

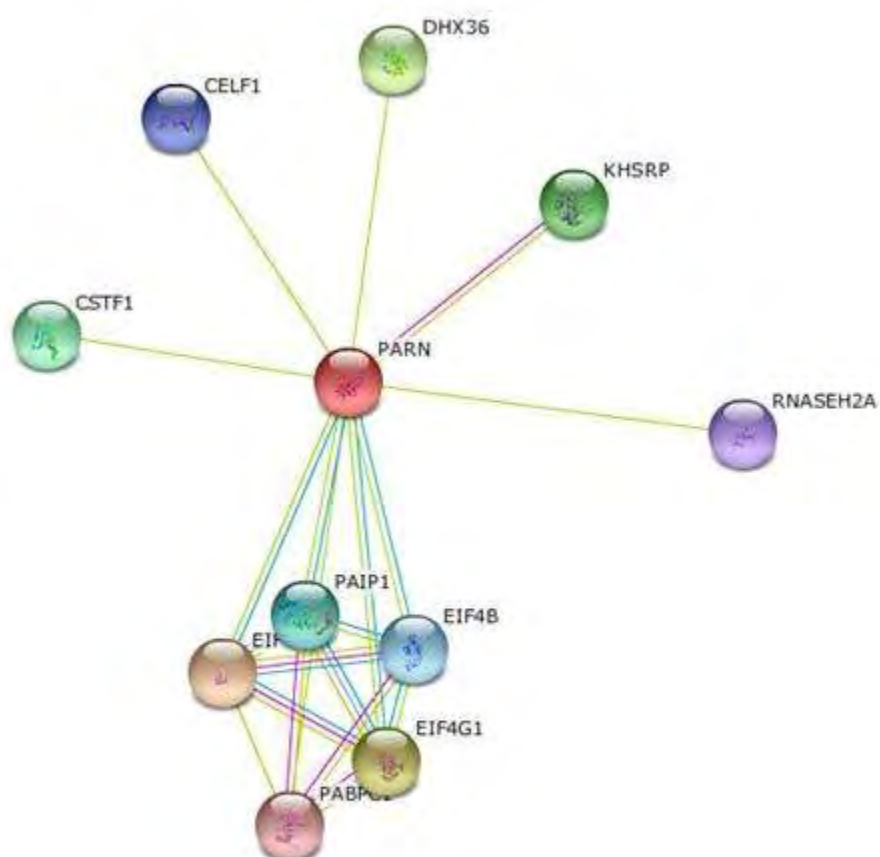


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΗΣ POLY(A)-ΕΞΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ (PARN)



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΤΡΑΒΟΚΕΦΑΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΛΑΡΙΣΑ, 2013

IDENTIFICATION OF NOVEL INTERACTING PARTNERS OF POLY(A)-SPECIFIC RIBONUCLEASE (PARN)

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνος Καθηγητής:

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

Τριμελής επιτροπή:

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

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

Δρ. Παναγιώτου Γεώργιος, Διευθυντής Ινστιτούτου Μοριακής Ογκολογίας, Ερευνητικό Κέντρο
Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ»

Εικόνα εξωφύλλου: Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της πολυ(Α)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN) - String Database (String 9.0)

Ευχαριστίες,

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων οι υποδείξεις, η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για την διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Την τριμελή επιτροπή και ιδιαίτερα τον καθηγητή κύριο Μπαλατσό Νικόλαο για την αμέριστη συμπαράσταση, εμπιστοσύνη και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομάδα από το Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ» για την ανάλυση των δειγμάτων με φασματογραφία μαζών που πραγματοποίησαν για τις ανάγκες της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Επιπλέον, τους διδακτορικούς, μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας με τους οποίους η συνεργασία ήταν παραπάνω από ευχάριστη και εποικοδομητική. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδακτορικό φοιτητή, Μαραγκοζίδη Παναγιώτη, για τις συμβουλές, τις υποδείξεις, την υπομονή αλλά και τη σημαντική συμβολή του στη διεξαγωγή των πειραμάτων. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και την οικογένεια μου, και ιδιαίτερα τη μητέρα μου για την ανιδιοτελή αγάπη και στήριξή της κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α	4
Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Η.....	6
ABSTRACT	6
Ε Ι Σ Α Γ Ω Γ Η.....	7
1.1 Εισαγωγή στο RNA.....	7
1.2 Σύνθεση και ωρίμανση των ευκαρυωτικών mRNAs	7
1.2.1 Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει την καλύπτρα m ⁷ G.....	8
1.2.2 Το 3' άκρο υπόκειται σε επεξεργασία.	9
1.3 Αποικοδόμηση του mRNA	11
1.3.1 Αποικοδόμηση φυσιολογικών mRNAs	11
1.3.2 Αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNAs	13
1.4 Σήματα που ρυθμίζουν την αποικοδόμηση του mRNA	13
1.5 Κατάταξη και δράση των αποαδενυλασών	14
1.6 Η πολυ(Α)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN [poly(A)-specific ribonuclease].....	16
1.7 Γνωστές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της πολυ-(Α)εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης, PARN	18
Σ Κ Ο Π Ο Σ Τ Η Σ Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α Σ	20
Υ Λ Ι Κ Α Κ Α Ι Μ Ε Θ Ο Δ Ο Ι	21
2.1 ΥΛΙΚΑ	21
2.1.1 Χημικές ουσίες.....	21
2.1.2 Διαλύματα	22
2.1.3 Κυτταρική σειρά.....	24
2.1.4 Πρωτεΐνες και αντισώματα	24
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
2.2.1 Απόψυξη κυττάρων NCI-H520.....	25
2.2.2 Ανακαλλιέργεια των κυττάρων NCI-H520 – Θρυψινοποίηση	25
2.2.3 Ψύξη των κυττάρων NCI-H520	26
2.2.4 Συλλογή και λύση των κυττάρων NCI-H520	26
2.2.5 Απομόνωση της ολικής πρωτεΐνης από τα NCI-H520 κύτταρα	26
2.2.6 Bradford Protein Assay.....	27

2.2.7	Ανοσοκατακρήμνιση (immunoprecipitation).....	27
2.2.8	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου	29
2.2.9	Χρώση με νιτρικό άργυρο – silver staining	30
2.2.10	Ανίχνευση πρωτεϊνών με western blot	30
2.2.11	Φασματογραφία μαζών (Mass Spectrometry).....	31
Α Π Ο Τ Ε Λ Ε Σ Μ Α Τ Α		33
3.1	Πρότυπη καμπύλη με BSA (bovine serum albumin)	33
3.2	Επιβεβαίωση της ύπαρξης της πρωτεΐνης PARN στα NCI-H520 κύτταρα με western blot... ..	33
3.3	Επιβεβαίωση της ύπαρξης της πρωτεΐνης PARN στο ολικό εκχύλισμα των κυττάρων NCI-H520 μετά από ανοσοκατακρήμνιση με το ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα anti-PARN74 με western blot.....	34
3.4	Εφαρμογή της χρώσης του νιτρικού αργύρου (AgNO ₃) στην πηκτή για την οπτικοποίηση των πρωτεϊνών που κατακρημνίζονται μαζί με την PARN	35
3.5	Μελέτη πιθανής αλληλεπίδρασης της PARN(1-471) με τη CNOT6(CCR4a).....	36
3.6	Φασματογραφία μαζών (mass spectrometry)	39
Σ Υ Ζ Η Τ Η Σ Η		46
Β Ι Β Λ Ι Ο Γ Ρ Α Φ Ι Α		48
Π Α Ρ Α Ρ Τ Η Μ Α		51

Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Η

Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN, είναι από τις κυριότερες αποαδενυλάσες στα κύτταρα των θηλαστικών με ενεργή συμμετοχή στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης των πολυ(A) ουρών των ευκαρυωτικών mRNAs με κατεύθυνση 3'→5' ρυθμίζοντας το χρόνο ζωής τους. Πολλοί είναι οι πρωτεϊνικοί παράγοντες με τους οποίους φαίνεται να αλληλεπιδρά η PARN μέσα στο κύτταρο. Έχει δειχθεί, μεταξύ άλλων, πως αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο CstF-50/BARD1 κατά τη συμμετοχή της στην απόκριση λόγω της βλάβης του DNA (DNA damage response, DDR). Ο CstF-50 (cleavage stimulation factor-50) αποτελεί μέρος του συμπλόκου της επεξεργασίας του 3' άκρου του pre-mRNA, όπως και ο παράγοντας CF I_m (cleavage factor I_m). Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια μελέτης των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της PARN μέσω της μεθόδου της ανοσοκατακρήμνισης και έπειτα της ταυτοποίησης των πρωτεϊνών με φασματογραφία μαζών. Τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία του CPSF6/ CF I_m 68 ως πιθανού παράγοντα με τον οποίο αλληλεπιδρά η PARN. Τέλος, η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της PARN με την αποαδενυλάση CNOT6 δεν έδειξε κάποια αλληλεπίδραση.

ABSTRACT

Poly(A)-specific ribonuclease, PARN is one of the most important deadenylases in mammal cells and is actively involved in the regulation of gene expression. PARN efficiently degrades mRNA poly(A) tails of eukaryotic cells, in 3'→5' direction, determining their stability. Inside cells, PARN interacts with many protein factors. Among others, studies have shown that PARN interacts with CstF-50/BARD1 complex upon DNA damage response, DDR. The 3'-end processing complex is comprised by several factors, including Cleavage stimulation factor-50, CstF-50, and Cleavage Factors I, and II (CF I_m, and CF II_m). In this thesis, we analyze the protein interactions of PARN with immunoprecipitation coupled with mass spectrometry. The results show that PARN may interact with CF I_m 68. Finally, no interaction was observed between PARN and CNOT6 deadenylase.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εισαγωγή στο RNA

Το RNA (*ριβονουκλεϊνικό οξύ*, ribonucleic acid) είναι ένα μόριο κεντρικής σημασίας για τη γονιδιακή έκφραση (Lewin, GENES VIII-163). Όταν το κύτταρο χρειάζεται μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη, η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στο κατάλληλο τμήμα του τεράστιου μορίου του DNA ενός χρωμοσώματος, πρώτα αντιγράφεται σε RNA. Αυτά τα RNA αντίγραφα του DNA χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία που κατευθύνουν τη σύνθεση των πρωτεϊνών (Alberts, Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας-276). Η εμπλοκή του RNA σε πολλές λειτουργίες που αφορούν τη 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. Οι τρεις κύριες τάξεις RNA που εμπλέκονται άμεσα στην παραγωγή πρωτεϊνών είναι: το αγγελιαφόρο RNA (mRNA), το μεταφορικό RNA (tRNA) και το ριβοσωμικό RNA (rRNA) (Lewin, GENES VIII-163).

1.2 Σύνθεση και ωρίμανση των ευκαρυωτικών mRNAs

Όλο το RNA ενός κυττάρου παράγεται με μεταγραφή (transcription), δηλαδή με τη μετατροπή των πληροφοριών της νουκλεοτιδικής αλυσίδας του DNA σε πληροφορίες αλληλουχίας του RNA σύμφωνα με τους κανόνες συμπληρωματικότητας των βάσεων (Alberts, Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας-280). Η μεταγραφή παράγει ένα μονόκλωνο μόριο RNA όμοιο στην αλληλουχία με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Η αλυσίδα του DNA η οποία κατευθύνει τη σύνθεση του mRNA δημιουργώντας ζεύγη συμπληρωματικών βάσεων αποκαλείται αντισημαίνουσα αλυσίδα (antisense strand), ενώ η άλλη αλυσίδα που φέρει την ίδια αλληλουχία με το mRNA ονομάζεται σημαίνουσα αλυσίδα (sense strand) (Lewin, GENES VIII-165). Η σύνθεση του RNA καταλύεται από ένζυμα που αποκαλούνται RNA πολυμεράσες. Οι RNA πολυμεράσες καταλύουν το σχηματισμό των φωσφοδιεστερικών δεσμών που συνδέουν τα νουκλεοτίδια μεταξύ τους και δημιουργούν τον σακχαροφωσφορικό σκελετό της αλυσίδας του RNA. Η αυξανόμενη αλυσίδα του RNA επιμηκύνεται με ρυθμό ένα νουκλεοτίδιο τη φορά με κατεύθυνση 5' → 3' χρησιμοποιώντας τριφωσφορικά νουκλεοσίδια (ATP, CTP, UTP και GTP) (Alberts, Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας-280).

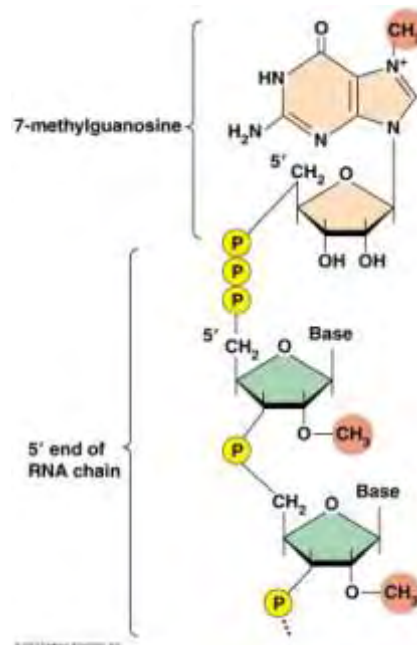
Τα μόρια RNA που τελικά κατευθύνουν τη σύνθεση των πρωτεϊνών συλλογικά αποκαλούνται αγγελιοφόρα RNA (messenger RNA, mRNA) (Alberts, Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας-280). Η σύνθεση των πρόδρομων μορίων του mRNA πραγματοποιείται από την RNA πολυμεράση II, η οποία εντοπίζεται στο πυρηνόπλασμα και συνθέτει επίσης και μερικά μικρά μόρια RNA όπως εκείνα του μηχανισμού ματίσματος (Stryer, Βιοχημεία-896).

Η μετάφραση (translation) μετατρέπει τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του mRNA στην αλληλουχία αμινοξέων που αποτελούν μια πρωτεΐνη και καταλύεται από το ριβόσωμα. Όλα τα mRNAs περιέχουν δύο τύπους περιοχών: την κωδική περιοχή και τις μη μεταφραζόμενες περιοχές. Η κωδική περιοχή (coding region) αποτελείται από μια σειρά κωδικονίων που αντιστοιχούν στην αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης, αρχίζοντας (συνήθως) με AUG και καταλήγοντας με ένα κωδικόνιο τερματισμού. Η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή βρίσκεται στο 5' άκρο, πριν από την αρχή της κωδικής περιοχής, και περιγράφεται ως οδηγός-αλληλουχία ή 5' UTR. Η 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή βρίσκεται στο 3' άκρο ακολουθώντας το σήμα τερματισμού και περιγράφεται ως μετατερματική ακολουθία ή 3' UTR. Παρόλο που αυτές οι περιοχές αποτελούν μέρος της ίδιας μεταγραφικής μονάδας δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνη (Lewin, GENES VIII-174).

Η παραγωγή του ευκαρυωτικού mRNA περιλαμβάνει επιπρόσθετα στάδια μετά τη μεταγραφή που οδηγούν στην ωρίμανση του. Η ωρίμανση περιλαμβάνει την προσθήκη της καλύπτρας στο 5' άκρο (capping), την τμήση (cleavage) και την προσθήκη της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο (polyadenylation) και το μάτισμα (splicing). Μόνο μετά την ολοκλήρωση όλων των τροποποιήσεων και της επεξεργασίας μπορεί το mRNA να εξαχθεί από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Κατά μέσο όρο, το mRNA καθυστερεί περίπου 20min για να εξέλθει από τον πυρήνα. Μόλις το mRNA εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα και μεταφράζεται. Υπάρχει μια αξιοσημείωτη αύξηση της σταθερότητας στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς: το mRNA των ζωικών κυττάρων είναι σχετικά σταθερό, με χρόνο ημιζωής μεταξύ 1 - 24 ωρών. Οι τροποποιήσεις και στα δυο άκρα του mRNA συνεισφέρουν σε αυτή τη σταθερότητα (Lewin, GENES VIII-175 και 176).

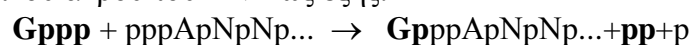
1.2.1 Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει την καλύπτρα m⁷G.

Η καλύπτρα m⁷G στο 5' άκρο του mRNA σχηματίζεται 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), ενώ φέρει και μεθυλομάδες. Η προσθήκη της τριφωσφορικής γουανοσίνης στο 5' άκρο καταλύεται από ένα πυρηνικό ένζυμο, τη γουανυλυλο-τρανσφεράση.



Εικόνα 1: Η καλύπτρα m⁷G στο 5' άκρο του mRNA (<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-21/CB21.html>)

Η αντίδραση αυτή συμβαίνει τόσο γρήγορα μετά την έναρξη της μεταγραφής, που δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθούν παρά μόνο ίχνη του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου στο πυρηνικό RNA. Η συνολική αντίδραση μπορεί να αναπαρασταθεί ως μία συμπύκνωση μεταξύ του GTP και του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου του RNA ως εξής:



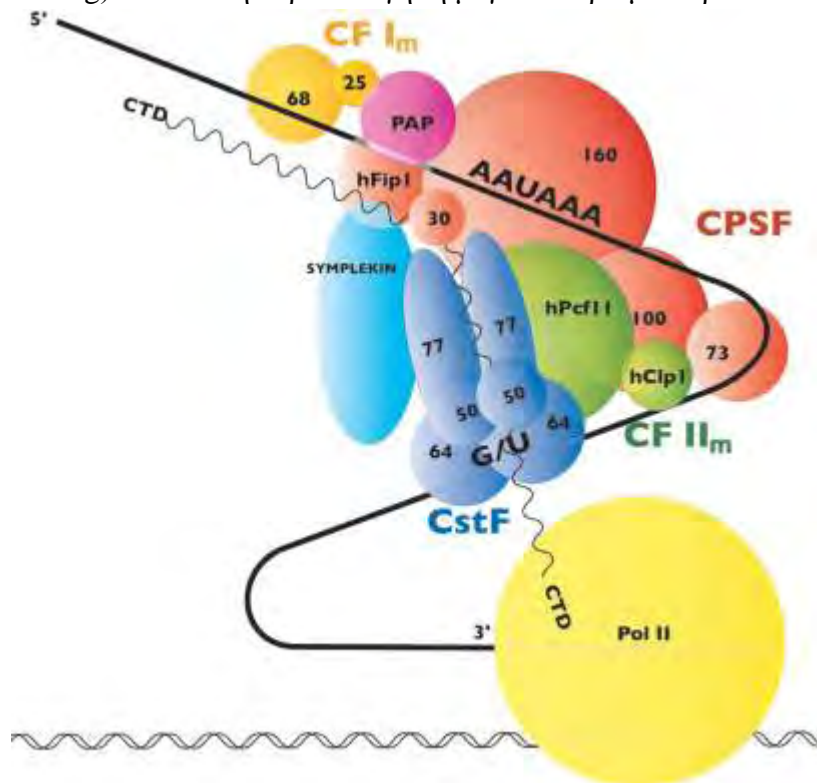
Το νέο κατάλοιπο G που προστίθεται στο άκρο του RNA έχει αντίστροφο προσανατολισμό (5'→5') από όλα τα άλλα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας. Η καλύπτρα m⁷G αποτελεί υπόστρωμα για αρκετές αντιδράσεις μεθυλίωσης και τοποθετείται για να εξυπηρετήσει δύο λειτουργίες: πρώτον, τα καλυμμένα mRNAs μεταφράζονται πιο αποδοτικά διότι αναγνωρίζονται από το ριβόσωμα για το σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης και δεύτερον, σταθεροποιεί τα mRNAs,

προστατεύοντάς τα από ριβονουκλεάσες που δρουν στο 5' άκρο (5' εξωριβονουκλεάσες) (Lewin, GENES VIII-176). Στην **εικόνα 1** παρουσιάζεται η δομή της καλύπτρας m⁷G.

1.2.2 Το 3' άκρο υπόκειται σε επεξεργασία.

Το 3' άκρο του mRNA δημιουργείται με την τμήση (cleavage) του πρόδρομου mRNA (pre-mRNA) στην περιοχή πολυαδενυλίωσης (polyadenylation site) και έπειτα την προσθήκη μιας πολυ(A) ουράς (poly(A) tail). Στα κύτταρα των θηλαστικών η πολυ(A) ουρά έχει μήκος περίπου 200-300 κατάλοιπα αδενοσίνης. Η μετα-μεταγραφική αυτή τροποποίηση ονομάζεται επεξεργασία του 3' άκρου (3' end processing). Η αντίδραση της προσθήκης καταλύεται από το ένζυμο πολυ(A)-πολυμεράση (poly(A) polymerase, PAP). Η συγκρότηση του συμπλόκου της τμήσης /πολυαδενυλίωσης απαιτεί συγκεκριμένα σήματα στην αλληλουχία του πρόδρομου mRNA καθώς επίσης και τη συμμετοχή ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνικών παραγόντων. Αυτά τα σήματα χαρακτηρίζονται ως *cis-acting elements* και εντοπίζονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3'UTR) του pre-mRNA και περιλαμβάνουν τα σήματα APA, τις περιοχές-στόχους των microRNA (miRNA) και τα στοιχεία AREs (AU-rich elements), όπου τα τελευταία έχει βρεθεί πως παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της επεξεργασίας του 3' άκρου. Στα φυσιολογικά κύτταρα των θηλαστικών το στάδιο της τμήσης απαιτεί τον παράγοντα CPSF (cleavage-polyadenylation specificity factor), τον παράγοντα CstF (cleavage stimulation factor), τους παράγοντες CF I και II (cleavage factors I και II), την RNAP II (RNA polymerase II) και την PAP (poly(A) polymerase), ενώ η επακόλουθη σύνθεση της πολυ(A) ουράς εξαρτάται από τον CPSF, την PAP, την symplekin και την PABNI (poly(A)-binding protein nuclear I). Αν και η συγκρότηση όλων αυτών των παραγόντων πιστεύεται πως είναι επαρκής, ωστόσο για να συμβεί η επεξεργασία του 3' άκρου, απαιτούνται και επιπρόσθετοι πρωτεϊνικοί παράγοντες που έχουν ταυτοποιηθεί ως μέρος του συμπλόκου της επεξεργασίας του 3' άκρου (Zha-ng et al., 2010).

Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στην **εικόνα 2** η επεξεργασία του 3' άκρου (3' end processing) απαιτεί τη στρατολόγηση μεγάλου αριθμού πρωτεϊνικών παραγόντων όπως ήδη αναφέρθηκε.



Εικόνα 2: Μοντέλο του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου επεξεργασίας του 3' άκρου των pre-mRNAs στα θηλαστικά (Mandel et al., 2008)

συγκεκριμένα ο CstF-64 περιέχει ένα συντηρημένο μοτίβο αναγνώρισης RNA (RNA-recognition motif,

Συγκεκριμένα, ο CPSF συγκροτείται από έξι υπομονάδες, την CPSF-30, CPSF-73, CPSF-100, CPSF-160, την hFip1 (Kaufmann et al., 2004) και την WDR33 (Shi et al., 2009), όπου όλες είναι απαραίτητες για την αποτελεσματική τμήση και πολυαδενυλίωση των pre-mRNAs. Η υπομονάδα CPSF-160 προσδένεται με το εξαμερές AAUAAA σινιάλο πολυαδενυλίωσης (PAS), ενώ η υπομονάδα CPSF-73 προσδένεται στην περιοχή τμήσης (cleavage site) και είναι η ενδονουκλεάση του συμπλόκου. Η CPSF-73 ανήκει στην υπεροικογένεια των μεταλλο-β-λακταμάσης εξαρτώμενων από ψευδάργυρο υδρολασών (Mandel et al., 2006). Ο CstF αποτελείται

από τις υπομονάδες CstF-64, CstF-77 και CstF-50 και συγκεκριμένα ο CstF-64 περιέχει ένα συντηρημένο μοτίβο αναγνώρισης RNA (RNA-recognition motif,

RRM) μέσω του οποίου προσδένεται στο mRNA και ιδιαίτερα στα στοιχεία που βρίσκονται καθοδικά και είναι πλούσια σε G/U (G/U-rich downstream element, DSE). Ο CstF φαίνεται πως εμπλέκεται στην επιλογή των περιοχών πολυαδενυλίωσης. Ο CF I_m είναι ένα τετραμερές που συγκροτείται από δύο υπομονάδες των 25 kDa, τις CF I_m25 (ή Nudt21 ή CPSF5), οι οποίες έρχονται σε επαφή με μοτίβα UGUA των pre-mRNAs, και δύο μεγαλύτερες των 59 ή 68 kDa, τις CF I_m59 (ή CPSF7) και CF I_m68 (ή CPSF6) που είναι δομικά σχετικές πρωτεΐνες και περιέχουν το μοτίβο αναγνώρισης του RNA, RRM (RNA recognition motif) (Kim et al., 2010). Ο CF I_m68 βρέθηκε πως μετακινείται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και πως συμμετέχει στην εξαγωγή του mRNA στο κυτταρόπλασμα. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως ο CF I_m αναγνωρίζει το RNA μέσω της ακολουθίας του (sequence specific manner). Έτσι εκτός από τον CPSF και τον CstF, ο CF I_m φαίνεται πως επίσης συμμετέχει στην επιλογή των περιοχών πολυαδενυλίωσης. Τέλος, ο CF I_m είναι μοναδικός ανάμεσα στους παράγοντες που συμμετέχουν στη επεξεργασία του 3' άκρου, αφού δεν είναι εξελικτικά συντηρημένος ανάμεσα στα είδη, αλλά φαίνεται πως εμφανίστηκε ειδικά στα μετάζωα. (Mandel et al., 2008; Martin et al., 2012; Kim et al., 2010).

Ο ρόλος της πολυ(A) ουράς είναι κεντρικής σημασίας για το mRNA. Προστατεύει το 3' άκρο του mRNA από εξωνουκλεοτιδική αποικοδόμηση, συμμετέχει σε διεργασίες όπως η έξοδος στο κυτταρόπλασμα και από αυτή ξεκινά και το κύριο μονοπάτι αποικοδόμησης του mRNA. Στις διαδικασίες αυτές η πολυ(A) ουρά συμμετέχει κυρίως μέσω των πρωτεϊνικών παραγόντων που προσδένονται σε αυτή, και κυρίως την πρωτεΐνη πρόσδεσης στην πολυ(A) ουρά [poly(A)-binding protein, PABP]. Ομόλογα αυτής της πρωτεΐνης απαντώνται σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ένα μονομερές PABPC των 70 kDa συνδέεται σε περίπου 24 βάσεις της πολυ(A) ουράς. Έτσι, μια πολυ(A) ουρά από 240 νουκλεοτίδια φέρει περίπου 10 μόρια PABPC, δηλαδή περίπου 700 kDa. Ο βασικότερος ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι αφενός να προστατεύει την ίδια την ουρά από αποικοδόμηση και αφετέρου να αλληλεπιδρά με άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες ρυθμίζοντας έτσι την βιωσιμότητα του mRNA. Για παράδειγμα, η αλληλεπίδραση της PABP στον παράγοντα έναρξης της μεταγραφής eIF4G δημιουργεί έναν κλειστό βρόχο, στον οποίο τα 5' και 3' άκρα του mRNA συγκρατούνται από το ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο και έτσι προσλαμβάνεται από τη μεταφραστική μηχανή όπως φαίνεται και στην **εικόνα 5** (Lewin, GENES VIII).

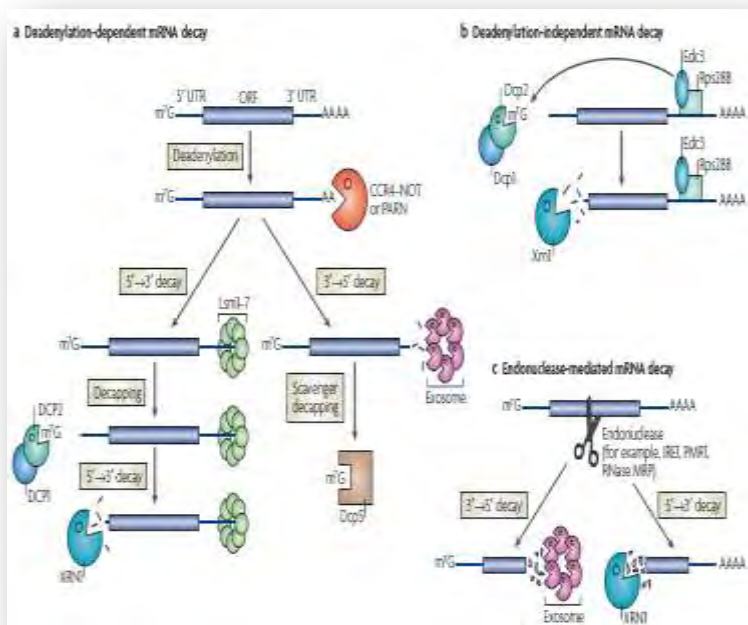
Η αφαίρεση της πολυ(A) ουράς αναστέλλει την έναρξη της μετάφρασης *in vitro* και η μείωση των επιπέδων της PABP έχει το ίδιο αποτέλεσμα σε ζυμομύκητες *in vivo*. Αυτές οι επιδράσεις μπορεί να εξαρτώνται από την πρόσδεση της PABP στο σύμπλοκο έναρξης, στο 5' άκρο του mRNA. Σε μερικές περιπτώσεις, τα mRNA 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 (Lewin, GENES VIII).

Λόγω της σημαντικότητας που παρουσιάζει η πολυ(A) ουρά για τη σταθερότητα του mRNA, η επακόλουθη τροποποίηση του μήκους της αποτελεί ένα αυστηρά ρυθμιζόμενο γεγονός, το οποίο εξαρτάται από τις εκάστοτε κυτταρικές συνθήκες. Έτσι οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στον έλεγχο και την αποικοδόμηση του μήκους της πολυ(A) ουράς παρουσιάζονται ως ένα επιπρόσθετο σημείο ελέγχου στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των ευκαρυωτών. Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι PAPs και οι αποαδενυλάσες αποτελούν τους καταλύτες-κλειδιά που απαιτούνται για τη σωστή ρύθμιση του μήκους της πολυ(A) ουράς (Zhang et al., 2010).

1.3 Αποικοδόμηση του mRNA

Ο έλεγχος της αποικοδόμησης του mRNA αποτελεί σημαντικό παράγοντα της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, καθώς τα σταθερά επίπεδα του mRNA καθορίζονται τόσο από το ρυθμό σύνθεσης όσο και από το ρυθμό αποικοδόμησης του (Meyer et al., 2004). Κατά την αποικοδόμηση του mRNA, η υδρόλυση της 5' καλύπτρας και της πολυ(A) ουράς είναι σημαντικά γεγονότα και, συγκεκριμένα, η απομάκρυνση της πολυ(A) ουράς είναι συχνά το πρώτο και το περιοριστικό βήμα που καθορίζει την αποτελεσματικότητα της αποικοδόμησης (Meyer et al., 2004; Parker & Song, 2004).

Υπάρχουν τρεις κύριες τάξεις ενδοκυτταρικών ενζύμων αποικοδόμησης του RNA (ριβονουκλεάσες ή RNases): οι ενδοριβονουκλεάσες, οι 3' εξωνουκλεάσες (που αποικοδομούν το RNA από το 3' άκρο) και οι 5' εξωνουκλεάσες (που υδρολύουν το RNA από το 5' άκρο). Τα περισσότερα γονιδιώματα κωδικοποιούν μια πληθώρα ριβονουκλεασών, συχνά με επικαλυπτόμενες λειτουργίες, πιθανώς λόγω ανάγκης ενίσχυσης της αποτελεσματικότητας των μονοπατιών αποικοδόμησης (Houseley & Tollervey, 2009).



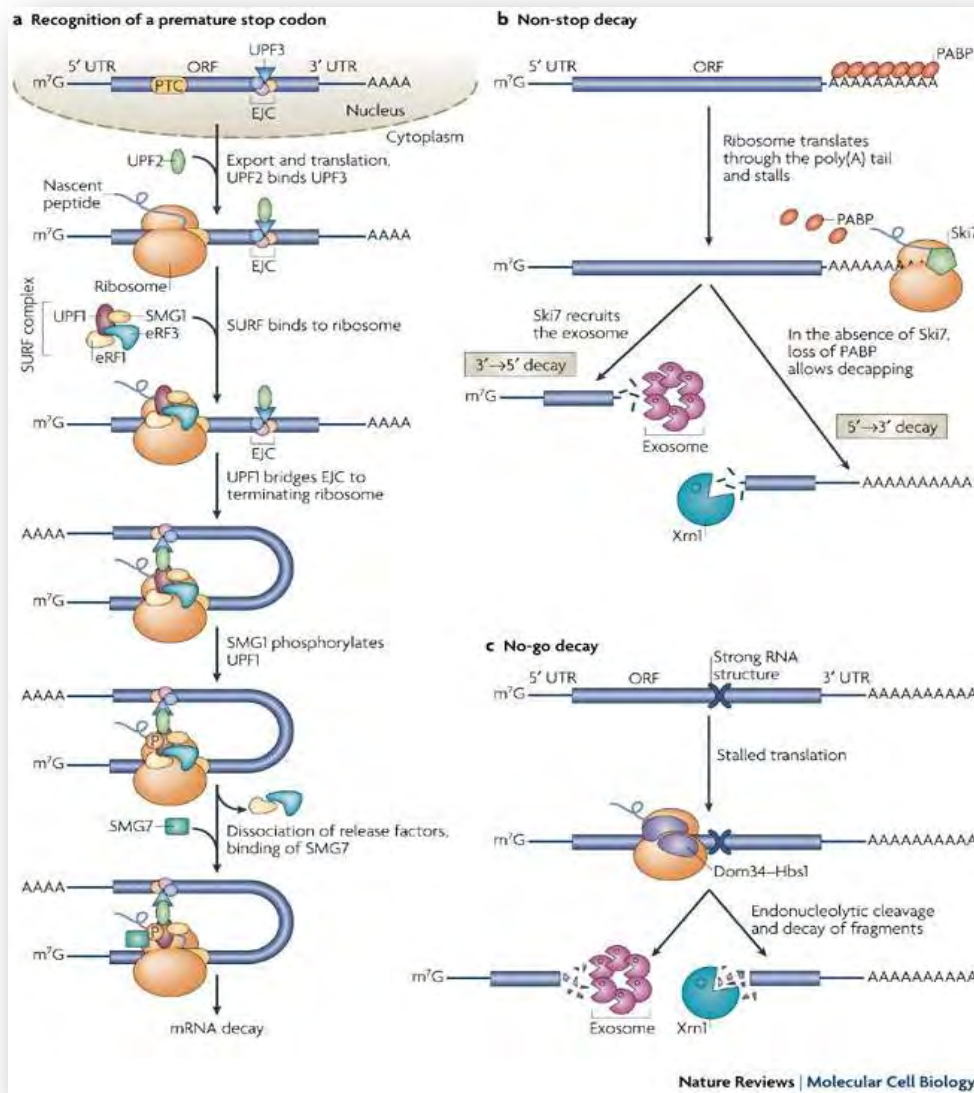
Εικόνα 3: Μηχανισμοί αποικοδόμησης φυσιολογικών mRNAs (Gameau et al., 2007).

νήσει η αποικοδόμηση ενός μετάγραφου θα πρέπει ένας από αυτούς τους παράγοντες να απομακρυνθεί ή το μετάγραφο να υποστεί ενδονουκλεοτιδική πέψη (Gameau et al., 2007).

Στους ευκαρυώτες έχουν χαρακτηριστεί δύο κύρια μονοπάτια για την αποικοδόμηση του mRNA που συχνά αναφέρονται σαν το μονοπάτι που εξαρτάται από αποαδενυλίωση (deadenylation dependent pathway) (εικόνα 3a). Η θεώρηση των δύο αυτών μονοπατιών σαν ένα, οφείλεται στο γεγονός ότι και στα δύο το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την εξωνουκλεοτιδική απομάκρυνση της πολυ(A) ουράς, γνωστή ως αποαδενυλίωση. Στο ένα μονοπάτι, μετά την αποαδενυλίωση που γίνεται από ένα ένζυμο με ενεργότητα αποαδενυλίωσης, όπως για παράδειγμα από το σύμπλοκο CCR4-NOT ή από την PARN, ακολουθεί η απομάκρυνση της καλύπτρας (decapping) και η επακόλουθη αποικοδόμηση του 'σώματος' του μετάγραφου από μια 5' εξωνουκλεάση.

1.3.1 Αποικοδόμηση φυσιολογικών mRNAs

Όπως ήδη αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.2 τα ώριμα ευκαρυωτικά mRNAs φέρουν δύο καθοριστικούς παράγοντες σταθερότητας: την 5' καλύπτρα και την 3' πολυ(A) ουρά που προστίθενται μετα-μεταγραφικά. Αυτοί οι δύο παράγοντες αλληλεπιδρούν με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη eIF4E και την πρωτεΐνη πρόσδεσης με την πολυ(A) ουρά, PABP (poly(A)-binding protein), αντίστοιχα, με σκοπό να προστατεύσουν τα μετάγραφα από τις εξωνουκλεάσες και να επιτευχθεί η μετάφρασή τους. Προκειμένου να ξεκι-



Εικόνα 4: Μονοπάτια αποικοδόμησης ελαττωματικών mRNAs (Garneau et al., 2007)

Η απομάκρυνση της καλύπτρας γίνεται από το DCP1–DCP2 σύμπλοκο που επάγεται από το σύμπλοκο Lsm1–7, το οποίο αλληλεπιδρά με το 3' άκρο του mRNA. Η αφαίρεση της καλύπτρας οδηγεί στην αποικοδόμηση του mRNA από την 5' → 3' εξωριβονουκλεάση XRN1. Στο δεύτερο μονοπάτι, το αποαδενυλιωμένο μετάγραφο μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3' → 5' από το εξώσωμα (exosome) και η εναπομένονσα καλύπτρα να υδρολυθεί από το ένζυμο DcpS. Στην **εικόνα 3b** φαίνεται το μονοπάτι αποικοδόμησης το οποίο είναι ανεξάρτητο από την αποαδενυλίωση (Deadenylation-independent mRNA decay) στον *Saccharomyces cerevisiae*. Σε αυτό το μονοπάτι απαιτείται η στρατολόγηση της πρωτεϊνικής μηχανής απομάκρυνσης της καλύπτρας. Ωστόσο, η αποικοδόμηση ορισμένων μορίων mRNA μπορεί να ξεκινήσει με ενδονουκλεολυτική διάσπαση, είτε από ειδικές ενδονουκλεάσες, είτε μέσω του μηχανισμού παρεμβολής RNA (RNAi). Πρόκειται για το μονοπάτι αποικοδόμησης διαμεσολαβούμενο από ενδονουκλεάσες (endonuclease-mediated mRNA decay), στο οποίο το mRNA πέπτει εσωτερικά και προκύπτουν δύο θραύσματα με απροστάτευτα άκρα, τα οποία και αποικοδομούνται στη συνέχεια με τη δράση του εξωσώματος και της XRN1 (**εικόνα 3c**) (Garneau et al., 2007).

1.3.2 Αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNAs

Το κύτταρο διαθέτει μηχανισμούς οι οποίοι ανιχνεύουν και αποικοδομούν ελαττωματικά μετάγραφα προκειμένου να διατηρηθεί η πιστότητα της μετάφρασης και να αποφευχθεί η δημιουργία βλαβερών πρωτεϊνών. Ο έλεγχος ποιότητας (surveillance) και επεξεργασίας ακατάλληλων mRNA μορίων γίνεται στον πυρήνα, ενώ υπάρχουν τρία μονοπάτια εξαρτώμενα από τη μετάφραση που ανιχνεύουν ελαττωματικές δομές ριβονουκλεοπρωτεϊνών (mRNPs) στο κυτταρόπλασμα (Garneau et al., 2007). Το πιο καλά χαρακτηρισμένο μονοπάτι ελέγχου ποιότητας είναι αυτό της *μη-νοηματικά (ανερμηνεύσιμα) διαμεσολαβούμενης αποικοδόμησης* (nonsense-mediated decay, NMD) κατά το οποίο τα mRNAs που περιέχουν πρόωρα κωδικόνια τερματισμού [premature termination codons (PTCs)] αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται (**εικόνα 4a**). Το μονοπάτι της NMD έχει εντοπιστεί σε όλους τους ευκαρυώτες και οι κύριες πρωτεΐνες του NMD συμπλόκου είναι η UPF1, η UPF2 και η UPF3, οι οποίες είναι υψηλά συντηρημένες (Conti & Izaurralde, 2005). Ένα άλλο μονοπάτι αποικοδόμησης ελαττωματικών mRNAs περιλαμβάνει την *αποικοδόμηση μη-τερματισμού* (non-stop decay, NSD) που στοχεύει σε mRNAs τα οποία στερούνται κωδικόνιο τερματισμού (**εικόνα 4b**). Η μετάφραση ενός τέτοιου mRNA έχει σαν αποτέλεσμα τη διέλευση του ριβοσώματος μέχρι και την πολυ(A) ουρά με αποτέλεσμα να εκτοπίζεται η πρωτεΐνη πρόσδεσης στην πολυ(A) ουρά (poly(A)-binding protein, PABP) και το ριβόσωμα να ακινητοποιείται στο 3' άκρο του μετάγραφου. Στη συνέχεια, το εκτεθειμένο mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί είτε από το εξώσωμα, όπως συμβαίνει στη ζύμη και στα κύτταρα των θηλαστικών, είτε από την 5'→3' εξωριβονουκλεάση Xrn1, όπως συμβαίνει στο *Saccharomyces cerevisiae*. Τέλος, στη ζύμη έχει ανακαλυφθεί και η *no-go αποικοδόμηση* (no-go decay, NGD) στην οποία παρατηρείται ακινητοποίηση του ριβοσώματος στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης λόγω σχηματισμού ειδικής δευτεροταγούς δομής στο ελαττωματικό mRNA (**εικόνα 4c**). Ως αποτέλεσμα, πυροδοτείται η διαμεσολαβούμενη από ενδονουκλεάσες αποικοδόμηση του mRNA και η απελευθέρωση του ριβοσώματος (Garneau et al., 2007).

Η αποικοδόμηση των mRNAs συνδέεται με την εμφάνιση των p-bodies (processing bodies). Πρόκειται για κυτταροπλασματικές περιοχές που εμπλέκονται στον κύκλο ζωής του mRNA (mRNA turnover) (Zhang et al., 2010). Τα P bodies στρατολογούνται όταν υπάρχουν πολλά μόρια RNA τα οποία αποικοδομούνται μέσω του συστήματος 5' → 3' αποικοδόμησης, ή όταν η αποικοδόμηση των mRNAs παρεμποδίζεται λόγω μεταλλαγών σε διάφορους παράγοντες. Αντίθετα, μειώνονται σε μέγεθος και αριθμό όταν μειώνεται και ο αριθμός των μορίων mRNA προς αποικοδόμηση. Παρεμπόδιση της μεταγραφής ή της μετάφρασης καθώς και μεταλλάξεις σε παράγοντες που εμπλέκονται στα αρχικά στάδια της αποικοδόμησης όπως το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CCR4-NOT και το σύμπλοκο Lsm, επίσης έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση των P bodies. Αποτελούν λοιπόν δομές που σχηματίζονται για να ρυθμίσουν την «αλληλεπίδραση» μεταξύ μετάφρασης και αποικοδόμησης. Ακόμη, οι δομές αυτές, είναι πιθανό να σχηματίζονται μόνο όταν το 5' → 3' μονοπάτι αποικοδόμησης είναι υπερφορτωμένο με υπόστρωμα ή διαταράσσεται η φυσιολογική λειτουργία του. Εναλλακτικά, μπορεί να απομονώνουν μόρια mRNA τα οποία έχουν σημαθεί για αποικοδόμηση και με αυτόν τον τρόπο να αποφεύγεται η παραγωγή ελαττωματικών πρωτεϊνών (Garneau et al., 2007; Parker and Song, 2004).

1.4 Σήματα που ρυθμίζουν την αποικοδόμηση του mRNA

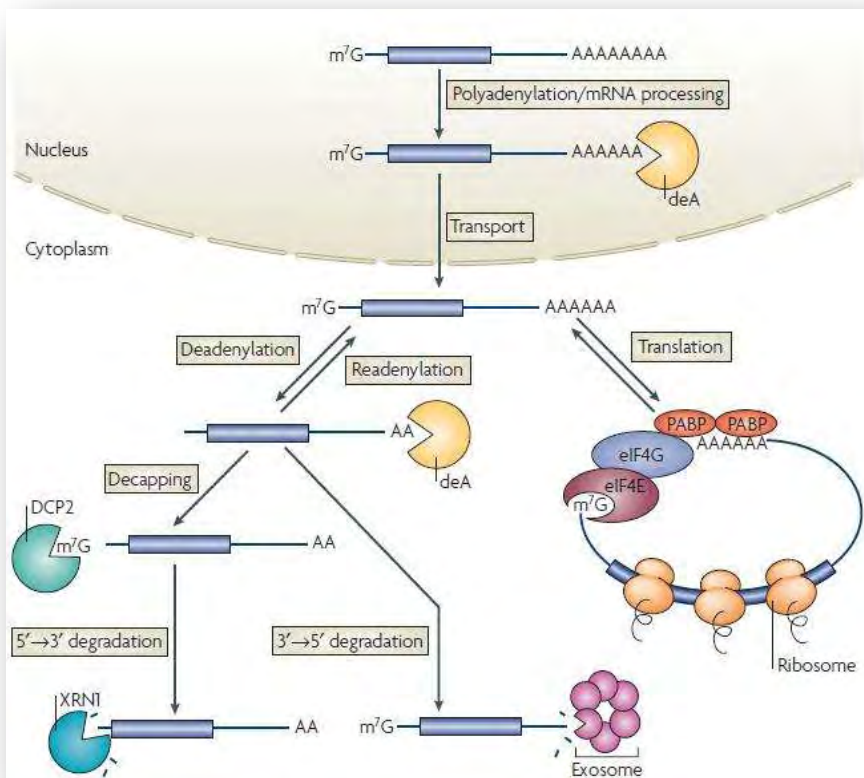
Η σταθερότητα ποικίλλει ανάμεσα στα διάφορα είδη των mRNAs και καθορίζεται από συγκεκριμένα *cis-acting* ρυθμιστικά στοιχεία που εντοπίζονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) των ευκαρυωτικών mRNAs (Chou et al., 2006). Αυτά τα ρυθμιστικά στοιχεία στρατολογούν *trans-acting* πρωτεϊνικούς παράγοντες που ρυθμίζουν διαδικασίες όπως η πολυαδενυλίωση, η σταθερότητα του mRNA, η μετάφραση και η αποαδενυλίωση και επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση (Zhang et al., 2010).

Το πιο κοινό *cis*-acting στοιχείο που είναι υπεύθυνο για τη γρήγορη αποικοδόμηση του mRNA στα κύτταρα των θηλαστικών είναι το πλούσιο σε AU στοιχείο (AU-rich element, ARE) που βρίσκεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) πολλών μικρής διάρκειας mRNAs (Chou et al., 2006). Περίπου το 12% των mRNAs των θηλαστικών φέρουν περιοχές AREs στη 3' αμετάφραστη περιοχή τους (3' UTR). Αυτές οι περιοχές τυπικά περιέχουν ένα έως αρκετά πενταμερή της ακολουθίας AUUUA ανάμεσα σε μια περιοχή πλούσια σε U (U-rich). Τα AREs λειτουργούν στη σταθερότητα ή στην αποσταθεροποίηση του mRNA ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες. Έχει βρεθεί πως κάποιοι *trans*-acting παράγοντες, γνωστοί ως πρωτεΐνες που προσδένονται στα AREs (ARE-binding proteins, ARE-BPs), ρυθμίζουν την αποικοδόμηση των mRNAs μέσω των AREs είτε αναστέλλοντας είτε ενεργοποιώντας την αποαδενυλίωση. Αυτοί που προάγουν την αποικοδόμηση των mRNAs περιλαμβάνουν τους TTP (tristetraprolin), BRF1 (butyrate response factor 1), AUF1 (AU-rich binding factor 1) και KHSRP ή KSRP (KHtype splicing regulatory protein). Μέχρι τώρα μόνο ο HuR έχει βρεθεί πως παίζει ρόλο στη σταθεροποίηση των mRNAs που περιέχουν AREs (Zhang et al., 2010).

Άλλα ρυθμιστικά στοιχεία που σχετίζονται με την αποικοδόμηση του mRNA είναι κάποιες ακολουθίες-στόχοι των miRNAs (miRNA target sites). Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι τα miRNAs αποσταθεροποιούν το mRNA μέσω μονοπατιών αποαδενυλίωσης. Συγκεκριμένα, η διαμεσολαβούμενη από τα miRNAs αποαδενυλίωση συμβαίνει μέσω του συμπλόκου miRISCs που μεταξύ άλλων περιέχει και αποαδενυλάσες, όπως το σύμπλοκο CAF1-CCR4-NOT, και μέσω αυτών οδηγεί το mRNA σε αποικοδόμηση (Zhang et al., 2010).

1.5 Κατάταξη και δράση των αποαδενυλασών

Οι αποαδενυλάσες είναι μαγνησιο-εξαρτώμενες εξωριβονουκλεάσες που υδρολύουν τα μόρια RNA με κατεύθυνση 3' → 5'. Αυτό οδηγεί στην απελευθέρωση του 5' - AMP (μονοφωσφορική αδενοσίνη). Οι πολυ(A) ουρές αποτελούν το βασικό υπόστρωμα αυτών των



Εικόνα 5: Μονοπάτια αποικοδόμησης και μετάφρασης (Goldstrohm & Wickens, 2008)

ενζύμων, ωστόσο έχει δείξει ότι *in vitro* αποικοδομούν, λιγότερο αποτελεσματικά, και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή. Μετά την απομάκρυνση της πολυ(A) ουράς από το mRNA, άλλα ένζυμα αποικοδόμησης στρατολογούνται για την έναρξη της αποικοδόμησής της (εικόνα 5) (Goldstrohm & Wickens, 2008). Ο αριθμός των γνωστών αποαδενυλασών συνεχώς αυξάνεται καθώς συνεχίζονται τα βιοχημικά και γενετικά πειράματα. Η ταξινόμησή τους γίνεται με βάση την αξιολόγηση των περιοχών νουκλεάσης

που διαθέτει η κάθε αποαδενυλάση. Έτσι, η κάθε αποαδενυλάση ταξινομείται σε μια από τις δύο μεγάλες υπερ-οικογένειες: αυτή των DEDD ή αυτή των εξωνουκλεασών- ενδονουκλεασών- φωσφατασών (exonuclease-endonuclease-phosphatase, EEP). Η DEDD υπερ-οικογένεια έχει λάβει το όνομά της από τα συντηρημένα και καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu που βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ τριών μοτίβων εξωνουκλεάσης, τα οποία συντονίζουν τα ιόντα Mg^{2+} . Μέλη αυτής της ομάδας αποτελούν οι αποαδενυλάσες: POP2/CAF1 (CNOT7 & CNOT8), η CAF1Z, η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (poly(A)-specific ribonuclease, PARN), καθώς και οι οικογένειες των PAN2 αποαδενυλασών. Από την άλλη μεριά, η υπερ-οικογένεια των εξωνουκλεασών- ενδονουκλεασών- φωσφατασών περιλαμβάνει αποαδενυλάσες που φέρουν συντηρημένα καταλυτικά αμινοξέα Asp και His στις περιοχές νουκλεάσης που διαθέτουν. Παραδείγματα τέτοιων ενζύμων αποτελούν οι αποαδενυλάσες Nocturnin, CCR4 (CCR4a/ CNOT6 & CCR4b/ CNOT6L), ANGEL και 2' PDE (Πίνακας 1) (Goldstrohm & Wickens, 2008).

Πίνακας 1: Πίνακας κατάταξης των αποαδενυλασών (Goldstrohm & Wickens, 2008)

Family	Sc	Ce	Dm	Xl	Mm	Hs	Active	Notes	Protein domains	Local-ization	Biological functions	Ref
DEDD nucleases												
POP2	Pop2	CCF-1	POP2	CNOT7	CNOT7	CNOT7	Sc, Dm, Mm, Hs	Inhibited by PABP	DEDD	C, PB, Sh	DNA damage, cell cycle (Sc) Development, fertility (Ce) Cell size, miRNA control (Dm) Spermatogenesis, bone mass (Mm)	4, 10, 20, 22, 28, 32, 33, 34, 36, 66, 68, 69
				CNOT8	CNOT8	CNOT8	Hs		DEDD		ND	
CAF1Z		CAF-1z	CAF1Z	CAF1Z	CAF1Z	CAF1Z	Hs		DEDD, C3H Znf, NLS	N, CB, Sh	ND	16
PARN		PARN	PARN	PARN	PARN	PARN	Xl, Hs	Binds and stimulated by cap; inhibited by PABP and CBP80	DEDD, R3H, NBD, NLS	N, C, Sh	Oocyte maturation (Xl) NMD (Hs)	4, 20, 27, 38, 61
				PARNL	PARNL	PARNL	ND		DEDD			
PAN2	Pan2	PAN-2	PAN2	PAN2	PAN2	PAN2	Sc, Mm, Hs	Stimulated by PABP	DEDD, WD40, UCH	N, C, Sh	Nuclear poly(A) shortening, replication stress (Sc)	4, 20, 70
EEP nucleases												
CCR4	Ccr4	CCR-4	CCR4	CNOT6	CCR4	CNOT6	Sc, Dm, Mm, Hs	Inhibited by PABP	EEP, LRR	C, PB, Sh	DNA damage, cell cycle, replication stress (Sc) Oogenesis (Dm) NMD (Mm)	4, 20, 23, 29, 69
				CNOT6L	CCR4L	CNOT6L	Mm, Hs		EEP, LRR	C, Sh	Cell proliferation (Mm)	
Nocturnin			NOC	Noc	NOC	NOC	Xl, Mm, Hs		EEP	C	Circadian (Xl, Mm) Homeostasis (Mm)	35, 40, 71
ANGEL	Ng1	Angel	Angel	Angel1	ANGEL1	ANGEL1	ND		EEP	C, MA (Sc)		15-17
	Ng12			Angel2	ANGEL2	ANGEL2	Sc		EEP	C (Sc); N, CB, Sh (Hs)	5.8S rRNA processing, carbon source (Sc)	
	Ng13						ND		EEP	ND		
2'PDE		2'PDE	2'PDE	2'PDE	2'PDE	2'PDE	Hs	Degrades 2'-5'A and 3'-5'A	EEP	ND	Interferon response (Hs)	18

Μέχρι τώρα οι καλύτερα χαρακτηρισμένες αποαδενυλάσες είναι το σύμπλοκο CCR4-POP2-NOT, που αποτελεί μια κυρίαρχη αποαδενυλάση σε όλους τους ευκαρυώτες, η PARN, που είναι μια πολύ σημαντική αποαδενυλάση στα θηλαστικά και η πολυ(A) νουκλεάση (PAN), που εμπλέκεται στα πρώιμα στάδια του μεταβολισμού της πολυ(A) ουράς. Μελέτες έχουν δείξει πως οι αποαδενυλάσες εντοπίζονται στον πυρήνα αλλά και στο κυτταρόπλασμα και εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως η απόκριση στη βλάβη του DNA (DNA damage response,

DDR), η μη-νοηματικά διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (non-sense mediated decay, NMD), η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, ο έλεγχος της κυτταρικής ανάπτυξης, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η φλεγμονώδης αντίδραση, η κυτταρική διαφοροποίηση κ.α. Ο ρόλος της αποαδενυλίωσης σε αυτές τις κυτταρικές διεργασίες είναι είτε να μειώσει τα συνολικά επίπεδα του mRNA, είτε να ρυθμίσει τα επίπεδα συγκεκριμένων mRNAs μέσω στοιχείων με συγκεκριμένη ακολουθία (sequence elements) που βρίσκονται στη 3' UTR τους ή, τέλος, να συμμετέχει στη τροποποίηση της πολυ(A) ουράς (Zhang et al., 2010).

Η μεγάλη ποικιλομορφία των αποαδενυλασών υποδηλώνει πως πιθανότατα ειδικές αποαδενυλάσες στοχεύουν συγκεκριμένες ομάδες mRNAs ή ότι διάφορες από αυτές δρουν στο ίδιο mRNA με επικαλυπτόμενες λειτουργίες (Goldstrohm & Wickens, 2008). Για παράδειγμα, στα κύτταρα των θηλαστικών η PAN2 αρχικά αφαιρεί τη μισή περίπου πολυ(A) ουρά και έπειτα μέλη των οικογενειών POP2 και CCR4 αποικοδομούν την υπόλοιπη (Yamashita et al., 2005). Οι αποαδενυλάσες συχνά σχηματίζουν σύμπλοκα με υπομονάδες άλλων πρωτεϊνών ή σχηματίζουν ετερο- ή ομο-διμερή (Goldstrohm & Wickens, 2008). Για παράδειγμα, ο ομοδιμερισμός της πολυ(A)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN) είναι απαραίτητος για την ενεργότητά της (Wu, M. et al., 2005), ενώ στη ζύμη η Ccr4 και η Pop2 σχηματίζουν ετεροδιμερή (Denis, C. L. & Chen, J., 2003).

Το γεγονός πως συγκεκριμένες αποαδενυλάσες είναι απαραίτητες για συγκεκριμένες βιολογικές διεργασίες αποδεικνύει πως ο έλεγχος ορισμένων mRNAs είναι καθοριστικής σημασίας για την ομαλή λειτουργία αυτών των διεργασιών. Η ρύθμιση, λοιπόν, 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 αποικοδομούνται (Goldstrohm & Wickens, 2008).

Η ρύθμιση των αποαδενυλασών συμβαίνει συνολικά αλλά και ειδικά, στο επίπεδο του mRNA. Έτσι, η έκφραση των αποαδενυλασών και των ρυθμιστών τους υποδεικνύουν πότε και που θα συμβεί η αποαδενυλίωση. Επίσης, η αποαδενυλίωση επηρεάζεται σε χωρικό επίπεδο από το διαχωρισμό του πυρήνα-κυτταροπλάσματος και τον εντοπισμό σε κοκκία, όπως είναι τα P-bodies. Σε επίπεδο mRNA, η αποαδενυλίωση ρυθμίζεται μέσω ειδικών στοιχείων-αλληλουχίας (sequence elements) που συχνά εντοπίζονται στη 3' UTR και την ενισχύουν. Η ενίσχυση επιτυγχάνεται μέσω πρωτεϊνών που προσδένονται στο RNA και στρατολογούν τις αποαδενυλάσες με την απευθείας πρόσδεσή τους σε αυτές. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι οι CUG-BP, PUF, CPEB, KSRP και τα miRNAs (Goldstrohm & Wickens, 2008).

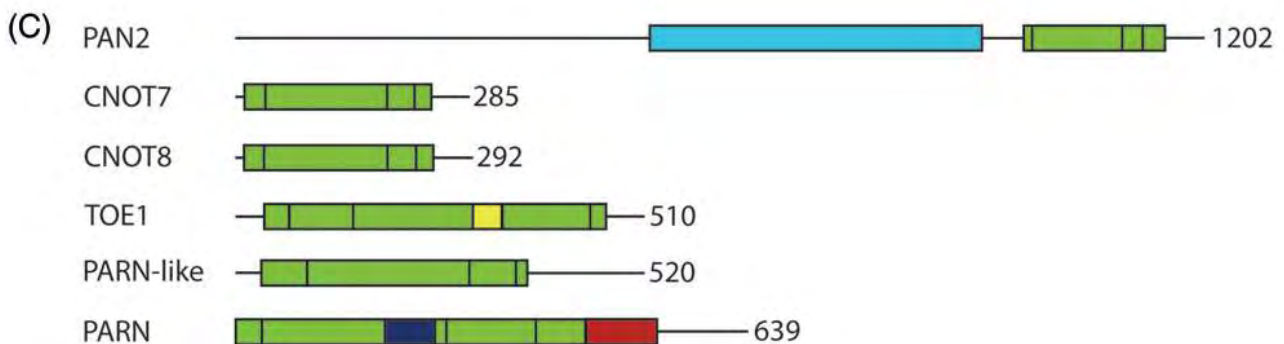
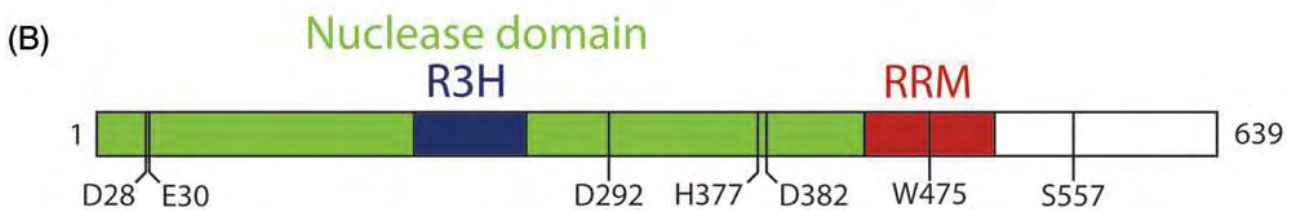
1.6 Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN [poly(A)-specific ribonuclease]

Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN, είναι από τις κυριότερες αποαδενυλάσες στα κύτταρα των θηλαστικών και με αυτή την πρωτεΐνη ασχολείται η παρούσα εργασία. Η PARN αρχικά απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε σε κύτταρα θηλαστικών (Körner et al., 1997). Είναι συντηρημένη σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς αλλά απουσιάζει από το *S.cerevisiae* και την *D. Melanogaster* (Parker & Song, 2004). Εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα και ιδιαίτερα στα πυρηνικά υποδιαμερίσματα, πυρηνίσκος (nucleolus) και σωμάτια Cajal (Cajal bodies) (Berndt et al., 2012) αλλά και στο κυτταρόπλασμα (Virtanen et al., 2013).

Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η PARN είναι εξαρτώμενη από δισθενές κατιόν, ομοδιμερής (εικόνα 7), με ικανότητα αλληλεπίδρασης με την καλύπτρα m⁷G και εξειδικευμένη 3' → 5' εξωριβονουκλεάση για τις πολυ(A) ουρές, ελευθερώνοντας 5' - AMP. Επίσης η ενεργότητα της εξαρτάται από την ύπαρξη μιας υδροξυλικής ομάδας στο 3' άκρο (εικόνα 6a). Η PARN είναι μοναδική ανάμεσα στις μέχρι τώρα γνωστές ευκαρυωτικές πολυ(A) νουκλεάσες αποικοδόμησης, αφού είναι η μοναδική αποαδενυλάση που έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά απευθείας, κατά την

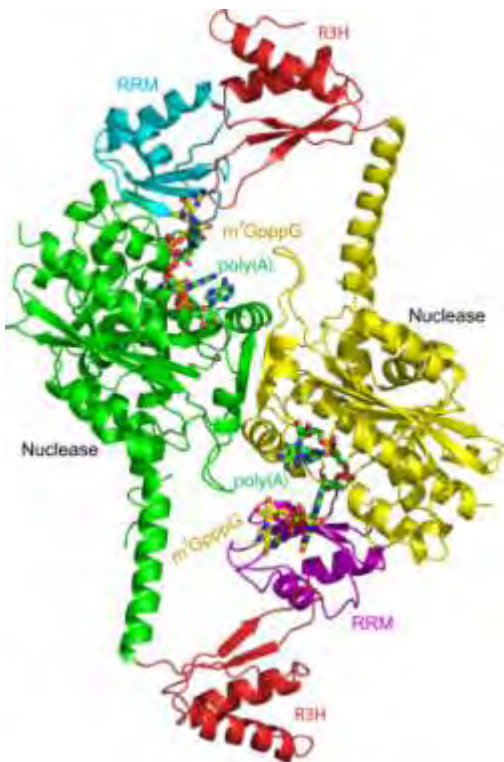
υδρόλυση της πολυ(A) ουράς, τόσο με την καλύπτρα m^7G όσο και με την πολυ(A) ουρά του mRNA (Virtanen et al., 2013).

Η ανάλυση της ακολουθίας της PARN έδειξε ότι ανήκει στην DEDD υπερ-οικογένεια, όπου όλες οι νουκλεάσες περιέχουν έναν συντηρημένο καταλυτικό πυρήνα που αποτελείται από τέσσερα αμινοξέα (Asp, Glu, Asp και Asp), ο οποίος αποκαλείται μοτίβο DEDD και ανάλογα με την παρουσία των αμινοξέων Tyr ή His γίνεται διαχωρισμός σε DEDDy ή DEDDh εξονουκλεάσες, αντίστοιχα. Η PARN έχει ένα καταλυτικό πυρήνα τύπου DEDDh με τα αμινοξέα D28, E30, D292, D382 and H377 και το γονίδιο της ανθρώπινης PARN (hPARN) έχει μήκος 639 αμινοξέα. Κατατάσσεται ως μέλος της οικογένειας CAF1 των ριβονουκλεασών λόγω της συγκεκριμένης περιοχής νουκλεάσης (nuclease domain) που διαθέτει (**εικόνα 6**) (Virtanen et al., 2013; Goldstrohm & Wickens, 2008).



Εικόνα 6: Α) Το μονοπάτι αντίδρασης της PARN- διαμεσολαβούμενης αποικοδόμησης της πολυ(A) ουράς, Β) Το γονίδιο της hPARN, Γ) Τα γονίδια των πρωτεϊνών που ανήκουν στη CAF1 οικογένεια των νουκλεασών (Virtanen et al. 2013)

Εκτός από την περιοχή νουκλεάσης διαθέτει και δύο άλλες περιοχές με ικανότητα πρόσδεσης στο RNA. Η μία περιοχή είναι το *μοτίβο πρόσδεσης στο RNA* που αναφέρεται ως R3H περιοχή και η άλλη είναι ένα *μοτίβο αναγνώρισης του RNA* (RNA recognition motif, RRM). Η R3H περιοχή προσδέεται σε μονόκλιωνα νουκλεϊκά οξέα και πιθανόν κατευθύνει την PARN στο πολυαδενυλιωμένο mRNA. Το RRM μοτίβο έχει ιδιότητες πρόσδεσης στην πολυ(A) ουρά αλλά και στη 5' καλύπτρα. Το ένζυμο στον άνθρωπο απαντά σε δύο ισόμορφες, μία πυρηνική 74 kDa και μία κυτταροπλασματική 54 kDa (Körner et al., 1998). Η τελευταία είναι πρωτεολυμένο παράγωγο της πρώτης από το οποίο απουσιάζει το εύκαμπτο καρβοξυτελικό άκρο. Η καρβοξυτελική περιοχή των ομόλογων γονιδίων της PARN δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένη. Η περιοχή αυτή ευθύνεται και για την μετακίνηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα αφού περιέχει την NLS αλληλουχία (nuclear localization signal) (Virtanen et al., 2013). Στην **εικόνα 6** εκτός από τα παραπάνω γίνεται και μια σύγκριση του μήκους των γονιδίων των νουκλεασών που ανήκουν στη Caf1 οικογένεια (**εικόνα 6c**). Επίσης, η PARN, όπως και ένζυμα που εμπλέκονται στα $5' \rightarrow 3'$ και $3' \rightarrow 5'$ μονοπάτια αποικοδόμησης, απαιτούνται για την διαμεσολαβούμενη από AREs αποικοδόμηση του mRNA (AMD) (Lin et al., 2007). Επιπλέον συνδέεται με την μη-νοηματικά διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση των mRNAs (nonsense-mediated mRNA decay - NMD) (Wu et al, 2005).



Εικόνα 7: Μοντέλο του ομοδιμερούς της PARN. Απεικονίζονται και οι τρεις δομικές περιοχές. (Wu et al. (2009))

1.7 Γνωστές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της πολυ-(A)εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης, PARN

Λίγα είναι γνωστά σχετικά με τη φυσιολογία της πρωτεΐνης PARN και με το τρόπο που ρυθμίζεται από τους *trans*-acting παράγοντες σε σχέση με τη λεπτομερή βιοχημική γνώση της δομής και των εγγενών μηχανιστικών ιδιοτήτων της (Virtanen et al., 2013).

Κάποιες από τις γνωστές αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης PARN παρατίθενται παρακάτω.

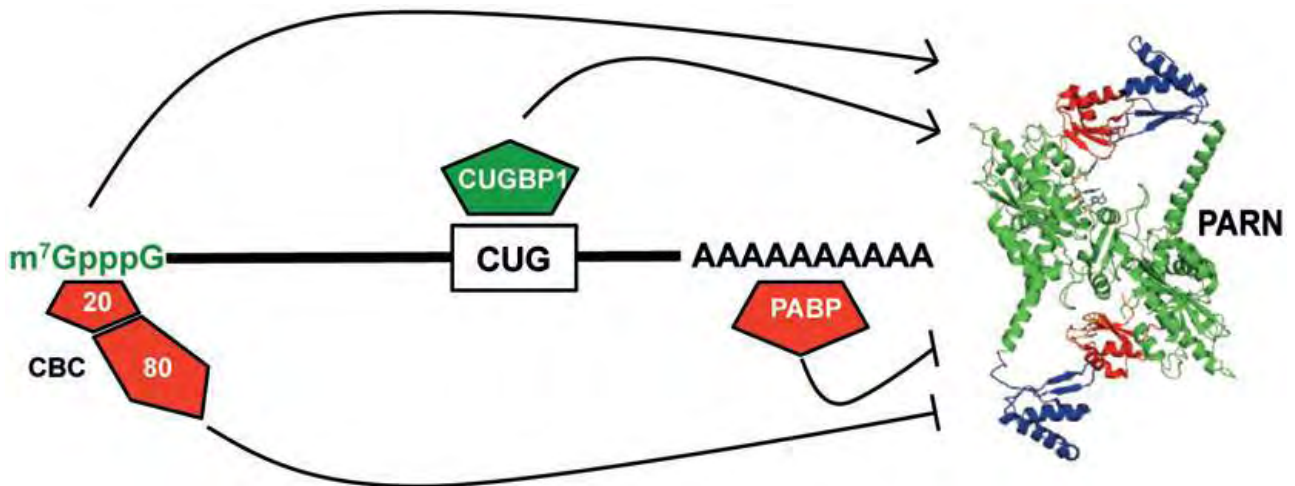
Τρεις διαφορετικές κλάσεις *cis*-acting στοιχείων έχουν ταυτοποιηθεί ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση της ενεργότητας της PARN. Πρόκειται για τη δομή της καλύπτρα m^7G στο 5' άκρο, την πολυ(A) ουρά στο 3' άκρο και τα στοιχεία αλληλουχίας (sequence elements) στη 3' UTR των mRNAs, όπως είναι τα AU- ή τα GU-πλούσια στοιχεία (AREs και GREs, αντίστοιχα) (Virtanen et al., 2013).

Έχει βρεθεί πως το πυρηνικό σύμπλοκο δέσμευσης στην καλύπτρα m^7G (nuclear cap binding complex, CBC), και συγκεκριμένα η υπομονάδα CBC80

του συμπλόκου, αναστέλλει τη δραστηριότητα της PARN με ένα τρόπο ανεξάρτητο από την καλύπτρα (cap-independent) και έχει προταθεί ως πιθανός ρυθμιστής της (εικόνα 8) (Balatsos et al., 2006). Στο κυτταρόπλασμα, αντικαθίσταται από τον κυτταροπλασματικό προσδεδεμένο στην καλύπτρα m^7G ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης, eIF4E, ο οποίος ως μέρος του συνόλου του συμπλόκου eIF4F μπορεί επίσης να δράσει ως αναστολέας της PARN (Gao et al., 2000). Η πολυ(A) ουρά του mRNA αλληλεπιδρά στον πυρήνα με την πρωτεΐνη πρόσδεσης στην πολυ(A) ουρά 1 [poly(A)-binding protein 1, PABPN1], ενώ στο κυτταρόπλασμα αντικαθίσταται από την PABPC. Η PABP φαίνεται πως αναστέλλει την ενεργότητα της PARN πιθανόν μέσω του σχηματισμού του συμπλόκου PABP/πολυ(A) ουρά, όπου η PABP παρεμβάλλεται και δεν επιτρέπει την πρόσβαση στην PARN (εικόνα 8) (Virtanen et al., 2013).

Όπως ήδη αναφέρθηκε στη παράγραφο 1.4 το πλούσιο σε AU στοιχείο (AU-rich element, ARE) είναι ένα από τα περισσότερο επικρατή *cis*-acting στοιχεία που ευθύνεται για την αποικοδόμηση του mRNA στα ανθρώπινα κύτταρα. Η KSRP (K homology splicing regulatory protein), η tristetraprolin (TTP) και η RNA ελικάση που αλληλεπιδρά με τα AREs (RHAU) ανήκουν στις πρωτεΐνες που προσδένονται στα AREs (ARE-binding protein, ARE-BPs) και οδηγούν το mRNA σε αποικοδόμηση. Χρησιμοποιώντας τεχνικές του μηχανισμού RNAi σε κύτταρα HeLa, έχει βρεθεί πως η KSRP σχηματίζει σύμπλοκο με ένζυμα αποικοδόμησης του mRNA συμπεριλαμβανομένης και της PARN (Chou et al., 2006). Η KSRP στρατολογεί την PARN σε mRNAs που περιέχουν ARE για να ξεκινήσει την αποαδενυλίωση της πολυ(A) ουράς ώστε αυτά έπειτα να αποικοδομηθούν από το εξώσωμα (Zhang et al., 2010). Η KSRP, η TTP καθώς και η RHAU έχουν προταθεί σαν ενεργοποιητές ή στρατολογητές της PARN. Επιπλέον, εκτός από τα AREs, οι 3' UTRs πολλών μικρής διάρκειας mRNAs είναι εμπλουτισμένες με τα GREs (GU-rich elements). Τα GREs πιστεύεται ότι λειτουργούν αλληλεπιδρώντας με τις πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA, όπως και τα AREs αλληλεπιδρούν με τις ARE-BPs. Μία από αυτές τις πρωτεΐνες είναι και η CELF1 (CUG-binding protein Elav-like family member 1) που επίσης αναφέρεται και ως CUGBP1. Η CUGBP1 αλληλεπιδρά με την PARN και έχει προταθεί πως την στρατολογεί στο mRNA-στόχο με σκοπό την αποικοδόμησή του (εικόνα 8) (Virtanen et al., 2013).

Άλλος ένας ρόλος της PARN είναι η συμμετοχή της στην απόκριση λόγω της βλάβης του DNA (DNA damage response, DDR) σε κύτταρα των θηλαστικών. Συγκεκριμένα, κατά την επαγόμενη από UV βλάβη του DNA η PARN αποδεσμεύεται από την υπομονάδα CBC80 του συμπλόκου CBC, η οποία αναστέλλει την ικανότητα αποαδενυλίωσής της, και αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο CstF-50/BARD1 (cleavage stimulation factor-50/tumour suppressor). Αυτή η αλληλεπίδραση της PARN με το σύμπλοκο CstF-50/BARD1 φαίνεται πως παίζει ρόλο στη ρύθμιση των ενδογενών μεταγράφων κατά τη διάρκεια της DDR, είτε μέσω της αναστολής της 3' τμήσης (3' cleavage) του mRNA, είτε με την ενεργοποίηση της αποαδενυλίωσης ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός επιβλαβών πρωτεϊνών για το κύτταρο (Zhang et al., 2010).



Εικόνα 8: Ρύθμιση της ενεργότητας της PARN μέσω *cis*-acting στοιχείων και *trans*-acting παραγόντων (Virtanen et al. 2013).

Σ Κ Ο Π Ο Σ Τ Η Σ Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α Σ

Λίγα είναι γνωστά σχετικά με τη φυσιολογία της πολυ(A)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης, PARN και σχετικά με το τρόπο που ρυθμίζεται από τους *trans*-acting παράγοντες σε σχέση με τη λεπτομερή βιοχημική γνώση της δομής και των εγγενών μηχανιστικών ιδιοτήτων της. Έχει βρεθεί, μεταξύ άλλων, πως αλληλεπιδρά με την υπομονάδα CBC80 του συμπλόκου δέσμευσης στην καλύπτρα m⁷G, CBC (nuclear cap binding complex), με τον κυτταροπλασματικό προσδεδεμένο στην καλύπτρα m⁷G ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης, eIF4E, με την πρωτεΐνη πρόσδεσης στην πολυ(A) ουρά 1, PABPN1, με πρωτεΐνες που προσδένονται στα AREs, τη KSRP, τη tristetraprolin και τη RHAU, με την CUGBP1 και τέλος με το σύμπλοκο CstF-50/BARD1.

Σκοπός της εργασίας είναι να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις της πολυ(A)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης, PARN, μέσω της μεθόδου της ανοσοκατακρήμνισης και της ταυτοποίησης των πρωτεϊνών με φασματογραφία μαζών, ώστε να αποκαλυφθούν πιθανοί επιπλέον παράγοντες με τους οποίους αλληλεπιδρά η PARN. Η εύρεση αυτών των παραγόντων θα διευρύνουν το φάσμα της γνώσης σχετικά με τη ρύθμιση και τη φυσιολογία της PARN μέσα στο κύτταρο.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Χημικές ουσίες

- Αιθανόλη Sigma
- Ακρυλαμίδη (Acrylamide) Serva
- Ammonium Persulfate (APS) Sigma
- Αποβουτυρωμένο γάλα Regilait
- Β-μερκαπτοαιθανόλη Riedel de Haen
- Bovine Serum Albumin (BSA) New England Biolabs
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) Sigma
- Δις-ακρυλαμίδιο (Bis-acrylamide) Serva
- Fetal Bovine Serum FBS Gibco
- Glycine Serva
- HEPES Serva
- Ισοπροπανόλη (Isopropanole) Scharlau
- KCl Merck
- KH₂PO₄ Merck
- Μεθανόλη (Methanol) Carlo ERBA
- NaCl Panreac
- Na₂HPO₄ Merck
- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) Research Organics
- Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) Serva
- RPMI 1640 Biosera
- Sodium dodecyl sulfat (SDS) Sigma

- Triton-X 100 Merck
- Tris ultrapure Applichem
- Trypan blue solution 0,5% Biosera
- Trypsin-EDTA 0,5% 10x Gibco
- Tween-20 Euro-clone

2.1.2 Διαλύματα

- **Θρεπτικό διάλυμα για τα NCI-H520 κύτταρα**

RPMI 1640: w/o L-Glutamine w/25mM HEPES, 10% FBS

- **Διάλυμα κρυοπροστασίας NCI-H520 κυττάρων**

10% DMSO, 90% RPMI

- **Διάλυμα για την απομόνωση της ολικής πρωτεΐνης από τα NCI-H520 κύτταρα**

Αντιδραστήριο TRI (TRI reagent, Sigma):

Ισοπροπανόλη, 100% αιθανόλη, 1% SDS, 0.3 M Guanidine hydrochloride σε 95% αιθανόλη, 1-bromo-3-chloropropane

- **Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)**

Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (running buffer 10x):

25mM Tris base, 192mM Γλυκίνη, 0,1% SDS

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

Ανάλογα με τη συσκευή της SDS-PAGE, την περιεκτικότητα του πολυακρυλαμιδίου που απαιτείται καθώς και το μοριακό βάρος της υπό μελέτη πρωτεΐνης, χρησιμοποιούνται και οι αντίστοιχες ποσότητες από τα stock διαλύματα. Στην παρούσα εργασία, η απαιτούμενη περιεκτικότητα του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου ήταν 7,5% και οι ποσότητες των stock διαλυμάτων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (**πίνακας 2**).

Πίνακας 2: Ποσότητες των διαλυμάτων για την SDS-PAGE

stock διαλύματα	Separating gel buffer (7,5%)	Stacking gel buffer
Tris- HCl 1,5M, pH 8,8	2,5 ml	-
Tris- HCl 0,5M, pH 6,8	-	1,25ml
SDS 10% v/w	0,1ml	0,05ml
Ακρυλαμίδιο/δισ- ακρυλαμίδιο 30% v/w	2,5ml	0,65ml
H ₂ O	4,9ml	3,05ml
Υτελ.	10ml	5ml

Για το separating gel buffer προστέθηκαν 50μl ammonium persulfate (APS) 10% και 5μl TEMED, ενώ για το stacking gel buffer προστέθηκαν 25μl APS 10% και 5μl TEMED. Το ammonium persulfate (APS) και το TEMED είναι καταλύτες που βοηθούν στο γρήγορο πολυμερισμό του ακρυλαμίδιου.

- **Διάλυμα loading buffer**

4X SDS-PAGE sample loading buffer (From OpenWetWare) (πίνακας 3)

Πίνακας 3: Σύσταση του sample loading buffer

10 ml	1X (τελική συγκέντρωση)
2.0 ml 1M Tris-HCl, pH 6.8	50 mM
0.8 g SDS	2%
4.0 ml 100% glycerol	10%
0.4 ml 14.7 M β-mercaptoethanol	1%
1.0 ml 0.5 M EDTA	12.5 mM
8.0 mg bromophenol blue	0.02%
2.6 ml H ₂ O	

- **Διαλύματα για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF (western blotting)**

Ρυθμιστικό διάλυμα για την μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη PVDF (transfer buffer 10x):
25mM Tris base, 192mM Γλυκίνη, 0,1% SDS, 10% μεθανόλη (η μεθανόλη δεν περιέχεται στο stock 10x αλλά προστίθεται πάντα κατά την παρασκευή του transfer buffer 1x)

Blocking buffer:

5% αποβουτυρωμένο γάλα, 0,1% Tween-20 σε PBS

1^o Antibody Buffer (1:1000):

20μl Antibody solution σε 20ml Blocking buffer

2^o Antibody (goat anti-rabbit IgG antibody, HRP-conjugate) Buffer (1:10000):

2μl Antibody solution σε 20ml Blocking buffer

Διάλυμα έκπλυσης (washing buffer):

0,1% PBS/Tween-20

- Διάλυμα λύσης των NCI-H520 κυττάρων/διάλυμα για τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης (immunoprecipitation-IP) -lysis buffer-IP150 (Balatsos N. et al., 2006)

20mM HEPES, pH 7.9, 150mM KCL, 1% Triton X-100

- Διαλύματα για τη χρώση με νιτρικό άργυρο – silver staining

Fixation solution:

50% μεθανόλη και 5% οξικό οξύ

Washing:

50% μεθανόλη

Sensitizing solution:

0.0775gr $\text{NA}_2\text{S}_2\text{O}_3$ σε 250ml ddH₂O

AgNO₃:

0.25gr AgNO₃ σε 250ml ddH₂O

Developing solution:

5gr NA_2CO_3 σε 250ml ddH₂O και 100μl HCHO

Terminating solution:

12.5μl οξικό οξύ σε 250ml ddH₂O

2.1.3 Κυτταρική σειρά

Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα NCI-H520:

Πρόκειται για ανθρώπινη, καρκινική κυτταρική σειρά του ακανθοκυτταρικού ή επιδερμοειδή καρκίνου (squamous cell carcinoma) του επιθηλίου του πνεύμονα.

2.1.4 Πρωτεΐνες και αντισώματα

protein A (*Staphylococcus aureus*) coupled to sepharose beads

Anti-PARN 74kDa

pre-immune-PARN 74kDa

Acris antibodies

Ευγενική προσφορά του
Καθ. A.Virtanen,
Uppsala University,
Uppsala, Σουηδία
Chemicon

goat anti-rabbit IgG antibody, HRP-conjugate

Anti-CNOT6

Anti-β-Actin

RNase A from bovine pancreas

Bovine Serum Albumin (BSA)

Blue Star Prestained Protein Marker

Aviva Systems Biology
Aviva Systems Biology
Sigma
New England Biolabs
Genetics

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Απόψυξη κυττάρων NCI-H520

Τα κύτταρα βρίσκονται αποθηκευμένα σε υγρό N₂ μέσα σε φιαλίδια (cryovials). Κατά την απόψυξή τους μεταφέρονται από το υγρό N₂ στο υδατόλουτρο στους 37°C. Τα κύτταρα δεν αφήνονται να ξεπαγώσουν τελείως λόγω της παρουσίας του DMSO που μπορεί να τα θανατώσει. Έπειτα, προστίθεται η απαιτούμενη ποσότητα του θρεπτικού μέσου RPMI-10% FBS και ακολουθεί ήπια φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια, αφαιρείται το υπερκείμενο στο οποίο περιέχεται και το DMSO. Το φιαλίδιο καθαρίζεται με 70% αιθανόλη εξωτερικά και τοποθετείται μέσα στον απαγωγό κάθετης νηματικής ροής (flow laminar hood), ο οποίος έχει ήδη καθαριστεί με 70% αιθανόλη. Ακολουθεί στρώσιμο των κυττάρων σε πλαστική φλάσκα-75T και η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας θρεπτικού μέσου RPMI-10% FBS. Τέλος, η φλάσκα με τα κύτταρα τοποθετείται στον κλίβανο στους 37 °C.

2.2.2 Ανακαλλιέργεια των κυττάρων NCI-H520 – Θρυψινοποίηση

Η θρυψινοποίηση είναι απαραίτητη όταν είναι επιθυμητή η ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Για να πραγματοποιηθεί η θρυψινοποίηση θα πρέπει η πληρότητα των κυττάρων στο ταπήτιο της φλάσκας να είναι 90-100%. Η αραιώση που πραγματοποιείται συνήθως είναι 1:3.

Σε πρώτο στάδιο τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο και πραγματοποιείται έλεγχος της μορφολογίας και της πληρότητάς τους (confluency). Ο απαγωγός κάθετης νηματικής ροής καθαρίζεται με 70 % αιθανόλη. Έπειτα, αφού έχει προηγηθεί ο κατάλληλος καθαρισμός όλων των υλικών και των εργαλείων που απαιτούνται για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων με 70% αιθανόλη, αυτά τοποθετούνται στον απαγωγό κάθετης νηματικής ροής. Ακολουθεί ο εξωτερικός καθαρισμός των φλασκών επίσης με 70% αιθανόλη και η τοποθέτησή τους στον απαγωγό κάθετης νηματικής ροής.

Αρχικά, απομακρύνεται (με αναρρόφηση) το υλικό της καλλιέργειας και ακολουθεί η πλύση των κυττάρων με διάλυμα PBS 1X (4-5 ml)(δύο φορές). Τα κύτταρα αναδεύονται και το PBS αφαιρείται. Ακολουθεί η προσθήκη του διαλύματος της θρυψίνης-EDTA 0.5% (1ml για φιάλη 75cm²). Η φλάσκα ανακινείται ώστε το διάλυμα της θρυψίνης να καλύψει όλο το ταπήτιο και τοποθετείται μέσα στο κλίβανο στους 37°C για 1min. Μετά το πέρας του 1min τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο και εν συνεχεία η θρυψίνη αφαιρείται. Τα κύτταρα μεταφέρονται και πάλι στον κλίβανο (37°C) για περίπου 2-3min. Έπειτα παρατηρείται το σχήμα των κυττάρων στο μικροσκόπιο (στρογγυλό σχήμα). Ακολουθεί ελαφρύ χτύπημα της φλάσκας στο πλάι, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από το ταπήτιο. Προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα του θρεπτικού μέσου RPMI-10% FBS (6ml) και με τη βοήθεια του σιφωνίου τα κύτταρα αναδεύονται ώστε να διαλυθούν τα συσσωματώματα. Σε αυτή τη φάση, ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος, τα κύτταρα μπορούν να μοιραστούν σε μία ή περισσότερες φλάσκες ή να απομακρυνθούν από την ήδη υπάρχουσα. Το μοίρασμα πραγματοποιείται σύμφωνα με την απαιτούμενη αραιώση που καθορίζεται από το ποσοστό της πληρότητας που πρέπει να επιτευχθεί. Ακολουθεί η προσθήκη του θρεπτικού μέσου RPMI-10% FBS συμπληρωματικά ως προς τον αρχικό όγκο που προστέθηκε για την ανάδευση (~8ml, επιθυμητός τελικός όγκος 10-15ml). Τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο και τέλος, η φλάσκα με τα κύτταρα τοποθετείται στον κλίβανο στους 37°C περίπου για τρεις ημέρες, όπου είναι αναγκαία η εκ νέου ανακαλλιέργεια των κυττάρων.

2.2.3 Ψύξη των κυττάρων NCI-H520

Αρχικά, πραγματοποιείται η θρυψινοποίηση των κυττάρων σε φλάσκα των 75cm², όπως περιγράφεται παραπάνω (παράγραφος 2.2.2), σε απαγωγό καθέτου νηματικής ροής. Στο στάδιο προσθήκης της κατάλληλης ποσότητας του θρεπτικού μέσου RPMI-10% FBS (6ml), αφού τα κύτταρα αποκολληθούν από το ταπήτιο, ακολουθεί η τοποθέτησή τους σε falcon. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση και μετά το πέρας αυτής, η αφαίρεση του υπερκειμένου. Έπειτα, στο ίζημα προστίθενται 1800μl RPMI-10% FBS και 200μl DMSO. Ακολουθεί ανάδευση και τοποθέτηση των κυττάρων σε cryovial. Η ψύξη των κυττάρων πρέπει να γίνει αργά και αυτό είναι εφικτό με τη χρήση του cryobox (προσθήκη ισοπροπανόλης) (1°C/1 min) στους -80°C. Τέλος, την επόμενη μέρα τα κύτταρα τοποθετούνται στο υγρό N₂.

2.2.4 Συλλογή και λύση των κυττάρων NCI-H520

- Συλλογή

Αρχικά, πραγματοποιείται η θρυψινοποίηση των κυττάρων σε φλάσκα των 75cm², όπως περιγράφεται παραπάνω (παράγραφος 2.2.2), σε απαγωγό καθέτου νηματικής ροής. Όπως και για την κατάψυξη των κυττάρων, στο στάδιο προσθήκης της κατάλληλης ποσότητας του θρεπτικού μέσου RPMI-10% FBS (6ml), αφού τα κύτταρα αποκολληθούν από το ταπήτιο, ακολουθεί η τοποθέτησή τους σε falcon. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση και μετά το πέρας αυτής, η αφαίρεση του υπερκειμένου. Το ίζημα των κυττάρων που βρίσκεται μέσα στο falcon φυλάσσεται στους -80°C.

- Λύση

Πραγματοποιείται επαναδιάλυση του ιζήματος, των κυττάρων που συλλέχθηκαν, σε 1,5ml IP150 lysis buffer για κάθε ~10⁷ κύτταρα. Έπειτα, προστίθενται 10μl από τον αναστολέα των πρωτεασών, PMSF (stock 150mM). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται τοποθέτηση των κυττάρων σε εναλλαγή θερμοκρασιών με σκοπό τη λύση τους. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37°C και έπειτα στους -80°C. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές.

2.2.5 Απομόνωση της ολικής πρωτεΐνης από τα NCI-H520 κύτταρα

Η απομόνωση της ολικής πρωτεΐνης από τα NCI-H520 κύτταρα έγινε μέσω του αντιδραστηρίου TRI (TRI reagent) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Sigma. Η λύση του ιζήματος των κυττάρων πραγματοποιείται με την προσθήκη 1ml του αντιδραστηρίου TRI για κάθε 5-10 x 10⁶ κύτταρα και ανάδευση με την πιπέτα για να γίνει καλά η λύση. Το διάλυμα αφήνεται για 5min σε θερμοκρασία δωματίου (R.T). Έπειτα, προστίθεται 0.1ml 1-bromo-3-chloropropane για κάθε ml του αντιδραστηρίου TRI. Ακολουθεί γρήγορη ανάδευση (vortex) για 15 sec και το διάλυμα αφήνεται για 2-15 min σε R.T. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 12,000 x g για 15 min στους 2-8 °C. Σε αυτό το στάδιο, με τη φυγοκέντρηση προκύπτουν τρεις φάσεις: μια υδατική, άχρωμη φάση στο πάνω μέρος που περιέχει το RNA, μια ενδιάμεση φάση που περιέχει το DNA και μια οργανική, κόκκινη φάση στο κάτω μέρος που περιέχει τις πρωτεΐνες.

Η αφαίρεση του RNA και του DNA από το διάλυμα είναι απαραίτητη για την ανάκτηση των πρωτεϊνών. Έτσι, γίνεται αφαίρεση της υδατικής φάσης που περιέχει το RNA και προστίθεται 0.3ml 100% αιθανόλης για κάθε 1 ml αντιδραστηρίου TRI. Ακολουθεί ήπια ανάδευση με το χέρι και επώαση για 2-3 min σε R.T. Έπειτα, το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 2,000 x g για 5 min

στους 2–8°C. Το υπερκείμενο, όπου περιέχονται οι πρωτεΐνες, συλλέγεται και προστίθενται 1.5 ml ισοπροπανόλης για κάθε 1ml του αντιδραστηρίου TRI. Το δείγμα επωάζεται για 10 min σε R.T. και φυγοκεντρείται στα 12,000 x g για 10 min στους 2–8°C.

Το υπερκείμενο αφαιρείται και ακολουθούν τρεις πλύσεις του ιζήματος που περιέχει τις πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 2ml 0.3 M guanidine hydro-chloride/95% αιθανόλη για κάθε 1 ml του αντιδραστηρίου TRI. Μετά από κάθε πλύση το δείγμα επωάζεται για 20min σε R.T. Έπειτα, φυγοκεντρείται στα 7,500 x g για 5 min στους 2–8°C. Μετά το τέλος των τριών πλύσεων προστίθενται 2 ml 100% ethanol και γρήγορη ανάδευση (vortex) του πρωτεϊνικού ιζήματος. Το δείγμα επωάζεται για 20 min σε R.T. και ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 7,500 x g για 5 min στους 2–8°C. Στη συνέχεια ακολουθεί λυοφιλίωση υπό κενό για 5-10min. Το διάλυμα επαναδιαλύεται σε 1% SDS και βράζεται στους 95°C για 5min. Με τη βοήθεια ενός tip διαλύεται το ίζημα των πρωτεϊνών και τέλος, φυγοκεντρείται σε full speed για 2 min.

2.2.6 Bradford Protein Assay

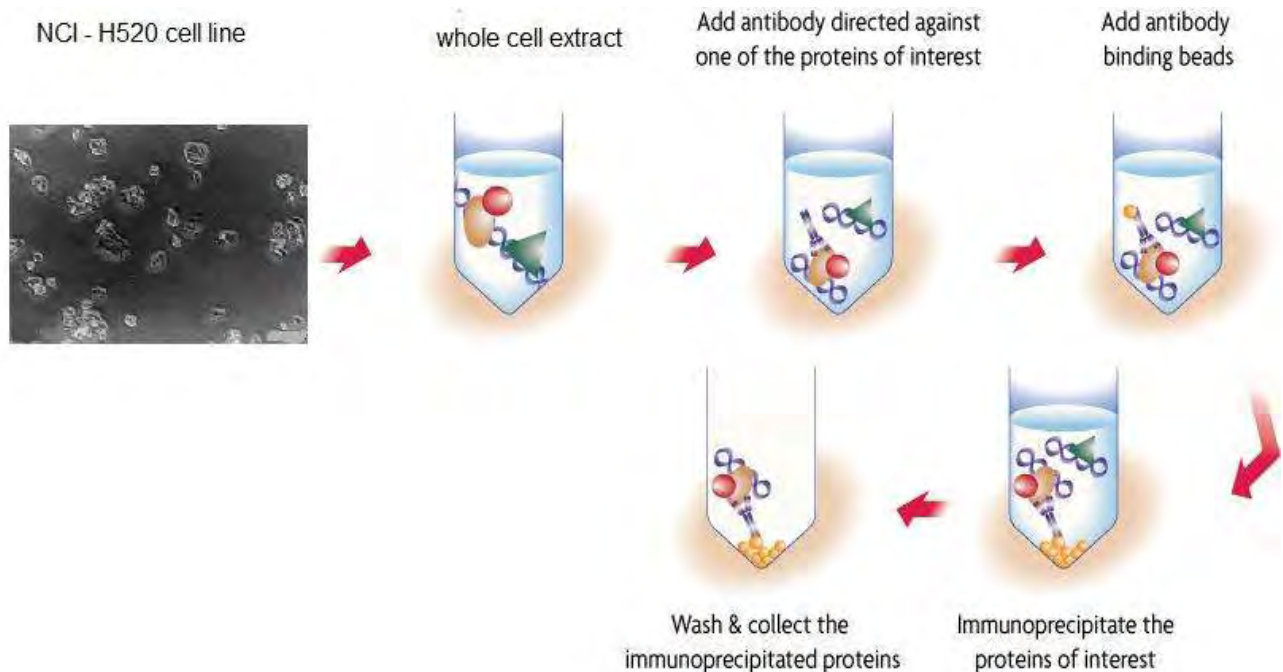
Η μέθοδος Bradford είναι μια απλή διαδικασία για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε ένα διάλυμα. Η τεχνική βασίζεται στην πρόσδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 στις πρωτεΐνες (Bradford, 1976). Η χρωστική συναντάται σε τρεις μορφές: κατιονική (κόκκινη), ουδέτερη (πράσινη) και ανιονική (μπλε). Όταν η χρωστική προσδένεται στην πρωτεΐνη μετατρέπεται στην σταθερή αποπρωτονιωμένη μορφή ($\lambda_{max}=595nm$) η οποία ανιχνεύεται με τη χρήση ενός φασματοφωτομέτρου.

Σε κάθε πρωτεϊνική ανάλυση η ιδανικότερη πρωτεΐνη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μάρτυρας είναι ένα εξευγενισμένο παρασκεύασμα της πρωτεΐνης που αναλύεται. Σε περίπτωση που δεν μπορεί να επιτευχθεί αυτό, χρησιμοποιούνται παρεμφερείς μέθοδοι με συνηθέστερη την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης με BSA (Bovine Serum Albumin) ή γ -globulin.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης με BSA τα δείγματα προετοιμάζονται με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Για ανάλυση σε κυβελίδα 1ml χρειάζονται 20μl δείγματος και 1ml χρωστικής και η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 5min. Σε καμία περίπτωση η επώαση δεν πρέπει να ξεπερνά την 1h. Στη συνέχεια, γίνεται ρύθμιση του φασματοφωτόμετρου στα 595nm, μηδενισμός με το τυφλό και μέτρηση των απορροφήσεων. Έπειτα, η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται σε γραφική παράσταση με τις τιμές των απορροφήσεων στον άξονα ψ και τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων ($\mu g/mL$) στον άξονα χ . Τέλος, η συγκέντρωση των αγνώστων δειγμάτων προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη. Αν τα δείγματα έχουν αραιωθεί η τελική συγκέντρωση υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας με τον συντελεστή αραιώσης.

2.2.7 Ανοσοκατακρήμνιση (immunoprecipitation)

Η ανοσοκατακρήμνιση είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για την απομόνωση μιας πρωτεΐνης για την οποία είναι διαθέσιμο ένα ειδικό αντίσωμα. Αφού πραγματοποιηθεί η απομόνωση των ολικών πρωτεϊνών του δείγματος, γίνεται η επώαση με το ειδικό αντίσωμα. Το αντίσωμα προσδένεται στην πρωτεΐνη που αναγνωρίζει και σχηματίζει με αυτήν ένα σύμπλοκο. Τέτοιου είδους σύμπλοκα απομονώνονται μετά από επώαση του δείγματος με πρωτεΐνη A, η οποία είναι προσδεμένη σε σφαιρίδια αγαρόζης ή σεφαρόζης. Η πρωτεΐνη A είναι μια βακτηριακή πρωτεΐνη που συνδέεται ισχυρά στη σταθερή περιοχή των αντισωμάτων τύπου IgG και τα ακινητοποιεί πάνω στα σφαιρίδια (Slack, Βασικές αρχές βιολογίας ανάπτυξης). Μετά τη συλλογή του δείγματος με την πρωτεΐνη που απομονώθηκε, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου για την περαιτέρω μελέτη της υπό εξέταση πρωτεΐνης.



Εικόνα 9: Τα στάδια της ανοσοκατακρήμνισης (<http://www.activemotif.com/catalog/25/nuclear-complex-co-ip-kit>)

Το πρωτόκολλο που ακολουθεί εφαρμόστηκε σύμφωνα με την McKendrick et al., 2001; Balatsos N. et al., 2006.

Σε πρώτο στάδιο είναι απαραίτητη η λύση των κυττάρων, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.5, ώστε να ληφθεί το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (whole cell extract). Το ολικό εκχύλισμα τοποθετείται σε δύο eppendorfs των 1,5ml και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 10.000 g για 10 min στους 4°C. Συλλέγεται το υπερκείμενο και μεταφέρεται σε falcon ώστε να ακολουθήσει η επώαση του εκχυλίσματος με την protein A sepharose με σκοπό την απομάκρυνση των μορίων στα οποία, η protein A sepharose, προσδένεται μη ειδικά (lysate preclearing).

- Προετοιμασία της protein A sepharose

Η protein A sepharose από την εταιρεία acris antibodies βρίσκεται σε διάλυμα 20% αιθανόλης, οπότε πριν το lysate preclearing είναι απαραίτητη η απομάκρυνση της αιθανόλης. Έτσι, τοποθετούνται σε ένα eppendorf 150μl protein A sepharose και προστίθενται 1350μl από το buffer IP150. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 10.000 g για 30 sec στους 4°C και το υπερκείμενο αφαιρείται. Στη συνέχεια πραγματοποιείται άλλη μια πλύση με 1500μl από το buffer IP150 και έπειτα φυγοκέντρηση στα 10.000 g για 30 sec στους 4°C και το υπερκείμενο αφαιρείται. Τέλος, γίνεται επαναδιάλυση σε 150μl από το buffer IP150.

- Καθαρισμός του εκχυλίσματος (lysate preclearing)

Στο falcon που περιέχεται το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα προστίθενται 50μl από το διάλυμα της protein A sepharose που προετοιμάστηκε με βάση το προηγούμενο βήμα. Ακολουθεί αργή ανάδευση για 1h στους 4°C και έπειτα το διάλυμα μεταφέρεται σε καινούργια eppendorfs των 1.5ml. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 10.000 g για 10 min στους 4°C και το υπερκείμενο μεταφέρεται προσεκτικά (χωρίς να μεταφερθεί καθόλου από το ίζημα) σε δύο καινούργια eppendorfs των 1.5ml.

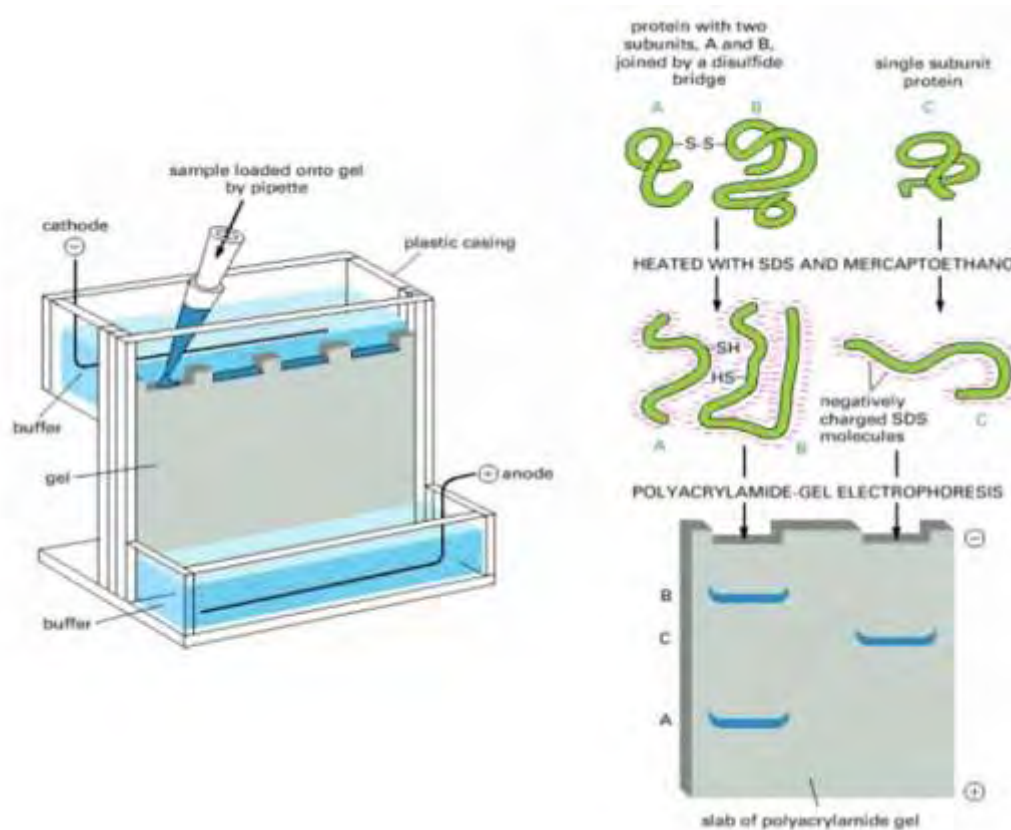
- Συν-ανοσοκατακρήμνιση (co-immunoprecipitation)

Αρχικά, γίνεται η προσθήκη του αντισώματος σε κάθε ένα από τα δύο eppendorfs που περιέχουν το precleared lysate από το προηγούμενο βήμα. Συγκεκριμένα, στο ένα eppendorf τοποθετούνται 10μl από το αντίσωμα της πρωτεΐνης που μελετάται (στην παρούσα εργασία προστέθηκαν τα αντισώματα anti-PARN 74kDa ή anti-PARN 54kDa, ανάλογα με την υπό εξέταση πρωτεΐνη του κάθε πειράματος που πραγματοποιήθηκε) και 10μl ορού pre-immune, που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control. Κατόπιν, ακολουθεί αργή ανάδευση στις 20 rpm για 1h στους 4°C και έπειτα προστίθενται 50μl protein A sepharose στο κάθε eppendorf. Ομοίως με την προηγούμενη επώαση με το αντίσωμα πραγματοποιείται αργή ανάδευση στις 20 rpm για 1h στους 4°C. Μόλις παρέλθει ο απαιτούμενος χρόνος αφαιρείται όσο το δυνατόν περισσότερο υπερκείμενο και ακολουθούν τρεις πλύσεις με 500μl buffer IP150. Στην πρώτη πλύση, ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος, προστίθενται 80μl RNase A και τα δείγματα επωάζονται για 15min. Μετά το πέρας κάθε πλύσης, τα δείγματα φυγοκεντρώνται στα 10.000g για 30sec στους 4°C, το υπερκείμενο αφαιρείται και ακολουθεί η επόμενη πλύση. Τέλος, μετά και την τρίτη πλύση, το υπερκείμενο αφαιρείται και γίνεται επαναδιάλυση του κάθε δείγματος σε 40μl του buffer IP150.

2.2.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου

Ένα μόριο με καθαρό φορτίο θα μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Το φαινόμενο αυτό λέγεται ηλεκτροφόρηση και προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο για να διαχωριστούν τα μακρομόρια, όπως είναι και οι πρωτεΐνες. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε μια λεπτή κατακόρυφη πλάκα πολυακρυλαμίδιου. Η πηκτή πολυακρυλαμίδιου είναι το μέσο στο οποίο πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Έτσι, τα μικρά μόρια μετακινούνται γρήγορα, ενώ τα μεγάλα μόρια μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Το ακρυλαμίδιο πολυμερίζεται με διασύνδεση μεθυλενο-δισακρυλαμίδιου (Bis-acrylamide). Σε μια ηλεκτροφόρηση πολύ-ακρυλαμίδιου κάτω από συνθήκες αποδιάταξης, όπως με την παρουσία του δωδεκακυλο-θεικού νατρίου (SDS), οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως βάσει της μάζας τους. Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Επίσης, προστίθεται μερκαπτοαιθανόλη που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά δύο αμινοξέα. Αυτό δίνει στο σύμπλοκο του SDS με την αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο αρνητικό φορτίο, περίπου ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης (**εικόνα 10**) (Stryer, Βιοχημεία).

Η προετοιμασία της πηκτής του πολυακρυλαμίδιου (gel) περιλαμβάνει την παρασκευή του separating gel buffer 7,5% και του stacking gel buffer και την τοποθέτησή τους στα ειδικά τζάμια της συσκευής. Μόλις πήξει η πηκτή του πολυακρυλαμίδιου, τα τζάμια τοποθετούνται στη συσκευή mini-PROTEAN® Tetra Cell. Στη συνέχεια, προστίθεται το running buffer και τα δείγματα καθώς και ο μάρτυρας (protein marker) τοποθετούνται στις εσοχές της πηκτής του πολυακρυλαμίδιου. Έπειτα, ρυθμίζεται το τροφοδοτικό στα 100V για το stacking gel buffer και 150V για το separating gel buffer.



Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) (Alberts, Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας-195Ε)

2.2.9 Χρώση με νιτρικό άργυρο – silver staining

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών στην πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου αφαιρείται η πηκτή (gel) από τη συσκευή και τοποθετείται σε ένα ειδικό δοχείο όπου προστίθενται 150ml από το fixation solution. Ακολουθεί επώαση του gel για 20 min και έπειτα το διάλυμα αφαιρείται. Στη συνέχεια προστίθενται 100ml από το washing και ακολουθεί 10 min επώαση. Αφού αφαιρεθεί το washing πραγματοποιούνται 5-6 πλύσεις με ddH₂O για 10 min η καθεμιά. Εναλλακτικά υπάρχει η δυνατότητα το ddH₂O να μείνει overnight. Μετά την αφαίρεση του ddH₂O τοποθετείται το sensitizing solution για 20-30 sec, αφαιρείται και ξεπλένεται δύο φορές με ddH₂O (1min/πλύση). Όταν ολοκληρωθούν οι πλύσεις προστίθεται το διάλυμα του AgNO₃ για 20 min και το δοχείο καλύπτεται με αλουμινόχαρτο (λόγω της φωτοευαισθησίας του AgNO₃). Έπειτα, αφού αφαιρεθεί το διάλυμα του AgNO₃, τοποθετείται το developing solution αφού πρώτα προστεθούν τα 100μl HCHO. Ακολουθεί ανάδευση με το χέρι και αναμονή εμφάνισης των ζωνών. Μόλις η χρώση των ζωνών είναι στην επιθυμητή ένταση τοποθετείται το terminating solution για να τερματιστεί η αντίδραση. Όλες οι επώσεις πραγματοποιούνται υπό αργή ανάδευση σε R.T. και όλα τα διαλύματα τοποθετούνται στους 4°C πριν τη χρήση.

2.2.10 Ανίχνευση πρωτεϊνών με western blot

Αρχικά, παρασκευάζεται το transfer buffer 1X και προστίθεται 10% μεθανόλη. Στη συνέχεια, γίνεται εμβάπτιση των ειδικών χαρτιών whatman (6 χαρτιά) στο transfer buffer 1X. Η μεμβράνη PVDF κόβεται στις απαιτούμενες διαστάσεις και ενεργοποιείται με την εμβάπτισή της σε μεθανόλη για λίγα δευτερόλεπτα. Έπειτα, τοποθετείται στο transfer buffer 1x. Τοποθετείται και η πηκτή πολυακρυλαμιδίου στο transfer buffer 1X. Η μεμβράνη PVDF και η πηκτή

πολυακρυλαμιδίου επώαζονται στο transfer buffer 1X για 5-10min. Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται στη συσκευή semidry transfer system. Η προετοιμασία της μεμβράνης περιλαμβάνει τη στρώση των πρώτων τριών χαρτιών, έπειτα την τοποθέτηση της μεμβράνης, της πηκτής πολυακρυλαμιδίου και τέλος, των άλλων τριών χαρτιών με σκοπό να δημιουργηθεί μια μορφή “σάντουιτς”. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου, λόγω του αρνητικού φορτίου τους, μετακινούνται προς το θετικό πόλο και δεσμεύονται πάνω στη μεμβράνη. Η ρύθμιση του τροφοδοτικού γίνεται στα 450mA για 50min. Μετά το πέρας των 50min ακολουθεί η επώαση της μεμβράνης στο blocking buffer για 1h και έπειτα στο 1^ο antibody buffer στους 4°C overnight. Ακολούθως το 1^ο antibody buffer αφαιρείται και πραγματοποιούνται τρεις πλύσεις των 30min με το washing buffer. Αφού τελειώσουν οι πλύσεις προστίθεται το 2^ο antibody buffer για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιούνται, εκ νέου, άλλες τρεις πλύσεις των 30min με το washing buffer. Για την εμφάνιση χρησιμοποιήθηκε το LumiSensorTM Chemiluminescent HRP Substrate Kit. Η εμφάνιση πραγματοποιήθηκε στο FluorChem E system.

2.2.11 Φασματογραφία μαζών (Mass Spectrometry)

Οι πρωτεϊνικές αναλύσεις «διασποράς» (Shotgun proteomics) περιλαμβάνουν μια σειρά από διαδοχικές πειραματικές τεχνικές, με σκοπό την αναγνώριση της ταυτότητας των πρωτεϊνών σε ένα πολύπλοκο βιολογικό δείγμα, κυρίως με τη συνδυαστική χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) και φασματογραφίας μαζών (McDonald W. H. και Yates III J. R., 2003). Στις αναλύσεις αυτού του τύπου, οι πρωτεΐνες ενός μίγματος πέπτονται με πρωτεολυτικά ένζυμα, και τα πεπτίδια που προκύπτουν διαχωρίζονται με υγρή χρωματογραφία και τέλος αναγνωρίζονται με φασματογραφία μαζών (bottom-up strategy).

Η φασματογραφία μαζών παίζει πλέον έναν όλο και σημαντικότερο ρόλο στις πρωτεομικές και μεταβολομικές μελέτες, λόγω της ολοένα και αυξανόμενης ταχύτητας και ευαισθησίας της, της δυνατότητας ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων της, και της δυνατότητας να συνδέεται με διάφορες μεθόδους χρωματογραφικής κλασμάτωσης του προς μελέτη δείγματος.

Ο φασματογράφος μαζών είναι ένα όργανο, με το οποίο γίνεται ο προσδιορισμός της μάζας των συστατικών του δείγματος (στις πρωτεομικές αναλύσεις κυρίως πεπτίδια). Στην πρωτεομική επιστήμη, η μάζα των πρωτεϊνών ή των πεπτιδίων τους δίνουν πληροφορίες για την ταυτότητά τους, τις χημικές τροποποιήσεις τους και τη δομή τους. Όλοι οι φασματογράφοι μαζών αποτελούνται από τρία βασικά μέρη: μία πηγή ιόντων, έναν αναλυτή και έναν ανιχνευτή. Κάθε φασματογράφος μαζών μπορεί να μετρήσει τη μάζα μορίων αν αυτά είναι φορτισμένα, έτσι η πηγή ιόντων θα πρέπει να είναι ικανή να παράγει ιόντα. Επίσης ο αναλυτής θα πρέπει να μπορεί να διαχωρίζει τα ιόντα με βάση την αναλογία μάζας/φορτίου, και ο ανιχνευτής να μπορεί να ανιχνεύει φορτισμένα μόρια και έπειτα να ενισχύει την απόκριση για να δίνει μετρήσιμο σήμα.

Η τεχνική της φασματογραφίας μαζών έχει μεγαλύτερη ευαισθησία και ακρίβεια στον προσδιορισμό της μάζας των επιμέρους πεπτιδίων παρά ολόκληρων των πρωτεϊνών (Aebersold R. και Mann M., 2003). Για το λόγο αυτό, κάποια βήματα επεξεργασίας του προς ανάλυση πρωτεϊνικού δείγματος κρίνονται απαραίτητα για ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα.

Για την παρούσα ανάλυση, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν και έγινε χρώση με νιτρικό άργυρο. Οι επιθυμητές ζώνες κόπηκαν και στη συνέχεια στάλθηκαν στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ», όπου πραγματοποιήθηκε η τεχνική πέψης πρωτεϊνικού δείγματος εντός τεμαχίων πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου (In-gel Digestion Method), ώστε να προετοιμαστούν τα πρωτεϊνικά δείγματα για τη φασματογραφία μαζών. Η τεχνική πέψης εντός τεμαχίων πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου περιλαμβάνει την επιλογή και αποκοπή τμημάτων από πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου από μονοδιάστατη ή δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση, αποχρωματισμό των τμημάτων του πηκτώματος, την αναγωγή και αλκυλίωση των πρωτεϊνών (για να αποτραπεί ο επανασχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των αμινοξέων κυστεΐνης), την πρωτεολυτική πέψη των πρωτεϊνών και τέλος την απόσταξη των πεπτιδίων (Shevchenko *et al.*, 1996).

Όσον αφορά στην πρωτεολυτική πέψη των πρωτεϊνών, σκοπός της είναι η υδρολυτική διάσπαση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας σε μικρά πεπτίδια για περαιτέρω ανάλυση με φασματογραφία μαζών μέσω κάποιας πρωτεάσης. Μια πρωτεάση που χρησιμοποιείται εκτενέστατα για το λόγο αυτό είναι η τρυψίνη. Η τρυψίνη, που συγκεκριμένα αποτελεί μια πρωτεάση σερίνης (φέρει ένα αμινοξύ σερίνης στο ενεργό κέντρο της, το οποίο είναι υπεύθυνο για την επαφή ενζύμου-υποστρώματος), υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς στην καρβοξυτελική πλευρά των αμινοξέων λυσίνη και αργινίνη, εκτός από την περίπτωση που αυτά τα αμινοξέα ακολουθούνται από το αμινοξύ προλίνη. Υπάρχει όμως και η δυνατότητα χρήσης και περισσότερων της μιας πρωτεασών, ανάλογα με το δείγμα και τα αποτελέσματα που επιζητούνται.

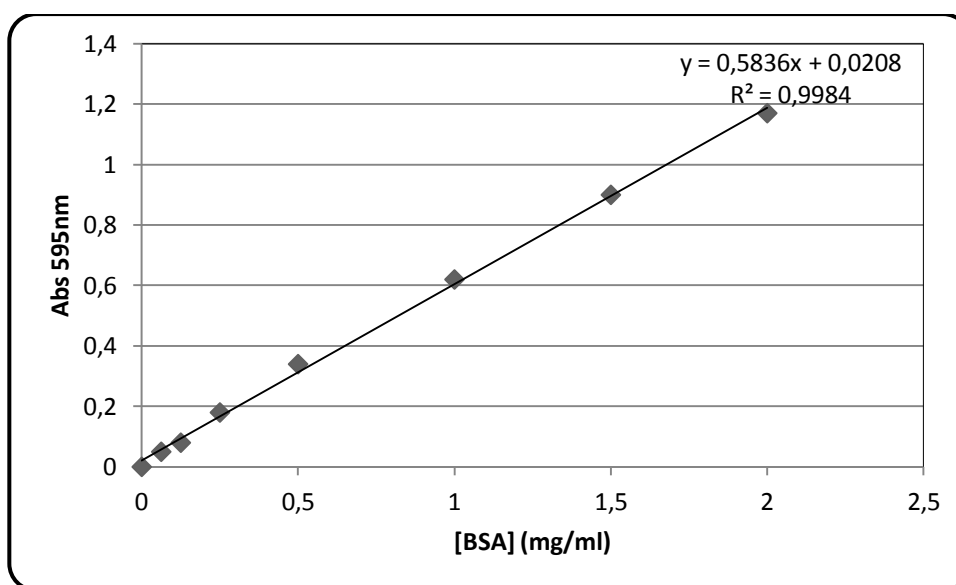
Η προετοιμασία και η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με LC/MS/MS [υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματογραφία μαζών από δύο διαδοχικούς αναλυτές μάζας (tandem MS ή MS/MS ή MSⁿ)] από το Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ».

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Πρότυπη καμπύλη με BSA (bovine serum albumin)

Πραγματοποιήθηκε παρασκευή stock διαλύματος πρωτεΐνης BSA 2mg/ml. Από αυτό φτιάχτηκαν διαλύματα συγκέντρωσης από 0 μέχρι 2,00mg/ml και έγινε επώαση των διαλυμάτων με το αντιδραστήριο Bradford για τουλάχιστον 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Η πρότυπη καμπύλη έγινε μετρώντας τις απορροφήσεις των διαλυμάτων στα 595nm με τη βοήθεια του φωτόμετρου. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 11**, προκύπτει μια γραμμική σχέση με εξίσωση:

$$A = 0,5836 \times C(\text{mg/ml}) + 0,0208$$

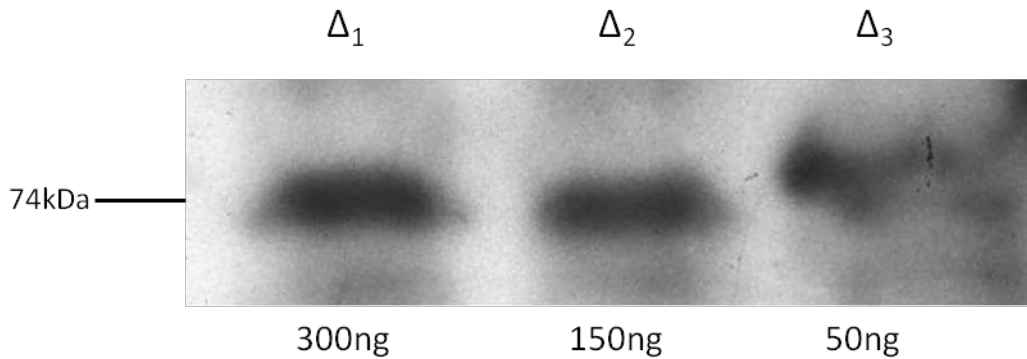


Εικόνα 11: Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης BSA με τη μέθοδο Bradford

Με την συγκεκριμένη εξίσωση υπολογίζεται η ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών στα δείγματα όπου αυτό είναι απαραίτητο.

3.2 Επιβεβαίωση της ύπαρξης της πρωτεΐνης PARN στα NCI-H520 κύτταρα με western blot

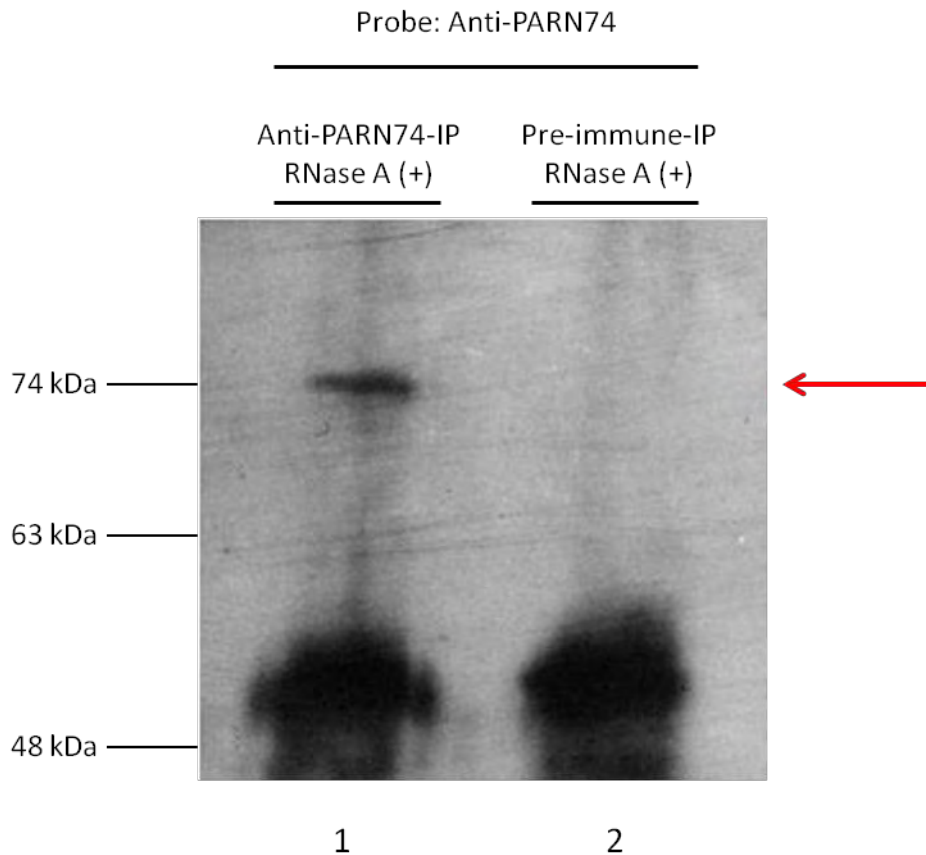
Αρχικά, έγινε συλλογή των κυττάρων NCI-H520 από μια φλάσκα 75cm² (~ 6 x 10⁶ κύτταρα, η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της πλάκας Neubauer) και ακολούθησε εξαγωγή των πρωτεϊνών (protein extraction) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6. Με τη μέθοδο Bradford υπολογίστηκε ότι στα 52μl του τελικού διαλύματος των πρωτεϊνών περιέχονται 540μg πρωτεΐνης και ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των εξής δειγμάτων: Δ₁→50μg, Δ₂→150μg, Δ₃→300μg. Το αναμενόμενο μοριακό βάρος της PARN είναι περίπου τα 74 kDa. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος western blot και οι ζώνες της PARN ανιχνεύθηκαν με το αντίσωμα anti-PARN74, όπως φαίνεται και στην **εικόνα 12**.



Εικόνα 12: Western blot σε δείγματα διαφορετικών συγκεντρώσεων από ολικό εκχύλισμα NCI-H520 κυττάρων. Φαίνονται οι ζώνες της PARN στα 74kDa.

3.3 Επιβεβαίωση της ύπαρξης της πρωτεΐνης PARN στο ολικό εκχύλισμα των κυττάρων NCI-H520 μετά από ανοσοκατακρήμνιση με το ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα anti-PARN74 με western blot

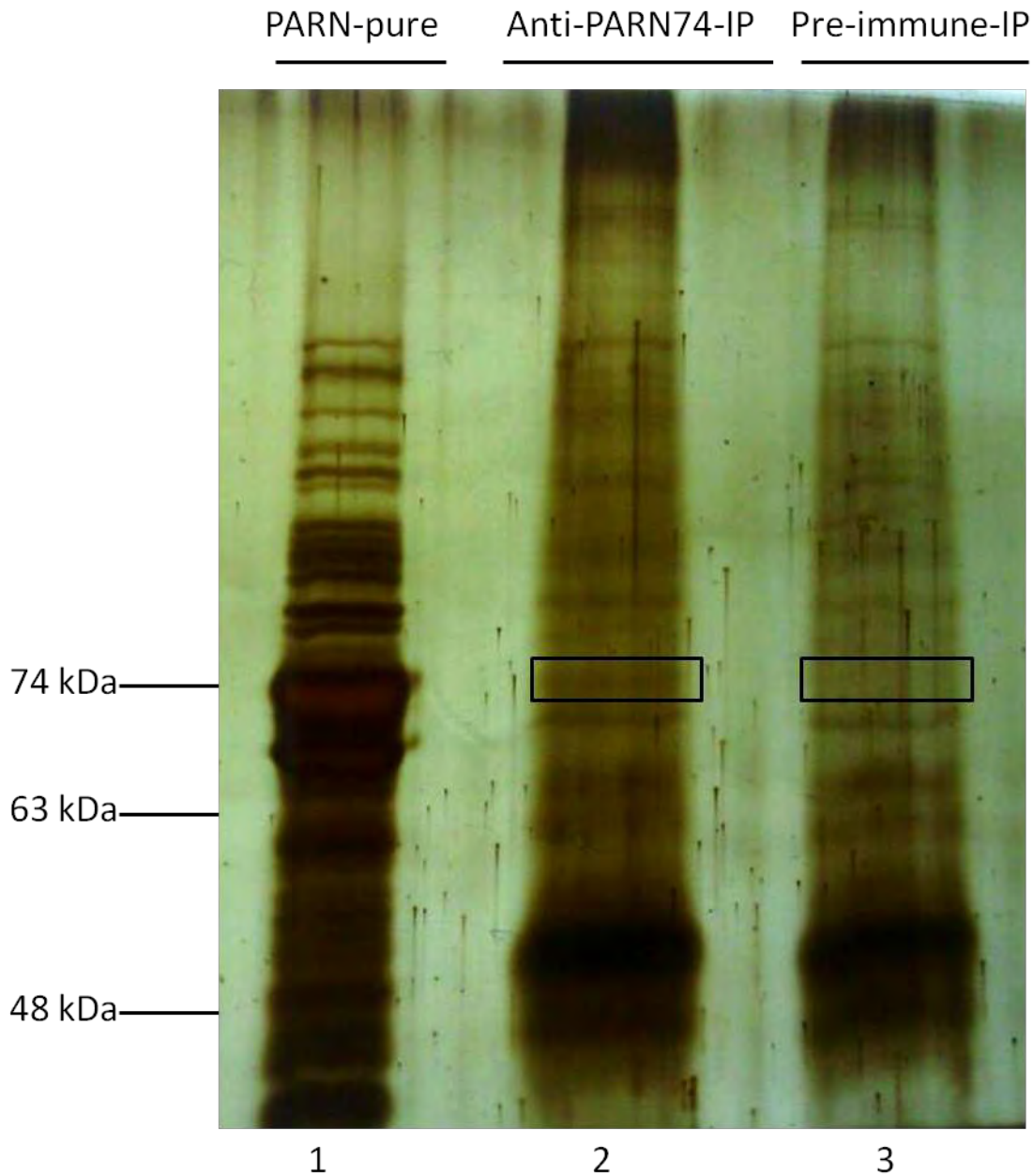
Αρχικά, έγινε συλλογή των κυττάρων NCI-H520 από 2 φλάσκες 75cm² (~6 x 10⁶ κύτταρα για το κάθε δείγμα-1 φλάσκα) και ακολούθησε η λύση και η συλλογή του ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος (whole cell extract, wce). Το wce διαχωρίστηκε σε δύο eppendorf των 1.5ml, ένα για την ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης PARN με το αντίσωμα anti-PARN74 και ένα για το αρνητικό control (pre-immune). Κατά τη διάρκεια της πρώτης πλύσης με το buffer IP150 προστέθηκε διάλυμα RNase A. Μετά το πέρας της ανοσοκατακρήμνισης έγινε επαναδιάλυση του ιζήματος σε 40μl από το buffer IP150 και μετά την προσθήκη του loading buffer 4x ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των δύο δειγμάτων και η ανίχνευση της πρωτεΐνης PARN με τη μέθοδο western blot όπως φαίνεται στην **εικόνα 13**. Σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford η ποσότητα της πρωτεΐνης [για 6 φλάσκες 75cm² (3 για το κάθε δείγμα)] που περιέχεται στα 10μl που ηλεκτροφορούνται, είναι περίπου 1-1.5μg για το κάθε δείγμα. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της πρωτεΐνης PARN ήταν το anti-PARN74.



Εικόνα 13: Western blot στο δείγμα Anti-PARN74-R(+) και Pre-immune-R(+) μετά από ανοσοκατακρήμιση με το αντίσωμα anti-PARN74. Η ζώνη της PARN επισημαίνεται με κόκκινο βέλος.

3.4 Εφαρμογή της χρώσης του νιτρικού αργύρου (AgNO_3) στην πηκτή για την οπτικοποίηση των πρωτεϊνών που κατακρημνίζονται μαζί με την PARN

Πραγματοποιήθηκε συλλογή των κυττάρων NCI-H520 από 6 φλάσκες 75cm^2 ($\sim 18 \times 10^6$ κύτταρα για το κάθε δείγμα-3 φλάσκες) και ακολούθησε η ίδια διαδικασία όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.3 μέχρι το στάδιο της ηλεκτροφόρησης, όπου προστέθηκε και ένα stock δείγμα παλαιότερου έτους της πρωτεΐνης PARN μετά από τον καθαρισμό της. Στη συνέχεια έγινε χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο και τα αποτελέσματα φαίνονται στην **εικόνα 14**, όπου στο ύψος των 74kDa για το δείγμα anti-PARN74-IP εμφανίζεται μια ζώνη, ενώ στο δείγμα pre-immune-IP, όχι.



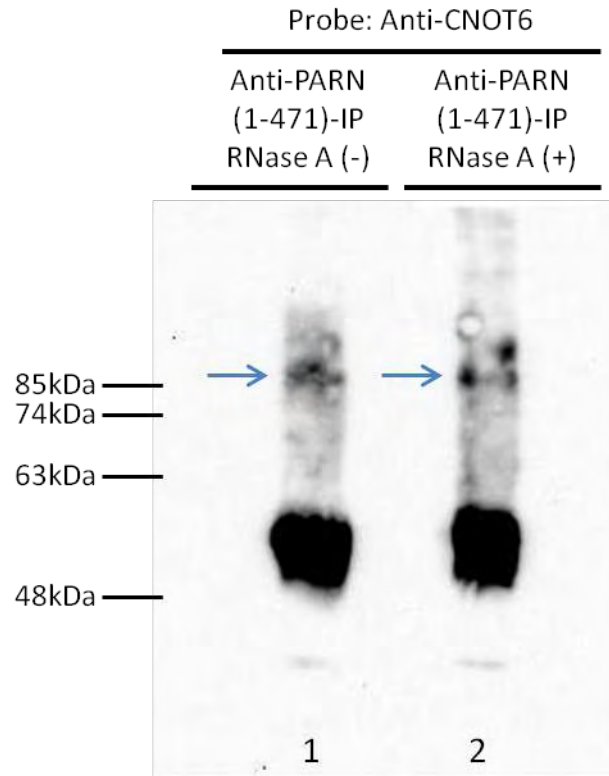
Εικόνα 11: Silver stain για τα δείγματα Anti-PARN74-R(+) και Pre-immune-R(+) μετά από ανοσοκατακρήμνιση. Απεικονίζεται και ένα δείγμα της PARN μετά από τον καθαρισμό της. Η ζώνη των 74kDa επισημαίνεται με μαύρο πλαίσιο.

3.5 Μελέτη πιθανής αλληλεπίδρασης της PARN(1-471) με τη CNOT6(CCR4a)

Έχει βρεθεί πως στα κύτταρα των θηλαστικών η PAN2 αρχικά αφαιρεί τη μισή περίπου πολυ(A) ουρά και έπειτα μέλη των οικογενειών POP2 και CCR4 αποικοδομούν την υπόλοιπη. Η μελέτη έδειξε πως η επεξεργασία λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα (Yamashita et al., 2005). Θέλοντας να μελετηθεί η πιθανή αλληλεπίδραση της PARN με τη CNOT6 (CCR4a) χρησιμοποιήθηκε η κυτταροπλασματική μορφή της PARN, η PARN(1-471).

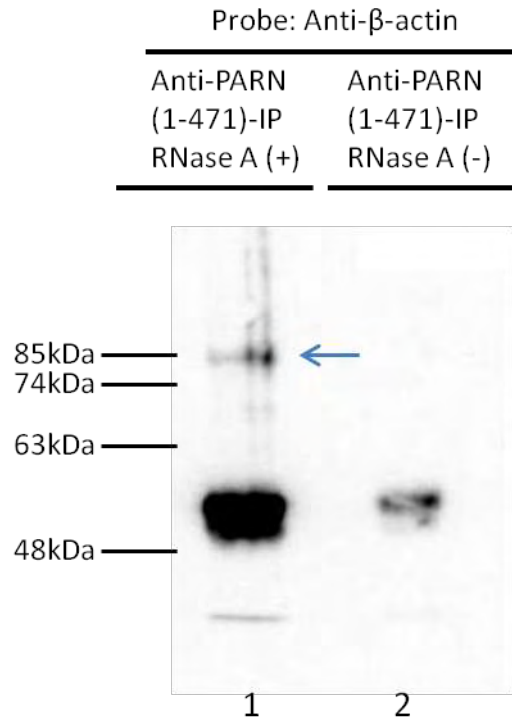
Σε πρώτο στάδιο συλλέχθηκαν κύτταρα NCI-H520 από 2 φλάσκες 75cm² (~6 × 10⁶ κύτταρα για το κάθε δείγμα-1 φλάσκα) και ακολούθησε η λύση και η συλλογή του ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος (whole cell extract, wce). Το wce διαχωρίστηκε σε δύο eppendorf των 1.5ml, ένα για την ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης PARN(1-471) με το αντίσωμα anti-PARN(1-471) και την προσθήκη του διαλύματος της RNase A κατά τη διάρκεια της πρώτης πλύσης με το buffer

IP150 και ένα για την ανοσοκατακρήμιση της πρωτεΐνης PARN(1-471) με το αντίσωμα anti-PARN(1-471), χωρίς όμως την προσθήκη του διαλύματος της RNase A. Μετά το πέρας της ανοσοκατακρήμισης έγινε επαναδιάλυση του ιζήματος σε 40μl από το buffer IP150 και μετά την προσθήκη του loading buffer 4x ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των δύο δειγμάτων και η προσθήκη του αντισώματος anti-CNOT6 για την πιθανή ανίχνευση της πρωτεΐνης CNOT6 με τη μέθοδο western blot, όπως φαίνεται στην **εικόνα 15**. Το αναμενόμενο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης CNOT6 είναι τα 63.307kDa, ωστόσο και για τα δύο δείγματα παρατηρήθηκε μια ζώνη των ~85kDa.



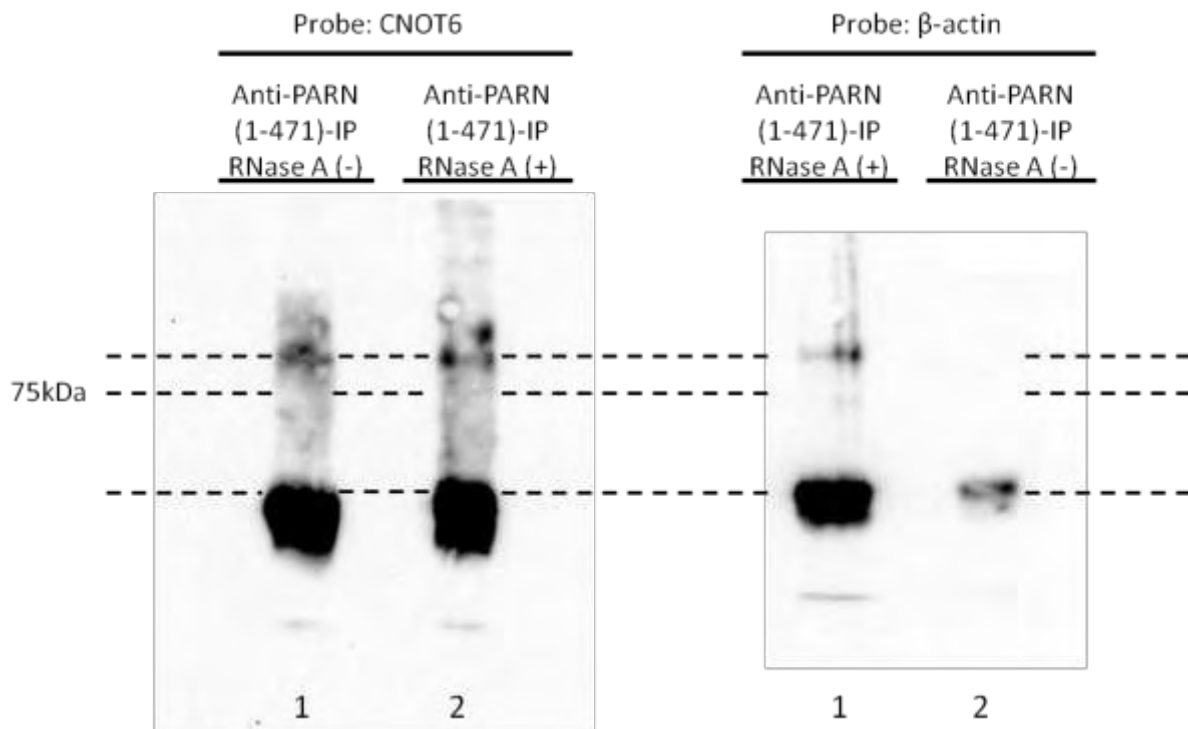
Εικόνα 12: Western blot στα δείγματα Anti-PARN(1-471)-R(-) και Anti-PARN(1-471)-R(+) μετά από ανοσοκατακρήμιση με το αντίσωμα anti-CNOT6. Τα μπλε βέλη δείχνουν τη ζώνη των ~85kDa.

Στη συνέχεια, για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη ζώνη των ~85kDa που φαίνεται στην **εικόνα 15** πραγματοποιήθηκε εκ νέου ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων anti-PARN(1-471)-IP RNase A (-) και anti-PARN(1-471)-IP RNase A (+) και επώαση της μεμβράνης με το αντίσωμα της β-actin, όπως φαίνεται στην **εικόνα 16**, όπου έχουμε και πάλι εμφάνιση της ζώνης των ~85kDa.



Εικόνα 13: Western blot στα δείγματα Anti-PARN(1-471)-R(-) και Anti-PARN(1-471)-R(+) μετά από ανοσοκατακρήμνιση με το αντίσωμα anti- β -actin. Το μπλε βέλος δείχνει τη ζώνη των ~85kDa.

Στην **εικόνα 17** παρουσιάζονται σε σύγκριση οι **εικόνες 15** και **16** για την αξιολόγηση του σημείου εμφάνισης της ζώνης των ~85kDa, η οποία πράγματι εμφανίζεται ακριβώς στο ίδιο ύψος. Επομένως, η ζώνη των ~85kDa είναι μη ειδική και δεν σχετίζεται με την πρωτεΐνη CNOT6, αφού εμφανίζεται ακόμη και με το αντίσωμα της β -actin.

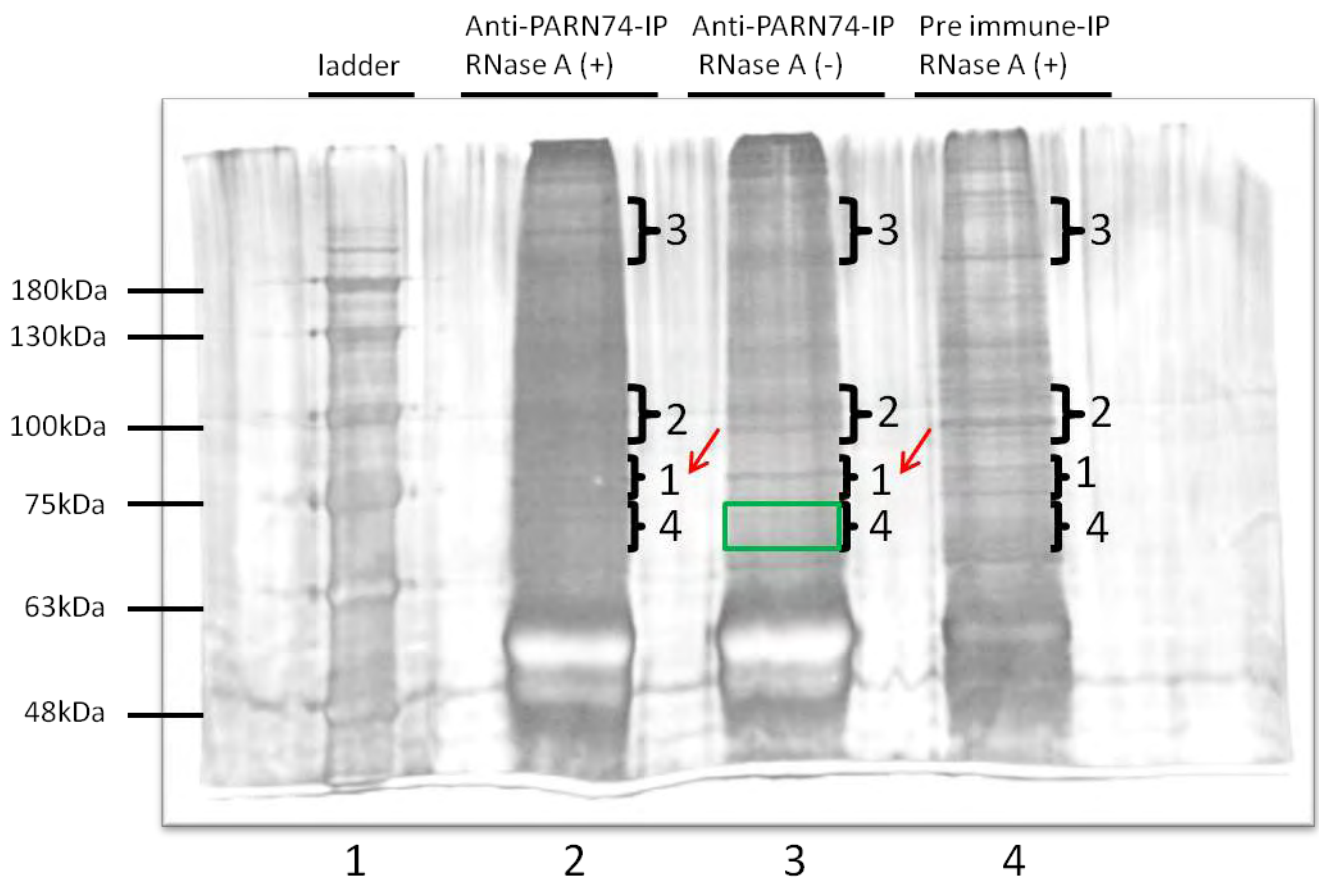


Εικόνα 14: Σύγκριση των εικόνων 15 και 16 για την αξιολόγηση του σημείου εμφάνισης της ζώνης των ~85kDa

3.6 Φασματογραφία μαζών (mass spectrometry)

- Προετοιμασία των δειγμάτων για φασματογραφία μαζών

Χρησιμοποιήθηκαν 15 φλάσκες 75cm² (~3 x 10⁷ κύτταρα για το κάθε δείγμα-5 φλάσκες). Αμέσως μετά τη διαδικασία της ανοσοκατακρήμισης και αφού έγινε η επαναδιάλυση των δειγμάτων στο buffer IP150 και η προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας loading buffer 4x, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης έγινε χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο (silver staining) και οι ζώνες 'κόπηκαν' και τοποθετήθηκαν σε eppendorfs για να σταλούν προς ανάλυση φασματογραφίας μαζών¹. Η χρώση με το νιτρικό άργυρο και οι ζώνες 1-4 που αφαιρέθηκαν φαίνονται στην **εικόνα 18**.



Εικόνα 15: Silver stain στα δείγματα Anti-PARN74-R(+), Anti-PARN74-R(-) και Pre-immune-R(+). Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν τις ζώνες που κόπηκαν και αναλύθηκαν με φασματογραφία μαζών. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν τη ζώνη που εντοπίστηκε η PARN και το πράσινο πλαίσιο τη ζώνη που εντοπίστηκε ο CPSF6.

¹ Αρχικά τα δείγματα στάλθηκαν με το buffer IP150 και έπειτα με το loading buffer 4x, αλλά και στις δύο περιπτώσεις τα αποτελέσματα της φασματογραφίας μαζών δεν ήταν τα επιθυμητά αφού δεν είχαμε την ανίχνευση της πρωτεΐνης PARN. Έτσι, σε τρίτη φάση επιλέχθηκε η χρώση με το νιτρικό άργυρο (silver staining) που τελικά οδήγησε στην απόκτηση των επιθυμητών αποτελεσμάτων.

- Αποτελέσματα από την φασματογραφία μαζών

Ζώνη 1:

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση για τα δείγματα Anti-PARN74-IP RNase A (+) και Anti-PARN74-IP RNase A (-) της ζώνης 1 φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακα 4), όπου και στα δύο δείγματα εντοπίζεται η υπό μελέτη πρωτεΐνη της παρούσας εργασίας, η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN, με το αντίσωμα της οποίας πραγματοποιήθηκε η ανοσοκατακρήμνιση. Στους πίνακες που ακολουθούν, δεν συμπεριλήφθηκαν οι πρωτεΐνες keratin, protein S100-A7, Fillagrin, Dermcidin, Lysozyme C, Trypsin και Hornerin, διότι θεωρήθηκαν ως μη ειδικές για το αποτέλεσμα, λόγω επιμόλυνσης ή μη ειδικής σύνδεσης με τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκατακρήμνιση. Η αναλυτική παράθεση της σύστασης των πρωτεϊνών των δειγμάτων που αναλύθηκαν σε κάθε ζώνη, παρατίθενται στο παράρτημα στο τέλος της εργασίας.

Πίνακας 4: Σύσταση πρωτεϊνών των δειγμάτων Anti-PARN74-IP RNaseA(+) και Anti-PARN74-IP RNaseA(-)(ζώνη 1)

Ζώνη 1				
Anti-PARN74-IP RNase A (-)			Anti-PARN74-IP RNase A (+)	
	Protein Name	Accession number	Protein Name	Accession number
1	Poly(A)-specific ribonuclease PARN	O95453-2	Poly(A)-specific ribonuclease PARN	O95453-2
2	Actin-like protein 7A	Q9Y615	Actin-like protein 7A	Q9Y615
3	Actin-related protein 8	HDY849	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5	E7EWE1
4	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform	P42336	Neurobeachin	Q5T321
5	Annexin A6	PO8133-2	Transcription factor 20	I3L1M7
6	ATP-binding cassette sub-family D member 2	Q9UBJ2	Like-glycosyltransferase	B0QY11
7			Cellular retinoic acid-binding protein 1	B5MCB5

Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν και στα δύο δείγματα: Anti-PARN74-IP RNase A (+) και Anti-PARN74-IP RNase A (-) της ζώνης 1.

Ζώνη 2:

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακα 5), όπου για το δείγμα Anti-PARN74-IP RNase A (-) εντοπίζεται η πρωτεΐνη Heat shock protein HSP 90-beta και για το δείγμα -PARN74-IP RNase A (+) εντοπίζεται η πρωτεΐνη Heat shock protein HSP 90-alpha, ενώ στο αρνητικό control Pre-immune-IP RNase A (+) εντοπίζεται η πρωτεΐνη Heat shock cognate 71 kDa protein.

Πίνακας 5: Σύσταση πρωτεϊνών των δειγμάτων Anti-PARN74-IP RNase A (+), Anti-PARN74-IP RNase A (-) και Pre-immune-IP RNase A (+) (ζώνη 2)

Ζώνη 2						
	Anti-PARN74-IP RNase A (-)		Anti-PARN74-IP RNase A (+)		Pre-immune-IP RNase A (+)	
	Protein Name	Accession number	Protein Name	Accession number	Protein Name	Accession number
1	Heat shock protein HSP 90-beta	P08238	Heat shock protein HSP 90-alpha	P07900	Heat shock cognate 71 kDa protein	E9PI65
2	Actin-like protein 7A	Q9Y615			Actin-like protein 7A	Q9Y615
3	Albumin, isoform CRA_k	C9JKR2	Calnexin	B4E2T8	Retinoblastoma-binding protein 5	Q15291-2
4	Ubiquitin	J3QSA3			Ubiquitin	J3QSA3
5	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P55072		
6	Uncharacterized protein C9orf117	Q5JU67-2	Putative zinc-alpha-2-glycoprotein-like 1	A8MT79	Serine/threonine-protein kinase SIK3	H7C3X8
7	Histidine-rich glycoprotein	PO4196	Corneodesmosin	G8JLG2	Suprabasin	Q6UWP8
8	Transcription factor jun-B	P17275			Retinoic acid receptor RXR-gamma	P48443
9	Structural maintenance of chromosomes protein 6	Q96SB8				
10	ATP-binding cassette sub-family D member 2	Q9UBJ2				
11	Zinc finger and SCAN domain-containing	Q6NSZ9-3				

	protein 25						
12	AH receptor-interacting protein	O00170					

Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι κοινές πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν στα δείγματα: Anti-PARN74-IP RNase A (+), Anti-PARN74-IP RNase A (-) και Pre-immune-IP RNase A (+) της ζώνης 2.

Ζώνη 3:

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση για τα δείγματα Anti-PARN74-IP RNase A (+), Anti-PARN74-IP RNase A (-) και Pre-immune-IP RNase A (+) της ζώνης 3 φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακα 6).

Πίνακας 6: Σύσταση πρωτεϊνών των δειγμάτων Anti-PARN74-IP RNase A (+), Anti-PARN74-IP RNase A (-) και Pre-immune-IP RNase A (+) (ζώνη 3)

Ζώνη 3						
	Anti-PARN74-IP RNase A (-)		Anti-PARN74-IP RNase A (+)		Pre-immune-IP RNase A (+)	
	Protein Name	Accession number	Protein Name	Accession number	Protein Name	Accession number
1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5	E7EWE1	Nuclear pore membrane glycoprotein 210	Q8TEM1	ATP-binding cassette sub-family D member 2	Q9UBJ2
2	Rotatin	J3KT00	Ephrin type-B receptor 2	B1AKC9	Potassium voltage-gated channel subfamily C member 4	Q03721-2
3	Serine/threonine-protein kinase SIK3	H7C3X8	Dystonin	Q03001-9	Homeobox protein SIX5	H0YLK1
4	Albumin, isoform CRA_k	C9JKR2	Albumin, isoform CRA_k	C9JKR2	Albumin, isoform CRA_k	C9JKR2
5	Actin-like protein 7A	Q9Y615	Actin-like protein 7A	Q9Y615	Actin-like protein 7A	Q9Y615
6	Ubiquitin	J3QSA3			Ubiquitin	J3QSA3
7	Acidic repeat-containing protein	Q96QF7	Centromere protein F	P49454	Junction plakoglobin	P14923
8	DNA replication licensing factor MCM6	Q14566	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit beta	O00459	Polycystic kidney disease protein 1-like 3	Q7Z443

9	Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 6	Q96DC7				Cystatin-A	C9J0E4
10	Target of Nesh-SH3	H7C524				Host cell factor 2	Q9Y5Z7
11	Zinc finger protein 721	B4E159				Helicase with zinc finger domain 2	Q9BYK8-2
12						Mitochondrial Rho GTPase 1	J3QLG2

Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι κοινές πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν στα δείγματα: Anti-PARN74-IP RNase A (+), Anti-PARN74-IP RNase A (-) και Pre-immune-IP RNase A (+) της ζώνης 3.

Ζώνη 4:

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση για τα δείγματα Anti-PARN74-IP RNase A (+), Anti-PARN74-IP RNase A (-) και Pre-immune-IP RNase A (+) της ζώνης 4 φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακα 7). Στο δείγμα Anti-PARN74-IP RNase A (-) με μπλε χρώμα παρατηρείται ο παράγοντας CPSF6/CF I_m68 (Cleavage and polyadenylation-specificity factor subunit 6) που συμμετέχει στο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο της επεξεργασίας του 3' άκρου, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 1.2.2.

Πίνακας 7: Σύσταση πρωτεϊνών των δειγμάτων Anti-PARN74-IP RNase A (+), Anti-PARN74-IP RNase A (-) και Pre-immune-IP RNase A (+) (ζώνη 4)

Ζώνη 4						
	Anti-PARN74-IP RNase A (-)		Anti-PARN74-IP RNase A (+)		Pre-immune-IP RNase A (+)	
	Protein Name	Accession number	Protein Name	Accession number	Protein Name	Accession number
1			Desmoglein-1	Q02413	Desmoglein-1	Q02413
2	Isoform 2 of Heat shock cognate 71 kDa protein	P11142-2	Suprabasin	Q6UWP8	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809
3			Desmoplakin	P15924-2	Desmoplakin	P15924-2
4			Corneodesmosin	G8JLG2	Corneodesmosin	G8JLG2
5			Lactotransferrin	P02788-2	Lactotransferrin	P02788-2
6			Albumin, isoform	C9JKR2	Albumin, isoform	C9JKR2

			CRA_k		CRA_k	
7			Prolactin-inducible protein	P12273	Prolactin-inducible protein	P12273
8			Ig kappa chain C region	P01834	Ig kappa chain C region	P01834
9			Caspase-14	P31944	Caspase-14	P31944
10	Actin-like protein 7A	Q9Y615	Actin-like protein 7A	Q9Y615	Actin-like protein 7A	Q9Y615
11			Actin, cytoplasmic 1	P60709	Actin, cytoplasmic 1	P60709
12	Cystatin-A	C9J0E4	Cystatin-A	P01040	Cystatin-A	P01040
13	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3	Q5TH69	Junction plakoglobin	P14923	Pyruvate kinase PKM	P14618
14			Ubiquitin	J3QSA3	Ubiquitin	J3QSA3
15			Statherin	P02808	Statherin	P02808
16	Cleavage and polyadenylation-specificity factor subunit 6	F8WJN3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	E7EUT5	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Q5T6W5
17	Uncharacterized protein	A6NML0	Catalase	P04040	Zinc-alpha-2-glycoprotein	P25311
18	EH domain-containing protein 3	Q9NZN3	Ig lambda-7 chain C region	A0M8Q6	Transketolase	B4E022
19			Lipocalin-1	P31025	Lipocalin-1	P31025
20	Albumin, isoform CRA_k	C9JKR2	Potassium voltage-gated channel subfamily C member 4	Q03721-2	Golgi reassembly-stacking protein 1	H7C0J2
21			Histone H4	P62805	Dihydropyrimidinase-related protein 3	Q14195
22			Zinc-alpha-2-glycoprotein	C9JEV0	RNA-binding protein FUS	P35637-2
23			Protein-glutamine gamma-	Q08188	Arf-GAP with GTPase,	E7ESL9

			glutamyltransferase E		ANK repeat and PH domain-containing protein 3	
24			Annexin A1	Q5T3N1	Cystatin-S	P01036
25			Titin	Q8WZ42-3	RING finger protein 37	A2A2Q6
26			Serpin B4	C9JZ65	Probable helicase senataxin	Q7Z333-3
27			Annexin A2	H0YLE2	Annexin A2	H0YLE2
28			Gamma-glutamylcyclotransferase	H7BZK5	Extracellular glycoprotein lacritin	Q9GZZ8
29			Interferon-induced GTP-binding protein Mx2	C9JS04	Interferon-induced GTP-binding protein Mx2	C9JS04
30			Galectin-7	P47929	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	B4DLW8
31					LVV-hemorphin-7	F8W6P5

Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι κοινές πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν στα δείγματα: Anti-PARN74-IP RNase A (+), Anti-PARN74-IP RNase A (-) και Pre-immune-IP RNase A (+) της ζώνης 4, ενώ με μπλε χρώμα απεικονίζεται ο CPSF6/CF I_m68, όπως αναφέρεται και στο κείμενο.

Σ Υ Ζ Η Τ Η Σ Η

Η πολυ(Α)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN, είναι από τις κυριότερες αποαδενυλάσες στα κύτταρα των θηλαστικών με ενεργή συμμετοχή στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης των πολυ(Α) ουρών των ευκαρυωτικών mRNAs με κατεύθυνση 3'→5' ρυθμίζοντας το χρόνο ημιζωής τους (Virtanen et al., 2013). Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια μελέτης των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της PARN στα κύτταρα NCI-H520 υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης. Η αποαδενυλάση PARN έχει βρεθεί πως αλληλεπιδρά, μεταξύ άλλων, με διάφορους παράγοντες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Τέτοιοι παράγοντες είναι το σύμπλοκο δέσμευσης στην καλύπτρα m⁷G, CBC (nuclear cap binding complex), και συγκεκριμένα η υπομονάδα CBC80 του συμπλόκου (Balatsos et al., 2006), ο κυτταροπλασματικός προσδεδεμένος στην καλύπτρα m⁷G ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης, eIF4E (Gao et al., 2000) και η πρωτεΐνη πρόσδεσης στην πολυ(Α) ουρά 1, PABPN1 (Virtanen et al., 2013). Επίσης η PARN έχει βρεθεί πως αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες που προσδένονται στα AREs, και συγκεκριμένα, τη KSRP, τη tristetrarprolin και τη RHAU, τη πρωτεΐνη πρόσδεσης σε περιοχές GREs (GU-rich elements) του RNA, τη CUGBP1 και τέλος με το σύμπλοκο CstF-50/BARD1 (Chou et al., 2006; Virtanen et al., 2013; Zhang et al., 2010). Η αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο CstF-50/BARD1 γίνεται σε συνθήκες απόκρισης λόγω της βλάβης του DNA (DNA damage response, DDR). Ο παράγοντας CstF-50 αποτελεί μέρος του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου της επεξεργασίας του 3' άκρου (Zhang et al., 2010; Mandel et al., 2008).

Αρχικά, αφού επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη της PARN στα κύτταρα NCI-H520 με τη μέθοδο western blot, έγινε προσπάθεια ανοσοκατακρήμνισης της PARN με το αντίσωμα Anti-PARN74 ώστε να απομονωθούν οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά. Η ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιήθηκε παρουσία και απουσία της RNase A, ώστε να αποκαλυφθούν οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα με τη μεσολάβηση ή μη του mRNA με το οποίο αλληλεπιδρά το ένζυμο (είτε άμεσα είτε έμμεσα) τη δεδομένη στιγμή. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η PARN εμφανίζεται στο δείγμα anti-PARN74-IP και όχι στο αρνητικό control, pre-immune-IP, στη ζώνη των 74kDa που είναι και την αναμενόμενη μοριακή μάζα στην οποία εμφανίζεται η πρωτεΐνη. Έπειτα, με σκοπό να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της ανοσοκατακρήμνισης της PARN, έγινε εκ νέου ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμιδίου και έπειτα πραγματοποιήθηκε η μέθοδος western blot. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια ευδιάκριτη ζώνη στα 74kDa στο δείγμα anti-PARN74-IP-RNase A (+), σε αντίθεση με το αρνητικό control, pre-immune-IP-RNase A (+), επιβεβαιώνοντας πως η PARN ανοσοκατακρήμνιστηκε επιτυχώς. Στη συνέχεια, τα δείγματα anti-PARN74-IP-RNase A (+), anti-PARN74-IP-RNase A (-) και pre-immune-IP-RNase A (+) αναλύθηκαν με φασματογραφία μαζών, με σκοπό να ταυτοποιηθούν οι πρωτεΐνες που εντοπίζονταν σε κάθε δείγμα, και επομένως οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά η PARN. Η ανάλυση με φασματογραφία μαζών εντόπισε πολλές πρωτεΐνες και επιβεβαίωσε την ύπαρξη της PARN. Μεταξύ αυτών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει ο παράγοντας CPSF6/CF I_m68, που όπως και ο πρωτεϊνικός παράγοντας CstF-50, αποτελεί μέλος του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου επεξεργασίας του 3' άκρου (Mandel et al., 2008). Από μελέτες φαίνεται πως εκτός από τον CPSF και τον CstF, ο CF I_m επίσης συμμετέχει στην επιλογή των περιοχών πολυαδενυλίωσης παίζοντας ενεργό ρόλο στην επεξεργασία του 3' άκρου του pre-mRNA (Kim et al., 2010). Για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν, δεν μπορούσε να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα, αφού δεν υπάρχει κάποια πειραματική πληροφορία που να συνδέει αυτές τις πρωτεΐνες με τη λειτουργία της PARN. Ο παράγοντας CPSF6/CF I_m68 εντοπίστηκε στο δείγμα anti-PARN74-IP-RNase A (-) και όχι στο δείγμα anti-PARN74-IP-RNase A (+) ή στο δείγμα pre-immune-PARN74-IP-RNase A (+). Δηλαδή εντοπίστηκε στο δείγμα που δεν προστέθηκε RNase A, και άρα υπάρχει η πιθανότητα οι δύο παράγοντες να αλληλεπιδρούν μέσω του mRNA πάνω στο οποίο ασκούν τη δράση τους.

Έχει βρεθεί πως στα κύτταρα των θηλαστικών η PAN2 αρχικά αφαιρεί τη μισή περίπου πολυ(A) ουρά και έπειτα μέλη των οικογενειών POP2 και CCR4 αποικοδομούν την υπόλοιπη. Δηλαδή, η μελέτη έδειξε πως η επεξεργασία πραγματοποιείται σε δύο στάδια και, επίσης, λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα (Yamashita et al., 2005). Έτσι, έγινε προσπάθεια μελέτης της πιθανής αλληλεπίδρασης της PARN(1-471) με την αποαδενυλάση CNOT6 (CCR4a), του συμπλόκου CCR4-NOT, αφού όπως αναφέρθηκε έχουν βρεθεί περιπτώσεις όπου οι αποαδενυλάσες συνεργάζονται πάνω στο ίδιο mRNA. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση της PARN(1-471) των 54kDa, που θεωρείται πως είναι η κυτταροπλασματική μορφή της PARN, ώστε να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο κυτταρόπλασμα. Μετά την ανοσοκατακρήμνιση, αφού έγινε διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση, πραγματοποιήθηκε western blot με το αντίσωμα Anti-CNOT6. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν κάποια αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών πρωτεϊνών.

Η παρούσα εργασία δίνει νέες προοπτικές στη μελέτη της ρύθμισης της PARN και κατ' επέκταση της αποικοδόμησης των ευκαρυωτικών mRNAs. Έτσι, είναι απαραίτητη η εξέταση της παρατήρησης πως ο παράγοντας CPSF6/CF I_m68 κατακρημνίζεται από την PARN. Συγκεκριμένα, είναι απαραίτητη η ανοσοκατακρήμνιση της PARN74 και έπειτα η ανίχνευση του παράγοντα CPSF6/CF I_m68 μέσω του αντισώματός του και αντίστροφα, ώστε να ειπωθεί με βεβαιότητα πως αυτές οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν. Οι απαντήσεις σε αυτά τα ερωτήματα θα διευρύνουν το φάσμα της γνώσης σχετικά με τη ρύθμιση και τη λειτουργία της PARN μέσα στο κύτταρο.

Β Ι Β Λ Ι Ο Γ Ρ Α Φ Ι Α

- Aebersold, R., & Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), 198-207.
- Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter, 2^η έκδοση (2006). Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας.
- Balatsos, N. A., Nilsson, P., Mazza, C., Cusack, S., & Virtanen, A. (2006). Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC). *Journal of Biological Chemistry*, 281(7), 4517-4522.
- Berndt, H., Harnisch, C., Rammelt, C., Stöhr, N., Zirkel, A., Dohm, J. C., ... & Wahle, E. (2012). Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA*, 18(5), 958-972.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Chou, C. F., Mulky, A., Maitra, S., Lin, W. J., Gherzi, R., Kappes, J., & Chen, C. Y. (2006). Tethering KSRP, a decay-promoting AU-rich element-binding protein, to mRNAs elicits mRNA decay. *Molecular and cellular biology*, 26(10), 3695-3706.
- Conti, E. & Izaurralde, E. (2005). Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 316–325.
- Denis, C. L., & Chen, J. (2003). The CCR4–NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 73, 221-250.
- Gao, M., Fritz, D. T., Ford, L. P., & Wilusz, J. (2000). Interaction between a poly (A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro. *Molecular cell*, 5(3), 479-488.
- Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 113–26.
- Goldstrohm AC, Wickens M. (2008). Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 337–44.
- Houseley, J., & Tollervey, D. (2009). The many pathways of RNA degradation. *Cell*, 136(4), 763-776.
- Kaufmann I., Martin G., Friedlein A., Langen H., and Keller W. (2004). Human Fip1 is a subunit of CPSF that binds to U-rich RNA elements and stimulates poly(A) polymerase. *EMBO J.* 23, 616–626.
- Kim S, Yamamoto J, Chen Y, Aida M, Wada T, Handa H, Yamaguchi Y. (2010). Evidence that cleavage factor Im is a heterotetrameric protein complex controlling alternative polyadenylation. *Genes Cells* 15, 1003–1013.

Körner, C.G. & Wahle, E. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J. Biol. Chem.* 272, 10448–10456 (1997).

Körner M Wormington, M Muckenthaler, S Schneider, E Dehlin, and E Wahle. (1998). The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 17, 5427-5437.

Lewin, GENES VIII

Lin, W. J., Duffy, A., & Chen, C. Y. (2007). Localization of AU-rich element-containing mRNA in cytoplasmic granules containing exosome subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 282(27), 19958-19968.

Linda McKendrick, Elizabeth Thompson, Joao Ferreira, Simon J. Morley and Joe D. Lewis. (2001). Interaction of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G with the Nuclear Cap-Binding Complex Provides a Link between Nuclear and Cytoplasmic Functions of the m7Guanosine Cap *Mol. Cell Biol.* p. 3632–3641

Mandel, C. R., Kaneko, S., Zhang, H., Gebauer, D., Vethantham, V., Manley, J. L., & Tong, L. (2006). Polyadenylation factor CPSF-73 is the pre-mRNA 3'-end-processing endonuclease. *Nature*, 444(7121), 953-956.

Mandel, C. R., Bai, Y., & Tong, L. (2008). Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(7-8), 1099-1122.

Martin, G., Gruber, A. R., Keller, W., & Zavolan, M. (2012). Genome-wide analysis of pre-mRNA 3' end processing reveals a decisive role of human cleavage factor I in the regulation of 3' UTR length. *Cell Reports*, 1(6), 753-763.

McDonald, W. H., & Yates 3rd, J. R. (2003). Shotgun proteomics: integrating technologies to answer biological questions. *Current opinion in molecular therapeutics*, 5(3), 302.

Meyer, S., Temme, C., & Wahle, E. (2004). Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 39(4), 197-216.

Parker, R., & Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature structural & molecular biology*, 11(2), 121-127.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry*, 68(5), 850-858.

Shi Y., Di Giammartino D.C., Taylor D., Sarkeshik A., Rice W.J., Yates J.R. 3rd, Frank J., and Manley J.L. (2009). Molecular architecture of the human pre-mRNA 3' processing complex. *Mol. Cell* 33, 365–376.

Virtanen, A., Henriksson, N., Nilsson, P., & Nissbeck, M. (2013). Poly (A)-specific ribonuclease (PARN): An allosterically regulated, processive and mRNA cap-interacting deadenylase. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 48(2), 192-209.

Wu, M., Reuter, M., Lilie, H., Liu, Y., Wahle, E., & Song, H. (2005). Structural insight into poly (A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *The EMBO journal*, 24(23), 4082-4093.

Wu, M., Nilsson, P., Henriksson, N., Niedzwiecka, A., Lim, M. K., Cheng, Z., & Song, H. (2009). Structural Basis of m⁷GpppG Binding to Poly (A)-Specific Ribonuclease. *Structure*, 17(2), 276-286.

Yamashita A, Chang TC, Yamashita Y, et al. (2005). Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1054–63.

Zhang, X., Virtanen, A., & Kleiman, F. E. (2010). To polyadenylate or to deadenylate: that is the question. *Cell Cycle*, 9(22), 4437-4449.

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-21/CB21.html>

<http://www.activemotif.com/catalog/25/nuclear-complex-co-ip-kit>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αποτελέσματα από τη φασματογραφία μαζών των δειγμάτων μετά από την ανοσοκατακρήμνιση. Οι ζώνες αναφέρονται στα τμήματα που κόπηκαν, όπως φαίνεται στην εικόνα 18. Με κόκκινο πλαίσιο επισημαίνεται η πολυ(Α)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN για τα δείγματα Anti-PARN74-IP RNase A (+) και Anti-PARN74-IP RNase A (-) της ζώνης 1 και ο παράγοντας CPSF6/CF I_m68 (Cleavage and polyadenylation-specificity factor subunit 6) για το δείγμα Anti-PARN74-IP RNase A (-) της ζώνης 4.

Ζώνη 1:

Anti-PARN74-IP RNase A (+)

Protein	Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]
1	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GI=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]	238.40	42.98%	5	19	26	66	584	58.8
2	P05908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GI=KRT2 PE=1 SV=2 - [K2E_HUMAN]	169.98	59.31%	25	24	28	47	639	65.4
3	P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GI=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]	160.69	32.45%	9	23	25	48	644	66.0
4	P05527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GI=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]	93.90	44.20%	2	13	16	24	623	62.0
5	P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GI=KRT14 PE=1 SV=4 - [K1C14_HUMAN]	27.47	14.19%	9	3	6	9	472	51.5
6	P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GI=KRT5 PE=1 SV=3 - [K2C5_HUMAN]	20.05	12.88%	21	4	8	8	590	62.3
7	O95453-2	Isoform 2 of Poly(A)-specific ribonuclease PARN OS=Homo sapiens GI=PARN - [PARN_HUMAN]	15.26	7.79%	6	5	5	5	578	66.5

AC	Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	ΔCh	ICorr	Charge	MW [Da]	ΔM [ppm]	RT [min]	# Missed Cleavage
1	IEDLLQSEENK	1	5	1	O95453-2		0.0000	3.70	2	1317.65264	-0.51	27.94	
2	RDVLAHYTFPK	1	4	1	O95453-2		0.0000	3.38	4	1348.74031	-0.13	25.33	
3	DHYLHYTFPK	1	4	1	O95453-2		0.0000	3.12	3	1192.64746	0.09	26.90	
4	DISIVNTSLAELEK	1	5	1	O95453-2		0.0000	2.71	2	1459.78518	0.86	32.74	
5	IQTYAEYNGR	1	4	1	O95453-2		0.0000	2.35	2	1231.57829	0.55	27.96	

Protein	Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]
8	P01605	Desmoplakin OS=Homo sapiens GI=DCD PE=1 SV=2 - [DCD_HUMAN]	6.64	12.73%	2	2	2	2	110	11.3
9	E7EHE1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5 OS=Homo sapiens GI=UBAS PE=2 SV=1 - [E7EHE_HUMAN]	4.63	5.48%	3	1	1	2	347	36.7
10	Q9P935	Actin-like protein 7A OS=Homo sapiens GI=ACTL7A PE=1 SV=1 - [ACTL7A_HUMAN]	2.60	4.60%	1	1	1	1	435	48.6
11	Q5T321	Neurobeachin OS=Homo sapiens GI=NBEA PE=4 SV=1 - [Q5T321_HUMAN]	2.57	0.54%	3	1	1	1	2943	327.3
12	I3L1M7	Transcription factor 20 (Fragment) OS=Homo sapiens GI=TCF20 PE=4 SV=1 - [I3L1M7_HUMAN]	2.42	16.99%	3	1	1	1	153	16.0
13	P08133-2	Isoform 2 of Annexin A6 OS=Homo sapiens GI=ANXA6 - [ANXA6_HUMAN]	2.41	2.81%	3	1	1	1	641	72.4
14	B0QY11	Glycosyltransferase-like protein LARGE1 (Fragment) OS=Homo sapiens GI=LARGE PE=4 SV=...	2.39	10.93%	3	1	1	1	183	21.5
15	B9AC26	Cellular retinoic acid-binding protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GI=CRABP1 PE=4 SV=2...	2.22	7.96%	2	1	1	1	113	12.3
16	P0VY32	Lysosome C OS=Homo sapiens GI=LYZ PE=2 SV=1 - [P0VY32_HUMAN]	2.21	11.54%	2	1	1	1	104	11.5

Anti-PARN74-IP RNase A (-)

Administration x 05061310-01.ms1 x												
Protein	Peptides	Search Input	Result Filters	Peptide Confidence	Search Summary							
	Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	
1	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KR...	303.17	83.32 %	6	22	27	86	504	58.8	5.21	
2	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapien...	260.15	61.19 %	22	25	31	73	639	65.4	8.00	
3	P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT...	245.66	50.11 %	9	22	28	79	644	66.0	8.12	
4	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT...	151.79	48.11 %	2	20	22	44	623	62.0	5.24	
5	P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT...	53.90	22.37 %	20	6	12	22	590	62.3	7.74	
6	P48668	Keratin, type II cytoskeletal 6C OS=Homo sapiens GN=KR...	51.74	20.74 %	17	4	10	19	564	60.0	8.00	
7	P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KR...	47.71	31.36 %	7	6	11	15	472	51.5	5.16	
8	P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KR...	28.94	20.93 %	4	2	8	11	473	51.2	5.05	
9	O95453-2	Isiform 2 of Poly(A)-specific ribonuclease PARN OS=Homo...	16.59	9.17 %	6	3	6	6	578	66.5	6.38	
A2	Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	ΔCn	XCorr	Charge	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	RT [min]
1	EDLLQSEEM	1	5	1	O95453-2		0.0000	3.47	2	1317.65349	0.14	28.06
2	EQELNIAVQPSR	1	4	1	O95453-2		0.0000	3.03	2	1493.68755	0.53	28.76
3	FIDQVKEKEDLLQSEEM	1	5	1	O95453-2		0.0000	2.85	3	2276.16886	1.37	41.90
4	RDHGLVITPPK	1	4	1	O95453-2		0.0000	2.64	4	1348.74056	0.06	25.60
5	DHGLVITPPK	1	4	1	O95453-2		0.0000	2.43	3	1192.64462	-0.45	26.89
6	IQTVKELKSR	1	4	1	O95453-2		0.0000	2.16	2	1231.57756	-0.05	28.04
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI		
10	P31151	Protein S100-A7 OS=Homo sapiens GN=S100A7 PE=1 SV...	7.51	19.89 %	1	2	2	2	101	11.5	6.77	
11	Q9Y615	Actin-like protein 7A OS=Homo sapiens GN=ACTL7A PE=...	5.66	4.60 %	1	1	1	2	435	48.6	7.09	
12	Q5D962	Flagginn-2 OS=Homo sapiens GN=FLG2 PE=2 SV=1 - [FL...	4.89	0.96 %	1	2	2	2	2391	247.9	6.31	
13	H0Y049	Actin-related protein 8 (fragments) OS=Homo sapiens GN...	4.61	3.97 %	3	1	1	2	378	42.5	6.71	
14	P42336	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic s...	3.18	2.81 %	1	1	1	1	1068	124.2	7.23	
15	P81605	Dermodin OS=Homo sapiens GN=DOD PE=1 SV=2 - [DC...	2.80	10.00 %	2	1	1	1	110	11.3	6.54	
16	P20930	Flagginn OS=Homo sapiens GN=FLG PE=1 SV=3 - [FLA...	2.72	0.30 %	1	1	1	1	4061	434.9	9.25	
17	P08133-2	Isiform 2 of Annexin A6 OS=Homo sapiens GN=ANXA6 ...	2.71	2.81 %	3	1	1	1	641	72.4	5.60	
18	P8Y632	Lyszyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=2 SV=1 - [PB...	2.48	11.54 %	2	1	1	1	104	11.5	9.07	
19	Q9UBJ2	ATP-binding cassette sub-family D member 2 OS=Homo s...	2.36	2.43 %	1	1	1	1	740	83.2	8.92	

Zώνη 2:

Anti-PARN74-IP RNase A (+)

Administration x 05061310-01.ms1 x												
Protein	Peptides	Search Input	Result Filters	Peptide Confidence	Search Summary							
	Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	
1	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KR...	274.03	42.98 %	5	17	24	77	584	58.8	5.21	
2	P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT...	198.14	50.47 %	13	18	26	63	644	66.0	8.12	
3	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapien...	184.43	52.27 %	8	16	24	51	639	65.4	8.00	
4	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT...	150.59	48.64 %	2	16	22	44	623	62.0	5.24	
5	P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KR...	50.95	33.47 %	12	7	13	17	472	51.5	5.16	
6	P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT...	38.86	21.19 %	5	3	11	17	590	62.3	7.74	
7	P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens GN=...	18.15	9.29 %	18	5	7	7	732	84.6	5.02	
A2	Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	ΔCn	XCorr	Charge	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	RT [min]
1	GYDSEDLPLNISR	1	11	1	P07900		0.0000	3.60	2	1513.78606	0.21	31.99
2	TLTIVDTGIGMTK	1	5	1	P07900		0.0000	2.76	2	1349.73442	-0.10	31.93
3	YIDQEELNK	1	6	1	P07900		0.0000	2.67	2	1151.55815	0.19	24.16
4	EDQTEYLEER	1	8	1	P07900		0.0000	2.57	2	1311.57073	0.58	25.99
5	RAPFDLFEHR	1	3	1	P07900		0.0000	2.38	2	1264.64348	0.09	31.35
6	APFDLFEHR	1	3	1	P07900		0.0000	2.14	2	1108.54338	1.03	33.34
7	ADLNLNLGTIAK	1	5	1	P07900		0.0000	2.03	2	1242.70549	0.16	31.47
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI		
8	P06702	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV...	7.35	13.16 %	1	1	1	2	114	13.2	6.13	
9	B4E2T8	Calhexin OS=Homo sapiens GN=CANX PE=2 SV=1 - [B4E...	5.91	7.23 %	4	1	2	2	484	55.6	4.70	
10	P81605	Dermodin OS=Homo sapiens GN=DOD PE=1 SV=2 - [DC...	5.26	12.73 %	2	1	2	2	110	11.3	6.54	
11	P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sap...	2.66	2.11 %	1	1	1	1	806	89.3	5.26	
A2	Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	ΔCn	XCorr	Charge	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	RT [min]
1	NAPAIIFIDELDAIPK	1	1	1	P55072		0.0000	2.66	2	1810.99626	0.68	41.22
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI		
12	G8LIG2	Corneodesmosin OS=Homo sapiens GN=CDSN PE=4 SV=...	2.64	3.40 %	3	1	1	1	529	51.6	8.44	
13	P31151	Protein S100-A7 OS=Homo sapiens GN=S100A7 PE=1 SV...	2.59	10.89 %	1	1	1	1	101	11.5	6.77	
14	Q9Y5Y7	Lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1 O...	2.37	5.28 %	1	1	1	1	322	35.2	8.28	
15	ARM179	Putative zinc-alpha-2-glycoprotein-like 1 OS=Homo sapien...	2.37	4.90 %	2	1	1	1	204	23.0	6.30	

Anti-PARN74-IP RNase A (-)

Administration x 05061311-01.ms1f x													
Proteins	Peptides	Search Input	Result Filters	Peptide Confidence	Search Summary								
		Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	
1		P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KR...	271.56	40.58 %	29	19	23	78	584	58.8	5.21	
2		P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapien...	181.58	50.08 %	7	16	22	52	639	65.4	8.00	
3		P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT...	159.29	36.34 %	13	18	23	51	644	66.0	8.12	
4		P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT...	141.71	47.51 %	2	16	22	40	623	62.0	5.24	
5		P04259	Keratin, type II cytoskeletal 68 OS=Homo sapiens GN=KR...	40.47	13.83 %	5	1	7	16	564	60.0	8.00	
6		P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT...	39.35	21.19 %	7	4	11	17	590	62.3	7.74	
7		P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KR...	36.17	33.05 %	20	5	11	12	472	51.5	5.16	
8		P08238	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=H...	15.05	9.67 %	13	1	6	6	724	83.2	5.03	
A2													
		Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	ΔCn	XCorr	Charge	MW [Da]	ΔM [ppm]	RT [min]
1		GWVSEDLPLNISR	1	11	2	P07900;P08238		0.0000	3.05	2	1513.78655	0.53	32.18
2		TLTYDTGIGMTK	1	5	2	P07900;P08238		0.0000	2.85	2	1349.73503	0.36	31.89
3		IDIPNPQER	1	2	1	P08238		0.0000	2.40	2	1194.64636	0.50	29.65
4		ADLNNLGTIAK	1	5	2	P07900;P08238		0.0000	2.34	2	1242.70549	0.16	31.51
5		ELISNASDALDK	1	1	1	P08238		0.0000	2.23	2	1275.64433	1.24	27.81
6		YIDQEELNK	1	6	2	P07900;P08238		0.0000	2.18	2	1151.55779	-0.13	24.20
A2													
		Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	ΔCn	XCorr	Charge	MW [Da]	ΔM [ppm]	RT [min]
1		INFOITNEEYGEFYK	1	3	1	P07900		0.0000	3.18	2	1833.78191	0.27	31.15
2		GWVSEDLPLNISR	1	11	2	P07900;P08238		0.0000	3.05	2	1513.78655	0.53	32.18
3		TLTYDTGIGMTK	1	5	2	P07900;P08238		0.0000	2.85	2	1349.73503	0.36	31.89
4		ADLNNLGTIAK	1	5	2	P07900;P08238		0.0000	2.34	2	1242.70549	0.16	31.51
5		YIDQEELNK	1	6	2	P07900;P08238		0.0000	2.18	2	1151.55779	-0.13	24.20
A2													
		Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	
9		P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens GN=...	13.59	8.61 %	14	1	5	5	732	84.6	5.02	
A2													
		Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	ΔCn	XCorr	Charge	MW [Da]	ΔM [ppm]	RT [min]
1		INFOITNEEYGEFYK	1	3	1	P07900		0.0000	3.18	2	1833.78191	0.27	31.15
2		GWVSEDLPLNISR	1	11	2	P07900;P08238		0.0000	3.05	2	1513.78655	0.53	32.18
3		TLTYDTGIGMTK	1	5	2	P07900;P08238		0.0000	2.85	2	1349.73503	0.36	31.89
4		ADLNNLGTIAK	1	5	2	P07900;P08238		0.0000	2.34	2	1242.70549	0.16	31.51
5		YIDQEELNK	1	6	2	P07900;P08238		0.0000	2.18	2	1151.55779	-0.13	24.20
A2													
		Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	
10		Q9Y615	Actin-like protein 7A OS=Homo sapiens GN=ACTL7A PE=...	5.38	4.60 %	1	1	1	2	435	48.6	7.09	
11		P06702	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=...	4.16	13.16 %	1	1	1	1	114	13.2	6.13	
12		C9JKR2	Albumin, isoform CRA_k OS=Homo sapiens GN=ALB PE=...	3.74	2.88 %	6	1	1	1	417	47.3	6.35	
13		J3QSA3	Ubiquitin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=UBB PE=4 S...	3.09	37.21 %	24	1	1	1	43	4.9	5.19	
14		P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sap...	2.94	2.11 %	1	1	1	1	806	89.3	5.26	
15		P81605	Dermodin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 - [DC...	2.90	10.00 %	2	1	1	1	110	11.3	6.54	
16		Q5JU67-2	Isoform 2 of Uncharacterized protein C9orf117 OS=Homo...	2.90	4.71 %	2	1	1	1	425	49.8	9.07	
17		P04196	Histidine-rich glycoprotein OS=Homo sapiens GN=HRG PE...	2.88	1.71 %	1	1	1	1	525	59.5	7.50	
18		P17275	Transcription factor jun-B OS=Homo sapiens GN=JUNB P...	2.73	6.34 %	1	1	1	1	347	35.9	9.22	
19		Q965B8	Structural maintenance of chromosomes protein 6 OS=Ho...	2.71	2.66 %	2	1	1	1	1091	126.2	6.99	
20		Q9UBJ2	ATP-binding cassette sub-family D member 2 OS=Homo s...	2.44	2.43 %	1	1	1	1	740	83.2	8.92	
21		P8VY32	Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=2 SV=1 - [FB...	2.44	11.54 %	2	1	1	1	104	11.5	9.07	
22		Q6NS29-3	Isoform 3 of Zinc finger protein 498 OS=Homo sapiens G...	2.35	5.18 %	3	1	1	1	328	37.0	9.03	
23		O00170	AH receptor-interacting protein OS=Homo sapiens GN=AL...	2.28	6.06 %	1	1	1	1	330	37.6	6.29	

Pre-immune-IP RNase A (+)

Administration x 05061305-01.ms1* x												
Proteins	Peptides	Search Input	Result Filters	Peptide Confidence	Search Summary							
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI		
1	P13645 Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KR...	252.62	44.86 %	8	19	27	73	584	58.8	5.21		
2	P04264 Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT...	213.37	39.60 %	9	25	31	66	644	66.0	8.12		
3	P35908 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapien...	179.14	55.87 %	25	23	28	49	639	65.4	8.00		
4	P35527 Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT...	113.05	62.60 %	2	17	19	30	623	62.0	5.24		
5	P02533 Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KR...	39.92	20.97 %	14	4	8	12	472	51.5	5.16		
6	P08779 Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KR...	31.02	15.43 %	12	3	7	11	473	51.2	5.05		
7	P13647 Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT...	27.78	14.58 %	19	2	9	11	590	62.3	7.74		
8	E9P165 Heat shock cognate 71 kDa protein (Fragment) OS=Homo...	12.21	30.95 %	26	4	4	4	168	17.9	5.29		
A2 Sequence # PSMs # Proteins # Protein Groups Protein Group Accessions Modifications ΔCn XCorr Charge MH+ [Da] ΔM [ppm] RT [min]												
1	IIINEPTAAAIAYGLDK	1	13	1	E9P165		0.0000	3.81	2	1659.89702	1.04	32.94
2	VEIIANDQGNR	1	25	1	E9P165		0.0000	2.90	2	1228.62773	-0.30	23.99
3	TTPSYAFTDTER	1	23	1	E9P165		0.0000	2.89	2	1487.70183	0.35	29.15
4	DAGTIAGLNMLR	1	9	1	E9P165		0.0000	2.60	2	1199.67473	0.33	32.92
9 H7C3X8 Serine/threonine-protein kinase SIK3 (Fragment) OS=Ho...												
A2 Sequence # PSMs # Proteins # Protein Groups Protein Group Accessions Modifications ΔCn XCorr Charge MH+ [Da] ΔM [ppm] RT [min]												
1	DLKAENLLLDANLNK	2	8	1	H7C3X8		0.0000	2.46	3	1797.01242	0.39	37.70
2	hTVGVADPRTEVIEDLQK	2	8	1	H7C3X8	N-Term(Acetyl); M13(Oxid...	0.0000	2.36	2	2083.01201	-0.26	34.91
10 P81605 Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCE PE=1 SV=2 - [DC...												
11 Q5D862 Flaggrin-2 OS=Homo sapiens GN=FLG2 PE=1 SV=1 - [FI...												
12 Q6UWP8 Suprabasin OS=Homo sapiens GN=SBSN PE=2 SV=2 - [S...												
13 Q9Y615 Actin-like protein 7A OS=Homo sapiens GN=ACTL7A PE=...												
14 J3Q5A3 Ubiquitin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=UBB PE=4 S...												
A2 Sequence # PSMs # Proteins # Protein Groups Protein Group Accessions Modifications ΔCn XCorr Charge MH+ [Da] ΔM [ppm] RT [min]												
1	TITLEVEPSDITENYK	1	24	1	J3Q5A3		0.0000	4.30	2	1787.92937	1.11	32.18
15 Q15291-2 Isoform 2 of Retinoblastoma-binding protein 5 OS=Homo...												
A2 Sequence # PSMs # Proteins # Protein Groups Protein Group Accessions Modifications ΔCn XCorr Charge MH+ [Da] ΔM [ppm] RT [min]												
1	gSFLINTADRIIRVYDGR	1	2	1	Q15291-2	N-Term(Acetyl)	0.0000	2.91	2	2211.14189	3.57	31.87
16 P48443 Retinoic acid receptor ROR-gamma OS=Homo sapiens GN...												
A2 Sequence # PSMs # Proteins # Protein Groups Protein Group Accessions Modifications ΔCn XCorr Charge MH+ [Da] ΔM [ppm] RT [min]												
1	mKDMQMDKSELGCLR	1	1	1	P48443	M1(Oxidation); MH(Oxidati...	0.0000	2.34	2	1816.79521	-6.01	32.56

Ζώνη 3:
Anti-PARN74-IP RNase A (+)

Administration x 05061307-01.ms1* x												
Proteins	Peptides	Search Input	Result Filters	Peptide Confidence	Search Summary							
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI		
1	P13645 Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KR...	216.79	37.16 %	5	15	19	61	584	58.8	5.21		
2	P35908 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapien...	138.28	51.49 %	8	16	22	40	639	65.4	8.00		
3	P04264 Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT...	134.59	31.68 %	13	18	22	41	644	66.0	8.12		
4	P35527 Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]	40.06	30.72 %	2	14	16	22	623	62.0	5.24		
5	P02533 Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KR...	49.06	30.72 %	12	7	11	14	472	51.5	5.16		
6	P04259 Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KR...	22.15	11.35 %	4	1	6	8	564	60.0	8.00		
7	P13647 Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT...	17.71	9.15 %	5	3	5	8	590	62.3	7.74		
8	P81605 Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCE PE=1 SV=2 - [DC...	5.94	12.73 %	2	2	2	2	110	11.3	6.54		
9	Q9Y615 Actin-like protein 7A OS=Homo sapiens GN=ACTL7A PE=...	5.30	4.60 %	1	1	1	2	435	48.6	7.09		
10	Q8TEM1 Nuclear pore membrane glycoprotein 210 OS=Homo sapi...	4.68	1.38 %	2	1	2	2	1887	205.0	6.81		
A2 Sequence # PSMs # Proteins # Protein Groups Protein Group Accessions Modifications ΔCn XCorr Charge MH+ [Da] ΔM [ppm] RT [min]												
1	YVQALELPLR	1	2	1	Q8TEM1		0.0000	2.37	2	1095.65288	0.68	31.52
2	HLHPIQTSFQETASK	1	1	1	Q8TEM1		0.0000	2.32	3	1794.91568	1.28	26.72
11 P06702 Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV...												
12 C9JKR2 Albumin, isoform CRA_k OS=Homo sapiens GN=ALB PE=...												
13 B1AKC9 Ephrin type-B receptor 2 OS=Homo sapiens GN=EPHB2 P...												
A2 Sequence # PSMs # Proteins # Protein Groups Protein Group Accessions Modifications ΔCn XCorr Charge MH+ [Da] ΔM [ppm] RT [min]												
1	FGQIVNTLDMIRNPNLSK	1	4	1	B1AKC9	N-Term(Acetyl)	0.0000	2.41	2	2230.21636	6.73	35.10
14 Q03001-9 Isoform 4 of Dystonin OS=Homo sapiens GN=DST - [DYS...												
A2 Sequence # PSMs # Proteins # Protein Groups Protein Group Accessions Modifications ΔCn XCorr Charge MH+ [Da] ΔM [ppm] RT [min]												
1	SOILEDETSIQK	1	7	1	Q03001-9		0.0000	2.30	2	1490.74419	-9.61	30.94
15 P49454 Centromere protein F OS=Homo sapiens GN=CENPF PE=...												
A2 Sequence # PSMs # Proteins # Protein Groups Protein Group Accessions Modifications ΔCn XCorr Charge MH+ [Da] ΔM [ppm] RT [min]												
1	sSTAMENLQTK	1	1	1	P49454	N-Term(Acetyl)	0.0000	2.20	2	1509.73332	2.99	29.93
16 F8WV32 Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=2 SV=1 - [F8...												
A2 Sequence # PSMs # Proteins # Protein Groups Protein Group Accessions Modifications ΔCn XCorr Charge MH+ [Da] ΔM [ppm] RT [min]												
1	STDYGFQINSR	1	2	1	F8WV32		0.0000	2.19	2	1400.68132	0.58	32.04
17 Q00459 Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit beta OS=...												
A2 Sequence # PSMs # Proteins # Protein Groups Protein Group Accessions Modifications ΔCn XCorr Charge MH+ [Da] ΔM [ppm] RT [min]												
1	TWYVGIINRTQAEENLQSK	1	1	1	Q00459		0.0000	2.15	2	2211.10747	-6.92	31.62

Anti-PARN74-IP RNase A (-)

Administration		05061306-01.ms1*		Show the sequence comparison view							
Proteins	Peptides	Search Input	Result Filters	Peptide Confidence	Search Summary						
	Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
1	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KR...	251.36	42.81 %	8	20	25	72	584	58.8	5.21
2	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapien...	192.40	59.47 %	22	24	29	56	639	65.4	8.00
3	P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT...	160.68	43.79 %	9	24	27	49	644	66.0	8.12
4	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT...	105.05	48.15 %	2	19	20	28	623	62.0	5.24
5	P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KR...	44.71	27.75 %	14	5	10	14	472	51.5	5.16
6	P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT...	32.84	14.41 %	20	5	9	14	590	62.3	7.74
7	P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KR...	25.10	11.42 %	12	1	6	9	473	51.2	5.05
8	P31151	Protein S100-A7 OS=Homo sapiens GN=S100A7 PE=1 SV...	5.41	19.80 %	1	1	1	1	101	11.5	6.77
9	Q9Y615	Actin-like protein 7A OS=Homo sapiens GN=ACTL7A PE=...	4.90	4.60 %	1	1	1	2	435	48.6	7.09
10	E7EWE1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5 OS=Homo sap...	4.55	5.48 %	3	1	1	2	347	38.7	5.47
11	J3Q5A3	Ubiquitin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=UBB PE=4 S...	3.34	37.21 %	24	1	1	1	43	4.9	5.19
12	P06702	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV...	3.18	13.16 %	1	1	1	1	114	13.2	6.13
13	J3K700	Rotatin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RTTN PE=4 S...	3.11	5.98 %	5	1	1	1	669	75.0	6.28
14	C9JXR2	Albumin, isoform CRA_1 OS=Homo sapiens GN=ALB PE=...	3.02	2.88 %	6	1	1	1	417	47.3	6.35
15	P81605	Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 - [DC...	2.85	10.00 %	2	1	1	1	110	11.3	6.54
16	Q96QF7	Acidic repeat-containing protein OS=Homo sapiens GN=A...	2.75	2.60 %	1	1	1	1	691	76.1	4.60
17	Q14566	DNA replication licensing factor MCM6 OS=Homo sapiens...	2.65	2.68 %	1	1	1	1	821	92.8	5.41
18	Q96DC7	Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein...	2.52	3.04 %	2	1	1	1	493	54.4	5.81
19	H7C524	Target of Nesh-SH3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=A...	2.51	14.56 %	1	1	1	1	158	17.2	4.98
20	B4E159	Zinc finger protein 721 OS=Homo sapiens GN=ZNF721 PE...	2.49	9.09 %	1	1	1	1	132	15.6	7.42
21	H7C3X8	Serine/threonine-protein kinase SIK3 (Fragment) OS=Ho...	2.40	3.56 %	8	1	1	1	506	57.1	6.10

Pre-immune-IP RNase A (+)

Administration		05061308-01.ms1*		Show the sequence comparison view							
Proteins	Peptides	Search Input	Result Filters	Peptide Confidence	Search Summary						
	Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
1	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KR...	266.57	42.64 %	21	23	29	76	584	58.8	5.21
2	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapien...	224.91	56.81 %	22	22	29	63	639	65.4	8.00
3	P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT...	204.28	48.60 %	9	28	30	62	644	66.0	8.12
4	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT...	72.59	40.13 %	2	14	14	19	623	62.0	5.24
5	P48668	Keratin, type II cytoskeletal 6C OS=Homo sapiens GN=KR...	43.76	15.07 %	18	1	8	14	564	60.0	8.00
6	P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KR...	42.13	24.15 %	20	5	8	14	472	51.5	5.16
7	P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT...	34.98	17.97 %	21	5	11	13	590	62.3	7.74
8	Q723Y8	Keratin, type I cytoskeletal 27 OS=Homo sapiens GN=KR...	13.18	5.88 %	3	1	3	5	459	49.8	5.05
9	P31151	Protein S100-A7 OS=Homo sapiens GN=S100A7 PE=1 SV...	7.33	19.80 %	1	2	2	2	101	11.5	6.77
10	P81605	Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 - [DC...	5.19	12.73 %	2	2	2	2	110	11.3	6.54
11	Q9UB32	ATP-binding cassette sub-family D member 2 OS=Homo s...	5.19	2.43 %	1	1	1	2	740	83.2	8.92
12	Q03721-2	Isoform 2 of Potassium voltage-gated channel subfamily...	3.29	7.22 %	6	1	1	1	582	64.5	7.09
13	H0Y1K1	Homeobox protein SDX5 OS=Homo sapiens GN=SDX5 PE=...	3.21	15.61 %	1	1	1	1	301	30.5	7.93
14	P14923	Junction plakoglobin OS=Homo sapiens GN=JUP PE=1 SV...	2.76	2.68 %	1	1	1	1	745	81.7	6.14
15	Q9Y615	Actin-like protein 7A OS=Homo sapiens GN=ACTL7A PE=...	2.66	4.60 %	1	1	1	1	435	48.6	7.09
16	Q72443	Polycystic kidney disease protein 1-like 3 OS=Homo sapie...	2.56	0.87 %	1	1	1	1	1732	195.8	8.48
17	C9J0E4	Cystatin-A OS=Homo sapiens GN=CSTA PE=2 SV=1 - [C9...	2.49	19.05 %	2	1	1	1	63	7.1	7.24
18	C9JXR2	Albumin, isoform CRA_1 OS=Homo sapiens GN=ALB PE=...	2.48	3.60 %	6	1	1	1	417	47.3	6.35
19	Q9Y527	Host cell factor 2 OS=Homo sapiens GN=HCFC2 PE=1 SV...	2.46	2.65 %	1	1	1	1	792	86.7	8.48
20	F8W32	Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=2 SV=1 - [F8...	2.44	11.54 %	2	1	1	1	104	11.5	9.07
21	Q9BY8-2	Isoform 2 of Helicase with zinc finger domain 2 OS=Hom...	2.40	0.91 %	3	1	1	1	2080	231.5	7.69
22	J3Q5A3	Ubiquitin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=UBB PE=4 S...	2.39	37.21 %	24	1	1	1	43	4.9	5.19
23	J3QLG2	Mitochondrial Rho GTPase 1 (Fragment) OS=Homo sapie...	2.12	14.93 %	11	1	1	1	134	15.4	6.25

Ζώνη 4:

Anti-PARN74-IP RNase A (+)

Administration		22071306.ms1*		22071307.ms1*		Multi Report from 2 Reports					
Proteins	Peptides	Search Input	Result Filters	Peptide Confidence	Search Summary						
	Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
1	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapien...	505.46	75.90 %	6	31	36	126	639	65.4	8.00
2	P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT...	501.71	49.84 %	8	33	38	140	644	66.0	8.12
3	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT...	470.82	46.75 %	6	24	26	124	594	59.8	5.21
4	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT...	417.53	50.88 %	2	23	23	98	623	62.0	5.24
5	P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT...	140.10	31.36 %	13	12	19	46	590	62.3	7.74
6	P02533	Keratin, type II cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT...	114.24	42.16 %	9	9	15	32	472	51.5	5.16
7	P04259	Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KR...	102.48	28.01 %	9	2	16	34	564	60.0	8.00
8	P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KR...	92.41	28.01 %	9	3	16	30	564	60.0	8.00
9	Q86Y23	Hornerin OS=Homo sapiens GN=HRNR PE=1 SV=2 - [HO...	65.44	15.40 %	1	11	11	17	2850	282.2	10.04
10	P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KR...	58.79	27.48 %	7	6	10	18	473	51.2	5.05
11	Q50862	Flaggrin-2 OS=Homo sapiens GN=FLG2 PE=1 SV=1 - [FI...	54.76	8.32 %	1	8	8	14	2391	247.9	8.31
12	Q72794	Keratin, type II cytoskeletal 1b OS=Homo sapiens GN=KR...	35.19	7.79 %	5	2	4	10	578	61.9	5.99
13	Q08413	Desmoglein-1 OS=Homo sapiens GN=D5G1 PE=1 SV=2 - [...]	33.72	10.30 %	1	6	6	9	1049	113.7	5.03
14	Q08695	Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Homo sapiens GN=KR...	24.26	14.35 %	7	2	6	8	432	48.1	5.02
15	Q6JWP8	Suprabasin OS=Homo sapiens GN=SBSN PE=2 SV=2 - [S...	24.05	15.25 %	1	2	2	6	590	60.5	7.01
16	FSH8K9	Keratin, type II cytoskeletal 4 OS=Homo sapiens GN=KRT...	23.76	12.00 %	8	2	5	7	500	53.9	5.92
17	P81605	Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 - [DC...	16.82	22.73 %	2	3	3	5	110	11.3	6.54
18	P15924-2	Isoform DP11 of Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DSP...	15.85	3.26 %	2	4	4	4	2272	280.0	6.96
19	Q86Y46-2	Isoform 2 of Keratin, type II cytoskeletal 73 OS=Homo sa...	13.72	8.66 %	13	1	3	4	381	42.0	8.25
20	Q86Y11H	Keratin, type II cytoskeletal 78 OS=Homo sapiens GN=KR...	12.63	6.73 %	3	3	3	4	520	56.8	6.02
21	Q6K866-2	Isoform 2 of Keratin, type II cytoskeletal 80 OS=Homo sa...	12.44	5.45 %	8	1	2	4	422	47.2	5.30
22	G83L62	Corneodesmosin OS=Homo sapiens GN=CDSN PE=4 SV=...	10.60	7.94 %	3	2	2	3	529	51.6	8.44
23	F8WV32	Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=2 SV=1 - [FB...	10.55	11.54 %	2	1	1	3	104	11.5	9.07
24	P02788-2	Isoform Delta1 of Lactotransferrin OS=Homo sapiens GN...	9.88	7.36 %	6	3	3	3	666	73.1	7.85
25	C93K2	Albumin, isoform CRA_1 OS=Homo sapiens GN=ALB PE=...	9.73	10.55 %	6	3	3	3	417	47.3	6.35
26	B1AN99	Trypsin-3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=...	9.15	7.30 %	6	1	1	3	178	19.4	6.07
27	P12273	Prolactin-inducible protein OS=Homo sapiens GN=PIP PE...	8.63	26.03 %	1	3	3	3	146	16.6	8.05
28	P06702	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV...	7.65	13.16 %	1	1	1	2	114	13.2	6.13
29	P01834	Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE...	7.12	32.08 %	1	2	2	2	106	11.6	5.87
30	P31944	Caspase-14 OS=Homo sapiens GN=CASP14 PE=1 SV=2 - [...]	6.17	9.09 %	1	2	2	2	242	27.7	5.58
31	Q9Y615	Actin-like protein 7A OS=Homo sapiens GN=ACTL7A PE=...	6.01	4.60 %	1	1	1	2	435	48.6	7.09
32	P60709	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 S...	5.90	9.07 %	22	2	2	2	375	41.7	5.48
33	P01040	Cystatin-A OS=Homo sapiens GN=CSTA PE=1 SV=1 - [CY...	3.65	18.37 %	1	1	1	1	98	11.0	5.50
34	P14923	Junction plakoglobin OS=Homo sapiens GN=JUP PE=1 SV...	3.33	1.88 %	1	1	1	1	745	81.7	6.14
35	J3Q5A3	Ubiquitin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=UBB PE=4 S...	3.31	37.21 %	24	1	1	1	43	4.9	5.19
36	P02808	Statherin OS=Homo sapiens GN=STATH PE=1 SV=2 - [S...	3.30	53.23 %	1	1	1	1	62	7.3	8.47
37	E7EUT5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo s...	3.26	5.38 %	3	1	1	1	260	27.9	6.95
38	P04040	Catalase OS=Homo sapiens GN=CAT PE=1 SV=3 - [CATA...	3.22	2.09 %	1	1	1	1	527	59.7	7.39
39	ADM9Q6	Ig lambda-7 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGLC7...	3.21	14.15 %	6	1	1	1	106	11.3	8.28
40	P31025	Lipocalin-1 OS=Homo sapiens GN=LCN1 PE=1 SV=1 - [L...	3.13	6.25 %	1	1	1	1	176	19.2	5.58
41	Q03721-2	Isoform 2 of Potassium voltage-gated channel subfamily...	3.10	7.22 %	6	1	1	1	582	64.5	7.09
42	P62805	Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2...	3.01	9.71 %	1	1	1	1	103	11.4	11.36
43	C93E90	Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A2GP1...	3.01	5.29 %	2	1	1	1	227	26.3	5.73
44	Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E OS=Hom...	2.96	1.59 %	1	1	1	1	693	76.6	5.86
45	Q5T3N1	Annexin A1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ANXA1 PE...	2.93	7.84 %	2	1	1	1	204	22.7	5.53
46	Q8W242-3	Isoform 3 of Titin OS=Homo sapiens GN=TTN - [TTITN_H...	2.93	0.06 %	11	1	1	1	26926	2991.1	6.74
47	Q5T749	Keratinocyte proline-rich protein OS=Homo sapiens GN=K...	2.92	1.55 %	1	1	1	1	579	64.1	8.27
48	C93265	Serpin B4 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SERPINB4 P...	2.90	5.69 %	6	1	1	1	211	24.4	6.61
49	H0YLE2	Annexin A2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE...	2.85	22.22 %	15	1	1	1	45	5.3	4.50
50	P20930	Flaggrin OS=Homo sapiens GN=FLG PE=1 SV=3 - [FLA...	2.76	1.72 %	1	1	1	1	4061	434.9	9.25
51	H7B2K5	Gamma-glutamylcystoltransferase (Fragment) OS=Homo s...	2.69	10.92 %	3	1	1	1	119	13.2	6.54
52	C93J04	Interferon-induced GTP-binding protein Mx2 (Fragment)...	2.67	5.60 %	5	1	1	1	125	14.3	9.70
53	P47929	Galectin-7 OS=Homo sapiens GN=LGALS7 PE=1 SV=2 - [...]	2.63	8.09 %	1	1	1	1	136	15.1	7.62
54	P31151	Protein S100-A7 OS=Homo sapiens GN=S100A7 PE=1 SV...	2.63	10.89 %	1	1	1	1	101	11.5	6.77

Anti-PARN74-IP RNase A (-)

Administration X 05061309-01.ms1 X													
Protein	Peptides	Search Input	Result Filters	Peptide Confidence	Search Summary								
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [Da]	pI			
1	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	205.20	41.44 %	6	21	24	60	504	58.0	5.21		
2	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=	140.48	40.33 %	7	16	22	39	639	65.4	8.00		
3	P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	131.62	36.80 %	13	16	20	42	644	66.0	8.12		
4	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	81.49	35.25 %	2	12	14	24	623	62.0	5.24		
5	P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3	17.60	12.20 %	4	4	6	7	590	62.3	7.74		
6	P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	15.00	14.19 %	4	2	6	6	472	51.5	5.16		
7	P11142-2	Isiorm 2 of Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSC	13.26	14.20 %	26	3	5	5	490	53.5	5.86		
A2 Sequence # PSMs # Proteins # Protein Groups Protein Group Accessions Modifications ΔCh XCorr Charge MH+ [Da] ΔM [ppm] RT [min] # Missed Cleave													
1	INNEPTAAAIAYLDEK	1	13	1	P11142-2		0.0000	3.51	2	1659.89617	0.53	33.09	
2	FEELNAQLFR	1	7	1	P11142-2		0.0000	2.69	3	1253.61662	0.39	33.71	
3	STAGDTHLGGEDFDMR	1	5	1	P11142-2		0.0000	2.51	3	1691.72531	-0.20	24.53	
4	TTPSYVAFDTER	1	23	1	P11142-2		0.0000	2.46	2	1487.70378	1.66	29.08	
5	NQVAEDPINTVDAK	1	10	1	P11142-2	MOxidation	0.0000	2.10	2	1665.79155	0.83	27.40	
A2 Sequence # PSMs # Proteins # Protein Groups Protein Group Accessions Modifications ΔCh XCorr Charge MH+ [Da] ΔM [ppm] RT [min] # Missed Cleave													
8	P81605	Desmocidin OS=Homo sapiens GN=DCLD PE=1 SV=2 - [DCLD_HUMAN]	7.94	25.45 %	2	2	3	3	110	11.3	6.54		
9	Q5TH69	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3 OS=Homo sapi	5.61	0.60 %	1	1	1	2	2177	240.5	5.82		
A2 Sequence # PSMs # Proteins # Protein Groups Protein Group Accessions Modifications ΔCh XCorr Charge MH+ [Da] ΔM [ppm] RT [min] # Missed Cleave													
1	GLSEGCYQLLLR	2	1	1	Q5TH69	N-Term(Acetyl)	0.0000	2.84	3	1467.86039	5.01	31.15	
A2 Sequence # PSMs # Proteins # Protein Groups Protein Group Accessions Modifications ΔCh XCorr Charge MH+ [Da] ΔM [ppm] RT [min] # Missed Cleave													
10	Q9Y615	Actin-like protein 7A OS=Homo sapiens GN=ACTL7A PE=1 SV=1 - [ACTL7A	5.47	4.60 %	1	1	1	2	435	48.6	7.09		
11	C9XRF2	Albumin, isoform CRA_1 OS=Homo sapiens GN=ALB PE=4 SV=1 - [C9XRF2	4.07	2.88 %	1	1	1	1	417	47.3	6.35		
12	PBWZND	Cleavage and polyadenylation-specificity factor subunit 6 OS=Homo sapien	3.85	5.23 %	4	1	1	1	478	52.2	6.43		
A2 Sequence # PSMs # Proteins # Protein Groups Protein Group Accessions Modifications ΔCh XCorr Charge MH+ [Da] ΔM [ppm] RT [min] # Missed Cleave													
1	AYSDASAGYDQAEITLVTA	1	4	1	PBWZND		0.0000	3.85	3	2452.28391	0.84	45.53	
A2 Sequence # PSMs # Proteins # Protein Groups Protein Group Accessions Modifications ΔCh XCorr Charge MH+ [Da] ΔM [ppm] RT [min] # Missed Cleave													
13	P06702	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1 - [S100A9_HU	3.29	13.16 %	1	1	1	1	114	13.2	6.13		
14	A0ANL0	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Homo sapiens PE=1 SV=2 - [A0AN	2.83	27.83 %	1	1	1	1	115	12.4	10.11		
15	Q9RZND	Eri domain-containing protein 3 OS=Homo sapiens GN=ERD3 PE=1 SV=2	2.74	3.55 %	1	1	1	1	535	60.8	6.57		
16	Q5D662	Flaggrin-2 OS=Homo sapiens GN=FLG2 PE=1 SV=1 - [FLG2_HUMAN]	2.70	0.46 %	1	1	1	1	2391	247.9	8.31		
17	C9XKE4	Cytactin-A OS=Homo sapiens GN=CSTA PE=2 SV=1 - [C9XKE4_HUMAN]	2.61	19.05 %	2	1	1	1	63	7.1	7.24		

Pre-immune-IP RNase A (+)

Administration		22071306.msfs*		22071307.msfs*		Multi Report from 2 Reports					
Proteins	Peptides	Search Input	Result Filters	Peptide Confidence	Search Summary						
	Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
1	P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT...	485.31	54.66 %	11	30	40	156	644	66.0	8.12
2	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT...	401.35	54.09 %	2	22	30	114	623	62.0	5.24
3	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapi...	398.52	72.30 %	12	28	38	110	639	65.4	8.00
4	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KR...	352.76	45.89 %	6	20	28	104	584	58.8	5.21
5	P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT...	143.26	37.80 %	21	8	24	54	590	62.3	7.74
6	P04259	Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KR...	108.49	27.13 %	16	1	16	40	564	60.0	8.00
7	P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KR...	100.88	35.59 %	10	5	16	35	472	51.5	5.16
8	P48668	Keratin, type II cytoskeletal 6C OS=Homo sapiens GN=KR...	98.81	27.13 %	18	2	16	36	564	60.0	8.00
9	P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KR...	73.42	30.87 %	11	4	14	27	473	51.2	5.05
10	Q06495	Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Homo sapiens GN=KR...	39.22	18.52 %	11	2	10	15	432	48.1	5.02
11	Q86Y23	Hornerin OS=Homo sapiens GN=HNR PE=1 SV=2 - [HO...	35.02	14.53 %	1	4	7	11	2850	282.2	10.04
12	C93KR2	Albumin, isoform CRA_k OS=Homo sapiens GN=ALB PE=...	32.96	10.55 %	6	3	4	11	417	47.3	6.35
13	FSHK9	Keratin, type II cytoskeletal 4 OS=Homo sapiens GN=KRT...	32.43	15.00 %	13	2	7	12	500	53.9	5.92
14	Q5D862	Flaggrin-2 OS=Homo sapiens GN=FLG2 PE=1 SV=1 - [FI...	31.51	4.56 %	1	4	5	9	2391	247.9	8.31
15	P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapie...	25.28	13.96 %	5	5	6	8	573	61.0	5.87
16	K7ERE3	Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Homo sapiens GN=KR...	23.88	14.46 %	7	1	7	9	415	45.2	4.81
17	Q02413	Desmoglein-1 OS=Homo sapiens GN=DSG1 PE=1 SV=2 - ...	20.56	7.91 %	1	3	6	7	1049	113.7	5.03
18	P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2 OS=Homo sapiens GN=...	18.61	18.27 %	13	5	6	7	531	57.9	7.84
19	P61605	Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 - [DC...	17.78	22.73 %	2	3	3	6	110	11.3	6.54
20	Q516W5	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sa...	12.51	13.79 %	6	3	4	4	428	47.5	5.63
21	F8W32	Lysosome C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=2 SV=1 - [F8...	11.38	19.23 %	2	1	2	4	104	11.5	9.07
22	P06702	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=...	11.34	24.56 %	1	1	2	4	114	13.2	6.13
23	P31944	Caspase-14 OS=Homo sapiens GN=CASP14 PE=1 SV=2 - ...	11.02	17.77 %	1	3	4	4	242	27.7	5.58
24	P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A2GP1...	10.24	12.75 %	2	1	3	4	298	34.2	6.05
25	P02788-2	Isoform DeltaL of Lactotransferrin OS=Homo sapiens GN...	9.63	7.06 %	4	3	3	3	666	73.1	7.85
26	P31025	Lipocalin-1 OS=Homo sapiens GN=LCN1 PE=1 SV=1 - [L...	8.37	12.50 %	2	2	2	3	176	19.2	5.58
27	P60709	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 S...	7.46	9.60 %	15	1	3	3	375	41.7	5.48
28	BHE022	Transketolase OS=Homo sapiens GN=TKT PE=2 SV=1 - [...	6.71	6.42 %	4	2	2	2	576	62.8	7.52
29	H7C032	Golgi reassembly-stacking protein 1 (Fragment) OS=Hom...	6.10	13.48 %	1	1	1	2	141	15.7	8.65
30	Q14195	Dihydropyrimidinase-related protein 3 OS=Homo sapiens...	6.08	4.91 %	4	2	2	2	570	61.9	6.49
31	P35637-2	Isoform Short of RNA-binding protein FUS OS=Homo sapi...	5.92	6.29 %	3	1	2	2	525	53.3	9.36
32	P12273	Prolactin-inducible protein OS=Homo sapiens GN=PIP PE...	5.36	15.07 %	1	2	2	2	146	16.6	8.05
33	P01040	Cystatin-A OS=Homo sapiens GN=CSTA PE=1 SV=1 - [CY...	5.33	30.61 %	2	2	2	2	98	11.0	5.50
34	E7ESL9	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containi...	5.15	4.51 %	1	1	1	2	576	61.7	10.74
35	Q8N1N4-2	Isoform 2 of Keratin, type II cytoskeletal 78 OS=Homo sa...	5.07	5.37 %	3	1	2	2	410	45.0	5.20
36	C930A4	Interferon-induced GTP-binding protein Mx2 (Fragment)...	4.80	5.60 %	5	1	1	2	125	14.3	9.70
37	G8JL62	Corneodesmosin OS=Homo sapiens GN=CDSN PE=4 SV=...	3.94	3.40 %	3	1	1	1	529	51.6	8.44
38	P02808	Statherin OS=Homo sapiens GN=STATH PE=1 SV=2 - [S...	3.83	53.23 %	1	1	1	1	62	7.3	8.47
39	P15924-2	Isoform DP1 of Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DSP...	3.42	0.75 %	2	1	1	1	2272	260.0	6.96
40	B1AN99	Trypsin-3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=...	3.39	7.30 %	6	1	1	1	178	19.4	6.07
41	J3Q5A3	Ubiquitin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=UBB PE=4 S...	3.03	37.21 %	24	1	1	1	43	4.9	5.19
42	P01036	Cystatin-S OS=Homo sapiens GN=CST4 PE=1 SV=3 - [CY...	2.91	12.77 %	1	1	1	1	141	16.2	5.02
43	A2A2Q6	RING finger protein 37 (Fragment) OS=Homo sapiens GN...	2.87	21.59 %	3	1	1	1	88	9.9	6.51
44	H0VLE2	Annexin A2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE...	2.79	22.22 %	15	1	1	1	45	5.3	4.50
45	Q7Z333-3	Isoform 3 of Probable helicase senataxin OS=Homo sapie...	2.71	0.49 %	3	1	1	1	2644	299.2	7.21
46	P31151	Protein S100-A7 OS=Homo sapiens GN=S100A7 PE=1 SV...	2.69	10.89 %	1	1	1	1	101	11.5	6.77
47	P01834	Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE...	2.65	16.98 %	1	1	1	1	106	11.6	5.87
48	Q51749	Keratinocyte proline-rich protein OS=Homo sapiens GN=K...	2.62	1.55 %	1	1	1	1	579	64.1	8.27
49	Q9GZ28	Extracellular glycoprotein lacritin OS=Homo sapiens GN=L...	2.58	7.97 %	1	1	1	1	138	14.2	5.50
50	B4DLW8	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Homo s...	2.55	2.24 %	9	1	1	1	535	60.5	9.07
51	F8W6P5	LW-hemorphin-7 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HBB...	2.53	14.44 %	2	1	1	1	90	9.7	6.79