

Περίληψη

Ραφαηλία Μπέτα

2023

Διερεύνηση και μελέτη απαδενυλασών που σχετίζονται με τον ημερονύκτιο ρυθμό

Διδακτορική διατριβή

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

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

μηχανισμού. Συνδυάζοντας τα βιοχημικά αποτελέσματα με ανάλυση *in silico*, αξιολογήσαμε τη σημασία των απαραίτητων για την κατάλυση αμινοξέων, οδηγώντας στην κατηγοριοποίηση της HESPERIN στην οικογένεια απαδενυλασών EEP (exonuclease-endonuclease-phosphatase). Παράλληλα, έχει περιγραφεί πως η PARN εκδηλώνει ρυθμικά επίπεδα mRNA σε ήπαρ μύος, χωρίς να είναι κάτι γνωστό για τα πρωτεϊνικά της επίπεδα ή το γενικότερο ρόλο που μπορεί να διαδραματίζει στο κirkάδιο ρολόι. Στο πλαίσιο της διατριβής, εξετάσαμε τα επίπεδά της PARN σε ανθρώπινα κύτταρα HEK293T μετά από εναρμόνιση με τον κirkάδιο ρυθμό αλλά και σε ήπαρ μύος. Επιπλέον, εξετάσαμε την αλληλεπίδρασή της PARN με το miR-29a, καθώς από μελέτες του εργαστηρίου έχει προκύψει πως σε κύτταρα πλακώδους καρκίνου του πνεύμονα αλληλεπιδρά η PARN εμπλέκεται στην ωρίμανση του, ενώ παράλληλα έχει περιγραφεί πως το miR-29a διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της περιόδου του ρολογιού σε ήπαρ ποντικών. Ανοσοκατακρήμνιση της PARN και ανάλυση των προσδεδεμένων σε αυτή μορίων RNA έδειξε πως αλληλεπιδρά με το miR-29a και ακολούθησε κατακρήμνιση του miR-29a σε διάφορα χρονικά σημεία του 24ώρου ώστε να ταυτοποιηθούν οι πρωτεϊνικές του αλληλεπιδράσεις. Τέλος, ο ρόλος της PARN στον κirkάδιο ρυθμό μελετήθηκε πραγματοποιώντας μεγάλης κλίμακας πρωτεομική μελέτη μετά από ανοσοκατακρήμνιση της PARN από ήπαρ ποντικών στη διάρκεια του 24ωρου. Η μελέτη αυτή αποκάλυψε νέους παράγοντες που αλληλεπιδρούν με την PARN σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές του 24ώρου αλλά και παράγοντες που υποδεικνύουν πως η PARN ίσως διαδραματίζει πολύ εξειδικευμένους ρόλους στο πλαίσιο του κirkάδιου ρυθμού, θέτοντας τα θεμέλια για τη μελέτη της σε διεργασίες που δεν έχει κάποιο γνωστό ρόλο.

SUMMARY

Rafailia Beta

2023

Investigation and study of deadenylases related to circadian rhythms

PhD thesis

University of Thessaly

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

In addition, we examined the interaction of PARN with miR-29a, as studies from our lab have shown that PARN interacts with miR-29a in squamous lung cancer cells and is involved in its maturation, while at the same time it is described that miR-29a plays an important role in period regulation of the clock in mouse liver. Immunoprecipitation of PARN and analysis of RNA molecules bound to it showed that it interacts with miR-29a, followed by precipitation of miR-29a at various time points of 24 hours to identify its protein interactions. Finally, the role of PARN in the circadian rhythm was studied by performing a large-scale proteomic study after immunoprecipitation of PARN from mouse liver over the course of 24 hours. This study revealed novel factors that interact with PARN at specific times of the 24-hour period, but also factors that indicate that PARN may have highly specialized roles within the circadian rhythm, laying the groundwork for the study of these previously unknown processes.