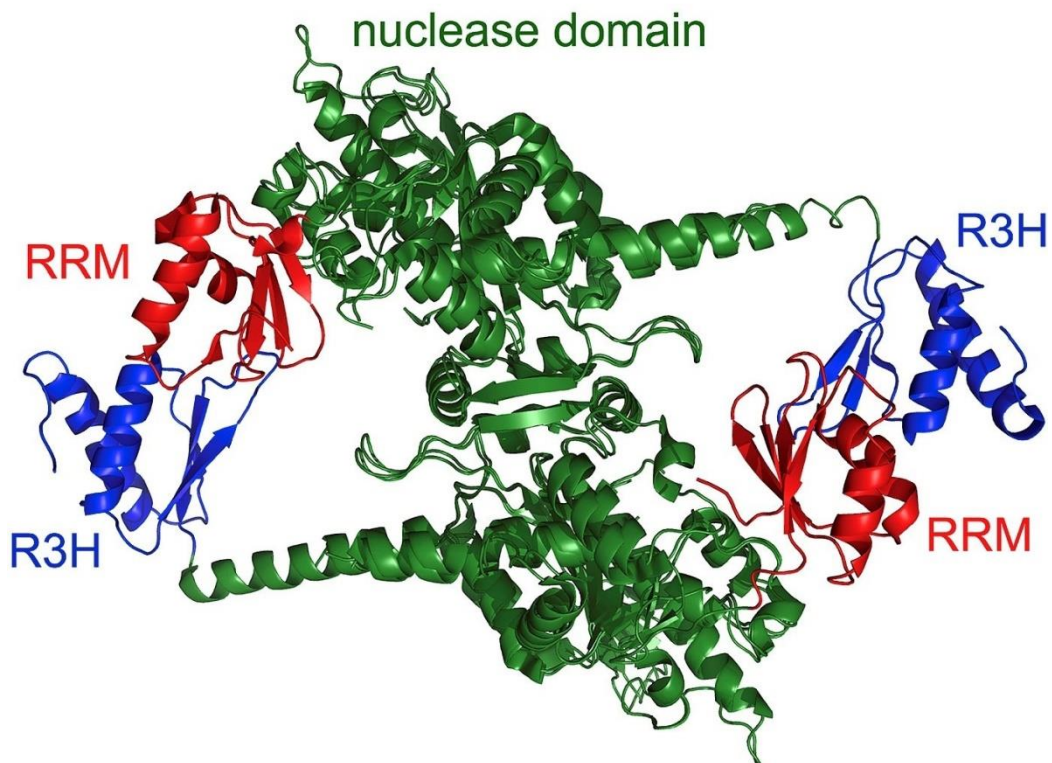




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Μελέτη της επίδρασης του ολιγομερισμού της Πολυ(Α)-εξειδικευμένης
ριβονουκλεάσης στον υποκυτταρικό εντοπισμό της.**



Διπλωματική Εργασία – Άγγελος Δρόσος Μαργιολακιώτης
Λάρισα, Ιούλιος 2021

Διπλωματική Εργασία

“Μελέτη της επίδρασης του ολιγομερισμού της Πολυ(Α)-εξειδικευμένης
ριβονουκλεάσης στον υποκυτταρικό εντοπισμό της.”

“Study of the effect of the oligomerisation of Poly(A)-specific
ribonuclease in its subcellular localisation.”

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

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

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Κλέτσας Δημήτριος, Ερευνητής Α΄. ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Δημήτριος Λεωνίδας, Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Εικόνα εξωφύλλου:

Τρισδιάστατη απεικόνιση της Πολυ(Α)-εξειδικευμένης Ριβονουκλεάσης (PARN) (He & Yan, 2019).

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

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου και επιβλέποντα κ. Νικόλαο Μπαλατσό, για την πολύτιμη βοήθεια, ηθική και επιστημονική συμπαράσταση και ουσιαστική καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής για την άψογη συνεργασία μας και τη συμβολή τους στην διεξαγωγή της διπλωματικής αυτής. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω ιδιαίτερες ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας Ραφαηλία Μπέτα, της οποίας η αμέριστη βοήθεια, στήριξη και συνεισφορά, τόσο σε πρακτικό όσο και σε ψυχολογικό επίπεδο, ήταν εξαιρετικά σημαντική και καθοριστική για την επίτευξη των πειραμάτων μου, αλλά και τη συγγραφή και ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας. Επιπλέον, παραθέτω τις ευχαριστίες μου και για τον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας Αθανάσιο Κυρίτση για τη σημαντική βοήθειά του στην αρχική διεξαγωγή των εργαστηριακών πειραμάτων μου. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω φυσικά, τον υποψήφιο διδάκτορα Διονύσιο Αντωνόπουλο, για τη γενικότερη στήριξή του στην προσπάθειά μου καθώς και το ιδιαίτερο χιούμορ που τον διακρίνει. Η ηθική βοήθεια και το φιλικό κλίμα είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για την ομαλή διεξαγωγή των πειραμάτων, κάτι που δημιούργησαν και με το παραπάνω η Βερονίκη Δούκα και η Δήμητρα Στεργίου και θα ήθελα να της ευχαριστήσω ιδιαίτερα. Επίσης, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και υποψήφιους διδάκτορες για τις πολύτιμες συμβουλές τους, τη συνεργασία και τη βοήθειά τους. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη στήριξη, τη συμπαράσταση και την ενθάρρυνση των προσπαθειών μου κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών μου σπουδών.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Παραγωγή, μεταγραφή και μετάφραση του mRNA	8
1.2 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA	8
1.3 Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει κάλυμμα.	9
1.4 Μάτισμα	10
1.5 Το άκρο 3' πολυαδενυλιώνεται	10
1.6 Αποικοδόμηση του mRNA- Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA	12
1.6.1 Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την απαδενυλίωση.....	12
1.6.2 Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αφαίρεση της καλύπτρας.....	13
1.6.3 Αποικοδόμηση μέσω ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης	14
1.7 Διαδικασίες ελέγχου ποιότητας μεταγράφων mRNA.....	15
1.7.1 Nonsense-mediated decay	15
1.7.2 Non-stop decay.....	15
1.7.3 No-go decay.....	16
1.8 Απαδενυλίωση	16
1.8.1 Κατάταξη, ρόλοι και ρύθμιση των απαδενυλασών	17
1.9 Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A)-specific ribonuclease, PARN]19	
1.9.1 Ο ρόλος της αργινίνης 99 (R99) και της γλουταμίνης 109 (Q109).....	22
2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	25
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
3.1 Υλικά.....	26
3.1.1 Πλασμιδιακοί φορείς	26
3.2 Μέθοδοι	28
3.2.1 Δημιουργία του φορέα pDsRed-N1-PARN	28
3.2.2 Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών	34
3.2.3 Μικροσκοπία Φθορισμού	37
4 Αποτελέσματα - Συζήτηση	38
4.1 Κλωνοποίηση.....	38
4.2 Διαμόλυνση κυττάρων HEK293T με το κατιονικό πολυμερές PEI	40
4.2.1 Διαμόλυνση με φορέα pEGFP-C2.....	40

4.2.2	Διαμόλυνση με το φορέα pDsRed-Monomer-N1	41
4.3	Διαμόλυνση κυττάρων HeLa με το κατιονικό πολυμερές Viromer	42
4.3.1	Διαμόλυνση με το φορέα pEGFP-C2	42
4.3.2	Διαμόλυνση με το φορέα pDsRed-Monomer-N1	43
4.4	Συν-Διαμόλυνση κυττάρων HEK293T με τα πλασμίδια pEGFP-C2 και pDsRed-Monomer-N1.....	44
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το πρώτο στάδιο της αποικοδόμησης του mRNA, είναι αυτό της απαδενυλίωσης, δηλαδή της ελάττωσης του μήκους της ουράς πολυ(A). Η αντίδραση αυτή, καταλύεται από εξειδικευμένα ένζυμα, που ονομάζονται απαδενυλάσες. Μια εξ αυτών, η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), μπορεί να αποικοδομήσει την ουρά πολυ(A) αλληλεπιδρώντας με την 5' καλύπτρα του μορίου mRNA. Με αυτόν τον τρόπο ρυθμίζεται η διάρκεια ζωής των mRNA στόχων και επιτυγχάνεται ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης. Έχει δειχθεί πως δύο κατάλοιπα της αμινοξικής αλληλουχίας του ενζύμου αυτού είναι σημαντικά για το διμερισμό του, η αργινίνη99 (R99) και η γλουταμίνη109 (Q109). Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε ο ρόλος των καταλοίπων αυτών σε σχέση με τον υποκυτταρικό εντοπισμό του ενζύμου με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού. Έγινε κλωνοποίηση του cDNA της PARN στον πλασμιδιακό φορέα pDsRed-Monomer-N1 και ακολούθως έγινε συνδιαμόλυνση κυττάρων HEK293T και HeLa με αυτόν καθώς και με το φορέα pEGFP-C2, ο οποίος ήταν ανασυνδυασμένος και έφερε το cDNA της PARN που φέρει μεταλλάξεις στα κατάλοιπα R99 και Q109. Από τα αποτελέσματά μας προκύπτει πως οι συνθήκες διαμόλυνσης και συνδιαμόλυνσης χρήζουν βελτιστοποίησης με αποτέλεσμα να μην είναι έγκυρη η εξαγωγή συμπερασμάτων ως προς το συνεντοπισμό των δυο πρωτεϊνών.

ABSTRACT

The first stage of mRNA degradation is that of deadenylation; the shortening of the poly (A) tail. This reaction is catalyzed by specific enzymes called deadenylases. One of them, poly(A)-specific ribonuclease (PARN), can degrade poly(A) tails by interacting with the 5' cap of the mRNA molecule. In this way, the lifespan of target mRNAs is regulated and the control of gene expression is achieved. It has been shown that two residues of the amino acid sequence of this enzyme are important for its dimerization, namely arginine99 (R99) and glutamine109 (Q109). In this study, the role of these residues in relation to the subcellular localization of the enzyme was investigated using fluorescence confocal microscopy. The cDNA of PARN was cloned into the plasmid vector pDsRed-Monomer-N1 and then HEK293T and HeLa cells were co-transfected with it and the recombinant pEGFP-C2 vector, which was bearing the cDNA of PARN with mutations for R99 and Q109. From our results it appears that the conditions of transfection and co-transfection need to be optimized, as the results are not valid to draw conclusions regarding the co-location of the two proteins.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Παραγωγή, μεταγραφή και μετάφραση του mRNA

Το mRNA (messenger RNA) αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα και καλύτερα μελετημένα είδη μορίων RNA και ο ρόλος του είναι να μεταφέρει τη γενετική πληροφορία μιας πρωτεϊνικής αλληλουχίας από τον πυρήνα στα ριβοσώματα. Κατά τη διαδικασία της μεταγραφής (transcription) παράγεται ένα μονόκλωνο μόριο RNA, το οποίο εμφανίζει όμοια αλληλουχία με την μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA, ενώ κατά τη μετάφραση (translation) η νουκλεοτιδική αλληλουχία του mRNA μετατρέπεται στην αλληλουχία αμινοξέων που σχηματίζουν μια πρωτεΐνη. Η μετάφραση δεν πραγματοποιείται σε ολόκληρο το μήκος του μορίου mRNA. Σε κάθε mRNA περιέχεται μία κωδική περιοχή (coding region) που σχετίζεται μέσω του γενετικού κώδικα με μία πρωτεϊνική αλληλουχία: κάθε νουκλεοτιδική τριπλέτα (κωδικόνιο) της κωδικής περιοχής αντιστοιχεί σε ένα αμινοξύ. Μόνο η μία αλυσίδα του DNA έχει τη δυνατότητα να μεταγράφεται σε αγγελιαφόρο RNA (mRNA). Η μία αλυσίδα του δίκλωνου DNA η οποία δημιουργώντας ζεύγη συμπληρωματικών βάσεων κατευθύνει τη σύνθεση του mRNA, αποκαλείται αλυσίδα-μήτρα (template strand) και περιέχει αλληλουχία συμπληρωματική με το mRNA. Αντιθέτως, κωδική αλυσίδα (coding strand), ονομάζεται η αλυσίδα του DNA που παρουσιάζει την ίδια αλληλουχία με το mRNA (με εξαίρεση ότι περιλαμβάνει T αντί για U) (Alberts, 2008).

1.2 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA

Προκειμένου να καταστούν ώριμα και λειτουργικά μόρια, τα RNA αντίγραφα των αλληλουχιών του DNA είναι απαραίτητο να τροποποιηθούν, συνεπώς μετά τη σύνθεση του πρώιμου ευκαρυωτικού mRNA (pre-mRNA) σειρά έχει η διαδικασία της ωρίμανσης, από την οποία και προκύπτει το τελικό ώριμο mRNA. Κατά το στάδιο της ωρίμανσης λαμβάνουν χώρα οι εξής συμμεταγραφικές τροποποιήσεις: Η τροποποίηση του άκρου 5' του RNA με την προσθήκη καλύμματος ή «καλύπτρας» (capping) όπου η τριφωσφορική ομάδα του αρχικού μεταγράφου αντικαθίσταται από ένα νουκλεοτίδιο προστιθέμενο σε αντίθετο προσανατολισμό (3'-5'), το μάτισμα (splicing) και η τροποποίηση του άκρου 3' ως αποτέλεσμα προσθήκης μιας σειράς νουκλεοτιδίων αδενυλικού οξέος και συγκεκριμένα της ουράς πολυ(A) (polyadenylation) αμέσως μετά την αποκοπή του. Εφόσον ολοκληρωθούν όλες οι τροποποιήσεις και η επεξεργασία και κατά συνέπεια τα διάφορα mRNA αποκτήσουν χαρακτηριστικά που θα τα καθιστούν πλέον λειτουργικά, τότε μόνο μπορούν

αυτά να εξαχθούν στο κυτταρόπλασμα και εν συνεχεία να αναγνωριστούν από τα ριβοσώματα και να μεταφραστούν. Η ρυθμιζόμενη σταθερότητα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των mRNA μετά την εφαρμογή των προαναφερόμενων συ- και μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων, καθώς συντελεί και καθορίζει τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Edwards-Gilbert et al., 1997). Οι δομές της καλύπτρας, που προστίθεται στο 5' άκρο του RNA και της ουράς πολυ(A), που προστίθεται στο άκρο 3' του RNA, αποτελούν σημαντικά αναγνωριστικά στοιχεία κατά τη διάρκεια ολόκληρου του κύκλου ζωής του mRNA (Garneau, Wilusz, & Wilusz, 2007; Shatkin & Manley, 2000; Wilusz, Wormington, & Peltz, 2001).

1.3 Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει κάλυμμα.

Η μεταγραφή, όπως στα προκαρυωτικά κύτταρα έτσι και στους ευκαρυώτες, ξεκινάει με ένα τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο (συνήθως μια πουρίνη, A ή G). Ωστόσο, το τριφωσφορικό 5' άκρο της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας RNA τροποποιείται αμέσως. Αρχικά, ελευθερώνεται με υδρόλυση μια φωσφορική ομάδα, ενώ στη συνέχεια το διφωσφορικό πλέον 5' άκρο προσβάλλει το α-άτομο του φωσφόρου μιας GTP για να σχηματιστεί ένας πολύ ασυνήθης 5'-5' τριφωσφορικός δεσμός. Η προσθήκη της G στο 5' άκρο καταλύεται από ένα πυρηνικό ένζυμο, τη γουανιδυλο-τρανσφεράση. Λόγω του ότι η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται πολύ σύντομα μετά την έναρξη της μεταγραφής, είναι αδύνατον 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. Το νέο κατάλοιπο G που προστίθεται στο άκρο του RNA έχει αντίστροφο προσανατολισμό σε σχέση με όλα τα άλλα νουκλεοτίδια. Αυτό το διακριτό άκρο ονομάζεται καλύπτρα (cap), αποτελεί υπόστρωμα για αρκετές αντιδράσεις μεθυλίωσης. Η προσθήκη της καλύπτρας πραγματοποιείται περίπου όταν το μήκος του pre-mRNA είναι 20-30 νουκλεοτίδια (Ghosh & Lima, 2010).

Το πλήθος των μεθυλίωσεων που έχουν πραγματοποιηθεί καθορίζει τους τύπους των καλύπτρων. Η πρώτη μεθυλίωση πραγματοποιείται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και χαρακτηρίζεται από την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στη θέση 7 της ακραίας γουανίνης. Η καλύπτρα που περιέχει μόνο τη μεθυλομάδα αυτή ονομάζεται καλύπτρα 0 (cap 0). Στους μονοκύτταρους ευκαρυώτες η αντίδραση σταματάει σε αυτό το σημείο. Με την πρόσθεση ακόμη μιας μεθυλομάδας στο 2'-O της ριβόζης του αρχικού νουκλεοτιδίου του mRNA, σχηματίζεται η καλύπτρα 1. Αυτή η καλύπτρα ανευρίσκεται σε

όλους τους ευκαρυώτες, εκτός των μονοκύτταρων οργανισμών. Η ουσία του ρόλου της καλύπτρας έγκειται στην προστασία των νεοσυντιθέμενων μορίων mRNA από τη δράση φωσφατασών και νουκλεασών, συμβάλλοντας έτσι στη συνολική σταθερότητά τους, αλλά και στο γεγονός ότι είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί η συναρμογή των ώριμων μορίων mRNA με μεγάλη απόδοση και για να εξαχθούν τελικά από τον πυρήνα (Ghosh & Lima, 2010).

1.4 Μάτισμα

Το μάτισμα είναι μια διαδικασία η οποία λαμβάνει χώρα ανάμεσα στη μεταγραφή και τη μετάφραση και σε αυτήν υπόκεινται όσα RNA προέρχονται από γονίδια που περιέχουν εσόνια (μη κωδικοποιούσες αλληλουχίες που απαντώνται εντός του pre-mRNA μορίου, αλλά δεν υπάρχουν στα ώριμα mRNA μόρια). Κατά το μάτισμα πραγματοποιείται αποκοπή των εσονίων και συρραφή των εξονίων με σκοπό να παραμείνει στο μετάγραφο μια άθικτη κωδική αλληλουχία του γονιδίου που θα είναι συμπληρωματική με το πολυπεπτιδικό προϊόν. (Lewin, *Genes VIII*, 2004).

1.5 Το άκρο 3' πολυαδενυλιώνεται

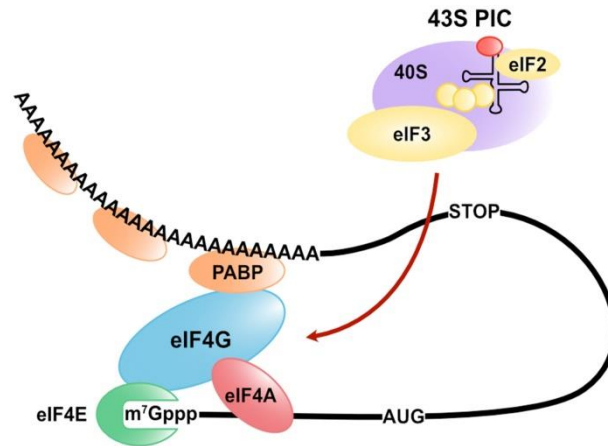
Στο άκρο 3' των πρώιμων mRNA προστίθεται μια αλληλουχία η οποία αποτελείται από 250-300 νουκλεοτίδια αδενοσίνης και αποκαλείται ουρά πολυ(A). Αυτή η αντίδραση πραγματοποιείται από το ένζυμο πολυ(A)-πολυμεράση, το οποίο προσθέτει κατάλοιπα αδενοσίνης στο άκρο 3' του mRNA (Darnell et al., 1971). Αυτή η τροποποίηση ονομάζεται διεργασία του 3' άκρου και επιτελείται σε δύο στάδια με τη συμμετοχή πρωτεϊνών οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να προσδένονται στο RNA, τις RNA binding proteins.

Η προσθήκη της ουράς πολυ(A) στο άκρο 3' ενός ευρέος φάσματος μορίων RNA είναι μια εξαιρετικά διατηρημένη τροποποίηση που παίζει κεντρικό ρόλο στη λειτουργία του κυτταρικού RNA (Torabi et al., 2021). Συγκεκριμένα το άκρο 3' υπόκειται σε εκτεταμένη ρύθμιση στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα, η οποία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο μέσα στο κύτταρο αλλά και στην ιστοειδική έκφραση γονιδίων. Παράλληλα υπάρχουν ολοένα και περισσότερες ενδείξεις ότι οι καθολικές αλλαγές στο μήκος της 3' UTR περιοχής συνδέονται με αλλαγές στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Συνεπώς αλλαγές στο μήκος της ουράς πολυ(A) είναι κρίσιμες σε διάφορες αναπτυξιακές πορείες (Shi, 2012; Tian & Manley, 2013).

Στον πυρήνα, η διάσπαση και πολυαδενυλίωση του άκρου 3' των μορίων mRNA είναι απαραίτητες για τον τερματισμό της μεταγραφής, την απελευθέρωση των μεταγράφων, και των εξαγωγή τους στο κυτταρόπλασμα (Perales et al., 2009). Στο κυτταρόπλασμα η ουρά πολυ(A) προστατεύει τα μόρια mRNA από την αποικοδόμηση και ενισχύει τη μετάφρασή τους (Weill et al., 2012)

Η αλληλουχία πολυ(A) συμμετέχει στις παραπάνω διεργασίες κυρίως μέσω των πρωτεϊνών που προσδένονται σε αυτή, και ειδικότερα της πολυ(A) προσδενόμενης πρωτεΐνης [poly(A)-binding protein, PABP]. Η ικανότητα της πολυ(A) να προστατεύει το mRNA από την αποικοδόμηση απαιτεί τη σύνδεση της με την PABP. Ένα μονομερές της PABP, έχει τη δυνατότητα να προσδένεται ανά 10 με 20 βάσεις της ουράς πολυ(A) . Δηλαδή, αυτό σημαίνει πως σε μια ουρά με μήκος 240 νουκλεοτίδια βρίσκονται περί τα 10 μονομερή της PABP. Το συνολικό μοριακό βάρος αυτών των μονομερών είναι περίπου 700 kDa, δεδομένου ότι ένα μονομερές έχει βάρος περίπου 70 kDa. Έτσι, σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς το 3' άκρο των mRNA αποτελείται ουσιαστικά από την ουρά πολυ(A) και το σύμπλοκο των πρωτεϊνών. Εκτός του ρόλου της πρωτεΐνης PABP να προστατεύει την ουρά πολυ(A) από το να αποικοδομηθεί, αυτή ρυθμίζει το πόσο βιώσιμα είναι τα mRNA καθώς αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες. Η σύνδεσή της, για παράδειγμα, με τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4G έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας κλειστής θηλιάς, όπου εκατέρωθεν αυτού του συμπλόκου βρίσκονται τα δύο άκρα του mRNA. Έτσι, αυτό το σύμπλοκο το λαμβάνει ο μεταφραστικός μηχανισμός (**Εικόνα 1**).

Έχει παρατηρηθεί *in vitro* πως η αφαίρεση της ουράς πολυ(A) δρα ανασταλτικά για την έναρξη της μετάφρασης, ενώ *in vivo* παρατηρείται το ίδιο αποτέλεσμα με την ελάττωση των επιπέδων της PABP σε ζυμομύκητες. Αυτό είναι πιθανό να συμβαίνει λόγω της πρόσδεσης της PABP στο σύμπλοκο έναρξης της μετάφρασης. Υπάρχουν περιστάσεις όπου μόρια mRNA μπορεί να παραμείνουν χωρίς την ουρά πολυ(A) τους και αυτή να προστεθεί αργότερα, όταν είναι αναγκαία η μετάφρασή τους. Άλλοτε, mRNA που φέρουν ουρά πολυ(A) , τροποποιούνται και αυτή αφαιρείται, ελαττώνοντας με αυτόν τον τρόπο το ρυθμό μετάφρασής τους.



Εικόνα 1: Η δημιουργία θηλιάς που προκύπτει από την πρόσδεση της PABP στον παράγοντα eIF4G (Fukao, Tomohiro, & Fujiwara, 2021)

1.6 Αποικοδόμηση του mRNA- Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA

Για την ομαλή λειτουργία όλων των κυττάρων, θα πρέπει να ελέγχονται τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης, αλλά να γίνεται και ποιοτικός έλεγχος των μεταγράφων mRNA (Dyckxhoom et al., 2003; Maquat et al., 2000; Hoof van et al., 1999). Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων έχει αναπτυχθεί η διαδικασία της αποικοδόμησης του mRNA. Σημείο κλειδί της διαδικασίας ελέγχου των μορίων mRNA, είναι η ρύθμιση της σταθερότητάς τους. Μάλιστα, ύστερα από ανάλυση μικροσυστοιχιών, έχει προκύψει το συμπέρασμα πως πολλές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση μετά από απόκριση σε διάφορα κυτταρικά σήματα, προκαλούνται στο επίπεδο σταθερότητας των mRNA (Cheadle et al., 2005; Fan et al., 2002). Πιο συγκεκριμένα, αλλαγές στη σύσταση ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων προκαλούν αυτές τις μεταβολές, οπότε ο ρυθμός της αποικοδόμησης είτε ελαττώνεται είτε αυξάνεται. Πληθώρα κυτταρικών παραγόντων και μηχανισμών έχουν ως στόχο το συντονισμό του ρυθμού αποικοδόμησης του mRNA. Τα μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA που έχουν περιγραφεί σχετίζονται με τη μετάφραση. Τα ελαττωματικά ριβονουκλειικά σύμπλοκα ανιχνεύονται στο κυτταρόπλασμα, ενώ ο έλεγχος της ωρίμανσης γίνεται στον πυρήνα. (Garneau et al., 2007)

1.6.1 Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την απαδενυλίωση

Στους ευκαρυώτες, τα περισσότερα μόρια mRNA αποικοδομούνται μέσω μιας μεταβολικής οδού η οποία βασίζεται από την απαδενυλίωση, της οποίας το πρώτο στάδιο είναι η ελάττωση του μεγέθους της ουράς πολυ(A). Μέσω της απαδενυλίωσης που

πραγματοποιείται στον πυρήνα, οι νεοσυντεθήμενες πολυ(A) ουρές, βραχύνονται στο βέλτιστο μήκος ούτως ώστε το ώριμο πλέον mRNA να μεταφραστεί στο κυτταρόπλασμα. Ωστόσο, η βράχυνση πέραν κάποιων νουκλεοτιδίων οδηγεί στην αποικοδόμηση του μορίου mRNA. Η αντίδραση της απαδενυλίωσης καταλύεται από τις απαδενυλάσες, οι οποίες είναι εξωριβονουκλεάσες που εξαρτώνται από ιόντα μαγνησίου για να εκδηλώσουν τη δράση τους. Το σύμπλοκο Ccr4-Not και Pan2/3, αλλά και η απαδενυλάση PARN επιτελούν κυρίως αυτή την αντίδραση. Με το πέρας της απαδενυλίωσης το mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί μέσω δύο οδών: 1) αφαίρεση της καλύπτρας και 5'-3' αποικοδόμηση 2) 3'-5' αποικοδόμηση μέσω εξωσώματος. Ωστόσο, οι δύο αυτές οδοί δεν είναι αλληλοαποκλειόμενες, αφού στον *S.cerevisiae* παρατηρήθηκε πως η αποσιώπηση συστατικών των δύο πορειών, το μεταγραφώσωμα επηρεάστηκε ελάχιστα κάτι που σημαίνει πως υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί αποικοδόμησης (F. He et al., 2003; Houalla et al., 2006).

1.6.2 Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αφαίρεση της καλύπτρας

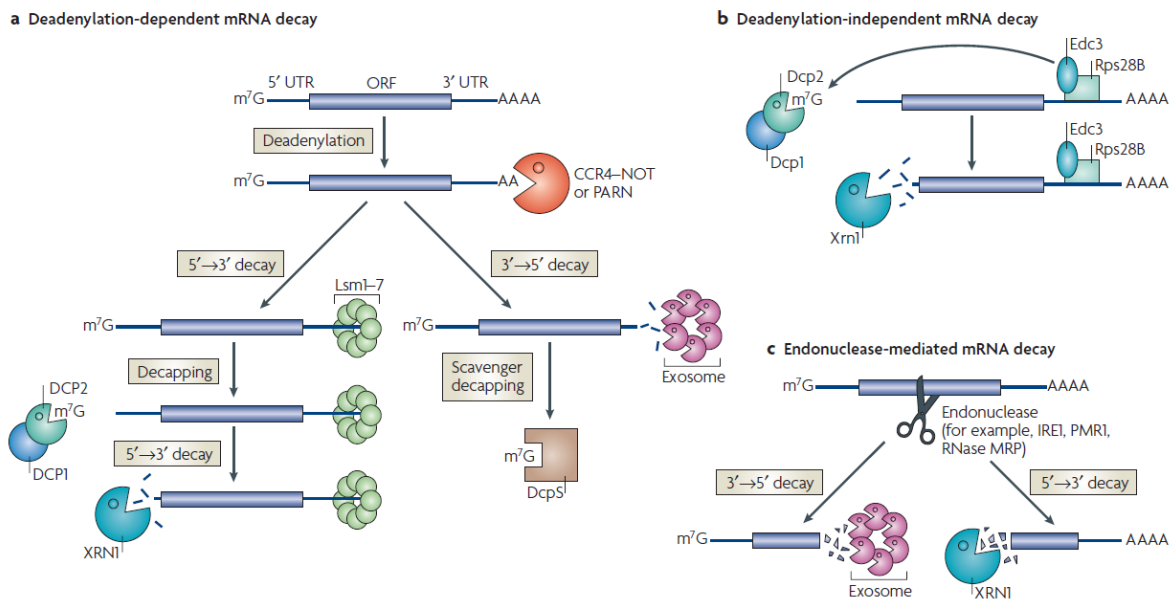
Εναλλακτικά, λιγότερο συχνά, η αποικοδόμηση ξεκινά με την αφαίρεση της καλύπτρας. Ενώ στον *S.cerevisiae*, το ένζυμο που καταλύει την αφαίρεση της καλύπτρας είναι διμερές και αποτελείται από τις πρωτεΐνες Dcp1 και Dcp2, με την Dcp2 που φέρει μια επικράτεια MutT να επιτελεί την καταλυτική δράση, στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, υπάρχει μια τρίτη πρωτεΐνη, η Hed1s (ή Ge-1). (Fenger-Gron, Fillman, Norrild, & Lykke-Andersen, 2005; Steiger, Carr-Schmid, Schwartz, Kiledjian, & Parker, 2003; Yu, Yang, Gulick, Bloch, & Bloch, 2005) Με την αφαίρεση της καλύπτρας, η εξωριβονουκλεάση Xrn1 ξεκινά την αποικοδόμηση του mRNA-στόχου.

Δύο άλλα μετάγραφα τα οποία δεν σχετίζονται μεταξύ τους (RPS28B και EDC), έχουν τη δυνατότητα να παρακάμψουν το στάδιο της απαδενυλίωσης και η καλύπτρα τους αφαιρείται αυτορρυθμιστικά. Η πρωτεΐνη συνδέεται σε μια δομή βρόγχου στην 3'-UTR του μεταγράφου της και στρατολογεί μια άλλη πρωτεΐνη η οποία δρα ως ενισχυτής της αφαίρεσης της καλύπτρας, την Edc3. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την προσέλκυση κι άλλων πρωτεϊνών που αφαιρούν την καλύπτρα και έτσι καθίσταται δυνατή η αποικοδόμηση η οποία είναι ανεξάρτητη της απαδενυλίωσης. (Cheadle et al., 2005) Το EDC1 μετάγραφο mRNA του *S.cerevisiae*, το οποίο κωδικοποιεί για την ρυθμιστική πρωτεΐνη Edc1, αποικοδομείται και αυτό μέσω οδών ανεξάρτητων της απαδενυλίωσης. Εδώ, η απαδενυλίωση φαίνεται να αποτρέπεται από την αλληλεπίδραση της ουράς πολυ(A) και

μιας περιοχής πολυ(U) στην αμετάφραστη περιοχή 3'. Αυτή η αλληλεπίδραση εμποδίζει τη δράση των απαδενυλασών, αφού εμποδίζει την πρόσβασή τους στην ουρά πολυ(A). Το ότι το Edc1 κωδικοποιεί για ένα ρυθμιστή της αφαίρεσης της καλύπτρας και αποικοδομείται από ένα μονοπάτι που είναι πολύ ευαίσθητο στην αφαίρεση της καλύπτρας, υποδεικνύει ένα μηχανισμό ανατροφοδοτικής ρύθμισης. Η αφαίρεση της καλύπτρας του μεταγράφου mRNA του EDC1 απαιτεί κάποιες υπομονάδες του συμπλόκου CCR4–NOT, κάτι που σημαίνει ένα συσχετισμό ανάμεσα στο σύμπλοκο απαδενυλίωσης και αφαίρεσης της καλύπτρας (Garneau et al., 2007).

1.6.3 Αποικοδόμηση μέσω ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης

Ο συγκεκριμένος, είναι πιθανόν ο αποδοτικότερος τρόπος αποικοδόμησης mRNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Εδώ, παράγονται δύο κομμάτια τα οποία είναι ευαίσθητα στη δράση εξωνουκλεασών. Έχουν ταυτοποιηθεί διάφορες ενδονουκλεάσες των οποίων ο στόχος είναι mRNA. Ανάμεσα σε αυτές είναι οι PMR1, IRE1 και το κυρίως πυρηνικό ένζυμο επεξεργασίας ριβοσωμικού RNA (RNase MRP). Κάποιες ενδονουκλεάσες που ακόμη δεν έχουν χαρακτηριστεί, ενδεχομένως να συμμετέχουν στην αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNA, ενώ κάποια siRNAs αρχίζουν την αποικοδόμηση μέσω ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης στην οποία διαμεσολαβεί η Argonaute protein-2 (Ago2). (Garneau et al., 2007)



Εικόνα 2: Μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA. **a)** Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την απαδενυλίωση, **b)** Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αφαίρεση της καλύπτρας, **c)** Αποικοδόμηση μέσω ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης (Garneau et al., 2007).

1.7 Διαδικασίες ελέγχου ποιότητας μεταγράφων mRNA

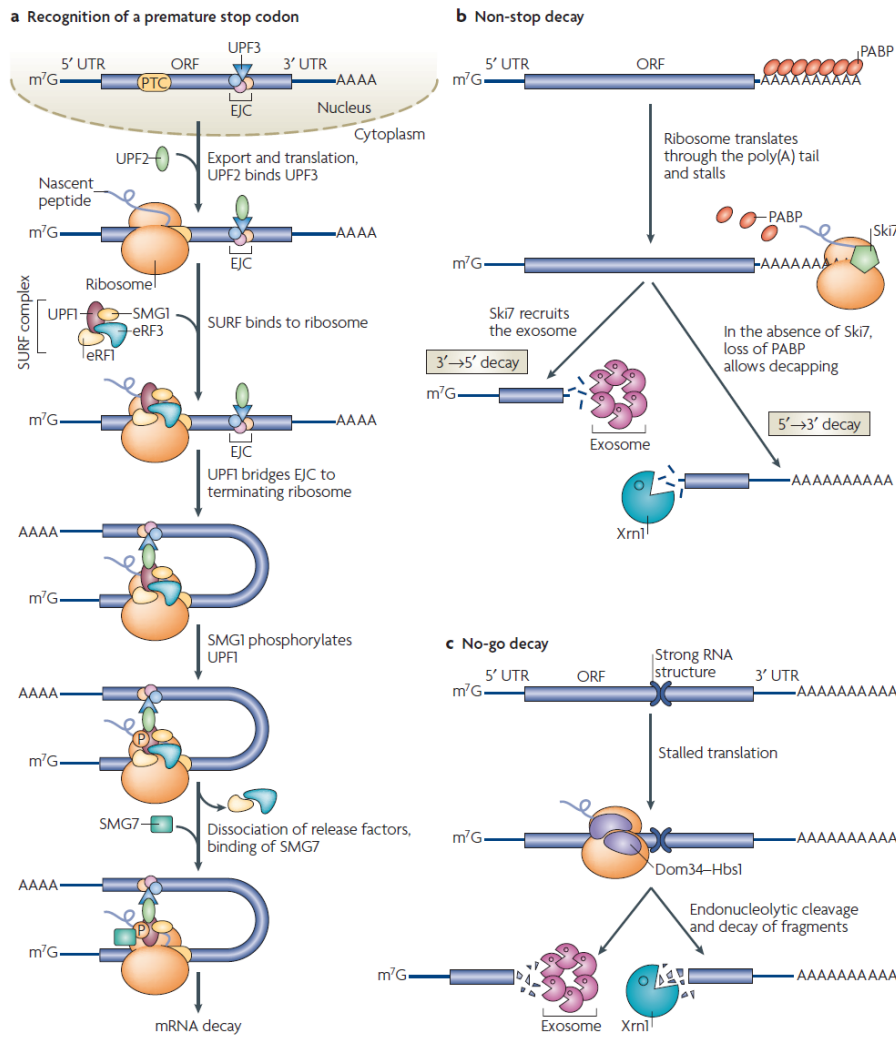
Σε κάθε στάδιο της βιοσύνθεσης του mRNA, υπάρχει πιθανότητα να συμβεί κάποιο λάθος. Ωστόσο, θα πρέπει να διασφαλίζεται η πιστότητα της διαδικασίας έχουν αναπτυχθεί μηχανισμοί εντοπισμού και αποικοδόμησης τυχόν ελαττωματικών μεταγράφων. Με αυτόν τον τρόπο, τα κύτταρα προφυλάσσονται από τοξικά πρωτεϊνικά προϊόντα. Ενώ ο έλεγχος της ωρίμανσης του mRNA λαμβάνει χώρα στον πυρήνα, οι παρακάτω διαδικασίες πραγματοποιούνται στο κυτταρόπλασμα καθώς εξαρτώνται από τη μετάφραση και μπορούν να ανιχνεύσουν προβληματικές αγγελιαφόρες ριβονουκλεοπρωτεϊνικές δομές (Garneau et al., 2007).

1.7.1 Nonsense-mediated decay

Είναι το καλύτερα μελετημένο μονοπάτι ελέγχου της ποιότητας του mRNA. Μέσω αυτού του μονοπατιού μπορούν να αναγνωριστούν και να αποικοδομηθούν μετάγραφα τα οποία περιέχουν πρώιμα κωδικόνια τερματισμού. Αυτά μπορεί να προκύψουν από μεταλλάξεις, αλλαγές στο αναγνωστικό πλαίσιο, προβληματική επεξεργασία του μεταγράφου, ελαττωματική έναρξη της μετάφρασης και 3' αμετάφραστη περιοχή με μεγάλη έκταση. Αν μεταφραζόντουσαν αυτά τα μετάγραφα θα προέκυπταν κολοβωμένες πρωτεΐνες με ελαττωματικές λειτουργίες. Αυτή η οδός έχει βρεθεί σε όλους τους ευκαρυώτες και οι κύριες πρωτεΐνες του συμπλόκου αυτού είναι η UPF1, UPF2 και UPF3, οι οποίες είναι πολύ διατηρημένες (Lykke-Andersen & Jensen, 2015).

1.7.2 Non-stop decay

Όμοια με τον προηγούμενο μηχανισμό, εδώ ταυτοποιούνται και αποικοδομούνται μετάγραφα mRNA τα οποία δεν φέρουν καθόλου κωδικόνιο τερματισμού. Αυτά μπορεί να προκύψουν ύστερα από θραύσεις είτε από την πλήρη απουσία, εντός πλαισίου, κωδικονίου τερματισμού, συνεχίζοντας έτσι στη μετάφραση της ουράς πολυ(A). Θεωρείται πως η πρόωρη πολυαδενυλίωση συνεισφέρει σημαντικά στην παραγωγή υποστρωμάτων για αυτό το μονοπάτι. Τα μετάγραφα αυτά αποικοδομούνται από το εξώσωμα του κυτταροπλάσματος με κατεύθυνση 3'-5'.



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση των οδών ελέγχου της ποιότητας του mRNA (Garneau et al., 2007).

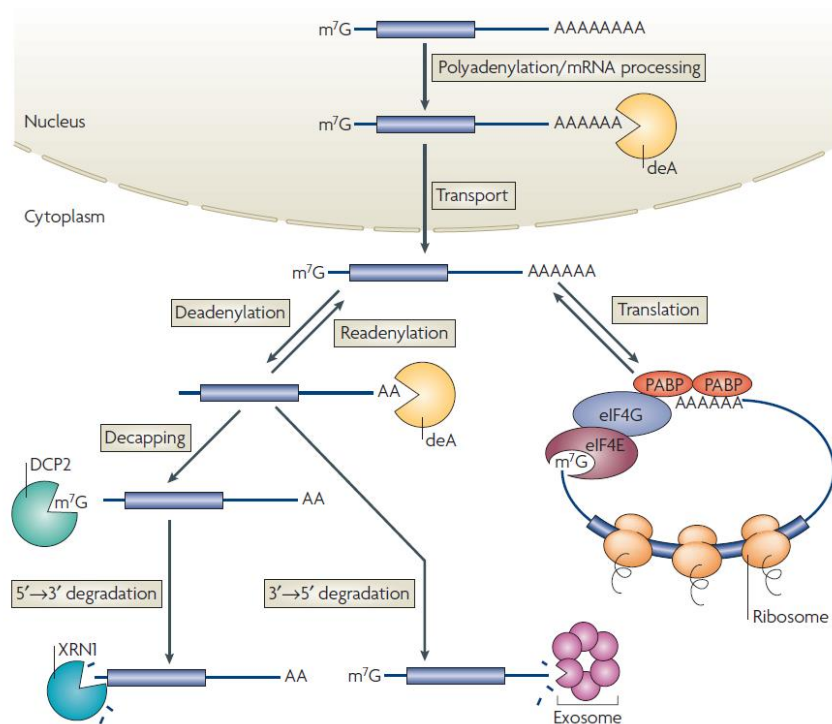
1.7.3 No-go decay

Αυτό το μονοπάτι ανακαλύφθηκε στη ζύμη και δεν έχει μελετηθεί πλήρως, αλλά έχει βρεθεί πως τα ριβοσώματα που επιτελούν τη μετάφραση παρακωλύονται και δεν μπορούν να συνεχίσουν. Αυτό μπορεί να οφείλεται για παράδειγμα αν συναντήσουν κάποια δευτεροταγή ειδική δομή στο mRNA. Το μονοπάτι αυτό προλαμβάνει την προσέλκυση μεταφραστικών παραγόντων, αποικοδομώντας το μετάγραφο κοντά στην περιοχή παρακώλυσης. Έτσι, τα ριβοσώματα απελευθερώνονται και τα θραύσματα mRNA που προκύπτουν αποικοδομούνται περαιτέρω από το εξώσωμα και το ένζυμο Xrn1.

1.8 Απαδενυλίωση

Η απαδενυλίωση είναι το πρώτο βήμα, συνήθως, της αποικοδόμησης του mRNA και αυτό που ορίζει το ρυθμό της. Επίσης, ρυθμίζει τη μεταφραστική σίγηση του mRNA και για

αυτούς τους λόγους, θεωρείται το πιο σημαντικό σημείο ελέγχου των διαδικασιών αυτών. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι απαδενυλάσες είναι εξωριβονουκλεάσες οι οποίες εξαρτώνται από το μαγνήσιο για να εκδηλώσουν τη δράση τους. Υδρολύουν τα μεταγράφα mRNA με κατεύθυνση 3'-5', απελευθερώνοντας 5'-AMP. Το βασικό τους υπόστρωμα είναι οι πολυ(A) ουρές, αλλά, έχει παρατηρηθεί πως κάποιες απαδενυλάσες έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν κι άλλα μόρια RNA *in vitro* (van Hoof, Frischmeyer, Dietz, & Parker, 2002). Άπαξ και αφαιρεθεί η ουρά πολυ(A), άλλα ένζυμα προσδέονται στο mRNA και αρχίζουν να το διασπούν.



Εικόνα 4: Το ρυθμοκαθοριστικό στάδιο της αποικοδόμησης του mRNA, είναι η απαδενυλίωση (Goldstrohm & Wickens, 2008).

1.8.1 Κατάταξη, ρόλοι και ρύθμιση των απαδενυλασών

Ύστερα από σύγκριση των επικρατειών νουκλεάσης που έχουν οι απαδενυλάσες, αυτές χωρίστηκαν σε δύο μεγάλες ομάδες. Η πρώτη είναι η υπεροικογένεια DEDD και η άλλη είναι η υπεροικογένεια εξωνουκλεάση-ενδονουκλεάση-φωσφατάση (EEP). Οι νουκλεάσες DEDD, καλούνται έτσι λόγω των τεσσάρων συντηρημένων καταλυτικών αμινοξέων που τις χαρακτηρίζουν (Asp, Glu, Asp, Asp – DEDD). Αυτά βρίσκονται σε διάφορα σημεία των τριών επικρατειών εξωνουκλεάσης των ενζύμων τα οποία δεσμεύουν και προσανατολίζουν ιόντα Mg. Σε αυτή την υπεροικογένεια ανήκει η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), η

POP2(CAF1), η CAF1Z και οι απαδενυλάσες των οικογενειών PAN2. Τα μέλη της υπεροικογένειας EEP, έχουν συντηρημένα κατάλοιπα Asp και His στις αντίστοιχες επικράτειες με δράση νουκλεάσης. Κάποια παραδείγματα της υπεροικογένειας αυτής είναι: η ANGEL, η CCR4 και η 2'PDE (Dlakis, 2000).

ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ							
		SC	CE	DM	XL	MM	HS
Υπεροικογένεια DEDD	CNOT7/POP2	+	+	+	+	+	+
	CNOT8	-	-	-	+	+	+
	CAF1Z	-	+	-	+	+	+
	PARN	-	+	-	+	+	+
	PAN2	+	+	+	+	+	+
Υπεροικογένεια EEP	CNOT6/CCR4	+	+	+	+	+	+
	CNOT6L	-	-	-	-	+	+
	2'PDE	-	+	+	+	+	+

Εικόνα 5: Η ποικιλομορφία των απαδενυλασών. Με κόκκινο σταυρό σημαίνονται τα είδη που έχει επιβεβαιωθεί η ενζυμική δραστηριότητα, με μαύρο εκείνα στα οποία προβλέπεται να υπάρχει ενζυμική δραστηριότητα, ενώ με παύλα τα είδη τα οποία δεν έχει εντοπιστεί η ενζυμική δραστηριότητα. Sc: *S. cerevisiae*, Ce: *C. elegans*, Dm: *D. melanogaster*, Xl: *X. laevis*, Mm: *M. musculus*, Hs: *H. sapiens*(Goldstrohm & Wickens, 2008).

Βλέπουμε από την εικόνα παραπάνω πως κάποιες απαδενυλάσες είναι παρούσες σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ενώ άλλες υπάρχουν μόνο σε κάποιους. Σε κάθε περίπτωση όμως, σε όλους τους οργανισμούς υπάρχει τουλάχιστον ένα μέλος από κάθε υπεροικογένεια. Η ποικιλομορφία αυτή υποδεικνύει πως κάποιες απαδενυλάσες έχουν σαν στόχο συγκεκριμένα mRNA, ορίζοντας τον έλεγχο του mRNA μέσω ρύθμισης της δραστηριότητας ενός ενζύμου. Είναι όμως πιθανό διαφορετικές απαδενυλάσες να στοχεύουν το ίδιο mRNA, με λειτουργίες που είναι ξεχωριστές, αλλά αλληλοεπικαλυπτόμενες.

Ο ρόλος των απαδενυλασών είναι η αποικοδόμηση των πολυ(A) ουρών των μεταγράφων mRNA ρυθμίζοντας έτσι τη γονιδιακή έκφραση. Εκτός αυτών όμως, οι απαδενυλάσες έχουν και άλλες λειτουργίες. Για παράδειγμα, η PARN στον *X. laevis* και στην *A. thaliana*, η CCR4 στη *D. melanogaster* και η CCF-1 στο *C. elegans*, είναι ζωτικής σημασίας για την πρώιμη ανάπτυξή τους (Chiba et al., 2004; Korner et al., 1998; Molin & Puisieux, 2005; Morris, Hong, Lilly, & Lehmann, 2005). Υπό τη σκοπιά της φυσιολογίας των οργανισμών, οι απαδενυλάσες

είναι εξίσου σημαντικές. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι ποντίκια στα οποία είχε αποσιωποηθεί το γονίδιο της Cnot7 είχαν μεγαλύτερη οστική μάζα, λόγω του της αύξησης σχηματισμού οστών (Washio-Oikawa et al., 2007).

Η ρύθμιση της δραστηριότητας των απαδενυλασών κρίνεται αναγκαία και θεμελιώδους σημασίας, καθώς η ανεξέλεγκτη απαδενυλίωση θα απέβαινε μοιραία για το κύτταρο. Τα ελαττωματικά mRNAs θα πρέπει να απαδενυλιώνονται και ακολούθως να αποικοδομούνται, ενώ τα σταθερά και μεταγραφικά ενεργά mRNA να προστατευθούν από την απαδενυλίωση της ουράς πολυ(A) (Lejeune & Maquat, 2003). Ο ρυθμός της απαδενυλίωσης, ο οποίος διαφέρει μεταξύ διάφορων mRNA ελέγχεται από πρωτεΐνες οι οποίες προσδένονται ειδικά σε συγκεκριμένες αλληλουχίες των mRNA. Στις 3' αμετάφραστες περιοχές των mRNA, συνήθως υπάρχουν ρυθμιστικά στοιχεία που ενισχύουν την απαδενυλίωσή τους, τα οποία δεσμεύονται από παράγοντες που προωθούν τη διαδικασία της απαδενυλίωσης επιστρατεύοντας συγκεκριμένες απαδενυλάσες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων παραγόντων αποτελούν οι CUG-BP, miRNAs, PUF και CPEB (Goldstrohm & Wickens, 2008; Kadyrova et al., 2007; Hook et al., 2007). Ενίσχυση της απαδενυλίωσης συμβαίνει και μέσω σύνδεσης της PABP με συγκεκριμένες απαδενυλάσες. Επιπρόσθετα, παρατηρείται αύξηση της δραστηριότητας μερικών απαδενυλασών καθώς και της ικανότητας επεξεργασίας των αλυσίδων mRNA, υπό την επιρροή της 5' καλύπτρας των αλυσίδων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η απαδενυλάση PARN, της οποίας η δράση φαίνεται να εξαρτάται από την ύπαρξη δομής καλύπτρας (Virtanen et al., 2013).

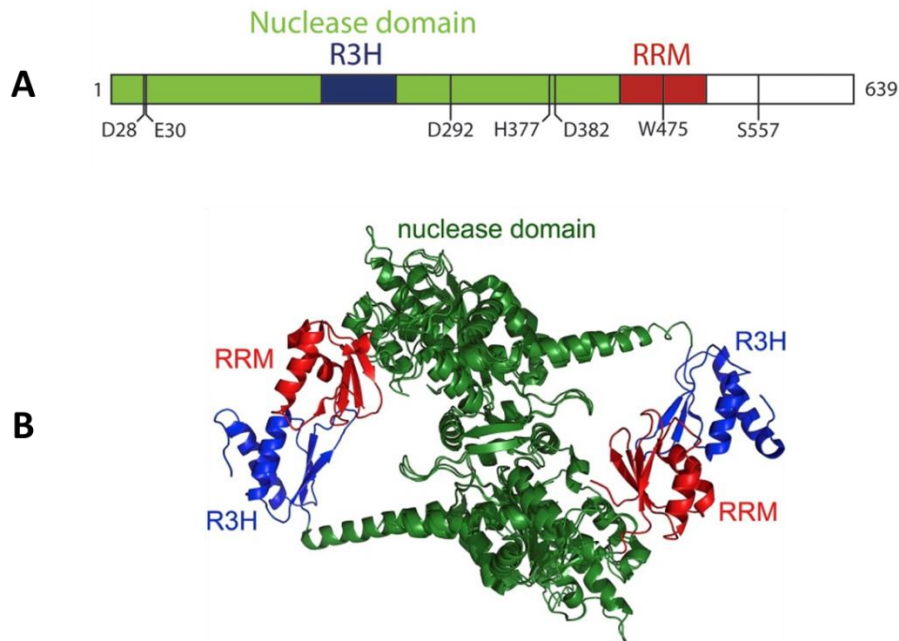
1.9 Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A)-specific ribonuclease, PARN]

Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN, αποτελεί μία από τις κυριότερες και καλύτερα χαρακτηρισμένες απαδενυλάσες στα κύτταρα των θηλαστικών, στα οποία και αρχικά απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε (Astrom et al., 1992; Korner et al., 1997). Επιπλέον, είναι συντηρημένη σε αρκετούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των φυτών και του ανθρώπου, ωστόσο απουσιάζει από άλλους, όπως για παράδειγμα τον *S.cerevisiae* και τη *D.melanogaster*, γεγονός που υποδηλώνει ότι η PARN δεν απαιτείται σε όλους τους ευκαρυώτες και πιθανώς ένα διαφορετικό ένζυμο απαδενυλίωσης αντικαθιστά τη δραστηριότητά της, όπως για παράδειγμα συμβαίνει στον *S.cerevisiae* και την *D. melanogaster*, όπου και στους δύο αυτούς οργανισμούς απουσιάζει η

PARN και εντοπίζεται το POP2 (Parker & Song, 2004; Orychchal et al., 2005). Βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η PARN είναι ομοδιμερής (ένα καίριο χαρακτηριστικό για την καταλυτική δράση της), με ικανότητα αλληλεπίδρασης με την καλύπτρα m⁷G και εξειδικευμένη 3'-5' εξωριβονουκλεάση για τις πολυ(A) ουρές, ελευθερώνοντας 5'-AMP (Wu et al., 2005).

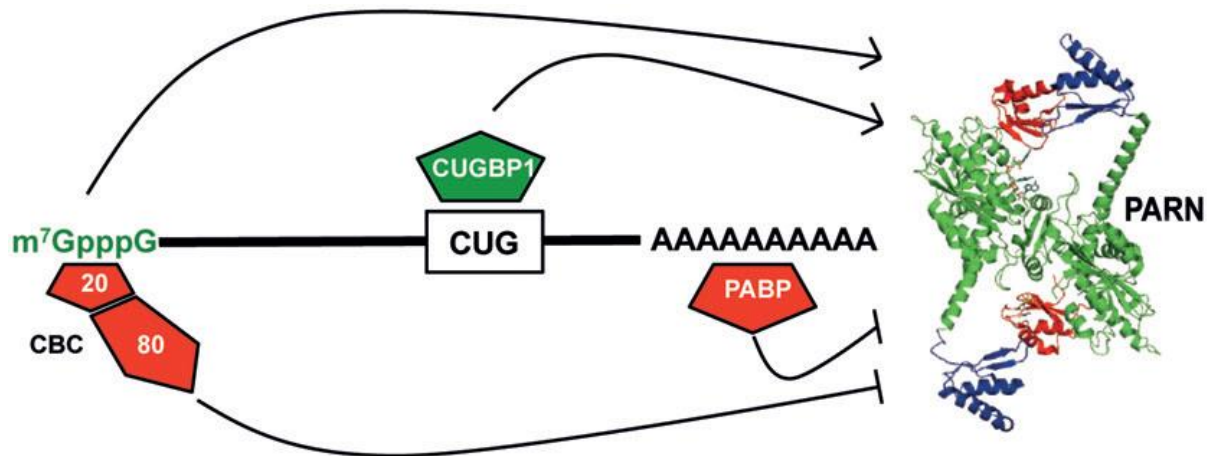
Το αμινοτελικό άκρο της είναι πιο συντηρημένο ανάμεσα στα ομόλογα της PARN συγκριτικά με το καρβοξυτελικό. Επίσης, η αποτελεσματική δραστηριότητα του ενζύμου αυτού είναι εξαρτώμενη από δισθενή μεταλλικά ιόντα, κυρίως Mg²⁺ που πιθανόν βρίσκονται στο ενεργό κέντρο παίζοντας καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό της κατάλυσης και απαιτεί την ύπαρξη μονόκλωνου RNA ως υπόστρωμα με ελεύθερη ομάδα υδροξυλίου (-OH) στο άκρο 3' του (Korner & Wahle, 1997; Wu et al., 2005). Η PARN είναι μοναδική μεταξύ των μέχρι τώρα γνωστών ευκαρυωτικών πολυ(A) νουκλεασών αποικοδόμησης ως η μόνη απαδενυλάση που αλληλεπιδρά απευθείας τόσο με την καλύπτρα όσο και με την ουρά πολυ(A), για την υδρόλυση της ουράς πολυ(A) των mRNA (Virtanen et al., 2013). Η ιδιότητα αυτή αποδεικνύει έμμεσα ότι η PARN συμμετέχει στον μεταβολισμό του mRNA καθώς και το ότι αποτελεί πιθανό ρυθμιστή των ευκαρυωτικών mRNA, αφού είναι τα μόνα που φέρουν καλύπτρα και ουρά πολυ(A).

Ειδικότερα, η PARN ανήκει στην υπεροικογένεια των εξωριβονουκλεασών με δραστηριότητα 3'-5' η οποία ονομάζεται DnaQ-like (Korner et al., 1998; Mian, 1997; Moser et al., 1997). Το κοινό χαρακτηριστικό αυτών είναι ο καταλυτικός πυρήνας, ο οποίος είναι συντηρημένος και φέρει το μοτίβο DEDD, που είναι στην ουσία τα τέσσερα κύρια καταλυτικά αμινοξέα (Asp, Glu, Asp, Asp) (Zuo & Deutscher, 2001). Δομικά, η PARN αποτελείται από 639 αμινοξέα και το μοριακό της βάρος είναι 73.5 kDa. (Korner et al., 1998). Το καταλυτικό της κέντρο αποτελείται από μια κοιλότητα αρνητικά φορτισμένη και βρίσκεται στην επικράτεια νουκλεάσης του ενζύμου. (Korner et al., 1998). Πέραν αυτής, έχουν χαρακτηριστεί δύο ακόμη επικράτειες οι οποίες έχουν ιδιότητες που σχετίζονται με το RNA, η R3H και η RRM. Μέσω της επικράτειας R3H, η PARN συνδέεται με την πολυ(A) ουρά (Wu et al., 2005) ενώ η RRM είναι σημαντική για την πρόσδεση της καλύπτρας m⁷G (Nilsson et al., 2007) και θεωρείται πως σταθεροποιεί τη δομή της PARN (Zhang, Liu, & Yan, 2007). Οι δύο μονάδες της PARN συνδέονται μεταξύ τους με ένα δισουλφιδικό δεσμό που ενώνει τις επικράτειες νουκλεάσης των μονάδων αυτών και μιας διεπιφάνειας η οποία αποτελείται από πολλά αρωματικά αμινοξέα (Virtanen et al., 2013).



Εικόνα 6: Α) Η PARN αποτελείται από 639 αμινοξέα και αποτελείται από την επικράτεια νουκλεάσης (σημαίνεται με πράσινο χρώμα), την επικράτεια R3H (μπλε) και την επικράτεια RRM (κόκκινο). Δεξιά, με άσπρο, σημαίνεται το καρβοξυτελικό άκρο το οποίο είναι μη συντηρημένο. Επισημαίνονται στην επικράτεια νουκλεάσης σημαντικά αμινοξέα του μοτίβου DEDD, ενώ στην επικράτεια RRM επισημαίνεται η τρυπτοφάνη στη θέση 475 η οποία είναι καθοριστικής σημασίας για την πρόσδεση της καλύπτρας. (Virtanen, Henriksson, Nilsson, & Nissbeck, 2013) **Β)** Δομή της PARN. Με πράσινο σημαίνεται η επικράτεια νουκλεάσης, με μπλε η επικράτεια R3H και με κόκκινο η επικράτεια RRM. Χαρακτηριστικά παρατηρούμε στο κέντρο τη διεπιφάνεια σύνδεσης των δύο μονάδων (G. J. He & Yan, 2019).

Σε ό,τι αφορά στη ρύθμιση της PARN, η καλύπτρα θεωρείται αλλοστερικός ρυθμιστής της, αφού έχει φανεί πως ενισχύει το ρυθμό αποικοδόμησης της πολύ(A) ουράς των mRNA στόχων του ενζύμου. Επίσης, ένα ακόμη στοιχείο που συνηγορεί στην αλλοστερική ιδιότητα της καλύπτρας είναι η θέση που συνδέεται με την PARN, η οποία βρίσκεται εκτός του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου. (Wu et al., 2009). Εκτός της καλύπτρας και της πολύ(A) ουράς, στη ρύθμιση συμβάλλουν και *cis*-δραστικά στοιχεία όπως τα AU και GU (Garneau et al., 2007). Σε αυτά προσδένονται διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες έχουν σαν στόχο τη ρύθμιση της δράσης της PARN.



Εικόνα 7: Η ρύθμιση της PARN επιτελείται από διάφορες πρωτεΐνες (Virtanen et al., 2013).

Η PARN εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα και κυρίως στα πυρηνικά υποδιαμερίσματα, τον πυρηνίσκο (nucleolus) και τα σωμάτια Cajal (Cajal bodies) (Berndt et al., 2012) αλλά και στο κυτταρόπλασμα (Virtanen et al., 2013) και σε μια μελέτη έχει φανεί πως εντοπίζεται και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Duan, Jiao, He, & Yan, 2020). Στον άνθρωπο, η PARN υπάρχει σε δύο ισομορφές, την πυρηνική με μοριακό βάρος 74kDa και την κυτταροπλασματική με μοριακό βάρος 54kDa (Korner et al., 1998). Η δεύτερη, προκύπτει ύστερα από πρωτεόλυση της πυρηνικής ισομορφής και θεωρείται πως ο λόγος που ευρίσκεται στο κυτταρόπλασμα είναι διότι στο κομμάτι που απομακρύνεται κατά την πρωτεόλυση (καρβοξυτελικό άκρο), υπάρχει μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localisation Signal, NLS) (Copeland & Wormington, 2001; Duan et al., 2019). Εκτός των δύο ισομορφών αυτών, η PARN έχει τη δυνατότητα να μετακινείται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (και ανάποδα) μέσω παλίνδρομης κίνησης (Yamashita et al., 2005).

1.9.1 Ο ρόλος της αργινίνης 99 (R99) και της γλουταμίνης 109 (Q109)

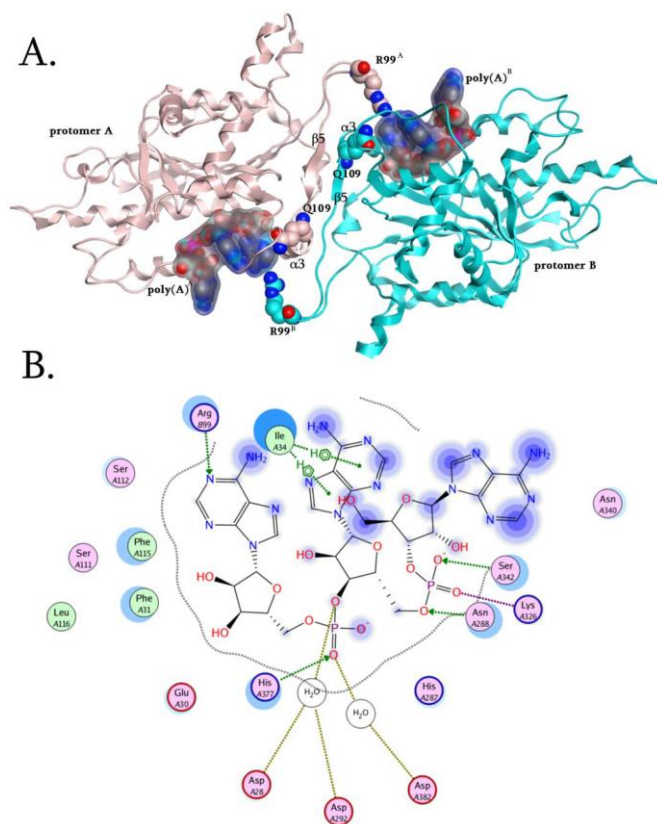
Ύστερα από φυλογενετική ανάλυση η οποία βασίστηκε στα διαθέσιμα γονιδιώματα, αποκαλύφθηκαν σημαντικά αμινοξέα που θα μπορούσαν να παίζουν ρόλο στην ρύθμιση της καταλυτικής δραστηριότητας της PARN (Vlachakis et al., 2012). Στην ανάλυση αυτή, ταυτοποιήθηκαν 32 ομόλογες πρωτεϊνικές αλληλουχίες της PARN στα υπό εξέταση γονιδιώματα, οι οποίες αντιπροσωπεύουν ποικίλες ευκαρυωτικές ταξινομικές κατηγορίες. Δηλαδή, η PARN εμφανίζει ευρεία φυλογενετική κατανομή, η οποία εκτείνεται από τα πρωτόζωα μέχρι τα μετόζωα. Ωστόσο, στο ζυμομύκητα *S.cerevisiae* και τη *D.melanogaster* δεν βρέθηκαν ομόλογα της και αυτό θα μπορούσε να σημαίνει πως σε αυτούς τους οργανισμούς υπάρχουν εναλλακτικές οδοί για την αποικοδόμηση των ουρών πολυ(A).

Επιπλέον πρωτεϊνικά μοτίβα εξήχθησαν από πολλαπλές στοιχίσεις της αμινοξικής αλληλουχίας της PARN. Πέραν του συντηρημένου καταλυτικού μοτίβου (Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382, μοτίβο DEDD) ανακαλύφθηκε ένα δεύτερο μοτίβο που περιείχε τα αμετάβλητα κατάλοιπα αργινίνη 99 (R99) και γλουταμίνη 109 (Q109). Ύστερα, από εξέταση της πρωτοταγούς αμινοξικής αλληλουχίας των άλλων ειδών εκτός των μεταζώων, βρέθηκε πως στη γείτονα περιοχή της αργινίνης 99 εντοπίζονται είτε άλλα κατάλοιπα αργινίνης είτε αυτά έχουν αντικατασταθεί με τα επίσης πολικά κατάλοιπα λυσίνης.

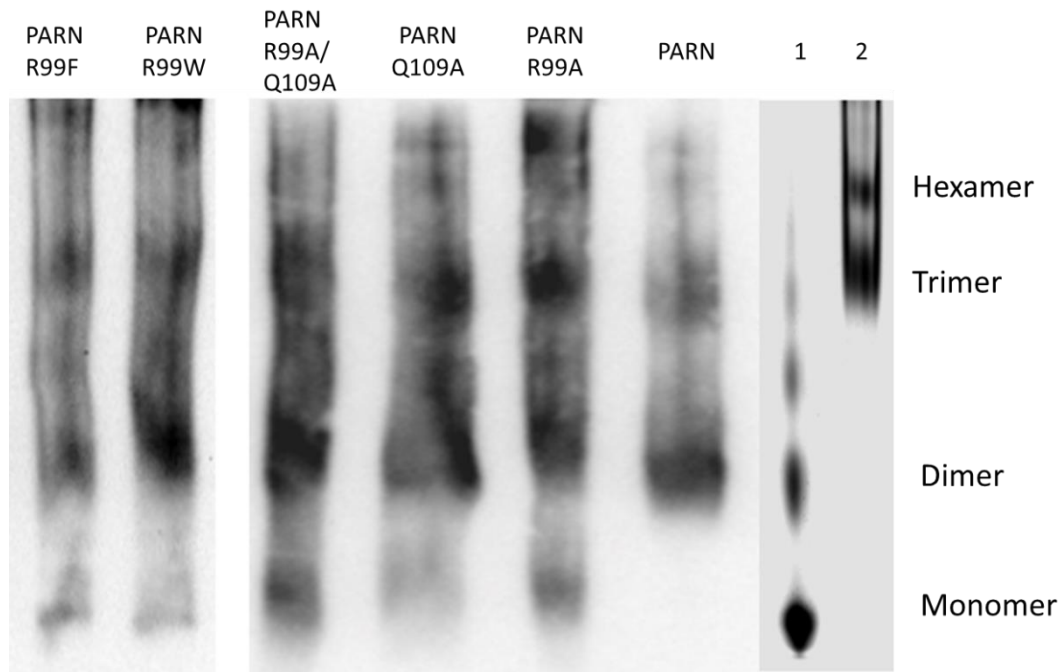
Για την περαιτέρω ανάλυση του πιθανού ρόλου των αμετάβλητων καταλοίπων αργινίνης 99 και γλουταμίνης 109, έγινε δομική υπέρθεση των δύο μονάδων της PARN και των δύο αντίστοιχων πολυ(A) νουκλεοτιδίων. Αυτή έδειξε μικρές αποκλίσεις ($\max Ca\ RMSD < 2\text{\AA}$). Η δομική *in silico* ανάλυση αποκάλυψε πως η αργινίνη 99 της μονάδας A (Arg99^A) εκτείνεται στο καταλυτικό κέντρο της μονάδας B, όπως το ίδιο κάνει το Arg99^B στο καταλυτικό κέντρο της μονάδας A. Τα κατάλοιπα αυτά δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με την αδενίνη του τελευταίου 3' νουκλεοσιδίου αδενοσίνης της ουράς πολυ(A). Η ουσία της συμβολής του καταλοίπου της αργινίνης 99, επιβεβαιώθηκε και από μελέτες μετάλλαξης της α3 έλικας της PARN. Η έλικα αυτή δημιουργεί μια ευλύγιστη θηλιά, η οποία στηρίζει τη θηλιά της αργινίνης 99 της έτερης μονάδας. Με αυτόν τον τρόπο καταφέρνει να διατηρήσει την αργινίνη 99 στην καταλυτική περιοχή. Τα παραπάνω, λοιπόν, δείχνουν πως η αργινίνη 99 είναι πιθανό να είναι ένα σημαντικό κατάλοιπο του ενζύμου, αφού ενώνει τις δύο υπομονάδες, συνεισφέρει στη συνολική σταθερότητα του ενζύμου και καθοδηγεί το υπόστρωμα στην καλύτερη δυνατή θέση για την αντίδραση διάσπασης.

Το άλλο απαράλλακτο κατάλοιπο, η γλουταμίνη 109, είναι τοποθετημένο στους αντιπαράλληλους β5 κλώνους της ομοδιμερούς διεπιφάνειας. Για τη διαλεύκανση του ρόλου αυτού του καταλοίπου δημιουργήθηκαν *in silico* τα μεταλλάγματα Q109A και Q109W. Το πρώτο μετάλλαγμα έδειξε σημαντική απώλεια στην ένωση και την πακετοποίηση των δύο β5 κλώνων (τετραπλάσια ενεργειακή απώλεια). Το δεύτερο δεν σχηματιζόταν καθόλου, αφού το πιο ογκώδες κατάλοιπο τρυπτοφάνης δεν μπορούσε να προσαρμοστεί στην περιοχή της διεπιφάνειας της PARN. Φαίνεται, λοιπόν, πως το κατάλοιπο γλουταμίνη 109 σχηματίζει τη μορφή και το μέγεθος της καταλυτικής κοιλότητας που είναι διαθέσιμη για να υποδεχτεί το υπόστρωμα πολυ(A). (Vlachakis et al., 2012).

Με βάση αυτά τα ευρήματα, το εργαστήριό μας οδηγήθηκε να εξετάσει το ενδεχόμενο τα αμινοξέα αυτά να επηρεάζουν τη δομή του ενζύμου. Έτσι, μετά από ηλεκτροφόρηση μεταλλαγμάτων της PARN στα R99 και Q109, παρατηρήθηκε πως διαταράσσεται ο ολιγομερισμός του ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα, η μονομερής μορφή της PARN εντοπιζόταν σε όλα τα μεταλλάγματα (κάτι που δεν ήταν εμφανές στην αγρίου τύπου PARN), ενώ μορφές που είχαν περισσότερες από δύο υπομονάδες, παρατηρούταν τόσο στην αγρίου τύπου όσο και στα μεταλλάγματα (Εικόνα 9). Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα πως τα δύο κατάλοιπα επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία της PARN, με μεγαλύτερη επιρροή να έχει το κατάλοιπο αργινίνη 99.



Εικόνα 8: Ο ρόλος και η θέση των καταλοίπων R99 και Q109. Α) Αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της PARN και της πολυ(Α) **Β)** Ο χάρτης αλληλεπιδράσεων του καταλυτικού κέντρου της PARN και της πολυ(Α), όπου φαίνεται χαρακτηριστικά η συμβολή της R99 και του καταλοίπου His377.



Εικόνα 9: Επίδραση των μεταλλάξεων στον ολιγομερισμό της PARN. Στις διαδρομές 1 και 2 Albumin bovine serum (Monomer–Dimer) Urease (Trimer–Hexamer) αντίστοιχα. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. (Μεταπτυχιακή Διατριβή Λάσχου Βασιλική, 2015)

2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο στόχος της εργασίας είναι να μελετηθεί το κατά πόσο ο ολιγομερισμός της πολυ(A)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN) επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της. Για να επιτευχθεί αυτός, έγινε κλωνοποίηση της φυσικού τύπου PARN στον πλασμιδιακό φορέα pDsRed-Monomer-N1. Έπειτα, διαμολύνθηκαν κύτταρα HeLa και HEK293T με τον ανασυνδυασμένο φορέα, αλλά και με τον φορέα pEGFP-C2 ο οποίος έφερε το διπλό μετάλλαγμα R99 και Q109. Τα συνδιαμολυσμένα κύτταρα παρατηρήθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία και μικροσκοπία φθορισμού και έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων.

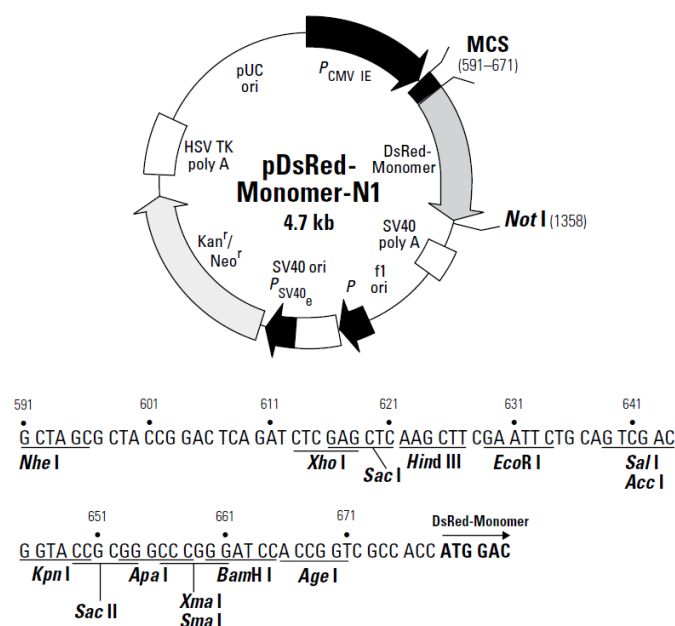
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Πλασμιδιακοί φορείς

i. Ο φορέας pDsRed-Monomer-N1

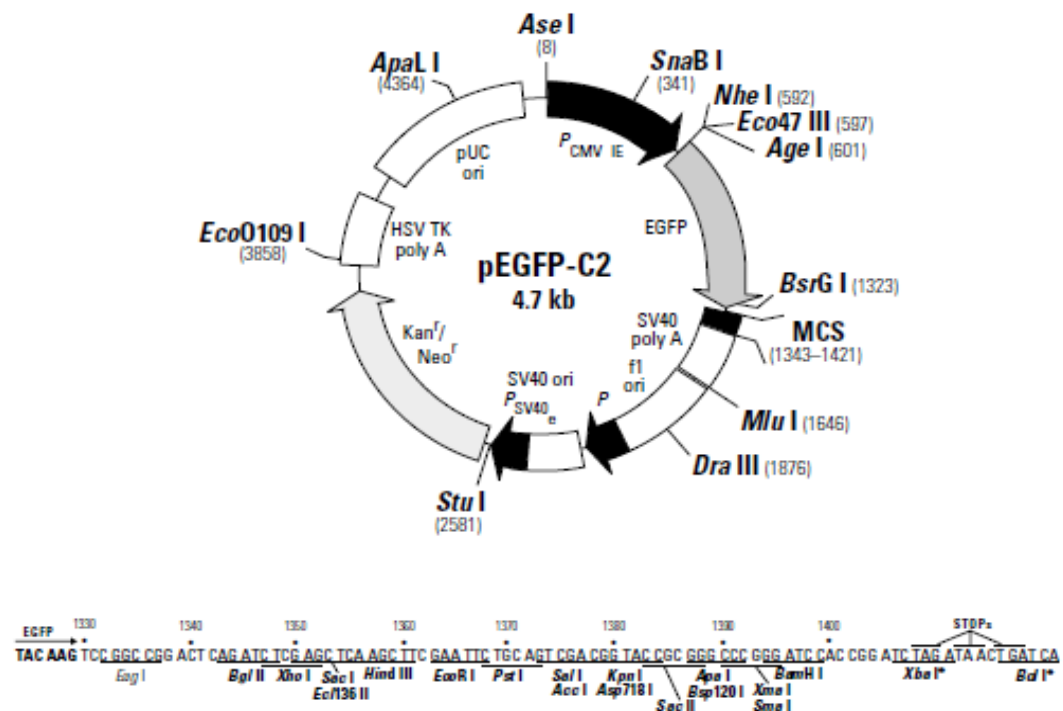
Για την κλωνοποίηση της wtPARN επιλέχθηκε ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών pDsRed-Monomer-N1, ο οποίος κωδικοποιεί την φθορίζουσα πρωτεΐνη DsRed-Monomer, μια παραλλαγή της DsRed η οποία προήλθε από ανθόζωα του γένους *Discosoma*. (Matz et al., 1999) Ο φορέας έχει μέγεθος 4,7kb και η κωδική αλληλουχία του έχει υποστεί βελτιστοποίηση των κωδικονίων για τον άνθρωπο ώστε να επιτευχθεί υψηλή έκφραση σε κύτταρα θηλαστικών. Η περιοχή του πολυσυνδέτη (Multiple Cloning Site - MCS) βρίσκεται μεταξύ υποκινητή και της κωδικής αλληλουχίας του DsRed-Monomer. Τα γονίδια που κλωνοποιούνται στο MCS εκφράζονται σε σύντηξη (fusion) με το αμινοτελικό άκρο της φθορίζουσας πρωτεΐνης υπό την προϋπόθεση να βρίσκονται στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης και να μην υπάρχουν κωδικόνια τερματισμού. Ο φορέας pDsRed-Monomer-N1 φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη ώστε να γίνει επιλογή σε καλλιέργειες στελεχών της *E. coli*, καθώς και γονίδιο αντίστασης στη νεομυκίνη για την επιλογή των διαμολυσμένων ευκαρυωτικών κυττάρων (pDsRed-Monomer-N1 Vector Information, Takara Bio).



Εικόνα 10: Ο πλασμιδιακός φορέας pDsRed-Monomer-N1. Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνεται η περιοχή του πολυσυνδέτη.

ii. Ο φορέας pEGFP-C2-PARN R99A/Q109A

Για την κλωνοποίηση του διπλού μεταλλάγματος της PARN (PARN – R99A/Q109A), χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pEGFP-C2, ο οποίος είχε δημιουργηθεί σε παλαιότερη μελέτη του εργαστηρίου. Πρόκειται για ένα φορέα 4.7kb, ο οποίος κωδικοποιεί για μια παραλλαγή της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) φυσικού τύπου. Αυτή έχει υποστεί βελτιστοποίηση ώστε να επιτευχθεί ισχυρότερος φθορισμός και μεγαλύτερη έκφρασή της σε κύτταρα θηλαστικών, καθώς και περισσότερες από 190 συνώνυμες μεταλλαγές βάσεων στην κωδική της περιοχή με σκοπό την καλύτερη ανταπόκριση στα ανθρώπινα κωδικόνια. Η περιοχή του πολυσυνδέτη (Multiple Cloning Site - MCS) βρίσκεται μεταξύ του σινιάλου πολυαδενυλίωσης του ιού Polyoma SV40 (SV40 poly A), και της κωδικής περιοχής της GFP. Τα γονίδια που κλωνοποιούνται στο MCS εκφράζονται σε σύντηξη (fusion) με το καρβοξυτελικό άκρο της φθορίζουσας πρωτεΐνης υπό την προϋπόθεση να βρίσκονται στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης και να μην υπάρχουν κωδικόνια τερματισμού. Ο φορέας pEGFP-C2 φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη ώστε να γίνει επιλογή σε καλλιέργειες στελεχών της *E. coli*, καθώς και γονίδιο αντίστασης στη νεομυκίνη για την επιλογή των διαμολυσμένων ευκαρυωτικών κυττάρων.



Εικόνα 11: Ο πλασμιδιακός φορέας pEGFP-C2. Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνεται η περιοχή του πολυσυνδέτη.

3.2 Μέθοδοι

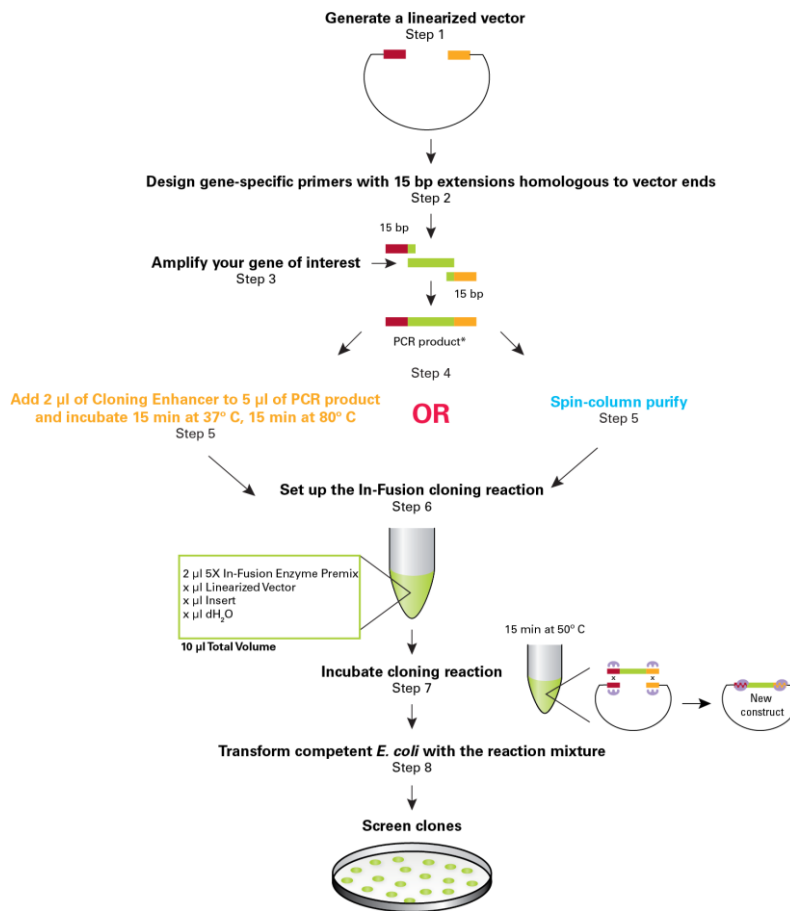
3.2.1 Δημιουργία του φορέα pDsRed-N1-PARN

i. Γενική επισκόπηση μεθόδου κλωνοποίησης Infusion HD cloning

Για την κλωνοποίηση της PARN φυσικού τύπου (wtPARN) στο φορέα pDsRed-Monomer-N1, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο In-fusion HD Cloning Kit. Αυτό σχεδιάστηκε ώστε να γίνεται γρήγορα και κατευθυνόμενα η κλωνοποίηση ενός ή πολλών τμημάτων DNA σε ένα φορέα. Πιο συγκεκριμένα, με τη χρήση του ενζύμου In-Fusion (Clontech), καθίσταται δυνατό να συνδεθούν τμήματα DNA (στη συγκεκριμένη περίπτωση, ένας γραμμικοποιημένος φορέας και το προϊόν ενίσχυσης της PCR). Για να συμβεί αυτό, θα πρέπει αυτά τα τμήματα να αλληλοεπικαλύπτονται στα άκρα τους επακριβώς και με το σωστό προσανατολισμό. Αυτή η αλληλοεπικάλυψη πρέπει να έχει μήκος 15 ζεύγη βάσεων και προκύπτει με το σωστό σχεδιασμό των εκκινητών της PCR.

Πιο συγκεκριμένα, τα βήματα της μεθόδου έχουν ως εξής:

Αρχικά, ενισχύουμε τη wtPARN μέσω PCR. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούμε μια DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας. Έπειτα, πραγματοποιούμε την πέψη του φορέα pDsRed-Monomer-N1 ώστε να κλωνοποιήσουμε το ένθεμα με μια ενδονουκλεάση περιορισμού. Το ένζυμο που χρησιμοποιούμε αναγνωρίζει μια θέση στην περιοχή πολυσυνδέτη του φορέα. Ύστερα, επαληθεύουμε την παρουσία του ενθέματος καθώς και του γραμμικοποιημένου φορέα μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης. Απομονώνουμε τα προηγούμενα από την πηκτή με τη χρήση του PCR clean-up Gel extraction της Macherey-Nagel. Ακολούθως, πραγματοποιούμε τον ομόλογο ανασυνδυασμό της wtPARN στο γραμμικοποιημένο φορέα με τη χρήση του ενζύμου In-Fusion. Τέλος, μετασχηματίζουμε χημικώς επιλεκτικά βακτηριακά κύτταρα και επιλέγουμε εκείνα που έχουν μετασχηματιστεί επιτυχώς και οι κλώνοι ελέγχονται με αλληλούχιση.



* If you obtain PCR product with non-specific background, isolate the target fragment by gel extraction first, then spin-column purify.

Εικόνα 12: Γενική Επισκόπηση του πρωτοκόλλου In-fusion.

ii. Σχεδιασμός εκκινητών και αντιδράσεων

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR), επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό και ενίσχυση επιλεγμένων αλληλουχιών DNA. Αυτό επιτυγχάνεται αρχικά αποδιατάσσοντας θερμικά το δίκλωνο DNA-στοχο, στη συνέχεια πραγματοποιείται η υβριδοποίηση των κατάλληλα σχεδιασμένων συμπληρωματικών μοριών – εκκινητών (primers) και τελικά επιμηκώνεται η νεοσυντιθέμενη νουκλεοτιδική αλυσίδα μέσω θερμοάντοχων πολυμερασών. Η διαδικασία αυτή γίνεται σε κύκλους με σκοπό την παραγωγή μεγάλης ποσότητας της αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει.

Για να επιτευχθεί η ορθή κλωνοποίηση με το In-Fusion HD Cloning Kit του προϊόντος της PCR, δηλαδή το cDNA της PARN φυσικού τύπου (wtPARN), θα πρέπει αρχικά να σχεδιαστούν κατάλληλοι εκκινητές. Θα πρέπει να είναι τέτοιοι ώστε το προϊόν της

ενίσχυσης της PCR να έχει ομόλογα άκρα με τα άκρα του γραμμικοποιημένου pDsRed-Monomer-N1.

Οι εκκινητές In-Fusion θα πρέπει να πληρούν ορισμένα κριτήρια. Αρχικά, το 5' άκρο κάθε εκκινητή θα πρέπει να έχει 15 νουκλεοτιδικές βάσεις συμπληρωματικές με τις 15 νουκλεοτιδικές βάσεις του άκρου του γραμμικοποιημένου φορέα που πρόκειται να εισαχθεί η αλληλουχία που μας ενδιαφέρει και να υπάρχει συγκεκριμένη αλληλουχία για το cDNA στόχο στο άκρο 3' του εκκινητή. Επίσης, αυτό το άκρο θα πρέπει να είναι εξειδικευμένο για το γονίδιο – στόχο, να έχει περιεχόμενο GC 40-60%, μέγεθος 18-25 νουκλεοτιδίων, και η θερμοκρασία τήξεως (Tm) να είναι 58-65° C. Η διαφορά στις τιμές Tm των δύο εκκινητών δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τους 4° C. Η τιμή της θερμοκρασίας τήξης υπολογίζεται με βάση την αλληλουχία των εκκινητών. Για να αποτρέψουμε το σχηματισμό διμερών των εκκινητών (primer dimer) καθώς και την παραγωγή δευτεροταγών διαμορφώσεων που θα εμποδίσουν την ομαλή διεξαγωγή της αντίδρασης, θα πρέπει να μην υπάρχει συμπληρωματικότητα μέσα στον ίδιο τον εκκινητή καθώς και μεταξύ των δύο εκκινητών (πρόσθιου και ανάστροφου). Η απομόνωσή τους θα πρέπει να έχει πραγματοποιηθεί με HPLC ή θα πρέπει να μην υπάρχουν προσμίξεις αλάτων (salt-free). Τέλος, πρέπει να ελέγξουμε την ειδικότητα και την ακρίβεια των εκκινητών ως προς το cDNA-στόχο. (εγχειρίδιο του In-Fusion® HD Cloning Kit της εταιρείας Takara Bio).

Για το σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το αντίστοιχο εργαλείο στην ιστοσελίδα της Clontech. Εκεί, δίνεται η δυνατότητα σχεδιασμού των εκκινητών, παρέχοντας την αλληλουχία του γονιδίου/cDNA στόχου, την αλληλουχία του πλασμιδίου στο οποίο θέλει να εισαχθεί το εν λόγω γονίδιο ή cDNA και διαλέγοντας το περιοριστικό ένζυμο που θα γραμμικοποιήσει το φορέα. (εγχειρίδιο του In-Fusion® HD Cloning Kit της εταιρείας Takara Bio).

Ο πολλαπλασιασμός του cDNA της wtPARN έγινε χρησιμοποιώντας το KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit, με υπόστρωμα το πλασμίδιο pEGFP-C2 (στο οποίο είχε ήδη ενσωματωθεί το cDNA της wtPARN) παρουσία των εκκινητών και της DNA πολυμεράσης.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
dNTPs (τελική συγκέντρωση 10 μM)	1
Template (pEGFP-C2)	3
Forward Primer (συγκέντρωσης 10 μM)	1
Reverse Primer (συγκέντρωσης 10 μM)	1

Buffer Kara 10X (τελική συγκέντρωση 1X)	2
Kara Taq Πολυμεράση	0.2
dH ₂ O	11.8
Τελικός Όγκος	20

Πίνακας 1: Σύνθεση των αντιδράσεων της PCR.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (seconds)	
Αρχική αποδιάταξη	98	30	35 κύκλοι αντίδρασης
Αποδιάταξη	98	10	
Υβριδοποίηση	66	30	
Επέκταση	72	30	
Τελική Επέκταση	72	120	

Πίνακας 2: Θερμικό προφίλ της PCR.

iii. Πέψη Πλασμιδιακού φορέα pDsRed-Monomer-N1

Η πέψη του φορέα pDsRed-Monomer-N1 έγινε με τη χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI, η οποία αναγνωρίζει την παλίνδρομη αλληλουχία 5'-G/AATTC-3' και τέμνει τον φωσφοδιεστερικό δεσμό ανάμεσα στη G και την A (σημειώνεται με /). Η αλληλουχία αυτή είναι μοναδική στο φορέα και βρίσκεται στην περιοχή του πολυσυνδέτη. Τα αντιδραστήρια και οι αντίστοιχες ποσότητές τους καθορίστηκαν βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή και ειδικότερα έτσι ώστε το υπόστρωμα DNA να είναι $\leq 1\mu\text{g}$. Έπειτα, η αντίδραση επιάστηκε για 2 ώρες στους 37° C. Με το πέρας των 2 ωρών, προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης τελικής συγκέντρωσης 1X, ώστε να πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης με σκοπό την επιβεβαίωση της επιτυχούς αντίδρασης, ποσοτικοποίηση του γραμμικού φορέα και καθαρισμός του από την πηκτή για τη χρήση του στην αντίδραση ανασυνδυασμού.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl)
10X Buffer H (τελικής συγκέντρωσης 1X)	2
pDsRed-Express-N1	10
EcoRI	1 (15 Units)

ddH ₂ O	7
Τελικός Όγκος	20

Πίνακας 3: Τα στοιχεία της αντίδρασης πέψης.

iv. Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού και έλεγχος θετικών αποικιών

Η διαδικασία της κλωνοποίησης έχει σαν τελικό στάδιο τον ομόλογο ανασυνδυασμό του προϊόντος της PCR και του γραμμικοποιημένου φορέα που έχει προκύψει μέσω πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Την αντίδραση του ομόλογου ανασυνδυασμού καταλύει το ένζυμο In-Fusion της Clontech, το οποίο αναγνωρίζει τα όμοια άκρα των εκκινητών και του προϊόντος της PCR. Σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειριδίου του In-Fusion Cloning kit και για να επιτευχθεί υψηλός βαθμός απόδοσης της αντίδρασης, θα πρέπει η ποσότητα του ενθέματος να είναι τριπλάσια εκείνης του γραμμικοποιημένου φορέα (wtPARN : pDsRed-Monomer-N1 3:1).

Πιο αναλυτικά:

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
pDsRed-Monomer-N1 ($15 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$)	4
wtPARN ($45 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$)	4
5X In-Fusion HD Enzyme Premix	2
Τελικός Όγκος	10

Πίνακας 4: Τα στοιχεία της αντίδρασης ομόλογου ανασυνδυασμού.

v. Μετασχηματισμός επιδεκτικών για χημικό μετασχηματισμό βακτηρίων με τον κατάλληλο φορέα

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο θερμικό σοκ. Αρχικά, τοποθετούμε τα επιδεκτικά κύτταρα XL1-Blue σε πάγο από τους -80° C ώστε να ξεπαγώσουν ελαφρώς. Όταν γίνει αυτό, αναμειγνύουμε τα κύτταρα με 50ng πλασμιδίου και αναδεύονται. Έπειτα, τα αφήνουμε για 30 λεπτά σε πάγο. Με το πέρας του προηγούμενου βήματος, τα τοποθετούμε στους 42° C σε υδατόλουτρο για 45 δευτερόλεπτα. Ύστερα, τα επανατοποθετούμε σε πάγο για 2 λεπτά. Προσθέτουμε 900μl αποστειρωμένου, άνευ αντιβιοτικού LB Broth και στη συνέχεια επωάζουμε για 60 λεπτά στους 37° C στα 210 rpm. Επιστρώνουμε τριβλία με το $\frac{1}{500}$ του αρχικού όγκου καλλιέργειας των μετασχηματισμένων κυττάρων. Τα τριβλία έχουν το θρεπτικό μέσο LB Agar και σε αυτά περιέχεται το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή

των μετασχηματισμένων αποικιών. Τέλος, γίνεται επώαση των κυττάρων για 12 – 16 ώρες στους 37° C.

vi. Ανακαλλιέργεια αποικιών μετασχηματισμένων βακτηρίων XL1-Blue σε υγρό θρεπτικό υλικό.

Αρχικά, διαλέγουμε μία απομονωμένη και ευδιάκριτη αποικία από κάθε τριβλίο που έχει επωαστεί. Έπειτα, προσθέτουμε 5ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB Agar (το οποίο περιέχει 50μg/ml Kan) σε σωλήνα φυγοκέντρησης τύπου Falcon. Εμβολιάζουμε την υγρή καλλιέργεια αφού έχουμε διαλέξει την κατάλληλη αποικία από το τριβλίο με τη βοήθεια αποστειρωμένου ρύγχους πιπέτας. Τέλος, τοποθετούμε τις εμβολιασμένες υγρές καλλιέργειες σε επωαστήρα υπό ανάδευση (210 rpm) για 12-16 ώρες στους 37° C.

vii. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από υγρές καλλιέργειες βακτηρίων

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA, ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο της Macherey – Nagel Nucleospin Plasmid No Lid.

Αρχικά, παίρνουμε 1,5 mL από την υγρή καλλιέργεια και το φυγοκεντρούμε για 30 δευτερόλεπτα στα 11.000 x g και μετά πετάμε το υπερκείμενο. Έπειτα, προσθέτουμε 250 μL από το Buffer A1 και επαναδιαλύουμε σε αυτό το ίζημα που σχηματίστηκε από το προηγούμενο βήμα με τη βοήθεια μιας πιπέτας. Για να σιγουρευτούμε ότι το διάλυμα είναι πλήρως ομογενοποιημένο, αναδεύουμε για μερικά δευτερόλεπτα στο vortex. Έπειτα, προσθέτουμε 250 μL από το Buffer A2 και αναδεύουμε αναποδογυρίζοντας ήπια το σωληνάριό μας. Αφήνουμε το δείγμα να επωαστεί για 2 με 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 250 μL από το Buffer A3 και αναδεύουμε αναποδογυρίζοντας ήπια το σωληνάριό μας. Φυγοκεντρούμε στα 11.000 x g σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Παίρνουμε μια στήλη NucleoSpin Plasmid No lid και την τοποθετούμε σε ένα σωλήνα συλλογής των 2 mL. Σε αυτήν βάζουμε το υπερκείμενο από το προηγούμενο βήμα και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στα 11.000 x g. Απορρίπτουμε το έκλουσμα του σωλήνα συλλογής και επανατοποθετούμε τη στήλη σε αυτόν. Ύστερα, προσθέτουμε 450 μL από το Buffer AQ (το οποίο έχουμε εμπλουτίσει με αιθανόλη, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή) και φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 11.000 x g και στη συνέχεια απορρίπτουμε το έκλουσμα. Τέλος, τοποθετούμε τη στήλη σε νέο σωλήνα, προσθέτουμε 50 μL από το Buffer AE και αφήνουμε να επωαστεί για 1 λεπτό σε θερμοκρασία 70° C. Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στα 11.000 x g. Το εκλουσμένο DNA μπορεί να αποθηκευθεί στους -20° C.

viii. Ηλεκτροφόρηση DNA

Η ηλεκτροφόρηση μεγάλων μορίων DNA γίνεται σε πηκτές αγαρόζης με σκοπό το διαχωρισμό τους και τον επικείμενο καθαρισμό τους. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη διαφορική ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA με βάση το μέγεθός τους, τη συγκέντρωση της αγαρόζης στην πηκτή (1.5% και 1% στην παρούσα εργασία) και στη διαφορά δυναμικού εκατέρωθεν των άκρων της. Με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, τα τμήματα DNA μεταφέρονται προς την άνοδο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αυτά είναι αρνητικά φορτισμένα. Για την ανίχνευση των μορίων, χρησιμοποιείται η φθορίζουσα χρωστική Midori Green η οποία παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το φθορισμό της ουσίας στα 540nm στην πράσινη περιοχή του ορατού όταν τα μόρια του DNA εκτεθούν σε υπεριώδη ακτινοβολία των 270nm. Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το TAE (Tris-base 40mM, acetic acid 20mM, 1mM EDTA) τελικής συγκέντρωσης 1X. Για την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης το οποίο περιέχει κυανό της ξυλόλης και μπλε της βρωμοθυμόλης. Τέλος, η διαφορά δυναμικού (τάση) η οποία εφαρμόζεται είναι 70-100V.

3.2.2 Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών

i. Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα είναι αποθηκευμένα σε φιαλίδια (cryovials) των 2mL στο υγρό άζωτο (N₂). Το πρώτο βήμα για την απόψυξή τους είναι η εμβάπτιση σε υδατόλουτρο, το οποίο έχει σταθερή θερμοκρασία στους 37° C και η ήπια ανάδυσή τους. Έπειτα, αφού ξεπαγώσουν, τα μεταφέρουμε σε μια φλάσκα επιφάνειας μεγέθους 25cm² (T25 flask). Σε αυτή, προσθέτουμε θρεπτικό υλικό έως 5 mL και την τοποθετούμε στον επωαστήρα σε θερμοκρασία 37° C και συγκέντρωσης διοξειδίου του άνθρακα στο 5%. Ύστερα, υπό την προϋπόθεση ότι έχει γίνει προσκόλληση των κυττάρων στο ταπήτιο της φλάσκας, αλλάζουμε το θρεπτικό υλικό αφού πραγματοποιήσουμε πλύση των κυττάρων με PBS ώστε να απομακρυνθούν όλα τα υπολείμματα θρεπτικού υλικού. Ο σκοπός αυτής της αλλαγής είναι η απομάκρυνση του κρυοπροστατευτικού DMSO που περιεχόταν στο αρχικό θρεπτικό υλικό και εμποδίζει ανάπτυξη των κυττάρων. Έπειτα, καλλιεργούμε τα κύτταρά σε 1 φλάσκα επιφάνειας μεγέθους 75cm² (T75 flask) σε θρεπτικό υλικό DMEM, το οποίο έχει εμπλουτιστεί με 10% FBS και 1% Antibiotic/Antimycotic έως να γίνει πλήρωση της φλάσκας στο 80% - 90%.

ii. Επίστρωση κυττάρων για πείραμα μικροσκοπίας φθορισμού

Την επόμενη ημέρα, τοποθετούμε αποστειρωμένες καλυπτρίδες (η αποστείρωση πραγματοποιήθηκε σε ξηρό κλίβανο στους 121 °C) σε πιάτο καλλιέργειας με 12 θέσεις. Επιστρώνουμε κατάλληλο αριθμό κυττάρων. Ενδεικτικά, επιστρώνουμε 15×10^4 κύτταρα για τη διαδικασία διαμόλυνσης με Viomer και 7×10^4 κύτταρα για τη διαδικασία διαμόλυνσης με Xfect σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Η επίστρωση γίνεται σε θρεπτικό υλικό DMEM, το οποίο έχει εμπλουτιστεί με 10% FBS και 1% Antibiotic/Antimycotic. Τα κύτταρα αφήνονται να προσκολληθούν για 24 ώρες.

iii. Συγχρονισμός καλλιέργειας μέσω στέρησης ορού

Την επόμενη ημέρα, κάνουμε μια πλύση με PBS και στη συνέχεια προσθέτουμε θρεπτικό υλικό το οποίο δεν είναι εμπλουτισμένο με ορό αλλά περιέχει Antibiotic/Antimycotic (DMEM, 0.5% FBS, 1% Antibiotic/Antimycotic) και το αφήνουμε για 2 ώρες ούτως ώστε να γίνει συγχρονισμός της καλλιέργειας. Με το πέρας των 2 ωρών αφαιρούμε το προηγούμενο και προσθέτουμε εκ νέου καινούργιο θρεπτικό υλικό DMEM, το οποίο έχει εμπλουτιστεί με 10% FBS και 1% Antibiotic/Antimycotic. Σκοπός της στέρησης του ορού είναι η μετάβαση όλων των κυττάρων σε συγκεκριμένη φάση (G_0) του κυτταρικού κύκλου.

iv. Διαμόλυνση

- Πρωτόκολλο διαμόλυνσης Xfect

Το Xfect, αποτελείται από το Xfect Polymer και το Xfect Reaction Buffer. Το Xfect Polymer σχηματίζει κατιονικά λιποσώματα όταν συνδυάζεται με DNA, επιτρέποντας έτσι την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα με μεγάλη απόδοση. Τα λιποσώματα αυτά, συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων που θέλουμε να διαμολύνουμε, απελευθερώνοντας σε αυτά το DNA ενδιαφέροντος.

Αρχικά, θα πρέπει να προετοιμάσουμε τα κύτταρα μας βάζοντας τα σε θρεπτικό υλικό. Αναδεύουμε σε vortex το Xfect Polymer. Στη συνέχεια, προσθέτουμε ποσότητα του πλασμιδιακού DNA στο Xfect Reaction Buffer σε αναλογία 1ng DNA ανά 20μl buffer και αναμειγνύουμε καλά σε vortex σε υψηλή ταχύτητα. Έπειτα, προσθέτουμε στο διάλυμα 0.3 μl Xfect Polymer για κάθε 1ng πλασμιδιακού DNA που χρησιμοποιούμε και αφήνουμε για 10 λεπτά να επωαστεί σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστούν συμπλέγματα νανοσωματιδίων. Φυγοκεντρούμε για 1 δευτερόλεπτο ώστε να συγκεντρωθεί το περιεχόμενο στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα και το ρίχνουμε στάγδην στο θρεπτικό υλικό με τα κύτταρα. Επώαζουμε στους 37 °C για 4 – 16 ώρες. Τέλος, αφαιρούμε

τα νανοσωματίδια με αναρρόφηση, προσθέτουμε φρέσκο θρεπτικό υλικό και αφήνουμε τα κύτταρα στον επωαστήρα στους 37 °C (εγχειρίδιο του Xfect Transfection Reagent της εταιρείας Takara Bio).

- Πρωτόκολλο διαμόλυνσης Viromer

Το Viromer είναι ένα διακλαδισμένο πολυμερές μέσου μεγέθους, το οποίο μιμείται τον μηχανισμό διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων του ιού της γρίπης. Το Viromer έχει ουδέτερο φορτίο και σχηματίζει σύμπλοκο με το DNA ενδιαφέροντος. Το σύμπλοκο αυτό στη συνέχεια εισέρχεται στα ευκαρυωτικά κύτταρα που θέλουμε να διαμολύνουμε μέσω ενδοσωμάτων. Τελικά, το σύμπλοκο απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα σύμφωνα με ένα μηχανισμό που βασίζεται στην ενεργή έξοδο λόγω μείωσης του pH, και εκεί το Viromer αποκτά φορτίο και με αυτόν τον τρόπο απεμπλέκεται από το DNA που θέλουμε να εισάγουμε στα κύτταρα.

Το πρώτο βήμα της μεθόδου, είναι η αραιώση του πλασμιδιακού DNA σε ένα φιαλίδιο έως τελικής συγκέντρωσης 11 ng/μl και τελικού όγκου 90μl. Σε ένα άλλο φιαλίδιο, διαλύουμε το Viromer στο ρυθμιστικό διάλυμα του κατασκευαστή σε αναλογία 0,4 μl Viromer ανά 10 μl DNA αντίστοιχα. Αφού αναδεύσουμε για λίγα δευτερόλεπτα σε Vortex, αναμειγνύουμε τα περιεχόμενα των δύο φιαλιδίων, αναδεύουμε εντόνως και αφήνουμε να επωαστούν για 15' σε θερμοκρασία δωματίου. Τελικά, προσθέτουμε το διάλυμα στα κύτταρα που θέλουμε να διαμολυνθούν και παρατηρούμε ύστερα από 24 ώρες. (εγχειρίδιο του Viromer Red της εταιρείας Lipocalyx).

- Πρωτόκολλο διαμόλυνσης PEI

Το PEI (PolyEthyleneimine) είναι ένα κατιονικό πολυμερές το οποίο συμπυκνώνει το DNA ενδιαφέροντος σε θετικά φορτισμένα σωματίδια τα οποία προσδένονται σε ανιονικές κυτταρικές επιφάνειες. Εν συνεχεία, το σύμπλοκο PEI:DNA ενδοκυτταρώνεται και το DNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων που θέλουμε να διαμολύνουμε.

Σε ένα σωλήνα προσθέτουμε θρεπτικό υλικό DMEM, το πλασμιδιακό DNA και έπειτα αναδεύουμε σε Vortex. Έπειτα, προσθέτουμε το αντιδραστήριο PEI και αφήνουμε να επωαστεί σε θερμοκρασία δωματίου για 20'. Μετά το πέρας της επώασης, προσθέτουμε ποσότητα θρεπτικού υλικού DMEM εμπλουτισμένου με 5% FBS και απλώνουμε το διάλυμα στα κύτταρα που θέλουμε να διαμολύνουμε. Μετά βάζουμε τα κύτταρα σε επωαστήρα

στους 37° C, 5% CO₂ για 4 ώρες. Έπειτα, αλλάζουμε το θρεπτικό υλικό, χωρίς πλύση των κυττάρων, με πλήρες θρεπτικό υλικό. Τελικά, συλλέγουμε τα κύτταρα έπειτα από 36 ώρες (Longo, Kanran, Kim, & Leahy, 2013).

3.2.3 Μικροσκοπία Φθορισμού

Αρχικά, αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό που βρίσκονται τα κύτταρα και τα ξεπλένουμε με PBS 2-3 φορές για 5 λεπτά. Έπειτα, τα μονιμοποιούμε με φορμαλδεΐδη (συγκέντρωσης 3%) σε PBS για 3 λεπτά. Αφαιρούμε τη φορμαλδεΐδη και ξεπλένουμε τα κύτταρα με PBS και ξαναπλένουμε 2 φορές με PBS για 5 λεπτά. Ύστερα, επωάζουμε τα κύτταρα με PBS στο οποίο έχουμε προσθέσει Triton X-100 σε συγκέντρωση 1%, για 15 λεπτά στους 4° C. Ο σκοπός αυτού του βήματος είναι ώστε να δημιουργηθεί μια διαπερατή μεμβράνη, όμως αυτό παραλείπεται όταν η μονιμοποίηση γίνεται με μεθανόλη. Έπειτα, αφαιρούμε το PBS με το 1% Triton X-100 και κάνουμε 1 πλύση με PBS. Στη συνέχεια, πλένουμε 2 φορές με PBS για 5 λεπτά και μετά με H₂O για 5 λεπτά. Έπειτα, στεγνώνουμε τις καλυπτρίδες και τις τοποθετούμε σε αντικειμενοφόρο πλάκα με υλικό στερεοποίησης (mounting medium) το οποίο περιέχει χρωστική για την οπτικοποίηση του DNA (DAPI). τοποθετούμε τις καλυπτρίδες με την πλευρά των κυττάρων να βρίσκεται προς τα κάτω. Τέλος, τις στεγνώνουμε για 20 λεπτά στο σκοτάδι και τις τοποθετούμε στο ψυγείο μέχρι να τις παρατηρήσουμε στο μικροσκόπιο.

Μικροσκοπία:

Η απεικόνιση των κυττάρων έγινε στο ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP8 MP στη μονάδα Οπτικής Μικροσκοπίας του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών (ΙΒΕ) του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. "Δημόκριτος" από τον ειδικό τεχνικό επιστήμονα Δρ. Αλέξανδρο Αθανασόπουλο. Η λήψη των εικόνων έγινε με καταδυτικό φακό μεγέθυνσης 63x.

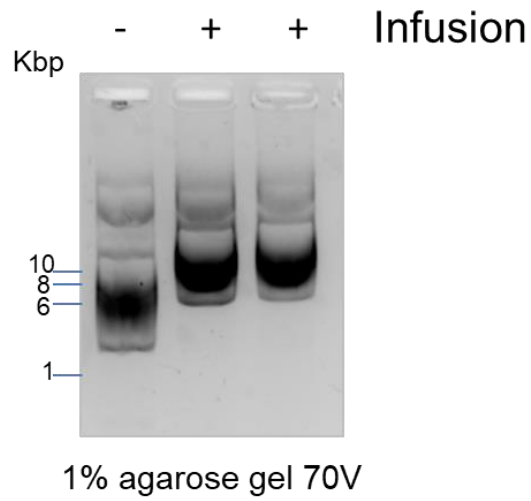
4 Αποτελέσματα - Συζήτηση

Για τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πολύ (A) εξειδικευμένης πολυμεράσης (PARN), έγινε παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa και HEK293T με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο για το διπλό μετάλλαγμα της PARN καθώς και πλασμίδιο με την φυσικού τύπου PARN. Το πλασμίδιο που έφερε το μετάλλαγμα R99A/Q109A ήταν το pEGFP-C2, ενώ η φυσικού τύπου PARN είχε κλωνοποιηθεί στο πλασμίδιο pDsRed-Monomer-N1. Η διαμόλυνσή τους έγινε χρησιμοποιώντας το κατιονικό πολυμερές PEI (Polyethylenimine) και το κατιονικό πολυμερές Viomer το οποίο μιμείται το μηχανισμό μόλυνσης του ιού της γρίπης.

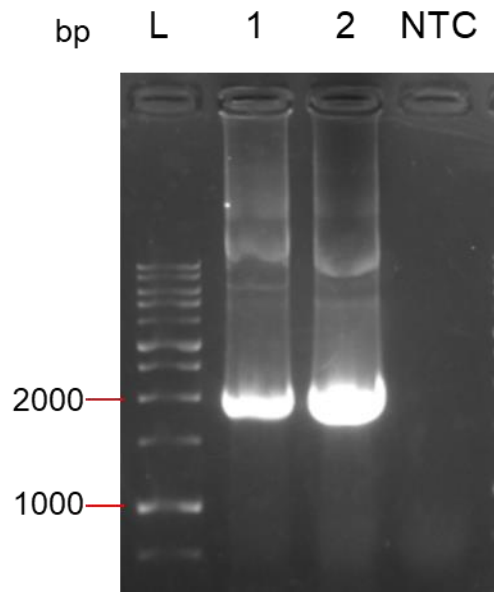
4.1 Κλωνοποίηση

Το πρώτο βήμα της διαδικασίας ήταν ο πολλαπλασιασμός και η επικείμενη απομόνωση του φορέα pDsRed-Monomer-N1 από κύτταρα XL1Blue. Αφού απομονώθηκε, στη συνέχεια έγινε πέψη με το ένζυμο περιορισμού EcoRI με σκοπό τη γραμμικοποίησή του. Μετά την πέψη του, προκύπτει ένας ενιαίος φορέας καθώς υπάρχει μία θέση που αναγνωρίζει η EcoRI στην περιοχή πολυσυνδέτη. Για τη μελέτη συνεντοπισμού των wtPARN και PARN R99A/Q109A πραγματοποιήθηκε αρχικά κλωνοποίηση της κωδικής περιοχής της PARN στο φορέα pDsRed-Monomer-N1 όπως περιγράφηκε και στην ενότητα των μεθόδων. Η επιτυχία της κλωνοποίησης επιβεβαιώθηκε με PCR και ηλεκτροφόρηση του ανασυνδυασμένου φορέα (Εικόνα 13). Στην εικόνα παρατηρείται πως ο ανασυνδυασμένος φορέας (διαδρομή 2-3) μεταναστεύει πιο αργά σε σχέση με τον άδειο φορέα που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για την ηλεκτροφόρηση (διαδρομή 1) γεγονός που συνηγορεί στο ότι η αντίδραση ανασυνδυασμού ήταν επιτυχής. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών για την PARN και η επακόλουθη ηλεκτροφόρηση αγαρόζης (βλ. Εικόνα 14) καταδεικνύουν πως η κλωνοποίηση ήταν επιτυχής. Η πλήρης επιβεβαίωση της κλωνοποίησης έγινε με αλληλούχιση του ανασυνδυασμένου φορέα.

pDsRed-Monomer-N1



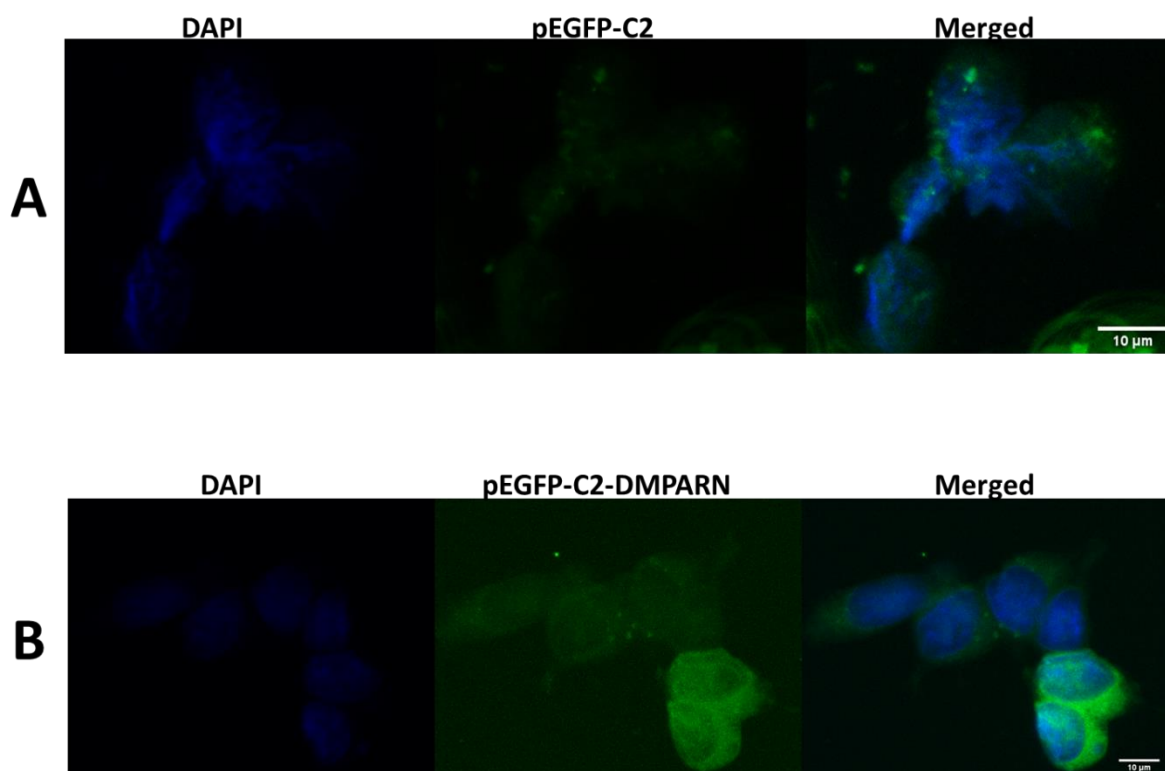
Εικόνα 12: Ηλεκτροφόρηση ανασυνδυασμένου και άδειου φορέα. Στη διαδρομή 1 φαίνεται η πορεία του άδειου φορέα, ενώ στις διαδρομές 2-3 του ανασυνδυασμένου. Με σταυρό σημαίνεται η πορεία των ανασυνδυασμένων φορέων, ενώ με παύλα του άδειου φορέα.



Εικόνα 13: Αντίδραση PCR για τον έλεγχο της κλωνοποίησης. Στις διαδρομές 1 και 2 είναι τα προϊόντα της PCR (wt PARN), στη διαδρομή 3 είναι το No Template Control (NTC) και L είναι ο μάρτυρας μοριακών μαζών. Οι αριθμοί στα αριστερά υποδεικνύουν το μέγεθος των τμημάτων DNA σε bp.

4.2 Διαμόλυνση κυττάρων HEK293T με το κατιονικό πολυμερές PEI

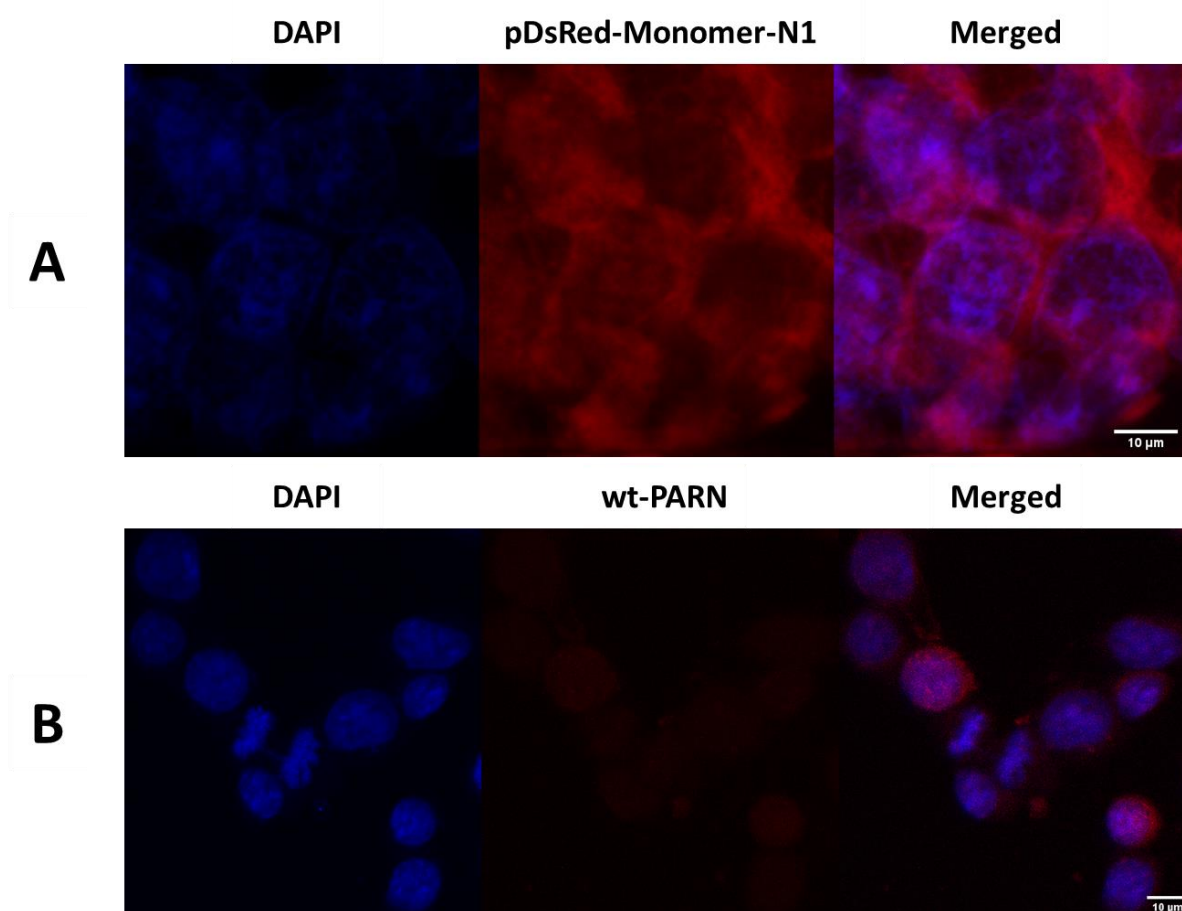
4.2.1 Διαμόλυνση με φορέα pEGFP-C2



Εικόνα 14: Απεικόνιση κυττάρων HEK293T ύστερα από διαμόλυνσή τους με τον φορέα pEGFP-C2 (A) και με τον ανασυνδυασμένο φορέα pEGFP-C2- PARN-R99A/Q109A (B). Από αριστερά προς τα δεξιά: DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) χρώση πυρήνων, pEGFP-C2 ο απλός φορέας, pEGFP-C2-DMPARN ο ανασυνδυασμένος φορέας με το διπλό μετάλλαγμα PARN-R99A/Q109A και ως Merged σημαίνεται η εικόνα που προκύπτει από το συνδυασμό των προηγούμενων δύο εικόνων. Η απεικόνιση των κυττάρων έγινε στο ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP8 MP. Η λήψη των εικόνων έγινε με καταδυτικό φακό μεγέθυνσης 63x.

Στην εικόνα 15 βλέπουμε τον εντοπισμό της GFP (Εικόνα 1 A) και του διπλού μεταλλάγματος της PARN η οποία είναι συζευγμένη με την GFP. Φαίνεται, πως είναι επιτυχημένη η διαμόλυνση στα συγκεκριμένα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό διαμόλυνσης των κυττάρων ανέρχεται περί του 50%. Ο φθορισμός είναι διάχυτος και φαίνεται πως το μετάλλαγμα εντοπίζεται τόσο εντός όσο και εκτός του πυρήνα των κυττάρων, ενώ η GFP παρατηρείται κυρίως περιπυρηνικά.

4.2.2 Διαμόλυνση με το φορέα pDsRed-Monomer-N1



Εικόνα 15: Απεικόνιση κυττάρων HEK293T ύστερα από διαμόλυνσή τους με τον φορέα pDsRed-Monomer-N1 (A) και με τον ανασυνδυασμένο φορέα pDsRed-Monomer-N1-wtPARN (B). Από αριστερά προς τα δεξιά: **DAPI** (4',6-diamidino-2-phenylindole) χρώση πυρήνων, **pDsRed-Monomer-N1** ο απλός φορέας, **wtPARN** ο ανασυνδυασμένος φορέας και ως **Merged** σημαίνεται η εικόνα που προκύπτει από το συνδυασμό των προηγούμενων δύο εικόνων. Η απεικόνιση των κυττάρων έγινε στο ανάστροφο συνεστιάκο μικροσκόπιο Leica TCS SP8 MP. Η λήψη των εικόνων έγινε με καταδυτικό φακό μεγέθυνσης 63x.

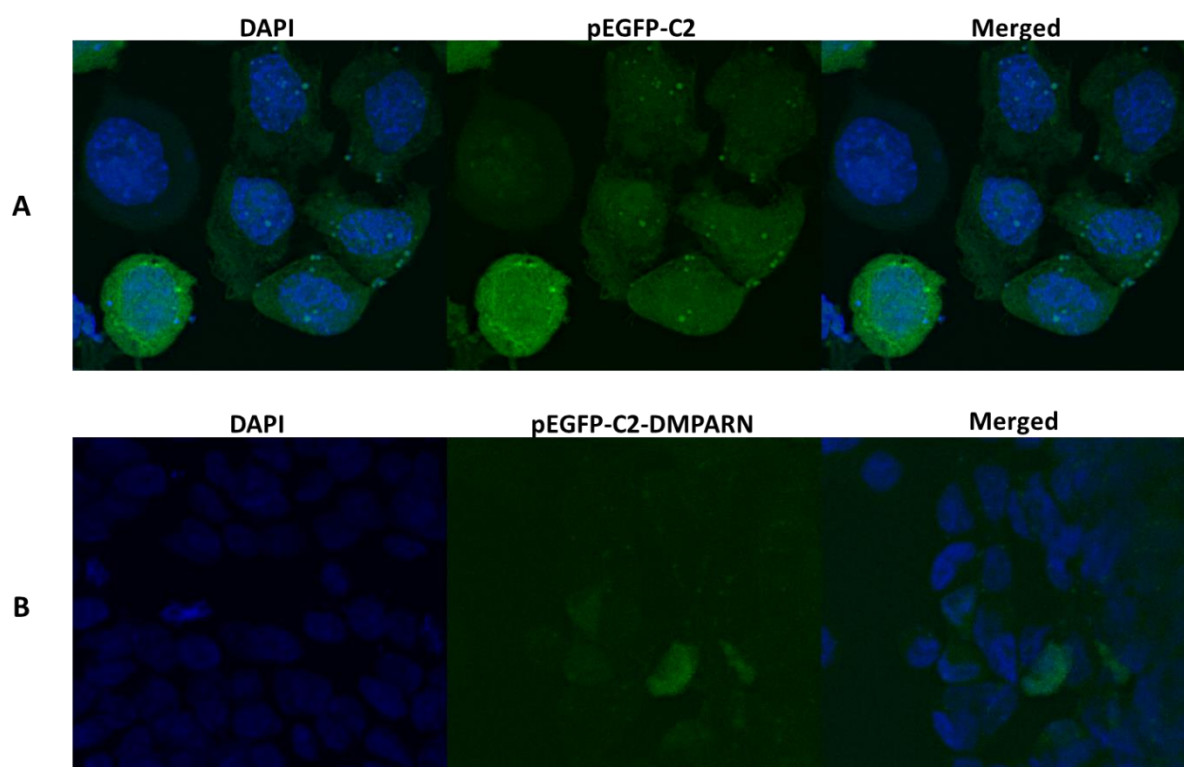
Στην εικόνα 16, βλέπουμε την έκφραση της RFP και της PARN φυσικού τύπου η οποία είναι συζευγμένη με την RFP. Φαίνεται, πως ήταν επιτυχής η διαμόλυνση στα συγκεκριμένα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό διαμόλυνσης των κυττάρων ανέρχεται περί του 20%. Όπως και στην προηγούμενη εικόνα, βλέπουμε πως ο εντοπισμός της PARN, δεν περιορίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα των κυττάρων, αλλά παρατηρείται και στο κυτταρόπλασμα. Αυτή η εικόνα συνάδει με μελέτες οι οποίες έχουν δείξει πως η PARN είναι κυρίως πυρηνική πρωτεΐνη και παρατηρείται κυρίως στα σωματίδια Cajal και τον πυρηνίσκο (Berndt et al., 2012; Duan, He, Hu, & Yan, 2019), αλλά σε κύτταρα HeLa και HEK293T, εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμά τους και πιο συγκεκριμένα στο ενδοπλασματικό δίκτυό τους (Duan et al., 2020).

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, βλέπουμε πως το ποσοστό διαμόλυνσης είναι σχετικά μικρό (~50% για τα κύτταρα με τον φορέα pEGFP-C2 και ~20% για τα κύτταρα με τον φορέα pDsRed-Monomer-N1. Τα χαμηλά αυτά ποσοστά ενδεχομένως να οφείλονται στη διαδικασία διαμόλυνσης με πλασμίδια, καθώς αυτή γενικά έχει μικρότερη αποδοτικότητα σε σχέση με την εισαγωγή εξωγενούς DNA με χρήση ιών (Oh & Kessler, 2018). Για το λόγο αυτό και στο πλαίσιο βελτιστοποίησης της διαμόλυνσης, δοκιμάσαμε και άλλα αντιδραστήρια διαμόλυνσης.

4.3 Διαμόλυνση κυττάρων HeLa με το κατιονικό πολυμερές Viromer

Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο, η διαμόλυνση με ιούς είναι πιο αποδοτική για διαμόλυνση πλασμιδίων σε κύτταρα. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε το αντιδραστήριο διαμόλυνσης Viromer, του οποίου η τεχνολογία εισαγωγής του DNA στα κύτταρα βασίζεται στην ομοιότητα της διαδικασίας αυτής με την εισαγωγή ιών στα κύτταρα.

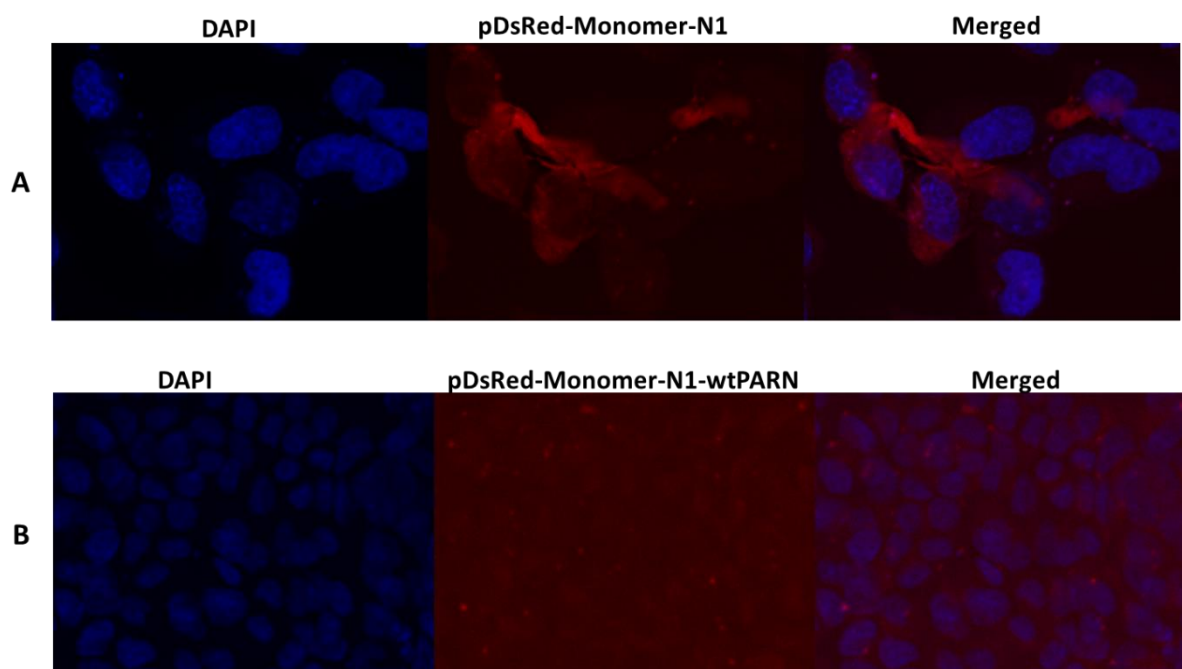
4.3.1 Διαμόλυνση με το φορέα pEGFP-C2



Εικόνα 16: Απεικόνιση κυττάρων HeLa ύστερα από διαμόλυσή τους με το φορέα pEGFP-C2 και με τον ανασυνδυασμένο φορέα pEGFP-C2-DMPARN. Από αριστερά προς τα δεξιά: DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), pEGFP-C2 ο απλός φορέας, pEGFP-C2-DMPARN ο ανασυνδυασμένος φορέας με το διπλό μετάλλαγμα PARN-R99A/Q109A και ως Merged σημαίνεται η εικόνα που προκύπτει από το συνδυασμό των

προηγούμενων δύο εικόνων. Η χρώση DAPI προσδένεται ισχυρά στο πυρηνικό DNA και έτσι παρατηρούμε τους πυρήνες των κυττάρων. Η απεικόνιση των κυττάρων έγινε στο μικροσκόπιο φθορισμού με χρήση ψυχόμενης κάμερας. Η λήψη των εικόνων έγινε με καταδυτικό φακό μεγέθυνσης 63x (A) και με φακό μεγέθυνσης 20x (B).

4.3.2 Διαμόλυνση με το φορέα pDsRed-Monomer-N1

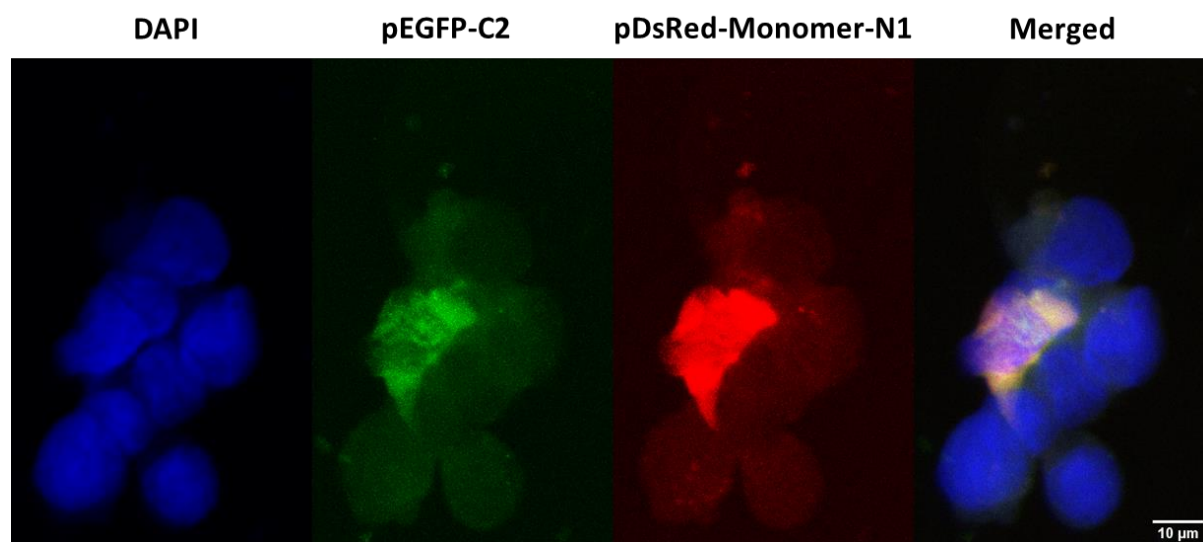


Εικόνα 18: Απεικόνιση κυττάρων HeLa ύστερα από διαμόλυνσή τους με τον απλό φορέα pDsRed-Monomer-N1 με τον ανασυνδυασμένο φορέα pDsRed-Monomer-N1-wtPARN (B). Από αριστερά προς τα δεξιά: **DAPI** (4',6-diamidino-2-phenylindole) χρώση πυρήνων, **pDsRed-Monomer-N1** ο απλός φορέας, **wtPARN** ο ανασυνδυασμένος φορέας και ως **Merged** σημαίνεται η εικόνα που προκύπτει από το συνδυασμό των προηγούμενων δύο εικόνων. Η απεικόνιση των κυττάρων έγινε στο ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP8 MP και η λήψη των εικόνων έγινε με καταδυτικό φακό μεγέθυνσης 63x (A). Η απεικόνιση των κυττάρων έγινε στο μικροσκόπιο φθορισμού με χρήση ψυχόμενης κάμερας. Η λήψη των εικόνων έγινε φακό μεγέθυνσης 20x (B).

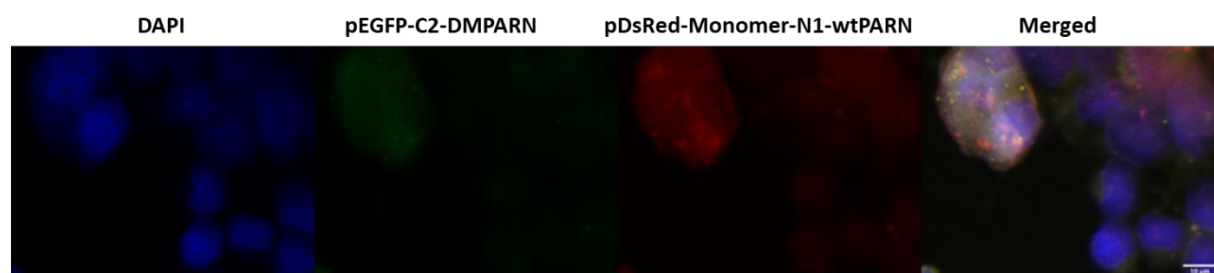
Όπως και με τα αποτελέσματα με τα κύτταρα HEK293T με το πολυμερές PEI, η φυσικού τύπου PARN εμφανίζεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα. Το ποσοστό διαμόλυνσης σε αυτή την περίπτωση είναι παρόμοιο σε σχέση με το PEI και ανέρχεται στο 20% των συνολικών κυττάρων. Οι εικόνες και εδώ είναι παρόμοιες με αυτές των κυττάρων HEK293T. Η PARN-R99A/Q109A, παρατηρείται στον πυρήνα αλλά και περιπυρηνικά. Το ποσοστό διαμόλυνσης ανέρχεται περίπου στο 50%. Στα παραπάνω αποτελέσματα είναι σημαντική η παρόμοια απεικόνιση της φυσικού τύπου PARN όσο και του διπλού μεταλλάγματος. Αυτό σημαίνει πως παρά την αλλαγή του μέσου διαμόλυνσης και της κυτταρικής σειράς, ο εντοπισμός των πρωτεϊνών δεν άλλαξε, αλλά παρέμεινε όμοιος.

4.4 Συν-Διαμόλυνση κυττάρων HEK293T με τα πλασμίδια pEGFP-C2 και pDsRed-Monomer-N1

Παρότι τα μέχρι στιγμής ποσοστά διαμόλυνσης δεν ήταν σε ιδανικά ποσοστά, προχωρήσαμε σε συνδιαμόλυνση των πλασμιδίων στα κύτταρα με τη χρήση των αντιδραστηρίων PEI και Viromer ώστε να είναι οι εικόνες όσο το δυνατόν πιο συγκρίσιμες γίνεται.

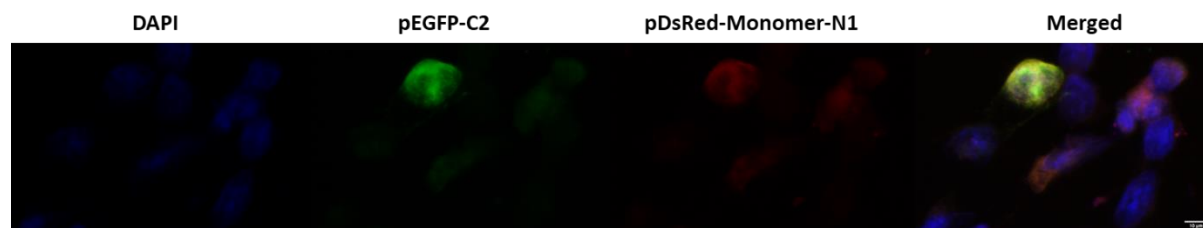


Εικόνα 19: Απεικόνιση κυττάρων HEK293T ύστερα από ταυτόχρονη διαμόλυνσή τους με τα πλασμίδια pEGFP-C2 και pDsRed-Monomer-N1 με τη χρήση του πολυμερούς PEI. Από αριστερά προς τα δεξιά: **DAPI** (4',6-diamidino-2-phenylindole), **pEGFP-C2**: ο φορέας pEGFP-C2, **pDsRed-Monomer-N1**: ο φορέας pDsRed-Monomer-N1 και ως **Merged** σημαίνεται η εικόνα που προκύπτει από το συνδυασμό των προηγούμενων εικόνων. Η χρώση DAPI προσδένεται ισχυρά στο πυρηνικό DNA και έτσι παρατηρούμε τους πυρήνες των κυττάρων. Η απεικόνιση των κυττάρων έγινε στο ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP8 MP. Η λήψη των εικόνων έγινε με καταδυτικό φακό μεγέθυνσης 63x.

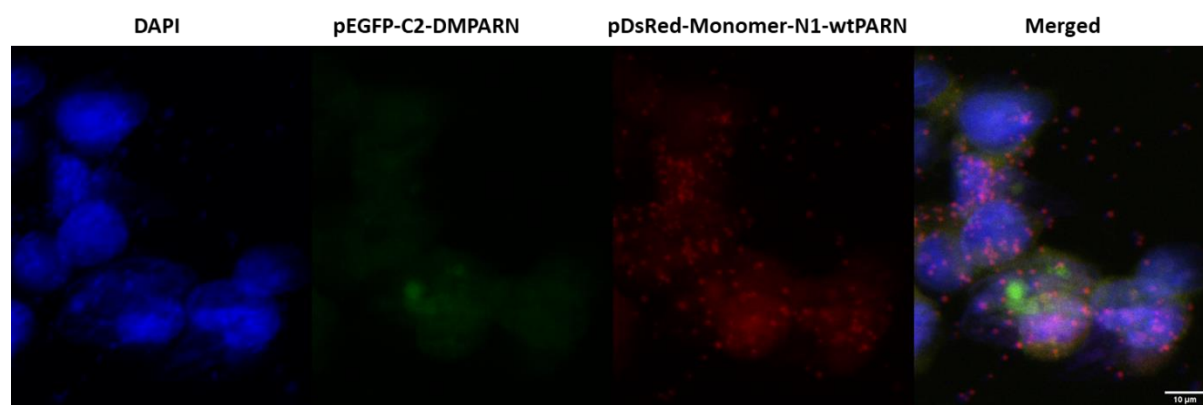


Εικόνα 20: Απεικόνιση κυττάρων HEK293T ύστερα από ταυτόχρονη διαμόλυνσή τους με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pEGFP-C2-PARN R99A/Q109A και pDsRed-Monomer-N1-wtPARN με τη χρήση του πολυμερούς PEI. Από αριστερά προς τα δεξιά: **DAPI** (4',6-diamidino-2-phenylindole), **pEGFP-C2-DMPARN**: ο ανασυνδυασμένος φορέας pEGFP-C2, **pDsRed-Monomer-N1-wtPARN**: ο ανασυνδυασμένος φορέας pDsRed-Monomer-N1 και ως **Merged** σημαίνεται η εικόνα που προκύπτει από το συνδυασμό των προηγούμενων εικόνων. Η χρώση DAPI

προσδένεται ισχυρά στο πυρηνικό DNA και έτσι παρατηρούμε τους πυρήνες των κυττάρων. Η απεικόνιση των κυττάρων έγινε στο ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP8 MP. Η λήψη των εικόνων έγινε με καταδυτικό φακό μεγέθυνσης 63x.



Εικόνα 21: Απεικόνιση κυττάρων HEK293T ύστερα από ταυτόχρονη διαμόλυνσή τους με τα πλασμίδια pEGFP-C2 και pDsRed-Monomer-N1 με τη χρήση του πολυμερούς Viromer. Από αριστερά προς τα δεξιά: **DAPI** (4',6-diamidino-2-phenylindole), **GFP**: πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, **RFP**: κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη και ως **Merged** σημαίνεται η εικόνα που προκύπτει από το συνδυασμό των προηγούμενων εικόνων. Η χρώση DAPI προσδένεται ισχυρά στο πυρηνικό DNA και έτσι παρατηρούμε τους πυρήνες των κυττάρων. Η απεικόνιση των κυττάρων έγινε στο ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP8 MP. Η λήψη των εικόνων έγινε με καταδυτικό φακό μεγέθυνσης 63x.



Εικόνα 22: Απεικόνιση κυττάρων HEK293T ύστερα από ταυτόχρονη διαμόλυνσή τους με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pEGFP-C2-PARN R99A/Q109A και pDsRed-Monomer-N1-wtPARN με τη χρήση του πολυμερούς Viromer. Από αριστερά προς τα δεξιά: **DAPI** (4',6-diamidino-2-phenylindole), **GFP**: πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, **RFP**: κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη και ως **Merged** σημαίνεται η εικόνα που προκύπτει από το συνδυασμό των προηγούμενων εικόνων. Η χρώση DAPI προσδένεται ισχυρά στο πυρηνικό DNA και έτσι παρατηρούμε τους πυρήνες των κυττάρων. Η απεικόνιση των κυττάρων έγινε στο ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP8 MP. Η λήψη των εικόνων έγινε με καταδυτικό φακό μεγέθυνσης 63x.

Το ποσοστό διαμόλυνσης παρέμεινε χαμηλό (<10%). Στις παραπάνω εικόνες παρατηρείται γενικά πως υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των δύο πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο, αλλά λόγω του χαμηλού αριθμού συνδιαμολυσμένων κυττάρων δεν ήταν εφικτό να πραγματοποιηθεί στατιστική ανάλυση για τον συνεντοπισμό ή όχι αυτών. Αυτή η αδυναμία στην επιτυχία της συνδιαμόλυνσης θα μπορούσε να οφείλεται στην αναστολή μεταξύ των φορέων. Έχει παρατηρηθεί πως σε πειράματα συνδιαμόλυνσης κυττάρων, οι φορείς αναστέλλουν ο ένας τον άλλο [(Hofman, Swinnen, Claessens, Verhoeven, and Heyns (2000); Nejeperinska, Malik, Wagner, and Svoboda (2014)] μειώνοντας έτσι την απόδοση της συνδιαμόλυνσης. Ένα

ακόμη πρόβλημα που προέκυψε κατά την λήψη των φωτογραφιών των κυττάρων ήταν ο αυτοφθορισμός, δηλαδή ο φυσικός φθορισμός που εκπέμπουν τα βιολογικά υλικά (Billinton & Knight, 2001). Μελλοντικά, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί βελτιστοποίηση των σταδίων της διαδικασίας διαμόλυνσης ή της απεικόνισης των κυττάρων ώστε να φιλτραριστεί/ελαχιστοποιηθεί αυτή η παράμετρος του αυτοφθορισμού.

Ένα από τα αρχικά στάδια της διαδικασίας της παρατήρησης των κυττάρων στο μικροσκόπιο, είναι η μονιμοποίησή τους και η χρήση κατάλληλου μέσου μονιμοποίησης. Η χρήση μη κατάλληλου μέσου μειώνει το σήμα που εκπέμπεται και δίνει χαμηλής ποιότητας φωτογραφίες. Πιο συγκεκριμένα, η μεθανόλη έχει την ιδιότητα να καθιζάνει της πρωτεΐνες και να της μονιμοποιεί στο κυτταρικό διαμέρισμά τους, αλλά δρα αρνητικά για πολλούς επιτόπους. Για να αντισταθμιστεί αυτό το φαινόμενο, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένα διάλυμα ακετόνης/μεθανόλης. (Griffiths, Burke, & Lucocq, 1993)

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που καθορίζει την ποιότητα των εικόνων, είναι το υλικό στερεοποίησης (mounting medium), το οποίο πρέπει να έχει συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες, ώστε να γίνεται η διάθλαση του φωτός με τέτοιο τρόπο για να γίνεται σωστά η λήψη των φωτογραφιών. Η χρήση υλικού στερεοποίησης το οποίο δεν είναι ιδανικό για τις εξεταζόμενες συνθήκες ενδέχεται να προκαλέσει μείωση σήματος και οπτικές παρεκκλίσεις και γι' αυτό το λόγο πολλές φορές σε αυτά τα υλικά προστίθενται ουσίες που έχουν ως στόχο τη μείωση της εξασθένησης του σήματος (anti-fade) (Longin, Souchier, Ffrench, & Bryon, 1993; Ono et al., 2001).

Βελτιστοποίηση απαιτούν και οι συνθήκες διαμόλυνσης, ώστε να επιτευχθούν υψηλότερα ποσοστά διαμόλυνσης και επιβίωσης των κυττάρων. Ειδικότερα, το μέσο διαμόλυνσης αποτελεί καίριο και καθοριστικό βήμα της διαδικασίας καθώς αυτό, αυξάνει κατά πολύ τα ποσοστά επιτυχίας. Δοκιμές με διαφορετικές ποσότητες φορέων και μέσου διαμόλυνσης Vigomer πραγματοποιήθηκαν καθώς και με άλλα μέσα (Liprofectamine 3000, Xfect) χωρίς όμως κάποιο ουσιαστικό αποτέλεσμα. Σημαντική είναι και η κυτταρική σειρά, καθώς η επιλογή της κυτταρικής σειράς για πειράματα μικροσκοπίας έγινε μεταξύ άλλων βάσει της ικανότητας διαμόλυνσης των κυττάρων. Στην παρούσα εργασία, η αρχική επιλογή της κυτταρικής σειράς HEK293T βασίστηκε στο γεγονός πως τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να διαμολύνονται με πλασμίδια αρκετά εύκολα ανεξάρτητα από το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται στις περισσότερες περιπτώσεις. Δυστυχώς όμως, κατά

την ανάπτυξή τους, σχηματίζουν συσσωματώματα και επικαλύπτουν το ένα το άλλο με αποτέλεσμα η απεικόνιση να καθίσταται δύσκολη ή να μην γίνεται καλή χρώση των πυρήνων με τη χρωστική DAPI με αποτέλεσμα το δείγμα προς παρατήρηση να είναι πολύ χαμηλής ποιότητας. Αντίθετα, τα κύτταρα HeLa, σχηματίζουν συσσωματώματα μόνο εάν δεν δοθεί προσοχή κατά την επίστρωση. Συγκριτικά με τα κύτταρα HEK293T, διαμολύνονται «πιο δύσκολα», δηλαδή χρειάζονται μεγαλύτερη προσοχή έως ότου βρεθεί η κατάλληλη ποσότητα DNA για τη διαμόλυνση, η κατάλληλη αναλογία μεταξύ των πλασμιδίων που χρησιμοποιούνται κατά τη συνδιαμόλυνση και το κατάλληλο αντιδραστήριο που θα οδηγήσει σε ικανοποιητικά ποσοστά διαμόλυνσης με την ελάχιστη τοξικότητα.

Μελλοντικά, και δεδομένου ότι η δοκιμή 4 αντιδραστηρίων διαμόλυνσης, διαφορετικών αναλογιών μεταξύ των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στη συνδυαμόλυνση, αλλά και 2 διαφορετικών κυτταρικών σειρών δεν απέφερε τα επιθυμητά αποτελέσματα, οδηγεί στην επιλογή για την αλλαγή των πλασμιδιακών φορέων με τους οποίους πραγματοποιείται η συνδιαμόλυνση. Στην περίπτωση που η παρατήρηση εξαιρετικά χαμηλών επιπέδων συνδυαμόλυνσης οφείλεται σε σίγηση λόγω της παρουσίας των δυο φορέων ταυτόχρονα (Hofman et al. (2000); Nejerinska et al. (2014), η αλλαγή φορέα για ένα από τα 2 ή και για τα δυο γονίδια θα μπορούσε να δώσει λύση σε αυτό το πρόβλημα. Για παράδειγμα, μπορεί να χρησιμοποιηθούν πολύ διαφορετικά πλασμίδια το ένα φέρον φθορίζουσα πρωτεΐνη και το άλλο κάποια ετικέτα (tag) ώστε να ανιχνεύεται με τη χρήση ειδικού αντισώματος. Παράλληλα, η εύρεση εναλλακτικών τρόπων απεικόνισης ίσως βοηθούσε σε περίπτωση που το πρόβλημα της συνδιαμόλυνσης δε λυθεί με την αλλαγή φορέα. Για παράδειγμα, η δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς που υπερεκφράζει σταθερά τη φυσικού τύπου PARN με ή χωρίς φθορίζουσα πρωτεΐνη, πιθανόν να διευκόλυνε τη διαδικασία της διαμόλυνσης, καθώς δε θα υπάρχει το εμπόδιο της συνδιαμόλυνσης για κάθε πείραμα.

Τέλος, η βελτιστοποίηση των συνθηκών θα προσφέρει εγκυρότητα και επαναληψιμότητα στα μέχρι στιγμής αποτελέσματά μας, ενώ θα δοθεί και απάντηση στο ερευνητικό ερώτημα εάν συνεντοπίζονται η φυσικού τύπου PARN με το μετάλλαγμα που φέρει αλλαγές στα αμινοξέα R99 και Q109 επηρεάζοντας το διμερισμό του ενζύμου και τη δραστηριότητά του στο κύτταρο.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alberts B. , J.A., Lewis J. , Raff M. , Roberts K. , Walter P., Molecular biology of the Cell 5th Edition. 2008, USA: Garland Science.
2. Anderson, J.S.J. and Parker, R. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.*, 17, 1497–1506 (1998).
3. Astrom, J., Astrom, A. and Virtanen, A. Properties of a HeLa cell 3' exonuclease specific for degrading poly(A) tails of mammalian mRNA. *J. Biol. Chem.*, 267, 18154-18159 (1992).
4. Balatsos, N. A. A., Nilsson, P., Mazza, C., Cusack, S. and Virtanen, A. Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC). *J. Biol. Chem.*, 281, 4517–22 (2006).
5. Balatsos, N. A. A., Maragozidis, P., Anastasakis, D. and Stathopoulos, C. Modulation of Poly(A)-specific Ribonuclease (PARN): Current Knowledge and Perspectives. *Curr. Med. Chem.*, 19, 4838-4849 (2012).
6. Berndt H, Harnisch C, Rammelt C, et al. Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA*, 18, 958-972 (2012).
7. Bianchin C., Mauxion F., Sentis S., Séraphin B. and Corbo L. Conservation of the deadenylase activity of proteins of the Caf1 family in human. *RNA*, 11, 487-494 (2005).
8. Billinton, N., and Knight, A. W. Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal. Biochem*, 291(2), 175-197 (2001).
9. Cao, D. and Parker, R. Computational modeling and experimental analysis of nonsense-mediated decay in yeast. *Cell*, 113, 533-545 (2003).
10. Cheadle, C., Fan, J., Cho-Chung, Y. S., Werner, T., Ray, J., Do, L., ... and Becker, K. G. Control of gene expression during T cell activation: alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability. *BMC Genomics*, 6, 75 (2005).
11. Chen, C.Y. et al. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell*, 107, 451-464 (2001).
12. Chiba, Y., Johnson, M. A., Lidder, P., Vogel, J. T., van Erp, H., and Green, P. J. AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in Arabidopsis. *Gene*, 328, 95-102. (2004).

13. Darnell, J.E., Philipson, L., Wall, R. Adesnik M. Polyadenylic acid sequences: role in conversion of nuclear RNA into messenger. *RNA* (1971).
14. Dehlin, E., Wormington, M., Körner, C.G. and Wahle, E. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.*, 19, 1079–1086 (2000).
15. Dodson, R.E. and Shapiro, D.J. Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 72, 129-164 (2002).
16. Dlakić, M. Functionally unrelated signalling proteins contain a fold similar to Mg²⁺-dependent endonucleases. *Trends Biochem Sci*, 25(6), 272-273 (2000).
17. Duan, T. L., He, G. J., Hu, L. D., and Yan, Y. B. The Intrinsically Disordered C-Terminal Domain Triggers Nucleolar Localization and Function Switch of PARN in Response to DNA Damage. *Cells*, 8(8) (2019).
18. Duan, T. L., Jiao, H., He, G. J., and Yan, Y. B. Translation Efficiency and Degradation of ER-Associated mRNAs Modulated by ER-Anchored poly(A)-Specific Ribonuclease (PARN). *Cells*, 9(1) (2020).
19. Dykxhoo, D.M., Novina, C.D. and Sharp, P.A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4, 457-467 (2003).
20. Edwalds-Gilbert, G., Veraldi, K. L. and Milcarek, C. Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res.* 25 (13), 2547-2561 (1997).
21. Fan, J., Yang, X., Wang, W., Wood, W. H., 3rd, Becker, K. G., and Gorospe, M. Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(16), 10611-10616 (2002).
22. Fenger-Gron, M., Fillman, C., Norrild, B., and Lykke-Andersen, J. Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Mol Cell*, 20(6), 905-915 (2005).
23. Frischmeyer, P.A. et al. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science*, 295, 2258-2261 (2002).
24. Fukao, A., Tomohiro, T., & Fujiwara, T. Translation Initiation Regulated by RNA-Binding Protein in Mammals: The Modulation of Translation Initiation Complex by Trans-Acting Factors. *Cells*, 10(7), 1711 (2021).
25. Gao, M., Fritz, D. T., Ford, L. P. and Wilusz, J. Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro. *Mol. Cell*, 5, 479–488 (2000).

26. Garneau, N., Wilusz, J. and Wilusz, C. The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 8, 113–126 (2007).
27. Ghosh, A. and Lima, C.D. Enzymology of RNA cap synthesis. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 1, 152-172 (2010).
28. Goldstrohm, A. C. and Wickens, M. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 337–344 (2008).
29. Green, C. B., Douris, N., Kojima, S., Strayer, C. A., Fogerty, J., Lourim, D., ... and Besharse, J. C. Loss of Nocturnin, a circadian deadenylase, confers resistance to hepatic steatosis and diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(23), 9888-9893 (2007).
30. Griffiths, G., Burke, B., and Lucocq, J. Fine structure immunocytochemistry (1993).
31. He, F., Li, X., Spatrick, P., Casillo, R., Dong, S., and Jacobson, A. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. *Mol Cell*, 12(6), 1439-1452 (2003).
32. He, G. J. and Yang, Y. B. Contributions of the C-terminal domain to poly(A)-specific ribonuclease (PARN) stability and self-association. *Biochem Biophys Rep*, vol.18 (2019).
33. Hofman, K., Swinnen, J. V., Claessens, F., Verhoeven, G., and Heyns, W. Apparent coactivation due to interference of expression constructs with nuclear receptor expression. *Mol Cell Endocrinol*, 168(1-2), 21-29 (2000).
34. Hoof van, A. and Parker, R. The exosome: a proteasome for RNA? *Cell* (1999).
35. Hoof van, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C. and Parker, R. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science*, 295, 2262-2264 (2002).
36. Hook, B., Goldstrohm, A. C., Seay, D. J. and Wickens, M. Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. *J. Biol. Chem.*, 282, 15430–15438 (2007).
37. Houalla, R., Devaux, F., Fatica, A., Kufel, J., Barrass, D., Torchet, C., and Tollervey, D. Microarray detection of novel nuclear RNA substrates for the exosome. *Yeast*, 23(6), 439-454 (2006).
38. Kadyrova, L. Y., Habara, Y., Lee, T. H., and Wharton, R. P. Translational control of maternal cyclin B mRNA by nanos in the *Drosophila* germline. *Development*, 134, 1519–1527 (2007).
39. Kim, W.C. and Lee, C.H. The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1796, 99-113 (2009).

40. Körner, C.G. and Wahle, E. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J. Biol. Chem.*, 272, 10448–10456 (1997), (1998).
41. Lejeune, F., Li, X. and Maquat, L.E. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylation, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell*, 12, 675-687 (2003).
42. Lewin, Genes VIII, ISBN SET 960-88412-0-8, κεφάλαιο 5 (2004).
43. Liu, H., Rodgers, N.D., Jiao, X.0020 and Kiledjian, M. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J.*, 21, 4699-4708 (2002).
44. Longin, A., Souchier, C., Ffrench, M., and Bryon, P. A. Comparison of anti-fading agents used in fluorescence microscopy: image analysis and laser confocal microscopy study. *J Histochem Cytochem*, 41(12), 1833-1840 (1993).
45. Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M. S., and Leahy, D. J. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol*, 529, 227-240 (2013).\
46. Lykke-Andersen, S., and Jensen, T. H. Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(11), 665-677 (2015).
47. Maquat, L.E. and Carmichael, G.G. Quality control of mRNA function. *Cell* 26, 173-176 (2000).
48. Maragozidis et al. *Akta Aematol.*, 128, 39-46 (2012).
49. Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., et al. CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.*, 39, 225-229 (2011).
50. Martínez, J. et al. 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).
51. Martínez, J., Ren, Y.-G., Nilsson, P., Ehrenberg, M. and Virtanen, A. The mRNA Cap Structure Stimulates Rate of Poly(A) Removal and Amplifies Processivity of Degradation. *J. Biol. Chem.*, 276, 27923–27929 (2001).
52. Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L., and Lukyanov, S. A. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol*, 17(10), 969-973 (1999).
53. Meyer, S., Temme, C. and Wahle, E. Messenger RNA Turnover in Eukaryotes: Pathways and Enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 197–216 (2004).

54. Mian, I.S., Comparative sequence analysis of ribonucleases HII, III, II PH and D. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3187-3195 (1997).
55. Mitchell, P. and Tollervey, D. mRNA turnover. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13, 320-325 (2001).
56. Mitchell, P. and Tollervey, D. An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'—<-5' degradation. *Mol. Cell* (2003).
57. Molin, L., and Puisieux, A. C. elegans homologue of the Caf1 gene, which encodes a subunit of the CCR4-NOT complex, is essential for embryonic and larval development and for meiotic progression. *Gene*, 358, 73-81 (2005).
58. Moore, M. J. Nuclear RNA turnover. *Cell*, 108, 431–434 (2002).
59. Morris, J. Z., Hong, A., Lilly, M. A., and Lehmann, R. twin, a CCR4 homolog, regulates cyclin poly(A) tail length to permit Drosophila oogenesis. *Development*, 132(6), 1165-1174 (2005).
60. Moser, M.J., Holley, W.R., Chatterjee, A., Mian, I.S. The proofreading domain of Escherichia coli DNA polymerase I and other DNA and/or RNA exonuclease domains. *Nucleic Acids Res.*, 25, 5110-5118 (1997).
61. Muhlrads, D. and Parker, R. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature*, 370, 578-581 (1994).
62. Mukherjee, D. et al. The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.*, 21, 165–174 (2002).
63. Nejepinska, J., Malik, R., Wagner, S., and Svoboda, P. Reporters transiently transfected into mammalian cells are highly sensitive to translational repression induced by dsRNA expression. *PLoS One*, 9(1), e87517 (2014).
64. Nilsson, P., Henriksson, N., Niedzwiecka, A., Balatsos, N. A., Kokkoris, K., Eriksson, J., and Virtanen, A. A multifunctional RNA recognition motif in poly(A)-specific ribonuclease with cap and poly(A) binding properties. *J Biol Chem*, 282(45), 32902-32911 (2007).
65. Oh, S., and Kessler, J. A. Design, Assembly, Production, and Transfection of Synthetic Modified mRNA. *Methods*, 133, 29-43 (2018).
66. Ono, M., Murakami, T., Kudo, A., Isshiki, M., Sawada, H., and Segawa, A. Quantitative comparison of anti-fading mounting media for confocal laser scanning microscopy. *J Histochem Cytochem*, 49(3), 305-312 (2001).
67. Opyrchal, M., Anderson, J. R., Sokoloski, K. J., Wilusz, C. J. and Wilusz, J. A cell-free mRNA stability assay reveals conservation of the enzymes and mechanisms of mRNA decay between mosquito and mammalian cell lines. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35, 1321–34 (2005).

68. Parker, R. and Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11, 121–127 (2004).
69. Perales, R. and Bentley, D. "Cotranscriptionality": the transcription elongation complex as a nexus for nuclear transactions. *Molecular cell*, 36, 178-191 (2009).
70. Shatkin, A. J., and Manley, J. L. The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat Struct Biol.*, 10, 838 -842 (2000).
71. Shi, Y. Alternative polyadenylation: new insights from global analyses. *RNA*, 18, 2105-2117 (2012).
72. Steiger, M., Carr-Schmid, A., Schwartz, D. C., Kiledjian, M., and Parker, R. Analysis of recombinant yeast decapping enzyme. *RNA*, 9(2), 231-238 (2003).
73. Takahashi, S., Araki, Y., Sakuno, T. and Katada, T. Interaction between Ski7p and Upflp is required for nonsense-mediated 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.*, 22, 3951-3959 (2003).
74. Thore S., Mauxion F., Seraphin B. and Suck D. X-ray structure and activity of the yeast Pop2 protein: a nuclease subunit of the mRNA deadenylase complex. *EMBO, Rep.*4, 1150–1155 (2003).
75. Tian, B. and Manley, J.L. Alternative cleavage and polyadenylation: the long and short of it. *Trends in biochemical sciences*, 38, 312-320 (2013).
76. Torabi, S.F., Vaidya, A., Tycowski, K., DeGregorio, S., Wang, J., Shu, M.D., Steitz. T. and Steitz J. RNA stabilization by a poly(A) tail 3'-end binding pocket and other modes of poly(A)-RNA interaction. *Science*, 371(6529) (2021).
77. Tucker, M. and Parker, R. Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.*, 69, 571-595 (2000).
78. Virtanen, A., Henriksson, N., Nilsson, P. and Nissbeck, M. Poly(A)-specific ribonuclease (PARN): an allosterically regulated, processive and mRNA cap-interacting deadenylase. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 48, 192-209 (2013).
79. Vlachakis, D., Pavlopoulou, A., Tsiliki, G., Komiotis, D., Stathopoulos, C., Balatsos, N. A., and Kossida, S. An integrated in silico approach to design specific inhibitors targeting human poly(a)-specific ribonuclease. *PLoS ONE*, 7(12), e51113 (2012).
80. Wang, Z. and Kiledjian, M. Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell*, 107, 751-762 (2001).
81. Washio-Oikawa, K., Nakamura, T., Usui, M., Yoneda, M., Ezura, Y., Ishikawa, I., . . . and Noda, M. Cnot7-null mice exhibit high bone mass phenotype and modulation of BMP actions. *J Bone Miner Res*, 22(8), 1217-1223 (2007).

82. Weill, L., Belloc, E., Bava, F.A. and Mendez, R. Translational control by changes in poly(A) tail length: recycling mRNAs. *Nature structural & molecular biology*, 19, 577-585 (2012).
83. Wilusz, C. J., Wormington, M., and Peltz, S. W. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(4), 237-246 (2001).
84. Wu, M., Nilsson, P., Henriksson, N., Niedzwiecka, A., Lim, M. K., Cheng, Z., Song, H. (2009). Structural basis of m(7)GpppG binding to poly(A)-specific ribonuclease. *Structure*, 17(2), 276-286 (2009).
85. Wu, M. et al. Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO J.* 24, 4082–4093 (2005).
86. Yamashita, A., Chang, T. C., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C. Y., & Shyu, A. B. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol*, 12(12), 1054-1063 (2005).
87. Yu, J. H., Yang, W. H., Gulick, T., Bloch, K. D., and Bloch, D. B. Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *RNA*, 11(12), 1795-1802 (2005).
88. Zhang, A., Liu, W. F., and Yan, Y. B. Role of the RRM domain in the activity, structure and stability of poly(A)-specific ribonuclease. *Arch Biochem Biophys*, 461(2), 255-262 (2007).
89. Zhao, J., Hyman, L. and Moore, C. Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiology and molecular biology review*, 63, 405-445 (1999).
90. Zuo, Y. and Deutscher, M. P. Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res.*, 29, 1017–1026 (2001).