

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρωτόκολλο καθαρισμού και διερεύνηση δραστηριότητας φωσφατάσης RNA
της απαδευνυλάσης AtHesperin

Purification protocol and examination of RNA phosphatase activity of
AtHesperin

Διπλωματική εργασία
Μπούρχα Αγορίτσα του Χρήστου

Λάρισα 2022

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

- Νικόλαος Μπαλατσός (επιβλέπων καθηγητής), Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Δημήτριος Λεωνίδας, Καθηγητής Βιοχημείας Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Γεώργιος Στραβοδήμος, Μεταδιδακτορικός Ερευνητής Δομικής Βιοχημείας Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	3
Περίληψη- Abstract.....	4
1 Εισαγωγή.....	5
1.1 Απαδενυλίωση και απαδενυλάσες.....	5
1.2 Αποικοδόμηση mRNA στον κirkάδιο ρυθμό.....	7
1.3 Απαδενυλίωση και κirkάδιος ρυθμός.....	9
1.4 Πρωτεΐνη ANGEL2.....	11
1.5 Αντιδράσεις φωσφορυλίωσης.....	15
1.6 Hesperin και ενδεχόμενη δραστικότητα φωσφατάσης κυκλικών φωσφορικών.....	21
1.7 Σκοπός της εργασίας.....	23
2 Υλικά- Μέθοδοι.....	24
2.1 Υλικά.....	24
2.1.1 Βακτηριακά στελέχη.....	24
2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς.....	24
2.1.3 Διαλύματα.....	24
2.1.3.1 Θρεπτικά υλικά ανάπτυξης βακτηρίων.....	24
2.1.3.2 Ρυθμιστικά διαλύματα λύσης βακτηριακών κυττάρων.....	25
2.1.3.3 Ρυθμιστικά διαλύματα Υγρής Χρωματογραφίας Συγγένειας ακίνητοποιημένου μετάλλου (IMAC).....	25
2.1.4 Μελέτη ενζυμικής δραστικότητας.....	26
2.1.4.1 Αντίδραση απαδενυλίωσης.....	26
2.1.4.2 Αντίδραση διάσπασης 2',3'-κυκλικού φωσφορικού, δραστικότητα cΡασης.....	27
2.1.4.3 Διαλύματα.....	28
2.2 Οργανολογία.....	29
2.3 Μεθοδολογία.....	29
2.3.1 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων BL21-Gold με πλασμιδιακό φορέα pATHRA.....	29
2.3.2 Παραγωγή της ανασυνδυασμένης AtHESPERIN.....	30
2.3.3 Λύση βακτηριακών κυττάρων.....	30
2.3.4 Απομόνωση της AtHESPERIN με χρωματογραφία αγχιστείας ακίνητοποιημένων μετάλλων (IMAC).....	31
2.3.4.1 Αφαίρεση ετικέτας αγχιστείας μέσω πέψης με πρωτεάση 3C.....	31
2.3.5 Συμπύκνωση και διαπίδυση της AtHESPERIN.....	32
3 Αποτελέσματα- Συζήτηση.....	34
3.1 Ομοπαράθεση AtHESP και ANGEL2.....	34
3.2 Υπερέκφραση και καθαρισμός AtHESP.....	35
3.3 Αντίδραση διάσπασης 2',3'-κυκλικού φωσφορικού, δραστικότητα cΡασης.....	37
Βιβλιογραφία.....	39

Περίληψη

Η διαδικασία της βράχυνσης της πολυ(A) ουράς καταλύεται από ένζυμα που ονομάζονται απαδενυλάσες. Η HESPERIN είναι μια απαδενυλάση που έχει απομονωθεί από το φυτό *Arabidopsis thaliana*, εμφανίζει κιρκάδια έκφραση και είναι η μόνη κιρκάδια απαδενυλάση που έχει περιγραφεί μέχρι σήμερα. Ανήκει στην υπερικογένεια των EEP απαδενυλασών και εμφανίζει ομολογία και παρόμοια δομή με τις NOCTURNIN και ANGEL2. Ωστόσο, οι δύο τελευταίες πρωτεΐνες στην πορεία φάνηκε πως διαθέτουν δραστηριότητα φωσφατάσης και όχι απαδενυλάσης, όπως πιστευόταν αρχικά. Για τον λόγο αυτό και με βάση το γεγονός ότι στη φύση υπάρχουν χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες με παραπάνω από μια λειτουργίες, στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να διαπιστωθεί αν και η HESPERIN είναι μία φωσφατάση. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε εξέταση ομολογίας μέσω ομοπαράθεσης, καθαρίστηκε ανσυνδυασμένη AtHESPERIN και αναμένεται να χρησιμοποιηθεί σε κατάλληλες αντιδράσεις με τροποποιημένα υποστρώματα που σχεδιάστηκαν για χαρακτηρισμό φωσφατασών 2',3'-κυκλικού φωσφορικού.

Abstract

The process of shortening the poly(A) tail is catalyzed by enzymes called apadenylases. HESPERIN is an apadenylase isolated from *Arabidopsis thaliana* that exhibits circadian expression, and is the only circadian apadenylase described to date. It belongs to the superfamily of EEP adenyases and shows homology and similar structure to NOCTURNIN and ANGEL2. However, the latter two proteins along the way were shown to possess phosphatase activity and not apadenylase activity, as originally thought. For this reason and based on the fact that in nature there are characterized proteins with more than one function, in this work an attempt was made to establish whether HESPERIN is a phosphatase or not. To this end, homology screening was carried out, recombinant AtHESPERIN was purified and expected to be used in suitable reactions with modified substrates designed to characterize 2',3'-cyclic phosphate phosphatases.

1. Εισαγωγή

1.1 Απαδενυλίωση και απαδενυλάσες

Η αποικοδόμηση των μορίων mRNA είναι κύριος ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης. Το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμηση είναι η αφαίρεση της ουράς πολυ(A), μια διεργασία γνωστή ως απαδενυλίωση, και τα ένζυμα που καταλύουν την διεργασία ονομάζονται απαδενυλάσες. Οι απαδενυλάσες είναι εξωνουκλεάσες που εξαρτώνται από μαγνήσιο (Mg^{2+}) και αποικοδομούν την πολυ(A) ουρά με κατεύθυνση $3' \rightarrow 5'$. Προϊόν της διάσπασης είναι το 5'-AMP (Goldstrohm and Wickens, 2008). Έπειτα, άλλα σύμπλοκα ενζύμων θα οδηγήσουν στην πλήρη αποικοδόμηση του mRNA.

Οι απαδενυλάσες ταξινομούνται σε δύο μεγάλες υπεροικογένειες: την DEDD και την EEP. Η DEDD υπεροικογένεια περιλαμβάνει τις οικογένειες των POP2, CAF1Z, PARN και PAN2 (εικόνα 1) (Goldstrohm and Wickens 2008• Pavlioroulou et al., 2013). Η υπεροικογένεια αυτή πήρε το όνομά της από τα συντηρημένα κατάλοιπα Asp και Glu που περιέχουν οι απαδενυλάσες διάσπαρτα στα τρία μοτίβα εξωνουκλεάσης (Zuo and Deutscher, 2001). Οι απαδενυλάσες αυτής της υπεροικογένειας χωρίζονται στις DEDDh και DEDDy, ανάλογα με το αν το πέμπτο συντηρημένο καταλυτικό αμινοξύ είναι His (H) ή Tyr (Y) (Balatsos et al, 2012).

Family	Sc	Ce	Dm	Xl	Mm	Hs	Active
<i>DEDD nucleases</i>							
POP2	Pop2	CCF-1	POP2	CNOT7 CNOT8	CNOT7 CNOT8	CNOT7 CNOT8	Sc, Dm, Mm, Hs Hs
CAF1Z		CAF-1z		CAF1Z	CAF1Z	CAF1Z	Hs
PARN		PARN		PARN	PARN	PARN	Xl, Hs
					PARNL	PARNL	ND
PAN2	Pan2	PAN-2	PAN2	PAN2	PAN2	PAN2	Sc, Mm, Hs

Εικόνα 1. Η DEDD υπεροικογένεια σε διάφορους οργανισμούς-μοντέλα. Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Xl: *Xenopus laevis*, Mm: *Mus musculus*, Hs: *Homo sapiens* (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Η υπεροικογένεια EEP (εξωνουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών) περιλαμβάνει τις οικογένειες των CCR4, Nocturin, ANGEL και 2'PDE (εικόνα 2). Οι

απαδενυλάσες αυτής της υπεροικογένειας περιέχουν συντηρημένα κατάλοιπα Asp και His στην περιοχή νουκλεάσης. Εντούτοις, τόσο η Nocturnin όσο και η ANGEL2 δείχθηκε πως διαθέτουν δραστικότητα φωσφατάσης, παρά απαδενυλάσης. Η Nocturnin είναι 2' φωσφατάση του NADPH• χρησιμοποιεί το δινουκλεοτίδιο NADP(H) αφαιρώντας το φωσφορικό 2' δημιουργώντας NAD(H) (Laothamatas et al. 2019).

Family	Sc	Ce	Dm	Xl	Mm	Hs	Active
<i>EEP nucleases</i>							
CCR4	Ccr4	CCR-4	CCR4	CNOT6	CCR4	CNOT6	Sc, Dm, Mm, Hs
				CNOT6L	CCR4L	CNOT6L	Mm, Hs
Nocturnin			NOC	Noc	NOC	NOC	Xl, Mm, Hs
ANGEL	Ng1	Angel	Angel	Angel1	ANGEL1	ANGEL1	ND
	Ng2			Angel2	ANGEL2	ANGEL2	Sc
	Ng3						ND
2'PDE		2'PDE	2'PDE	2'PDE	2'PDE	2'PDE	Hs

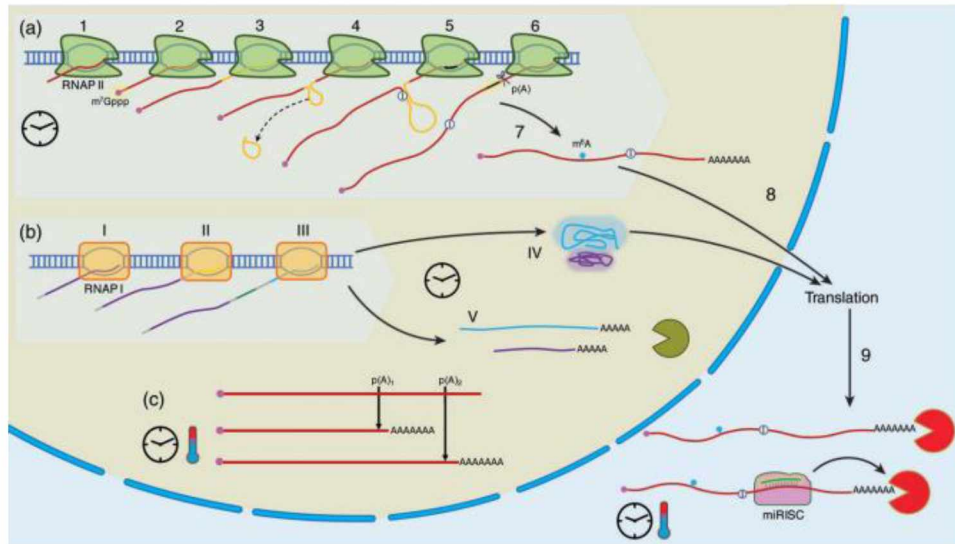
Εικόνα 2. Η υπεροικογένεια EEP σε διάφορους οργανισμούς-μοντέλα. Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Xl: *Xenopus laevis*, Mm: *Mus musculus*, Hs: *Homo sapiens* (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Έχουν περιγραφεί περισσότερες από 10 απαδενυλάσες στα θηλαστικά, ενώ 26 έχουν καταγραφεί στην *Arabidopsis* (Goldstrohm & Wickens, 2008). Οι λόγοι της συγκεκριμένης ποικιλομορφίας παραμένουν άγνωστοι, εντούτοις είναι γνωστό πως συγκεκριμένες απαδενυλάσες δύνανται να στοχεύσουν συγκεκριμένα μετάγραφα. Εναλλακτικά, πολλαπλές απαδενυλάσες δύνανται να δράσουν στο ίδιο mRNA μόριο, εκδηλώνοντας διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες λειτουργίες (Goldstrohm & Wickens, 2008). Στην παρούσα φάση, η πλειοψηφία των δημοσιευμένων εργασιών συγκλίνει προς το πρώτο σενάριο (Maragozidis et al., 2015; Lee et al., 2012; Aslam et al., 2009; Morita et al., 2007), με αρκετά ωστόσο ερωτήματα να χρήζουν πρόσθετων διευκρινήσεων, καθώς εξαρτώνται από τις εκάστοτε συνθήκες και την εκάστοτε χρονική στιγμή. Απαιτούνται πρόσθετες έρευνες, προκειμένου να εντοπισθούν απαδενυλάσες καθώς επίσης και παράγοντες που εξαρτώνται από τους κιρκάδιους ρυθμούς (π.χ. *cis*-δραστικά στοιχεία, πρωτεΐνες προσδεμένες σε RNA και/ή miRNAs), με σκοπό να διευκρινισθούν μηχανιστικές λεπτομέρειες που άπτονται της αποδόμησης του mRNA σε σχέση με τη σύνθετη κιρκάδια λειτουργία.

1.2 Αποικοδόμηση mRNA στον κερκάδιο ρυθμό

Η αποικοδόμηση των μορίων mRNA, όπως και η διαδικασία έναρξης της μεταγραφής, αποτελεί μία εκτενώς ρυθμιστική διεργασία που συμβάλλει σημαντικά στη διαμόρφωση της κερκάδιας γονιδιακής έκφρασης και την μετάδοση των περιοδικών μηνυμάτων. Το πρώτο και καθοριστικό βήμα στην αποικοδόμηση των mRNA αποτελεί η βράχυνση των ουρών poly(A), γεγονός που καθορίζει τη σταθερότητα και το χρόνο ζωής των μεταγράφων (Εικόνα 3). Η ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA είναι κομβικής σημασίας για την επίτευξη της ρυθμικής έκφρασης του mRNA, σύμφωνα με προβλέψεις μαθηματικών μοντέλων που διαμορφώθηκαν πριν από δύο δεκαετίες (Wuarin et al., 1992). Οι καθορισμένοι ρυθμοί αποδόμησης του mRNA συσχετίζονται με το μήκος των poly(A) ουρών, υποδηλώνοντας πως η εμφάνιση μετα-μεταγραφικών ρυθμιστικών γεγονότων είναι απαραίτητη προκειμένου να επιτευχθούν σταθερά επίπεδα παραγωγής mRNA μορίων (Luck et al., 2014).

Αναφορικά με την σταθερότητα και την αποδόμηση κερκαδικά εξαρτώμενων γονιδίων, ευρήματα μελετών αναφέρουν πως η έκφραση μίας μικρής ομάδας συστημικά εξαρτώμενων γονιδίων παρέμεινε ρυθμική στο ήπαρ ποντικών έπειτα από την κατάργηση του τοπικού κερκάδιου ρυθμού. Μεταξύ των γονιδίων, εντοπίστηκαν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μετα-μεταγραφικό έλεγχο (π.χ. Nocturnin, CIRP) (Kornmann et al., 2007). Τα ανώτατα επίπεδα της Nocturnin, μιας φωσφατάσης, παρατηρούνται κατά τις βραδινές ώρες επηρεάζοντας την σταθερότητα και την μεταφρασιμότητα των mRNA στόχων (Garbarino-Pico et al., 2007; Baggs & Green, 2003). Απώλεια της Nocturnin οδηγεί στη διαμόρφωση ισχυρών μεταβολικών φαινοτύπων στα ποντίκια, συμπεριλαμβάνοντας την εκδήλωση αντίστασης σε δίαιτες που επάγουν παχυσαρκία (Douris et al., 2011; Green et al., 2007). Επιπρόσθετα, εντοπίζονται mRNA που κωδικοποιούν για ένζυμα που συμμετέχουν στη σύνθεση χοληστερόλης και λιπιδίων όπου καταγράφηκε μεγαλύτερο μήκος των ουρών poly(A) των εν λόγω μεταγράφων σε απογονιδιακά (knock out) πειραματόζωα έναντι φυσικού τύπου (wild type) (Stubblefield et al., 2018). Έχει αναφερθεί πως τα mRNA βαζοπρεσίνης φαίνεται να έχουν μικρότερα μήκη poly(A) ουρών κατά την διάρκεια των νυχτερινών ωρών.



Εικόνα 3. Ουρές πολυ(A) στις συμμεταγραφικές και μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις μορίων RNA. Ρόλος poly(A) ουρών mRNA (a), rRNA κατά την ημερήσια παραγωγή ριβοσωμάτων (b) και εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης (c) (Beta & Balatsos, 2018).

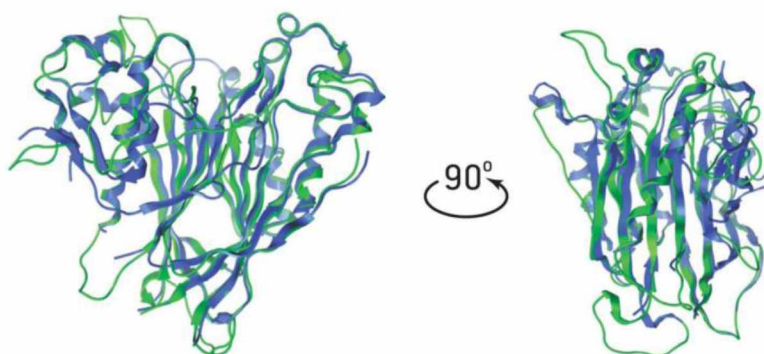
Παραπλήσιο παράδειγμα συνιστά η πρόσφατα χαρακτηριζόμενη απαδενυλάση με την επωνυμία HESPERIN στον οργανισμό *Arabidopsis* (AtHESP), η οποία αν και εκδηλώνει ένα διακριτό κερκαδικό εκφραστικό προφίλ, δεν συνιστά μέρος των ταλαντώσεων του πυρήνα (Delis et al., 2016). Η AtHESP επηρεάζει την έκφραση και ρυθμιστικότητα των TOC1 και CCA1 γονιδίων του πυρήνα. Ωστόσο, κανένα mRNA μόριο δεν αποτελεί άμεσο στόχο της δραστηριότητας απαδενυλάσης της AtHESP. Το εν λόγω γεγονός ενδεχομένως υποδηλώνει πως το συγκεκριμένο μόριο δύναται να επηρεάζει τον ρυθμό στην *Arabidopsis*, μέσω αποσταθεροποίησης ενός ή περισσοτέρων δύσκολα προσεγγίσιμων στόχων (Delis et al., 2016).

1.3 Απαδενυλίωση και κικκάδιος ρυθμός

Η poly(A) ουρά αποτελεί μία δυναμική δομή, το μέγεθος της οποίας ποικίλλει ανάλογα με την διάρκεια ζωής του mRNA (Beta & Balatsos, 2018), με τις εν λόγω μεταβολές να άπτονται του τρόπου λειτουργίας του κικκάδιου ρυθμού (Kojima et al., 2012; Cagampang et al., 1994). Κατά την διάρκεια της δημιουργίας RNA μορίων, λαμβάνει χώρα προσθήκη της poly(A) ουράς και έπειτα ειδικές πρωτεΐνες προσδένονται στην ουρά (PABPs, poly(A) binding proteins) όπου σταθεροποιούν τα μετάγραφα, διευκολύνοντας την εξαγωγή και τη μετάφρασή τους (Goldstrohm & Wickens, 2008). Οι PABPs είναι επίσης απαραίτητες για την αποδόμηση της poly(A) ουράς- απαδενυλίωση (Goss & Kleiman, 2013; Mangus et al., 2003), διαμορφώνοντας την διάρκεια ζωής του mRNA μορίου. Η βράχυνση της ουράς πέρα από κάποιο σημείο επάγει αποδόμηση και μεταφραστική αποσιώπηση (Lima et al., 2017; Eckmann et al., 2011; Goldstrohm & Wickens, 2008). Επομένως, η απαδενυλίωση αποτελεί μία διαδικασία που ρυθμίζει τους χρόνους εκδήλωσης της μεταγραφής και μετάφρασης, αντίστοιχα (Goldstrohm & Wickens, 2008). Η βράχυνση της poly(A) ουράς επιτυγχάνεται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μέσω κατάλυσης από μία οικογένεια ενζύμων που ονομάζονται απαδενυλάσες, οι οποίες κατηγοριοποιούνται σε δύο ομάδες: τις DEDD και EEP (endonuclease/exonuclease/phosphatase) νουκλεάσες. Η ονομασία των DEDD νουκλεασών οφείλεται στα συντηρημένα κατάλοιπα Asp (D) and Glu (E) που εντοπίζονται στο ενεργό κέντρο. Από την άλλη πλευρά, οι EEP νουκλεάσες διατηρούν συντηρημένα κατάλοιπα Asp, Glu και His (Collart & Panasenko, 2017; Wang et al., 2010; Goldstrohm & Wickens, 2008), τα οποία και είναι σημαντικά για τον συγχρονισμό των ιόντων μαγνησίου, βοηθώντας στη διαμόρφωση της θέσης του υποστρώματος εντός της καταλυτικής θέσης (Zhang et al., 2016).

Ο ακριβής ρόλος των απαδενυλασών, σε επίπεδο κικκάδιου ρυθμού, παραμένει μερικώς κατανοητός, αν και πλέον γνωρίζουμε πως τα συγκεκριμένα ένζυμα δρουν ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης. Η Nocturnin περιγράφηκε αρχικά ως παράδειγμα απαδενυλάσης που ακολουθεί ρυθμική έκφραση στα θηλαστικά. Το συγκεκριμένο μοτίβο δράσης βασίζεται ως επί το πλείστον στην παρουσία μίας EEP περιοχής του πρωτεϊνικού συμπλόκου CCR4-NOT, ενώ υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές και για εκδήλωση του συγκεκριμένου μοτίβου σε πρώιμα *in vitro* πειράματα (Baggs & Green, 2003; Wang et al., 2001). Ωστόσο, πρόσφατες εμπειριστατωμένες βιοχημικές μελέτες αναφέρουν πως η Nocturnin αποτελεί παράδειγμα φωσφατάσης που μετατρέπει τα άμεσα υποστρώματα NADP+

και NADPH σε NAD⁺ και NADH, αντίστοιχα (Laothamatas et al., 2020; Estrella et al., 2019). Η Hesperin (AtHESPERIN) έχει αναγνωρισθεί ως ομόλογη της Nocturnin στην *Arabidopsis thaliana* και ως η πρώτη απαδενυλάση με δυνατότητα ρυθμικής έκφρασης σε φυτικούς οργανισμούς (Delis et al., 2016). Η δομή της AtHESPERIN είναι ολιγομερής και πιθανότατα αποτελείται από τρεις πανομοιότυπες υπομονάδες (Delis et al., 2016). Σύμφωνα με ευρήματα βιοπληροφορικής ανάλυσης, η AtHESPERIN διαθέτει μία συντηρημένη EEP περιοχή, με αποτέλεσμα να επιδεικνύει αυξημένη ομολογία σε επίπεδο αλληλουχίας με λοιπές πρωτεΐνες που επίσης φέρουν EEP περιοχή. Τέτοια παραδείγματα περιλαμβάνουν την CNOT6L απαδενυλάση, την Nocturnin και ενδεχομένως και περιπτώσεις καταλυτικών αμινοξέων (Delis et al., 2016). Προς αυτή την κατεύθυνση, οι Beta et al. (2020) διερεύνησαν τον καταλυτικό μηχανισμό της AtHESPERIN. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρουν πως τροποποίησαν ένα πρωτόκολλο κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης και διαπίστωσαν πως τα E114, D287, D346 και H385 κατάλοιπα της Hesperin περιλαμβάνουν στο ενεργό τους κέντρο το αντίστοιχο συντηρημένο καταλυτικό μοτίβο που ανευρίσκεται στις EEP απαδενυλάσες. Ακολούθησαν προσομοιώσεις μοριακής μοντελοποίησης προκειμένου να διερευνηθούν οι δομικές επιπτώσεις των καταλυτικών καταλοίπων της Hesperin και ο ρόλος τους στο μηχανισμό κατάλυσης. Τα ευρήματα της εν λόγω μελέτης αναδεικνύουν την AtHESPERIN ως μέλος της υπεροικογένειας EEP των απαδενυλασών. Πιο ειδικά, η εφαρμοζόμενη μοριακή μοντελοποίηση αναφέρει πως η AtHESPERIN ακολουθεί την κανονική και τυπική τρισδιάστατη δομή λοιπών EEP απαδενυλασών (Εικόνα 4).

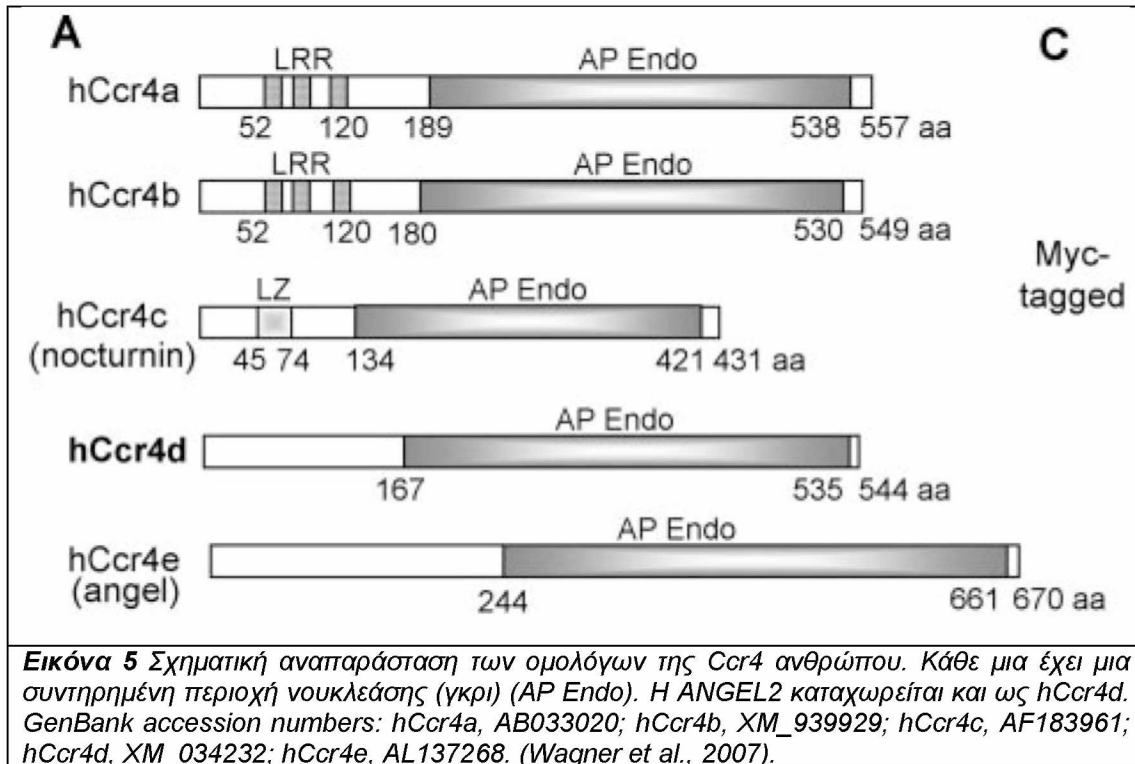


Εικόνα 4 Μοντέλο ομολογίας της AtHESPERIN. Το μοντέλο (AtHESPERIN) εμφανίζεται με μπλε χρώμα ενώ με πράσινο απεικονίζεται η δομή οδηγός (CNOT6L) (Beta et al., 2020)

Οι απαδενυλάσες που έχουν καταγραφεί στα φυτά, αν και δεν έχουν διερευνηθεί διεξοδικά όπως σε άλλες περιπτώσεις οργανισμών, αφήνουν υποσχόμενες προοπτικές για το μέλλον. Πιο συγκεκριμένα, είναι ξεκάθαρο πως η *Arabidopsis* χρησιμοποιεί διαφορετικές απαδενυλάσες προκειμένου να στοχοποιήσει μόρια mRNA (Walley et al., 2010A; 2010B; Liang et al., 2009; Sarowar et al., 2007) και φαίνεται να διαδραματίζουν ρόλους σε επίπεδο κυτταρικής ανάπτυξης και φυσιολογίας. Έχουν εντοπισθεί δύο περιπτώσεις PARN γονιδίων στην *Arabidopsis*, με το γονίδιο At1g55870 (AtPARN) να αποτελεί κυτταροπλασματική απαδενυλάση, απαραίτητη για τη διαδικασία της εμβρυογένεσης (Reverdatto et al., 2004). Ανάλογη συμπεριφορά έχει καταγραφεί και σε θηλαστικούς οργανισμούς, σχετικά με την στοχοποίηση μεταγράφων από PARN γονίδια. Επιπρόσθετα, έχουν περιγραφεί 11 περιπτώσεις CAF1 γονιδίων στην *Arabidopsis*, ορισμένα εκ των οποίων σχετίζονται με το στρες (Walley et al., 2010A; 2010B; Liang et al., 2009; Wu et al., 2005). Τα εν λόγω γονίδια σχετίζονται ακόμα με ανθεκτικότητα των φυτών έναντι μυκητιακών και βακτηριακών λοιμώξεων (Walley et al., 2010A; 2010B; Sarowar et al., 2007). Η παρουσία πολλαπλών απαδενυλασών δύναται να αντικατοπτρίζει διαφορετικές ανάγκες σε επίπεδο έκφρασης συγκεκριμένων mRNA μορίων, σε διαφορετικές χρονικές στιγμές σε κύτταρα ή ιστούς, καθώς επίσης και στην παρουσία συγκεκριμένων mRNA μορίων σε διαφορετικές χρονικές περιόδους (Goldstrohm & Wickens, 2008).

1.4 Πρωτεΐνη ANGEL2

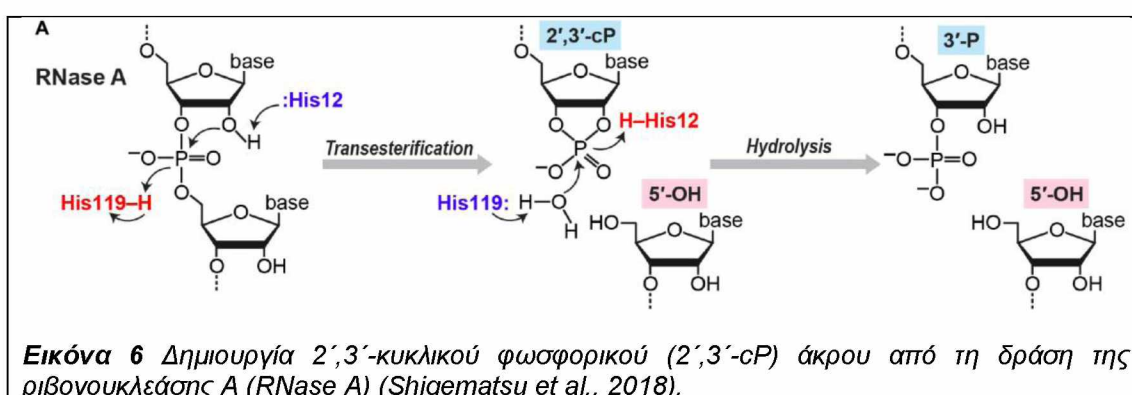
Η πρωτεΐνη ANGEL2 έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Κατατάσσεται στην υπεροικογένεια των EEP απαδενυλασών ως Ccr4d, μαζί με την ANGEL1 (Ccr4e). Όμως δεν είχε παρατηρηθεί να εκδηλώνει δραστικότητα απαδενυλάσης (Wagner et al., 2007).



Η ανθρώπινη ANGEL2 έχει μέγεθος 62 kDa και αποτελείται από 544 αμινοξέα, εμφανίζει ομολογία με την CCR4 (carbon catabolite repression 4). Η τελευταία αποτελεί μέλος του CCR4-NOT συμπλόκου των απαδενυλασών (Goldwin et al., 2013). Από τα πέντε ανθρώπινα CCR4 ομόλογα, μόλις δύο και συγκεκριμένα τα CNOT6 (CCR4a) και CNOT6L (CCR4b) συγκροτούνται με εναλλακτικό τρόπο στο σύμπλοκο CCR4-NOT (Wahle & Winkler, 2013). Πρέπει να αναφερθεί πως οι Nocturnin (CCR4c), ANGEL2 (CCR4d) και ANGEL1 (CCR4e) θεωρούνται ως απαδενυλάσες (Dupressoir et al., 2001), καθώς περιλαμβάνουν τη σχετική συντηρημένη περιοχή νουκλεάσης (εξαρτώμενη από τη δράση ιόντων μαγνησίου). Η εν λόγω περιοχή αποτελεί κοινό στοιχείο της EEP υπεροικογένειας και είναι χαρακτηριστική της CCR4 οικογένειας. Ωστόσο, στις περιπτώσεις των παραπάνω απαδενυλασών οι N-τελικές περιοχές χαρακτηρίζονται από απουσία της πλούσιας σε

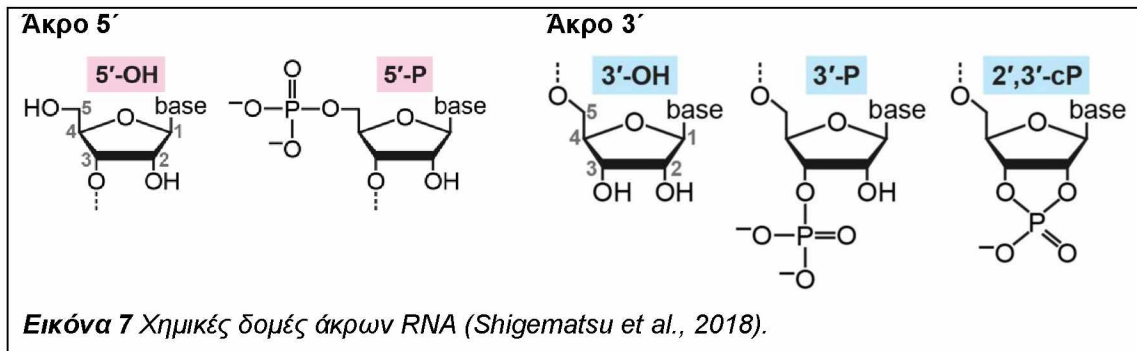
λευκίνη επαναλαμβανόμενης περιοχής, η οποία και απαιτείται για την ενσωμάτωση στο CCR4-NOT σύμπλοκο (Goldwin et al., 2013; Wahle & Winkler, 2013).

Η ANGEL 2 θα αναλυθεί περισσότερο. Αρχικά, χαρακτηρίστηκε ως νουκλεάση Ccr4p-like που είναι απαραίτητη για το τελικό βήμα της επεξεργασίας του άκρου 3' του 5.8S rRNA στη ζύμη (Faber et al., 2002). Οι Pinto et al. (2020) μελέτησαν το κατά πόσο η πρωτεΐνη ANGEL2, που αποτελεί μέλος της CCR4 οικογένειας των απαδενυλασών, διαθέτει την ικανότητα να επιδεικνύει δραστικότητα προσόμοια της 2',3'-κυκλικής φωσφατάσης. Τα μόρια RNA συχνά τροποποιούνται με μία τελική ομάδα 2',3'-κυκλικής φωσφατάσης, ως αποτέλεσμα διάσπασης ενδονουκλεάσης, περικοπής εξονουκλεάσης ή *de novo* σύνθεσης.



Κατά την διάρκεια δημιουργίας πρώιμων μεταφορικών RNA μορίων (tRNA) και μη συμβατικής συρραφής αγγελιοφόρων RNA μορίων (mRNA), οι 2',3'-κυκλικές φωσφατάσες αποτελούν υποστρώματα του συμπλόκου της λιγάσης των tRNA και η απομάκρυνσή τους είναι ιδιαίτερως σημαντική στην ανακύκλωση των μορίων tRNA. Η χημική δομή των άκρων των RNA φαίνεται στην ακόλουθη Εικόνα. Οι συγγραφείς της συγκεκριμένης μελέτης αναφέρουν πως εντόπισαν την πρωτεΐνη ANGEL2, ως έχουσα δραστικότητα ανθρώπινης φωσφατάσης που μετατρέπει 2',3'-κυκλικά μόρια φωσφόρου σε νουκλεοτίδια που φέρουν ομάδες υδροξυλίου στις θέσεις 2' και 3'. Αναλύθηκαν η προτίμηση της πρωτεΐνης ANGEL2 σε επίπεδο υποστρώματος, η δομή της, καθώς επίσης και ο σχετικός μηχανισμός της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν πως η διατάραξη της έκφρασης της ANGEL2 επηρέασε την αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας προ-tRNA, τη συρραφή του mRNA της XBP1 (X-box-binding protein 1) της μη ξεδιπλωμένης πρωτεϊνικής απόκρισης, καθώς επίσης και της προσθήκης CCA στην TRNT1 (tRNA nucleotidyltransferase 1). Τα εν λόγω συμβάντα είναι δηλωτικά της συμμετοχής της ANGEL2 σε μονοπάτια RNA που εξαρτώνται από την υδρόλυση 2',3'-κυκλικών μορίων φωσφορικού. Η ίδια μελέτη αναφέρει πως εκτός από την ANGEL2, η

ANGEL1 επιδεικνύει παρόμοια αλλά όχι τόσο έντονη δραστικότητα 2',3'-κυκλικής φωσφατάσης (Gosselin et al., 2001). Η διατήρηση και των δύο μορφών της πρωτεΐνης ANGEL κατά την διάρκεια της εξέλιξης ενδεχομένως να συσχετισθεί με επιτέλεση συμπληρωματικών κυτταρικών λειτουργιών, μέσω της δράσης της 2',3'-κυκλικής φωσφατάσης.



1.5 Αντιδράσεις φωσφορυλίωσης

Η διαδικασία της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών αποτελεί μία βασική αντιστρεπτή μετα-μεταφραστική τροποποίηση, στην οποία οι πρωτεϊνικές κινάσες (protein kinases, PKs) μεταφέρουν την *c*-φωσφορική ομάδα του μορίου ATP στις πρωτεϊνικές πλευρικές ομάδες. Την ίδια στιγμή, οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες (protein phosphatases, PPs) αποφωσφορυλιώνουν τις φωσφοπρωτεΐνες. Έχουν καταγραφεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα περί των 518 PKs (Roskoski, 2015) και 189 PPs (Chen et al., 2017), εν αντιθέσει με το γονιδίωμα της *Arabidopsis* όπου έχουν καταγραφεί περί των 1.125 PKs και 150 PPs (Tran et al., 2012), αντίστοιχα. Η πλειοψηφία των PKs φέρει μία περιοχή β-φύλλου N-τελική και μία περιοχή α-έλικας C-τελική για την πρόσδεση σε υποστρώματα. Από την άλλη πλευρά, οι PPs περιλαμβάνουν ετερόκλητες υπεροικογένειες με διαφορετικές τρισδιάστατες δομές, ενεργά κέντρα και υδρολυτικούς μηχανισμούς (Brautigan, 2013). Η αρχική θεώρηση ήταν πως οι PPs ήταν ενεργά 'housekeeping' ένζυμα και οι PKs αποτελούσαν τους πρωτογενείς ρυθμιστές της κυτταρικής σηματοδότησης (Brautigan, 2013). Ωστόσο, τα ευρήματα που ακολούθησαν κατέστησαν σαφές πως οι PPs αποτελούν εξειδικευμένους και αυστηρά ρυθμιζόμενους καταλύτες. Διαδραματίζουν το ρόλο των κύριων ρυθμιστών, επάγοντας την αποφωσφορυλίωση στόχων που έχουν υποστεί φωσφορυλίωση, διαμορφώνοντας έτσι έναν μοριακό διακόπτη που ενεργοποιεί ή απενεργοποιεί την λειτουργία των κυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης.

Ανάλογα με την ειδικότητα του υποστρώματος, τον μηχανισμό κατάλυσης και την ευαισθησία του αναστολέα, οι ευκαρυωτικές PPs κατηγοριοποιούνται σε PPPs (phosphoprotein phosphatases), PPMs (metallo-dependent protein phosphatases), PTPs (protein tyrosine phosphatases) και ADPs (aspartate-dependent phosphatases) (Kerk et al., 2008). Προκαλεί ενδιαφέρον το γεγονός πως οι προαναφερθείσες ομάδες των ευκαρυωτικών PPs χαρακτηρίζονται από εξειδικευμένα μοτίβα ενεργού κέντρου. Πιο συγκεκριμένα, καταγράφονται τα ακόλουθα μοτίβα:

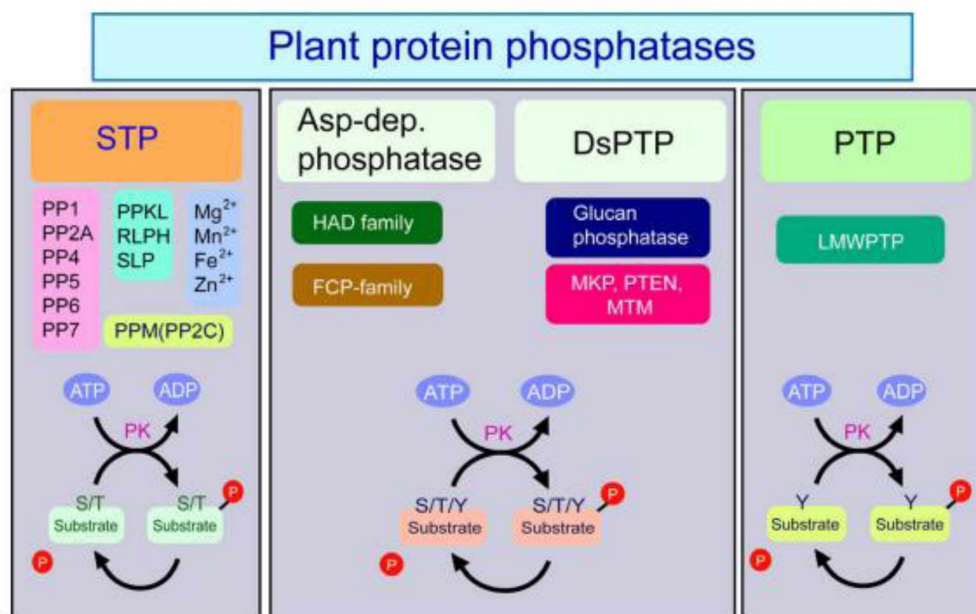
- (1) PPPs-GDxHG(x)23 GDxVDRG(x)25GNHE,
- (2) PPMs/PP2C-(E/Q)D(x)n DGH(A/G)(x)nD(N/D)-,
- (3) ADPs-DxDx(T/V/I)L- και
- (4) PTPs-CX5R- (Lillo et al., 2014; Cohen, 2010).

Η κατηγοριοποίηση των φυτικών PPs περιγράφεται στην εικόνα 8 που ακολουθεί και βασίζεται στον αριθμό των αμινοξέων που υφίστανται

αποφωσφορυλίωση. Οι οικογένειες PPPs και PPMs είναι φωσφατάσες με ειδικότητα σε κατάλοιπα σερίνης (serine, Ser) ή θρεονίνης (threonine, Thr), ενώ οι PTPs είναι φωσφατάσες με ειδικότητα σε κατάλοιπα τυροσίνης (tyrosine, Tyr), αντίστοιχα. Οι φωσφατάσες διπλής ειδικότητας (dual specificity, DS) αποφωσφορυλιώνουν και τις τρεις κατηγορίες αμινοξικών καταλοίπων που προαναφέρθηκαν (Farkas et al., 2007). Οι PPPs και PPMs μοιράζονται ένα παρόμοιο τρόπο δομικής αναδίπλωσης, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενός κοινού μηχανισμού κατάλυσης (Das et al., 1996). Οι εξαρτώμενες από Ser/Thr φωσφατάσες, που περιλαμβάνουν τις PP2C φωσφατάσες, την φωσφατάση πυρουβικής αφυδρογονάσης, καθώς επίσης και εξαρτώμενες από μαγνήσιο (Mg^{2+}) ή μαγγάνιο (Mn^{2+}) φωσφατάσες, αποτελούν μία ανεξάρτητη οικογένεια PPM και δεν εμφανίζουν ομολογία σε επίπεδο αλληλουχίας με τις PPPs (Barford et al., 1998). Οι PTPs έχουν εξελιχθεί με τρόπο ανεξάρτητο, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την μοναδική τρισδιάστατη δομή της καταλυτικής περιοχής, ενώ δεν εμφανίζουν ομολογία σε επίπεδο αλληλουχίας με τις STPs (Singh et al., 2010). Οι μηχανισμοί κατάλυσης των STPs και PTPs διαφέρουν, ενώ αυτοί των PTPs και DsPTPs εμφανίζουν στενή ομοιότητα. Σε αντίθεση με τις PTPs, οι PPPs απαιτούν δύο ιόντα μετάλλων για κατάλυση, κυρίως Mn^{2+} και Fe^{2+} (Shi, 2009). Τα συγκεκριμένα ιόντα συντονίζουν την φωσφορική ομάδα του υποστρώματος, οδηγώντας στη σταθεροποίηση του αρνητικού φορτίου. Ο δεσμός φωσφορικού εστέρα υδρολύεται με νουκλεοφιλική επίθεση ενός μορίου νερού στο στοιχείο του φωσφόρου. Η PTP-επαγόμενη υδρόλυση επιτελείται μέσω ενός καταλοίπου κυστεΐνης που δρα νουκλεοφιλικά και δημιουργεί μία ενδιάμεση δομή φωσφοκυστεΐνης (Barr et al., 2011). Οι ADPs υδρολύουν υποστρώματα μέσα από την λειτουργία των ενδιάμεσων δομών ασπαρτυλ-φωσφο, που εξαρτώνται από την παρουσία Mg^{2+} (Brautigan, 2013).

Η PPP οικογένεια περιλαμβάνει τις φωσφατάσες PP1, PP2A, PP2B και PP4-7 (Kerk et al., 2008). Οι PP1 και PP2A ευθύνονται για την πλειοψηφία των περιπτώσεων αποφωσφορυλίωσης Ser/Thr (Bollen et al., 2010; Virshup & Shenolikar, 2009; Moorhead et al., 2007). Οι καταλυτικές υπομονάδες αλληλεπιδρούν με τις ρυθμιστικές υπομονάδες, είτε μέσω άμεσης πρόσδεσης (π.χ. PP1 φωσφατάσες), είτε έμμεσα με δημιουργία υπομονάδων σκαφοειδών (π.χ. PP2A, PP4, PP6 φωσφατάσες) (Brautigan, 2013). Η PPP οικογένεια, η οποία σχετίζεται σε επίπεδο αλληλουχίας και δομής, επιδεικνύει πανομοιότυπο μηχανισμό κατάλυσης. Ο συσχετισμός των καταλυτικών υπομονάδων με τις ρυθμιστικές υπομονάδες, σε συνδυασμό με την ειδικότητα για Ser/Thr διαμορφώνει την ειδικότητα του υποστρώματος και το βαθμό ποικιλομορφίας (Shi, 2009; Farkas et al., 2007). Οι

πρωτεϊνικές φωσφατάσες με περιοχές Kelch, έχουν καταγραφεί στα φυτά, ενώ υπάρχουν βάσεις δεδομένων για τις συντηρημένες περιοχές μελών των οικογενειών PPP και PTP που έχουν καταγραφεί στην *Arabidopsis* (Marchler-Bauer et al., 2017; Uhrig et al., 2013).



Εικόνα 8 Κατηγοριοποίηση πρωτεϊνικών φωσφατάσων στα φυτά, βάση ειδικότητας του υποστρώματος, μηχανισμού κατάλυσης και ευαισθησίας αναστολέα (Συντομογραφίες: PPs/protein phosphatases, PPPs/phosphoprotein phosphatases, PPMs/metallo-dependent protein phosphatases, PTPs/protein tyrosine phosphatases, ADPs/Aspartate-dependent phosphatases, STPs/Ser or Thr-specific phosphatases, LMWPTPs/low-molecular-weight PTPs, PTPs/classical PTPs, DsPTPs/dual-specificity phosphatases) (Bheri et al., 2021)

Η *Arabidopsis thaliana* αποτελεί είδος οργανισμού που έχει χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο διερεύνησης αμυντικών μηχανισμών που προσδίδουν αντοχή σε φυτικούς οργανισμούς έναντι παθογόνων οργανισμών. Οι εν λόγω φυτικοί οργανισμοί διαθέτουν εξειδικευμένους υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια, μέσω των οποίων καθίσταται εφικτός ο εντοπισμός παθογόνων και η έναρξη λειτουργίας μηχανισμών με απώτερο στόχο την αναστολή ανάπτυξης των τελευταίων.

Με βάση τα όσα προαναφέρθηκαν για την λειτουργία των φυτικών PPs, έχουν περιγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά ευρήματα στον οργανισμό *Arabidopsis thaliana* που αποτελεί και τον οργανισμό διερεύνησης της παρούσας εργασίας. Ένα πρώτο εύρημα σχετίζεται με τις TOPPs (type-one protein phosphatases), οι οποίες αποτελούν τις αντίστοιχες των PP1 φωσφατάσων στους φυτικούς οργανισμούς και περιγράφονται στον οργανισμό *Arabidopsis thaliana*. Πιο συγκεκριμένα, έχουν καταγραφεί στον εν λόγω οργανισμό εννέα διακριτές TOPP ισομορφές. Η

φωσφορυλίωση της AtPPI-2 έχει σαν αποτέλεσμα τροποποιήσεις στον τρόπο διαμόρφωσης της πρωτεΐνης, γεγονός που οδηγεί στη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων TOPP. Κατά αναλογία με την PPI-2 στα θηλαστικά, η φυτική πρωτεΐνη επικεντρώνεται στα συντηρημένα RVxF, PxTPY και RKxHY μοτίβα, ενώ στερείται των SGILK και SQ μοτίβων. Η φωσφορυλίωση του μοτίβου PxTPY στο N-τελικό άκρο της PPI-2 καταγράφεται συντηρημένη σε φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς, αν και μόνο η φυτική PPI-2 επιδεικνύει φωσφορυλίωση του RKxHY μοτίβου (Ahsan et al., 2013).

Το γονιδίωμα της *Arabidopsis* περιλαμβάνει 5 C υπομονάδες, 17 B υπομονάδες και 3 A υπομονάδες, από τις οποίες παράγονται περίπου 255 PP2A ολοένζυμα, το εύρος δράσης των οποίων συνδέεται με πλεονάζουσες και εξειδικευμένες λειτουργίες (Zhou et al., 2004). Οι ρυθμιστικές υπομονάδες PP2A δύνανται να αλληλεπιδράσουν με ρυθμιστικές πρωτεΐνες με αποκλειστικά αμοιβαίο τρόπο, γεγονός που επακόλουθα επηρεάζει την δραστηριότητα PP2A (Wu et al., 2011; Xing et al., 2008; Yang et al., 2007). Η ενεργοποίηση της PP2A συμβαίνει μέσω αναστρέψιμης μεθυλίωσης, με την δράση του ενζύμου LCMT (Leu carbocylmethyltransferase). Αυτό το ένζυμο δρα ως καταστολέας της BRI1 στην *Arabidopsis* (Wu et al., 2011; De Baere et al., 1999; Favre et al., 1994) και της φωσφατάσης PME-1 (protein phosphatase methylesterase-1) (Ogris et al., 1999; Lee et al., 1996; Xie & Clarke, 1994). Η PP2A-ειδική μεθυλ-εστεράση απομακρύνει την μεθυλική ομάδα του μεθυλιωμένου PP2A ενζύμου (Chao et al., 2006). Η AtPTPA (*Arabidopsis* phosphotyrosyl phosphatase activator) εμπλέκεται στη ρύθμιση της μεθυλίωσης PP2A και της δημιουργίας του ολοενζύμου (Chen et al., 2014). Η HDA14 (histone deacetylase) στην *Arabidopsis* συνδέεται άμεσα με την υπομονάδα PP2A-A2 και δρα ως αποακετυλάση τουμπουλίνης. Εκτός από την HDA14, η ιστόνη ELP3 ακετυλοτρανσφεράση και οι PP2A A-υπομονάδες δραστηριοποιούνται στον πυρήνα, καθώς επίσης και στο κυτοσόλιο του κυττάρου. Ο εν λόγω συσχετισμός συνδέει την πρωτεϊνική φωσφορυλίωση και την ακετυλίωση (Tran et al., 2012). Η σύνθεση του ολοενζύμου PP2A μεταβάλλεται διαρκώς και ρυθμίζει διαφορετικούς κόμβους μονοπατιών σηματοδότησης, καθώς επίσης και ρυθμιστικά κυκλώματα σε ζώα και φυτά (Durian et al., 2016; Wu et al., 2011; Tang et al., 2011).

Οι ευκαρυωτικές PP2Cs φέρουν μεταβλητή καταλυτική περιοχή, είτε στο N-, είτε στο C-τελικό άκρο (Schweighofer et al., 2004). Περίπου το 58% των PP2Cs φέρουν C-τελική καταλυτική περιοχή και διαφορετικές προεκτάσεις στο N-τελικό άκρο (στην περίπτωση της *Arabidopsis*), ενώ σε ορισμένες PP2Cs η καταλυτική περιοχή

εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο (ιδίως σε περιπτώσεις φωσφατάσων που ανήκουν στην ομάδα F) (Schweighofer et al., 2004). Η καταλυτική περιοχή περιλαμβάνει 11 χαρακτηριστικές υπο-περιοχές (Su & Forchhammer, 2013). Οι ABI1, ABI2 και AtPP2CA αποτελούν περιπτώσεις Mg^{2+} -εξαρτώμενων PP2Cs (Himmelbach et al., 2002). Πιο συγκεκριμένα, η ABI1 πρωτεΐνη είναι μία Ca^{2+} -ρυθμιζόμενη φωσφατάση, της οποίας το C-τελικό άκρο φέρει υψηλό βαθμό ομοιότητας με την PP2C. Από την άλλη πλευρά, το N-τελικό άκρο περιλαμβάνει ένα σημείο πρόσδεσης ιόντων ασβεστίου (Leung et al., 1994; Meyer et al., 1994). Η δραστικότητα φωσφατάσης των ανασυνδυασμένων ABI1 και ABI2 πρωτεϊνών καταγράφεται μειωμένη λόγω των μεταλλάξεων *abi1-1* (Bertauche et al., 1996) και *abi2-1* (Leung et al., 1997). Οι εν λόγω μεταλλάξεις συνιστούν μεταθέσεις G – A στις θέσεις 970 και 553 στην αλληλουχία του cDNA, αντίστοιχα, με αποτέλεσμα την ίδια αντικατάσταση αμινοξέος (Gly – Asp στη θέση 180 στην ABI1, Gly – Asp στη θέση 168 στην ABI, αντίστοιχα) (Leung et al., 1997). Η ABI2 αλληλεπιδρά με την SOS2 (salt overly sensitive 2/PKS/CIPK24), μία πρωτεϊνική κινάση σερίνης-θρεονίνης που απαιτείται για την ανθεκτικότητα της *Arabidopsis* στο άλας. Η SOS2 φέρει PPI (protein phosphatase interaction) μοτίβο και περιλαμβάνει 37 αμινοξικά κατάλοιπα που ευθύνονται για την αλληλεπίδραση με την ABI2 [η τελευταία περιλαμβάνει μία χαρακτηριστική PKI (protein kinase interaction) περιοχή]. Το μοτίβο PPI καταγράφεται συντηρημένο σε πρωτεϊνικές κινάσες της οικογένειας SOS2 και στην κινάση Chk1 (checkpoint kinase) του κυτταρικού κύκλου.

Οι φωσφατάσες PP7 είναι μοναδικές στους φυτικούς οργανισμούς και δεν φέρουν τις αντίστοιχες περιοχές των PP2Cs που αναφέρθηκαν ανωτέρω. Οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες των θηλαστικών, οι οποίες σχετίζονται με τις PP7, φέρουν την ονομασία PPEFs (protein phosphatases with EF-hand domains) (Andreeva & Kutuzov, 2009). Οι φυτικές PP7 φέρουν χαρακτηριστική αρχιτεκτονική των περιοχών και διαφορετικές ρυθμιστικές περιοχές, οι οποίες δεν φέρουν προεκτάσεις στο N- και το C-τελικό άκρο, κατά αναλογία με τις PPEFs στα θηλαστικά. Οι καταλυτικές περιοχές των PP7 φωσφατάσων σε ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς συνιστούν ένα ξεχωριστό κλάδο (Andreeva & Kutuzov, 2009). Η *Arabidopsis* περιλαμβάνει τα AtPP7 και δύο PP7-προσομοιάζοντα γονίδια (Farkas et al., 2007). Η AtPP7 περιλαμβάνει τρεις χαρακτηριστικές φορτισμένες περιοχές, με μεγέθη που διαφέρουν, στο C-τελικό άκρο της καταλυτικής περιοχής, καθώς επίσης και ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού στο C-τελικό άκρο (Andreeva & Kutuzov, 2001; Kutuzov et al., 2001). Η ενεργοποίηση της AtPP7 επισυμβαίνει μέσω πρωτεολυτικής διάσπασης της μεγαλύτερης σε μέγεθος φορτισμένης περιοχής (Kutuzov & Andreeva, 2001).

Στους φυτικούς οργανισμούς έχουν αναφερθεί μεμονωμένες περιπτώσεις πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης. Η φωσφορυλίωση της τυροσίνης λαμβάνει χώρα με την βοήθεια των DSKs (dual-specificity kinases) στους φυτικούς οργανισμούς (Rudrabhatla et al., 2006). Οι PKs που περιλαμβάνουν καταλυτικές περιοχές TK (tyrosine kinase) (Rudrabhatla et al., 2006), TK-προσομοιάζουσες κινάσες (Martin et al., 2009), CRKs [Ca^{2+} -dependent protein kinase (CDPK/CRK)-related PKs] που επιδεικνύουν TK δραστικότητα (Nemoto et al., 2015), πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν SH2 (src homology 2) (Williams & Zvelebil, 2004) και C2-phosphotyrosine-προσδεδεμένες περιοχές (Miranda-Saavedra & Barton, 2007), αποτελούν ένδειξη του μηχανισμού φωσφορυλίωσης της τυροσίνης στους φυτικούς οργανισμούς. Οι PTPs εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης στα ζώα. Συμμετέχουν στην εκδήλωση, ρύθμιση των μονοπατιών MAPK (mitogen-activated protein kinase) και ορμονικών οδών και στις αποκρίσεις έναντι του στρες, στα φυτά (Shankar et al., 2015). Έχουν περιγραφεί στον άνθρωπο 100 PTPs, εκ των οποίων οι 60 είναι DsPTPs ενώ 11 περιπτώσεις είναι ανενεργές (Ghelis, 2011). Η περίπτωση της *Arabidopsis* παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς εάν και περιλαμβάνει στο γονιδίωμά της λιγότερες PTPs σε σχέση με το ανθρώπινο γονιδίωμα, περιλαμβάνει τις διπλάσιες σε αριθμό PKs, υποδηλώνοντας λειτουργικό εκφυλισμό στους φυτικούς οργανισμούς (Shankar et al., 2015). Οι PTPs ταξινομούνται σε τρεις υπο-οικογένειες, τύπων I-III. Η τύπου I αποτελείται από Tyr-ειδικές PTPs και DsPTPs και συνιστά την μεγαλύτερη υπο-οικογένεια (Tonks, 2013). Η τύπου II αποτελείται από φωσφατάσες με ειδικότητα σε Tyr και Thr, οι οποίες και δρουν ως ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, ενώ η τύπου III περιλαμβάνει Tyr-ειδικές LMWPTPs. Ένας έτερος τρόπος διαχωρισμού των PTPs είναι σε προσομοιάζουσες με υποδοχείς PTPs και ενδοκυτταρικές PTPs (Stone & Dixon, 1994).

Οι SLPs (Shewanella-like phosphatases) ανευρίσκονται σε φυτικούς οργανισμούς, βρύα και πράσινα φύκια (Uhrig et al., 2013). Διαχωρίζονται στις ομάδες 1 και 2, δημιουργώντας μία διαφορετική συνάθροιση από τα λοιπά PPP μέλη (Uhrig et al., 2013). Οι AtSLP1 και AtSLP2 φωσφατάσες στην *Arabidopsis* δύνανται να έχουν μοναδικές ή καθόλου υπομονάδες (Tran et al., 2012). Εντοπίζονται στο χλωροπλάστη και το κυτοσόλιο, αντίστοιχα (Uhrig et al., 2013).

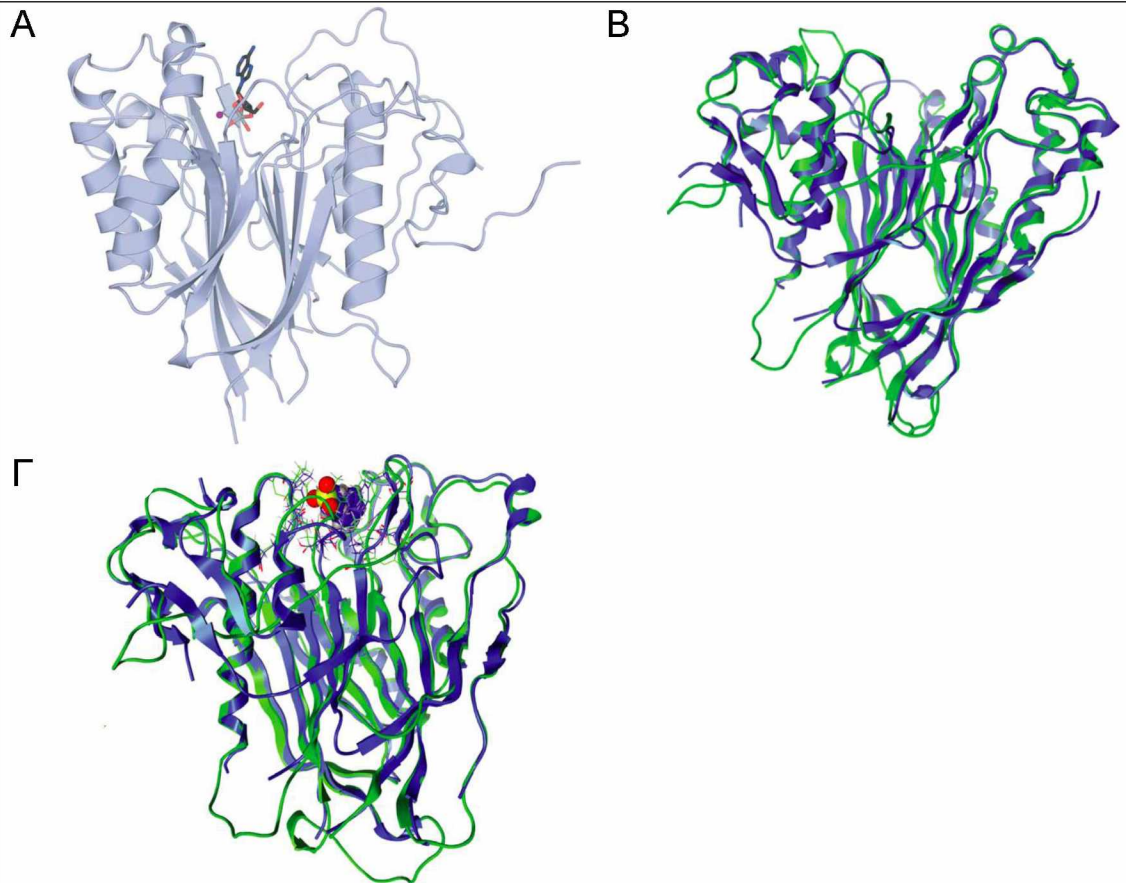
Τα παραπάνω ευρήματα συνηγορούν υπέρ της αξιοποίησης του οργανισμού *Arabidopsis thaliana* ως εμπλεκόμενο σε διαφορετικές κατηγορίες φωσφατασών, σε επίπεδο φυτικών οργανισμών. Λαμβάνοντας υπ' όψη πως η απαδενυλάση Hesperin έχει απομονωθεί από τον εν λόγω φυτικό οργανισμό, καθίσταται σαφής η εμπλοκή

της σε επίπεδο ανάδειξης δραστηριότητας φωσφατάσης. Απαιτούνται πρόσθετες μελέτες στο χώρο της διεθνούς βιβλιογραφίας, μέσω των οποίων θα διερευνηθούν σε βάθος οι υποκείμενοι μηχανισμοί δράσης.

1.6 Hesperin και ενδεχόμενη δραστηριότητα φωσφατάσης κυκλικών φωσφορικών

Ένζυμα που διαθέτουν δύο διαφορετικές καταλυτικές δράσεις δεν είναι άγνωστα. Έτσι, στην *Arabidopsis thaliana*, μια πρωτεΐνη (UniProt entry: A9TLP4) δείχθηκε να διαθέτει δύο καταλυτικές δραστηριότητες, υδρόλυσης πεπτιδικών δεσμών και φωσφορικών δεσμών. Ειδικότερα, δρα τόσο ως πεπτιδάση III διπεπτιδίων και σαν υδρολάση Nudix, που είναι γνωστό να δρα σε ποικιλία παραγώγων διφωσφορικών νουκλεοτιδίων (Karačić et al., 2018; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5606203/>). Επίσης, η πρωτεΐνη AmiA από τον *Chlamydia pneumoniae* (UniProt entry: Q9Z8C6) χρησιμοποιεί το λιπίδιο II (το πρόδρομο μόριο για δομική μονάδα του βακτηριακού τοιχώματος) ως υπόστρωμα δρώντας ως αμιδάση και καρβοξυπεπτιδάση (Klöckner et al., 2013; <https://www.nature.com/articles/ncomms5201#content>).

Οι ANGEL2, Nocturnin και AtHESP κατατάσσονται στην ίδια κατηγορία απαδενυλασών, EEP. Αλλά μέλη της οικογένειας είναι οι ANGEL1 και ANGEL3 (Ngl3p) έχουν χαρακτηριστεί ως απαδενυλάσες. Όμως, οι ANGEL2 και Nocturnin εκδηλώνουν δράση φωσφατάσης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Ας σημειωθεί πως η AtHESP και η Nocturnin είναι ομόλογες πρωτεΐνες (Beta et al., 2020• Delis et al., 2016). Η δομή της ANGEL2 παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με την AtHESP, όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα. Επιπλέον, η θέση αναγνώρισης των υποστρωμάτων τους από τις ANGEL2 και AtHESP φαίνεται να εντοπίζεται στην ίδια περιοχή (σύγκρινε Α και Γ). Προκαταρκτικές παρατηρήσεις ομοπαράθεσης μεταξύ ANGEL2 και AtHESP, έδειξαν πως τα δύο ένζυμα χρησιμοποιούν ίδια αμινοξέα στο ενεργό τους κέντρο για να καταλύσουν τις αντιδράσεις τους (βλ. «Αποτελέσματα»). Τέλος, τόσο η ANGEL2 όσο και η AtHESP αναγνωρίζουν και δρουν σε άκρα 3' RNA. Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στην διερεύνηση αν η AtHESP διαθέτει καταλυτική δράση φωσφατάσης.



A. Δομή της ANGEL2 ΔN-AV. Από τη δομή απουσιάζει το άκρο N (ΔN) του ενζύμου (ANGEL2 119-544). Η 2',3'-αδενοσίνη του βαναδικού (adenosine-2',3'-vanadate, AV), που μιμείται την πεντασθενή μεταβατική κατάσταση κατά την υδρόλυση 2',3' > P, δείχνεται με μαύρες ράβδους, ενώ το Mg^{2+} ως ιώδης σφαίρα (Pinto et al., 2020).

B. Μοντελοποίηση ομολογίας της AtHESP. Το μοντέλο της AtHESP δείχνεται με κυανό χρώμα, ενώ με πράσινο χρώμα αποδίδεται η CNOT6 ανθρώπου. Και οι δύο (AtHESP και CNOT6L κατατάσσονται στην κατηγορία EEP όπως και η ANGEL2 (Beta et al, 2020).

Γ. Μοντέλο της AtHESPERIN με την AMP προσδεμένη στο ενεργό κέντρο. Η AMP δείχνεται με χωροπληρωτικό μοντέλο (Beta et al, 2020).

1.7 Σκοπός της εργασίας

Αναφέρθηκαν παραπάνω, οι ομοιότητες στη δομή μεταξύ της AtHESPERIN και της ANGEL2, η ομολογία μεταξύ AtHESP και Nocturnin, καθώς και το ότι και οι τρεις πρωτεΐνες έχουν καταταχθεί στην ίδια υπεροικογένεια απαδενυλασών EEP.

Σκοπός της εργασίας είναι να εξεταστεί αν η AtHESPERIN διαθέτει δραστικότητα φωσφατάσης 2',3'-κυκλικού φωσφορικού, ανάλογη με αυτή της ANGEL2.

Για την προσέγγιση του σκοπού, θα γίνει εξέταση ομολογίας μέσω ομοπαράθεσης, θα καθαρισθεί ανασυνδυασμένη AtHESPERIN και θα χρησιμοποιηθεί σε κατάλληλες αντιδράσεις με τροποποιημένα υποστρώματα για χαρακτηρισμό φωσφατασών 2',3'-κυκλικού φωσφορικού.

2 Υλικά- Μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Βακτηριακά στελέχη

Προκειμένου να επιτευχθεί υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη BL21- Gold (DE3). Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά επιλέγεται κατά την έκφραση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, καθώς δεν περιλαμβάνει τις πρωτεάσες Lon και OmpT που πιθανώς θα οδηγούσαν σε χαμηλότερη ποσότητα της εκφραζόμενης πρωτεΐνης. Επιπλέον, τα στελέχη BL21-Gold (DE3) περιλαμβάνουν κωδικόνια που χρησιμοποιούνται ελάχιστα από την E.coli, συνεπώς είναι δυνατό η πρωτεΐνη να παραχθεί σε υψηλή ποσότητα (Phillips et al., 1984) .

2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς

Τα πλασμίδια αποτελούν δίκλινα, κυκλικά τμήματα DNA, το μέγεθος των οποίων ποικίλλει (από 1.000 μέχρι 200.000 ζεύγη βάσεων), που εντοπίζονται σε πολλά βακτήρια και περιέχουν μικρό ποσοστό της γενετικής πληροφορίας του κυττάρου (1 - 2%). Στη γενετική μηχανική τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται ονομάζονται φορείς(vectors). Έχουν τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από το κύριο βακτηριακό μόριο DNA, καθώς και να εκφράζουν συγκεκριμένα γονίδια. Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για παραγωγή πρωτεΐνης συζευγμένης με έξι ιστιδίνες (His Tag) που φέρει αλληλουχία αναγνώρισης για την πρωτεάση 3C, ονομάζεται pATHRA (Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας).

2.1.3 Διαλύματα

2.1.3.1 Θρεπτικά υλικά ανάπτυξης βακτηρίων

- LB Broth: 1% tryptone, 0.5% yeast extract και 0.17M sodium chloride.
- TB Broth: 1.2% tryptone ,2.4% γραμμάρια yeast extract, 0.4% Glycerol, 70mM K₂HPO₄ και 16mM KH₂PO₄.

2.1.3.2 Ρυθμιστικά διαλύματα λύσης βακτηριακών κυττάρων

- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 1: 0.1M Sodium Phosphate buffer (pH 6), 0.2M NaCl, 10% Glycerol, 0,1% MTG, 1mg/mL lysozyme, 1mM PMSF, 50U βενζονάση

Το MTG, η λυσοζύμη και το PMSF που αναστέλλει τη δράση των πρωτεασών προστέθηκαν λίγο πριν χρησιμοποιηθεί το διάλυμα. Η βενζονάση έχει την ικανότητα να διασπά κάθε τύπο DNA - μονόκλωνο, δίκλωνο, γραμμικό, κυκλικό -, ενώ το ένζυμο λυσοζύμη πραγματοποιεί την υδρόλυση της πεπτιδογλυκάνης που απαρτίζει το κυτταρικό τοίχωμα και έτσι αυτό διασπάται (Duckett, 1999).

-Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 2: 50mM Sodium Phosphate buffer (pH8), 0.2M NaCl, 5 % Glycerol, 1mg/mL lysozyme, 1mM PMSF, 50U βενζονάση

2.1.3.3 Ρυθμιστικά διαλύματα Υγρής Χρωματογραφίας Συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC)

- Χρωματογραφία ιόντων Co

Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης: 0.1M Phosphate Buffer, 0.2M NaCl, 0.1% MTG
ρύθμιση έως pH 6.0

Ρυθμιστικό Διάλυμα έκλουσης: 0.1M Phosphate Buffer, 0.6M Imidazole, 0.2M NaCl, 0.1% MTG ρύθμιση έως pH 6.0

Διάλυμα διαπίδυσης: 0,1M Tris buffer (pH 8), 0.2M NaCl, 0.1% MTG, 0.5M Imidazole. Το διάλυμα αυτό, χρησιμοποιείται για την αλλαγή του pH του διαλύματος. Το δείγμα τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης και στη συνέχεια μέσα στο διάλυμα διαπίδυσης. Αναδεύεται 16 ώρες ώστε η αλλαγή του διαλύματος μέσω των πόρων της μεμβράνης να γίνει σταδιακά.

- Χρωματογραφία ιόντων Ni

Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης: 50mM Sodium Phosphate buffer, 0.2M NaCl, 0.1M Imidazole έως pH 8.0

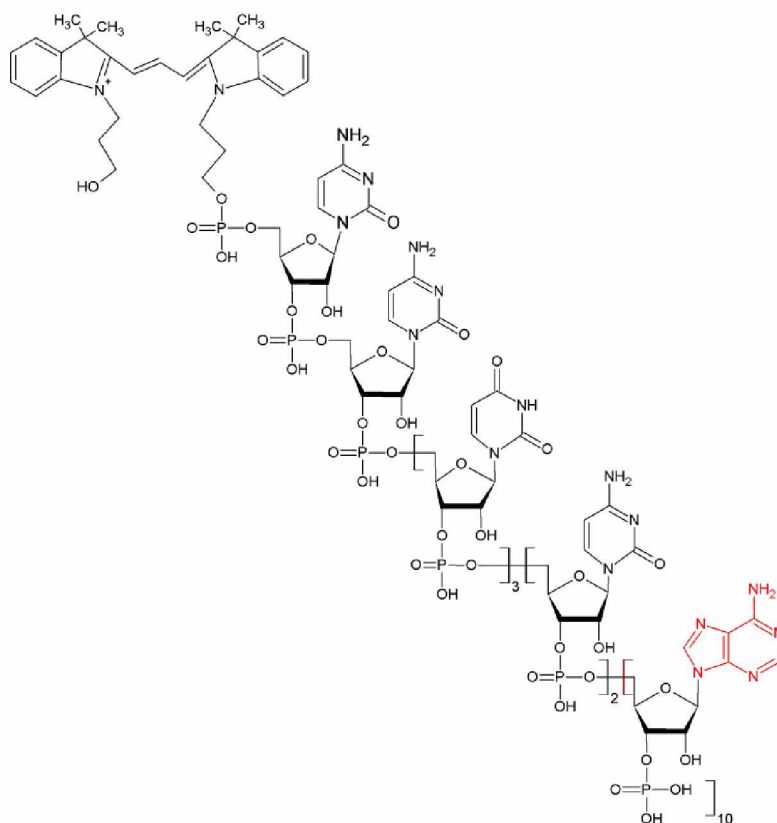
Ρυθμιστικό Διάλυμα έκλουσης: 50mM Sodium Phosphate buffer, 0.2M NaCl, 0.5M Imidazole έως pH 8.0

Dialysis buffer: 0,05 Phosphate Buffer, 0.2M NaCl

2.1.4 Μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας

2.1.4.1 Αντίδραση απαδενυλίωσης

Η εξέταση της ενζυμικής δραστηριότητας της AtHESPERIN έγινε σύμφωνα με τους Maryati, M., et al. (Maryati et al., 2014) με τροποποιήσεις. Χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα ένα μόριο RNA μήκους 17 βάσεων (5' - CCU UUC CAA AAA AAA AA - 3') φέροντας στο άκρο 5' του τη φθορίζουσα χρωστική Cy3 ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το υπόστρωμα. Το υπόστρωμα διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης και στο διάλυμα αυτό, προστίθεται και το ένζυμο. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 25°C και τερματίζεται με την προσθήκη ίσου όγκου 2× ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων RNA και θέρμανση στους 85°C για 3min. Η αντίδραση αναλύεται σε πηκτή ακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες στα 200V.

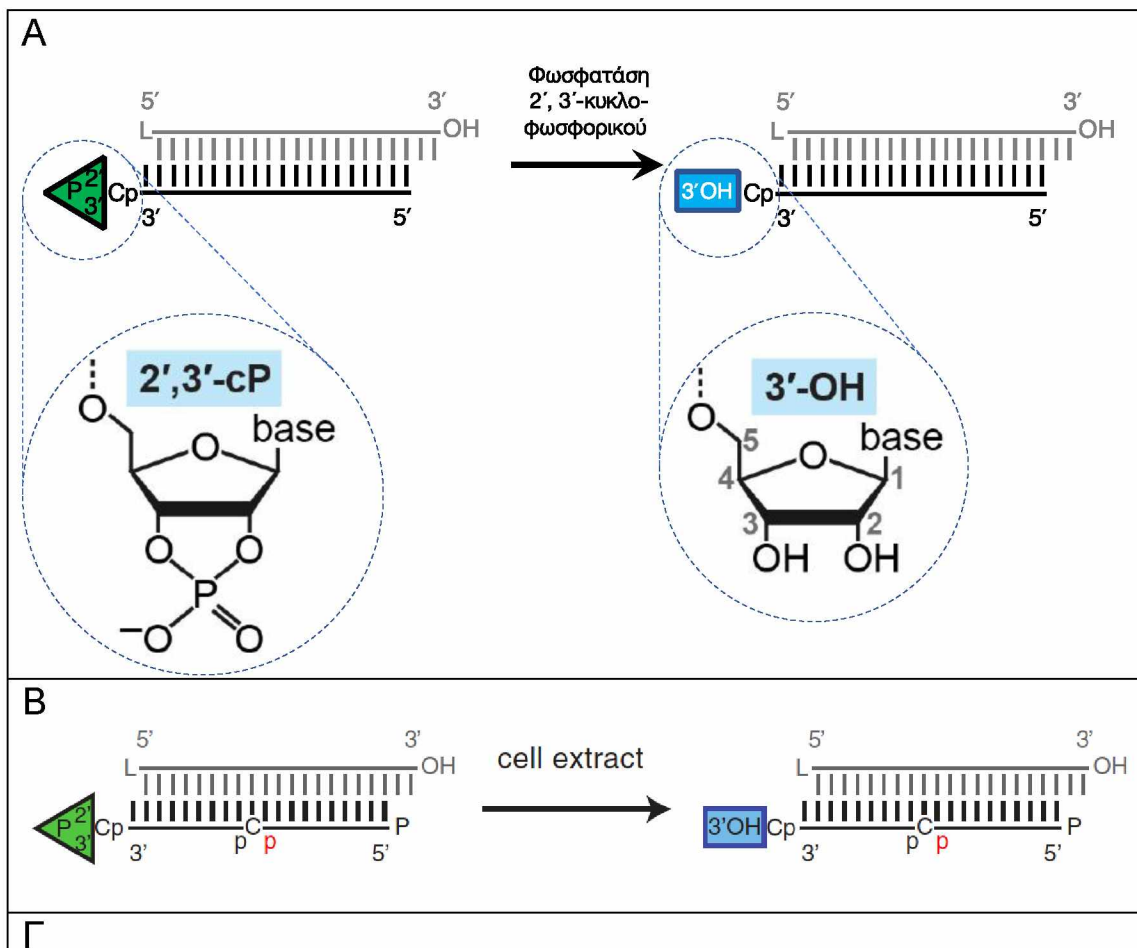


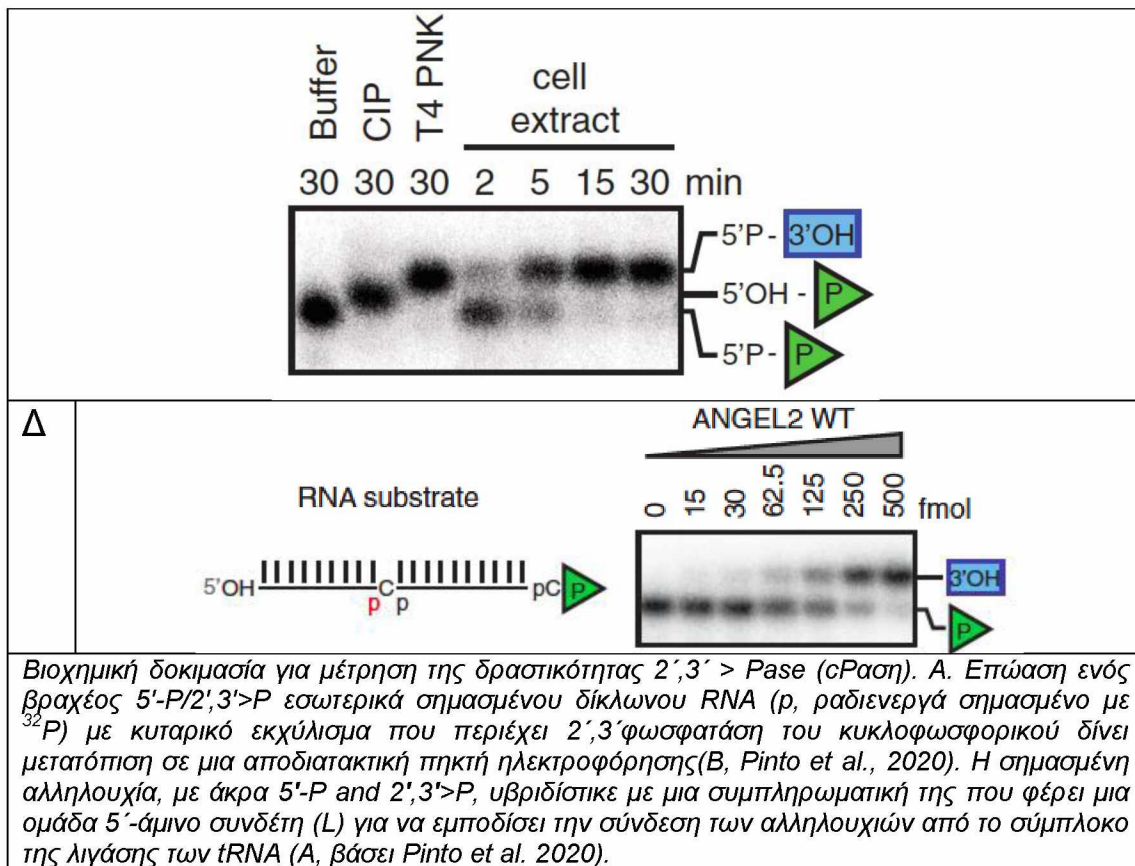
Εικόνα 9 Υπόστρωμα που ομοιάζει με RNA με μικρό μήκος «ουράς» αδενοσινών, που χρησιμοποιείται σε δοκιμές απαδενυλίωσης. Αλληλουχία 17 ριβονουκλεοτιδίων συνδεδεμένων με δεσμούς 5'-3' (5' - CCU UUC CAA AAA AAA AA -3'). Στο άκρο 5' φέρει τη φθορίζουσα χρωστική Cy3 ομοιοπολικά συνδεδεμένη στην αλληλουχία με το 1^ο νουκλεοτίδιο (5' - C). (Beta et al.)

Τα μόρια RNA που ηλεκτροφορούνται έχουν διαφορετική κινητικότητα μέσα στην πηκτή λόγω του μήκους τους. Έτσι, μόρια με μικρότερο μήκος λόγω της δράσης του ενζύμου, έχουν υψηλότερη κινητικότητα από μόρια τα οποία είναι μεγαλύτερου μήκους. Τα προϊόντα της αντίδρασης οπτικοποιούνται με τη χρήση φίλτρου ανίχνευσης του φθορισμού της χρωστικής Cy3 μηχανήματος αρχειοθέτησης (Unitec, Cambridge, τμήμα Ιατρικής-Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας).

2.1.4.2 Αντίδραση διάσπασης 2',3'-κυκλικού φωσφορικού, δραστικότητα cΡασης

Η μελέτη δράσης cΡασης γίνεται σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα, σύμφωνα με την εργασία των Pinto et al., 2020.





2.1.4.3 Διαλύματα

- Διάλυμα αντίδρασης: 50mM Sodium Citrate, 2mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0.5mM DTT, 10% glycerol (pH 6.5), το DTT διατηρεί τους δισουλφιδικούς δεσμούς του ενζύμου σταθερούς κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 10×: 1M Tris, 1M Boric acid, 50mM EDTA. Οι σκόνες διαλύονται σε αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (DEPC) και φιλτράρεται σε αποστειρωμένο μπουκάλι.

- Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων RNA 2× (Sample buffer): 95% φορμαμίδιο, 5mM EDTA, 0,025% SDS. Το φορμαμίδιο έχει δείχθει πως αναστέλλει τη δράση των RNAσών και βοηθά στη διατήρηση του RNA (Chomczynski, 1992). Η παρουσία του EDTA ως χηλικού παράγοντα εξυπηρετεί τον ίδιο σκοπό με την ιδιότητά του να δεσμεύει δισθενή ιόντα μετάλλων και ιδιαίτερα Mg²⁺. Τα δισθενή ιόντα μετάλλων, είναι απαραίτητα για τη δραστικότητα πολλών RNAσών και η δέσμευσή τους από το EDTA δρα ανασταλτικά για τα ένζυμα αυτά (Brody and Kern, 2004).

2.2 Οργανολογία

Το τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας και το εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας παρέχει όλα τα όργανα για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας.

AKTA purifier (FPLC system)	GE Healthcare Life Sciences
Αυτόματες πιπέτες	Gilson
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini PROTEAN® Tetra Cell	BioRad
Μετρητής pH	Metrohm
Σύστημα απεικόνισης	XR doc, BioRad Uvitec, Cambridge
Φυγόκεντροι	Centrifuge 5814R, eppendorf Z36HK, Hermle CR-22N Himac, HITACHI
Φασματοφωτόμετρο	VWR 1600-PC
Οργανο ρομπότ σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης	Douglas Instruments

2.3 Μεθοδολογία

2.3.1 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων BL21-Gold με πλασμιδιακό φορέα pATHRA

Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηρίων E.coli BL21-Gold με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock). Σε σωληνάριο τύπου eppendorf όπου ήταν αποθηκευμένα τα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα έγινε προσθήκη 1μL ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pATHRA, ανάδευση και επώαση για 30min. Έπειτα για 45 δευτερόλεπτα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 42oC . Στη συνέχεια, μεταφέρονται για επώαση για 2min σε πάγο. Έπειτα προστίθενται 900μL αποστειρωμένο LB Broth χωρίς την παρουσία αντιβιοτικού. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm) για 1h.

Για να επιβεβαιώσουμε τον μετασχηματισμό των βακτηριακών στελεχών BL21-Gold, πραγματοποιούμε καλλιέργεια με στερεό θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη). Δηλαδή, με την ολοκλήρωση της επώασης, επιστρώνουμε 50μL σε τρυβλία petri με θρεπτικό μέσο LB Agar, στα οποία έχει προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό. Τα τρυβλία επωάζονται overnight σε θερμοκρασία 37oC στα 210 rpm. Όλες οι προαναφερθείσες διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες.

2.3.2 Παραγωγή της ανασυνδυσασμένης AtHESPERIN

Μια μικρή καλλιέργεια 50 mL εμβολιάστηκε με μία (1) αποικία που έχει αναπτυχθεί μετά το μετασχηματισμό, και κατόπιν χρησιμοποιήθηκε για να εμβολιστούν 3 L αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού μέσου σε αναλογία 1/100 που επωάστηκαν στους 37°C με συνεχή ανάδευση (210rpm), αφού είχε προστεθεί κατάλληλη συγκέντρωση από το αντιβιοτικό (50μg/ml). Η διαδικασία της ανάπτυξης των βακτηρίων παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά. Η επώαση θεωρείται ολοκληρωμένη όταν η οπτική απορρόφηση της ήταν $A_{600} = 0.6-0.7$ (περίπου μετά από 3 ώρες), όπου θεωρείται ότι η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

Ακολούθησε επαγωγή της υπερέκφρασης της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης. Με προσθήκη του επαγωγέα (IPTG). Οι καλλιέργειες μετά την επαγωγή της υπερέκφρασης αφέθηκαν να αναπτυχθούν για ακόμη 4h στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm). Μετά το πέρας της επώασης, η καλλιέργεια τοποθετήθηκε στον πάγο, το σύνολο της καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε και το υπερκείμενο που αποτελούνταν από το θρεπτικό υλικό απορρίφθηκε. Τα κυτταρικά ιζήματα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C μέχρι τη λύση τους.

2.3.3 Λύση βακτηριακών κυττάρων

Το κυτταρικό ίζημα, αφού αποψύχθηκε ελαφρώς σε πάγο για πιο εύκολη μεταχείριση, διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και αφού ομογενοποιήθηκε, προστέθηκε Βενζονάση και επωάστηκε σε πάγο για 20 λεπτά με ανάδευση ανά 5 λεπτά. Η πλήρης λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με χρήση υπερήχων, η οποία έγινε σε 9 κύκλους των 20s ενώ το κυτταρόλυμα βρίσκεται σε πάγο. Η συσκευή υπερήχων για 20s παράγει υπερήχους σε εύρος 75%, σε συνεχόμενους κύκλους, ενώ για 20s σταματάει την παραγωγή υπερήχων. Αυτό συμβαίνει διότι κατά την εφαρμογή υπερήχων αυξάνεται η θερμοκρασία του διαλύματος. Μετά το πέρας της μηχανικής λύσης, το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 45000×g/4 °C για 45 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, γίνεται διαχωρισμός του υπερκείμενου το οποίο αποτελείται από το διάλυμα των πρωτεϊνών, από το κυτταρικό ίζημα και φιλτράρεται με τη βοήθεια φίλτρου 0,45μm.

2.3.4 Απομόνωση της AtHESPERIN με χρωματογραφία αγκιστείας ακινητοποιημένων μετάλλων (IMAC)

Πρωτεΐνες και πεπτίδια όπως η AtHESPERIN που εμφανίζουν συγγένεια με ιόντα μετάλλων, λόγω της προστιθέμενης ετικέτας αγκιστείας έξι ιστιδινών στο αμινοτελικό τη άκρο, μπορούν να απομονωθούν χρησιμοποιώντας χρωματογραφία αγκιστείας ακινητοποιημένων μετάλλων. Η ιστιδίνη (His) σχηματίζει σύμπλοκα με τα ιόντα μετάλλων σε τιμές pH 6-7 και η περιεκτικότητα μιας πρωτεΐνης σε ιστιδίνες ευθύνεται για την πρόσδεση της πρωτεΐνης αυτής σε ένα ιόν μετάλλου (Porath, 1992). Τα υλικά χρωματογραφίας IMAC μπορεί να εμπλουτιστούν με ιόντα μετάλλων, όπως νικέλιο, ψευδάργυρος, χαλκός, ασβέστιο, κοβάλτιο ή σίδηρος. Η αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη-στόχο εξαρτάται από το pH και την ιοντική ισχύ. Τα μόρια που έχουν προσδεθεί, συνήθως εκλύονται με αύξηση της ιοντικής ισχύος του ρυθμιστικού διαλύματος ή με την προσθήκη ιμιδαζολίου στο ρυθμιστικό διάλυμα (Bornhorst and Falke, 2011).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε στήλη με ιόντα κοβαλτίου (Talon crude, Cytiva) και ιόντα νικελίου (HisTrap FF, Cytiva). Σε κάθε περίπτωση ο όγκος στήλης ήταν 1ml και εξισορροπείται με τουλάχιστον 10 όγκους στήλης (cv) από το αντίστοιχο διάλυμα. Ρυθμίζοντας την πίεση και το ρυθμό ροής, η AtHESPERIN, περνάει μέσα από τη στήλη, ώστε να μπορεί να προσδεθεί μέσω του His-Tag στα ιόντα μετάλλου, ενώ ό,τι δεν είναι ειδικό να εκπλυθεί στα κλάσματα υπερδιηθήματος (flow-through). Ακολούθως, συνεχίζει η έκπλυση του υλικού χρωματογραφίας με τουλάχιστον 5 cv. Τέλος, ακολουθεί η έκλυση της πρωτεΐνης, η οποία γίνεται με βαθμίδωση συγκέντρωσης (0- 100%) του διαλύματος έκλυσης.

2.3.4.1 Αφαίρεση ετικέτας αγκιστείας μέσω πέψης με πρωτεάση 3C

Οι ετικέτες αγκιστείας είναι ιδιαίτερα σημαντικές στην παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών καθώς μέσω αυτών μπορούμε να απομονώσουμε και να ταυτοποιήσουμε τις πρωτεΐνες που τις φέρουν. Παρά τη χρησιμότητά τους, μπορεί να επέμβουν στη βιολογική δράση της πρωτεΐνης. Συνεπώς πρέπει να αφαιρεθεί η ετικέτα αγκιστείας προς αποφυγή προβλημάτων σε μετέπειτα πειραματικές διεργασίες. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, χρησιμοποιούνται ένζυμα τα οποία ονομάζονται πρωτεάσες (Vaugh, 2005).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η ενδοπρωτεάση 3C. Η πρωτεάση αυτή έχει αυστηρή εξειδίκευση ως προς την αλληλουχία που αναγνωρίζει δηλαδή την

αλληλουχία LEVLFQ/GP. Η καρβοξυ- πλευρά του δεσμού της 3C πρωτεάσης είναι υπεύθυνη για τη μη απομάκρυνση της μαζί με την ετικέτα αγχιστείας (Waugh, 2005). Στην παρούσα εργασία η πρωτεάση 3C είναι επίσης συντηγμένη με ετικέτα αγχιστείας HisTag το οποίο μας δίνει τη δυνατότητα να την απομακρύνουμε από το πρωτεϊνικό διάλυμα με καθαρισμό. Η θέση αναγνώρισης της πρωτεάσης υπήρχε στον φορέα που χρησιμοποιήθηκε. Μετά τον καθαρισμό της πρωτεΐνης από τη στήλη αγχιστείας, η πρωτεΐνη αναμιγνύεται με την πρωτεάση 3C. Μόλις αναμιχθούν τα διαλύματα των πρωτεϊνών, αναδεύονται και επωάζονται για 16 ώρες στους 4°C για να ολοκληρωθεί η αντίδραση πέψης.

Με το πέρας της αντίδρασης, το δείγμα φορτώνεται στη στήλη αγχιστείας IMAC και απομονώνονται τα κλάσματα υπερδιηθήματος, όπου αναμένεται να εμπεριέχεται η AtHESPERIN, χωρίς την παρουσία της ετικέτας αγχιστείας, και στα κλάσματα έκλουσης απομονώνεται η HisTag-3C αλλά και πιθανή AtHESPERIN της οποίας η ετικέτα HisTag δεν απομακρύνθηκε με την πέψη. Εάν χρησιμοποιείται πρωτεάση 3C συντηγμένη με ετικέτα αγχιστείας GST, τότε το βήμα αφαίρεσης της πρωτεάσης και της άκοπτης πρωτεΐνης από το διάλυμα πραγματοποιείται με χρωματογραφία αγχιστείας GST και όχι IMAC. Η ύπαρξη AtHESPERIN η οποία φέρει ετικέτα αγχιστείας στο κλάσμα υπερδιηθήματος μαζί με τη φυσικού τύπου AtHESPERIN (χωρίς ετικέτα) ανιχνεύεται με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

2.3.5 Συμπύκνωση και διαπίδυση της AtHESPERIN

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης της πρωτεΐνης, αυτή συμπυκνώνεται και υποβάλλεται σε διαπίδυση για την αλλαγή διαλύματος ανάλογα με τις αναλύσεις που θα ακολουθήσουν σε επόμενα βήματα. Οι βασικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν μετά την απομόνωση ήταν οι εξής: α) αφαίρεση της ετικέτας αγχιστείας και β) προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας. Η διαδικασία της συμπύκνωσης πραγματοποιείται για όλες ανεξαιρέτως τις μετέπειτα διαδικασίες σε φίλτρα φυγοκεντρικής συμπύκνωσης (Amicon ultra 4). Η διαπίδυση, μπορεί να συνδυαστεί με τη συμπύκνωση εάν χρησιμοποιούνται φίλτρα φυγοκεντρικής συμπύκνωσης είτε να πραγματοποιηθεί ξεχωριστά με τη χρήση μεμβράνης διαπίδυσης.

α) αφαίρεση της ετικέτας αγχιστείας: Μετά το πρώτο βήμα καθαρισμού, η AtHESPERIN βρίσκεται στο διάλυμα έκλουσης από τη στήλη IMAC. Το διάλυμα αυτό περιέχει μεταξύ άλλων, υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου, το οποίο σαν συστατικό δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα της πρωτεάσης 3C, αλλά δυσχεραίνει την

απομάκρυνση αυτής μετά την αντίδραση πέψης. Για τον παραπάνω λόγο, πραγματοποιείται διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο δεν έχει ιμιδαζόλιο, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί απομόνωση της AtHESPERIN που δε φέρει HisTag σε επόμενο βήμα καθαρισμού, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα.

β) προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας: Μετά το πρώτο βήμα καθαρισμού, η AtHESPERIN βρίσκεται στο διάλυμα έκλουσης από τη στήλη IMAC. Το διάλυμα αυτό, δεν είναι το κατάλληλο για την ενζυμική δραστηριότητα της AtHESPERIN, και ως εκ τούτου πρέπει να αντικατασταθεί από το διάλυμα αντίδρασης το οποίο περιγράφεται στα υλικά.

3 Αποτελέσματα- Συζήτηση

3.1 Ομοπαράθεση AtHESP και ANGEL2

Η ομοπαράθεση με τη χρήση του αλγόριθμου στοίχισης BLAST για τις AtHesp (A8MS41.1) και ANGEL2 (Q5VTE6.1) έδωσε Identity 32% (77/239) και Positives 47% (113/239).

```

A8MS41.1 1 -----MFSSTLHHLPRP 13
Q5VTE6.1 1
MEAWRVCVRKGYGHCVVGRGRYPMPFHHSRSLGRDWTTPWENLQRCCWNRHISCMRWPGHYSRAPYPYFSSRHFSLNWRP 80

A8MS41.1 14 NLLLPRKVISRRMSTNPAIEPKVRKFE----SVEGVDIGS-RNKSDGFFA----IPLYLSKLVALYNCISLSRIGTS 81
Q5VTE6.1 81 PCLFESRTQFQYCNWRPDNLSQTSLIHLSSYVMNAEGDEPSSKRKHKHQGVIKRNWEYICSHDKEKTKILGDKNVDPKCED
160

A8MS41.1 82 NENFVFSGIRFRLVSYNILAQVYVK--SALLPHSPACKWKARSHAILSVLKNLQADFFCLQEVDE--YDSFYRNNMDS 157
Q5VTE6.1 161 SEN---KFD FSVMSYNILSQDLEDNSHLYRHCRRPVLHWSFRFPNLIKIKHFDADVLCLQEVQEDHYGAEIRPSLES 236

A8MS41.1 158 LGYSGIYIQRGTGQRKRDGCAIFYKPSCAELVTKERIEYNLVDLSIKADSVSCSEQKIETSNEGKDSRKDSRDLNDPLVRL
237
Q5VTE6.1 237 LGYHCEYKMRTG-RKPDGCAICFKHSKFSLLSVNPVEF-----FRPDISLL 281

A8MS41.1 238 KRDCVGIAMAARINKPFQH--IVIVANTHLYWDPKLAQAKYLLSRLAQFKTLISDEFECTPSLLLAGDFNSIPGD 315
Q5VTE6.1 282 DRDNVGLVLLLPKIPYAAACPAICVANTHLLYNPRRGDIKLTQLAMLLAEISSVAHQDGSF-C--PIVMCGDFNSVPGS 358

A8MS41.1 316 MVYSYLVSGNAK---PTETIEEEEAP-----VP----- 340
Q5VTE6.1 359 PLYSFIKEGKLN YEGLPIGKVSQEQSSRGQRILSIPIWPPNLGISQNCVYEVQQVPKVEKTDSDLTQTQLKQTEVLVTA
438

A8MS41.1 341 -----LSSVYE--VTRGEPKFTNCTPGFTNTLDYIFISPSDF-----IKPVSILQLPEPDSP 390
Q5VTE6.1 439 EKLSSNLQHHSFSSVYSHYFPDGTGPIEVTTCHSRSAITVDYIFYSAEKEDVAGHPGAEVALVGGLKLLARLSLLTEQDL
518

A8MS41.1 391 DVVGFLPNHHHPSDHLPIGAEFIRRE 417
Q5VTE6.1 519 WTVNGLPNENNSSDHLPLLAKFRLEL- 544
  
```

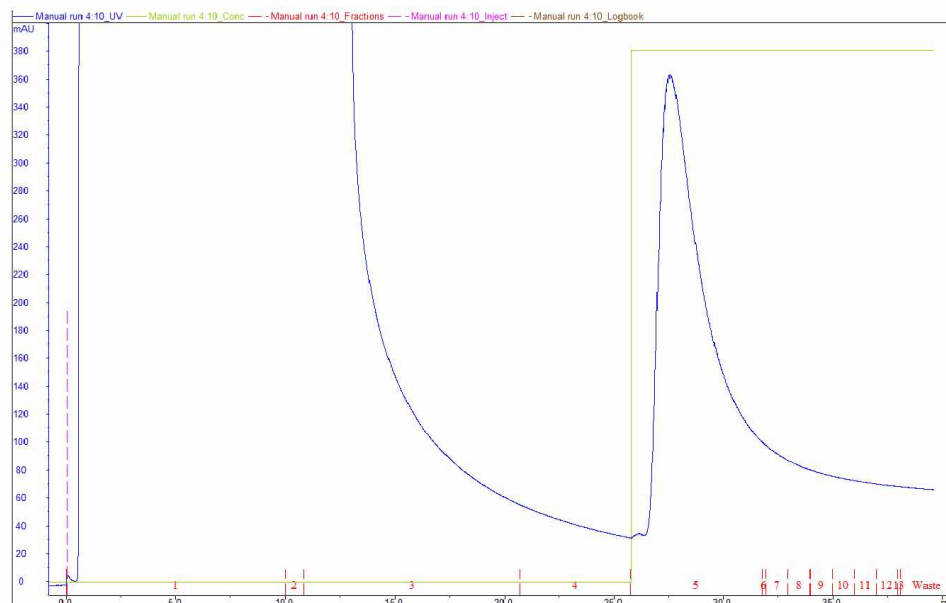
Εικόνα 10 Ομοπαράθεση AtHesp (A8MS41.1) και ANGEL2 (Q5VTE6.1). Η κίτρινη επισήμανση υποδεικνύει συνηρημένα κατάλοιπα που σχετίζονται με την καταλυόμενη αντίδραση. Με έντονη γραφή σημειώνονται καταλυτικά αμινοξέα των δύο ενζύμων.

Κοινά Καταλυτικά αμινοξέα		
<u>AtHESP</u>		<u>ANGEL2</u>
E143	-	E220
D308	-	D351
D366	-	D479*
H405	-	H533

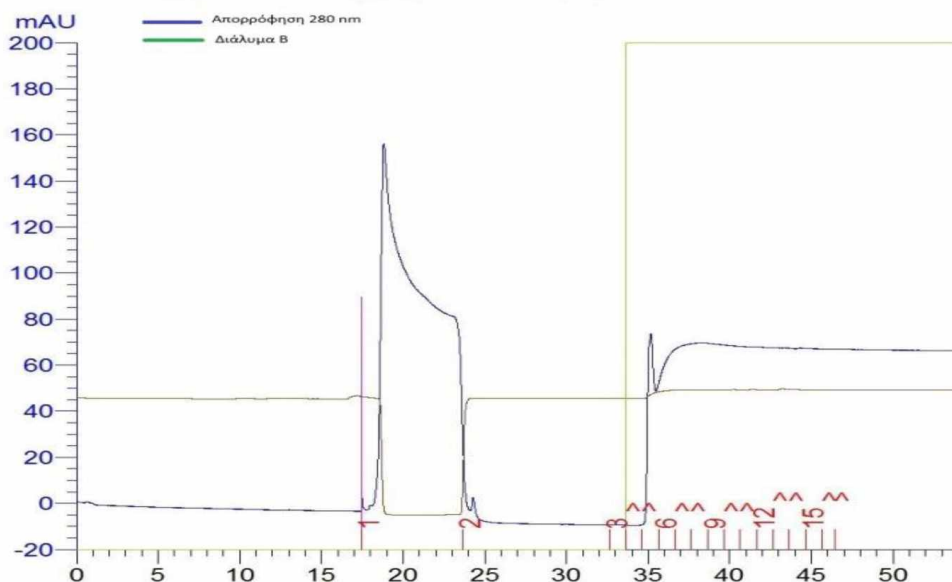
* ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΕΥΧΕΘΟΥΣ ΚΕΝΤΡΟΥ

3.2 Υπερέκφραση και καθαρισμός AtHESP

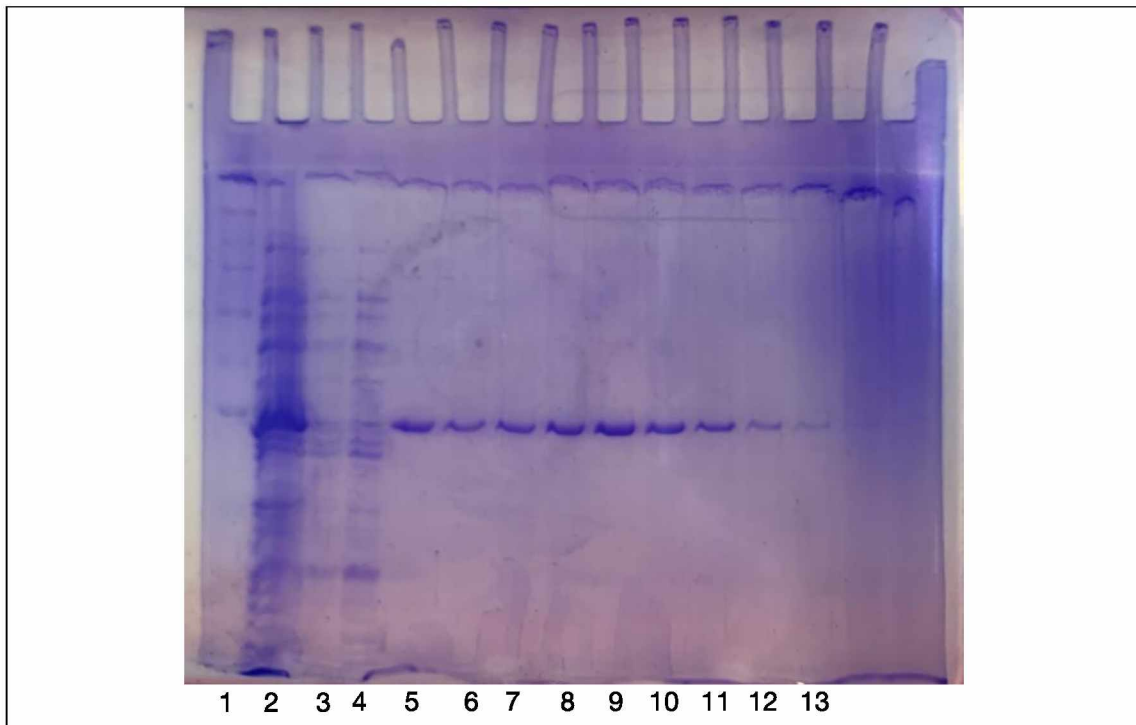
Η υπερέκφραση και ο καθαρισμός ακολούθησαν την πορεία που περιγράφεται στην Ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση και θα χρησιμοποιηθούν για πειράματα προσδιορισμού δράσης cΡασης.



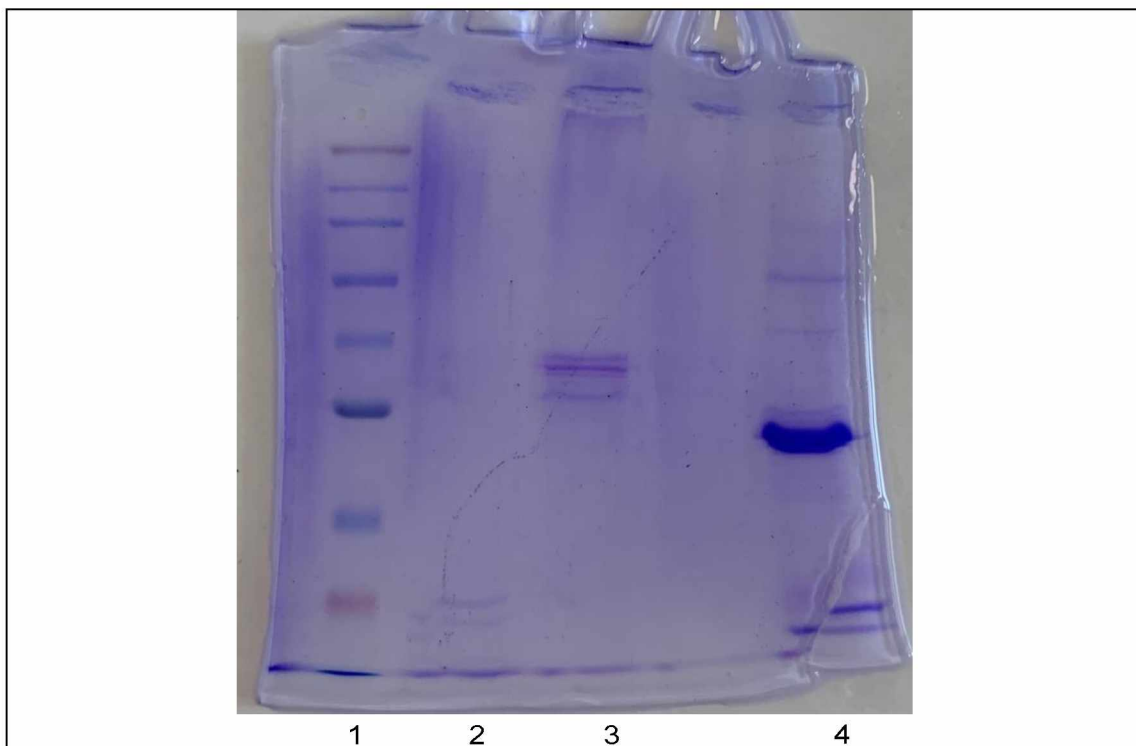
Εικόνα 11 Πρώτο βήμα καθαρισμού όπου παρουσιάζεται το χρωματογράφημα σε στήλη Ni^{2+} . Τα κλάσματα 1-3 περιείχαν πρωτεΐνες που δε παρουσιάζουν συγγένεια προς τη στήλη (Flow Through), το κλάσμα 4 αποτελεί την έκπλυση της στήλης (Wash), ενώ τα κλάσματα 5-12 περιείχαν το έκλουσμα των συνδεδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών.



Εικόνα 12 Δεύτερο βήμα καθαρισμού της AtHesp (His-Trap), όπου παρουσιάζεται το χρωματογράφημα, μετά την πρωτεολυτική διάσπαση από την πρωτεάση 3C (His-Trap). Το κλάσμα 1 περιείχε πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια προς τη στήλη (Flow Through) και εκεί βρίσκεται η πρωτεΐνη που υπέστη πρωτεολυτική διάσπαση από τη πρωτεάση TEV. Τα κλάσματα 2-3 είναι η έκπλυση της στήλης (Wash), ενώ τα κλάσματα 4-12 περιείχαν το έκλουσμα της άτηκτης πρωτεΐνης, και του παράγοντα τμήσης που είναι η πρωτεάση TEV.



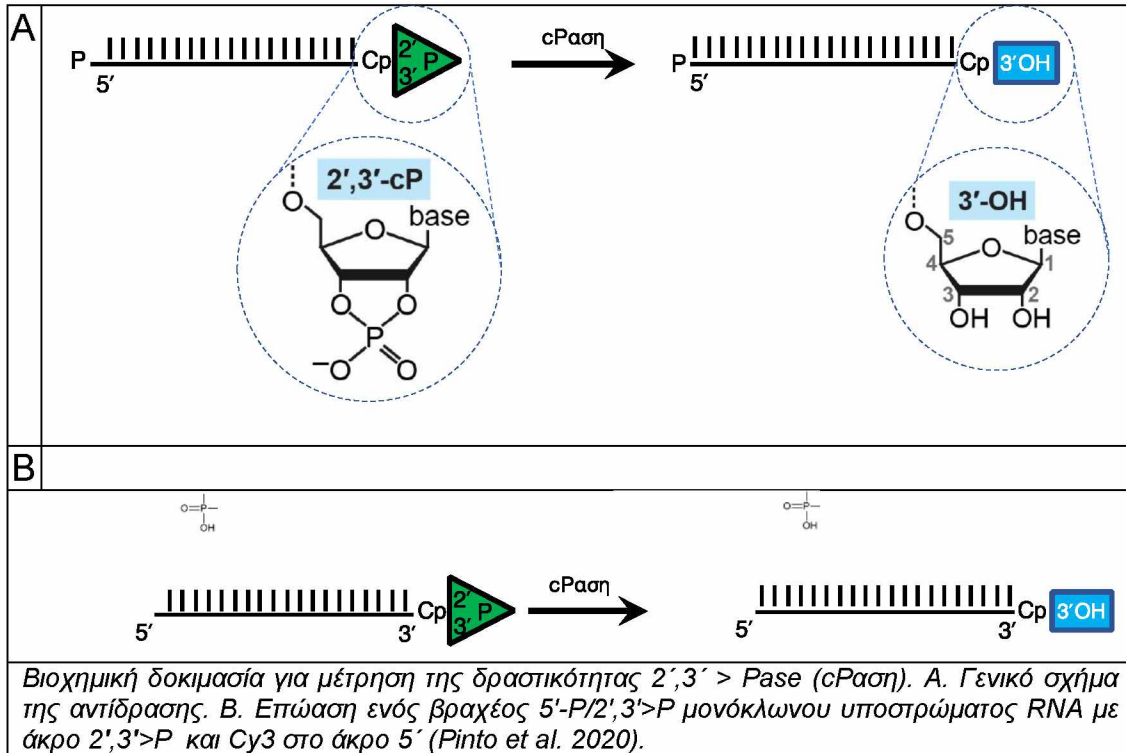
Εικόνα 13 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μετά από υπερέκφραση γονιδίου *AtHesperin* σε βακτήρια. Διαδρομές: 1. Δείκτες μοριακής μάζας. 2. Σύνολο δείγμα προς ανάλυση (ολικές πρωτεΐνες πριν τη φυγοκέντρηση). 3. FT, διερχόμενο μη-συνδεμένο δείγμα (Flow through). 4. Δείγματα έκπλυσης (wash). 5 -13. Εκλούσματα AKTA (κλάσματα 14-22).



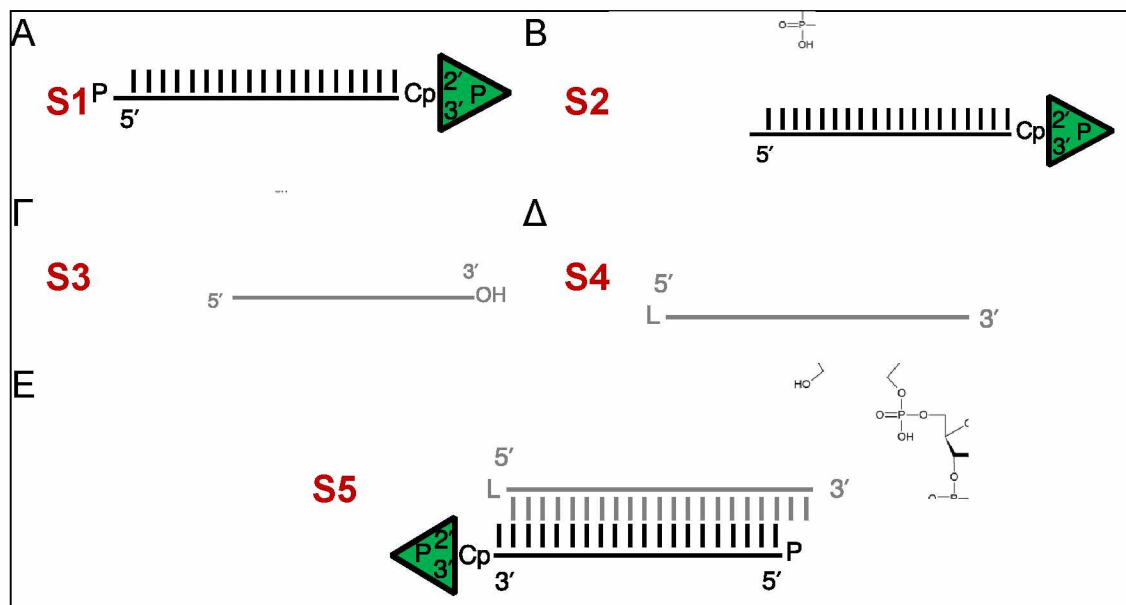
Εικόνα 14 Ηλεκτροφόρηση μετά από συμπύκνωση κλασμάτων. Διαδρομές: 1. Δείκτες μοριακής μάζας. 2. Flow through (αραιό δείγμα πρωτεΐνης) 3. Έκπλυση 4. Συμπύκνωμα δειγμάτων.

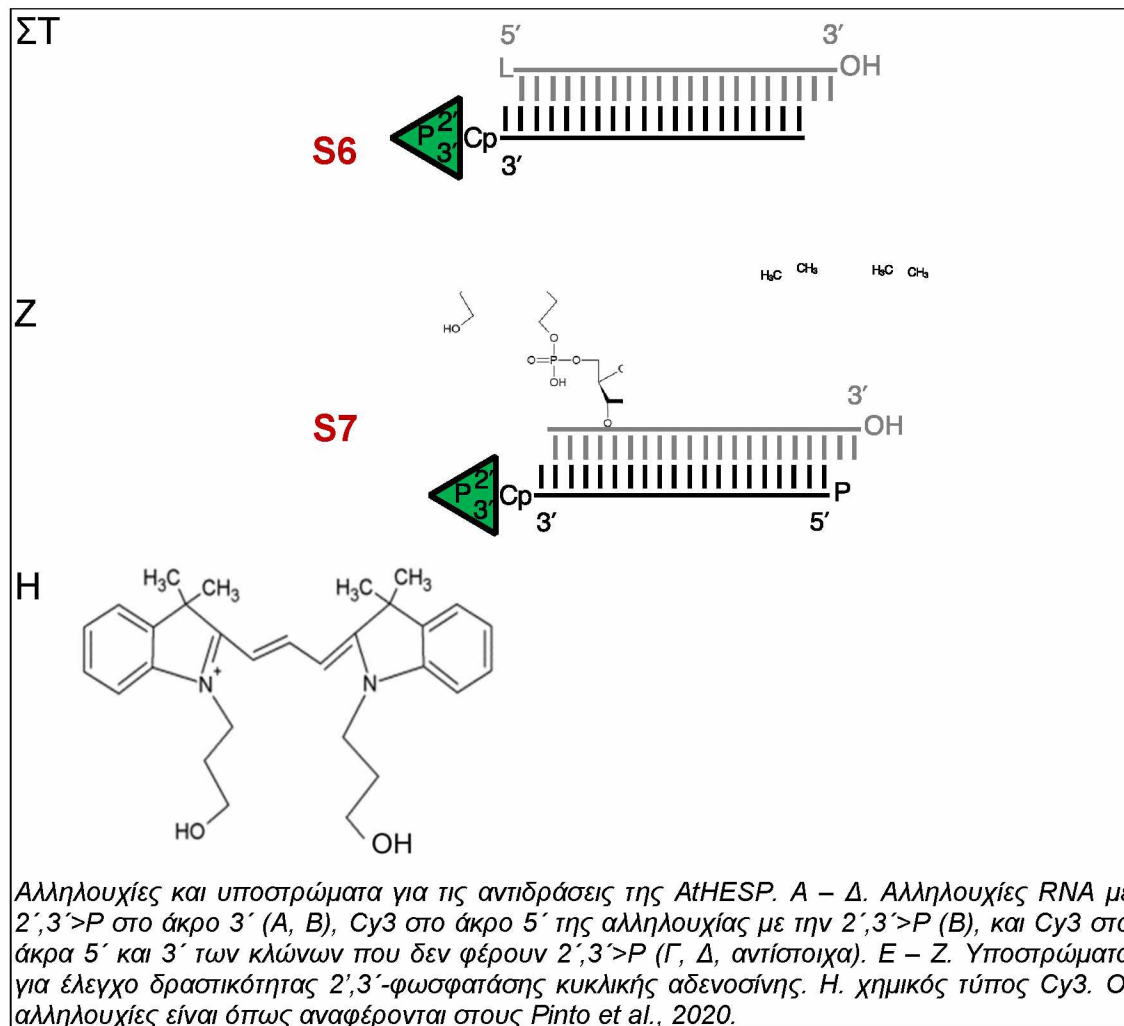
3.3 Αντίδραση διάσπασης 2',3'-κυκλικού φωσφορικού, δραστηκότητα cΡασης

Γενικό σχήμα αντίδρασης



Υποστρώματα





Στην παρούσα εργασία σχεδιάστηκε η πειραματική προσέγγιση για την εξέταση πιθανής δράσης της απαδενυλάσης AtHESPERIN ως φωσφατάσης του 2',3'-κυκλικού φωσφορικού (cPase). Έγινε ομοπαράθεση της AtHESPERIN με την ANGEL2, μια cPase που χαρακτηρίστηκε πρόσφατα και εντάσσεται στην ίδια υποκατηγορία απαδενυλασών με την AtHESPERIN. Η σύγκριση έδειξε πως τα δύο ένζυμα χρησιμοποιούν κοινά κατάλοιπα αμινοξέων ώστε να καταλύσουν τις αντιδράσεις τους. Ακολούθως, το cDNA της AtHESPERIN εκφράστηκε σε ετερόλογο σύστημα και η πρωτεΐνη απομονώθηκε με υψηλή καθαρότητα με την χρήση κατάλληλων στηλών χρωματογραφίας και το σύστημα καθαρισμού πρωτεϊνών ÄKTA. Τέλος, σχεδιάστηκαν κατάλληλα υποστρώματα RNA για τον έλεγχο της δραστηριότητας cPase από την AtHESPERIN. Τα υποστρώματα σχεδιάστηκαν ώστε να φέρουν στο άκρο 5' την ομάδα Cy3 (φθορίζουσα χρωστική), και θα χρησιμοποιηθούν αντί υποστρωμάτων που έχουν σημανθεί με ³²P κατά τον βιοχημικό χαρακτηρισμό της ANGEL2. Στο άμεσο μέλλον έχει σχεδιασθεί η πειραματική εξέταση της δραστηριότητας cPase από την AtHESPERIN.

Βιβλιογραφία:

Ahsan, N., Huang, Y., Tovar-Mendez, A., *et al.* (2013). A versatile mass spectrometry-based method to both identify kinase client-relationships and characterize signaling network topology. *J Proteome Res*, 12, 937-948.

Andreeva, A. V., Kutuzov, M. A. (2001). Nuclear localization of the plant protein Ser/Thr phosphatase PP7. *Mol Cell Biol Res Commun*, 4, 345-352.

Andreeva, A. V., Kutuzov, M. A. (2009). PPEF/PP7 protein Ser/Thr phosphatases. *Cell Mol Life Sci*, 66, 3103-3110.

Aslam, A., Mittal, S., Koch, F., *et al.* (2009). The Ccr4-NOT deadenylase subunits CNOT7 and CNOT8 have overlapping roles and modulate cell proliferation. *Mol Biol Cell*, 20, 3840-3850.

Baggs, J. E., Green, C. B. (2003). Nocturnin, a deadenylase in *Xenopus laevis* retina: a mechanism for posttranscriptional control of circadian-related mRNA. *Curr Biol*, 13, 189-198.

Barford, D., Das, A. K., Egloff, M. P. (1998). The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 27, 133-164.

Barr, F. A., Elliott, P. R., Gruneberg, U. (2011). Protein phosphatases and the regulation of mitosis. *J Cell Sci*, 124, 2323-2334.

Berndt, H., Harnisch, C., Rammelt, C., *et al.* (2012). Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA*, 18, 958-972.

Bertauche, N., Leung, J., Giraudat, J. (1996). Protein phosphatase activity of Abscisic acid insensitive 1 (ABI1) protein from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem*, 241, 193-200.

Beta, R. A. A., Balatsos, N. A. A. (2018). Tales around the clock: Poly(A) tails in circadian gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, e1484.

Beta, R. A. A., Kyritsis, A., Douka, V., *et al.* (2022). Biochemical and in silico identification of the active site and the catalytic mechanism of the circadian deadenylase HESPERIN. *FEBS Open Biol*, 12, 1036-1049.

Bheri, M., Mahiwal, S., Sanyal, S. K., *et al.* (2021). Plant protein phosphatases: What do we know about their mechanism of action? *FEBS J*, 288, 756-785.

Bollen, M., Peti, W., Ragusa, M. J., *et al.* (2010). The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends Biochem Sci*, 35, 450-458.

Braun, J. E., Huntzinger, E., Izaurralde, E. (2012). A molecular link between miRISCs and deadenylases provides new insight into the mechanism of gene silencing by microRNAs. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4.

Brautigan, D. L. (2013). Protein Ser/Thr phosphatases-the ugly ducklings of cell signalling. *FEBS J*, 280, 324-345.

Cagampang, F. R., Yang, J., Nakayama, Y., *et al.* (1994). Circadian variation of arginine-vasopressin messenger RNA in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain research. Mol Brain Res*, 24, 179-184.

Chao, Y., Xing, Y., Chen, Y., *et al.* (2006). Structure and mechanism of the Phosphotyrosyl Phosphatase Activator. *Mol Cell*, 23, 535-546.

- Chen, J., Hu, R., Zhu, Y., *et al.* (2014). Arabidopsis PHOSPHOTYROSYL PHOSPHATASE ACTIVATOR is essential for PROTEIN PHOSPHATASE 2A holoenzyme assembly and plays important roles in hormone signaling, salt stress response, and plant development. *Plant Physiol*, 166, 1519-1534.
- Chen, M. J., Dixon, J. E., Manning, G. (2017). Genomics and evolution of protein phosphatases. *Sci Signal*, 10, eaag1796.
- Cohen, P. T. W. (2010). Phosphatase families dephosphorylating Serine and Threonine residues in proteins. In *Handbook of Cell Signaling*, 2nd edn. (Bradshaw, R. A., Dennis, E. A., eds), pp. 659-675. Academic Press, USA.
- Collart, M. A., Panasenko, O. O. (2017). The Ccr4-Not Complex: Architecture and Structural Insights. *Subcell Biochem*, 83, 349-379.
- Das, A. K., Helps, N. R., Cohen, P. T., *et al.* (1996). Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO J*, 15, 6798-6809.
- De Baere, I., Derua, R., Janssens, V., *et al.* (1999). Purification of porcine brain protein phosphatase 2A leucine carboxyl methyltransferase and cloning of the human homologue. *Biochemistry*, 38, 16539-16547.
- Delis, C., Krokida, A., Tomatsidou, A., *et al.* (2016). AtHESPERIN: a novel regulator of circadian rhythms with poly(A)-degrading activity in plants. *RNA Biol*, 13, 68-82.
- Douris, N., Kojima, S., Pan, X., *et al.* (2011). Nocturnin regulates circadian trafficking of dietary lipid in intestinal enterocytes. *Curr Biol*, 21, 1347-1355.
- Dupressoir, A., Morel, A. - P., Barbot, W., *et al.* (2001). Identification of four families of yCCR4- and Mg²⁺-dependent endonuclease-related proteins in higher eukaryotes, and characterization of orthologs of yCCR4 with a conserved leucine-rich repeat essential for hCAF1/hPOP2 binding. *BMC Genomics*, 2, 9-22.
- Durian, G., Rahikainen, M., Alegre, S., *et al.* (2016). Protein Phosphatase 2A in the regulatory network underlying biotic stress resistance in plants. *Front Plant Sci*, 7, 812.
- Eckmann, C. R., Rammelt, C., Wahle, E. (2011). Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2, 348-361.
- Estrella, M. A., Du, J., Chen, L., *et al.* (2019). The metabolites NADP(+) and NADPH are the targets of the circadian protein Nocturnin (Curled). *Nat Commun*, 10, 2367.
- Farkas, I., Dombradi, V., Miskei, M., *et al.* (2007). Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends Plant Sci*, 12, 169-176.
- Favre, B., Zolnierowicz, S., Turowski, P., *et al.* (1994). The catalytic subunit of protein phosphatase 2A is carboxyl-methylated in vivo. *J Biol Chem*, 269, 16311-16317.
- Garbarino-Pico, E., Niu, S., Rollag, M. D., *et al.* (2007). Immediate early response of the circadian polyA ribonuclease nocturnin to two extracellular stimuli. *RNA*, 13, 745-755.
- Gerstner, J. R., Vanderheyden, W. M., LaVaute, T., *et al.* (2012). Time of day regulates subcellular trafficking, tripartite synaptic localization, and polyadenylation of the astrocytic Fabp7 mRNA. *J Neuroscience*, 32, 1383-1394.
- Ghelis, T. (2011). Signal processing by protein tyrosine phosphorylation in plants. *Plant Signal Behav*, 6, 942-951.

Godwin, A. R., Kojima, S., Green, C. B., *et al.* (2013). Kiss your tail goodbye: the role of PARN, Noctumin, and Angel deadenylases in mRNA biology. *Biochim Biophys Acta*, 1829, 561-570.

Goldstrohm, A. C., Wickens, M. (2008). Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature reviews. Mol Cell Biol*, 9, 337-344.

Goss, D. J., Kleiman, F. E. (2013). Poly(A) binding proteins: are they all created equal? *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 4, 167-179.

Gosselin, P., Martineau, Y., Morales, J., *et al.* (2013). Tracking a refined eIF4E-binding motif reveals Angel1 as a new partner of eIF4E. *Nucl Acids Res*, 41, 7783-7792.

Green, C. B., Douris, N., Kojima, S., *et al.* (2007). Loss of Nocturnin, a circadian deadenylase, confers resistance to hepatic steatosis and diet-induced obesity. *Proc Nat Acad Sci USA*, 104, 9888-9893.

Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., *et al.* (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. *EMBO J*, 21, 3029-3038.

Ishikawa, H., Yoshikawa, H., Izumikawa, K., *et al.* (2017). Poly(A)-specific ribonuclease regulates the processing of small-subunit rRNAs in human cells. *Nucl Acids Res*, 45, 3437-3447.

Kerk, D., Templeton, G., Moorhead, G. B. (2008). Evolutionary radiation pattern of novel protein phosphatases revealed by analysis of protein data from the completely sequenced genomes of humans, green algae, and higher plants. *Plant Physiol*, 146, 351-367.

Kim, J. H., Richter, J. D. (2006). Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic polyadenylation. *Mol Cell*, 24, 173-183.

Kojima, S., Sher-Chen, E. L., Green, C. B. (2012). Circadian control of mRNA polyadenylation dynamics regulates rhythmic protein expression. *Genes Dev*, 26, 2724-2736.

Kornmann, B., Schaad, O., Bujard, H., *et al.* (2007). System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol*, 5, e34.

Kutuzov, M. A., Andreeva, A. V. (2001). Noncompetitive inhibition of plant protein Ser/Thr phosphatase PP7 by phosphate. *Biochem Biophys Res Commun*, 283, 93-96.

Kutuzov, M. A., Bennett, N., Andreeva, A. V. (2001). Interaction of plant protein Ser/Thr phosphatase PP7 with Calmodulin. *Biochem Biophys Res Commun*, 289, 634-640.

Laothamatas, I., Gao, P., Wickramaratne, A., *et al.* (2020). Spatiotemporal regulation of NADP(H) phosphatase Noctumin and its role in oxidative stress response. *Proc Nat Acad Sci USA*, 117, 993-999.

Lee, J. E., Lee, J. Y., Trembly, J., *et al.* (2012). The PARN deadenylase targets a discrete set of mRNAs for decay and regulates cell motility in mouse myoblasts. *PLoS Genet*, 8, e1002901.

Lee, J., Chen, Y., Tolstykh, T., *et al.* (1996). A specific protein carboxyl methyltransferase that demethylates phosphoprotein phosphatase 2A in bovine brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 6043-6047.

Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P. C., *et al.* (1994). Arabidopsis ABA response gene ABI1: Features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science*, 264, 1448-1452.

- Leung, J., Merlot, S., Giraudat, J. (1997). The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous Protein Phosphatases 2C involved in Abscisic acid signal transduction. *Plant Cell*, 9, 759-771.
- Liang, W., Li, C., Liu, F., *et al.* (2009). The Arabidopsis homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses. *Cell Res*, 19, 307-316.
- Lillo, C., Kataya, A. R. A., Heidari, B., *et al.* (2014). Protein phosphatases PP2A, PP4 and PP6: mediators and regulators in development and responses to environmental cues. *Plant Cell Environ*, 37, 2631-2648.
- Lima, S. A., Chipman, L. B., Nicholson, A. L., *et al.* (2017). Short poly(A) tails are a conserved feature of highly expressed genes. *Nature Struct Mol Biol*, 24, 1057-1063.
- Luck, S., Thurley, K., Thaben, P. F., *et al.* (2014). Rhythmic degradation explains and unifies circadian transcriptome and proteome data. *Cell Reports*, 9, 741-751.
- Mangus, D. A., Evans, M. C., Jacobson, A. (2003). Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol*, 4, 223.
- Maragozidis, P., Papanastasi, E., Scutelnic, D., *et al.* (2015). Poly(A)-specific ribonuclease and Nocturnin in squamous cell lung cancer: Prognostic value and impact on gene expression. *Mol Cancer*, 14, 187.
- Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., *et al.* (2017). CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res*, 45, D200-D203.
- Martin, D. M. A., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J. (2009). Kinomer v. 1.0: A database of systematically classified eukaryotic protein kinases. *Nucleic Acids Res*, 37, D244-250.
- Meyer, K., Leube, M. P., Grill, E. (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in Arabidopsis thaliana. *Science*, 264, 1452-1455.
- Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J. (2007). Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases. *Proteins*, 68, 893-914.
- Montellese, C., Montel-Lehry, N., Henras, A. K., *et al.* (2017). Poly(A)-specific ribonuclease is a nuclear ribosome biogenesis factor involved in human 18S rRNA maturation. *Nucl Acids Res*, 45, 6822-6836.
- Moon, D. H., Segal, M., Boyraz, B., *et al.* (2015). Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 30 -end maturation of the telomerase RNA component. *Nature Genet*, 47, 1482-1488.
- Moorhead, G. B., Trinkle-Mulcahy, L., Ulke-Lemee, A. (2007). Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 234-244.
- Morita, M., Suzuki, T., Nakamura, T., *et al.* (2007). Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers elevation of the p27Kip1 mRNA level and impairs cell growth. *Mol Cell Biol*, 27, 4980-4990.
- Nemoto, K., Takemori, N., Seki, M., *et al.* (2015). Members of the plant CRK superfamily are capable of trans- and autophosphorylation of tyrosine residues. *J Biol Chem*, 290, 16665-16677.
- Ogris, E., Du, X., Nelson, K. C., *et al.* (1999). A protein phosphatase methylesterase (PME-1) is one of several novel proteins stably associating with two inactive mutants of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*, 274, 14382-14391.

- Pinto, P. H., Kroupova, A., Schleffer, A., Martinez, J. *et al.* (2020). ANGEL 2 is a member of the CCR4 family of deadenylases with 2',3'-cyclic phosphatase activity. *Science*, 369, 524-530.
- Reverdatto, S. V., Dutko, J. A., Chekanova, J. A., *et al.* (2004). mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants. *Rna*, 10, 1200-1214.
- Richter, J. D. (2007). CPEB: A life in translation. *Trends Biochem Sci*, 32, 279-285.
- Robinson, B. G., Frim, D. M., Schwartz, W. J., *et al.* (1988). Vasopressin mRNA in the suprachiasmatic nuclei: Daily regulation of polyadenylate tail length. *Science*, 241, 342-344.
- Roskoski, R. Jr. (2015). A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol Res*, 100, 1-23.
- Rudrabhatla, P., Reddy, M. M., Rajasekharan, R. (2006). Genome-wide analysis and experimentation of plant serine/threonine/tyrosine-specific protein kinases. *Plant Mol Biol*, 60, 293-319.
- Sarowar, S., Oh, H. W., Cho, H. S., *et al.* (2007). Capsicum annuum CCR4-associated factor CaCAF1 is necessary for plant development and defence response. *Plant J*, 51, 792-802.
- Schweighofer, A., Hirt, H., Meskiene, I. (2004). Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci*, 9, 236-243.
- Shankar, A., Agrawal, N., Sharma, M., *et al.* (2015). Role of protein tyrosine phosphatases in plants. *Curr Genomics*, 16, 224-236.
- Shi, Y. (2009). Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell*, 139, 468-484.
- Shukla, S., Schmidt, J. C., Goldfarb, K. C., *et al.* (2016). Inhibition of telomerase RNA decay rescues telomerase deficiency caused by dyskerin or PARN defects. *Nature Struct Mol Biol*, 23, 286-292.
- Singh, A., Giri, J., Kapoor, S., *et al.* (2010). Protein phosphatase complement in rice: genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development. *BMC Genom*, 11, 435.
- Sinturel, F., Gerber, A., Mauvoisin, D., *et al.* (2017). Diurnal oscillations in liver mass and cell size accompany ribosome assembly cycles. *Cell*, 169, 651-663.
- Stone, R. L., Dixon, J. E. (1994). Protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem*, 269, 31323-31326.
- Stubblefield, J. J., Gao, P., Kilaru, G., *et al.* (2018). Temporal control of metabolic amplitude by Nocturnin. *Cell Reports*, 22, 1225–1235.
- Su, J., Forchhammer, K. (2013). Determinants for substrate specificity of the bacterial PP2C protein phosphatase tPphA from *Thermosynechococcus elongatus*. *FEBS J*, 280, 694-707.
- Tang, W., Tu, S., Lee, H. C., *et al.* (2016). The RNase PARN-1 trims piRNA 30 ends to promote transcriptome surveillance in *C. elegans*. *Cell*, 164, 974-984.
- Tang, W., Yuan, M., Wang, R., *et al.* (2011). PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat Cell Biol*, 13, 124-131.
- Tonks, N. K. (2013). Protein tyrosine phosphatases—from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. *FEBS J*, 280, 346-378.

- Tran, H. T., Nimick, M., Uhrig, R. G., *et al.* (2012). Arabidopsis thaliana histone deacetylase 14 (HDA14) is an α -tubulin deacetylase that associates with PP2A and enriches in the microtubule fraction with the putative histone acetyltransferase ELP3. *Plant J*, 71, 263-272.
- Tran, H. T., Uhrig, R. G., Nimick, M., *et al.* (2012). Interfacing protein lysine acetylation and protein phosphorylation. *Plant Signal Behav*, 7, 901-903.
- Uhrig, R. G., Labandera, A. M., Moorhead, G. B. (2013). Arabidopsis PPP family of serine/threonine protein phosphatases: many targets but few engines. *Trends Plant Sci*, 18, 505-513.
- Uhrig, R. G., Moorhead, G. B. (2011). Two ancient bacterial-like PPP family phosphatases from Arabidopsis are highly conserved plant proteins that possess unique properties. *Plant Physiol*, 157, 1778-1792.
- Virshup, D. M., Shenolikar, S. (2009). From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell*, 33, 537-545.
- Walley, J. W., Kelley, D. R., Nestorova, G., *et al.* (2010A). Arabidopsis deadenylases AtCAF1a and AtCAF1b play overlapping and distinct roles in mediating environmental stress responses. *Plant Physiol*, 152, 866-875.
- Walley, J. W., Kelley, D. R., Savchenko, T., *et al.* (2010B). Investigating the function of CAF1 deadenylases during plant stress responses. *Plant Signal Behav*, 5, 802-805.
- Wang, H., Morita, M., Yang, X., *et al.* (2010). Crystal structure of the human CNOT6L nuclease domain reveals strict poly(A) substrate specificity. *EMBO J*, 29, 2566-2576.
- Wang, Y., Osterbur, D. L., Megaw, P. L., *et al.* (2001). Rhythmic expression of Noctumin mRNA in multiple tissues of the mouse. *BMC Dev Biol*, 1, 9.
- Williams, J. G., Zvelebil, M. (2004). SH2 domains in plants imply new signalling scenarios. *Trends Plant Sci*, 9, 161-163.
- Wu, G., Wang, X., Li, X., *et al.* (2011). Methylation of a phosphatase specifies dephosphorylation and degradation of activated brassinosteroid receptors. *Science Signaling*, 4, ra29.
- Wu, M., Reuter, M., Lilie, H., *et al.* (2005). Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *Embo J*, 24, 4082-4093.
- Wuarin, J., Falvey, E., Lavery, D., *et al.* (1992). The role of the transcriptional activator protein DBP in circadian liver gene expression. *J Cell Sci*, 16, 123-127.
- Xie, H. Y., Clarke, S. (1994). An enzymatic activity in bovine brain that catalyzes the reversal of the C-terminal methyl esterification of Protein Phosphatase 2A. *Biochem Biophys Res Commun*, 203, 1710-1715.
- Xing, Y., Li, Z., Chen, Y., *et al.* (2008). Structural Mechanism of Demethylation and Inactivation of Protein Phosphatase 2A. *Cell*, 133, 154-163.
- Yang, J., Roe, S. M., Prickett, T. D., *et al.* (2007). The Structure of Tap42/a4 reveals a tetratricopeptide repeat-like fold and provides insights into PP2A regulation. *Biochemistry*, 46, 8807-8815.
- Yoda, M., Cifuentes, D., Izumi, N., *et al.* (2013). Poly(A)-specific ribonuclease mediates 3' - end trimming of Argonaute2-cleaved precursor microRNAs. *Cell Reports*, 5, 715-726.
- Zhang, Q., Yan, D., Guo, E., *et al.* (2016). Structural basis for inhibition of the deadenylase activity of human CNOT6L. *FEBS Lett*, 590, 1270-1279.

Zhang, X., Devany, E., Murphy, M. R., *et al.* (2015). PARN deadenylase is involved in miRNA-dependent degradation of TP53 mRNA in mammalian cells. *Nucl Acids Res*, 43, 10925-10938.

Zhou, H. W., Nussbaumer, C., Chao, Y., *et al.* (2004). Disparate roles for the regulatory A subunit isoforms in Arabidopsis protein phosphatase 2A. *Plant Cell*, 16, 709-722.