

2.6.2004



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΠΟΛΥ(Α)-
ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ (PARN)



ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΑΝΑΣΤΑΣΑΚΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

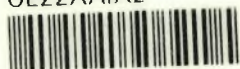
ΛΑΡΙΣΑ 2007



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

Αριθ. Εισ.: 5918/1
Ημερ. Εισ.: 01-06-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΑΝΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087231

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

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Τριμελής Επιτροπή:

- Νικόλαος Μπαλατσός, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.
- Κοντού Μαρία, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.
- Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, 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 ομαλή και επιτυχή διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Κωνσταντίνο Σταθόπουλο, Επικ. Καθ. του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για την επιστημονική καθοδήγηση και την ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε, επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω τον Λέκτορα του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Νικόλαο Μπαλατσό για τη συνεργασία και πολύτιμη βοήθεια κατά τη διεκπεραίωση της εργασίας αυτής, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Λειτουργικής Βιοχημείας, για την άψογη και ευχάριστη συνεργασία μας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ABSTRACT	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1. Το mRNA παράγεται με μεταγραφή και μεταφράζεται.....	5
1.2. Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA.....	6
1.2.1. Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει κάλυμμα.....	7
1.2.2. Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται.....	8
1.3. αποικοδόμηση του mRNA.....	10
1.3.1. Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA.....	10
1.3.2. Ένζυμα και έλεγχος αποαδενυλίωσης.....	12
1.3.3. Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [πολυ(A) specific ribonuclease, PARN].....	14
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	18
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	19
3.1 Υλικά.....	19
3.1.1 Χημικά.....	19
3.1.2 Βακτηριακά στελέχη.....	20
3.1.3 Θρεπτικά υλικά.....	20
3.1.4 Πρωτεΐνες και ένζυμα.....	20
3.1.5 Νουκλεοτίδια και νουκλεϊκά οξέα.....	20
3.1.6 Πλασμίδια.....	20
3.1.7 Υλικά χρωματογραφίας.....	20
3.1.8 Διαλύματα.....	21
3.2. Μέθοδοι.....	24
3.2.1. Υπερέκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένης PARN74-54 kd.....	23
3.2.2. Μέτρηση της ενεργότητας της PARN με κυανό του μεθυλενίου.....	25
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	27
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	39
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	45

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αποικοδόμηση του mRNA ξεκινάει με την βράχυνση της πολυ(A) ουράς. Σε ανώτερους οργανισμούς το κύριο ένζυμο για την διαδικασία της αποαδενυλίωσης είναι η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN, η οποία προσδένεται ειδικά στην πολυ(A) ουρά και την αποικοδομεί με φορά 3'-5', ενώ το κάλυμμα στο 5' άκρο διεγείρει την επεξεργαστική δράση του ενζύμου *in vitro*. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αφορούν στην έκφραση, τον καθαρισμό και τη μελέτη της PARN. Ειδικότερα, μελετήθηκε η επίδραση των νουκλεοτιδίων πουρίνης σε *in vitro* αντιδράσεις αποαδενυλίωσης. Βρέθηκε ότι τα GMP, GDP, GTP και AMP, ADP, ATP μειώνουν τη δραστικότητα του ενζύμου. Το GMP και το ATP ανέστειλλαν τη δραστικότητα του ενζύμου μη συναγωνιστικά, ενώ τα GMP και GDP, καθώς και τα AMP και ADP έδρασαν ως συναγωνιστικοί αναστολείς. Επίσης εξετάστηκε η επίδραση του Mg(II) στην ανασταλτική ικανότητα των παραπάνω νουκλεοτιδίων και δείχνεται πως το ιόν επηρεάζει διαφορετικά τη δράση των YTP και YMP από αυτή των YMP.

ABSTRACT

The degradation of mRNA usually begins with the shortening of poly(A) tail, where poly(A)-specific ribonuclease, PARN, is a key enzyme in this process. It binds specifically poly(A) tails and degrades them. The cap structure at the 5'-end of mRNA stimulates PARN activity by increasing the processivity of degradation. The results of this work are related to overexpression, purification and study of the regulation of PARN activity *in vitro*. In particular, we study the effect of purine nucleotides on PARN in *in vitro* deadenylation reactions. We find that GTP, GDP, GMP and ATP, ADP, AMP can reduce PARN activity: GTP and ATP inhibited PARN activity non-competitively, while GMP, GDP and AMP, ADP competitively. The effect of Mg(II) ions on the inhibitory effect of the nucleotides was tested. We find that the concentration of the ion can affect YDP and YTP nucleotides in a different mode than YMP.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το RNA είναι ένα μόριο κεντρικής σημασίας για τη γονιδιακή έκφραση. Αρχικά χαρακτηρίστηκε ως ενδιάμεσο προϊόν, της πρωτεϊνοσύνθεσης, όμως έχουν ανακαλυφθεί πολλά 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 υποβοηθήσαν ή ανέλαβαν αποκλειστικά πολλές από αυτές τις λειτουργίες, γεγονός που είχε ως συνέπεια την αύξηση της προσαρμοστικότητας και πιθανόν της αποτελεσματικότητας. Οι τρεις κύριες τάξης RNA είναι το mRNA το tRNA και το rRNA.[1]

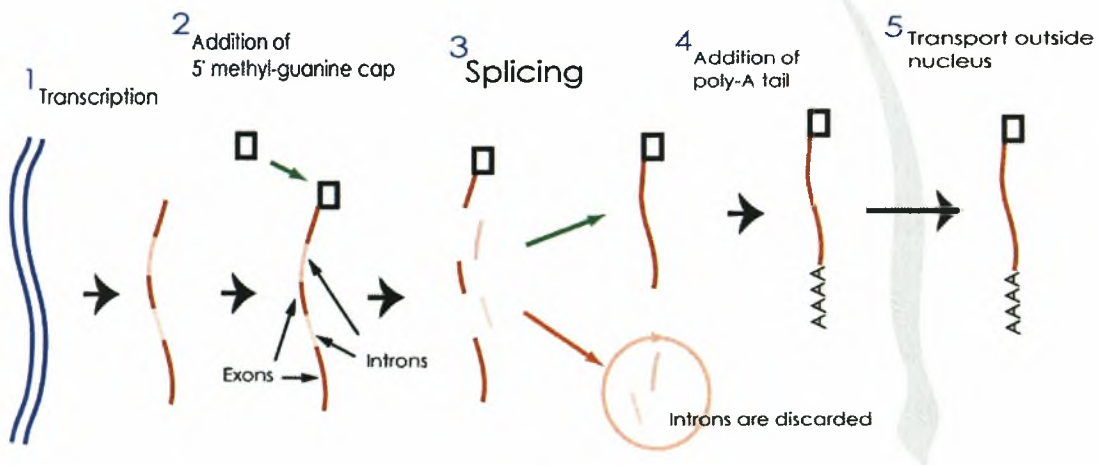
1.1. Το mRNA παράγεται με μεταγραφή και μεταφράζεται.

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) 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 (template strand) ή αντινοσηματική αλυσίδα (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 για U) ονομάζεται κωδική αλυσίδα (coding strand) ή νοηματική αλυσίδα (sense strand).

1.2. Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA.

Μετά τη σύνθεση του πρώιμου ευκαρυωτικού mRNA ακολουθεί η ωρίμανση που δίδει το τελικό ώριμο mRNA. Η ωρίμανση περιλαμβάνει την προσθήκη του καλύμματος στο 5' άκρο, την προσθήκη της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο και το μάτισμα (Εικόνα 1). Οι δύο πρώτες τροποποιήσεις περιγράφονται στις δύο επόμενες παραγράφους. 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 20 λεπτά 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 είναι πιο παρατεταμένος από αυτόν του βακτηριακού mRNA. Η μεταγραφή στα ζωικά κύτταρα συμβαίνει με τη ίδια περίπου ταχύτητα που συμβαίνει και στα βακτήρια (περίπου 40 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο). Πολλά ευκαρυωτικά γονίδια είναι μεγάλα: ένα γονίδιο 10.000 bp χρειάζεται περίπου 5 λεπτά 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 (βλέπε 1.2.2).

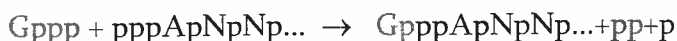
Το ευκαρυωτικό mRNA αποτελεί μόνο ένα μικρό ποσοστό το συνολικού κυτταρικού RNA (περίπου 3% της μάζας του). Ο χρόνος ημιζωής των mRNA στους ζυμομύκητες είναι σχετικά μικρός και κυμαίνεται από 1 έως 60 λεπτά. Υπάρχει μια αξιοσημείωτη αύξηση της σταθερότητας στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς: το mRNA των ζωικών κύτταρο είναι σχετικά σταθερό, με χρόνο ημιζωής μεταξύ 1 και 24 ωρών. Οι τροποποιήσεις και στα δυο άκρα του mRNA συνεισφέρουν σε αυτή τη σταθερότητα.

1.2.1. Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει κάλυμμα.

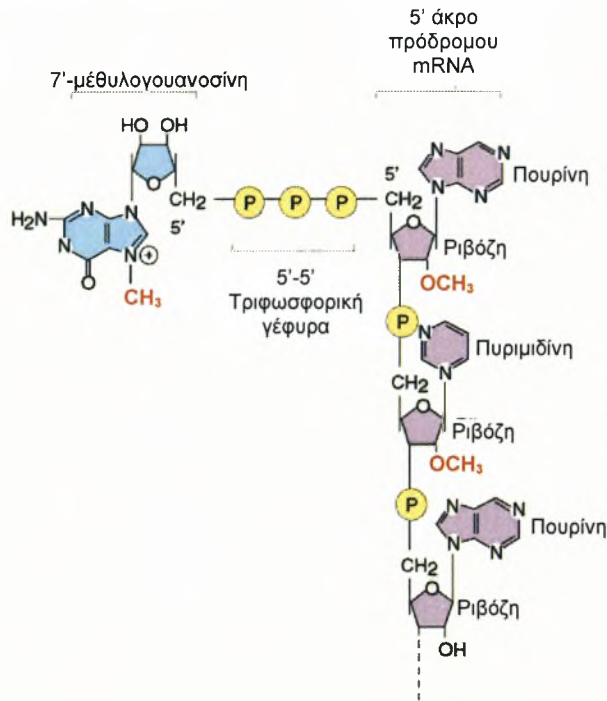
Το 5' κάλυμμα σχηματίζεται με την προσθήκη μιας τριφωσφορικής γουανοσίνης στην πρώτη βάση του μεταγράφου μέσω ενός 5'-5' δεσμού. Που είναι ένα τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο (συνήθως μια πουρίνη, A ή G). Η αρχική αλληλουχία του μεταγράφου μπορεί να αναπαρασταθεί ως:



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 το αντίστροφο προσανατολισμό (5'-5') από όλα τα άλλα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας (εικόνα2).



Εικόνα 2. Το κάλυμμα στο 5' άκρο του mRNA

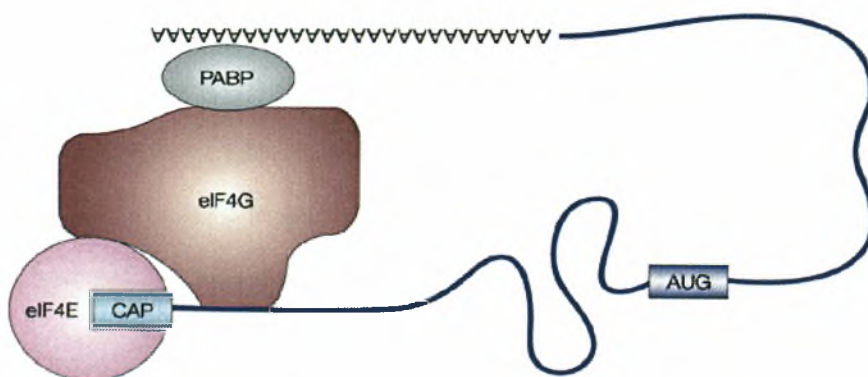
Το κάλυμμα αποτελεί υπόστρωμα για αρκετές αντιδράσεις μεθυλίωσης. Οι τύποι των καλυμμάτων διακρίνονται από το πλήθος των μεθυλίωσεων που φέρουν. Η πρώτη μεθυλίωση γίνεται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και αποτελείται από την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στη θέση 7 της ακραίας γουανίνης, μια αντίδραση 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.

1.2.2. 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 τουλάχιστο επτά πρωτεϊνικοί παράγοντες. Η αντίδραση της προσθήκης καταλύεται από το ένζυμο πολυ(A)-πολυμεράση.

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 PABP των περίπου 70 kd 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 kd. 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 eIF4G δημιουργεί έναν κλειστό βρόχο, στον οποίο τα 5' και 3' άκρα του mRNA συγκρατούνται από το ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο (Εικόνα 3) και έτσι προσλαμβάνεται από τη μεταφραστική μηχανή.



Εικόνα 3. Η πρόσδεση της PABP στον παράγοντα έναρξης eIF4G δημιουργεί έναν κλειστό βρόχο.
CAP: το κάλυμμα στο 5' άκρο.

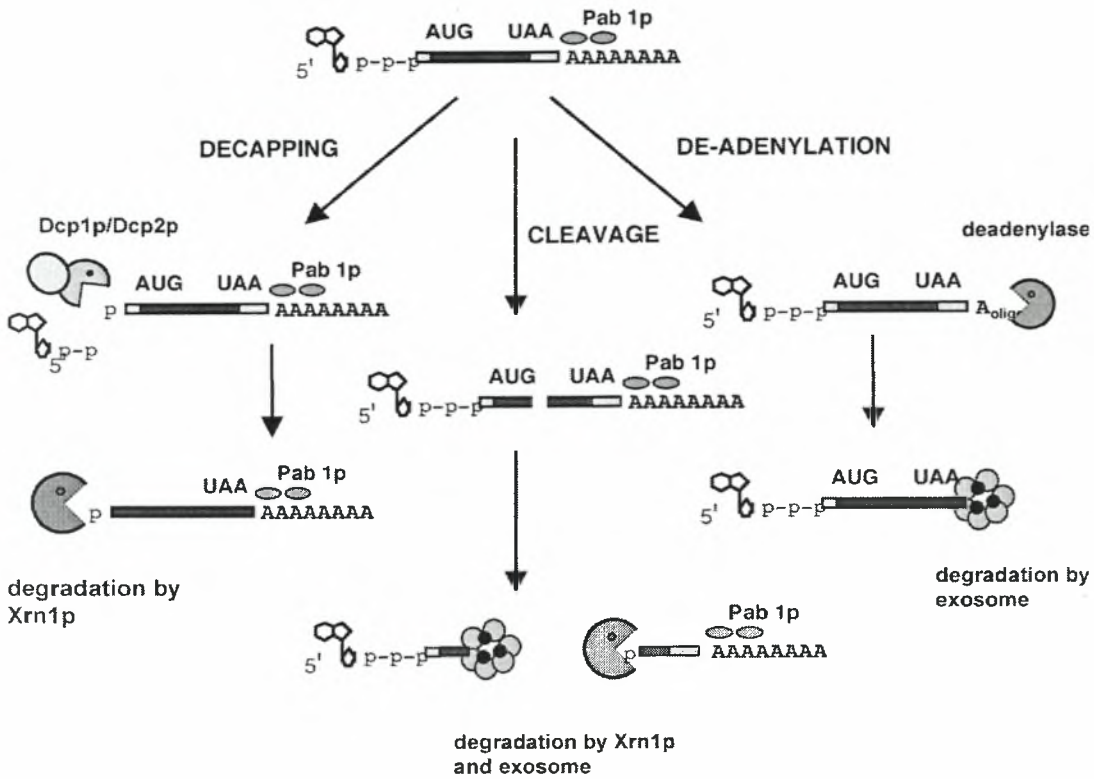
Η αφαίρεση της πολυ(A) ουράς αναστέλλει την έναρξη της μετάφρασης *in vitro* και η μείωση των επιπέδων της PABP έχει το ίδιο αποτέλεσμα στο ζυμομύκητα *in vivo*. Αυτές οι επιδράσεις μπορεί να εξαρτώνται από την πρόσδεση της PABP στο σύμπλοκο έναρξης, στο 5' άκρο του mRNA. Σε μερικές περιπτώσεις, τα mRNA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

1.3. Αποικοδόμηση του mRNA

1.3.1. 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 αντίική προστασία [2,3,4].

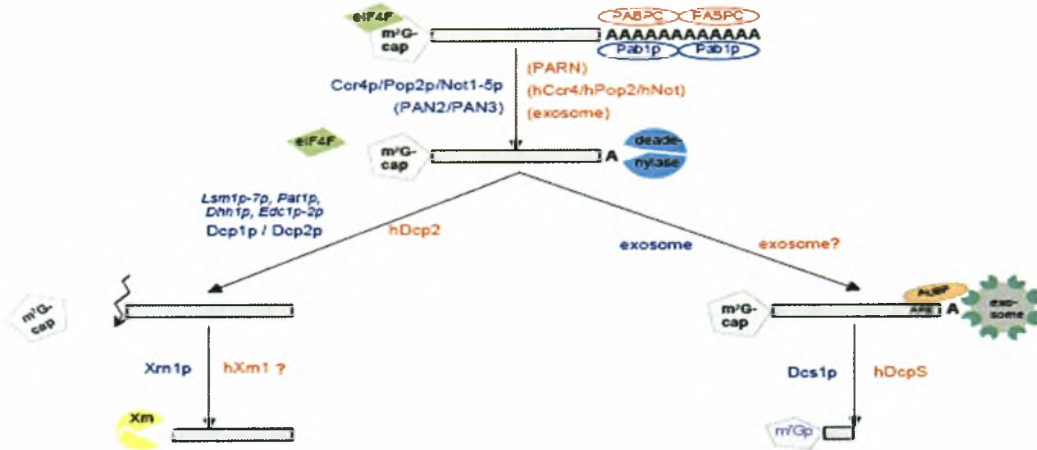
Η αποικοδόμηση του mRNA συνήθως ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο του (αποαδενυλίωση) από διάφορες αποαδενυλάσες [5,6]. Ακολουθώντας την αποαδενυλίωση ένα ειδικό ένζυμο που αποτελείται από δύο υπομονάδες (Dcp1p και Dcp2p) αφαιρεί το κάλυμμα, εκθέτοντας το μετάγραφο σε αποικοδόμηση 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 (Εικόνα 4) που αναγνωρίζουν και αποικοδομούν ταχύτατα ανώμαλα mRNA χρησιμοποιώντας τα ίδια ένζυμα που αποικοδομούν φυσιολογικά mRNAs.



Εικόνα 4. Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA

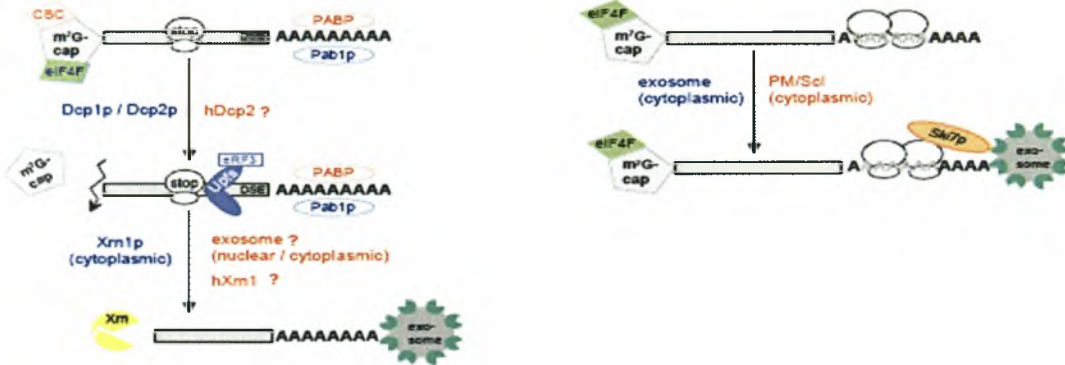
Για παράδειγμα pre-mRNA που αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν την διαδικασία ωρίμανσης μπορεί να κατακρατηθούν στον πυρήνα και/ή να αποικοδομηθούν [13]. Εναλλακτικά τα κύτταρα μπορούν να υπολογίζουν την μεταφραστική χωρητικότητα των mRNA: σε μια διαδικασία που αναφέρεται και ως μη-νοηματικά διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (nonsense-mediated decay, NMD) τα mRNA που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται. Τέτοια μετάργραφα 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] (Εικόνα 5).

mRNA decay in yeast and human



Nonsense-mediated decay (NMD)

Nonstop-mediated decay (NSD)



Εικόνα 5. Τα mRNA τα οποία δεν περιέχουν, ή περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αποικοδομούνται ταχύτατα

1.3.2. 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 αποαδενυλίωση.

Επίσης μπορεί να σημαίνει ότι κάθε αποαδενύλαση μπορεί να στοχεύει σε διαφορετικές δεξαμενές mRNA [38-42].

Στο ζυμομύκητα το επικρατέστερο σύμπλοκο αποαδενύλασης περιλαμβάνει δύο νουκλεάσες, την Ccr4p και την Pop2p, και άλλες πρωτεΐνες Not1-Not5p, Caf4, Caf16, Caf40 και Caf30p [20,21]. Η Ccr4p είναι διατηρημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς με πολλαπλές γονιδιακές παραλλαγές στο γονιδίωμα των θηλαστικών και φυτών. Είναι μέλος της οικογένειας των ExoIII νουκλεασών [22] 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 αποαδενύλωση [23-25]. Η άλλη πρωτεΐνη στο σύμπλοκο με δραστηριότητα αποαδενύλασης είναι η Pop2p. Η Pop2p είναι επίσης ευρέως διατηρημένη με πολλαπλές γονιδιακές παραλλαγές ανάμεσα στους σύνθετους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. 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' εξωδεοξυρυβονουκλεάσης. Έχουν τις ίδιες αναδιπλώσεις, περιέχουν δύο θέσεις σύνδεσης για δισθενή ιόντα και έχουν τον ίδιο καταλυτικό μηχανισμό με τον οποίο υδρολύουν τον φωσφοδιεστερικό δεσμό [26-29]. 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 τη αποαδενύλωση 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 αποαδενύλασης είτε σταθεροποιώντας το σύμπλοκο αποαδενύλασης είτε προάγοντας την αλληλεπίδραση με το mRNA. Αυτός ο

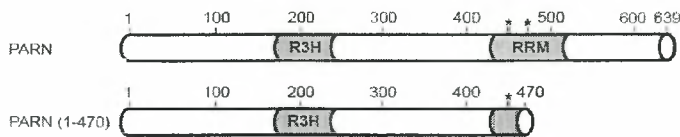
δεύτερος ρόλος βασίζεται σε παρατηρήσεις στη ζύμη όπου παρόλο η έλλειψη της Pop2 προκαλεί αλλαγές στην αποαδενυλίωση, η έλλειψη της καταλυτικής της δράσης μόνο δεν επιφέρει καμία αλλαγή στον φαινότυπο.

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 δείχθει με Ccr4Δ στελέχη ζύμης 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 [30]. Η Pan2p και Pop2p φαίνεται να παίζουν ρόλο στην ειδική ρύθμιση του mRNA της RAD5 σε απόκριση σε αντιγραφικό στρες [31]. 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, μία πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην εξαγωγή του mRNA, και μπορεί να ευθύνεται για την παράδοση του Pan2/Pan3p στο νέο συντιθέμενο mRNA για την αρχική αποαδενυλίωση της πολυ(A) ουράς [32].

1.3.3. 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 [33-34].

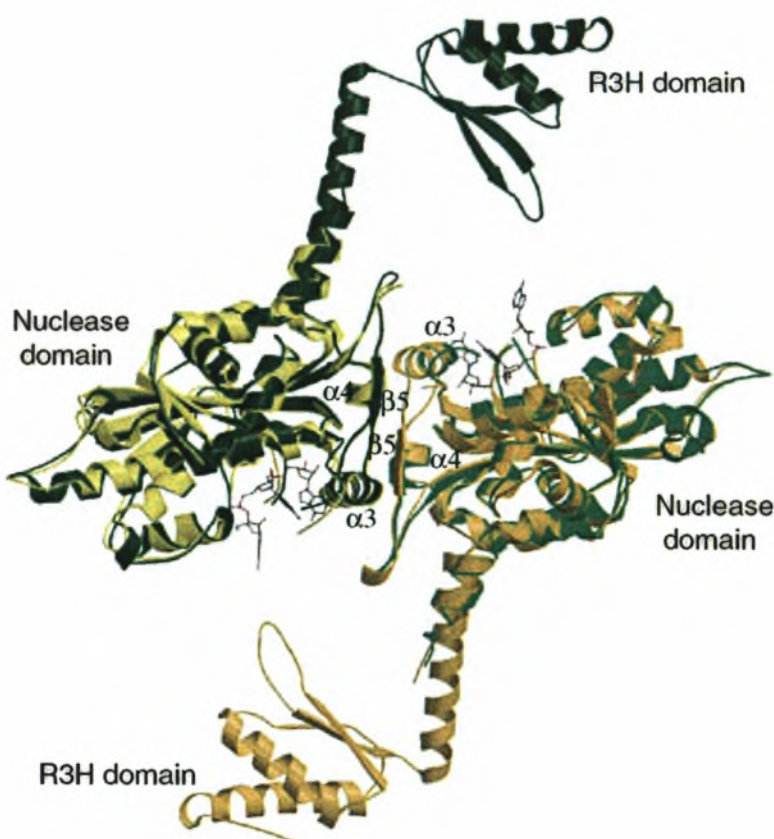
Αναλύσεις αλληλουχιών δείχνουν ότι η PARN όπως και η Pan2p και Por2p ανήκει στην οικογένεια των RNaseD νουκλεασών που φέρει το χαρακτηριστικό μοτίβο DEDD. Είναι συντηρημένη σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς αλλά απουσιάζει από το *S.cerevisiae* και την *Drosophila melanogaster* και μεταλλάξεις στα προβλεπόμενα καταλυτικά κατάλοιπα (DEDD) αναστέλλουν τη δράση της [35,36]. Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η ενεργότητα της PARN εξαρτάται από δισθενή μεταλλικά ιόντα ενώ μεγαλύτερη δραστηριότητα 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 ποιό μεταλλικό ιόν βρίσκεται στο ενεργό κέντρο. Το ένζυμο απαντά σε δύο ισόμορφες μία πυρηνική 74 kD και μία κυτταροπλασματική 54 kD στον άνθρωπο (62 kD στον *Xenopus laevis*). Η τελευταία είναι πρωτεολυμένο παράγωγο από το οποίο απουσιάζει μια εύκαμπτη καρβοξυτελική περιοχή. 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 κρυσταλική δομή, το οποίο έχει ιδιότητες πρόσδεσης πολυ(A) αλλά και καλύμματος [49] καθώς και μια συντηρημένη R3H περιοχή που φαίνεται να έχει δομή όμοια με αυτήν της IF3 καρβοξυτελικής περιοχής [37]. Η R3H περιοχή προσδέεται σε μονόκλιωνα νουκλεϊκά οξέα και πιθανόν κατευθύνει την PARN στο πολυαδενυλιωμένο mRNA (Σχήμα 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.

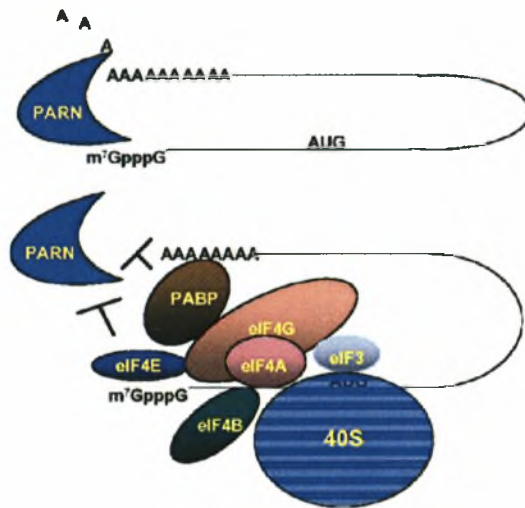
Η κρυσταλλική δομή της ανθρώπινης PARN, από την οποία λείπει το καρβόξυ-τελικό άκρο (κατάλοιπα 1-430 σε σύνολο 639), έδειξε πως το ένζυμο είναι ομοδιμερές όπου κάθε υπομονάδα αναδιπλώνεται σε δύο περιοχές, μία συντηρημένη και την περιοχή της νουκλεάσης [37]. Το ενεργό κέντρο περιέχει τέσσερα απaráλλακτα κατάλοιπα, ένα γλουταμικό και τρία ασπαρτικά οξέα (Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382) κατά το μοτίβο DEDD, τα οποία κατευθύνουν κύρια καταλυτικά δισθενή ιόντα, όπως Mg^{2+} [35]. Παρόλα αυτά η κρυσταλλική δομή της κολοβωμένης PARN δεν έδειξε την ύπαρξη ιόντων $Mg(II)$ στο ενεργό κέντρο του ενζύμου [37].



Εικόνα 7. Κρυσταλλική δομή της nPARN (αμινοξέα 1-430) [37].

Η δραστηριότητα της PARN φαίνεται πως ρυθμίζεται με τουλάχιστο έξι διαφορετικούς τρόπους: (α) διέγερσή της μέσω απευθείας αλληλεπίδρασης της PARN και του καλύμματος στο 5' άκρο [39,40,51,52], (β) αναστολή της από μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια πουρινών καθώς και από ένα ανάλογο του καλύμματος

[51]; (γ) αναστολή από την κυτταροπλασματική πολυ(A)-προσδεδόμενη πρωτεΐνη C, PABPC, [34,52], 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 [53]; (ε) διέγερση της αποικοδόμησης του πολυ(A) από πρωτεΐνες που προσδένονται σε περιοχές γνωστές ως ARE [36] (στ) συναγωνισμός μεταξύ της PARN και του eIF4E για την πρόσδεση του καλύμματος [52]. Στην Εικόνα 8 συνοψίζονται μερικοί από τους προαναφερθέντες μηχανισμούς ρύθμισης της PARN [κυρίως τα σημεία (α) και (γ)].



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

Η PARN φαίνεται επίσης να είναι απαραίτητη για ταχεία αποαδενυλίωση επαγόμενη από την πλούσια σε AU αλληλουχία, την ARE binding protein τριστρετραπρολίνη [36,43]. 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. Στην *Arabidopsis thaliana* φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της ανάπτυξης και στην αποαδενυλίωση μιας συγκεκριμένης ομάδας mRNA [44].

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η PARN κατέχει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αποικοδόμησης του mRNA και κατά συνέπεια σε όλη τη διαδικασία της γονιδιακής έκφρασης. Η αποκάλυψη της κρυσταλλικής δομής έδωσε πολύτιμες πληροφορίες για τη ρύθμιση της δραστικότητας του ενζύμου ενώ πρόσφατες εργασίες αναφέρουν την επίδραση αναλόγων του 5' καλύμματος και ορισμένων νουκλεοτιδίων στην δραστικότητα του ενζύμου. Σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη της ρύθμισης της PARN και ειδικότερα η επίδραση νουκλεοτιδίων πουρίνης στην αποαδενυλιωτική ικανότητα του ενζύμου. Προχωρήσαμε σε εκτενή κινητική μελέτη της δράσης των νουκλεοτιδίων στην PARN. Μελετήσαμε επίσης τον κρίσιμο ρόλο των ιόντων Mg(II) τόσο στη δραστικότητα του ενζύμου αλλά και κατά την αναστολή PARN από τα νουκλεοτίδια. Για το σκοπό αυτό βασιστήκαμε σε μια νέα απλή φωτομετρική τεχνική αποφεύγοντας την πολύπλοκη διαδικασία με ραδιενεργά σημασμένα υποστρώματα και την αναπτύξαμε ώστε να προχωρήσουμε σε κινητική ανάλυση της δράσης του ενζύμου.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Χημικά

Αγαρόζη	SeaKem
Acrylamide	SIGMA
Αμπικιλλίνη	SIGMA
APS (Ammonium Persulfate)	SIGMA
Bis-acrylamide	SIGMA
B-μερκαπτοαιθανόλη	Riedel de Haen
Βρωμιούχο αιθίδιο	Merck
BSA	New England Biolabs
Γλυκερόλη	Panreac
Γλυκίνη	AppliChem
Γλυκόζη	Panreac
Coomasie Brilliant Blue	Fluka
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Research Organics
Dithiothreitol (DTT)	SERVA
EDTA	Panreac
HCl	Merck
HEPES	SERVA
Ισοπροπανόλη	Scharlau
IPTG (Isopropyl ThioGalactosyl)	Fermentas
KCl	Merck
LB Broth	Scharlau
LB Agar	Scharlau
Μεθανόλη	Panreac
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Panreac
MOPS	Alfa Aesar
NaCl	Panreac
NaOH	Merck
Οξικό οξύ	Merck
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	SIGMA
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)	Research Organics
Τετρακυκλίνη	SIGMA
Tris base	Merck
Phenylmethansulfonylfluorid	PMSF
Χλωραμφαινικόλη	SIGMA

3.1.2 Βακτηριακά στελέχη

DH5a	E.coli K12, F ⁻ endA1 hsdR17(r _K -M _{K+}) supE44thi-1 recA1gyrA (Nal ^r) relA1 D(lacIZYA-argF)U169 deoR[Φ80dlacD(lacZ)M15
BL21	(DE3) pUBS E. coli B, F ⁻ dcm ompT hsdS(r _B +m _{B+}) gal λ(DE3)

3.1.3 Θρεπτικά υλικά

LB Broth	Scharlau
LB Agar	Scharlau

3.1.4 Πρωτεΐνες και ένζυμα

His6-hPARN 74kD	Από E.coli BL21
His6-hPARN 54kD	Από E.coli BL21
BSA Fraction V	Merck
Rnasin	Biolabs

3.1.5 Νουκλεοτίδια και νουκλεϊκά οξέα

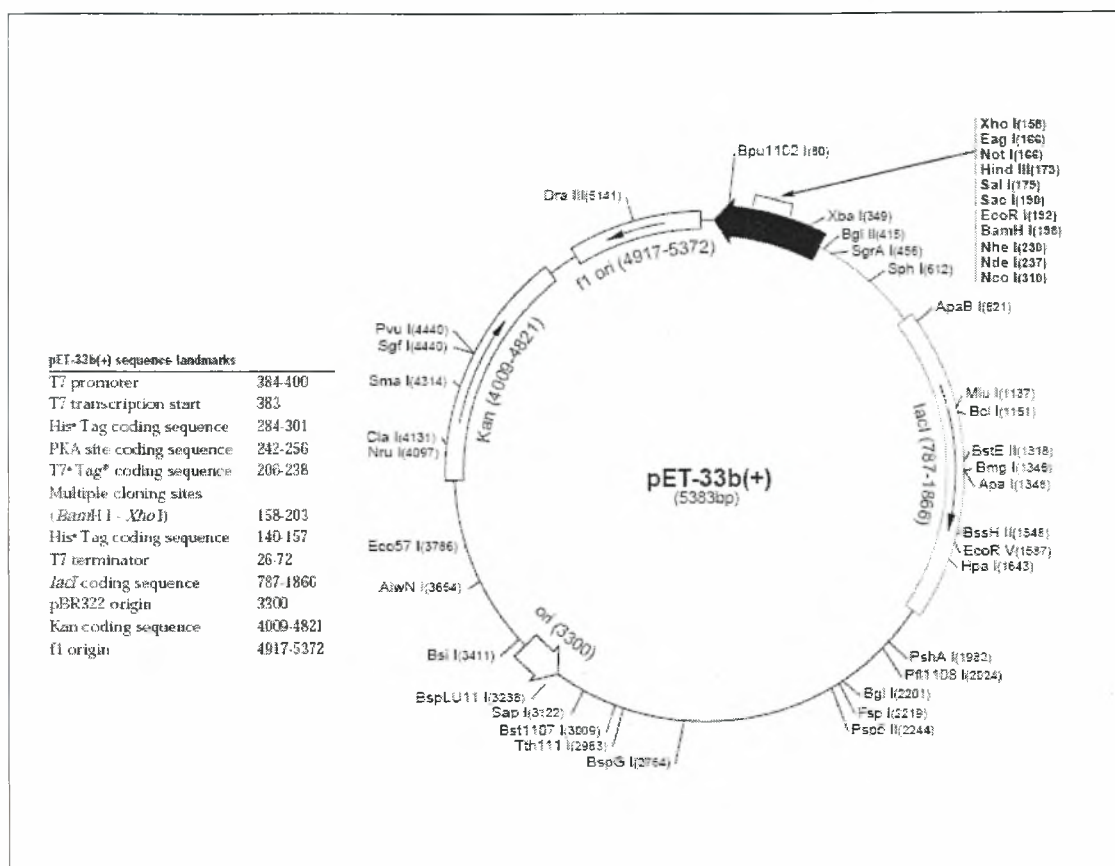
dNTPs	Stratagene
NTPs	SIGMA
Πολυαδενιλικό οξύ	SIGMA

3.1.6 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).

3.1.7 Υλικά χρωματογραφίας

Ni ²⁺ -NTA Agarose	QIAGEN
-------------------------------	--------



Εικόνα 9. Χάρτης πλασμιδιακού φορέα pET33-b

3.1.8 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 (20 mM HEPES pH 7.9, 0.5 M KCl, 0.1% Triton X-100 , 10% γλυκερόλη, 2mM μερκαπτοαιθανόλη and 2.5 mM ιμιδαζόλιο, PMSF 0,1 mM, λυσοζύμη)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (20 mM HEPES pH 7.9, 0.5 M KCl, 10% γλυκερόλη, 5 mM ιμιδαζόλιο)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (20 mM HEPES pH 7.9, 0.5 M KCl, 10% γλυκερόλη and 150 mM 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 στοκ για πήκτωμα ακρυλαμίδιου

- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl pH 8,8 1,5M
- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl pH 6,8 0,5M
- 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 στοκ που θα πρέπει να αναμείξουμε και προσθέτουμε στο τέλος τους καταλύτες APS 10% και TEMED

Διαλύματα για βαφή του gel

- Διαλυμα χρώσης Coomassie 0,1% v/w, Ισοπροπανόλη 33% , Οξικό οξύ 2%
- Διάλυμα αποχρωματισμού, Ισοπροπανόλη 9% , Οξικό οξύ 1%

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

- διάλυμα αντίδρασης (1.5mM MgCl₂ , 100 mM KCl , 20 mM HEPES-KOH pH7 0.2 mM EDTA , 0.25 mM DTT και 10% γλυκερόλη)

- διάλυμα κυανού του μεθυλενίου (0.0012% κυανό του μεθυλενίου 0,1M MOPS-KOH pH7,5 2mM EDTA)
- στοκ 10 mg/ml πολυ(A) στερεό πολυ(A) διαλύεται σε διάλυμα αντίδρασης για συγκέντρωση 100μg/ml πολυ(A)

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Υπερέκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένης PARN74-54 kd [6]

3.2.1.1 Μετασχηματισμός BL21 με pET33 PARN 74-54

Σε 200ml επιδεκτικών 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 30 λεπτά και ακολούθως στους 42°C για 1,5 λεπτά. Έπειτα τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 1-2 λεπτά και εν συνεχεία προστίθενται σε κάθε καλλιέργεια 800μl υλικό SOC. Ακολουθεί επώαση για 1,5 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση (160 rpm). Τέλος, επιστρώνονται 300μl της μετασχηματισμένης καλλιέργειας σε τριβλία 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 (καναμικίνη) και χλωραμφαινικόλη στην οποία ήδη έχουν ανθεκτικότητα τα BL21 από μόνα τους. Ακολουθεί επώαση των τριβλίων στους 37°C για 12-14h.

Σε 5ml LB Broth με χλωραμφαινικόλη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 25mg/ml και καναμικίνη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml, ενοφθαλμίζονται μετασχηματισμένα κύτταρα BL 21 και επωάζονται για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Ακολουθεί μεταφορά των 5ml της ο/π καλλιέργειας σε 400ml από φρέσκο θρεπτικό μέσο LB broth με χλωραμφαινικόλη και καναμικίνη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm (OD₆₀₀) και επώαση των καλλιεργειών στους 37°C υπό ανάδευση έως ότου το OD₆₀₀ φτάσει περίπου το 0,5 που αντιστοιχεί στη

λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Προσθέτουμε IPTG (0,1M) (Isopropyl Thio Galactosyl) σε τελική συγκέντρωση 0,5mM και 1 mM, το οποίο επάγει την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Οι καλλιέργειες επωάζονται υπό ανάδευση είτε για 4 ώρες στους 37° για την PARN 74 είτε O/N σε θερμοκρασία δωματίου για την PARN54. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 30 min στους 4°C, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αποθηκεύεται στους -80°C.

3.2.1.2. Απομόνωση της PARN

Ομογενοποίηση των κυττάρων

Το καταψυγμένο ίζημα κυττάρων διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διαδικασία του σπασίματος των κυττάρων με υπέρηχους (sonicator) μέσα σε πάγο. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 14000 rpm, για 30 λεπτά στους 4°C. Διαχωρίζεται το υπερκείμενο από το ίζημα και ακολουθεί η διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης η οποία βρίσκεται στο υπερκείμενο .

Χρωματογραφία συγγένειας

Στο υπερκείμενο προστίθεται ρητίνη νικελίου αγαρόζης (NTA-Ni agarose), η οποία έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης και αναδεύεται απαλά για μια ώρα στους 4°. Η πρωτεΐνη δεσμεύεται στην ρητίνη μέσω σύνδεσης των ιστιδινών που περιέχει με τα άτομα του νικελίου. Το διάλειμμα περνιέται προσεκτικά από στήλη η οποία κατακρατεί την ρητίνη. Η στήλη ξεπλένεται με 10ml ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Η έκλουση της πρωτεΐνης έγινε με 3 ml ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης το οποίο περιέχει ιμιδαζόλη σε συγκέντρωση 150mM . Αυτό που κάνει στην ουσία η ιμιδαζόλη είναι να δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα ιόντα νικελίου και να ανταγωνίζεται τις πρωτεΐνες συνδεδεμένες με ιστιδίνες (His-tagged) στη δέσμευση. Συλλέγονται 5

κλάσματα από τη στήλη (E1-E5). Από κάθε βήμα της απομόνωσης κρατάμε δείγματα για μέτρηση ολικής και για ηλεκτροφόρηση

3.2.2. Μέτρηση της ενεργότητας της PARN με κυανό του μεθυλενίου

3.2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στη μείωση της απορρόφησης στα 662nm όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυ(A). Στην αρχή αυτή και με βάση την πρότυπη καμπύλη γίνεται η μέτρηση της συγκέντρωσης σε μία αντίδραση των 100μμε πρόσθεση 900μl διάλυμα κυανού του μεθυλενίου. Το τελευταίο περιέχει κυανό του μεθυλενίου το οποίο προσδένεται στο πολυμερές πολυ(α) 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 σταματάει την αντίδραση. Μείωση της συγκέντρωσης που μπορεί να 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.

3.2.2.2. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης πολυ(A) σύμφωνα με τη δοκιμή ενεργότητας με διάλυμα κυανού του μεθυλενίου.

Τα δείγματα ετοιμάστηκαν σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. Όταν προστέθηκε το διάλυμα κυανού του μεθυλενίου τα δείγματα επωάστηκαν για 15' και φωτομέτρηση έγινε στα 662 nm. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (10μg/ml τελική συγκέντρωση). Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλη μια φορά και αφού υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Υπολογίστηκε η διαφορά απορρόφησης 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

Τελική συγκέντρωση (μg/ml)	0 (T)	2	4	6	8	10
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

3.2.2.3. Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

Σε χρόνο που θέλουμε να μετρήσουμε μείωση της συγκέντρωσης πολυ(A) από αντίδραση πολλαπλάσια της βασικής (100λ) αραιώνονται 90μl από την αντίδραση και προστίθενται σε 810μl ρυθμιστικό διάλυμα κυανού του μεθυλενίου που βρίσκονται είδη σε χωριστά erpendorf. Ο λόγος που παίρνουμε 90μl σε 810μl ρυθμιστικό διάλυμα κυανού του μεθυλενίου και όχι 100μl σε 900μl είναι για να φτάσει η ποσότητα της αντίδρασης και για την τελευταία μέτρηση αφού εάν παίρνουμε κάθε φορά 100 λόγω των σταγονιδίων που μπορεί να κολλήσουν στο ακροφύσιο (tip) κάθε φορά θα παραμείνει στο τέλος μικρότερος όγκος από 100λ, ενώ η αναλογία είναι η ίδια και το φωτόμετρο μετράει 900λ. Τα δείγματα θερμαίνονται στους 30°C πριν προσθέσουμε ένζυμο για μερικά λεπτά για να φτάσουν στην θερμοκρασία αντίδρασης. Ακολουθεί προσθήκη του ενζύμου και οι αντιδράσεις συνεχίζουν στους 30°. Μετά το πέρας χρόνου αντίδρασης η αντίδραση σταματά με προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος κυανού του μεθυλενίου στα και τα δείγματα φωτομετρούνται στα 662nm.

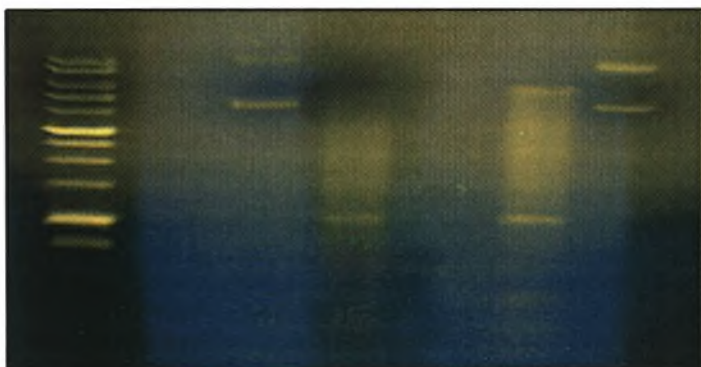
3.2.2.4. Κινητική με αυξανόμενες συγκεντρώσεις πολυ(A).

Έχοντας υπολογίσει με πειράματα χρονοκαμπύλης την ποσότητα του ενζύμου και τον απαιτούμενο χρόνο αντίδρασης ώστε οι τιμές που θα λαμβάνουμε να βρίσκονται στο όριο της γραμμικής περιοχής της χρονοκαμπύλης μπορούμε να κατασκευάσουμε καμπύλη Michaelis-Menten με συγκεντρώσεις πολυ(A) από περίπου 5 -90 μg/ml

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πολλαπλασιασμός και έλεγχος πλασμιδίου

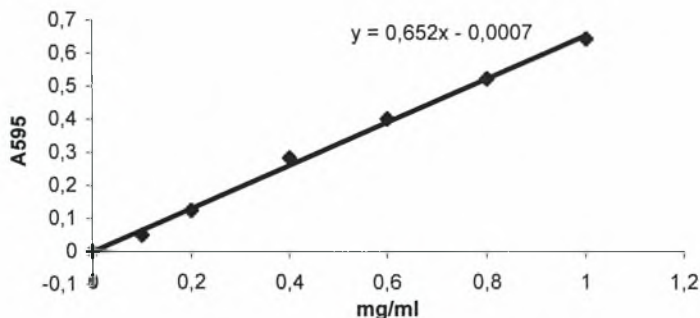
Τα πλασμίδια που περιέχουν το γονίδιο της ανθρώπινης ανασυνδυασμένης PARN74-54 πολλαπλασιάστηκαν με κύτταρα DH5a, απομονώθηκαν και έγινε έλεγχος με τα ένζυμα περιορισμού BamH1 και NdeI. Τα προϊόντα της πέψης αναλύθηκαν σε gel αγαρόζης 1% απο το οποίο επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη των γονιδίων της PARN 74 και PARN 54 (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης σε αγαρόζη 1% των προϊόντων της πέψης των πλασμιδίων pET33-P74 και pET33-P54 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamH1 και NdeI. Με σειρά: Μάρτυρες , pET33P74 άκοπο, pET33P74 κομμένο, pET33P54κομμένο και pET33P54 άκοπο

Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης

Η πρότυπη καμπύλη έγινε μετρώντας διάφορες αραιώσεις διαλύματος BSA με τη μέθοδο BRADFORD..

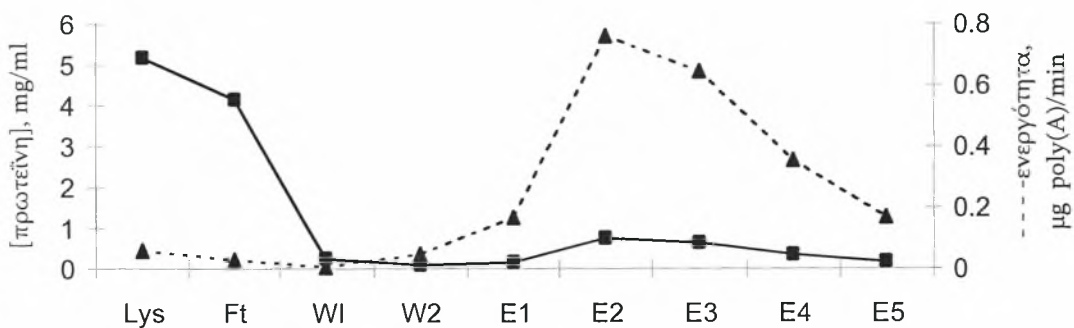


Εικόνα 11. Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης με τη μέθοδο BRADFORD από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει η συνάρτηση $C_{mg/ml}=0,652/A_{595}$

Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει η συνάρτηση $C_{mg/ml}=0,652/A595$ με την οποία θα βρίσκουμε την ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών στα δείγματα από διάφορα στάδια της απομόνωσης

Υπερέκφραση και απομόνωση PARN 74

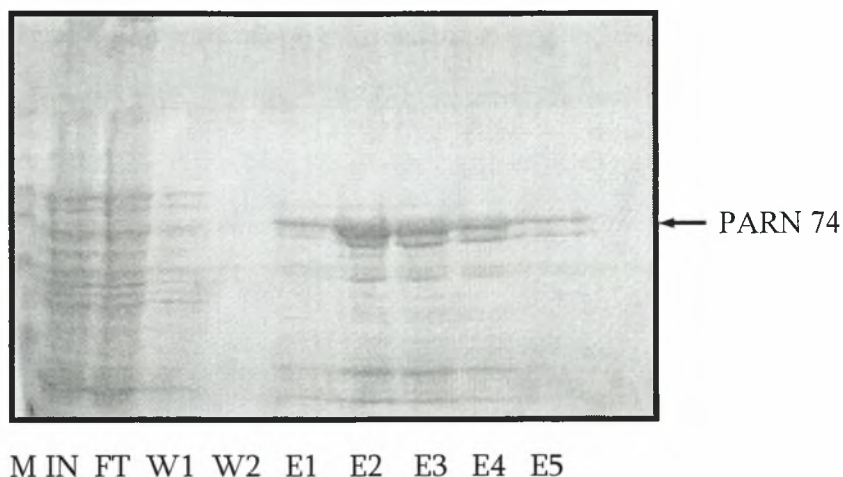
Κύτταρα BL21 μετασχηματίστηκαν με πλασμίδια υπερέκφρασης pET33 P74. Η επαγωγή πραγματοποιήθηκε σε OD περίπου 600 με IPTG τελικής συγκέντρωσης 1 mM για 4 ώρες στους 37°C. Η μέτρηση ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης από όλα τα στάδια της απομόνωσης της PARN74 έγινε με τη μέθοδο BRADFORD σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη (Εικόνα 12), και υπολογίστηκε η δραστικότητα σταθερής ποσότητας από όλα τα δείγματα με την μέθοδο κυανού του μεθυλενίου



Εικόνα 12 Μέτρηση της συγκέντρωσης (mg/ml) ολικής πρωτεΐνης και της ενεργότητας αποαδενύλωσης (μg poly(A)/min) από όλα τα στάδια της απομόνωσης της PARN74.

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από όλα τα στάδια της απομόνωσης της PARN74 έγινε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 7.5%. Οι ζώνες στις διαδρομές των δειγμάτων της έκλουσης (E1-E5) που δείχνουν την στην ανασυνδυασμένη μορφή του ενζύμου μετά τον καθαρισμό δηλώνεται στην Εικόνα 13 με το σύμβολο «←» και δείχνουν τον ικανοποιητικό βαθμό καθαρότητας του ενζύμου.

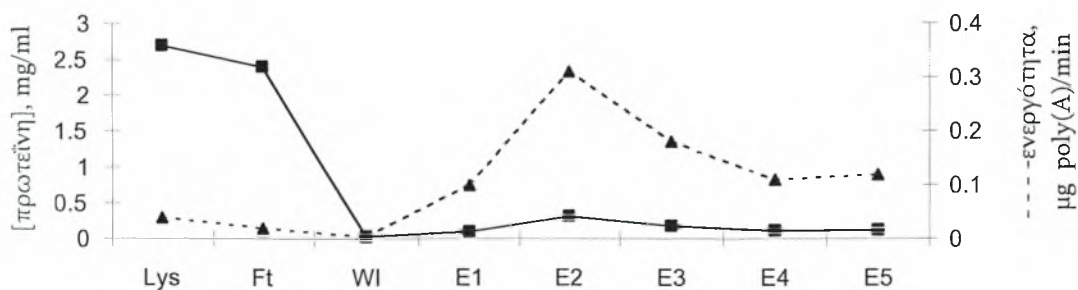
Τα δείγματα E1, E2 και E3 μεταφέρθηκαν σε διάλυμα αντίδρασης με διαπίδυση και υπολογίστηκε η συγκέντρωση με τη μέθοδο BRADFORD στα 0,248 mg/ml.



Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) δειγμάτων από όλα τα στάδια της απομόνωσης της PARN74 σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 7,5%. Χρώση με Coomassie brilliant blue. M:δείκτες μοριακού βάρους, IN: Δείγμα προς καθαρισμό, FT: Δείγμα που δεν προσδέθηκε στην στήλη, W1,W2: Δείγματα έκπλυσης, E1-E5: Δείγματα έκλουσης από την στήλη.

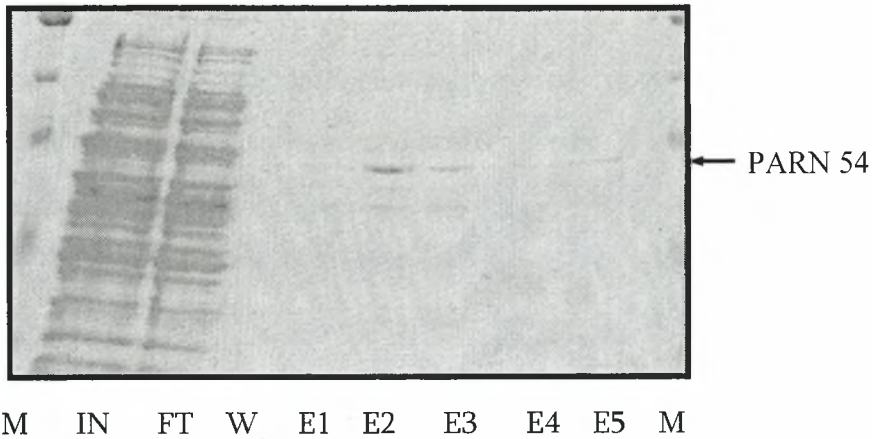
Υπερέκφραση και απομόνωση PARN 54

Κύτταρα BL21 μετασχηματίστηκαν με πλασμίδια υπερέκφρασης pET33 P54. Η προσπάθεια υπερέκφρασης της PARN 54 στις ίδιες συνθήκες με την υπερέκφραση της PARN 74 δεν απέδωσε ένζυμο και η διαδικασία επαναλήφθηκε όμως η Η επαγωγή πραγματοποιήθηκε σε OD 600 με IPTG τελικής συγκέντρωσης 1 mM O/N στους 25°. Η μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης από όλα τα στάδια της απομόνωσης της PARN74 έγινε με τη μέθοδο BRADFORD και μετρήθηκε η δραστηριότητα σταθερής ποσότητας από όλα τα δείγματα με την μέθοδο του κυανό του μεθυλενίου



Εικόνα 14. Μέτρηση της συγκέντρωσης (mg/ml) ολικής πρωτεΐνης και της ενεργότητας αποαδενυλίωσης (µg poly(A)/min) από όλα τα στάδια της απομόνωσης της PARN54.

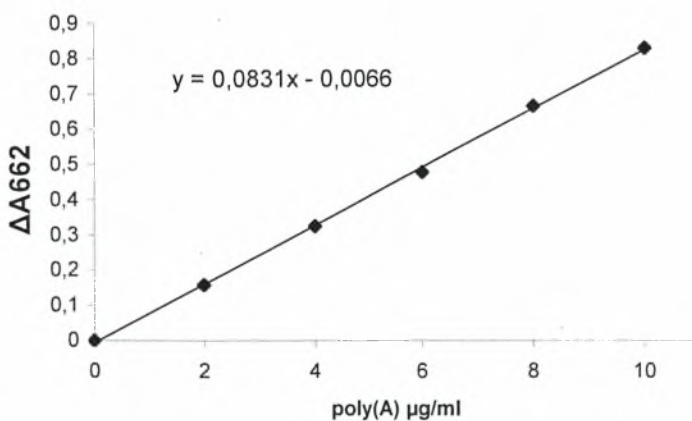
Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα δείγματα της έκλουσης είναι αρκετά μικρότερη από αυτήν της PARN 74 (σύγκριση Εικόνες 14 και 15) Η ηλεκτροφόρηση δειγμάτων από όλα τα στάδια της απομόνωσης της PARN54 έγινε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10 % (Εικόνα 15)



Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) δειγμάτων από όλα τα στάδια της απομόνωσης της PARN54 σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 7,5%. Χρώση με Coomassie brilliant blue. M:δείκτες μοριακού βάρους, IN: Δείγμα προς καθαρισμό, FT: Δείγμα που δεν προσδέθηκε στην στήλη, W1,W2: Δείγματα έκπλυσης, E1-E5: Δείγματα έκλουσης από την στήλη.

Πρότυπη καμπύλη πολυ(A)

Φωτομέτρηση στα 662 nm. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (10μg/ml τελική συγκέντρωση). Οι απόλυτες τιμές από την αφαίρεση από όλες τις απορροφήσεις την μεγαλύτερη (για πολυ(A)=0) δίνουν την παρακάτω πρότυπη καμπύλη (Εικόνα 17)

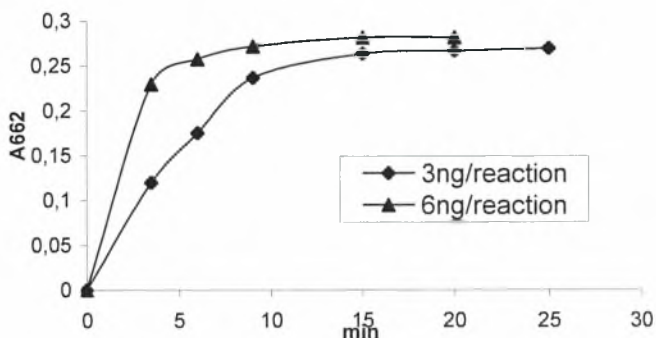


Εικόνα 17. Πρότυπη καμπύλη πολυ(A). Y: Διαφορά απορρόφησης στα 662nm

Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει η εξίσωση $C_{\text{πολυ(A)}}(\mu\text{g/ml})=0,0831/A_{662}$ από την οποία μπορούμε να υπολογίζουμε την ποσότητα του πολυ(A) που υδρολύεται κατά τις ενζυμικές αντιδράσεις

Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

Μετά από πολλές δοκιμές καθορίστηκε για τα παρούσα πειραματικά δεδομένα η μέγιστη ποσότητα των ποσότητα των 3 ng/reaction σε συγκέντρωση πολυ(A) 60μg/ml.



Εικόνα 18. Χρονοκαμπύλη με 6ng (τρίγωνα) και 3ng/reaction (ρόμβοι) σε συγκέντρωση πολυ(A) 60μg/ml.

Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας παρουσία νουκλεοτιδίων

Έχει αναφερθεί ότι η δομή του καλύμματος διεγείρει το ρυθμό της αποαδενυλίωσης όταν χορηγείται *in cis* ενώ αναστέλλει το ένζυμο όταν χορηγείται *in trans*. Επίσης έχει δειχθεί ότι το GMP αναστέλλει την PARN 54 όταν χορηγείται σε συγκεντρώσεις 10mM[51]. Το GTP είναι βασικός ενεργειακός φορέας του κυττάρου και μαζί με το GDP εμπλέκονται σε πολυάριθμες βιοχημικές αντιδράσεις. Βασιζόμενοι στα δεδομένα και στην δομική ομοιότητα του GTP με το κάλυμμα μελετήσαμε την επίδραση των τριών νουκλεοτιδίων γουανίνης, δηλαδή των GTP, GDP και GMP, στην ενεργότητα της PARN.

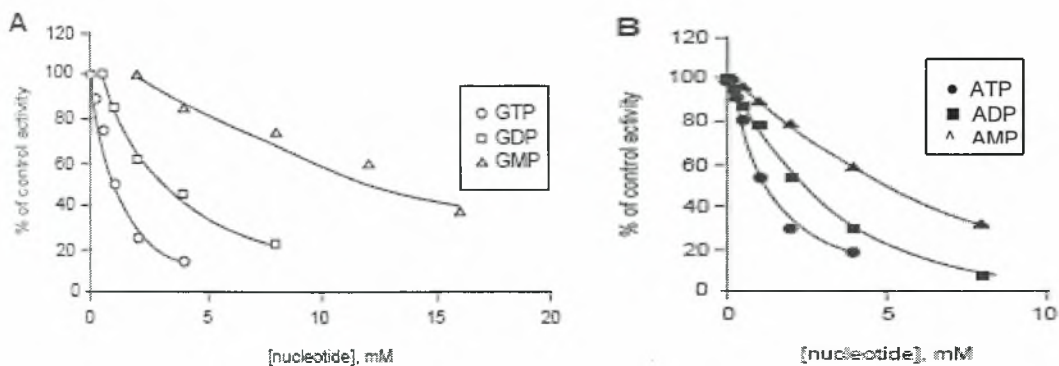
Το GTP μειώνει δραστικά την ενεργότητα του ενζύμου που ακολουθεί την κλασική κινητική κατά Michaelis-Menten. Παρατηρήσαμε περί το 90% μείωση της δραστηριότητας σε συγκέντρωση GTP ίση με 4mM μετά από δέκα λεπτά

επώασης. Το GDP ήταν λιγότερο δραστικό σε σχέση με το GTP, καθώς η μείωση της δραστηριότητας στα 4mM ήταν περίπου η μισή από αυτή του GTP.

Τέλος το GMP μείωσε τη δραστηριότητα της PARN περί το 50% σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (περίπου 14mM). Οι φαινομενικές σταθερές αναστολής $appK_i$ προσδιορίστηκαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις mM (1.0, 3.3 και 11.7mM για το GTP, GDP και GMP, αντίστοιχα). Το $appK_i$ ορίστηκε ως η συγκέντρωση του νουκλεοτιδίου που είχε ως αποτέλεσμα 50% αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στο Σχήμα 19A.

Ακολούθως ελέγχθηκε η επίδραση των νουκλεοτιδίων της άλλης ομάδας των βάσεων πουρίνης, της αδενίνης (AMP, ADP και ATP) στην ενεργότητα της PARN. Και τα τρία νουκλεοτίδια μπορούσαν να μειώσουν το ρυθμό αποαδενυλίωσης και το προφίλ της μείωσης ήταν ίδιο με αυτό των νουκλεοτιδίων της γουανίνης. Σύμφωνα με τις τιμές της $appK_i$ για τα διάφορα νουκλεοτίδια φαίνεται ότι το ένζυμο δεν έχει προτίμηση μεταξύ της γουανίνης και της αδενίνης.

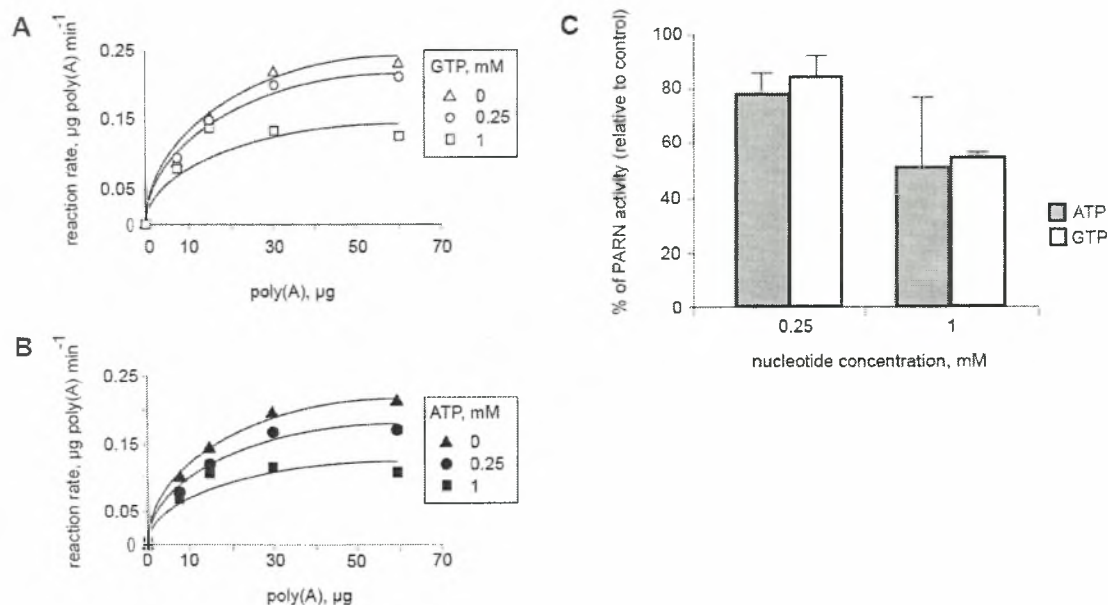
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 19B και δείχνουν ότι και τα τρία νουκλεοτίδια μπορούν να μειώσουν την ενεργότητα της PARN και ο αριθμός των φωσφορικών ομάδων παίζουν ρόλο στη μείωση αυτή, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των φωσφορικών ομάδων τόσο μεγαλύτερη είναι η μείωση της ενεργότητας.



Εικόνα 19. Επίδραση των νουκλεοτιδίων πουρίνης στη δραστηριότητα της PARN. A: Η σχετική δραστηριότητα εκφρασμένη ως ποσοστό %, απεικονίζεται ως συνάρτηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων GMP (△), GDP (□), ή GTP (○). Η $[Mg^{2+}]$ είναι 1.5mM. B. Όμοια με το A, εκτός του ότι χρησιμοποιείται AMP (▲), ADP (■), ή ATP (●).

Τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια πουρινών αναστέλλουν την PARN ακολουθώντας κινητική μη συναγωνιστικής αναστολής

Για να ερευνησουμε το μηχανισμό της αναστολής από το GTP πιο προσεκτικά, προχωρήσαμε σε κινητική ανάλυση. Προετοιμάσαμε τα δείγματα παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων GTP. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε διαγράμματα Lineweaver-Burk και είναι συμβατά με τη μη συναγωνιστική αναστολή. 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 του GTP. Σύμφωνα με την ανάλυση η τιμή της K_i είναι 3.30 mM, δηλαδή είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με την $appK_i$ για το GTP (1.4mM).



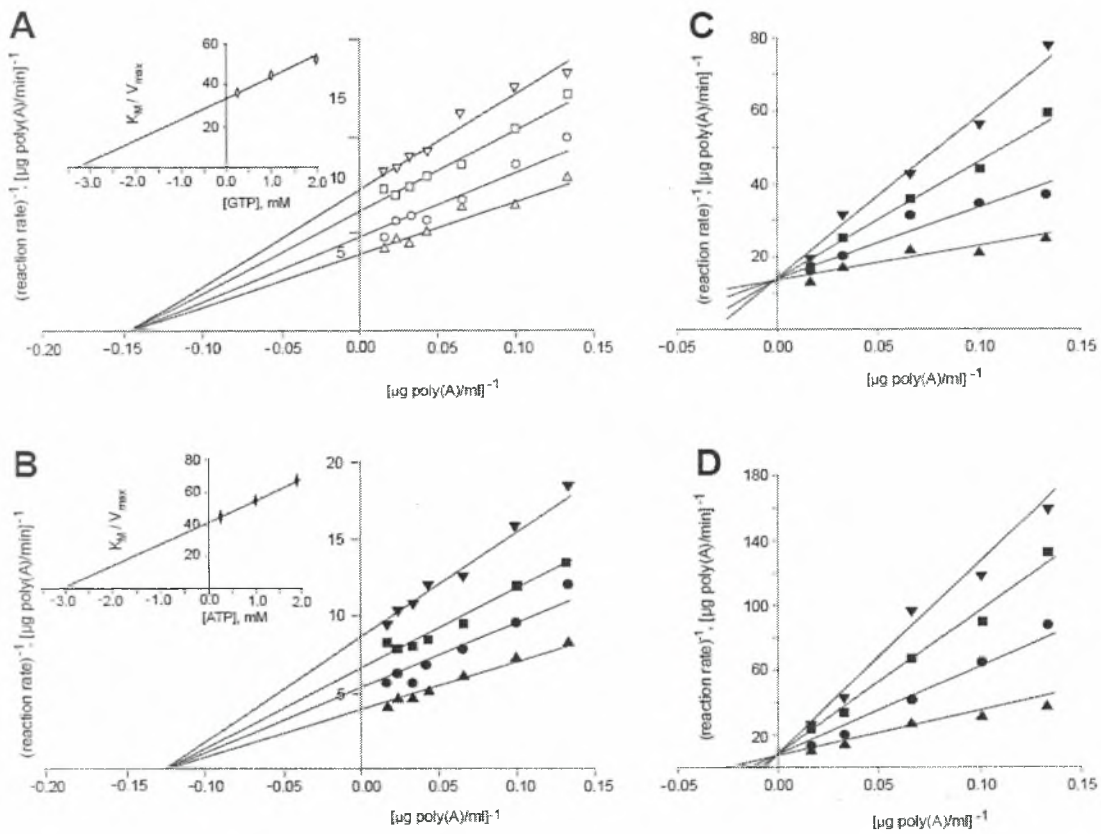
Εικόνα 20. Τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια πουρίνης αναστέλλουν την PARN. Α. Απεικονίσεις κατά Michaelis-Menten που δείχνουν την επίδραση του GTP PARN. Οι αντιδράσεις έγιναν όπως περιγράφονται στην παράγραφο “Υλικά και Μέθοδοι” παρουσία 0 mM (Δ), 0.25 mM (\circ) και 1 mM (\square) GTP. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από τουλάχιστο τρία ανεξάρτητα πειράματα. Β. Όμοια με το Α, εκτός του ότι χρησιμοποιήθηκε ATP σε 0 mM (\blacktriangle), 0.25 mM (\bullet) και 1 mM (\blacksquare). C. Σύγκριση της ανασταλτικής επίπτωσης του ATP και του GTP στη δραστηρότητα της PARN. Οι αντιδράσεις έγιναν παρουσία των αναγραφόμενων συγκεντρώσεων ATP (σκίαση) ή GTP (λευκές στήλες). Μέσος όρος από τουλάχιστο τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Οι ίδιες παρατηρήσεις έγιναν και για το ATP. Το νουκλεοτίδιο αυτό συμπεριφέρεται σα μη συναγωνιστικός αναστολέας της PARN και η τιμή της K_i υπολογίστηκε στα 3.2mM, όπως και για το GTP. Αυτά τα αποτελέσματα

υποδεικνύουν ότι η PARN δε διακρίνει μεταξύ των πουρινών, αλλά η αδείνη και η γουανίνη μπορούν εξίσου αποτελεσματικά να μειώσουν τη δραστηριότητα την ενζυμική δραστηριότητα. Επιπλέον, τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια πουρινών είναι μη συναγωνιστικοί αναστολείς της PARN.

Τα μονο- και διφωσφορικά νουκλεοτίδια πουρινών αναστέλλουν την PARN ακολουθώντας συναγωνιστική κινητική

Ακολουθώντας, ακολουθήσαμε την ίδια προσέγγιση και πραγματοποιήσαμε κινητική ανάλυση των μονο- και διφωσφορικών νουκλεοτιδίων.



Εικόνα 21. Κινητική ανάλυση παρουσία νουκλεοτιδίων πουρινών GTP (A) and ATP (B) δρουν ως μη συναγωνιστικοί αναστολής. AMP (C) and ADP (D) δρουν ως συναγωνιστικοί αναστολείς. Φαίνονται τα διαγράμματα διπλού ανάστροφου $1/v$, $1/s$. Οι συγκεντρώσεις των GTP (καινά σχήματα στο A) και ATP (συμπαγή σχήματα στο B) ήταν 0mM (τρίγωνα), 0.25mM (κύκλοι), 1mM (τετράγωνα) and 2mM (ανάστροφα τρίγωνα). Οι συγκεντρώσεις του AMP ήταν 0mM (\blacktriangle), 2mM (\bullet), 4mM (\blacksquare) and 6mM (\blacktriangledown). Οι συγκεντρώσεις του ADP ήταν 0mM (\blacktriangle), 1mM (\bullet), 2mM (\blacksquare) and 3mM (\blacktriangledown). Στα A και B φαίνονται οι κλίσεις (K_M/V_{max})

Χρησιμοποιήσαμε ένα εύρος συγκεντρώσεων νουκλεοτιδίων γύρω από την τιμή της $appK_i$ του Πίνακα 1. Τα νουκλεοτίδια αυτά αναστέλλουν την PARN συναγωνιστικά. Οι τιμές της K_i που υπολογίστηκαν είναι 0.5 και 1.6mM για το AMP και το ADP, αντίστοιχα. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν έναν άμεσο ανταγωνισμό μεταξύ του AMP, του ADP και του υποστρώματος για την ίδια θέση δέσμευσης της PARN..

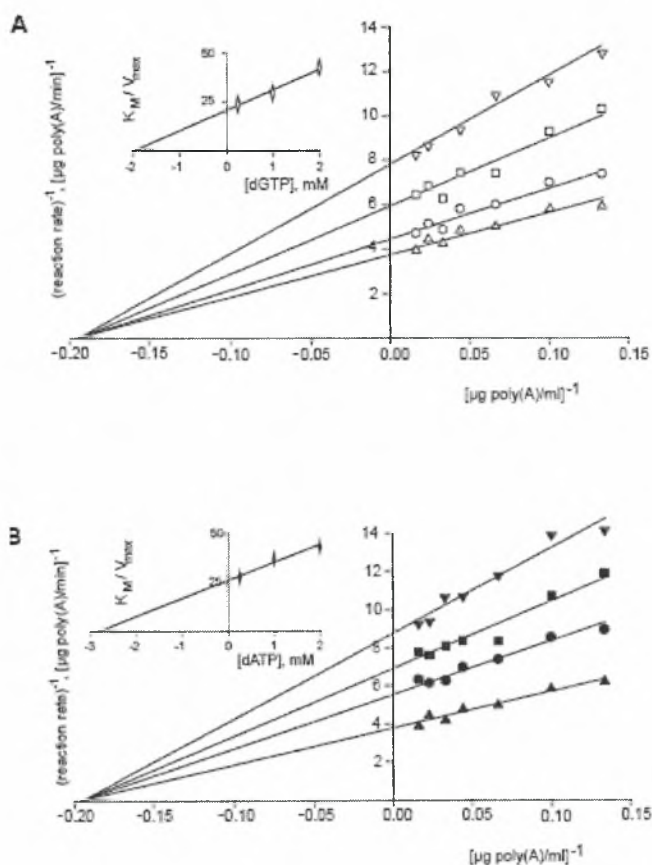
Νουκλεοτίδιο	K_i , mM	$appK_i$, mM	
		1.5mM Mg^{2+}	0.5mM Mg^{2+}
GTP	3.3 ± 0.5*	1.0 ± 0.1	0.5 ± 0.1
GDP	2.8 ± 0.8	3.3 ± 0.3	1.4 ± 0.5
GMP	4.5 ± 2.2	11.3 ± 3.2	4.8 ± 1.2
ATP	3.2 ± 0.8	1.0 ± 0.2	0.3 ± 0.1
ADP	0.5 ± 0.3	2.2 ± 0.7	1.0 ± 0.3
AMP	1.6 ± 0.3	4.7 ± 1.2	6.7 ± 2.2
dGTP	2.0 ± 0.1	n.d	n.d
dATP	2.8 ± 0.5	n.d	n.d

Πίνακας 1. Αναστολή της PARN 74 και της PARN 54 από νουκλεοτίδια πουρίνων

Το δεόξυ-ATP και το δεόξυ-GTP μειώνουν τη δραστηριότητα της PARN μη συναγωνιστικά

Ακολουθώντας τις προηγούμενες παρατηρήσεις, ελέγξαμε αν το είδος του σακχάρου του νουκλεοτιδίου επηρεάζει την δραστηριότητα της PARN. Πραγματοποιήσαμε αντιδράσεις αποαδενυλίωσης όπως περιγράφηκαν παραπάνω συμπεριλαμβάνοντας dATP και dGTP. Και στις δύο περιπτώσεις τα δεοξυνουκλεοτίδια μείωσαν την ενζυμική δραστηριότητα μη συναγωνιστικά. Οι τιμές της K_i ήταν 2.0 και 2.8mM για το dGTP και το dATP, αντίστοιχα. Τα

αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η φύση του σακχάρου δεν αλλάζει το προφίλ της αναστολής. Το γεγονός ότι οι τιμές της K_i για το ATP και το dATP είναι παρόμοιες υποστηρίζει τις μετρήσεις μας.



Εικόνα 22. Τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια πουρινών αναστέλλουν τη δραστικότητα της PARN: Τα dGTP (A) και dATP (B) είναι μη συναγωνιστικοί αναστολείς. Απεικονίσεις διπλού ανάστροφου (Lineweaver-Burk) ($1/v$ σε συνάρτηση με το $1/[\text{υπόστρωμα}]$) δραστικότητας της PARN παρουσία dATP ή dGTP. Οι συγκεντρώσεις dGTP (κενά σύμβολα στο A) και dATP (συμπαγή σύμβολα στο B) ήταν 0 mM (τρίγωνο), 0.25mM (κύκλος), 1mM (τετράγωνο) and 2mM (ανάστροφο τρίγωνο). Ενδεικτικά αποτελέσματα από δύο τουλάχιστο πειράματα. Ένθετα: Κλίσεις (K_M/V_{max}) των καμπυλών των διπλών ανάστροφων ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των νουκλεοτιδίων.

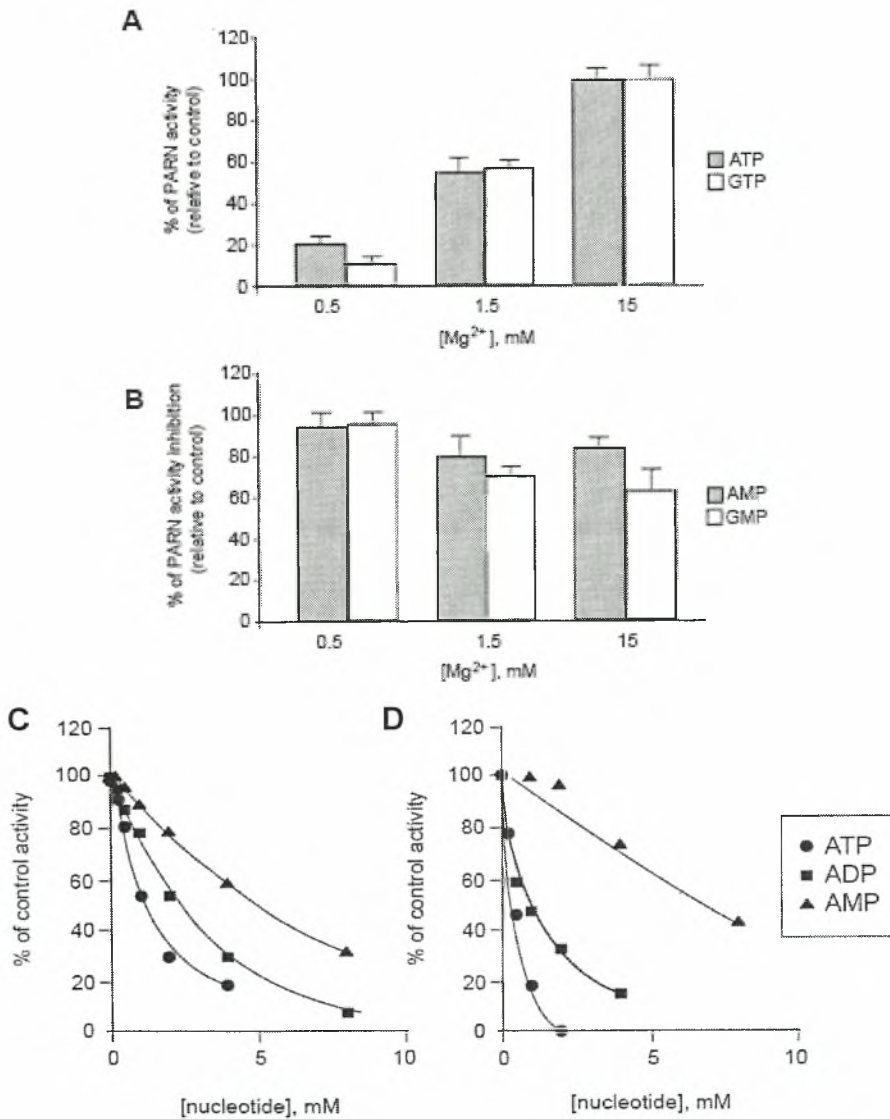
Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η PARN δεν διακρίνει μεταξύ της ριβόζης και της δεοξυριβόζης. Συμπερασματικά, τα πειράματα που περιγράφηκαν υποδεικνύουν ότι είναι ο αριθμός των φωσφορικών ομάδων που ρυθμίζει την αποτελεσματικότητα της PARN και όχι η πουρίνη ή το σάκχαρο.

Η επίδραση των νουκλεοτιδίων πουρίνης αναστέλλεται από την προσθήκη ιόντων Mg(II).

Αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι τα δισθενή ιόντα Mg αλληλεπιδρούν με τριφωσφορικά νουκλεοσίδια, καθώς τα ιόντα δεσμεύουν τη β φωσφορική ομάδα. Για να ερευνήσουμε αν η παρατηρούμενη αναστολή της PARN οφειλόταν στην απώλεια Mg^{2+} , πραγματοποιήσαμε αντιδράσεις αποαδενυλίωσης με τις συγκεντρώσεις των ιόντων να κυμαίνονται σε τιμές χαμηλότερες και υψηλότερες της συγκέντρωσης των νουκλεοτιδίων. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση των Mg^{2+} παύει η αναστολή της PARN. Σε 15mM Mg^{2+} παρουσία 1mM ATP ή GMP, η ενζυμική δραστηριότητα επανακτάται πλήρως σε σύγκριση με το μάρτυρα. Όταν η συγκέντρωση των Mg^{2+} (0.5mM) ήταν χαμηλότερη από αυτή του νουκλεοτιδίου (1mM), παρατηρούνταν αναστολή της PARN. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι αντιδράσεις αποαδενυλίωσης πραγματοποιήθηκαν σε pH 7.5, καθώς η αλληλεπίδραση των Mg^{2+} με τη β φωσφορική ομάδα είναι ισχυρότερη σε ουδέτερες συνθήκες παρά σε όξινες.

Αν τα Mg^{2+} αλληλεπιδρούν με τη β και/ή τη γ φωσφορική ομάδα, τότε τα μονονουκλεοτίδια πουρίνης που δεν έχουν τέτοιες ομάδες δε θα ήταν ικανά να επανακτήσουν τη δραστηριότητα της PARN. Πράγματι, σε πειράματα που έγιναν με συγκεντρώσεις Mg^{2+} κατά πολύ μεγαλύτερες από της συγκεντρώσεις των AMP (5mM) και GMP (5mM) η επανάκτηση της δραστηριότητας δεν ήταν ποτέ υψηλότερη από 40%, σε σύγκριση με την σχεδόν πλήρη ανάκτηση της δραστηριότητας στην περίπτωση των ΥTPs. Αυτή η παρατήρηση σε συνδυασμό με το γεγονός ότι δε λαμβάνει χώρα αλληλεπίδραση μεταξύ των ιόντων και των μονοφωσφορικών νουκλεοτιδίων, υποδεικνύει ότι τα νουκλεοτίδια πουρίνης μπορούν να μειώσουν τη δραστηριότητα της PARN όχι μόνο μέσω αλληλεπίδρασης με τα Mg^{2+} .

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα τα νουκλεοτίδια πουρίνης μειώνουν τη δραστικότητα της PARN κυρίως στερώντας του βασικά δισθενή ιόντα μετάλλου.



Εικόνα 23. Επίδραση των Mg²⁺ στην αναστολή της PARN από νουκλεοτίδια πουρινών. Α. Σχετική ενεργότητα στα 1.5mM ATP (γκρι στήλες) και 1.5mM GTP (κενές στήλες) παρουσία των τριών συγκεντρώσεων Mg²⁺. Β. σχετική ενεργότητα στα 1.5mM AMP (γκρι στήλες) και 1.5mM GMP (κενές στήλες) παρουσία των τριών συγκεντρώσεων Mg²⁺. Γ. Σχετική ενεργότητα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις AMP (▲), ADP (■), or ATP (●). Δ. όπως και στο C, αλλά σε 0.5mM Mg²⁺.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση των νουκλεοτιδίων πουρίνης και η πιθανή ρυθμιστική τους δράση στην δραστικότητα της PARN. Επιλέχθηκαν τα μόρια αυτά με βάση προηγούμενες αναφορές σχετικά με την επίδραση των νουκλεοτιδίων πουρινών και των αναλόγων τους στη δραστικότητα της PARN. Συγκεκριμένα: α) το AMP και το GMP αναφέρεται ότι αναστέλλουν το ένζυμο και β) τα νουκλεοτίδια πουρίνης είναι δομικά όμοια με τα μονομερή των πολύ(A) ουρών και του 5' καλύμματος που δεσμεύει την RRM περιοχή του ενζύμου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όλα τα νουκλεοτίδια πουρίνης μπορούν να μειώσουν την ενεργότητα της PARN. Λεπτομερής κινητική ανάλυση αποκάλυψε ότι ο αριθμός των φωσφορικών ομάδων των μονονουκλεοτιδίων αλλάζει τον τύπο της αναστολής: συναγωνιστική για τα μονο- και τα διφωσφορικά νουκλεοτίδια, μη συναγωνιστική για τα τριφωσφορικά. τελικά τα ιόντα Mg^{++} αίρουν την αναστολή από τα δι και τριφωσφορικά, αλλά δεν επηρεάζουν την αναστολή από τα μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια.

Η PARN περιέχει δύο περιοχές δέσμησης RNA, την R3H και την RRM. Έχει αναφερθεί ότι η περιοχή μεταξύ 431 και 537 της PARN είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση του καλύμματος[37]. Αυτό το τμήμα περιλαμβάνει την περιοχή RRM που εκτείνεται από το αμινοξύ 437 έως το 524, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί πρόσφατα με ανάλυση NMR (PDB entry: 1WMV) και σπεκτροσκοπικά. Η περιοχή RRM μπορεί να δεσμεύσει και τη δομή του καλύμματος και την πολύ(A) ουρά και οι δύο περιοχές δέσμησης είναι διακριτές τόσο δομικά όσο και λειτουργικά[50]. Μέρος της εργασίας αυτής αναφέρεται στην επίδραση του GTP και του ATP στη δραστικότητα της PARN. Και τα δύο αυτά νουκλεοτίδια μπορούν να αναστείλουν το ένζυμο μη συναγωνιστικά. Με βάση τη δομική ομοιότητα του GTP και του ATP με το κάλυμμα είναι πιθανό τα νουκλεοτίδια πουρίνης να δεσμεύονται στην περιοχή RRM της PARN. Αν αυτή η

δέσμευση υφίσταται, τότε φαίνεται λογικό τα νουκλεοτίδια αυτά να συναγωνίζονται με το κάλυμμα για τη δέσμευση στην PARN και η μεγάλη συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων σε σχέση με το κάλυμμα να ευνοεί τη δέσμευση των νουκλεοτιδίων, προστατεύοντας έτσι το mRNA από την αποικοδόμηση. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η PARN πλήρους μεγέθους αναστέλλεται από 20μM ελεύθερου m7GpppG , ενώ μια κατά 5 με 10 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση GpppG (περίπου 0.33 mM) απαιτούνταν για το ίδιο αποτέλεσμα.

Τουλάχιστον επτά μηχανισμοί έχουν αναφερθεί για τη ρύθμιση της PARN: (i) ενεργοποίηση της δραστηριότητας της PARN μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με το κάλυμμα του mRNA, (ii) αναστολή της PARN από μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια πουρινών και ανάλογα της καλύπτρας, (iii) αναστολή της δράσης της PARN από την PABPC, πιθανόν λόγω της δέσμευσης της PABPC με την πολύ(A), (iv) αναστολή της PARN από το πυρηνικό σύμπλοκο δέσμευσης του καλύμματος (CBC), δίνοντας έμφαση στη σημασία της επικοινωνίας μεταξύ των δύο άκρων των mRNA μορίων, (v) αλληλεπίδραση της PARN με την CUG-BP πρωτεΐνη που δεσμεύει mRNA, η οποία είναι η ομόλογη ανθρώπινη πρωτεΐνη της EDEN-BP του *Xenopus*, και ενεργοποίηση από τη μείωση της πολύ(A) ουράς, (vi) προώθηση της αποικοδόμησης της πολύ(A) από την ARE και τις συσχετιζόμενες με αυτή πρωτεΐνες, (vii) ανταγωνισμός μεταξύ της PARN και του eIF4E για τη δέσμευση του καλύμματος, όπου η φωσφορυλιωμένη PARN και eIF4E φαίνεται να ρυθμίζουν το αποτέλεσμα του ανταγωνισμού μεταξύ της PARN και του eIF4E. Παρόμοια με τα παραπάνω αποτελέσματα (και ειδικότερα με το ii), τα δεδομένα μας δείχνουν ότι η PARN αναστέλλεται από το GTP ή το ATP με μη συναγωνιστικό τρόπο. Δεδομένης της δομικής ομοιότητας αυτών των νουκλεοτιδίων με το ανάλογο του καλύμματος και τον ίδιο τύπο αναστολής, είναι λογικό να προτείνουμε ότι τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια ασκούν τη δράση τους στην PARN πιθανώς μιμούμενα το κάλυμμα *in trans*.

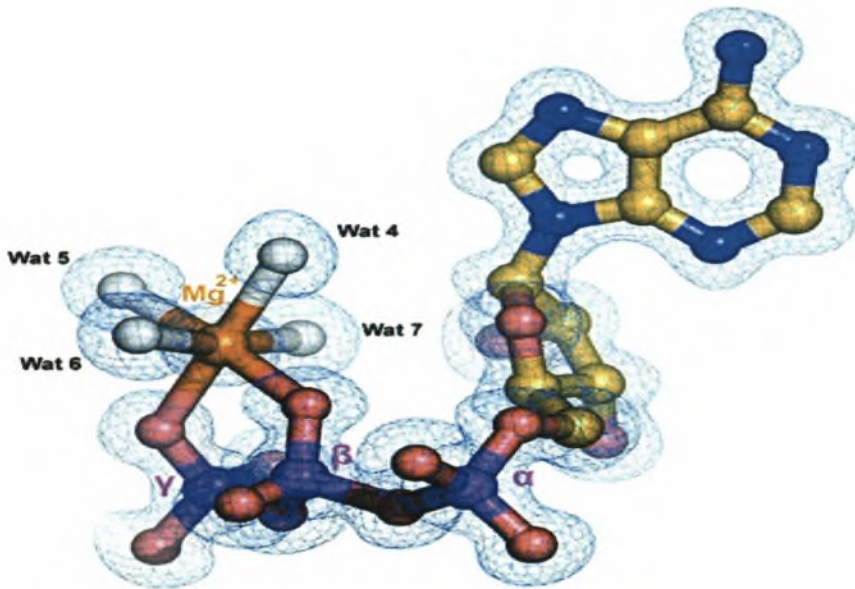
Ένας ακόμα σημαντικός ρόλος της ικανότητας δέσμευσης του καλύμματος από την PARN είναι ότι θα μπορούσε να ρυθμίζει τον ανταγωνισμό μεταξύ της αποικοδόμησης και της μετάφρασης του mRNA, αλλά να μην επιτρέπει την έναρξη της μετάφρασης ενός mRNA που υπόκειται σε αποικοδόμηση της πολύ(A) ουράς του από το ένζυμο, ή η αλληλεπίδραση καλύμματος-PARN να σταματά τη μετάφραση και να πυροδοτεί την αποικοδόμηση του mRNA. Σύμφωνα με τα δεδομένα μας αυξανόμενες συγκεντρώσεις GTP και/ή ATP γύρω από τη μεταφραστική μηχανή θα μείωναν την προτίμηση της PARN για το κάλυμμα και την επακόλουθη αποικοδόμηση του πολύ(A). Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της μετάφρασης η πολύ(A) ουρά του mRNA μειώνεται συνεχώς σε μέγεθος. Αυτή η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι ένα κρίσιμο ελάχιστο μήκος το οποίο φαίνεται να είναι περίπου 10-12 αδενυλικά κατάλοιπα στους κατώτερους ευκαρυώτες και το διπλάσιο στα μετόζωα. Σε κάθε περίπτωση η ουρά δε φαίνεται να απομακρύνεται πλήρως από την υπεύθυνη αποαδενυλάση. Όσον αφορά την PARN, φαίνεται ότι η υψηλή τοπική συγκέντρωση των παραγόμενων 5'-AMP από την αντίδραση αποαδενυλίωσης αναστέλλει συναγωνιστικά το ένζυμο και το απελευθερώνει από τα υποστρώματά του.

Αναφέρεται στη βιβλιογραφία η αναστολή της PARN από το AMP, το GMP και ένα ανάλογο του καλύμματος. Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι το ανάλογο του καλύμματος μπορεί να δράσει ανασταλτικά όταν παρέχεται *in trans* και να διεγείρει το ένζυμο όταν παρέχεται *in cis*. Προς σύγκριση, το 5'-AMP και το 5'-GMP ανέστειλαν επίσης το ένζυμο, αλλά όταν παρέχοντας σε συγκεντρώσεις περίπου δύο τάξεις μεγέθους πάνω από το ανάλογο (10mM από το νουκλεοτίδιο, 0.1mM για το ανάλογο του καλύμματος.) το ανάλογο του καλύμματος αναφέρεται ότι αναστέλλει την PARN μη συναγωνιστικά με τον ίδιο τρόπο που βρήκαμε ότι το ATP και το GTP δρουν στο ένζυμο. Επεκτείναμε τις παρατηρήσεις μας και πραγματοποιήσαμε κινητική ανάλυση της αναστολής από το 5'-AMP και το 5'-GMP. Αποδείχτηκε ότι και αυτά τα νουκλεοτίδια

αναστέλλουν την PARN, αλλά ο τύπος της αναστολής είναι συναγωνιστικός. Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι το προϊόν της αντίδρασης μπορεί να αναστείλει το ένζυμο και να συναγωνιστεί για τη δέσμευση του υποστρώματος. Τα ADP και GDP ανέστειλαν και αυτά την PARN συναγωνιστικά. Σύμφωνα με τις τιμές των σταθερών αναστολής τα νουκλεοτίδια πουρίνης με δύο φωσφορικές ομάδες αλληλεπιδρούν ισχυρότερα από τα μονοφωσφορικά με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Μαζί με προηγούμενα δεδομένα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το ένζυμο μπορεί να διακρίνει μεταξύ των μονο- ή διφωσφορικών ομάδων και των τριφωσφορικών: τα πρώτα αλληλεπιδρούν με την PARN στην περιοχή του ενεργού κέντρου, ενώ τα τελευταία σε μια άλλη περιοχή του ενζύμου. Η RRM θα μπορούσε να είναι αυτή η περιοχή καθώς το κάλυμμα δεσμεύει την RRM και τα ATP/GTP είναι δομικά όμοια με το κάλυμμα. Επιπλέον, τόσο το κάλυμμα όσο και τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια πουρίνης αναστέλλουν την PARN μη συναγωνιστικά. Ωστόσο, αυτή η υπόθεση απαιτεί περαιτέρω μελέτες. Παρόλα αυτά, το σημαντικό σημείο είναι ότι το προϊόν της αντίδρασης μπορεί να αναστείλει το ένζυμο μέσω ανταγωνισμού με το υπόστρωμα για το ενεργό κέντρο.

Τέλος, μελετήθηκε ο ρόλος των ιόντων Mg^{2+} . Οι Son και συν. μελέτησαν την αλληλεπίδραση των Mg^{2+} με τα τριφωσφορικά νουκλεοσίδια και έδειξαν ότι τα ιόντα δεσμεύουν μόνο τη β-φωσφορική ομάδα – ένα ιόν μετάλλου δεσμεύεται ανά νουκλεοτίδιο. Πρόσφατες επίσης μελέτες δείχνουν πως η αλληλεπίδραση του $Mg(II)$ με τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια γίνεται μέσω των β και γ φωσφορικών ομάδων τους (Εικόνα 23). Βασισμένοι σε αυτές τις παρατηρήσεις μελετήσαμε την επίδραση της συγκέντρωσης των Mg^{2+} στην αναστολή της PARN από τα νουκλεοτίδια. Τα τρι- και διφωσφορικά νουκλεοτίδια δεν αναστέλλουν την PARN παρουσία Mg^{2+} σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από αυτές των νουκλεοτιδίων. Επομένως, μια ισομοριακή ποσότητα του ιόντος θα μπορούσε να δεσμεύει τα νουκλεοτίδια και να απενεργοποιεί τις επιδράσεις στην PARN, ενώ μια άλλη ποσότητα αλληλεπιδρά με το ενεργό κέντρο. Σε συμφωνία με την

παρατήρηση ότι η β φωσφορική ομάδα αλληλεπιδρά με το ιόν, καμία ανάκτηση της δραστηριότητας της PARN δεν παρατηρήθηκε σε αυξημένες συγκεντρώσεις Mg^{2+} παρουσία AMP και GMP καθώς τα νουκλεοτίδια αυτά δε φέρουν β φωσφορική ομάδα. Επομένως, μπορούμε λογικά να υποθέσουμε ότι ο συνδυασμός της τοπικής συγκέντρωσης των Mg^{2+} και των ATP/GTP (ή ADP/GDP) ρυθμίζει τη δραστηριότητα της PARN. Όταν η αντίδραση αποαδενυλίωσης είναι ενεργή (και απελευθερώνεται 5'-AMP) δεν υφίσταται ρύθμιση από ιόντα μετάλλου.



Εικόνα 33 Σύμπλοκο ATP- Mg^{++}

Σε συνδυασμό με τους μηχανισμούς που αναφέρθηκαν παραπάνω, τα δεδομένα μας υποστηρίζουν ένα νέο, απλό μηχανισμό ρύθμισης μέσω του οποίου η αποαδενυλίωση μέσω της PARN ρυθμίζεται με απλή αλλοστερική αναστολή του ενζύμου από τριφωσφορικά νουκλεοτίδια πουρίνης σε συνδυασμό με τις συγκεντρώσεις των Mg^{2+} . Στα πλαίσια αυτά, μια υψηλή συγκέντρωση GTP στο μικροπεριβάλλον της μεταφραστικής μηχανής θα μπορούσε να εξασφαλίσει ότι η PARN θα είναι λιγότερο δραστήρια σε ένα πολυαδενυλιωμένο mRNA με κάλυμμα,

καθώς το ένζυμο θα μπορούσε⁴ να δεσμεύει το νουκλεοτίδιο έναντι του καλύμματος. Επιπλέον, τα eIF4E και PABC θα μπορούσαν να περιορίσουν την πρόσβαση της PARN στο mRNA. Σε ένα τέτοιο μικροπεριβάλλον, η PARN θα έμενε «σιωπημένη» μέσω της προστασίας των δομών που προσεγγίζει στο mRNA, δηλαδή της πολύ(A) ουράς και του καλύμματος, αλλά και μέσω αλλοστερικής αναστολής από μικρά και άφθονα μόρια, όπως το GTP και το ATP. Επομένως, ένα νουκλεοτίδιο πουρίνης μπορεί να δρα σαν πηγή ενέργειας αλλά ταυτόχρονα και σαν αλλοστερικό ρυθμιστικό μόριο. Όταν η αποικοδόμηση του mRNA λαμβάνει χώρα, η αποαδενυλίωση συμβαίνει στο πρώτο στάδιο μέχρι η ουρά να μειωθεί ως ένα κρίσιμο μήκος όπου η αποαδενυλάση δεν είναι ενεργή. Θα μπορούσε να είναι το παραγόμενο 5'-AMP που τελικά αναστέλλει το ένζυμο, άσχετα με τη συγκέντρωση των Mg^{2+} , και έπειτα άλλες εξονουκλεάσες αποικοδομούν πλήρως το mRNA. Ωστόσο, η απάντηση κλειδί στην ερώτηση πως η PARN έχει πρόσβαση τόσο στην πολύ(A) ουρά όσο και στο κάλυμμα παραμένει αδιευκρίνιστη. Επιπλέον, οι παρατηρήσεις μας ότι τα δεοξυριβονουκλεοτίδια πουρίνης αναστέλλουν την PARN σε υψηλές συγκεντρώσεις αντανακλούν το γεγονός ότι στο πυρηνικό μικροπεριβάλλον το ένζυμο παραμένει ανενεργό. Και σε αυτή την περίπτωση, παράγοντες όπως το CBC και το PABPN περιορίζουν την πρόσβαση της PARN στο mRNA. Ωστόσο απαιτούνται περαιτέρω πειράματα για να ελεγχθεί η υπόθεση αυτή.

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. GENES VIII Benjamin Lewin πρώτος τόμος κεφάλαιο 5
2. Hoof van, A. & Parker, R. The exosome: a proteasome for RNA? *Cell* 99, 347–350 (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' to 5' degradation. *Mol. Cell* 11, 1405–1413 (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. 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).

21. 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).

22. Dlakic, M. Functionally unrelated signalling proteins contain a fold similar to Mg²⁺-dependent endonucleases. *Trends Biochem. Sci.* 25, 272–273 (2000).

23. Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrud, D. & Parker, R. Ccr4p is the catalytic sub-unit of a Ccr4/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 21, 1427–1436 (2002).

24. 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).

25. 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)

26. Dageron, M.C., Mauxion, F. & Seraphin, B. The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Res.* 29, 2448–2455 (2001).

27. 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).

28. 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).

29. Joyce, C.M. & Steitz, T.A. Polymerase structures and function: variations on a theme? *J. Bacteriol.* 177, 6321–6329 (1995).
30. 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).
31. 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).
32. Ito, T. *et al.* A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4277–4278 (2001).
33. 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).
34. Kömer, C.G. & Wahle, E. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3' exonuclease. *J. Biol. Chem.* 272, 10448–10456 (1997).
35. 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).
36. 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).
37. Wu, M., Reuter, M., Lilie, H., Liu, Y., Wahle, E. & Song H. Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO J* (2005), 1–12
38. 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).
39. Dehlin, E., Wormington, M., Kömer, C.G. & Wahle, E. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.* 19, 1079–1086 (2000).
40. 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).
41. Sach, A.B. & Deardorff, J.A. Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast. *Cell* 70, 961–973 (1992).

42. 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).
43. Lejeune, F., Li, X. & Maquat, L.E. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylation, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell* 12, 675–687 (2003).
44. Paul R. Copeland and Michael Wormington The mechanism and regulation of deadenylation: Identification and characterization of *Xenopus* PARN. RNA (2001), 7:875–886 Cambridge University Press. Printed in the USA. Copyright © 2001 RNA Society.
45. Javier Martínez, Yan-Guo Ren, Per Nilsson, Måns Ehrenberg, and Anders Virtanen. The mRNA Cap Structure Stimulates Rate of poly(A) Removal and Amplifies Processivity of Degradation. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 276, No. 30, Issue of July 27, pp. 27923–27929, 2001
46. Per Nilsson, Anders Virtanen. Expression and purification of recombinant poly(A)-specific ribonuclease (PARN) *International Journal of Biological Macromolecules* 2006
47. Cheng Y, Liu WF, Yan YB, Zhou HM A nonradioactive assay for poly(A)-specific ribonuclease activity by κανό του μεθυλενίου colorimetry. *Protein Pept Lett.* 2006;13(2):125-8.
48. A General Ribonuclease Assay Using Κανό του μεθυλενίου. Greiner-Stoeffele T.; Grunow M.; Hahn U. *Analytical Biochemistry*, Volume 240, Number 1, August 1996, pp. 24-28(5)
49. 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
50. A. Zhang, W.-F. Liu, Y.-B. Yan, Arch. Role of the RRM domain in the activity, structure and stability of poly(A)-specific ribonuclease *Biochem. Biophys.* 461 (2007) 255-262
51. Javier Martínez, Yan-Guo Ren, Ann-Charlotte Thuresson, Ulf Hellma, 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* *Biol. Chem.* 275 (2000) 24222-24230

52. Min Gao, David T. Fritz, Lance P. Ford, and Jeffrey Wilusz Interaction between a Poly(A)-Specific Ribonuclease and the 5' Cap Influences mRNA Deadenylation Rates In Vitro *Mol. Cell* 5 (2000) 479-488.

53. Min Gao, Carol J. Wilusz, Stuart W. Peltz and Jeffrey Wilusz A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements (2001) *EMBO J.* 20, 1134–1143.

