



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Ραφαηλία Μπέτα

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΑΔΕΝΥΛΑΣΩΝ ΠΟΥ
ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΝ ΗΜΕΡΟΝΥΚΤΙΟ ΡΥΘΜΟ**

2023

Διερεύνηση και μελέτη απαδενυλασών που σχετίζονται με τον ημερονύκτιο ρυθμό

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Νικόλαος Μπαλατσός (επιβλέπων)	Επίκουρος καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Δημήτριος Λεωνίδας	Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης	Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Δημήτριος Βλαχάκης	Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης	Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Δημήτρης Κλέτσας	Διευθυντής Ερευνών, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»
Δημήτριος Λεωνίδας	Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Παναγιώτης Λιάκος	Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τομέας Βασικών και Εφαρμοσμένων Βιοϊατρικών Επιστημών, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Νικόλαος Μπαλατσός (επιβλέπων)	Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Γεώργιος Παναγιώτου	Ερευνητής Α', Ινστιτούτο Βιοκαινοτομίας, Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

Ραφαηλία Μπέτα

Διερεύνηση και μελέτη απαδενυλασών που σχετίζονται με τον ημερονύκτιο ρυθμό

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 14

Συνολικός αριθμός σελίδων: 112

Αριθμός πινάκων: 10

Αριθμός εικόνων: 28

Αριθμός παραρτημάτων: 4

Αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 191

Περίληψη

Ραφαηλία Μπέτα

2023

Διερεύνηση και μελέτη απαδενυλασών που σχετίζονται με τον ημερονύκτιο ρυθμό

Διδακτορική διατριβή

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ο κιρκάδιος ρυθμός είναι κάθε εγγενής διαδικασία που ρυθμίζει τον κύκλο εγρήγορσης-ύπνου και επαναλαμβάνεται κάθε 24 ώρες περίπου. Μπορεί να είναι ενδογενής, αλλά και να προσαρμόζονται σε αλλαγές στο περιβάλλον, με κυριότερη από αυτές την εναλλαγή φωτός/σκότους λόγω της περιστροφής της Γης περί τον άξονά της. Σε αυτή την περίπτωση οι κιρκάδιοι ρυθμοί ονομάζονται και ημερονύκτιοι ρυθμοί. Οι κιρκάδιοι ρυθμοί κατευθύνονται από το κιρκάδιο ρολόι, ένα βιοχημικό ταλαντωτή που μεταβάλλεται με σταθερή *φάση* και συγχρονίζεται με την ημέρα 24ωρών. Τα κιρκάδια ρολόγια επιτρέπουν στον οργανισμό να αποκρίνονται στις αναμενόμενες περιβαλλοντικές αλλαγές από την εναλλαγή φωτός/σκότους και να προσαρμόζονται ανάλογα. Έτσι, οι ρυθμοί επηρεάζουν διάφορες πτυχές της φυσιολογίας και της συμπεριφοράς των οργανισμών, όπως ο κύκλος ύπνου, οι κινήσεις των φύλλων στα φυτά, κ.α.. Ο μοριακός μηχανισμός του ρολογιού βασίζεται στη μεταγραφική ρύθμιση, οδηγώντας σε ρυθμικές αλλαγές που βασίζονται σε αλληλένδετους βρόχους ανατροφοδότησης μεταξύ μεταγραφής και μετάφρασης ελέγχοντας την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται με τον ρυθμό. Έτσι, οι διαδικασίες και οι παράγοντες που καθορίζουν τη ρυθμική γονιδιακή έκφραση είναι σημαντικοί για την κατανόηση των κιρκάδιων ρυθμών. Μεταξύ αυτών, οι ουρές πολυ(A) των RNA παίζουν βασικό ρόλο στη σταθερότητα, τη μεταφραστική ικανότητα, αλλά και την αποδόμησή. Ειδικότερα, η βράχυνση και αφαίρεση της ουράς πολυ(A) από ένζυμα που ονομάζονται απαδενυλάσες, είναι το πρώτο και καθοριστικό βήμα της αποικοδόμησης των ευκαρυωτικών mRNA, καθορίζοντας έτσι τη διάρκεια ζωής τους. Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε ο ρόλος δυο απαδενυλασών που εμπλέκονται στον κιρκάδιο ρυθμό, της AtHESPERIN και της πολυ(A) εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN). Από μελέτες του εργαστηρίου ταυτοποιήθηκε η HESPERIN ως μια απαδενυλάση με κιρκάδια έκφραση στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Στην διατριβή περιγράφεται ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του ενζύμου μέσω των διαδικασιών βελτιστοποίησης των συνθηκών παραγωγής και απομόνωσης αλλά και της εξέτασης του ενεργού του κέντρου και του καταλυτικού μηχανισμού. Συνδυάζοντας τα βιοχημικά αποτελέσματα με ανάλυση *in silico*, αξιολογήσαμε τη σημασία των απαραίτητων για την κατάλυση αμινοξέων, οδηγώντας στην κατηγοριοποίηση της HESPERIN στην οικογένεια απαδενυλασών EEP (exonuclease-endonuclease-phosphatase). Παράλληλα, έχει περιγραφεί πως η PARN εκδηλώνει ρυθμικά

επίπεδα mRNA σε ήπαρ μυός, χωρίς να είναι κάτι γνωστό για τα πρωτεϊνικά της επίπεδα ή το γενικότερο ρόλο που μπορεί να διαδραματίζει στο κερκάδιο ρολόι. Στο πλαίσιο της διατριβής, εξετάσαμε τα επίπεδά της PARN σε ανθρώπινα κύτταρα HEK293T μετά από εναρμόνιση με τον κερκάδιο ρυθμό αλλά και σε ήπαρ μυός. Επιπλέον, εξετάσαμε την αλληλεπίδρασή της PARN με το miR-29a, καθώς από μελέτες του εργαστηρίου έχει προκύψει πως σε κύτταρα πλακώδους καρκίνου του πνεύμονα αλληλεπιδρά η PARN εμπλέκεται στην ωρίμανση του, ενώ παράλληλα έχει περιγραφεί πως το miR-29a διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της περιόδου του ρολογιού σε ήπαρ ποντικών. Ανοσοκατακρήμνιση της PARN και ανάλυση των προσδεδεμένων σε αυτή μορίων RNA έδειξε πως αλληλεπιδρά με το miR-29a και ακολούθησε κατακρήμνιση του miR-29a σε διάφορα χρονικά σημεία του 24ώρου ώστε να ταυτοποιηθούν οι πρωτεϊνικές του αλληλεπιδράσεις. Τέλος, ο ρόλος της PARN στον κερκάδιο ρυθμό μελετήθηκε πραγματοποιώντας μεγάλης κλίμακας πρωτεομική μελέτη μετά από ανοσοκατακρήμνιση της PARN από ήπαρ ποντικών στη διάρκεια του 24ωρου. Η μελέτη αυτή αποκάλυψε νέους παράγοντες που αλληλεπιδρούν με την PARN σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές του 24ώρου αλλά και παράγοντες που υποδεικνύουν πως η PARN ίσως διαδραματίζει πολύ εξειδικευμένους ρόλους στο πλαίσιο του κερκάδιου ρυθμού, θέτοντας τα θεμέλια για τη μελέτη της σε διεργασίες που δεν έχει κάποιο γνωστό ρόλο.

Μέρος της διδακτορικής διατριβής έχει συμπεριληφθεί στις παρακάτω δημοσιεύσεις:

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής έχει δημοσιευθεί ως μέρος ερευνητικών εργασιών σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά και αναφέρονται στο κείμενο με τη λατινική αρίθμηση που τους αποδίδεται παρακάτω:

- Biochemical and in silico identification of the active site and the catalytic mechanism of the circadian deadenylase HESPERIN. (2020)
Beta RAA, Kyritsis A, Douka V, Papanastasi E, Rizouli M, Leonidas DD, Vlachakis D, Balatsos NAA. *FEBS Open Bio*. doi: 10.1002/2211-5463.13011. PMID: 33095977
- Core clock regulators in dexamethasone-treated HEK 293T cells at 4 h intervals. (2022)
Beta RAA, Arsenopoulou ZV, Kanoura A, Dalkidis D, Avraamidou R, Balatsos NAA. *BMC Res Notes*. 15(1):23. doi: 10.1186/s13104-021-05871-7. PMID: 35090555

Εργασίες σε συναφές αντικείμενο

- Tales around the clock: Poly(A) tails in circadian gene expression. (2018)
Beta RAA, Balatsos NAA. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 9(5):e1484. doi: 10.1002/wrna.1484. PMID: 29911349
- Repeatability of pleural adenosine deaminase measurements in diagnostic evaluation of pleural effusions. (2018)
Kotsiou OS, Tzortzi P, **Beta RAA**, Kyritsis A, Gourgouljanis KI. *J Clin Lab Anal*. 32(5):e22371. doi: 10.1002/jcla.22371. PMID: 29218743

Εργασίες σε προετοιμασία

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής βρίσκεται σε στάδιο προετοιμασίας ή έκδοσης. Οι εργασίες αυτές δεν αναφέρονται με αρίθμηση μέσα στο κείμενο:

- Time-of-day interacting partners of poly(A)-specific ribonuclease in mouse liver.
Beta R.A.A., Arsenopoulou Z.A., Samiotaki M, Dalkidis D, Kletsas D, Panayotou G, Balatsos N.A.A.
- Poly(A)-specific ribonuclease regulates early steps of the biogenesis of a subset of microRNAs with implications in cell mobility and circadian rhythms.
A. Kyritsis, **R.A.A. Beta**, D. Scutelnic, V. Vescovo, D. Kletsas, P. Moutopoulou, V. Stravokefalou, Z. Arsenopoulou, M. Samiotaki, G. Panayotou, M.A. Denti, N.A.A. Balatsos.

Χρηματοδότηση

- Μέρος της διατριβής υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «Synthetic Biology: From omics technologies to genomic engineering (OMIC-ENGINE)» (MIS 5002636) που εντάσσεται στη Δράση «Ενίσχυση των Υποδομών Έρευνας και Καινοτομίας» και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης). Διάρκεια χρηματοδότησης: 01/04/2018 - 30/04/2020.



- Η διατριβή αυτή συγχρηματοδοτήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης: «Υποστήριξη ερευνητών με έμφαση στους νέους ερευνητές-κύκλος Β'» (MIS 5048947) που εντάσσεται στο Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση & Δια βίου Μάθηση, ΕΔΒΜ-103, 2014-2020» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο). Διάρκεια χρηματοδότησης: 01/05/2020 - 31/07/2021.



Ευχαριστίες

Μία RNA expedition φτάνει στο τέλος της. Ήταν πράγματι μια δετής εκστρατεία η οποία είχε πολλούς συνοδοιπόρους τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον επιβλέποντά μου, Νικόλαο Μπαλατσό, για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη, τη βοήθεια, τη στήριξη και την υπομονή του κατά τη διεξαγωγή της διατριβής. Επιπλέον, τον ευχαριστώ για όλα όσα έμαθα κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας για την επιστήμη και την έρευνα, αλλά και για όλα όσα θα ανακαλύψω στο μέλλον καθώς έμαθα να σκέφτομαι, να αναπτύσσω συνεχώς τις δυνατότητές μου αλλά και να μη διστάζω να εξερευνώ οτιδήποτε μου εξάπτει την επιστημονική περιέργεια ακόμη και όταν μου φαίνεται δύσκολο.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δημήτριο Λεωνίδα, καθώς δέχθηκε να είναι μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου αλλά και για την καθοδήγησή του, τη βοήθεια και τη συνεργασία του. Τα σχόλιά του ήταν πάντα εποικοδομητικά με αποτέλεσμα να βελτιώνομαι συνεχώς μέσα από τη συνεργασία μας. Ομοίως, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη. Η άριστη συνεργασία μας και η ενθουσιώδης καθοδήγησή του με συνόδευσαν καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας, ενώ η συμμετοχή μου στα μαθήματα της Πνευμονολογικής Κλινικής αποτέλεσε μια πολύτιμη εμπειρία για τη σημασία της μεταφραστικής έρευνας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Παναγιώτη Λιάκο, το Δημήτρη Κλέτσα και τον Γιώργο Παναγιώτου, καθώς η συμβολή τους στη διεξαγωγή της διατριβής μου ήταν πολύ σημαντική. Τους ευχαριστώ όχι μόνο για την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε, αλλά και γιατί με φιλοξένησαν στα εργαστήριά τους με μεγάλη προθυμία. Τέλος, ευχαριστώ θερμά το Δημήτρη Βλαχάκη για την εξαιρετική και παραγωγική συνεργασία που είχαμε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Μαρτίνα Σαμιωτάκη για τη φιλοξενία στο εργαστήριο Πρωτεομικής ανάλυσης του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», την υπομονή της και την άψογη συνεργασία καθώς και το Αλέξανδρο Αθανασόπουλο για τη φιλοξενία και πολύτιμη βοήθειά του ως Ειδικός Τεχνικός Επιστήμονας της μονάδας Οπτικής Μικροσκοπίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Επιπλέον, ευχαριστώ την Χριστίνα Καρατζαφέρη, για την εξαιρετική ευκαιρία που μου πρόσφερε να ταξιδέψω και να εκπαιδευτώ στο Πανεπιστήμιο του Στέλενμπους.

Ευχαριστώ όλους τους αξιότιμους συναδέλφους του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας και ειδικότερα, τον Θάνο Κυρίτση για όλα όσα μου έμαθε, για όλη μας τη συνεργασία και όλες τις κοινές μας εμπειρίες που ενίσχυσαν τη φιλία μας, τη Ζωή Αρσενοπούλου για την εξαιρετική της συνεργασία και τον αδαμάντινο χαρακτήρα της και τη Ειρήνη Παπαναστάση, η οποία ήταν εξαιρετική συνάδελφος ακόμη και αφού

έφυγε από το εργαστήριο. Εύχομαι να έχω και άλλους τέτοιους συναδέλφους στο μέλλον. Επιπλέον, ευχαριστώ τη Θεοδώρα Σολοβού, για τη συνεργασία μας και την πολύτιμη φιλία της και για όλα αυτά που δε λέγονται. Ομοίως, ευχαριστώ το Γεώργιο Στραβοδήμο για την άψογη συνεργασία και την εξαιρετική του παρέα. Τέλος, ευχαριστώ τον Γιάννη Τσιάλτα για τη συνεργασία του και την προθυμία του να με βοηθήσει όποτε το ζήτησα. Εκτός του εργαστηρίου μας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την εξαιρετική γειτόνισσα, συνάδελφο, συνεργάτη, και κουμπαρούλα μου Ιωάννα-Μαρία Γκοτινάκου για τη βοήθειά της σε όλα, για τη στήριξή της με όλα και γιατί πάντα ήταν πιο ψύχραιμη από εμένα, ακόμη και όταν γινόταν σεισμός!

Ευχαριστώ όλους τους μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές που επέβλεψα αυτά τα χρόνια, καθώς με όλους μοιραστήκαμε εμπειρίες που μας εξέλιξαν σαν επιστήμονες και σαν ανθρώπους. Κάποιους από αυτούς τους «ταλαιπώρησα» λίγο παραπάνω, αλλά νομίζω άξιζε τον κόπο καθώς προοδεύσαμε μαζί, άλλωστε πολλά από όσα τους «δίδασκα» τα μάθαινα και εγώ επί το έργον. Ευχαριστώ πολύ, λοιπόν, με σειρά εμφάνισης, την Αμαλία Κάνουρα, τη Μαριάννα Ριζούλη και τον Δημήτρη Δαλκίδη. Δεν μπορώ καν να θυμηθώ πόσες «πρώτες φορές» βιώσαμε μαζί!

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τους φίλους οι οποίοι αποτέλεσαν στήριγμα και κινητήριο δύναμη όποτε το χρειάστηκα. Χωρίς τους Θεοδώρα Σολοβού, Ιωάννα-Μαρία Γκοτινάκου, Αλέξανδρο Γραμματικόπουλο, Κωνσταντίνο Τσιλαφάκη και Μαρία Χαραλάμπους νομίζω θα ήμουν χειρότερος επιστήμονας, αλλά και χειρότερος άνθρωπος! Τέλος, θα ήθελα να αναφέρω την οικογένειά μου, των οποίων η αγάπη και η στήριξη ήταν μια σταθερά στη ζωή μου η οποία μου επέτρεψε να ακολουθήσω την περιέργειά μου έως αυτό το σημείο. Αν και το «ευχαριστώ» δεν είναι αρκετό, θα αρκεστώ σε αυτό, καθώς χωρίς τους αγαπημένους μου γονείς, Κατερίνα και Άγγελο, την αδερφή μου, Μαλεβή, και το σύζυγό μου, Ευθύμιο, δεν θα είχα ξεκινήσει και δε θα είχα ολοκληρώσει τίποτα.

Ελπίζω μόνο να είμαι και εγώ το ίδιο θετική επιρροή στις ζωές όλων όσων ανέφερα όσο υπήρξαν εκείνοι για τη δική μου εξέλιξη.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	IV
ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ.....	VIII
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	X
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	XIII
ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
Το κικκάδιο ρολόι.....	1
Περιφερικά ρολόγια	5
Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο κικκάδιο ρολόι.....	6
Η ουρά πολυ(A) στο κικκάδιο ρολόι.....	9
Απαδενυλάσες.....	11
ΣΚΟΠΟΣ	19
ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	21
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ - Η HESPERIN ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	23
Εισαγωγή	23
Μεθοδολογία	24
Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	26
Συμπεράσματα	34
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ - Η PARN ΣΤΟ ΚΙΚΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΙ: ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ HEK293T	36
Εισαγωγή	36
Μεθοδολογία	37
Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	40
Συμπεράσματα	45
ΤΡΙΤΟ ΜΕΡΟΣ - Η PARN ΣΤΟ ΚΙΚΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΙ: ΤΟ ΖΩΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ C57BL/6J	47
Εισαγωγή	47
Μεθοδολογία	48
Αποτελέσματα - Συζήτηση	54
Συμπεράσματα	68
SUMMARY	71
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1	72
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2	73
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3	75
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4	77
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	90

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κινκάρδιο ρολόι

Το κινκάρδιο ρολόι, είναι οι ενδογενείς μηχανισμοί κατά τους οποίους ρυθμίζονται οι συμπεριφορές και φυσιολογικές λειτουργίες ενός οργανισμού ως απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα ή προκαταβολικά ως προσμονή αυτών των αλλαγών. Οι αποκρίσεις της φυσιολογίας που ρυθμίζονται από το κινκάρδιο ρολόι διατηρούνται ακόμη και απουσία εξωτερικών ερεθισμάτων και έχουν περίοδο ~24ωρών. Κύριο εξωτερικό ερέθισμα αποτελεί το φως της ημέρας και η εναλλαγή φωτός/σκοταδιού που οφείλεται στην περιστροφή της γης. Τα βασικά χαρακτηριστικά του κινκάρδιου ρυθμού είναι πως είναι ενδογενής, αυτοσυντηρούμενος και ευθυγραμμίζεται με τα εξωτερικά ερεθίσματα (1). Ας σημειωθεί πως ένας ρυθμός αναφέρεται ως «κινκάρδιος» όταν η ταλάντωσή του έχει περίοδο 24ωρών περίπου και διατηρείται σε συνεχείς συνθήκες, όπως σταθερό φως ή συνεχές σκότος. Η αδυναμία του ρυθμού να διατηρηθεί σε σταθερές συνθήκες σημαίνει πως κατευθύνεται από αποκρίσεις σε εξωτερικά ερεθίσματα-χρονοδότες (zeitgebers) ή περιοδικές αλλαγές στη συμπεριφορά παρά από περιοδικές εσωτερικές διεργασίες (2).

Το κινκάρδιο ρολόι είναι ο κύριος μηχανισμός που κατευθύνει τους κινκάρδιους ρυθμούς. Τα κινκάρδια ρολόγια απαρτίζονται από τρία κύρια συστατικά:

- Εξωγενή ερεθίσματα που αλληλεπιδρούν με τον κεντρικό ταλαντωτή (π.χ. φως) επιτρέποντας την *εναρμόνιση*¹ του ρολογιού
- Έναν κεντρικό μοριακό ταλαντωτή, με περίοδο ~24 ωρών που τηρεί την ώρα
- Ενδογενή μονοπάτια κατευθυνόμενα από διακριτές φάσεις του κεντρικού ταλαντωτή που ρυθμίζουν ρυθμούς στη βιοχημεία, φυσιολογία και συμπεριφορά του οργανισμού.

Η ιδιότητα της εναρμόνισης (entrainment) του ρολογιού προσδίδει προσαρμοστικότητα στο κινκάρδιο σύστημα. Η ικανότητα της αυτονομίας/αυτοσυντήρησης του ρυθμού θα οδηγούσε σε απόκλιση από τους φυσικούς κύκλους κάτι το οποίο αποφεύγεται με την ύπαρξη του μηχανισμού της εναρμόνισης από εξωτερικούς μηχανισμούς ώστε να διατηρείται η σωστή «χρονομέτρηση» κάθε μέρα (4). Στα περισσότερα άτομα, ο κινκάρδιος ρυθμός αφορά σε ένα κύκλο 24 ωρών περίπου. Όμως, μερικά άτομα δεν ακολουθούν αυτήν την 24ωρη περίοδο, όπως για παράδειγμα άτομα που στερούνται της όρασης και δεν μπορούν να αποκριθούν σε φυσικό ή τεχνητό φως (5). Ας σημειωθεί πως από τα παραπάνω προκύπτει πως σε φυσιολογικές συνθήκες οι κινκάρδιοι

¹ Ως *εναρμόνιση*, *entrainment*, εννοείται η διεργασία όπου ένας ρυθμός συγχρονίζεται με έναν εξωτερικό Ως *Περίοδος Ελεύθερης Λειτουργίας*, *Free-run Period*, *FRP*, εννοείται ο ρυθμός ενός ατόμου που καθορίζεται όταν ο κύκλος εγρήγορσης/ύπνου του δεν καθορίζεται από εξωτερικά ερεθίσματα, όπως η διαδοχή φωτός/σκότους (3).

ρυθμοί δεν είναι ελεύθερης λειτουργίας, αλλά συγχρονίζονται από το περιβάλλον με την εναρμόνιση.

Επιπλέον, αν και οι ρυθμοί διατηρούνται σε σταθερές συνθήκες, η FRP μπορεί να αποκλίνει ελαφρά σε μεταβαλλόμενες εντάσεις φωτός. Έτσι, οι ημερόβιοι οργανισμοί εμφανίζουν μια ελαφρώς μικρότερη FRP (πιο γρήγορο ρολόι) σε υψηλότερες εντάσεις φωτός από ότι σε χαμηλό φως, ενώ οι νυκτόβιοι δείχνουν την αντίστροφη απόκριση με μεγαλύτερη FRP (πιο αργό ρολόι) σε έντονο παρά σε αμυδρό φωτισμό. Το φαινόμενο είναι γνωστό ως «κανόνας του Aschoff» (3).

Οι λόγοι για τους οποίους είναι απαραίτητος ο μηχανισμός χρονομέτρησης, ενώ ο οργανισμός μπορεί να αισθάνεται τις αλλαγές στο περιβάλλον και έχει την ικανότητα να αντιδρά γρήγορα στις διάφορες ανάγκες που προκύπτουν κάθε μέρα ή/και ανάλογα την εποχή, είναι πολλοί. Αρχικά, η φύση μπορεί να μην είναι τόσο προβλέψιμη όσο θα ήταν επιθυμητό και δεν προειδοποιεί πάντοτε χρονικά ώστε να καθοδηγείται η συμπεριφορά των οργανισμών. Βέβαια, ακόμη και σε καταστάσεις όπου οι περισσότερες περιβαλλοντικές μεταβλητές είναι πρακτικά σταθερές, όπως στους δύο πόλους της γης, φαίνεται πως ορισμένες διαδικασίες ακολουθούν τους κιρκάδιους ρυθμούς. Για παράδειγμα, η διαδικασία της αναζήτησης τροφής των πιγκουίνων Τσίνστραπ στις νότιες νήσους Σέτλαντ στην Ανταρκτική έχει ημερήσιο ρυθμό ακόμη και σε συνθήκες συνεχούς ημέρας και σταθερής θερμοκρασίας. Επιπλέον, το κιρκάδιο ρολόι δεν ακολουθεί τυφλά τις αλλαγές του περιβάλλοντος αποκρινόμενο παθητικά, καθώς σε αυτή την περίπτωση δεν θα προσέφερε δυνατότητες πρόβλεψης στον οργανισμό· έχει το πλεονέκτημα να αναμένει τις προβλέψιμες αλλαγές, επιτρέποντας στον οργανισμό να προετοιμάζεται σε μελλοντικές προκλήσεις με το βέλτιστο τρόπο (4).

Το κιρκάδιο ρολόι αντιπροσωπεύει μια εξελικτικά συντηρημένη προσαρμογή στο περιβάλλον που μπορεί να ανιχνευθεί ακόμη και στις πρώτες μορφές ζωής. Στα ζώα, η κιρκάδια συμπεριφορά μπορεί να αναλυθεί ως ένα σύστημα του οργανισμού, ξεκινώντας από τα γονίδια έως τα τελικά αποτελέσματα (outputs) στη συμπεριφορά (6). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το βασικό εξωτερικό ερέθισμα ή χρονοδότης (zeitgeber ή time giver) του ρολογιού είναι το φως του ήλιου και η εναλλαγή ημέρας/νύχτας, αλλά υπάρχουν και άλλοι εξίσου σημαντικοί χρονοδότες όπως η θερμοκρασία του περιβάλλοντος και η πρόσληψη τροφής, μεταξύ άλλων (1). Εξελικτικά, η εναρμόνιση του κιρκάδιου ρυθμού από το ηλιακό φως εξηγείται από την υπόθεση «αποφυγής του φωτός» όπου ένας αρχαίος υδρόβιος οργανισμός ανέπτυξε έναν αισθητήρα αντίληψης του μπλε φωτός, το οποίο διεισδύει πιο βαθιά στο νερό, ώστε να συγχρονίσει τις κινήσεις του προς και από την επιφάνεια του ωκεανού για να μεγιστοποιήσει την διαθεσιμότητα θρεπτικών και να ελαχιστοποιήσει την έκθεσή του στις βλαβερές συνέπειες της υπερϊώδους

ακτινοβολίας του ηλιακού φωτός. Είναι γνωστό πως ο τελευταίος κοινός πρόγονος της σημερινής οικογένειας φωτολυασών/cryptochromes ήταν ο αισθητήρας κυανού φωτός που καθοδηγούσε την ημερήσια κάθετη κίνηση (diel vertical migration) (7). Οι μοριακοί μηχανισμοί του ρολογιού δεν είναι ρυθμικοί σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα γεγονός που υποδεικνύει πως το κερκάδιο ρολόι δεν είναι λειτουργικό κατά την πρώιμη ανάπτυξη. Η έναρξη της λειτουργίας του κερκάδιου ρυθμού στον εγκέφαλο συμβαίνει ακριβώς πριν τη γέννηση και ακολουθείται από ρυθμούς που εμφανίζονται στους περιφερικούς ιστούς (8).

Η πρώτη καταγεγραμμένη περιγραφή περιοδικής συμπεριφοράς αφορά στο άνοιγμα και κλείσιμο των φύλλων του δένδρου οξυφοίνικα (ή ταμάρινδος, *Tamarindus indica*) κατά την ημέρα και την νύχτα, αντίστοιχα, και περιγράφηκε από τον Ανδροσθένη τον Θάσιο, έναν από τους ναυάρχους του Μ. Αλεξάνδρου στο σύγγραμμά του *Ὁ τῆς Ἰνδικῆς παραπλοῦς*. Ο Carl von Linné (1707-1778) γνωρίζοντας ότι συγκεκριμένα λουλουδία ανοίγουν σε διαφορετικές ώρες της ημέρας κατασκεύασε ένα «ρολόι λουλουδιών» ώστε να χρησιμοποιείται για ακριβείς μετρήσεις του χρόνου (9). Το 1729 ο Γάλλος αστρονόμος Jean-Jacques d'Ortous de Mairan ανέφερε πως η κίνηση των φύλλων του φυτού *Mimosa* ως απόκριση στο φως του ήλιου διατηρείται και όταν το φυτό τοποθετηθεί σε χώρο που δεν έχει φως κατά την διάρκεια της ημέρας.

Ο Jagadish Chandra Bose (1858-1937) μελέτησε τις ημερήσιες κινήσεις των φύλλων των φυτών και ανακάλυψε την εναρμόνιση (entrainment) των κινήσεων σε εναλλαγές φωτός/σκότους και παρατήρησε τις περιόδους ελεύθερης λειτουργίας σε συνεχές φως και συνεχές (Bose 1919) (10). Το 1930, ο Γερμανός βιολόγος Erwin Bünning περιέγραψε πως η κίνηση των φύλλων του φυτού της φασολιάς έχει περίοδο 24,4 και όχι 24 ώρες εάν το φυτό βρίσκεται σε συνθήκες συνεχούς φωτός και πως αυτό το χαρακτηριστικό είναι κληρονομήσιμο, καθορίζοντας πως ο φωτοπεριοδισμός στα φυτά ελέγχεται από ένα ενδογενές ρολόι που συγχρονίζεται από εξωτερικά ερεθίσματα (11). Οι μελέτες του Gustav Kramer μετέφεραν τις μελέτες από τα φυτά στα ζώα, δείχνοντας πως τα αποδημητικά πουλιά χρησιμοποιούν τα βιολογικά τους ρολόγια για να προσανατολιστούν στον χρόνο και τον χώρο· η μετάθεση του κύκλου φωτός/σκότους κατά 6 ώρες προκαλούσε στα πουλιά να κάνουν σφάλμα κατά 90° στην κατεύθυνση που ξεκινούσαν την πτήση τους (12).

Ο εύγλωττος όρος κερκάδιος, *circadian*², επινοήθηκε από τον Franz Halberg το 1959 από τις λατινικές λέξεις *circa* = περίπου και *dies* = ημέρα, για να τονισθεί ότι οι ρυθμοί είναι πράγματι ενδογενείς, δηλαδή έχουν περίοδο περίπου 24 ωρών και διατηρούνται απουσία οποιουδήποτε εξωτερικού ερεθίσματος (13). Ήδη, από το 1930 οι Bünning και

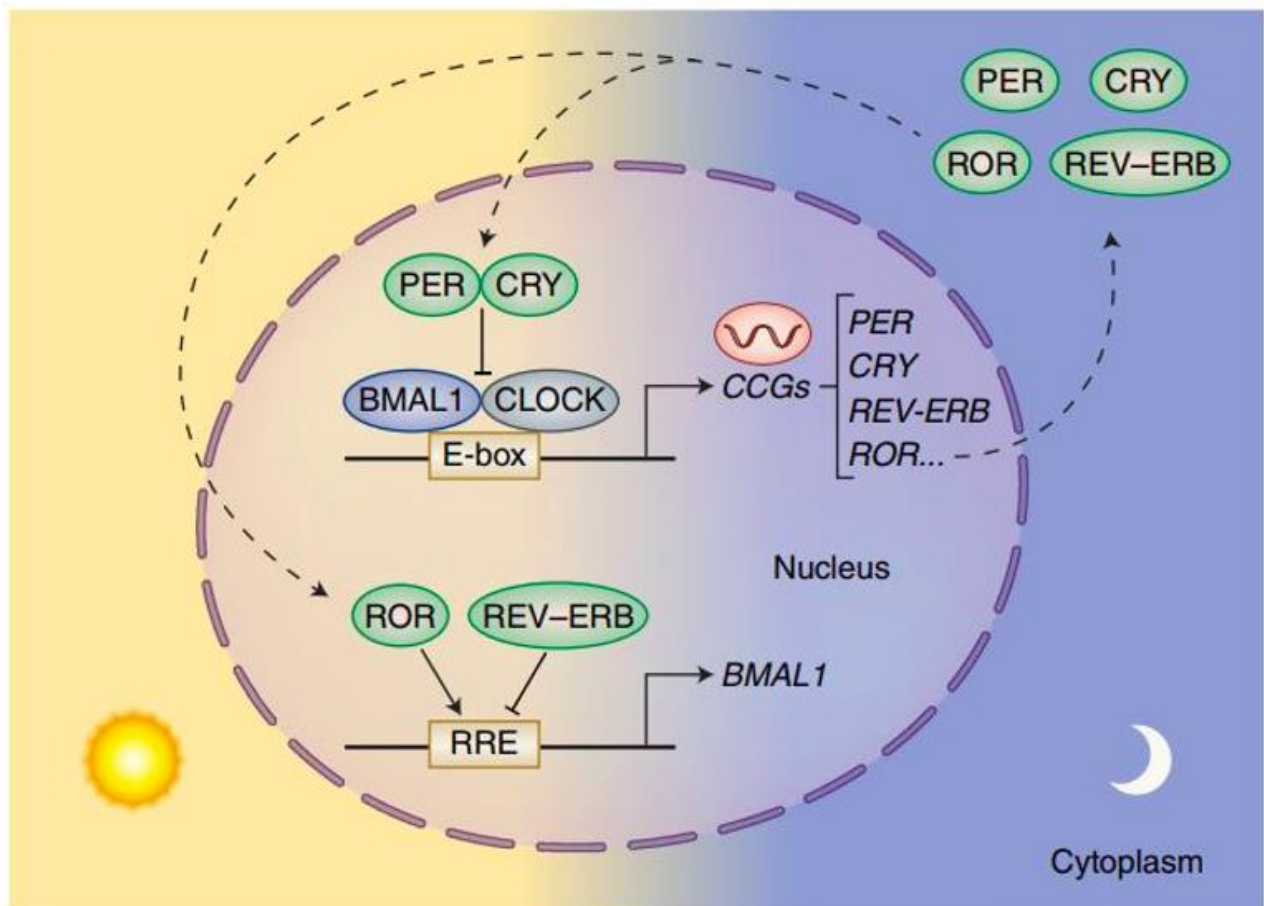
² Ας σημειωθεί πως μέχρι την διατύπωση του όρου *circadian* χρησιμοποιούταν διάφοροι όροι για τους καθημερινούς ρυθμούς. Έτσι, οι Άγγλοι αναφερόταν σε ρυθμούς *diurnal*, οι Αμερικανοί σε *daily* (καθημερινά), οι Γερμανοί (πιο εύστοχα) *endodürnal*, και οι Καναδοί *diel*. Οι ίδιοι οι ρυθμοί ονομάζονταν κύκλοι, περίοδοι και περιοδικότητες.

Stern τόνισαν ότι οι περίοδοι των ρυθμών υπό σταθερές συνθήκες αποκλίνουν από τις 24 ώρες δικαιολογώντας έτσι τη χρήση του όρου κικκάδιος. Έτσι, ένας ρυθμός λογίζεται ως «κικκάδιος» όταν η ταλάντωση έχει περίοδο περίπου 24 h και διατηρείται σε σταθερές συνθήκες, όπως σε σταθερό φως (συνήθως αναφέρεται ως LL) ή σταθερό σκοτάδι (DD) (10).

Το 1971 ήταν μια χρονιά-σταθμός στην χρονοβιολογία. Οι Seymour Benzer και Ronald Konopka στο California Institute of Technology εκθέσανε μύγες σε μεθυλσουλφονικό αιθύλιο ώστε να προκαλέσουν βλάβες στο DNA. Παρατήρησαν πως οι μεταλλαγμένες μύγες συμπεριφέρονταν με τελείως διαφορετικές περιόδους 19 ή 28 ωρών ή χωρίς να αποκρίνονται σε κύκλους φωτός/σκότους. Το εντυπωσιακό εύρημα ήταν πως για τις αλλαγές αυτές ευθύνονταν ένα γονίδιο στο χρωμάτωμα X και το ονόμασαν *period* (*per*) (13). Έτσι, για πρώτη φορά συνδέθηκε η συμπεριφορά με ένα γονίδιο παρά με τα φυσικά χαρακτηριστικά του οργανισμού. Εντούτοις, η εργασία αυτή που άλλαξε όλο το πεδίο έλαβε μόλις 9 αναφορές την επόμενη δεκαετία. Ήταν η ανάπτυξη τεχνολογιών όπως του ανασυνδυασμένου DNA και της αλληλούχησης DNA που άρχισαν να αναδεικνύουν το ρόλο του *per* και της πρωτεΐνης PER στο κικκάδιο σύστημα.

Έτσι, το 1984 έγινε η ταυτοποίηση του *per* στη *Drosophila* από τους Jeffrey C. Hall και Michael Rosbash στο Πανεπιστήμιο Brandeis και ανεξάρτητα από τον Michael W. Young στο Πανεπιστήμιο Rockefeller, χωρίς αυτό να αποκαλύπτει αυτομάτως και το μοριακό μηχανισμό του ρολογιού. Το 1990 ανακοινώθηκε πως η PER εμπλέκεται σε έναν μηχανισμό ανατροφοδότησης που ρυθμίζεται από τις ταλαντώσεις του ίδιου του mRNA. Περαιτέρω έρευνα έδειξε πως ο μοριακός μηχανισμός του ρολογιού εξαρτάται από μεταγραφικούς ενεργοποιητές ή καταστολείς που ρυθμίζουν τη σταθερότητα και την πυρηνική μετατόπιση των κικκάδιων πρωτεϊνών δημιουργώντας δύο αλληλένδετες θηλιές ανατροφοδότησης με περίοδο διάρκειας 24ωρών. Ο ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας CLOCK/BMAL1 προσδένεται στις αλληλουχίες E-box των υποκινητών των γονιδίων στόχων του, μεταξύ άλλων και των γονιδίων CRY, PER και REV-ERBa, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή τους στην αρχή της ημέρας. Μετά τη μεταγραφή και μετάφραση ο REV-ERBa εισέρχεται στον πυρήνα και καταστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων BMAL1 και CRY. Μέσα στην ημέρα, συσσωρεύονται οι πρωτεΐνες PER και CRY στο κυτταρόπλασμα, οδηγώντας στο σχηματισμό συμπλόκων PER/CRY, τα οποία εισέρχονται στον πυρήνα κατά την έναρξη της νύκτας. Το σύμπλοκο αυτό διαταράσσει το μεταγραφικό σύμπλοκο που σχετίζεται με το CLOCK/BMAL1 οδηγώντας στην αναστολή της μεταγραφής των CRY, PER και REV-ERBa και άρση της αναστολής της μεταγραφής του BMAL1 (1, 14, 15) (Εικόνα 1). Οι θηλιές θετικής και αρνητικής ανατροφοδότησης που αλληλεπιδρούν διατηρούν χαμηλά τα επίπεδα των PER και CRY και υψηλά επίπεδα για τον

BMAL1 κατά την έναρξη της νέας ημέρας (14). Η πρωτεΐνη PER φωσφορυλιώνεται από την κινάση CKIε αποσταθεροποιώντας και οδηγώντας την προς αποικοδόμηση μέσω ουβικιτινίωσης (14). Οι ερευνητές έχουν εντοπίσει αρκετά ακόμη γονίδια που πιθανόν διαδραματίζουν επιπρόσθετους ρόλους στο κιρκάδιο ρολόι, όπως η θηλιά ανατροφοδότησης που περιλαμβάνει το REV-ERBa (6) που περιγράφεται παραπάνω. Το 2017 οι Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash και Michael W. Young, τιμήθηκαν με το βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας ή Ιατρικής για τη συνεισφορά τους στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν τον κιρκάδιο ρυθμό (2).



Εικόνα 1. Τα συστατικά του μοριακού μηχανισμού του κιρκάδιου ρυθμού των θηλαστικών. E-box: enhancer box, αλληλουχία στον υποκινητή γονιδίων στόχων. RRE: retinoic acid response elements, αλληλουχία στον υποκινητή γονιδίων στόχων. CCGs: clock controlled genes, γονίδια των οποίων η μεταγραφή εξαρτάται άμεσα από τη δράση των βασικών μεταγραφικών παραγόντων του κιρκάδιου ρολογιού (15).

Περιφερικά ρολόγια

Οι πρώτες εργασίες για τους ρυθμούς χρησιμοποιούσαν τη ρυθμική συμπεριφορά του οργανισμού (π.χ. *Drosophila melanogaster*) ως ένδειξη της εύρυθμης λειτουργίας του

ρολογιού. Ο υπερχιασματικός πυρήνας³ στον υποθάλαμο των θηλαστικών αναγνωρίστηκε ως ο κεντρικός ταλαντωτής που οδηγεί τους ρυθμούς συμπεριφοράς, αποκαλύπτοντας πως συγχρονίζει τις διεργασίες σε όλο τον οργανισμό. Τα περισσότερα περιφερικά όργανα εκδηλώνουν κιρκάδιες ταλαντώσεις αυτόνομα, αλλά εξακολουθούν να λαμβάνουν, ή και να είναι απαραίτητο να προσλαμβάνουν, σήματα από τον υπερχιασματικό πυρήνα *in vivo* (6).

Το αυτόνομο ρολόι βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα και τους ιστούς του σώματος και είναι γνωστό πως οι ταλαντωτές που βρίσκονται μέσα σε κάθε κύτταρο αποκρίνονται διαφορετικά στα σήματα εναρμόνισης, ελέγχουν διαφορετικά αποτελέσματα της φυσιολογίας αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους και σαν σύστημα συνολικά, ενώ έχουν χαρακτηριστεί και οι μηχανισμοί με τους οποίους τα κιρκάδια ρολόγια διέπουν τις βιολογικές διεργασίες, αλλά και ρυθμίζονται από αυτές, π.χ. το παράδειγμα της στενής και αμοιβαίας αλληλεπίδρασης μεταξύ του κιρκάδιου ρολογιού και των βασικών μεταβολικών οδών, της αποτοξίνωσης ξενοβιοτικών, της ομοιόστασης της γλυκόζης και της λιπογένεσης (6).

Τα γονίδια του ρολογιού εκδηλώνουν ρυθμική έκφραση, ενώ έχει παρατηρηθεί και ρυθμική πρωτεϊνοσύνθεση σε κύτταρα και ιστούς σε όλο το σώμα των θηλαστικών. Επίσης, έχει παρατηρηθεί πως αυτοί οι ρυθμοί συνεχίζουν και στην καλλιέργεια (*ex vivo*), αναδεικνύοντας πως οι ενδογενείς ταλαντωτές βρίσκονται και εκτός των κυττάρων του υπερχιασματικού πυρήνα (6, 16). Παρότι ο κεντρικός μηχανισμός του ρολογιού είναι συντηρημένος, υπάρχουν διαφορές στη σχετική συνεισφορά των μεμονωμένων συστατικών του ρολογιού αλλά και στον τρόπο με τον οποίο αυτά τα ρολόγια επαναρυθμίζονται (*reset*) καθώς και ποιες αποκρίσεις (*outputs*) ελέγχουν (6). Αυτά τα ενδογενή κυτταρικά ρολόγια κατευθύνουν τους ρυθμούς της γονιδιακής έκφρασης, με το ~15% των mRNA σταθεροποιημένης κατάστασης σε κάθε ιστό να ακολουθεί κιρκάδιους ρυθμούς (1, 17). Αξίζει να σημειωθεί πως σε μεγάλο βαθμό δεν υπάρχει χρονική επικάλυψη στα γονίδια των οποίων η έκφραση ελέγχεται από το κιρκάδιο ρολόι σε κάθε ιστό, αντανακλώντας την ανάγκη για χρονικό έλεγχο της κυτταρικής φυσιολογίας του κάθε κυτταρικού τύπου (6).

Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο κιρκάδιο ρολόι

Η ρύθμιση της μεταγραφής οδηγεί στην επίτευξη και διατήρηση της 24ωρης

³ Ο υπερχιασματικός πυρήνας (*suprachiasmatic nucleus, SCN*) είναι μια περιοχή του εγκεφάλου στον υποθάλαμο, ακριβώς πάνω από το οπτικό χίασμα και ελέγχει τους κιρκάδιους ρυθμούς, κυρίως μέσω των ορμονών που εκκρίνει περιοδικά σε έναν κύκλο περίπου 24 ωρών. Ο SCN του ποντικίου αποτελείται από περίπου 20.000 νευρώνες. Ο SCN συντονίζει τους ρυθμούς του ύπνου, της φυσικής δραστηριότητας, της εγρήγορσης, των επιπέδων ορμονών, της θερμοκρασίας του σώματος, της ανοσοποιητικής λειτουργίας και της πεπτικής δραστηριότητας σε ολόκληρο το σώμα, ενώ οι ρυμοί χάνονται αν καταστραφεί ο SCN. Είναι ο SCN που διατηρεί τον έλεγχο σε όλο το σώμα συγχρονίζοντας τους περιφερειακούς ταλαντωτές, οι οποίοι με τη σειρά τους, εμφανίζουν τους δικούς τους ρυθμούς ~24 ωρών και ελέγχουν τα κιρκάδικα συμπεριφορά ιστών και οργάνων.

ρυθμικότητας από το ρολόι (1). Η έναρξη της μεταγραφής ελέγχεται από το κικκάδιο ρολόι και συνεισφέρει στην παραγωγή των ρυθμών, όπως φαίνεται και από τη λειτουργία των βασικών βρόχων αρνητικής ανατροφοδότησης του κεντρικού μοριακού μηχανισμού του ρολογιού (18). Παρόλα αυτά, η ρυθμική μεταγραφή δεν είναι ο μόνος τρόπος ρύθμισης του κικκάδιου ρυθμού καθώς έχει δειχθεί πως μόλις το 28.4% των ρυθμικών μορίων mRNA προκύπτουν από τη ρυθμική μεταγραφή (19, 20), ενώ το 50% των κικκάδια ταλαντούμενων πρωτεϊνών προέρχεται από μη ρυθμικά mRNA (19-21). Επιπλέον, έχουν περιγραφεί μετάγραφα που εκδηλώνουν ρυθμικά επίπεδα να μην εμφανίζουν έντονη ταλάντωση σε επίπεδο πρώιμου ή αρτιγενούς mRNA (20). Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν πως οι συμμεταγραφικές και μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις συμβάλλουν τα μέγιστα στη ρύθμιση του κικκάδιου ρυθμού, και παρότι η ρυθμική μεταγραφή μπορεί να επηρεάζει περίπου το 30% των γονιδίων με ρυθμική έκφραση, τα μετα-μεταγραφικά γεγονότα μπορεί να επηρεάζουν τη ρυθμικότητα ~70% των εκφραζόμενων mRNA (20). Φαίνεται πως οι διαδικασίες της μεταγραφής, της επεξεργασίας και της εξαγωγής των mRNA από τον πυρήνα έχουν εξελιχθεί μαζί ώστε να επιτρέπεται η χωροχρονική σύμπτωση των αντιδράσεων που εκτελούνται κατά τα στάδια αυτά. Η σύνδεση των αντιδράσεων στο χώρο πραγματοποιείται μέσω των μηχανισμών προσέλκυσης που τοποθετούν τους παράγοντες επεξεργασίας του RNA στο σωστό σημείο ώστε να δράσουν στο αρτιγενές μετάγραφο. Η χρονική σύνδεση επιτυγχάνεται με το συντονισμό των ρυθμών της επιμήκυνσης και της επεξεργασίας του μεταγράφου (1).

Συμμεταγραφικές τροποποιήσεις

Η μεταγραφή είναι ταυτόχρονη και μηχανιστικά συνδεδεμένη με την επεξεργασία των πρόδρομων mRNA (pre-mRNA) (**Εικόνα 2**). Η επεξεργασία των mRNA ξεκινά αμέσως μετά τη μεταγραφή και μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία πολλαπλών mRNA από ένα αρχικό μετάγραφο λόγω του εναλλακτικού ματίσματος ή/και της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης. Στις συμμεταγραφικές τροποποιήσεις του mRNA συμπεριλαμβάνεται η προσθήκη της δομής της καλύπτρας στο 5' άκρο του mRNA, το μάτισμα, η επεξεργασία του 3' άκρου, κ.α.. Η καλύπτρα έχει προστατευτικό ρόλο από εξωνουκλεολυτική διάσπαση, προσελκύει πρωτεϊνικούς παράγοντες που μεσολαβούν το μάτισμα, την πολυαδενυλίωση και την εξαγωγή από τον πυρήνα. Το μάτισμα είναι η διαδικασία απομάκρυνσης των ιντρονίων από τα πρόδρομα μετάγραφα και η συναρμογή των εξονίων. Το εναλλακτικό μάτισμα είναι η συναρμογή παραλείποντας εξόνια μεταξύ ιντρονίων ή παραλείποντας ιντρόνια και προσφέρει ένα ισχυρό μέσο διαφοροποίησης της γονιδιακής έκφρασης (1).

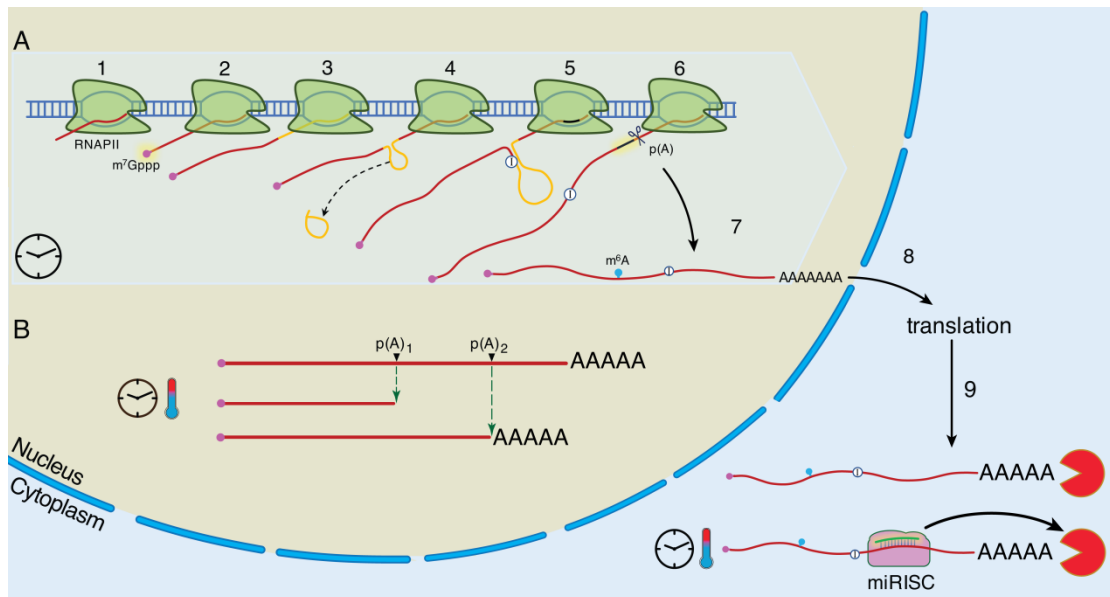
Ο μηχανισμός επεξεργασίας του 3' άκρου αποτελείται από ~85 πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων και παραγόντων που μεσολαβούν την αλληλεπίδραση με άλλες διαδικασίες, όπως το μάτισμα. Η επεξεργασία του 3' άκρου περιλαμβάνει την προσθήκη

της ουράς πολυ(A), η οποία πραγματοποιείται σε δύο τμήματα· την τμήση του πρόδρομου mRNA και την προσθήκη της ουράς. Η αναγνώριση του σήματος πολυαδενυλίωσης και η αντίδραση της πολυαδενυλίωσης προηγούνται του τερματισμού της μεταγραφής. Στην ουρά πολυ(A) προσδένεται η πυρηνική πρωτεΐνη που προσδένεται στο πολυ(A) [poly(A)-Binding Protein, PABPN1] η οποία είναι πολύ σημαντική για τον πολυμερισμό της ουράς. Αξίζει να σημειωθεί πως ομοίως με το εναλλακτικό μάτισμα, έχει περιγραφεί και η εναλλακτική πολυαδενυλίωση η οποία εξαρτάται από την ύπαρξη πολλαπλών σημάτων πολυαδενυλίωσης αυξάνοντας την ποικιλομορφία του μεταγραφώματος (1).

Μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις

Μετά τη μεταγραφή τα mRNA συνήθως μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα, όπου είτε ξεκινά κατευθείαν η διαδικασία της μετάφρασης, είτε της αποικοδόμησής τους. Πιο συγκεκριμένα, τα mRNA μεταφράζονται αμέσως ή αλληλεπιδρούν με παράγοντες που τα μεταφέρουν σε κάποιο συγκεκριμένο κυτταρικό διαμέρισμα για να μεταφραστούν. Εναλλακτικά, ξεκινά η αποικοδόμηση των mRNA με τη βράχυνση της ουράς πολυ(A) ή τη μετακίνηση τους σε κυτταροπλασματικά συστατικά όπως τα σωμάτια επεξεργασίας (processing bodies, p-bodies) ή τα κοκκία στρες (stress granules) για αποθήκευση και εκ νέου πολυαδενυλίωση ή αποικοδόμηση. Οι ρυθμοί της κερκάδιας αποικοδόμησης των mRNA σχετίζονται με το μήκος των ουρών πολυ(A) υποδηλώνοντας πως πρέπει να πραγματοποιούνται ρυθμιστικά μεταμεταγραφικά γεγονότα ώστε να υπάρχουν ρυθμικά επίπεδα mRNA σε σταθερή κατάσταση (1).

Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται και τα miRNA. Έχει δειχθεί πως το 30% των mRNA των θηλαστικών ελέγχονται από τα miRNA (22), και πως ρυθμίζουν την κερκάδια ρυθμικότητα διαφόρων mRNA και πρωτεϊνών (18). Πολλά miRNA εμφανίζουν και τα ίδια κερκάδια έκφραση ενισχύοντας τη σημασία του ρόλου τους στην κερκάδια γονιδιακή έκφραση (18, 22, 23). Τα miRNA έχουν μήκος ~22nt και αναγνωρίζουν τους στόχους τους μέσω μερικής συμπληρωματικότητας στη μη μεταφραζόμενη περιοχή του 3' άκρου (3'UTR) του mRNA στόχου. Το 5' τμήμα του miRNA αλληλεπιδρά με απόλυτη συμπληρωματικότητα με μια περιοχή 6-8 nt στο 3'UTR του mRNA στόχου (seed region) ενώ το υπόλοιπο μόριο μπορεί να αλληλεπιδράσει με το στόχο μέσω μερικής συμπληρωματικότητας (22, 24). Ένα μόριο miRNA μπορεί να έχει πολλούς στόχους, ρυθμίζοντας ταυτόχρονα μεγάλο αριθμό στόχων, καθώς επίσης και ένα mRNA στόχος μπορεί να φέρει στην 3'UTR θέσεις αναγνώρισης για πολλά διαφορετικά miRNA, αυξάνοντας την πολυπλοκότητα των βιολογικών αποκρίσεων αλλά και την εξειδίκευσή τους. Η αλληλεπίδραση του miRNA με το mRNA στόχο προσελκύει απαδενυλάσες σε αυτό, οδηγώντας σε αποσταθεροποίηση του και ταυτόχρονα καταστέλλει τη μετάφρασή του (24) (Εικόνα 2, βήμα 9).



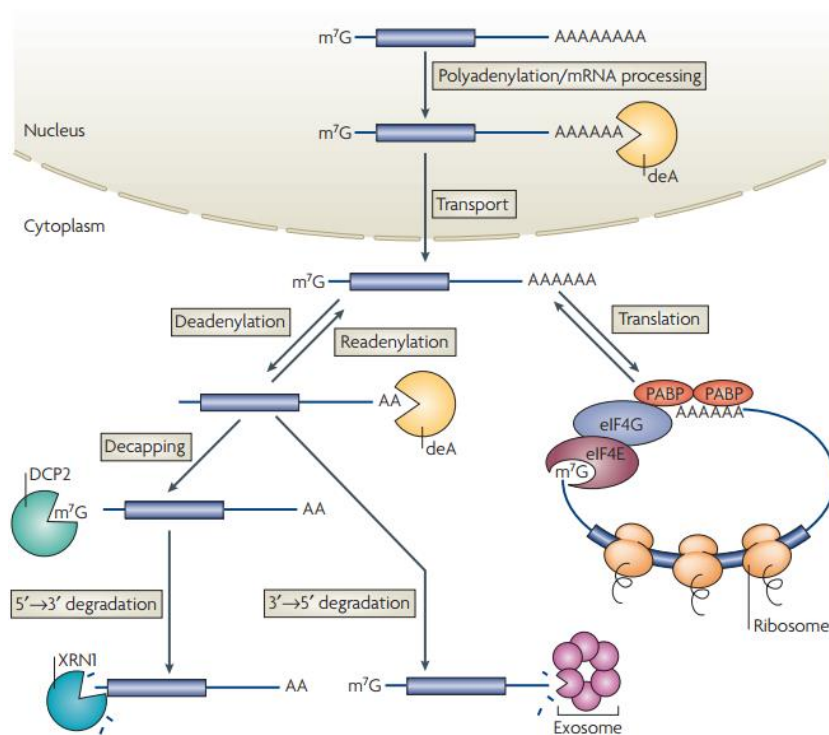
Εικόνα 2. Συμμεταγραφικές και μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις του RNA. Α. Τροποποιήσεις του mRNA. Η πολυμεράση II του RNA (RNAP II) μεταγράφει το DNA (1) και προστίθεται η καλύπτρα (m^7Gppp) στο αρτιγενές μετάγραφο (κόκκινο χρώμα) (2). Το πρώτο ιντρόνιο (πορτοκαλί χρώμα) μεταγράφεται και μέσω του ματίσματος (3) ενώνονται τα δυο εξόνια απελευθερώνοντας το ιντρόνιο ως θηλιά (4). Πραγματοποιείται η επεξεργασία (5) και μετά τη μεταγραφή της αλληλουχίας AAUAAA (μαύρο χρώμα) φαίνεται η τμήση στο σήμα πολυαδενυλίωσης ($p(A)$) (ψαλίδι) (6). Οι τροποποιήσεις του μεταγράφου (7) εμφανίζονται ως μπλε κουκκίδια που αντιπροσωπεύει τη μεθυλίωση της αδερίνης και ως I σε λευκό κύκλο που αντιπροσωπεύει την απαμίνωση της αδενοσίνης. Το ώριμο μετάγραφο εξέρχεται από τον πυρήνα (8) και μεταφράζεται στο κυτταρόπλασμα. Η κόκκινη *rascan* αντιπροσωπεύει τα ένζυμα αποικοδόμησης της ουράς πολυ(A) οδηγώντας στην αποικοδόμηση του mRNA (9). Η διαδικασία της αποικοδόμησης της ουράς θα μπορούσε να μεσολαβείται και από τον υβριδισμό των miRNA και την πρόσδεση του miRISC στο μετάγραφο. Β. Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση. Η επιλογή μεταξύ του σημείου πολυαδενυλίωσης 1 ή 2 [$p(A)_1$ or $p(A)_2$] οδηγεί σε διαφορετικά μετάγραφα. Τα ρολόγια ή θερμομέτρα υποδεικνύουν πως αυτά τα βήματα υπόκεινται σε αλλαγές από το κιρκάδιο ρολόι και τη θερμοκρασία, αντίστοιχα. Η εικόνα προσαρμόστηκε από Beta and Balatsos, 2018 (1).

Η ουρά πολυ(A) στο κιρκάδιο ρολόι

Η συγκέντρωση των mRNA, σε σταθεροποιημένη κατάσταση, βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ σύνθεσης και αποικοδόμησης (25, 26). Αυτή η ισορροπία εξαρτάται από το μήκος της ουράς πολυ(A) η οποία επίσης είναι σε ισορροπία μεταξύ επιμήκυνσης και βράχυνσης καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του mRNA, παρότι παραδοσιακά θεωρείτο πως το μήκος της ουράς πολυ(A) ρυθμίζεται προς τη μια μόνο κατεύθυνση, αυτή της αποικοδόμησης (1, 21) (Εικόνα 3). Επιπλέον, έχει δειχθεί πως τα mRNA με πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης φέρουν πολύ κοντές ουρές πολυ(A) (<70 αδενοσίνες), ενώ τα μη κωδικά RNA έχουν ουρές μεγαλύτερου μήκους (27). Η ρύθμιση του μήκους της ουράς πολυ(A) διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε κάποιες βιολογικές διεργασίες όπως η ωρίμανση των ωκυττάρων, η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου, η κυτταρική γήρανση και η συναπτική πλαστικότητα (28-30). Αυτού του είδους η ρύθμιση επιτρέπει στα κύτταρα να μεταβάλλουν τις μεταβολικές πορείες τάχιστα χωρίς να απαιτείται *de novo* σύνθεση νέων μεταγράφων (21). Παρόλα αυτά, όσο σημαντικό στοιχείο της σταθερότητας και της διάρκειας ζωής των mRNA είναι η παρουσία της ουράς πολυ(A), εξίσου σημαντική είναι και η απομάκρυνσή της. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται απαδενυλίωση και είναι το πρώτο

και καθοριστικό βήμα της αποικοδόμησης των mRNA (31). Αντίθετα, η επιμήκυνση της ουράς συμβαίνει με την κυτταροπλασματική πολυαδενυλίωση από την κυτταροπλασματική πολυ(A) πολυμεράση, GLD2, ενεργοποιώντας τη μετάφραση (32).

Φαίνεται πως η ρύθμιση του μήκους της ουράς πολυ(A) συμμετέχει στον έλεγχο της κερκάδιας γονιδιακής έκφρασης. Οι ρυθμικές αλλαγές στο μήκος της ουράς πολυ(A) βρίσκονται από τον έλεγχο του κερκάδιου ρολογιού τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, οι ρυθμικές αυτές αλλαγές συσχετίζονται έντονα και με την ρυθμική σύνθεση των πρωτεϊνών ασχέτως των προτύπων έκφρασης και των επιπέδων σταθεροποιημένης κατάστασης των mRNA (21). Επίσης, πολλά συστατικά των μηχανισμών της απαδενυλίωσης και της πολυ(A) πολυμεράσης βρίσκονται στον έλεγχο του κερκάδιου ρυθμού. Αυτό επιτρέπει στο ρολόι να ρυθμίζει χρονικά τη ρύθμιση της σύνθεσης των πρωτεϊνών ανεξάρτητα από τη μεταγραφή (21).



Εικόνα 3. Μονοπάτια μετάφρασης και αποικοδόμησης. Ο σχηματισμός του 3' άκρου και η προσθήκη της ουράς πολυ(A) είναι απαραίτητα για την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα. Μόλις εξέλθει στο κυτταρόπλασμα, η ουρά πολυ(A) ενισχύει και σταθεροποιεί το mRNA. Οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ουρά πολυ(A) (PABP, eIF4G και eIF4E) αλληλεπιδρούν με την καλύπτρα στο 5' άκρο προωθώντας την έναρξη της μετάφρασης. Με την απομάκρυνση της ουράς πολυ(A) από το mRNA μέσω της δράσης των απαδενυλασών ακολουθεί η αποικοδόμησή του και τη μεταφραστική σίγηση, ενώ η εκ νέου πολυαδενυλίωση ενεργοποιεί κάποια mRNA. Τα πιο κοινά μονοπάτια αποικοδόμηση των mRNA είναι είτε από το 5' άκρο μετά την αφαίρεση της καλύπτρας (ένζυμο DCP2) και την επακόλουθη δράση της εξωριβονουκλεάσης XRN1, είτε από το 3' άκρο όπου η αποικοδόμηση προχωρά από το σύμπλοκο του εξωσώματος (33).

Απαδενυλάσες

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η βράχυνση της πολυ(A) ουράς των mRNA ονομάζεται απαδενυλίωση και καταλύεται από μια οικογένεια ενζύμων εξωριβονουκλεασών, γνωστά ως απαδενυλάσες. Πιο συγκεκριμένα, οι απαδενυλάσες καταλύουν την αντίδραση υδρόλυσης ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού απελευθερώνοντας 5' φωσφορικό μονοεστέρα σε κάθε κύκλο καταλυτικού γεγονότος, με προτίμηση σε υπόστρωμα που αποτελείται από αλληλουχία αδενοσινών [πολυ(A)] (34). Συνεπώς, πρόκειται για ρίνιση της ουράς παρά για αποκοπή, όπως συνήθως εννοείται η βράχυνση.



Σχήμα 1. Η αντίδραση απαδενυλίωσης. Το υπόστρωμα RNA φέρει ουρά πολυ(A) και κάλυμμα στα άκρα 3' και 5', αντίστοιχα. Σε κάθε καταλυτική αντίδραση απελευθερώνεται ένα κατάλοιπο AMP από την ουρά και με την ολοκλήρωση διαδοχικών κύκλων αντιδράσεων αφαιρείται η ουρά. 5'-m⁷G, 7-μεθυλογουανυλικό κάλυμμα στο άκρο 5' ~, 5'- 5' τριφωσφοδιεστερικός σύνδεσμος· R, νουκλεοτίδιο πουρίνης· X_n, το κυρίως σώμα του RNA και X οποιοδήποτε μονοφωσφορικό ριβονουκλεοτίδιο· A, AMP, μονοφωσφορική αδενοσίνη· A_n, ουρά πολυ(A).

Εφόσον η παραπάνω αντίδραση (Σχήμα 1), παρότι εξειδικευμένη, δεν είναι ιδιαίτερα δύσκολη ή σπάνιο να συμβεί, καθώς ουρά πολυ(A) διαθέτουν τα περισσότερα mRNA, θα περίμενε κανείς η οικογένεια των απαδενυλασών να μην απαριθμεί πολλά μέλη. Παρόλα αυτά, υπάρχουν αρκετές απαδενυλάσες σε μεγάλο εύρος οργανισμών, οι οποίες διακρίνονται σε 2 κατηγορίες, τις νουκλεάσες DEDD και EEP (Πίνακας 1). Οι νουκλεάσες DEDD έχουν ονομαστεί από τα συντηρημένα κατάλοιπα D και E στο ενεργό τους κέντρο, ενώ οι νουκλεάσες EEP (exonuclease–endonuclease–phosphatase) διαθέτουν συντηρημένα κατάλοιπα D, E και H στο ενεργό τους κέντρο (33, 35, 36), τα οποία είναι σημαντικά για το συντονισμό των ιόντων Mg και συνεισφέρουν στην τοποθέτηση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (33, 37). Ο μεγάλος αριθμός των απαδενυλασών αλλά και το γεγονός πως η απαλοιφή τους από το κύτταρο επηρεάζει συγκεκριμένους πληθυσμούς mRNA στόχων υποδηλώνει πως κάθε μια απαδενυλάση δρα σε συγκεκριμένους στόχους, αλλά υπάρχει και η πιθανότητα να έχουν αλληλοεπικαλυπτόμενους ρόλους (34).

Πίνακας 1. Οι 2 οικογένειες απαδενυλασών. Κόκκινος σταυρός: τα είδη όπου έχει δείχθει οι πρωτεΐνες να έχουν ενζυμική δραστικότητα επισημαίνονται με, μαύρος σταυρός: τα είδη όπου προβλέπεται να υπάρχει ενζυμική δραστικότητα και με – επισημαίνονται τα είδη στα οποία δεν έχει καθοριστεί η ενζυμική δραστικότητα. Στην οικογένεια νουκλεασών EEP έχουν χαρακτηριστεί μέλη τα οποία διαθέτουν δραστικότητα φωσφατάσης και όχι απαδενυλάσης (χωρίζονται από μαύρη γραμμή). Sc: *S. cerevisiae*, Ce: *C. elegans*, Dm: *D. melanogaster*, Xl: *X. laevis*, Mm: *M. musculus*, Hs: *H.*

sapiens. Προσαρμοσμένο από (33, 38, 39).

		<i>At</i>	<i>Sc</i>	<i>Ce</i>	<i>Dm</i>	<i>Xl</i>	<i>Mm</i>	<i>Hs</i>
DEDD nucleases	CNOT7/POP2	-	+	+	+	+	+	+
	CNOT8	-	-	-	-	+	+	+
	CAF1Z/TOE	-	-	+	-	+	+	+
	PARN	+	-	+	-	+	+	+
	PAN2	-	+	+	+	+	+	+
EFP nucleases	CNOT6/CCR4	-	+	+	+	+	+	+
	CNOT6L	-	-	-	-	-	+	+
	HESPERIN	+	-	-	-	-	-	-
	NOC	-	-	-	+	+	+	+
	PDE2	-	-	+	+	+	+	+
	ANGEL1/2	-	-	-	-	-	+	+

Ρύθμιση της δράσης απαδενυλασών

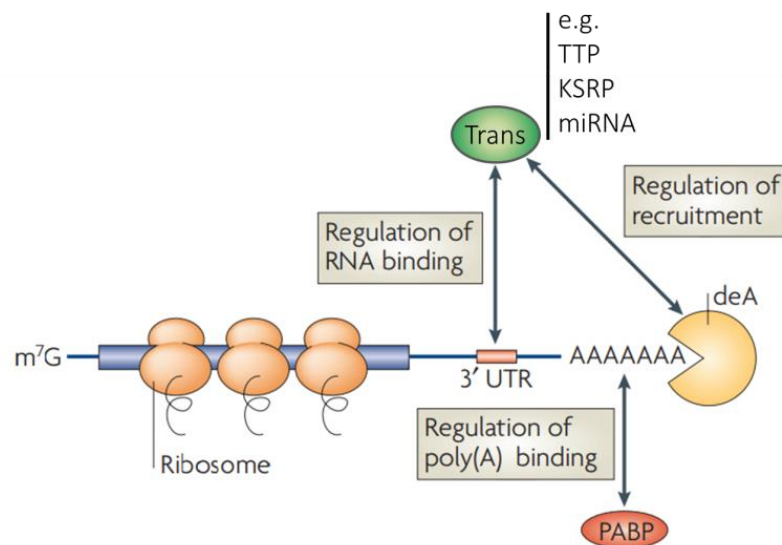
Η διαδικασία της απαδενυλίωσης είναι απαραίτητως ρυθμιζόμενη, καθώς η ανεξέλεγκτη απαδενυλίωση θα προκαλούσε σοβαρά προβλήματα στο κύτταρο με άλλα mRNA να πρέπει να προστατευτούν από την απαδενυλίωση της ουράς τους ώστε να προχωρήσει η μετάφρασή τους ενώ άλλα mRNA που είναι πιο ασταθή ή δεν είναι άλλο απαραίτητα στο κύτταρο να πρέπει να απαδενυλιωθούν για να προχωρήσει η αποικοδόμησή τους (33). Η ρύθμιση της απαδενυλίωσης γίνεται μέσω ρύθμισης των ίδιων των απαδενυλασών. Αυτή η ρύθμιση μπορεί να εστιάζεται στην παρουσία ή απουσία της απαδενυλάσης από κάποιο ιστό ή τη χρονική παρουσία της σε κάποια χρονική στιγμή ανεξαρτήτως ιστοειδικότητας. Για παράδειγμα, η CNOT8, ως μέλος του συμπλόκου CCR4-NOT, διατηρεί σταθερά υψηλά επίπεδα σε μεγάλο εύρος ιστών (33, 40), ενώ η CNOT6L εμφανίζει υψηλά επίπεδα στα ωκύτταρα (40). Όσον αφορά την παρουσία των απαδενυλασών σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία, μέχρι σήμερα η μόνη κirkάδια απαδενυλάση που έχει ταυτοποιηθεί είναι η HESPERIN από το φυτό *Arabidopsis thaliana* (41, 42), ενώ στα θηλαστικά έχει δειχθεί πως η PARN έχει ρυθμικά επίπεδα έκφρασης (21) με την παραγωγή της πρωτεΐνης να ακολουθεί επίσης ρυθμικά επίπεδα (αποτελέσματα δεύτερου και τρίτου μέρους της παρούσας διατριβής). Επιπλέον της ρύθμισης της απαδενυλίωσης μέσω της παρουσίας ή απουσίας των απαδενυλασών, η μετακίνησή τους μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος επίσης συμβάλλει στη ρύθμιση της απαδενυλίωσης (33, 40).

Εκτός από την χωροχρονική παρουσία των απαδενυλασών, η δράση τους ρυθμίζεται και από άλλους παράγοντες όπως τα *cis* δραστικά στοιχεία και *trans* δραστικούς παράγοντες (Εικόνα 4). Πιο συγκεκριμένα, στα *cis* δραστικά στοιχεία ανήκουν η 5' καλύπτρα η οποία έχει δειχθεί πως αυξάνει τη δραστηριότητά της PARN και επηρεάζει

το μηχανισμό κατάλυσης (43) και τα στοιχεία πλούσια σε αδενοσίνες και ουριδίνες (AU) και γουανοσίνες και ουριδίνες (GU), ARE και GRE, αντίστοιχα. Τα ARE και GRE είναι αλληλουχίες στις 3'UTR των mRNA οι οποίες αποτελούνται από επαναλήψεις του πενταμερούς AUUUU/GUUUG (44, 45). Τα ARE είναι καλύτερα μελετημένα, και έχει δειχθεί πως πολλές πρωτεΐνες προσδένονται απευθείας σε αυτά ρυθμίζοντας τη σταθερότητα και τη μεταφραστική ικανότητα του mRNA (45). Οι trans δραστικοί παράγοντες που έχει δειχθεί να ρυθμίζουν τη δράση των απαδενυλασών φαίνονται στον Πίνακα 2. Σημειώνεται πως trans δραστικοί παράγοντες δεν είναι μόνο πρωτεΐνες αλλά και τα miRNA, τα οποία θα συζητηθούν παρακάτω.

Πίνακας 2. Διάφοροι ρυθμιστές της δράσης των απαδενυλασών

Απαδενυλάση	Ρυθμιστής
PARN	CPEB (32), CUGBP (46), KSRP (47), UPF1 (48), PABPN1 (49), TPP (50), CPSF100 (32), CPSF73 (32), miRNA (51)
POP2	TPP(52), Smaug (33)
PAN2-PAN3	PABPC (53), miRNA (54)
CCR4-NOT	PABPC (55), TPP(52), miRNA (54)



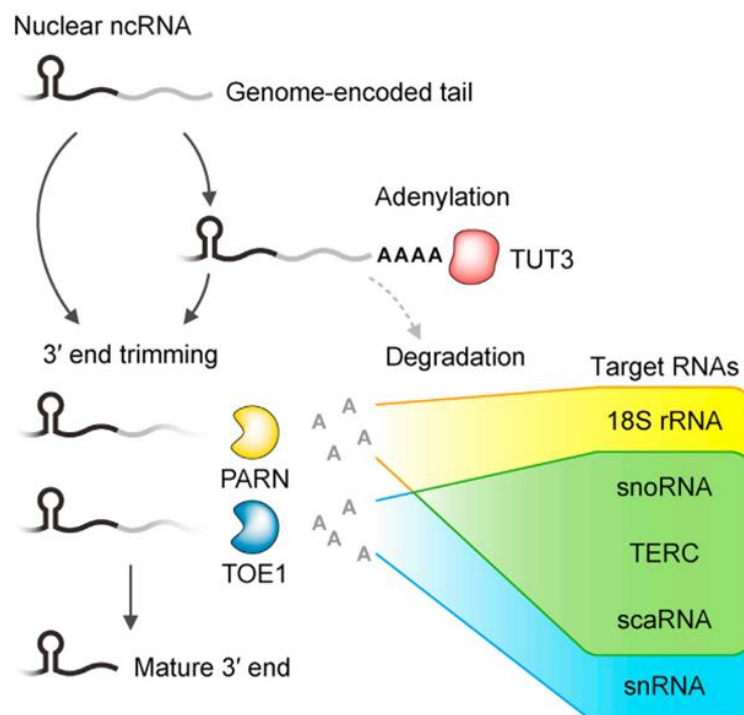
Εικόνα 4. Ρύθμιση της απαδενυλίωσης του mRNA. Οι trans δραστικοί παράγοντες προσδένονται ειδικά την 3'UTR των mRNA και ρυθμίζουν την απαδενυλίωση είτε προσελκύοντας τις απαδενυλάσες είτε αποκλείοντας την πρόσδεση παραγόντων. Η παρουσία της PABP στην ουρά πολυ(A) επίσης καθορίζει την αποτελεσματικότητα της απαδενυλίωσης. Συγκεκριμένα παραδείγματα αναφέρονται στον Πίνακα 2. Τα διπλά βέλη υποδεικνύουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών ή μεταξύ πρωτεϊνών και RNA. Προσαρμοσμένο από (33).

Οι απαδενυλάσες και η επεξεργασία του 3' άκρου

Οι απαδενυλάσες δεν αφαιρούν την ουρά πολυ(A) μόνο για να οδηγήσουν το RNA στόχο προς αποικοδόμηση, αλλά και για συμβάλλουν στην ολοκλήρωση του σχηματισμού

του 3' άκρου τους (Εικόνα 5). Οι απαδενυλάσες PARN και TOE έχει δειχθεί πως στοχεύουν μη κωδικά RNA (ncRNA) και εμπλέκονται στη βιογένεσή τους και το σχηματισμό του 3' άκρου τους. Κατά τη μεταγραφή των ncRNA προστίθενται στο 3' άκρο τους αλληλουχίες οι οποίες στοχεύονται από το σύμπλοκο του εξωσώματος, το οποίο δεν απομακρύνει όλη την αλληλουχία, αλλά δημιουργεί ένα ενδιάμεσο προϊόν της διαδικασίας καθώς αφήνει μια μικρή ουρά στα RNA. Αυτά τα ενδιάμεσα προϊόντα αδενυλιώνονται από μέλη του συμπλόκου TRAMP, το οποίο διαδραματίζει σημαντικούς ρόλους στη διαδικασία επιτήρησης του RNA, σηματοδοτώντας τα προς αποικοδόμηση. Οι PARN και TOE με τη δράση απαδενυλάσης τους προστατεύουν αυτά τα RNA από το σύστημα επιτήρησης. Αξίζει να σημειωθεί πως σε αυτή την περίπτωση γίνεται αποικοδόμηση και πέρα από την ουρά πολυ(A) προς την αλληλουχία που κωδικοποιείται από το γονιδίωμα (56).

Επιπλέον, έχει δειχθεί πως η PARN συμβάλλει στην ωρίμανση του RNA συστατικού της τελομεράσης (TERC) (57, 58). Η ωρίμανση του TERC πραγματοποιείται με παρόμοιο τρόπο όπως περιγράφεται παραπάνω, δηλαδή πραγματοποιείται προσθήκη μιας ουράς μέσω της δράσης του συμπλόκου TRAMP στο 3' άκρο και η απαδενυλάση προστατεύει το μόριο από αποικοδόμηση οδηγώντας στην ωρίμανσή του μέσω της αποικοδόμησης αυτής της ουράς. Τέλος, όπως και στο παράδειγμα των μη κωδικών μορίων που περιγράφεται παραπάνω, έτσι και στην περίπτωση του TERC, συμμετέχουν από κοινού οι απαδενυλάσες PARN και TOE (56) (Εικόνα 5).

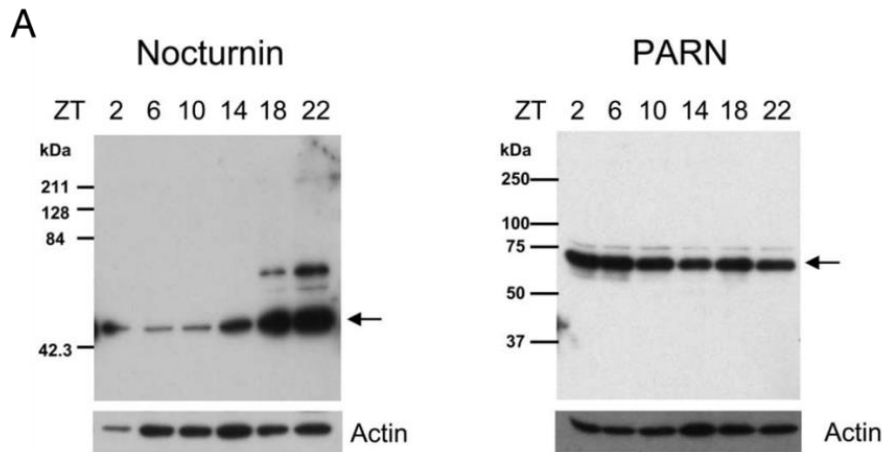


Εικόνα 5. Οι απαδενυλάσες PARN και TOE συμβάλουν στην ωρίμανση των πυρηνικών μικρών μη κωδικών RNA και φαίνεται να έχουν έως ένα βαθμό κοινούς στόχους και από κοινού να είναι απαραίτητοι για τη βιογένεση των scaRNA

Οι απαδενυλάσες στην κirkάδια γονιδιακή έκφραση

Όπως περιγράφηκε και παραπάνω, η κirkάδια γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται από τη μεταγραφή, συνοδευόμενη από τα συμμεταγραφικά και μετα-μεταγραφικά γεγονότα, η οποία καθορίζει τη ρυθμικότητα και την παραγωγή ταλαντώσεων. Εξίσου σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και τα ρυθμιστικά γεγονότα που συνοδεύουν αυτές τις διαδικασίες, με το βασικότερο αυτών να είναι η ρύθμιση των επιπέδων των μορίων RNA που είναι διαθέσιμα στα διάφορα χρονικά σημεία του 24ώρου καθορίζοντας επακόλουθα βήματα και συμβάλλοντας στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η ρύθμιση των επιπέδων ενός RNA μπορεί να μεσολαβείται είτε μέσω της ρύθμισης της παραγωγής του είτε της αποικοδόμησής του. Καθοριστικό βήμα της αποικοδόμησης των ευκαρυωτικών RNA είναι η απομάκρυνση της ουράς πολυ(A) που βρίσκεται στο 3' άκρο τους, καθώς αυτό καθορίζει τη διάρκεια ζωής τους.

Παρότι έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές απαδενυλάσες στα θηλαστικά, καμία δεν έχει δειχθεί πως σχετίζεται με το κirkάδιο ρολόι. Η μόνη κirkάδια απαδενυλάση που έχει ταυτοποιηθεί έως σήμερα είναι η HESPERIN από το φυτό *Arabidopsis thaliana* (41, 42). Η HESPERIN παρότι εμφανίζει έντονη ταλάντωση στο 24ωρο, δεν είναι μέρος του κεντρικού ταλαντωτή στην *A. thaliana*, παρότι επηρεάζει την έκφραση και τη ρυθμικότητα των γονιδίων του κεντρικού ταλαντωτή TOC1 and CCA1. Ωστόσο, κανένα από τα δύο γονίδια δεν αποτελούν άμεσο στόχο της HESPERIN υποδηλώνοντας πως επηρεάζει τον κirkάδιο ρυθμό του φυτού στοχεύοντας άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ακόμη γνωστά (42). Όσον αφορά τα θηλαστικά, η NOCTURNIN είχε περιγραφεί αρχικά ως μια κirkάδια απαδενυλάση με μέγιστα επίπεδα έκφρασης τη νύχτα (59) (Εικόνα 6 Α). Παρόλα αυτά, στη συνέχεια δείχθηκε πως δεν διαθέτει δραστηριότητα απαδενυλάσης, αλλά φωσφατάσης του NADPH (60-62). Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον το γεγονός πως στις πρώτες εργασίες χαρακτηρισμού του κirkάδιου προτύπου της NOCTURNIN χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας η PARN ως μια απαδενυλάση που έχει σταθερά επίπεδα στο 24ωρο στον αμφιβληστροειδή του *Xenopus laevis* (59), παρότι είναι εμφανές πως, αν και σε πολύ μικρότερο βαθμό από τη NOCTURNIN, τα επίπεδά της μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια του 24ωρου (Εικόνα 6 Α, δεξιά). Σε πιο πρόσφατη εργασία της ίδιας ερευνητικής ομάδας, δείχθηκε πως η PARN εμφανίζει ρυθμικά επίπεδα mRNA σε ήπαρ ποντικών (21, 63).



Εικόνα 6. Α. Σύγκριση των πρωτεϊνικών επιπέδων των *Nocturnin* και *PARN* σε ιστό αμφιβληστροειδούς από *Xenopus laevis* με ανοσοσύτιπωση κατά Western. Αριστερά, φαίνεται η αυξομείωση των επιπέδων της *Nocturnin* στο 24ωρο με μέγιστα επίπεδα κατά τη διάρκεια της νύχτας. Δεξιά, τα επίπεδα της *PARN* στη διάρκεια του 24ωρου. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. ZT: Zeitgeber, συνθήκες LD: 12h φως και 12h σκοτάδι (59).

Αλληλεπίδραση των απαδενυλασών με *microRNA*

Μεταξύ των trans δραστικών παραγόντων οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την εξειδίκευση στη δράση των απαδενυλασών για την αποικοδόμηση επιλεγμένων mRNA βρίσκονται και τα *microRNA* (*miRNA*). Τα *miRNA* είναι μη κωδικά RNA, τα οποία μετά τη μεταγραφή και την ωρίμανσή τους ενσωματώνονται στο σύμπλοκο miRISC (*microRNA*-induced silencing complex) και αλληλεπιδρούν με αλληλουχίες στο 3' UTR του mRNA-στόχου, με αποτέλεσμα την αναστολή της μετάφρασής του και την προσέλκυση απαδενυλασών σε αυτό, προκαλώντας την αποσταθεροποίηση και την αποικοδόμησή του (24). Έτσι, τα *miRNA* σε συνεργασία με τις απαδενυλάσες δρουν ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης (24). Καθώς ένα *miRNA* μπορεί να προσδέεται σε πολλά διαφορετικά mRNA αποσταθεροποιώντας τα (64), τα *miRNA* συμβάλλουν αποφασιστικά στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των ευκαρυωτικών οργανισμών. Επιπλέον, αρκετά *miRNA* ακολουθούν κιρκάδια έκφραση στα θηλαστικά και τα έντομα, και έχει περιγραφεί πως ρυθμίζουν παράγοντες του κεντρικού ταλαντωτή (1, 22, 23, 65, 66).

Χαρακτηριστικό και καλά μελετημένο παράδειγμα ενός *miRNA* που έχει κιρκάδια έκφραση είναι το *miR-122* (22, 65, 67). Το *miR-122* είναι από τα πιο υψηλά παραγόμενα *miRNA* στο ήπαρ (περίπου 70% των *miRNA* (68)), όπου οι πρόδρομες μορφές του (*pri-miR-122* και *pre-miR-122*) έχουν έντονη ταλάντωση κατά τη διάρκεια του 24ώρου, ενώ η ώριμη μορφή του φαίνεται να διατηρεί σταθερά επίπεδα. Η μεταγραφή του *miR-122* είναι ρυθμική και ελέγχεται από τον REV-ERBa ένα βασικό γονίδιο του ρολογιού (22). Το *miR-122* στοχεύει το mRNA της *NOCTURNIN* συμβάλλοντας στο κιρκάδιο προφίλ έκφρασής της (65). Η σταθερότητα του *miR-122* ρυθμίζεται από την επαναπολυαδενυλίωση. Πιο συγκεκριμένα, η *GLD-2*, μια κυτταροπλασματική πολυ(A) πολυμεράση σταθεροποιεί ειδικά το *miR-122* προσθέτοντας μια ουρά 30 αδενοσινών, ενώ η *PARN* προσελκύεται σε αυτή

την ολιγοαδενυλιωμένη ουρά από την CUGBP1 (μια πρωτεΐνη που προσδέεται σε επαναλήψεις CUG του RNA) οδηγώντας στην αποικοδόμησή του (69).

PARN

Η PARN είναι μια πολύ καλά μελετημένη απαδενυλάση και εμπλέκεται σε διαδικασίες όπως η ωρίμανση των ωοκυττάρων (28, 32), η εμβρυογένεση, τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, οι βλάβες του DNA και η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου (70). Η δράση της ρυθμίζεται από την πρόσδεσή της στην 5' καλύπτρα του mRNA (70-73), καθώς και από την παρουσία *cis* δραστικών στοιχείων στο 3'UTR των mRNA-στόχων, όπως τα στοιχεία κυτταροπλασματικής πολυαδενυλίωσης (CPEs) και τα στοιχεία ARE (70, 74) (Πίνακας 2). Έτσι, παράγοντες όπως η KHSRP, η τριστετραπρολίνη και η CUG-BP που προσδέονται σε CPE και ARE προσελκύουν την PARN σε mRNA που υπερεκφράζονται σε διάφορους καρκίνους, όπως IL-8, VEGF, c-jun, uPA, TP53, c-fos και TNF-α (75, 76).

Η PARN έχει έναν καλά χαρακτηρισμένο ρόλο στην ωρίμανση μικρών ncRNA, όπως τα snoRNA (56, 77), και miRNA (51, 78). Επιπλέον, μεσολαβεί την ωρίμανση του 3' άκρου του 18S pre-rRNA (79, 80) και του RNA συστατικού της τελομεράσης (57), ενώ εμπλέκεται στην αποσταθεροποίηση και ανακύκλωση του miR-122 και άλλων microRNA πλούσιων σε GU στο κυτταρόπλασμα (69). Τέλος, έχει αναδειχθεί ο ρόλος της σε ασθένειες από σειρά εργασιών, όπως σε τύπους καρκίνου (οξείες λευχαιμίες, πνεύμονα, παχέος εντέρου), συγγενούς δυσκεράτωσης, πνευμονικής ίνωσης (81-84) κ.α..

ΣΚΟΠΟΣ

Τα δεδομένα που αναφέρθηκαν παραπάνω καταδεικνύουν τη σημασία της ουράς πολυ(A) ως ένα σημαντικό δομικό χαρακτηριστικό των mRNA, το οποίο καθορίζει τη σταθερότητα, τη μεταφραστική ικανότητα και την αποικοδόμηση των mRNA. Ταυτόχρονα, οι απαδενυλάσες οι οποίες καθορίζουν το μήκος των ουρών πολυ(A), φαίνεται να συμβάλλουν σημαντικά στη ρύθμιση της κirkάδιας γονιδιακής έκφρασης. Όπως αναφέρθηκε, έχουν περιγραφεί αρκετές απαδενυλάσες έως σήμερα, ενώ η ρύθμιση και οι μηχανισμοί δράσης τους είναι αντικείμενο έντονης μελέτης με πτυχές της ρύθμισής τους και της λειτουργίας τους να μην έχουν αποκαλυφθεί. Με δεδομένα α) η έκφραση γονιδίων και η αποικοδόμηση των mRNA είναι περιοδική, β) το μήκος της ουράς πολυ(A) μεταβάλλεται περιοδικά και γ) πλήθος λειτουργιών όπου απαδενυλάσες οι απαδενυλάσες εκδηλώνουν κirkάδια συμπεριφορά, τίθεται το ερώτημα αν η έκφραση των απαδενυλασών στη διάρκεια του 24ώρου είναι σταθερή ή περιοδική. Ειδικότερα, αν οι απαδενυλάσες συντίθεται σταθερά καθ' όλο το 24ωρο και διατηρούνται σε κατάσταση αναμονής έως ότου τις κατευθύνουν στους στόχους τους κατάλληλοι παράγοντες που αλληλεπιδρούν με αυτές, όπως miRNA ή πρωτεΐνες, ή συντίθενται (και αποικοδομούνται) ρυθμικά με στόχο τη ρυθμική αποικοδόμηση συγκεκριμένων RNA με βάση τη χρονική συγκυρία; Το ερώτημα γίνεται πιο πολύπλοκο αν ληφθεί υπόψη ο αριθμός των διαφορετικών απαδενυλασών που έχει δείχθει να ελέγχουν τόσο διαφορετικά αλλά και κοινά βιοχημικά μονοπάτια.

Επιπλέον, δεν είναι γνωστό αν υπάρχουν απαδενυλάσες με κirkάδια έκφραση στα θηλαστικά, ούτε αν μια απαδενυλάση χωρίς κirkάδια έκφραση μπορεί να προσελκύεται σε ένα mRNA-στόχο από ένα άλλο μόριο (π.χ. ένα miRNA) με περιοδική έκφραση. Το γεγονός πως δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποια κirkάδια απαδενυλάση στα θηλαστικά ίσως ενισχύει την υπόθεση πως η δράση των ενζύμων αυτών στο κirkάδιο ρολόι ρυθμίζεται από άλλους παράγοντες, όπως cis δραστικά στοιχεία, αλληλεπιδρούσες πρωτεΐνες, πρωτεΐνες που προσδένονται στο RNA και miRNA, προσελκύνοντας τες στους στόχους τους και επηρεάζοντας τη ρυθμικότητά τους και τη δράση τους.

Κύρια πρόκληση και σκοπό της διατριβής αποτέλεσαν η μελέτη και η αποσαφήνιση του ρόλου απαδενυλασών που σχετίζονται με τον κirkάδιο ρυθμό. Αρχικά, εξετάστηκε η HESPERIN, η μόνη κirkάδια απαδενυλάση από το *Arabidopsis thaliana*, συνεχίζοντας στο βιοχημικό της καθαρισμό. Παράλληλα, η εργαστηριακή μας ομάδα έχει ασχοληθεί με την PARN, μια καλά μελετημένη απαδενυλάση η οποία φαίνεται πολλοί στόχοι της και διεργασίες όπου εμπλέκονται να είναι κirkάδιοι/ες, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα.

Σχεδιάγραμμα διατριβής

Το πειραματικό μέρος της Διατριβής δομείται σε τρία μέρη. Στο πρώτο εξετάζεται η HESPERIN, ενώ στα άλλα δύο η κirkάδια συμπεριφορά της PARN σε κυτταρικό και ζωικό μοντέλο, αντίστοιχα. Ειδικότερα,

- Στο πρώτο μέρος αναλύεται ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της HESPERIN με την αξιοποίηση βιοχημικών και *in silico* μεθόδων.
- Στο δεύτερο μέρος περιγράφεται το πρωτόκολλο εναρμόνισης των κυττάρων HEK 293T με το κirkάδιο ρολόι και στη συνέχεια εξετάζονται τα επίπεδα της PARN παράλληλα με το miR-29a στο κυτταρικό μοντέλο του κirkάδιου ρυθμού.
- Στο τρίτο μέρος εξετάζεται η PARN παράλληλα με το miR-29a στο ζωικό μοντέλο του κirkάδιου ρυθμού. Επιπλέον, εξετάστηκαν οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του miR-29a ενώ παράλληλα εξετάστηκαν και οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της PARN σε συνθήκες φυσιολογικού και διαταραγμένου ημερονύκτιου ρυθμού.

Κάθε μέρος αποτελείται από μια σύντομη εισαγωγή, μια ενότητα μεθοδολογίας και μια ενότητα με τα αποτελέσματα σε πλαίσιο συζήτησης. Στο τέλος κάθε μέρους παρατίθενται τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τα αποτελέσματα.

Μέρος Πρώτο - Η HESPERIN από το φυτό *Arabidopsis thaliana*

Εισαγωγή

Η βασική λειτουργία του κερκάδιου ρολογιού δε διαφέρει ουσιαστικά μεταξύ θηλαστικών και φυτών. Ο κεντρικός ταλαντωτής των φυτών έχει τα ίδια χαρακτηριστικά με τον κεντρικό ταλαντωτή των θηλαστικών και εξαρτάται από βρόχους αρνητικής ανατροφοδότησης μεταξύ μεταγραφής και μετάφρασης και από την περίπλοκη και πολυεπίπεδη ρύθμιση που συναντάται και στα θηλαστικά. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν οδηγήσει στην αποσαφήνιση των μηχανισμών του κερκάδιου ρολογιού στα φυτά προέρχονται από την *Arabidopsis thaliana* (85).

Συνοπτικά, το κερκάδιο δίκτυο περιλαμβάνει πληθώρα καταστολέων του ρολογιού που εκφράζονται και λειτουργούν συγκεκριμένες ώρες κατά τη διάρκεια της ημέρας και της νύχτας. Στους καταστολείς του ρολογιού περιλαμβάνονται, μεταξύ άλλων, οι μεταγραφικοί παράγοντες CCA1 (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1) και LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL), οι οποίοι εκφράζονται κατά τη διάρκεια της ημέρας και ο TOC1 (TIMING OF CAB EXPRESSION1) ο οποίος εκφράζεται πριν τη νύχτα. Το απόγευμα, το Evening complex (EC), το οποίο αποτελείται από τα ELF3 (EARLY FLOWERING 3, ELF4) και LUX/PCL1 (LUX ARRHYTHMO/PHYTOCLOCK1), λειτουργεί κατασταλτικά στα πρωινά γονίδια. Αυτοί οι καταστολείς διαμορφώνουν ένα πολύπλοκο ρυθμιστικό δίκτυο το οποίο συμπληρώνεται με λειτουργίες που ενεργοποιούν τους μηχανισμούς των ρυθμικών αλλαγών στους υποκινητές γονιδίων ή άλλα συστατικά του ρολογιού τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ώστε να προσελκύσουν το μηχανισμό της μεταγραφής και να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση της μεταγραφής (85).

Η σημασία του κερκάδιου ρυθμού στο *Arabidopsis* αντανακλάται στο μεγάλο αριθμό λειτουργιών που ελέγχει, από την ανάπτυξη, τη βλάστηση ή τις αποκρίσεις σε βιοτικές ή αβιοτικές καταπονήσεις. Το κερκάδιο ρολόι επίσης αλληλεπιδρά με πολλές σχετικές κυτταρικές λειτουργίες και μονοπάτια συμπεριλαμβανομένων μεταξύ άλλων και της γήρανσης και του κυτταρικού κύκλου. Τα φυτά, όπως άλλοι οργανισμοί, χρειάζεται να ελέγχουν με ακρίβεια το συγχρονισμό της παραγωγής και καταμερισμού ενέργειας, ώστε να παράγουν αρκετή ενέργεια για να καλύψουν όλες τις ενεργειακές ανάγκες (85). Η σταθερότητα των ρυθμικά εκφραζόμενων γονιδίων είναι κρίσιμη για τη διατήρηση των κερκάδιων ρυθμών (86). Η ουρά πολυ(A) βρίσκεται στο 3' άκρο των ευκαρυωτικών mRNA και το μήκος της καθορίζει τη διάρκεια ζωής, τη σταθερότητα και την ικανότητα των μεταγράφων για μετάφραση. Η βράχυνση της ουράς πολυ(A), ή απαδενυλίωση, αποτελεί το πρώτο και καθοριστικό βήμα της αποκοδόμησής των ευκαρυωτικών mRNA (27, 33, 87). Ως εκ τούτου, η απαδενυλίωση είναι μια διαδικασία που ρυθμίζει το ρυθμό της μεταγραφής και της μετάφρασης (33), ενώ δεν έχει μελετηθεί σε βάθος ο τρόπος

λειτουργίας των απαδενυλασών στο πλαίσιο του κικκάδιου ρυθμού.

Η μόνη απαδενυλάση που έχει ταυτοποιηθεί πως ελέγχεται από το κικκάδιο ρολόι μέχρι σήμερα είναι η HESPERIN από το φυτό *Arabidopsis thaliana*. Η HESPERIN είναι μια απαδενυλάση με επικράτεια EEP και έχει δειχθεί πως αξιοποιεί ιόντα Mg για την καταλυτική της δράση (42). Παρόλα αυτά, ελλείψει κρυσταλλικής δομής είναι δύσκολο να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός δράσης της. Μελέτες του εργαστηρίου μας έχουν προσεγγίσει το ζήτημα της κρυστάλλωσης της AtHESPERIN χωρίς επιτυχία καθώς η παραγόμενη πρωτεΐνη παρότι εμφάνιζε υψηλή βιοχημική καθαρότητα, ήταν ασταθής. Στην παρούσα διατριβή έγινε προσπάθεια βελτίωσης του καθαρισμού της AtHESPERIN προς παραγωγή πρωτεΐνης υψηλής καθαρότητας και σταθερότητας, ώστε να ολοκληρωθεί ο βιοχημικός της χαρακτηρισμός, περιγράφοντας τα καταλυτικά αμινοξέα. Αυτό πραγματοποιήθηκε συνδυάζοντας πειραματικά δεδομένα κινητικής και *in silico* προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

Μεθοδολογία

Στοχευμένη μεταλλαξιγένεση

Για τη μετάλλαξη των υποψήφιων καταλυτικών αμινοξέων της AtHESPERIN πραγματοποιήθηκε στοχευμένη μεταλλαξιγένεση όπως έχει περιγραφεί (41). Πιο συγκεκριμένα, σχεδιάζονται ειδικοί εκκινητές οι οποίοι φέρουν την επιθυμητή μετάλλαξη και πραγματοποιείται ενίσχυση PCR. Για την αποφυγή της δημιουργίας διμερών μεταξύ των εκκινητών, πραγματοποιούνται δύο ξεχωριστές αντιδράσεις ενίσχυσης με τον κάθε εκκινητή ξεχωριστά (41). Οι εκκινητές σχεδιάζονται με τη χρήση του online εργαλείου primer-X (<http://bioinformatics.org/primerx/>) και ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pATHRA-HESP (88). Ο πλασμιδιακός φορέας που προκύπτει από την αντίδραση της μεταλλαξιγένεσης διαχωρίζεται από τον αρχικό φορέα-μήτρα από το μίγμα της αντίδρασης με επώαση με το ένζυμο Dpn1 (1235B, TaKaRa Bio), σύμφωνα με το εγχειρίδιο οδηγιών του κατασκευαστή, και ο νέος φορέας που φέρει τη μετάλλαξη κατακρημνίζεται με αιθανόλη (41). Ο έλεγχος της εισαγωγής της επιθυμητής μετάλλαξης γίνεται με αλληλούχηση, αφού απομονωθούν επαρκείς ποσότητες του μεταλλαγμένου φορέα μετά από μετασχηματισμό σε βακτήρια XI1-Blue. Οι μεταλλάξεις που δημιουργήθηκαν στην AtHESPERIN ήταν οι D287A, D346A, H385A (41).

Παραγωγή και απομόνωση της AtHESPERIN

Μετασχηματισμός και καλλιέργεια βακτηρίων

Η παραγωγή της AtHESPERIN αλλά και οι μεταλλαγμένες μορφές αυτής (E114A, D287A, D346A και H385A) από το φορέα pATHRA έγινε όπως έχει περιγραφεί (41). Πιο

συγκεκριμένα, οι φορείς με την επιθυμητή αλληλουχία χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό βακτηρίων BL21-GOLD (DE3) (Agilent Technologies) και ανακαλλιέργειά τους σε μεγάλη κλίμακα (1-3 L). Τα βακτήρια αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο TB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού έως ότου η καλλιέργεια να έχει οπτική πυκνότητα $A_{600nm} = 0.6$. Η υπερέκφραση του φορέα και παραγωγή της πρωτεΐνης επάγεται με 1mM IPTG και ακολούθησε συλλογή των κυττάρων 3 ώρες μετά με φυγοκέντρηση.

Απομόνωση AtHESPERIN

Η απομόνωση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε όπως έχει περιγραφεί (41) με μερικές τροποποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε κατάλληλο διάλυμα λύσης [50mM Sodium phosphate (pH 8), εμπλουτισμένο με 0.2 M NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, 0.1% (v/v) monothioglycerol (MTG), 1 mM PMSF και 1 mg/mL lysozyme]. Το κυτταρόλυμα επωάζεται με 250U Benzopase (E1014, SIGMA-ALDRICH), υποβάλλεται σε μηχανική λύση με υπερήχους, φυγοκεντρείται (21130 g) και φιλτράρεται ώστε να απομακρυνθούν τα αδιάλυτα κυτταρικά στοιχεία. Η πρωτεΐνη απομονώνεται από το κυτταρόλυμα με τη χρήση στήλης HisTrap FF (17525501, Cytiva) με το σύστημα ÄKTApurifier (GE Healthcare). Το διάλυμα πρόσδεσης στη στήλη αποτελείται από 50mM Sodium phosphate (pH 8), εμπλουτισμένο με 50mM Imidazole, 0.2 M NaCl, 0.1% (v/v) MTG, ενώ το διάλυμα έκλουσης είναι πανομοιότυπο με το διάλυμα πρόσδεσης εμπλουτισμένο με 0.5 M Imidazole.

Μετά την έκλουση, η πρωτεΐνη επωάζεται με την πρωτεάση His Tag 3C και στη συνέχεια πραγματοποιείται διαπίδυση σε διάλυμα πρόσδεσης. Μετά τη χρωματογραφική αφαίρεση της πρωτεάσης 3C και της AtHESPERIN που φέρει ακόμη His Tag, η AtHESPERIN συμπυκνώνεται και υποβάλλεται σε διαπίδυση προς διάλυμα αντίδρασης [50 mM sodium citrate (pH 6.5) εμπλουτισμένο με 0.1 M NaCl, 2 mM MgCl₂, 10% (v/v) glycerol] σε μονάδα φυγοκεντρικής συμπίκνωσης Amicon Ultra 4 ή 15 (Merck).

Η απομόνωση των μεταλλαγμένων μορφών της AtHESPERIN, ήτοι E114A, D287A, D346A και H385A, πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται (41).

Ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με ευρέως χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα (41, 42). Για τον έλεγχο της επίδρασης διάφορων μορίων [AMP, Neomycin, πολυ(A)] στη διαμόρφωση της AtHESPERIN προετοιμάστηκαν αντιδράσεις όπως για την *in vitro* αντίδραση απαδενυλίωσης όπου το poly(A), το AMP και η Neomycin ήταν σε συγκέντρωση $50 \times K_M$ και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν (89)/10 (25μg).

Για τον έλεγχο της επίδρασης διάφορων μορίων [AMP, Neomycin, πολυ(A)] στη

διαμόρφωση της AtHESPERIN προετοιμάστηκαν αντιδράσεις όπως για την αντίδραση απαδενυλίωσης *in vitro*, όπου το poly(A), το AMP και η Neomycin ήταν σε συγκέντρωση $50 \times K_M$ και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν $[S]/10$ (25 μ g) ($K_M=0.34$ l/mL). Οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 25°C για 1 ώρα και κατόπιν αναλύθηκαν σε πηκτή ακρυλαμιδίου 7% παρουσία κατάλληλων δεικτών μοριακής μάζας (MWND500, Sigma-Aldrich). Πιο συγκεκριμένα, η BSA χρησιμοποιείται ενδεικτικά της διμερούς και τριμερούς διαμόρφωσης της AtHESPERIN (η BSA εμφανίζεται ως δυο ζώνες των 66 kDa και 132 kDa) και η ουρίαση χρησιμοποιείται ενδεικτικά για την εκτίμηση μεγαλύτερης μάζας ολιγομερών διαμορφώσεων της AtHESPERIN [η ουρίαση εμφανίζεται ως δυο ζώνες, μια τριμερούς (272 kDa) και μια εξαμερούς (545 kDa) διαμόρφωσης].

***In vitro* αντίδραση απαδενυλίωσης**

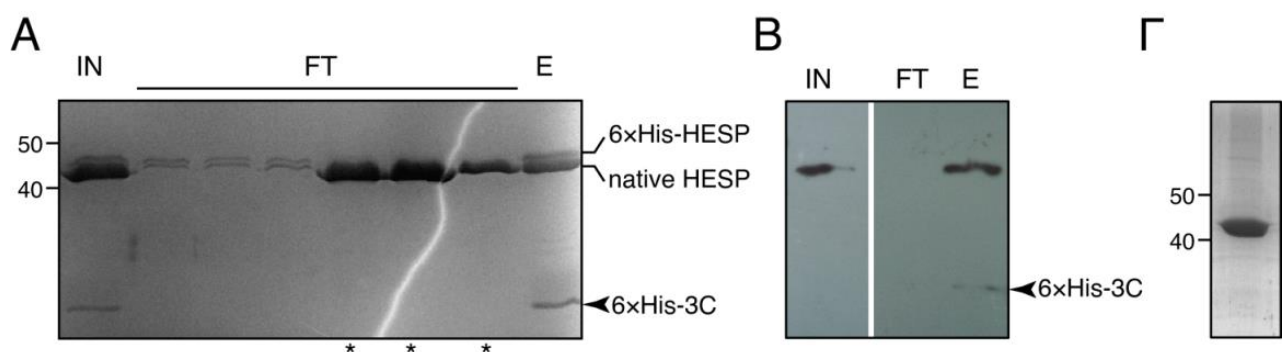
Η αντίδραση απαδενυλίωσης *in vitro* πραγματοποιείται σύμφωνα με τους Maryati, et al. (90) με τροποποιήσεις (41). Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης χρησιμοποιείται φθορίζον 17μερές υπόστρωμα RNA (5'- CCU UUC CAA AAA AAA AA -3') το οποίο φέρει στο 5' άκρο τη φθορίζουσα CY3. Οι αντιδράσεις τερματίζονται με την προσθήκη 2x ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων RNA [95% (v/v) formamide, 5 mM EDTA, 0.025% (w/v) SDS] στους 85 °C για 3 min. Οι αντιδράσεις αναλύονται σε πηκτή ακρυλαμιδίου 15% παρουσία 8M ουρίας στο σύστημα Mini-PROTEAN Tetra-Cell (Bio-Rad) και οπτικοποιούνται ψηφιακά με τη χρήση του συστήματος Uvitec Alliance 4 (Cambridge) ή ImageQuant Fluor imaging system (Cytiva).

Αποτελέσματα-Συζήτηση

Βελτιστοποίηση απομόνωσης της AtHESPERIN

Με σκοπό να ολοκληρωθεί ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της AtHESPERIN πραγματοποιήθηκε βελτίωση του προηγούμενου πρωτοκόλλου καθαρισμού (41) το οποίο συμπεριλάμβανε βήματα χρωματογραφίας αγκιστείας και μοριακής διήθησης προς ένα απλοποιημένο πρωτόκολλο. Συγκεκριμένα, για την απομάκρυνση της ετικέτας αγκιστείας 6 ιστιδινών (6xHis) από την HESPERIN χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pATHRA (41, 88) σε συνδυασμό με την πρωτεάση 3C (που και η ίδια φέρει ετικέτα 6xHis). Η προσέγγιση μειώνει τα βήματα χρωματογραφίας από 3 (41) σε 2 αυξάνοντας έτσι την απόδοση της απομόνωσης χωρίς να μειώνεται η καθαρότητα του δείγματος (Εικόνα 7). Πιο συγκεκριμένα, μετά το πρώτο στάδιο του καθαρισμού της AtHESPERIN, ήτοι τη λύση των κυττάρων και την χρωματογραφία αγκιστείας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC), η 6xHis-HESPERIN (Εικόνα 7 A, IN) επώαζεται με την 6xHis-3C και στη συνέχεια ακολουθεί διαπίδυση. Η τελευταία πραγματοποιείται ώστε να απομακρυνθεί το ιμιδαζόλιο από το

πρωτεϊνικό δείγμα και να μπορέσει να γίνει χρωματογραφικός καθαρισμός της AtHESPERIN (πλέον χωρίς την ετικέτα αγκιστείας) (Εικόνα 7 A, FT) από το δείγμα που συμπεριλαμβάνει τη 6xHis-3C και πιθανώς υπόλοιπο 6xHis-HESPERIN (Εικόνα 7 A, E). Τα δείγματα με πρωτεΐνες που δεν έχουν προσδεθεί στη στήλη, FT (Εικόνα 7 A, FT – διαδρομές με *), αλλά και το δείγμα της έκλουσης από την IMAC (Εικόνα 7 A, E) αναλύονται με ανοσοσύτωση κατά Western με αντίσωμα που αναγνωρίζει την ετικέτα 6xHis (Εικόνα 7 B), ώστε να διαπιστωθεί η απόδοση της αντίδρασης της πέψης. Παρατηρείται πως κάποια δείγματα FT (διαδρομές χωρίς *) εμφανίζουν 2 ζώνες οι οποίες αντιστοιχούν σε 6xHis-HESPERIN και σε μικρότερο ποσοστό σε φυσικού τύπου AtHESPERIN. Ως εκ τούτου, επιλέγονται τα δείγματα από τις υπόλοιπες διαδρομές (*). Τέλος, εφόσον μετά την ανοσοσύτωση κατά Western το δείγμα FT δεν φέρει πρόσμιξη με 6xHis-HESPERIN, συμπυκνώθηκε και αναλύθηκε σε ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες ώστε να εκτιμηθεί η βιοχημική καθαρότητα του (Εικόνα 7 Γ). Η ποιότητα της παραχθείσας πρωτεΐνης αξιολογήθηκε με έλεγχο της ενζυμικής δραστηριότητάς της (βλ. παρακάτω). Η συνολική απόδοση της απομόνωσης της AtHESPERIN αυξήθηκε σε σχέση με προηγούμενη εργασία μας από 0.6 mg πρωτεΐνης ανά λίτρο καλλιέργειας (41) σε 1 mg πρωτεΐνης ανά λίτρο καλλιέργειας.



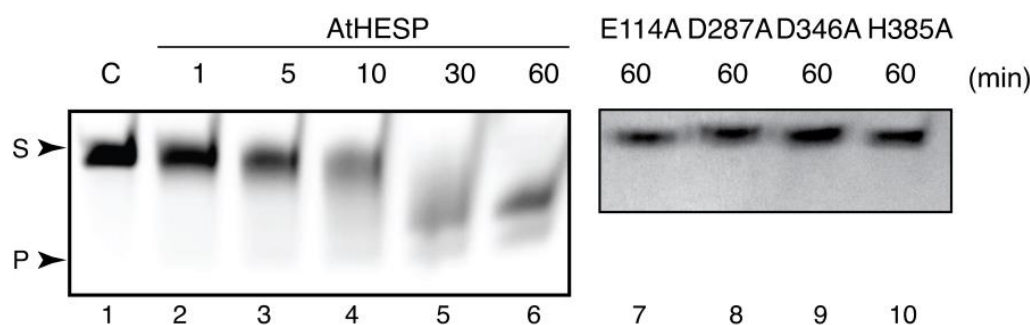
Εικόνα 7. Η απομόνωση της AtHESPERIN. A. Επισκόπηση των πρώτων δύο σταδίων καθαρισμού. B. Η AtHESPERIN από τα δείγματα * από την εικόνα (A) και από τη διαδρομή E σε ανοσοσύτωση κατά western. Στην εικόνα φαίνονται μόνοι οι πρωτεΐνες που φέρουν ετικέτα 6xHis. Γ. AtHESPERIN από τα δείγματα * από την εικόνα (A) και μετά από συμπύκνωση σε ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Οι αριθμοί αριστερά από τις πηκτές αντιστοιχούν στους δείκτες μοριακών μαζών (kDa). IN: Input, FT: flow-through, E: έκλουση.

Το ενεργό κέντρο της AtHESPERIN

Η ταυτοποίηση των σημαντικών για την κατάλυση αμινοξέων της AtHESPERIN βασίστηκε σε ομοπαράθεση της αλληλουχίας της AtHESPERIN με άλλα μέλη της οικογένειας EEP (42). Τα Glu114, Asp287, Asp346 και His385 μεταλλάχθηκαν προς αλανίνη ώστε να εξεταστεί η ενζυμική δραστηριότητά τους (

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1, Εικόνα 25). Η ενζυμική δραστηριότητα εξετάστηκε σε χρονικά διαστήματα (Εικόνα 8, διαδρομές 1-6) με τη χρήση φθορίζοντος υποστρώματος, όπως έχει

περιγραφεί (41). Παρατηρούνται ζώνες μεγαλύτερης ηλεκτροφορητικής κινητικότητας, ενδεικτικές βραχύτερων προϊόντων της αντίδρασης απαδενυλίωσης που οφείλονται στη δράση του ενζύμου. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η δραστικότητα των μεταλλαγμένων μορφών της AtHESPERIN σε διάρκεια αντίδρασης 60 λεπτά και τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν όπως και στην περίπτωση της φυσιολογικής AtHESPERIN (Εικόνα 8, διαδρομές 7-10), όπου παρατηρείται πλήρης απουσία δραστικότητας απαδενυλάσης. Η παραπάνω παρατήρηση μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα κατάλοιπα Glu114, Asp287, Asp346 και His385 είναι πράγματι σημαντικά για την ενζυμική δραστικότητα της AtHESPERIN διαμορφώνοντας το ενεργό της κέντρο (41).



Εικόνα 8. Δραστικότητα της AtHESPERIN και των μεταλλαγμένων της μορφών. Η δραστικότητα της AtHESPERIN σε σχέση με τον χρόνο, σε χρονικά διαστήματα που δείχνονται πάνω από τις διαδρομές 2 – 6. Οι αντιδράσεις με τις μεταλλαγμένες μορφές της AtHESPERIN, ήτοι E114A, D287A, D346A and H385A, φαίνονται στις διαδρομές 7-10. Οι αντιδράσεις έχουν πραγματοποιηθεί στο ίδιο διάλυμα αντίδρασης. Οι αριθμοί στο επάνω μέρος των πηκτών αντιστοιχεί στο χρόνο αντίδρασης σε λεπτά. S, υπόστρωμα που φέρει τη φθορίζουσα χρωστική Cy3 στο 5' άκρο του, P, προϊόν της αντίδρασης απαδενυλίωσης, C, αντίδραση αρνητικού ελέγχου, όπου δεν έχει προστεθεί ένζυμο. Τροποποιημένη εικόνα από (41).

Ο καταλυτικός μηχανισμός της HESPERIN

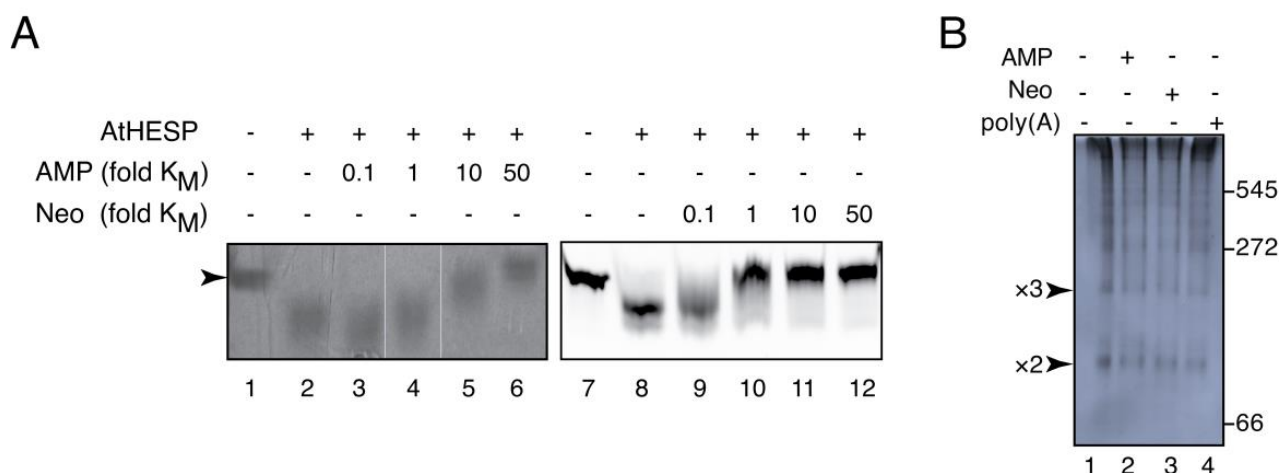
Επίδραση μικρών μορίων στη δραστικότητα της AtHESPERIN και ολιγομερής διαμόρφωση του ενζύμου

Για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της AtHESPERIN, εξετάστηκαν μικρά μόρια που μπορεί να τροποποιούν τη δραστικότητα της, όπως το AMP και η Νεομυκίνη. Η επίδραση του 5' AMP στη δραστικότητα της AtHESPERIN ως προϊόν που απελευθερώνεται από την αντίδραση απαδενυλίωσης (59, 74, 91) εξετάστηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις AMP σε σχέση με την τιμή της σταθεράς K_M ($K_M = 0.34 \mu\text{g/ml}$). Η ανάλυση των προϊόντων των αντιδράσεων με το φθορίζων υπόστρωμα σε πηκτική ακρυλαμιδίου παρουσία ουρίας έδειξε πως το 5' AMP μειώνει αποτελεσματικά τη δραστικότητα της AtHESPERIN σε υψηλές συγκεντρώσεις ($10 - 50 \times K_M$), ενώ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις είχε μικρότερη επίδραση στη δραστικότητα του ενζύμου ($0.1 - 1 \times K_M$) (Εικόνα 9 A, διαδρομές 2-6).

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η επίδραση της Νεομυκίνης Β (Neo) στη δραστικότητα της AtHESPERIN, καθώς είναι γνωστό πως αναστέλλει απαδενυλάσες των οποίων η δράση

εξαρτάται από Mg^{+2} των οικογενειών DEDD και EEP όπως η PARN (92) και η CNOT6L (37), αντίστοιχα. Εξετάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις Neo σε σχέση με την τιμή της σταθεράς K_M ($K_M = 0.34 \mu\text{g/ml}$). Η ανάλυση των προϊόντων των αντιδράσεων έδειξε πως η προσθήκη της Neo στην αντίδραση οδηγεί σε παρόμοια αποτελέσματα με το 5' AMP, αλλά λιγότερο έντονα (Εικόνα 9 A, διαδρομές 8-12). Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει πως οι δύο αυτές ενώσεις αναστέλλουν τη δραστηριότητα του ενζύμου πιθανόν μέσω διαφορετικών μηχανισμών (41). Λεπτομερής ανάλυση των δεδομένων της κινητικής της αναστολής του ενζύμου από το 5' AMP με τη χρήση της μετασχηματισμός Hanes-Woolf έδειξε πως το 5' AMP είναι συναγωνιστικός αναστολέας της AtHESPERIN (41).

Καθώς είναι γνωστό πως η AtHESPERIN σχηματίζει ολιγομερή (42), έγινε έλεγχος εάν η ανασταλτική δράση του AMP και της Νεομικίνης Β οδηγούν σε αλλαγή στερεοδιαμόρφωσης του ενζύμου διαταράσσοντας την τριμερή διαμόρφωση που έχει συνήθως (41). Έτσι, η AtHESPERIN επώαστηκε με $50 \times K_M$ AMP και Neo σε συνθήκες αντίδρασης απαδενυλίωσης και οι αντιδράσεις αναλύθηκαν σε ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (Εικόνα 9 B). Ως θετικός μάρτυρας προστέθηκε μια διαδρομή της AtHESPERIN και μια διαδρομή με AtHESPERIN που επώαστηκε με υπόστρωμα πολυ(A). Οι δυο αυτές συνθήκες αναμένεται να έχουν πρότυπο ζωνών όμοιο μεταξύ τους και συμβατό με τη δραστική ολιγομερή διαμόρφωση της AtHESPERIN (42). Όλες οι διαδρομές εμφάνισαν το ίδιο πρότυπο ζωνών υποδηλώνοντας πως δεν ευθύνεται η αλλαγή διαμόρφωσης του ενζύμου για την απώλεια δραστηριότητας κατά την προσθήκη AMP και Neo. Αντίθετα, η απώλεια δραστηριότητας θα μπορούσε να αποδοθεί στη μετατόπιση των απαραίτητων για την κατάλυση ιόντων Mg από το ενεργό κέντρο, όπως έχει παρατηρηθεί για την CNOT6L (37).

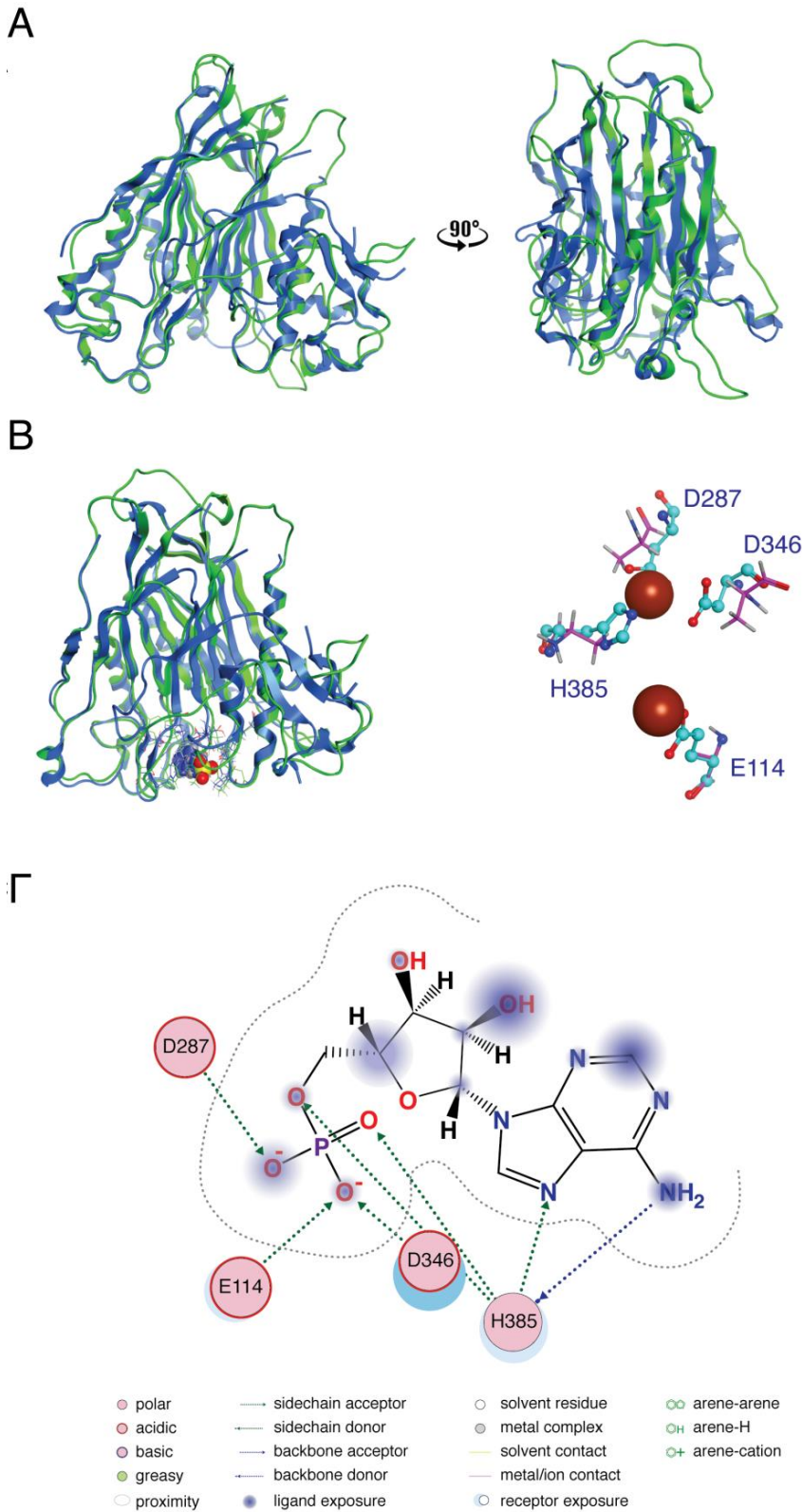


Εικόνα 9. A. Αντιδράσεις απαδενυλίωσης της AtHESPERIN παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων AMP ή Νεομικίνης Β (φαίνονται ως πολλαπλάσια της K_M στο επάνω μέρος των διαδρομών). B. Ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή 7% της AtHESPERIN παρουσία πολυ(A), AMP και Νεομικίνης. Τα βέλη υποδεικνύουν τη θέση των ολιγομερών της AtHESPERIN (2x: διμερές ~ 90kDa; 3x: τριμερές ~ 150 kDa). Οι αριθμοί δεξιά από την εικόνα υποδηλώνουν τη θέση των δεικτών μοριακών μαζών (kDa). Τροποποιημένη από (41).

Μοριακό μοντέλο της AtHESPERIN και προτεινόμενος καταλυτικός μηχανισμός

Η δημιουργία του μοντέλου της AtHESPERIN έγινε σε συνεργασία με τον Επικ. Καθηγητή Γενετικής Δημήτριο Βλαχάκη στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Το μοντέλο της AtHESPERIN (UniProt ID: A8MS41) που δημιουργήθηκε βάσει ομολογίας χρησιμοποιώντας ως οδηγό τη δομή της ανθρώπινης CNOT6L (PDB ID: 3NGQ) (35) δείχνει τη συντηρημένη τρισδιάστατη δομή με τη χαρακτηριστική δομή του δικτύου β φύλλων και δυο βασικών α ελίκων πλευρικά του ενεργού κέντρου (41). Το μοντέλο της AtHESPERIN καταλαμβάνει πλήρως τη δομή της CNOT6L (Εικόνα 10 Α).

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η τοποθέτηση του AMP στο καταλυτικό κέντρο τόσο της δομής οδηγού όσο και του μοντέλου της AtHESPERIN (docking). Η διαμόρφωση του μοντέλου αλλά και το πρότυπο αλληλεπιδράσεων με το AMP συντηρήθηκαν στο μοντέλο της AtHESPERIN, υποστηρίζοντας την εγκυρότητά του (Εικόνα 10 Β). Για την περαιτέρω ανάλυση της αλληλεπίδρασης του AMP και της AtHESPERIN, αλλά και την επίδραση των μεταλλάξεων που συζητήθηκαν παραπάνω, ήταν απαραίτητο να καθοριστεί η φύση της αλληλεπίδρασης και να γίνει διαχωρισμός μεταξύ άμεσων δεσμών υδρογόνου ή μακρών αλληλεπιδράσεων χωρίς δεσμό. Η ανάλυση LIGPLOT (93) αποκάλυψε πως τα κατάλοιπα E114, D287, D346 και H385 της AtHESPERIN εμπλέκονται σε άμεσες αλληλεπιδράσεις με το AMP (Εικόνα 10 Γ), ενώ η μικρή απόσταση και ο προσανατολισμός τους φαίνεται να είναι ευνοϊκός για τη δημιουργία δεσμού υδρογόνου υψηλής ενέργειας και η *in silico* μετάλλαξη οποιουδήποτε από αυτά τα τέσσερα αμινοξέα σε αλανίνη, οδηγεί σε απώλεια των αλληλεπιδράσεων (Εικόνα 11 Α) και σε σημαντικές αλλαγές στη φυσικοχημική φύση του καταλυτικού κέντρου αλλά και του προτύπου τοποθέτησης συνολικά. Σύμφωνα με τα παραπάνω, το μοντέλο ομολογίας και η τοποθέτηση του AMP αποκαλύπτουν δομικές ομοιότητες μεταξύ των ενεργών κέντρων της AtHESPERIN και της CNOT6L (41).

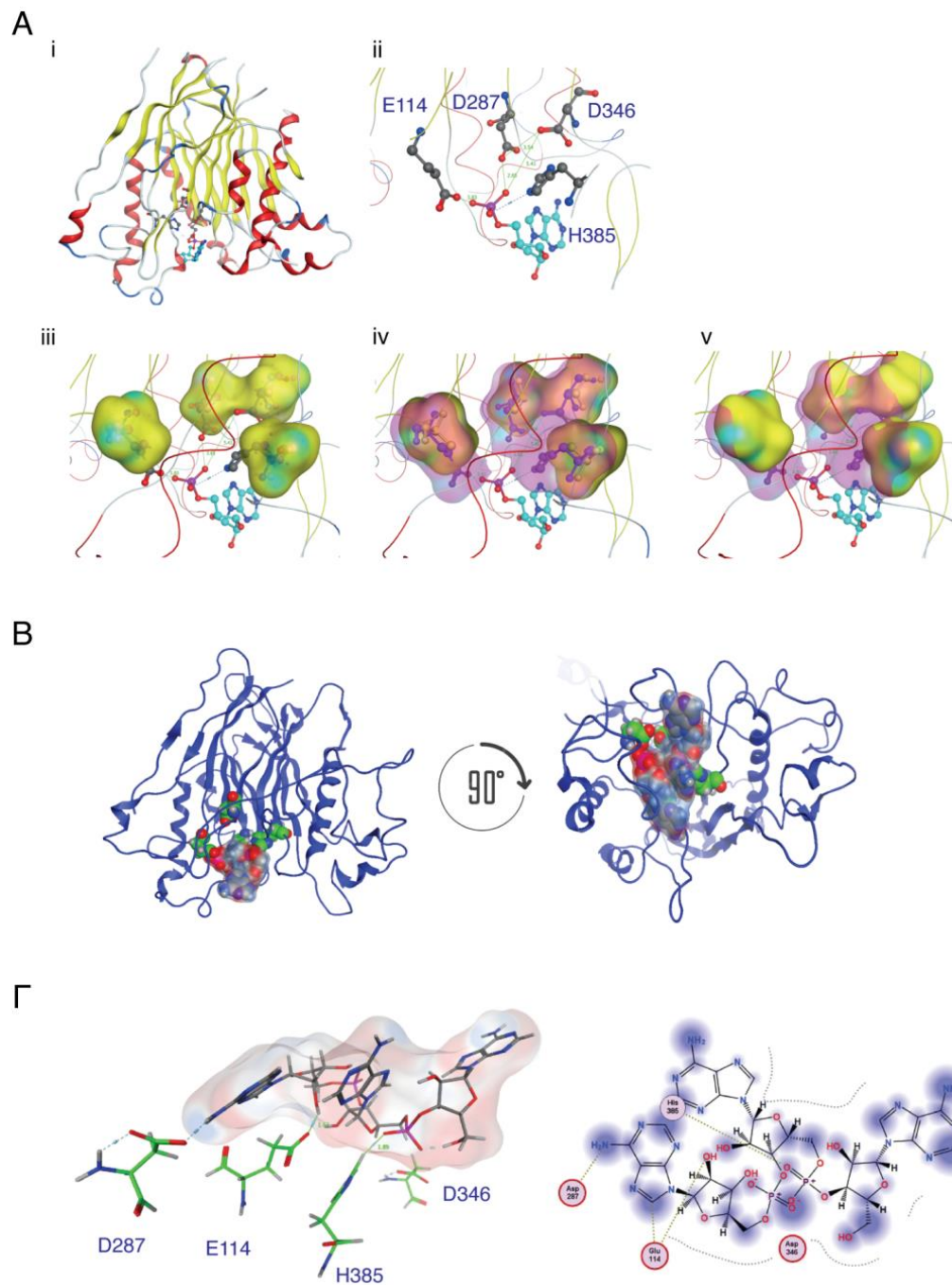


Εικόνα 10. Α. Μοντέλο ομολογίας της AtHESPERIN. Το μοντέλο απεικονίζεται με κυανό χρώμα ενώ η ανθρώπινη CNOT6L (δομή-οδηγός) με πράσινο. Β. Η CNOT6L και το μοντέλο της AtHESPERIN με το AMP στο καταλυτικό κέντρο. Το AMP εμφανίζεται με τη μορφή πλήρωσης χώρου. Στο δεξί μέρος τη εικόνας φαίνεται σε μεγέθυνση το σημείο τοποθέτησης του AMP. Οι καφέ σφαίρες ορίζουν τη διαμόρφωση του AMP στο χώρο. Γ. Σχηματική αναπαράσταση από το LIGPLOT του χάρτη αλληλεπιδράσεων του AMP με το μοντέλο της AtHESPERIN (41).

Βασιζόμενοι στα προηγούμενα δεδομένα της ταυτοποίησης σημαντικών για την

κατάλυση αμινοξέων (Εικόνα 8) και λαμβάνοντας υπόψη ότι α) η AtHESPERIN είναι μια απαδενυλάση EEP με προτίμηση σε πολυ(A) (42), β) τα ιόντα Mg είναι απαραίτητα για την κατάλυση (42) και γ) οι κρυσταλλικές δομές της CNOT6L (35) και της NOCTURNIN (60) είναι γνωστές, κατασκευάστηκε ένα μοντέλο του καταλυτικού συμπλόκου όπου στο ένζυμο έχει τοποθετηθεί ένα τρινουκλεοτίδιο αδενοσινών (A_3). Το A_3 μπορεί να υιοθετήσει μόνο μια διαμόρφωση κατά το πείραμα τοποθέτησης/ελλιμενισμού (docking) (Εικόνα 11 B). Ανάλυση των μοριακών αλληλεπιδράσεων της διεπιφάνειας ενζύμου:υποστρώματος δείχνει πως το A_3 αλληλεπιδρά με δεσμούς υδρογόνου με τα καταλυτικά αμινοξέα της AtHESPERIN.

Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, ο μηχανισμός της αντίδρασης απαδενυλίωσης από την AtHESPERIN προτείνεται ως εξής: τα δυο κατάλοιπα ασπαρτικού, D287 και D346, βρίσκονται σε κοντινή απόσταση στον τρισδιάστατο χώρο του καταλυτικού κέντρου και αρχικά καθορίζουν τη θέση των δύο ιόντων Mg. Στη συνέχεια, ο ιμιδαζολικός δακτύλιος της His385 λειτουργεί ως βάση προσελκύνοντας ένα πρωτόνιο από ένα μόριο νερού. Ως εκ τούτου, η πρωτονιωμένη ιστιδίνη ενεργοποιείται για πυρηνόφιλη προσβολή, ενώ η γειτονική Glu114 αποπρωτονιώνει το πεντασθενές ενδιάμεσο προκαλώντας στην υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Αυτός ο μηχανισμός καθιστά την αντίδραση απαδενυλίωσης απαραίτητως εξαρτημένη από την τρισδιάστατη διαμόρφωση του ενζύμου, η οποία είναι απαραίτητο να είναι συντηρημένη ώστε να συντονίζονται τα καταλυτικά αμινοξέα κατάλληλα στο καταλυτικό κέντρο ώστε να επιτευχθεί η αντίδραση (41).



Εικόνα 11. Μοριακό μοντέλο της απώλειας των αλληλεπιδράσεων από μεταλλάξεις και ο προτεινόμενος καταλυτικός μηχανισμός της AtHESPERIN. Α. (i) Μοντέλο της AtHESPERIN με τα καταλυτικά αμινοξέα (γκρι ράβδοι/σφαίρες) και του AMP (αδενοσίνη γαλάζιες/μπλε ράβδοι/σφαίρες). (ii) Μεγέθυνση του καταλυτικού κέντρου και του τοποθετημένου AMP από το (Α). (iii) Ο χώρος που διαμορφώνουν τα κατάλοιπα αλανίνης εμφανίζεται ως κίτρινο νέφος σε υπέρθεση με τα αρχικά κατάλοιπα E114, D287, D346 και H385. (iv) Ο χώρος που διαμορφώνουν τα τα αρχικά κατάλοιπα E114, D287, D346 και H385 εμφανίζεται ως πορφυρό νέφος σε υπέρθεση με το χώρο της αλανίνης. (v) Η απώλεια του διαθέσιμου χώρου φαίνεται ως διαφανές κίτρινο νέφος. Χρωματισμοί σφαιρών: Κυανό: άτομα άνθρακα του AMP, γκρι: άτομα άνθρακα των καταλυτικών αμινοξέων, κόκκινο: οξυγόνο, μπλε: άζωτο, πορφυρό: φώσφορος. Β. Το τριουκλεοτίδιο αδενοσίνης (A_3) (μπλε/κόκκινο σε μορφή πλήρωσης χώρου) τοποθετημένο στο καταλυτικό κέντρο της AtHESPERIN (αριστερά) και σε κλίση 90° προς τα πίσω στον οριζόντιο άξονα (δεξιά). Γ. Το τριουκλεοτίδιο αδενοσίνης (A_3) (μπλε/κόκκινο σε μορφή ράβδου) στο χώρο και οι αλληλεπιδράσεις με τα τέσσερα καταλυτικά αμινοξέα της AtHESPERIN (πράσινες ράβδοι) (αριστερά) και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καταλοίπων του ενεργού κέντρου και του A_3 όπως προκύπτει από το LIGPLOT (41).

Συμπεράσματα

Η AtHESPERIN είναι μια ολιγομερής απαδενυλάση της οικογένειας EEP και μοιράζεται σημαντικά στοιχεία με άλλα μέλη της ίδιας οικογένειας. Η κινητική ανάλυση της AtHESPERIN έδειξε αναστολή από το προϊόν της αντίδρασης (AMP) και τη νεομυκίνη Β. Επιπλέον, ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες δεν υποδηλώνει απώλεια της τεταρτοταγούς διαμόρφωσης της AtHESPERIN καθώς η παρουσία πολυ(Α), AMP και νεομυκίνης δεν επηρέασαν το πρότυπο ζωνών κατά την ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 9 Β) και πιθανόν υποδηλώνει πως η απώλεια δραστηριότητας οφείλεται στη μετατόπιση ιόντων Mg από το ενεργό κέντρο όπως έχει δείχθει για τη CNOT6L (37). Μέσω βιοχημικής και *in silico* ανάλυσης, φαίνεται πως τα κατάλοιπα Glu114, Asp287, Asp346 και His385 είναι απαραίτητα για την κατάλυση και η αντικατάσταση οποιουδήποτε από τα τέσσερα είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια δραστηριότητας από την AtHESPERIN υποδηλώνοντας πως είναι απαραίτητα στον καταλυτικό μηχανισμό είτε συντονίζοντας ιόντα Mg είτε σταθεροποιώντας την πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Τέλος, η *in silico* ανάλυση υποδεικνύει ένα μηχανισμό δράσης της AtHESPERIN (Εικόνα 11 Β, Γ) χαρακτηριστικό για τις EEP απαδενυλάσες.

Ο βιολογικός ρόλος της AtHESPERIN έχει διερευνηθεί σε πειράματα αποσιώπησης (knock-down) και υπερέκφρασης σε σειρές μεταλλαγμένων φυτών και φαίνεται να επηρεάζει το φαινότυπο τόσο στη δομική ανάπτυξη του φυτού αλλά και αλλάζοντας την απόκριση σε συνθήκες στρες (42). Παρότι δεν έχει καταστεί εφικτό να παραχθούν κρύσταλλοι της AtHESPERIN για πειράματα περίθλασης ακτίνων Χ ώστε να προσδιοριστεί η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου, ο πλήρης βιοχημικός χαρακτηρισμός της συμβάλλει σημαντικά στην αποσαφήνιση των λειτουργιών του ενζύμου, ενώ μελέτες σε φυτά που φέρουν τις μεταλλάξεις στο ενεργό κέντρο της AtHESPERIN θα προσθέσουν σημαντική γνώση στην κατανόηση του βιολογικού της ρόλου.

Μέρος Δεύτερο - Η PARN στο κirkάδιο ρολόι: Το κυτταρικό μοντέλο HEK293T

Εισαγωγή

Στα θηλαστικά, ο κεντρικός ταλαντωτής του ρολογιού βρίσκεται στον υπερχιασματικό πυρήνα στον εγκέφαλο, ενώ οι μοριακοί μηχανισμοί του ρολογιού βρίσκονται σε όλους τους ιστούς του σώματος (94). Η σταθερότητα, οι ρυθμοί ανακύκλωσης και οι χρόνοι ζωής είναι χαρακτηριστικά των κirkάδιων mRNA που διαμορφώνουν την κirkάδια γονιδιακή έκφραση. Άλλοι παράγοντες, όπως τα miRNAs, διαμορφώνουν με τη σειρά τους αυτά τα χαρακτηριστικά. Έτσι, miRNA με περιοδική έκφραση στοχεύοντας συγκεκριμένα mRNA σε κατάλληλα χρονικά σημεία διαμορφώνουν σε μεγάλο βαθμό το κirkάδιο ρολόι (95, 96). Πιο συγκεκριμένα, το pri-miR-29a εμφανίζει κirkάδια ταλάντωση σε μύες (19) και το ώριμο miR-29a επηρεάζει τα επίπεδα του *PER1*, οδηγώντας σε μια χρονική καθυστέρηση που είναι απαραίτητη για την περίοδο του κirkάδιου ρυθμού στους μύες (23).

Πέρα από τη μελέτη σε ζωικά μοντέλα, η έκφραση των γονιδίων του ρολογιού έχει μελετηθεί σε πρωτογενείς καλλιέργειες, αλλά και σε αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές (16, 97). Μεταξύ αυτών, έχει χρησιμοποιηθεί η κυτταρική σειρά HEK293T που προέρχεται από νεφρικό ιστό, όργανα με έντονη ρυθμικότητα, απαραίτητη για τη λειτουργία τους και τις ομοιοστατικές λειτουργίες, καθώς συμμετέχουν και στην απομάκρυνση φαρμάκων από τον οργανισμό (98, 99). Όσον αφορά στις μεθόδους εναρμόνισης των κυττάρων σε καλλιέργεια με το κirkάδιο ρολόι, έχουν περιγραφεί αρκετοί τρόποι, όπως η θερμοκρασία, μεταβολή (αύξηση) συγκέντρωσης του ορού στο θρεπτικό υλικό, και ανάπτυξη παρουσία γλυκοκορτικοειδών, όπως η δεξαμεθαζόνη (100-102). Η τελευταία είναι μια δημοφιλής μέθοδος που έχει περιγραφεί την πρώτη δεκαετία του 2000 (16, 100). Παρόλα αυτά, υπάρχουν αντιθέσεις στα αποτελέσματα μεταξύ των εργασιών της βιβλιογραφίας, όσον αφορά στην κατατομή της γονιδιακής έκφρασης των κύριων ρυθμιστών του ρολογιού στο 24ωρο (97, 103-105).

Σε αυτή την ενότητα της διατριβής, μελετήθηκαν τα επίπεδα της PARN στα κύτταρα HEK 293T κατόπιν εναρμόνισής τους με το ρολόι. Αρχικά, αξιολογήθηκαν τα επίπεδα γνωστών γονιδίων και πρωτεϊνών του κirkάδιου ρυθμού, ώστε να εξεταστούν οι πειραματικές συνθήκες της εναρμόνισης της καλλιέργειας με το κirkάδιο ρολόι. Ακολούθως, αναλύθηκαν τα επίπεδα της PARN (mRNA και πρωτεΐνη) στο 24ωρο. Τέλος, εξετάστηκαν τα επίπεδα του miR-29a στην πρόδρομη και ώριμη μορφή του.

Μεθοδολογία

Το κυτταρικό μοντέλο HEK 293T

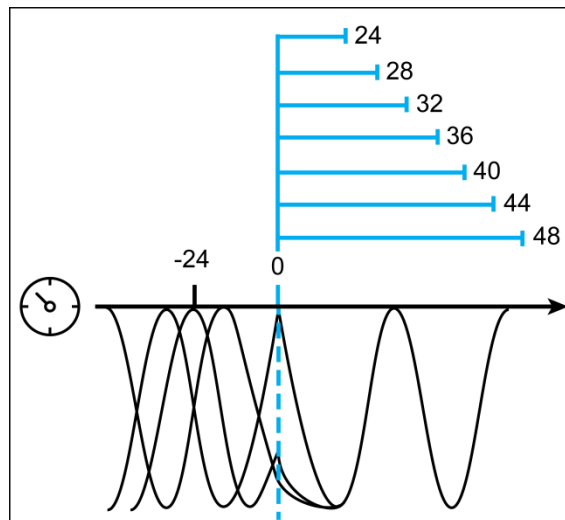
Βασικά χαρακτηριστικά

Τα κύτταρα HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293 cells) προέρχονται από ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα(106), τα οποία έχουν μετασχηματιστεί με ένα τμήμα DNA αδενοϊού τύπου 5 (Ad5)(107) το οποίο παράγει μια πρωτεΐνη του ιού που εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο και αναστέλλει την απόπτωση (108). Η σειρά 293T προέρχεται από τη HEK 293 μετά την εισαγωγή μιας μεταλλαγμένης μορφής του θερμοευαίσθητου T αντιγόνου του ιού SV40 και αρχικά αναφερόταν στη βιβλιογραφία ως 293/tsA1609neo(109). Η προέλευσή τους είναι ο νεφρός, αν και πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν πως τα κύτταρα HEK293 προέρχονται από εμβρυϊκό πρόδρομο ιστών επινεφριδίων (108).

Εναρμόνιση της καλλιέργειας με το κερκάδιο ρολόι

Για τη μελέτη γονιδίων και πρωτεϊνών σε χρονικά σημεία διαφόρων φάσεων του 24ώρου, τα κύτταρα HEK 293T, επεξεργάστηκαν ώστε να ακολουθούν το κερκάδιο ρολόι. Η επαγωγή του κερκάδιου ρολογιού στην καλλιέργεια HEK 293T γίνεται με δεξαμεθαζόνη (DEX) και συλλέχθηκαν σε επιλεγμένα χρονικά σημεία του 24ώρου, σύμφωνα με καθορισμένα πρωτόκολλα(110, 111).

Πιο συγκεκριμένα, κατάλληλος αριθμός κυττάρων επιστρώθηκε σε πιάτα καλλιέργειας τα οποία αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 12-16 ώρες (2×10^5 - 4×10^5 ανάλογα το πιάτο καλλιέργειας και το χρονικό σημείο που συλλέγονται τα κύτταρα). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού μέσου με μέσο το οποίο διαθέτει 100nM DEX (8893, SIGMA-ALDRICH) και 2 ώρες μετά ακολούθησε εκ νέου αλλαγή με το σύνηθες θρεπτικό καλλιέργειας (DMEM High glucose, L-glutamine, sodium pyruvate, 10% FBS) (110, 111). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες και συλλέχθηκαν ανά 4 ώρες για ένα 24ωρο. Τα δείγματα κυττάρων ονομάζονται ανάλογα με το χρονικό σημείο κατά το οποίο συλλέχθηκαν (ήτοι 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 ώρες μετά την προσθήκη της DEX) και τη συνθήκη στην οποία ανήκουν (**Εικόνα 12**). Η DEX διαλυτοποιείται παρουσία 0,004% DMSO, οπότε, εκτός από την ομάδα κυττάρων που επώαστηκαν για 2 ώρες με DEX, καλλιεργήθηκε άλλη μια ομάδα κυττάρων ελέγχου όπου τα κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες με 0.004% DMSO που αποτελεί την τελική συγκέντρωση του διαλύτη της DEX (112).



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας επαγωγής του κιρκάδιου ρυθμού στην καλλιέργεια HEK 293T. Το ρολόι στα αριστερά υποδηλώνει τη σχετική ώρα των χειρισμών στην καλλιέργεια. -24: 24 ώρες πριν την επαγωγή, 0: προσθήκη DEX, οι γαλάζιες γραμμές και οι χρόνοι 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 υποδηλώνουν τους χρόνους συλλογής των κυττάρων μετά την επαγωγή με DEX.

Εκχύλιση πρωτεϊνών

Η λύση των κυττάρων για εκχύλιση των πρωτεϊνών από κύτταρα HEK 293T έγινε όπως έχει περιγραφεί (113). Πιο συγκεκριμένα, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από το πιάτο καλλιέργειας και τα κύτταρα εκπλένονται με ψυχρό διάλυμα PBS. Μετά την απομάκρυνσή του, προστίθεται απευθείας πάνω στα κύτταρα διάλυμα λύσης κυττάρων IP150 (114) εμπλουτισμένο με 1mM DTT, 2mM EDTA και αναστολείς πρωτεασών (539196, SIGMA-ALDRICH) και τα κύτταρα αποκολλώνται από το επιφάνεια του τριβλίου με ειδική ξύστρα (scraper), συλλέγονται σε σωλήνα τύπου eppendorf χωρητικότητας 1.5 ml και αφήνονται για 20 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια, τα κύτταρα διασπώνται με τη χρήση υπερήχων για συνολικά 1 λεπτό με ενδιάμεσες παύσεις ανά 20 δευτερόλεπτα ενώ βρίσκονται σε πάγο. Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρώνται (15000rpm/20min) ώστε να κατακρημνιστούν τα κυτταρικά υπολείμματα και συλλέγεται το υπερκείμενο που αποτελεί το εκχύλισμα των πρωτεϊνών.

Ανοσοσύτρωση κατά Western

Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών

Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF βασίζεται στο γεγονός ότι τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-SDS είναι αρνητικά φορτισμένα και επομένως με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου μετακινούνται προς την άνοδο με αποτέλεσμα να εξέλθουν από την πηκτή και να καθηλωθούν στη μεμβράνη λόγω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων (115). Η τοποθέτηση της πηκτής και της μεμβράνης στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (Yrdimes Semi-dry Blotter, Wealtec) γίνεται ανάμεσα από ζεύγος χαρτιών Whatman (3 χαρτιά εκατέρωθεν της πηκτής-μεμβράνης) με τη μεμβράνη

προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και την πηκτή στον αρνητικό. Πριν την τοποθέτηση τους στη συσκευή, τόσο τα φύλλα Whatman όσο και η πηκτή και η μεμβράνη εμβαπίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς [Towbin Transfer Buffer (115): 25mM Tris, 192mM Glycine, 0.1% SDS, 15% Methanol]. Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται υπό σταθερή ένταση ρεύματος 270mA για 55 ± 3 λεπτά⁴. Η επιβεβαίωση της μεταφοράς γίνεται με έγχρωμους μάρτυρες γνωστών μοριακών μαζών και στη συνέχεια με χρώση της μεμβράνης με Ponceau S.

Ανοσοανίχνευση

Η ανοσοανίχνευση πραγματοποιήθηκε όπως έχει περιγραφεί (16) τροποποιώντας όπου χρειάζεται τα χρονικά διαστήματα επώασης με το πρωτογενές αντίσωμα. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη διατριβή περιγράφονται στον Πίνακα 4 (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2).

Επεξεργασία εικόνων

Η επεξεργασία των εικόνων μετά την ανοσοανίχνευση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ImageJ (116) ως εξής: για κάθε χρονικό σημείο που εξετάζεται, τα επίπεδα του μορίου στόχου κανονικοποιούνται με βάση τα επίπεδα της πρωτεΐνης αναφοράς (β-ακτίνη ή GAPDH).

Σύνθεση cDNA και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)

Σύνθεση ολικού cDNA

Για τη σύνθεση cDNA για επακόλουθη ανίχνευση μορίων mRNA με RT-qPCR χρησιμοποιείται το PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit (6110A, TaKaRa Bio) ενώ για την ανίχνευση μορίων miRNA RT-qPCR χρησιμοποιείται το Mir-X™ miRNA First Strand Synthesis Kit (638313, TaKaRa Bio). Και στις δύο περιπτώσεις, χρησιμοποιείται 1μg ολικού RNA και ακολουθούνται οι οδηγίες του εγχειριδίου οδηγιών του κατασκευαστή. Η χρήση διαφορετικών αντιδραστηρίων για την παρασκευή cDNA οφείλεται στο γεγονός πως η αντίστροφη μεταγραφή των μορίων miRNA δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί ικανοποιητικά έως καθόλου με «κοινά» αντιδραστήρια αντίστροφης μεταγραφής, καθώς είναι πολύ μικρά σε μέγεθος και δεν διαθέτουν ουρά πολυ(A), με αποτέλεσμα στην επακόλουθη αντίδραση RT-qPCR είτε να μην ανιχνεύονται καθόλου είτε τα αποτελέσματα να μην είναι αντιπροσωπευτικά ή/και επαναλήψιμα.

RT-qPCR

Οι αντιδράσεις RT-qPCR πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται (113). Η συγκριτική

⁴ Εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής διαχωρισμού κατά την ηλεκτροφόρηση

σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων μετά από κατάλληλη κατεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται με τη μέθοδο ΔC_T (117, 118). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη διατριβή περιγράφονται στον Πίνακα 3 (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2).

Αποτελέσματα-Συζήτηση

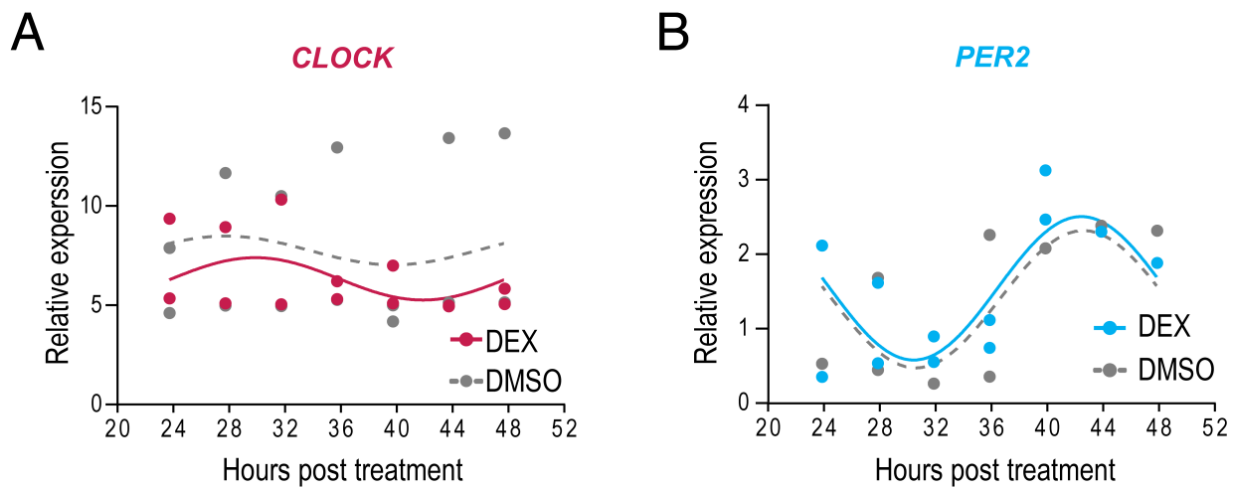
Εναρμόνιση των κυττάρων HEK293T με το κικκάδιο ρολόι

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές σχετικά με την εναρμόνιση της καλλιέργειας με το κικκάδιο ρολόι, αλλά πολλές φορές οι διαφορές στον πειραματικό σχεδιασμό και την κατατομή της έκφρασης των γονιδίων και των αντίστοιχων πρωτεϊνών τους στο 24ωρο μπορεί να προκαλέσουν σύγχυση (113). Προκαταρκτικά πειράματα καθόρισαν το χρονικό διάστημα επώασης των κυττάρων μετά τη DEX αλλά και το χρονικό διάστημα μεταξύ των δειγμάτων, προσδιορίζοντας έτσι τα χρονικά σημεία τα οποία μελετώνται. Αρχικά, είχαν εξεταστεί τα επίπεδα έκφρασης κικκάδιων γονιδίων ξεκινώντας τη λήψη και ολοκλήρωση των δειγμάτων μέσα στο πρώτο 24ωρο από την επώαση με DEX. Επιπλέον, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης κικκάδιων γονιδίων και πρωτεϊνών 24ώρες μετά την επώαση με DEX σε χρονικά διαστήματα που απείχαν μεταξύ τους 6 ώρες (119). Τέλος, για την εξέταση της διάρκειας της επίδρασης της DEX στην επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης των κικκάδιων γονιδίων, εξετάστηκαν σημεία πέρα από το δεύτερο 24ωρο (119). Η συλλογή κυττάρων για επιπλέον χρονικά σημεία πέραν του 24ώρου που εξετάζεται δεν κρίθηκε αναγκαία, καθώς η επίδραση της DEX είναι σταθερή έως και 60 ώρες μετά την προσθήκη της στα κύτταρα, χωρίς να υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα αποτελέσματα, ενώ αυξάνουν ιδιαίτερα τον όγκο των δεδομένων προς ανάλυση (119).

Έχοντας επιλέξει τις κατάλληλες χρονικές συνθήκες, ακολούθησε η μελέτη των επιπέδων των κύριων γονιδίων *CLOCK* και *PER2* του ρολογιού ώστε να ελεγχθεί η αρτιότητα της εναρμόνισης των κυττάρων με αυτό. Παρατηρούμε πως τα επίπεδα έκφρασης του *CLOCK* δεν εμφανίζουν κάποιο περιοδικό πρότυπο στο 24ωρο (Εικόνα 13 A). Το *CLOCK* σπανίως χρησιμοποιείται ως αντιπροσωπευτικό γονίδιο μεταξύ των γονιδίων του ρολογιού και δεν αποκρίνεται στην εναρμόνιση της καλλιέργειας με την DEX (14), παρότι αυτή είναι ένας ισχυρός και ευρέως χρησιμοποιούμενος παράγοντας για τον σκοπό αυτό (30). Όντως, η έκφραση του *CLOCK* δεν αλλάζει στατιστικά σημαντικά παρουσία της DEX, ενώ και η καμπύλη των αποτελεσμάτων περνάει τη δοκιμασία κανονικότητας (113).

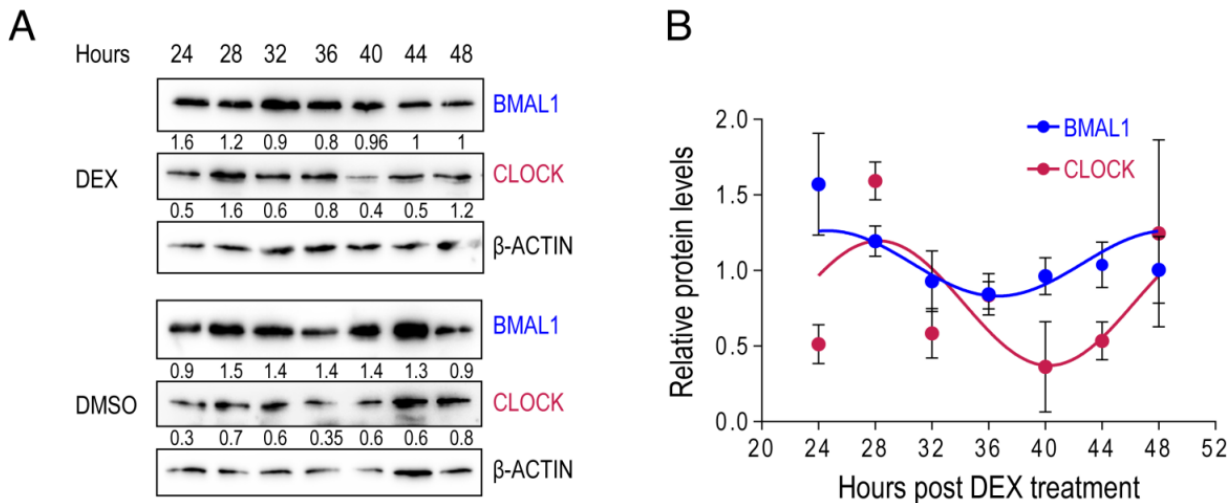
Η έκφραση του γονιδίου *PER2* ελέγχεται από στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (101) και εμφανίζει αναμενόμενο πρότυπο έκφρασης στο 24ωρο (Εικόνα 13 B) αν και τα μέγιστα και ελάχιστα της έκφρασης αποκλίνουν χρονικά με άλλες

εργασίες (104, 120). Η έκφραση του *PER2* διαφέρει σημαντικά μεταξύ της συνθήκης DEX και DMSO (p -value = 0.0481) παρότι οι καμπύλες μεταξύ των δύο συνθηκών εμφανίζουν ομοιότητα (113).



Εικόνα 13. Οι κύριοι ρυθμιστές του ρολογιού σε κύτταρα HEK293T εναρμονισμένα με το κιρκάδιο ρολόι. A-B. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *CLOCK* (A) και *PER2* (B) στη διάρκεια του 24ώρου. Οι τιμές ($n=2$) έχουν κανονικοποιηθεί με την έκφραση της *GAPDH*. Στα γραφήματα απεικονίζονται και οι δυο βιολογικές επαναλήψεις του πειράματος. DEX: κύτταρα που επώαστηκαν με DEX, DMSO: κύτταρα που επώαστηκαν με DMSO (απεικονίζονται με γκρι χρώμα) (113).

Στη συνέχεια, εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των κύριων ρυθμιστών του ρολογιού *CLOCK* και *BMAL1* (Εικόνα 14 A) που αποτελούν μέλη του ίδιου ετεροδιμερούς μεταγραφικού συμπλόκου (1). Αξίζει να σημειωθεί πως οι πρωτεΐνες παράγονται όλο το 24ωρο, όπως έχει περιγραφεί (121, 122). Το γράφημα που προκύπτει μετά τον υπολογισμό των σχετικών επιπέδων των πρωτεϊνών αυτών φαίνεται στην Εικόνα 14 B και αποκαλύπτει πως οι δυο παράγοντες εμφανίζουν παρόμοιο πρότυπο σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (123). Εξετάζοντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα του *CLOCK* (Εικόνα 13 και Εικόνα 14), παρατηρείται πως στα χρονικά σημεία 36-44 τα επίπεδα του σταδιακά μειώνονται. Ταυτόχρονα, στα ίδια χρονικά σημεία φαίνεται να συσσωρεύεται το mRNA του *PER2* (Εικόνα 13 B). Αυτή είναι μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση, καθώς η έκφραση του *PER2* βρίσκεται υπό το μεταγραφικό έλεγχο του συμπλόκου *CLOCK:BMAL1* (6).



Εικόνα 14. Επίπεδα των πρωτεϊνών *CLOCK* και *BMAL1* σε εναρμονισμένη καλλιέργεια HEK 293T. Οι αριθμοί πάνω από την εικόνα αντιστοιχούν στις ώρες κατά τις οποίες έγινε η συλλογή των δειγμάτων μετά την επώαση με DEX. Οι αριθμοί κάτω από κάθε εικόνα αντιστοιχούν στην τιμή της σχετικής κανονικοποίησης των επιπέδων των πρωτεϊνών αυτών σε σχέση με τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β -Actin. B. Διαγραμματική απεικόνιση των ποσοτικοποιημένων πρωτεϊνικών επιπέδων των πρωτεϊνών *CLOCK* και *BMAL1* από το A. Το σφάλμα αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση 3 βιολογικών επαναλήψεων (113).

Η PARN στο κυτταρικό μοντέλο του κιρκάδιου ρυθμού

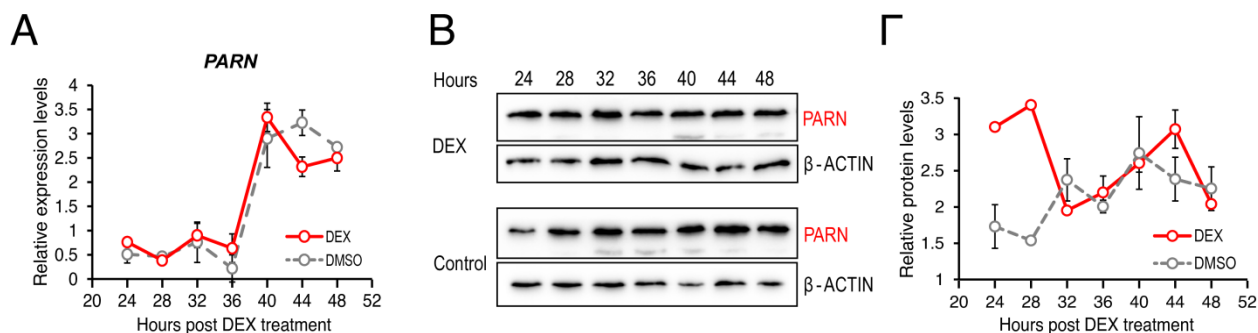
Η δράση της PARN ρυθμίζεται από την πρόσδεσή της στο 5' κάλυμμα του mRNA (70-73), καθώς και από την παρουσία *cis* δραστικών στοιχείων στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή των mRNA-στόχων, όπως τα στοιχεία κυτταροπλασματικής πολυαδενυλίωσης (CPEs) και στοιχεία πλούσια σε αδενοσίνες και ουριδίνες (AREs) (70). Επιπλέον, η PARN εμπλέκεται στην ωρίμανση μη κωδικών RNA, όπως τα snoRNA, τα miRNA επεξεργασμένα από την AGO2 και το στοιχείο RNA της τελομεράσης (51, 57, 77).

Από μελέτες του εργαστηρίου μας, έχει αναδειχθεί μια ενδιαφέρουσα δυναμική αλληλεπίδραση της PARN με το miR-29a-3p στον καρκίνο του πνεύμονα, όπου φαίνεται πως η PARN συμμετέχει στη διαδικασία ωρίμανσης του miR-29a-3p, ενώ το ώριμο miR-29a-3p στοχεύει το mRNA της PARN, ρυθμίζοντας τα επίπεδά της⁵. Σε συνδυασμό με το γεγονός πως το miR-29a διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο κιρκάδιο ρολόι και πως η PARN έχει ρυθμική έκφραση σε ήπαρ ποντικών (21) εξετάζουμε τα πρωτεϊνικά της επίπεδα στο κιρκάδιο ρολόι. Η μόνη αναφορά στα πρωτεϊνικά της επίπεδα στη διάρκεια του 24ωρου, αφορά μόνο σε δείγματα αμφιβληστροειδούς *X. laevis* (59)· η εργασία παρουσίαζε τα έντονα αυξομειούμενα επίπεδα της NOCTURNIN κατά τη διάρκεια του 24ώρου και η PARN είχε χρησιμοποιηθεί συγκριτικά ως μια απαδενυλάση με σταθερά επίπεδα (Εικόνα 6) (59).

Η εξέταση των αποτελεσμάτων μας για τα επίπεδα mRNA της PARN σε κύτταρα HEK293T, τα οποία έχουν εναρμονιστεί με το κιρκάδιο ρολόι, εμφανίζουν μια έντονη

⁵ A. Κυρίτσας, Διδακτορική διατριβή, Διαφορική έκφραση καρκινικών δεικτών σε παθήσεις του πνεύμονα: δυναμική σχέση απαδενυλασών και microRNAs, 2022, TBB, ΠΘ και Kyritsis A. et al (in preparation).

ταλάντωση στο 24ωρο (Εικόνα 15 Α). Στη συνέχεια, εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PARN στη διάρκεια του 24ώρου, καθώς δεν είναι ασύνηθες να παρατηρείται ταλάντωση σε επίπεδο μεταγράφου, αλλά η παραγωγή της πρωτεΐνης να ακολουθεί διαφορετικό πρότυπο (21). Όντως, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PARN φαίνεται να είναι ρυθμικά σε κύτταρα που έχουν εναρμονιστεί με το κερκάδιο ρολόι (Εικόνα 15 Β-Γ).



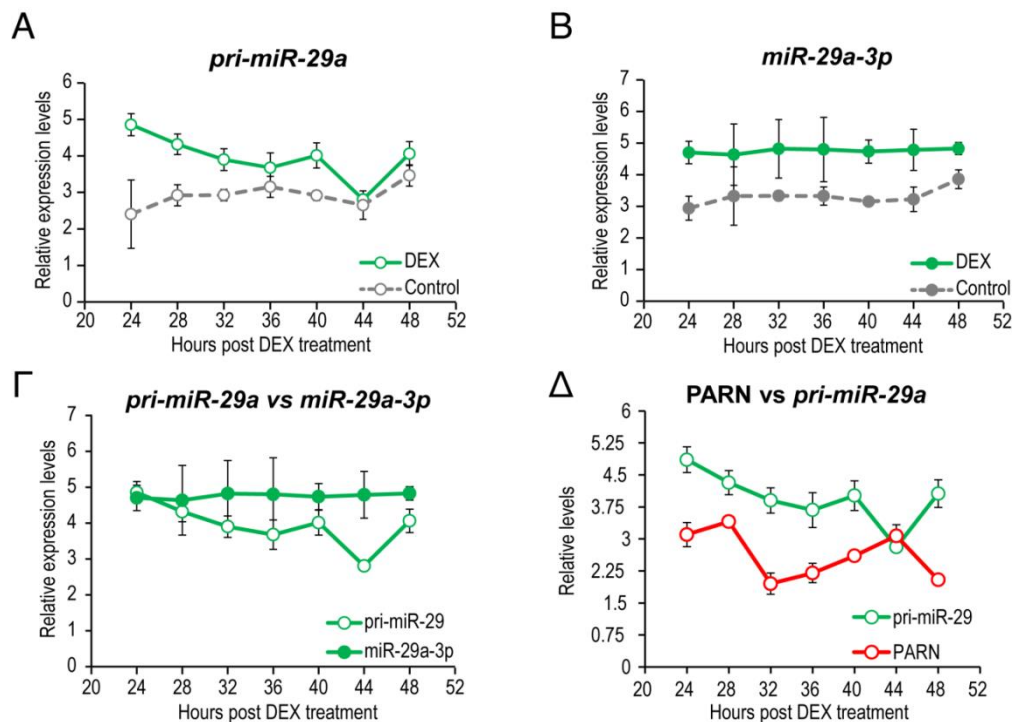
Εικόνα 15. Τα επίπεδα της PARN κατά τη διάρκεια του 24ώρου σε κύτταρα HEK 293T εναρμονισμένα με DEX. Α. Τα επίπεδα έκφρασης της *parn* στη διάρκεια του 24ώρου. Β. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης PARN στη διάρκεια του 24ώρου. Οι αριθμοί πάνω από την εικόνα αντιστοιχούν στις ώρες κατά τις οποίες έγινε η συλλογή των δειγμάτων μετά την επώαση με DEX. Γ. Διαγραμματική απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PARN. Το σφάλμα αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση 3 βιολογικών επαναλήψεων. Το DMSO χρησιμοποιείται στη διάλυση της DEX και για τον έλεγχο της πειραματικής διαδικασίας.

Αξίζει να σημειωθεί, πως στα κύτταρα που επώαστηκαν με DEX, τα επίπεδα mRNA της PARN εμφανίζουν μέγιστα επίπεδα στις 40 ώρες μετά την επώαση με DEX. Παράλληλα, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PARN φαίνεται να έχουν αργή και σταθερή αύξηση από τις 32 έως τις 44 ώρες μετά την επώαση με DEX, με μέγιστα επίπεδα στις 44 ώρες ακολουθώντας τα μέγιστα της συσσώρευσης του mRNA της. Τα επίπεδα πρωτεΐνης στα κύτταρα-μάρτυρες (control) θα μπορούσαν να καταδεικνύουν μια φυσική τάση παραγωγής της πρωτεΐνης, χωρίς ιδιαίτερες αυξομειώσεις στο 24ωρο, υποδηλώνοντας πως το παρατηρούμενο πρότυπο της PARN στα κύτταρα που επώαστηκαν με DEX οφείλεται σε κάποιο παράγοντα που επηρεάζει αποφασιστικά τη μετάφραση του mRNA της, δεδομένου ότι η *de novo* σύνθεση κάποιας πρωτεΐνης είναι μεγάλη μεταβολική επιβάρυνση, οπότε αυτή είναι απαραίτητη (124). Μια τέτοια παρατήρηση, θα μπορούσε να οφείλεται και σε έναν ρόλο προληπτικής ομοίωσης, όπως συμβαίνει, για παράδειγμα, εάν ένας παράγοντας είναι απαραίτητος για το κύτταρο σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία μέσα στο 24ωρο, αλλά η ρύθμιση ή η μεταγραφή του δεν εξαρτάται από τους μηχανισμούς του κερκάδιου ρολογιού (124). Η μεταγραφική δραστηριότητα καθεαυτή, μπορεί να επηρεάζει τα επίπεδα ενός μορίου mRNA, αλλά με όχι τόσο άμεσο αποτέλεσμα, όσο η ρύθμιση της παραγωγής μιας πρωτεΐνης ή η αποικοδόμησή της (124). Όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή (Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο κερκάδιο ρολόι), η περιοδική αφθονία του mRNA οφείλεται στη ρυθμική μεταγραφή, τη σταθερότητα και την αποικοδόμηση, ή το συνδυασμό αυτών των διεργασιών, καθορίζοντας τη διάρκεια ζωής

του mRNA (125, 126). Ομοίως, η περιοδική αφθονία των πρωτεϊνών είναι αποτέλεσμα και της ρυθμικής μετάφρασης, που συχνά σχετίζεται με την περιοδική αφθονία του mRNA, και της ρυθμικής αποικοδόμησης των πρωτεϊνών (126).

Το miR-29a στο κερκάδιο ρολόι

Στη συνέχεια, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης της πρόδρομης και της ώριμης μορφής του miR-29a-3p, καθώς έχει δειχθεί πως η PARN αλληλεπιδρά με την πρόδρομη μορφή του miR-29a επηρεάζοντας την ωρίμανσή του προς miR-29a αλλά και πως εμφανίζει κερκάδια ταλάντωση σε μύες (19). Επιπλέον, το ώριμο miR-29a επηρεάζει τα επίπεδα του *PER1*, οδηγώντας σε μια χρονική καθυστέρηση που είναι απαραίτητη για την περίοδο του κερκάδιου ρυθμού σε μύες (23). Τα επίπεδα της πρόδρομης μορφής του miR-29a αλλά και της ώριμης μορφής miR-29a-3p εξετάστηκαν για 24 ώρες σε κύτταρα που ευθυγραμμίστηκαν με το ρολόι (Εικόνα 16). Τα επίπεδα του pri-miR-29a φαίνεται να έχουν αυξομειούμενα επίπεδα (Εικόνα 16 Α, Γ), ενώ τα επίπεδα του miR-29a-3p φαίνεται να είναι πιο σταθερά κατά τη διάρκεια του 24ώρου (Εικόνα 16 Β, Γ), μια παρατήρηση που συνάδει με τα αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας καθώς η ταλάντωση στα επίπεδα του ώριμου microRNA στο 24ωρο είναι σύνηθες να είναι ανεπαίσθητη (22, 23). Τέλος, λαμβάνοντας υπόψη την αλληλεπίδραση μεταξύ PARN και pri-miR-29a, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PARN απεικονίστηκαν μαζί με τα επίπεδα του pri-miR-29a στη διάρκεια του 24ώρου (Εικόνα 16 Δ). Αξίζει να σημειωθεί, πως τα επίπεδα της PARN σε σχέση με το pri-miR-29a φαίνεται να έχουν μια φαίνεται να είναι σε *αντίφαση*· όταν τα επίπεδα της PARN αυξάνονται έως το μέγιστο των παρατηρούμενων επιπέδων τους (χρονικά σημεία 32 έως 44) τα επίπεδα του pri-miR-29a έχουν μια μειούμενη τάση έως το ελάχιστο των παρατηρούμενων επιπέδων τους (χρονικό σημείο 32 έως 44), υποδηλώνοντας πως η αλληλεπίδραση του pri-miR-29a και της PARN λαμβάνει χώρα και σε κύτταρα εναρμονισμένα με το κερκάδιο ρολόι.



Εικόνα 16. Τα επίπεδα του πρόδρομου και ώριμου miR-29a κατά τη διάρκεια του 24ώρου. Α, Β. Τα επίπεδα έκφρασης του pri-miR-29a (Α) και miR-29a-3p (Β) στη διάρκεια του 24ώρου. Η γκρι διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στα επίπεδα του pri-miR-29a ή miR-29a-3p στα κύτταρα που επώαστηκαν με DMSO (control). Γ. Απεικόνιση των επιπέδων του pri-miR-29a και miR-29a-3p στη διάρκεια του 24ώρου από τα κύτταρα που επώαστηκαν με DEX. Δ. Συνδυαστικό διάγραμμα των επιπέδων του pri-miR-29a σε σχέση με τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PARN σε κύτταρα που επώαστηκαν με DEX. Οι αριθμοί στο γράφημα αντιστοιχούν στο χρόνο (σε ώρες) μετά την επώαση με DEX. Το σφάλμα αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση 3 βιολογικών επαναλήψεων.

Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, η μελέτη του κιρκάδιου ρυθμού σε καλλιέργεια κυττάρων, και συγκεκριμένα σε κύτταρα HEK293T, είναι αξιόπιστη με υψηλά ποσοστά επαναληψιμότητας (113). Η PARN παρατηρείται να έχει αυξομειούμενα επίπεδα στη διάρκεια του 24ώρου τόσο σε επίπεδο mRNA αλλά και πρωτεΐνης, μια παρατήρηση που δεν έχει αναφερθεί ξανά σε κύτταρα που έχουν εναρμονιστεί με το κιρκάδιο ρολόι. Επιπλέον, τα επίπεδα του miR-29-3p και της πρόδρομης μορφής του είναι γνωστό πως ταλαντώνονται σε μύες και συγκεκριμένα το miR-29a-3p έχει περιγραφεί πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο κιρκάδιο ρολόι σε μύες (23), χωρίς μέχρι στιγμής να έχουν προσδιοριστεί τα επίπεδά τους στη διάρκεια του 24ώρου σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά. Η αλληλεπίδραση που έχει δειχθεί μεταξύ PARN και pri-miR-29a σε ανθρώπινα κύτταρα πλακώδους καρκίνου του πνεύμονα, NCI-H520, και η ταύτιση των μέγιστων επιπέδων της PARN με τα ελάχιστα επίπεδα του pri-miR-29a στη διάρκεια του 24ώρου σε ανθρώπινα κύτταρα HEK293T, υποδεικνύουν μια σχέση μεταξύ των δυο μορίων η οποία χρήζει περαιτέρω μελέτης, προλογίζοντας πειραματικά την επόμενη ενότητα πειραματισμού σε ζώα εργαστηρίου.

Τρίτο μέρος - Η PARN στο κερκάδιο ρολόι: Το ζωικό μοντέλο C57BL/6J

Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε, ο κεντρικός ταλαντωτής του ρολογιού των θηλαστικών βρίσκεται στον υπερχιασματικό πυρήνα του εγκεφάλου, ενώ οι μοριακοί μηχανισμοί του ρολογιού βρίσκονται σε όλους τους ιστούς του σώματος (94), μεταξύ των οποίων και το ήπαρ (94, 127). Η σταθερότητα και οι ρυθμοί ανακύκλωσης των κερκάδιων mRNA συμβάλλουν στη διατήρηση της κερκάδιας γονιδιακής έκφρασης. Τα miRNA είναι γνωστό ότι συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στο στην κερκάδια γονιδιακή έκφραση στοχεύοντας κερκάδια μετάγραφα (95, 96). Πιο συγκεκριμένα, το pri-miR-29a εμφανίζει κερκάδια ταλάντωση σε μύες (19) ενώ το ώριμο miR-29a επηρεάζει τα επίπεδα του *PER1*, δημιουργώντας μια χρονική καθυστέρηση που είναι απαραίτητη για την περίοδο του κερκάδιου ρυθμού στους ποντικούς (23).

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η ουρά πολυ(A) είναι ένα σημαντικό δομικό χαρακτηριστικό των mRNA το οποίο καθορίζει τη σταθερότητα, τη μεταφραστική ικανότητα και την αποικοδόμηση των mRNA (1). Το μεταβαλλόμενο μήκος της ουράς πολυ(A) (21) κατά τη διάρκεια του 24ώρου θέτει ένα ερώτημα σχετικά με την απαδενυλίωση: εάν οι απαδενυλάσες συντίθεται καθ' όλη τη διάρκεια του 24ώρου και διατηρούνται σε κατάσταση αναμονής έως ότου τις κατευθύνουν στους επιλεγμένους στόχους τους miRNA ή πρωτεΐνες με τα οποία αλληλεπιδρούν, ή εάν παράγονται και αποικοδομούνται ρυθμικά με στόχο τη ρυθμική αποικοδόμηση συγκεκριμένων RNA με βάση τη χρονική συγκυρία;

Ορμώμενοι από τα αποτελέσματα για την περιοδική έκφραση της PARN στα εναρμονισμένα κύτταρα HEK, εξετάσαμε σε επίπεδο οργανισμού με την PARN στο επίκεντρο, ώστε να αποτυπωθούν οι αλληλεπιδράσεις της PARN σε πραγματικές συνθήκες φωτοπεριόδου. Για το σκοπό αυτό, αρχικά εξετάστηκαν τα επίπεδα της PARN στο 24ωρο. Παράλληλα, εξετάζοντας την αλληλεπίδραση PARN::miR-29a σε φυσιολογικές συνθήκες στο ζωικό μοντέλο, ενώ έγινε και προσπάθεια για τη διερεύνηση της σχέσης αυτής. Τέλος, ακολούθησε πρωτεομική ανάλυση δειγμάτων από όλα τα χρονικά σημεία του 24ώρου ώστε να ταυτοποιηθούν οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της PARN σε μια προσπάθεια να φωτιστεί ο ρόλος της PARN στο κερκάδιο ρολόι. Η PARN φαίνεται να αλληλεπιδρά με νέες πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν σε μεγάλο εύρος βιολογικών διεργασιών, υποδηλώνοντας πως επιτελεί νέους και διαφορετικούς ρόλους ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου στο κερκάδιο ρολόι.

Μεθοδολογία

Το ζωικό μοντέλο C57BL/6J

Βασικά χαρακτηριστικά

Οι μύες C57BL/6J είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο στέλεχος στην έρευνα αλλά και για τη δημιουργία διαγονιδίων. Είναι ζώο εργαστηρίου που αναπαράγεται με αιμομικτικό τρόπο, γεγονός που οδηγεί σε γενετικά ομοιόμορφους πληθυσμούς ως προς τα κληρονομούμενα χαρακτηριστικά ή τους φαινότυπους (π.χ. εμφάνιση, συμπεριφορά, φυσιολογία και απόκριση στις πειραματικές διεργασίες). Οι μύες μικτού γενετικού υποβάθρου ή μύες που δεν αναπαράγονται αποκλειστικά αιμομικτικά έχουν υψηλά μεταβλητή περίοδο στον κικκάδιο ρυθμό τους (128), καθώς έχει δειχθεί πως οι πολυμορφισμοί που μπορεί να εμφανιστούν σε αιμομικτικά στελέχη τρωκτικών υποδεικνύουν και διαφορές στο γενετικό υπόβαθρο που επηρεάζουν την κικκάδια ρυθμικότητα (129). Για τους παραπάνω λόγους, επιλέχθηκε το συγκεκριμένο στέλεχος το οποίο επιδεικνύει έντονες και μη παθολογικές αποκρίσεις του κικκάδιου ρυθμού επιτρέποντας τη μελέτη του χωρίς το γενετικό υπόβαθρο να συνεισφέρει έντονα στη λειτουργία του κικκάδιου ρυθμού (129).

Εκτροφή και θυσία

Η εκτροφή, οι χειρισμοί και η θυσία των μυών πραγματοποιήθηκε στο εκτροφείο πειραματόζων του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Το πειραματικό πρωτόκολλο διαδικασιών σχεδιάστηκε σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία (19-22, 130-133), και ακολούθως αξιολογήθηκε και έλαβε έγκριση από την αρμόδια Διεύθυνση της Περιφέρειας Αττικής για πειραματισμό σε ζώα εργαστηρίου με Αρ.Πρωτ.: 3752/20-07-2018.

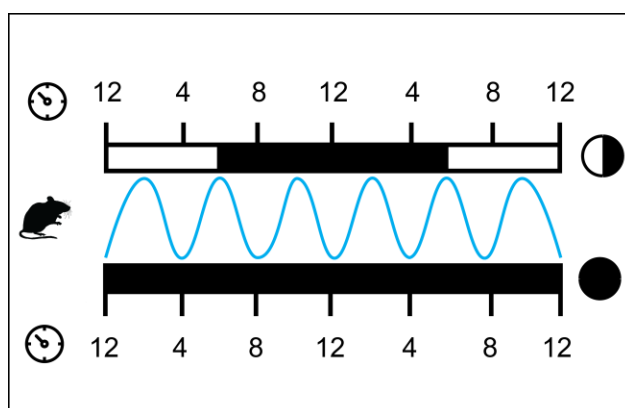
Σύμφωνα με το σχεδιασμό, 28 αρσενικοί μύες ηλικίας 8 εβδομάδων με *ελεύθερη πρόσβαση (ad libitum) σε φαγητό* και νερό εκτράφηκαν σε δυο ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, η μία ομάδα εκτράφηκε σε κανονικό κύκλο ημέρας/νύκτας (12h/12h)⁶ (στο εξής «ποντικοί LD») μέχρι τη στιγμή της ευθανασίας. Η δεύτερη ομάδα μυών εκτράφηκε επίσης σε κανονικό κύκλο ημέρας/νύκτας και μεταφέρθηκε σε συνθήκες συνεχούς νύκτας (ημέρα/νύκτα: 0h/24h) 2 εβδομάδες πριν την ευθανασία (στο εξής «ποντικοί DD») (Εικόνα 17).

Όλοι οι οργανισμοί συνεχίζουν να επιδεικνύουν ρυθμικότητα στη φυσιολογία και τη συμπεριφορά τους με περίοδο περίπου 24 ωρών ακόμη και αν βρίσκονται σε συνεχείς συνθήκες (1, 134). Στα θηλαστικά, το φως αποτελεί το κυριότερο ερέθισμα εναρμόνισης του κικκάδιου ρυθμού με το εξωτερικό περιβάλλον (106). Η συνθήκη διατήρησης των μυών σε 24 ώρες σκότους (προσομοίωση νύκτας στο εξωτερικό περιβάλλον) έγινε

⁶ Συνθήκες φωτοπεριόδου. Φως: 06:00-18:00, σκοτάδι: 18:00-06:00

λαμβάνοντας υπόψη πρωτόκολλα πειραματισμού που έχουν ήδη περιγραφεί (19-22, 130-133) αλλά και το γεγονός πως οι μύες είναι νυκτόβια ζώα (δηλαδή είναι δραστήρια κατά τη διάρκεια της νύκτας) (134).

Η θυσία των πειραματόζων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της αρμόδιας Διεύθυνσης Περιφέρειας Αττικής για πειράματα με το λιγότερο δυνατό αριθμό ζώων εργαστηρίου και την πρόκληση της ελάχιστης δριμύτητας των χειρισμών σε αυτά. Οι πειραματικός σχεδιασμός προέβλεπε τη θυσία των μυών ανά 4 ώρες για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Για κάθε χρονικό σημείο θυσιάστηκαν 2 μύες από κάθε ομάδα (LD και DD) και ακολούθως αφαιρέθηκε το ήπαρ. Τα δείγματα ήπατος εκπλύθηκαν μια φορά με κρύο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS), καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο και κατόπιν μεταφέρθηκαν στους -80°C έως την περαιτέρω επεξεργασία τους.



Εικόνα 17. Επισκόπηση της δειγματοληψίας από μύες C57BL/6J. Δίπλα από τις ώρες της ημέρας (επάνω και κάτω από τις μπάρες) φαίνεται η εναλλαγή φωτοπεριόδου για τις δυο ομάδες μυών. Η ασπρόμαυρη μπάρα δείχνει τις ώρες του 24ώρου όπου υπάρχει φως (λευκό χρώμα) ή σκοτάδι (μαύρο χρώμα ή μαύρη μπάρα). Ασπρόμαυρος κύκλος: 12 ώρες φως/12 ώρες σκοτάδι, μαύρος κύκλος: 0/24.

Εκχύλιση πρωτεϊνών

Η εκχύλιση του συνόλου των πρωτεϊνών από ήπαρ μυός πραγματοποιείται με την ανάδευση/ομογενοποίησή του με ρυθμιστικό διάλυμα IP150 (114) εμπλουτισμένο με 1mM DTT, 2mM EDTA και αναστολείς πρωτεασών (1ml ανά 100mg ιστού, 539196, SIGMA-ALDRICH)) σε ομογενοποιητή διάσπασης ιστών τύπου Potter-Elvehjem. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται λύση σε πάγο με χρήση υπερήχων για συνολικά 1 λεπτό με ενδιάμεσες παύσεις ανά 20 δευτερόλεπτα, φυγοκέντρηση και συλλογή του υπερκειμένου που αποτελεί το εκχύλισμα του συνόλου των πρωτεϊνών. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, αφού ποσοτικοποιηθούν με τη μέθοδο Bradford, αποθηκεύονται στους -80°C .

Ανοσοσύπωση κατά Western

Η ανοσοσύπωση κατά Western για τα δείγματα από ηπατικό ιστό πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται (113), ενώ περισσότερες λεπτομέρειες βρίσκονται στη Μεθοδολογία του Δεύτερου μέρους της παρούσας διατριβής (βλ. σελ. 38).

Σύνθεση cDNA και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)

Οι αντιδράσεις RT-qPCR πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται (113). Η συγκριτική σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων μετά από κατάλληλη κατεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται με τη μέθοδο ΔC_T (117, 118). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη διατριβή περιγράφονται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 (Πίνακας 5). Περισσότερες λεπτομέρειες βρίσκονται στη Μεθοδολογία του Δεύτερου μέρους της παρούσας διατριβής (βλ. σελ. 39).

Ανοσοκατακρήμιση πρωτεϊνών

Η ανοσοκατακρήμιση πραγματοποιήθηκε με σφαιρίδια σεφαρόζης που φέρει συζευγμένα μόρια πρωτεΐνης A (ab193256, Abcam). Η πρωτεΐνη A είναι γενετικά τροποποιημένη πρωτεΐνη ώστε να περιέχει πέντε περιοχές δέσμευση για IgG σε σχέση με τη φυσική πρωτεΐνη A. Η περιοχή σύνδεσης κυτταρικού τοιχώματος, περιοχή δέσμευσης αλβουμίνης και άλλες περιοχές μη ειδικής πρόσδεσης έχουν απομακρυνθεί από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη A για να διασφαλιστεί μέγιστη ειδική σύνδεση IgG με ικανότητα πρόσδεσης IgG ≥ 16 mg human ή rabbit IgG ανά mL σφαιριδίων (ab193256, Abcam). Τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα IP150 (εμπλουτισμένο με 1mM DTT, 1mM PMSF και αναστολείς πρωτεασών). Οι εκπλύσεις πραγματοποιούνται με την επαναδιάλυση των σφαιριδίων στο εμπλουτισμένο διάλυμα IP150 που απομακρύνεται με φυγοκέντρηση σε 1000xg. Η διαδικασία της πλύσης επαναλαμβάνεται 3 φορές. Μετά την τελευταία πλύση, τα σφαιρίδια αναμίχθηκαν με το εκχύλισμα πρωτεϊνών και πραγματοποιήθηκε η προεκκαθάριση (preclearing) στους 4°C για 1 ώρα υπό συνεχή περιστροφή (15rpm), ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική πρόσδεση πρωτεϊνών στα σφαιρίδια. Στη συνέχεια, το πρωτεϊνικό εκχύλισμα επώαστηκε με πρωτογενές αντίσωμα για τη σύνδεση με την πρωτεΐνη-στόχο την κατακρήμιση της πρωτεΐνης στόχου με αναλογία 1μg αντισώματος ανά 1mg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από 14-40 ώρες 4°C υπό συνεχή περιστροφή (15rpm). Σημειώνεται, πως πριν την προσθήκη αντισώματος για την ανοσοκατακρήμιση, παραλαμβάνεται το 5% του δείγματος για ανάλυση (INPUT) ελεγχθεί/επιβεβαιωθεί η παρουσία της PARN στο εκχύλισμα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για την ανοσοκατακρήμιση. Ακολούθως, τα σφαιρίδια διαχωρίστηκαν το από υπερκείμενο δείγμα με φυγοκέντρηση και τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν με τρεις όγκους διαλύματος IP150 (εμπλουτισμένο με 1mM DTT, 1mM PMSF και αναστολείς πρωτεασών) τρεις φορές με ενδιάμεση επώαση 2 λεπτών υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Με το πέρας των πλύσεων, πραγματοποιείται προαιρετικά επώαση των σφαιριδίων με RNase A σε συγκέντρωση 50μg/ml για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή περιστροφή (15rpm). Τέλος, πραγματοποιείται η έκλυση των πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια με την

προσθήκη 1-2 όγκων διαλύματος 0.2M γλυκίνης pH 2-2.5 για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση (15rpm). Οι πρωτεΐνες παραλαμβάνονται με φυγοκέντρηση σε 15000rpm. Μέρος του δείγματος εκλουσμένων πρωτεϊνών φυλάσσεται στους -80°C μέχρι την ανάλυση κατά western και το υπόλοιπο δείγμα υποβάλλεται σε φασματομετρία μάζας. Ως δείγμα ελέγχου, χρησιμοποιείται το ίδιο δείγμα όπου έχει πραγματοποιηθεί ανοσοκατακρήμνιση με φυσιολογικό IgG, το οποίο είναι συμβατό με τον οργανισμό προέλευσης του πρωτογενούς αντισώματος, και ακολουθείται η ίδια διαδικασία.

Ανοσοκατακρήμνιση συμπλόκων πρωτεϊνών-RNA

Για την ανοσοκατακρήμνιση πρωτεΐνης που προσδένει RNA ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Vogt M. και Taylor V. (135) με τροποποιήσεις. Για την ανάπτυξη διασυνδέσεων (crosslinks) μεταξύ RNA και πρωτεϊνών από τον ηπατικό ιστό πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ακτινοβολίας UV. Ο ιστός τεμαχίζεται σε μικρά κομμάτια, επαναιωρείται σε ισότονο διάλυμα (PBS) εμπλουτισμένο με αναστολείς πρωτεασών (539196, SIGMA-ALDRICH) και 100U/ml αναστολέα RNασών (2313A, TaKaRa Bio) σε αναλογία 10ml/gr ιστού. Στη συνέχεια, το εναιώρημα τοποθετείται κάτω από λάμπα ακτινοβολίας UV (254 nm) (UVGL-58, Taylor Scientific) σε απόσταση 3-5 cm από το δείγμα (136). Στη συνέχεια, το δείγμα ομογενοποιείται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (135) και κατόπιν διασπάται με τη χρήση υπερήχων για 1 λεπτό και 40 δευτερόλεπτα με ενδιάμεσες παύσεις των 10 δευτερολέπτων ενώ όλη η διαδικασία λύσης γίνεται σε πάγο. Το διάλυμα φυγοκεντρείται και το εκχύλισμα προεκαθαρίζεται και στη συνέχεια επώαζεται με το πρωτογενές αντίσωμα και το φυσιολογικό IgG, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω (βλ. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών). Σημειώνεται πως, πριν την προσθήκη αντισώματος για την ανοσοκατακρήμνιση, λαμβάνεται το 5% του δείγματος για ανάλυση (INPUT). Εν συνεχεία, τα σφαιρίδια εκπλένονται σε θερμοκρασία δωματίου με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα εμπλουτισμένο με αναστολείς πρωτεασών και 100U/ml αναστολέα RNασών. Τέλος η έκλυση των συμπλόκων RNA-πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια γίνεται με την προσθήκη διαλύματος RIP (135) εμπλουτισμένου με 400 U/ml αναστολέα RNασών. Στα δείγματα προστίθεται απευθείας αντιδραστήριο TRI-Reagent (SIGMA-ALDRICH), σύμφωνα με το εγχειρίδιο οδηγιών του κατασκευαστή, και ακολουθεί σύνθεση cDNA χρησιμοποιώντας όλη την ποσότητα του εκχυλισμένου RNA για την αντίδραση σύνθεσης. Τα δείγματα αναλύονται με qPCR με αραίωση του cDNA 1:4, ενώ η ποσοτικοποίησή τους γίνεται με τη σύγκριση των επιπέδων των προς εξέταση mRNA με τα επίπεδα του δείγματος πριν την ανοσοκατακρήμνιση (INPUT).

Πρωτόκολλο ανίχνευσης *in vivo* αλληλεπιδράσεων μέσω κατακρήμνισης RNA (in vivo Interactions by pulldown of RNA-vIPR)

Για τη διαδικασία ανίχνευσης πρωτεϊνών που κατακρημνίζονται με συγκεκριμένα RNA ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της Theil, K. et al., 2019 (136). Η διαδικασία δημιουργίας σταθερών συνδέσεων μεταξύ RNA και πρωτεϊνών από τον ηπατικό ιστό πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται παραπάνω (βλ. Ανοσοκατακρήμνιση συμπλόκων πρωτεϊνών-RNA). Ακολούθως, ο ιστός επαναιωρήθηκε σε πάγο παρουσία διαλύματος λύσης IP (IP lysis buffer, (135)) εμπλουτισμένο με 1×PIs, 2mM DTT και 200U/ml αναστολέα RNασών (RNasin, 2313A, TaKaRa Bio) σε αναλογία 100μl buffer/ 10mg ιστού και ομογενοποιήθηκε. Τα υπολείμματα ιστού κατακρημνίστηκαν με φυγοκέντρηση (1000 rpm, 10 λεπτά, 4°C). Στη συνέχεια, έγινε λύση με τη χρήση υπερήχων συνολικά για ένα λεπτό σε χρονικά διαστήματα των 20 δευτερολέπτων με ενδιάμεσα διαλείμματα ίδιας διάρκειας για την αποφυγή της αύξησης της θερμοκρασίας στο δείγμα, ενώ το δείγμα παρέμεινε στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (28900g, 30 λεπτά, 4°C) ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα κυτταρικών μεμβρανών. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου σε αυτό. Τέλος, το εκχύλισμα πρωτεϊνών/RNA αραιώθηκε με διάλυμα IP150 (εμπλουτισμένο με αναστολείς πρωτεασών, 2mM DTT και 200U/ml RNasin) ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 2-3.5mg/ml και τέλος αραιώθηκε 1:2 με διάλυμα υβριδοποίησης (750 mM NaCl, 1% SDS, 50 mM Tris-Cl, pH 7.0, 1 mM EDTA, 15% formamide). Σημειώνεται πως πριν την κατακρήμνιση, παραλαμβάνεται το 5% του δείγματος για ανάλυση (INPUT).

Τα σφαιρίδια που χρησιμοποιήθηκαν είναι μαγνητικά και έχουν μέγεθος 1μm ενώ φέρουν στην επιφάνειά τους ομοιοπολικά συνδεδεμένα μόρια στρεπταβιδίνης με ικανότητα πρόσδεσης 3500-5000 pmol βιοτίνης ανά mg σφαιριδίων (MD03001, Magtivio, Ολλανδία). Η προεκκαθάριση του δείγματος έχει ως σκοπό την αύξηση της εξειδίκευσης της αλληλεπίδρασης του δείγματος με τα σφαιρίδια που φέρουν τον ακινητοποιημένο ιχνηθέτη. Τα μαγνητικά σφαιρίδια εκπλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα IP150 (εμπλουτισμένο με 1×PIs, 2mM DTT και 200U/ml RNasin) σε ίσο όγκο (100 μL σφαιριδίων ανά 1 mL εκχυλίσματος). Οι πλύσεις πραγματοποιούνται με την επαναδιάλυση των σφαιριδίων στο εμπλουτισμένο διάλυμα IP150 και εφαρμογή μαγνητικού πεδίου ώστε να αφαιρεθεί το διάλυμα και να επαναληφθεί η πλύση. Μετά την τελευταία πλύση, τα σφαιρίδια αναμίχθηκαν με το εκχύλισμα πρωτεϊνών/RNA για προεκκαθάριση με διάλυμα υβριδοποίησης (136). Κατόπιν, το προεκκαθαρισμένο εκχύλισμα αναμιγνύεται με κατάλληλη ποσότητα ιχνηθέτη (50pmol ιχνηθέτη ανά mg προεκκαθαρισμένου εκχυλίσματος) και αφήνονται να υβριδοποιηθούν 12-16 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση. Ο ιχνηθέτης που χρησιμοποιείται είναι ένα μόριο DNA που φέρει αντινοσηματική αλληλουχία

για το πρόδρομο μόριο miR-29a (pri-miR-29a) ή μια μη νοηματική αλληλουχία για χρήση ως αρνητικού μάρτυρα (μη νοηματικός ιχνηθέτης/scramble). Οι ιχνηθέτες σχεδιάστηκαν όπως έχει περιγραφεί (133, 136, 137) (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2, Πίνακας 6). Στη συνέχεια, προστίθενται τα σφαιρίδια και επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C υπό ανάδευση. Κατόπιν πραγματοποιούνται 5 πλύσεις με διάλυμα 2xSSC, 0.5% SDS και ακολουθεί έκλουση πρωτεϊνών όπως έχει περιγραφεί (136). Τα δείγματα πρωτεΐνης που προκύπτουν αναλύονται με φασματομετρία μάζας.

Προετοιμασία δειγμάτων για φασματομετρία μάζας

Τα δείγματα έκλουσης μετά την ανοσοκατακρήμνιση της PARN, καθώς και τα δείγματα έκλουσης μετά από χρήση φυσιολογικών IgG για ανοσοκατακρήμνιση, επεξεργάστηκαν σύμφωνα με τη μεθοδο SP3 (138). Τα κατάλοιπα κυστεϊνών ανήχθησαν σε 100mM DTT και αλκυλιώθηκαν σε 100 mM ιωδοακεταμίδιο (iodoacetamide, Acros Organics). Χρησιμοποιήθηκε μίγμα υδρόφιλων και υδρόφοβων σφαιριδίων Sera-Mag τροποποιημένων με καρβονυλικές ομάδες για την ομοιοπολική σύνδεση πρωτεϊνών μέσω πρωτοταγών αμινών, σε αναλογία μίγματος 1:1 (Cytiva Life Sciences). 20 μg σφαιριδίων προστέθηκαν σε κάθε δείγμα σε διάλυμα 50% αιθανόλης και ο καθαρισμός του δείγματος έγινε εφαρμόζοντας μαγνητικό πεδίο στα σφαιρίδια. Τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν δυο φορές με 80% αιθανόλη και μια φορά με 100% ακετονιτρίλιο. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται συνδεδεμένες πάνω στα σφαιρίδια επώαστηκαν με διάλυμα 0.5 μg Trypsin/LysC (MS grade, Thermo Scientific)/100 mM Ammonium bicarbonate για 12-16 ώρες στους 37°C υπό έντονη ανάδευση (1200 rpm, Eppendorf Thermomixer). Ακολούθως, το υπερκείμενο συλλέχθηκε και τα πεπτίδια καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο SP3 και επαναδιαλύθηκαν στην κινητή φάση A (0.1% Formic acid σε νερό), υποβλήθηκαν σε κατεργασία με υπερήχους και ακολούθησε ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των πεπτιδίων με μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm (Implen). Η φασματομετρία μάζας πραγματοποιήθηκε από την Δρ Μαρίνα Σαμιωτάκη (εργαστήριο Πρωτεομικής ανάλυσης του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ») στο Dionex Ultimate 3000 nano RSLC συνδεδεμένο με το φασματογράφο μάζας Thermo Q Exactive HF-X Orbitrap. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με DIA-NN 1.8 (Data-Independent Acquisition by Neural Networks) αντιστοιχίζοντας τα αποτελέσματα με τη βάση δεδομένων Uniprot για *Mus musculus* και η στατιστική ανάλυση και οπτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πακέτο Perseus 1.6.15.0.

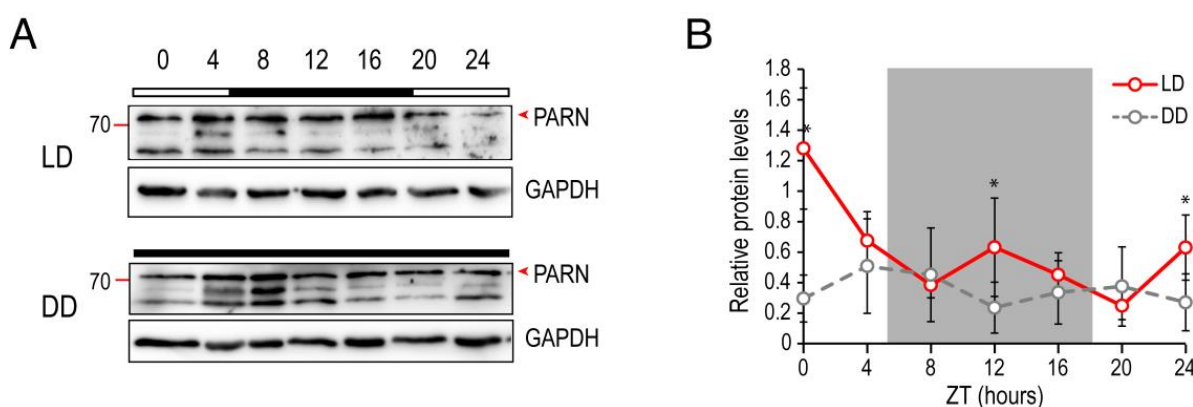
Αποτελέσματα – Συζήτηση

Η PARN σε μύες C57BL/6J

Εφόσον τα προκαταρκτικά αποτελέσματα από την εναρμόνιση των κυττάρων HEK293T υποδηλώνουν πως η PARN έχει ρυθμική έκφραση και αυξομειούμενα επίπεδα κατά τη διάρκεια του 24ώρου, προχωρήσαμε σε παρόμοιες μελέτες σε ήπαρ μυών C57BL/6J (Εικόνα 26, ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, έχει δειχθεί πως το mRNA της PARN έχει ρυθμική έκφραση σε ήπαρ ποντικών (21). Το πρότυπο των επιπέδων κατά τη διάρκεια του 24ώρου μεταξύ της δημοσιευμένης εργασίας και των δικών μας πειραματικών αποτελεσμάτων δεν βρίσκονται σε απόλυτη ταύτιση (Εικόνα 18 A και Εικόνα 6 B), γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε διαφορές εκχύλισης του RNA από τον ιστό αλλά και την επιλογή των εκκινητών που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση του cDNA. Δεδομένου πως η εργασία εστιάζει στο μήκος των ουρών πολυ(A) χρησιμοποιούν εκκινητές που υβριδίζουν στην ουρά πολυ(A) ενώ στο δικό μας πειραματικό σχεδιασμό χρησιμοποιείται μίγμα εκκινητών που υβριδίζουν στην ουρά πολυ(A) και τυχαίων εξαμερών εκκινητών (139). Παρατηρείται συχνά διαφορετική αντιπροσώπευση γονιδίων σε ένα δείγμα εάν το cDNA έχει συντεθεί με εκκινητές που υβριδίζουν στην ουρά πολυ(A) του RNA (εκκινητής oligodT) σε σχέση με τα επίπεδα που μπορεί να παρατηρηθούν εάν η σύνθεση cDNA έχει πραγματοποιηθεί με τυχαίους εξαμερείς εκκινητές (140). Παρατηρούμε πως τα επίπεδα mRNA της PARN μεταξύ LD και DD μυών δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση (Εικόνα 18 A). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, όπου η PARN έχει ρυθμικά επίπεδα mRNA στο 24ωρο, αν και πρέπει να σημειωθεί πως το συμπέρασμα αυτό στη συγκεκριμένη εργασία προκύπτει από πειράματα μικροσυστοιχιών (21).

Στη συνέχεια, εξετάσαμε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PARN στη διάρκεια του 24ώρου στο ήπαρ μυών που προέρχονται από τις ομάδες LD και DD (Εικόνα 18 B, Γ). Τα επίπεδα της PARN φαίνεται να έχουν αυξομειούμενα επίπεδα στη διάρκεια του 24ώρου, με μέγιστα επίπεδα στα χρονικά σημεία 0/24 και 12 (ZT0, 12, 24) στους μύες LD ενώ στους μύες DD τα αυξομειούμενα επίπεδα δε συμφωνούν χρονικά μεταξύ των ομάδων LD και DD, ενώ τα συνολικά επίπεδα της PARN στα DD ζώα είναι χαμηλότερα όλο το 24ωρο. Συμπερασματικά, η PARN φαίνεται να έχει συνεχή παρουσία στο ήπαρ μυών όλο το 24ωρο με αυξομειούμενα επίπεδα χωρίς, ωστόσο, να μπορεί να θεωρηθεί πως είναι μια κερκάδια πρωτεΐνη, καθώς έχει στατιστικά σημαντικά διαφορετικό πρότυπο επιπέδων κατά τη διάρκεια του 24ώρου σε συνεχείς συνθήκες σκοταδιού σε σχέση με τα πειραματόζωα που εκτράφηκαν σε συνθήκες φυσιολογικής φωτοπεριόδου (Εικόνα 18 Γ). Αυτό το συμπέρασμα προκύπτει από το γεγονός πως ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του

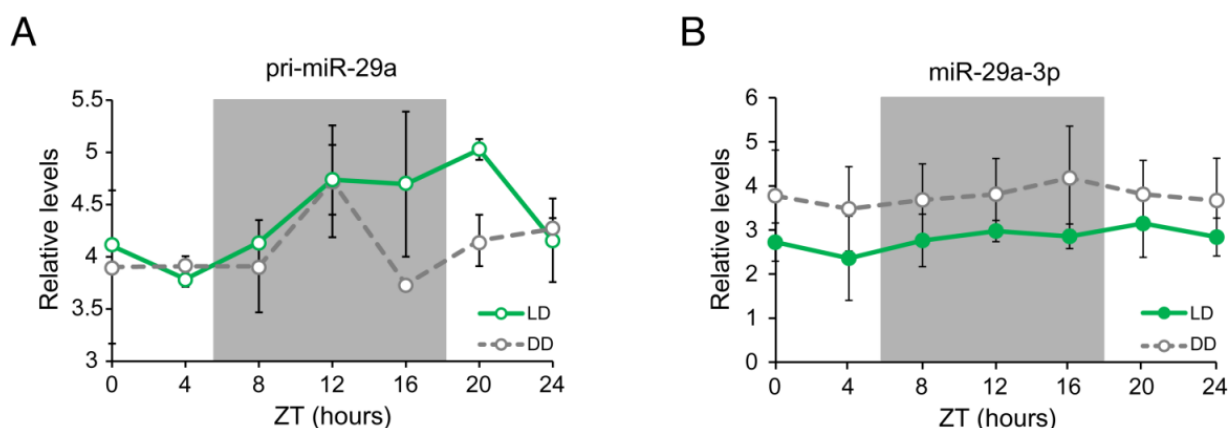
κirkάδιου ρολογιού είναι πως είναι αυτοσυντηρούμενος, δηλαδή αποκρίνεται στα εξωτερικά ερεθίσματα αλλά έχει και την ικανότητα να αντισταθμίζει την επίδραση της θερμοκρασίας (και άλλων παραγόντων που διαφοροποιούνται συχνά και έντονα) στη διάρκεια του 24ώρου (141, 142). Επομένως, βασικό χαρακτηριστικό των παραγόντων που ρυθμίζουν ή ρυθμίζονται άμεσα από το ρολόι είναι να μπορούν να διατηρούν τη ρυθμικότητα στα επίπεδά τους ακόμη και σε συνθήκες όπου ο κύριος χρονοθέτης (ZT) – εν προκειμένω το φως– απουσιάζει (141). Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει το γεγονός πως κατά την ανοσοανίχνευση της PARN, συστηματικά ανιχνεύονται 2 ζώνες υψηλότερης κινητικότητας και είναι άγνωστο εάν πρόκειται για εναλλακτικές μορφές της ή τροποποιήσεις της που εμφανίζουν επίσης ρυθμικότητα και χρήζει επιπλέον διερεύνησης. Παρόμοιο πρότυπο ζωνών έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία (32, 91). Στη μια εργασία, εκτός της PARN στα 74kDa (p74), παρατηρείται και μια αρκετά έντονη ζώνη στα 62kDa (p62) σε ωκύτταρα *Xenopus laevis* (32). Οι δυο αυτές μορφές της PARN φαίνεται να διαχωρίζονται στον κυτταρικό εντοπισμό τους με την p74 να είναι κυρίως πυρηνική και την p62 να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (143). Δεν σχολιάζονται περαιτέρω αυτές οι παρατηρήσεις, παρά μόνο πως η p62 πρόκειται για προϊόν πρωτεόλυσης της p74 (32). Επιπλέον, έχει χαρακτηριστεί και ένα τμήμα 54kDa (p54) της PARN από κύτταρα θύμου αδένου βοός (91). Σχολιάζεται πως η p54 στα κύτταρα βοός αντιστοιχεί στο p62 που περιγράφηκε στα κύτταρα *Xenopus laevis*. Στα αποτελέσματα της διατριβής παρατηρείται κάτι παρόμοιο τόσο στο κυτταρικό όσο και στο ζωικό μοντέλο (Εικόνα 15 Β και Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Τα επίπεδα της PARN στη διάρκεια του 24ώρου σε ήπαρ μυών. Α. Ανοσοσύτπωση κατά western για τα δείγματα που έχουν ληφθεί ανά 4 ώρες μέσα στο 24ωρο. Οι αριθμοί στο επάνω μέρος των διαδρομών υποδεικνύουν το χρόνο (σε ώρες). Η ασπρόμαυρη μπάρα πάνω από τις διαδρομές LD υποδεικνύει τα χρονικά διαστήματα ημέρας/νύχτας (επάνω μέρος), ενώ η μαύρη μπάρα πάνω από τις διαδρομές DD υποδηλώνει συνθήκες συνεχούς σκοταδιού (κάτω μέρος). Το κόκκινο βέλος υποδεικνύει την PARN 74kDa. Β. Διάγραμμα των κανονικοποιημένων επιπέδων της PARN σε σχέση με τη GAPDH (βάσει των δεδομένων του Α). Η κόκκινη γραμμή αντιστοιχεί στα επίπεδα της PARN από τους μύες LD ενώ η γκρι διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στους μύες DD. Το γκρι πλαίσιο υποδεικνύει τη χρονική διάρκεια του σκοταδιού για τις συνθήκες LD. Οι τιμές που απεικονίζονται είναι μέση τιμή ± SEM (n = 5), *p<0.05. ZT: Zeitgeber; LD: 12h φως-12h σκοτάδι; DD: 24h σκοτάδι.

Το miR-29a στο κερκάδιο ρολόι μυών C57BL/6J

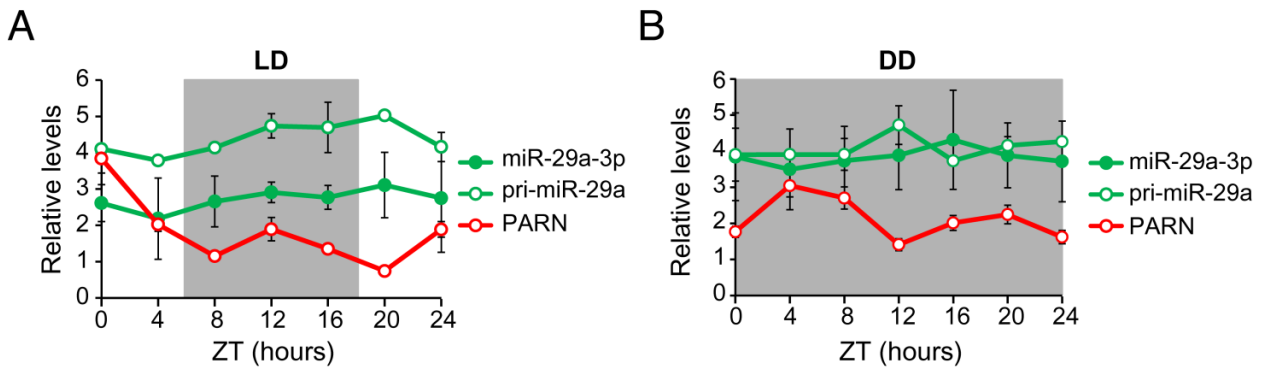
Όπως αναφέρεται και παραπάνω, τα microRNA συνεισφέρουν στην κερκάδια γονιδιακή έκφραση στοχεύοντας τα κερκάδια μετάγραφα (95), αναστέλλοντας τη μετάφρασή του και προσελκύνοντας σε αυτά απαδενυλάσες οδηγώντας στην αποσταθεροποίηση και αποικοδόμησή τους (24). Μεταξύ αυτών, το miR-29a παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, τόσο λόγω της αλληλεπίδρασής του με την PARN όσο και λόγω της εμπλοκής του στον κερκάδιο ρυθμό (19, 23). Τα επίπεδα του πρόδρομου miR-29a εμφανίζουν ταλαντούμενο πρότυπο έκφρασης στο 24ωρο παρόμοιο με τη βιβλιογραφία (19) (Εικόνα 19 A), ενώ τα επίπεδα της ώριμης μορφής διατηρούνται πιο σταθερά στη διάρκεια του 24ώρου (Εικόνα 19 B).



Εικόνα 19. Επίπεδα του πρόδρομου και ώριμου miR-29a κατά τη διάρκεια του 24ώρου σε ήπαρ μυών. A, B. Τα επίπεδα έκφρασης του pri-miR-29a (A) και miR-29a-3p (B) στη διάρκεια του 24ώρου. Η γκρι διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στα επίπεδα του pri-miR-29a ή miR-29a-3p σε συνθήκες DD. Το γκρι πλαίσιο υποδεικνύει τη χρονική διάρκεια του σκοταδιού για τις συνθήκες LD. Οι τιμές που απεικονίζονται είναι μέση τιμή \pm SEM ($n = 3$).

Όπως παρατηρήθηκε και για τα αποτελέσματα από τα κύτταρα HEK293T, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PARN και της πρόδρομης και ώριμης μορφής του miR-29a έχουν μέγιστα και ελάχιστα σε αντίφαση και για τις δυο ομάδες δειγμάτων (LD και DD)(Εικόνα 20). Λαμβάνοντας υπόψη την αλληλεπίδραση που έχουμε παρατηρήσει στο εργαστήριο, όπου η PARN αλληλεπιδρά με το pri-miR-29a και συμβάλλει στην ωρίμανσή του και το γεγονός πως το miR-29a στοχεύει το mRNA της PARN οδηγώντας την σε αποικοδόμηση της ουράς πολυ(A) του ίδιου της του μεταγράφου σε ανθρώπινα κύτταρα πλακώδους καρκίνου του πνεύμονα, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η εξέταση αυτής της αλληλεπίδρασης σε ένα ζωικό μοντέλο, εκτός του πλαισίου του καρκίνου του πνεύμονα⁷.

⁷ A. Κυρίτσης, Διδακτορική διατριβή, Διαφορική έκφραση καρκινικών δεικτών σε παθήσεις του πνεύμονα: δυναμική σχέση απαδενυλασών και microRNAs, 2022, TBB, ΠΘ και Kyritsis A. et al (in preparation).

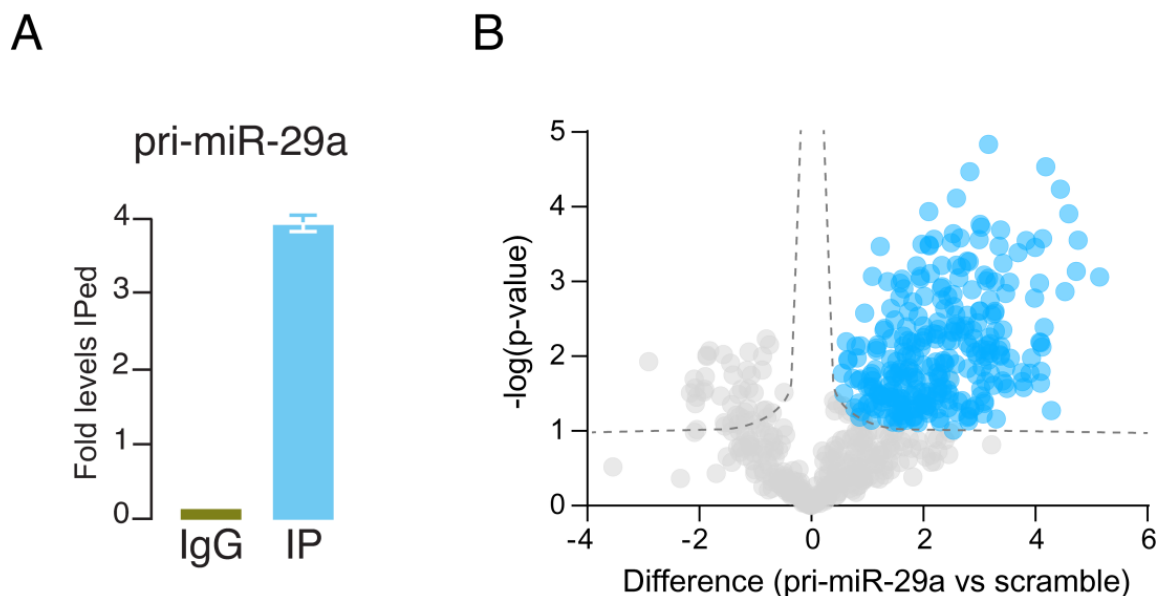


Εικόνα 20. Τα επίπεδα του πρόδρομου και ώριμου miR-29a κατά τη διάρκεια του 24ώρου σε σχέση με τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PARN. Συνδυαστικό διάγραμμα των επιπέδων του pri-miR-29a και miR-29a σε σχέση με τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PARN σε συνθήκες LD (A) και DD (B). Το γκρι πλαίσιο υποδεικνύει τη χρονική διάρκεια του σκοταδίου για τις συνθήκες LD. Οι τιμές που απεικονίζονται είναι μέση τιμή \pm SEM ($n = 3$).

Με σκοπό την επιβεβαίωση αυτής της αλληλεπίδρασης, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρίμνηση RNA με αντίσωμα έναντι της PARN ώστε να εξεταστεί εάν στα συγκατακρημνιζόμενα μόρια RNA συμπεριλαμβάνεται και το pri-miR-29a ή και το mRNA της PARN. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκε ενδεικτικά ένα χρονικό σημείο από τα δείγματα LD όπου τα επίπεδα του pri-miR-29a είναι τα μέγιστα, ήτοι ZT20. Πράγματι το miR-29a ανιχνεύεται εμπλουτισμένο κατά 4 φορές στο δείγμα όπου έγινε η ανοσοκατακρίμνηση σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, δείχνοντας πως η PARN αλληλεπιδρά με το pri-miR-29a σε ιστό ήπατος μύος (Εικόνα 21 A). Αξίζει να σημειωθεί πως δεν ανιχνεύθηκε το mRNA της PARN στο δείγμα αυτό. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός πως το δείγμα που εξετάστηκε προέρχεται από ένα χρονικό σημείο όπου τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PARN είναι μειωμένα, άρα πιθανόν να μην πραγματοποιείται ρύθμιση των επιπέδων mRNA εκείνη τη στιγμή. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση της PARN με το mRNA της θα μπορούσε να είναι ένας διακόπτης λειτουργίας για τη συγκεκριμένη συνθήκη στον καρκίνο του πνεύμονα και το mRNA της να μην αποτελεί έναν από τους συνήθεις στόχους της PARN.

Στη συνέχεια, θελήσαμε να εξετάσουμε περαιτέρω σχέση μεταξύ PARN και pri-miR-29a. Επιδιώξαμε να ανιχνεύσουμε πρωτεϊνικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με το pri-miR-29a και πιθανόν ελκύουν την PARN σε αυτό προς την ωρίμανσή του. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε κατακρήμνηση του pri-miR-29a χρησιμοποιώντας έναν αντισηματικό ιχνηθέτη για το pri-miR-29a, και ακολούθως ανάλυση του δείγματος που προκύπτει από ανάλυση με φασματομετρία μάζας (136) ώστε να ανιχνευθούν πρωτεϊνικοί παράγοντες που αλληλεπιδρούν μαζί του και πιθανόν στρατολογούν την PARN σε αυτό προς την ωρίμανσή του. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από τα δείγματα έκλουσης του πειράματος και ακολούθησε qPCR με σκοπό την ανίχνευση του pri-miR-29a στα δείγματα αυτά. Το pri-miR-29a δεν ανιχνεύεται, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως μπορεί να μην είναι απολύτως επιτυχημένη η κατακρήμνηση. Η φασματομετρία μάζας σε δείγματα έκλουσης από το ίδιο πείραμα ταυτοποίησε 600 πρωτεΐνες στο δείγμα όπου είχε

πραγματοποιηθεί κατακρήμνιση του pri-miR-29a από τις οποίες, οι 293 ήταν στατιστικά σημαντικές σε σχέση με το δείγμα όπου χρησιμοποιήθηκε μη νοηματικός ιχνηθέτης για κατακρήμνιση (Εικόνα 21 Β). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων φασματομετρίας μάζας δείχνει πως η PARN δεν ταυτοποιήθηκε σε κανένα δείγμα των 3 τεχνικών επαναλήψεων, γεγονός που μας οδηγεί στο να επανεξετάσουμε τον πειραματικό σχεδιασμό. Σύμφωνα με την εργασία που περιγράφει το πρωτόκολλο αυτό (136), χρησιμοποιείται μίγμα δέκα ιχνηθετών για κάθε μόριο στόχο, ενώ εμείς χρησιμοποιήσαμε ίδια συγκέντρωση ενός μόνο ιχνηθέτη. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να επαναληφθεί το πείραμα με την προσθήκη τουλάχιστον 5 διαφορετικών ιχνηθετών για το pri-miR-29a ώστε να αυξηθεί η απόδοση της κατακρήμνισης και να επαναληφθούν τουλάχιστον 2 βιολογικές επαναλήψεις ώστε τα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα και έγκυρα.



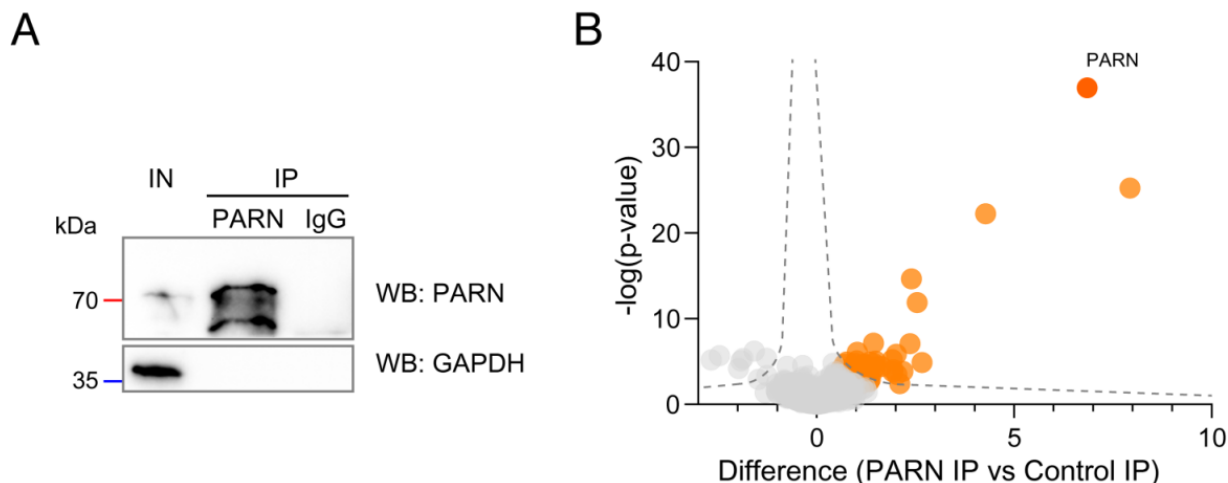
Εικόνα 21. Αλληλεπιδράσεις του pri-miR-29a σε ήπαρ μυός. Α. Το pri-miR-29a ανιχνεύεται μετά από ανοσοκατακρήμνιση της PARN και ανάλυση των mRNA που παρασύρονται μαζί της. Στο δείγμα όπου έγινε ανοσοκατακρήμνιση της PARN παρατηρείται 4 φορές περισσότερο pri-miR-29a σε σχέση με το δείγμα όπου έγινε ανοσοκατακρήμνιση με φυσιολογικά IgG κονίκλου. Β. Διάγραμμα volcano από τα αποτελέσματα φασματομετρίας μάζας μεταξύ του δείγματος όπου χρησιμοποιήθηκαν ιχνηθέτες για το pri-miR-29a με το δείγμα όπου χρησιμοποιήθηκε τυχαίος μη νοηματικός ιχνηθέτης. IgG: δείγμα ανοσοκατακρήμνισης με φυσιολογικά αντισώματα κονίκλου, IP: δείγμα όπου έγινε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα για την PARN. Οι τιμές που απεικονίζονται είναι μέση τιμή \pm SEM ($n = 3$).

Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της PARN στο κερκάδιο ρολόι

Συνολικό πρότυπο αλληλεπιδράσεων (interactome) της PARN

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η στρατηγική ανίχνευσης των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του pri-miR-29a και πιθανών αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών με την PARN χρειάζεται αρκετή βελτιστοποίηση και εστιάζοντας στη ρύθμιση της PARN στο κερκάδιο ρολόι, προχωρήσαμε σε ανοσοκατακρήμνιση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της PARN και φασματομετρία μάζας από όλα τα δείγματα ήπατος ποντικών στο 24ωρο. Η επιβεβαίωση της ανοσοκατακρήμνισης πραγματοποιήθηκε με ανοσοσύτρωση κατά western

(Εικόνα 22 A). Μέσω της φασματομετρίας μάζας ταυτοποιήθηκαν 1889 πρωτεΐνες, 53 από τις οποίες ήταν στατιστικά σημαντικές μεταξύ των δειγμάτων ανοσοκατακρήμνισης της PARN (PARN IP) και των δειγμάτων όπου πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση με φυσικών IgG από κόνικλο (IgG IP) ως μάρτυρας (Εικόνα 22 B) (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ , Πίνακας 7).



Εικόνα 22. Το σύνολο των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της PARN στο κερκάδιο ρολόι. A. Η PARN ανιχνεύεται σε δείγμα ήπατος μυός. Ενδεικτική εικόνα ανοσοσύτωσης κατά western μετά από ανοσοκατακρήμνιση. Οι αριθμοί στα αριστερά αντιπροσωπεύουν τους δείκτες μοριακών μαζών (kDa). IN: Input, δείγμα πριν την ανοσοκατακρήμνιση. IgG: ανοσοκατακρήμνιση με τη χρήση φυσικών IgG κόνικλου. B. Γράφημα volcano όπου συγκρίνονται τα δείγματα IP της PARN με τα δείγματα IgG IP. Με γκρι απεικονίζονται οι στατιστικά μη σημαντικές πρωτεΐνες. Με πορτοκαλί απεικονίζονται οι πρωτεΐνες με $p\text{-value} > 0.05$, και με σκούρο πορτοκαλί απεικονίζεται η PARN.

Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός (functional annotation) των πρωτεϊνών, η οποία έγινε χρησιμοποιώντας το διαδικτυακά διαθέσιμο εργαλείο GeneCodis 4 (144, 145), αναδεικνύει πως η πλειοψηφία των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την PARN εντοπίζονται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4, Πίνακας 8). Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς η PARN είναι γνωστό πως εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνισκο σε φυσιολογικές συνθήκες αλλά μετακινείται και εντός και εκτός του πυρήνα, ενώ μετά από επαγωγή βλαβών στο DNA εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα (146, 147). Επιπλέον, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον πως ένα σημαντικό ποσοστό αυτών των πρωτεϊνών επίσης εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια, ενώ ο λειτουργικός χαρακτηρισμός υποδεικνύει πως συμμετέχουν σε ποικιλία βιολογικών διεργασιών εκτός από το μεταβολισμό του RNA, όπως στη μετάφραση στα μιτοχόνδρια, τη μεταφορά ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα και τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Αξίζει να σημειωθεί πως δεν υπάρχουν αναφορές για τον εντοπισμό της PARN στα μιτοχόνδρια και ο ακριβής μηχανισμός της ανακύκλησης των mRNA στο μιτοχόνδριο δεν έχει αποσαφηνιστεί. Ας σημειωθεί πως στα κύτταρα HEK 293T τα μιτοχονδριακά mRNA είτε σταθεροποιούνται είτε αποσταθεροποιούνται από την πολυαδενυλίωση, ενώ τροποποιημένη PARN, η οποία έχει σχεδιαστεί με σήμα μιτοχονδριακού εντοπισμού φαίνεται να προκαλεί αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης (148). Επίσης, ένα σημαντικό ποσοστό των πρωτεϊνών που

ανιχνεύονται, σχετίζονται με το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ). Πρόσφατα, δείχθηκε πως η PARN εντοπίζεται στο ΕΔ και συμμετέχει ενεργά στη ρύθμιση της μετάφρασης καθορίζοντας την αφθονία των mRNA στο ΕΔ μέσω της δράσης της ως απαδενυλάση (147).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως εντοπίστηκαν κάποιες από τις πρωτεΐνες οι οποίες είναι γνωστό πως αλληλεπιδρούν με την PARN [π.χ. UPF1 (48), ELAVL1 (69), EIF4E (46, 149), NPM1 (150)], αλλά όχι μεταξύ των στατιστικά σημαντικών πρωτεϊνών μεταξύ των δειγμάτων PARN IP και δειγμάτων IgG IP. Αυτή η παρατήρηση θα μπορούσε να υποδεικνύει πως αυτές οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της PARN πιθανόν διατηρούνται καθ' όλη τη διάρκεια του 24ώρου και δεν παρουσιάζουν διακύμανση κατά τη διάρκεια της ημέρας, καθώς δεν εμπλουτίστηκαν σημαντικά στα δείγματα PARN IP. Επιπλέον, η πρωτεΐνη PABPN1, η οποία είναι γνωστό πως αλληλεπιδρά με την PARN και αναστέλλει τη δράση της (40), εντοπίστηκε στο στατιστικά σημαντικό τμήμα των πρωτεϊνών μόνο στα δείγματα DD (Εικόνα 28).

Οι στατιστικά σημαντικές πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν εμπλέκονται σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες με τη μεταφορά πρωτεϊνών (GO:0015031), την επεξερασία του mRNA (GO:0006397) και τη μετάφραση (GO:0006974) να είναι από τους πιο εμπλουτισμένους όρους σε πρωτεΐνες κατά την ανάλυση (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4, Πίνακας 9). Αξίζει να σημειωθεί πως δεν εντοπίστηκαν καθόλου όροι σχετικοί με το κικκάδιο ρολόι και σε όλο το πείραμα δεν ταυτοποιήθηκαν παράγοντες του κεντρικού μηχανισμού του κικκάδιου ρυθμού. Για το σκοπό αυτό, εξετάστηκε εάν στα δεδομένα υπάρχουν πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον κικκάδιο ρυθμό χωρίς να αποτελούν τμήμα του βασικού μηχανισμού του. Στην ενδελεχή αυτή αναζήτηση εντοπίστηκε η CCAR2 (DBC1), η οποία ρυθμίζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του κύριου ρυθμιστή του κικκάδιου ρολογιού REV-ERBa, προστατεύοντάς τον από ουβικιτινίωση και επιπλέον ρυθμίζει τα μονοπάτια της κικκάδιας γονιδιακής έκφρασης επηρεάζοντας την έκφραση του BMAL1 (151).

Συνολικά, το γεγονός πως οι πρωτεΐνες που είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με την PARN δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική αλλαγή μεταξύ των δειγμάτων PARN IP και των δειγμάτων IgG IP, καθώς και το γεγονός πως οι πρωτεΐνες που συγκατακρημνίζονται με την PARN εμπλέκονται σε μεγάλο εύρος βιολογικών διεργασιών του κυττάρου χωρίς να σχετίζονται με το κικκάδιο ρολόι, υποδεικνύουν πως η PARN πιθανόν να αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια του 24ώρου και πιθανόν να εμπλέκεται και σε λειτουργίες με τις οποίες δεν είχε συνδεθεί έως τώρα.

Αλληλεπιδράσεις της PARN κατά τη διάρκεια του 24ώρου

Εφόσον τα αποτελέσματα από όλα τα δείγματα υποδεικνύουν πως η PARN μπορεί να έχει διάφορες μη χαρακτηρισμένες λειτουργίες σε ήπαρ μυών, εστίασαμε την ανάλυση

των αποτελεσμάτων μεταξύ των χρονικών σημείων του 24ώρου και των συνθηκών LD και DD, δηλαδή 12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι και 24 ώρες σκοτάδι, αντίστοιχα. Τα δεδομένα από τη φασματομετρία μάζας υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο συνθηκών, με την πιο σημαντική από αυτή να είναι ο συνολικός αριθμός στατιστικά σημαντικών πρωτεϊνών που φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την PARN ανά συνθήκη. Πιο συγκεκριμένα, στα δείγματα LD ανιχνεύονται 14 πρωτεΐνες ενώ στα DD 108 (Εικόνα 23 Α, Β), υποδεικνύοντας πως η PARN διαδραματίζει ξεχωριστούς ρόλους μεταξύ φυσιολογικών και διαταραγμένων συνθηκών του κικκάδιου ρυθμού.

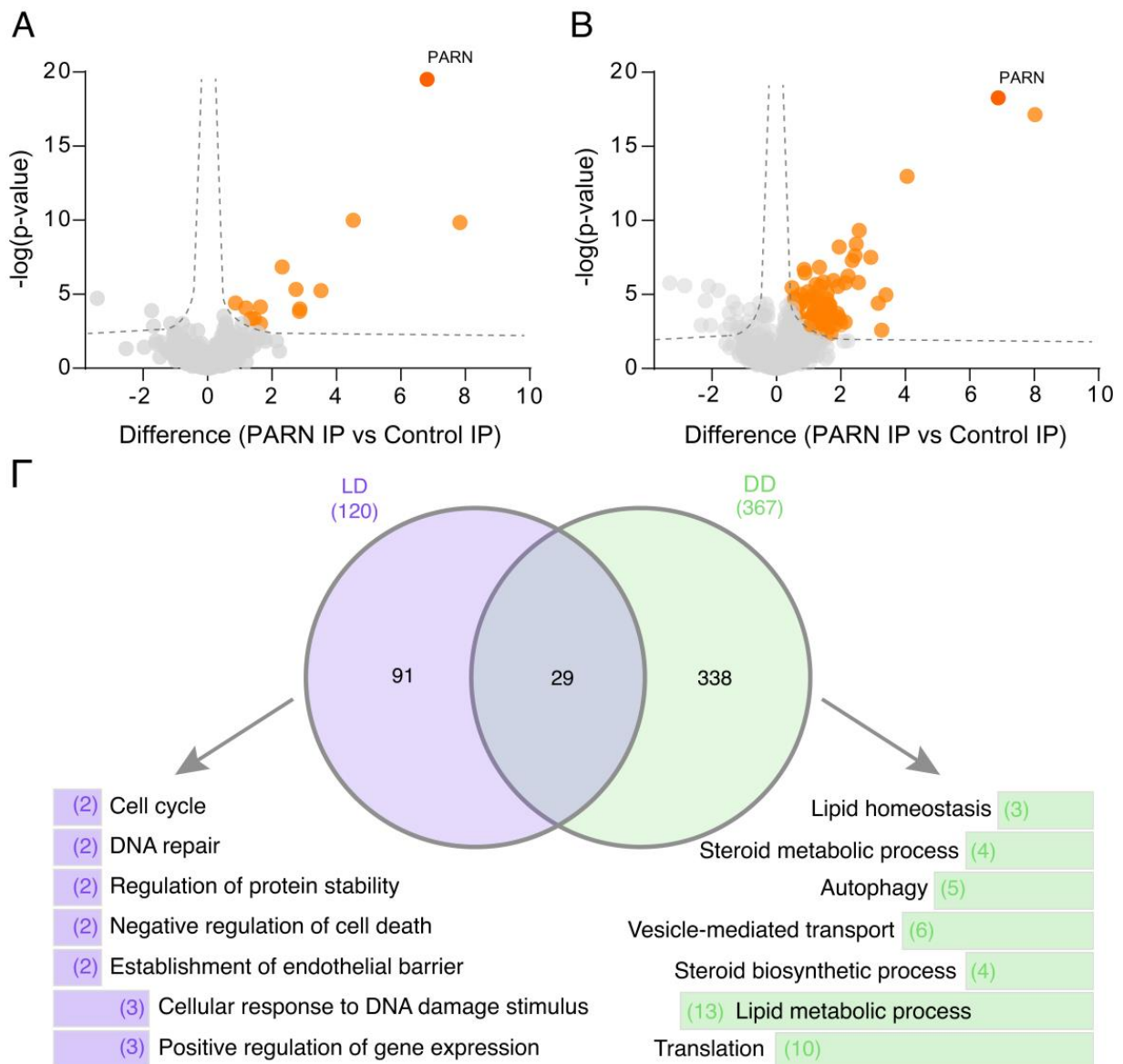
Η ανάλυση των βιολογικών διεργασιών μετά τη λειτουργική επισήμανση των στατιστικά σημαντικών πρωτεϊνών στα δείγματα LD αποκαλύπτει την αναμενόμενη ισχυρή παρουσία όρων σχετικούς με το μεταβολισμό του RNA (GO:0006397, GO:0031087, GO:0000290, GO:0031124, GO:0045292, GO:0000289, GO:0090503) καθώς και όρων απόκρισης σε βλάβη του DNA (GO:0006974, GO:0006281, GO:2000003, GO:0072423) (Εικόνα 23 Γ).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν και τα δεδομένα από τη λειτουργική επισήμανση των στατιστικά σημαντικών πρωτεϊνών από τα δείγματα DD, όπου οι όροι όπως απόκριση σε βλάβη του DNA και επιδιόρθωση του DNA δεν ταυτοποιήθηκαν. Σε αυτά τα δείγματα επικράτησαν όροι όπως «βιοσυνθετικές/μεταβολικές διεργασίες στεροειδών» (GO:0006694, GO:0008202), «μεταβολικές διεργασίες λιπιδίων» (GO:0006629), «μετάφραση» (GO:0006412) και όροι σχετικοί με την αυτοφαγία (GO:0006914, GO:0000045, GO:0044804, GO:0016240) μεταξύ των όρων μεταβολισμού του RNA (GO:0000184, GO:0000294). Αυτή η μη αναμενόμενη διαφορά μεταξύ LD και DD συνθηκών θα μπορούσε να υποδεικνύει πως η PARN εκτελεί τις συνήθειες της λειτουργίες υπό φυσιολογικές συνθήκες φωτοπεριόδου, υποστηρίζοντας την παρατήρηση πως επηρεάζει διαφορετικές βιολογικές διεργασίες στη διάρκεια του 2ώρου. Αυτό στηρίζεται περαιτέρω στον τρόπο δράσης της PARN στη διαδικασία απόκρισης σε βλάβες του DNA (DNA damage response –DDR) (152), που αναλύεται πιο αναλυτικά παρακάτω.

Οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την PARN φαίνεται να εμπλέκονται σε κοινές βιολογικές διεργασίες μεταξύ των δυο συνθηκών. Η σύγκριση των βιολογικών διεργασιών με p -value <0.05, 29 όροι φαίνεται να είναι κοινοί μεταξύ LD και DD (Εικόνα 23 Γ). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως εντοπίζονται διαφορετικές πρωτεΐνες για κάποιους από αυτούς τους κοινούς όρους. Πιο συγκεκριμένα, παρότι οι όροι «συναρμογή του RNA» (GO:0008380) και «επεξεργασία του RNA» (GO:0006397) εμφανίζονται και στις δυο συνθήκες, η ανάλυση των δειγμάτων LD ξεχωρίζει την CCAR2, έναν παράγοντα που ρυθμίζει το εναλλακτικό μάτισμα ως μέρος του συμπλόκου DBIRD (153), ενώ στα δείγματα DD αναδεικνύονται πιο ειδικά συστατικά του σωματίου

συναρμογής (spliceosome) όπως οι παράγοντες SFRS2, U2AF1 και SNRPD3 (154). Ομοίως, στον όρο «μεταφορά πρωτεϊνών» (GO:0015031) εντοπίζεται η RAB5C και η CHMP2A στα δείγματα LD, δυο πρωτεΐνες που εμπλέκονται κυρίως στη διαλογή πρωτεϊνών στα αυτοφαγοσώματα (155, 156), με την RAB5 επίσης να εμπλέκεται στην πρόιμη σύντηξη του ενδοσώματος (157), ενώ στα δείγματα DD μεταξύ των πρωτεϊνών που κατηγοριοποιούνται στον όρο «μεταφορά πρωτεϊνών» εντοπίζονται οι ARCN1, EIF5A, AP1G1, SCAMP3, HGS, SEC61A1, RAB8, AP1S1 και SEC16, οι οποίες εμπλέκονται στη βιογένεση και μεταφορά του ενδοσώματος, τη μεταφορά πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύστημα Golgi και την κυκλοφορία των πρωτεϊνών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (158-165).

Παρότι διαφορές μεταξύ LD και DD είναι αναμενόμενες, εφόσον ακόμη και ο αριθμός των στατιστικά σημαντικών πρωτεϊνών που εντοπίζονται είναι πολύ διαφορετικός μεταξύ των δυο συνθηκών, αξίζει να σημειωθεί πως οι πρωτεΐνες που ταυτοποιούνται να συμμετέχουν σε κοινές βιολογικές διεργασίες είναι σταθερά διακριτές στις δυο αυτές συνθήκες. Επιπλέον, στις κοινές διεργασίες μεταξύ των δυο συνθηκών, οι πρωτεΐνες που εντοπίζονται φαίνεται να εμπλέκονται σε παρόμοια βήματα (π.χ. σχηματισμός ενδοσώματος). Αυτή η παρατήρηση μπορεί να υποδεικνύει έναν ρόλο ή τη χρονική παρουσία της PARN κατά το σχηματισμό των ενδοσωμάτων στις συνθήκες LD και μια πολύ πιο εστιασμένη δράση της στις συνθήκες DD.



Εικόνα 23. Πρότυπο αλληλεπιδράσεων (*interactome*) της PARN. A-B. Γράφημα *volcano* όπου συγκρίνονται τα δείγματα IP της PARN με τα δείγματα IgG IP σε συνθήκες LD (A) και DD (B). Με γκρι απεικονίζονται οι στατιστικά μη σημαντικές πρωτεΐνες. Με πορτοκαλί απεικονίζονται οι πρωτεΐνες με p -value > 0.05, και με σκούρο πορτοκαλί απεικονίζεται η PARN. Γ. Διάγραμμα Venn όπου συγκρίνονται οι βιολογικές διεργασίες που προκύπτουν από τη λειτουργική επισήμανση των πρωτεϊνών από τα γραφήματα *Volcano* για τις συνθήκες LD και DD. Κάτω από το διάγραμμα φαίνονται κάποιες από τις μοναδικές βιολογικές διεργασίες για κάθε συνθήκη. Οι διεργασίες εμφανίζονται με σειρά μειούμενης p -value. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στον αριθμό των πρωτεϊνών από τα A και B που εμπλέκονται σε κάθε διαδικασία.

Απόκριση σε βλάβες του DNA

Οι βλάβες στο DNA μπορεί να συμβούν φυσικά στα κύτταρα και ο σωστός συγχρονισμός των μηχανισμών της απόκρισης στις βλάβες του DNA (όπως η επιδιόρθωση, η απόπτωση, κ.α.) συνεισφέρουν στη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος και την αποφυγή συσσώρευσης μεταλλάξεων (166). Σε μη στρεσογόνες συνθήκες, η PARN δρα ως αρνητικός ρυθμιστής των mRNA των γονιδίων που εμπλέκονται στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου και την απόκριση στις βλάβες του DNA (152) αλλά και μεταγράφων του μονοπατιού του p53 όπως και το mRNA του p53 (49) μέσω των στοιχείων

πλούσια σε αδενosίνες και ουριδίνες (ARE) των μεταγράφων αυτών αλλά και με τη βοήθεια trans-δραστικών παραγόντων όπως η φωσφορυλιωμένη nucleolin (NCL) (167). Με την πρόκληση βλαβών στο DNA λόγω της επίδρασης υπεριώδους ακτινοβολίας, η NCL αποφωσφορυλιώνεται και το ARE του mRNA του p53 καταλαμβάνεται από την HuR, καθιστώντας το μη προσβάσιμο από την PARN, η οποία προσελκύεται σε άλλους στόχους (167). Η ταχεία αλλαγή του δικτύου αλληλεπίδρασης της PARN, κυρίως μέσω της αλλαγής των HuR/NCL, καθιστά τη δράση της PARN εστιασμένη σε συγκεκριμένα στάδια της απόκρισης σε βλάβες του DNA, ενώ η απουσία της PARN οδηγεί σε μη ρυθμιζόμενη απόκριση σε βλάβες του DNA και κυτταρικό θάνατο (168).

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός πως ο κερκάδιος ρυθμός έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο (15) και καθώς οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA βρίσκονται στον έλεγχο του κερκάδιου ρυθμού (7) δημιουργείται η υπόθεση πως η δράση της PARN στην απόκριση στις βλάβες του DNA φαίνεται να επηρεάζεται από το κερκάδιο ρολόι, καθώς σε συνθήκες DD δεν φαίνεται να συγκατακρημνίζει πρωτεΐνες που να εμπλέκονται σε αυτή τη βιολογική διεργασία. Έχει προταθεί πως το κερκάδιο ρολόι έχει εξελιχθεί ώστε ένας αρχαίος υδρόβιος οργανισμός να αποφεύγει το φως και τις βλαβερές συνέπειες της υπεριώδους ακτινοβολίας που το συνοδεύουν, αναπτύσσοντας έναν αισθητήρα κυανού φωτός. Αυτή η πρωτόγονη φλαβοπρωτεΐνη με μέγιστη απορρόφηση του κυανού φωτός οδήγησε στην εξέλιξη των σημερινών φωτολυασών που επιδιορθώνουν το DNA και στα κρυπτοχρώματα (Cry) που ελέγχουν το κερκάδιο ρολόι με μηχανισμούς που εξαρτώνται από το φως, αλλά και μηχανισμούς ανεξάρτητους του φωτός. Έτσι, ενώ η πιθανή εξελικτική προέλευση του κερκάδιου ρολογιού και των μηχανισμών που διατηρούν την ακεραιότητα του γονιδιώματος έχουν αναγνωριστεί από την αρχή στο πεδίο έρευνας του κερκάδιου ρολογιού, μόλις πρόσφατα έχουν περιγραφεί οι σύνδεσμοι μεταξύ των δυο συστημάτων (169). Αξίζει να σημειωθεί, ωστόσο, πως παρότι οι φωτολυάσες δεν έχουν πλέον φωτοαισθητηριακή λειτουργία και τα Cry δεν έχουν άμεση σχέση με την επιδιόρθωση βλαβών στο DNA, τα Cry συνεχίζουν να συμμετέχουν στη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος από τις βλάβες του DNA που έχουν προκληθεί από UV ή παράγοντες που μιμούνται το UV (7, 169). Τα Cry συνεισφέρουν στην επιδιόρθωση του DNA και τη διατήρηση του γονιδιώματος ρυθμίζοντας την επιδιόρθωση μέσω απομάκρυνσης νουκλεοτιδίων. Αυτός είναι ο μόνος γνωστός μηχανισμός επιδιόρθωσης των φωτοδιμερών που προκύπτουν από το UV στα πλακουντοφόρα θηλαστικά όπου λείπουν οι φωτολυάσες και συντονίζοντας το κερκάδιο ρολόι με τα σημεία ελέγχου του DNA το οποίο επίσης βοηθάει στην κυτταρική επιβίωση και ως εκ τούτου στην απόδραση από το φως (7).

Αυτοφαγία

Σύμφωνα με τα δεδομένα της διατριβής (Εικόνα 23 Γ) καθώς και το γεγονός πως η PARN φαίνεται να αλληλεπιδρά πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διαδικασία του σχηματισμού των αυτοφαγοσωμάτων, εμφανίζοντας μεγαλύτερη ποικιλία στους παράγοντες με τους οποίους αλληλεπιδρά να παρατηρούνται στις συνθήκες DD, παρατηρήσεις που συνάδουν με τη σχετική βιβλιογραφία. Η αυτοφαγία είναι μια συντηρημένη και αυστηρά ελεγχόμενη καταβολική διεργασία η οποία οδηγεί σε αποικοδόμηση και ανακύκλωση των κατεστραμμένων κυτταρικών συστατικών και πρωτεϊνών προς παραγωγή ενέργειας (170). Η αυτοφαγία εμφανίζει έντονα κιρκάδια διαφοροποίηση που συνάδει με το πρότυπο πρόσληψης τροφής στα θηλαστικά, τα γονίδια που σχετίζονται με τη διαδικασία αυτή έχουν κιρκάδια έκφραση ενώ έχει προταθεί πως η κιρκάδια αυτοφαγία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση των ιστών (171). Η σύνδεση μεταξύ του κιρκάδιου ρυθμού και της αυτοφαγίας σχετίζεται και με την αποικοδόμηση και ανακύκλιση των κιρκάδιων πρωτεϊνών, όπως το CRY1. Καθώς το CRY1 καταστέλλει την ηπατική γλυκονεογένεση, μεταξύ άλλων, η αποικοδόμησή του στα σωστά χρονικά σημεία επιτρέπει την παραγωγή γλυκόζης. Επιπλέον, η παχυσαρκία αυξάνει την αποικοδόμηση του CRY1 μέσω της αυτοφαγίας οδηγώντας σε μεγαλύτερη παραγωγή γλυκόζης και υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα ενώ απώλεια της αυτοφαγίας οδηγεί στη συσσώρευση του CRY1 διαταρράσσοντας το ρολόι (172). Τέλος, έχει προταθεί πως ο μέγιστος όγκος και αριθμός αυτοφαγοσωμάτων παρατηρείται κατά τη διάρκεια της νύχτας (170).

Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την PARN όλο το 24ωρο

Μεταξύ των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν στις συνθήκες LD και DD, 4 πρωτεΐνες φαίνεται να συγκατακρημνίζονται με την PARN σε όλα τα δείγματα (Εικόνα 24 Α), ήτοι οι DCPS, EDC4, PDE2A και MARVELD2.

1. Η DCPS (Uniprot ID: Q9DAR7) είναι ένα εκκαθαριστικό ένζυμο απομάκρυνσης του καλύμματος στο 5' που εντοπίζει και υδρολύει τις εναπομείνουσες δομές καλύπτρας (decapping scavenger enzyme), το οποίο καταλύει τη μετατροπή του m^7GDP προς m^7GMP και ακολουθεί η αποικοδόμηση των mRNA με κατεύθυνση 3'-5' μέσω του εξοσώματος (173-175).
2. Η EDC4 (Uniprot ID: Q3UJB9) δρα ως προσάρτηση για την πρόσδεση του συμπλόκου απομάκρυνσης της καλύπτρας DCP1/2, ενισχύοντας τη δράση της DCP2. Επιπλέον, η EDC4 καταστέλλει τη γονιδιακή σίγηση μέσω miRNA σε κύτταρα Dm και στο φυτό *A. thaliana* (176), ενώ έχει περιγραφεί πως συμμετέχει στον ομόλογο ανασυνδυασμό που μεσολαβείται από την απόκριση σε βλάβες του DNA αντιγράφοντας το φαινότυπο του BRCA1 (177). Και οι δυο αυτές πρωτεΐνες σχετίζονται με τα

σωματίδια επεξεργασίας, p-bodies (178, 179). Η αναζήτηση στη βιβλιογραφία ανέσυρε μια εργασία (180) η οποία δείχνει πως η PARN και η EDC4 συγκατακρημνίζονται με τη DCPS σε κυτταρικές σειρές οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας. Αξίζει να σημειωθεί πως η PARN έχει δειχθεί πως εντοπίζεται σε κοκκίωδεις δομές του κυττάρου, τα σώματα Cajal στον πυρήνα (150) και κυταροπλασματικά εξοσωμικά κοκκία (181), αλλά δεν έχει σχετιστεί με τα p-bodies.

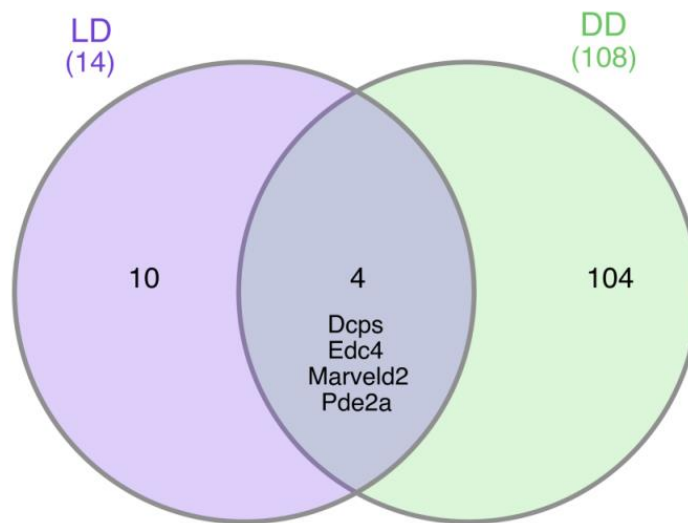
3. Η PDE2a (Uniprot ID: Q922S4) είναι μια φωσφοδιεστεράση η οποία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του ήπατος, επιδεικνύοντας διπλή εξειδίκευση για τους δευτερογενείς αγγελιαφόρους, cAMP and cGMP (182). Η PDE2a, όπως και άλλες φωσφοδιεστεράσες, είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των p-bodies (183).
4. Η MARVELD2 (Uniprot ID: Q3UZP0), επίσης γνωστή και ως tricellulin, συμμετέχει στο σχηματισμό των στεγανών συνδέσεων (tight junctions) μεταξύ τριών κυττάρων στους επιθηλιακούς φραγμούς και η απουσία της οδηγεί σε προοδευτικό εκφυλισμό των κοχλιακών τριχοειδών κυττάρων, οδηγώντας σε απώλεια ακοής, ενώ η ουβικιτίνωσή της οδηγεί σε ενδοκύττωση και αποικοδόμησή της στα λυσοσώματα (184).

Όπως αναφέρεται και παραπάνω, τρεις από αυτές τις πρωτεΐνες εντοπίζονται στα p-bodies (178, 179, 183), ενώ δεν είναι γνωστό εάν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με εξαίρεση μια εργασία όπου στα πρωτογενή δεδομένα φαίνεται να συγκατακρημνίζεται η PARN και η EDC4 με την DCPS (180) (Εικόνα 27). Επιπλέον, η MARVELD2 σχετίζεται με τους στεγανούς συνδέσμους. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν πως η PARN ίσως εντοπίζεται σε αυτά τα κυτταρικά συστατικά, ήτοι p-bodies και στεγανοί σύνδεσμοι, σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία του 24ώρου.

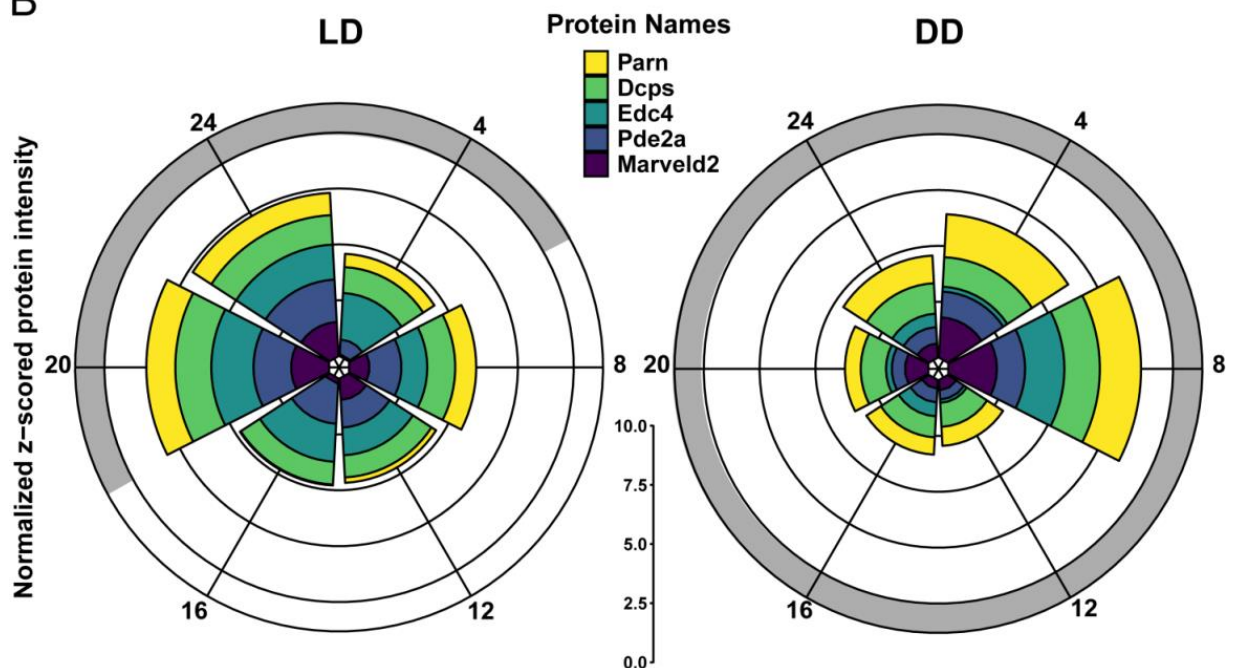
Λαμβάνοντας υπόψη τα επίπεδα των τεσσάρων αυτών πρωτεϊνών στη διάρκεια του 24ώρου (Εικόνα 24 B) παρατηρείται πως η MARVELD2 συμβαδίζει με τα επίπεδα της PARN σε όλα τα δείγματα (και στις συνθήκες LD και DD), ενώ το αντίθετο παρατηρείται για την EDC4 και σε μικρότερο βαθμό για την PDE2a. Αξίζει να σημειωθεί πως και οι τέσσερις αυτές πρωτεΐνες εντοπίζονται σε όλα τα δείγματα και η διακύμανση στην αφθονία τους σχετικά με την PARN μεταξύ συνθηκών LD και DD είναι αντιφασική. Πιο συγκεκριμένα, σε συνθήκες LD, αυτές οι πρωτεΐνες φαίνεται να συσσωρεύονται ακριβώς μετά την έναρξη του σκοταδίου με μέγιστα επίπεδα στα μεσάνυχτα (ZT 20-24), ενώ σε συνθήκες DD παρατηρείται ακριβώς το αντίθετο. Οι πρωτεΐνες αρχίζουν να συσσωρεύονται και να έχουν μέγιστα επίπεδα στα χρονικά σημεία ZT4 και ZT8. Αυτή η παρατήρηση, της χρονικά αντιδιαμετρικής κατανομής των πρωτεϊνών που συγκατακρημνίζονται σταθερά με την PARN σε όλα τα δείγματα, θα μπορούσε να εξηγήσει την μεγάλη αναντιστοιχία μεταξύ των στατιστικά σημαντικών πρωτεϊνών στις δυο συνθήκες. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως εφόσον η PARN χρησιμοποιείται για να γίνει ανοσοκατακρήμνιση στα δείγματα, θεωρείται πως τα επίπεδά της είναι παρόμοια σε όλα τα

δείγματα και όποιες διαφορές εντοπίζονται στα επίπεδά της οφείλονται σε διακύμανση των επιπέδων της στο 24ωρο, εφόσον για την ανοσοκατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκε η ίδια ποσότητα αντισώματος.

A



B



Εικόνα 24. Κοινές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την PARN σε συνθήκες LD και DD. Α. Διάγραμμα Venn όλων των πρωτεϊνών που ταυτοποιούνται για κάθε μια από τις συνθήκες. Η περιοχή αλληλεπικάλυψης υποδεικνύει τις κοινές πρωτεΐνες μεταξύ των δυο συνθηκών. Β. Κυκλικό επιστοιβαγμένο ραβδόγραμμα των κανικοποιημένων πρωτεϊνικών εντάσεων της PARN και των πρωτεϊνών που είναι κοινές μεταξύ των δυο γερρσυνθηκών από το Α από όλα τα δείγματα σε όλα τα χρονικά σημεία του 24ώρου σε μύες LD και DD. Οι αριθμοί γύρω από τους κύκλους υποδεικνύουν τα χρονικά σημεία του 24ώρου, ο γκρι κύκλος ή ημικύκλιο υποδεικνύουν τη περίοδο σκοταδίου και τη διάρκεια του 24ώρου.

Στεγανές συνδέσεις

Η Marveld2 είναι μέλος της οικογένειας TAMP (Tight junction Associated Marvel Proteins) μαζί με τις Occludin και Marveld3. Η αμινοτελική και καρβοξυτελική περιοχή της Marveld2 είναι κυτταροπλασματικές, με την τελευταία να είναι πολύ σημαντική για τις

αλληλεπιδράσεις με την Occludin (185). Αυτή η περιοχή θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδρασή της με την PARN. Το γονίδιο της Occludin ελέγχεται από το κερκάδιο ρολόι και έχει ταλαντούμενα επίπεδα mRNA στο παχύ έντερο μυών και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ευαισθησία στην κολίτιδα και την διαπερατότητα του παχέος εντέρου, διαδικασίες που είναι επίσης κάτω από κερκάδιο έλεγχο (186). Οι αμινοτελικές και καρβοξυτελικές περιοχές της Marveld2 είναι κυτταροπλασματικές. Πιο συγκεκριμένα, η καρβοξυτελική περιοχή της Marveld2 είναι υπεύθυνη για τις αλληλεπιδράσεις με την Occludin. Θα μπορούσε να γίνει η υπόθεση πως και η PARN αλληλεπιδρά με την Marveld2 μέσω αυτών των κυτταροπλασματικών της περιοχών. Μια πρόσφατη αναφορά (187), συνδέει το σύμπλοκο στεγανών συνδέσμων με το κερκάδιο ρολόι στο ήπαρ. Η tight junction protein 1 (TJP1) αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο PER::CRY στο κυτταρόπλασμα κατά τη διάρκεια της ημέρας ή κατά τη διάρκεια νηστείας και το βράδυ ή μετά τη λήψη γεύματος, ο ενεργοποιημένος mTOR φωσφορυλιώνει την TJP1 διαταράσσοντας την αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο PER::CRY οδηγώντας στην μετατόπισή του στον πυρήνα ώστε να ολοκληρωθεί η θηλιά ανατροφοδότησης της κερκάδιας μεταγραφής (187).

P-bodies

Τα P-bodies είναι μεταξύ των δυναμικών οργανιδίων/foci του κυτταροπλάσματος χωρίς μεμβράνη (188). Τα P-bodies περιέχουν mRNA και ένζυμα αποικοδόμησης mRNA, αντανακλώντας έναν μηχανισμό σίγησης της μετάφρασης των mRNA. Έχει προταθεί ότι τα P-bodies μπορεί να λειτουργούν ως προσωρινή αποθήκευση για μετάγραφα που κωδικοποιούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες σε βασικές οδούς. Η αποαδενυλίωση είναι ένα ουσιαστικό, και ίσως αρχικό, βήμα για το σχηματισμό των P-bodies, αν και αρχικά θεωρήθηκε ότι τα ένζυμα απομάκρυνσης της καλύπτρας είχαν πιο σημαντική επίδραση (189). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι ο αριθμός των P-bodies ποικίλλει κατά τη διάρκεια της ημέρας και είναι υπό τον έλεγχο του κερκάδιου ρολογιού συμβάλλοντας στην κερκάδια μετα-μεταγραφική ρύθμιση (190). Τέλος, αν και έχει αναφερθεί ότι η PARN εντοπίζεται σε κοκκία του κυττάρου, όπως τα σωματίδια Cajal στον πυρήνα (150) και τα κυτταροπλασματικά κοκκία εξωσώματος (67), δεν έχει περιγραφεί να εντοπίζεται σε P-bodies.

Συμπεράσματα

Ο ρόλος της ανακύκλισης του mRNA μέσω της απαδενυλίωσης στον κερκάδιο ρυθμό είναι μια πτυχή της κερκάδιας γονιδιακής έκφρασης που έχει αγνοηθεί. Η PARN είναι μια βασική απαδενυλίωση των θηλαστικών και εμπλέκεται σε μεγάλο εύρος διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης και της ωρίμανσης των ωοκυττάρων (28), την εμβρυογένεση, την πρόωμη ανάπτυξη, τις βλάβες του DNA και την πρόοδο του κυτταρικού

κύκλου (70). Η δραστηριότητά της ρυθμίζεται από την πρόσδεσή της στην 5' καλύπτρα του mRNA και την παρουσία cis-δραστικών στοιχείων στις 3'-UTR των mRNA στόχων της (ARE και CRE) (70, 75, 76). Στην παρούσα εργασία, εστιάσαμε στην PARN καθώς έχει δειχθεί πως έχει ρυθμικά επίπεδα mRNA σε ήπαρ μυός (21) ενώ δεν υπάρχει κάποια αναφορά στα πρωτεϊνικά της επίπεδα και ο πιθανός της ρόλος στο κερκάδιο ρολόι δεν έχει εξεταστεί μέχρι τώρα.

Αυτό το μέρος της διατριβής εξετάζει για πρώτη φορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PARN στο 24ωρο από ήπαρ μυός, τα οποία φαίνεται να είναι ρυθμικά. Επιπλέον, εξετάστηκε η σχέση της PARN με το miRNA-29 και την πρόδρομη μορφή του. Η ανοσοκατακρήμνιση της PARN και επακόλουθη εκχύλιση RNA σε ήπαρ μυός, έδειξε πως η PARN αλληλεπιδρά με το pri-miR-29a σε φυσιολογικές συνθήκες φωτοπεριόδου. Επιχειρήθηκε η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που επηρεάζουν την ωρίμανση του pri-miR-29a, ως μια προσέγγιση της ταυτοποίησης των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την PARN και της προσδίδουν εξειδίκευση στους στόχους της. Αυτή η προσέγγιση δε απέδωσε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, και η μελέτη επανεστιάστηκε στην ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της PARN.

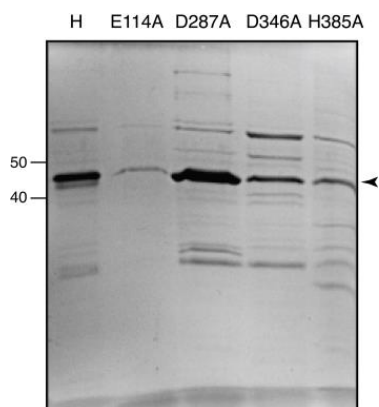
Τα αποτελέσματα αυτού του μέρους της διατριβής περιγράφουν το σύνολο των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της PARN σε ήπαρ μυός και αναδεικνύουν νέες πρωτεΐνες με τις οποίες πιθανόν αλληλεπιδρά. Η διαφορά στην κατανομή αυτών των πρωτεϊνών μεταξύ φυσιολογικών και διαταραγμένων συνθηκών φωτοπεριόδου ίσως υποδεικνύουν έναν πιθανό μηχανισμό δράσης της PARN οδηγούμενο από αλλαγές του κερκάδιου ρυθμού, όπως η διαταραχή της φωτοπεριόδου. Επιπλέον, η PARN φαίνεται να αλληλεπιδρά με αρκετές πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν σε ποικιλία βιολογικών διεργασιών, όπως η αυτοφαγία και εντοπίζονται σε ποικίλα κυτταρικά συστατικά του κυττάρου, όπως το κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ επίσης φαίνεται πως η PARN ίσως εντοπίζεται κοντά στους στεγανούς συνδέσμους. Τέλος, οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά η PARN σε συνθήκες LD αναδεικνύουν τη συμμετοχή της στην απόκριση σε βλάβες του DNA, εάν ληφθεί υπόψη πως οι μηχανισμοί απόκρισης σε βλάβες του DNA είναι υπό τον έλεγχο του κερκάδιου ρυθμού (7) και η απορρύθμισή τους μπορεί να οδηγήσει στην εξέλιξη του καρκίνου (15). Ταυτόχρονα, θα μπορούσε να θεωρηθεί πως η PARN σε συνθήκες DD ανακατευθύνεται σε άλλες λειτουργίες από τις συνηθισμένες της λειτουργίες της στο μεταβολισμό του RNA και την απόκριση στις βλάβες του DNA, όπως η έναρξη της αυτοφαγίας. Επιπλέον μελέτη είναι απαραίτητη για να αποσαφηνιστεί η σημασία των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που εντοπίστηκαν, αλλά και οι τρόποι με τους οποίους εμπλέκεται η PARN στις διαδικασίες που αναφέρθηκαν στο πλαίσιο του κερκάδιου ρολογιού.

SUMMARY

The circadian rhythm is an intrinsic process in all organisms that regulates the sleep-wake cycle and repeats itself almost every 24 hours. They are endogenous, but also adapt to changes in the environment, the most important of which is the light/dark cycles due to Earth's rotation around its axis. Circadian rhythms are driven by the circadian clock, a biochemical mechanism that oscillates with a stable phase and is synchronized with the 24-hour day. Circadian clocks in the body respond to expected environmental changes from the light/dark cycle and adjust accordingly. Thus, rhythms influence various aspects of the physiology and behavior of organisms, such as the sleep cycle, leaf movements in plants, etc. The molecular mechanism of the clock is based on transcriptional regulation, leading to rhythmic changes based on negative feedback loops between transcription and translation controlling the expression of genes involved in the rhythm. Thus, the processes and factors that determine rhythmic gene expression are important for understanding circadian rhythms. Among them, poly(A) tails of RNAs play a key role in stability, translational capacity, as well as degradation. In particular, the shortening and removal of the poly(A) tail by enzymes called deadenylases, is the first and rate limiting step in the degradation of eukaryotic mRNAs, determining their lifespan. Herein, the role of two deadenylases involved in the circadian rhythm, AtHESPERIN and poly(A) specific ribonuclease (PARN) was investigated. HESPERIN was identified from studies from our group as a deadenylase with circadian expression in *Arabidopsis thaliana*. We describe the biochemical characterization of the enzyme through the optimization processes of the production and purification conditions as well as the examination of the active site and the catalytic mechanism. Combining the biochemical results with *in silico* analysis, we assessed the importance of the amino acids required for catalysis, leading to the categorization of HESPERIN in the EEP (exonuclease-endonuclease-phosphatase) family of deadenylases. At the same time, it has been described that PARN exhibits rhythmic mRNA levels in mouse liver, without any other known details about its protein levels or the more general role it may have in the circadian role. In the context of the thesis, we examined the levels of PARN in human HEK293T cells after synchronization with the circadian rhythm and also in mouse liver. In addition, we examined the interaction of PARN with miR-29a, as studies from our lab have shown that PARN interacts with miR-29a in squamous lung cancer cells and is involved in its maturation, while at the same time it is described that miR-29a plays an important role in period regulation of the clock in mouse liver. Immunoprecipitation of PARN and analysis of RNA molecules bound to it showed that it interacts with miR-29a, followed by precipitation of miR-29a at various time points of 24 hours to identify its protein interactions. Finally, the role of PARN in the circadian rhythm was studied by performing a large-scale proteomic study after immunoprecipitation of PARN from mouse liver over the course

of 24 hours. This study revealed novel factors that interact with PARN at specific times of the 24-hour period, but also factors that indicate that PARN may have highly specialized roles within the circadian rhythm, laying the groundwork for the study of these previously unknown processes.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1



Εικόνα 25. Απομόνωση της AtHESPERIN και των μεταλλαγμένων της μορφών. Οι πρωτεΐνες (10μg ανά διαδρομή) αναλύθηκαν σε πηκτή 10% gel. Η βιοχημική καθαρότητα της AtHESPERIN και των μεταλλαγμένων της μορφών διαφέρουν. Το βέλος στα δεξιά υποδεικνύει τη θέση της AtHESPERIN και των μεταλλαγμάτων. Οι αριθμοί στα αριστερά υποδεικνύουν τη θέση των δεικτών μοριακής μάζας (kDa) (41).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

Πίνακας 3. Αλληλουχίες εκκινητών για γονίδια *Homo sapiens* που χρησιμοποιήθηκαν στην RT-qPCR

Στόχος	Αλληλουχία	
<i>στόχοι mRNA</i>		
gapdh	FWD	AGAAGGCTGGGGCTCATTTG
	REV	AGGGGCCATCCACAGTCTTC
β-actin	FWD	GGACTTCGAGCAAGAGATGG
	REV	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
U6 snRNA	Μ.Δ.	
clock	FWD	GGCTGAAAGACGACGAGAAC
	REV	GGTGTGAGGAAGGGTCTGA
per2	FWD	CTGATTGAAACCCAGTGCT
	REV	ATGGGTTGATGAAGCTGGAC
parn	FWD	CGAGTAGAACCGCTGAGGC
	REV	ATGCAGAGACTGAAGGTCCATC
nocturnin	FWD	GCCAAGACACTGAACAGCAG
	REV	GGCAATCTGTCCTCAGATCC
<i>στόχοι pri-miRNA</i>		
pri-miR-29a	FWD	CCAACCCTCACGACCTTCTG
	REV	TCCTCTCAGCAGTCAGCATCA
pri-miR-101-1	FWD	ATGCAGCCACCAGAAAGGAT
	REV	TCTTCCTGGGTACGGTGAGG
pri-miR-122	FWD	ACACCTTCGTGGCTACAGAGT
	REV	CGAGGGAAGGATTGCCTAGCAG
pri-miR-1207	FWD	GGAGCCCTTTCTTTTTCTG
	REV	CAAGACGCAAACATCTCGAA
<i>στόχοι miRNA</i>		
miR-29a-3p		GGGTAGCACCATCTGAAATCGGTTA
miR-101-1		GCGGAGTACTGTGATAACTGAA

miR-122-5p		GGGAACACCATTGTCACACTCCA
miR-1207-5p		TGGCAGGGAGGCTGGGAGG

Πίνακας 4. Πίνακας αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοσύτωση Western

Στόχος	Κατασκευαστής	Κωδικός	Αραίωση	Μοριακή Μάζα (kDa)
<i>Πρωτογενή Αντισώματα</i>				
PARN	Abcam	ab188333	1:500	74
	Santa Cruz	sc-135242	1:1000	74
	Καθ. A.Virtanen, Πανεπιστήμιο της Ουψάλα	Μ.Δ.	1:1000	74
BMAL1 (D2L7G)	Cell Signaling Technology	14020	1:1000	78
CLOCK (D45B10)	Cell Signaling Technology	5157	1:1000	100
β-ACTIN	Sigma-Aldrich	A5316	1:5000	43
GAPDH (D16H11)	Cell Signaling Technology	5174	1:2000	37
His-Tag	Επικ. Καθ. Η. Μυλωνής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας	Μ.Δ.	1:5000	-
<i>Δευτερογενή Αντισώματα</i>				
Mouse IgG-HRP	Pierce	31432	1:25000	-
Rabbit IgG-HRP	Pierce	31462	1:15000-1:50000	-

Πίνακας 5. Αλληλουχίες εκκινητών για γονίδια *Mus musculus* που χρησιμοποιήθηκαν στην RT-qPCR

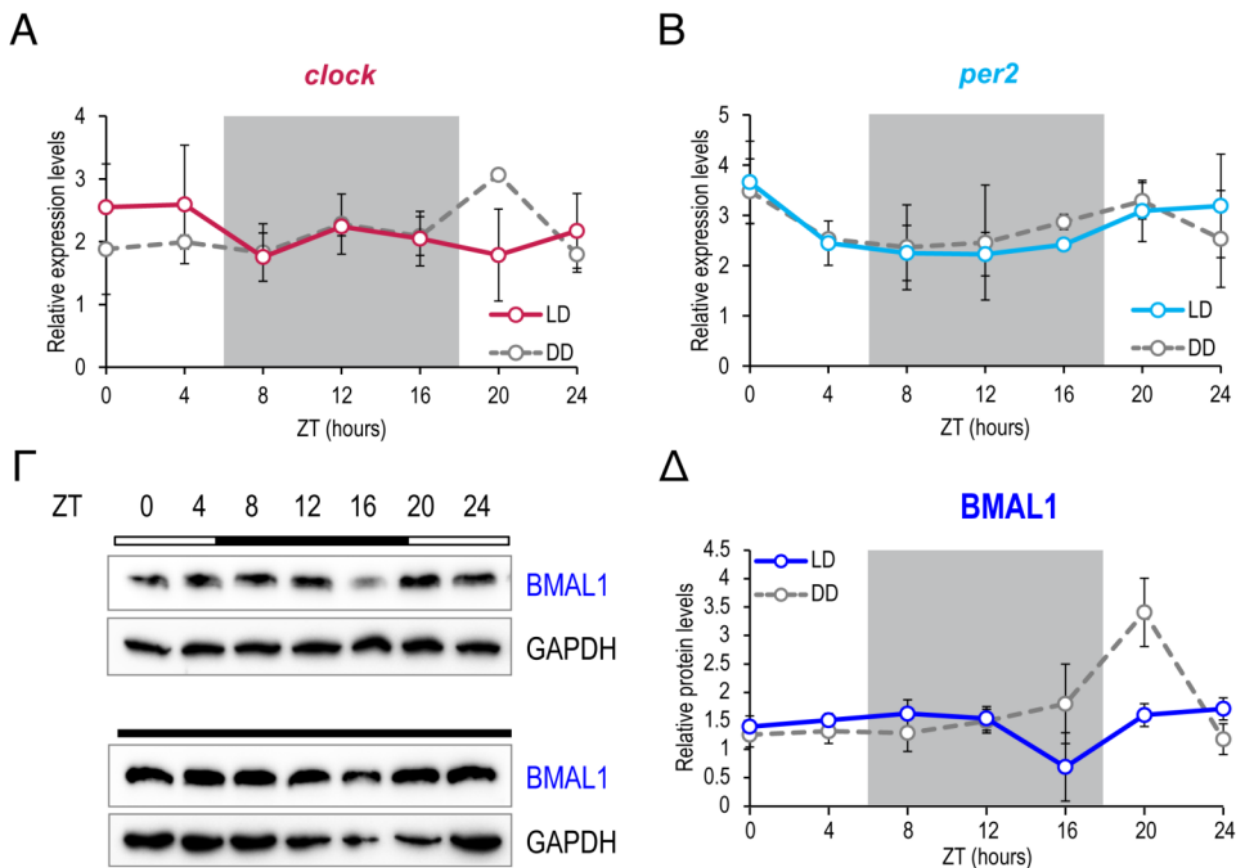
Στόχος	Αλληλουχία	
<i>στόχοι mRNA</i>		
b2m	FWD	GTTCGGCTTCCCATTCTCC
	REV	GGTCTTTCTGGTGCTTGTCTCA
U6 snRNA	Μ.Δ.	
clock	FWD	ACCACAGCAACAGCAACAAC
	REV	AAAGGCAGCAGAGAGGATGA

per2	FWD	GGACTTCGAGCAAGAGATGG
	REV	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
parn	FWD	CCATGCACTGGGTTCCAAAG
	REV	TCCTGCTCTCTCCTTTTGCG
στόχοι pri-miRNA		
pri-miR-29a	FWD	CAGCTGAACGGTGCTCTTCC
	REV	CTTCCCAGTGACACATGACCTC
pri-miR-101a	FWD	ATGCAGCCACCAGAAAGGAT
	REV	TCTTCCTGGGTACGGTGAGG
pri-miR-122	FWD	CGGAGGAATGTGAAGGGAAG
	REV	TTGCTCGGAGAGAACAGACG
στόχοι miRNA		
miR-29a-3p		GGGTAGCACCATCTGAAATCGGTTA
miR-101-1		GCGGAGTACTGTGATAACTGAA
miR-122-5p		GGGAACACCATTGTCACACTCCA
miR-1207-5p		TGGCAGGGAGGCTGGGAGG

Πίνακας 6. Αλληλουχίες ιχνηθετών που χρησιμοποιήθηκαν για το vIPR

Στόχος ιχνηθέτη	Αλληλουχία ιχνηθέτη καθοδικά του 5'-Biotin-TEG
pri-miR-29a	ATCGGTTATAATGATTGGGG
pri-miR-101a	AGTGTGTCTGGTCCTGTCC
pri-miR-122	ACTTTGCTCAAACCTTTAAG
Μη νοηματικός	GTGAGGCGTTGTAAGAGTGGTTAAG(133)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3



Εικόνα 26. Οι βασικοί ρυθμιστές του ρολογιού, **CLOCK**, **PER2** και **BMAL1**, σε ήπαρ μυός. Πρότυπο έκφρασης του **CLOCK** (A) και του **PER2** (B) στη διάρκεια του 24ώρου σε ήπαρ μυός. Γ. Πρωτεϊνικά επίπεδα του **BMAL1** στη διάρκεια του 24ώρου σε ήπαρ μυός. Δ. Γράφημα της σχετικής ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνικών επιπέδων του **BMAL1** στη διάρκεια του 24ώρου σε σχέση με το χρόνο. Η γκρι διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στα δείγματα από τις συνθήκες συνεχούς σκοταδιού (DD). Το γκρι πλαίσιο στα γραφήματα και η ασπρόμαυρη ή μαύρη μπάρα στην εικόνα της ανοσοσύτωσης κατά Western υποδηλώνουν τη διάρκεια της νύχτας.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

Πίνακας 7. Το σύνολο των στατιστικά σημαντικών πρωτεϊνών που ανιχνεύθηκαν από το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης με την PARN από ήπαρ μυός. Οι τιμές είναι ταξινομημένες κατά φθίνουσα τιμή διαφοράς μεταξύ των δειγμάτων PARN IP και IgG IP.

Πλήρες όνομα πρωτεΐνης	Όνομα γονιδίου	$-\log(p\text{-value})$	Difference
m ⁷ GpppX diphosphatase	Dcps	25.23537	7.933305
Poly(A)-specific ribonuclease PARN	Parn	36.96354	6.849151
cGMP-dependent 3',5'-cyclic phosphodiesterase	Pde2a	22.2646	4.279432
Isoform 2 of T-box transcription factor TBX20	Tbx20	4.891138	2.664743
Enhancer of mRNA-decapping protein 4	Edc4	11.87827	2.540883
MARVEL domain-containing protein 2	Marveld2	14.64919	2.396352
Serrate RNA effector molecule homolog	Srrt	7.081633	2.365152
Nuclear pore complex protein Nup155	Nup155	3.854837	2.183865
Leucine-rich repeat-containing protein 57	Lrrc57	2.404009	2.099458
E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	Ubr5	3.498957	2.030092
Adenylosuccinate lyase	Adsl	5.862171	2.018083
Proline-rich AKT1 substrate 1	Akt1s1	4.057694	1.939922
Cell cycle and apoptosis regulator protein 2	Ccar2	3.800293	1.922363
Kalirin	Kalrn	5.208993	1.917501
40S ribosomal protein S28	Rps28	4.406148	1.632863
Pleckstrin homology-like domain family A member 1	Phlda1	5.041452	1.490728
Dynamin-1	Dnm3	4.29199	1.468881
Ras-related GTP-binding protein B	Rragb	4.750286	1.45081
Splicing factor U2AF 35 kDa subunit	U2af1	7.141032	1.438865
ATP synthase subunit delta, mitochondrial	Atp5f1d	3.68347	1.401511
WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 4	Wdr45	2.868237	1.361627
Acyl-coenzyme A diphosphatase FITM2	Fitm2	4.958613	1.33696
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	Eif5a	2.661882	1.326985
Derlin-2	Derl2	2.997898	1.248905
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	Snrpd3	3.567635	1.247785

28S ribosomal protein S33, mitochondrial	Mrps33	4.690067	1.187131
Charged multivesicular body protein 2a	Chmp2a	3.647691	1.165776
Ras-related protein Rab-5C	Rab5c	4.415209	1.13926
Heat shock 70 kDa protein 1-like	Hspa2	3.742697	1.138708
UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine transporter	Slc35d1	2.505714	1.129839
Charged multivesicular body protein 4b	Chmp4b	2.395105	1.121764
Collagen alpha-1(XIV) chain	Col14a1	3.671144	1.104265
Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	Hgs	3.930245	1.05914
Legumain	Lgmn	6.099574	1.026914
Gamma-butyrobetaine dioxygenase	Bbox1	3.041606	1.025548
Peroxisomal biogenesis factor 3	Pex3	5.096183	1.011379
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdhs	2.765926	0.996727
Solute carrier family 22 member 18	Slc22a18	4.789872	0.963376
Lathosterol oxidase	Sc5d	2.777657	0.949134
39S ribosomal protein L28, mitochondrial	Mrpl28	3.466513	0.945312
39S ribosomal protein L24, mitochondrial	Mrpl24	3.951839	0.92933
Protein SCO1 homolog, mitochondrial	Sco1	2.71591	0.863813
Calpain-1 catalytic subunit	Capn1	4.006373	0.85564
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	Ndufa6	2.829251	0.818017
Structural maintenance of chromosomes protein 1A	Smc1a	2.970049	0.790598
Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-2	Slc25a23	3.752693	0.788837
AFG1-like ATPase	Afg1l	4.953621	0.761647
Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1	Ergic1	3.132974	0.758286
Lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase	Lipa	3.212312	0.727901
Broad substrate specificity ATP-binding cassette transporter ABCG2	Abcg2	3.130663	0.719953

Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	Timm50	4.694606	0.69836
60S ribosomal protein L23	Rpl23	3.508599	0.636243
Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Acadl	4.112328	0.611674

Πίνακας 8. Το σύνολο των κυτταρικών συστατικών στα οποία κατατάσσονται οι πρωτεΐνες από τον Πίνακα 6 κατά αύξουσα τιμή p-value όπως υπολογίζεται από το GeneCodis 4.0. Στον πίνακα εμφανίζονται οι όροι με p-value < 0.05.

Κυτταρικό συστατικό	Αριθμός γονιδίων	p-value	Γονίδια
Mitochondrion	19	6.10E-07	Dcps, Abcg2, Acadl, Atp5f1d, Adsl, Afg1l, Mrps33, Mrpl28, Capn1, Hspa2, Pde2a, Bbox1, Dnm3, Ndufa6, Sco1, Slc25a23, Fitm2, Timm50, Mrpl24
Nuclear pore	4	0.001378	Eif5a, Chmp2a, Chmp4b, Nup155
Multivesicular body membrane	3	0.001378	Chmp2a, Hgs, Chmp4b
Ribosome	5	0.002487	Rps28, Mrps33, Mrpl28, Rpl23, Mrpl24
Cytoplasm	29	0.0035	Parn, Tbx20, Kalrn, Eif5a, Dcps, Rps28, Ccar2, Afg1l, Chmp2a, Marveld2, Srrt, Edc4, Capn1, Hspa2, Snrpd3, Pde2a, Slc22a18, Bbox1, Hgs, Lgmn, Akt1s1, Dnm3, Rragb, Wdr45, Chmp4b, Phlda1, Rpl23, Nup155, Gapdhs
Cytosol	20	0.004137	Ubr5, Smc1a, Kalrn, Dcps, Rps28, Adsl, Chmp2a, Mrpl28, Capn1, Hspa2, Snrpd3, Pde2a, Pex3, Hgs, Akt1s1, Wdr45, Chmp4b, Rpl23, Gapdhs, Lipa
ESCRT III complex	2	0.005036	Chmp2a, Chmp4b
Amphisome membrane	2	0.005378	Chmp2a, Chmp4b
Mitochondrial inner membrane	6	0.005711	Atp5f1d, Pde2a, Ndufa6, Sco1, Slc25a23, Timm50
Nucleoplasm	17	0.0066	Ubr5, Smc1a, Kalrn, Dcps, Abcg2, Ccar2, Ergic1, U2af1, Srrt, Edc4, Hspa2, Snrpd3, Pex3, Phlda1, Rpl23, Lipa, Timm50
Mitochondrial membrane	4	0.008792	Abcg2, Acadl, Afg1l, Ndufa6
Kinetochores microtubule	2	0.008792	Chmp2a, Chmp4b
Nuclear envelope	4	0.016804	Chmp2a, Slc22a18, Chmp4b, Nup155

Postsynaptic endocytic zone membrane	1	0.023357	Dnm3
Membrane coat	2	0.023357	Chmp2a, Chmp4b
Basal tubulobulbar complex	1	0.023357	Dnm3
Integral component of endoplasmic reticulum membrane	3	0.025558	Derl2, Ergic1, Fitm2
Lysosome	5	0.027157	Capn1, Hgs, Lgmn, Rragb, Lipa
Kinetochores	3	0.032123	Smc1a, Chmp2a, Chmp4b
ESCRT-0 complex	1	0.032462	Hgs
Apical tubulobulbar complex	1	0.032462	Dnm3
DBIRD complex	1	0.032462	Ccar2
Protein-lipid complex	1	0.032462	Pex3
Autophagosome membrane	2	0.034934	Chmp2a, Chmp4b
Proton-transporting ATP synthase complex	1	0.043029	Atp5f1d
Nuclear pore inner ring	1	0.043029	Nup155
Postsynaptic density	4	0.043195	Kalrn, Dnm3, Chmp4b, Rpl23
Multivesicular body	2	0.043195	Chmp2a, Chmp4b
Mitochondrial large ribosomal subunit	2	0.043195	Mrpl28, Mrpl24
Tricellular tight junction	1	0.043826	Marveld2
Endoplasmic reticulum	9	0.043826	Eif5a, Derl2, Rps28, Sc5d, Slc35d1, Ergic1, Pde2a, Pex3, Fitm2
Gtr1-Gtr2 GTPase complex	1	0.043826	Rragb

Hippocampal mossy fiber	1	0.043826	Pde2a
External side of apical plasma membrane	1	0.043826	Abcg2
Protein-containing complex	6	0.049565	Ubr5, Adsl, Srrt, Pex3, Akt1s1, Rpl23
Commitment complex	1	0.049565	Snrpd3
Cytoplasmic side of rough endoplasmic reticulum membrane	1	0.049565	Rps28
Mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, catalytic sector F(1)	1	0.049565	Atp5f1d
Meiotic cohesin complex	1	0.049565	Smc1a
Spliceosomal tri-snRNP complex	1	0.049565	Snrpd3
Proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)	1	0.049565	Atp5f1d
Extrinsic component of membrane	2	0.049565	Kalrn, Wdr45
U2AF complex	1	0.049565	U2af1
pICln-Sm protein complex	1	0.049565	Snrpd3
Cellular anatomical entity	3	0.049565	Atp5f1d, Lgmn, Col14a1
Hrd1p ubiquitin ligase ERAD-L complex	1	0.052307	Derl2

Πίνακας 9. Το σύνολο των βιολογικών διεργασιών στις οποίες εμπλέκονται οι πρωτεΐνες από τον Πίνακα 6 κατά αύξουσα τιμή p-value όπως υπολογίζεται από το GeneCodis 4.0. Στον πίνακα εμφανίζονται οι όροι με p-value < 0.05.

Βιολογική διεργασία	Κωδικός Οντολογίας γονιδίων	Αριθμός γονιδίων	p-value	Γονίδια
protein polymerization	GO:0051258	2	0.017265	Chmp2a, Chmp4b
receptor catabolic process	GO:0032801	2	0.017265	Capn1, Lgmn
late endosome to lysosome transport	GO:1902774	2	0.017265	Chmp2a, Chmp4b
xenobiotic detoxification by transmembrane export across the plasma membrane	GO:1990961	2	0.017265	Abcg2, Slc22a18
positive regulation of vascular permeability	GO:0043117	2	0.017265	Capn1, Pde2a
exit from mitosis	GO:0010458	2	0.017265	Chmp2a, Chmp4b
nuclear membrane reassembly	GO:0031468	2	0.017265	Chmp2a, Chmp4b
protein transport	GO:0015031	7	0.017265	Eif5a, Rab5c, Chmp2a, Hgs, Chmp4b, Nup155, Timm50
vacuolar transport	GO:0007034	2	0.017265	Chmp2a, Chmp4b
viral budding from plasma membrane	GO:0046761	2	0.017265	Chmp2a, Chmp4b
self-proteolysis	GO:0097264	2	0.017265	Capn1, Lgmn
multivesicular body sorting pathway	GO:0071985	2	0.017265	Chmp2a, Chmp4b
membrane invagination	GO:0010324	2	0.017265	Chmp2a, Hgs
viral budding via host ESCRT complex	GO:0039702	2	0.017265	Chmp2a, Chmp4b
positive regulation of exosomal secretion	GO:1903543	2	0.017265	Chmp2a, Hgs
midbody abscission	GO:0061952	2	0.018319	Chmp2a, Chmp4b
cardiac septum development	GO:0003279	2	0.02162	Tbx20, Pde2a
regulation of centrosome duplication	GO:0010824	2	0.022656	Chmp2a, Chmp4b
establishment of endothelial barrier	GO:0061028	2	0.023546	Marvel2, Pde2a

positive regulation of cardiac muscle cell apoptotic process	GO:0010666	2	0.023546	Eif5a, Capn1
regulation of mitotic spindle assembly	GO:1901673	2	0.023546	Chmp2a, Chmp4b
mRNA processing	GO:0006397	5	0.024161	Dcps, Ccar2, U2af1, Srrt, Snrpd3
plasma membrane repair	GO:0001778	2	0.025616	Chmp2a, Chmp4b
FasL biosynthetic process	GO:0045210	1	0.026205	Phlda1
glucuronoside metabolic process	GO:0019389	1	0.026205	Abcg2
positive regulation of long-term synaptic potentiation	GO:1900273	2	0.026205	Kalrn, Lgmn
carnitine catabolic process	GO:0042413	1	0.026205	Acadl
ncRNA deadenylation	GO:0110008	1	0.026205	Parn
aerobic respiration	GO:0009060	2	0.026205	Atp5f1d, Adsl
organic anion transport	GO:0015711	2	0.026205	Abcg2, Slc22a18
nucleus organization	GO:0006997	2	0.026205	Chmp2a, Chmp4b
fatty-acyl-CoA catabolic process	GO:0036115	1	0.026205	Fitm2
regulation of cell growth involved in cardiac muscle cell development	GO:0061050	1	0.026205	Col14a1
ubiquitin-dependent protein catabolic process via the multivesicular body sorting pathway	GO:0043162	2	0.026205	Chmp2a, Chmp4b
negative regulation of cell death	GO:0060548	3	0.026205	Chmp2a, Pde2a, Chmp4b
negative regulation of ERBB signaling pathway	GO:1901185	1	0.026205	Lgmn
positive regulation of DNA damage checkpoint	GO:2000003	1	0.026205	Ccar2
tricuspid valve development	GO:0003175	1	0.026205	Tbx20
cholesterol biosynthetic process via lathosterol	GO:0033490	1	0.026205	Sc5d

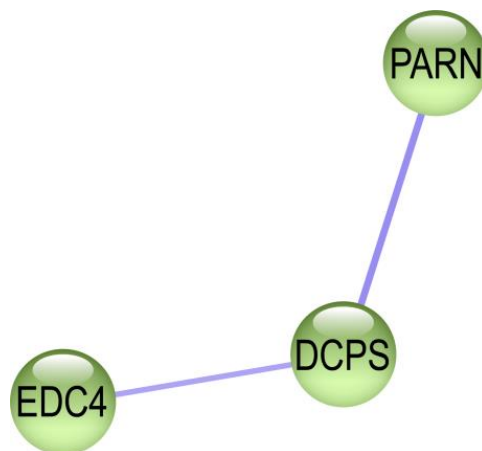
embryonic heart tube elongation	GO:0036306	1	0.026205	Tbx20
autophagosome maturation	GO:0097352	2	0.028811	Chmp2a, Chmp4b
cellular response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxine	GO:1904613	1	0.033241	Pde2a
response to cold	GO:0009409	2	0.033241	Acadl, Hspa2
cellular response to menadione	GO:0036245	1	0.033241	Dcps
synaptonemal complex disassembly	GO:0070194	1	0.033241	Hspa2
regulation of sequestering of calcium ion	GO:0051282	1	0.033241	Slc25a23
protein localization to nuclear inner membrane	GO:0036228	1	0.033241	Nup155
pulmonary valve formation	GO:0003193	1	0.033241	Tbx20
purine ribonucleotide biosynthetic process	GO:0009152	1	0.033241	Adsl
adenine nucleotide transport	GO:0051503	1	0.033241	Slc25a23
foramen ovale closure	GO:0035922	1	0.033241	Tbx20
translation	GO:0006412	4	0.033241	Eif5a, Rps28, Rpl23, Mrpl24
negative regulation of centriole elongation	GO:1903723	1	0.033241	Chmp2a
urea homeostasis	GO:0097274	1	0.033241	Slc25a23
RNA splicing	GO:0008380	4	0.033241	Dcps, Ccar2, U2af1, Snrpd3
homeostasis of number of cells within a tissue	GO:0048873	2	0.033241	Col14a1, Lipa
response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxine	GO:1904612	1	0.033241	Abcg2
pulmonary vein morphogenesis	GO:0060577	1	0.033241	Tbx20
protein-DNA complex disassembly	GO:0032986	1	0.033241	Rpl23
regulation of cGMP-	GO:0010752	1	0.033241	Pde2a

mediated signaling				
response to DNA damage checkpoint signaling	GO:0072423	1	0.033241	Smc1a
mitotic metaphase plate congression	GO:0007080	2	0.033241	Chmp2a, Chmp4b
box H/ACA RNA 3'-end processing	GO:0000495	1	0.033241	Parn
NMDA selective glutamate receptor signaling pathway	GO:0098989	1	0.039721	Kalrn
carnitine biosynthetic process	GO:0045329	1	0.039721	Bbox1
visceral motor neuron differentiation	GO:0021524	1	0.039721	Tbx20
cardiac chamber formation	GO:0003207	1	0.039721	Tbx20
regulation of triglyceride biosynthetic process	GO:0010866	1	0.039721	Fitm2
UDP-glucuronic acid transmembrane transport	GO:0015787	1	0.039721	Slc35d1
biotin transport	GO:0015878	1	0.039721	Abcg2
carnitine metabolic process, CoA-linked	GO:0019254	1	0.039721	Acadl
methylguanosine-cap decapping	GO:0110156	1	0.039721	Dcps
positive regulation of translational elongation	GO:0045901	1	0.039721	Eif5a
cellular detoxification	GO:1990748	1	0.039721	Abcg2
vacuolar protein processing	GO:0006624	1	0.039721	Lgmn
regulation of G1 to G0 transition	GO:1903450	1	0.039721	Rpl23
UDP-N-acetylgalactosamine transmembrane transport	GO:0015789	1	0.039721	Slc35d1
positive regulation of translational termination	GO:0045905	1	0.039721	Eif5a
amide transport	GO:0042886	1	0.039721	Abcg2

cGMP catabolic process	GO:0046069	1	0.043089	Pde2a
regulation of cellular hyperosmotic salinity response	GO:1900069	1	0.043089	Slc25a23
transcription-dependent tethering of RNA polymerase II gene DNA at nuclear periphery	GO:0000972	1	0.043089	Nup155
cyclooxygenase pathway	GO:0019371	1	0.043089	Sco1
deadenylation-independent decapping of nuclear-transcribed mRNA	GO:0031087	1	0.043089	Edc4
cellular response to actinomycin D	GO:0072717	1	0.043089	Rpl23
negative regulation of growth hormone secretion	GO:0060125	1	0.043089	Kalrn
regulation of protein deacetylation	GO:0090311	1	0.043089	Ccar2
synaptic vesicle budding from presynaptic endocytic zone membrane	GO:0016185	1	0.043089	Dnm3
regulation of telomerase RNA localization to Cajal body	GO:1904872	1	0.043089	Parn
negative regulation of histone H2A K63-linked ubiquitination	GO:1901315	1	0.043089	Ubr5
autophagy	GO:0006914	3	0.043089	Chmp2a, Wdr45, Chmp4b
renal urate salt excretion	GO:0097744	1	0.043089	Abcg2
negative regulation of intestinal absorption	GO:1904479	1	0.043089	Abcg2
peroxisome membrane biogenesis	GO:0016557	1	0.043089	Pex3
sequestering of triglyceride	GO:0030730	1	0.043089	Fitm2
behavioral response to formalin induced pain	GO:0061368	1	0.043089	Kalrn
telomerase RNA	GO:0090669	1	0.043089	Parn

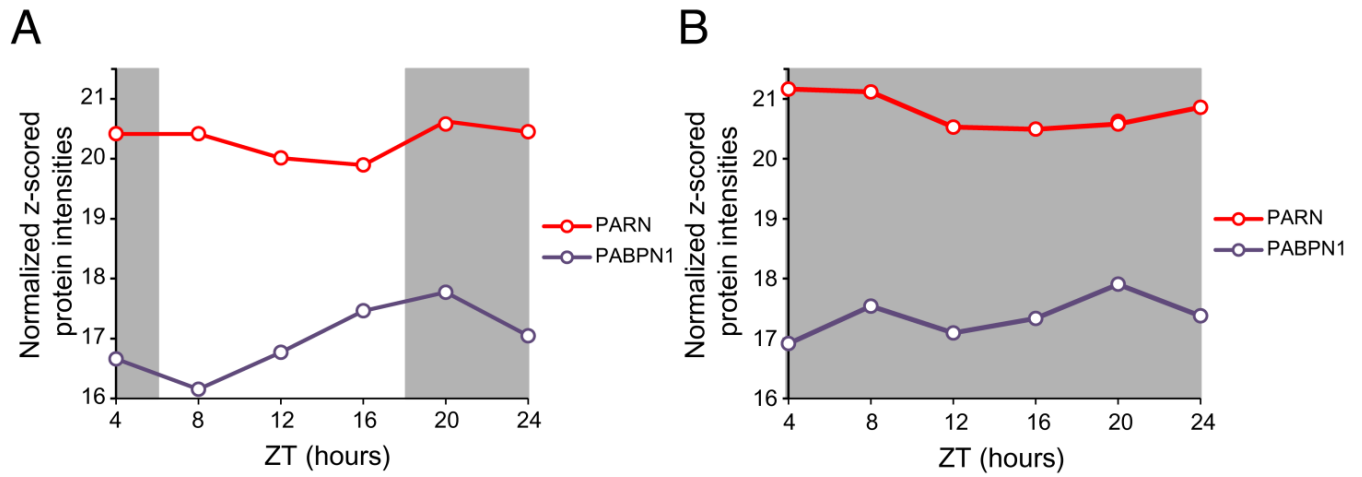
stabilization				
regulation of autophagy	GO:0010506	2	0.047881	Rragb, Chmp4b
regulation of nitric oxide mediated signal transduction	GO:0010749	1	0.047881	Pde2a
regulation of cytochrome-c oxidase activity	GO:1904959	1	0.047881	Sco1
positive regulation of synaptic vesicle recycling	GO:1903423	1	0.047881	Dnm3
regulation of cAMP-mediated signaling	GO:0043949	1	0.047881	Pde2a
atrioventricular valve development	GO:0003171	1	0.047881	Tbx20
negative regulation of SMAD protein complex assembly	GO:0010991	1	0.047881	Tbx20
negative regulation of cellular response to insulin stimulus	GO:1900077	1	0.047881	Sco1
ubiquitin-independent protein catabolic process via the multivesicular body sorting pathway	GO:0090611	1	0.047881	Chmp4b
long-chain fatty acid catabolic process	GO:0042758	1	0.047881	Acadl
UDP-N-acetylglucosamine transmembrane transport	GO:1990569	1	0.047881	Slc35d1
AMP biosynthetic process	GO:0006167	1	0.047881	Adsl
postsynaptic neurotransmitter receptor internalization	GO:0098884	1	0.049653	Dnm3
pyrimidine nucleotide-sugar transmembrane transport	GO:0090481	1	0.049653	Slc35d1
ventricular cardiac muscle tissue development	GO:0003229	1	0.049653	Col14a1
cellular response to macrophage colony-stimulating factor stimulus	GO:0036006	1	0.049653	Pde2a

cellular lipid catabolic process	GO:0044242	1	0.049653	Acadl
membrane fission	GO:0090148	1	0.049653	Chmp4b
mitochondrial protein catabolic process	GO:0035694	1	0.049653	Afg1l
protein import into peroxisome membrane	GO:0045046	1	0.049653	Pex3
habituation	GO:0046959	1	0.049653	Kalrn
purine nucleotide metabolic process	GO:0006163	1	0.049653	Adsl
cellular response to cGMP	GO:0071321	1	0.049653	Pde2a
riboflavin transport	GO:0032218	1	0.049653	Abcg2
negative regulation of double-strand break repair	GO:2000780	1	0.049653	Ubr5
smooth muscle cell proliferation	GO:0048659	1	0.049653	Kalrn
regulation of DNA-templated transcription, elongation	GO:0032784	1	0.049653	Ccar2
'de novo' IMP biosynthetic process	GO:0006189	1	0.049653	Adsl
negative regulation of cGMP-mediated signaling	GO:0010754	1	0.049653	Pde2a



Εικόνα 27. Δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ Parn, Dcps και Edc4 από τη βάση δεδομένων STRING (191). Το πάχος των συνδετικών γραμμών υποδηλώνει το βαθμό εμπιστοσύνης μεταξύ των πρωτεϊνών που συνδέουν και προκύπτει από συγκέντρωση δεδομένων από κείμενο (textmining) και δεδομένα συνέκφρασης των πρωτεϊνών αυτών. Οι πρωτεΐνες για τις οποίες δε

βρέθηκε κάποιο στοιχείο στη βάση δεδομένων δεν απεικονίζονται.



Εικόνα 28. Η διακύμανση των επιπέδων της PABPN1 που ανιχνεύονται στα δείγματα LD και DD στο 24ωρο μετά από ανοσοκατακρήμνιση της PARN σε ιστό ήπατος ποντικού.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Beta RA, Balatsos NA. Tales around the clock: poly(A) tails in circadian gene expression WIREs RNA. 2018(in press).
2. Vitaterna MH, Takahashi JS, Turek FW. Overview of circadian rhythms. Alcohol Res Health. 2001;25(2):85-93.
3. Kuhlman SJ, Craig LM, Duffy JF. Introduction to Chronobiology. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018;10(9).
4. Golombek DA, Rosenstein RE. Physiology of circadian entrainment. Physiol Rev. 2010;90(3):1063-102.
5. Sack RL, Brandes RW, Kendall AR, Lewy AJ. Entrainment of free-running circadian rhythms by melatonin in blind people. N Engl J Med. 2000;343(15):1070-7.
6. Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS. Central and peripheral circadian clocks in mammals. Annu Rev Neurosci. 2012;35:445-62.
7. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Kang TH, Reardon JT, Lee JH, Ozturk N. Circadian clock control of the cellular response to DNA damage. FEBS letters. 2010;584(12):2618-25.
8. Mashhour A, Al Mansour Z, Al Hallaj AS, Ali R, Trivilegio T, Boudjelal M. P19 Cells as a Model for Studying the Circadian Clock in Stem Cells before and after Cell Differentiation. J Circadian Rhythms. 2018;16:6.
9. McClung CR. Plant circadian rhythms. Plant Cell. 2006;18(4):792-803.
10. Ajay JY, Gajula PK, Kalaimagal K, Hari BN. Chronopharmacognosy. Pharmacogn Rev. 2012;6(11):6-15.
11. Huang RC. The discoveries of molecular mechanisms for the circadian rhythm: The 2017 Nobel Prize in Physiology or Medicine. Biomed J. 2018;41(1):5-8.
12. Kramer G. EXPERIMENTS ON BIRD ORIENTATION. International journal of avian science. 1952.
13. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of Drosophila melanogaster. Proc Natl Acad Sci U S A. 1971;68(9):2112-6.
14. Masri S, Sassone-Corsi P. The emerging link between cancer, metabolism, and circadian rhythms. Nat Med. 2018;24(12):1795-803.
15. Fu L, Lee CC. The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. Nat Rev Cancer. 2003;3(5):350-61.
16. Kaeffer B, Pardini L. Clock genes of Mammalian cells: practical implications in tissue culture. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2005;41(10):311-20.
17. Castelo-Szekely V, Gatfield D. Emerging Roles of Translational Control in Circadian Timekeeping. Journal of molecular biology. 2020;432(12):3483-97.
18. Anna G, Kannan NN. Post-transcriptional modulators and mediators of the circadian clock. Chronobiol Int. 2021;38(9):1244-61.
19. Wang H, Fan Z, Zhao M, Li J, Lu M, Liu W, et al. Oscillating primary transcripts harbor miRNAs with circadian functions. Scientific reports. 2016;6:21598.
20. Menet JS, Rodriguez J, Abruzzi KC, Rosbash M. Nascent-Seq reveals novel features of mouse circadian transcriptional regulation. eLife. 2012;1:e00011.
21. Kojima S, Sher-Chen EL, Green CB. Circadian control of mRNA polyadenylation dynamics regulates rhythmic protein expression. Genes & development. 2012;26(24):2724-36.
22. Gatfield D, Le Martelot G, Vejnar CE, Gerlach D, Schaad O, Fleury-Olela F, et al. Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. Genes & development. 2009;23(11):1313-26.
23. Chen R, D'Alessandro M, Lee C. miRNAs are required for generating a time delay critical for the circadian oscillator. Curr Biol. 2013;23(20):1959-68.
24. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. Nat Rev Genet. 2015;16(7):421-33.
25. Labno A, Tomecki R, Dziembowski A. Cytoplasmic RNA decay pathways - Enzymes and

- mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1863(12):3125-47.
26. Stoney PN, Yanagiya A, Nishijima S, Yamamoto T. CNOT7 Outcompetes Its Paralog CNOT8 for Integration into The CCR4-NOT Complex. *J Mol Biol*. 2022;434(9):167523.
 27. Lima SA, Chipman LB, Nicholson AL, Chen YH, Yee BA, Yeo GW, et al. Short poly(A) tails are a conserved feature of highly expressed genes. *Nature structural & molecular biology*. 2017;24(12):1057-63.
 28. Copeland PR, Wormington M. The mechanism and regulation of deadenylation: identification and characterization of *Xenopus* PARN. *Rna*. 2001;7(6):875-86.
 29. Udagawa T, Swanger SA, Takeuchi K, Kim JH, Nalavadi V, Shin J, et al. Bidirectional control of mRNA translation and synaptic plasticity by the cytoplasmic polyadenylation complex. *Mol Cell*. 2012;47(2):253-66.
 30. Park JE, Yi H, Kim Y, Chang H, Kim VN. Regulation of Poly(A) Tail and Translation during the Somatic Cell Cycle. *Mol Cell*. 2016;62(3):462-71.
 31. Wahle E, Winkler GS. RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-not and Pan2-Pan3 complexes. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1829(6-7):561-70.
 32. Kim JH, Richter JD. Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic polyadenylation. *Mol Cell*. 2006;24(2):173-83.
 33. Goldstrohm AC, Wickens M. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(4):337-44.
 34. Yan YB. Deadenylation: enzymes, regulation, and functional implications. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2014;5(3):421-43.
 35. Wang H, Morita M, Yang X, Suzuki T, Yang W, Wang J, et al. Crystal structure of the human CNOT6L nuclease domain reveals strict poly(A) substrate specificity. *EMBO J*. 2010;29(15):2566-76.
 36. Collart MA, Panasenko OO. The Ccr4-Not Complex: Architecture and Structural Insights. *Subcell Biochem*. 2017;83:349-79.
 37. Zhang Q, Yan D, Guo E, Ding B, Yang W, Liu R, et al. Structural basis for inhibition of the deadenylase activity of human CNOT6L. *FEBS letters*. 2016;590(8):1270-9.
 38. Pinto PH, Kroupova A, Schleiffer A, Mechtler K, Jinek M, Weitzer S, et al. ANGEL2 is a member of the CCR4 family of deadenylases with 2',3'-cyclic phosphatase activity. *Science*. 2020;369(6503):524-30.
 39. Estrella MA, Du J, Chen L, Rath S, Prangle E, Chitrakar A, et al. The metabolites NADP(+) and NADPH are the targets of the circadian protein Nocturnin (Curled). *Nat Commun*. 2019;10(1):2367.
 40. Horvat F, Fulka H, Jankele R, Malik R, Jun M, Solcova K, et al. Role of Cnot6l in maternal mRNA turnover. *Life Sci Alliance*. 2018;1(4):e201800084.
 41. Beta RAA, Kyritsis A, Douka V, Papanastasi E, Rizouli M, Leonidas DD, et al. Biochemical and in silico identification of the active site and the catalytic mechanism of the circadian deadenylase HESPERIN. *FEBS Open Bio*. 2020.
 42. Delis C, Krokida A, Tomatsidou A, Tsikou D, Beta RA, Tsioumpekou M, et al. AtHESPERIN: a novel regulator of circadian rhythms with poly(A)-degrading activity in plants. *RNA biology*. 2016;13(1):68-82.
 43. Niedzwiecka A, Nilsson P, Worch R, Stepinski J, Darzynkiewicz E, Virtanen A. Molecular recognition of mRNA 5' cap by 3' poly(A)-specific ribonuclease (PARN) differs from interactions known for other cap-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1864(4):331-45.
 44. Halees AS, Hitti E, Al-Saif M, Mahmoud L, Vlasova-St Louis IA, Beisang DJ, et al. Global assessment of GU-rich regulatory content and function in the human transcriptome. *RNA Biol*. 2011;8(4):681-91.
 45. Gruber AR, Fallmann J, Kratochvill F, Kovarik P, Hofacker IL. AREsite: a database for the comprehensive investigation of AU-rich elements. *Nucleic acids research*. 2011;39(Database issue):D66-9.
 46. Moraes KC, Wilusz CJ, Wilusz J. CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase. *Rna*. 2006;12(6):1084-91.

47. Gherzi R, Lee KY, Briata P, Wegmuller D, Moroni C, Karin M, et al. A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol Cell*. 2004;14(5):571-83.
48. Lejeune F, Li X, Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylation, and exonucleolytic activities. *Mol Cell*. 2003;12(3):675-87.
49. Devany E, Zhang X, Park JY, Tian B, Kleiman FE. Positive and negative feedback loops in the p53 and mRNA 3' processing pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(9):3351-6.
50. Lykke-Andersen J, Wagner E. Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes Dev*. 2005;19(3):351-61.
51. Yoda M, Cifuentes D, Izumi N, Sakaguchi Y, Suzuki T, Giraldez AJ, et al. Poly(A)-specific ribonuclease mediates 3'-end trimming of Argonaute2-cleaved precursor microRNAs. *Cell Rep*. 2013;5(3):715-26.
52. Hsieh HH, Chen YA, Chang YJ, Wang HH, Yu YH, Lin SW, et al. The functional characterization of phosphorylation of tristetraprolin at C-terminal NOT1-binding domain. *J Inflamm (Lond)*. 2021;18(1):22.
53. Funakoshi Y, Doi Y, Hosoda N, Uchida N, Osawa M, Shimada I, et al. Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes Dev*. 2007;21(23):3135-48.
54. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:402.
55. Webster MW, Chen YH, Stowell JAW, Alhusaini N, Sweet T, Graveley BR, et al. mRNA Deadenylation Is Coupled to Translation Rates by the Differential Activities of Ccr4-Not Nucleases. *Mol Cell*. 2018;70(6):1089-100 e8.
56. Son A, Park JE, Kim VN. PARN and TOE1 Constitute a 3' End Maturation Module for Nuclear Non-coding RNAs. *Cell Rep*. 2018;23(3):888-98.
57. Moon DH, Segal M, Boyraz B, Guinan E, Hofmann I, Cahan P, et al. Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 3'-end maturation of the telomerase RNA component. *Nat Genet*. 2015.
58. Nguyen D, Grenier St-Sauveur V, Bergeron D, Dupuis-Sandoval F, Scott MS, Bachand F. A Polyadenylation-Dependent 3' End Maturation Pathway Is Required for the Synthesis of the Human Telomerase RNA. *Cell Rep*. 2015;13(10):2244-57.
59. Baggs JE, Green CB. Nocturnin, a deadenylase in *Xenopus laevis* retina: a mechanism for posttranscriptional control of circadian-related mRNA. *Curr Biol*. 2003;13(3):189-98.
60. Estrella MA, Du J, Korennykh A. Crystal Structure of Human Nocturnin Catalytic Domain. *Scientific reports*. 2018;8(1):16294.
61. E TA, Chasseur J, Bohn JA, Del Rizzo PA, Freddolino PL, Goldstrohm AC, et al. The structure of human Nocturnin reveals a conserved ribonuclease domain that represses target transcript translation and abundance in cells. *Nucleic acids research*. 2018;46(12):6257-70.
62. Laothamatas I, Gao P, Wickramaratne A, Quintanilla CG, Dino A, Khan CA, et al. Spatiotemporal regulation of NADP(H) phosphatase Nocturnin and its role in oxidative stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(2):993-9.
63. Wang J, Symul L, Yeung J, Gobet C, Sobel J, Luck S, et al. Circadian clock-dependent and -independent posttranscriptional regulation underlies temporal mRNA accumulation in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(8):E1916-E25.
64. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. 2009;19(1):92-105.
65. Kojima S, Gatfield D, Esau CC, Green CB. MicroRNA-122 modulates the rhythmic expression profile of the circadian deadenylase Nocturnin in mouse liver. *PLoS One*. 2010;5(6):e11264.
66. Zhou L, Miller C, Miraglia LJ, Romero A, Mure LS, Panda S, et al. A genome-wide microRNA screen identifies the microRNA-183/96/182 cluster as a modulator of circadian rhythms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(1).

67. Zhai X, Cheng F, Ji L, Zhu X, Cao Q, Zhang Y, et al. Leptin reduces microRNA-122 level in hepatic stellate cells in vitro and in vivo. *Molecular immunology*. 2017;92:68-75.
68. Schueller F, Roy S, Vucur M, Trautwein C, Luedde T, Roderburg C. The Role of miRNAs in the Pathophysiology of Liver Diseases and Toxicity. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1).
69. Katoh T, Hojo H, Suzuki T. Destabilization of microRNAs in human cells by 3' deadenylation mediated by PARN and CUGBP1. *Nucleic acids research*. 2015;43(15):7521-34.
70. Balatsos NA, Maragozidis P, Anastasakis D, Stathopoulos C. Modulation of poly(A)-specific ribonuclease (PARN): current knowledge and perspectives. *Curr Med Chem*. 2012;19(28):4838-49.
71. Dehlin E, Wormington M, Körner CG, Wahle E. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *Embo J*. 2000;19(5):1079-86.
72. Gao M, Fritz DT, Ford LP, Wilusz J. Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro. *Mol Cell*. 2000;5(3):479-88.
73. Martinez J, Ren YG, Nilsson P, Ehrenberg M, Virtanen A. The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation. *J Biol Chem*. 2001;276(30):27923-9.
74. Balatsos NA, Anastasakis D, Stathopoulos C. Inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by purine nucleotides: kinetic analysis. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2009;24(2):516-23.
75. Zhang X, Devany E, Murphy MR, Glazman G, Persaud M, Kleiman FE. PARN deadenylase is involved in miRNA-dependent degradation of TP53 mRNA in mammalian cells. *Nucleic acids research*. 2015.
76. Kim WC, Lee CH. The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1796(2):99-113.
77. Berndt H, Harnisch C, Rammelt C, Stohr N, Zirkel A, Dohm JC, et al. Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *Rna*. 2012.
78. Lee D, Park D, Park JH, Kim JH, Shin C. Poly(A)-specific ribonuclease sculpts the 3' ends of microRNAs. *Rna*. 2019;25(3):388-405.
79. Ishikawa H, Yoshikawa H, Izumikawa K, Miura Y, Taoka M, Nobe Y, et al. Poly(A)-specific ribonuclease regulates the processing of small-subunit rRNAs in human cells. *Nucleic acids research*. 2017;45(6):3437-47.
80. Montellese C, Montel-Lehry N, Henras AK, Kutay U, Gleizes PE, O'Donohue MF. Poly(A)-specific ribonuclease is a nuclear ribosome biogenesis factor involved in human 18S rRNA maturation. *Nucleic acids research*. 2017;45(11):6822-36.
81. Maragozidis P, Papanastasi E, Scutelnic D, Totomi A, Kokkori I, Zargiannis SG, et al. Poly(A)-specific ribonuclease and Nocturnin in squamous cell lung cancer: prognostic value and impact on gene expression. *Molecular cancer*. 2015;14:187.
82. Moon DH, Segal M, Boyraz B, Guinan E, Hofmann I, Cahan P, et al. Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 3'-end maturation of the telomerase RNA component. *Nature genetics*. 2015;47(12):1482-8.
83. Zhang LN, Yan YB. Depletion of poly(A)-specific ribonuclease (PARN) inhibits proliferation of human gastric cancer cells by blocking cell cycle progression. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853(2):522-34.
84. Maragozidis P, Karangeli M, Labrou M, Dimoulou G, Papaspyrou K, Salataj E, et al. Alterations of deadenylase expression in acute leukemias: evidence for poly(a)-specific ribonuclease as a potential biomarker. *Acta haematologica*. 2012;128(1):39-46.
85. Cervela-Cardona L, Alary B, Mas P. The Arabidopsis Circadian Clock and Metabolic Energy: A Question of Time. *Front Plant Sci*. 2021;12:804468.
86. Beta RAA, Balatsos NAA. Tales around the clock: Poly(A) tails in circadian gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2018:e1484.
87. Eckmann CR, Rammelt C, Wahle E. Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2011;2(3):348-61.

88. Μπέτα Ρ. Δομικές και λειτουργικές μελέτες της AtHESPERIN. Λάρισα: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας; 2016.
89. Lafourcade C, Sobo K, Kieffer-Jaquinod S, Garin J, van der Goot FG. Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS One*. 2008;3(7):e2758.
90. Maryati M, Kaur I, Jadhav GP, Olotu-Umoren L, Oveh B, Hashmi L, et al. A fluorescence-based assay suitable for quantitative analysis of deadenylase enzyme activity. *Nucleic acids research*. 2014;42(5):e30.
91. Martinez J, Ren YG, Thuresson AC, Hellman U, Astrom J, Virtanen A. A 54-kDa fragment of the Poly(A)-specific ribonuclease is an oligomeric, processive, and cap-interacting Poly(A)-specific 3' exonuclease. *J Biol Chem*. 2000;275(31):24222-30.
92. Ren YG, Martinez J, Kirsebom LA, Virtanen A. Inhibition of Klenow DNA polymerase and poly(A)-specific ribonuclease by aminoglycosides. *Rna*. 2002;8(11):1393-400.
93. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng*. 1995;8(2):127-34.
94. Dibner C, Sage D, Unser M, Bauer C, d'Eysmond T, Naef F, et al. Circadian gene expression is resilient to large fluctuations in overall transcription rates. *EMBO J*. 2009;28(2):123-34.
95. Mehta N, Cheng HY. Micro-managing the circadian clock: The role of microRNAs in biological timekeeping. *Journal of molecular biology*. 2013;425(19):3609-24.
96. Du NH, Arpat AB, De Matos M, Gatfield D. MicroRNAs shape circadian hepatic gene expression on a transcriptome-wide scale. *eLife*. 2014;3:e02510.
97. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*. 1998;93(6):929-37.
98. Firsov D, Bonny O. Circadian rhythms and the kidney. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(10):626-35.
99. Nikolaeva S, Ansermet C, Centeno G, Pradervand S, Bize V, Mordasini D, et al. Nephron-Specific Deletion of Circadian Clock Gene *Bmal1* Alters the Plasma and Renal Metabolome and Impairs Drug Disposition. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(10):2997-3004.
100. Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, et al. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*. 2000;289(5488):2344-7.
101. So AY, Bernal TU, Pillsbury ML, Yamamoto KR, Feldman BJ. Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(41):17582-7.
102. Xie Y, Tang Q, Chen G, Xie M, Yu S, Zhao J, et al. New Insights Into the Circadian Rhythm and Its Related Diseases. *Front Physiol*. 2019;10:682.
103. Lemos DR, Goodspeed L, Tonelli L, Antoch MP, Ojeda SR, Urbanski HF. Evidence for circadian regulation of activating transcription factor 5 but not tyrosine hydroxylase by the chromaffin cell clock. *Endocrinology*. 2007;148(12):5811-21.
104. Kiessling S, Beaulieu-Laroche L, Blum ID, Landgraf D, Welsh DK, Storch KF, et al. Enhancing circadian clock function in cancer cells inhibits tumor growth. *BMC Biol*. 2017;15(1):13.
105. Asher G, Gatfield D, Stratmann M, Reinke H, Dibner C, Kreppel F, et al. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell*. 2008;134(2):317-28.
106. Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J*. 2002;16(8):869-71.
107. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 1977;36(1):59-74.
108. Lin YC, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun*. 2014;5:4767.
109. DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. Analysis of mutation in

- human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol*. 1987;7(1):379-87.
110. Gao Q, Zhou L, Yang SY, Cao JM. A novel role of microRNA 17-5p in the modulation of circadian rhythm. *Scientific reports*. 2016;6:30070.
111. Woo KC, Ha DC, Lee KH, Kim DY, Kim TD, Kim KT. Circadian amplitude of cryptochrome 1 is modulated by mRNA stability regulation via cytoplasmic hnRNP D oscillation. *Mol Cell Biol*. 2010;30(1):197-205.
112. Nagoshi E, Brown SA, Dibner C, Kornmann B, Schibler U. Circadian gene expression in cultured cells. *Methods Enzymol*. 2005;393:543-57.
113. Beta RAA, Arsenopoulou ZV, Kanoura A, Dalkidis D, Avraamidou R, Balatsos NAA. Core clock regulators in dexamethasone-treated HEK 293T cells at 4 h intervals. *BMC Res Notes*. 2022;15(1):23.
114. Balatsos NA, Nilsson P, Mazza C, Cusack S, Virtanen A. Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC). *J Biol Chem*. 2006;281(7):4517-22.
115. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(9):4350-4.
116. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*. 2012;9(7):671-5.
117. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
118. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN, Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*. 2006;7:85.
119. Κάνουρα Α. Αναζήτηση microRNA και απαδενυλασών με περιοδική έκφραση σε κύτταρα θηλαστικών. Λάρισα: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας; 2019.
120. Sakamoto W, Takenoshita S. Overexpression of Both Clock and Bmal1 Inhibits Entry to S Phase in Human Colon Cancer Cells. *Fukushima J Med Sci*. 2015;61(2):111-24.
121. Doruk YU, Yarparvar D, Akyel YK, Gul S, Taskin AC, Yilmaz F, et al. A CLOCK-binding small molecule disrupts the interaction between CLOCK and BMAL1 and enhances circadian rhythm amplitude. *J Biol Chem*. 2020;295(11):3518-31.
122. Bee L, Marini S, Pontarin G, Ferraro P, Costa R, Albrecht U, et al. Nucleotide excision repair efficiency in quiescent human fibroblasts is modulated by circadian clock. *Nucleic acids research*. 2015;43(4):2126-37.
123. Patel SA, Velingkaar N, Makwana K, Chaudhari A, Kondratov R. Calorie restriction regulates circadian clock gene expression through BMAL1 dependent and independent mechanisms. *Scientific reports*. 2016;6:25970.
124. Luck S, Westermarck PO. Circadian mRNA expression: insights from modeling and transcriptomics. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(3):497-521.
125. Beta RAA, Balatsos NAA. Tales around the clock: Poly(A) tails in circadian gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2018(in press):e1484.
126. Luck S, Thurley K, Thaben PF, Westermarck PO. Rhythmic degradation explains and unifies circadian transcriptome and proteome data. *Cell Rep*. 2014;9(2):741-51.
127. Weger BD, Gobet C, David FPA, Atger F, Martin E, Phillips NE, et al. Systematic analysis of differential rhythmic liver gene expression mediated by the circadian clock and feeding rhythms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(3).
128. Siepka SM, Takahashi JS. Methods to record circadian rhythm wheel running activity in mice. *Methods Enzymol*. 2005;393:230-9.
129. Schwartz WJ, Zimmerman P. Circadian timekeeping in BALB/c and C57BL/6 inbred mouse strains. *J Neurosci*. 1990;10(11):3685-94.
130. Shende VR, Kim SM, Neuendorff N, Earnest DJ. MicroRNAs function as cis- and trans-acting modulators of peripheral circadian clocks. *FEBS letters*. 2014;588(17):3015-22.
131. Liu Y, Hu W, Murakawa Y, Yin J, Wang G, Landthaler M, et al. Cold-induced RNA-binding proteins regulate circadian gene expression by controlling alternative polyadenylation. *Scientific reports*. 2013;3:2054.

132. Le Martelot G, Canella D, Symul L, Migliavacca E, Gilardi F, Liechti R, et al. Genome-wide RNA polymerase II profiles and RNA accumulation reveal kinetics of transcription and associated epigenetic changes during diurnal cycles. *PLoS biology*. 2012;10(11):e1001442.
133. Palfi A, Hokamp K, Hauck SM, Vencken S, Millington-Ward S, Chadderton N, et al. microRNA regulatory circuits in a mouse model of inherited retinal degeneration. *Scientific reports*. 2016;6:31431.
134. Peirson SN, Brown LA, Potheary CA, Benson LA, Fisk AS. Light and the laboratory mouse. *J Neurosci Methods*. 2018;300:26-36.
135. Vogt M, Taylor V. Cross-linked RNA Immunoprecipitation. *Bio-protocol*. 2013;3(5):e398.
136. Theil K, Imami K, Rajewsky N. Identification of proteins and miRNAs that specifically bind an mRNA in vivo. *Nat Commun*. 2019;10(1):4205.
137. Vencken S, Hassan T, McElvaney NG, Smith SG, Greene CM. miR-CATCH: microRNA capture affinity technology. *Methods Mol Biol*. 2015;1218:365-73.
138. Hughes CS, Moggridge S, Muller T, Sorensen PH, Morin GB, Krijgsveld J. Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nat Protoc*. 2019;14(1):68-85.
139. Abruzzi KC, Rodriguez J, Menet JS, Desrochers J, Zadina A, Luo W, et al. *Drosophila* CLOCK target gene characterization: implications for circadian tissue-specific gene expression. *Genes & development*. 2011;25(22):2374-86.
140. Lahens NF, Kavakli IH, Zhang R, Hayer K, Black MB, Dueck H, et al. IVT-seq reveals extreme bias in RNA sequencing. *Genome Biol*. 2014;15(6):R86.
141. Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human molecular genetics*. 2006;15 Spec No 2:R271-7.
142. Ki Y, Ri H, Lee H, Yoo E, Choe J, Lim C. Warming Up Your Tick-Tock: Temperature-Dependent Regulation of Circadian Clocks. *Neuroscientist*. 2015;21(5):503-18.
143. Korner CG, Wormington M, Muckenthaler M, Schneider S, Dehlin E, Wahle E. The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J*. 1998;17(18):5427-37.
144. Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol*. 2007;8(1):R3.
145. Tabas-Madrid D, Nogales-Cadenas R, Pascual-Montano A. GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic acids research*. 2012;40(Web Server issue):W478-83.
146. Duan TL, He GJ, Hu LD, Yan YB. The Intrinsically Disordered C-Terminal Domain Triggers Nucleolar Localization and Function Switch of PARN in Response to DNA Damage. *Cells*. 2019;8(8).
147. Duan TL, Jiao H, He GJ, Yan YB. Translation Efficiency and Degradation of ER-Associated mRNAs Modulated by ER-Anchored poly(A)-Specific Ribonuclease (PARN). *Cells*. 2020;9(1).
148. Wydro M, Bobrowicz A, Temperley RJ, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM. Targeting of the cytosolic poly(A) binding protein PABPC1 to mitochondria causes mitochondrial translation inhibition. *Nucleic acids research*. 2010;38(11):3732-42.
149. Seal R, Temperley R, Wilusz J, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM. Serum-deprivation stimulates cap-binding by PARN at the expense of eIF4E, consistent with the observed decrease in mRNA stability. *Nucleic acids research*. 2005;33(1):376-87.
150. Berndt H, Harnisch C, Rammelt C, Stohr N, Zirkel A, Dohm JC, et al. Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA*. 2012;18(5):958-72.
151. Chini CC, Escande C, Nin V, Chini EN. DBC1 (Deleted in Breast Cancer 1) modulates the stability and function of the nuclear receptor Rev-erb α . *Biochem J*. 2013;451(3):453-61.
152. Cevher MA, Zhang X, Fernandez S, Kim S, Baquero J, Nilsson P, et al. Nuclear deadenylation/polyadenylation factors regulate 3' processing in response to DNA damage. *EMBO*

- J. 2010;29(10):1674-87.
153. Johnson GS, Rajendran P, Dashwood RH. CCAR1 and CCAR2 as gene chameleons with antagonistic duality: Preclinical, human translational, and mechanistic basis. *Cancer Sci.* 2020;111(10):3416-25.
154. Fong JY, Pignata L, Goy PA, Kawabata KC, Lee SC, Koh CM, et al. Therapeutic Targeting of RNA Splicing Catalysis through Inhibition of Protein Arginine Methylation. *Cancer Cell.* 2019;36(2):194-209 e9.
155. Zhou F, Wu Z, Zhao M, Murtazina R, Cai J, Zhang A, et al. Rab5-dependent autophagosome closure by ESCRT. *J Cell Biol.* 2019;218(6):1908-27.
156. Takahashi Y, He H, Tang Z, Hattori T, Liu Y, Young MM, et al. An autophagy assay reveals the ESCRT-III component CHMP2A as a regulator of phagophore closure. *Nat Commun.* 2018;9(1):2855.
157. Deneka M, Neeft M, Popa I, van Oort M, Sprong H, Oorschot V, et al. Rabaptin-5alpha/rabaptin-4 serves as a linker between rab4 and gamma(1)-adaptin in membrane recycling from endosomes. *EMBO J.* 2003;22(11):2645-57.
158. Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L, Schekman R. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:87-123.
159. Rossi D, Galvao FC, Bellato HM, Boldrin PE, Andrews BJ, Valentini SR, et al. eIF5A has a function in the cotranslational translocation of proteins into the ER. *Amino Acids.* 2014;46(3):645-53.
160. Johnson KR, Gagnon LH, Chang B. A hypomorphic mutation of the gamma-1 adaptin gene (Ap1g1) causes inner ear, retina, thyroid, and testes abnormalities in mice. *Mamm Genome.* 2016;27(5-6):200-12.
161. Singleton DR, Wu TT, Castle JD. Three mammalian SCAMPs (secretory carrier membrane proteins) are highly related products of distinct genes having similar subcellular distributions. *J Cell Sci.* 1997;110 (Pt 17):2099-107.
162. Li Y, Chin LS, Levey AI, Li L. Huntingtin-associated protein 1 interacts with hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate and functions in endosomal trafficking. *J Biol Chem.* 2002;277(31):28212-21.
163. Dejgaard SY, Murshid A, Erman A, Kizilay O, Verbich D, Lodge R, et al. Rab18 and Rab43 have key roles in ER-Golgi trafficking. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 16):2768-81.
164. Li Q, Sun Y, van ISCD. A Link between Intrahepatic Cholestasis and Genetic Variations in Intracellular Trafficking Regulators. *Biology (Basel).* 2021;10(2).
165. Bhattacharyya D, Glick BS. Two mammalian Sec16 homologues have nonredundant functions in endoplasmic reticulum (ER) export and transitional ER organization. *Mol Biol Cell.* 2007;18(3):839-49.
166. Kieffer SR, Lowndes NF. Immediate-Early, Early, and Late Responses to DNA Double Stranded Breaks. *Front Genet.* 2022;13:793884.
167. Zhang X, Xiao S, Rameau RD, Devany E, Nadeem Z, Caglar E, et al. Nucleolin phosphorylation regulates PARN deadenylase activity during cellular stress response. *RNA biology.* 2018;15(2):251-60.
168. Shukla S, Bjerke GA, Muhlrad D, Yi R, Parker R. The RNase PARN Controls the Levels of Specific miRNAs that Contribute to p53 Regulation. *Mol Cell.* 2019;73(6):1204-16 e4.
169. Kang TH, Sancar A. Circadian regulation of DNA excision repair: implications for chronotherapy. *Cell Cycle.* 2009;8(11):1665-7.
170. Rabinovich-Nikitin I, Love M, Kirshenbaum LA. Intersection of autophagy regulation and circadian rhythms in the heart. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2022;1868(4):166354.
171. Wang X, Xu Z, Cai Y, Zeng S, Peng B, Ren X, et al. Rheostatic Balance of Circadian Rhythm and Autophagy in Metabolism and Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:616434.
172. Rijo-Ferreira F, Takahashi JS. Genomics of circadian rhythms in health and disease. *Genome Med.* 2019;11(1):82.
173. Liu H, Rodgers ND, Jiao X, Kiledjian M. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J.* 2002;21(17):4699-708.

174. van Dijk E, Le Hir H, Seraphin B. DcpS can act in the 5'-3' mRNA decay pathway in addition to the 3'-5' pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12081-6.
175. Han GW, Schwarzenbacher R, McMullan D, Abdubek P, Ambing E, Axelrod H, et al. Crystal structure of an Apo mRNA decapping enzyme (DcpS) from Mouse at 1.83 Å resolution. *Proteins*. 2005;60(4):797-802.
176. Nishihara T, Zekri L, Braun JE, Izaurralde E. miRISC recruits decapping factors to miRNA targets to enhance their degradation. *Nucleic acids research*. 2013;41(18):8692-705.
177. Hernandez G, Ramirez MJ, Minguillon J, Quiles P, Ruiz de Garibay G, Aza-Carmona M, et al. Decapping protein EDC4 regulates DNA repair and phenocopies BRCA1. *Nat Commun*. 2018;9(1):967.
178. Brothers WR, Hebert S, Kleinman CL, Fabian MR. A non-canonical role for the EDC4 decapping factor in regulating MARF1-mediated mRNA decay. *eLife*. 2020;9.
179. Malys N, McCarthy JE. Dcs2, a novel stress-induced modulator of m7GpppX pyrophosphatase activity that locates to P bodies. *Journal of molecular biology*. 2006;363(2):370-82.
180. Yamauchi T, Masuda T, Canver MC, Seiler M, Semba Y, Shboul M, et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 Screen Identifies Leukemia-Specific Dependence on a Pre-mRNA Metabolic Pathway Regulated by DCPS. *Cancer Cell*. 2018;33(3):386-400 e5.
181. Lin WJ, Duffy A, Chen CY. Localization of AU-rich element-containing mRNA in cytoplasmic granules containing exosome subunits. *J Biol Chem*. 2007;282(27):19958-68.
182. Barbagallo F, Rotilio V, Assenza MR, Aguanno S, Orsini T, Putti S, et al. PDE2A Is Indispensable for Mouse Liver Development and Hematopoiesis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(8).
183. Berchtold D, Battich N, Pelkmans L. A Systems-Level Study Reveals Regulators of Membrane-less Organelles in Human Cells. *Mol Cell*. 2018;72(6):1035-49 e5.
184. Jennek S, Mittag S, Reiche J, Westphal JK, Seelk S, Dorfel MJ, et al. Tricellulin is a target of the ubiquitin ligase Itch. *Ann N Y Acad Sci*. 2017;1397(1):157-68.
185. Furuse M, Izumi Y, Oda Y, Higashi T, Iwamoto N. Molecular organization of tricellular tight junctions. *Tissue Barriers*. 2014;2:e28960.
186. Kyoko OO, Kono H, Ishimaru K, Miyake K, Kubota T, Ogawa H, et al. Expressions of tight junction proteins Occludin and Claudin-1 are under the circadian control in the mouse large intestine: implications in intestinal permeability and susceptibility to colitis. *PLoS One*. 2014;9(5):e98016.
187. Liu Y, Zhang Y, Li T, Han J, Wang Y. The tight junction protein TJP1 regulates the feeding-modulated hepatic circadian clock. *Nat Commun*. 2020;11(1):589.
188. Ivanov P, Kedersha N, Anderson P. Stress Granules and Processing Bodies in Translational Control. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2019;11(5).
189. Chen CY, Shyu AB. Deadenylation and P-bodies. *Adv Exp Med Biol*. 2013;768:183-95.
190. Malcolm M, Saad L, Penazzi LG, Garbarino-Pico E. Processing Bodies Oscillate in Neuro 2A Cells. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:487.
191. Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, et al. STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic acids research*. 2009;37(Database issue):D412-6.