

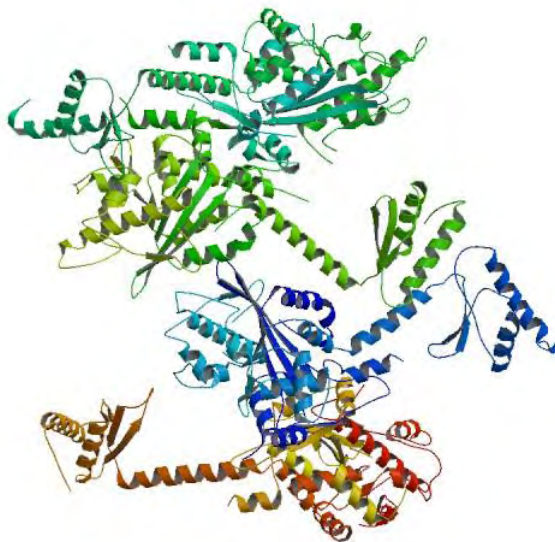


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

**ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΗΣ ΠΟΛΥ (A)
– ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ, PARN: Ο ΡΟΛΟΣ
ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ R99A/Q109A**

ΜΠΑΤΣΑΡΑ ANNA



ΛΑΡΙΣΑ, 2016

**ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΗΣ ΠΟΛΥ (Α)
– ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ, PARN: Ο ΡΟΛΟΣ
ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ R99A/Q109A**

**STUDIES ON THE SUBCELL TRACKING OF POLY(A) –
SPECIALIZED RIBONUCLEASE PARN: THE INFLUENCE OF
THE MUTATION R99A/Q109A**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

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

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Ψαρρά Άννα – Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Κοντού Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Εικόνα εξωφύλλου

Στην εικόνα εξωφύλλου απεικονίζεται η τρισδιάστατη διμερής δομή της ανθρώπινης αποαδενυλάσης PARN (http://www.rcsb.org/pdb/images/2A1S_asym_r_500.jpg).

Ευχαριστίες

- Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Είναι αποτέλεσμα εκτενούς αναζήτησης και έρευνας. Θα ήθελα να απευθύνω θερμές ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή μου κύριο Μπαλατσό Νικόλαο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ευχαριστώ, επίσης, τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, την κυρία Ψαρρά Άννα – Μαρία, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας και την κυρία Κοντού Μαρία, Επίκουρο Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA	6
1.1.1 Οι τροποποιήσεις στα άκρα των mRNAs: κάλυμμα και πολυαδενυλίωση	7
1.2 Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA.....	8
1.2.1 Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αποαδενυλίωση	8
1.2.2 Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αφαίρεση της καλύπτρας.....	9
1.2.3 Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση	9
1.3 Αποαδενυλίωση	11
1.3.1 Σύμπλοκα αποαδενυλασών	13
1.4 Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A) specific ribonuclease, PARN]	14
1.4.1 Δομή της PARN και ο ρόλος της αργινίνης 99 (R99) και της γλουταμίνης 109 (Q109).	16
2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	21
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	22
3.1 Κλωνοποίηση βάσει πρωτοκόλλου του In-fusion HD cloning kit (Clontech):.....	22
3.2 Επιλογή και ενζυμική πέψη του φορέα κλωνοποίησης.....	23
3.3 Σχεδιασμός ειδικών PCR εκκινητών	25
3.4 Ενίσχυση του γονιδίου ενδιαφέροντος με απλή PCR	27
Καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αφαίρεσης (gelextraction)	29
3.5 Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού	30
3.6 Χημικός μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων XL1Blue (transformation).	31
Επίστρωση τρυβλίων με τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα και επιλογή των αποικιών που περιέχουν τον κλωνοποιημένο φορέα.....	32
3.7 Παρασκευή επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων (competent cells).....	33
3.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (miniprep)	34
3.9 Μέτρηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων	35
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	36
4.1 Δοκιμασία υποκυτταρικού εντοπισμού της PARN αργίου τύπου (wild type PARN-wtPARN) με ανίχνευση φθορισμού- Κυτταροχημεία.....	38
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι απαδενυλάσες, είναι τα ένζυμα που αφαιρούν την πολυ(A) ουρά των ευκαρυωτικών mRNAs, η οποία παίζει καθοριστικό ρόλο στην μεταφορά, την μετάφραση και την αποικοδόμησή τους, ελέγχοντας της πρωτεϊνοσύνθεση και την σταθερότητα των mRNA. Η PARN είναι μια εκτενώς χαρακτηρισμένη απαδενυλάση των θηλαστικών. Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της κατανόησης του υποκυττάριου εντοπισμού της απαδενυλάσης PARN. Στην παρούσα εργασία κλωνοποιήθηκε η PARN φυσικού τύπου (wild-type PARN) στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C2, μεταλλάχθηκαν δύο αμινοξέα της, οι R99 και Q109 σε αλανίνες και στην συνέχεια, με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο διαμολύνθηκαν καρκινικά κύτταρα NCI-H520. Ακολούθως, εξετάστηκε η υποκυττάρια κατανομή του μεταλλάγματος με τη βοήθεια μικροσκοπίας φθορισμού, και συγκρίθηκε με αυτήν του φυσικού τύπου PARN.

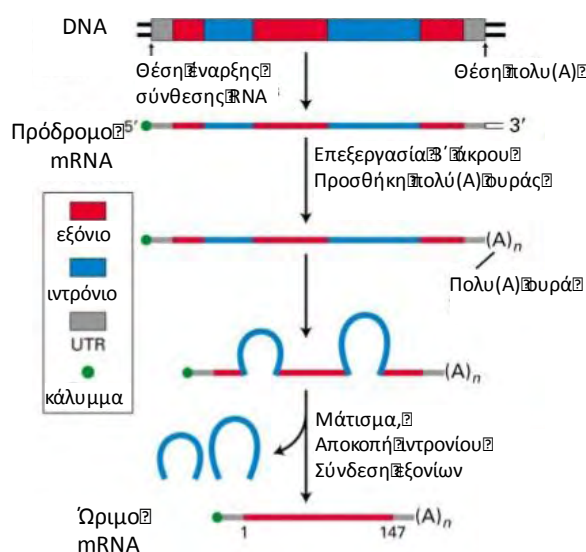
ABSTRACT

Polyadenylate-specific ribonucleases are enzymes that degrade the poly(A) tail of eukaryotic mRNAs, which plays a decisive role in transfer, translation and degradation of the mRNAs, by controlling protein production and mRNA stability. PARN is a mammal apadenylase which is extensively characterized. In the present study, wild-type PARN was cloned into the plasmid vector pEGFP-C2. Two amino acids of the enzyme, R99 και Q109, were mutated into alanine. The recombinant plasmid vector was used to transfect NCI-H520 cancer cells. Subsequently, the subcellular distribution of the mutant PARN was examined using fluorescence microscopy, and it was compared with that of wild type PARN.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA

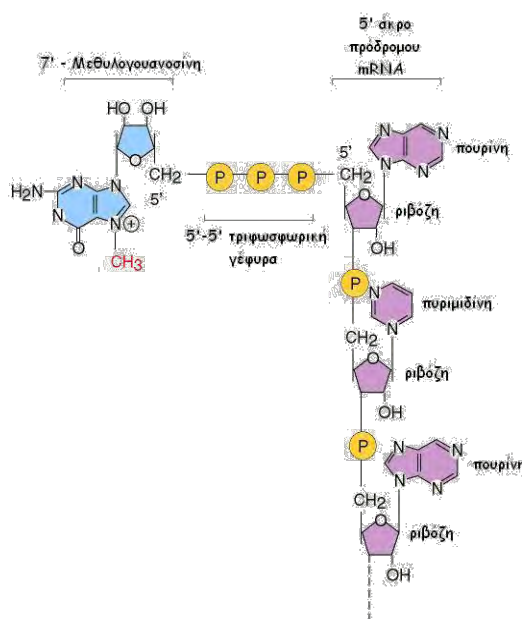
Μετά τη σύνθεση του πρώιμου ευκαρυωτικού mRNA (pre-mRNA) ακολουθεί η ωρίμανση που δίνει το τελικό ώριμο mRNA. Η ωρίμανση περιλαμβάνει την προσθήκη του καλύμματος στο 5' άκρο (*capping*), την προσθήκη της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο (*polyadenylation*) και το μάτισμα (*splicing*) για την απομάκρυνση των εσόνιων και τη συρραφή των εξονίων. Μόνο μετά την ολοκλήρωση όλων των τροποποιήσεων και της επεξεργασίας μπορεί το mRNA να εξαχθεί από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Μόλις το mRNA εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα και μεταφράζεται.



Εικόνα 1. Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA

1.1.1 Οι τροποποιήσεις στα άκρα των mRNAs: κάλυμμα και πολυαδενυλίωση

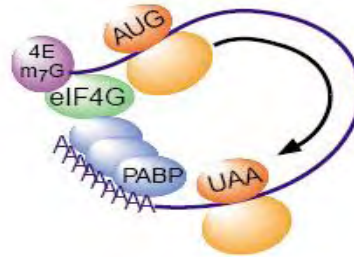
Το 5' κάλυμμα σχηματίζεται με την προσθήκη μιας τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP) στην πρώτη βάση του μεταγράφου μέσω ενός 5'-5' δεσμού, που είναι ένα τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο (συνήθως μια πουρίνη, A ή G).



Εικόνα 2. Το κάλυμμα στο 5' άκρο του mRNA

Τα πρόδρομα mRNAs λαμβάνουν στο 3' άκρο τους μια χαρακτηριστική αλληλουχία από 250-300 νουκλεοτίδια αδενοσίνης, γνωστή ως πολυ (A) ουρά. Ο ρόλος της πολυ(A) ουράς είναι κεντρικής σημασίας για το mRNA. Προστατεύει το 3' άκρο του mRNA από εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, συμμετέχει σε διεργασίες όπως η έξοδος στο κυτταρόπλασμα και από αυτή ξεκινά και το κύριο μονοπάτι αποικοδόμησης του mRNA. Στις διαδικασίες αυτές η πολυ(A) ουρά συμμετέχει κυρίως μέσω των πρωτεϊνικών παραγόντων που προσδένονται σε αυτή, και κυρίως την πολυ(A) προσδεδεμένη πρωτεΐνη [*poly(A)-binding protein, PABP*]. 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.



Εικόνα 3. Η πρόσδεση της PABP στον παράγοντα έναρξης eIF4G δημιουργεί έναν κλειστό βρόχο (Mitchell et al., 2001).

1.2 Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA

1.2.1 Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αποαδενυλίωση

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το μεγαλύτερο ποσοστό των mRNAs αποικοδομείται μέσω του μονοπατιού αποικοδόμησης εξαρτώμενο από αποαδενυλίωση, το οποίο ξεκινά με τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς. Στον πυρήνα, με τη διαδικασία της αποαδενυλίωσης περιορίζονται οι νέο-προστιθέμενες πολυ(A) ουρές, στο κατάλληλο μήκος, ώστε το mRNA να εξαχθεί στο κυτταρόπλασμα και να ξεκινήσει η μετάφραση του, ενώ η εκτεταμένη αποαδενυλίωση του mRNA στο κυτταρόπλασμα πέρα από ένα συγκεκριμένο μήκος, σηματοδοτεί την αποικοδόμηση του. Η αποαδενυλίωση καταλύεται από τις αποαδενυλάσες, μια οικογένεια εξοριβονουκλεασών που υδρολύουν RNA με κατεύθυνση $3' \rightarrow 5'$. Μετά την αποαδενυλίωση, δύο μηχανισμοί μπορούν να οδηγήσουν στην αποικοδόμηση του mRNA: είτε αφαίρεση της 5' καλύπτρας και αποικοδόμηση με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$, είτε αποικοδόμηση $3' \rightarrow 5'$. Στο πρώτο μονοπάτι, το σύμπλεγμα πρωτεϊνών Lsm 1-7 αλληλεπιδρά με το 3' άκρο του μεταγράφου επάγωντας την αφαίρεση της καλύπτρας μέσω του συμπλόκου Dcp1-Dcp2 και εκθέτωντας έτσι το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την Xrn1p, μια $5' \rightarrow 3'$ εξωνουκλεάση. Εναλλακτικά, το αποαδενυλιωμένο mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση $3' \rightarrow 5'$ από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών. Στη περίπτωση αυτή η καλύπτρα υδρολύεται από το ένζυμο DcpS [6]. Να σημειωθεί ότι ο ρυθμός της αποαδενυλίωσης ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων mRNAs και εξαρτάται από τη σίγηση miRNA, την ύπαρξη πρόωρων κωδικονίων τερματισμού και καθοριστών σταθερότητας που βρίσκονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή, όπως είναι οι περιοχές πλούσιες σε

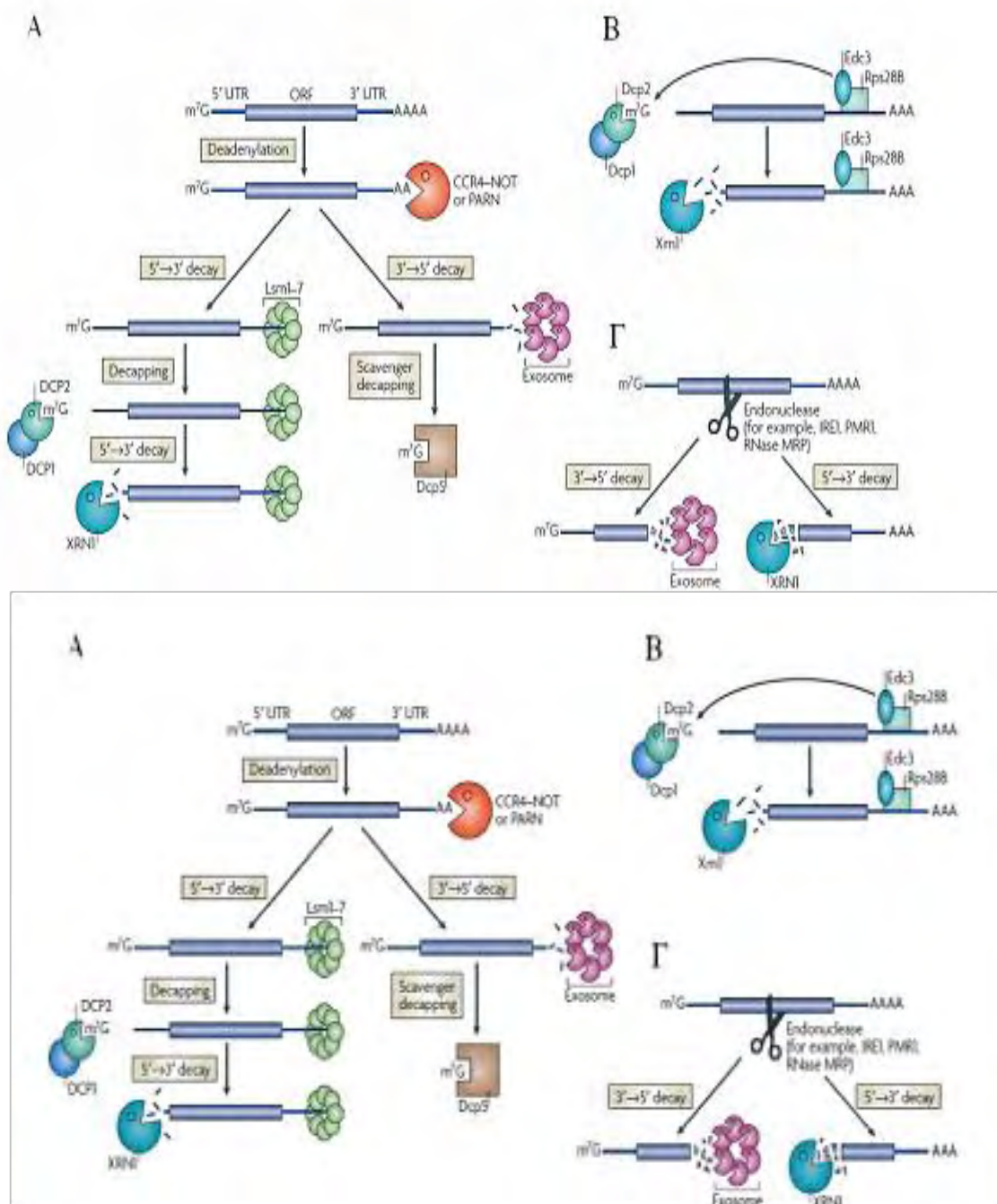
αλληλουχίες AU, γνωστές και ως στοιχεία AU ή ARE (Εικόνα 4).

1.2.2 Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αφαίρεση της καλύπτρας

Δύο μετάγραφα που δεν σχετίζονται μεταξύ τους, τα RPS28B και EDC1, παρακάμπτουν το στάδιο της αποαδενυλίωσης, και αφαιρείται η καλύπτρα με έναν αυτορυθμιστικό μηχανισμό (Εικόνα 4). Η πρωτεΐνη Rps28B προσδένεται σε μία δομή θηλιάς στην 3' αμετάφραστη περιοχή του δικού της μεταγράφου και στρατολογεί την Edc3, έναν προαγωγέα της αφαίρεσης της. Αυτό επιφέρει σύνδεση και άλλων παραγόντων αφαίρεσης της καλύπτρας και επιτρέπει την αποικοδόμηση που είναι ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση [5]. Επίσης, Το EDC1 mRNA του *S.Cerevisiae* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Edc1 που ρυθμίζει την αφαίρεση της καλύπτρας, αποικοδομείται με πορείες ανεξάρτητες της αποαδενυλίωσης. Στην περίπτωση αυτή η αποαδενυλίωση φαίνεται να προλαμβάνεται από την αλληλεπίδραση της πολυ(A) ουράς και μία περιοχή πολυ(U) που βρίσκεται στο 3' UTR. Αυτό το ενδομοριακό ζευγάρωμα βάσεων εμποδίζει την πρόσβαση των αποαδενυλασών. Ο μηχανισμός αυτός είναι ένας μηχανισμός ανατροφοδοτικής ρύθμισης όπου το προϊόν της μετάφρασης αποικοδομεί το μετάγραφο του. Η αφαίρεση του EDC1 mRNA απαιτεί την παρουσία υπομονάδων του συμπλόκου Ccr4–Not γεγονός που υποδηλώνει συσχέτιση μεταξύ αφαίρεσης της καλύπτρας και αποαδενυλίωσης.

1.2.3 Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση

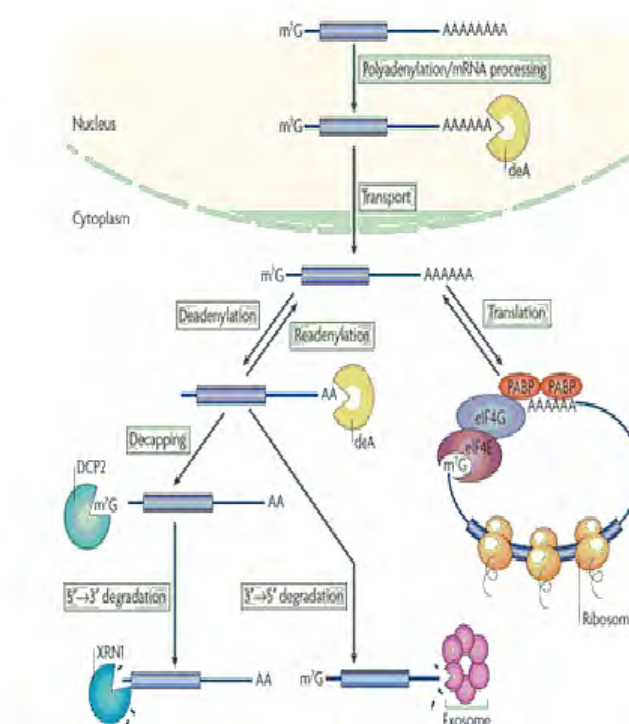
Ένας αποτελεσματικός τρόπος αποικοδόμησης του mRNA είναι μέσω ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης, όπου παράγονται δύο τμήματα που είναι ευάλωτα σε εξωνουκλεάσες (Εικόνα 4). Διάφορες ενδονουκλεάσες που στοχεύουν το mRNA έχουν χαρακτηριστεί πρόσφατα συμπεριλαμβανομένου τις PMR1, IRE1 και το ένζυμο επεξεργασίας του ριβοσωμικού RNA (RNase MRP) το οποίο φαίνεται να επιτελεί επιπρόσθετο ρόλο αφού επιτίθεται και σε συγκεκριμένα μόρια mRNA. Επιπλέον ενδονουκλεάσες φαίνεται να εμπλέκονται στην αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNAs [8,9] ενώ τα siRNAs ξεκινούν την αποικοδόμηση μέσω ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης όπου εμπλέκεται η Argonaute protein-2 (Ago2) [10,11].

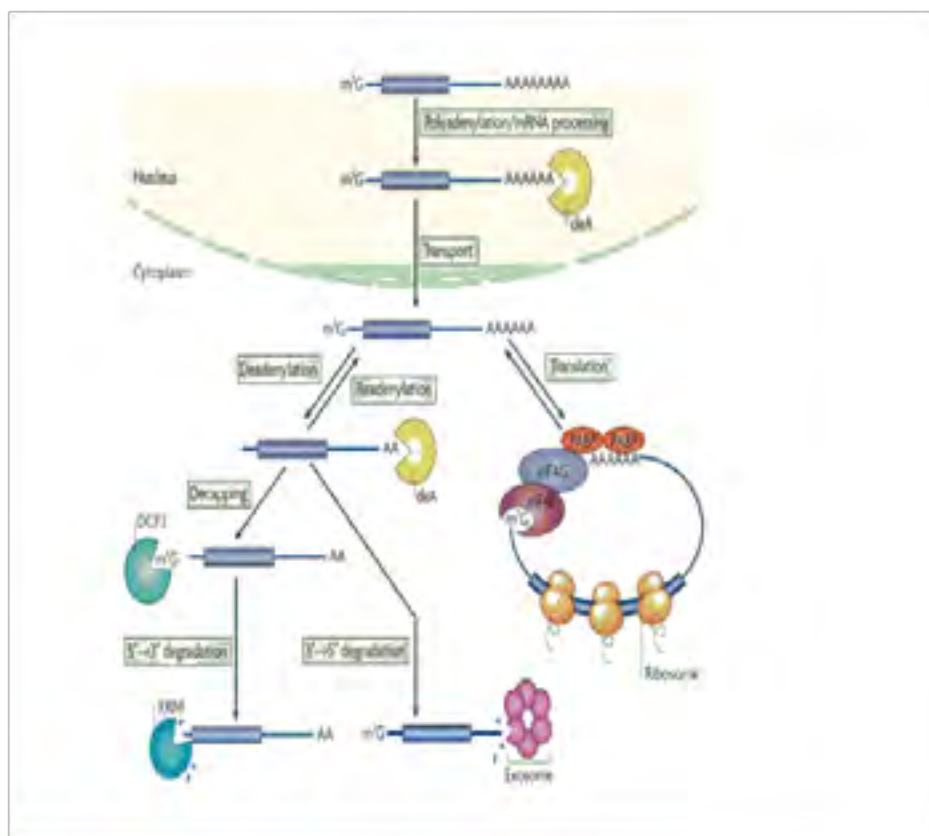


Εικόνα 4. Α. Αποικοδόμηση που εξαρτάται από αποαδενυλίωση. Β. Αποικοδόμηση που εξαρτάται από την αφαίρεση της καλύπτρας Γ. Αποικοδόμηση που εξαρτάται από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση [7].

1.3 Αποαδενυλίωση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η αποικοδόμηση του mRNA υπό φυσιολογικές συνθήκες συνήθως ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ(A) ουράς. Η αποαδενυλίωση είναι το σημαντικότερο στάδιο που καθορίζει το ρυθμό της αποικοδόμησης και της μεταφραστικής αποσιώπησης του mRNA. Το γεγονός αυτό καθιστά την αποαδενυλίωση ως το κυριότερο σημείο ελέγχου για τις δύο αυτές διαδικασίες. Τα ένζυμα που καταλύουν την αποαδενυλίωση είναι εξωνουκλεάσες εξαρτώμενες από Mg^{2+} που υδρολύουν το mRNA με κατεύθυνση 3'-5', παράγοντας 5'-AMP. Οι πολυ(A) ουρές είναι το κυριότερο υπόστρωμα των ενζύμων αυτών, ωστόσο μερικές αποαδενυλάσες μπορούν να διασπούν και άλλα μόρια RNA in vitro [16,17]. Από την στιγμή που η πολυ(A) ουρά έχει αφαιρεθεί από το mRNA, άλλα υδρολυτικά ένζυμα ξεκινούν την διάσπαση του (Εικόνα 6).





Εικόνα 5. Η αποαδενυλίωση είναι συνήθως το στάδιο που καθορίζει το ρυθμό της αποικοδόμησης και της αποσιώπησης του mRNA [7].

Ο αριθμός των γνωστών αποαδενυλασών έχει επεκταθεί πρόσφατα, κυρίως μέσω βιοχημικών και γενετικών μελετών. Υποψήφιες αποαδενυλάσες έχουν ταυτοποιηθεί με χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής, ωστόσο η δράση τους δεν έχει αποδειχθεί. Σύμφωνα με συγκριτικές μελέτες των περιοχών με δράση ριβονουκλεάσης των ενζύμων αυτών, όλες οι γνωστές αποαδενυλάσες ανήκουν σε μία από της δύο ομάδες, την DEDD ή την εξωνουκλεάση-ενδονουκλεάση-φωσφατάση (EEP) υπέρ-οικογένεια. Οι DEDD νουκλεάσες ονομάστηκαν έτσι εξαιτίας των συντηρημένων καταλυτικών αμινοξικών καταλοίπων Asp και Glu τα οποία είναι διάσπαρτα σε τρία μοτίβα εξωνουκλεάσης που δεσμεύουν ιόντα μαγνησίου. Μέλη της ομάδας αυτής περιλαμβάνουν τις οικογένειες της Pop2 (γνωστή και ως Caf1), της πολυ(A) εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN), την Caf1Z, και την Pan2. Τα ένζυμα της ομάδας EEP περιλαμβάνουν την Ccr4, την Nocturinin, την ANGEL και 2' phosphodiesterase (2' PDE) και έχουν συντηρημένα κατάλοιπα Asp και His στην περιοχή με δράση νουκλεάσης. Είναι πιθανό να υπάρχουν και άλλες νουκλεάσες εκτός των υπέρ-οικογενειών DEDD και EEP ωστόσο δεν έχει ταυτοποιηθεί καμία ακόμη [18].

1.3.1 Σύμπλοκα αποαδενυλασών

Οι αποαδενυλάσες συνήθως σχηματίζουν σύμπλοκα. Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα σύμπλοκα αυτά μπορεί να επηρεάζουν την δραστηριότητα των αποαδενυλασών. Για παράδειγμα, η αποαδενυλάση Pan2 προσδένεται στην Pan3 η οποία με την σειρά της αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη PABP 4. Η PABP ρυθμίζει την δράση του συμπλόκου Pan2-Pan3 προσελκύοντας το στην πολυ(A) ουρά. Κάποιες πολυαδενυλάσες σχηματίζουν ομο- ή ετερο-διμερή (Εικόνα 7). Σε κάποιες περιπτώσεις ο ομοδιμερισμός είναι απαραίτητος για την ενεργότητα της [19]. Η Ccr4 και η Pop2 σχηματίζουν ετεροδιμερή στο *S. Cerevisiae* [20]. Επίσης ο ετεροδιμερισμός επεκτείνει το ρεπερτόριο των αποαδενυλασών στα θηλαστικά. Επτά διακριτά σύμπλοκα μεταξύ των αποαδενυλασών έχουν καταγραφεί [21,22]. Διάφορα ετεροδιμερή μπορεί να έχουν διαφορετική ενζυμική ή ρυθμιστική ικανότητα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η CNOT8 η οποία είναι μέλος της Pop2 οικογένειας και έχει την ικανότητα να προσδένεται στην PUF ρυθμιστική πρωτεΐνη περισσότερο από ότι προσδένεται η CNOT7, ένα άλλο μέλος της Pop2 οικογένειας[23]. Ανώτερα σύμπλοκα όσον αφορά το επίπεδο οργάνωσης προσθέτουν επιπλέον λειτουργίες και ρυθμιστική δυνατότητα. Υπάρχουν ειδικά ετεροδιμερή αποτελούμενα από την Ccr4 και την Pop2 πρωτεΐνη σε διάφορα είδη, συνδέονται με πρωτεΐνες Not για να σχηματίσουν μεγάλα συμπλέγματα πολλαπλών υπομονάδων [20,21]. Το σύμπλοκο Ccr4-Pop2-NOT εμφανίζεται σε διαφορετικές μορφές με μοριακά βάρη να κυμαίνονται από 0,65 έως 2 MDa [20]. Οι πρωτεΐνες Not μπορούν να δρουν ως συνδέτες: η NOT4 της *D. Melanogaster* συνδέει το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης σε μία 3'UTR ρυθμιστική πρωτεΐνη. Μεταξύ ετεροδιμερών και υψηλού επιπέδου πολυπλοκότητας συμπλόκων στα οποία μπορούν να προσδένονται διαφορετικά, το ρεπερτόριο των αποαδενυλασών και του βιολογικού τους ρόλου είναι αρκετά εκτενές.

Πίνακας 3. Κατάταξη των αποαδενυλασών στις δύο μεγάλες υπεροικογένειες και εντοπισμός τους σε αντιπροσωπευτικά είδη οργανισμών.

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

Εικόνα 6.ΒάσειGoldstrohm and Wickens, 2008. SC: *S.cerevisiae*, CE: *C. elegans*, DM: *D.melanogaster*, XL: *X.laavis*, MM: *M. musculus*, HS: *H.sapiens*

1.4 Η πολυ(Α)-εξειδικευμένηριβονουκλεάση [poly(A) specificribonouclease, PARN]

Η PARN είναι η μόνη αποαδενυλάση που επιδρά άμεσα κατα την διάρκεια της υδρόλυσης της πολυ(Α) ουράς και με την δομή της 5'-καλύπτρας και με τη πολυ(Α) ουρά του mRNA (Dehlinetal. 2000,Gaoetal.2000,Martinezetal. 2000,2001). Η ιδιότητα αυτή αναδεικνύει το κάλυμμα ως ένα ρυθμιστή της σταθερότητας των ευκαριωτικών κυττάρων mRNAs.

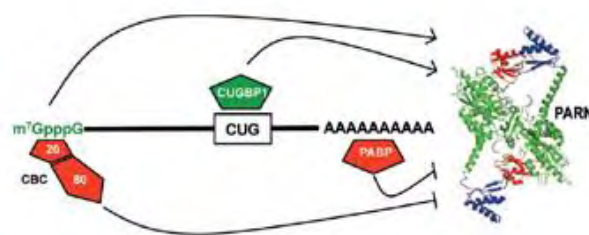
Η PARN απαρτίζεται απο 639 αμινοξέα, με προβλεπόμενο μοριακό βάρος 73,5 kDa (Korneretal. 1998, Martinezetal.2000). Ανήκει στην υπεροικογένεια DnaQ-like των 3'-5' εξωριβονουκλεασών (Korneretal. 1998, Mian 1997, Moseretal,1997), οι οποίες μοιράζονται έναν συντηρημένο καταλυτικό πυρήνα, που περιέχει το μοτίβο DEDD (πίνακας 1) αποτελούμενο απο τα τέσσερα καταλυτικά αμινοξέα Asp, Glu, Asp, και Asp (DEDD) (Marchler-Baueretal. 2011, ZuoandDeatscher 2001), ενώ και η ιστιδίνη 377 συμπεριλαμβάνεται στα παραπάνω και έτσι η PARN ανήκει στην υποκατηγορία DEDDh (Wueta., 2005). Η αμινοτελική περιοχή της φαίνεται να είναι η πιο συντηρημένη ανάμεσα στα ομόλογα της PARN στους οργανισμούς σε αντίθεση με την καρβοξυτελική. Η PARN έχει ενεργότητα εξαρτώμενη απο δισθενή ιόντα Mg, απαιτεί ως

[14]

υπόστρωμα μονόκλωνο RNA, με ελεύθερη ομάδα υδροξυλίου(-OH) στο 3'-άκρο του (KornerandWahle 1997). Όσον αφορά στον υποκυττάριο εντοπισμό της PARN, μελέτες έχουν δείξει πως η PARN μπορεί να βρίσκεται μέσα στον πυρήνα, αλλά μετακινείται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (Yamashitaetal. 2005, Uhlenetal.2010). Μάλιστα φαίνεται πως στον *Xenopuslaevis*, η PARN πλήρους μήκους απαντά σχεδόν αποκλειστικά στον πυρήνα, ενώ μια βραχύτερη μορφή του ενζύμου, προϊόν πρωτεολυτικής δράσης, απαντά στο κυτταρόπλασμα (CopleandandWormington, 2001).

Μελέτες έχουν δείξει δύο επιπλέον εμφανή βιοχημικά χαρακτηριστικά της PARN: την επεξεργαστικότητα στον τρόπο δράσης της και την επίδραση στην ενεργότητα αποαδενύλασηςαπο την 5'-m⁷G-καλύπτρα (Dehlinetal. 2000, Gaoetal.2000,Martinezetal 2000,2001). Η επεξεργασία αναφέρεται, στην ενεργότητα ενζύμων που πραγματοποιεί συνεχώς την ίδια αντίδραση χωρίς το ένζυμο να αποσπάται απο το σύμπλοκο με το υπόστρωμά του, σε κάθε κύκλο κατάλυσης (NossalandSinger 1968).

Η PARN συμμετέχει σε αρκετούς κυτταρικούς μηχανισμούς και αποκρίσεις, όπως για παράδειγμα στη απόκριση στο στρές (Cevheretal. 2010, Reinhardtetal. 2010), στην αποικοδόμηση των πολλαπλά ματισμένων HIV-1 mRNAs κατά την μόλυνση από HIV-1(Zhuetal.2011).Επίσης μπορεί να θεωρηθεί ως ένας πιθανός δείκτης της καρκινικής ανάπτυξης (Maragozidisetal. 2012). Εκτός από την 5'-m⁷G-καλύπτρα και την πολυ(A) ουρά, η ρύθμιση της αποαδενύλασης φαίνεται να πραγματοποιείται και από άλλα *cis*- δραστικά στοιχεία όπως είναι τα: AU και GU, τα οποία είναι γνωστά ως AU-richelements, ή AREs (Balatsosetal,2012, Garneauetal. 2007, Goldstrohm&Wickens,2008,Parker&Song,2004, Zhanetal.2010).



Εικόνα 7. Ρύθμιση της αποαδενύλασης μέσω από RNA-συνδεόμενων πρωτεϊνών (Virtanenetal.2013).

Στα παραπάνω στοιχεία, προσδένονται διάφορες RNA-συνδεόμενες πρωτεΐνες, που ενισχύουν ή αναστέλλουν την δράση της αποαδενύλασης. Στο κυτταρόπλασμα, η πρωτεΐνηCBC (αναστολέας της PARN), αντικαθίστανται στο mRNA, από τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E

(Marcotrigianoetal. 1997), ο οποίος αποτελεί τμήμα του eIF4E συμπλόκου, κεντρικής σημασίας για την πιο αποτελεσματική έναρξη της μετάφρασης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης PABP στην πολυ(A) ουρά, επίσης αναστέλλει την ενεργότητα της αποαδενυλάσης. Συνεπώς σχηματίζεται ένα σύμπλοκο PABP -πολυ(A) ουράς, το οποίο και παρεμβαίνει στην αλληλεπίδραση των αποαδενυλασών με το υπόστρωμα πολυ(A) (Bernsteinetal. 1989, CopelandandWormington 2001, Fordetal. 1999, FordandWilusz, 1999, Kim&Richter, 2007, Wormingtonetal. 1996).

1.4.1 Δομή της PARN και ο ρόλος της αργινίνης 99 (R99) και της γλουταμίνης 109 (Q109).

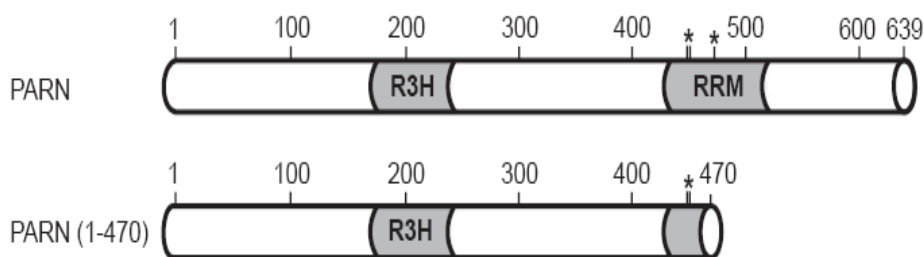
Στην δομή της PARN, ο καταλυτικός πυρήνας της σχηματίζει μια αρνητικά φορτισμένη κοιλότητα, που εντοπίζεται σε μια περιοχή, που ονομάζεται επικράτεια νουκλεάσης (Korneretal. 1998, Renetal. 2002 a,b, Wuetal. 2005).



Εικόνα 8. Τρισδιάστατη διμερή δομή της ανθρώπινης αποαδενυλάσης PARN (http://www.rcsb.org/pdb/images/2A1S_asym_r_500.jpg).

Παράλληλα με την περιοχή της νουκλεάσης, δύο ακόμη νουκλεάσες με RNA, RRM (CopelandandWormington 2001, Moneckeetal. 2008, Nagataetal. 2008, Nilssonetal. 2007, Wuetal.

2009) και το μοτίβο αναγνώρισης RNA, που αναφέρεται ως περιοχή ή επικράτεια R3H(Wuetal. 2005). HRRM περιοχή είναι απαραίτητη για την πρόσδεση της 5'-m7G-καλύπτρας(Nilssonetal.2007), ενώ η R3H για την σύνδεση της PARN στην πολυ(Α)ουρά (Wuetal. 2005). Επίσης η RRM περιοχή σταθεροποιεί την συνολική τρισδιάστατη δομή της PARN (Zhangetal.2007).



Εικόνα 9. Οι δύο ισομορφές της ανθρώπινης PARN. Σημειώνονται οι RRM και R3H περιοχές. Με αστερίσκο δηλώνονται σημαντικά αμινοξέα που συμμετέχουν στην πρόσδεση του καλύμματος.

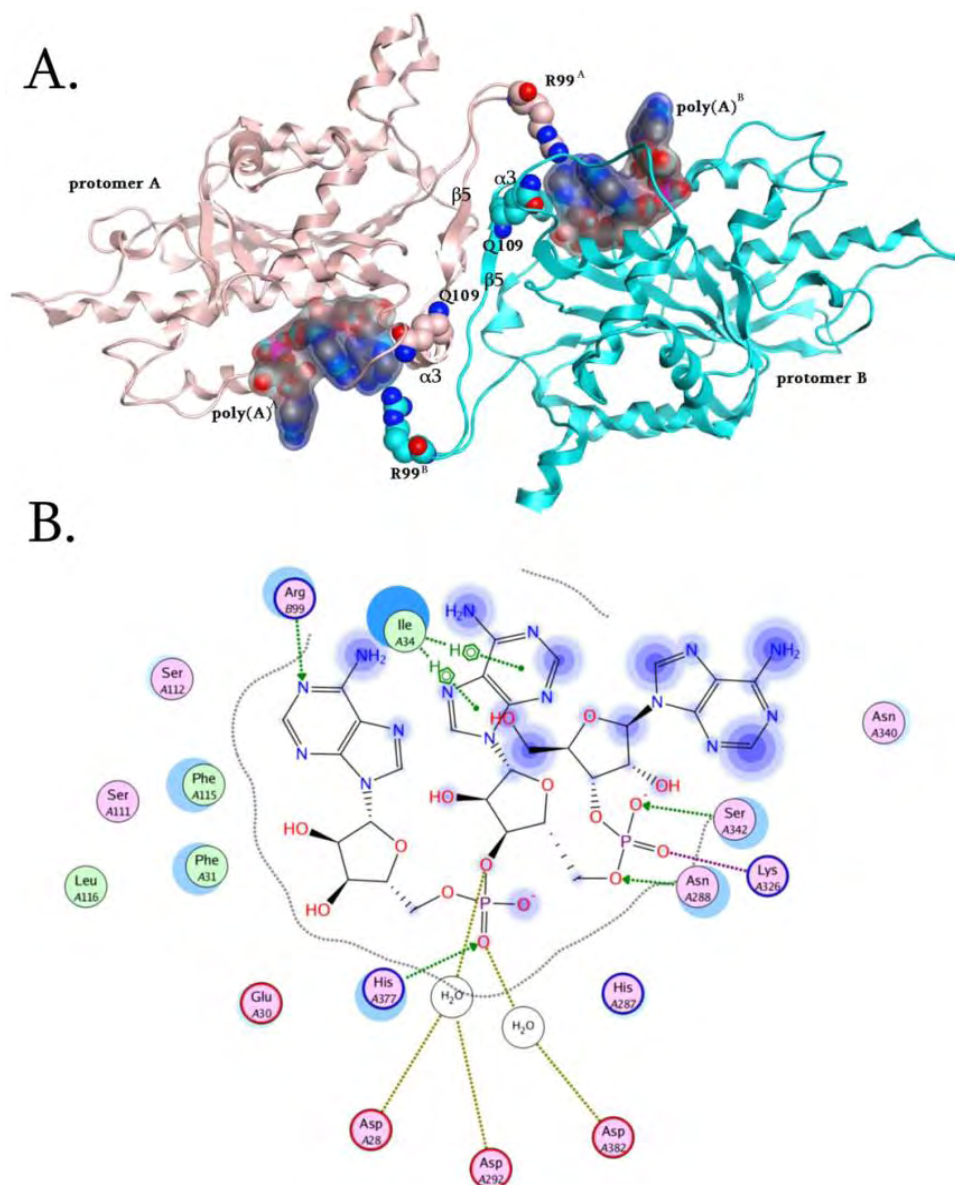
Η αποαδενυλάση σχηματίζει εναομοδιμερέςπολυ καλά συνδεδεμένο ,του οποίου οι υπομονάδες συγκρατούνται μεταξύ τους με έναν δισουλφιδικό δεσμό (...S—S) που ενώνει τις δυο περιοχές νουκλεάσης της PARN (Martinezetal.2000, Wuetal. 2005,2209, Niedzwieckaetal.2011). Αυτός ακριβώς ο διμερισμόςείναι απόλυτα ζωτικής σημασίας για την καταλυτική ικανότητα της PARN (Wuetal. 2005). Το τμήμα του mRNA που αποτελεί την 5'-m7G-καλύπτρα, θεωρείται ένας αλλοστερικός ρυθμιστής της ενεργότητας της αποαδενυλάσηςγιατι: 1) η 5'-m7G-καλύπτρα επηρεάζει τον ρυθμό αποικοδόμησης της πολυ(Α) ουράς από την αποαδενυλάση (Dehlinetal. 2000, Gaoetal.2000, Martinezetal.2000,2001), μέσω της ενίσχυσης της επεξεργασίας του ενζύμου (Martinezetal.2001), 2) και φυσικά λόγω της θέσης πρόσδεσης της 5'-m7G-καλύπτρας (Wuetal. 2009), που βρίσκεται στο καταλυτικό κέντρο της αποαδενυλάσης.

Εκτενής φυλογενετική ανάλυση, βασισμένη στο σύνολο των διαθέσιμων γονιδιωμάτων, έδειξε μια ευρεία κατανομή για την PARN στα ευκαρυωτικά είδη, και αποκάλυψε δομικά σημαντικά αμινοξέα, τα οποία δυνητικά θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στη ρύθμιση του καταλυτικού μηχανισμού της PARN [50]. Συνολικά εντοπίστηκαν 32 ομόλογες πρωτεϊνικές αλληλουχίες της PARN στα γονιδιώματα των ειδών, οι οποίες αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ταξινομικές ευκαρυωτικές ομάδες (σύμφωνα με την ταξινομική βάση δεδομένων του NCBI).

Ομόλογα της PARN δεν βρέθηκαν στο αρθρόποδο *Drosophilamelanogaster* και στο μύκητα *S.Cerevisiae*, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Εναλλακτικά μεταβολικά μονοπάτια μπορεί να υπάρχουν σε αυτούς του δύο οργανισμούς για την αποικοδόμηση του πολυ(A). Παρόλα αυτά, οι θεωρούμενες ομόλογες αλληλουχίες της PARN ανιχνεύονται σε άλλα αρθρόποδα και μύκητες. Περαιτέρω, πρωτεϊνικά μοτίβα αντλούνται από πολλαπλές συστοιχίσεις των αμινοξικών αλληλουχιών της PARN. Εκτός από το συντηρημένο καταλυτικό μοτίβο (Asp29, Glu30, Asp292 και Asp382), ένα δεύτερο μοτίβο που περιέχει τα αμετάβλητα κατάλοιπα R99 και Q109 ανιχνεύθηκε μόνο στα μεταζώα. Μετά από προσεκτική εξέταση της πρωτοταγούς αλληλουχίας αμινοξέων των άλλων ειδών εκτός των μεταζώων, βρέθηκε ότι στη γειτονική περιοχή της R99, είτε υπάρχουν κατάλοιπα Arg ή η Arg έχει αντικατασταθεί από την επίσης πολική Lys.

Με βάση τη φυλογενετική ανάλυση, η έρευνα επικεντρώθηκε στους πιθανούς ρόλους των αμετάβλητων καταλοίπων R99 και Q109, εκτός των άλλων. Δομική υπέρθεση των δύο μονομερών της PARN και των δύο αντίστοιχων ολιγονουκλεοτιδίων πολυ(A) αποκάλυψε μικρές αποκλίσεις (maxCa RMSD <2Å). Η δομική ανάλυση *in silico* έδειξε ότι η R99 του μονομερούς Ala (R99A) υποστηρίζεται από το συμπληρωματικό μονομερές με συμμετρικό τρόπο κατά τη διάρκεια της κατάλυσης. Συγκεκριμένα, η R99^A εκτείνεται μέσα στο ενεργό κέντρο της αλυσίδας B, όπως και η R99^B στο ενεργό κέντρο της αλυσίδας A. Αυτά τα κατάλοιπα Arg σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τη βάση αδενίνης του τελευταίου 3' νουκλεοτιδίου της πολυ(A) αλυσίδας. Ο δεσμός υδρογόνου επιτυγχάνεται με τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ της ομάδας -NH₂ (δότης) της Arg και την ομάδα -N= (δέκτης) του δακτυλίου της αδενίνης (Εικόνα 10A). Η ουσιαστική συμβολή της R99 επιβεβαιώνεται επίσης από μελέτες μετάλλαξης στην α3 έλικα της PARN, η οποία σχηματίζει έναν ευέλικτο βρόχο, ο οποίος υποστηρίζει τον βρόχο που βρίσκεται η Arg του άλλου μονομερούς ώστε να βρίσκεται στην εγγύτητα της καταλυτικής περιοχής. Η βέλτιστη καταλυτική τοποθέτηση του σχιζόμενου δεσμού κατευθύνεται από την His377, η οποία σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο της ομάδας -P=O του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Κατά συνέπεια, δεδομένου ότι η His377 και η R99 σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το πρώτο νουκλεοσίδιο από διαφορετικές κατευθύνσεις, παίζουν σημαντικό ρόλο στην τρισδιάστατη του σταθεροποίηση και τοποθέτηση στο ενεργό κέντρο της PARN (Εικόνα 10B). Συμπερασματικά, η R99 μπορεί να αντιπροσωπεύει ακόμα ένα σημαντικό κατάλοιπο καθώς συνδέει τα δύο μονομερή, συμβάλλει στη συνολική σταθερότητα και κατευθύνει το υπόστρωμα σε μια βέλτιστη θέση για την αντίδραση διάσπασης [50]. Από την άλλη η Q109 βρίσκεται στις δύο αντιπαράλληλες έλικες β5 της ομοδιμερούς περιοχής επαφής. Δημιουργήθηκαν *in silico* μεταλλάξεις τόσο Q109A αλλά και Q109Trp για την κατανόηση του ρόλου της. Η πρώτη μετάλλαξη αποκάλυψε μια σημαντική απώλεια στο πακετάρισμα και στη σύνδεση των δύο σκελών β5 (4 φορές ενεργειακή απώλεια) ενώ το Q109Trp συνεχώς αποτυγχάνει

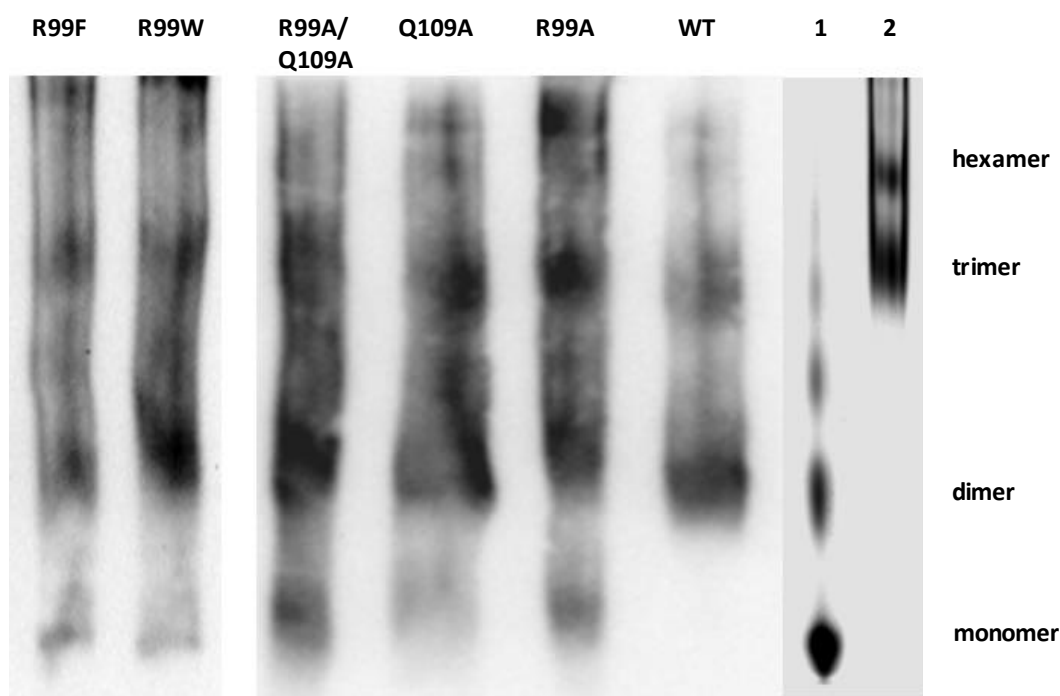
της δημιουργίας του λόγω του ογκώδους υπολείμματος και δεν μπορεί να φιλοξενηθεί στην περιοχή διεπαφής ομοδιμερισμού της pARN (Εικόνα 10 Α). Είναι επίσης προφανές πως το Q109 καθορίζει το σχήμα του καταλυτικού θύλακα που είναι διαθέσιμη για να φιλοξενήσει το υπόστρωμα πολυ(Α).



Εικόνα 10. Θέση της Αργινίνης 99 και Γλουταμίνης 109 στην PARN και πως την επηρεάζει [50].

Οι προηγούμενες παρατηρήσεις του εργαστηρίου οδήγησαν να εξεταστεί αν τα αμινοξέα αυτά επηρεάζουν τη δομή του ενζύμου. Για το σκοπό αυτό εξατάστηκε η κατατομή των [19]

μεταλλαγμάτων χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έδειξαν πως επηρεάζεται ο ολιγομερισμός της πρωτεΐνης· η μονομερής μορφή της πρωτεΐνης παρατηρείται σε όλες τις μεταλλαγμένες μορφές, ενώ δεν ήταν εμφανής στην αγρίου τύπου. Μορφές με αριθμό υπομονάδων μεγαλύτερο του 2 παρατηρούνται τόσο στις μεταλλαγμένες όσο και την αγρίου τύπου μορφές. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν πως η R99 και η Q109 επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία της PARN, με την πρώτη να έχει επηρεάζει πιο έντονα τη συμπεριφορά του ενζύμου (Laschouetal.inpreparation)



Εικόνα 11. Επίδραση των μεταλλάξεων στον ολιγομερισμό της PARN. Ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες των PARN και των μεταλλαγμάτων PARNR99A (R99A), PARNQ109A (Q109A), PARNR99A/Q109A (R99A/Q109A), PARNR99F (R99F) και PARNR99W (R99W). 1: Albumin bovine serum (monomer–dimer), 2: Urease (trimer–hexamer).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως αναφέρθηκε, η PARN έχει κύριο ρόλο στην αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs και είναι γνωστό πως κατανέμεται τόσο στον πυρήνα, όσο και στο κυτταρόπλασμα. Σκοπός της εργασίας είναι να εξετάσει την επίδραση δύο κρίσιμων αμινοξέων στην υποκυττάρια κατανομή του ενζύμου. Έτσι, στην εργασία έγινε κλωνοποίηση της φυσικής μορφής της PARN (wild-type PARN) στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C2 και κατόπιν δημιουργήθηκε ένα μετάλλαγμα της PARN που φέρει διπλή μετάλλαξη δύο σημαντικών αμινοξέων της (R99 και Q109). Ακολούθησε ο έλεγχος της υποκυτταρικής της εντόπισης μετά από διαμόλυνση καρκινικών κυττάρων NCI-H520 και σύγκριση με την κατανομή της φυσικής μορφής της PARN.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Κλωνοποίηση βάσει πρωτοκόλλου του In-fusionHDcloningkit (Clontech):

Για την κλωνοποίηση της DMPARN, στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C2, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του In-fusionHDcloningkit. Το πρωτόκολλο αυτό είναι σχεδιασμένο για γρήγορη και κατευθυνόμενη κλωνοποίηση ενός ή περισσότερων τμημάτων DNA σε έναν φορέα. Η τεχνολογία που χρησιμοποιεί το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ ενός τμήματος DNA και ενός γραμμικοποιημένου φορέα. Η αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού καταλύεται από το «In-fusion ένζυμο», μία ανασυνδυάση που αναγνωρίζει με ακρίβεια και εξειδίκευση κοινά άκρα των 15bp που έχουν ο φορέας και το τμήμα DNA, το οποίο έχει ενισχυθεί με PCR με ειδικούς εκκινητές (για τον σχεδιασμό των ειδικών εκκινητών, βλ. παρ. 4.1.2).

Τα γενικά βήματα που ακολουθούμε για την κλωνοποίηση σύμφωνα με το πρωτόκολλο In-fusionHDcloning, είναι τα εξής (Εικόνα 4-1):

- * Επιλογή του κατάλληλου φορέα κλωνοποίησης και προσδιορισμός της θέσης ένθεσης. Γραμμικοποίηση του φορέα με χρήση κατάλληλου ενζύμου περιορισμού (ενζυμική πέψη του φορέα).

- * Σχεδιασμός ειδικών PCR εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Ο σχεδιασμός γίνεται ούτως ώστε οι εκκινητές να παράγουν μία επιπλέον αλληλουχία των 15bp στα άκρα του γονιδίου-στόχος, η οποία θα είναι ομόλογη με τα άκρα του γραμμικοποιημένου φορέα.

- * Ενίσχυση του τμήματος DNA με PCR χρησιμοποιώντας μία DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας (high-fidelity DNA polymerase). Επαλήθευση ότι το γονίδιο έχει ενισχυθεί ειδικά, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.

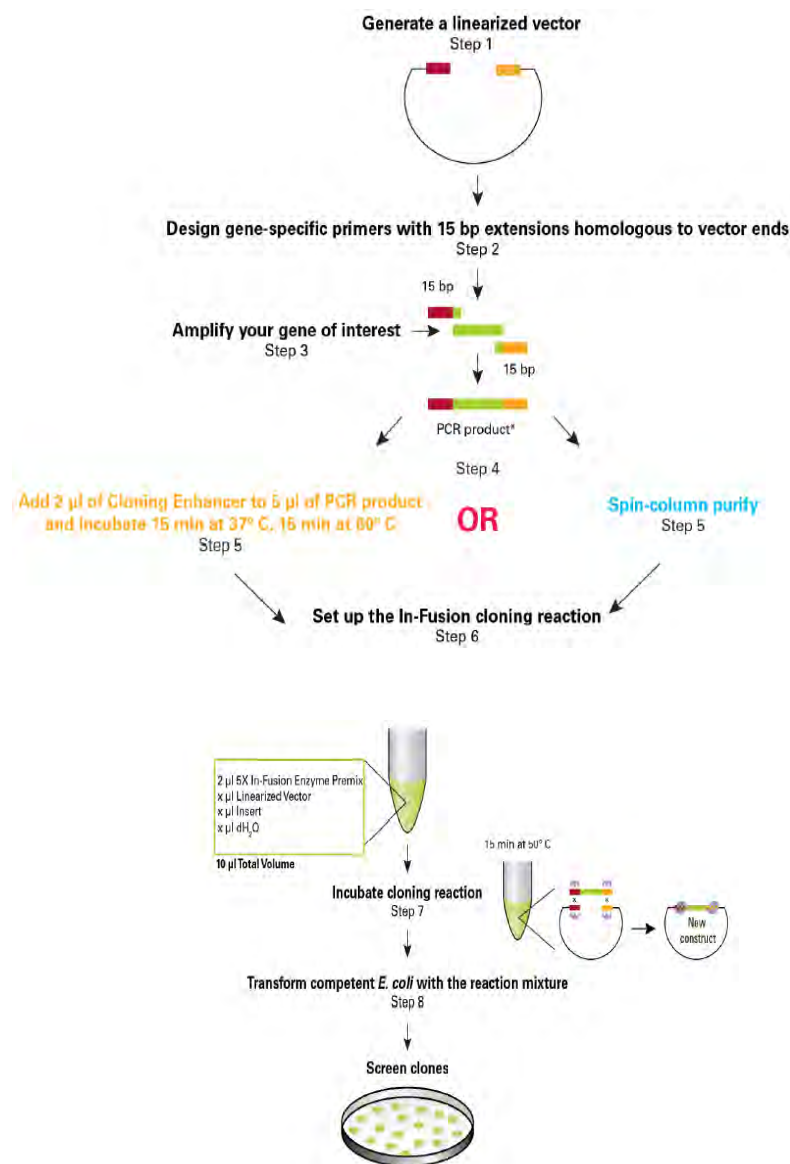
- * Απομόνωση του προϊόντος PCR και του προϊόντος πέψης από την πηκτή αгарόζης (gelextraction).

- * Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ του προϊόντος PCR και του γραμμικού φορέα. Επώση της αντίδρασης για 15min στους 50 °C, και επακόλουθη τοποθέτηση στον πάγο.

- * Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων με την αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού.

- * Επιστροφή τρυβλίων με τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα.

- * Επιλογή των αποικιών που περιέχουν τον κλωνοποιημένο φορέα.

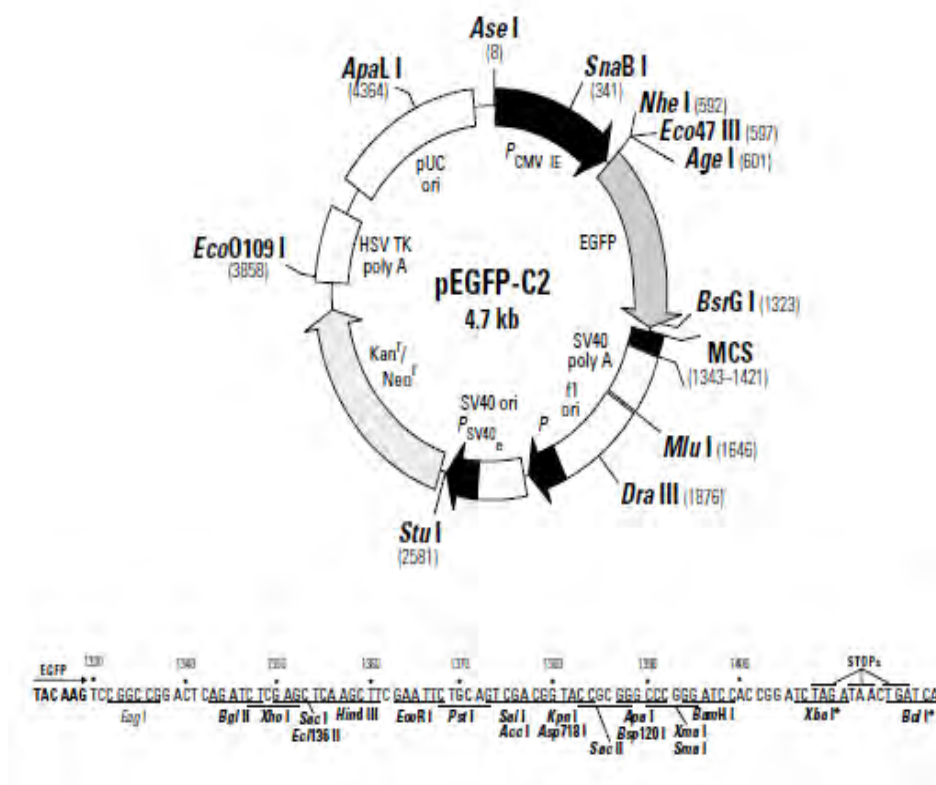


Εικόνα 12. Συνοπτική παρουσίαση του πρωτοκόλλου κλωνοποίησης.

3.2 Επιλογή και ενζυμική πέψη του φορέα κλωνοποίησης

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση της DMPARN, είναι ο pEGFP-C2. Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας των 4,7 Kb κωδικοποιεί μια παραλλαγή της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP), η οποία έχει βελτιστοποιηθεί προκειμένου να έχει εντονότερο φθορισμό και υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών. Ειδικότερα, ο pEGFP-C2 (Εικόνα 2) κωδικοποιεί το GFPmut1 μετάλλαγμα, το οποίο φέρει τη διπλή αμινοξική [23]

αντικατάσταση Phe64>Leu64 και Ser65>Thr65. Η κωδική αλληλουχία του γονιδίου της GFP περιέχει περισσότερες από 190 σιωπηλές μεταβολές βάσεων προκειμένου να ανταποκρίνεται καλύτερα στα ανθρώπινα κωδικόνια. Η περιοχή πολυσυνδέτης ή αλλιώς *multiple cloning site* (MCS) του φορέα βρίσκεται μεταξύ των κωδικών αλληλουχιών της GFP και του σήματος πολυαδενυλίωσης SV40 polyA. Τα γονίδια που κλωνοποιούνται στο MCS του φορέα, εκφράζονται ως καρβοξυτελική συνέχεια (fusion) της GFP με την προϋπόθεση πως δεν υπάρχουν παρεμβαλλόμενα κωδικόνια τερματισμού. Ο pEGFP-C2 φέρει επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη για επιλογή σε καλλιέργειες στελεχών *E. Coli*, καθώς και γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στη νεομυκίνη για επιλογή σε ευκαρυωτικές κυτταρικές καλλιέργειες. Ο εν λόγω πλασμιδιακός φορέας είναι κατάλληλος για πειράματα εντοπισμού της επιθυμητής πρωτεΐνης *in vivo*, με την προϋπόθεση ότι αυτή έχει εισαχθεί επιτυχώς στο καρβοξυτελικό άκρο της GFP.



Εικόνα 13. Οχάρτης και το MCS του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-C2.

Η πέψη του φορέα κλωνοποίησης pEGFP-C2 έγινε με τη χρήση του ενζύμου περιορισμού *EcoRI*, το οποίο αναγνωρίζει μία μοναδική αλληλουχία στην περιοχή πολυσυνδέτη του

[24]

πλασμιδίου. Τα επιμέρους συστατικά και οι όγκοι της αντίδρασης πέψης, ορίστηκαν σύμφωνα με το αντίστοιχο πρωτόκολλο TAKARA για το EcoRI, και φαίνονται στον Πίνακα 4-1. Οι όγκοι ορίστηκαν ώστε το υπόστρωμα DNA να έχει ποσότητα $\leq 1\mu\text{g}$.

10x H Buffer	2 μl
Πλασμιδιακό DNA (pEGFP-C2)	10 μl
ddH ₂ O	7 μl
EcoR	1 μl (15U)
Ντελ.	20 μl

Πίνακας 1. Σύσταση ενζυμικής αντίδρασης πέψης του φορέα pEGFP-C2.

Στη συνέχεια έγινε επώαση της αντίδρασης στους 37 °C για 2 ώρες. Μετά τις 2 ώρες επώασης η αντίδραση περατώθηκε με προσθήκη loadingbuffer (6x), ώστε στον τελικό όγκο να έχουμε loadingbuffer (1x).

3.3 Σχεδιασμός ειδικών PCRεκκινητών

Ο σχεδιασμός ορθών και ποιοτικών εκκινητών είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχία της κλωνοποίησης με το HD-InFusioncloningkit της Clontech. Οι In-FusionPCR εκκινητές πρέπει να σχεδιαστούν με τρόπο τέτοιο ώστε να παράγουν προϊόν ενίσχυσης PCR με άκρα ομόλογα με τα άκρα του επιθυμητού φορέα στη γραμμικοποιημένη του μορφή (μετά από πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες).

Κάθε In-Fusion εκκινητής πρέπει να έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

Το 5' άκρο κάθε εκκινητή θα πρέπει να περιέχει 15 βάσεις ομόλογες με τις 15 βάσεις στο ένα άκρο του κομματιού DNA στο οποίο πρόκειται να εισαχθεί (π.χ. πλασμιδιακός φορέας).

Το 3' άκρο κάθε εκκινητή θα πρέπει να περιέχει αλληλουχία ειδική για το γονίδιο στόχο.

Το 3' τμήμα κάθε εκκινητή θα πρέπει να είναι ειδικό για το γονίδιο στόχο, να έχει GC περιεχόμενο 40-60%, μήκος 18-25 νουκλεοτίδια, T_m 58-65°C (η διαφορά της T_m μεταξύ Fwd και Rev δεν πρέπει να ξεπερνά τους 4°C. Η τιμή της T_m πρέπει να υπολογίζεται βάσει της γονιδιο-

ειδικής αλληλουχίας του εκκινητή.

Θα πρέπει να αποφεύγεται η συμπληρωματικότητα εντός του ίδιου εκκινητή, καθώς και μεταξύ των εκκινητών.

Οι εκκινητές να είναι απομονωμένοι με HPLC ή desalted.

Να έχει ελεγχθεί η ορθότητα και η εξειδίκευσή τους ως προς το γονίδιο-στόχος με BL

Η Clontech παρέχει ένα δωρεάν εύχρηστο εργαλείο στην ιστοσελίδα της, με τη βοήθεια του οποίου μπορεί ο κάθε ενδιαφερόμενος απλά παρέχοντας την αλληλουχία του επιθυμητού γονιδίου, την αλληλουχία του φορέα στον οποίο επιθυμεί να εισάγει γονίδιο καθώς και επιλέγοντας το ένζυμο περιορισμού με το οποίο θα πραγματοποιηθεί η γραμμικοποίηση του φορέα, μπορεί εύκολα και γρήγορα να σχεδιάσει εκκινητές κατάλληλους για χρήση με το HD-InFusioncloningkit.

Με τη βοήθεια του παραπάνω εργαλείου σχεδιάστηκαν οι ακόλουθοι εκκινητές με T_m περίπου 65°C (με κόκκινο επισημαίνεται το τμήμα των εκκινητών που είναι ειδικό για την αλληλουχία του γονιδίου-στόχος), για την κλωνοποίηση του cDNA της DMPARN, στον γραμμικοποιημένο πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C2 έπειτα από πέψη με το ένζυμο περιορισμού EcoRI:

FWD primer : CTC-AAG-CTT-CGA-ATT-ATG-GAG-ATA-ATC-AGG-AGC-AA

REV primer: GTC-GAC-TGC-AGA-ATT-TTA-CCA-TGT-GTC-AGG-AAC-TT

Παρακάτω παρατίθεται ένα αδρό διάγραμμα (διάγραμμα 1) κλωνοποίησης μετά και τον σχεδιασμό των κατάλληλων εκκινητών.

1. PCRProduct.

Fragment1(+) :

CTCAAGCTTCGAATTATGGAGATAATCAGGAGCAA.....AAGTTCCTGACACATGGTAA
AATTCTGCAGTCGAC

Fragment1(-) :

GAGTTCGAAGCTTAATACCTCTATTAGTCCTCGTT.....TTCAAGGACTGTGTACCATTTT
AAGACGTCAGCTG

2. Linearized vector

EcoR I

EcoR I

Vector(+) :GCCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCG
AATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATC....

[26]

Vector(-) :CGGCCTGAGTCTAGAGCTCGAGTTCGAAGCTTAA
GACGTCAGCTGCCATGGCGCCCGGGCCCTAG....

3. Annealing

Fragment1(+) :

5'CTCAAGCTTCGAATTATGGAGATAATCAGGAGCAA....AAGTTCCTGACACATGGTAAA
ATTCTGCAGTCGAC -3'

Fragment1(-) :

3'GAGTTCGAAGCTTAATACCTCTATTAGTCCTCGTT....TTCAAGGACTGTGTACCATTTT
AAGACGTCAGCTG -5'

Vector(+) :GCCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCG -3'

5'-AATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATC....

Vector(-):....CGGCCTGAGTCTAGAGCTCGAGTTCGAAGCTTAA-5'

3'- GACGTCAGCTGCCATGGCGCCCGGGCCCTAG....

Διάγραμμα 1. Κλωνοποίηση της DMPARN στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C2.

3.4 Ενίσχυση του γονιδίου ενδιαφέροντος με απλή PCR

Το cDNA της wtDMPARN ενισχύθηκε με απλή PCR, με τη χρήση του KAPAHiFiHotStartReadyMixPCRKit, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το πλασμιδιακό DNApET33b-wtPARN, τους ειδικούς εκκινητές και DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας. Η εν λόγω DNA πολυμεράση φέρει ένα αντίσωμα το οποίο αποδεσμεύεται από το ένζυμο όταν υποβληθεί απότομα σε υψηλή θερμοκρασία (hotstart), με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η δράση του ενζύμου πριν ξεκινήσει η αντίδραση PCR, και ως εκ τούτου τη δημιουργία μη ειδικών προϊόντων.

Τα επιμέρους συστατικά και οι όγκοι της αντίδρασης PCR φαίνονται στον παρακάτω πίνακα

2X KAPA HiFiHotStart Ready Mix	25μl
ΕκκινητήςFwd 10μM	1,5μl

Εκκινητής Rev 10μM	1,5μl
Πλασμιδιακό DNA (pet33b-wtPARN)	1μl
ddH ₂ O	21μl
Βτελ	50μL

Πίνακας 2: Σύσταση αντίδρασης PCR για την ενίσχυση της DMPARN.

Το θερμικό προφίλ της αντίδρασης PCR ήταν το ακόλουθο:

Αρχική αποδιάταξη:	95°C	3min	} 35 κύκλοι
Αποδιάταξη:	98°C	20sec	
Υβριδοποίηση:	65°C	15sec	
Επέκταση:	72°C	2min	
Τελική επέκταση:	72°C	10min	
Αποθήκευση:	4°C		

Μια παρατήρηση που πρέπει να ληφθεί υπόψιν είναι η εξής: Ο χρόνος επέκτασης, του πολυμερισμού δηλαδή του νεοσυντιθέμενου κλώνου DNA, εξαρτάται από το μήκος του τμήματος που ενισχύεται. Γενικά ισχύει ότι για κάθε 1kbDNA που ενισχύεται, ο χρόνος επέκτασης ισούται με $\approx 1\text{min}$.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%

Η επιβεβαίωση των ειδικών προϊόντων της PCR και της πέψης, έγινε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 1%. Το ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση των νουκλεϊκών οξέων που χρησιμοποιήθηκε είναι το TAE 1x (διάλυση 1gr αгарόζης σε 100mlTAE 1x), ενώ έγινε εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στα 60V και παρακολούθηση του μετώπου των χρωστικών που ενυπάρχουν στο loadingbuffer.

Υλικά:

TAE 50x:Tris base 24,2% v/w, ακετοξικόξύ 5,71% w/w, EDTA 0,05M, pH 8,6

Loading buffer 6x:Bromophenol Blue 0,09%, Xylene Cyanol 0,09%, Γλυκερόλη 60%, EDTA 60mM

Αγαρόζη (Sigma)

DNA μοριακόζυμάρι 1Kb (Fermentas)

Midori Green DNA stain (Nippon Genetics)

Bromophenolblue (Research Organics)

Xylene Cyanol (Merck)

Γλυκερόλη(Panreac)

EDTA (Merck)

Tris (Merck)

Ακετοξικόξύ (Merck)

Καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης (gelextraction)

Η απομόνωση και ο καθαρισμός του προϊόντος της PCR και του προϊόντος της πέψης από την πηκτή αγαρόζης (DNA extraction from agarose gels) έγινε με βάση το πρωτόκολλο Invitrogen PureLink Quick Gel Extraction.

1) Εξαγωγή του τμήματος DNA- Διάλυση της πηκτής:

Αρχικά εξάγεται από την πηκτή αγαρόζης η ζώνη με το τμήμα του DNA που επιθυμούμε να απομονώσουμε με την βοήθεια ενός αποστειρωμένου ξυραφιού. Η εξαγωγή πραγματοποιείται με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί όσο το δυνατόν ο περιττός όγκος της πηκτής. Το κομμάτι αυτό διαλύεται σε buffer GS1 σε αναλογία 30μl buffer για κάθε 10mg πηκτής αγαρόζης (για πηκτή αγαρόζης μέχρι και 2%). Η διάλυση επιτυγχάνεται με θέρμανση της πηκτής στους 50°C για 15 λεπτά με ανάδευση κάθε 3 λεπτά. Αφού λιώσει η πηκτή, αφήνω στους 50°C για 5 λεπτά ακόμη. Παράλληλα προθερμαίνω το TEbuffer στους 65-70°C.

2) Δέσμευση του DNA- Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης

Το δείγμα φορτώνεται σε στήλη, η οποία τοποθετείται σε ένα συλλεκτικό σωλήνα (collecting tube) των 2ml. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 12000 x g, απομακρύνεται το έκλουσμα και επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα. Ακολούθως, προστίθενται

ακόμη 500μl GS1 buffer, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12000 x g και απομακρύνεται το έκλουσμα. Η στήλη επανατοποθετείται στο συλλεκτικό σωλήνα. Στη συνέχεια, προστίθενται 700μl buffer W9 (περιέχει αιθανόλη) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12000 x g, απομακρύνεται το έκλουσμα και επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα.

3) Ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης- Έκλουση του DNA

Τα δείγμα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 12000 x g με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση του οποιουδήποτε buffer. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο γιατί έτσι επιτυγχάνεται η απομάκρυνση της αιθανόλης που περιέχει το buffer W9, η οποία είναι πιθανόν να αναστείλει ακόλουθες αντιδράσεις. Ακολούθως, η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωλήνα (RecoveryTube) και προστίθενται 50μl του TEbuffer που είχε προθερμανθεί. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό με σκοπό την αύξηση της απόδοσης της έκλουσης του DNA. Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 12000 x g. Το εκλούόμενο DNA φυλάσσεται στους -20oC.

3.5 Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού

Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο, η διαδικασία κλωνοποίησης, αντί της «αντίδρασης λιγάσης», βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ του προϊόντος PCR και του γραμμικοποιημένου φορέα. Η αντίδραση καταλύεται από μία ανασυνδυάση που αναγνωρίζει με ακρίβεια και εξειδίκευση τα κοινά άκρα των 15bp που έχουν ο φορέας και το γονίδιο ενδιαφέροντος το οποίο έχει ενισχυθεί με PCR με ειδικούς εκκινητές. Η αναλογία της ποσότητας του ενθέματος προς αυτή του φορέα κλωνοποίησης, προκειμένου η απόδοση του ομόλογου ανασυνδυασμού να είναι υψηλή, ορίστηκε ως 3 προς 1 αντίστοιχα (wtPARNDNA: pEGFP-C2 DNA 3:1) σύμφωνα με το In-fusionHDcloningkit. Τα επιμέρους συστατικά και οι όγκοι της αντίδρασης ομόλογου ανασυνδυασμού φαίνονται στον Πίνακα 3:

pEGFP-C2 →	1,25μl
------------	--------

wtDMPARN(100ng)	6,75μl
5x In-fusion HD Enzyme (35ng)	2μl
ddH ₂ O	-
Υτελ	10 μl

Πίνακας 3: Σύσταση αντίδρασης ομόλογου ανασυνδυασμού.

Στη συνέχεια έγινε επώαση της αντίδρασης στους 50 οC για 30min. Μετά τα 30min επώασης, η αντίδραση περατώθηκε με αποθήκευση στον πάγο (4 οC).

3.6 Χημικός μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων XL1Blue (transformation).

- 1) Ξεπάγωμα 100 μl επιδεκτικών κυττάρων στον πάγο.
- 2) Προσθήκη 0,1-50 ngDNA(στην προκειμένη περίπτωση το προϊόν του ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ wtPARNκαι pEGFP-C2) στο νιάμε τα ξεπαγωμένα επιδεκτικά κύτταρα.
- 3) Μετά από ήπια ανάδευση πραγματοποιείται επώαση στον πάγο για 30min.
- 4) Θερμικό σοκ (heatshock)στους 420C για 45 δευτερόλεπτα (sec). Ηδιάρκεια αυτού του βήματος είναι μείζονος σημασίας για την επιτυχία του μετασχηματισμού.
- 5) Επώαση των κυττάρων στον πάγο για 1-2 λεπτά (min) και εν συνεχεία προσθήκη900μl προθερμανσμένου (στους 420C) θρεπτικού υλικού SOC.
- 6) Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 37 0C υπό ανάδευση (160-225 rpm).
- 7) Τέλος, επιστρώνονται 100μl της μετασχηματισμένωνκυττάρων σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο LB agar το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής (στην περίπτωση των XL1Blueεπιδεκτικών κυττάρων προσθέτουμε τετρακυκλίνη).
- 8) Τέλος, πραγματοποιείται επώαση του τρυβλίου στους 37 0C για 12-14 ώρες. Την επομένη, εφόσον υπάρχουν διακριτές αποικίες, ενοφθαλμίζουμε λίγες εξ αυτών σε 5mlLBBroth

περιέχοντα τετρακυκλίνη σε συγκέντρωση 100 µg/mL. Οι υγρές αυτές καλλιέργειες επωάζονται Ο/Ν στους 37 °C, 210 rpm. Την επομένη, δημιουργούμε stock γλυκερόλης (700µl κυττάρων + 300 µl αποστειρωμένη 50% γλυκερόλη) από τις συγκεκριμένες καλλιέργειες, τα οποία και φυλάσσονται στους -80 °C. Όλα τα βήματα της διαδικασίας μετασχηματισμού εκτελούνται υπό φλόγα.

Παρασκευή SOBmedium (αρχικό):

Tryptone	20gr
Yeast extract	5gr
NaCl	0,5g
ddH ₂ O	έως 980 ml
Vτελ	980ml

Αφού παρασκευαστεί το παραπάνω διάλυμα, αποστειρώνεται και στη συνέχεια γίνεται προσθήκη των παρακάτω συστατικών:

Παρασκευή SOBmedium (τελικό διάλυμα):

Διάλυμα SOB (αρχικό)	980ml
MgCl ₂ (1M)	10ml
MgSO ₄ (1M)	10ml
Vτελ	1Lt

Το τελικό αυτό διάλυμα SOB αποθηκεύεται μέχρι χρήσης στους -20 °C. Η παρασκευή του διαλύματος SOC γίνεται με προσθήκη στο διάλυμα SOB των παρακάτω συστατικών:

Παρασκευή SOCmedium:

Διάλυμα SOB	990ml
Glucose (2M)	10ml
Vτελ	1Lt

Επίστρωση τρυβλίων με τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα και επιλογή των αποικιών που περιέχουν τον κλωνοποιημένο φορέα.

Αφού πραγματοποιήθηκε ο μετασχηματισμός, έγινε επίστρωση τρυβλίων (LB άγαρ, με

προσθήκη καναμυκίνης σε Cτελ=30 µg/ml) με 50µl και 150µl μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων αντίστοιχα, υπό φλόγα, και επώασή τους στους 37 °C για περίπου 12-16h. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, έγινε δημιουργία μικρών, υγρών βακτηριακών καλλιέργειών με ενοφθασισμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία, σε LB broth (καναμυκίνη 30 µg/ml) και επώασή τους στους 37 °C, υπό ανάδευση στις 210 rpm, O/N.

Προκειμένου να επαληθεύσουμε ότι τα βακτηριακά κύτταρα μετασχηματίστηκαν με τον κλωνοποιημένο φορέα pEGFP-C2wtDMPARN και όχι με άδειο πλασμίδιο pEGFP-C2, το οποίο προκύπτει με επανακυκλοποίησή του, έγινε πέψη του πλασμιδιακού DNA μετά την ανάκτησή του με απομόνωση μικρής κλίμακας. Στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης σε πηκτή αгарόζης 1% και επιλογή των αντίστοιχων δειγμάτων που περιείχαν τον κλωνοποιημένο φορέα για αποστολή για αλληλούχιση.

3.7 Παρασκευή επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων (competent cells).

Για τη δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος CaCl₂.

Αρχικά σε 3 ml θρεπτικού υλικού LB Broth ενοφθαλμίζονται τα κύτταρα που επιθυμούμε να καταστήσουμε επιδεκτικά. Στην περίπτωση των κυττάρων XL1Blue προστίθεται στο θρεπτικό υλικό και το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη (σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml). Οι υγρές καλλιέργειες έπειτα τοποθετούνται στους 37 °C και στις 210 rpm για 12-16 ώρες (overnight).

Από την overnight καλλιέργεια λαμβάνεται 1 ml και τοποθετείται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100 ml θρεπτικό LB Broth. Έπειτα από ήπια ανάδευση, φωτομετρείται 1 ml από την καλλιέργεια στα 600 nm. Η οπτική απορρόφηση (OD₆₀₀) πρέπει να είναι γύρω στο 0,04. Ακολούθως η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C και στις 210 rpm. Πραγματοποιούνται φωτομετρήσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα έως ότου η οπτική απορρόφηση είναι OD₆₀₀=0,4-0,7, καθώς τα κύτταρα στο σημείο εκείνο βρίσκονται στην εκθετική φάση της ανάπτυξης τους.

Τα 100 ml της καλλιέργειας των κυττάρων μοιράζονται σε δύο αποστειρωμένα και παγωμένα falcons των 50 ml (υπό φλόγα) και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο για 10 λεπτά.

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

Σε κάθε falcon προστίθεται 30 ml διάλυμα MgCl₂-CaCl₂ (80 mM/20 mM) και πραγματοποιείται ελαφρά ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.

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

Σε κάθε falcon προστίθεται 2 ml παγωμένου διαλύματος CaCl_2 0.1 M, αναδιαλύεται το ίζημα και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο.

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

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

Πολύ γρήγορα μοιράζεται η ποσότητα των επιδεκτικών κυττάρων (200 µl ανά σωλήνα των 1.5 ml) και τα aliquots τοποθετούνται προς φύλαξη στους -80°C .

3.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (miniprep)

Βακτηριακά κύτταρα (συνήθως από stock γλυκερόλης), συνήθως DH5α ή XL1Blue που φέρουν το επιθυμητό πλασμίδιο, ενοφθαλμίζονται σε 3ml LB broth που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί επώαση των καλλιέργειών για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Η ακόλουθη διαδικασία πραγματοποιείται με βάση το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από κύτταρα E. coli, NucleoSpin Plasmid QuickPure:

1) Καλλιέργεια και συλλογή των βακτηριακών κυττάρων:

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

2) Λύση των κυττάρων:

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

3) Δέσμευση του DNA:

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

4) Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης:

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

5) Έκλουση του DNA:

Τοποθετείται η στήλη σε νέο σωλήνα και προστίθενται 50μl buffer AE. Στη συνέχεια, επωάζεται το δείγμα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 x g. Το προϊόν της έκλουσης φυλάσσεται στους -20°C.

3.9 Μέτρηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης όλων των δειγμάτων DNA της παρούσας εργασίας έγινε με τη βοήθεια του Qubit dsDNA BR Assay kit (Invitrogen), που είναι σχεδιασμένο για αποκλειστική εφαρμογή στο φθορισμόμετρο Qubit 2.0. Το συγκεκριμένο kit προσφέρει πολύ υψηλή ακρίβεια αλλά και μεγάλο εύρος στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων.

Η προετοιμασία των δειγμάτων DNA προκειμένου να είναι δυνατή η φωτομέτρησή τους μετά από υποβολή τους στο φθορισμόμετρο Qubit, γίνεται ως εξής:

Παρασκευής του Qubit working solution:

DNA reagent: Qubit buffer = 1:200 (μl)

Παρασκευή τελικού διαλύματος DNA:

Δείγμα DNA: Qubit working solution = [1-20]:[199-180] μl

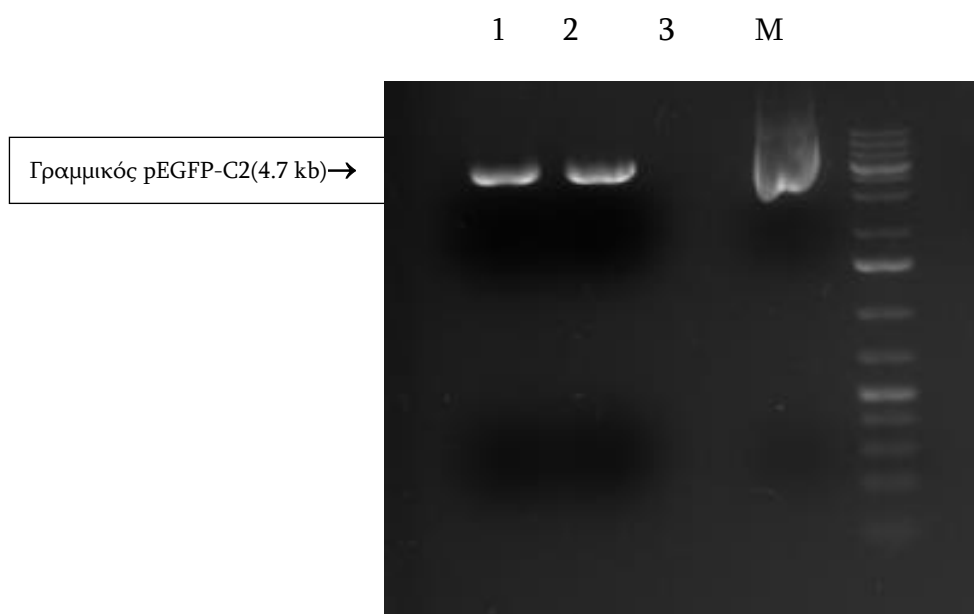
Η καμπύλη αναφοράς γίνεται με τη βοήθεια της παρασκευής και της φωτομέτρησης δύο δειγμάτων DNA γνωστής συγκέντρωσης, τα οποία παρέχονται από το Qubit DNA Assay kit (Qubit DNA Standard #1, Qubit DNA Standard #2). Η αναλογία των δύο δειγμάτων προς το

Qubitworkingsolution, είναι 10:190 μ l, αντίστοιχα.

Το τελικό διάλυμα DNA, αφήνεται να επωαστεί σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) για 2min, ο οποίος είναι ο ελάχιστος απαιτούμενος χρόνος επώασης των δειγμάτων πριν την φωτομέτρηση, ενώ οι 3 ώρες θεωρούνται ο μέγιστος χρόνος επώασης μέσα στον οποίο το Qubit 2.0 Fluorometer μπορεί να δώσει αξιόπιστες τιμές.

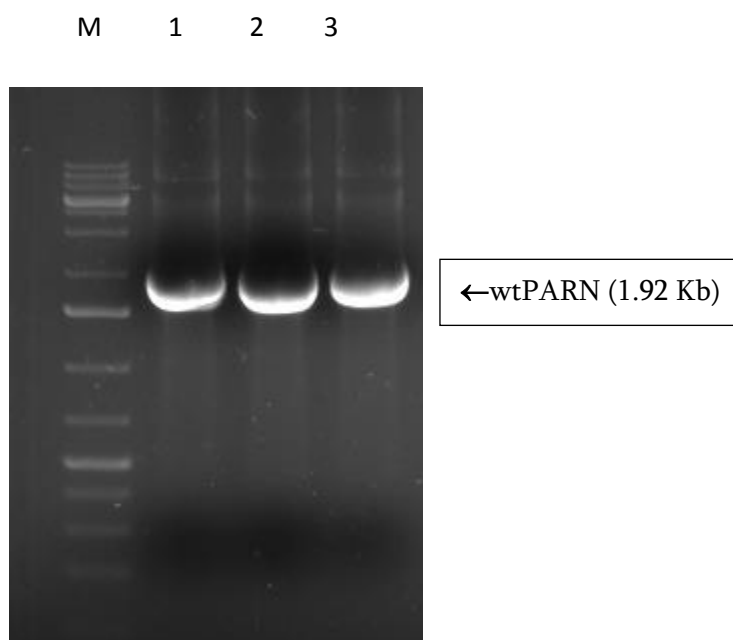
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρχικά έγινε απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-C2 με τη βοήθεια του πρωτοκόλλου που περιγράφηκε στην παράγραφο 4.3., από υγρές καλλιέργειες μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο κυττάρων XL1Blue. Η επιβεβαίωση της απομόνωσης έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Ακολούθησε η ενζυμική πέψη του φορέα pEGFP-C2 με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, προκειμένου να γραμμικοποιηθεί. Η EcoRI κόβει σε μια μοναδική θέση στην περιοχή πολυσυνδέτη του φορέα. Η επιβεβαίωση της πέψης έγινε και πάλι με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% (Εικόνα 4). Όπως μπορούμε να δούμε στην εικόνα, το αρνητικό control που χρησιμοποιήθηκε (άπεπτος φορέας), εμφανίζει ένα μικρό smear (διαδρομή 3), το οποίο οφείλεται στην διάφορες μορφές υπερελίκωσης στις οποίες μπορεί να βρίσκεται ο άκοπος, κυκλικός φορέας, σε αντίθεση με το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο, το οποίο εμφανίζει μία ξεκάθαρη ζώνη κοντά στις 5kb.



Εικόνα 14. Αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης του προϊόντος της πέψης του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-C2, με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Διαδρομές 1,2: φορέας που έχει υποστεί πέψη. Διαδρομή 3: άπεπτος φορέας. M: ladder 1Kb.

Παράλληλα έγινε αντίδραση ενίσχυσης του cDNA της PARN, με απλή PCR. Τοθερμικό προφίλ και τα επιμέρους συστατικά της αντίδρασης παρατίθενται στην παράγραφο 3.1.3. Ως υπόστρωμα για την αντίδραση, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pET-33b που φέρει το cDNA της PARN. Οι εκκινητές ήταν ειδικά σχεδιασμένοι βάσει των οδηγιών της παραγράφου 3.1.2., έτσι ώστε να παράγουν στα άκρα του cDNA της PARN, τμήματα 15bpομόλογα προς τα άκρα του γραμμικοποιημένου, μετά από πέψη με EcoRI,φορέα pEGFP-C2. Η εικόνα που προέκυψε μετά την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος τηςPCR σε πηκτή αгарόζης 1,5 %, επιβεβαίωσε την ορθότητα της ενίσχυσης εφόσον είναι ευδιάκριτη μια ειδική ζώνη που αντιστοιχεί στις 1,92 kb, όσο, δηλαδή, είναι και το αναμενόμενο μέγεθος του cDNA της PARN(Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντοςPCR σε πηκτή αгарόζης 1,5%. Διακρίνεται καθαρά η ειδική ζώνη στις 1,92kb που αντιστοιχεί στο cDNA της wtPARN. M: μάρτυρας DNA 1Kb. Διαδρομές 1,2,3: Προϊόντα ενίσχυσης PCR.

Αφού επαληθεύτηκε η πέψη του πλασμιδίου pEGFP-C2 και η ενίσχυση του ειδικού προϊόντος της PCR, προβήκαμε σε ανάκτηση του DNA από την πηκτή αгарόζης χρησιμοποιώντας το PCRgelextractionclean-upkit (βλ. παρ. 3.1.4.). Στη συνέχεια, το DNA που ανακτήθηκε, φωτομετρήθηκε με τη βοήθεια του QubitdsDNABroadRangeAssaykit για προσδιορισμό της

συγκέντρωσης του.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού, προκειμένου τα άκρα του γραμμικού πλασμιδίου pEGFP-C2 να ανασυνδυαστούν με τα ομόλογά τους άκρα όπως προστέθηκαν στο γονίδιο της wtDMPARN μετά από ενίσχυσή του με ειδικούς PCR εκκινητές (βλ. Εικόνα 3, παρ. 3.1.2). Τα επιμέρους συστατικά και οι συνθήκες της αντίδρασης ομόλογου ανασυνδυασμού περιγράφονται στην παράγραφο 3.1.5. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί πως ο χρόνος επώασης ήταν 30 λεπτά, ενώ τηρήθηκε και η αναλογία 3:1 μεταξύ wtPARNDNA και pEGFP-C2 DNA.

Ακολούθησε μετασχηματισμός επιλεκτικών βακτηριακών κυττάρων XL1-Blue με 5μl του προϊόντος της αντίδρασης ομόλογου ανασυνδυασμού σύμφωνα με την παρ. 3.1.6. Στη συνέχεια, έγινε επίστρωση τρυβλίων (LB άγαρ, με προσθήκη καναμυκίνης), υπό φλόγα, με 50μl και 150μl αντίστοιχα από την αντίδραση μετασχηματισμού, και επακόλουθη επώαση των τρυβλίων στους 37 οC για περίπου 12-16h. Μετά το πέρας των 16 ωρών, έγινε δημιουργία μικρών βακτηριακών καλλιιεργειών με ενοφθασισμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία (συνολικά 5), σε LBbroth (με καναμυκίνη) και επώασή τους στους 37 οC, υπό ανάδευση στις 210rpm, O/N. Από τις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν, έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας. Το DNA που απομονώθηκε ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης 1%. Ο έλεγχος της θετικότητας των πλασμιδίων (δηλαδή αν φέρουν το cDNA της PARN) έγινε με PCR. Από τα 5 δείγματα που ελέγχθηκαν, στα 2 είχαμε ειδική ενίσχυση προϊόντος στο αναμενόμενο μήκος των 1,92Kb που αντιστοιχεί στο μέγεθος του cDNA της PARN. Τα δύο αυτά "θετικά" πλασμίδια στάλθηκαν για ανάλυση αλληλούχισης, η οποία και επιβεβαίωσε την επιτυχία της κλωνοποίησης της PARN, στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C2 (Εικόνα 6). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης (sequencing) έγινε με το πρόγραμμα MEGA 3.1.

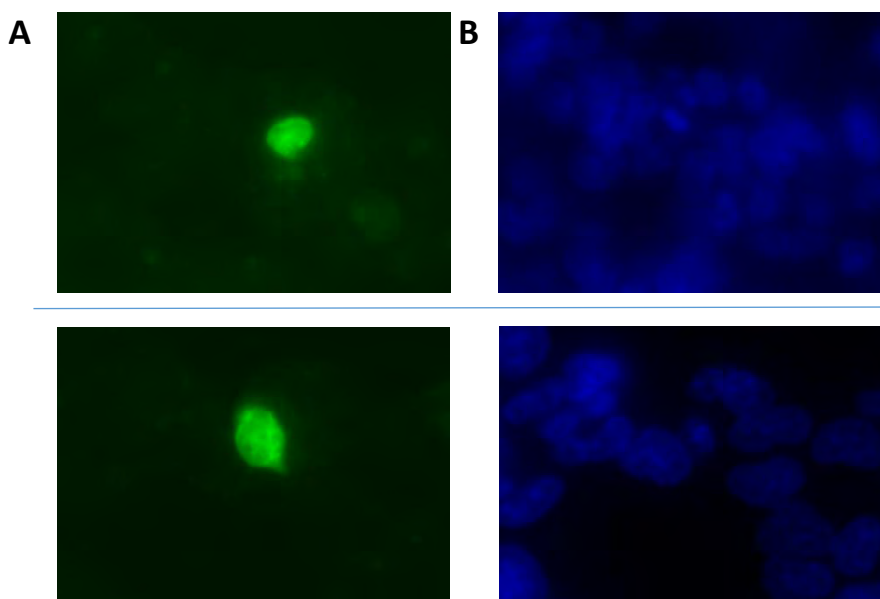
4.1 Δοκιμασία υποκυτταρικού εντοπισμού της PARN αγρίου τύπου (wildtypePARN-wtPARN) με ανίχνευση φθορισμού-Κυτταροχημεία

Πειραματική διαδικασία

- 1) Σε 2 πηγαδάκια (wells) ενός 24× well-plate τοποθετούνται καλυπτρίδες (coverslips). Τα πηγαδάκια αποστειρώνονται με έκθεση σε UV ακτινοβολία για 30 min, αφού προηγουμένως έχουν εκπλυθεί 2 φορές με EtOH 70 %. Η πλάκα ανάπτυξης κυττάρων

- (plate) τοποθετείται εντός του επωαστικού κλιβάνου (37°C, 5 % CO₂) μέχρι την ημέρα εφαρμογής του πρωτοκόλλου διαμόλυνσης.
- 2) Πρώτο βήμα στη διαδικασία της διαμόλυνσης αποτελεί η θρυψινοποίηση των κυττάρων (NCI-H520) μιας T25 flask, στην οποία η πληρότητα των κυττάρων είναι 95%-100%. Ακολουθεί υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων με τη χρήση μιας πλάκας Neubauer.
 - 3) Σε κάθε well που φέρει καλυπτρίδα προσθέτουμε 15.000 θρυψινοποιημένα κύτταρα έτσι ώστε σε κάθε well να έχουμε πληρότητα περίπου 50-70% μετά από ~24h επώασης στους 37°C. Η πληρότητα αυτή ενδείκνυται για τη διαμόλυνση.
 - 4) Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε το X-fectreagent, το οποίο περιέχει το X-fectPolymer και το X-fectReactionBuffer. Το X-fectPolymer σχηματίζει κατιονικά λιποσωμάτια και επιτρέπει τη διαμόλυνση πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα των θηλαστικών ικανοποιητική απόδοση. Το αντιδραστήριο αυτό συνδυαζόμενο με DNA, σχηματίζει λιποσώματα που συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων και αποχύνουν το περιεχόμενο DNA στο εσωτερικό του κυττάρου (στην περίπτωση μας μιλάμε για πλασμίδια που φέρουν shRNAs) (Felgeretal., 1994). Μεταβολές των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων DNA και X-fectPolymer είναι απαραίτητες για την βελτιστοποίηση της διαμόλυνσης.
 - 5) Για το σχηματισμό των λιποσωμάτων ετοιμάζουμε δύο διαλύματα: ένα DNAmix και ένα X-fectmix σύμφωνα με τις εξής ενδείξεις: α. DNAmix: 1μg πλασμιδίου (pEGFP-C2-wtPARN ή pEGFP-C2-dmPARN) σε 25μlX-fectReactionBuffer ανά well, β. X-fectmix: 0,3μlX-fectPolymer σε 25μlX-fectReactionBuffer ανά well
 - 6) Παρασκευή του transfectionmix: Προσθέτουμε το DNAmix στο X-fectmix, πραγματοποιούμε vortex για 10 sec και τα αφήνουμε για επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
 - 7) Παράλληλα απομακρύνουμε από κάθε well το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και ξεπλένουμε τα κύτταρα με κρύο και αποστειρωμένο PBS 1x (0,5ml) δύο φορές. Πριν την προσθήκη του transfectionmix προσθέτουμε θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά-αντιμυκητοκικά και χωρίς ορό (FBS) σε κάθε well (0,25 mlRPMI/well).
 - 8) Μετά το πέρας του χρόνου επώασης του transfectionmix, μοιράζουμε το τελευταίο με κυκλικό τρόπο στάγδην στα κύτταρα που προορίζονται για διαμόλυνση και αφήνουμε το 24-wellplate να επωαστεί στους 37°C.
 - 9) Μετά από 5-6h, απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από τα διαμολυσμένα κύτταρα και το αντικαθιστούμε μετά από δύο πλύσεις με 0,5mlPBS 1X, με 0,5ml φρέσκο RPMI (10% FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic).

- 10) 48h μετά τη διαμόλυνση τα 2 wells με τα διαμολυσμένα κύτταρα εκπλύνονται με PBS 1x και γίνεται σε αυτά προσθήκη διαλύματος PBS που περιέχει Hoechst 33342 (1:1000). Το Hoechst είναι μια χρωστική που εκπέμπει μπλέ φθορισμό όταν δεσμευτεί σε δίκλωνο DNA και χρησιμοποιείται συχνά στην μικροσκοπία φθορισμού για τον εντοπισμό των πυρήνων. Τα κύτταρα αφήνονται να επωαστούν στον κλίβανο παρουσία Hoechst, για περίπου 30 min. Ακολουθούν 2 πλύσεις των κυττάρων με PBS 1X.
- 11) Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα η διαδικασία της μονιμοποίησης. Από το στάδιο αυτό και έπειτα, δεν απαιτούνται στείρες συνθήκες. Η μονιμοποίηση γίνεται με την προσθήκη ψυχρής μεθανόλης (στους -20°C). Το 24-well plate ακολούθως τοποθετείται στους -20°C για 10 min.
- 12) Μετά από αναρρόφηση της μεθανόλης και 2 πλύσεις των μονιμοποιημένων πια κυττάρων με PBS 1X, οι καλυπτρίδες τοποθετούνται (η επιφάνεια που φέρει τα κύτταρα "βλέπει" προς τα κάτω) με προσοχή με τη βοήθεια λαβίδας σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Για τη στερέωση τους στην αντικειμενοφόρο πλάκα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα PBS1X-γλυκερόλης 100% σε αναλογία 1:1. Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετείται σε κασετίνα και σε σκοτεινό μέρος στους 4°C για τουλάχιστον 24ώρες.
- 13) Στο τέλος πραγματοποιείται η μικροσκόπηση σε κατάλληλο μικροσκόπιο φθορισμού και η συλλογή εικόνων (εικόνες 1 και 2).



Από τις παραπάνω εικόνες διαπιστώνουμε πως τόσο η PARN αγρίου τύπου όσο και η dmPARN εμφανίζουν διάχυτο κυτταρικό φθορισμό δηλ, εντοπίζονται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων NCI-H520. Εντούτοις, στις εικόνες που ελήφθησαν από τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με pEGFP-C2-dmPARN, φαίνεται πως το σήμα φθορισμού που λαμβάνουμε από τον πυρήνα είναι ασθενέστερο εν συγκρίσει με το αντίστοιχο σήμα από το κυτταρόπλασμα. Βέβαια, για να εξάγουμε ασφαλέστερα συμπεράσματα για την επίδραση της διπλής μετάλλαξης R99A και Q109A στον υποκυτταρικό εντοπισμό της PARN, κρίνεται απαραίτητο να επαναληφθούν τα πειράματα κυτταροχημείας και σε άλλες κυτταρικές σειρές (π.χ. HeLa), να βελτιωθεί η απόδοση της διαμόλυνσης και να ληφθούν περισσότερες εικόνες από το μικροσκόπιο φθορισμού.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anderson, J.S.J. & Parker, R. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* 17: 1497–1506 (1998).
- Balatsos et al. 2012
- Berndt et al. 2012
- Bernstein et al. 1989
- Cao, D. & Parker, R. Computational modeling and experimental analysis of nonsense-mediated decay in yeast. *Cell* 113: 533–545 (2003).
- Chen, C.Y. et al. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451–464 (2001).
- Copeland, P.R. & Wormington, M. The mechanism and regulation of deadenylation: Identification and characterization of *Xenopus* PARN. *RNA* 7: 875–886 (2001).
- Dehlin, E., Wormington, M., Körner, C.G. & Wahle, E. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.* 19: 1079–1086 (2000).
- Dodson, R.E. & Shapiro, D.J. Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72: 129–164 (2002).
- Frischmeyer, P.A. et al. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 295: 2258–2261 (2002).
- Ford et al. 1999
- Ford and Wilusz 1999
- Gao, M, Fritz, D.T., Ford, L.P. & Wilusz, J. Interaction between a Poly(A)-Specific Ribonuclease and the 5' Cap Influences mRNA Deadenylation Rates *In Vitro*. *Mol. Mol Cell* 5: 479-488 (2000).
- Garneau, N., Wilusz, J. & Wilusz, C. The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 113–126 (2007).
- Gevher et al. 2010
- Ghou et al. 2006
- Goldstrohm & Wickens. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature Publishing Group* Vol 9:337-344 (2008).

- Hoof van, A. & Parker, R. The exosome: a proteasome for RNA? *Cell* (1999).
- Hook, B., Goldstrohm, A. C., Seay, D. J. & Wickens, M. Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. *J. Biol. Chem.* 282: 15430–15438 (2007).
- Kadyrova, L. Y., Habara, Y., Lee, T. H., & Wharton, R. P. Translational control of maternal cyclin B mRNA by nanos in the Drosophila germline. *Development* 134: 1519–1527 (2007).
- Kim and Lee 2009
- Kim and Richter 2007
- Kiss et al. 2010
- Körner, C.G. & Wahle, E. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J. Biol. Chem.* 272: 10448–10456 (1997) , (1997), (1998) .
- Lai, W.S., Kennington, E.A. & Blackshear, P.J. Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol. Cell. Biol.* 23: 3798–3812 (2003), (1999), (2000) .
- Liu, H., Rodgers, N.D., Jiao, X. & Kiledjian, M. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J.* 21: 4699–4708 (2002).
- Maragozidis et al. 2012
- Marchler- Bauer et al. 2011
- Marcotrigiano et al. 1997
- **Martínez J., Ren Y., Thuresson, A., Hellman, U. Åström, J. & Virtanen, A.** A 54- kDa Fragment of the Poly(A)-specific Ribonuclease Is an Oligomeric, Processive, and Cap-interacting Poly(A)-specific 3' Exonuclease. *J. Biol. Chem.* 275: 24222-24230 (2000).
- Martínez, J., Ren, Y.-G., Nilsson, P., Ehrenberg, M. & Virtanen, A. The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation. *J. Biol. Chem.* 276: 27923–27929 (2001).
- Maquat, L.E. & Carmichael, G.G. Quality control of mRNA function. *Cell* 26: 173–176 (2000).
- Matera et al 2007
- Meyer, S. , Temme, C. & Wahle, E. Messenger RNA Turnover in Eukaryotes: Pathways and Enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 39:197–216 (2004)
- Mian 1997
- Mitchell, P. & Tollervey, D. mRNA turnover. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 320–325 (2001).
- Mitchell, P. & Tollervey, D. An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol. Cell* (2003).

- Monecke et al 2008
- Moore, M.J. Nuclear RNA turnover. *Cell* 108: 431–434 (2002).
- Moraes et al 2006
- Moser et al 1997
- Muhlrad, D. & Parker, R. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370: 578–581 (1994).
- Mukherjee, D. et al. The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.* 21: 165–174 (2002).
- Nagata et al. 2008
- Nilsson, P., Henriksson, N., Niedzwiecka, A., Balatsos, N.A., Kokkoris, K., Eriksson, J., Virtanen, A. A multifunctional RNA recognition motif (RRM) in poly(A)-specific ribonuclease (PARN) with cap and poly(A) binding properties. *J. Biol. Chem.* (2007).
- Nossal and Singer 1968
- Parker, R. & Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 121–127(2004).
- Reinhardt et al. 2010
- Ren, Y.-G., Martínez, J. & Virtanen, A. Identification of the active site of poly(A)-specific ribonuclease by site-directed mutagenesis and Fe²⁺-mediated cleavage. *J. Biol. Chem.* 277: 5982–5987 (2002).
- Schoenberg and Maquat , 2012
- Takahashi, S., Araki, Y., Sakuno, T. & Katada, T. Interaction between Ski7p and Upf1p is required for nonsense-mediated 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.* 22: 3951–3959 (2003)
- Tran et al. 2003
- Tucker, M. & Parker, R. Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 571–595 (2000).
- Uhlen et al. 2010
- Van Hoof et al. 2002
- Virtanen et al. 2013
- Wang, Z. & Kiledjian, M. Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* 107: 751–762 (2001).
- Wilusz et al. 2001
- Wormington et al. 1996
- Wu and Brewer 2012

- Wu, M., Reuter, M., Lilie, H., Liu, Y., Wahle, E. & Song, H. Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO J* 24: 4082-4093 (2005).
- Wu, M. et al. Structural basis of m⁷GpppG binding to Poly(A)-specific ribonuclease. *Structure* , 17: 276-286 (2009).
- Yamashita et al. 2005
- Zhang et al. 2007, 2010
- Zhu et al. 2011
- Zuo and Deatscher , 2001