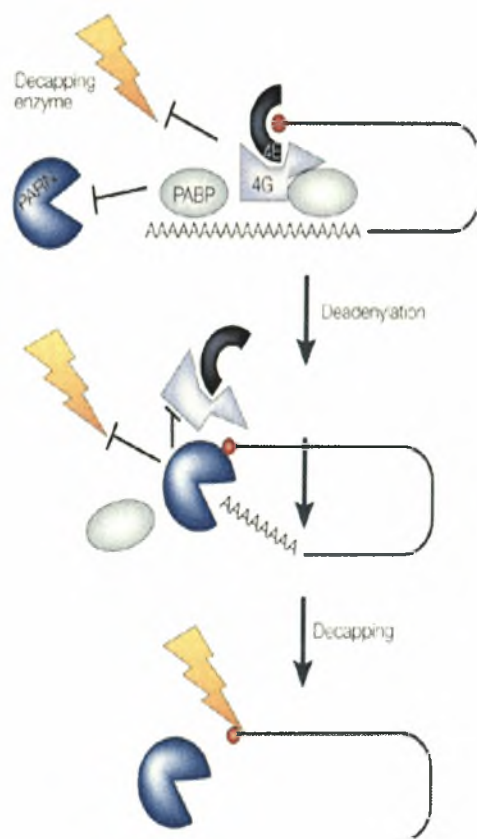




**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΟΛΥ(Α)  
ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ (PARN)**



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΛΕΒΕΝΤΗ ΔΗΜΗΤΡΑ**



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

Αριθ. Εισ.: 7668/1

Ημερ. Εισ.: 09-11-2009

Δωρεά: Π.Θ.

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2009

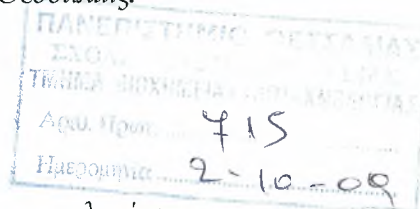
ΛΕΒ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087169

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Λειτουργικής βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.



Υπεύθυνος Καθηγητής:

**Μπαλατσός Νικόλαος**, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τριμελής επιτροπή:

**Σταθόπουλος Κωνσταντίνος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος  
Ιατρικής, Πανεπιστημίου Πατρών *a.a nam*

**Κομιώτης Δημήτριος**, Επικουρος Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας *D/Ch*

**Μπαλατσός Νικόλαος**, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας *nam*

Ευχαριστίες,

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων οι υποδείξεις, η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για την επιτυχή διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Λέκτορα του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Μπαλατσό Νικόλαο, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την καθοδήγηση και την υποστήριξη που μου προσέφερε. Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω όλους τους φοιτητές του Εργαστηρίου Λειτουργικής Βιοχημείας και ιδιαίτερα τον Αναστασάκη Δημήτριο για τη βοήθεια και τις συμβουλές που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας..

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>- 4 -</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>- 4 -</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>- 5 -</b>
1.1 ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΤΟΥ RNA .....	- 6 -
1.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟΥ MRNA .....	- 9 -
1.3 Η ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ MRNA ΕΙΝΑΙ ΜΙΑ ΠΟΛΥΠΛΟΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ .....	- 13 -
1.4 Η ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ.....	- 16 -
1.5 Η ΠΟΛΥ(Α) ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ PARN.....	- 18 -
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</b>	<b>- 21 -</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>- 22 -</b>
3.1 ΥΛΙΚΑ .....	- 22 -
3.1.1 Χημικές ουσίες.....	- 22 -
3.1.2 Κύτταρα.....	- 22 -
3.1.3 Θρεπτικά μέσα.....	- 22 -
3.1.4 Πρωτεΐνες και ένζυμα.....	- 23 -
3.1.5 Ανάλογα πουρίνης και πυριμιδίνης .....	- 24 -
3.1.6 Πλασμίδια .....	- 24 -
3.1.7 Υλικά χρωματογραφίας.....	- 24 -
3.1.8 Διαλύματα .....	- 24 -
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	- 27 -
3.2.1 Υπερέκφραση και απομόνωση ανασυνδασμένης PARN74-54 kd.....	- 27 -
3.2.2 Μέτρηση της ενεργότητας της PARN με κωνό του μεθυλενίου.....	- 30 -
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>- 32 -</b>
4.1. ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ .....	- 32 -
4.2. ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ PARN 74 .....	- 33 -
4.3. ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ PARN 54 .....	- 34 -
4.4. ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΠΟΛΥ(Α) .....	- 34 -
4.5. ΧΡΟΝΟΚΑΜΠΥΛΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ .....	- 35 -
4.6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ.....	- 36 -
4.7. ΤΟ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΑΝΑΛΟΓΟ Α6 ΑΝΑΣΤΕΛΛΕΙ ΤΗΝ PARN ΑΚΟΛΟΥΘΩΝΤΑΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΙΚΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ .....	- 37 -
4.8. ΤΟ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΑΝΑΛΟΓΟ Α2 ΑΝΑΣΤΕΛΛΕΙ ΤΗΝ PARN ΑΚΟΛΟΥΘΩΝΤΑΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΣΥΝΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ .....	- 39 -
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>- 41 -</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>- 42 -</b>

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

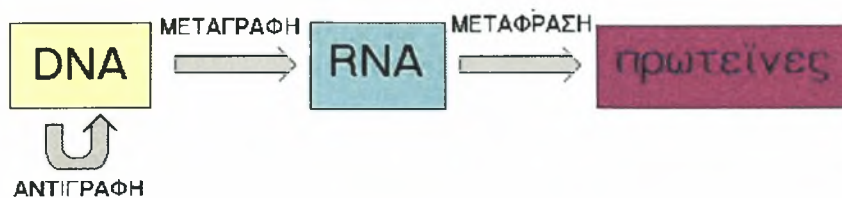
Η αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση, στον ποιοτικό έλεγχο της βιοσύνθεσης του mRNA και στην αντιική άμυνα. Ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα αποικοδόμησης του mRNA είναι η πολύ (A) εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), η οποία καταλύει τη βράχυνση της πολύ(A) ουράς των mRNA. Η παρουσία του καλύμματος στο 5' άκρο των mRNA επηρεάζει τη δραστηριότητα του ενζύμου. Ειδικότερα, η φύση του νουκλεοτιδίου που βρίσκεται στο 5' κάλυμα μπορεί να επηρεάσει την πορεία της αποαδενυλίωσης. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε μια σειρά τροποποιημένων νουκλεοτιδίων και εξετάστηκε η επίδρασή τους στην καταλυτική δραστηριότητα της PARN. Οι τροποποιήσεις αφορούν επιπλέον δακτυλίους σε φυσικά νουκλεοτίδια. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, το τροποποιημένο νουκλεοτίδιο A2(1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-b-D-glucopyranosyl)-N6 - Benzoyl adenine) και το A6(1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-b-D-glucopyranosyl)-N4 - Benzoyl cytosine) επιδρούν ανασταλτικά στην PARN με συναγωνιστική και μη συναγωνιστική αναστολή, αντίστοιχα. Τα ανάλογα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χημικά υποστρώματα για την ανάπτυξη νέων ενώσεων που θα μπορούν να ρυθμίζουν τη δραστηριότητα της PARN και να χρησιμοποιηθούν για αντικαρκινικούς σκοπούς.

## **ABSTRACT**

The degradation of eukaryotic mRNAs plays an important role in the modulation of gene expression, quality control of mRNAs biogenesis and antiviral defenses. One of the most important enzymes catalyzing mRNA degradation is poly (A) specific ribonuclease (PARN), that contributes in mRNA deadenylation . The activity of PARN is regulated by the 5' cap. Different nucleotides in this position may alter the activity of the enzyme. Thus, different modified nucleosides are tested for their possible effect on catalytic activity of PARN. Natural nucleotides are modified to contain additional chemical rings. Modified molecules A2(1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-b-D-glucopyranosyl)-N6 - Benzoyl adenine) and A6(1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-b-D-glucopyranosyl)-N4 - Benzoyl cytosine) seem to be competitive and non-competitive inhibitors, respectively, of PARN's activity. These modified nucleosides can be used as chemical templates for the development of novel regulators of PARN and can be used as anti-tumor growth factors.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το Κεντρικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας είναι μια αναπαράσταση των τρόπων ροής της γενετικής πληροφορίας (Εικόνα 1)



**Εικόνα 1. Η ροή της γενετικής πληροφορίας**

Η αντιγραφή του DNA είναι η διαδικασία κατά την οποία το DNA αυτοδιπλασιάζεται προκειμένου να διατηρήσει και να μεταβιβάσει τη γενετική πληροφορία από το μητρικό στο θυγατρικό κύτταρο, η μεταγραφή, η μεταφορά της γενετικής πληροφορίας από μορφή DNA σε μορφή αγγελιοφόρου RNA (mRNA), και η μετάφραση, η έκφραση της πληροφορίας από τη γλώσσα του DNA στη γλώσσα των αμινοξέων (πρωτεΐνες), με βάση το γενετικό κώδικα

Η εμπλοκή του RNA σε πολλές λειτουργίες που αφορούν τη γονιδιακή έκφραση υποστηρίζει τη γενική άποψη ότι ολοκληρωμένη η διαδικασία μπορεί να έχει εξελιχθεί σε έναν «κόσμο RNA» στην αρχή της ζωής, πριν την εμφάνιση του DNA και των πρωτεϊνών. Τα μόρια RNA πρώτα κατέλυσαν τη δική τους αντιγραφή, και ανέπτυξαν ένα ρεπερτόριο ενζυμικής δραστηριότητας. Σε δεύτερο στάδιο το RNA άρχισε να συνθέτει πρωτεΐνες που αρχικά στρατολογήθηκαν ως βοηθητικές και έπειτα αυτονομήθηκαν ως ένζυμα καλύτερης ποιότητας, διότι 20 πλευρικές αλυσίδες επιτρέπουν μεγαλύτερη ποικιλία από ότι 4 βάσεις RNA. Τελικά το DNA σχηματίστηκε από την αντίστροφη μεταγραφή του RNA, και αντικατέστησε το RNA ως γενετικό υλικό διότι η διπλή ελικοειδής δομή του, είναι πιο σταθερή και σίγουρη αποθήκη γενετικών πληροφοριών σε σχέση με την απλή έλικα RNA. Σε αυτό το σημείο το RNA έμεινε με τους ρόλους που διατηρεί μέχρι σήμερα

- ♦ Αγγελιοφόρο RNA ή mRNA είναι το RNA που μεταφέρει τη γενετική πληροφορία από το DNA στα ριβοσώματα για την πρωτεϊνοσύνθεση.
- ♦ Μεταφορικό RNA ή tRNA μεταφέρει τα συγγενή αμινοξέα σε μια επεκτεινόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα στα ριβοσώματα του κυττάρου όπου γίνεται η πρωτεϊνοσύνθεση.

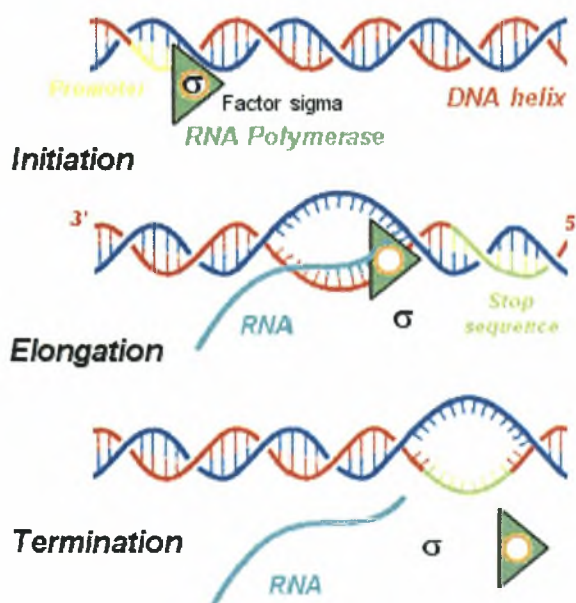
♦ Ριβοσωμικό RNA ή rRNA είναι ένας δομικός ή λειτουργικός λίθος των ριβοσωμάτων που μαζί με τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες σχηματίζει τη μικρή και τη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα.

### 1.1 Μεταγραφή και μετάφραση του RNA

Το πρώτο βήμα στην έκφραση ενός τμήματος των γενετικών πληροφοριών ενός κυττάρου είναι η μετατροπή της κατάλληλης αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του DNA, δηλαδή του κατάλληλου γονιδίου, σε μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων του RNA. Η διεργασία αυτή αποκαλείται μεταγραφή και παράγει ένα μονόκλωνο μόριο RNA όμοιο στην αλληλουχία με μια από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA.

Στη μεταγραφή συμμετέχει το ολοένζυμο της RNA πολυμεράσης. Αυτό το ένζυμο ξεδιπλώνει και ανοίγει την έλικα του DNA ανεφοδιάζει με ριβονουκλεοτίδια και τα ζευγαρώνει σύμφωνα με την αλυσίδα εκμαγείο του DNA. Η μεταγραφή είναι όμοια στους προκαρυωτικούς και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Μια από τις διαφορές είναι ότι στα ευκαρυωτικά κύτταρα υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι RNA πολυμεράσης (I, II, III) ενώ στους προκαρυωτικούς μόνο ένας. Κάθε τύπος RNA πολυμεράσης ευθύνεται για τη σύνθεση μιας κατηγορίας RNA (pol I για rRNA, pol II για mRNA και pol III για tRNA και 5S rRNA).

Η μεταγραφή περιγράφεται σε τρία βήματα: έναρξη, επιμήκυνση και τερματισμός.



Εικόνα 2. Τα στάδια της διαδικασίας της μεταγραφής

Η έναρξη συμβαίνει όταν το ολοένζυμο της RNA πολυμεράσης προσδένεται σε μια συγκεκριμένη περιοχή στο DNA που ονομάζεται εκκινητής. Επιπλέον μια μικρή πρωτεΐνη, ο παράγοντας  $\sigma$  προσαρτάται στην πολυμεράση και τη σταθεροποιεί στην αλυσίδα του DNA που θα μεταγραφεί. Στη συνέχεια η πολυμεράση ξεδιπλώνει και ανοίγει την διπλή έλικα του DNA σχηματίζοντας έναν μεταγραφικό βρόγχο επιτρέποντας στο πρώτο νουκλεοτίδιο να ενωθεί με το αντίστοιχο συμπληρωματικό του στην αλυσίδα του DNA.

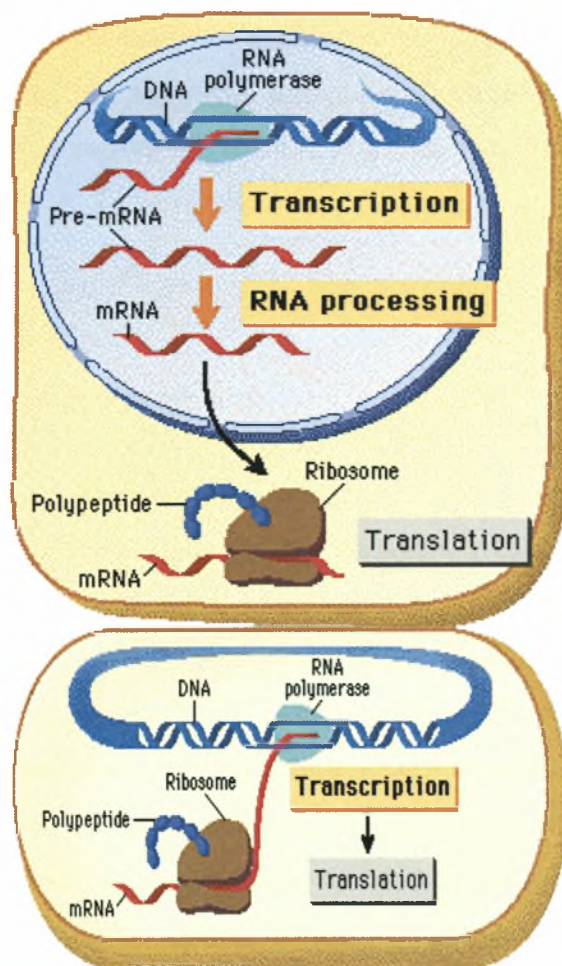
Η επιμήκυνση της RNA αλυσίδας περιλαμβάνει την επιτυχή προσθήκη νουκλεοτιδίων με κατεύθυνση 5'-3'. Κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης, το ένζυμο κινείται κατά μήκος του υποστρώματος DNA και επεκτείνει την αλυσίδα του RNA. Καθώς το ένζυμο κινείται, ξετυλίγει την έλικα του DNA, ώστε ένα νέο τμήμα του υποστρώματος να γίνει μονόκλωνο. Τα νουκλεοτίδια προστίθενται ομοιοπολικά στο 3' άκρο της αλυσίδας του RNA, δημιουργώντας ένα υβρίδιο RNA – DNA στην αποδιαταγμένη περιοχή. Πίσω από την αποδιαταγμένη περιοχή, η αλυσίδα μήτρα του DNA ζευγαρώνει με τον αρχικό της εταίρο για το σχηματισμό διπλής έλικας. Το RNA αναδύεται ως μια ελεύθερη, μονόκλωνη αλυσίδα. Κατά την επιμήκυνση, η μεταγραφική θηλιά μετακινείται αποδιατάσσοντας τη δομή του DNA, ώστε, στην προσωρινή αποδιαταγμένη περιοχή, η αλυσίδα-μήτρα να ζευγαρώνει με το RNA στο σημείο της σύνθεσής του.

Ο τερματισμός συμβαίνει όταν συναντάται ένα σήμα τερματισμού που σηματοδοτεί το τέλος του γονιδίου. Το σήμα τερματισμού είναι γενικά μια παλινδρομική, πλούσια σε G-C περιοχή που σχηματίζει μια δομή φουρκέτας στο RNA που ακολουθείται από μερικά νουκλεοτίδια U. Η υβριδική έλικα RNA – DNA που δημιουργείται μετά τη δομή φουρκέτας, είναι ασυνήθιστα ασταθής λόγω του περιεχομένου της σε ζεύγη ριβο-U - δεοξυ-A, τα οποία είναι τα πλέον ασταθή από όλα τα είδη ζευγών βάσεων των νουκλεϊκών οξέων. Επομένως, το νεοσύστατο RNA αποδεσμεύεται από το εκμαγείο του DNA και στη συνέχεια από το ένζυμο.

Το δεύτερο και τελευταίο στάδιο υλοποιείται με τη μετάφραση του mRNA, την αντιστοίχιση, δηλαδή, της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του mRNA στην αλληλουχία αμινοξέων που αποτελούν μια πρωτεΐνη. Ένα μόριο mRNA δεν μεταφράζεται σε ολόκληρο το μήκος του, αλλά κάθε mRNA περιέχει τουλάχιστον μια κωδική περιοχή, η οποία σχετίζεται με μια πρωτεϊνική αλληλουχία μέσω του γενετικού κώδικα. Επιπρόσθετα, τα 5' και 3' τμήματα του mRNA δεν μεταφράζονται (5' UTR, 3' UTR).



Η μεταγραφή και η μετάφραση των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι χωροταξικά και χρονικά χωρισμένες. Η μεταγραφή των ευκαρυωτών συμβαίνει εντός του πυρήνα, ενώ, η μετάφραση συμβαίνει σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα. Αντίθετα, η μετάφραση του βακτηριακού mRNA αρχίζει ενώ ακόμη το μεταγράφημα συντίθεται. Ο ενδοκυτταρικός χωροταξικός αλλά προσωρινός διαχωρισμός της μεταγραφή και της μετάφρασης δίνει τη δυνατότητα στα ευκαρυωτικά κύτταρα να ρυθμίζουν τη γονιδιακή τους έκφραση με πιο πολύπλοκο τρόπο, συντελώντας έτσι στον πλούτο των ευκαρυωτικών μορφών και λειτουργιών.



*Εικόνα 3. Η μεταγραφή και η μετάφραση σε ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά κύτταρα*

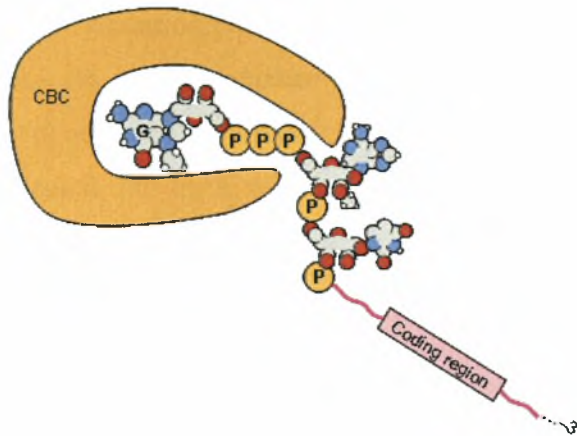
Μια δεύτερη κύρια διαφορά μεταξύ προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων είναι ότι τα ευκαρυωτικά επεξεργάζονται σε μεγάλη έκταση το νεοσυστατο RNA το οποίο προορίζεται να γίνει mRNA. Πρωτογενή μετάγραφα – τα προϊόντα της δράσης της RNA πολυμεράσης - επικαλύπτονται με μια πρόσθετη χημική ομάδα στο 5'

άκρο τους, ενώ στο 3' άκρο τους προστίθεται μια <<ουρά>> από πολύ-A. Το πιο σημαντικό είναι ότι σχεδόν όλα τα πρόδρομα μόρια των mRNA των ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων ματίζονται. Ιντρόνια εξάγονται με ακρίβεια από τα πρωτογενή μετάγραφα προκειμένου να σχηματιστούν τα ώριμα mRNA τα οποία περιέχουν συνεχή μηνύματα. Ο τρόπος της διάσπασης και επανασύνδεσης μερικών πρωτογενών μεταγραφών ρυθμίζεται κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων, δημιουργώντας έτσι παραλλαγές του ίδιου μορίου μέσω της διαδικασίας που καλείται εναλλακτικό μάτισμα.

Ένα ακόμη αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό της έκφρασης των ευκαρυωτικών γονιδίων είναι ότι η πλειοψηφία των προϊόντων της μεταγραφής αποικοδομείται εντός του πυρήνα. Το mRNA προκύπτει από μια ομάδα πρόδρομων μορίων, τα οποία καλούνται ετερογενές πυρηνικό RNA (hnRNA). Μόνο το 20% των μορίων hnRNA μετατρέπονται σε mRNA. Τα άλλα υδρολύονται από νουκλεάσες μέσα σε μερικά λεπτά από τη σύνθεσή τους.

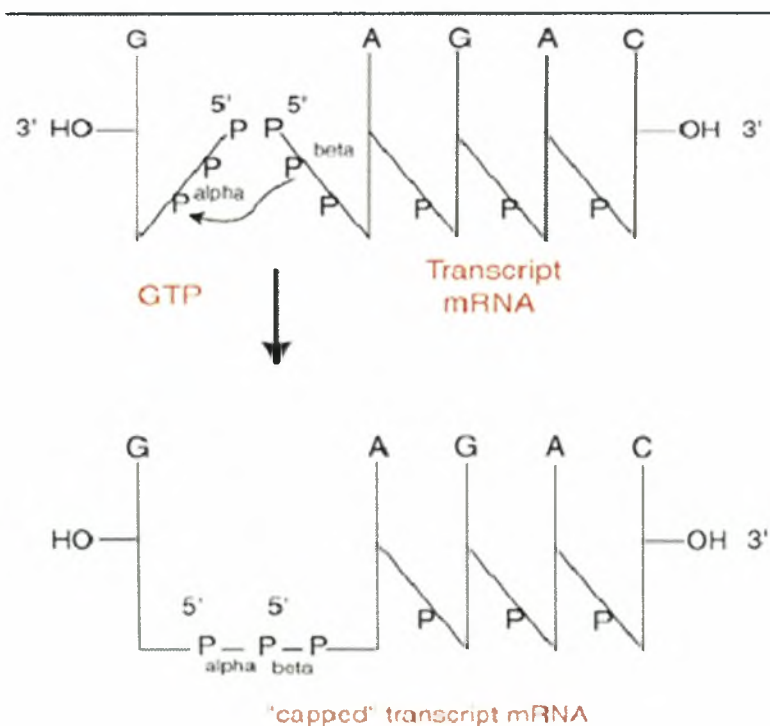
## **1.2 Τροποποιήσεις ευκαρυωτικού mRNA**

Το ευκαρυωτικό mRNA τροποποιείται κατά τη διάρκεια ή μετά το πέρας της μεταγραφής του. Τα πρόδρομα μόρια mRNA αποκτούν καλύμματα στο 5' άκρο τους. Η μεταγραφή συνήθως αρχίζει με A ή G. Εντούτοις, το 5' τριφωσφορικό άκρο της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας του RNA σχεδόν αμέσως τροποποιείται. Μια φωσφορική ομάδα απελευθερώνεται με υδρόλυση. Στη συνέχεια, το διφωσφορικό 5' άκρο προσβάλλει το α άτομο του φωσφόρου ενός μορίου GTP σχηματίζοντας έτσι έναν πολύ ασυνήθη 5'-5' τριφωσφορικό σύνδεσμο. Το νέο κατάλοιπο G, που προστίθεται στο RNA, έχει τον αντίστροφο προσανατολισμό από όλα τα άλλα νουκλεοτίδια, <<σφραγίζοντας>> με αυτό τον τρόπο το άκρο. Αυτό το εξαιρετικά ευδιάκριτο άκρο καλείται κάλυμμα (cap).



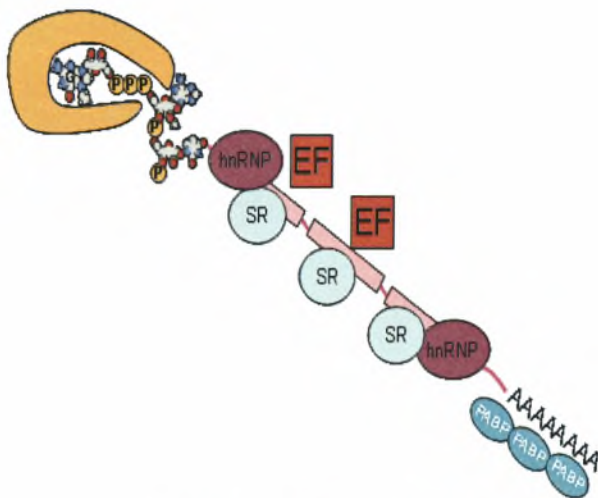
**Εικόνα 4. Το 5' κάλυμμα**

Στη συνέχεια, το άτομο N-7 του αζώτου της γουανίνης σε αυτό το άκρο μεθυλιώνεται από την S-αδενοσυλομεθειονίνη σχηματίζονται το κάλυμμα 0. οι παρακείμενες ριβόζες μπορούν να μεθυλιωθούν και έτσι να σχηματισθούν το κάλυμμα 1 και το κάλυμμα 2. Τα καλύμματα είναι σημαντικά για τις αντιδράσεις ματίσματος που ακολουθούν. Επίσης συντελούν στη σταθερότητα του mRNA προστατεύοντας τα 5' άκρα από τη δράση φωσφατασών και νουκλεασών. Ακόμη, τα καλύμματα ενισχύουν τη μετάφραση του mRNA από ευκαρυωτικά συστήματα βιοσύνθεσης πρωτεϊνών. Τα μεταφορικά και τα ριβοσωμικά RNA δεν έχουν καλύμματα.



**Εικόνα 5. Η αντίδραση προσθήκης του 5' καλύμματος**

Στο 3' άκρο των περισσότερων πρόσδρομων μορίων mRNA, προστίθεται μια πολυαδενυλική ουρά μετά από τη διάσπασή τους από μία ενδονουκλεάση. Γενικά, πολύ λίγα είναι γνωστά γύρω από τα σήματα τερματισμού της μεταγραφής στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Μερικά από αυτά περιλαμβάνουν μια δομή φουρκέτας που ακολουθείται από μια σειρά καταλοίπων U, όπως και στα μεταγραφήματα των προκαρυωτικών κυττάρων. Τα περισσότερα από τα ευκαρυωτικά mRNA περιέχουν μια πολυαδενυλική (πολύ A) ουρά στο 3' άκρο τους. Αυτή η πολύ A ουρά δεν κωδικοποιείται από το DNA αλλά προστίθεται στο RNA, μέσα στον πυρήνα, μετά τη μεταγραφή. Το νουκλεοτίδιο το οποίο προηγείται της πολύ-A ουράς δεν είναι το τελευταίο νουκλεοτίδιο που προστίθεται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα. Μερικά πρωτογενή μετάγραφα περιέχουν εκατοντάδες νουκλεοτίδια πέρα από το 3' άκρο των ώριμων μορίων mRNA.



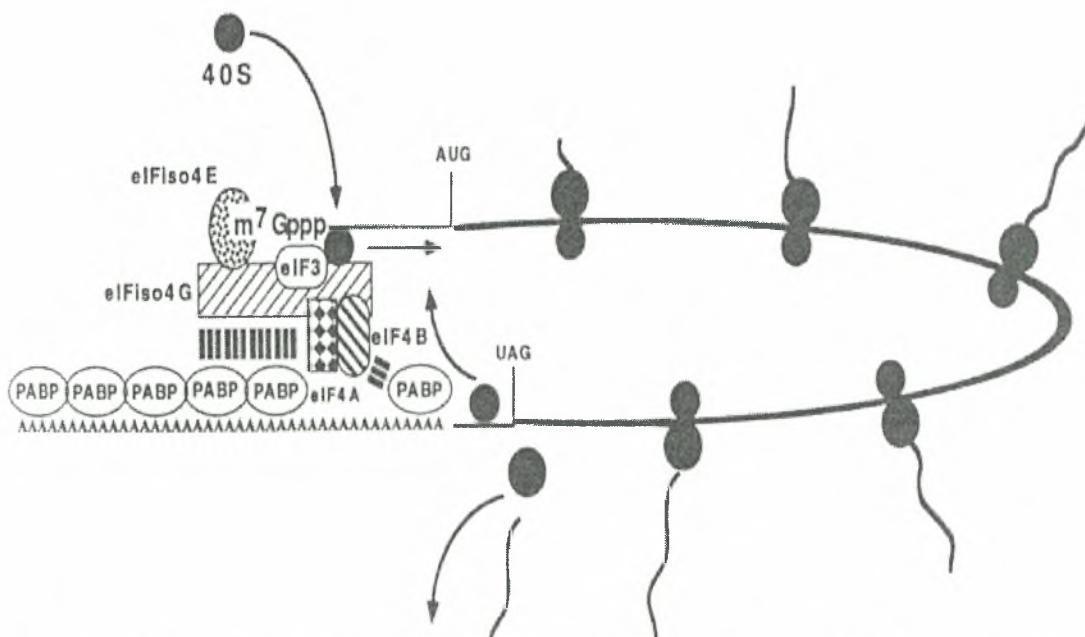
*Εικόνα 6. Η πολυ(A) ουρά*

Η προσθήκη της πολύ(A) ουράς πραγματοποιείται ως μέρος μιας αντίδρασης στην οποία το 3' άκρο δημιουργείται και τροποποιείται από ένα σύμπλοκο ενζύμων. Η δημιουργία της σωστής δομής στο 3' άκρο απαιτεί μια ενδονουκλεάση, μια πολύ(A) πολυμεράση, για να συνθέσει την ουρά πολύ(A) και έναν παράγοντα ειδικότητας που αναγνωρίζει την αλληλουχία AAUAAA. Η αντίδραση της πολυαδενυλίωσης διέρχεται από δυο στάδια. Πρώτα, μια βραχεία αλληλουχία λίγων καταλοίπων αδενίνης προστίθεται στο 3' άκρο με τη βοήθεια της πολύ A πολυμεράσης. Στη δεύτερη φάση, η ουρά ολιγο (A) επιμηκύνεται μέχρι το πλήρες μήκος των ~200 καταλοίπων στο ελεύθερο 3'-OH άκρο του mRNA. Ο δότης A σε αυτή την αντίδραση είναι το

ΑΤΡ. Η αλληλουχία τόσο του πυρηνικού όσο και του mRNA, είναι συνδεδεμένη με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται πολύ(A) – συνδεόμενη πρωτεΐνη (PABP, Poly(A) – Binding Protein). Ένα μονομερές PABP των ~70kD συνδέεται σε κάθε 10-20 βάσεις της ουράς πολύ(A). Έτσι, το 3' άκρο του mRNA αποτελείται από μια αλληλουχία πολύ(A), η οποία είναι προσδεδεμένη σε μια μεγάλη πρωτεϊνική μάζα.

Η πρόσδεση της PABP στον παράγοντα έναρξης eIF4G δημιουργεί ένα κλειστό βρόγχο, στον οποίο τα 5' και 3' άκρα του mRNA συγκρατούνται στο ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Ο σχηματισμός αυτού του συμπλόκου μπορεί να ευθύνεται για κάποιες από τις επιδράσεις της πολύ (A) στις ιδιότητες του mRNA. Η ικανότητα της πολύ(A) να προστατεύει το mRNA από την αποικοδόμηση απαιτεί τη σύνδεσή της με τη PABP.

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

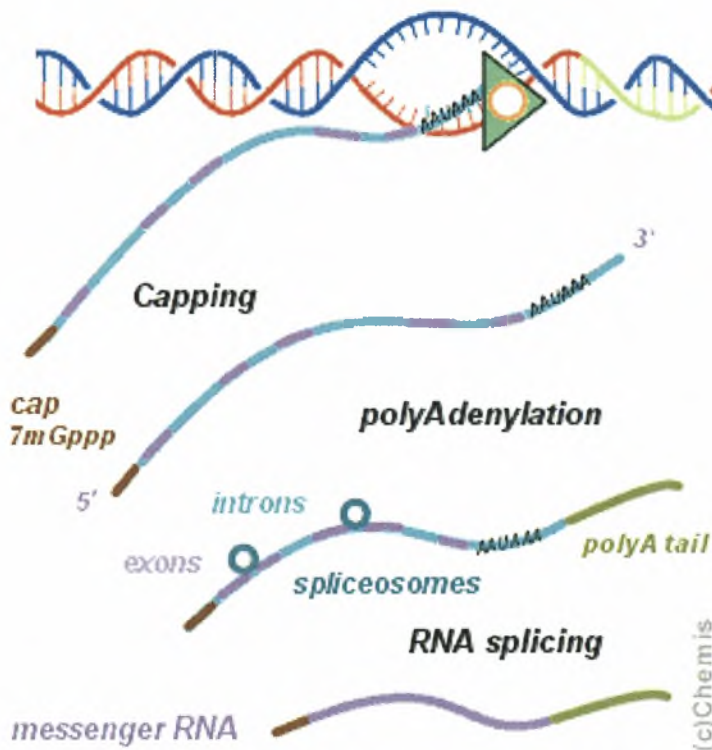


Εικόνα 7. Η πρόσδεση της PABP στον παράγοντα έναρξης δημιουργεί ένα κλειστό βρόγχο

Όσα mRNA προέρχονται από γονίδια που περιέχουν ιντρόνια πρέπει να υποστούν μάτισμα, ώστε να αφαιρεθούν τα ιντρόνια και να παραχθεί ένα μικρότερο mRNA που να περιέχει μια άθικτη κωδική αλληλουχία.

Μόνο μετά την ολοκλήρωση όλων των τροποποιήσεων και της επεξεργασίας μπορεί το mRNA να εξαχθεί από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Κατά μέσο όρο, το mRNA καθυστερεί ~20 λεπτά για να εξέλθει από τον πυρήνα. Μόλις το mRNA εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα και μεταφράζεται.

Η συνολική διαδικασία των τροποποιήσεων του ευκαρυωτικού mRNA περιγράφεται συνοπτικά στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 8. Τροποποιήσεις ευκαρυωτικού mRNA**

### **1.3 Η αποικοδόμηση του mRNA είναι μια πολύπλοκη διαδικασία**

Το καλύτερα μελετημένο σύστημα αποικοδόμησης του mRNA είναι αυτό του ζυμομύκητα. Υπάρχουν δυο μονοπάτια, που αρχίζουν με την αφαίρεση της πολύ(A) ουράς η οποία καταλύεται από μια ειδική αποαδενυλάση. Η καταλυτική υπομονάδα είναι η Ccr4 στο ζυμομύκητα και η εξωνουκλεάση PARN (η οποία έχει συγγένεια με την RNAάση D) στα σπονδυλωτά. Η δράση του ενζύμου είναι συνεχής από τη στιγμή

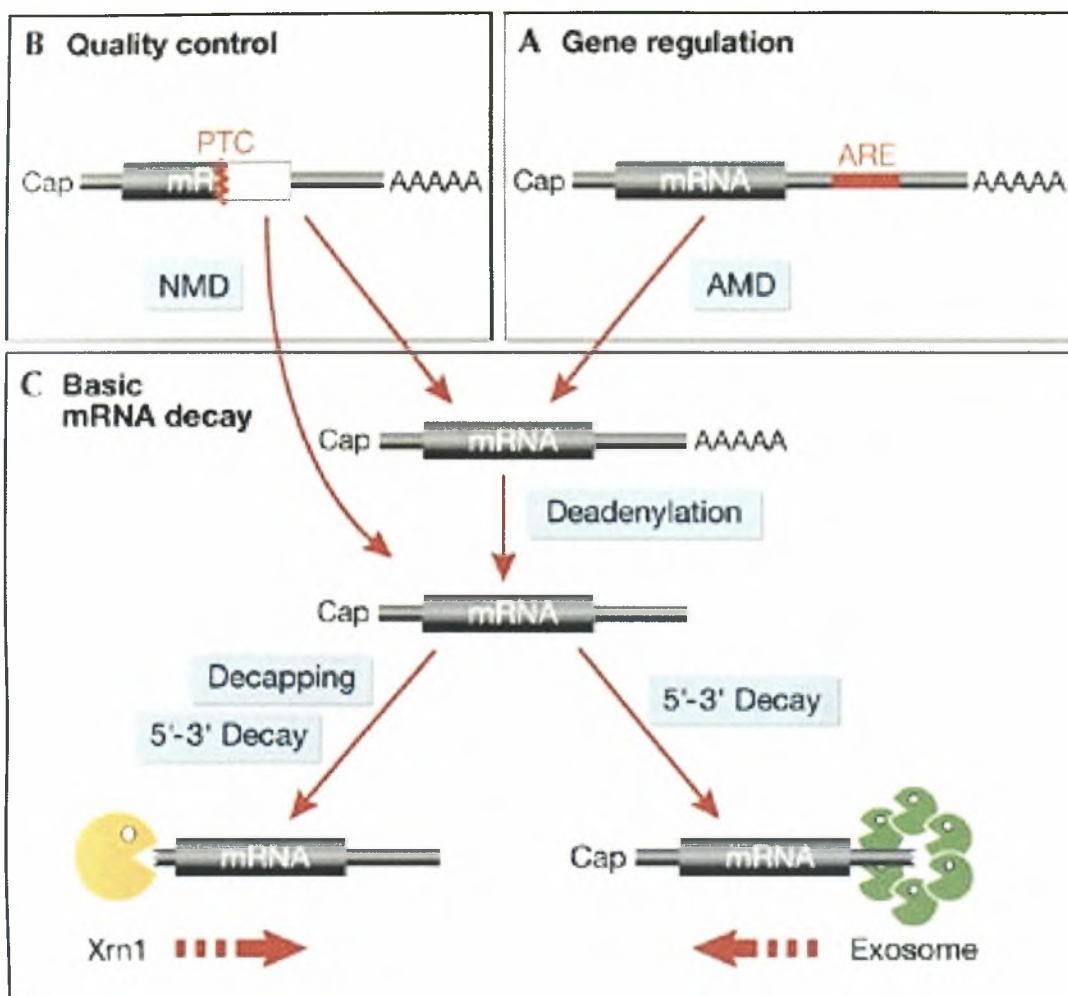
που αρχίζει να αποικοδομεί ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα mRNA, συνεχίζει να το τεμαχίζει βάση προς βάση μέχρι το τέλος.

Η αποαδενυλίωση στο 3' άκρο πυροδοτεί την αφαίρεση της καλύπτρας στο 5' άκρο από ένα ειδικό ένζυμο που αποτελείται από δύο υπομονάδες (Dcp1p και Dcp2p). Η παρουσία της PABP στην πολύ(A) ουρά εμποδίζει το ένζυμο που αφαιρεί την καλύπτρα να προσδεθεί στο 5' άκρο. Η PABP αποδεσμεύεται όταν το μήκος της πολύ(A) μειωθεί κάτω από 10-15 κατάλοιπα. Η αντίδραση αφαίρεσης της καλύπτρας συμβαίνει με αποκοπή 1-2 βάσεων από το 5' άκρο.

Τα δυο άκρα του mRNA συγκρατούνται μεταξύ τους από τους παράγοντες που ενέχονται στην πρωτεϊνοσύνθεση. Έτσι κάθε άκρο επηρεάζει γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στο άλλο άκρο. Η επίδραση που έχει η PABP στην αφαίρεση της καλύπτρας επιτρέπει στο 3' άκρο να επηρεάσει τη σταθεροποίηση του 5' άκρου. Επίσης, υπάρχει μια σχέση ανάμεσα στη δομή του 5' άκρου και στην αποικοδόμηση στο 3' άκρο. Η αποαδενυλίωση προσδέεται άμεσα στην καλύπτρα. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη προκειμένου να προσβάλει εξωνουκλεολυτικά την αλληλουχία πολύ(A).

Η αφαίρεση της καλύπτρας πυροδοτεί το 5' – 3' μονοπάτι αποικοδόμησης, κατά το οποίο η 5' → 3' εξωνουκλεάση XRN1 αποικοδομεί το 5' άκρο με μεγάλη ταχύτητα.

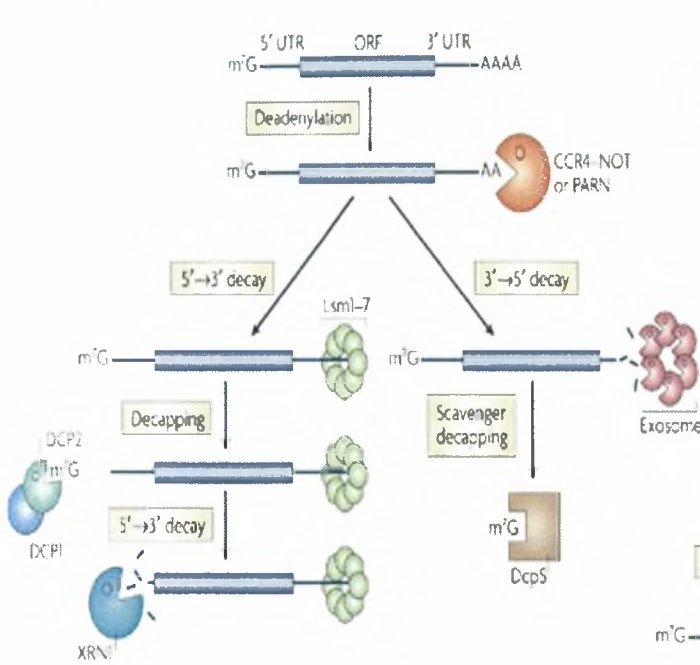
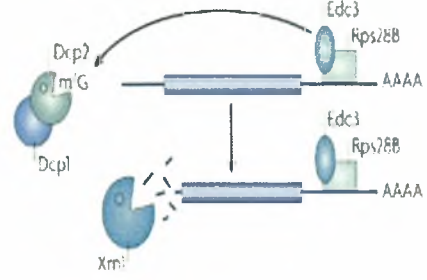
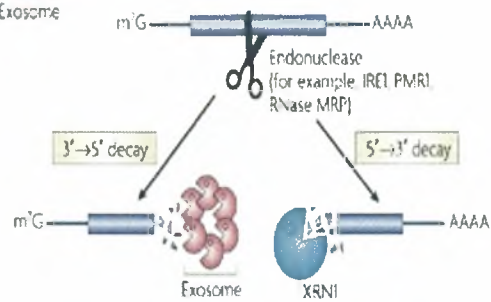
Στο δεύτερο μονοπάτι, τα αποαδενυλιωμένα mRNA του ζυμομύκητα μπορούν να αποικοδομηθούν από την 3' → 5' ενεργότητα εξωνουκλεάσης του εξωσώματος, ενός συμπλόκου που περιλαμβάνει περισσότερες από 9 εξωνουκλεάσες. Το εξώσωμα όμως εμπλέκεται και στην επεξεργασία των προδρομικών μορίων rRNA. Η συσσωμάτωση των εξωνουκλεασών στο σύμπλοκο του εξωσώματος μπορεί να καθιστά εφικτό το συντονισμένο έλεγχο των 3' → 5' εξωνουκλεολυτικών δραστηριοτήτων. Το εξώσωμα μπορεί επίσης να αποικοδομήσει τμήματα του mRNA που απελευθερώθηκαν με ενδονουκλεολυτική διάσπαση. Το εξώσωμα απαντάται και μέσα στον πυρήνα, όπου αποικοδομεί πρόδρομα mRNA που δεν έχουν υποστεί μάτισμα. Ωστόσο η αποικοδόμηση ορισμένων mRNA μπορεί να πυροδοτηθεί από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση είτε από ειδικές ενδονουκλεάσες είτε σε απόκριση σε miRNA ή siRNA. Επίσης τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν ειδικά μονοπάτια αποικοδόμησης που αναγνωρίζουν και αποικοδομούν ταχύτατα ανώμαλα mRNA χρησιμοποιώντας τα ίδια ένζυμα που αποικοδομούν φυσιολογικά mRNA.



**Εικόνα 9. Μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA**

Ένα άλλο μονοπάτι αποικοδόμησης προσδιορίζεται από την εξαρτώμενη από ανερμηνεύσιμα κωδικόνια αποσύνθεση του mRNA (nonsense-mediated decay). Η εισαγωγή μιας ανερμηνεύσιμης μετάλλαξης συχνά οδηγεί σε αυξημένη αποικοδόμηση του mRNA. Η εξάρτηση της αποικοδόμησης από ένα κωδικόνιο τερματισμού αποδεικνύει ότι η αποικοδόμηση συμβαίνει στο κυτταρόπλασμα. Αυτός ο μηχανισμός επιλεκτικής αποικοδόμησης των μορίων mRNA που φέρουν ανερμηνεύσιμα κωδικόνια πιθανόν να αντιπροσωπεύει ένα σύστημα ποιοτικού ελέγχου ή επιτήρησης που απομακρύνει τα μη λειτουργικά mRNA. Παρομοίως σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως nonstop decay (NSD) τα mRNA στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα.



**a Deadenylation-dependent mRNA decay****b Deadenylation-independent mRNA decay****c Endonuclease-mediated mRNA decay**

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Εικόνα 10. α) nonsense mediated decay γ) non stop decay****1.4 Η αποαδενυλίωση και τα ένζυμα που συμμετέχουν**

Το πρώτο βήμα στην αποικοδόμηση του mRNA στους ευκαρυώτες είναι η αποαδενυλίωση. Μέχρι στιγμής, έχουν ταυτοποιηθεί τρία διαφορετικά ένζυμα ως αποαδενυλάσες. Στη ζύμη, το επικρατές σύμπλοκο αποαδενυλίωσης αποτελείται από δυο νουκλεάσες, την Ccr4 και την Pop2p, και ένας πλήθος από άλλες πρωτεΐνες. Η Ccr4p είναι διατηρημένη ανάμεσα στους ευκαρυώτες με πολλαπλές γονιδιακές παραλλαγές παρούσες στο γονιδίωμα των θηλαστικών και φυτών. Είναι μέλος της οικογένειας των ExoIII νουκλεασών και χρησιμοποιεί ένα γλουταμινικό και μία ιστιδίνη για να ενεργοποιήσει μία υδροξυλική ομάδα για την πυρηνόφιλη προσβολή του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, μεταλλάξεις στα καταλυτικά αμινοξέα καταργούν τη δραστηριότητα του ενζύμου *in vivo* στις ζύμες και *in vitro* για ζύμες, άνθρωπο και *Xenopus laevis*. Σύμφωνα με παρατηρήσεις που έχουν γίνει στη ζύμη, η Ccr4p φαίνεται να έχει τον κυριότερο ρόλο σε αυτό το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης.

Η άλλη πρωτεΐνη σε αυτό το σύμπλοκο που εμφανίζει δραστικότητα αποαδενυλάσης είναι η Pop2p . Η Pop2p είναι επίσης ευρέως διατηρημένη με πολλαπλές γονιδιακές παραλλαγές ανάμεσα στους σύνθετους ευκαρυώτες. Σύμφωνα με μελέτες πολλαπλής ομοπαράθεσης, η πρωτεΐνη Pop2p είναι μέλος της οικογένειας των RnaseD νουκλεασών, οι οποίες έχει αποδειχτεί ότι έχουν δομή και μηχανισμό δράσης παρόμοιο με αυτό της περιοχής με δράση 3'→5' εξωδεοξυριβονουκλεάσης της DNA πολυμεράσης. Πράγματι, η δομή της Pop2p επιβεβαιώνει ότι αυτά τα ένζυμα αναδιπλώνονται όμοια με τις DNA εξωνουκλεάσες και θα ήταν αναμενόμενο να περιέχουν δύο θέσεις σύνδεσης για δισθενή μεταλλικά ιόντα στην κατάλληλη θέση για να έχουν τον ίδιο καταλυτικό μηχανισμό που χρησιμοποιούν οι DNA εξωνουκλεάσες για να υδρολύουν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς.

Η πρωτεΐνη Pop2 φαίνεται να έχει δύο λειτουργικούς ρόλους. Πρώτον, η νουκλεολυτική της δράση και η συντήρηση καταλοίπων κλειδιά για το ενεργό κέντρο δείχνει ότι κάτω από ορισμένες περιστάσεις θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για την αποαδενυλίωση μορίων mRNA. Έτσι το σύμπλοκο Ccr4-Pop2-Not θα είχε πολλές νουκλεάσες που μπορεί να ρυθμίζονται διαφορετικά. Ένας δεύτερος ρόλος της Pop2 είναι να διεγείρει την δράση της αποαδενυλάσης Ccr4, είτε σταθεροποιώντας το σύμπλοκο αποαδενυλάσης ή ίσως προάγοντας πρόσθετες αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου με το mRNA. Αυτή η δεύτερη λειτουργία βασίζεται στη παρατήρηση ότι παρόλο που στη ζύμη η έλλειψη της Pop2 προκαλεί ελλείψεις στην αποαδενυλίωση, στελέχη που την περιέχουν εξ' ολοκλήρου αλλά καταλυτικά ανενεργή δεν φέρουν αλλαγές στο φαινότυπο.

Ένα άλλο ενζυμικό σύμπλοκο που καταλύει την αποαδενυλίωση του mRNA είναι ένα συντηρημένο σύμπλοκο που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Pan2p και Pan3p. Ο ρόλος της PAN στην αποαδενυλίωση του mRNA αποκαλύφθηκε στα *ccr4Δ* στελέχη ζύμης όπου απουσιάζει η επικρατούσα αποαδενυλάση και η αποαδενυλίωση εξαρτάται από την Pan2p. Στη ζύμη, και πιθανώς σε άλλους ευκαρυώτες, η PAN εμπλέκεται σε ένα πρώιμο βήμα στο μεταβολισμό του πολύ(A) στον οποίο μία αρχικά μακριά πολυ(A) ουρά βραχύνεται μέχρι τα ~55-75 νουκλεοτίδια, εξαρτάται από το mRNA. Ακόμη και αν υπάρχουν ειδικά mRNA ή συνθήκες που το ένζυμο του Pan2/Pan3p είναι επικρατές, η κυτοπλασματική αποαδενυλάση του mRNA έχει καθοριστεί. Παρ' όλα αυτά αυτή η πιθανότητα προτάθηκε από την παρατήρηση ότι η Pan2p και η Pan3p φαίνεται να παίζουν ρόλο στην ειδική ρύθμιση του mRNA της RAD5 σε απόκριση σε αντιγραφικό στρες.

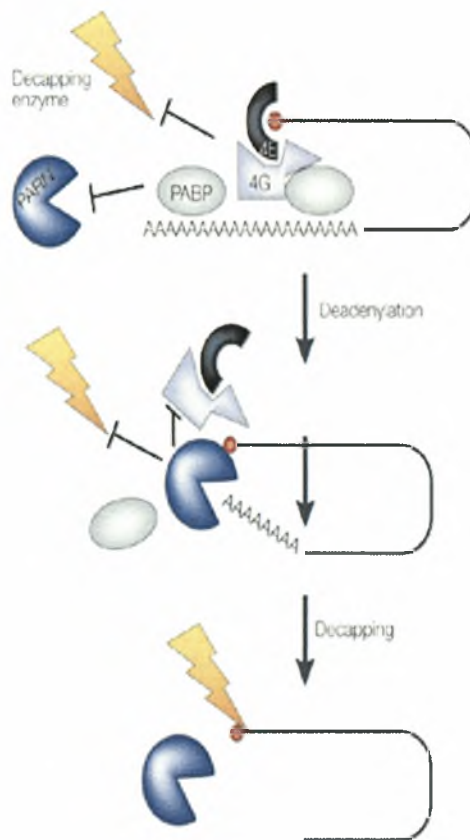
Αναλύσεις αλληλουχιών δείχνουν ότι η καρβοξυτελική περιοχή της Pan2p, όπως και της Pop2p είναι μέλος της υπερικογένειας των RnaseD, και φαίνεται να είναι η καταλυτική υπομονάδα και να χρησιμοποιούν ένα μηχανισμό υδρόλυσης που εξαρτάται από δύο δισθενή ιόντα. Ο ρόλος της Pan3p είναι πιθανών η διέγερση 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 παλινδρομήσιμη πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην εξαγωγή του mRNA, και μπορεί να ευθύνεται για την παράδοση του Pan2/Pan3p στο νέο συντιθέμενο mRNA για την αρκτική αποαδενυλίωση της πολυ(A) ουράς.

### **1.5 Η πολύ(A) εξειδικευμένη ριβονουκλεάση PARN**

Το τελευταίο ένζυμο που γνωρίζουμε να λειτουργεί στην αποαδενυλίωση του mRNA είναι η πολυ(A)-εξειδικευμένη εξωνουκλεάση γνωστή ως PARN (poly(A) ribonuclease) που αρχικά απομονώθηκε από κύτταρα θηλαστικών. Όμοια με την Pan2p και την Pop2p, ανάλυση αλληλουχιών δείχνει ότι η PARN είναι μέλος της οικογένειας των RnaseD νουκλεασών που φέρει το χαρακτηριστικό μοτίβο DEDD και μεταλλάξεις στα προβλεπόμενα καταλυτικά κατάλοιπα αναστέλλουν την ενζυμική της δράση και *in vivo* και *in vitro*. Η PARN επίσης έχει μια σπάνια διατηρημένη RH3 περιοχή που φαίνεται να έχει δομή όμοια με αυτή της IF3 καρβοξυτελικής περιοχής. Η RH3 περιοχή μπορεί να λειτουργήσει ως μια περιοχή που προσδέεται σε μονόκλωνα νουκλεϊκά οξέα για να προσδέσει την PARN στο πολυαδενυλιωμένο mRNA.

Η PARN έχει τη μεγαλύτερη ενεργότητα αποαδενυλάσης *in vitro* στα θηλαστικά σε συστήματα αποικοδόμησης. Επιπρόσθετα, η PARN φαίνεται να είναι απαραίτητη για ταχεία αποαδενυλίωση που επάγεται από την πλούσια σε AU αλληλουχία, την ARE προσδενόμενη πρωτεΐνη τριστετραπρολίνη και μπορεί να επηρεάσει τη διαδικασία της εξαρτώμενης από ανεμηνεύσιμα κωδικόνια αποσύνθεσης. Αυτές οι παρατηρήσεις προτείνουν ότι η PARN μπορεί να είναι μια σημαντική αποαδενυλάση του mRNA στα κύτταρα σπονδυλωτών. Ομόλογα της PARN έχουν βρεθεί σε γονιδιώματα πολλών ευκαρυωτών όπως *Arabidopsis thaliana*. Ωστόσο απουσιάζει από τα γονιδιώματα των *Subtilis cerevisiae* και *Drosophila melanogaster*, δείχνοντας ότι αυτό το ένζυμο δεν απαιτείται από όλους τους ευκαρυώτες.

Παρατηρήσεις προτείνουν ότι διαφορετικές αποαδενυλάσες προτιμούν διαφορετικά υποστρώματα mRNA. Για παράδειγμα, η ενεργότητα της Ccr4p δεν επηρεάζεται από τη δομή της καλύπτρας στο mRNA, αλλά αναστέλλεται από την πολύ(A)-προσδεδόμενη πρωτεΐνη (Pab1p). Σε αντίθεση, η PARN διεγείρεται από τη δομή της καλύπτρας στο υπόστρωμα, όμως αναστέλλεται επίσης από την πολύ(A)-προσδεδόμενη πρωτεΐνη (Pab1p) υπό φυσιολογικές συνθήκες αλατότητας.



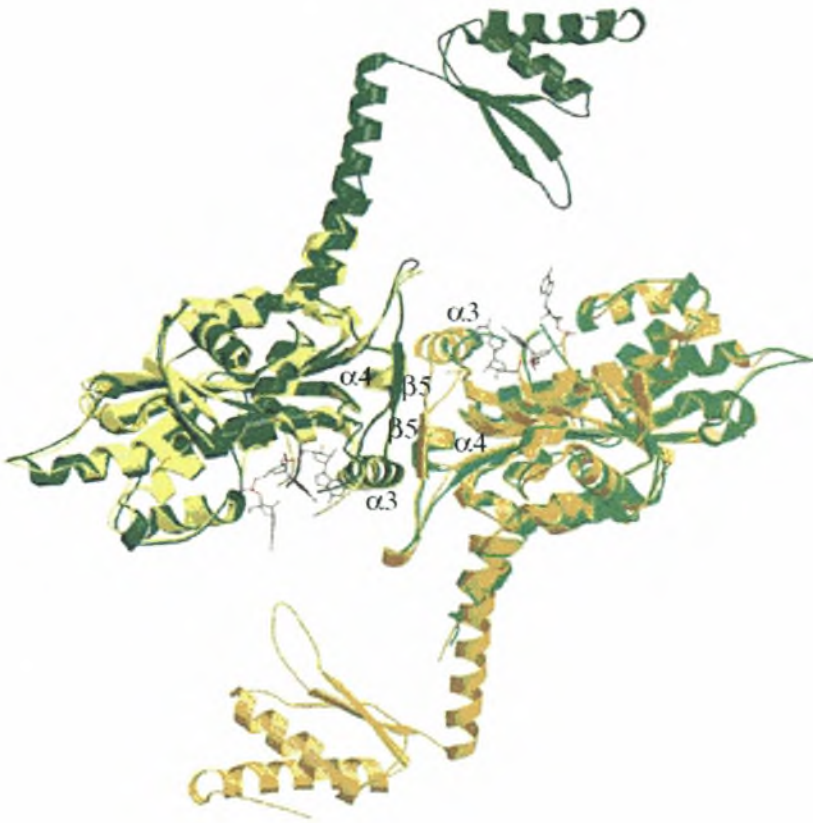
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Εικόνα 11. Η διαδικασία αποαδενυλίωσης από την PARN**

Κάθε αποαδενυλάση του mRNA θα έχει ένα υπόστρωμα. Για παράδειγμα, το προτιμώμενο υπόστρωμα για την PAN θα ήταν ένα mRNA με την Pab1p προσδεδεμένη στην πολυ(A) ουρά. Σε αντίθεση, το προτιμώμενο υπόστρωμα για την PARN θα ήταν ένα mRNA με ταυτόχρονα εκτεθειμένη την καλύπτρα και την πολυ(A) ουρά απουσιάζοντας η πολύ(A)-προσδεδόμενη πρωτεΐνη. Αυτό έχει τις εξής περιπλοκές. Αρχικά, δείχνει ότι η ροή μεταξύ διαφορετικών καταστάσεων mRNP αλλάζει την επιδεκτικότητα των mRNA στις διαφορετικές αποαδενυλάσες. Δεύτερον, προτείνει ότι αλλάζοντας την ενεργότητα κάποιων από τις αποαδενυλάσες θα επηρεάσει αρχικά δι-

αφορετικές δεξαμενές μεταγράφων. Τρίτον, προτείνει δύο τρόπους με τους οποίους οι πολύ(A)-εξειδικευμένες προσδεδεσμένες πρωτεΐνες που ελέγχουν την αποαδενυλίωση να μπορούν να λειτουργήσουν. Τέτοιοι ρυθμιστές μπορούν απευθείας να προμηθεύουν αποαδενυλάσες στο υπόστρωμα και έτσι να αυξάνουν την ενεργότητά τους.

Συνοψίζοντας, η PARN είναι μια πολύ(A)-εξειδικευμένη 3' εξωνουκλεάση που αποικοδομεί αποτελεσματικά πολύ(A) ουρές mRNA και ανήκει σε μια οικογένεια RnaseD νουκλεασών που χαρακτηρίζεται από την παρουσία τεσσάρων συντηρημένων καταλοίπων. Η PARN είναι ένα ολιγομερές, που φαίνεται να αποτελείται από τρεις υπομονάδες και αλληλεπιδρά και με την 3' πολύ(A) ουρά και την 5' καλύπτρα κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης. Η αλληλεπίδραση με την 5' καλύπτρα ενισχύει τον ρυθμό της αποικοδόμησης. Το ένζυμο αυτό βρίσκεται σε δύο ισόμορφες μία πυρηνική 74 kd και μία κυτταροπλασματική, 54 kd ή 62 kd στον άνθρωπο και στον *Xenopus laevis* αντίστοιχα, οι οποίες είναι πρωτεολυμένα παράγωγα από τα οποία απουσιάζει μια εύκαμπτη καρβοξυτελική περιοχή. Η περιοχή αυτή ευθύνεται και για τη μετακίνηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα αφού περιέχει την NLS (nuclear localization signal) αλληλουχία. Η PARN εξαρτάται από δισθενή μεταλλικά ιόντα ενώ μεγαλύτερη δραστηριότητα έχει παρουσία ιόντων  $Mg^{++}$  τα οποία πιθανόν προσδένονται στο μοτίβο DEDD του ενεργού κέντρου παίζοντας καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό της κατάλυσης. Το ελάχιστο μήκος υποστρώματος είναι τα δι η τρι - αδενυλονουκλεοτίδα ανάλογα με το παρόν μεταλλικό ιόν στο ενεργό κέντρο.



*Εικόνα 12. Η κρυσταλλική δομή της PARN*

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η PARN είναι ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα αποαδενυλίωσης. Έχει μελετηθεί η επίδραση αναλόγων του 5' καλύμματος στη δραστηριότητα του ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα, έχειδειχτεί ότι τα νουκλεοτίδια πουρίνης μειώνουν την ενεργότητα του ενζύμου. Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης αναλόγων πουρινών και πυριμιδινών στη δραστηριότητα της PARN, ώστε να αποκαλυφθούν μηχανισμοί ρύθμισης του ενζύμου από μικρά μόρια καθώς και η επίδραση του ενζύμου στο χρόνο ζωής των μορίων mRNA. Μελετήθηκαν επτά ανάλογα νουκλεοσιδίων πουρίνης και πυριμιδίνης και αναλύθηκε η κινητική της επίδρασης των μορίων αυτών στη δραστηριότητα της PARN. Για τον σκοπό αυτό θα χρησιμοποιήσουμε μια φωτομετρική μέθοδο.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Υλικά

##### 3.1.1 Χημικές ουσίες

---

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

---

##### 3.1.2 Κύτταρα

- ◆ *E. coli* BL21 DE3
- ◆ *E. coli* BL21 DE3 RIL

##### 3.1.3 Θρεπτικά μέσα

- ◆ Υγρό θρεπτικό μέσο (LB Broth)

Για τελικό όγκο υγρού θρεπτικού μέσου 1L χρησιμοποιούνται:

---

LB Broth (Scharlau)	15g
NaCl (Scharlau)	10g
Απιονισμένο H <sub>2</sub> O	

---

Το διάλυμα αποστειρώνεται.

◆ **Στερεό θρεπτικό μέσο (LB Agar)**

Για τελικό όγκο στερεού θρεπτικού μέσου 1L χρησιμοποιούνται:

---

LB Agar	30g
NaCl	10g
Απιονισμένο H <sub>2</sub> O	

---

Το διάλυμα αποστειρώνεται και διανέμεται σε τρυβλία μετά την προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού.

◆ **SOC medium (υγρό θρεπτικό μέσο) pH 7**

Για τελικό όγκο 100ml χρησιμοποιούνται:

---

<b>Αντιδρα- στήριο</b>	<b>Πο- σότητα</b>
Tryptone	2g
Yeast ex- tract	0,5g
NaCl 1M	1ml
KCl 1M	0,25m
	l
δ/μα Mg <sup>2+</sup> 2M	1ml
Γλυκόζη 2M	1ml

---

Το διάλυμα αποστειρώνεται πριν την προσθήκη Mg και γλυκόζης.

**3.1.4 Πρωτεΐνες και ένζυμα**

---

His6-hPARN 74KD (Από *E.coli* BL21) ανασυνδυασμένη

His6-hPARN 54kD (Από *E.coli* BL21)

BSA Fraction V (Merck)

RNasin (Biolabs)

---



### 3.1.5 Ανάλογα πουρίνης και πυριμιδίνης

- ◆ 9-(3,4-dideoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N<sup>6</sup>-benzoyl adenine  
(MW:403,364)
- ◆ 1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N<sup>4</sup> – benzoyl cytosine  
(MW:379,339)

### 3.1.6 Πλασμίδια

- ◆ pET33 NOVAGEN

Ο πλασμιδιακός φορέας με το γονίδιο της PARN 54 παραχωρήθηκε από τον κ. Virtanen και ο πλασμιδιακός φορέας με το γονίδιο της PARN 74 κατασκευάστηκε σε προηγούμενη εργασία και χρησιμοποιήθηκε ως είχε.

### 3.1.7 Υλικά χρωματογραφίας

Ρητίνη ιονανταλλαγής Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose, QIAGEN

### 3.1.8 Διαλύματα

#### 3.1.8.1 Διαλύματα για απομόνωση πρωτεΐνης

- ◆ Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης :

Συγκέντρωση	Αντιδραστήριο
20 mM	HEPES pH 7.9
0.5 M	KCl
0.1%	Triton X-100
10%	γλυκερόλη
2mM	μερκαπτοαιθανόλη
2.5 mM	ιμιδαζόλιο,
0,1 mM	PMSF
	λυσοζύμη

- ◆ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης

Συγκέντρωση	Αντιδραστήριο
-------------	---------------

20 mM	HEPES pH 7.9
0.5 M	KCl
10%	γλυκερόλη
5 mM	ιμιδαζόλιο

- ◆ Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης

Συγκέντρωση	Αντιδραστήριο
20 mM	HEPES pH 7.9
0.5 M	KCl
10%	γλυκερόλη
150 mM	ιμιδαζόλιο

### 3.1.8.2 Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

- ◆ Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (10x):

Tris base 1,5 %
Γλυκίνη 7,2% v/w
SDS 0,5%
pH 8,3

- ◆ Διαλύματα stock για πήκτωμα ακρυλαμιδίου
  - ο Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl pH 8,8 1,5M
  - ο Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl pH 6,8 0,5M
  - ο SDS 10% v/w
  - ο Ακρυλαμίδιο 30% v/w
  - ο APS 10%
  - ο TEMED

◆ **Διαλύματα για χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης**

---

διάλυμα χρώσης Coomassie Brilliant Blue G250 0,1% w/v

ισοπροπανόλη 33%

οξικό οξύ 2%

---

◆ **Διάλυμα αποχρωματισμού**

---

ισοπροπανόλη 9%

οξικό οξύ 1%

---

**3.1.8.3 Διαλύματα για την μέτρηση της ενεργότητας της PARN**

◆ **διάλυμα αντίδρασης**

---

<b>Συγκέντρωση</b>	<b>Αντιδραστήριο</b>
1.5mM	MgCl <sub>2</sub>
100 mM	KCl
20 mM	HEPES-KOH pH7
0.2 mM	EDTA
0.25 mM	DTT
10%	γλυκερόλη

---

◆ **διάλυμα κυανού του μεθυλενίου**

---

<b>Συγκέντρωση</b>	<b>Αντιδραστήριο</b>
0.0012%	Κυανό του μεθυλενίου
0,1M	MOPS-KOH pH7,5
2mM	EDTA

---

◆ **διάλυμα πολυ(A)**

Το πολυ(Α) (10 mg/ml) αραιώνεται σε διάλυμα αντίδρασης σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml.

### **3.2 Μέθοδοι**

#### **3.2.1 Υπερέκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένης PARN74-54 kd**

##### **3.2.1.1 Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων (competent cells).**

Για τη δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος CaCl<sub>2</sub>.

➤ Αρχικά σε 5 ml θρεπτικού υλικού LB Broth ενοφθαλμίζονται τα κύτταρα που επιθυμούμε να καταστήσουμε επιδεκτικά. Στο θρεπτικό υλικό προστίθεται και το αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη (34 mg/ml), σε τελική συγκέντρωση 100 mg/ml. Η υγρή καλλιέργεια έπειτα τοποθετείται στους 37 °C και στις 210 rpm για 12-16 ώρες (overnight).

➤ Από την overnight καλλιέργεια λαμβάνεται 1 ml και τοποθετείται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100 ml θρεπτικό LB Broth. Έπειτα από ήπια ανάδευση, φωτομετρείται 1 ml από την καλλιέργεια στα 600 nm. Η οπτική απορρόφηση (OD<sub>600</sub>) πρέπει να είναι γύρω στο 0,04. Ακολούθως η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C και στις 210 rpm. Πραγματοποιούνται φωτομετρήσεις άνα τακτά χρονικά διαστήματα έως ότου η οπτική απορρόφηση είναι OD<sub>600</sub>=0,4, καθώς τα κύτταρα στο σημείο εκείνο βρίσκονται στην εκθετική φάση της ανάπτυξης τους.

➤ Τα 100 ml της καλλιέργειας των κυττάρων μοιράζονται σε δύο αποστειρωμένους και παγωμένους πλαστικούς σωλήνες (falcon) των 50 ml (υπό φλόγα) και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο για 10 λεπτά.

➤ Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 λεπτά και στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα falcons τοποθετούνται ανάποδα ώστε να απομακρυνθούν και τα τελευταία ίχνη.

➤ Σε κάθε falcon προστίθεται 30 ml διάλυμα MgCl<sub>2</sub>-CaCl<sub>2</sub> (80 mM/20 mM) και πραγματοποιείται ελαφρά ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.

➤ Τα falcons φυγοκεντρώνονται εκ νέου στις 4.000 rpm για 10 λεπτά και στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα falcons τοποθετούνται ανάποδα.

➤ Σε κάθε falcon προστίθεται 2 ml παγωμένου διαλύματος CaCl<sub>2</sub> 0.1 M, αναδιαλύεται το ίζημα και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο.

➤ Εισάγονται 70 μl DMSO σε κάθε falcon και ακολουθεί ανάδευση (το DMSO διατηρεί τα κύτταρα δεκτικά για περισσότερο διάστημα και εμποδίζει τυχόν διαφυγή των τμημάτων τους). Έπειτα αφήνονται στον πάγο για 15 λεπτά.

➤ Προστίθενται άλλα 70 μl DMSO στα falcon και αφού αναδευτούν, τοποθετούνται στον πάγο.

Πολύ γρήγορα μοιράζεται η ποσότητα των επιδεκτικών κυττάρων (200 μl ανά σωλήνα των 1.5 ml) και τοποθετούνται προς φύλαξη στους  $-80^{\circ}\text{C}$

### **3.2.1.2 Μετασχηματισμός DH3 με pET33 PARN 74-54 (transformation)**

Σε 200μl επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* DE3, γίνεται προσθήκη 5μl του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA pET33 PARN 74-54. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση στον πάγο για 30 λεπτά και θερμικό σοκ στους  $42^{\circ}\text{C}$  για 1,5 λεπτά. Έπειτα τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 1-2 λεπτά και εν συνεχεία προστίθενται σε κάθε καλλιέργεια 800μl διάλυμα SOC. Ακολουθεί επώαση για 1,5 ώρες στους  $37^{\circ}\text{C}$  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  $37^{\circ}\text{C}$  για 12-14h.

### **3.2.1.3 Υπερέκφραση της PARN**

Σε 5ml LB Broth με τελική συγκέντρωση χλωραμφαινικόλης 25mg/ml και καναμικίνης 0,1mg/ml, ενοφθαλμίζονται μετασχηματισμένα κύτταρα DE3 και επωάζονται για 12-14h στους  $37^{\circ}\text{C}$  υπό ανάδευση (210 rpm). Ακολουθεί μεταφορά των 5ml της ο/η καλλιέργειας σε 400ml από φρέσκο θρεπτικό μέσο LB broth με χλωραμφαινικόλη και καναμικίνη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm ( $\text{OD}_{600}$ ) και επώαση των καλλιεργειών στους  $37^{\circ}\text{C}$  υπό ανάδευση έως ότου το  $\text{OD}_{600}$  φτάσει περίπου το 0,5 που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Τίθεται IPTG (0,1M) 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  $37^{\circ}\text{C}$  για την PARN 74 είτε για 12 ώρες (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

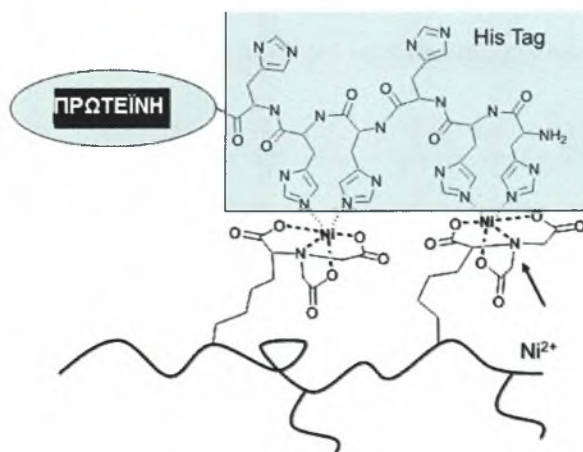
### 3.2.1.4 Απομόνωση της PARN

#### ♦ Ομογενοποίηση των κυττάρων

Το καταψυγμένο ίζημα κυττάρων διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διαδικασία της ομογενοποίησης 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

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 ώρα στους 4°C. Η πρωτεΐνη δεσμεύεται στην ρητίνη μέσω σύνδεσης των ιστοτιδινών που περιέχει με τα άτομα του νικελίου.



Εικόνα 13. Χρωματογραφία συγγένειας

Η στήλη ξεπλένεται με 10ml ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Η έκλυση της πρωτεΐνης έγινε με 3 ml ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 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 συνδε-

μένες με ιστιδίνες (His-tagged). Συλλέγονται πέντε κλάσματα από τη στήλη (E1-E5). Από κάθε βήμα της απομόνωσης κρατάμε δείγματα για μέτρηση ολικής πρωτεΐνης και ηλεκτροφόρηση.

### **3.2.1.5 Μέθοδος Bradford**

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στα διάφορα δείγματα. Αρχικά κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις μιας πρωτεΐνης, όπως είναι η αλβουμίνη βοοειδούς (BSA), με βάση την απορρόφηση στα 595 nm. Κατόπιν μετρείται η απορρόφηση στα 595 nm του άγνωστου δείγματος και μέσω της καμπύλης υπολογίζεται η πρωτεϊνική συγκέντρωση των άγνωστων δειγμάτων. Η άμεση σχέση της απορρόφησης στα 595nm με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης οφείλεται στον δεσμό που δημιουργείται μεταξύ της πρωτεΐνης και του Coomassie Brilliant Blue G. Από τα πέντε κλάσματα που συλλέχθηκαν από τη στήλη Νικελίου λήφθηκαν 2μl και προστέθηκαν 900μl διαλύματος Bradford. Συμπληρώθηκε νερό σε τελικό όγκο 1000μl. Μετρήθηκαν οι απορροφήσεις των δειγμάτων στα 595nm και προσδιορίστηκε σε ποιο δείγμα βρίσκεται η μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης.

### **3.2.2 Μέτρηση της ενεργότητας της PARN με κυανό του μεθυλενίου**

Η μέθοδος στηρίζεται στη μείωση της απορρόφησης στα 662nm όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυ(A) [47,48]. Σύμφωνα με την αρχή αυτή και με βάση την πρότυπη καμπύλη γίνεται η μέτρηση της συγκέντρωσης σε μία αντίδραση των 100μl με προσθήκη 900μl διαλύματος κυανού του μεθυλενίου. Το τελευταίο περιέχει κυανό του μεθυλενίου το οποίο προσδένεται στο πολυμερές πολυ(α) και EDTA σε συγκέντρωση 2mM το οποίο δεσμεύει τα ιόντα μαγνησίου. Τα ιόντα μαγνησίου είναι απαραίτητα για τη 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.

♦ **Κατασκευή πρότυπης καμπύλης πολυ(Α) σύμφωνα με τη δοκιμή ενεργότητας με διάλυμα κυανού του μεθυλενίου.**

Τα δείγματα ετοιμάστηκαν σύμφωνα με τον παρακάτω Πίνακα. Μετά την προσθήκη του διαλύματος κυανού του μεθυλενίου τα δείγματα επώαστηκαν για 15' και η 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(Α) που υδρολύεται κατά τις ενζυμικές αντιδράσεις.

♦ **Αντιδραστήρια και ποσότητες για το βασικό πειραματικό προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας με τη φωτομετρική μέθοδο του κυανού του μεθυλενίου.**

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

Σε χρόνο που θέλουμε να μετρήσουμε μείωση της συγκέντρωσης πολυ(Α) 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 σωληνάκια αντίδρασης (erpendorf tubes). 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 παραμένει η ίδια. Τα δείγματα θερμαίνονται στους 30<sup>ο</sup> C πριν προσθέσουμε ένζυμο για μερικά λεπτά για να φτάσουν στην θερμοκρασία αντίδρασης. Ακολουθεί προσθήκη του ενζύμου και οι αντιδράσεις συνεχίζουν στους 30<sup>ο</sup> C για τον επιθυμητό χρόνο. Μετά το πέρας χρόνου αντίδρασης η αντίδραση σταματά με προσθήκη



του ρυθμιστικού διαλύματος κυανού του μεθυλενίου και τα δείγματα φωτομετρούνται στα 662nm.

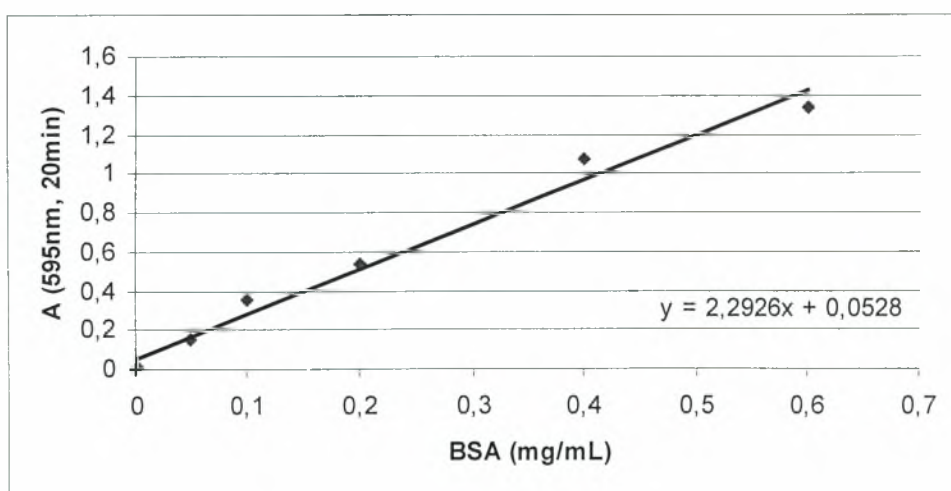
#### 3.2.2.4. Κινητική με αυξανόμενες συγκεντρώσεις πολυ(A).

Έχοντας υπολογίσει την ποσότητα του ένζυμου και τον απαιτούμενο χρόνο αντίδρασης ώστε οι τιμές που θα λαμβάνουμε να βρίσκονται στη γραμμική περιοχή της χρονοκαμπύλης κατασκευάζουμε την καμπύλη Michaelis-Menten με συγκεντρώσεις πολυ(A) από περίπου 5 -90  $\mu\text{g/ml}$ .

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης

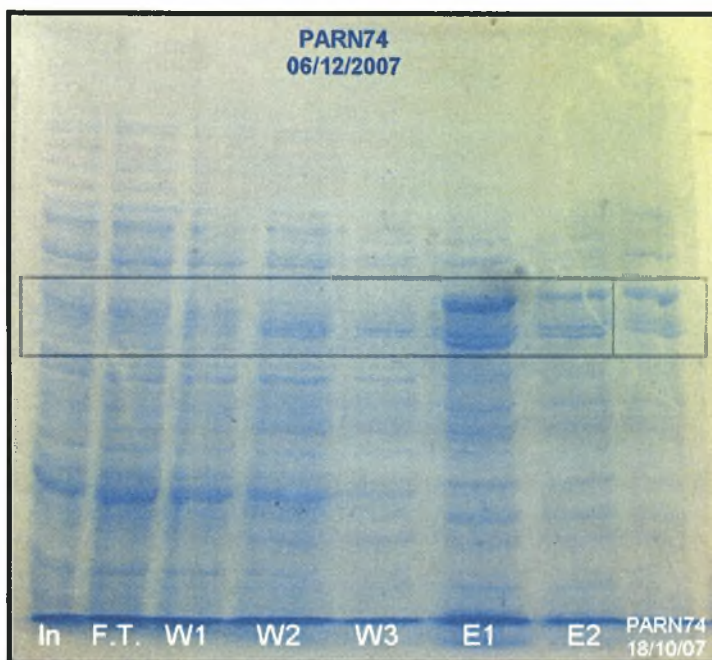
Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford. Από αρχικό διάλυμα BSA 2mg/mL παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης από 0 έως 2mg/mL και επώαστηκαν με Bioquant για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετρήθηκαν οι απορροφήσεις των διαλυμάτων φωτομετρικά στα 595nm και κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη. Η εξίσωση που προκύπτει είναι:  $A = 0,5092 \cdot C(\text{mg/mL}) + 0,0008$ . Με αυτή θα υπολογιστούν οι ολικές συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών στα διάφορα στάδια απομόνωσης.



Εικόνα 14. Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

#### 4.2. Υπερέκφραση και απομόνωση PARN 74

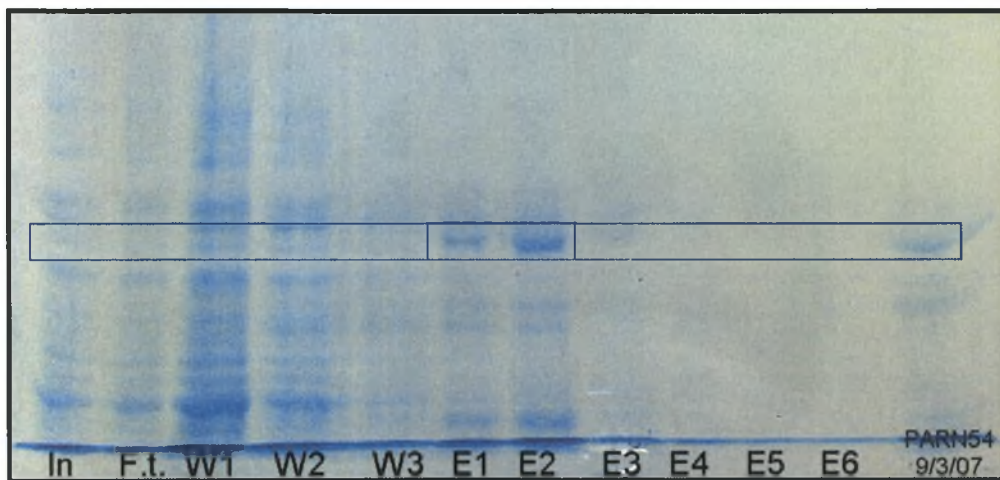
Κύτταρα *E.coli* BL21 μετασηματίστηκαν με πλασμίδια υπερέκφρασης pET33 P74. Όταν η απορρόφηση φτάσει την τιμή  $A_{600}=0,640$  επάγουμε την έκφραση του γονιδίου της PARN με IPTG τελικής συγκέντρωσης 1mM για 4 ώρες στους 37°C. Ακολουθεί απομόνωση του ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας (NTA-Ni agarose). Η μέτρηση ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης από όλα τα στάδια της απομόνωσης της PARN74 έγινε με τη μέθοδο Bradford. Δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου x% υπο αποδιατακτικές συνθήκες και η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 7,5% (SDS-PAGE). Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα δείγματα της έκλουσης σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford ήταν 0,160mg/ml.



**Εικόνα 15.** Ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της PARN74. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue. In: Κυτταρικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα, Ft: Δείγμα που δεν συνδέθηκε στη στήλη, W1 – W3: Δείγματα έκπλυσης, E1, E2: Δείγματα έκλουσης από τη στήλη, PARN74 18/10/07 : παλαιότερο ένζυμο που χρησιμοποιείται ως δείκτης μοριακού βάρους.

### 4.3. Υπερέκφραση και απομόνωση PARN 54

Κύτταρα *E.coli* BL21 μετασχηματίστηκαν με πλασμίδια υπερέκφρασης pET33 P54. Η προσπάθεια υπερέκφρασης της PARN 54 στις ίδιες συνθήκες με την υπερέκφραση της PARN 74 δεν ήταν εξίσου αποτελεσματική. Η διαδικασία επαναλήφθηκε και η επαγωγή της έκφρασης πραγματοποιήθηκε σε A600 περίπου 0.6 με IPTG τελικής συγκέντρωσης 1 mM για 12-16h στους 25°C. Η μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης από όλα τα στάδια της απομόνωσης της PARN74 έγινε με τη μέθοδο Bradford. Δείγματα από όλα σχεδόν τα στάδια απομόνωσης της πρωτεΐνης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης x% υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).

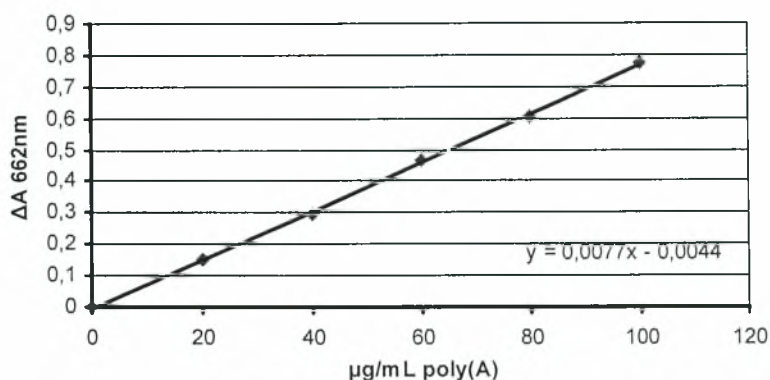


Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της PARN54. PARN54 9/3/07: παλαιότερο ένζυμο που χρησιμοποιείται ως δείκτης μοριακού βάρους.

### 4.4. Πρότυπη καμπύλη πολυ(A)

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης πολυ(A) χρησιμοποιούνται αραιώσεις του πολυ(A) από 0 έως 10μg/ml. Μετά την προσθήκη του κυανού του μεθυλενίου, φωτομετρούμε στα 662 nm αφού πρώτα μηδενιστεί το φωτόμετρο με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυ(A) (10μg/ml τελική συγκέντρωση). Υπολογίστηκαν οι απόλυτες τιμές από την αφαίρεση όλων των απορροφήσεων από τη μεγαλύτερη θέτοντας το τυφλό ως 0. Από την παρακάτω πρότυπη καμπύλη προκύπτει η εξίσωση :  $0,0077 * C(\mu\text{g/ml}) - 0,0044$ .

### Προτ.Καμπ. poly(A)

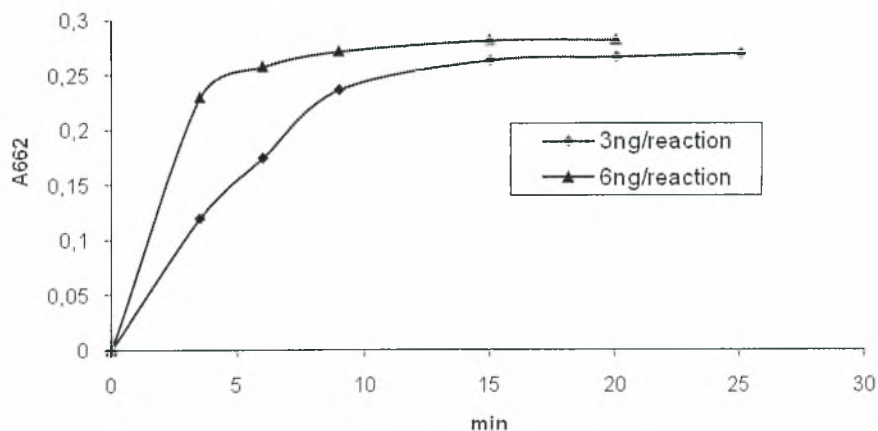


*Εικόνα 17. Πρότυπη καμπύλη πολύ(A) με χρήση κυανού του μεθυλενίου*

Οι απορροφήσεις των ενζυμικών αντιδράσεων θα αντιστοιχηθούν με τις συγκεντρώσεις του πολύ(A) που αποικοδομήθηκε κατά τις αντιδράσεις.

#### 4.5. Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

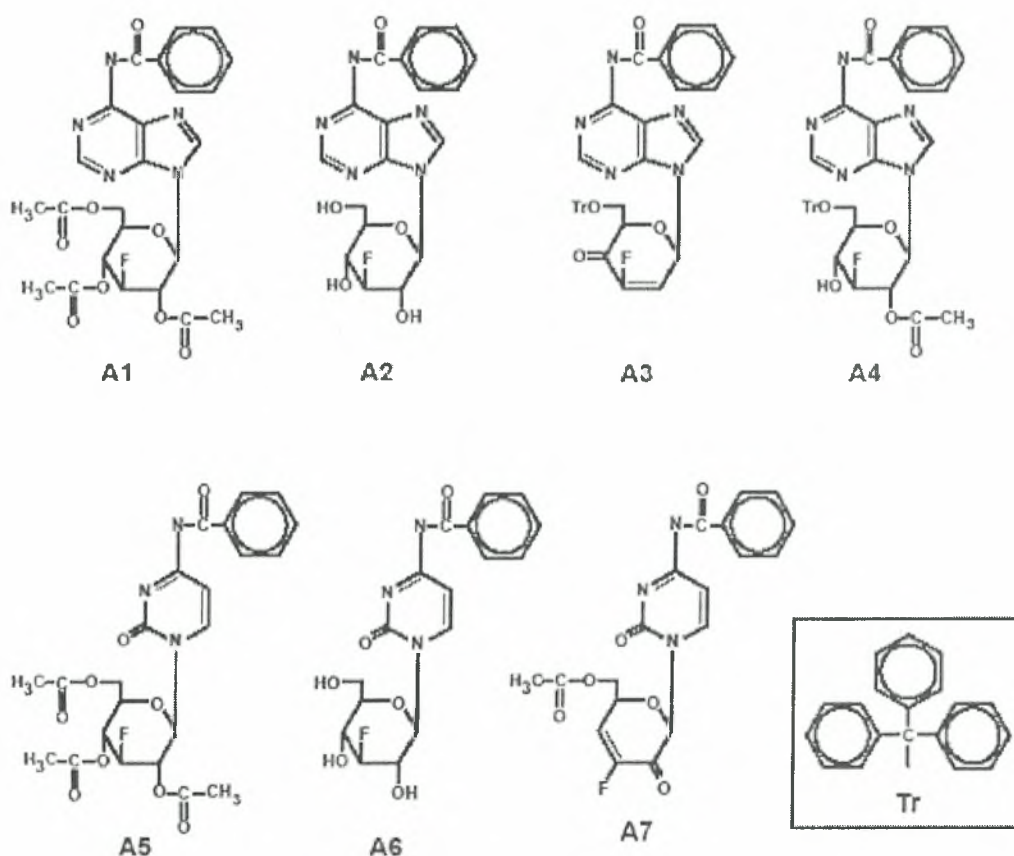
Βασιζόμενοι σε προηγούμενη εργασία, καθορίστηκε ως ιδανική ποσότητα ενζύμου τα 3 ng PARN/αντίδραση και ελάχιστος χρόνος αντίδρασης 15min για την PARN74, ενώ για την PARN54 40min. Η συγκέντρωση πολυ(A) κυμάνθηκε από 7,5 έως 60,0 μg/ml.



*Εικόνα 18. Χρονοκαμπύλη με 6ng και 3ng PARN/αντίδραση σε συγκέντρωση πολύ(A) 60μg/ml*

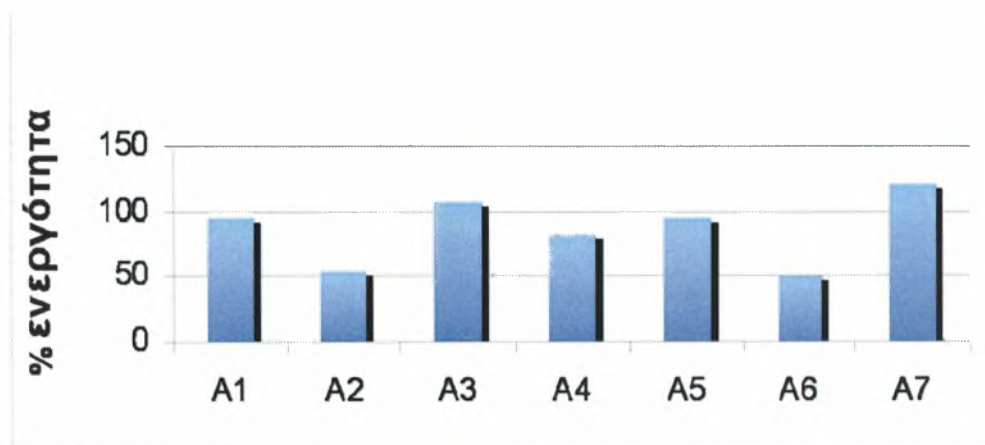
#### 4.6. Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηκότητας παρουσία συνθετικών νουκλεοσιδίων

Στην παρούσα εργασία συνθέσαμε και εξετάσαμε μια σειρά αναλόγων νουκλεοσιδίων πουρίνης και πυριμιδίνης που φέρουν τροποποιήσεις στο σάκχαρο και στη βάση. Συνολικά εξετάστηκαν έξι ενώσεις από τις οποίες μόνο οι δυο έδειξαν να επηρεάζουν τη δραστηκότητα του ενζύμου. Ονομάσαμε τις ενώσεις A1, A2, A3, A4, A5, A6 και A7. Οι A2 (1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-b-D-glucopyranosyl)-N<sup>6</sup> – Benzoyl adenine) και A6 (1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-b-D-glucopyranosyl)-N<sup>4</sup> – Benzoyl cytosine) μελετήθηκαν περαιτέρω καθώς μειώναν τη δραστηκότητα της PARN. Το MB<sub>A2</sub> ισούται με 403,364 και το MB<sub>A6</sub>=379,339. Οι δομές αυτών των μορίων φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 19. Το σύνολο των συνθετικών νουκλεοσιδίων που χρησιμοποιήθηκαν

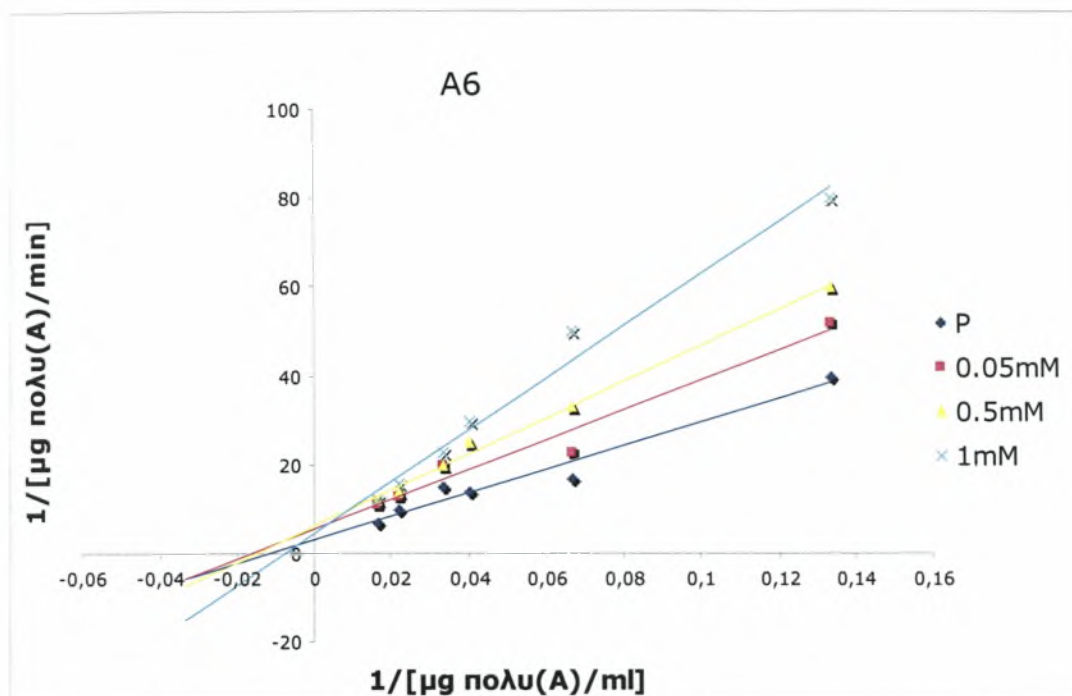
Τα ανάλογα των νουκλεοσιδίων που παρασκευάστηκαν (A1-A7) ελέγχθησαν ως προς την επίδρασή τους στην ενζυμική δραστικότητα της ριβονουκλεάσης PARN. Σύμφωνα με τις αναλύσεις παρουσία και απουσία των συγκεκριμένων εν δυνάμει τροποποιητών, δείχθηκε ότι δεν έχουν καμία σημαντική επίδραση στην ενεργότητα του συγκεκριμένου υπό μελέτη ενζύμου. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι συγκεκριμένες τροποποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν δεν μετατρέπουν τα μόρια αυτά σε τροποποιητές, συναγωνιστικούς ή μη, της ριβονουκλεάσης. Ωστόσο, θα πρέπει να ελεγχθεί η πιθανότητα της συνεργιακής επίδρασης των τροποποιήσεων αυτών με επιπλέον χημικές αλλαγές στα συγκεκριμένα μόρια στην ενζυμική δραστικότητα του συγκεκριμένου στόχου.



**Εικόνα 20. Επίδραση συνθετικών νουκλεοσιδίων στην ενεργότητα της PARN.**

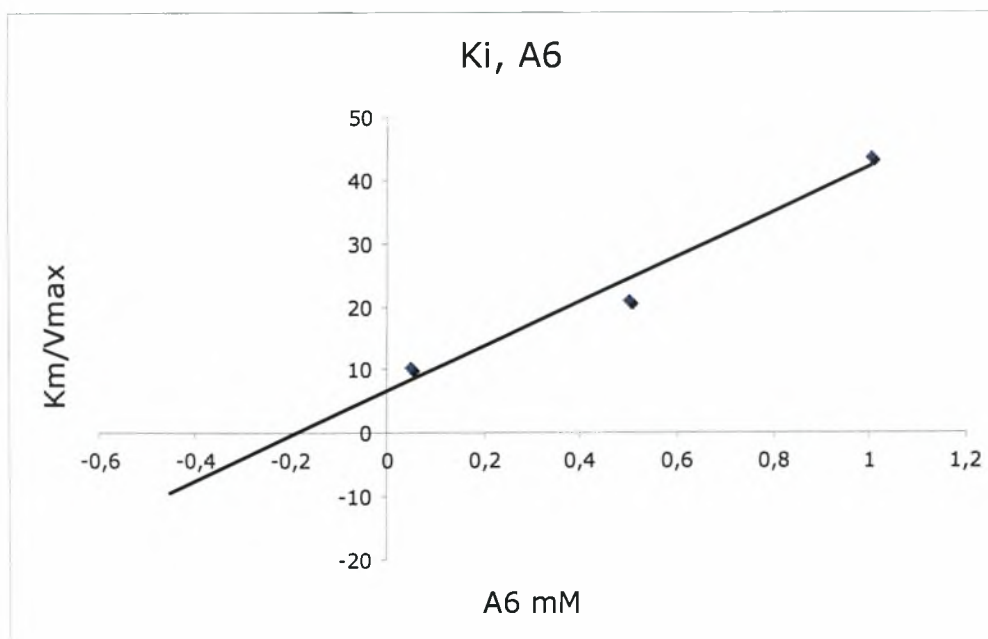
#### **4.7. Το συνθετικό ανάλογο A6 αναστέλλει την PARN ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής**

Για να μελετήσουμε το είδος της αναστολής της PARN από το A6, που είναι ένα συνθετικό ανάλογο κυτοσίνης, προχωρήσαμε σε κινητική ανάλυση του ενζύμου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις A6. Οι χρόνοι των αντιδράσεων ήταν 15min για την PARN 74 και 40min για την PARN 54. Η αντιστοίχιση των απορροφήσεων σε πολυ(A) που αποικοδομήθηκε έγινε με την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης πολυ(A). Τα αποτελέσματα λήφθηκαν ύστερα από μελέτη της καμπύλης Lineweaver – Burk που έδειξε ότι το A6 παρουσιάζει κινητική συναγωνιστικής αναστολής.



**Εικόνα 21.** Κινητική ανάλυση παρουσία συνθετικού αναλόγου A6. Διάγραμμα δι-πλού αντιστρόφου  $1/V - 1/S$ . Οι συγκεντρώσεις του A6 ήταν  $0,05\mu\text{M}$ ,  $0,5\mu\text{M}$ ,  $1\mu\text{M}$ .

Για να προσδιορίσουμε τη σταθερά αναστολής ( $K_i$ ) κινητικά, χρησιμοποιήσαμε την κλίση των ευθειών του παραπάνω διαγράμματος σε σχέση με την συγκέντρωση του A6.



**Εικόνα 22.** Διάγραμμα  $K_m/V_{max} - [A6]$ . Από την κλίση της ευθείας υπολογίζεται η σταθερά αναστολής  $k_i$ .

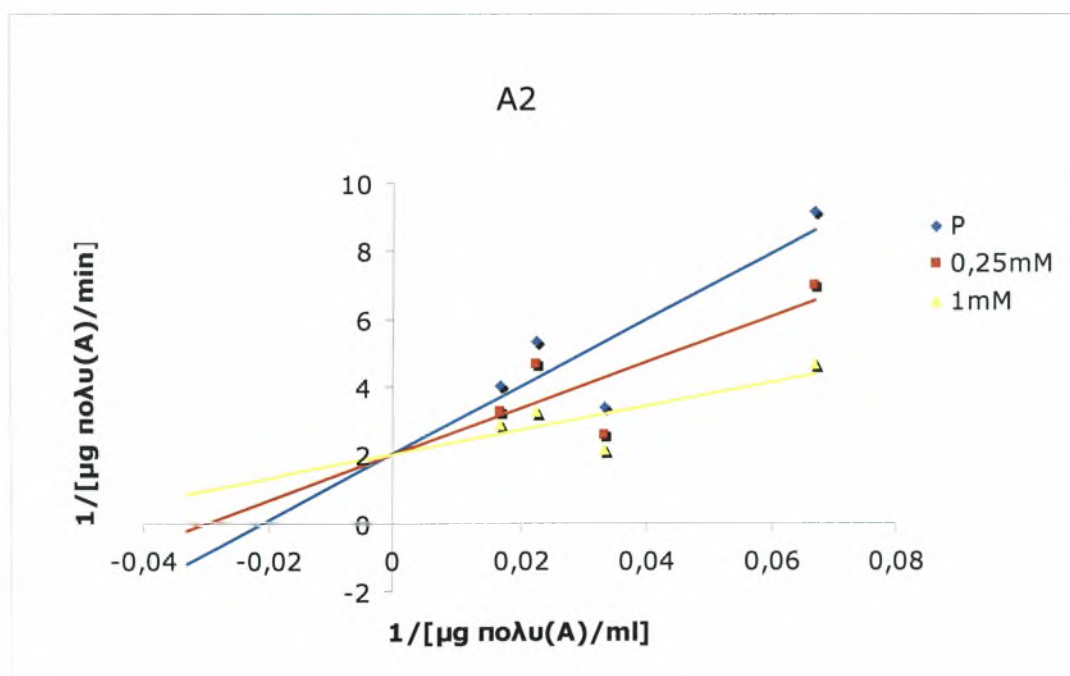
Η κλίση της καμπύλης ισούται με  $K_{max}/V_{max}$ . Το σημείο τομής με τον άξονα των x είναι το  $K_i$ . Σύμφωνα με τα παραπάνω προέκυψε η τιμή του  $K_i$  0,188mM.

Συνολικά τα αποτελέσματα της κινητικής της PARN σε σχέση με το A6 εμφανίζονται στο παρακάτω πίνακα:

	$k_i$	$V_{max}$	$k_m$
Απουσία αναστολέα (P)		0.295 $\mu\text{g}/\text{min}$	78.74
Παρουσία αναστολέα (A6)	188 $\mu\text{M}$	0.214 $\mu\text{g}/\text{min}$	125.47

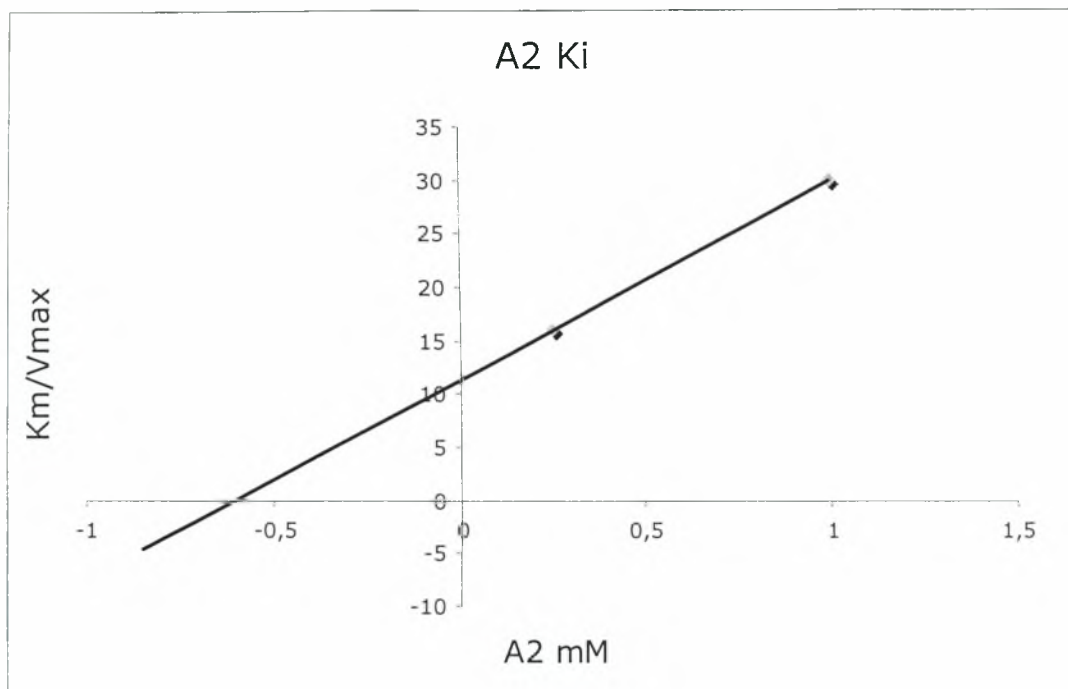
#### 4.8. Το συνθετικό ανάλογο A2 αναστέλλει την PARN ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής

Η ίδια προσέγγιση ακολουθήθηκε και για το A2 που είναι ένα συνθετικό ανάλογο αδενίνης. Σ' αυτή την περίπτωση, η μελέτη της καμπύλης Lineweaver – Burk έδειξε ότι το A2 παρουσιάζει κινητική συναγωνιστικής αναστολής. Τα γραφήματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα παρακάτω:



Εικόνα 23. Κινητική ανάλυση παρουσία συνθετικού αναλόγου A2. Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου  $1/V - 1/S$ . Οι συγκεντρώσεις του A2 ήταν 0,25 $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{M}$ .





**Εικόνα 24** Διάγραμμα  $K_m/V_{max} - [A2]$ . Από την κλίση της ευθείας υπολογίζεται η σταθερά αναστολής  $k_i$

Η τιμή  $K_i$  για το συνθετικό νουκλεοτίδιο A2 ήταν 0,6mM.

Συνολικά τα αποτελέσματα της κινητικής της PARN σε σχέση με το A2 εμφανίζονται στο παρακάτω πίνακα:

	$k_i$	$V_{max}$	$K_m$
Απουσία αναστολέα (P)		0.48 $\mu\text{g}/\text{min}$	50
Παρουσία αναστολέα (A2)	600 $\mu\text{M}$	0.49 $\mu\text{g}/\text{min}$	17.5

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η PARN αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα για την αποικοδόμηση του mRNA. Στόχος της είναι η βράχυνση της πολύ(A) ουράς μέσω του οποίου μπορεί να ρυθμίζει και το χρόνο ημιζωής του mRNA. Σε προηγούμενες εργασίες αποδείχτηκε η επίδραση νουκλεοτιδίων πουρινών και πυριμιδινών στη δράση του ενζύμου και μελετήθηκε ο μηχανισμός δράσης αυτών. Τα νουκλεοτίδια αυτά δείχτηκε πως αναστέλλουν το ένζυμο τόσο με συναγωνιστικό όσο και με μη συναγωνιστικό τρόπο.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο έλεγχος της επίδρασης άλλων μορίων στη δραστηριότητα της PARN. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε μια σειρά από συνθετικά νουκλεοσίδια που φέρουν τροποποιήσεις σε σχέση με τα φυσικά νουκλεοτίδια. Οι τροποποιήσεις έχουν να κάνουν με την προσθήκη επιπλέον δακτυλίων στα φυσικά νουκλεοτίδια. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίδραση δυο από αυτών μετά από κινητική μελέτη. Συγκεκριμένα, τα A2 (1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-b-D-glucopyranosyl)-N<sup>6</sup> – Benzoyl adenine) και A6 (1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-b-D-glucopyranosyl)-N<sup>4</sup> – Benzoyl cytosine) ανέστειλλαν την PARN ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής.

Στη συναγωνιστική αναστολή ο αναστολέας δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος, δηλαδή αναστολέας και υποστρώμα συναγωνίζονται για δέσμευση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η μεγαλύτερη αναστολή εμφανίζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα είναι υψηλή ή όταν η τιμή της συγκέντρωσης του υποστρώματος είναι χαμηλή. Γι' αυτό εξετάστηκε η ενζυμική κινητική σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, καθώς και υποστρώματος.

Τα συνθετικά αυτά μόρια που μελετήθηκαν, αποδείχτηκε ότι ρυθμίζουν τη δράση του ενζύμου και το γεγονός ότι η ρύθμιση αυτή είναι ανεξάρτητη της συγκέντρωσης μαγνησίου, όπως αποδείχτηκε σε προηγούμενη εργασία, μπορεί να καταστήσει το ένζυμο στόχο για αντικαρκινικές μελέτες. Σημαντική θα ήταν, μελλοντικά, η χρήση αυτών των μορίων σε καρκινικά κύτταρα για την ρύθμιση του χρόνου ημιζωής των mRNA τους. Οι ουσίες αυτές μπορεί ακόμη να χρησιμοποιηθούν ως βάση για την ανάπτυξη νέων αποτελεσματικότερων μορίων.

## 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 non-sense-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* 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 Mg<sup>2+</sup>-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. Daugeron, M.C., Mauxion, F. & Séraphin, B. The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Res.* 29, 2448–2455 (2001).
27. Thore, S., Mauxion, F., Séraphin, 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. Körner, C.G. & Wahle, E. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *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 Fe<sup>2+</sup>-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. Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *The EMBO Journal* (2005), 1–12 | & 2005 European Molecular Biology Organization All Rights Reserved 0261-4189/05
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., Körner, 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, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell* 12, 675–687 (2003).
44. 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. 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. Expression and purification of recombinant poly(A)-specific ribonuclease (PARN) *International Journal of Biological Macromolecules* 2006
47. A nonradioactive assay for poly(a)-specific ribonuclease activity by methylene blue colorimetry. Cheng Y, Liu WF, Yan YB, Zhou HM. *Protein Pept Lett.* 2006;13(2):125-8.
48. A General Ribonuclease Assay Using Methylene Blue. Greiner-Stoeffele T.; Grunow M.; Hahn U. *Analytical Biochemistry*, Volume 240, Number 1, August 1996, pp. 24-28(5)

