



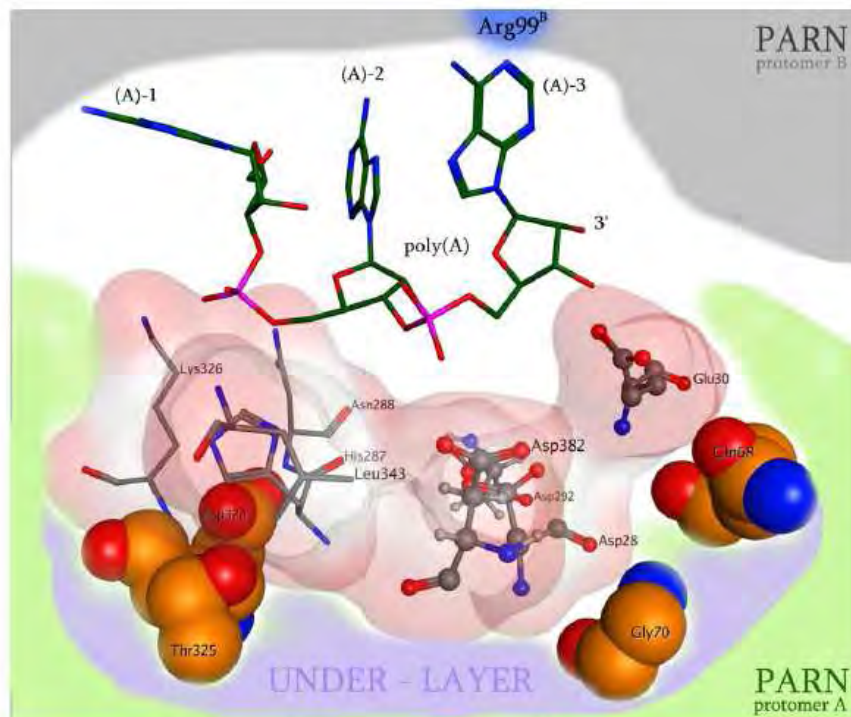
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

## Βιοχημικός Χαρακτηρισμός Του Μεταλλάγματος Arg99Ala Της Πολυ(A)-Εξειδικευμένης Ριβονουκλεάσης

### Biochemical Characterization of Mutant Poly(A)- Specific Ribonuclease Arg99Ala



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΣΧΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

*Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*

Επιβλέπων καθηγητής:

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

Τριμελής Επιτροπή:

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

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

**Σοφία Κοσσίδα**, PhD Ερευνήτρια Γ', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Επιστημών, Ακαδημία  
Αθηνών

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων οι υποδείξεις, η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για την διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Τους καθηγητές μου για την αμέριστη συμπαράσταση και εμπιστοσύνη τους κατά τη διάρκεια της πτυχιακής εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους Υποψήφιους Διδάκτορες Αθανάσιο Κυρίτση, Πάναγιώτη Μαραγκοζίδη, Γοργογιέτα Βύρων και τις Υποψήφιες Διδάκτορες Καντσάδη Αναστασία, Χατζηλεοντιάδου Δήμητρα του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τις συμβουλές και υποδείξεις τους και για την οποιαδήποτε βοήθεια τους είτε πρακτική είτε ηθική, καθώς και τους συμφοιτητές μου με τους οποίους η συνεργασία ήταν παραπάνω από ευχάριστη και επικοινωνιακή.

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η πολυ(A) ουρά των ώριμων ευκαρυωτικών mRNAs διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη μεταφορά, τη μετάφραση, την αποικοδόμησή τους και τη σταθερότητά τους, παρέχοντας ένα σημαντικό μέσο ελέγχου των επιπέδων τους στο κυτταρόπλασμα. Η αποικοδόμηση των mRNAs ξεκινά συνήθως με τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς, και καταλύεται από ειδικά ένζυμα γνωστά ως αποαδενυλάσες. Μια από τις καλύτερα μελετημένες αποαδενυλάσες είναι η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN. Το ένζυμο είναι ομοδιμερές και πρόσφατα έχει προταθεί πως ένα αμινοξύ, η αργινίνη 99 (Arg99 ή R99), έχει σημαντικό ρόλο στη λειτουργικότητά του, συμβάλλοντας στον ομοδιμερισμό του και στον προσανατολισμό του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η επίδραση *in vitro* της R99 στην ενεργότητα του ενζύμου. Η R99 αντικαταστάθηκε από μια αλανίνη, ένα μη πολικό και δομικά απλούστερο αμινοξύ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δραστηριότητα του μεταλλαγμένου ενζύμου είναι μειωμένη σε σχέση με αυτή του αγρίου τύπου, μετά από μέτρηση της ενεργότητας των δύο ενζύμων με φασματοφωτομετρική μέθοδο με κυανό του μεθυλενίου. Τα αποτελέσματα επίσης δείχνουν μία μικρή επίδραση στις τιμές της  $K_M$  και  $V_{max}$ . Επίσης, εξετάστηκε η επίδραση της συγκεκριμένης μετάλλαξης στη δομή του ενζύμου. Η εργασία ανοίγει το δρόμο για περαιτέρω μελέτες για την αποκάλυψη του πλήρους καταλυτικού μηχανισμού της PARN.

## **ABSTRACT**

The poly(A) tail plays a crucial role in mature eukaryotic mRNA transport, translation, degradation and stability, providing a widespread means of controlling mRNA levels in the cytoplasm. mRNA degradation usually begins with the shortening of poly(A) tail and is catalyzed by specific enzymes known as deadenylases. One of the well-studied deadenylases is poly(A)-specific ribonuclease, PARN. The enzyme is a homodimer, and recently has been suggested that an amino acid, arginine 99 (Arg99 or R99), has an important role in its function, helping homodimerization and orientation of the substrate in the active site. In the present study, the *in vitro* effect of R99 on the enzyme activity was examined. The R99 was replaced by an alanine, a non-polar amino acid and structurally simpler. The results indicated that the activity of the mutant enzyme was reduced compared to that of wild type enzyme, after measuring the activity of both enzymes by the methylene blue spectrophotometric method. The results, also suggest to have a slight effect in the  $K_M$  and  $V_{max}$  values.

Furthermore, we studied the effect of this particular mutation in the structure of the enzyme. Future studies could be based on the findings of this work concerning the role of this particular amino acid residue, in order to elucidate the complete catalytic mechanism of PARN.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	7 σελ.
1.1 Σύνθεση του RNA και μετάφραση του	7 σελ.
1.2 Το ευκαρυωτικό mRNA τροποποιείται κατά τη διάρκεια ή μετά το πέρας της μεταγραφής του	8 σελ.
1.3 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA	8 σελ.
1.3.1 Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει καλύπτρα	8 σελ.
1.3.2 Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται	11 σελ.
1.4 Αποικοδόμηση του mRNA	12 σελ.
1.4.1 Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA	13 σελ.
1.5 Μηχανισμοί ελέγχου της ποιότητας του mRNA	15 σελ.
1.6 Αποαδενυλίωση	17 σελ.
1.7 Σύμπλοκα αποαδενυλασών	19 σελ.
1.8 Ρύθμιση της αποαδενυλίωσης	19 σελ.
1.9 Ένζυμα και έλεγχος αποαδενυλίωσης	21 σελ.
1.10 Η πολυ(A) - εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A) - specific ribonuclease, PARN]	23 σελ.
1.11 Φυλογενετική ανάλυση της PARN και ο σημαντικός ρόλος της Arg99	25 σελ.
2. Σκοπός της εργασίας	28 σελ.
3. Υλικά και μέθοδοι	29 σελ.
3.1 Υλικά	29 σελ.
3.2 Διαλύματα	31 σελ.
3.3 Μέθοδοι	34 σελ.

4. Αποτελέσματα	44 σελ.
5. Συζήτηση	52 σελ.
6. Βιβλιογραφία	56 σελ.

## 1. Εισαγωγή

Το DNA αποθηκεύει τις γενετικές πληροφορίες σε μια σταθερή μορφή, η οποία μπορεί εύκολα να αντιγραφεί. Ωστόσο, η έκφραση αυτών των γενετικών πληροφοριών προϋποθέτει τη ροή της από το DNA στο RNA στις πρωτεΐνες. Το RNA είναι ένα μόριο κεντρικής σημασίας για τη γονιδιακή έκφραση. Η εμπλοκή του RNA σε πολλές λειτουργίες που αφορούν τη γονιδιακή έκφραση υποστηρίζει τη γενική άποψη ότι ολόκληρη η διαδικασία μπορεί να έχει εξελιχθεί σε έναν «κόσμο RNA», στον οποίο αρχικά το RNA ήταν το ενεργό συστατικό του μηχανισμού διατήρησης και έκφρασης της γενετικής πληροφορίας. Αργότερα οι πρωτεΐνες υποβοήθησαν ή ανέλαβαν αποκλειστικά πολλές από αυτές τις λειτουργίες, γεγονός που έχει ως συνέπεια την αύξηση της προσαρμοστικότητας και πιθανόν της αποτελεσματικότητας. Οι τρεις κύριες τάξεις RNA που εμπλέκονται άμεσα στην παραγωγή πρωτεϊνών είναι: το αγγελιοφόρο RNA (mRNA), το μεταφορικό RNA (tRNA) και το ριβοσωμικό RNA (rRNA). Η γονιδιακή έκφραση πραγματοποιείται σε δύο στάδια: στη μεταγραφή όπου παράγει ένα μονόκλωνο μόριο RNA όμοιο στην αλληλουχία με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA και στη μετάφραση όπου μετατρέπει τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του mRNA στην αλληλουχία των αμινοξέων που αποτελούν μια πρωτεΐνη.

### 1.1 Σύνθεση του RNA και μετάφραση του

Η σύνθεση του RNA, ή μεταγραφή, είναι η διεργασία της μεταγραφής των πληροφοριών της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA σε πληροφορίες αλληλουχίας RNA. Η σύνθεση του RNA καταλύεται από ένα μεγάλο ένζυμο που ονομάζεται RNA πολυμεράση. Η σύνθεση του RNA, όπως σχεδόν όλες οι βιολογικές αντιδράσεις πολυμερισμού, πραγματοποιείται σε τρία στάδια: την έναρξη την επιμήκυνση και τον τερματισμό. Η χημεία της σύνθεσης του RNA είναι ίδια για όλες τις μορφές RNA, η συνθετική διεργασία διαφέρει κυρίως στη ρύθμιση, στη μετα-μεταγραφική επεξεργασία και στην ειδική πολυμεράση η οποία συμμετέχει. Ένα μόριο mRNA δε μεταφράζεται σε ολόκληρο το μήκος του, αλλά κάθε mRNA περιέχει τουλάχιστον μία κωδική περιοχή, η οποία σχετίζεται σε μια πρωτεϊνική αλληλουχία μέσω του γενετικού κώδικα: κάθε νουκλεοτιδική τριπλέτα (κωδικόνιο) της κωδικής περιοχής αντιστοιχεί σε ένα αμινοξύ. Η αλυσίδα του DNA που φέρει την ίδια αλληλουχία με το mRNA (με εξαίρεση ότι περιέχει T αντί για U) και ονομάζεται κωδική αλυσίδα ή αντισημαίνουσα αλυσίδα.



## **1.2 Το ευκαρυωτικό mRNA τροποποιείται κατά τη διάρκεια ή μετά το πέρας της μεταγραφής του**

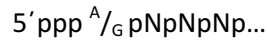
Η παραγωγή του ευκαρυωτικού mRNA περιλαμβάνει επιπρόσθετα στάδια μετά τη μεταγραφή. Η μεταγραφή γίνεται με το συνήθη τρόπο, ξεκινώντας με τη δημιουργία ενός μεταγράφου με 5' τριφωσφορικό άκρο. Ωστόσο, το 3' άκρο δημιουργείται αποκόπτοντας ένα τμήμα του μεταγράφου και όχι τερματίζοντας τη μεταγραφή σε μια καθορισμένη θέση. Όσα RNA προέρχονται από γονίδια που περιέχουν ιντρόνια πρέπει να υποστούν μάτισμα, ώστε να αφαιρεθούν τα ιντρόνια και να παραχθεί ένα μικρότερο mRNA που περιέχει μία άθικτη κωδική αλληλουχία. Τροποποιούνται και οι δύο άκρες του μεταγράφου με την προσθήκη επιπλέον νουκλεοτιδίων. Το 5' άκρο του RNA τροποποιείται αμέσως μετά την εμφάνιση του, εξαιτίας της προσθήκης μιας καλύπτρας. Το 3' άκρο τροποποιείται εξαιτίας της προσθήκης μιας σειράς νουκλεοτιδίων αδενυλικού οξέος [πολυαδενυλικό οξύ ή πολυ(A), poly(A)] αμέσως μετά την αποκοπή του. Μόνο μετά την ολοκλήρωση όλων των τροποποιήσεων και της επεξεργασίας μπορεί το mRNA να εξαχθεί από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Κατά μέσο όρο, το mRNA καθυστερεί ~20 λεπτά για να εξέλθει από τον πυρήνα. Μόλις το mRNA εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα και μεταφράζεται. Το ευκαρυωτικό mRNA αποτελεί μόνο ένα μικρό ποσοστό το συνολικού κυτταρικού RNA (~3% της μάζας του). Ο χρόνος ημιζωής των mRNA στους ζυμομύκητες είναι σχετικά μικρός και κυμαίνεται από 1 έως 60 λεπτά. Υπάρχει μια αξιοσημείωτη αύξηση της σταθερότητας στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς: το mRNA των ζωικών κυττάρων είναι σχετικά σταθερό, με χρόνο ημιζωής μεταξύ 1 και 24 ωρών. Τα ευκαρυωτικά πολυσώματα είναι σχετικά σταθερά. Οι τροποποιήσεις και στα δυο άκρα του mRNA συνεισφέρουν σε αυτή τη σταθερότητα.

## **1.3 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA**

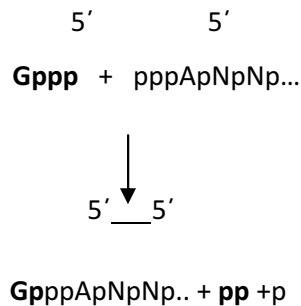
### **1.3.1 Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει καλύπτρα**

Τα ευκαρυωτικά πολυσώματα είναι σχετικά σταθερά. Οι τροποποιήσεις και στα δύο άκρα του mRNA συνεισφέρουν σε αυτή τη σταθερότητα. Η μεταγραφή αρχίζει μένα τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο (συνήθως μία πουρίνη, A ή G). Το πρώτο νουκλεοτίδιο διατηρεί την 5' τριφωσφορική ομάδα του και δημιουργεί το συνήθη

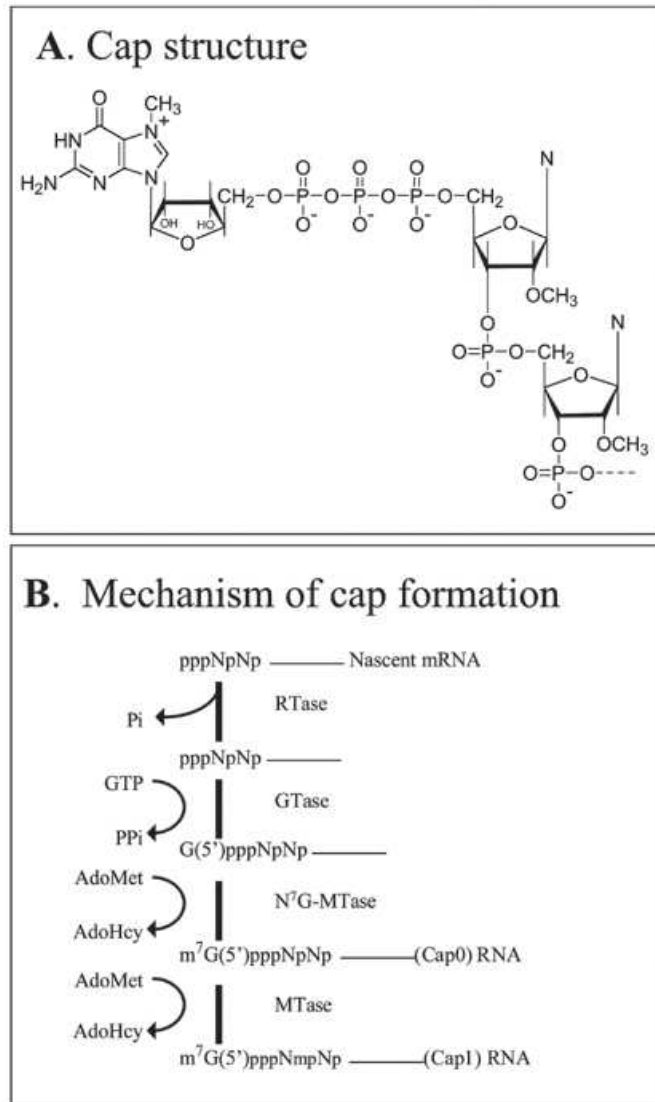
φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ της 3' θέσης του και της 5' θέσης του επόμενου νουκλεοτιδίου [2]. Η αρχική αλληλουχία του μεταγράφου μπορεί να αναπαρασταθεί ως:



Ωστόσο, αν το ώριμο mRNA επεξεργαστεί *in vitro* με ένζυμα τα οποία θα έπρεπε να το αποικοδομήσουν σε μεμονωμένα νουκλεοτίδια, το 5' άκρο δεν παράγει το αναμενόμενο τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο. Αντίθετα, περιλαμβάνει δύο νουκλεοτίδια συνδεδεμένα με 5'-5' τριφωσφορικό δεσμό, ενώ φέρει και μεθυλομάδες. Η ακραία βάση είναι πάντα μια γουανίνη, η οποία προστίθεται στο αρχικό μόριο RNA μετά τη μεταγραφή. Η προσθήκη της G στο 5' άκρο καταλύεται από ένα πυρηνικό ένζυμο, τη γουανυλυλο-τρανφεράση. Η αντίδραση αυτή συμβαίνει τόσο σύντομα μετά την έναρξη της μεταγραφής, που δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθούν παρά μόνο ίχνη του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου στο πυρηνικό RNA. Η συνολική αντίδραση μπορεί να αναπαρασταθεί ως μια συμπύκνωση μεταξύ του GTP και του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου του RNA. Συνεπώς:

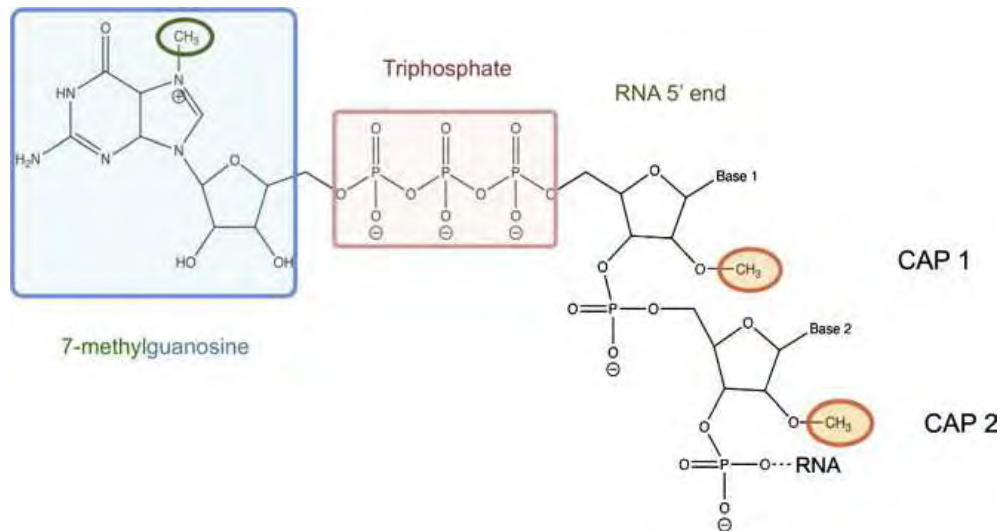


Το νέο κατάλοιπο **G**, που προστίθεται στο άκρο του RNA, έχει τον αντίστροφο προσανατολισμό από όλα τα άλλα νουκλεοτίδια. Αυτή η δομή ονομάζεται καλύπτρα (*cap*) και αποτελεί υπόστρωμα για αρκετές αντιδράσεις μεθυλίωσης (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Α) Χημική δομή της καλύπτρας και Β) Μηχανισμός δημιουργίας της καλύπτρας.

Οι τύποι των καλυπτρών διακρίνονται από το πλήθος των μεθυλιώσεων που έχουν συμβεί. Το N-7 της τελικής γουανίνης μεθυλιώνεται από την S-αδενοσυλομεθειονίνη για να σχηματιστεί η καλύπτρα στη θέση 0. Οι παρακείμενες ριβόζες μπορούν να μεθυλωθούν και να σχηματιστεί το κάλυμμα 1 ή το κάλυμμα 2 (Εικόνα 2). Τα καλύμματα συμβάλουν στη σταθερότητα των μορίων mRNA, προστατεύοντας τα 5'-άκρα τους από τη δράση φωσφατασών και νουκλεασών. Επιπλέον, τα καλύμματα ενισχύουν τη μετάφραση του mRNA από τα ευκαρυωτικά συστήματα σύνθεσης πρωτεϊνών.

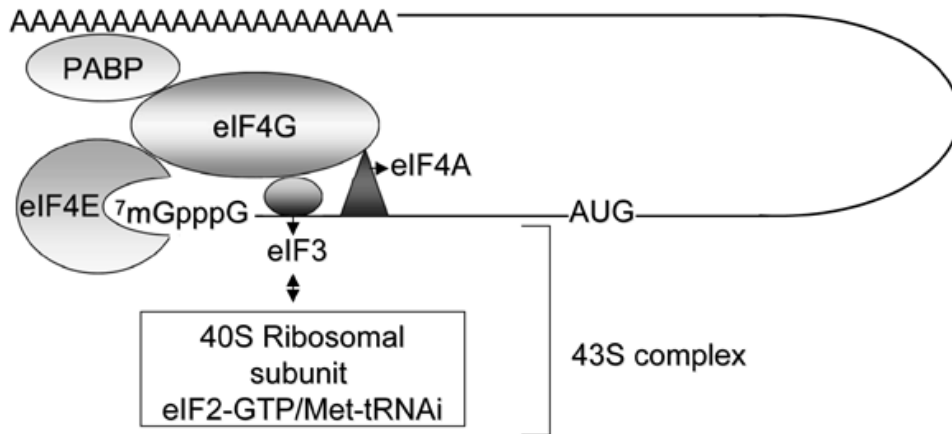


Εικόνα 2. Οι διάφοροι τύποι καλυπτρών διακρίνονται ανάλογα με το πλήθος των μεθυλιώσεων που έχουν συμβεί. Η θέση μεθυλίωσης 0 της N-7 είναι στο κυανό πλαίσιο σε κύκλο, οι θέσεις μεθυλίωσης 1 και 2 δείχνονται ως CAP1 και CAP2, αντίστοιχα.

### 1.3.2 Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται

Η 3' τερματική αλληλουχία από κατάλοιπα A συχνά περιγράφεται ως ουρά πολυ(A), ενώ το mRNA που έχει αυτό το χαρακτηριστικό δηλώνεται ως πολυ(A)<sup>+</sup> [*poly(A)<sup>+</sup>*]. Η αλληλουχία πολυ(A) δεν κωδικοποιείται στο DNA, αλλά προστίθεται στο RNA, μέσα στο πυρήνα, μετά τη μεταγραφή. Η προσθήκη της πολυ(A) καταλύεται από το ένζυμο πολυ(A) πολυμεράση [*poly(A) polymerase*], η οποία προσθέτει ~200 νουκλεοτίδια μονοφωσφορικής αδενοσίνης (A) στο ελεύθερο 3'-OH άκρο του mRNA [3]. Η αλληλουχία πολυ(A) είναι συνδεδεμένη με μία πρωτεΐνη που ονομάζεται πολυ(A)-συνδεόμενη πρωτεΐνη (*PABP, Poly(A)-Binding Protein*). Συγγενικές μορφές αυτής της πρωτεΐνης απαντώνται σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ένα μονομερές PABP των ~70kD συνδέεται σε κάθε 10-20 βάσεις της ουράς πολυ(A). Έτσι, ένα κοινό χαρακτηριστικό σε πολλούς ή στους περισσότερους ευκαρυώτες είναι ότι το 3' άκρο του mRNA αποτελείται από μία αλληλουχία πολυ(A), η οποία είναι προσδεμένη σε μία μεγάλη πρωτεϊνική μάζα. Η προσθήκη της πολυ(A) πραγματοποιείται ως μέρος μιας αντίδρασης στην οποία το 3' άκρο του mRNA δημιουργείται και τροποποιείται από ένα σύμπλοκο ενζύμων. Η πρόσδεση της PABP στον παράγοντα έναρξης eIF4G δημιουργεί ένα κλειστό βρόχο, στον οποίο τα 5' και 3' άκρα του mRNA συγκρατούνται στο ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο (Εικόνα 3). Ο σχηματισμός αυτού του συμπλόκου μπορεί να ευθύνεται για κάποιες από τις επιδράσεις της πολυ(A) στις ιδιότητες του mRNA. Η πολυ(A) συνήθως σταθεροποιεί

το mRNA. Η ικανότητα της πολυ(A) να προστατεύει το mRNA από την αποικοδόμηση απαιτεί τη σύνδεση της με την PABP.



Εικόνα 3. Η πρόσδεση της PABP στον παράγοντα έναρξης eIF4G δημιουργεί ένα κλειστό βρόχο, στον οποίο τα 5' και 3' άκρα του mRNA συγκρατούνται στο ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο [53].

Η αφαίρεση της πολυ(A) αναστέλλει την έναρξη της μετάφρασης *in vitro* και η μείωση της PABP έχει το ίδιο αποτέλεσμα στο ζυμομύκητα *in vivo*. Αυτές οι επιδράσεις μπορεί να εξαρτώνται από την πρόσδεση της PABP στο σύμπλοκο έναρξης, στο 5' άκρο του mRNA. Υπάρχουν πολλά παραδείγματα στην πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη όπου η αποαδενυλίωση ενός συγκεκριμένου μορίου mRNA συσχετίζεται με τη μετάφραση του. Σε μερικές περιπτώσεις, τα mRNA αποθηκεύονται σε μη αποαδενυλιωμένη μορφή και η πολυ(A) προστίθεται όταν είναι απαραίτητη η μετάφρασή τους. Σε άλλες περιπτώσεις, τα πολυ(A)<sup>+</sup> mRNA αποαδενυλιώνονται, με συνέπεια τη μείωση της μετάφρασής τους.

#### 1.4 Αποικοδόμηση του mRNA

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι μια σύνθετη διαδικασία που περιλαμβάνει τον έλεγχο του ρυθμού μεταγραφής, την επεξεργασία και σταθερότητα του mRNA, τον ρυθμό της μετάφρασης και την σταθερότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Στο επίπεδο του mRNA το σημαντικότερο σημείο ελέγχου αφορά την σταθερότητα του μορίου. Ανάλυση μικροσυστοιχιών έχει αποκαλύψει ότι το 40–50% των αλλαγών γονιδιακής έκφρασης σε απόκριση σε διάφορα

κυτταρικά σήματα συμβαίνει σε επίπεδο σταθερότητας του mRNA [4,5]. Αυτές οι αλλαγές προκαλούνται συνήθως από μεταβολές στην σύσταση των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων με αποτέλεσμα είτε να αναστέλλεται είτε να διευκολύνεται η αποικοδόμηση. Πολλοί κυτταρικοί παράγοντες και μηχανισμοί είναι αφιερωμένα στον συντονισμό του ρυθμού της αποικοδόμησης του mRNA. Κατά την διάρκεια των τελευταίων πέντε ετών, τα περισσότερα από τα ένζυμα που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση του mRNA έχουν ταυτοποιηθεί και ξεκινάει η διαλεύκανση της σύνθετης ρύθμισης που καθορίζει την πορεία και τον ρυθμό της αποικοδόμησης του mRNA [1].

#### **1.4.1 Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA**

##### *Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αποαδενυλίωση*

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το μεγαλύτερο ποσοστό των mRNAs αποικοδομείται μέσω του μονοπατιού αποικοδόμησης εξαρτώμενο από αποαδενυλίωση, το οποίο ξεκινά με τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς. Στον πυρήνα, με τη διαδικασία της αποαδενυλίωσης περιορίζονται οι νέο-προστιθέμενες πολυ(A) ουρές, στο κατάλληλο μήκος, ώστε το mRNA να εξαχθεί στο κυτταρόπλασμα και να ξεκινήσει η μετάφραση του, ενώ η εκτεταμένη αποαδενυλίωση του mRNA στο κυτταρόπλασμα πέρα από ένα συγκεκριμένο μήκος, σηματοδοτεί την αποικοδόμηση του. Η αποαδενυλίωση καταλύεται από τις αποαδενυλάσες, που είναι μαγνήσιο-εξαρτώμενες εξωριβονουκλεάσες, δηλαδή υδρολύουν RNA με κατεύθυνση 3'→5' και πραγματοποιείται κυρίως από το σύμπλοκο Ccr4-Not καθώς και από το σύμπλοκο PARN. Μετά την αποαδενυλίωση, δύο μηχανισμοί μπορούν να οδηγήσουν στην αποικοδόμηση του mRNA: είτε αφαίρεση της 5' καλύπτρας και αποικοδόμηση με κατεύθυνση 5'→3', είτε αποικοδόμηση 3'→5'. Στο πρώτο μονοπάτι, το σύμπλεγμα πρωτεϊνών Lsm 1-7 αλληλεπιδρά με το 3' άκρο του μεταγράφου επάγωντας την αφαίρεση της καλύπτρας μέσω του συμπλόκου Dcp1-Dcp2 και εκθέτωντας έτσι το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την Xrn1p, μια 5'→3' εξωνουκλεάση. Εναλλακτικά, το αποαδενυλιωμένο mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών. Στη περίπτωση αυτή η καλύπτρα υδρολύεται από το ένζυμο DcpS [6]. Να σημειωθεί ότι ο ρυθμός της αποαδενυλίωσης ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων mRNAs και εξαρτάται από τη σίγηση miRNA, την ύπαρξη πρόωρων κωδικονίων τερματισμού και καθοριστών σταθερότητας που βρίσκονται στην 3'

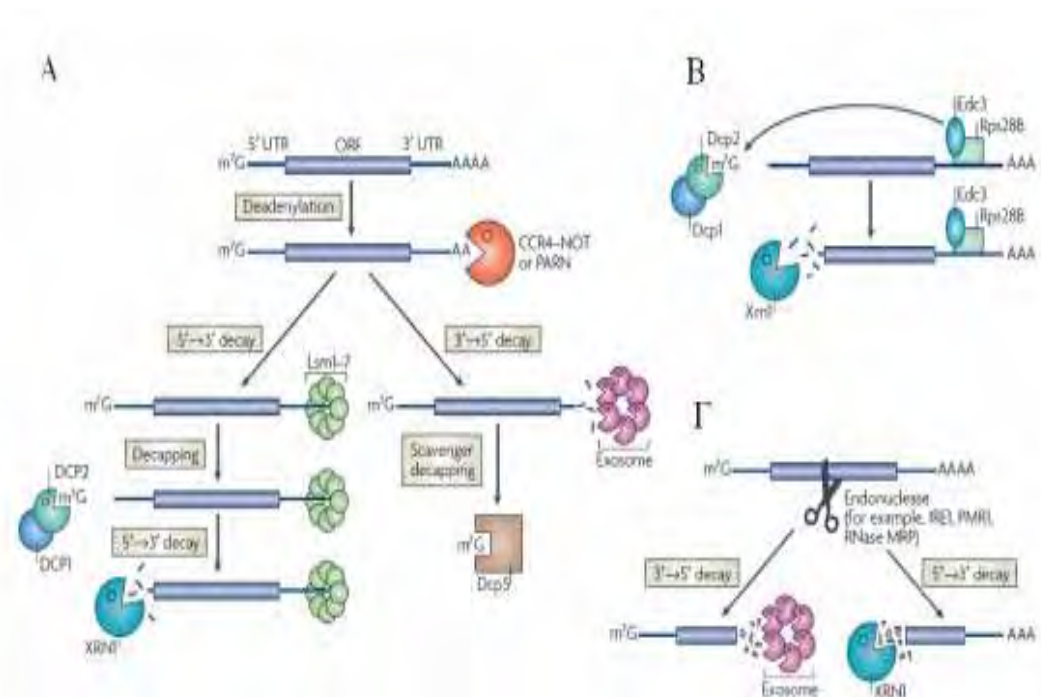
αμετάφραστη περιοχή, όπως είναι οι περιοχές πλούσιες σε AU αλληλουχίες ή ARE (Εικόνα 4).

#### *Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αφαίρεση της καλύπτρας*

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

#### *Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση*

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



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

### 1.5 Μηχανισμοί ελέγχου της ποιότητας του mRNA

Κάθε βήμα στην παραγωγή ενός ώριμου μεταγράφου παρέχει δυνατότητες εισαγωγής λαθών. Για να εξασφαλίζεται η πιστότητα της μεταγραφής το κύτταρο έχει αναπτύξει την ικανότητα να εντοπίζει τα ελαττωματικά μεταγράφα και να τα αποικοδομεί, προφυλάσσοντας το κύτταρο από τοξικές πρωτεΐνες. Ο έλεγχος της ωρίμανσης του mRNA συμβαίνει στον πυρήνα, ενώ οι πορείες ελέγχου που αναφέρονται παρακάτω σχετίζονται με την μετάφραση και ανιχνεύουν ελαττωματικά ριβονουκλεϊνικά σύμπλοκα στο κυτταρόπλασμα.

A. *Nonsense-mediated decay*: Στην διαδικασία αυτή (NMD) τα mRNA που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται (Εικόνα 5). Η πρόωρη αλληλουχία τερματισμού μπορεί να προκύψει από σημειακές μεταλλάξεις, μετατοπίσεις αναγνωστικού πλαισίου,

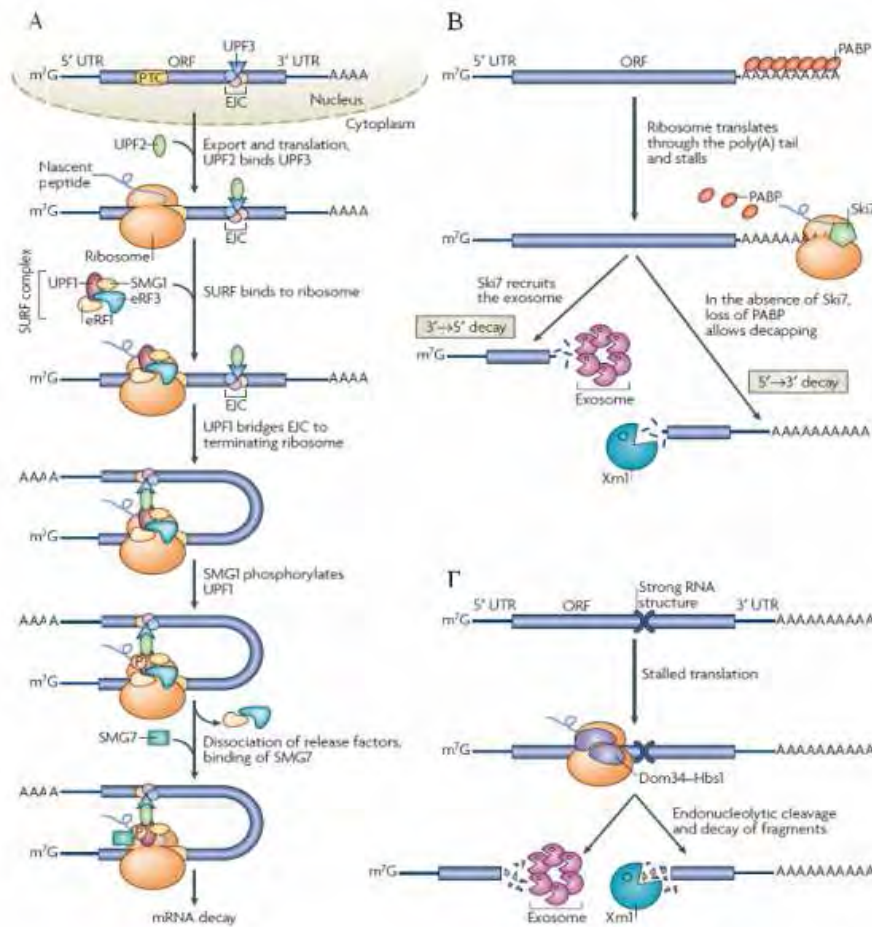


ελαττωματική ωρίμανση του μεταγράφου, προβληματική έναρξη της μετάφρασης [12] και εκτενή 3' αμετάφραστη περιοχή. Τα μεταγράφα αυτά θα οδηγούσαν στην παραγωγή ελαττωματικής πρωτεΐνης. Το μονοπάτι αυτό έχει βρεθεί σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ενώ τα κυριότερα συστατικά του NMD συμπλόκου UPF1, UPF2 και UPF3, είναι διατηρημένα.

Β. *Non-stop decay*: Παρομοίως σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως non-stop decay (NSD) τα mRNA στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'-5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα [13,14]. Τέτοια μεταγράφα μπορούν να προκύψουν από διάσπαση, από την απουσία αλληλουχίας τερματισμού μέσα στην κωδικοποιούμενη περιοχή καθώς επίσης και από πρόωρη πολυαδενυλίωση κατά την μεταγραφή (Εικόνα 5).

Γ. *No-go decay*: Ένας τελευταίος μηχανισμός επιτήρησης είναι ο no-go decay (NGD) [15] (Εικόνα 5), ο οποίος ανακαλύφθηκε πρόσφατα στον ζυμομύκητα και δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως.

Κατά την διαδικασία αυτή ανιχνεύονται ριβοσώματα τα οποία έχουν κολλήσει πάνω σε ένα mRNA με αποτέλεσμα να διασπάται το mRNA μόριο με ενδονουκλεοτιδική διάσπαση κοντά στο σημείο αυτό. Τα ριβοσώματα απελευθερώνονται και τα παραγόμενα τμήματα RNA αποικοδομούνται από το εξώσωμα και την Xrn1.

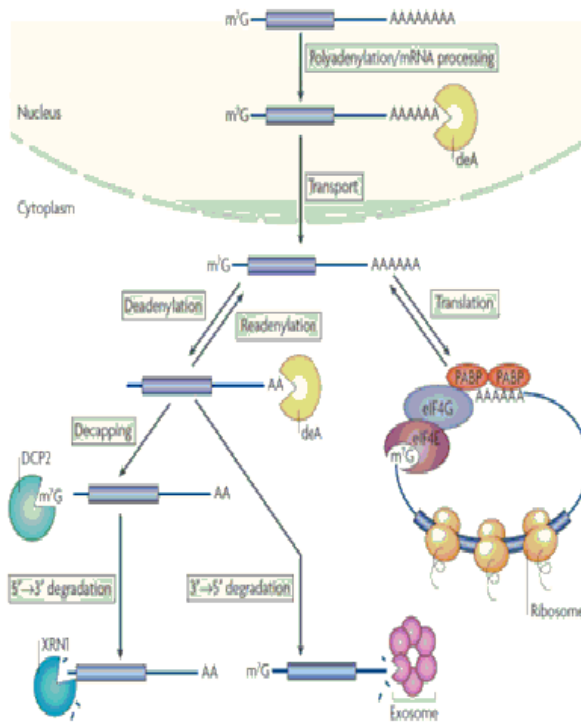


Εικόνα 5. : A. Nonsense-mediated decay. Στην διαδικασία αυτή τα mRNA που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται. B. Non-stop decay. Τα mRNA στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα. Γ. No-go decay. Κατά την διαδικασία αυτή ανιχνεύονται ριβοσώματα τα οποία έχουν κολληθεί πάνω σε ένα mRNA με αποτέλεσμα να διασπάται το mRNA μόριο με ενδονουκλεοτιδική διάσπαση κοντά στο σημείο αυτό [7].

## 1.6 Αποαδενυλίωση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η αποικοδόμηση του mRNA υπό φυσιολογικές συνθήκες συνήθως ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ(A) ουράς. Η αποαδενυλίωση είναι το σημαντικότερο στάδιο που καθορίζει το ρυθμό της αποικοδόμησης και της μεταφραστικής αποσιώπησης του mRNA. Το γεγονός αυτό καθιστά την αποαδενυλίωση ως το κυριότερο σημείο ελέγχου για τις δύο αυτές διαδικασίες. Τα ένζυμα που καταλύουν την αποαδενυλίωση είναι εξωνουκλεάσες εξαρτώμενες από  $Mg^{2+}$  που υδρολύουν το mRNA με κατεύθυνση 3'-5', παράγοντας 5'-AMP. Οι πολυ(A) ουρές είναι το κυριότερο υπόστρωμα των ενζύμων αυτών,

ωστόσο μερικές αποαδενυλάσες μπορούν να διασπούν και άλλα μόρια RNA *in vitro* [16,17]. Από την στιγμή που η πολυ(A) ουρά έχει αφαιρεθεί από το mRNA, άλλα υδρολυτικά ένζυμα ξεκινούν την διάσπαση του (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Η αποαδενυλίωση είναι συνήθως το στάδιο που καθορίζει το ρυθμό της αποικοδόμησης και της αποσιώπησης του mRNA [7].

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

Nocturinin, την ANGEL και 2' phosphodiesterase (2' PDE) και έχουν συντηρημένα κατάλοιπα Asp και His στην περιοχή με δράση νουκλεάσης. Είναι πιθανό να υπάρχουν και άλλες νουκλεάσες εκτός των υπέρ-οικογενειών DEDD και EEP ωστόσο δεν έχει ταυτοποιηθεί καμία ακόμη [18].

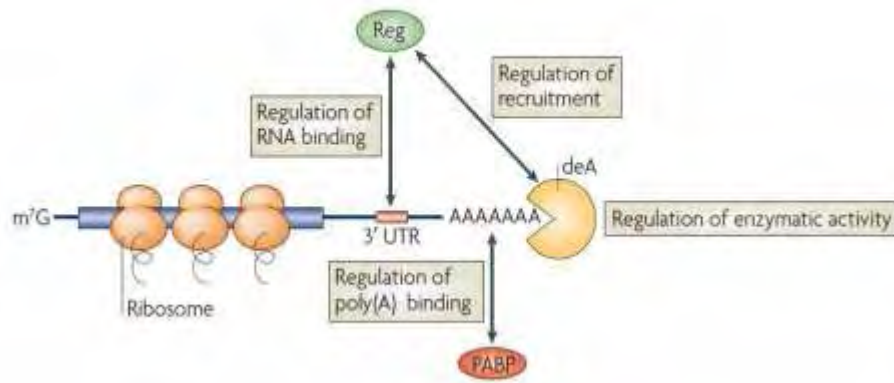
### 1.7 Σύμπλοκα αποαδενυλασών

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

### 1.8 Ρύθμιση της αποαδενυλίωσης

Η ρύθμιση της δράσης των αποαδενυλασών είναι αναγκαία, καθώς μη φυσιολογική αποαδενυλίωση επιφέρει γενική απορρύθμιση. Σταθερά και

μεταφραζόμενα mRNA πρέπει να προστατεύονται από την αφαίρεση της πολυ(A) ουράς, ενώ μη σταθερά ή προβληματικά mRNA πρέπει να αποαδενυλιώνονται και να αποικοδομούνται [24,25]. Ταχεία αποαδενυλίωση συγκεκριμένων στόχων ξεχωρίζει σημαντικά από την φυσιολογική αποαδενυλίωση. Έτσι οι αποαδενυλάσες πρέπει να ρυθμίζονται γενικά αλλά και ειδικά σύμφωνα με τον στόχο.



Εικόνα 7. Οι αποαδενυλάσες ρυθμίζονται γενικά αλλά και ειδικά σύμφωνα με το στόχο [7].

Οι αποαδενυλάσες και οι ρυθμιστές τους εκφράζονται σε δεδομένη χρονική στιγμή και τόπο όταν μπορεί να υπάρχει και η ρύθμιση τους. Άλλες αποαδενυλάσες, όπως μέλη της Pop2 και Ccr4 οικογένειας εκφράζονται ευρέως και σταθερά. Ένας δεύτερος μηχανισμός για γενική ρύθμιση της αποαδενυλίωσης είναι η αναστολή της ενζυμικής δράσης. Ειδικά στρεσογόνα, όπως η υπερϊώδης ακτινοβολία, οξειδωτικά, οσμωτική πίεση ή θερμικό στρες, έλλειψη γλυκόζης αναστέλλουν την αποαδενυλίωση, ενώ μελέτες επί της ανθρώπινης PARN δείχνουν ότι αναστέλλεται από νουκλεοτίδια και συνθετικά τους ανάλογα. Η αποαδενυλίωση επηρεάζεται από δύο τοπολογικά διακριτές μορφές ελέγχου: α) πυρηνική - κυτταροπλασματική και β) εντοπισμός σε κοκκία [26]. Διάφορες αποαδενυλάσες κινούνται παλινδρομικά από τον πυρήνα στον κυτταρόπλασμα. Αλλαγές στην διαμερισματοποίηση επιφέρουν δραματικά αποτελέσματα. Στα αμφίβια, αποσύνθεση του πυρήνα κατά την μείωση απελευθερώνει την PARN στο κυτταρόπλασμα όπου και αποαδενυλιώνει μητρικά mRNA. Διάφορες αποαδενυλάσες εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά κοκκία. Τα γαμετοκύτταρα, τα νευρωνικά κοκκία και τα σωμάτια P (*P bodies*) περιέχουν mRNA μόρια σε καταστολή τα οποία μπορούν να ενεργοποιηθούν [28]. Ο συνεντοπισμός των ενζύμων με τα υποστρώματα μπορεί να διεγείρει την αποαδενυλίωση αλλά αυτό

δεν έχει αποδειχθεί πλήρως. Από την άλλη η αποαδενυλίωση δεν φαίνεται να περιορίζεται στα κοκκία γιατί οι ίδιες αποαδενυλάσες έχουν βρεθεί και στο κυτταρόπλασμα [27].

Η αποαδενυλίωση μπορεί να επηρεάζεται από χαρακτηριστικά του mRNA. Η 5' καλύπτρα διεγείρει την ενεργότητα και την διαρκή εξωνουκλεοτιδική δράση δηλαδή την συνεχή αποαδενυλίωση από την PARN, ενώ δεν έχει επίδραση στην δράση άλλων αποαδενυλασών. Αυτή η ιδιαίτερη ιδιότητα της PARN οφείλεται στην ικανότητα πρόσδεσης του ενζύμου αυτού στην 5' καλύπτρα του mRNA μέσω μια ειδικής περιοχής πρόσδεσης. Σε κάποια mRNA η πολυ(A) ουρά μπορεί να προστατευθεί από τις αποαδενυλάσες μέσω ζευγαρώματος βάσεων. Για παράδειγμα το πυρηνικό RNA της PAN στο σάρκωμα Karosi, προκαλούμενο από ερπιτιό, αποτρέπει την αποαδενυλίωση του με ζευγάρωμα των βάσεων μεταξύ της πολυ(A) ουράς και μίας περιοχής πλούσιας σε ουριδίνη [29].

### 1.9 Ένζυμα και έλεγχος αποαδενυλίωσης

Η ρύθμιση ειδικών mRNA οφείλεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες που συχνά βρίσκονται στο 3' UTR και προάγουν την αποαδενυλίωση. Στις αλληλουχίες αυτές προσδένονται παράγοντες που στρατολογούν αποαδενυλάσες και διεγείρουν την αποαδενυλίωση. Διάφορες RNA προσδενόμενες πρωτεΐνες (CUG-BP, PUF και CREB), στρατολογούν τις αποαδενυλάσες αλληλεπιδρώντας άμεσα με αυτές [30,31]. Ακόμα και η PABP μπορεί να ενεργοποιήσει την αποαδενυλίωση έλκοντας το σύμπλοκο Pan2-Pan3 στο mRNA. Στα θηλαστικά η PABP μπορεί να στρατολογήσει σύμπλοκα μελών των οικογενειών Pop2-Ccr4 μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που συσχετίζονται με TOB πρωτεΐνες [31]. Η συνδυαστική δράση των ρυθμιστών επεκτείνει την πολυπλοκότητα των διαδικασιών αποαδενυλίωσης. Πολλαπλοί καταστολείς είτε πρωτεΐνες είτε miRNAs, συχνά προσδένονται στο ίδιο mRNA 3' UTR. Για παράδειγμα, οι κατασταλτικές πρωτεΐνες του ζυμομύκητα Puf4 και Puf5 προσδένονται στο 3' UTR του HO mRNA και κάθε πρωτεΐνη επιστρατεύει τα σύμπλοκα Ccr4-Pop2 για να επιταχυνθεί η αποαδενυλίωση [32]. Επιπλέον σύμπλοκα που προσδένονται στο 3'-UTR μπορούν μέσω διαφορετικών υπομονάδων να προσελκύσουν αποαδενυλάσες.

Το υπόστρωμα των αποαδενυλασών, η πολυ(A) ουρά του mRNA είναι καλυμμένη με μόρια PABP που εμποδίζουν την πρόσβαση σε αυτήν. Η ρυθμιζόμενη

αποδέσμευση της PABP από την πολυ(A) του mRNA ή η αλληλεπίδραση της PABP με μία αποαδενυλάση μπορεί να διεγείρει την αποαδενυλίωση [33]. Στον άνθρωπο υπάρχουν τουλάχιστον 6 μορφές της PABP, ενώ υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες που επίσης προσδένονται στη πολυ(A) ουρά (όπως η NAB2), για τις οποίες δεν είναι γνωστό εάν επηρεάζουν την αποαδενυλίωση. Οι ρυθμιστές είναι δυνατόν να μπλοκάρουν την αποαδενυλίωση με το να σταθεροποιούν σύμπλοκα PABP-mRNA. Το  $\alpha$ -CP σύμπλοκο των RNA προσδεδόμενων πρωτεϊνών σταθεροποιεί το mRNA της  $\alpha$ -globin με το να προσδένεται στην PABP. Συγχρόνως άλλες πρωτεΐνες προσδέτες μπορούν να επηρεάζουν την αποαδενυλίωση. Η CBP80, μία υπομονάδα του πυρηνικού συμπλόκου πρόσδεσης στο 5' κάλυμμα προσδένεται και ανταγωνίζεται την δράση της PARN, πιθανόν περιορίζοντας την δράση της σε νεοσυντιθέμενα pre-mRNAs [34]. Επιπλέον ρυθμιστικές πρωτεΐνες μπορούν να δρουν μέσω της PABP για να διεγείρουν την αποαδενυλίωση του mRNA. Πρωτεΐνες συσχετιζόμενες με ελικάση όπως η RHAU μπορούν να διεγείρουν την αποαδενυλίωση αντικαθιστώντας την PABP από την πολυ(A) ουρά. Η TOB των θηλαστικών διεγείρει την αποαδενυλίωση με το να στρατολογεί μέλη της Ccr4-Pop2 οικογένειας μέσω αλληλεπιδράσεων με την C-τελική περιοχή (*non-RNA-binding*) της PABP. Η TOB λειτουργεί ως γέφυρα συνδέοντας την PABP με σύμπλοκα αποαδενυλίωσης [35, 31].

Πολλοί ρυθμιστές (όπως PUF, CPEB, KSRP, Smaug, TTP και miRNAs) στρατολογούν ειδικές αποαδενυλάσες και συμπαράγοντες τους, που είτε αναστέλλουν την μετάφραση (όπως Dhh1, Maskin, CUP and 4EHP), είτε προάγουν την απομάκρυνση της καλύπτρας (όπως η DCP1 και DCP2) είτε αποικοδομούν ταχεία το mRNA (όπως το εξώσωμα και η εξωριβονουκλεάση -1 (XRN1)).

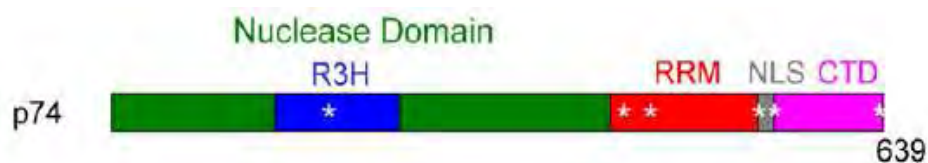
Τα miRNAs δρουν με ποικίλο τρόπο πάνω στα μόρια mRNA. Μπορούν να καταστείλουν την μετάφραση ενός mRNA, να διεγείρουν την αποικοδόμηση του, και να προκαλέσουν αποαδενυλίωση [36]. Τα miRNAs αλληλεπιδρούν με την Argonaute πρωτεΐνη για να σχηματίσουν τα *RNA-induced silencing complexes* (RISCs) [37]. Αυτά τα σύμπλοκα διεγείρουν την αποαδενυλίωση του mRNA μέσω του Ccr4-Pop2-Not συμπλόκου, καταστέλλουν την μετάφραση μέσω ενός μηχανισμού αλληλεπίδρασης Argonaute - 5' - καλύπτρα και προάγουν την αφαίρεση της καλύπτρας του mRNA μέσω του συμπλόκου αφαίρεσης της καλύπτρας Dcp1-Dcp2 [36, 38]. Επιπλέον, συστατικά του RISC σχετίζονται με ελικάση RCK (p54), μία ορθόλογη της Dhh1 που απαιτείται για την καταστολή μέσω

miRNA [36]. Πρόσφατη μελέτη αναδεικνύει τον μοναδικό ρόλο των αποαδενυλασών και των πολυ(A) ουρών στην γονιδιακή αποσιώπηση με miRNA όπου υποστηρίζεται η άποψη ότι όλοι οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αποσιώπηση ακόμα και αυτοί που δεν ξεκινούν με την αποαδενυλίωση απαιτούν την παρουσία πολυ(A) με σύμπλοκο αποαδενυλάσης [39].

#### **1.10 Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [*poly(A)-specific ribonuclease, PARN*]**

Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), όπου θα μελετήσουμε στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, είναι μία από τις καλύτερα χαρακτηριζόμενες αποαδενυλάσες στα θηλαστικά. Φαίνεται πως είναι παρούσα τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Ανήκει στην *DNAQ-like* υπεροικογένεια των 3'-5' εξωνουκλεασών. Η *DNAQ-like* υπεροικογένεια περιλαμβάνει μια ποικιλία από εξωνουκλεάσες, συμπεριλαμβανμένων τόσο DNases και RNases [44]. Η επιτυχής κλωνοποίηση της PARN στον άνθρωπο και στο *X. laevis* αποκάλυψε ότι αποτελείται από 639 (μοριακό βάρος 73,5 kDa) και 631 αμινοξέα (μοριακό βάρος 72,8kDa), αντίστοιχα. Είναι μέλος της τάξης DEDD μιας κατηγορίας εξωνουκλεασών που περιέχουν τα διατηρημένα κατάλοιπα Asp-Glu-Asp-Asp στην ενεργό της περιοχή [42]. Μετάλλαξη σε οποιαδήποτε από αυτά τα τέσσερα αμινοξέα ουσιαστικώς μειώνει τη συνολική ενζυματική δραστηριότητα της PARN. Ακόμη, η PARN μπορεί να ταξινομηθεί ως μέλος της οικογένειας Caf1 ριβονουκλεασών, λόγω του τομέα νουκλεάσης [45]. Η PARN υπάρχει ως διμερές, αλληλεπιδρά με δισθενές μέταλλο-ión, κυρίως  $Mg^{+2}$ , που αποικοδομεί αποκλειστικά πολυ(A) ουρές ευκαρυωτικών mRNA. Το  $Mg^{+2}$  παίζει σημαντικό ρόλο στη δομική σταθερότητα της PARN [43]. Είναι η μόνη αποαδενυλάση που έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά άμεσα κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης πολυ(A) τόσο με τη δομή της καλύπτρας m7-G και της πολυ(A) ουράς του mRNA [40]. Αυτή η αλληλεπίδραση αυξάνει τη λειτουργία του ενζύμου, αυξάνοντας το ποσοστό της αφαίρεσης πολυ(A). Παραδόξως, η PARN δεν εμπλέκεται αποκλειστικά σε ρύθμιση της λειτουργίας mRNA, καθώς συμμετέχει επίσης στην επεξεργασία ορισμένων μη κωδικοποιημένων RNAs, όπως τα μικρά πυρηνικά RNAs (snoRNAs) και των μικρών RNAs στα σωμάτια *Cajal* (ScaRNAs) [41].

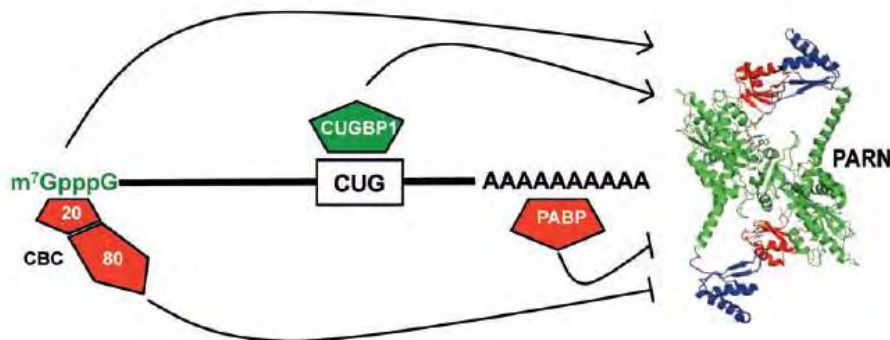




Εικόνα 8. Η PARN αποτελείται από RNA-δεσμευτικές περιοχές. Η NLS (nuclear localization signal) ενθύνεται και για την μετακίνηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα [49].

Ανάλυση αλληλουχίας αποκαλύπτει ότι κάθε υπομονάδα περιέχει τρεις RNA-δεσμευτικές περιοχές, τον τομέα αναγνώρισης RNA (RRM), τον τομέα νουκλεάσης και τον τομέα R3H ο οποίος είναι μία πρωτεϊνική περιοχή όπου περιέχει ένα μη μεταβλητό κατάλοιπο αργινίνης και υψηλά διατηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης και ένα C-τερματικό τομέα (CTD) (Εικόνα 8). Ο τομέας νουκλεάσης και ο τομέας RRM έχουν υψηλή προτίμηση στη σύνδεση με πολυ(A) και ο RMM έχει υψηλή σύνδεση με την καλύπτρα. Δεν ήταν σαφές γιατί η PARN απαιτεί τρεις περιοχές σύνδεσης και αν οι τρεις τομείς συμβάλουν στην αποτελεσματικότητα και στην καταλυτική δράση του ενζύμου. Σε πρόσφατη μελέτη κατασκεύασαν μια σειρά από μεταλλάγματα που στερούνται είτε τον έναν είτε δύο από τους τρεις τομείς RNA-σύνδεσης. Ο τομέας R3H έχει την ικανότητα να δεσμεύει διάφορα ολιγονουκλεοτίδια χωρίς προτίμηση, όταν έλειπε ο τομέας αυτός η PARN υπήρχε ως μονομερές και κατείχε την ιδιότητα της αποαδενυλίωσης. Άρα ο τομέας αυτός είναι απαραίτητος για τη δομή του ενζύμου. Η περιοχή RRM παίζει ρόλο στην αναγνώριση της καλύπτρας. Κρυσταλλικές δομές δείχνουν ότι η περιοχή αυτή συνδέεται με τη 7-μεθυλογουανοσίνη καλύπτρα μέσω ενός καταλοίπου τρυπτοφάνης [49].

Η πολυ(A) ουρά του mRNA συνδέεται στον πυρήνα με την πυρηνική πολυ(A)-δεσμευτική πρωτεΐνη 1 (PABPN1) ενώ στο κυτταρόπλασμα, η PABP1 αντικαθίσταται από την PABPC. Εκτός από αυτά τα δύο μεγάλα PABPS, έχουν εντοπιστεί και άλλα PABPS που συνδέονται με την πολυ(A), αυξάνοντας την ετερογένεια των συμπλόκων πολυ(A)/PABP [46]. Η σύνδεση της PABP με την πολυ(A) αναστέλλει τη δραστηριότητα της PARN (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Η σύνδεση της PABP αναστέλλει τη δραστηριότητα της PARN [46].

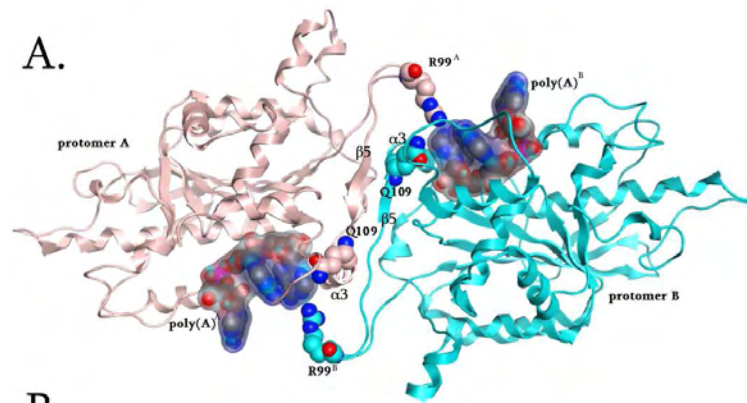
Πρόσφατα έχει δειχθεί πως η PARN μπορεί να συμμετέχει στον έλεγχο ενός υποσυνόλου mRNAs αντί για το μεγαλύτερο μέρος του mRNA πληθυσμού [47]. Επίσης, φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη πρόωρη ανάπτυξη καθώς ίσως και σε ορισμένους καρκίνους. Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι η έκφραση της PARN ήταν υψηλότερη 2,2 φορές σε οξεία λεμφαιοκυτταρική λευχαιμία (ALL) και 2 φορές σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML) σε σύγκριση με άλλους ασθενείς [48].

### 1.11 Φυλογενετική ανάλυση της PARN και ο σημαντικός ρόλος της Arg99

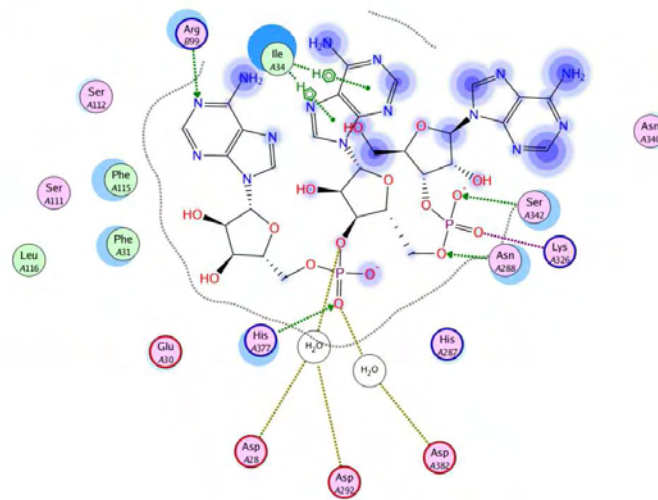
Εκτενής φυλογενετική ανάλυση, βασισμένη στο σύνολο των διαθέσιμων γονιδιωμάτων, έδειξε μια ευρεία κατανομή για την PARN στα ευκαρυωτικά είδη, και αποκάλυψε δομικά σημαντικά αμινοξέα, τα οποία δυνητικά θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στη ρύθμιση του καταλυτικού μηχανισμού της PARN [50]. Συνολικά εντοπίστηκαν 32 ομόλογες πρωτεϊνικές αλληλουχίες της PARN στα γονιδιώματα των ειδών, οι οποίες αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ταξινομικές ευκαρυωτικές ομάδες (σύμφωνα με την ταξινομική βάση δεδομένων του NCBI). Ομόλογα της PARN δεν βρέθηκαν στο αρθρόποδο *Drosophila melanogaster* και στο μύκητα *S. Cerevisiae*, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Εναλλακτικά μεταβολικά μονοπάτια μπορεί να υπάρχουν σε αυτούς του δύο οργανισμούς για την αποικοδόμηση του πολυ(A). Παρόλα αυτά, οι θεωρούμενες ομόλογες αλληλουχίες της PARN ανιχνεύονται σε άλλα αρθρόποδα και μύκητες. Περαιτέρω, πρωτεϊνικά μοτίβα αντλούνται από πολλαπλές συστοιχίες των αμινοξικών αλληλουχιών της PARN. Εκτός από το συντηρημένο καταλυτικό μοτίβο (Asp29, Glu30, Asp292 και Asp382), ένα δεύτερο μοτίβο που περιέχει τα αμετάβλητα κατάλοιπα Arg99 και Gln109 ανιχνεύθηκε μόνο στα μετάζωα. Μετά από προσεκτική εξέταση της πρωτοταγούς αλληλουχίας

αμινοξέων των άλλων ειδών εκτός των μεταζώων, βρέθηκε ότι στη γειτονική περιοχή της Arg99, είτε υπάρχουν κατάλοιπα Arg ή η Arg έχει αντικατασταθεί από την επίσης πολική Lys.

Με βάση τη φυλογενετική ανάλυση, η έρευνα επικεντρώθηκε στους πιθανούς ρόλους του αμετάβλητου καταλοίπου της Arg99, εκτός των άλλων. Δομική υπέρθεση των δύο μονομερών της PARN και των δύο αντίστοιχων ολιγονουκλεοτιδίων πολυ(A) αποκάλυψε μικρές αποκλίσεις ( $\max Ca\ RMSD < 2\text{\AA}$ ). Η δομική ανάλυση *in silico* έδειξε ότι η Arg99 του μονομερούς Ala (R99A) υποστηρίζεται από το συμπληρωματικό μονομερές με συμμετρικό τρόπο κατά τη διάρκεια της κατάλυσης. Συγκεκριμένα, η R99A εκτείνεται μέσα στο ενεργό κέντρο της αλυσίδας B, όπως και η R99B στο ενεργό κέντρο της αλυσίδας A. Αυτά τα κατάλοιπα Arg σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τη βάση αδενίνης του τελευταίου 3' νουκλεοσιδίου της πολυ(A) αλυσίδας. Ο δεσμός υδρογόνου επιτυγχάνεται με τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ της ομάδας  $-NH_2$  (δότης) της Arg και την ομάδα  $-N=$  (δέκτης) του δακτυλίου της αδενίνης (Εικόνα 10A). Η ουσιαστική συμβολή της Arg99 επιβεβαιώνεται επίσης από μελέτες μετάλλαξης στην  $\alpha 3$  έλικα της PARN, η οποία σχηματίζει έναν ευέλικτο βρόχο, ο οποίος υποστηρίζει τον βρόχο που βρίσκεται η Arg του άλλου μονομερούς ώστε να βρίσκεται στην εγγύτητα της καταλυτικής περιοχής. Η βέλτιστη καταλυτική τοποθέτηση του σχιζόμενου δεσμού κατευθύνεται από την His377, η οποία σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο της ομάδας  $-P=O$  του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Κατά συνέπεια, δεδομένου ότι η His377 και η Arg99 σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το πρώτο νουκλεοσίδιο από διαφορετικές κατευθύνσεις, παίζουν σημαντικό ρόλο στην τρισδιάστατη του σταθεροποίηση και τοποθέτηση στο ενεργό κέντρο της PARN (Εικόνα 10B). Συμπερασματικά, η Arg99 μπορεί να αντιπροσωπεύει ακόμα ένα σημαντικό κατάλοιπο καθώς συνδέει τα δύο μονομερή, συμβάλλει στη συνολική σταθερότητα και κατευθύνει το υπόστρωμα σε μια βέλτιστη θέση για την αντίδραση διάσπασης [50].



B.



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

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Με βάση μια πρόσφατη μελέτη *in silico* για το σχεδιασμό ειδικών αναστολέων της PARN, η οποία απέδωσε σημαντικό δομικό ρόλο στην Arg99, σχεδιάστηκε μια μετάλλαξη αυτού του αμινοξέος σε Ala για να εξεταστεί η επίδρασή της στις ιδιότητες του ενζύμου. Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας, εξετάστηκαν οι πιθανές μεταβολές στην δραστικότητα του μεταλλαγμένου ενζύμου σε σύγκριση με αυτό του αγρίου τύπου, με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο βασισμένη στο διάλυμα κυανού του μεθυλενίου καθώς και την επίδραση της συγκεκριμένης μετάλλαξης στον ομοδιμερισμό της πρωτεΐνης με ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Υλικά

##### A) Χημικά

Ammonium Persulfate(*APS*) SIGMA

Bovine Serum Albumin (*BSA*) New England Biolabs

Coomasie Brilliant Blue Fluka

Diethylpyrocarbonat (*DEPC*) Research Organics

Dithiothreitol (*DTT*) SERVA

DMSO Panreac

EDTA Panreac

HCl Merck

HEPES SERVA

Isopropyl ThioGalactosyl (*IPTG*) Fermentas

KCl Merck

LB Agar Scharlau

LB Broth Scharlau

MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O Panreac

MOPS Alfa Aesar

NaCl Panreac

NaHCO<sub>3</sub> Merck

NaOH Merck

Phenylmethansulfonylfluorid (*PMSF*) SERVA

SDS (*Sodium dodecyl sulfate*) SIGMA

TEMED (*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine) Research Organics

Tris base Merck

Αγαρόζη (*Agarose*) SeaKem

Αιθανόλη Panreac

Ακρυλαμίδη (*Acrylamide*) SIGMA

β-μερκαπτοαιθανόλη Riedel de Haen

Γλυκερόλη (*glucerosl*) Panreac

Δις-ακρυλαμίδιο (*Bis-acrylamide*) SIGMA

Ισοπροπανόλη (*Isopropanole*) Scharlau

Οξικό οξύ Merck

Χλωραμφαινικόλη SIGMA

Μεθανόλη AppliChem

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> MERC

AgNO<sub>3</sub> Panreac

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Panreac

Φορμαλδεΐδη (Formaldehyde) AppliChem

Γλυκίνη (Glycine) BioChemica

Σκόνη γάλακτος Regilait

Tween-20 BioChemica

## **B) Βακτηριακά στελέχη**

BL21 Gold, στελέχη του βακτηρίου Esherichia Coli

## **Γ) Θρεπτικά υλικά**

LB Broth Scharlau

LB Agar Scharlau

#### **Δ) Πρωτεΐνες και ένζυμα**

His6-hPARN 74 kDa από E.coli BL21

BSA Fraction V Merck

Rnasin Biolabs

#### **Ε) Υλικά χρωματογραφίας συγγένειας**

HisTrap HP (Ni Sepharose) (GE Healthcare)

Ministart (0,45μm)(Sartorius stedim biotech)

#### **ΣΤ) Υλικά διαπίδυσης**

Μεμβράνη διαπίδυσης SIGMA

#### **Ζ) Υλικά για το Western Blotting**

Μεμβράνη PVDF

Χαρτιά Whatman

1<sup>ο</sup> αντίσωμα: Antisome anti-PARN (1/1.000)

2<sup>ο</sup> αντίσωμα: anti-HPR Couiqualed ZNA Ab CHEMLOON (1/10.000)

### **3.2 Διαλύματα**

#### **A) Θρεπτικά υλικά**

- Υγρό θρεπτικό μέσο (LB Broth) pH 7,2
- Στερεό θρεπτικό μέσο (LB Ager) pH 7,2
- SOC mediun υγρό (θρεπτικό μέσο) pH 7 για τελικό όγκο 1ml

#### **B) Διαλύματα για απομόνωση πρωτεΐνης**

- Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCL, 0,1% Triton X-100, PMSF 0,1mM, μερκαπτοαιθανόλη 2mM, λυσοζύμη)



- Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης (20mM HEPES pH 7,9 , 0,5M KCL, 10% γλυκερόλη, 20mM imidazole)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCL, 10% γλυκερόλη, 500mM imidazole)

#### **Γ) Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου**

- Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (10x)
  - Tris base 1,5%
  - Γλυκίνη 7,2% v/w
  - SDS 0,5%, pH 8,3
- Διαλύματα stock για πήκτωμα ακρυλαμιδίου:
  - Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-HCL 1,5M, pH 8,8
  - Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-HCL 0,5M, pH 6,8
  - SDS 10% v/w
  - Ακρυλαμίδιο 40% v/w (ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο : 29/1) σε ddH<sub>2</sub>O

#### **Δ) Διαλύματα για το πήκτωμα ακρυλαμιδίου**

Ανάλογα με την συσκευή και την περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου που θα χρειαστούμε θα αναζητήσουμε τους πίνακες για την αναλογία των διαλυμάτων stock που θα πρέπει να αναμείξουμε και προσθέτουμε στο τέλος τους καταλύτες APS 10% και TEMED.

#### **Ε) Διαλύματα για ηλεκτοφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου για Native Gel**

Είναι παρόμοια με τα διαλύματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με τη διαφορά ότι δεν περιέχει SDS.

- Electrophoresis Buffer (1Lt)
  - 14,4gr Glycine
  - 3gr Tris
  - Προσθέτω ddH<sub>2</sub>O μέχρι το 1 λίτρο (pH ~ 8,3)
- 4x Native Page sample Buffer
  - 2ml 100% Glycerol
  - 1,25ml 1M Tris-HCl pH=6,8

- 75μl 1% Bromophenol Blue dissolved in 100% EtOH
- Διαλύματα stock για πήκτωμα ακρυλαμιδίου (χωρίς SDS)
- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-HCL 1,5M, pH 8,8
- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-HCL 0,5M, pH 6,8
- Ακρυλαμίδιο 40% v/w (ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο : 29/1) σε ddH<sub>2</sub>O

### **ΣΤ) Διαλύματα για βαφή του gel**

- Βαφή πηκτής με Coomassie
- Διάλυμα χρώσης Coomassie Brilliant Blue G250 0,1% w/v, ισοπροπανόλη 33%, οξικό οξύ 2%
- Οξικό οξύ 10%
- Βαφή πηκτής με Silver Staining
- FIXATION (50% μεθανόλη , 5% οξικό οξύ και συμπληρώνω με ddH<sub>2</sub>O μέχρι τον επιθυμητό όγκο)
- SENSITIVE (0,0775gr Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> σε 250ml ddH<sub>2</sub>O)
- AgNO<sub>3</sub> (0,25gr AgNO<sub>3</sub> σε 250ml ddH<sub>2</sub>O)
- DEVELOPER (5gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> σε 250gr ddH<sub>2</sub>O και 100μl φορμαλδεΐδη)
- STOPPER (12,5μl οξικό οξύ σε 250ml ddH<sub>2</sub>O)
- 50% μεθανόλη (50ml)

### **Ζ) Διαλύματα για Westen Blotting**

- Transfer Buffer 10x (25mM Tris, 192mM glycine, 0,1% SDS, ddH<sub>2</sub>O)
- Blocking Buffer (100ml PBS, 5% γάλα, 0,1%Tween-20)
- Washing Buffer (PBS, 0,1 % Tween-20)
- Chemiluminescent HPR Substrate Reagent A και B (Genscript Corporation)

### **Η) Διαλύματα για την ενεργότητα της PARN**

- Νερό ελεύθερο νουκλεασών (0,05% DEPC, O/N και αποστείρωση, αποθήκευση στο σκοτάδι)
- Διάλυμα αντίδρασης (1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 20mM HEPES-KOH, pH 7, 0,2mM DTT, 10% γλυκερόλη)

- Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου (0,0012% κυανό του μεθυλενίου, 0,1M MOPS-KOH pH 7,5, 2mM EDTA)
- Διάλυμα πολύ(A) 100μg/ml. Διάλυμα αποθήκευσης πολύ(A) (10mg/ml) αραιώνεται κατάλληλα σε διάλυμα αντίδρασης

### 3.3 Μέθοδοι

#### A) Χημικός μετασχηματισμός δεκτικών BL21 Gold κυττάρων (transformation)

Σε 200ml επιδεκτικών κυττάρων γίνεται προσθήκη 0.5-1,5μl του πλασμιδίου όπου φέρει τη μετάλλαξη R99A μετά την κατακρήμιση με αιθανόλη. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση στον πάγο για 30min και ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42 °C για 45 δευτερόλεπτα (sec). Έπειτα τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 1-2 λεπτά (min) και εν συνεχεία προστίθενται σε κάθε καλλιέργεια 800μl SOC medium. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 37 °C υπό ανάδευση (160-210 rpm). Τέλος, επιστρώνονται 100μl της μετασχηματισμένης καλλιέργειας σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB agar το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό (καναμυκίνη), ανάλογα με τα γονίδια ανθεκτικότητας που διαθέτει το εκάστοτε πλασμίδιο που χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό. Τέλος, πραγματοποιείται επώαση των τρυβλίων στους 37 °C για 12-14 ώρες. Την επομένη, εφόσον υπάρχουν διακριτές αποικίες, ενοφθαλμίζουμε σε 5ml LB Broth με 5 μl αντιβιοτικού (καναμυκίνη) μία αποικία. Το επωάζουμε ο/η στους 37 °C και 210 rpm. Δημιουργούμε stock από την συγκεκριμένη καλλιέργεια χρησιμοποιώντας 700μl της καλλιέργειας και 200μl γλυκερόλης αποστειρωμένης (αποθήκευση στους -80 °C).

#### B) Δοκιμασία υπερέκφρασης της PARN R99A

##### Δημιουργία μικρών καλλιεργειών

Σε ένα αποστειρωμένο φάλκον προστίθεται 10ml LB Broth και 10μl του αντιβιοτικού καναμυκίνη. Με το tip της πιπέτας παραλαμβάνονται από το stock κυττάρων λίγα και ενοφθαλμίζονται στο φάλκον. Τοποθετούνται για επώαση ο/η στους 37 °C και 210 rpm.

##### Δημιουργία μεγάλων καλλιεργειών

Σε 2 αποστειρωμένες φιάλες των 2 λίτρων με 500ml LB Broth και 50μl του αντιβιοτικού καναμυκίνη εμβολιάζονται στην κάθε μία 5ml από την μικρή

καλλιέργεια. Πριν πραγματοποιηθεί ο εμβολιασμός φυλάσσεται 1ml LB Broth, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως τυφλό στη διαδικασία της φασματοφωτομέτρησης. Ακολούθως, γίνεται επώαση των 2 κωνικών φιαλών στους 37 °C και στα 210 rpm, μέχρι OD<sub>600</sub> ~ 0,5-0,7. Στην πειραματική διεργασία που περιγράφεται στη διπλωματική αυτή, η επώαση διήρκησε 7-8 ώρες, καθώς μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος η OD<sub>600</sub> πήρε τις απαιτούμενες τιμές στις δύο κωνικές φιάλες. Μόλις φτάσει στο επιθυμητό OD<sub>600</sub> προστέθηκε 250ml του αντιβιοτικού καναμυκίνη και 500ml IPTG στη κάθε μία κωνική φιάλη. Επάζονται για 4 ώρες στους 37 °C και 210 rpm. Το σύνολο της καλλιέργειας φυγοκεντρείται στους 4 °C, στα 4000 rpm για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται καθώς στο ίζημα περιέχονται τα κύτταρα. Αποθηκεύονται στους -80 °C.

Να τονιστεί, ότι τόσο η παρασκευή των μικρών και μεγάλων καλλιιεργειών όσο και η φασματοφωτομέτρηση, γίνονται σε στείρες συνθήκες και παρουσία αυτόκαυστου. Χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα υλικά και σκεύη, και το πείραμα διεξάγεται σε πάγκους οι οποίοι έχουν καθαριστεί με αιθανόλη.

### **Γ) Απομόνωση της PARN**

#### Ομογενοποίηση των κυττάρων

Το ίζημα των κυττάρων διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης (περίπου 10ml). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διαδικασία του σπασίματος των κυττάρων με υπέρηχους (sonication) μέσα σε πάγο. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 12.000rpm, για 60min στους 4°C. Διαχωρίζεται το υπερκείμενο από το ίζημα και ακολουθεί η διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης η οποία βρίσκεται στο υπερκείμενο.

#### Καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας (ÄKTA - GE Healthcare)

Για τον καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας, χρειάστηκε να προσθέσουμε 20ml DNase 20U για μερικά λεπτά (2-3 min). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε φίλτρο Minisart μιας χρήσης των 0,45µm. Πραγματοποιήθηκε αραιώση της πρωτεΐνης 1:2,5 με το ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 20mM, pH 7,9 ώστε το διάλυμα να είναι πιο υδαρές και να μπορέσει να περάσει από τη στήλη. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η HisTrap HP Ni Sepharose καθώς η πρωτεΐνη δεσμεύεται στη ρητίνη μέσω σύνδεσης των ιστιδινών που περιέχει το αμινοτελικό

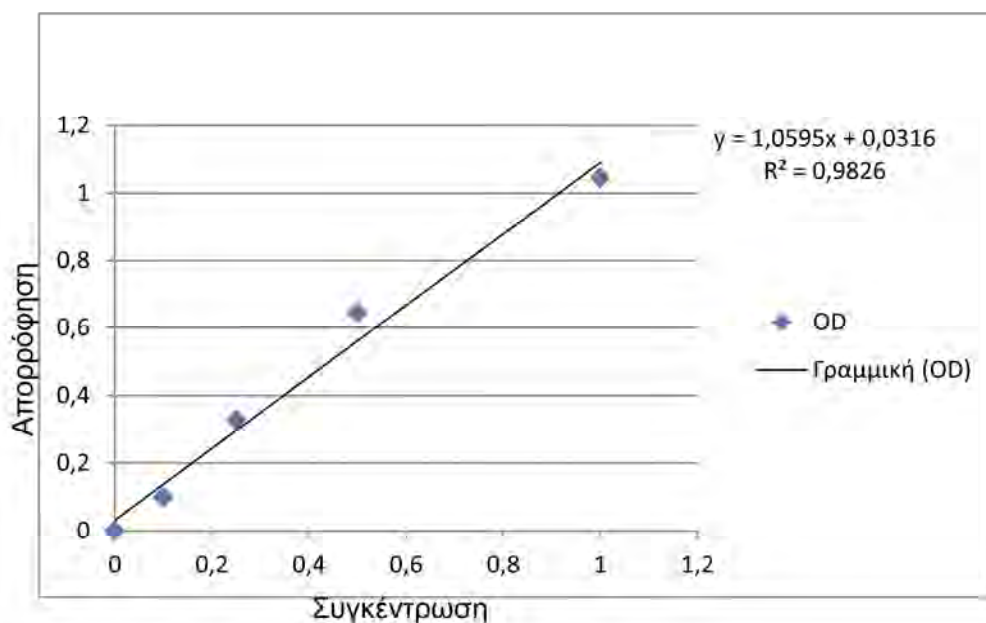
άκρο με τα μόρια του νικελίου. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) για την απομόνωση. Η στήλη μπορεί και δέχεται πίεση μέχρι 0,8MPa. Τα διαλύματα εξισορρόπησης και έκλουσης έχουν περαστεί από φίλτρο και απαερωθεί πριν χρησιμοποιηθούν. Αναλυτικά, καθαρίσαμε τη στήλη Ni Sepharose και την ÄKTA με αιθανόλη, μετά περάστηκε το διάλυμα εξισορρόπησης για περίπου 10 λεπτά με flow 1,00ml/min ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της PARN R99A. Το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε για την έκλυση της πρωτεΐνης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω σταδιακής αύξησης της ιονικής ισχύος. Το flow που πραγματοποιήθηκε ήταν 0,5ml/min. Όσο αυξάνεται η ιονική ισχύς, απομακρύνονται πρωτεΐνες από τη στήλη ανάλογα με την ισχύ πρόσδεσης τους σε αυτή. Επομένως, αρχικά θα παρατηρηθεί έκλυση των ασθενώς προσδεδεμένων πρωτεϊνών και στη συνέχεια εκλύονται οι ισχυρότερα προσδεδεμένες. Τα κλάσματα συλλέγονται ανά 1ml. Επομένως, μόλις η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης στη στήλη φτάσει το 60%, θα εκλουσθεί η ισχυρότερα προσδεδεμένη σε αυτή πρωτεΐνη, η PARN R99A. Τα κλάσματα στα οποία βρίσκεται η PARN R99A έχουν στο διάγραμμα οπτικής απορρόφησης την μεγαλύτερη OD στα 1070nm. Τα κλάσματα αυτά φυλάσσονται στο ψυγείο προκειμένου να υποβληθούν σε έλεγχο καθαρότητας στο επόμενο στάδιο του πειράματος

#### Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης

Παρασκευάστηκε stock διάλυμα BSA 10mg/ml. Από αυτό φτιάχτηκαν διαλύματα συγκέντρωσης από 0 μέχρι 2,00mg/ml (0, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2). Από κάθε δείγμα παραλαμβάνουμε 20μl και προσθέτουμε 1 ml Bradford, φυλάσσονται στο σκοτάδι για 15 λεπτά. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάστηκε μετρώντας τις απορροφήσεις των διαλυμάτων φωτομετρικά στα 595nm. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 11*, προκύπτει μια γραμμική σχέση με εξίσωση:

$$A = 1,0595 \times C + 0,0316$$

Με την συγκεκριμένη εξίσωση υπολογίστηκε η ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών των δειγμάτων στα διάφορα στάδια της απομόνωσης.



Εικόνα 11: Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης της πρωτεΐνης BSA και η παρουσίαση της πρότυπης καμπύλης.

#### Δ) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, η οποία αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές, την πηκτή διχωρισμού (separating gel) και την πηκτή συγκέντρωσης (stacking gel). (Πίνακας 1 και Πίνακας 2 αντίστοιχα )

**Πίνακας 1 :** Σύσταση πηκτής διαχωρισμού 7,5%

Αντιδραστήρια	Όγκος
Ακρυλαμίδιο 40%	1,875ml
Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	2,5 ml
SDS 10%	100 μl
TEMED	8,0 μl
APS 10%	100 μl
ddH <sub>2</sub> O	5,475 ml

Η πηκτή συγκέντρωσης έχει μικρότερη πυκνότητα από το πήκτωμα διαχωρισμού και συγκεντρώνει τη ποσότητα των δειγμάτων που έχουμε φορτώσει

στα πηγάδια, τα οποία όταν εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού, διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Αρχικά η πηκτή διαχωρισμού τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται από πάνω της μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης για την ευθυγράμμιση της επιφάνειας της πηκτής. Αφού πήξει, αφαιρείται η ισοπροπανόλη και τοποθετείται στη συσκευή η πηκτή συγκέντρωσης ακριβώς πάνω από την πηκτή διαχωρισμού, η οποία αφήνεται να πήξει. Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν φορτωθούν στην πηκτή περιλαμβάνει την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού (4x) και τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η μετουσίωση επιτυγχάνεται με θέρμανση των δειγμάτων στους 98°C, για 5 λεπτά, έτσι ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος και όχι με βάση το φορτίο τους, το οποίο είναι ενιαία αρνητικό, εξαιτίας του SDS. Ακολούθως, αφού εξασφαλιστεί ότι η πηκτή είναι έτοιμη, φορτώνονται τα δείγματα, καθώς και οι μάρτυρες μοριακού βάρους, στις ειδικές υποδοχές της πηκτής και προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris, γλυκίνη, SDS), έτσι ώστε να έρχεται σε επαφή με την πηκτή. Τέλος, συνδέονται τα ηλεκτρόδια με την συσκευή τροφοδότησης και εφαρμόζεται τάση 100V, μέχρι τα δείγματα να διανύσουν την πηκτή συγκέντρωσης, ενώ μόλις φτάσουν στη πηκτή διαχωρισμού η τάση αυξάνεται στα 200V.

**Πίνακας 2 :** Σύσταση πηκτής συγκέντρωσης 5%

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Όγκος</b>
Ακρυλαμίδιο 40%	0,625 ml
Tris-HCl 0,5M (pH 6,8)	1,25 ml
SDS 10%	50 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l
APS 10%	25 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	3,03 ml

Το APS και το TEMED προστίθενται στο τέλος, καθώς είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου. Ακολουθεί, αφαίρεση της πηκτής συγκέντρωσης και χρώση της πηκτής διαχωρισμού με το διάλυμα χρωματισμού (stain solution).

#### Χρώση πηκτώματος ακρυλαμιδίου με Coomassie

- Τοποθετείται το πήκτωμα σε ποτήρι ζέσεως και προστίθεται οξικό οξύ 10%
- Βράσιμο στο φούρνο μικροκυμάτων και μεταφορά σε νέο ποτήρι ζέσεως, όπου προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης (Coomassie Brilliant Blue G250)
- Βράσιμο στο φούρνο μικροκυμάτων και έπειτα ήπια ανάδευση για 5΄
- Ξεπλένεται με νερό το πήκτωμα και τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως με οξικό οξύ 10%
- Βράσιμο στο φούρνο μικροκυμάτων
- Τοποθετείται σε νέο ποτήρι ζέσεως με οξικό οξύ 10%
- Ήπια ανάδευση

#### Χρώση πηκτώματος ακρυλαμιδίου με Silver Staining

- Τοποθετείται το πήκτωμα σε ποτήρι ζέσεως με το διάλυμα FIXATION διάλυμα για 20 λεπτά
- Αφαιρώ το FIXATION διάλυμα και προσθέτω τη μεθανόλη 50% για 10 λεπτά
- Αφαιρώ τη μεθανόλη 50% και προσθέτω ddH<sub>2</sub>O ο/η ή 5-6 πλύσεις των δέκα λεπτών η κάθε μία
- Αφαιρώ το ddH<sub>2</sub>O και προσθέτω το SENSITIVE διάλυμα 20-30 δευτερόλεπτα
- Αφαιρώ το SENSITIVE διάλυμα και ξεπλένω με ddH<sub>2</sub>O 2 φορές με 1 λεπτό η κάθε πλύση
- Αφαιρώ το ddH<sub>2</sub>O και προσθέτω το AgNO<sub>3</sub> διάλυμα για 20 λεπτά
- Αφαιρώ το AgNO<sub>3</sub> διάλυμα και προσθέτω το DEVELOPER διάλυμα ώσπου να εμφανιστούν οι μπάντες κουνώντας πολύ ελαφριά για 6-7 λεπτά περίπου (η φορμαδεΐδη προστίθεται λίγο πριν την προσθήκη του DEVELOPER διαλύματος στο ποτηρι ζέσεως)
- Αφαιρώ το DEVELOPER διάλυμα και προσθέτω το STOPPER διάλυμα

#### **E) Συμπύκνωση και Διαπίδυση**

Το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 3000g, στους 4 °C ανά 3 λεπτά ώστε να συμπηκνωθεί με φίλτρακι Vivaspin 4 santorius με cut off 10 μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Ένα κομμάτι μεμβράνης διαπίδυσης βράζετε σε υψηλή θερμοκρασία σε 2% w/v NaHCO<sub>3</sub> για 25 λεπτά και ξεπλένεται με αποστειρωμένο νερό. Σφραγίζεται η μεμβράνη από τη μία πλευρά με έναν κόμπο και ένα πιαστράκι και στη συνέχεια



μεταφέρονται με την πιπέτα τα κλάσματα από την στήλη στην μεμβράνη. Η μεμβράνη σφραγίζεται και από την άλλη πλευρά. Έπειτα αυτή στηρίζεται στο πάνω μέρος ποτηριού ζέσεως των 500ml, το οποίο περιέχει διάλυμα αντίδρασης χωρίς DTT , έτσι ώστε το τμήμα της μεμβράνης που περιέχει τα δείγματα να βρίσκεται μέσα στο διάλυμα. Το ποτήρι ζέσεως τοποθετείται σε συσκευή μαγνητικής ανάδευσης με ένα μαγνήτη έτσι ώστε να αναδεύεται το διάλυμα στους 4 °C ο/ν. Την επομένη το διάλυμα μοιράζεται σε μικροσωλήνες φυγοκέντρησης (eppendorf tubes των 1,5ml) και αποθηκεύονται με αποστειρωμένη γλυκερόλη στους -80 °C .

### **ΣΤ) Μέτρηση της ενεργότητας της PARN με κυανό του μεθυλενίου**

#### Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στη μείωση της διαφοράς απορρόφησης (ΔΑ) του πολυ(Α) στα 662nm όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του [51,52]. Σύμφωνα με την αρχή αυτή και με βάση την πρότυπη καμπύλη γίνεται η μέτρηση της συγκέντρωσης σε μία αντίδραση των 100μl, με προσθήκη 900μl διαλύματος κυανού του μεθυλενίου. Το τελευταίο περιέχει κυανό του μεθυλενίου το οποίο προσδένεται στο πολυμερές πολυ(Α) και EDTA σε συγκέντρωση 2mM το οποίο δεσμεύει τα ιόντα μαγνησίου. Τα ιόντα μαγνησίου είναι απαραίτητα για την λειτουργία του ενζύμου και έτσι το EDTA δεσμεύοντας τα ιόντα σταματάει την αντίδραση. Μείωση της συγκέντρωσης του πολυ(Α), που οφείλεται σε ενζυμική δράση έχει ως συνέπεια την αύξηση της απορρόφησης. Έτσι για την μέτρηση της ενεργότητας προστίθεται ίδια ποσότητα πολυ(Α) στο τυφλό και στην αντίδραση, όπου η τιμή της απορρόφησης, μετά από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα στην αντίδραση, είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας πολυ(Α) που αποικοδομήθηκε.

#### Κατασκευή πρότυπης καμπύλης πολυ(Α)

Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης ετοιμάστηκαν σύμφωνα με τον πίνακα 3. Μετά την προσθήκη του διαλύματος κυανού του μεθυλενίου τα δείγματα επώαστηκαν για 15 λεπτά στους 30° C στο σκοτάδι και η φωτομέτρηση έγινε στα 662nm. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυ(Α) (10μg/ml τελική συγκέντρωση). Υπολογίστηκε η διαφορά απορρόφησης (ΔΑ) θέτοντας το τυφλό ως 0. Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει η

εξίσωση από την οποία μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα πολυ(A) που υδρολύεται κατά τις ενζυμικές αντιδράσεις.

**Πίνακας 3 :** Πρότυπη καμπύλη πολυ(A)

Τελική συγκέντρωση πολυ(A) (10μg/ml)	0	2	4	6	8	10 (T)
Πολυ(A) 100μg/ml (μl)	0	20	40	60	80	100
Διάλυμα αντίδρασης (μl)	100	80	60	40	20	0
Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου (μl)	900	900	900	900	900	900

#### Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30° C. Για να υπολογιστεί ο βέλτιστος χρόνος αντίδρασης, πραγματοποιούνται πειράματα ενζυμικής δράσης στη βέλτιστη σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος  $K_m=30\mu\text{g/ml}$ , και σε καθορισμένους χρόνους σταματάει η αντίδραση με την προσθήκη 900μl ρυθμιστικού διαλύματος κυανού του μεθυλενίου και τα δείγματα φωτομετρούνται στα 662nm.

#### **Z) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native Gel)**

Η τεχνική αυτή διαφέρει κατά πολύ με την ηλεκτροφόρηση SDS - PAGE. Στην SDS ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται το απορρυπαντικό SDS για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών, ενώ στη NATIVE PAGE οι πρωτεΐνες δεν υποβάλλονται σε καμία επεξεργασία, βρίσκονται στη φυσική τους κατάσταση. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν κάποια απορρυπαντικά στην περίπτωση που πρέπει να γίνει λύση των κυττάρων και να ελευθερωθούν οι πρωτεΐνες. Στην native PAGE, τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών παραμένουν όσο το δυνατό περισσότερο ενωμένα, όπως ακριβώς βρίσκονται στο κύτταρο.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πρωτεϊνών μετά από τον καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας. Η προετοιμασία που πραγματοποιήθηκε είναι η εξής: σε 23,7μg δείγματος πρωτεϊνών προστίθενται 8μl

χρωστική. Το δείγμα αναδεύεται καλά και είναι έτοιμο να εισαχθεί στα κανάλια της πηκτής. Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών μέσω native PAGE είναι παραπλήσια της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE, με κύρια διαφορά την απουσία του απορρυπαντικού SDS και ότι η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκε στους 4 °C , στα 120Volt για περίπου 2 ώρες. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, η οποία αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές, την πηκτή διχωρισμού (separating gel) και την πηκτή συγκέντρωσης (stacking gel). (Πίνακας 4 και Πίνακας 5 αντίστοιχα )

**Πίνακας 4 :** Σύσταση πηκτής διαχωρισμού 8%

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Όγκος</b>
Ακρυλαμίδιο 40%	2ml
Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	2,5 ml
TEMED	10 μl
APS 10%	50 μl
ddH <sub>2</sub> O	5,5 ml

**Πίνακας 5 :** Σύσταση πηκτής συγκέντρωσης 5%

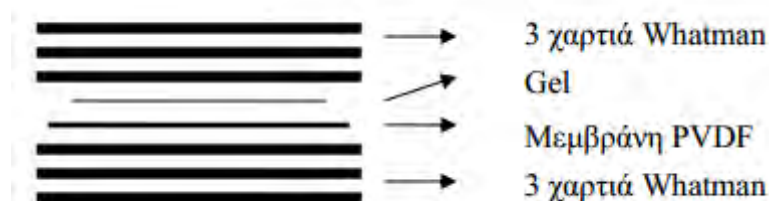
<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Όγκος</b>
Ακρυλαμίδιο 40%	0,4ml
Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	2,6 ml
TEMED	5 μl
APS 10%	20 μl
ddH <sub>2</sub> O	2,6 ml

Όπως και στην SDS-PAGE έτσι και εδώ το TEMED και το APS προστίθενται στο τέλος.

## **H)Western Blotting**

Η μέθοδος Western Blotting βασίζεται σε ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μίγματος πρωτεϊνών και εν συνεχεία μεταφορά τους στην επιφάνεια μιας μεμβράνης PVDF και επώαση με ειδικό αντίσωμα για την υπό μελέτη πρωτεΐνη. Η τεχνική αρχίζει με την προετοιμασία του separating gel και την τοποθέτησή του στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Ακολουθεί η παρασκευή του stacking gel και η προετοιμασία των δειγμάτων. Ακολουθεί το φόρτωμα των δειγμάτων στα κανάλια

του gel, γεμίζεται η δεξαμενή με Running Buffer και ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων για 45min στα 150Volts. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η μεμβράνη PVDF ενεργοποιείται σε μεθανόλη 100% για περίπου 2 λεπτά. Ακολουθεί η μεταφορά των διαχωρισμένων από την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών στη μεμβράνη PVDF. Τοποθετούνται 3 χαρτιά Whatman εμποτισμένα με Transfer Buffer στο κάτω ηλεκτρόδιο, εν συνεχεία τοποθετείται η μεμβράνη, το gel και άλλα 3 χαρτιά Whatman, με προσοχή ώστε να μην εγκλωβιστεί αέρας στο σχηματιζόμενο «sandwich» (Εικόνα 12). Εφαρμόζεται τάση 150mA για 90min. Μετά το πέρας της μεταφοράς, αφαιρούνται οι μεμβράνες από το «sandwich» και πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου βάφεται με Coomassie για να δούμε αν πραγματοποιήθηκε σωστά η μεταφορά των πρωτεϊνών στην PVDF μεμβράνη. Εν συνεχεία η μεμβράνη PVDF εμβαπτίζεται με Blocking Buffer για 1 ώρα υπό ανάδευση. Αφαιρούμε το Blocking Buffer και προσθέτουμε το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα (antisome anti-PARN), το αφήνουμε στους 4 °C υπό ανάδευση ο/ν. Αφαιρώ το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα και πραγματοποιώ 5 πλύσεις των 15 λεπτών με Washing Buffer. Αφαιρώ το Washing Buffer και προσθέτω το 2<sup>ο</sup> αντίσωμα για 1 ώρα υπό ανάδευση. Αφαιρώ το 2<sup>ο</sup> αντίσωμα και πραγματοποιώ 6 πλύσεις των 15 λεπτών με το Washing Buffer και φέρεται το διάλυμα 1:1 ECL από τους 4 °C σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά και την τελευταία πλύση και αφού έχει παρασκευαστεί το διάλυμα ECL, η μεμβράνη PVDF στραγγίζεται και φέρεται σε ένα κομμάτι διαφανούς μεμβράνης. Προστίθεται όσο ECL απαιτείται για να καλυφθεί όλη η επιφάνεια της μεμβράνης και αναμένεται 3 λεπτά στο σκοτάδι. Η μεμβράνη στραγγίζεται και μεταφέρεται face down σε ένα δεύτερο κομμάτι διαφανούς μεμβράνης. Στη συνέχεια μεταφέρονται στην κασετίνα του film, όπου στερεώνονται. Γίνεται εμφάνιση της μεμβράνης PVDF με ειδικό πρόγραμμα στο μηχάνημα εμφάνισης.

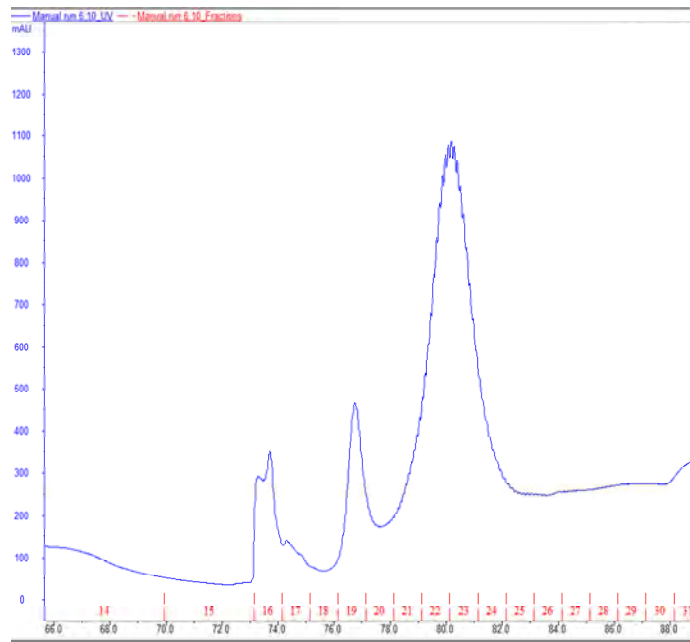


Εικόνα 12: προβολή τοποθέτησης της μεμβράνης PVDF, gel και τα χαρτιά Whatman.

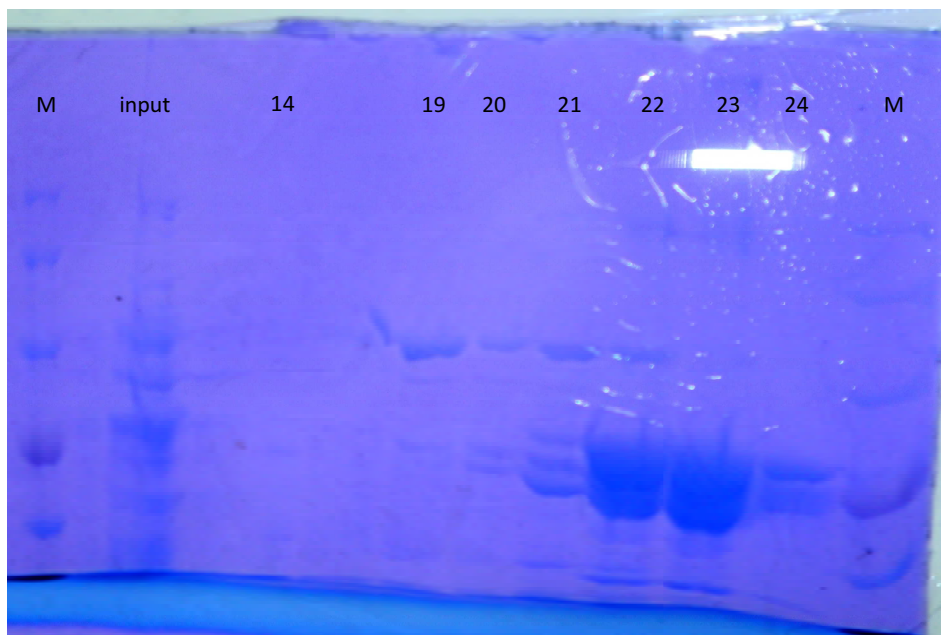
#### 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

##### Δοκιμασία υπερέκφρασης και απομόνωση της PARN R99A

Αρχικά, κύτταρα BL21 (GOLD) μετασχηματίστηκαν με πλασμίδιο από τις αποικίες που επιβεβαιώθηκαν θετικές για την επιθυμητή μετάλλαξη. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα ενοφθαλμίστηκαν σε καλλιέργεια LB Broth 5ml (37°C, 210rpm, ο/η) και έπειτα η καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε 1000ml (500 x 2) φρέσκο θρεπτικό μέσο. Όταν η απορρόφηση της καλλιέργειας έφτασε  $A_{600}^1=0,641$  και  $A_{600}^2=0,547$ , που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης, πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης της PARN(R99A) με χρήση IPTG τελικής συγκέντρωσης 1mM για 4 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση της καλλιέργειας και συλλογή του ιζήματος. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης, όπου πραγματοποιήθηκε σπάσιμο των κυττάρων με υπέρηχους. Το ομογενοποίηση φυγοκεντρήθηκε (12.000rpm, 60min, 4°C) και συλλέχθηκε το υπερκείμενο για απομόνωση του ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας (*HisTrap Ni Sepharose*) (Εικόνα 13). Συλλέχθηκαν κλάσματα έκπλυσης και τα κλάσματα έκλουσης. Η μέτρηση ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης από τα κλάσματα της χρωματογραφίας έγινε με τη μέθοδο Bradford και η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της PARN(R99A) έγινε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου 7,5% (*SDS-PAGE*) (Εικόνα 14). Ηλεκτροφορήθηκαν τα δείγματα όπου είχαν μέγιστο OD, δηλαδή αυτά που ενδέχεται να έχουν την πρωτεΐνη μας. Τα εμπλουτισμένα δείγματα όπου περιέχουν την πρωτεΐνη μας καθαρή συμπυκνώθηκαν και μεταφέρθηκαν για διαπίδυση για 12 ώρες σε διάλυμα αντίδρασης για την απομάκρυνση του ιμιδαζολίου. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford ήταν 0,79mg/ml. Με τον ίδιο τρόπο υπερεκφράστηκε και απομονώθηκε η αγρίου τύπου PARN με μοριακή μάζα 74kDa, η συγκέντρωση της οποίας σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford ήταν 0,93mg/ml.



Εικόνα 13: Αποτελέσματα απομόνωσης της PARN R99A με χρωματογραφία συγγένειας.



Εικόνα 14: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE) των κλασμάτων απομόνωσης της PARN R99A. Η διαδρομή 14 είναι το Flow Throw και οι 19-24 είναι τα κλάσματα, όπου έχουμε το μέγιστο OD (το input είναι δείγμα πρωτεΐνης πριν τον καθαρισμό). Η χρώση πραγματοποιήθηκε με Coomassie Brilliant Blue.

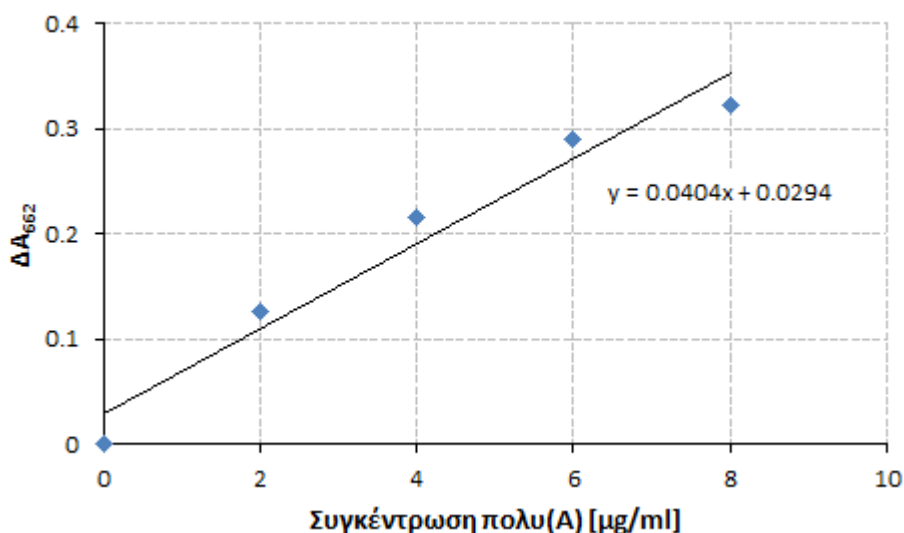
#### Μέτρηση της ενεργότητας της PARN R99A με κυανό του μεθυλενίου

##### Πρότυπη καμπύλη πολυ(A)

Τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης προετοιμάστηκαν σύμφωνα με τον πίνακα 3. Μετά την προσθήκη του διαλύματος κυανού του μεθυλενίου τα δείγματα επώαστηκαν για 15min στους 30°C και η φωτομέτρηση έγινε στα 662nm. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυ(A) (10μg/ml τελική συγκέντρωση). Υπολογίστηκε η διαφορά απορρόφησης (ΔA) θέτοντας το τυφλό ως 0. Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει η γραμμική σχέση με την εξίσωση:

$$A = -0.0404 \times C(\mu\text{g/ml}) + 0.3036$$

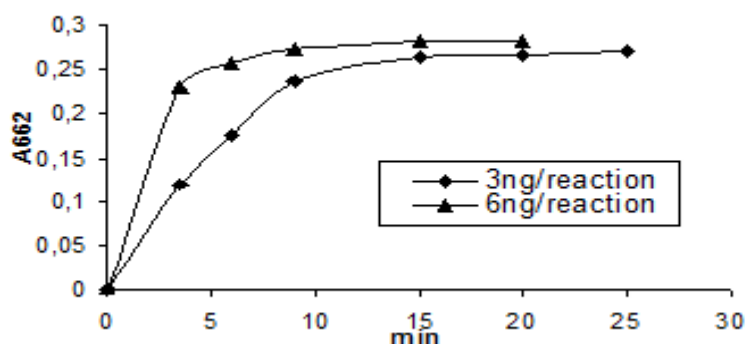
Με τη συγκεκριμένη εξίσωση μπορούν να υπολογιστούν οι απορροφήσεις των ενζυμικών αντιδράσεων σε πολυ(A) που αποικοδομήθηκε κατά τις αντιδράσεις (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Πρότυπη καμπύλη πολυ(A).

#### Χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης

Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 30°C. Βασιζόμενοι σε προηγούμενη εργασία, καθορίστηκε ως ιδανική ποσότητα ενζύμου για τα παρόντα πειραματικά αποτελέσματα τα 3ng PARN/αντίδραση και ελάχιστος χρόνος αντίδρασης 15min για την PARN (Εικόνα 16). Η συγκέντρωση πολυ(A) κυμαίνεται από 7,5 έως 60,0μg/ml για να είναι εντός των ορίων γραμμικότητας της μεθόδου [54].



Εικόνα 16: Χρονοκαμπύλη με 6ng και 3ng PARN/αντίδραση σε συγκέντρωση πολυ(A) 60mg/ml (ενδεικτικά δεδομένα από διπλωματική εργασία Ζωής Μπαρού, στο TBB).

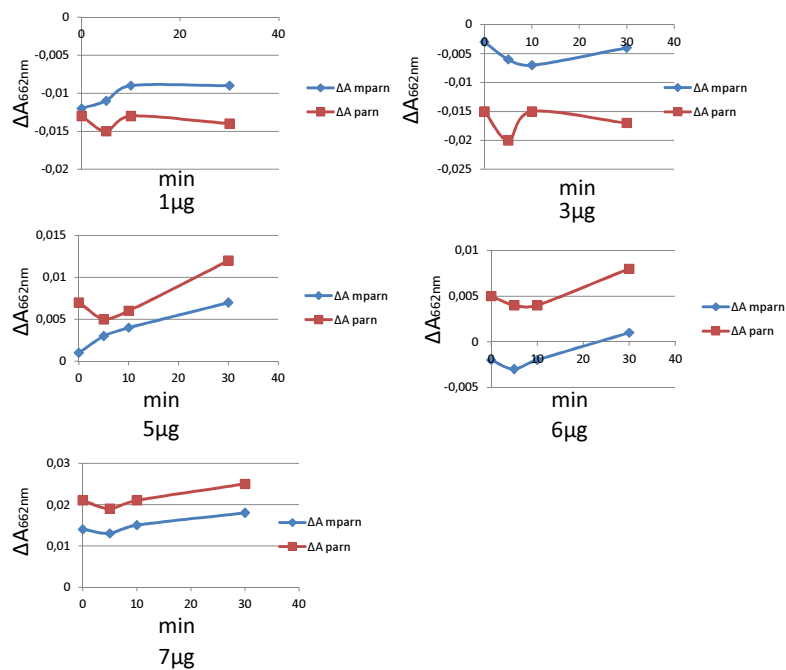
#### Επίδραση της μετάλλαξης R99A στην ενεργότητα της PARN

Για την παρατήρηση της επίδρασης της μετάλλαξης στη δραστικότητα του ενζύμου, πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις στους 30°C και σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος (1,3,5,6,7μg πολυ(A)), μία με το ένζυμο αγρίου τύπου και μία για το μεταλλαγμένο ένζυμο. Οι ποσότητες των ενζύμων υπολογίστηκαν για το 1μg υποστρώματος (πολυ(A)) και μαζί να ισχύει η συνθήκη  $[E]/[S]=1/5$ . Κάθε φορά που αυξανόταν η συγκέντρωση του υποστρώματος μειωνόταν η ποσότητα του διαλύματος αντίδρασης που προσθέτονταν, ώστε να έχουμε τελική όγκο αντίδρασης 1ml (η ποσότητα του κυανού του μεθυλενίου παραμένει σταθερή στα 900μl). Τα διαλύματα των αντιδράσεων φωτομετρήθηκαν στα 662nm μετά την προσθήκη διαλύματος methylene blue σε τέσσερις διαφορετικούς χρόνους (0, 5, 10 και 30 λεπτά), το οποίο σταματά τις αντιδράσεις. Στις εικόνες που ακολουθούν (Εικόνα 17 και Εικόνα 18) παρουσιάζονται τα διαγράμματα των αποτελεσμάτων από δύο επαναληπτικά πειράματα. Για κάθε επανάληψη, παρατίθενται ένα διάγραμμα απορρόφησης του ενσωματωμένου κυανού του μεθυλενίου στο πολυ(A) στα 662nm προς το χρόνο αντίδρασης. Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα, η απορρόφηση της PARN R99A είναι μειωμένη σε σχέση με αυτή της PARN καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Ακόμη, διαπιστώνουμε από την Εικόνα 19 πως η ενεργότητα της PARN R99A είναι μικρότερη από της PARN καθώς η απορρόφηση της PARN είναι μικρότερη άρα καταναλώνει περισσότερο υπόστρωμα. Επίσης, παρατηρείται μείωση της απορρόφησης του κυανού του μεθυλενίου καθώς προχωρά η αντίδραση και από τα

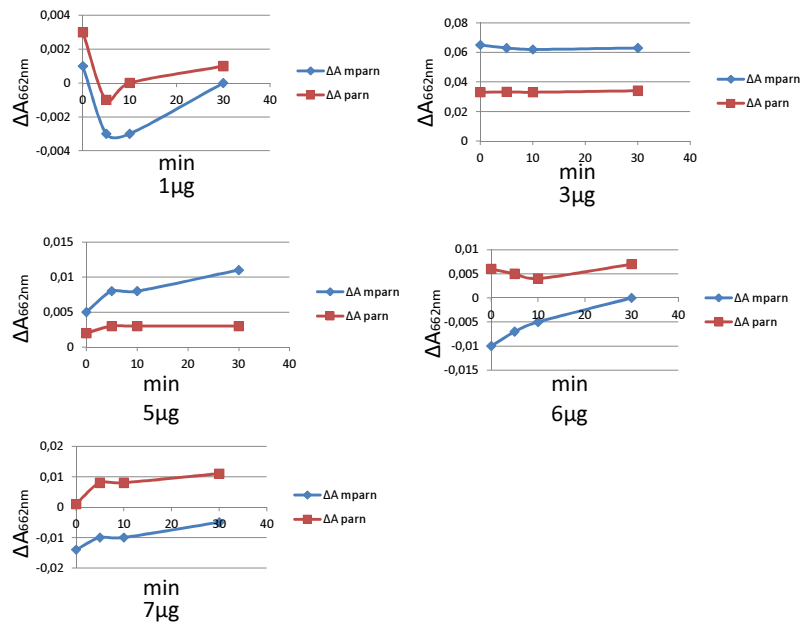


δύο ένζυμα σύμφωνα με το ίδιο πρότυπο, γεγονός που συμβαδίζει με τις πληροφορίες που υπάρχουν ως τώρα για τον τρόπο δράσης της PARN.

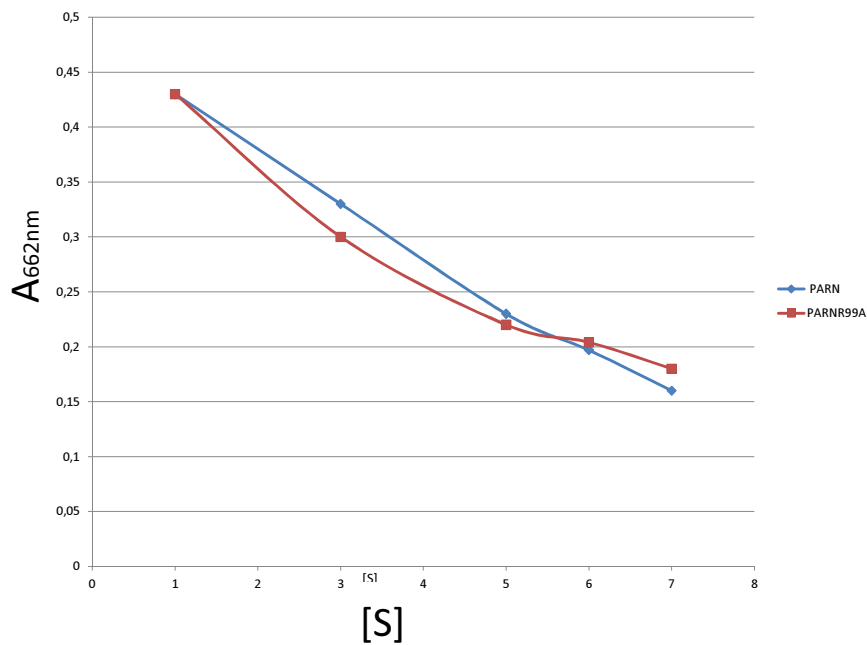
Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν οι κινητικές σταθερές  $K_M$  και  $V_{max}$  της PARN R99A (Πίνακας 6). Η σύγκριση με τις αντίστοιχες σταθερές της αγρίου τύπου PARN δεν έδειξε σημαντικές διαφορές. Η μικρή μείωση στην  $K_M$  δείχνει πως η μετάλλαξη πράγματι επέδρασε στην πρόσδεση του υποστρώματος στο δραστικό κέντρο, ενώ ο ρυθμός της αντίδρασης δεν άλλαξε σημαντικά (βλ συζήτηση).



Εικόνα 17: Εξέλιξη της μεταβολής της απορρόφησης κατά τη διάρκεια της αντίδρασης ( $1^{\eta}$  μέτρηση)



Εικόνα 18: Εξέλιξη της μεταβολής της απορρόφησης κατά τη διάρκεια της αντίδρασης ( $2^{\eta}$  μέτρηση)



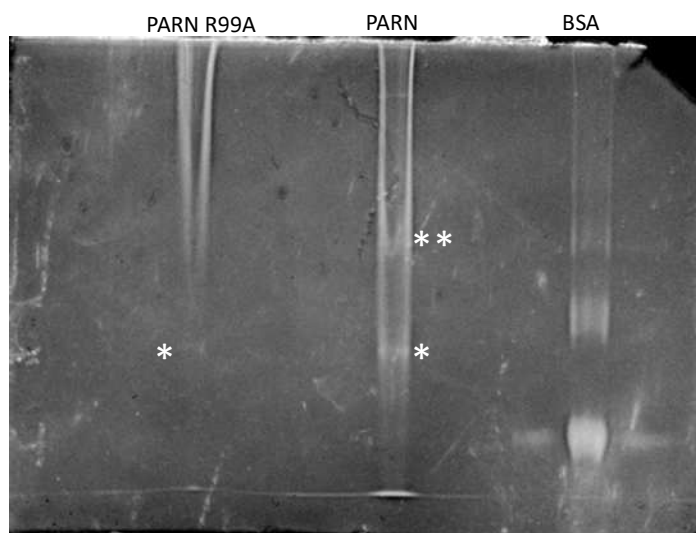
Εικόνα 19: Στη συγκεκριμένη γραφική παράσταση παρατηρούμε σε σχέση με την αύξηση του υποστρώματος πως μεταβάλλεται η απορρόφηση στην PARN και στην PARN R99A (η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στο 30 λεπτό μετά την προσθήκη του ενζύμου)

**Πίνακας 6:** Κινητικές σταθερές της PARN R99A και PARN.

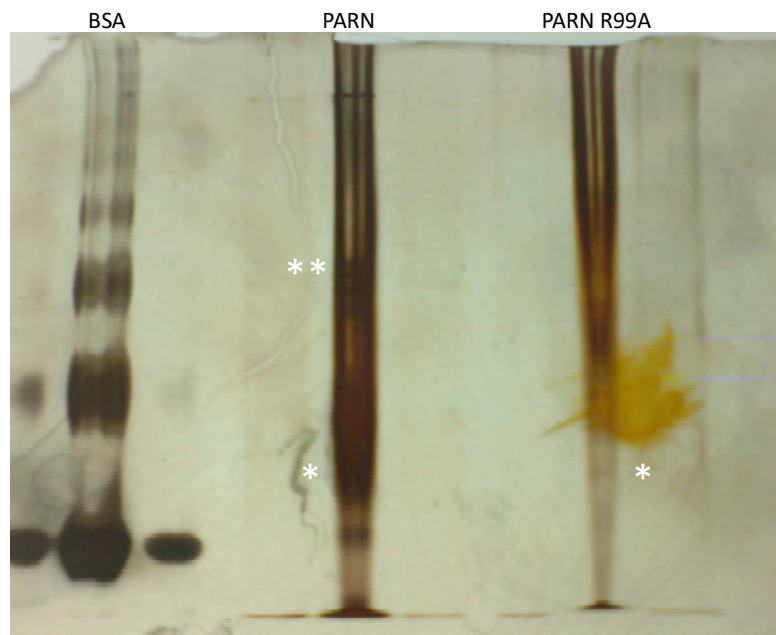
	$K_M$ μg poly(A)/ml	$V_{max}$ μg poly(A)/(ml min)
PARN	$4.2 \pm 0.6$	$0.14 \pm 0.01$
PARN R99A	$6.1 \pm 1.8$	$0.10 \pm 0.02$

Επίδραση της μετάλλαξης R99A στον ομοδιμερισμό της PARN

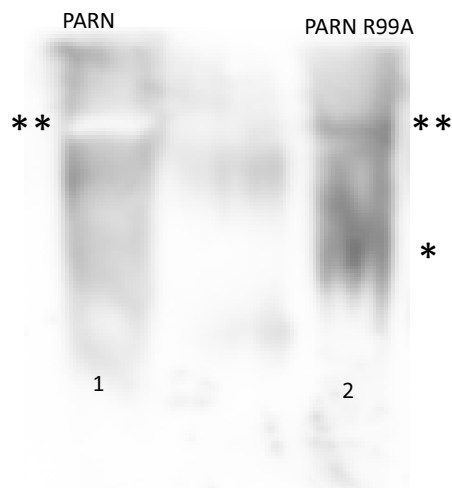
Για την συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήσαμε ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακριλαμίδιου με μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native Gel). Τα δείγματα που χρησιμοποιήσαμε για την συγκεκριμένη ηλεκτροφόρηση ήταν 23,7μg πρωτεΐνης τόσο της PARN όσο και της PARN R99A (χρησιμοποιήθηκε σαν control και η BSA). Τα δείγματα δεν προήλθαν σε διαδικασία μετουσίωσης καθώς δεν θέλουμε την πρωτεΐνη αποδιαταγμένη. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στους 4° C για περίπου 2 ώρες στα 100Volt. Η χρώση της πηκτής έγινε με Coomassie Brilliant Blue (Εικόνα 20), Silver Staining (Εικόνα 21). Ακόμη, πραγματοποιήθηκε και η μέθοδος Western Blotting για την συγκεκριμένη πηκτική (Εικόνα 22).



Εικόνα 20: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (native) και χρώση με Coomassie Brilliant Blue. \* μονομερές, \*\* διμερές.



Εικόνα 21: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης Native Gel και χρώση αργύρου (silver staining). \* μονομερές, \*\* διμερές.



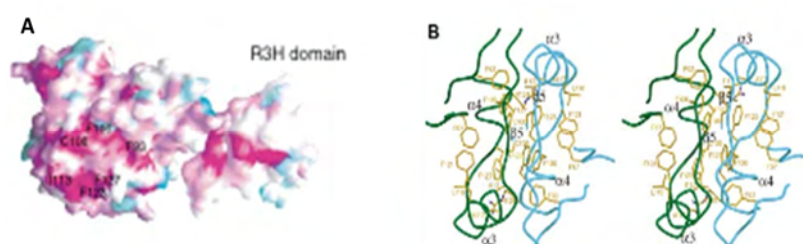
Εικόνα 22 : Αποτελέσματα Western Blotting με αντίσωμα έναντι της PARN. \* μονομερές, \*\* διμερές.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Βιοχημικές και δομικές μελέτες αποκάλυψαν ότι η PARN συγκροτείται από δύο ίδιες υπομονάδες μάζας 74kDa. Το ενεργό της κέντρο αποτελείται από τέσσερα αμινοξέα (Asp28, Glu30, Asp292, και Asp382), τα οποία πιστεύεται ότι προσανατολίζουν τα σημαντικά για την κατάλυση δισθενή ιόντα. Επίσης, η His377 έχει προταθεί ως σημαντικό αμινοξύ για την ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου. Έτσι, η PARN κατατάσσεται στις DEDDh νουκλεάσες [43]. Δομικές μελέτες έχουν δείξει πως η καταλυτική περιοχή της PARN συμμετέχει στο σχηματισμό του διμερούς, όπου η πτύχωση b5 και οι έλικες a3 και a4 συνεισφέρουν καίρια στην μεσεπιφάνεια του διμερούς (Εικόνα 23 A). Ειδικότερα, οι έλικες a3 και a4 του ενός μονομερούς βρίσκονται απέναντι στις έλικες a4 και a3 του άλλου μονομερούς. Η πτύχωση b5 του ενός μονομερούς σχηματίζει με την αντίστοιχή της από το άλλο μονομερές μια αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια. Οι πλευρικές αλυσίδες των συντηρημένων αμινοξέων

Phe93, Cys108, Phe106, Ile113, Phe123 and Phe127 (Εικόνα 23B), του ενός μονομερούς σχηματίζει εκτενείς υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις με την ίδια ομάδα αμινοξέων από το άλλο μονομερές. Ας σημειωθεί πως η Phe123 (που είναι απaráλλακτη σε όλα τα είδη), εντοπίζεται στο κέντρο του υδρόφοβου πυρήνα που σχηματίζεται από τις πλευρικές αλυσίδες των Phe67, Ile113, Leu116, Ala117, Phe121 και Phe127 στο ίδιο μόριο και την πλευρική αλυσίδα της Phe127 και της μεθυλομάδας της Arg128 του άλλου μονομερούς (Εικόνα 23B). Αυτή η εκτενής μεσεπιφάνεια του διμερούς και η συμμετοχή σε αυτή πολλών υψηλά συντηρημένων αμινοξέων της PARN υπαινίσσεται πως η ομοδιμερής PARN είναι η δομική μονάδα της ενζυματικής ενεργότητας πρέπει δύο μονομερή να διμεριστούν για να δώσουν μια πλήρως δραστική ενζυμική μονάδα. Έτσι, η αντικατάσταση της Ile113 ή της Phe123 από Αλανίνη απενεργοποίησε το ένζυμο, ενώ η μετάλλαξη της Phe127 σε Ala μείωσε σημαντικά την ενζυμική δραστηριότητα [43]. Πρέπει να σημειωθεί, όμως, πως οι παρατηρήσεις των επιδράσεων των μεταλλάξεων αυτών στη δραστηριότητα, αφορούν σε μεταλλάγματα της PARN τα οποία ήταν διατηρούν ενζυμική ενεργότητα, αλλά τους έλειπαν σημαντικά τμήματα από το καρβόξυ τελικό τους άκρο, και τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής της δομής. Έτσι, ενώ η μετάλλαξη Phe123Ala στην πλήρους μεγέθους πρωτεΐνη έδειξε να μειώνει κατά τουλάχιστο 150 φορές τη δραστηριότητα, η μετάλλαξη Phe127Ala δεν έδειξε σημαντική αλλαγή. Αυτό υπαινίσσεται πως άλλες περιοχές

στην καρβόξυ-τελική περιοχή σταθεροποιούν τη δομή διμερούς του ενζύμου [43]. Επιπλέον, τα μεταλλάγματα Ile113Ala, Phe123Ala και Phe127Ala της PARN(1-537) είχαν ελάχιστη συγγένεια ή πρόσδεση για υπόστρωμα πολυ(A). Περαιτέρω αναλύσεις χρωματογραφίας της PARN(1-537) έδειξαν πως το μετάλλαγμα Phe127Ala απαντά κύρια σε μονομερή κατάσταση, ενώ τα Ile113Ala και Phe123Ala μετατρέπουν πλήρως την PARN από διμερή σε μονομερή κατάσταση [43]. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι οι μεταλλάξεις διαταράσσουν τη διμερή μορφή και αποσταθεροποιούν την αρχιτεκτονική της κοιλότητας όπου προσδένεται το RNA, επηρεάζοντας έτσι την δραστικότητα του ενζύμου η μεσεπιφάνεια διμερισμού και το δραστικό κέντρο της PARN(1-431) ακολουθούν η μια την άλλη, όπου η έλικα α3 εμπλέκεται τόσο στο διμερισμό, όσο και το σχηματισμό της κοιλότητας που προσδένει το RNA [43].



Εικόνα 23:

A. Μοριακή επιφάνεια της PARN(1-431) που εμπλέκεται στο διμερισμό του ενζύμου. Η εικόνα δείχνει υψηλά και χαμηλά συντηρημένες περιοχές που απαντώνται στην PARN και δείχνονται με χρωματική διαβάθμιση από το ιώδες προς το κυανό, αντίστοιχα. Τα συντηρημένα αμινοξέα είναι αριθμημένα στην εικόνα.

B. Στερεοδιάγραμμα της μεσεπιφάνειας διμερισμού της PARN(1-431). Τα δύο μόρια δείχνονται με βαθύ πράσινο και κυανό, αντίστοιχα. Τα αμινοξέα που εμπλέκονται στο διμερισμό δείχνονται με απεικόνιση stick model. [43].

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, όπου βασίζεται η παρούσα εργασία, η Arg99 αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό αμινοξύ, καθώς συμβάλλει στη σύνδεση των δύο μονομερών της PARN, συνεισφέρει στη σταθερότητα του ενζύμου και κατευθύνει το υπόστρωμα στη βέλτιστη θέση για την αντίδραση διάσπασης της πολυ(A) ουράς [50] Η Arg99 μαζί με τη His377 (που όπως προαναφέρθηκε συμμετέχει άμεσα στη κατάλυση) σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το πρώτο νουκλεοτίδιο αδενοσίνης της πολυ(A) ουράς από διαφορετικές διευθύνσεις. Τα

δύο αυτά αμινοξέα έχουν κρίσιμο ρόλο στη σταθερότητα της PARN και στον προσανατολισμό του υποστρώματος συμβάλλοντας έτσι στην ενζυμική αντίδραση. Με βάση τον σημαντικό διαφαινόμενο ρόλο της Arg99 στη δομή και στη λειτουργία της PARN, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε έκφραση και απομόνωση του ήδη υπάρχοντος ενζύμου όπου φέρει την μεταλλαγή R99A (προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας) σε καλλιέργειες *E.coli*. Ακολούθως συγκρίθηκε η ενεργότητα της με αυτή του ενζύμου αγρίου τύπου. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η ενεργότητα της PARN R99A είναι μειωμένη σε σύγκριση με αυτή του αγρίου τύπου (*Εικόνες 17,18 και 19*). Επίσης, όσον αφορά στη δομή του ενζύμου, τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες έδειξαν πως επηρεάζεται ως ένα βαθμό ο διμερισμός του (*Εικόνες 20, 21 και 22*).

Πρόσφατες μελέτες από το εργαστήριό μας έδειξαν πως οι Arg99 και Glh109 θα μπορούσαν να εμπλέκονται στη ρύθμιση της κατάλυσης. Στην εργασία ταυτοποιήθηκαν ορισμένα अपαράλλακτα (invariant) αμινοξέα και με βάση τη φυλογενετική ανάλυση (*Εικόνα 24*), το ενδιαφέρον εστιάστηκε στις Arg99 και Glh109. Η ανάλυση *in silico* έδειξε πως η Arg99 του μονομερούς A εκτείνεται στο καταλυτικό κέντρο του μονομερούς B, θυμίζοντας την Phe123, που αναφέρθηκε παραπάνω. Η μετάλλαξη Arg99Ala που μελετήσαμε στην εργασία έγινε στο πλήρους μήκους μονομερές της PARN. Όπως αναφέρθηκε, μεταλλάξεις σε κολοβωμένες μορφές της PARN είχαν σημαντική επίδραση στη δραστηριότητά τους, όχι όμως στην πλήρους μήκους PARN.

Όπως αναφέρθηκε και σε άλλες εργασίες που μελετούν σημειακές μεταλλάξεις στην PARN, ενώ οι μεταλλάξεις σε κολοβωμένες μορφές επηρέασαν τη λειτουργικότητα του ενζύμου, δεν έκαναν το ίδιο στο πλήρους μήκους ένζυμο [43]. Είναι λοιπόν πιθανό πως η μετάλλαξη Arg99Ala που μελετήσαμε στο πλήρες ένζυμο, να έχει τη συμμετοχή της στο διμερισμό και λειτουργία του ενζύμου, όπως φαίνεται από την αύξηση της  $K_M$  και λιγότερο στην αποτελεσματικότητα της αντίδρασης, όπως φαίνεται από την μικρότερη μεταβολή της  $V_{max}$ . Εφόσον, λόγω της μετάλλαξης, διαταράσσεται η συνοχή του διμερούς, όχι ιδιαίτερα έντονα, η μετάλλαξη στο ένα μονομερές επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος στο άλλο. Σημειώνεται εδώ, πως το προτεινόμενο μοντέλο κατάλυσης από την PARN, προτείνει πως το διμερές της PARN προσδένει ένα υπόστρωμα για κάθε αντίδραση που καταλύει, δηλαδή πολυ(A) ουρά, και όχι κάθε διμερές προσδένει

από ένα υπόστρωμα. Με άλλα λόγια, δύο μονομερή PARN διμερίζονται και καταλύουν τη βράχυνση μιας πολυ(A) ουράς ενός μορίου mRNA και όχι δύο mRNAs ταυτόχρονα, κάθε μονομερές όμως διατηρεί την ικανότητα να προσδένει και να καταλύει την αντίδραση [55]. Με αυτές τις παρατηρήσεις ερμηνεύονται οι αλλαγές στις κινητικές σταθερές ως συνέπεια της μετάλλαξης Arg99Ala.

Επιπλέον, έχοντας υπόψη πως η βράχυνση της πολυ(A) ουράς από την PARN γίνεται μέσω επεξεργαστικής διεργασίας (processivity) και σε αυτό συμβάλλει ο διμερισμός της [55] θα μπορούσε να υποθεθεί πως η μετάλλαξη Arg99Ala μπορεί να επηρεάσει τη επεξεργαστικότητά της. Για να αποφανθούμε όμως για την επίδραση της Arg99Ala σε αυτή τη λειτουργία απαιτούνται πιο ειδικές μελέτες.



Εικόνα 24: Sequence logo των μοτίβων που εντοπίζονται στην αλληλουχία αμινοξέων της PARN. Οι αριθμοί πάνω από τα αμινοξέα (συμβολίζονται με ένα γράμμα) είναι σύμφωνα με την αρίθμηση της ανθρώπινης PARN. Το ύψος κάθε γράμματος είναι ανάλογο της συχνότητας του αμινοξέος σε αυτή τη θέση. Τα γράμματα είναι τοποθετημένα με σειρά ώστε το πιο συχνά απαντώμενο να είναι ψηλότερα. Τα αμινοξέα που είναι απαραίλακτα φέρουν μια τελεία στο κάτω μέρος. [50]

### Προοπτικές, μελλοντικός σχεδιασμός

Μελλοντικά, σκοπεύουμε να μελετήσουμε την επίδραση της μετάλλαξης Arg99Ala στην επεξεργαστικότητα του ενζύμου. Επίσης, σχεδιάζεται η μελέτη του αμινοξέος Gln109, που όπως αναφέρθηκε αναμένεται να συμβάλλει στον ομοδιμερισμό της PARN. Ακόμα και την επίδραση του διπλού μεταλλάγματος, των Arg99 και Gln109, στην ενεργότητα αλλά και στον ομοδιμερισμό της πρωτεΐνης. Επίσης, είναι δυνατό να πραγματοποιηθούν πειράματα για κρυστάλλωση της δομής της PARN όπου φέρει τα μεταλλάγματα. Τέλος, σχεδιάζονται μελέτες in vivo σε κύτταρα για να διαπιστωθεί αν όντως η μειωμένη ενεργότητα της έχει επίδραση στα επίπεδα των mRNAs.



## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Garneau N, Wilusz J, Wilusz C (2007). "The highways and byways of mRNA decay". *Nature reviews, Molecular cell Biology* vol.8
2. Banerjee, A.K. 5'-Terminal cap structure in eukaryotic messenger ribonucleic acids. (1980) *Microbiol. Rev.* 44: 175–205
3. Darnell JE, Philipson L, Wall R, Adesnik M. Polyadenylic acid sequences: role in conversion of nuclear RNA into messenger RNA. (1971) *Science* 29:174(8):507–5
4. Fan J., Yang X., Wang W., Wood WH 3rd, Becker K.G., Gorospe M. Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays. (2002) *Proc Natl Acad Sci USA.* 16: 10611-10616
5. Cheadle C., Fan J., Cho-Chung Y.S., Werner T., Ray J., Do L., Gorospe M., Becker K.G. Control of gene expression during T cell activation: alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability. (2005) *BMC Genomics.*
6. Cougot N, Babajko S, Seraphin B (2004). "Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells". *J Cell Biol* 165, 31-40
7. Goldstrohm A.C., Wickens M.. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 337–344
8. He F., Li X., Spatrick P., Casillo R., Dong S., Jacobson A. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. (2003) *Mol Cell* . 6: 1439–1452
9. Houalla R., Devaux F., Fatica A., Kufel J., Barrass D., Torchet C., Tollervey D. Microarray detection of novel nuclear RNA substrates for the exosome. (2006) *Yeast.* 6: 439–454

10. Liu J., Carmell MA., Rivas FV., Marsden C.G., Thomson J.M., Song J.J., Hammond S.M., Joshua-Tor L. & Hannon G.J. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. (2004) *Science*. 305: 1437–1441
11. Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J. & Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. (2004) *Science*. 305: 1434–1437
12. Conti E. & Izaurralde E. Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. (2005) *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 316–325
13. Van Hoof A., Frischmeyer P.A., Dietz H.C. & Parker R. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. (2002) *Science*. 295: 2262–2264
14. Frischmeyer P.A., van Hoof A., O'Donnell K., Guerrierio A.L., Parker R. & Dietz H.C. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. (2002) *Science*. 295: 2258–2261
15. Doma M. K. & Parker R. RNA quality control in eukaryotes. (2007) *Cell*. 131: 660–668
16. Bianchin C., Mauxion F., Sentis S., Séraphin B., Corbo L. Conservation of the deadenylase activity of proteins of the Caf1 family in human. (2005) *RNA*. 11: 487-94
17. Thore S., Mauxion F., Seraphin B. & Suck D. X-ray structure and activity of the yeast Pop2 protein: a nuclease subunit of the mRNA deadenylase complex. (2003) *EMBO Rep.* 4: 1150–1155

18. Doidge R, Mittal S, Aslam A, Winkler GS. Deadenylation of cytoplasmic mRNA by the mammalian Ccr4-Not complex. (2012) *Biochem Soc Trans*
19. Faber A. W., Van Dijk M., Raue H. A. & Vos J.C. Ng12p is a Ccr4p-like RNA nuclease essential for the final step in 3'-end processing of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. (2002) *RNA*. 8: 1095–1101
20. Deni C. L. & Chen J. The CCR4–NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism. (2003) *Prog. NuCleic Acid Res*. 73: 221–250
21. Wagner E., Clement S.L. & Lykke-Andersen J. An unconventional human CCR4–CAF1 deadenylase complex in nuClear cajal bodies. (2007) *Mol. Cell Biol*. 27: 1686–1695
22. Morita M. et al. Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers elevation of the p27Kip1 mRNA level and impairs cell growth. (2007) *Mol. Cell Biol*. 27: 4980–4990
23. Goldstrohm A.C., Hook B.A., Seay D.J. & Wickens, M. PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs. (2006) *Nature Struct. Mol. Biol*. 13: 533–539
24. Lejeune F., Li, X. & Maquat, L. E. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonuCleolytic activities. (2003) *Mol. Cell*. 12: 675–687
25. Chen C.Y. & Shyu, A.B. Rapid deadenylation triggered by a nonsense codon precedes decay of the RNA body in a mammalian cytoplasmic nonsense-mediated decay pathway. (2003) *Mol. Cell Biol*. 23: 4805–4813

26. Hilgers V, Teixeira D, Parker R. Translation-independent inhibition of mRNA deadenylation during stress in *Saccharomyces cerevisiae*. (2006) *RNA*
27. Conrad N.K., Shu M.D., Uyhazi K.E. & Steitz J.A. Mutational analysis of a viral RNA element that counteracts rapid RNA decay by interaction with the polyadenylate tail. (2007) *Proc. Natl Acad. Sci.* 104: 10412–10417
28. Eulalio A., Behm-Ansmant I. & Izaurralde E. P bodies: at the crossroads of posttranscriptional pathways. (2007) *Mol. Biol. Cell.* 8: 9–22
29. Conrad N.K., Shu M.D., Uyhazi K.E. & Steitz J.A. Mutational analysis of a viral RNA element that counteracts rapid RNA decay by interaction with the polyadenylate tail. (2007) *Proc. Natl Acad. Sci.* 104: 10412–10417
30. Kim J.H. & Richter J.D. Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic polyadenylation. (2006) *Mol. Cell.* 24: 173–183
31. Ezzeddine N. et al. Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a PABP-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation. (2007) *RNA.* 27: 1084–1091
32. Hook B.A., Goldstrohm, A.C., Seay, D. J. & Wickens, M. Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. (2007) *J. Biol. Chem.* 282: 15430–15438
33. Voeltz G.K., Ongkasuwan J., Standart N. & Steitz J. A novel embryonic poly(A) binding protein, ePAB, regulates mRNA deadenylation in *Xenopus* egg extracts. (2001) *Genes Dev.* 15: 774–788
34. Balatsos N.A., Nilsson P., Mazza C., Cusack S. & Virtanen A. Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC). (2006) *J. Biol. Chem.* 281: 4517–4522

35. Funakoshi Y. et al. Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. (2007) *Genes Dev.* 21: 3135–3148
36. Standart N. & Jackson R. J. MicroRNAs repress translation of m7Gppp-capped target mRNAs in vitro by inhibiting initiation and promoting deadenylation. (2007) *Genes Dev.* 21: 1975–1982
37. Colegrove-Otero L.J., Minshall N. & Standart N.. RNA-binding proteins in early development. (2005) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40: 21–73
38. Behm-Ansmant I. et al. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4: NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. (2006) *Genes Dev.* 20: 1885–1898
39. Emiliano P. Ricci et al. Activation of a microRNA response in trans reveals a new role for poly(A) in translational repression. (2011) *NuCleic Acids Res.* 17: 1093
40. Alan R. Godwin, Shihoko Kojima, Carla B. Green, Jeffrey Wilusz. Kiss your tail goodbye: The role of PARN, Nocturnin, and Angel deadenylases in mRNA biology(2013) *Biochimica et Biophysica Acta*
41. Berndt H, Harnisch C, Rammelt C, et al. (2012). Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA* 18:958–72.
42. A.C. Goldstrohm, M. Wickens, Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 337–344.

43. M. Wu, M. Reuter, H. Lilie, Y. Liu, E. Wahle, H. Song, Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN, *EMBO J.* 24 (2005) 4082–4093.
44. Yang W. (2011). NuCleases: diversity of structure, function and mechanism. *Q Rev Biophys* 44:1–93.
45. Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, et al. (2011). CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. *NuCleic Acids Res* 39:D225–9.
46. Eckmann CR, Rammelt C, Wahle E. (2011). Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2:348–61.
47. Lee JE, Lee JY, Trembly J, et al. (2012). The PARN deadenylase targets a discrete set of mRNAs for decay and regulates cell motility in mouse myoblasts. *PLoS Genet* 8:e1002901.
48. P. Maragozidis, M. Karangeli, M. Labrou, G. Dimoulou, K. Papaspyrou, E. Salataj, S. Pournaras, P. Matsouka, K.I. Gourgoulianis, N.A. Balatsos, Alterations of deadenylase expression in acute leukemias: evidence for poly(a)-specific ribonuClease as a potential biomarker, *Acta Haematol.* 128 (2012) 39–46.
49. T. Nagata, S. Suzuki, R. Endo, M. Shirouzu, T. Terada, M. Inoue, T. Kigawa, N. Kobayashi, P. Güntert, A. Tanaka, Y. Hayashizaki, Y. Muto, S. Yokoyama, The RRM domain of poly(A)-specific ribonuClease has a noncanonical binding site for mRNA cap analog recognition, *NuCleic Acids Res.* 36 (2008) 4754–4767.
50. Vlachakis D., Pavlopoulou A., Tsiliki G., Komiotis D., Stathopoulos C., Balatsos N.A.A., Kossida S. An Integrated *In Silico* Approach to Design Specific Inhibitors Targeting Human Poly(A)-Specific RibonuClease. *PLoS ONE* 7(12): e51113 (2012)

51. Copeland PR and Wormington M. The mechanism and regulation of deadenylation: Identification and characterization of *Xenopus* PARN. *RNA* 7,875–886 (2001).
52. Cheng Y, Liu WF, Yan YB, Zhou HM. A nonradioactive assay for poly(A)-specific ribonuclease activity by methylene blue colorimetry. *Protein Pept. Lett.* 2006;13(2):125-8.
53. Marcelo Lopez-Lastra, Andrea Rivas and Maria Ines Barria. Protein synthesis in eukaryotes: The growing biological relevance of cap-independent translation initiation.
54. Balatsos N.A.A., Anastasakis D., Stathopoulos C. Inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by purine nucleotides: kinetic analysis. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2009; 48(26):6044-51
55. Virtanen A, Henriksson N, Nilsson P, Nissbeck M. Poly(A)-specific ribonuclease (PARN): an allosterically regulated, processive and mRNA cap-interacting deadenylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2013; 48:192-209.