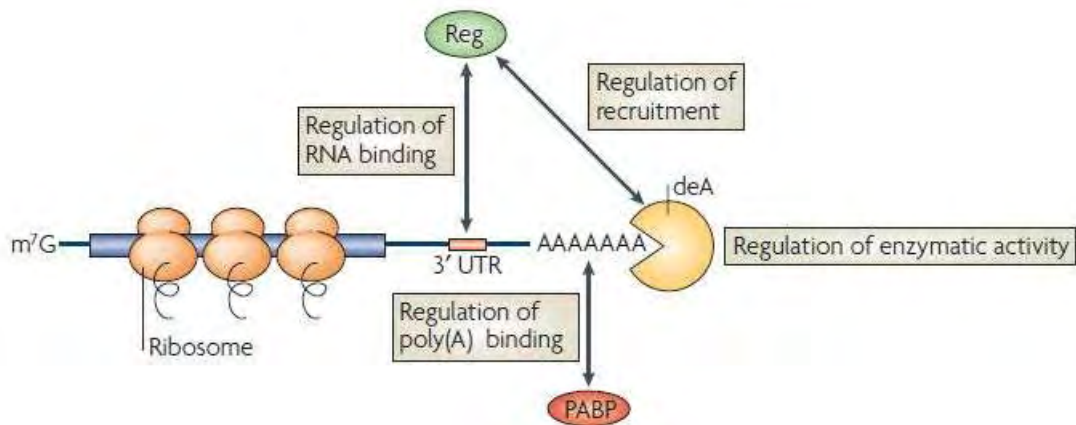




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΗΜΟΥ ΜΑΡΙΑ-ΒΙΚΤΩΡΙΑ**

**ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΠΑΔΕΝΥΛΑΣΩΝ ΣΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ  
RNAs**



**ΛΑΡΙΣΑ, 2017**

"Αποτίμηση της δράσης των απαδενυλασών στη σταθερότητα των  
RNAs"

"Evaluation of the action of deadenylases in RNAs stability"

## **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**Μπαλατσός Νικόλαος**, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Λεωνίδας Δημήτριος**, Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Μπαλατσός Νικόλαος**, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Σκαμνάκη Βασιλική**, Λέκτορας Βιοχημείας-Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## **Εικόνα εξωφύλλου**

Ρύθμιση της απαδενυλίωσης του mRNA. Συγκεκριμένη ακολουθία mRNA, RNA δεσμευμένοι ρυθμιστικοί παράγοντες (REG) οι οποίοι ενισχύουν την πολυαδενυλίωση βοηθώντας τη σύνδεση διαφόρων στοιχείων στην 3' αμετάφραστη περιοχή (UTR) του mRNA και στρατολογώντας απαδενυλάσες (DEA). Η στρατολογημένη απαδενυλάση τότε καταστρέφει την πολυ(A) ουρά, ξεκινώντας την έναρξη της αποικοδόμησης του mRNA και την καταστολή της μετάφρασης (Goldstrohm & Wickens, 2008).

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 η υποστήριξη και οι υποδείξεις υπήρξαν πολύτιμες για την διεκπεραίωση της παρούσης εργασίας. Όλα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Ν.Μπαλατσό, για την ηθική και επιστημονική συμπαράσταση και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς και τους Μαρία Λάμπρου και Αθανάσιο Κυρίτση, η βοήθεια των οποίων υπήρξε καθοριστικής σημασίας για την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Ριβονουκλεάσες.....	9
<b>Απαδενυλάσες.....</b>	<b>13</b>
<b>Απαδενυλάσες στον καρκίνο.....</b>	<b>16</b>
<b>PARN.....</b>	<b>16</b>
<b>CCR4-NOT complex .....</b>	<b>17</b>
1.2 mRNAs που σχετίζονται με τον καρκίνο .....	18
<b>Ο ρόλος των μεταγράφων-στόχων ERHA7, ITGB3 και IQSEC3 στον καρκίνο .....</b>	<b>19</b>
2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	24
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
3.1 Κυτταρική σειρά - Χειρισμοί.....	24
<b>Απόψυξη κυττάρων .....</b>	<b>25</b>
<b>Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας .....</b>	<b>25</b>
<b>Συλλογή των κυττάρων.....</b>	<b>26</b>
3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα.....	26
3.3 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με χρήση λιποσωμάτων.....	28
<b>Η τεχνολογία του RNA interference (RNAi).....</b>	<b>28</b>
<b>Αποσιώπηση απαδενυλασών.....</b>	<b>30</b>
<b>Short-Hairpin RNAs (shRNAs).....</b>	<b>30</b>
3.4 Απομόνωση ολικού RNA και πρωτεϊνών από κύτταρα θηλαστικών.....	37
3.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε δύο βήματα (Two step Real Time PCR ).....	38
<b>Σύνθεση cDNA .....</b>	<b>39</b>

<b>qRT-PCR</b> .....	40
<b>Μέθοδος ΔΔCt</b> .....	40
3.6 Εξέταση της κατάστασης πολυαδενυλίωσης διαφόρων mRNAs με τη μέθοδο LM-PAT .....	43
3.7 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων LM-PAT.....	48
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	49
4.1 Έλεγχος της αποσιώπησης των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8, με ποσοτική RT-PCR (qPCR) .....	49
4.2 Επίδραση της αποσιώπησης των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 στο μήκος των πολυ(A) ουρών των μεταγράφων IQSEC3 , ITGB3, ERHA7 .....	60
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....	65

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από απορρύθμιση της σταθερότητας των mRNA, γεγονός που οδηγεί, μεταξύ άλλων, σε αυξημένη σύνθεση προϊόντων ογκογονιδίων και μειωμένη σύνθεση προϊόντων ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Στην απορρύθμιση της σταθερότητας των διαφόρων mRNAs που σχετίζονται με τον καρκίνο, σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζουν οι απαδενυλάσες, στις οποίες και αναφέρεται η παρούσα εργασία. Οι απαδενυλάσες είναι ένζυμα τα οποία καταλύουν το πρώτο βήμα στην αποικοδόμηση των mRNAs, δηλαδή τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς τους. Από προηγούμενες μελέτες έχει δειχθεί διαφοροποιημένη έκφραση απαδενυλασών σε οξείες λευχαιμίες και στον καρκίνο του πνεύμονα. Με βάση τα παραπάνω, στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να αποσαφηνιστεί περαιτέρω ο ρόλος αυτών των ενζύμων στον καρκίνο. Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκε η επίδραση των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6-LIKE, CNOT7 και CNOT8 σε επιλεγμένα μετάγραφα που σχετίζονται με τον καρκίνο. Αρχικά, επιτεύχθηκε γονιδιακή σίγηση των παραπάνω απαδενυλασών σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά από καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα (NCI-H520). Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η τεχνική LM-PAT, ώστε να εντοπισθούν πιθανές μεταβολές στο μήκος της πολυ(A) ουράς των επιλεγμένων μεταγράφων σε κύτταρα NCI-H520, στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση των απαδενυλασών σε σχέση με κύτταρα - μάρτυρες. Αυτό έγινε με σκοπό να ελεγχθεί αν οι απαδενυλάσες είναι υπεύθυνες για την απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης αυτών των μεταγράφων, καταλύοντας τη βράχυνση της πολυ-(A) ουράς τους. Η αποσιώπηση των απαδενυλασών ελέγχθηκε με ποσοτική RT-PCR και το μήκος της πολυ(A) ουράς των mRNAs που μελετήθηκαν ελέγχθηκε όπως αναφέρθηκε με την τεχνική LM-PAT. Η τεχνική LM-PAT αποκάλυψε ότι το μήκος της πολυ(A) ουράς των επιλεγμένων mRNAs που εξετάσαμε πράγματι εμφάνισε διαφορές μεταξύ κυττάρων όπου η έκφραση απαδενυλασών είχε αποσιωπηθεί και κυττάρων - μαρτύρων, όπως είχε φανεί από προηγούμενες αναλύσεις μικροσυστοιχιών. Συνολικά, τα αποτελέσματά μας ενισχύουν τις παρατηρήσεις μας σχετικά με την αποσαφήνιση του ρόλου των απαδενυλασών στη σταθερότητα των mRNAs και τον εντοπισμό πιθανών mRNAs στόχων αυτών των απαδενυλασών

## **ABSTRACT**

Cancer is characterized by deregulation of the stability of different mRNAs (due to the deregulation of their stability control mechanisms), leading to increased synthesis of oncogene products and decreased synthesis of tumor-suppressing gene products. This study aims to investigate the significant role that deadenylase appear to play in the deregulation of the stability of different mRNAs associated with cancer. Deadenylases are enzymes that catalyze the first step in the degradation of mRNAs, i.e. the shortening of their poly-(A) tails. According to previous studies, a differential expression of deadenylases in acute leukemias and lung cancer has been observed. Based on the above, further clarification of the role of these enzymes in cancer was attempted in this study. The effect of deadenylases PARN, CNOT6, CNOT6-LIKE, CNOT7 and CNOT8 was thus studied on selected cancer-related mRNAs. First, gene silencing of the specific deadenylases was attained in human carcinoma cell line of squamous cell lung (NCI-H520). Then, the LM-PAT technique was used for the identification of possible changes in the length of poly (A) tail of the selected transcripts in NCI-H520 cells for which silencing of deadenylases had been achieved, in comparison with cells where no silencing had occurred, known as Mock sh cells (NCI-H520 cells transduced with non-target shRNA vector). The specific procedure was held in order to test whether the deadenylases are responsible for the deregulation of those mRNAs' gene expression, catalyzing the shortening of their poly-(A) tail. The LM-PAT assay revealed that the poly(A) tail length of the selected mRNAs we tested indeed exhibited changes between MSH and knockdown cells, as predicted from microarray analyses. Collectively, our results extend our observations on clarifying the role of specific deadenylases in mRNA stability, and identifying potential target mRNAs of these deadenylases.



# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Ριβονουκλεάσες

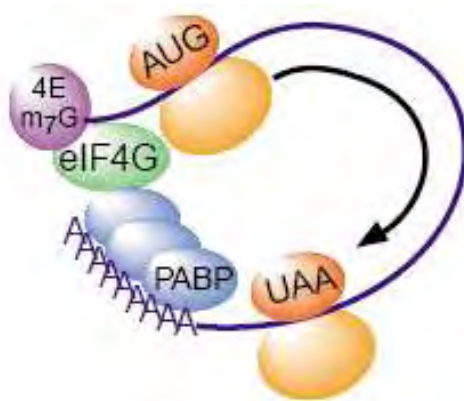
Η ρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs στα ευκαρυωτικά κύτταρα παρέχει έναν μηχανισμό ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης. Στον καρκίνο, απορύθμιση των μηχανισμών που ελέγχουν τη σταθερότητα των mRNAs, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη παραγωγή ογκογόνων προϊόντων και/ή μείωση ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών (Kim W.C and Lee C.H., 2009).

Οι διαδικασίες με τις οποίες ελέγχεται η σταθερότητα ή η αποικοδόμηση των mRNAs, διενεργούνται από cis-δραστικά στοιχεία — όπως είναι η πολυ(A)ουρά, η 5'-καλύπτρα και τα στοιχεία ARE (AU-rich elements) — και από trans-δραστικούς παράγοντες, όπως είναι τα μη-κωδικά μόρια RNA (non-coding RNAs, ncRNAs), οι RNA-συνδεόμενες πρωτεΐνες (RNA-binding proteins, RBPs) και οι ριβονουκλεάσες (Kim W.C and Lee C.H., 2009).

Όσον αφορά τα cis-δραστικά στοιχεία της 5'-καλύπτρας και της πολυ(A)ουράς, φαίνεται ότι αυτά αποτελούν στοιχεία πρωταρχικής σημασίας για τη ρύθμιση του mRNA. Και η σταθερή συγκέντρωση αλλά και η αποτελεσματικότητα της μετάφρασης του ευκαρυωτικού mRNA, είναι ιδιαίτερα εξαρτώμενα από την καλύπτρα 7-μέθυλ-γουανοσίνης στο 5'-άκρο και την πολυ(A)ουρά στο 3'-άκρο του μορίου. Οι δομές αυτές δρουν ως σημαντικά στοιχεία αναγνώρισης από ρυθμιστικές και καταλυτικές πρωτεΐνες — όπως είναι οι ριβονουκλεάσες — καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής του mRNA (Garneau et al., 2007, Shatkin & Manley, 2000, Wilusz et al. 2001). Κατά την αποικοδόμηση του mRNA, η υδρόλυση και της 5'-καλύπτρας και της πολυ(A)ουράς αποτελούν κρίσιμα γεγονότα, και η αφαίρεση της πολυ(A)ουράς — με απαδενυλίωση από ριβονουκλεάσες — είναι συχνά το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποτελεσματικότητα της αποικοδόμησης του mRNA (Meyer et al. 2004, Parker & Song, 2004). Η αποτελεσματικότητα της απαδενυλίωσης, επηρεάζει κατ' αυτό τον τρόπο άμεσα τον ρυθμό της αποικοδόμησης του mRNA και κατά συνέπεια την συγκέντρωση ενός mRNA σε συγκεκριμένα στάδια ή φυσιολογικές συνθήκες. Για την ακρίβεια, η συγκέντρωση ενός mRNA καθορίζεται από τον λόγο της σύνθεσης και της αποικοδόμησης (Ross 1995), όπου οι πολυ(A) πολυμεράσες (PAPs) και οι ριβονουκλεάσες (π.χ. απαδενυλάσες) είναι υπεύθυνες για την σύνθεση και την

αποικοδόμηση της πολυ(A) ουράς, αντίστοιχα. Η πολυ(A) ουρά είναι από μόνη της μια εξαιρετικά δυναμική δομή. Το μήκος της ποικίλλει σημαντικά κατά τη διάρκεια της ζωής ενός mRNA και σε απόκριση σε διαφορετικά φυσιολογικά ερεθίσματα (Eckmann et al. 2011, Richter & Lasko, 2011, Schoenberg & Maquat, 2012, Wickens, 1990). Αρχικά, μετά τη σύνθεσή του στον πυρήνα, σχηματίζεται η πολυ(A) ουρά των mRNAs με πολυαδενυλίωση, η οποία στα θηλαστικά, φτάνει μέχρι και 250 κατάλοιπα αδενοσίνης σε μήκος.

Κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνοσύνθεσης, η παρουσία της 5'-καλύπτρας και το μήκος της πολυ(A) ουράς, παίζουν καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της έναρξης της μετάφρασης (Sachs & Varani, 2000). Η δομή της 5'-καλύπτρας αναγνωρίζεται από τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E (Marcotrigiano et al. 1997, Hinnebusch and Lorsch 2012, Sonenberg and Dever 2003). Η αναγνώριση της 5'-καλύπτρας είναι σημαντική, καθώς καθορίζει την αποτελεσματική στρατολόγηση του ριβοσώματος στο mRNA. Το σύμπλοκο έναρξης eIF4F περιέχει επίσης τον παράγοντα eIF4G, ο οποίος με τη σειρά του αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική πολυ(A)-συνδεόμενη πρωτεΐνη PABPC, που προσδένεται στην πολυ(A)ουρά του mRNA. Η αλληλεπίδραση eIF4G και PABPC, κυκλοποιεί το mRNA φέρνοντας κοντά το 5' με το 3'-άκρο (Amrani et al, 2008, Tarun & Sachs, 1996, Wells et al, 1998) (Εικόνα 1). Το κυκλοποιημένο mRNA διευκολύνει την στρατολόγηση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας και την επακόλουθη συγκρότηση του πλήρως λειτουργικού 80S ριβοσώματος. Έτσι, η παρουσία της 5'- m7G-καλύπτρας και της πολυ(A) ουράς εγείρει την έναρξη και την επανέναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης και συνεπώς καθορίζουν την ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης.



**Εικόνα 1:** Η αλληλεπίδραση eIF4G και PABPC, κυκλοποιεί το mRNA φέρνοντας κοντά το 5' με το 3'-άκρο (Mitchell et al., 2001)

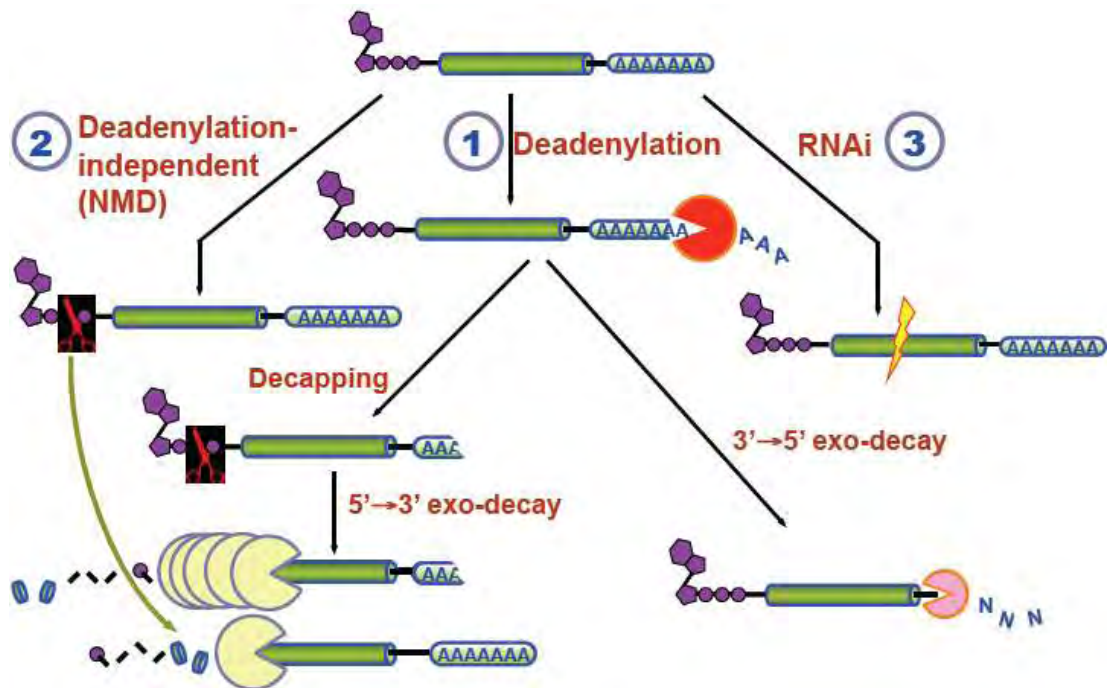
Η ρύθμιση της πολυ(A) ουράς στο κυτταρόπλασμα, είναι στενά συνδεδεμένη με τον έλεγχο της μετάφρασης. Συνήθως μια πολυ(A) ουρά μεγάλου μήκους σχετίζεται με αποτελεσματική πρωτεϊνοσύνθεση.

Από τα παραπάνω, είναι φανερό ότι οι καταλυτικές οντότητες που εμπλέκονται στη σύνθεση, την τροποποίηση, την επεξεργασία και την αποικοδόμηση της 5'-καλύπτρας και της πολυ(A)ουράς, επηρεάζουν τη λειτουργία και την αφθονία του mRNA στο κύτταρο (Garneau et al., 2007, Goldstrohm & Wickens, 2008, Meyer et al., 2004, Parker & Song, 2004, Schoenberg & Maquat, 2012, Wu & Brewer, 2012).

Οι ριβονουκλεάσες (RNases) αποτελούν μια ομάδα ενζύμων, η οποία τέμνει μόρια RNA — συμπεριλαμβανομένου των mRNAs — σε φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, έχοντας ως αποτέλεσμα ποικίλες βιολογικές συνέπειες. Οι ριβονουκλεάσες παίζουν μείζονα ρόλο, δρώντας με ενορχηστρωμένο τρόπο στη ρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs, ελέγχοντας μ' αυτό τον τρόπο τη γονιδιακή έκφραση στα κύτταρα των θηλαστικών οργανισμών (Parker & Song, 2004). Πολλές ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των mRNAs, προάγοντας την απαδενυλίωσή τους, ενώ μερικές εξωριβονουκλεάσες, αποικοδομούν περαιτέρω τα απαδενυλιωμένα και /ή τα mRNAs, από τα οποία έχει αφαιρεθεί η 5'-καλύπτρα, στα 3' και/ή 5' άκρα τους, αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, οι ενδοριβονουκλεάσες (π.χ. οι PMR1 και RNase L), δεν προαπαιτούν την αφαίρεση της καλύπτρας ή απαδενυλίωση προκειμένου να δράσουν, τέμνοντας έτσι εσωτερικά τα mRNAs, παράγοντας προϊόντα που αποικοδομούνται περαιτέρω από τις εξωριβονουκλεάσες με κατεύθυνση 5'-3' (XRN1) ή 3'-5' (Exosome complex) (Εικόνα 2) (Kim and Lee 2009).

Σε συνθήκες έλλειψης μηχανισμών ελέγχου, οι ενδοουκλεάσες μπορεί να έχουν μια βαθιά επίδραση στη γονιδιακή έκφραση, καθώς μια και μόνο ενδοουκλεολυτική τμήση στο εσωτερικό του mRNA, συνεπάγεται την αδρανοποίησή του. Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που εμποδίζουν τέτοιου είδους ανώμαλης αποικοδόμησης των mRNAs, μέσω της ρύθμισης των ενδοουκλεασών. Για παράδειγμα, μερικές από αυτές (RNase L, IRE1 και PMR1) έχει δειχθεί να είναι ισχυρά ρυθμιζόμενες μέσω κυτταρικών σημάτων (Clemens & Williams, 1978, Sidrauski & Walter, 1997, Peng & Schoenberg, 2007). Μ' αυτό τον τρόπο, τα κύτταρα αποκρίνονται αποτελεσματικά στις αλλαγές του περιβάλλοντός του με τη ρύθμιση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA.

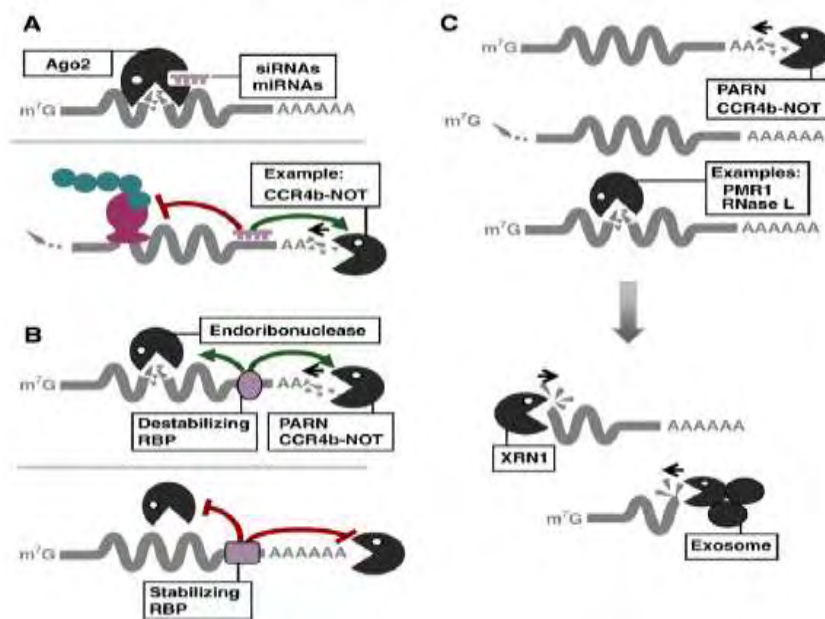
Οι ριβονουκλεάσες μπορούν να δράσουν μόνες ή ενορχηστρωμένα με άλλους παράγοντες αποικοδόμησης, αλλά και μεταξύ τους, προκειμένου να προορίσουν mRNAs προς αποικοδόμηση. Οι απαδενυλάσες, όπως είναι η πολυ(A) ριβονουκλεάση PARN (Poly(A)-specific ribonuclease) και η CCR4b του συμπλόκου απαδενυλίωσης CCR4b-NOT (γνωστή και ως CNOT6-like), αφαιρούν την πολυ(A)ουρά του mRNA-στόχου, ενώ άλλα ένζυμα αφαιρούν την 5'-m7G mRNA καλύπτρα.



**Εικόνα 2:** Μονοπάτια αποικοδόμησης των mRNAs (Σχέδιο βάσει: Kim and Lee, 2009; Goldstrohm & Wickens, 2008)

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι RNA-συνδεόμενες πρωτεΐνες (RNA-binding proteins, RBPs) μπορούν να επηρεάσουν δραματικά τη σταθερότητα των mRNAs (Paschoud et al., 2006, Gherzi et al., 2006, Pulcrano et al., 2007). Αυτές δεν επιτρέπουν μόνο τη διακύμανση των χρόνων ημιζωής των mRNAs (Zhao et al. 2008), αλλά είναι επίσης ικανές να ελέγχουν το ρυθμό αποικοδόμησης συγκεκριμένων mRNAs ως απόκριση σε διαφορετικά ερεθίσματα. Η δράση αυτή έχει παρατηρηθεί σε μετάγραφα που κωδικοποιούν κυτταροκίνες ή πρωτοογκογονίδια, τα οποία φέρουν ARE αλληλουχίες στην 3'-αμετάφραστη περιοχή τους (3'-UTR) (Ross 1995).

Οι RBPs μπορούν να προσδένονται στις 3'-αμετάφραστες περιοχές των mRNAs, αλλά και στην κωδική τους περιοχή και να τα προστατεύουν από τους μηχανισμούς αποικοδόμησης. Έχει δειχθεί ότι η πρωτεΐνη HuR μπορεί να προάγει την υπερέκφραση ενός ογκογόνου βιοδείκτη, αυξάνοντας το χρόνο ημιζωής του mRNA του (Guo & Hartley 2006). Άλλες RBPs, όπως η KSRP, μπορούν να εγείρουν την αποικοδόμηση πολλών κυτταρικών mRNAs τα οποία φέρουν τα στοιχεία ARE, μέσω στρατολόγησης ενδοριβονουκλεασών και παραγόντων απαδενυλίωσης προκειμένου να ρυθμίσουν την έκφρασή τους (Gherzi et al. 2004, Chou et al. 2006, Mazan-Mamczarz & Gartenhaus, 2007). Οι RBPs έχουν διαφορετικές επιδράσεις στα κύτταρα, που εξαρτώνται από τα mRNAs με τα οποία αλληλεπιδρούν. Για παράδειγμα, δείχθηκε ότι η υπερέκφραση της HuR είναι υπεύθυνη για την αύξηση ενός ογκογόνου mRNA στους ινοβλάστες (Sobue et al., 2008), ενώ η ίδια πρωτεΐνη μπορεί να σταθεροποιήσει ένα mRNA ογκοκατασταλτικό παράγοντα (Tumour Suppressor Gene, TSG), σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη (Quann et al., 2007). Η ρυθμιστική ικανότητα των RBPs έγκειται στην ισορροπία μεταξύ της πυροδότησης ή της καθυστέρησης της αποικοδόμησης των mRNAs.



**Εικόνα 3:** Ρόλος των ριβονουκλεασών, των miRNAs και των RNA-συνδεόμενων πρωτεϊνών στη ρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs (Kim and Lee, 2009)

Έχει δειχθεί ότι οι πρωτεΐνες RBPs, καθώς και τα μη-κωδικά μόρια RNA (ncRNAs) μπορούν και στρατολογούν συστατικά του μονοπατιού απαδενυλίωσης, τα οποία σε συνδυασμό με άλλες ριβονουκλεάσες, ρυθμίζουν mRNA ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών παραγόντων (Valencia-Sanchez et al., 2006, Jackson & Standart, 2007). Η PARN αποτελεί ένα τέτοιο παράδειγμα.

Η λειτουργία των μη-κωδικών μορίων RNA (ncRNAs) στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης επιτελείται μέσω του μηχανισμού RNAi. Η πρόσδεση ενός siRNA/miRNA μέσω συμπληρωματικότητας στο mRNA, πυροδοτεί την έναρξη της αποικοδόμησής του από την υπομονάδα AGO του συμπλόκου RISC, η οποία έχει ενεργότητα ριβονουκλεάσης. Εναλλακτικά, η πρόσδεση ενός miRNA στο mRNA, προκαλεί τη στρατολόγηση απαδενυλασών, ένζυμα τα οποία επιτελούν την βράχυνση της πολυ(A) ουράς — το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμηση — ενώ παράλληλα καταστέλλεται και η μετάφραση του μεταγράφου.

## Απαδενυλάσες

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, εκτός από τη δράση των ενδοριβονουκλεασών, η αποικοδόμηση των mRNAs στα κύτταρα των θηλαστικών, ξεκινά και με απαδενυλίωση (Parker and Song 2004).

Ως απαδενυλάσες ορίζουμε τις εξωριβονουκλεάσες που αποικοδομούν την πολυ(A) ουρά των mRNAs με κατεύθυνση 3'-5' απελευθερώνοντας 5'-AMP. Οι απαδενυλάσες εκδηλώνουν μια σαφή προτίμηση για 3'- πολυ(A) ως υπόστρωμα, παρά το γεγονός πως σε ορισμένες περιπτώσεις έχει δειχτεί ότι

αποικοδομούν λιγότερο αποτελεσματικά και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή (Goldstrohm & Wickens, 2008).

Όλες οι γνωστές απαδενυλάσες είναι  $Mg^{2+}$ -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 συντονίζονται από τα ιόντα  $Mg^{2+}$ . Μέλη αυτής της ομάδας αποτελούν η απαδενυλάση POP2/CNOT7 (γνωστή και ως CAF1), η CNOT8, η CAF1Z, η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), καθώς και οι οικογένειες των PAN2 απαδενυλασών. Από την άλλη μεριά η υπερ-οικογένεια των εξωνουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών (Exonuclease-Endonuclease-Phosphatase, EEP), περιλαμβάνει απαδενυλάσες που φέρουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στις δομικές περιοχές νουκλεάσης τους. Παραδείγματα EEP ενζύμων αποτελούν οι απαδενυλάσες CCR4(CNOT6 και CNOT6L), Nocturnin και Angel. Τα μέλη των οικογενειών POP2, CCR4, PAN2 και Angel είναι παρόντα σε όλους τους ευκαρυώτες, ενώ άλλες απαδενυλάσες είναι λιγότερο συντηρημένες (Goldstrohm & Wickens 2008). Η τεράστια ποικιλότητα και η ποικιλομορφία των απαδενυλασών υποδηλώνει πως πιθανότατα συγκεκριμένες απαδενυλάσες στοχεύουν συγκεκριμένα mRNAs επιτάσσοντας τον έλεγχο τους στη δραστηριότητα ενός μόνο ενζύμου. Από την άλλη, διαφορετικές απαδενυλάσες μπορούν να δράσουν στο ίδιο mRNA με διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες λειτουργίες. Στον πίνακα 1 παρουσιάζεται συνοπτικά η κατάταξη των απαδενυλασών στις δύο υπερ-οικογένειες καθώς και ενδεικτικά παραδείγματα ενζύμων που εντοπίζονται σε αντιπροσωπευτικά είδη οργανισμών.

		SC	CE	DM	XL	MM	HS
<b>DEDD nucleases</b>	CNOT7/IPO P2	+	+	+	+	+	+
	CNOT8	-	-	-	+	+	+
	CAF1Z	-	+	-	+	+	+
	PARN	-	+	-	+	+	+
	PAN2	+	+	+	+	+	+
<b>EEP nucleases</b>	CNOT6/CCR4	+	+	+	+	+	+
	CNOT6L	-	-	-	-	+	+
	NOC	-	-	+	+	+	+
	2'PDE	-	+	+	+	+	+

**Πίνακας 1:** Κατάταξη των απαδενυλασών στις δύο μεγάλες υπερ-οικογένειες και εντοπισμός τους σε αντιπροσωπευτικά είδη οργανισμών (Goldstrohm & Wickens, 2008: SC: *S.cerevisiae*, CE: *C. elegans*, DM: *D.melanogaster*, XL: *X.laavis*, MM: *M. musculus*, HS: *H.sapiens*).

Οι απαδενυλάσες, εκτός από τον ρόλο που έχουν στη διαδικασία αποικοδόμησης των mRNAs, επιτελούν και αρκετούς εξειδικευμένους, ρυθμιστικούς, ρόλους. Κάποιες είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των

οργανισμών. Άλλες, όπως είναι η PARN (*Xenopus laevis*) είναι σημαντικές κατά την πρώιμη ανάπτυξη, ενώ άλλες απαιτούνται για τη γονιμότητα και τη μεταβολική ομοίωση (CNOT7 και Nocturnin στα ποντίκια).

Η ρύθμιση της δραστηριότητας των απαδενυλασών κρίνεται απαραίτητη, καθώς συνθήκες ανεξέλεγκτης απαδενυλίωσης θα οδηγούσαν σε καταστροφή και θάνατο του κυττάρου. Σταθερά και μεταγραφικά ενεργά mRNAs πρέπει να προστατευθούν από την απαδενυλίωση ενώ τα ασταθή και μη φυσιολογικά θα πρέπει να απαδενυλιώνονται και να οδηγούνται στην αποικοδόμηση.

Ο ρυθμός της απαδενυλίωσης ποικίλλει μεταξύ των διάφορων mRNAs. Αυτή η διαδικασία ελέγχεται από ρυθμιστικούς παράγοντες οι οποίοι προσδένονται σε εξειδικευμένες αλληλουχίες των mRNAs. Ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται συνήθως στις 3' αμετάφραστες περιοχές συγκεκριμένων mRNAs (3'-UTR) διαμεσολαβούν και ενισχύουν την απαδενυλίωση τους. Αυτά τα στοιχεία αναγνωρίζονται από παράγοντες οι οποίοι στρατολογούν τις απαδενυλάσες προωθώντας έτσι την απαδενυλίωση. Παραδείγματα παραγόντων που δεσμεύονται στις 3'-UTR περιοχές των mRNA, αποτελούν τα miRNAs και οι CUG-BP, PUF και CPEB πρωτεΐνες (Goldstrohm & Wickens, 2008, Kadyrova et al., 2007, Hook et al., 2007). Εναλλακτικά, προώθηση της απαδενυλίωσης μπορεί να επιτευχθεί μέσω αλληλεπίδρασης της PABP — πρωτεΐνη που αναγνωρίζει και προσδένεται στην πολυ(A) ουρά (Mitchell et al. 2001) — και συγκεκριμένων απαδενυλασών (π.χ η PABP στρατολογεί το σύμπλοκο PAN2-PAN3). Επίσης, το 5' κάλυμμα του mRNA μπορεί να επηρεάσει θετικά την απαδενυλίωση διεγείροντας την δραστηριότητα και την ικανότητα επεξεργασίας κάποιων απαδενυλασών (χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η PARN). Ο ρυθμός απαδενυλίωσης επηρεάζεται από δύο μορφές χωρικού ελέγχου: τον πυρηνο-κυτταροπλασματικό διαχωρισμό των απαδενυλασών και την εντόπισή τους σε κοκκία. Στην πρώτη περίπτωση, προβλήματα σωστού διαχωρισμού των απαδενυλασών μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος μπορούν να αποβούν μοιραία για την τύχη mRNAs που δεν θα έπρεπε να αποικοδομηθούν. Από τη άλλη μεριά, συγκεκριμένες απαδενυλάσες εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά κοκκία, τα οποία περιέχουν κατεσταλμένα mRNAs, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να ενεργοποιηθούν. Η συν-εντόπιση αυτών των απαδενυλασών με τα υποστρώματά τους πιθανότατα διευκολύνει την κινητική της απαδενυλίωσης (Goldstrohm & Wickens, 2008).

Οι απαδενυλάσες συνήθως αποτελούν τμήμα συμπλόκων. Οι παρακείμενες υπομονάδες, επηρεάζουν τη δραστηριότητα των απαδενυλασών. Για παράδειγμα, η PAN2 δεσμεύεται στην PAN3, που με τη σειρά της αλληλεπιδρά με την PABP. Η τελευταία στρατολογεί το σύμπλοκο PAN2-PAN3 στην πολυ(A) ουρά των mRNA-στόχων (Hammet et al. 2002). Άλλες απαδενυλάσες σχηματίζουν ομοδιμερή και άλλες ετεροδιμερή. Ο ετεροδιμερισμός αυξάνει σημαντικά το ρεπερτόριο των συμπλόκων των απαδενυλασών που σχηματίζονται, καθώς διαφορετικά ετεροδιμερή έχουν και διαφορετικές ενζυμικές και ρυθμιστικές ιδιότητες. Η δυνατότητα για έλεγχο της απαδενυλίωσης καθίσταται τεράστια και ιδιαίτερα πολύπλοκη, λόγω της αλληλεπίδρασης των πολυάριθμων πιθανών συμπλόκων απαδενυλασών 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 & Wickens 2008).

Τα σύμπλοκα απαδενυλασών που στρατολογούνται από ειδικούς ρυθμιστές είναι πολυλειτουργικά καθώς περιέχουν, εκτός των ενζύμων απαδενυλίωσης, συστατικά που καταστέλλουν τη μετάφραση και συστατικά που ενισχύουν την αποικοδόμηση του mRNA. Η πολυλειτουργικότητα αυτή παρέχει ευκαιρίες για πολυάριθμα σημεία ρύθμισης της απαδενυλίωσης, της μετάφρασης και της αποικοδόμησης των mRNAs, είτε ξεχωριστά είτε συντονισμένα (Goldstrohm & Wickens 2008).

## **Απαδενυλάσες στον καρκίνο**

Στον καρκίνο, η απορρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη σύνθεση των προϊόντων ογκογονιδίων ή/και μείωση των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών. Ο ρόλος των ριβοβουκλεασών, και συγκεκριμένα των απαδενυλασών διαφαίνεται καθοριστικής σημασίας για τη σταθερότητα των mRNAs. Μείωση της αποικοδόμησης των mRNAs σε παθολογικές καταστάσεις, μπορεί να απορρέει άμεσα μέσω υπερέκφρασης των παραγόντων που σταθεροποιούν το mRNA, ή μέσω υποέκφρασης των αποσταθεροποιητικών παραγόντων, όπως είναι οι απαδενυλάσες. Κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει σε μία επιμηκυμένη σταθερή κατάσταση των επιπέδων των ογκογόνων mRNAs, με αποτέλεσμα την πρόκληση του καρκίνου. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει εμπλοκή των απαδενυλασών σε οξείες λευχαιμίες (Balatsos et al. 2012) καθώς και εμπλοκή αυτών στον καρκίνο του πνεύμονα (Maragozidis et al. 2015). Πρόσφατη εργασία έχει δείξει ότι η έκφραση διαφόρων απαδενυλασών, συμπεριλαμβανομένων των PARN και CNOT7, μεταβάλλεται στην οξεία λευχαιμία και η PARN μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα υποσχόμενο βιοδείκτη και στόχο φαρμάκων (Maragozidis et al. 2015). Επιπλέον οι CNOT6L και PARN απαδενυλάσες συνδέονται με την έκφραση mRNA που σχετίζονται με τον καρκίνο (Maragozidis et al. 2015).

## **PARN**

Η PARN συμμετέχει σε μια σειρά κυτταρικών μηχανισμών και αποκρίσεων. Για παράδειγμα, έχει δείχθει ότι η PARN εμπλέκεται σε κυτταρική απόκριση στο στρες (Cevher et al., 2010, Reinhardt et al., 2010), στην αποικοδόμηση των πολλαπλά ματισμένων HIV-1 mRNAs κατά τη μόλυνση από HIV-1 (Zhu et al., 2011). Επίσης, έχει προταθεί ως ένας πιθανός δείκτης της καρκινικής ανάπτυξης (Maragozidis et al., 2012). Η πιθανή εμπλοκή της PARN σε διεργασίες όπως είναι η καρκινογένεση διαφαίνεται από τα παρακάτω δεδομένα. Πολλά mRNAs τα οποία περιέχουν τα στοιχεία ARE (πλούσια σε AU κατάλοιπα), αποτελούν πρωτο-ογκογονίδια (π.χ. c-myc, c-fos και c-jun), κυτταροκίνες (π.χ. TNF $\alpha$ ), χυμοκίνες, αυξητικοί παράγοντες και ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (Schoenberg & Maquat, 2012, Wilusz et al., 2001, Wu & Brewer, 2012). Τα εν λόγω mRNAs, ρυθμίζονται από τις ARE-συνδεδεμένες πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν εμπλακεί σε διεργασίες δρώντας ως ενεργοποιητές ή πρωτεΐνες στρατολόγησης της PARN (Lai et al., 1999, 2000, 2003). Επίσης, σε μελέτες όπου έγινε υποέκφραση της PARN, με την τεχνολογία των αντινοσηματικών μορίων shRNAs,



εξετάστηκαν τα επίπεδα μιας σειράς mRNAs. Από αυτά, μόνο ένα μικρό υποσύνολο είχε διαφοροποιημένη έκφραση. Αυτό όμως που έχει ενδιαφέρον, είναι ότι πολλά από αυτά τα mRNAs, κωδικοποιούσαν πρωτεΐνες, οι οποίες είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην καρκινική μετανάστευση των κυττάρων και πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.

Παράλληλα με τα παραπάνω, η ενεργότητα απαδενυλίωσης της PARN, συνδυασμένη με την αποσταθεροποιητική ικανότητα των RBPs, μπορεί να δράσει δυνητικά ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας, προκαλώντας αποικοδόμηση mRNAs που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες, όπως είναι η IL-8 και ο VEGF. Το γεγονός αυτό αποκαλύφθηκε κατά τη διερεύνηση του ρόλου μιας ελαττωματικής αποσταθεροποιητικής RBP πρωτεΐνης, της TTP (Tristetraprolin), η οποία δεν μπορούσε να στρατολογήσει την PARN σε κακοήγη γλειοκύτταρα (Lai et al. 2003, Suswam et al. 2008). Επίσης, η PARN και το σύμπλοκο εξωσώματος φαίνεται να στρατολογούνται από τον KSRP και/ή τον DHAU, συμμετέχοντας στην αποσταθεροποίηση πολλών mRNAs, συμπεριλαμβανομένου των c-jun και uPA τα οποία είναι αυξημένα στους διαφόρους τύπους καρκίνων (Chou, et al. 2006, Tran, et al. 2003). Μια άλλη μελέτη εστίασε στην αλληλεπίδραση της PARN και της CUG-BP, στην οποία δείχθηκε ότι η RNA-συνδεόμενη πρωτεΐνη CUG-BP στρατολογεί την απαδενυλάση PARN προκειμένου να αποσταθεροποιήσει τα ογκογόνα mRNAs των c-fos και TNF-alpha (Moraes et al. 2006).

### **CCR4-NOT complex**

Τόσο στις ζύμες όσο και στα ανθρώπινα κύτταρα, η αρχική βράχυνση της πολυ (A) ουράς πραγματοποιείται από την PAN2, η οποία αποτελεί ένα ετεροδιμερές με την PAN3 (Brown et al., 1996, Boeck et al., 1998, Brown & Sachs, 1998, Uchida et al., 2004). Μεταγενέστερη απομάκρυνση της πολυ (A) ουράς επιτυγχάνεται με το CCR4-Not, ένα συντηρημένο σύμπλοκο, το οποίο περιέχει περίπου 10 υπομονάδες, συμπεριλαμβανομένων αρκετών απαδενυλασών (Aslam et al., 2009). Στα θηλαστικά, έχουν βρεθεί δύο ομόλογα του συμπλόκου απαδενυλίωσης CCR4 της ζύμης: η απαδενυλάση CCR4a — γνωστή και ως CNOT6 — και η προσφάτως ταυτοποιημένη CCR4b, γνωστή ως CNOT6-LIKE. Η τελευταία, επιδεικνύει επίσης ενεργότητα απαδενυλάσης *in vitro* και *in vivo* (Morita et al., 2007). Η CNOT6-LIKE, όπως και η CNOT6, αλληλεπιδρά με τις CNOT1, CNOT2, CNOT3, CAF1a/CNOT7, CAF1b/CNOT8 και CAF40/CNOT9, στον άνθρωπο, σχηματίζοντας ένα ετεροπολυμερές σύμπλοκο το λεγόμενο CCR4-NOT (Wagner et al., 2007).

Όσον αφορά τον καρκίνο η CNOT6L φαίνεται να εμπλέκεται σ'αυτόν με ποικίλους τρόπους. Έχειδειχθεί ότι επάγει την αύξηση σε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών, μέσω της δραστηριότητας απαδενυλίωσης και προτείνεται ότι αποτελεί πρωτο-ογκογονίδιο (Morita et al. 2007). Σε φυσιολογικές συνθήκες, το ένζυμο φάνηκε να ρυθμίζει τα επίπεδα του mRNA του p27Kip1, ενός ογκοκατασταλτικού παράγοντα που αναστέλλει τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες Cdk, και να προάγει την κυτταρική ανάπτυξη. Επιπλέον, όταν κύτταρα στερούνταν την CNOT6L, τα επίπεδα του p27Kip1 ήταν αυξημένα, ενώ η κυτταρική αύξηση μειωμένη (Morita et al., 2007). Η CNOT6L μπορεί επίσης να κατασταλεί *in vitro* από μια αναγνωρισμένη αντι-πολλαπλασιαστική πρωτεΐνη, την Tob, ενισχύοντας προηγούμενες μελέτες σχετικά με το ότι η ενεργότητά της

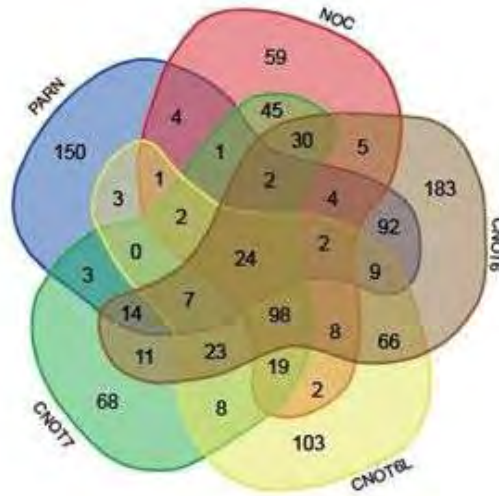
ως απαδενυλάση, προάγει την κυτταρική ανάπτυξη (Miyasaka et al. 2007). Επίσης, στοιχεία καταδεικνύουν τη CNOT6L ως ένα ρυθμιστή της προσδενόμενης πρωτεΐνης 5, η οποία προσδένεται στον αυξητικό παράγοντα insulin-like growth factor, και η οποία μεσολαβεί στη σύλληψη του κυτταρικού κύκλου και στη γήρανση του κυττάρου μέσω ενός εξαρτώμενου από p53 μονοπατιού (Xianghua Piao et al., 2010).

Όσον αφορά τις CNOT7 και CNOT8 είναι μέλη της οικογένειας DEDD όπως έχουμε ήδη αναφέρει και έχουν αλληλοεπικαλυπτόμενες λειτουργίες λόγω της υψηλής ομοιότητας της αλληλουχίας των αμινοξέων τους (89% ομοιότητα) (Aslam et., al 2009) Αλληλεπιδρούν με μέλη της οικογένειας BTG / Tob των αντιπολλαπλασιαστικών πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση του mRNA. Ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων των CNOT7 και CNOT8 σε ανθρώπινα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη απαδενυλίωση του κυρίως μέρους του mRNA και σταθεροποίηση ενός ασταθούς mRNA αναφοράς (Schwede et al., 2008). Οι CNOT7 και CNOT8 συμβάλουν στον αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων του καρκίνου του μαστού. Η λειτουργία του CNOT7 στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων εν μέρει εξαρτάται από την καταλυτική της δράση ως απαδενυλάση (Aslam et., al 2009). Επιπλέον, οι CNOT7 και CNOT8 όπως αναφέραμε αλληλεπιδρούν με τα μέλη της BTG /Tob οικογένειας αντιπολλαπλασιαστικών πρωτεϊνών που αναστέλλουν κυτταρικό κύκλο στη G1-S-φάση (Ezzeddine et al., 2007, Funakoshi et al., 2007, Mauxion et al., 2008).

## 1.2 mRNAs που σχετίζονται με τον καρκίνο

Σε προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο μας επιτεύχθηκε αποσιώπηση συγκεκριμένων απαδενυλασών σε κύτταρα ανθρώπινης κυτταρικής σειράς από καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα (NCI-H520) (Maragozidhs P et al., 2015). Ακολούθησε ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης στα κύτταρα αυτά με τη χρήση μικροσυστοιχιών και βρέθηκαν ορισμένα μετάγραφα με αυξημένα επίπεδα έκφρασης, σε σύγκριση με κύτταρα φυσικού WT (Μαραγκοζίδης Π. , 2016) (Εικόνα 4). Τα υπερεκφρασμένα μετάγραφα πιθανόν να αποτελούν στόχους των απαδενυλασών καθώς η αποσιώπηση τους μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη σταθερότητα αυτών των mRNAs. Από τις μικροσυστοιχίες βρέθηκαν ορισμένα μετάγραφα να ελέγχονται από μία μόνο απαδενυλάση. Επίσης, ορισμένα βρέθηκαν να ελέγχονται από περισσότερες από μία απαδενυλάσες και κάποια βρέθηκαν να ελέγχονται και από τις πέντε απαδενυλάσες (εικόνα 4).

## Upregulated transcripts upon DeAs silencing in NCI-H520



**Εικόνα 4:** Υπερεκφρασμένα μετάγραφα μετά απο αποσιώπηση των απαδενυλασών PARN, NOC, CNOT6, CNOT6L και CNOT7 σε NCI-H520 κύτταρα (Μαραγκοζίδης Π. 2016)

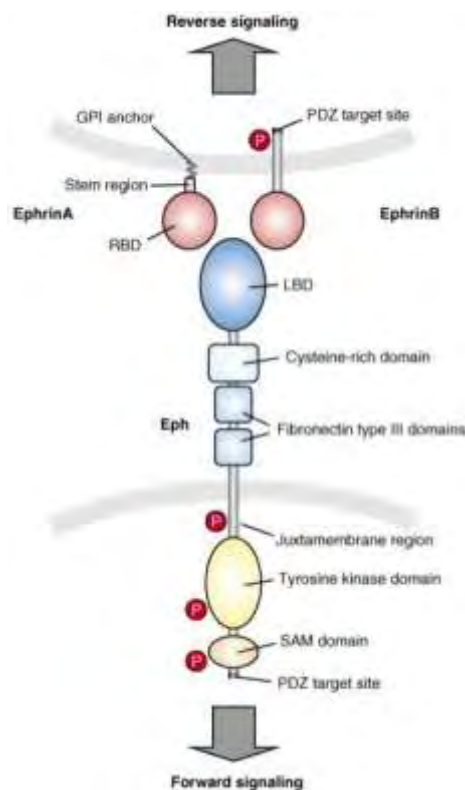
Από τις μικροσυστοιχίες έγινε επιλογή συγκεκριμένων υπερεκφρασμένων μεταγράφων με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση των απαδενυλασών σ'αυτά. Τα επιλεγμένα μετάγραφα είναι τα EPH receptor A7 (EPHA7), Integrin subunit beta 3 (ITGB3) και IQ motif and Sec7 domain 3 (IQSEC3) από τα οποία τα EPHA7 και ITGB3 βρέθηκαν μέσω των μικροσυστοιχιών να ελέγχονται μόνο από τη απαδενυλάση CNOT6 και ο IQSEC3 να ελέγχεται από τη CNOT6L. Στην παρούσα όμως εργασία εξετάσθηκε η πιθανή επίδραση και των πέντε απαδενυλασών που μελετάμε (PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7, CNOT8), στις πολυ(A) ουρές των mRNA που εξετάσαμε και όχι μόνο η επίδραση των απαδενυλασών από τις οποίες βρέθηκαν μέσω των μικροσυστοιχιών να ελέγχονται.

## Ο ρόλος των μεταγράφων-στόχων EPHA7, ITGB3 και IQSEC3 στον καρκίνο

### EPH receptor A7 (EPHA7)

Οι υποδοχείς εφρίνης (Eph) αποτελούν τη μεγαλύτερη υπο-οικογένεια υποδοχέων κινάσης τυροσίνης. Οι προσδέτες τους, οι εφρίνες (ephrins) είναι αγκυροβολημένοι στην κυτταρική μεμβράνη. Οι αλληλεπιδράσεις Eph / ephrin

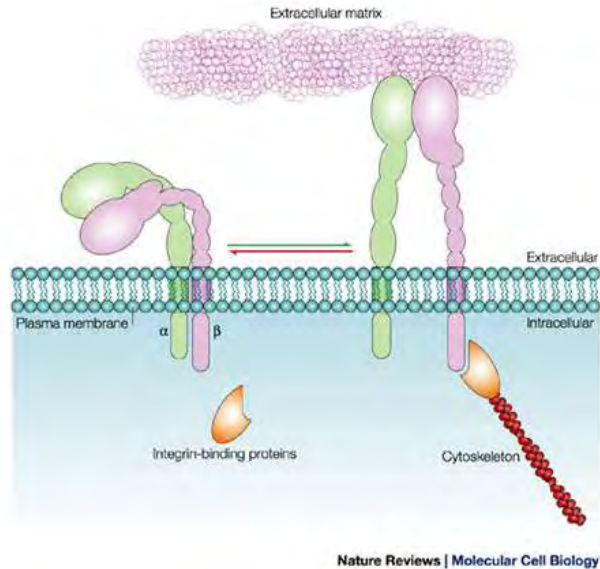
συμβαίνουν σε περιοχές επαφής του ενός κυττάρου με το άλλο, δεδομένου ότι και τα δύο μόρια δεσμεύονται μεμβράνη. Από αυτή την άποψη, οι υποδοχείς Ephs και οι προσδέτες τους εφρίνες (eprhins) έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αμφίδρομη επικοινωνία-σηματοδότηση μεταξύ των κυττάρων. Μέχρι σήμερα, η σηματοδότηση Eph / ephrin θεωρείται ότι συμβάλλει σε ένα ευρύ φάσμα αναπτυξιακών διεργασιών, όντας σε θέση να ρυθμίζουν την κυτταρική συγκόλληση, την μετανάστευση ή χημειο-απόπτωση και τον σχηματισμό συνόρων μεταξύ ιστών / κυττάρων . Πέρα από τον αρχικό τους ρόλο στις αναπτυξιακές διαδικασίες οι υποδοχείς εφρίνης συχνά υπερεκφράζονται σε ανθρώπινους κακοήθεις όγκους και σχετίζονται με την ανάπτυξη του όγκου, την διήθηση, την μετάσταση και την αγγειογένεση. Αξίζει να σημειωθεί, ότι οι Ephs θεωρούνται κύριοι ρυθμιστές ικανοί είτε να τονώνουν τις δραστηριότητες των ογκογόνων δικτύων σηματοδότησης ή να τις καταστέλλουν, ανάλογα με τη διέγερση από την εφρίνη και άλλους συναφείς παράγοντες. Αρκετοί Ephs ή / και εφρίνες εκφράζονται επίσης σε αμφοτέρα τα καρκινικά κύτταρα και το μικροπεριβάλλον του όγκου, όπου επηρεάζουν τις ιδιότητες του όγκου επιτρέποντας την ανώμαλη επικοινωνία κύτταρου-κύτταρου εντός και μεταξύ των διαμερισμάτων του όγκου. Πολλά κλινικά στοιχεία έχουν αποδείξει ότι οι Ephs υπερεκφράζονται σε μία ποικιλία όγκων, που συνδέονται με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους ζωτικής σημασίας για τη διαχείριση των ασθενών και την πρόγνωση. Έτσι, η σηματοδότηση eph / ephrin έχει θεωρηθεί ως ελκυστικός στόχος για το σχεδιασμό φαρμάκων, καθώς στοχεύοντας αυτά τα μόρια θα μπορούσαν ταυτόχρονα να ανασταλούν διάφορες πτυχές της ανάπτυξης και της εξέλιξης του όγκου (Giaginis et al., 2014).



**Εικόνα 5:** Γενικά χαρακτηριστικά των υποδοχέων Eph και των εφρινών. Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει ένα κύτταρο που εκφράζει ephrinA- και ephrinB- (επάνω) σε επαφή με ένα υποδοχέα-Eph που εκφράζεται από ένα άλλο κύτταρο (κάτω) (Egea & Klein, 2007)

### **Integrin subunit beta 3 (ITGB3)**

Το γονίδιο *Itgb3* κωδικοποιεί τη αλυσίδα βήτα 3 των ιντεγκρινών. Οι ιντεγκρίνες είναι αναπόσπαστες πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας και αποτελούνται από μία άλφα αλυσίδα και μία βήτα αλυσίδα. Μια δεδομένη αλυσίδα μπορεί να συνδυαστεί με πολλές άλλες αλυσίδες με αποτέλεσμα να υπάρχουν πολλές διαφορετικές ιντεγκρίνες. Η βήτα 3 αλυσίδα βρίσκεται μαζί με την αλυσίδα άλφα IIb σε αιμοπετάλια. Οι ιντεγκρίνες είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην προσκόλληση κυττάρων, καθώς και στη κυτταρικά διαμεσολαβούμενη σηματοδότηση. Οι ιντεγκρίνες όπως αναφέραμε είναι μόρια κυτταρικής προσκόλλησης που αποκρίνονται σε μηχανικά ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος και συμβάλλουν στην επαγόμενη από την εξωκυττάρια μήτρα (ECM) σηματοδότηση σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις όπως τη φλεγμονή και τον καρκίνο. Οι ιντεγκρίνες βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου και στο μικροπεριβάλλον και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη του όγκου και ρυθμίζουν τα μονοπάτια επιβίωσης. Υπερέκφραση των ιντεγκρινών έχει συσχετισθεί με επιθηλιακές κακοήθειες, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της διήθησης, της μετάστασης, και της αγγειογένεσης. Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις για το ρόλο των ανώμαλα εκφρασμένων ιντεγκρινών στην παθοφυσιολογία του γλοιοβλαστωματος. Οι β3 και β5 ιντεγκρίνες έχει βρεθεί να εμπλέκονται στην αγγειογένεση, και αρκετές προσεγγίσεις που στοχεύουν σε αυτά τα μόρια είναι υπό κλινική έρευνα. Οι β1 ιντεγκρίνες, οι οποίες συντονίζουν ευρύτερες λειτουργικές δραστηριότητες όπως η φλεγμονή, ο πολλαπλασιασμός, η προσκόλληση και η διήθηση, έχουν πρόσφατα βρεθεί να συμβάλλουν στη θεραπευτική αντίσταση σε πολλαπλά στερεά μοντέλα καρκίνου και αιματοποιητικές κακοήθειες. Τέλος η γνώση της σχέσης μεταξύ ιντεγκρινών και υποδοχέων κινάσης τυροσίνης έχει θέσει τα θεμέλια για νέες προσεγγίσεις για την θεραπεία του καρκίνου. Συγκεκριμένα, η στόχευση σε ιντεγκρίνες που συνδέονται με RTKs είναι μια αναδυόμενη προσέγγιση για την αναστολή της αγγειογένεσης (Carbonell et al., 2013).



**Εικόνα 6:** Οι ιντεγκρίνες περιλαμβάνουν άλφα και βήτα υπομονάδες που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και φτάνουν στον εξωκυτταρικό χώρο. Αμφότερες οι άλφα και βήτα υπομονάδες έχουν μια σύντομη κυτταροπλασματική ουρά στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης του πλάσματος και μια μακρά εξωκυτταρική περιοχή που προεξέχει από την εξωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης, η οποία εφάπτεται με το εξωκυτταρικό πλέγμα (ECM). Μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των εξωκυτταρικών και πλησίον της μεμβράνης περιοχών τους, φέρει τις άλφα και βήτα υπομονάδες μαζί σε ένα ετεροδιμερές. Οι κοντές κυτταροπλασματικές ουρές και των δύο, άλφα και βήτα υπομονάδων των ιντεγκρινών αλληλεπιδρούν με μία γκάμα ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών. Αυτές οι ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες που συνδέονται με την ιντεγκρίνη συνδέονται επίσης και με τον κυτταροσκελετό, υποβάλλοντας με τον τρόπο αυτό τις ιντεγκρίνες σε μηχανικές πιέσεις που δημιουργούνται από τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (δεξιά πλευρά του σχήματος). Μία μη-ομοιοπολική αλληλεπίδραση μεταξύ των κυτταροπλασματικών ουρών μιας ανενεργής ιντεγκρίνης παρεμποδίζει την ενεργοποίηση αυτής (αριστερή πλευρά του σχήματος) (Kinbara et al., 2003).

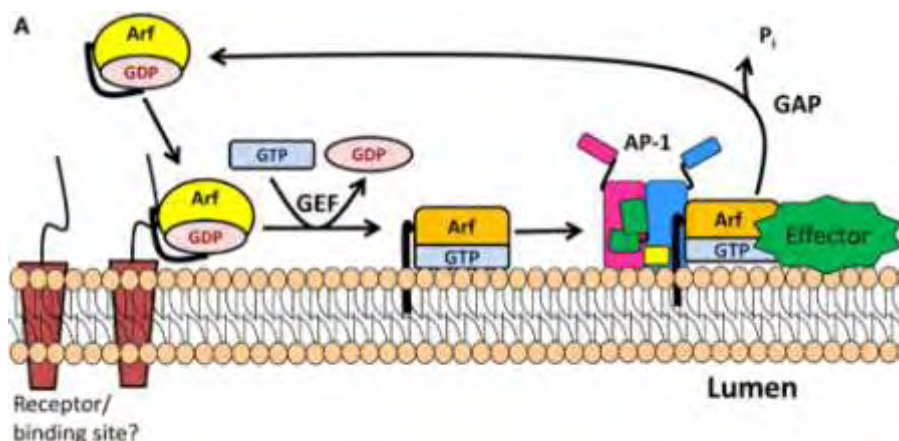
### **IQ motif and Sec7 domain 3 (IQSEC3)**

Ο IQSEC3 δρα ως παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEF) για την ARF1. Γενικότερα οι παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEFs) είναι πρωτεΐνες ή περιοχές πρωτεϊνών (domains) που ενεργοποιούν μονομερείς GTPases διεγείροντας την απελευθέρωση της διφωσφορικής γουανοσίνης (GDP) ώστε να επιτραπεί η σύνδεση της τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP). Οι GTPάσες δρουν ως μοριακοί διακόπτες σε ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης και έχουν πολλούς καθοδικούς στόχους. Οι πιο γνωστές GTPases περιλαμβάνουν τη Ras υπεροικογένεια και εμπλέκονται σε απαραίτητες κυτταρικές διεργασίες όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός, η οργάνωση του κυτταροσκελετού και η πυρηνική μεταφορά. Οι GTPάσες είναι ενεργές όταν συνδέονται με GTP και ανενεργές όταν συνδέεται με το GDP, επιτρέποντας τη δραστηριότητά τους να ρυθμίζεται από τις GEFs και τις GAPs. Οι παράγοντες ριβοζυλίωσης του ADP (ARFs) της υπεροικογένειας Ras είναι πρωτεΐνες που συνδέονται με GTP (GTPases) και

χρειάζονται βοήθεια από άλλες πρωτεΐνες για την εναλλαγή δέσμευσης μεταξύ GTP και GDP. Οι πρωτεΐνες απενεργοποίησης GTPάσης (GAPs) αναγκάζουν τις ARF πρωτεΐνες να υδρολύουν το δεσμευμένο GTP σε GDP, και οι παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης αναγκάζουν τις ARF να δεσμεύσουν ένα νέο μόριο GTP στη θέση ενός δεσμευμένου GDP.

Όσον αφορά τον καρκίνο, οι GEFs είναι πιθανός στόχος για την θεραπεία της ασθένειας λόγω του ρόλου τους σε πολλές οδούς σηματοδότησης, ιδιαίτερα τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Για παράδειγμα, πολλοί καρκίνοι προκαλούνται από μεταλλάξεις στο μονοπάτι MAPK / ERK και οδηγούν σε ανεξέλεγκτη ανάπτυξη. Η GEF SOS1 ενεργοποιεί τις Ras, των οποίων στόχος είναι η κινάση Raf. Η Raf είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο επειδή μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη αυτή έχουν βρεθεί σε πολλούς καρκίνους (Quilliam et al., 2002). Η Rho GTPάση Vav1, η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί από τον υποδοχέα GEF, έχει δείχθει ότι προάγει τον πολλαπλασιασμό των όγκων σε καρκίνο του παγκρέατος (Fernandez-Zapico et al., 2005). Οι GEFs αντιπροσωπεύουν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους, δεδομένου ότι μπορούν ενδεχομένως να παίζουν ρόλο στη ρύθμιση αυτών των οδών μέσω της ενεργοποίησης των GTPασών.

Η πρωτεΐνη IQSEC3 όπως αναφέρθηκε είναι ένας παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης και περιέχει έναν μοτίβο IQ, ακολουθούμενο από ένα μοτίβο sec7 και στη συνέχεια ένα PH. Λειτουργεί ως ARF-GEF για την οικογένεια ARF των GTPασών. Οι ARF όπως είπαμε συνδέονται με δύο μορφές του νουκλεοτιδίου γουανοσίνη, τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP) και διφωσφορική γουανοσίνη (GDP). Το σχήμα του ARF μορίου εξαρτάται από τη μορφή με την οποία δεσμεύεται, επιτρέποντάς της να εξυπηρετήσει σε μια ρυθμιστική ικανότητα.



**Εικόνα 7:** Ο Arf / GEF / GAP κύκλος. (A) Το GDP-Arf είναι κυττασολικό και πιστεύεται ότι στρατολογείται στον μεμβρικό του στόχο από την αλληλεπίδραση με έναν υποδοχέα. Η ανταλλαγή του Arf-δεσμευμένου GDP με το GTP καταλύεται από έναν Arf-GEF, ο οποίος προκαλεί μια διαμορφωτική αλλαγή στον Arf και προκαλεί την απελευθέρωση του GDP. Arfs που δεσμεύουν GTP προσδένονται στη μεμβράνη μέσω του N-αμινοτελικού τους άκρου και στρατολογούν κυττασολικές πρωτεΐνες που λειτουργούν ως τελεστές (effectors). Ένας από αυτούς τους τελεστές είναι ένας Arf-GAP, ο οποίος προάγει την δραστικότητα GDPάσης της Arf, με αποτέλεσμα την αποκόλληση της από τη μεμβράνη (Bonnemaison et al., 2013).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η κύρια αιτία θνησιμότητας από καρκίνο σε όλο τον κόσμο, κυρίως λόγω της καθυστερημένης διάγνωσης, της κακής πρόγνωσης και της ετερογένειας των όγκων. Έτσι, η ανάγκη για βιοδείκτες οι οποίοι θα βοηθήσουν στην ταξινόμηση και την θεραπεία παραμένει έντονη και επιτακτική και εξαρτάται από την καλύτερη κατανόηση της παθοβιολογίας του όγκου και των υποκείμενων μηχανισμών. Η απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου και μια κρίσιμη παράμετρος είναι η σταθερότητα των mRNAs που μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα μεταγράφων αλλά και πρωτεϊνών ογκογιδίων και/ ή μειωμένα επίπεδα μεταγράφων και πρωτεϊνών ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η βράχυνση των πολυ(A) ουρών των mRNAs καθορίζει τη σταθερότητα τους, καθώς είναι συνήθως το πρώτο βήμα στην αποικοδόμηση του mRNA, και καταλύεται από τις απαδενυλάσες.

Στην παρούσα μελέτη, έγινε προσπάθεια να αποσαφηνιστεί περαιτέρω ο ρόλος των απαδενυλασών στον καρκίνο. Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκε η επίδραση των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6-LIKE, CNOT7 και CNOT8 στο μήκος των πολυ(A) ουρών επιλεγμένων μεταγράφων που σχετίζονται με τον καρκίνο. Τα μετάγραφα αυτά είναι ο υποδοχέας εφρίνης EPH receptor A7 (EPHA7), η αλυσίδα β3 των ιντεγκρινών Integrin subunit beta 3 (ITGB3) και ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης IQ motif and Sec7 domain 3 (IQSEC3). Η επιλογή αυτών των μεταγράφων έγινε από προηγούμενα πειράματα μικροσυστοιχιών(παράγραφος 1.2) καθώς και από εργασίες που εξετάζουν τον ρόλο των παραγόντων στον καρκίνο .

## 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1 Κυτταρική σειρά - Χειρισμοί

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά NCI-H520. Πρόκειται για ανθρώπινη κυτταρική σειρά από καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα. Τα κύτταρα της κυτταρικής αυτής σειράς σχηματίζουν μονόστιβες επιθηλιακές επιφάνειες στο ταπήτιο ανάπτυξης.



## Απόψυξη κυττάρων

- 1) Τα φιαλίδια (cryovials) που περιέχουν τα κύτταρα από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  (ή υγρό άζωτο) όπου ήταν αποθηκευμένα, εμβαπτίζονται σε υδατόλουτρο ( $37^{\circ}\text{C}$ ) με ήπια ανάδευση.
- 2) Αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα, γίνεται καθαρισμός του φιαλιδίου με αιθανόλη (70%) εξωτερικά.
- 3) Ακολουθεί μεταφορά του αιωρήματος των κυττάρων σε φάλκον 15ml με επιπλέον προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού μέχρι τα 10ml.
- 4) Φυγοκέντρηση του αιωρήματος στις 1500rpm για 2min.
- 5) Μεταφορά στον απαγωγό και απομάκρυνση του υπερκειμένου, προκειμένου να αποβάλουμε το DMSO που περιέχεται στο αρχικό κρουοπροστατευτικό θρεπτικό υλικό των κυττάρων και δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξή τους.
- 6) Προσθήκη 10 ml θρεπτικού RPMI (10% FBS) και μεταφορά σε T25 flask.
- 7) Επώαση των κυττάρων στους  $37^{\circ}\text{C}$  μέχρι να προσκολληθούν στο ταπήτιο της φλάσκας.
- 8) Αφού η πληρότητα των κυττάρων φτάσει το 90-100%, μεταφέρουμε τα κύτταρα μετά από τρυψινοποίηση σε T75 flask.

## Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων είναι απαραίτητη η διαδικασία της θρυψινοποίησης. Για να προβούμε σε θρυψινοποίηση, η πληρότητα των κυττάρων στο ταπήτιο της φλάσκας ανάπτυξης θα πρέπει να είναι 90-100%. Έτσι λοιπόν ακολουθούμε τα εξής βήματα:

- 1) Παρατηρούμε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο. Ελέγχουμε και σημειώνουμε:
  - α. Μορφολογία κυττάρων
  - β. Πληρότητα ταπητίου (confluency).
- 2) Απομακρύνουμε (με αναρρόφηση) το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας.
- 3) «Ξεπλένουμε» τα κύτταρα με διάλυμα PBS 1x (\*) το οποίο εμποδίζει την αναστολή της τρυψίνης (η οποία θα προστεθεί στο επόμενο βήμα) από αναστολείς πρωτεασών που υπήρχαν στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας.
- 4) Προσθέτουμε διάλυμα τρυψίνης-EDTA 0.05% (1ml για φιάλη  $75\text{cm}^2$ ) ώστε να σπάσουν τα συσσωματώματα των κυττάρων και να ξεκολλήσουν τα κύτταρα από το πάτο του ταπητίου ανάπτυξης.
- 5) Ανακινούμε τη φιάλη έτσι ώστε το διάλυμα τρυψίνης να καλύψει όλο το ταπήτιο.
- 6) Μεταφέρουμε τα κύτταρα στον επωαστήρα (κλίβανος  $37^{\circ}\text{C}$ ) για περίπου 2-3min. Παρατηρούμε το σχήμα των κυττάρων στο μικροσκόπιο, και ελέγχουμε αν έχουν αποκτήσει σφαιρική μορφή.
- 7) Προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού RPMI, 1% Antibiotic-antimycotic και FBS(10%) (10ml θρεπτικού για φιάλη  $75\text{cm}^2$ ).

- 8) Επαναιωρούμε τα κύτταρα και τα διασπείρουμε ομοιόμορφα με πιπέτα (των 10ml).
- 9) Στο σημείο αυτό μπορούμε να χωρίσουμε τα κύτταρα σε δύο ή περισσότερες φλάσκες ή απλά να απομακρύνουμε μέρος των κυττάρων στην ήδη υπάρχουσα φλάσκα.
- 10) Κάθε φορά που γίνεται η τρυψινοποίηση, καταγράφεται ως πέρασμα (π.χ. πέρασμα p25-passage 25).

(\* Σημείωση: το PBS διάλυμα που χρησιμοποιείται στον χειρισμό των κυττάρων, είναι φιλτραρισμένο και αποστειρωμένο

### **Συλλογή των κυττάρων**















- 1)\* Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων με παγωμένο και αποστειρωμένο PBS 1x (3 φορές).
- 2)\* Θρυψινοποίηση των κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται παραπάνω.
- 3)\* Ομογενοποίηση των αποκολλημένων κυττάρων με πιπετάρισμα σε PBS 1x (ή RPMI), και μεταφορά τους σε tubes 1,5ml.
- 4) Φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5 min στις 3000rpm στους 4°C.
- 5) Απομάκρυνση του υπερκείμενου προσεκτικά και φύλαξη του ιζήματος στους -80 °C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν πειραματικά.

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

### **3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα**

Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση ήδη μετασηματισμένων βακτηρίων στα οποία είχαν εισαχθεί πλασμιδιακοί φορείς (pLKO.1-puro) κλωνοποιημένοι με shRNAs που στοχεύουν στην αποσίωση των αποδενυλασών που μας ενδιαφέρουν (PARN CNOT6, CNOT6-LIKE, CNOT7 και CONT8). Για τον πολλαπλασιασμό αυτών των βακτηρίων και κατ'επέκταση των πλασμιδίων που περιέχουν τα shRNAs, κάναμε υγρή καλλιέργεια στην οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη κάθε μετασηματισμένου με διαφορετικό shRNA βακτηρίου, 160ml θρεπτικού και 160ml του αντιβιοτικού αμπικιλίνη. Στη συνέχεια, ακολούθησε λύση των παραπάνω βακτηρίων και συλλογή των πλασμιδίων σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο.

## Πρωτόκολλο NucleoSpin® Plasmid (NoLid)

	NucleoSpin® Plasmid	NucleoSpin® Plasmid (NoLid)	
<b>1</b> Cultivate and harvest bacterial cells			11,000 x g, 30 s
<b>2</b> Cell lysis			250 µL Buffer A1 250 µL Buffer A2 RT, up to 5 min 300 µL Buffer A3
<b>3</b> Clarification of the lysate			11,000 x g, 5–10 min
<b>4</b> Bind DNA			Load supernatant  11,000 x g, 1 min
<b>5</b> Wash silica membrane			<i>(Optional: 500 µL Buffer AW: RT or 50 °C)</i>  600 µL Buffer A4 11,000 x g, 1 min
<b>6</b> Dry silica membrane			11,000 x g, 2 min
<b>7</b> Elute DNA			50 µL Buffer AE RT, 1 min  11,000 x g, 1 min

**Εικόνα 8:** Συγκενρωτικό πρωτόκολλο απομόνωσης RNA και πρωτεϊνών με το NucleoSpin® Plasmid (NoLid)

### **Υλικά-Αντιδραστήρια**

- Θρεπτικό υλικό: RPMI, 10% FBS, 1% Antibiotic-antimycotic
- PBS 1x (Phosphate Buffer Salts): 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

- RPMI (Biosera)
- FBS (Biosera)
- Antibiotic-antimycotic (Gibco)
- DMSO (Sigma)
- Τρυψίνη (Biosera)
- EDTA (Merck)
- NaCl (Merck)
- KCl (Merck)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)
- Αιθανόλη (Sigma)

### 3.3 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με χρήση λιποσωμάτων

#### 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* (χάρη στα οποία έλαβαν και το βραβείο Nobel στην Ιατρική ή Φυσιολογία το 2006) 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).

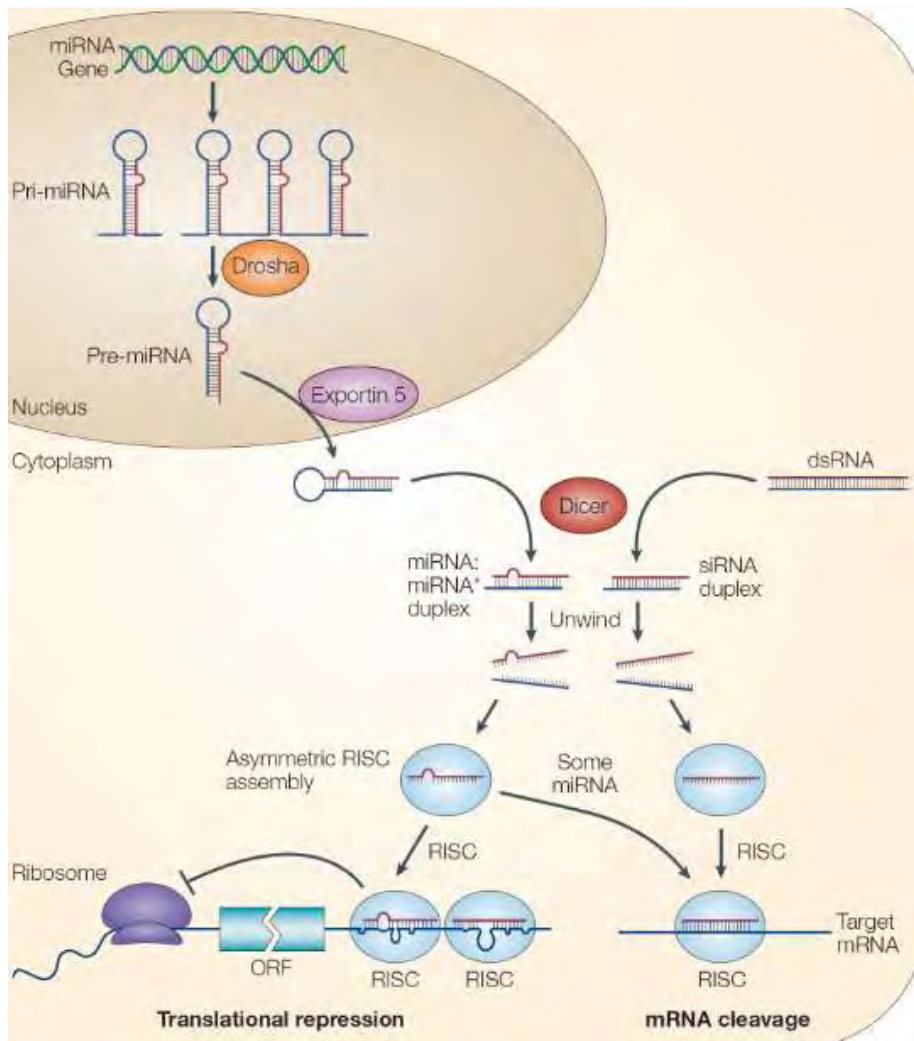
Τα δίκλιωνα μόρια που προκαλούν τη γονιδιακή σίγηση στο RNAi, είτε παράγονται ενδογενώς από μικρά μη-μεταφραζόμενα RNAs γνωστά ως miRNAs, είτε χορηγούνται εξωγενώς στο κύτταρο και ονομάζονται μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs). Σε αντίθεση με τα miRNAs, τα siRNAs σχετίζονται με την αποσιώπηση που προκύπτει λόγω διαγονιδίων, ιών, τρανσποζονίων και εισαγόμενων RNAs, 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, shRNA) επεξεργάζονται από το σύμπλοκο Dicer, ένα ένζυμο με δράση παρόμοια με την RNAάση III. Ως αποτέλεσμα παράγονται μικρότερα μόρια, τα siRNAs, τα οποία φέρουν 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 σύμπλοκο σίγησης επαγόμενο από RNA - 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 mRNA-στόχους, γεγονός που πυροδοτεί την ενδονουκλεοτιδική τμήση των τελευταίων (Εικόνα 9).

**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). Σε αντίθεση με τα siRNAs, τα miRNAs δεν οδηγούν συνήθως σε τμήση του mRNA-στόχου αλλά σε καταστολή της μετάφρασής του. Έχει δειχθεί πως ενισχύουν επίσης και την αποικοδόμηση του mRNA, ενώ ένας τρίτος λιγότερο μελετημένος μηχανισμός τα εμπλέκει στην αναδιοργάνωση της ετεροχρωματίνης (Derek et al., 2003, Lippman & Martienssen, 2004).

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 έκφρασης του (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Μονοπάτια παραγωγής miRNAs και siRNAs μορίων

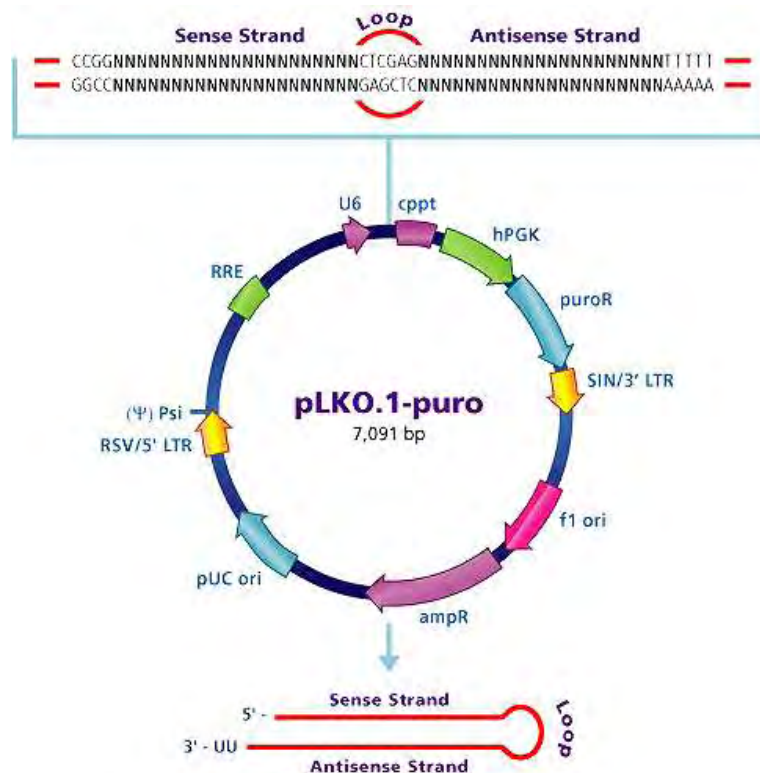
## Αποσιώπηση απαδενυλασών

Προκειμένου να γίνει αποσιώπηση των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6-L, CNOT7 και CNOT8 ώστε να ελεγχθεί η επίδραση της αποσιώπησής τους στο μήκος των πολυ(A) ουρών διαφόρων mRNAs πιθανών στόχων των αποδενυλασών αυτών, έγινε διαμόλυνση των κυττάρων NCI-H520 με πλασμιδιακούς φορείς, οι οποίοι έφεραν αλληλουχίες που κωδικοποιούν shRNAs έναντι των 5 αυτών απαδενυλασών.

## Short-Hairpin RNAs (shRNAs)

Για την αποσιώπηση των PARN, CNOT6, CNOT6-L και CNOT8 χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά shRNAs για την κάθε απαδενυλάση ενώ για

την αποσιώπηση της CNOT7 χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικά shRNAs κλωνοποιημένα στο λεντι-ϊικό πλασμιδιακό φορέα pLKO.1-puro . 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 από 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.



**Εικόνα 10:** Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pLKO.1- puro της Sigma. Παρατίθεται και πίνακας με σημαντικές αλληλουχίες-στοιχεία του φορέα

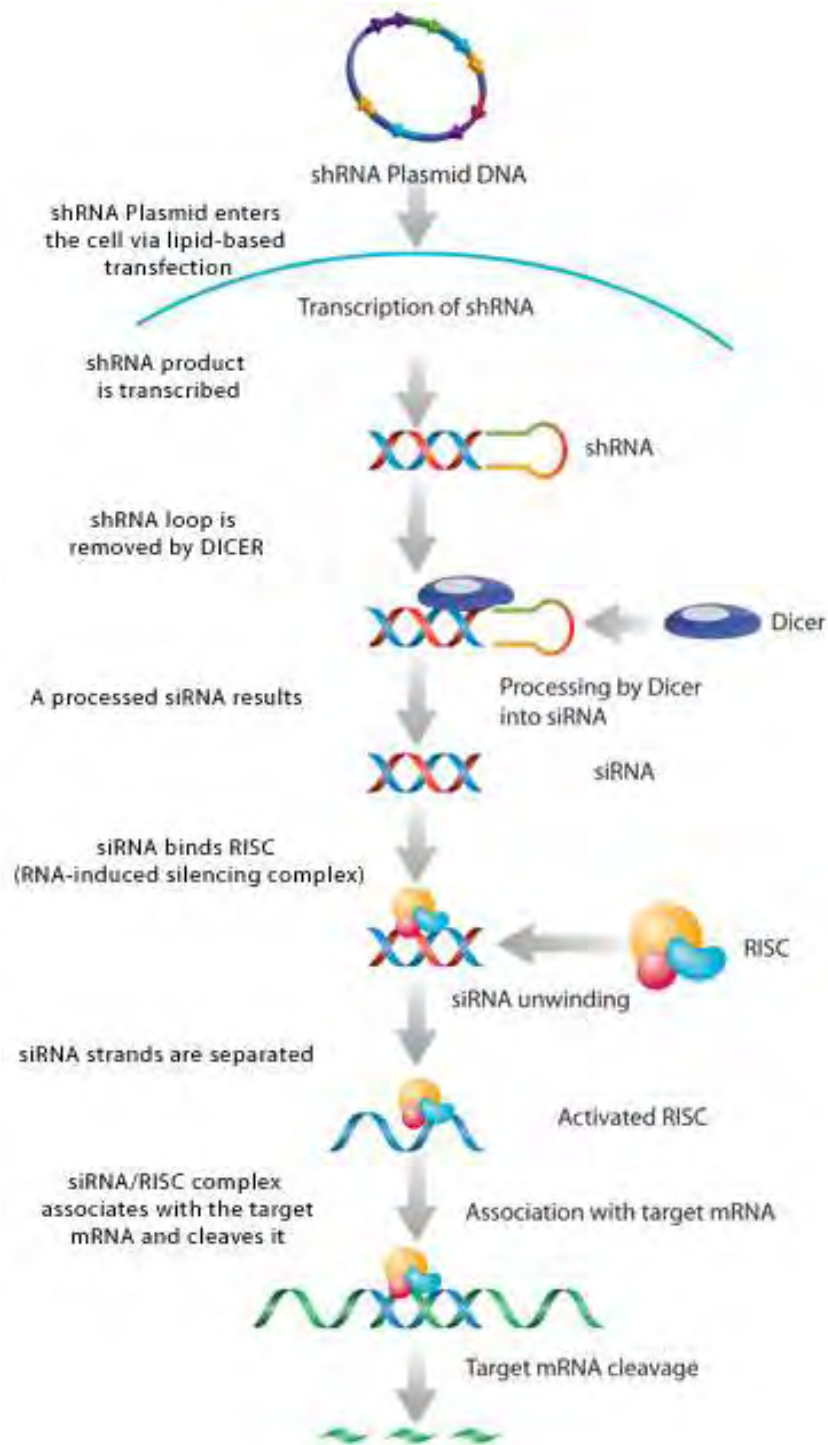
Name	Description
cppt	Central polypurine tract
hPGK	Human phosphoglycerate kinase eukaryotic promoter
puroR	Puromycin resistance gene for mammalian selection
SIN/LTR	3' self inactivating long terminal repeat
	f1 origin of replication
ampR	Ampicillin resistance gene for bacterial selection
pUC ori	pUC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

Ο μηχανισμός δράσης των shRNAs έγκειται στην ενδοκυττάρια μεταγραφή της κλωνοποιημένης στο φορέα αλληλουχίας shRNA με την 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 που αναγνωρίζουν ειδικά τον επιθυμητό mRNA-στόχο, ο οποίος αποικοδομείται μέσω του συμπλόκου σίγησης RISC (Εικόνα 11).

Βάσει του πρωτοκόλλου της Ambion είχαν σχεδιαστεί σε προηγούμενη μελέτη ειδικά και εξειδικευμένα shRNAs για την αποσιώπηση των απαδενυλασών τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Ο σχεδιασμός των shRNAs έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της oligoengine « pSUPER : Manual A Vector System for Expression of Short Interfering RNA». Ενώ διατέθηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich.

Τα siRNAs/shRNAs για να είναι αποτελεσματικά θα πρέπει να διαθέτουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (Taxman et al., 2006), τα οποία παρατίθενται στον πίνακα 2.





**Εικόνα 11:** Μηχανισμός αποσιώπησης μέσω πλασμιδικών φορέων που μεταγράφουν shRNAs.

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά βάσει των οποίων σχεδιάστηκαν τα shRNAs

<b>Κριτήρια επιλογής siRNAs/ shRNAs</b>
<b>Μέγεθος siRNA: ≈21nt με αρχή AA</b>
<b>Επιλογή 2-4 αλληλουχιών στόχων</b>
<b>Αποφυγή καταλοίπων G στα άκρα</b>
<b>5' AA και 3'UU (μεγάλη αποτελεσματικότητα)</b>
<b>30%-50% GC (υψηλό ποσοστό GC μειώνει την αποτελεσματικότητα)</b>
<b>Όχι πολλές επαναλήψεις T ή A γιατί αποτελούν σήμα τερματισμού μεταγραφής από την RNA πολυμεράση</b>
<b>Επιλογή τμημάτων mRNA σε διαφορετικές θέσεις κατά μήκος του γονιδίου</b>

Όλα τα shRNAs που σχεδιάστηκαν στοχεύουν σε διαφορετικές θέσεις κατά μήκος του mRNA των δύο απαδενυλασών και έχουν τη γενική δομή:

**5' – Sense sequence – Hairpin sequence – Antisense sequence – 3'**

Ως control στην αποσιώπηση των απαδενυλασών χρησιμοποιήθηκαν εκτός από κύτταρα WT και κύτταρα στα οποία έχουν εισαχθεί πλασμίδιοκοί φορείς που φέρουν μια εξειδικευμένη αλληλουχία shRNA, η οποία όμως δεν έχει ομολογία προς κανένα γνωστό γονίδιο των θηλαστικών τα λεγόμενα κύτταρα Mock sh (MSH). (Το πλασμίδιο αυτό διατέθηκε επίσης από τη Sigma, και ο χάρτης του φαίνεται στην εικόνα 12.)



**Εικόνα 12:** Πλασμιδιακός φορέας pLKO.1

Η επιλογή των κυττάρων τα οποία έχουν λάβει το πλασμίδιο, έγινε με πουρομυκίνη (6μg/mL), 12h μετά τη διαμόλυνση.

### **Πρωτόκολλο διαμόλυνσης:**

- 1) Πρώτο βήμα αποτελεί η τρυψινοποίηση των κυττάρων μιας T75 flask στην οποία η πληρότητα των κυττάρων είναι 95%-100%. Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται μετά από μέτρηση σε πλάκα Neubauer, και σε αυτή τη φλάσκα μπορούν να φτάσουν ως και  $42,5 \times 10^5$  κύτταρα.
- 2) Σε κάθε well ενός 12-well plate προσθέτουμε το 1/12 από τα παραπάνω τρυψινοποιημένα κύτταρα έτσι ώστε σε κάθε well να έχουμε πληρότητα περίπου 90-95% (50.000 κύτταρα) μετά από 24h, μετά από επώαση στους 37°C. Η πληρότητα αυτή ενδείκνυται για τη διαμόλυνση.
- 3) Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε το X-fect reagent, το οποίο περιέχει το X-fect Polymer και το X-fect Reaction Buffer. Το X-fect Polymer σχηματίζει κατιονικά λιποσωμάτια και επιτρέπει τη διαμόλυνση πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα των θηλαστικών με πολύ μεγάλη απόδοση. Το αντιδραστήριο αυτό συνδυαζόμενο με DNA, σχηματίζει λιποσώματα που συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων και αποχύνουν το περιεχόμενο DNA στο εσωτερικό του κυττάρου (στην περίπτωσή μας μιλάμε για πλασμίδια που φέρουν shRNAs) (Felger et al., 1994). Μεταβολές των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων DNA και X-fect Polymer είναι απαραίτητες για την βελτιστοποίηση της διαμόλυνσης. Επίσης, είναι

αναγκαία στα πειράματα αποσιώπησης και η ύπαρξη κυττάρων που χρησιμεύουν ως control και τα οποία δεν διαμολύνονται, καθώς και ως αρνητικό control κύτταρα τα οποία διαμολύνονται με πλασμιδιακό φορέα ο οποίος φέρει shRNA που δεν έχει ομολογία με κανένα γνωστό mRNA των θηλαστικών, κι έτσι δεν στοχεύει κανένα γονίδιο (συμπεριλαμβανομένου της απαδενυλάσης που μελετούμε), επονομαζόμενα ως Mock sh (MSH) κύτταρα. Η σύγκριση στα επίπεδα έκφρασης των απαδενυλασών των διαμολυσμένων κυττάρων, θα γίνει με τα Mock sh κύτταρα.

- 4) Για το σχηματισμό των λιποσωμάτων ετοιμάζουμε δύο διαλύματα: ένα DNA mix και ένα X-fect mix σύμφωνα με τις εξής ενδείξεις:
  - α. DNA mix: 2μg πλασμιδίου σε 50μl X-fect Reaction Buffer ανά well
  - β. X-fect mix: 0,6μl X-fect Polymer σε 50μl X-fect Reaction Buffer ανά well
- 5) Παρασκευή του transfection mix: Αναμιγνύουμε τα DNA mix και X-fect mix και τα αφήνουμε να επωαστούν για 10 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 (0,5ml) δύο φορές. Πριν την προσθήκη του transfection mix προσθέτουμε θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά-αντιμυκητοκικά και χωρίς ορό (FBS) σε κάθε well (0,5ml RPMI/well).
- 7) Μετά το πέρας του χρόνου επώασης του transfection mix, μοιράζουμε το τελευταίο με κυκλικό τρόπο στα κύτταρα που προορίζονται για διαμόλυνση και αφήνουμε το 12-well plate να επωαστεί στους 37°C.
- 8) Μετά από 5-6h, απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από τα διαμολυσμένα κύτταρα και το αντικαθιστούμε μετά από δύο πλύσεις με 0,5ml PBS 1x, με 0,5ml φρέσκο RPMI (10% FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic) το οποίο περιέχει επιπλέον και το αντιβιοτικό επιλογής (στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πουρομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 1-10μg/ml θρεπτικού υλικού).  
Η συλλογή των διαμολυσμένων κυττάρων έγινε 48h μετά την διαμόλυνση.

### **Υλικά-Αντιδραστήρια**

- Θρεπτικό υλικό: RPMI, 10% FBS, 1% Antibiotic-antimycotic
- PBS 1x (Phosphate Buffer Salts): 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Τρυψίνη: 0,05% EDTA
- X-fect reagent (Clontech)
- shRNAs (Sigma)
- pLKO.1-puro vector (Sigma)
- Puromycin (Sigma)
- RPMI (Biosera)
- FBS (Biosera)
- Antibiotic-antimycotic (Gibco)
- Τρυψίνη (Biosera)
- EDTA (Merck)
- NaCl (Merck)
- KCl (Merck)

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)
- Αιθανόλη (Sigma)
- Neubauer (Poly Optik GmbH)

### 3.4 Απομόνωση ολικού RNA και πρωτεϊνών από κύτταρα θηλαστικών

Για την απομόνωση του RNA από τα κύτταρα NCI-H520 όπου έγινε αποσιώπηση των απαδενυλασών, έγινε χρήση του NucleoSpin® TriPrep kit. Το συγκεντρωτικό πρωτόκολλο απομόνωσης σκιαγραφείται στην εικόνα 13.

NucleoSpin® TriPrep		
1	Homogenize sample	Up to 30 mg
2	Lyse sample	350 µL RP1 3.5 µL β-mercaptoethanol (or comparable reducing agent)
3	Filtrate lysate	1 min, 11,000 x g
4	Adjust DNA and RNA binding conditions	350 µL ethanol (70%)
5	Bind DNA and RNA	Load sample 30 s, 11,000 x g

#### DNA and RNA Purification (both bound to the silica membrane)

6	Wash silica membrane	1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> wash each: 500 µL DNA Wash 1 min, 11,000 x g
7	Dry membrane	RT, 3 min (with open lid)
8	Elute DNA	100 µL DNA Elute Incubate 1 min 1 min, 11,000 x g
9	Digest residual DNA	95 µL DNase reaction mixture RT, 15 min
10	Wash and dry silica membrane	1 <sup>st</sup> wash 200 µL RA2 2 <sup>nd</sup> wash 600 µL RA3 30 s, 11,000 x g 3 <sup>rd</sup> wash 250 µL RA3 2 min, 11,000 x g
11	Elute highly pure RNA	60 µL H <sub>2</sub> O (RNase-free) 1 min, 11,000 x g

**Εικόνα 13:** Συγκεντρωτικό πρωτόκολλο απομόνωσης RNA και πρωτεϊνών με το NucleoSpin® TriPrep kit

## Υλικά-αντιδραστήρια

- NucleoSpin® TriPrep kit

### 3.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε δύο βήματα (Two step Real Time PCR )

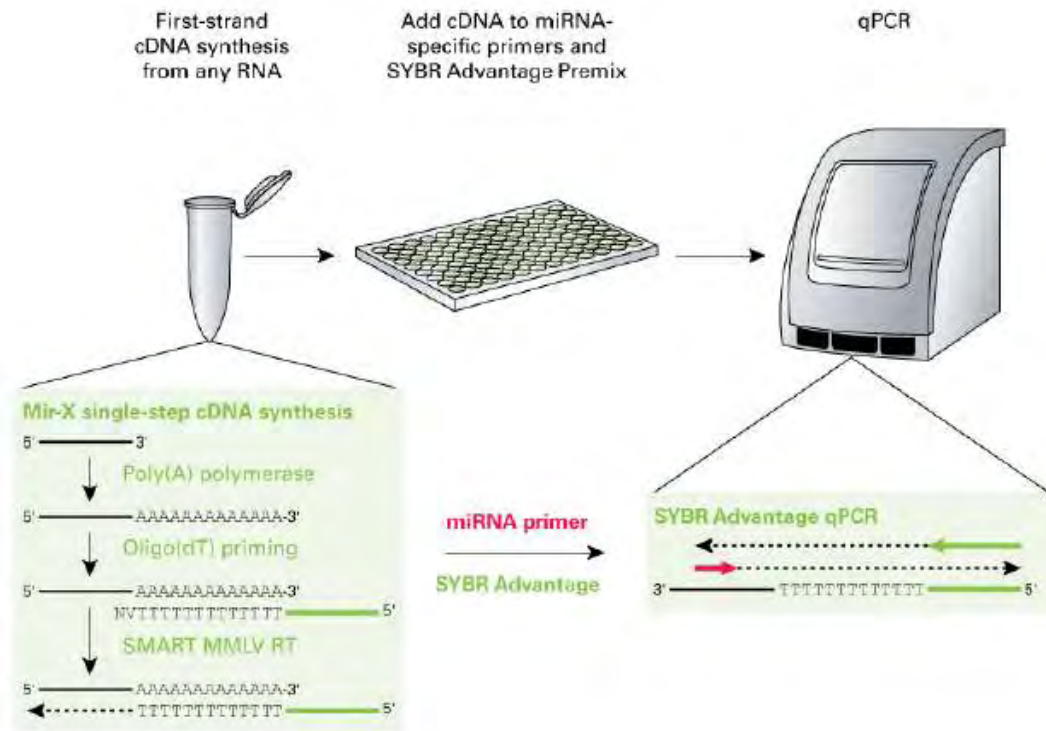
Η Real Time PCR είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού γονιδιακής έκφρασης. Είναι μία ιδιαίτερα ευαίσθητη και εξειδικευμένη τεχνική καθώς μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και ένα αντίγραφο ενός μεταγράφου ή ακόμα να ανιχνεύσει διαφορετικής έντασης έκφραση μεταξύ δύο δειγμάτων σε ποσοστό 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 tube ή σε δύο βήματα (two-steps) όπου η αντίστροφη μεταγραφή και η ενίσχυση του παραγόμενου cDNA πραγματοποιούνται σε διαφορετικά tubes. Η one step Real time PCR θεωρείται ότι μειώνει την πειραματική απόκλιση γιατί οι ενζυμικές αντιδράσεις συμβαίνουν στο ίδιο tube. Ωστόσο αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί μία αρχική RNA μήτρα η οποία είναι επιρρεπής σε αποικοδόμηση.

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 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 εργασία εφαρμόσαμε την ποσοτική two-step RT-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Clontech Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis and SYBR® qRT-PCR. Το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να γίνει σύνθεση cDNA στο πρώτο βήμα, με μήτρα RNA μόρια, , ενώ στο δεύτερο βήμα έγινε η ποσοτικοποίηση των μορίων με ενίσχυση qRT-

PCR. Το Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit χρησιμοποιείται για τη μετατροπή των μορίων mRNA σε cDNA και η ποσοτικοποίηση με RT-PCR θα ήταν αδύνατη σε ένα μόνο βήμα. Έτσι λοιπόν, σε μία μονή αντίδραση όλα τα μόρια RNA πολυαδενυλιώνονται με την πολύ-(A) πολυμεράση, και ακολουθεί αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA, με τη βοήθεια αντίστροφης μεταγραφάσης, η οποία χρησιμοποιεί ως εκκινητή τον oligo-dT primer που έχει συμπληρωματικότητα με την πολυ(A) ουρά (Εικόνα 14).



**Εικόνα 14:** Βήματα που ακολουθούνται στην two-step RT-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Clontech Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis

## Σύνθεση cDNA

Το πρωτόκολλο για τη σύνθεση cDNA ακολουθεί την παρακάτω διαδικασία:

- 1) Σε ένα tube 0.2 ml, ελεύθερο ριβονουκλεασών (RNase-free), γίνεται συνδυασμός των εξής αντιδραστηρίων:

**Πίνακας 3**

Reagent	Volume (μl)
mRQ Buffer (2x)	5
RNA sample (0.25–8 μg)	3.75
mRQ Enzyme	1.25
<b>Total volume</b>	<b>10</b>

- 2) Επωάζουμε σε θερμοκυκλοποιητή για 1h στους 37 °C, και τερματίζουμε για 5min στους 85 °C, για την αδρανοποίηση των ενζύμων.
- 3) Αραιώνουμε το νεοσυντιθέμενο δείγμα cDNA προσθέτοντας 90μl ddH<sub>2</sub>O, φέρνοντας τον τελικό όγκο στα 100μl.
- 4) Το δείγμα cDNA που προκύπτει είναι έτοιμο προς χρήση στην qRT-PCR. Αποθηκεύουμε το δείγμα cDNA στους -20°C, έως ότου γίνει προετοιμασία της PCR, ή αν επιθυμούμε η τελευταία να γίνει άλλη χρονική στιγμή.

## qRT-PCR

Για την ποσοτικοποίηση των mRNAs των απαδενυλασών, εφαρμόστηκε συγκριτική ποσοτική Real Time PCR (Comparative qRT-PCR) με τη μέθοδο  $\Delta\Delta Ct$ , με την οποία η κανονικοποίηση γίνεται με τη βοήθεια ιδιοσυστατικών γονιδίων αναφοράς. Με την εν λόγω μέθοδο, ελέγχθηκαν τα επίπεδα των mRNAs των απαδενυλασών συγκριτικά με τα επίπεδα της  $\beta$ -ακτίνης.

## Μέθοδος $\Delta\Delta Ct$

Ο προσδιορισμός των επιπέδων των mRNAs μεταξύ δύο δειγμάτων (π.χ. control και εξεταζόμενο δείγμα) γίνεται βάσει της παρακάτω εξίσωσης:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Ct_{\text{target (control-treated)}}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref (control-treated)}}}}$$

Όπου:

$E_{\text{target}}$  ο βαθμός ενίσχυσης του mRNA

$E_{\text{ref}}$  ο βαθμός ενίσχυσης του γονιδίου αναφοράς ( $\beta$ -ακτίνης)

$Ct$  ο κύκλος αντίδρασης κατά τον οποίο επιτυγχάνεται η ουδός φθορισμού της χρωστικής παρακολούθησης της ενίσχυσης (SYBR Green dye),

$\Delta Ct_{\text{target}}$  η διαφορά  $Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{treated}}$  του mRNA στο control και στο εξεταζόμενο δείγμα αντίστοιχα

$\Delta Ct_{\text{reference}}$  η διαφορά  $Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{treated}}$  της  $\beta$ -ακτίνης στο control και στο εξεταζόμενο δείγμα.

Ο βαθμός ενίσχυσης  $E$ , θεωρητικά προσεγγίζει την τιμή 2, κάτι που σημαίνει ότι σε κάθε κύκλο αντίδρασης της PCR, ο στόχος διπλασιάζεται.

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων των mRNAs των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6-LIKE, CNOT7 και CONT8 μετά αποσιώπηση τους έγινε με PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια του πίνακα 4, οι εκκινητές του πίνακα 5 και το θερμικό προφίλ που φαίνεται στον πίνακα 6.



**Πίνακας 4:** Ενίσχυση mRNA των PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7, CNOT8 και β-ακτίνης

Reagent	Volume (μl)
<b>K-SYBR mix</b>	<b>10μl</b>
<b>Forward primer(10μM)</b>	<b>0,2μl</b>
<b>Reverse primer(10μM)</b>	<b>0,2μl</b>
<b>Rox dye low</b>	<b>0,4μl</b>
<b>DdH<sub>2</sub>O</b>	<b>7,2μl</b>
<b>cDNA</b>	<b>2μl</b>
<b>Total volume</b>	<b>20μl</b>

Όπου:

**K-SYBR mix** αποτελεί μίγμα πολυ(A) πολυμεράσης, dNTPs, ιόντων Mg<sup>2+</sup>, και χρωστικής παρακολούθησης SYBR Green,

**ROX dye** η χρωστική αναφοράς, η οποία μειώνει το θόρυβο του μηχανήματος (θερμοκυκλοποιητή).

Οι **forward και reverse primers** είναι specific για συγκεκριμένες αλληλουχίες των εκάστοτε αποδενυλασών

Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα, οι αντιδράσεις για την ποσοτικοποίηση των mRNAs έγινε σε triplicates. Για κάθε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών, στην αντίδραση συμπεριλήφθηκε ως αρνητικό control, NTC αντίδραση που στερούνταν δείγματος cDNA (No Template Control).

Ο κάθε εκκινητής ελέγχθηκε ως προς την εξειδίκευση του για το αντίστοιχο cDNA-στόχο με Blastn.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, παρατίθενται στον πίνακα 5.

**Πίνακας 5:** Εκκινητές των παραγόντων που μελετήθηκαν

<b>PARN</b>	<b>FORWARD</b>	CAGCAGAAACATGCCAAAGA
	<b>REVERSE</b>	CCAAGAGTCTGGGCAAACA
<b>CNOT6-L</b>	<b>FORWARD</b>	CGGCTCTTCCAGCTACAAAC
	<b>REVERSE</b>	GGAAGCTGCTCGGATGAAC
<b>CNOT6</b>	<b>FORWARD</b>	TTGCCAAGCTTCACAATCTG
	<b>REVERSE</b>	CCGTCTTGTTCCATCTGGTT

<b>CNOT8</b>	<b>FORWARD</b>	GCATTTGCAGAGGATTGGAA
	<b>REVERSE</b>	TCACTGCTGCATGTTGTTGA
<b>CNOT7</b>	<b>FORWARD</b>	GGATTACAGGAGGTGGCAGA
	<b>REVERSE</b>	GAACCAGAACCAAGGCCATA
<b>b-actin</b>	<b>FORWARD</b>	GGACTTCGAGCAAGAGATGG
	<b>REVERSE</b>	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

Το θερμικό προφίλ του κυκλοποιητή της αντίδρασης PCR για την ποσοτικοποίηση των αποδενυλάσων ορίστηκε ως εξής:

**Πίνακας 6:** Θερμικό προφίλ ενίσχυσης mRNAs των PARN, CNOT6, CNOT7, CNOT8 και β-ακτίνης

<b>Type of reaction</b>	<b>Cycling conditions</b>
Denaturation (1 cycle)	95°C, 3min
Amplification (x40 cycles)	95°C, 3sec
	60°C, 30sec
	72°C, 11sec
	95°C, 1min
Dissociation	55 °C, 30sec
	95 °C, 30sec
(1 cycle)	25°C, 3min

Η ανάλυση των δεδομένων μετά την ενίσχυση των δειγμάτων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος MxPro.

### **Υλικά-Αντιδραστήρια**

- Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis kit (Clontech)
- K-SYBR® qRT-PCR kit (Kapa)

### **3.6 Εξέταση της κατάστασης πολυαδενυλίωσης διαφόρων mRNAs με τη μέθοδο LM-PAT**

Υπάρχουν 3 μέθοδοι με τις οποίες μπορεί να εξετασθεί η κατάσταση πολυαδενυλίωσης ενός συγκεκριμένου mRNA στο πλαίσιο του συνολικού RNA ενός κυττάρου. Η τεχνική oligo(dT)/RNase H-Northern, η οποία χρησιμοποιείται περισσότερο στο εργαστήριο και οι μέθοδοι PAT (poly(A) test) στις οποίες περιλαμβάνονται οι RACE-PAT (rapid amplification of cDNAs ends-PAT) και LM-PAT (ligase mediated-PAT). Οι μέθοδοι PAT είναι αναλύσεις που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και παρέχουν ταχύτητα, ευαισθησία και ποσοτικοποίηση του μήκους της πολυ(A) ουράς ανεξάρτητα από το μέγεθος του mRNA. Μπορούν να διεξαχθούν μέσα σε μια μέρα και μπορούν εύκολα να ανιχνεύσουν την κατάσταση πολυαδενυλίωσης ενός mRNA που υπάρχει σε ποσότητες υποναογραμμαρίων του συνολικού κυτταρικού RNA. Οι δοκιμασίες PAT είναι δύο σταδίων. Αρχικά συντίθενται τα PAT cDNAs και στη συνέχεια, το μήκος της πολυ(A) ουράς του κάθε mRNA εντός του δείγματος προσδιορίζεται με μία απλή PCR αντίδραση. Με τις PAT δοκιμασίες όλα τα προϊόντα που παράγονται από την υβριδοποίηση του primer σε ένα εσωτερικό σημείο της πολυ(A) ουράς θα δώσουν μια ζώνη σε ένα χαμηλότερο μοριακό βάρος από τη ζώνη του αμπλικονίου της πολυ(A) ουράς. Η δοκιμασία RACE-PAT είναι κατάλληλη για έλεγχο πολλών διαφορετικών δειγμάτων ή σε περιπτώσεις όπου οι αλλαγές στη πολυαδενυλίωση είναι μεγάλες ενώ η δοκιμασία LM-PAT θυσιάζει ένα μικρό ποσό της ευαισθησίας και του χρόνου για να κερδίσει πιο ακριβή ποσοτικοποίηση του μήκους της πολυ(A) ουράς. Η τελευταία προτιμάται όταν εξετάζονται κοντές πολυ(A) ουρές ή όταν υπάρχουν λιγότερο δραματικές αλλαγές στο μήκος της πολυ(A) ουράς (Salles et al., 1999).

#### **Μέθοδος RACE-PAT**

Η μέθοδος RACE-PAT είναι μια εφαρμογή του 3' RACE (ταχεία ενίσχυση των άκρων του cDNA) πρωτοκόλλου, όπου το ολικό κυτταρικό RNA υφίσταται αντίστροφη μεταγραφή με ένα ολίγο(dT) εκκινητή συνδεδεμένο με ένα πλούσιο σε G / C anchor [oligo(dT) anchor] (Εικόνα 15). Η υβριδοποίηση του τμήματος ολίγο (dT) του εκκινητή στις πολυ (A) ουρές του mRNA, μπορεί να συμβεί οπουδήποτε σε όλο το μήκος της πολυ(A) ουράς. Ως εκ τούτου, μετά από αντίστροφη μεταγραφή θα συντεθεί μια ετερογενής ομάδα cDNAs η οποία έχει προκύψει από υβριδοποίηση του εκκινητή σε όλες τις πιθανές θέσεις κατά μήκος της πολυ(A) ουράς. Έπειτα με μία αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε αυτή την ομάδα cDNAs με ένα ειδικό εκκινητή και τον ολίγο(dT) anchor αποδίδει ένα μίγμα ενισχυμένων PCR προϊόντων που αντιπροσωπεύουν το μήκος της πολυ(A) ουράς του ειδικού RNA που μας ενδιαφέρει. Η αλληλουχία του anchor στον ολίγο(dT) anchor χρησιμεύει στην πρόληψη της προοδευτικής βράχυνσης των ομοπολυμερών(dA) που αντιπροσωπεύουν την πολυ(A) ουρά κατά τη διάρκεια της PCR ενίσχυσης. Μόλις συντεθούν τα cDNAs από το RACE-

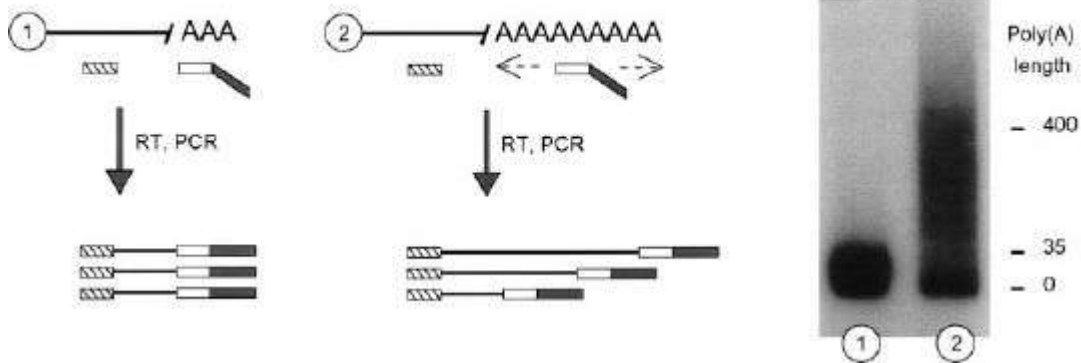
PAT, είναι σταθερά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της κατάστασης της πολυ(A) ουράς κάθε mRNA εντός του μείγματος με μια απλή PCR (Salles et al., 1999).

### **Μέθοδος LM-PAT**

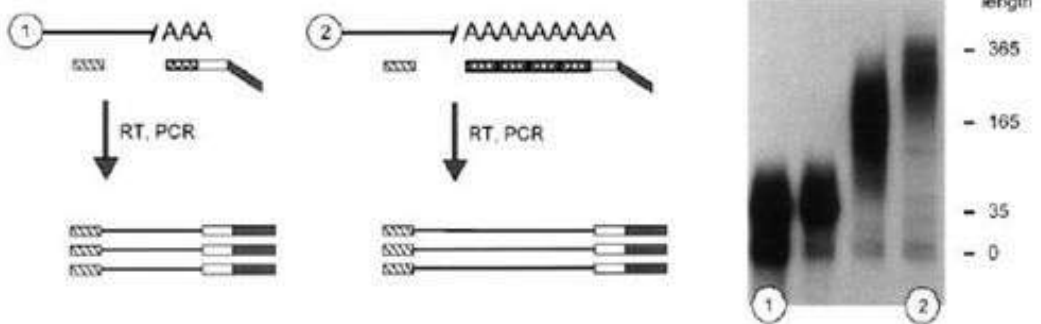
Η μέθοδος LM-PAT είναι μία τροποποίηση της RACE-PAT σχεδιασμένη ώστε να είναι πιο ευαίσθητη στις μεταβολές του μήκους της πολυ(A) ουράς στοχεύοντας ειδικά τον ολιγο(dT) anchor στο 3' άκρο της πολυ (A) ουράς (Εικόνα 15).

Για να επιτευχθεί αυτό, γίνεται κορεσμός της πολυ(A) ουράς με φωσφορυλιωμένο ολιγο(dT)<sub>12-18</sub> [p(dT)<sub>12-18</sub>] στους 42 °C παρουσία T4 DNA λιγάσης. Η λιγάση δημιουργεί ένα in situ ολιγο(dT) αντίγραφο της πολυ(A) ουράς. Σε μερικά μόρια RNA, τα 5' και / ή 3' άκρα της πολυ(A) ουράς παραμένουν μη ζευγαρωμένα λόγω της δυσμενούς υβριδοποίησης με το p(dT)<sub>12-18</sub> στους 42 °C. Ο ολιγο-(dT) anchor στη συνέχεια προστίθεται στην αντίδραση σε μία πενταπλάσια μοριακή περίσσεια [πάνω από το p(dT)<sub>12-18</sub>] και σε μειωμένη θερμοκρασία, ευνοώντας την υβριδοποίηση (annealing) του ολιγο(dT) anchor στα μη ζευγαρωμένα άκρα. Ο ολιγο(dT) anchor μπορεί τώρα να συνδεθεί με το 5' άκρο του νεοσυντιθέμενου ολιγο(dT) αντίγραφου της πολυ(A) ουράς. Αυτός ο προσδέδεμενος εκκινήτης στη συνέχεια χρησιμοποιείται ώστε να βοηθήσει την αντίστροφη μεταγραφάση να ξεκινήσει (prime) την αντίστροφη μεταγραφή του mRNA. Όταν τα LM-PAT cDNAs συντεθούν, είναι σταθερά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της κατάστασης της πολυ(A) ουράς κάθε mRNA που βρίσκεται ανάμεσα στα υπόλοιπα με μία απλή PCR (Salles et al., 1999).

## RACE-PAT



## LM-PAT



**Εικόνα 15:** Σχηματικά και αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από τις 2 δοκιμασίες πολυαδενυλίωσης που εφαρμόζονται στο mRNA του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου ιστού (tPA). Τα χαρακτηριστικά πολυαδενυλίωσης του mRNA του tPA σε ωοκύτταρα ποντικού χρησιμοποιούνται για να περιγραφούν οι δύο δοκιμασίες πολυαδενυλίωσης. Το mRNA της πρωτεΐνης tPA έχει μια μικρή πολυ(A) ουρά σε ωοκύτταρα που βρίσκονται στο στάδιο του βλαστικού(σπερματικού) κυστιδίου(germinal vesicle-GV). Μετά το σπάσιμο του βλαστικού κυστιδίου(GVBD) το mRNA είναι πολυαδενυλιωμένο με ένα χρονικά εξαρτώμενο τρόπο στο κυτταρόπλασμα και μεταφραστικά ενεργοποιημένο (11, 15). Τα σχηματικά RNAs αντιπροσωπεύουν το mRNA της tPA από ωοκύτταρα GV [κοντή πολυ(A) ουρά] και ωοκύτταρα στα οποία έχουν εξωθεί πολικά σωμάτια [13 ώρες μετά το GVBD ή μακριά πολυ(A) ουρά]. Το σταυρωτά διαγραμμισμένο κουτί [crosshatched] αντιπροσωπεύει το φωσφορυλιωμένο ολίγο(dT)<sub>12-18</sub> [p(dT)<sub>12-18</sub>]. Στην μέθοδο RACE-PAT, λόγω της ικανότητας του ολίγο(dT) anchor για την εκκίνηση της αντίστροφης μεταγραφής από οπουδήποτε κατά μήκος της πολυ(A) ουράς, τα αποτελέσματα εμφανίζονται σαν ένα στερεό επίχρισμα λόγω της υβριδοποίησης(annealing) του primer από το 5' ξεκίνημα της πολυ(A) ουράς προς το 3' άκρο. Τα αποτελέσματα δείχνουν μια πολυ(A) ουρά περίπου 35 nt στο στάδιο GV και 400 nt 13 ώρες μετά το στάδιο GVBD (13-h-post-GVBD). Το μισό άσπρο/ μισό μαύρο κουτί αντιπροσωπεύει τον ολίγο(dT) anchor, το διαγώνια διαγραμμισμένο κουτί παριστάνει τον ειδικό εκκινήτη για την PCR. Στην ανάλυση LM-PAT, λόγω της στόχευσης του ολίγο(dT) anchor προς το 3' άκρο με αντίδραση λιγάσης, η τεχνική μπορεί εύκολα να προσδιορίσει διακριτές μεταβολές στο μήκος της πολυ(A) ουράς με την πάροδο του χρόνου. RACE-PAT: PCR (27 κύκλοι) η οποία περιέχει [32P]dATP, διεξήχθη σε ένα ωοκύτταρο που ισοδυναμεί με το RACE-PAT cDNA και 5% (GV) or 50% (13 h) από το ενισχυμένο με PCR-υλικό οπτικοποιήθηκε με αυτοραδιογραφία και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες σε ένα gel 5%. tPA sense oligo(5'-TCAGATGAGATGACAGGGAGATGCC). Oligo(dT) anchor (5'-GCGAGCTCCGCGGCCGCG-T12). Το minimum αναμενόμενο αμπλικόνιο είναι 534bp [504-bp tPA +30-bp oligo(dT) anchor]. LM-PAT: PCR (30 cycles) η οποία περιέχει [32P]dATP διεξήχθη σε ένα ωοκύτταρο που ισοδυναμεί με LM-PAT cDNA και 25% (GV and 1 h) or 50% (6, 11 h) από το ενισχυμένο με PCR- υλικό οπτικοποιήθηκε με αυτοραδιογραφία και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση υπο μη αποδιατακτικές συνθήκες σε ένα gel 5%. tPA-specific primer (5'-ACTCTATAGATGGTTGGGAG).). Το minimum αναμενόμενο αμπλικόνιο είναι 185 bp [155-bp tPA + 30-bp oligo(dT) anchor] (Salles et al., 1999).

## Πρωτόκολλο LM-PAT (ligase-mediated Poly(A) test)

### Σύνθεση cDNA

1. Τοποθέτηση 5μl RNA κατάλληλης συγκέντρωσης σε νερό DEPC σε στείρο και καθαρό από RNAάσες erpendorf
2. Προσθήκη 2μl p(dT)<sub>12-18</sub> (10 ng/μl DEPC-distilled H<sub>2</sub>O) σε κάθε δείγμα RNA.
3. Μεταφορά στους 65 °C για 5-10min (θερμοκρασία μετουσίωσης)
4. Μεταφορά του erpendorf στους 42 °C (αμέσως). Η απευθείας μεταφορά στους 42 °C βοηθάει στο να εμποδίσει την υβριδοποίηση του p(dT)<sub>12-18</sub> στο τέλος της πολύ(A) ουράς
5. Προσθήκη 13μl από το ακόλουθο προθερμασμένο (42°C) μείγμα  
4μl 5x RT(αντίστροφη μεταγραφή) buffer  
1μl αναστολέα RNAασών (40 U/ml)  
4μl 0.05 M DTT  
1 μl 10 mM απο το μείγμα dNTPs  
1 μl 10 mM ATP (απαιράιτητο για τη λιγάση)  
2 μl T4 DNA ligase (6-40 U), (350U/μl)
6. Επώαση στους 42°C για 30 min.
7. Στο τέλος της επώασης και όσο το παραπάνω μείγμα είναι στους 42°C γίνεται προσθήκη 1 μl oligo(dT) anchor (200 ng/μl), vortex και επώαση στους 12°C για 2h.
8. Μεταφορά του μείγματος στους 42°C για 2 min (αντίδραση λιγάσης)
9. Προσθήκη 0,5μl PrimeScript RT (10U/μl ), vortex και επώαση στους 42°C για 1h.
10. Απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής και της λιγάσης στους 65°C για 20 min.
11. Αποθήκευση στους -20°C

### PCR

- 5μl 10X KAPA Taq PCR buffer  
1 μl 10 mM dNTP mix  
2 μl oligo(dT) anchor (200ng/μl) (reverse primer)  
2 μl message-specific primer (25 pmol/μl) (forward primer)  
0.2 μl KAPA Taq πολυμεράση (5 U/μl)  
3 μl εκμαγείο PAT cDNA  
36,8 H<sub>2</sub>O για αντίδραση 50 μl

**Πίνακας 7:** Εκκινητές των παραγόντων που μελετήθηκαν και μέγεθος των προϊόντων

IQSEC3	FORWARD	GTACCCACTAGGTTCCCT	Product size 248bp
	REVERSE	oligo(dT) anchor	
ITGB3	FORWARD	GCTCATGCCTGTAATTATA	240bp
	REVERSE	oligo(dT) anchor	
EPHA7	FORWARD	GTGTTTTTAAGACAATTA	382bp
	REVERSE	oligo(dT) anchor	

Το θερμικό προφίλ του κυκλοποιητή της αντίδρασης PCR για την ποσοτικοποίηση των στόχων EPHA7, IQSEC3, ITGB3 των αποδενυλασών φαίνεται στον πίνακα 8. Να σημειωθεί ότι για την ενίσχυση του παράγοντα EPHA7 χρησιμοποιήθηκε το ίδιο θερμικό προφίλ με μόνη διαφορά την θερμοκρασία υβριδοποίησης των primers η οποία ορίστηκε στους 50 °C και όχι στους 55°C.

**Πίνακας 8:** Θερμικό προφίλ ενίσχυσης των mRNAs των EPHA7, IQSEC3, ITGB3

<b>Cycling conditions</b>	
Αποδιάταξη δίκλωνων μορίων (1cycle)	95°C, 3min
Ενίσχυση (x34 cycles)	95°C, 30sec (αποδιάταξη δίκλωνων μορίων) 55°C, 45sec (υβριδοποίηση των primers) 72°C, 1min (χρόνος πολυμερισμού)
Ολοκλήρωση των κομματιών που έχουν ενισχυθεί απο την πολυμεράση	72°C, 7min

### Υλικά-Αντιδραστήρια

- Reverse transcriptase (PrimeScript RT, Takara Bio)
- RT Buffer 5x
- RNase inhibitor (40U/μl)
- 0.1 DTT
- 10 mM dNTPs
- 10 mM ATP
- T4 DNA ligase
- 2 μl oligo(dT) anchor (200ng/μl)
- 10x PCR buffer (100mM Tris-HCL, pH 9.00, 500 mM KCl, 1% X-100, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)
- 25 pmol/μl message-specific primer
- Taq polymerase (Kapa)

### 3.7 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων LM-PAT

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR του LM-PAT πραγματοποιήθηκε σε πηκτή αγαρόζης υψηλής ανάλυσης (high resolution agarose) 2,5%. Χρησιμοποιήθηκε TBE 1X ως ρυθμιστικό διάλυμα και η ηλεκτροφόρηση ρυθμίστηκε στα 60V.

#### Υλικά-Αντιδραστήρια

- TBE 10X: Tris base 121,14 g/mol, βορικό οξύ 61,83 g/mol, EDTA 0,5M pH=8
- Loading buffer 6x: Bromophenol Blue 0,09%, Xylene Cyanol 0,09%, Γλυκερόλη 60%, EDTA 60 mM
- Αγαρόζη (Sigma)
- DNA μοριακός μάρτυρας GeneRuler 1 kb Plus (Thermo Fischer)
- DNA μοριακός μάρτυρας RTU 1 kb (GeneDireX)
- Midori Green DNA stain (Nippon Genetics)
- Bromophenolblue (Research Organics)



## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Έλεγχος της αποσιώπησης των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8, με ποσοτική RT-PCR (qPCR)

Για να ελέγξουμε εάν τα μετάγραφα που επιλέχθηκαν αποτελούν στόχους των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6-LIKE, CNOT7 και CNOT8, έγινε γονιδιακή σίγηση των απαδενυλασών αυτών σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά από καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα (NCI-H520). Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η τεχνική LM-PAT ώστε να εντοπισθούν πιθανές μεταβολές στο μήκος της πολυ(A) ουράς των επιλεγμένων μεταγράφων σε κύτταρα NCI-H520 στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση των απαδενυλασών σε σχέση με κύτταρα στα οποία δεν έχει γίνει η αποσιώπηση αυτών, τα επονομαζόμενα κύτταρα Mock sh (κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα με shRNA, το οποίο δεν στοχεύει κανένα γνωστό mRNA των θηλαστικών). Αυτό έγινε με σκοπό να ελεγχθεί αν οι απαδενυλάσες είναι υπεύθυνες για την απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης αυτών των μεταγράφων, καταλύοντας τη βράχυνση της πολυ-(A) ουράς τους. Η αποσιώπηση των απαδενυλασών ελέγχθηκε με ποσοτική RT-PCR και το μήκος της πολυ(A) ουράς των mRNAs που μελετήθηκαν ελέγχθηκε όπως αναφέρθηκε με την τεχνική LM-PAT.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων ανθρώπινης κυτταρικής σειράς από καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα (NCI-H520) με πλασμιδιακούς φορείς, οι οποίοι έφεραν αλληλουχίες που κωδικοποιούν short-hairpin RNAs (shRNAs) έναντι των απαδενυλασών που θέλαμε να αποσιωπήσουμε. Οι απαδενυλάσες που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης της παρούσας πτυχιακής εργασίας και επιτύχαμε την αποσιώπησή τους είναι οι PARN, CNOT6, CNOT6-LIKE (CNOT6L), CNOT7 και CNOT8. Επισημαίνεται ότι για την αποσιώπηση κάθε απαδενυλάσης χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά shRNAs που στόχευαν σε διαφορετικό σημείο του γονιδίου της εκάστοτε απαδενυλάσης, με εξαίρεση την αποσιώπηση της CNOT7 στην οποία χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικά είδη shRNAs. Το σχετικό πρωτόκολλο διαμόλυνσης περιγράφεται στην ενότητα 3.3. Η επιλογή των NCI-H520 κυττάρων που έλαβαν το πλασμιδιακό φορέα έγινε με πουρομυκίνη, ενώ τα κύτταρα συλλέχθηκαν 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση, ικανό χρονικό διάστημα για να πετύχουμε τη μέγιστη αποσιώπηση. Ως μάρτυρες της αποτελεσματικότητας και της εξειδίκευσης της διαδικασίας της διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα που έφερε μια εξειδικευμένη αλληλουχία shRNA, η οποία δεν έχει ομολογία προς κανένα γνωστό γονίδιο των θηλαστικών (Mock shRNA, MSH), για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο οι όποιες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των απαδενυλασών να οφείλονται στην καθ' αυτή διαδικασία της διαμόλυνσης

Από την διαμόλυνση προέκυψαν, εφτά διαφορετικά δείγματα κυττάρων:

**1) WT:** Κύτταρα NCI-H520 που δεν έχουν υποστεί τη διαδικασία της διαμόλυνσης (κύτταρα φυσικού τύπου)

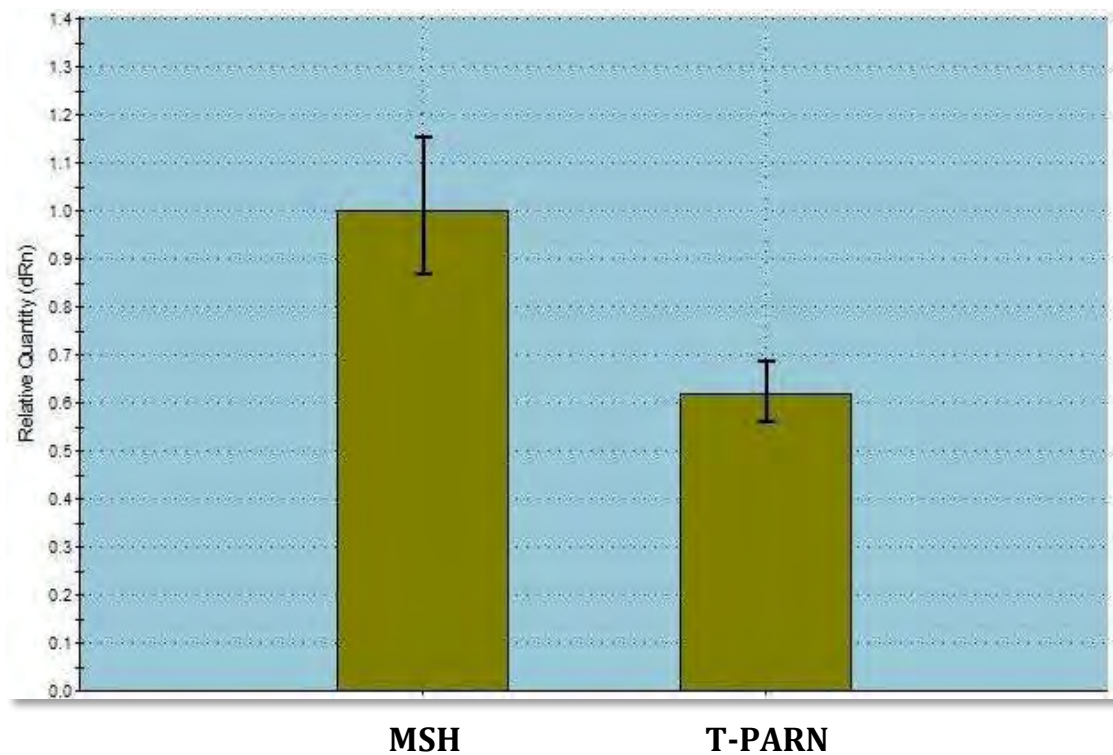
- 2) **MSH**: Κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα με πλασμιδιακό φορέα που έφερε μια εξειδικευμένη αλληλουχία shRNA, η οποία δεν έχει ομολογία προς κανένα γνωστό γονίδιο των θηλαστικών
- 3) **T-PARN**: Κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα με shRNA έναντι της PARN
- 4) **T-CNOT6-L**: Κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα με shRNA έναντι τη CNOT6L
- 5) **T-CNOT6**: Κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα με shRNA έναντι της CNOT6
- 6) **T-CNOT7**: Κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα με shRNA έναντι της CNOT7
- 7) **T-CNOT8**: Κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα με shRNA έναντι της CNOT8

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε συλλογή των παραπάνω κυττάρων και απομόνωση ολικού RNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο ενότητα 3.4. Ακολούθησε η ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης των υπο μελέτη απαδενυλασών και κατ' επέκταση ο έλεγχος της επιτυχούς διαδικασίας της αποσιώπησής τους, με συγκριτική ποσοτική RealTime PCR (Comparative qRT-PCR), όπου ενισχύθηκαν τα mRNAs των απαδενυλασών αυτών.

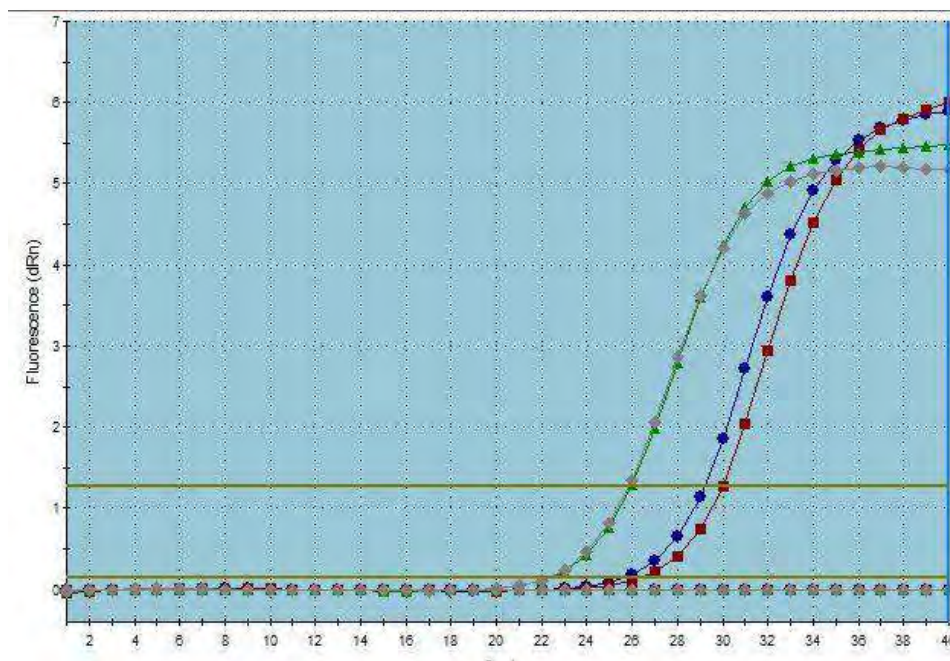
Η αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης των mRNA των απαδενυλασών κανονικοποιήθηκε με το πρότυπο έκφρασής τους σε κύτταρα MSH. Ως γονίδιο αναφοράς στην qRT-PCR χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-ακτίνης. Η ανάλυση των δεδομένων μετά την ενίσχυση των δειγμάτων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος MxPro.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν φαίνεται ότι τα επίπεδα έκφρασης της κάθε απαδενυλάσης είναι μειωμένα, μετά από την αποσιώπησή της με τη χρήση των shRNAs, σε σύγκριση με τα κύτταρα Mock sh (MSH), δηλαδή ότι η αποσιώπηση των απαδενυλασών ήταν επιτυχής.

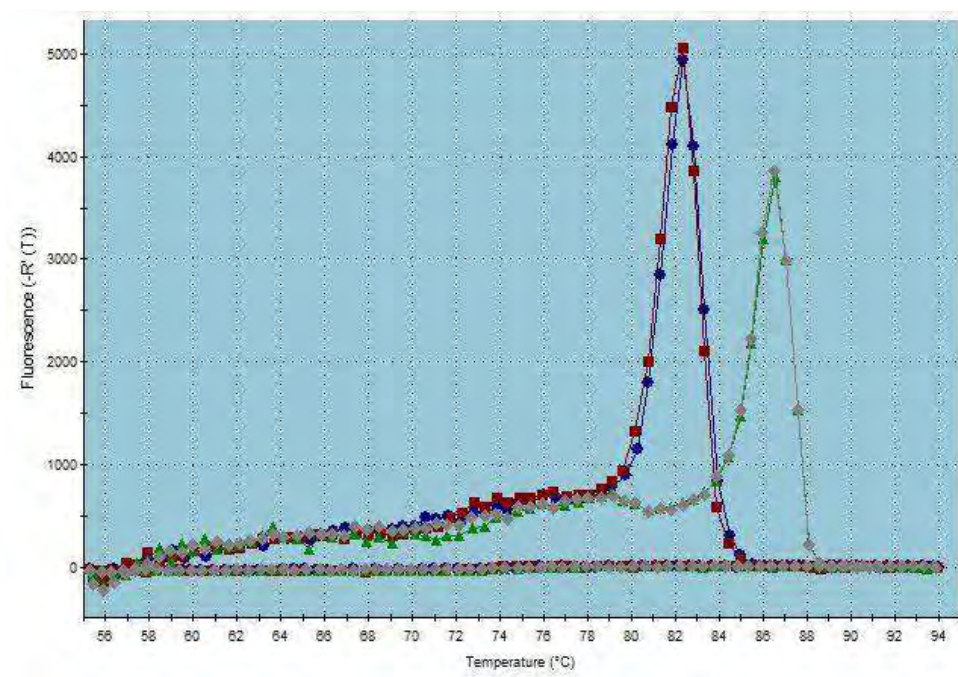
## Αποσιώπηση της PARN



**Εικόνα 16:** Ποσοτική RT-PCR για έλεγχο των επιπέδων έκφρασης της PARN μετά από αποσιώπηση της, σε κύτταρα NCI-H520. Επίπεδα έκφρασης της PARN σε αποσιωπημένα για την PARN κύτταρα (T-PARN) σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης της σε Mock sh (MSH) κύτταρα, MSH: κύτταρα διαμολυσμένα με shRNA, το οποίο δεν στοχεύει κανένα γνωστό γονίδιο των θηλαστικών, T-PARN: κύτταρα στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση της PARN.

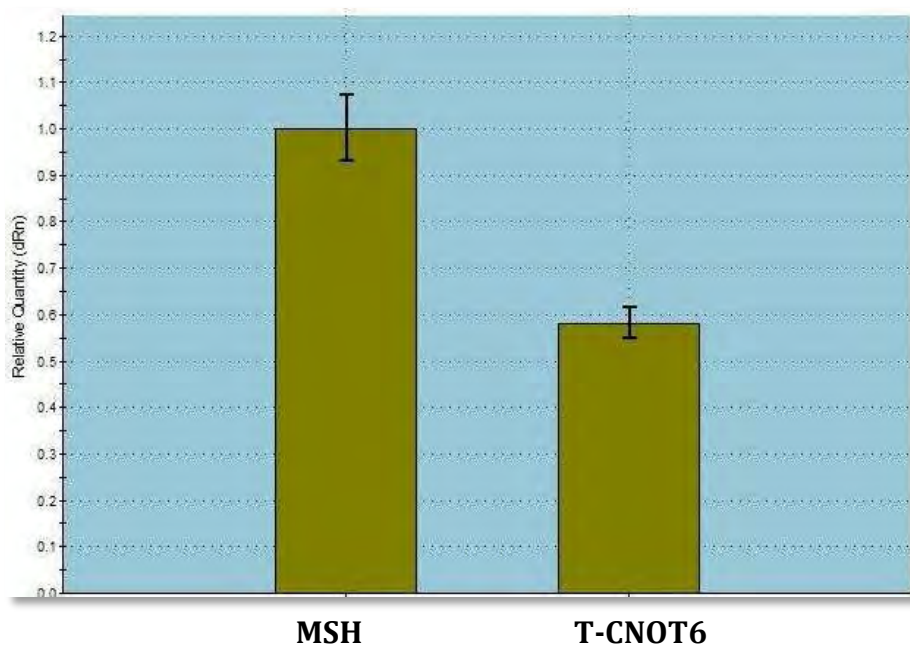


**Εικόνα 17:** Έλεγχος αποσιώπησης PARN: Ποσοτική RT-PCR , Amplification curve: Καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού. Οι καμπύλες με Ct=26 αφορούν την ενίσχυση της β-ακτίνης, ενώ οι καμπύλες με Ct=30 αφορούν την ενίσχυση της PARN.

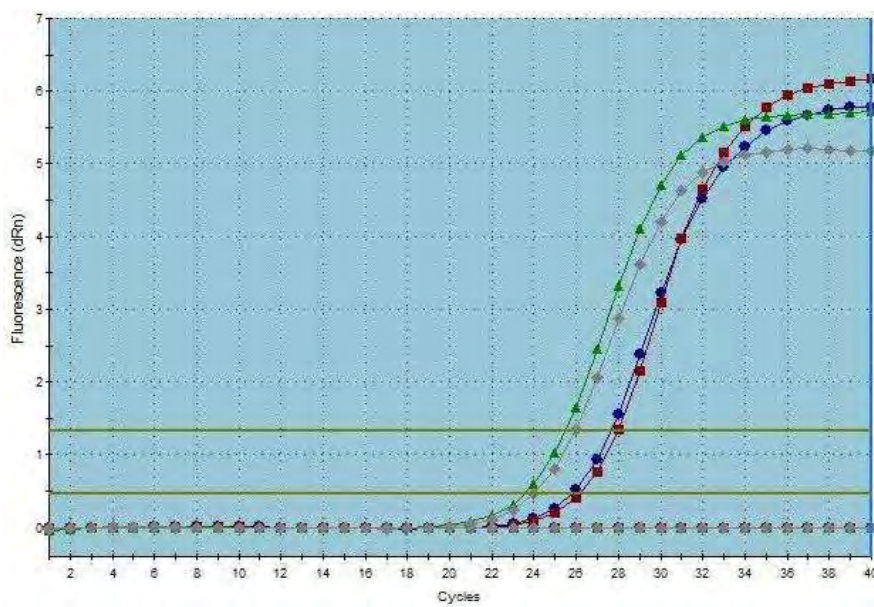


**Εικόνα 18:** Έλεγχος αποσιώπησης PARN: Ποσοτική RT-PCR, Dissociation Curve: Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού. Οι καμπύλες με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 82 °C αντιπροσωπεύουν προϊόντα από κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της PARN, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 87°C, αντιστοιχεί σε προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75 °C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.\*  $-Rn'(T)$ = Η πρώτη παράγωγος της ένδειξης αναφοράς φθορισμού κανονικοποιημένης με χρωστική πολλαπλασιασμένη με -1.

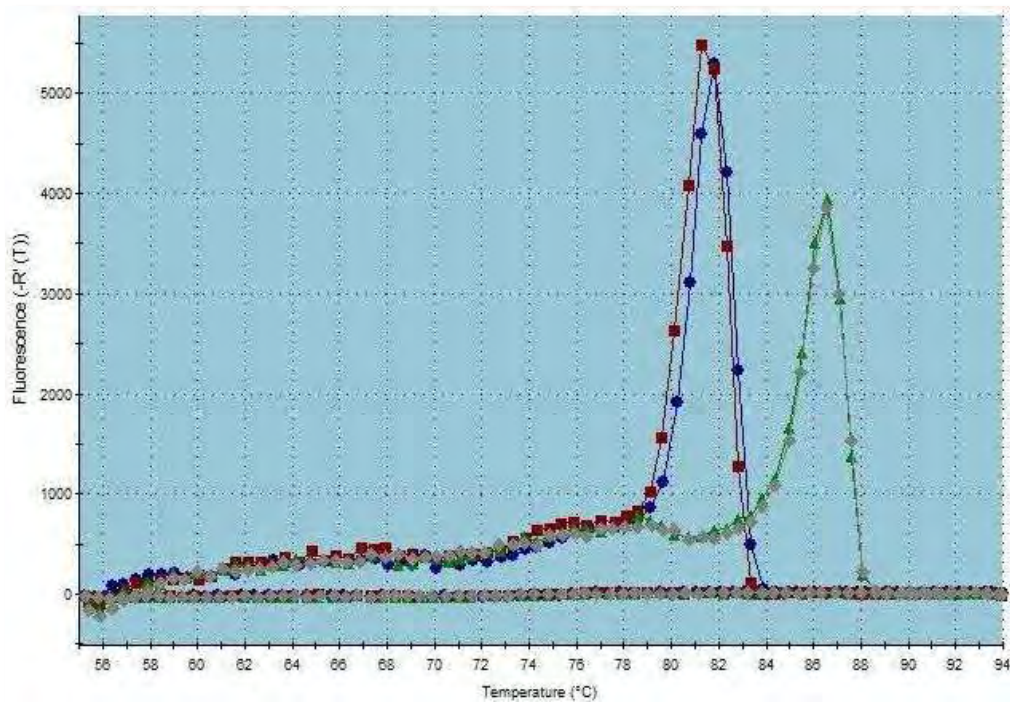
## Αποσιώπηση CNOT6



**Εικόνα 19:** Ποσοτική RT-PCR για έλεγχο των επιπέδων έκφρασης της CNOT6 μετά από αποσιώπηση της σε κύτταρα NCI-H520. Επίπεδα έκφρασης της CNOT6 σε αποσιωπημένα για την CNOT6 κύτταρα (T-CNOT6) σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασής της σε Mock sh (MSH) κύτταρα, MSH: κύτταρα διαμολυσμένα με shRNA, το οποίο δεν στοχεύει κανένα γνωστό γονίδιο των θηλαστικών, T- CNOT6-: κύτταρα στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση της CNOT6.

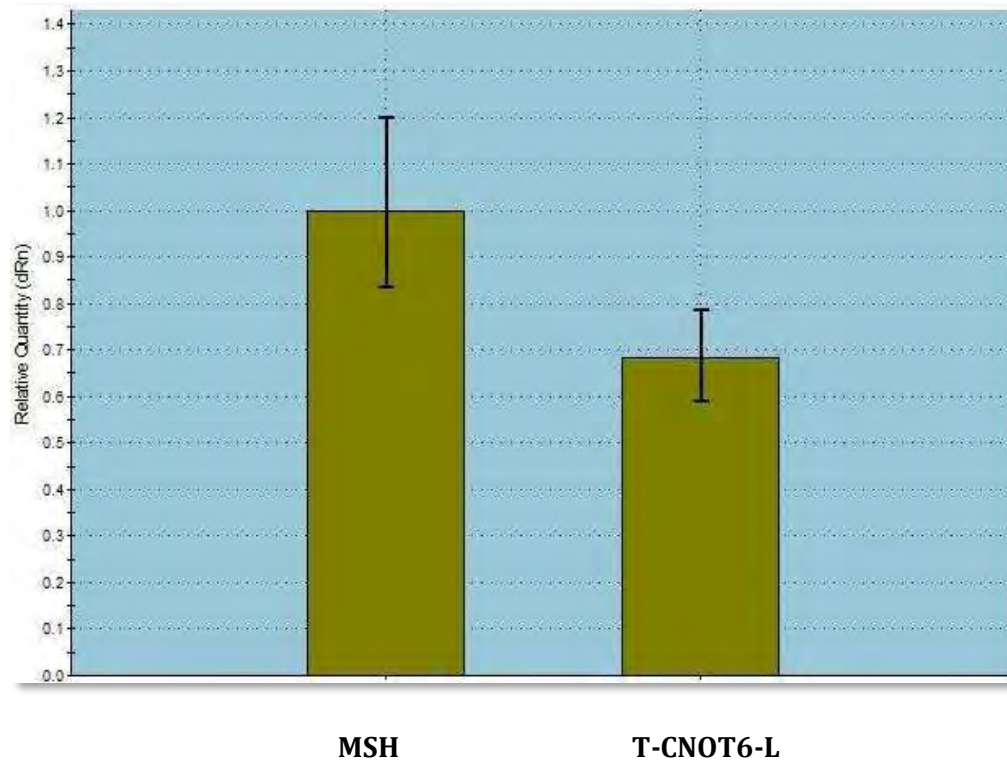


**Εικόνα 20:** Έλεγχος αποσιώπησης CNOT6: Ποσοτική RT-PCR, Amplification curve: Καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού. Οι καμπύλες με Ct=26 αφορούν την ενίσχυση της β-ακτίνης, ενώ οι καμπύλες με Ct=28 αφορούν την ενίσχυση της CNOT6.

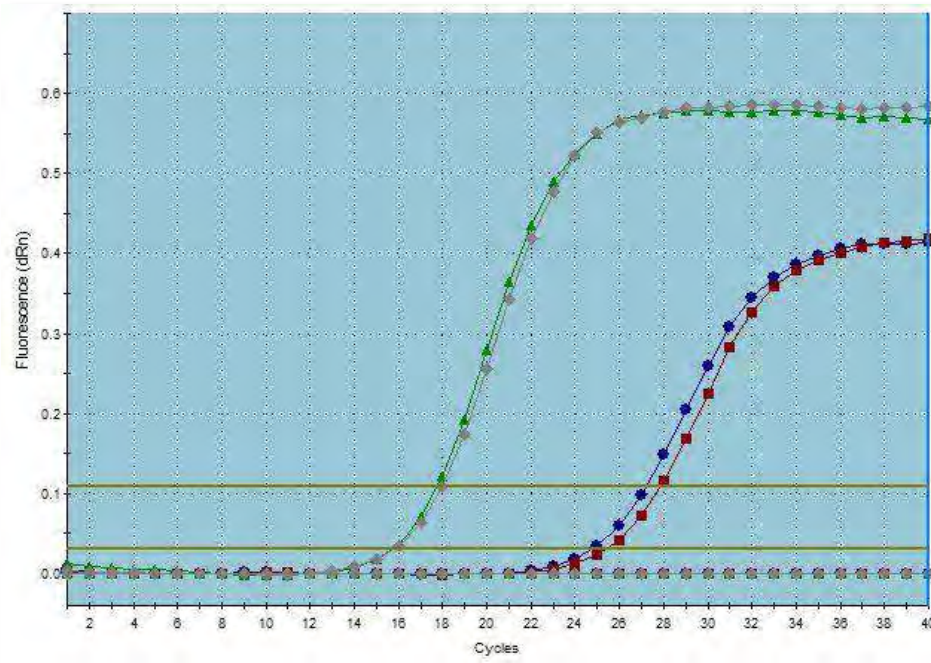


**Εικόνα 21:** Έλεγχος αποσιώπησης CNOT6: Ποσοτική RT-PCR, Dissociation Curve: Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού. Οι καμπύλες με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 81 °C αντιπροσωπεύουν προϊόντα από κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της CNOT6, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 87°C, αντιστοιχεί σε προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75 °C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.\*  $-Rn'(T)=$  Η πρώτη παράγωγος της ένδειξης αναφοράς φθορισμού κανονικοποιημένης με χρωστική πολλαπλασιασμένη με -1.

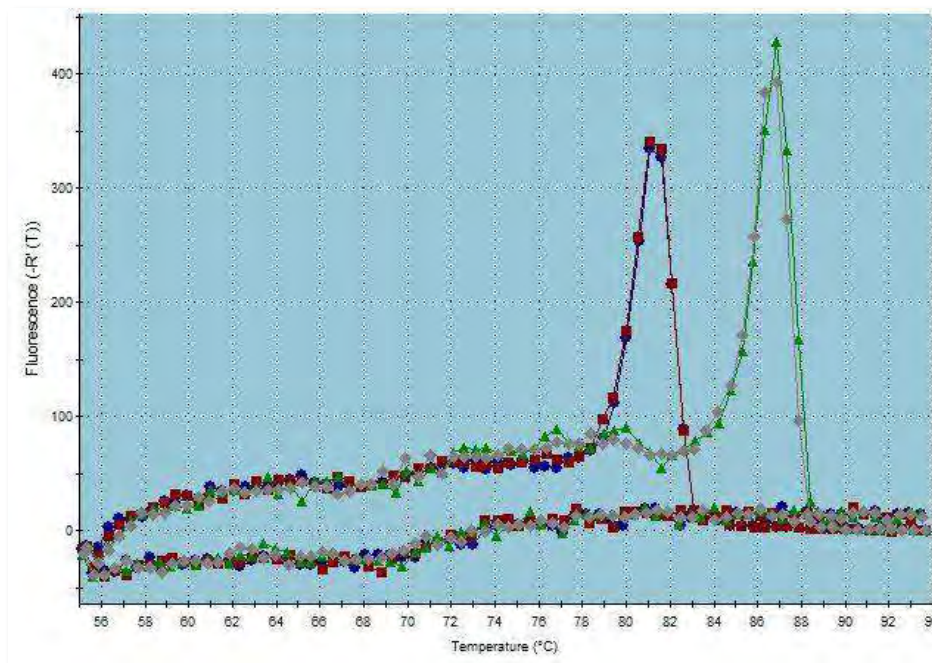
## Αποσιώπηση CNOT6-LIKE



**Εικόνα 22:** Ποσοτική RT-PCR για έλεγχο των επιπέδων έκφρασης της CNOT6L μετά από αποσιώπηση της σε κύτταρα NCI-H520. Επίπεδα έκφρασης της CNOT6-L σε αποσιωπημένα για την CNOT6-L κύτταρα (T-CNOT6-L) σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασής της σε Mock sh (MSH) κύτταρα, MSH: κύτταρα διαμολυσμένα με shRNA, το οποίο δεν στοχεύει κανένα γνωστό γονίδιο των θηλαστικών, T- CNOT6-L: κύτταρα στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση της CNOT6-L.



**Εικόνα 23:** Έλεγχος αποσιώπησης CNOT6-L: Ποσοτική RT-PCR , Amplification curve: Καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού. Οι καμπύλες με Ct=18 αφορούν την ενίσχυση της β-ακτίνης, ενώ οι καμπύλες με Ct=28 αφορούν την ενίσχυση της CNOT6L.

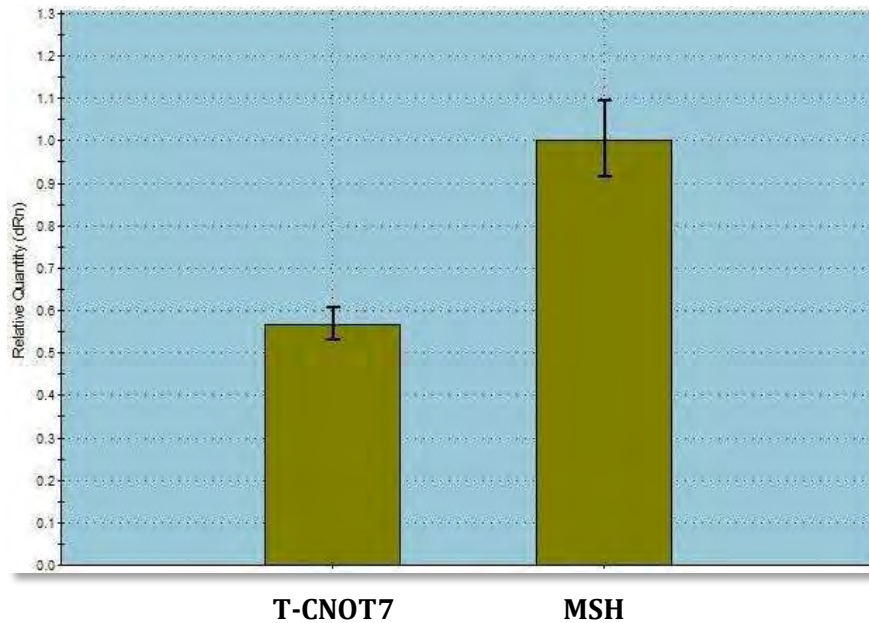


**Εικόνα 24:** Έλεγχος αποσιώπησης CNOT6-L: Ποσοτική RT-PCR, Dissociation Curve: Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού. Οι καμπύλες με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 81 °C αντιπροσωπεύουν προϊόντα από κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της CNOT6-L, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 87°C, αντιστοιχεί σε προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75 °C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.\*  $-Rn'(T)$ = Η πρώτη

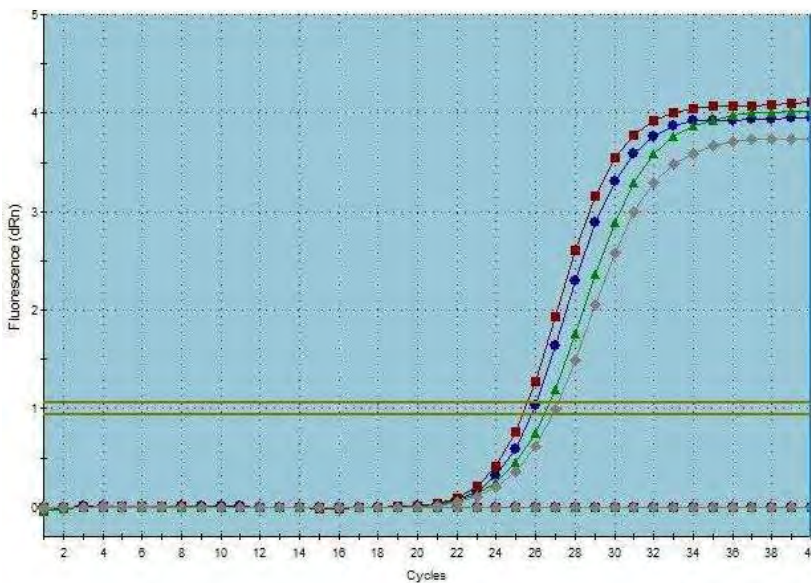


παράγωγος της ένδειξης αναφοράς φθορισμού κανονικοποιημένης με χρωστική πολλαπλασιασμένη με -1.

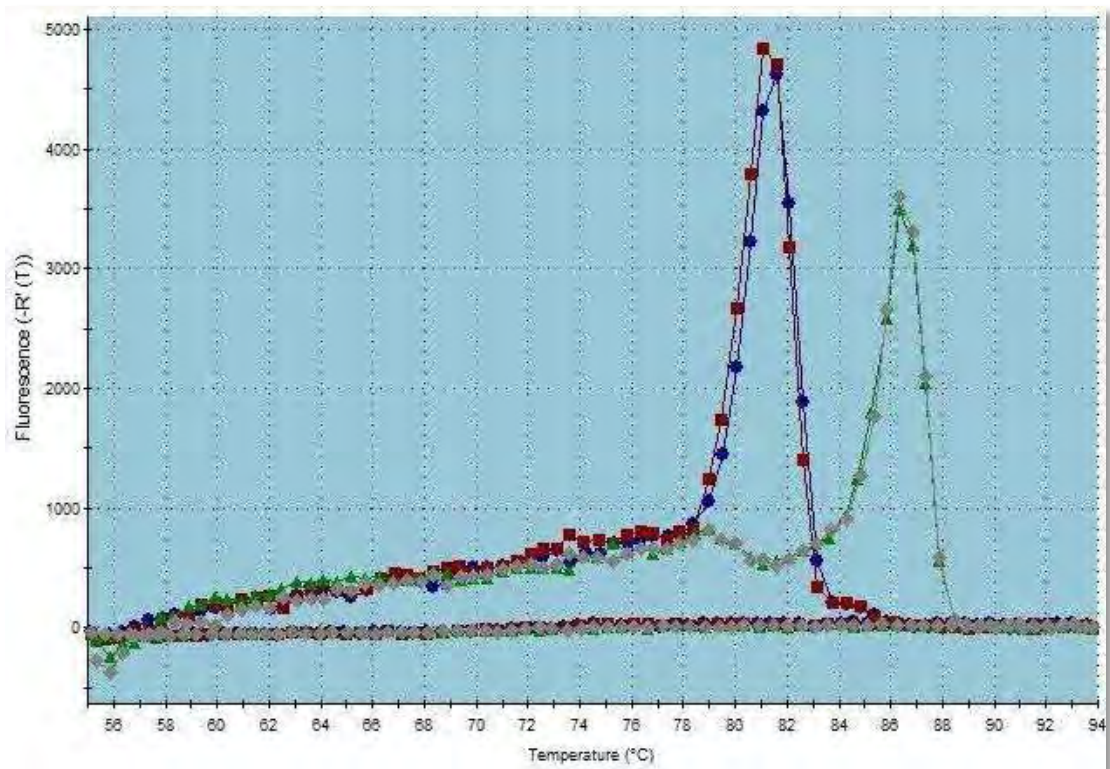
### Αποσιώπηση CNOT7



**Εικόνα 25:** Ποσοτική RT-PCR για έλεγχο των επιπέδων έκφρασης της CNOT7 μετά από αποσιώπηση της σε κύτταρα NCI-H520. Επίπεδα έκφρασης της CNOT7 σε αποσιωπημένα για την CNOT7 κύτταρα (T-CNOT7) σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασής της σε Mock sh (MSH) κύτταρα, MSH: κύτταρα διαμολυσμένα με shRNA, το οποίο δεν στοχεύει κανένα γνωστό γονίδιο των θηλαστικών, T- CNOT7: κύτταρα στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση της CNOT7.

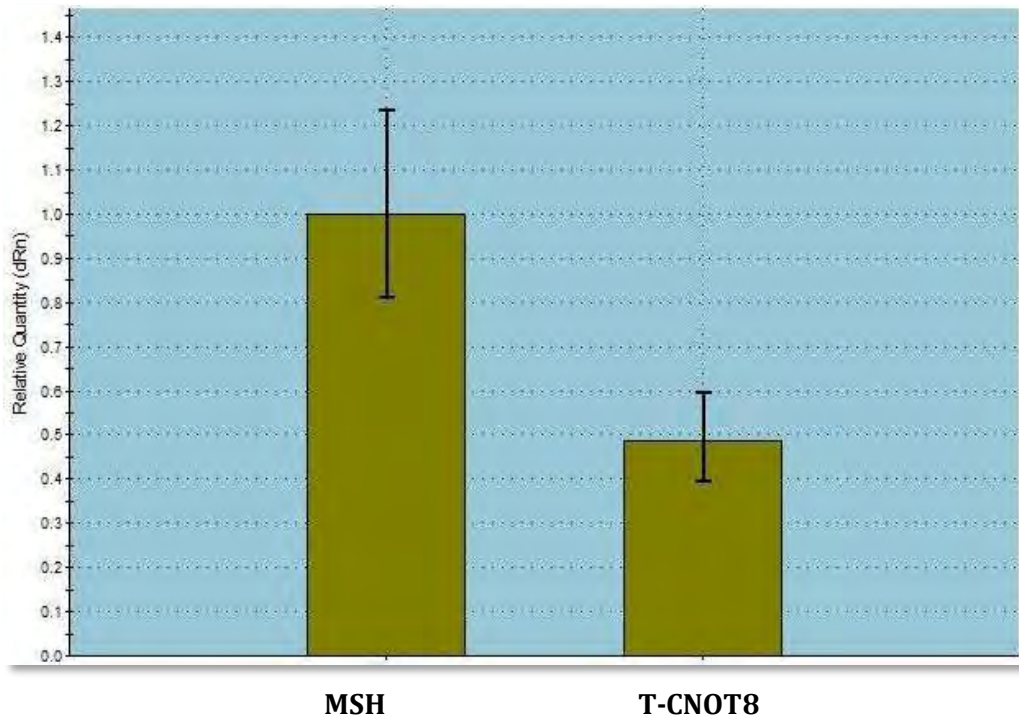


**Εικόνα 26:** Έλεγχος αποσιώπησης CNOT7: Ποσοτική RT-PCR, Amplification curve: Καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού. Οι καμπύλες με Ct=27 αφορούν την ενίσχυση της β-ακτίνης, ενώ οι καμπύλες με Ct=26 αφορούν την ενίσχυση της CNOT7.

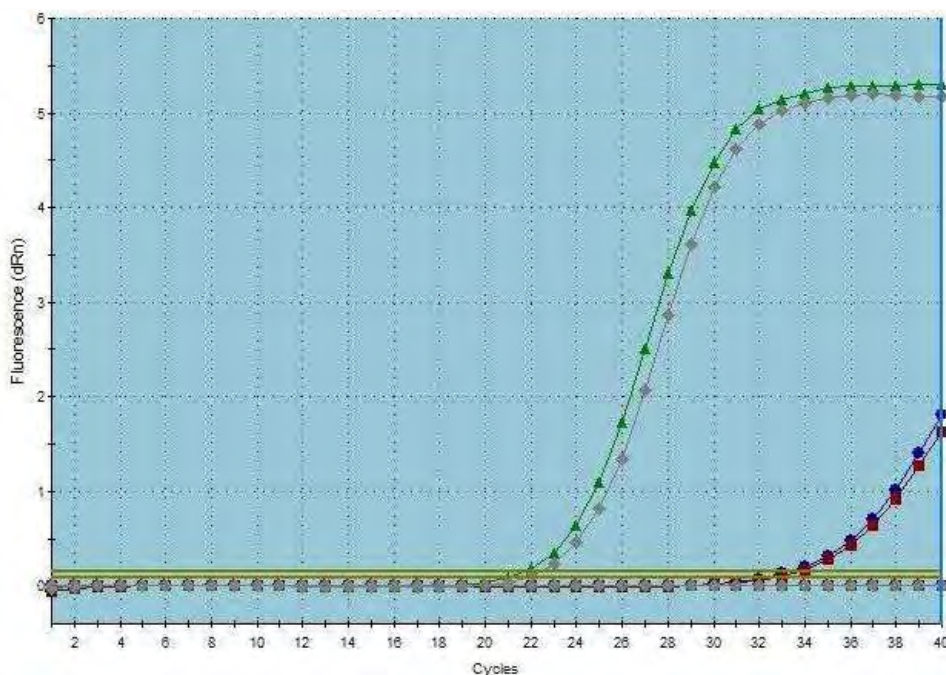


**Εικόνα 27:** Έλεγχος αποσιώπησης CNOT7: Ποσοτική RT-PCR, **Dissociation Curve:** Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού. Οι καμπύλες με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 81 °C αντιπροσωπεύουν προϊόντα από κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της CNOT7, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 87°C, αντιστοιχεί σε προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75 °C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.\*  $-Rn'(T)$ = Η πρώτη παράγωγος της ένδειξης αναφοράς φθορισμού κανονικοποιημένης με χρωστική πολλαπλασιασμένη με -1.

## Αποσίωψη CNOT8

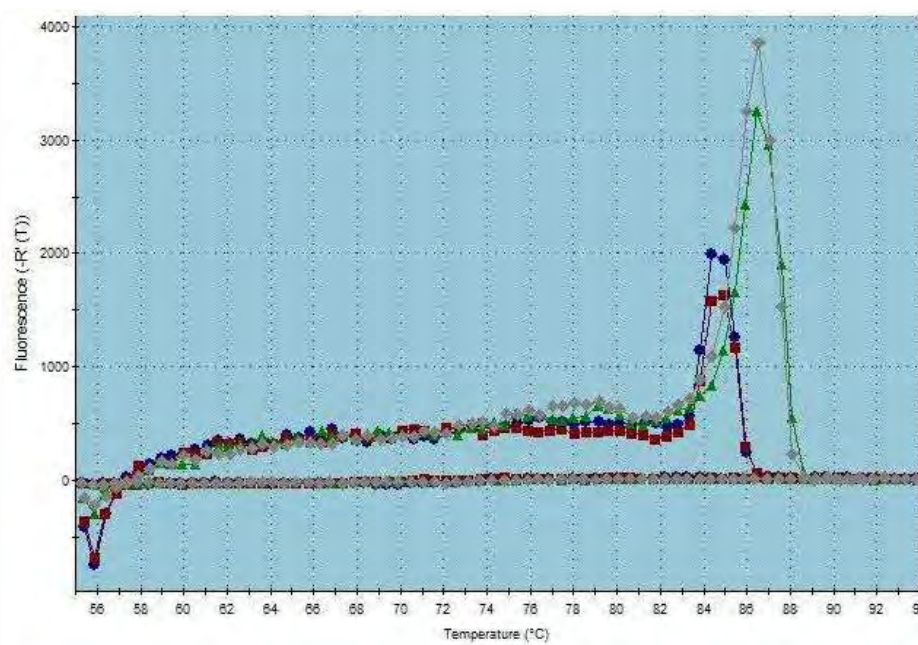


**Εικόνα 28:** Ποσοτική RT-PCR για έλεγχο των επιπέδων έκφρασης της CNOT8 μετά από αποσίωσή της σε κύτταρα NCI-H520. Επίπεδα έκφρασης της CNOT8 σε αποσιωπημένα για την CNOT8 κύτταρα (T-CNOT8) σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασής της σε Mock sh (MSH) κύτταρα, MSH: κύτταρα διαμολυσμένα με shRNA, το οποίο δεν στοχεύει κανένα γνωστό γονίδιο των θηλαστικών, T- CNOT8: κύτταρα στα οποία έχει γίνει αποσίωψη της CNOT8.



**Εικόνα 29:** Έλεγχος αποσίωψης CNOT8: Ποσοτική RT-PCR, Amplification curve: Καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού. Οι καμπύλες με Ct=22 αφορούν την ενίσχυση της β-ακτίνης, ενώ οι καμπύλες με Ct=34 αφορούν την ενίσχυση της

## CNOT8



**Εικόνα 30:** Έλεγχος αποσιώπησης CNOT8: Ποσοτική RT-PCR, Dissociation Curve: Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού. Οι καμπύλες με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 85 °C αντιπροσωπεύουν προϊόντα από κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της CNOT8, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 87°C αντιστοιχεί σε προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75 °C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.\*  $-Rn'(T) =$  Η πρώτη παράγωγος της ένδειξης αναφοράς φθορισμού κανονικοποιημένης με χρωστική πολλαπλασιασμένη με -1.

### 4.2 Επίδραση της αποσιώπησης των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 στο μήκος των πολυ(A) ουρών των μεταγράφων IQSEC3 , ITGB3, EPHA7

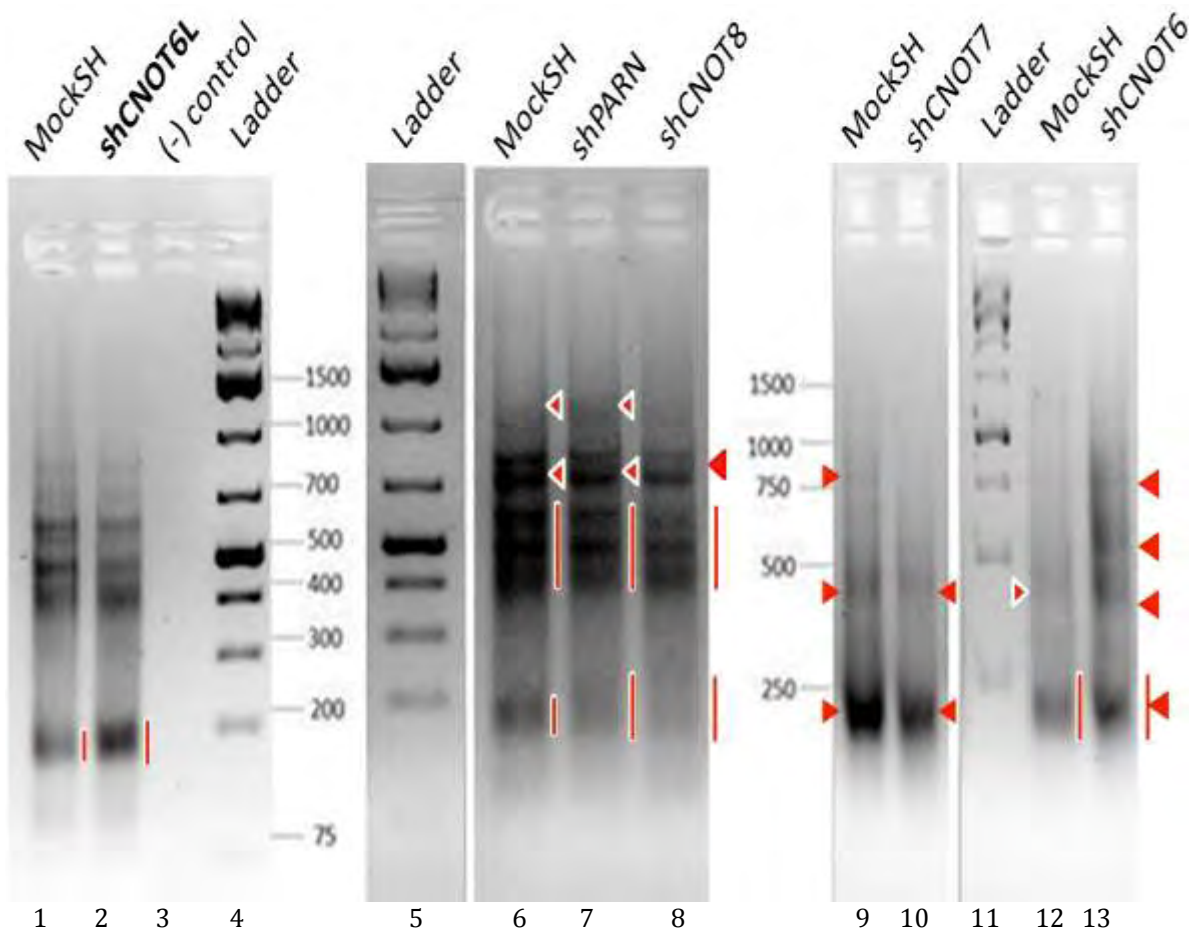
Αφού πραγματοποιήθηκε η επιβεβαίωση της αποσιώπησης των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8, ακολούθησε ο προσδιορισμός της κατάστασης πολυαδενυλίωσης επιλεγμένων μεταγράφων, με τη δοκιμή LM-PAT, τόσο σε κύτταρα στα οποία είχε γίνει αποσιώπηση των απαδενυλασών όσο και σε κύτταρα Mock sh(κύτταρα control). Τα επιλεγμένα μεταγράφα είναι τα παρακάτω:

- EPH receptor A7 (EPHA7) (382 bp)
- Integrin subunit beta 3 (ITGB3) (249 bp)

- IQ motif and Sec7 domain 3 (IQSEC3) (248 bp)

Χρησιμοποιήσαμε όπως ανέφερα τη μέθοδο LM-PAT για να εντοπίσουμε τις διαφορές στα μεγέθη των πολυ(A) ουρών των mRNAs των παραγόντων IQSEC3, ITGB3 και EPHA7, σε κύτταρα Mock sh σε σύγκριση με τα αποσιωπημένα για τις απαδενυλάσες κύτταρα. Η μέθοδος LM-PAT περιλαμβάνει τη σύνθεση cDNA από το ολικό RNA των κυττάρων, με τη βοήθεια ενός εκκινητή ολιγο(dT) που στοχεύει ειδικά στο 3' άκρο της πολυ(A) ουράς και την επακόλουθη ενίσχυση των υπό μελέτη μεταγράφων με τη μέθοδο της PCR χρησιμοποιώντας έναν ειδικό (specific) εκκινητή για κάθε υπο μελέτη μετάγραφο, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του LM-PAT (ενότητα 3.6). Τέλος, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης υψηλής ανάλυσης (Εικόνες 31, 32, 33). Να σημειωθεί ότι για κάθε αποσιώπηση η σύγκριση γίνεται με συγκεκριμένο Mock sh (σύμφωνα με τη διάταξη της κάθε εικόνας) γιατί έχουν προκύψει από διαφορετικά πειράματα αποσιώπησης. Τα αποτελέσματα του LM-PAT φαίνονται στις παρακάτω εικόνες.

## IQSEC3

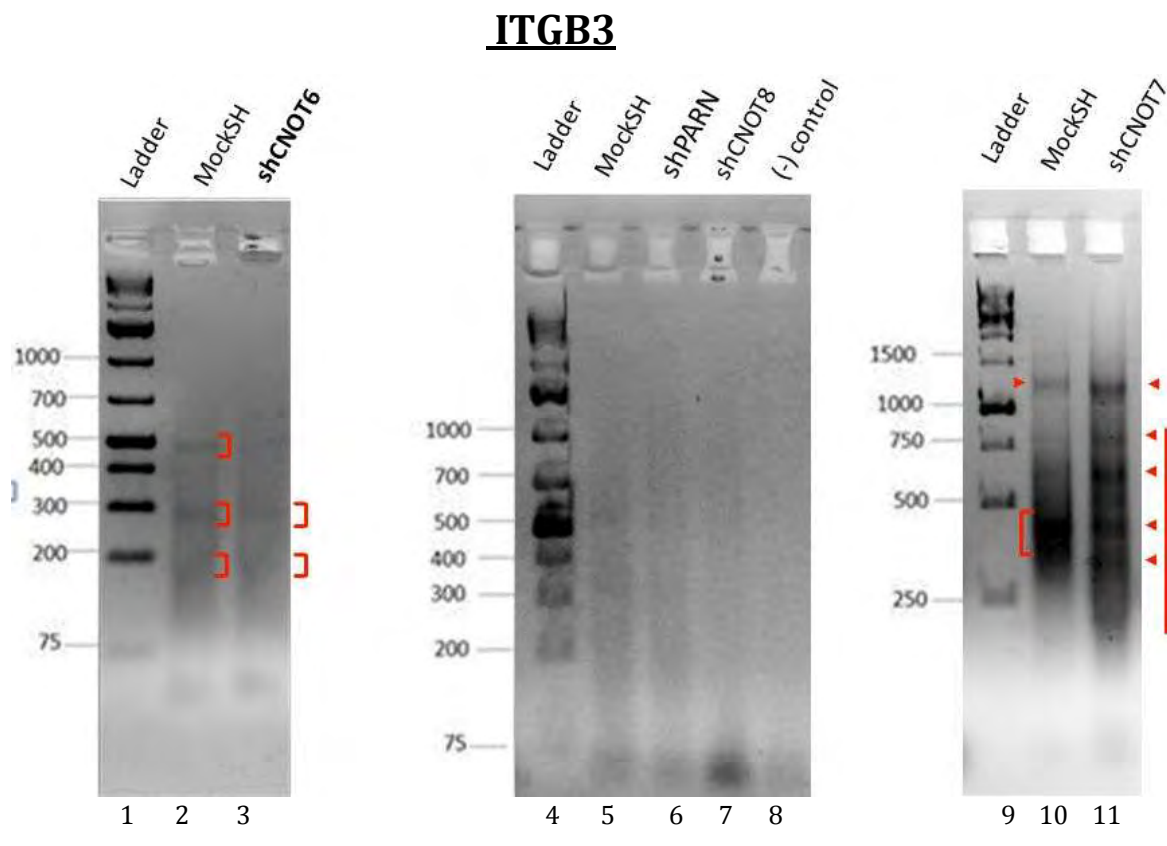


**Εικόνα 31:** LM-PAT για μετάγραφα του IQSEC3 από κύτταρα NCI-H520 στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση των απαδενυλασών CNOT6-L, PARN, CNOT8, CNOT7 και CNOT6 (shCNOT6L, shPARN, shCNOT8, shCNOT7, shCNOT6). MockSH: NCI-H520 κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με πλασμιδιακό φορέα που περιέχει shRNA που δεν έχει ομολογία προς κανένα γνωστό γονίδιο, Ladder1: 1kb, >75bp (GeneRuler), Ladder2: 1kb, >250bp (RTU). Οι κόκκινες γραμμές και τα βέλη υποδεικνύουν πολυ(A) ουρές.

## IQSEC3

Όσον αφορά τον παράγοντα IQSEC3, από το πείραμα μικροσυστοιχιών (ενότητα 1.2) βρέθηκε ότι η CNOT6L επηρεάζει τον συγκεκριμένο παράγοντα καθώς παρατηρήθηκε υπερέκφραση αυτού σε κύτταρα στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση της CNOT6L. Όμως, από τα αποτελέσματα LM-PAT για τον παράγοντα IQSEC3 (εικόνα 31) φάνηκε ότι αυτός επηρεάζεται εκτός από την

CNOT6L που έδειξαν οι μικροσυστοιχίες και από τις απαδενυλάσες CNOT8 (διαδρομή 8) και CNOT6 (διαδρομή 13) και CNOT7(διαδρομή 10). Όσον αφορά την CNOT8 φαίνεται ότι αυτή επιδρά στον παράγοντα IQSEC3 καθώς παρατηρείται διαφοροποιημένη κατανομή των πολυ(A) ουρών στα κύτταρα στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση αυτής (διαδρομή 8) σε σχέση με τα κύτταρα MockSH( κύτταρα control, διαδρομή 6). Το ίδιο μπορούμε να συμπεράνουμε και για την CNOT6 απαδενυλάση καθώς βλέπουμε διαφορετικό πρότυπο ζωνών και κατ'επέκταση πολυ(A) ουρών στα κύτταρα στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση αυτής (13 διαδρομή) σε σχέση με τα κύτταρα MockSH( κύτταρα control, διαδρομή 12). Διαφορετική κατανομή πολυ(A) ουρών θα μπορούσαμε να πούμε ότι παρατηρείται και στα κύτταρα στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση της CNOT7 (διαδρομή 10) σε σχέση με τα κύτταρα MockSH ( κύτταρα control, διαδρομή 9). (Εικόνα 31)

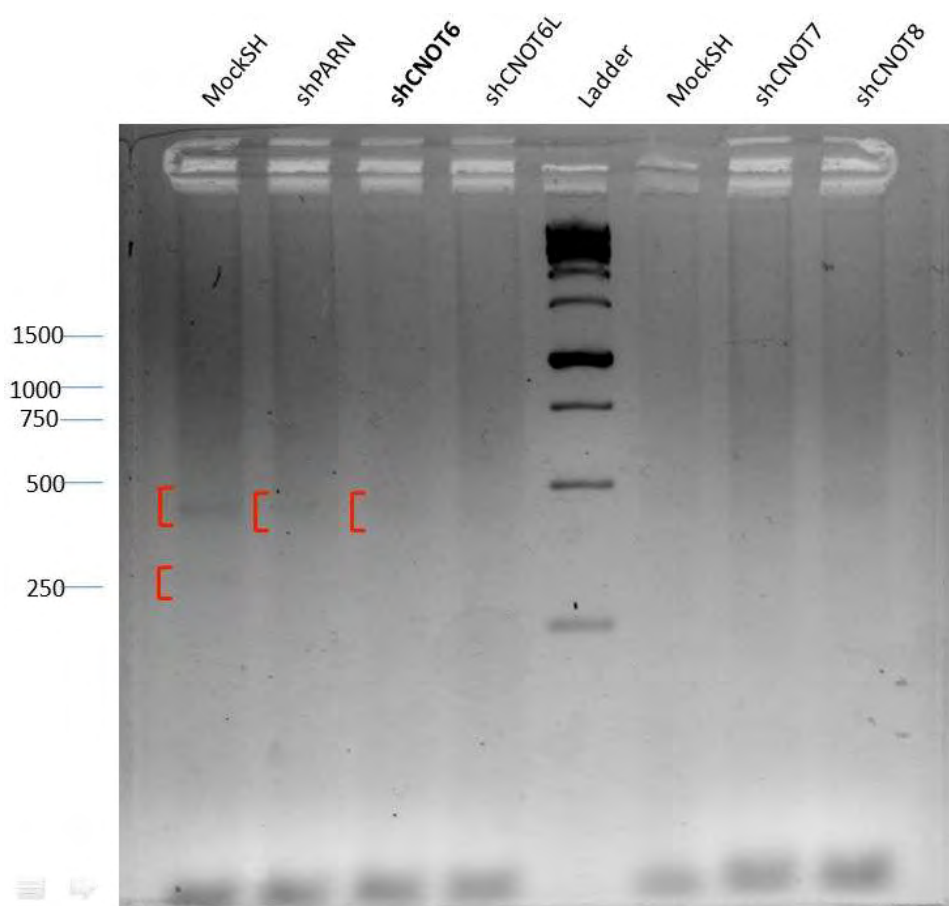


**Εικόνα 32:** LM-PAT για μετάγραφα του ITGB3 από κύτταρα NCI-H520 στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση των απαδενυλασών CNOT6, PARN, CNOT8, και CNOT7 (shCNOT6, shPARN, shCNOT8, shCNOT7). MockSH: NCI-H520 κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με πλασμιδιακό φορέα που περιέχει shRNA που δεν στοχεύει κάποιο γνωστό γονίδιο, Ladder1: 1kb, >75bp (generuler), Ladder2: 1kb, >250bp (RTU). Οι κόκκινες αγκύλες και τα βέλη υποδεικνύουν πολυ(A) ουρές.

## ITGB3

Όσον αφορά τον παράγοντα ITGB3, βρέθηκε από το πείραμα μικροσυστοιχιών(ενότητα 1.2) ότι επηρεάζεται από την απαδενύλαση CNOT6 γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα LM-PAT για τον συγκεκριμένο παράγοντα (εικόνα 32), καθώς παρατηρείται διαφορετική κατανομή πολυ(A) ουρών στα αποσιωπημένα για την CNOT6 κύτταρα(διαδρομή 3) σε σχέση με τα κύτταρα MockSH (κύτταρα control, διαδρομή 2). Επίσης παρατηρούμε από τα αποτελέσματα LM-PAT ότι ο παράγοντας ITGB3 επηρεάζεται και από την απαδενύλαση CNOT7 καθώς παρατηρείται διαφορετικό πρότυπο ζωνών και κατ'επέκταση πολυ(A) ουρών στα αποσιωπημένα για την CNOT7 κύτταρα (διαδρομή 11) σε σχέση με τα κύτταρα MockSH ( κύτταρα control, διαδρομή 10). (Εικόνα 32)

## EPHA7



**Εικόνα 33:** LM-PAT για τα μετάγραφα του EPHA7 σε κύτταρα NCI-H520 μετά από αποσιώπηση των απαδενυλασών PARN CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8. (shPARN, shCNOT6, sh CNOT6L, shCNOT7, shCNOT8), MockSH: NCI-H520 κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με φορέα που περιέχει shRNA το οποίο δεν στοχεύει γνωστό γονίδιο, Ladder2: 1kb, >250bp (RTU). Οι κόκκινες αγκύλες υποδεικνύουν πολυ(A) ουρές.



## **EPHA7**

Όσον αφορά τον παράγοντα EPHA7, βρέθηκε από το πείραμα μικροσυστοιχιών (ενότητα 1.2) ότι επηρεάζεται από την απαδενυλάση CNOT6. Όμως, από τα αποτελέσματα LM-PAT δεν μπορούμε να βγάλουμε σαφή συμπεράσματα για το ποιες απαδενυλάσες επηρεάζουν τον συγκεκριμένο παράγοντα καθώς δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες αλλαγές στην κατανομή των πολυ(A) ουρών μεταξύ των κυττάρων στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση των απαδενυλασών και στα κύτταρα MockSH ( κύτταρα control). (Εικόνα 33)

## **5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Ως γνωστόν, χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου αποτελεί η απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης επιτελείται σε διάφορα στάδια όπως είναι η μεταγραφή, η ωρίμανση του mRNA, η μετάφραση και η αποικοδόμηση του. Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με το στάδιο της αποικοδόμησης του mRNA και συγκεκριμένα με τις απαδενυλάσες καθώς αυτές καταλύουν το πρώτο και καθοριστικό βήμα στην αποικοδόμηση των mRNAs, δηλαδή την βράχυνση της πολυ(A) ουράς τους. Απορρύθμιση της αποικοδόμησης του mRNA στον καρκίνο μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη σύνθεση προϊόντων ογκογονιδίων και μειωμένη σύνθεση προϊόντων ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Τα τελευταία χρόνια γίνεται μια προσπάθεια κατανόησης του ρόλου των απαδενυλασών στον καρκίνο. Τέτοιες προσπάθειες έχουν γίνει και στο εργαστήριο μας. Πιο συγκεκριμένα σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου βρέθηκε σε κλινικά δείγματα ασθενών με καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα (SCC) διαφοροποιημένη έκφραση απαδενυλασών στα παθολογικά σε σχέση με τα μη-παθολογικά δείγματα καθώς και αύξηση του χρόνου επιβίωσης των ασθενών στον οποίων τα δείγματα παρατηρήθηκε υπερέκφραση κάποιων απαδενυλασών. Στη συνέχεια για να αποσαφηνιστεί ο βιολογικός ρόλος των απαδενυλασών πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση αυτών και ανάλυση μικροσυστοιχιών καθώς και RealTime PCR ώστε να διερευνηθεί η έκφραση των διαφόρων mRNAs.

Στην παρούσα μελέτη προσπαθώντας να αποσαφηνιστεί περαιτέρω ο ρόλος των απαδενυλασών στον καρκίνο επιτεύχθηκε αποσιώπηση των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 σε κύτταρα NCI-

H520 και έπειτα πραγματοποιήθηκε η μέθοδος LM-PAT για να εξετασθεί η επίδραση των απαδενυλασών σε επιλεγμένα mRNAs που σχετίζονται με τον καρκίνο. Από τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής διαφάνηκε ότι οι απαδενυλάσες επηρέασαν με διαφορετικό τρόπο το μήκος των πολυ(A) ουρών των επιλεγμένων mRNAs. Επίσης, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση των δεδομένων του πειράματος των μικροσυστοιχιών που είχε γίνει σε προηγούμενη μελέτη στον εργαστήριο μας (ενότητα 1.2). Παράδειγμα αυτού αποτελεί ο παράγοντας IQSEC3, ο οποίος από τις μικροσυστοιχιές φαίνεται να επηρεάζεται από την CNOT6L αλλά τα αποτελέσματα του LM-PAT έδειξαν ότι αυτός ίσως να επηρεάζεται και από τις απαδενυλάσες CNOT6, CNOT7 και CNOT8. Διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων των μικροσυστοιχιών παρατηρήθηκε και για τον παράγοντα ITGB3, ο οποίος από τις μικροσυστοιχιές φαίνεται να επηρεάζεται από την CNOT6 αλλά τα αποτελέσματα του LM-PAT έδειξαν ότι αυτός μπορεί να επηρεάζεται και από την απαδενυλάση CNOT7. Όσον αφορά τον παράγοντα ERHA7 τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών είχαν δείξει ότι επηρεάζεται από την απαδενυλάση CNOT6. Τα αποτελέσματα του LM-PAT όμως γι' αυτόν τον παράγοντα δεν δίνουν σαφή εικόνα για το ποιες απαδενυλάσες τον επηρεάζουν. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες ώστε να αποσαφηνίσουν την εξειδικευμένη δράση των απαδενυλασών στα mRNA-στόχους τους. Για παράδειγμα, αύξηση του αριθμού των εξεταζόμενων μεταγράφων, τροποποίηση/βελτίωση πρωτοκόλλου καθώς και νέες πειραματικές προσεγγίσεις (RNA seq) θα μπορούσαν να συμβάλλουν στον παραπάνω σκοπό.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης ενισχύουν την πληρέστερη κατανόηση του ρόλου των αποαδενυλασών στην παθογένεια σημαντικών νοσημάτων όπως ο καρκίνος του πνεύμονα. Η ανάγκη για ανάπτυξη νέων κλινικών εργαλείων πρόγνωσης και διάγνωσης του καρκίνου είναι πρωταρχικής σημασίας καθώς στην πλειοψηφία των περιπτώσεων οι κακοήθεις όγκοι ταυτοποιούνται σε προχωρημένο στάδιο, με κακή πρόγνωση και μικρές πιθανότητες επιτυχούς ανταπόκρισης στη θεραπεία. Επίσης, είναι μεγάλη η ανάγκη για στροφή της αναζήτησης νέων δεικτών σε βιολογικά δείγματα που να μπορούν να λαμβάνονται συχνά και εύκολα από τους ασθενείς με ανώδυνες, μη επεμβατικές μεθόδους. Έτσι, από την καλύτερη κατανόηση του ρόλου των απαδενυλασών στον καρκίνο είναι πιθανό να προκύψουν δεδομένα που θα μπορούσαν να κατατάξουν και να παγιώσουν τις απαδενυλάσες ως διαγνωστικούς δείκτες στη διαφοροδιάγνωση τύπων και υποτύπων καρκίνου, όπως είναι αυτός του πνεύμονα, στο μέλλον.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Ambros, V.**, Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., Tuschl, T. (2003). A uniform system for microRNA annotation *RNA* 9, pg. 277-279 .

**Amrani, N.**, Ghosh, S., Mangus, D.A., Jacobson, A. (2008). Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature* 453, pg. 1276–80.

**Anderson, J.S. & Parker, R.** (1998). 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, pg. 1497-1506.

**Aslam, A.**, Mittal, S., Koch, F., Andrau, J., Winkler, G. J. (2009). The Ccr4–Not Deadenylase Subunits CNOT7 and CNOT8 Have Overlapping Roles and Modulate Cell Proliferation, vol. 20, pg 3840-3850.

**Balatsos, N.A.**, Maragozidis, P., Anastasakis, D., Stathopoulos, C. (2012). Modulation of poly(A)-specific ribonuclease (PARN): current knowledge and perspectives. *Curr Med Chem* 19, pg. 4838–49.

**Bonnemaison, M. L.**, Eipper, B. A., Mains, R. E. (2013). Role of adaptor proteins in secretory granule biogenesis and maturation. Available at: [<https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00101>].

**Carbonell, W. S.**, DeLay, M., Jahangiri, A., Park, C., Aghi, K. M. (2013).  $\beta$ 1 Integrin Targeting Potentiates Antiangiogenic Therapy and Inhibits the Growth of Bevacizumab-Resistant Glioblastoma. *Cancer Res.*

**Carrington, J.C.**, Ambros, V. (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301, pg. 336–338.

**Cevher, M.A.**, Zhang, X., Fernandez, S., et al. (2010). Nuclear deadenylation/polyadenylation factors regulate 30 processing in response to DNA damage. *EMBO J* 29, pg. 1674–87.

**Chen, C.Y.** et al. (2001). AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, pg. 451-464

**Chou, C.F.**, Mulky, A., MSaitra, S., Lin, W.J, Gherzi, R., Kappes, J., Chen, C.Y. (2006). Tethering KSRP, a decay-promoting AU-rich element-binding protein, to mRNAs elicits mRNA decay, *Mol. Cell. Biol.* 26, pg. 3695–3706.

**Clemens, M.J.**, Williams, B.R. (2000). Inhibition of cell-free protein synthesis by pppA<sub>2</sub>'p5'A<sub>2</sub>'p5'A: a novel oligonucleotide synthesized by interferon-treated L cell extracts, *Cell* 13, pg. 565–572.

**Derek, M.**, Novina, C., Sharp, P.A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence expression. *Nature* Vol4.

**Eckmann, C.R.**, Rammelt, C., Wahle, E. (2011). Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2:348–61

**Egea J.**, Klein R. (2007). Bidirectional Eph-ephrin signalling during axon guidance. *Trends Cell Biol*; 17(5), pg. 230-238.

**Felger, J.H.** et al. (1994). Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulation. *JB. Biol. Chem*; 28, pg. 2550-61.

- Fernandez-Zapico, M. E.,** Gonzalez-Paz, N. C., Weiss E., Savoy D. N., Molina J. R., Fonseca R., Smyrk T. C., Chari S. T., Urrutia, R.; Billadeau, D. D. (2005). Ectopic expression of VAV1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis. *Cancer Cell.* 7 (1), pg. 39–49.
- Garneau, N.,** Wilusz, J., Wilusz, C. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8, pg. 113–126.
- Gherzi, R.,** Lee, K.Y., Briata, P., Wegmüller, D., Moroni, C., Karin, M., Chen, C.Y. (2004). A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery, *Mol. Cell* 14, pg. 571–583.
- Gherzi, R.,** Trabucchi, M., Ponassi, M., Ruggiero, T., Corte, G., Moroni, C., Chen, C.Y., Khabar, K.H., Andersen, J.S., Briata, P. (2006). The RNA-binding protein KSRP promotes decay of beta-catenin mRNA and is inactivated by PI3K-AKT signaling, *PLoS Biol.* 5, e5.
- Giaginis, C.,** Tsoukalas, N., Bournakis, E., Alexandrou, P., Kavantzas, N., Patsouris, E., Theocharis, S. (2014). Ephrin (Eph) receptor A1, A4, A5 and A7 expression in human non-small cell lung carcinoma: associations with clinicopathological parameters, tumor proliferative capacity and patients' survival. *BMC Clinical Pathology*
- Goldstrohm, A.C.,** Wickens, M. (2008). Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature Publishing Group Vol 9*, pg. 337-344.
- Grishok, A.** et al. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106, pg. 23-34.
- Guo, X., Hartley, R.S.** (2006). HuR contributes to cyclin E1 deregulation in MCF-7 breast cancer cells, *Cancer Res.* 66, pg. 7948–7956.
- Hook, B.,** Goldstrohm, A. C., Seay, D. J., Wickens, M. (2007). Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. *J. Biol. Chem.* 282, pg. 15430-15438.
- Jackson, R.J.,** Standart, N. (2010). How do microRNAs regulate gene expression? *Sci. STKE*367 re.1.
- Kadyrova, L. Y.,** Habara, Y., Lee, T. H., & Wharton, R. P. (2007). Translational control of maternal cyclin B mRNA by nanos in the *Drosophila* germline. *Development* 134, pg. 1519-1527.
- Kinbara K.,** Goldfinger E. L., Hansen M., Chou C. F., Ginsberg M. H. (2003). Ras GTPases: integrins' friends or foes?, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, pg 767-778, available from: [[http://www.nature.com/nrm/journal/v4/n10/fig\\_tab/nrm1229\\_F1.html](http://www.nature.com/nrm/journal/v4/n10/fig_tab/nrm1229_F1.html)]
- Körner C.G., Wahle E.** (1997). Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 30-exoribonuclease. *J Biol Chem* 272, pg. 10448–56.
- Lippman, R.,** Martienssen, A. (2004). The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431, pg. 364-370.
- Maquat, L.E.,** Carmichael, G.G. (2000). Quality control of mRNA function. *Cell* 26, pg. 173-176.
- Maragozidis P,** Papanastasi E, Scutelnic D, Totomi A, Kokkori I, Zarogiannis SG, Kerenidi T, Gourgoulis K, Balatsos NA. Poly(A)-specific ribonuclease and Nocturnin in squamous cell lung cancer: prognostic value and impact on gene expression.
- Maragozidis P,** Papanastasi E., Scutelnic D., Totomi A., Kokkori I., Zarogiannis S. G., Kerenidi T., Gourgoulis K. I., Balatsos N. A. A. (2015). Poly(A)-specific ribonuclease and Nocturnin in squamous cell lung cancer: prognostic value and impact on gene expression, available at: [<http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-015-0457-3>].
- Mazan-Mamczarz, K.,** Gartenhaus, R.B. (2007). Post-transcriptional control of the MCT-1-associated protein DENR/DRP by RNA-binding protein AUF1, *Cancer Genomics Proteomics* 4, pg. 233–239.
- Meyer, S., Temme, C., Wahle, E.** (2004). Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39, pg. 197–216.
- Mol Cancer.* 2015; 14:187.
- Morita, M.,** Suzuki, T., Nakamura, T., Yokoyama, K., Miyasaka, T., Yamamoto, T. (2007). Depletion of Mammalian CCR4b Deadenylase Triggers Elevation of the *p27Kip1* mRNA Level and Impairs Cell Growth. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, July 2007, pg. 4980–4990.

**Parker, R.**, Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 11, pg. 121–127.

**Paschoud, S.**, Dogar, A.M., Kuntz, C., Grisoni-Neupert, B., Richman, L., Kühn, L.C., (2006). Destabilization of interleukin-6 mRNA requires a putative RNA stem-loop structure, an AU-rich element, and the RNA-binding protein AUF1, *Mol. Cell. Biol.* 26, pg. 8228–8241.

**Peng, Y.**, Schoenberg, D.R. (2007). c-Src activates endonuclease-mediated mRNA decay, *Mol. Cell* 25, pg. 779–787.

**Pulcrano, G.**, Leonardo, R., Piscopo, M., Nargi, E., Locascio, A., Aniello, F., Branno, M., Fucci, L. (2007). PLAUF binding to the 3' UTR of the H3.3 histone transcript affects mRNA stability, *Gene* 406, pg. 124–133.

**Quann, E.J.**, Khwaja, F., Djakiew, D. (2007). The p38 MAPK pathway mediates aryl propionic acid induced messenger RNA stability of p75 NTR in prostate cancer cells, *Cancer Res.* 67, pg. 11402–11410.

**Quilliam, L.**, Rebhun, J., Castro, A. (2002). A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of ras-family GTPases. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology:* 71, pg. 391–444.

**Reinhardt, H.C.**, Hsaskamp, P., Schmedding, I., et al. (2010). DNA damage activates a spatially distinct late cytoplasmic cell-cycle checkpoint network controlled by MK2-mediated RNA stabilization. *Mol Cell* 4.0, pg. 34–49

**Richter, J.D., Lasko, P.**, (2011). Translational control in oocyte development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a002758.

**Ross, J.** (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* 59, pg. 423–50.

**Sachs, A.B, Varani, G.** (2000). Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *Nat Struct Biol* 7, pg. 356–61.

**Salles, F.J.**, Richards, W. G., Strickland, S. (1999). Assaying the Polyadenylation State of mRNAs. *A Companion to Methods in Enzymology* 17, pg. 38 – 45

**Schoenberg, D.R.**, Maquat, L.E. (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* 13, pg. 246–59.

**Shatkin, A.J., Manley, J.L.** (2000). The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat Struct Biol* 7, pg. 838–42.

**Sidrauski C.**, Walter P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response, *Cell* 90, pg. 1031–1039.

**Sobue, S.**, Murakami, M., Banno, Y., Ito, H., Kimura, A., Gao, S., Furuhashi, A., Takagi, A., Kojima, T., Suzuki, M., Nozawa, Y., Murate, T. (2008). v-Src oncogene product increases sphingosine kinase 1 expression through mRNA stabilization: alteration of AU-rich element-binding proteins, *Oncogene* 27, pg. 6023–6033.

**Tarun, J.R.**, Sachs, S.Z. (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *Embo J* 15, pg. 7168–77.

**Taxman, K.**, et al. (2006). Criteria for effective design, construction, and gene knockdown by shRNA vectors. *BMC Biotechnology*, 6:7.

**Valencia-Sanchez, M.A.**, Liu, J., Hannon, G.J., Parker, R. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs, *Genes Dev.* 20, pg. 515–524.

**Wells, S.E.**, Hillner, P.E., Vale, R.D., Sachs, A.B. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* 2, pg. 135–40.

**Wickens, M.** (1990). In the beginning is the end: regulation of poly(A) addition and removal during early development. *Trends Biochem Sci* 15, pg. 320–324.

**Wilusz, C.J.**, Wormington, M., Peltz, S.W. (2001). The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, pg. 237–46.

**Wu, X., Brewer, G.** (2012). The regulation of mRNA stability in Mammalian Cells: 2.0. *Gene* 500(1), pg. 10–21.

**Xianghua, P., et al.** (2010). CCR4-NOT Deadenylates mRNA Associated with RNA-Induced Silencing Complexes in Human Cells. *Molecular and Cellular Biology*, pg. 1486–1494.

**Μαραγκοζίδης Π.** «Μελέτες στη βιολογική σημασία των ανθρώπινων αποαδενυλασών και ο ρόλος τους σε νοσήματα του πνεύμονα», Διδακτορική Διατριβή, Λάρισα 2016.