



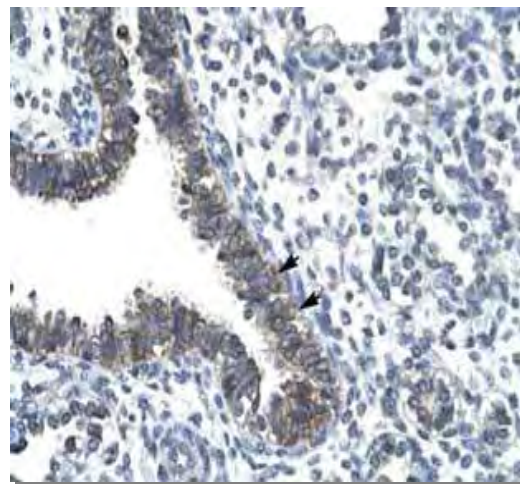
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

---

**In silico και in vitro μελέτη του υποκυτταρικού  
εντοπισμού της αποαδενυλάσης CCRN4L (Nocturnin)**



Διπλωματική εργασία- Πάνου Μαργαρίτα-Μαρία

Λάρισα 2011-12

In silico και in vitro μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της αποαδενυλάσης **CCRN4L** ( Nocturnin) .

In silico and in vitro studies on the subcellular localization of **CCRN4L** deadenylase (Nocturnin) .

Τριμελής επιτροπή:

**Μπαλατσός Νικόλαος**, Λέκτορας Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (επιβλέπων)

**Λεωνίδας Δημήτριος**, Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Ψαρρά Άννα- Μαρία**, Λέκτορας Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Εικόνες εξωφύλλου:** α) Μιτοχόνδριο σε τρισδιάστατη απεικόνιση

β) Immunohistochemistry - Nocturnin antibody

(Paraffin- embedded Human lung tissue. Cells with positive label: epithelial cells of bronchiole (indicated by arrows))

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

### **Ευχαριστίες**

*Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων οι υποδείξεις, η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για την διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Την τριμελή μου επιτροπή και ιδιαίτερα τον καθηγητή μου, κύριο Μπαλατσό Νικόλαο, για τη βοήθεια και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης, τα μέλη του εργαστηρίου Λειτουργικής Βιοχημείας (Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας) και ιδιαίτερα τους υποψήφιους διδάκτορες, Παναγιώτη Μαραγκοζΐδη και Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου για τη σημαντική συμβολή τους στη διεξαγωγή των πειραμάτων. Καθώς επίσης την κυρία Σταματίνα Γιαννούλη αλλά και την κυρία Καπετανάκη, διευθύντρια του κέντρου <<Βασική Έρευνα Ι>> του ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών και την κυρία Αντιγόνη Διοκμετζΐδου, για τη φιλοξενία, τη συναδελφική αλληλεγγύη και τη βοήθεια που μας προσέφεραν.*

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT .....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Η σύνθεση και η μετ'αφραση του mRNA. ....	9
1.2 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA. ....	9
1.3 Αποικοδόμηση του mRNA .....	11
1.3.1 Αποικοδόμηση φυσιολογικών mRNAs.....	11
1.3.2 Αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNAs.....	15
1.3.3 Σήματα που ρυθμίζουν την αποικοδόμηση του mRNA .....	15
1.4 Αποαδενυλάσες. Κατάταξη, βιολογικές λειτουργίες και έλεγχος δραστηριότητάς τους. ....	16
1.5 Πολυαδενυλίωση και αποαδενυλίωση στα ανθρώπινα μιτοχόνδρια .....	21
1.5.1 Το γονίδιο ND2 .....	22
1.5.2 Το γονίδιο του Cyt b .....	22
1.6 Η αποαδενυλάση NOCTURNIN.....	23
1.6.1 Γενικά χαρακτηριστικά .....	23
1.7 Η τεχνολογία του RNA interference (RNAi) .....	26
2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	29
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
3.1. ΥΛΙΚΑ .....	30
3.1.1 Χημικές ουσίες .....	30
3.1.2 Διαλύματα .....	32
3.1.3 Αντισώματα.....	34
3.1.4 Κυτταρικές σειρές.....	34

3.1.5 Short-Hairpin RNAs (shRNAs) .....	35
3.1.6 Εκκινητές.....	38
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	40
3.2.1 Απόψυξη κυττάρων Hep2 .....	40
3.2.2 Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας -Τρυψινοποίηση .....	40
3.2.3 Κατάψυξη κυττάρων.....	41
3.2.4 Συλλογή και λύση κυττάρων θηλαστικών.....	41
3.2.5 Απομόνωση μιτοχονδρίων από καρκινική κυτταρική σειρά Hep2.....	42
3.2.6 Απομόνωση μιτοχονδρίων από κύτταρα θηλαστικών .....	43
3.2.7 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών.....	44
3.2.8 Ηλεκτροδιάτρηση δεκτικών κυττάρων DH5a ( <i>E.coli</i> ) με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 (puro-amp).....	47
3.2.9 Stock γλυκερόλης .....	47
3.2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation).....	47
3.2.11 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF και Ανοσοανίχνευση.....	48
3.2.12 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με χρήση λιποσωμάτων (Lipofection) .....	51
3.2.14 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου δύο βημάτων (Real Time PCR two-steps).....	53
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	57
4.1 In silico χαρακτηρισμός της Nocturnin.....	55
4.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός της NOC σε δείγματα απο καρκινική κυτταρική σειρά Hep2 .....	57
4.3 Υποκυτταρικός εντοπισμός της NOC σε κύτταρα θηλαστικών (ποντίκια).....	58
4.4 Μελέτη της αποσιώπησης της NOC .....	61

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	63
--	----

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πολυ-(A) ουρά των ώριμων ευκαρυωτικών mRNAs διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη μεταφορά, τη μετάφραση και την αποικοδόμησή τους, παρέχοντας ένα σημαντικό μέσο ρύθμισης της πρωτεϊνοσύνθεσης και της σταθερότητας των mRNAs. Η αποικοδόμηση των mRNAs ξεκινά συνήθως με τη βράχυνση της πολυ-(A) ουράς, με τα ένζυμα που συμμετέχουν στη διαδικασία να χαρακτηρίζονται από διαφορετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, βιολογικές λειτουργίες και εξειδίκευση ως προς το mRNA-υπόστρωμα. Η βράχυνση της πολυ-(A) ουράς καταλύεται από ένζυμα γνωστά ως αποαδενυλάσες. Τα ένζυμα αυτά δεν καταλύουν μόνο τη βράχυνση της πολυ-(A) ουράς των πυρηνικών γονιδίων, αλλά και των μιτοχονδριακών. Μάλιστα, έχουν δείχθει πειραματικά ότι στην διαδικασία αυτή εμπλέκονται συγκεκριμένες αποαδενυλάσες όπως η 2'- φωσφοδιεστεράση (PDE12) καθώς και η CCRN4L (Nocturnin). Στην παρούσα εργασία επιλέγουμε να αποσιωπήσουμε την ανθρώπινη αποαδενυλάση Nocturnin (NOC). Η αποαδενυλάση αυτή είναι η πρώτη που δείχθηκε να ρυθμίζεται από τον κερκάδιο ρυθμό. Παράλληλα με τον προσδιορισμό των στόχων της NOC, λόγω της ιδότητάς της ως αποαδενυλάση, προσπαθούμε να δούμε σε ποιά μεταβολικά μονοπάτια εμπλέκεται, ώντας ένα γονίδιο που ρυθμίζεται από τον κερκάδιο ρυθμό του οργανισμού. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν 5 κατάλληλα shRNAs για την εξειδευμένη σίγηση της NOC και με αυτά διαμολύνθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα Hep2. Με ανοσοαποτύπωση και ποσοτική Real Time PCR, ελέγχθηκε σε επίπεδο πρωτεϊνών και mRNA αντίστοιχα, η επιτυχία της αποσιώπησης και τα επίπεδα έκφρασης των εξεταζόμενων παραγόντων σε εκχυλίσματα κυττάρων μάρτυρες (control) και κυττάρων στα οποία αποσιωπήθηκε η NOC. Με την πρώτη τεχνική εντοπίσαμε υποκυτταρικά την παρουσία του ενζύμου στα εργοστάσια παραγωγής ενέργειας του κυττάρου, στα μιτοχόνδρια. Με τη δεύτερη τεχνική διαπιστώσαμε το πώς η έκφραση ή η αποσιώπηση της NOC αντίστοιχα, επηρεάζει τα επίπεδα των mRNAs μιτοχονδριακών γονιδίων (ND2 και CytB).

## **ABSTRACT**

The poly(A) tail plays a crucial role in mature eukaryotic mRNA transport, translation and degradation and provides a widespread means of controlling protein production and mRNA stability. mRNA degradation usually begins with the shortening of poly(A) tail, with each enzyme involved in this process being characterized by different regulatory mechanisms, biological functions and mRNA specificity. The shortening of the poly (A) tail is catalyzed by a range of enzymes, known as deadenylases. That enzymes catalyze the shortening of poly (A) tail of nuclear and mitochondrial genes. In this pathway, are involved many deadenylases such as 2'-phosphodiesterase (2'-PDE) and CCRN4L ( Nocturnin ) . In this work, we tested the effect of human circadian deadenylase Nocturnin (NOC) silencing on the expression levels of selected target mRNAs, in order to determine its role in metabolism and its function as a circadian gene being a part of the circadian clock. For this purpose, we designed and used five appropriate shRNAs, specific for NOC silencing, and with them we transfected human cancer cells (Hep2). Western blot and quantitative RT-PCR were used for the analysis of extracts from NOC-silenced and control cells in protein and mRNA level respectively. By Western blot we found the subcellular localization of NOC and quantitative RT- PCR was a powerfool tool to measure steady- state amounts of mRNAs in small samples and to examine who expressed or silenced NOC influence the steady- state level of others mitochondrial mRNAs ( such as ND2 and CytB).



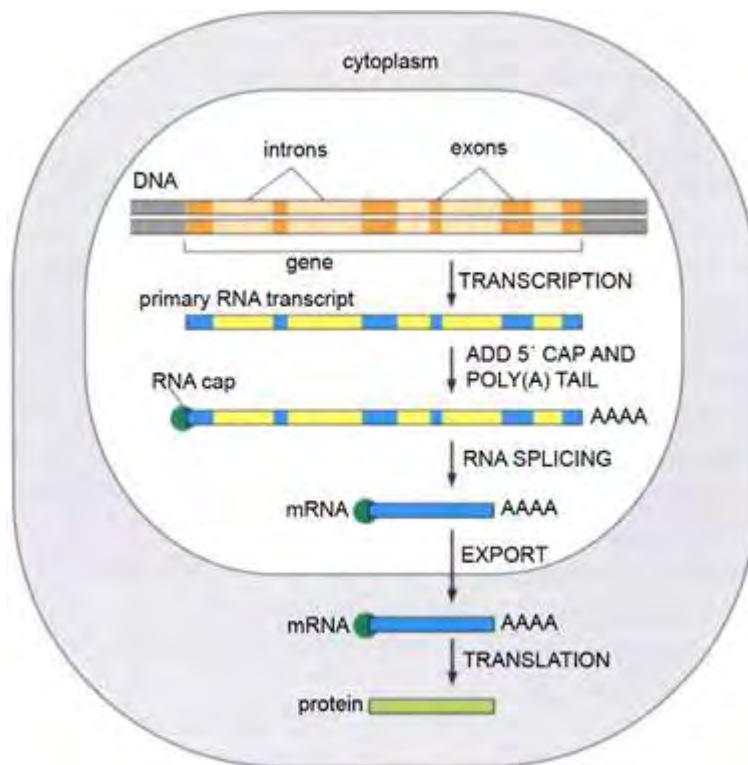
# **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## **1.1 Η σύνθεση και η μετάφραση του mRNA.**

Η διεργασία της μεταγραφής (*transcription*) παράγει ένα μονόκλωνο μόριο RNA όμοιο στην αλληλουχία με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA, ενώ η μετάφραση (*translation*) μετατρέπει ακολούθως τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του mRNA στην αλληλουχία αμινοξέων που αποτελούν μια πρωτεΐνη. Ένα μόριο mRNA δε μεταφράζεται σε ολόκληρο το μήκος του, αλλά κάθε mRNA περιέχει τουλάχιστον μία κωδική περιοχή (*coding region*), η οποία σχετίζεται με μια πρωτεϊνική αλληλουχία μέσω του γενετικού κώδικα: κάθε νουκλεοτιδική τριπλέτα (*κωδικόνιο*) της κωδικής περιοχής αντιστοιχεί σε ένα αμινοξύ. Μόνο η μία αλυσίδα του δίκλωνου DNA μεταγράφεται σε αγγελιαφόρο RNA. Η μία αλυσίδα του DNA η οποία κατευθύνει τη σύνθεση του mRNA δημιουργώντας ζεύγη συμπληρωματικών βάσεων αποκαλείται αλυσίδα-μήτρα (*template strand*) ή αντινοηματική αλυσίδα (*antisense strand*). Ο όρος «αντινοηματική» χρησιμοποιείται γενικά για την περιγραφή μιας αλληλουχίας του DNA ή του RNA που είναι συμπληρωματική με το mRNA ενώ η αλυσίδα του DNA που φέρει την ίδια αλληλουχία με το mRNA (με εξαίρεση ότι περιέχει T αντί για U) ονομάζεται κωδική αλυσίδα (*coding strand*) ή νοηματική αλυσίδα (*sense strand*).

## **1.2 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA.**

Μετά τη σύνθεση του πρώιμου ευκαρυωτικού mRNA (*pre-mRNA*) ακολουθεί η ωρίμανση που δίνει το τελικό ώριμο mRNA. Η ωρίμανση περιλαμβάνει την προσθήκη του καλύμματος στο 5' άκρο (*capping*), την προσθήκη της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο (*polyadenylation*) και το μάτισμα (*splicing*) για την απομάκρυνση των εσονίων και τη συρραφή των εξονίων, όπως φαίνεται και στην **εικόνα 1**. Μόνο μετά την ολοκλήρωση όλων των τροποποιήσεων και της επεξεργασίας μπορεί το mRNA να εξαχθεί από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Κατά μέσο όρο, το mRNA καθυστερεί περίπου 20min για να εξέλθει από τον πυρήνα. Μόλις το mRNA εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα και μεταφράζεται. (*Cooper et al.*, 2004).



**Εικόνα 1** Στάδια ωρίμανσης του ευκαριωτικού mRNA

Ο κύκλος ζωής του ευκαρυωτικού mRNA είναι πιο παρατεταμένος από αυτόν του βακτηριακού. Η μεταγραφή στα ζωικά κύτταρα συμβαίνει με τη ίδια περίπου ταχύτητα που συμβαίνει και στα βακτήρια, δηλαδή περίπου 40 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο. Πολλά ευκαρυωτικά γονίδια είναι μεγάλα: ένα γονίδιο 10.000bp χρειάζεται περίπου 5min για να μεταγραφεί. Η μεταγραφή του mRNA δεν τερματίζεται με την αποδέσμευση του ενζύμου της RNA πολυμεράσης από το DNA, αντίθετα, το ένζυμο συνεχίζει τη μεταγραφή και μετά το τέλος του γονιδίου. Μια συντονισμένη σειρά γεγονότων δημιουργεί το 3' άκρο του mRNA με αποκοπή ενός τμήματος και προσθήκη μιας αλληλουχίας πολυ(A) στο πρόσφατα δημιουργημένο 3' άκρο.

Το ευκαρυωτικό mRNA αποτελεί μόνο ένα μικρό ποσοστό το συνολικού κυτταρικού RNA, περίπου 3% της μάζας του. Ο χρόνος ημιζωής των mRNAs στους ζυμομύκητες είναι σχετικά μικρός και κυμαίνεται από 1 έως 60min. Υπάρχει μια αξιοσημείωτη αύξηση της σταθερότητας στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς: το mRNA των ζωικών κυττάρων είναι σχετικά σταθερό, με χρόνο ημιζωής μεταξύ 1 - 24 ωρών. Οι τροποποιήσεις και στα δυο άκρα του mRNA

συνεισφέρουν σε αυτή τη σταθερότητα.

### 1.3 Αποικοδόμηση του mRNA

#### 1.3.1 Αποικοδόμηση φυσιολογικών mRNAs

Η ρύθμιση της αποικοδόμησης του mRNA αποτελεί σημαντική συνιστώσα της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, αφού η σταθερή συγκέντρωση του mRNA στο κύτταρο καθορίζεται τόσο από το ρυθμό σύνθεσης, όσο και από το ρυθμό αποικοδόμησης (Meyer et al., 2004).

Υπάρχουν τρεις κύριες τάξεις ενδοκυτταρικών ενζύμων αποικοδόμησης (ριβονουκλεάσες ή RNases): οι ενδοριβονουκλεάσες, οι 3' εξωνουκλεάσες και οι 5' εξωνουκλεάσες. Μέσα στο κύτταρο υπάρχει πληθώρα ριβονουκλεασών και αυτή η αφθονία πιθανώς ενισχύει την αποτελεσματικότητα των μονοπατιών αποικοδόμησης (Houseley and Tollervey, 2009).

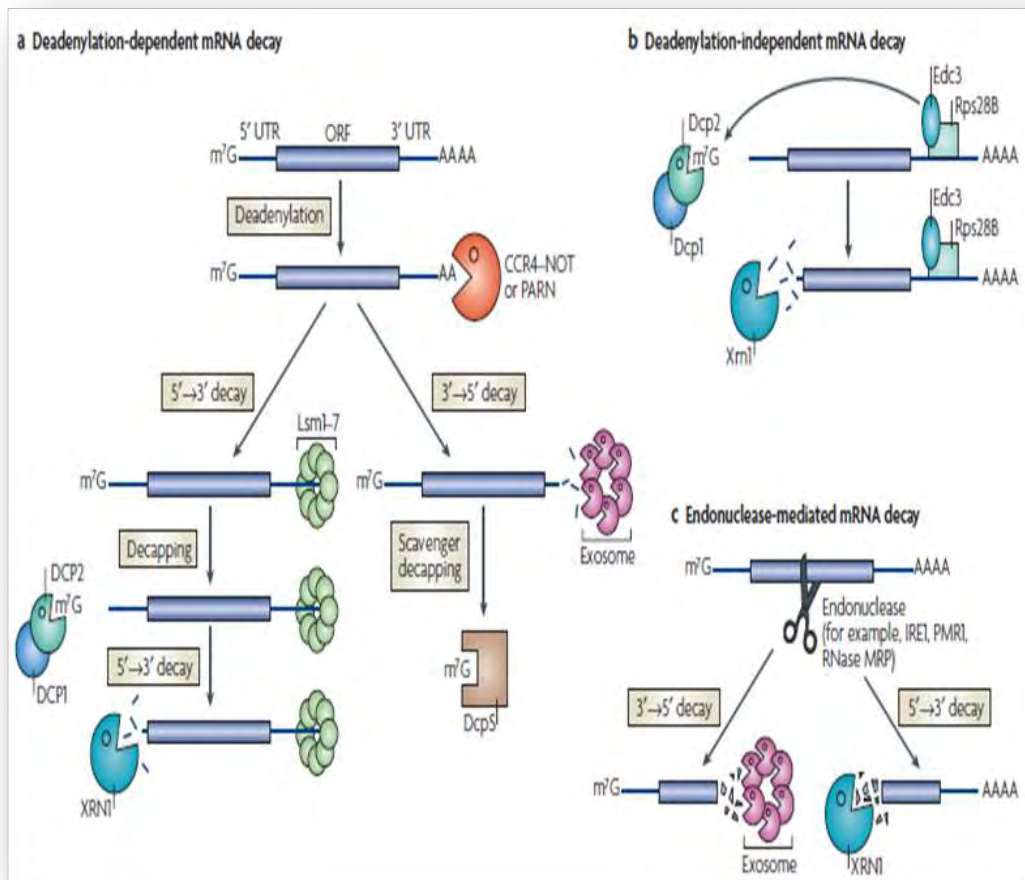
Τα ώριμα ευκαρυωτικά mRNAs φέρουν δύο καθοριστικούς παράγοντες σταθερότητας: την 5' καλύπτρα και την 3' πολυ(A) ουρά. Προκειμένου να ξεκινήσει η αποικοδόμηση θα πρέπει, είτε ένας από αυτούς τους παράγοντες να απομακρυνθεί, είτε το mRNA να υποστεί ενδονουκλεολυτική πέψη όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 2**.

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το μεγαλύτερο ποσοστό των mRNAs αποικοδομείται μέσω ενός μονοπατιού, το οποίο ξεκινά με τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς και είναι γνωστό ως *μονοπάτι αποικοδόμησης εξαρτώμενο από αποαδενυλίωση* (**Εικόνα 2a**). Στον πυρήνα, με τη διαδικασία της αποαδενυλίωσης περιορίζονται οι νεοπροστιθέμενες πολυ(A) ουρές, στο κατάλληλο μήκος, ώστε το mRNA να εξαχθεί στο κυτταρόπλασμα και να ξεκινήσει η μετάφρασή του. Αντίθετα, η εκτεταμένη αποαδενυλίωση του mRNA στο κυτταρόπλασμα πέρα από ένα συγκεκριμένο μήκος, σηματοδοτεί την αποικοδόμηση του. Η αποαδενυλίωση καταλύεται από μαγνήσιο-εξαρτώμενες εξωριβονουκλεάσες, τις αποαδενυλάσες. Ακολουθώντας την αποαδενυλίωση, δύο μηχανισμοί μπορούν να οδηγήσουν στην αποικοδόμηση του mRNA: είτε αφαίρεση της 5' καλύπτρας και αποικοδόμηση με κατεύθυνση 5'→3', είτε αποικοδόμηση 3'→5'. Στο πρώτο μονοπάτι, το σύμπλεγμα πρωτεϊνών Lsm 1-7 αλληλεπιδρά με το 3' άκρο του μεταγράφου επάγοντας την αφαίρεση της καλύπτρας μέσω του συμπλόκου DCP1-DCP2 και εκθέτοντας έτσι το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την XRN1, μια 5'→3' εξωνουκλεάση. Εναλλακτικά, το

αποαδενυλιωμένο mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών. Στην περίπτωση αυτή η καλύπτρα υδρολύεται από το ένζυμο DcpS (Garneau et al., 2007). Οι πρωτεϊνικοί παράγοντες που εμπλέκονται στο μονοπάτι αποικοδόμησης εξαρτώμενο από αποδενυλίωση, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1**.

Στην **Εικόνα 2b** φαίνεται το μονοπάτι αποικοδόμησης το οποίο είναι ανεξάρτητο από την αποαδενυλίωση στον *Saccharomyces cerevisiae*, στο οποίο απαιτείται η στρατολόγηση της πρωτεϊνικής μηχανής απομάκρυνσης του καλύμματος. Ωστόσο, η αποικοδόμηση ορισμένων μορίων mRNA μπορεί να ξεκινήσει με ενδονουκλεολυτική διάσπαση, είτε από ειδικές ενδονουκλεάσες, είτε μέσω του μηχανισμού παρεμβολής RNA (RNAi). Πρόκειται για το μονοπάτι αποικοδόμησης διαμεσολαβούμενο από ενδονουκλεάσες, στο οποίο το mRNA πέπτει εσωτερικά και προκύπτουν δύο θραύσματα με απροστάτευτα άκρα, τα οποία και αποικοδομούνται στη συνέχεια με τη δράση του εξωσώματος και της XRN1 (**Εικόνα 2c**) (Garneau et al., 2007).

Παράγοντες που εμπλέκονται στην έναρξη της μετάφρασης, την αποαδενυλίωση, την αφαίρεση της καλύπτρας, την 5'→3' εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, την ανερμηνεύσιμα διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (nonsense-mediated decay) και στην microRNA (miRNA) διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση, συνεντοπίζονται σε κοκκώδεις κυτταροπλασματικές δομές, τα P bodies, τα οποία θεωρούνται τόποι αποικοδόμησης των mRNAs.



**Εικόνα 2:** Μηχανισμοί αποικοδόμησης φυσιολογικών mRNAs (Garneau et al., 2007).

**Πίνακας 1** Παράγοντες που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του mRNA (Garneau et al., 2007).

Decay factor	Protein components	Protein domains	Functions and characteristics	Localization	Other functions
<i>Deadenylation</i>					
CCR4-NOT	Ccr4	3'→5' exonuclease	Main deadenylase in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; inhibited by PABP	Nucleus; cytoplasm; P bodies	Transcription; protein degradation
	Caf1 (Pop2)	3'→5' exonuclease			
	Caf40 (Rcd1)	Rcd1-like			
	Caf130	Not known			
	Not1	Not known			
	Not2	Not2, Not3 and Not5 share a domain of unknown function			
	Not3	Not2, Not3 and Not5 share a domain of unknown function			
	Not4	Ubiquitin ligase			
	Not5	Not2, Not3 and Not5 share a domain of unknown function			
PAN2-PAN3	PAN2	WD40 repeat	Involved in first phase of poly(A) shortening	Nucleus; cytoplasm	Not known
	PAN3	3'→5' exonuclease			
PARN	PARN	3'→5' exonuclease	Cap-dependent deadenylase activity; inhibited by PABP and nuclear cap-binding complex	Nucleus; cytoplasm	Translation inhibition
<i>5'→3' decay</i>					
Decapping enzyme	DCP1A, DCP1B	EVH1	Produces <sup>7mG</sup> GDP; Hedls not found in yeast	Cytoplasm; P bodies	mRNA localization
	DCP2	Nudix Mut T			
	Hedls (Ge-1)	WD40 repeat			
Dhh1 (RCK/p54, Me31B)	Dhh1	DEXD/H-box RNA helicase	Required for decapping	Cytoplasm; P bodies	Translational repression
Edc proteins	Edc1, Edc2 ( <i>S. cerevisiae</i> )	Not known	Enhance decapping	P bodies (EDC3)	Not known
	EDC3 (Lsm16)	Sm-like; YjeF_N			
Lsm complex	Lsm1-7	Sm-like	Required for decapping; heptameric	Cytoplasm; P bodies	Nuclear Lsm2-8 involved in splicing
Pat1	Pat1	Not known	Yeast specific	Cytoplasm	Translational repression
XRN1 (Sep1, Kem1)	XRN1	5'→3' exonuclease	Degrades decapped 5'-monophosphate RNA	Cytoplasm; P bodies	Microtubule polymerization
<i>3'→5' decay</i>					
Cytoplasmic exosome	RRP41 (Ski6), RRP42, RRP45 (PM-Scl75), RRP46, Mtr3, OIP2	RNase PH	RNase PH domain subunits form a six-membered ring structure; RNase PH domain has affinity for AU-rich sequences; RRP44 is not present in human exosome preparations	Nucleus; cytoplasm; evidence for cytoplasmic foci; Ski7 is exclusively cytoplasmic	Processing of small RNAs; nuclear mRNA surveillance
	CSL4 (Ski4), RRP4, RRP40	S1 RNA binding; KH RNA binding			
	RRP44 (Dis3)	PIN RNA binding; RNase II			
	Ski2	DEVH RNA helicase			
	Ski3	Tetratricopeptide repeat			
	Ski7	EF1α-like GTPase			
	Ski8	WD40 repeat			
	Scavenger-decapping enzyme	DcpS			

### 1.3.2 Αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNAs

Προκειμένου να διατηρηθεί η πιστότητα της μετάφρασης, το κύτταρο διαθέτει μηχανισμούς οι οποίοι ανιχνεύουν και αποικοδομούν ελαττωματικά μετάγραφα, προστατεύοντάς το έτσι από την παραγωγή τοξικών πρωτεϊνών. Ο έλεγχος ποιότητας και επεξεργασίας ακατάλληλων mRNA μορίων γίνεται στον πυρήνα, ενώ υπάρχουν τρία μονοπάτια εξαρτώμενα από τη μετάφραση που ανιχνεύουν ελαττωματικά σύμπλοκα mRNA και ριβονουκλεοπρωτεϊνών (mRNP) στο κυτταρόπλασμα (Garneau et al., 2007).

Στο πρώτο από αυτά, σε μια πορεία που αναφέρεται και ως μη-νοηματικά (ανερμηνεύσιμα) διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (nonsense-mediated decay, NMD) τα mRNAs που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται. Τέτοια μετάγραφα αποικοδομούνται είτε μετά από αφαίρεση του καλύμματος σε μία διαδικασία η οποία είναι ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση, είτε από επιτάχυνση της αποαδενυλίωσης και της 3'→5' αποικοδόμησης από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα (**Εικόνα 3a**) (Conti and Izaurralde, 2005). Ομοίως, σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως αποικοδόμηση μη-τερματισμού (non-stop decay, NSD), τα mRNAs στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα (**Εικόνα 3b**) (Frischmeyer et al., 2002). Τέλος, στη ζύμη έχει ανακαλυφθεί και η No-Go αποικοδόμηση (no-go decay, NGD) στην οποία παρατηρείται ακινητοποίηση του ριβοσώματος στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης λόγω σχηματισμού ειδικής δευτεροταγούς δομής στο ελαττωματικό mRNA. Ως αποτέλεσμα, πυροδοτείται η διαμεσολαβούμενη από ενδονουκλεάσες αποικοδόμηση του mRNA και η απελευθέρωση του ριβοσώματος (**Εικόνα 3c**) (Doma and Parker, 2006).

### 1.3.3 Σήματα που ρυθμίζουν την αποικοδόμηση του mRNA

Οι καθοριστές της σταθερότητας των mRNAs, βρίσκονται κυρίως στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) όπου τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα προστατεύονται από τη διάσχιση των ριβοσωμάτων κατά μήκος των mRNAs, αλλά και στην 5' UTR και στην κωδική περιοχή. Τα πιο καλά μελετημένα στοιχεία σταθερότητας των mRNAs, αποτελούν οι περιοχές που είναι πλούσιες σε AU αλληλουχίες (πενταμερές AUUUA), ή αλλιώς οι αλληλουχίες ARE. Βρίσκονται στην 3' UTR περιοχή πολλών

μεταγράφων που κωδικοποιούν κυρίως για κυτοκίνες, πρωτοογκογονίδια και μεταγραφικούς παράγοντες. Οι παράγοντες που προσδένονται σε αυτές τις αλληλουχίες έχει βρεθεί πως στρατολογούν τη μηχανή αποικοδόμησης των mRNAs, όπως μεταξύ άλλων, τις αποαδενυλάσες (PARN, CCR4-NOT), τους DCP1-2 και το εξώσωμα. Παραδείγματα τέτοιων αποσταθεροποιητικών παραγόντων, αποτελούν οι: AUF1, CUG-BP, KSRP, RHAU, TIAR, Tristetraprolin. Υπάρχουν όμως και ARE-προσδενόμενες πρωτεΐνες, όπως είναι οι ELAV πρωτεΐνες (HuR και HuD), οι οποίες σταθεροποιούν τα mRNAs είτε μέσω ανταγωνισμού με τις αποσταθεροποιητικές πρωτεΐνες για την πρόσδεση, είτε μέσω μεταφοράς των ίδιων των mRNAs από τα P-bodies στα πολυσώματα. Άλλα στοιχεία που σχετίζονται με τη σταθερότητα των mRNAs, αποτελούν οι πρωτεΐνες PUF που αναγνωρίζουν πλούσιες σε UG αλληλουχίες και επιταχύνουν την αποικοδόμηση των υποστρωμάτων τους στρατολογώντας το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (Garneau et al., 2007).

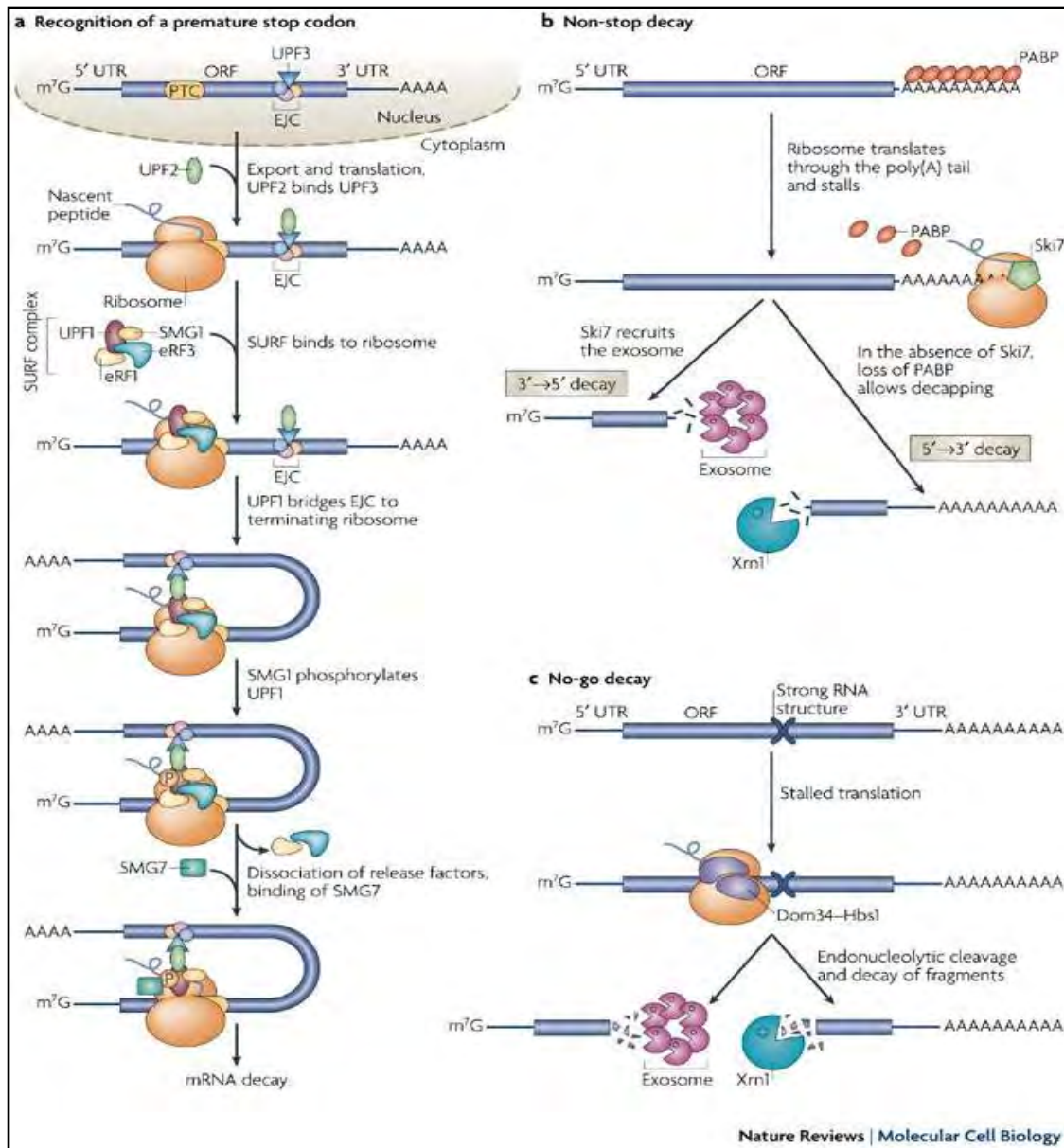
#### **1.4 Αποαδενυλάσες. Κατάταξη, βιολογικές λειτουργίες και έλεγχος δραστηριότητάς τους**

Ως αποαδενυλάσες ορίζουμε τις εξωριβονουκλεάσες που αποικοδομούν την πολύ(A) ουρά των mRNAs με κατεύθυνση 3'→5' απελευθερώνοντας 5'-AMP. Καθημερινά ο αριθμός των ταυτοποιημένων αποαδενυλασών αυξάνει ως αποτέλεσμα βιοχημικών και γενετικών ερευνών. Οι αποαδενυλάσες εκδηλώνουν μια σαφή προτίμηση για 3'- πολυ(A) ως υπόστρωμα, παρά το γεγονός πως σε ορισμένες περιπτώσεις έχει δειχθεί ότι αποικοδομούν λιγότερο αποτελεσματικά και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Όλες οι γνωστές αποαδενυλάσες είναι Mg<sup>2+</sup>-εξαρτώμενα ένζυμα που μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες υπερ-οικογένειες με βάση την παρουσία συγκεκριμένων συντηρημένων καταλοίπων στο καταλυτικό τους κέντρο. Η DEDD υπερ-οικογένεια έχει λάβει το όνομά της από τα καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu που βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ τριών μοτίβων εξωνουκλεάσης, τα οποία συντονίζουν τα ιόντα Mg<sup>2+</sup>. Μέλη αυτής της ομάδας αποτελούν η αποαδενυλάση POP2 (γνωστή και ως CAF1), η CAF1Z, η πολύ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), καθώς και οι οικογένειες των PAN2 αποαδενυλασών. Από την άλλη μεριά η υπερ-οικογένεια των εξωνουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών (*exonuclease-endonuclease-phosphatase*, *EEP*), περιλαμβάνει αποαδενυλάσες που φέρουν



συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στις δομικές περιοχές νουκλεάσης τους. Παραδείγματα EEP ενζύμων αποτελούν οι αποαδενυλάσες Nocturnin, CCR4 και Angel.



Εικόνα 3 Μονοπάτια αποικοδόμησης ελαττωματικών mRNAs (Garneau et al., 2007)

Κάθε είδος οργανισμού διαθέτει και διαφορετική γκάμα και αριθμό αποαδενυλασών. Για παράδειγμα, μέλη των οικογενειών POP2, CCR4, PAN2 και Angel είναι παρόντα σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ενώ άλλες αποαδενυλάσες είναι λιγότερο συντηρημένες (π.χ. η *Drosophila melanogaster* στερείται τόσο της PARN όσο και της CAF1Z (Goldstrohm and Wickens, 2008)).

Η τεράστια ποικιλότητα και η ποικιλομορφία των αποαδενυλασών υποδηλώνει πως πιθανότατα συγκεκριμένες αποαδενυλάσες στοχεύουν συγκεκριμένα mRNAs επιτάσσοντας τον έλεγχο τους στη δραστηριότητα ενός μόνο ενζύμου. Από την άλλη, διαφορετικές αποαδενυλάσες μπορούν να δράσουν στο ίδιο mRNA με διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες λειτουργίες.

Οι αποαδενυλάσες όπως αναφέρθηκε, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γενική διαδικασία ανακύκλωσης του mRNA. Επιτελούν όμως και αρκετούς εξειδικευμένους, ρυθμιστικούς ρόλους. Κάποιες είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των οργανισμών, ενώ μεταλλάγματα άλλων επιφέρουν μια ποικιλία ενδιαφερόντων φαινοτύπων. Επιπλέον, συγκεκριμένες αποαδενυλάσες είναι απαραίτητες για συγκεκριμένες βιολογικές διεργασίες, γεγονός που αποδεικνύει πως ο έλεγχος ορισμένων mRNAs είναι καθοριστικής σημασίας για την ομαλή λειτουργία αυτών των διεργασιών (Goldstrohm and Wickens, 2008; Parke and Song, 2004). Για παράδειγμα, αρκετές αποαδενυλάσες, συμπεριλαμβανομένων της PARN του *Xenopus laevis* και της CCF-1 του *C. elegans*, είναι σημαντικές κατά την πρόωμη ανάπτυξη, ενώ άλλες απαιτούνται για τη γονιμότητα (όπως η CNOT7 στα ποντίκια) και τη μεταβολική ομοιόσταση (ποντίκια που στερούνται της Nocturnin, λαμβάνουν λιγότερο σωματικό βάρος και λίπος σε σύγκριση με τα ποντίκια που τη διαθέτουν, κάτω από ίδιες συνθήκες διατροφής και συμπεριφοράς).

Η ρύθμιση της δραστηριότητας των αποαδενυλασών κρίνεται απαραίτητη, καθώς συνθήκες ανεξέλεγκτης αποαδενυλίωσης θα οδηγούσαν σε καταστροφή και θάνατο του κυττάρου. 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.

Ο ρυθμός της αποαδενυλίωσης ποικίλλει μεταξύ των διάφορων mRNAs. Αυτή η διαδικασία ελέγχεται από παράγοντες-ρυθμιστές οι οποίοι προσδένονται ειδικά σε συγκεκριμένες αλληλουχίες των mRNAs. Ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται συνήθως στις 3' αμετάφραστες περιοχές συγκεκριμένων mRNAs (3'-UTR) ενισχύουν την αποαδενυλίωση τους. Αυτά τα στοιχεία δεσμεύονται από παράγοντες οι οποίοι

στρατολογούν συγκεκριμένες αποαδενυλάσες προωθώντας έτσι την αποαδενυλίωση. Τέτοια παραδείγματα παραγόντων που δεσμεύονται στις 3'-UTR περιοχές μορίων mRNA αποτελούν οι CUG-BP, miRNAs, PUF και CPEB (Goldstrohm and Wickens, 2008; Kadyrova et al., 2007; Hook et al., 2007). Εναλλακτικά, προώθηση της αποαδενυλίωσης μπορεί να επιτευχθεί και μέσω αλληλεπίδρασης της PABP και συγκεκριμένων αποαδενυλασών (π.χ η PABP στρατολογεί το σύμπλοκο PAN2-PAN3). Επίσης, το 5' κάλυμμα του mRNA μπορεί να επηρεάσει θετικά την αποαδενυλίωση διεγείροντας τη δραστικότητα και την επεξεργαστικότητα κάποιων αποαδενυλασών (χαρακτηριστικότερο και μοναδικό γνωστό έως σήμερα παράδειγμα αποτελεί η PARN). Η έκφραση των αποαδενυλασών και των αντίστοιχων ρυθμιστών τους υποδεικνύει το χρόνο και τον τόπο, στον οποίο μπορεί να συμβεί ρύθμιση της αποαδενυλίωσης. Για παράδειγμα, η έκφραση της Nocturnin είναι ρυθμική και ελέγχεται από τον κirkάδιο ρυθμό, ενώ οι αποαδενυλάσες της οικογένειας των POP2 είναι ιδιοσυστατικές. Επιπροσθέτως, όταν το κύτταρο υποβάλλεται σε διάφορες μορφές stress (UV, οξείδωση, οσμωτική πίεση ή έλλειψη γλυκόζης) τότε η αποαδενυλίωση σταματά αμέσως. Ο μοριακός μηχανισμός της αναστολής παραμένει άγνωστος. Η αποαδενυλίωση επηρεάζεται επίσης από δύο μορφές χωρικού ελέγχου: τον πυρηνο-κυτταροπλασματικό διαχωρισμό των αποαδενυλασών και την εντόπισή τους σε κοκκία. Στην πρώτη περίπτωση, προβλήματα σωστού διαχωρισμού των αποαδενυλασών μεταξύ πυρήνα και κυτοσολίου μπορούν να αποβούν μοιραία για την τύχη mRNAs που δεν θα έπρεπε να αποικοδομηθούν. Από την άλλη μεριά, συγκεκριμένες αποαδενυλάσες εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά κοκκία, τα οποία περιέχουν κατεσταλμένα mRNAs, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να ενεργοποιηθούν. Ο συνεντοπισμός αυτών των αποαδενυλασών με τα υποστρώματά τους πιθανότατα διευκολύνει την κινητική της αποαδενυλίωσης (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Οι αποαδενυλάσες συνήθως αποτελούν τμήμα συμπλόκων με πολλές υπομονάδες. Οι άλλες πρωτεΐνες σε αυτά τα σύμπλοκα επηρεάζουν τη δραστικότητα των αποαδενυλασών. Για παράδειγμα, η PAN2 δεσμεύεται στην PAN3 που με τη σειρά της αλληλεπιδρά με την PABP. Η τελευταία στρατολογεί όπως αναφέρθηκε το σύμπλοκο PAN2-PAN3 στην πολυ(A) ουρά των mRNA-στόχων (Hammet et al., 2002). Άλλες αποαδενυλάσες σχηματίζουν ομοδιμερή και άλλες ετεροδιμερή. Ο ετεροδιμερισμός αυξάνει σημαντικά το ρεπερτόριο των συμπλόκων των αποαδενυλασών, καθώς διαφορετικά ετεροδιμερή έχουν και διαφορετικές ενζυμικές

και ρυθμιστικές ιδιότητες. Η δυνατότητα για έλεγχο της αποαδενυλίωσης καθίσταται τεράστια και ιδιαίτερα πολύπλοκη αν σε όλα αυτά συνυπολογίσουμε την αλληλεπίδραση των πολυάριθμων πιθανών συμπλόκων αποαδενυλασών με την τεράστια ποικιλία των ρυθμιστών τους και την αλληλεπίδραση των τελευταίων με μία εξίσου μεγάλη ποικιλία διαφορετικών ρυθμιστικών στοιχείων επί των 3'-UTR περιοχών των mRNA-στόχων (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Τα σύμπλοκα αποαδενυλασών που στρατολογούνται από ειδικούς ρυθμιστές είναι πολυλειτουργικά καθώς περιέχουν, εκτός των ενζύμων αποαδενυλίωσης, συστατικά που καταστέλλουν τη μετάφραση και συστατικά που ενισχύουν την αποικοδόμηση του mRNA. Η πολυλειτουργικότητα αυτή παρέχει ευκαιρίες για πολυάριθμα σημεία ρύθμισης της αποαδενυλίωσης, της μετάφρασης και της αποικοδόμησης των mRNAs, είτε ξεχωριστά είτε συντονισμένα (Goldstrohm and Wickens, 2008). Στον **πίνακα 2** παρουσιάζεται συνοπτικά η κατάταξη των αποαδενυλασών στις δύο υπερ-οικογένειες καθώς και ενδεικτικά παραδείγματα ενζύμων που εντοπίζονται σε αντιπροσωπευτικά είδη οργανισμών.

**Πίνακας 2** Ποικιλομορφία των αποαδενυλασών.

Group	Name	SC	CE	DM	XL	MM	HS
<b>DEDD nucleases</b>	CNOT7/Caf1a	+	+	+	+	+	+
	CNOT8/Caf1b	-	-	-	+	+	+
	PAN2	+	+	+	+	+	+
	PARN	-	+	-	+	+	+
	PARNL	?	?	?	?	?	?
<b>EPP nucleases</b>	CNOT6/CCR4a	+	+	+	+	+	+
	CNOT6L/CCR4b	-	-	-	-	+	+
	CCR4C/NOC	-	-	+	+	+	+
	2'PDE	-	+	+	+	+	+
	ANGEL 1	+	-	-	+	+	+
	ANGEL 2	?	?	?	?	?	?

SC, *S. cerevisiae*; CE, *C. Elegans*; DM, *D. Melanogaster*; XL, *X. Laevis*; MM, *M. Musculus*; HS, *H. Sapiens*  
 +, demonstrated enzymatic activity; +, predicted enzymatic activity; -, ND  
 modified from Goldstrohm and Wickens *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008; 9: 337

## 1.5 Πολυαδενυλίωση και αποαδενυλίωση στα ανθρώπινα μιτοχόνδρια

Το μιτοχόνδριο είναι ένα υποκυτταρικό οργανίδιο που απαιτείται για την παραγωγή ενέργειας, η οποία και εξασφαλίζεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι δίκλωνο, κυκλικό και κωδικοποιεί 13 διαφορετικές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS). Η μεταγραφή της βαριάς αλυσίδας του mtDNA έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μεγάλου πολυκοιστρονικού μεταγράφου που φέρει 12 πρωτεΐνες κωδικοποιούμενων γονιδίων, ενώ μόνο μία πρωτεΐνη, η ND6, μεταγράφεται από την ελαφριά αλυσίδα. Το πρωτογενές μετάγραφο της βαριάς αλυσίδας θα παράγει 12 ώριμα mRNAs. Αυτά τα mRNAs δημιουργούνται ταυτόχρονα κατά τη διάρκεια της μεταγραφής. Παρ' όλα αυτά, τα μεταγραφικά επίπεδα (steady-state level) κάθε mRNA είναι διαφορετικά (Duborjal *et al.*, 2002), αποδεικνύοντας ότι η σταθερότητα και ο χρόνος ζωής του μιτοχονδριακού mRNA ελέγχεται μετα-μεταγραφικά. Ο μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου ελέγχεται ο αριθμός του αντιγράφου και η σταθερότητα κάθε mRNA δεν είναι πλήρως κατανοητός.

Η πολυαδενυλίωση του mRNA παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της σταθερότητας του. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η πολυαδενυλίωση προσδίδει σταθερότητα στο mRNA, προάγει την έναρξη της μετάφρασης και παίζει ρόλο στη μεταφορά των mRNAs από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Beelman and Parker, 1995; Chekanova and Belostotsky, 2003; Sachs *et al.*, 1997; Shatkin and Manley, 2000). Αντίθετα, στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και στους χλωροπλάστες, η πολυαδενυλίωση αποτελεί σήμα για την καταστροφή του mRNA (Carpousis *et al.*, 1999; Hajnsdorf *et al.*, 1995; Kudla *et al.*, 1996; O'Hara *et al.*, 1995; Py *et al.*, 1996). Τα mRNAs των ανθρώπινων μιτοχονδρίων διαθέτουν μια μικρή πολυ-(A) ουρά η οποία δημιουργείται από την ανθρώπινη μιτοχονδριακή πολυ-(A) πολυμεράση (hmtPAP) (Nagaike *et al.*, 2005; Tomecki *et al.*, 2004). Στα ανθρώπινα μιτοχόνδρια, η πολυαδενυλίωση μέσω της hmtPAP είναι απαραίτητη για τη δημιουργία UAA κωδικονίου λήξης σε επτά mRNAs τα οποία γενετικά τα στερούνται.

Έχει παρατηρηθεί ότι η αποσιώπηση της hmtPAP μέσω του μηχανισμού RNAi, έχει ως αποτέλεσμα τη βράχυνση των πολυ-(A) ουρών και τη μείωση των μεταγραφικών επιπέδων των CO1, CO2, CO3 και ATP6 mRNAs αντίστοιχα (Nagaike *et al.*, 2005). Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι η πολυαδενυλίωση σταθεροποιεί

ένα συγκεκριμένο υποσύνολο μιτοχονδριακών mRNAs. Επίσης, η ακριβής μέτρηση του χρόνου ζωής των μιτοχονδριακών mRNAs είναι απαραίτητη ώστε να ανακαλύψουμε τον μοριακό μηχανισμό ρυθμίζοντας τη σταθερότητα των mRNAs στα μιτοχόνδρια των θηλαστικών.

### **1.5.1 Το γονίδιο ND2**

Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μία υπομονάδα της αφυδρογονάσης του NADH. Η αφυδρογονάση του NADH (complex I) είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH στο συνένζυμο Q. Χαρακτηρίζεται ως ένα από τα «ένζυμα εισόδου» της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια. Είναι το πιο μεγάλο και πιο περίπλοκο ένζυμο της ηλεκτρονιακής αλυσίδας (Berg, J et al. 2006). Στην όλη διαδικασία, το σύμπλοκο μεταφέρει τέσσερα πρωτόνια, διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης, για κάθε μόριο οξειδούμενου NADH βοηθώντας έτσι στη δημιουργία ηλεκτροχημικού δυναμικού και στην παραγωγή του ATP. Επίσης, το σύμπλοκο I μπορεί να διαδραματίζει και κάποιο ρόλο στην απόπτωση. Έχει δείχθει ότι υπάρχει μία συνεργασία μεταξύ μιτοχονδριακών λειτουργιών και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής σωματικής ανάπτυξης (Petrucci E, et al. 2009). Τέλος, μεταλλάξεις στις υπομονάδες του συμπλόκου I μπορούν να προκαλέσουν μιτοχονδριακές παθήσεις όπως είναι το σύνδρομο Leigh καθώς επίσης, υπάρχουν και κάποιες αποδείξεις ότι το σύμπλοκο I παίζει ρόλο στην αιτιολογία της ασθένειας του Parkinson εξαιτίας των ενεργών ριζών οξυγόνου (Chou AP, Li S, Fitzmaurice AG, Bronstein JM., 2010).

### **1.5.2 Το γονίδιο του Cyt b**

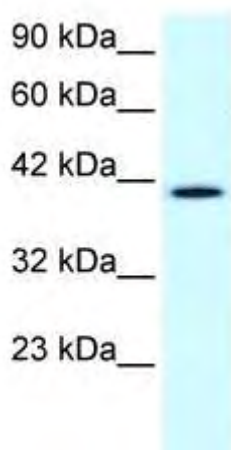
Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί το κυτόχρωμα b (Cyt b) το οποίο είναι η κύρια υπομονάδα των διαμεμβρανικών συμπλόκων του κυτοχρώματος bc<sub>1</sub> και b<sub>6f</sub>. Στα ευκαρυωτικά μιτοχόνδρια και στα μιτοχόνδρια των αερόβιων προκαρυωτικών οργανισμών, το κυτόχρωμα b είναι συστατικό του συμπλόκου III (complex III) της αναπνευστικής αλυσίδας. Το σύμπλοκο αυτό εμπλέκεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων και την παραγωγή ATP (Howell N (August 1989), Esposti MD, De Vries S, Crimi M, Ghelli A, Patarnello T, Meyer A (July 1993)). Το Cyt b είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη 400 αμινοξικών καταλοίπων και διαθέτει 8 διαμεμβρανικές περιοχές.

Τέλος, συχνά χρησιμοποιείται ως τμήμα του μιτοχondριακού DNA για την απόδειξη ύπαρξης φυλογενετικής συγγένειας μεταξύ διαφορετικών οργανισμών (Castresana, J. (2001) .

## 1.6 Η αποαδενυλάση NOCTURNIN

### 1.6.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η Nocturnin (NOC) έχει ενεργότητα αποαδενυλάσης, αφού εμπλέκεται στην διαδικασία της αποαδενυλίωσης, έχει μοριακό βάρος γύρω στα 40kDa. Πήρε το όνομά της λόγω του μεγάλου εύρους έκφρασής της τη νύχτα (nocturnal), με τη μέγιστη έκφρασή της να εκδηλώνεται 2-4 ώρες μετά την έναρξη του σκότους (C. B. Green, 2003). Η έκφραση του γονιδίου της NOC παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στα ραβδοειδή κύτταρα και στους κωνοειδείς φωτουποδοχείς του αμφιβληστροειδή χιτώνα στον *Xenopus laevis*. Με ανάλυση Western blot φάνηκε ξεκάθαρα η παρουσία της και προσδιορίστηκε το μοριακό της βάρος (εικόνα 4).



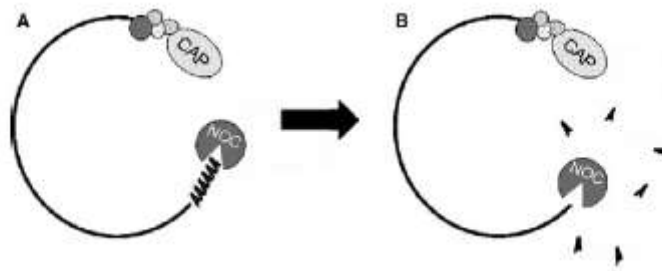
**Εικόνα 4 :** Ανάλυση Western blot για τη NOC

Συγκεκριμένα είναι μια 3'-εξωνουκλεάση που αποικοδομεί την 3'-πολυ(A) ουρά κάποιων mRNAs (Julie E. Baggs and Carla B. Green, 2003) . Η ενεργότητα

νουκλεάσης της NOC είναι εξαρτώμενη από το δισθενές κατιόν  $Mg^{2+}$ , καθώς με πείραμα μεταλλαξιγένεσης του καταλοίπου δέσμευσης  $Mg^{2+}$ , η NOC δεν παρουσίαζε πια ενεργότητα αποαδενυλάσης. Το γεγονός αυτό την κατατάσσει στην APE1 (DNA-repair apurinic/apirimidinic endonuclease) υπερικογένεια νουκλεασών (Julie E. Baggs and Carla B. Green, 2003). Έχει δειχθεί ότι η NOC έχει γενετική και αμινοξική ομοιότητα στο N-τελικό αλλά και στο C-τελικό άκρο με την αποαδενυλάση CCR4 της ζύμης, γι' αυτό και αποτελεί μία CCR4 like protein και ονομάζεται Ccrn4l (carbon catabolite repression 4 like) (Eduardo Garbarino-Pico et al., 2007).

Το N-τελικό άκρο της NOC μοιάζει αρκετά με αυτό της CCR4 λόγω της επικράτειας φερμουάρ λευκίνης που φέρει. Οι NOC και CCR4 μοιράζονται όμοιο μηχανισμό κατάλυσης, όμως οι ενεργότητες αποαδενυλάσης που έχουν, διαφέρουν. Στον άνθρωπο, το σύμπλοκο CCR4-NOT αποτελεί ένα ετερογενές και πολυλειτουργικό σύμπλοκο αποαδενυλίωσης που περιλαμβάνει πρωτεϊνικές υπομονάδες -όπως και την CCR4- οι οποίες εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στη μεταγραφή και αποικοδόμηση του mRNA, στην επιτήρηση ανώμαλων mRNAs και στη μεταγωγή (Goldstrohm and Wickens 2008). 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. Στον πυρήνα βρίσκονται συνδεδεμένες οι CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 οι οποίες είναι μεταβλητές υπομονάδες εντός του συμπλόκου. 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 CCR4 του συμπλόκου είναι η κύρια RNA αποαδενυλάση στις ζύμες αλλά τα κύτταρα των θηλαστικών απαιτούν, ακόμη και τη δραστηριότητα τόσο του συμπλόκου CNOT6/hCCR4a και του CNOT7/hCaf1a(Lau et al 2009). Η CCR4 ως υπομονάδα του συμπλόκου CCR4-NOT, αποτελεί και μεταγραφικό συνενεργοποιητή ο οποίος προσδένεται όχι απευθείας πάνω στο DNA αλλά πάνω σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες μέσω της περιοχής πλούσια σε λευκίνη και έτσι προκαλεί τη μεταγραφή γονιδίων (Eduardo Garbarino-Pico et al., 2007). Το γεγονός αυτό γενά το ερώτημα για το αν η NOC εκτός από την ενεργότητα αποαδενυλάσης που έχει, μπορεί να κατευθύνει και τη μεταγραφή γονιδίων μέσω της επικράτειας πλούσια σε λευκίνη.





Εικόνα 5: Μετά-μεταγραφική αποαδενυλίωση mRNA από την εξωριβονουκλεάση νοκτουρνίνη.

A. Η NOC προσδένεται στην πολυ(A)-ουρά και ξεκινά την αποικοδόμηση.

B. Η μείωση του μήκους πολυαδενυλίωσης μπορεί να οδηγήσει σε εναλλακτική μετάφραση και/ή σε πλήρη αποικοδόμηση του μεταγράφου (Douris and Green, 2009).

Από διάφορες μελέτες έγινε γνωστό ότι η ομοιότητα του cDNA της NOC δεν περιορίζεται στον μεταγραφικό παράγοντα CCR4 της ζύμης, αλλά και με τους παράγοντες ESTs του ποντικού αλλά και του ανθρώπου. Τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν μεγάλη συντήρηση ανάμεσα στα NOC και CCR4 ομόλογα των σπονδυλωτών, με ένα πιθανό ομόλογο στη *Drosophila* (Yunxia Wang *et al.*, 2001). Επίσης δείχθηκε ότι υπάρχει ομολογία στα cDNA της NOC ανάμεσα στον άνθρωπο, τον αρουραίο, την αγελάδα και το κοτόπουλο. Πείραμα στο οποίο ανιχνεύτηκε το mRNA της NOC με Northern στα ποντίκια, έδειξε ότι αυτό εκφράζεται σε πολλούς ιστούς, με τη μεγαλύτερη αφθονία και έκφραση στο ήπαρ, στους νεφρούς και στους όρχεις. Το mNOC επίσης εκφραζόταν σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου (υπερχιασματικός πυρήνας και επιφυσιακός αδένας). Το mNOC φάνηκε στα πειράματα αυτά ότι επιδεικνύει κιρκάδια ρυθμική έκφραση στον αμφιβληστροειδή, στον σπλήνα, στην καρδιά, στους νεφρούς και στο ήπαρ. Το γεγονός αυτό παραλληλίζεται με την ευρεία και ρυθμική έκφραση των mRNA άλλων κιρκάδιων γονιδίων, γεγονός που υποδεικνύει ότι η NOC ίσως παίζει ρόλο και ως κιρκάδιος τελεστής (Yunxia Wang *et al.*, 2001). Αυτό μπορεί να υποστηριχτεί και από το γεγονός ότι τα επίπεδα του mRNA της επιδεικνύουν κιρκάδιο ρυθμό ρυθμιζόμενο από κιρκάδιο ρολόι που υπάρχει στον αμφιβληστροειδή των σπονδυλωτών και ελέγχει πολλά στη φυσιολογία του, ελέγχοντας τους κυτταρικούς ρυθμούς για την

παραγωγή της μελατονίνης παραδείγματος χάρη. Μένει να διευκρινιστεί αν η NOC λειτουργεί ως συστατικό του κερκάδιου ρολογιού, ή ως επόμενος τελεστής σε παρακάτω μονοπάτι της λειτουργίας του κερκάδιου ρολογιού, ή ως μεταγραφικός παράγοντας μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες μέσω της επικράτειας του φερμουάρ λευκίνης. Μια υπόθεση προτείνει πως η NOC ως αποαδενυλάση μπορεί και ρυθμίζει τη διάρκεια ζωής των mRNA, οπότε και τη ρυθμική έκφρασή τους, και έτσι μπορεί να δρά ως κερκάδιος ρυθμιστής (Carla B. Green and Joseph C. Besharse, 1996).

### 1.7 Η τεχνολογία του RNA interference (RNAi)

Το RNAi αποτελεί ένα ισχυρό φαινόμενο εξειδικευμένης γονιδιακής σίγησης που πυροδοτείται από δίκλιωνα μόρια RNA. Τα πειράματα των ομάδων των Fire και Mello το 1998 στο *C. Elegans*, έδωσαν μεγάλη ώθηση σε αυτή τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως σαν πειραματικό και θεραπευτικό εργαλείο.

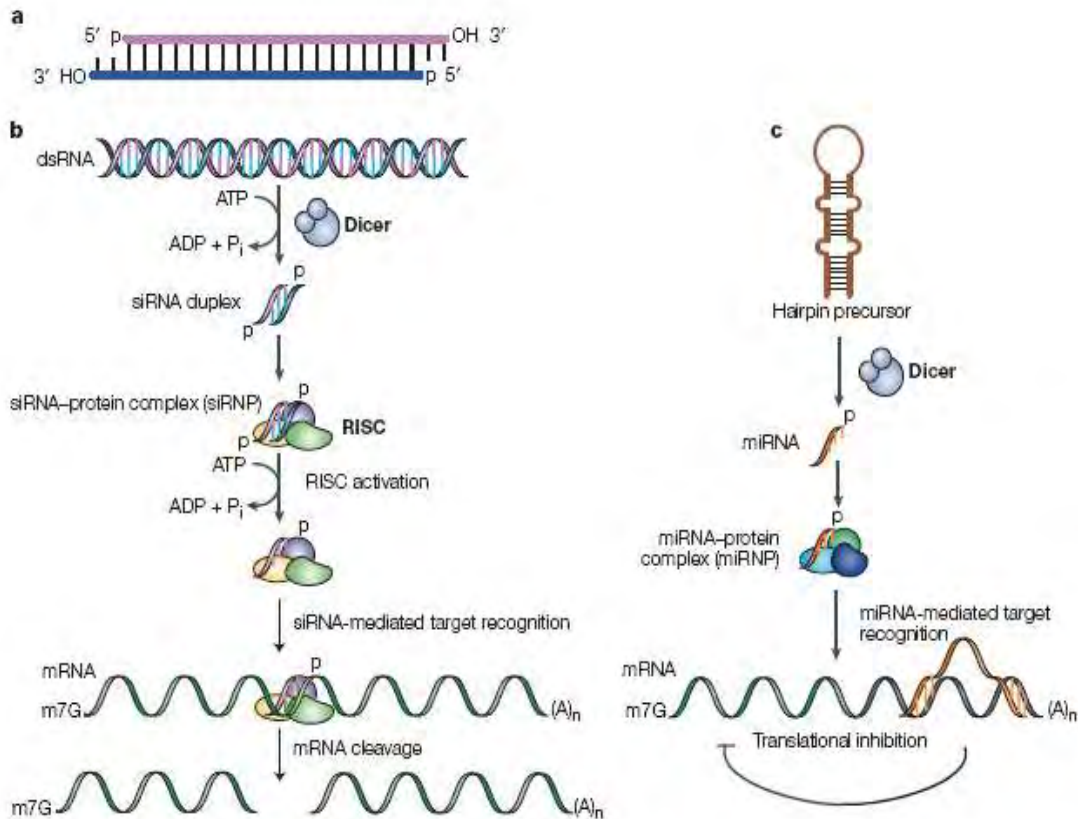
Το RNAi είναι ένα φυσικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα τόσο στα φυτά όσο και στους μύκητες και τα ζώα. Σε όλα τα ζωικά βασίλεια δίκλιωνα μόρια RNA εμπλέκονται σε αυτό το μηχανισμό. Μόλις το 2001 εφαρμόστηκε και σε κύτταρα θηλαστικών. (Fire et al., 1998; Elbashir et al., 2001).

Τα δίκλιωνα μόρια που προκαλούν τη γονιδιακή σίγηση στο RNAi, είτε παράγονται εξωγενώς από μικρά μη-μεταφραζόμενα RNAs γνωστά ως miRNAs, είτε χορηγούνται εξωγενώς στο κύτταρο και ονομάζονται μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs). Σε αντίθεση με τα miRNAs, τα siRNAs σχετίζονται με την αποσιώπηση που προκύπτει από διαγονίδια, ιούς, τρανσποζόνια και εισαγόμενα RNA και έτσι, μπορούν να θεωρηθούν ενδιάμεσα στα μονοπάτια άμυνας εναντίον ξένων νουκλεοτιδίων.

**Μονοπάτι siRNA:** Επιμήκη δίκλιωνα μόρια RNA (dsRNA) ή δίκλιωνα μόρια RNA με δομή φουρκέτας (hairpin RNA) επεξεργάζονται από το σύμπλοκο Dicer, ένα ένζυμο με δράση παρόμοια με την RNAάση III. Ως αποτέλεσμα παράγονται μικρότερα μόρια, τα siRNAs, τα οποία φέρουν μη μονόκλιωνα δινουκλεοτιδικά 3' άκρα και φωσφορυλιωμένα 5' άκρα, ενώ το μήκος τους δεν ξεπερνά τα 19 ζεύγη βάσεων. Εναλλακτικά, μπορούν να εισαχθούν στο κύτταρο έτοιμα siRNAs μήκους 19-23 νουκλεοτιδίων (αυτά παρακάμπτουν πιο εύκολα την αντίδραση ιντερφερόνης του κυττάρου συγκριτικά με τα μεγάλα δίκλιωνα μόρια RNA), τα οποία και φωσφορυλιώνονται από κυτταρικές κινάσες. Ακολουθώς τα παραγόμενα siRNAs

ενσωματώνονται στο RNA-επαγόμενο σύμπλεγμα σίγησης το RISC. Το τελευταίο καταλύει το ξετύλιγμα των δύο κλώνων των siRNAs με ένα ATP-εξαρτώμενο τρόπο και οι ξετυλιγμένοι αντινοσηματικοί (antisense) κλώνοι οδηγούν το RISC στα συμπληρωματικά mRNAs-στόχους, γεγονός που πυροδοτεί την ενδονουκλεοτιδική τμήση των mRNAs (εικόνα 6).

**Μονοπάτι miRNA:** Τα miRNAs εμπλέκονται σε μια ποικιλία φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών που περιλαμβάνουν την απόπτωση, την αιμοποίηση, την ανάπτυξη και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η έκφραση τους είναι ειδική για συγκεκριμένους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια και το προφίλ τους αλλάζει σε διάφορες ανθρώπινες ασθένειες. (Grishok et al., 2001; Ambros et al., 2003; Carrington and Ambros, 2003). Έχει εκτιμηθεί πως ο συνολικός αριθμός miRNA γονιδίων στον άνθρωπο κυμαίνεται στα 200-250. Σε αντίθεση με τα siRNAs, τα miRNAs δεν οδηγούν συνήθως σε τμήση του mRNA-στόχου αλλά σε καταστολή της μετάφρασής του. Πρόσφατα έχει δειχθεί πως ενισχύουν και την αποικοδόμηση του mRNA, ενώ ένας τρίτος λιγότερο μελετημένος μηχανισμός τα εμπλέκει στην αναδιοργάνωση της ετεροχρωματίνης (Derek et al., 2003; Lippman and Martienssen, 2004).



**Εικόνα 6:** Μονοπάτια siRNA και miRNA (Derek et al., 2003).

Τα miRNAs μεταγράφονται από την RNA pol II σε μεγάλα δίκλιωνα μόρια RNA που φέρουν δομές βρόχου και καλούνται pri-miRNAs. Αυτά κόβονται από το σύμπλεγμα Drosha και παράγονται τα pre-miRNAs (70 νουκλεοτίδια), τα οποία με τη σειρά τους εξέρχονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα όπου και αναλαμβάνει δράση η Dicer. Η τελευταία παράγει μικρά μονόκλιωνα miRNAs (των 22 νουκλεοτιδίων) τα οποία ενσωματώνονται στο σύμπλεγμα miRNP που καθοδηγείται στο mRNA-στόχο πυροδοτώντας την καταστολή της έκφρασής του (**εικόνα 6**).

## **2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Οι αποαδενυλάσες εμπλέκονται στη ρύθμιση του χρόνου ζωής των mRNAs, καταλύοντας το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμησή τους, που είναι η βράχυνση των πολυ-(A) ουρών, ρυθμίζοντας έτσι τη γονιδιακή έκφραση. Είναι επίσης γνωστό πως στα μιτοχόνδρια βρίσκονται mRNAs που φέρουν πολυ(A) ουρές. Θα μπορούσε λοιπόν να υπάρχει τουλάχιστον ένα ένζυμο που, όπως στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, που να αναγνωρίζει τις πολυ(A) ουρές και να τις αποικοδομεί. Προκαταρκτικές μελέτες *in silico* έδειξαν πως είναι πιθανό η Nocturnin να εντοπίζεται στο μιτοχόνδριο. Σκοπός της εργασίας αυτής είναι ο υποκυτταρικός εντοπισμός της Nocturnin και η διερεύνηση της πιθανότητας να βρίσκεται στα μιτοχόνδρια. Για την πειραματική προσέγγιση έγινε αποσιώπηση *in vivo* της αποαδενυλάσης NOC σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα Hep2 με τη χρήση μικρών δίκλωνων shRNA μορίων. Ακολούθησε η ανάλυση της επίδρασής της στα επίπεδα έκφρασης κάποιων μιτοχονδριακών γονιδίων, μέσω της τεχνικής RT-qPCR. Τέλος, ο υποκυτταρικός εντοπισμός του ενζύμου ελέγχθηκε και σε επίπεδο πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωση.

### **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1. ΥΛΙΚΑ**

##### **3.1.1 Χημικές ουσίες**

- Acrylamide (Sigma)
- Αιθανόλη (Merck)
- Ακετόνη (Merck)
- Αμμωνία (Merck)
- Αμπικιλίνη (Sigma)
- Antibiotic-Antimycotic (Biosera)
- APS (Ammonium Persulfate) (Sigma)
- AgNO<sub>3</sub> (Sigma)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haen)
- BCIP/NBT Alkaline Phosphatase System (KPL)
- Bioquant Protein (Merck)
- Bis-acrylamide (Sigma)
- Bromophenol Blue (Research Organics)
- BSA (Bovine Serum Albumin)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Merck)
- Coomassie Brilliant Blue (Fluka)
- Γλυκερόλη (Panreac)
- Γλυκίνη (AppliChem)
- Γλυκόζη (Sigma)
- GelRed Nuclein Acid Stain (Biotium)
- DNA marker 1 kb (GenScript)
- Fetal Bovine Serum FBS (Gibco)
- Full Range Rainbow MW Markers (Amersham)

- HCl (Merck)
- Ισοπροπανόλη (Scharlau)
- LB Broth (Scharlau)
- LB Agar (Scharlau)
- Μανιτόλη (Sigma)
- Μεθανόλη (Merck)
- MEM (Biosera)
- MOPS (Sigma)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)
- NaCl (Panreac)
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma)
- NaOH (Merck)
- Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Sigma)
- Οξικό οξύ (Merck)
- Ponceau Red (Sigma)
- Protease Inhibitors (Roche)
- PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride)
- Puromycin (Sigma)
- SDS (Sodium dodecyl sulfate) (Sigma)
- Skimmed Milk (Scharlau)
- Temed (N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine) (Research Organics)
- Tris base (Merck)
- Tween 20 (Euroclone)
- Φορμαλδεϋδη (Sigma)
- Φορμαλίνη (Sigma)

### **3.1.2 Διαλύματα**

#### **Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων**

- Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης (50x): Tris base 24,2% v/w, Οξικό οξύ 5,71% w/w, EDTA 0,05M, pH 8,6
- Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων (6x)-διάλυμα φορτώματος δειγμάτων: Bromophenol Blue 0,09%, Xylene Cyanol 0,09%, Γλυκερόλη 60%, EDTA 60mM.

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

- Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (10x)-Running buffer: Tris base 1,5%, Γλυκίνη 7,2% v/w, SDS 0,5%, pH 8,3.

#### **Διαλύματα stock για πήκτωμα ακρυλαμιδίου**

- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl 1,5M, pH 8,8
- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl 0,5M, pH 6,8
- SDS 10% v/w
- Ακρυλαμίδιο 30% v/w (ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο : 29/1) σε ddH<sub>2</sub>O
- Loading Buffer (1M Tris pH 6.8, 10% glycerol, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% bromophenol blue).

#### **Διαλύματα για το πήκτωμα ακρυλαμιδίου**

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

#### **Διαλύματα για βαφή του gel**

- Διάλυμα χρώσης Coomassie Brilliant Blue G250 0,1% w/v, οξικό οξύ 1%.
- Διάλυμα αποχρωματισμού, Οξικό οξύ 1%.



### **Διαλύματα για βαφή του gel με τη μέθοδο silver staining**

- Fixation solution : 50% Methanol, 12% Acetic Acid, 0,05% Formalin
- Washing solution: 20% Methanol
- Sensitizing sol.: 0,02% w/v sodium thiosulfate ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )
- Staining sol. (fresh) : 0,2% w/v  $\text{Ag}/\text{NO}_3$ , 0,076% Formalin
- Developing sol.: 6% w/v  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,0004% w/v  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 0,05% Formalin
- Terminating sol: 12% Acetic Acid
- Drying sol: 20% Methanol.

### **Διαλύματα για ανοσοαποτύπωση (Western blot) σε μεμβράνη PVDF**

- Ponceau Red για επιβεβαίωση της μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη PVDF: 1) 0,1% ponceau w/v σε 5% οξικό οξύ 2) 2% ponceau w/v σε 30% TCA και 30% sulfosalicylic acid.
- Transfer buffer: Tris 48mM, Γλυκίνη 39mM, SDS 1,3mM, Μεθανόλη 20%.

### **Διαλύματα για ανίχνευση σήματος σε PVDF μεμβράνη-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)
- ECL Plus : Solution A και B (Amersham)
- Developer Solution (Kodak)
- Fixer Solution (Kodak)

### **Διαλύματα για απομόνωση μιτοχονδρίων**

- Mitochondria Isolation Reagent A (R-A), Mitochondria Isolation Reagent B (R-B), Mitochondria Isolation Reagent C (R-C), PIs, PMSF (100mM).
- 0,1M Tris/MOPS pH 7,4 , 0,1M EGTA/Tris pH 7,4 , 1M Σουκρόζη, IBc (0,1M Tris/MOPS pH 7,4 , 0,1M EGTA/Tris pH 7,4 , 1M Σουκρόζη) pH 7,4.
- MSE: 1M Μανιτόλη, 1M Σουκρόζη, 0,5M EGTA, 0,5M Tris/HCl pH 7,4,  $\text{dH}_2\text{O}$ .

Εάν το εκχύλισμα των μιτοχονδρίων μας προέρχεται από ζωικό ιστό, χρησιμοποιούμε MSE αντί του IBc.

#### **Διαλύματα λύσης μιτοχονδρίων**

- 2% CHAPS σε Tris buffered saline ( TBS; 25mM Tris, 0,15M NaCl; pH 7,2).

#### **Θρεπτικά διαλύματα**

- MEM : 2 ή 10% FBS (ανάλογα με τον επιθυμητό ρυθμό ανάπτυξης , 1% Antibiotic- Antimycotic)
- Διαλύματα κρυοπροστασίας Hep2 κυττάρων : 10% DMSO, 20% FBS, MEM
- LB Broth
- LB Agar
- SOB

#### **Διαλύματα για τη διαμόλυνση Hep2 κυττάρων**

- Lipofectamine <sup>TM</sup> 2000 και Lipofectanine Plus Reagent (Invitrogen).

#### **Διαλύματα για την αποσύνδεση αντισωμάτων από PVDF μεμβράνη**

- Stripping buffer: 2-μερκαπτοαιθανόλη 100mM, 2% SDS, 62.5mM Tris-HCl pH 6.7.

#### **3.1.3 Αντισώματα**

- Anti-NOC
- Goat anti-rabbit IgG-HRP (Chemicon)

#### **3.1.4 Κυτταρικές σειρές**

- DH5a: Στέλεχος *E. coli* που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή και κλωνοποίηση πλασμιδιακού DNA. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για την αναγέννηση των πλασμιδίων που περιέχουν τα ειδικά shRNAs για τη σίγηση της NOC.

- Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα Hep2: Πρόκειται για ανθρώπινη, ετεροπλοειδή, καρκινική κυτταρική σειρά (συγκεκριμένα προέρχεται από επιδερμικό καρκίνωμα του λάρυγγα μετά από επιμόλυνση με κύτταρα HeLa). Σχηματίζουν μονόστιβες επιθηλιακές επιφάνειες στο ταπήτιο ανάπτυξης.



**Εικόνα 7:** Κύτταρα Hep2, μεγέθυνση 10x

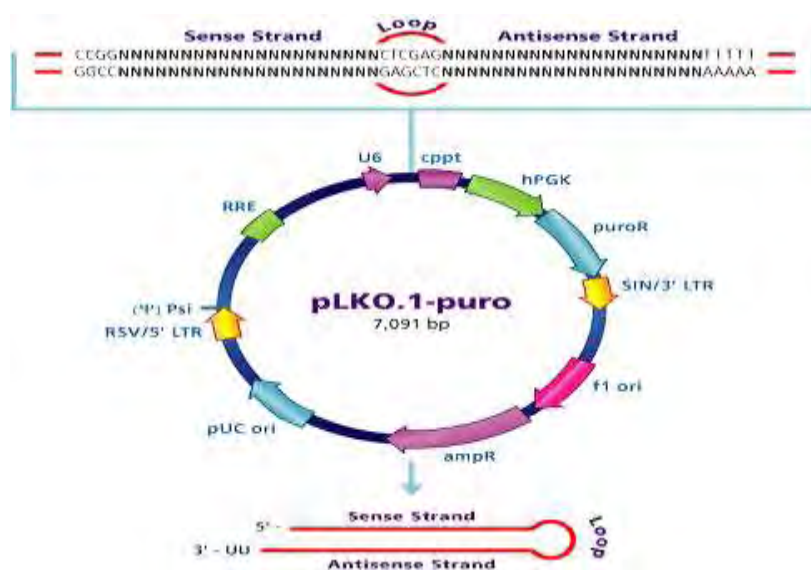
### **3.1.5 Short-Hairpin RNAs (shRNAs)**

Για την αποσιώπηση της NOC χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικά shRNAs κλωνοποιημένα στον πλασμιδιακό φορέα pLKO.1-puro (**Εικόνα 8**). Τα shRNAs και τα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου φορέα παρέχουν ένα ισχυρό μοριακό εργαλείο μακροπρόθεσμης, σταθερής αποσιώπησης του επιθυμητού γονιδίου, μέσω του συστήματος του RNAi καθώς και τη δυνατότητα αναγέννησης του πλασμιδίου μετά το μετασχηματισμό βακτηρίων με αυτό. Ο pLKO.1-puro περιέχει γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και την πουρομυκίνη για δυνατότητα επιλογής βακτηριακών και ευκαρυωτικών κυττάρων αντιστοίχως, που έλαβαν επιτυχώς το πλασμίδιο.

Ο μηχανισμός δράσης των shRNAs έγκειται στην *in vivo* μεταγραφή της κλωνοποιημένης στο φορέα αλληλουχίας του shRNA ενδοκυτταρικά και η παραγωγή μικρών δίκλωνων μορίων RNA που φέρουν μια δευτεροταγή δομή φουρκέτας. Στη συνέχεια αυτά τα δίκλιωνα μόρια επεξεργάζονται από τη Dicer και παράγουν μια ομάδα από siRNAs ειδικά για το επιθυμητό mRNA-στόχο το οποίο αποικοδομείται μέσω του συμπλόκου Argonaute που περιέχει την νουκλεάση RISC (**Εικόνα 9**).

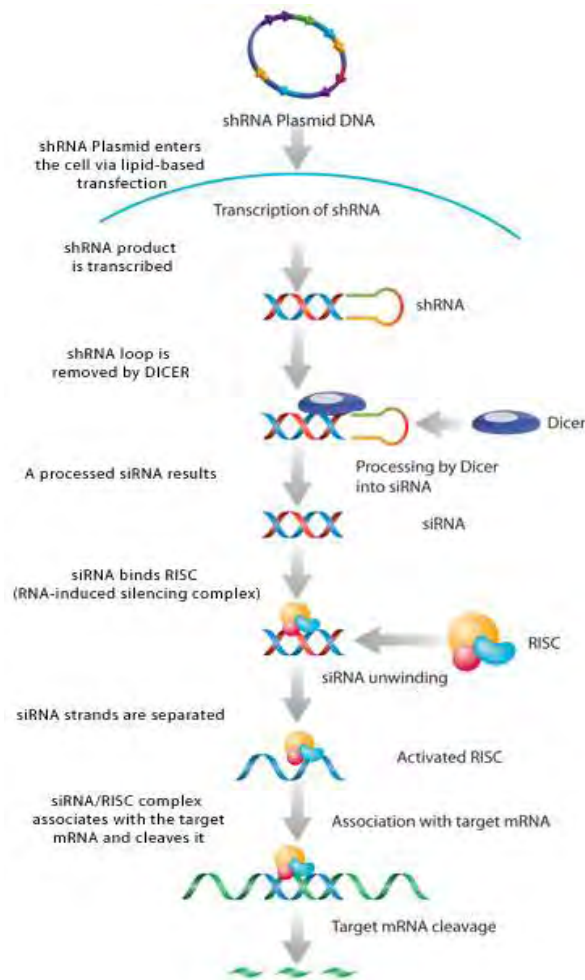
Βάσει του πρωτοκόλλου της Sigma σχεδιάστηκαν πέντε ειδικά και εξειδικευμένα shRNAs, έναντι του mRNA της ανθρώπινης NOC. Σχεδιάστηκε, μία ακόμη αλληλουχία shRNA, η οποία δεν στοχεύει κανένα γονίδιο εντός του κυττάρου

και χρησιμοποιείται ως αρνητικό control (non target shRNA control vector). Η αλληλουχία αυτή περιέχει τέσσερις αναντιστοιχίες ζευγών βάσεων, για κάθε γνωστό ανθρώπινο γονίδιο. Αυτό μας επιτρέπει να εξετάσουμε την επίδραση της διαμόλυνσης του κυττάρου με ένα shRNA, στη γονιδιακή έκφραση και να ερμηνεύσουμε συγκριτικά, την επίδραση της αποσιώπησης που επιτυγχάνεται με τη χρήση των ειδικών shRNAs. Τα siRNAs/shRNAs για να είναι αποτελεσματικά θα πρέπει να διαθέτουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 (Taxman et al., 2006).



Name	Description
cppt	Central polypurine tract
hPGK	Human phosphoglycerate kinase eukaryotic promoter
puroR	Puromycin resistance gene for mammalian selection
SIN/LTR	3' self inactivating long terminal repeat
f1 ori	f1 origin of replication
ampR	Ampicillin resistance gene for bacterial selection
pUC ori	pUC origin of replication
5' LTR	5' long terminal repeat
Psi	RNA packaging signal
RRE	Rev response element

**Εικόνα 8:** Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pLKO.1- puro της Sigma. Παρατίθεται και ένας πίνακας με σημαντικές αλληλουχίες-στοιχεία του φορέα.

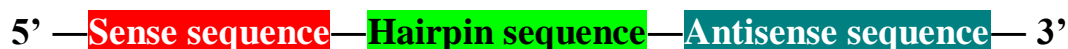


**Εικόνα 9:** Μηχανισμός αποσιώπησης μέσω πλασμιδικών φορέων που μεταγράφουν shRNAs.

**Πίνακας 3** Κριτήρια επιλογής siRNAs/ shRNAs

- ❖ Μέγεθος shRNA:  $\approx 21$ 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

Όλα τα shRNAs που σχεδιάστηκαν στοχεύουν σε διαφορετικές θέσεις κατά μήκος του mRNA της NOC και έχουν τη γενική δομή:



Πίνακας 4 Χαρακτηριστικά των σχεδιασμένων shRNAs έναντι της NOC.

Αλληλουχία θηλιάς (5'→3')	Θέση στο mRNA	Περιεχόμενο % GC	Αλληλουχία των 5 shRNAs
CTCGAG	396	31,6	CCGGGGCCTACCAGCCTGATATATTCTCGAGAATATATC AGGCTGGTAGGCCTTTTTG
CTCGAG	923	52,6	CCGGGCTCTCGATCTGCTCACTGAACTCGAGTTCAGTGA GCAGATCGAGAGCTTTTTI
CTCGAG	1713	33,3	CCGGAGCTTTACTGAGGAATCTGATCTCGAGATCAGATT CCTCAGTAAAGCTTTTTI
CTCGAG	2414	52,6	CCGGTTTAATCACAGGAGTCTATTTCTCGAGAAATAGAC TCCTGTGATTAAATTTTTG
CTCGAG	206	48,0	CCGGCCGGTACAAGCAGACTCTATACTCGAGTATAGAGT CTGCTTGTACCGGTTTTTG

### 3.1.6 Εκκινητές

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης της NOC και των υπολοίπων εξεταζόμενων παραγόντων (περιγράφονται στον Πίνακα 5) με Real Time PCR, σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος PRIMER 3 εκκινητές (primers) ειδικοί για το mRNA (για την ακρίβεια cDNA) του κάθε υπό μελέτη παράγοντα. Ο κάθε εκκινητής ελέγχθηκε ως προς την εξειδίκευση του για το αντίστοιχο cDNA-στόχο με Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

**Πίνακας 5** Συνοπτική παρουσίαση των επιλεγμένων παραγόντων, των οποίων τα επίπεδα εξετάστηκαν μετά την αποσιώπηση της NOC (παρατίθενται και οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση της RT-PCR καθώς και τα αναμενόμενα μεγέθη των ενισχυμένων προϊόντων).

<b>ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ</b>	<b>ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ</b>	<b>Primers (5' → 3')- Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR (bp)</b>
<b>NOCTURNIN</b>  (CCR4 carbon catabolite repression 4-like)	Αποαδενυλάση κατηγορίας EEP εξαρτώμενη από δισθενή κατιόντα Mg <sup>2+</sup> . Υπόκειται σε κικαδίο έλεγχου(Aaron C. Goldstrohm and Marvin Wickens).	Fwd GCCAAGACACTGAACAGCAG  Rev GGCAATCTGTCCTCAGATCC  175bp
<b>GAPDH</b>	Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης. Ένζυμο γύρω στα 37kDa, καταλύει το έκτο βήμα της γλυκόλυσης, δηλαδή τη μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης σε 1,3-φωσφορική γλυκεραλδεύδη  ( <a href="http://ncbi.nlm.nih.gov/">http://ncbi.nlm.nih.gov/</a> ).	Fwd GTCTTCACCACCATGGAGAAGG  Rev ATGATCTTGAGGCTGTTGTCAT  140bp
<b>ND2</b>	Αφυδρογονάση του NADH. Ανήκει στο σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας, το οποίο μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADH στην αναπνευστική αλυσίδα. Ο ενδιάμεσος αποδέκτης ηλεκτρονίων πιστεύεται ότι είναι η ουβικινόνη (Chen J, Gusdon AM, Mathews CE).	Fwd TACGCCTAATCTACTCCACCTC  Rev GGAGATAGGTAGGAGTAGCGTG  140bp
<b>CytB</b>	Η κύρια υπομονάδα των διαμεμβρανικών συμπλόκων κυτοχρώματος b6f και bc1 και αποτελεί μέρος του συμπλέγματος III (complex III) της αναπνευστικής αλυσίδας. Εμπλέκεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων και στη δημιουργία του ATP, το οποίο παίζει ζωτικό ρόλο για το κύτταρο.  ( <a href="http://ncbi.nlm.nih.gov/">http://ncbi.nlm.nih.gov/</a> ).	Fwd CTGATCCTCCAAATCACCACAG  Rev GCGCCATTGGCGTGAAGGTA  140bp

## 3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.2.1 Απόψυξη κυττάρων Hep2

1. Τα φιαλίδια (cryovials) που περιέχουν τα κύτταρα από την τράπεζα αζώτου (Liquid N<sub>2</sub>) όπου ήταν αποθηκευμένα, εμβαπτίζονται αμέσως σε υδατόλουτρο 37°C με ήπια ανάδευση.
2. Αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα γίνεται καθαρισμός του φιαλιδίου με 70% αιθανόλη εξωτερικά.
3. Ακολουθεί μεταφορά του αιωρήματος των κυττάρων σε πλαστική φλάσκα (συνήθως 25cm<sup>2</sup>) και γίνεται προσθήκη υλικού MEM με 10% ορό (FBS) .
4. Επώαση των κυττάρων στους 37°C για 4-8 ώρες μέχρι να προσκολληθούν στο ταπήτιο της φλάσκας.
5. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και η προσθήκη φρέσκου με 10% ορό καθώς το DMSO που περιέχεται στο αρχικό κρυοπροστατευτικό θρεπτικό υλικό των κυττάρων δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξή τους.

### 3.2.2 Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας - Τρυψινοποίηση

Η τρυψινοποίηση είναι απαραίτητη όταν επιθυμούμε να ανακαλλιεργήσουμε τα κύτταρα. Για να πραγματοποιήσουμε κάτι τέτοιο η πληρότητα των κυττάρων στο ταπήτιο της φλάσκας ανάπτυξης θα πρέπει να είναι 90-100%. Έτσι λοιπόν ακολουθούμε τα εξής βήματα:

1. Αρχικά παρατηρούμε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο. Ελέγχουμε και σημειώνουμε α) την μορφολογία των κυττάρων και β) την πληρότητα του ταπητίου (confluency).
2. Απομακρύνουμε (με αναρρόφηση) το υλικό της καλλιέργειας.
3. «Ξεπλένουμε» τα κύτταρα με διάλυμα PBS 1X.
4. Προσθέτουμε διάλυμα τρυψίνης - EDTA 0.05% (1ml για φιάλη 75cm<sup>2</sup>).
5. Ανακινούμε τη φιάλη έτσι ώστε το διάλυμα της θρυψίνης να καλύψει όλο το ταπήτιο. Παρατηρούμε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο.



6. Μεταφέρουμε τα κύτταρα στον επωαστήρα (κλίβανος 37°C) για περίπου 1-2 min. Παρατηρούμε το σχήμα των κυττάρων στο μικροσκόπιο.
7. Χτυπάμε ελαφρά τη φιάλη στο πλάι, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα.
8. Προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού (10ml για φιάλη 75cm<sup>2</sup>).
9. Επαναιωρούμε τα κύτταρα και τα διασπείρουμε ομοιόμορφα με πιπέτα (των 10ml).
10. Στο σημείο αυτό μπορούμε να χωρίσουμε τα κύτταρα σε δύο ή περισσότερες φλάσκες ή απλά να απομακρύνουμε τα 2/3 από την υπάρχουσα φιάσκα.

### **3.2.3 Κατάψυξη κυττάρων**

1. Τρυψινοποίηση των κυττάρων.
2. Φυγοκέντρηση των κυττάρων (1800rpm, 3 min, 4°C)
3. Προσθήκη 2 ml κρυοπροστατευτικού υλικού για T75 flask (MEM + 20% FBS+10% DMSO).
4. Μοιράζουμε από 1mL σε δύο cryovials.
6. Αργή ψύξη μέσα σε cryobox (1°C/1 min) στους -80°C.
7. Αποθήκευση σε υγρό άζωτο.

### **3.2.4 Συλλογή και λύση κυττάρων θηλαστικών**

*Συλλογή κυττάρων:*

1. Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων με αποστειρωμένο PBS 1X (3 φορές).
2. Τρυψινοποίηση των κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2. και χρήση ειδικών πλαστικών scrapers για την αποκόλληση στο σύνολό τους.
3. Ομογενοποίηση των αποκολλημένων κυττάρων με πιπετάρισμα σε PBS 1X ή MEM και μεταφορά τους σε tubes 1,5ml.
4. Φυγοκέντρηση των κυττάρων (3000rpm, 5 min, 4°C).

5. Απομάκρυνση του υπερκείμενου προσεκτικά και φύλαξη του ιζήματος στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

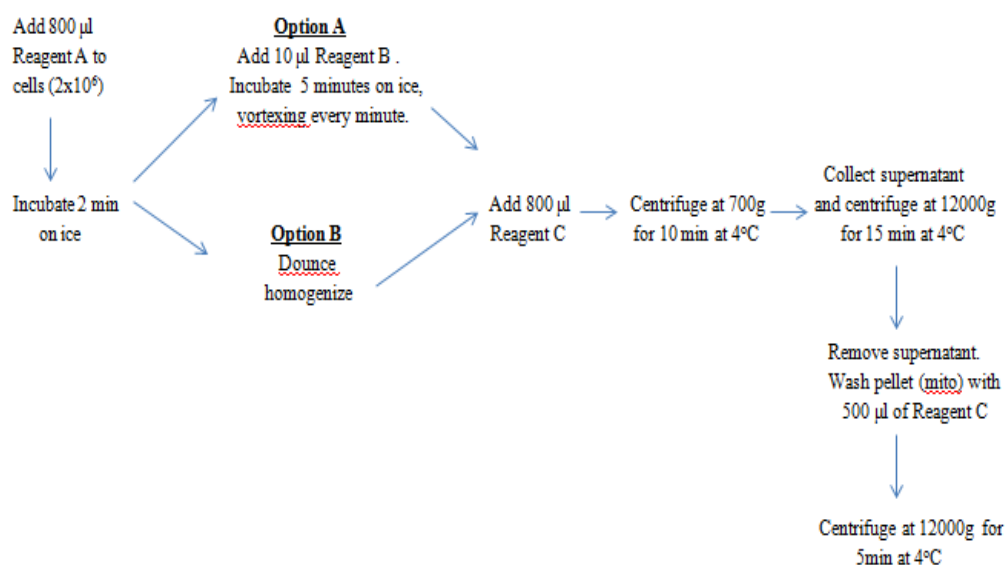
\* Τα βήματα 1-3 είναι απαραίτητα να πραγματοποιούνται σε απαγωγό καθέτου νηματικής ροής.

*Λύση κυττάρων:*

1. Επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος που συλλέξαμε και αποθηκεύσαμε σε 25μL Lysis Buffer 4X, παρουσία αναστολέων πρωτεασών.
2. Πάγωμα σε υγρό άζωτο και ακολούθως θέρμανση του δείγματος στους  $60^{\circ}\text{C}$  για 3min (επανάληψη βήματος 3 φορές).
3. Φυγοκέντρηση δείγματος σε μέγιστη ταχύτητα για 1min και συλλογή υπερκείμενου, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτες σε πρωτεϊνικό κυρίως επίπεδο.

### 3.2.5 Απομόνωση μιτοχονδρίων από καρκινική κυτταρική σειρά Hep2

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της **Εικόνας 10**:



**Εικόνα 10:** Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκε

### 3.2.6 Απομόνωση μιτοχονδρίων από κύτταρα θηλαστικών

1. Αναδιαλύουμε τα κύτταρα που διαθέτουμε σε PBS.
2. Φυγοκεντρούμε στα 600g στους 4° C για 10min.
3. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε το ίζημα σε 1-3 ml ice-cold IBc (ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων, max 120 \* 10<sup>6</sup> cells).
4. Ομογενοποιούμε στα 1600rpm, 30-40 φορές (κρατάμε δείγμα από αυτό το μίγμα καθώς πρόκειται για το total extract).
5. Φυγοκεντούμε στα 600g στους 4° C για 10 min (στο ίζημα βρίσκονται οι πυρήνες).
6. Επαναλαμβάνουμε το προηγούμενο βήμα μέχρι να μην καθιζάνει ίζημα.
7. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωλήνα erpendorf.
8. Φυγοκεντρούμε στα 7000g στους 4° C για 10 min.
9. Αποθηκεύουμε το υπερκείμενο καθώς πρόκειται για κυτταρόπλασμα.
10. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 500ml ice-cold IBc.
11. Φυγοκεντρούμε στα 600g στους 4° C για 10 min και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωλήνα erpendorf. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 10 και 11 μέχρι να μην έχουμε ίζημα. Τα μιτοχόνδρια βρίσκονται στο υπερκείμενο.
12. Φυγοκεντρούμε στα 7000g στους 4° C για 10 min.
13. Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
14. Αναδιαλύουμε το ίζημα σε 200μl ice-cold IBc.
15. Φυγοκεντρούμε στα 7000g στους 4° C για 10 min. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 13 και 15 για 3 φορές ακόμα.
16. Αναδιαλύουμε το ίζημα σε 100μl Protein Extraction Buffer.
17. Ομογενοποιούμε τα δείγματα με υπερήχους (3x 5min).
18. Φυγοκεντρούμε στα 14000g στους 4° C για 15min.
19. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωλήνα erpendorf.
20. Μετρούμε τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford στα εξής δείγματα: total, cytosol, mito.

**Εάν θέλουμε να καθαρίσουμε τα μιτοχόνδρια που μόλις λάβαμε, περισσότερο, μετά το βήμα 15 ακολουθούμε τα εξής:**














1. Ετοιμάζουμε σε ένα σωλήνα διαβάθμιση συγκέντρωσης σουκρόζης από 60-50-40-30-20% και βάζουμε ίσες ποσότητες από το καθένα για να γεμίσει ο σωλήνας μέχρι επάνω.
2. Τοποθετούμε επάνω τα αναδιαλυμένα μιτοχόνδρια.
3. Φυγοκεντρούμε στα 38000rpm στους 4° C για 30min.
4. Γνωρίζουμε ότι τα μιτοχόνδρια θα σχηματίσουν μια ζώνη μεταξύ των συγκεντρώσεων 50-4%. Απορρίπτουμε την υγρή επάνω φάση.
5. Μεταφέρουμε τα μιτοχόνδρια σε falcon των 50ml (ή γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρου).
6. Αραιώνουμε σε μεγάλο όγκο ice-cold IBc.
7. Φυγοκεντρούμε στα 11000rpm στους 4° C για 20min.
8. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε το ίζημα (περιέχει καθαρά μιτοχόνδρια) σε 1ml ice-cold IBc.
9. Φυγοκεντρούμε στα 11000rpm στους 4° C για 20min.
10. Τέλος, αναδιαλύουμε το ίζημα σε buffer ανάλογα με την επακόλουθη χρήση τους και το αποθηκεύουμε στους -20° C.

### **3.2.7 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών**

Για την απομόνωση ολικού RNA από τα επεξεργασμένα και μη (controls) με shRNAs κύτταρα που συλλέχθηκαν με το πρωτόκολλο της παραγράφου 3.2.4, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό Total RNA Isolation kit Nucleospin RNA II της Macherey Nagel. Η διαδικασία απομόνωσης είναι βασισμένη στην μέθοδο των Chomczynski και Sacchi στην οποία χρησιμοποιείται στο αρχικό στάδιο της ομογενοποίησης ιστού και εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων σε όξινο φαινολικό διάλυμα θειοκυανικής γουανιδίνης. Συνοπτικά, η διαδικασία φαίνεται στην **εικόνα 11**. Αρχικά περίπου 30 mg από κάθε δείγμα ομογενοποιούνται με την προσθήκη 350  $\mu$ L διαλύματος RA1 παρουσία 3.5  $\mu$ L  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλης. Το ομογενοποίημα τοποθετείται σε ειδικές στήλες οι οποίες επιτρέπουν το φιλτράρισμα του δείγματος

μετά από φυγοκέντρηση στις 11000 x g για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διηθημένο μίγμα μεταφέρεται σε νέους αποστειρωμένους σωλήνες erpendorf, στο οποίο προστίθενται 0.350 ml αιθανόλης 70%. Ακολουθεί δέσμευση του ολικού RNA σε μικρές στήλες χρωματογραφίας και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8000 x g για 30 sec σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απομάκρυνση τυχόν αλάτων με ειδικό διάλυμα (Membrane Desalting Buffer, MDB) και επώαση του δείγματος παρουσία DNAάσης I , για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το βήμα αυτό εξασφαλίζει την ελάχιστη δυνατή επιμόλυνση του δείγματός μας με γονιδιωματικό DNA, γεγονός το οποίο θα επηρέαζε την τελική ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR. Ακολουθούν σταδιακές φυγοκεντρήσεις του δείγματος, κατά τις οποίες απομακρύνονται τα υποπροϊόντα της πέψης με την DNAάση I.

Τέλος, ακολουθεί έκλυση του ολικού RNA του δείγματος με H<sub>2</sub>O ελεύθερο ριβονουκλεασών (RNase-free ή DEPC-treated water). Κάθε δείγμα RNA που απομονώνεται ελέγχεται για τυχαία υδρόλυση μετά από ανάλυση τόσο σε πηκτική αгарόζης 0,8% όσο και σε πηκτική αгарόζης 1,2% παρουσία φορμαλδεΐδης και φυλάσσεται στους -80°C.

1	Supply sample		Use up to $5 \times 10^6$ cultured cells or 5 mg tissue samples
2	Lyse and homogenize cells		100 $\mu$ l RA1 2 $\mu$ l TCEP Mix
3	Add Carrier RNA		5 $\mu$ l Carrier RNA working solution Mix
4	Filtrate lysate (optional)	 	11,000 x g 30 s
5	Adjust RNA binding condition		100 $\mu$ l 70% ethanol Mix
6	Bind RNA	 	Load lysate 11,000 x g 30 s
7	Desalt silica membrane	 	100 $\mu$ l MDB 11,000 x g 30 s
8	Digest DNA		25 $\mu$ l DNase reaction mixture RT 15 min
9	Wash and dry silica membrane	 	1 <sup>st</sup> wash 100 $\mu$ l RA2 RT, 2 min 11,000 x g, 30 s 2 <sup>nd</sup> wash 400 $\mu$ l RA3 11,000 x g, 2 min 3 <sup>rd</sup> wash 200 $\mu$ l RA3 11,000 x g, 2 min
10	Elute highly pure RNA	 	10 $\mu$ l RNase-free H <sub>2</sub> O 11,000 x g 30 s

**Εικόνα 11:** Συνοπτική παρουσίαση του πρωτοκόλλου απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών.

### **3.2.8 Ηλεκτροδιάτρηση δεκτικών κυττάρων DH5a (*E.coli*) με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 (puro-amp)**

1. Ξεπαγώνουμε το θρεπτικό (SOB) και στεγνώνουμε το επιστρωμένο, με LB-άγαρ και αμπικιλίνη, τρυβλίο στους 37°C.
2. Τοποθετούμε την ειδική κυψελίδα της συσκευής ηλεκτροδιάτρησης (electroporator) στον πάγο.
3. Σε 990μl SOB προσθέτουμε 10μl 2M γλυκόζης για τη δημιουργία του διαλύματος SOC.
4. Ξεπαγώνουμε τα ηλεκτροδεκτικά βακτηριακά κύτταρα από τους -80°C.
5. Προσθέτουμε 1μl πλασμιδίου σε 40μl δεκτικών κυττάρων DH5a.
6. Ανακατεύουμε με την πιπέτα και τοποθετούμε όλη την ποσότητα στην κυψελίδα, την οποία και εφαρμόζουμε στη συσκευή.
7. Για την εκδήλωση του φαινομένου της ηλεκτροδιάτρησης, υπάρχει ένα κατώφλι της τάσης του ηλεκτρικού ρεύματος, που διαπερνά τη μεμβράνη και κυμαίνεται από 1,5-2,0 kV κατά τη διάρκεια ενός παλμού (περίπου 5msec).
8. Αμέσως μετά την εφαρμογή του παλμού, προσθέτουμε στα κύτταρα 200μl διαλύματος SOC.
9. Επιστρώνουμε 50μl στο τρυβλίο και αφήνουμε να αναπτυχθούν αποικίες O/N, 37°C.
10. 12-14h μετά, ενοφθαλμίζεται μία αποικία που επιλέγουμε σε 5ml LB broth που περιέχει αμπικιλίνη. Ακολουθεί επώαση των καλλιιεργειών για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm).

### **3.2.9 Stock γλυκερόλης**

Σε 700μl βακτηριακών κυττάρων σε υγρή καλλιέργεια, προσθέτουμε 300μl 50% αποστειρωμένης γλυκερόλης και αποθηκεύουμε στους -80°C.

### **3.2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)**

Βακτηριακά κύτταρα (συνήθως από stock γλυκερόλης) ενοφθαλμίζονται σε 3ml LB broth που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί επώαση των καλλιιεργειών για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Η ακόλουθη

διαδικασία πραγματοποιείται με βάση το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli*, NucleoSpin Plasmid:

1. *Καλλιέργεια και συλλογή των βακτηριακών κυττάρων*: Μεταφέρονται 1,5ml από την καλλιέργεια *E. coli* που αναπτύχθηκε σε ένα σωλήνα και φυγοκεντρώνονται για 30s στις 11000 x g. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται αυτό το βήμα.
2. *Λύση των κυττάρων*: Προστίθενται 250μl buffer A1 και επαναδιαλύεται το ίζημα με τη βοήθεια πιπέτας και έντονη ανάδευση στο vortex. Ακολουθεί προσθήκη 250μl buffer A2 και ανάμειξη αναποδογυρίζοντας ήπια μερικές φορές χωρίς τη χρήση του vortex. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά. Ακολούθως προστίθενται 300μl buffer A3 και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση αναποδογυρίζοντας μερικές φορές (6-8) αποφεύγοντας τη χρήση του vortex. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 11000 x g σε θερμοκρασία δωματίου.
3. *Δέσμευση του DNA*: Τοποθετείται η στήλη NucleoSpin (Plasmid QuickPure σε ένα συλλεκτικό σωλήνα (collecting tube) των 2ml στην οποία φορτώνεται το υπερκείμενο που έχει προκύψει από τη φυγοκέντρωση του προηγούμενου βήματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11000 x g και απομάκρυνση του εκλούσματος.
4. *Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης*: Επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα και προστίθενται 450μl buffer AQ (με αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στις 11000 x g όπου και επιτυγχάνεται ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης. Τέλος, πραγματοποιείται απομάκρυνση του εκλούσματος και φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα.
5. *Εκλούση του DNA*: Τοποθετείται η στήλη σε νέο σωλήνα και προστίθενται 50μl buffer AE. Στη συνέχεια, επωάζεται το δείγμα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11000 x g.

### **3.2.11 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF και Ανοσοανίχνευση**

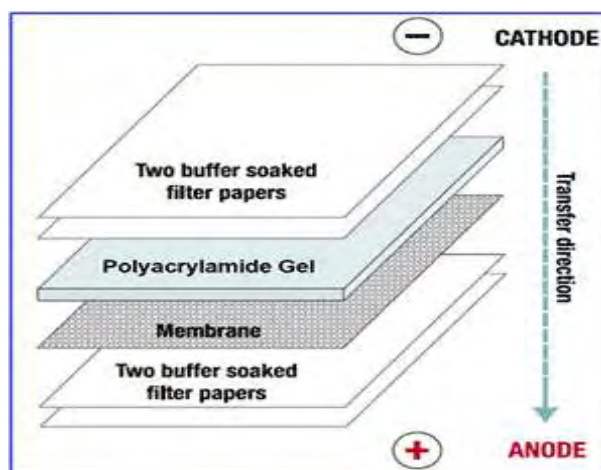
#### *Ηλεκτρομεταφορά*



Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών των υπό ανάλυση δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 7,5%, όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος.

Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF (ή νιτροκυτταρίνης) είναι γνωστή ως Western blotting. Βασίζεται στο γεγονός ότι τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-SDS που είναι αρνητικά φορτισμένα, μετακινούνται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου προς την άνοδο, εξέρχονται από την πηκτή και καθλώνονται στη μεμβράνη λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η μεμβράνη και η πηκτή μεταφέρονται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (*Transfer buffer*). Στην περίπτωση της PVDF μεμβράνης προηγείται ένα στάδιο εμβαπτίσεως της μεμβράνης σε 100% μεθανόλη πριν βυθιστεί στο διάλυμα μεταφοράς.

Η τοποθέτησή του gel και της μεμβράνης στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (χρησιμοποιήθηκε Semidry Transfer System για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας) γίνεται ανάμεσα σε δύο ζεύγη από χαρτιά Whatman με τη μεμβράνη προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και την πηκτή στον αρνητικό (**Εικόνα 12**). Η επαφή μεταξύ της πηκτής και της μεμβράνης πρέπει να είναι άμεση χωρίς την παρεμβολή φυσαλίδων που παρεμποδίζουν τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η μεταφορά των πρωτεϊνών στην συγκεκριμένη εργασία έγινε κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 400 mA για 45 min, χρόνος που μπορεί όμως να διαφέρει ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που πρόκειται να μεταφερθούν. Μπορούν να παρακολουθηθούν οι μάρτυρες που θα μεταφερθούν από την πηκτή στη μεμβράνη και να εκτιμηθεί ο κατάλληλος χρόνος για την κάθε περίπτωση. Παράλληλα μπορεί να τοποθετηθεί και δεύτερη μεμβράνη κάτω από την πρώτη, ώστε να μεταφερθούν εκεί οι πρωτεΐνες αν εφαρμοστεί μεγαλύτερος χρόνος ή μεγαλύτερη ένταση ρεύματος. Η επιβεβαίωση της μεταφοράς έγινε με βαφή της μεμβράνης με Ponceau Red.



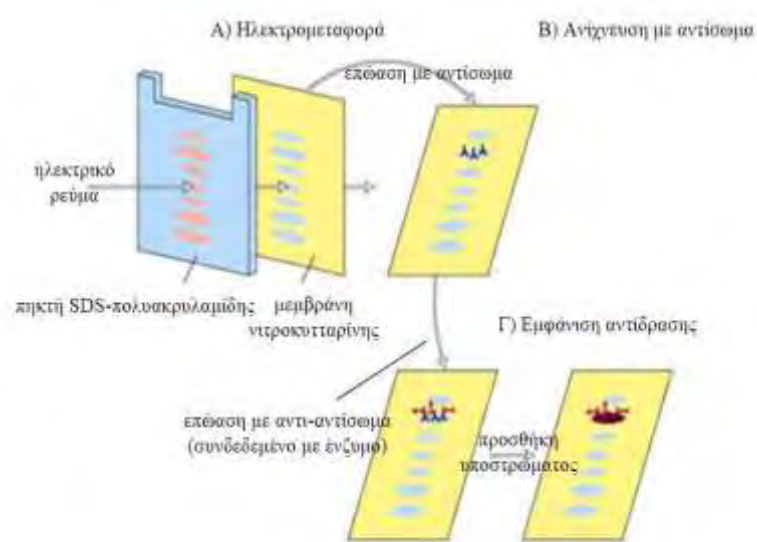
**Εικόνα 12:** Συναρμολόγηση συσκευής ηλεκτρομεταφοράς

### *Ανοσοανίχνευση*

Η ανοσοανίχνευση είναι μια τεχνική που επιτρέπει τον εντοπισμό μιας καθηλωμένης σε μεμβράνη πρωτεΐνης με τη βοήθεια αντισώματος. Η τεχνική βασίζεται στο γεγονός ότι όταν η καθηλωμένη πρωτεΐνη-αντιγόνο αλληλεπιδράσει με το αντίσωμα, μπορεί να ανιχνευτεί με τη βοήθεια ενός δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο.

Αρχικά η μεμβράνη PVDF μετά την ηλεκτρομεταφορά εμβαπτίζεται υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα σε blotto buffer ώστε να κορεστεί η μεμβράνη από την καζεΐνη του γάλακτος και να αποφευχθούν οι μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα το ειδικό για την επιθυμητή πρωτεΐνη (στην προκειμένη περίπτωση ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε rabbit anti-NOC σε αραιώση 1:500 σε blotto buffer). Κατόπιν η μεμβράνη επώάζεται με το πρώτο αντίσωμα υπό συνεχή ανακίνηση overnight στους 4°C. Ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης με PBS-T 5, 10 και 15min, αντίστοιχα, υπό ανάδευση και στη συνέχεια, επώση της μεμβράνης επίσης υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία του δεύτερου αντισώματος (φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένη υπροξειδάση) για 1 ώρα. Ως δεύτερο αντίσωμα στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε goat anti-rabbit IgG-HRP αραιωμένο 1:10.000. Της διαδικασίας εμφάνισης του σήματος προηγούνται 3 πλύσεις της μεμβράνης με PBS-T για 15min. Η ανίχνευση ειδικού σήματος στη συνέχεια οφείλεται στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας, καθώς το δεύτερο αντίσωμα που είναι ειδικό έναντι rabbit IgG ανοσοσφαιρινών, μετά την προσθήκη κατάλληλου αντιδραστήριου δίνει προϊόν που παράγει έντονο φως (συγκεκριμένα ως

αποτέλεσμα οξείδωσης της λουμινόλης από την υπεροξειδάση), το οποίο μπορεί να αποτυπωθεί σε φωτογραφικό φιλμ με τη μορφή σκοτεινής ζώνης. Η εμφάνιση γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο του συστήματος ανοσοανίχνευσης ECL Plus της Amersham.



**Εικόνα 13:** Συνοπτική παρουσίαση των διαδικασιών ηλεκτρομεταφοράς, ανοσοανίχνευσης και εμφάνισης σήματος

### 3.2.12 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με χρήση λιποσωμάτων (Lipofection)

1. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει θρυψινοποίηση μιας T75 flask στην οποία η πληρότητα σε κύτταρα είναι περίπου 90%. Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται μετά από μέτρηση σε πλάκα Neubauer, και σε αυτή τη φλάσκα ο αριθμός τους φτάνει τα  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα.
2. Σε κάθε πηγαδάκι ενός 6-well plate προσθέτουμε το 1/12 από τα παραπάνω θρυψινοποιημένα κύτταρα έτσι ώστε να έχουμε πληρότητα περίπου 90-95% την επόμενη μέρα σε κάθε well μετά από επώαση στους 37°C. Η πληρότητα αυτή ενδείκνυται για τη διαμόλυνση.
3. Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε λιποφεκταμίνη (Lipofectamine), ένα πολυκατιονικό συνθετικό λιπίδιο αναμειγμένο με φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη. Το αντιδραστήριο αυτό συνδυαζόμενο με DNA, σχηματίζει λιποσώματα που

συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων και απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους στο εσωτερικό του κυττάρου (στην περίπτωση μας μιλάμε για πλασμίδια που φέρουν shRNAs) (Felger et al., 1994). Μεταβολές των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων DNA και λιποφεκταμίνης είναι απαραίτητες για την βελτιστοποίηση της διαμόλυνσης. Επίσης, είναι αναγκαία στα πειράματα αποσιώπησης και η ύπαρξη control κυττάρων τα οποία διαμολύνονται με το Non Target shRNA control vector, όπως προαναφέρθηκε.

4. Για το σχηματισμό των λιποσωμάτων ετοιμάζουμε δύο διαλύματα: ένα DNA mix και ένα Lipo mix σύμφωνα με τους εξής κανόνες:
  - ο λόγος  $\mu\text{g DNA} / \mu\text{l χρησιμοποιούμενης Λιποφεκταμίνης} = 1/2$
  - 250 $\mu\text{l MEM} / \mu\text{g DNA}$  (για προετοιμασία του DNA mix)
  - 250 $\mu\text{l MEM} / 2 \mu\text{l λιποφεκταμίνης}$  (για την προετοιμασία του Lipo mix)
  - 0,5-4 $\mu\text{g DNA}$  απαιτούνται για τη διαμόλυνση των κυττάρων σε κάθε well ενός 6-well plate (Στη συγκεκριμένη εργασία, ως DNA θεωρούμε το μείγμα πλασμιδίων που φέρουν και τα 5 είδη shRNAs έναντι της CNOT6 ή της CNOT8 – ανάλογα με το ποια αποσιωπούμε κάθε φορά. Για την καρκινική σειρά Hep2 που χρησιμοποιούμε, η βέλτιστη ποσότητα DNA για μία επιτυχή διαμόλυνση, είναι 3 $\mu\text{g}$ ).
5. Παρασκευή του transfection mix: Αναμιγνύουμε τα DNA mix και Lipo mix και τα αφήνουμε να επωαστούν για 5-20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Παράλληλα απομακρύνουμε από κάθε well το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και ξεπλένουμε τα κύτταρα με κρύο και αποστειρωμένο PBS 1X δύο φορές. Πριν την προσθήκη του transfection mix προσθέτουμε θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά-αντιμυκητοκικά και χωρίς ορό (FBS) σε κάθε well (2ml/well).
7. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης του transfection mix, μοιράζουμε το τελευταίο στα κύτταρα που προορίζονται για διαμόλυνση και αφήνουμε το 6-well plate να επωαστεί στους 37°C.
8. Την επόμενη μέρα απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από τα διαμολυσμένα κύτταρα και το αντικαθιστούμε με MEM 10% FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic το οποίο περιέχει επιπλέον και το αντιβιοτικό επιλογής (στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πουρομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 1-10 $\mu\text{g/mL}$  θρεπτικού

υλικού. Πραγματοποιήσαμε τέντ ανθεκτικότητας των Her2 στην πουρομυκίνη και η βέλτιστη συγκέντρωση, στην οποία ψοφάει το 100% των κυττάρων που δεν φέρουν πλασμίδιο ανθεκτικότητας σε 48h μετά την αρχική έκθεση, είναι 3μg/mL).

### **3.2.14 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου δύο βημάτων (Real Time PCR two-steps)**

Η Real Time PCR είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού γονιδιακής έκφρασης. Είναι μία ιδιαίτερα ευαίσθητη και εξειδικευμένη τεχνική καθώς μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και ένα αντίγραφο ενός μεταγράφου ή ακόμα να ανιχνεύσει διαφορετικής έντασης έκφραση μεταξύ δύο δειγμάτων σε ποσοστό έως και 23%. 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 σωληνάκι ή σε δύο βήματα (two-steps) όπου η αντίστροφη μεταγραφή και η ενίσχυση του παραγόμενου cDNA πραγματοποιούνται σε διαφορετικά σωληνάκια. Η one step Real time PCR θεωρείται ότι μειώνει την πειραματική απόκλιση γιατί οι ενζυμικές αντιδράσεις συμβαίνουν στο ίδιο σωληνάκι. Ωστόσο αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί ως μήτρα το RNA, το οποίο είναι επιρρεπές σε αποικοδόμηση. Για το λόγο αυτό εφαρμόσαμε τη δεύτερη μέθοδο, Real-time PCR δύο βημάτων, ή αλλιώς RT-qPCR.

#### *Βήμα 1<sup>ο</sup>: Σύνθεση του cDNA κλώνου*

Η σύνθεση του πρώτου κλώνου του cDNA, έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της TaKaRa Bio, PrimeScript™ 1<sup>st</sup> strand cDNA synthesis. Σύμφωνα λοιπόν με το πρωτόκολλο αυτό, η αντίστροφη μεταγραφή που προέρχεται από τον ιό MMLV (Moloney Murine Leukemia virus), συνθέτει τον πρώτο κλώνο του cDNA, χρησιμοποιώντας ως μήτρα ολικό RNA ή πολυ(A)+ RNA. Το ένζυμο αυτό είναι πολύ αποτελεσματικό και μπορεί να συνθέσει ένα κλώνο μήκους έως και 12kb ακόμη και αν το RNA μήτρα, είναι πλούσιο σε αλληλουχίες GC ή δευτεροταγείς δομές. Αυτό βοηθά, στο να αποφεύγονται υψηλές θερμοκρασίες που μπορεί να προκαλέσουν την αποσύνθεση του RNA.

Ετοιμάζουμε σε ένα μικρό eppendorf τα εξής:

Αντιδραστήρια	Όγκος
Oligo dT Primer (50 $\mu$ M)*	1.0 $\mu$ l
dNTP Mixture (10 mM each)	1.0 $\mu$ l
Template RNA	(Ολικό RNA : < 5 $\mu$ g*, πολυ(A) <sup>+</sup> RNA : < 1 $\mu$ g**)
RNase free dH <sub>2</sub> O	μέχρι 10 $\mu$ l

\*Σε περίπτωση που θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε ειδικούς εκκινητές για κάποιο γονίδιο, όπως παραδείγματος χάριν το 18S rRNA που δεν έχει πολυ(A) ουρά, η τελική συγκέντρωση του εκκινητή πρέπει να είναι 2pmol.

\*\*Στην παρούσα εργασία η μήτρα RNA που χρησιμοποιούμε έχει συγκέντρωση 300ng/rxn.

5 min στους 65° C, για να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA και για την πρόσδεση των εκκινητών στο στόχο. Έπειτα μεταφέρουμε την αντίδραση απευθείας στον πάγο.

Προσθέτουμε στη συνέχεια τα αντιδραστήρια που παρουσιάζονται παρακάτω, μέχρι τον τελικό όγκο που είναι 20 $\mu$ l.

Αντιδραστήρια	Όγκος
Template RNA Primer Mixture	μέχρι 10.0 $\mu$ l
5 X PrimeScript™ Buffer	4 $\mu$ l (1X)
RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l (20 units)
PrimeScript™ RTase (200 U/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l (200 units)
RNase free dH <sub>2</sub> O	μέχρι 20.0 $\mu$ l

Αναδεύουμε και επωάζουμε το μείγμα της αντίδρασης στους 42° C για 52 min. Αυτή είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου.

Επώαση στους 70° C για 5 min, ώστε να αδρανοποιηθεί το ένζυμο.

### Βήμα 2°: Real Time PCR

Η Real Time PCR επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου σε όλη τη διάρκεια της PCR. Ύστερα από μια αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα, ακολουθεί μία εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα του προϊόντος σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Αν υπάρχουν περισσότερα μόρια-στόχοι αρχικά στο tube, θα χρειαστούν και λιγότεροι κύκλοι για να ξεκινήσει η εκθετική φάση. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την έλευση της εκθετικής φάσης σε διαφορετικές αντιδράσεις, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα στις αντιδράσεις.

Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό του προϊόντος της PCR που υπάρχει στο τέλος κάθε κύκλου, αλλά όλες βασίζονται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας ετικέτας (tag), η οποία συνδέεται σε κάθε μόριο που συντίθεται. Οι πρώτες ετικέτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το βρωμιούχο αιθίδιο και το SYBR Green I. Και τα δύο εισχωρούν στις αύλακες του δίκλωνου DNA.

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία εφαρμόσαμε την ποσοτική PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Kapa Biosystems "KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kit - Master Mix (2X) Universal". Ελέγξαμε με βάση το πρωτόκολλο αυτό, τα επίπεδα έκφρασης της NOC και των υπολοίπων επιλεγμένων παραγόντων σε κύτταρα Hep2 στα οποία εισήχθησαν αντι-NOC shRNAs, και σε κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με το Non target shRNA και χρησιμοποιούνται ως control. Οι αντιδράσεις προετοιμάστηκαν χρησιμοποιώντας τους primers του **Πίνακα 5**, ενώ ως χρωστική αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η ROX. Ως εσωτερικά control για την κανονικοποίηση του σήματος των ειδικών προϊόντων, ορίστηκαν τα ιδιοσυστατικά γονίδια της GAPDH τα οποία εμφανίζουν το ίδιο ακριβώς πρότυπο. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε cDNA, από ολικό RNA απομονωμένο από τα εξεταζόμενα δείγματα. Αναλυτικότερα, οι ποσότητες των επιμέρους αντιδραστηρίων των

αντιδράσεων και οι συνθήκες αυτών παρουσιάζονται στους **Πίνακες 6, 7** και αντίστοιχα.

**Πίνακας 6:** Συστατικά αντίδρασης qPCR

	<b>Final concentration</b>	<b>20 µl rxn</b>
<b>KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Universal</b>	1X	10.0µl
<b>Forward Primer (10 µM)</b>	200nM	0.4µl
<b>Reverse Primer (10 µM)</b>	200nM	0.4µl
<b>Template DNA</b>	(<20 ng/20 µl rxn)	Variable
<b>ROX Low</b>	50nM	0.4µl
<b>PCR grade water up to 20 µl</b>		As required

**Πίνακας 7:** Συνθήκες αντίδρασης qPCR για την ενίσχυση των επιλεγμένων παραγόντων

<b>qPCR steps</b>	<b>Cycling conditions</b>	
<b>Denaturation (Hot Start)</b>	95°C, 3min	(1 cycle)
<b>Amplification</b>	95°C, 3sec	(40 cycles)
	60°C, 30sec	
	72°C, 11sec	
<b>Dissociation</b>	95°C, 1min	(1 cycle)
	55°C, 30sec	
	95°C, 30sec	
	25°C, 3min	



## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **4.1 Χαρακτηρισμός *in silico* της Nocturnin**

Η πρωτεΐνη NOC, φέρει τη χαρακτηριστική επικράτεια της οικογένειας των ενδονουκλεασών/εξωνουκλεασών/φωσφατασών (EEP). Υπολογιστικά προγράμματα τα οποία ελέγχουν το αμινοτελικό άκρο πρωτεϊνών για την παρουσία συγκεκριμένης μιτοχονδριακής ετικέτας (mitochondrial targeting sequence- MTS), έδειξαν πως υπάρχει μεγάλη πιθανότητα ύπαρξης MTS στη NOC. Έτσι σε πρώτο επίπεδο μπορούμε να υποθέσουμε πως η NOC είναι μια αποαδενυλάση που οδηγείται και δρά στα μιτοχόνδρια. Για να αποδείξουμε αν όντως τελικά ισχύει αυτό, ακολουθεί μία σειρά *in vitro* μελετών υποκυτταρικού εντοπισμού σε δείγματα απο καρκινική κυτταρική σειρά Her2 και σε κύτταρα ποντικού.

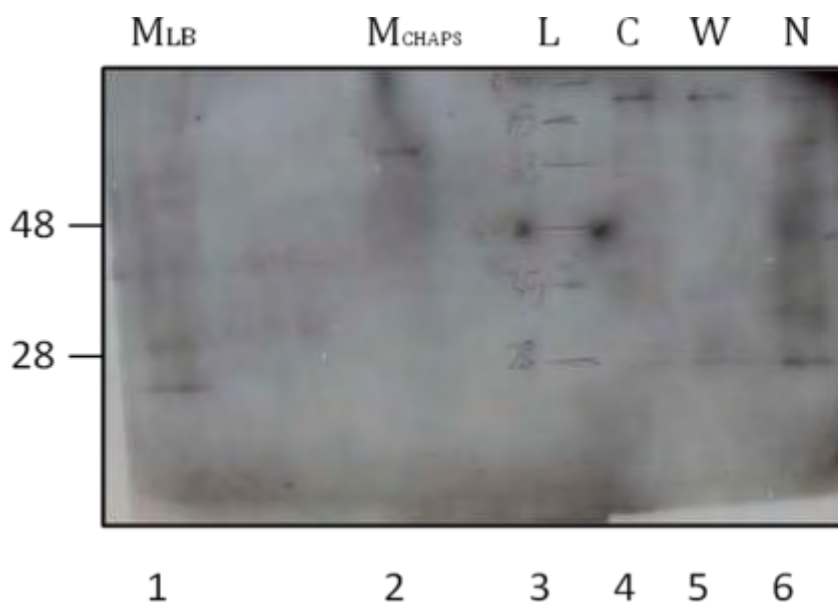
### **4.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός της NOC σε δείγματα απο καρκινική κυτταρική σειρά Her2**

Για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της NOC ήταν αναγκαία η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. Χρησιμοποιήσαμε κύτταρα Her2 τα οποία προέρχονταν από καρκινική κυτταρική σειρά. Αφού αναπτύχθηκαν στα κατάλληλα θρεπτικά μέσα, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και απομονώθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.4. Στη συνέχεια, σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης μιτοχονδρίων που περιγράφεται στην ακριβώς επόμενη παραγράφο 3.2.5, λάβαμε τα οργανίδια που μας ενδιέφεραν από τα καρκινικά κύτταρα Her2.

Κατά τη διάρκεια της απομόνωσης συλλέξαμε κλάσματα από πυρήνες, κυτταροπλάσματα, ολικό εκχύλισμα (whole lysates) και μιτοχόνδρια. Έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία τα κλάσματα αυτά λύθηκαν και οι πρωτεΐνες τους μπορούσαν να επεξεργαστούν περαιτέρω. Εν συνεχεία, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα 8,5% ακριλαμιδίου όπου και οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Το κάθε δείγμα που ηλεκτροφορήθηκε ήταν σε ποσότητα 150μg.

Έπειτα, ακολούθησε η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών απο το πήκτωμα πολυακριλαμιδίου στη μεμβράνη PVDF και η ανοσοανίχνευση όπως αναφέρεται αναλυτικά στην παράγραφο 3.2.11. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε έναντι της

πρωτεΐνης NOC ήταν σε συγκέντρωση 1:500. Το αναμενόμενο μοριακό βάρος της NOC σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, είναι γύρω στα 40kDa.

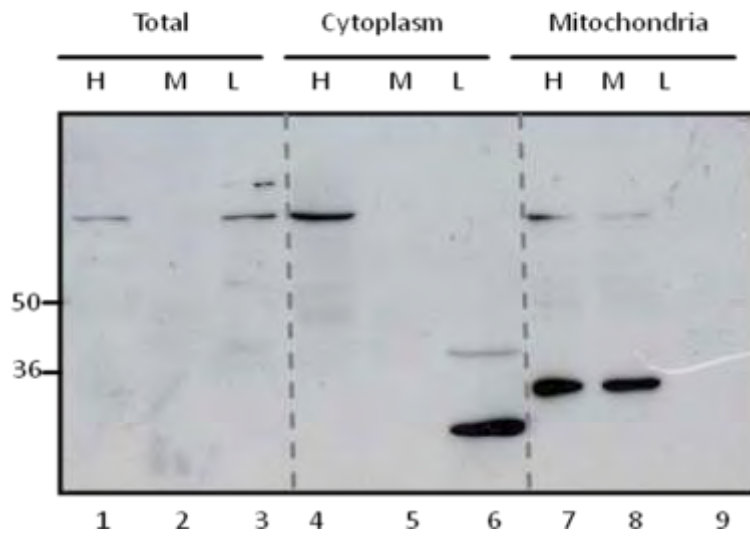


**Εικόνα 14:** Ηλεκτροφόρηση και ανοσοανίχνευση της NOC σε κύτταρα από καρκινική κυτταρική σειρά. Στην πρώτη διαδρομή είναι τα μιτοχόνδρια τα οποία έχουν λυθεί και επεξεργαστεί με loading buffer. Στη δεύτερη διαδρομή είναι κλάσμα μιτοχονδρίων που έχει επεξεργαστεί με το απορρυπαντικό chaps. Στην Τρίτη διαδρομή εμφανίζεται ο ladder με τα μοριακά βάρη. Στην τέταρτη διαδρομή κλάσμα από το κυτταρόπλασμα. Στην πέμπτη διαδρομή δείγμα από ολόκληρο λυμμένο υλικό και στην έκτη διαδρομή δείγμα από πυρήνες. Τα δείγματα έχουν ηλεκτροφορηθεί σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 8,5%. M, μιτοχόνδριο- C, κυτταρόπλασμα- W, ολικό εκχύλισμα- N, πυρήνας- LB, loading buffer.

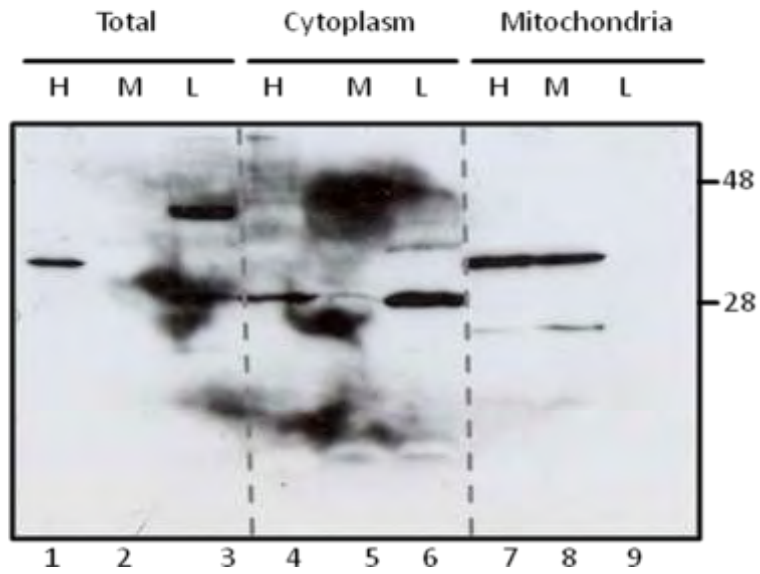
#### 4.3 Υποκυτταρικός εντοπισμός της NOC σε κύτταρα θηλαστικών (ποντίκια)

Ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς συνολική διαδικασία με τη μόνη αλλαγή στο πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση μιτοχονδρίων (παράγραφος 3.2.6). Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα 12% πολυακρυλαμιδίου και με ποσότητα 150μg πρωτεΐνης το καθένα. Σαν μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν η GAPDH (αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεριναλδεϋδης) και η COX IV (οξειδάση του κυτοχρώματος c- μιτοχονδριακός δείκτης). Έτσι, στο τέλος λάβαμε τα αποτελέσματα της Εικόνας 15:

## A Anti-hNOC, #1

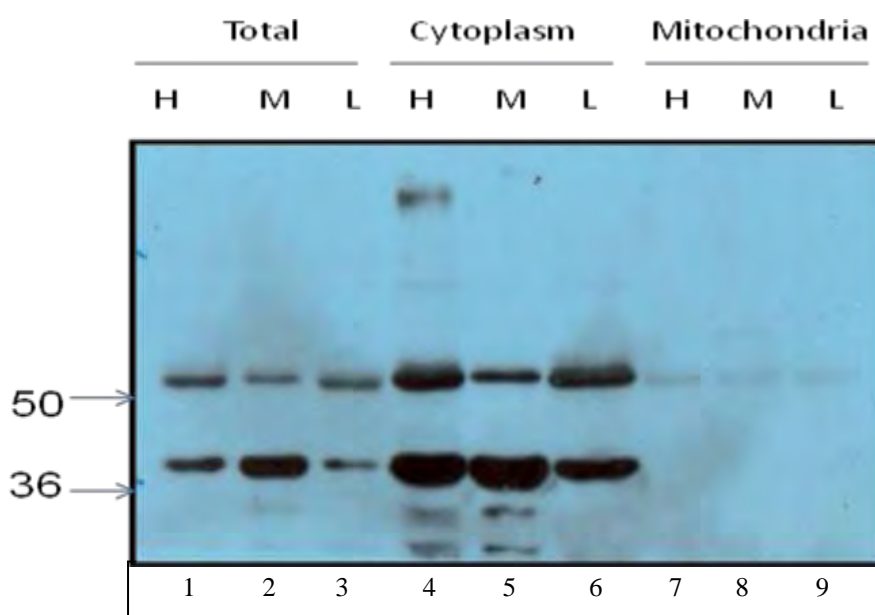


## B Anti-hNOC, #2

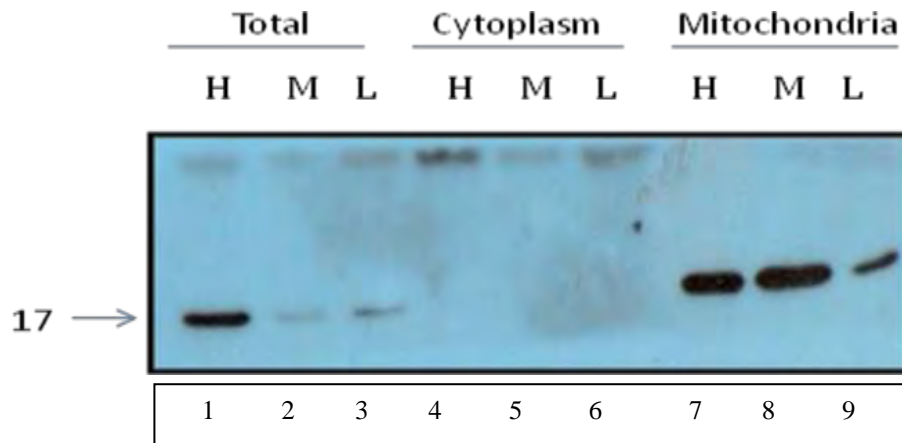


Mouse tissues. H, heart; M, muscle; L, liver. Anti-hNOC (1:500)  
12%SDS gels

**Εικόνα 15:** Ηλεκτροφόρηση και ανοσοανίχνευση της NOC σε κύτταρα από θηλαστικά (ποντίκια). Και οι δύο εικόνες 15α και 15β είναι απεικόνιση ακριβώς των ίδιων δειγμάτων με ακριβώς τα ίδια αντισώματα, αλλά σε διαφορετική χρονική στιγμή. Στη συγκεκριμένη δοκιμή έχουμε συλλέξει δείγματα από τρεις διαφορετικούς ιστούς ποντικού. Από καρδιά, μύ και ήπαρ. Όπως και στην προηγούμενη δοκιμή έχουμε συλλέξει κλάσματα από ολικό εκχύλισμα, κυτταρόπλασμα και μιτοχόνδρια. Στη πρώτη τριάδα διαδρομών έχουμε τα κλάσματα από το συνολικό, στη δεύτερη από κυτταρόπλασμα και στην τρίτη από μιτοχόνδρια. Στις διαδρομές 1,4,7 προέρχονται από τον ιστό της καρδιάς, στις διαδρομές 2,5,8 από μύ του ποντικού και τέλος στις διαδρομές 3,6,9 από ήπαρ. Τα αναμενόμενα μοριακά βάρη σύμφωνα με το ladder φαίνονται αριστερά και δεξιά των εικόνων αντίστοιχα.



#### A. Ηλεκτροφόρηση και ανοσοανίχνευση της GAPDH



## B. Ηλεκτροφόρηση και ανοσοανίχνευση της COX IV

**Εικόνα 16:** Οι δύο εικόνες A και B είναι απεικόνιση ακριβώς των ίδιων δειγμάτων με αντισώματα έναντι της GAPDH και της COX IV αντίστοιχα. Οι δύο αυτές ουσίες χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες για τις δοκιμές μας. Στη συγκεκριμένη δοκιμή έχουμε συλλέξει δείγματα από τρεις διαφορετικούς ιστούς ποντικού. Από καρδιά, μύ και ήπαρ. Όπως και στην προηγούμενη δοκιμή έχουμε συλλέξει κλάσματα από συνολικό λυμένο υλικό, κυτταρόπλασμα και μιτοχόνδρια. Στις πρώτη τριάδα διαδρομών έχουμε τα κλάσματα από το συνολικό, στη δεύτερη από κυτταρόπλασμα και στην τρίτη από μιτοχόνδρια. Στις διαδρομές 1,4,7 προέρχονται από τον ιστό της καρδιάς, στις διαδρομές 2,5,8 από μύ του ποντικού και τέλος στις διαδρομές 3,6,9 από ήπαρ. Τα αναμενόμενα μοριακά βάρη σύμφωνα με το ladder φαίνονται αριστερά και των δύο εικόνων αντίστοιχα. Η GAPDH βλέπουμε πως δεν εμφανίζεται καθόλου στα κλάσματα των μιτοχονδρίων, σε αντίθεση με την COX IV που εμφανίζεται καθώς αποτελεί έναν μιτοχονδριακό δείκτη.

### 4.4 Μελέτη της αποσιώπησης της NOC

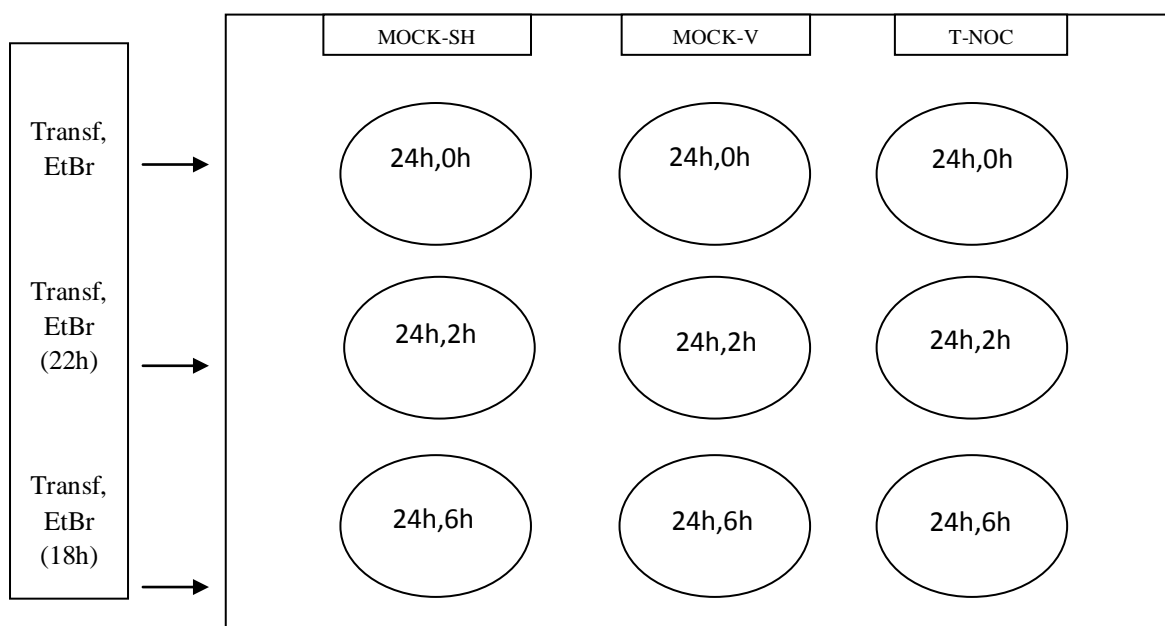
Για την αποσιώπηση της NOC διαμόλυνουμε καρκινικά κύτταρα Hep2 με πέντε διαφορετικά shRNAs ταυτόχρονα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.12. Ελέγχθηκε η αποσιώπηση της NOC 24 και 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση. Παράλληλα μελετήθηκε πως επηρεάζει η αποσιώπηση αυτή τα μεταγραφικά επίπεδα δύο μιτοχονδριακών γονιδίων (ND2 και Cyt b).

Στην παρούσα εργασία τα κύτταρα 2 και 6 ώρες αντίστοιχα πριν τη συλλογή τους εκτέθηκαν σε βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Για να ποσοτικοποιήσουμε το χρόνο ημιζωής μιτοχονδριακών mRNAs, θα πρέπει να σταματήσει η διαδικασία της μιτοχονδριακής μεταγραφής. Το EtBr εμποδίζει εκλεκτικά τη μεταγραφή κυκλικών

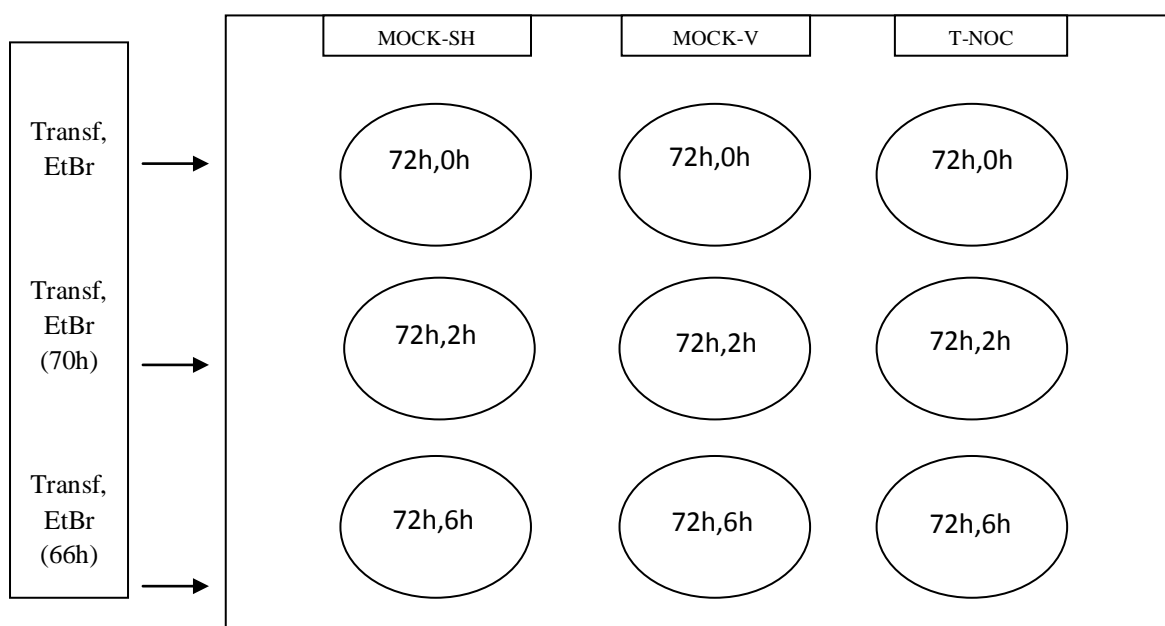
DNAs όπως είναι το μιτοχονδριακό DNA αλλάζοντας την τεταρτοταγή δομή του μορίου (Hayashi et al.,1990). Βιβλιογραφικά, είναι γνωστό πως η βέλτιστη συγκέντρωση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι τα 500 ng/ml (Nagao et al., 2008).

Η ποσοτικοποίηση έγινε με την τεχνική της RT-qPCR και ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το Non- target shRNA (mock), για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο πως οι όποιες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των επιλεγμένων παραγόντων, οφείλονται στη διαδικασία της διαμόλυνσης και μόνο. Απομονώθηκε ολικό RNA από κύτταρα τα οποία συλλέχθηκαν 24 και 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση και πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις Real Time-PCR δύο βημάτων, προκειμένου να ελέγξουμε εκτός από τα επίπεδα έκφρασης των ίδιων των αποαδενυλασών που αποσιωπούμε και τα αντίστοιχα των παραγόντων του **Πίνακα 5**. Χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες και οι συγκεντρώσεις που περιγράφονται στην παράγραφο 3.2.14 για την προετοιμασία των αντιδράσεων. Για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, για την κανονικοποίηση (normalization) των αποτελεσμάτων επιλέξαμε το γονίδιο που μεταγράφει για το 18S rRNA καθώς δεν αποτελεί στόχο των αποαδενυλασών (δεν φέρει πολυ-(A) ουρά), καθώς και το γονίδιο της GAPDH. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα γονίδια αυτά εκφράζονται ιδιοσυστατικά σε όλα τα κύτταρα, διατηρώντας σταθερά τα επίπεδά τους (housekeeping genes).

Για τα πειράματα διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν 9-well plates τα οποία είχαν την παρακάτω μορφή:

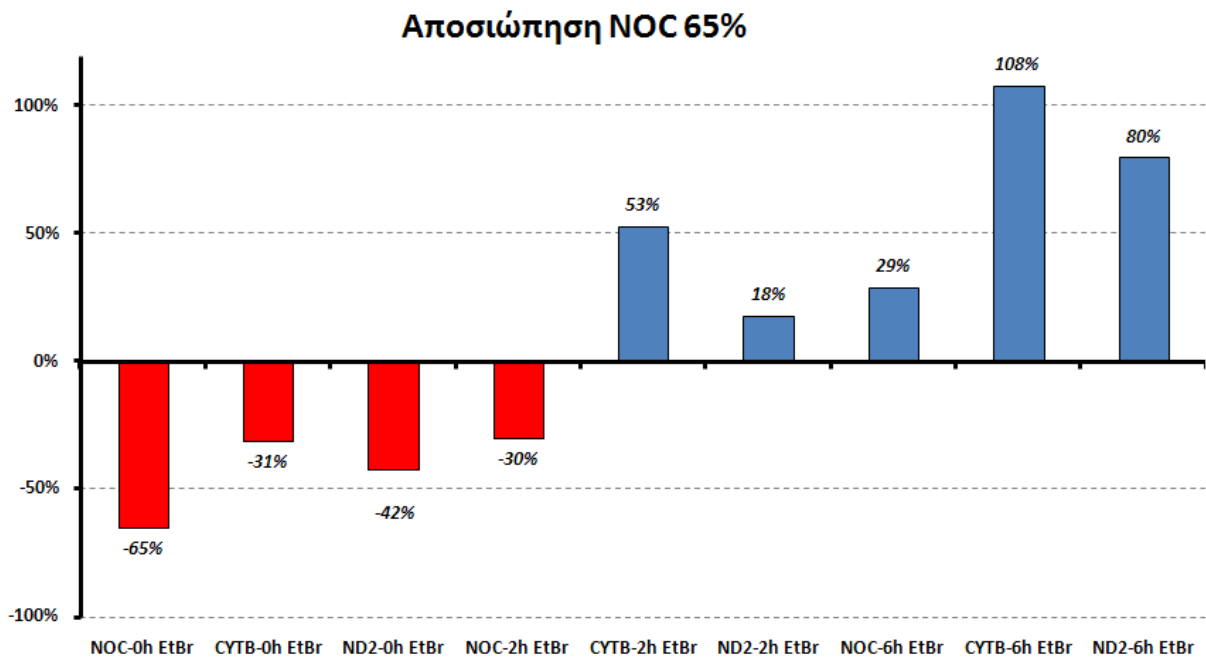


**Εικόνα 17α :** Απεικόνιση του 9-well plate για τη διαμόλυνση και συλλογή μετά από 24h



**Εικόνα 17β :** Απεικόνιση του 9-well plate για τη διαμόλυνση και συλλογή μετά από 72h

Κατόπιν επεξεργασίας και αξιολόγησης των αποτελεσμάτων της RT-qPCR, προκύπτει το συγκεντρωτικό διάγραμμα που παρουσιάζεται στην εικόνα 18.



**Εικόνα 18:** Ποσοστό μεταβολής των εξεταζόμενων mRNAs. Με μπλέ απεικονίζονται τα επίπεδα των mRNAs συγκεκριμένων γονιδίων (ND2, Cyt B, NOC) των οποίων τα επίπεδα έπειτα από την αποσιώπηση της NOC και μετά την έκθεση σε EtBr έχουν αυξηθεί, ενώ με κόκκινο εκείνα που έχουν μειωθεί. Οι αριθμοί πάνω ή κάτω από τις ράβδους δηλώνουν το ποσοστό μεταβολής σε σχέση με το μάρτυρα.



## **5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Η αφαίρεση της πολυ-(A) ουράς των ευκαρυωτικών mRNAs αποτελεί το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμησή τους. Ο αριθμός των ενζύμων που καταλύουν την αντίδραση αυτή συνεχώς αυξάνεται και ο μηχανισμός ρύθμισής τους παραμένει άγνωστος. Έτσι λοιπόν, δημιουργείται το ερώτημα ποιά η βιολογική σημασία αυτής της μεγάλης ποικιλομορφίας αποαδενυλασών; Πιθανότατα αυτό συμβαίνει για λόγους εξειδίκευσης. Οι αποαδενυλάσες μπορεί να έχουν διακριτές ή/και επικαλυπτόμενες δράσεις επί συγκεκριμένων ομάδων mRNAs καθορίζοντας την τύχη τους (Goldstrohm and Wickens, 2008)

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια ζωτικής σημασίας για το κύτταρο καθώς παρέχουν ενέργεια μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Το 16,6 kb κυκλικό ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (mtDNA) κωδικοποιεί 2 rRNAs, 22 tRNAs και 13 διαφορετικές πρωτεΐνες συστατικά των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες του μιτοχονδριακού πρωτεώματος, συμπεριλαμβανομένων και όλων των απαραίτητων παραγόντων για την έκφραση του mtDNA, κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα. Και οι δύο μιτοχονδριακές mtDNA αλυσίδες μεταγράφονται από προαγωγείς οι οποίοι βρίσκονται σε μη κωδικοποιούμενες περιοχές. Μεταγραφή της βαριάς αλυσίδας (H-strand) του mtDNA δημιουργεί ένα μεγάλο πολυκοιστρονικό μετάγραφο που φέρει 12 πρωτεΐνες κωδικοποιούμενων γονιδίων. Μόνο μία πρωτεΐνη, η ND6, μεταγράφεται από την ελαφρυνά (L-strand). Το πρωτογενές μετάγραφο της βαριάς αλυσίδας πρόκειται να παράγει 12 ώριμα mRNAs, μάλιστα τα mRNAs αυτά δημιουργούνται ταυτόχρονα κατά τη διάρκεια της μεταγραφής. Παρ'όλα αυτά, τα μεταγραφικά επίπεδα κάθε mRNA είναι διαφορετικά (Duborjal et al., 2002), ταυτοποιώντας ότι η σταθερότητα και ο χρόνος ημιζωής του mt-DNA ελέγχεται μεταμεταγραφικά. Όπως προείπαμε τα mt-mRNAs φέρουν πολυ-(A) ουρές και υπεύθυνο για τη σύνθεσή τους είναι το ένζυμο ανθρώπινη μιτοχονδριακή πολυ(A) πολυμεράση (hmtPAP). Βέβαια παρά την ύπαρξη μιας πολυ(A) πολυμεράσης στα μιτοχόνδρια, δεν έχει αναγνωριστεί με σαφήνεια κάποια αποαδενυλαση, ώστε να απομακρύνει την ουρά. Όλες οι ανθρώπινες χαρακτηρισμένες αποαδενυλάσες εντοπίζονται είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στον πυρήνα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η 2-φωσφοδιεστεράση (PDE-12) έχει

ομολογία με γνωστές RNA αποαδενυλάσες και *in silico* μελέτες προβλέπουν πως εντοπίζεται εντός των μιτοχονδρίων. Η PDE-12 είναι μία εξωριβονουκλεάση με προτίμηση στα ολιγονουκλεοτίδια αδενίνης, έτσι αφαιρεί τις πολυ-(A) ουρές από τα mRNAs *in vitro* αλλά και από μιτοχόνδρια κυττάρων από καλλιέργειες. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η αποαδενυλίωση του mt-mRNA οδηγεί στην παρεμπόδιση της μιτοχονδριακής πρωτεϊνοσύνθεσης, προτείνοντας ότι οι πολυ-(A) ουρές ρυθμίζουν τη μετάφραση στα μιτοχόνδρια (Rorbach et al., 2011).

Οι περισσότεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν εκτός από το σύμπλοκο PAN2-PAN3 και την PARN, το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (Meyer et al., 2004). Μελετώντας τη NOC που έχει ομολογία με την υπομονάδα CCR4 του συμπλόκου αυτού, ίσως μας δώσει παραπάνω στοιχεία για τη λειτουργία του συμπλόκου. Ο κεντρικός ρόλος της NOC στην αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs, καθιστά την ταυτοποίηση των πιθανών mRNAs- στόχων της ένα ερευνητικό πεδίο με πολλές προκλήσεις.

Στην παρούσα εργασία, εστιάζουμε στην *in silico* και *in vitro* μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της NOC, καθώς και στο πώς επηρεάζει τα επίπεδα των mRNAs άλλων εξεταζόμενων γονιδίων έπειτα από την αποσιώπησή της. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, της RT- qPCR και η χρήση ειδικών υπολογιστικών προγραμμάτων για την *in silico* μελέτη.

Έπειτα από επεξεργασία υπολογιστικών προγραμμάτων, βρήκαμε ότι η αποαδενυλάση Nocturnin διαθέτει συγκεκριμένη αλληλουχία στο αμινοτελικό της άκρο η οποία την κάνει ικανή να έχει δράση εντός κυτταρικών οργανιδίων και συγκεκριμένα στα μιτοχόνδρια. Τα υπολογιστικά προγράμματα εξάγουν τα αποτελέσματά τους σε πιθανότητες, για το λόγο αυτό θα έπρεπε να γίνουν περαιτέρω *in vitro* μελέτες. Συνεπώς, έπειτα από απομόνωση πυρηνικών κλασμάτων, ολόκληρου λυμμένου υλικού, κυτταροπλάσματος και μιτοχονδρίων από κύτταρα Hep2 και ποντικού, ακολούθησαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης και ανοσοανίχνευσης. Όπως βλέπουμε στις εικόνες 14 και 15 εμφανίζεται μία μόνο ζώνη, του αναμενόμενου μοριακού βάρους, στα κλάσματα των μιτοχονδρίων. Έτσι μπορούμε να επιβεβαιώσουμε πως η NOC εντοπίζεται εντός των μιτοχονδρίων. Στην εικόνα 16 βλέπουμε τους μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές μας. Όπως είναι γνωστό και από τη βιβλιογραφία η GAPDH εμφανίζεται στο ολικό εκχύλισμα και στο κυτταρόπλασμα, αλλά όχι στο δείγμα των μιτοχονδρίων. Το αντίθετο ακριβώς

παρατηρούμε για την πρωτεΐνη COX IV, η οποία υπάρχει μόνο στο κλάσμα των μιτοχονδρίων, καθώς αποτελεί έναν μιτοχονδριακό δείκτη.

Στη συνέχεια, ακολούθησαν τα πείραματα αποσιώπησης της NOC. Η επιτυχία της αποσιώπησης της NOC επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα της RT-qPCR, δείχνοντας μείωση των mRNA επιπέδων της κατά 65% σε σύγκριση πάντα με τα control (mock) κύτταρα. Η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης εξασφαλίστηκε με τη χρήση κατιονικών λιποσωμάτων για τη διαμόλυνση των κυττάρων Hep2, καθώς δεν είναι τοξικά για τα κύτταρα και παρέχουν δυνατότητα επιτυχούς εισαγωγής γενετικού υλικού, σε ποσοστό 90%. Επίσης για την επιτυχία της διαμόλυνσης κρίθηκε απαραίτητη η ταυτόχρονη χρήση και των πέντε διαθέσιμων shRNAs έναντι της NOC, τα οποία στοχεύουν σε διαφορετικές περιοχές κατά μήκος του mRNA. Τέλος, το ολικό RNA, που απομονώθηκε τόσο από τα mock όσο και από τα αποσιωπημένα για τη NOC κύτταρα, ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης για την ακεραιότητά του, ενώ πριν την χρησιμοποίησή του ως υπόστρωμα στην RT-qPCR προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή του.

Όπως προαναφέρθηκε, εκτός από τον έλεγχο της αποσιώπησης της NOC, μελετήσαμε και την επίδρασή της στα επίπεδα mRNA των μιτοχονδριακών γονιδίων ND2 και CytB. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την RT-qPCR που ακολούθησε παρατίθενται στην εικόνα 18. Όπως παρουσιάζεται, έχουμε μία επιτυχή αποσιώπηση της NOC σε ποσοστό 65%. Παρατηρούμε μία μείωση των επιπέδων mRNA του CytB της τάξης του 31% όπως και του ND2 σε ποσοστό 42%. Αν τα δύο αυτά mt-mRNA αποτελούσαν στόχους της αποαδενύλασης NOC, το πιθανότερο θα ήταν εφόσον την αποσιωπούμε τα επίπεδα τους να αυξάνονται. Κάτι τέτοιο όμως δεν παρατηρείται. Όπως είναι γνωστό, τα ανθρώπινα μιτοχονδριακά mRNAs δεν φέρουν ούτε ιντρόνια αλλά ούτε και 5' καλύπτρα. Παρ'όλα αυτά διαθέτουν 50 κατάλοιπα αδενοσίνης στο 3' άκρο τα οποία προστίθενται από τη μιτοχονδριακή πολύ(A) πολυμεράση (Tomecki et al., 2004). Αποσιώπηση όμως του ενζύμου αυτού δεν δίνει ξεκάθαρη απάντηση για το ρόλο που διαδραματίζει η επέκταση της πολύ-(A) ουράς στη σταθερότητα των mt-mRNAs, καθώς ενώ επιτελείται βράχυνση των πολύ-(A) ουρών, δεν φαίνεται να επηρεάζεται η σταθερότητά τους με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων των mRNAs (Nagao et al., 2008). Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται και σε πειράματα στα οποία η αποαδενύλαση PARN καθοδηγείται στα μιτοχόνδρια όπου και αφαιρεί ολοκληρωτικά τις πολύ-(A) ουρές των mt-mRNAs (Wydro et al., 2010). Τα επίπεδα όμως κάποιων mt-mRNAs και μεταξύ αυτών, των ND2 και CytB, εν τέλει

αυξάνονται. Ομοίως, κατά την αποαδενυλίωση από το ένζυμο PDE-12 (Slomonic et al., 2005). Υπερέκφραση της PDE-12 έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των μεταφραστικών επιπέδων παρά το γεγονός ότι τα μεταγραφικά επίπεδα των mt-mRNAs ND2 και CytB αυξάνονται. Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι η πολυαδενυλίωση συμβάλλει στη σταθερότητα ενός υποσυνόλου mt-mRNAs αλλά όχι όλων (Nagao et al., 2008). Ακόμη, έχει βρεθεί πως αποικοδόμηση των πολύ(A) ουρών των mt-mRNAs αποσταθεροποιεί ορισμένα από αυτά (όπως τα CO1 και CO2), ενώ η προσθήκη πολύ(A) επάγει την αποικοδόμηση άλλων, όπως των ND1 και ND2 (Slomonic et al., 2005; Schuster et al., 2009).

Για πιο ολοκληρωμένη διεξαγωγή αποτελεσμάτων, προσπαθήσαμε επιπλέον να αναστείλλουμε τη διαδικασία της μεταγραφής εντός των μιτοχονδρίων. Ο ιδανικότερος παράγοντας για να παρεμποδιστεί η μεταγραφή είναι το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), καθώς αλλάζει την τεταρτοταγή δομή του μιτοχονδριακού DNA. Έτσι λοιπόν τα κύτταρα 2 και 6 ώρες πριν τη συλλογή τους εκτέθηκαν σε EtBr.

Όπως προείπαμε το EtBr είναι ο ιδανικότερος παράγοντας για την παρεμπόδιση της μεταγραφής μιτοχονδριακών γονιδίων και μόνο. Έτσι η έκφραση του γονιδίου της NOC δεν επηρεάζεται από την έκθεση σε αυτόν τον παράγοντα καθώς αποτελεί πυρηνικό γονίδιο. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία πως ο καταλληλότερος παράγοντας για την παρεμπόδιση της μεταγραφής πυρηνικών γονιδίων είναι η ακτινομυκίνη D (Nagao et al., 2008). Με την δίωρη έκθεση των mRNAs της NOC, του ND2 και του CytB στο EtBr, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των mRNAs σε ποσοστό - 30% , 18% και 53% αντίστοιχα. Ακριβώς το ίδιο φαινόμενο παρατηρούμε και έπειτα από την εξάωρη έκθεση σε EtBr. Μάλιστα η αύξηση εντοπίζεται σε μεγαλύτερη κλίμακα, ενώ το αναμενόμενο θα ήταν τα επίπεδα των mRNAs του ND2 και του CytB να μειώνονταν καθώς το EtBr παρεμποδίζει τη μιτοχονδριακή μεταγραφή. Συμπερασματικά, πιθανόν με κάποιο μηχανισμό το EtBr επηρεάζει τη διαδικασία της διαμόλυνσης και της αποσιώπησης ή και αντίστροφα, δηλαδή η επίδραση του EtBr να παρεμποδίζει τη διαμόλυνση και κατ'επέκταση την αποσιώπηση. Για να αποσαφηνιστεί αυτός ο γρίφος θα πρέπει να διεξαχθούν περισσότερα πειράματα πάνω στο συγκεκριμένο θέμα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Joanna Rorbach, Thomas J.J Nicholls and Michal Minczuk. PDE-12 removes mitochondrial RNA poly(A) tails and controls translation in human mitochondria (2011).
- Asuteka Nagao, Narumi Hino-Shigi and Tsutomu Suzuki. Measuring mRNA decay in human mitochondria
- Ambros et al. A uniform system for microRNA annotation *RNA* 9: 277-279 (2003).
- Wydro, M., Bobrowicz, A., Temperley, R.J., Lightowlers, R.N. and Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. (2010) Targeting of the cytosolic poly(A) binding protein PABPC1 to mitochondria causes mitochondrial translation inhibition. *Nucleic Acids Res.*, 38, 3732–3742.
- Anderson, J.S.J. & Parker, R. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* 17: 1497–1506 (1998).
- Åström, J., Åström, A. & Virtanen, A. Properties of a HeLa cell 3' exonuclease specific for degrading poly(A) tails of mammalian mRNA. *J. Biol. Chem.* 267: 18154–18159 (1992).
- Cao, D. & Parker, R. Computational modeling and experimental analysis of nonsense-mediated decay in yeast. *Cell* 113: 533–545 (2003).
- Carrington, J.C., and Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301:336–338 (2003).
- Chen, C.Y. et al. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451–464 (2001).
- Copeland, P.R. & Wormington, M. The mechanism and regulation of deadenylation: Identification and characterization of *Xenopus* PARN. *RNA* 7: 875–886 (2001).
- Dehlin, E., Wormington, M., Körner, C.G. & Wahle, E. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.* 19: 1079–1086 (2000).

- Derek, M., Novina, C. & Sharp, P.A. Killing the messenger: short RNAs that silence expression. *Nature* Vol4 (2003).
- Dodson, R.E. & Shapiro, D.J. Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72: 129–164 (2002).
- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. & Sharp, P.A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 457–467 (2003).
- Gorgoni, B. & Gray, N. The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective. *Brief Funct. Genomic Proteomic* 3: 125–141 (2004).
- Elbashir, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498 (2001).
- Felger, J.H. et al. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulation. *JB. Biol.Chem.* 28:2550-61 (1994).
- Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811 (1998).
- Frischmeyer, P.A. et al. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 295: 2258–2261 (2002).
- Gao, M, Fritz, D.T., Ford, L.P. & Wilusz, J. Interaction between a Poly(A)-Specific Ribonuclease and the 5' Cap Influences mRNA Deadenylation Rates *In Vitro*. *Mol. Mol Cell* 5: 479-488 (2000).
- Gao, M., Wilusz, C.J., Peltz, S.W. & Wilusz, J. A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements *EMBO J.* 20: 1134–1143 (2001).
- Garneau, N., Wilusz, J. & Wilusz, C. The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 113–126 (2007).
- Goldstrohm & Wickens. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature Publishing Group* Vol 9:337-344 (2008).
- Grishok, A. et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106:23-34 (2001).

- Hammet, A., Pike, B.L. & Heierhorst, J. Posttranscriptional regulation of the *RAD5* DNA repair gene by the dun1 kinase and the Pan2-Pan3 poly(A)-nuclease complex contributes to survival of replication blocks. *J. Biol. Chem.* 277: 22469–22474 (2002).
- Hoof van, A. & Parker, R. The exosome: a proteasome for RNA? *Cell* (1999).
- van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C. & Parker, R. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* 295: 2262–2264 (2002).
- Hook, B., Goldstrohm, A. C., Seay, D. J. & Wickens, M. Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. *J. Biol. Chem.* 282: 15430–15438 (2007).
- Horr e et al. Hypoxia and angiogenesis in endometrioid endometrial. *Cellular Oncology IOS Press* 29:219-227 (2007).
- Kadyrova, L. Y., Habara, Y., Lee, T. H., & Wharton, R. P. Translational control of maternal cyclin B mRNA by nanos in the *Drosophila* germline. *Development* 134: 1519–1527 (2007).
- Kaygun & Marzluff. Translation termination is involved in histone mRNA degradation when DNA replication is inhibited. *Molecular and Cellular Biology* 25(16):6879-6888 (2005).
- Kiriakidou, M. et al. “Expanded RNA-binding activities of mammalian Argonaute 2” *Nucleic Acids Res* (2009)
- Körner, C.G. & Wahle, E. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J. Biol. Chem.* 272: 10448–10456 (1997).
- Kranenburg O. The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim. Biophys. Acta* 1756 2: 81–2 (2005).
- Lai, W.S., Kennington, E.A. & Blackshear, P.J. Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol. Cell. Biol.* 23: 3798–3812 (2003).
- Lejeune, F., Li, X. & Maquat, L.E. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell* 12: 675–687 (2003).

- Lewin B. GENES VIII, κεφάλαιο 5.
- Lippman & Martienssen. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431:364-370 (2004).
- Liu, H., Rodgers, N.D., Jiao, X. & Kiledjian, M. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J.* 21: 4699–4708 (2002).
- Mamane et al. Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation. *PLoS One* 21:242 (2007).
- Martínez J., Ren Y., Thuresson, A., Hellman, U. Åström, J. & Virtanen, A. A 54- kDa Fragment of the Poly(A)-specific Ribonuclease Is an Oligomeric, Processive, and Cap-interacting Poly(A)-specific 3' Exonuclease. *J. Biol. Chem.* 275: 24222-24230 (2000).
- Martínez, J., Ren, Y.-G., Nilsson, P., Ehrenberg, M. & Virtanen, A. The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation. *J. Biol. Chem.* 276: 27923–27929 (2001).
- Maquat, L.E. & Carmichael, G.G. Quality control of mRNA function. *Cell* 26: 173–176 (2000).
- Maquat et al. Evidence for a Pioneer Round of mRNA Translation: mRNAs Subject to Nonsense-Mediated Decay in Mammalian Cells Are Bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 106:607-617 (2001).
- Meyer, S. , Temme, C. & Wahle, E. Messenger RNA Turnover in Eukaryotes:
- Pathways and Enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 39:197–216 (2004)
- Mitchell, P. & Tollervey, D. mRNA turnover. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 320–325 (2001).
- Mitchell, P. & Tollervey, D. An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol. Cell* (2003).
- Moore, M.J. Nuclear RNA turnover. *Cell* 108: 431–434 (2002).
- Muhrad, D. & Parker, R. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370: 578–581 (1994).
- Mukherjee, D. et al. The mammalian exosome mediates the efficient



degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.* 21: 165–174 (2002).

- Mullen, et al. Cell-cycle regulation of histone mRNA degradation in mammalian cells: role of translation and oligouridylation. *Methods Enzymol.* 449:23-45 (2008).
- Nelson, D.M., Ye, X., Hall, C., Santos, H., Ma, T., Kao, G.D., Yen, T.J., Harper, J.W., Adams, P.D. Coupling of DNA synthesis and histone synthesis in S phase independent of cyclin/cdk2 activity. *Mol. Cell. Biol.* 22: 7459–72 (2002).
- Nilsson, P., Henriksson, N., Niedzwiecka, A., Balatsos, N.A., Kokkoris, K., Eriksson, J., Virtanen, A. A multifunctional RNA recognition motif (RRM) in poly(A)-specific ribonuclease (PARN) with cap and poly(A) binding properties. *J. Biol. Chem.* (2007).
- Oridate et al. Growth inhibition of head and neck squamous cells by small interfering RNAs targeting eIF4E or cyclin D1 alone or combined with cisplatin. *Cancer Biol Ther* 4(3):318-23 (2005).
- Parker, R. & Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 121–127(2004).
- Rastogi et al. Glut-1 antibodies induce growth arrest and apoptosis in human cancer cell lines. *Cancer Letters*, 257: 24-251 (2007).
- Reik et al. The Locus control region is necessary for gene expression in the Human  $\beta$ -globin locus but not the maintenance of an open chromatin structure in erythroids cells. *Molecular and Cellular Biology* 18: 5992-6000 (1998)
- Ren, Y.-G., Martínez, J. & Virtanen, A. Identification of the active site of poly(A)-specific ribonuclease by site-directed mutagenesis and  $\text{Fe}^{2+}$ -mediated cleavage. *J. Biol. Chem.* 277: 5982–5987 (2002).
- Robert & Pelletier. Translation initiation: a critical signalling node in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 13(11):1279-93 (2009)
- Semenza. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3(10): 721-32 (2003).
- Takahashi, S., Araki, Y., Sakuno, T. & Katada, T. Interaction between Ski7p and Upf1p is required for nonsense-mediated 3'-to-5' mRNA decay in yeast.

*EMBO J.* 22: 3951–3959 (2003)

- Taxman et al. Criteria for effective design, construction, and gene knockdown by shRNA vectors. *BMC Biotechnology*, 6:7(2006).
- Tucker, M. & Parker, R. Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 571–595 (2000).
- Wang, Z. & Kiledjian, M. Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* 107: 751–762 (2001).
- Weihai & Parker. Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing. *Cell Biology* 12:346-350 (2000).
- Wong, L. & Medrano, J. F. Real-time PCR for mRNA quantification. *Biotechniques* 39 No1 (2005).
- Wu, M., Reuter, M., Lilie, H., Liu, Y., Wahle, E. & Song, H. Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO J* 24: 4082-4093 (2005).
- Wu, M. et al. Structural basis of m<sup>7</sup>GpppG binding to Poly(A)-specific ribonuclease. *Structure* , 17: 276-286 (2009).
- Wu, R.S. & Bonner, W.M. Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell* 27 (2 Pt 1): 321–30 (1981).
- Yang, X. Crystal structure of human BTG2 and mouse TIS21 involved in suppression of CAF1 deadenylase activity. *Nucleic Acids Res* (2009).