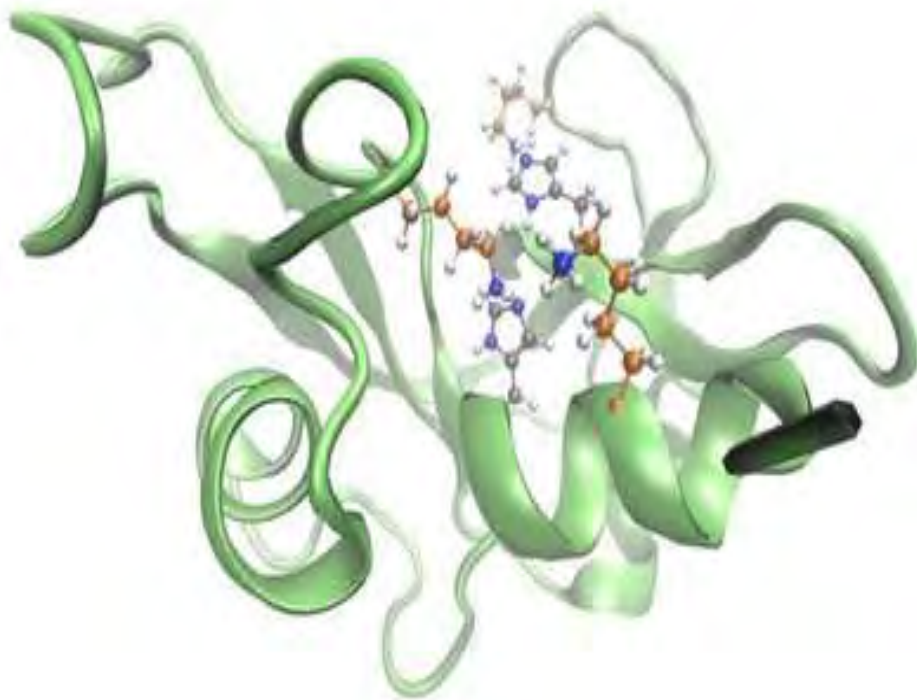




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Επίδραση συνθετικών αναλόγων νουκλεοσιδίων στην ενζυμική  
δραστηκότητα ριβονουκλεασών**



Διπλωματική Εργασία - Τσιουμπέκου Μαρία  
Λάρισα 2011

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

Υπεύθυνος Καθηγητής:

**Μπαλατσός Νικόλαος**, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Παν.Θεσσαλίας.

Τριμελής Επιτροπή:

**Μπαλατσός Νικόλαος**, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Παν.Θεσσαλίας.

**Λεωνίδα Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Παν.Θεσσαλίας.

**Γιαννούλη Σταματίνα**, Λέκτορας επί συμβάσει (ΠΔ 407/80) Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Παν.Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, και κυρίως τον υπεύθυνο καθηγητή μου, κύριο Μπαλατσό Νικόλαο για την πολύτιμη καθοδήγηση, υπομονή και συμπαράσταση του κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς και την κυρία Γιαννούλη Σταματίνα για την αμέριστη βοήθεια, και υποστήριξη της. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον υποψήφιο διδάκτορα Μαραγκοζίδη Παναγιώτη για τις χρήσιμες υποδείξεις του καθώς και όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την ευχάριστη συνεργασία και τις συμβουλές τους όλο αυτό το διάστημα.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
Μεταγραφή και μετάφραση του mRNA.....	6
Ωρίμανση και διάρκεια ζωής του mRNA.....	7
Το 5' κάλυμμα προστατεύει το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA.....	8
Ο ρόλος της πολυαδενυλίωσης του 3' άκρου του mRNA.....	8
Μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA.....	9
Αποαδενυλίωση του 3' άκρου του mRNA.....	10
Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A)-specific ribonuclease, PARN].....	12
Πολυ(A) ουρά και καρκίνος.....	14
Ριβονουκλεάσες και καρκίνος.....	15
EDN, η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη.....	17
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	19
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
Υλικά.....	20
Διαλύματα.....	22
Μέθοδοι.....	25
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	37
Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης.....	37
Έκφραση και απομόνωση PARN 74.....	37
Πρότυπη καμπύλη πολυ(A).....	39
Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης.....	39
Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας παρουσία συνθετικών νουκλεοσιδίων.....	40
Τα συνθετικά νουκλεοσίδια αναστέλλουν την PARN ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής.....	40
Αντιδράσεις αποαδενυλασών με πολυ(A).....	43
Πέψεις πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού NsiI και EcoRI και <i>in vitro</i> μεταγραφή.....	44

Αντιδράσεις RNA με πολυ(A)-ριβονουλεάσες.....	45
Συνθετικά νουκλεοσίδια και ριβονουκλεάσες.....	47
Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη, EDN, αποικοδομεί πολυ(U).....	48
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	50
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	53

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο χρόνος ζωής των mRNAs είναι άμεσα συνδεδεμένος με την ποσότητα της πρωτεΐνης που θα συντεθεί από το κύτταρο για να διεκπεραιώσει τις λειτουργίες τους. Ο κρισιμότερος ίσως παράγοντας που καθορίζει το χρόνο αυτό είναι η ρύθμιση της αποικοδόμησης των mRNAs και ως εκ τούτου είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο. Η διαδικασία αποικοδόμησης ξεκινά από τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο, ήδη κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνοσύνθεσης, και είναι γνωστή ως αποαδενυλίωση. Καταλύεται από πολυ(A)-εξειδικευμένες εξωριβονουκλεάσες ή αποαδενυλάσες. Μελέτες για τη ρύθμιση της ενεργότητας ενός από τα ένζυμα αυτά, της πολυ(A)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης, PARN, από το εργαστήριο έχουν δείξει πως τόσο φυσικά νουκλεοτίδια και συνθετικά ανάλογα νουλεοσιδίων δρουν ως αναστολείς τους. Στην παρούσα διπλωματική εργασία συνεχίζουμε την έρευνα αυτή. Ειδικότερα, συνθέσαμε νέα ανάλογα νουκλεοσιδίων, με τροποποιήσεις τόσο στο σάκχαρο όσο και στη βάση τους, και μελετήσαμε την επίδραση τους στην PARN. Επεκτείναμε τη μελέτη σε μια ακόμη ριβονουκλεάση, τη νευροτοξίνη που προέρχεται από τα ηωσινόφιλα, EDN. Η επίδραση των νουκλεοσιδίων μελετήθηκε κινητικά με μια ήδη εφαρμοσμένη φωτομετρική μέθοδο και έγινε προσπάθεια να απεικονιστεί σε πηκτές αγαρόζης και ακρυλαμιδίου. Δείχθηκε ότι συνθετικά νουκλεοσίδια με βάση τη φθοροουρακίλη και με τροποποίηση στο σάκχαρο μπορούν να αναστείλουν κυρίως την PARN και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αρχικές ενώσεις για ανάπτυξη νέων ενώσεων που θα μπορούν να ρυθμίζουν τις ριβονουκλεάσες PARN και EDN.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

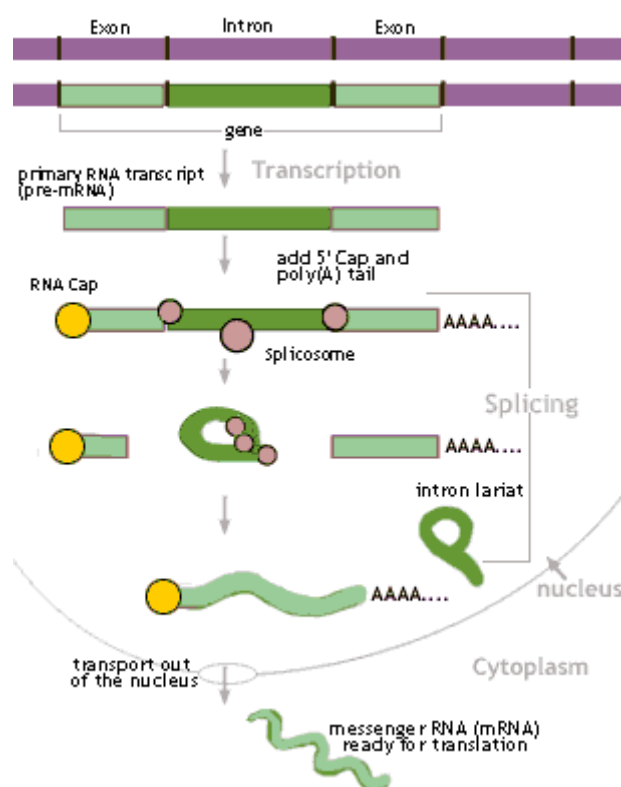
Το ριβονουκλεϊκό οξύ, RNA, είναι ένα ιδιαίτερα σημαντικό μόριο για τη γονιδιακή έκφραση. Εκτός από το κύριο ρόλο του στην πρωτεϊνοσύνθεση, πολλά είδη RNA συμμετέχουν και σε άλλα στάδια της γονιδιακής έκφρασης. Η εμπλοκή των RNA σε πολλές λειτουργίες όσον αφορά τη γονιδιακή έκφραση, και κυρίως η ιδιότητα ορισμένων εξ' αυτών να καταλύουν αντιδράσεις, υποστηρίζει την άποψη ότι η ζωή σε εξαιρετικά αρχέγονα στάδια θα μπορούσε να στηριχθεί αποκλειστικά στο RNA για την αποθήκευση γενετικών πληροφοριών καθώς και την κατάλυση στοιχειωδών χημικών αντιδράσεων. Οι τρεις κύριες τάξεις RNA είναι το αγγελιαφόρο (*mRNA*), το μεταφορικό (*tRNA*) και το ριβοσωμικό (*rRNA*). (Lewin B. GENES VIII κεφάλαιο 5)

### Μεταγραφή και μετάφραση του mRNA

Το RNA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ροή της γενετικής πληροφορίας από το DNA στις πρωτεΐνες, γνωστή και ως κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας, καθώς αποτελεί τον ενδιάμεσο φορέα της πληροφορίας. Κατά τη μεταγραφή παράγεται ένα μονόκλωνο μόριο RNA όμοιο στην αλληλουχία με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA, ενώ κατά τη διαδικασία της μετάφρασης η νουκλεοτιδική αλληλουχία του mRNA μετατρέπεται σε αλληλουχία αμινοξέων που αποτελούν μια πρωτεΐνη. Ένα μόριο mRNA δε μεταφράζεται σε ολόκληρο το μήκος του, αλλά κάθε mRNA περιέχει τουλάχιστον μία κωδική περιοχή, η οποία σχετίζεται με μια πρωτεϊνική αλληλουχία μέσω του γενετικού κώδικα: κάθε νουκλεοτιδική τριπλέτα (*κωδικόνιο*) της κωδικής περιοχής αντιστοιχεί σε ένα αμινοξύ. Μόνο η μία αλυσίδα του δίκλωνου DNA μεταγράφεται σε αγγελιαφόρο RNA. Η μία αλυσίδα του DNA η οποία κατευθύνει τη σύνθεση του mRNA δημιουργώντας ζεύγη συμπληρωματικών βάσεων αποκαλείται αλυσίδα-μήτρα ή αντινοσηματική αλυσίδα. Ο όρος «αντινοσηματική» χρησιμοποιείται γενικά για την περιγραφή μιας αλληλουχίας του DNA ή του RNA που είναι συμπληρωματική με το mRNA ενώ η αλυσίδα του DNA που φέρει την ίδια αλληλουχία με το mRNA (με εξαίρεση ότι περιέχει θυμίνη αντί ουρακίλη) ονομάζεται κωδική ή νοσηματική αλυσίδα.

## Ωρίμανση και διάρκεια ζωής του mRNA.

Κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης το πρώιμο mRNA υφίσταται τροποποιήσεις: η προσθήκη του καλύμματος στο 5' άκρο, η προσθήκη της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο και το μάτισμα. Οι τροποποιήσεις αυτές απεικονίζονται στην Εικόνα 1 και έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός τελικού ώριμου mRNA, έτοιμο να εξαχθεί από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Κατά μέσο όρο, το mRNA χρειάζεται περίπου 20min για να εξέλθει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα και μεταφράζεται. (Lewin B. GENES VIII κεφάλαιο 24)



**Εικόνα 1:** Επεξεργασία του mRNA ([www.ewa.cz/pages1/813.htm](http://www.ewa.cz/pages1/813.htm))

Υπάρχουν διαφορές στον κύκλο ζωής μεταξύ των ευκαρυωτικών και βακτηριακών mRNA. Η μεταγραφή στα ζωικά κύτταρα συμβαίνει με την ίδια σχεδόν ταχύτητα που συμβαίνει και στα βακτήρια, δηλαδή περίπου 40 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο. Το μέγεθος πολλών ευκαρυωτικών γονιδίων είναι μεγαλύτερο οπότε απαιτείται περισσότερος χρόνος για τη μεταγραφή τους. 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.

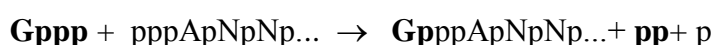
Το ευκαρυωτικό mRNA αποτελεί μόνο ένα μικρό ποσοστό το συνολικού κυτταρικού RNA. Ο χρόνος ημιζωής των mRNA στους ζυμομύκητες είναι σχετικά μικρός και κυμαίνεται από 1 έως 60min. Αντίθετα το mRNA των ζωικών κυττάρων είναι σχετικά σταθερό, με χρόνο ημιζωής μεταξύ 1 - 24 ωρών. Στο γεγονός αυτό συνεισφέρουν οι τροποποιήσεις και στα δυο άκρα του mRNA.

### **Το 5' κάλυμμα προστατεύει το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA**

Η προσθήκη 5' καλύμματος είναι ζωτικής σημασίας για τη δημιουργία ενός ώριμου mRNA. Το 5' κάλυμμα προκύπτει με την προσθήκη μιας τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP) στην πρώτη βάση του μεταγράφου μέσω ενός 5'-5' δεσμού, που είναι ένα τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο (συνήθως μια πουρίνη, A ή G). Η προσθήκη αυτή καταλύεται από ένα πυρηνικό ένζυμο, τη γουανυλυλο-τρανσφεράση ενώ χαρακτηριστικό της αντίδρασης είναι ότι το νέο κατάλοιπο G που προστίθεται έχει αντίστροφο προσανατολισμό (5'-5') από όλα τα άλλα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας.. Η αρχική αλληλουχία του μεταγράφου μπορεί να αναπαρασταθεί ως:



Η συνολική αντίδραση μπορεί να αναπαρασταθεί ως μία συμπύκνωση μεταξύ του GTP και του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου του RNA όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα:



Το κάλυμμα αποτελεί υπόστρωμα για αρκετές αντιδράσεις μεθυλίωσης. Οι τύποι των καλυμμάτων διακρίνονται από το πλήθος των μεθυλίωσεων που φέρουν. Η πρώτη μεθυλίωση γίνεται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και αποτελείται από την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στη θέση N7 της ακραίας γουανίνης, μια αντίδραση που καταλύεται από την 7-μεθυλο-τρανσφεράση της γουανίνης. Ένα κάλυμμα που έχει μόνο αυτή τη μεθυλομάδα ονομάζεται κάλυμμα 0 (*cap 0*).

### **Ο ρόλος της πολυαδενυλίωσης του 3' άκρου του mRNA**

Μια επιπλέον τροποποίηση που υφίσταται το πρόδρομο mRNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι η προσθήκη στο 3' άκρο του μιας πολυ(A) ουράς, δηλαδή μιας αλληλουχίας από 250-300 νουκλεοτίδια αδενοσίνης. Η διαδικασία της



προσθήκης της ουράς είναι γνωστή ως διεργασία του 3' άκρου. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο πολυ(A)-πολυμεράση [*poly(A)-polymerase, PAP*] ενώ στη μεταμεταγραφική αυτή τροποποίηση συμμετέχουν τουλάχιστον επτά πρωτεϊνικοί παράγοντες.

Η πολυ(A) ουρά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο καθώς προστατεύει το 3' άκρο του mRNA από εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, συμμετέχει σε διεργασίες όπως η έξοδος στο κυτταρόπλασμα και από αυτή ξεκινά και το κύριο μονοπάτι αποικοδόμησης του mRNA. Ιδιαίτερη σημασία έχει η συμμετοχή πρωτεϊνικών παραγόντων που προσδένονται στην πολυ(A) ουρά, και κυρίως η πολυ(A)-προσδεδόμενη πρωτεΐνη [*poly(A)-binding protein, PABP*], ο ρόλος της οποίας είναι να προστατεύει την ίδια την ουρά από αποικοδόμηση και να αλληλεπιδρά με άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες ρυθμίζοντας έτσι την βιωσιμότητα του mRNA.

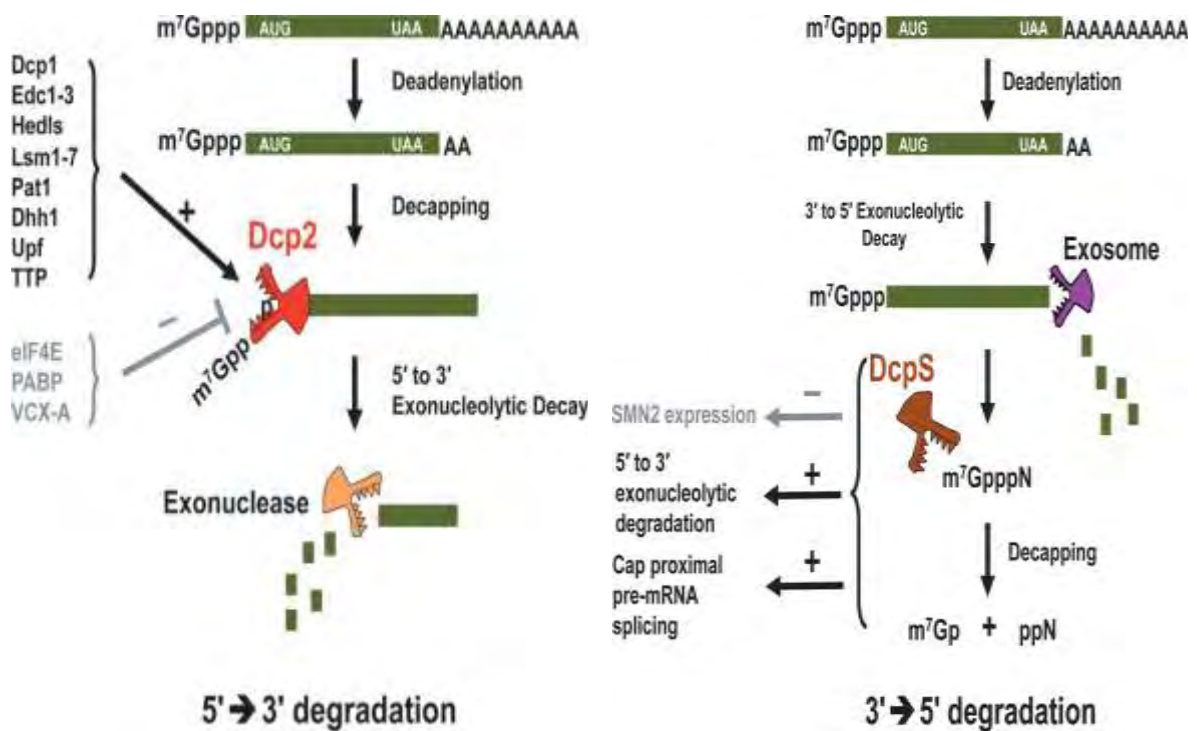
Η αφαίρεση της πολυ(A) ουράς αναστέλλει την έναρξη της μετάφρασης *in vitro* και η μείωση των επιπέδων της PABP έχει το ίδιο αποτέλεσμα σε ζυμομύκητες *in vivo*. Αυτές οι επιδράσεις μπορεί να εξαρτώνται από την πρόσδεση της PABP στο σύμπλοκο έναρξης, στο 5' άκρο του mRNA. Σε μερικές περιπτώσεις, τα mRNA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

### **Μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA**

Η αποικοδόμηση του ευκαρυωτικού mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στον ποιοτικό έλεγχο της βιοσύνθεσης mRNA και στην αντιϊκή προστασία (Dykxhoorn et al., 2003; Maquat et al., 2000; Hoofvan et al., 1999). Η αποαδενυλίωση αποτελεί το καθοριστικό βήμα στην αποικοδόμηση των μορίων mRNA και την μεταφραστική αποσιώπηση, γεγονός που την καθιστά ιδανικό σημείο ελέγχου και των δύο διεργασιών.

Στον πυρήνα, με την διαδικασία της αποαδενυλίωσης περιορίζονται οι νεοπροστιθέμενες πολυ(A) ουρές, στο κατάλληλο μήκος. Οι πολυ(A) ουρές όταν είναι σε προκαθορισμένο σωστό μήκος είναι απαραίτητες για την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα και όταν αυτό φτάσει στο κυτταρόπλασμα του προσδίδουν σταθερότητα και έναυσμα για μετάφραση. Στο κυτταρόπλασμα, η εκτεταμένη αποαδενυλίωση του mRNA

σηματοδοτεί την αποικοδόμηση του, η οποία ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο του από διάφορα ένζυμα, γνωστά ως αποαδενυλάσες. (Tucker et al., 2000; Mitchell et al., 2001). Στη συνέχεια ένα ειδικό ένζυμο που αποτελείται από δύο υπομονάδες (Dcp1p και Dcp2p) αφαιρεί το κάλυμμα, εκθέτοντας το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την Xrn1p, μια 5'→3' εξωνουκλεάση. Εναλλακτικά, μετά την αποαδενυλίωση, το mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών (Anderson et al., 1998; Chen et al., 2001; Wang and Kiledjian, 2001; Mukherjee et al., 2002). Στην περίπτωση αυτή το κάλυμμα υδρολύεται από το DcpS (Liu et al., 2002). Τα 2 κυριότερα μονοπάτια αποικοδόμησης του ευκαρυωτικού mRNA και οι πρωτεϊνικοί παράγοντες που εμπλέκονται σ' αυτά συνοψίζονται στην Εικόνα 2.



**Εικόνα 2:** Μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA (Li You and Megerditch Kiledjian, 2010)

### Αποαδενυλίωση του 3' άκρου του mRNA

Η αποαδενυλίωση, δηλαδή η βράχυνση της πολυ(A) ουράς του mRNA η οποία επιτελείται από τις αποαδενυλάσες, ένζυμα που αποικοδομούν πολυ(A) ουρές, αποτελεί υπό φυσιολογικές συνθήκες το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμηση του

mRNA.

Το επικρατέστερο σύμπλοκο αποαδενυλάσης που ανακαλύφθηκε στο ζυμομύκητα περιλαμβάνει δύο νουκλεάσες, την Ccr4p και την Pop2p, και άλλες πρωτεΐνες όπως τις Not1-Not5p, Caf4, Caf16, Caf40 και Caf30p. (Viswanathan et al.,2003; Dehlin et al.,2000; Martínez et al.,2001; Sach et al.1992; Wickens et al. 2002; Tucker et al. 2001; Denis et al. 2003). Η Ccr4p είναι διατηρημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς με πολλαπλές γονιδιακές παραλλαγές 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 την πυρηνόφιλη προσβολή στον φωσφοδιεστερικό δεσμό. (Dlakic, 2000). Πιθανές λοιπόν μεταλλάξεις στα καταλυτικά αμινοξέα έχουν ως αποτέλεσμα την κατάργηση της δραστηριότητας του ενζύμου. Τα μεταλλάγματα αυτά δείχνουν ότι στη ζύμη η Ccr4p φαίνεται να έχει τον κυριότερο ρόλο στο σύμπλοκο αποαδενυλίωσης.( Tucker et al. 2002; Chen et al. 2002; Baggs et al. 2003). Η άλλη πρωτεΐνη στο σύμπλοκο με δραστηριότητα αποαδενυλάσης είναι η Pop2p. Η Pop2p είναι επίσης ευρέως συντηρημένη σε σύνθετους ευκαρυωτικούς οργανισμούς με πολλαπλές γονιδιακές παραλλαγές. Είναι μέλος της οικογένειας των RNaseD νουκλεασών οι οποίες έχουν μηχανισμό δράσης και δομή παρόμοια με αυτή της περιοχής της DNA πολυμεράσης με δράση 3'→5' εξωδοξυ-ριβονουκλεάσης. Έχουν τις ίδιες αναδιπλώσεις, περιέχουν δύο θέσεις σύνδεσης για δισθενή ιόντα και έχουν τον ίδιο καταλυτικό μηχανισμό με τον οποίο υδρολύουν τον φωσφοδιεστερικό δεσμό.(Daugeron et al.,2001; Thore et al. 2003 ; Moser et al. 1997; Joyce et al. 1995). Η Pop2 φαίνεται να έχει δύο λειτουργικούς ρόλους: α) η δράση νουκλεάσης και η εναλλαγή των καταλοίπων του ενεργού κέντρου δείχνει ότι κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορεί να είναι υπεύθυνη για την αποαδενυλίωση του mRNA. Έτσι το σύμπλοκο Ccr4-Pop2-Not μπορεί να έχει πολλαπλές νουκλεάσες που ωστόσο ρυθμίζονται διαφορετικά και β) η Pop2 διεγείρει την δράση της Ccr4 αποαδενυλάσης είτε σταθεροποιώντας το σύμπλοκο αποαδενυλάσης είτε προάγοντας την αλληλεπίδραση με το mRNA.

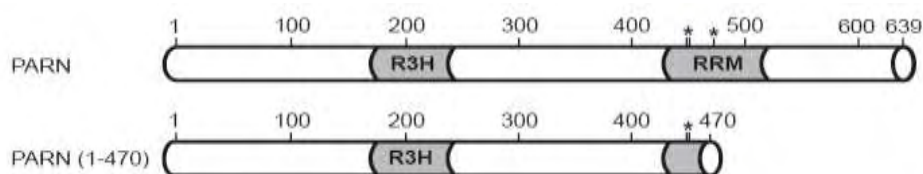
Το δεύτερο ενζυμικό σύμπλοκο που καταλύει την αποαδενυλίωση του mRNA είναι ένα διατηρημένο σύμπλοκο και αποτελείται από τις πρωτεΐνες Pan2p και Pan3p. Ο ρόλος των Pan στην αποαδενυλίωση έχει δειχθεί με στελέχη ζύμης Ccr4Δ όπου απουσιάζει ο κύριος τρόπος αποαδενυλίωσης, οπότε η αποαδενυλίωση εξαρτάται από την Pan2p. Στη ζύμη και πιθανόν σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η Pan εμπλέκεται σε ένα πρώιμο στάδιο της ζωής του mRNA όπου μία αρκετά μακριά πολυ(A) ουρά βραχύνεται

μέχρι να φτάσει τα 55-75 νουκλεοτίδια, αριθμός που κάθε φορά εξαρτάται από το συγκεκριμένο mRNA. (Brown et al. 1998). Οι Pan2p και Pop2p φαίνεται να συμμετέχουν στην ειδική ρύθμιση του mRNA της RAD5 σε απόκριση σε αντιγραφικό στρες. (Hammet et al. 2002) Αναλύσεις αλληλουχιών δείχνουν ότι η καρβοξυτελική περιοχή της Pan2p, όπως και της Pop2p ανήκει στην οικογένεια των RNaseD, και περιλαμβάνουν τα καταλυτικά κατάλοιπα και μηχανισμό υδρόλυσης που εξαρτάται από δύο δισθενή ιόντα. Ο πιθανός ρόλος της Pan3p είναι η διέγερση της Pan2p. Η Pan3p αλληλεπιδρά με την Dun1p, που φαίνεται να παίζει ρόλο στην ρύθμιση του mRNA της RAD5. Επιπλέον η Pan3p αλληλεπιδρά με την Mex67p, μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην εξαγωγή του mRNA και μπορεί να ευθύνεται για την παράδοση του Pan2/Pan3p στο νεοσυντιθέμενο mRNA για την αρχική αποαδενυλίωση της πολυ(A) ουράς (Ito et al. 2001).

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

Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [*poly(A) specific ribonuclease, PARN*] με την οποία εν μέρει θα ασχοληθούμε στην παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί το τρίτο κύριο ένζυμο που αποικοδομεί πολυ(A) ουρές mRNA. Η PARN αρχικά απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε σε κύτταρα θηλαστικών (Åström et al. 1992; Körner et al. 1997). Αποτελεί μέλος της οικογένειας των RNaseD νουκλεασών που φέρει το χαρακτηριστικό μοτίβο DEDD. Είναι συντηρημένη σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς, απουσιάζει όμως από το *S.cerevisiae* και την *D. melanogaster* ενώ μεταλλάξεις στα προβλεπόμενα καταλυτικά κατάλοιπα (DEDD) αναστέλλουν τη δράση της. (Ren et al. 2002; Lai et al. 2003). Η ενεργότητα της PARN εξαρτάται από δισθενή μεταλλικά ιόντα ενώ μεγαλύτερη δραστηριότητα έχει παρουσία ιόντων Mg(II) τα οποία πιθανόν βρίσκονται στο ενεργό κέντρο παίζοντας καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό της κατάλυσης. Το ένζυμο στον άνθρωπο βρίσκεται σε δύο ισόμορφες, μία πυρηνική 74 kDa και μία κυτταροπλασματική 54 kDa. Η τελευταία είναι πρωτεολυμένο παράγωγο της πρώτης από το οποίο απουσιάζει το εύκαμπτο καρβοξυτελικό άκρο. Η περιοχή αυτή ευθύνεται και για την μετακίνηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα αφού περιέχει την NLS (*nuclear localization signal*) αλληλουχία. Η PARN επίσης περιέχει ένα μοτίβο αναγνώρισης RNA (*RNA recognition motif, RRM*), το οποίο σημειώνεται πως απουσιάζει από την κρυσταλλική δομή. Το RRM έχει ιδιότητες πρόσδεσης του πολυ(A) αλλά και του καλύμματος, καθώς και μια συντηρημένη R3H περιοχή που φαίνεται να έχει δομή όμοια με αυτήν της IF3 καρβοξυτελικής περιοχής. (Wu et al., 2005). Η R3H περιοχή

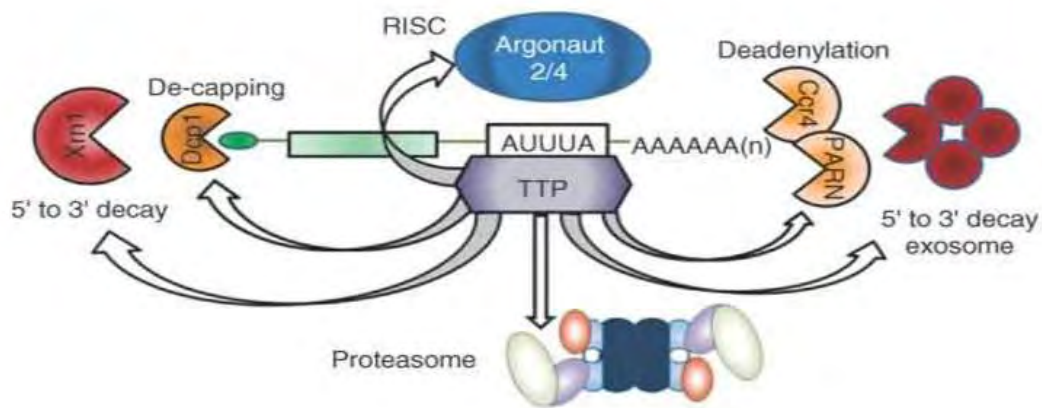
προσδένεται σε μονόκλιωνα νουκλεϊκά οξέα και πιθανόν κατευθύνει την PARN στο πολυαδενυλιωμένο mRNA (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3:** Οι δυο ισομορφές της ανθρώπινης PARN.

Όσον αφορά την ανθρώπινη PARN, από την οποία λείπει το καρβοξυτελικό άκρο (αμινοξέα 1-430 σε σύνολο 639), η κρυσταλλική της δομή έδειξε πως το ένζυμο είναι ομοδιμερές, με κάθε υπομονάδα να αναδιπλώνεται σε δύο περιοχές, μία συντηρημένη και την περιοχή της νουκλεάσης. Το ενεργό κέντρο περιέχει τέσσερα συντηρημένα αμινοξέα, ένα γλουταμικό και τρία ασπαρτικά οξέα (*Asp28*, *Glu30*, *Asp292* και *Asp382*) κατά το μοτίβο DEDD, τα οποία κατευθύνουν κύρια καταλυτικά δισθενή ιόντα, όπως  $Mg^{2+}$  αν και δεν εμφανίζονται ιόντα  $Mg(II)$  στο ενεργό κέντρο του ενζύμου .

Η δραστηριότητα της PARN φαίνεται πως ρυθμίζεται με τουλάχιστον έξι διαφορετικούς τρόπους: (α) διέγερσή της μέσω απευθείας αλληλεπίδρασης της PARN και του καλύμματος στο 5' άκρο, (β) αναστολή της από μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια πουρινών καθώς και από ένα ανάλογο του καλύμματος, (γ) αναστολή από την κυτταροπλασματική πολυ(A)-προσδεδόμενη πρωτεΐνη C (*PABPC*) , πιθανόν λόγω της πρόσδεσης και αλληλεπίδρασης αυτής με την πολυ(A) ουρά, (δ) αλληλεπίδραση της PARN με την CUG-BP mRNA-προσδεδόμενη πρωτεΐνη με αποτέλεσμα την βράχυνση των πολυ(A) ουρών, (ε) διέγερση της αποικοδόμησης της πολυ(A) ουράς από πρωτεΐνες που προσδένονται σε περιοχές γνωστές ως ARE όπως η TTP, (στ) συναγωνισμός μεταξύ της PARN και του eIF4E για την πρόσδεση του καλύμματος. Στην Εικόνα 4 παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση της PARN κατά την ARE-μεσολαβούμενη αποικοδόμηση, με την πρωτεΐνη TTP που συνδέεται στις περιοχές ARE με αποτέλεσμα τη γρήγορη αποαδενυλίωση του mRNA.



**Εικόνα 4:** Αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης TTP με παράγοντες αποικοδόμησης mRNA, μεταξύ αυτών και η PARN. (Seth A. Brooks, 2010)

### Πολυ(A) ουρά και καρκίνος

Η πολυ(A) ουρά στο 3' άκρο των mRNA είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς επηρεάζει την κυτταροπλασματική σταθερότητα και ικανότητα μετάφρασης του mRNA. (Sachs A. et al., 1993). Για το σχηματισμό της δομής αυτής πολλοί πρωτεϊνικοί παράγοντες είναι απαραίτητοι, μεταξύ αυτών όπως ήδη αναφέρθηκε, και η πολυ(A)-πολυμεράση [*Poly(A)-Polymerase, PAP*], της οποίας υψηλά επίπεδα δραστηριότητας σχετίζονται με γρήγορα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Έρευνες στο παρελθόν έχουν δείξει ότι η PAP μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιολογικός δείκτης σε ασθενείς με χρόνια λευχαιμία. (Pangalis G. A. et al. 1985, Sasaki et al., 1990).

Πρώιμες μελέτες αποδίδουν τα αυξημένα επίπεδα της δραστηριότητας της PAP στην νεοπλασία στην φωσφορυλίωση. Μεταξύ των διαφόρων μορφών της PAP που χαρακτηρίζονται από ποικίλους βαθμούς φωσφορυλίωσης οι φωσφορυλιωμένες μορφές έχουν μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα. Έχει δειχθεί ότι η PAP μπορεί να φωσφορυλιωθεί *in vivo* και *in vitro* από το p34(cdc2)/cyclin B, τον παράγοντα δηλαδή προώθησης της μίτωσης.

Μελέτες για την προγνωστική αξία της PAP έγιναν και για τον καρκίνο του μαστού. Τα επίπεδα της δραστηριότητας της PAP στον καρκίνο του μαστού μπορεί να είναι μία παράμετρος που σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό και την δραστηριότητα μεταγραφής του καρκινικού κυττάρου. Υψηλά επίπεδα δραστηριότητας της PAP μπορεί να είναι αποτέλεσμα απορρύθμισης της έκφρασης της πρωτεΐνης, γεγονός που πιθανόν

να συμβάλλει στον κακοήθη φαινότυπο του κυττάρου ενώ χαρακτηρίζουν κυρίως έναν περισσότερο επιθετικό τύπο καρκίνου. Για τους λόγους αυτούς, η PAP έχει δειχθεί πως είναι ένας καινούργιος ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης (Scorilas et al., Cancer Res. 2000).

## **Ριβονουκλεάσες και καρκίνος**

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομαλής λειτουργίας των κυττάρων και δεν είναι τυχαίο που ανωμαλίες αυτής σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου. Ιδιαίτερη σημασία έχει ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης στο πεδίο της αποικοδόμησης του mRNA. Οι διαδικασίες που αναφέρονται στην σταθερότητα του mRNA, στην μεταγραφική καταστολή και στην αποικοδόμηση μεταγράφων συνδέονται πολύπλοκα μεταξύ τους και μπορούν να επηρεαστούν από διάφορα cis-acting στοιχεία όπως η πολυ(A) ουρά, τα στοιχεία ARES (αλληλουχίες πλούσιες σε AU) και από trans-acting παράγοντες όπως τα non-coding RNAs (ncRNAs), οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το RNA (*RNA Binding proteins, RBPs*) και οι ριβονουκλεάσες. (Wan-Cheol Kim, et al., 2009)

Τα ncRNAs (μη κωδικοποιητικά) είναι μετάγραφα οποιουδήποτε μεγέθους που δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ncRNAs αποτελούν τα miRNAs (20-25 νουκλεοτίδια) που παράγονται από ενδονουκλεολυτική επεξεργασία με τον μηχανισμό της παρεμβολής του RNA και συνδέονται στο mRNA στόχο είτε για να αναστείλουν την μετάφρασή του είτε για να γίνει η έναρξη της αποικοδόμησής του. Σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής του mRNA έχουν και οι πρωτεΐνες που συνδέονται με αυτό (*RNA Binding proteins, RBPs*) οι οποίες έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν το ρυθμό αποσύνθεσής του σε ανταπόκριση σε διάφορα ερεθίσματα.

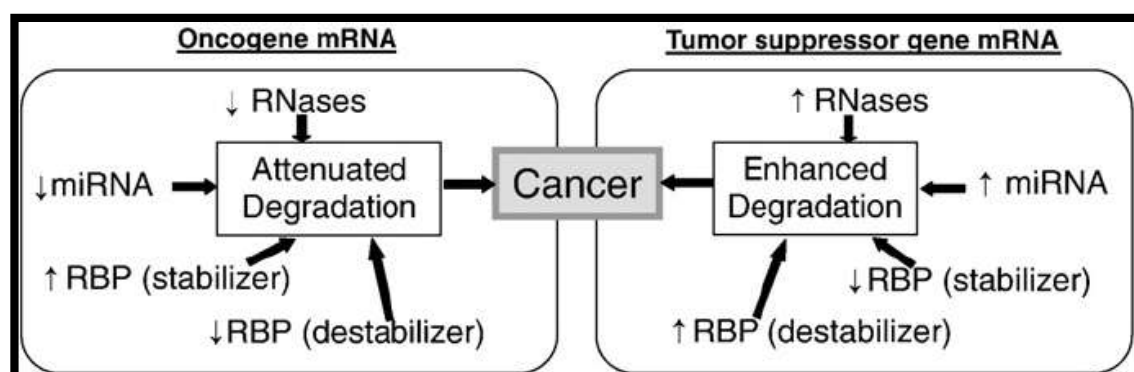
Πολλές μελέτες όμως πραγματοποιήθηκαν με στόχο τη διερεύνηση συνδέσμου μεταξύ καρκινογένεσης και δυσλειτουργικών trans-acting παραγόντων στον μεταβολισμό του mRNA. Πράγματι, έδειξαν ότι οι ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στην καρκινογένεση και έχουν σημαντική επίδραση στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Οι ριβονουκλεάσες μπορούν να δράσουν ως ογκοπρωτεΐνες ή καταστολείς όγκων δίνοντας μία άλλη στροφή στην ρύθμιση της αφθονίας του mRNA και στους ρυθμούς μετάφρασης. (Kim Wan-Cheol et al., 2009)

Διάφορες ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στο στάδιο αποαδενυλίωσης του mRNA. Εξωριβονουκλεάσες κόβουν τα 3', 5' άκρα των mRNA μετά την αφαίρεση

καλύπτρας και πολυ(A) ουράς ενώ ενδοριβονουκλεάσες κόβουν εσωτερικά το mRNA και παράγουν προϊόντα που έπειτα αποικοδομούνται από τις εξωριβονουκλεάσες. Απουσία ρυθμιστικών μηχανισμών οι ενδοριβονουκλεάσες έχουν μία προφανή επίδραση στην γονιδιακή έκφραση αφού μία και μόνο ενδονουκλεολυτική κοπή οδηγεί στην αδρανοποίηση του mRNA. Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα έχουν μηχανισμούς ρύθμισης των ενδοριβονουκλεασών αυτών και κατά συνέπεια αποτροπής μίας τέτοιας ανώμαλης αποικοδόμησης του mRNA.

**Πίνακας 1 :** Κατάταξη ριβονουκλεασών

<b>ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ</b>	
<b>ΕΝΔΟΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ</b>	<b>ΕΞΩΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ</b>
RNase A	Polynucleotide Phosphorylase (PNPase)
RNase H	RNase PH
RNase I	RNase II
RNase III	RNase R
RNase L	RNase D
RNase P	RNase T
RNase PhyM	Oligoribonuclease
RNase T1	Exoribonuclease I
RNase T2	Exoribonuclease II
RNase U2	-
RNase U1	-
RNase U	-



**Εικόνα 5 :** Μετα-μεταγραφικός έλεγχος στον καρκίνο



Η μειωμένη αποικοδόμηση ογκογόνων mRNA μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου. Στην Εικόνα 5 φαίνεται πως η μείωση στην δραστικότητα των ριβονουκλεασών και των miRNA που αναστέλλουν την μετάφραση ογκογόνων mRNA οδηγούν σε μειωμένη αποικοδόμησή τους. Παρόμοιες επιδράσεις έχουν η αυξημένη δραστικότητα των σταθεροποιητικών πρωτεϊνών που συνδέονται με το mRNA ή η μειωμένη δραστικότητα των αποσταθεροποιητικών RBP.

Όμως και αυξημένη αποικοδόμηση των ογκοκατασταλτικών mRNA μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου σε περίπτωση που έχουμε αυξημένη δραστικότητα ριβονουκλεασών ή miRNA που αναστέλλουν την μετάφρασή τους. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το mRNA όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα .

Οι ριβονουκλεάσες έχουν δείξει ότι ελέγχουν τα επίπεδα των mRNA αλληλεπιδρώντας με τις πρωτεΐνες που συνδέονται με το RNA. Η PARN είναι ένα τέτοιο παράδειγμα ριβονουκλεάσης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπου δεν οδηγεί σε αυξημένη αποαδενυλίωση και αποικοδόμηση ογκοκατασταλτικών mRNA, η αποαδενυλιωτική δραστικότητα της PARN συνδυαζόμενη με αποσταθεροποιητικές δράσεις των πρωτεϊνών που συνδέονται με το mRNA μπορεί να δράσει ως καταστολέας όγκου προκαλώντας αποικοδόμηση των mRNAs που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες. Για το λόγο αυτό μελέτες σε καρκινικά κύτταρα έχουν δείξει μειωμένη έκφραση της.

### **EDN, η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη**

Τα κοκκία των ηωσινόφιλων κυττάρων του ανθρώπου περιλαμβάνουν δυο βασικές πρωτεΐνες, οι οποίες ονομάζονται ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP) και ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN). Και οι δυο αυτές πρωτεΐνες ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια των ριβονουκλεασών. Έχουν νευροτοξική ικανότητα και προκαλούν το «φαινόμενο του Gordon» στα κουνέλια, το οποίο χαρακτηρίζεται από δυσκαμψία, αταξία, παράλυση, καταστροφή των ινών του Purkinje και εκφυλισμό της παρεγκεφαλίδας. Ειδικότερα, η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη, με την οποία και θα ασχοληθούμε και στην παρούσα εργασία, εμφανίζει κυτταροτοξικότητα ενάντια σε έλμινθες, σε RNA μονόκλωνους ιούς και σε αναπνευστικά επιθηλιακά κύτταρα, γεγονότα που υποδηλώνουν ότι το ένζυμο συμμετέχει στον αμυντικό μηχανισμό του ανθρώπου, έχοντας ίσως αρνητικές επιδράσεις. (Leonidas DD et al.,2001, Leonidas DD

et.al 1999). Για το λόγο αυτό, είναι σημαντική η μελέτη της δράσης της ριβονουκλεάσης αυτής και η εύρεση αναστολέων της.

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Μελέτες από το εργαστήριο για τη ρύθμιση της ενεργότητας της PARN, έχουν δείξει πως συνθετικά ανάλογα νουκλεοσιδίων με τροποποιημένα σάκχαρα και βάσεις, δρουν ως αναστολείς της.

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι να επεκτείνει τις προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου και να ελέγξει νέα ανάλογα με πιθανή ανασταλτική δράση. Επίσης, να συμβάλλει στην αποκάλυψη των μηχανισμών δράσης συνθετικών αναλόγων των νουκλεοτιδίων με σκοπό τη ρύθμιση της δράσης των ριβονουκλεασών και κατ' επέκταση την παρέμβαση στο χρόνο ζωής των mRNAs. Οι ενώσεις αυτές θα εξεταστούν για το αν μπορούν να λειτουργήσουν ως πλατφόρμα για σύνθεση αποτελεσματικότερων ενώσεων ρύθμισης της δράσης ριβονουκλεασών με επιπτώσεις στην επιβίωση των κυττάρων.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### ΥΛΙΚΑ

#### Χημικά

Acrylamide	SIGMA
Agar	CHEMBIOTIN
Ammonium Persulfate (APS)	SIGMA
Ampicillin	SIGMA
Bis-acrylamide	SIGMA
Boric acid	SIGMA
Coomasie Brilliant Blue	Fluka
Chloroform (CHCl <sub>3</sub> )	MERCK
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Research Organics
Dithiothreitol (DTT)	SERVA
EDTA	Panreac
Glycogen	SIGMA
HCl	Merck
HEPES	SERVA
Isopropyl ThioGalactosyl (IPTG)	Fermentas
KCl	Merck
LB Agar	Scharlau
LB Broth	Scharlau
LiCl	SIGMA
Maleic acid	SIGMA
Methylene blue	SIGMA
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	Panreac

MOPS	Alfa Aesar
NaCl	Panreac
NaHCO <sub>3</sub>	Merck
NaOH	Merck
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	SERVA
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	SIGMA
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)	Research Organics
Tris base	Merck
Triton X	Merck
Urea	Riedel de Haen
Αγαρόζη (Agarose)	SeaKem
Αιθανόλη	Panreac
B-μερκαπτοαιθανόλη	Riedel de Haen
Βρωμιούχο αιθίδιο	Merck
Γλυκερόλη (glucerosol)	Panreac
Ισοπροπανόλη (Isopropanole)	Scharlau
Λυσοζύμη	FLUKA
Οξικό οξύ	Merck

- **Βακτηριακά στελέχη**

BL21 (DE3) pUBS E.coli B, F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub>+m<sub>B</sub>+) gal λ(DE3)

- **Θρεπτικά υλικά**

LB Broth Scharlau

- **Πρωτεΐνες και ένζυμα**

PARN 74 kDa Από E.coli BL21

DNase TAKARA

RNase inhibitor Invitrogen

EcoRI	New England Biolabs
NsiI	SIGMA
T3 πολυμεράση	SIGMA
Πρωτεΐνωση Κ	SIGMA

Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη, EDN, παραχωρήθηκε από τον καθηγητή Δημήτριο Λεωνίδα.

- **Νουκλεοσίδια και συνθετικά νουκλεοσίδια**

Πολυαδενυλικό οξύ	SIGMA
Πολυουρακυλικό οξύ	SIGMA
Roche DIG labeling mix	SIGMA

Τα συνθετικά νουκλεοσίδια 10KCOO1, 10KCOO2, 10KCOO5 και 10KCOO6 παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του καθηγητή Δημητρίου Κομιώτη.

- **Πλασμίδια**

pBS (+/-) phagemid Ο πλασμιδιακός φορέας παραχωρήθηκε από τον καθηγητή Anders Virtanen (Uppsala University, Ουψάλα, Σουηδία).

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

- **Υλικά χρωματογραφίας**

Ni <sup>2+</sup> -NTA Agarose	QIAGEN
-------------------------------	--------

- **Υλικά διαπίδυσης**

Μεμβράνη διαπίδυσης	SIGMA
---------------------	-------

### Διαλύματα

- **Θρεπτικά υλικά**

Υγρό θρεπτικό μέσο (LB Broth)

- **Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης**

- TAE (1X TAE: 40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)

- Red gel. Διατηρείται στους -20 °C. Προστίθεται 1μl/10000μl.
- DNA Loading Buffer 6X (0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου, 30% γλυκερόλη)

- **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 την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου**

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

Διαλύματα stock για πηκτή 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/bis-ακρυλαμίδιο : 29/1) σε ddH<sub>2</sub>O

- **Διαλύματα για την πηκτή 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 τη χρώση της πηκτής ακρυλαμιδίου (πρωτεϊνών)**

- 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 ηλεκτροφόρηση RNA σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου**

-Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση RNA σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (TBE 10x): Tris 107,81 g/L, EDTA 7,44 g/L, Boric acid 55,03 g/L και DEPC

Για πηκτή ακρυλαμιδίου: Acrylamide solution 12% - 8M Urea

-Ακρυλαμίδιο 40% v/w (Acrylamide/ Bis-acrylamide: 38/2) σε DEPC H<sub>2</sub>O

-Urea (ώστε τελική συγκέντρωση 8M)

-TBE 10X (ώστε τελική συγκέντρωση 1X).

Το διάλυμα θερμαίνεται στους 60 °C μέχρι να γίνει διαυγές και φυλάσσεται σε σκοτάδι.

Προσθέτουμε στο τέλος τους καταλύτες APS 20% και TEMED

RNA loading buffer: 90% formamide, 0,05% Bromophenol blue, 0,05% Xylene cyanol και DEPC H<sub>2</sub>O.

- **Διαλύματα για ανίχνευση RNA σε μεμβράνη PVDF**

-Διάλυμα έκπλυσης (Washing buffer): Maleic acid 0,1M, NaCl 0,15M, Tween 20 0,3% v/v ρύθμιση pH 7,5 με NaOH

- Blocking buffer: Maleic acid buffer (Maleic acid 0,1M, NaCl 0,15M, pH 7,5) + Blocking solution (1gr για 100ml Maleic acid buffer)

-Antibody Buffer: 4μl Antibody solution σε 20ml Blocking buffer

- Διάλυμα ανίχνευσης (Detection buffer): Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1M pH 9,5

- **Διαλύματα για τη μέτρηση της ενεργότητας της PARN**

-Νερό ελεύθερο νουκλεασών (0,05% DEPC, O/N και αποστείρωση, αποθήκευση στο σκοτάδι)

-Διάλυμα αντίδρασης (2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM HEPES-KOH, 0,5mM DTT, 10% γλυκερόλη)

-Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου (0,0012% κυανό του μεθυλενίου, 0,1M MOPS-KOH)

-Διάλυμα πολυ(A) 0,7mg/ml. Διάλυμα αποθήκευσης πολυ(A) (10mg/ml) αραιώνεται κατάλληλα σε διάλυμα αντίδρασης



## ΜΕΘΟΔΟΙ

### Έκφραση και απομόνωση ανασυνδυσμένης PARN74 kDa

#### Μετασχηματισμός BL21 με pET33 PARN 74

Σε 20ml LB Broth με καναμυκίνη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml, ενοφθαλμίζεται μια αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων BL21 και επωάζονται για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210rpm). Ακολουθεί μεταφορά των 20ml της ο/η καλλιέργειας σε 2l φρέσκου θρεπτικού μέσου LB Broth με καναμυκίνη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm ( $OD_{600}$ ) και επώαση των καλλιεργειών στους 37°C υπό ανάδευση μέχρι το  $OD_{600}$  να φτάσει περίπου το 0,6 που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Προσθέτουμε IPTG (*Isopropyl Thio Galactosyl, 1M*) σε τελική συγκέντρωση 1mM, το οποίο επάγει την έκφραση της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης. Οι καλλιέργειες επωάζονται υπό ανάδευση για 4 ώρες στους 37°. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4.000rpm για 30min στους 4°C, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αποθηκεύεται στους -80°C.

### Απομόνωση της PARN

#### Ομογενοποίηση των κυττάρων

Το καταψυγμένο ίζημα των κυττάρων διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης (περίπου 10mL). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διαδικασία του σπασίματος των κυττάρων με υπέρηχους (*sonicator*) μέσα σε πάγο. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 12.000rpm, για 60min στους 4°C. Διαχωρίζεται το υπερκείμενο από το ίζημα και ακολουθεί η διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης η οποία βρίσκεται στο υπερκείμενο.

#### Χρωματογραφία συγγένειας

Το υπερκείμενο αναμιγνύεται με ρητίνη νικελίου αγαρόζης (*NTA-Ni agarose*), η οποία έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης και αναδεύεται ήπια για 30min στους 4°C. Η πρωτεΐνη δεσμεύεται στην ρητίνη μέσω σύνδεσης των ιστιδινών που περιέχει στο αμινοτελικό άκρο με τα άτομα του νικελίου. Το διάλυμα εκχυλίζεται προσεκτικά από στήλη η οποία κατακρατεί την ρητίνη. Η στήλη ξεπλένεται με 10ml ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (*wash buffer*). Η έκλυση της πρωτεΐνης έγινε με 6ml ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης (*elution buffer*) το οποίο περιέχει ιμιδαζόλιο σε συγκέντρωση 150mM. Ο ρόλος του ιμιδαζολίου είναι να δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα ιόντα νικελίου και να ανταγωνίζεται για δέσμευση με τις πρωτεΐνες

συνδεδεμένες με ιστιδίνη (*His-tagged*). Συλλέγονται πέντε κλάσματα από τη στήλη (E1-E4). Από κάθε βήμα της απομόνωσης κρατάμε δείγματα για μέτρηση ολικής πρωτεΐνης και ηλεκτροφόρηση.

### **Μέτρηση συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford**

Σε σωλήνες erpendorf προστίθενται τα παρακάτω:

#### **Πίνακας 2.**

	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Δείγμα</b>	<b>Χρωστική</b>
<b>FT</b>	2μl	18μl	1 ml
<b>W1</b>	-	20μl	1 ml
<b>W2</b>	-	20μl	1 ml
<b>W3</b>	-	20μl	1 ml
<b>E1</b>	-	20μl	1 ml
<b>E2</b>	-	20μl	1 ml
<b>E3</b>	-	20μl	1 ml
<b>E4</b>	-	20μl	1 ml

Επωάζουμε για 15 λεπτά και φωτομετρούμε σε οπτική απορρόφηση 595nm (OD<sub>595</sub>). Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης με βάση την πρότυπη καμπύλη.

### **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 erpendorf και τα θερμαίνουμε για 5' στους 95°C

#### Προετοιμασία πηκτής

Στήνουμε την συσκευή. Στα 7 ml Running buffer 50μl APS 10% και 5μl TEMED, αναδεύουμε και εκχύνουμε με πιπέτα ανάμεσα στα δύο τζάμια μέχρι τα ~3/5 του ύψους. Για να οριζοντιοποιηθεί η πηκτή και να σπάσουν οι φουσκάλες εκχύνουμε με πιπέτα ανάμεσα στα δύο τζάμια ισοπροπανόλη.

Αφού πήξει, στα 3,5 ml Staking buffer προσθέτω 25μl APS 10% και 5μl TEMED. Εκχύνουμε με πιπέτα ανάμεσα στα δύο τζάμια μέχρι 2-3 χιλιοστά από πάνω

και τοποθετούμε το χτενάκι για να σχηματιστούν τα βοθρία στα οποία θα τοποθετήσουμε τα δείγματα εφόσον πήξει η πηκτή.

#### Φόρτωση και ηλεκτροφόρηση δειγμάτων στην πηκτή

Υπολογίζουμε πόση ποσότητα από το κάθε δείγμα θα φορτώσουμε στην πηκτή για να έχουμε στο κάθε βοθρίο περίπου 30μg συνολικής πρωτεΐνης, ρυθμίζουμε το τροφοδοτικό στα 110V μέχρι η μπλε γραμμή φτάσει στο running buffer και ανεβάζουμε τα volt στα 200V μέχρι η γραμμή να φτάσει στο τέρμα της πηκτής.

#### Χρώση πηκτής

Μετά το πέρας της ημεκτροφόρησης, τοποθετούμε την πηκτή σε ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε οξικό οξύ 10%. Βράζουμε στο φούρνο μικροκυμάτων και τοποθετούμε την πηκτή σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει Staining buffer. Βράζουμε και πάλι στο φούρνο μικροκυμάτων και αφήνουμε για ανάδευση για πέντε λεπτά. Ξεπλένουμε την πηκτή με λίγο απιονισμένο νερό και την τοποθετούμε στο ποτήρι ζέσεως με το οξικό οξύ. Βράζουμε στο φούρνο μικροκυμάτων. Τέλος, τοποθετούμε την πηκτή σε ένα πλαστικό δοχείο με οξικό οξύ και την αφήνουμε για ανάδευση ώσπου να ξεβάψει καλά.

#### Διαπίδυση

Αφού κόψουμε ένα κομμάτι (~10cm) μεμβράνης διαπίδυσης, τη βράζουμε σε υψηλή θερμοκρασία σε 2% w/v NaHCO<sub>3</sub> για 25 λεπτά και ξεπλένουμε με απιονισμένο νερό. Σφραγίζουμε τη μεμβράνη από τη μία πλευρά με ένα πιαστράκι και με πιπέτα μεταφέρουμε το κλάσμα ή τα κλάσματα, στα οποία είδαμε από την πηκτή ότι υπάρχει το υπό μελέτη ένζυμο. Σφραγίζουμε τη μεμβράνη και από την άλλη πλευρά κατά τον ίδιο τρόπο. Τοποθετούμε τη μεμβράνη σε ποτήρι ζέσεως το οποίο περιέχει 900ml διαλύματος διαπίδυσης με pH=7.0. Τοποθετούμε το ποτήρι ζέσεως, στο οποίο έχουμε προσθέσει και ένα μαγνήτη, σε συσκευή μαγνητικής ανάδευσης έτσι ώστε να αναδεύεται το διάλυμα απαλά στους 4°C για όλο το βράδυ. Την επόμενη ημέρα αφαιρούμε προσεκτικά το περιεχόμενο της μεμβράνης και, αφού πραγματοποιήσουμε μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford, το μοιράζουμε σε μικροσωλήνες φυγοκέντρωσης (eppendorf tubes 1.5 ml).

## Μέτρηση της ενεργότητας της PARN με κυανό του μεθυλενίου

Η μέθοδος στηρίζεται στη αύξηση της απορρόφησης του πολυ(A) στα 662nm όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του (Cheng et al., 2006, Greiner-Stoeffele et al., 1996). 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). Παρουσία ενός ενζύμου που υδρολύει το πολυ(A), το μήκος του τελευταίου μικραίνει, με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται μόρια κυανού του μεθυλενίου και να αυξάνει ο ρυθμός μεταβολής της απορρόφησης (ΔA). Επίσης, έχουμε εξετάσει ένα εύρος συγκεντρώσεων υποστρώματος, ώστε να ελεγχθεί και να καθοριστεί η περιοχή της γραμμικής απόκρισης της μεταβολής της ΔA.

### Κατασκευή πρότυπης καμπύλης πολυ(A)

Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης προετοιμάζονται σύμφωνα με τον **Πίνακα 3**. 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 υπολογίσουμε την ποσότητα του πολυ(A) που αποικοδομείται-υδρολύεται κατά την ενζυμική αντίδραση.

### **Πίνακας 3.**

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

### Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε pH 7 και σε θερμοκρασία 30°C. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σύμφωνα με τον **Πίνακα 4**:

**Πίνακας 4.**

	<b>P</b>	<b>T (τυφλό)</b>
<b>Διάλυμα αντίδρασης</b>	87,6μl	89μl
<b>RNasin</b>	1μl	1μl
<b>Υπόστρωμα (S)</b>	10μl	10μl
<b>Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου</b>	900μl	900μl
<b>Ένζυμο (E)</b>	1,1μl	-

Το υπόστρωμα, δηλαδή το πολυ(A), έχει συγκέντρωση ίση με 0,7mgr/ml και το ένζυμο ίση με 0,93mgr/ml. Προσθέτουμε όλα τα αντιδραστήρια εκτός του κυανού του μεθυλενίου. Επωάζουμε για 10 λεπτά σε 30°C. Μετά το πέρας του χρόνου αντίδρασης, δηλαδή των 10 λεπτών, προσθέτουμε το κυανό του μεθυλενίου και επωάζουμε για 15 λεπτά σε 30°C στο σκοτάδι. Φωτομετρούμε τα δείγματα στα 662nm και λαμβάνονται τιμές σε χρόνο 0, 1, 3, 5, 10, 15 λεπτών.

Αφού βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες, κατασκευάζουμε τη χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης χρησιμοποιώντας τις τιμές που πήραμε.

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

Κατασκευάζουμε την καμπύλη Michaelis-Menten πραγματοποιώντας αντιδράσεις σε pH=7,0 και θερμοκρασία 30°C, υπολογίζοντας τη διαφορά απορρόφησης ( $\Delta A$ ). Τα δείγματα προετοιμάζονται σύμφωνα με τον **Πίνακα 5**:

**Πίνακας 5.**

	<b>T1</b>	<b><math>\Delta 1</math></b>	<b>T2</b>	<b><math>\Delta 2</math></b>	<b>T3</b>	<b><math>\Delta 3</math></b>
<b>Διάλυμα αντίδρασης</b>	89μl	84,2μl	91,8μl	87,06μl	94,7 μl	89,9μl
<b>RNasin</b>	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl
<b>Υπόστρωμα (S)</b>	10μl	10μl	7,14μl	7,14μl	4,3μl	4,3μl
<b>Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου</b>	900μl	900μl	900μl	900μl	900μl	900μl
<b>Ένζυμο (E)</b>	-	4,8μl	-	4,8μl	-	4,8μl

Τα δείγματα Δ1-Δ3 αντιστοιχούν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πολυ(A):

Δ1= 7μgr/ml

Δ2= 5μgr/ml

Δ3= 3μgr/ml

Τα T1,T2,T3 είναι το τυφλό με το οποίο μηδενίζουμε το φωτόμετρο.

Μετά το πέρας του χρόνου αντίδρασης, δηλαδή των 10 λεπτών, προσθέτουμε το κυανό του μεθυλενίου και επωάζουμε για 15 λεπτά σε σκοτάδι. Φωτομετρούμε τα δείγματα στα 662nm και λαμβάνονται τιμές σε χρόνο 0, 1, 3, 5, 10, 15 λεπτών.

### **Μετασηματισμός των βακτηριακών κυττάρων *E.coli***

Σε σωλήνα erpendorf που περιέχει 80μl δεκτικά κύτταρα του στελέχους μεταφέρονται 2μl pBS (+/-) phagemid. Το δείγμα παραμένει στον πάγο για 30 λεπτά. Υποβάλλουμε τα κύτταρα σε θερμική καταπόνηση (42°C) για 1 λεπτό και τα αφήνουμε στον πάγο για 2 λεπτά, προκειμένου να διευκολυνθεί η εισαγωγή του πλασμιδίου. Προστίθενται 200μl υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και τοποθετούνται σε κλίβανο στους 37°C για 45 λεπτά. Προσθέτουμε στα κύτταρα 10μl 0,1M IPTG και 50μl 2% X-Gal. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων. Στην περίπτωση μας, αμπικιλίνη. Μετά, γίνεται επώαση των τρυβλίων για όλο το βράδυ στους 37°C. Η φύλαξη των τρυβλίων γίνεται στο ψυγείο στους 4°C. Οι αποικίες που φέρουν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εμφανίζονται μπλε, λόγω της δράσης της β-γαλακτοσιδάσης. Αντίθετα, οι αποικίες που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εμφανίζονται λευκές. Σε 5ml LB Broth με αμπικιλίνη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml, ενοφθαλμίζεται μια αποικία μετασηματισμένων κυττάρων *E.coli* και επωάζονται για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210rpm).

### **Απομόνωση πλασμιδιακού DNA**

#### Πρωτόκολλο Miniprep (Macherey nagel-nucleospin plasmid)

Μετά από φυγοκέντρηση 1,5ml υγρής καλλιέργειας, τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 250μl ρυθμιστικό διάλυμα A1 που περιέχει Rnάση A. Προστίθενται 250μl ρυθμιστικό διάλυμα A2 και γίνεται ελαφρά ανακίνηση του φυγοκεντρικού σωλήνα (erpendorf). Προστίθενται επιπλέον 350μl ρυθμιστικό διάλυμα

A3 και αμέσως αναποδογυρίζεται το erpendorf 4-6 φορές. Το ελαιώρημα θολώνει. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα, με αποτέλεσμα να σχηματιστεί ένα λευκό ίζημα. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται με πιπέτα σε στήλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30-60sec και απορρίπτεται το υγρό που έχει διέλθει από το φίλτρο. Η στήλη ξεπλένεται με 0,75ml ρυθμιστικό διάλυμα A4 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30-60sec. Το διερχόμενο από το φίλτρο υγρό απορρίπτεται και επαναφυγοκεντρείται για 1 λεπτό μέχρι να απαλειφθεί το υπολειπόμενο διάλυμα ξεπλύματος. Εάν παραμείνει αιθανόλη από το διάλυμα A4 ίσως παρεμποδιστούν περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό φυγοκεντρικό σωλήνα 1,5ml. Προκειμένου να ληφθεί το DNA, προστίθεται διάλυμα 50μl AE (10mM Tris-HCl, pH=8,5) ή νερό. Το διάλυμα έκλουσης αφήνεται για 1 λεπτό και, τέλος, φυγοκεντρείται για 1 λεπτό, οπότε και λαμβάνεται το καθαρό πλασμιδιακό DNA.

### **Πέψη του πλασμιδιακού DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού**

Πραγματοποιούμε πέψη με το ένζυμο περιορισμού NsiI και EcoRI αντίστοιχα. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 50μl και περιλαμβάνει τα παρακάτω συστατικά:

-5μl 3-NEB buffer 10X

-0,5μl BSA

-2μl NsiI ή EcoRI

-7μl DNA

-36μl ddH<sub>2</sub>O

Το δείγμα επωάζεται για 3 ώρες στους 37°C

### **Ηλεκτροφόρηση δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης**

Στόχος μας είναι ο έλεγχος της πέψης του πλασμιδιακού DNA συγκρίνοντας κομμένο και άκοπο DNA. Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται, με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Αν πρέπει να διαχωριστούν γραμμικά δίκλινα μόρια, η σχέση που συνδέει την κινητικότητα των μορίων με το μέγεθός τους είναι ημιλογαριθμική. Η κινητικότητα μη γραμμικών

μορίων εντός του ηλεκτρικού πεδίου της πηκτής δεν είναι άμεση συνάρτηση του μεγέθους τους, αλλά εξαρτάται και από τη διαμόρφωσή τους στο χώρο. Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτική αγαρόζη εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής σε αγαρόζη, για παράδειγμα σε 0,8% συγκέντρωση αγαρόζης μπορούν να διαχωριστούν, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, τμήματα του DNA που κυμαίνονται από 1 έως 12 kb. Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη gel red, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η προετοιμασία της πηκτής των δειγμάτων γίνεται ως εξής :

Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης (συνήθως 1,2-1,5%) προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 1X και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει. Στην λιωμένη αγαρόζη προστίθεται 0,001% v/v διάλυμα gel red και αφήνεται να κρυώσει. Η πηκτική τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Εδώ πρέπει να σημειωθεί πως στην πηκτική βυθίζεται ειδική "χτένα" που δημιουργεί τις υποδοχές των δειγμάτων. Στα δείγματα του DNA που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται 1/10 όγκου διαλύματος χρωστικής DNA Loading Buffer 6X. Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτική απομακρύνεται η "χτένα" και τοποθετείται στο δοχείο ηλεκτροφόρησης, το οποίο συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 1X. Τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5V/cm.

### **Καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA με φαινόλη/ χλωροφόρμιο**

Ο καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο αποσκοπεί στην απομάκρυνση πρωτεϊνών και RNA από το πλασμιδιακό DNA. Αρχικά προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης στην πέψη που έχει προηγηθεί. Παρατηρούμε τη δημιουργία δυο φάσεων. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά σε 13.000 στροφές. Τοποθετούμε την υδατική φάση στην οποία βρίσκεται το DNA σε νέο erppendorf και προσθέτουμε μισό όγκο φαινόλη και μισό όγκο χλωροφόρμιο . Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά σε 13.000 στροφές. Τοποθετούμε την υδατική φάση σε νέο erppendorf και προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφορμίου. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά σε 13.000 στροφές. Στη συνέχεια, τοποθετούμε την υδατική φάση σε νέο erppendorf και προσθέτουμε 2,5 όγκους EtOH 100% και 1/20 όγκου CH<sub>3</sub>COONa pH 5,3 (ώστε να δημιουργηθούν συσσωματώματα με το DNA). Αφήνουμε O/N στους -20 °C και



φυγοκεντρούμε για 20 λεπτά σε 14.000 στροφές σε 4 °C. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο ίζημα EtOH 70%. Φυγοκεντρούμε για 20 λεπτά σε 14.000 στροφές σε 4 °C και αφαιρούμε το υπερκείμενο κι αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει. Επαναδιαλύουμε σε 11 μl dH<sub>2</sub>O.

### ***In vitro* μεταγραφή**

Στόχος είναι η *in vitro* μεταγραφή του DNA που προέκυψε από την πέψη με NsiI με σκοπό τη δημιουργία τμήματος RNA με 30 αδενοσίνες στο άκρο του καθώς και του DNA με πέψη με EcoRI (L3A<sub>30</sub>X<sub>54</sub>) που αποσκοπεί στη δημιουργία τμήματος RNA με αδενοσίνες στο μέσο του . Να σημειωθεί ότι η ουριδίνη που χρησιμοποιείται για τη μεταγραφή είναι σημασμένη με DIG. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20μl και περιλαμβάνει τα παρακάτω συστατικά:

- 10μl πλασμιδιακού DNA
- 2μl Roche DIG labeling mix
- 2μl transcription buffer
- 2μl T3 πολυμεράση
- 3μl Cap 4mM (σε ένα eppendorf)
- 3μl ddH<sub>2</sub>O

Το δείγμα επωάζεται για 2 ώρες στους 37°C.

Σημείωση: Δημιουργούμε δυο RNA από το DNA που έχει κοπεί από το NsiI. Στο ένα προσθέτουμε 5' καλύπτρα ( ●—A m<sup>7</sup>GpppGL3(A30)) καθώς είναι γνωστό ότι ορισμένες αποαδενυλάσες και συγκεκριμένα η PARN δεσμεύει το κάλυμμα στο 5' άκρο του RNA ενώ στο άλλο δεν γίνεται καμία τροποποίηση ( ✕—A L3(A30)).

Προσθέτουμε 2 μl DNase (40 units) και επωάζουμε για 30 λεπτά στους 37°C. Σταματάμε την αντίδραση με 2 μl EDTA 0,2 M pH 8. Κατακρημνίζουμε το RNA με 1,25 μl LiCl 8 M, 1 μl γλυκογόνο και 75 μl αιθανόλη 100%. Αφήνουμε στους -80 °C over night. Την επόμενη μέρα φυγοκεντρούμε για 20 λεπτά σε 14.000 στροφές σε 4 °C. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο ίζημα EtOH 70%, Φυγοκεντρούμε για 20 λεπτά σε 14.000 στροφές σε 4 °C και στη συνέχεια αφαιρούμε το υπερκείμενο κι αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει. Τέλος επαναδιαλύουμε σε 103 μl dH<sub>2</sub>O. Τρέχουμε τα

αποτελέσματα σε gel αγαρόζης 2,5% αποστειρωμένο με RNA Loading Buffer 3X σε 80V.

### **Αντιδράσεις του RNA (in vitro μεταγραφής) με αποαδενυλάσες**

Γνωρίζοντας το μήκος του RNA που δημιουργήσαμε καθώς και την ακριβή αλληλουχία του, στόχος μας είναι να πραγματοποιήσουμε αντιδράσεις με αποαδενυλάσες (PARN και AtESP) και να αποδείξουμε με τον τρόπο αυτό την αποικοδόμηση των αδενοσινών στο άκρο του RNA. Εξετάζουμε τη δράση των αποαδενυλασών σε δυο ή τρεις χρονικές στιγμές: παραδείγματος χάριν 0 και 30 λεπτά. Οι αντιδράσεις έχουν τελικό όγκο 45  $\mu$ l και περιλαμβάνουν τα ακόλουθα συστατικά:

- 10  $\mu$ l RNA
- 34  $\mu$ l Buffer D
- 0,5 RNase inhibitor (40u/ $\mu$ l)
- 4  $\mu$ l PARN (0,16 mg/ml).

Η αντίδραση που χρησιμοποιείται σαν control (χρόνος 0) αντί για PARN περιέχει 38  $\mu$ l Buffer D (20mM HEPES pH 7.0, 100mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM EDTA, 20% glycerol, 0,5mM DTT, DEPC H<sub>2</sub>O)

Μόλις ετοιμάσουμε τα eppendorf με τις αντιδράσεις, προσθέτουμε ένζυμο στην αντίδραση των 30 λεπτών και επωάζουμε στους 30°C. Μετά από 20 λεπτά προσθέτουμε ένζυμο στην αντίδραση των 10 λεπτών, αφήνουμε για 10 λεπτά και σταματάμε ταυτόχρονα όλες τις αντιδράσεις με Stop Buffer.

Stop Buffer (3,5ml): Pre Stop Buffer (3,33 ml), Glycogen (10 $\mu$ l), NaCl 5M (160  $\mu$ l)

Pre Stop Buffer: 20 mM NaCl, 0,02M EDTA, 100mM Tris pH 8, 0,4% SDS, 200 $\mu$ g/ml Proteinase K, DEPC H<sub>2</sub>O.

Πραγματοποιούμε καθαρισμό με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρημνίζουμε το RNA για 30 λεπτά σε -80°C σε 3 όγκους EtOH 100% και NaCl 5M ώστε 200mM. Στη συνέχεια, φυγοκεντρούμε τα δείγματα σε 14 krpm σε 4°C για 30 λεπτά. Αφαιρούμε την αιθανόλη κι αφήνουμε τα ιζήματα να στεγνώσουν. Επαναδιαλύουμε τα ιζήματα σε 10-20  $\mu$ l DEPC H<sub>2</sub>O.

## **Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου**

### Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Σε 10μl από τα δείγματα προσθέτουμε 5μl loading buffer. Τα θερμαίνουμε για 4min στους 95°C.

### Προετοιμασία

Συναρμολογούμε την συσκευή αφού πρώτα την αποστειρώσουμε. Στα 10ml Ακρυλαμιδίου-ουρίας 12% - 8M Urea αφού τα φιλτράρουμε, προσθέτουμε 40μl APS 20% και 10μl TEMED, αναδεύουμε και εκχύνουμε με πιπέτα ανάμεσα στα δύο τζάμια μέχρι 2-3 χιλιοστά από πάνω και τοποθετούμε το χτενάκι για να σχηματιστούν τα βοηθία στα οποία θα τοποθετήσουμε τα δείγματα εφόσον σχηματιστεί η πηκτή. Τοποθετούμε την πηκτή στη συσκευή ηλεκτροφόρησης την οποία έχουμε γεμίσει με TBE 1X (50ml TBE 10X και 450ml dH<sub>2</sub>O) και τρέχουμε την πηκτή χωρίς δείγματα για 20 λεπτά στα 200V για να καθαρίσει η ουρία. Στη συνέχεια, καθαρίζουμε τα βοηθία με σύριγγα για να φύγει η ουρία και φορτώνουμε τα δείγματα. Ηλεκτροφορούμε στα 150V μέχρι να φύγει η δεύτερη χρωστική εντελώς από την πηκτή.

## **Ανίχνευση RNA σε μεμβράνη PVDF**

Το RNA είναι σημασμένο με DIG καθώς κατά τη μεταγραφή η ουριδίνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν σημασμένη με σκοπό την ανίχνευση μέσω αντίδρασης με αλκαλική φωσφατάση. Η μεταφορά του RNA γίνεται σε PVDF μεμβράνη με τη συσκευή Semidry Transfer System στα 400mA για 30 λεπτά 10V. Μόλις τελειώσει η μεταφορά, τοποθετώ τη μεμβράνη για 3 λεπτά σε UV για να μονιμοποιηθεί το RNA στη μεμβράνη. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με 100ml Διάλυμα έκπλυσης για 2 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση σε rollers. Επωάζουμε τη μεμβράνη με 100ml Blocking buffer για 30 λεπτά υπό ανάδευση και έπειτα για 30 λεπτά με το αντίσωμα (20ml Antibody Solution) υπό ανάδευση. Συνεχίζουμε με 2 πλυσίματα με Διάλυμα έκπλυσης για 15 λεπτά το καθένα. Ακολουθεί επώαση για 3 λεπτά με 20ml Διάλυμα ανίχνευσης χωρίς ανάδευση. Για την εμφάνιση, προσθέτουμε 37,5 μl από κάθε υπόστρωμα σε 20ml Διάλυμα ανίχνευσης και επωάζουμε τη μεμβράνη χωρίς ανάδευση σε σκοτεινό μέρος για 25 λεπτά, στο τέλος των οποίων επιβεβαιώνεται η μεταφορά. Η αντίδραση σταματά μετά από 12 ώρες περίπου ξεπλένοντας τη μεμβράνη με dH<sub>2</sub>O.

## **Αντιδράσεις αποαδενυλασών με πολυ(A) και ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή αγαρόζης**

Προκειμένου να αποδείξουμε όχι μόνο φωτομετρικά την αποικοδόμηση πολυ-A από αποαδενυλάσες, σχεδιάζουμε αντιδράσεις πολυ-A με τις PARN και AtESP. Ειδικότερα, εξετάζουμε τη δράση των αποαδενυλασών σε 30 λεπτά ενώ έχουμε και τη χρονική στιγμή 0' ως control. Οι αντιδράσεις έχουν τελικό όγκο 300 μl και περιλαμβάνουν: διάλυμα αντίδρασης pH 7.0 για την PARN και pH 6.5 για την AtESP αντίστοιχα, RNAsin 0,9u/μl, PARN 0,93mg/ml και πολυ(A) 0,7mg/ml. Επώαζουμε για 30 λεπτά σε 30 °C τις αντιδράσεις με PARN και σε 25 °C τις αντίστοιχες με AtESP. Σταματάμε την αντίδραση προσθέτοντας 7,5 μl EDTA 0,5M pH 8.0. Τα δείγματα υποβάλλονται κατακρήμνιση με αιθανόλη (ανάμειξη με 922,5 μl EtOH 100% και 12,3 μl NaCl 5M, επώαση σε -80°C για 30 λεπτά και φυγοκέντρωση 14,5 krpm σε 4°C για 30 λεπτά). Μετά την αφαίρεση της αιθανόλης, αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει. Τα ιζήματα επαναδιαλύονται σε 20μl DEPC H<sub>2</sub>O και αναλύονται σε 1,5% πηκτή αγαρόζης. Ηλεκτροφορούμε στα 110V για 10 λεπτά.

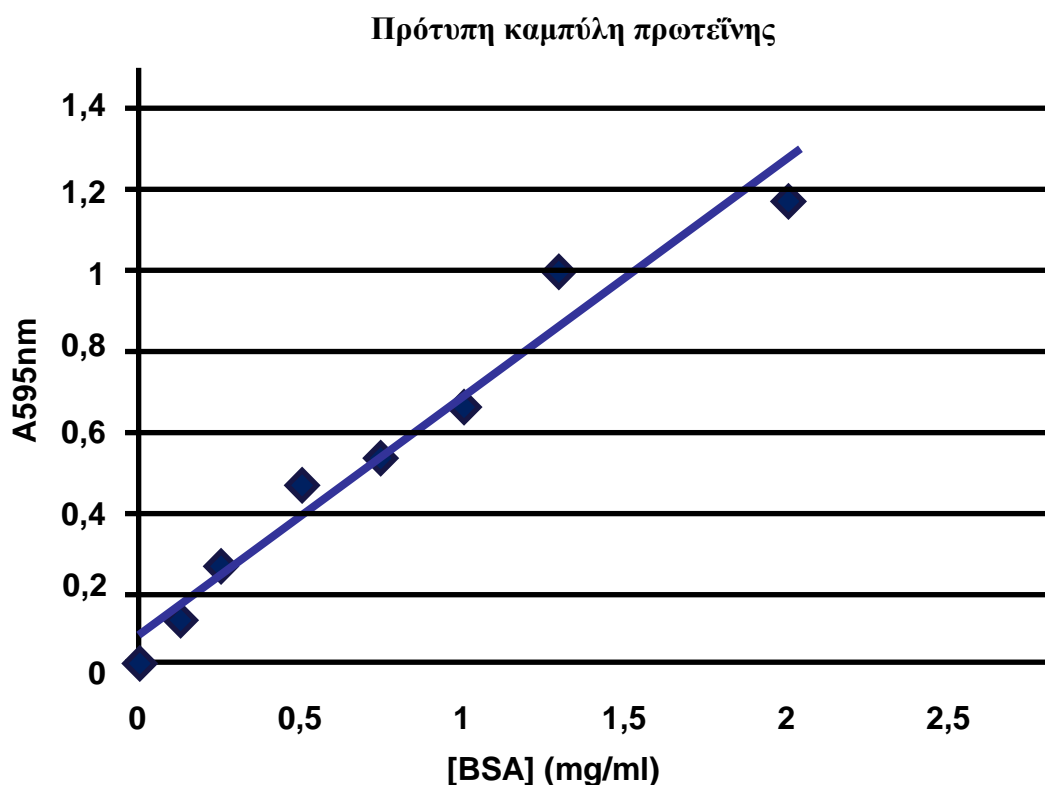
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης

Η πρότυπη καμπύλη έγινε μετρώντας διάφορες αραιώσεις διαλύματος BSA με τη μέθοδο Bradford. Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει η γραμμική σχέση με εξίσωση:

$$A = 0,594x + 0,082$$

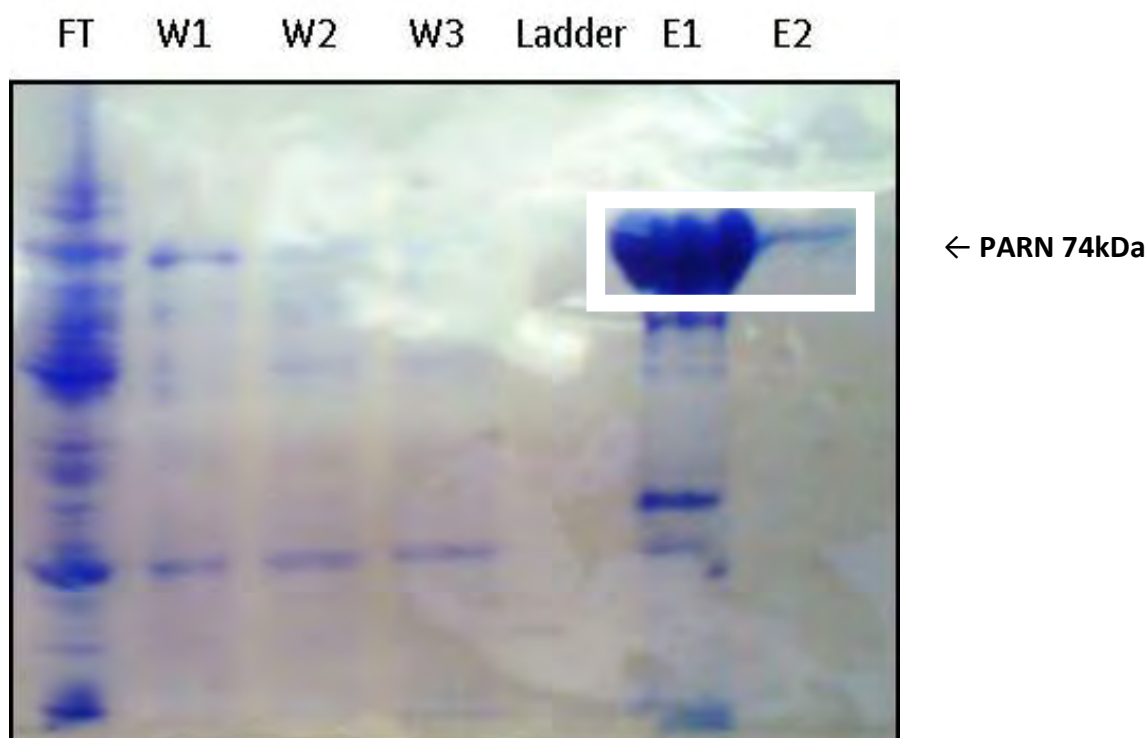
Με την συγκεκριμένη εξίσωση θα υπολογίσουμε την ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών στα δείγματα στα διάφορα στάδια της απομόνωσης.



### Έκφραση και απομόνωση PARN 74

Μετασηματίζουμε κύτταρα E.coli BL21 με πλασμίδιο υπερέκφρασης pET33 PARN 74. Ενοφθαλμίζουμε τα μετασηματισμένα κύτταρα σε καλλιέργεια LB Broth των 20mL (37°C, 210rpm, o/n) και έπειτα μεταφέρουμε την καλλιέργεια σε φρέσκο θρεπτικό 2L. Όταν η απορρόφηση της καλλιέργειας φτάσει  $A_{600}=0,640$  επάγουμε την έκφραση της PARN με χρήση IPTG τελικής συγκέντρωσης 1mM για 4h στους 37°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της καλλιέργειας (4.000rpm, 30min, 4°C) και συλλογή του ιζήματος. Το

ίζημα επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης όπου πραγματοποιείται σπάσιμο των κυττάρων με υπερήχους. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται (12.000rpm, 60min, 4°C) και συλλέγεται το υπερκείμενο για απομόνωση του ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας (*NTA-Ni agarose*). Συλλέγονται 3 κλάσματα έκπλυσης (W1-W3) και 4 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*). Τα δείγματα E1 και E2 μεταφέρθηκαν για διαπίδυση σε διάλυμα αντίδρασης (*o/n*) για την απομάκρυνση του ιμιδαζολίου. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford ήταν 0,93mg/ml. Στην Εικόνα 6 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων της χρωματογραφίας απ' όπου απουσιάζουν τα κλάσματα E3-E5 καθώς δεν ανιχνεύθηκε πρωτεΐνη. Η PARN 74 μοριακού βάρους 74 kDa εντοπίζεται μέσα στο ορθογώνιο σχήμα.



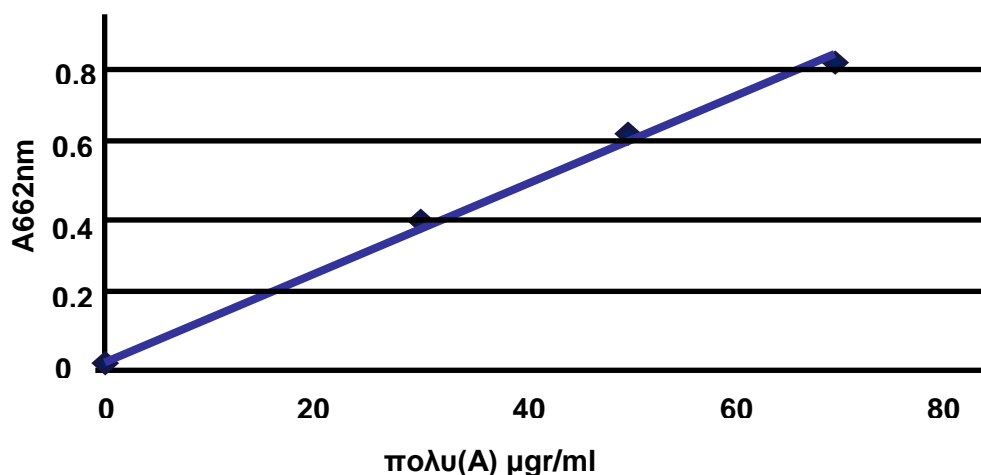
**Εικόνα 6:** 26/11/10 Ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της PARN74. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue. W1, W2,W3: Δείγματα έκπλυσης, E1-E2: Δείγματα έκλουσης από την στήλη. Συγκέντρωση πρωτεΐνης που εντοπίζεται στο E1: 0,93mg/ml

### Πρότυπη καμπύλη πολυ(A)

Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης πολυ(A) κατασκευάζονται σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει η γραμμική σχέση με εξίσωση:

$$A = 0,0117 * C (\mu\text{gr/ml}) + 0,0182$$

Με την παραπάνω εξίσωση μετατρέπουμε τις απορροφήσεις των ενζυμικών αντιδράσεων σε πολυ(A) που αποικοδομήθηκε κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων.

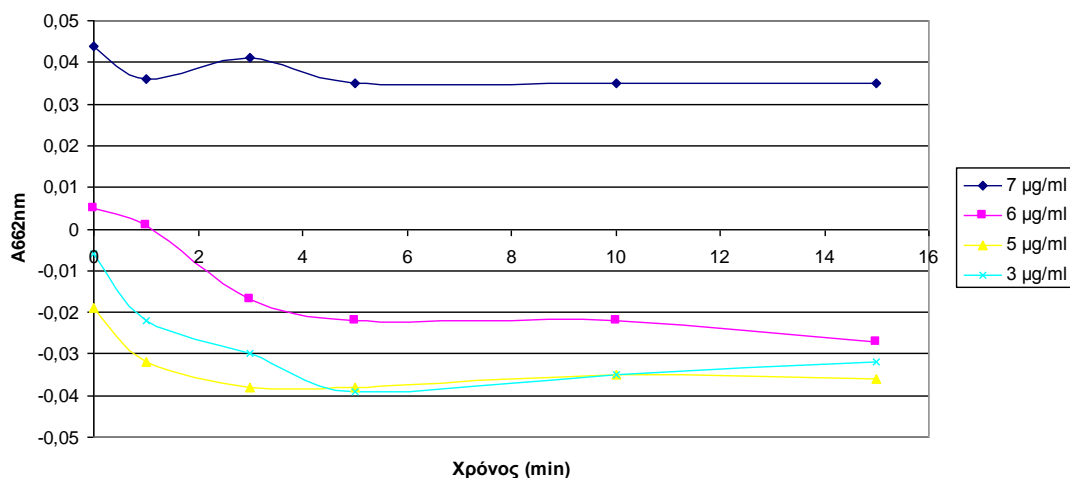


Εικόνα 7: Πρότυπη καμπύλη πολυ(A) με χρήση κυανού του μεθυλενίου.

### Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30°C.

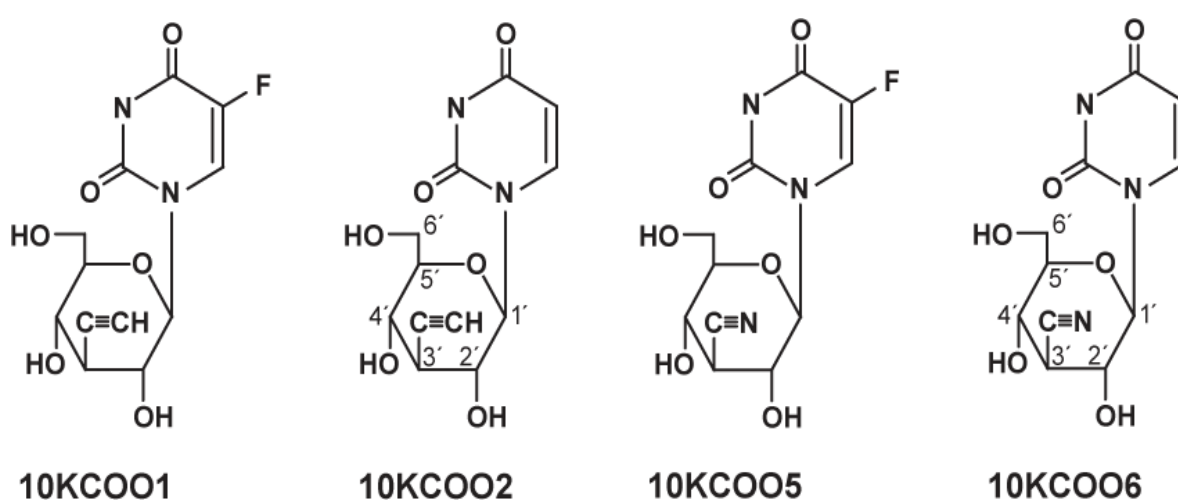
#### Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης



Εικόνα 8: Χρονοκαμπύλη PARN/αντίδραση σε συγκέντρωση πολυ(A) 3,5,6 και 7μgr/ml.

## Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας παρουσία συνθετικών νουκλεοσιδίων

Στο εργαστήριο μας έχει δειχθεί ότι φυσικά νουκλεοτίδια πουρινών (Balatsos et al., J Enzyme Inhib Med Chem. 2009) καθώς και συνθετικά ανάλογα νουκλεοσιδίων με γνωστή αντικαρκινική και αντιϊκή δράση που φέρουν τροποποιήσεις τόσο στο σάκχαρο όσο και στη βάση (Komiotis D. et al.,2007) μπορούν να αναστείλουν την δραστηριότητα της PARN αποτελεσματικά (Balatsos et al., Biochemistry 2009). Στην παρούσα εργασία θα μελετήσουμε την επίδραση συνθετικών νουκλεοσιδίων με τροποποιήσεις είτε στο σάκχαρο ( $C\equiv N$  ή  $C\equiv CH$ ) είτε στη βάση (ουρακίλη ή φθορο-ουρακίλη).



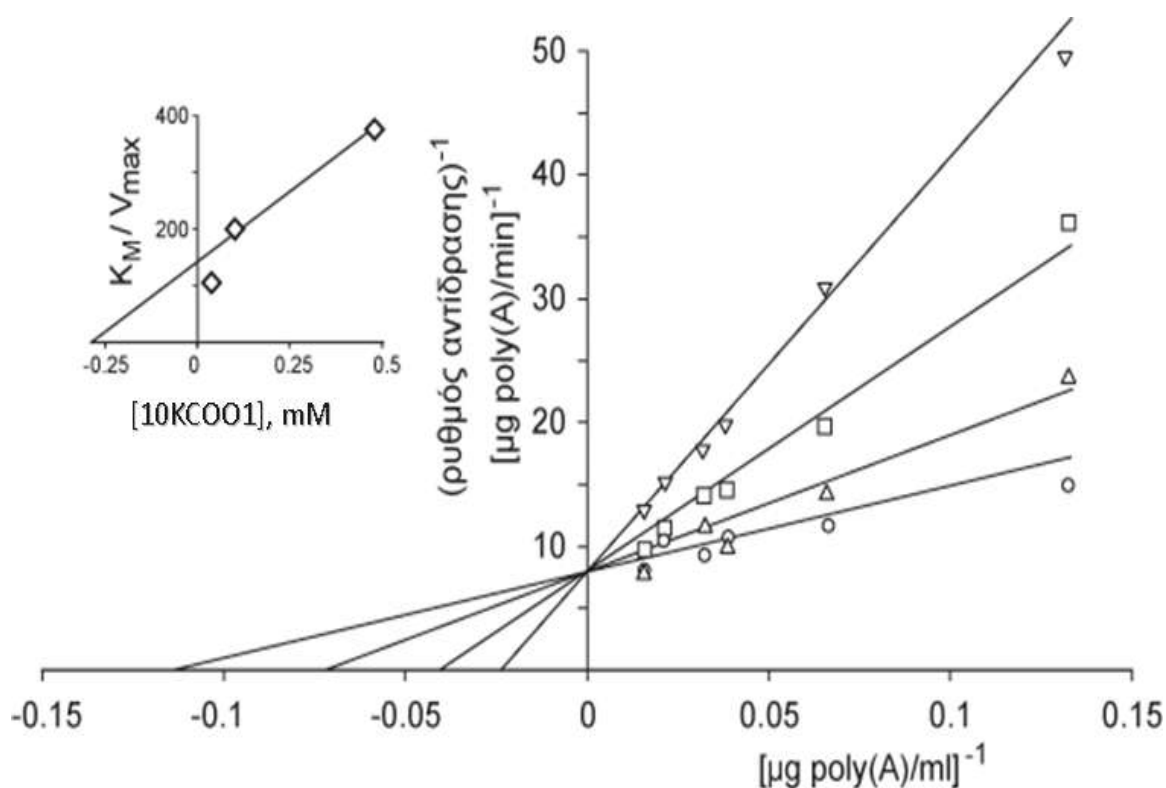
**Εικόνα 9:** Δομές συνθετικών αναλόγων νουκλεοσιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

**Τα συνθετικά νουκλεοσίδια αναστέλλουν την PARN ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής**

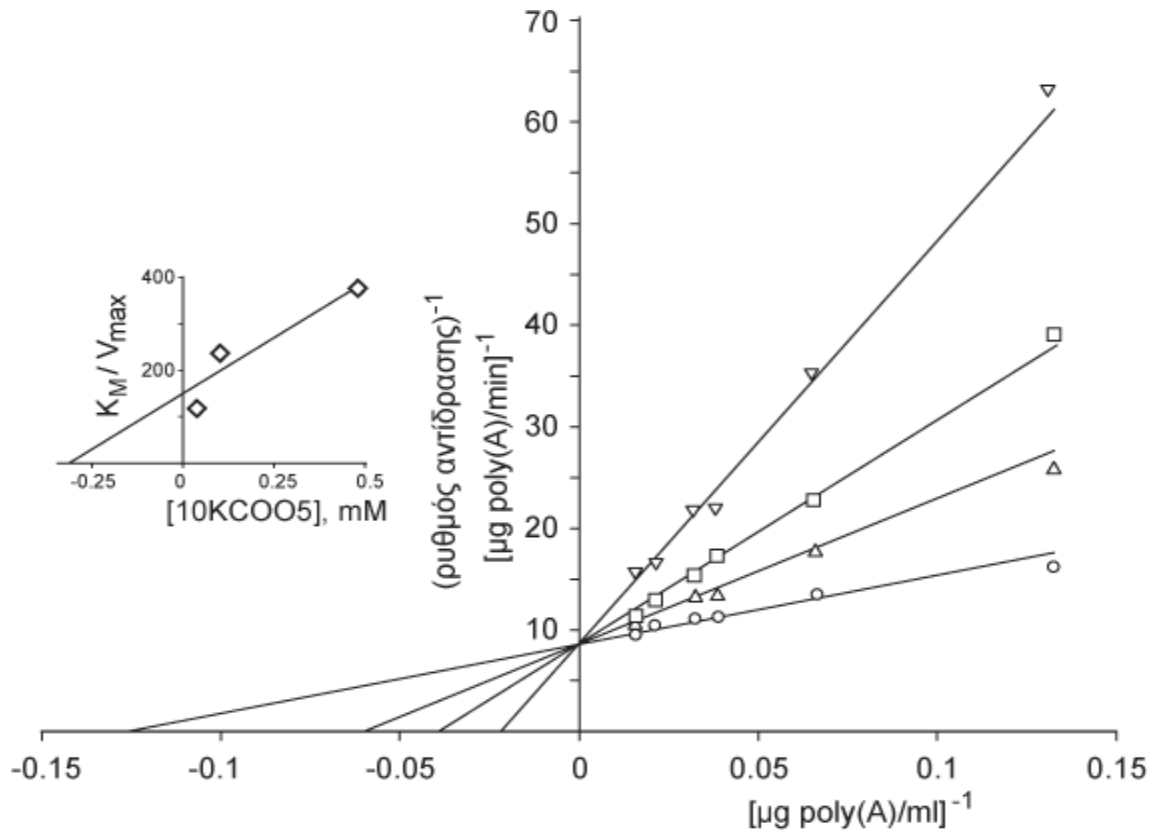
Για να εκτιμήσουμε περαιτέρω την επίδραση των συνθετικών νουκλεοσιδίων στη δραστηριότητα της PARN προχωρήσαμε σε πειράματα ενζυμικής δραστηριότητας. Οι χρόνοι των αντιδράσεων της PARN 74 ήταν 15min, ενώ η μετατροπή των απορροφήσεων σε πολυ(A) που αποικοδομήθηκε έγινε με την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης πολυ(A). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως δυο εξ' αυτών, τα 10KCOO1 και 10KCOO5 έδειξαν τις μικρότερες μεταβολές στην απορρόφηση ( $\Delta A_{662}$ ), γεγονός που υπαινίσσεται ότι θα μπορούσαν να δρουν ως αναστολείς του ενζύμου. Κινητική ανάλυση αποκάλυψε πως οι ουσίες ανέστειλαν την ενεργότητα του ενζύμου με συναγωνιστικό



τρόπο. Η απεικόνιση των αποτελεσμάτων σε διαγράμματα Lineweaver-Burk (διπλού αντιστρόφου) έδειξε ότι τόσο το 10KCOO1 όσο και το 10KCOO5 παρουσιάζουν κινητική συναγωνιστικής αναστολής.



**Εικόνα 10:** Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου της ενεργότητας της PARN παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων συναγωνιστικού αναστολέα της PARN 10KCOO1. Οι συγκεντρώσεις του 10KCOO1 είναι: 0 (○), 10 (△), 100 (□) και 500 (▽) μM, αντίστοιχα. Στο ένθετο σχήμα απεικονίζονται τα διαγράμματα  $K_m/V_{max} - [10KCOO1]$ , από όπου υπολογίζεται η  $K_i$ .

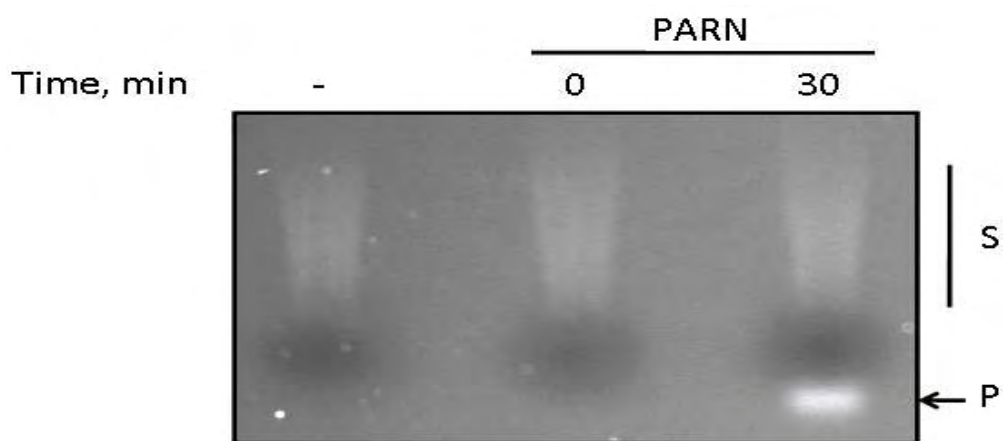


**Εικόνα 11:** Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου της ενεργότητας της PARN παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων συναγωνιστικού αναστολέα της PARN 10KCOO5. Οι συγκεντρώσεις του 10KCOO5 είναι: 0 (○), 10 (△), 100 (□) και 500 (▽) μM, αντίστοιχα. Στο ένθετο σχήμα απεικονίζονται τα διαγράμματα  $K_m/V_{max} - [10KCOO5]$ , από όπου υπολογίζεται η  $K_i$ .

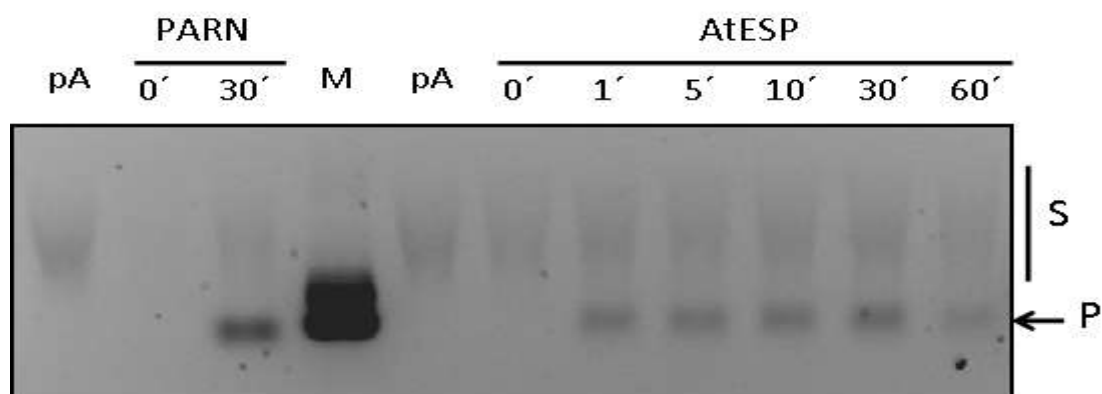
Για να προσδιορίσουμε τις σταθερές αναστολής ( $K_i$ ) κινητικά, η κλίση των ευθειών των παραπάνω διαγραμμάτων χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία διαγράμματος σε σχέση με τις συγκεντρώσεις των αναστολέων. Σύμφωνα με τα παραπάνω οι σταθερές αναστολής  $K_i$  υπολογίστηκαν για το 10KCOO1 280μM και του 10KCOO5 310μM.

## Αντιδράσεις αποαδενυλασών με πολυ(A)

Εκτός από την κινητική μας μελέτη, η επίδραση των νουκλεοσιδίων στην PARN μελετήθηκε και με μια νέα μέθοδο, της οπτικοποίησης σε πηκτές κυρίως αγαρόζης. Πρώτος μας στόχος ήταν η οπτικοποίηση της δράση των ριβονουκλεασών. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήσαμε αντιδράσεις των πολυ(A)-ριβονουκλεασών μας με το υπόστρωμα τους, πολυ(A), και στη συνέχεια αναλύσαμε τις αντιδράσεις αυτές σε πηκτές αγαρόζης.



**Εικόνα 12:** Αντίδραση PARN με πολυ(A) σε t=30min σε πηκτική αγαρόζης 1,5%. S:υπόστρωμα, P: προϊόν

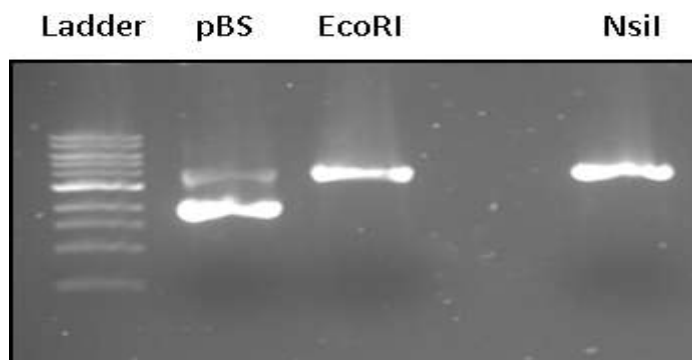


**Εικόνα 13:** Αντιδράση PARN-πολυ(A) σε t=30min και time course αντίδρασης AtESP-polyA σε t=0,1,5,10,30,60 min σε πηκτική αγαρόζης 1,5%. S υπόστρωμα, P προϊόν

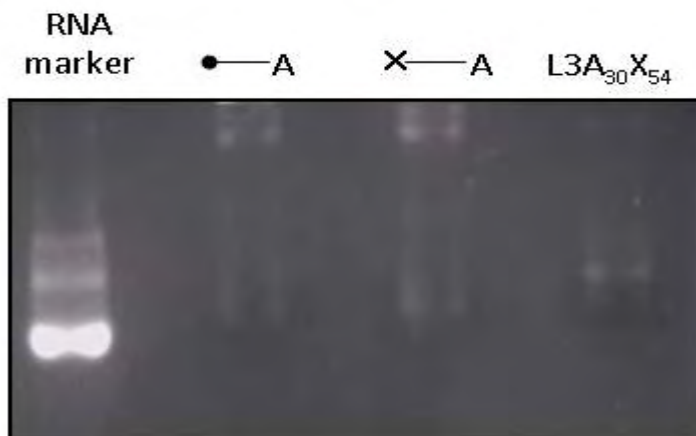
Η εμφάνιση ζώνης μικρότερης μοριακής μάζας (P) στην πηκτική σε t=30min στις αντιδράσεις με την PARN και t=1,5,10,30,60 min στις αντιδράσεις με την AtESP υποδηλώνει την αποικοδόμηση του υποστρώματος, γεγονός που αποδεικνύει τη δράση των δυο ενζύμων.

## Πέψεις πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού NsiI και EcoRI και *in vitro* μεταγραφή

Επειδή το εμπορικά διαθέσιμο πολυ(A), ως υπόστρωμα αποαδενυλασών, δεν έχει συγκεκριμένο μήκος, και ως εκ τούτου δεν δείχνει καθαρές ζώνες σε πηκτώματα ηλεκτροφόρησης. Για να μελετήσουμε τη δράση των ριβονουκλεασών σε RNA γνωστής αλληλουχίας καθώς και την οπτικοποίηση της δράσης αυτής σε πηκτές αγαρόζης και ακρυλαμιδίου χρησιμοποιήσαμε ένα πλασμιδιακό DNA γνωστής αλληλουχίας. Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε είναι το pBS (+/-) phagemid 3204 bp που προέρχεται από το pUC19. Σε αυτό πραγματοποιήθηκε πέψη με δυο ένζυμα περιορισμού, NsiI και EcoRI, με σκοπό μετά την *in vitro* μεταγραφή τη δημιουργία τμήματος RNA με πολυ(A) ουρά στο άκρο του και τμήματος με πολυ(A) ουρά στο εσωτερικό του αντίστοιχα. Τα μετάγραφα που προέκυψαν είναι τα L3A<sub>30</sub> και L3A<sub>30</sub>X<sub>54</sub>, όπου το A δηλώνει αδενοσίνη, το X τυχαίο νουκλεοτίδιο και ο δείκτης τον αριθμό των αντίστοιχων νουκλεοτιδίων. Επίσης να σημειωθεί ότι δημιουργήθηκε RNA και με καλύπτρα στο 5' άκρο του, με την προσθήκη m<sup>7</sup>GpppG .



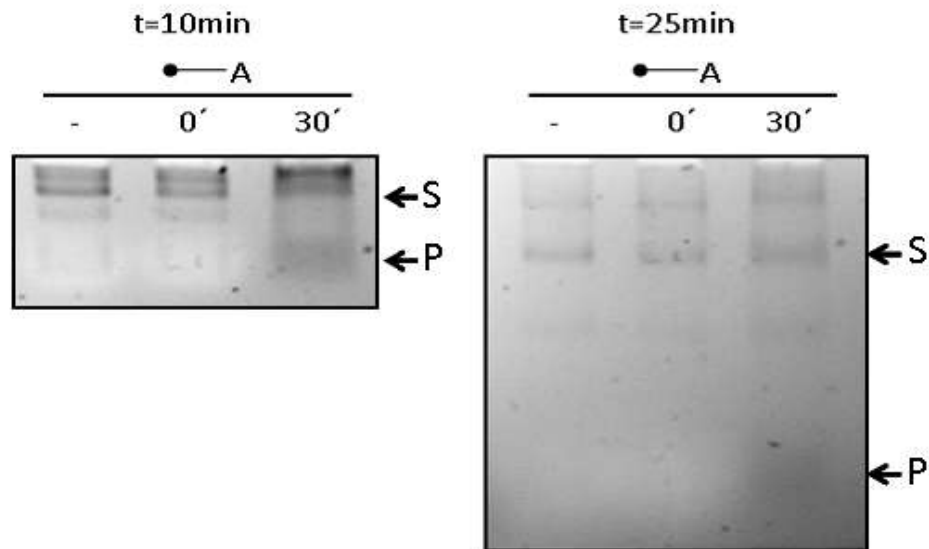
Εικόνα 14: Πέψη πλασμιδιακού DNA με NsiI και EcoRI



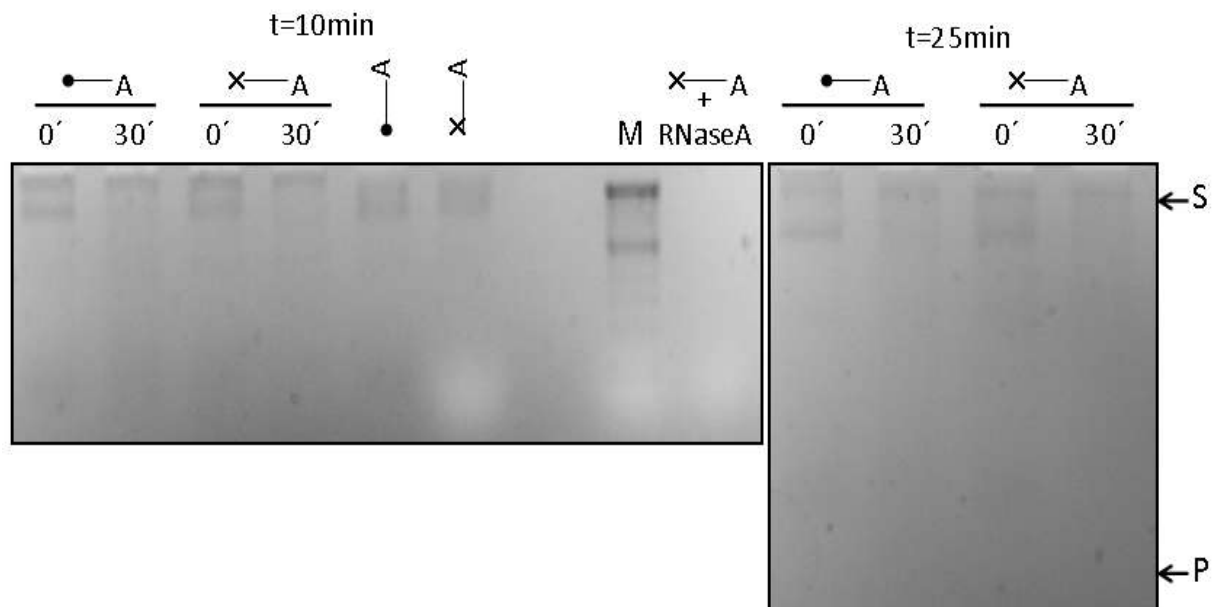
Εικόνα 15: Αποτελέσματα *in vitro* μεταγραφής

## Αντιδράσεις RNA με πολυ(A)-ριβονουκλεάσες

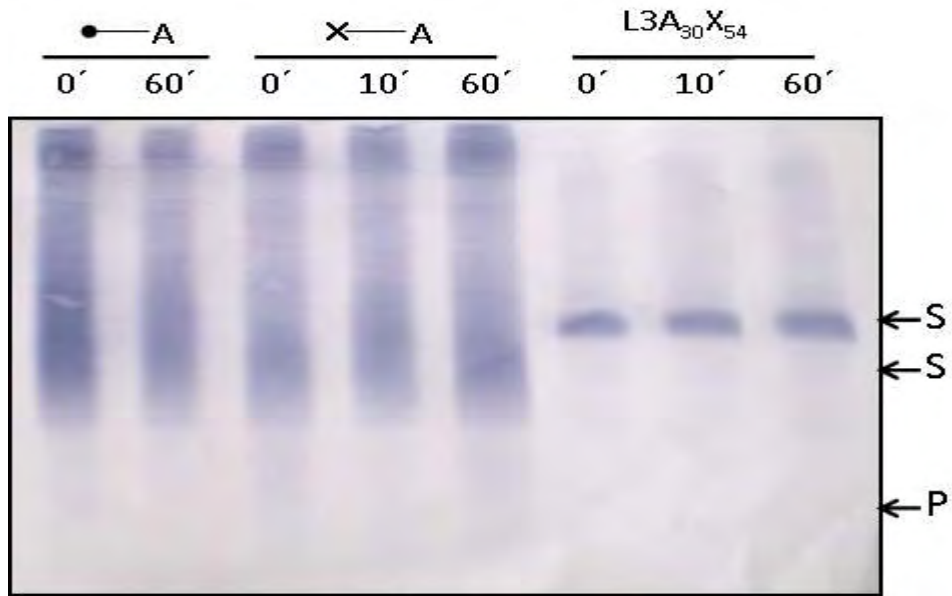
Προκειμένου να οπτικοποιήσουμε τη δράση της πολυ(A)-ριβονουκλεάσης PARN με υπόστρωμα το RNA γνωστής αλληλουχίας που παρήχθη με *in vitro* μεταγραφή, σχεδιάστηκε μια σειρά πειραμάτων και πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις, τα αποτελέσματα των οποίων απεικονίζονται παρακάτω.



**Εικόνα 16:** Αντιδράσεις RNA ( ●—A  $m^7GpppGL3(A30)$ ) με PARN σε χρόνο  $t=10min$  και  $t=25min$  σε πηκτή αγαρόζης 3%. S υπόστρωμα, P προϊόν, M: RNA marker

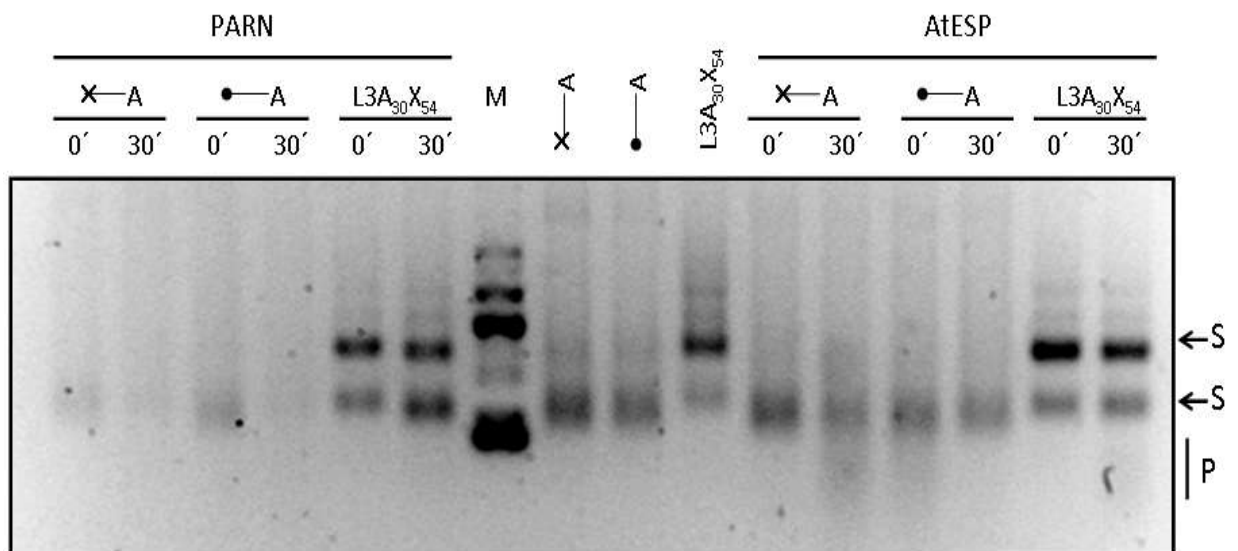


**Εικόνα 17:** Αντιδράσεις RNA ( ●—A  $m^7GpppGL3(A30)$ , ✕—A L3(A30) ) με PARN σε χρόνο  $t=10min$  και  $t=25min$  σε πηκτή αγαρόζης 3%. S:υπόστρωμα, P: προϊόν. M: RNA marker

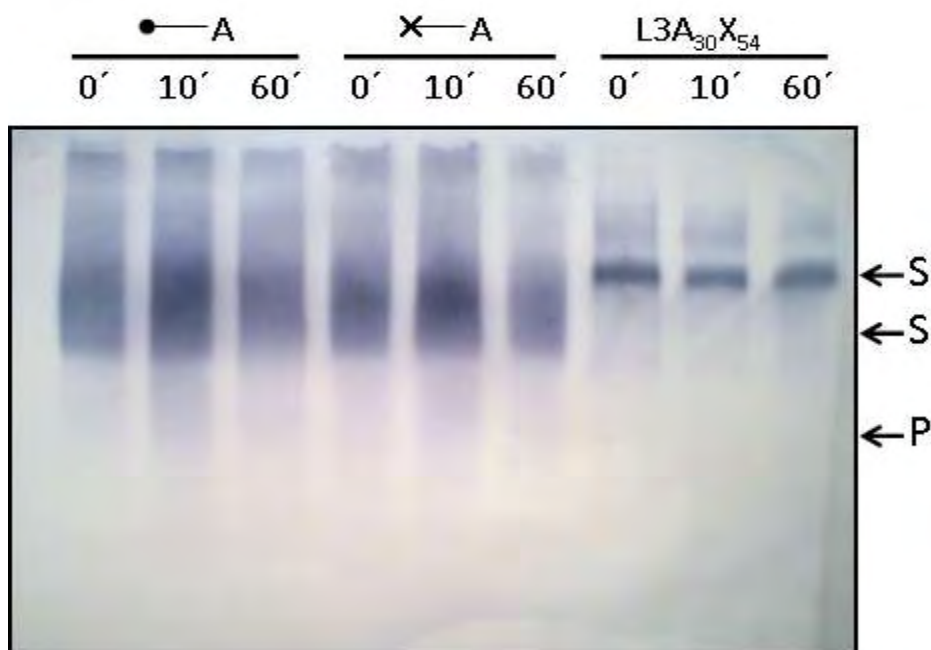


**Εικόνα 18:** Αντίδραση PARN με τα τρία υποστρώματα RNA σε χρόνο  $t=0\text{min}$ ,  $t=10\text{min}$  και  $t=60\text{min}$  σε πηκτή ακρυλαμιδίου 18%-ουρίας 7M. Ανίχνευση RNA σε μεμβράνη PVDF. S:υπόστρωμα, P: προϊόν

Εκτός όμως από την PARN, αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν και με μια νέα πολυ(A)-ριβονουκλεάση που ανακαλύφθηκε στο εργαστήριο μας. Πρόκειται για την AtESP, η οποία βρέθηκε στο *Arabidopsis thaliana* και χαρακτηριστικό αυτής είναι η ρύθμιση της από το κερκάδιο ρολόι. Η δράση της απεικονίζεται στην Εικόνα 19.



**Εικόνα 19:** Αντιδράσεις RNA γνωστής αλληλουχίας ( ●—A  $m^7\text{GpppGL3(A30)}$ , X—A L3(A30),  $L3A_{30}X_{54}$ ) με ένζυμα PARN και AtESP σε  $t=15\text{min}$  σε πηκτή αγαρόζης 3%. S:υπόστρωμα, P: προϊόν. M: RNA marker



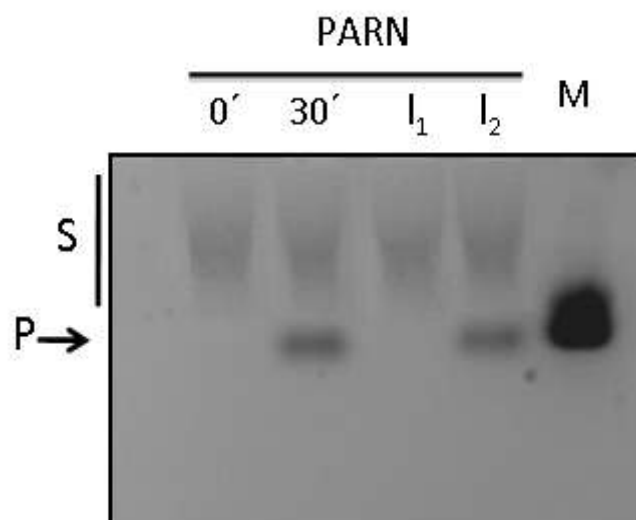
**Εικόνα 20:** Αντίδραση AtESP με τα τρία υποστρώματα RNA σε χρόνο  $t=0\text{min}$ ,  $t=10\text{min}$  και  $t=60\text{min}$  σε πηκτή ακρυλαμιδίου 18%-ουρίας 7M. Ανίχνευση RNA σε μεμβράνη PVDF. S:υπόστρωμα, P: προϊόν

Συμπερασματικά, η εμφάνιση ζώνης μικρότερης μοριακής μάζας (P) στην πηκτή σε  $t=30\text{min}$  στις αντιδράσεις με την PARN και υπόστρωμα τόσο το RNA γνωστής αλληλουχίας που φέρει 5' καλύπτρα ( $m^7\text{GpppGL3(A30)}$ ) όσο και με αυτό που δεν φέρει ( $L3(A30)$ ), υποδηλώνει την αποικοδόμηση του υποστρώματος και κατά συνέπεια τη δράση του ενζύμου. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρούνται και σε  $t=30\text{min}$  στις αντιδράσεις με την AtESP. Επιπλέον, όπως παρατηρούμε στις εικόνες, και τα δυο ένζυμα είναι εξωνουκλεάσες κι όχι ενδονουκλεάσες, καθώς δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στις αντιδράσεις με το RNA που παρήχθη μετά από πέψη με το EcoRI ( $L3A_{30}X_{54}$ ).

### Συνθετικά νουκλεοσίδια και ριβονουκλεάσες

Από την κινητική μελέτη παρατηρήσαμε ότι δυο από τα τέσσερα συνθετικά νουκλεοσίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ανέστειλαν την PARN. Έχοντας αποτυπώσει τη δράση του ενζύμου σε πηκτές, πραγματοποιήσαμε αντιδράσεις με υπόστρωμα πολυ(A) παρουσία των συνθετικών νουκλεοσιδίων 10KCOO1 και 10KCOO5 προκειμένου να φανεί η ανασταλτική τους δράση. Στην εικόνα της πηκτής που ακολουθεί παρατηρούμε ότι όντως τα συνθετικά αυτά νουκλεοσίδια αναστέλλουν τη

δράση της PARN. Ειδικότερα, παρουσία του συναγωνιστικού αναστολέα 10KCOO1 (I<sub>1</sub>) δεν εμφανίζεται ζώνη μικρότερης μοριακής μάζας στην πηκτή, που υποδηλώνει τη μη αποικοδόμηση του υποστρώματος και αναστολή του ενζύμου. Επιπλέον παρουσία του 10KCOO5 η ζώνη μικρότερης μοριακής μάζας (P) που εμφανίζεται στην πηκτή έχει μειωμένη ένταση συγκριτικά με τη ζώνη σε t=30min, που είναι αποτέλεσμα μερικής αποικοδόμησης πολυ(A) και κατά συνέπεια μερικής αναστολής της PARN.



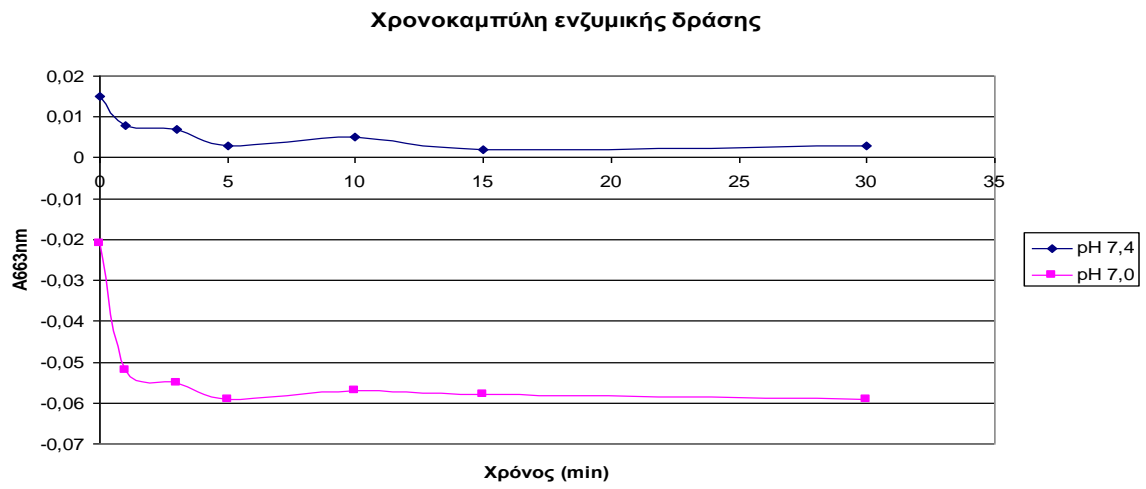
**Εικόνα 21:** Αντιδράσεις PARN-πολυ(A) παρουσία συνθετικών νουκλεοσιδίων σε χρόνο 30min σε πηκτή αгарόζης 1,5%. S: υπόστρωμα, P: προϊόν. I<sub>1</sub>: παρουσία αναστολέα 10KCOO1, I<sub>2</sub>: παρουσία αναστολέα 10KCOO5

### Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη, EDN, αποικοδομεί πολυ(U)

Επεκτείναμε τη μελέτη μας και σε μία ακόμη ριβονουκλεάση, τη νευροτοξίνη που προέρχεται από τα ηωσινόφιλα, EDN. Ελέγξαμε την δραστικότητα της ριβονουκλεάσης αυτής με μία φωτομετρική μέθοδο (Greiner-Stoeffele et al., 1996) χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα πολυ(U) στηριζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες (Sorrentino et al., J Biol Chem, 1992). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30°C ενώ πραγματοποιήθηκε έλεγχος της δραστικότητας του ενζύμου σε δυο διαφορετικά pH 7.0 και pH 7.4. Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε στα 663nm. Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται η χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης της EDN, σύμφωνα με την οποία μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η EDN μπορεί να αποικοδομεί πολυ(U).



## Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

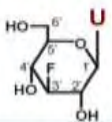
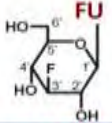
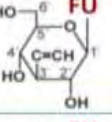
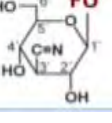


**Εικόνα 22:** Χρονοκαμπύλη EDN/αντίδραση σε pH 7.0 και pH 7.4.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ιδιαίτερος ρόλος των ριβονουκλεασών στην αποικοδόμηση του mRNA αντικατοπτρίζει την ανάγκη ρύθμισης τους. Έχοντας ως βάση προηγούμενες έρευνες στον τομέα αυτό, όπως τη ρύθμιση της ριβονουκλεάσης PARN από μικρά μόρια είτε φυσικά είτε συνθετικά (Balatsos et al., J Enzyme Inhib Med Chem. 2009; 24: 516-52, Balatsos et al., Biochemistry 2009; 48: 6044-605), προχωρήσαμε στη σύνθεση αναλόγων νουκλεοσιδίων με τροποποιήσεις τόσο στο σάκχαρο όσο και στη βάση και έπειτα στη μελέτη επίδρασης τους στη δραστηριότητα κυρίως της PARN και έπειτα της EDN. Η διαφορά όμως συγκριτικά με προηγούμενες μελέτες ήταν ο τρόπος προσέγγισης της έρευνας αυτής. Ειδικότερα, μελετήσαμε την επίδραση των συνθετικών νουκλεοσιδίων στη δραστηριότητα της PARN τόσο κινητικά όσο και απεικονίζοντας την επίδραση αυτή σε πηκτές κυρίως αγαρόζης. Η κινητική ανάλυση έδειξε πως οι ουσίες ανέστειλαν την ενεργότητα του ενζύμου με συναγωνιστικό τρόπο. Οι σταθερές αναστολής για τα 10KCOO1 και 10KCOO5 υπολογίστηκαν σε 280 και 310μM, αντίστοιχα. Προηγούμενες μελέτες από το εργαστήριό μας στην επίδραση της ενεργότητας της PARN με συνθετικά ανάλογα νουκλεοσιδίων προσδιόρισαν τροποποιήσεις στο σάκχαρο και τη βάση που αναστέλλουν αποτελεσματικά το ένζυμο.

**Πίνακας 6:**

Ένωση (συντ.)	Δομή	K <sub>i</sub> , μM
U1		20*
FU1		135*
10KCOO1		280
10KC005		310

\* Δεδομένα από τη διπλωματική εργασία της Βασιλικής Χατζηγεωργίου, TBB 2009

Στην παρούσα εργασία, αναζητήσαμε νέες τροποποιήσεις στο σάκχαρο, διατηρώντας ως βάσεις την ουρακίλη και την φθοροουρακίλη. Σε σύγκριση με προηγούμενα αποτελέσματα, παρατηρούμε γενικά πως οι κινητικές αναστολής δεν βελτιώθηκαν, αντιθέτως αυξήθηκαν ελαφρά. Παρατηρούμε επίσης, πως ενώ είχε παρατηρηθεί πως η παρουσία της ουρακίλης ως βάση γενικά αναστέλλει την PARN αποτελεσματικότερα από την φθοροουρακίλη (*Ki* 20 και 135, αντίστοιχα), στην εργασία μας μόνο η φθοροουρακίλη ανέστειλε το ένζυμο. Αυτό όμως μπορεί να οφείλεται στην αλλαγή του ιόντος φθορίου σε  $-C\equiv CH$  ή  $-C\equiv N$  στο σάκχαρο. Περαιτέρω μελέτες που θα περιλαμβάνουν δοκιμές μοριακής μοντελοποίησης, θα μπορούσαν να αποκαλύψουν τις διαφορές στη συμπεριφορά αυτή.

Προκειμένου να οπτικοποιήσουμε την επίδραση των συνθετικών αυτών νουκλεοσιδίων, θα έπρεπε πρώτα να απεικονιστεί η δράση των ριβονουκλεασών. Η δραστηριότητα ριβονουκλεασών επιχειρήθηκε να αποτυπωθεί αρχικά σε πηκτές αγαρόζης, και στη συνέχεια ακρυλαμιδίου, έχοντας ως υπόστρωμα RNA γνωστής αλληλουχίας με 30 αδενοσίνες στο 3' άκρο του, το οποίο παρήχθη μετά από πέψη και *in vitro* μεταγραφή πλασμιδιακού DNA. Από την κινητική μελέτη, παρατηρήσαμε ότι οι δυο από τις τέσσερις ενώσεις που συνθέσαμε ανέστειλαν την PARN. Πρόκειται για τα νουκλεοσίδια που φέρουν ως βάση τη φθοροουρακίλη καθώς και τροποποίηση στο σάκχαρο τους. Συνεχίσαμε τη μελέτη μας, απεικονίζοντας σε πηκτές τη δράση ριβονουκλεασών με υπόστρωμα πολυ(A) και μετά το σχεδιασμό αντιδράσεων παρουσία των υπονήφιων αναστολέων, αναλύσαμε τις αντιδράσεις σε πηκτές αγαρόζης και πιστοποιήσαμε και με αυτόν τον τρόπο τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης. Όμως εκτός από την PARN, το ενδιαφέρον μας κίνησε και μια ακόμη ριβονουκλεάση, η EDN ή αλλιώς ηωσινόφιλη νευροτοξίνη. Η ριβονουκλεάση αυτή, όπως ήδη αναφέρθηκε, εμφανίζει κυτταροτοξικότητα ενάντια σε έλμινθες, σε RNA μονόκλωνους ιούς και σε επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού, γεγονός που υποδηλώνουν ότι το ένζυμο συμμετέχει στον αμυντικό μηχανισμό του ανθρώπου (Leonidas DD et al., J Biol Chem. 2001;276 (18): 15009-17). Η έρευνα σχετικά με την EDN είναι σε αρχικά ακόμη στάδια. Ελέγξαμε τη δραστηριότητα της EDN με μια νέα πειραματική δοκιμή έχοντας ως υπόστρωμα πολυ(U) σε δυο διαφορετικά pH (7.0 και 7.4). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε πως η EDN μπορεί να αποικοδομεί πολυ(U). Η παρατήρηση αυτή μας επιτρέπει να έχουμε μια τεχνική για τον έλεγχο της όποιας ανασταλτικής δράσης συνθετικών ενώσεων. Η συμμετοχή της στον αμυντικό μηχανισμό

οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, με αρνητικές κυρίως συνέπειες, υποδεικνύει την ανάγκη ρύθμισης της.

Συμπερασματικά, ανοίγει ένας νέος δρόμος έρευνας για τη ρύθμιση ριβονουκλεασών, μελετώντας την επίδραση νουκλεοσιδίων όχι μόνο κινητικά αλλά και απεικονίζοντας την επίδραση αυτή και σε πηκτές. Τα συνθετικά νουκλεοσίδια που χρησιμοποιήσαμε και δείξαμε ότι μπορούν να χαρακτηριστούν ως υποψήφιοι αναστολείς των ριβονουκλεασών, με πιο κύρια την PARN, θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση μελλοντικά για την ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων. Όσον αφορά την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη, για την οποία λίγες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί, οι ενώσεις που ανέστειλαν την PARN δεν φαίνεται να την επηρεάζουν. Όμως το ότι διαθέτουμε δυο αξιόπιστες τεχνικές (μία φωτομετρική και μια απεικόνιση) για να παρακολουθούμε την ενεργότητά της μας επιτρέπει να εξετάσουμε νέα συνθετικά ανάλογα στην αναζήτηση μικρών μορίων που θα μπορούσαν να δράσουν ως αναστολείς της.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anderson J.S.J., Parker R., *EMBO J.* 1998; 17: 1497–1506
- Åström, J., Åström, A. & Virtanen, A., *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 18154–18159
- Baggs, J. E. & Green, C.B, *Curr. Biol.* 2003; 13: 189–198
- Balatsos et al., *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2009; 24: 516-523
- Balatsos et al., *Biochemistry* 2009; 48: 6044-6051
- Brown, C. E. & Sachs, A.B. *Mol. Cell. Biol.* 1998; 18: 6548–6559
- Chen C. Y. et al., *Cell* 2001; 107, 451–464
- Chen, J., Chiang, Y.C. & Denis, C.L. *EMBO J.* 2002; 21: 1414–1426
- Cheng Y, Liu WF, Yan YB, Zhou HM, *Protein Pept. Lett.* 2006;13(2):125-8
- D'Alessio G and Riordan JF, eds., Academic Press 1997
- Daugeron, M.C., Mauxion, F. & Seraphin, B. , *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: 2448–2455
- Dehlin E., Wormington M., Körner C. G. & Wahle E., *EMBO J* 2000; 19: 1079–1086.
- Denis C.L. & Chen J, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 2003; 73: 221–250
- Dlagic M., *Trends Biochem. Sci.* 2000; 25: 272–273
- Dykxhoorn D. M., Novina C.D., Sharp, P.A., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003; 4: 457–467
- Gerdes K, Christensen SK and Lobner-Olesen A, *Nat. Rev. Microbiol.* 2005; 3: 371–382
- Greiner-Stoeffele T., Grunow M., Hahn U., *Analytical Biochemistry*, 1996; 240: 24-28
- Hammet A., Pike B. L. & Heierhorst J., *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 22469–22474
- Holzmann J., P. Frank, E. Löffler, K. Bennett, C. Gerner & W. Rossmannith, *Cell* 2008; 135: 462–474
- Hoof van A., Parker R., *Cell* 1999
- Joyce, C.M. & Steitz, T.A., *J. Bacteriol.* 1995; 177: 6321–6329
- Ito, T. *et al*, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 4277–4278
- Kim Wan-Cheol, Chow H. Lee , *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1796(2) :99-113
- Komiotis D. et al., 2007
- Körner, C.G. & Wahle, E., *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 10448–10456
- Lai, W.S., Kennington, E.A. & Blackshear, P.J. , *Mol. Cell. Biol.* 2003; 23: 3798–3812
- Leonidas DD et al., *J Biol Chem.* 2001;276(18): 15009-17
- Leonidas DD et al., *Biochemistry* 1999; 38(51): 16794-801
- Lewin B. *GENES VIII κεφάλαιο 5*
- Lewin B. *GENES VIII κεφάλαιο 24*
- Li You and Kiledjian Megerditch, *WIREs RNA* 2010 1 253–265

Liu H., Rodgers N.D., Jiao X., Kiledjian M., EMBO J. 2002; 21: 4699–4708

Maquat L. E., Carmichael, G. G., Cell 2000; 26: 173–176

Martínez J., Ren Y. G., Nilsson P., Ehrenberg M. & Virtanen A., J. Biol. Chem 2001; 276: 27923–27929

Mitchell P., Tollervey D., Curr. Opin. Cell Biol. 2001; 13: 320–325

Moser M. J., Holley W.R., Chatterjee A. & Mian I. S., Nucleic Acids Res. 1997; 25: 5110–5118

Mukherjee D. et al., EMBO J. 2002; 21: 165–174

Pangalis, G. A., Trangas, T., Roussou, P. A., and Tsiapalis, C. M., Acta Haematol. 1985; 74: 31–34

Ren, Y.-G., Martínez, J. & Virtanen, A., J. Biol. Chem 2002; 277: 5982–5987

Sach, A.B. & Dearnorff, J.A. Cell 1992; 70: 961–973

Sachs, A., and Wahle, E., J. Biol. Chem. 1993; 268: 22955–22958

Sasaki, R., Minowada, J., Bollum, F. J., and Miura, Y., Leuk. Res. 1990; 14: 273–278

Scorilas et al., Cancer Res.m 2000

Seth A. Brooks ,WIREs RNA, 2010; 1: 240–252

Sorrentino S., Glitz D., Hamann K., Loegering D., Checkel J., and Gleich G., J Bio Chem, 1992: 267; 14859-14865

Thore, S., Mauxion, F, Seraphin, B & Suck, D., EMBO Rep. 2003; 4:1150–1155

Tucker M., Parker R., Annu. Rev. Biochem. 2000; 69: 571–595

Tucker, M. et al. Cell 2001;104: 377–386

Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrads, D. & Parker, R., EMBO J 2002.; 21: 1427–1436

Viswanathan, P.,Chen, J., Chiang, Y.-C. & Denis, C.L., J. Biol. Chem 2003; 278: 14949–14955

Wang Z., Kiledjian M., Cell 2001; 107: 751–762

Wickens M., Bernstein D.S., Kimble J. & Parker R, Trends Genet 2002; 18: 150–157

[www.ewa.cz/pages1/813.htm](http://www.ewa.cz/pages1/813.htm)