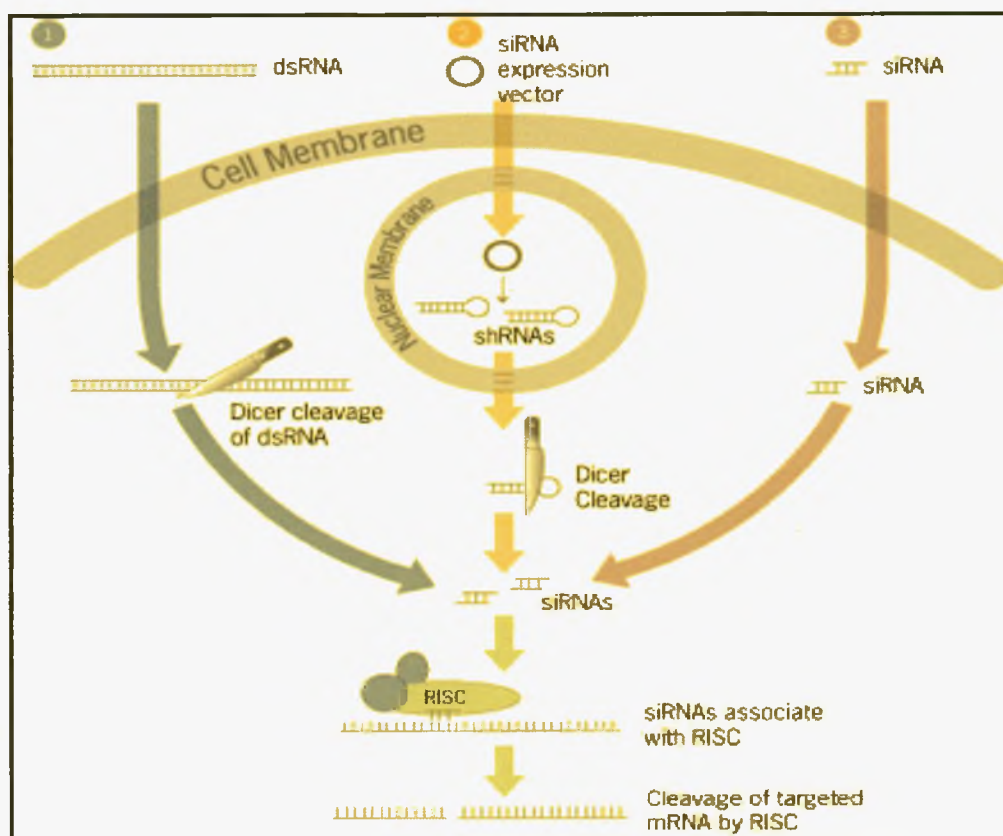


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ  
ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΗΣ CNOT7**



**ΠΑΛΛΑΚΗ ΠΑΣΧΑΛΙΝΑ**  
**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**ΛΑΡΙΣΑ 2010**



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 8165/1

Ημερ. Εισ.: 17-05-2010

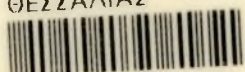
Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΒΒ

2010

ΠΑΛ


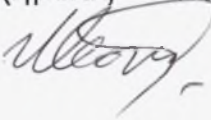
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087072

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέπων καθηγητή τον κ. Μπαλατσό Νικόλαο.

Μέλη τριμελούς επιτροπής

- Νικόλαος Μπαλατσός, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας 
- Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών
- Κοντού Μαρία, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. 



Κωνσταντίνος Σταθόπουλος  
Αναπληρωτής Καθηγητής  
Τηλ: 30-2610-997 932  
Fax: 30-2610-969 167  
E-mail: cstath@med.upatras.gr

Πάτρα 17-2-2010

Προς την  
Γραμματεία του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας  
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΘΕΜΑ: «Πτυχιακή εργασία της κας Π. Παλλάκη»

Με την παρούσα επιστολή σας ενημερώνω ότι έχω λάβει γνώση σχετικά με την πρόοδο και την περάτωση της πτυχιακής εργασίας από την κα Π. Παλλάκη, με επιβλέποντα τον Λέκτορα κο Ν. Μπαλατσό και συναινώ στην κατάθεσή της προς εξέταση και έγκρισή της από αρμόδια Τριμελή Επιτροπή όπως αυτή έχει ορισθεί από το Τμήμα σας.

Με εκτίμηση

Κ. Σταθόπουλος  
Αναπλ. Καθηγητής

*Ευχαριστώ,*

*Όλους όσους με εμπιστεύτηκαν για την ανάθεση αυτής της εργασίας. Ευχαριστώ τον κύριο Μπαλατσό για το πρωτότυπο του θέματος, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την διεκπεραίωση των πειραμάτων, όπως επίσης για την πληθώρα γνώσεων που μου προσέφερε και για τις πολύτιμες συμβουλές που ήταν καθοριστικές για την επίτευξη του στόχου μας. Ευχαριστώ τον κύριο Σταθόπουλο που με δέχτηκε στο εργαστήριό του και για την ενθάρρυνση που δέχτηκα για την ολοκλήρωση της εργασίας. Επίσης οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές του εργαστηρίου Λειτουργικής Βιοχημείας και ιδιαίτερα στον Α. Κυρίτση για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που δημιουργήθηκε στο εργαστήριο, στην Μ. Λάμπρου από το εργαστήριο μοριακής μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας όπως επίσης και στα μέλη του εργαστηρίου Ιολογίας και Μικροβιολογίας του τμήματος κυρίως στην Σ. Σαναλίδου και στην Β. Πλιάκα. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου και στους φίλους μου για την μεγάλη και ανεκτίμητη υποστήριξη τους.*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	5
<b>2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
2.1 Αποικοδόμηση ή μετάφραση.....	6
2.1.1 Μονοπάτια αποικοδόμησης φυσιολογικών mRNAs.....	8
2.1.2 Εξαρτώμενη από την αποαδενυλίωση αποικοδόμηση.....	10
2.1.3 Αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNAs.....	13
2.2 Κατάταξη και δράση των αποαδενυλασών .....	16
2.2.1 Δομή του ανθρώπινου συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT.....	17
2.2.2 Ο ρόλος της υπομονάδας CNOT7 του CCR4-NOT.....	18
2.2.3 Αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες.....	19
2.2.4 Φυσιολογικός ρόλος της CNOT7.....	19
2.3 Παρεμβολή RNA (RNAi).....	23
2.3.1 MicroRNAs (miRNAs).....	24
2.3.2 short interfering RNAs.....	25
2.3.3 Μέθοδοι αποσιώπησης.....	26
<b>3. ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	29
<b>4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	30
4.1 Υλικά	
4.1.1 Διαλύματα	
4.1.2 Χημικά	
4.1.3 Καρκινική κυτταρική σειρά	
4.1.4 Θρεπτικά υλικά	
4.1.5 Πρωτεΐνες ενζυμα και αντισώματα	
4.2 Μέθοδοι	
4.2.1 TCA/DOC κατακρήμνιση	
4.2.2 Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας με θρυψίνη	
4.2.3 Φύλαξη κυττάρων	
4.2.4 Απόψυξη κυττάρων	

- 4.2.5 Λύση κυττάρων θηλαστικών
- 4.2.6 Ανίχνευση πρωτεϊνών με western blot
- 4.2.7 Σχεδιασμός των shRNAs έναντι της CNOT7
- 4.2.8. Τεχνολογία RNA interference (RNAi)
- 4.2.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA των shRNA
- 4.2.10 Διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων Hep2
- 4.2.11 Lipofection
- 4.2.12 Απομόνωση ολικού RNA
- 4.2.13 One step quantitative real-time reverse transcription PCR (RT-PCR)

## **5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... 43**

- 5.1 Έλεγχος της αποσιώπησης της CNOT7 με ανοσοαποτύπωση
- 5.2 Έλεγχος της αποσιώπησης της CNOT7 με RT-PCR
- 5.3 Έλεγχος της διαμόλυνσης με άδειο πλασμίδιο σε κύτταρα Hep2
- 5.4 Έλεγχος της αποσιώπησης σε δομικές πρωτεΐνες του κυττάρου
- 5.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ ΤΗΣ CNOT7 ΣΤΟΥΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ
- 5.6 Επίδραση της αποσιώπησης της cnot7 στις αποαδενυλασες parn, cnot7 και nos σε διαφορετικούς χρόνους

## **7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... 62**

## **1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η ακριβής γονιδιακή έκφραση απαιτεί συνεχή έλεγχο των επιπέδων του mRNA. Η αποικοδόμηση του mRNA αποτελεί ρυθμιστικό στοιχείο της γονιδιακής έκφρασης. Στα κύτταρα των θηλαστικών το κύριο μονοπάτι αποικοδόμησης ξεκινά με αποαδενυλίωση, την αφαίρεση δηλαδή των πολύ(A) ουρών από το 3' άκρο ενός ώριμου mRNA. Η βράχυνση της ουράς καταλύεται από ένζυμα γνωστά ως αποαδενυλάσες. Ο ρόλος της ύπαρξης πολλών τέτοιων ενζύμων που επιτελούν τη συγκεκριμένη διεργασία δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Επιχειρούμε να προσεγγίσουμε το ερώτημα αυτό, αποσιωπώντας τις αποαδενυλάσες και αναλύοντας την επίδρασή της στα επίπεδα έκφρασης επιλεγμένων mRNAs.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η επίδραση της αποσιώπησης της ανθρώπινης CNOT7 στα επίπεδα έκφρασης επιλεγμένων παραγόντων, στα πλαίσια μιας πρώτης προσπάθειας για τον προσδιορισμό των mRNA-στόχων της κάθε αποαδενυλάσης. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάσαμε 5 κατάλληλα shRNAs για την ειδική σίγηση της CNOT7 και με αυτά διαμολύναμε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα Hep2. Με ανοσοαποτύπωση και ποσοτική Real Time PCR ελέγξαμε σε επίπεδο πρωτεϊνών και mRNA αντίστοιχα, την επιτυχία της αποσιώπησης και τα επίπεδα έκφρασης των εξεταζόμενων παραγόντων σε εκχυλίσματα κυττάρων αγρίου τύπου και κυττάρων διαμολυσμένων με τα shRNAs. Σύγκριση των προτύπων έκφρασης μετά από αποσιώπηση της CNOT7 με τα αντίστοιχα από την αποσιώπηση άλλων σημαντικών αποαδενυλασών όπως η PARN, φανερώνει κάποια διαφορετικότητα όσον αφορά τουλάχιστον σε ορισμένα mRNAs.

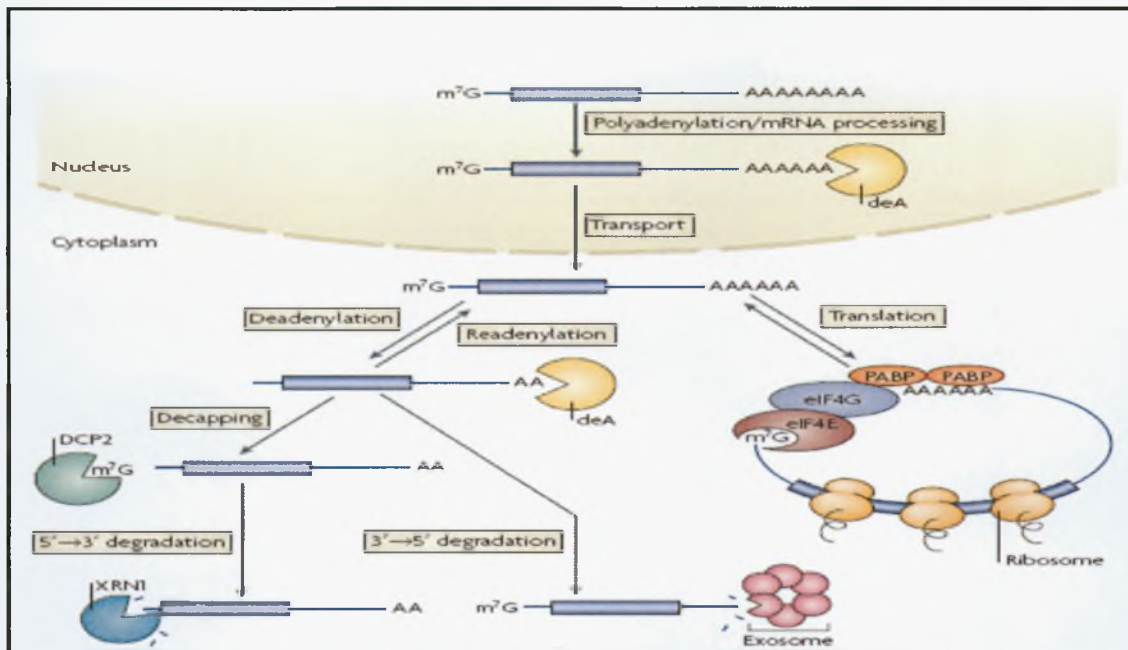


## **2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **2.1 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ Ή ΜΑΤΑΦΡΑΣΗ**

Η γένεση του mRNA (μεταγραφή) είναι ένα στάδιο από τα πολλά που υπάρχουν για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Από το μάτισμα και την πολυαδενυλίωση μέχρι την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα και την μετάφραση του, το μετάγραφο υπόκειται σε συνεχή έλεγχο. Πολλοί κυτταρικοί παράγοντες και μηχανισμοί είναι απόλυτα εξειδικευμένοι στη ρύθμιση της αποικοδόμησης του mRNA. (Garneau et al.2007, Moore 2005).

Η διάρκεια ζωής των ευκαρυωτικών mRNAs ποικίλει από μερικά λεπτά μέχρι και μήνες. Στις ζύμες για παράδειγμα το RNA διατηρείται σταθερό για από 2 μέχρι και 15 λεπτά ενώ στα κύτταρα των θηλαστικών από 15 λεπτά μέχρι 24 ώρες. Έχει παρατηρηθεί ότι τα μικρής διάρκειας mRNAs κωδικοποιούν για ρυθμιστικές πρωτεΐνες (π.χ ένζυμα).(*Meyer et al, 2004*). Η ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA, της μετάφρασης και της υποκυτταρικής του τοποθέτησης καθορίζουν το χρόνο, τον εντοπισμό και την ποσότητα της πρωτεΐνης που παράγεται κατά τη μετάφραση του mRNA. Στον πυρήνα η διαδικασία σύνθεσης νέων mRNAs συνοδεύεται από την προσθήκη (A) ουράς. Αλλαγές στο μήκος της poly (A) ουράς του mRNA συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ζωής του. Κατά την έξοδό του στο κυτταρόπλασμα η poly (A) προσδεμένη πρωτεΐνη (PABP) συνδέεται στην ουρά και σταθεροποιεί το mRNA διευκολύνοντας την μετάφραση. Το σύμπλοκο που δημιουργείται μεταξύ της PABP και παραγόντων έναρξης μετάφρασης (eIF4G) προσδένεται στην eIF4E πρωτεΐνη (εικ.1) που προσδένει το κάλυμμα (cap-binding protein). Αυτό το σύμπλοκο των τριών πρωτεϊνών ενισχύει την μετάφραση του mRNA (*Goldstrohm, Wickens, 2008*).



**Εικόνα 1. Μονοπάτια αποικοδόμησης και μετάφρασης**

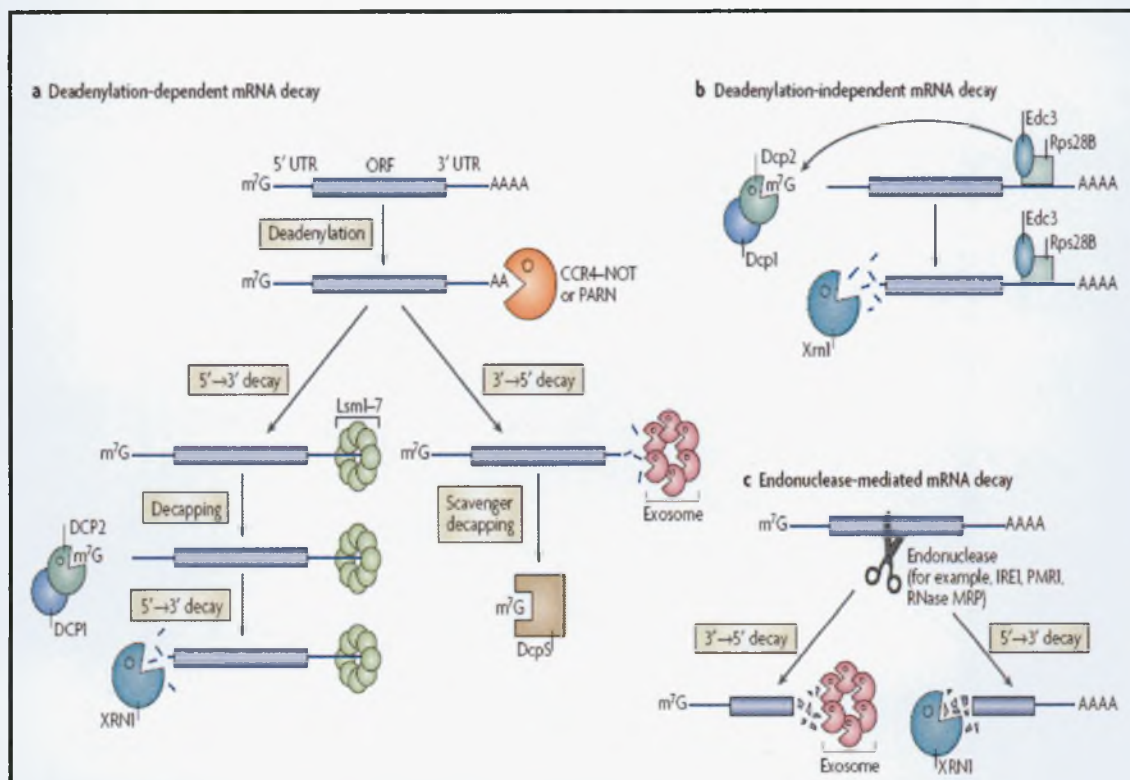
(Goldstrohm and Wickens, 2008)

### **2.1.1 ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ**

#### **mRNAs**

Η έναρξη της αποικοδόμησης του mRNA απαιτεί ειδικά σήματα και φαίνεται να πραγματοποιείται σχεδόν αποκλειστικά από εξωνουκλεάσες. Τα άκρα των mRNAs προστατεύονται από τη δράση αυτών των ενζύμων, το 3' άκρο έχει για προστασία την πολύ(A) ουρά και το 5' άκρο το κάλυμμα  $m^7GpppN$ . (Meyer et al, 2004). Οι μηχανισμοί που διαθέτουν τα κύτταρα για να αποικοδομούν τα φυσιολογικά mRNAs διαχωρίζονται βάσει των ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτούς και διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες i) αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αποαδενυλίωση ii) αποικοδόμηση ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση και iii) αποικοδόμηση διαμεσολαβούμενη από ενδονουκλεάσες (εικ.2). Τα περισσότερα mRNAs υποβάλλονται σε αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αποαδενυλίωση όπου αφαιρείται η πολύ(A) ουρά από μία αποαδενυλάση (βλ. § 2.1.2) (Garneau et al, 2007). Στα κύτταρα των θηλαστικών φαίνεται ότι η αποικοδόμηση με φορά  $3' \rightarrow 5'$  είναι η κυρίαρχη (Chen et al., 2001, Mukherjee et al., 2002, Garneau et al, 2007). Στην αποικοδόμηση που είναι ανεξάρτητη από την

αποαδενυλίωση (*S. Cerevisiae*) μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη, η Rps28B, συνδέεται άμεσα στην stem-loop δομή στο 3' UTR του δικού της mRNA και στρατολογεί έναν ενισχυτή της αφαίρεσης του καλύμματος και ακολουθεί συσσώρευση άλλων decapping ενζύμων. Στη αποικοδόμηση με ενδοριβονουκλεάσες παράγονται δύο κομμάτια τα οποία είναι επιρρεπή σε εξωνουκλεάσες. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναγνωριστεί πολλές κυτταρικές ενδονουκλεάσες (π.χ RNase MRP) αλλά υπάρχουν πολλές που δεν έχουν αναγνωριστεί και φαίνεται πως οι τελευταίες εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των ανώμαλων mRNAs και των short interfering RNAs (βλ. παρακάτω) (siRNA). (Garneau et al, 2007)



**Εικόνα 2. Μηχανισμοί αποικοδόμησης φυσιολογικών mRNAs**

a) Μονοπάτι αποαδενυλίωσης b) Μονοπάτι αποικοδόμησης ανεξάρτητο από την αποαδενυλίωση (*S.cerevisiae*) προϋποθέτει την ανάκτηση της μηχανής decapping c) Αποικοδόμηση διαμεσολαβούμενη από ενδονουκλεάσες (Garneau et al, 2007)

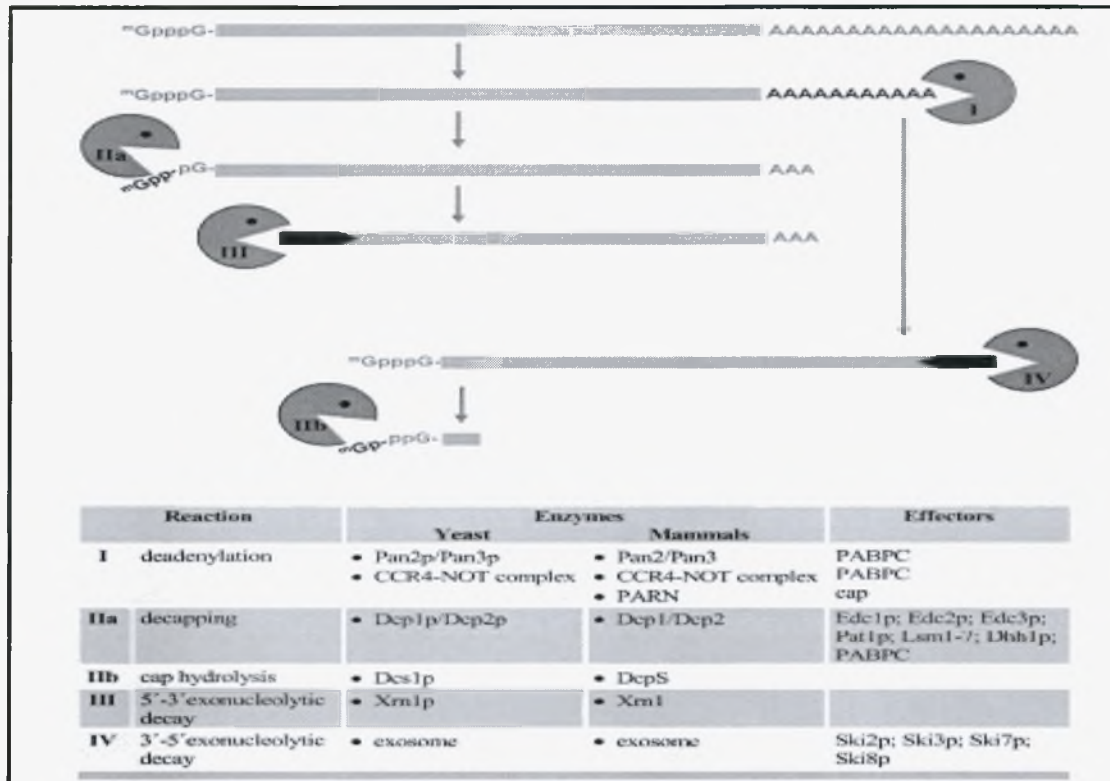
### **2.1.2 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ mRNA ΠΟΥ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗ (Deadenylation-dependent mRNA decay)**

Οι αποαδενυλάσες καταστρέφουν συνεχώς poly (A) ουρές. Τα ένζυμα αυτά τα οποία κόβουν και μικραίνουν τις poly (A) ουρές των mRNAs είναι ένζυμα κλειδιά στην διαδικασία της μεταφραστικής καταστολής. Η αποαδενυλίωση εξαρτάται από την κατανομή των mRNAs στον πυρηνοκυτταροπλασματικό χώρο και από την τοποθέτηση στα κοκκία. Αυτά τα κοκκία (της γαμετικής σειράς, νευρωνικά,) εκτός του ότι σχηματίζουν τα Ρ σώματα περιέχουν επίσης απενεργοποιημένα mRNAs τα οποία μπορούν να ενεργοποιηθούν.(Goldstrohm & Wickens 2008). Η αποαδενυλίωση είναι απίθανο να απαγορευτεί στα κοκκία γιατί οι ίδιες αποαδενυλάσες βρίσκονται και στο κυτταρόπλασμα. Πολλές από τις αποαδενυλάσες κυκλοφορούν μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος και κάποιες άλλες ανιχνεύονται σε ενδοκυτταρικά κοκκία. Όποιες αλλαγές που μπορεί να συμβούν στην κατανομή των αποαδενυλασών μπορεί να έχει δραματικές συνέπειες για τη ζωή του κυττάρου (μετά από ρήξη του πυρήνα κατά τη διάρκεια της μείωσης στα αμφίβια απελευθερώνεται η PARN στο κυτταρόπλασμα όπου αποαδενυλιώνει μητρικά mRNAs (Yamashita, A. et al 2005, Korner, C. G. et al 1998)

Στον πυρήνα, με την διαδικασία της αποαδενυλίωσης περιορίζονται οι νεοπροστιθέμενες poly (A) ουρές, στο κατάλληλο μήκος. Οι poly (A) ουρές όταν είναι σε προκαθορισμένο σωστό μήκος είναι απαραίτητες για την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα και όταν αυτό φτάσει στο κυτταρόπλασμα του προσδίδουν σταθερότητα και έναυσμα για μετάφραση.

Στο κυτταρόπλασμα η εκτεταμένη αποαδενυλίωση του mRNA σηματοδοτεί την αποικοδόμηση του (Goldstrohm, Wickens 2008). Η αποαδενυλίωση προετοιμάζει το mRNA για την υδρόλυση του 5' καλύμματος. Μόνο όταν η πολύ(A) ουρά αποικοδομηθεί σε ένα συγκεκριμένο όριο τότε αρχίζει η ολική αποικοδόμηση. Η πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για αυτή τη διαδικασία είναι η Dcp2 στις ζύμες ή η ομόλογη της στα θηλαστικά (Meyer et al, 2004). Υπάρχουν δύο μονοπάτια αποικοδόμησης που ακολουθούν τα αποαδενυλιωμένα mRNAs (εικ.3). Το μονοπάτι που έχει κατεύθυνση 5' → 3' και το οποίο συνεχίζει μετά από το decapping του mRNA (το οποίο καταλύεται από ένζυμα decapping DCP2) και ακολουθεί αποικοδόμηση από

εξωριβονουκλεάσες XRN1. Το δεύτερο μονοπάτι έχει κατεύθυνση 3' → 5' και καταλύεται από το εξόσωμα (exosome complex) (Brouwer et al. 2001)



**Εικόνα 3. Τα δύο κύρια μονοπάτια αποικοδόμησης των ευκαρυωτικών mRNAs και οι κυριότεροι παράγοντες που συμμετέχουν (ενισχυτές και αναστολείς) (Mayer et al 2004)**

Η αποαδενυλίωση είναι ένα ιδανικό σημείο ελέγχου ή ένας διακόπτης τόσο της αποικοδόμησης του mRNA όσο και της μεταφραστικής σίγησης. Η αποαδενυλίωση ελαττώνει την έναρξη της μετάφρασης και αντίστροφα η λήξη της μετάφρασης μπορεί να επηρεάσει την αποαδενυλίωση μέσω αλληλεπιδράσεων της PABP και του παράγοντα τερματισμού eRF3. Ο ρυθμός της αποαδενυλίωσης ποικίλλει μεταξύ των διάφορων mRNAs. Αυτή η διαδικασία ελέγχεται από παράγοντες που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες οι οποίοι προσδένονται στα mRNAs. Ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται συνήθως στις 3' UTR ενισχύουν την αποαδενυλίωση. Αυτά τα στοιχεία δεσμεύονται από παράγοντες οι οποίοι στρατολογούν τις αποαδενυλάσες προωθώντας έτσι την αποαδενυλίωση. Πολλές από τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν RNA (CUG-BP, PUF, CPEB) στρατολογούν

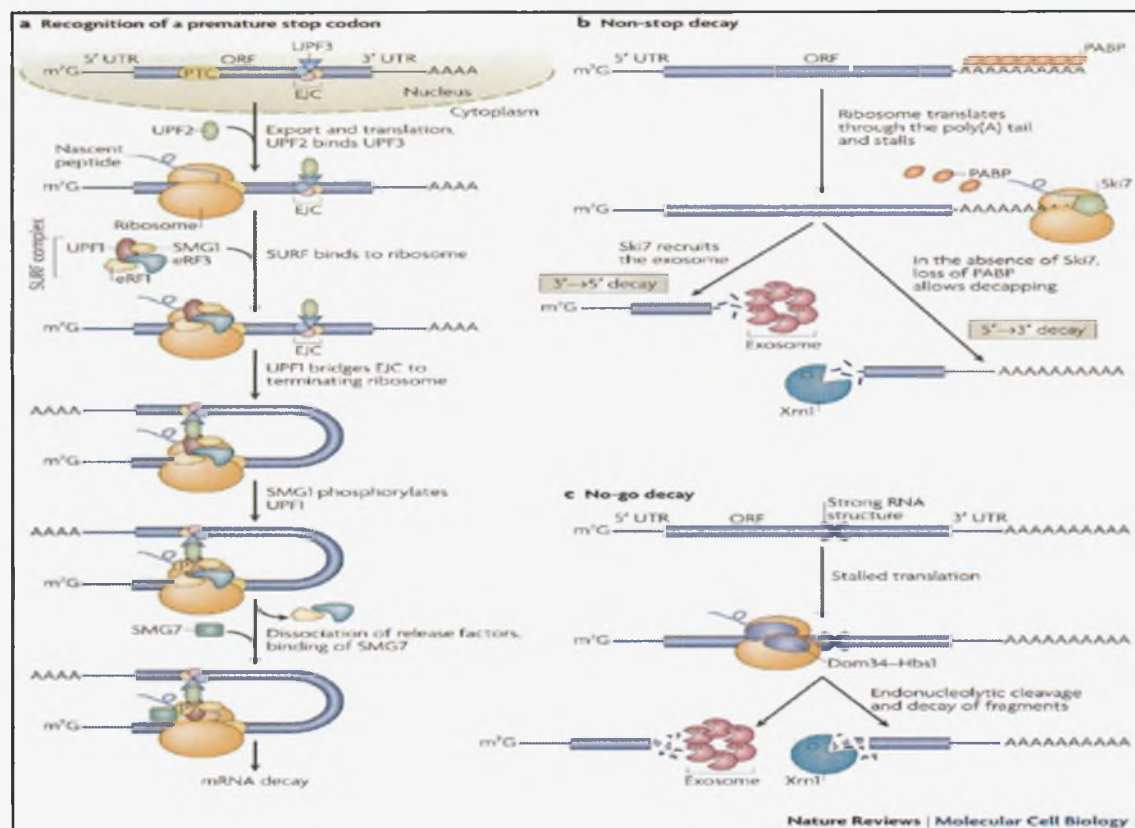
αποαδενυλάσες με άμεση δέσμευση σε αυτές (για παράδειγμα οι PABP πρωτεΐνες μπορούν να ενεργοποιήσουν την αποαδενυλίωση στρατολώντας το σύμπλοκο PAN2-PAN3 στο mRNA). Επιπλέον, το μήκος της πολυ(A) ουράς ενός mRNA μπορεί να ποικίλλει κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ή από τη φάση του κυτταρικού κύκλου που βρίσκεται το κύτταρο. Μετρήσεις με *microarrays* έχουν δείξει ότι mRNAs με μακριά ουρά μεταφράζονται με μεγαλύτερη εξειδίκευση. (*Goldstrohm and Wickens 2008*)

Η ρύθμιση της αποαδενυλίωσης είναι πολύ σημαντική και ζωτικής σημασίας για τη ζωή του κυττάρου, καθώς ανεξέλεγκτη αποαδενυλίωση μπορεί να προκαλέσει καταστροφή του. Σταθερά και μεταγραφικά ενεργά mRNAs πρέπει να προστατευθούν από την αποαδενυλίωση ενώ τα ασταθή και μη φυσιολογικά θα πρέπει να αποαδενυλιώνονται και να οδηγούνται στην αποικοδόμηση. Η έκφραση των αποαδενυλασών και των ρυθμιστών τους υπαγορεύεται όπου και όποτε μπορεί να συμβαίνει η ρύθμιση (π.χ η έκφραση της νοκτουρνίνης ελέγχεται από τον κερκάδιο ρυθμό, οι αποαδενυλάσες της υποοικογένειας POP2 εκφράζονται συνεχώς). Όταν το κύτταρο υποβάλλεται σε stress (UV, οξειδωση, οσμωτική πίεση ή έλλειψη γλυκόζης) τότε η αποαδενυλίωση σταματά αμέσως. Ο μοριακός μηχανισμός της αναστολής παραμένει άγνωστος. Η αποαδενυλίωση επηρεάζεται τόσο από τον πυρηνοκυτταροπλασματικό διαχωρισμό των αποαδενυλασών όσο και από τον εντοπισμό τους σε κοκκία. Προβλήματα στο διαχωρισμό προκαλεί ανισορροπία στις αποαδενυλάσες που θα έπρεπε να βρίσκονται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα με δραματικές συνέπειες για τα ενεργά mRNAs. (*Körner, C.G. et al. 1998*) Τα χαρακτηριστικά του mRNA στόχου επηρεάζουν εξίσου την αποτελεσματικότητα της αποαδενυλίωσης γιατί ορισμένες αποαδενυλάσες αναγνωρίζουν το 5' κάλυμμα και αλληλεπιδρούν με το στόχο.

### 2.1.3 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΕΛΑΤΤΩΜΑΤΙΚΩΝ mRNAs

Κάθε βήμα κατά την παραγωγή ώριμων mRNAs μεταγράφων παρέχει ευκαιρίες για λάθη. Για την διατήρηση της μεταφραστικής ακεραιότητας, το κύτταρο αναπτύσσει μηχανισμούς αναγνώρισης και καταστροφής των ελαττωματικών μεταγράφων προστατεύοντας έτσι τον εαυτό του από πιθανές τοξικές πρωτεΐνες που θα παράγονταν. Αυτό το σύστημα επιτήρησης δρα στον πυρήνα αλλά τα τρία μονοπάτια αποικοδόμησης των ελαττωματικών μεταγράφων ανιχνεύουν ελαττωματικά mRNPs στο κυτταρόπλασμα. Τα τρία μονοπάτια αποικοδόμησης (εικ.4) είναι: **α)** το μονοπάτι **Nonsense-Mediated Decay (NMD)**, το οποίο είναι το καλύτερα μελετημένο. Σε αυτό το μονοπάτι αποικοδομούνται όσα μετάγραφα περιέχουν πρώιμα κωδικόνια λήξης. Αυτά τα μετάγραφα θα μεταφράζονταν σε λανθασμένες πρωτεΐνες μικρότερου μεγέθους (truncated). Το μονοπάτι αυτό δεν ελέγχει μόνο τα λανθασμένα μετάγραφα αλλά και την φυσιολογική γονιδιακή έκφραση. (*Wagner and Andersen 2002*) **β)** Το μονοπάτι αποικοδόμησης **Non-stop (NSD)** στοχεύει mRNAs τα οποία δεν διαθέτουν κωδικόνιο λήξης. Τέτοια mRNAs συνεχίζουν τη μετάφραση κατά μήκος της πολύ(A) ουράς. Η πρώιμη πολυαδενυλίωση μπορεί να συνεισφέρει στην παραγωγή υποστρωμάτων για το συγκεκριμένο μονοπάτι αποικοδόμησης (*Garneau et al, Nature 2007 Vol 8, Frischmeyer et al Nature 2002*). Η αποικοδόμηση αυτού του τύπου πραγματοποιείται από το εξόσωμα (*Mayer et al Biochemistry and Molecular Biology 2004*). Επιπλέον, για την προστασία του κυττάρου από ελαττωματικές πρωτεΐνες, αυτό το μονοπάτι επιτρέπει την απελευθέρωση του ριβοσώματος. Τέλος, πρόσφατα ανακαλύφθηκε στη ζύμη και ένα τρίτο μονοπάτι αποικοδόμησης, **γ) No-go αποικοδόμηση (NGD)**. Τα ριβοσώματα μπορούν να ακινητοποιηθούν στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) λόγω της παρουσίας μιας δευτεροταγούς δομής RNA. Τα ένζυμα που εμπλέκονται σε αυτό το μονοπάτι μόλις αντιληφθούν το πρόβλημα δεσμεύουν το μετάγραφο δίπλα στη θέση της ακινητοποίησης του ριβοσώματος και σηματοδοτούν μια ενδονουκλεοτιδική αποικοδόμηση. Με αυτή τη διαδικασία απελευθερώνεται το ριβόσωμα και προκύπτουν δύο mRNA κομμάτια το κάθε ένα με ένα ελεύθερο άκρο εκτεθειμένο για

εξωνουκλεοτιδική αποικοδόμηση. (Garneau *at al*, 2007, Doma and Parker 2006)



**Εικόνα 4** **a) Nonsense-mediated decay (NMD)** **b) Non-stop decay** **c) No-go decay** (Garneau *at al*, Nature 2007)

## 2.2 ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΩΝ

Οι αποαδενυλάσες είναι εξωριβονουκλεάσες οι οποίες υδρολύουν RNA με κατεύθυνση 3'→5' με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του 5'-AMP. Για τη δράση τους εξαρτώνται από Mg<sup>++</sup>. Οι poly(A) ουρές είναι το βασικό υπόστρωμα αυτών των ενζύμων. Ωστόσο μερικές αποαδενυλάσες μπορούν να αποικοδομούν άλλα ριβοπολυμερή *in vitro*.

Ο αριθμός των γνωστών αποαδενυλασών έχει αυξηθεί τελευταία και για αυτό έχουν ταξινομηθεί σε δύο υπερικογένειες (DEDD νουκλεάσες και



οι EEP νουκλεάσες) βάσει της σύγκρισης των περιοχών αποαδενυλάσης τους δηλαδή το όνομα της κάθε οικογένειας δηλώνει τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Κοινό γνώρισμα της πρώτης οικογένειας είναι τα καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu τα οποία βρίσκονται σκόρπια μεταξύ τριών μοτίβων εξωνουκλεάσης τα οποία συντονίζουν τα ιόντα  $Mg^{++}$ . Η ποικιλότητα και η ποικιλομορφία των αποαδενυλασών δηλώνουν πως πιθανόν συγκεκριμένες αποαδενυλάσες στοχεύουν μοναδικά mRNAs επιτάσσοντας τον έλεγχο του mRNA στη δραστικότητα του ενζύμου. Από την άλλη, διαφορετικές αποαδενυλάσες μπορούν να δράσουν στο ίδιο mRNA με διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες λειτουργίες. Οι αποαδενυλάσες βρίσκονται συνήθως σε σύμπλοκα με πολλές υπομονάδες. Οι άλλες πρωτεΐνες(π.χ PABP, NOT, PUF proteins) σε αυτά τα σύμπλοκα μπορούν να επηρεάσουν την δραστικότητα της αποαδενυλάσης. Τα ένζυμα της αποαδενυλίωσης έχουν ποικίλες βιολογικές και φυσιολογικές λειτουργίες. Πολλοί ρυθμιστές (PUF, CPEB, KSRP, Smaug, miRNAs) στρατολογούν συγκεκριμένες αποαδενυλάσες και συμπαράγοντες οι οποίοι άλλοτε παρεμποδίζουν τη μετάφραση, ενισχύουν το decapping ή καταστρέφουν γρήγορα το mRNA. Ορισμένες από τις αποαδενυλάσες είναι σημαντικά ένζυμα για την βιωσιμότητα των διάφορων οργανισμών ενώ μεταλλάγματα μερικών δίνουν συγκεκριμένο φαινότυπο. Διάφορες αποαδενυλάσες, συμπεριλαμβανομένου της PARN του φυτού *A.Thaliana* και του *Xenopus* όπως επίσης της CCR4 στη *D.melenogaster* και της CCF1 στο *C.elegans*,είναι σημαντικές για την πρώιμη ανάπτυξη ενώ άλλες είναι απαραίτητες για γονιμότητα. (*Goldstrohm and Wickens 2008*)

**Πίνακας 1. Κατάταξη και ταυτοποίηση των αποαδενυλασών**

Οικογένεια	Αποαδενυλάση	Οργανισμός					
		<i>SC</i>	<i>CE</i>	<i>DM</i>	<i>XL</i>	<i>MM</i>	<i>HS</i>
<i>DEDD</i> νουκλεάσες	<b>CNOT7/POP2</b>	+	+	+	+	+	+
	<b>CNOT8</b>	-	-	-	+	+	+
	<b>CAF1Z</b>	-	+	-	+	+	+
	<b>PARN</b>	-	+	-	+	+	+
	<b>PAN2</b>	+	+	+	+	+	+
<i>EEP</i> νουκλεάσες	<b>CNOT6/CCR4</b>	+	+	+	+	+	+
	<b>CNOT6L</b>	-	-	-	-	+	+
	<b>NOC</b>	-	-	+	+	+	+
	<b>2'PDE</b>	-	+	+	+	+	+

**SC:** *S.cerevisiae*, **CE:** *C. elegans*, **DM:** *D.Melanogaster*, **XL** *X.Laevis*, **MM:** *M. Musculus*, **HS:** *H.Sapiens*, +/- παρουσία/απουσία της αποαδενυλάσης.

## **2.3 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ**

### **ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗΣ CCR4-NOT**

Το εξελικτικά συντηρημένο σύμπλοκο CCR4-NOT είναι απαραίτητο σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες τόσο του πυρήνα όσο και του κυτταροπλάσματος. Είναι ένα ετερογενές και πολυλειτουργικό σύμπλοκο αφού περιλαμβάνει πρωτεϊνικές υπομονάδες οι οποίες εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην μεταγραφή (επιδρώντας στη δομή της χρωματίνης) και αποικοδόμηση του mRNA, στην επιτήρηση ανώμαλων mRNAs και στην μεταγωγή σήματος. (*Goldstrohm and Wickens 2008*). Επίσης η ενεργότητα E3 λιγάσης της ανθρώπινης Not (hNot) υπομονάδας αποδεικνύει τη συμμετοχή του συμπλόκου σε μονοπάτια ουβικουιτινίωσης. (Albert et al 2002) Ωστόσο η CNOT4E3 λιγάση δεν είναι δομική υπομονάδα του ανθρώπινου συμπλόκου. (*Lau et al 2009*) Η CCR4 υπομονάδα στη ζύμη όπως και στα θηλαστικά λειτουργεί ως πολύ(A)-εξειδικευμένη εξωριβονουκλεάση in vitro απουσία των άλλων υπομονάδων του συμπλόκου, πράγμα που προτείνει την ύπαρξη διαφορετικών τύπων CCR4-NOT συμπλόκων που καταλύουν την αποαδενυλίωση. (*Mayer et al.2004*)

Η υπομονάδα CCR4p του συμπλόκου είναι η κύρια RNA αποαδενυλάση στις ζύμες αλλά τα κύτταρα των θηλαστικών απαιτούν, ακόμη και τη δραστηριότητα τόσο του συμπλόκου CNOT6/hCCR4 όσο και του CNOT7/hCaf1. Ο πυρήνας του ανθρώπινου CCR4-NOT συμπλόκου έχει μελετηθεί πολύ πρόσφατα και βρέθηκε ότι αποτελείται από επτά υπομονάδες, τις πρωτεΐνες CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT9, CNOT10 TAB182, η οποία επηρεάζει το μήκος των τελομερών και την μιτωτική άτρακτο και την C20Rf29 με άγνωστη λειτουργία. Στον πυρήνα αυτό από πρωτεΐνες βρίσκονται συνδεδεμένες οι CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 οι οποίες είναι μεταβλητές υπομονάδες εντός του συμπλόκου.CCR4-NOT τα οποία διαφέρουν μόνο στις τέσσερις μεταβλητές υπομονάδες Στα ανθρώπινα κύτταρα φαίνεται να υπάρχουν διάφορα σύμπλοκα Είναι ενδιαφέρον να σημειώσουμε ότι οι αποαδενυλάσες CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 είναι σχετικά λιγότερο παρούσες στα κύτταρα σε σχέση με τις υπόλοιπες CNOT πρωτεΐνες. (*Lau et al 2009*)

## **2. 4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ CNOT7**

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την υπομονάδα CNOT7 εντοπίζεται στο όγδοο χρωμόσωμα στη θέση 8p22. Λόγω αυτής της θέσης του ήταν υποψήφιο ως καταστολέας του καρκίνου του παχέως εντέρου αλλά η θεωρία διαψεύστηκε (*Flanagan et al 2003*). Οι πρωτεΐνες CNOT7 και CNOT8 καθορίζουν με ευκρίνεια το ανθρώπινο σύμπλοκο CCR4-NOT ενώ η CNOT6L και η CNOT6 σχηματίζουν σταθερότερα σύμπλοκα με την CNOT7 από ότι με την CNOT8. Οι δύο τελευταίες αποαδενυλάσες ανταγωνίζονται για τη θέση πρόσδεσης στην δομική πρωτεΐνη σκαλωσιάς CNOT1. Τα σύμπλοκα CCR4-NOT που έχουν την υπομονάδα CNOT7 έχει βρεθεί ότι «πηγαινοέρχονται» μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος. Επιπλέον πειράματα, έχουν δείξει την άμεση συμμετοχή της υπομονάδας CNOT7 στο μάτισμα του mRNA, στην μεταφορά και στην υποκυτταρική του τοποθέτηση. Το ενζυμικό υπόστρωμα για την CNOT7 και για την CNOT8 είναι διαφορετικό οπότε η αποικοδόμηση ρυθμίζεται διαφορετικά από αυτές τις δύο. (*Lau et al 2009*). Η CNOT7 αποικοδομεί αποκλειστικά πολύ(A) ουρές. (*Bianchin et al 2005*)

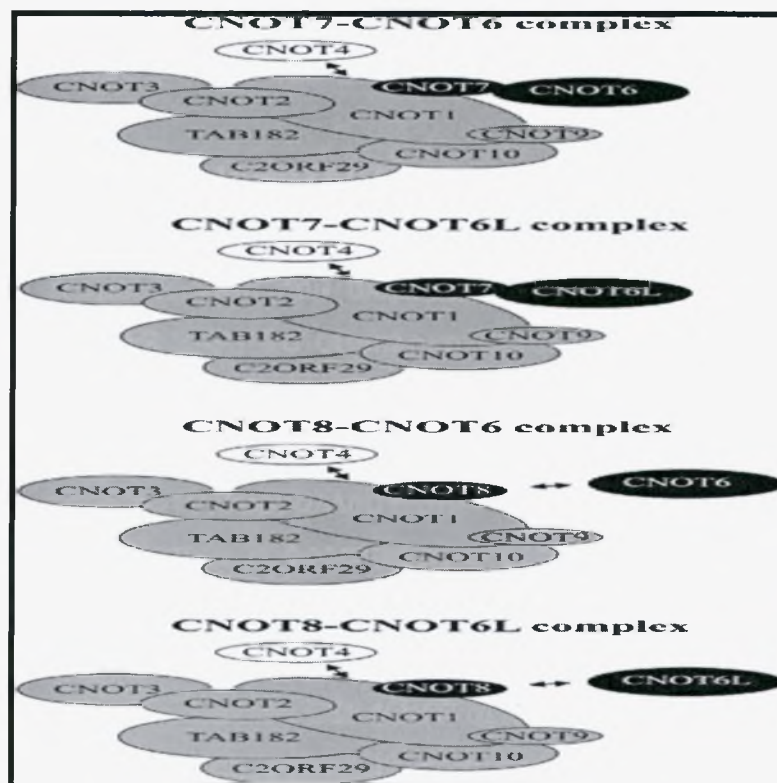
## **2. 5 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ**

Οι αποαδενυλάσες CNOT6, CNOT7 και CNOT9 κάνουν αποτελεσματική τη μετάφραση που διαμεσολαβείτε από διάφορους πυρηνικούς υποδοχείς (π.χ ER,RAR) Το σύμπλοκο CCR4-NOT, εκτός από το σπουδαίο ρόλο που έχει στην αποικοδόμηση του mRNA, διαμεσολαβεί στη μεταγραφική ενεργοποίηση αλλά και στην μεταγραφική καταστολή. Οι πρωτεΐνες CNOT7 και CNOT8 συμβάλλουν στην δραστική κυτταρική ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Η δραστικότητα αποαδενυλάσης της CNOT7 είναι υπεύθυνη για τη συμμετοχή της στην κυτταρική αύξηση. (*Aslam et al 2009*) Έχει βρεθεί ότι το σύμπλοκο Tob περιέχει συστατικά του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT CNOT1,2,3,CNOT6/CCR4 και CNOT7/Caf1. Η πρωτεΐνη Tob φαίνεται να καταστέλλει την αποαδενυλιωτική δραστικότητα του CCR4-NOT συμπλόκου. (*Suzuki et al*) Οι πρωτεΐνες Tob έχουν κατασταλτικό, μετα-μεταφραστικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη γιατί ελέγχουν τη σταθερότητα των mRNAs στόχων και εμπλέκονται στην μεταφραστική ρύθμιση. (*Miyasaka T 2008*) Η αποαδενυλιωτική

δραστικότητα του συμπλόκου CCR4-NOT ενισχύεται μέσω αλληλεπιδράσεων με το σύμπλοκο αποσίωσης RISC (miRNAs και πρωτεΐνες Argonautes) (Goldstrohm and Wickens 2008) Οι αποαδενυλάσες CNOT7 και CNOT8 έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με μέλη της BTG/Tob οικογένειας (anti-proliferate proteins) οι οποίες εμπλέκονται στην ανακύκλωση του mRNA και στην μεταγραφή. (Ezzeddine et al., 2007, Funakoshi et al., 2007, Mauxion et al 2008)

## 2.6 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ CNOT7

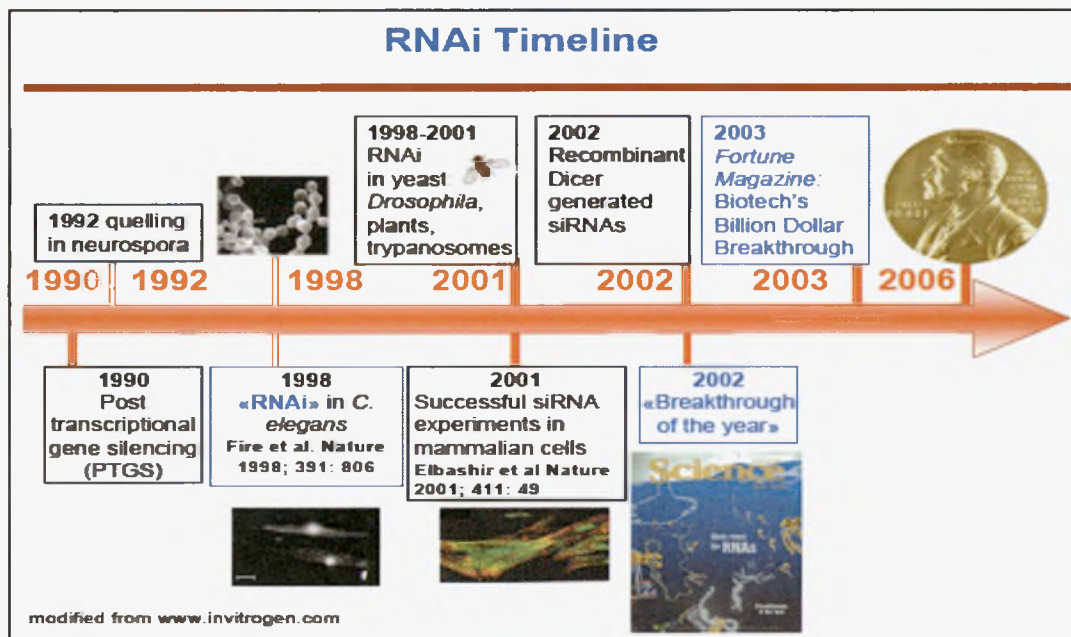
Τα CNOT7-Knockout ποντίκια είναι βιώσιμα και χωρίς εμφανή σωματικά ελαττώματα ωστόσο παρατηρείται ελαττωματική σπερματογένεση με αποτέλεσμα τα αρσενικά να είναι στείρα. Σε ίδια ποντίκια παρατηρήθηκε επίσης, αύξηση της οστικής μάζας εξαιτίας του ενισχυμένου σχηματισμού οστών. Αντιθέτως υπερέκφραση της CNOT7 στα θηλαστικά προκαλεί μείωση της κυτταρικής ανάπτυξης (Goldstrohm and Wickens 2008).



**Εικόνα 5.** Οι **σταθερές υπομονάδες** που συγκροτούν τον πυρήνα του ενζύμου φαίνονται με γκρι χρώμα. Οι **μεταβλητές υπομονάδες** φαίνονται με μαύρο. Τα τόξα δείχνουν που υπάρχει ασταθής αλληλεπίδραση. (LAU et al. 2009)

## 2.3 ΠΑΡΑΜΒΟΛΗ RNA (RNAi)

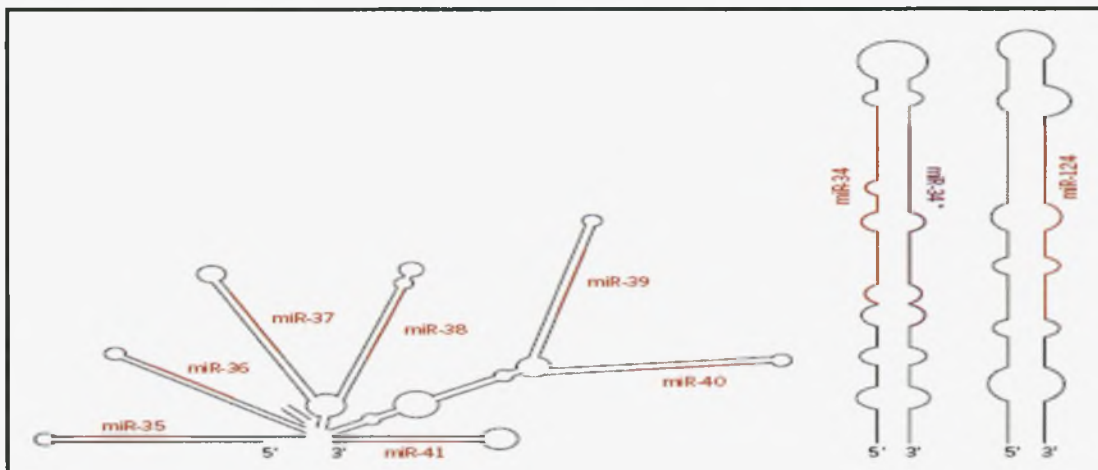
Η τεχνολογία του RNA interference είναι μία δυναμική κυτταρική διεργασία που έχει ανακαλυφθεί τα τελευταία δέκα χρόνια, περίπου με τα πειράματα των Fire και Mello στο *C. elegans* (εικ.5), και συγκεντρώνει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Μόλις το 2001 εφαρμόστηκε και σε κύτταρα θηλαστικών. (Fire .et al.1998., Elbashir ,S.M. et al.2001) Το RNA interference (RNAi) είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει φυσιολογικά σε ένα κύτταρο (μύκητες, φυτά και θηλαστικά). Οι αρχικές μελέτες έδειξαν πως έναυσμα για την έναρξη του συστήματος αποτελούν τα δίκλινα μόρια RNA, τα οποία είτε παράγονται ενδογενώς από μικρά μη-μεταφραζόμενα RNAs (miRNAs) είτε παράγονται εξωγενώς (siRNAs) και εισάγονται στο κύτταρο. Τα microRNAs (miRNAs) και οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες προσδένονται στις UTRs περιοχές του mRNA στόχου για να ελέγχουν την μετάφραση και τη σταθερότητα του. Σε πολλές περιπτώσεις η δράση τους συνδέεται και με τις αλλαγές της poly (A) ουράς. Οι καταστολείς βραχαιίνουν την poly (A) ουρά ενώ οι ενεργοποιητές την επιμηκύνουν.(Goldstrohm, Wickens, Nature 2008). Τα siRNAs σχετίζονται με την αποσιώπηση που προκύπτει από διαγονίδια, ιούς και τρανσποζόνια.



**Εικόνα 5. Χρονοδιάγραμμα ανακαλύψεων του συστήματος RNAi στους διάφορους οργανισμούς**

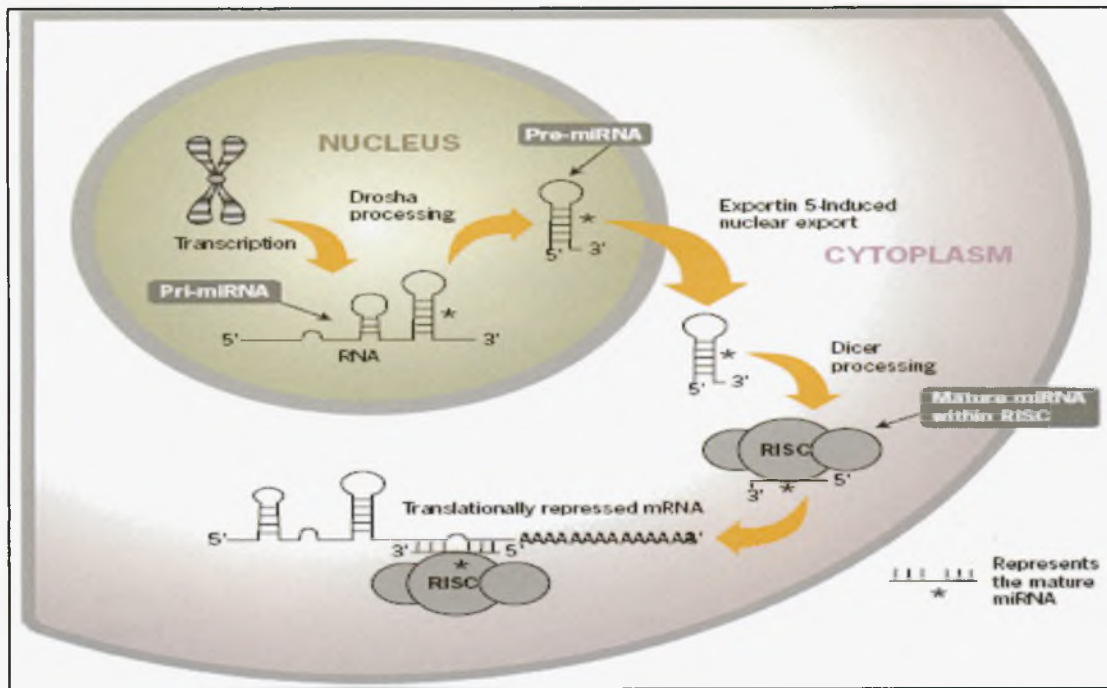
### 2.3.1 Micro RNAs (miRNAs)

Τα miRNAs είναι μικρά RNAs που καταστέλλουν την έκφραση ενδογενών γονιδίων, σημαντικών για φυσιολογικά προγράμματα ζώων και φυτών. Η έκφραση τους είναι ειδική για συγκεκριμένους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια (εικ.6) και το προφίλ τους αλλάζει σε διάφορες ανθρώπινες ασθένειες. (Grishok A. et al,2001 & Ambros et al 2003) Έχει εκτιμηθεί πως ο συνολικός αριθμός miRNA γονιδίων στον άνθρωπο κυμαίνεται στα 200-250 ενώ στο *C.elegans* περίπου 123. (Lim et al 2003) Στα θηλαστικά η αποαδενυλίωση επιταχύνεται μέσω των κυτταροπλασματικών Ρ-σωματίων, τα οποία αποτελούνται από miRNAs, mRNAs-στόχους και Argonautes πρωτεΐνες όπου προσελκύουν ένζυμα αποικοδόμησης όπως αποαδενυλάσες, 3'-5' εξωνουκλεάσες και ένζυμα αφαίρεσης καλύμματος. (Carrington, J. and Ambros, V. 2003)



#### **Εικόνα 6. Περιγραφή των miRNA**

60% των miRNAs εκφράζονται ανεξάρτητα, 15% σε σύμπλοκα και 25% είναι ιντρόνια (Ambion miRNA Research Guide)

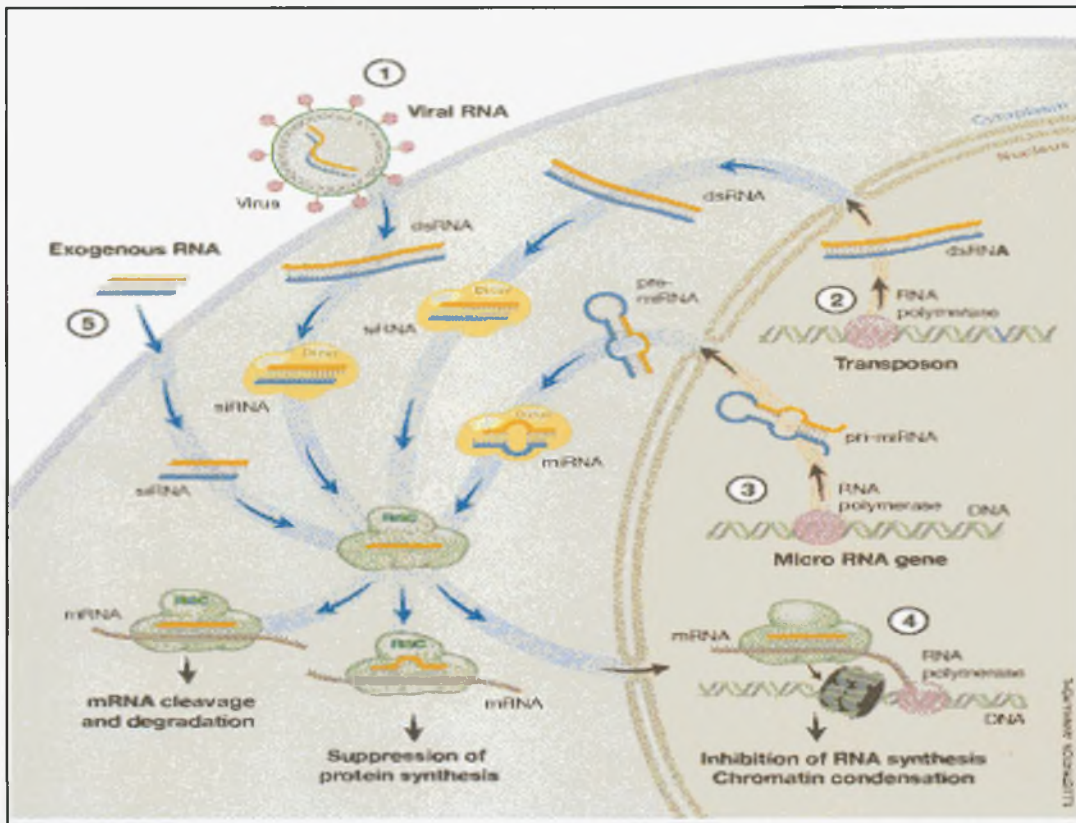


**Εικόνα 7. Το μονοπάτι των miRNAs**

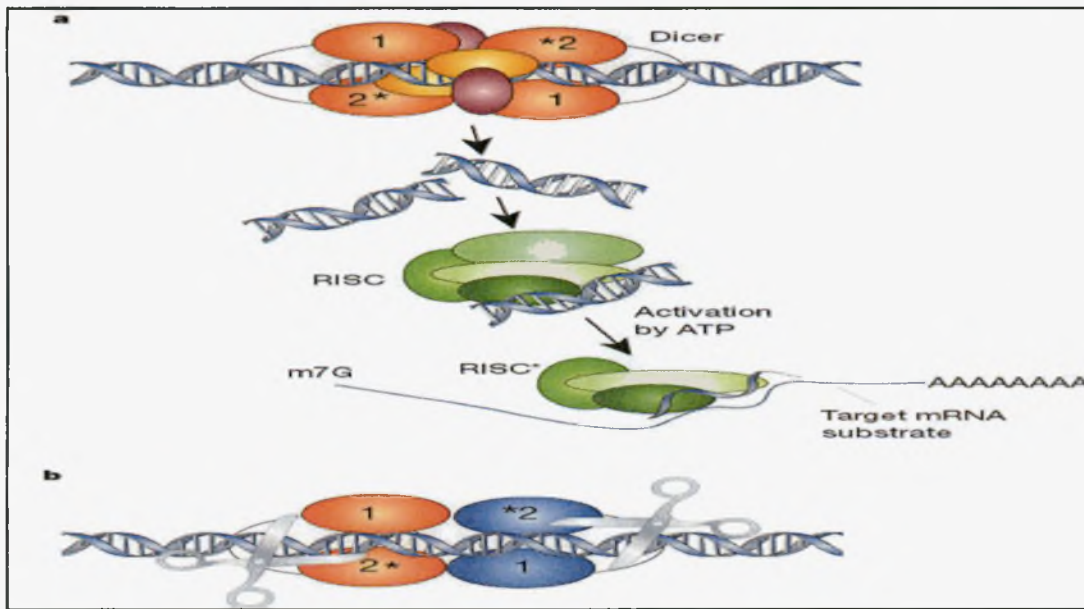
### **2.3.2 ΜΙΚΡΑ ΠΑΡΕΜΒΑΛΛΟΜΕΝΑ RNAs (siRNAs)**

Τα siRNA αποδείχθηκε πως είναι τα πιο αποτελεσματικά εργαλεία για απόλυτα ακριβή και ειδικευμένη σίγηση ενός γονιδίου. Η εφαρμογή τους επιτρέπει τη μελέτη της λειτουργίας και της σημασίας της αποσιωπημένης πρωτεΐνης στο κύτταρο. Ειδικότερα τα μικρά siRNAs είναι ικανά να ξεπεράσουν την αντίδραση ιντερφερόνης και την ενεργοποίηση άλλων αντιικών μονοπατιών όταν εισάγονται σε κύτταρα θηλαστικών. (*Nature Publishing Group 2003, Nature Cell Biology 2003*) Η επεξεργασία των siRNAs γίνεται από ένα καλά συντηρημένο ένζυμο, το DICER και δρα όπως η RNase III. (*Bernstein et al Nature 2001*) Η DICER δρα σε σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων των μελών της οικογένειας των Argonaute και HEN1(εικ.9) (*Park et al.2002, Boutet et al.2003., Carmell MA et al. 2002*). Στα κύτταρα των θηλαστικών τα siRNAs όσο και τα miRNAs αλληλεπιδρούν με ένα σύμπλοκο που περιέχει μία υπομονάδα με δραστικότητα ενδονουκλεάσης ενδονουκλεάση το RISC (RNA induced silencing complex) προκαλώντας αποικοδόμηση συγγενικών mRNAs (εικ.7) (*Hammond et al 2000*).





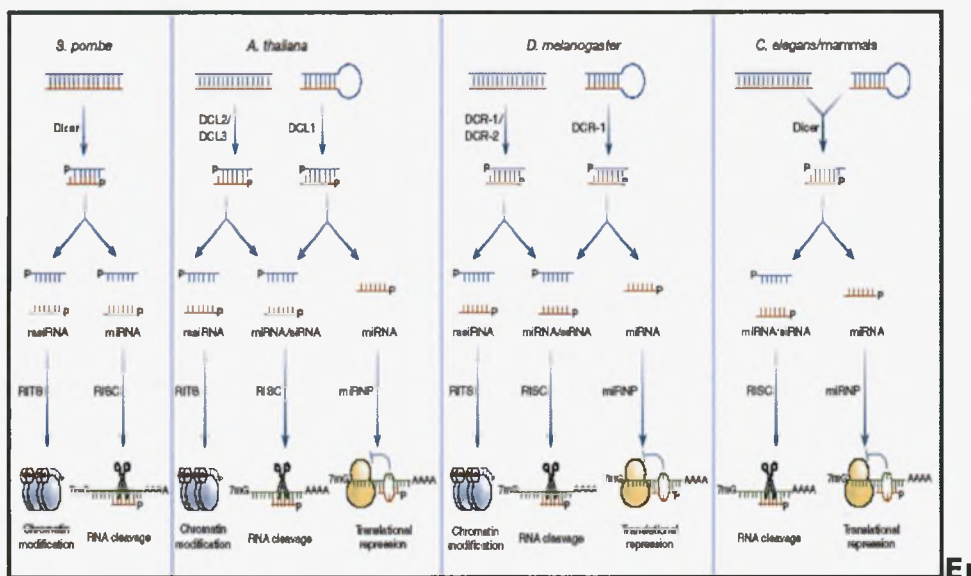
**Εικόνα 8. Μονοπάτια επεξεργασίας των εισαχθέντων στο κύτταρο RNAs**



**Εικόνα 9. Απεικόνιση της Dicer και του συμπλόκου RISC**

### 2.3.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ

Τα miRNAs και τα siRNAs παρεμποδίζουν την μετάφραση του mRNA με κοινούς μηχανισμούς (εικ.10) (Zeng et al 2003 Proc. Natl Acad. Sci., Doench et al 2003 Genes Dev). Τα siRNAs μειώσουν την γονιδιακή έκφραση μέσω της πρόσδεσης τους στην αλληλουχία του mRNA στόχου και το κόβουν (cleavage). Τα ενδογενή miRNAs μπορεί να ακολουθήσουν και άλλη πορεία χωρίς να κόβουν το στόχο τους αλλά καταστέλλοντας τη μετάφραση, γιατί προσδένονται στην 3'UTR περιοχής του mRNA και έχει βρεθεί πρόσφατα ότι ενισχύουν και την αποικοδόμηση του mRNA. Υπάρχει και ένας τρίτος μηχανισμός λιγότερο μελετημένος ο οποίος περιλαμβάνει την αποσιώπηση της ετεροχρωματινής από τα siRNAs (Baggas et al 2005 Cell, Rana 2007 Nature, Lippman and Martienssen Nature 2004). Η αποσιώπηση με αυτή την μεθοδολογία συνήθως επιτυγχάνεται παροδικά με διαμόλυνση κυττάρων με μικρά interfering RNA ολιγονουκλεοτίδια (siRNAs) τα οποία συντίθενται χημικά και αποτελούνται από 19-22 νουκλεοτίδια, ενώ για σταθερή αποσιώπηση χρησιμοποιούνται τα short hairpin RNA (shRNA) τα οποία εκφράζονται από κάποιο DNA φορέα (pSUPER vector for mammalian cells Brummelkamp et al. Science 2002 ) ή ιό. (Taxman et al. BMC Biotechnology 2006).



**Εικόνα 10. Διαφορετικά μονοπάτια μεταφραστικής καταστολής σε διαφορετικούς** (Meister and Tuschl 2004)

### 3. ΣΚΟΠΟΣ

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν μια μεγάλη ποικιλία αποαδενυλασών, τα οποία αφαιρούν πολύ(A) ουρές και σηματοδοτούν την έναρξη της αποικοδόμησης του mRNA. Η χρησιμότητα της ύπαρξης τόσο πολλών ενζύμων αποαδενυλίωσης στο κύτταρο δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Εικάζεται πως αυτή η ποικιλία υπάρχει για λόγους εξειδίκευσης. Δηλαδή, όπως αναφέρθηκε είναι πιθανό συγκεκριμένες αποαδενυλάσες να στοχεύουν συγκεκριμένα μόρια mRNA καθώς και ένα συγκεκριμένο mRNA μπορεί να αποτελεί από τη μεριά του υπόστρωμα για μια πληθώρα διαφορετικών αποαδενυλασών που δρουν πάνω του με διακριτό αλλά επικαλυπτόμενο τρόπο.

Σκοπός της εργασίας είναι να συμβάλλει στην αποκάλυψη και τη μελέτη πιθανών mRNA-στόχων της ανθρώπινης CNOT7. Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας κρίθηκε απαραίτητη η αποσιώπηση *in vivo*, της αποαδενυλάσης CNOT7 σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα Hep2, μέσω του ενδοκυττάριου μηχανισμού RNAi και η μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης αυτής στα επίπεδα έκφρασης ενός συνόλου επιλεγμένων παραγόντων. Στους παράγοντες αυτούς περιλαμβάνονται άλλες δύο αποαδενυλάσες (η αποαδενυλάση PARN και η Nocturnin), πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το mRNA ή εμπλέκονται στο μηχανισμό του RNAi, παράγοντες σημαντικοί για το μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων κτλ. Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν μικρά δίκλιωνα shRNAs (short hairpin RNAs), για τη διαμόλυνση της καρκινικής κυτταρικής σειράς Hep2. Τα αποτελέσματα της αποσιώπησης ελέγχθηκαν σε επίπεδο πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωση και σε επίπεδο mRNA με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου ενός βήματος (quantitative, one-step Real Time PCR).

## 4.1 ΥΛΙΚΑ

### 4.1.1 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

#### 1. RUNNING BUFFER 10X (500ml)

72gr γλυκίνη 1,92M M.B= 75,04

15gr TRIS 0,25M M.B=121,1

5gr SDS 0,035M M.B=288,4

#### 2. PONCEAU RED

Δύο τρόποι παρασκευής: 1) 0,1% ponceau w/v σε 5% οξικό οξύ 2)  
2% ponceau w/v σε 30% TCA και 30% sulfosalicylic acid

#### 3. 30% Acrylamide-Bis (100ml)

30gr acrylamide

1gr bis

100ml dH<sub>2</sub>O

#### 4. LYSIS BUFFER

600Mm KCl

20mM Tris-HCl pH=7,8

20% γλυκερόλη

4% αναστολείς πρωτεασών

#### 5. TRANSFER BUFFER

Tris 48mM

Γλυκίνη 39mM

SDS 1,3mM

Μεθανόλη 20%

#### 6. PBS 1x

137mM NaCl,

2.7mM KCl,

4.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

## **7. ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟ ΔΙΑΥΜΑ**

10% DMSO  
20% FBS  
MEM

## **8. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

MEM (5 ή 10% FBS, 1% Antibiotic-antimycotic)

## **9. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΙΛΑΜΙΔΙΟΥ**

- 30% bis/acrylamide (29:1 / acrylamide:bis-acrylamide) σε ddH<sub>2</sub>O
- 10% SDS
- Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl pH 8.8 1M
- Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl pH 6.8 1M
- Ρυθμιστικό Διάλυμα 10x pH 8.3: Tris-base 1,5%, Γλυκίνη 7,2%, SDS 0,5%
- Loading Buffer (1M Tris pH 6.8, 10% glycerol, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% bromophenol blue)

## **10. ΓΙΑ ΒΑΦΗ ΤΟΥ GEL**

### **1. Coomasie Brilliant Blue 0,01%**

- 40% μεθανόλη
- 10% οξικό οξύ)

### **2. Destaining Buffer**

- 30% μεθανόλη
- 10% οξικό οξύ

## **11. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ TRANSFER GEL ΠΟΛΥΑΚΡΙΛΑΜΙΔΙΟΥ ΣΕ PVDF ΜΕΜΒΡΑΝΗ**

Transfer Buffer

- Tris 48mM,
- Glycine 39mM, SDS 1.3mM, Methanol 20%)

## **12. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ DETECTION**

- Blotto Buffer (5% Skim Milk, 0,1 % Tween 20 σε PBS)
- PBS-T (0,1% Tween 20 σε PBS)
- ECL : Solution A και B Amersham



Ακετόνη	Merck
Αμμωνία	Merck
Γλυκερόλη	Panreac
Γλυκίνη	AppliChem
Ισοπροπανόλη	Scharlau
Μεθανόλη	Merck

#### 4.1.3 Καρκινική Κυτταρική Σειρά

Hep2

#### 4.1.4 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Antibiotic-antimycotic 100x	Biosera
FBS	Biosera
MEM	Biosera
Puromycin 2HCl	Biosera
Electroforesis	Serva

#### 4.1.5 ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ, ENZYMA ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Anti-CNOT7 (CCR4-NOT)	Aviva Systems Biology
Anti-NOCTURNIN (CCR4L)	Proteintech Group Inc Chicago
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Chemicon
Protease Inhibitors	Roche
shRNA bacterial glycerol stock	Sigma

## 4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.2.1 TCA/DOC ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

Αυτή η διαδικασία ακολουθείται προκειμένου να καθαριστεί ένα δείγμα από τα συστατικά. Αραιώνουμε το δείγμα μέχρι τα 100λ. Προσθέτουμε 10λ DOC 0,15% και αφήνουμε το μίγμα στον πάγο για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προσθέτουμε 10λ TCA 100% ή 72% και αφήνουμε πάλι στον πάγο για δέκα λεπτά και μετά στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για μισή ώρα. Φυγοκεντρούμε στις 12000rpm/15' και αφαιρούμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε 200λ TCA 2,5% για μία πλύση και το αφαιρούμε αμέσως χωρίς να ακουμπήσουμε το ίζημα. Αν το ίζημα διαλυθεί κάνουμε ξανά φυγοκέντρηση 12000rpm/15' και αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο. Προσθέτουμε παγωμένη ακετόνη δύο φορές για έκλυση. Μετά την προσθήκη ακετόνης φυγοκεντρούμε στις 12000rpm/15' . Αφήνουμε την περίσσεια ακετόνης να εξατμιστεί και προσθέτουμε το loading buffer 4X 20 μl. Τέλος βράζουμε το δείγμα με το loading buffer για πέντε λεπτά στους  $95^{\circ}\text{C}$ .

### 4.2.2 ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΟΝΟΣΤΙΒΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕ ΘΡΥΨΙΝΗ

Η ανακαλλιέργεια είναι απαραίτητη όταν η φλάσκα έχει τόσα κύτταρα που καλύπτουν όλο το ταπήτιο οπότε δεν υπάρχει πλέον χώρος να αναπτυχθούν περαιτέρω. Αρχικά, απομακρύνουμε το υλικό της καλλιέργειας και πλένουμε με διάλυμα PBS 1X. Προσθέτουμε διάλυμα θρυψίνης-EDTA 0.05% (2ml για φιάλη 75cm<sup>2</sup> και 1ml για φιάλη 25 cm<sup>2</sup>). Ακολουθεί καλή ανακίνηση της φιάλης έτσι ώστε το διάλυμα της θρυψίνης να καλύψει όλο το ταπήτιο. Τα κύτταρα στο μικροσκόπιο τώρα φαίνονται σαν μικρές σφαίρες, λόγω της αποκόλλησης. Μεταφέρουμε τα κύτταρα στον κλίβανο  $37^{\circ}\text{C}$  για περίπου 1-2'. Για να αποκολληθούν τα κύτταρα χτυπήστε ελαφρά τη φιάλη στο πλάι (flick). Προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα υλικού (10ml για φιάλη 75cm<sup>2</sup> και 5ml για φιάλη 25 cm<sup>2</sup>) για την επαναιώρηση των κυττάρων και αναδεύουμε τη φιάλη για ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων.



#### **4.2.3 ΦΥΛΑΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Ακολουθείται η διαδικασία θρυψινοποίησης κυττάρων (3.2.2). Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 0,5 ml κρυοπροστατευτικού υλικού για T25 flask (MEM + 20% FBS+10% DMSO). Για ένα φιαλίδιο (cryovial) απαιτούνται 2 T25 flasks ή 1 T75 flask. Τοποθετείστε μέσα σε cryobox για αργό πάγωμα (1°C/1 min) στους -80°C. Αποθήκευση στους -80°C ή σε υγρό άζωτο.

#### **4.2.4 ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Τα αποθηκευμένα φιαλίδια (cryovials) στους -80°C, εμβαπτίζονται αμέσως σε υδατόλουτρο 37°C με ήπια ανάδευση στο οποίο προσθέτουμε λίγο οινόπνευμα ή χλωρίνη. Αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα γίνεται καθαρισμός του φιαλιδίου με 70% αιθανόλη εξωτερικά. Ακολουθεί μεταφορά του αιωρήματος των κυττάρων σε flask και γίνεται προσθήκη υλικού MEM με 10% ορό (FBS) . Τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C για 4-8 ώρες μέχρι να προσκολληθούν (adherent). Προτιμάται η απομάκρυνση του υλικού και η προσθήκη φρέσκου υλικού με 10% ορό.

#### **4.2.5 ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ**

Εκροφήστε το υλικό από τα κύτταρα και ξεπλύνετε με 1ml κρύο και αποστειρωμένο PBS κάθε πηγαδάκι. Απομακρύνετε και ακολουθήστε τη διαδικασία θρυψινοποίησης κυττάρων ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα. Ομογενοποιήστε με πιπετάρισμα, ξύστε τα υπόλοιπα κύτταρα και μεταφέρετε σε erpendorf. Τα παραπάνω βήματα πρέπει να γίνουν σε απαγωγό καθέτου νηματικής ροής. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 1λεπτό. Απομακρύνετε προσεχτικά το υπερκείμενο και επαναδιαλύστε το ίζημα σε 25μl 4x lysis buffer, παρουσία αναστολέων πρωτεασών. Παγώστε τα δείγματα σε υγρό άζωτο, μεταφέρετε στους 60°C για 3 λεπτά και αναδεύστε (vortex) .Επαναλάβετε τον παραπάνω κύκλο 3 φορές. Φυγοκεντρήστε σε μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό και κρατήστε το υπερκείμενο.

#### **4.2.6 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ WESTERN BLOT**

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε 7,5% SDS-τζελ πολυακριλαμιδίου στα 130V για το separating gel και στα 170V για το running gel. Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται σε PVDF μεμβράνη με τη συσκευή Semidry Transfer System στα 270mA για 40 λεπτά. Βαφή της μεμβράνης με Ponceau red επιβεβαιώνει τη μεταφορά.

Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με Blocking Buffer για 1 ώρα, υπό συνεχή ανάδευση σε rollers σε θερμοκρασία δωματίου. Το πρώτο αντίσωμα προστίθεται σε αραιώση τέτοια ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι ίση με 0,25μg/ml και επωάζεται όλο το βράδυ στους 4°C υπό ανάδευση. Συνεχίζεις με 2 πλυσίματα με Wash Buffer για 10 λεπτά το κάθε ένα ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα για μία ώρα υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου. Η αραιώση του δεύτερου αντισώματος goat anti-rabbit IgG-HRP αντιστοιχεί σε 1:10000. Ακολουθούν 5 πλυσίματα με PBS-T για 10-15 λεπτά το καθένα. Η εμφάνιση ECL ή ECL Plus γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Amersham.

#### **4.2.7 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ shRNA (short hairpin RNA)**

Βάσει του πρωτοκόλλου της Ambion(6) σχεδιάσαμε πέντε ειδικά και εξειδικευμένα shRNA για την αποσιώπηση της CNOT7 τα οποία περιλαμβάνουν εκτός από τις αλληλουχίες των siRNAs μία δευτεροταγή δομή φουρκέτας. Ο σχεδιασμός των shRNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της oligoengine « pSUPER : Manual A Vector System for Expression of Short Interfering RNA». Τα siRNA για να είναι αποτελεσματικά θα πρέπει να διαθέτουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τα οποία παρατίθενται παρακάτω:

## ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ siRNAs

- **Μέγεθος** siRNA:  $\approx 21$ nt με αρχή AA
- **Επιλογή** 2-4 αλληλουχιών **στόχων**
- **Αποφυγή** καταλοίπων G στα άκρα
- **5'AA & 3'UU**(μεγάλη αποτελεσματικότητα)
- 30%-50% **GC** (υψηλό ποσοστό GC μειώνει την αποτελεσματικότητα)
- **Όχι πολλές επαναλήψεις** T ή A γιατί αποτελούν σήμα τερματισμού μεταγραφής της RNA πολυμεράσης.
- **Επιλογή** τμημάτων mRNA σε **διαφορετικές θέσεις**
- κατά μήκος του γονιδίου

## ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΣΧΕΔΙΑΣΜΕΝΩΝ siRNAs

Αλληλουχία - στόχος	Θέση στο γονίδιο	Περιεχόμενο GC	Νοηματική αλυσίδα siRNA	Αντινοσηματική αλυσίδα siRNA
AACTTGGATGA AGAGATGAAG	354	38,1%	CUUGGAUGAAGAGAUGAA Gtt	CUUCAUCUCUCAUCCAA Gtt
AATTCAGCTAG GACTGACATT	521	38.1%	UUCAGCUAGGACUGACAU Utt	AAUGUCAGUCCUAGCUGA Att
AACAGTTAGA GCTGGAACGG A	940	47.6%	CAGUUAGAGCUGGAACGG Att	UCCGUUCCAGCUCUAACU Gtt
AAGAGGAAGC CAACAAGCAG T	1132	47.6%	GAGGAAGCCAACAAGCAG Utt	ACUGCUUGUUGGCUUCC UcTt

BgIII — SENSE — HAIRPIN — ANTISENSE — HindIII

**354**

5' GATCCCC —CTTGGATGAAGAGATGAAG —TTCAAGAGA—CTTCATCTC  
TTCATCCAAG—TTTTTA 3'  
3'GGG—GAACCTACTTCTCTACTTC—AAGTTCTCT—GAAGTAGAGAAGTAGGTTC—AAAA  
ATTCGA 5'

**521**

5' GATCCCC—TTCAGCTAGGACTGACATT—TTCAAGAGA—AATGTCAGTCCTAGCTGAA  
—TTTTTA 3'  
3'GGG —AAGTCGATCCTGACTGTAA—AAGTTCTCT— TTACAGTCAGGATCGACTT  
—AAAAATTCGA 5'

**940**

5' GATCCCC-CAGTTAGAGCTGGAACGGA- TTCAAG AGA-TCCGTTCCAGCTCTAACTG-  
TTT TTA 3'  
3' GGG-GTCAATCTCGACCTTGCCT- TTCAAGAGA-AGGCAAGGTCGAGATTGAC-  
AAAAATTCGA 5'

**1132**

5' GATCCCC-GAGGAAGCCAACAAGCAGT — TTCAAGAGA - ACTGCTTGTTGGCTTCCTC-  
TTTTTA 3'  
3'GGG-CTCCTTCGGTTGTTTCGTCA —TTCAAGAGA- TGACGAACAACCGAAGGAG-  
AAAAATTCGA 5'

#### 4.2.8 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Τα shRNA βρίσκονται σε stock βακτηρίων και αποθηκεύονται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Για να χρησιμοποιήσουμε τα shRNA για την διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων θα πρέπει να τα απομονώσουμε. Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες από το kit Μετά το τέλος της διαδικασίας απομόνωσης μετράμε την συγκέντρωση των πέντε διαφορετικών shRNA.

**ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ shRNAs**

ΟΝΟΜΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ng/μl)
shRNA 17868	162,8
shRNA 17869	138,0
shRNA 17870	185,1
shRNA 17871	111,5
shRNA 17872	71,4

#### 4.2.9 ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ Hep2

Η επιτυχία της εισαγωγής των shRNAs φέρει μέγιστης προσοχής για την πραγματοποίηση της αναμενόμενης αποσιώπησης. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, ο αριθμός των κυττάρων καθώς και ο τρόπος χειρισμού είναι καθοριστικοί παράγοντες.

- Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει θρυψινοποίηση μιας T75 flask. Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται μετά από μέτρηση σε πλάκα Newbuer, και σε αυτή τη flask φτάνουν τα  $42,5 \cdot 10^5$ .
- Σε κάθε πηγαδάκι του 6-well plate προσθέτουμε 600λ κυττάρων ώστε ο τελικός αριθμός τους να είναι  $2,5 \cdot 10^5$ .
- Αφήνουμε τα κύτταρα να αναπτυχθούν για μία ημέρα στους  $37^{\circ}\text{C}$  ώστε κάθε well να έχει πληρότητα περίπου 90% και λιγότερη από 100%.
- Την επόμενη ημέρα ακολουθεί η διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων. Η εισαγωγή των shRNA στα κύτταρα γίνεται με τη χρήση της λιποπρωτεΐνης, λιποφεκταμίνης (lipofection).

- αφαιρούμε το υπερκείμενο από κάθε well.
- Αφού ξεπλύνουμε κάθε well με κρύο και αποστειρωμένο PBS τρεις φορές, προσθέτουμε θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά, αντιμυκωτικά και χωρίς ορό(FBS).
- Συνεχίζουμε παρασκευάζοντας το πρώτο διάλυμα (mix 1) που θα περιέχει τη λιποφεκταμίνη και το δεύτερο διάλυμα (mix 2) το οποίο θα περιέχει τα shRNA.

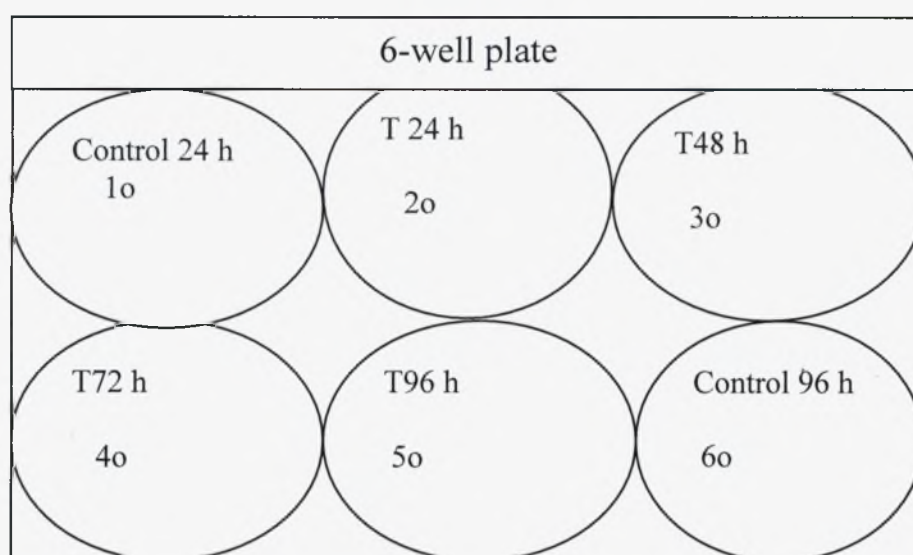
**ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ DNA ΚΑΙ  
ΛΙΠΟΦΕΚΤΑΜΙΝΗΣ. ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΩΝ ΓΙΑ  
ΤΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ.**

<b>MIX 1</b>	
DNA/MEM = 1γ DNA /50λ MEM	MIX 1
MEM	100λ
DNA	2γ
<b>MIX 2</b>	
LIPOFECTAMINE/MEM = 2λ/ 50λ	MIX 2
MEM	1050
LIPOFECTAMINE	42

- Οι ποσότητες για κάθε mix υπολογίζονται από το πρωτόκολλο της INVITROGEN "Transfection with lipofectamine 2000" (invitrogen Cat:11668-027). Κάθε mix επωάζεται για πέντε λεπτά έκαστο.

shRNA 17868	3,1λ
shRNA 17869	3,6λ
shRNA 17870	2,7λ
shRNA 17871	4,5λ
shRNA 17872	7λ

- Συνδυάζουμε τα mix 1 και 2 και τα αφήνουμε για επώαση από πέντε μέχρι είκοσι λεπτά (mix 3). Η επώαση δεν πρέπει να ξεπεράσει τα είκοσι λεπτά
- Το πρώτο και το έκτο well δεν διαμολύνεται καθώς θα το χρησιμοποιήσουμε συγκριτικά με τα αυτά που έχουν διαμολυνθεί ως control. Από το δεύτερο μέχρι το τέταρτο έχουν διαμολυνθεί. Η διαφορά τους είναι στις ώρες συλλογής των κυττάρων οι οποίες αναγράφονται στον πίνακα.



#### 4.2.10 LIPOFECTION

Η διαμόλυνση με λιποφεκταμίνης είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για να εισάγει γενετικό υλικό μέσα σε κύτταρα μέσω των λιποσωμάτων (κύστες) τα οποία εύκολα μπορούν να απορροφηθούν από τη κυτταρική μεμβράνη αφού και τα δύο αποτελούνται από φωσφορική διπλοστοιβάδα. Τα κύρια πλεονεκτήματα είναι η αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης σε όλους τους τύπους νουκλεϊκών οξέων και σε πολλά είδη κυττάρων. Υπάρχει ευκολία στη χρήση της και χαμηλή τοξικότητα, είναι κατάλληλη για όλα τα είδη διαμόλυνσης (σταθερής σειράς, co-transfection) και τέλος είναι αποτελεσματική σε μερικές in vivo μεθόδους. (Felger JH et al 1994)

#### **4.2.11 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA**

Η απομόνωση του RNA έγινε βάσει του πρωτοκόλλου «Total RNA isolation. Nucleospin® RNA II Nucleospin® RNA L Macherey-Nagel

#### **4.2.12 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ ΣΕ ΕΝΑ ΒΗΜΑ (REAL TIME PCR - ONE STEP RT-PCR)**

Η Real Time PCR είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μέθοδοι ποσοτικοποίησης γονιδίων. Διαθέτει ένα δυναμικό εύρος δεδομένων σχετικών με την ποσοτικοποίηση, τα οποία δεν απαιτούν μετατροποποιήσεις. Είναι αποτελεσματικότερη από τις RNAase protection assays και από τον dot blot υβριδισμό έχοντας μεγαλύτερη ευαισθησία καθώς μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και ένα αντίγραφο ενός μετάγραφου ή ακόμα να ανιχνεύσει διαφορετικής έντασης έκφραση (23%) μεταξύ των δειγμάτων. Επίσης η RT-PCR μπορεί να διακρίνει μεταξύ αγγελιοφόρων RNAs (mRNAs) με σχεδόν ίδιες αλληλουχίες, απαιτεί πολύ λιγότερο RNA ως μήτρα σε σχέση με άλλες μεθόδους γονιδιακής έκφρασης.

Η ακριβής κανονικοποίηση είναι απαραίτητη προϋπόθεση για μία σωστή μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης. Για την real-time reverse transcription PCR η πιο συνήθης στρατηγική κανονικοποίησης περιλαμβάνει την προτυποποίηση από ένα ιδιοστατικό γονίδιο σταθερής έκφρασης. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι κανένα γονίδιο δεν εκφράζεται ιδιοστατικά σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και κάτω από όλες τις πειραματικές συνθήκες προτείνοντας έτσι ότι η σταθερότητα της έκφρασης του γονιδίου-control πρέπει να επαληθεύεται πριν από κάθε πείραμα.(Andersen et al 2004) Το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι οι μεγάλες απαιτήσεις σε εξοπλισμό και τα ακριβά αντιδραστήρια.

Μπορεί να διεξαχθεί σε ένα βήμα (one step reaction), όπου η όλη διαδικασία από τη σύνθεση του cDNA μέχρι την αντίδραση πολυμεράσης συμβαίνει στο ίδιο tube ή σε δύο βήματα (two-steps) όπου η διαδικασία συμβαίνει σε διαφορετικά tubes. Η Real time PCR one step θεωρείται ότι μειώνει την πειραματική απόκλιση γιατί οι ενζυμικές αντιδράσεις



συμβαίνουν στο ίδιο tube. Ωστόσο αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί μία αρχική RNA μήτρα η οποία είναι επιρρεπής σε αποικοδόμηση, οπότε η one step αντίδραση μπορεί να είναι αναποτελεσματική σε πειράματα όπου χρησιμοποιείται το ίδιο δείγμα RNA για κάποιο χρονικό διάστημα. (Wong and F.Medrano 2005)

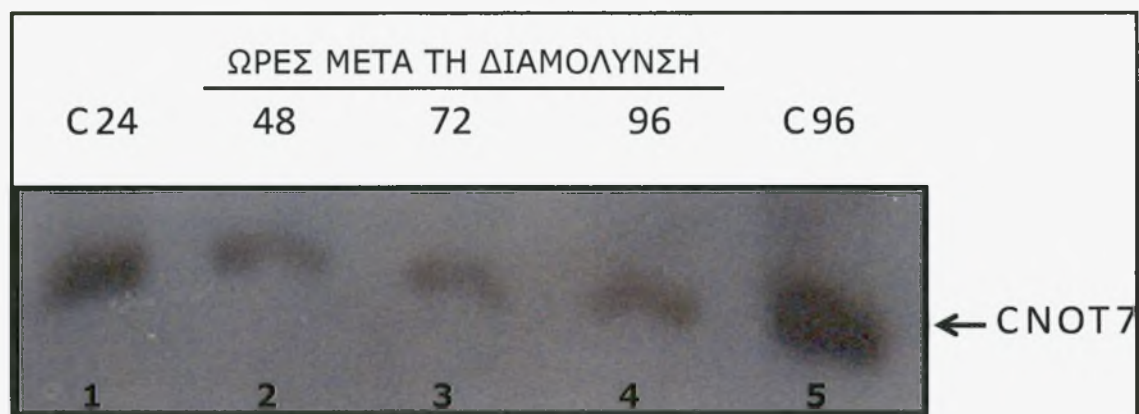
Στην παρούσα πειραματική διαδικασία εφαρμόσαμε την one step RT-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Invitrogen "SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit". Η αντίδραση προετοιμάστηκε χρησιμοποιώντας τους primers του πίνακα 4.

Στα αποτελέσματα που θα πάρουμε το διάγραμμα διάστασης (dissociation plot) δείχνει την ποσότητα του στόχου που υπάρχει στο κάθε δείγμα χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR Green σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Στα διαγράμματα μπορούμε να συγκρίνουμε δύο τύπους πληθυσμών σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Ο πληθυσμός με  $T_m < 80^\circ\text{C}$  ανταποκρίνονται στα ειδικά DNA προϊόντα της PCR. Τα DNA προϊόντα της PCR που παρατηρούνται σε θερμοκρασία  $>75^\circ\text{C}$  είναι μη ειδικά. Οι πληθυσμοί με μπλε χρώμα δείχνουν τα προϊόντα από διαμολυσμένα κύτταρα ενώ με κόκκινο τα προϊόντα από φυσιολογικά κύτταρα. (εικ. Γ2-Γ14)

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

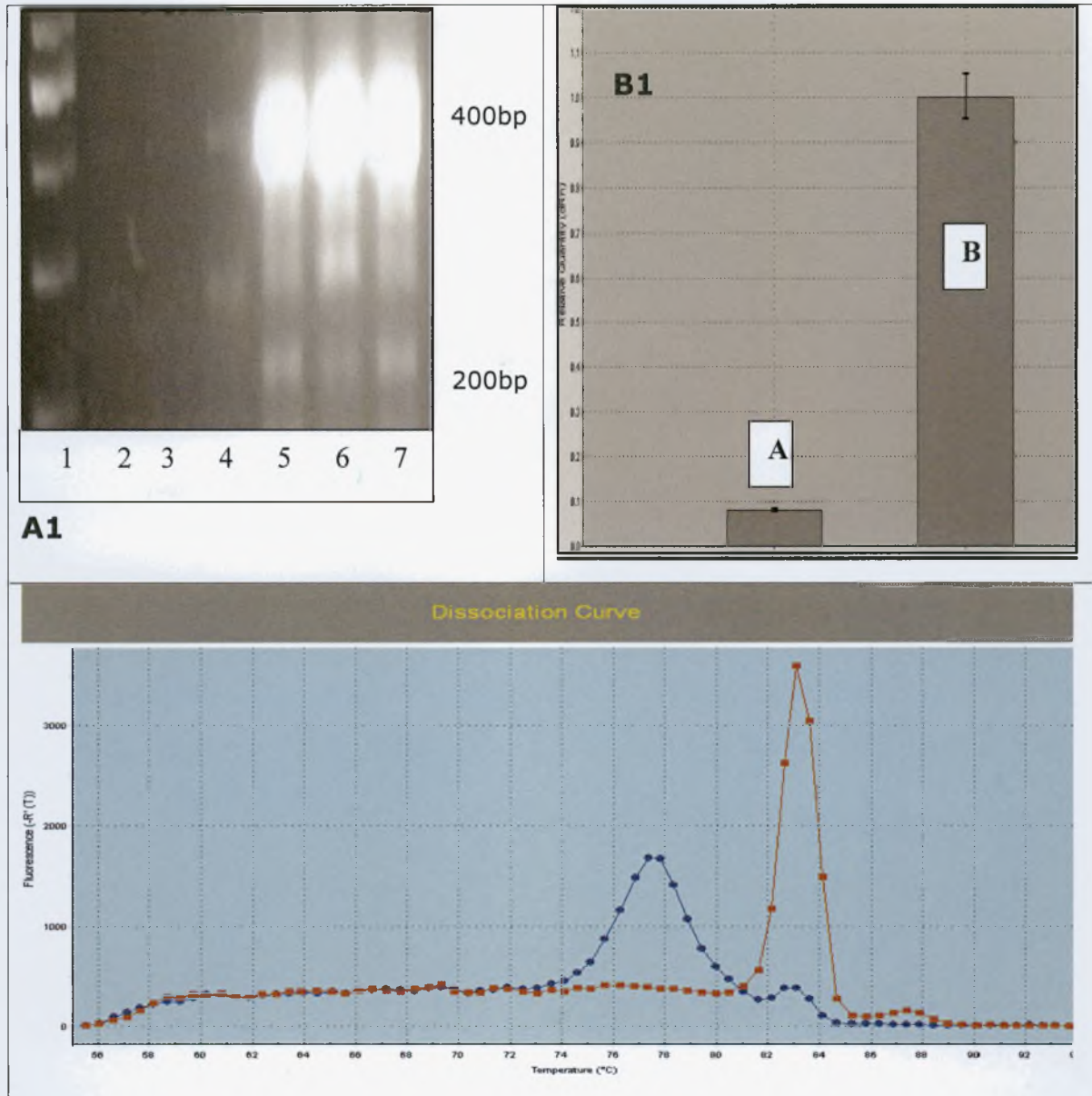
### 5.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ ΤΗΣ CNOT7 ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

Για τον έλεγχο της αποσιώπησης της αποαδενυλάσης CNOT7 στην καρκινική κυτταρική σειρά Hep2 ηλεκτροφορήσαμε σε gel πολυακρυλαμίδης δείγματα από τα διαμολυσμένα, με shRNAs, κύτταρα καθώς και δείγματα κυττάρων που δεν είχαν διαμολυνθεί. Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε μεταφορά των πρωτεϊνών του gel πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη PVDF. Το αποτέλεσμα της αποσιώπησης της CNOT7 φαίνεται στην παρακάτω εικόνα η οποία δείχνει το εικόνα που πήραμε από την ανοσοαποτύπωση. (Western blot)



Εικόνα 5.1. Ανοσοαποτύπωση εκχυλισμάτων από διαμολυσμένα κύτταρα Hep2 με shRNA έναντι της CNOT7 σε διαφορετικούς χρόνους (48, 72 και 96 ώρες) και τους αντίστοιχους μάρτυρες (controls) σε 24 και 96 ώρες. C24, C96 =control-φυσιολογικά μη-διαμολυσμένα κύτταρα τα οποία συλλέχθηκαν σε 24 και 96 h, αντίστοιχα.

## 5.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ ΤΗΣ CNOT7 ΜΕ REAL-TIME PCR



**Εικ. Α2:** Εικόνα από ηλεκτροφόρηση, σε gel αγαρόζης, των προϊόντων της RT-PCR. Η CNOT7 αναμένεται στις 400bp

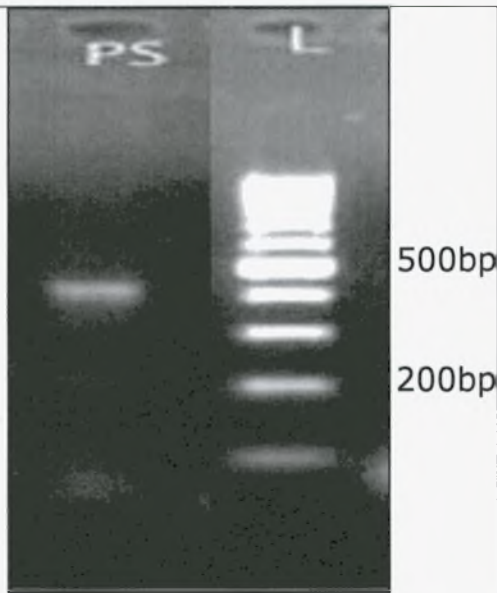
**Εικ. Β1:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την RT-PCR (Relative chart) Η στήλη Α αντιπροσωπεύει το mRNA της CNOT7 από τα διαμολυσμένα κύτταρα ενώ η στήλη Β από τα φυσιολογικά, τα κύτταρα χωρίς ένθεμα.

**Εικ. Γ2:** Διάγραμμα διάστασης (dissociation plot) Οι πληθυσμοί με μπλε χρώμα δείχνουν τα προϊόντα από διαμολυσμένα κύτταρα ενώ με κόκκινο τα προϊόντα από φυσιολογικά κύτταρα. Φαίνονται δύο τύπους πληθυσμών σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Ο πληθυσμός με  $T_m < 80^\circ\text{C}$  ανταποκρίνονται στα ειδικά DNA προϊόντα της PCR.

### 5.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗΣ ΜΕ ΑΔΕΙΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ

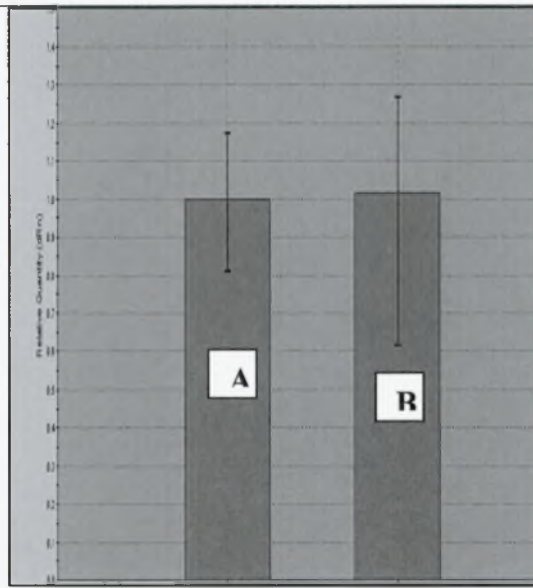
Προκειμένου να αποδείξουμε ότι η αποσιώπηση της αποαδενυλάσης οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στην ύπαρξη των εξειδικευμένων shRNA και όχι στη διαδικασία της διαμόλυνσης αυτής καθαυτής μετρήσαμε συγκρίναμε τα επίπεδα RNA των κυττάρων που έχουν λάβει κενό πλασμίδιο (empty pSUPER vector) χωρίς shRNA με κύτταρα που δεν έχουν κανένα ένθεμα. Σε κάθε ένα από τα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η διαφορά στη συγκέντρωση των mRNAs των διάφορων παραγόντων σε διαμολυσμένα με shRNAs κύτταρα και σε φυσιολογικά.

#### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ REAL TIME PCR



**Εικ.Α2**

PS : Διαμόλυνση κυττάρων Hep2 με άδειο φορέα (pSUPER) χωρίς shRNAs.  
L: μάρτυρες μοριακού βάρους σε bp



**Εικ.Β2**

A: Διαμολυσμένα κύτταρα Hep2 με άδειο πλασμίδιο (pSUPER empty)  
B: Κύτταρα Hep2 χωρίς ένθεμα

## 5.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ ΣΕ ΔΟΜΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ (ΛΑΜΙΝΗ)

ΕΙΚ.5.2



**ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1:** ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΜΗ ΔΙΑΜΟΛΥΣΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ 24 ΩΡΩΝ

**ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2:** ΔΙΑΜΟΛΥΣΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ shRNA ΓΙΑ ΤΗ CNOT7 24ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ

**ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3:** ΔΙΑΜΟΛΥΣΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ 96 ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ

**ΔΙΑΔΡΟΜΗ 4:** ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΗ ΔΙΑΜΟΛΥΣΜΕΝΑ 96 ΩΡΩΝ

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται μερικά από κυριότερα χαρακτηριστικά των παραγόντων που επιλέξαμε να μελετήσουμε στα αποσιωπημένα για τη CNOT7 κύτταρα. Στην τρίτη στήλη του πίνακα αναγράφεται το μέγεθος του προϊόντος που αναμένεται από την RT-PCR.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
CNOT7	Οι <b>CNOT7</b> και <b>PARN</b> ανήκουν στην ίδια οικογένεια αποαδενυλασών DEDD συμβάλλοντας στην αποαδενυλίωση του mRNA. Στους περισσότερους ευκαρυώτες εκτός από το αποαδενυλάσες CCR4-NOT και PAN υπάρχει και ένα τρίτο ένζυμο πολύ(A)αποικοδόμησης η πολύ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση PARN	419
PARN		200
NOCTURNIN	Αποαδενυλάση διαφορετικής κατηγορίας (EEP) από τις δύο προηγούμενες (CNOT7, PARN)	175
PABP	Το mRNA Κατά την έξοδο του στο κυτταρόπλασμα η poly (A) προσδεμένη πρωτεΐνη ( PABP) συνδέεται στην ουρά και το σταθεροποιεί διευκολύνοντας την μετάφραση. Το σύμπλοκο PABP και παραγόντων	500

	<p>έναρξης μετάφρασης (eIF4G) προσδένεται στην cap-binding protein eIF4E και ενισχύει την μετάφραση του mRNA (<i>Goldstrohm and Wickens 2008</i>)</p>	
LSM PROTEINS	<p>Lsm 2p- 8p αλληλεπιδρούν με το U6 snRNA και συμβάλουν στο μάτισμα του pre-mRNA. Ο ακριβής μηχανισμός των πρωτεϊνών στο μάτισμα παραμένει άγνωστος.</p> <p>Lsm 1-7 ενεργοποιούν την αφαίρεση της 5' καλύπτρας του mRNA. (<i>Weihai and Parker 2000</i>)</p>	209
BTG2	<p>Κύριο μέλος της οικογένειας των TOB πρωτεϊνών (anti-proliferative proteins). Εμπλέκεται στην κυτταρική ανάπτυξη, την διαφοροποίηση και την επιδιόρθωση του DNA, Έχει αντι-αποπτωτικό ρόλο στην νευρογένεση.</p> <p>Αλληλεπιδρά με τον παράγοντα CAF1 και τον POP2, που είναι τα κύρια συστατικά του Ccr4-Not συμπλόκου καταστέλλοντας την ενεργότητα αποαδενυλάσης της CAF1.</p> <p>(<i>Yang, . 2009</i>)</p>	477
AGO2	<p>Σχηματίζει το σύμπλοκο με τα miRNAs και τα siRNAs (σύμπλοκο RNA αποσιώπησης) (RISC/miRNPs).</p> <p>Η ενδογενής πρωτεΐνη Ago2 προσδένεται άμεσα στα pre-miRNAs ανεξάρτητα από την πρωτεΐνη Dicer (έχει μία dsRNA-προσδένουσα περιοχή) και τα σύμπλοκα Ago2:pre-miRNA βρίσκονται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των ανθρώπινων κυττάρων.</p> <p><i>Kiriakidou M at al. 2009</i></p>	599
H2A Z	<p>Το νουκλεόσωμα αποτελείται από 146 bp DNA το οποίο είναι τυλιγμένο γύρω από το οκταμερές των ιστονών (ένα ζευγάρι από τις ιστονές H2A, H2B, H3 και H4)</p> <p><i>Enterz Gene: H2AFZ H2A histone family, member Z</i> Οι ιστονές έχουν δομικό και λειτουργικό ρόλο, ελέγχοντας την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση της χρωματίνης.</p> <p>Οι παραλλαγές της H2A συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διαδικασίες (μεταγραφική ενεργοποίηση, επιδιόρθωση του DNA, απόπτωση, μείωση) (<i>Ausio and Abbott, 2002</i>) Το 3' άκρο του mRNA των ιστονών είναι το υπεύθυνο στοιχείο για την αποικοδόμηση του mRNA.</p>	255

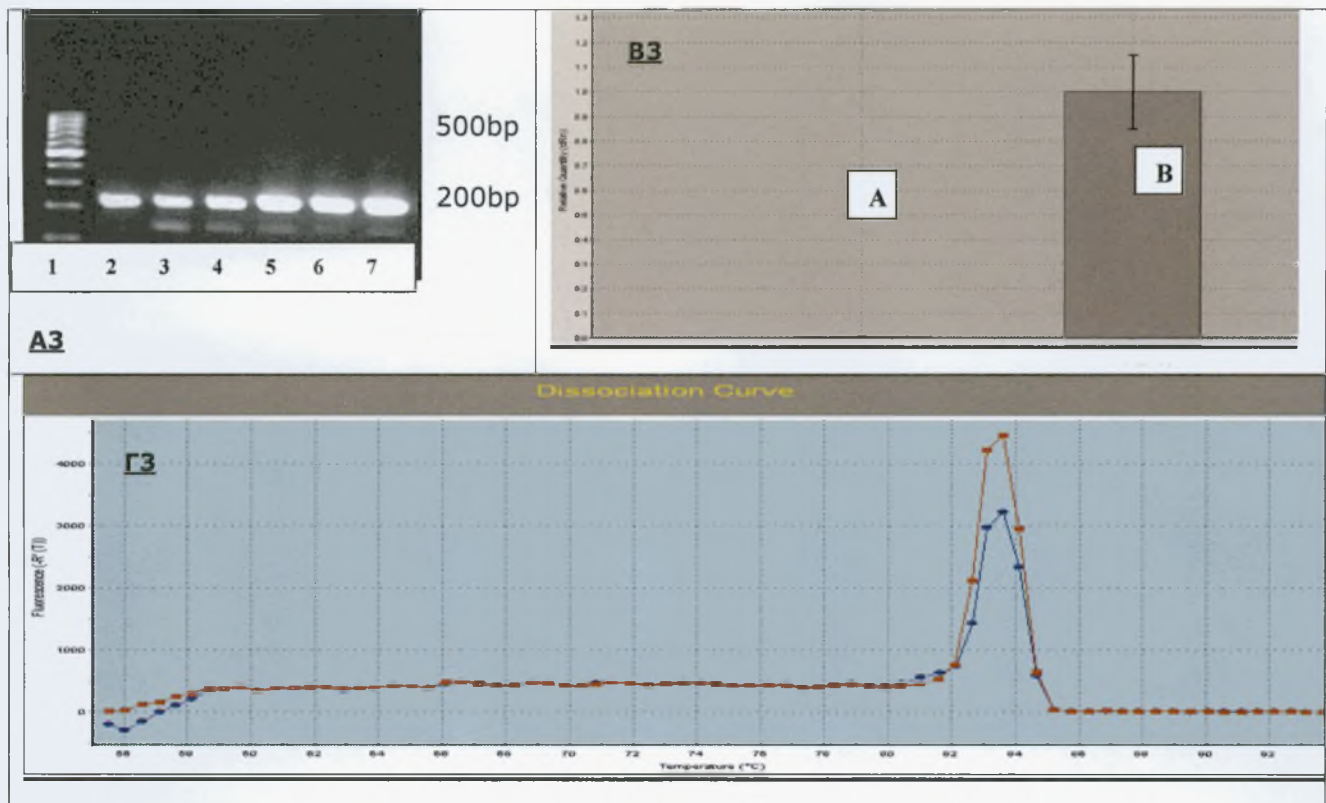
	<p>Το mRNA των ιστονών είναι το μοναδικό που δεν πολυαδενυλιώνεται, παρά μόνο το άκρο του έχει μία δομή θηλείας (loop-structure) η οποία είναι απαραίτητη για την γρήγορη αποικοδόμηση του mRNA. Αυτή η δομή θηλείας αναγνωρίζεται από μία πρωτεΐνη την SLBP. Το πρώτο βήμα της αποικοδόμησης είναι η προσκόλληση μιας πολυU ουράς στο 3' άκρο παρέχοντας έτσι μια πλατφόρμα όπου θα προσδεθούν παράγοντες αποικοδόμησης (<i>Mullen, Kaygun, Murzluff 2008 449:23-45, Kaygun and Marzluff 2005</i>)</p>	
b-GLOBIN	<p>Η β-σφαιρίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Στους ενήλικες οι α- και β- σφαιρίνες σχηματίζουν δύο πολυπεπίδια τα οποία αποτελούν την αιμοσφαιρίνη (Hb A). Το γονίδιο της β-σφαιρίνης βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11(11p15.5) και περιλαμβάνει πέντε ρυθμιζόμενα γονίδια(5'-ε-Gγ-Aγ-δ-β-3'). Η θέση αυτή του γονιδίου ρυθμίζει την μεταγραφή, την δομή της χρωματίνης και την ικανότητα αντιγραφής.(<i>Reik et al 1998</i>)</p>	200
CBP20 CBP80	<p>Σχετίζεται με την nonsense αποικοδόμηση του mRNA. Μαζί με τον παράγοντα CBP80 αποτελούν συστατικά του πυρηνικού συμπλόκου πρόσδεσης καλύμματος το οποίο προστίθεται μετα-μεταφραστικά. Ο παράγοντας CBP20 σχετίζεται με τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4G (<i>Maquat at al, 2001</i>)</p>	175
eIF4E	<p>Η μη ρύθμιση της μετάφρασης είναι ένας μηχανισμός που προκαλεί ανώμαλη κυτταρική αύξηση και επιβίωση. Ο παράγοντας eIF4E προσδένεται στο 5' άκρο του mRNA ελέγχοντας την μετάφραση. Υπερέκφραση του παράγοντα μπορεί να προκαλέσει τη μετάφραση ενός υποσυνόλου mRNAs και παρεμποδίζει την απόπτωση. Επίσης μπορεί να προκαλέσει μεταμόρφωση κυττάρων του πλακώδους επιθηλίου. Η αποσιώπηση αυτού του παράγοντα θα είναι χρήσιμη για θεραπεία του καρκίνου. (<i>Mamane et al 2007, Robert and Pelletier 2009, Oridate et al. 2005</i>)</p>	256

<p>HIF1-a (Hypoxia-inducible factor 1a)</p>	<p>Ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην αγγειογένεση, στην κυτταρική επιβίωση, στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην προσαρμοστική απόκριση των κυττάρων στη υποξία, προκαλώντας βιολογικά γεγονότα σχετιζόμενα με την επιθετικότητα του καρκίνου. Υπερέκφραση του HIF1-a παρατηρήθηκε σε υπερπλασίες (61%) και καρκινώματα (87%) και αυξάνει την αγγειογένεση. (<i>Horrée et al. 2007, Semenza GL 2003</i>)</p>	<p>327</p>
<p>SL C2A1 (glut-1)</p>	<p>Οι μεταφορείς γλυκόζης (Gluts) διευκολύνουν την πρόσληψη γλυκόζης και συνήθως υπερεκφράζονται σε διάφορους καρκίνους ειδικά ο Glut-1. Στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, τα οποία έχουν χαμηλό ρυθμό διαφοροποίησης και πολλαπλασιάζονται γρήγορα, έχει παρατηρηθεί αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του μεταφορέα Glut-1 παρέχει ένα χρήσιμο προγνωστικό δείκτη για το καρκίνο του παγκρέατος. (<i>Raffaele De Caro 2009</i>) Πειράματα επώασης καρκινικών κυττάρων από μαστό και πνεύμονα με αντισώματα anti-Glut-1 αποκαλύπτουν μείωση της κυτταρικής αύξησης (κατά 50% και 75% αντίστοιχα) και αύξηση του ρυθμού απόπτωσης. (<i>Rastogi et al 2007</i>)</p>	<p>300</p>

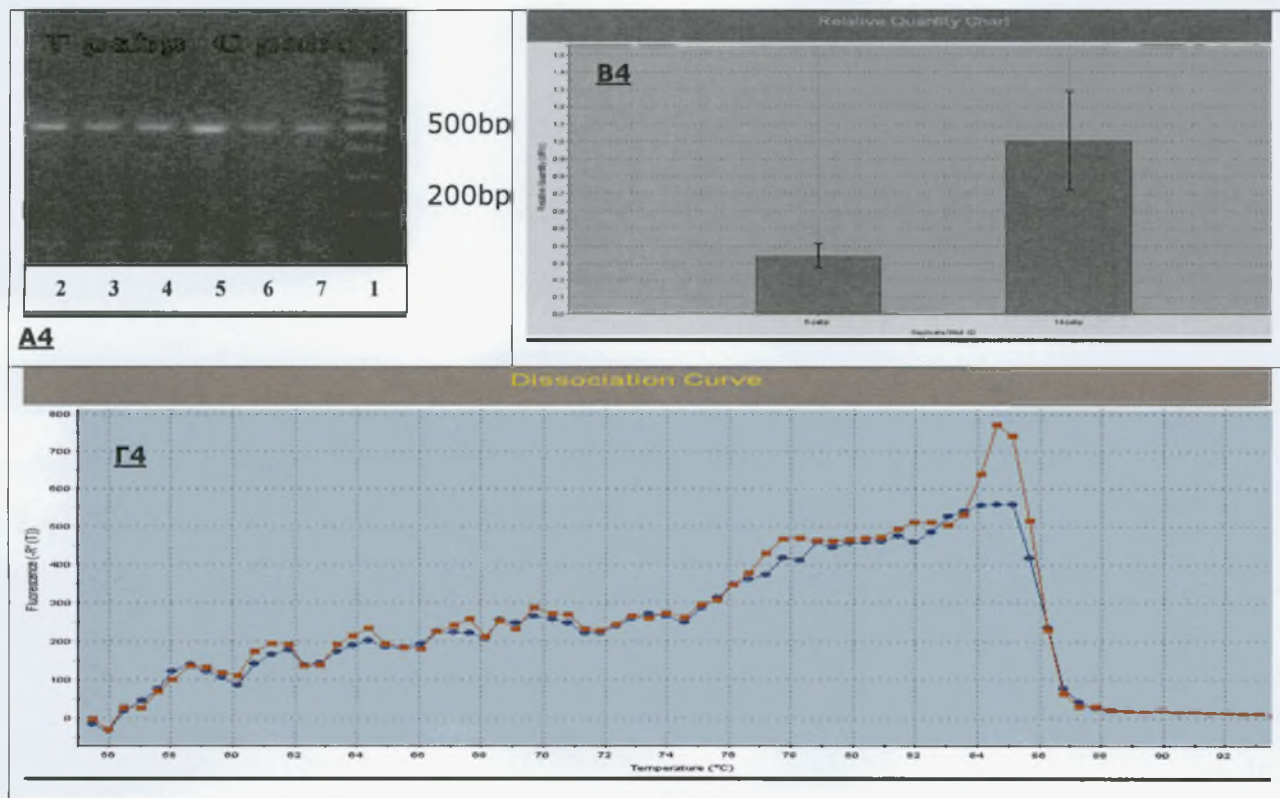


## 5.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ ΤΗΣ CNOT7 ΣΤΟΥΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

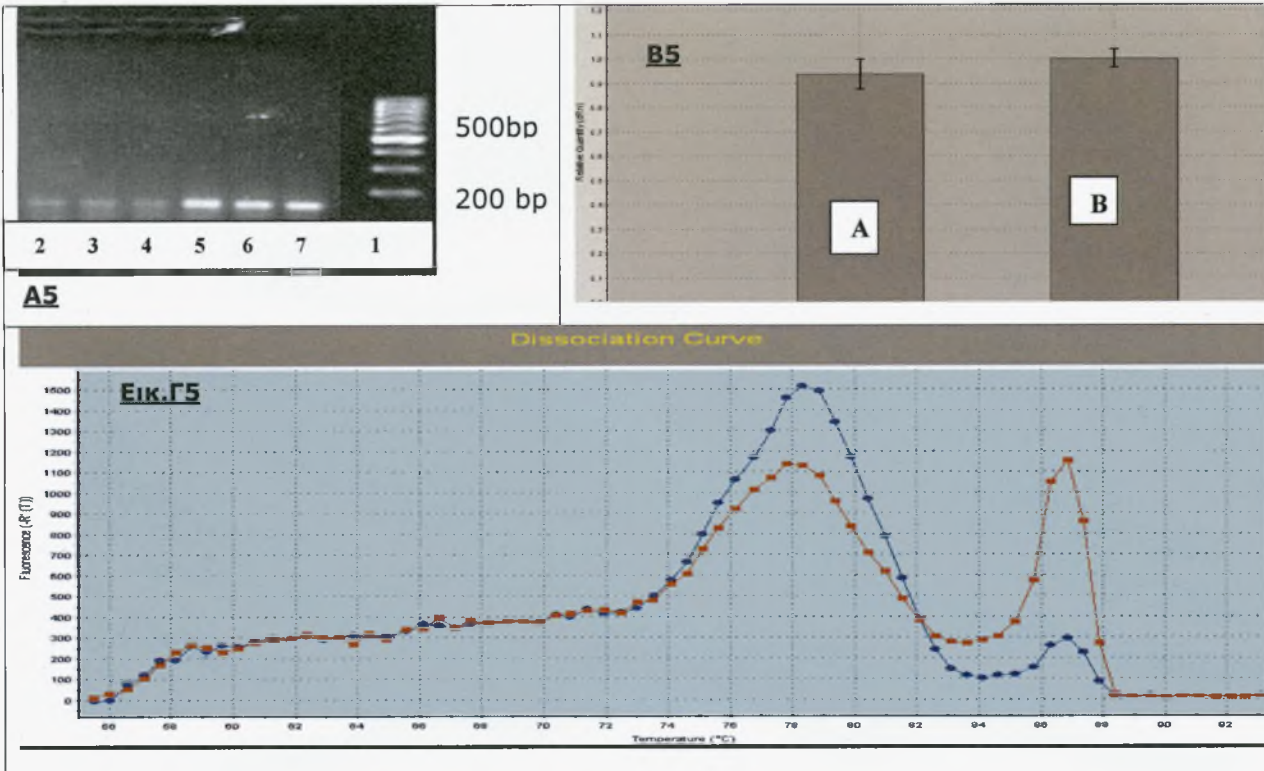
### PARN



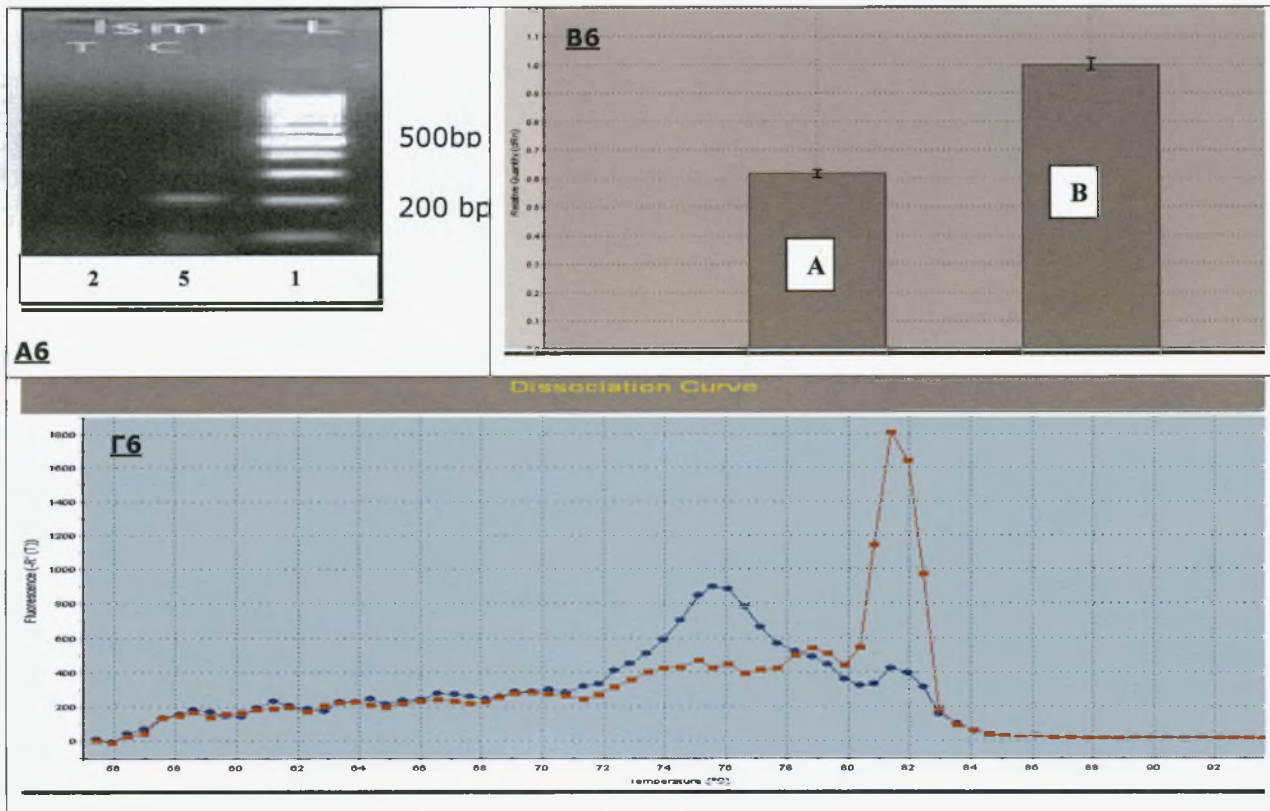
### PABP



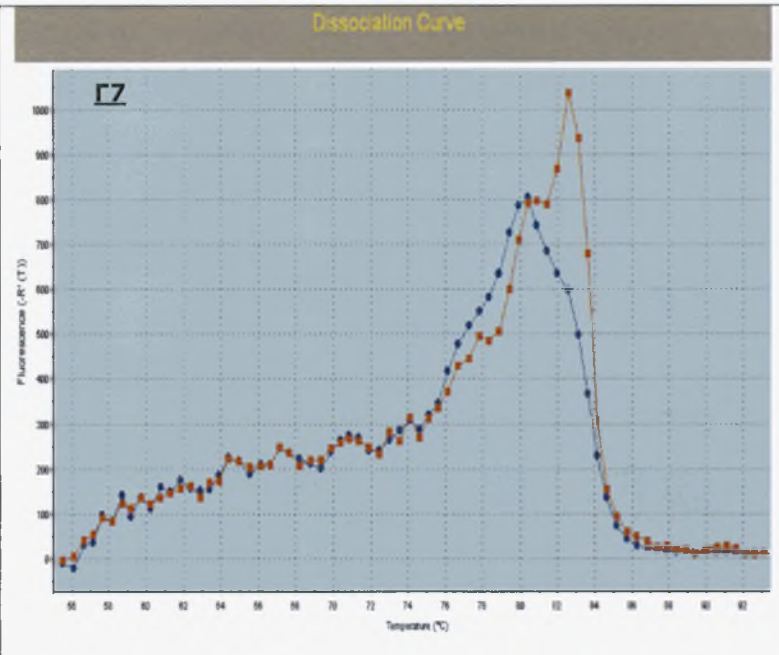
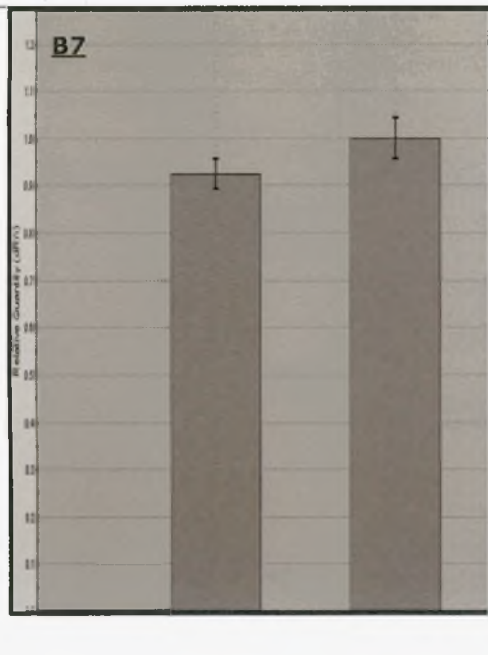
**NOC**



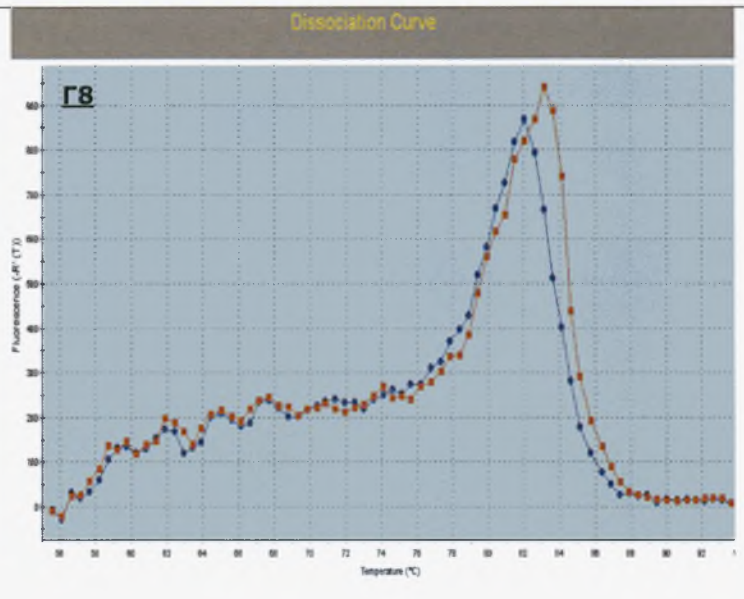
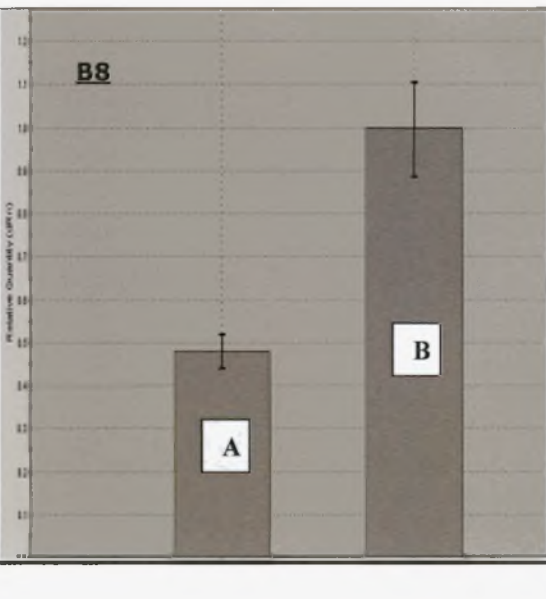
**LSM**



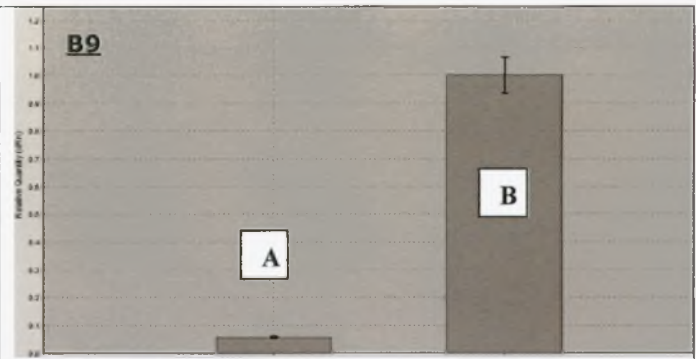
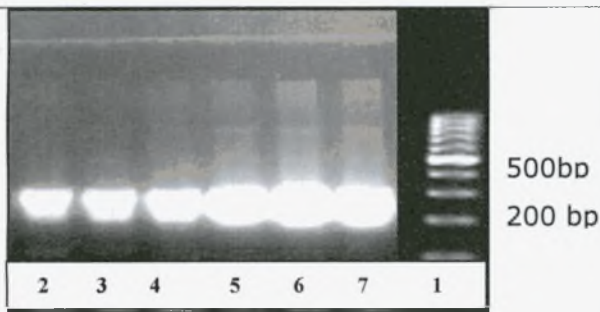
## BTG2



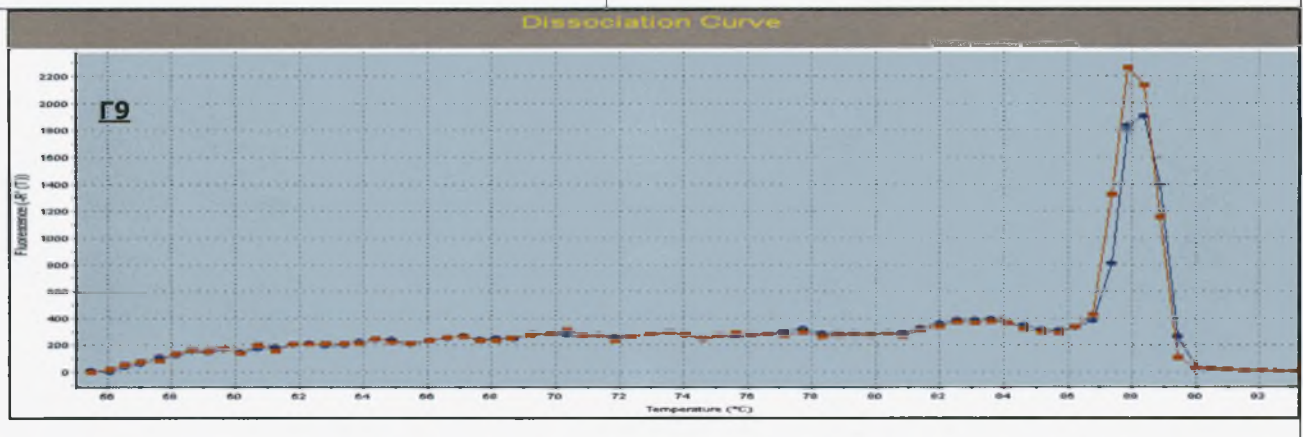
## AGO2



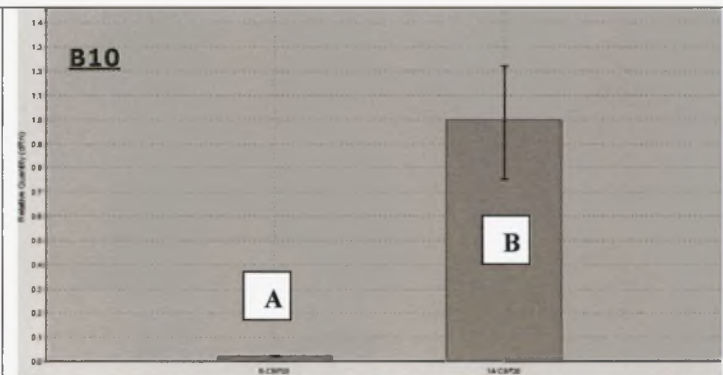
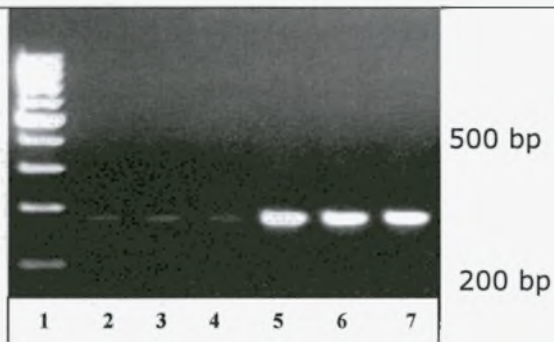
## H2A



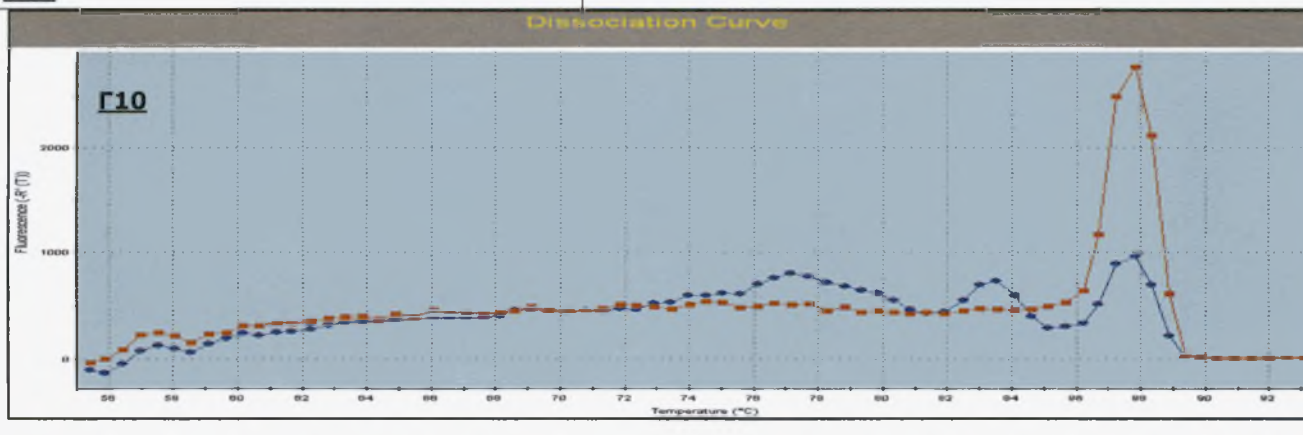
**A9**



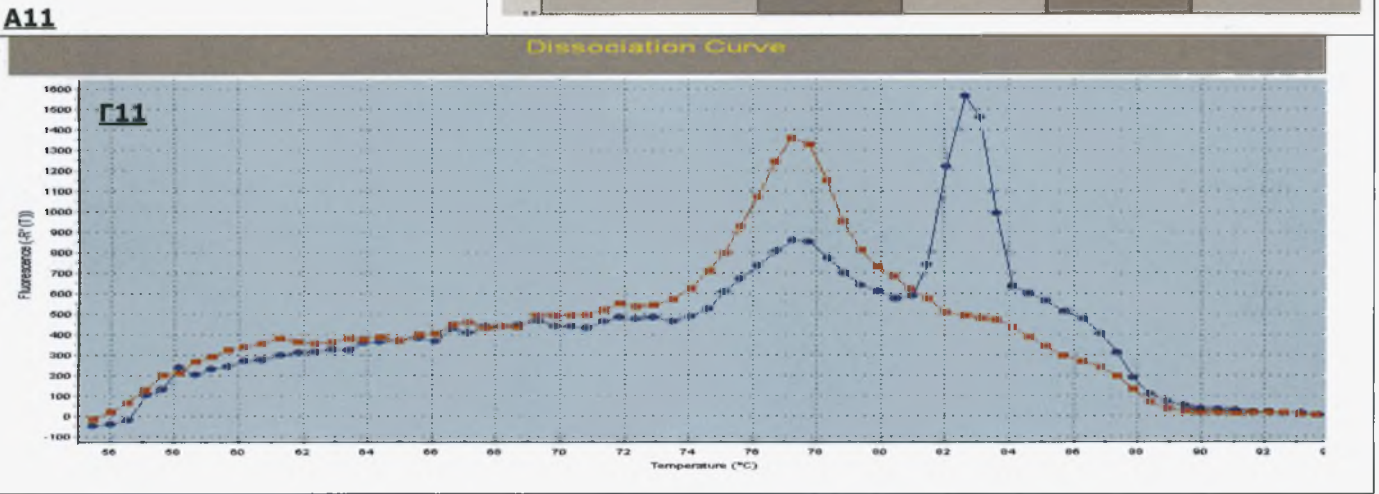
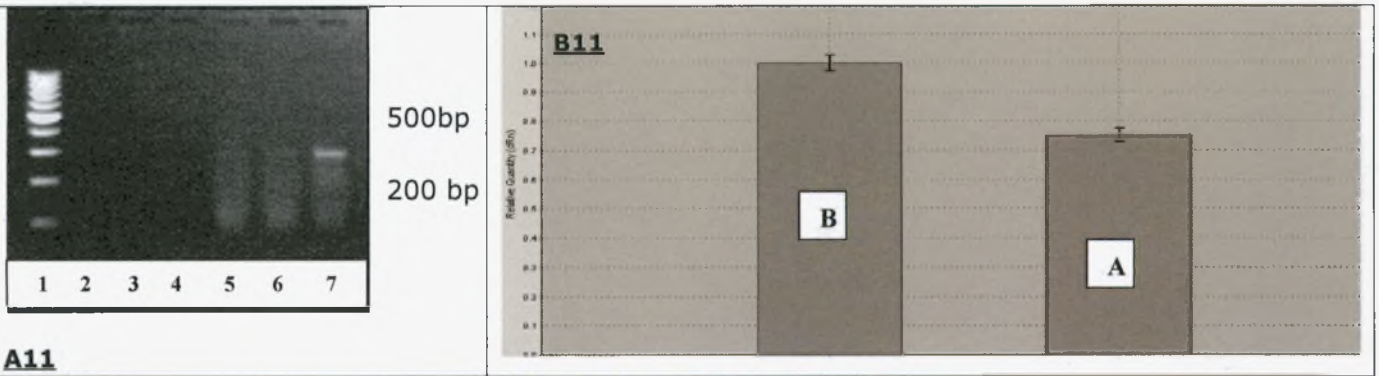
## CBP20



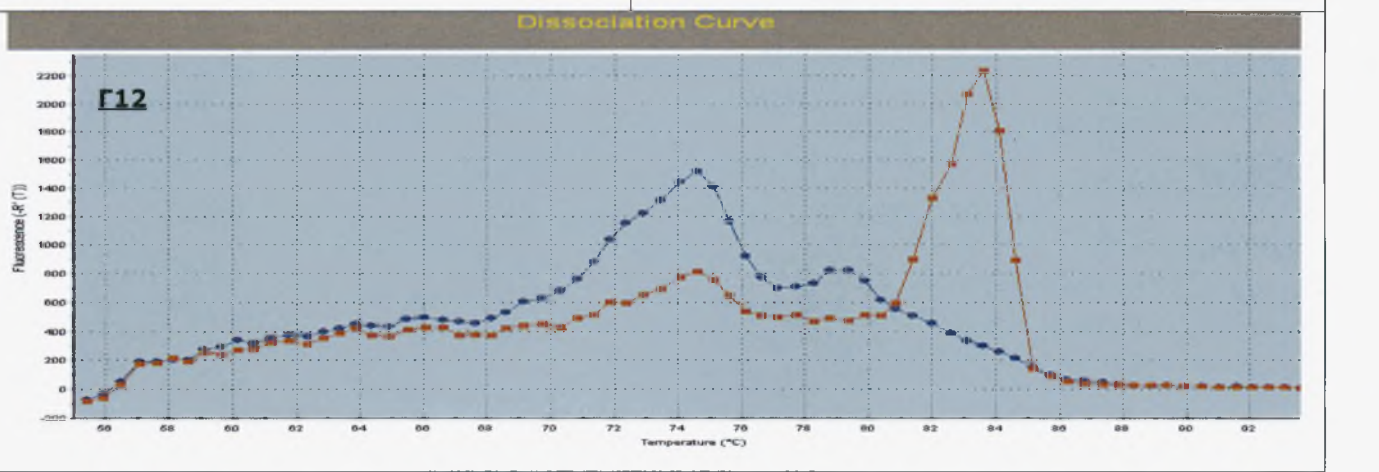
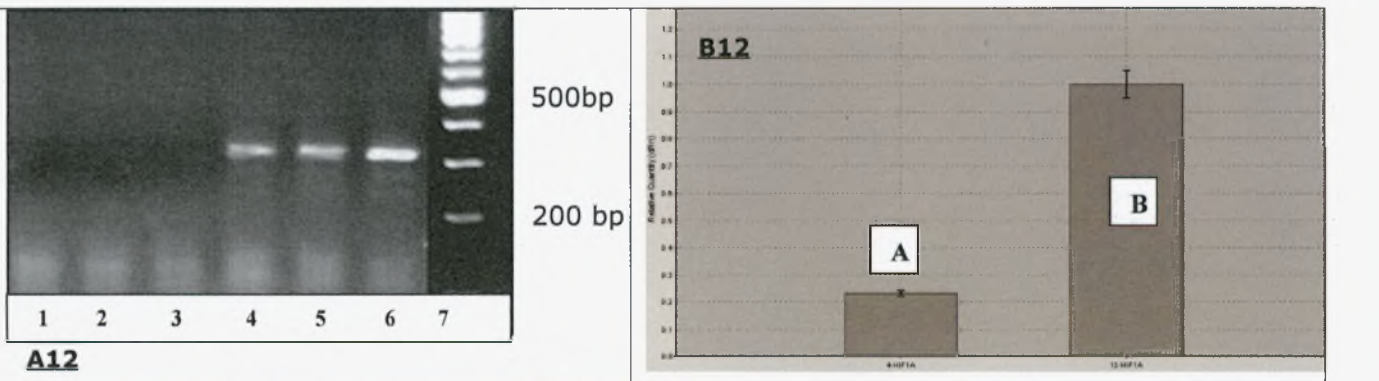
**A10**



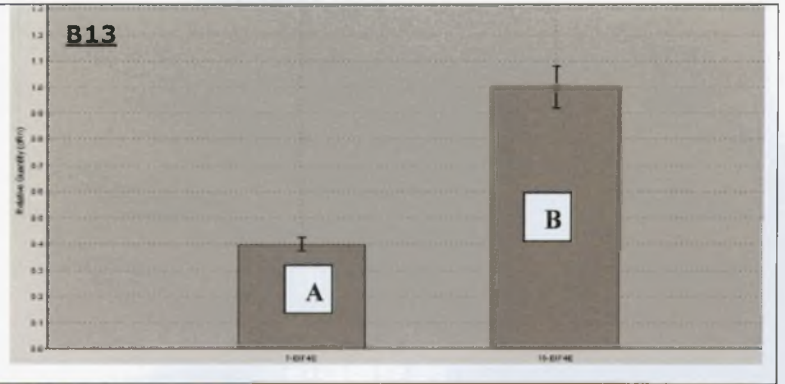
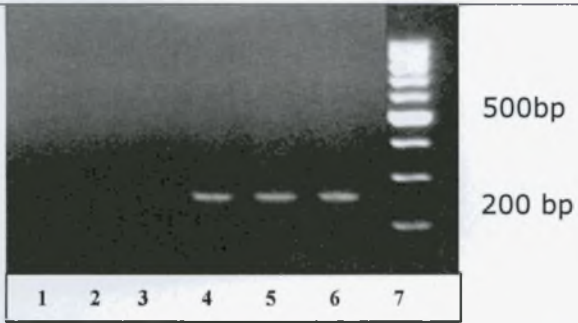
**CBP80**



**HIF 1a**

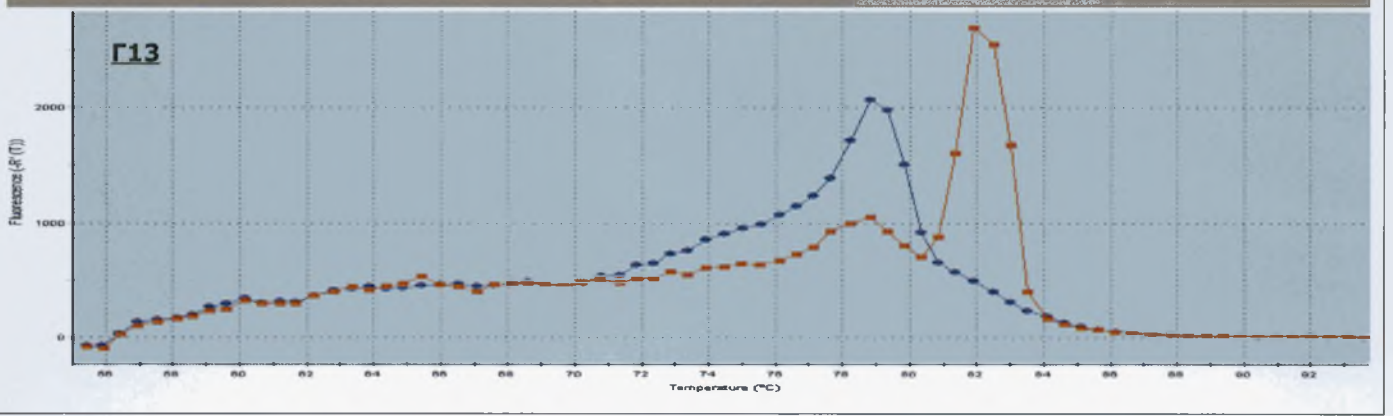


**EIF4E**

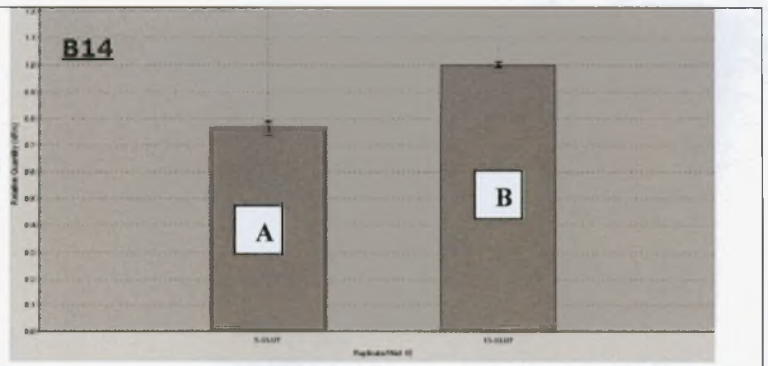
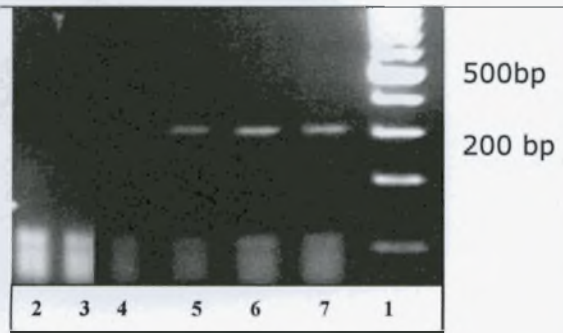


**A13**

**Dissociation Curve**

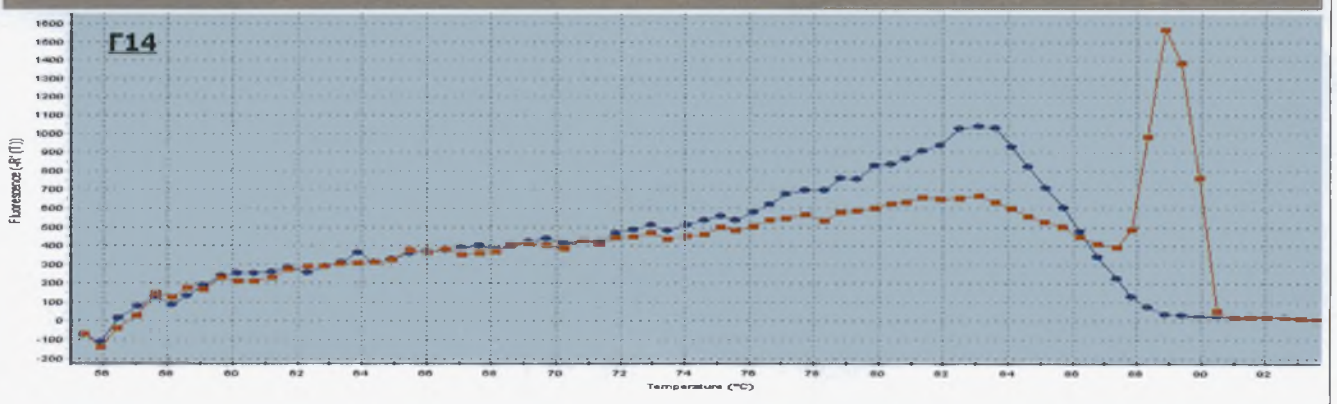


**SL C2A1 (alut-1)**

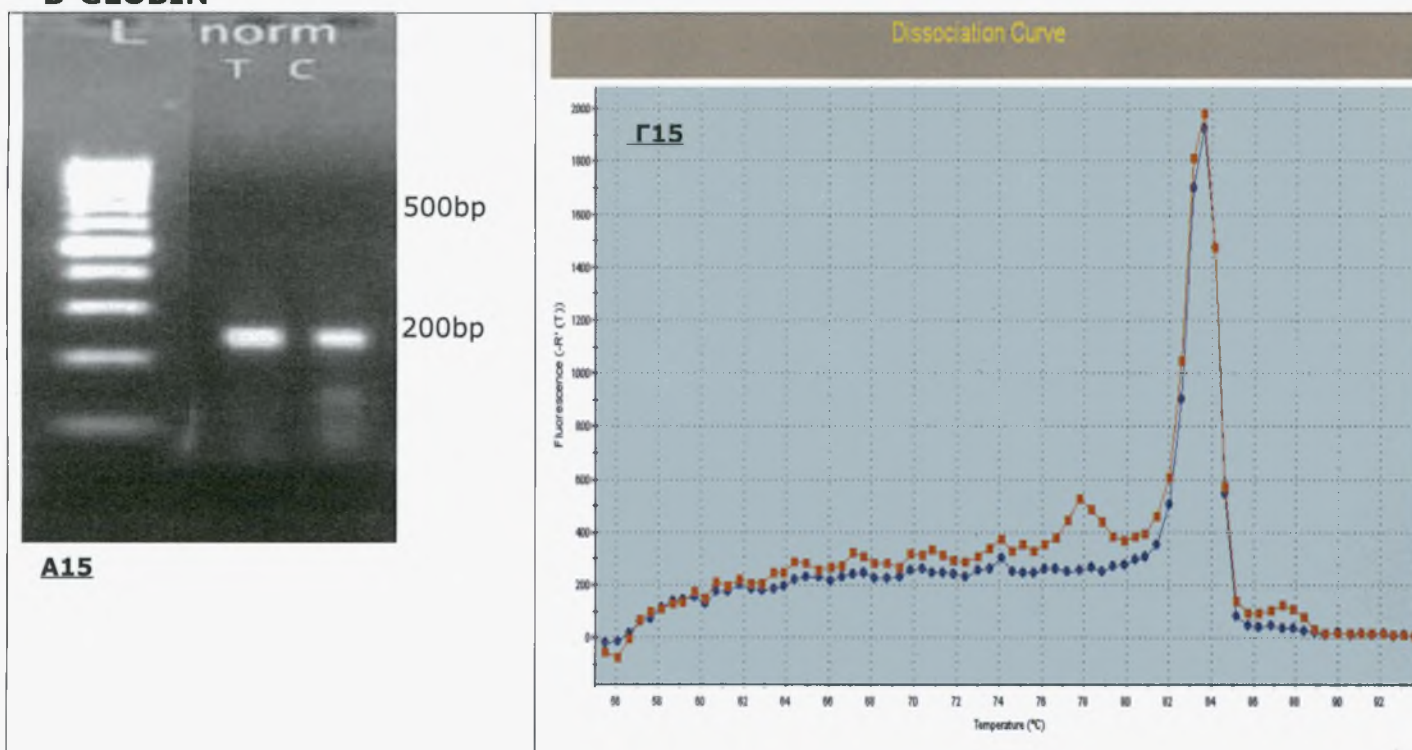


**A14**

**Dissociation Curve**



## B-GLOBIN

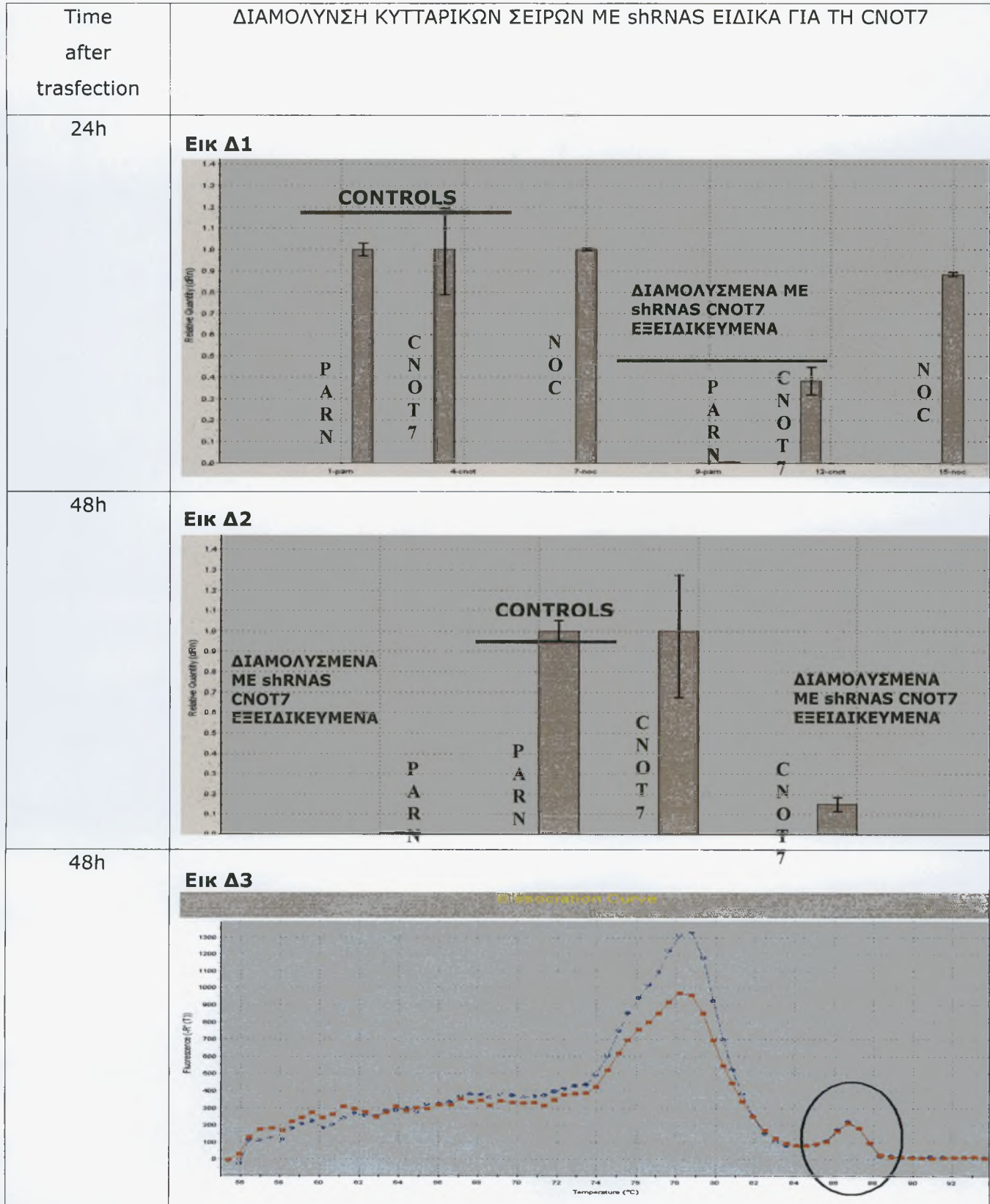


**Εικ. Α3-Α15:** Αποτελέσματα από ηλεκτροφόρηση, σε gel αгарόζης, των προϊόντων της RT-PCR όπου φαίνονται τα μοριακά βάρη των 12 παραγόντων.

**Εικ. Β3-Β14:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις RT-PCRs για κάθε ένα παράγοντα. Η στήλη Α αντιπροσωπεύει το mRNA του κάθε παράγοντα από τα διαμολυσμένα κύτταρα ενώ η στήλη Β από τα φυσιολογικά, τα μη διαμολυσμένα κύτταρα.

**Εικ. Γ3-Γ15:** διάγραμμα διάστασης (dissociation plot). Οι πληθυσμοί με μπλε χρώμα δείχνουν τα προϊόντα από διαμολυσμένα κύτταρα ενώ με κόκκινο τα προϊόντα από φυσιολογικά κύτταρα. Φαίνονται δύο τύπους πληθυσμών σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Ο πληθυσμός με  $T_m < 80^\circ\text{C}$  ανταποκρίνονται στα ειδικά DNA προϊόντα της PCR

**5.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ ΤΗΣ CNOT7 ΣΤΙΣ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΕΣ PARN, CNOT7 ΚΑΙ NOC ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΧΡΟΝΟΥΣ**





**Πίνακας 2:** Συγκριτικός πίνακας επίδρασης αποσιώπησης της PARN και αποσιώπησης της CNOT7 στα επίπεδα mRNA επιλεγμένων παραγόντων.

<b>Factor</b>	<b>PARN silencing</b>	<b>CNOT7 silencing</b>
CBP20	16*	44
CBP80	20	42
eIF4E	8	28
PABPC	12	73
CNOT7	2	23
PARN	50	79
NOC	17	61
AGO2	130	98
MYC	2	35
RAS	147	120
H2A	100	100

\* % των επιπέδων mRNA των μη διαμολυσμένων κυττάρων

## 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε, ο αριθμός των γνωστών αποαδενυλασών συνεχώς αυξάνεται. Η δράση τους όμως και ο μηχανισμός ρύθμισής τους παραμένει άγνωστος. Γεννάται λοιπόν το εξής ερώτημα: ποιό είναι το πλεονέκτημα από την ύπαρξη αυτής της τεράστιας ποικιλομορφίας αποαδενυλασών; Πιθανότατα αυτό συμβαίνει για λόγους εξειδίκευσης. Οι αποδενυλάσες μπορεί να έχουν διακριτές ή/και επικαλυπτόμενες δράσεις επί συγκεκριμένων ομάδων mRNAs καθορίζοντας την τύχη τους (Goldstrohm and Wickens, 2008). Ο κεντρικός ρόλος της CNOT7 στην αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs, καθιστά την ταυτοποίηση των πιθανών mRNA-στόχων της ένα ερευνητικό πεδίο με πολλές προκλήσεις.

Για αυτό το σκοπό, στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε μια σειρά από παράγοντες (συμπεριλαμβανομένων άλλων σημαντικών αποδενυλασών, πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με το mRNA, παραγόντων-κλειδιά στο μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων, ογκογονιδίων κτλ.) και εξετάσθηκε η επίδραση της αποσιώπησης της CNOT7 στα επίπεδα των mRNAs τους.

Η εικόνα της ανοσοαποτύπωσης (εικ.5.1) δείχνει σε πρώτη φάση την επιτυχή αποσιώπηση της CNOT7 *in vivo*, για την οποία σχεδιάστηκαν τα πέντε shRNAs, μάλιστα η μέγιστη αποσιώπηση παρατηρείται μετά από 72-96 ώρες μετά τη διαμόλυνση. Η επιτυχία της σίγησης επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα της RT-PCR (εικ.Α1,Β1,Γ1) τα οποία έδειξαν μείωση περίπου 70% (κανονικοποίηση με β-σφαιρίνη) των επιπέδων του mRNA της CNOT7 στα διαμολυσμένα κύτταρα (72 ωρών) σε σύγκριση πάντα με τα κύτταρα μάρτυρες (επίσης 72 ωρών). Η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης εξασφαλίστηκε με τη χρήση λιποφεκταμίνης για την διαμόλυνση των κυττάρων Her2 καθώς δεν είναι τοξική για τα κύτταρα και παρέχει δυνατότητα επιτυχούς εισαγωγής γενετικού υλικού σε ποσοστά 90-95%. Η εγκυρότητα του αποτελέσματος έγκειται στο γεγονός ότι η ίδια πυκνότητα κυττάρων και η ίδια ποσότητα αντιδραστηρίων έχουν τοποθετηθεί ανά well καθώς και στο ότι φορτώθηκε η ίδια ποσότητα κυττάρων και στις πέντε διαδρομές του gel πολυακρυλαμιδίου. Έτσι εξασφαλίζεται η εγκυρότητα της σύγκρισης της έντασης των ζωνών. Επίσης, η μεμβράνη PVDF πριν επωαστεί με το blocking buffer βάφτηκε με Ponceau red, το οποίο δεσμεύεται στις πρωτεΐνες και τις χρωματίζει. Η

εικόνα έδειξε την ίδια ένταση χρώματος σε όλες τις διαδρομές. Η πιο εντυπωσιακή διαφορά εμφανίζεται μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων (διαδρομή 5-C96) και των κυττάρων που μαζέψαμε μετά από 96 ώρες μετά τη διαμόλυνση (διαδρομή 4-96).

Επιπλέον για να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο τα αποτελέσματα των αντιδράσεων να είναι πλασματικά λόγω της επίδρασης της διαδικασίας της διαμόλυνσης στα επίπεδα mRNA των επιλεγμένων παραγόντων, πραγματοποιήθηκε και διαμόλυνση κυττάρων Hep2 με άδειο πλασμιδιακό φορέα pSUPER. Τα αποτελέσματα της RT-PCR έδειξαν πως η διαμόλυνση αυτή καθ' αυτή δεν επηρεάζει τα επίπεδα της CNOT7. Επίσης, για την επιτυχία της διαμόλυνσης κρίθηκε απαραίτητη η ταυτόχρονη χρήση και των τεσσάρων διαθέσιμων shRNAs έναντι της CNOT7, τα οποία στοχεύουν σε διαφορετικές περιοχές κατά μήκος ολόκληρου του mRNA της PARN. Τέλος, το ολικό RNA που απομονώθηκε τόσο από τα control όσο και από τα διαμολυσμένα κύτταρα, ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για την ακεραιότητά του, ενώ πριν την χρησιμοποίησή του ως υπόστρωμα στην RT-PCR προσδιορίσθηκε η συγκέντρωση του.

Ελέγξαμε αν η αποσιώπηση της CNOT7 επηρεάζει δομικές πρωτεΐνες του κυττάρου όπως η λαμίνη. Πραγματοποιήσαμε ένα επιπλέον στύπωμα Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα anti-lamin. Τα δείγματα που χρησιμοποιήσαμε αυτή τη φορά ήταν κύτταρα που συλλέξαμε μετά από 24 και 96 ώρες μετά τη διαμόλυνση με shRNAs. Επιλέξαμε αυτές της ώρες γιατί τα διαμολυσμένα κύτταρα παρουσιάζουν τη μικρότερη και τη μεγαλύτερη αντίστοιχα διαφορά σε σχέση με τα φυσιολογικά. Η εικόνα 5.2 δείχνει πως τα επίπεδα της λαμίνης μειώνονται στα διαμολυσμένα με shRNAs κύτταρα τα οποία μαζεύτηκαν σε 96 ώρες μετά τη διαμόλυνση. Αντίθετα στα κύτταρα που μαζεύτηκαν σε 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στα επίπεδα της πρωτεΐνης. Από το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται πως η λαμίνη αποτελεί στόχο των shRNAs.

Ο εσωτερικός μάρτυρας όμως που χρησιμοποιήσαμε στην RT-PCR, η β-σφαιρίνη σε αντίθεση με την λαμίνη, δεν αποτελεί στόχο των shRNAs. Αυτό φαίνεται τόσο από την εικόνα του gel αγαρόζης όσο και από το διάγραμμα διάσπασης (εικ. A15 και B15). Σε τεχνικές μελέτης έκφρασης του RNA όπως η real time PCR μελετάτε και η έκφραση ενός γονιδίου housekeeping ώστε να ελέγχονται τα λάθη μεταξύ των δειγμάτων. Αν οι

πειραματικές συνθήκες προκαλέσουν μία κατευθυνόμενη αλλαγή στο housekeeping γονίδιο τότε η τελική κανονικοποίηση θα δείξει μη αληθή αποτελέσματα. (Dheda et al. 2004). Στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό control το γονίδιο της β-σφαιρίνης. Επίσης, η H2A χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας παράλληλα με τη β-σφαιρίνη γιατί τα mRNAs των ιστονών είναι τα μοναδικά που δεν πολυαδενυλιώνονται, παρά μόνο το άκρο τους έχει μία δομή θηλείας (loop-structure) η οποία είναι απαραίτητη για την γρήγορη αποικοδόμηση τους mRNA. Αντίθετα με τα συνήθη mRNAs που παίρνουν άλλοτε μεγάλες και άλλοτε μικρές πολύ(A) ουρές, τα mRNAs των ιστονών παίρνουν μια μικρή ουρά U, που βοηθά στην αποικοδόμηση. Επίσης, έχει δειχθεί πρόσφατα πως το πρώτο στάδιο στην αποικοδόμηση των mRNA των ιστονών απαιτεί την προσθήκη μερικών καταλοίπων ουριδίνης στο 3' άκρο τους μετά το πέρας της S φάσης του κυτταρικού κύκλου. Η αποικοδόμηση γίνεται και προς τις δύο φορές, 5' → 3' και 3' → 5' (Mullen and Marzluff 2008). Εφόσον το mRNA δεν αποαδενυλιώνεται δεν θα έπρεπε να επηρεάζεται από τις αλλαγές των επιπέδων των αποαδενυλασών. Ωστόσο από τις εικόνες B9 και Γ9 φαίνεται πως η αποσιώπηση έχει επίδραση στα επίπεδα των ιστονών καθώς μειώνονται στα διαμολυσμένα κύτταρα. Η πραγματική εικόνα όμως του αποτελέσματος φαίνεται από το gel ηλεκτροφόρησης (A9) η οποία μας δείχνει ότι τα επίπεδα της ιστόνης δεν παρουσιάζουν τόσο έντονη απόκλιση μεταξύ των αποσιωπημένων και των φυσιολογικών όπως φαίνεται από τις εικόνες B9 και Γ9. Αυτή η διαφορά στο αποτέλεσμα οφείλεται πιθανόν σε εσφαλμένη κανονικοποίηση. Επίσης άλλη μία εξήγηση για αυτή την παρατήρηση είναι η πιθανότητα τα κύτταρα να συλλέχτηκαν ενώ η πλειοψηφία τους βρισκόταν σε φάση S του κυτταρικού κύκλου, καθώς είναι γνωστό πως η σύνθεση των ιστονών πραγματοποιείται κυρίως στο συγκεκριμένο στάδιο και κατά συνέπεια μειώνονται δραματικά τα επίπεδα των mRNAs τους. (Wu and Bonner, 1981 et al., 2002)

Τα αποτελέσματα από την RT-PCR για τους υπόλοιπους παράγοντες έδειξαν πως η αποσιώπηση δεν είναι τόσο ειδική μόνο για την CNOT7 καθώς τα επίπεδα mRNA και άλλων παραγόντων μειώνονται. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα των άλλων δύο αποαδενυλασών PARN και NOC μειώνονται εξίσου. Τα επίπεδα της πρώτης μειώνονται δραματικά ενώ της δεύτερης παρουσιάζουν μικρή αλλά σημαντική μείωση. Επίσης, μείωση

παρατηρείται σε όλους τους εξεταζόμενους παράγοντες εκτός από τον BTG2 που παραμένει σε σταθερά επίπεδα. Αυτό ίσως να οφείλεται στο ότι αυτός ο παράγοντας δεν αλληλεπιδρά με την CNOT7 αλλά με άλλες υπομονάδες του συμπλόκου CCR4-NOT. Στους παράγοντες LSM, BTG2, AGO2, CBP20,80, EIF4E, HIF1A και GLUT-1 δεν πήραμε σήμα στο gel αγαρόζης από τα δείγματα των διαμολυσμένων κυττάρων αλλά στο διάγραμμα διάστασης (dissociation plot) φαίνεται να υπάρχουν ειδικά προϊόντα καθώς υπάρχουν πληθυσμοί σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από του 78°C. Πιθανόν, η ποσότητα των προϊόντων της RT-PCR δεν είναι αρκετή ώστε να δώσει σήμα στο gel ηλεκτροφόρησης αφού η RT-PCR είναι πολύ πιο ευαίσθητη τεχνική από την ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης. Αυτά τα mRNAs που μειώνονται πιθανόν να υπόκεινται σε διαφορετικό μηχανισμό ελέγχου των επιπέδων τους μετά την αποσιώπηση της CNOT7, ο οποίος είτε σχετίζεται με την ενεργοποίηση άλλων αποαδενυλασών που καταστρέφουν δίχως ρύθμιση το mRNA-στόχο είτε την εμπλοκή εναλλακτικών παραγόντων αποικοδόμησης (π.χ miRNAs).

Στις εικόνες Δ1, Δ2 και Δ3 φαίνονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της αποσιώπησης με shRNA-CNOT7 εξειδικευμένα, στις αποαδενυλάσες CNOT7, PARN και nocturnin (NOC). Οι μετρήσεις των επιπέδων του mRNA των τριών αποαδενυλασών έγιναν σε χρόνο 24 (εικ.Δ1) και 48 ωρών (εικ.Δ2 και Δ3) μετά την διαμόλυνση των κυττάρων με τα shRNAs. Οι εικόνες από το Relative quantity chart δεν ήταν αντιπροσωπευτικές λόγω των αυξημένων μη ειδικών προϊόντων. Η εικόνα από το διάγραμμα διάσπασης δείχνει την ύπαρξη ειδικών προϊόντων χωρίς να μειώνονται αυτά από τα διαμολυσμένα κύτταρα. Στην εικόνα Δ1 παρατηρούμε ότι τη σημαντικότερη μείωση υπέστη η PARN. Τα μειωμένα επίπεδα αυτής της αποαδενυλάσης διατηρούνται με την πάροδο του χρόνου, ακόμα και 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση (εικ. Δ2) Αντίθετα, η μείωση των επιπέδων της CNOT7 γίνεται εντονότερη με την πάροδο του χρόνου. Σε διάστημά 24 ωρών η CNOT7 στα διαμολυσμένα κύτταρα, μειώνεται κατά τα 3/5 σε σχέση με τα επίπεδα της στα φυσιολογικά κύτταρα. Μετά από 48 ώρες από την διαμόλυνση τα επίπεδα της CNOT7 μειώνονται στο 1/10 και 72 ώρες μετά το ποσοστό γίνεται μικρότερο από 1/10. Η nocturnin στις πρώτες 24 ώρες φαίνεται να μειώνεται σε μικρό βαθμό. Μετά το πέρας των 48 και 72

ωρών αυτή η διαφορά των επιπέδων μεταξύ διαμολυσμένων και φυσιολογικών κυττάρων τείνει να εξισορροπηθεί.

Το πρότυπο έκφρασης που προέκυψε μετά την αποσιώπηση της υπομονάδας CNOT7 του συμπλέγματος CCR4-NOT συγκρίθηκε με το αντίστοιχο πρότυπο μετά την αποσιώπηση της PARN (η αποσιώπηση αυτή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια άλλης εργασίας). Μια προσεκτική παρατήρηση του πίνακα 2 αποκαλύπτει σημαντικές διαφορές όσον αφορά τις μεταβολές στα επίπεδα mRNA τουλάχιστον σε κάποιους από τους επιλεγμένους παράγοντες (π.χ Nocturnin και PABPC). Αυτές οι διαφορές στα πρότυπα έκφρασης που προκύπτουν μετά την αποσιώπηση της CNOT7 και της PARN αποτελούν μια πρώτη ένδειξη για διαφορετικότητα στη ρύθμιση των εξεταζόμενων mRNAs και μια λιγότερο ασφαλή υπόθεση για την ύπαρξη εξειδίκευσης μεταξύ των δύο αποαδενυλασών ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου μια δεδομένη χρονική στιγμή.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα εργασία αποσιωπήσαμε την CNOT7 in vivo και εξετάσαμε την επίδραση στα επίπεδα mRNA μιας σειράς παραγόντων, στα πλαίσια μιας πρώτης προσπάθειας να ταυτοποιηθούν τα mRNAs-στόχοι της και να δοθεί μια απάντηση στο ερώτημα της ύπαρξης μιας τόσο μεγάλης ποικιλίας αποδενυλασών. Βέβαια, πληρέστερη εικόνα τόσο για την CNOT7 όσο και για άλλες σημαντικές ευκαρυωτικές αποαδενυλάσες, θα έχουμε μετά τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών, στις οποίες θα είναι μόνιμα αποσιωπημένα τα συγκεκριμένα ένζυμα και η ακόλουθη επίδραση αυτών των σιγήσεων στα επίπεδα έκφρασης του συνόλου των παραγόντων που υπάρχουν στον άνθρωπο. Προς την κατεύθυνση αυτή και πάλι είναι απαραίτητη η χρήση της τεχνικής των DNA μικροσυστοιχιών.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Albert et al. 2002 EMBO J VOL 21:355-364 " Identification of a ubiquitin-protein ligase subunit within the CCR4-NOT transcription repressor complex"

Albert et al. 2000 Oxford University Press VOL 28:809-817 "Isolation and characterization of human orthologs of yeast CCR4-NOT complex subunits"

Ambion miRNA Research Guide

[http://www.ambion.com/techlib/guides/Ambion\\_miRNA\\_res.pdf](http://www.ambion.com/techlib/guides/Ambion_miRNA_res.pdf)

Ambros et al 2003 RNA VOL 9: 277-279 "A uniform system for microRNA annotation"

Andersen et al. Aug 2004 Cancer research VOL 64:5245-5250 "Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A model-Based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon data sets"

Aslam et al. Sep 2009 Mol Biol Cell VOL20:3840-50 "The CCR4-NOT deadenylase subunits CNOT7 and CNOT8 have overlapping roles and modulate cell proliferation"

Ausio and Abbott 2002 Biochemistry VOL41(19):5945-5949 "The many tales of a tail: Carboxyl-terminal tail heterogeneity specializes histone H2A variants for defined chromatin function"

Baggas S. et al 2005 Cell VOL 122:553-563 "Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation"

Bernstein, 2001 Nature VOL 409:363-366 "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference"

Bianchin et al 2005 RNA VOL 11:487-494 "Conservation of the deadenylase activity of proteins of the CAF1 family in human.

Boutet et al. 2003 Curr. Biol. VOL13:843-848 "Arabidopsis HEN1: A genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance.

Brouwer et al. 2001 Journal of Biological Chemistry VOL 276: 6177-84 "Three novel components of the human exosome".

Brummelkamp et al. Science 2002 VOL 296:550-553 "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells"

Carmell MA et al. 2002 Genes VOL16:2733-2742 "The Argonaute family: Tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis"

Carrington JC, and Ambros V 2003 Science VOL 301:336-338 "Role of microRNAs in plant and animal development"

Chen, J. 2001 J Mol Biol VOL 314:683-694 "Purification and characterization of the 1.0 MDa CCR4-NOT complex identifies two novel components of the complex"

Dheda et al. 2004 BioTechniques VOL 37:112-119 "Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in Real time PCR"

Doench et al 2003 Genes Dev. VOL17:438-442 "siRNAs can function as miRNAs"

Doma and Parker 2006 Nature VOL 440:561-564 "Endonucleotic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation"



Elbashir, et al. 2001 Nature VOL 411: 494-498 "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells"

Ezzeddine et al. 2007 Mol Cell Biol.VOL27:7791-801 "Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation"

Felger JH et al. Jan 1994 JB. Biol.Chem. VOL 28:2550-61 "Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulation."

Fire, A et al 1998 Nature VOL391:806-811 "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*"

Flanagan et al. Sep 2003 VOL 106:505-9 "Analysis of the transcription regulator, CNOT7 as a candidate chromosome 8 tumor suppressor gene in colorectal cancer"

Frischmeyer et al 2002 Nature VOL 295:2258-2261 "An mRNA Surveillance Mechanism That Eliminates Transcripts Lacking Termination Codons"

Funakoshi et al. 2007 Genes VOL 21:3135-48 "Mechanism of mRNA deadenylation:evidence for molecular interlay between translation termination factor eRF3 and deadenylases"

Garneau et al 2007 Nature VOL 8:113-126 "The highways and byways of mRNA decay"

Goldstrohm and Wickens. April 2008 Nature Publishing Group VOL 9:337-344 "Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control"

Grishok.A. et al 2001 Cell VOL 106:23-34 "Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing"

Hammond et al 2000 Nature 404, 293-296 "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells"

Hatch and Bonner 1990J Bio Chem VOL 265(25):15211-8 "The human histone H2A.Z gene. Sequence and regulation."

Horrée et al 2007 Cellular Oncology IOS Press VOL 29:219-227 "Hypoxia and angiogenesis in endometrioid endometrial"

[http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)

Karginov et al. Dec 2007 PNAS VOL 104(49):19291-19296 "A biochemical approach to identifying microRNA targets"

Kaygun and Marzluff 2005 Molecular and Cellular Biology Aug. VOL 25(16):6879-6888 "Translation termination is involved in histone mRNA degradation when DNA replication is inhibited"

Kiriakidou M et al. 2009 Nucleic Acids Res "Expanded RNA-binding activities of mammalian Argonaute 2"

Korner, C. G. et al. 1998 EMBO J. VOL 17:5427-5437 "The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of Xenopus oocytes."

Lim et al 2003 Science VOL 299:1540 "Vertebrate microRNA genes"

Lippman and Martienssen 2004 Nature VOL 431:364-370 "The role of RNA interference in heterochromatic silencing"

Mamane et al 2007 PLoS One VOL 21:242 "Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation"

Maquat et al, 2001 Cell VOL 106:607-617, "Evidence for a Pioneer Round of mRNA Translation: mRNAs Subject to Nonsense-Mediated Decay in Mammalian Cells Are Bound by CBP80 and CBP20"

Mauxion et al 2008 EMBO J. VOL27:1039-48 " The BTG2 protein is general activator of mRNA deadenylation"

Meyer et al 2004 Biochemistry and Molecular Biology VOL39:197-216 "Messenger RNA turnover in eukaryotes pathways and enzymes"

Miyaska T et al. 2008 Cancer Sci VOL 99:755-61 " Interaction of antiproliferative protein Tob with the CCR4-NOT deadenylase complex"

Moore Sep 2005 Science VOL 309:1514-1518 "From birth to death: The complex lives of eukaryotic mRNAs"

Mukherjee, 2002. EMBO J VOL 21:165-174 "The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements."

Mullen and Marzluff 2008 Genes Dev. VOL22: 50-65 "Degradation of histone mRNA requires oligouridylation followed by decapping and simultaneous degradation of the mRNA both 5' to 3' and 3' to 5' "

Mullen, et al. 2008 VOL 449:23-45 "Cell-cycle regulation of histone mRNA degradation in mammalian cells: role of translation and oligouridylation"

Lau et al. 2009 Biochem J VOL 422:443-453 "Human Ccr4-Not complexes contain variable deadenylase subunits"

Oridate et al. 2005 Cancer Biol Ther VOL 4(3):318-23 "Growth inhibition of head and neck squamous cells by small interfering RNAs targeting eIF4E or cyclin D1 alone or combined with cisplatin"

Park et al. 2002 Curr. Biol. VOL12:1484-1495. " CARPEL factory, a dicer homolog and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana"

Parker and Song 2004 Nature Structural and Molecular VOL 11:121-126 "The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover"

Raffaele De Caro 2009 Histol Histopathol VOL 24:175-185 "Glucose transporter-1 expression and prognostic significance in pancreatic carcinogenesis"

Rana, Jan 2007 Nature Publishing Group VOL 8:23-36 "Illonimating the silence: understanding the structure and function of small RNAs"

Rastogi et al 2007 Cancer Letters, VOL 257:24-251 "Glut-1 antibodies induce growth arrest and apoptosis in human cancer cell lines"

Reik et al 1998 Molecular and Cellular Biology VOL 18: 5992-6000 "The Locus control region is nnecessary for gene expression in the Human  $\beta$ -globin locus but not the maintenance of an open chromatin structure in erythroids cells"

Robert and Pelletier 2009 Expert Opin Ther Targets VOL 13(11):1279-93 "Translation initiation: a critical signalling node in cancer"

Semenza 2003 Nat Rev Cancer VOL 3(10): 721-32 "Targeting HIF-1 for cancer therapy"

Taxman et al. 2006BMC Biotechnology, VOL6:7 "Criteria for effective design, construction, and gene knockdown by shRNA vectors"

Wagner and Andersen 2002 Journal of Cell Science VOL 115:3033-3038 "mRNA surveillance: The perfect persist."

Weihai and Parker. May 2000 Cell Biology VOL 12:346-350 "Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing"

Wong and F.Medrano July 2005 Biotechniques VOL 39.No.1 "Real time PCR for mRNA quantitation"

Xiuna Yang, Oct 2009 Nucleic Acids Res "Crystal structure of human BTG2 and mouse TIS21 involved in suppression of CAF1 deadenylase activity"

Yamashita, A. et al. 2005 Nature Struct. Mol. Biol. VOL 12:1054-1063 "Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover"

Zeng et al 2003 Proc. Natl Acad. Sci. USA VOL 100:9779-9784 "micro RNA and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms"