

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

Τσιγγενέ Αικατερίνη του Κωνσταντίνου



Λάρισα, Ιούλιος, 2025

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

«Διερεύνηση της Έκφρασης Εναλλακτικού Μεταγράφου της Πολυ(Α)-Εξειδικευμένης Ριβονουκλεάσης»

Master Thesis

“Investigation of Alternative Transcript Expression of Poly(A)-Specific Ribonuclease”

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- Νικόλαος Μπαλατσός, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων).
- Άννα-Μαρία Ψαρρά, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Ειρήνη Τσιλιώνη, Επισκέπτρια Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πολυ(Α)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN) αποτελεί σημαντική απαδενυλάση των ευκαρυωτικών κυττάρων, η οποία εμπλέκεται στην αποικοδόμηση των mRNA και στη ρύθμιση της σταθερότητας διαφόρων μη κωδικοποιητικών RNA. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση της εναλλακτικής ισομορφής PARN_V1, η οποία προκύπτει μέσω εναλλακτικής 5' θέσης ματίσματος στο πρώτο εξόνιο, με αποτέλεσμα να απουσιάζει μια περιοχή 61 αμινοξέων. Αν και η PARN_V1 δεν διαθέτει δύο αμινοξέα επαφής της PARN που συμμετέχουν άμεσα στην κατάλυση (Asp28 και Glu30), έχει αποδειχθεί ότι διατηρεί δραστηριότητα απαδενυλάσης. Η PARN_V1 απομονώθηκε στο εργαστήριο από κύτταρα κακοήθους πλευριτικού μεσοθηλιώματος.

Στο πλαίσιο της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, διερευνήθηκαν οι συνθήκες έκφρασης της εναλλακτικής ισομορφής PARN_V1 σε καταστάσεις κυτταρικής αδράνειας και γήρανσης, σε πληθώρα φυσιολογικών και καρκινικών κυτταρικών σειρών. Η ισομορφή PARN_V1 ανιχνεύθηκε μέσω qPCR και Western blot σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, φυσιολογικούς και καρκινικούς, χωρίς σημαντικές διαφορές έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών. Ούτε η γήρανση, ούτε η επαγωγή αδράνειας, μέσω της έκθεσης σε εξωσώματα καρκινικών κυττάρων ή σε αναστολέα του c-Myc επηρέασαν στατιστικά την έκφρασή της. Τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η PARN_V1 δεν σχετίζεται άμεσα με γήρανση ή με τη ρύθμιση της αδράνειας. Ωστόσο, η παρουσία της PARN_V1, σε συνδυασμό με την απουσία της πλήρους ισομορφής, σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του λιπώδους ιστού και συνθήκες που προσομοιάζουν την κυτταρική διαφοροποίηση εγείρει το ερώτημα, εάν η PARN_V1 εμπλέκεται σε σχετικές μοριακές διαδικασίες.

Λέξεις – Κλειδιά

Πολυ(Α)-Εξειδικευμένη Ριβονουκλεάση, Εναλλακτικό Μετάγραφο PARN_V1, Κυτταρική Αδράνεια, Γήρανση, Κυτταρική Διαφοροποίηση, Ανοσοανίχνευση, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, Ινοβλάστες, Καρκινικές σειρές μαστού, Μεσεγχυματικά Κύτταρα.

ABSTRACT

Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) is a major deadenylase in eukaryotic cells, involved in mRNA degradation and the regulation of stability of various non-coding RNAs. This study investigated the expression of the alternative isoform PARN_V1, which arises from an alternative 5' splice site within the first exon, resulting in the loss of a 61-amino-acid N-terminal region. Although PARN_V1 lacks two of the five catalytic residues of full-length PARN (Asp28 and Glu30), it has been shown to retain deadenylase activity. PARN_V1 was originally identified in our lab from pleural malignant mesothelioma cells.

In this master's thesis, the expression profile of PARN_V1 was examined under conditions of cellular quiescence and senescence across a variety of normal and cancer cell lines. The isoform was detected via qPCR and Western blot in multiple cell types, with no significant changes in expression between experimental conditions. Neither cellular aging nor the induction of quiescence—through exposure to cancer-derived exosomes or c-Myc inhibition—significantly affected PARN_V1 expression levels. These findings suggest that PARN_V1 is not directly associated with aging or the regulation of quiescence. However, its presence—alongside the absence of full-length PARN—in mesenchymal stem cells from adipose tissue under conditions mimicking cellular differentiation raises the question of whether PARN_V1 may participate in related molecular processes.

Keywords

Poly(A)-Specific Ribonuclease, Alternative Transcript PARN_V1, Cellular Quiescence, Senescence, Cellular Differentiation, Immunodetection, Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR), Fibroblasts, Breast Cancer Cell Lines, Mesenchymal Stem Cells.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1.1 Πολυαδενυλίωση	13
1.2 Το εναλλακτικό μάτισμα	14
1.2.1 Κατηγορίες εναλλακτικού ματίσματος	14
1.2.2 Μηχανισμός ματίσματος	15
1.2.3 Βιολογικός ρόλος εναλλακτικού ματίσματος	17
1.3 Αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNA	18
1.4 Απαδενυλάσεις	19
1.5 Πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN)	20
1.5.1 Ρύθμιση της δράσης της PARN	22
1.5.2 Ο ρόλος της PARN στα non-coding RNA (ncRNAs)	23
1.5.3 Ασθένειες στις οποίες εμπλέκεται η PARN	27
1.6 Εναλλακτικό μετάγραφο PARN_V1	29
1.7 Κυτταρική αδράνεια (Quiescence)	29
1.8 Κυτταρική γήρανση (Cellular Senescence)	32
1.9 Σκοπός	33
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	34
2.1 Υλικά	34
I. Κυτταρικές σειρές	34
II. Μέσα Κυτταροκαλλιέργειας	34
III. Εκκινητές	35
IV. Διάλυμα RIPA. Διάλυμα λύσης των κυττάρων. Επιτρέπει την εκχύλιση πρωτεϊνών	35
V. Διαλύματα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE	36

VI. Διαλύματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western	37
VII. Αντισώματα	38
VIII. Άλλα υλικά.....	38
IX. Kit που χρησιμοποιήθηκαν	39
X. Διάλυμα αναστολέα c-Myc.....	39
2.2 Μέθοδοι	39
I. Κυτταροκαλλιέργειες	39
▪ Απόψυξη κυττάρων.....	39
▪ Καλλιέργεια κυττάρων	39
▪ Ανακαλλιέργεια κυττάρων	40
II. Συλλογή & Λύση κυττάρων.....	40
III. Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών	41
IV. Ανοσοαποτύπωση κατά Western	41
▪ Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-PAGE	41
▪ Ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη PVDF	43
▪ Ανοσοδοκιμασία Western & Χρωμογόνος ανίχνευση	43
▪ Αποδέσμευση αντισώματος (stripping).....	44
V. Απομόνωση ολικού RNA από τα κύτταρα.....	44
VI. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR - qPCR).....	45
▪ Σύνθεση cDNA	45
▪ qPCR	46
▪ Ποσοτικοποίηση mRNA.....	47
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
3.1 Έλεγχος έκφρασης εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1 σε γηρασμένα εμβρυονικά κύτταρα MRC5 (Senescence)	48
A. Γηρασμένα Εμβρυονικά Κύτταρα MRC5.....	48
B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western	49
C. PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR-qPCR).....	50

3.2 Έλεγχος έκφρασης εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1 σε εμβρυονικούς και πρωτογενείς ινοβλάστες σε συνθήκες κυτταρικής αδράνειας (Quiescence).....	52
I. Έλεγχος έκφρασης του εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1 σε διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας – Στέρηση Ορού	52
II. Έλεγχος της έκφρασης εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1 μετά από την επίδραση του αναστολέα του c-Myc	55
A. Μορφολογία Κυττάρων DLF ύστερα από την επίδραση του αναστολέα του c-Myc	55
B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western	56
C. Έλεγχος της έκφρασης εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1 ύστερα από την επίδραση εξωσωμάτων	58
I. Ανοσοαποτύπωση κατά Western	58
II. PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR-qPCR)	60
3.3 Έλεγχος διαφοροποίησης της έκφρασης του εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1 σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές	61
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	65
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	73

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού πολυαδενυλίωσης στο 3' άκρο (Guo et al., 2023).	13
Εικόνα 2: Οι κατηγορίες του εναλλακτικού ματίσματος των pre-mRNA (Ferragut Cardoso et al., 2022).	15
Εικόνα 3: Ο μηχανισμός του ματίσματος μέσω δύο αντιδράσεων διεστεροποίησης (Jacob et al., 2022).	16
Εικόνα 4: Τα μονοπάτια αποικοδόμησης των ευκαρυωτικών RNA (Ghosh & Jacobson, 2010).	18
Εικόνα 5: Το διμερές της ανθρώπινης PARN. Με πράσινο απεικονίζεται η περιοχή νουκλεάσης, με κόκκινο η περιοχή RRM και με μπλε η περιοχή R3H (Harnisch et al., 2012).	20
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών της PARN και των καταλυτικών της αμινοξέων (Huynh & Parker, 2023).	21
Εικόνα 7: Ρύθμιση της δράσης της PARN από cis στοιχεία και trans παράγοντες. Ένα υπόστρωμα mRNA, με 5' κάλυμμα, ένα στοιχείο GRE και ουρά πολυ(A) στο 3' άκρο, που αλληλεπιδρά με ενεργοποιητικούς (πράσινο) και ανασταλτικούς (κόκκινο) παράγοντες. Η PARN απεικονίζεται ως ομοδιμερές (Virtanen et al., 2013).	23
Εικόνα 8: Ρύθμιση της σταθερότητας miRNA μέσω της πολυαδενυλίωσης και απαδενυλίωσης του 3' άκρου από τις PAPD5 και PARN και της αποικοδόμησης από τη DIS3L (αριστερά) (Shukla et al., 2019). Η GLD-2 σταθεροποιεί ειδικά το miR-122 με 3'-ολιγοαδενυλίωση. Η CUGBP1 αναγνωρίζει την πλούσια σε UG περιοχή του miR-122 και προσελκύει την PARN στο 3-άκρο του miRNA (δεξιά) (Katoh et al., 2015).	24
Εικόνα 9: Ο ρόλος της PARN στην απομάκρυνση καταλοίπων αδενοσίνης από τις ουρές πολυ(A) των mRNA (άσπρο πλαίσιο), στην επεξεργασία του 3' άκρου του 18S rRNA, στη βράχυνση των oligo-αδενυλιωμένων ουρών των snoRNAs του H/ACA box και τέλος, στην επεξεργασία των miRNA (Nanjappa et al., 2021).	25
Εικόνα 10: Αδενυλίωση του TERC από την PAPD5, η οποία οδηγεί στην αποικοδόμησή του από το εξώσωμα. Αντίθετα, η PARN και άλλες εξοριβονουκλεάσες κόβουν τις προεκτάσεις στο 3' άκρο για να προκύψει το ώριμο TERC (Nagpal & Agarwal, 2020).	26
Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση των εξονίων και των πρωτεϊνικών περιοχών των PARN και PARN_V1. Τα πλαίσια που σημειώνονται με x υποδεικνύουν τις περιοχές που λείπουν από το mRNA και την πρωτεΐνη PARN_V1. Τα αμινοξέα σε παρενθέσεις υποδεικνύουν την αρίθμηση στην PARN_V1 (Αντωνόπουλος, 2024).	29
Εικόνα 12: Διάγραμμα του κυτταρικού κύκλου, που δείχνει την κατάσταση πολλαπλασιασμού και την κατάσταση ηρεμίας G0 (Marescal & Cheeseman, 2020).	31
Εικόνα 13: Εμβρυονικοί ινοβλάστες MRC5 σε Passage 2.	48
Εικόνα 14: Εμβρυονικοί ινοβλάστες MRC5 σε Passage 2.	49
Εικόνα 15: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της PARN_V1 με τα αντισώματα anti-PARN (πρωτογενές) και anti-rabbit IgG-HRP	

(δευτερογενές). Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, MRC5-P2· 2, MRC5-P3· 3, MRC5-P4· 4, MRC5-P5· 5, MRC5-P6· 6, MRC5-P7· 7, MRC5-P8.....	49
Εικόνα 16: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western με τα αντισώματα anti-β-actin (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές), που χρησιμοποιείται για κανονικοποίηση. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, MRC5-P2· 2, MRC5-P3· 3, MRC5-P4· 4, MRC5-P5· 5, MRC5-P6· 6, MRC5-P7· 7, MRC5-P8.....	50
Εικόνα 17: Επίπεδα έκφρασης της PARN σε κύτταρα MRC5 που διαφέρουν στον αριθμό ανακαλλιεργειών. Η PARN εκφράζεται και στις δύο συνθήκες, χωρίς να παρουσιάζει κάποια διαφορά στα επίπεδά της.	51
Εικόνα 18: Επίπεδα έκφρασης της PARN σε κύτταρα MRC5 που διαφέρουν στον αριθμό ανακαλλιεργειών. Η PARN εκφράζεται και στις δύο συνθήκες, χωρίς να παρουσιάζει κάποια διαφορά στα επίπεδά της.	52
Εικόνα 19: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης του PARN_V1 με τα αντισώματα anti-PARN (πρωτογενές) και anti-rabbit IgG-HRP (δευτερογενές) σε κύτταρα MRC5. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, PANEXIN NTA· 2, PANEXIN· 3, 10% FBS· 4, EXO FREE FBS· 5, PANEXIN/b-FGF. ...	53
Εικόνα 20: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western με τα αντισώματα anti-β-actin (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές), που χρησιμοποιείται ως control σε κύτταρα MRC5. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, PANEXIN NTA· 2, PANEXIN· 3, 10% FBS· 4, EXO FREE FBS· 5, PANEXIN/b-FGF.	54
Εικόνα 21: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της PARN_V1 με τα αντισώματα anti-PARN (πρωτογενές) και anti-rabbit IgG-HRP (δευτερογενές) σε κύτταρα MRC5. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, 0,5% FBS· 2, 2% FBS· 3, 10% FBS· 4, 10% EXO FREE FBS.	54
Εικόνα 22: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western με τα αντισώματα anti-β-actin (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές), που χρησιμοποιείται ως control σε κύτταρα MRC5. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, 0,5% FBS· 2, 2% FBS· 3, 10% FBS· 4, 10% EXO FREE FBS.	55
Εικόνα 23: Σύγκριση μορφολογίας κυττάρων, πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) τη χρήση του αναστολέα του c-Myc.	56
Εικόνα 24: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της PARN_V1 με τα αντισώματα anti-PARN (πρωτογενές) και anti-rabbit IgG-HRP (δευτερογενές) σε κύτταρα DLF. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, 2% FBS (control)· 2, 2% FBS (c-Myc inhibitor)· 3, 10% FBS (control)· 4, 10% FBS (c-Myc inhibitor).	56
Εικόνα 25: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western με τα αντισώματα anti-β-actin (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές), που χρησιμοποιείται ως control σε κύτταρα DLF. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, 2% FBS (control)· 2, 2% FBS (c-Myc inhibitor)· 3, 10% FBS (control)· 4, 10% FBS (c-Myc inhibitor).	57

- Εικόνα 26:** Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western με τα αντισώματα anti-FAP (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές), που χρησιμοποιείται ως control σε κύτταρα DLF. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, 2% FBS (control)· 2, 2% FBS (c-Myc inhibitor)· 3, 10% FBS (control)· 4, 10% FBS (c-Myc inhibitor). 57
- Εικόνα 27:** Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της PARN_V1 με τα αντισώματα anti-PARN (πρωτογενές) και anti-rabbit IgG-HRP (δευτερογενές) σε κύτταρα DLF. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, PANEXIN (control)· 2, PANEXIN + 170μL εξωσωμάτων· 3, PANEXIN + 330μL εξωσωμάτων. 58
- Εικόνα 28:** Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της β-ακτίνης με τα αντισώματα anti-β-actin (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές) σε κύτταρα DLF. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, PANEXIN (control)· 2, PANEXIN + 170μL εξωσωμάτων· 3, PANEXIN + 330μL εξωσωμάτων. 59
- Εικόνα 29:** Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της FAP με τα αντισώματα anti-FAP (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές) σε κύτταρα DLF. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, PANEXIN (control)· 2, PANEXIN + 170μL εξωσωμάτων· 3, PANEXIN + 330μL εξωσωμάτων. 59
- Εικόνα 30:** Επίπεδα έκφρασης της PARN σε κύτταρα DLF (control), και σε κύτταρα DLF που έχουν επωαστεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις εξωσωμάτων. Η PARN εκφράζεται και στις τρεις συνθήκες, χωρίς να παρουσιάζει κάποια διαφορά στα επίπεδά της. 60
- Εικόνα 31:** Επίπεδα έκφρασης της PARN_V1 σε κύτταρα DLF (control), και σε κύτταρα DLF που έχουν επωαστεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις εξωσωμάτων. Η PARN_V1 εκφράζεται και στις τρεις συνθήκες, χωρίς να παρουσιάζει κάποια διαφορά στα επίπεδά της. 61
- Εικόνα 32:** Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της PARN_V1 με τα αντισώματα anti-PARN (πρωτογενές) και anti-rabbit IgG-HRP (δευτερογενές). Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, κύτταρα MCF7· 2, κύτταρα MDA-MB-231. 61
- Εικόνα 33:** Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της β-ακτίνης με τα αντισώματα anti-β-actin (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές). Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, κύτταρα MCF7· 2, κύτταρα MDA-MB-231. 62
- Εικόνα 34:** Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της PARN_V1 με τα αντισώματα anti-PARN (πρωτογενές) και anti-rabbit IgG-HRP (δευτερογενές). Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, κύτταρα DLF· 2, κύτταρα BNF. 62
- Εικόνα 35:** Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της β-ακτίνης με τα αντισώματα anti-β-actin (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP

(δευτερογενές). Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, κύτταρα DLF· 2, κύτταρα BNF. 62

Εικόνα 36: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της PARN_V1 με τα αντισώματα anti-PARN (πρωτογενές) και anti-rabbit IgG-HRP (δευτερογενές). Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, κύτταρα ASCs.....63

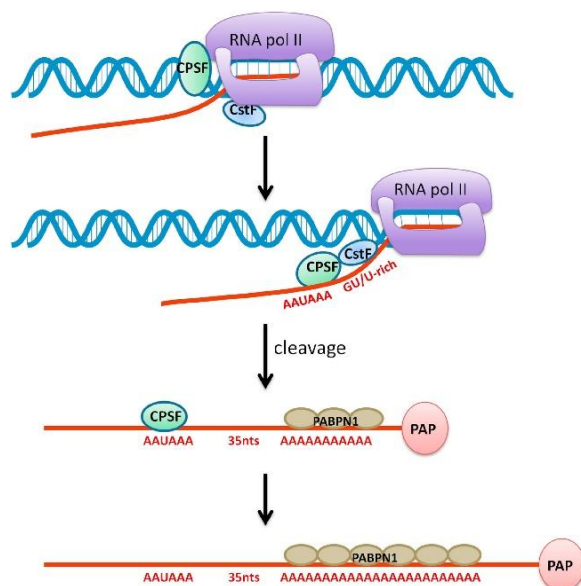
Εικόνα 37: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της β-ακτίνης με τα αντισώματα anti-β-actin (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές). Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, κύτταρα ASCs.....63

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η γονιδιακή έκφραση είναι μία βιολογική διεργασία αυστηρά ρυθμιζόμενη σε πολλαπλά στάδια. Ένα από αυτά αποτελεί η επεξεργασία του RNA, που ξεκινά αμέσως μετά τη μεταγραφή. Στο στάδιο αυτό, η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται κυρίως από την προσθήκη του 5' καλύμματος (cap), το μάτισμα (splicing) και την πολυαδενυλίωση στο 3' άκρο (συμμεταγραφικές τροποποιήσεις) (Zhang *et al.*, 2010).

1.1 Πολυαδενυλίωση

Κατά την πολυαδενυλίωση, το 3' άκρο του mRNA υποβάλλεται σε επεξεργασία με τη τμήση του πρόδρομου mRNA (pre-mRNA) στη θέση πολυαδενυλίωσης, ακολουθούμενη από την προσθήκη μιας μη κωδικοποιούμενης πολυαδενυλιωμένης ουράς, η οποία στα κύτταρα των θηλαστικών έχει μήκος περίπου 50-250 κατάλοιπα αδενοσίνης (Ren *et al.*, 2020). Όλα σχεδόν τα ευκαρυωτικά mRNA αποκτούν μια ουρά πολυ(A), εκτός από αυτά των ιστονών (Passmore & Collier, 2022). Η πολυαδενυλίωση καταλύεται από ένα ένζυμο που ονομάζεται πολυ(A)-πολυμεράση [poly(A) polymerase, PAP].



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού πολυαδενυλίωσης στο 3' άκρο (Guo *et al.*, 2023).

Συνοπτικά, ο μηχανισμός περιλαμβάνει τη μεταφορά των παραγόντων της πολυαδενυλίωσης CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor) και CstF (Cleavage Stimulation Factor) στην καρβοξυτελική περιοχή (CTD-Carboxyl terminal domain) της RNA πολυμεράσης II (RNAP II). Η RNAP II «προχωράει» μέσω του σήματος της πολυαδενυλίωσης [poly(A) signals, PAS], ειδικών αλληλουχιών που σε συνδυασμό με

περιοχές πλούσιες σε A ή GU κοντινής απόστασης, πυροδοτούν την σύνδεση των CPSF και CstF, καθώς και άλλων πρωτεϊνών, στο RNA. Οι CPSF και CstF ξεκινούν τη διάσπαση περίπου 35 νουκλεοτίδια μετά το PAS, ενώ η πολυ(A) πολυμεράση αρχίζει να συνθέτει την ουρά πολυ(A). Σχεδόν ταυτόχρονα, η πρωτεΐνη δέσμευσης πολυ(A) [Poly(A)-binding protein in the nucleus, PABPN1] δεσμεύεται στην ουρά και λειτουργεί ως μοριακός χάρακας, ορίζοντας πότε σταματά η πολυαδενυλίωση (*Εικόνα 1*) (Guo *et al.*, 2023, Gruber *et al.*, 2019).

Η σημασία της πολυαδενυλίωσης εντοπίζεται στη ρύθμιση της λειτουργίας και της σταθερότητας τόσο των mRNA όσο και των μη κωδικοποιητικών RNA (ncRNAs-non coding RNAs) (Shukla *et al.*, 2019). Στην περίπτωση των mRNA, η προσθήκη ουρών πολυ(A) προάγει την επεξεργασία, την εξαγωγή στο κυτταρόπλασμα και τη μετάφρασή τους. Επιπλέον, μπορεί να αυξήσει τη σταθερότητά τους, μειώνοντας τον ρυθμό αποικοδόμησης του καλύμματος στο 5' άκρο, ή/και αναστέλλοντας την πρόσβαση των 3'→5' εξονουκλεασών. Στα ncRNA, η διαδικασία προσθήκης και αφαίρεσης ουράς ολιγο(A) μπορεί να ρυθμίζει την αποικοδόμηση ή και τη σταθερότητα αυτών (Huynh *et al.*, 2023).

Αξίζει, τέλος, να σημειωθεί ότι η **εναλλακτική πολυαδενυλίωση (APA-Alternative Polyadenylation)** είναι ένας ευρέως διαδεδομένος μηχανισμός στα ευκαρυωτικά κύτταρα που παράγει ισομορφές mRNA με εναλλακτικά 3' άκρα, λόγω πολλαπλών θέσεων πολυαδενυλίωσης. Έχει αναδειχθεί ως βασικός ρυθμιστικός μηχανισμός που επιτρέπει την παραγωγή πολλών διαφορετικών μεταγράφων, αυξάνοντας την ποικιλομορφία του μεταγραφώματος (Lutz *et al.*, 2008).

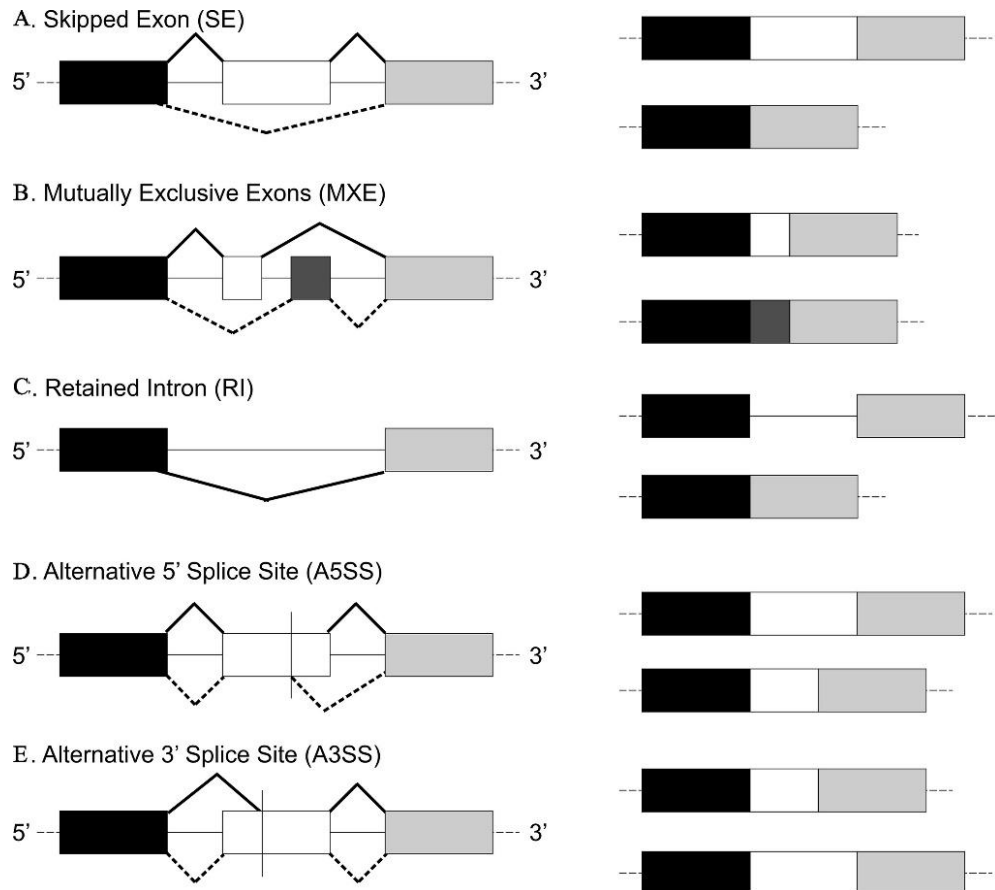
1.2 Το εναλλακτικό μάτισμα

Το εναλλακτικό μάτισμα είναι ένας ακόμη μηχανισμός που επιτρέπει την παραγωγή πολλών διαφορετικών ισομορφών mRNA από το ίδιο γονίδιο, αυξάνοντας την πολυπλοκότητα τόσο του μεταγραφώματος όσο και του πρωτεώματος (Wright *et al.*, 2022). Αυτές οι διαφορετικές ισομορφές mRNA δημιουργούνται μέσω της διαφορετικής ενσωμάτωσης ή/και αποκοπής εξονίων και ιντρονίων στο τελικό μόριο mRNA που μεταγράφεται. Τα εξόνια που απαντώνται πάντα στο ώριμο mRNA, ονομάζονται ιδιοστατικά, ενώ εκείνα που μπορεί να υπάρχουν μόνο σε κάποιες ισομορφές ονομάζονται εναλλακτικά (Singh & Ahi, 2022).

1.2.1 Κατηγορίες εναλλακτικού ματίσματος

Οι πιο συνήθεις κατηγορίες εναλλακτικού ματίσματος που έχουν χαρακτηριστεί είναι οι εξής: παράλειψη εξονίου, αμοιβαία αποκλειόμενα εξόνια, διατήρηση ιντρονίου και χρήση εναλλακτικών 5' ή 3' θέσεων ματίσματος (Edwards-Gilbert, 2010) (*Εικόνα 2*). Κατά την

παράλειψη εξονίου αφαιρούνται ορισμένα εξόνια και τα παρακείμενα ιντρόνια τους από το mRNA πριν από τη μετάφραση, ενώ κατά τη διατήρηση ιντρονίου μη κωδικοποιητικές περιοχές του γονιδίου διατηρούνται στο τελικό μετάγραφο mRNA. Τα εξόνια μπορούν επίσης να ενώνονται σε εναλλακτικές 5' ή 3' θέσεις ματίσματος, ενώ τέλος στην περίπτωση των αμοιβαία αποκλειόμενων εξονίων, δύο ή περισσότερα γεγονότα ματίσματος δεν είναι ανεξάρτητα, αλλά εκτελούνται ή απενεργοποιούνται με συντονισμένο τρόπο (Liu *et al.*, 2022).



Εικόνα 2: Οι κατηγορίες του εναλλακτικού ματίσματος των pre-mRNA (Ferragut Cardoso *et al.*, 2022).

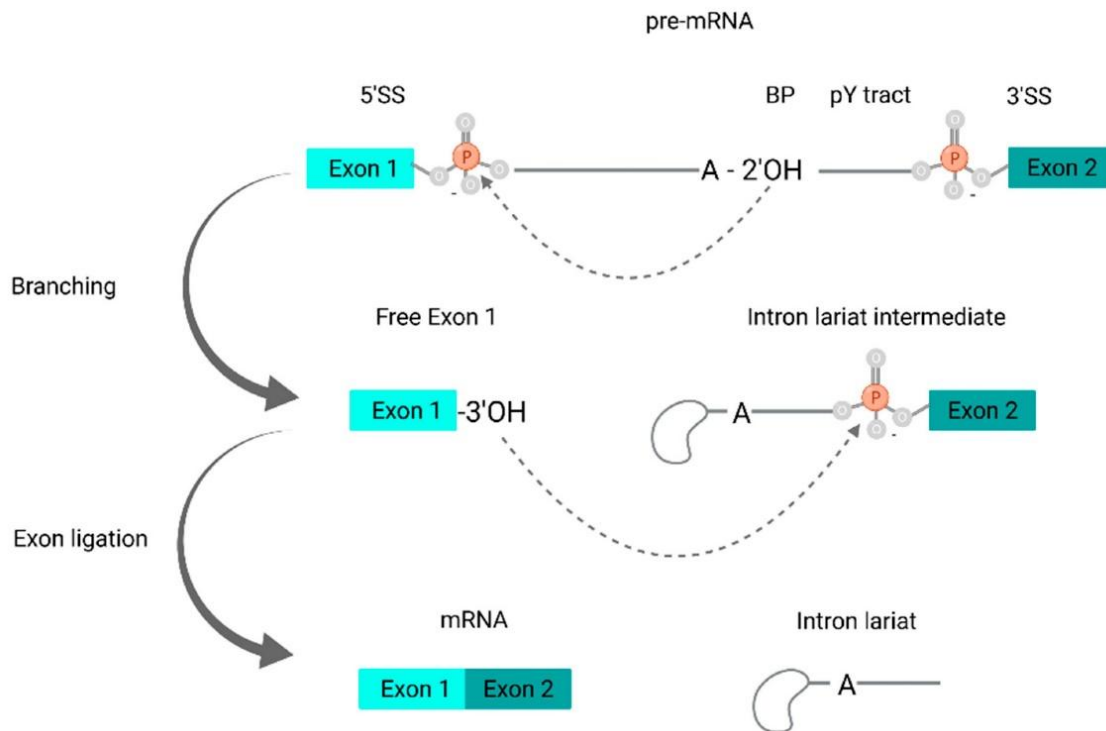
1.2.2 Μηχανισμός ματίσματος

Οι νέες ισομορφές mRNA προκύπτουν όταν το «σωμάτιο συρραφής» ή αλλιώς «ματισματούςωμα» (spliceosome) αλληλεπιδρά με θέσεις ματίσματος που βρίσκονται στα όρια ιντρονίου-εξονίου. Το σωμάτιο συρραφής αποτελείται από πέντε RNA (U1, U2, U4, U5 και U6), που καλούνται όλα μαζί μικρά πυρηνικά RNA (snRNAs: small nuclear RNAs), και εκατοντάδες πρωτεΐνες, που ονομάζονται μικρές πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (snRNPs) (Will & Lührmann, 2011). Η πολύπλοκη διαδικασία ρύθμισης του ματίσματος

πραγματοποιείται χάρη στις δυναμικές συναρμολογήσεις των snRNP με σταδιακό τρόπο (Liu *et al.*, 2022).

Τα όρια μεταξύ ιντρονίων και εξονίων που θα λάβει χώρα το μάτισμα χαρακτηρίζονται κατά κανόνα από GU στην 5'-θέση συρραφής (5' splice site ή donor), ενώ η αλληλουχία στην 3' θέση συρραφής (3' splice site ή acceptor) τελειώνει κατά κανόνα σε AG. Για την αφαίρεση του ιντρονίου απαιτείται μια επιπλέον αλληλουχία εσωτερικά του-συνήθως κοντά στην 3' θέση συρραφής-που ονομάζεται θέση διακλάδωσης (branch site) και έχει μία συντηρημένη A ακολουθούμενη από μια σειρά πυριμιδινών (McManus & Graveley, 2011).

Ο μηχανισμός του μάτισματος περιλαμβάνει δύο διαδοχικές αντιδράσεις διεστεροποίησης (transesterification). Στην πρώτη, η 2'-OH της ριβόζης της συντηρημένης A στη θέση διακλάδωσης επάγει μια πυρηνόφιλη προσβολή στη φωσφορυλομάδα της συντηρημένης G στην 5' θέση συρραφής. Ο φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ εξονίου-ιντρονίου διασπάται και η G της 5' θέσης συρραφής ενώνεται με μια τριπλή σύνδεση στη θέση 2' της A της θέσης διακλάδωσης. Στη δεύτερη αντίδραση διεστεροποίησης, η ελεύθερη 3'-OH του εξονίου επάγει μια πυρηνόφιλη προσβολή στη φωσφορυλομάδα της 3' θέσης συρραφής. Οι δύο αυτές αντιδράσεις έχουν ως αποτέλεσμα αρχικά να «συρράπτονται» το άκρο 3' του εξονίου με το άκρο 5' του επόμενου εξονίου και έπειτα να απελευθερώνουν το ιντρόνιο με μια δομή βρόχου ή «λάσου» (lariat) (Εικόνα 3) (Pan *et al.*, 2015).



Εικόνα 3: Ο μηχανισμός του μάτισματος μέσω δύο αντιδράσεων διεστεροποίησης (Jacob *et al.*, 2022).

1.2.3 Βιολογικός ρόλος εναλλακτικού ματίσματος

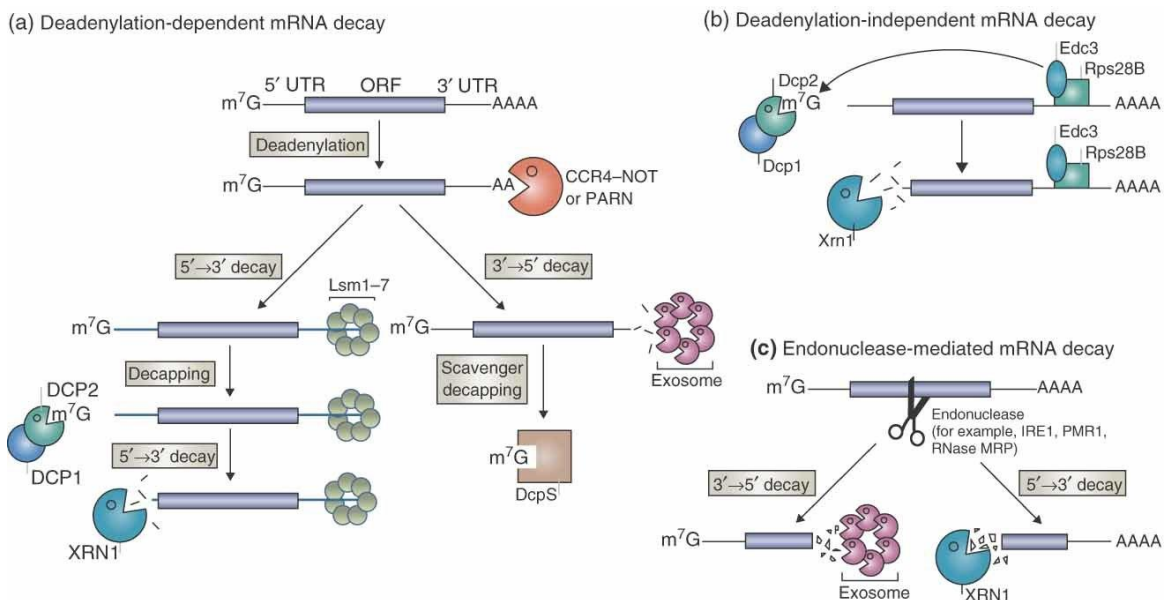
Μία από τις κύριες λειτουργίες του εναλλακτικού ματίσματος, όπως αναφέρθηκε, είναι η αύξηση της πρωτεϊνικής ποικιλομορφίας, καθώς παράγονται διαφορετικές πρωτεΐνες από ένα συγκεκριμένο σύνολο γονιδίων. Περίπου το 95% των γονιδίων που περιέχουν ιντρόνια στον άνθρωπο, υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα, με ποικίλες συνέπειες για τον οργανισμό (Jacob *et al.*, 2022). Πιο συγκεκριμένα, μέσω του εναλλακτικού ματίσματος μπορεί να ρυθμίζεται η σύνδεση μεταξύ πρωτεϊνών, μεταξύ πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων, όπως και οι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών και μεμβρανών. Το εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να επηρεάσει επιπλέον, τον κυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών, τις ενζυμικές τους ιδιότητες και την αλληλεπίδρασή τους με άλλους παράγοντες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι αλλαγές που προκαλούνται από ένα μεμονωμένο γεγονός ματίσματος είναι μικρές. Τα κύτταρα αντιθέτως συνήθως συντονίζουν πολυάριθμες αλλαγές στα «προγράμματα ματίσματος», οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων, καθώς και τις ιδιότητές τους (Stamm *et al.*, 2005). Χάρη στη μοριακή ευελιξία του, το εναλλακτικό μάτισμα αναδεικνύεται ως βασικός παράγοντας στη ρύθμιση γονιδίων, επηρεάζοντας σχεδόν κάθε βιολογική λειτουργία. Μερικές από τις διεργασίες στις οποίες διαδραματίζει σημαντικό ρόλο το εναλλακτικό μάτισμα περιλαμβάνουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων και των ιστών, την ανάπτυξη των οργάνων, τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση (Baralle & Giudice, 2017, Moore *et al.*, 2010, Yabas *et al.*, 2015).

Ως διαδικασία που επηρεάζει μεγάλο ποσοστό των ανθρώπινων γονιδίων, δεν αποτελεί έκπληξη η σύνδεσή του με αρκετές ανθρώπινες ασθένειες. Κατά κανόνα προκύπτουν από σημειακές μεταλλάξεις στις ρυθμιστικές αλληλουχίες των εξονίων, λανθασμένη αναλογία των ισομορφών μια πρωτεΐνης, σημειακές μεταλλάξεις σε ιντρόνια με αποτέλεσμα λανθασμένες θέσεις ματίσματος, μεταλλάξεις στην 5' θέση συρραφής, μη φυσιολογική έκφραση ή λειτουργία των ρυθμιστικών πρωτεϊνών ματίσματος κλπ. (Tazi *et al.*, 2009). Όσον αφορά παθολογικές καταστάσεις, το εναλλακτικό μάτισμα σχετίζεται άμεσα με την καρκινογένεση, μέσω μηχανισμών καταστολής ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή ενεργοποίησης ογκογονιδίων. Μπορεί να επηρεάσει διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κινητικότητα των κυττάρων κατά τη μετάσταση και η απόκριση στα φάρμακα. Ένα σύνολο αλλαγών στο εναλλακτικό μάτισμα επηρεάζει πρωτεϊνικές περιοχές που μεταλλάσσονται συχνά σε όγκους και δυνητικά διαταράσσουν τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις σε ρυθμιστικά μονοπάτια, και γενικότερα μετέχει στη συνολική απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Climente-González *et al.*, 2017). Χαρακτηριστικά, κατά τη διαδικασία της απόπτωσης, η ισορροπημένη έκφραση ισομορφών (προαποπτωτικές, αντιαποπτωτικές) που έχουν ανταγωνιστική δράση διαταράσσεται, προάγοντας την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων (Climente-González *et al.*, 2017, Oltean & Bates, 2014).

1.3 Αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNA

Οι δομές που λειτουργούν ως σημεία αναγνώρισης καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής ενός mRNA είναι το 5' κάλυμμα (m^7G -cap) και η ουρά πολυ(A) στο άκρο 3'. Για να ξεκινήσει η αποικοδόμηση του mRNA, πρέπει, είτε να πραγματοποιηθεί υδρόλυση των δύο αυτών δομών, είτε το mRNA να διασπαστεί με τη δράση κάποιας ενδονουκλεάσης. Στους ευκαρυώτες, το μεγαλύτερο μέρος των mRNA υφίσταται αποικοδόμηση μέσω μιας οδού που ξεκινά από τη βράχυνση της ουράς πολυ(A), διαδικασίας που ονομάζεται **απαδενυλίωση** (Garneau *et al.*, 2007). Μετά την απαδενυλίωση, δύο μηχανισμοί μπορούν να ακολουθηθούν. Στον πρώτο μηχανισμό, το σύμπλοκο Lsm1-7 συνδέεται με το 3' άκρο του mRNA και επάγει την αφαίρεση του καλύμματος από το σύμπλοκο Dcp1/Dcp2. Στη συνέχεια, το mRNA αποικοδομείται από την 5'→3' εξονουκλεάση, XRN1. Όσον αφορά στο δεύτερο μηχανισμό, αυτός πραγματοποιείται από το άκρο 3' του mRNA με κατεύθυνση 3'→5' και η αποικοδόμηση του πραγματοποιείται από ένα μεγάλο σύμπλοκο εξονουκλεασών 3'→5', γνωστό ως εξώσωμα (*Εικόνα 1a*).

Οι ανεξάρτητες από την απαδενυλίωση οδοί αποικοδόμησης του mRNA απαιτούν την αφαίρεση του καλύμματος στο 5' άκρο. Για παράδειγμα, στη ζύμη, η πρωτεΐνη Rps28B αλληλεπιδρά με την Edc3 για να στρατολογήσει το σύμπλοκο Dcp1/Dcp2. Μετά την αφαίρεση, το mRNA αποικοδομείται από την XRN1 (*Εικόνα 1b*). Τέλος, η αποικοδόμηση mRNA με τη μεσολάβηση ενδονουκλεάσης, περιλαμβάνει την τμήση ενός mRNA εσωτερικά του, δημιουργώντας δύο θραύσματα με απροστάτευτα άκρα. Τα θραύσματα αυτά υποβάλλονται στη συνέχεια σε πέψη από την XRN1 ή το εξώσωμα (*Εικόνα 1c*) (Tourriere *et al.*, 2002, Ghosh & Jacobson, 2010).



Εικόνα 4: Τα μονοπάτια αποικοδόμησης των ευκαρυωτικών RNA (Ghosh & Jacobson, 2010).

1.4 Απαδενυλάσες

Τα ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση βράχυνσης της ουράς πολυ(A) ονομάζονται απαδενυλάσες. Οι απαδενυλάσες (EC 3.1.13.4) είναι εξονουκλεάσες που υδρολύουν το mRNA με κατεύθυνση 3'→5', με τις ουρές πολυ(A) να αποτελούν το κύριο υπόστρωμα αυτών, αν και ορισμένες μπορούν να αποικοδομήσουν επίσης αλυσίδες ριβονουκλεοτιδίων ολιγο(U) και ολιγο(G), αλλά με αρκετά μικρότερη απόδοση. Η αντίδραση βράχυνσης της ουράς πολυ(A) απαιτεί Mg^{2+} για τη δράση των εξοριβονουκλεασών, ενώ τελικό προϊόν της είναι απαδενυλιωμένο μετάγραφο και κατάλοιπα 5'-AMP (Yan, 2014). Όλες οι γνωστές απαδενυλάσες εντοπίζονται στον πυρήνα, αλλά και στο κυτταρόπλασμα (κυρίως σε κοκκία στρες, Ρ-σωμάτια και σωμάτια Cajal), με εξαίρεση την PDE12 που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Οι περισσότερες εκφράζονται σε όλους τους ιστούς, αλλά κάποιες είναι ιστοειδικές (Skeparnias *et al.*, 2017).

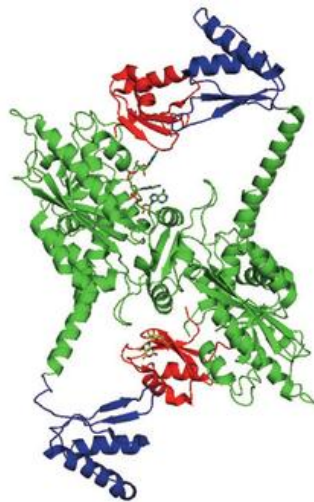
		At	Sc	Ce	Dm	Xl	Mm	Hs
DEDD nucleases	CNOT7/POP2	-	+	+	+	+	+	+
	CNOT8	-	-	-	-	+	+	+
	CAF1Z	-	-	+	-	+	+	+
	PARN	+	-	+	-	+	+	+
	PAN2	-	+	+	+	+	+	+
EEP nucleases	CNOT6/CCR4	-	+	+	+	+	+	+
	CNOT6L	-	-	-	-	-	+	+
	HESPERIN	+	-	-	-	-	-	-
	NOC	-	-	-	+	+	+	+
	PDE2	-	-	+	+	+	+	+
	ANGEL1/2	-	-	-	-	-	+	+

Πίνακας 1: Οι δύο υπεροικογένειες απαδενυλασών DEDD και EEP. +: ενζυμική δραστηριότητα, +: προβλεπόμενη ενζυμική δραστηριότητα, -: δεν έχει καθοριστεί ενζυμική δραστηριότητα. Sc: *S. cerevisiae*, Ce: *C. elegans*, Dm: *D. melanogaster*, Xl: *X. laevis*, Mm: *M. musculus*, Hs: *H. sapiens* (Μπέτα, 2023).

Οι απαδενυλάσες διακρίνονται σε δύο υπεροικογένειες: την DEDD και την EEP (Πίνακας 1). Η υπεροικογένεια DEDD χαρακτηρίζεται από την παρουσία τεσσάρων όξινων καταλοίπων (Asp-Glu-Asp-Asp) στο ενεργό κέντρο -από όπου και πήρε το όνομά της-, καθώς και από κάποια συντηρημένα κατάλοιπα που κατανέμονται σε τρία διακριτά μοτίβα (I, II & III). Ένα πέμπτο κατάλοιπο His ή Tyr χωρίζει την DEDD σε δύο επιμέρους οικογένειες, DEDDh και DEDDy, αντίστοιχα. Οι περισσότερες από τις απαδενυλάσες τύπου DEDD ανήκουν στην κατηγορία DEDDh (Zuo & Deutscher, 2001). Η υπεροικογένεια EEP (εξονουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών) περιλαμβάνει πέντε εξαιρετικά συντηρημένα κατάλοιπα NEDDH (Yan, 2014). Στην υπεροικογένεια αυτή έχουν χαρακτηριστεί μέλη τα οποία δε διαθέτουν δραστικότητα απαδενυλάσης, αλλά φωσφατάσης (διαχωρίζονται με την κόκκινη γραμμή στον Πίνακα 1) (Μπέτα, 2023). Στα θηλαστικά, τα σύμπλοκα CCR4-CNOT και, σε πολλές περιπτώσεις, το σύμπλοκο PAN2-PAN3, είναι οι κύριες απαδενυλάσες που είναι υπεύθυνες για την ανακύκλωση του mRNA (Skearnias *et al.*, 2017).

1.5 Πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN)

Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN) είναι μία από τις καλύτερα βιοχημικά χαρακτηρισμένες απαδενυλάσες των θηλαστικών. Εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς των ευκαρυωτικών οργανισμών και η έκφρασή της εντοπίζεται κυρίως στον πυρηνίσκο και στα σωμάτια Cajal (Virtanen *et al.*, 2013, Nanjappa *et al.*, 2021). Είναι μοναδική μεταξύ των ριβονουκλεασών λόγω της ικανότητάς της να αλληλεπιδρά τόσο με το 5' άκρο του καλύμματος όσο και την ουρά πολυ(A) του mRNA. Η αλληλεπίδραση της PARN με το 5'-κάλυμμα του mRNA θεωρείται ότι ενισχύει τον ρυθμό αποικοδόμησης του mRNA, αλλά και τον επεξεργαστικό τρόπο δράσης του ενζύμου (Nanjappa *et al.*, 2021, Wu *et al.*, 2005).

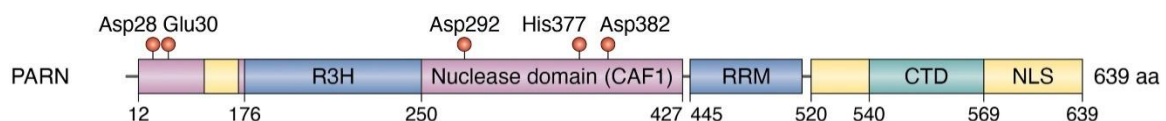


Εικόνα 5: Το διμερές της ανθρώπινης PARN. Με πράσινο απεικονίζεται η περιοχή νουκλεάσης, με κόκκινο η περιοχή RRM και με μπλε η περιοχή R3H (Harnisch *et al.*, 2012).

Η PARN σχηματίζει ένα ομοδιμερές (*Εικόνα 5*), κάθε μονομερές του οποίου έχει μοριακό βάρος 74kDa και αποτελείται από 639 αμινοξέα (Harnisch *et al.*, 2012). Το ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί την PARN βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16, αποτελείται από 24 εξόνια και έχει μέγεθος περίπου 195kb. Το πλήρους μήκους πολυπεπτίδιο PARN στον άνθρωπο κωδικοποιείται από ένα mRNA μήκους 3,1kb (Virtanen *et al.*, 2013).

Η PARN διαθέτει τρεις χαρακτηριστικές περιοχές: i) την περιοχή της καταλυτικής νουκλεάσης (κατάλοιπα 1-177 και 246-391), ii) την περιοχή R3H (κατάλοιπα 178-245) και iii) την περιοχή δέσμησης RNA ή το μοτίβο αναγνώρισης RNA (RRM) (κατάλοιπα 437-510) (*Εικόνα 6*) (Balatsos *et al.*, 2012). Οι δύο τελευταίες δομές αποτελούν περιοχές δέσμησης RNA που συνεισφέρουν στην επεξεργασιμότητα του ενζύμου. Το μοτίβο RRM απαιτείται για τη δέσμευση του καλύμματος, ενώ η περιοχή R3H απαιτείται για τη δραστηριότητα της PARN. Ένα μετάλλαγμα της PARN που δεν περιέχει την περιοχή RRM, παρόλο που είναι λιγότερο ενεργό, διατηρεί την ειδικότητά του για την ουρά πολυ(A). Ομοίως, απαλοιφή της περιοχής R3H μειώνει τη συγγένεια για το RNA αλλά όχι για το υπόστρωμα (Virtanen *et al.*, 2013, Wu *et al.*, 2005).

Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι τα τέσσερα συντηρημένα κατάλοιπα Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382 είναι απαραίτητα για την καταλυτική δράση του ενζύμου και απαιτούνται για τη δέσμευση των δισθενών ιόντων. Επιπλέον, αντικατάσταση του His377 από Ala ανέστειλε τη δραστηριότητα της PARN, υποδηλώνοντας ότι το His377, ως το πέμπτο συντηρημένο αμινοξύ, είναι επίσης απαραίτητο για την δράση του ενζύμου. Επομένως, η PARN ανήκει στην οικογένεια DEDDh. Τέλος, στο ένζυμο υπάρχει μία αλληλουχία NLS πλησίον της καρβοξυτελικής περιοχής, στην οποία οφείλεται η παλινδρόμηση της πρωτεΐνης μεταξύ πυρήνα-κυτταροπλάσματος (Wu *et al.*, 2005, Huynh & Parker, 2023).



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών της PARN και των καταλυτικών της αμινοξέων (Huynh & Parker, 2023).

Ο κυριότερος βιολογικός ρόλος της PARN είναι η ρύθμιση της σταθερότητας των μορίων mRNA, ελέγχοντας το μήκος της ουράς πολυ(A). Μια μεγαλύτερη ουρά πολυ(A) σχετίζεται συνήθως με μεγαλύτερη σταθερότητα του mRNA, ενώ μια βραχύτερη οδηγεί τα mRNA για αποικοδόμηση. Κατά συνέπεια, συμμετέχει στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Ο ρόλος της PARN στην αποικοδόμηση των mRNA επίσης, εξασφαλίζει ότι τα επίπεδα συγκεκριμένων πρωτεϊνών ρυθμίζονται σε απόκριση στις ανάγκες των κυττάρων (Virtanen *et al.*, 2013). Συνοπτικά, η συμμετοχή της PARN έχει βρεθεί στα εξής: i) στην ωρίμανση

ωοκυττάρων και την πρώιμη ανάπτυξη, ii) στο μηχανισμό της μη νοηματικά διαμεσολαβούμενης αποικοδόμησης RNA (NMD-Nonsense-mediated mRNA decay), iii) στην επιλογή mRNA για αποικοδόμηση κατά τη ρύθμιση της κινητικότητας των κυττάρων, iv) στη βράχυνση της ουράς πολυ(A) των νεοσυντιθέμενων mRNA και των μικρών πυρηνικών RNA (snoRNAs), v) στην ωρίμανση των miRNA και του TERC (Telomerase RNA component) και vi) στην κυτταρική απόκριση σε βλάβη του DNA (DNA damage response DDR) (Niedzwiecka *et al.*, 2016).

Για παράδειγμα, μέσω του μηχανισμού της μη νοηματικά διαμεσολαβούμενης αποικοδόμησης RNA, NMD, ανιχνεύονται τα mRNA που φέρουν πρόωρα κωδικόνια λήξης και αποικοδομούνται. Η σύνδεση μεταξύ NMD και PARN προήλθε από μια αναφορά που δείχνει ότι οι παράγοντες του NMD Upf1, Upf2 και Upf3X μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκο με την PARN και ενεργοποιήσουν την διαδικασία της απαδενυλίωσης (Balatsos *et al.*, 2012).

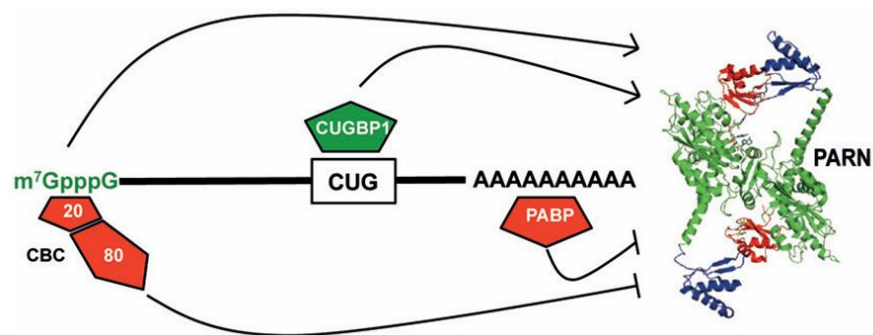
Όσον αφορά στο ρόλο της PARN στην ανάπτυξη, μελέτες έχουν δείξει ότι η δραστηριότητα της είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη διαφόρων ειδών. Συγκεκριμένα στα φυτά, έμβρυα με μεταλλαγμένη PARN παρουσίασαν ανωμαλίες κατά την ανάπτυξή τους σε ανώτερα φυτά, οι οποίες έχει προταθεί ότι οφείλονται στην αποτυχία απομάκρυνσης των πολυ(A) ουρών σε συγκεκριμένα mRNA (Nanjappa *et al.*, 2021). Ομοίως, στο *C. elegans*, μεταλλάξεις της PARN έχουν ως αποτέλεσμα μικρό μέγεθος απογόνου και μειωμένη γονιμότητα σε σύγκριση με τα ζώα άγριου τύπου, ενώ επίσης συσσωρεύουν piRNA με μακριές ουρές πολυ(A) (Huynh & Parker, 2023). Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των ωοκυττάρων του *X. laevis*, η PARN αποδείχθηκε ότι προκαλεί την μαζική απαδενυλίωση των μητρικών mRNA (Nanjappa *et al.*, 2021). Οι επιπλοκές αυτές στην ανάπτυξη σχετίζονται με μειωμένη ολιγοαδενυλίωση συγκεκριμένων snoRNAs και H/ACA box scaRNAs, συμπεριλαμβανομένου του συστατικού RNA της τελομεράσης (TERC) (αναλύονται στην Ενότητα 1.5.2). Είναι σημαντικό ότι τα κύτταρα με ανεπάρκεια PARN εμφάνιζαν ανωμαλίες κυρίως σε δύο μονοπάτια: βραχεία τελομερή και ανώμαλο προφίλ ριβοσωμάτων (Dhanraj *et al.*, 2015).

1.5.1 Ρύθμιση της δράσης της PARN

Η ρύθμιση της πολυ(A)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης επιτυγχάνεται μέσω διάφορων *trans* ή *cis-acting* παραγόντων, οι οποίοι μπορούν να αναστέλλουν ή να ενεργοποιούν τη δράση της. Πιο συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση του ενζύμου με τη δομή του 5' καλύμματος και την ουρά πολυ(A) οδηγεί σε ενεργοποίηση (Virtanen *et al.*, 2013). Ωστόσο, η δομή του 5' καλύμματος επηρεάζει την δράση του ενζύμου και μέσω των πρωτεϊνών που δεσμεύονται σε αυτή. Το σύμπλοκο CBC (cap-binding complex) είναι ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο που αποτελείται από τις υπομονάδες CBP20 και CBP80. Έχει περιγραφεί ότι το σύμπλοκο CBC δεσμεύει το καρβοξυτελικό άκρο της PARN μέσω της

υπομονάδας CBP80 και αναστέλλει τη δράση της απαδενυλάσης. Επιπλέον, στο κυτταρόπλασμα η σύνδεση του παράγοντα έναρξης eIF4E στο 5' κάλυμμα μπορεί να αναστέλλει τη δέσμευση της PARN σε αυτό (Nanjappa *et al.*, 2021, Virtanen *et al.*, 2013). Η σύνδεση της PARN στην ουρά πολυ(A) μπορεί επίσης να ανασταλεί από τη δέσμευση των πρωτεϊνών PABP στην ουρά πολυ(A). Τέλος, τα στοιχεία AREs και GREs βρίσκονται συχνά εντός της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA και θεωρείται ότι μειώνουν τη σταθερότητα των mRNA (Virtanen *et al.*, 2013, Balatsos *et al.*, 2012). Τα στοιχεία αυτά καθώς και κάποιες πρωτεΐνες που δεσμεύονται σε αυτά (όπως οι AUBPs) αποδείχθηκε ότι μπορούν να ενεργοποιήσουν διαδικασίες απαδενυλίωσης, 3'- 5' αποικοδόμησης και αφαίρεσης του καλύμματος 5' (Balatsos *et al.*, 2012).

Επιπλέον, η πρωτεΐνη CUGBP (CUG-binding protein) αλληλεπιδρά ειδικά με μια ποικιλία RNA μέσω AREs και GREs και μπορεί να βοηθήσει στη δέσμευση της PARN σε ορισμένους στόχους mRNA, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης και την αύξηση της επεξεργασιμότητας της απαδενυλίωσης (Εικόνα 7) (Moraes *et al.*, 2006). Ομοίως, η ανθρώπινη τριστετραπρολίνη (TTP-tristetraproline), μια πρωτεΐνη πλούσια σε δακτύλους ψευδαργύρου που δεσμεύει στοιχεία AREs, μπορεί να ενεργοποιήσει την PARN. Η σύνδεση της TTP με το υπόστρωμα RNA είναι κρίσιμη για την ενεργοποίηση αυτή, καθώς σε μεταλλάγματα της TTP που δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το RNA, παρατηρείται συσσώρευση αδενυλιωμένων υποστρωμάτων. Τέλος, η μετα-μεταφραστική τροποποίηση της PARN με φωσφορυλίωση μπορεί επίσης να παίζει ρόλο στη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων της PARN με υποστρώματα RNA (Godwin *et al.*, 2013).



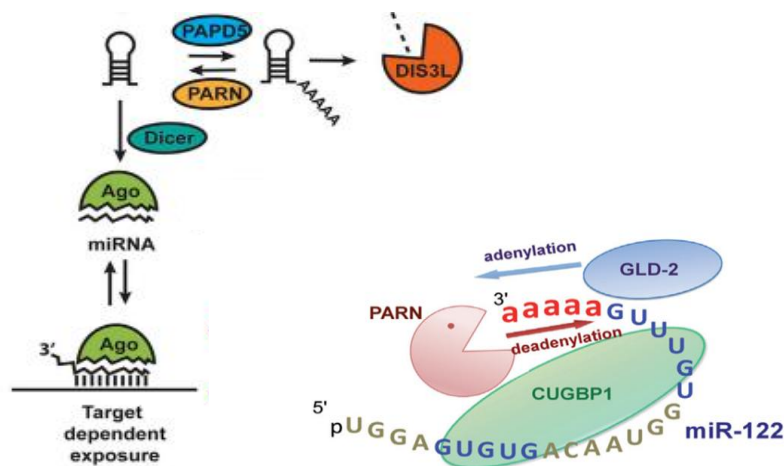
Εικόνα 7: Ρύθμιση της δράσης της PARN από cis στοιχεία και trans παράγοντες. Ένα υπόστρωμα mRNA, με 5' κάλυμμα, ένα στοιχείο GRE και ουρά πολυ(A) στο 3' άκρο, που αλληλεπιδρά με ενεργοποιητικούς (πράσινο) και ανασταλτικούς (κόκκινο) παράγοντες. Η PARN απεικονίζεται ως ομοδιμερές (Virtanen *et al.*, 2013).

1.5.2 Ο ρόλος της PARN στα non-coding RNA (ncRNAs)

Η παρουσία καταλοίπων αδενίνης σε πρόδρομα μη κωδικοποιητικά RNA επηρεάζει τη σταθερότητά τους. Η προσθήκη πολυ(A) ουράς μπορεί να προάγει την αποικοδόμηση

ορισμένων ncRNA. Για παράδειγμα, ολιγοαδενοσύλιωση από την PAPD5 των miRNA, του RNA ανθρώπινης τελομεράσης (hTR), του ριβοσωμικού RNA (rRNA), των μικρών πυρηνικών RNAs (snoRNAs) και των scaRNA (small Cajal body-specific RNAs) μπορεί να στρατολογήσει εξονουκλεάσες για να αποικοδομήσει τα RNA (Huynh & Parker, 2023).

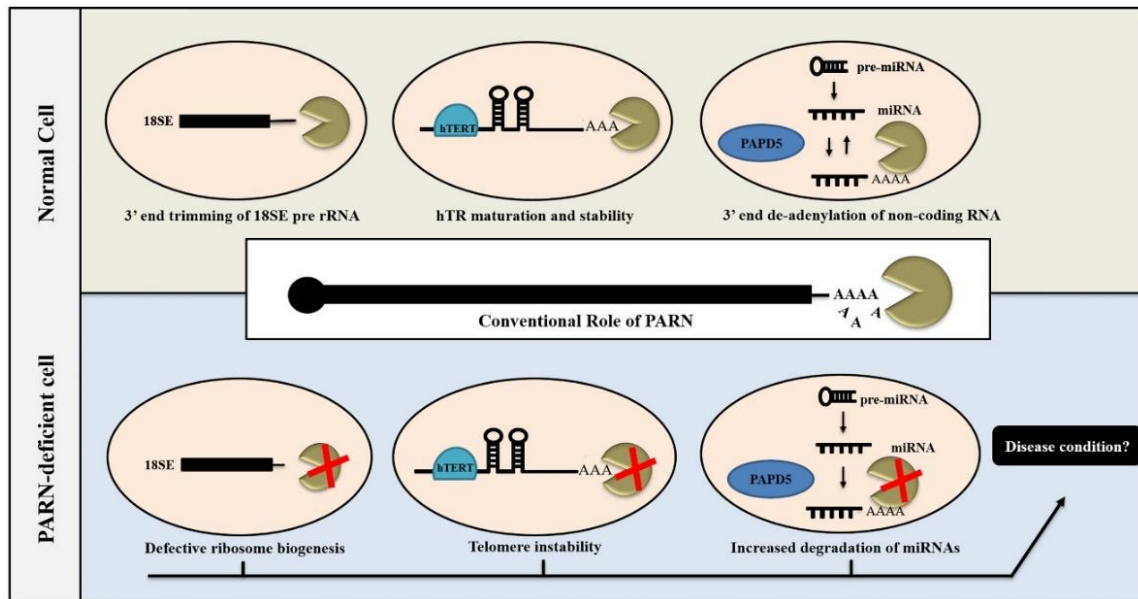
Συνεπώς, καθώς οι ουρές ολιγο(A) μπορούν να προάγουν την αποικοδόμηση του RNA, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι κάποιες απαδενοσύνθεσες μπορούν να αφαιρέσουν τις ουρές ολιγο(A) και έτσι να σταθεροποιήσουν ορισμένα ncRNA, όπως τα hTR, Y RNA, και miRNA. Μεταξύ αυτών ανήκει και η PARN, η οποία ρυθμίζει τη σταθερότητα αρκετών ncRNA σε κύτταρα θηλαστικών, αφαιρώντας τις ουρές πολυ(A) που προστέθηκαν από τις PAPD5/7. Η αφαίρεση της ουράς πολυ(A) περιορίζει τη στρατολόγηση των εξονουκλεασών (π.χ. DIS3L) ή του συμπλόκου εξωσώματος (Huynh & Parker, 2023, Shukla & Parker, 2017) (Εικόνα 10, αριστερά), προάγοντας την ωρίμανσή τους. Μελέτη σε κυτταρική σειρά HeLa έδειξε ότι καταστολή της PARN δεν άλλαξε το μήκος της ουράς πολυ(A), ούτε την αφθονία των mRNA, αλλά αντίθετα διαδραμάτισε σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση διάφορων ειδών μη κωδικοποιητικών RNA, όπως τα snoRNAs, τα scaRNA, συγκεκριμένα miRNA και 18S rRNA (Harnisch *et al.*, 2012).



Εικόνα 8: Ρύθμιση της σταθερότητας miRNA μέσω της πολυαδενοσύλιωσης και απαδενοσύλιωσης του 3' άκρου από τις PAPD5 και PARN και της αποικοδόμησης από τη DIS3L (αριστερά) (Shukla *et al.*, 2019). Η GLD-2 σταθεροποιεί ειδικά το miR-122 με 3'-ολιγοαδενοσύλιωση. Η CUGBP1 αναγνωρίζει την πλούσια σε UG περιοχή του miR-122 και προσελκύει την PARN στο 3-άκρο του miRNA (δεξιά) (Kato *et al.*, 2015).

Αναλυτικότερα, κύριος ρόλος των snoRNAs είναι να προκαλούν χημικές τροποποιήσεις σε rRNA, tRNA και μικρά πυρηνικά RNA. Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα C/D box snoRNA που εμπλέκονται κυρίως στη μεθυλίωση και τα H/ACA box snoRNAs που

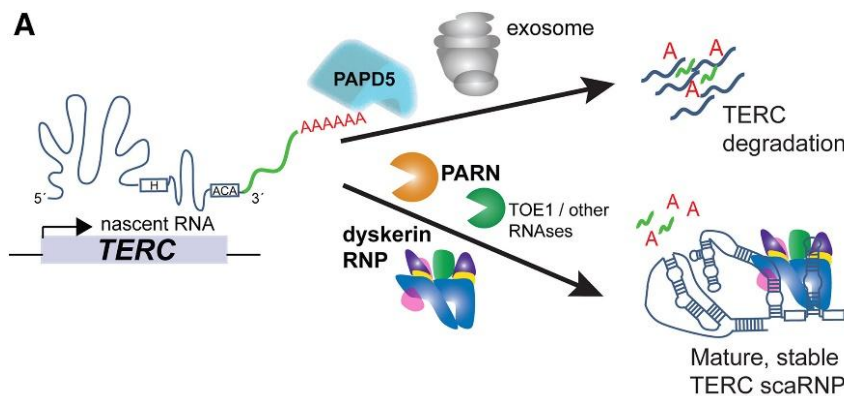
σχετίζονται με ψευδο-ουριδυλίωση (Berndt *et al.*, 2012). Από μια μελέτη μικροσυστοιχιών, αποκαλύφθηκε ότι τόσο στα κύτταρα HEK293 όσο και στα κύτταρα U2OS, η αναστολή της PARN είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση RNA του τύπου H/ACA στα κύτταρα (Harnisch *et al.*, 2012).



Εικόνα 9: Ο ρόλος της PARN στην απομάκρυνση καταλοίπων αδενοσίνης από τις ουρές πολυ(A) των mRNA (άσπρο πλαίσιο), στην επεξεργασία του 3' άκρου του 18S rRNA, στη βράχυνση των ολιγο-αδενυλιωμένων ουρών των snoRNAs του H/ACA box και τέλος, στην επεξεργασία των miRNA (Nanjappa *et al.*, 2021).

Τα microRNA (miRNAs) είναι μικρά μη κωδικοποιητικά RNA μήκους 21-23 νουκλεοτιδίων που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση σε ευκαρυωτικά κύτταρα μέσω του ζευγαρώματος βάσεων με τα mRNA-στόχους τους. Τα miRNA μεταγράφονται αρχικά σε μόρια pri-miRNAs (primary), τα οποία στη συνέχεια κόβονται για να δημιουργηθεί το πρόδρομο miRNA (pre-miRNA). Το pre-miRNA διασπάται στη συνέχεια από το ένζυμο Dicer για να δημιουργήσει το ώριμο miRNA. Το ώριμο miRNA αλληλεπιδρά με τους παράγοντες Argonaute και GW182 και άλλες πρωτεΐνες, για να σχηματίσει το επαγόμενο από το RNA σύμπλοκο αποσιώπησης RISC (Shukla *et al.*, 2019). Η PARN ρυθμίζει τα επίπεδα επιλεγμένων miRNAs στα κύτταρα απαδενυλιώνοντας τα 3' άκρα τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το miR-122, για το οποίο βρέθηκε ότι τα επίπεδά του ρυθμίζονται από την ισορροπία μεταξύ των αντίθετων δράσεων της GLD-2, μιας πολυ(A) πολυμεράσης που προσθέτει την αδενυλιωμένη ουρά και των PARN/CUGBP1. Η PARN προσελκύεται από την CUGBP1 που έχει προσδεθεί στο RNA λόγω των επαναλήψεων CUG, με αποτέλεσμα την αποικοδόμησή του (Εικόνα 10, δεξιά) (Katoh *et al.*, 2015).

Όπως αναφέρθηκε, σύνδεση φαίνεται επίσης να υπάρχει μεταξύ της PARN και των τελομερών. Η τελομεράση είναι ένα ένζυμο που επιμηκύνει τα τελομερή, τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στα άκρα των χρωμοσωμάτων, και αποτελείται από δύο κύρια συστατικά: το RNA της τελομεράσης TERC (Telomerase RNA Component) και την πρωτεϊνική υπομονάδα TERT (Telomerase reverse transcriptase). Η TERT έχει δραστηριότητα αντίστροφης μεταγραφάσης, ενώ το TERC αποτελεί το μοριακό καλούπι για την επιμήκυνση των τελομερών. Έχει αποδειχθεί ότι απαλοιφή του γονιδίου της PARN σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων του ώριμου TERC, λόγω της μη απομάκρυνσης της ολιγο(A) ουράς (Moon *et al.*, 2015) (*Εικόνα 10*). Επομένως, έλλειψη του ενζύμου επηρεάζει τη διατήρηση των τελομερών, παρά την έκφραση της TERT (Boyratz *et al.*, 2016). Ανεπαρκής ποσότητα της PARN στα κύτταρα προκαλεί τη μειωμένη δράση της τελομεράσης, με συνέπεια τη βράχυνση και την αστάθεια των τελομερών (Benyelles *et al.*, 2019). Η μειωμένη έκφραση των γονιδίων που απαιτούνται για τη διατήρηση των τελομερών προκαλεί την βράχυνσή τους, οδηγώντας σε μη φυσιολογική απόκριση του κυττάρου σε βλάβη του DNA, αυξάνοντας τα επίπεδα του p53 και τελικά επάγοντας την απόπτωση (Nanjappa *et al.*, 2021).



Εικόνα 10: Αδενυλίωση του TERC από την PAPD5, η οποία οδηγεί στην αποικοδόμησή του από το εξώσωμα. Αντίθετα, η PARN και άλλες εξοριβονουκλεάσες κόβουν τις προεκτάσεις στο 3' άκρο για να προκύψει το ώριμο TERC (Nagpal & Agarwal, 2020).

Τέλος, η PARN συμμετέχει στη βιογένεση της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας (40S), ρυθμίζοντας την επεξεργασία του 18S rRNA. Το 18S rRNA προέρχεται από το 47S pre-rRNA, το οποίο περιλαμβάνει τόσο τις αλληλουχίες των ώριμων rRNA όσο και μη κωδικές περιοχές που τελικά απομακρύνονται μέσω ενδο- και εξονουκλεολυτικών γεγονότων διάσπασης. Αρχικά, λαμβάνει χώρα μία ενδονουκλεολυτική τμήση, οδηγώντας στη δημιουργία ενός πρόδρομου μορίου που φέρει επέκταση ~950 νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο του 18S rRNA. Η επέκταση αυτή αρχικά υποβάλλεται σε εξονουκλεολυτική αποικοδόμηση στον πυρηνίσκο, έως το όριο μιας συντηρημένης περιοχής, και στη συνέχεια υφίσταται ενδονουκλεολυτική τομή στο σημείο E, σχηματίζοντας το 18S-E pre-rRNA. Ακολουθεί

περαιτέρω εξονουκλεολυτική επεξεργασία στον πυρήνα και ολοκλήρωση της ωρίμανσης στο κυτταρόπλασμα από την ενδονουκλεάση NOB1, η οποία δημιουργεί το ώριμο 3' άκρο του 18S rRNA. Στην πυρηνική φάση αυτής της διαδικασίας συμμετέχει η PARN, η οποία μεσολαβεί στη βράχυνση του 3' άκρου του 18S-E pre-rRNA μετά την τομή στο σημείο E. Η δράση της διεγείρεται από την ολιγοαδενυλίωση του 18S-E pre-rRNA, η οποία καταλύεται από την PAPD5. Η δράση της PARN επί περιοχών πλούσιων σε GC βάσεις καταδεικνύει την εξειδίκευσή της, ενώ ο εντοπισμός της στον πυρηνίσκο υποδηλώνει σημαντικό ρόλο στην πυρηνική επεξεργασία του rRNA. Επίσης, αναστολή της PARN είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση ανώριμων 18S-E pre-rRNA στο κυτταρόπλασμα (Montellese *et al.*, 2020, Locati *et al.*, 2021).

1.5.3 Ασθένειες στις οποίες εμπλέκεται η PARN

Η συγγενής δυσκεράτωση (Dyskeratosis congenita-DC) είναι μία σπάνια γενετική κληρονομική διαταραχή που χαρακτηρίζεται κυρίως από ανεπάρκεια του μυελού των οστών και δερματικά προβλήματα. Ένα βασικό μοριακό χαρακτηριστικό της DC είναι τα χαμηλά επίπεδα TERC και, συνεπώς, η μειωμένη συνολική δραστηριότητα της τελομεράσης. Αν και έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις σε 11 γονίδια σε ασθενείς με συγγενή δυσκεράτωση και συναφείς τελομεροπάθειες, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 60% των περιπτώσεων, πέντε από αυτά κωδικοποιούν συστατικά του ενζύμου τελομεράση (DKC1, TERC, TERT, NOP10, NHP2) που συμβάλλουν στην καταλυτική του δράση. Παρόλα αυτά, μεταλλάξεις της PARN αποδείχθηκε ότι προκαλούν μια σοβαρή μορφή DC γνωστή ως σύνδρομο Hoyeraal-Hreidarsson, η οποία προκαλεί ασυνήθιστα βραχεία τελομερή. Αποδείχθηκε ότι η απώλεια της PARN προκαλεί μειωμένα επίπεδα του TERC, μειωμένη δραστηριότητα τελομεράσης και διατήρηση των τελομερών. Αυτό οφείλεται σε ελαττωματική ωρίμανση του 3' άκρου του TERC, λόγω ολιγοαδενυλίωσης από την PAPD5 και ακολούθως, είτε 3'→5' αποικοδόμησης από την EXOSC10 στον πυρήνα ή μεταφορά στο κυτταρόπλασμα και 5'→3' αποικοδόμηση από τις DCP2/XRN1 (Shukla *et al.*, 2019). Σύμφωνα με αυτό, τα μεταγράφα TERC στα κύτταρα ασθενών με μεταλλαγμένη PARN αποσυντίθενται με επιταχυνόμενο ρυθμό. Επιπλέον, σε μία μελέτη βρέθηκαν μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα στο γονίδιο της PARN σε αρκετές μη συγγενείς περιπτώσεις DC, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ανεπάρκεια της απαδενυλίωσης μπορεί να παίζει ρόλο στη βιολογία της νόσου. Η ανεπάρκεια αυτή αποδείχθηκε ότι οδηγεί σε πρόωμη επαγωγή της DDR (DNA Damage Response). Όταν τα κύτταρα DC εκτέθηκαν σε υπεριώδη ακτινοβολία έδειξαν μειωμένη επιβίωση, επαγωγή του TP53 και πρόωμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, τα επίπεδα mRNA αρκετών γονιδίων που σχετίζονται με τη διατήρηση των τελομερών, συμπεριλαμβανομένων των TERC, DKC1, Regulator of Telomere Elongation Helicase 1 (RTEL1) και Telomeric Repeat Binding Factor 1 (TERF1), ήταν μειωμένα σε ασθενείς με μεταλλάξεις PARN (Belaya *et al.*, 2021, Nanjappa *et al.*, 2021).

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (Idiopathic Pulmonary Fibrosis-IPF) είναι μία χρόνια, μη αναστρέψιμη και προοδευτικά εξελισσόμενη πνευμονική νόσος που χαρακτηρίζεται από χρόνια βλάβη του κυψελιδικού επιθηλίου και παραμορφωμένη δομή των κυψελίδων. Η IPF διαθέτει αρκετά από τα χαρακτηριστικά των κακοήθων νόσων, συμπεριλαμβανομένης της κακής ανοσοαπόκρισης στη θεραπεία, της τροποποιημένης απόκρισης σε μονοπάτια σηματοδότησης, της μη φυσιολογικής έκφρασης miRNA και της ενεργοποίησης μη ειδικών μονοπατιών σηματοδότησης. Το ποσοστό επιβίωσης είναι γενικά χαμηλό (Nanjappa *et al.*, 2021). Οι μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν συστατικά της τελομεράσης που ευθύνονται για τη βράχυνση των τελομερών στα κυψελιδικά βλαστοκύτταρα και κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα, εμπλέκονται στην παθογένεση αυτής της ασθένειας. Το TERC διαθέτει μια περιοχή που ονομάζεται 3' H/ACA snoRNA-like domain. Αυτή η περιοχή αποτελεί θέση-στόχο για τη ρύθμιση από την PARN, που προάγει την ωρίμανση του 3' άκρου του TERC. Ο περιορισμός της δράσης της PARN εμπλέκεται στη μειωμένη δραστηριότητα της τελομεράσης και της βράχυνσης των τελομερών. Μελέτες σχετικά με την IPF έχουν επίσης δείξει ότι περίπου το 75% των περιπτώσεων έχουν μετάλλαξη στον ογκοσταλτικό παράγοντα TP53 (Stuart *et al.*, 2015, Mulet & Signes-Costa, 2022).

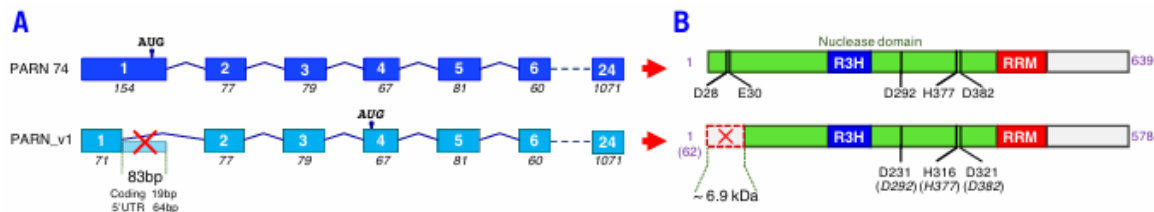
Τύπος καρκίνου	Έκφραση της PARN
Θυλακιώδες λέμφωμα	Καμία αλλαγή
Οξεία λευχαιμία	Αύξηση
Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα	Αύξηση
Καρκίνος του στομάχου	Αύξηση
Καρκίνος του μαστού	Απορρυθμισμένη

Πίνακας 2: Η αλλαγή της έκφρασης της PARN σε διάφορους τύπους καρκίνου (Nanjappa *et al.*, 2021).

Τέλος, είναι σαφές ότι η ρύθμιση των mRNA συνδέεται άμεσα με την ανάπτυξη καρκίνου. Η μειωμένη ή αυξημένη δράση συγκεκριμένων ριβονουκλεασών μπορεί να επηρεάσει τη σταθερότητα των mRNA ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων, οδηγώντας σε καρκινογένεση. Η PARN, που συμμετέχει στην απομάκρυνση της πολυ(A) ουράς, έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς η έκφρασή της έχει αναφερθεί να διαφέρει σε πολλούς τύπους καρκίνου (Πίνακας 2). Επιπλέον, ρυθμίζει τη σταθερότητα mRNA που σχετίζονται με την απόκριση σε βλάβες DNA, όπως του TP53 και του c-MYC.

1.6 Εναλλακτικό μετάγραφο PARN_V1

Από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου, εντοπίστηκε ένα εναλλακτικό μετάγραφο της PARN, η PARN_V1 που εκφράζεται σε καρκινικές σειρές πλευριτικού μεσοθηλιώματος (pleural malignant mesothelioma-PMM). Η PARN_V1 προκύπτει μέσω μίας εναλλακτικής θέσης ματίσματος 5' του εξονίου 1. Δεδομένου ότι το κωδικόνιο έναρξης για την PARN που εντοπίζεται στο πρώτο εξόνιο έχει ματιστεί, η μετάφραση ξεκινάει από ένα κωδικόνιο έναρξης που βρίσκεται στο εξόνιο 4. Ως αποτέλεσμα, από το γονίδιο της PARN_V1 λείπουν 83 ζεύγη βάσεων από το άκρο 3' του εξονίου 1, από τα οποία τα 64 αντιστοιχούν στην 5' αμετάφραστη περιοχή (5'UTR) και τα 19 κωδικοποιούν για πρωτεΐνη (συμπεριλαμβανομένου του κωδικονίου έναρξης). Η πρωτεΐνη που προκύπτει αποτελείται από 578 αμινοξέα σε σχέση με την κανονικού μεγέθους PARN που αποτελείται από 639 αμινοξέα (Εικόνα 11). Η προκύπτουσα πρωτεΐνη PARN_V1 παρόλο που στερείται αλληλουχίας 61 αμινοξέων από το αμινοτελικό της άκρο και περιλαμβάνει δύο από τα πέντε καταλυτικά αμινοξέα, τα Asp28 και Glu30, έχει δείχθει ότι διατηρεί την δραστηριότητα απαδενυλάσης. Η μοριακή μάζα της PARN υπολογίζεται στα 74kDa, ενώ της PARN_V1 στα 63kDa (Αντωνόπουλος, 2024).



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση των εξονίων και των πρωτεϊνικών περιοχών των PARN και PARN_V1. Τα πλαίσια που σημειώνονται με x υποδεικνύουν τις περιοχές που λείπουν από το mRNA και την πρωτεΐνη PARN_V1. Τα αμινοξέα σε παρενθέσεις υποδεικνύουν την αρίθμηση στην PARN_V1 (Αντωνόπουλος, 2024).

1.7 Κυτταρική αδράνεια (Quiescence)

Η κυτταρική αδράνεια (quiescence) είναι μια δυναμική, αναστρέψιμη κατάσταση κατά την οποία το κύτταρο εξέρχεται προσωρινά από τον κυτταρικό κύκλο και εισέρχεται στη φάση G0, διατηρώντας χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα και μηδενική ή ελάχιστη κυτταρική διαίρεση. Σε αντίθεση με τη γήρανση (senescence), η κυτταρική αδράνεια δεν χαρακτηρίζεται από την απώλεια της ικανότητας κυτταρικής διαίρεσης. Παρά την απουσία κυτταρικής διαίρεσης, το κύτταρο παραμένει βιολογικά ενεργό και είναι ικανό να επανεισέλθει στον κύκλο κατόπιν ερεθίσματος, π.χ. σε περίπτωση τραυματισμού ή παρουσίας αυξητικών παραγόντων (Marescal & Cheeseman, 2020).

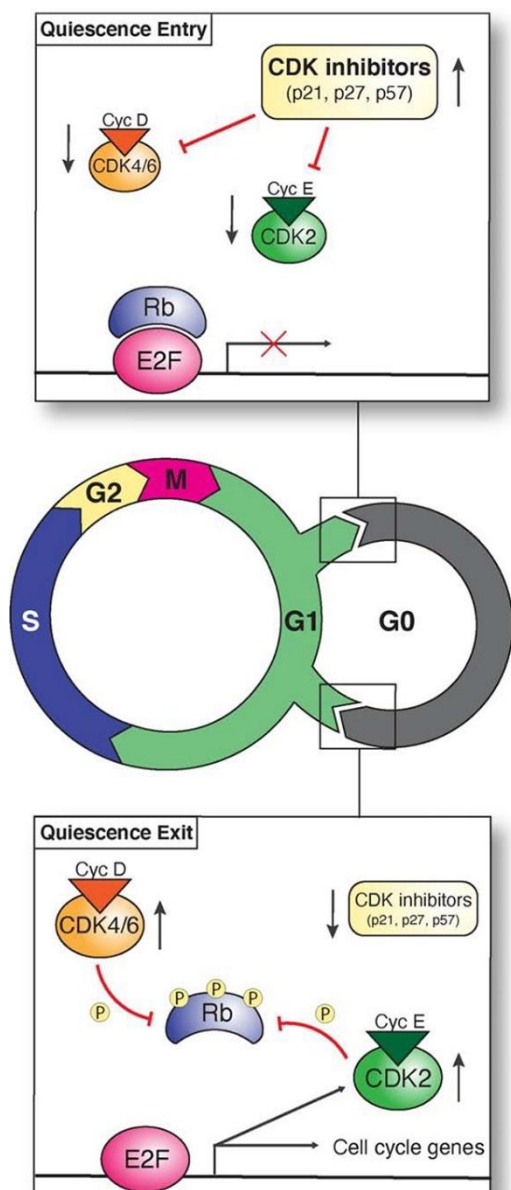
Η είσοδος, η διατήρηση και η έξοδος από την αδράνεια ρυθμίζονται από ένα πολύπλοκο δίκτυο μεταγραφικών και σηματοδοτικών μοριακών μηχανισμών. Καθοριστικής σημασίας είναι η καταστολή των κυκλινών και των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs), καθώς η ενεργοποίησή τους είναι απαραίτητη για την πρόοδο στον κυτταρικό κύκλο. Όταν είναι

ενεργά αυτά τα σύμπλοκα, φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος (Rb), εμποδίζοντας την ανασταλτική της δράση στον πολλαπλασιασμό. Από την άλλη πλευρά, οι αναστολείς των CDKs, διαδραματίζουν ανασταλτικό ρόλο στην κυτταρική διαίρεση, ευνοώντας την είσοδο των κυττάρων σε quiescence. Δύο οικογένειες κυκλινο-εξαρτώμενων αναστολέων των κινασών (CDKIs) παρεμποδίζουν τη δραστηριότητα των συμπλοκών CDK-Cyclin στην πρώιμη φάση G1 (οικογένεια INK4, που περιλαμβάνει τους p15, p16, p18, p19) ή σε όλο τον κυτταρικό κύκλο (οικογένεια CIP/KIP, συμπεριλαμβανομένων των p21, p27, p5) (Εικόνα 12) (Mademtzoglu & Relaix, 2022).

Επιπλέον, στη διαδικασία αυτή σημαντικό ρόλο έχει ο μεταγραφικός παράγοντας c-Myc, ο οποίος ενισχύει τη μεταβολική δραστηριότητα και την κυτταρική ανάπτυξη. Η καταστολή του c-Myc μπορεί να οδηγήσει σε παύση της κυτταρικής αύξησης και επαγωγή του quiescence (Wilson *et al.*, 2004). Παράλληλα, μονοπάτια σηματοδότησης όπως το PI3K/Akt/mTOR, το TGF-β, το Notch και το Wnt/β-catenin μπορούν να συμβάλλουν στη διατήρηση της αδράνειας, ιδιαίτερα σε πληθυσμούς βλαστοκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, ενεργοποίηση του μονοπατιού TGF-β οδηγεί στην καταστολή των κυκλινών D/E και την επαγωγή αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών όπως οι p15 και p21, αναστέλλοντας έτσι την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και προωθώντας την είσοδο στη G0 (Massagué, 2008). Το μονοπάτι Notch ρυθμίζει τη διατήρηση των κυττάρων σε αδρανή κατάσταση, κυρίως σε βλαστικά μυϊκά και αιμοποιητικά κύτταρα. Προλαμβάνει την είσοδό τους στον κυτταρικό κύκλο, επιτρέποντας την επιβίωση και την μακροπρόθεσμη λειτουργία τους (Bjornson *et al.*, 2012). Η καταστολή του μονοπατιού Wnt/β-catenin συσχετίζεται επίσης με την είσοδο σε quiescence, ενώ η ενεργοποίησή του προάγει την κυτταρική ενεργοποίηση και διαίρεση (Kalaitzidis & Neel, 2008). Η καταστολή του mTOR στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR, είτε μέσω ενεργοποίησης της AMPK (AMP-activated protein kinase) είτε με αναστολείς (όπως η ραπαμυκίνη), οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης και εισαγωγή του κυττάρου σε quiescence (Yilmaz *et al.*, 2006).

Επιπλέον, ο p53 λειτουργεί ως κύριος αισθητήρας κυτταρικού στρες και βλάβης DNA. Μέσω της επαγωγής του p21 και της καταστολής του mTOR, προωθεί την είσοδο των κυττάρων σε αδράνεια. Σε περιβάλλον χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου, η ενεργοποίηση του HIF-1α ομοίως καταστέλλει την mTOR και επάγει μεταβολική επαναπροσαρμογή που διατηρεί το quiescence. Τέλος, μεταβολές στη δομή της χρωματίνης, όπως η μεθυλίωση ιστονών (π.χ. H3K9me3), καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση, διατηρώντας την αδρανή κατάσταση.

Η κυτταρική αδράνεια εκτός από τις αλλαγές στη δομή της χρωματίνης και την έκφραση γονιδίων, συνοδεύεται και από αλλαγές στο μεταβολισμό. Τα κύτταρα στη φάση αυτή τείνουν να υιοθετούν ένα φαινότυπο χαμηλής ενεργειακής κατανάλωσης, με αυξημένη χρήση λιπιδίων και οξειδωτικής φωσφορυλίωσης σε σχέση με τα ενεργά διαιρούμενα κύτταρα (Cheung & Rando, 2013).



Εικόνα 12: Διάγραμμα του κυτταρικού κύκλου, που δείχνει την κατάσταση πολλαπλασιασμού και την κατάσταση ηρεμίας G0 (Marescal & Cheeseman, 2020).

Φυσιολογικά, το quiescence αποτελεί θεμελιώδη μηχανισμό για τη μακροχρόνια διατήρηση των βλαστικών κυττάρων σε πολλούς ιστούς. Στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, εξασφαλίζει τη μακροχρόνια διατήρηση του αποθέματος των κυττάρων μέσω της προσωρινής απόσυρσης από την ενεργό κυτταρική διαίρεση. Αντίστοιχα, σε μυϊκά ή νευρικά πρόδρομα κύτταρα, η αδράνεια συμβάλλει στη διατήρηση της επάρκειας τους ώστε να ενεργοποιηθούν υπό συνθήκες τραυματισμού ή εκφυλισμού. Αντίστοιχα, σε κύτταρα όπως οι ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, εξασφαλίζει ιστική ομοιόσταση μέσω της ελεγχόμενης ανανέωσης. Η στρατηγική αυτή μειώνει τις πιθανότητες γονιδιακής αστάθειας, της συσσώρευσης μεταλλάξεων και επιτρέπει τη διατήρηση της λειτουργικής ακεραιότητας των ιστών (Cheung & Rando, 2013, Li & Clevers 2010).

Ωστόσο, η δυσλειτουργία του μηχανισμού αδράνειας σχετίζεται με παθολογικές καταστάσεις. Η αδυναμία εισόδου σε G0 μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην επακόλουθη ανάπτυξη νεοπλασιών. Παράλληλα, αρκετοί καρκινικοί πληθυσμοί, κυρίως τα καρκινικά βλαστοκύτταρα (cancer stem cells), εκμεταλλεύονται το quiescence για να διαφύγουν την επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων που στοχεύουν σε ταχέως διαιρούμενα κύτταρα. Από την άλλη πλευρά, η παρατεταμένη και μη αναστρέψιμη παραμονή των κυττάρων σε

κατάσταση quiescence μπορεί να συντελέσει στη γήρανση και την εκφύλιση ιστών (Li & Clevers 2010, Chen *et al.*, 2016).

Η κατανόηση και η αξιοποίηση των μηχανισμών της κυτταρικής αδράνειας προσφέρει σημαντικές θεραπευτικές ευκαιρίες. Στον τομέα της ογκολογίας, η απομάκρυνση των καρκινικών κυττάρων από την αδρανή κατάσταση και η είσοδός τους σε ενεργό κυτταρικό κύκλο μπορεί να τα καθιστά ευάλωτα σε χημειοθεραπεία (Essers & Trump, 2010). Αντιθέτως, στην αναγεννητική ιατρική, η δυνατότητα διατήρησης βλαστοκυττάρων σε quiescence *in vitro* ενισχύει την επιβίωση και μακροχρόνια λειτουργικότητά τους πριν από την εφαρμογή τους σε μεταμοσχεύσεις ή αποκατάσταση ιστών (Cheung & Rando, 2013).

Επίσης, η ρύθμιση του quiescence προσεγγίζεται ως πιθανή στρατηγική για την επιβράδυνση της κυτταρικής γήρανσης και τη διατήρηση της λειτουργικής επάρκειας σε ηλικιωμένους οργανισμούς (Li & Clevers, 2010).

Πειραματικά, το quiescence μπορεί να επαχθεί με διάφορους τρόπους. Η αναστολή του c-Myc έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τον μεταβολισμό και την κυτταρική δραστηριότητα, οδηγώντας τα κύτταρα σε G0 (Grandori *et al.*, 2000). Επιπλέον, η χρήση αναστολέων της mTOR, όπως η ραπαμυκίνη, επιβραδύνει τη σηματοδότηση υπέρ της κυτταρικής αύξησης, ενισχύοντας τη διατήρηση της αδράνειας (Fang *et al.*, 2017). Σε επίπεδο καλλιέργειας κυττάρων, η καλλιέργεια σε συνθήκες στέρησης ορού ή αυξητικών παραγόντων αποτελεί κλασική μέθοδο επαγωγής quiescence (Coller *et al.*, 2006). Επιπλέον, μόρια όπως το forskolin ή αναστολείς του μονοπατιού TGF-β χρησιμοποιούνται για την τροποποίηση της εξωκυττάριας σηματοδότησης και την είσοδο των κυττάρων σε G0 (Chen *et al.*, 2012).

Οι ερευνητικές προοπτικές γύρω από το quiescence είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικές. Η βαθύτερη κατανόηση των μοριακών και επιγενετικών μηχανισμών που την διέπουν μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη φαρμάκων που είτε «ξυπνούν» αδρανή καρκινικά κύτταρα, είτε διατηρούν χρήσιμα κύτταρα σε αδρανή κατάσταση για μελλοντική χρήση. Η ταυτοποίηση βιοδεικτών που σηματοδοτούν το quiescence ενδέχεται επίσης να συμβάλει σημαντικά στη διάγνωση και την παρακολούθηση της θεραπευτικής απόκρισης σε διάφορες παθολογίες (van Velthoven & Rando, 2019).

1.8 Κυτταρική γήρανση (Cellular Senescence)

Η κυτταρική γήρανση αποτελεί μία σταθερή και μη αναστρέψιμη κατάσταση διακοπής κυτταρικού κύκλου, στην οποία περιέρχονται τα κύτταρα ως απάντηση σε ποικίλα ενδογενή ή εξωτερικά ερεθίσματα. Το φαινόμενο αυτό περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Hayflick και Moorhead το 1961, όταν παρατήρησαν ότι οι φυσιολογικοί ανθρώπινοι ινοβλάστες εμφανίζουν έναν περιορισμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων, πριν εισέλθουν σε μία μη διαιρούμενη κατάσταση, γνωστή πλέον ως «Hayflick limit» (Campisi & Robert, 2014). Πρόκειται για μια βασική βιολογική διεργασία που οδηγεί στη γήρανση του οργανισμού, αλλά και στην προστασία από την καρκινογένεση, παρότι μακροπρόθεσμα μπορεί να προάγει φλεγμονώδεις και παθολογικές καταστάσεις (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007).

Η κυτταρική γήρανση μπορεί να προκληθεί είτε από την βράχυνση των τελομερών, είτε από στρες που σχετίζεται με βλάβες στο DNA, οξειδωτικό στρες, ενεργοποίηση ογκογονιδίων, ακτινοβολία ή μεταλλαξιγόνους παράγοντες. Οι δύο βασικοί μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη γήρανση είναι οι οδοί p53/p21^{CIP1} και p16^{INK4a}, οι οποίες ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και οδηγούν σε παρατεταμένη παύση της κυτταρικής διαίρεσης. Η πρώτη ενεργοποιείται κυρίως ως απάντηση σε βλάβες στο DNA. Ο ογκοκατασταλτικός παράγοντας p53 είναι ανιχνεύει τη βλάβη και προάγει τη μεταγραφή

του γονιδίου CDKN1A, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p21^{CIP1}. Η p21 αναστέλλει τις κυκλίνες και τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDKs), προκαλώντας σταθερή διακοπή του κυτταρικού κύκλου, κυρίως στη φάση G1. Αν οι βλάβες δεν αποκατασταθούν, το κύτταρο εισέρχεται σε κατάσταση μόνιμης γήρανσης. Η δεύτερη βασική οδός ενεργοποιείται συχνότερα σε καταστάσεις χρόνιου στρες, μείωσης τελομερών ή ογκογόνου σηματοδότησης. Το γονίδιο CDKN2A κωδικοποιεί την p16^{INK4a}, η οποία αναστέλλει τις CDK4/6, οδηγώντας σε μειωμένη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb. Η ενεργή Rb δεσμεύει και αδρανοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F, μπλοκάροντας έτσι την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο. Αυτός ο μηχανισμός είναι επίσης μη αναστρέψιμος και πολύ χαρακτηριστικός της γήρανσης (Kuilman *et al.*, 2010).

Τα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζουν χαρακτηριστικές μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές, όπως αυξημένο κυτταρικό μέγεθος, αυξημένη δραστικότητα της β-γαλακτοσιδάσης (SA-β-gal), ετεροχρωματίνωση της χρωματίνης (Senescence-associated heterochromatic foci – SAHF), καθώς και μεταβολές στο μεταγραφικό προφίλ. Επιπλέον, εμφανίζουν έναν διακριτό εκκριτικό φαινότυπο γνωστό ως SASP (senescence-associated secretory phenotype), που σχετίζεται με την έκκριση φλεγμονωδών παραγόντων, κυτοκινών, χημειοκινών και πρωτεολυτικών ενζύμων και μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το μικροπεριβάλλον του ιστού (Corré *et al.*, 2008).

Παρόλο που η κυτταρική γήρανση λειτουργεί ως φραγμός στην ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση και επομένως προστατεύει από τον καρκίνο, η συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων στους ιστούς σχετίζεται με χρόνιες φλεγμονές και με την ανάπτυξη ηλικιακών νοσημάτων, όπως η αθηροσκλήρωση και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Childs *et al.*, 2015). Για τον λόγο αυτό, η έρευνα τα τελευταία χρόνια επικεντρώνεται στην ανάπτυξη «σενολυτικών» παραγόντων, οι οποίοι στοχεύουν εκλεκτικά τα γηρασμένα κύτταρα-χωρίς να βλάπτουν τα υγιή- με σκοπό την επιβράδυνση της ηλικιακά σχετιζόμενης λειτουργικής φθοράς των ιστών και οργάνων.

1.9 Σκοπός

Με βάση όσα αναφέρθηκαν, σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η διερεύνηση των συνθηκών έκφρασης του εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε κυτταρικές σειρές εμβρυονικών ινοβλαστών του πνεύμονα, πρωτογενών ινοβλαστών του πνεύμονα και του μαστού, καθώς και καρκινικών κυτταρικών σειρών. Ελέγχθηκε η διαφοροποίηση της έκφρασης σε συνθήκες κυτταρικής αδράνειας και γήρανσης.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

Η εταιρεία προέλευσης των υλικών εμφανίζεται σε παρένθεση.

I. Κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινες κυτταρικές σειρές MRC5 εμβρυονικών ινοβλαστών του πνεύμονα, DLF πρωτογενών ινοβλαστών του πνεύμονα, BNF πρωτογενών ινοβλαστών του μαστού καθώς και καρκινική κυτταρικές σειρές του μαστού MCF7 και MDA-MB-231.

II. Μέσα Κυτταροκαλλιέργειας

- **Θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης (4,5g/L) (Biosera).** Περιέχει επιπλέον γλουταμίνη και πυροσταφυλικό νάτριο. Χρησιμοποιείται κυρίως για την καλλιέργεια καρκινικών κυτταρικών σειρών.
- **Θρεπτικό υλικό MEM (Minimum Essential Medium) (Capricorn Scientific).** Περιέχει L-γλουταμίνη και Earle's salts και αποτελεί ένα σύνθηες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας για ευκαρυωτικά κύτταρα. Στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιείται για τις κυτταρικές σειρές ινοβλαστών.
- **Βόειος Εμβρυικός Ορός (FBS) (Biosera).** Περιέχει πρωτεΐνες και αυξητικούς παράγοντες, απαραίτητους για τη διατήρηση και τον πολλαπλασιασμό των ευκαρυωτικών κυττάρων in vitro. Από αυτό, παρασκευάζουμε το Exo Free FBS, με υπερφυγοκέντρωση, δεν περιέχονται δηλαδή ύστερα από αυτή, εξωσώματα.
- **Panexin basic-Serum Replacement with Defined Components (PAN-Biotech) (1% w/v).** Είναι ένα συνθετικό υποκατάστατο ορού για συνθήκες καλλιέργειας απουσίας ορού ή σημαντικής μείωσης της ποσότητας ορού. Το Panexin περιέχει πρωτεΐνες, λιπίδια, άλατα, αμινοξέα, ιχνοστοιχεία, ορμόνες και μόνο ίχνη ζωικών συστατικών. Δεν περιέχει αυξητικούς παράγοντες.
- **Panexin NTA Serum Substitute with Defined Components for Adherent Cells (PAN-Biotech) (2% w/v).** Είναι ένα πλήρες υποκατάστατο ορού για την καλλιέργεια προσκολλημένων κυττάρων σε συνθήκες απουσίας ορού. Υποστηρίζει την ανάπτυξη πολλών τύπων κυττάρων με βέλτιστο τρόπο. Το Panexin NTA ομοίως περιέχει πρωτεΐνες, λιπίδια, άλατα, αμινοξέα, ιχνοστοιχεία, παράγοντες προσκόλλησης, ορμόνες και ίχνη συστατικών ζωικής προέλευσης, αλλά όχι αυξητικούς παράγοντες.

- **Αντιβιοτικό/αντιμυκητιακό 100×** (πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη-αμφοτερικίνη) (**Gibco**). Περιέχει 10.000units/mL πενικιλίνης, 10.000μg/mL στρεπτομυκίνης και 25μg/mL αμφοτερικίνης. Τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη αποτρέπουν τη βακτηριακή μόλυνση των κυτταροκαλλιεργειών, ενώ η αμφοτερικίνη Β αποτρέπει τη μόλυνση των κυτταρικών καλλιεργειών από μύκητες.
- **Διάλυμα Trypsin 2,5% in PBS (Biosera)**. Πρόκειται για ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που διευκολύνει την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας και καταλύει την υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών μεταξύ των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών και του υποστρώματος, στο οποίο καλλιεργούνται.
- **Accutase (Biosera)**. Μπορεί να αντικαταστήσει τη θρυψίνη για την αποκόλληση των κυττάρων. Τα πλεονεκτήματα της έναντι της κλασσικής επεξεργασίας με θρυψίνη είναι ότι είναι πιο ήπια και λιγότερο επιζήμια για τα κύτταρα και δεν περιέχει πρωτεΐνες που προέρχονται από θηλαστικά ή βακτήρια. Συνήθως δεν απαιτεί στάδιο απενεργοποίησης.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1×** (**Dulbecco's Phosphate Buffered Saline**) (**Capricorn Scientific**). Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει φωσφορικό νάτριο, χλωριούχο νάτριο και φωσφορικό κάλιο. Χρησιμοποιείται για τις πλύσεις των κυττάρων.

III. Εκκινητές

Οι εκκινητές κατασκευάστηκαν από την εταιρία Eurofins. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την Real Time PCR είναι οι ακόλουθες:

- PARN Forward: 5' - CGAGTAGAACCGCTGAGGC - 3'
PARN Reverse: 5' - ATGCAGAGACTGAAGGTCCATC - 3'
- PARN_V1 Forward: 5' - CGCCGCGGAATTTTTTAAGAG - 3'
PARN_V1 Reverse: 5' - ATGCAGAGACTGAAGGTCCATC - 3'
- β-actin Forward: 5' - GGA CTTCGAGCAAGAGATGG - 3'
β-actin Reverse: 5' - AGCACTGTGTTGGCGTACAG - 3'

IV. Διάλυμα RIPA. Διάλυμα λύσης των κυττάρων. Επιτρέπει την εκχύλιση πρωτεϊνών

Συστατικά	Τελική συγκέντρωση
NaCl (Penta Chemicals)	150mM
Tris-HCl pH 7,4 (Serva-Sharlab)	50mM

NP-40 (Applichem)	1% v/v
Sodium Deoxycholate (Thermo Fisher)	0,25% w/v
SDS (Serva)	0,1% w/v
dH ₂ O (Vioser)	

Πίνακας 3: Συστατικά διαλύματος λύσης RIPA.

Το διάλυμα αποθηκεύεται στους -20°C και πριν τη χρήση του γίνεται προσθήκη διαλύματος αναστολέα πρωτεασών 1% v/v (Roche).

V. Διαλύματα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE

▪ Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης 4× (Loading buffer)

- 500mM Tris-HCl, pH 6,8
- 40% v/v γλυκερόλη (Applichem)
- 8% w/v SDS
- 5% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη (Serva)
- 0,04% w/v Bromophenol blue (Research Organics)

▪ Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10× (Running Buffer)

- 0,25M Tris
- 1,92M γλυκίνη (Penta Chemicals)
- 1% w/v SDS
- dH₂O

▪ 30% w/v ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο

- 29% w/v Acrylamide (Applichem)
- 1% w/v bis-Acrylamide (Applichem)
- dH₂O

▪ Πήκτωμα επιστοίβαξης & διαχωρισμού

Συστατικά	Όγκος (μL)
dH ₂ O	1900
30% w/v ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο	1700

1,5M Tris-HCl pH 8,8	1300
10% w/v SDS	50
10% w/v APS (Serva)	50
TEMED (Applichem)	2

Πίνακας 4: Συστατικά πηκτής διαχωρισμού 10%.

Συστατικά	Όγκος (μL)
dH ₂ O	1400
30% w/v ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο	330
1M Tris-HCl pH 6,8	250
10% w/v SDS	20
10% w/v APS	20
TEMED	2

Πίνακας 5: Συστατικά πηκτής επιστοίβαξης 5%.

VI. Διαλύματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western

▪ Transfer Buffer 1×

- 10% v/v Running Buffer 10×
- 20% v/v μεθανόλη (Riedel-de Haën)
- dH₂O

▪ TBS 10×

- 200mM Tris
- 1500mM NaCl
- dH₂O

▪ TBS-T

- 10% v/v TBS 10×
- 0,1% v/v Tween20 (Applichem)
- dH₂O

- **PBS-T**

- 10% v/v PBS 10× (Biosera)
- 0,1% v/v Tween20
- dH₂O

- **5% Blocking Buffer**

- 5% w/v γάλα (Regilait)
- TBS-T

- **Stripping Buffer**

- 0,5M Tris-HCl, pH 6,8
- 10% w/v SDS
- 8% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη
- dH₂O

VII. Αντισώματα

Αντίσωμα	Οργανισμός	Αραίωση	Τύπος	Εταιρεία
anti-PARN	rabbit	1:500	μονοκλωνικό	Abcam
anti-PARN	rabbit	1:500	πολυκλωνικό	Καθ. Α. Virtanen, Πανεπιστήμιο της Ουψάλα
anti-β-actin	mouse	1:5000	μονοκλωνικό	Sigma-Aldrich
anti-FAP	mouse	1:100	μονοκλωνικό	Santa Cruz
anti-rabbit- IgG-HRP	goat	1:5000	-	Pierce
anti-mouse- IgG-HRP	goat	1:25000	-	Pierce

Πίνακας 6: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western.

VIII. Άλλα υλικά

- Μεμβράνη PVDF (Porablot)

- Χαρτιά Whatman (Whatman International Ltd)
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών (Nippon Genetics Europe)
- TRI Reagent (Sigma)
- 1-βρωμο-3-χλωροπροπάνιο (Sigma)
- Immobilon Western HRP substrate (Merck Millipore)
- Ισοπροπανόλη (Riedel-de Haën)
- Αιθανόλη (Riedel-de Haën)
- Αυξητικός παράγοντας 5μg/mL b-FGF (Sigma)

IX. Kit που χρησιμοποιήθηκαν

- Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific) για την ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών
- Monarch (New England Biolabs) για την απομόνωση του RNA από τα κύτταρα
- First strand cDNA synthesis (Takara)
- KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Kit (Roche)

X. Διάλυμα αναστολέα c-Myc

- 64mM c-Myc inhibitor ($C_{12}H_{11}NOS_2$) (Cayman Chemical)
- DMSO (Sigma-Aldrich)

2.2 Μέθοδοι

I. Κυτταροκαλλιέργειες

▪ Απόψυξη κυττάρων

Για την καλλιέργεια των κυττάρων που βρίσκονται σε υγρό άζωτο, το φυαλίδιο (cryovial) που περιέχει τα κύτταρα μεταφέρεται αρχικά σε πάγο και στη συνέχεια στο υδατόλουτρο με θερμοκρασία 37°C. Πριν λιώσει πλήρως ο πάγος, το φυαλίδιο μεταφέρεται στον θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, και ύστερα από πολύ ήπιο πιπετάρισμα, το περιεχόμενό του μεταφέρεται σε σωλήνα (falcon) των 15mL. Ακολουθεί προσθήκη 9mL θρεπτικού, φυγοκέντρωση σε 1000rpm για 5 λεπτά στους 37°C και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Τέλος, γίνεται επαναιώρηση του ιζήματος σε 5mL θρεπτικού υλικού και μεταφορά σε φλάσκα T25.

▪ Καλλιέργεια κυττάρων

Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων πραγματοποιούνται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, ενώ ως θρεπτικό υλικό για την καλλιέργεια χρησιμοποιείται είτε το DMEM (για την καρκινική κυτταρική σειρά), είτε το MEM (για τις κυτταρικές σειρές ινοβλαστών) με την προσθήκη 0,02-10% FBS κατά συνθήκη και 1% αντιβιοτικού/αντιμυκητιακού. Για την εξέταση συνθηκών απουσίας αυξητικών παραγόντων, αντί για FBS, γίνεται προσθήκη

10% Panexin σε θρεπτικό MEM και 1% αντιβιοτικού/αντιμυκητιακού. Χρησιμοποιούνται αποστειρωμένες φλάσκες, οι οποίες επωάζονται σε κλίβανο, σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂.

▪ Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Σε κάλυψη της επιφάνειας της φλάσκας σε ποσοστό 70-90% από τα κύτταρα, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια των κυττάρων, με στόχο την απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων και το διαχωρισμό των κυττάρων σε νέες φλάσκες. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση της θρυψίνης. Συνολικά, η διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα (για φλάσκα T75):

- i. Αφαίρεση του ήδη υπάρχοντος θρεπτικού υλικού από τη φλάσκα.
- ii. Πλύση με 5mL PBS 1× pH 7,4, ήπια ανακίνηση και απομάκρυνση υπερκείμενου (2 επαναλήψεις).
- iii. Προσθήκη 1mL διαλύματος θρυψίνης 0,25%, ήπια ανακίνηση ώστε να καλυφθεί όλη η επιφάνεια της φλάσκας και επώαση για 5min στους 37°C.
- iv. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο για έλεγχο αποκόλλησης των κυττάρων.
- v. Προσθήκη 5mL πλήρους θρεπτικού (10% FBS) που απαιτείται για την απενεργοποίηση της θρυψίνης, επαναιώρηση και μεταφορά σε falcon των 15mL.
- vi. Φυγοκέντρωση σε 1200rpm για 5min.
- vii. Επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό κατά συνθήκη στο ίζημα της φυγοκέντρωσης.
- viii. Ανάδευση με πιπτετάρισμα και διαχωρισμός στις νέες φλάσκες.

II. Συλλογή & Λύση κυττάρων

Για τη συλλογή των κυττάρων, γίνεται αρχικά απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και εν συνεχεία δύο πλύσεις με διάλυμα PBS 1× pH 7,4. Μετά την απομάκρυνση του PBS, γίνεται προσθήκη διαλύματος θρυψίνης 0,25% ή accutase, και τα κύτταρα αφήνονται για περίπου 5 λεπτά στον επωαστήρα. Τα κύτταρα αποκολλώνται από τη φλάσκα ή από το πιάτο καλλιέργειας με τη βοήθεια του πιπτεταδόρου ή της πιπέτας αντίστοιχα και συλλέγονται σε σωλήνα (eppendorf) του 1,5mL και τοποθετούνται αμέσως σε πάγο. Στη συνέχεια, φυγοκεντρώνονται σε 1500rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C, απομακρύνεται το υπερκείμενο και ακολουθούν δύο πλύσεις με PBS 1×, με ενδιάμεσες επαναιωρήσεις του ιζήματος και φυγοκεντρίσεις. Ακολουθώντας, γίνεται προσθήκη του διαλύματος λύσης RIPA σε αναλογία με το ίζημα κάθε φορά, και προσθήκη επίσης αναστολέα πρωτεασών. Στη συνέχεια, τα κύτταρα υποβάλλονται σε μηχανική λύση με υπερήχους (sonication) σε 1 κύκλο, 30% amplitude για 3 φορές των 30 δευτερολέπτων. Με στόχο να μην αυξηθεί η θερμοκρασία του διαλύματος, μεσολαβούν ενδιάμεσες παύσεις των 30 δευτερολέπτων, διάστημα κατά το οποίο το διάλυμα τοποθετείται σε πάγο. Ακολουθεί shaking των κυττάρων σε 800rpm, 4°C για 15 λεπτά, και τέλος φυγοκέντρωση αυτών σε 14000g για 15 λεπτά στους 4°C, για να απομακρυνθούν τυχόν κυτταρικά υπολείμματα. Αφού το τελικό

διάλυμα μεταφερθεί σε νέο σωλήνα (ependorf), από κάθε δείγμα κρατούνται 5μL για την ποσοτικοποίηση του ολικού πρωτεϊνικού διαλύματος.

III. Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το *Pierce™ BCA Protein Assay Kits*. Με βάση τις απορροφήσεις διαδοχικών αραιώσεων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης (BSA-βόειας αλβουμίνης ορού) σε OD 562nm υπολογίζεται η πρότυπη καμπύλη. Ως τυφλό αλλά και για την αραιώση των δειγμάτων χρησιμοποιείται το εκάστοτε διάλυμα στη συγκεκριμένη περίπτωση το διάλυμα λύσης RIPA. Η πρότυπη καμπύλη υπολογίστηκε σε: $y=0,0012x+0,0909$, όπου y είναι η απορρόφηση στα 562nm και x η ζητούμενη συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε $\mu\text{g/mL}$. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- i. Προσθήκη 25μL κάθε πρότυπου διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης σε πλάκα μικροπιλοποίησης 96 θέσεων.
- ii. Ομοίως προσθήκη 25μL δείγματος (ή αραιωμένου με RIPA δείγματος) στην πλάκα μικροπιλοποίησης 96 θέσεων.
- iii. Προσθήκη 200μL του αντιδραστηρίου WR σε κάθε θέση πρότυπου διαλύματος και δείγματος και ήπια ανακίνηση της πλάκας μικροπιλοποίησης προς αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων.
- iv. Επώαση στους 37°C για 30 λεπτά.
- v. Μέτρηση σε OD 562nm.
- vi. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης.
- vii. Υπολογισμός της ζητούμενης συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε $\mu\text{g/mL}$ με βάση την πρότυπη καμπύλη (και λαμβάνοντας υπόψιν τυχόν αραιώση του δείγματος).

IV. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η μέθοδος Western Blotting είναι μία ημι-ποσοτική πολυσταδιακή μέθοδος ανίχνευσης μίας συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Βασίζεται στο συνδυασμό της διακριτικής ισχύος της ηλεκτροφόρησης, της ειδικότητας της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος και της ευαισθησίας των ενζυμικών προσδιορισμών. Η συνολική διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

▪ Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-PAGE

Ο έλεγχος της έκφρασης των επιθυμητών πρωτεϊνών στα κύτταρα, μπορεί να ελεγχθεί μέσω της ηλεκτροφόρησης υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Στην ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδιου, οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται ώστε να μπορούν να μετακινηθούν με βάση το μέγεθός τους και όχι τη διαμόρφωσή τους. Οι υπάρχοντες δισουλφιδικοί δεσμοί της πρωτεΐνης ανοίγουν με τη β-μερκαπτοαιθανόλη. Οι πρωτεΐνες

διαλύονται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειϊκού νατρίου (SDS), ενός ανιοντικού απορρυπαντικού που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας πρωτεΐνης, ευθυγραμμίζει τις πρωτεϊνικές αλυσίδες και τις φορτίζει αρνητικά στοιχειομετρικά (1 μόριο SDS ανά 2 αμινοξέα). Η μετουσίωση ολοκληρώνεται ακολουθώντας με βρασμό. Το φυσικό φορτίο της πρωτεΐνης επικαλύπτεται και καθίσταται αμελητέο και έτσι όλες οι πρωτεΐνες αποκτούν την ίδια πυκνότητα φορτίου.

Πήκτωμα επιστοίβαξης & διαχωρισμού

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδιου που αποτελούνται από δύο τμήματα που διαφέρουν στο pH και την πυκνότητα. Το πάνω τμήμα της πηκτής (πήκτωμα επιστοίβαξης) έχει πυκνότητα 5% και επιτρέπει στις πρωτεΐνες να «πακετάρουν» σε μια κοινή ζώνη, εξασφαλίζοντας ότι αυτές θα εισέλθουν ταυτόχρονα στη δεύτερη φάση της πηκτής, την πηκτή διαχωρισμού. Αυτό γίνεται εφικτό επειδή στο πάνω τμήμα οι πρωτεΐνες παγιδεύονται ανάμεσα στα αρνητικά φορτία χλωρίου (Cl⁻) και γλυκίνης και σχηματίζουν ένα λεπτό στρώμα. Στο κάτω τμήμα, πυκνότητας 10% (πήκτωμα διαχωρισμού), λόγω του υψηλότερου pH, τα μόρια γλυκίνης ιονίζονται πλήρως και αφήνουν πίσω τους τις πρωτεΐνες να διαχωριστούν με βάση το μέγεθος. Οι μικρότερες μοριακού βάρους πρωτεΐνες κινούνται πιο γρήγορα στην πηκτή.

Η δημιουργία της πηκτής οφείλεται στην αντίδραση πολυμερισμού του διαλύματος ακρυλαμίδιου και δις-ακρυλαμίδιου, με τη δράση των παραγόντων υπερθειικό αμμώνιο (APS) και τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED). Το TEMED δρα ως επιταχυντής, το οποίο αντιδρά με το APS και προκαλεί τη διάσπαση των υπερθειικών ιόντων σε θειικές ελεύθερες ρίζες. Οι δύο αυτοί παράγοντες προστίθενται στο τέλος. Αμέσως μετά την προσθήκη του υπερθειικού αμμωνίου, το μίγμα του πηκτώματος διαχωρισμού τοποθετείται ανάμεσα σε δύο γυάλινες πλάκες της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Το ύψος της πρέπει να φτάνει μέχρι 0.5cm περίπου κάτω από το χτένι. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια πιπέτας, προστίθεται ισοπροπανόλη, για την ευθυγράμμιση της επιφάνειας της πηκτής, μέχρι να σχηματίσει στοιβάδα ύψους 3-4mm περίπου. Το πήκτωμα αφήνεται να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά περίπου. Αφού πολυμεριστεί, αποχύνεται η ισοπροπανόλη, αναποδογυρίζοντας τη συσκευή πάνω σε απορροφητικό χαρτί. Στη συνέχεια το διάλυμα του πηκτώματος επιστοίβαξης τοποθετείται πάνω στο πολυμερισμένο πήκτωμα διαχωρισμού, μέχρι να καλύψει τον υπόλοιπο κενό χώρο. Μεταξύ των γυάλινων πλακών τοποθετείται χτένι, ώστε με τον πολυμερισμό του πηκτώματος επιστοίβαξης να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα. Αφήνεται επίσης για 30 λεπτά και τέλος, το χτένι αφαιρείται.

Προετοιμασία & Τοποθέτηση των δειγμάτων

Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλαμβάνει την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος 4× (loading buffer 4×), ώστε η τελική αραίωση των δειγμάτων να είναι 1×. Ακολουθεί θέρμανση τους στους 95°C για 5 λεπτά για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια,

η πηκτική τοποθετείται σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1×. Η διαδικασία συνεχίζεται με τη φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα (20μg) και επιπλέον φορτώθηκαν και 2μL μάρτυρα μοριακών μεγεθών. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται μέσω τροφοδοτικού, με ρεύμα τάσης 100V. Ο τερματισμός της ηλεκτροφόρησης γίνεται με βάση την οπτική παρακολούθηση της χρωστικής bromophenol blue, που υπάρχει στο ρυθμιστικό διάλυμα 4×.

▪ **Ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη PVDF**

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται μεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών στην επιφάνεια μιας μεμβράνης PVDF. Η διαδικασία βασίζεται στο ότι οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται προς τον θετικό πόλο, δηλαδή στη μεμβράνη. Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης, αφαιρείται το πήκτωμα επιστοίβαξης από την πηκτική, η πηκτική εμβαπτίζεται σε transfer buffer 1×, ενώ η μεμβράνη PVDF εμβαπτίζεται σε μεθανόλη 100% για 30 δευτερόλεπτα με σκοπό την ενεργοποίησή της, προτού μεταφερθεί και αυτή στο transfer buffer. Στη συνέχεια, 3 χαρτιά Whatman εμποτισμένα με transfer buffer τοποθετούνται στο κάτω ηλεκτρόδιο της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς (Semi Dry Transfer System), εν συνεχεία τοποθετείται η μεμβράνη, η πηκτική και άλλα 3 εμποτισμένα με transfer buffer χαρτιά Whatman, με προσοχή προκειμένου να μην εγκλωβιστεί αέρας ή φυσαλίδες. Σε κάθε βήμα το σύστημα περιβρέχεται με transfer buffer. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιείται με σταθερή ένταση 0,27A για 52 λεπτά.

▪ **Ανοσοδοκιμασία Western & Χρωμογόνος ανίχνευση**

Ακολουθώντας η μεμβράνη PVDF εμβαπτίζεται σε 5% blocking buffer για 1 ώρα υπό ανάδευση ώστε να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης. Η μεμβράνη συνήθως κόβεται οριζόντια στη μέση για την επώαση με δύο διαφορετικά αντισώματα. Έπειτα, το blocking buffer απομακρύνεται και προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα rabbit monoclonal PARN αντίσωμα στο ένα τμήμα της μεμβράνης και mouse monoclonal β-actin στο άλλο. Ακολουθεί επώαση στους 4°C υπό ανάδευση για 36 ώρες για την PARN και O/N για την β-actin. Μετά από τα διαστήματα αυτά, τα αντισώματα αφαιρούνται και πραγματοποιούνται 3 πλύσεις των 10 λεπτών με TBS-T. Μετά την απομάκρυνση του TBS-T, γίνεται προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος goat anti-rabbit IgG-HRP για την PARN και goat anti-mouse IgG-HRP για β-actin για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Όπως και παραπάνω, το δευτερογενές αντίσωμα αφαιρείται και πραγματοποιούνται 3 πλύσεις των 5 λεπτών με το TBS-T. Ακολουθεί η εμφάνιση (ανίχνευση του σήματος), με τη χρήση του αντιδραστηρίου Immobilon Western HRP Substrate και με τη βοήθεια του Uvitec Alliance Imaging System (Cambridge) του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

▪ Αποδέσμευση αντισώματος (stripping)

Το stripping είναι μία διαδικασία αφαίρεσης πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων από τη μεμβράνη. Γίνεται με στόχο τη διερεύνηση πολλαπλών πρωτεϊνών στο ίδιο στύπωμα και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη κατά τη μελέτη δύο πρωτεϊνών παρόμοιου μοριακού βάρους. Κατά το stripping, η μεμβράνη που έχει ήδη επωαστεί με ένα αντίσωμα, αρχικά εμβαπτίζεται σε stripping buffer και αφήνεται για 20 λεπτά στους 50°C. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται δύο πλύσεις των 10 λεπτών με PBS-T, και έπειτα αφού ξεπλυθεί με PBS 1×, επωάζεται σε blocking buffer για μία ώρα. Η διαδικασία που ακολουθεί στη συνέχεια είναι ίδια με αυτή που περιγράφεται παραπάνω, μετά το πέρας της επώασης με blocking buffer (πλύσεις με TBS-T, προσθήκη αντισώματος κλπ.).

V. Απομόνωση ολικού RNA από τα κύτταρα

Η διαδικασία που ακολουθείται για την απομόνωση του ολικού RNA από τα κύτταρα προκύπτει από κάποιες τροποποιήσεις του kit *Monarch*. Συγκεκριμένα, περιγράφεται από τα εξής βήματα:

- Γίνεται προσθήκη 300μL TRI Reagent στο ίζημα των κυττάρων (αναλογικά η ποσότητα του αντιδραστηρίου με την ποσότητα του ιζήματος) και ανάδευση με την πιπέτα ώστε να λυθούν τα κύτταρα.
- Ακολουθεί προσθήκη 30μL (0,1V) βρωμοχλωροπροπάνιο, ήπια ανακίνηση ×30 με το χέρι και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έτσι, προκύπτουν τρεις φάσεις: η υδατική φάση (διαυγής), όπου περιέχεται το RNA, η ενδιάμεση θολή φάση, που περιέχει το DNA και τέλος η κάτω, ροζ φάση, στην οποία περιέχονται οι πρωτεΐνες.
- Έπειτα, το δείγμα φυγοκεντρείται σε 12000g για 15 λεπτά στους 4°C.
- Η υδατική φάση, μετά τη φυγοκέντρωση, μεταφέρεται σε νέο eppendorf και αφού μετρηθεί ο όγκος της, προστίθεται ο ίδιος όγκος αιθανόλης και αναδεύεται.
- Στη συνέχεια, αυτό το διάλυμα μεταφέρεται σε αντίστοιχη στήλη (RNA purification) που περιέχει το kit, αφού τοποθετηθεί σε collection tube και φυγοκεντρείται σε 16000g για 30 δευτερόλεπτα.
- Μετά την απομάκρυνση του flow-through, γίνεται προσθήκη 500μL RNA priming buffer, φυγοκέντρωση σε 16000g για 30 δευτερόλεπτα, και πάλι απόρριψη του flow-through.
- Ακολουθεί προσθήκη 500μL RNA wash buffer, φυγοκέντρωση σε 16000g για 30 δευτερόλεπτα, και απόρριψη του flow-through.
- Επανάληψη του προηγούμενου βήματος, αλλά φυγοκέντρωση διάρκειας 2 λεπτών.
- Τέλος, προστίθεται 30-100μL nuclease-free water (ανάλογα με τη συγκέντρωση και την καθαρότητα που επιθυμούμε) και ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 16000g για 30 δευτερόλεπτα. Έτσι, λαμβάνουμε το RNA.
- Ακολουθεί μέτρηση της συγκέντρωσης RNA σε Nanodrop.

VI. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR - qPCR)

▪ Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του cDNA για την ανάλυση των επιπέδων PARN και PARN_V1 έγινε σύμφωνα με το *First strand cDNA Synthesis* kit, με τη χρήση τυχαίων εξαμερών ως εκκινητές. Το πρώτο βήμα είναι η αποδιάταξη του mRNA, ενώ ακολουθεί η σύνθεση του cDNA.

Για την αποδιάταξη του mRNA:

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
Random hexamers	1
dNTP mix	1
RNA	8
dH ₂ O	-

Πίνακας 7: Αντιδραστήρια και οι αντίστοιχοι όγκοι για την αποδιάταξη mRNA (1 αντίδραση).

Στο παραπάνω βήμα απαιτείται ισοφόρτωμα του RNA μεταξύ των δειγμάτων. Οπότε προσαρμόζουμε τους όγκους του RNA και του H₂O, ανάλογα με τις συγκεντρώσεις του RNA από το Nanodrop. Ακολουθεί ανάδευση, spin down, επώαση για 5 λεπτά στους 65°C, και εν συνεχεία τα δείγματα αφήνονται στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Για τη σύνθεση του cDNA:

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
Template RNA primer mix	10
5 Prime Script Buffer	4
RNase inhibitor	0,5
RTase	1
RNase free H ₂ O	4,5

Πίνακας 8: Αντιδραστήρια και οι αντίστοιχοι όγκοι για μία αντίδραση σύνθεσης cDNA τελικού όγκου 10μL.

Ακολουθεί επώαση στους 30°C για 10 λεπτά, εν συνεχεία στους 70°C για 15 λεπτά και τέλος, στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί για την qPCR.

▪ qPCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR-qPCR) είναι μία ιδιαίτερα ευαίσθητη τεχνική που επιτρέπει τη μέτρηση της συγκέντρωσης ενός συγκεκριμένου μορίου DNA σε πραγματικό χρόνο. Παρακολουθεί την ενίσχυση ενός στοχευμένου μορίου DNA κατά τη διάρκεια της PCR, όχι στο τέλος της, όπως στην κλασσική PCR. Η ανάλυση της συσσώρευσης προϊόντων στην qPCR επιτυγχάνεται με τη χρήση φθορίζουσών χρωστικών που επισημαίνουν ειδικά dsDNA ή ένα συγκεκριμένο είδος DNA που μας ενδιαφέρει-η ποσότητα του φθορισμού είναι ανάλογη με την ποσότητα του DNA που υπάρχει.

Ο σχηματισμός προϊόντων σε μια αντίδραση PCR ακολουθεί μια καμπύλη κορεσμού. Οι πρώτοι κύκλοι ενίσχυσης παράγουν προϊόν με εκθετικό τρόπο-η PCR λειτουργεί με μέγιστη απόδοση. Καθώς η PCR εξελίσσεται, η αποδοτικότητα μειώνεται λόγω μειωμένων συγκεντρώσεων dNTPs και εκκινητών, και αποικοδόμησης του ενζύμου. Ο σχηματισμός του προϊόντος έρχεται σε γραμμική μεταβλητότητα. Τέλος, η αντίδραση εξελίσσεται σε μια φάση πλατώ, όπου ο σχηματισμός προϊόντος μειώνεται σημαντικά λόγω της εξάντλησης των αντιδραστηρίων. Ο κύκλος PCR στον οποίο λαμβάνει χώρα κάθε μετάβαση φάσης είναι μοναδικός για κάθε αντίδραση και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση του πρότυπου DNA. Οι PCR που περιέχουν μεγάλη αρχική συγκέντρωση θα έχουν γενικά πλατώ σε προηγούμενους κύκλους από τις PCR που περιέχουν αρχική μικρότερη ποσότητα. Με σύγκριση των κύκλων και ύστερα από κανονικοποίηση, μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα αρχική ποσότητα των μορίων στα δείγματα.

Η SYBR Green είναι ένα μη ειδικό μόριο που παρουσιάζει μεγάλη αύξηση του φθορισμού όταν δεσμεύεται σε δίκλωνο DNA. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της χρωστικής είναι η μη ειδική φύση του, η οποία επιτρέπει τη χρήση του για πολλαπλά δείγματα με ελάχιστη ή καθόλου προετοιμασία. Η Rox αποτελεί χρωστική αναφοράς.

Η qPCR πραγματοποιείται με το *KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Kit*.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
SYBR Green	10
cDNA	2
Rox	0,4
Forward Primer (10mM)	0,4
Reverse Primer (10mM)	0,4
H ₂ O	7,2

Πίνακας 9: Αντιδραστήρια και οι αντίστοιχοι όγκοι για κάθε αντίδραση της qPCR τελικού όγκου 20μL.

Τα στάδια των αντιδράσεων της qPCR:

- Pre-incubation: 55°C για 2 λεπτά
- Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 2 λεπτά
- Αποδιάταξη (40 κύκλοι): 95°C για 15 δευτερόλεπτα
- Υβριδοποίηση και ενίσχυση (40 κύκλοι): 60°C για 60 δευτερόλεπτα
- Διάσταση και επαναδιάταξη (Melting Curve): 95°C για 60 δευτερόλεπτα
- Διάσταση και επαναδιάταξη (Melting Curve): 55°C για 30 δευτερόλεπτα
- Διάσταση και επαναδιάταξη (Melting Curve): 95°C για 30 δευτερόλεπτα

▪ Ποσοτικοποίηση mRNA

Η κανονικοποίηση των επιπέδων mRNA (PARN, PARN_V1) ως προς το γονίδιο αναφοράς (β-actin) γίνεται με τη μέθοδο $\Delta\Delta C_t$ (σχετική ποσοτικοποίηση). Για κάθε δείγμα, χρησιμοποιείται ο ακόλουθος τύπος:

$$2^{-\Delta\Delta C_t}, \text{ όπου}$$

- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ δείγματος} - \Delta C_t \text{ δείγματος αναφοράς και}$
- $\Delta C_t = C_t \text{ γονιδίου/στόχου} - C_t \text{ γονιδίου/αναφοράς}$

Οι παραπάνω υπολογισμοί έγιναν με τη χρήση του Microsoft Excel.

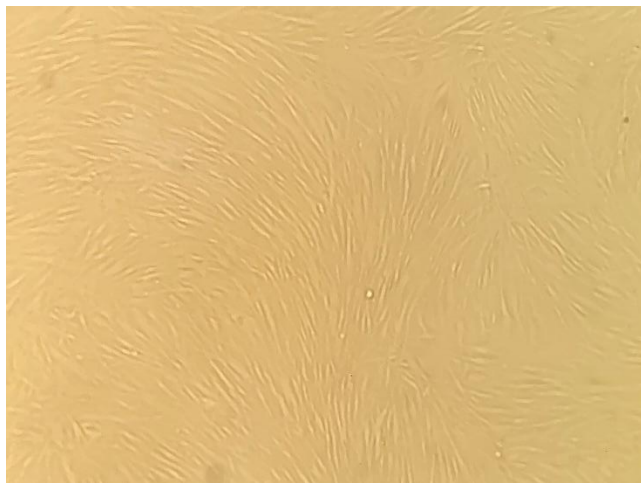
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Έλεγχος έκφρασης εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1 σε γηρασμένα εμβρυονικά κύτταρα MRC5 (Senescence)

Σε αυτή την ενότητα των πειραμάτων, εξετάστηκε η έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1 να αυξάνεται με την προοδευτική γήρανση των κυττάρων. Η υπόθεση είναι ότι όσο προχωρούν οι ανακαλλιέργειες (passages) των κυττάρων, δηλαδή όσο οδηγούνται σε γήρανση, τότε εμφανίζεται σε μεγαλύτερα επίπεδα η εναλλακτική μορφή. Για το σκοπό αυτό, καλλιεργήθηκαν εμβρυονικοί ινοβλάστες MRC5 σε θρεπτικό υλικό MEM/10% FBS, και σε κάθε ανακαλλιέργεια (για ευκολία συμβολίζονται από τη λέξη *Passage-P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 & P8*) συλλεγόταν δείγμα για να ελεγχθεί αρχικά η έκφραση των πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western και στη συνέχεια σε επίπεδο mRNA με PCR Πραγματικού Χρόνου (Real-Time qPCR).

A. Γηρασμένα Εμβρυονικά Κύτταρα MRC5

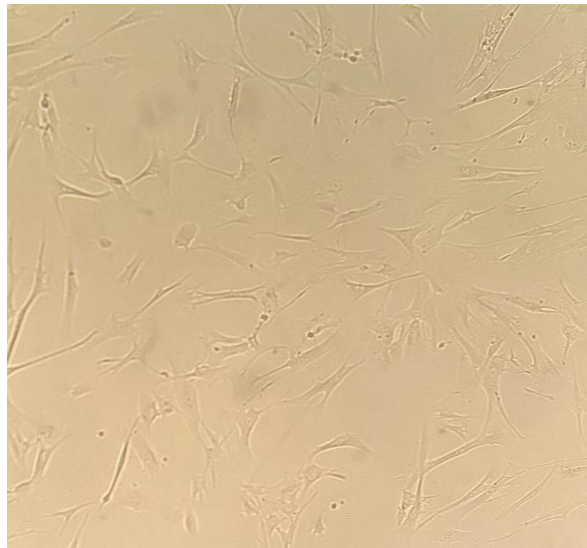
Στην ακόλουθη εικόνα, παρουσιάζονται κύτταρα MRC5 σε Passage 2, ύστερα από παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η μορφολογία των κυττάρων είναι επιμήκης και τα κύτταρα είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους.



Εικόνα 13: Εμβρυονικοί ινοβλάστες MRC5 σε Passage 2.

Αντίθετα, στην *Εικόνα 14*, παρουσιάζονται κύτταρα MRC5 σε προχωρημένο Passage-συγκεκριμένα P8. Αυτό που παρατηρείται, συγκρίνοντας τις δύο αυτές εικόνες, είναι ότι καθώς τα κύτταρα οδεύουν προς τη γήρανση, χάνουν την επιμήκη μορφολογία τους και

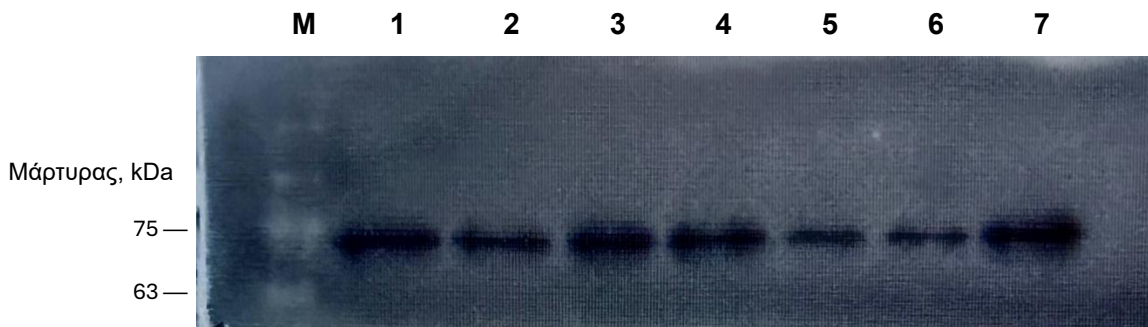
αποκτούν μεγαλύτερο κυτταρικό μέγεθος. Οι ινοβλάστες είναι εμφανώς πιο πεπλατυσμένοι και με χαρακτηριστικές απολήξεις.



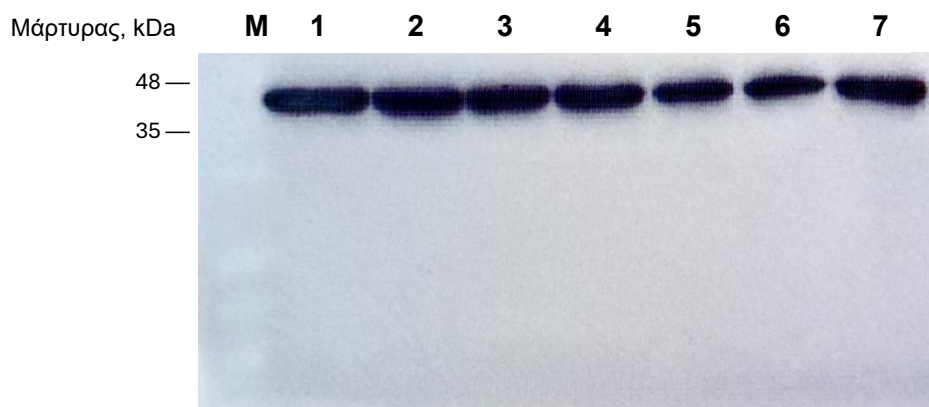
Εικόνα 14: Εμβρυονικοί ινοβλάστες MRC5 σε Passage 8.

B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Για τον έλεγχο της έκφρασης του εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1 πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot), με δείγματα από P2 έως P8 των εμβρυονικών ινοβλαστών MRC5. Στην *Εικόνα 15* παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου, μετά από επώαση με τα αντισώματα, μονοκλωνικό anti-PARN (πρωτογενές) και anti-rabbit IgG-HRP (δευτερογενές) για την ανίχνευση της PARN και στην *Εικόνα 16* με τα αντισώματα anti-β-actin (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές) για την ανίχνευση της β-ακτίνης, που χρησιμοποιείται για κανονικοποίηση.



Εικόνα 15: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της PARN_V1 με τα αντισώματα anti-PARN (πρωτογενές) και anti-rabbit IgG-HRP (δευτερογενές). Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, MRC5-P2· 2, MRC5-P3· 3, MRC5-P4· 4, MRC5-P5· 5, MRC5-P6· 6, MRC5-P7· 7, MRC5-P8.



Εικόνα 16: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western με τα αντισώματα anti-β-actin (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές), που χρησιμοποιείται για κανονικοποίηση. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, MRC5-P2· 2, MRC5-P3· 3, MRC5-P4· 4, MRC5-P5· 5, MRC5-P6· 6, MRC5-P7· 7, MRC5-P8.

Σημειώνεται ότι το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-PARN αναγνωρίζει την περιοχή ανάμεσα στα αμινοξέα 400-500 του ενζύμου, που υπάρχει τόσο στην πλήρους μεγέθους PARN, όσο και στο εναλλακτικό μετάγραφο PARN_V1. Επομένως, δύναται να ανιχνεύσει και τις δύο πρωτεΐνες. Το μοριακό βάρος της PARN υπολογίζεται στα 74kDa, ενώ της PARN_V1 στα 63kDa.

Αυτό που παρατηρούμε στην *Εικόνα 15*, είναι ότι μεταξύ των μεγεθών 75kD και 63kD του μάρτυρα, αποτυπώνεται η έκφραση μόνο της πλήρους ισομορφής της PARN, ενώ δεν παρατηρείται έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1.

C. PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR-qPCR)

Σε συνέχεια του παραπάνω πειράματος, ακολούθησε RT-qPCR με σκοπό να ελεγχθεί η ύπαρξη της PARN_V1 και να παρατηρηθούν τυχόν διαφορές σε επίπεδο mRNA των PARN και PARN_V1. Η ειδικότητα των αντιδράσεων ενίσχυσης οφείλεται στις αλληλουχίες των πρόσθιων εκκινήτων, ενώ οι δύο αντιδράσεις χρησιμοποιούν τον ίδιο ανάστροφο εκκινήτη. Ο πρόσθιος εκκινήτης για την PARN προσδένεται στην 3' περιοχή του εξονίου 1 που δεν υπάρχει στην PARN_V1, ενώ εκείνος για την ενίσχυση της PARN_V1 προσδένεται στον εξονικό κόμβο μεταξύ του εξονίου 1 και του εξονίου 2, που είναι χαρακτηριστικός για το μετάγραφο PARN_V1. Ο κοινός ανάστροφος εκκινήτης προσδένεται στο εξόνιο 3 που απαντάται και στα δύο cDNA.

Σε αυτό το πειραματικό βήμα, εξετάστηκαν μόνο δύο συνθήκες, οι P2 και P8. Κάθε μία από αυτές ενισχύθηκε σε δύο επαναλήψεις (duplicates). Στον *Πίνακα 10* αναγράφεται ο μέσος όρος των κύκλων ποσοτικοποίησης (C_T):

	Μέσος Όρος C _T MRC5 P2	Μέσος Όρος C _T MRC5 P8
PARN	25,64	25,32
PARN_V1	29,33	29,07
β-actin	14,93	14,64

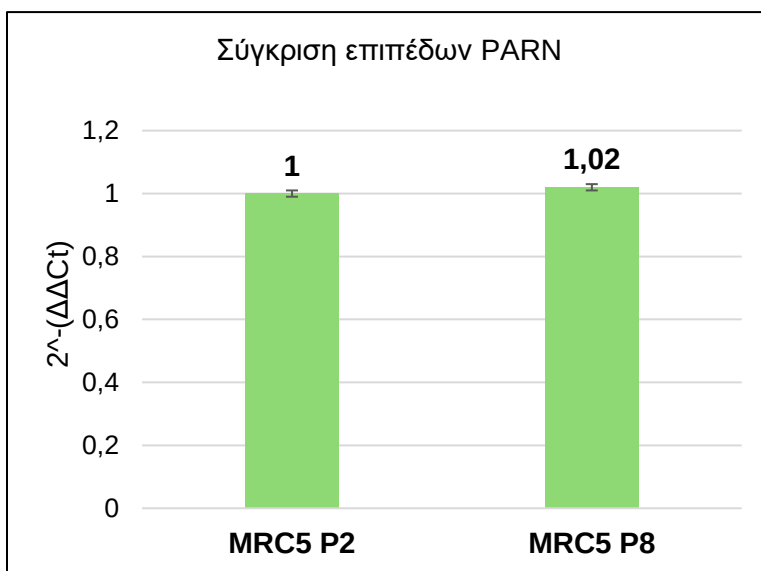
Πίνακας 10: Κύκλοι ποσοτικοποίησης που προέκυψαν από την ενίσχυση των PARN, PARN_V1 και β-actin σε κύτταρα MRC5 για τα passages 2 και 8.

Η κανονικοποίηση των επιπέδων mRNA (PARN, PARN_V1) ως προς το γονίδιο αναφοράς (β-actin) γίνεται με τη μέθοδο ΔΔCt (σχετική ποσοτικοποίηση). Τα αποτελέσματα φαίνονται στην ακόλουθο πίνακα:

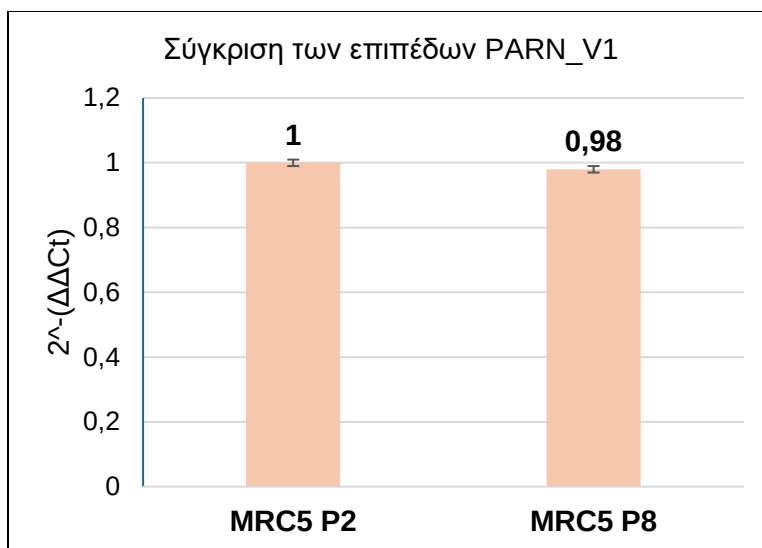
	MRC5 P2	MRC5 P8
PARN	1	1,02
PARN_V1	1	0,98

Πίνακας 11: Η σύγκριση της έκφρασης των PARN και PARN_V1 σε κύτταρα MRC5, σε P2 και P8 αντίστοιχα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα:



Εικόνα 17: Επίπεδα έκφρασης της PARN σε κύτταρα MRC5 που διαφέρουν στον αριθμό ανακαλλιεργειών. Η PARN εκφράζεται και στις δύο συνθήκες, χωρίς να παρουσιάζει κάποια διαφορά στα επίπεδά της.



Εικόνα 18: Επίπεδα έκφρασης της PARN σε κύτταρα MRC5 που διαφέρουν στον αριθμό ανακαλλιιεργειών. Η PARN εκφράζεται και στις δύο συνθήκες, χωρίς να παρουσιάζει κάποια διαφορά στα επίπεδά της.

Βάσει των Εικόνων 17 & 18, η PARN_V1 υπάρχει και στις δύο συνθήκες P2 και P8 σε κύτταρα MRC5. Ωστόσο, τα επίπεδα του mRNA τόσο της PARN όσο και της PARN_V1 δεν εμφανίζουν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο συνθήκες P2 και P8. Η PARN_V1 πιθανώς δεν ανιχνεύεται στην ανοσοαποτύπωσης, λόγω μικρής ποσότητας.

Κατά συνέπεια και σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι η έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1, δεν σχετίζεται με τη γήρανση των κυττάρων, καθώς δεν παρατηρείται κάποια διαφορά ούτε σε επίπεδο πρωτεΐνης (Western Blot), αλλά ούτε σε επίπεδο mRNA (qPCR). Η υπόθεση συσχέτισης με την κυτταρική γήρανση δεν επαληθεύτηκε.

3.2 Έλεγχος έκφρασης εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1 σε εμβρυονικούς και πρωτογενείς ινοβλάστες σε συνθήκες κυτταρικής αδράνειας (Quiescence)

I. Έλεγχος έκφρασης του εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1 σε διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας – Στέρηση Ορού

Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου, κύτταρα MRC5 καλλιιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο MEM/ Panexin 10%. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, έδειξαν ότι στην κυτταρική αυτή σειρά εκφράζεται μόνο η εναλλακτική ισομορφή

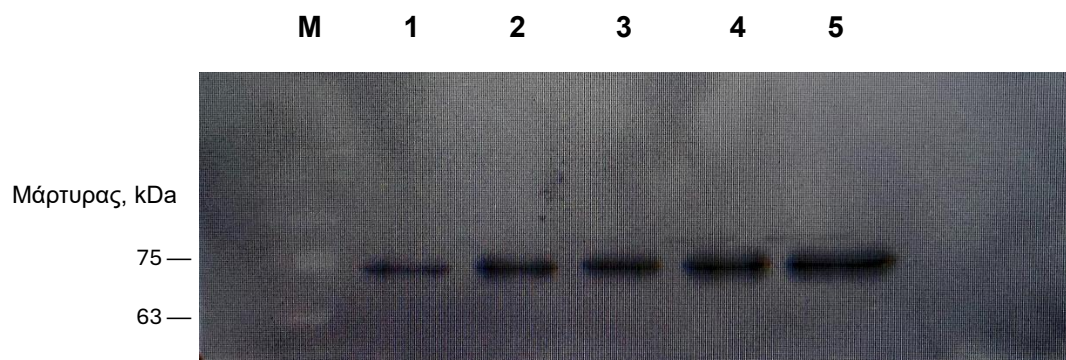
PARN_V1. Στη συνέχεια τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν στο ίδιο θρεπτικό, αλλά παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης εξωσωμάτων, και τότε αυτό που παρατηρήθηκε ήταν η σταδιακή μείωση της έκφρασης του εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1 και η αύξηση της έκφρασης της PARN. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση των ινοβλαστών σε CAF (cancer-associated fibroblast), ύστερα από επώαση με αντίσωμα FAP (Fibroblast-activation protein). Η υπόθεση είναι ότι τα κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση κυτταρικής αδράνειας, και τότε εκφράζεται μόνο η εναλλακτική ισομορφή, ενώ ύστερα από κάποιο ερέθισμα (εξωσώματα/αυξητικοί παράγοντες) γίνεται η αλλαγή για έκφραση της πλήρους μήκους μορφής.

Με στόχο να ελεγχθεί και να καθοριστούν οι συνθήκες έκφρασης του εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1, κυτταρική σειρά MRC5 καλλιεργήθηκε στις ακόλουθες τέσσερις συνθήκες για 4 ημέρες σε 6-well plate:

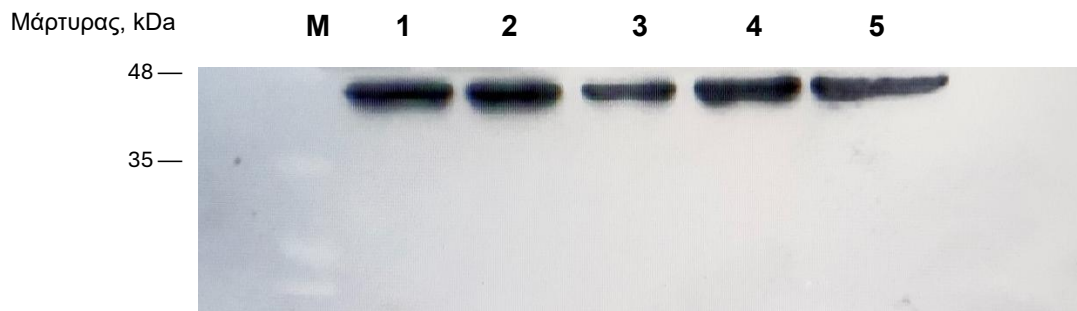
- Θρεπτικό υλικό MEM/ 10% Panexin NTA
- Θρεπτικό υλικό MEM/ 10% Panexin
- Θρεπτικό υλικό MEM/ 10% FBS
- Θρεπτικό υλικό MEM/ 10% Exo Free FBS
- Θρεπτικό υλικό MEM/ 10% Panexin & 5ng/mL b-FGF

Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western, για τα παραπάνω δείγματα με μονοκλωνικό αντίσωμα anti-PARN, ενώ για την κανονικοποίηση και σύγκριση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται η β-ακτίνη (μονοκλωνικό αντίσωμα anti-β-actin). Με βάση τα προϋπάρχοντα αποτελέσματα, και την υπόθεση, λόγω κυτταρικής αδράνειας αναμένεται η έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1 μόνο στις συνθήκες με MEM/ 10% Panexin NTA και MEM/ 10% Panexin, λόγω έλλειψης αυξητικών παραγόντων.

Τα αποτελέσματα του Western blot παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες:



Εικόνα 19: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης του PARN_V1 με τα αντισώματα anti-PARN (πρωτογενές) και anti-rabbit IgG-HRP (δευτερογενές) σε κύτταρα MRC5. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, PANEXIN NTA· 2, PANEXIN· 3, 10% FBS· 4, EXO FREE FBS· 5, PANEXIN/b-FGF.



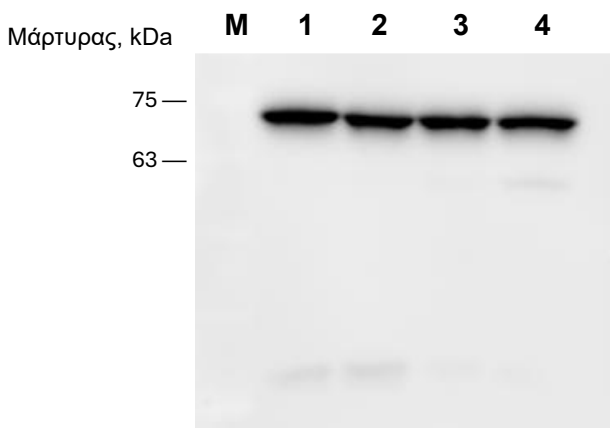
Εικόνα 20: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western με τα αντισώματα anti- β -actin (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές), που χρησιμοποιείται ως control σε κύτταρα MRC5. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, PANEXIN NTA· 2, PANEXIN· 3, 10% FBS· 4, EXO FREE FBS· 5, PANEXIN/b-FGF.

Αυτό που παρατηρούμε με βάση τα παραπάνω, είναι ότι μεταξύ των μεγεθών 75kD και 63kD του μάρτυρα μοριακών μεγεθών εκφράζεται μόνο η πλήρους ισομορφή της πρωτεΐνης και δεν παρατηρείται καθόλου έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφοι. Το αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε με αρκετές βιολογικές επαναλήψεις.

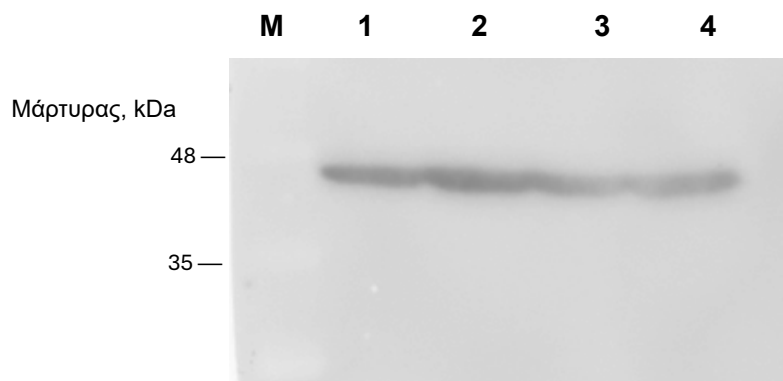
Σε συνέχεια των παραπάνω, ακολούθησαν πειράματα στέρησης ορού για διάστημα 8 ημερών σε κύτταρα MRC5 με τις εξής συνθήκες:

- Θρεπτικό υλικό MEM/ 0,5% FBS
- Θρεπτικό υλικό MEM/ 2% FBS
- Θρεπτικό υλικό MEM/ 10% FBS
- Θρεπτικό υλικό MEM/ 10% Exo Free FBS

Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western παρουσιάζονται στις *Εικόνες 21 και 22*:



Εικόνα 21: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της PARN_V1 με τα αντισώματα anti-PARN (πρωτογενές) και anti-rabbit IgG-HRP (δευτερογενές) σε κύτταρα MRC5. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, 0,5% FBS· 2, 2% FBS· 3, 10% FBS· 4, 10% EXO FREE FBS.



Εικόνα 22: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western με τα αντισώματα anti-β-actin (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές), που χρησιμοποιείται ως control σε κύτταρα MRC5. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, 0,5% FBS· 2, 2% FBS· 3, 10% FBS· 4, 10% EXO FREE FBS.

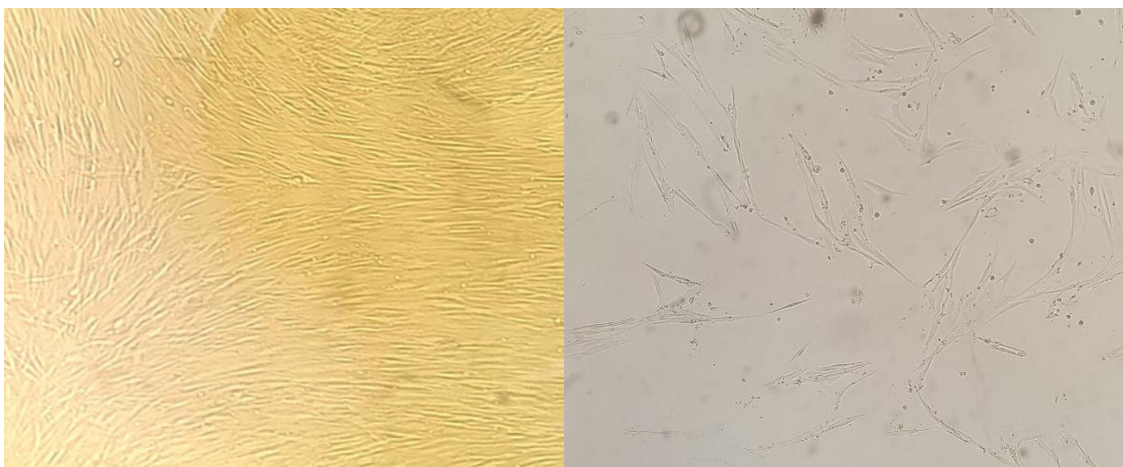
Δεν φαίνεται μία απόλυτη έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1 σε καμία από τις παραπάνω συνθήκες. Σε όλες κυριαρχεί η έκφραση της πλήρους ισομορφής, ενώ σε αυτή την ανοσοαποτύπωση κατά Western, εμφανίζεται αχνά η εναλλακτική ισομορφή PARN_V1, στα 63kDa, χωρίς όμως να υπάρχει κάποια απόλυτη σχέση, ούτε να είναι η πρωτεΐνη που εκφράζεται σε μεγαλύτερα επίπεδα σε σύγκριση με την PARN.

II. Έλεγχος της έκφρασης εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1 μετά από την επίδραση του αναστολέα του c-Myc

Σε επόμενο στάδιο, ελέγχθηκε η επαγωγή της κυτταρικής αδράνειας με τη χρήση ενός αναστολέα του c-Myc σε κύτταρα πρωτογενών ινοβλαστών του πνεύμονα DLF σε συνθήκες καλλιέργειας με θρεπτικό MEM/ 2% FBS και MEM/ 10% FBS. Και στις δύο αυτές συνθήκες, όταν η φλάσκα έφτασε σε ποσοστό 50%, προστέθηκε ο αναστολέας c-Myc σε συγκέντρωση 64mM. Ο αναστολέας δρα μέσω της πρόσδεσής του στο c-Myc, εμποδίζοντας την πρόσδεση του παράγοντα Max. Με την αναστολή του διμερισμού των c-Myc και Max εμποδίζεται η εξαρτώμενη από το c-Myc γονιδιακή έκφραση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Προκαλείται διακοπή του κυτταρικού κύκλου, επάγοντας την κυτταρική αδράνεια. Ο αναστολέας του c-Myc διαλύεται σε DMSO, ενώ ως control σε κάθε συνθήκη στο θρεπτικό υλικό προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα DMSO.

A. Μορφολογία Κυττάρων DLF ύστερα από την επίδραση του αναστολέα του c-Myc

Συγκρίνοντας τα κύτταρα στην Εικόνα 23, παρατηρούμε ότι μετά τη δράση του αναστολέα του c-Myc, οι ινοβλάστες γίνονται μικρότεροι και λιγότερο εκτεταμένοι. Επίσης, εμφανίζεται διόγκωση του πυρήνα. Η εικόνα αυτή παρατηρήθηκε στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν τόσο σε θρεπτικό με 10% FBS, όσο και με 2% FBS.

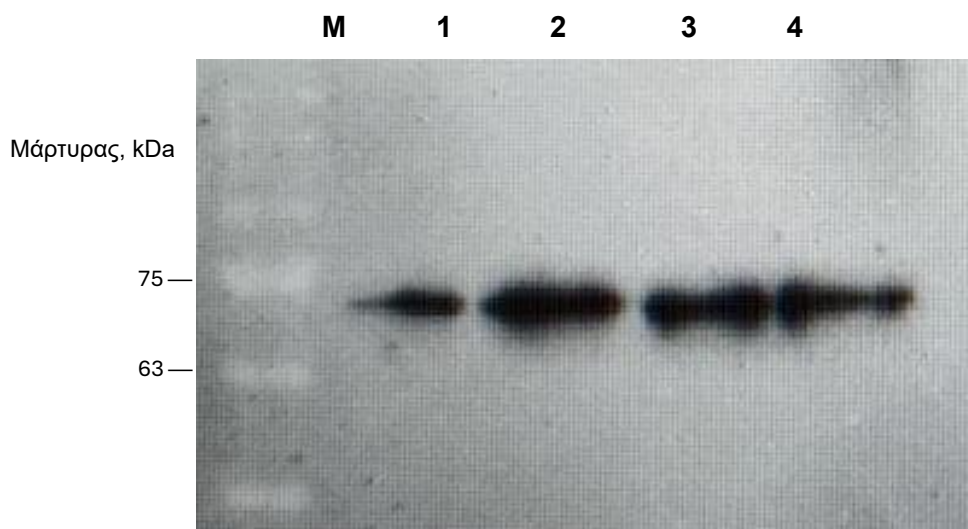


Εικόνα 23: Σύγκριση μορφολογίας κυττάρων, πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) τη χρήση του αναστολέα του *c-Myc*.

B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

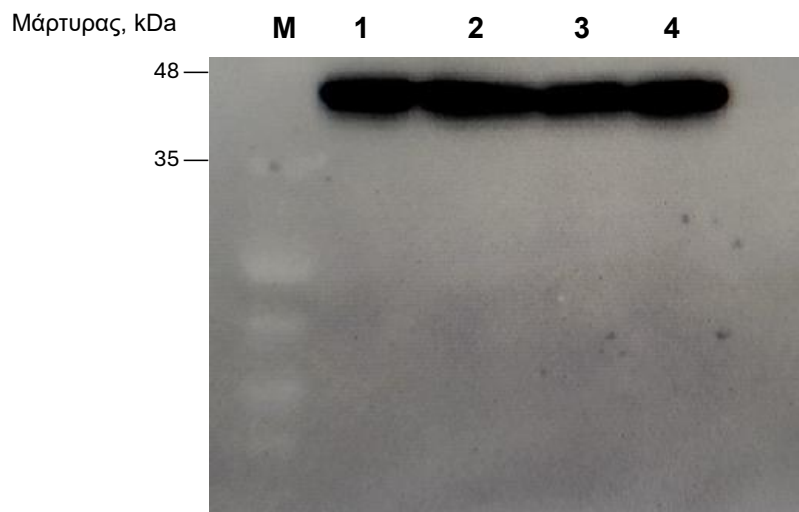
Τα αποτελέσματα της μεθόδου παρουσιάζονται στις εικόνες που παρατίθενται παρακάτω:

Ύστερα από επώαση με μονοκλωνικό αντίσωμα anti-PARN:



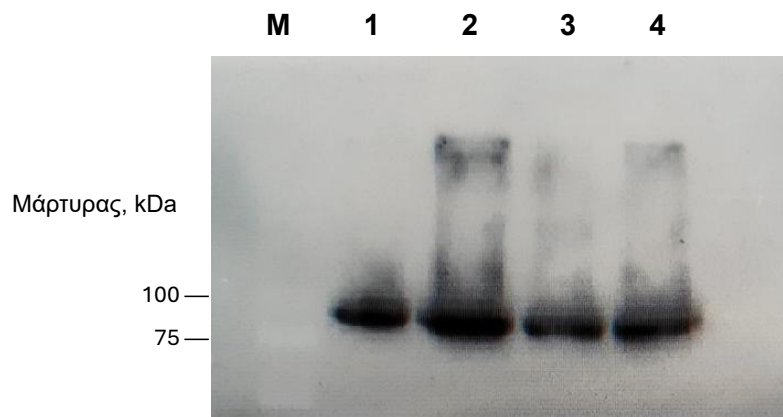
Εικόνα 24: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της *PARN_V1* με τα αντισώματα *anti-PARN* (πρωτογενές) και *anti-rabbit IgG-HRP* (δευτερογενές) σε κύτταρα *DLF*. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, 2% FBS (control)· 2, 2% FBS (*c-Myc* inhibitor)· 3, 10% FBS (control)· 4, 10% FBS (*c-Myc* inhibitor).

Μετά από επώαση με μονοκλωνικό αντίσωμα anti-β-actin για κανονικοποίηση:



Εικόνα 25: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western με τα αντισώματα anti-β-actin (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές), που χρησιμοποιείται ως control σε κύτταρα DLF. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, 2% FBS (control)· 2, 2% FBS (c-Myc inhibitor)· 3, 10% FBS (control)· 4, 10% FBS (c-Myc inhibitor).

Ύστερα από επώαση με μονοκλωνικό αντίσωμα anti-FAP:



Εικόνα 26: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western με τα αντισώματα anti-FAP (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές), που χρησιμοποιείται ως control σε κύτταρα DLF. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, 2% FBS (control)· 2, 2% FBS (c-Myc inhibitor)· 3, 10% FBS (control)· 4, 10% FBS (c-Myc inhibitor).

Παρατηρώντας την Εικόνα 23, μεταξύ των μοριακών μεγεθών 75kDa και 63kDa, ανιχνεύεται και πάλι μόνο η πλήρους μήκους πρωτεΐνη, χωρίς να υπάρχει κάποιο διακριτό

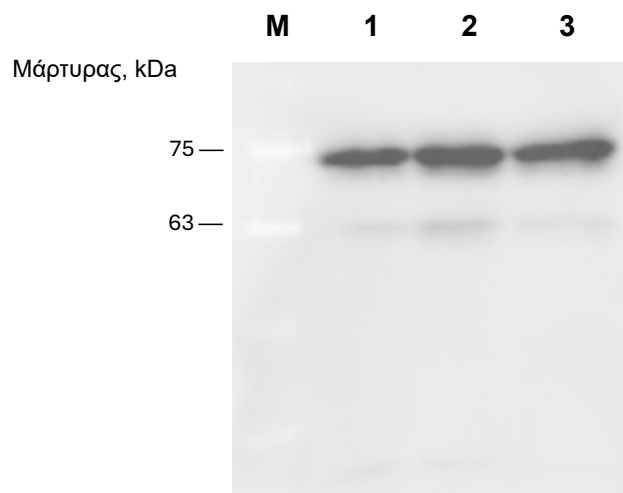
μοτίβο έκφρασης μεταξύ των δύο ισομορφών. Επιπλέον, από την *Εικόνα 25* βλέπουμε ότι οι ινοβλάστες είναι ενεργοποιημένοι, αφού και στις 4 διαδρομές έχει ανιχνευτεί η πρωτεΐνη FAP μεταξύ των 100 και 75kDa.

C. Έλεγχος της έκφρασης εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1 ύστερα από την επίδραση εξωσωμάτων

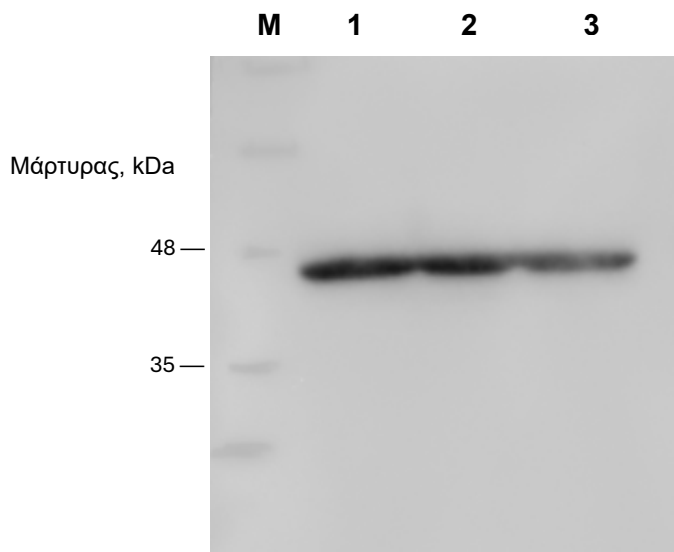
Σε επόμενα πειράματα, στόχος ήταν να ελεγχθεί η επίδραση των εξωσωμάτων από καρκινική σειρά του μαστού MCF7 στην έκφραση των PARN και PARN_V1 πρωτογενών ινοβλαστών του πνεύμονα DLF. Για το λόγο αυτό, ακολούθησαν πειράματα καλλιέργειας πρωτογενών ινοβλαστών του πνεύμονα DLF για τρεις ημέρες σε θρεπτικό υλικό MEM/ 10% Panexin NTA και στη συνέχεια τα κύτταρα εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις εξωσωμάτων για μία ημέρα, ομοίως σε θρεπτικό υλικό MEM/ 10% Panexin NTA. Τα κύτταρα επωάστηκαν με εξωσώματα που απομονώθηκαν από 55 (170μL εξωσωμάτων) και 110mL (330μL εξωσωμάτων) θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιέργειας MCF7. Η απομόνωση των εξωσωμάτων έγινε σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου με υπερφυγοκέντρηση σε μονή στιβάδα σουκρόζης και η παρουσία τους επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι των εξωσωμικών δεικτών CD81 και TSG 101.

I. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

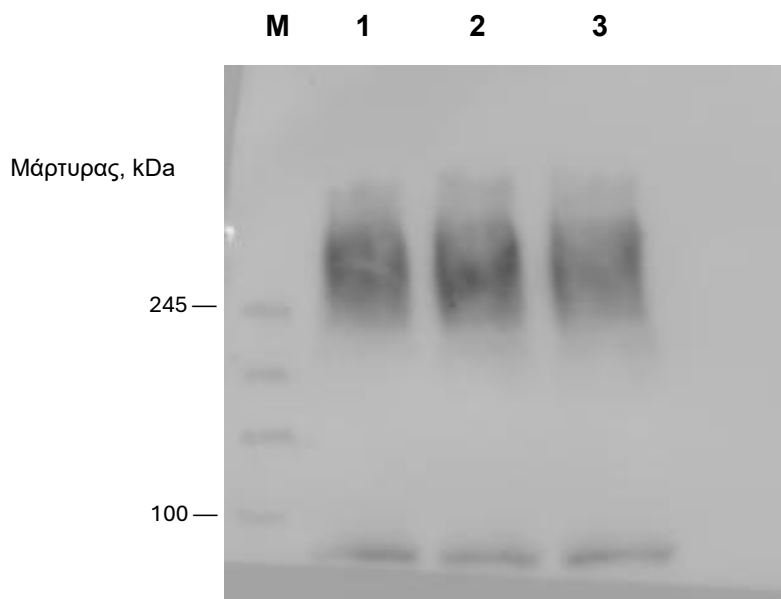
Πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα anti-PARN, anti-β-actin και anti-FAP, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στις παρακάτω εικόνες:



Εικόνα 27: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της PARN_V1 με τα αντισώματα anti-PARN (πρωτογενές) και anti-rabbit IgG-HRP (δευτερογενές) σε κύτταρα DLF. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, PANEXIN (control)· 2, PANEXIN + 170μL εξωσωμάτων· 3, PANEXIN + 330μL εξωσωμάτων.



Εικόνα 28: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της β-ακτίνης με τα αντισώματα anti-β-actin (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές) σε κύτταρα DLF. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, PANEXIN (control)· 2, PANEXIN + 170μL εξωσωμάτων· 3, PANEXIN + 330μL εξωσωμάτων.



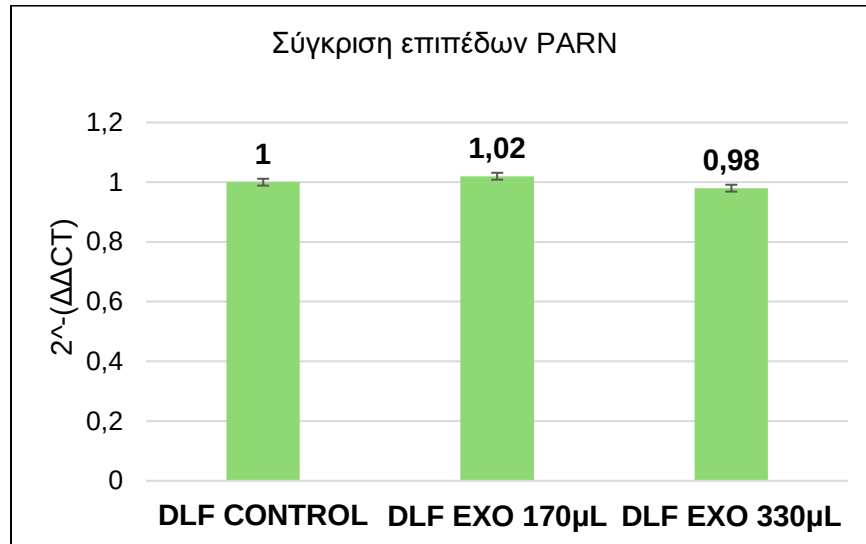
Εικόνα 29: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της FAP με τα αντισώματα anti-FAP (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές) σε κύτταρα DLF. Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, PANEXIN (control)· 2, PANEXIN + 170μL εξωσωμάτων· 3, PANEXIN + 330μL εξωσωμάτων.

Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης έδειξαν, εκτός την πλήρους μήκους PARN μεταξύ των μοριακών μεγεθών 75kDa και 63kDa, μία ακόμα ζώνη στα 63kDa περίπου που αντιστοιχεί στο εναλλακτικό μετάγραφο PARN_V1 και στις τρεις διαδρομές. Ωστόσο, δε

φαίνεται να υπάρχει κάποια δόσοεξαρτώμενη σχέση με τη συγκέντρωση των εξωσωμάτων και την έκφραση της PARN_V1. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην έκφραση της FAP (Εικόνα 29) μεταξύ του δείγματος ελέγχου (διαδρομή 1) και των δειγμάτων που είχαν επωαστεί με εξωσώματα (διαδρομές 2 & 3).

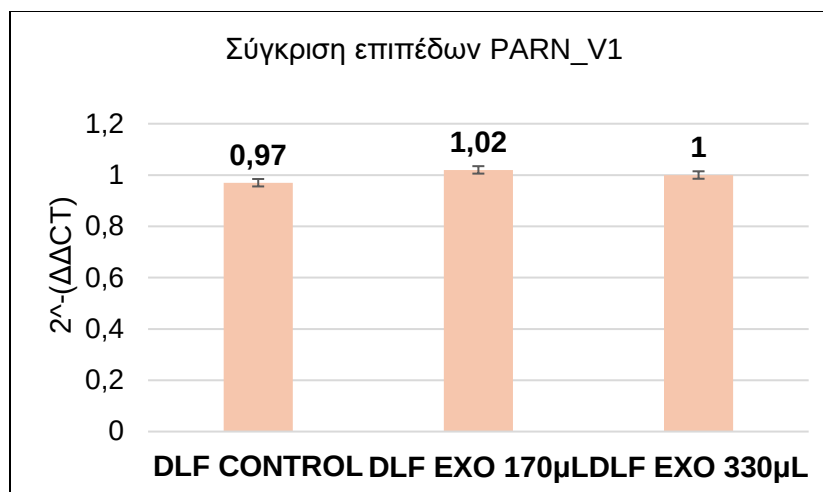
II. PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR-qPCR)

Με σκοπό να ελεγχθούν τυχόν διαφορές στην έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου PARN_V1, μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων εξωσωμάτων πραγματοποιήθηκε qPCR, με τη διαδικασία που περιγράφηκε και παραπάνω. Έτσι, μετά από τη σχετική κανονικοποίηση με γονίδιο αναφοράς την β-ακτίνη (μέθοδος $\Delta\Delta C_T$), προκύπτουν τα παρακάτω αποτελέσματα:



Εικόνα 30: Επίπεδα έκφρασης της PARN σε κύτταρα DLF (control), και σε κύτταρα DLF που έχουν επωαστεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις εξωσωμάτων. Η PARN εκφράζεται και στις τρεις συνθήκες, χωρίς να παρουσιάζει κάποια διαφορά στα επίπεδά της.

Αυτό που παρατηρούμε από τα διαγράμματα των Εικόνων 30 και 31, είναι ότι δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των PARN και PARN_V1. Αυτό φαίνεται να συμβαίνει τόσο ανάμεσα στα δείγματα control και στα δείγματα που έχουν εκτεθεί σε εξωσώματα, όσο και στα δείγματα με τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις εξωσωμάτων.

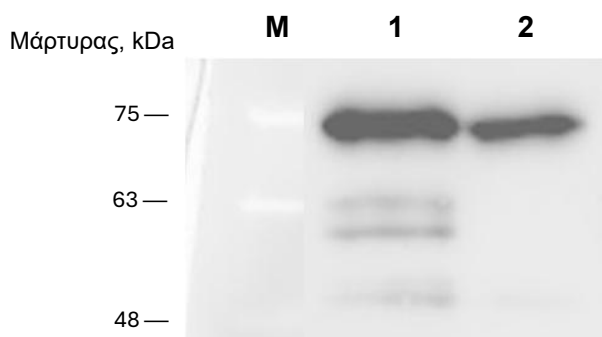


Εικόνα 31: Επίπεδα έκφρασης της PARN_V1 σε κύτταρα DLF (control), και σε κύτταρα DLF που έχουν επωαστεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις εξωσωμάτων. Η PARN_V1 εκφράζεται και στις τρεις συνθήκες, χωρίς να παρουσιάζει κάποια διαφορά στα επίπεδά της.

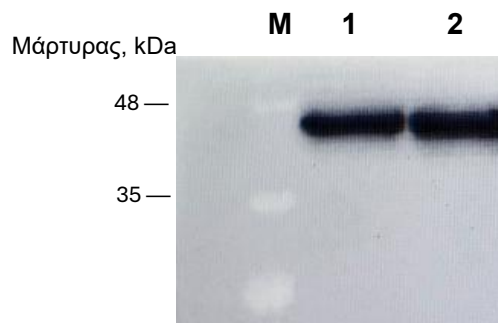
3.3 Έλεγχος διαφοροποίησης της έκφρασης του εναλλακτικού μεταγράψου PARN_V1 σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές

Τέλος, εξετάστηκαν κάποιες επιπλέον κυτταρικές σειρές. Πρόκειται για τις καρκινικές σειρές του μαστού MCF7 και MDA-MB-231. Επίσης, εξετάστηκε πρωτογενής σειρά ινοβλαστών του μαστού BNF, αλλά και ένας τύπος μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSC) που βρίσκονται στον λιπώδη ιστό (adipose mesenchymal stem cells – ASCs). Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM/10% FBS, ενώ οι υπόλοιπες σε MEM/2% FBS.

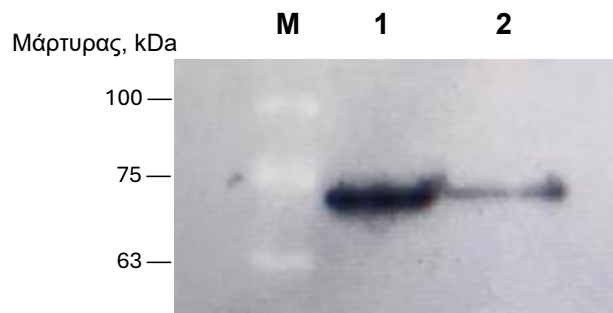
Παρουσιάζονται παρακάτω τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western ύστερα από επώαση με μονοκλωνικό αντίσωμα anti-PARN και anti-β-actin για τις παραπάνω κυτταρικές σειρές:



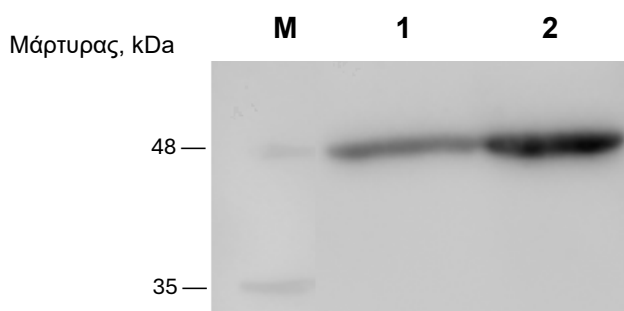
Εικόνα 32: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της PARN_V1 με τα αντισώματα anti-PARN (πρωτογενές) και anti-rabbit IgG-HRP (δευτερογενές). Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, κύτταρα MCF7· 2, κύτταρα MDA-MB-231.



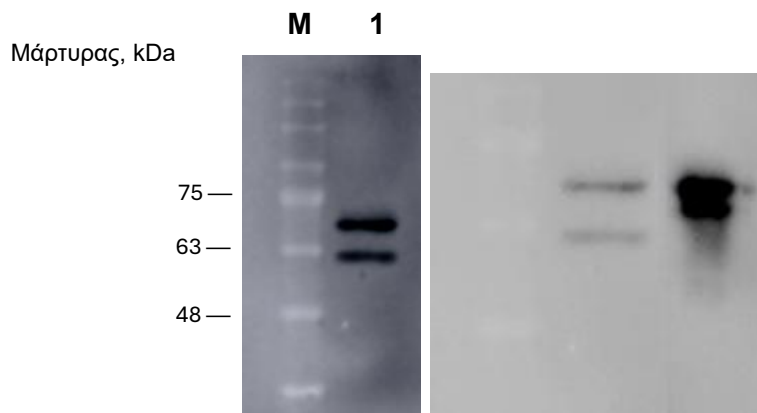
Εικόνα 33: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της β-ακτίνης με τα αντισώματα anti-β-actin (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές). Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, κύτταρα MCF7· 2, κύτταρα MDA-MB-231.



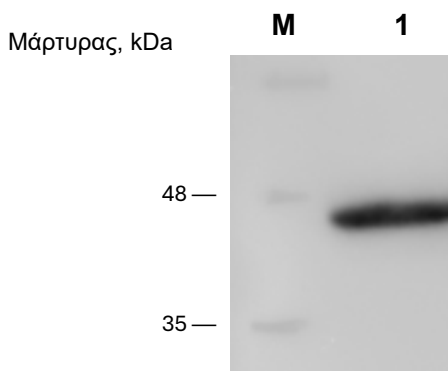
Εικόνα 34: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της PARN_V1 με τα αντισώματα anti-PARN (πρωτογενές) και anti-rabbit IgG-HRP (δευτερογενές). Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, κύτταρα DLF· 2, κύτταρα BNF.



Εικόνα 35: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της β-ακτίνης με τα αντισώματα anti-β-actin (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές). Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, κύτταρα DLF· 2, κύτταρα BNF.



Εικόνα 36: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της PARN_V1 με τα αντισώματα anti-PARN (πρωτογενές) και anti-rabbit IgG-HRP (δευτερογενές). Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, κύτταρα ASCs.



Εικόνα 37: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης της β-ακτίνης με τα αντισώματα anti-β-actin (πρωτογενές) και anti-mouse IgG-HRP (δευτερογενές). Διαδρομές: M, Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών· 1, κύτταρα ASCs.

Με βάση τις παραπάνω εικόνες αυτής της ενότητας, παρατηρούμε ότι υπάρχουν διαφοροποιήσεις στην έκφραση των μεταγράφων της πολυ(Α)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης. Εκτός από το εναλλακτικό μετάγραφο PARN_V1 που μελετάται και την πλήρη ισομορφή της πρωτεΐνης, στην κυτταρική σειρά MCF7 παρατηρούνται επιπλέον δύο μετάγραφα. Το μοριακό μέγεθος αυτών υπολογίζεται με βάση τον μάρτυρα των μοριακών μεγεθών σε 57kDa και 50kDa (Εικόνα 32). Στην κυτταρική σειρά MDA-MB-231, παρατηρείται η μόνο η πλήρης ισομορφή ενώ σε μικρότερα επίπεδα εμφανίζεται το μετάγραφο των 50kDa, όπως στα MCF7.

Εξετάζοντας τις κυτταρικές σειρές των πρωτογενών ινοβλαστών πνεύμονα DLF και μαστού BNF, παρατηρούμε ότι εμφανίζεται μόνο η PARN, ενώ ποσοτικά, και βάσει της

κανονικοποίησης με την ακτίνη, η πρωτεΐνη έχει μεγαλύτερα επίπεδα στους ινοβλάστες του πνεύμονα σε σχέση με του μαστού.

Τέλος, στα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από λιπώδη ιστό (ASCs), παρατηρούμε για πρώτη φορά ότι δεν υπάρχει καθόλου η πλήρης ισομορφή. Αντίθετα, εμφανίζονται μόνο δύο εναλλακτικές μορφές, το μοριακό βάρος των οποίων αντιστοιχεί σε 67kDa και 63kDa.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη της έκφρασης της εναλλακτικής ισομορφής PARN_V1 έδειξε ότι παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις σε σχέση με την έκφραση της πλήρους μήκους PARN. Αν και η δομική ανάλυση της PARN_V1 έδειξε την απουσία 61 αμινοξέων του αμινοτελικού άκρου, περιλαμβάνοντας μόνο δύο από τα πέντε καταλυτικά κατάλοιπα της PARN, αυτή έχει αποδειχθεί σε προηγούμενα πειράματα ότι διατηρεί σημαντική δραστηριότητα απαδενυλάσης.

Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν πως η PARN_V1 εκφράζεται τόσο σε φυσιολογικά (MRC5, DLF) όσο και σε καρκινικά κύτταρα (MCF7) χωρίς να εντοπίζονται διαφορές στα επίπεδά της. Σε πολλές από τις αναλύσεις Western blot, η PARN_V1 εμφανίζεται με ασθενές ή καθόλου σήμα, ενώ κυρίαρχη παραμένει η έκφραση της πλήρους PARN στα 74kDa. Σε επίπεδο mRNA η qPCR, ομοίως δεν έδειξε κάποια διαφοροποίηση στην έκφραση της PARN_V1 στις συνθήκες και κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν.

Εξετάζοντας την συνθήκη της κυτταρικής αδράνειας, η επίδραση εξωσωμάτων που απομονώθηκαν από MCF7 κύτταρα, και μεταφέρθηκαν στο θρεπτικό υλικό των DLF κυττάρων, δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση της PARN_V1 ούτε σε επίπεδο πρωτεΐνης (Western Blot) ούτε σε επίπεδο mRNA (qPCR), αφού δεν ανιχνεύεται δοσοεξαρτώμενη σχέση. Αντίστοιχα, και η χρήση αναστολέα του c-Myc δεν τροποποίησε την έκφραση της PARN_V1 σημαντικά. Επιπλέον, όμοια αποτελέσματα έδειξαν τα πειράματα στέρησης ορού σε εμβρυονικούς ινοβλάστες MRC5, όπου η καλλιέργεια με Panexin ή με χαμηλές συγκεντρώσεις FBS δε φαίνεται να οδηγεί σε εμφάνιση μόνο της PARN_V1, γεγονός που υποδηλώνει ότι η έκφρασή της δεν επηρεάζεται από αυτόν τον μοριακό μηχανισμό.

Ακόμα, δεν επιβεβαιώνεται κάποια σαφής συσχέτιση με τη γήρανση, καθώς τόσο στα qPCR όσο και στα Western Blot δεν ανιχνεύονται αξιοσημείωτες διαφορές έκφρασης μεταξύ πρώιμων και όψιμων passages MRC5 κυττάρων. Η σχετική ποσοτικοποίηση μέσω qPCR υποστηρίζει την παραπάνω παρατήρηση, αφού ούτε στην έκφραση mRNA παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνθηκών γήρανσης (P2 και P8).

Η σταθερή παρουσία της PARN_V1 σε πλήθος κυτταρικών σειρών και συνθηκών σε μικρότερα επίπεδα που δεν ανιχνεύεται πάντα με την ανοσοαποτύπωση κατά Western, ενδεχομένως να συνδέεται με βασικές μεταγραφικές ή μεταμεταφραστικές λειτουργίες που δεν περιορίζονται σε παθολογικές καταστάσεις. Παρόλα αυτά, η ασθενής έκφρασή της και η απουσία διαφοροποίησης σε περιβάλλοντα με ογκογόνες επιρροές, όπως ο c-Myc ή τα εξωσώματα από MCF7 κύτταρα, υπονοούν ότι η PARN_V1 δεν σχετίζεται άμεσα με την καρκινογένεση ή τουλάχιστον όχι με μηχανισμούς που περιλαμβάνουν αυτά τα μόρια.

Περιορισμός της μελέτης αποτελεί η έλλειψη πειραμάτων που να εξετάζουν τις συνέπειες από την υπερέκφραση ή σίγαση της PARN_V1, καθώς και η απουσία δεδομένων από *in*

νίνο μοντέλα ή ασθενείς. Επιπλέον, η χρήση μονοκλωνικού αντισώματος που ανιχνεύει και τις δύο ισομορφές ενδέχεται να επηρεάζει την καθαρότητα των αποτελεσμάτων Western blot. Η περαιτέρω μελέτη με ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα θα μπορούσε να διασαφηνίσει το πραγματικό μοριακό αποτύπωμα της PARN_V1.

Από τα όλα τα παραπάνω πειράματα, ωστόσο, μπορούμε να εξάγουμε ένα πρώτο συμπέρασμα, σύμφωνα με το οποίο οι εναλλακτικές μορφές (δηλαδή τόσο το μετάγραφο PARN_V1), όπως και οι άλλες που βρέθηκαν, πιθανώς σχετίζονται με μοριακά προγράμματα που εμπλέκονται στην κυτταρική διαφοροποίηση. Δηλαδή, τα κύτταρα αρχικά, πριν τη διαφοροποίησή τους εκφράζουν τις εναλλακτικές μορφές (μία ή περισσότερες), και κατά τη διαφοροποίησή τους, γίνεται η αλλαγή στην πλήρους ισομορφή, ή και διατηρούν και ένα ποσοστό της έκφρασης αυτών.

Η παρατήρηση αυτή ανοίγει νέα ερευνητικά ερωτήματα ως προς τον πιθανό ρόλο της PARN_V1 στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, ιδιαίτερα σε συνθήκες χαμηλής κυτταρικής δραστηριότητας. Τα επόμενα βήματα, επομένως είναι να καθοριστούν όλα τα εναλλακτικά μετάγραφα της PARN που βρέθηκαν, καθώς και οι συνθήκες που αυτά εκφράζονται, σε συσχέτιση επιπλέον με τις κυτταρικές σειρές. Τέλος, σε δεύτερο χρόνο, θα ήταν σκόπιμο να διερευνηθεί ο βιολογικός ρόλος καθενός από αυτά.

Συμπερασματικά, η PARN_V1 αποτελεί μια εναλλακτική μορφή του ενζύμου απαδενυλάσης PARN, η οποία εκφράζεται σε ποικιλία κυτταρικών τύπων χωρίς να παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις σε συνθήκες κυτταρικής αδράνειας ή γήρανσης. Αν και η βιολογική της σημασία παραμένει ασαφής, η σταθερή της έκφραση υποδηλώνει πιθανό υποστηρικτικό ή ρυθμιστικό ρόλο στην ομοιόσταση του μεταγραφικού μηχανισμού, ο οποίος χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- AA Balatsos, N., Maragozidis, P., Anastasakis, D., & Stathopoulos, C. (2012). Modulation of poly (A)-specific ribonuclease (PARN): current knowledge and perspectives. *Current medicinal chemistry*, 19(28), 4838-4849.
- Baralle, F. E., & Giudice, J. (2017). Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nature reviews Molecular cell biology*, 18(7), 437-451.
- Belaya, Z., Golounina, O., Nikitin, A., Tarbaeva, N., Pigarova, E., Mamedova, E., ... & Van Hul, W. (2021). Multiple bilateral hip fractures in a patient with dyskeratosis congenita caused by a novel mutation in the PARN gene. *Osteoporosis International*, 32, 1227-1231.
- Benyelles, M., Episkopou, H., O'Donohue, M. F., Kermasson, L., Frange, P., Poulain, F., ... & Revy, P. (2019). Impaired telomere integrity and rRNA biogenesis in PARN-deficient patients and knock-out models. *EMBO molecular medicine*, 11(7), e10201.
- Berndt, H., Harnisch, C., Rammelt, C., Stöhr, N., Zirkel, A., Dohm, J. C., ... & Wahle, E. (2012). Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *Rna*, 18(5), 958-972.
- Bjornson, C. R., Cheung, T. H., Liu, L., Tripathi, P. V., Steeper, K. M., & Rando, T. A. (2012). Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. *Stem cells*, 30(2), 232-242.
- Boyraz, B., Moon, D. H., Segal, M., Muosieyiri, M. Z., Aykanat, A., Tai, A. K., ... & Agarwal, S. (2016). Posttranscriptional manipulation of TERC reverses molecular hallmarks of telomere disease. *The Journal of clinical investigation*, 126(9), 3377-3382.
- Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(9), 729-740.
- Campisi, J., & Robert, L. (2014). Cell senescence, role in aging and age-related diseases. *Interdisciplinary topics in gerontology*, 39, 45.
- Chen, W., Dong, J., Haiech, J., Kilhoffer, M. C., & Zeniou, M. (2016). Cancer stem cell quiescence and plasticity as major challenges in cancer therapy. *Stem cells international*, 2016(1), 1740936.
- Chen, Y., Li, D., Wang, D., Liu, X., Yin, N., Song, Y., ... & Zhan, Q. (2012). Quiescence and attenuated DNA damage response promote survival of esophageal cancer stem cells. *Journal of cellular biochemistry*, 113(12), 3643-3652.
- Cheung, T. H., Quach, N. L., Charville, G. W., Liu, L., Park, L., Edalati, A., ... & Rando, T. A. (2012). Maintenance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489. *Nature*, 482(7386), 524-528.

- Cheung, T. H., & Rando, T. A. (2013). Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(6), 329-340.
- Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & Van Deursen, J. M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature medicine*, 21(12), 1424-1435.
- Climente-González, H., Porta-Pardo, E., Godzik, A., & Eyraes, E. (2017). The functional impact of alternative splicing in cancer. *Cell reports*, 20(9), 2215-2226.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., ... & Serrano, M. (2005). Senescence in premalignant tumours. *Nature*, 436(7051), 642-642.
- Coller, H. A., Sang, L., & Roberts, J. M. (2006). A new description of cellular quiescence. *PLoS biology*, 4(3), e83.
- Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y. U., Muñoz, D. P., Goldstein, J., ... & Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology*, 6(12), e301.
- Dhanraj, S., Gunja, S. M. R., Deveau, A. P., Nissbeck, M., Boonyawat, B., Coombs, A. J., ... & 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.
- Edwards-Gilbert, G. (2010). Regulation of mRNA splicing by signal transduction. *Nature Education*, 3(9), 43.
- Essers, M. A. G., & Trumpp, A. (2010). Targeting leukemic stem cells by breaking their dormancy. *Molecular oncology*, 4(5), 443-450.
- Fang, Y., Yang, Y., Hua, C., Xu, S., Zhou, M., Guo, H., ... & Zhou, J. (2017). Rictor has a pivotal role in maintaining quiescence as well as stemness of leukemia stem cells in MLL-driven leukemia. *Leukemia*, 31(2), 414-422.
- Ferragut Cardoso, A. P., Banerjee, M., Al-Eryani, L., Sayed, M., Wilkey, D. W., Merchant, M. L., ... & States, J. C. (2022). Temporal modulation of differential alternative splicing in HaCaT human keratinocyte cell line chronically exposed to arsenic for up to 28 wk. *Environmental health perspectives*, 130(1), 017011.
- Garneau, N. L., Wilusz, J., & Wilusz, C. J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(2), 113-126.
- Ghosh, S., & Jacobson, A. (2010). RNA decay modulates gene expression and controls its fidelity. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 1(3), 351-361.

- Godwin, A. R., Kojima, S., Green, C. B., & Wilusz, J. (2013). Kiss your tail goodbye: the role of PARN, Nocturnin, and Angel deadenylases in mRNA biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(6-7), 571-579.
- Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P., & Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology*, 16(1), 653-699.
- Gruber, A. J., & Zavolan, M. (2019). Alternative cleavage and polyadenylation in health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 20(10), 599-614.
- Guo, S., & Lin, S. (2023). mRNA alternative polyadenylation (APA) in regulation of gene expression and diseases. *Genes & Diseases*, 10(1), 165-174.
- Harnisch, C., Moritz, B., Rammelt, C., Temme, C., & Wahle, E. (2012). Activity and function of deadenylases. In *The Enzymes* (Vol. 31, pp. 181-211). Academic Press.
- Hornblower, B., Robb, G. B., & Tzertzinis, G. (2018). Minding your caps and tails—Considerations for functional mRNA synthesis. *DNA*, 5(3), 3.
- 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).
- Jacob, S., Bühring, S., & Bersching, K. (2022). Recent advances in research on molecular mechanisms of fungal signaling. *Encyclopedia*, 2(2), 840-863.
- Kalaitzidis, D., & Neel, B. G. (2008). Flow-cytometric phosphoprotein analysis reveals agonist and temporal differences in responses of murine hematopoietic stem/progenitor cells. *PloS one*, 3(11), e3776.
- Katoh, T., Hojo, H., & Suzuki, T. (2015). Destabilization of microRNAs in human cells by 3' deadenylation mediated by PARN and CUGBP1. *Nucleic acids research*, 43(15), 7521-7534.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes & development*, 24(22), 2463-2479.
- Li, L., & Clevers, H. (2010). Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *science*, 327(5965), 542-545.
- Liu, Q., Fang, L., & Wu, C. (2022). Alternative splicing and isoforms: from mechanisms to diseases. *Genes*, 13(3), 401.
- Locati, M. D., Pagano, J. F. B., Girard, G., Ensink, W. A., van Olst, M., van Leeuwen, S., ... & van Oudenaarden, A. (2021). PARN is required for maturation and quality control of the 18S rRNA 3' end. *RNA*, 27(2), 206–221.

- Lutz, C. S. (2008). Alternative polyadenylation: a twist on mRNA 3' end formation. *ACS chemical biology*, 3(10), 609-617.
- Mademtoglou, D., & Relaix, F. (2022). From cyclins to CDKIs: Cell cycle regulation of skeletal muscle stem cell quiescence and activation. *Experimental Cell Research*, 420(1), 113275.
- Marescal, O., & Cheeseman, I. M. (2020). Cellular mechanisms and regulation of quiescence. *Developmental cell*, 55(3), 259-271.
- Massagué, J. (2008). TGF β in cancer. *cell*, 134(2), 215-230.
- McManus, C. J., & Graveley, B. R. (2011). RNA structure and the mechanisms of alternative splicing. *Current opinion in genetics & development*, 21(4), 373-379.
- Montellese, C., van den Heuvel, J., Truesdell, S. S., Kampen, K. R., Velupillai, S., Oppikofer, M., ... & Ugalde, A. P. (2020). PARN mediates 18S rRNA processing in the maturation of the small ribosomal subunit. *Nature Communications*, 11(1), 2792.
- Moon, D. H., Segal, M., Boyraz, B., Guinan, E., Hofmann, I., Cahan, P., ... & Agarwal, S. (2015). Mutations in the Poly (A)-specific ribonuclease (PARN) impair telomerase RNA 3'end maturation in dyskeratosis congenita patients.
- Moore, M. J., Wang, Q., Kennedy, C. J., & Silver, P. A. (2010). An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell*, 142(4), 625-636.
- Moraes, K. C., Wilusz, C. J., & Wilusz, J. (2006). CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase. *Rna*, 12(6), 1084-1091.
- Mulet, A., & Signes-Costa, J. (2022). Idiopathic pulmonary fibrosis and telomeres. *Journal of Clinical Medicine*, 11(23), 6893.
- Nagpal, N., & Agarwal, S. (2020). Telomerase RNA processing: Implications for human health and disease. *Stem Cells*, 38(12), 1532-1543.
- Nanjappa, D. P., Babu, N., Khanna-Gupta, A., O'Donohue, M. F., Sips, P., & Chakraborty, A. (2021). Poly (A)-specific ribonuclease (PARN): More than just "mRNA stock clearing". *Life sciences*, 285, 119953.
- Niedzwiecka, A., Nilsson, P., Worch, R., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E., & Virtanen, A. (2016). Molecular recognition of mRNA 5' cap by 3' poly (A)-specific ribonuclease (PARN) differs from interactions known for other cap-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1864(4), 331-345.
- Oltean, S., & Bates, D. O. (2014). Hallmarks of alternative splicing in cancer. *Oncogene*, 33(46), 5311-5318.

- Pan, K., Lee, J. T. H., Huang, Z., & Wong, C. M. (2015). Coupling and coordination in gene expression processes with pre-mRNA splicing. *International journal of molecular sciences*, 16(3), 5682-5696.
- Passmore, L. A., & Collier, J. (2022). Roles of mRNA poly (A) tails in regulation of eukaryotic gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(2), 93-106.
- Ren, F., Zhang, N., Zhang, L., Miller, E., & Pu, J. J. (2020). Alternative Polyadenylation: a new frontier in post transcriptional regulation. *Biomarker Research*, 8, 1-10.
- Shukla, S., & Parker, R. (2017). PARN modulates Y RNA stability and its 3'-end formation. *Molecular and Cellular Biology*, 37(20), e00264-17.
- 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), 1204-1216.
- Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., DeBerardinis, R. J., Mahmoud, A. I., Olson, E. N., ... & Sadek, H. A. (2010). The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell stem cell*, 7(3), 380-390.
- Singh, P., & Ahi, E. P. (2022). The importance of alternative splicing in adaptive evolution.
- Skeparnias, I., Anastasakis, D., Shaukat, A. N., Grafanaki, K., & Stathopoulos, C. (2017). Expanding the repertoire of deadenylases. *RNA biology*, 14(10), 1320-1325.
- Stamm, S., Ben-Ari, S., Rafalska, I., Tang, Y., Zhang, Z., Toiber, D., ... & Soreq, H. (2005). Function of alternative splicing. *Gene*, 344, 1-20.
- Stuart, B. D., Choi, J., Zaidi, S., Xing, C., Holohan, B., Chen, R., ... & Garcia, C. K. (2015). Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. *Nature genetics*, 47(5), 512-517.
- Tazi, J., Bakkour, N., & Stamm, S. (2009). Alternative splicing and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1792(1), 14-26.
- Tourriere, H., Chebli, K., & Tazi, J. (2002). mRNA degradation machines in eukaryotic cells. *Biochimie*, 84(8), 821-837.
- 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.
- Will, C. L., & Lührmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(7), a003707.

- Wilson, A., Murphy, M. J., Oskarsson, T., Kaloulis, K., Bettess, M. D., Oser, G. M., ... & Trump, A. (2004). c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes & development*, 18(22), 2747-2763.
- Wright, C. J., Smith, C. W., & Jiggins, C. D. (2022). Alternative splicing as a source of phenotypic diversity. *Nature Reviews Genetics*, 23(11), 697-710.
- 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.
- Yabas, M., Elliott, H., & Hoyne, G. F. (2015). The role of alternative splicing in the control of immune homeostasis and cellular differentiation. *International journal of molecular sciences*, 17(1), 3.
- Yan, Y. B. (2014). Deadenylation: enzymes, regulation, and functional implications. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 5(3), 421-443.
- Yilmaz, Ö. H., Valdez, R., Theisen, B. K., Guo, W., Ferguson, D. O., Wu, H., & Morrison, S. J. (2006). Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature*, 441(7092), 475-482.
- Zhang, X., Virtanen, A., & Kleiman, F. E. (2010). To polyadenylate or to deadenylate: that is the question. *Cell cycle*, 9(22), 4437-4449.
- Zuo, Y., & Deutscher, M. P. (2001). Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic acids research*, 29(5), 1017-1026.
- van Velthoven, C. T., & Rando, T. A. (2019). Stem cell quiescence: dynamism, restraint, and cellular idling. *Cell stem cell*, 24(2), 213-225.
- Αντωνόπουλος, Δ. (2024). Χαρακτηρισμός εναλλακτικού μεταγράφου της πολυ(Α) εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης PARN και διερεύνηση του βιολογικού του ρόλου (Διδακτορική διατριβή). Διαθέσιμο από: Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών.
- Μπέτα, Ρ. (2023). Διερεύνηση και μελέτες απαδενυλασών που σχετίζονται με τον ημερονύκτιο ρυθμό (Διδακτορική διατριβή). Διαθέσιμο από: Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το χρονικό διάστημα Οκτώβριος 2024 - Ιούνιος 2025, στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας, Μοριακή Γενετική - Διαγνωστικοί Δείκτες».

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Νικόλαο Μπαλατσό, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας, που για ακόμη μία φορά με εμπιστεύτηκε για την ανάθεση του θέματος. Η στήριξη και η καθοδήγησή του σε όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας, καθώς και οι υποδείξεις του, ήταν πολύτιμες, όχι μόνο για την παρούσα εργασία, αλλά και για τα ερευνητικά πρότζεκτ που μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω. Τον ευχαριστώ για όλες τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου προσέφερε, μα πάνω από όλα για τη συνεργασία μας από την προπτυχιακή διπλωματική μου εργασία μέχρι και σήμερα.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Άννα-Μαρία Ψαρρά, Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, και ειδικότερα Διευθύντρια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών, για την ευκαιρία να ενταχθώ και να διδαχθώ στο συγκεκριμένο εργαστήριο και γενικά για την συνεργασία που είχαμε, ως μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Θα ήθελα ομοίως να ευχαριστήσω θερμά την κα Ειρήνη Τσιλιώνη, όχι μόνο ως μέλος της τριμελούς επιτροπής, αλλά και για την άποψη και πολύ βοηθητική συνεργασία που είχαμε καθόλη τη διάρκεια της χρονιάς στο πλαίσιο του ερευνητικού πρότζεκτ με τίτλο: «*Investigating exosome microRNAs profile in COPD patients colonized or not with Pseudomonas Aeruginosa*». Ακόμα, ευχαριστώ την κα Κώτσιου, για την συμμετοχή μου.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω τον κ. Δ. Κλέτσα, Διευθυντή του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», του Εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης, του Εργαστηρίου Κυτταρικών Συστημάτων και Βιοδραστικών Μορίων και του Εκτροφείου Πειραματοζώων για την δωρεά των κυτταρικών σειρών, DLF & ASCs.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Λάμπρο Μπαλή, για όλα όσα έμαθα, για όλη μας τη συνεργασία και για όλες τις κοινές εμπειρίες σε κάθε βήμα της διπλωματικής μου εργασίας. Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω θερμά τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Λαγοπούλου Δέσποινα, τόσο για την εργαστηριακή βοήθεια και στήριξή της σε όλα, μα κυρίως για την πολύτιμη φιλία που μου χάρισε.

Ομοίως ευχαριστώ όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας-ερευνητικό προσωπικό, υποψήφιους διδάκτορες, μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους φίλους μου, αλλά κυρίως, το μεγαλύτερό μου στήριγμα, την οικογένειά μου, καθώς χωρίς εκείνους και την αγάπη τους, δεν θα είχα καταφέρει να ακολουθήσω αυτό που αγαπώ.

Κατερίνα Τσιγγενέ,

Λάρισα, Ιούλιος 2025