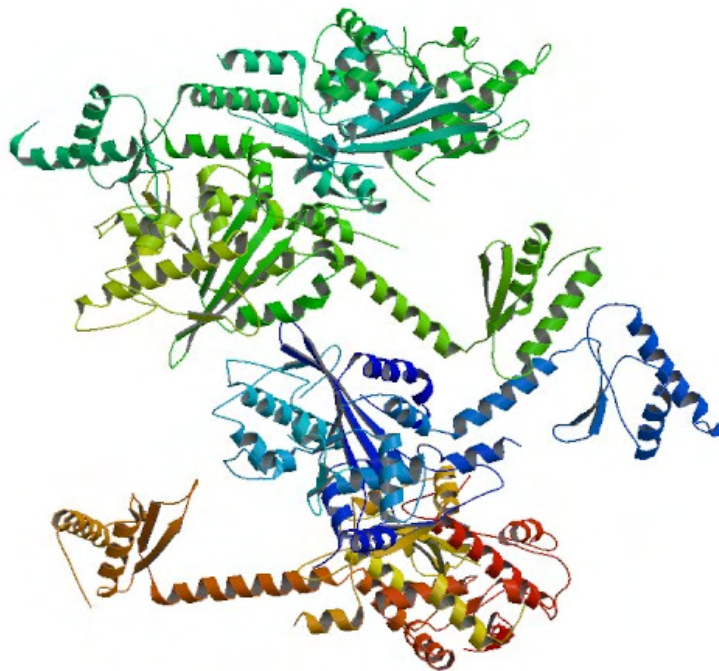




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Επίδραση της μετάλλαξης Arg99Ala στις ιδιότητες της
πολυ(Α)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN)**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΠΑΡΟΥ ΖΩΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επιβλέπων καθηγητής:

Νικόλαος Μπαλατσός, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τριμελής επιτροπή:

Νικόλαος Μπαλατσός, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δημήτριος Λεωνίδας, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σοφία Κοσσίδα, PhD Ερευνήτης Γ', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Επιστημών, Ακαδημία Αθηνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	iv
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	v
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	vii
ABSTRACT	vii
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Αποικοδόμηση του mRNA- Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA	1
1.2. Αποαδενυλάσες - Κατάταξη, βιολογικές λειτουργίες και έλεγχος δραστηριότητάς τους	3
1.3. Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A)-specific ribonuclease, PARN]	7
1.4. Φυλογενετική ανάλυση της PARN και ο σημαντικός ρόλος της Arg99	10
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	13
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	13
3.1. Υλικά	13
3.2. Διαλύματα.....	15
3.3. Μέθοδοι.....	17
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	31
4.1. Σχεδιασμός εκκινητών για τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση <i>in vitro</i>	31
4.2. Τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση <i>in vitro</i>	31
4.3. Υπερέκφραση, απομόνωση της PARN(R99A)	32
4.4. Μέτρηση της ενεργότητας της PARN με κυανό του μεθυλενίου:	34
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	39
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	40

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πολυ(A) ουρά των ώριμων ευκαρυωτικών mRNAs διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη μεταφορά, τη μετάφραση, την αποικοδόμησή τους και τη σταθερότητά τους, παρέχοντας ένα σημαντικό μέσο ελέγχου των επιπέδων τους στο κυτταρόπλασμα. Η αποικοδόμηση των mRNAs ξεκινά συνήθως με τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς, και καταλύεται από ειδικά ένζυμα γνωστά ως αποαδενυλάσες. Μια από τις καλύτερα μελετημένες αποαδενυλάσες είναι η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN. Το ένζυμο είναι ένα ομοδιμερές και πρόσφατα έχει προταθεί πως ένα αμινοξύ, η αργινίνη 99 (Arg99 ή R99), έχει σημαντικό ρόλο στη λειτουργικότητά του, συμβάλλοντας στον ομοδιμερισμό του και στον προσανατολισμό του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η επίδραση *in vitro* της R99 στην ενεργότητα του ενζύμου. Η R99 αντικαταστάθηκε από μια αλανίνη, ένα μη πολικό και δομικά απλούστερο αμινοξύ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δραστηριότητα του μεταλλαγμένου ενζύμου είναι μειωμένη σε σχέση με αυτή του αγρίου τύπου, μετά από μέτρηση της ενεργότητας των δύο ενζύμων με φασματοφωτομετρική μέθοδο με κυανό του μεθυλενίου. Η εργασία ανοίγει το δρόμο για περαιτέρω μελέτες για την αποκάλυψη του πλήρους καταλυτικού μηχανισμού της PARN.

ABSTRACT

The poly(A) tail plays a crucial role in mature eukaryotic mRNAs transport, translation, degradation and stability providing a widespread means of controlling their levels in the cytoplasm. mRNAs degradation usually begins with the shortening of poly(A) tail and is catalyzed by specific enzymes known as deadenylases. One of the well-studied deadenylases is poly(A)-specific ribonuclease, PARN. The enzyme is a homodimer, and recently has been suggested that an amino acid, arginine 99 (Arg99 or R99), has an important role in its functionality, helping homodimerization and orientation of the substrate in the active site. In the present study, the *in vitro* effect of R99 on the enzyme activity was examined. The R99 was replaced by an alanine, a non-polar amino acid and structurally simpler. The results indicated that the activity of the mutant enzyme was reduced compared to that of wild type enzyme, after measuring the activity of both enzymes by methylene blue spectrophotometric method. Future studies could be based on the findings of this work concerning the role of this particular amino acid residue, in order to elucidate the complete catalytic mechanism of PARN.

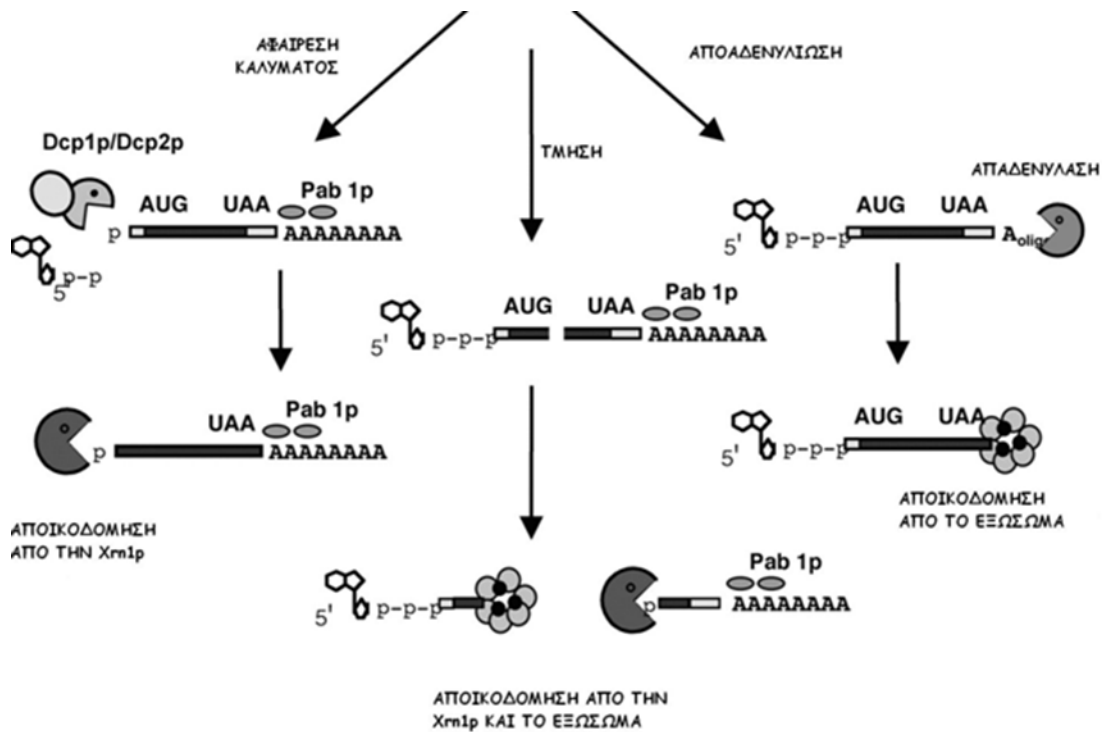
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA), είναι ένα μόριο κεντρικής σημασίας για τη γονιδιακή έκφραση. Αρχικά χαρακτηρίστηκε ως ενδιάμεσο προϊόν της πρωτεϊνοσύνθεσης, 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 στη γονιδιακή έκφραση υποστηρίζει τη γενική άποψη ότι ολόκληρη η διαδικασία μπορεί να έχει εξελιχθεί σε έναν «κόσμο RNA», στον οποίο αρχικά το RNA ήταν το ενεργό συστατικό του μηχανισμού διατήρησης και έκφρασης της γενετικής πληροφορίας. Αργότερα οι πρωτεΐνες υποβοήθησαν ή ανέλαβαν αποκλειστικά πολλές από αυτές τις λειτουργίες, γεγονός που είχε ως συνέπεια την αύξηση της προσαρμοστικότητας και πιθανόν της αποτελεσματικότητας. Οι τρεις κύριες τάξεις RNA είναι το *αγγελιαφόρο (mRNA)*, το *μεταφορικό (tRNA)* και το *ριβοσωμικό (rRNA)* [1].

1.1. Αποικοδόμηση του mRNA- Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA

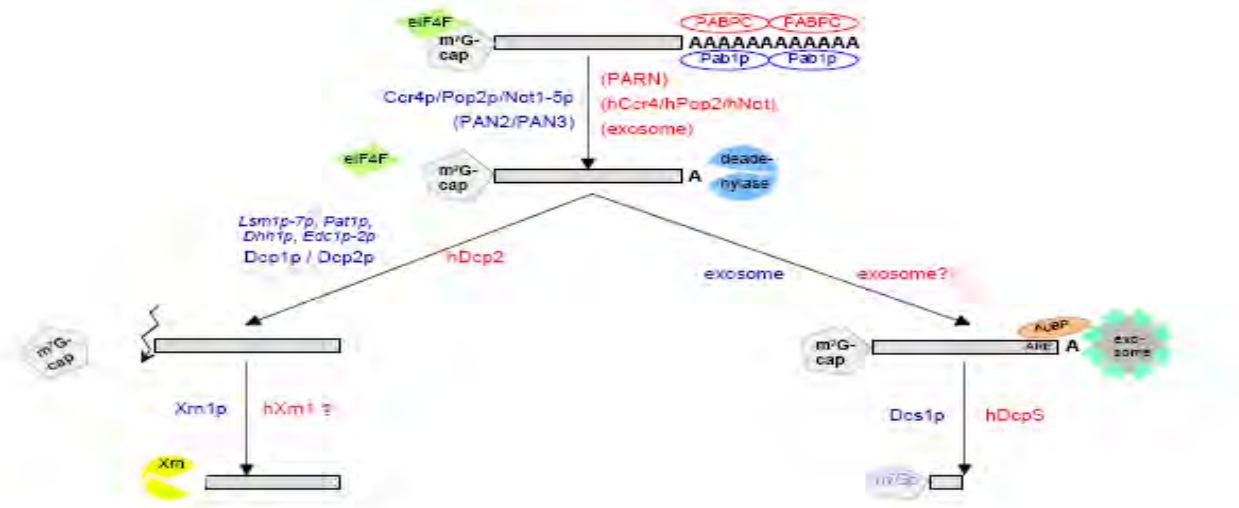
Η αποικοδόμηση του ευκαρυωτικού mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στον ποιοτικό έλεγχο της βιοσύνθεσης mRNA και στην αντι-ϊική προστασία [2,3,4].

Η αποικοδόμηση του mRNA συνήθως ξεκινάει από τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο του (αποαδενυλίωση, deadenylation) από διάφορες αποαδενυλάσες [5,6]. Ακολουθώντας την αποαδενυλίωση ένα ειδικό ένζυμο που αποτελείται από δύο υπομονάδες (Dcp1p και Dcp2p) αφαιρεί το κάλυμμα, εκθέτοντας το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την Xrn1p, μια 5'→3' εξωνουκλεάση. Εναλλακτικά, μετά την αποαδενυλίωση, το mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με την κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών [7-10]. Στην περίπτωση αυτή το κάλυμμα υδρολύεται από το DcpS [11]. Ωστόσο η αποικοδόμηση ορισμένων mRNA μπορεί να ξεκινήσει με ενδονουκλεοτιδική διάσπαση είτε από ειδικές ενδονουκλεάσες είτε από το μηχανισμό του RNAi [12]. Επίσης τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν ειδικά μονοπάτια αποικοδόμησης που αναγνωρίζουν και αποικοδομούν ταχύτατα ανώμαλα mRNA χρησιμοποιώντας τα ίδια ένζυμα που αποικοδομούν φυσιολογικά mRNAs, όπως φαίνεται στην εικόνα 1-1 [1].



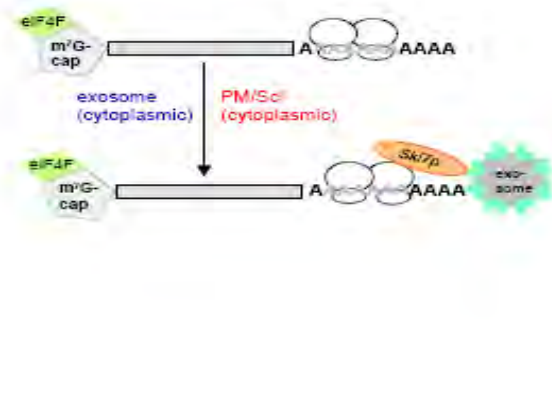
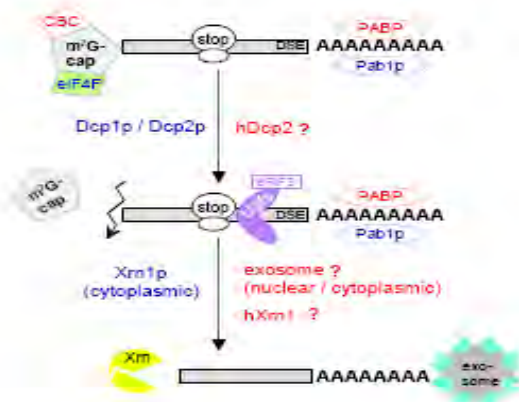
Εικόνα 1-1: Μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA

Για παράδειγμα, πρώιμα mRNAs που αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν τη διαδικασία ωρίμανσης μπορεί να κατακρατηθούν στον πυρήνα ή/και να αποικοδομηθούν [13]. Εναλλακτικά, τα κύτταρα μπορούν να υπολογίζουν την μεταφραστική χωρητικότητα των mRNAs σε μια διαδικασία που αναφέρεται και ως μη-νοηματικά διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (nonsense-mediated decay, NMD). Τα mRNAs που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται. Τέτοια μετάγραφα αποικοδομούνται είτε μετά από αφαίρεση του καλύμματος σε μία διαδικασία ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση, είτε από επιτάχυνση της αποαδενυλίωσης και της 3'→5' αποικοδόμησης από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα [14-17]. Παρομοίως, σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως αποικοδόμηση μη-τερματισμού (nonstop decay, NSD), τα mRNAs στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα [18,19]. Οι διαδικασίες παρουσιάζονται σχηματικά στην εικόνα 1-2.



Nonsense-mediated decay (NMD)

Nonstop-mediated decay (NSD)



Εικόνα 1-2: Τα mRNAs που δεν περιέχουν, ή περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αποικοδομούνται ταχύτατα στους μύκητες και στα ανθρώπινα κύτταρα

1.2. Αποαδενυλάσες - Κατάταξη, βιολογικές λειτουργίες και έλεγχος δραστηριότητάς τους

Ως αποαδενυλάσες ορίζουμε τις εξωριβονουκλεάσες που αποικοδομούν την πολύ(A) ουρά των mRNAs με κατεύθυνση 3'→5' απελευθερώνοντας 5'-AMP. Καθημερινά ο αριθμός των ταυτοποιημένων αποαδενυλασών αυξάνει ως αποτέλεσμα βιοχημικών και γενετικών ερευνών. Οι αποαδενυλάσες εκδηλώνουν μια σαφή προτίμηση για 3'- πολυ(A) ως υπόστρωμα, παρά το

γεγονός πως σε ορισμένες περιπτώσεις έχει δειχτεί ότι αποικοδομούν λιγότερο αποτελεσματικά και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή [25].

Όλες οι γνωστές αποαδενυλάσες είναι Mg^{2+} -εξαρτώμενα ένζυμα που μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες υπερ-οικογένειες με βάση την παρουσία συγκεκριμένων συντηρημένων καταλοίπων στο καταλυτικό τους κέντρο. Η DEDD υπερ-οικογένεια έχει λάβει το όνομά της από τα καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu που βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ τριών μοτίβων εξωνουκλεάσης, τα οποία συντονίζουν τα ιόντα Mg^{2+} . Μέλη αυτής της ομάδας αποτελούν η αποαδενυλάση POP2 (γνωστή και ως CAF1), η CAF1Z, η πολύ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), καθώς και οι οικογένειες των PAN2 αποαδενυλασών. Από την άλλη μεριά η υπερ-οικογένεια των εξωνουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών (*exonuclease-endonuclease-phosphatase*, EEP), περιλαμβάνει αποαδενυλάσες που φέρουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στις δομικές περιοχές νουκλεάσης τους. Παραδείγματα EEP ενζύμων αποτελούν οι αποαδενυλάσες Nocturnin, CCR4 και Angel.

Κάθε είδος οργανισμού διαθέτει διαφορετική γκάμα και αριθμό αποαδενυλασών. Για παράδειγμα, μέλη των οικογενειών POP2, CCR4, PAN2 και Angel είναι παρόντα σε όλους τους ευκαρυώτες, ενώ άλλες αποαδενυλάσες είναι λιγότερο συντηρημένες (π.χ. η *Drosophila melanogaster* στερείται τόσο της PARN όσο και της CAF1Z [25]). Ο πίνακας 1-1 παρουσιάζει συνοπτικά την κατάταξη των αποαδενυλασών στις δύο υπερ-οικογένειες καθώς και ενδεικτικά παραδείγματα ενζύμων που εντοπίζονται σε αντιπροσωπευτικά είδη οργανισμών.

Πίνακας 1-1: Ποικιλομορφία των αποαδενυλασών [25]

(SC: *S.cerevisiae*, CE: *C. elegans*, DM: *D.melanogaster*, XL: *X.laevis*, MM: *M. musculus*, HS: *H.sapiens*)

		SC	CE	DM	XL	MM	HS
DEDD nucleases	CNOT7/PO P2	+	+	+	+	+	+
	CNOT8	-	-	-	+	+	+
	CAF1Z	-	+	-	+	+	+
	PARN	-	+	-	+	+	+
	PAN2	+	+	+	+	+	+
EEP nucleases	CNOT6/CC R4	+	+	+	+	+	+
	CNOT6L	-	-	-	-	+	+
	NOC	-	-	+	+	+	+
	2'PDE	-	+	+	+	+	+

Η τεράστια ποικιλότητα και ποικιλομορφία των αποαδενυλασών υποδηλώνει πως πιθανότατα συγκεκριμένες αποαδενυλάσες στοχεύουν συγκεκριμένα mRNAs επιτάσσοντας τον έλεγχό τους στη δραστηριότητα ενός μόνο ενζύμου. Από την άλλη, διαφορετικές αποαδενυλάσες μπορούν να δράσουν στο ίδιο mRNA με διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες λειτουργίες [20-24].

Οι αποαδενυλάσες, όπως αναφέρθηκε, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γενική διαδικασία ανακύκλωσης του mRNA. Επιτελούν όμως και αρκετούς εξειδικευμένους, ρυθμιστικούς ρόλους. Κάποιες είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των οργανισμών, ενώ μεταλλάγματα άλλων επιφέρουν μια ποικιλία ενδιαφερόντων φαινοτύπων. Επιπλέον, συγκεκριμένες αποαδενυλάσες είναι απαραίτητες για συγκεκριμένες βιολογικές διεργασίες, γεγονός που αποδεικνύει πως ο έλεγχος ορισμένων mRNAs είναι καθοριστικής σημασίας για την ομαλή λειτουργία αυτών των διεργασιών [25,26]. Για παράδειγμα, αρκετές αποαδενυλάσες, συμπεριλαμβανομένων της PARN του *Xenopus laevis* και της CCF-1 του *C.elegans*, είναι σημαντικές κατά την πρώιμη ανάπτυξη, ενώ άλλες απαιτούνται για τη γονιμότητα (όπως η CNOT7 στα ποντίκια) και τη μεταβολική ομοιόσταση (ποντίκια που στερούνται Nocturnin, λαμβάνουν λιγότερο σωματικό βάρος και λίπος σε σύγκριση με τα ποντίκια που τη διαθέτουν, κάτω από ίδιες συνθήκες διατροφής και συμπεριφοράς).

Η ρύθμιση της δραστηριότητας των αποαδενυλασών κρίνεται απαραίτητη, καθώς συνθήκες ανεξέλεγκτης αποαδενυλίωσης θα οδηγούσαν σε καταστροφή και θάνατο του κυττάρου. Σταθερά και μεταγραφικά ενεργά mRNAs πρέπει να προστατευθούν από την αποαδενυλίωση ενώ τα ασταθή και μη φυσιολογικά θα πρέπει να αποαδενυλιώνονται και να οδηγούνται στην αποικοδόμηση.

Ο ρυθμός της αποαδενυλίωσης ποικίλλει μεταξύ των διάφορων mRNAs. Αυτή η διαδικασία ελέγχεται από παράγοντες-ρυθμιστές οι οποίοι προσδένονται ειδικά σε συγκεκριμένες αλληλουχίες των mRNAs. Ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται συνήθως στις 3' αμετάφραστες περιοχές συγκεκριμένων mRNAs (3'-UTR) ενισχύουν την αποαδενυλίωση τους. Αυτά τα στοιχεία δεσμεύονται από παράγοντες οι οποίοι στρατολογούν συγκεκριμένες αποαδενυλάσες προωθώντας έτσι την αποαδενυλίωση. Τέτοια παραδείγματα παραγόντων που δεσμεύονται στις 3'-UTR περιοχές μορίων mRNA αποτελούν οι CUG-BP, miRNAs, PUF και CPEB [25,27,28]. Εναλλακτικά, προώθηση της αποαδενυλίωσης μπορεί να επιτευχθεί και μέσω αλληλεπίδρασης της PABP και συγκεκριμένων αποαδενυλασών (π.χ. η PABP στρατολογεί το

σύμπλοκο PAN2-PAN3). Επίσης, το 5' κάλυμμα του mRNA μπορεί να επηρεάσει θετικά την αποαδενυλίωση διεγείροντας την δραστικότητα και την επεξεργαστικότητα κάποιων αποαδενυλασών (χαρακτηριστικότερο και μοναδικό γνωστό έως σήμερα παράδειγμα αποτελεί η PARN). Η έκφραση των αποαδενυλασών και των αντίστοιχων ρυθμιστών τους υποδεικνύει το χρόνο και τον τόπο, στον οποίο μπορεί να συμβεί ρύθμιση της αποαδενυλίωσης. Για παράδειγμα, η έκφραση της Nocturnin είναι ρυθμική και ελέγχεται από τον κερκάδιο ρυθμό, ενώ οι αποαδενυλάσες της οικογένειας των POP2 είναι ιδιοσυστατικές [30-32]. Επιπροσθέτως, όταν το κύτταρο υποβάλλεται σε διάφορες μορφές stress (UV, οξειδωση, οσμωτική πίεση ή έλλειψη γλυκόζης), τότε η αποαδενυλίωση σταματά αμέσως. Ο μοριακός μηχανισμός της αναστολής παραμένει άγνωστος. Η αποαδενυλίωση επηρεάζεται επίσης από δύο μορφές χωρικού ελέγχου: (α) τον πυρηνο-κυτταροπλασματικό διαχωρισμό των αποαδενυλασών και (β) την εντόπισή τους σε κοκκία. Στην πρώτη περίπτωση, προβλήματα σωστού διαχωρισμού των αποαδενυλασών μεταξύ πυρήνα και κυτοσολίου μπορούν να αποβούν μοιραία για την τύχη mRNAs που δεν θα έπρεπε να αποικοδομηθούν. Από τη άλλη μεριά, συγκεκριμένες αποαδενυλάσες εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά κοκκία, τα οποία περιέχουν κατασταλαμένα mRNAs, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να ενεργοποιηθούν. Η συν-εντόπιση αυτών των αποαδενυλασών με τα υποστρώματά τους πιθανότατα διευκολύνει την κινητική της αποαδενυλίωσης [25].

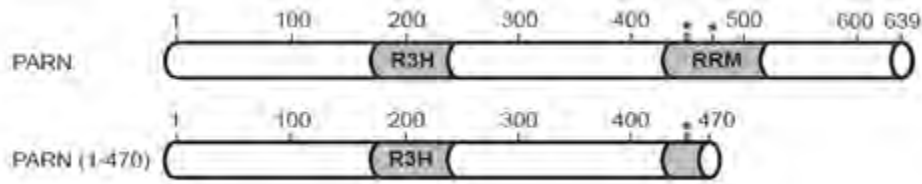
Οι αποαδενυλάσες συνήθως αποτελούν τμήμα συμπλόκων με πολλές υπομονάδες. Οι άλλες πρωτεΐνες σε αυτά τα σύμπλοκα επηρεάζουν τη δραστικότητα των αποαδενυλασών. Για παράδειγμα, η PAN2 δεσμεύεται στην PAN3 που με τη σειρά της αλληλεπιδρά με την PABP. Η τελευταία στρατολογεί -όπως αναφέρθηκε- το σύμπλοκο PAN2-PAN3 στην πολυ(A) ουρά των mRNA-στόχων [29]. Άλλες αποαδενυλάσες σχηματίζουν ομοδιμερή και άλλες ετεροδιμερή. Ο ετεροδιμερισμός αυξάνει σημαντικά το ρεπερτόριο των συμπλόκων των αποαδενυλασών, καθώς διαφορετικά ετεροδιμερή έχουν και διαφορετικές ενζυμικές και ρυθμιστικές ιδιότητες. Η δυνατότητα για έλεγχο της αποαδενυλίωσης καθίσταται τεράστια και ιδιαίτερα πολύπλοκη αν σε όλα αυτά συνυπολογίσουμε την αλληλεπίδραση των πολυάριθμων πιθανών συμπλόκων αποαδενυλασών με την τεράστια ποικιλία των ρυθμιστών τους και την αλληλεπίδραση των τελευταίων με μία εξίσου μεγάλη ποικιλία διαφορετικών ρυθμιστικών στοιχείων επί των 3'-UTR περιοχών των mRNA-στόχων [25].

Τα σύμπλοκα αποαδενυλασών που στρατολογούνται από ειδικούς ρυθμιστές είναι πολυλειτουργικά, καθώς περιέχουν εκτός των ενζύμων αποαδενυλίωσης, συστατικά που

καταστέλλουν τη μετάφραση και συστατικά που ενισχύουν την αποικοδόμηση του mRNA. Η πολυλειτουργικότητα αυτή παρέχει ευκαιρίες για πολυάριθμα σημεία ρύθμισης της αποαδενυλίωσης, της μετάφρασης και της αποικοδόμησης των mRNAs, είτε ξεχωριστά είτε συντονισμένα [25].

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

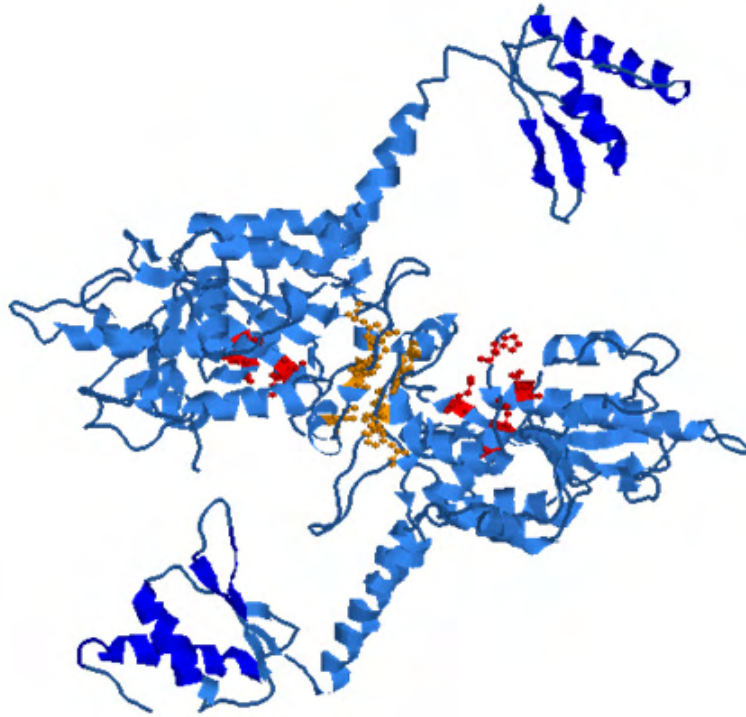
Το κύριο ένζυμο που αποικοδομεί πολυ(A) ουρές mRNA είναι η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A) specific ribonuclease, PARN], την οποία μελετά η παρούσα διπλωματική εργασία. Η PARN αρχικά απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε σε κύτταρα θηλαστικών [33,34]. Αναλύσεις αλληλουχιών δείχνουν ότι η PARN όπως και η Pan2p και Pop2p ανήκει στην οικογένεια των RNaseD νουκλεασών που φέρει το χαρακτηριστικό μοτίβο DEDD. Είναι συντηρημένη σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς αλλά απουσιάζει από *S.cerevisiae* και *D.melanogaster*. Μεταλλάξεις στα προβλεπόμενα καταλυτικά κατάλοιπα (DEDD) αναστέλλουν τη δράση της [35,36]. Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η ενεργότητα της PARN εξαρτάται από δισθενή μεταλλικά ιόντα ενώ μεγαλύτερη δραστηριότητα έχει η παρουσία ιόντων Mg(II) τα οποία πιθανόν βρίσκονται στο ενεργό κέντρο παίζοντας καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό της κατάλυσης. Το ελάχιστο μήκος υποστρώματος είναι τα δι- ή τρι- νουκλεοτίδα αδενοσίνης ανάλογα με το ποιο μεταλλικό ιόν βρίσκεται στο ενεργό κέντρο. Το ένζυμο στον άνθρωπο απαντά σε δύο ισόμορφες, μία πυρηνική 74 kDa και μία κυτταροπλασματική 54 kDa (62 kDa στον *Xenopus laevis*). Η τελευταία είναι πρωτεολυμένο παράγωγο της πρώτης από το οποίο απουσιάζει το εύκαμπτο καρβοξυτελικό άκρο. Η περιοχή αυτή ευθύνεται και για την μετακίνηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα αφού περιέχει την NLS (nuclear localization signal) αλληλουχία. Η PARN επίσης περιέχει ένα μοτίβο αναγνώρισης RNA (RNA recognition motif, RRM), το οποίο σημειώνεται πως απουσιάζει από την κρυσταλλική δομή. Το RRM έχει ιδιότητες πρόσδεσης του πολυ(A) αλλά και του καλύμματος [37], καθώς και μια συντηρημένη R3H περιοχή που φαίνεται να έχει δομή όμοια με αυτήν της IF3 καρβοξυτελικής περιοχής [38]. Η R3H περιοχή προσδένεται σε μονόκλωνα νουκλεϊκά οξέα και πιθανόν κατευθύνει την PARN στο πολυαδενυλιωμένο mRNA (εικόνα 1-3) [38].



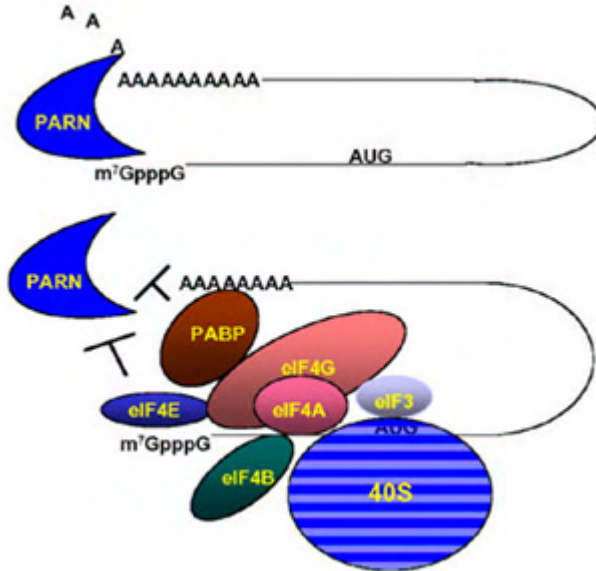
Εικόνα 1-3: Οι δύο ισομορφές της ανθρώπινης PARN. Σημειώνονται οι RRM και R3H περιοχές. Με αστερίσκο δηλώνονται σημαντικά αμινοξέα που συμμετέχουν στην πρόσδεση του καλύμματος

Η κρυσταλλική δομή της ανθρώπινης PARN, από την οποία λείπει το καρβοξυτελικό άκρο (κατάλοιπα 1-430 σε σύνολο 639), έδειξε πως το ένζυμο είναι ομοδιμερές. Κάθε υπομονάδα αναδιπλώνεται σε δύο περιοχές, μία συντηρημένη και την περιοχή της νουκλεάσης. Το ενεργό κέντρο περιέχει τέσσερα συντηρημένα κατάλοιπα, ένα γλουταμικό και τρία ασπαρτικά οξέα (Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382) κατά το μοτίβο DEDD, τα οποία κατευθύνουν κύρια καταλυτικά δισθενή ιόντα, όπως Mg^{2+} . Παρόλ' αυτά η κρυσταλλική δομή της κολοβωμένης PARN δεν έδειξε την ύπαρξη ιόντων $Mg(II)$ στο ενεργό κέντρο του ενζύμου [35,38].

Η δραστηριότητα της PARN φαίνεται πως ρυθμίζεται με τουλάχιστον έξι διαφορετικούς τρόπους: (α) διέγερσή της μέσω απευθείας αλληλεπίδρασης της PARN και του καλύμματος στο 5' άκρο [21,22,39,40], (β) αναστολή της από μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια πουρινών καθώς και από ένα ανάλογο του καλύμματος [44], (γ) αναστολή από την κυτταροπλασματική πολυ(A)-προσδενόμενη πρωτεΐνη C (PABPC) [34,40], πιθανόν λόγω της πρόσδεσης και αλληλεπίδρασης της τελευταίας με την πολυ(A) ουρά, (δ) αλληλεπίδραση της PARN με την CUG-BP mRNA-προσδενόμενη πρωτεΐνη, η οποία είναι το ανθρώπινο ανάλογο της πρωτεΐνης του *Xenopus* EDEN-BP \times (η αλληλεπίδραση αυτή διεγείρει την βράχυνση των πολυ(A) ουρών) [41], (ε) διέγερση της αποικοδόμησης του πολυ(A) από πρωτεΐνες που προσδένονται σε περιοχές γνωστές ως ARE [36] και (στ) συναγωνισμός μεταξύ της PARN και του eIF4E για την πρόσδεση του καλύμματος [40]. Στην εικόνα 1-5 συνοψίζονται μερικοί από τους προαναφερθέντες μηχανισμούς ρύθμισης της PARN.



*Εικόνα 1-4: Κρυσταλλική δομή της nPARN (αμινοξέα 1-430)
(Περιοχή νουκλεάσης, περιοχή R3H, περιοχή διμερισμού)*



Εικόνα 1-5: Ρύθμιση της δράσης της PARN. Σημειώνεται ο ανασταλτικός ρόλος των eIF4E και PABP

Η PARN φαίνεται επίσης να είναι απαραίτητη για ταχεία αποαδενλίωση, επαγόμενη από την πλούσια σε AU αλληλουχία, την ARE binding protein τριστετραπρολίνη [36,42]. 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 mRNAs κατά την ωρίμανση του ωαρίου. Στο *Arabidopsis thaliana* φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της ανάπτυξης και στην αποαδενυλίωση μιας συγκεκριμένης ομάδας mRNA [43].

1.4. Φυλογενετική ανάλυση της PARN και ο σημαντικός ρόλος της Arg99

Εκτενής φυλογενετική ανάλυση, βασισμένη στο σύνολο των διαθέσιμων γονιδιωμάτων, έδειξε μια ευρεία κατανομή για την PARN στα ευκαρυωτικά είδη, και αποκάλυψε δομικά σημαντικά αμινοξέα, τα οποία δυνητικά θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στη ρύθμιση του καταλυτικού μηχανισμού της PARN [48].

Συνολικά εντοπίστηκαν 32 ομόλογες πρωτεϊνικές αλληλουχίες της PARN στα γονιδιώματα των ειδών, οι οποίες αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ταξινομικές ευκαρυωτικές ομάδες (σύμφωνα με την ταξινομική βάση δεδομένων του NCBI). Ομόλογα της PARN δεν βρέθηκαν στο αρθρόποδο *Drosophila melanogaster* και στο μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* όπως έχει προαναφερθεί. Εναλλακτικά μεταβολικά μονοπάτια μπορεί να υπάρχουν σε αυτούς του δύο οργανισμούς για την αποικοδόμηση του πολυ(A). Παρόλ' αυτά, οι θεωρούμενες ομόλογες αλληλουχίες της PARN ανιχνεύονται σε άλλα αρθρόποδα και μύκητες.

Περαιτέρω, πρωτεϊνικά μοτίβα αντλούνται από πολλαπλές συστοιχίσεις των αμινοξικών αλληλουχιών της PARN. Εκτός από το συντηρημένο καταλυτικό μοτίβο (Asp29, Glu30, Asp292 και Asp382), ένα δεύτερο μοτίβο που περιέχει τα αμετάβλητα κατάλοιπα Arg99 και Gln109 ανιχνεύθηκε μόνο στα μετάρζωα (εικόνα 1-6). Μετά από προσεκτική εξέταση της πρωτοταγούς αλληλουχίας αμινοξέων των άλλων ειδών εκτός των μετάρζων, βρέθηκε ότι στη γειτονική περιοχή της Arg99, είτε υπάρχουν κατάλοιπα Arg ή η Arg έχει αντικατασταθεί από την επίσης πολική Lys.



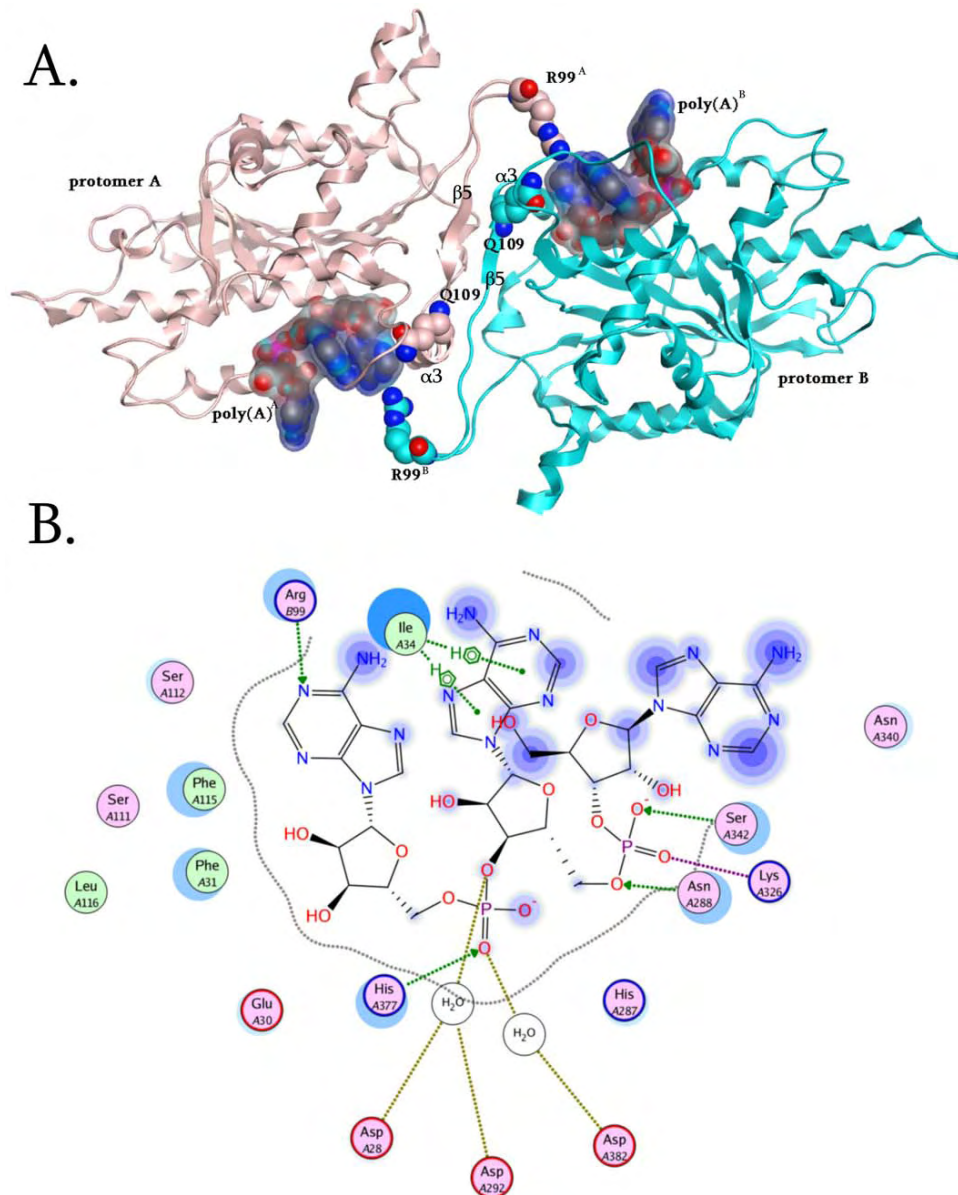
Εικόνα 1-6: Οι αριθμοί των αμινοξικών καταλοίπων (σύμφωνα με την αρίθμηση στην ανθρώπινη PARN) υποδεικνύονται στο πάνω μέρος. Το ύψος κάθε γράμματος είναι ανάλογο της συχνότητας του αντίστοιχου αμινοξέος σε αυτή τη θέση, και τα γράμματα είναι σε τέτοια σειρά ώστε το συχνότερο να βρίσκεται στην κορυφή. Τα αμετάβλητα κατάλοιπα υποδεικνύονται με τελείες. [48]

Με βάση τη φυλογενετική ανάλυση, η έρευνα επικεντρώθηκε στους πιθανούς ρόλους του αμετάβλητου καταλοίπου της Arg99, εκτός των άλλων. Δομική υπέρθεση των δύο μονομερών της PARN και των δύο αντίστοιχων ολιγονουκλεοτιδίων πολυ(A) αποκάλυψε μικρές αποκλίσεις (max Ca RMSD <math><2\text{\AA}</math>). Η *in silico* δομική ανάλυση έδειξε ότι η Arg99 του μονομερούς A (Arg99A) υποστηρίζεται από το συμπληρωματικό μονομερές με συμμετρικό τρόπο κατά τη διάρκεια της κατάλυσης. Συγκεκριμένα, η Arg99A εκτείνεται μέσα στο ενεργό κέντρο της αλυσίδας B, όπως και η Arg99B στο ενεργό κέντρο της αλυσίδας A. Αυτά τα κατάλοιπα Arg σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τη βάση αδενίνης του τελευταίου 3' νουκλεοσιδίου της πολυ(A) αλυσίδας. Ο δεσμός υδρογόνου επιτυγχάνεται με τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ της ομάδας -NH_2 (δότης) της Arg και την ομάδα -N= (δέκτης) του δακτυλίου της αδενίνης (εικόνα 1-7).

Η ουσιαστική συμβολή της Arg99 επιβεβαιώνεται επίσης από μελέτες μετάλλαξης στην $\alpha 3$ έλικα της PARN, η οποία σχηματίζει έναν ευέλικτο βρόχο, ο οποίος υποστηρίζει τον βρόχο που βρίσκεται η Arg του άλλου μονομερούς ώστε να βρίσκεται στην εγγύτητα της καταλυτικής περιοχής.

Η βέλτιστη καταλυτική τοποθέτηση του σχιζόμενου δεσμού κατευθύνεται από την His377, η οποία σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο της ομάδας -P=O του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Κατά συνέπεια, δεδομένου ότι η His377 και η Arg99 σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το πρώτο νουκλεοσίδιο από διαφορετικές κατευθύνσεις, παίζουν σημαντικό ρόλο στην

τριδιάστατη του σταθεροποίηση και τοποθέτηση στο ενεργό κέντρο της PARN (εικόνα 1-7B). Συμπερασματικά, η Arg99 μπορεί να αντιπροσωπεύει ακόμα ένα σημαντικό κατάλοιπο καθώς συνδέει τα δύο μονομερή, συμβάλλει στη συνολική σταθερότητα και κατευθύνει το υπόστρωμα σε μια βέλτιστη θέση για την αντίδραση διάσπασης [48].



Εικόνα 1-7: Ο ρόλος της Arg99 στον καταλυτικό μηχανισμό της PARN [48]

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Με βάση μια πρόσφατη *in silico* μελέτη για το σχεδιασμό ειδικών αναστολέων της PARN, η οποία απέδωσε σημαντικό δομικό ρόλο στην Arg99 της PARN, σχεδιάστηκε μια μετάλλαξη αυτού του αμινοξέος σε Ala για να εξεταστεί η επίδρασή της στις ιδιότητες της PARN. Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας, εξετάστηκαν οι πιθανές μεταβολές στην δραστικότητα του μεταλλαγμένου ενζύμου σε σύγκριση με αυτό του αγρίου τύπου, με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο με διάλυμα κυανού του μεθυλενίου.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Υλικά

α) 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
Phenylmethansulfonylfluorid (<i>PMSF</i>)	SERVA
SDS (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)	SIGMA
TEMED (<i>N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine</i>)	Research Organics
Tris base	Merck
Αγαρόζη (<i>Agarose</i>)	SeaKem
Αιθανόλη	Panreac
Ακρυλαμίδη (<i>Acrylamide</i>)	SIGMA
β-μερκαπτοαιθανόλη	Riedel de Haen
Γλυκερόλη (<i>glucerosl</i>)	Panreac
Δις-ακρυλαμίδιο (<i>Bis-acrylamide</i>)	SIGMA
Ισοπροπανόλη (<i>Isopropanole</i>)	Scharlau
Οξικό οξύ	Merck
Χλωραμφαινικόλη	SIGMA

β) Βακτηριακά στελέχη

BL21 (DE3) pUBS E.coli B, F⁻ dcm ompT hsdS_(TB+MB+) gal λ(DE3)

γ) Θρεπτικά υλικά

LB Broth	Scharlau
LB Agar	Scharlau

δ) Πρωτεΐνες και ένζυμα

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

ε) Πλασμίδια

pET33 PARN 74	NOVAGEN
---------------	---------

στ) Υλικά χρωματογραφίας

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

ζ) Υλικά διαπίδυσης

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

3.2. Διαλύματα

α) Θρεπτικά υλικά:

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

β) Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων:

- Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης (50x): Tris base 24,2% v/w, Οξικό οξύ 5,71% w/w, EDTA 0,05M, pH 8,6
- Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων (6x): Bromophenol Blue 0,09%, Xylene Cyanol 0,09%, Γλυκερόλη 60%, EDTA 60mM

γ) Διαλύματα για απομόνωση πρωτεΐνης:

- Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCl, 0,1% Triton X-100, 10% γλυκερόλη, 2mM μερκαπτοαιθανόλη, PMSF 0,1mM, λυσοζύμη)
- Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCl, 10% γλυκερόλη, 20mM ιμιδαζόλιο)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 1 (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCl, 10% γλυκερόλη, 50mM ιμιδαζόλιο)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 2 (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCl, 10% γλυκερόλη, 100mM ιμιδαζόλιο)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCl, 10% γλυκερόλη, 500mM ιμιδαζόλιο)

δ) 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

ε) 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.

στ) Διαλύματα για βαφή του gel:

- Διάλυμα χρώσης Coomassie Brilliant Blue G250 0,1% w/v, ισοπροπανόλη 33%, οξικό οξύ 2%
- Οξικό οξύ 10%

ζ) 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.

3.3. Μέθοδοι

α) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation):

Βακτηριακά κύτταρα (συνήθως από stock γλυκερόλης) ενοφθαλμίζονται σε 3ml LB broth που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί επώαση των καλλιιεργειών για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Η ακόλουθη διαδικασία πραγματοποιείται με βάση το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E.coli*, NucleoSpin Plasmid QuickPure:

1) Καλλιέργεια και συλλογή των βακτηριακών κυττάρων:

Μεταφέρονται 1,5ml από την καλλιέργεια *E. coli* που αναπτύχθηκε σε ένα σωλήνα και φυγοκεντρώνονται για 30s στις 11000 x g. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται αυτό το βήμα.

2) Λύση των κυττάρων:

Προστίθενται 250μl buffer A1 και επαναδιαλύεται το ίζημα με τη βοήθεια πιπέτας και έντονη ανάδευση στο vortex. Ακολουθεί προσθήκη 250μl buffer A2 και ανάμειξη αναποδογυρίζοντας ήπια μερικές φορές χωρίς τη χρήση του vortex. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά. Ακολούθως προστίθενται 300μl buffer A3 και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση αναποδογυρίζοντας μερικές φορές (6-8) αποφεύγοντας τη χρήση του vortex. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 11000 x g σε θερμοκρασία δωματίου.

3) Δέσμευση του DNA:

Τοποθετείται η στήλη NucleoSpin (Plasmid QuickPure σε ένα συλλεκτικό σωλήνα (collecting tube) των 2ml στην οποία φορτώνεται το υπερκείμενο που έχει προκύψει από τη φυγοκέντρηση του προηγούμενου βήματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 x g και απομάκρυνση του εκλούσματος.

4) Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης:

Επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα και προστίθενται 450μl buffer AQ (με αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 11000 x g όπου και επιτυγχάνεται ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης. Τέλος, πραγματοποιείται απομάκρυνση του εκλούσματος και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα.

5) Έκλυση του DNA:

Τοποθετείται η στήλη σε νέο σωλήνα και προστίθενται 50μl buffer AE. Στη συνέχεια, επωάζεται το δείγμα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 x g.

β) Σχεδιασμός εκκινητών για *in vitro* τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση:

Για το σχεδιασμό των μεταλλαξιγόνων εκκινητών χρησιμοποιείται το λογισμικό PrimerX, το οποίο συγκρίνει μια αλληλουχία DNA (μήτρα) με μια αλληλουχία DNA ή πρωτεΐνης, στην οποία έχει ήδη εισαχθεί η επιθυμητή μετάλλαξη. Στη συνέχεια, δημιουργεί αλληλουχίες FW εκκινητών υπολογίζοντας όλες τις πιθανές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων κατάλληλου μήκους που

κωδικοποιούν αυτή τη μετάλλαξη και ακολουθούν συγκεκριμένους περιορισμούς. Τέλος, το PrimerX παράγει αντίστοιχες αντίστροφες αλληλουχίες εκκινητών, και υπολογίζει άλλες απαραίτητες πληροφορίες, όπως η θερμοκρασία τήξεως και η περιεκτικότητα GC για κάθε ζεύγος εκκινητών. Στην συγκεκριμένη εργασία έγινε η εξής αντικατάσταση:

$R_{99} \rightarrow A_{99}$

$AGA \rightarrow GCA \quad AG_{295}GC$

Έπειτα επιβεβαιώθηκε η σχεδιασμένη μετάλλαξη με το λογισμικό Expsy (translation tool). Σύμφωνα με το εγχειρίδιο οδηγιών του QuikChange II Site-Directed Mutagenesis kit που χρησιμοποιήθηκε, οι εκκινητές πρέπει να πληρούν τις εξής προϋποθέσεις:

- 1) Και οι δύο μεταλλαξιγόνοι εκκινητές πρέπει να περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη και να προσδένονται στην ίδια αλληλουχία στις απέναντι αλυσίδες του πλασμιδίου.
- 2) Οι εκκινητές πρέπει να είναι μεταξύ 25 και 45 βάσεις σε μήκος, με θερμοκρασία τήξεως (T_m) $>78^\circ C$
- 3) Η επιθυμητή μετάλλαξη πρέπει να βρίσκεται στη μέση του εκκινητή με 10-15 βάσεις σωστής αλληλουχίας ανοδικά και καθοδικά της μετάλλαξης.
- 4) Οι εκκινητές ιδανικά πρέπει να έχουν ελάχιστη περιεκτικότητα GC 40% και να τερματίζουν σε μια ή περισσότερες G ή C βάσεις.

γ) *In vitro* τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση (*in vitro* site-directed mutagenesis):

Η *in vitro* τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση είναι μια πολύτιμη τεχνική για τον χαρακτηρισμό των δυναμικών, πολύπλοκων συσχετισμών μεταξύ της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών, για την μελέτη στοιχείων γονιδιακής έκφρασης, και για την εκτέλεση τροποποιήσεων πλασμιδιακών φορέων.

Το QuikChange II Site-Directed Mutagenesis kit χρησιμοποιείται για τη δημιουργία σημειακών μεταλλάξεων, αντικατάσταση αμινοξέων, όπως στην παρούσα εργασία, και για μεταλλάξεις διαγραφής ή παρεμβολής. Αυτή η μέθοδος πραγματοποιείται με τη χρήση της DNA

πολυμεράσης υψηλής πιστότητας PfuUltra (HF) για την κατευθυνόμενη από μεταλλαξιγόνους εκκινητές αντιγραφή και των δύο αλυσίδων του πλασμιδίου. Η βασική διαδικασία χρησιμοποιεί ένα φορέα (υπερελικωμένο dsDNA) με το ένθεμα που ενδιαφέρει και τους δύο συνθετικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές, οι οποίοι περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη (εικόνα 3-1). Οι εκκινητές, ο καθένας συμπληρωματικός προς τις δύο αλυσίδες του φορέα, επεκτείνονται κατά τη διάρκεια εναλλαγής θερμοκρασιών με τη βοήθεια της πολυμεράσης PfuUltra χωρίς να εκτοπιστούν. Έτσι, η επέκταση των εκκινητών παράγει ένα μεταλλαγμένο πλασμίδιο με κομμένα άκρα. Ακολουθεί πέψη του πατρικού DNA με το ένζυμο περιορισμού Dpn I (ειδικό για μεθυλιωμένο και ημιμεθυλιωμένο DNA) για να επιλεγθεί το νεοσυντιθέμενο DNA που περιέχει τη μετάλλαξη. Ο κομμένος φορέας που περιέχει την επιθυμητή μετάλλαξη μετασχηματίζεται σε χημικώς επιδεκτικά κύτταρα.

Έλεγχος της in vitro μεταλλαξιγένεσης (mutagenesis control)

Για να δοκιμαστεί η αποτελεσματικότητα παραγωγής του μεταλλαγμένου πλασμιδίου, χρησιμοποιείται το πλασμίδιο ελέγχου (control) pWhitescript 4,5 kb. Αυτό το πλασμίδιο ελέγχου περιέχει ένα κωδικόνιο λήξης (TAA) στη θέση ενός κωδικονίου για Gln (CAA) στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης του pBluescript II SK(-) φαγομιδίου (αντιστοιχεί στο αμινοξύ 9 της πρωτεΐνης). Επιδεκτικά κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί με αυτό το πλασμίδιο ελέγχου δημιουργούν λευκές αποικίες σε τρυβλία με LB άγαρ και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη που περιέχουν IPTG και X-gal, επειδή η δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης έχει εξαλειφθεί. Οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές ελέγχου δημιουργούν μία σημειακή μετάλλαξη στο πλασμίδιο ελέγχου (pWhitescript 4,5kb), η οποία επαναφέρει το T κατάλοιπο του κωδικονίου λήξης (TAA) στο αμινοξύ 9 του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης σε C κατάλοιπο, με αποτέλεσμα το κωδικόνιο Gln (CAA) που βρίσκεται στην αγρίου τύπου αλληλουχία. Μετά από μετασχηματισμό, οι αποικίες μπορούν να υποβληθούν σε διαλογή για το γαλάζιο φαινότυπο β-γαλακτοσιδάσης (β-gal+) σε μέσο που περιέχει IPTG και X-gal.

Πίνακας 3-1: Συστατικά αντίδρασης ελέγχου

Component	μl /50μl of reaction
Pfu Ultra DNA polymerase (2,5u)	1
10X reaction buffer	5
pWhitescript (4,5kb)	2
control primer 1	1,25
control primer 2	1,25
dNTP mix (10mM each)	1
dd H ₂ O	38,5

Πραγματοποιούνται δύο αντιδράσεις ενίσχυσης, μία για κάθε αλυσίδα του πλασμιδίου.

Πίνακας 3-2: Αντίδραση 1 (ενίσχυση της κωδικής αλυσίδας)

Component	μl /50μl of reaction
Pfu Ultra DNA polymerase (2,5u)	1
10X reaction buffer	5
pET33b (≈50ng)	1,5
Mutagenic primer for coding strand (100pmol/μl)	1,3 (1/10 αραίωση)
dNTPs 25mM each	0,5
ddH ₂ O	40,7

Πίνακας 3-3: Αντίδραση 2 (ενίσχυση της μη κωδικής αλυσίδας)

Component	μl /50μl of reaction
Pfu Ultra DNA polymerase (2,5u)	1
10X reaction buffer	5
pET33b (≈50ng)	1,5
Mutagenic primer for non-coding strand (100pmol/μl)	1,2 (1/10 αραίωση)
dNTPs 25mM each	0,5
ddH ₂ O	40,8

Πίνακας 3-4: Συνθήκες αντίδρασης PCR για τις αντιδράσεις 1, 2, control

Βήμα αντίδρασης	Συνθήκες
μετουσίωση	95 °C, 1min (1 cycle)
μετουσίωση	95°C, 1min (10cycles)
υβριδισμός	55 °C, 1min (10 cycles)
πολυμερισμός	68 °C, 8min (10 cycles)

Μετά το πέρας των αντιδράσεων, 25μl από κάθε αντίδραση μεταφέρονται σε νέο tube. Προστίθενται 0,75μl πολυμεράσης PfuUltra στο κάθε tube για μια νέα αντίδραση ενίσχυσης:

Πίνακας 3-5: Συνθήκες αντίδρασης PCR για την τελική αντίδραση ενίσχυσης

Βήμα αντίδρασης	Συνθήκες
μετουσίωση	95 °C, 1min (1 cycle)
μετουσίωση	95°C, 30sec(15cycles)
υβριδισμός	58 °C, 1min (15 cycles)
πολυμερισμός	68 °C, 8min (15 cycles)
68 °C, 20min (1 cycle)	
Hold 4 °C	

Επιβεβαιώνεται η ενίσχυση με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και με τα εναπομείναντα 44μl της τελευταίας αντίδρασης πραγματοποιείται πέψη με το ένζυμο περιορισμού:

- 5μl 10x buffer 4 (NEB)
- 1μl DpnI (NEB)

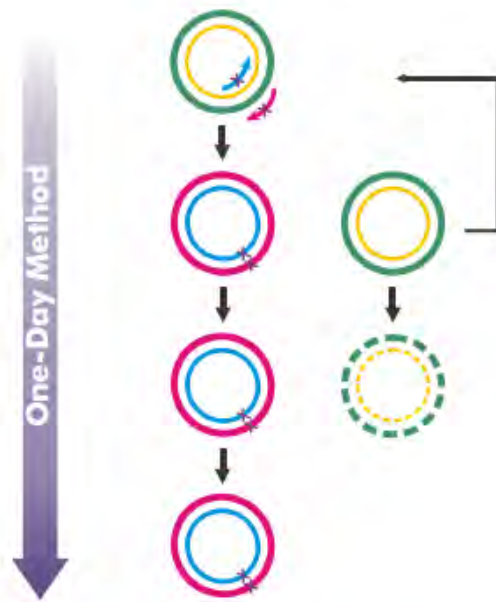
Αμέσως ακολουθεί επώαση των δειγμάτων προς πέψη στους 37 °C για 5 ώρες. Το αποτέλεσμα της πέψης επιβεβαιώνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Το προϊόν της πέψης κατακρημνίζεται με αιθανόλη.

Κατακρήμνιση με αιθανόλη (ethanol precipitation)

- Προσθήκη 5M NaCl σε τελική συγκέντρωση 0,25M
- Προσθήκη τρεις φορές τον όγκο του δείγματος παγωμένη αιθανόλη 100%
- Ανάδευση
- Φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα για 5' στους 4 °C
- Απόρριψη του υπερκείμενου
- Στέγνωμα στο heatblock
- Επαναδιάλυση σε 10μl αποστειρωμένο νερό
- Ανάδευση

Μετασηματισμός χημικός επιδεικτικών κυττάρων (transformation)

Σε 200μl επιδεικτικών κυττάρων γίνεται προσθήκη 5μl του προϊόντος μετά την κατακρήμνιση με αιθανόλη. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση στον πάγο για 30min και ακολούθως heatshock στους 42°C για 45sec. Έπειτα τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 1-2 min και εν συνεχεία προστίθενται σε κάθε καλλιέργεια 800μl SOC medium. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 37°C υπό ανάδευση (160 rpm). Τέλος, επιστρώνονται 100μl της μετασηματισμένης καλλιέργειας σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB agar το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό (καναμυκίνη), ανάλογα με τα γονίδια ανθεκτικότητας που διαθέτει το εκάστοτε πλασμίδιο που χρησιμοποιείται για το μετασηματισμό. Τέλος, πραγματοποιείται επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 12-14h. Για την αντίδραση ελέγχου προστίθενται στο στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει αμπικιλίνη, πριν τα κύτταρα, 80μg/ml X-gal και 20mM IPTG.



Εικόνα 3-1: Επισκόπηση της μεθόδου της *in vitro* τοποκατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης με το *Quikchange II kit*

δ) Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων (competent cells):

Για τη δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος $CaCl_2$:

- Αρχικά σε 3 ml θρεπτικού υλικού LB Broth ενοφθαλμίζονται τα κύτταρα που επιθυμούμε να καταστήσουμε επιδεκτικά. Στην περίπτωση των κυττάρων DH5α προστίθεται στο θρεπτικό υλικό και το αντιβιοτικό αμικικιλίνη (100 mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 100 mg/ml. Οι υγρές καλλιέργειες έπειτα τοποθετούνται στους 37°C και στις 210 rpm για 12-16 ώρες (overnight).
- Από την overnight καλλιέργεια λαμβάνεται 1 ml και τοποθετείται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100 ml θρεπτικό LB Broth. Έπειτα από ήπια ανάδευση, φωτομετρείται 1 ml από την καλλιέργεια στα 600 nm. Η οπτική απορρόφηση (OD_{600}) πρέπει να είναι περίπου 0,04. Ακολούθως η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C και στις 210 rpm. Πραγματοποιούνται φωτομετρήσεις άνα τακτά χρονικά διαστήματα έως ότου η οπτική απορρόφηση είναι $OD_{600}=0,4$, καθώς τα κύτταρα στο σημείο εκείνο βρίσκονται στην εκθετική φάση της ανάπτυξης τους.
- Τα 100 ml της καλλιέργειας των κυττάρων μοιράζονται σε δύο αποστειρωμένα και παγωμένα falcons των 50 ml (υπό φλόγα) και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο για 10 λεπτά.

- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 λεπτά και στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα falcons τοποθετούνται ανάποδα ώστε να απομακρυνθούν και τα τελευταία ίζημα.
- Σε κάθε falcon προστίθεται 30 ml διάλυμα MgCl₂-CaCl₂ (80 mM/20 mM) και πραγματοποιείται ελαφρά ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.
- Τα falcons φυγοκεντρώνονται εκ νέου στις 4.000 rpm για 10 λεπτά και στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα falcons τοποθετούνται ανάποδα.
- Σε κάθε falcon προστίθεται 2 ml παγωμένου διαλύματος CaCl₂ 0.1 M, αναδιαλύεται το ίζημα και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο.
- Εισάγονται 70 μl DMSO σε κάθε falcon και ακολουθεί ανάδευση (το DMSO διατηρεί τα κύτταρα δεκτικά για περισσότερο διάστημα και εμποδίζει τυχόν διαφυγή των τμημάτων τους). Έπειτα αφήνονται στον πάγο για 15 λεπτά.
- Προστίθενται άλλα 70 μl DMSO στα falcons και αφού αναδευτούν, τοποθετούνται στον πάγο.
- Πολύ γρήγορα μοιράζεται η ποσότητα των επιδεκτικών κυττάρων (200 μl ανά σωλήνα των 1.5 ml) και τοποθετούνται προς φύλαξη στους -80°C.

ε) Υπερέκφραση της PARN:

Σε 5ml LB Broth με χλωραμφαινικόλη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 25mg/ml και καναμυκίνη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml, ενοφθαλμίζονται μετασχηματισμένα κύτταρα BL21 και επωάζονται για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210rpm). Ακολουθεί μεταφορά των 5ml της ο/ν καλλιέργειας σε 400ml φρέσκου θρεπτικού μέσου LB Broth με χλωραμφαινικόλη και καναμυκίνη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm (OD_{600}) και επώαση των καλλιεργείων στους 37°C υπό ανάδευση μέχρι το OD_{600} να φτάσει περίπου το 0,6 που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Προσθέτουμε IPTG (*Isopropyl Thio Galactosyl*, 1M) σε τελική συγκέντρωση 0,5mM και 1mM, το οποίο επάγει την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Οι καλλιέργειες επωάζονται υπό ανάδευση 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.

στ) Απομόνωση της PARN:

Ομογενοποίηση των κυττάρων

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

Χρωματογραφία συγγένειας

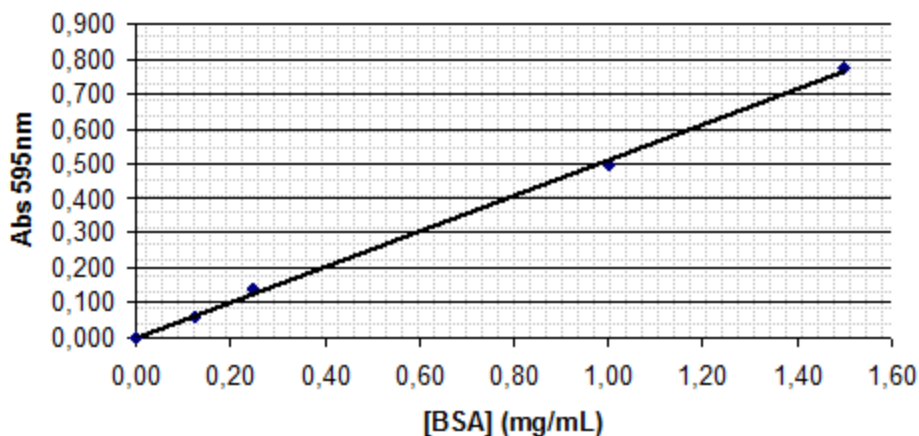
Το υπερκείμενο απομακρύνεται και αναμιγνύεται με ρητίνη νικελίου αραρόζης (*NTA-Ni agarose*), η οποία έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης και αναδεύεται ήπια για μια 30min στους 4°C. Η πρωτεΐνη δεσμεύεται στην ρητίνη μέσω σύνδεσης των ιστιδινών που περιέχει στο αμινοτελικό άκρο με τα άτομα του νικελίου. Το διάλυμα περνιέται προσεκτικά από στήλη η οποία κατακρατεί την ρητίνη. Η στήλη ξεπλένεται με 10ml ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (*wash*). Η έκλυση (*elution*) της πρωτεΐνης έγινε με 6ml ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης το οποίο περιέχει ιμιδαζόλιο σε συγκέντρωση 500mM. 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-E5). Από κάθε βήμα της απομόνωσης κρατάμε δείγματα για μέτρηση ολικής πρωτεΐνης και ηλεκτροφόρηση.

Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης

Παρασκευάστηκε stock διάλυμα BSA 2mg/ml. Από αυτό φτιάχτηκαν διαλύματα συγκέντρωσης από 0 μέχρι 2,00mg/ml και επώαστηκε με Bioquant για τουλάχιστον 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάστηκε μετρώντας τις απορροφήσεις των διαλυμάτων φωτομετρικά στα 595nm. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3-2, προκύπτει μια γραμμική σχέση με εξίσωση:

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

Με την συγκεκριμένη εξίσωση υπολογίστηκε η ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών των δειγμάτων στα διάφορα στάδια της απομόνωσης.



Εικόνα 3-2: Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

ζ) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου:

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, η οποία αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές, την πηκτή διαχωρισμού (separating gel) (πίνακας 3-6) και την πηκτή συγκέντρωσης (stacking gel) (πίνακας 3-7).

Πίνακας 3-6: Σύσταση πηκτής διαχωρισμού 8%

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος</i>
Ακρυλαμίδιο 30%	2,7 ml
Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	2,5 ml
SDS 10%	100 μ l
TEMED	6,0 μ l
APS 10%	100 μ l
ddH ₂ O	Up to 10 ml

Η πηκτή συγκέντρωσης έχει μικρότερη πυκνότητα από το πήκτωμα διαχωρισμού και συγκεντρώνει τη ποσότητα των δειγμάτων που έχουμε φορτώσει στα πηγάδια, τα οποία όταν εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού, διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Αρχικά η πηκτή διαχωρισμού τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται από πάνω της μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης για την ευθυγράμμιση της επιφάνειας της πηκτής. Αφού πήξει, αφαιρείται η ισοπροπανόλη και τοποθετείται στη συσκευή η πηκτή συγκέντρωσης ακριβώς πάνω από την πηκτή διαχωρισμού, η οποία αφήνεται να πήξει. Η προετοιμασία των δειγμάτων

πριν φορτωθούν στην πηκτή περιλαμβάνει την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού (3x) και τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η μετουσίωση επιτυγχάνεται με θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C, για 4 λεπτά, έτσι ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος και όχι με βάση το φορτίο τους, το οποίο είναι ενιαία αρνητικό, εξαιτίας του SDS. Ακολούθως, αφού εξασφαλιστεί ότι η πηκτή είναι έτοιμη, φορτώνονται τα δείγματα, καθώς και οι μάρτυρες μοριακού βάρους, στις ειδικές υποδοχές της πηκτής και προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris, γλυκίνη, SDS), έτσι ώστε να έρχεται σε επαφή με την πηκτή. Τέλος, συνδέονται τα ηλεκτρόδια με την συσκευή τροφοδότησης και εφαρμόζεται τάση 100V, μέχρι τα δείγματα να διανύσουν την πηκτή συγκέντρωσης, ενώ μόλις φτάσουν στη πηκτή διαχωρισμού η τάση αυξάνεται στα 200V.

Πίνακας 3-7: Σύσταση πηκτής συγκέντρωσης 5%

Αντιδραστήρια	Όγκος
Ακρυλαμίδιο 30%	0,83 ml
Tris-HCl 0,5M (pH 6,8)	1,26 ml
SDS 10%	50 μ l
TEMED	5,0 μ l
APS 10%	50 μ l
ddH ₂ O	Up to 5 ml

Το APS και το TEMED προστίθενται στο τέλος, καθώς είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου. Ακολουθεί, αφαίρεση της πηκτής συγκέντρωσης και χρώση της πηκτής διαχωρισμού με το διάλυμα χρωματισμού (stain solution).

Χρώση πηκτώματος ακρυλαμιδίου

- Τοποθετείται το πήκτωμα σε ποτήρι ζέσεως και προστίθεται οξικό οξύ 10%
- Βράσιμο στο φούρνο μικροκυμάτων και μεταφορά σε νέο ποτήρι ζέσεως, όπου προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης (Coomassie Brilliant Blue G250)
- Βράσιμο στο φούρνο μικροκυμάτων και έπειτα ήπια ανάδευση για 5'
- Ξεπλένεται με νερό το πήκτωμα και τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως με οξικό οξύ 10%
- Βράσιμο στο φούρνο μικροκυμάτων

- Τοποθετείται σε νέο ποτήρι ζέσεως με οξικό οξύ 10%
- Ήπια ανάδευση

η) Διαπίδυση:

Ένα κομμάτι μεμβράνης διαπίδυσης βράζεται σε υψηλή θερμοκρασία σε 2% w/v NaHCO_3 για 25' και ξεπλένεται με αποστειρωμένο νερό. Σφραγίζεται η μεμβράνη από τη μια πλευρά με έναν κόμπο και ένα πιαστράκι και στη συνέχεια μεταφέρονται με πιπέτα τα κλάσματα από τη στήλη στην μεμβράνη. Η μεμβράνη σφραγίζεται και από την άλλη πλευρά. Έπειτα αυτή στηρίζεται στο πάνω μέρος ποτηριού 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. Το ποτήρι βρασμού τοποθετείται σε συσκευή μαγνητικής ανάδευσης με ένα μαγνήτη έτσι ώστε να αναδεύεται το διάλυμα στο ψυγείο O/N. Την επομένη το διάλυμα μοιράζεται σε μικροσωλήνες φυγοκέντρησης (eppendorf tubes, 1.5 ml).

θ) Μέτρηση της ενεργότητας της PARN με κυανό του μεθυλενίου:

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στη μείωση της διαφοράς απορρόφησης (ΔA) του πολυ(A) στα 662nm όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του [44,45]. Σύμφωνα με την αρχή αυτή και με βάση την πρότυπη καμπύλη γίνεται η μέτρηση της συγκέντρωσης σε μία αντίδραση των 100μl, με προσθήκη 900μl διαλύματος κυανού του μεθυλενίου. Το τελευταίο περιέχει κυανό του μεθυλενίου το οποίο προσδένεται στο πολυμερές πολυ(A) και EDTA σε συγκέντρωση 2mM το οποίο δεσμεύει τα ιόντα μαγνησίου. Τα ιόντα μαγνησίου είναι απαραίτητα για την λειτουργία του ενζύμου και έτσι το EDTA δεσμεύοντας τα ιόντα σταματάει την αντίδραση. Μείωση της συγκέντρωσης του πολυ(A), που οφείλεται σε ενζυμική δράση έχει ως συνέπεια την αύξηση της απορρόφησης. Έτσι για την μέτρηση της ενεργότητας προστίθεται ίδια ποσότητα πολυ(A) στο τυφλό και στην αντίδραση, όπου η τιμή της απορρόφησης, μετά από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα στην αντίδραση, είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας πολυ(A) που αποικοδομήθηκε.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης πολυ(Α)

Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης ετοιμάστηκαν σύμφωνα με τον πίνακα 3-8. Μετά την προσθήκη του διαλύματος κυανού του μεθυλενίου τα δείγματα επώαστηκαν για 15min στους 30°C στο σκοτάδι και η φωτομέτρηση έγινε στα 662nm. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυ(Α) (10μg/ml τελική συγκέντρωση). Υπολογίστηκε η διαφορά απορρόφησης (ΔA) θέτοντας το τυφλό ως 0. Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει η εξίσωση από την οποία μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα του πολυ(Α) που υδρολύεται κατά τις ενζυμικές αντιδράσεις.

Πίνακας 3-8: Πρότυπη καμπύλη πολυ(Α)

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

Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30°C. Για να υπολογιστεί ο βέλτιστος χρόνος αντίδρασης, πραγματοποιούνται πειράματα ενζυμικής δράσης στη βέλτιστη σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος $K_m=30\mu\text{g/ml}$, και σε καθορισμένους χρόνους σταματάει η αντίδραση με την προσθήκη 900μl ρυθμιστικού διαλύματος κυανού του μεθυλενίου και τα δείγματα φωτομετρούνται στα 662nm.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρχικά απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA (pET33b-PARN) για να χρησιμοποιηθεί για την υπερέκφραση της PARN σε κύτταρα BL21, αλλά και για την *in vitro* τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση.

4.1. Σχεδιασμός εκκινητών για τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση *in vitro*

Σχεδιάστηκαν εκκινητές με το πρόγραμμα PrimerX για την μετάλλαξη της αργινίνης 99 σε αλανίνη. Η αλανίνη είναι μη πολική και ένα από τα απλούστερα δομικά αμινοξέα. Χρησιμοποιείται ευρέως σε μελέτες μεταλλαξιγένεσης για την κατανόηση του ρόλου αμινοξέων στη δομή και λειτουργικότητα των πρωτεϊνών. Η διαδικασία έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειριδίου του QuikChange II kit (Agilent Technologies), με τα εξής αποτελέσματα:

Forward: 5' CCGAAACCCTTCAATGCATCCTCACCAGATG 3'

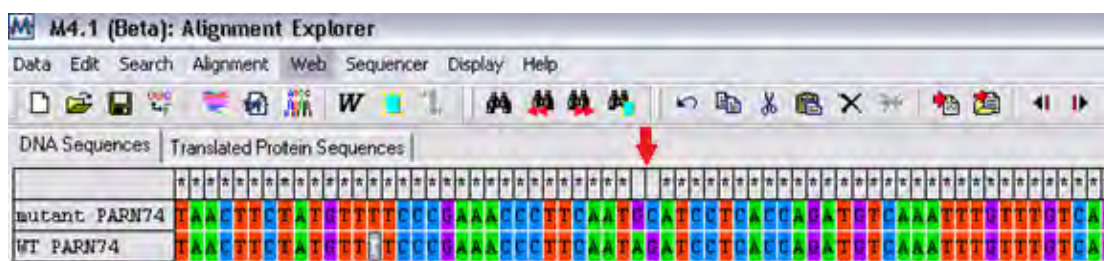
Reverse: 5' CATCTGGTGAGGATGCATTGAAGGGTTTCGG 3'

GC content: 51.61%	Location: 280-310
Melting temp: 75.0°C	Mismatched bases: 2
Length: 31 b	Mutation: Substitution
5' flanking region: 15 bp	Forward primer MW: 9369.23Da
3' flanking region: 14 bp	Reverse primer MW: 9662.36 Da

4.2. Τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση *in vitro*

Πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις ενίσχυσης, μία για την κωδική αλυσίδα και μία για την μη κωδική αλυσίδα του γονιδίου της PARN, με τους μεταλλαξιγόνους εκκινητές και την πολυμεράση PfuUltra που παρείχε το kit και μια αντίδραση ελέγχου, σύμφωνα με τους πίνακες 3-2 και 3-3. Ακολούθησε μια νέα αντίδραση ενίσχυσης με τα προϊόντα των δύο προηγούμενων αντιδράσεων, η οποία υποβλήθηκε σε αντίδραση πέψης με το περιοριστικό ένζυμο DpnI, που επίσης παρείχε το kit, με σκοπό την απαλλαγή του προϊόντος από το πατρικό μεθυλιωμένο DNA, το οποίο δεν περιέχει την επιθυμητή μετάλλαξη. Έπειτα το προϊόν της πέψης κατακρημνίστηκε με αιθανόλη και με αυτό μετασχηματίστηκαν χημικά επιδεκτικά κύτταρα DH5a. Τα μετασχηματισμένα με το μεταλλαγμένο πλασμίδιο κύτταρα επιστρώθηκαν σε στερεό

θρεπτικό μέσο LB Agar με καναμυκίνη, και τα μετασηματισμένα κύτταρα ελέγχου σε στερεό θρεπτικό μέσο LB Agar με αμικικιλίνη, αφού προστέθηκε X-gal και IPTG στο τελευταίο τρυβλίο. Στη συνέχεια επωάστηκαν οι καλλιέργειες στους 37°C ο/ν. Στο τρυβλίο για τον έλεγχο της μεταλλαξιγένεσης, αναπτύχθηκαν αποικίες, οι οποίες σε ποσοστό περίπου 80% ήταν γαλάζιες, επιβεβαιώνοντας κατά ένα τρόπο την επιτυχία της διαδικασίας της μεταλλαξιγένεσης. Για την επιβεβαίωση της επιθυμητής μετάλλαξης στο γονίδιο της PARN, ενοφθαλμίστηκαν οι τέσσερις αποικίες που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο της μεταλλαξιγένεσης σε 5ml LB broth με καναμυκίνη η κάθε μία, επωάστηκαν στους 37°C υπό ανάδευση στις 210rpm ο/ν, και αφού απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA, στάλθηκαν 10μl από κάθε απομονωθέν πλασμίδιο (100ng/μl) για αλληλούχιση (τα δείγματα «διαβάστηκαν» με τον T7 universal primer). Με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης και τη βοήθεια του λογισμικού MEGA επιβεβαιώθηκε η επιθυμητή μετάλλαξη για τις δύο από τις τέσσερις αποικίες (εικόνα 4-1). Η μεταλλαγμένη PARN θα σημειώνεται στο εξής ως PARN(R99A).

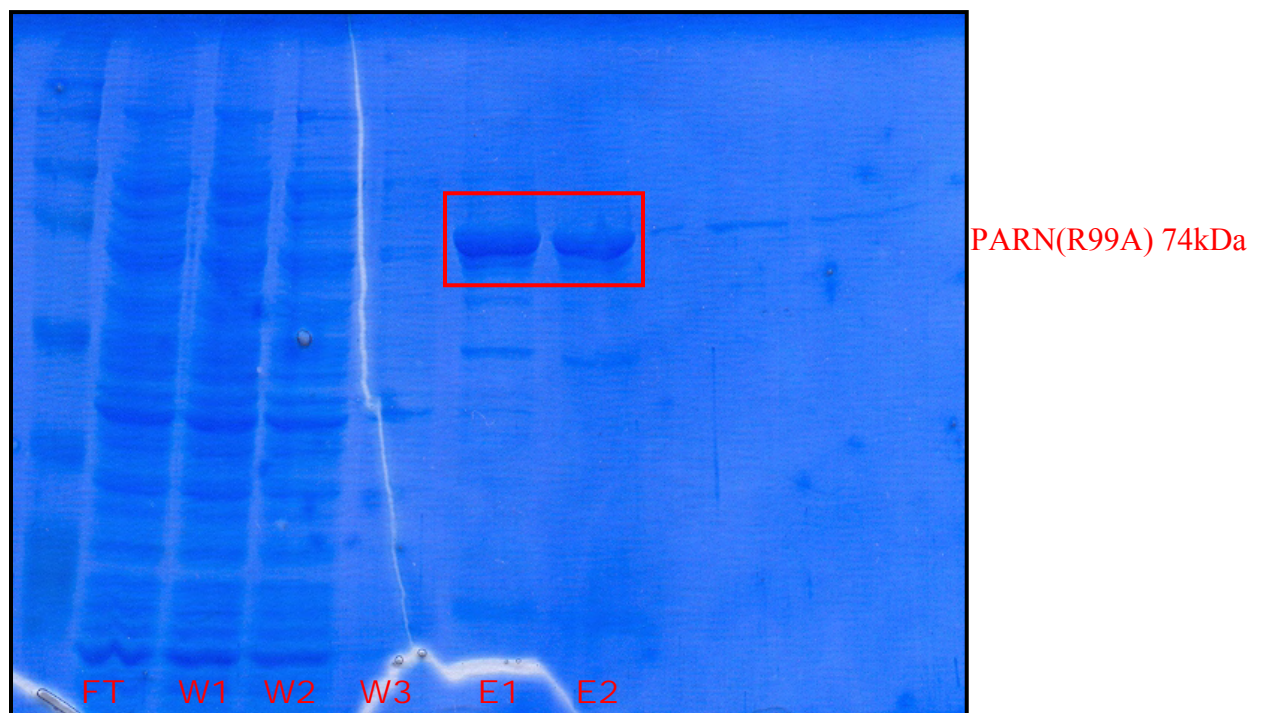


Εικόνα 4-1: Απεικόνιση του λογισμικού MEGA για τη σύγκριση των αλληλουχιών της PARN(R99A) και της wild type PARN (Με κόκκινο βέλος σημειώνεται η περιοχή της μετάλλαξης)

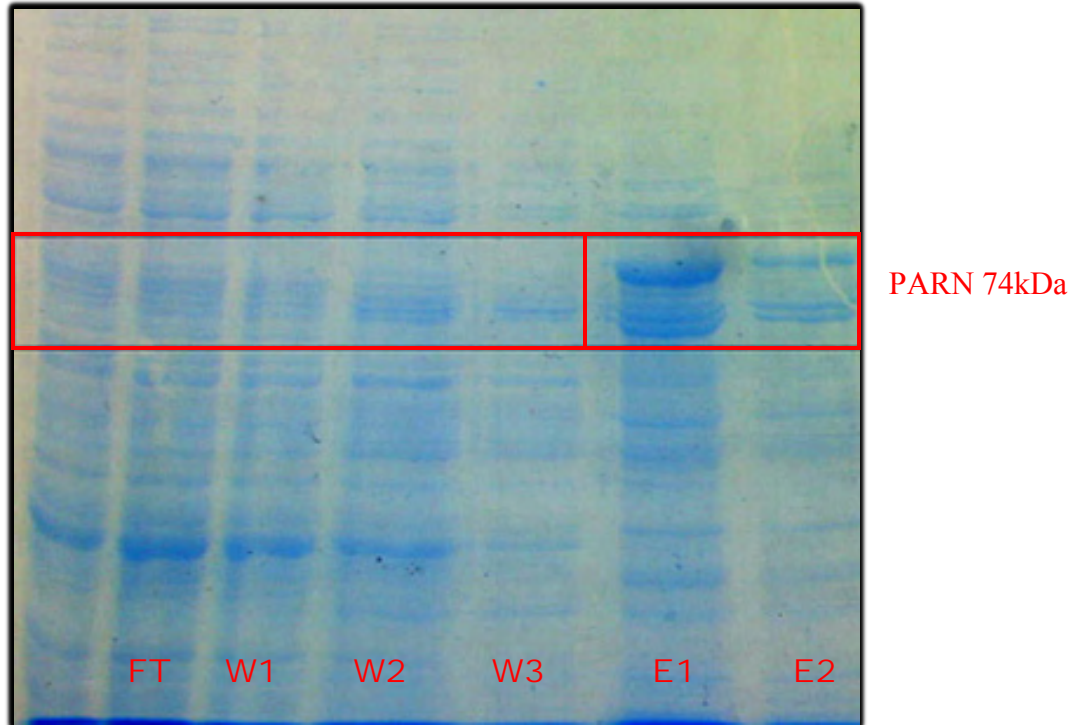
4.3. Υπερέκφραση, απομόνωση της PARN(R99A)

Στη συνέχεια κύτταρα BL21(DE3) μετασηματίστηκαν με πλασμίδιο από τις δύο αποικίες που επιβεβαιώθηκαν θετικές για την επιθυμητή μετάλλαξη. Τα μετασηματισμένα κύτταρα ενοφθαλμίστηκαν σε καλλιέργεια LB Broth 5ml (37°C, 210rpm, ο/ν) και έπειτα η καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε 400ml φρέσκο θρεπτικό μέσο. Όταν η απορρόφηση της καλλιέργειας έφτασε $A_{600}=0,650$, που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης, πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης της PARN(R99A) με χρήση IPTG τελικής συγκέντρωσης 1mM για 4h στους 37°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση της καλλιέργειας (4.000rpm, 20min, 4°C) και συλλογή του ιζήματος. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης, όπου πραγματοποιήθηκε

σπάσιμο των κυττάρων με υπέρηχους. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε (12.000rpm, 60min, 4°C) και συλλέχθηκε το υπερκείμενο για απομόνωση του ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας (*NTA-Ni agarose*). Συλλέχθηκαν 3 κλάσματα έκπλυσης (W1-W3, εικόνα 4-2) και 5 κλάσματα έκλουσης (E1-E5, εικόνα 4-2). Η μέτρηση ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης από τα κλάσματα της χρωματογραφίας έγινε με τη μέθοδο Bradford και η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της PARN(R99A) 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 0,475mg/ml. Στην εικόνα 4-2 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων της χρωματογραφίας απ' όπου απουσιάζουν τα κλάσματα E3-E5 καθώς δεν ανιχνεύθηκε πρωτεΐνη. Με τον ίδιο τρόπο υπερεκφράστηκε και απομονώθηκε η αγρίου τύπου PARN με μοριακή μάζα 74kDa (εικόνα 4-3), η συγκέντρωση της οποίας σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford ήταν 0,93mg/ml.



Εικόνα 4-2: Ηλεκτροφόρηση (*SDS-PAGE*) δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της PARN(R99A). Χρώση με *Coomassie Brilliant Blue*. **FT:** Δείγμα που δεν προσδέθηκε στη στήλη, **W1-W3:** Δείγματα έκπλυσης, **E1-E2:** Δείγματα έκλουσης. Η PARN(R99A) μοριακού βάρους 74 kDa εντοπίζεται μέσα στο ορθογώνιο πλαίσιο.



Εικόνα 4-3: Ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της PARN. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue. **FT:** Δείγμα που δεν προσδέθηκε στη στήλη, **W1-W3:** Δείγματα έκπλυσης, **E1-E2:** Δείγματα έκλυσης. Η PARN μοριακού βάρους 74 kDa εντοπίζεται μέσα στο δεξί ορθογώνιο πλαίσιο.

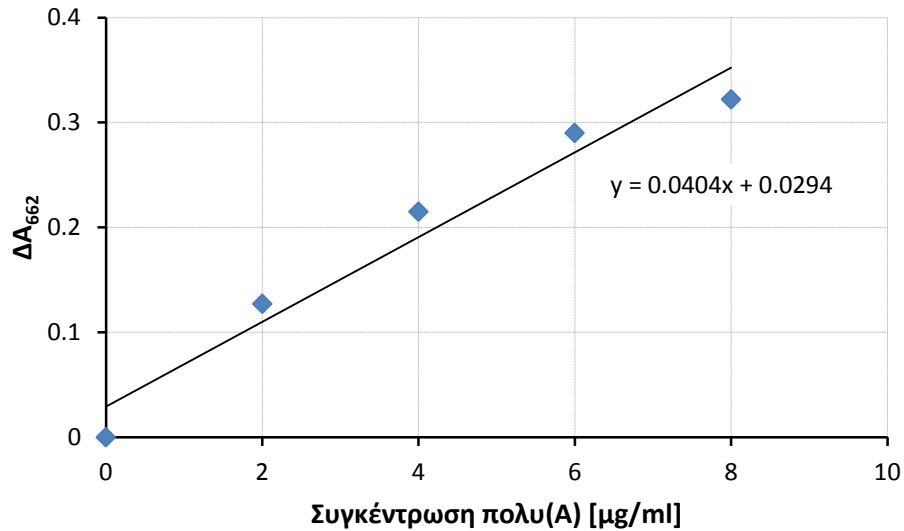
4.4. Μέτρηση της ενεργότητας της PARN με κυανό του μεθυλενίου:

Πρότυπη καμπύλη πολυ(A)

Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης προετοιμάστηκαν σύμφωνα με τον πίνακα 3-8. 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 γραμμική σχέση με την εξίσωση:

$$A = -0.0404 * C(\mu\text{g/ml}) + 0.3036$$

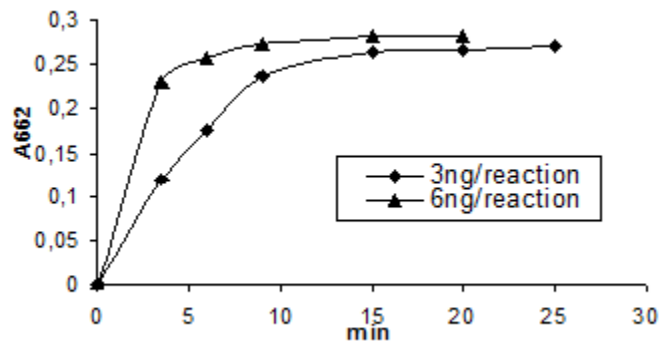
Με τη συγκεκριμένη εξίσωση μπορούν να υπολογιστούν οι απορροφήσεις των ενζυμικών αντιδράσεων σε πολυ(A) που αποικοδομήθηκε κατά τις αντιδράσεις. Στην εικόνα 4-4 φαίνεται η πρότυπη καμπύλη πολυ(A).



Εικόνα 4-4: Πρότυπη καμπύλη πολυ(Α)

Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

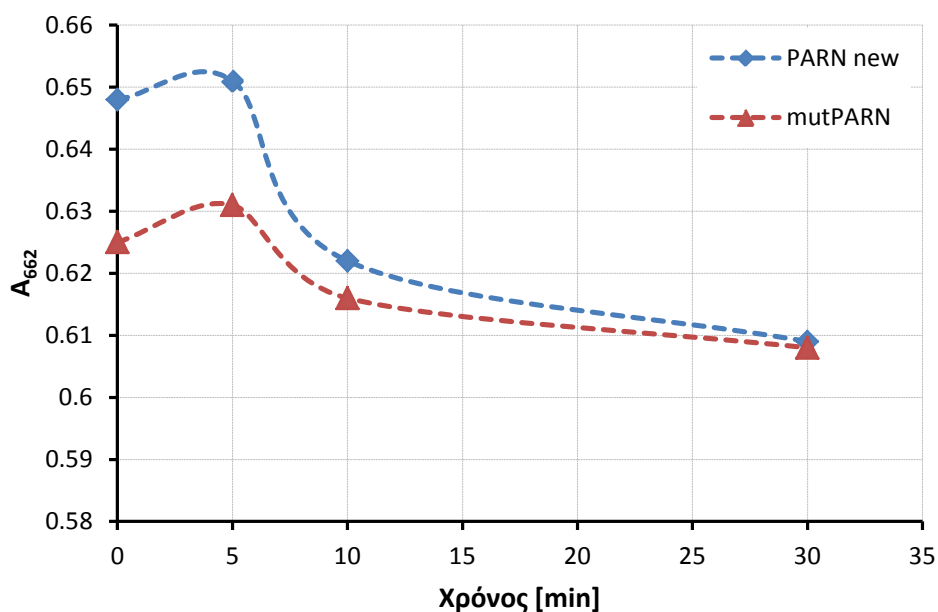
Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 30°C. Βασιζόμενοι σε προηγούμενη εργασία, καθορίστηκε ως ιδανική ποσότητα ενζύμου για τα παρόντα πειραματικά αποτελέσματα τα 3ng PARN/αντίδραση και ελάχιστος χρόνος αντίδρασης 15min για την PARN (εικόνα 4-5). Η συγκέντρωση πολυ(Α) κυμαίνεται από 7,5 έως 60,0μg/ml για να είναι εντός των ορίων γραμμικότητας της μεθόδου [46].



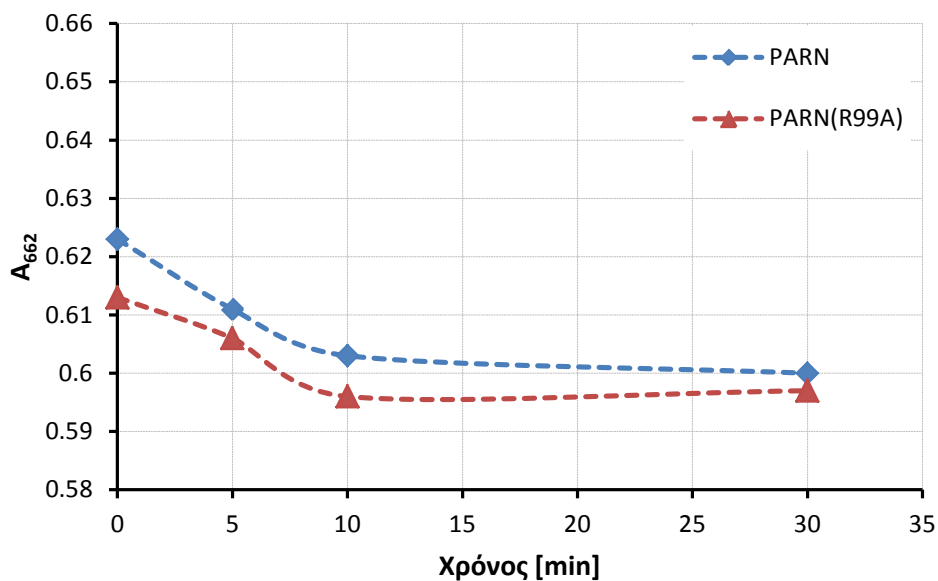
Εικόνα 4-5: Χρονοκαμπύλη με 6ng και 3ng PARN/αντίδραση σε συγκέντρωση πολυ(Α) 60μg/ml

Επίδραση της μετάλλαξης R99A στην ενεργότητα της PARN

Για την παρατήρηση της επίδρασης της μετάλλαξης στη δραστικότητα του ενζύμου, πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις στους 30°C και με τη βέλτιστη συγκέντρωση υποστρώματος 30μg/ml, μία με το ένζυμο αγρίου τύπου και μία για το μεταλλαγμένο ένζυμο. Τα διαλύματα των αντιδράσεων φωτομετρήθηκαν στα 662nm μετά την προσθήκη διαλύματος methylene blue σε τέσσερις διαφορετικούς χρόνους (0,5,10,30min), το οποίο σταματά τις αντιδράσεις. Στις εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα διαγράμματα των αποτελεσμάτων από δύο επαναληπτικά πειράματα. Για κάθε επανάληψη, παρατίθενται ένα διάγραμμα απορρόφησης του ενσωματωμένου κυανού του μεθυλενίου στο πολυ(A) στα 662nm προς το χρόνο αντίδρασης (εικόνες 4-6 και 4-7), ένα διάγραμμα μεταβολής αυτής της απορρόφησης (ΔA) προς το χρόνο αντίδρασης (εικόνες 4-8 και 4-9) και ένα ραβδόγραμμα για το ποσοστό της δραστικότητας της μεταλλαγμένης PARN ως προς την δραστικότητα της αγρίου τύπου PARN (εικόνα 4-10). Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα, η απορρόφηση της PARN(R99A) είναι μειωμένη σε σχέση με αυτή της PARN καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Επίσης παρατηρείται μείωση της απορρόφησης του κυανού του μεθυλενίου καθώς προχωρά η αντίδραση και από τα δύο ένζυμα σύμφωνα με το ίδιο πρότυπο, γεγονός που συμβαδίζει με τις πληροφορίες που υπάρχουν ως τώρα για τον τρόπο δράσης της PARN.

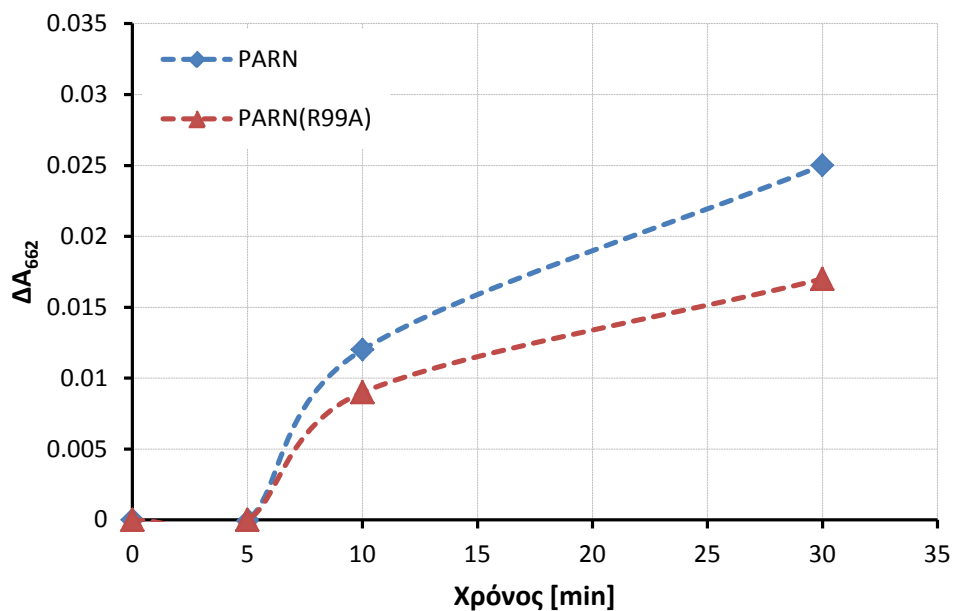


Εικόνα 4-6: Απορρόφηση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (1η μέτρηση)

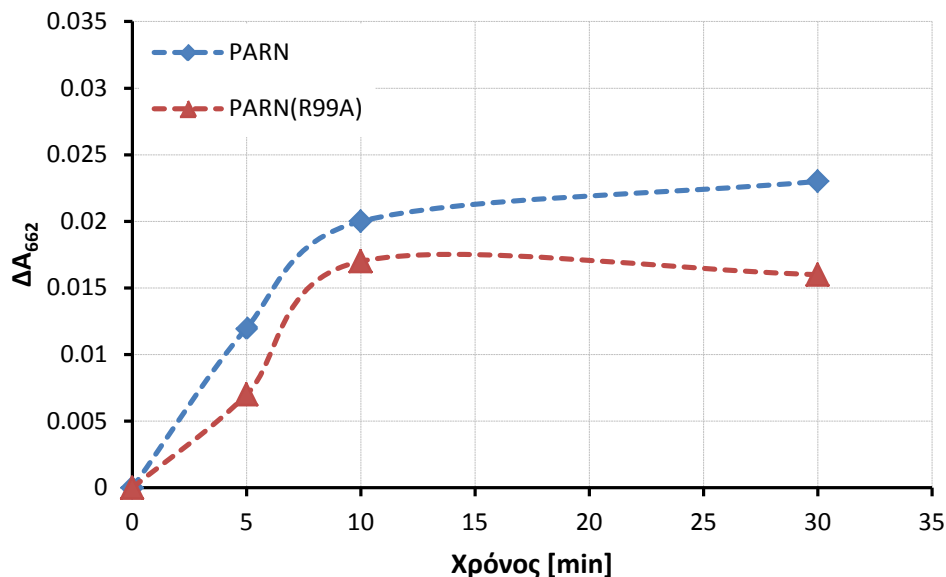


Εικόνα 4-7: Απορρόφηση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (2η μέτρηση)

Στις εικόνες 4-8 και 4-9 επίσης παρατηρείται ότι η ΔA της PARN(R99A) είναι μειωμένη σε σχέση με αυτή της PARN.

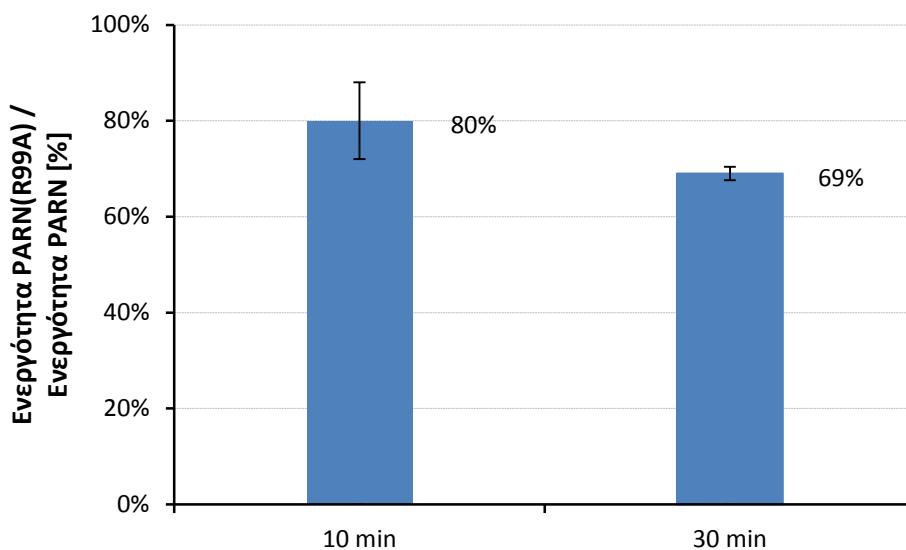


Εικόνα 4-8: Εξέλιξη της μεταβολής της απορρόφησης κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (1η μέτρηση)



Εικόνα 4-9: Εξέλιξη της μεταβολής της απορρόφησης κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (2η μέτρηση)

Με το ραβδόγραμμα (εικόνα 4-10) παρουσιάζεται η επίδραση της μετάλλαξης R99A στη δραστηριότητα του μεταλλαγμένου ενζύμου σε σχέση με αυτή του αγρίου τύπου. Η ενεργότητα της PARN(R99A) εκφράζεται ως ποσοστό της ενεργότητας της PARN σε διάφορους χρόνους της αντίδρασης. Τα ποσοστά υπολογίστηκαν σύμφωνα με τις μετρήσεις της ΔA για τα δύο ένζυμα και κάθε στήλη αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των δύο μετρήσεων.



Εικόνα 4-10: Επίδραση της μετάλλαξης R99A στην ενεργότητα της PARN. Η ενεργότητα της PARN (R99A) εκφράζεται ως ποσοστό της ενεργότητας της PARN.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Βιοχημικές και δομικές μελέτες αποκάλυψαν ότι η PARN συγκροτείται από δύο ίδιες υπομονάδες μάζας 74 kDa. Το ενεργό της κέντρο αποτελείται από τέσσερα αμινοξέα (Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382), τα οποία πιστεύεται ότι προσανατολίζουν τα σημαντικά για την κατάλυση δισθενή μεταλλικά ιόντα. Επιπλέον, η His377 έχει προταθεί ως σημαντικό αμινοξύ για την ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου. Έτσι, η PARN κατατάσσεται στις DEDDh νουκλεάσες [38]. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη βιοπληροφορικής, στις οποίες τα αποτελέσματα βασίζεται η παρούσα εργασία, η Arg99 αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό κατάλοιπο, καθώς συμβάλλει στη σύνδεση των δύο μονομερών της PARN, συνεισφέρει στην σταθερότητα του ενζύμου και κατευθύνει το υπόστρωμα στη βέλτιστη θέση για την αντίδραση διάσπασης της πολυ(A) ουράς. Η Arg99 μαζί με την His377 (που όπως προαναφέρθηκε συμμετέχει άμεσα στην κατάλυση) σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το πρώτο νουκλεοτίδιο αδενοσίνης της πολυ(A) ουράς από διαφορετικές διευθύνσεις. Τα δύο αυτά αμινοξέα έχουν κρίσιμο ρόλο στην σταθερότητα της PARN και στον προσανατολισμό του υποστρώματος συμβάλλοντας έτσι στην ενζυμική αντίδραση. Με βάση τον σημαντικό διαφαινόμενο ρόλο της Arg99 στη δομή και λειτουργία της PARN, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σύνθεση ενός μεταλλάγματος του ενζύμου, η PARN(R99A), με *in vitro* τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση. Η μεταλλαγμένη PARN εκφράστηκε και απομονώθηκε σε καλλιέργειες *E.coli*. Ακολούθως, συγκρίθηκε η ενεργότητά της με αυτή του ενζύμου του αγρίου τύπου. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η ενεργότητα της PARN(R99A) είναι μειωμένη κατά περίπου 30% σε σχέση με της PARN (εικόνα 4-10).

Η παρούσα εργασία μπορεί να αποτελέσει την αρχή για μελλοντικές μελέτες με σκοπό την περαιτέρω αποσαφήνιση του ομοδιμερισμού, της τοποθέτησης του υποστρώματος και κατ' επέκταση την πλήρη κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της PARN. Σε αυτή την κατεύθυνση, κινητικές και δομικές μελέτες με χρήση πολυαδενυλιωμένων mRNAs ή τροποποιημένων υποστρωμάτων αναμένεται να χαρακτηρίσουν περαιτέρω το ρόλο της Arg99 στο μηχανισμό κατάλυσης και να συμβάλλουν γενικότερα στην κατανόηση της λειτουργίας της PARN.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lewin B. GENES VIII κεφάλαιο 5.
2. Hoof van, A. & Parker, R. The exosome: a proteasome for RNA? *Cell* (1999).
3. Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. & Sharp, P.A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 457–467 (2003).
4. Maquat, L.E. & Carmichael, G.G. Quality control of mRNA function. *Cell* 26, 173–176 (2000).
5. Tucker, M. & Parker, R. Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 571–595 (2000).
6. Mitchell, P. & Tollervey, D. mRNA turnover. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 320–325 (2001).
7. Anderson, J.S.J. & Parker, R. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* 17, 1497–1506 (1998).
8. Chen, C.Y. *et al.* AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451–464 (2001).
9. Wang, Z. & Kiledjian, M. Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* 107, 751–762 (2001).
10. Mukherjee, D. *et al.* The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.* 21, 165–174 (2002).
11. Liu, H., Rodgers, N.D., Jiao, X. & Kiledjian, M. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J.* 21, 4699–4708 (2002).
12. Dodson, R.E. & Shapiro, D.J. Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72, 129–164 (2002).

13. Moore, M.J. Nuclear RNA turnover. *Cell* 108, 431–434 (2002).
14. Muhlrاد, D. & Parker, R. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370, 578–581 (1994).
15. Cao, D. & Parker, R. Computational modeling and experimental analysis of nonsense-mediated decay in yeast. *Cell* 113, 533–545 (2003).
16. Mitchell, P. & Tollervay, D. An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol. Cell* (2003).
17. Takahashi, S., Araki, Y., Sakuno, T. & Katada, T. Interaction between Ski7p and Upf1p is required for nonsense-mediated 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.* 22, 3951–3959 (2003).
18. Frischmeyer, P.A. *et al.* An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 295, 2258–2261 (2002).
19. van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C. & Parker, R. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* 295, 2262–2264 (2002).
20. Viswanathan, P., Chen, J., Chiang, Y.-C. & Denis, C.L. Identification of multiple RNA features that influence CCR4 deadenylation activity. *J. Biol. Chem.* 278, 14949–14955 (2003).
21. Dehlin, E., Wormington, M., Körner, C.G. & Wahle, E. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.* 19, 1079–1086 (2000).
22. Martínez, J., Ren, Y.-G., Nilsson, P., Ehrenberg, M. & Virtanen, A. The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation. *J. Biol. Chem.* 276, 27923–27929 (2001).
23. Sach, A.B. & Deardorff, J.A. Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast. *Cell* 70, 961–973 (1992).

24. Wickens, M., Bernstein, D.S., Kimble, J. & Parker, R. A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet.* 18, 150–157 (2002).
25. Goldstrohm & Wickens. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature Publishing Group Vol 9:337-344* (2008).
26. Parker, R. & Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 121–127(2004).
27. Kadyrova, L. Y., Habara, Y., Lee, T. H., & Wharton, R. P. Translational control of maternal cyclin B mRNA by nanos in the *Drosophila* germline. *Development* 134: 1519–1527 (2007).
28. Hook, B., Goldstrohm, A. C., Seay, D. J. & Wickens, M. Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. *J. Biol. Chem.* 282: 15430–15438 (2007).
29. 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).
30. Baggs, J.E. & Green, C.B. Nocturnin, a deadenylase in *Xenopus laevis* retina. A mechanism for posttranscriptional control of circadian-related mRNA. *Curr. Biol.* 13, 189–198 (2003).
31. Daugeron, M.C., Mauxion, F. & Seraphin, B. The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Res.* 29, 2448–2455 (2001).
32. Thore, S., Mauxion, F, Seraphin, B & Suck, D. X-ray structure and activity of the yeast Pop2 protein: a nuclease subunit of the mRNA deadenylase complex. *EMBO Rep.* 4, 1150–1155 (2003).
33. Åström, J., Åström, A. & Virtanen, A. Properties of a HeLa cell 3' exonuclease specific for degrading poly(A) tails of mammalian mRNA. *J. Biol. Chem.* 267, 18154–18159 (1992).
34. Körner, C.G. & Wahle, E. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J. Biol. Chem.* 272, 10448–10456 (1997).

35. Ren, Y.-G., Martínez, J. & Virtanen, A. Identification of the active site of poly(A)-specific ribonuclease by site-directed mutagenesis and Fe²⁺-mediated cleavage. *J. Biol. Chem.* 277, 5982–5987 (2002).
36. Lai, W.S., Kennington, E.A. & Blackshear, P.J. Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3798–3812 (2003).
37. Nilsson P, Henriksson N, Niedzwiecka A, Balatsos NA, Kokkoris K, Eriksson J, Virtanen A. A multifunctional RNA recognition motif (RRM) in poly(A)-specific ribonuclease (PARN) with cap and poly(A) binding properties. *J. Biol. Chem.* In press.
38. 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).
39. Javier Martínez, Yan-Guo Ren, Ann-Charlotte Thuresson, Ulf Hellman, Jonas Åström, and Anders Virtanen. A 54- kDa Fragment of the Poly(A)-specific Ribonuclease Is an Oligomeric, Processive, and Cap-interacting Poly(A)-specific 3' Exonuclease *J. Biol. Chem.* 275, 24222-24230 (2000).
40. Gao M, Fritz DT, Ford LP, and Wilusz J. Interaction between a Poly(A)-Specific Ribonuclease and the 5' Cap Influences mRNA Deadenylation Rates In Vitro *Mol. Cell* 5, (2000) 479-488.
41. Gao M, Wilusz CJ, Peltz SW, and Wilusz J. A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements *EMBO J.* 20, 1134–1143(2001).
42. Lejeune, F., Li, X. & Maquat, L.E. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylation, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell* 12, 675–687 (2003).
43. Copeland PR and Wormington M. The mechanism and regulation of deadenylation: Identification and characterization of Xenopus PARN. *RNA* 7,875–886 (2001).

44. 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.
45. Greiner-Stoeffele T., Grunow M., Hahn U. A General Ribonuclease Assay Using methylene blue. *Analytical Biochemistry*, 1996; 240: 24-28.
46. 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.
47. 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.
48. Vlachakis D., Pavlopoulou A., Tsiliki G., Komiotis D., Stathopoulos C., Balatsos N.A.A., Kossida S. An Integrated *In Silico* Approach to Design Specific Inhibitors Targeting Human Poly(A)-Specific Ribonuclease. *PLoS ONE* 7(12): e51113 (2012)