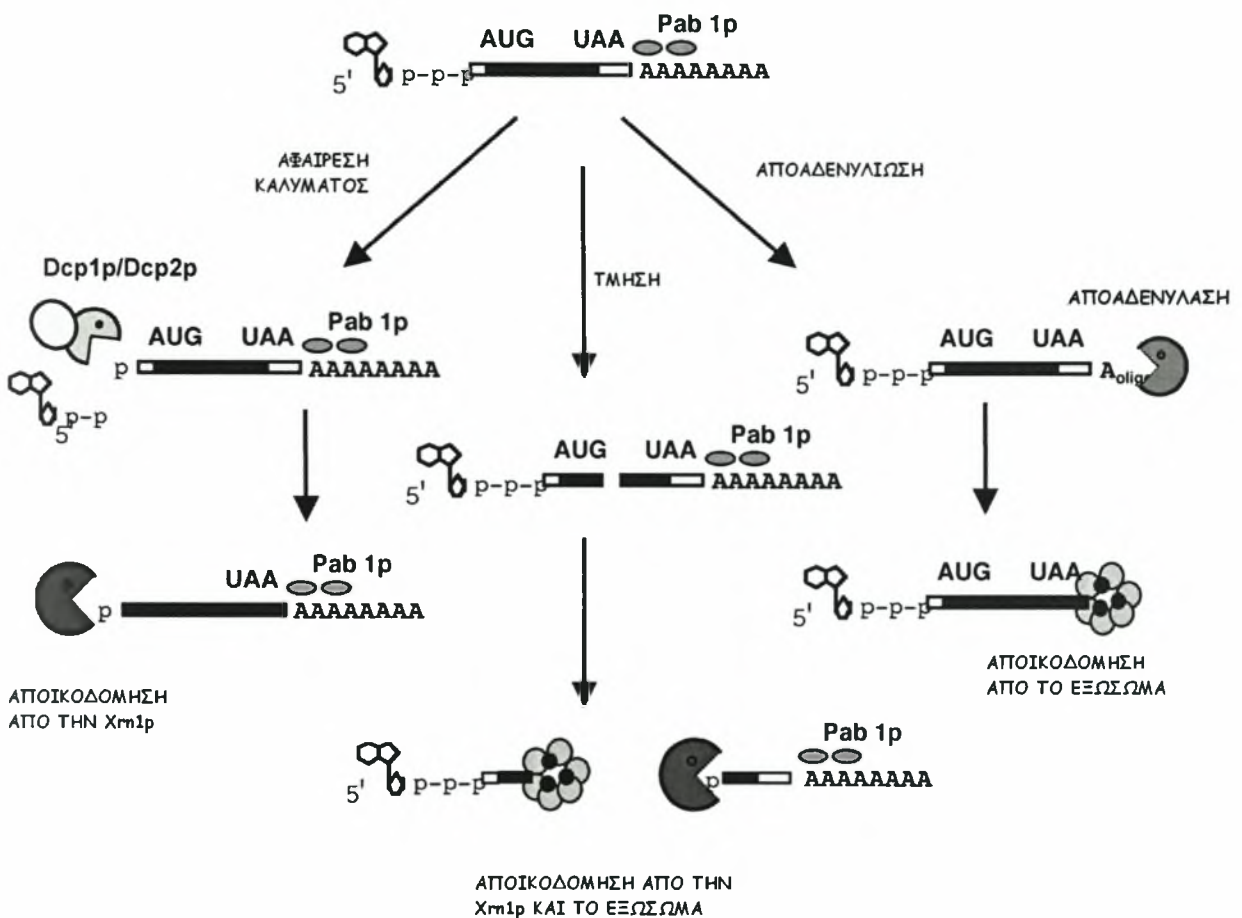
Αποικοδόμηση του mRNA

Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA

Η αποικοδόμηση του ευκαρυωτικού mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στον ποιοτικό έλεγχο της βιοσύνθεσης mRNA και στην αντι-ϊική προστασία [2,3,4].

Η αποικοδόμηση του mRNA συνήθως ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο του (αποαδενυλίωση, *deadenylation*) από διάφορες αποαδενυλάσες [5,6]. Ακολουθώντας την αποαδενυλίωση ένα ειδικό ένζυμο που αποτελείται από δύο υπομονάδες (Dcp1p και Dcp2p) αφαιρεί το κάλυμμα, εκθέτοντας το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την Xrn1p, μια 5'→3' εξωνουκλεάση. Εναλλακτικά, μετά την αποαδενυλίωση, το mRNA μπορεί

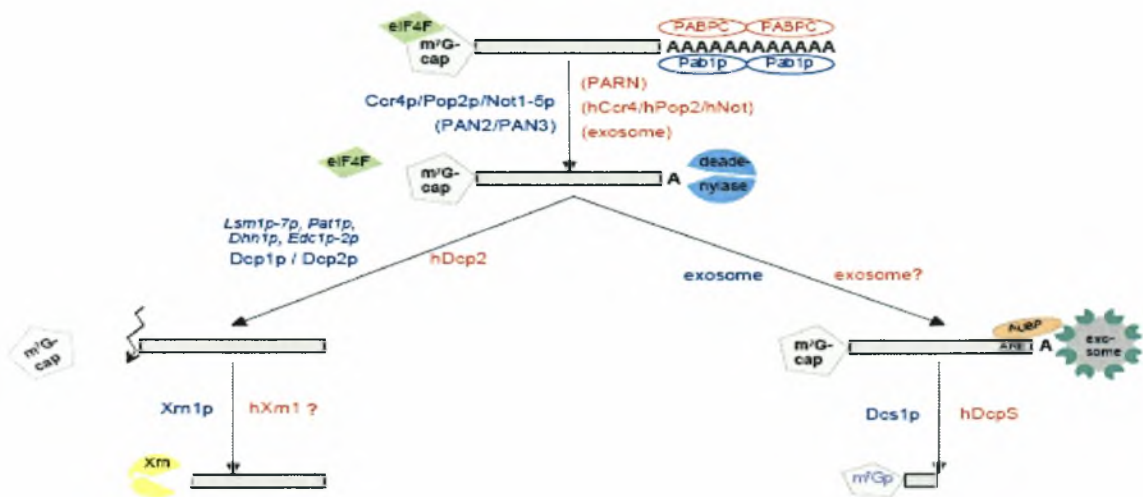
να αποικοδομηθεί με την κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών [7-10]. Στην περίπτωση αυτή το κάλυμμα υδρολύεται από το DcpS [11]. Ωστόσο η αποικοδόμηση ορισμένων mRNA μπορεί να ξεκινήσει με ενδονουκλεοτιδική διάσπαση είτε από ειδικές ενδονουκλεάσες είτε από το μηχανισμό του RNAi [12]. Επίσης τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν ειδικά μονοπάτια αποικοδόμησης που αναγνωρίζουν και αποικοδομούν ταχύτατα ανώμαλα mRNA χρησιμοποιώντας τα ίδια ένζυμα που αποικοδομούν φυσιολογικά mRNAs, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.



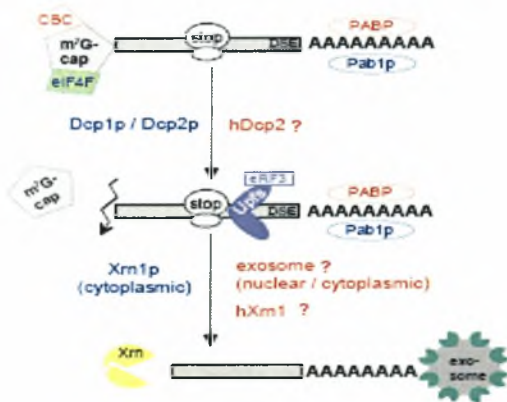
Εικόνα 4 Μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA

Για παράδειγμα, πρώιμα mRNAs που αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν την διαδικασία ωρίμανσης μπορεί να κατακρατηθούν στον πυρήνα και/ή να αποικοδομηθούν [13]. Εναλλακτικά τα κύτταρα μπορούν να υπολογίζουν την μεταφραστική χωρητικότητα των mRNA: σε μια διαδικασία που αναφέρεται και ως μη-νοηματικά διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (*nonsense-mediated decay, NMD*) τα mRNAs που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται. Τέτοια μετάγραφα

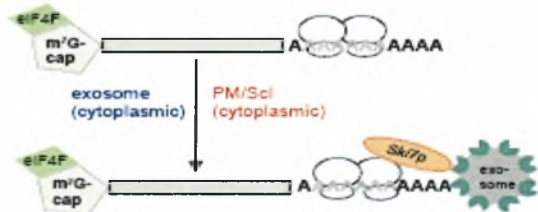
αποικοδομούνται είτε μετά από αφαίρεση του καλύμματος σε μία διαδικασία η οποία είναι ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση, είτε από επιτάχυνση της αποαδενυλίωσης και της 3'→5' αποικοδόμησης από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα [14-17]. Παρομοίως σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως αποικοδόμηση μη-τερματισμού (*nonstop decay, NSD*) τα mRNA στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα [18,19]. Οι διαδικασίες παρουσιάζονται σχηματικά στην Εικόνα 5.



Nonsense-mediated decay (NMD)



Nonstop-mediated decay (NSD)



Εικόνα 5 Τα mRNA τα οποία δεν περιέχουν, ή περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αποικοδομούνται ταχύτατα στους μύκητες και στα ανθρώπινα κύτταρα

Ένζυμα και έλεγχος αποαδενυλίωσης

Όπως αναφέρθηκε, η αποικοδόμηση του mRNA υπό φυσιολογικές συνθήκες συνήθως ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ(A) ουράς, μιας διεργασίας γνωστής ως αποαδενυλίωση. Έως τώρα έχουν ταυτοποιηθεί τρία διαφορετικά ένζυμα που αποικοδομούν πολυ(A) ουρές. Ο λόγος για την ύπαρξη διαφορετικών αποαδενυλασών δεν είναι ξεκάθαρος και έχει προταθεί πως κάθε μορφή του mRNA το καθιστά διαθέσιμο στην αντίστοιχη αποαδενυλάση. Επίσης μπορεί να σημαίνει ότι κάθε αποαδενυλάση μπορεί να στοχεύει σε διαφορετικές δεξαμενές mRNA [20-24].

Στο ζυμομύκητα το επικρατέστερο σύμπλοκο αποαδενυλάσης περιλαμβάνει δύο νουκλεάσες, την Ccr4p και την Pop2p, και άλλες πρωτεΐνες όπως τις Not1-Not5p, Caf4, Caf16, Caf40 και Caf30p [25,26]. Η Ccr4p είναι διατηρημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς με πολλαπλές γονιδιακές παραλλαγές στο γονιδίωμα των θηλαστικών και φυτών. Είναι μέλος της οικογένειας των ExoIII νουκλεασών [27] και χρησιμοποιεί ένα γλουταμινικό και μία ιστιδίνη για να ενεργοποιήσει μία υδροξυλική ομάδα την πυρηνόφιλη προσβολή στον φωσφοδιεστερικό δεσμό. Σύμφωνα με αυτό το καταλυτικό μηχανισμό, μεταλλάξεις στα καταλυτικά αμινοξέα καταργούν την δραστηριότητα του ενζύμου. Τα μεταλλάγματα αυτά δείχνουν ότι κάτω από τις συνθήκες που έχουν εξεταστεί έως τώρα στη ζύμη, η Ccr4p φαίνεται να έχει τον κυριότερο ρόλο στο σύμπλοκο αποαδενυλίωσης [28-30]. Η άλλη πρωτεΐνη στο σύμπλοκο με δραστηριότητα αποαδενυλάσης είναι η Pop2p. Η Pop2p είναι επίσης ευρέως συντηρημένη ανάμεσα στους σύνθετους ευκαρυωτικούς οργανισμούς με πολλαπλές γονιδιακές παραλλαγές. Σύμφωνα με μελέτες πολλαπλής ομοπαράθεσης η Pop2p ανήκει στην οικογένεια των RNaseD νουκλεασών οι οποίες έχουν μηχανισμό δράσης και δομή παρόμοια με αυτή της περιοχής της DNA πολυμεράσης με δράση 3'→5' εξωδεοξυριβονουκλεάσης. Έχουν τις ίδιες αναδιπλώσεις, περιέχουν δύο θέσεις σύνδεσης για δισθενή ιόντα και έχουν τον ίδιο καταλυτικό μηχανισμό με τον οποίο υδρολύουν τον φωσφοδιεστερικό δεσμό [31-34]. Η Pop2 φαίνεται να έχει δύο λειτουργικούς ρόλους: α) η δράση νουκλεάσης και η εναλλαγή των καταλοίπων του ενεργού κέντρου δείχνει ότι κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορεί να είναι υπεύθυνη για την αποαδενυλίωση του mRNA. Έτσι το σύμπλοκο Ccr4-Pop2-Not μπορεί να έχει πολλαπλές νουκλεάσες που ωστόσο ρυθμίζονται διαφορετικά και β) η Pop2 διεγείρει την δράση της Ccr4 αποαδενυλάσης είτε σταθερο-

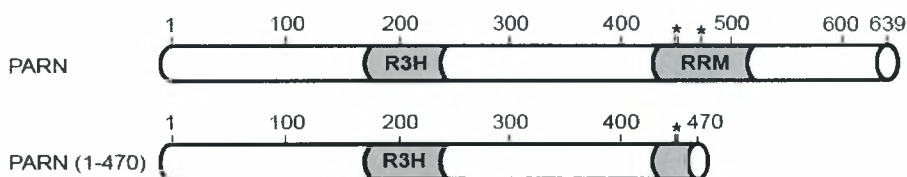
ποιώντας το σύμπλοκο αποαδενυλάσης είτε προάγοντας την αλληλεπίδραση με το mRNA. Αυτός ο δεύτερος ρόλος βασίζεται σε παρατηρήσεις στη ζύμη όπου παρόλο που η έλλειψη της Pop2 προκαλεί αλλαγές στην αποαδενυλίωση, η έλλειψη της καταλυτικής της δράσης μόνο δεν επιφέρει καμία αλλαγή στον φαινότυπο.

Το δεύτερο ενζυμικό σύμπλοκο που καταλύει την αποαδενυλίωση του mRNA είναι ένα διατηρημένο σύμπλοκο και αποτελείται από τις πρωτεΐνες Pan2p και Pan3p. Ο ρόλος των Pan στην αποαδενυλίωση έχει δειχθεί με στελέχη ζύμης Ccr4Δ όπου απουσιάζει ο κύριος τρόπος αποαδενυλίωσης, οπότε η αποαδενυλίωση εξαρτάται από την Pan2p. Στη ζύμη και πιθανόν σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η PAN εμπλέκεται σε ένα πρώιμο στάδιο της ζωής του mRNA όπου μία αρκετά μακριά πολυ(A) ουρά βραχύνεται μέχρι να φτάσει τα 55-75 νουκλεοτίδια, αριθμός που κάθε φορά εξαρτάται από το συγκεκριμένο mRNA [35]. Οι Pan2p και Pop2p φαίνεται να παίζουν ρόλο στην ειδική ρύθμιση του mRNA της RAD5 σε απόκριση σε αντιγραφικό στρες [36]. Αναλύσεις αλληλουχιών δείχνουν ότι η καρβοξυτελική περιοχή της Pan2p, όπως και της Pop2p ανήκει στην οικογένεια των RNaseD, και περιλαμβάνουν τα καταλυτικά κατάλοιπα και μηχανισμό υδρόλυσης που εξαρτάται από δύο δισθενή ιόντα. Ο πιθανός ρόλος της Pan3p είναι η διέγερση της Pan2p. Η Pan3p αλληλεπιδρά με την Dun1p, που φαίνεται να παίζει ρόλο στην ρύθμιση του mRNA της RAD5. Επιπλέον η Pan3p αλληλεπιδρά με την Mex67p, μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην εξαγωγή του mRNA και μπορεί να ευθύνεται για την παράδοση του Pan2/Pan3p στο νεοσυντιθέμενο mRNA για την αρχική αποαδενυλίωση της πολυ(A) ουράς [37].

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

Το τρίτο κύριο ένζυμο που αποικοδομεί πολυ(A) ουρές mRNA είναι η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [*poly(A) specific ribonuclease, PARN*] με την οποία και θα ασχοληθούμε στην παρούσα διπλωματική εργασία. Η PARN αρχικά απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε σε κύτταρα θηλαστικών [38-39]. Αναλύσεις αλληλουχιών δείχνουν ότι η PARN όπως και η Pan2p και Pop2p ανήκει στην οικογένεια των RNaseD νουκλεασών που φέρει το χαρακτηριστικό μοτίβο DEDD. Είναι συντηρημένη σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς αλλά απουσιάζει από το *S.cerevisiae* και την *D. melanogaster* και μεταλλάξεις στα προβλεπόμενα καταλυτικά κατάλοιπα (*DEDD*) αναστέλλουν τη δράση της [40,41]. Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η ενεργότητα της PARN εξαρτάται από δισθενή μεταλλικά

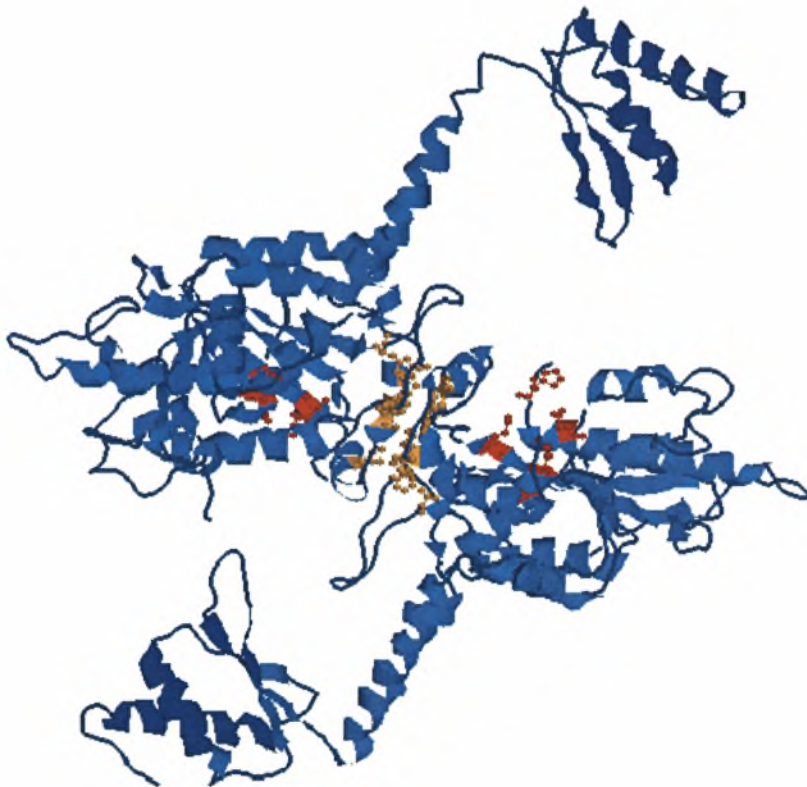
ιόντα ενώ μεγαλύτερη δραστικότητα έχει παρουσία ιόντων Mg(II) τα οποία πιθανόν βρίσκονται στο ενεργό κέντρο παίζοντας καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό της κατάλυσης. Το ελάχιστο μήκος υποστρώματος είναι τα δι- ή τρι- νουκλεοτίδα αδενοσίνης ανάλογα με το ποιο μεταλλικό ιόν βρίσκεται στο ενεργό κέντρο. Το ένζυμο στον άνθρωπο απαντά σε δύο ισόμορφες, μία πυρηνική 74 kDa και μία κυτταροπλασματική 54 kDa (62 kDa στον *Xenopus laevis*). Η τελευταία είναι πρωτεολυμένο παράγωγο της πρώτης από το οποίο απουσιάζει το εύκαμπτο καρβοξυτελικό άκρο. Η περιοχή αυτή ευθύνεται και για την μετακίνηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα αφού περιέχει την NLS (*nuclear localization signal*) αλληλουχία. Η PARN επίσης περιέχει ένα μοτίβο αναγνώρισης RNA (*RNA recognition motif, RRM*), το οποίο σημειώνεται πως απουσιάζει από την κρυσταλλική δομή. Το RRM έχει ιδιότητες πρόσδεσης του πολυ(A) αλλά και του καλύμματος [42], καθώς και μια συντηρημένη R3H περιοχή που φαίνεται να έχει δομή όμοια με αυτήν της IF3 καρβοξυτελικής περιοχής [43]. Η R3H περιοχή προσδέεται σε μονόκλιωνα νουκλεϊκά οξέα και πιθανόν κατευθύνει την PARN στο πολυαδενυλιωμένο mRNA (Εικόνα 6).



Εικόνα 6 Οι δύο isoμορφές της ανθρώπινης PARN. Σημειώνονται οι RRM και R3H περιοχές. Με αστερίσκο δηλώνονται σημαντικά αμινοξέα που συμμετέχουν στην πρόσδεση του καλύμματος

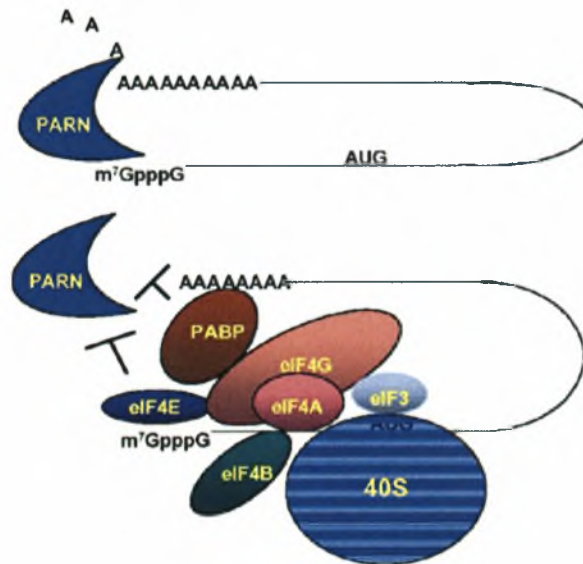
Η κρυσταλλική δομή της ανθρώπινης PARN, από την οποία λείπει το καρβοξυτελικό άκρο (κατάλοιπα 1-430 σε σύνολο 639), έδειξε πως το ένζυμο είναι ομοδιμερές, όπου κάθε υπομονάδα αναδιπλώνεται σε δύο περιοχές, μία συντηρημένη και την περιοχή της νουκλεάσης. Το ενεργό κέντρο περιέχει τέσσερα συντηρημένα κατάλοιπα, ένα γλουταμικό και τρία ασπαρτικά οξέα (*Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382*) κατά το μοτίβο DEDD, τα οποία κατευθύνουν κύρια καταλυτικά δισθενή ιόντα, όπως Mg²⁺. Παρόλα αυτά η κρυσταλλική δομή της κολοβωμένης PARN δεν έδειξε την ύπαρξη ιόντων Mg(II) στο ενεργό κέντρο του ενζύμου [40,43].

Η δραστηριότητα της PARN φαίνεται πως ρυθμίζεται με τουλάχιστον έξι διαφορετικούς τρόπους: (α) διέγερσή της μέσω απευθείας αλληλεπίδρασης της PARN και του καλύμματος στο 5' άκρο [21,22,44,45], (β) αναστολή της από μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια πουρινών καθώς και από ένα ανάλογο του καλύμματος [44], (γ) αναστολή από την κυτταροπλασματική πολυ(A)-προσδεδόμενη πρωτεΐνη C (*PABPC*) [39,45], πιθανόν λόγω της πρόσδεσης και αλληλεπίδρασης της τελευταίας με την πολυ(A) ουρά, (δ) αλληλεπίδραση της PARN με την CUG-BP mRNA-προσδεδόμενη πρωτεΐνη, η οποία είναι το ανθρώπινο ανάλογο της πρωτεΐνης του *Xenopus* EDEN-BP· η αλληλεπίδραση αυτή διεγείρει την βράχυνση των πολυ(A) ουρών [46], (ε) διέγερση της αποικοδόμησης του πολυ(A) από πρωτεΐνες που προσδέονται σε περιοχές γνωστές ως ARE [41], (στ) συναγωνισμός μεταξύ της PARN και του eIF4E για την πρόσδεση του καλύμματος [45]. Στην Εικόνα 8 συνοψίζονται μερικοί από τους προαναφερθέντες μηχανισμούς ρύθμισης της PARN.



Εικόνα 7 Κρυσταλλική δομή της nPARN (αμινοξέα 1-430).
Περιοχή νουκλεάσης, περιοχή R3H, περιοχή διμερισμού.

Η PARN φαίνεται επίσης να είναι απαραίτητη για ταχεία αποαδενυλίωση, επαγόμενη από την πλούσια σε AU αλληλουχία, την ARE binding protein τριστετραπρόληνη [41,47]. Ωστόσο η PARN βρίσκεται και σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στο *Xenopus laevis* η PARN απαιτείται σε έναν εξελικτικά διατηρημένο μηχανισμό κατά τον οποίο αποσιωπούνται τα μητρικά mRNA κατά την ωρίμανση του ωαρίου. Στο *Arabidopsis thaliana* φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της ανάπτυξης και στην αποαδενυλίωση μιας συγκεκριμένης ομάδας mRNA [48].

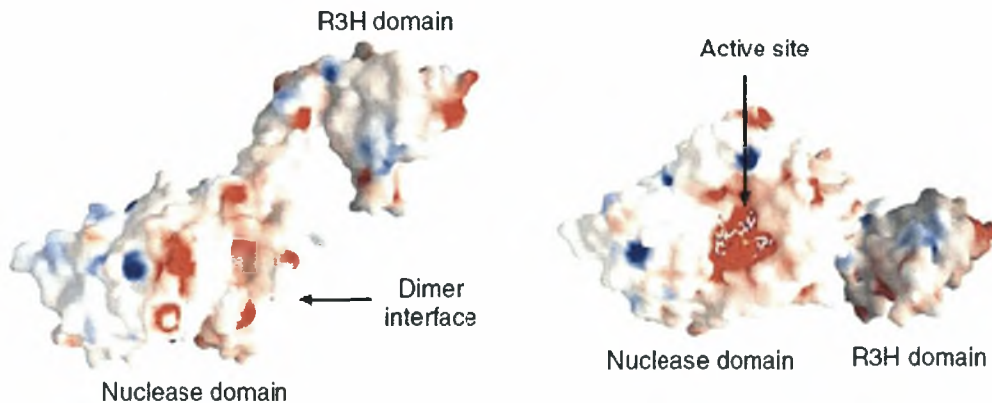


Εικόνα 8 Ρύθμιση της δράσης της PARN. Σημειώνεται ο ανασταλτικός ρόλος των eIF4E και PABP

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η πολύ(A) ουρά παίζει σημαντικό ρόλο στην σταθερότητα των αγγελιοφόρων RNA (mRNA). Η αποικοδόμηση των mRNAs ξεκινά στις περισσότερες των περιπτώσεων με τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς, όπου στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το ένζυμο-κλειδί για αυτή τη διεργασία είναι η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN. Είναι γνωστό πως η PARN δεσμεύει το κάλυμμα στο 5' άκρο των mRNAs και πρόσφατα δείχθηκε πως τα νουκλεοτίδια πουρινών αναστέλλουν την PARN *in vitro*.

Σκοπός της εργασίας είναι να συμβάλλει στην αποκάλυψη και τη μελέτη μηχανισμών ρύθμισης του ενζύμου από μικρά μόρια όπως τα νουκλεοτίδια. Επίσης αποσκοπεί στη χρήση συνθετικών αναλόγων των νουκλεοτιδίων με σκοπό τη ρύθμιση της δράσης του ενζύμου και κατ' επέκταση την παρέμβαση στο χρόνο ζωής των mRNAs. Οι τελευταίες αναμένεται να λειτουργήσουν ως πλατφόρμα για περαιτέρω σύνθεση αναστολέων του ενζύμου.



Εικόνα 9 PARN54 βαμμένη από μπλε (βασικά) έως κόκκινο (όξινα), φαίνεται μόνο η μια υπομονάδα. Αριστερά: πλάγια όψη όμοια με της εικόνας 7. Δεξιά: κάτοψη της ίδιας υπομονάδας περιστρεφόμενη κατά 90⁰ στον y άξονα

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά

Χημικά

Ammonium Persulfate (<i>APS</i>)	SIGMA
Bovine Serum Albumin (<i>BSA</i>)	New England Biolabs
Coomasie Brilliant Blue	Fluka
Diethylpyrocarbonat (<i>DEPC</i>)	Research Organics
Dithiothreitol (<i>DTT</i>)	SERVA
DMSO	Panreac
EDTA	Panreac
HCl	Merck
HEPES	SERVA
Isopropyl ThioGalactosyl (<i>IPTG</i>)	Fermentas
KCl	Merck
LB Agar	Scharlau
LB Broth	Scharlau
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Panreac
MOPS	Alfa Aesar
NaCl	Panreac
NaHCO ₃	Merck
NaOH	Merck
PEG 40.000	SERVA
Phenylmethansulfonylfluorid (<i>PMSF</i>)	SERVA
SDS (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)	SIGMA

TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine)	Research Organics
Tris base	Merck
Αγαρόζη (<i>Agarose</i>)	SeaKem
Αιθανόλη	Panreac
Ακρυλαμίδη (<i>Acrylamide</i>)	SIGMA
Β-μερκαπτοαιθανόλη	Riedel de Haen
Βρωμιούχο αιθίδιο	Merck
Γλυκερόλη (<i>glucerosl</i>)	Panreac
Δις-ακρυλαμίδιο (<i>Bis-acrylamide</i>)	SIGMA
Ισοπροπανόλη (<i>Isopropanole</i>)	Scharlau
Οξικό οξύ	Merck
Χλωραμφαινικόλη	SIGMA
Βακτηριακά στελέχη	
BL21	(DE3) pUBS E.coli B, F ⁻ dcm ompT hsdS _(r_B+m_B+) gal λ(DE3)
Θρεπτικά υλικά	
LB Broth	Scharlau
LB Agar	Scharlau
Πρωτεΐνες και ένζυμα	
His6-hPARN 74 kDa	Από E.coli BL21
His6-hPARN 54 kDa	Από E.coli BL21
BSA Fraction V	Merck
Rnasin	Biolabs

Νουκλεοτίδια και συνθετικά νουκλεοσίδια

CMP SIGMA

CTP SIGMA

Πολυαδενυλικό οξύ SIGMA

1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-cytosine (*A6*)

3-deoxy-3-fluoro-glucopyranose (*B6*)

Τα συνθετικά νουκλεοσίδια *A6* και *B6* παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του δρ. Δημητρίου Κομιώτη.

Πλασμίδια

pET33 PARN 74 και pET33 PARN 54 (NOVAGEN). Ο πλασμιδιακός φορέας με το γονίδιο της PARN 74-54 παραχωρήθηκε από τον καθηγητή Anders Virtanen (Uppsala University, Ουψάλα, Σουηδία).

Υλικά χρωματογραφίας

Ni²⁺-NTA Agarose QIAGEN

Υλικά διαπίδυσης

Μεμβράνη διαπίδυσης SIGMA

Διαλύματα

Θρεπτικά υλικά

- Υγρό θρεπτικό μέσο (LB Broth) pH 7,2
- Στερεό θρεπτικό μέσο (LB Agar) pH 7,2
- SOC medium (υγρό θρεπτικό μέσο) pH 7 για τελικό όγκο 100ml

Διαλύματα την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

- Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης (50x): Tris base 24,2% v/w, Οξικό οξύ 5,71% w/w, EDTA 0,05M, pH 8,6

- Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων (6x): Bromophenol Blue 0,09%, Xylene Cyanol 0,09%, Γλυκερόλη 60%, EDTA 60mM

Διαλύματα για απομόνωση πρωτεΐνης

- Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCl, 0,1% Triton X-100, 10% γλυκερόλη, 2mM μερκαπτοαιθανόλη, 2,5mM ιμιδαζόλιο, PMSF 0,1mM, λυσοζύμη)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCl, 10% γλυκερόλη, 5mM ιμιδαζόλιο)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCl, 10% γλυκερόλη, 150mM ιμιδαζόλιο)

Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου

- Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (10x): Tris base 1,5%, Γλυκίνη 7,2% v/w, SDS 0,5%, pH 8,3

Διαλύματα stock για πήκτωμα ακρυλαμίδιου

- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl 1,5M, pH 8,8
- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl 0,5M, pH 6,8
- SDS 10% v/w
- Ακρυλαμίδιο 30% v/w (ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο : 29/1) σε ddH₂O

Διαλύματα για το πήκτωμα ακρυλαμίδιου

Ανάλογα με την συσκευή και την περιεκτικότητα ακρυλαμίδιου που θα χρειαστούμε θα αναζητήσουμε τους πίνακες για την αναλογία των διαλυμάτων stock που θα πρέπει να αναμειξουμε και προσθέτουμε στο τέλος τους καταλύτες APS 10% και TEMED.

Διαλύματα για βαφή του gel

- Διάλυμα χρώσης Coomassie Brilliant Blue G250 0,1% w/v, ισοπροπανόλη 33%, οξικό οξύ 2%
- Διάλυμα αποχρωματισμού, Ισοπροπανόλη 9%, Οξικό οξύ 1%

Διαλύματα για την μέτρηση της ενεργότητας της PARN σύμφωνα με το άρθρο

- Νερό ελεύθερο νουκλεασών (0,05% DEPC, ο/π και αποστείρωση, αποθήκευση στο σκοτάδι)
- Διάλυμα αντίδρασης (1,5mM MgCl₂, 100mM KCl, 20mM HEPES-KOH pH 7, 0,2mM EDTA, 0,25mM DTT, 10% γλυκερόλη)
- Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου (0,0012% κυανό του μεθυλενίου, 0,1M MOPS-KOH pH7,5, 2mM EDTA)
- Διάλυμα πολυ(A) 100μg/ml. Διάλυμα αποθήκευσης πολυ(A) (10mg/ml) αραιώνεται κατάλληλα σε διάλυμα αντίδρασης.

Μέθοδοι

Έκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένης PARN74-54 kDa

Μετασχηματισμός BL21 με pET33 PARN 74-54

Σε 200μl επιδεικτικών κυττάρων BL21, γίνεται προσθήκη 5μl του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA pET33 PARN 74-54 το οποίο εκφράζει την PARN η οποία φέρει 6 ιστιδίνες στο αμινοτελικό της άκρο. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση στον πάγο για 30min και ακολούθως στους 42°C για 1,5min. Έπειτα τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 2min και εν συνεχεία προστίθεται σε κάθε καλλιέργεια 800μl υλικό SOC. Ακολουθεί επώαση για 1,5 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση (160rpm). Τέλος, επιστρώνονται 300μl της μετασχηματισμένης καλλιέργειας σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB agar το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό, ανάλογα με τα γονίδια ανθεκτικότητας που διαθέτει το εκάστοτε πλασμίδιο που χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό (*καναμυκίνη*) και χλωραμφαινικόλη στην οποία ήδη έχουν ανθεκτικότητα τα BL21 από μόνα τους. Ακολουθεί επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 12-14h (ο/π).

Σε 5ml LB Broth με χλωραμφαινικόλη (*100mg/ml*) σε τελική συγκέντρωση 25mg/ml και καναμυκίνη (*100mg/ml*) σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml, ενοφθαλμίζονται μετασχηματισμένα κύτταρα BL21 και επωάζονται για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210rpm). Ακολουθεί μεταφορά των 5ml της ο/π καλλιέργειας σε 400ml φρέσκου θρεπτικού μέσου LB

Broth με χλωραμφαινικόλη και καναμυκίνη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm (OD_{600}) και επώαση των καλλιιεργειών στους 37°C υπό ανάδευση μέχρι το OD_{600} να φτάσει περίπου το 0,6 που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Προσθέτουμε IPTG (*Isopropyl Thio Galactosyl, 1M*) σε τελική συγκέντρωση 0,5mM και 1mM, το οποίο επάγει την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Οι καλλιέργειες επωάζονται υπό ανάδευση είτε για 4 ώρες στους 37° για την PARN 74 είτε ο/π σε θερμοκρασία δωματίου για την PARN54. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4.000rpm για 20min στους 4°C, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αποθηκεύεται στους -80°C.

Απομόνωση της PARN

Ομογενοποίηση των κυττάρων

Το καταψυγμένο ίζημα των κυττάρων διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης (περίπου 10mL). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διαδικασία του σπασίματος των κυττάρων με υπέρηχους (*sonicator*) μέσα σε 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.

Χρωματογραφία συγγένειας

Το υπερκείμενο απομακρύνεται και αναμιγνύεται με ρητίνη νικελίου αγαρόζης (*NTA-Ni agarose*), η οποία έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης και αναδεύεται ήπια για μια 30min στους 4°C. Η πρωτεΐνη δεσμεύεται στην ρητίνη μέσω σύνδεσης των ιστιδινών που περιέχει στο αμινοτελικό άκρο με τα άτομα του νικελίου. Το διάλυμα περνιέται προσεκτικά από στήλη η οποία κατακρατεί την ρητίνη. Η στήλη ξεπλένεται με 10ml ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (*wash*). Η έκλουση (*elution*) της πρωτεΐνης έγινε με 6ml ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης το οποίο περιέχει ιμιδαζόλιο σε συγκέντρωση 150mM. Ο ρόλος του ιμιδαζολίου είναι να δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα ιόντα νικελίου και να ανταγωνίζεται για δέσμευση με τις πρωτεΐνες συνδεδεμένες με ιστιδίνη (*His-tagged*). Συλλέγονται έξι κλάσματα από τη στήλη (E1-E6). Από κάθε βήμα της απομόνωσης κρατάμε δείγματα για μέτρηση ολικής πρωτεΐνης και ηλεκτροφόρηση.

Μέτρηση της ενεργότητας της PARN με κυανό του μεθυλενίου

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στη μείωση της απορρόφησης του πολυ(A) στα 662nm όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του [49,50]. Στην 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 1. Μετά την προσθήκη του διαλύματος κυανού του μεθυλενίου τα δείγματα επωάστηκαν για 15min στους 30°C 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 μπορούμε να υπολογίζουμε την ποσότητα του πολυ(A) που υδρολύεται κατά τις ενζυμικές αντιδράσεις.

Πίνακας 1

Τελική συγκέντρωση πολυ(A) (μg/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. Για να υπολογίσουμε τον βέλτιστο χρόνο αντίδρασης και την κατάλληλη ποσότητα ενζύμου, εκτελούμε πειράματα ενζυμικής δράσης κάτω από μεταβαλλόμενες συνθήκες. Μετά το πέρας του χρόνου αντίδρασης, η αντίδραση σταματά με προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος κυανού του μεθυλενίου και τα δείγματα φωτομετρούνται στα 662nm.

Κινητική με αυξανόμενες συγκεντρώσεις πολυ(A)

Έχοντας υπολογίσει με πειράματα χρονοκαμπύλης την ποσότητα του ενζύμου και τον απαιτούμενο χρόνο αντίδρασης ώστε οι τιμές που θα λαμβάνουμε να βρίσκονται στη γραμμική περιοχή της χρονοκαμπύλης μπορούμε να κατασκευάσουμε καμπύλη Michaelis-Menten με συγκεντρώσεις πολυ(A) από 7,5 -60,0 $\mu\text{g/ml}$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

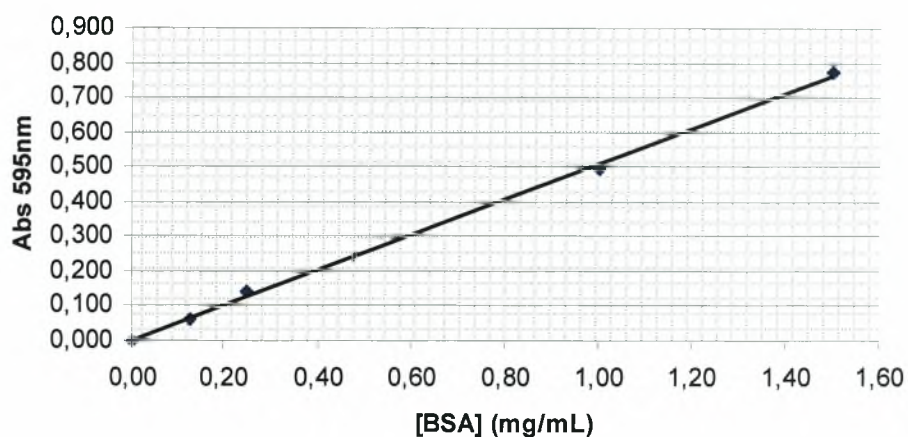
Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης

Παρασκευάστηκε stock διάλυμα BSA 2mg/mL. Από αυτό φτιάχτηκαν διαλύματα συγκέντρωσης από 0 μέχρι 2,00mg/mL και επώαστηκε με Bioquant για τουλάχιστον 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Η πρότυπη καμπύλη έγινε μετρώντας τις απορροφήσεις των διαλυμάτων φωτομετρικά στα 595nm. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 10, προκύπτει μια γραμμική σχέση με εξίσωση:

$$A = 0,5092 * C(\text{mg/mL}) + 0,0008$$

Με την συγκεκριμένη εξίσωση θα υπολογίσουμε την ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών στα δείγματα στα διάφορα στάδια της απομόνωσης.

Προτυπη καμπύλη πρωτεΐνης

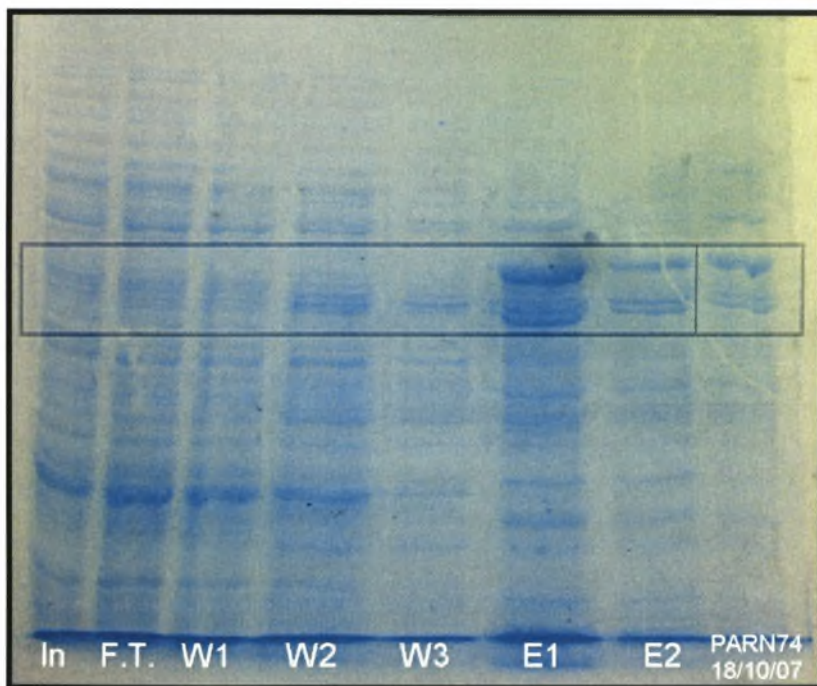


Εικόνα 10 Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Έκφραση και απομόνωση PARN 74

Μετασχηματίζουμε κύτταρα E.coli BL21 με πλασμίδιο υπερέκφρασης pET33 PARN 74. Ενοφθαλμίζουμε τα μετασχηματισμένα κύτταρα σε καλλιέργεια LB Broth των 5mL (37°C, 210rpm, o/n) και έπειτα μεταφέρουμε την καλλιέργεια σε φρέσκο θρεπτικό 400mL. Όταν η απορρόφηση της καλλιέργειας φτάσει $A_{600}=0,640$ επάγουμε την έκφραση της PARN με χρήση IPTG τελικής συγκέντρωσης 0,5mM για 4h στους 37°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της καλλιέργειας (4.000rpm, 20min, 4°C) και συλλογή του ιζήματος. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε

ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης όπου πραγματοποιείται σπάσιμο των κυττάρων με υπέρηχους. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται (12.000rpm, 60min, 4°C) και συλλέγεται το υπερκείμενο για απομόνωση του ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας (*NTA-Ni agarose*). Συλλέγονται 3 κλάσματα έκπλυσης (W1-W3) και 5 κλάσματα έκλουσης (E1-E5). Η μέτρηση ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης από τα κλάσματα της χρωματογραφίας έγινε με τη μέθοδο Bradford και η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της PARN74 έγινε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 7,5% (*SDS-PAGE*). Τα δείγματα E1 και E2 μεταφέρθηκαν για διαπίδυση σε διάλυμα αντίδρασης (*o/n*) για την απομάκρυνση του ιμιδαζολίου. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford ήταν 0,160mg/ml. Στην Εικόνα 11 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων της χρωματογραφίας απ' όπου απουσιάζουν τα κλάσματα E3-E5 καθώς δεν ανιχνεύθηκε πρωτεΐνη. Η PARN 74 μοριακού βάρους 74 kDa εντοπίζεται μέσα στο ορθογώνιο σχήμα.

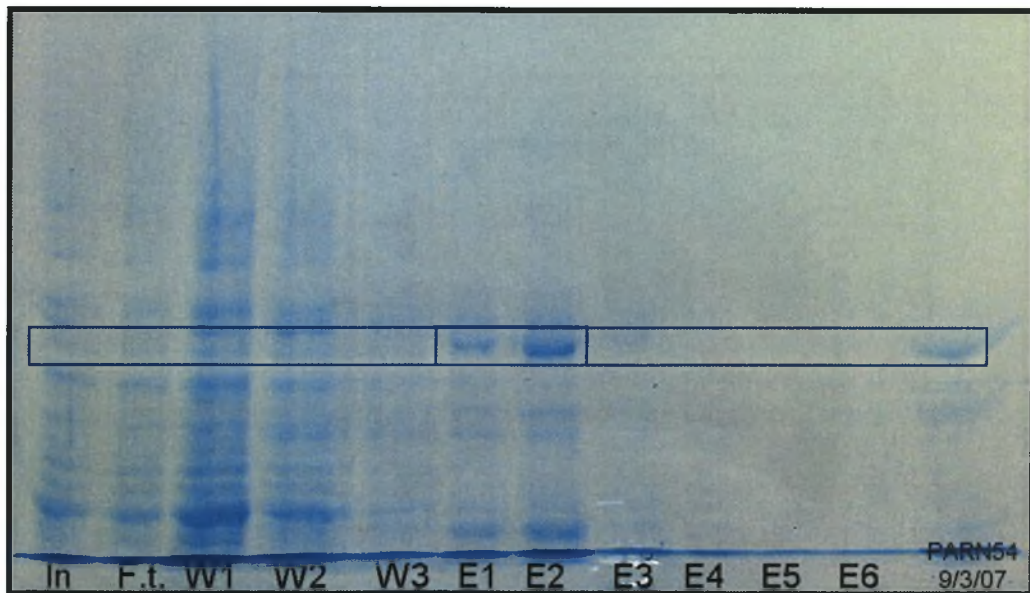


Εικόνα 11 Ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της PARN74. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue. In: Δείγμα ιζήματος, Ft: Δείγμα που δεν προσδέθηκε στην στήλη, W1-W3: Δείγματα έκπλυσης, E1, E2: Δείγματα έκλουσης από την στήλη, PARN74 18/10/07: παλαιότερο ένζυμο που χρησιμοποιείται ως δείκτης μοριακού βάρους

Έκφραση και απομόνωση PARN 54

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για την έκφραση και απομόνωση της PARN 54 με κάποιες τροποποιήσεις για καλύτερη έκφραση. Η επαγωγή της έκφρασης της PARN 54 έγινε

όταν η απορρόφηση της καλλιέργειας έφτασε $A_{600}=0,665$ σε θερμοκρασία 25°C για 12h (ο/π) με 1,0mM IPTG. Παρόλα αυτά, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα δείγματα της έκλουσης ήταν αρκετά μικρότερη από αυτήν της PARN 74 (0,080mg/mL) και γι' αυτό μετά τη διαπίδυση των κλασμάτων E1 και E2, ακολούθησε συμπύκνωση με PEG 40.000 όπου πήραμε τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης 0,190mg/mL. Στην Εικόνα 12 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων της χρωματογραφίας, όπου η PARN 54 μοριακού βάρους 54 kDa εντοπίζεται μέσα στο ορθογώνιο σχήμα.



Εικόνα 12 Ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της PARN54. PARN54 9/3/07: παλαιότερο ένζυμο που χρησιμοποιείται ως δείκτης μοριακού βάρους

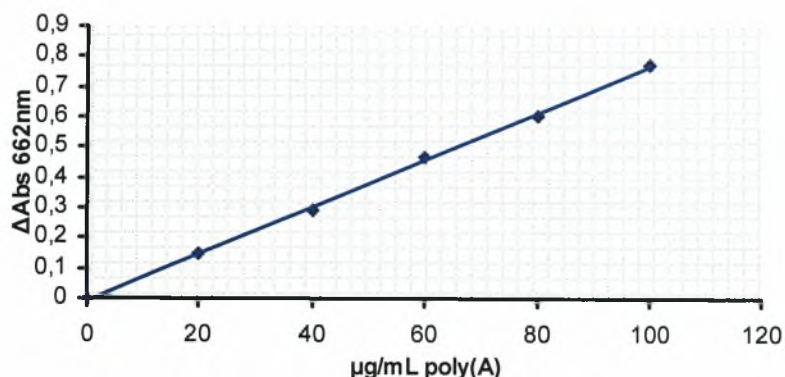
Πρότυπη καμπύλη πολυ(A)

Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης πολυ(A) ετοιμάστηκαν σύμφωνα με τον Πίνακα 1. Μετά την προσθήκη του διαλύματος κυανού του μεθυλενίου τα δείγματα επωάστηκαν για 15min στους 30°C , που είναι η θερμοκρασία στην οποία γίνεται και η αντίδραση της PARN, 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 μια γραμμική σχέση με εξίσωση:

$$A = 0,0077 * C(\mu\text{g}/\text{mL}) - 0,0044$$

Με τη συγκεκριμένη εξίσωση θα μετατραπούν οι απορροφήσεις των ενζυμικών αντιδράσεων σε πολύ(A) που αποικοδομήθηκε κατά τις αντιδράσεις. Στην Εικόνα 13 φαίνεται η πρότυπη καμπύλη πολύ(A).

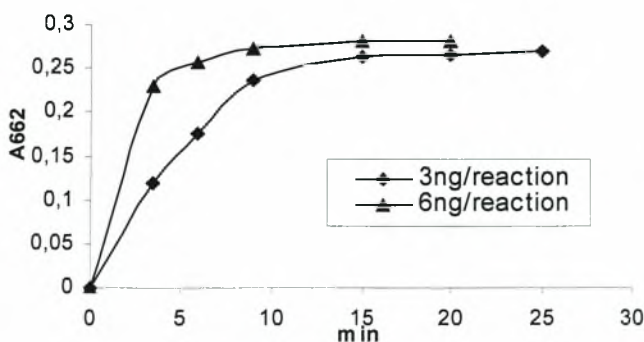
Πρότυπη Καμπύλη poly(A)



Εικόνα 13 Πρότυπη καμπύλη πολύ(A) με χρήση κυανού του μεθυλενίου

Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

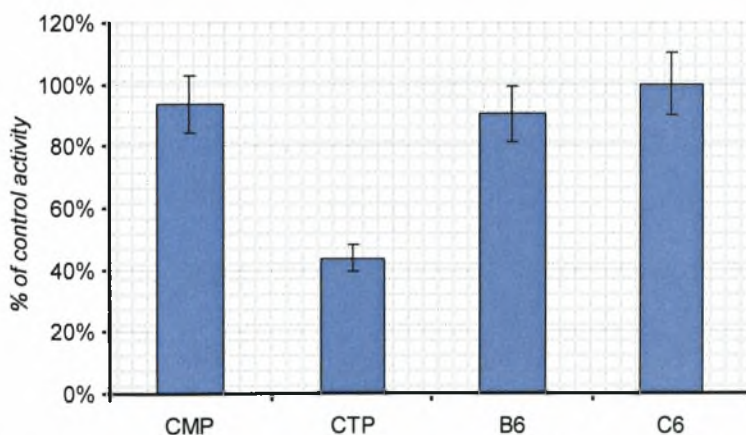
Βασιζόμενοι σε προηγούμενη εργασία, καθορίστηκε ως ιδανική ποσότητα ενζύμου για τα παρόντα πειραματικά αποτελέσματα τα 3ng PARN/αντίδραση και ελάχιστος χρόνος αντίδρασης 15min για την PARN 74 (Εικόνα 14), ενώ για την PARN54 ο χρόνος αντίδρασης ήταν 40min. Η συγκέντρωση πολύ(A) κυμαίνεται από 7,5 έως 60,0µg/ml για να είναι εντός των ορίων γραμμικότητας της μεθόδου [51].



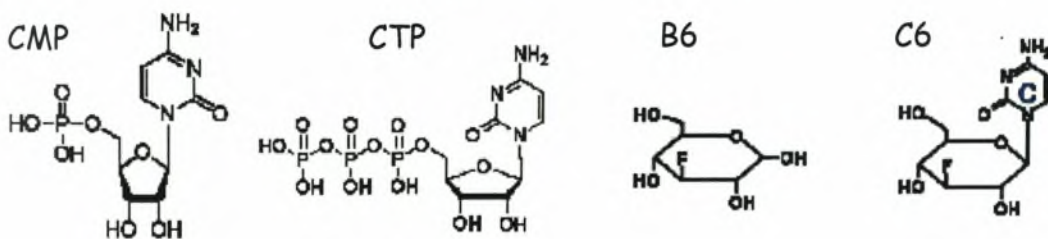
Εικόνα 14 Χρονοκαμπύλη με 6ng και 3ng PARN/αντίδραση σε συγκέντρωση πολυ(A) 60µg/ml.

Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας παρουσία νουκλεοτιδίων και συνθετικών νουκλεοσιδίων

Πρόσφατα δείχθηκε πως τα νουκλεοτίδια πουρινών αναστέλλουν την πολυ(A) εξειδικευμένη ριβονουκλεάση. Μάλιστα, τα μονο- και διφωσφορικά νουκλεοτίδια πουρινών αναστέλλουν την PARN ακολουθώντας συναγωνιστική κινητική, ενώ τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια παρουσιάζουν μη συναγωνιστική αναστολή [51]. Στην παρούσα εργασία επεκτείναμε την προηγούμενη ανάλυση εξετάζοντας την πιθανή δράση νουκλεοτιδίων κυτοσίνης. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως και τα συγκεκριμένα νουκλεοτίδια μπορούν να αναστείλουν αποτελεσματικά την PARN (Εικόνα 15) και έγινε κινητική ανάλυση για να προσδιορισθεί το είδος της αναστολής. Επιπλέον, συνθέσαμε και χρησιμοποίησαμε μια σειρά αναλόγων νουκλεοσιδίων πυριμιδίνης που φέρουν τροποποιήσεις στο σάκχαρο και στη βάση (Εικόνα 16). Ειδικότερα, φέρουν εξαμελή δακτύλιο γλυκοπυρανόζης ως σάκχαρο με προσθήκη ενός ατόμου φθορίου. Ενώσεις με τις τροποποιήσεις αυτές έχουν αναφερθεί να εκδηλώνουν αντικαρκινική και αντι-ϊική δράση [52]. Μια εκ των ενώσεων, ο δακτύλιος γλυκοπυρανόζης (B6), μείωσε αποτελεσματικά τη δραστηριότητα της PARN, ενώ το συνθετικό C6 δεν παρουσίασε κάποια επίδραση στη δραστηριότητα του ενζύμου (Εικόνα 15).



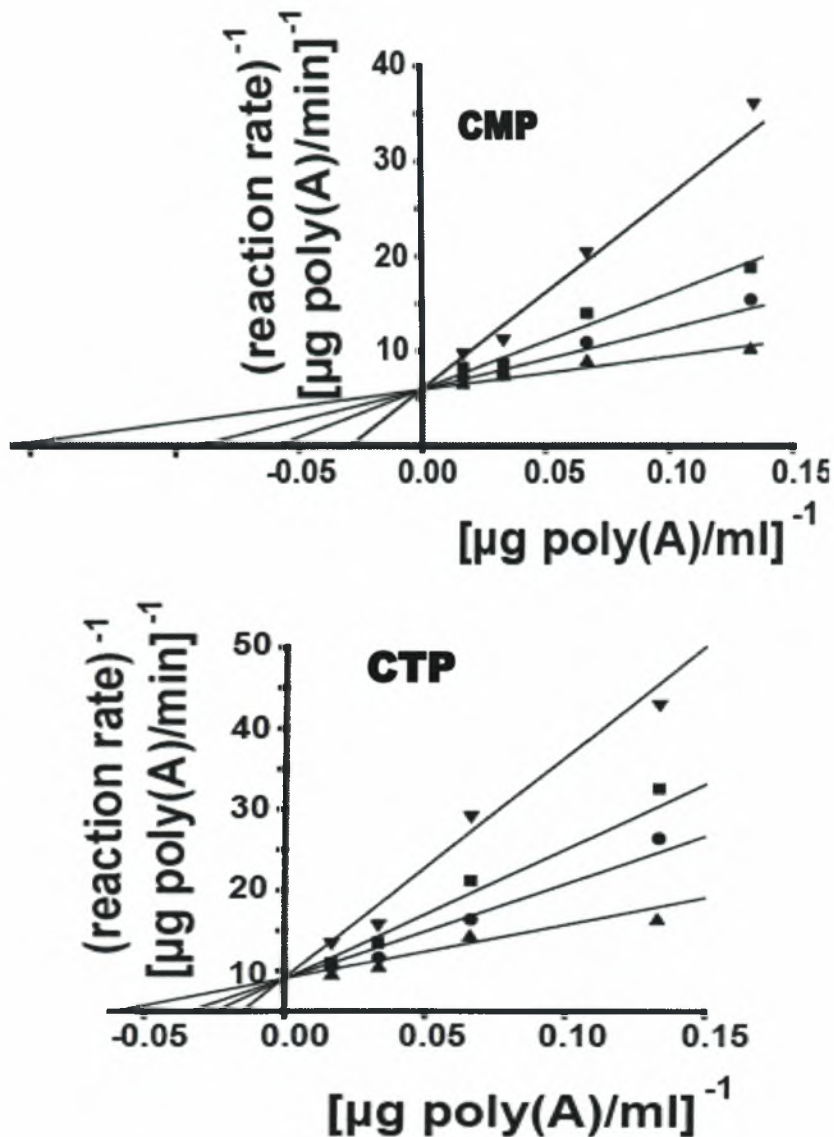
Εικόνα 15 Επίδραση νουκλεοτιδίων στην ενεργότητα της PARN



Εικόνα 16 Δομή των νουκλεοτιδίων που μελετήθηκαν στην εργασία

Τα νουκλεοτίδια κυτοσίνης αναστέλλουν την PARN ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής

Για να μελετήσουμε το είδος της αναστολής της PARN από τα νουκλεοτίδια κυτοσίνης προχωρήσαμε σε κινητική ανάλυση του ενζύμου παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των νουκλεοτιδίων. Οι χρόνοι των αντιδράσεων ήταν 15min για την PARN 74 και 40min για την PARN 54, ενώ η μετατροπή των απορροφήσεων σε πολυ(A) που αποικοδομήθηκε έγινε με την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης πολυ(A). Η απεικόνιση των αποτελεσμάτων σε διαγράμματα Lineweaver-Burk έδειξε ότι τόσο το CTP όσο και το CMP παρουσιάζουν κινητική συναγωνιστικής αναστολής όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 17.



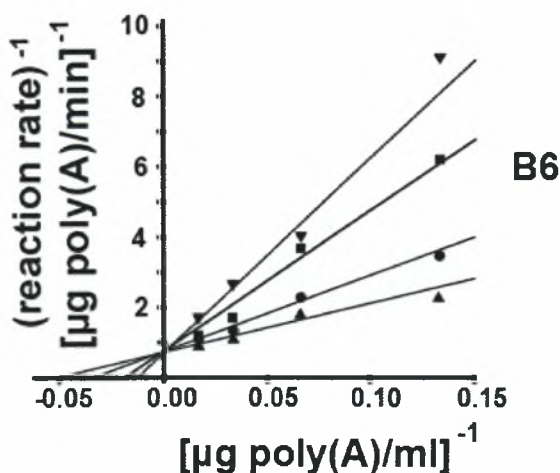
Εικόνα 17 Κινητική ανάλυση παρουσία νουκλεοτιδίων CMP και CTP. Φαίνονται τα διαγράμματα διπλού ανάστροφου $1/V - 1/S$. Οι συγκεντρώσεις των νουκλεοτιδίων ήταν 0mM (▲), 0.025mM (●), 0.25mM (■) και 1.00mM (▼)

Για να προσδιορίσουμε τις σταθερές αναστολής (K_i) κινητικά, η κλίση των ευθειών των παραπάνω διαγραμμάτων χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία διαγράμματος σε σχέση με τις συγκεντρώσεις των CTP και CMP. Σύμφωνα με τα παραπάνω προέκυψαν οι τιμές K_i για το CMP 0,9mM και του CTP 0,5mM (Πίνακας 2).

Πίνακας 2 Σταθερές αναστολής K_i	
νουκλεοτίδια	K_i
CTP	0,5mM
CMP	0,9mM
B6	0,7mM

Το συνθετικό νουκλεοσίδιο 3-deoxy-3-fluoro-glucopyranose (B6) αναστέλλει την PARN ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής

Η ίδια προσέγγιση ακολουθήθηκε και για την κινητική ανάλυση των συνθετικών νουκλεοσιδίων B6 και C6. Συγκεκριμένα για το 3-deoxy-3-fluoro-glucopyranose (B6), που αποτελείται από ένα δακτύλιο γλυκοπυρανόζης, η απεικόνιση των αποτελεσμάτων σε διάγραμμα Lineweaver-Burk (Εικόνα 18) έδειξε ότι αναστέλλει την PARN με συναγωνιστικό τρόπο. Η τιμή K_i που προέκυψε είναι 0,7mM, η οποία είναι συγκρίσιμη με τις σταθερές αναστολής των νουκλεοτιδίων CMP και CTP που μελετήθηκαν (Πίνακας 2).

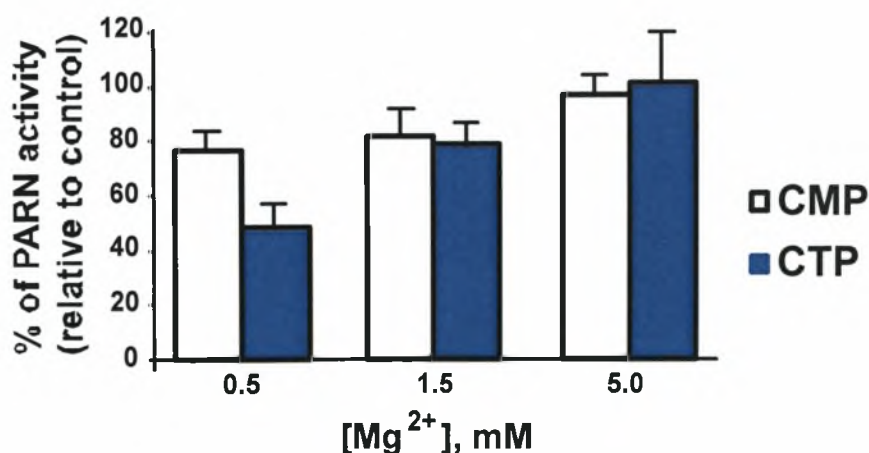


Εικόνα 18 Κινητική ανάλυση παρουσία B6. Διάγραμμα διπλού ανάστροφου $1/V - 1/S$. Οι συγκεντρώσεις των νουκλεοτιδίων ήταν 0mM (▲), 0.025mM (●), 0.25mM (■) και 1.00mM (▼)

Σε αυτό το σημείο να αναφέρουμε ότι η κινητική ανάλυση που έγινε για το συνθετικό νουκλεοτίδιο 1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-cytosine (Cδ), που αποτελείται από μια κυτοσίνη προσκολλημένη σε ένα δακτύλιο γλυκοπυρανόζης, έδειξε ότι η συγκεκριμένη ουσία δεν έχει καμία επίδραση στην PARN (τα αποτελέσματα δεν δείχνονται) και δεν προχωρήσαμε σε περαιτέρω ανάλυση (Εικόνα 15).

Η επίδραση των νουκλεοτιδίων κυτοσίνης αναστέλλεται από την αυξανόμενη συγκέντρωση ιόντων Mg(II)

Είναι γνωστό ότι τα δισθενή ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}) αλληλεπιδρούν με τριφωσφορικά νουκλεοτίδια, καθώς δεσμεύονται στις φωσφορικές τους ομάδες. Δεδομένου ότι και το ένζυμο χρειάζεται ιόντα μαγνησίου για να δράσει, πραγματοποιήσαμε αντιδράσεις αποαδενυλίωσης με μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις μαγνησίου για να ερευνήσουμε αν η παρατηρούμενη αναστολή του ενζύμου οφείλεται στην δέσμευση των Mg^{2+} από τα νουκλεοτίδια κυτοσίνης, όπως συμβαίνει και με τα νουκλεοτίδια πουρινών [51]. Πράγματι, για την τριφωσφορική κυτοσίνη, με αύξηση της συγκέντρωσης μαγνησίου ($5,0mM$) στην αντίδραση αίρεται η αναστολή, ενώ με μείωση ($0,5mM$) παρατηρήθηκε εντονότερη αναστολή σε σχέση με τις συνηθείς συνθήκες αντίδρασης που ήταν $1,5mM [Mg^{2+}]$ (Εικόνα 19).

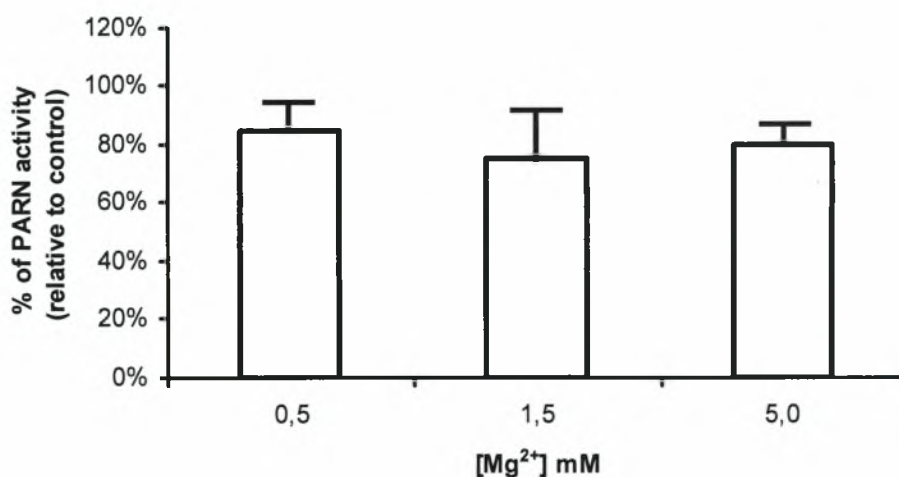


Εικόνα 19 Επίδραση των Mg^{2+} στην αναστολή της PARN από νουκλεοτίδια κυτοσίνης. Σχετική ενεργότητα $1,0mM$ CMP (□) και CTP (■) σε τρεις συγκεντρώσεις Mg^{2+}

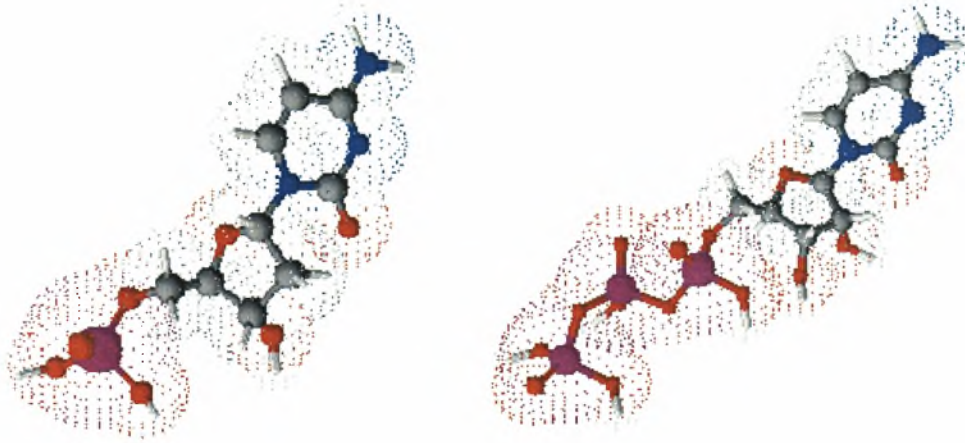
Αντιθέτως, για τη μονοφωσφορική κυτοσίνη δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή της αναστολής. Γεγονός που αναμενόταν, αφού τα μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια δεν αλληλεπιδρούν τόσο έντονα με τα ιόντα μαγνησίου. Αυτή η παρατήρηση επισημαίνει για ακόμη μια φορά ότι τα νουκλεοτίδια μπορούν να μειώσουν τη δραστικότητα της PARN όχι μόνο μέσω της αλληλεπίδρασης με τα ιόντα μαγνησίου αλλά και πιθανόν μέσω της πρόσδεσής τους στο ένζυμο.

Η επίδραση του συνθετικού νουκλεοτιδίου 3-deoxy-3-fluoro-glucopyranose (B6) δεν επηρεάζεται από την αυξανόμενη συγκέντρωση ιόντων $Mg(II)$

Ομοίως, ερευνήσαμε αν η αναστολή της PARN από το συνθετικό νουκλεοσίδιο B6 επηρεάζεται από την συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου στην αντίδραση, όπως παρατηρείται με τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια. Πραγματοποιήσαμε αντιδράσεις αποαδενυλίωσης με μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις μαγνησίου. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως η επίδραση του B6 στο ένζυμο είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του μαγνησίου στην αντίδραση (Εικόνα 20), γεγονός που μπορεί να είναι σημαντικό στη ρύθμιση της PARN από συνθετικά μόρια.



Εικόνα 20 Επίδραση των Mg^{2+} στην αναστολή της PARN από το B6. Σχετική ενεργότητα παρουσία 1,0mM B6 (□) σε τρεις συγκεντρώσεις Mg^{2+}



Εικόνα 22 Τρισδιάστατη δομή των νουκλεοτιδίων CMP (αριστερά) και CTP (δεξιά)



Εικόνα 21 Τα συνθετικά νουκλεοσίδια 3-deoxy-3-fluoro-glucopyranose (B6) αριστερά και 1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-cytosine (C6) δεξιά. Φαίνονται οι δακτύλιοι γλυκοπυρανόζης με το άτομο φθορίου (πράσινο)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο κεντρικός ρόλος της PARN στην αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs την καθιστά κύριο στόχο μέσω του οποίου μπορεί να ρυθμίζεται ο χρόνος ζωής τους. Έχει δειχθεί πως μικρά μόρια που απαντούν σε αφθονία στο κύτταρο, όπως τα νουκλεοτίδια, επηρεάζουν τη δράση του ενζύμου και πρόσφατα έχει μελετηθεί κινητικά ο μηχανισμός δράσης μερικών από αυτά. Στόχος μας είναι να αποκαλύψουμε και να μελετήσουμε μηχανισμούς ρύθμισης του ενζύμου από μικρά μόρια όπως τα νουκλεοτίδια. Επίσης σκοπεύουμε στη σύνθεση αναλόγων των μορίων αυτών με σκοπό της ρύθμιση της δράσης του ενζύμου και κατ' επέκταση να επέμβουμε στο χρόνο ζωής των mRNAs. Σε προηγούμενη εργασία μελετήθηκε η επίδραση νουκλεοτιδίων πουρινών (*RTP*, *RDP*, *RMP*) στην PARN. Τα νουκλεοτίδια αυτά δείχθηκε πως αναστέλλουν το ένζυμο τόσο με συναγωνιστικό (*RMP*, *RDP*) όσο και με μη συναγωνιστικό τρόπο (*RTP*). Στην παρούσα διπλωματική εργασία επεκτείναμε κατά πρώτον τα αποτελέσματα της προηγούμενης εργασίας και επελέγησαν νουκλεοτίδια πυριμιδινών (*CMP* και *CTP*). Έγινε κινητική μελέτη και παρουσίασαν συναγωνιστική αναστολή. Μελετήθηκε η δράση ιόντων Mg(II) και φάνηκε πως αυξανόμενη της συγκέντρωσης, αίρεται η αναστολή που προκαλείται στο ένζυμο από τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια, αλλά επηρεάζουν ελάχιστα την αναστολή από τα μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια. Αυτή η παρατήρηση δείχνει πως μικρά μόρια που βρίσκονται διαλυμένα στο κυτταρόπλασμα, όπως τα νουκλεοτίδια και των οποίων η συγκέντρωση τοπικά μπορεί να είναι αυξημένη, μπορούν να ρυθμίσουν τη δραστηριότητα της PARN *in vitro*. Είναι πιθανό η ρύθμιση αυτή να γίνεται μέσω της δέσμευσης των ιόντων μαγνησίου από τα δι- και τριφωσφορικά νουκλεοτίδια αλλά και μέσω της πιθανής αλλοστερικής πρόσδεσής τους στο ένζυμο.

Με βάση την αναστολή της PARN από νουκλεοτίδια, αναζητήσαμε ενώσεις με παραπλήσια δομή που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη δράση του ενζύμου. Ελέγχθηκε μια σειρά μορίων, επιλέξαμε δύο και εξετάστηκε περαιτέρω η δράση τους. Επεκτείναμε τις μελέτες με συνθετικά μόρια 3-deoxy-3-fluoro-glucopyranose (*B6*) και 1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-cytosine (*C6*) τα οποία είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση και η δομή τους βασίζεται σε νουκλεοτίδια. Παρόλο που το C6 δεν έδειξε να έχει κάποια επίδραση πάνω στην PARN, τα αποτελέσματα από την κινητική ανάλυση του B6 ήταν ενθαρρυντικά, καθώς παρουσίασε συναγωνιστική αναστολή. Μάλιστα η σταθερά αναστολής

(K_i) είναι συγκρίσιμη με τις σταθερές αναστολής των νουκλεοτιδίων CMP και CTP, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, ενώ η δράση του δεν επηρεάζεται από τη συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου στο διάλυμα. Η τελευταία παρατήρηση είναι ιδιαίτερα σημαντική, γιατί μια τέτοια ουσία θα μπορεί να λειτουργεί και να αναστέλλει το ένζυμο ανεξάρτητα από την τοπική συγκέντρωση των ιόντων Mg.

Φαίνεται τελικά πως τα νουκλεοτίδια, που υπάρχουν σε αφθονία μέσα στο κύτταρο, μπορούν να λειτουργήσουν εν δυνάμει ως ρυθμιστές της PARN μαζί με τις άλλες λειτουργίες που επιτελούν μέσα στο κύτταρο. Ενδεικτικά αναφέρεται πως αποτελούν τους δομικούς λίθους των νουκλεϊκών οξέων (*DNA, RNA*), συστατικά συνενζύμων (*CoA, NADH, FADH*) και μόρια μεταγωγής σήματος (*cAMP, cGMP*). Ένας πιθανός τρόπος δράσης τους είναι η αναστολή της PARN μέσω της τοπικής συγκέντρωσης ως προϊόντα αποικοδόμησης των mRNAs. Είναι ένας συνήθης μηχανισμός ρύθμισης που παρατηρείται σε αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο μικροπεριβάλλον του κυττάρου.

Η διαπίστωση πως συνθετικά μόρια, όπως αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, μπορούν να ρυθμίσουν τη δράση του ενζύμου και το γεγονός ότι η ρύθμιση αυτή είναι ανεξάρτητη της συγκέντρωσης μαγνησίου μπορεί να καταστήσει το ένζυμο στόχο για αντικαρκινικές μελέτες. Οι ουσίες αυτές μπορούν να λειτουργήσουν ως πλατφόρμα για ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών μορίων στο εγγύς μέλλον. Στο περιβάλλον του κυττάρου, οι συνθήκες (όπως η συγκέντρωση Mg^{2+}) μεταβάλλονται ανάλογα με τις απαιτήσεις του (ενεργειακές, θρεπτικές) πολύ συχνά. Ένα επόμενο βήμα σε αυτή την έρευνα μπορεί να είναι η επίδραση αυτών των μορίων, νουκλεοτιδίων και συνθετικών μορίων, *in vivo*. Η αναστολή της PARN σε καρκινικά κύτταρα θα μπορούσε να έχει καθοριστική σημασία, γιατί θα επεμβαίνει και θα αλλάζει το χρόνο ζωής των mRNA του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lewin B. GENES VIII κεφάλαιο 5.
2. Hoof van, A. & Parker, R. The exosome: a proteasome for RNA? *Cell* (1999).
3. Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. & Sharp, P.A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 457–467 (2003).
4. Maquat, L.E. & Carmichael, G.G. Quality control of mRNA function. *Cell* 26, 173–176 (2000).
5. Tucker, M. & Parker, R. Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 571–595 (2000).
6. Mitchell, P. & Tollervey, D. mRNA turnover. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 320–325 (2001).
7. Anderson, J.S.J. & Parker, R. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* 17, 1497–1506 (1998).
8. Chen, C.Y. *et al.* AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451–464 (2001).
9. Wang, Z. & Kiledjian, M. Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* 107, 751–762 (2001).
10. Mukherjee, D. *et al.* The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.* 21, 165–174 (2002).
11. Liu, H., Rodgers, N.D., Jiao, X. & Kiledjian, M. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J.* 21, 4699–4708 (2002).
12. Dodson, R.E. & Shapiro, D.J. Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72, 129–164 (2002).
13. Moore, M.J. Nuclear RNA turnover. *Cell* 108, 431–434 (2002).
14. Muhrad, D. & Parker, R. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370, 578–581 (1994).
15. Cao, D. & Parker, R. Computational modeling and experimental analysis of nonsense-mediated decay in yeast. *Cell* 113, 533–545 (2003).
16. Mitchell, P. & Tollervey, D. An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol. Cell* (2003).
17. Takahashi, S., Araki, Y., Sakuno, T. & Katada, T. Interaction between Ski7p and Upf1p is required for nonsense-mediated 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.* 22, 3951–3959 (2003).
18. Frischmeyer, P.A. *et al.* An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 295, 2258–2261 (2002).

19. van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C. & Parker, R. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* 295, 2262–2264 (2002).
20. Viswanathan, P., Chen, J., Chiang, Y.-C. & Denis, C.L. Identification of multiple RNA features that influence CCR4 deadenylation activity. *J. Biol. Chem.* 278, 14949–14955 (2003).
21. Dehlin, E., Wormington, M., Körner, C.G. & Wahle, E. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.* 19, 1079–1086 (2000).
22. Martínez, J., Ren, Y.-G., Nilsson, P., Ehrenberg, M. & Virtanen, A. The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation. *J. Biol. Chem.* 276, 27923–27929 (2001).
23. Sach, A.B. & Deardorff, J.A. Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast. *Cell* 70, 961–973 (1992).
24. Wickens, M., Bernstein, D.S., Kimble, J. & Parker, R. A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet.* 18, 150–157 (2002).
25. Tucker, M. *et al.* The transcription factor associated proteins Ccr4 and Caf1 are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104, 377–386 (2001).
26. Denis, C.L. & Chen, J. The CCR4-NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 73, 221–250 (2003).
27. Dlakic, M. Functionally unrelated signalling proteins contain a fold similar to Mg²⁺-dependent endonucleases. *Trends Biochem. Sci.* 25, 272–273 (2000).
28. Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhrad, D. & Parker, R. Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 21, 1427–1436 (2002).
29. Chen, J., Chiang, Y.C. & Denis, C.L. CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *EMBO J.* 21, 1414–1426 (2002).
30. Baggs, J.E. & Green, C.B. Nocturnin, a deadenylase in *Xenopus laevis* retina. A mechanism for posttranscriptional control of circadian-related mRNA. *Curr. Biol.* 13, 189–198 (2003).
31. Daugeron, M.C., Mauxion, F. & Seraphin, B. The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Res.* 29, 2448–2455 (2001).
32. 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. *EMBO Rep.* 4, 1150–1155 (2003).
33. Moser, M.J., Holley, W.R., Chatterjee, A. & Mian, I.S. The proofreading domain of *Escherichia coli* DNA polymerase I and other DNA and/or RNA exonuclease domains. *Nucleic Acids Res.* 25, 5110–5118 (1997).
34. Joyce, C.M. & Steitz, T.A. Polymerase structures and function: variations on a theme? *J. Bacteriol.* 177, 6321–6329 (1995).

35. Brown, C.E. & Sachs, A.B. Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6548–6559 (1998).
36. Hammet, A., Pike, B.L. & Heierhorst, J. Posttranscriptional regulation of the *RAD5* DNA repair gene by the dun1 kinase and the Pan2-Pan3 poly(A)-nuclease complex contributes to survival of replication blocks. *J. Biol. Chem.* 277, 22469–22474 (2002).
37. Ito, T. *et al.* A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4277–4278 (2001).
38. Åström, J., Åström, A. & Virtanen, A. Properties of a HeLa cell 3' exonuclease specific for degrading poly(A) tails of mammalian mRNA. *J. Biol. Chem.* 267, 18154–18159 (1992).
39. Körner, C.G. & Wahle, E. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J. Biol. Chem.* 272, 10448–10456 (1997).
40. Ren, Y.-G., Martínez, J. & Virtanen, A. Identification of the active site of poly(A)-specific ribonuclease by site-directed mutagenesis and Fe²⁺-mediated cleavage. *J. Biol. Chem.* 277, 5982–5987 (2002).
41. Lai, W.S., Kennington, E.A. & Blackshear, P.J. Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3798–3812 (2003).
42. Nilsson P, Henriksson N, Niedzwiecka A, Balatsos NA, Kokkoris K, Eriksson J, Virtanen A. A multifunctional RNA recognition motif (RRM) in poly(A)-specific ribonuclease (PARN) with cap and poly(A) binding properties. *J. Biol. Chem.* In press.
43. Wu, M., Reuter, M., Lilie, H., Liu, Y., Wahle, E. & Song H. Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO J* 24, 4082-4093 (2005).
44. Javier Martínez, Yan-Guo Ren, Ann-Charlotte Thuresson, Ulf Hellman, Jonas Åström, and Anders Virtanen. A 54- kDa Fragment of the Poly(A)-specific Ribonuclease Is an Oligomeric, Processive, and Cap-interacting Poly(A)-specific 3' Exonuclease *J. Biol. Chem.* 275, 24222-24230 (2000).
45. Gao M, Fritz DT, Ford LP, and Wilusz J. Interaction between a Poly(A)-Specific Ribonuclease and the 5' Cap Influences mRNA Deadenylation Rates In Vitro *Mol. Cell* 5, (2000) 479-488.
46. Gao M, Wilusz CJ, Peltz SW, and Wilusz J. A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements *EMBO J.* 20, 1134–1143(2001).
47. Lejeune, F., Li, X. & Maquat, L.E. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell* 12, 675–687 (2003).
48. Copeland PR and Wormington M. The mechanism and regulation of deadenylation: Identification and characterization of *Xenopus* PARN. *RNA* 7,875–886 (2001).

49. 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.
50. Greiner-Stoeffele T., Grunow M., Hahn U. A General Ribonuclease Assay Using methylene blue. *Analytical Biochemistry*, 1996; 240: 24-28.
51. 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.* 2008. In press.
52. Manta S., Agelis G., Botic T, Cencic A., Komiotis D. Fluoro-ketopyranosyl nucleosides: Synthesis and biological evaluation of 3-fluoro-2-keto- β -D-glycopyranosyl derivatives of N⁴-benzoyl cytosine. *Bioorg. Med. Chem.* 2007; 15: 980-987.