



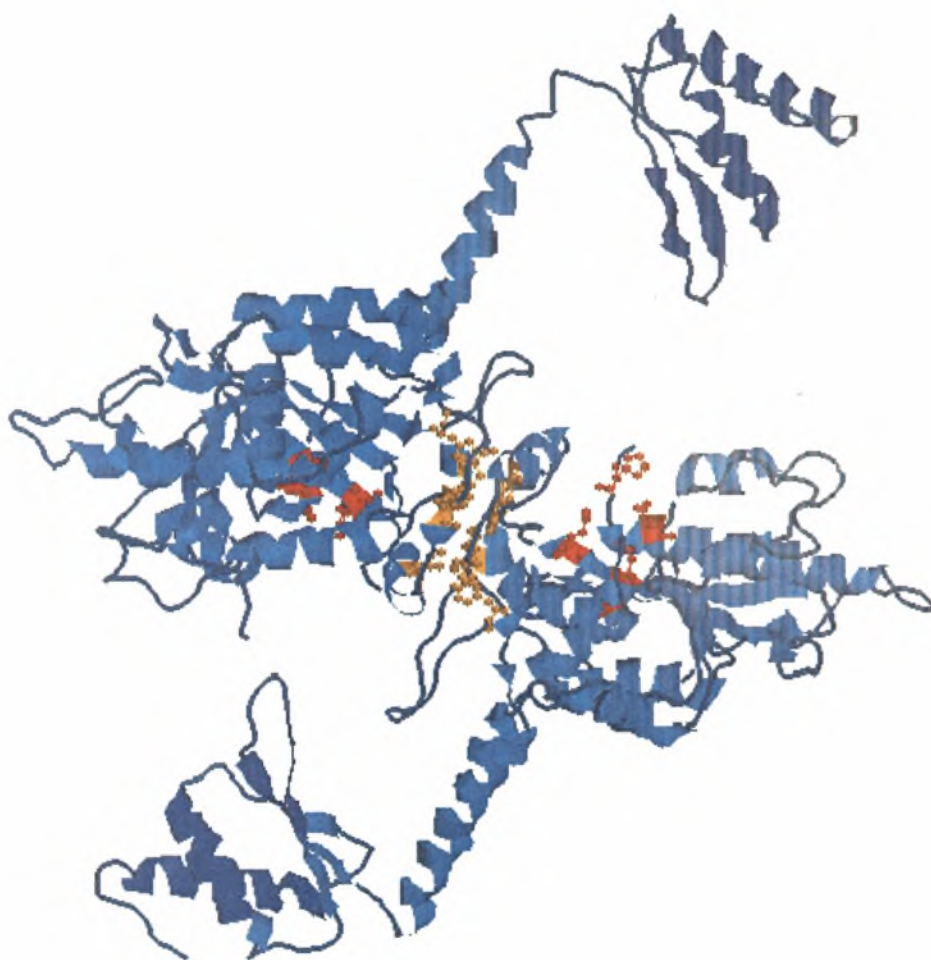
607
25-9-09

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Αναστολή της αποικοδόμησης της πολυ(Α) ουράς από
συνθετικά ανάλογα νουκλεοσιδίων και υποστρωμάτων.**



Διπλωματική Εργασία – Χατζηγεωργίου Βασιλική

Λάρισα 2009



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

Αριθ. Εισ.: 7650/1
Ημερ. Εισ.: 24-11-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΧΑΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087148

Η εργασία διεκπεραιώθηκε στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Υπεύθυνος Καθηγητής:

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

Τριμελής Επιτροπή:

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

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

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

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω για την αμέριστη εμπιστοσύνη, την πολύτιμη καθοδήγηση και την συμπαράστασή του, τον υπεύθυνο καθηγητή μου, κύριο Μπαλατσό Νικόλαο. Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον καθηγητή μου, κύριο Σταθόπουλο Κωνσταντίνο για την παραχώρηση του εργαστηρίου του και τις εποικοδομητικές συμβουλές και παρεμβάσεις του στην πορεία της πειραματικής διαδικασίας καθώς και τον καθηγητή κύριο Κομιώτη Δημήτριο και τους διδακτορικούς φοιτητές του για την παρασκευή και παραχώρηση των μορίων με τα οποία εργαστήκαμε. Τέλος, χρωστάω πολλά ευχαριστώ στον απόφοιτο Μαραγκοζίδη Παναγιώτη, τον φοιτητή Κυρίτση Αθανάσιο, τη Δρ.Γιαννούλη Σταματίνα και τις προπτυχιακές συμφοιτητριάς μου, με τους οποίους συνεργαστήκαμε ευχάριστα στο εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας, για την συμπαράστασή τους, πάνω από όλα την πολύτιμη βοήθεια και τις χρήσιμες υποδείξεις τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
Το mRNA παράγεται με μεταγραφή και μεταφράζεται.....	5
Το ευκαρυωτικό mRNA τροποποιείται κατά τη διάρκεια ή μετά το πέρας της μεταγραφής του.....	5
Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει καλύπτρα.....	7
Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται.....	10
Η αποικοδόμηση του mRNA είναι μια πολύπλοκη διαδικασία.....	11
Ένζυμα και έλεγχος αποαδενυλίωσης.....	14
Η πολυ(Α)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A)-specific ribonuclease,PARN].....	16
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	19
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
Υλικά.....	20
Διαλύματα.....	22
Μέθοδοι.....	24
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	28
Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης.....	28
Έκφραση και απομόνωση PARN 74.....	29
Πρότυπη καμπύλη πολυ(Α).....	31
Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης.....	32
Συνθετικά ανάλογα νουκλεοσιδίων και υποστρωμάτων.....	34
Τα συνθετικά νουκλεοσίδια αναστέλλουν την PARN ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής.....	35
Το ανάλογο υποστρώματος της PARN, DNP-πολυ(Α), αναστέλλει την PARN ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής.....	36
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	39

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ρύθμιση της αποικοδόμησης των mRNAs είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο. Το πρώτο βήμα της αποικοδόμησης στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι η βράχυνση της πολυ(A) ουράς. Ένα ένζυμο-κλειδί της διεργασίας είναι η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN. Πολλές στρατηγικές έχουν προταθεί για τη ρύθμιση του ενζύμου, όμως ελάχιστα είναι γνωστά για την επίδραση μικρών μορίων στη δραστηριότητά του. Πρόσφατα δείχθηκε από το εργαστήριό μας πως τα νουκλεοτίδια πουρινών αναστέλλουν το ένζυμο. Επίσης δείχθηκε πως συνθετικά ανάλογα νουκλεοσιδίων με αντικαρκινική και αντι-ϊική δράση που φέρουν τροποποιήσεις τόσο στο σάκχαρο (φθορο-γλυκοκυρανοζυλικός δακτύλιος), όσο και τη βάση (αδενίνη ή κυτοσίνη που φέρουν βενζόυλ-ομάδα) είναι συναγωνιστικοί αναστολείς της PARN. Στην παρούσα εργασία, βασιζόμενοι στις προηγούμενες μελέτες μας, χρησιμοποιήσαμε νέα ανάλογα νουκλεοσιδίων που φέρουν το ίδιο τροποποιημένο σάκχαρο και ως βάση ουρακίλη ή 5-φθοροουρακίλη, με σκοπό να βελτιώσουμε τα χαρακτηριστικά της αναστολής των νουκλεοσιδίων. Επίσης χρησιμοποιήσαμε ένα τροποποιημένο υπόστρωμα [πολυ-2'-O-(2,4-δινιτροφαίνυλ) πολυ(A), DNP-πολυ(A)] που έχει δειχθεί να αναστέλλουν ικές αντίστροφες μεταγραφάσες καθώς και αρκετές ριβονουκλεάσες. Τα αποτελέσματά μας από την κινητική ανάλυση, τον προσδιορισμό των σταθερών αναστολής (K_i) και τη σύγκριση με προηγούμενα δεδομένα μας, δείχνουν πως τόσο τα νέα νουκλεοσιδία, όσο και το τροποποιημένο υπόστρωμα αναστέλλουν αποτελεσματικότερα την PARN από αυτά προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου. Επίσης ενισχύει προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου που δείχνουν πως η PARN θα μπορούσε να αποτελέσει ένα νέο μοριακό στόχο για την ανάπτυξη ενώσεων με θεραπευτικές ιδιότητες μέσω της ρύθμισης της αποικοδόμησης των πολυ(A) ουρών και κατ' επέκταση της σταθερότητας των mRNAs.

ABSTRACT

The regulation mRNA degradation is one of the most critical cellular processes. The first step in mRNA degradation usually is the shortening of poly(A) tail. A key enzyme in this process is poly(A)-specific ribonuclease, PARN. Many strategies have been proposed for the regulation of the enzyme, but very few is known for the effect of small molecules in PARN activity. It was recently shown in our laboratory that purine nucleotides inhibit PARN. It was also shown that synthetic nucleosides with modifications both in the sugar moiety (fluoro-glucopyranosyl ring) and the base (purine or pyrimidine modified on the amine with a benzoyl-group) behave as competitive inhibitors of PARN. Moreover, these nucleosides exhibit anticancer and antiviral activity in cell cultures. Our aim is to develop new compounds in order to inhibit the enzyme more effectively. In the present work, we extended our previous studies and we tested new nucleosides with the same modified sugar and a uracil or 5-fluorouracil as the base moiety. We also used a modified substrate [poly-2'-O-(2,4-dinitrophenyl) poly (A), DNP-poly(A)] which is a potent inhibitor of reverse transcriptases and of several ribonucleases. Detailed kinetic analysis, calculation of K_i values and comparison with our previous results showed that both the new nucleosides and the substrate analogue, can inhibit PARN more effectively than the nucleosides that we have used previously. Moreover, our results support previous work from the laboratory showing that PARN could emerge as a new molecular target for the development of compounds with therapeutic potential through the regulation of the degradation of poly(A) tails and thus, the stability of mRNAs.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ριβονουκλεϊκό οξύ, RNA, είναι ένα μόριο κεντρικής σημασίας για τη γονιδιακή έκφραση. Αρχικά χαρακτηρίστηκε ως ενδιάμεσο προϊόν της πρωτεϊνوسύνθεσης, όμως έχουν ανακαλυφθεί πολλά είδη RNA που έχουν δομικούς ή λειτουργικούς ρόλους σε άλλα στάδια της γονιδιακής έκφρασης. Η εμπλοκή του RNA σε πολλές λειτουργίες που αφορούν την γονιδιακή έκφραση υποστηρίζει την γενική άποψη ότι ολόκληρη η διαδικασία μπορεί να έχει εξελιχθεί σε έναν «κόσμο RNA», στον οποίο αρχικά το RNA ήταν το ενεργό συστατικό του μηχανισμού διατήρησης και έκφρασης της γενετικής πληροφορίας. Αργότερα οι πρωτεΐνες 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 τάξεις RNA είναι το αγγελιαφόρο (*mRNA*), το μεταφορικό (*tRNA*) και το ριβοσωμικό (*rRNA*) [1].

Το mRNA παράγεται με μεταγραφή και μεταφράζεται.

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

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

Η παραγωγή του ευκαρυωτικού mRNA περιλαμβάνει επιπρόσθετα στάδια μετά τη μεταγραφή. Η μεταγραφή γίνεται με το συνήθη τρόπο, ξεκινώντας με τη δημιουργία ενός

μεταγράφου με 5' τριφωσφορικό άκρο. Ωστόσο, το 3' άκρο δημιουργείται αποκόπτοντας ένα τμήμα του μεταγράφου και όχι τερματίζοντας τη μεταγραφή σε μια προκαθορισμένη θέση. Όσα RNA προέρχονται από γονίδια που περιέχουν ιντρόνια πρέπει να υποστούν μάτισμα, ώστε να αφαιρεθούν τα ιντρόνια και να παραχθεί ένα μικρότερο mRNA που να περιέχει μια άθικτη κωδική αλληλουχία.

Και οι δύο άκρες του μεταγράφου τροποποιούνται με προσθήκη επιπλέον νουκλεοτιδίων εμπλέκοντας πρόσθετα ενζυμικά συστήματα (εικόνα 1). Το 5' άκρο του RNA τροποποιείται αμέσως μετά την εμφάνιση του, εξαιτίας της προσθήκης μιας «καλύπτρας». Η τριφωσφορική ομάδα του αρχικού μεταγράφου αντικαθίσταται από ένα νουκλεοτίδιο που προστίθεται σε αντίθετο προσανατολισμό (3'→ 5'), «σφραγίζοντας» με αυτόν τον τρόπο το άκρο. Το 3' άκρο τροποποιείται εξαιτίας της προσθήκης μιας σειράς νουκλεοτιδίων αδενυλικού οξέος [πολυαδενυλικό οξύ ή πολυ(A), poly(A)] αμέσως μετά την αποκοπή του. Μόνο μετά την ολοκλήρωση όλων των τροποποιήσεων και της επεξεργασίας μπορεί το mRNA να εξαχθεί από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Κατά μέσο όρο, το mRNA καθυστερεί ~20 λεπτά για να εξέλθει από τον πυρήνα. Μόλις το mRNA εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα και μεταφράζεται.



Εικόνα 1 Το ευκαρυωτικό mRNA τροποποιείται με την προσθήκη μιας καλύπτρας στο 5' άκρο και μιας ουράς πολυ(A) στο 3' άκρο [1].

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 (~40 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο). Πολλά ευκαρυωτικά γονίδια είναι μεγάλα: ένα γονίδιο 10.000 bp χρειάζεται ~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.

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

Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει καλύπτρα.

Η 5' καλύπτρα σχηματίζεται με την προσθήκη ενός G στην ακραία βάση του μεταγράφου μέσω ενός 5'-5' δεσμού. 1-3 μεθυλομάδες προστίθενται στη βάση ή στη ριβόζη της καινούριας ακραίας γουανωσίνης (εικόνα 2).

Η μεταγραφή αρχίζει με ένα τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο (συνήθως μια πουρίνη, A ή G). Το πρώτο νουκλεοτίδιο διατηρεί την 5' τριφωσφορική ομάδα του και δημιουργεί το συνήθη φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ της 3' θέσης του και της 5' θέσης του επόμενου νουκλεοτιδίου. Η αρχική αλληλουχία του μεταγράφου μπορεί να αναπαρασταθεί ως:

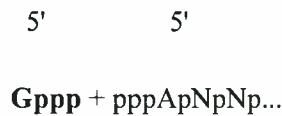


Ωστόσο, αν το ώριμο mRNA επεξεργαστεί *in vitro* με ένζυμα τα οποία θα έπρεπε να το αποικοδομήσουν σε μεμονωμένα νουκλεοτίδια το 5' άκρο δεν παράγει το αναμενόμενο τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο. Αντίθετα, περιλαμβάνει δύο νουκλεοτίδια συνδεδεμένα με 5'-5' τριφωσφορικό δεσμό, ενώ φέρει και μεθυλομάδες. Η ακραία βάση είναι πάντα μια γουανίνη, η οποία προστίθεται στο αρχικό μόριο RNA μετά τη μεταγραφή.

Η προσθήκη της G στο 5' άκρο καταλύεται από ένα πυρηνικό ένζυμο, τη γουανυλλο-τρανσφεοάση. Η αντίδραση αυτή συμβαίνει τόσο σύντομα μετά την έναρξη της μεταγραφής, που δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθούν παρά μόνο ίχνη του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου στο πυρηνικό RNA. Η συνολική αντίδραση μπορεί να αναπαρασταθεί

ως μία συμπύκνωση μεταξύ του GTP και του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου του RNA.

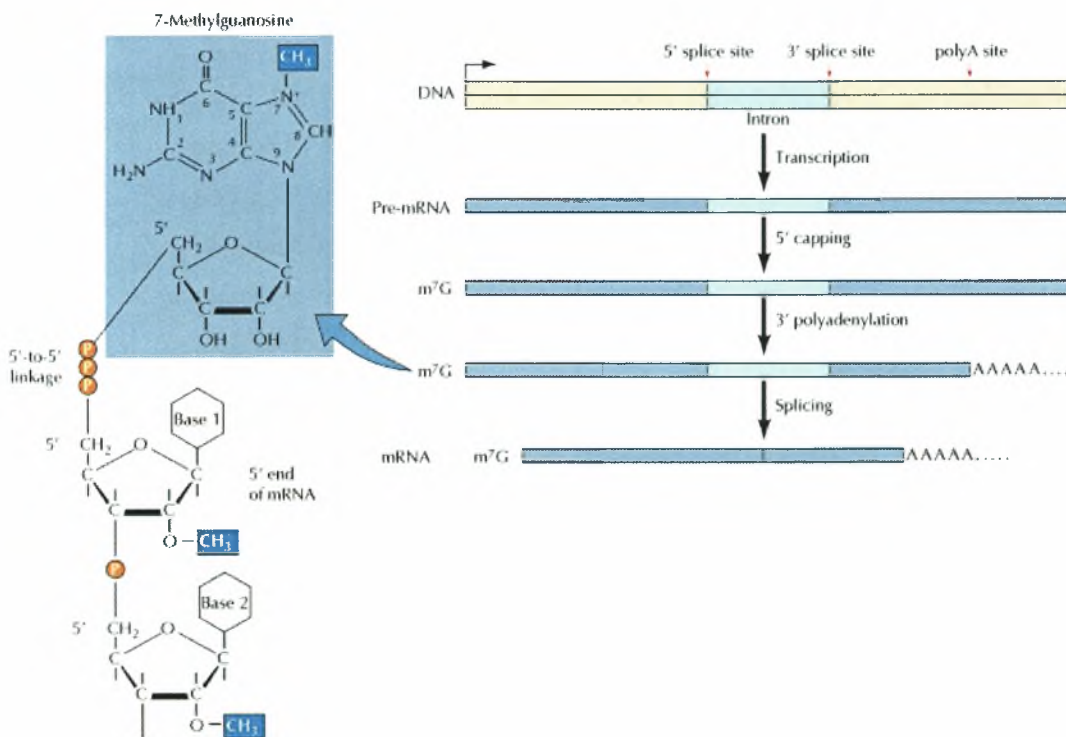
Συνεπώς:



↓



Το νέο κατάλοιπο G, που προστίθεται στο άκρο του RNA, έχει το αντίστροφο προσανατολισμό από όλα τα άλλα νουκλεοτίδια.



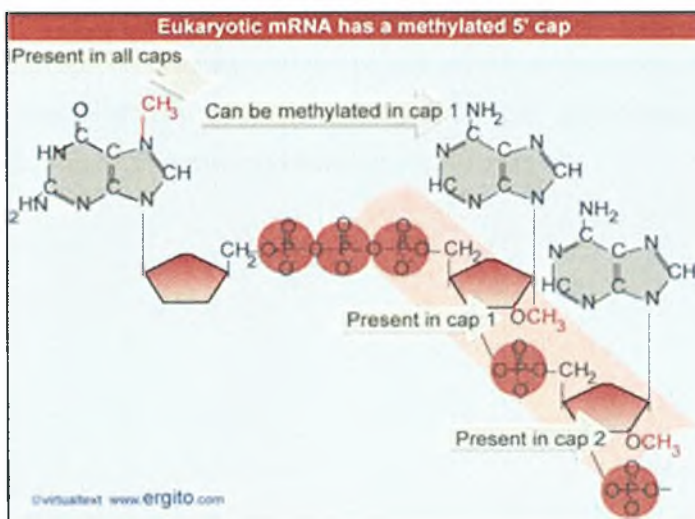
Εικόνα 2 Η πορεία του ευκαρυωτικού αγγελιοφόρου RNA περιλαμβάνει μετασχηματισμό του 5' άκρου μέσω κάλυψης με 7-μεθυλογουανοσίνη (m^7G), μετασχηματισμό του 3' άκρου μέσω πολυαδενυλίωσης και μετακίνηση των ιντρονίων μέσω ματίσματος. Το 5' κάλυμμα σχηματίζεται με την προσθήκη ενός GTP σε αντίστροφη φορά από το 5' άκρο του mRNA, σχηματίζοντας ένα 5'-5' δεσμό. Το προστιθέμενο G τότε μεθυλιώνεται στην N-7 θέση, και μεθυλικές ομάδες προστίθενται στις ριβόζες του πρώτου ή και του δεύτερου νουκλεοτιδίου στο mRNA [40].

Αυτή η δομή ονομάζεται **καλύπτρα** (cap) και αποτελεί υπόστρωμα για αρκετές αντιδράσεις μεθυλίωσης. Στην **εικόνα 3** παρουσιάζεται η πλήρης δομή μιας καλύπτρας μετά την προσθήκη όλων των δυνατών μεθυλομάδων. Οι τύποι των καλύπτρων διακρίνονται από το πλήθος των μεθυλιώσεων που έχουν συμβεί.

Η πρώτη μεθυλίωση γίνεται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και αποτελείται από την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στη θέση 7 της ακραίας γουανίνης. Μια καλύπτρα που έχει μόνο αυτή τη μεθυλομάδα ονομάζεται **καλύπτρα 0** (cap 0). Στους μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η αντίδραση σταματά σε αυτό το σημείο. Το ένζυμο που ευθύνεται γι' αυτή την τροποποίηση λέγεται 7-μεθυλο-τρανσφεράση της γουανίνης.

Το επόμενο βήμα είναι η προσθήκη μιας ακόμη μεθυλομάδας στη 2'-Ο θέση της πρότελευταίας βάσης (η οποία ήταν η πρώτη βάση του μεταγράφου πριν γίνουν οι τροποποιήσεις). Μια καλύπτρα με δύο μεθυλομάδες ονομάζεται **καλύπτρα 1** (cap1). Είναι ο κύριος τύπος καλύπτρας σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, εκτός από τους μονοκύτταρους οργανισμούς.

Σε ορισμένα είδη προστίθεται μια μεθυλομάδα στην τρίτη βάση του καλυμμένου mRNA. Το υπόστρωμα γι' αυτήν την αντίδραση είναι το mRNA με καλύπτρα 1, που περιέχει ήδη δύο μεθυλομάδες. Η τροποποίηση της τρίτης βάσης είναι πάντα μια 2'-Ο μεθυλίωση της ριβόζης. Έτσι δημιουργείται η **καλύπτρα 2** (cap2). Αυτή η καλύπτρα συνήθως αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 10-15% του συνολικού πληθυσμού του mRNA που είναι καλυμμένο.



Εικόνα 3 Η καλύπτρα προστατεύει το 5' άκρο του mRNA. Μπορεί να μεθυλωθεί σε αρκετές θέσεις [1].

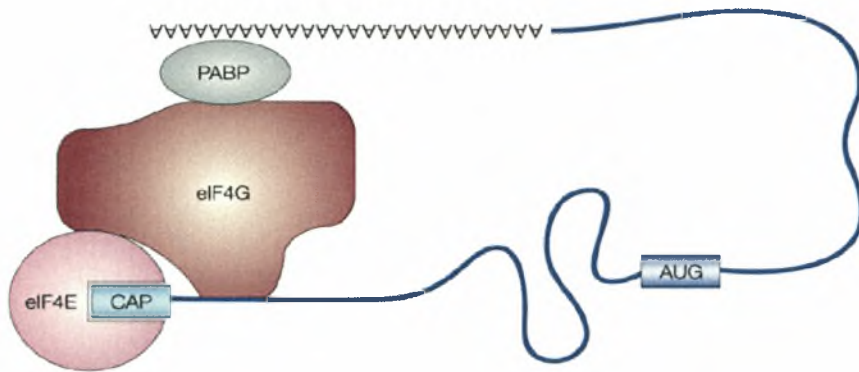
Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται

Η 3' τερματική αλληλουχία από κατάλοιπα Α συχνά περιγράφεται ως ουρά πολυ(Α), ενώ το mRNA που έχει αυτό το χαρακτηριστικό δηλώνεται ως **πολυ(Α)⁺** [poly(A)⁺].

Η αλληλουχία πολυ(A) δεν κωδικοποιείται στο DNA , αλλά προστίθεται στο RNA, μέσα στον πυρήνα, μετά τη μεταγραφή. Η προσθήκη της πολυ(A) καταλύεται από το ένζυμο πολυ(A) πολυμεράση, η οποία προσθέτει ~200 κατάλοιπα A στο ελεύθερο 3'-OH άκρο του mRNA. Η αλληλουχία πολυ(A), τόσο του πυρηνικού RNA όσο και του mRNA, είναι συνδεδεμένη με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται πολυ(A)-συνδεόμενη πρωτεΐνη (**PABP**, Poly(A) binding protein). Συγγενικές μορφές αυτής της πρωτεΐνης απαντώνται σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ένα μονομερές PABP των 70 kDa συνδέεται σε κάθε 10-20 βάσεις της ουράς πολυ(A). Έτσι, ένα κοινό χαρακτηριστικό σε πολλούς ή στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι ότι το 3' άκρο του mRNA αποτελείται από μία αλληλουχία πολυ(A), η οποία είναι προσδεμένη σε μία μεγάλη πρωτεϊνική μάζα. Η προσθήκη της πολυ(A) πραγματοποιείται ως μέρος μιας αντίδρασης στην οποία το 3' άκρο του mRNA δημιουργείται και τροποποιείται από ένα σύμπλοκο ενζύμων.

Η πρόσδεση της PABP στον παράγοντα έναρξης eIF4G δημιουργεί έναν κλειστό βρόχο, στον οποίο τα 5' και 3' άκρα του mRNA συγκρατούνται στο ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο (**εικόνα 4**). Ο σχηματισμός αυτού του συμπλόκου μπορεί να ευθύνεται για κάποιες από τις επιδράσεις της πολυ(A) στις ιδιότητες του mRNA. Η πολυ(A) συνήθως σταθεροποιεί το mRNA. Η ικανότητα της πολυ(A) να προστατεύει το mRNA από την αποικοδόμηση απαιτεί τη σύνδεση της με την PABP.

Η αφαίρεση της πολυ(A) αναστέλλει την έναρξη της μετάφρασης *in vitro* και η μείωση της PABP έχει το ίδιο αποτέλεσμα στο ζυμομύκητα *in vivo*. Αυτές οι επιδράσεις μπορεί να εξαρτώνται από την πρόσδεση της PABP στο σύμπλοκο έναρξης, στο 5' άκρο του mRNA. Σε μερικές περιπτώσεις, τα mRNA αποθηκεύονται σε μη πολυαδενυλωμένη 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 μετάφρασης τους.



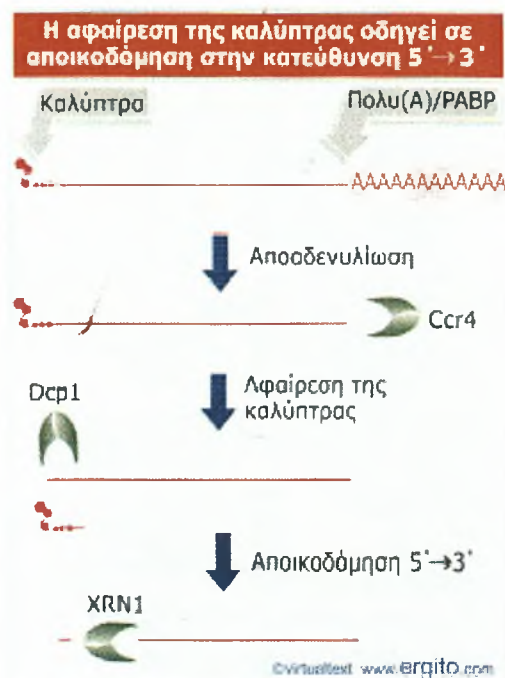
Εικόνα 4 Η πρόσδεση της PABP στον παράγοντα έναρξης eIF4G δημιουργεί έναν κλειστό βρόχο

Η αποικοδόμηση του mRNA είναι μια πολύπλοκη διαδικασία

Τα περισσότερα από όσα γνωρίζουμε αφορούν την αποικοδόμηση του ζυμομύκητα. Υπάρχουν δύο μονοπάτια. Και τα δύο ξεκινούν με την αφαίρεση της πολύ(A) ουράς. Αυτή καταλύεται από μια ειδική αποαδενυλάση, η οποία πιθανόν λειτουργεί ως μέρος ενός μεγάλου πρωτεϊνικού συμπλόκου. Η καταλυτική υπομονάδα είναι η εξωνουκλεάση 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.

Το κύριο μονοπάτι της αποικοδόμησης παρουσιάζεται συνοπτικά στην εικόνα 5. Η αποαδενυλίωση στο 3' άκρο πυροδοτεί την αφαίρεση της καλύπτρας στο 5' άκρο. Η βάση αυτής της σχέσης είναι ότι η παρουσία της PABP [πολύ(A) συνδεόμενη πρωτεΐνη] στην ουρά πολύ(A) εμποδίζει το ένζυμο που αφαιρεί την καλύπτρα να προσδεθεί στο 5' άκρο.

Κάθε άκρο του mRNA επηρεάζει γεγονότα που συμβαίνουν στο άλλο άκρο. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι τα δύο άκρα του mRNA συγκρατούνται μεταξύ τους από τους παράγοντες που ελέγχουν την πρωτεϊνοσύνθεση. Η επίδραση που έχει η PABP στην αφαίρεση της καλύπτρας επιτρέπει στο 3' άκρο να επηρεάζει τη σταθεροποίηση του 5' άκρου. Επίσης υπάρχει μια σχέση ανάμεσα στη δομή του 5' άκρου και στην αποικοδόμηση στο 3' άκρο. Η αποαδενυλάση προσδένεται άμεσα στην 5' καλύπτρα. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη προκειμένου να προσβάλλει εξωνουκλεολυτικά την αλληλουχία πολύ(A).



Εικόνα 5 Η αποαδενυλίωση επιτρέπει την αφαίρεση της καλύπτρας, γεγονός που οδηγεί στην εξωνουκλεολυτική διάσπαση του 5' άκρου [1].

Ποια η σημασία των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα στα δύο άκρα του mRNA; Ίσως να διασφαλίζει ότι το mRNA δεν θα υφίσταται σε μια μορφή που θα φέρει ειδική δομή στο ένα μόνο άκρο, αφού είναι δυνατόν μια τέτοια μορφή του mRNA να μπορεί να ανταγωνιστεί τα ενεργά mRNA για τη σύνδεση των πρωτεϊνών που δεσμεύονται στα άκρα.

Ακολουθώντας την αποαδενυλίωση ένα ειδικό ένζυμο που αποτελείται από δύο υπομονάδες (Dcp1p και Dcp2p) αφαιρεί την 5' δομή καλύπτρας. Η αφαίρεση της καλύπτρας πυροδοτεί το 5'→3' μονοπάτι αποικοδόμησης, κατά το οποίο η 5'→3' εξωνουκλεάση XRN1 αποικοδομεί το mRNA από το 5' άκρο με μεγάλη ταχύτητα [2-5].

Στο δεύτερο μονοπάτι, τα αποαδενυλιωμένα mRNA του ζυμομύκητα μπορούν να αποικοδομηθούν από την 3'→5' ενεργότητα εξωνουκλεάσης του εξωσώματος, ενός συμπλόκου από >9 εξωνουκλεάσες. Στην περίπτωση αυτή το προκύπτων ολιγονουκλεοτίδιο-καλύπτρα υδρολύεται από το DcpS [6]. Ωστόσο η αποικοδόμηση ορισμένων mRNA μπορεί να πυροδοτηθεί από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση είτε από ειδικές ενδονουκλεάσες είτε σε απόκριση από miRNA ή siRNA [7]. Επίσης τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν ειδικά μονοπάτια αποικοδόμησης που αναγνωρίζουν και αποικοδομούν ταχύτατα ανώμαλα mRNA χρησιμοποιώντας τα ίδια ένζυμα που αποικοδομούν φυσιολογικά mRNA

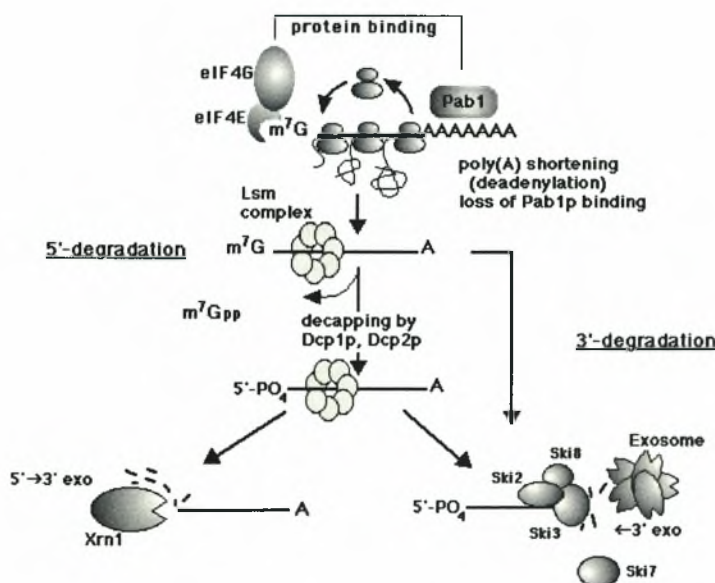
Το εξώσωμα όμως εμπλέκεται και στην επεξεργασία των πρόδρομων μορίων των rRNA. Η συσσωμάτωση των εξωνουκλεασών στο σύμπλοκο του εξωσώματος μπορεί να καθιστά εφικτό το

συντονισμένο έλεγχο των 3'→5' εξωνουκλεολυτικών δραστηριοτήτων. Το εξώσωμα μπορεί επίσης να αποικοδομήσει τμήματα του mRNA που απελευθερώθηκαν με ενδονουκλεολυτική αποικοδόμηση. Στην **εικόνα 6** φαίνεται ότι το 3'→5' μονοπάτι αποικοδόμησης μπορεί στην πραγματικότητα να περιλαμβάνει συνδυασμούς ενδονουκλεολυτικών και εξωνουκλεολυτικών δράσεων. Το εξώσωμα απαντάται και μέσα στον πυρήνα, όπου αποικοδομεί πρόδρομα mRNA που δεν έχουν υποστεί μάτισμα.



Εικόνα 6 Η αποαδενυλίωση μπορεί να προκαλέσει άμεσα την ενδονουκλεολυτική διάσπαση και την εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση από το 3' άκρο [1].

Μεταλλαγμένα στελέχη ζυμομύκητα που στερούνται του ενός ή του άλλου εκ των δύο εξωνουκλεολυτικών μονοπατιών αποικοδομούν πιο αργά τα mRNA, όμως η ταυτόχρονη απώλεια και των δύο μονοπατιών είναι θανατηφόρα.



Εικόνα 7 Τα δύο μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA εξαρτώνται από αποαδενυλίωση [39]

Ένζυμα και έλεγχος αποαδενυλίωσης

Όπως αναφέρθηκε η αποικοδόμηση του mRNA υπο φυσιολογικές συνθήκες συνήθως ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ(A) ουράς. Έως τώρα έχουν ταυτοποιηθεί τρία διαφορετικά ένζυμα που κάνουν αυτή τη δουλειά. Στο ζυμομύκητα το επικρατέστερο σύμπλοκο αποαδενυλάσης περιλαμβάνει δύο νουκλεάσες, την Ccr4p και την Pop2p, και άλλες πρωτεΐνες Not1-Not5p, Caf4, Caf16, Caf40 και Caf30p [8-14]. Η Ccr4p διατηρημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς με πολλαπλές γονιδιακές παραλλαγές στο γονιδίωμα των θηλαστικών και φυτών. Είναι μέλος της οικογένειας των ExoIII νουκλεασών [15] 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, μετάλλαξης 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 αποαδενυλίωση [16-18].

Η άλλη πρωτεΐνη στο σύμπλοκο με δραστηριότητα αποαδενυλάσης 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 με δράση 3'→5' εξωδεοξυριβονουκλεάσης της DNA πολυμεράσης. Έχουν τις ίδιες αναδιπλώσεις, περιέχουν δύο θέσεις σύνδεσης για δισθενή ιόντα και έχουν τον ίδιο καταλυτικό μηχανισμό με τον οποίο υδρολύουν τον φωσφοδιεστερικό δεσμό [19-22].

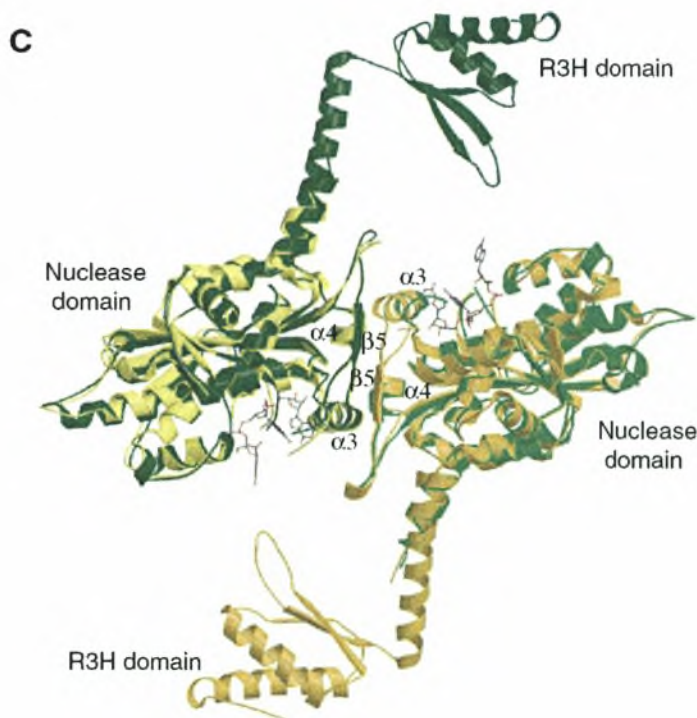
Η Pop2 φαίνεται να έχει δύο λειτουργικούς ρόλους, πρώτον η δράση νουκλεάσης και η εναλλαγή των καταλοίπων του ενεργού κέντρου δείχνει ότι κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορεί να είναι υπεύθυνη για τη αποαδενυλίωση του mRNA. Έτσι το σύμπλοκο Ccr4-Pop2-Not μπορεί να έχει πολλαπλές νουκλεάσες που ωστόσο ρυθμίζονται διαφορετικά. Ένας δεύτερος ρόλος της Pop2 είναι να διεγείρει την δράση της Ccr4 αποαδενυλάσης είτε σταθεροποιώντας το σύμπλοκο αποαδενυλάσης είτε προάγοντας πιθανόν 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. Ένα άλλο ενζυμικό σύμπλοκο που καταλύει την αποαδενυλίωση του mRNA είναι ένα διατηρημένο σύμπλοκο που αποτελείται από τις πρωτεΐνες Pan2p και Pan3p. Ο ρόλος της PAN στην αποαδενυλίωση έχει δείχθει με Ccr4Δ στελέχη ζύμης όπου απουσιάζει ο κύριος τρόπος αποαδενυλίωσης και 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 εξαρτάται από το συγκεκριμένο mRNA κάθε φορά [23]. Η Pan2p και Pop2p φαίνεται να παίζουν ρόλο στην ειδική ρύθμιση του mRNA της RAD5 σε απόκριση σε αντιγραφικό στρες [24].

Αναλύσεις αλληλουχιών δείχνουν ότι η καρβοξυτελική περιοχή της Pan2p, όπως και της Pop2p ανήκει στην οικογένεια των Rnase D, και περιλαμβάνουν τα καταλυτικά κατάλοιπα και μηχανισμό υδρόλυσης που εξαρτάται από δύο δισθενή ιόντα. Ο ρόλος της Pan3p είναι πιθανόν 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 παλινδρομίσιμη 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 [25].

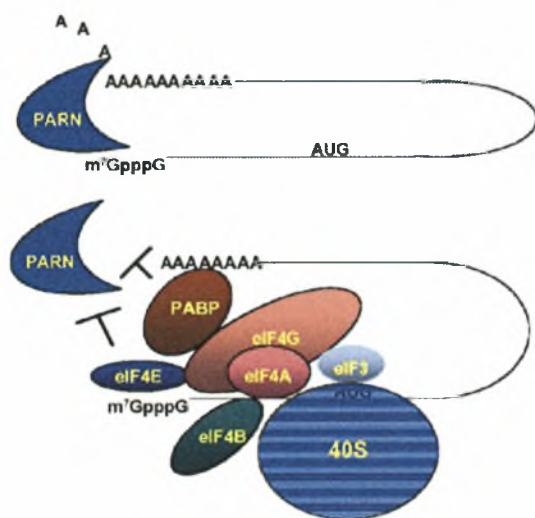
Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A)-specific ribonuclease, PARN]

Το τελικό ένζυμο γνωστό για την αποαδενυλίωση του mRNA είναι η PARN με την οποία και θα ασχοληθούμε στην παρούσα διπλωματική εργασία (poly(A) specific ribonuclease) που αρχικά περιγράφηκε και απομονώθηκε από κύτταρα θηλαστικών [26-27]. Αναλύσεις αλληλουχιών δείχνουν ότι η PARN όπως και η Pan2p και Pop2p ανήκει στην οικογένεια των RnaseD νουκλεασών και μεταλλάξεις στα προβλεπόμενα καταλυτικά κατάλοιπα αναστέλλουν τη δράση της [28-29]. Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η PARN εξαρτάται από δισθενή μεταλλικά ιόντα ενώ μεγαλύτερη δραστηριότητα έχει παρουσία Mg^{+2} τα οποία πιθανόν βρίσκονται στο μοτίβο DEDD του ενεργού κέντρου παίζοντας καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό της κατάλυσης. Η PARN περιέχει επίσης μια σπάνια διατηρημένη RH3 περιοχή που φαίνεται να έχει δομή όμοια με αυτήν της IF3 καρβοξυτελικής περιοχής [30]. Η RH3 περιοχή προσδένεται σε μονόκλιωνα νουκλεϊκά οξέα και πιθανόν επιστρατεύει την PARN στο πολυαδενυλιωμένο mRNA. Το ελάχιστο μήκος υποστρώματος είναι τα δι ή τρι-αδενυλονουκλεοτίδια ανάλογα με το παρόν στο ενεργό κέντρο μεταλλικό ιόν (εικόνα 8). Η PARN είναι διατηρημένη σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς αλλά απουσιάζει από το *S.cerevisiae* και την *D. melanogaster*.



Εικόνα 8 Υποθετικό μοντέλο κρυσταλλικής δομής απουσία μεταλλικών ιόντων. (προκύπτει από αλληλοεπικάλυψη κρυσταλλικών δομών διαφορετικών περιοχών της πρωτεΐνης). Στη κρυσταλλική αυτή δομή φαίνονται τα τρινουκλεοτίδια αδενίνης στο ενεργό κέντρο [30].

Διάφορες παρατηρήσεις υποστηρίζουν ότι οι διαφορετικές αποαδενυλάσες προτιμούν και διαφορετικά mRNA υποστρώματα. Για παράδειγμα η δράση της Ccr4p δεν επηρεάζεται από την παρουσία του cap στο μόριο του mRNA, αλλά αναστέλλεται από την poly(a) binding protein (Pab1p), σε αντίθεση με την PARN η οποία διεγείρεται από την παρουσία του cap πάνω στο υπόστρωμα, όμως αναστέλλεται επίσης από την poly(a) binding protein (Pab1p) σε φυσιολογικές συνθήκες αλατότητας. Τέλος η PAN διεγείρεται από την παρουσία της poly(a) binding protein (Pab1p) πάνω στο πολυ(A). Έτσι ένα ιδανικό υπόστρωμα για την PAN είναι ένα μόριο mRNA με την Pab1p να καλύπτει την πολυ(A) ουρά, ένα ιδανικό υπόστρωμα για την PARN είναι ένα mRNA με εκτεθειμένο το cap και την πολυ(A) ουρά (εικόνα 9). Συμπερασματικά, κάθε μορφή του mRNA το καθιστά διαθέσιμο στην αντίστοιχη αποαδενυλάση, δηλαδή η αποαδενυλίωση μπορεί να ελεγχθεί από διαφορετικές συνθέσεις του mRNA με πρωτεΐνες. Επίσης μπορεί να σημαίνει ότι κάθε αποαδενυλάση μπορεί να στοχεύει σε διαφορετικές δεξαμενές mRNA .



Εικόνα 9 Ρύθμιση της δράσης της PARN

Η PARN φαίνεται επίσης να είναι απαραίτητη για ταχεία αποαδενυλίωση επαγόμενη από την πλούσια σε AU αλληλουχία, την ARE binding protein τριστρεταπρολίνη [29,31]. 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 [32].

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 την μετακίνηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα αφού περιέχει την NLS (nuclear localization signal) αλληλουχία.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ρύθμιση της αποικοδόμησης των mRNAs είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο γιατί καθορίζει το χρόνο ζωής. Το πρώτο βήμα της αποικοδόμησης στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι η βράχυνση της πολυ(A) ουράς από ένζυμα γνωστά ως αποαδενυλάσες. Ένα ένζυμο-κλειδί της διεργασίας είναι η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN, που είναι το καλύτερα μελετημένο μέλος της οικογένειας των αποαδενυλασών.

Με βάση προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, όπου ανάλογα νουκλεοσιδίων με αντικαρκινική και αντι-ιϊκή δράση αναστέλλουν συναγωνιστικά το ένζυμο, η εργασία αποσκοπεί στην ανεύρεση νέων συνθετικών αναλόγων νουκλεοσιδίων πυριμιδινών και αναλόγων υποστρωμάτων με σκοπό τα βελτιωμένα χαρακτηριστικά αναστολής του ενζύμου. Οι ενώσεις αυτές αναμένεται να λειτουργήσουν ως πλατφόρμα για σύνθεση αποτελεσματικότερων ενώσεων ρύθμισης της δράσης της PARN και των αποαδενυλασών γενικότερα, με άμεσες επιπτώσεις στην επιβίωση των κυττάρων.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά

Χημικά

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

TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine)	Research Organics
Tris base	Merck
Αγαρόζη (<i>Agarose</i>)	SeaKem
Αιθανόλη	Panreac
Ακρυλαμίδη (<i>Acrylamide</i>)	SIGMA
Β-μερκαπτοαιθανόλη	Riedel de Haen
Βρωμιούχο αιθίδιο	Merck
Γλυκερόλη (<i>glucerosol</i>)	Panreac
Δις-ακρυλαμίδιο (<i>Bis-acrylamide</i>)	SIGMA
Ισοπροπανόλη (<i>Isopropanole</i>)	Scharlau
Οξικό οξύ	Merck
Χλωραμφαινικόλη	SIGMA

Βακτηριακά στελέχη

BL21 (DE3) pUBS E.coli B, F⁻ dcm ompT hsdS(r_B-m_B⁺) gal λ(DE3)

Θρεπτικά υλικά

LB Broth Scharlau

Πρωτεΐνες και ένζυμα

His6-hPARN 74 kDa Από E.coli BL21

BSA Fraction V Merck

Rnasin Biolabs

Νουκλεοτίδια και συνθετικά νουκλεοσίδια

Πολυαδενυλικό οξύ SIGMA

Πολυ-2'-O-(2,4-δινιτροφαίνυλ) πολυ(A), DNP-πολυ(A)

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

Τα συνθετικά νουκλεοσίδια U1 και U2 παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του δρ. Δημητρίου Κομιώτη.

Πλασμίδια

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

Υλικά χρωματογραφίας

Ni²⁺-NTA Agarose QIAGEN

Υλικά διαπίδυσης

Μεμβράνη διαπίδυσης SIGMA

Διαλύματα

Θρεπτικά υλικά

- Υγρό θρεπτικό μέσο (LB Broth)

Διαλύματα για απομόνωση πρωτεΐνης

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

Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα 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

- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl 1,5M, pH 8,8
- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl 0,5M, pH 6,8

- SDS 10% v/w
- Ακρυλαμίδιο 30% v/w (ακρυλαμίδιο/δις-ακρυλαμίδιο : 29/1) σε ddH₂O

Διαλύματα για το πήκτωμα ακρυλαμιδίου

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

Διαλύματα για χρώση της πηκτής.

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

Διαλύματα για την μέτρηση της ενεργότητας της PARN

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

Μέθοδοι

Έκφραση και απομόνωση ανασυνδασμένης PARN74 kDa

Μετασχηματισμός BL21 με pET33 PARN 74

Κύτταρα *Escherichia coli* BL21(DE3) μετασχηματίζονται με πλασμίδιο pET33PARN74 που εκφράζει την PARN74 η οποία φέρει ιστιδίνες στο αμινοτελικό της άκρο. Μία αποικία χρησιμοποιείται για inoculation 5-100ml LB παρουσία 50 g/ml καναμυκίνης και επωάζεται όλη τη νύχτα στους 37°C. Τα 5ml καλλιέργειας ενοφθαλμίζονται

σε 400ml φρέσκο θρεπτικό μέσο που περιέχει χλωραμφενικόλη και καναμυκίνη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm (OD600) και επώαση των καλλιιεργειών στους 37°C υπό ανάδευση μέχρι το OD600 να φτάσει περίπου το 0,6 που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Οι αποικίες επωάζονται με IPTG (Isopropyl Thio Galactosyl,) 0,25-1mM τελικής συγκέντρωσης το οποίο επάγει την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Οι καλλιέργειες επωάζονται υπό ανάδευση για 4 ώρες στους 37°C. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4.000rpm για 20min στους 4°C, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αποθηκεύεται στους -80°C.

Απομόνωση της PARN

Ομογενοποίηση των κυττάρων

Τα παγωμένα ιζήματα διαλύονται στον πάγο σε 10ml διάλυμα εκχύλισης και επωάζονται για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διαδικασία του σπασίματος των κυττάρων με υπέρηχους (sonicator) μέσα σε πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12.000rpm, για 60min στους 4°C. Διαχωρίζεται το υπερκείμενο από το ίζημα και ακολουθεί η απομόνωση της πρωτεΐνης η οποία βρίσκεται στο υπερκείμενο.

Χρωματογραφία συγγένειας

Το υπερκείμενο αναμειγνύεται με ρητίνη νικελίου αραρόζης (NTA-Ni agarose), η οποία έχει εξισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης και το μείγμα αναδεύεται αργά για 30min στους 4°C. Η πρωτεΐνη δεσμεύεται στην ρητίνη μέσω σύνδεσης των ιστιδινών που έχει στο αμινοτελικό άκρο με τα άτομα νικελίου. Το διάλυμα εκχυλίζεται προσεκτικά μέσα από στήλη που κατακρατεί την ρητίνη. Η στήλη ξεπλένεται με 10ml ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (wash buffer). Η έκλουση της πρωτεΐνης γίνεται με 6ml ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (elution buffer) το οποίο περιέχει ιμιδαζόλιο σε συγκέντρωση 150mM. Ο ρόλος του ιμιδαζολίου είναι να δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα ιόντα νικελίου και να ανταγωνίζεται στη δέσμευση τις πρωτεΐνες συνδεδεμένες με ιστιδίνη (His-tagged). Συλλέγουμε πέντε κλάσματα από τη στήλη (E1-E5) από κάθε βήμα της απομόνωσης για μέτρηση της ολικής πρωτεΐνης σε καθένα και ηλεκτροφόρηση.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου

Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Σε 20μl από τα δείγματα προσθέτουμε 10μl loading buffer SDS page. Τρυπάμε με βελόνα τα καπάκια των eppendorf και τα θερμαίνουμε για 5' στους 95°C

Προετοιμασία πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Στήνουμε την συσκευή .Φτιάχνουμε Running GEL, προσθέτουμε στα 7 ml Running GEL buffer 50μl APS και 5μl TEMED, αναδεύουμε και εκχύνουμε με πιπέτα ανάμεσα στα δύο τζάμια μέχρι τα ~3/5 του ύψους. Για να οριζοντιοποιηθεί το GEL και να σπάσουν οι φουσκάλες εκχύνουμε με πιπέτα ανάμεσα στα δύο τζάμια ισοπροπανόλη.

Καθώς περιμένουμε να πήξει φτιάχνουμε Staking GEL Στα 3,5 ml Staking GEL buffer προσθέτω 25μl APS και 5μl TEMED. Εκχύνουμε με πιπέτα ανάμεσα στα δύο τζάμια μέχρι 2-3 χιλιοστά από πάνω και τοποθετούμε το χτενάκι για να σχηματιστούν τα πηγαδάκια στα οποία θα τοποθετήσουμε τα δείγματα εφόσον πήξει το gel.

Φόρτωση και ηλεκτροφόρηση δειγμάτων στο GEL

Υπολογίζουμε πόση ποσότητα από το κάθε δείγμα θα φορτώσουμε στο GEL για να έχουμε στο κάθε πηγαδάκι περίπου 20μg συνολικής πρωτεΐνης, ρυθμίζουμε το τροφοδοτικό στα 110V μέχρι η μπλε γραμμή φτάσει στο running buffer και ανεβάζουμε τα volt στα 250 μέχρι η γραμμή να φτάσει στο τέρμα του gel.

Βαφή GEL

Τοποθετούμε το gel σε ένα δίσκο και προσθέτουμε staining buffer να καλύψει το gel και αφού αναδευτεί για μία ώρα ώστε να βαφτεί καλά αλλάζουμε με destaining buffer ,το αφήνουμε να αναδεύεται 2-3 ώρες, (αλλάζουμε όταν χρειαστεί το destaining buffer με καθαρό) μέχρι να παραμείνουν μόνο η μπάντες έντονα βαμμένες.

Μέτρηση συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης πρωτεΐνης

Διαλύουμε 10mg BSA σε 100 ml νερό (0,1mg/ml) και σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα ετοιμάζουμε τα δείγματα. Αφού προστεθεί διάλυμα bradford τα δείγματα επωάζονται 5' και φωτομετρούνται στα 595nm. Από τις μετρήσεις που θα πάρουμε κατασκευάζουμε την πρότυπη καμπύλη.

Πίνακας 1:Πρότυπη καμπύλη BSA

	Τυφλό	0,1mg/ml	0,2mg/ml	0,4mg/ml	0,6mg/ml	0,8mg/ml	1mg/l
Νερό	100λ	90λ	80λ	60λ	40λ	20λ	-
BSA 1mg/ml	-	10 λ	20λ	40λ	60λ	80λ	100λ
Bradford	900λ	900λ	900λ	900λ	900λ	900λ	900λ

Μέτρηση ολικής πρωτεΐνης

Αφού έχουμε προσθέσει 90λ νερό σε eppendorf προσθέτουμε 10λ από τα δείγματα και τέλος τα 900λ Bradford. Αφού προστεθεί διάλυμα bradford τα δείγματα επωάζονται 5' και φωτομετρούνται στα 595nm. Σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη βρίσκουμε την συγκέντρωση των δειγμάτων .

Διαπίδυση

Αφού κόψουμε ένα κομμάτι μεμβράνης διαπίδυσης τη βράζουμε σε υψηλή θερμοκρασία σε 2% w/v NaHCO_3 για 25' και ξεπλένουμε με αποστειρωμένο νερό. Σφραγίζω την μεμβράνη από την μια πλευρά με έναν κόμπο και ένα πιαστράκι και με πιπέτα μεταφέρω τα κλάσματα από τη στήλη στην μεμβράνη. Σφραγίζω από την άλλη πλευρά με έναν κόμπο και ένα πιαστράκι. Στηρίζω την μεμβράνη στο πάνω μέρος ποτήρι ζέσεως των 1000ml (το οποίο περιέχει διάλυμα αντίδρασης χωρίς DTT) έτσι ώστε το τμήμα της μεμβράνης που περιέχει τα δείγματα να βρίσκεται μέσα στο διάλυμα. Τοποθετούμε το ποτήρι βρασμού με συσκευή μαγνητικής ανάδευσης με ένα μαγνήτη έτσι ώστε να αναδεύεται το διάλυμα απαλά στο ψυγείο O/N. Την επομένη βγάζουμε προσεκτικά το διάλυμα από την μεμβράνη και το μοιράζουμε σε μικροσωλήνες φυγοκέντρωσης (eppendorf tubes, 1.5 ml).

Μέτρηση της ενεργότητας της PARN με κυανό του μεθυλενίου

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στη μείωση της απορρόφησης του πολυ(A) στα 662nm όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του [33,34]. Στην αρχή αυτή και με βάση την πρότυπη καμπύλη γίνεται η μέτρηση της συγκέντρωσης σε μία αντίδραση των 100μl με προσθήκη 900μl διαλύματος κυανού του μεθυλενίου. Το τελευταίο περιέχει κυανό του μεθυλενίου το οποίο

προσδένεται στο πολυμερές πολυ(A) και EDTA σε συγκέντρωση 2mM το οποίο δεσμεύει τα ιόντα μαγνησίου. Τα ιόντα μαγνησίου είναι απαραίτητα για την λειτουργία του ενζύμου και έτσι το EDTA δεσμεύοντας τα ιόντα σταματάει την αντίδραση. Μείωση της συγκέντρωσης του πολυ(A), που οφείλεται σε ενζυμική δράση έχει ως συνέπεια την αύξηση της απορρόφησης. Έτσι η τιμή της απορρόφησης, μετά από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα στην αντίδραση, είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας πολυ(A) που αποικοδομήθηκε.

Κατ' αυτόν τον τρόπο μετράμε την ενεργότητα της PARN.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης πολυ(A)

Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης προετοιμάστηκαν σύμφωνα με τον Πίνακα 2. Μετά την προσθήκη του διαλύματος κυανού του μεθυλενίου τα δείγματα επώαστηκαν για 15min στους 30°C και η φωτομέτρηση έγινε στα 662nm. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυ(A) (10μg/ml τελική συγκέντρωση). Υπολογίστηκε η διαφορά απορρόφησης (ΔA) θέτοντας το τυφλό ως 0. Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει η εξίσωση από την οποία μπορούμε να υπολογίζουμε την ποσότητα του πολυ(A) που αποικοδομείται-υδρολύεται κατά την ενζυμική αντίδραση.

Πίνακας 2:Πρότυπη καμπύλη πολυ(A)

Τελική συγκέντρωση πολυ(A) (μg/ml)	0	2	4	6	8	10 (T)
πολυ(A)100μg/ml (μl)	0	20	40	60	80	100
Διάλυμα αντίδρασης (μl)	100	80	60	40	20	0
διάλυμα κυανού του μεθυλενίου(μl)	900	900	900	900	900	900

Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30°C. Για να υπολογίσουμε τον βέλτιστο χρόνο αντίδρασης, πραγματοποιούμε πειράματα ενζυμικής δράσης στη βέλτιστη σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος $K_m=30\mu\text{g/ml}$ και με μεταβαλλόμενο χρόνο μετά το πέρας του οποίου σταματάμε την αντίδραση προσθέτοντας 900μl ρυθμιστικό διάλυμα κυανό του μεθυλενίου και τα δείγματα φωτομετρούνται στα 662nm.

Κινητική με αυξανόμενες συγκεντρώσεις πολυ(A)

Έχοντας υπολογίσει με πειράματα χρονοκαμπύλης τον κατάλληλο χρόνο αντίδρασης ώστε οι τιμές που θα λαμβάνουμε να βρίσκονται στη γραμμική περιοχή της χρονοκαμπύλης μπορούμε να κατασκευάσουμε καμπύλη Michaelis-Menten με συγκεντρώσεις πολυ(A) από 10 -60μg/ml.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

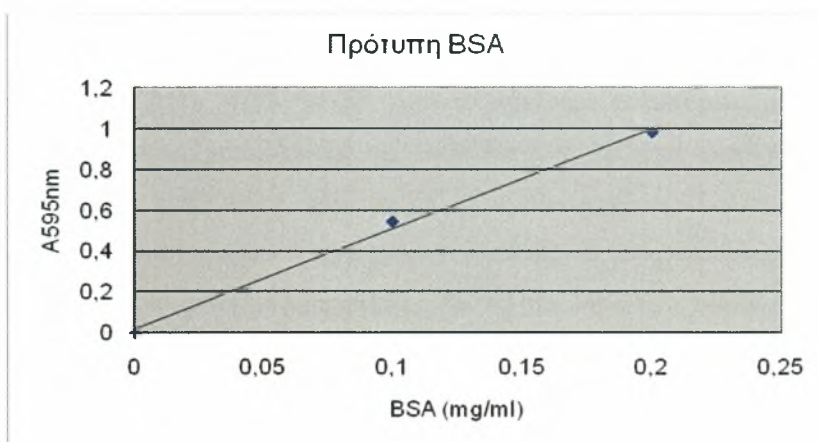
Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης

Η πρότυπη καμπύλη έγινε μετρώντας διάφορες αραιώσεις διαλύματος BSA με τη μέθοδο Bradford. Όπως φαίνεται στα γραφήματα 1 και 2 για τις πρότυπες που εκτελέστηκαν κατά τη χρονική περίοδο του πειράματος, προκύπτει μια γραμμική σχέση με εξισώσεις, αντίστοιχα:

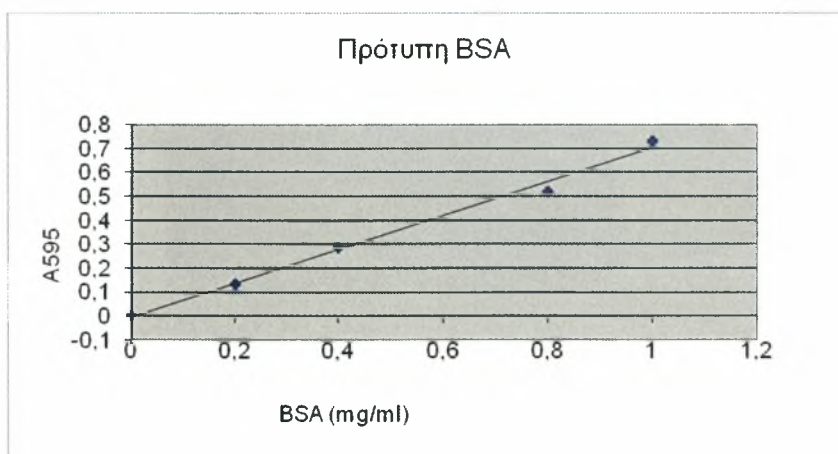
$$A = 4,9 * C(\text{mg/mL}) + 0,0177 \text{ και}$$

$$A = 0,7068 * C(\text{mg/mL}) - 0,0055$$

Με τις συγκεκριμένες εξισώσεις θα υπολογίσουμε την ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών στα δείγματα στα διάφορα στάδια της απομόνωσης.



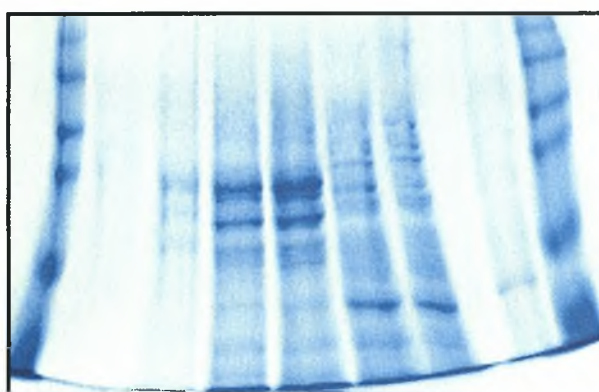
Γράφημα 1 Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.



Γράφημα 2 Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Έκφραση και απομόνωση PARN 74

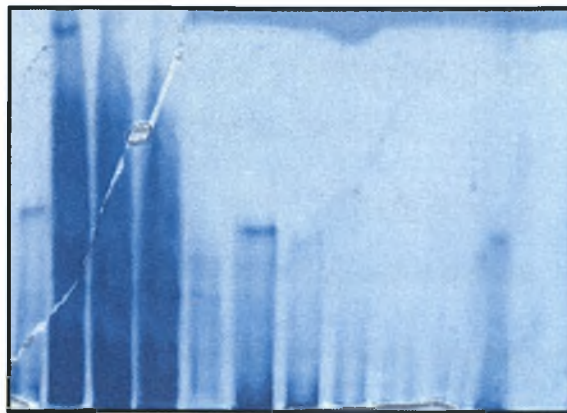
Μετασχηματίζουμε κύτταρα *E.coli* BL21 με πλασμίδιο υπερέκφρασης pET33 PARN 74. Ενοφθαλμίζουμε τα μετασχηματισμένα κύτταρα σε καλλιέργεια LB Broth των 5mL (37°C, 210rpm, o/n) και έπειτα μεταφέρουμε την καλλιέργεια σε φρέσκο θρεπτικό 400mL. Όταν η απορρόφηση της καλλιέργειας φτάσει $A_{600}=0,6$ επάγουμε την έκφραση της PARN με χρήση IPTG τελικής συγκέντρωσης 1mM για 4h στους 37°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της καλλιέργειας (4.000rpm, 20min, 4°C) και συλλογή του ιζήματος. Το ιζήμα επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης όπου πραγματοποιείται σπάσιμο των κυττάρων με υπέρηχους. Το ομογενοποίηση φυγοκεντρείται (12.000rpm, 60min, 4°C) και συλλέγεται το υπερκείμενο για απομόνωση του ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας (*NTA-Ni agarose*). Συλλέγονται τα κλάσματα έκπλυσης (W1-W2) και έπειτα τα κλάσματα έκλουσης (E1-E4). Η μέτρηση ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης από τα κλάσματα της χρωματογραφίας έγινε με τη μέθοδο Bradford και η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της PARN74 έγινε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 7,5% (*SDS-PAGE*). Από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου κρίναμε ποια δείγματα θα έπρεπε να μεταφέρουμε για διαπίδυση σε διάλυμα αντίδρασης (o/n) για την απομάκρυνση του μιδαζολίου κάθε φορά. Στις Εικόνες 10, 11 και 12 φαίνονται οι ηλεκτροφορήσεις των κλασμάτων της χρωματογραφίας για τους καθαρισμούς πρωτεΐνης που χρειαστήκαμε και διακρίνουμε με χοντρές μπάντες στα 74kDa τα κλάσματα όπου βρέθηκε η πρωτεΐνη PARN 74kDa σε κάθε περίπτωση. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford υπολογίστηκε κάθε φορά από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης της BSA που παρατίθεται παραπάνω.



← PARN 74kDa

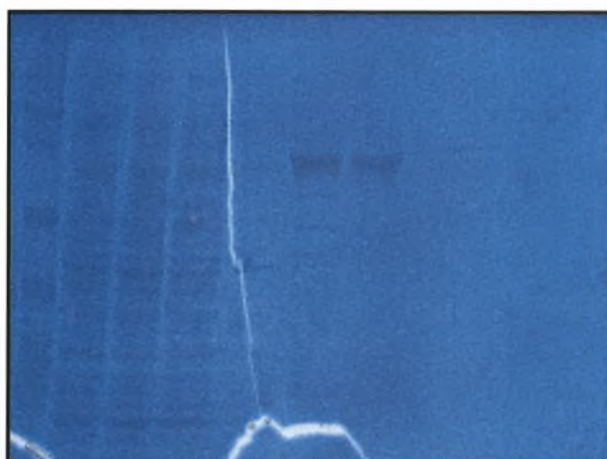
W1 W2 E1 E2 E3 E4 .

Εικόνα 10 20/02/09 Ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της PARN74. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue. W1, W2: Δείγματα έκπλυσης, E1-E4: Δείγματα έκλουσης από την στήλη. Συγκέντρωση πρωτεΐνης που εντοπίζεται στα E1, 2: 0,2mg/ml ή 2,76μM.



PARN P.E. F.T. W1 W2 E1 E2 E3 E4 PARN

Εικόνα 11 28/03/09 Ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της PARN74. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue. PARN: Δείγμα PARN74 20/02/09 που χρησιμοποιείται ως δείκτης μοριακού βάρους, P.E.: Protein Extract, δείγμα μείγματος στήλης και υπερκειμένου φυγοκέντρησης κυττάρων, F.T.: Δείγμα που δεν προσδέθηκε στην στήλη, W1, W2: Δείγματα έκπλυσης, E1-E4: Δείγματα έκλουσης από την στήλη. Συγκέντρωση πρωτεΐνης που εντοπίζεται στα E1, 2, 3 μετά από PEG αφυδάτωση: 0,184mg/ml ή 2,5μM.



E1 E2 E3 E4 E5

Εικόνα 12 9/04/09 Ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της PARN74. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue. E1-E5: Δείγματα έκλουσης από την στήλη. Συγκέντρωση πρωτεΐνης που εντοπίζεται στα E1, 2: 0,16mg/ml ή 2μM.

Πρότυπη καμπύλη πολυ(A)

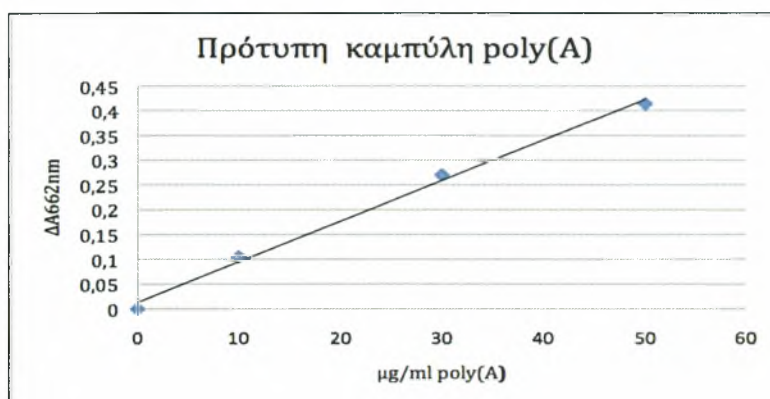
Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης προετοιμάστηκαν σύμφωνα με τον Πίνακα 2. Μετά την προσθήκη του διαλύματος κυανού του μεθυλενίου τα δείγματα επώαστηκαν για 15min στους 30°C και η φωτομέτρηση έγινε στα 662nm. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυ(A) (10μg/ml τελική συγκέντρωση).

Υπολογίστηκε η διαφορά απορρόφησης (ΔA) θέτοντας το τυφλό ως 0. Η παρασκευή πολύ(A) πραγματοποιήθηκε δύο φορές, την 1/12/08 και στις 16/03/09. Από τις δύο πρότυπες καμπύλες προκύπτουν οι γραμμικές σχέσεις με εξισώσεις:

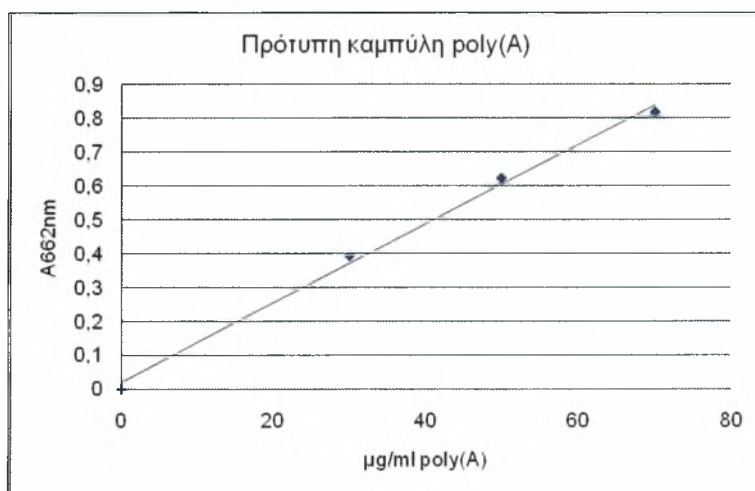
$$A = 0,0085 * C(\mu\text{g/mL}) \text{ και}$$

$$A = 0,012 * C(\mu\text{g/mL}) \text{ αντίστοιχα}$$

Με τις συγκεκριμένες εξισώσεις θα μετατραπούν οι απορροφήσεις των ενζυμικών αντιδράσεων σε πολύ(A) που αποκωδικομήθηκε κατά τις αντιδράσεις. Στα γραφήματα 3 και 4 φαίνονται οι δύο πρότυπες καμπύλες πολύ(A).



Γράφημα 3 Πρότυπη καμπύλη πολύ(A) με χρήση κυανού του μεθυλενίου 1/12/08

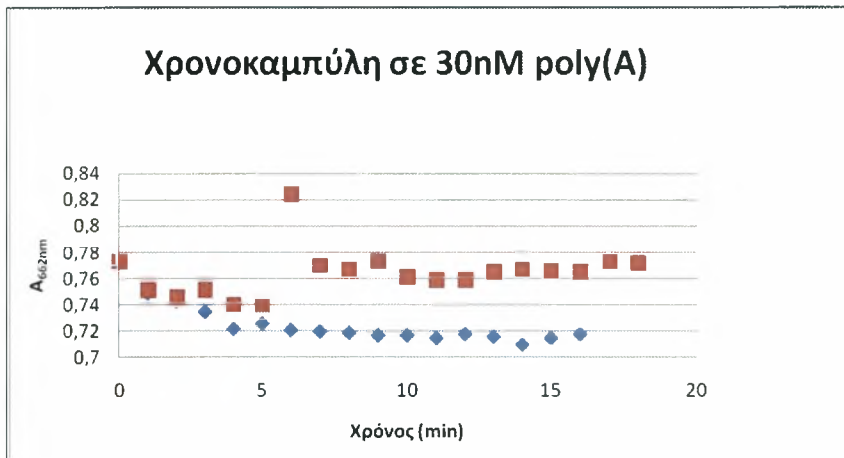


Γράφημα 4 Πρότυπη καμπύλη πολύ(A) με χρήση κυανού του μεθυλενίου 16/03/09

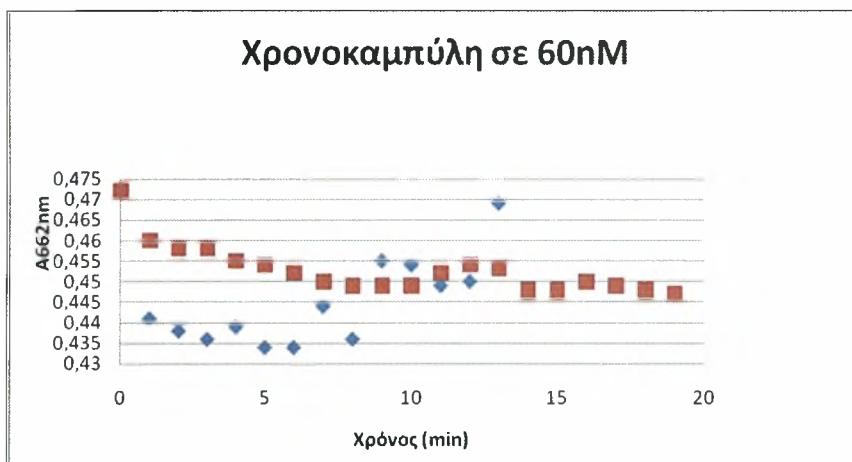
Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30°C. Για να υπολογίσουμε τον βέλτιστο χρόνο αντίδρασης, πραγματοποιούμε πειράματα ενζυμικής δράσης στη βέλτιστη σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος Km=30μg/ml (γράφημα 5) και επίσης σε συγκέντρωση

60μg/ml (γράφημα 6) με μεταβαλλόμενο χρόνο μετά το πέρας του οποίου σταματάμε την αντίδραση προσθέτοντας 900μl ρυθμιστικό διάλυμα κυανό του μεθυλενίου και τα δείγματα φωτομετρούνται στα 662nm.



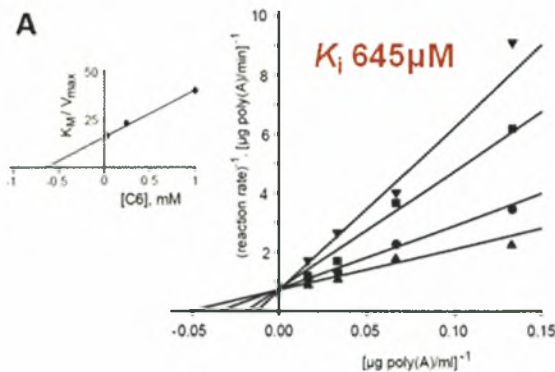
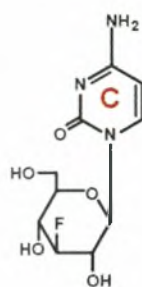
Γράφημα 5 Χρονοκαμπύλη PARN/αντίδραση σε συγκέντρωση πολυ(A) 30μg/ml.



Γράφημα 6 Χρονοκαμπύλη PARN/αντίδραση σε συγκέντρωση πολυ(A) 60μg/ml.

Συνθετικά ανάλογα νουκλεοσιδίων και υποστρωμάτων.

Πρόσφατα δείχθηκε από το εργαστήριό μας πως τα φυσικά νουκλεοτίδια πουρινών αναστέλλουν το ένζυμο [35]. Επίσης δείξαμε πως συνθετικά ανάλογα νουκλεοσιδίων πυριμιδινών με αντικαρκινική και αντιϊκή δράση [36] που φέρουν τροποποιήσεις τόσο στο σάκχαρο (φθορο-γλυκοκυρανοζυλικός δακτύλιος), όσο και τη βάση (αδενίνη ή κυτοσίνη που φέρουν βεζνύλ-ομάδα) είναι συναγωνιστικοί αναστολείς της PARN (εικόνα 13) [37].

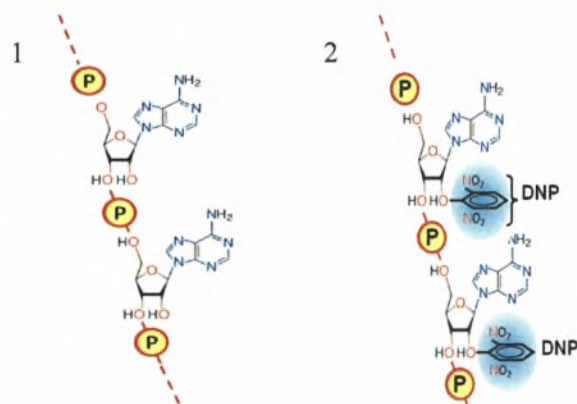


Εικόνα 13 Δομή αναλόγου νουκλεοσιδίου πυριμιδίνης που χρησιμοποιήθηκε σε πρόσφατη έρευνα στο εργαστήριο και διάγραμμα διπλού αντιστρόφου της ενεργότητας της PARN74 παρουσία αυτού με σταθερά αναστολής 645Μμ [37].

Στην παρούσα εργασία, βασιζόμενοι στις προηγούμενες μελέτες μας, συνθέσαμε και χρησιμοποιήσαμε νέα ανάλογα νουκλεοσιδίων που φέρουν το ίδιο τροποποιημένο σάκχαρο και ως βάση ουρακίλη ή 5-φθοροουρακίλη, με σκοπό να βελτιώσουμε τα χαρακτηριστικά της αναστολής των νουκλεοσιδίων. Ειδικά η 5-φθοροουρακίλη χρησιμοποιείται ευρέως ως αντικαρκινικό φάρμακο. Τα καινούρια ανάλογα νουκλεοσιδίων ονομάστηκαν (U1) [1-(3'-δεόξυ-3'-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανοζύλλ)] ουρακίλη και (FU1) [1-(3'-δεόξυ-3'-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανοζύλλ)] 5-φθόρο-ουρακίλη (**εικόνα 14**). Επιπλέον, χρησιμοποιήσαμε ανάλογο του φυσικού υποστρώματος της PARN, πολύ(A) όπου προστέθηκε η ομάδα δινιτροφαινύλιο στο 2'-OH και προέκυψε το πολυ-2'-O-(2,4-δινιτροφαινύλ) πολυ(A), DNP-πολυ(A), (**εικόνα 15**), που έχει δειχθεί να αναστέλλουν ιϊκές αντίστροφες μεταγραφάσες καθώς και αρκετές ριβονουκλεάσες.



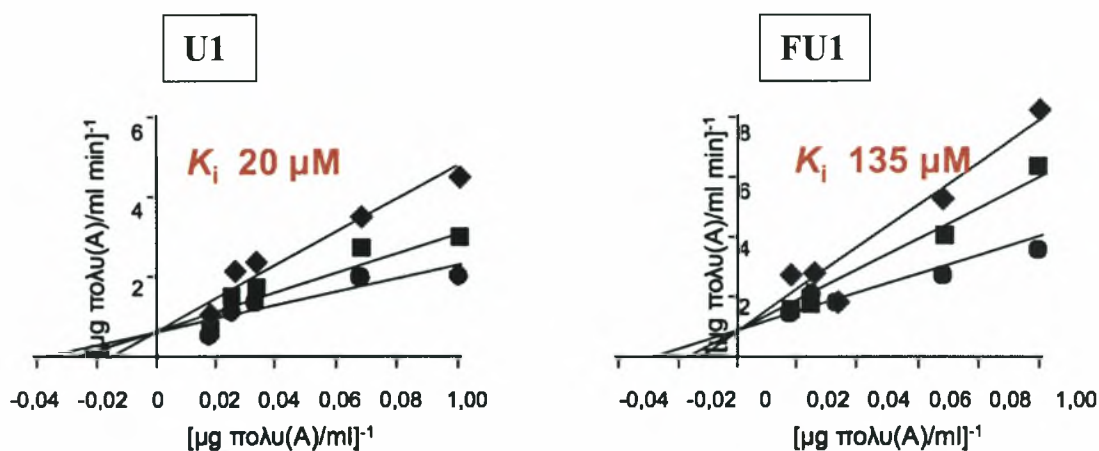
Εικόνα 14 Δομές των αναλόγων νουκλεοσιδίων U1 και FU1 που μελετήθηκαν



Εικόνα 15 Δομές πολύ(A) (1) και DNP-πολύ(A) (2)

Τα συνθετικά νουκλεοσίδια αναστέλλουν την PARN ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής

Για να μελετήσουμε το είδος της αναστολής της PARN από τα συνθετικά νουκλεοσίδια προχωρήσαμε σε κινητική ανάλυση του ενζύμου παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των νουκλεοσιδίων. Οι χρόνοι των αντιδράσεων της PARN 74 ήταν 10min, ενώ η μετατροπή των απορροφήσεων σε πολυ(A) που αποικοδομήθηκε έγινε με την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης πολυ(A). Η απεικόνιση των αποτελεσμάτων σε διαγράμματα Lineweaver-Burk (διπλού αντιστρίφου) έδειξε ότι τόσο το U1 όσο και το FU1 παρουσιάζουν κινητική συναγωνιστικής αναστολής όπως παρουσιάζεται και στο **γράφημα 7**.



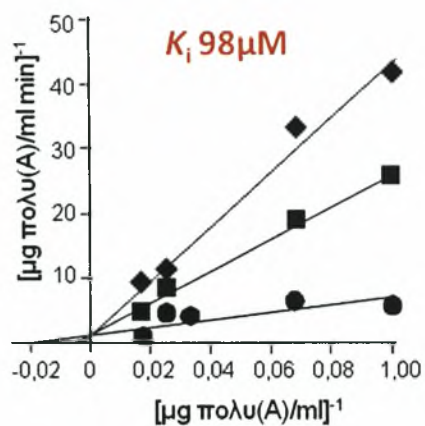
Γραφήμα 7 Διαγράμματα διπλού αναστρόφου της ενεργότητας της PARN παρουσία 0 μM (●), 10 μM (■) και 100 μM (◆) των ενώσεων U1 και FU1. Τα U1,FU1 είναι συναγωνιστικοί αναστολείς της PARN.

Τα αποτελέσματα της κινητικής ανάλυσης όπως φαίνεται και στα διαγράμματα διπλού αντιστρόφου, έδειξαν ότι η αναστολή που παρατηρήσαμε ήταν σαφώς καλύτερη σε σχέση με ενώσεις που είχαμε ως τώρα μελετήσει. Για να προσδιορίσουμε τις σταθερές αναστολής (K_i) κινητικά, χρησιμοποιήθηκε η κλίση των ευθειών των παραπάνω διαγραμμάτων. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν για το U1 20 μM και το FU1 135 μM (**Πίνακας 3**). Οι τιμές αυτές επιβεβαιώνουν τη σύγκριση με προηγούμενα δεδομένα μας, από παρόμοιες ενώσεις, που παρατίθενται συνοπτικά στην **εικόνα 13**.

Το ανάλογο υποστρώματος της PARN, DNP-πολυ(A), αναστέλλει την PARN ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής

Η ίδια προσέγγιση ακολουθήθηκε και για την κινητική ανάλυση του αναλόγου του φυσικού υποστρώματος της PARN. Συγκεκριμένα για το DNP-πολύ(A), η απεικόνιση των αποτελεσμάτων σε διάγραμμα Lineweaver-Burk (**Γράφημα 8**) έδειξε ότι αναστέλλει την

PARN με συναγωνιστικό τρόπο. Η τιμή K_i που προέκυψε είναι $98\mu\text{M}$, η οποία είναι συγκρίσιμη με τις σταθερές αναστολής των αναλόγων νουκλεοσιδίων U1 και FU1 που μελετήθηκαν (Πίνακας 3).



Γράφημα 8 Διάγραμμα διπλού αναστρέφου ενεργότητας PARN παρουσία $0\mu\text{M}$ (●), $30\mu\text{M}$ (■) και $300\mu\text{M}$ (◆) DNP-πολυ(A).

Πίνακας 3 Σταθερές αναστολής K_i
νουκλεοσίδια K_i

U1	$20\mu\text{M}$
FU1	$135\mu\text{M}$
DNP-πολύ(A)	$98\mu\text{M}$

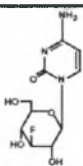
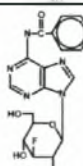
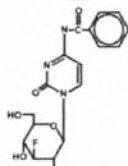
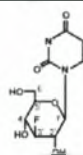
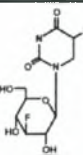
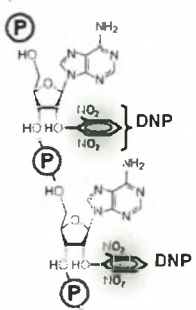
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο κεντρικός ρόλος της PARN στην αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs την καθιστά κύριο στόχο μέσω του οποίου μπορεί να ρυθμίζεται ο χρόνος ζωής τους. Μελέτες στο εργαστήριό μας έχουν δείξει ότι η δραστηριότητα της PARN αναστέλλεται από φυσικά νουκλεοτίδια πουρινών [35]. Επιπλέον, πρόσφατες *in vitro* μελέτες του εργαστηρίου και μοριακής προσομοίωσης της δέσμευσης συνθετικών αναλόγων νουκλεοσιδίων με γνωστή αντικαρκινική και αντιϊκή δράση [36], έδειξαν ότι οι ουσίες αυτές αναστέλλουν αποτελεσματικά την δραστηριότητα της PARN [37]. Τα συνθετικά αυτά ανάλογα φέρουν τροποποιήσεις τόσο στο σάκχαρο (φθορο-γλυκοκυανοζυλικός δακτύλιος), όσο και τη βάση (αδενίνη ή κυτοσίνη που φέρουν βενζόυλ-ομάδα) [36]. Στην παρούσα εργασία βασιζόμενοι στην ίδια στρατηγική και θέλοντας να επεκτείνουμε τις προϋπάρχουσες μελέτες μας με σκοπό να εντοπίσουμε πιο αποτελεσματικούς αναστολείς της PARN, συνθέσαμε και χρησιμοποιήσαμε μια σειρά νέων αναλόγων νουκλεοσιδίων πυριμιδινών που φέρουν τον ίδιο τροποποιημένο εξαμελή δακτύλιο σακχάρου και ως βάση ουρακίλη ή 5-φθοροουρακίλη. Έγινε κινητική μελέτη και η ανάλυση έδειξε πως τα νουκλεοσίδια αναστέλλουν συναγωνιστικά το ένζυμο. Στη συνέχεια, συντέθηκε ανάλογο του φυσικού υποστρώματος της PARN, όπου προστέθηκε η ομάδα δινιτροφαινύλιο στη θέση 2' και προέκυψε το πολυ-2'-O-(2,4-δινιτροφαινύλ)πολυ(A), γνωστό ως DNP-πολυ(A), που έχει δειχθεί να αναστέλλει ιικές αντίστροφες μεταγραφάσες καθώς και αρκετές ριβονουκλεάσες [38]. Η κινητική μελέτη με το DNP-πολύ(A) έδειξε ότι δρα και αυτό ως συναγωνιστικός αναστολέας της PARN. Το γεγονός αυτό μας δίνει την δυνατότητα να συλλέξουμε χρήσιμα δεδομένα για των μηχανισμό ενδεχομένης επίδρασης των διάφορων μορίων στην δραστηριότητα του ενζύμου. Συμπερασματικά, τα ως τώρα αποτελέσματά μας από την κινητική ανάλυση, τον προσδιορισμό των σταθερών αναστολής (K_i) και τη σύγκριση με προηγούμενα δεδομένα μας, δείχνουν πως τόσο τα νέα νουκλεοσίδια, όσο και το τροποποιημένο υπόστρωμα αναστέλλουν αποτελεσματικότερα την PARN από αυτά προηγούμενων μελετών μας. Από ότι φαίνεται η παρουσία της ουρακίλης στο νουκλεοσίδιο βελτίωσε τα χαρακτηριστικά αναστολής του νουκλεοσιδίου σε σχέση με τις προηγούμενες εργασίες μας, όπου είχε χρησιμοποιηθεί κυτοσίνη, αδενίνη, καθώς και τροποποιήσεις τους (προσθήκη βενζόυλ-ομάδας). Οι σταθερές αναστολής της παρούσας εργασίας, καθώς και των προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου συνοψίζονται στον Πίνακα 4. Εξίσου αποτελεσματικό με τα νέα νουκλεοσίδια ήταν και το ανάλογο υποστρώματος, DNP-πολυ(A). Το ανάλογο αυτό έχει δειχθεί πως αναστέλλει αρκετές ριβονουκλεάσες [38]. Τα δεδομένα μας επεκτείνουν αυτές τις μελέτες, δείχνοντας πως και η PARN αποτελεί στόχο του συγκεκριμένου αναλόγου. Μελέτες και σε άλλες αποαδενυλάσες αναμένεται να δείξουν αν και η οικογένεια των ενζύμων αυτών, που ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των ριβονουκλεασών, είναι στόχος αυτού του αναλόγου υποστρώματος, και έτσι θα μπορούσε να παρέμβει στο χρόνο ζωής των mRNAs.

Επομένως, νουκλεοσίδια με κατάλληλα τροποποιημένο σάκχαρο και βάση μπορούν να χρησιμεύσουν ως αρχικές ενώσεις για σύνθεση εξειδικευμένων αναστολέων της PARN. Ένα επόμενο βήμα σε αυτή την έρευνα μπορεί να είναι η επίδραση αυτών των μορίων, νουκλεοτιδίων και συνθετικών μορίων, *in vivo*. Η αναστολή της PARN σε καρκινικά κύτταρα θα μπορούσε να έχει καθοριστική σημασία, γιατί θα επεμβαίνει και θα αλλάζει το χρόνο ζωής των mRNA του. Συμπερασματικά, η PARN θα μπορούσε να αποτελέσει ένα νέο μοριακό στόχο για την ανάπτυξη ενώσεων με θεραπευτικές ιδιότητες μέσω της ρύθμισης της αποικοδόμησης των πολυ(A) ουρών και κατ' επέκταση της σταθερότητας των mRNAs. Η

διαπίστωση πως συνθετικά μόρια, όπως αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, μπορούν να ρυθμίσουν τη δράση του ενζύμου μπορεί να καταστήσει το ένζυμο στόχο για ανάπτυξη ουσιών με φαρμακευτικό/θεραπευτικό ενδιαφέρον.

Πίνακας 4

Ένωση (συντ.)	Δομή	K_i , μM
C6		645
A2		510
A6		210
U1		20
FU1		135
DNP- poly(A)		98

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lewin B. GENES VIII κεφάλαιο 5.
2. 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).
3. Chen, C.Y. *et al.* AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451–464 (2001).
4. Wang, Z. & Kiledjian, M. Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* 107, 751–762 (2001).
5. Mukherjee, D. *et al.* The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.* 21, 165–174 (2002).
6. 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).
7. Dodson, R.E. & Shapiro, D.J. Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72, 129–164 (2002).
8. 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).
9. Dehlin, E., Wormington, M., Körner, C.G. & Wahle, E. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.* 19, 1079–1086 (2000).
10. 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).
11. Sach, A.B. & Deardorff, J.A. Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast. *Cell* 70, 961–973 (1992).
12. 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).
13. 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).
14. 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).
15. Dlakic, M. Functionally unrelated signalling proteins contain a fold similar to Mg²⁺-dependent endonucleases. *Trends Biochem. Sci.* 25, 272–273 (2000).
16. Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrads, D. & Parker, R. Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*.

EMBO J. 21, 1427–1436 (2002).

17. 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).
18. 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).
19. Daugeron, M.C., Mauxion, F. & Seraphin, B. The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Res.* 29, 2448–2455 (2001).
20. 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).
21. 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).
22. Joyce, C.M. & Steitz, T.A. Polymerase structures and function: variations on a theme? *J. Bacteriol.* 177, 6321–6329 (1995).
23. 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).
24. 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).
25. Ito, T. *et al.* A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4277–4278 (2001).
26. 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).
27. Körner, C.G. & Wahle, E. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J. Biol. Chem.* 272, 10448–10456 (1997).
28. 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).
29. 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).
30. Wu, M., Reuter, M., Lilie, H., Liu, Y., Wahle, E. & Song H. Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO J* 24, 4082–4093 (2005).
31. 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).
32. Copeland PR and Wormington M. The mechanism and regulation of deadenylation:

Identification and characterization of Xenopus PARN. *RNA* 7,875–886 (2001).

33. Cheng Y, Liu WF, Yan YB, Zhou HM A nonradioactive assay for poly(A)-specific ribonuclease activity by methylene blue colorimetry. *Protein Pept. Lett.* 2006;13(2):125-8.
34. Greiner-Stoeffele T., Grunow M., Hahn U. A General Ribonuclease Assay Using methylene blue. *Analytical Biochemistry*, 1996; 240: 24-28.
35. Balatsos N.A.A., Anastasakis D., Stathopoulos C. Inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by purine nucleotides: kinetic analysis. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2008. In press.
36. Manta S., Agelis G., Botic T, Cencic A., Komiotis D. Fluoro-ketopyranosyl nucleosides: Synthesis and biological evaluation of 3-fluoro-2-keto- β -D-glycopyranosyl derivatives of N⁴-benzoyl cytosine. *Bioorg. Med. Chem.* 2007; 15: 980-987.
37. Balatsos N.A.A., Vlachakis D, Maragozidis P, Manta S, Anastasakis D, Kyritsis A, Vlasi M, Komiotis D and Stathopoulos C. Competitive inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by synthetic fluoro-pyranosyl nucleosides. *Biochemistry*,(2008) in press.
38. Rahman MH, Kang I, Waterbury RG, Narang U, Bright FV, Wang JH. Selective removal of ribonucleases from solution with covalently anchored macromolecular inhibitor. *Anal Chem.* 1996 Jan 1;68(1):134-8
39. Lingna Wang, Ph.D. Committee: Arlen W. Johnson, Supervisor, Scott W. Stevens, Paul M. Macdonald, David W. Hoffman, Ellen Gottlieb. Supervisor: Arlen Johnson, Characterization of factors involved in 3' to 5' mRNA degradation in yeast. The University of Texas at Austin, 2005.
40. Molecular Biology of the Cell. Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. New York and London: Garland Science; c2002

