



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Επίδραση των ισομορφών της πολυ(Α)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης
(PARN) στο συστατικό RNA της τελομεράσης (TERC)

Πτυχιακή Εργασία
Κεραμάρη Σοφία (του Νικολάου)
Λάρισα 2024



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND
BIOTECHNOLOGY



Effect of Poly(A)-Specific Ribonuclease (PARN) isoforms on the
telomerase RNA component (TERC)

Diploma thesis
Keramari N. Sofia
Larisa 2024

Επιβλέπων Καθηγητής

Μπαλατσός Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Μπαλατσός Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Λεωνίδας Δημήτριος, Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γκάγκος Σαράντης, Ερευνητής Β', Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας
Αθηνών

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, από τον Νοέμβριο του 2023 έως και τον Αύγουστο του 2024, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας Νικόλαου Μπαλατσού.

Ευχαριστίες

Αρχικά ευχαριστώ πολύ τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, τον αναπληρωτή καθηγητή βιοχημείας κ. Μπαλατσό Νικόλαο, για την ευκαιρία ένταξης στην εργαστηριακή του ομάδα, καθώς και για την άρτια συνεργασία και τις συμβουλές που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της εργασίας μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον κ. Λεωνίδα Δημήτριο και τον κ. Γκάγκο Σαράντη ως μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής. Ένα μεγάλο ευχαριστώ ακόμη οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Μπαλή Λάμπρο για την άψογη καθοδήγηση, την υπομονή και στήριξή του κατά τη διενέργεια των πειραμάτων αυτών. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και τις φίλες μου που με στήριζαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου και με προτρέπουν ανελλιπώς να είμαι αισιόδοξη και να στοχεύω ψηλά.

Περιεχόμενα

Περίληψη	7
Abstract.....	8
1. Εισαγωγή.....	9
1.1 Πολυ(Α)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN).....	9
1.2 Το εναλλακτικό μετάγραφο PARN_V1	10
1.3 Η βιολογική λειτουργία της PARN	11
1.4 Το πρόβλημα της αντιγραφής των άκρων και το σύμπλοκο της τελομεράσης. 12	
1.5 Αντίστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης (TERT)	15
1.6 Το συστατικό RNA της τελομεράσης.....	15
1.7 Βιογένεση και ωρίμανση του TERC.....	16
1.8 Διαταραχές της βιολογίας των τελομερών (Telomere Biology Disorders, TBDs) και η σύνδεσή τους με την PARN	17
2. Σκοπός.....	20
3. Μέθοδοι και Υλικά	21
3.1 Κυτταροκαλλιέργειες	21
3.2 Αποσιώπηση PARN σε MCF7 (knock-down)	22
3.2.1 Εισαγωγή πλασμιδιακών φορέων σε βακτήρια για κλωνοποίηση	23
3.2.2 Απομόνωση των κλωνοποιημένων πλασμιδίων από τα βακτήρια	25
3.2.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πλασμιδιακού DNA	26
3.2.4 Διαμόλυνση κυττάρων MCF7 με πλασμίδια-φορείς	26
3.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot).....	27
3.3.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών	28
3.3.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	28
3.3.3 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη, επώασεις με αντίσωμα και εμφάνιση στο imager	30
3.4 Αντίστροφη Μεταγραφή – Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (RT-qPCR)	32
3.4.1 Εκχύλιση RNA.....	32
3.4.2 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (1 st strand synthesis).....	33
3.4.3 Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (qPCR).....	34
4. Αποτελέσματα	37
4.1 Κύτταρα MCF7.....	37
4.2 Κύτταρα MRC5	40

4.2.1	Θρεπτικό μέσο και αλλαγές επιπέδων PARN, PARN_V1 και TERC	40
4.2.2	Χρόνος καλλιέργειας και αλλαγές επιπέδων PARN, PARN_V1 και TERC	43
4.2.3	Διερεύνηση επιπέδων PARN, PARN_V1 σε επίπεδο πρωτεΐνης	45
5.	Συζήτηση	47
6.	Βιβλιογραφία	50

Περίληψη

Η πολυ(Α)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN) είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών σε μια πολυ-αδενυλική ουρά μορίων RNA, οδηγώντας έτσι στην αποικοδόμησή της. Η PARN_V1 είναι μια ισομορφή της PARN, αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος, η οποία απομονώθηκε στο εργαστήριο από κύτταρα κακοήθους πλευριτικού μεσοθηλιώματος. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η PARN φαίνεται να εμπλέκεται στην επεξεργασία των ολιγο(Α)-ουρών μη κωδικοποιητικών RNAs (ncRNAs), όπως είναι το συστατικό RNA της τελομεράσης (TERC), αυξάνοντας έτσι την σταθερότητά τους. Το TERC είναι απαραίτητο για την σύνθεση των τελομερών και κατ' επέκταση για τη διατήρηση της διαιρετικής ικανότητας των κυττάρων. Έρευνες δείχνουν ότι δυσλειτουργία στην PARN οδηγεί σε αδυναμία ωρίμανσης του TERC, αδυναμία αναπλήρωσης των τελομερών και σε εμφάνιση ασθενειών. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση της PARN σε κύτταρα MCF7 και επιβεβαιώθηκε η μείωση των επιπέδων του TERC με RT-qPCR. Επίσης πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κυττάρων MRC5 σε θρεπτικά μέσα με FBS και Panexin και τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western που ακολούθησε υποδεικνύουν πιθανή συσχέτιση μεταξύ της απουσίας αυξητικών παραγόντων, και κατ' επέκταση της εισόδου των ινοβλαστών σε κατάσταση ηρεμίας, με την ενίσχυση της παρουσίας της ισομορφής PARN_V1.

Abstract

Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) is an enzyme that catalyzes the cleavage of phosphodiester bonds in the poly-adenylated tail of RNA molecules, leading to their degradation. PARN_V1 is an isoform of PARN, the result of alternative splicing, which was isolated in the laboratory from malignant pleural mesothelioma cells. According to the existing literature, PARN appears to be involved in the processing of oligo(A) tails of non-coding RNAs (ncRNAs), such as the RNA component of telomerase (TERC), thereby enhancing their stability. TERC is essential for the elongation of telomeres and, consequently, for maintaining the cell's proliferative capacity. Research suggests that PARN dysfunction leads to impaired TERC maturation, inability to replenish telomeres, and the onset of diseases. In the present study, PARN silencing was performed in MCF7 cells, and the decrease in TERC levels was confirmed by RT-qPCR. Additionally, MRC5 cells were cultured in media containing FBS and Panexin, and the results of the subsequent Western blot analysis indicate a possible correlation between the absence of growth factors—and, consequently, the entry of fibroblasts into a quiescent state—and the enhanced presence of the PARN_V1 isoform.

1. Εισαγωγή

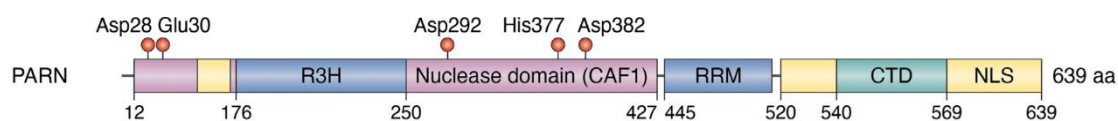
1.1 Πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN)

Τα κύτταρα για να εξασφαλίσουν την ομαλή και αποτελεσματική λειτουργία τους απαιτείται κάθε στιγμή να διαθέτουν τις απαραίτητες γι' αυτά πρωτεΐνες στις κατάλληλες ποσότητες. Για να επιτευχθεί αυτό χρειάζεται η έκφραση των γονιδίων τους να υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών εξαρτώνται άμεσα και από τη διαθεσιμότητα των mRNAs που τις κωδικοποιούν· αυτή με τη σειρά της εξαρτάται από τον ρυθμό μεταγραφής των γονιδίων αλλά και από τον ρυθμό αποικοδόμησης των mRNAs.

Ένα ώριμο και επεξεργασμένο mRNA διαθέτει δύο βασικά στοιχεία που παίζουν ρόλο στην σταθερότητα και τον ρυθμό αποικοδόμησής του: μια 5' καλύπτρα μεθυλογουανωσίνης και μια 3' πολυ(A) ουρά. Στα θηλαστικά, αμέσως μετά την σύνθεση στον πυρήνα, η πολυ(A) ουρά έχει μήκος περίπου 250 αδενοσίνες και μπορεί κατόπιν να αφαιρεθεί, να βραχυνθεί ή να επιμηκυνθεί (**Virtanen et al, 2013**). Η βράχυνση και η τελική απομάκρυνση της πολυ(A) ουράς είναι συχνά το πρώτο και ρυθμο-καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμηση ενός mRNA. Η πολυ(A) ουρά είναι μια δυναμική δομή, το μήκος της οποίας αλλάζει κατά τον βιολογικό κύκλο ενός mRNA και αποκρινόμενο σε διάφορα ερεθίσματα. Το μήκος της πολυ(A) ουράς ρυθμίζεται από τις πολυ(A) πολυμεράσες και μια ειδική κατηγορία ριβονουκλεασών, ειδικότερα εξωριβονουκλεασών, που είναι εξειδικευμένες να αποικοδομούν ουρές πολυ(A), γνωστές και ως απαδενυλάσες. Οι ριβονουκλεάσες διαθέτουν ικανότητα υδρόλυσης των φωσφοδιεστερικών δεσμών στο RNA. Στις ριβονουκλεάσες περιλαμβάνονται οι εξωριβονουκλεάσες και οι ενδοριβονουκλεάσες.

Με βάση την αλληλουχία και τη δομική σύγκριση περιοχών νουκλεασών, οι περισσότερες αποαδενυλάσες μπορούν να ταξινομηθούν είτε ως DEDD (DnaQ-like εξωνουκλεάσες) είτε ως EEP (εξωνουκλεάσες-ενδονουκλεάσες-φωσφατάσες, ή Exonuclease–Endonuclease Phosphatase). Οι νουκλεάσες τύπου DEDD, όπως PARN, PAN2 και Pop2p, είναι ειδικά ένζυμα για το RNA και περιέχουν έναν αριθμό από συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα ασπαρτικού (D) και γλουταμικού (E) σε ενεργή θέση που απαιτείται για την κατάλυση. Ειδικότερα, διαθέτουν έναν καταλυτικό πυρήνα αποτελούμενο από 4 όξινα αμινοξέα (Asp, Glu, Asp και Asp)· η τετράδα αυτή αποκαλείται μοτίβο DEDD. Επιπλέον, ένα κατάλοιπο ιστιδίνης ή τυροσίνης είναι υπεύθυνο για τον κατάλληλο προσανατολισμό και την ενεργοποίηση ενός μορίου νερού κατά την αντίδραση της υδρόλυσης. Με βάση αυτό το κριτήριο, το μοτίβο μιας νουκλεάσης μπορεί να χαρακτηριστεί ως DEDDh ή ως DEDDy. Τα πέντε αυτά αμινοξέα συγκροτούν μια αρνητικά φορτισμένη κοιλότητα, μέρος της επικράτειας νουκλεάσης των ενζύμων. Από την άλλη πλευρά, οι νουκλεάσες EEP, όπως η Ccr4p, ανήκουν σε μια πολύ ευρύτερη κατηγορία ενζύμων ικανή να αποικοδομεί τόσο RNA όσο και DNA μέσω και των δύο μηχανισμών: εξωνουκλεολυτικών και ενδονουκλεολυτικών.

Η πολυ(Α)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN) είναι μια 3' - 5' εξωριβονουκλεάση εξαρτώμενη από δισθενές μεταλλικό ιόν. Μεταξύ όλων των άλλων απαδενυλασών, έχει μοναδικό χαρακτηριστικό να αλληλεπιδρά άμεσα και με την 5' καλύπτρα και την 3' πολυ(Α) ουρά (Dehlin et al., 2000; Gao et al., 2000; Martinez et al., 2000, 2001) · η αλληλεπίδραση με την καλύπτρα καθιστά το ένζυμο ιδιαίτερος αποτελεσματικό, καθιστώντας την αντίδραση αποικοδόμησης επεξεργαστική (progressive). Η PARN εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς των ευκαρυωτικών οργανισμών, ενώ απουσιάζει από οργανισμούς όπως η ζύμη και η μύγα (*D.melanogaster*) (Virtanen et al, 2013). Το ένζυμο ανήκει στην υπερικογενεία των DnaQ-like εξωνουκλεασών, που όπως αναφέρθηκε, διαθέτουν έναν καταλυτικό πυρήνα αποτελούμενο από 4 όξινα αμινοξέα (Asp, Glu, Asp και Asp). Με κριτήριο της επικράτεια νουκλεάσης της, η PARN κατατάσσεται στην οικογένεια των CAF1 (διαθέτει μοτίβο DEDDh) ριβονουκλεασών (Virtanen et al, 2013). Εκτός από την επικράτεια νουκλεάσης, η PARN διαθέτει άλλες δύο επικράτειες με ιδιότητα σύνδεσης με το RNA. Αυτές είναι η επικράτεια RNA Recognition motif (RRM) και η RNA binding motif (R3H) (Εικόνα 1). Η επικράτεια RRM δεσμεύει την καλύπτρα και το RNA, με προτίμηση τις πολυ(Α) ουρές (Nagata et al, 2008). Η επικράτεια R3H είναι ζωτική για την καταλυτική ενεργότητα της PARN, σε περίπτωση που αφαιρεθεί το ένζυμο δε δύναται να δεσμεύσει την πολυ(Α) ουρά και η σταθερά K_M της αντίδρασης αυξάνεται 15 φορές, με την τιμή της V_{max} να παραμένει αναλλοίωτη (Wu et al, 2005).



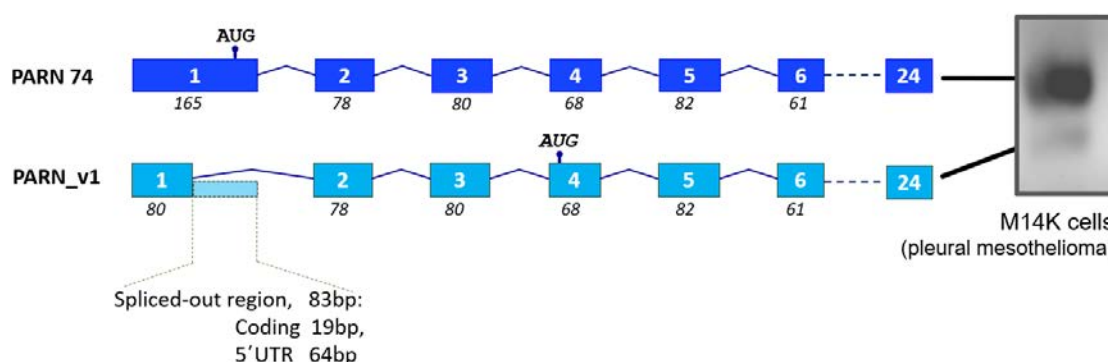
Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των καταλυτικών αμινοξέων και των επικρατειών της PARN (Huynh, 2023)

1.2 Το εναλλακτικό μετάγραφο PARN_V1

Η ανθρώπινη PARN αποτελείται από 639 αμινοξέα (μοριακό βάρος περίπου 73.5 kDa). Το γονίδιο που την κωδικοποιεί εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 16, αποτελείται από 24 εξόνια και έχει μήκος 195 kb. Το πλήρους μήκους, λειτουργικό ένζυμο κωδικοποιείται από ένα mRNA μήκους 3.1 kb, όμως φαίνεται ότι προκύπτουν τουλάχιστον δύο ακόμα εναλλακτικά μετάγραφα λόγω εναλλακτικού ματίσματος.

Στο εργαστήριο εντοπίστηκε ένα εναλλακτικό μετάγραφο (NM_001134477.3) και κλωνοποιήθηκε σε φορέα. Το μετάγραφο αυτό φαίνεται ότι μεταφράζεται και οδηγεί σε παραγωγή μια πρωτεΐνης 578 αμινοξέων, της PARN_V1. Στο συγκεκριμένο μετάγραφο απουσιάζουν 83 βάσεις από το εξόνιο 1, 64 από τις οποίες αποτελούν μέρος της 5' αμετάφραστης περιοχής, ενώ οι υπόλοιπες 19 μέρος του αναγνωστικού πλαισίου (συμπεριλαμβανομένου και του κωδικονίου έναρξης). Το επόμενο κωδικόνιο έναρξης εμφανίζεται στο εξόνιο 4, και επομένως από την PARN_V1 απουσιάζουν τα 61 πρώτα αμινοξέα (Εικόνα 2). Επιπλέον, από την πρωτεΐνη PARN_V1 απουσιάζουν τα

καταλυτικά αμινοξέα Asp28 και Glu30, και τα τελευταία πειράματα του εργαστηρίου έδειξαν ότι δεν εμφανίζει ενζυμική δραστικότητα, πολύ πιθανό ωστόσο να έχει κάποιον άλλο βιολογικό ρόλο.

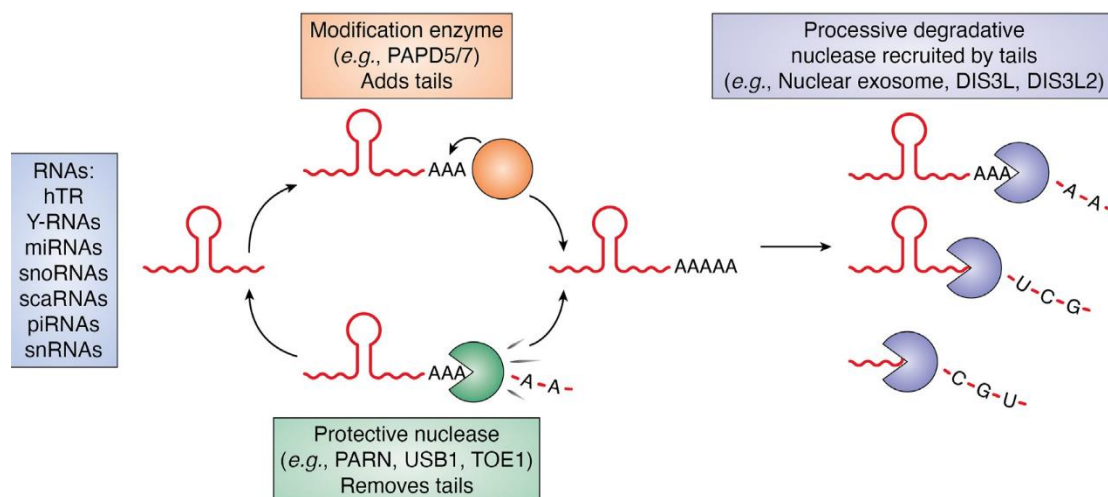


Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των μεταγράφων *PARN* πλήρους μήκους (μπλε) και *PARN_V1* (γαλάζιο). Δεξιά απεικονίζονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στα δύο μετάγραφα μετά από εκχύλιση καρκινικών M14K κυττάρων, qRT-PCR και ηλεκτροφόρηση

1.3 Η βιολογική λειτουργία της PARN

Η PARN ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά σε εκχυλίσματα από ωοκύτταρα *Xenopus laevis* (Körner et al, 1997), όπου διαπιστώθηκε να συμμετέχει στην ολική βράχυνση πολυ(A) ουρών (global poly(A) shortening) και αυτό οδήγησε στην θεωρία ότι συμμετέχει στον μεταβολισμό των mRNAs. Ωστόσο, έκτοτε τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι μάλλον η PARN δεν αποτελεί βασικό συντελεστή στην αποικοδόμηση των mRNAs (Son et al, 2018), αλλά εμπλέκεται σε αυτό υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Η PARN εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στον πυρηνίσκο (nucleolus) και σε κυττροπλασματικές εστίες (cytoplasmic foci). Θεωρείται, ότι ο βασικός της ρόλος είναι να καταλύει την ωρίμανση και να αυξάνει τη σταθερότητα μη-κωδικοποιητικών RNAs (non-coding RNAs, ncRNAs).

Όπως και τα mRNAs, τα ncRNAs υφίστανται τροποποιήσεις στο 3' άκρο τους, οι οποίες ρυθμίζουν την επεξεργασία ή/και την αποικοδόμησή τους. Μια τέτοια τροποποίηση είναι η προσθήκη ολιγο(A) ουράς. Σε αντίθεση με τα mRNAs, όπου μια μακριά πολυ(A) ουρά αυξάνει τον χρόνο ημιζωής και την σταθερότητα, στα ncRNAs η ολιγο(A) ουρά συνηθίζεται να προάγει την αποικοδόμηση (Εικόνα 3). Για παράδειγμα, ολιγοαδενυλίωση που πραγματοποιείται από τις πολυ(A)-πολυμεράσες PAPD5/PAPD7 σε miRNAs, στο συστατικό RNA της τελομεράσης, σε Y RNAs, σε rRNAs, σε snoRNAs, scaRNAs και snRNAs προσελκύει εξωνουκλεάσες οι οποίες τα αποικοδομούν (Huynh, 2023). Από την άλλη μεριά, οι απαδενυλάσες αφαιρώντας νουκλεοτίδια από τις ολιγο(A) ουρές, συμβάλλουν στην τελική διαμόρφωση των ncRNAs και αυξάνουν τη σταθερότητά τους. Μέχρι σήμερα τρεις απαδενυλάσες που επωμίζονται τον ρόλο αυτόν έχουν καταγραφεί, η USB1 (ονομάζεται και Mpn1), η TOE1 (Target of Erg1, ή Caf1z) και η PARN (Huynh, 2023).



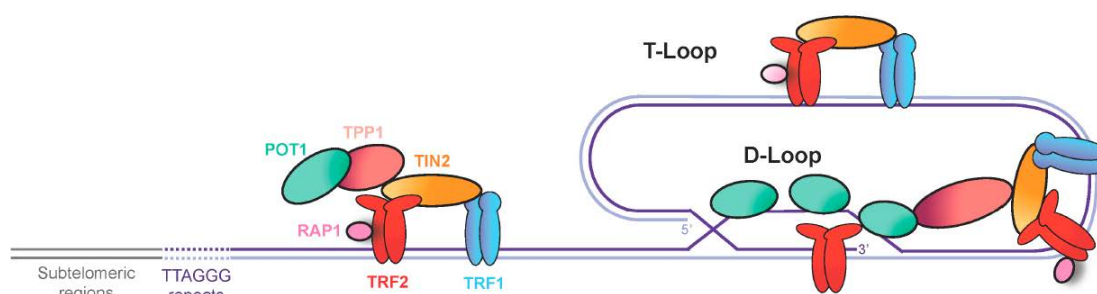
Εικόνα 3: Ρύθμιση της αποικοδόμησης των ncRNAs με προσθήκη ή αφαίρεση της ουράς ολιγο(A). Η αφαίρεση/επεξεργασία της ουράς από απαδενυλάσες προστατεύει τα ncRNAs από την αποικοδόμηση (Huyh, 2023)

Η PARN έχει βρεθεί πως προάγει την ωρίμανση και σταθεροποίηση του 18S rRNA (Montellese et al, 2017), snoRNAs, scaRNAs (Berndt et al, 2012), Y-RNAs (Shukla et al, 2017), piRNAs (Tang et al, 2017), miRNAs (Shukla et al, 2019) και του συστατικού RNA της τελομεράσης TERC (Telomerase RNA Component) (Moon et al, 2015). Το TERC είναι ένα μη-κωδικοποιητικό RNA που αποτελεί σημαντικό συστατικό του συμπλόκου της τελομεράσης, η οποία είναι υπεύνηνη για την σύνθεση των χρωμοσωμικών άκρων, δηλαδή των τελομερών. Το μήκος των τελομερών καθορίζει το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων και ανωμαλίες σε αυτό, σε επίπεδο οργανισμού μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές ασθένειες, όπως ο καρκίνος και οι διάφορες τελομεροπάθειες.

1.4 Το πρόβλημα της αντιγραφής των άκρων και το σύμπλοκο της τελομεράσης

Το γονιδίωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών αποτελείται από γραμμικά τμήματα DNA, συμπυκνωμένα με τη βοήθεια πρωτεϊνών, που ονομάζονται χρωμοσώματα. Τα άκρα των χρωμοσωμάτων, δηλαδή τα τελομερή, στα θηλαστικά περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (5'-TTAGGG-3') μήκους 5-10 χιλιάδες βάσεις και καταλήγουν σε μια προεξοχή μονόκλωνου DNA πλούσιου σε γουανίνη, μήκους 30-400 νουκλεοτίδια (3' overhang). Χάρη στο προεξέχον άκρο του το οποίο μπορεί να διεισδύσει στο δίκλωνο επαναλαμβανόμενο τμήμα του και να το υβριδοποιήσει, το DNA των τελομερών στα θηλαστικά μπορεί να αναδιπλωθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίσει έναν T-βρόχο (Εικόνα 4). Οι επαναλαμβανόμενες (5'-TTAGGG-3') των τελομερών αναγνωρίζονται από συγκεκριμένες πρωτεΐνες, οι οποίες όλες μαζί δημιουργούν το σύμπλοκο των σελτερινών (shelterin complex). Το σύμπλοκο αυτό απαρτίζεται από έξι πολυπεπτίδια: τους παράγοντες TRF1 και TRF2 (telomeric repeat binding factor 1/2) που δεσμεύονται στις τελομερικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και προσελκύουν τους RAP1 (repressor/activator protein 1), TIN2 (TRF1-interacting nuclear protein 2), TPP1 (tripeptidyl peptidase 1) και POT1 (protection of telomeres 1 protein). Η POT1 συνδέεται στο μονόκλωνο 3' άκρο του τελομερούς

(Diotti, 2011). Βασικός ρόλος αυτού του συμπλόκου είναι να προστατεύσει τα άκρα του χρωμοσώματος από το να αναγνωριστούν από τον μηχανισμό προστασίας κατά των βλαβών του DNA (DNA Damage Response pathway), και συγκεκριμένα από μονοπάτια που εμπλέκουν τις κινάσες ATM (ataxia telangiectasia mutated kinase) και ATR (ATM and Rad3-Related kinase). Ο TRF2 αποτρέπει την αναγνώριση του τελομερούς από την ATM ως δίκλωνη ρήξη, ενώ η POT1 αποτρέπει την αναγνώριση από την ATR ως μονόκλωνη ρήξη. Σε περίπτωση που συνέβαινε μια τέτοια αναγνώριση το κύτταρο θα οδηγούνταν σε μη ομόλογη σύνδεση των χρωμοσωμικών άκρων ή σε απόπτωση (Arnoult et al, 2016)



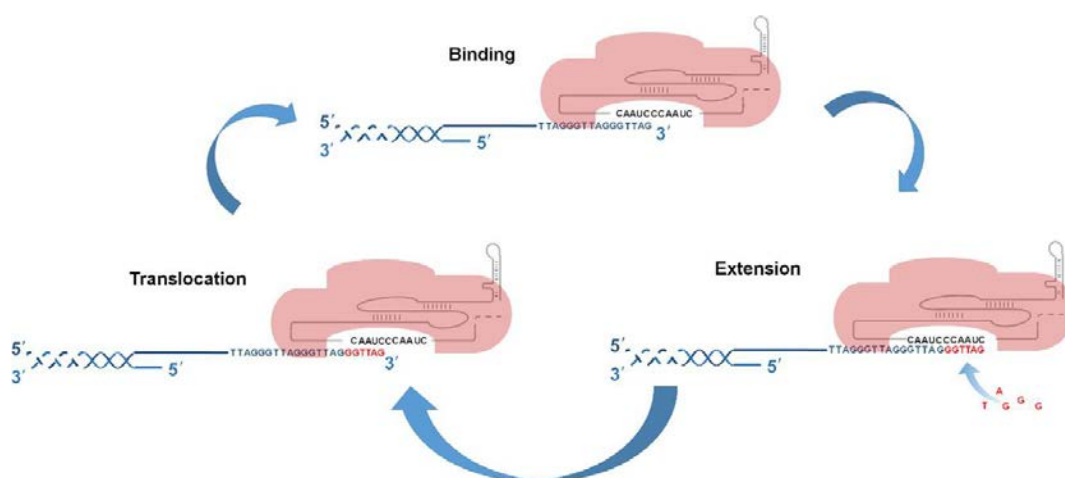
Εικόνα 4: Το τελομερικό άκρο στα σπονδυλωτά. Οι παράγοντες TRF1 και TRF2 προσδένονται στο δίκλωνο τμήμα του τελομερούς και προσελκύουν τους TIN2, TPP1 και RAP1. Η πρωτεΐνη POT1 προσδένεται στο μονόκλωνο τμήμα. Το τελομερικό DNA αναδιπλώνεται και δημιουργεί T-βρόχο (Maestroni et al, 2017)

Κατά την κυτταρική διαίρεση, το χρωμοσωμικό DNA διπλασιάζεται, προκειμένου κάθε θυγατρικό κύτταρο να διαθέτει την σωστή ποιοτικά και ποσοτικά γενετική πληροφορία και να μπορεί να λειτουργεί άρτια. Ωστόσο τα τελομερή μετά από κάθε διαίρεση βραχύνονται κατά 50-100 βάσεις (Chow et al, 2012)· αυτό οφείλεται στη γραμμική φύση των χρωμοσωμάτων σε συνδυασμό με την ιδιαιτερότητα της πολυμεράσης του DNA να λειτουργεί μόνο με κατεύθυνση από το 5' προς το 3' άκρο. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «το πρόβλημα της αντιγραφής των άκρων» (end replication problem) (Watson, 1972; Olovnikov, 1973).

Τα κύτταρα έχουν τρόπο να αποκαταστήσουν την απώλεια των χρωμοσωμικών άκρων με τη βοήθεια του συμπλόκου της τελομεράσης (Lingner et al, 1995). Το σύμπλοκο προσελκύεται στα άκρα των χρωμοσωμάτων λόγω των σελετερινών (Zhong et al, 2012). Πρόκειται για ένα μεγάλου μοριακού βάρους ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που εμπεριέχει δύο βασικά μέρη, την αντίστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης (TERT, Telomerase Reverse Transcriptase) και το συστατικό RNA (Telomerase RNA Component, TERC). Η αντίστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης είναι το καταλυτικά ενεργό συστατικό του συμπλόκου και μπορεί να επεκτείνει το 3' μονόκλωνο προεξέχον άκρο προσθέτοντας τελομερικές επαναλήψεις. Το TERC είναι ένα μη κωδικοποιητικό RNA που χρησιμεύει ως ικρίωμα για την επέκταση των τελομερών (Εικόνα 5). Τα δύο αυτά συστατικά αρκούν για καταλυτική ενεργότητα in vitro (Weinrich et al, 1997), αλλά in vivo το σύμπλοκο της τελομεράσης απαιτεί επιπλέον την πρωτεΐνη TCAB1 (telomerase Cajal body protein 1), την DKC1

(dyskerin) και τις NOP10 (Nucleolar Protein 10), NHP2 (non-histone chromosome protein 2) και GAR1 (glycine-arginine rich 1) (Nguyen et al, 2018). Επίσης πρόσφατες απεικονίσεις Cryo-EM δομής αναδεικνύουν το διμερές ιστονών H2A/H2B ως επιπρόσθετο συστατικό του ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου της τελομεράσης (Ghanim et al, 2021). Σημειώνεται ότι οι πρωτεΐνες DKC1, NOP10, NHP2, και NAF1 συνιστούν το σύμπλοκο της δυσκερίνης, το οποίο συνδέεται με επικράτειες H/ACA, όπως αυτή που απαντάται στο TERC αλλά και σε H/ACA box snoRNAs (small nucleolar RNAs) και scaRNAs (small Cajal body RNAs), και καταλύει την ψευδοουριδιλίωση των rRNAs και των snRNAs αντίστοιχα (Rubtsova, 2020). Οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν και στο σύμπλοκο της τελομεράσης συνδεόμενες με το TERC, αλλά προς το παρόν δεν έχει καταγραφεί κάποιος στόχος ψευδοουριδιλίωσης.

Η έκφραση του TERC είναι ιδιόσυστατη, ενώ της TERT υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση. Στον άνθρωπο παρατηρείται έκφραση της TERT σε γαμετικά κύτταρα, βλαστοκύτταρα και στο 85-90% των καρκινικών κυττάρων (Blasco, 2005). Ο ρόλος της τελομεράσης στον καρκίνο είναι ιδιαίτερα κομβικός, καθώς η δυνατότητα επέκτασης των τελομερών βοηθά τα καρκινικά κύτταρα να αποφύγουν την κυτταρική γήρανση και την συνεπαγόμενη απόπτωση, καθιστώντας τα έτσι αθάνατα, ικανά να επιτελούν απεριόριστο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων, να παρακάμπτουν το όριο Hayflick και να συσσωρεύουν μεταλλάξεις που θα τους προσδώσουν πλεονεκτήματα σε σχέση με τα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα. Το γεγονός ότι η τελομεράση είναι παρούσα στην πλειονότητα των καρκινικών κυττάρων, η σημαντική της συμβολή στην έναρξη του καρκίνου και στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων αλλά και το ότι εμφανίζει μειωμένη δραστηριότητα στα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα την τοποθετεί στο επίκεντρο της έρευνας με την ελπίδα να μπορέσει να αξιοποιηθεί είτε ως βιοδείκτης για την πρόληψη και την πρόγνωση του καρκίνου, είτε ως στόχος για θεραπευτικούς παράγοντες (Akincilar et al, 2016)



Εικόνα 5: Σύνθεση των τελομερών από την τελομεράση. Η τελομεράση προσδένεται στο 3' άκρο και χρησιμοποιώντας το TERC ως ικρίωμα εισάγει περισσότερες νουκλεοτιδικές επαναλήψεις, ώστε να αποκαταστήσει το τμήμα που χάνεται μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση (Giardini et al, 2014)

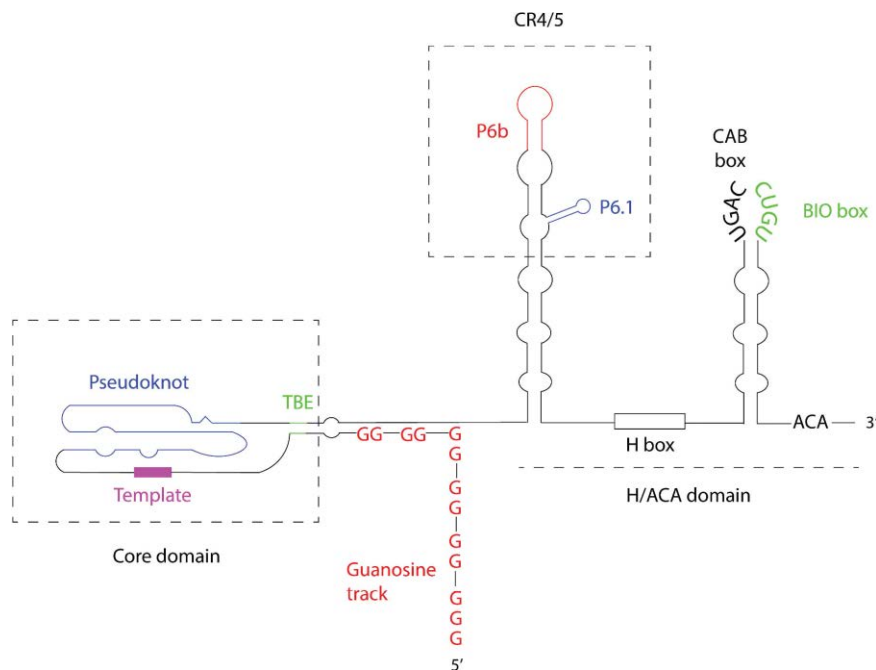
1.5 Αντίστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης (TERT)

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την ανθρώπινη TERT έχει μήκος 40kb και εντοπίζεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 5. Το πολυπεπτίδιο διαθέτει 4 επικράτειες: την TEN (telomerase N-end domain), την TRBD (telomerase RNA binding domain), την RT (reverse transcriptase domain) και την CTD (C-end domain). Η TEN επικράτεια σταθεροποιεί το υβρίδιο DNA-RNA που δημιουργείται δίπλα στην καταλυτικά ενεργή περιοχή από το καλούπι RNA και το τελομερικό DNA. Η RT επικράτεια είναι αυτή που διαθέτει τη δραστικότητα αντίστροφης μεταγραφάσης, ενώ η TRBD αλληλεπιδρά με το TERC προκειμένου να συγκροτηθεί το ενεργό ένζυμο (**Rubtsova, 2020**). Η αλληλεπίδραση αφορά την περιοχή ικρίωματος-ψευδοκόμπου και την CR4/5 δομή του TERC, οι οποίες αναφέρονται εκτενέστερα στην επόμενη υποενότητα.

1.6 Το συστατικό RNA της τελομεράσης

Το συστατικό RNA της τελομεράσης (TERC) ποικίλει σε αλληλουχία και δομή στα διάφορα είδη. Στα θηλαστικά εμφανίζεται να έχει μήκος περίπου 450 νουκλεοτίδια, ενώ το ανθρώπινο αποτελείται από 451 νουκλεοτίδια. Το RNA αυτό αναδιπλώνεται και αποκτά μια δευτεροταγή δομή με διαφορετικές επικράτειες.

Στο 5' άκρο του διακρίνονται το ικρίωμα (template region) και μια δευτεροταγής δομή ψευδοκόμπου (pseudoknot), καθώς και το στοιχείο που οριοθετεί το ικρίωμα (template boundary element, TBE) (**Εικόνα 6**).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση του TERC (Qin, 2021)

Στο 3' άκρο του υπάρχει η επικράτεια H/ACA, η οποία συναντάται και σε snoRNAs (small nucleolar RNAs) και σε scaRNAs (small Cajal body RNAs)· στην επικράτεια αυτή συνδέεται το σύμπλοκο της δυσκερίνης. Η σύνδεση του συμπλόκου εκεί σταθεροποιεί το TERC, προφυλάσσοντας το από εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση. Σε περίπτωση μετάλλαξης στις πρωτεΐνες του συμπλόκου το αποτέλεσμα είναι μειωμένα επίπεδα TERC και βραχεία τελομερή (Armanios, 2012). Μετά τη σύνδεση, η πρωτεΐνη NAF1 αντικαθίσταται από την GAR1 (Darzacq et al, 2006).

Η περιοχή H/ACA περιλαμβάνει μια 5' φουρκέτα, η οποία ακολουθείται από ένα H-box, μια 3' φουρκέτα και το τρινουκλεοτίδιο ACA. Το H-box περιέχει μια συναινετική αλληλουχία 5'-ANANNA-3', όπου το N σημαίνει οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο. Η κορυφή της 5' φουρκέτας ονομάζεται συντηρημένη περιοχή 4/5 (CR4/5) και δεν υπάρχει στα sno- και scaRNAs. Τέλος, στην κορυφή της 3' φουρκέτας εντοπίζονται το Cajal body box (CAB box), όπου προσδένεται η πρωτεΐνη TCAB1, και το biogenesis box (BIO box), που είναι υπεύθυνα για τη στόχευση του TERC στα σωμάτια Cajal και για τη συσσώρευσή του αντίστοιχα (Qin, 2021).

1.7 Βιογένεση και ωρίμανση του TERC

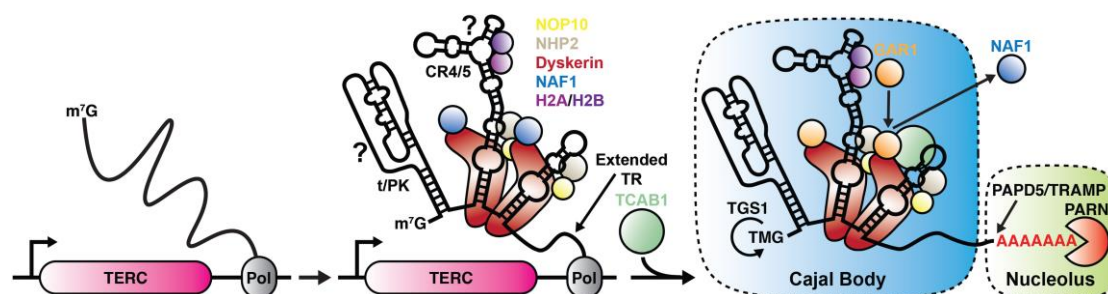
Σε αντίθεση με τα περισσότερα scRNAs και snoRNAs τα οποία προκύπτουν από μεταγραφή ιντρονίων, το TERC διαθέτει δικό του υποκινητή και μεταγράφεται αυτόνομα από την RNA πολυμεράση II (Feng et al, 1995). Ο γενετικός τόπος που το κωδικοποιεί εντοπίζεται στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 3.

Όπως και στα mRNAs, κατά τη μεταγραφή προστίθεται στο TERC μια 7-μεθυλογουανωσίνη ως καλύπτρα (Εικόνα 4). Αξιοσημείωτο είναι ότι η μεταγραφή δεν τερματίζεται στα 451 νουκλεοτίδια αλλά συνεχίζεται και προκύπτουν εκτεταμένα μετάγραφα (3' extended transcripts). Κάποια διαφέρουν από το ώριμο TERC μόνο κατά λίγα νουκλεοτίδια, ενώ άλλα υπερβαίνουν τα 1500 νουκλεοτίδια (Tseng et al, 2018). Σε σταθερή κατάσταση, το 70-80% του συνολικού TERC βρίσκεται σε ώριμη μορφή.

Τη μεταγραφή του TERC ακολουθεί περαιτέρω τροποποίηση των 5' και 3' άκρων. Σύμφωνα με πιο πρόσφατη βιβλιογραφία, η επεξεργασία των πρόδρομων μεταγράφων μπορεί να είναι είτε άμεση είτε έμμεση (Roake et al, 2019). Στο άμεσο μονοπάτι, τα πρόδρομα μετάγραφα τροποποιούνται απευθείας προς ώριμο TERC 451 νουκλεοτιδίων. Αντίθετα στο έμμεσο μονοπάτι παρεμβάλλεται πρώτα πολυαδενυλίωση από την πολυ(A) πολυμεράση PAPD5, που αποτελεί μέρος του συμπλόκου TRAMP (Trf4/Air2/Mtr4p Polyadenylation complex) (Boyratz et al, 2016). Αν δεν ακολουθήσει απαδενυλίωση από την πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN) και από την PABN1 (poly-A binding RNase factor), η ωρίμανση παρεμποδίζεται, τα πρόδρομα μετάγραφα αναγνωρίζονται από το 3'-5' ριβονουκλεολυτικό RNA εξώσωμα λόγω της ολιγο(A) ουράς τους και αποικοδομούνται. (Nguyen et al, 2015; Moon et al, 2015). Το εξώσωμα είναι υπεύθυνο να διατηρεί μια σταθερή δεξαμενή λειτουργικών RNAs, και παράλληλα

εμπλέκεται στην ανακύκλωση των RNAs και στην ωρίμανση των πρόδρομων RNAs (Houseley et al, 2006). Με άλλα λόγια, το μονοπάτι ωρίμανσης που εμπλέκει τις PABN1 και PARN και το μονοπάτι αποικοδόμησης από το σύμπλοκο TRAMP και το εξώσωμα ανταγωνίζονται για τα πρόδρομα συστατικά RNAs της τελομεράσης και συμβάλλουν στον έλεγχο της έκφρασης του TERC (Nguyen et al, 2015). Η PAPD5 και η PARN καθορίζουν τον ρυθμό της ωρίμανσης του TERC, η μεν επιβραδύνοντας την ωρίμανση και η δε προάγοντάς την (Roake et al, 2019).

Τέλος, το TERC λαμβάνει μια 5' καλύπτρα τριμεθυλογουανωσίνης (TMG cap) από τη συνθάση 1 της τριμεθυλογουανωσίνης (TSG1). Η καλύπτρα αυτή επηρεάζει την ωρίμανση και συσσώρευση του TERC, καθώς σε περίπτωση απαλοιφής της συνθάσης TSG1 παρατηρείται αύξηση των επιπέδων του TERC και επιμήκυνση των τελομερών (Chen et al, 2020).

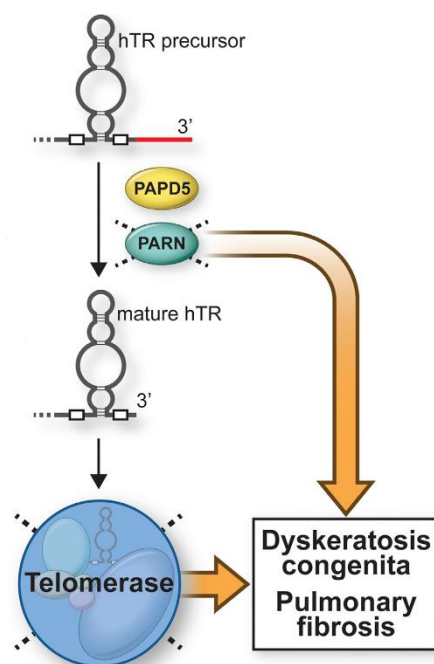


Εικόνα 7: Μοντέλο βιογένεσης του TERC. Μεταγραφή από RNA πολυμεράση II, προσθήκη 5' καλύπτρας και αυτόματη αναδίπλωση, προσέλκυση του συμπλόκου NOP10-NHP2-Dyskerin στην H/ACA επικράτεια, προσθήκη καλύπτρας TMG, πολυαδενυλίωση από PAPD5 και απαδενυλίωση από PARN (Klump, 2023)

1.8 Διαταραχές της βιολογίας των τελομερών (Telomere Biology Disorders, TBDs) και η σύνδεσή τους με την PARN

Γαμετικές μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με τη λειτουργία του συμπλόκου της τελομεράσης και με τη συντήρηση των τελομερών οδηγούν σε τελομεροπάθειες. Αυτές οι διαταραχές της βιολογίας των τελομερών είναι συνήθως απόρροια πολύ βραχέων ή δυσλειτουργικών τελομερών και επιφέρουν απώλειες σε σημαντικούς πληθυσμούς βλαστικών κυττάρων στους οργανισμούς που πάσχουν. Στις πιο σοβαρές περιπτώσεις οδηγούν σε απώλεια αιματοποιητικών βλαστικών κυττάρων (Hematopoietic Stem Cells), η οποία αποτελεί και την κύρια αιτία θανάτου στους ασθενείς αυτούς. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί μεταλλάξεις σε 14 διαφορετικά γονίδια σε ασθενείς με TBDs, μεταξύ των οποίων και το γονίδιο που κωδικοποιεί την PARN (Grill et al, 2021). Ο συνδετικός κρίκος μεταξύ της PARN και των διαταραχών της βιολογίας των τελομερών φαίνεται να είναι το TERC, του οποίου οι ανώριμες μορφές σε περίπτωση μετάλλαξης της PARN συσσωρεύονται (Moon et al, 2015). Αδυναμία ωρίμανσης του TERC οδηγεί σε μη λειτουργικό σύμπλοκο τελομεράσης και σε αδυναμία σύνθεσης των τελομερών, με αποτέλεσμα την εμφάνιση

τελομεροπαθειών, όπως είναι η φυλοσύνδετη συγγενής δυσκεράτωση, η απλαστική αναιμία και η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Αδυναμία επεξεργασίας της ολιγο(A) ουράς του TERC από την PARN οδηγεί σε δυσλειτουργικό σύμπλοκο τελομεράσης και σε τελομεροπάθειες (Τροποποιημένο από Corbett et al, 2019)

Η φυλοσύνδετη συγγενής δυσκεράτωση χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργίες σε μέρη του σώματος με υψηλή αναγεννητική ικανότητα, όπως είναι το δέρμα και ο μυελός των οστών. Οι ασθενείς που πάσχουν επίσης είναι επιρρεπείς σε κακοήθειες (Nanjappa et al, 2021). Μια σοβαρή μορφή της ασθένειας, το σύνδρομο Hoyeraal–Hreidarsson περιλαμβάνει επιπρόσθετα νευρολογικά συμπτώματα, όπως υποπλασία της παρεγκεφαλίδας, και σοβαρή ανοσοανεπάρκεια (Grill et al, 2021). Παραδοσιακά η εμφάνιση της ασθένειας συνδέεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο DKC1 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη δυσκερίνη, μια συνθάση ψευδοουριδίνης που όπως προειπώθηκε είναι βασικό συστατικό του συμπλόκου της τελομεράσης. Εντούτοις, τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι και η αδυναμία απαδενυλίωσης μπορεί να οδηγήσει στον ίδιο φαινότυπο. Έρευνα έδειξε ότι σε κύτταρα ασθενών με δι-αλληλικές μεταλλάξεις της PARN, ενεργοποιούνται πρώιμα ο μηχανισμός επιδιόρθωσης βλαβών του DNA μετά από ακτινοβολία με UV, ενώ μειώθηκαν και τα επίπεδα mRNA γονιδίων που εμπλέκονται στη συντήρηση των τελομερών, συμπεριλαμβανομένου και του TERC. (Tumalla et al, 2015). Επίσης, σε σωματικά και iPSC (induced Pluripotent Stem Cells) κύτταρα από ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο της PARN φάνηκαν μειωμένα τα επίπεδα του TERC και η δραστηριότητα της τελομεράσης (Moon et al, 2015). Τέλος, σε κύτταρα ασθενών με μεταλλαγμένη PARN, η αναστολή της πολυμεράσης PAPD5, που όπως προειπώθηκε προάγει την αποικοδόμηση του TERC, οδήγησε σε αυξημένη

σταθερότητα του TERC, αυξημένη δραστηριότητα τελομεράσης και σύνθεση τελομερών, δηλαδή σε αντιστροφή του φαινοτύπου **(Boyratz et al, 2016)** .

Η απλαστική αναιμία αποτελεί συχνή επιπλοκή της φυλοσύνδετης συγγενούς δυσκεράτωσης, ωστόσο πλέον θεωρείται ξεχωριστή περίπτωση τελομεροπάθειας. Στην ασθένεια αυτή, τα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα CD34+ είτε απουσιάζουν πλήρως είτε συναντώνται σε μικρούς αριθμούς, κάτι το οποίο οφείλεται και στους αυξημένους ρυθμούς απόπτωσης που παρουσιάζουν τα κύτταρα αυτά **(Timeus et al, 2005)**. Το μήκος των τελομερών επίσης εμφανίζεται μειωμένο σε κύτταρα περιφερικού αίματος, ειδικά σε ουδετερόφιλα **(Bär et al, 2016)**. Έρευνα έδειξε ότι ασθενείς με συμπτώματα ανεπάρκειας μυελού των οστών εμφάνιζαν δι-αλληλική μετάλλαξη στο γονίδιο της PARN, ενώ αποσιώπηση του μεταγράφου της PARN σε κύτταρα CD34+ οδήγησε σε μειωμένη δυνατότητα δημιουργίας αποικιών αιματοποιητικών κυττάρων **(Dhanraj et al, 2015)**.

Τέλος, η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση είναι μια χρόνια και προοδευτική ασθένεια των πνευμόνων με άγνωστη αιτία και κακή πρόγνωση. Βλάβη στα επιθηλιακά κύτταρα οδηγεί σε μη φυσιολογική ενεργοποίησή τους και προσέλκυση ινοβλαστών, που εκκρίνουν αφύσικα εξωκυττάρια ουσία, προκαλώντας ίνωση **(Mei et al, 2022)**. Στην οικογενή ίνωση, η οποία είναι αυτοσωμική επικρατής γενετική ασθένεια, έχουν παρατηρηθεί σπάνιες μεταλλάξεις στα γονίδια TERT, TERC, PARN και RTEL (Regulator of telomere elongation helicase) **(Barros et al, 2019)**. Ακόμη, σπάνιες παρανοηματικές μεταλλάξεις της PARN έχουν ταυτοποιηθεί σε ασθενείς, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανόν η PARN να σχετίζεται με δυσλειτουργικά τελομερή **(Zhang et al, 2019)**.

2. Σκοπός

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η πλήρους-μήκους PARN προάγει την ωρίμανση του TERC και περιπτώσεις μεταλλάξεων στο γονίδιό της οδηγούν σε μειωμένα επίπεδα ώριμου TERC. Αυτό εγείρει τη λογική απορία αν η ισομορφή της PARN, δηλαδή η PARN_V1, έχει κάποια επίδραση στο TERC. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας επομένως ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της PARN_V1 στα επίπεδα του ώριμου TERC.

3. Μέθοδοι και Υλικά

3.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές MCF7 και MRC5 (Vircell). Τα MCF7 (Michigan Cancer Foundation 7) είναι κύτταρα πλευρικής συλλογής από ασθενή με καρκίνο του μαστού, δηλαδή καρκινική σειρά. Τα MRC5 (Medical Research Council cell strain 5) είναι διπλοειδής κυτταρική σειρά ινοβλαστών, η οποία προέρχεται από τον πνευμονικό ιστό βρέφους που αποβλήθηκε. Τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν πεπερασμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων.

Η αποθήκευση των κυττάρων μέχρι τη στιγμή της καλλιέργειας γίνεται σε υγρό άζωτο σε cryovials που περιείχαν 10% DMSO (dimethyl sulfoxide), το οποίο είναι κρυοπροστατευτικό. Πριν την καλλιέργεια γίνεται προσθήκη θρεπτικού μέσου και κατόπιν φυγοκέντρηση με σκοπό την απομάκρυνση του DMSO, το οποίο μπορεί να δημιουργήσει οξειδωτικό στρες στα κύτταρα εάν παραμείνει.

Τα MCF7 καλλιεργήθηκαν αρχικά σε μικρή και κατόπιν σε μεσαία φλάσκα (75 cm³). Ανά δύο περίπου ημέρες γινόταν αλλαγή καλλιεργητικού μέσου ενώ όταν η φλάσκα προσέγγιζε confluency 70-80% γινόταν κατεργασία με τρυψίνη και ανακαλλιέργεια.

Τα MRC5 καλλιεργήθηκαν σε μεσαία φλάσκα και όμοια γινόταν αλλαγή θρεπτικού μέσου ανά τρεις περίπου ημέρες και κατεργασία με τρυψίνη όποτε καθίστατο απαραίτητο.

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) που περιείχε 10 % FBS (Fetal Bovine Serum) και 1 % πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη. Κάποια κύτταρα MRC5 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό όπου ο ορός FBS αντικαθίστατο από τον συνθετικό ορό Panexin NTA Serum Substitute. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν στον θάλαμο επώασης του εργαστηρίου (5% CO₂, 21% O₂). Οι διαδικασίες για αλλαγή του καλλιεργητικού μέσου και για κατεργασία με τρυψίνη περιγράφονται παρακάτω.

Αλλαγή καλλιεργητικού μέσου:

1. Απόρριψη του υπάρχοντος μέσου
2. Μία πλύση με 2 ή 5 ml PBS (Phosphate-buffered saline) για μικρή ή μεσαία φλάσκα αντίστοιχα
3. Προσθήκη 5 ή 10 ml νέου καλλιεργητικού μέσου για μικρή ή για μεσαία φλάσκα αντίστοιχα

Κατεργασία με τρυψίνη για αποκόλληση των κυττάρων από την φλάσκα και μεταφορά τους σε άλλη επιφάνεια:

1. Απόρριψη του υπάρχοντος καλλιεργητικού μέσου
2. Δύο πλύσεις με 2 ή 5 ml PBS για μικρή ή μεσαία φλάσκα αντίστοιχα

3. Προσθήκη 0.5 ή 1 ml τρυψίνης για μικρή ή μεσαία φλάσκα αντίστοιχα και επώαση για 5 min
4. Προσθήκη 2.5 ή 5 ml για μικρή ή μεσαία φλάσκα αντίστοιχα θρεπτικού μέσου και ανάδευση με το σιφώνι ώστε να αποκολληθούν μεταξύ τους τα κύτταρα
5. Απόρριψη 1.5 ή 4 ml για μικρή ή μεσαία φλάσκα αντίστοιχα
6. Συμπλήρωση με 3.5 ή 8 ml νέου καλλιεργητικού μέσου

Υλικά

- DMEM (Biosera)
- DMSO (SIGMA)
- FBS (PAN-Biotech)
- Panexin NTA Serum Substitute (PAN-Biotech)
- PBS (Biosera)
- Trypsin (Biosera)

3.2 Αποσιώπηση PARN σε MCF7 (knock-down)

Για να εξεταστεί η επίδραση της PARN στα επίπεδα του TERC, πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση της στην κυτταρική σειρά MCF7, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία short hairpin RNA (shRNA).

Η αποσιώπηση ενός μεταγράφου στο εργαστήριο προσομοιάζει τον φυσιολογικό μηχανισμό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων που ονομάζεται παρεμβολή RNA (RNA interference, RNAi). Ο μηχανισμός αυτός βασίζεται στη στοχευμένη αποικοδόμηση mRNA του ξενιστή χάρη σε ένα δίκλωνο μόριο RNA (dsRNA) το οποίο έχει συμπληρωματική αλληλουχία με το mRNA-στόχο. Η αποικοδόμηση επιτυγχάνεται μέσω μιας ενζυμικής οδού που βασίζεται στο ενδογενές σύμπλοκο RNA-επαγόμενης αποσιώπησης (RNAi-induced complex, RISC). Ο ένας κλώνος του dsRNA προσδένεται στο σύμπλοκο RISC με τη βοήθεια πρωτεϊνών Argonaute (Ago) και πρωτεϊνών που προσδένουν δίκλωνο RNA (double-stranded RNA proteins). Ο κλώνος RNA καθοδηγεί το σύμπλοκο και όταν υβριδίζει στο συμπληρωματικό του mRNA η πρωτεΐνη Ago το διασπά, ενώ στη συνέχεια άλλες ενδογενείς ενδονουκλεάσες το αποικοδομούν ολοκληρωτικά (Taxman et al, 2010)

Στο εργαστήριο αποσιώπηση μπορεί να επιτευχθεί είτε με απευθείας μεταφορά στο κύτταρο μικρών ολιγονουκλεοτιδικών RNA παρεμβολής (short interfering RNA, siRNA) είτε με διαμόλυνση των κυττάρων με έναν φορέα ο οποίος επιτρέπει την παραγωγή μικρών παρεμβαλλόμενων μορίων μέσα στο ίδιο το κύτταρο. Η δεύτερη μέθοδος είναι που επιλέχθηκε σε αυτήν την περίπτωση. Ένας πλασμιδιακός φορέας περιέχει αλληλουχία που κωδικοποιεί μικρό RNA σχήματος φουρκέτας (short hairpin RNA, shRNA). Το συγκεκριμένο RNA έχει αλληλουχία συμπληρωματική με το

μετάγραφο της PARN πλήρους μήκους αλλά και με της PARN_V1. Τα shRNAs γενικά αποτελούνται από δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες RNA μήκους 19-22 ζευγών βάσεων που συνδέονται με έναν μικρό βρόχο 4-11 νουκλεοτιδίων. Μετά τη μεταγραφή τους μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου όπου αναγνωρίζονται από το ένζυμο Dicer, το οποίο τα επεξεργάζεται και τα μετατρέπει σε δίκλιωνα siRNA. Κατόπιν αυτά ενσωματώνονται στο σύμπλοκο RISC και επιτυγχάνεται η αποσιώπηση των μεταγράφων PARN και PARN_V1.

Οι πλασμιδιακοί φορείς προτού γίνει διαμόλυνση είναι απαραίτητο να κλωνοποιηθούν ώστε να παραχθεί ικανός αριθμός και να γίνει αποτελεσματικά η αποσιώπηση. Για τον σκοπό αυτόν, αρχικά εισήχθησαν σε βακτηριακά κύτταρα XL blue 1. Οι πλασμιδιακοί φορείς διέθεταν ενσωματωμένο γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, επομένως επιτράπηκε να αναπτυχθούν σε τρυβλίο μόνο τα μετασχηματισμένα βακτήρια. Οι αποικίες μεταφέρθηκαν κατόπιν σε υγρή καλλιέργεια για περαιτέρω αύξηση της απόδοσης, και τελικά τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε λύση και απομονώθηκαν οι επιθυμητοί πλασμιδιακοί φορείς. Οι φορείς τέλος χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση κυττάρων MCF7 και επιτεύχθηκε γονιδιακή αποσιώπηση, η οποία επιβεβαιώθηκε με Western blot και RT-qPCR.

3.2.1 Εισαγωγή πλασμιδιακών φορέων σε βακτήρια για κλωνοποίηση

Η γονιδιακή αποσιώπηση γίνεται με τη βοήθεια shRNA τα οποία κωδικοποιούνται από πλασμίδια (Sigma Aldrich). Προκειμένου να παραχθεί ικανός αριθμός shRNA τα πλασμίδια εισάγονται σε βακτηριακά κύτταρα (XL blue 1) και καλλιεργούνται. Τα βακτηριακά κύτταρα αναπτύσσονται αρχικά σε τρυβλία και μετά μια αποικία από κάθε τρυβλίο χρησιμοποιείται για να γίνει υγρή καλλιέργεια, ώστε να αυξηθεί περισσότερο ο βακτηριακός πληθυσμός. Τέσσερα τρυβλία επιστρώθηκαν με βακτήρια, τα τρυβλία κατά σειρά περιείχαν control1, control2, sh2, sh4. Τα sh2 και sh4 είναι διαφορετικά short-hairpin RNA, τα οποία συνδέονται σε διαφορετικά σημεία της αλληλουχίας των μεταγράφων PARN και έχει διαπιστωθεί στο εργαστήριο ότι επιτυγχάνουν την πιο αποτελεσματική αποσιώπηση. Τα shRNAs συνδέονται και αποσιωπούν τόσο την PARN όσο και την PARN_V1. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Παρασκευή αρχικά σε κωνικές φιάλες LB broth και LB άγαρ, όπως περιγράφουν ο Πίνακας 1 και 2. Οι δύο κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν στο αυτόκαυστο στους 121°C για 30 λεπτά προκειμένου να αποστειρωθούν

Πίνακας 1: Σύσταση του LB άγαρ

Αντιδραστήρια	LB άγαρ (τελικός όγκος 100 ml)
Άγαρ	1.4 g
LB	2 g
Νερό	100 ml

Πίνακας 2: Σύσταση του LB broth

Αντιδραστήρια	LB broth (τελικός όγκος 100 ml)
LB	2.5 g
Νερό	100 ml

2. Στη συνέχεια οι δύο κωνικές αφέθηκαν στον πάγκο για να κρυώσουν. Στο LB άγαρ προστέθηκε αντιβιοτικό αμικικιλίνη. Το αντιβιοτικό έχει συγκέντρωση 1000 U/ml, οπότε για όγκο διαλύματος 100 ml προστέθηκαν 100 μl αντιβιοτικού
3. Το LB άγαρ μοιράστηκε σε 4 τρυβλία τα οποία αφέθηκαν να στερεοποιηθούν σε θερμοκρασία δωματίου
4. Τα βακτηριακά κύτταρα βρίσκονται αποθηκευμένα στους -80°C σε φιαλίδια (tubes), πάρθηκαν τέσσερα και τοποθετήθηκαν σε πάγο για 10 λεπτά
5. Προστέθηκε 1 μl διάλυμα που περιέχει πλασμίδια (150 ng/μl) σε κάθε φιαλίδιο κυττάρων και έγινε ήπια ανάδευση με το χέρι
6. Κατόπιν τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε πάγο για 30 λεπτά
7. Στη συνέχεια τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε θερμαντική πλάκα (heat block) στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα
8. Αμέσως μετά τοποθετήθηκαν σε πάγο για 2 λεπτά, και έπειτα προστέθηκαν σε κάθε φιαλίδιο 900 μl LB broth
9. Τα φιαλίδια μεταφέρθηκαν στον επωαστήρα όπου αφέθηκαν για 1 ώρα στους 37°C σε 210 rpm
10. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά σε 2000g
11. Απορρίφθηκαν 750 μl υπερκείμενου και το ίζημα επιστρώθηκε σε τρυβλίο. Τα 4 τρυβλία διατηρήθηκαν για όλο το βράδυ στον επωαστήρα στους 37°C
12. Το επόμενο πρωί παρασκευάστηκαν 8 σωλήνες φυγοκέντρου (falcon tubes), καθένας από τους οποίους περιείχε 10 ml LB broth και 10 μl αμικικιλίνη. Με πιπέτα μεταφέρθηκαν κύτταρα από μία αποικία κάθε τρυβλίου σε κάθε σωλήνα. Σε κάθε τρυβλίο αντιστοιχούν 2 σωλήνες falcon
13. Οι σωλήνες falcon παρέμειναν στον επωαστήρα για όλο το βράδυ στους 37°C σε 210 rpm

Υλικά

- LB (Biolab)
- Άγαρ (Biolab)
- Αμπικιλίνη (PAN-Biotech)
- Πλασμίδια (MISSION® shRNA, SIGMA, NM_002582)

3.2.2 Απομόνωση των κλωνοποιημένων πλασμιδίων από τα βακτήρια

Τα κλωνοποιημένα πλασμίδια που περιέχουν την αλληλουχία των shRNA έπρεπε να συλλεχθούν ώστε να χρησιμοποιηθούν για τη αποσιώπηση της PARN. Για να γίνει αυτό τα βακτήρια υποβλήθηκαν σε λύση και τα πλασμίδια που περιείχαν απομονώθηκαν με τη βοήθεια του ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research). Παρακάτω περιγράφεται το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε:

1. Συνολικά δύο σωλήνες falcon, ένας με το sh2 και ένας με το sh4, υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση 6000 rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο κατόπιν απορρίφθηκε.
2. Στο βακτηριακό ίζημα προστέθηκαν 250 µl ZymoPURE P1 και με τη χρήση πιπέτας έγινε επαναδιάλυση και το διάλυμα μεταφέρθηκε σε σωλήνα μικροφυγοκέντρου (Eppendorf) 1.5 ml.
3. Προστέθηκαν 250 µl ZymoPURE P2 και έγινε ανάμειξη χειροκίνητα αναστρέφοντας τον σωλήνα 8-10 φορές. Στη συνέχεια οι σωλήνες αφέθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 3 λεπτά. Η μωβ απόχρωση του διαλύματος υποδήλωνε ότι τα κύτταρα είχαν υποστεί πλήρη λύση
4. Προστέθηκαν 250 µl ZymoPURE P3 και έγινε ανάδευση χειροκίνητα. Το διάλυμα εμφάνισε κίτρινο χρώμα και αναδεύτηκε ξανά
5. Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο για 5 λεπτά σε 16000g
6. Μεταφέρθηκαν 600 µl υπερκείμενου σε καθαρό σωλήνα μικροφυγοκέντρου χωρητικότητας 1.5 ml
7. Προστέθηκαν 260 µl ZymoPURE Binding Buffer στον σωλήνα και έγινε ανάδευση με vortex
8. Πάνω σε έναν νέο σωλήνα τοποθετήθηκε η στήλη συλλογής Zymo-Spin II-PX Column και έγινε μεταφορά του υγρού από σε αυτήν την στήλη. Το υγρό αφέθηκε για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου να αρχίσει να διέρχεται από το φίλτρο της στήλης και κατόπιν υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 10000g. Το υγρό που διαπέρασε το φίλτρο της στήλης απορρίφθηκε (flow through)
9. Στην στήλη προστέθηκαν 800 µl ZymoPURE Wash 1 και έγινε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 10000g. Το υγρό που διαπέρασε το φίλτρο της στήλης απορρίφθηκε

10. Στην στήλη προστέθηκαν 200 μ l ZymoPURE Wash 2 και έγινε φυγοκέντρωση για 1 λεπτό σε 10000g. Το υγρό που διαπέρασε το φίλτρο της στήλης απορρίφθηκε
11. Έγινε φυγοκέντρωση για 1 λεπτό σε 1000g ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του διαλύματος πλύσης
12. Η στήλη μεταφέρθηκε σε έναν νέο σωλήνα χωρητικότητας 1.5 ml και προστέθηκαν 25 μ l ZymoPURE Elution Buffer μέσα στην στήλη. Το σύστημα αφέθηκε για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τελικά φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό σε 10000g

Υλικά

- ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research)

3.2.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πλασμιδιακού DNA

Έχοντας συλλέξει 25 μ l διαλύματος πλασμιδιακού DNA για κάθε shRNA, χρειαζόταν να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του DNA στα διαλύματα αυτά ώστε να χρησιμοποιηθούν οι κατάλληλοι όγκοι στη διαδικασία της διαμόλυνσης. Αυτό έγινε με τη χρήση του NanoDrop. Βρέθηκε συγκέντρωση 500 ng/ μ l για το sh2 και συγκέντρωση 707 ng/ μ l για το sh4, ενώ η καθαρότητα (απορρόφηση 260/280) ήταν 1.78.

3.2.4 Διαμόλυνση κυττάρων MCF7 με πλασμίδια-φορείς

Τα πλασμίδια που συλλέχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για διαμόλυνση των κυττάρων MCF7. Τα MCF7 επιστρώθηκαν στα πηγαδάκια (six-well-plates) προκειμένου να επιτευχθεί confluency 50-70% τη μέρα της διαμόλυνσης. Σε κάθε πηγαδάκι εναποτέθηκε 1 ml διαλύματος κυττάρων. Τα κύτταρα αφέθηκαν μια μέρα για να προσκολληθούν και έγινε αλλαγή του θρεπτικού μέσου σε μέσο με serum starvation (DMEM με 0,5% FBS). Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε η διαμόλυνση των κυττάρων με τη χρήση του X-fect transfection reagent (Takara Bio). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. Σε έναν σωλήνα μικροφυγοκέντρου αραιώθηκαν 5 μ g πλασμιδιακού DNA με Xfect Reaction Buffer σε τελικό όγκο 100 μ l. Τα 5 μ g αποτελούνταν από 2.5 μ g δαλύματος sh2 και 2.5 μ g διαλύματος sh4
2. Στο αραιωμένο πλασμιδιακό DNA προστέθηκαν 1.5 μ l Xfect Polymer και έγινε ανάδευση σε vortex για 10 δευτερόλεπτα
3. Το διάλυμα αφέθηκε για επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να δημιουργηθούν συμπλέγματα νανοσωματιδίων
4. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση (spin down) για 1 δευτερόλεπτο ώστε να συγκεντρωθούν τα περιεχόμενα του σωλήνα στον πυθμένα του

5. Το σύμπλεγμα νανοσωματιδίων συνολικού όγκου 100 μl μεταφέρθηκε στο πηγαδάκι και αναμίχθηκε με το καλλιεργητικό μέσο. Από τα έξι πηγαδάκια του six-well-plate στα 4 έγινε αποσιώπηση ενώ τα άλλα δύο χρησιμοποιήθηκαν ως control
6. Τα πηγαδάκια αφέθηκαν για επώαση στους 37°C για 5 ώρες
7. Κατόπιν απομακρύνθηκαν τα συμπλέγματα νανοσωματιδίων και στα πηγαδάκια προστέθηκαν 2 ml φρέσκου υλικού καλλιέργειας και αφέθηκαν στον επωαστήρα, απ' όπου συλλέχθηκαν έπειτα από είτε 48 είτε 72 ώρες
8. Πραγματοποιήθηκε κατεργασία με 0.5 ml τρυψίνη ανά πηγαδάκι. Οι πλύσεις έγιναν με 1 ml PBS
9. Τα περιεχόμενα των πηγαδιών τοποθετήθηκαν σε eppendorfs και φυγοκεντρήθηκαν στα 200g για 5 λεπτά
10. Το ίζημα φυλάχθηκε στους -80°C

Υλικά

- X-fect transfection reagent (Takara Bio)

3.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot)

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western είναι μια τεχνική ευρέως χρησιμοποιούμενη στην έρευνα για την ανίχνευση και ημι-ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών-στόχων σε ένα βιολογικό δείγμα.

Στην τεχνική αυτή αρχικά γίνεται λύση των κυττάρων που μελετώνται και απομόνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, το οποίο κατόπιν διαχωρίζεται βάσει μοριακού βάρους μέσω ηλεκτροφόρησης σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο κατά μήκος της πηκτής, οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες είναι πιο δυσκίνητες από τις μικρότερες και γι' αυτό διανύουν μικρότερες αποστάσεις. Οι πρωτεΐνες λόγω του SDS έχουν φορτίο αρνητικό και ανάλογο της μάζας τους και κινούνται προς τον θετικό πόλο.

Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μια μεμβράνη, με τη βοήθεια ηλεκτρικού φορτίου. Κατόπιν γίνεται επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο είναι εξειδικευμένο και δεσμεύεται μόνο στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Ένα δευτερογενές αντίσωμα που αναγνωρίζει το πρωτογενές προστίθεται και χρησιμεύει στην ανίχνευση των πρωτεϊνών, εν προκειμένω όντας συζευγμένο με το ένζυμο HRP (Horseradish peroxidase), το οποίο με την προσθήκη υποστρώματος θα δημιουργήσει έγχρωμο προϊόν. Τα αποτελέσματα οπτικοποιούνται μέσα σε σκοτεινό δωμάτιο με κατάλληλο εξοπλισμό. Το πάχος των ζωνών της πρωτεΐνης είναι ανάλογο της ποσότητάς τους στο δείγμα. (Yang et al, 2012; Sule et al, 2023)

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης στα MCF7 και να επιβεβαιωθεί η παρουσία της PARN_V1 στα MRC5.

3.3.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται στα προηγούμενα στάδια υποβλήθηκε σε 2 πλύσεις με 200 μ l PBS (προσθήκη PBS, φυγοκέντρηση, απόρριψη υπερκείμενου). Στη συνέχεια προστέθηκαν 100 μ l διάλυμα RIPA (radio-immunoprecipitation assay buffer), το οποίο λύει τα κύτταρα, και 1 μ l διαλύμα αναστολέα πρωτεασών, το οποίο θα παρεμποδίσει την υδρόλυση πρωτεϊνών ενδιαφέροντος από πρωτεάσες. Τα συστατικά του διαλύματος RIPA αναγράφονται στον Πίνακα 3. Κατόπιν χρησιμοποιήθηκε vortex και υπέρηχοι για 30 δευτερόλεπτα σε ένταση 30 για 3 φορές. Τα eppendorfs τοποθετήθηκαν σε shaker για 15 λεπτά στους 4°C και σε 400 rpm. Τέλος τοποθετήθηκαν σε φυγόκεντρο για 15 λεπτά στους 4°C και σε 4000g.

Πίνακας 3: Σύσταση διαλύματος RIPA

Σύσταση διαλύματος RIPA	
Hepes 30 mM pH 7.4	Sodium deoxycholate 0.5%
NaCl 150 mM	NaF 50 mM
NP-40 (1%)	PMSF 1 mM
Pepstatin A 10%	Aprotinin 10 μ g/ml
Leupepsin 10 μ g/ml	SDS 0.1%
EDTA 5 mM	

3.3.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Για την ηλεκτροφόρηση παρασκευάζονται 2 είδη πηκτής, η πηκτή διαχωρισμού και η πηκτή επιστοιβαξης των πρωτεϊνών. Η πηκτή διαχωρισμού είναι αυτή που θα οδηγήσει σε διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος μετά από εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Περιέχει μείγμα ακρυλαμίδιου και δις-ακρυλαμίδιου, τα οποία θα πολυμεριστούν με την βοήθεια των APS (εκκινητής πολυμερισμού) και TEMED (καταλύτης πολυμερισμού), ώστε να σχηματιστούν οι πόροι της πηκτής. Επίσης περιέχει SDS, το οποίο έχει κομβικό ρόλο, καθώς αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο ανάλογο με τη μάζα τους, εξασφαλίζοντας έτσι ότι το φυσικό τους φορτίο δεν θα επηρεάσει τον διαχωρισμό. Η παρασκευή πηκτής διαχωρισμού περιεκτικότητας 10 % σε πολυακρυλαμίδιο γίνεται σύμφωνα με τον Πίνακα 4:

Πίνακας 4: Σύσταση πηκτής διαχωρισμού περιεκτικότητας 10% πολυακρυλαμίδιο

Πηκτή διαχωρισμού 10 % πολυακρυλαμίδιο	
H ₂ O	1400 μ l
Acrylamide 30 %	330 μ l
Tris 15 M pH 8.8	1300 μ l

SDS 10 %	50 μ l
APS 10 %	50 μ l
TEMED	2 μ l

Το διάλυμα φορτώνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ισοπροπανόλη. Κατόπιν παρασκευάζεται η πηκτή επιστοίβαξης με παρόμοιο τρόπο, όπως περιγράφεται στον [Πίνακα 5](#):

Πίνακας 5: Σύσταση πηκτής επιστοίβαξης

Πηκτή επιστοίβαξης (2 ml)	
H ₂ O	1400 μ l
Acrylamide 30 %	330 μ l
Tris 1 M pH 6.8	250 μ l
SDS 10 %	20 μ l
APS 10 %	20 μ l
TEMED	2 μ l

Η ισοπροπανόλη αφαιρείται από τη συσκευή και φορτώνεται το διάλυμα της πηκτής επιστοίβαξης. Τοποθετείται το χτενάκι για τη δημιουργία πηγαδιών και το διάλυμα αφήνεται να πήξει. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν 30 μ l δείγματος τα οποία αναμείχθηκαν με 10 μ l loading buffer 4x, του οποίου η αναλυτική σύσταση αναγράφεται στον [Πίνακα 6](#). Το loading buffer περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης, το οποίο διευκολύνει την παρακολούθηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης, γλυκερόλη, η οποία προσδίδει βάρος στα δείγματα, και Tris για τη ρύθμιση του pH. Περιέχει επίσης SDS για αποδιάταξη και αρνητική φόρτιση των πρωτεϊνών και β-μερκαπτοαιθανόλη για αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών. Μετά την ανάμειξη τα Eppendorf τοποθετήθηκαν σε heat block για 10 λεπτά στους 70°C. Στα πηγαδάκια φορτώθηκαν 30 μ l του μείγματος. Η συσκευή συμπληρώθηκε με running buffer (1x), το οποίο παρασκευάζεται με αραιώση του Running buffer 10x ([Πίνακας 7](#)). Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε τάση 100 V.

Πίνακας 6: Σύσταση Loading Buffer 4x

Σύσταση Loading Buffer 4x (10 ml)	
Glycerol	4 ml
Tris 1M pH 6.8	2.4 ml
SDS	0.8 gr
Bromophenol blue	0.004 gr
β -mercaptoethanol	500 μ l
dH ₂ O	3.1 ml

Πίνακας 7: Σύσταση Running Buffer 10x

Σύσταση Running Buffer 10x (1L)	
Glycine	144 gr

Tris	30.3 gr
SDS	10 gr

Υλικά

- Acrylamide (SERVA)
- APS (Ammonium Persulfate) (Applichem)
- cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Merck)
- Ethanol (Honeywell)
- Glycerol (Applichem)
- Glycine (SERVA)
- Isopropanol (Honeywell)
- PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fischer Scientific)
- Promophenol blue (Research Organics)
- SDS (sodium dodecyl sulfate) (SERVA)
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) (Invitrogen)
- Tris base (Applichem)
- β-mercaptoethanol (Riedel de Haën)

3.3.3 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη, επώσεις με αντίσωμα και εμφάνιση στο imager

Μετά τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών γίνεται μεταφορά τους από την πηκτική ηλεκτροφόρησης σε μεμβράνη διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PVDF) με τη βοήθεια συσκευής ηλεκτροαποτύπωσης (electroblotting cassette). Εφαρμόζεται σύστημα ημίξηρης μεταφοράς (semi-dry transfer). Η επιφάνεια της συσκευής περιλούεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και με λαβίδα τοποθετούνται 3 φύλλα στυπώματος (φύλλα Whatman) το ένα πάνω στο άλλο. Πάνω από αυτά τοποθετείται και η μεμβράνη PVDF, η οποία επίσης προηγουμένως εμβαπτίστηκε σε μεθανόλη 100 % για 30 δευτερόλεπτα. Πάνω από την μεμβράνη τοποθετείται η πηκτική διαχωρισμού και κατόπιν προστίθενται με λαβίδα άλλα 3 φύλλα στυπώματος. Κάθε μεμβράνη πριν τοποθετηθεί διαβρέχεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Πίνακας 8). Η συσκευή ρυθμίζεται στα 0.27 A για 50 λεπτά.

Πίνακας 8: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς

Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς (100 ml)	
Running Buffer (10×)	10 ml
Μεθανόλη ≥ 99.8 %	20 ml
H ₂ O	70 ml

Αφού τελειώσει η διαδικασία της μεταφοράς, η μεμβράνη PVDF υπόκειται σε 3 πλύσεις με διάλυμα TBST-1x (Πίνακας 9) των 5 λεπτών.

Πίνακας 9: Σύσταση διαλύματος TBST-1x

Σύσταση TBST-1x	
TBS (Tris-buffered Saline)	50 ml
TWEEN	500 μ l
H ₂ O	450 ml

Στη συνέχεια 1.25 g αποβουτυρωμένου γάλακτος διαλύονται σε 25 ml TBST και σε αυτό το διάλυμα αφήνουμε την μεμβράνη να επωαστεί για 1 ώρα, προκειμένου να μπλοκαριστούν οι μη-ειδικές θέσεις σύνδεσης. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 7 λεπτών με TBST-1x και επώαση με πρωτογενές αντίσωμα προερχόμενο από κόνικλο που στοχεύει την PARN και την PARN_V1 για 36 ώρες. Παράλληλα στοχεύεται και η β -ακτίνη με αντίσωμα προερχόμενο από ποντικό. Μετά το πέρας των 36 ωρών, γίνονται 3 πλύσεις των 15 λεπτών με TBST-1x. Έπειτα διαλύονται 1.25 g αποβουτυρωμένου γάλακτος σε 25 ml TBST-1x και προστίθεται σε αυτό 1 μ l δευτερογενούς anti-rabbit για την PARN και anti-mouse αντισώματος για την β -ακτίνη, τα οποία είναι συζευγμένα με το ένζυμο HRP. Η μεμβράνη αφήνεται για επώαση για 1 ώρα και ακολουθούν 3 πλύσεις των 7 λεπτών με TBST-1x.

Τέλος, γίνεται εμφάνιση των αποτελεσμάτων της Western με τη βοήθεια του μηχανήματος ImageQuant™ 800. Η δυνατότητα παρατήρησης των αποτελεσμάτων της Western στηρίζεται στο φαινόμενο της χημειοφωτάγειας: το ένζυμο HRP που είναι συνδεδεμένο στο δευτερογενές αντίσωμα, μπορεί σε αλκαλικό περιβάλλον και παρουσία υπεροξειδίου να καταλύσει την οξείδωση της λουμινόλης και το προϊόν της αντίδρασης εκπέμπει φως. Η μεμβράνη, αφού επωαστεί με δευτερογενές αντίσωμα, επωάζεται για 3 λεπτά με 1 ml φωτοευαίσθητου υποστρώματος ECL (Enhanced Chemiluminescence, Immobilon Crescendo Western HRP substrate) και γίνεται εμφάνιση στο μηχάνημα. Ο συνιστώμενος χρόνος έκθεσης είναι μέχρι 8 λεπτά.

Υλικά

- Blotting paper (Whatman)
- ECL (Merck Millipore)
- HRP-conjugated secondary goat anti-mouse IgG (Pierce)
- HRP-conjugated secondary goat anti-rabbit IgG (Pierce)
- Methanol (Honeywell)
- PVDF membrane (Macherey-Nagel)
- Sodium chloride (Applichem)
- Tris base (Applichem)
- Tween (SIGMA)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα κόνικλου έναντι ανθρώπινης PARN (Santa Cruz)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι ανθρώπινης β -ακτίνης (Sigma-Aldrich)

3.4 Αντίστροφη Μεταγραφή – Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (RT-qPCR)

Η RT-qPCR είναι ευαίσθητη και εξειδικευμένη τεχνική για την ανίχνευση και ενίσχυση RNA. Είναι μια μέθοδος δύο βημάτων· στο πρώτο στάδιο χρησιμοποιείται η εξαρτώμενη από RNA DNA πολυμεράση (αντίστροφη μεταγραφάση), η οποία συνθέτει συμπληρωματικό DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας το RNA ως ικρίωμα. Στο δεύτερο στάδιο χρησιμοποιείται πολυμεράση, η οποία ενισχύει το cDNA όπως γίνεται σε μια κανονική PCR. Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης του RNA, αν χρησιμοποιηθούν και τα κατάλληλα control. Η qPCR περιλαμβάνει τη χρήση μια φθορίζουσας χρωστικής, της SYBR Green, η οποία μπορεί και συνδέεται στο δίκλωνο DNA. Τα επίπεδα φθορισμού καταγράφονται μετά από κάθε κύκλο αντιγραφής και αντικατοπτρίζουν την ποσότητα DNA που έχει ενισχυθεί μέχρι τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Όσο περισσότερο αρχικό υπόστρωμα υπάρχει για την αντίδραση τόσο λιγότεροι κύκλοι αντιγραφής χρειάζονται ώστε να παρατηρηθεί σήμα στατιστικά σημαντικό. Η χρονική αυτή στιγμή που θα παρατηρηθεί το σήμα εκφράζεται με τον αριθμό C_T (quantification cycle). Όσο μικρότερος ο αριθμός C_T , τόσο μεγαλύτερη ποσότητα cDNA υπήρχε στην αρχή της αντίδρασης (Bustin et al, 2020).

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική RT-qPCR για επιβεβαίωση της αποσιώπησης των μεταγράφων της PARN στα κύτταρα MCF7 και για μέτρηση των επιπέδων των PARN, PARN_V1 και TERC στα MCF7 και στα MRC5.

3.4.1 Εκχύλιση RNA

Η εκχύλιση του RNA από τα κύτταρα στηρίζεται στη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol Reagent, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για απομόνωση RNA, DNA αλλά και πρωτεϊνών από ποικίλα βιολογικά δείγματα. Περιέχει φαινόλη και θειοκυανική γουανιδίνη και αναστέλλει πολύ αποτελεσματικά τις RNAses. Η επεξεργασία με Trizol επιφέρει διαχωρισμό των δειγμάτων σε τρεις φάσεις, στην οργανική (μωβ χρώμα) που βρίσκεται κοντά στον πυθμένα και εμπεριέχει τις πρωτεΐνες, σε μια ενδιάμεση (θολή) φάση που περιέχει το DNA και σε μια (διαυγή) υδατική φάση που περιέχει το RNA και βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια.

1. Σε ένα falcon με κύτταρα προστίθενται 500 μ l Trizol Reagent και γίνεται ανάδευση για να διαρρηχθούν τα κύτταρα
2. Τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά
3. Προστίθενται 50 μ l βρωμοχλωροπροπάνιο και γίνεται ανακίνηση
4. Μεταφέρεται το περιεχόμενο σε eppendorf και αφήνεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να διαχωριστούν οι φάσεις
5. Γίνεται φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 12000g σε 4°C
6. Απομακρύνεται η υδατική φάση και ογκομετρείται
7. Προστίθεται ίσος όγκος αιθανόλης > 95% στην υδατική φάση και γίνεται έντονη ανάδευση

8. Το μείγμα μεταφέρεται σε στήλη καθαρισμού RNA (RNA purification column) στην οποία τοποθετείται και σωλήνας συλλογής
9. Γίνεται φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στα 16000g και απορρίπτεται το διαρρέον υγρό
10. Κατόπιν έγινε κατεργασία με DNase. Προστίθενται στη στήλη 500 μl RNA Wash buffer και γίνεται φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα σε 16000g. Απορρίπτεται το διαρρέον υγρό και η στήλη περιλούεται με διάλυμα που αποτελείται από 5 μl DNase και 75 μl DNase I reaction buffer. Η στήλη αφήνεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθενται 500 μl RNA priming buffer και γίνεται φυγοκέντρηση στα 16000g για 30 δευτερόλεπτα. Ο διαρρέων όγκος απορρίπτεται
11. Για την έκλουση προστίθενται 500 μl RNase Wash buffer και γίνεται φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στα 16000g. Απορρίπτεται ο διαρρέων όγκος
12. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία αυτή τη φορά για 2 λεπτά
13. Γίνεται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 16000g
14. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα και προστίθενται 60 μl RNA free water. Ακολουθείται ποσοτικοποίηση στο Nanodrop

Στο Nanodrop μετράται η συγκέντρωση του κάθε δείγματος σε RNA, ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός του ακριβούς όγκου που απαιτείται ώστε να λειτουργήσει η RT-qPCR.

Υλικά

- Trizol Reagent (Sigma Aldrich)
- Monarch total RNA extraction kit (New England Biolabs)

3.4.2 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (1st strand synthesis)

Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια: στην πρώτη αντίδραση γίνεται αποδιάταξη του RNA και υβριδισμός των τυχαίων εξαμερών, ενώ στην δεύτερη συντίθεται ο συμπληρωματικός κλώνος, και προκύπτει RNA/cDNA.

Για την πρώτη αντίδραση χρειάζεται σε κάθε σωλήνα να υπάρχει 1 μg RNA. Ο τελικός όγκος αντίδρασης είναι 10 μl. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται αναγράφονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Αντιδραστήρια για 1^η αντίδραση

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
Random examers	1
dNTP mix	1
Υπόστρωμα RNA	6 (150 ng/μl)
RNase free water	2

Γίνεται spin-down και οι σωλήνες τοποθετούνται για 5 λεπτά στους 65°C και μετά σε πάγο. Κατόπιν γίνεται προσθήκη αντιδραστηρίων που αναγράφονται στον [Πίνακα 11](#) και ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 20 μ l.

Πίνακας 11: Αντιδραστήρια για 2^η αντίδραση

Αντιδραστήριο	Όγκος (μ l)
Template RNA primer mix	10
5x Prime Script Buffer	4
RNase inhibitor 40 U/ μ l	0.5
Αντίστροφη μεταγραφάση	1
RNase free water	4.5

Μόλις προστεθούν τα συστατικά οι σωλήνες τοποθετούνται στον κυκλοποιητή MJ Mini Real Time PCR detection system αρχικά στους 30 °C για 10 λεπτά και κατόπιν στους 70 °C για 15 λεπτά.

Υλικά

- PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio)

3.4.3 Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (qPCR)

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμεύει στην ενίσχυση δείγματος δίκλωνου DNA. Σε αντίθεση με την κλασική PCR, απαλλάσσει τον χρήστη από την ανάγκη να πραγματοποιήσει ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για να διαπιστώσει την επιτυχία της αντίδρασης και επιτρέπει τον υπολογισμό της αρχικής ποσότητας DNA που περιείχε το δείγμα. Μέχρι το τέλος της αντίδρασης επαναλαμβάνονται 30-40 κύκλοι αντιγραφής. Ένας κύκλος υποδιαιρείται σε τρία στάδια, στην αποδιάταξη (denaturation), τον υβριδισμό των εκκινητών (primers annealing) και την επιμήκυνση (extension). Κατά την αποδιάταξη (95°C), που διαρκεί περίπου 20-30 δευτερόλεπτα αποχωρίζονται οι δύο κλώνοι του δίκλωνου DNA. Κατά την ενίσχυση (48-72°C, ανάλογα με το μήκος και την αλληλουχία των εκκινητών), που διαρκεί 20-40 δευτερόλεπτα, υβριδίζουν εκκινητές τα μονόκλωνα DNA και προσδένεται πάνω τους η πολυμεράση. Τέλος κατά την επιμήκυνση (68-72°C), που διαρκεί 1-2 λεπτά, η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές και συνθέτει νέο DNA.

Η qPCR αναφορικά με την εκπομπή φθορισμού διακρίνεται σε τέσσερις φάσεις, την λανθάνουσα (lag), την εκθετική (exponential), τη γραμμική (linear) και τη φάση πλατό (plateau). Κατά τη λανθάνουσα πραγματοποιείται ενίσχυση, αλλά το σήμα δεν είναι ακόμα αρκετά ισχυρό ώστε να ανιχνευθεί και να διακρίνεται από τον «θόρυβο». Στην εκθετική φάση υπάρχει εκθετική αύξηση των δίκλωνων μορίων DNA άρα και του φθορισμού, ενώ στη γραμμική πάλι υπάρχει αύξηση η οποία όμως δεν είναι εκθετική. Στη φάση πλατό το σήμα είναι πλέον πολύ έντονο και οι αλλαγές δεν είναι ανιχνεύσιμες. Στο τέλος κάθε qPCR προσδιορίζονται οι καμπύλες τήξης (melt curve)· στο στάδιο αυτό το μηχάνημα αυξάνει τη θερμοκρασία μέχρι να αποχωριστούν οι

κλώνοι του DNA. Ανάλογα με το μήκος και την αλληλουχία του κάθε δίκλωνο τμήμα DNA έχει διαφορετική θερμοκρασία τήξης και αυτό επιτρέπει να διαπιστώνεται αν ενισχύονται και μη επιθυμητά τμήματα DNA.

Ο θερμοκυκλοποιητής επιτρέπει στον χειριστή να ρυθμίσει ο ίδιος τις θερμοκρασίες και τους χρόνους που αφορούν την qPCR. Οι ρυθμίσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα συγκεκριμένα πειράματα αναγράφονται στον [Πίνακα 12](#):

Πίνακας 12: Στάδια της qPCR

Holding Stage	Step 1	50.0 °C	02:00
	Step 2	95.0 °C	02:00
Cycling Stage (40 cycles)	Step 1	95.0 °C	00:15
	Step 2	60.0 °C	00:40
Melt Curve Stage	Step 1	60.0 °C	01:00
	Step 2	95.0 °C	00:15

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης πρέπει να είναι 20 µl και τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια αναγράφονται στον [Πίνακα 13](#).

Πίνακας 13: Αντιδραστήρια για την αντίδραση qPCR

Αντιδραστήριο	Όγκος (µl)
SYBR 2x	10
Forward primer (10 µM)	0.4
Reverse primer (10 µM)	0.4
cDNA	2
Water for injection	6.8
ROX	0.4

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον [Πίνακα 14](#).

Πίνακας 14: Αλληλουχίες εκκινητών

Στόχος του εκκινητή		Αλληλουχία εκκινητή
PARN (full-length)	Forward	GGAGATAATCAGGAGCAATTTTAAG
	Reverse	ATGCAGAGACTGAAGGTCCATC
PARN_V1	Forward	CGAGTAGAACCGCTGAGGC
	Reverse	ATGCAGAGACTGAAGGTCCATC
TERC	Forward	CGCTGTTTTTCTCGCTGACT
	Reverse	GCTCTAGAATGAACGGTGGAA

Οι σωλήνες τοποθετούνται στο μηχάνημα της qPCR και μετά από λίγη ώρα το μηχάνημα εμφανίζει τον αριθμό των κύκλων ποσοτικοποίησης (C_T) για κάθε δείγμα.

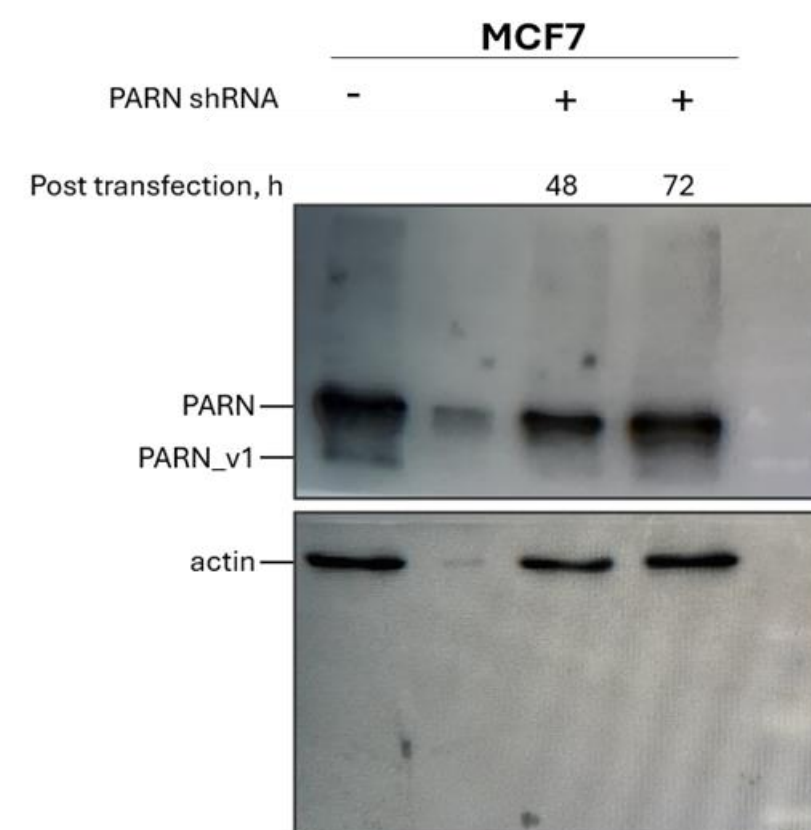
Υλικά

- KAPA SYBR FAST Universal Kit (Roche)
- Εκκινητές (Eurofins Scientific)

4. Αποτελέσματα

4.1 Κύτταρα MCF7

Σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό, τα κύτταρα MCF7 αφού καλλιεργήθηκαν σε DMEM/FBS 10%, τοποθετήθηκαν σε six-well-plate και έγινε αποσιώπηση με τη χρήση shRNAs. Τα shRNAs στοχεύουν την πλήρους-μήκους PARN και την PARN_V1, στα κύτταρα MCF7 εντούτοις συναντάται κυρίως η πλήρους-μήκους PARN. Η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Επίπεδα πρωτεΐνης PARN και PARN_V1 σε κύτταρα MCF7 χωρίς αποσιώπηση και με αποσιώπηση 48 και 72 ώρες μετά. Η β-ακτίνη χρησιμοποιείται για κανονικοποίηση.

Παρατηρείται ότι η πρωτεϊνική ζώνη της PARN μετά τη αποσιώπηση εμφανίζεται λιγότερο έντονη. Με βάση την Εικόνα 9, φαίνεται πώς τα χαμηλότερα πρωτεϊνικά επίπεδα επιτυγχάνονται στις 48 ώρες. Παρούσα στην μεμβράνη είναι και η PARN_V1, όμως σε μικρότερη ποσότητα όπως φαίνεται από την ένταση της ζώνης. Η PARN_V1 εντοπίζεται ως ζώνη κάτω από την PARN, επειδή υπολείπεται 61 αμινοξέων και επομένως έχει μικρότερο μοριακό βάρος.

Κατόπιν έγινε RT-qPCR, στην οποία ενισχύθηκαν τα μετάγραφα της πλήρους-μήκους PARN, της PARN_V1 και του TERC, σε τρεις συνθήκες: χωρίς αποσιώπηση, με αποσιώπηση μετά το πέρας 48 ωρών και με αποσιώπηση μετά το πέρας 72 ωρών. Για την κανονικοποίηση ενισχύθηκε επίσης η β-ακτίνη στις συνθήκες αυτές.

Το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε 2 επαναλήψεις (duplicates). Στον Πίνακα 14 αναγράφεται ο μέσος όρος των κύκλων ποσοτικοποίησης (C_T) στις επαναλήψεις αυτές:

Πίνακας 14: Κύκλοι ποσοτικοποίησης που προέκυψαν από την αντίδραση qPCR

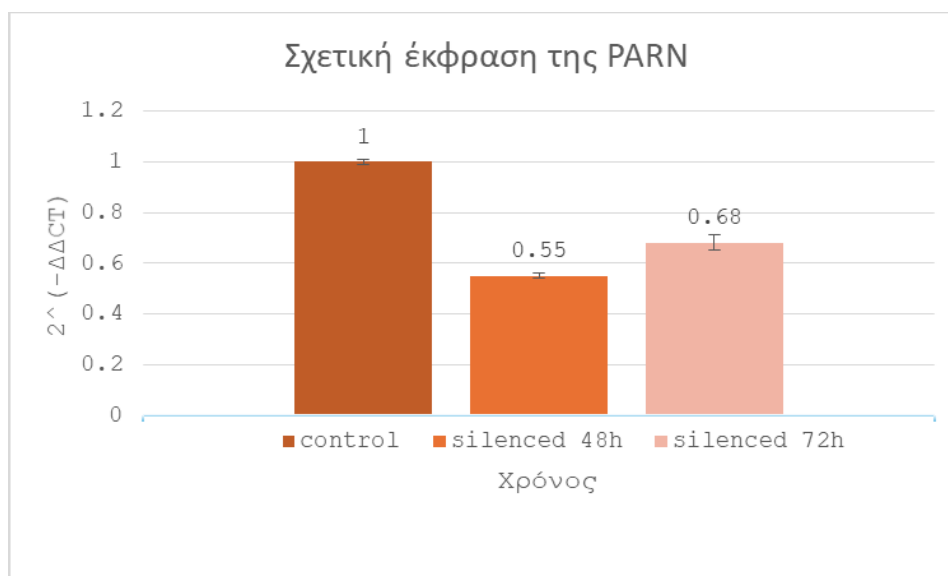
	C_T average χωρίς αποσιώπηση	C_T average Αποσιώπηση, 48 ώρες μετά	C_T average Αποσιώπηση, 72 ώρες μετά
PARN	26.74	25.31	22.93
PARN_V1	31.49	29.99	27.88
b-actin	17.82	15.53	13.44
TERC	19.27	19.6	18.37

Με στατιστική επεξεργασία με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_t}$ υπολογίζεται το εύρος αλλαγής (fold of change) το οποίο αναγράφεται στον Πίνακα 15:

Πίνακας 15: Εύρος αλλαγής (average) στην έκφραση μετά τη αποσιώπηση

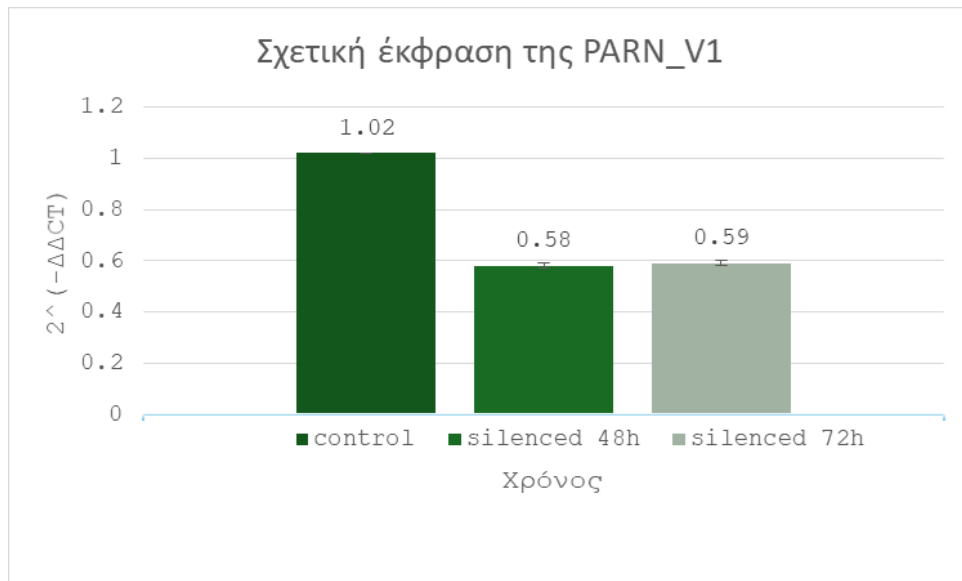
	Χωρίς αποσιώπηση	Αποσιώπηση, 48 ώρες μετά	Μεταβολή (%), 48 ώρες μετά	Αποσιώπηση, 72 ώρες μετά	Μεταβολή (%), 72 ώρες μετά
PARN	1.00±0.01	0.55±0.01	- 45	0.68±0.03	- 32
PARN_V1	1.02±0.00	0.58±0.01	- 42	0.59±0.01	- 41
TERC	1.00±0.07	0.16±0.01	- 84	0.09±0.00	- 91

Τα αποτελέσματα αυτά αναπαρίστανται γραφικά στα παρακάτω γραφήματα:



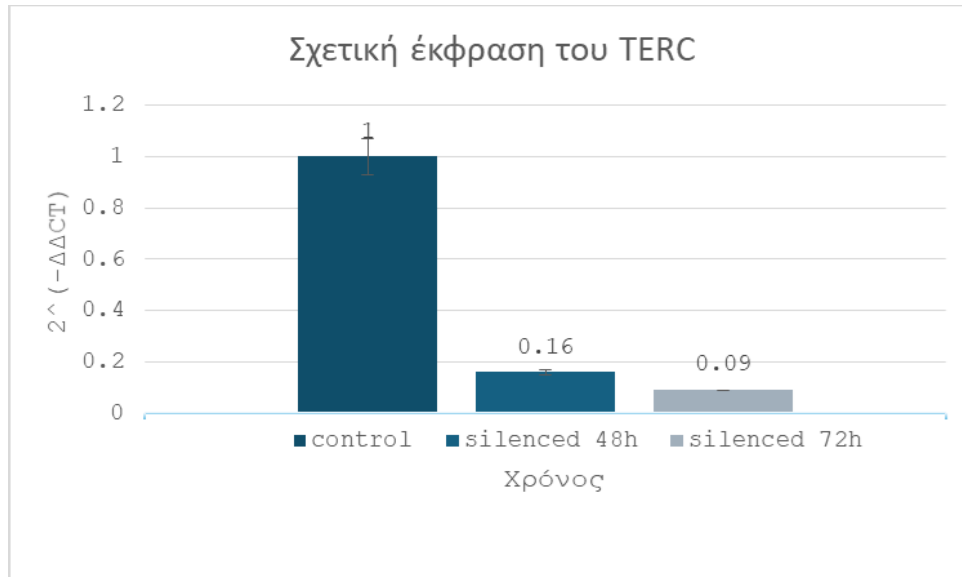
Γράφημα 1: Συγκριτικά επίπεδα του mRNA PARN απουσία αποσιώπησης και μετά από 48 και 72 ώρες αποσιώπηση

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 1, η πλήρους-μήκους PARN εμφανίζει μειωμένα επίπεδα mRNA κατά 45% και 32% στις 48 και στις 72 ώρες μετά τη αποσιώπηση αντίστοιχα.



Γράφημα 2: Συγκριτικά επίπεδα του mRNA PARN_V1 απουσία αποσιώπησης και μετά από 48 και 72 ώρες αποσιώπησης

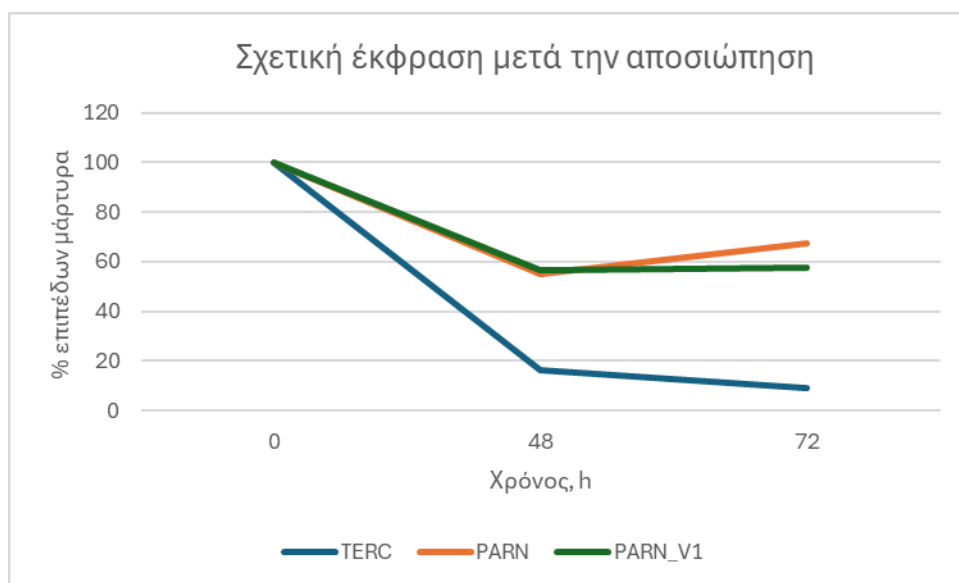
Όμοια, τα επίπεδα mRNA της PARN_V1 εμφανίζονται μειωμένα κατά 42% και 41% μετά από 48 και 72 ώρες αποσιώπηση αντίστοιχα, όπως φαίνεται στο [Γράφημα 2](#). Τα αποτελέσματα αυτά είναι λογικά καθώς τα shRNAs δεν μπορούν να υβριδίσουν όλα τα παραγόμενα mRNAs και όσα υβριδίζουν δεν καταστρέφονται, αλλά αναστέλλεται η μετάφρασή τους.



Γράφημα 3: Συγκριτικά επίπεδα του ώριμου TERC χωρίς αποσιώπηση και μετά από 48 και 72 ώρες αποσιώπησης

Στο [Γράφημα 3](#) απεικονίζεται η μεταβολή στα επίπεδα του ώριμου TERC μετά από 48 και 72 ώρες αποσιώπησης της PARN. Παρατηρείται ραγδαία μείωση 84% και 91%, με τα χαμηλότερα επίπεδα να παρατηρούνται στις 72 ώρες. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία: η παρουσία της PARN στα κύτταρα

φαίνεται να σχετίζεται με τα επίπεδα του ώριμου TERC, καθώς μετά από αποσιώπησή της τα επίπεδα του ώριμου TERC μειώνονται κατά μεγάλο ποσοστό.



Γράφημα 4: Συνδυαστική απεικόνιση των επιπέδων των μεταγράφων PARN, PARN_V1 και TERC μετά από αποσιώπηση.

Στο [Γράφημα 4](#) απεικονίζονται συνδυαστικά τα επίπεδα των μεταγράφων των πρωτεϊνών PARN και PARN_V1 αλλά και του μη κωδικοποιητικού RNA TERC. Η PARN εμφανίζει 45% και 32% μείωση σε 48 και 72 ώρες αντίστοιχα, ενώ η PARN_V1 42% και 41%. Φαίνεται ότι τα χαμηλότερα επίπεδα mRNA των πρωτεϊνών αυτών επιτυγχάνονται 48 ώρες μετά τη αποσιώπηση, κάτι το οποίο συνάδει και με τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Το TERC από την άλλη μεριά εμφανίζει μείωση 84% και 91% σε 48 και 72 ώρες αντίστοιχα, επομένως εμφανίζει τα χαμηλότερα επίπεδα στις 72 ώρες.

4.2 Κύτταρα MRC5

4.2.1 Θρεπτικό μέσο και αλλαγές επιπέδων PARN, PARN_V1 και TERC

Σε προηγούμενο πείραμα που είχε διενεργηθεί στο εργαστήριο¹, τα κύτταρα MRC5 είχαν καλλιεργηθεί σε θρεπτικό μέσο DMEM/Panexin 10% και είχε διαπιστωθεί η ύπαρξη της ισομορφής PARN_V1. Στην παρούσα σειρά πειραμάτων αρχικά καλλιεργήθηκαν σε six-well plate κύτταρα MRC5 για 4 μέρες, σε θρεπτικό υλικό που περιείχε DMEM/FBS 10% και σε θρεπτικό υλικό που περιείχε DMEM/Panexin 10%. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε RT-qPCR με σκοπό την παρατήρηση των επιπέδων των mRNA των PARN, PARN_V1, καθώς και του TERC.

¹ Διονύσιος Αντωνόπουλος, Διδακτορική Διατριβή (2023), Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Η ενίσχυση του κάθε παράγοντα έγινε σε δύο επαναλήψεις (duplicates). Στον Πίνακα 16 αναγράφεται ο μέσος όρος των κύκλων ποσοτικοποίησης (C_T) στις επαναλήψεις αυτές:

Πίνακας 16: Κύκλοι ποσοτικοποίησης που προέκυψαν από την αντίδραση qPCR

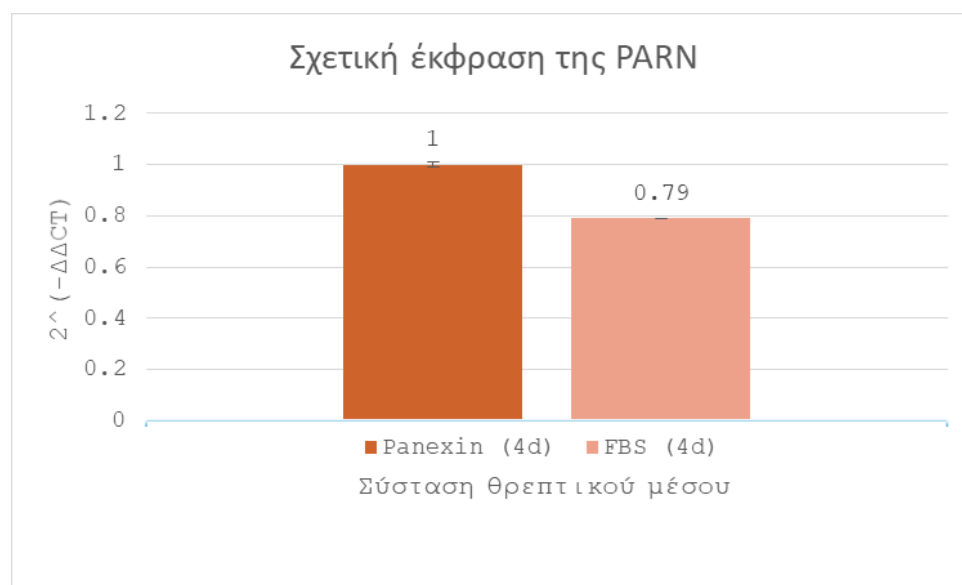
	C_T average (4 ημέρες, Panexin)	C_T average (4 ημέρες, FBS)
PARN	24.85	24.16
PARN_V1	27.30	26.67
b-actin	14.91	13.89
TERC	25.34	24.47

Με στατιστική επεξεργασία με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_T}$ υπολογίζεται το εύρος αλλαγής (fold of change) το οποίο αναγράφεται στον Πίνακα 17:

Πίνακας 17: Εύρος αλλαγής στην έκφραση στις δύο συνθήκες

	4 ημέρες, Panexin	4 ημέρες, FBS	Μεταβολή (%)
PARN	1.00±0.01	0.79±0.00	- 0.21
PARN_V1	1.00±0.02	0.76±0.01	- 0.24
TERC	1.00±0.01	0.90±0.01	- 0.10

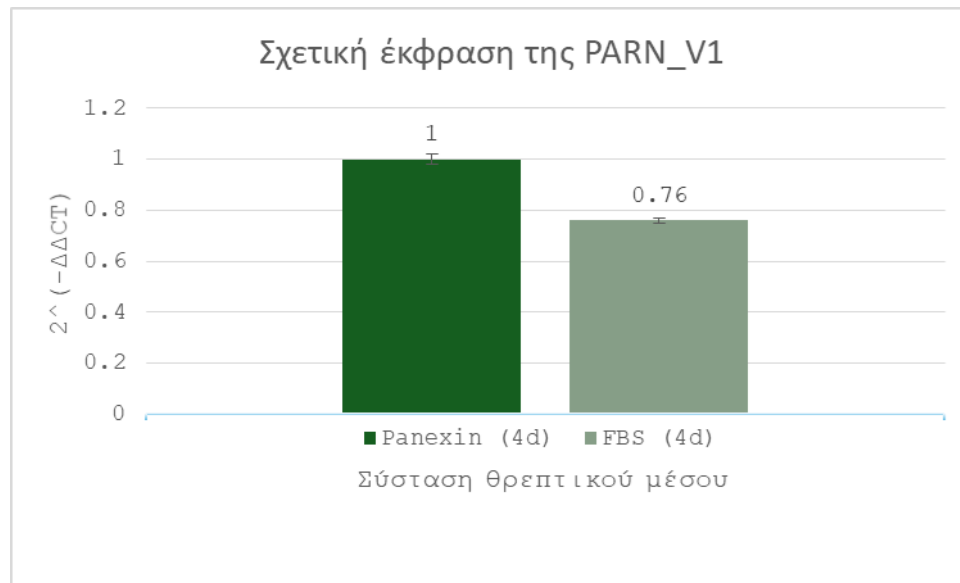
Στα Γραφήματα 5,6 και 7 αναπαρίστανται γραφικά τα δεδομένα του Πίνακα 17:



Γράφημα 5: Συγκριτικά επίπεδα του mRNA της PARN μετά από καλλιέργεια 4 ημερών σε Panexin και σε FBS

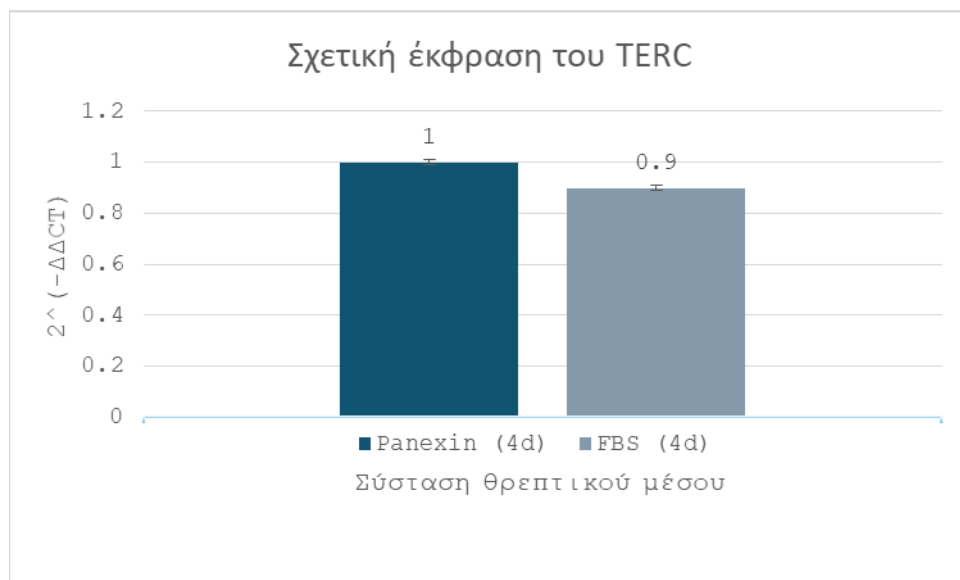
Όπως διακρίνεται στο Γράφημα 5, τα επίπεδα του mRNA της PARN είναι μειωμένα κατά 21% στην καλλιέργεια με FBS σε σύγκριση με την καλλιέργεια με Panexin. Παρόμοια μείωση παρατηρείται και στα επίπεδα του mRNA της PARN_V1, τα οποία

σε καλλιέργεια με FBS εμφανίζονται μειωμένα κατά 24% σε σχέση με την καλλιέργεια με Panexin (Γράφημα 6).



Γράφημα 6: Συγκριτικά επίπεδα του mRNA της PARN_V1 μετά από καλλιέργεια 4 ημερών σε Panexin και σε FBS

Στο επίπεδο του ώριμου TERC παρατηρείται επίσης μείωση, απλά μικρότερου μεγέθους σε σύγκριση με την PARN και την PARN_V1. Ενδεχομένως η πτώση των επιπέδων της PARN δεν επαρκούσε για να επιφέρει μεγάλη πτώση στο επίπεδο του TERC. Το TERC όπως αναπαρίσταται στο Γράφημα 7 εμφανίζει πτώση 10%.



Γράφημα 7: Συγκριτικά επίπεδα του ώριμου TERC μετά από καλλιέργεια 4 ημερών σε Panexin και σε FBS

4.2.2 Χρόνος καλλιέργειας και αλλαγές επιπέδων PARN, PARN_V1 και TERC

Κύτταρα MRC5 επίσης καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με 10% Panexin για 3.5 εβδομάδες, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν ο χρόνος καλλιέργειας επιφέρει κάποια αλλαγή στα επίπεδα των μεταγράφων PARN, PARN_V1 και TERC. Πραγματοποιήθηκε RT-qPCR και σύγκριση με τα επίπεδα των μεταγράφων σε καλλιέργεια Panexin για 4 ημέρες με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Η ενίσχυση του κάθε παράγοντα έγινε σε δύο επαναλήψεις (duplicates). Στον Πίνακα 18 αναγράφεται ο μέσος όρος των κύκλων ποσοτικοποίησης (C_T) στις επαναλήψεις αυτές. Για σύγκριση αναγράφονται και οι τιμές που αφορούν την καλλιέργεια με Panexin 4 ημερών.

Πίνακας 18: Κύκλοι ποσοτικοποίησης που προέκυψαν από την αντίδραση qPCR

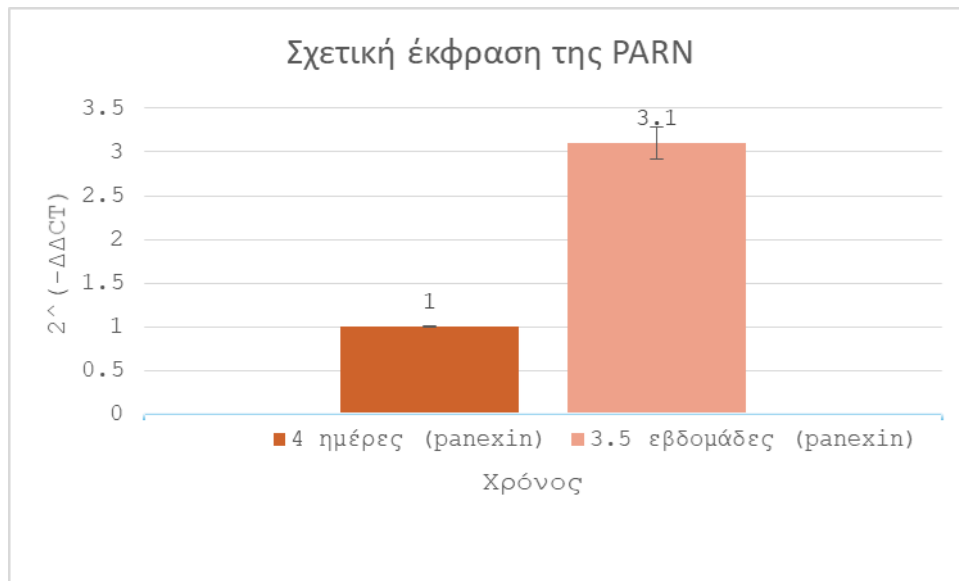
	C_T average (4 ημέρες, Panexin)	C_T average (3.5 εβδομάδες, Panexin)
PARN	24.85	25.02
PARN_V1	27.30	28.85
b-actin	14.91	16.72
TERC	25.34	26.61

Με στατιστική επεξεργασία με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_t}$ υπολογίζεται το εύρος αλλαγής (fold of change) το οποίο αναγράφεται στον Πίνακα 19:

Πίνακας 19: Εύρος αλλαγής στην έκφραση στις δύο συνθήκες

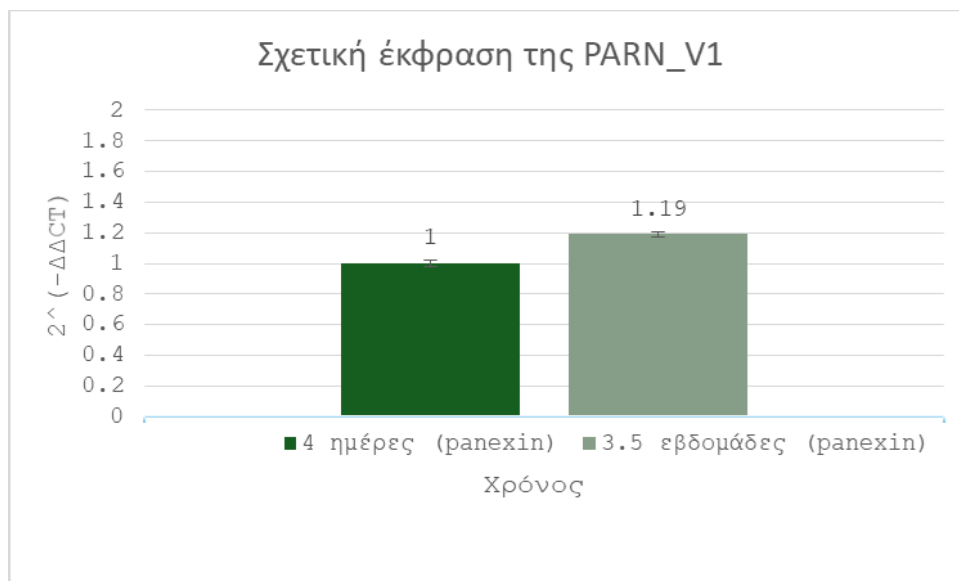
	4 ημέρες, Panexin	3.5 εβδομάδες, Panexin	Μεταβολή (%)
PARN	1.00±0.01	3.10±0.18	210
PARN_V1	1.00±0.02	1.19±0.02	19
TERC	1.00±0.01	1.48±0.34	48

Παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των μεταγράφων και των τριών παραγόντων. Το Γράφημα 8 απεικονίζει την αλλαγή στα επίπεδα της PARN μετά από 3.5 εβδομάδες καλλιέργεια με Panexin. Το επίπεδο του mRNA της PARN εμφανίζεται σχεδόν να τριπλασιάζεται (αύξηση 210%) στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν για διάστημα 3.5 εβδομάδων (Γράφημα 8).



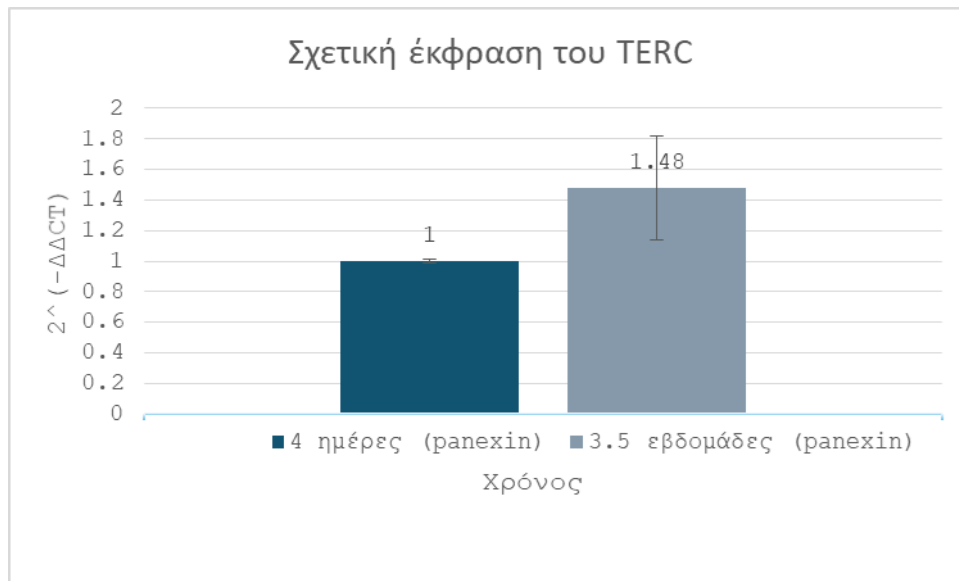
Γράφημα 8: Συγκριτικά επίπεδα του mRNA της PARN μετά από καλλιέργεια 4 ημερών και 3.5 εβδομάδων σε Panexin

Το επίπεδο του mRNA της PARN_V1 από την άλλη εμφανίζει αύξηση κατά 19%, όπως απεικονίζεται στο [Γράφημα 9](#).



Γράφημα 9: Συγκριτικά επίπεδα του mRNA της PARN_V1 μετά από καλλιέργεια 4 ημερών και 3.5 εβδομάδων σε Panexin

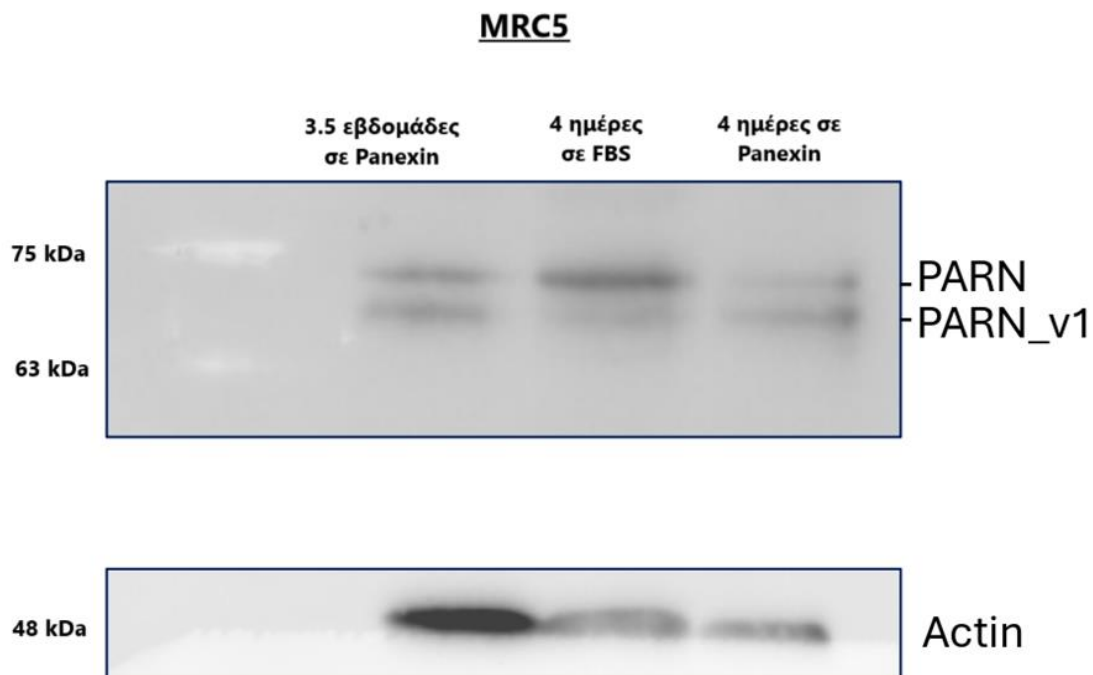
Όσον αφορά το TERC σημειώθηκε αύξηση 48%, όπως φαίνεται στο [Γράφημα 10](#). Η μεγάλη τυπική απόκλιση υποδηλώνει την ύπαρξη κάποιου σφάλματος και περιορίζει την εξαγωγή κάποιου αξιόπιστου συμπεράσματος όσον αφορά τα συγκεκριμένα κύτταρα.



Γράφημα 10: Συγκριτικά επίπεδα του TERC μετά από καλλιέργεια 4 ημερών και 3.5 εβδομάδων σε Panexin

4.2.3 Διερεύνηση επιπέδων PARN, PARN_V1 σε επίπεδο πρωτεΐνης

Εκτός από RT-qPCR, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western. Χρησιμοποιήθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και από τις τρεις διαφορετικές συνθήκες που δοκιμάστηκαν (4 ημέρες με FBS, 4 ημέρες με Panexin, 3.5 εβδομάδες με Panexin). Για την κανονικοποίηση χρησιμοποιήθηκε β-ακτίνη. Το αποτέλεσμα απεικονίζεται στην Εικόνα 10.



Εικόνα 10: Επίπεδα πρωτεΐνης PARN και PARN_V1 σε κύτταρα MRC5 μετά από καλλιέργεια 4 ημερών ή 3.5 εβδομάδων, σε θρεπτικό υλικό με FBS ή Panexin. Η β-ακτίνη χρησιμοποιείται για κανονικοποίηση.

Παρατηρείται παρουσία και των δύο ισομορφών σε όλες τις διαδρομές. Στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν για 3.5 εβδομάδες οι δύο ζώνες εμφανίζονται όμοιες σε ένταση χρώματος και πάχος. Στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν 4 ημέρες με FBS ωστόσο η συγκέντρωση της PARN είναι εμφανώς μεγαλύτερη· επίσης, στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν για 4 ημέρες με Panexin φαίνεται ενισχυμένη η ζώνη που αντιστοιχεί στην ισομορφή PARN_V1.

5. Συζήτηση

Η πολυ(Α) εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN) είναι μια απαδενυλάση, η οποία σύμφωνα με την πρόσφατη βιβλιογραφία φαίνεται να συμμετέχει στην απαδενυλίωση των ολιγο(Α)-ουρών μη κωδικοποιητικών RNAs, προάγοντας έτσι την ωρίμανσή τους και παρεμποδίζοντας την ταχεία αποικοδόμησή τους (Son et al, 2018). Ένα από τα σημαντικότερα υποστρώματα της PARN είναι το συστατικό RNA της τελομεράσης (TERC), που είναι απαραίτητο για τη συναρμολόγηση του συμπλόκου της τελομεράσης και για τη σύνθεση των τελομερών. Ανισορροπία στα επίπεδα του ώριμου TERC συνδέεται με σοβαρές γενετικές ασθένειες (Moon et al, 2015). Η PARN_V1 είναι μια ισομορφή της PARN που απομονώθηκε στο εργαστήριο, μικρότερη κατά 61 αμινοξέα και σύμφωνα με πιο πρόσφατα πειράματα καταλυτικά ανενεργή. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να εξεταστεί αν η PARN_V1 επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του TERC. Για το πειραματικό μέρος χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές, MCF7 και MRC5, στις οποίες επιβεβαιώθηκε η παρουσία της PARN και της PARN_V1. Επιπλέον προσδιορίστηκαν και συγκρίθηκαν τα επίπεδα των mRNA τους αλλά και τα επίπεδα του TERC σε διαφορετικές συνθήκες. Απώτερος στόχος των πειραμάτων αυτών είναι να συμβάλουν στη διαλεύκανση του βιολογικού ρόλου της ισομορφής, στην εξακρίβωση των συνθηκών εμφάνισής της και στον καθορισμό των συνθηκών μετατόπισης της έκφρασης από την πλήρους μήκους PARN στην PARN_V1. Μια τέτοια μετατόπιση ενδεχομένως να επιφέρει σημαντικές μεταβολές στη λειτουργία ενός κυττάρου, καθώς η PARN επεξεργάζεται πλήθος μη-κωδικοποιητικών RNA. Ειδικότερα, μια πιθανή επίδραση στο TERC, το οποίο συνδέεται τόσο με τις διαταραχές της βιολογίας των τελομερών (Telomere Biology Disorders, TBDs), όσο και με την ογκογένεση και την κυτταρική γήρανση, θα μπορούσε να υποδείξει νέες κατευθύνσεις έρευνας.

Τα αρχικά πειράματα έγιναν σε κύτταρα MCF7, που αποτελούν κυτταρική σειρά που προέρχεται από καρκινικό ιστό. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM/FBS 10%. Στα κύτταρα αυτά κυριαρχεί η πλήρους μήκους PARN, αλλά είναι παρούσα και η ισομορφή PARN_V1 σε μικρό ποσοστό. Αυτό παρατηρείται τόσο σε επίπεδο μεταγράφων, όσο και πρωτεϊνών· η PARN_V1 ανιχνεύεται σε μεγαλύτερο αριθμό C_T RT-qPCR σε σχέση με την PARN (C_T PARN_V1 : 31.49, C_T PARN : 26.74), ενώ και στην ανοσοαποτύπωση κατά Western εμφανίζει λιγότερο έντονη ζώνη. Αποσιώπηση (knock-down) της PARN και της PARN_V1 με την τεχνολογία shRNA, οδήγησε σε μεγάλη μείωση του επιπέδου του ώριμου TERC, όπως διαπιστώθηκε μέσω RT-qPCR. Σε επίπεδο mRNA, η PARN και η PARN_V1 εμφάνισαν τη μεγαλύτερη μείωση 48 ώρες μετά την αποσιώπηση, με 44% και 42% μείωση αντίστοιχα. Το χαμηλότερο πρωτεϊνικό επίπεδο παρατηρήθηκε επίσης στις 48 ώρες, σύμφωνα με την εικόνα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Το TERC ωστόσο παρουσίασε τη μεγαλύτερη μείωση (91%) 72 ώρες μετά τη αποσιώπηση. Αυτό το αποτέλεσμα είναι λογικό, καθώς η μείωση στη συγκέντρωση του ενζύμου δεν μπορεί να επηρεάσει αυτοστιγμεί το TERC. Εξάλλου, σύμφωνα και με τη βιβλιογραφία, η ωρίμανση μπορεί

να γίνει άμεσα ή έμμεσα, και όταν γίνεται έμμεσα την απαδενυλίωση ακολουθεί επεξεργασία από άλλα ένζυμα προκειμένου να δημιουργηθεί το ώριμο TERC. Γεγονός είναι πως η αποσιώπηση της PARN οδήγησε σε πολύ μεγάλη μείωση του TERC, κάτι που συμφωνεί και με τη σχετική βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία δι-αλληλικές μεταλλάξεις στο γονίδιο της PARN (άρα σε απουσία λειτουργικής PARN), το επίπεδο του ώριμου TERC μειώνεται σημαντικά.

Τα πειράματα συνεχίστηκαν κατόπιν σε κύτταρα MRC5, δηλαδή σε ινοβλάστες. Οι ινοβλάστες, όπως και πολλά κύτταρα του ανθρώπινου σώματος, βρίσκονται κατά κανόνα σε μια αναστρέψιμη κατάσταση ηρεμίας (quiescence). Στην κατάσταση αυτή βρίσκονται εκτός του κυτταρικού κύκλου (φάση G₀), αλλά δύνανται να επανεισέλθουν και να αρχίσουν ξανά να διαιρούνται (**Lemons et al, 2010**). Οι ινοβλάστες που εξέρχονται από την κατάσταση ηρεμίας ονομάζονται ενεργοποιημένοι ινοβλάστες· in vivo, ενεργοποίηση των ινοβλαστών συμβαίνει στο στάδιο φλεγμονής (inflammatory stage) κατά την επούλωση τραυμάτων. Οι ενεργοποιημένοι ινοβλάστες χαρακτηρίζονται από αυξημένο κυτταρικό μέγεθος, παραγωγή μεγάλης ποσότητας εξωκυττάριας ουσίας, υψηλά επίπεδα έκφρασης alpha-smooth muscle actin (α-SMA) και έντονη παρουσία μικροϊνιδίων που τους καθιστούν συσταλτούς (**Gomes et al, 2021**). Τους ινοβλάστες ενεργοποιούν κυτοκίνες και αυξητικοί παράγοντες, με κυριότερους τους TGF-β και PDGF.

Κύτταρα MRC5 καλλιεργήθηκαν για 4 ημέρες σε θρεπτικό μέσο DMEM/FBS 10% και σε θρεπτικό μέσο DMEM/Panexin 10%, προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας στα επίπεδα PARN, PARN_V1 και TERC. Το Panexin είναι ένα συνθετικό υποκατάστατο ορού, και η βασική του διαφορά με το FBS είναι ότι δεν περιέχει αυξητικούς παράγοντες. Η RT-qPCR που πραγματοποιήθηκε έδειξε μειωμένο επίπεδο mRNA των PARN και PARN_V1 (μείωση 21% και 24% αντίστοιχα) στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν με FBS, ενώ μικρότερη μείωση εμφάνισε και το TERC (μείωση 10%). Η αναλογία της PARN και της ισομορφής της σε επίπεδο μεταγράφων δε φαίνεται να διαφέρει στα δύο θρεπτικά μέσα. Από την ανοσοαποτύπωση κατά Western ωστόσο προκύπτει ένα πολύ ενδιαφέρον πειραματικό αποτέλεσμα: στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν με FBS, και επομένως υπό την επίδραση αυξητικών παραγόντων, κυριαρχεί η πλήρους μήκους PARN, ενώ στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν με Panexin η ένταση της πρωτεϊνικής ζώνης της PARN υποχωρεί σημαντικά και ενισχύεται η ζώνη που αντιστοιχεί στην PARN_V1. Αυτό βέβαια διαφοροποιείται από τα αποτελέσματα της RT-qPCR, που δείχνουν μειωμένο επίπεδο mRNA της PARN σε θρεπτικό μέσο με FBS. Οι διαφορές σε επίπεδο mRNA και επίπεδο πρωτεϊνών ωστόσο μπορούν να αιτιολογηθούν, καθώς η ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης εξαρτάται όχι μόνο από τον αριθμό των διαθέσιμων mRNAs, αλλά και από τον ρυθμό της μετάφρασης. Μπορεί επομένως να υπάρχει μικρότερος αριθμός μορίων mRNA της PARN, αλλά αυτά να μεταφράζονται με αυξημένο ρυθμό και να οδηγούν σε περισσότερη τελική πρωτεΐνη. Από τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, εξάγεται το συμπέρασμα ότι απουσία αυξητικών παραγόντων, όταν δηλαδή οι ινοβλάστες ρέπουν προς κατάσταση ηρεμίας (quiescence), η παρουσία της PARN υποχωρεί μερικώς και ενισχύεται η PARN_V1.

Από την άλλη, όταν οι ινοβλάστες τείνουν να ενεργοποιηθούν, κυριαρχεί εμφανώς η PARN. Ένα από τα επόμενα βήματα της έρευνας θα αποτελέσει η ισχυρότερη τεκμηρίωση του συμπεράσματος αυτού, πραγματοποιώντας προσδιορισμό των επιπέδων της πρωτεΐνης α -SMA με ανοσοαποτύπωση κατά Western, ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσον οι ινοβλάστες που καλλιιεργήθηκαν σε FBS είναι ενεργοποιημένοι.

Ακόμη, κύτταρα MRC5 καλλιιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM/Panexin 10% για 3.5 εβδομάδες, προς εξέταση της επίδρασης του χρόνου καλλιέργειας στα επίπεδα των PARN, PARN_V1 και TERC. Πραγματοποιήθηκε RT-qPCR, και βρέθηκαν αυξημένα τα επίπεδα mRNA των PARN (αύξηση 210%), PARN_V1 (αύξηση 19%) και του TERC (αύξηση 48%) σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν για 4 ημέρες στο ίδιο θρεπτικό μέσο. Στην περίπτωση του TERC η τυπική απόκλιση (1.48 ± 0.34 μονάδες $2^{-\Delta\Delta CT}$) είναι πολύ μεγάλη και επομένως δεν είναι δυνατή η εξαγωγή κάποιου αξιόπιστου συμπεράσματος, καθιστώντας απαραίτητη την επανάληψη των μετρήσεων για περιορισμό του σφάλματος. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο δεν παρατηρείται ισοδύναμη αύξηση, τουλάχιστον στην PARN, η οποία μεταγραφικά σχεδόν τριπλασιάζεται. Όπως αναφέρθηκε βέβαια, η μεταβολή σε μεταγραφικό επίπεδο δεν συνοδεύεται απαραίτητα από μεταβολή σε πρωτεϊνικό επίπεδο· ο αριθμός των mRNAs επομένως μπορεί να εμφανίζεται αυξημένος, αλλά αυτά να μην μεταφράζονται και να μην προκύπτει ισοδύναμη μεταβολή στην ποσότητα των πρωτεϊνών. Σημειώνεται επίσης ότι η μεταβολή αυτή παρατηρείται κατά βάσει λόγω των υψηλότερων τιμών C_T της β -ακτίνης (γονίδιο αναφοράς), όπου ενδεχομένως υπάρχει σφάλμα.

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών συμφωνούν και ερμηνεύονται με την τρέχουσα βιβλιογραφία, η οποία συνδέει την PARN με το επίπεδο του ώριμου TERC, και υποδεικνύουν συσχέτιση της παρουσίας αυξητικών παραγόντων στο θρεπτικό μέσο με την παρουσία τη ισομορφής PARN_V1. Η εξακρίβωση της κατάστασης των ινοβλαστών, αν δηλαδή είναι ενεργοποιημένοι ή σε ηρεμία, η βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας για μετατόπιση της μεταγραφικής ισορροπίας προς την ισομορφή PARN_V1 καθώς και η επίδραση των εξωσωμάτων στην ισορροπία αυτή είναι οι μελλοντικές προσεγγίσεις που θα συμβάλουν στην περαιτέρω κατανόηση των μηχανισμών γονιδιακής ρύθμισης των κυττάρων και θα παράσχουν τις απαραίτητες γνώσεις για αξιοποίηση των μηχανισμών αυτών προς προώθηση της επιστημονικής έρευνας.

6. Βιβλιογραφία

1. Akincilar, S. C., Unal, B., & Tergaonkar, V. (2016). Reactivation of telomerase in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(8), 1659–1670. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2146-9>
2. Armanios, M., & Blackburn, E. H. (2012b). The telomere syndromes. *Nature Reviews Genetics*, 13(10), 693–704. <https://doi.org/10.1038/nrg3246>
3. Arnoult, N., & Karlseder, J. (2015). Complex interactions between the DNA-damage response and mammalian telomeres. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(11), 859–866. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3092>
4. Bär, C., Povedano, J. M., Serrano, R., Benitez-Buelga, C., Popkes, M., Formentini, I., Bobadilla, M., Bosch, F., & Blasco, M. A. (2016). Telomerase gene therapy rescues telomere length, bone marrow aplasia, and survival in mice with aplastic anemia. *Blood*, 127(14), 1770–1779. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-667485>
5. Barros, A., Oldham, J., & Noth, I. (2019). Genetics of idiopathic pulmonary fibrosis. *The American Journal of the Medical Sciences*, 357(5), 379–383. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2019.02.009>
6. Berndt, H., Harnisch, C., Rammelt, C., Stöhr, N., Zirkel, A., Dohm, J. C., Himmelbauer, H., Tavanez, J.-P., Hüttelmaier, S., & Wahle, E. (2012). Maturation of mammalian H/ACA box snRNAs: Papd5-dependent adenylation and Parn-dependent trimming. *RNA*, 18(5), 958–972. <https://doi.org/10.1261/rna.032292.112>
7. Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 6(8), 611–622. <https://doi.org/10.1038/nrg1656>
8. Boyraz, B., Moon, D. H., Segal, M., Muosieyiri, M. Z., Aykanat, A., Tai, A. K., Cahan, P., & Agarwal, S. (2016). Posttranscriptional manipulation of TERC reverses molecular hallmarks of telomere disease. *Journal of Clinical Investigation*, 126(9), 3377–3382. <https://doi.org/10.1172/jci87547>
9. Bustin, S. A., & Nolan, T. (2020). RT-qPCR testing of SARS-COV-2: A Primer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 3004. <https://doi.org/10.3390/ijms21083004>
10. Chen, L., Roake, C. M., Galati, A., Bavasso, F., Micheli, E., Saggio, I., Schoeftner, S., Cacchione, S., Gatti, M., Artandi, S. E., & Raffa, G. D. (2020). Loss of human TGS1 hypermethylase promotes increased telomerase RNA and telomere elongation. *Cell Reports*, 30(5). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.004>

11. Chow, T. T., Zhao, Y., Mak, S. S., Shay, J. W., & Wright, W. E. (2012). Early and late steps in telomere overhang processing in normal human cells: The position of the final RNA primer drives telomere shortening. *Genes & Development*, 26(11), 1167–1178. <https://doi.org/10.1101/gad.187211.112>
12. Corbett, A. H., & Fasken, M. B. (2019). A-tail of telomerase RNA maturation. *Molecular Cell*, 74(4), 635–636. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.04.031>
13. Darzacq, X., Kittur, N., Roy, S., Shav-Tal, Y., Singer, R. H., & Meier, U. T. (2006). Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells. *The Journal of Cell Biology*, 173(2), 207–218. <https://doi.org/10.1083/jcb.200601105>
14. Dehlin, E., Wormington, M., Körner, C. G., & Wahle, E. (2000). Cap-dependent deadenylation of mrna. *The EMBO Journal*, 19(5), 1079–1086. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.5.1079>
15. Dhanraj, S., Gunja, S. M., Deveau, A. P., Nissbeck, M., Boonyawat, B., Coombs, A. J., Renieri, A., Mucciolo, M., Marozza, A., Buoni, S., Turner, L., Li, H., Jarrar, A., Sabanayagam, M., Kirby, M., Shago, M., Pinto, D., Berman, J. N., Scherer, S. W., ... Dror, Y. (2015). Bone marrow failure and developmental delay caused by mutations in poly(a)-specific ribonuclease (*parn*). *Journal of Medical Genetics*, 52(11), 738–748. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103292>
16. Diotti, R., & Loayza, D. (2011). Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus*, 2(2), 119–135. <https://doi.org/10.4161/nucl.2.2.15135>
17. Feng, J., Funk, W. D., Wang, S.-S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C.-P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C., Yu, J., Le, S., West, M. D., Harley, C. B., Andrews, W. H., Greider, C. W., & Villeponteau, B. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science*, 269(5228), 1236–1241. <https://doi.org/10.1126/science.7544491>
18. Gao, M., Fritz, D. T., Ford, L. P., & Wilusz, J. (2000). Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mrna deadenylation rates in vitro. *Molecular Cell*, 5(3), 479–488. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80442-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80442-6)
19. Giardini, M. A., Segatto, M., da Silva, M. S., Nunes, V. S., & Cano, M. I. (2014). Telomere and telomerase biology. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 1–40. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-397898-1.00001-3>
20. Gomes, R. N., Manuel, F., & Nascimento, D. S. (2021). The bright side of fibroblasts: Molecular signature and regenerative cues in major organs. *Npj Regenerative Medicine*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00153-z>

21. Grill, S., & Nandakumar, J. (2021). Molecular mechanisms of telomere biology disorders. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100064. <https://doi.org/10.1074/jbc.rev120.014017>
22. Houseley, J., LaCava, J., & Tollervey, D. (2006). RNA-quality control by the exosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(7), 529–539. <https://doi.org/10.1038/nrm1964>
23. Huynh, T. N., & Parker, R. (2023). The Parn, TOE1, and USB1 RNA deadenylases and their roles in non-coding RNA regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 299(9), 105139. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105139>
24. Körner, C. G., & Wahle, E. (1997a). Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(a)-specific 3'-exoribonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 272(16), 10448–10456. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.16.10448>
25. Lemons, J. M., Feng, X.-J., Bennett, B. D., Legesse-Miller, A., Johnson, E. L., Raitman, I., Pollina, E. A., Rabitz, H. A., Rabinowitz, J. D., & Collier, H. A. (2010). Quiescent fibroblasts exhibit high metabolic activity. *PLoS Biology*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000514>
26. Lingner, J., Cooper, J. P., & Cech, T. R. (1995). Telomerase and DNA end replication: No longer a lagging strand problem? *Science*, 269(5230), 1533–1534. <https://doi.org/10.1126/science.7545310>
27. Maestroni, L., Matmati, S., & Coulon, S. (2017). Solving the telomere replication problem. *Genes*, 8(2), 55. <https://doi.org/10.3390/genes8020055>
28. Martínez, J., Ren, Y.-G., Thuresson, A.-C., Hellman, U., Åström, J., & Virtanen, A. (2000). A 54-KDA fragment of the poly(a)-specific ribonuclease is an oligomeric, processive, and Cap-interacting poly(a)-specific 3' exonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 24222–24230. <https://doi.org/10.1074/jbc.m001705200>
29. Mei, Q., Liu, Z., Zuo, H., Yang, Z., & Qu, J. (2022). Idiopathic pulmonary fibrosis: An update on pathogenesis. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.797292>
30. Montellese, C., Montel-Lehry, N., Henras, A. K., Kutay, U., Gleizes, P.-E., & O'Donohue, M.-F. (2017). Poly(A)-specific ribonuclease is a nuclear ribosome biogenesis factor involved in human 18S rRNA maturation. *Nucleic Acids Research*, 45(11), 6822–6836. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx253>
31. Moon, D. H., Segal, M., Boyraz, B., Guinan, E., Hofmann, I., Cahan, P., Tai, A. K., & Agarwal, S. (2015). Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 3'-end maturation of the telomerase RNA component. *Nature Genetics*, 47(12), 1482–1488. <https://doi.org/10.1038/ng.3423>

32. Moon, D. H., Segal, M., Boyraz, B., Guinan, E., Hofmann, I., Cahan, P., Tai, A. K., & Agarwal, S. (2015a). Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 3'-end maturation of the telomerase RNA component. *Nature Genetics*, 47(12), 1482–1488. <https://doi.org/10.1038/ng.3423>
33. Nagata, T., Suzuki, S., Endo, R., Shirouzu, M., Terada, T., Inoue, M., Kigawa, T., Kobayashi, N., Güntert, P., Tanaka, A., Hayashizaki, Y., Muto, Y., & Yokoyama, S. (2008). The RRM domain of poly(a)-specific ribonuclease has a noncanonical binding site for mrna cap analog recognition. *Nucleic Acids Research*, 36(14), 4754–4767. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn458>
34. Nguyen, D., Grenier St-Sauveur, V., Bergeron, D., Dupuis-Sandoval, F., Scott, M. S., & Bachand, F. (2015). A polyadenylation-dependent 3' end maturation pathway is required for the synthesis of the human telomerase RNA. *Cell Reports*, 13(10), 2244–2257. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.003>
35. Nguyen, T. H., Tam, J., Wu, R. A., Greber, B. J., Toso, D., Nogales, E., & Collins, K. (2018). Cryo-EM structure of substrate-bound human telomerase holoenzyme. *Nature*, 557(7704), 190–195. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0062-x>
36. Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy. *Journal of Theoretical Biology*, 41(1), 181–190. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(73\)90198-7](https://doi.org/10.1016/0022-5193(73)90198-7)
37. Roake, C. M., Chen, L., Chakravarthy, A. L., Ferrell, J. E., Raffa, G. D., & Artandi, S. E. (2019b). Disruption of telomerase RNA maturation kinetics precipitates disease. *Molecular Cell*, 74(4). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.033>
38. Rubtsova, M., & Dontsova, O. (2020). Human telomerase RNA: Telomerase component or more? *Biomolecules*, 10(6), 873. <https://doi.org/10.3390/biom10060873>
39. Shukla, S., & Parker, R. (2017). PARN Modulates Y RNA Stability and Its 3'-End Formation. *Molecular and Cellular Biology*, 37(20). <https://doi.org/10.1128/MCB.00264-17>
40. Shukla, S., Bjerke, G. A., Muhlrads, D., Yi, R., & Parker, R. (2019). The RNase Parn controls the levels of specific mirnas that contribute to p53 regulation. *Molecular Cell*, 73(6). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.010>
41. Son, A., Park, J.-E., & Kim, V. N. (2018). Parn and Toe1 constitute a 3' end maturation module for nuclear non-coding RNAs. *Cell Reports*, 23(3), 888–898. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.089>
42. Sule, R., Rivera, G., & Gomes, A. V. (2023). Western blotting (immunoblotting): History, theory, uses, protocol and Problems. *BioTechniques*, 75(3), 99–114. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0034>

43. Tang, W., Tu, S., Lee, H.-C., Weng, Z., & Mello, C. C. (2016). The RNase PARN-1 trims Pirna 3' ends to promote transcriptome surveillance in *C. elegans*. *Cell*, 164(5), 974–984. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.008>
44. Taxman, D. J., Moore, C. B., Guthrie, E. H., & Huang, M. T.-H. (2010). Short hairpin RNA (shrna): Design, delivery, and assessment of Gene Knockdown. *Methods in Molecular Biology*, 139–156. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-657-3_10
45. Timeus, F., Crescenzo, N., Doria, A., Foglia, L., Linari, A., Giaccone, M., Pastore, G., di Montezemolo, L. C., Ramenghi, U., & Saracco, P. (2005). Flow cytometric evaluation of circulating CD34+ cell counts and apoptotic rate in children with acquired aplastic anemia and myelodysplasia. *Experimental Hematology*, 33(5), 597–604. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.02.005>
46. Tummala, H., Walne, A., Collopy, L., Cardoso, S., de la Fuente, J., Lawson, S., Powell, J., Cooper, N., Foster, A., Mohammed, S., Plagnol, V., Vulliamy, T., & Dokal, I. (2015). Poly(A)-specific ribonuclease deficiency impacts telomere biology and causes dyskeratosis congenita. *Journal of Clinical Investigation*, 125(5), 2151–2160. <https://doi.org/10.1172/jci78963>
47. Virtanen, A., Henriksson, N., Nilsson, P., & Nissbeck, M. (2013). Poly(A)-specific ribonuclease (PARN): An allosterically regulated, processive and mrna Cap-interacting deadenylase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 48(2), 192–209. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.771132>
48. Watson, J. D. (1972). Origin of concatemeric T7DNA. *Nature New Biology*, 239(94), 197–201. <https://doi.org/10.1038/newbio239197a0>
49. Weinrich, S. L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V. M., Holt, S. E., Bodnar, A. G., Lichtsteiner, S., Kim, N. W., Trager, J. B., Taylor, R. D., Carlos, R., Andrews, W. H., Wright, W. E., Shay, J. W., Harley, C. B., & Morin, G. B. (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component HTR and the catalytic protein subunit htrt. *Nature Genetics*, 17(4), 498–502. <https://doi.org/10.1038/ng1297-498>
50. Wu, M., Reuter, M., Lilie, H., Liu, Y., Wahle, E., & Song, H. (2005). Structural insight into poly(a) binding and catalytic mechanism of human Parn. *The EMBO Journal*, 24(23), 4082–4093. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600869>
51. Yang, P.-C., & Mahmood, T. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
52. Zhang, D., Zhou, Z., Abu-Hijleh, M., Batra, K., Xing, C., & Garcia, C. K. (2019). Homozygous rare *parn* missense mutation in familial pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 199(6), 797–799. <https://doi.org/10.1164/rccm.201809-1632le>

53. Zhong, F. L., Batista, L. F. Z., Freund, A., Pech, M. F., Venteicher, A. S., & Artandi, S. E. (2012). TPP1 ob-fold domain controls telomere maintenance by recruiting telomerase to chromosome ends. *Cell*, *150*(3), 481–494. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.012>