



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

---

## **Αναζήτηση microRNA και απαδενυλασών με περιοδική έκφραση σε κύτταρα θηλαστικών**

**Διπλωματική εργασία**  
**Αμαλία Κάνουρα**

Λάρισα 2019



**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**SCHOOL OF HEALTH SCIENCES**  
**FACULTY OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY**

---

# **Search for microRNAs and deadenylase with periodic expression in mammalian cells**

**Diploma thesis**  
**Amalia Kanoura**

Larissa 2019

---

Επιβλέπων καθηγητής:

**Νικόλαος Μπαλατσός**, *Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

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

**Μπαλατσός Νικόλαος**, *Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*

**Σκαμνάκη Βασιλική**, *Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*

---

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, από τον Μάρτιο του 2018 έως τον Ιανουάριο του 2019, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Βιοχημείας Δρ Μπαλατσού Νικόλαου.

### **Ευχαριστίες**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ Μπαλατσό Νικόλαο, για την υπόδειξη του θέματος και την επιστημονική του καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής Δρ Λεωνίδα Δημήτριο και Δρ Σκαμνάκη Βασιλική. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την συνεργασία και την αμέριστη βοήθεια για την ομαλή διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στην υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Ραφαηλία Μπέτα, για την άψογη καθοδήγηση, τις συμβουλές και τη συμπαράσταση. Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω του φίλους μου και την οικογένεια μου, που ήταν πάντα το στήριγμα μου καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	5
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ / ABSTRACT</b> .....	6
<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	7
<b>1.1.Ο ημερονύκτιος (κirkάδιος) ρυθμός</b> .....	7
1.1.1.Το κirkάδιο ρολόι στα θηλαστικά και τον άνθρωπο .....	7
1.1.2.Μοριακός μηχανισμός των κirkάδιων συστημάτων.....	9
1.1.3.Ορμονική ρύθμιση του κirkάδιου ρολογιού .....	13
<b>1.2. Αποικοδόμηση του mRNA</b> .....	15
1.2.1. Απαδενυλίωση .....	16
1.2.2. Η απαδενυλάση PARN .....	17
1.2.3. Η απαδενυλάση Nocturnin.....	19
<b>1.3. microRNA</b> .....	20
1.3.2. Συσχέτιση των miRNA με το κirkάδιο ρολόι .....	22
1.3.3. Το miR-29a .....	23
1.3.4. Το miR1207 .....	24
<b>2.ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	25
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	26
3.1. Υλικά.....	26
3.1.2. Ένζυμα.....	26
3.1.3. Δείκτες μοριακών μαζών .....	26
3.1.4. Διαλύματα.....	27
3.1.5. Υλικά-Οργανολογία .....	28
3.1.6. Αντισώματα .....	29
3.1.7. Κυτταρικές σειρές .....	29
3.1.8. Εκκινητές.....	29
3.2. Μέθοδοι .....	30
3.2.1. Κυτταροκαλλιέργειες.....	30
3.2.1.1.Απόλυση κυττάρων HEK293T.....	30
3.2.1.2. Ανακαλλιέργεια μονόστοιβης καλλιέργειας-Κατεργασία κυττάρων με θρυψίνη .....	30
3.2.1.3. Κατάλυση κυττάρων για επακόλουθη καλλιέργεια .....	31
3.2.1.4. Υπολογισμός αριθμού κυττάρων με την πλάκα Neubauer .....	31
3.2.1.5. Συλλογή κυττάρων θηλαστικών .....	31
3.2.1.6. Λύση κυττάρων θηλαστικών.....	32
3.2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	32
3.2.3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE), χρώση πηκτής, ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη PVDF και ανοσοανίχνευση .....	33
3.2.4. Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών.....	35
3.2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου δύο βημάτων (RT-qPCR).....	36
3.2.6. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων (DNA-RNA) .....	39
<b>4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	40
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	51

## I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κιρκάδιοι ρυθμοί είναι πανταχού παρόντες μηχανισμοί σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που οδηγούν στο συγχρονισμό της φυσιολογίας και της συμπεριφοράς με τις περιβαλλοντικές συνθήκες με περίοδο που προσεγγίζει το 24ωρο. Πρόσφατα αναδεικνύεται η σημασία της αποικοδόμησης των mRNA στη ρύθμιση των κιρκάδιων ρολογιών, η οποία μαζί με την έναρξη της μεταγραφής καθορίζουν το χρόνο ζωής τους. Στην αποικοδόμηση των mRNA κύριο ρόλο έχουν οι απαδενυλάσες και τα microRNA. Ο ρόλος των microRNA στον κιρκάδιο ρυθμό μελετάται έντονα, ενώ οι γνώσεις μας για τη συμβολή των απαδενυλασών είναι πολύ περιορισμένες. Στην εργασία, μελετούμε την απαδενυλάση PARN και επιλεγμένα microRNA στον κιρκάδιο ρυθμό. Εφαρμόσαμε ένα πειραματικό μοντέλο για την μελέτη της ρυθμικότητας γονιδίων με κεντρικό ρόλο στον κιρκάδιο ρυθμό. Η ρυθμικότητα της απαδενυλάσης PARN επιβεβαιώθηκε τόσο σε επίπεδο RNA όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνών με τη φάση του μεταγράφου να προηγείται της πρωτεΐνης. Όσον αφορά την έκφραση των miRNA, χαρακτηρίζεται από έντονη ρυθμικότητα και στην πρώιμη και στην ώριμη μορφή τους.

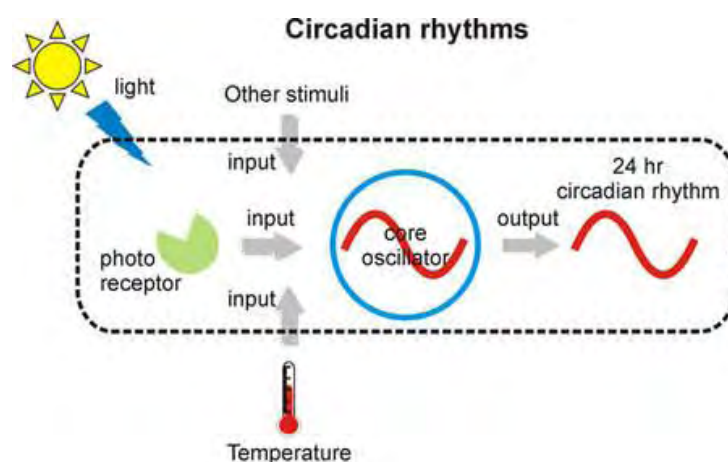
## II. ABSTRACT

Circadian rhythms are ubiquitous time-keeping mechanisms present in all eukaryotic organisms that lead to coordinate physiology and behavior with daily environmental rhythms with a period that is close to 24 hours. Recently, the importance of mRNA degradation in regulation of circadian clocks, which together with the onset of transcription, determine their lifetime. Deadenylases and microRNA play a key role in mRNA degradation. The role of microRNA in circadian rhythm is being studied thoroughly, and our knowledge about the contribution of deadenylases is very limited. At this diploma thesis, we study PARN deadenylase and selected microRNAs in the circadian regulation. We have applied an experimental model to study rhythmicity of genes with a central role in circadian clocks. The rhythmicity of PARN was confirmed at both RNA and protein level with the transcript phase preceding the protein. As for the expression of miRNAs, it is characterized by intense rhythmicity both in their primary and mature form.

## 1.1. Ο ημερονύκτιος (κirkάδιος) ρυθμός

Φαινόμενα ημερήσιων κύκλων φωτός και σκότους είναι πανταχού παρόντα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς [1]. Οι ημερήσιοι αυτοί κύκλοι αντιπροσωπεύουν έναν ενδογενή αυτοσυντηρούμενο μηχανισμό ο οποίος υπαγορεύει μία προσαρμοστική στρατηγική, με περίοδο που προσεγγίζει το 24ωρο, αφορά τις περιβαλλοντικές μεταβολές κατά τις διάφορες ώρες της ημέρας και εξαρτάται άμεσα από θηλιές ανατροφοδότησης μεταγραφής και μετάφρασης γονιδίων τα οποία χαρακτηρίζονται ως κεντρικά γονίδια του ρολογιού (core clock genes) (Πίνακας1)[2, 3]. Οι περισσότεροι οργανισμοί, υποβάλλονται καθημερινά σε ρυθμικές αλλαγές με αποτέλεσμα η συμπεριφορά και η φυσιολογία τους να συγχρονίζεται με τις αλλαγές του φυσικού περιβάλλοντος [4]. Οι εσωτερικοί ταλαντωτές που ρυθμίζουν τους ημερήσιους αυτούς ρυθμούς ονομάζονται κirkάδια ρολόγια (κirkάδιος < αγγλικά circadian > < λατινικά circa (περίπου) dies (ημέρα) : ελληνικά «περίπου μια μέρα»). Στα γεγονότα που ελέγχονται από τα ενδογενή ρολόγια συμπεριλαμβάνονται η ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος και της πίεσης του αίματος, η παραγωγή κυκλοφορούντων ορμονών, ο μεταβολισμός, η δραστηριότητα των νευρώνων, η γονιδιακή έκφραση και άλλες φυσιολογικές παράμετροι [1].

Τα χαρακτηριστικά σε ένα κirkάδιο σύστημα-ρολόι είναι (i) τα περιβαλλοντικά σήματα εισόδου, (ii) ο κεντρικός ταλαντωτής και (iii) οι μηχανισμοί των σημάτων εξόδου [1, 2]. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό όλων των ρολογιών, είναι η ικανότητα τους να διατηρούν τη ρυθμικότητά τους ακόμα και σε συνθήκες ελαφρώς διαφορετικές από τις 24 ώρες ή απουσία των περιβαλλοντικών παραγόντων (χρονοδότες ή Zeitgeber). Τα μοριακά ρολόγια εμφανίζουν επιπλέον ιδιαίτερη ευαισθησία σε ορισμένες περιβαλλοντικές ταλαντώσεις έχοντας έτσι την ικανότητα να αυτοπροστατεύονται [1].



Εικόνα1: Ρύθμιση των κirkάδιων ρυθμών από ποικίλα σήματα εισόδου: Το κυριότερο σήμα εισόδου (input) των ρολογιών είναι το φως, και ακολουθούν η θερμοκρασία και άλλα ερεθίσματα όπως ορμόνες και άλλοι νευροχημικοί παράγοντες. Στα σήματα εξόδου (output) από την άλλη, περιλαμβάνονται η έκφραση γονιδίων, συμπεριφορές όπως οι εναλλαγές στην κατάσταση ύπνου-εγρήγορσης, η γνωστική απόδοση, και η φυσιολογική λειτουργία οργάνων μεταξύ των οποίων είναι η καρδιά, το ήπαρ και οι νεφροί [5]

### 1.1.1. Το κirkάδιο ρολόι στα θηλαστικά και τον άνθρωπο

Η διατήρηση των κirkάδιων ρυθμών οφείλεται σε κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς του ρολογιού που ενέχονται σε όλους τους ιστούς του σώματος και συντονίζονται σε ολόκληρο τον οργανισμό από περιβαλλοντικά ερεθίσματα (όπως το φως), νευροχημικούς παράγοντες ή άλλα ερεθίσματα [1].

### Α. Κεντρικός ταλαντωτής

Το κικκάδιο σύστημα των θηλαστικών, χαρακτηρίζεται από ένα σύνολο ταλαντωτών που λειτουργούν από το επίπεδο του κυττάρου, σε αυτό των ιστών και τέλος, των συστημάτων/οργανισμού, διαθέτοντας ο καθένας διαφορετική θέση στην ιεραρχία του ρολογιού [6]. Ως κύριος ταλαντωτής (pacemaker), αναγνωρίζεται ο υπερχιασματικός πυρήνας (suprachiasmatic nucleus: SCN) του εγκεφάλου [7]. Ο SCN αποτελεί ένα σύνολο από συνδεδεμένες δομές του κοιλιακού υποθαλάμου και περιέχει περίπου 50.000 νευρώνες στον άνθρωπο. Καθένας από αυτούς τους νευρώνες, θεωρείται ότι περιέχει έναν αυτόνομο κικκάδιο ταλαντωτή σε επίπεδο κυττάρου, οι οποίοι συζεύγνυνται και λειτουργούν ως ένα ενιαίο δίκτυο που ταλαντώνεται με ένα συγκεκριμένο συνεκτικό τρόπο [8]. Σε κυτταρικό επίπεδο, οι νευρώνες του SCN παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα όσον αφορά τις κικκάδιες περιόδους τους που κυμαίνεται από 22 έως 30 ώρες. Ωστόσο, μέσω της ενδοκυτταρικής τους σύζευξης επιτυγχάνεται ένα πολύ μικρότερο εύρος που αντιστοιχεί τελικά και στην περίοδο του κικκάδιου ρολογιού η οποία είναι εξαιρετικά ακριβής [7]. Ο SCN, είναι ο κύριος συγχρονιστής όχι όμως και ο δημιουργός του ρυθμού. Όπως έχει δειχθεί οι ιστοί και τα κύτταρα εμφανίζουν κικκάδια ρυθμικότητα ακόμα και όταν απομονωθούν από τον SCN. Ο ρόλος αυτού είναι ουσιαστικά ο συγχρονισμός των ταλαντώσεων των μεμονωμένων ιστών και κυττάρων μέσω μονοπατιών μεταγωγής σήματος για την ορθή λειτουργία του οργανισμού βάσει του ερεθίσματος [1].

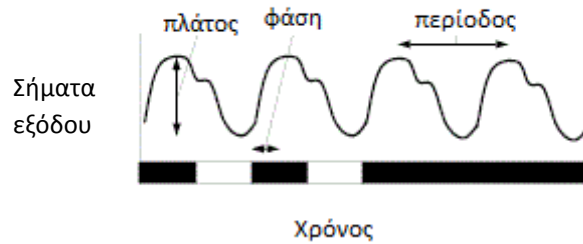
### Β. Zeitgebers

Ο όρος *χρονοδότης* ή *zeitgeber* [γερμανικά: *zeit* (χρόνος) και *geben* (δίνω)] αναφέρεται σε περιβαλλοντικά σήματα που μπορούν να επηρεάσουν την λειτουργία του SCN και κατ' επέκταση και το κικκάδιο ρολόι. Ο κυριότερος χρονοδότης είναι το φως της ημέρας. Οι ρυθμοί που σχετίζονται με ημερονύκτιες συμπεριφορές ελέγχονται από τον SCN. Το φωτεινό σήμα λαμβάνεται μέσω οφθαλμικών υποδοχέων, τα ραβδία και τα κωνία, και φτάνει στον SCN με τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς που περιέχουν μελανοψίνη (τα οποία ονομάζονται και *εγγενώς φωτοευαίσθητα γάγγλια του αμφιβληστροειδούς ipRGCs* (intrinsically photosensitive retinal ganglion cells) μέσω της ρετινο-υποθαλαμικής οδού (retinohypothalamic tract: RHT) [9, 10]. Η μελανοψίνη, καθιστά τους υποδοχείς αυτούς φωτοευαίσθητους ακόμα και σε ακτινοβολία μικρού μήκους κύματος. Η απόκριση στην φωτεινή πληροφορία χαρακτηρίζεται από αργή κινητική και σχετικά υψηλό κατώφλι ως προς το φως, καθώς η φωτεινή πληροφορία πρέπει να διαρκεί για μεγάλες χρονικές περιόδους και οι υποδοχείς να μην είναι ευαίσθητοι σε παροδικά φωτεινά σήματα που δεν σχετίζονται με τον κύκλο του ηλιακού φωτός [11]. Η θερμοκρασία είναι επίσης ένας από τους κύριους χρονοδότες που επηρεάζει τις αποκρίσεις των κικκάδιων ρυθμών. Παρόλο που τα κικκάδια ρολόγια «τρέχουν» με την ίδια περίοδο σε διάφορες θερμοκρασίες δε σημαίνει ότι αγνοούν τη θερμοκρασία. Τα περισσότερα είδη εκτίθενται σε πολλές ημερήσιες θερμοκρασιακές ταλαντώσεις.

### Γ. Περιφερικά ρολόγια

Εκτός από τα κεντρικά γονίδια του ρολογιού, εκατοντάδες ή και χιλιάδες γονίδια έχει παρατηρηθεί ότι εκφράζονται με έναν κικκάδιο ρυθμό όχι μόνο στον SCN αλλά και σχεδόν σε όλους ιστούς των θηλαστικών, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι υπάρχουν και εκατοντάδες γονίδια ρολογιού (core clock genes) [12, 13]. Από την άλλη, αποτελεί ένδειξη για την ύπαρξη ταλαντωτών και σε κύτταρα εκτός των νευρώνων του SCN, οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως περιφερικοί ταλαντωτές. Τα κεντρικά γονίδια του ρολογιού δρουν σαν τα γρανάζια ενός μηχανικού ρολογιού που έχει εκατοντάδες χέρια που δείχνουν σε όλες τις διαφορετικές φάσεις αλλά κινούνται με τον ίδιο ρυθμό [14]. Αν και τα εργαλεία αυτά επηρεάζουν τα περιφερικά ρολόγια, υπάρχουν διαφορές στη σχετική συνεισφορά και μεμονωμένων εξαρτημάτων του ρολογιού σε κάθε ιστό, γι' αυτό και η φάση έκφρασης, δηλαδή η χρονική στιγμή των μέγιστων και των ελάχιστων της γονιδιακής έκφρασης ποικίλει με τρόπο που είναι ειδικός για κάθε είδος ιστού (βλ.Εικόνα2) [15].





Εικόνα2: Ρυθμός βάσει του οποίου τα επίπεδα ενός μορίου ταλαντώνονται ανάλογα με το χρόνο. Η διαφορά ανάμεσα στο ελάχιστο επίπεδο και την κορυφή είναι το πλάτος της ταλάντωσης<sup>1</sup>. Η θέση ενός σημείου σε σχέση με ένα σταθερό σημείο αναφοράς αντιπροσωπεύει την φάση (στο σχήμα υποδεικνύεται με βέλος η έναρξη της νυκτερινής φάσης). Τέλος, το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ δύο κορυφών ή δύο ελαχίστων ονομάζεται περίοδος. (λευκό τετράγωνο: μέρα, μαύρο τετράγωνο: νύκτα) [16]

Είναι πιθανό ότι, όπως οι διάφοροι περιφερειακοί ταλαντωτές έχουν τελειοποιήσει τα κικκάδια μεταγραφώματά τους, να χρησιμοποιούν επίσης μοναδικούς συνδυασμούς σημάτων φυσιολογικής φάσης για βελτιστοποιείται ο συγχρονισμός τους στη φάση του SCN, και κατ' επέκταση να διευκολύνεται όσο το δυνατόν περισσότερο και η λειτουργία του εκάστοτε ιστού καθ' όλη τη διάρκεια του κικκάδιου κύκλου. Οι διαφορετικοί ρυθμοί επαναπροσδιορισμού των περιφερικών ιστών σε έναν νέο κύκλο φωτός-σκότους υποδηλώνουν αυτές τις χαρακτηριστικές ιδιότητες [17].

### 1.1.2. Μοριακός μηχανισμός των κικκάδιων συστημάτων

Οι μεταγραφικοί, συμμεταγραφικοί και μετα-μεταφραστικοί μηχανισμοί που διέπουν τα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης, όπως και η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, είναι σημαντικά για την διαμόρφωση παροδικής γονιδιακής έκφρασης προκειμένου να διατηρείται η ρυθμικότητα και η σωστή λειτουργία του κικκάδιου ρολογιού και ιδιαίτερα για το μοριακό μηχανισμό του ρολογιού [18, 19]. Στα θηλαστικά, ο βασικός μοριακός μηχανισμός του κεντρικού ταλαντωτή βασίζεται σε μια γενική αρχή αυτορρυθμισμού μέσω αλληλένδετων μεταγραφικών και μεταφραστικών βρόχων ανατροφοδότησης (transcription/translation feedback loops : TTFL) στους οποίους εμπλέκονται τα κεντρικά γονίδια του ρολογιού, που τελικά καθορίζουν τη ρυθμική έκφραση γονιδίων που ελέγχονται από το ρολόι [20].

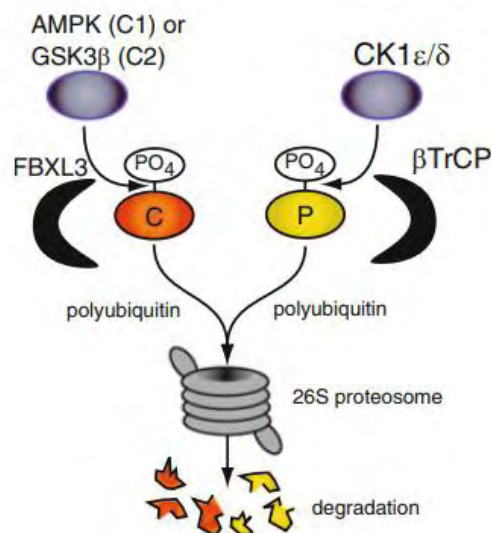
Το μοριακό ρολόι των θηλαστικών (βλ. Εικόνα4) απαρτίζεται από δύο TTFL οι οποίοι λειτουργούν αλληλένδετα για να ρυθμίσουν την κυκλική μεταγραφή και τη διατήρηση σταθερών επιπέδων των mRNA. Τα γονίδια Clock και Bmal1 κωδικοποιούν bHLH-PAS (basic helix-loop-helix; Per-Arnt-Single minded) πρωτεΐνες, οι οποίες λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες και διαμορφώνουν το βρόχο θετικής ρύθμισης του κυκλικού μηχανισμού ανατροφοδότησης. Οι πρωτεΐνες CLOCK και BMAL1 σχηματίζουν ετεροδιμερή και μέσω της συνδέσής τους στον υποκινητή (E-boxes και E'-boxes)<sup>2</sup> επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων τους [21]. Μεταξύ των ενεργοποιημένων γονιδίων, περιλαμβάνονται μέλη του αρνητικού βρόχου ανατροφοδότησης, όπως τα γονίδια Per (Per1, Per2, Per3) και Cry (Cry1, Cry2) [22]. Οι πρωτεΐνες PER και CRY που παράγονται, ετεροδιμερίζονται και αναστέλλουν την επιπλέον μεταγραφική δραστηριότητα του CLOCK/BMAL1 επιτρέποντας στον κύκλο να επαναληφθεί από ένα επίπεδο χαμηλής μεταγραφικής ενεργότητας [23, 24].

Η πρωτεΐνη CLOCK, διαθέτει μια επικράτεια ακετυλο-τρανσφεράσης των ιστονών [25]. Ο λόγος NAD<sup>+</sup> προς NADH φαίνεται να ρυθμίζει την ικανότητα του ετεροδιμερούς CLOCK/BMAL1 να προσδένεται

<sup>1</sup> Ταλάντωση: οποιαδήποτε παλινδρομική περιοδική μεταβολή

<sup>2</sup> Στοιχείο-E ή E-box (enhancer box) : Στοιχείο απόκρισης του DNA, που δρα ως θέση δέσμευσης πρωτεϊνών και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων. Οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται στους υποκινητές των γονιδίων μέσω των E-box επιτρέποντας στη συνέχεια τη σύνδεση και άλλων παραγόντων (π.χ. ενζύμων) για την έναρξη της μεταγραφής. Τα στοιχεία-E αποτελούν αναπόσπαστο μέρος των TTFL που συγκροτούν το κικκάδιο ρολόι.

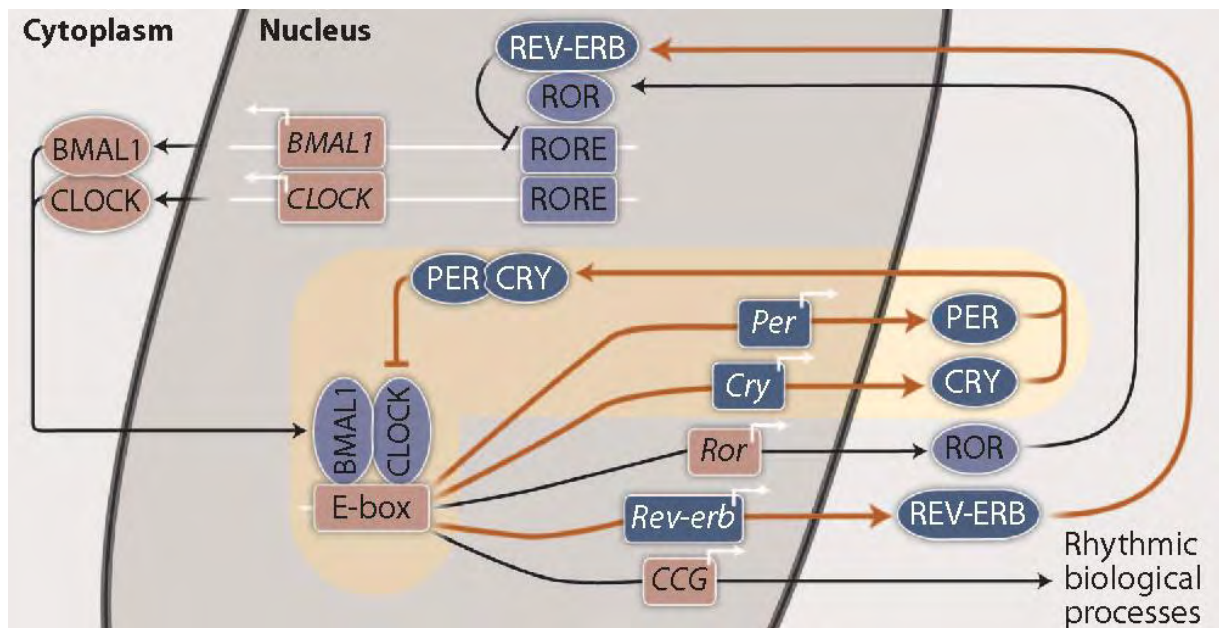
στο DNA in vitro [26]. Επομένως, ο κυτταρικός μεταβολισμός μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφικής κατάστασης και να επηρεάσει τη φάση του ρολογιού [26, 27]. Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών PER και CRY, είναι απαραίτητη για τον τερματισμό της ανασταλτικής φάσης και την έναρξη ενός νέου κύκλου μεταγραφής. Ο λόγος της σύνθεσης προς την αποικοδόμηση των PER και CRY είναι το κλειδί για τη ρύθμιση της περιόδου του ρολογιού. Η πρωτεΐνη PER φωσφορυλιώνεται από την κινάση της καζεΐνης 1ε (CK1ε). Η κινάση της καζεΐνης 1δ (CK1δ)<sup>3</sup> έχει επίσης ως στόχο το γονίδιο PER, ενώ η συνδυαστική φωσφορυλίωση και από τις δύο κινάσες αποτελεί το σήμα για την έναρξη της ουβικουιτίνωσης και της αποικοδόμησης της PER από το 26S πρωτεάσωμα [28, 29]. Όσον αφορά τώρα τα γονίδια CRY, υφίστανται πολυ-ουβικουιτίνωση και οδηγούνται προς το πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση από την FBXL3 (F-Box And Leucine Rich Repeat Protein 3) [30]. Ωστόσο οι διαφορετικές πρωτεΐνες CRY μπορούν να αποτελούν και στόχο διαφορετικών κινασών. Πιο συγκεκριμένα, το CRY1 φωσφορυλιώνεται από την AMPK1 (AMP-activated protein kinase), ενώ το CRY2 μέσω του καταρράκτη DYRK1A/GSK-3β. Η φωσφορυλίωση όπως και στην περίπτωση των PER γονιδίων αποτελεί σήμα ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της ουβικουιτίνωσης (βλ.Εικόνα3) [31, 32].



Εικόνα3: Αποικοδόμηση των πρωτεϊνών CRY (πορτοκαλί σφαίρα) και PER (κίτρινη σφαίρα) από το πρωτεάσωμα 26S [1]

Το διμερές CLOCK/BMAL1 οδηγεί στην έναρξη της μεταγραφής ενός δεύτερου ανατροφοδοτικού μηχανισμού ο οποίος περιλαμβάνει την μεταγραφή των γονιδίων Rev-Erba/β και RORa/β μέσω της πρόσδεσής του στα E-boxes [33-35]. Οι πρωτεΐνες REV-ERB και ROR με τη σειρά τους συναγωνίζονται για τη σύνδεση σε στοιχεία απόκρισης στο ρετινοϊκό οξύ (RORE) εντός του υποκινητή του γονιδίου Bmal1, όπου οι πρωτεΐνες ROR επάγουν την μεταγραφή του Bmal1, ενώ οι REV-ERB την αναστέλλουν [33, 34].

<sup>3</sup> CK1ε, CK1δ : κινάσες σερίνης-θρεονίνης

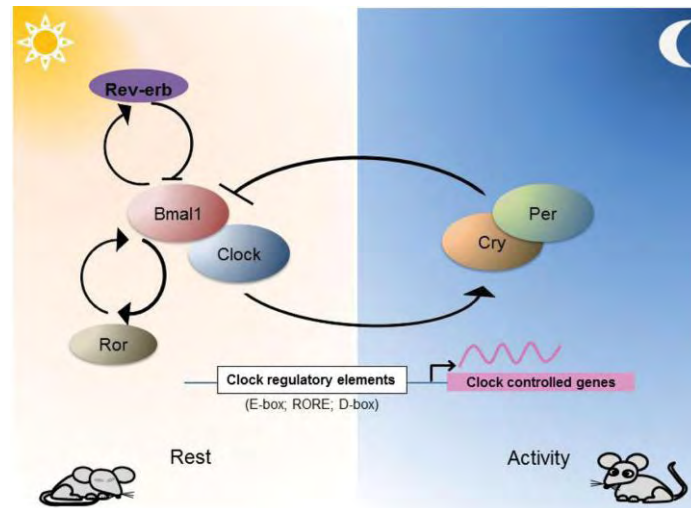


Εικόνα4: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου ανατροφοδότησης στα θηλαστικά: Κατά τη διάρκεια της ημέρας, επάγεται από το φως η μεταγραφή των γονιδίων *Bmal1* και *Clock* και η μετατόπιση των αντίστοιχων πρωτεϊνών στον πυρήνα για τη σύνδεσή του ετεροδιμερούς στα στοιχεία E-box των γονιδίων στόχων τους. Κατά τη διάρκεια της νύχτας, οι πρωτεΐνες PER και CRY αποφοσφωρλιώνονται στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα αντί να αποικοδομηθούν να μετατοπιστούν στον πυρήνα και να αναστείλουν τη δράση του διμερούς BMAL1/CLOCK (CCG: clock-controlled genes) [36].

Μια ξεχωριστή ομάδα γονιδίων PAR bZIP από τα οποία προκύπτουν μεταγραφικοί παράγοντες, δημιουργούν έναν ακόμα πιθανό βρόχο μεταγραφής ο οποίος περιλαμβάνει γονίδια των οικογενειών HLF, DBP, TEF και Nfil3. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες προσδέονται σε στοιχεία απόκρισης D-box στους υποκινητές των γονιδίων στόχων τους. Αυτά τα τρία γνωστά στοιχεία απόκρισης μαζί παρέχουν την απαραίτητη καθυστέρηση για τον κύκλο σε σχεδόν 24h : E-box το πρωί, D-box κατά τη διάρκεια της ημέρας και RORE στοιχεία το απόγευμα [37]. Οι οικογένειες των γονιδίων με τα D-box δεν είναι απαραίτητες για τη λειτουργία του ρολογιού, μπορεί όμως να έχουν την ικανότητα να καταστήσουν πιο έντονες τις ταλαντώσεις και να προσθέσουν ακρίβεια στην περίοδο της ταλάντωσης [38].

Τα μέρη του βρόχου που διαμεσολαβούν την αρνητική ρύθμιση και συγκεκριμένα τα γονίδια PER, δρουν ως σταθερές μεταβλητές στο μηχανισμό [39]. Αυτό σημαίνει ότι τα επίπεδα των πρωτεϊνών αυτών καθορίζουν τη φάση του ρολογιού. Τη νύχτα, όταν τα επίπεδα των PER πρωτεϊνών είναι χαμηλά, οξεία χορήγηση φωτός προκαλεί επαγωγή της μεταγραφής των *Per1* και *Per2* [40-42]. Με την έκθεση στο φως νωρίς τη νύχτα παρατηρείται καθυστέρηση φάσης και αυτό οδηγεί σε επαγόμενη από το φως αύξηση και των δύο πρωτεϊνών (PER1, PER2), ενώ στο υπόλοιπο της νύχτας μόνο τα επίπεδα του PER1 αυξάνονται με την έκθεση στο φως [43]. Η φωτοεπαγόμενη ενεργοποίηση των γονιδίων *Per* επιτυγχάνεται μέσω της δράσης του σηματοδοτικού μονοπατιού CREB/MAPK σε στοιχεία CRE (cAMP-response elements) του *Per* υποκινητή [44].

Συνοψίζοντας την παραπάνω διαδικασία χρονικά, η ενεργοποίηση του BMAL1 πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της ημέρας, οδηγώντας στη μεταγραφή των γονιδίων *Per* και *Cry* το απόγευμα και τη συσσώρευση των πρωτεϊνών PER και CRY αργά το απόγευμα ή το βράδυ. Οι πρωτεΐνες PER και CRY αλληλεπιδρούν μεταξύ τους όπως και με τις CK1δ και CK1ε [45] και μετατοπίζονται στον πυρήνα τη νύχτα, όπου αλληλεπιδρούν με το διμερές CLOCK/BMAL1 για να καταστείλουν τη δική τους μεταγραφή (βλ. Εικόνα5) [2].



Εικόνα5: Σχηματική απεικόνιση των κύκλων ανατροφοδότησης των κεντρικών γονιδίων του ρολογιού κατά τη διάρκεια της ημέρας και της νύκτας [46]

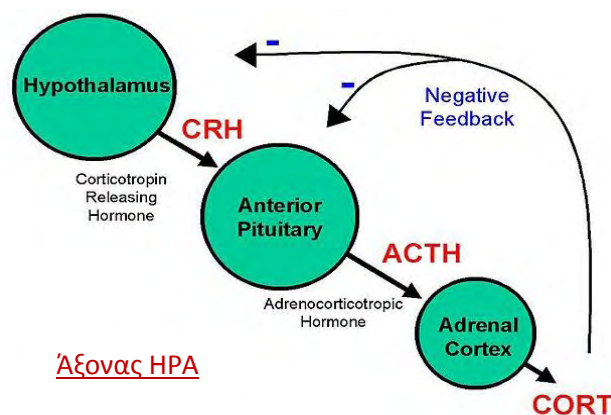
Πίνακας1: Συγκεντρωτική παρουσίαση των core clock genes

Γονίδιο	Πλήρες όνομα	Λειτουργία
Clock	Circadian locomotor output cycles kaput	Ελέγχει την διάρκεια του κηκκάδιου κύκλου σε διάφορα κηκκάδια γονίδια με το να αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα
Bmal1	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 (BMAL1, γνωστό και ως MOP3)	Δρα ως μεταγραφικός παράγοντας μέσω του συμπλόκου που δημιουργεί με το CLOCK, το οποίο προσδέεται στα στοιχεία E-box
Erb-Erva	Γνωστό και ως NR1D1 (nuclear receptor subfamily1, group D, member1)	Μεταγραφικός αναστολέας και ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων Rev-Erba
Rora	RAR-related orphan receptor alpha	Πυρηνικός υποδοχέας, προσδέεται στα στοιχεία απόκρισης ROR/REV-ERB (RRE) στον υποκινητή του Bmal, οδηγώντας στην trans-ενεργοποίηση του
Per1	Period homolog 1	Κωδικοποιεί συστατικά των κηκκάδιων ρολογιών που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό κ.α.
Per2	Period homolog 2	Μεταγραφικός παράγοντας επάγει την έκφραση του BMAL1
Per3	Period homolog 3	Κωδικοποιεί συστατικά των κηκκάδιων ρολογιών που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό κ.α.
Cry1	Cryptochrome homolog 1	Αποτελεί έναν ανεξάρτητο από το φως αναστολέα των συστατικών CLOCK-BMAL1 του ρολογιού
Cry2	Cryptochrome homolog 2	Αποτελεί έναν ανεξάρτητο από το φως αναστολέα των συστατικών CLOCK-BMAL1 του ρολογιού

### 1.1.3. Ορμονική ρύθμιση του κιρκάδιου ρολογιού

Αν και πολλές είναι οι ορμόνες που μπορεί να επηρεάζουν το κιρκάδιο σύστημα των θηλαστικών, τα κορτικοστεροειδή και ιδιαίτερα τα γλυκοκορτικοειδή είναι αυτά που έχουν λάβει τη μεγαλύτερη προσοχή. Τα κορτικοστεροειδή είναι μία τάξη χημικών ενώσεων που κατατάσσονται στις στεροειδείς ορμόνες και παράγονται από των φλοιό των επινεφριδίων. Εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών αποκρίσεων που αφορούν την ομοιόσταση του σώματος και την αντίδραση σε εξωτερικούς παράγοντες, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η απόκριση στο στρες, η ρύθμιση της φλεγμονώδους αντίδρασης, ο μεταβολισμός των υδατανθράκων, ο καταβολισμός των πρωτεϊνών και η ρύθμιση των επιπέδων ηλεκτρολυτών. Τα γλυκοκορτικοειδή, όπως είναι η κορτιζόλη, ελέγχουν το μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών, ενώ ασκούν και αντιφλεγμονώδη δράση. Ανωμαλίες στη σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση ασθενειών, μεταξύ των οποίων είναι και το μεταβολικό σύνδρομο και ο διαβήτης [47].

Ο κιρκάδιος έλεγχος της παραγωγής και έκκρισης των γλυκοκορτικοειδών ελέγχεται από τον κεντρικό ταλαντωτή του υποθαλάμου, SCN, καθώς και περιφερικό ρολόι στον ίδιο τον αδένα των επινεφριδίων. Η κεντρική ρύθμιση λοιπόν των γλυκοκορτικοειδών που εμφανίζουν περιοδική έκφραση, μεσολαβείται μέσω του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια καθώς και του αυτόνομου νευρικού συστήματος (Εικόνα5) [48]. Το ρολόι των επινεφριδίων φαίνεται να επηρεάζεται από την ορμόνη απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης (CRH) και να ελέγχει την ευαισθησία του αδένα στην ακετυλοχολίνη (ACTH) και στην απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών που προκαλείται από τη δράση της [49, 50].

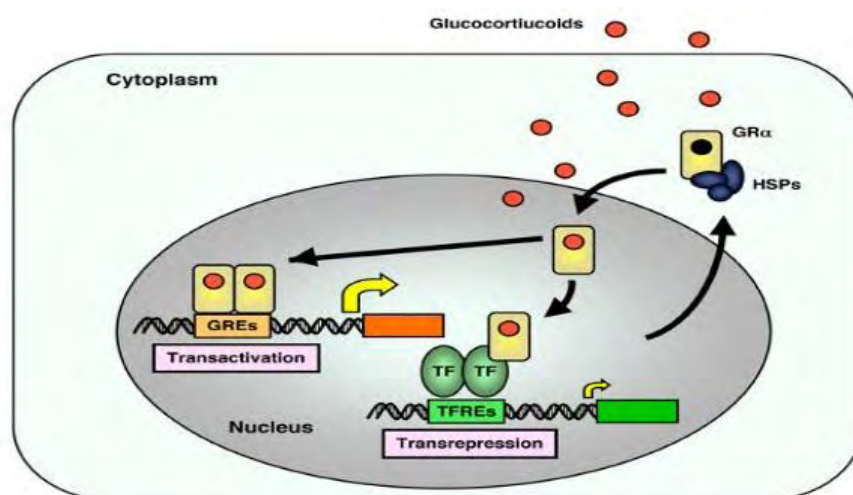


Εικόνα6: Ο άξονας HPA και ο ανατροφοδοτικός μηχανισμός αυτορρύθμισης του [51]

Τα ρυθμικά απελευθερούμενα γλυκοκορτικοειδή με τη σειρά τους, μπορεί να συμβάλλουν στον συγχρονισμό των ρολογιών μεμονωμένων κυττάρων σε όλο το σώμα [47]. Τα μέγιστα επίπεδα της κιρκάδιας απελευθέρωσης των γλυκοκορτικοειδών, σχετίζονται με την ενεργή φάση του οργανισμού, δηλαδή λαμβάνει χώρα το πρωί στα ημερήσια και νωρίς τη νύκτα στα νυκτόβια θηλαστικά [52]. Η απελευθέρωση της ACTH διεγείρεται από την CRH, το σύστημα αργινίνης-βασοπρεσσίνης (AVP) και την ωκυτοκίνη, τα οποία απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος μέσω νευρικών απολήξεων του παρακοιλιακού πυρήνα (PVN) του υποθαλάμου [53]. Η σύνθεση της CRH και της AVP θα μπορούσε επίσης να βρίσκεται υπό τον έλεγχο του ρολογιού καθώς το pre-mRNA τους φαίνεται να παρουσιάζει ημερήσιες διακυμάνσεις [20, 54]. Στον εγκέφαλο τα κορτικοστεροειδή προσδένονται με διαφορετική συγγένεια σε δύο τύπους υποδοχέων: τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid receptor GR), και τον υποδοχέα αλατοκορτικοειδών (mineralocorticoid receptor, MR). Οι GR και MR ανήκουν στην υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και μαζί με τους υποδοχείς της προγεστερόνης, των οιστρογόνων και των ανδρογόνων, σχηματίζουν την οικογένεια των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών [55]. Οι MR, παρά το όνομά τους, χαρακτηρίζονται από μεγάλη συγγένεια

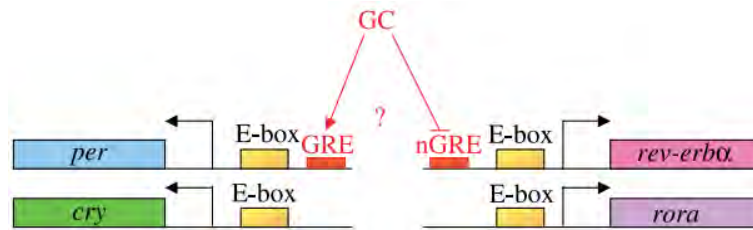
τόσο για τα αλατοκορτικοειδή όσο και για τα γλυκοκορτικοειδή, ενώ οι GR έχουν περίπου δέκα φορές μικρότερη συγγένεια για τα γλυκοκορτικοειδή από τους MR. Έτσι λοιπόν, ο κάθε τύπος έχει το δικό του φάσμα δράσης ακόμα και εντός του ίδιου κυττάρου. Μια από τις διαφορές στις δράσεις των υποδοχέων βασίζεται στη συγκέντρωση των κορτικοστεροειδών. Λόγω της διαφορετικής συγγένειας πρόσδεσης που έχουν, οι MR θα είναι πλήρως κορεσμένοι σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών, ενώ οι GR δεσμεύουν τα γλυκοκορτικοειδή όταν αυτά βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (όπως για παράδειγμα κατά τη έκθεση σε κάποιο φυσιολογικό ή ψυχολογικό παράγοντα στρες) [56]. Και οι δύο υποδοχείς στην ελεύθερη μορφή τους, δηλαδή χωρίς να έχει προσδεθεί σε αυτούς κάποια ορμόνη, εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στο κυτταρόπλασμα και μετά τη δέσμευση της ορμόνης μπορούν είτε να μετατοπιστούν στον πυρήνα είτε να παραμείνουν στο κυτταρόπλασμα ανάλογα με την λειτουργία που πρόκειται να επιτελέσουν. Στην περίπτωση που μετά από την δέσμευση των ορμονικών προσδετών τους μετακινούνται στον πυρήνα, αναγνωρίζουν και συνδέονται σε αλληλουχίες του DNA που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoid response elements: GRE) (βλ. Εικόνα7) [57].

Άλλες χαρακτηριστικές ορμόνες στην μελέτη του κικκάδιου ρυθμού είναι η μελατονίνη και η λεπτίνη. Η μελατονίνη παρουσιάζει έντονη ρυθμικότητα, με τα επίπεδα της να είναι ιδιαίτερα υψηλά κατά τη διάρκεια την νύκτας σε σχέση με αυτά που παρατηρούνται την ημέρα. Η οδός έκκρισης της μελατονίνης εκτείνεται από τον SCN στον παρακοιλιακό πυρήνα (paraventricular nucleus, PVN), τον νωτιαίο μυελό και την επίφυση και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των κύκλων ύπνου-εγρήγορσης. Χορήγηση μελατονίνης οδηγεί σε μείωση της λανθάνουσας κατάστασης ύπνου [10]. Η λεπτίνη από την άλλη είναι μία ορμόνη που παράγεται στο λευκό λιπώδη ιστό και συμμετέχει στη ρύθμιση της ενεργειακής πρόσληψης επηρεάζοντας της όρεξη, την αίσθηση της πείνας και τον μεταβολισμό. Πρόκειται για μία ορμόνη που αποτελεί στόχο μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με το κικκάδιο ρολόι και χαρακτηρίζεται διακυμάνσεις στο ρυθμό έκκρισης της κατά τη διάρκεια της ημέρας. Η ρυθμική μεταγραφή της οδηγεί και σε ρυθμική παραγωγή της αντίστοιχης πρωτεΐνης, που με τη σειρά της αποτελεί στόχο miRNA μεταξύ των οποίων και το miR-122, για το οποίο είναι γνωστό ότι στην πρώιμη μορφή του παρουσιάζει ρυθμικότητα στο ήπαρ [58].



Εικόνα7: Η κυκλική πορεία του GR μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα [59]

Οι αλληλουχίες GRE εντοπίζονται και στις ρυθμιστικές περιοχές των κεντρικών γονιδίων του ρολογιού, και πιο συγκεκριμένα των *Bmal1*, *Cry1*, *Per1* [51, 60] και *Per2* (Εικόνα8) [61]. Με αυτό τον τρόπο, τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να επηρεάσουν την μεταγραφική ενεργοποίηση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων του ρολογιού και να οδηγήσουν στο συγχρονισμό των ταλαντώσεων μεγάλου εύρους των συστατικών του ρολογιού σε όργανα όπως το ήπαρ και οι νεφροί [51]. Εκτός από τα θετικά στοιχεία GRE που λειτουργούν ως επαγωγείς της μεταγραφής, έχει προταθεί ότι στον υποκινητή του γονιδίου *Rev-erba* περιέχεται ένα αρνητικό στοιχείο GRE (nGRE) που ευθύνεται κατασταλτική δράση [62].



Εικόνα8: Στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GRE) στους υποκινητές γονιδίων του ρολογιού. Το ερωτηματικό υποδηλώνει ότι ενώ είναι γνωστό πως τα γλυκοκορτικοειδή προσδένονται σε στοιχεία απόκρισης εντός των υποκινητών των κεντρικών γονιδίων του ρολογιού επάγοντας ή αναστέλλοντας την μεταγραφή τους δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός μέσω του οποίου επιτελούν τις δράσεις αυτές [47]

Η δεξαμεθαζόνη (DEX) είναι ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές που δρα ως αγωνιστής των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών. Έχει παρατηρηθεί ότι εξωγενής χορήγηση δεξαμεθαζόνης επηρεάζει τη μεταγραφική ταλάντωση γονιδίων, προκαλώντας αλλαγή της φάσης του ρολογιού στο ήπαρ, τους νεφρούς και την καρδιά, καθώς επίσης και σε καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών *in vitro*. Σε πειράματα μελέτης του μεταγραφώματος και του πρωτεώματος σε ασυγχρόνιστο ήπαρ παρατηρήθηκε ότι η επεξεργασία των κυττάρων με δεξαμεθαζόνη οδηγούσε στο συγχρονισμό περίπου του 60% της γονιδιακής έκφρασης [51]. Τα ρυθμιστικά πρότυπα που αποδίδονται στην δεξαμεθαζόνη είναι ειδικά ως προς τα διαφορετικά συστατικά του ρολογιού. Μερικά από τα γονίδια του ρολογιού, ανταποκρίνονται στην παρουσία της δεξαμεθαζόνης χωρίς όμως να παρουσιάζουν ταλάντωση, ενώ άλλα δεν ανταποκρίνονται καθόλου. Η δεξαμεθαζόνη, βρέθηκε ότι διεγείρει την ταλάντωση 10 εκ των κεντρικών συστατικών του ρολογιού. Στα συστατικά αυτά, συμπεριλαμβάνονται τα γονίδια *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-Erba*, *Rev-Erbβ*, *Dbp*, *Npas2* και *Bmal1*. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό κατά πόσο η δεξαμεθαζόνη δρα απευθείας, μέσω της δέσμευσης της στα στοιχεία GRE των υποκινητών των γονιδίων στόχων, ή έμμεσα μέσω επίδρασης άλλων γονιδίων που μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στο συγχρονισμό του ρολογιού [61].

## 1.2. Αποικοδόμηση του mRNA και κιρκάδιος ρυθμός

Ένα από τα βασικά στάδια ώστε τα mRNA να είναι έτοιμα για την έναρξη της μετάφρασης, είναι η πολυαδενυλίωση. Πρόκειται για μια συν-μεταγραφική διαδικασία που χαρακτηρίζεται από την προσθήκη ουράς πολύ(A) στο 3' άκρο των μεταγράφων. Η πολυαδενυλίωση επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη σταθερότητα του mRNA, την μετατόπιση του μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος και την μετάφραση. Η αντίστροφη αυτής της διαδικασίας, ονομάζεται απαδενυλίωση και περιλαμβάνει την αποικοδόμηση της ουράς πολύ(A) στο κυτταρόπλασμα. Το μήκος της ουράς πολύ(A) έχει συνδεθεί με την κιρκάδια ρύθμιση στα θηλαστικά μετά από παρατήρηση της ημερήσιας διακύμανσης του μήκους της ουράς πολύ(A) ενός μεγάλου αριθμού mRNA. Μετάγραφα με πιο μακριές ουρές πολύ(A) παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της ημέρας, ενώ mRNA με βραχύτερες ουρές φαίνεται να επικρατούν κατά τη διάρκεια της νύκτας [20, 63]. Επιπλέον, αναφέρονται mRNA των οποίων η μεταγραφή δεν είναι ρυθμική, είναι όμως ρυθμική η αποσταθεροποίηση και η αποικοδόμησή τους σε συγκεκριμένες περιόδους του 24ώρου. Επιπρόσθετα, οι παραπάνω μεταβολές στη σταθερότητα των mRNA αντικατοπτρίζονται στη ρυθμική βιοσύνθεση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν [64]. Καθώς το μήκος της ουράς πολύ(A) σχετίζεται και με τη σταθερότητα του mRNA, μπορεί να επηρεάσει και την αποτελεσματικότητα της έκφρασης σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Μετάγραφα που χαρακτηρίζονται από ύπαρξη μεγάλης ουράς πολύ(A) φαίνεται να έχουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης, ενώ η αποικοδόμηση της ουράς μέχρι ένα κρίσιμο σημείο συνεπάγεται αυξημένη αποτελεσματικότητα μετάφρασης, ανεξάρτητα με την σταθερότητα [20].

## 1.2.1. Απαδενλίωση

Ως απαδενυλάσες ορίζονται οι εξωριβονουκλεάσες που αποικοδομούν την ουρά πολυ(A) των mRNA με κατεύθυνση 3'→5' απελευθερώνοντας παράλληλα 5'-AMP, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις έχει δείχθει ότι μπορούν να αποικοδομούν και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή, με μικρότερη ωστόσο αποτελεσματικότητα [64]. Όλες οι γνωστές απαδενυλάσες είναι ένζυμα των οποίων η δραστηριότητα εξαρτάται από  $Mg^{2+}$  και μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες υπεροικογένειες με βάση την παρουσία συγκεκριμένων συντηρημένων καταλοίπων στο καταλυτικό τους κέντρο: (i) η DEDD υπεροικογένεια, έχει λάβει το όνομά της από τα καταλυτικά αμινοξέα ασπαρτικού (D) και γλουταμινικό (E), τα οποία συντονίζουν τα ιόντα  $Mg^{2+}$  και είναι απαραίτητα για την κατάλυση. Μέλη αυτής της ομάδας αποτελούν η απαδενυλάση POP2 (γνωστή και ως CAF1), η CAF1Z, η πολύ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), καθώς και η PAN2.

(ii) η EEP υπεροικογένεια των εξωνουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών (exonuclease-endonuclease-phosphatase), περιλαμβάνει απαδενυλάσες που φέρουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος (Asp) και ιστιδίνης (His) στο καταλυτικό/ενεργό κέντρο νουκλεάσης τους. Παραδείγματα EEP ενζύμων αποτελούν οι απαδενυλάσες Nocturnin, CCR4 και Angel.

Στον πίνακα παρουσιάζονται οι δύο υπεροικογένειες και παραδείγματα ενζύμων που εντοπίζονται σε αντιπροσωπευτικά είδη οργανισμών.

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

Πίνακας2: Οι απαδενυλάσες από κάθε είδος κατηγοριοποιήθηκαν είτε προς την οικογένεια DEDD (Asp-Glu-Asp-Asp) είτε προς την οικογένεια εξωνουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών βάσει των αμινοξικών αλληλουχιών των επικρατειών εξωνουκλεάσης τους. Τα είδη όπου έχει αποδειχθεί ενζυμική δραστηριότητα επισημαίνονται με +, με + επισημαίνονται τα είδη όπου προβλέπεται να υπάρχει ενζ. δραστηριότητα και με - επισημαίνονται τα είδη στα οποία δεν έχει καθοριστεί η ενζ. δραστηριότητα. Sc: S.cerevisiae, Ce: C. elegans, Dm: D.melanogaster, Xl: X.laevis, Mm: M. musculus, Hs: H.sapiens [64]

Οι απαδενυλάσες συνήθως αποτελούν τμήμα συμπλόκων με πολλές υπομονάδες. Οι άλλες πρωτεΐνες σε αυτά τα σύμπλοκα επηρεάζουν τη δραστηριότητα των απαδενυλασών. Άλλες απαδενυλάσες σχηματίζουν ομοδιμερή και άλλες ετεροδιμερή. Ο ετεροδιμερισμός αυξάνει σημαντικά το ρεπερτόριο των συμπλόκων των αποαδενυλασών, καθώς διαφορετικά ετεροδιμερή έχουν και διαφορετικές ενζυμικές και ρυθμιστικές ιδιότητες [65].

Κάθε είδος οργανισμού διαθέτει και διαφορετικό φάσμα και αριθμό απαδενυλασών. Η ευρεία ποικιλότητα των απαδενυλασών είναι πιθανόν ένδειξη ότι συγκεκριμένες αποαδενυλάσες στοχεύουν συγκεκριμένα mRNA. Από την άλλη, διαφορετικές απαδενυλάσες μπορούν να δράσουν στο ίδιο mRNA με διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες λειτουργίες[64].

Ο ρυθμός της απαδενυλίωσης ποικίλλει μεταξύ των διάφορων mRNA. Η διαδικασία ελέγχεται από ρυθμιστικούς παράγοντες που προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες των mRNA. Ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται συνήθως στις 3' αμετάφραστες περιοχές (3'-UTR) ενισχύουν την



απαδενυλίωση [64, 66]. Η απαδενυλίωση προωθείται και μέσω αλληλεπίδρασης της PABP<sup>4</sup> και συγκεκριμένων αποαδενυλασών. Επιπλέον, η 5' καλύπτρα μπορεί να επηρεάσει θετικά την απαδενυλίωση διεγείροντας τη δραστικότητα και την επεξεργαστικότητα κάποιων αποαδενυλασών (χαρακτηριστικότερο και μοναδικό γνωστό έως σήμερα παράδειγμα αποτελεί η PARN)[64].

Οι αποαδενυλάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανακύκλιση του mRNA. Μπορούν να διαθέτουν και εξειδικευμένους, ρυθμιστικούς ρόλους, ενώ είναι απαραίτητες και για ορισμένες βιολογικές διεργασίες γεγονός που υποδεικνύει την σημασία του ελέγχου της έκφρασης, παραγωγής και δράσης τους, αλλά και της διατήρησης της λειτουργίας τους [64, 67].

### *Αποαδενυλάσες και microRNA*

Οι αποαδενυλάσες έχουν εξειδικευμένη δράση ως προς επιλεγμένα mRNA-στόχους. Κεντρικό ρόλο στο μηχανισμό που είναι υπεύθυνος γι' αυτήν την εξειδίκευση, φαίνεται πως έχουν τα microRNA (miRNA). Τα miRNA είναι μη κωδικά RNA που έχουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (βλ. παρακάτω). Αυτά, έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με αλληλουχίες στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (UTR) του mRNA-στόχου, οδηγώντας στην αναστολή της μετάφρασής του και την προσέλκυση αποαδενυλασών σε αυτό, προκαλώντας την αποσταθεροποίηση και την αποικοδόμησή του [68]. Επιπλέον ένα miRNA μπορεί να προσδένεται σε πολλά διαφορετικά mRNA. Η συνεργατική λοιπόν δράση των miRNA και των αποαδενυλασών λειτουργεί ως μηχανισμός ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης.

Η μελέτη των miRNA εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, ενώ πρόσφατα βρέθηκε ότι υπάρχουν κάποια ακολουθούν κirkάδια έκφραση στα θηλαστικά και τα έντομα, ενώ έχει περιγραφεί πως μπορούν ρυθμίζουν και παράγοντες του κεντρικού ταλαντωτή [69]. Μεταξύ των miRNA με κirkάδια έκφραση, το miR-122 έχει κεντρικό ρόλο. Το miR-122 είναι από τα πιο υψηλά παραγόμενα miRNA στο ήπαρ (περίπου 70% των miRNA). Οι πρόδρομες μορφές του (pri-miR-122 και pre-miR-122) έχουν έντονη ταλάντωση κατά τη διάρκεια του 24ώρου, ενώ η ώριμη μορφή του φαίνεται να διατηρεί σταθερά επίπεδα. Η μεταγραφή του miR-122 είναι ρυθμική και ελέγχεται από τον REV-ERB $\alpha$ , που είναι ένα από τα κεντρικά γονίδια [70]. Το παράδειγμα του miR-122 επίσης τη στενή σχέση μεταξύ miRNA και αποαδενυλασών. Το miR-122 στοχεύει το mRNA της αποαδενυλάσης Nocturnin συμβάλλοντας στο κirkάδιο προφίλ έκφρασής της [71], αλλά και αντίστροφα η σταθερότητα του miR-122 ρυθμίζεται από την επαναπολυαδενυλίωση. Πιο συγκεκριμένα, η GLD-2, μια κυτταροπλασματική πολυ(A) πολυμεράση σταθεροποιεί ειδικά το miR-122 προσθέτοντας μια ουρά 30 αδενοσινών, ενώ η PARN προσελκύεται σε αυτή την ολιγοαδενυλιωμένη ουρά από την CUGBP1 (μια πρωτεΐνη που προσδένεται σε επαναλήψεις CUG του RNA) οδηγώντας στην αποικοδόμησή του [72, 73].

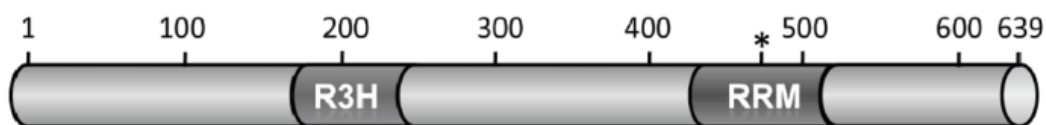
### **1.2.2. Η αποαδενυλάση PARN**

Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση PARN αποτελεί μία εξωριβονουκλεάση των ευκαρυωτών, η οποία καταλύει την αντίδραση υδρόλυσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των καταλοίπων αδενοσίνης της ουράς πολυ(A) με κατεύθυνση 3'→5' και έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά άμεσα με τη δομή της 5'-καλύπτρας ταυτόχρονα με την ουρά πολυ(A) των mRNA [74-76]. Πρόκειται για ένα ομοδιμερές ένζυμο, του οποίου η δραστικότητα εξαρτάται από δισθενή ιόντα Mg<sup>2+</sup> και απαιτεί την ύπαρξη μιας ελεύθερης 3' υδροξυλομάδας στο RNA-στόχο. Συνίσταται από 639 αμινοξέα, με μοριακή μάζα 74 kDa. Ανήκει στην υπερικογενεία των DEDD 3'-5' εξωριβονουκλεασών [77], οι οποίες μοιράζονται έναν συντηρημένο καταλυτικό πυρήνα, που περιέχει το DEDD μοτίβο, αποτελούμενο από τα τέσσερα καταλυτικά αμινοξέα: Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382 [78, 79]. Τυχόν μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από τα τέσσερα αυτά αμινοξέα, έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση της συνολικής δραστικότητας του ενζύμου [80]. Επιπλέον, η His377 αποτελεί μέρος του καταλυτικού κέντρου και έτσι

<sup>4</sup> Πολυ(A) συνδεόμενη πρωτεΐνη

κατατάσσεται στις εξωνουκλεάσες DEDDh [81]. Η PARN σχηματίζει ένα ομοδιμερές, οι υπομονάδες του οποίου συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω μιας πλούσιας σε αρωματικά αμινοξέα διεπιφάνειας και από έναν δισουλφιδικό δεσμό που ενώνει τις δύο επικράτειες νουκλεάσης της PARN [76, 82]. Ο διμερισμός αυτός είναι ζωτικής σημασίας για την ικανότητα κατάλυσης της PARN. Εντοπίζεται σε μεγάλες ποσότητες στον πυρήνα (κυρίως στον πυρηνίσκο και στα σωμάτια Cajal), ενώ μπορεί να μετακινείται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος [81].

Μελέτες έχουν δείξει δύο επιπλέον βιοχημικά χαρακτηριστικά της PARN: τον επεξεργαστικό τρόπο δράσης της και την επίδραση της 5'-m7G-καλύπτρα στην ενεργότητα απαδενυλάσης [74-76]. Η επεξεργαστικότητα αναφέρεται στο ότι μπορεί να επιτελεί επανειλημμένως την ίδια αντίδραση χωρίς να αποσπάται από το σύμπλοκο με το υπόστρωμά του, σε κάθε κύκλο κατάλυσης. Όσον αφορά τη δομή της PARN, ο καταλυτικός πυρήνας της (1-177αα και 246-391αα) σχηματίζει μία αρνητικά φορτισμένη κοιλότητα, η οποία εντοπίζεται σε μία επικράτεια, που ονομάζεται επικράτεια νουκλεάσης [78, 81]. Παράλληλα, έχουν προσδιοριστεί και δύο μοτίβα στην PARN, το μοτίβο αναγνώρισης RNA (RNA recognition motif, RRM) (437αα-510αα) [83] και το μοτίβο αναγνώρισης RNA (178αα-245αα), το οποίο αναφέρεται και ως επικράτεια R3H. Το RRM απαιτείται για την πρόσδεση της 5'-m7G-καλύπτρας, ενώ η R3H για την σύνδεση της στην πολυ(A) ουρά. Επίσης, έχει προταθεί, ότι η RRM σταθεροποιεί τη συνολική τρισδιάστατη δομή της PARN (Εικόνα 9) [81].



Εικόνα9: Σχηματική απεικόνιση της ανθρώπινης PARN και των ρυθμιστικών της περιοχών. Η επικράτεια νουκλεάσης (κατάλοιπα 1-177 και 246-391) περιβάλλουν την περιοχή R3H (κατάλοιπα 175-245). Ο αστερίσκος υποδηλώνει την Trp475 εντός της RRM επικράτειας, που είναι κρίσιμη για την δέσμευση με την 5'-m7G-καλύπτρας [77]

Η ρύθμιση της δραστηριότητας της PARN επιτελείται από διάφορους trans RNA-συνδεόμενους παράγοντες, οι οποίοι δεσμεύονται σε cis-δραστικά στοιχεία και μπορούν να προσελκύουν, να διεγείρουν ή να αναστέλλουν την PARN [77]. Ορισμένοι μηχανισμοί ρύθμισης της δραστηριότητας του ενζύμου αποτελούν οι εξής: α) αναστολή της PARN λόγω της πρόσδεσης και αλληλεπίδρασης της κυτταροπλασματικής πολυ(A)-δεσμευτικής πρωτεΐνης C (PABPC) με την ουρά πολυ(A), β) συναγωνισμός μεταξύ της PARN και του eIF4E για την πρόσδεση στο 5' κάλυμμα [75], γ) αναστολή της PARN από πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο 5' κάλυμμα (cap-binding proteins, CPBs) των mRNA-στόχων [84], δ) διέγερση της PARN μέσω της απευθείας αλληλεπίδρασής της με το 5' κάλυμμα [75, 76], και ε) διέγερση της αποικοδόμησης των ουρών πολυ(A) από πρωτεΐνες που συνδέονται σε περιοχές πλούσιες σε AU κατάλοιπα, γνωστές ως ARE [85].

Η PARN συμμετέχει σε μια σειρά κυτταρικών μηχανισμών και αποκρίσεων. Έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται στην κυτταρική απόκριση στο στρες και στην ταχεία απαδενυλίωση mRNA που περιέχουν στοιχεία πλούσια σε AU (AU-rich elements, ARE) [86]. Επίσης, έχει προταθεί ως ένας πιθανός δείκτης της καρκινικής ανάπτυξης [77]. Η παρατήρηση ότι η PARN εμπλέκεται και στην βιογένεση μη-κωδικών μορίων, οδήγησε στην κατάδειξη της ως ένα μόριο που μπορεί να εμπλέκεται και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες εκτός από τον έλεγχο των ευκαρυωτικών mRNA μέσω της απαδενυλίωσης μεταξύ των οποίων και η εμπλοκή της στον ημερονύκτιο ρυθμό.

### 1.2.3. Η απαδενυλάση *Nocturnin*

Η *Nocturnin* (NOC) προέρχεται από ένα έντονα ρυθμικό γονίδιο και έχει ενεργότητα απαδενυλάσης, αφού εμπλέκεται στην διαδικασία της απαδενυλίωσης. Η μοριακή της μάζα είναι ~40kDa. Έχει πάρει το όνομά της λόγω της έκφρασής της τη νύχτα (nocturnal), με τη μέγιστη έκφρασή της να εκδηλώνεται 2-4 ώρες μετά την έναρξη του σκότους [87]. Η έκφραση του γονιδίου της NOC παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στα ραβδοειδή κύτταρα και στους κωνοειδείς φωτουποδοχείς του αμφιβληστροειδή χιτώνα στον *Xenopus laevis*. Πιο συγκεκριμένα, είναι μια 3'-εξωνουκλεάση που αποικοδομεί την ουρά πολυ(A) κάποιων mRNA, ενώ η δραστηριότητά της είναι εξαρτώμενη από ιόντα  $Mg^{2+}$  [88]. Έχει δειχθεί ότι εμφανίζει γενετική και αμινοξική ομοιότητα στο N-τελικό (επικράτεια φερμουάρ λευκίνης) και στο C-τελικό άκρο με την απαδενυλάση CCR4 της ζύμης, και γι' αυτό αποτελεί μία CCR4-like protein και ονομάζεται *Ccrn4l* (carbon catabolite repression 4 like) [89]. Οι NOC και CCR4 μοιράζονται όμοιο μηχανισμό κατάλυσης, όμως η ενεργότητα απαδενυλάσης που έχουν διαφέρει. Στον άνθρωπο, το σύμπλοκο CCR4-NOT είναι ένα ετερογενές και πολυλειτουργικό σύμπλοκο απαδενυλίωσης που περιλαμβάνει πρωτεϊνικές υπομονάδες (μεταξύ των οποίων είναι και η CCR4) που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην μεταγραφή και αποικοδόμηση του mRNA, στην επιτήρηση για ανωμαλίες στα μετάγραφα και στην μεταγωγή σήματος [64]. Η υπομονάδα CCR4 στη ζύμη όπως και στα θηλαστικά λειτουργεί ως πολυ(A)-εξειδικευμένη εξωριβονουκλεάση *in vitro* απουσία των άλλων υπομονάδων του συμπλόκου, πράγμα που προτείνει την ύπαρξη διαφορετικών τύπων CCR4-NOT συμπλόκων που καταλύουν την απαδενυλίωση [90]. Η υπομονάδα CCR4 είναι η κύρια απαδενυλάση στις ζύμες αλλά τα κύτταρα των θηλαστικών απαιτούν, ακόμη και τη δραστηριότητα τόσο του συμπλόκου CNOT6/hCCR4 όσο και του CNOT7/hCaf1. Ο πυρήνας του ανθρώπινου συμπλόκου αποτελείται από επτά υπομονάδες, τις πρωτεΐνες CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT9, CNOT10, TAB182, ενώ οι πρωτεΐνες CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 είναι μεταβλητές υπομονάδες εντός του συμπλόκου [91]. Η CCR4 ως υπομονάδα του συμπλόκου CCR4-NOT, αποτελεί και μεταγραφικό συν-ενεργοποιητή ο οποίος προσδένεται όχι απευθείας πάνω στο DNA αλλά πάνω σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες μέσω της περιοχής πλούσια σε λευκίνη και έτσι προκαλεί τη μεταγραφή γονιδίων. Το γεγονός αυτό γεννά το ερώτημα για το αν η NOC εκτός από την ενεργότητα απαδενυλάσης που έχει, μπορεί να κατευθύνει και τη μεταγραφή γονιδίων μέσω της επικράτειας πλούσια σε λευκίνη [89].

Πειράματα ανίχνευσης του mRNA της NOC σε ποντίκια, έδειξαν ότι αυτό εκφράζεται σε πολλούς ιστούς, με τη μεγαλύτερη αφθονία και έκφραση στο ήπαρ, στους νεφρούς και στους όρχεις. Το mRNA εκφράζεται και σε περιοχές του εγκεφάλου όπως ο υπερχιασματικός πυρήνας και ο επιφυσιακός αδένας. Η NOC εμφανίζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της χαρακτηριστικής κερκάδιας έκφρασης που επιδεικνύει στον αμφιβληστροειδή, στο σπλήνα, στην καρδιά, στους νεφρούς και στο ήπαρ [92]. Ωστόσο δεν έχει προσδιοριστεί το αν η NOC λειτουργεί ως συστατικό του κερκάδιου ρολογιού, ή ως τελεστής σε παρακάτω μονοπάτι της λειτουργίας του ρολογιού, ή ως μεταγραφικός παράγοντας. Μια υπόθεση προτείνει πως η NOC ως απαδενυλάση μπορεί να ρυθμίζει τη διάρκεια ζωής των mRNA και κατ' επέκταση και την ρυθμική έκφρασή τους, δρώντας έτσι ως κερκάδιος ρυθμιστής [93]. Ένα στοιχείο που ενισχύει τη μεταγραφή της NOC είναι το E-box στο οποίο προσδένονται διάφοροι bHLH μεταγραφικοί παράγοντες, όπως το ετεροδιμερές που αποτελείται από το CLOCK και τον παράγοντα BMAL1 [87]. Προς το παρόν δεν έχει αναφερθεί εάν οι παράγοντες αυτοί μπορούν να κατευθύνουν και την έκφραση της NOC αν και η ενεργότητα του συμπλόκου CLOCK/BMAL1 έχει μέγιστη έκφραση περι τα μεσάνυχτα, όπου και επάγεται η μεταγραφή της NOC [94]. Η έκφραση της NOC μπορεί να ρυθμιστεί ισχυρά και από εξωκυτταρικά σήματα και να αποκριθεί άμεσα. Με βάση αυτό, κατατάσσεται στα γονίδια άμεσης απόκρισης, καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων που απαιτείται να αποσιωπηθούν (μέσω αποσταθεροποίησης του mRNA) ως απόκριση στα εξωκυτταρικά σήματα [89].

Η NOC έχει επίσης δειχθεί ότι εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο, στον μεταβολισμό των λιπιδίων και των υδατανθράκων, στη λιπογένεση, στη λειτουργία του ανοσοποιητικού (φλεγμονή), στην

ομοίωσταση της γλυκόζης, στην οστεογένεση και στην διαδικασία της πρωτεόλυσης στους περιφερικούς ιστούς [68].

Τα φυτά όπως και οι ζωικοί οργανισμοί, έχουν την ικανότητα να αντιδρούν και να προσαρμόζονται στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Η AtHESP, είναι ένα ομόλογο της Nocturnin στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, η οποία εμφανίζει μέγιστα επίπεδα έκφρασης το απόγευμα, και πήρε το όνομά της από τον Έσπερο, το πρώτο άστρο του ουρανού πριν τη νύχτα. Πρόκειται για μια 3'-εξωριβονουκλεάση με δράση απαδενυλάσης, δηλαδή έχει την ικανότητα να αφαιρεί την πολυ(A) ουρά από τα mRNA και είναι η πρώτη απαδενυλάση που σχετίστηκε με τον κirkάδιο ρυθμό. Τα γονίδια της AtHesp λοιπόν, εμφανίζουν ρυθμικότητα, με τα μέγιστα επίπεδα της να καταγράφονται κατά τη διάρκεια της νύκτας, με αποτέλεσμα να επηρεάζει τη σταθερότητα και την έκφραση επιλεγμένων μεταγράφων. Η μέγιστη έκφραση του γονιδίου λίγο πριν την νυχτερινή περίοδο, αντικατοπτρίζει την προετοιμασία του φυτού για τις επερχόμενες διεργασίες της νύκτας [3].

### 1.3. microRNA

Τα microRNA, ή miRNA, αποτελούν μία ομάδα μικρών, ενδογενών, μη κωδικών μορίων RNA μεγέθους περίπου 20-25 ζεύγη βάσεων. Μέχρι σήμερα, η βάση δεδομένων miRBase<sup>5</sup> απαριθμεί περισσότερα από 2000 αναγνωρισμένα miRNA. Έχει βρεθεί ότι τα miRNA συμμετέχουν σε πολλές πτυχές της κυτταρικής βιολογίας όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, ο μεταβολισμός, η ανάπτυξη, η απόπτωση και η φλεγμονή, ενώ έχουν αναφερθεί και σε ασθένειες. Μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει η ικανότητα των miRNA να ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο μέσω δέσμευσης σε μετάγραφα στο κυτταρόπλασμα, η οποία μπορεί να οδηγεί σε αποικοδόμηση του μεταγράφου στόχου ή σε αναστολή της διαδικασίας της μετάφρασης. Συναντώνται σχεδόν σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς, όπως τα φυτά, τα αρθρόποδα και τα σπονδυλωτά, υποδεικνύοντας ότι αντιπροσωπεύουν ένα εξελικτικά πολύ παλιό μηχανισμό επιγενετικής γονιδιακής ρύθμισης [95].

#### 1.3.1. Βιοσυνθετικά μονοπάτια των miRNA

Ο όρος βιογένεση των microRNA αναφέρεται στη διαδικασία που ακολουθείται έτσι ώστε από το αρχικό γονίδιο να προκύψει ένα ώριμο μόριο microRNA με βιολογική δραστηριότητα, μέσω διαδοχικών σταδίων ωρίμανσης. Η πλειοψηφία των πρώιμων microRNA των θηλαστικών βρίσκονται σε εσόνια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή σε μεταγραφικές μονάδες που εντοπίζονται μεταξύ γονιδίων και δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, ενώ πιο σπάνια βρίσκονται σε εξόνια [96].

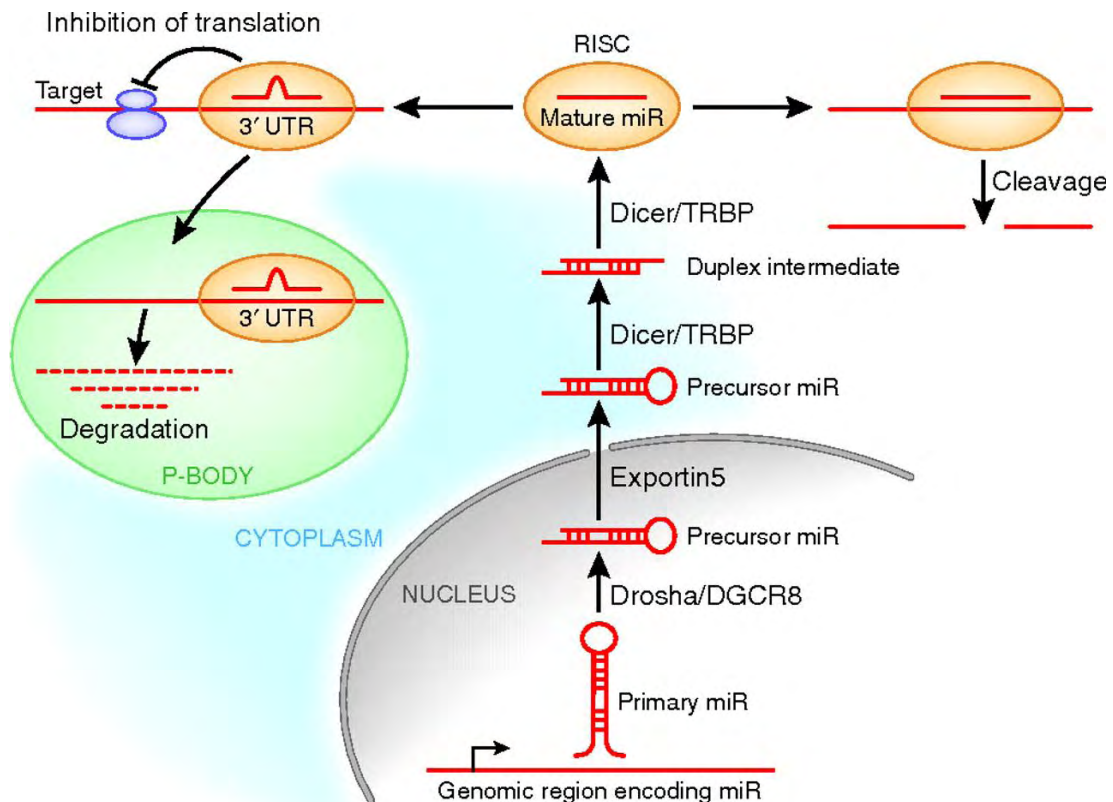
Τα μονοπάτια βιογένεσης των microRNAs χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: (I) το κανονικό (canonical) και (II) τα εναλλακτικά (non-canonical)

Το κανονικό μονοπάτι αναφέρεται στα μετάγραφα που προκύπτουν με δράση της πολυμεράσης II του RNA (RNAP II), τα οποία επεξεργάζονται από δύο ριβονουκλεάσες, τη Drosha και τη Dicer (αποτελούν RNase III) παράγοντας την πλειονότητα των miRNA [97].

Το κανονικό μονοπάτι βιοσύνθεσης (Εικόνα9), ξεκινάει με τη σύνθεση ενός πρώιμου μορίου RNA από την πολυμεράση II του RNA το οποίο ονομάζεται pri-miRNA [98]. Η δομή φουρκέτας που παρατηρείται στο pri-miRNA αποκόπτεται από ένα σύμπλοκο που ονομάζεται μικρο-επεξεργαστής (*Microprocessor*) και αποτελείται από τις πρωτεΐνες DROSHA και DGCR8 (RNA binding protein) [99-102]. Η φουρκέτα απελευθερώνεται μέσω της δράσης του του μικρο-επεξεργαστή και πλέον χαρακτηρίζεται ως πρόδρομο miRNA (pre-miRNA). Εφόσον ένα pre-miRNA έχει επεργαστεί

<sup>5</sup> miRBase: πρόκειται για μία βάση δεδομένων στην οποία περιέχονται δημοσιευμένες αλληλουχίες miRNA καθώς επίσης και αναφορά γνωστών χαρακτηριστικών τους συμπεριλαμβανομένου του χρωμοσώματος στο οποίο βρίσκεται, υποκυττάριο εντοπισμό, λειτουργίες κ.α.

(φέροντας μία μικρή δομή στελέχους-βρόχου και μια 3' προεξοχή), μπορεί να απελευθερωθεί από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα μέσω της *Exportin5* (XPO5) με ένα *Ran-GTP* εξαρτώμενο μηχανισμό [103-105]. Στο κυτταρόπλασμα, το pre-miRNA, υφίσταται επιπλέον επεξεργασία από την DICER, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός δίκλωνου RNA, απουσία βρόχου, περίπου 22 νουκλεοτιδίων που φέρει δύο προεξέχοντα νουκλεοτίδια στα 3' άκρα του [97]. Παράλληλα με την επεξεργασία από τα ένζυμα *Drosha/Dicer*, τα pre-miRNA υπόκεινται σε τροποποιήσεις που ρυθμίζουν τη βιογένεση των miRNA [106].

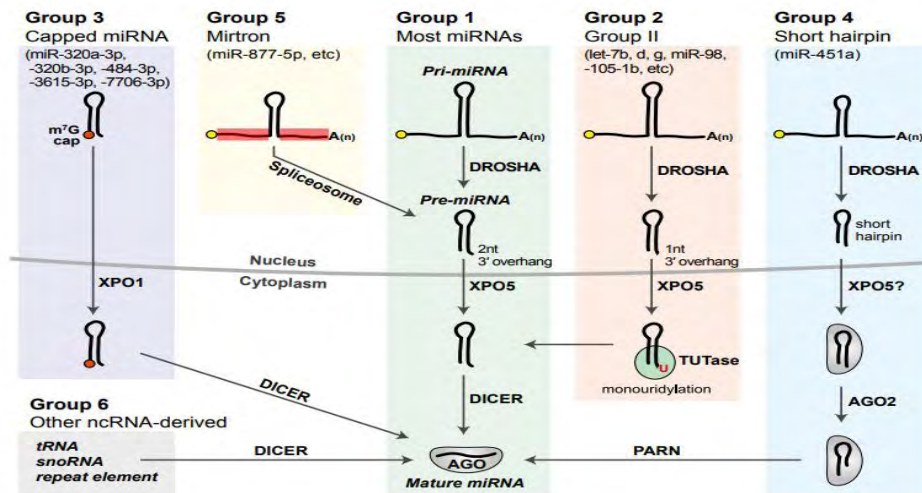


Εικόνα9: canonical μονοπάτι βιογένεσης και μηχανισμοί δράσης των microRNA [107]

Από την άλλη, κύριο χαρακτηριστικό των εναλλακτικών μονοπατιών είναι ότι παραλείπεται κάποιο από τα βασικά στάδια του κανονικού μονοπατιού. Χαρακτηριστικά παραδείγματα miRNA που ακολουθούν κάποιο non-canonical μονοπάτι βιοσύνθεσης είναι:

- (i) τα mirtrons, τα οποία δεν απαιτούν την DROSHA για την παραγωγή τους (εικόνα 9, group 5) [108],
- (ii) miRNA που μπορούν να προκύψουν από μικρά πυρηνικά RNA με έναν μηχανισμό εξαρτώμενο από την DICER αλλά ανεξάρτητο από την DROSHA [109] και
- (iii) ενδογενή siRNA των οποίων η βιοσύνθεση εξαρτάται από την DICER αλλά δεν απαιτείται η εμπλοκή της DROSHA [110].

Με βάση το βιοσυνθετικό μονοπάτι από το οποίο προκύπτουν, τα microRNA μπορούν να διακριθούν σε κατηγορίες οι οποίες και φαίνονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα10). Ωστόσο τα περισσότερα ανήκουν στην κατηγορία 1 [97].



Εικόνα10: κατηγοριοποίηση των miRNA με βάση το μονοπάτι βιοσύνθεσης τους [97]

Το ώριμο μόριο microRNA που έχει δημιουργηθεί, αναγνωρίζεται από τις πρωτεΐνες Αργοναύτες (AGO), όπου ο ένας κλώνος παραμένει συνδεδεμένος στην πρωτεΐνη AGO ενώ ο άλλος απομακρύνεται. Τα miRNA που προέρχονται από τα 5' και 3' άκρα του pre-miRNA ονομάζονται 5p και 3p miRNA αντίστοιχα. Τα θηλαστικά διαθέτουν 4 στενά συγγενικές πρωτεΐνες Αργοναύτες (Ago1-4) οι οποίες αλληλεπιδρούν επίσης με παράγοντες απαδενυλίωσης ενώ εμπλέκονται και στο μηχανισμό της μετάφρασης με σκοπό να επάγουν την αποικοδόμηση των mRNA και την καταστολή της μετάφρασης [97]. Το microRNA σε συνδυασμό με τις πρωτεΐνες DICER, Ago και τις TRBP, PACT συμβάλλουν στη δημιουργία του συμπλόκου miRISC (RNA induced silencing complex), το οποίο κατευθύνεται τελικά προς το mRNA στόχο προκειμένου να πραγματοποιηθεί επαγόμενη από miRNA σίγηση [111].

Παρόλο που οι πρωτεΐνες DROSHA, XPO5, και DICER παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση των miRNA, καθένας από αυτούς τους παράγοντες συμβάλλει με διαφορετικό τρόπο στη διαδικασία. Η κανονική πορεία βιογένεσης, αναστέλλεται στις περιπτώσεις που γίνεται σίγηση της DROSHA, ενώ αντιθέτως, πολλά είναι τα miRNA που παράγονται απουσία της XPO5, μέσω εναλλακτικών μονοπατιών εξόδου από τον πυρήνα. Τέλος, όσον αφορά την DICER, από μεταλλάγματα φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική για της σύνθεσης των περισσότερων miRNA με εξαίρεση τα 5p miRNA που φαίνεται να παράγονται ακόμα και απουσία της [97].

### 1.3.2. Συσχέτιση των miRNA με το κικαδίο ρολόι

Οι πρωτεΐνες των γονιδίων του ρολογιού μπορεί να εμφανίζονται αρκετές ώρες μετά από τα συγγενή τους μετάγραφα [45]. Αυτό συμβαίνει καθώς η μετάφραση ρυθμίζεται αυστηρά μέσω πολλαπλών μηχανισμών μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται και κάποιοι που μεσολαβούνται από τα microRNA. Υπολογίζεται ότι η έκφραση περίπου του 30% των γονιδίων των θηλαστικών ρυθμίζεται από miRNA[112]. Διαφορετικά miRNA θεωρείται ότι κατέχουν διαφορετική θέση στο μηχανισμό ρύθμισης του ρολογιού. Ορισμένα, εμπλέκονται στον έλεγχο των σημάτων εισόδου ή εξόδου του ρολογιού ενώ άλλα μπορεί να επηρεάζουν τον κεντρικό ταλαντωτή. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι τα miRNA μπορεί να εμφανίζουν ημερήσιες διακυμάνσεις, ωστόσο δεν χρειάζεται να χαρακτηρίζονται τα ίδια από περιοδικότητα προκειμένου να μπορούν να επηρεάσουν το κικαδίο ρολόι και την ταλάντωση άλλων μορίων [113].

Μελέτες στον ημερονύκτιο ρυθμό όπου πραγματοποιήθηκε ανάλυση του προφίλ των miRNA οδήγησαν στην ταυτοποίηση διαφόρων miRNA που παρουσιάζουν ημερήσιες ταλαντώσεις σε ένα μεγάλο αριθμό ιστών [114]. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν ορισμένα miRNA που εκφράζονται

εξειδικευμένα στον αμφιβληστροειδή και επηρεάζουν τη σύνθεση της μελατονίνης από την επίφυση, υποδεικνύοντας ότι μπορεί να είναι σημαντικοί παράγοντες για τη ρύθμιση διαφόρων πτυχών της λειτουργίας του κικκάδιου ρολογιού [115]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα miRNA που εμπλέκεται στον κικκάδιο ρυθμό μέσω επίδρασης του κεντρικού ταλαντωτή του ρολογιού είναι το miR-219. Έχει δειχθεί ότι η σίγηση του miR-219 στον SCN έχει ως αποτέλεσμα την επιμήκυνση της περιόδου των κικκαδικών ρυθμών κάτω από σταθερά σκοτεινές συνθήκες, προσδίδοντας στο miR-219 ρόλο ρυθμιστή της ταχύτητας του ρολογιού [116]. Αρκετά είναι επίσης τα miRNA των οποίων άμεσοι στόχοι είναι τα κεντρικά γονίδια του ρολογιού *Bmal1* και *Clock*. Ορισμένα από αυτά, μεταξύ των οποίων τα miR-494, miR-152 και miR-142-3p εκφράζονται στον ορό του αίματος οδηγώντας στην υπόθεση ότι κυκλοφορούντα miRNA θα μπορούσαν να λειτουργούν ως παράγοντες για το συντονισμό των περιφερικών ρολογιών [114]. Τα miR-24 και miR-29a στοχεύουν τα μετάγραφα των *Per1* και *Per3* με συνδυαστικό τρόπο, και μαζί με το miR-30 φαίνεται ότι προκαλούν μια καθυστέρηση της φάσης του κικκάδιου ταλαντωτή σε ινοβλάστες ποντικού [117]. Επίσης, το miR-24 καθώς και το miR-30, αν και σε μικρότερο βαθμό, αποσταθεροποιούν το mRNA του γονιδίου *Per2* [118]. Αρχικά θεωρήθηκε ότι τα ίδια τα miR-24, miR-29a και miR-30 δεν εμφανίζουν κικκάδιο ρυθμό έκφρασης, ωστόσο μετά από πειράματα ChiP-seq φάνηκε ότι τα πρώιμα μετάγραφα αυτών των miRNA βρίσκονται υπό τον έλεγχο βασικών ρυθμιστικών στοιχείων του κεντρικού κικκάδιου συστήματος. Συγκρίνοντας τα δεδομένα αυτά με τους ρυθμούς έκφρασης των ώριμων miRNA, βρέθηκε ότι ελάχιστα είναι αυτά που εμφανίζουν σταθερές κικκάδιες φάσεις και περιόδους τόσο στην πρώιμη όσο και στην ώριμη μορφή τους. Επιπλέον, το πλάτος της ταλάντωσης των ώριμων miRNAs είναι πολύ χαμηλότερο σε σχέση με των πρώιμων, πιθανόν λόγω της διαφοράς τους ως προς τη διάρκεια ζωής [119].

Σε αντίθεση με τις πολυάριθμες μελέτες που εξετάζουν την επίδραση των miRNA στον κεντρικό ταλαντωτή, λίγες είναι αυτές που επικεντρώνονται στο ρόλο των miRNA στη ρύθμιση των οδών εισόδου του ρολογιού. Το miR-132 είναι συστατικό ενός μονοπατιού εισόδου, ενώ παράλληλα θεωρείται ότι αποτελεί δυνητικό στόχο της πρωτεΐνης CREB (cAMP response element-binding), η οποία είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την επαγόμενη από το φως επαναφορά του ρολογιού του SCN. Σίγηση του miR-132 στον SCN, ενισχύει την φωτοεπαγόμενη επαναφορά του ρολογιού, καθιστώντας το ως έναν αρνητικό ρυθμιστή της συλλογής του φωτός. Αν και ο μηχανισμός με τον οποίο δρα δεν είναι πλήρως κατανοητός, πιστεύεται ότι μπορεί να επηρεάζει με έμμεσο τρόπο την μεταγραφή των γονιδίων *Per* [116]. Σχετικά περισσότερες είναι οι μελέτες που έχουν επικεντρωθεί σε μηχανισμούς της εξαρτώμενης από miRNA ρύθμισης των μονοπατιών εξόδου του ρολογιού. Τα μετάγραφα του πρόδρομου miR-122 βρέθηκε ότι ταλαντώνονται στο ήπαρ, με μέγιστο νωρίς το πρωί, ωστόσο το ώριμο miR-122 παραμένει σταθερό καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας. Αξίζει να σημειωθεί πως το miR-122 απαντάται σε ~65000 αντίγραφα ανά κύτταρο που αντιπροσωπεύει περίπου το 70% του συνόλου των ηπατικών miRNA, όντας ένα από τα υψηλότερα εκφραζόμενα miRNA σε όλους τους ιστούς [70]. Ένας από τους στόχους του miR-122 είναι και η *Nocturnin*, η οποία είναι ένα έντονα ρυθμικό ένζυμο όπως αναφέρθηκε παραπάνω [71]. Η σταθερότητα του ίδιου του miR-122 ρυθμίζεται από την δυναμική ισορροπία πολυαδενυλίωσης/απαδενυλίωσης (από την PARN) [20]. Προκαταρκτικά αποτελέσματα του εργαστηρίου μας δείχνουν πως τα επίπεδα της PARN ελέγχονται από τα miR-29a και miR-1207, τα οποία και περιγράφονται στις ακόλουθες ενότητες [124,125].

### 1.3.3. Το miR-29a

Η οικογένεια των miR-29 microRNA είναι καλά μελετημένη ως προς τη βιολογία της σε σχέση με άλλες οικογένειες για τις οποίες είναι γνωστές ελάχιστες πληροφορίες. Πολλά γονιδιώματα θηλαστικών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου, κωδικοποιούν την οικογένεια των miR-29 microRNA η οποία φέρει τρία ώριμα μέλη, τα miR-29a, miR-29b, και miR-29c. Τα miR-29 κωδικοποιούνται από δύο μεταγραφικές μονάδες (clusters) γονιδίων. Το miR-29a και το miR-29b-1 προκύπτουν από ένα ιντρόνιο ενός long non-coding γονιδίου που χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 7q32.3 ενώ τα miR-29b-2 και miR-29c εντοπίζονται στο 1q32.2 και μεταγράφονται μαζί. Τα miR-29b-1 και miR-29b-2 έχουν πανομοιότυπη αλληλουχία. Στις περιοχές των υποκινητών τους έχουν βρεθεί θέσεις δέσμευσης πολλών μεταγραφικών παραγόντων. Η αλληλουχίες από τις οποίες κωδικοποιούνται τα δύο miRNA εντός των

cluster απέχουν <1kb. Ωστόσο, παρουσιάζουν διαφορετική ρύθμιση και σε αρκετές περιπτώσεις και διαφορετική υποκυτταρική κατανομή, γεγονός που υποδηλώνει ότι η λειτουργική τους σημασία μπορεί να μην είναι ίδια. Τα διαφορετικά miR29 εντοπίζονται σε διαφορετικά επίπεδα μεταξύ των διαφορετικών υποκυτταρικών διαμερισμάτων. Το miR29a πιο συγκεκριμένα, εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα ενώ μπορεί να βρεθεί και σε αρκετά μικρότερες ποσότητες στον πυρήνα (miRBase).

Τα miR29 παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις δράσεις οι οποίες έχουν επιβεβαιωθεί στην καρδιά και τους νεφρούς. Επιπλέον, θεωρείται ότι εμπλέκονται στην επιβίωση των κυττάρων διαδραματίζοντας ρόλο προαποπτωτικών παραγόντων, ενώ εμπλέκονται και στη ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης. Η σημασία των miR29 στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης φαίνεται καλύτερα από το ρόλο τους σε διάφορους καρκίνους. Αρνητική ρύθμιση των μελών της οικογένειας αυτής έχει συσχετιστεί με τύπους καρκίνου όπως η λευχαιμία, το μελάνωμα, ο καρκίνος του ήπατος, του παχέος εντέρου και του τραχήλου της μήτρας. Επομένως, κατά κύριο λόγο λειτουργούν ογκοκατασταλτικά ενώ σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να εμπλέκονται και στην επαγωγή του όγκου όπως για παράδειγμα στον καρκίνο του μαστού, όπου παρατηρείται υπερέκφραση τους. Τέλος, τα miR29 μπορεί να συνεισφέρουν και στη φυσιολογική διαφοροποίηση των ιστών. Μέσω μελέτης σε κυτταρικά μοντέλα φάνηκε ότι η θετική ρύθμιση των miR29 μπορεί να περιορίσει την ανασταλτική δράση του TGF- $\beta$  στη μυογένεση μέσω στόχευσης ενός από τους βασικούς αναστολείς της διαφοροποίησης των μυών (HDAC4) [120].

### 1.3.4. Το miR1207

Στον άνθρωπο το miR1207 έχει ταυτοποιηθεί ότι κωδικοποιείται από μια ασταθή γονιδιωματική περιοχή του χρωμοσώματος 8q24. Διακρίνονται δύο ισομορφές, το miR1207-5p και το miR1207-3p για τις οποίες δεν έχουν καταγραφεί μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (miRBase). Έχει βρεθεί ότι το miR1207 παίζει ρόλο σε ρυθμιστικούς μηχανισμούς ανατροφοδότησης. Η βιολογική συμπεριφορά του μορίου και τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται χρειάζονται περαιτέρω μελέτη, ωστόσο είναι γνωστή η εμπλοκή του στον καρκίνο του προστάτη όπου το miR1207-3p μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός βιοδείκτης [121], και στον καρκίνο του πνεύμονα όπου το miR1207-5p αναστέλλει την αύξηση και την μετάσταση του όγκου στοχεύοντας τον παράγοντα CSF1 (colony stimulating factor 1) και στην καταστολή των σηματοδοτικών μονοπατιών STAT3 και AKT. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί σε πειραματικά μοντέλα ότι καταστέλλει και την ανάπτυξη του καρκίνου του στομάχου στοχεύοντας την τελομεράση [122].



Οι περισσότεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, υποβάλλονται καθημερινά σε ρυθμικές αλλαγές με αποτέλεσμα να συγχρονίζονται με τις αλλαγές του φυσικού περιβάλλοντος. Ο μεταβολισμός, η φυσιολογία και η συμπεριφορά τους επομένως είναι άμεσα συνδεδεμένα με το κιρκάδιο ρολόι. Το κιρκάδιο ρολόι, ελέγχει την ρυθμική έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων, ενώ αντίστροφα υπάρχει και μία μεγάλη γκάμα γονιδίων που θεωρείται ότι εμπλέκονται στην διατήρηση της λειτουργίας του κιρκάδιου ρολογιού. Ανάμεσα σε αυτά τα ρυθμιστικά γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί και miRNA. Επομένως, καθώς τα miRNA έχουν άμεση επίδραση στο κιρκάδιο ρολόι, η γνώση των προφίλ έκφρασης τους, μπορεί να προσφέρει γνώση γύρω από τους περίπλοκους μηχανισμούς ρύθμισης του κιρκάδιου ρολογιού. Μελέτες συσχετίζουν το ρόλο της απαδενυλάσης PARN με το κιρκάδιο miR-122, ενώ προκαταρκτικά αποτελέσματα του εργαστηρίου συνδέουν τα επίπεδα έκφρασής της με τα miR-29a και miR-1207. Επίσης, είναι γνωστό πως η PARN εκδηλώνει κιρκάδια έκφραση σε επίπεδο mRNA, ενώ η περιοδικότητά της σε επίπεδο πρωτεΐνης είναι ασαφής. Όμως, ενώ ο ρόλος των miRNA μελετάται εντατικά, η γνώση για τις απαδενυλάσες που εμπλέκονται στον κιρκάδιο ρυθμό είναι αρκετά περιορισμένη με αρκετά αναπάντητα ερωτήματα. Για παράδειγμα, εκτός από τη Nocturnin που παράγεται κατά τη νύχτα στα θηλαστικά, δεν είναι γνωστό αν υπάρχουν και άλλες απαδενυλάσες με κιρκάδια έκφραση που παράγονται σε άλλες φάσεις του 24ώρου. Δεν είναι επίσης γνωστό αν μια απαδενυλάση χωρίς κιρκάδια έκφραση μπορεί να προσελκύεται σε ένα mRNA-στόχο από ένα miRNA με περιοδική έκφραση.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διαμόρφωση ενός μοντέλου με τη χρήση της κυτταρικής σειράς HEK293T για την αναζήτηση απαδενυλασών με ρόλο στον κιρκάδιο ρυθμό.

Με δεδομένη την ιδιαίτερη σημασία έχουν τα miRNA με κιρκάδια έκφραση, και το ότι οι απαδενυλάσες προσελκύονται από miRNA για την αποικοδόμηση επιλεγμένων mRNA-στόχων, θα εξεταστούν miRNA τα οποία μπορεί να εμφανίζουν περιοδικότητα, είτε στην ώριμη είτε στην πρόωμη μορφή τους και ειδικότερα τα miR-29a και miR-1207. Παράλληλα, θα εξεταστεί η περιοδικότητα των επιπέδων της PARN σε μια προσπάθεια διερεύνησης του πιθανού της ρόλου στον κιρκάδιο ρυθμό.

3.1. Υλικά

3.1.1. Αντιδραστήρια

Acetic acid	Scharlau
Acrylamide	SERVA
Agarose	NIPPON GENETICS
Ammonium persulfate (APS)	SERVA
N',N'methylene-bisacrylamide	SERVA
β- mercaptoethanol	Riedel de Haën
Bovine serum albumin (BSA)	New England Biolabs
Bradford Protein assay	Bio-rad
Bromophenol Blue	Research Organics
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Serva
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Panreac AppliChem
Dithiotreitol (DTT)	Appllichem
Deoxycholic acid (DOC )	SERVA
Dexamethasone (DEX)	SIGMA
EDTA	Merck
Ethanol Absolute	SIGMA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco
Glycerol	Appllichem
Glycine	SERVA
Hydrochloric Acid (HCl)	Merck
Hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Appllichem
Isopropanol	Scharlau
Luminol	SIGMA
Methanol	Appllichem
NP-40	SIGMA
p-cumaric acid	SIGMA
Phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF )	Appllichem
Ponceau S	Sigma
Potassium Chloride (KCl)	Merck
Potassium Phosphate, monobasic ( KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
SDS (Sodium dodecyl Sulfate)	SERVA
Sodium Chloride (NaCl)	Appllichem
Sodium Hydrogen Phosphate (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
Trichloroacetic Acid (TCA)	Merck
N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)	Invitrogen
Tris Base	Appllichem
Triton-X100	Merck
Tween- 20	SIGMA

3.1.2. Ένζυμα

KAPA Taq PCR	KAPA BIOSYSTEMS
KAPA™ SYBR® FAST qPCR	KAPA BIOSYSTEMS
Protease inhibitor cocktail	Appllichem
RTase PrimeScript™ 1 <sup>st</sup> strand cDNA synthesis	TaKaRa

3.1.3. Δείκτες μοριακών μαζών

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Nippon Genetics

### 3.1.4. Διαλύματα

#### **Θρεπτικά υλικά**

- Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM για τα HEK293T: 10% FBS, 1% Antibiotic- Antimycotic
  - Διαλύματα κρυοπροστασίας HEK293T κυττάρων: πλήρες θρεπτικό DMEM, 10% DMSO
- Θρεπτικό υλικό συγχρονισμού του κερκάδιου ρολογιού

#### **Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης (50×)**

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-acetate-EDTA (TAE): 10x → Tris base 24,2% v/w, Οξικό οξύ 5,71% w/w, EDTA 0,05M, ρύθμιση τιμής pH 8,6

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται TAE 1x το οποίο προκύπτει με κατάλληλη αραιώση.

#### **Ρυθμιστικά διαλύματα για τη λύση των κυττάρων**

- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (Lysis Buffer): 25mM Tris-HCl pH 7,5 , 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton-X100, 10% Glycerol, 5mM DTT, 1mM PMSF
- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης RIPA: 150mM NaCl, 50mM Tris pH 8, 1% NP-40, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% SDS, dH<sub>2</sub>O

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

- Ρυθμιστικό διάλυμα (10x)-Running buffer: Tris base 1,5%, Γλυκίνη 7,2% v/w, SDS 0,5%, pH 8,3, διάλυση με θέρμανση υπό ανάδευση. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται Running Buffer 1× το οποίο προκύπτει με κατάλληλη αραιώση. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων SDS-PAGE 4× (Sample Buffer): 240mM Tris-HCl pH 6,8, 40% Glycerol, 8% SDS, 5% β- mercaptoethanol, 0,04% Bromophenol Blue. Διατηρείται στους -20°C. Το SDS είναι ο κύριος αποδιατακτικός παράγοντας που θα αποδιατάξει τη δευτεροταγή και την τριτοταγή δομή και αποδίδει στις πρωτεΐνες ένα ενιαίο αρνητικό φορτίο ανάλογο της μάζας κάθε πρωτεΐνης. Η αποδιάταξη της τριτοταγούς δομής γίνεται με θέρμανση τους 95 °C. Η προσθήκη β -μερκαπτοαιθανόλης στοχεύει στην πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών καθώς ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στην αποδιάταξη της τεταρτοταγούς δομής των πρωτεϊνών σε υπομονάδες. Το κυανό της βρομοφαινόλης προστίθεται ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης, καθώς έχει ταχύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα από τις ηλεκτροφορούμενες πρωτεΐνες.

- Μίγμα ακρυλαμίδιου 30% v/w: ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο : 29/1 σε ddH<sub>2</sub>O. Φύλαξη στους 4°C / στο σκοτάδι.

- Διαλύματα για το πήκτωμα ακρυλαμίδιου: Ανάλογα με τη συσκευή και την περιεκτικότητα ακρυλαμίδιου που απαιτείται θα αναζητήσουμε τους πίνακες για την αναλογία των διαλυμάτων stock που θα πρέπει να αναμειξουμε και προσθέτουμε στο τέλος τους καταλύτες APS 10% και TEMED.

#### **Διαλύματα για τη χρώση του πηκτώματος ακρυλαμίδιου**

- Διάλυμα χρώσης Coomassie 0,1%: 40% Methanol, 10% Acetic Acid, Coomassie Blue Brilliant R-2500,05%

- Διάλυμα αποχρωματισμού, Οξικό οξύ 10%

Η χρωστική προσδένεται μη ειδικά σε όλες τις πρωτεΐνες. Το πήκτωμα επωάζεται με το διάλυμα της χρωστικής και όση χρωστική δεν έχει προσδεθεί σε πρωτεΐνες διαχέεται από την πηκτή στα επακόλουθα βήματα της χρώσης.

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

- Ponceau S : 0,1% Ponceau S w/v σε 1% οξικό οξύ. Χρησιμοποιείται για τη χρώση της μεμβράνης PVDF και την επιβεβαίωση της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών σε αυτή.

○ Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer buffer) 10× : 25mM Tris, 192mM Glycine, 0,1% SDS, 10% MetOH (προστίθεται στην τελική αραιώση) [123] .

#### **Διαλύματα για την ανοσο-ανίχνευση πρωτεϊνών ακινητοποιημένων σε μεμβράνη PVDF**

○ διάλυμα κορεσμού (Blocking Buffer): 5% Άπαχο γάλα σε σκόνη, 0,1 % Tween 20 σε PBS 1×

○ PBS-T: 0,1% Tween 20 σε PBS 1×

○ PBS 1×: NaCl 130mM, KCl 2mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5mM. Ρύθμιση τιμής pH στο 7,4 και αποστείρωση

○ Διάλυμα χημειοφωτα (ECL):

(i) Lumisensor HRP substrate (Genscript),

(ii) Immobilon Crescendo Western HRP substrate (Merck Millipore),

(iii) Διάλυμα λουμινόλης/κουμαρικού/υπεροξειδίου → luminol 0,022 % : διαλύεται σε 100mM Tris pH 8,5 , υπό ανάδευση στο σκοτάδι), p-cumaric acid 0,0112 % : διαλύεται σε DMSO 100%), 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: αραιώνεται κατάλληλα σε νερό

○ Ανίχνευση σήματος σε φιλμ ακτινογραφίας

FIXER (Kodak)

DEVELOPER (Kodak)

#### **Διάλυμα για την αποσύνδεση αντισωμάτων από μεμβράνη PVDF (Stripping buffer)**

○ Stripping buffer: ABCAM για 100mL buffer χρειάζονται → 1,5gr Glycine, 0,1gr SDS, 1mL Tween 20 , pH 2,2 . Η μεμβράνη επωάζεται 2 φορές για 5 λεπτά με το διάλυμα υπό ανάδευση και στη συνέχεια ξεπλένεται δυο φορές για 10 λεπτά με PBS. Τέλος, ξεπλένεται 2 φορές για 5 λεπτά με PBS-T.

#### 3.1.5. Υλικά-Οργανολογία

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαθέσιμα στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας καθώς επίσης και στους κοινόχρηστους χώρους του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας. Αναφέρονται τα σημαντικότερα εξ αυτών:

Αυτόματες πιπέτες	Gilson, Eppendorf
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης mini-PROTEAN tetracell	Biorad
Μετρητής pH	Metrohm
Φυγόκεντροι	Μοντέλα
Cell scraper	Sarstedt
Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Falcon(50mL, 15mL)	SPL
Φλάσκες καλλιέργειας ευκαρυωτικών κυττάρων εμβαδού 25cm <sup>2</sup> και 75cm <sup>2</sup> ) με φίλτρο στο καπάκι	Orange Scientific
Μεμβράνη PVDF διαμέτρου πόρων 0,20μm	Macherey-Nagel
Whatman 3MM paper	Biorad
Πιάτα 6 βοθρίων για καλλιέργεια	Nest

#### 3.1.6. Αντισώματα

Δευτερογενές αντίσωμα αίγας έναντι IgG ποντικού συζευγμένο με περοξειδάση του χρένου (HRP-conjugated secondary goat anti-mouse IgG) , 1:25000	Pierce
Δεύτερο αντίσωμα goat anti-rabbit IgG-HRP, 1:50000	Pierce
Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι ανθρώπινης BMAL1, IgG <sub>1</sub> , 1:250	Santa Cruz
Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι του ανθρώπινου <i>cryptochrome1</i> (CRY1), IgG <sub>1</sub> , 1:250	Santa Cruz
Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι του ανθρώπινου <i>Period2</i> (PER2), IgG <sub>1</sub> , 1:200	Santa Cruz
Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι ανθρώπινης ακτίνης (b-actin), 1:5000	SIGMA-ALDRICH
Πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι ανθρώπινης Nocturnin (NOC), 1:1000	Upstate
Πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι ανθρώπινης PARN, 1:1000	Santa Cruz

Σημείωση: οι αραιώσεις που αναγράφονται στον πίνακα είναι αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας και όχι χαρακτηριστικό του σκευάσματος.

#### 3.1.7. Κυτταρικές σειρές

Human Embryonic Kidney 293 cells ή HEK293 cells: Πρόκειται για μία κυτταρική σειρά που προέρχεται από ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα, τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν ως μονόστοιβη ιστοκαλλιέργεια (tissue culture). Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκε η σειρά 293T που προέρχεται από την 293, μέσω μετασχηματισμού με DNA ανθρώπινου αδενοϊού τύπου 5 και εκφράζει μία μεταλλαγμένη μορφή του SV40 Large T-antigen. Η σειρά αυτή επιλέχθηκε λόγω της ευρείας χρήσης σε μελέτες κιρκάδιας έκφρασης, καθώς τα κύτταρα μπορούν να ευθυγραμμιστούν με το κιρκάδιο ρολόι με τη χρήση κορτικοστεροειδών, όπως είναι η δεξαμεθαζόνη (DEX).

#### 3.1.8. Εκκινητές

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των εξεταζόμενων παραγόντων με ημιποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR), σχεδιάστηκαν εκκινητές (primers) ειδικοί ως προς το mRNA του κάθε υπό μελέτη παράγοντα. Στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας3) παρουσιάζονται τα επιλεγμένα γονίδια και οι αλληλουχίες των εκκινητών.

Πίνακας 3. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην διπλωματική εργασία. Ο αριθμός στην παρένθεση δείχνει το αναμενόμενο μήκος του προϊόντος (bp).

Παράγοντας	Αλληλουχία εκκινητή (5'→3')
NOCTURNIN	Fwd GCCAAGACACTGAACAGCAG Rev GGCAATCTGTCCTCAGATCC (175bp)
CLOCK	Fwd GGCTGAAAGACGACGAGAAC Rev GGTGTTGAGGAAGGGTCTGA (210bp)
PARN	Fwd CGAGTAGAACCGCTGAGGC Rev ATGCAGAGACTGAAGGTCCATC (190bp)
pri-miR29a	Fwd CCAACCCTCAGGACCTTCTG Rev TCCTCTCAGCAGTCAGCATCA
pri-miR1207	Fwd CAAGAGGCAAACATCTCGAA Rev GGAGCCCTTCTTTTTCTG
miR29a 3p	GGGTAGCACCATCTGAAATCGGTTA
miR1207 5p	TGGCAGGGAGGCTGGGAG
ACTIN	Fwd GGACTTCGAGCAAGAGATGG Rev AGCACTGTGTTGGCGTACAG (243bp)
U6	Fwd GGAATGACACAGTGAAGATTGG Rev TTTCTGTCATC CTTGCACA (51bp)

### 3.2. Μέθοδοι

#### 3.2.1. Κυτταροκαλλιέργειες

##### 3.2.1.1. Απόψυξη κυττάρων HEK293T

1. Τα φιαλίδια (cryovials χωρητικότητας 2mL) που περιέχουν τα κύτταρα, το υγρό άζωτο (L.N<sub>2</sub>) όπου ήταν αποθηκευμένα, εμβαπτίζονται απευθείας σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C με ήπια ανάδευση.
2. Μόλις ξεπαγώσουν τελείως τα κύτταρα, γίνεται καθαρισμός του φιαλιδίου με 70% αιθανόλη εξωτερικά.
3. Ακολουθεί άμεση μεταφορά του αιωρήματος των κυττάρων σε φλάσκα εμβαδού 25 ή 75 cm<sup>2</sup> και προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM, με σκοπό την αναστολή της δράσης του DMSO που περιέχεται στο αρχικό κρυοπροστατευτικό θρεπτικό υλικό των κυττάρων και δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη τους, ενώ παράλληλα παρέχεται στα κύτταρα κατάλληλη ποσότητα υλικού ώστε να ξεκινήσουν εκ νέου την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους.
4. Τοποθέτηση της φλάσκας στον επωαστήρα, που διατηρεί τη θερμοκρασία στους 37°C παρουσία 5% CO<sub>2</sub><sup>6</sup> για 4-8 ώρες μέχρι να προσκολληθούν τα κύτταρα στο ταπήτιο της φλάσκας.
5. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και προσθήκη φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το DMSO από το θρεπτικό ανάπτυξης των κυττάρων.

##### 3.2.1.2. Ανακαλλιέργεια μονόστοιβης καλλιέργειας-Κατεργασία κυττάρων με τριψίνη

Η ανακαλλιέργεια είναι απαραίτητη όταν το ταπήτιο της φλάσκας καλυφθεί στο μεγαλύτερο μέρος του και δεν υπάρχει χώρος για περαιτέρω ανάπτυξη των κυττάρων. Επιπλέον, εξυπηρετεί στην απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων και μεταβολιτών. Η διαδικασία της τριψινοποίησης, πραγματοποιείται όταν η πληρότητα των κυττάρων (confluency) είναι περίπου 90-100% και ακολουθούνται τα εξής βήματα:

1. Απομάκρυνση του υλικού της καλλιέργειας με αναρρόφηση.
2. Πλύση των κυττάρων με PBS 1× και αναρρόφηση του διαλύματος.
3. Προσθήκη διαλύματος τριψίνης-EDTA 0,25%.
4. Ήπια ανακίνηση της φλάσκας, έτσι ώστε η τριψίνη να καλύψει όλο το ταπήτιο και το επώαση ~5 λεπτά στον επωαστήρα. Σε αυτό το σημείο, μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο, τα κύτταρα αρχίζουν να αποκολλώνται από την επιφάνεια και μεταβάλλεται η μορφολογία τους (αποκτούν σφαιρικό σχήμα).
5. Τερματισμός της αντίδρασης της τριψίνης. Γίνεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας πλήρους θρεπτικού υλικού και επαναιώρησης των κυττάρων έτσι ώστε να διασπαστούν τα τυχόν υπάρχοντα συσσωματώματα και να κατανεμηθούν ομοιόμορφα στη φλάσκα. Το πλήρες θρεπτικό υλικό περιέχει FBS και οι παράγοντες αυτού αναστέλλουν πλήρως τη δράση της τριψίνης.
6. Στο σημείο αυτό μπορεί να γίνει ανακαλλιέργεια των κυττάρων σε δύο ή περισσότερες φλάσκες, ή διατήρηση στην ήδη υπάρχουσα μειώνοντας τον πληθυσμό των κυττάρων με κατάλληλη αραιώση. Η αραιώση εξαρτάται από την επιθυμητή πληρότητα και το ρυθμό διπλασιασμού των κυττάρων. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με συμπλήρωση πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM.

<sup>6</sup> Η κύρια μορφή του CO<sub>2</sub> είναι το διττανθρακικό ιόν (-HCO<sub>3</sub>) το οποίο παίζει το ρόλο ρυθμιστικού διαλύματος του pH. Έτσι η παρουσία του σε συγκεκριμένη συγκέντρωση είναι απαραίτητη ώστε να μπορούν να πραγματοποιηθούν αλλαγές των θρεπτικών συστατικών και των μεταβολιτών κατά την ανάπτυξη των κυττάρων χωρίς να προκαλούνται μεγάλες μεταβολές στο pH της καλλιέργειας.

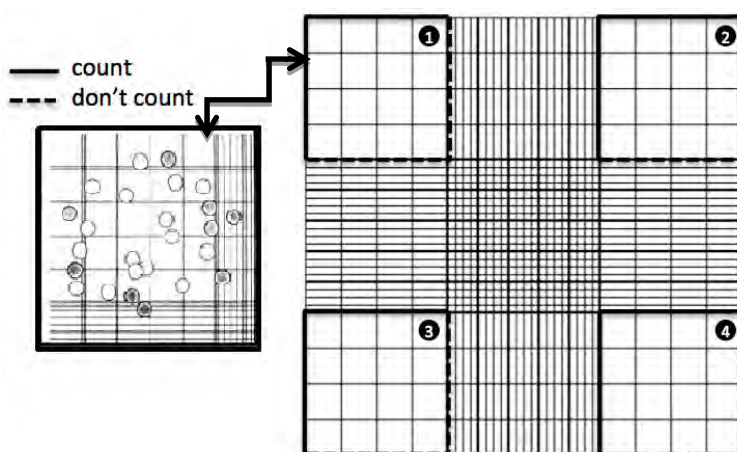
#### 3.2.1.3. Κατάψυξη κυττάρων για επακόλουθη καλλιέργεια

1. Τριψινοποίηση των κυττάρων, όταν η πληρότητα στο ταπήτιο είναι περίπου στο 80%, ώστε τα κύτταρα να βρίσκονται ακόμα σε εκθετική φάση ανάπτυξης.
2. Φυγοκέντρηση του δείγματος σε 1000rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 25°C.
3. Επαναιώρηση των κυττάρων στο θρεπτικό υλικό κρυοπροστασίας και μοίρασμα του αιωρήματος σε φιαλίδια (cryovials).
4. Τοποθέτηση για μερικά λεπτά στους 4°C ώστε το πάγωμα να γίνει σταδιακά. Στη συνέχεια, τα cryovials μεταφέρονται σε θερμοκρασία -80°C σε κατάλληλο δοχείο κατάψυξης το οποίο διαβρέχεται από ισοπροπανόλη ώστε να επιτευχθεί σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας με ρυθμό περίπου 1°C/min.
5. Για μακροπρόθεσμη αποθήκευση τα cryovials μεταφέρονται από τους -80°C σε υγρό άζωτο.

#### 3.2.1.4. Υπολογισμός αριθμού κυττάρων με την πλάκα Neubauer

Η πλάκα Neubauer, είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα, που λειτουργεί ως αιμοκυτταρόμετρο και διαθέτει δύο τετράγωνα πλέγματα μέτρησης κυττάρων. Κάθε πλέγμα αποτελείται από εννέα κύρια τετράγωνα, με μήκος πλευράς 1mm. Τα μεγάλα γωνιακά εξωτερικά τετράγωνα, υποδιαιρούνται σε 16 μικρότερα τετράγωνα, των οποίων η κάθε πλευρά έχει μήκος 0,25mm. Επιπλέον, το κεντρικό τετράγωνο φέρει επιπλέον διαβαθμίσεις (περισσότερα και μικρότερα τετράγωνα), διευκολύνοντας τον εντοπισμό των κύριων τετραγώνων στα οποία γίνεται η μέτρηση των κυττάρων και στον καθορισμό για το εάν τα κύτταρα θεωρείται ότι βρίσκονται εντός ή εκτός του πλέγματος. Το επίπεδο του πλέγματος, βρίσκεται 0,1mm από το επίπεδο στήριξης της καλυπτρίδας. Στην περιοχή της κοίλης επιφάνειας που δημιουργείται, τοποθετείται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο μέσω τριχοειδικών φαινομένων απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια. Ο αριθμός των κυττάρων σε καθένα από αυτά τα τετράγωνα αντιστοιχεί σε 0,1mm<sup>3</sup> ή 10<sup>-4</sup>mL. Η συγκέντρωση στο αρχικό εναιώρημα (κύτταρα/mL) υπολογίζεται μετά την καταμέτρηση των κυττάρων στα τέσσερα κύρια τετράγωνα και τον πολλαπλασιασμό του μέσου όρου των μετρήσεων με το 10<sup>4</sup>.

$$\text{αριθμός κυττάρων} = (\text{μέσος όρος } 4 \times 4) \times 10^4 \times (\text{συντελεστής αραίωσης}) \times (\text{τελικός όγκος})$$



Εικόνα11: Πλάκα Neubauer

#### 3.2.1.5. Συλλογή κυττάρων θηλαστικών

1. Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων με αποστειρωμένο PBS 1×.
2. Τριψινοποίηση με βάση την παράγραφο 3.2.1.2. ή εναλλακτικά, προσθήκη διαλύματος PBS 1× και χρήση ειδικών πλαστικών scrapers για την αποκόλληση των κυττάρων.
3. Μεταφορά των αποκολλημένων κυττάρων σε σωλήνες τύπου erpendorf 1,5mL.
4. Φυγοκέντρηση σε 3000rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C.

5. Προσεκτική αναρρόφηση του υπερκειμένου και φύλλαξη του κυτταρικού ιζήματος στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2.1.6. Λύση κυττάρων θηλαστικών

1. Επαναδιάλυση του ιζήματος, που έχει αποθηκευτεί μετά τη συλλογή των κυττάρων, σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος λύσης παρουσία αναστολέων πρωτεάσσε πάγο.
2. Θέρμανση του δείγματος στους  $95^{\circ}\text{C}$  για ένα λεπτό και ακολούθως επώαση στον πάγο για 10 λεπτά. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιείται ανάδευση του δείγματος με κυκλική μίξη (vortex). Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται 2 έως 5 φορές.
3. Φυγοκέντρηση του δείγματος σε  $15000\text{rpm}$  για 20 λεπτά σε θερμοκρασία  $4^{\circ}\text{C}$  και συλλογή υπερκειμένου.

Ως εναλλακτική για την λύση των κυττάρων, χρησιμοποιείται και το ρυθμιστικό διάλυμα RIPA το οποίο αποτελείται από πιο ισχυρά απορρυπαντικά. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω ωστόσο είναι διαφορετικός ο τρόπος με τον οποίο μπορεί να επιτευχθεί στη συνέχεια ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών.

#### 3.2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η δοκιμασία Bradford (Bio-rad), είναι μια μέθοδος ποσοτικής εκτίμησης πρωτεϊνών στο πυρηνικό και κυτταροπλασματικό εκχύλισμα και περιλαμβάνει τη δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 στις πρωτεΐνες. Η χρωστική αυτή μεταπίπτει μεταξύ τριών καταστάσεων, την πρωτονιωμένη (κόκκινο χρώμα), την ουδέτερη (πράσινο χρώμα) και την μη πρωτονιωμένη (μπλε χρώμα). Όταν η χρωστική προσδεθεί στην πρωτεΐνη, μετατρέπεται σε μια σταθερή μη πρωτονιωμένη μπλε μορφή, που παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα  $595\text{nm}$  ( $A_{\text{max}} = 595\text{nm}$ ). Η δέσμευση είναι ανάλογη της ποσότητας των πρωτεϊνών. Επομένως, αυτό μου ανιχνεύεται φωτομετρικά σε μήκος κύματος ( $\lambda$ )  $595\text{nm}$  είναι η μπλε μορφή του συμπλόκου χρωστικής-πρωτεΐνης. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 προσδένεται αρχικά στα βασικά (και ιδιαίτερα στην αργινίνη) και στα αρωματικά αμινοξέα. Για την διεξαγωγή της ποσοτικοποίησης ακολουθούνται τα εξής βήματα:

1. Μετά τη λύση των κυττάρων, λαμβάνεται μικρή ποσότητα από κάθε δείγμα σε ένα νέο σωλήνα τύπου eppendorf  $1,5\text{mL}$ .
2. Στον ίδιο σωλήνα, προστίθενται  $\text{dH}_2\text{O}$  και το αντιδραστήριο Bradford σε συγκέντρωση  $1\times$ , ανάλογα με την επιθυμητή αραιώση για το δείγμα. Παράλληλα με τα δείγματα προς ποσοτικοποίηση ετοιμάζεται και ένα δείγμα μάρτυρας (blank), το οποίο αντί για κάποιο κυτταρικό εκχύλισμα περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα λύσης. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στο ότι το δείγμα αυτό πρέπει να έχει την ίδια αραιώση με όλα τα υπόλοιπα.
3. Επώαση των διαλυμάτων για 10 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Μέτρηση φασματοφωτομετρικής απορρόφησης σε  $\lambda = 595\text{nm}$ .  
Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης ( $\text{mg/mL}$ ) της περιεχόμενης πρωτεΐνης σε κάθε διάλυμα βασίζεται στην εξίσωση πρότυπης καμπύλης που κατασκευάζεται με τη βοήθεια γνωστών συγκεντρώσεων της βόειας αλβουμίνης ορού (BSA) ( $\text{OD}_{595\text{nm}} = f(\text{C}_{\text{BSA}})$ ).
5. Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος (loading buffer  $4\times$ ) έτσι ώστε σε όλα τα δείγματα να περιέχεται ίση συγκέντρωση πρωτεΐνης με τελική αραιώση των δειγμάτων  $1\times$ .
6. Τοποθέτηση για 5 λεπτά στους  $95^{\circ}\text{C}$  ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών.
7. Φύλλαξη στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Στην περίπτωση που η λύση των κυττάρων έχει γίνει με RIPA Buffer, χρησιμοποιείται το protein quantification assay (Macherey-Nagel) για τον προσδιορισμό νέας πρότυπης καμπύλης, καθώς η συγκέντρωση των δειγμάτων αυτών δεν μπορεί να προσδιοριστεί με την κλασική μέθοδο Bradford. Κατά τη διαδικασία αυτή, η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται σε μήκος κύματος  $570\text{nm}$ .



#### 3.2.3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE), χρώση πηκτής, ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη PVDF και ανοσοανίχνευση

→ *Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)*

Η αναλυτική αυτή μέθοδος, βασίζεται στην αρχή πως ένα φορτισμένο μόριο θα μεταναστεύσει σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η κοινή πορεία, από την κάθοδο προς την άνοδο, όλων των μορίων που περιέχονται σε κάθε δείγμα, εξασφαλίζεται με την προσθήκη του αποδιατακτικού παράγοντα SDS, ο οποίος θα καταργήσει τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων φορτίζοντάς τα αρνητικά και προσδίδοντάς τους ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα, ώστε να μεταναστεύσουν όλα προς την άνοδο, και να διαχωριστούν όχι βάσει του φορτίου τους, αλλά βάσει του μοριακού τους βάρους. Καθώς οι πρωτεΐνες ανάλογα με το μέγεθός τους εμφανίζουν αντίστοιχη αύξηση της τριβής κατά την κίνησή τους διαμέσου των πόρων της πηκτής, όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης, άρα και όσο μεγαλύτερο το μέγεθός της, τόσο μικρότερη είναι η κινητικότητα του μορίου αυτού στην πηκτή.

Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πρώτο βήμα είναι η προετοιμασία της πηκτής. Στις περισσότερες περιπτώσεις η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής, δηλαδή πραγματοποιείται σε δύο διαδοχικές πηκτές διαφορετικής πυκνότητας: μία πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel), η οποία έχει σταθερή πυκνότητα 5% και μια πηκτή διαχωρισμού (separating gel) της οποίας η πυκνότητα επιλέγεται κάθε φορά έτσι ώστε να διαχωρίζονται καλά οι προς μελέτη πρωτεΐνες (Πίνακας4). Ο ρόλος της πηκτής επιστοιβάξης είναι να κινηθούν οι πρωτεΐνες και να στοιβαχθούν σε μια κοινή ζώνη, έτσι ώστε να εισέλθουν ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού και να δημιουργηθεί ένα ενιαίο μέτωπο κατά την ηλεκτροφόρηση. Η συγκέντρωση της πηκτής πολυακρυλαμιδίου στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι 8%. Ο σχηματισμός της πηκτής γίνεται με αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και δι-ακρυλαμιδίου σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία των παραγόντων υπερθειικό αμμώνιο (APS) και TEMED. Το TEMED είναι επιταχυντής και καταλύει την αντίδραση του πολυμερισμού των ελευθέρων ριζών του θείου του ακρυλαμιδίου που δημιουργούνται από το APS. Μόλις ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, τοποθετείται μαζί με το ικρίωμά της σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer 1×) ώστε να είναι σε άμεση επαφή με την πηκτή και στο πάνω και στο κάτω μέρος της συσκευής. Οι όγκοι των δειγμάτων που θα ηλεκτροφορηθούν υπολογίζονται έτσι ώστε σε όλα τα πηγάδια της πηκτής να φορτωθεί ίση συγκέντρωση πρωτεϊνών. Πριν φορτωθούν τα δείγματα, τοποθετούνται για 5 λεπτά στους 95°C. Σε ένα από τα πηγάδια φορτώνεται και ο μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών. Με τη βοήθεια τροφοδοτικού διαβιβάζεται ρεύμα σταθερής τάσης 110-140V στο κλειστό κύκλωμα που δημιουργείται μεταξύ της δεξαμενής και της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Πίνακας4:Σύσταση πηκτής διαχωρισμού και επιστοιβάξης

Πηκτή διαχωρισμού (Separating gel)		
	8%	10%
dH <sub>2</sub> O	2,3 mL	1,9 mL
30% acrylamide mix	1,3 mL	1,7 mL
Tris-HCl 1,5M pH8,8	1,3 mL	1,3 mL
10% SDS	50 μL	50 μL
10% ammonium persulfate (APS)	50 μL	50 μL
TEMED	3 μL	2 μL

Πηκτή επιστοίβαξης (Stacking gel)	
	5%
dH <sub>2</sub> O	3,4 mL
30% acrylamide mix	830 µL
Tris-HCl 1,5M pH6,8	630 µL
10% SDS	50 µL
10% ammonium persulfate (APS)	50 µL
TEMED	5 µL

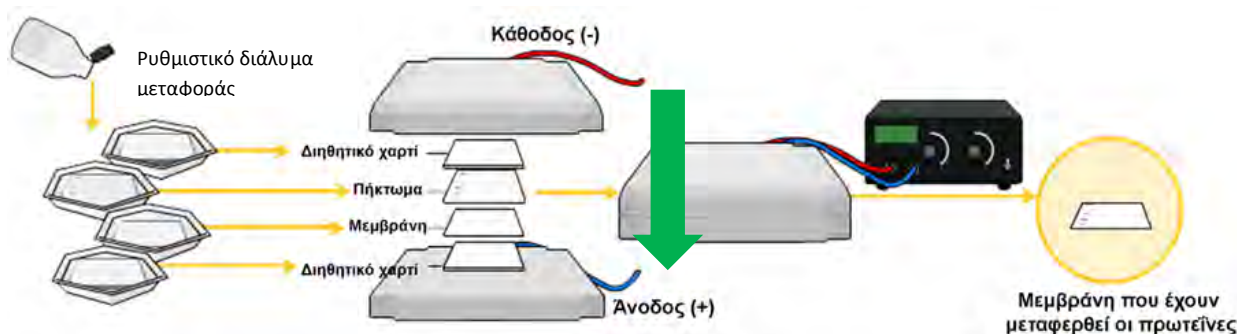
→ Χρώση της πηκτής με κυανό του Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250)

Μετά την ηλεκτρομεταφορά, για τον έλεγχο της απόδοσης, μπορεί να γίνει ανίχνευση των πρωτεϊνών με χρώση με κυανό του Coomassie. Η διαδικασία αυτή, πραγματοποιείται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον που ευνοεί τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη χρωστική και τις αμινομάδες των πρωτεϊνών, ενώ αναπτύσσονται και αλληλεπιδράσεις van der Waals. Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται  $\geq 0,1 \mu\text{g}$  πρωτεΐνης. Τα στάδια της μεθόδου είναι:

1. Επώαση της πηκτής με διάλυμα που περιέχει 50% (v/v) μεθανόλη και 10% (v/v) οξικό οξύ με θέρμανση, μέχρι να αρχίσει να βράζει.
2. Επώαση με το διάλυμα της χρωστικής Coomassie για 20 λεπτά υπό ανάδευση.
3. Αποχρωματισμός της πηκτής με διάλυμα αποχρωματισμού.

→ Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF

Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF (ή νιτροκυτταρίνης) βασίζεται στο γεγονός ότι τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-SDS είναι αρνητικά φορτισμένα και επομένως με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου θα μετακινηθούν προς την άνοδο με αποτέλεσμα να εξέλθουν από την πηκτή και να καθηλωθούν στη μεμβράνη λόγω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων. Η τοποθέτηση της πηκτής και της μεμβράνης στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε με τη μέθοδο Semi-dry -Υrdimes Semi-dry Blotter, Wealtec) γίνεται ανάμεσα από δύο ζεύγη τριών διηθητικών χαρτιών Whatman με τη μεμβράνη προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και την πηκτή στον αρνητικό. Πριν την τοποθέτηση τους στη συσκευή, τόσο τα φύλλα Whatman όσο και η πηκτή και η μεμβράνη εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer). Στην περίπτωση της PVDF, προηγείται και ένα στάδιο εμβάπτισης της μεμβράνης σε 100% μεθανόλη για 25-30 δευτερόλεπτα πριν τη μεταφορά στο Transfer Buffer. Η επαφή μεταξύ της πηκτής και της μεμβράνης πρέπει να είναι άμεση χωρίς την ύπαρξη φυσαλίδων καθώς παρεμποδίζουν τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η μεταφορά των πρωτεϊνών στην παρούσα διπλωματική υπό σταθερή ένταση ρεύματος 270mA για χρόνο που κυμαινόταν μεταξύ 52-54 λεπτών, χρόνος που μπορεί να διαφέρει σε κάθε περίπτωση ανάλογα με την πυκνότητα της πηκτής. Η επιβεβαίωση της μεταφοράς γίνεται σε πρώτο στάδιο με παρατήρηση της μεταφοράς του μάρτυρα και στη συνέχεια με χρώση της μεμβράνης με Ponceau S.



Εικόνα12: Συναρμολόγηση συσκευής ηλεκτρομεταφοράς (το πράσινο βέλος υποδεικνύει τον προσανατολισμο)

#### → *Ανοσοανίχνευση*

Η ανοσοανίχνευση είναι μία τεχνική η οποία επιτρέπει τον εντοπισμό των καθηλωμένων σε πρωτεϊνών σε μεμβράνη με τη χρήση αντισωμάτων. Βασίζεται στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη-αντιγόνο μπορεί εύκολα να αλληλεπιδράσει με ένα ειδικό ως προς την πρωτεΐνη αυτή αντίσωμα και στη συνέχεια το σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου να ανιχνευθεί με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος που φέρει εξειδίκευση για την σταθερή περιοχή του πρώτου. Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη PVDF χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των αντιγονικών θέσεων. Αρχικά, επώάζεται σε διάλυμα κορεσμού (Blocking Buffer) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ήπια ανάδευση, έτσι ώστε οι μεγαλομοριακές πρωτεΐνες του γάλακτος να καλύψουν τις μη ειδικές θέσης σύνδεσης και να αποφευχθούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης με το αντίσωμα. Ακολουθεί επώαση με το πρώτο αντίσωμα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία 4°C για 12-16 ώρες (overnight). Εν συνεχεία, γίνεται έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα PBS-T, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρώτου αντισώματος. Ο χρόνος και ο αριθμός των επαναλήψεων των πλύσεων εξαρτάται κάθε φορά από το αντίσωμα. Έπειτα, η μεμβράνη επώάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση με το δευτερογενές αντίσωμα για μία ώρα. Πριν τη διαδικασία της εμφάνισης του σήματος πραγματοποιούνται και πάλι πλύσεις με PBS-T. Η οπτικοποίηση της ειδικής πρόσδεσης του πρώτου αντισώματος γίνεται με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Ως χημειοφωταύγεια ορίζεται η εκπομπή φωτός που προέρχεται από την απελευθέρωση ενέργειας από ένα υπόστρωμα που βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση και επηρεάζεται από μια χημική αντίδραση. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, το δευτερογενές αντίσωμα φέρει προσδεδεμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης (HRP), το οποίο παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) σε αλκαλικό περιβάλλον, καταλύει την οξειδωση της λουμινόλης (luminol) με ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων, που μπορεί να αποτυπωθεί σε ακτινογραφικό φιλμ με τη μορφή σκοτεινής ζώνης. Η ενισχυμένη χημειοφωταύγεια επιτυγχάνεται όταν η οξειδωση της λουμινόλης από την υπεροξειδάση (HRP) πραγματοποιείται παρουσία χημικών ενισχυτών, όπως οι φαινόλες. Αφού ολοκληρωθούν λοιπόν και οι πλύσεις μετά την επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, η μεμβράνη επώάζεται για τρία λεπτά στο σκοτάδι με τα αντιδραστήρια ανίχνευσης ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Η ανίχνευση επιτυγχάνεται είτε με έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας, είτε σε μηχανήμα ανίχνευσης χημειοφωταύγειας. Ο χρόνος της εμφάνισης μπορεί να ποικίλλει από 30 δευτερόλεπτα μέχρι και 1 ώρα, ανάλογα με την ένταση του σήματος, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από την ποσότητα της πρωτεΐνης προς ανίχνευση.

#### 3.2.4. Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών

Για την απομόνωση του ολικού RNA από τα επεξεργασμένα και μη κύτταρα με DEX και DMSO, χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο (TRI Reagent-SIGMA ALDRICH). Με τα ιζήματα που έχουν αποθηκευτεί μετά από τη συλλογή των κυττάρων, σύμφωνα με την παράγραφο 3.2.1.6., ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Προσθήκη κατάλληλου όγκου TRI Reagent στο ίζημα των κυττάρων, λύση μέσω ήπιας ανάδευσης και στη συνέχεια επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Επώαση των δειγμάτων παρουσία 1-bromo-3-chloropropane για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Φυγοκέντρηση σε 12.000g για 15 λεπτά στους 4°C.
4. Στο σημείο αυτό διακρίνονται τρεις φάσεις, στον πυθμένα μια οργανική φάση, στην επιφάνεια μια υδατική φάση και στο ενδιάμεσο η ζώνη του DNA. Το RNA βρίσκεται στην υδατική φάση, η οποία και μεταφέρεται με ιδιαίτερη προσοχή σε νέο σωλήνα τύπου eppendorf 1,5mL.
5. Επανάληψη του βήματος 3 με σκοπό την αύξηση της καθαρότητας του δείγματος.
6. Προσθήκη ισοπροπανόλης (2-propanol) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Φυγοκέντρηση σε 12.000g για 10 λεπτά στους 4°C και απόρριψη υπερκείμενου.

8. Εκπλυση του ιζήματος με κατάλληλο όγκο παγωμένης αιθανόλης 75% και τοποθέτηση των δειγμάτων στους -20°C για 30 λεπτά. Η χαμηλή θερμοκρασία βοηθάει στην κατακρήμνιση του ιζήματος.
9. Φυγοκέντρωση σε 12.000g για 5 λεπτά στους 4°C.
10. Προσεκτική αφαίρεση της αιθανόλης και στέγνωμα του ιζήματος (RNA) σε αποστειρωμένο περιβάλλον.
11. Επαναιώρηση με νερό ελεύθερο ριβονουκλεασών (RNase-free ή DEPC-treated water) στους 55°C.
12. Αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C.

#### 3.2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου δύο βημάτων (RT-qPCR)

Στη συμβατική PCR, τα δεδομένα συλλέγονται αφού η αντίδραση ενίσχυσης έχει ολοκληρωθεί (συνήθως 30-40 κύκλους) και η τελική ποσότητα φθορισμού χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί η ποσότητα του αρχικού DNA στόχου, χρησιμοποιώντας πηκτή αγαρόζης. Αυτή η μέθοδος ποσοτικοποίησης είναι χρονοβόρα, αφού χρειάζεται επεξεργασία των δεδομένων και μετά το πέρας της αντίδρασης. Επιπλέον, μπορεί να δώσει αντιφατικά αποτελέσματα επειδή η αποδοτικότητα της μειώνεται κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού, καθώς τα αντιδραστήρια καταναλώνονται και έτσι η αλληλουχία στόχος δεν διπλασιάζεται πλέον σε κάθε κύκλο. Επίσης η κινητική της αντίδρασης μειώνεται από τη συσσώρευση αναστολέων. Η επίδραση αυτών των παραμέτρων μπορεί να ποικίλει από δείγμα σε δείγμα, οδηγώντας σε παραλλακτικότητα των τελικών δεδομένων, η οποία υποδηλώνει ότι η συμβατική PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για ποιοτικές μελέτες.

Αντίθετα, η PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR), είναι μία εξέλιξη της συμβατικής PCR η οποία επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου, σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Ύστερα από μια αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα, ακολουθεί μία εκθετική φάση αύξησης. 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. Είναι μία ιδιαίτερα ευαίσθητη και εξειδικευμένη τεχνική καθώς μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και ένα αντίγραφο ενός mRNA ή ακόμα και διαφορετική ένταση έκφρασης μεταξύ δύο δειγμάτων σε ποσοστό έως και 23%. Έτσι λοιπόν, αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού γονιδιακής έκφρασης. Μπορεί να διεξαχθεί σε ένα βήμα (one step reaction), όπου η όλη διαδικασία από τη σύνθεση του cDNA μέχρι την αντίδραση πολυμεράσης συμβαίνει στο ίδιο σωληνάκι ή σε δύο βήματα (two-step) όπου η αντίστροφη μεταγραφή και η ενίσχυση του παραγόμενου cDNA πραγματοποιούνται σε διαφορετικά σωληνάκια. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας εφαρμόστηκε η δεύτερη μέθοδος, δηλαδή Real-time PCR δύο βημάτων.

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

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

Πίνακας5: Συστατικά πρώτης αντίδρασης cDNA synthesis

Αντιδραστήριο	Τελικές ποσότητες (για όγκο αντίδρασης 10μL)
oligo dT Primer (50μM)	1 μL
dNTP Mixture (10mM each)	1 μL
template RNA	500 ng/rxn
RNase free dH <sub>2</sub> O	μέχρι 8 μL

Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 5 λεπτά στους 65°C, για να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA και για την πρόσδεση των εκκινητών στο στόχο. Έπειτα, τα δείγματα μεταφέρονται απευθείας σε πάγο. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη των παρακάτω αντιδραστηρίων, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 20μL.

Πίνακας6: συστατικά δεύτερης αντίδρασης cDNA synthesis

Αντιδραστήριο	Τελικές ποσότητες
1 <sup>st</sup> Rxn Mix	10 μL
5x PrimeScript™ Buffer	4 μL (1x)
RNasin (RNase αναστολέας 40U/μl)	0,5 μL (20 units)
PrimeScript™ RTase (200U/μl)	1 μL (200units)
RNase free dH <sub>2</sub> O	4,5 μL

Ανάδευση και επώαση για μία ώρα σε θερμοκρασία 42 °C (βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου) και στην συνέχεια για 15 λεπτά στους 70 °C (αδρανοποίηση του ενζύμου).

Οι επωάσεις πραγματοποιούνται στον κυκλοποιητή MiniOpticon real-time PCR detection system της BioRad.

#### Βήμα 2<sup>ο</sup> → Real Time PCR

Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό του προϊόντος της PCR στο τέλος κάθε κύκλου, αλλά όλες βασίζονται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας ετικέτας (tag), η οποία συνδέεται σε κάθε μόριο που συντίθεται. Οι πρώτες ετικέτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το βρωμιούχο αιθίδιο και το SYBR Green I. Και τα δύο εισχωρούν στις αύλακες του δίκλωνου DNA. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε ποσοτική PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Kapa Biosystems KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kit. Με βάση το πρωτόκολλο αυτό ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης και η περιοδικότητα των γονιδίων clock, nocturnin, PARN και των pri-miR29a και pri-miR1207 στις ομάδες των κυττάρων HEK293T που περιγράφηκαν στην παράγραφο 3.2.1.5. Ως γονίδιο control, χρησιμοποιήθηκε το ιδιοστατικά εκφραζόμενο γονίδιο της β-ακτίνης. Αναλυτικότερα, οι ποσότητες των επιμέρους αντιδραστηρίων των αντιδράσεων και οι συνθήκες παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας7: συστατικά master mix αντίδρασης qPCR

Αντιδραστήριο	Τελική ποσότητα / αντίδραση
KAPA SYBR	10 μL
Πρόσθιος εκκινητής (FWD 10μM)	0,1 μL
Ανάστροφος εκκινητής (REV 10μM)	0,1 μL
RNase free dH <sub>2</sub> O	7,5 μL

Πίνακας8: συστατικά αντίδρασης qPCR

Αντιδραστήριο	Τελική ποσότητα
cDNA (500ng)	2 µL
Master Mix	18 µL

Πίνακας9: Συνθήκες αντίδρασης qPCR

Βήματα qPCR	Θερμοκρασία / Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αποδιάταξη (denaturation)	95°C 03:00	1
Ενίσχυση (amplification)	95°C 00:03	40
	60°C 00:30 } μέτρηση 72°C 00:11 }	
Διάσταση (dissociation)	95°C 01:00 } melt curve <sup>7</sup>	1
	55°C 00:30 }	
	25°C 03:00	1

Η βασική αρχή που χρησιμοποιείται για την ανάλυση των δεδομένων, στηρίζεται στον αριθμό των κύκλων που είναι αναγκαίος να επιτευχθεί ώστε η αλληλουχία στόχος να έχει τέτοια συγκέντρωση στην αντίδραση που να επιτρέπει την ανίχνευση του σήματος φθορισμού. Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται για να γίνει αυτό, σχετίζεται με την αρχική συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου, όπως και οι τιμές της έντασης φθορισμού συσχετίζονται με τη συγκέντρωση των προϊόντων της PCR. Το σημείο ανίχνευσης του σήματος φθορισμού πάνω από το «θόρυβο» της αντίδρασης ορίζεται ως κατώφλι, και ο αριθμός των κύκλων που αντιστοιχεί σε αυτό το σημείο ονομάζεται threshold cycle ή Ct. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του αρχικού DNA-στόχου στο δείγμα, τόσο πιο γρήγορα θα ξεπεράσει η καμπύλη το όριο threshold.

Η παραπάνω διαδικασία ακολουθείται για τη μελέτη των γονιδίων clock, nocturnin και των pri-miR29a και pri-miR1207, ωστόσο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τα ώριμα miR29a και miR1207 καθώς είναι πολύ μικρά και δεν είναι πολυαδενυλωμένα. Στην περίπτωση αυτή, εργαλείο για τη σύνθεση του cDNA είναι το Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit και για την ποσοτικοποίηση και μελέτη των επιπέδων έκφρασης το Mir-X miRNA qRT-PCR TB Green Kit.

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

Πίνακας10: Συστατικά αντίδρασης cDNA synthesis

Αντιδραστήριο	Τελικές ποσότητες (για όγκο αντίδρασης 10µL)
mRQ Buffer (2×)	5 µL
RNA sample (0,25-8 µg) <sup>8</sup>	3,75 µL
mRQ Enzyme	1,25 µL

Στη συνέχεια τα δείγματα αραιώνονται με 90 µL dH<sub>2</sub>O.

<sup>7</sup> Καμπύλη τήξης (melt curve): Εκτίμηση των χαρακτηριστικών διάστασης του δίκλωνου DNA κατά τη θέρμανση. Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται οδηγώντας σε αύξηση της έντασης της απορρόφησης. Η θερμοκρασία στην οποία το 50% του DNA βρίσκεται σε δίκλωνη μορφή και το υπόλοιπο 50% σε μονόκλωνη ονομάζεται θερμοκρασία τήξης (melting temperature). Η ανάλυση της καμπύλης τήξης εξυπηρετεί στην εύρεση μη ειδικών προϊόντων καθώς επηρεάζουν τη θερμοκρασία τήξης.

<sup>8</sup> Στην παρούσα διπλωματική το RNA sample είχε συγκέντρωση 500 ng/txh επομένως ο όγκος για κάθε δείγμα είναι διαφορετικός (η ποσότητα που μένει για να συμπληρωθούν τα 3,75 µL αντιστοιχεί σε dH<sub>2</sub>O).

#### Βήμα 2<sup>ο</sup> → Real Time PCR

Πίνακας11: συστατικά αντίδρασης qPCR δείγματος

Αντιδραστήριο	Τελική ποσότητα / αντίδραση
cDNA	2 µL
TB Green Advantage Premix (2x)	12,5 µL
miRNA-specific primer (10µM)	0,5 µL
mRQ 3'Primer (10µM)	0,5 µL
dH <sub>2</sub> O	9 µL

Ως control σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται το U6 snRNA.

Πίνακας12: συστατικά αντίδρασης qPCR U6

Αντιδραστήριο	Τελική ποσότητα / αντίδραση
cDNA	2 µL
TB Green Advantage Premix (2x)	12,5 µL
U6 Forward primer (10µM)	0,5 µL
U6 Reverse primer (10µM)	0,5 µL
dH <sub>2</sub> O	9 µL

Πίνακας13: Συνθήκες αντίδρασης qPCR

Βήματα qPCR	Θερμοκρασία / Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αποδιάταξη (denaturation)	95°C 03:00	1
Ενίσχυση (amplification)	95 °C 00:05 60 °C 00:20	40
Διάσταση (dissociation)	95 °C 01:00 55 °C 00:30	1

Οποιοδήποτε από τα δύο πρωτόκολλα και αν χρησιμοποιείται, όλα τα δείγματα γίνονται εις διπλούν (duplicates), ενώ παράλληλα κάθε αντίδραση έχει το κατάλληλο No Template Control (NTC) και No Reverse Transcriptase (NRT).

#### 3.2.6. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων (DNA-RNA)

Η ηλεκτροφόρηση DNA και RNA δειγμάτων πραγματοποιείται σε πηκτή αγαρόζης η πυκνότητα της οποίας είναι ανάλογη με το μέγεθος του υπό μελέτη μορίου (στην παρούσα διπλωματική εργασία 1%). Τα μόρια DNA ή RNA φορτώνονται στην πηκτή μαζί με κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος να είναι 1×. Η ανίχνευση των μορίων στην πηκτή γίνεται με τη χρήση της χρωστικής Midori Green, η οποία προστίθεται πριν τον πολυμερισμό, καθώς εκπέμπει φθορισμό μετά την πρόσδεσή της σε μόρια DNA και RNA στο υπεριώδες φάσμα. Η ένταση του ρεύματος που εφαρμόζεται κυμαίνεται μεταξύ 70-100V.

### 4.1. Συγχρονισμός κυττάρων HEK293T για επαγωγή κερκάδιο ρολό

Τόσο για τον έλεγχο των κερκάδιων ταλαντώσεων μεταγράφων και πρωτεϊνών μορίων που είναι γνωστό ότι υπάγονται σε ρυθμική έκφραση (*clock*, *Nocturnin*, *PARN*, *pri-miR29a*) όσο και για την εύρεση προτύπων έκφρασης άλλων γονιδίων, ήταν απαραίτητος σε πρώτο στάδιο ο συγχρονισμός των κυττάρων HEK293T ως προς την φάση του κερκάδιου ρολογιού. Ο συγχρονισμός πραγματοποιήθηκε με την επώαση των κυττάρων για δύο ώρες σε θρεπτικό υλικό παρουσία δεξαμεθαζόνης (DEX) σε τελική συγκέντρωση 100nM. Η συλλογή των κυττάρων πραγματοποιήθηκε αρχικά ανά 6 ώρες και σε επόμενο στάδιο ανά 4 έτσι ώστε να διερευνηθούν όσο το δυνατόν περισσότερα χρονικά σημεία σε ένα εύρος 24 έως 56 ωρών μετά την επώαση με τη DEX. Κατά τον πειραματικό σχεδιασμό, χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες ελέγχου ώστε να γίνει ορθή κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Οι συνθήκες που εξετάστηκαν είναι οι εξής: κύτταρα τα οποία: α. επώαστηκαν για δύο ώρες με θρεπτικό υλικό που περιείχε 100nM DEX, β. επώαστηκαν για δύο ώρες με θρεπτικό υλικό που περιείχε κατάλληλη συγκέντρωση του DEX (0,004% DMSO) και γ. δεν υποβλήθηκαν σε επώαση με κάποια ουσία, παρά μόνο σε αλλαγές θρεπτικού υλικού όπως και στις άλλες δύο ομάδες (ασυγχρόνιστος πληθυσμός).

Η χρήση του DMSO στις πειραματικές διεργασίες προσφέρει τη δυνατότητα κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων ώστε τυχόν αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των επιλεγμένων παραγόντων που οφείλονται στην παρουσία του DMSO και όχι της DEX να μην επηρεάσουν τις τελικές μετρήσεις. Ο ασυγχρόνιστος πληθυσμός χρησιμεύει ως σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των επιλεγμένων παραγόντων σε συνθήκες μη συγχρονισμού με το κερκάδιο ρολόι.

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες των 25cm<sup>2</sup>, για λήψη ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος (WCE) και ανάλυση των επιπέδων των πρωτεϊνών, καθώς επίσης και πιάτα καλλιέργειας με 6 βοθρία για εκχύλιση ολικού RNA, ενώ για κάθε χρονική στιγμή (time-point) αντιστοιχούν δύο επαναλήψεις (duplicates).

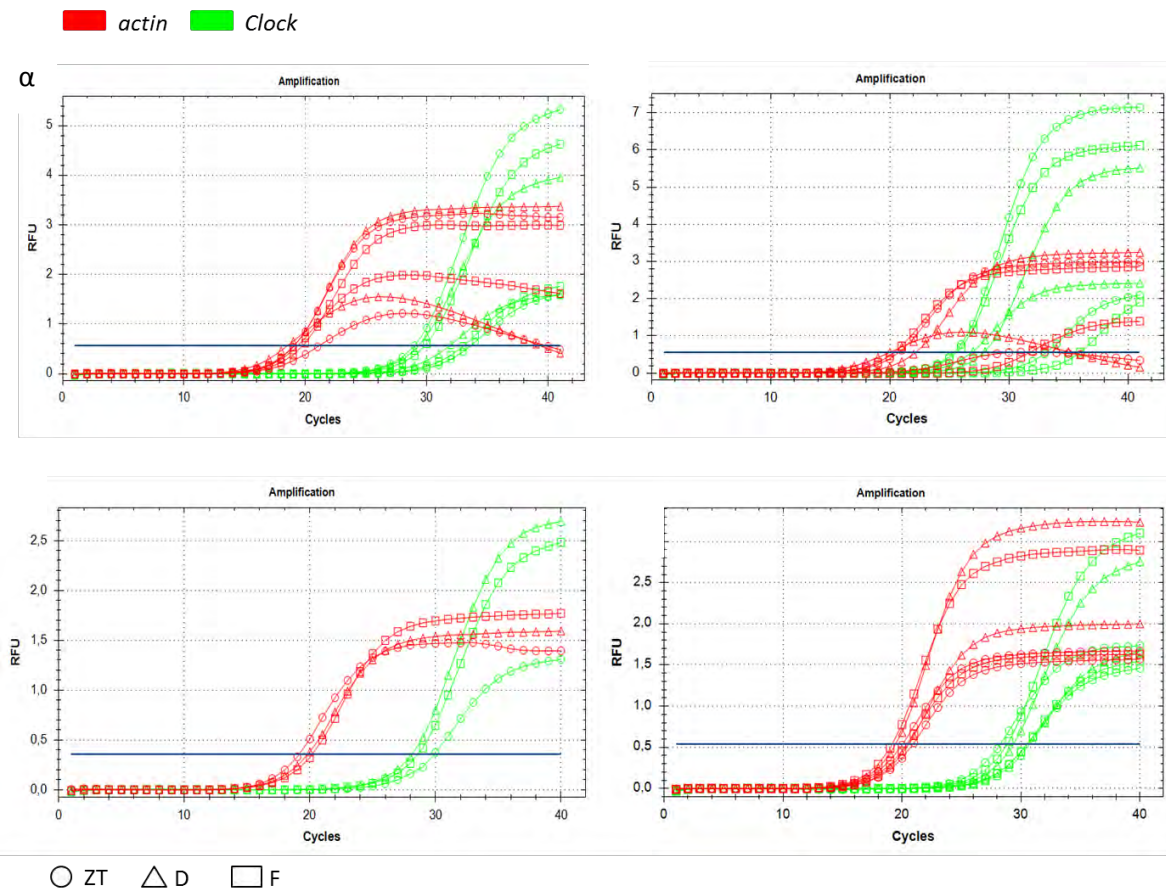
Στα παρακάτω αποτελέσματα, τα κύτταρα που επώαστηκαν με την δεξαμεθαζόνη και απεικονίζουν την επίδραση της στη λειτουργία του ρολογιού συμβολίζονται ως ZT (*Zeitgeber time*). Από τις ομάδες μάρτυρα, αυτή που υπέστη την επεξεργασία με το DMSO συμβολίζεται με το γράμμα D, ενώ η τελευταία ομάδα κυττάρων αναγράφεται με το σύμβολο F (*free-run*).

### 4.2. Έκφραση γονιδίων *clock*, *nocturnin*, *parn*, *(pri-)miR29a* και *(pri-)miR1207*

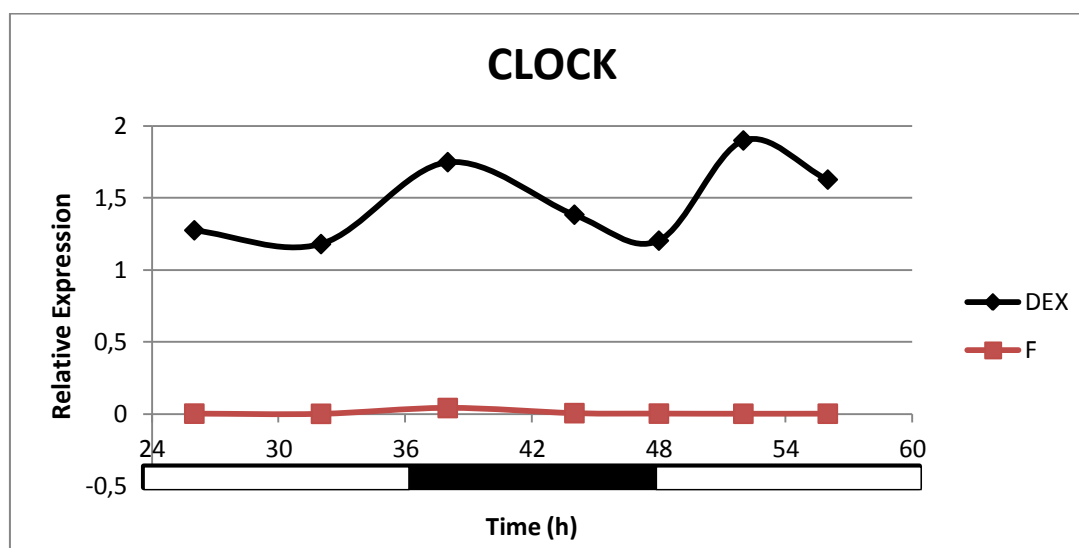
Ο έλεγχος της περιοδικότητας των γονιδίων *clock*, *nocturnin*, *parn*, *(pri-)miR29a* και *(pri-)miR1207* έγινε με πραγματοποίηση αντίδρασης RT-PCR, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα cDNA που συντέθηκε ολικό RNA και από τις τρεις ομάδες κυττάρων (ZT,D,F). Οι συγκεντρώσεις και οι συνθήκες των αντιδράσεων αναγράφονται στους πίνακες 5-13 στην ενότητα των μεθόδων. Για την κανονικοποίηση (normalization) των αποτελεσμάτων επιλέχθηκε η ακτίνη ως ένα γονίδιο που εκφράζεται ιδιοσυστατικά και δεν επηρεάζεται από το κερκάδιο ρολόι ως εσωτερικός μάρτυρας.



## Έκφραση *Clock*



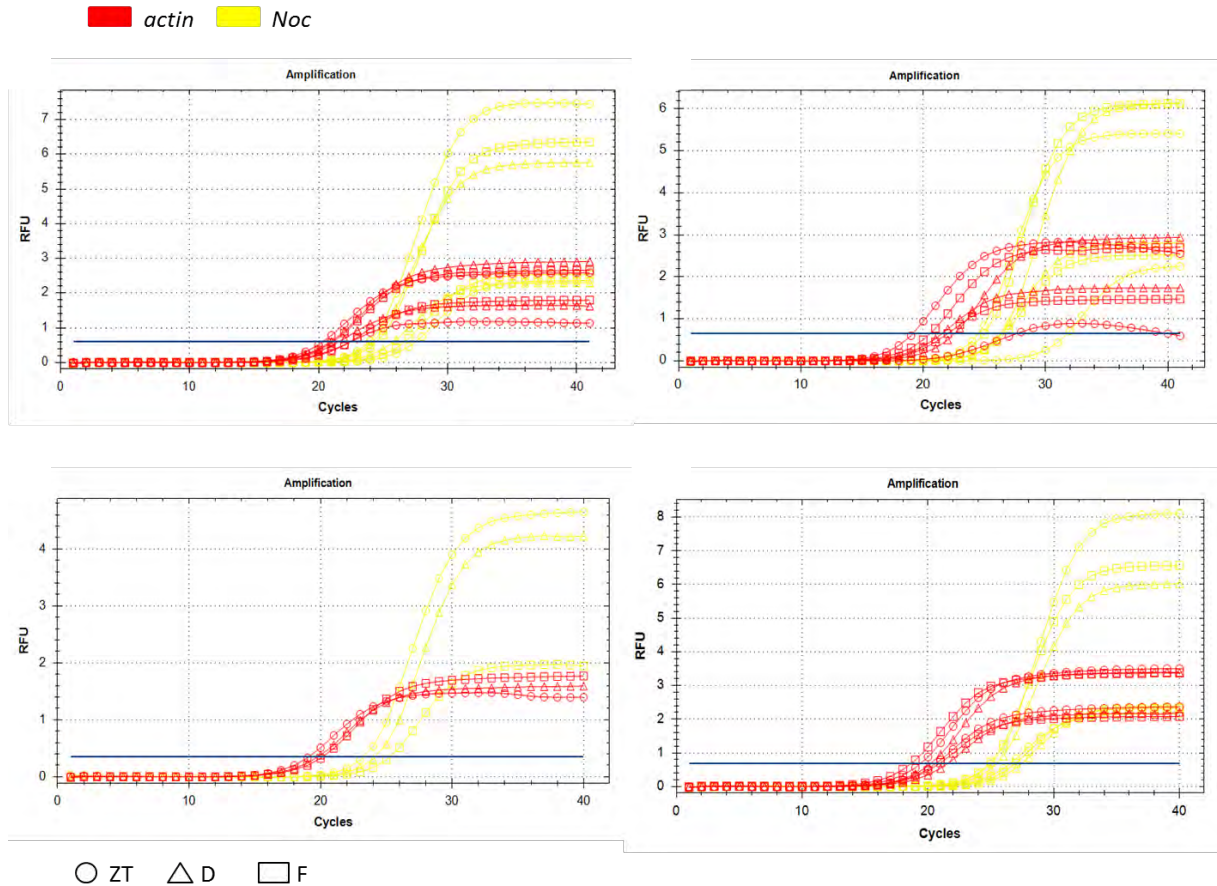
Εικόνα 13: Έκφραση του γονιδίου *CLOCK* σε συγχρονισμένα κύτταρα HEK293T. Διαγράμματα ενίσχυσης (Amplification curves): α) χρονικά σημεία 26-32, β) χρονικά σημεία 38-44, γ) χρονικό σημείο 48, δ) χρονικά σημεία 52-56. Με πράσινο χρώμα, απεικονίζονται τα δείγματα για το γονίδιο *clock*, ενώ οι καμπύλες με το κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στην ακτίνη που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας.



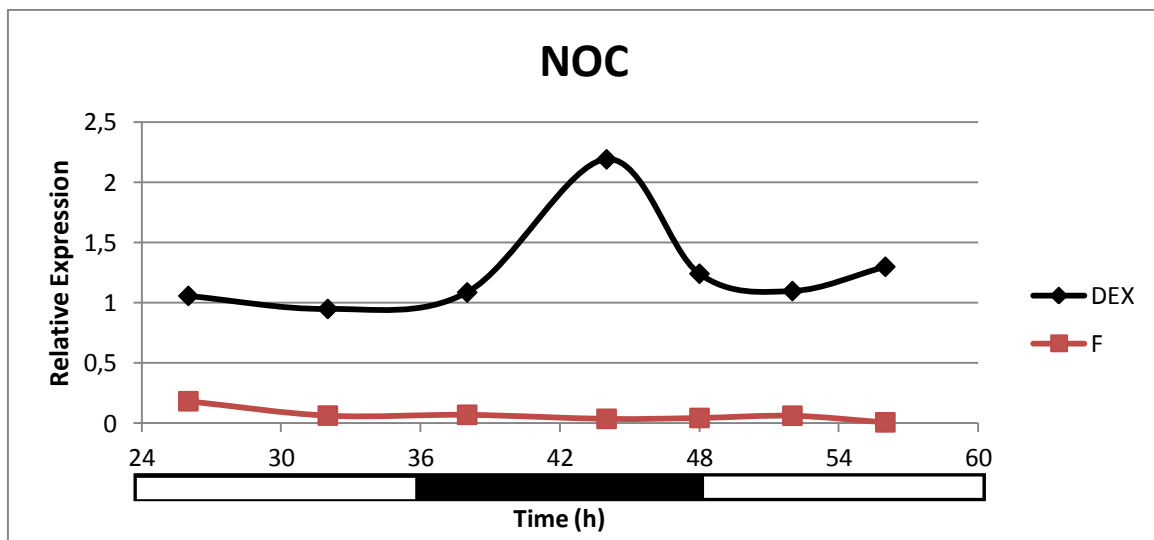
Γράφημα 1: Έκφραση του γονιδίου *CLOCK* σε συγχρονισμένα κύτταρα HEK293T. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR. Η καμπύλη DEX αντιστοιχεί στα σχετικά επίπεδα mRNA του *clock* και η ταλάντωση των δειγμάτων που είναι συγχρονισμένα ως προς το κιρκάδιο ρολόι (μετά από κανονικοποίηση τους ως προς τα δείγματα με το DMSO). Το F αντιπροσωπεύει τα αντίστοιχα επίπεδα για τα ασυγχρόνιστα κύτταρα. Οι σκιασμένες με λευκό χρώμα περιοχές αντιστοιχούν στις ώρες της ημέρας ενώ οι σκιασμένες με μαύρο το τι συμβαίνει κατά τη διάρκεια της νύκτας.

Από το γονίδιο *clock* προκύπτει ένας από τους κύριους μεταγραφικούς παράγοντες του κεντρικού ταλαντωτή του κιρκάδιου ρολογιού στα θηλαστικά, και γι αυτό η έκφραση και η συμπεριφορά του είναι γνωστή και καλά μελετημένη. Τα μέγιστα (38 και 52 ώρες μετά την επώαση με τη DEX) και ελάχιστα (32 και 48 ώρες μετά την επώαση με τη DEX) στο προφίλ έκφρασης με βάση τα αποτελέσματα του πειράματος, φαίνεται να ταιριάζουν με αυτά της βιβλιογραφίας, οδηγώντας στην εκτίμηση της περιόδου του γονιδίου αυτού περίπου στις 16 ώρες.

## Έκφραση *Nocturnin*



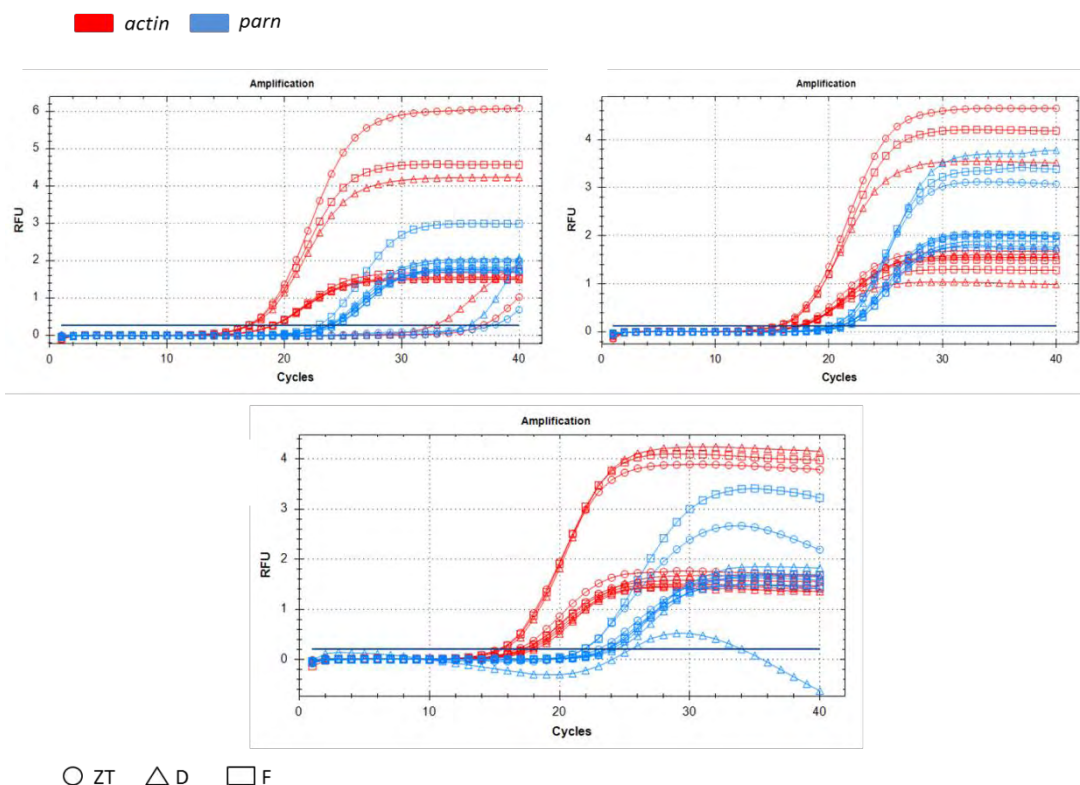
Εικόνα 14: Έκφραση του γονιδίου NOC σε συγχρονισμένα κύτταρα HEK293T Διαγράμματα ενίσχυσης (Amplification curves): α) χρονικά σημεία 26-32, β) χρονικά σημεία 38-44, γ) χρονικό σημείο 48, δ) χρονικά σημεία 52-56. Με κίτρινο χρώμα, απεικονίζονται τα δείγματα για το γονίδιο της *noc*, ενώ οι καμπύλες με το κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στην ακτίνη που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας.



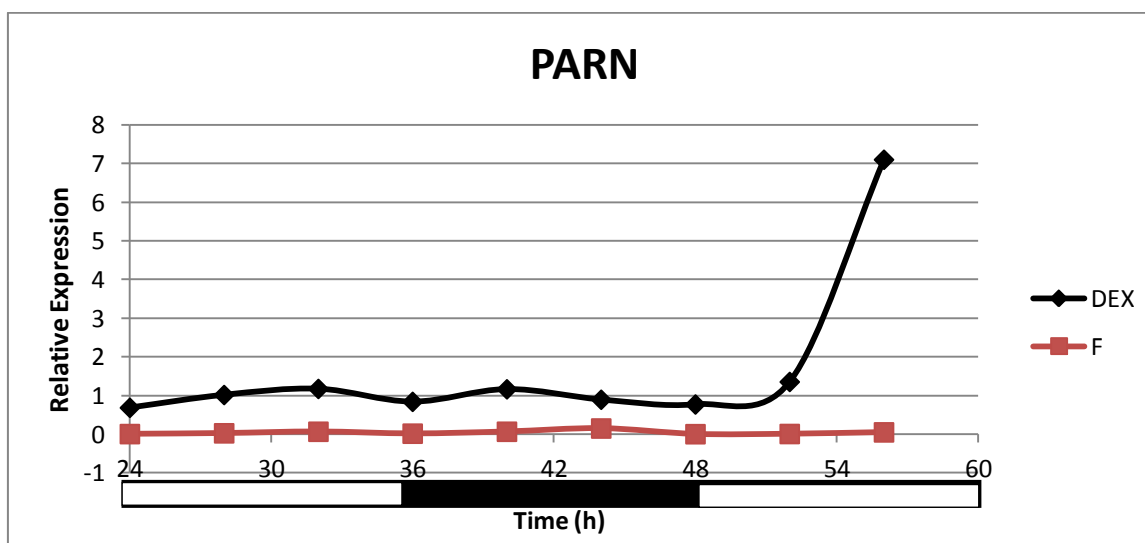
Γράφημα 2: Έκφραση του γονιδίου NOC σε συγχρονισμένα κύτταρα HEK293T Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR. Η καμπύλη DEX αντιστοιχεί στα σχετικά επίπεδα mRNA της *nocturnin* και η ταλάντωση των δειγμάτων που είναι συγχρονισμένα ως προς το κίρκαδιο ρολόι (μετά από κανονικοποίηση τους ως προς τα δείγματα με το DMSO). Το F αντιπροσωπεύει τα αντίστοιχα επίπεδα για τα ασυγχρόνιστα κύτταρα. Οι σκιασμένες με λευκό χρώμα περιοχές αντιστοιχούν στις ώρες της ημέρας ενώ οι σκιασμένες με μαύρο το τι συμβαίνει κατά τη διάρκεια της νύκτας.

Η απαδενυλάση NOC είναι ένα έντονα ρυθμικό γονίδιο το οποίο με βάση τη βιβλιογραφία εκφράζεται μερικές ώρες μετά την έναρξη του σκότους παρουσιάζοντας μέγιστη εκδήλωση της έκφρασης της κατά τη διάρκεια την νύκτας. Κάτι τέτοιο επαληθεύεται και σε αυτή την περίπτωση όπου κατά τη διάρκεια της ημέρας δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στα επίπεδα της και η μόνη κορυφή που φαίνεται να εμφανίζει είναι 44 ώρες μετά την επώαση με τη DEX.

## Έκφραση *parn*



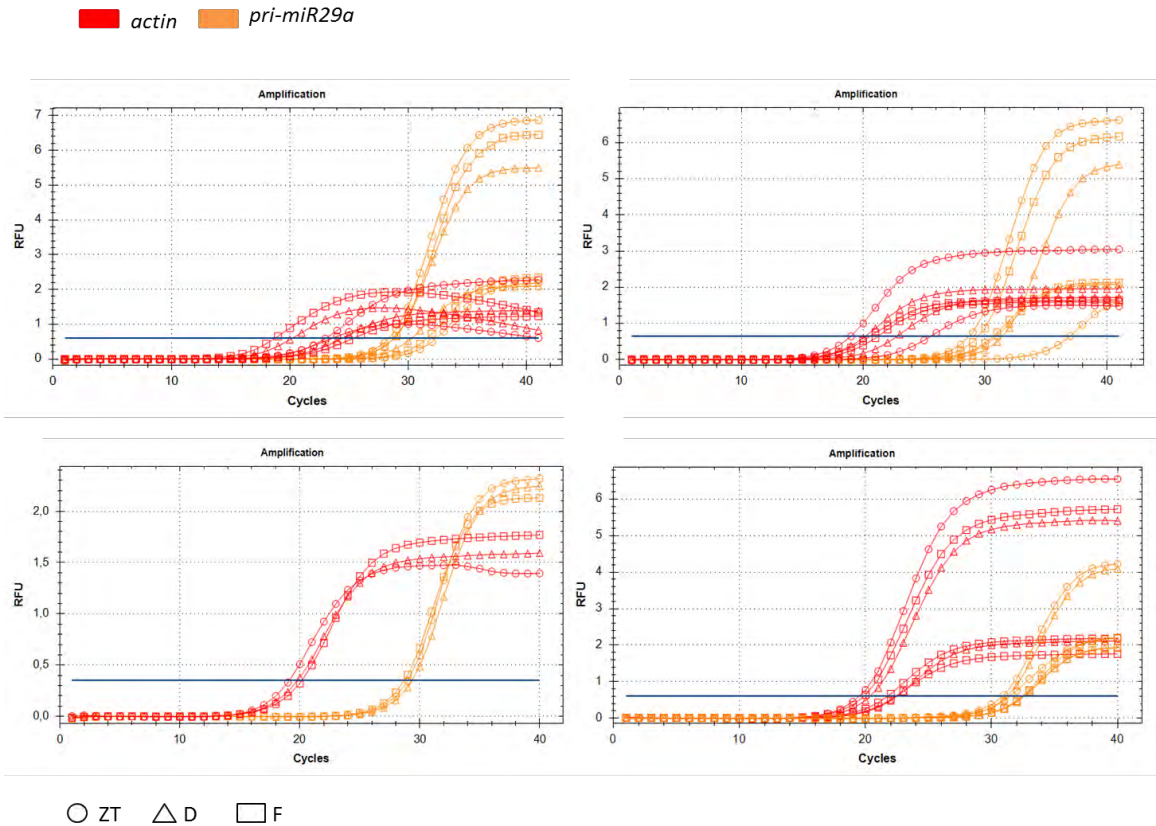
Εικόνα 15: Έκφραση του γονιδίου PARN σε συγχρονισμένα κύτταρα HEK293T Διαγράμματα ενίσχυσης (Amplification curves): α) χρονικά σημεία 24-28-32, β) χρονικά σημεία 36-40-44, γ) χρονικά σημεία 48-52-56. Με γαλάζιο χρώμα, απεικονίζονται τα δείγματα για το γονίδιο της *parn*, ενώ οι καμπύλες με το κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στην ακτίνη που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας



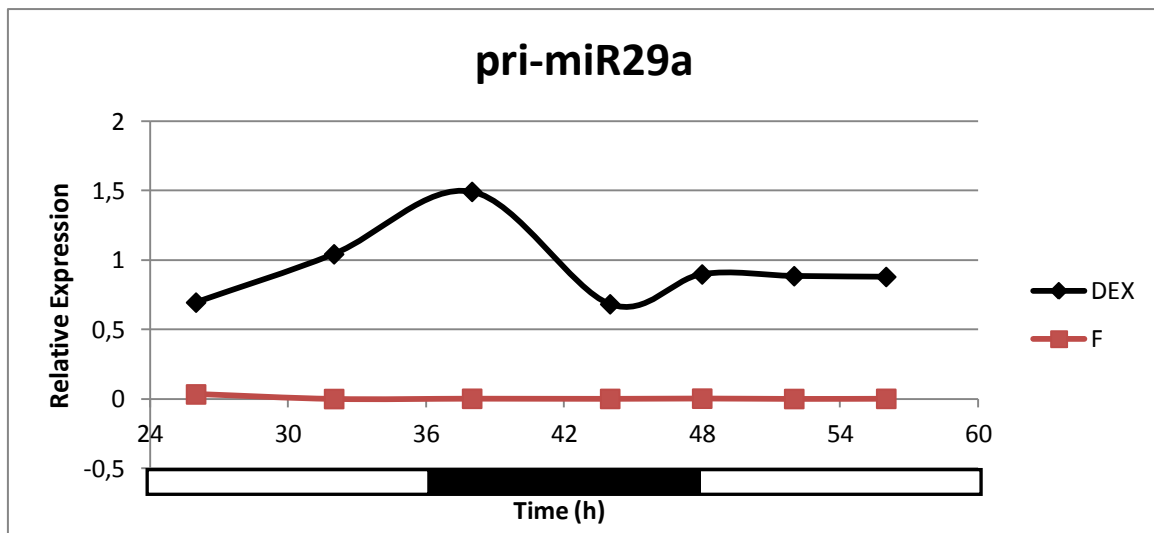
Γράφημα 3: Έκφραση του γονιδίου PARN σε συγχρονισμένα κύτταρα HEK293T Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR. Η καμπύλη DEX αντιστοιχεί στα σχετικά επίπεδα mRNA της *parn* και η ταλάντωση των δειγμάτων που είναι συγχρονισμένα ως προς το κικκάδιο ρολόι (μετά από κανονικοποίηση τους ως προς τα δείγματα με το DMSO). Το F αντιπροσωπεύει τα αντίστοιχα επίπεδα για τα ασυγχρόνιστα κύτταρα. Οι σκιασμένες με λευκό χρώμα περιοχές αντιστοιχούν στις ώρες της ημέρας ενώ οι σκιασμένες με μαύρο το τι συμβαίνει κατά τη διάρκεια της νύκτας.

Η απαδενυλάση PARN, έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζει ρυθμικά επίπεδα mRNA κατά τη διάρκεια του 24ώρου. Με βάση τα αποτελέσματα του πειράματος η περιοδική αυτή έκφραση επαληθεύεται. Παρατηρώντας τις κορυφές των ελαχίστων τιμών των επιπέδων της (24,36 και 48 ώρες μετά την επώση με τη DEX), φαίνεται να ταλαντώνεται με περίοδο που προσεγγίζει τις 12 ώρες. Ωστόσο, η τιμή αυτή βρίσκεται σε ασυμφωνία με την περίοδο που προκύπτει μελετώντας τις κορυφές των μέγιστων τιμών (32,38 και 56 ώρες μετά την επώση με τη DEX), υποδηλώνοντας πως για να καταλήξουμε σε ένα σαφέστερο προφίλ έκφρασης θα πρέπει να προσδιοριστούν τα επίπεδα έκφρασης και άλλες χρονικές στιγμές του 24ώρου.

## Έκφραση pri-miR29a



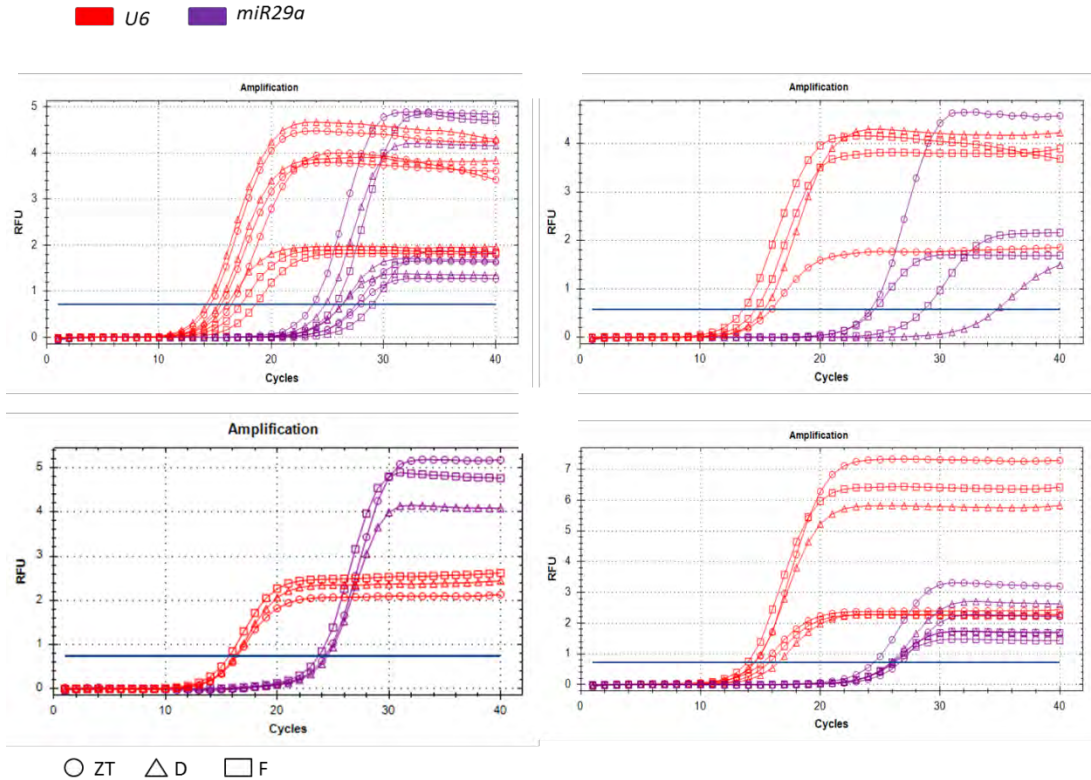
Εικόνα 16: Έκφραση του γονιδίου pri-miR29a σε συγχρονισμένα κύτταρα HEK293T. Διαγράμματα ενίσχυσης (Amplification curves): α) χρονικά σημεία 26-32, β) χρονικά σημεία 38-44, γ) χρονικό σημείο 48, δ) χρονικά σημεία 52-56. Με πορτοκαλί χρώμα, απεικονίζονται τα δείγματα για το γονίδιο *pri-miR29a*, ενώ οι καμπύλες με το κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στην ακτίνη που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας.



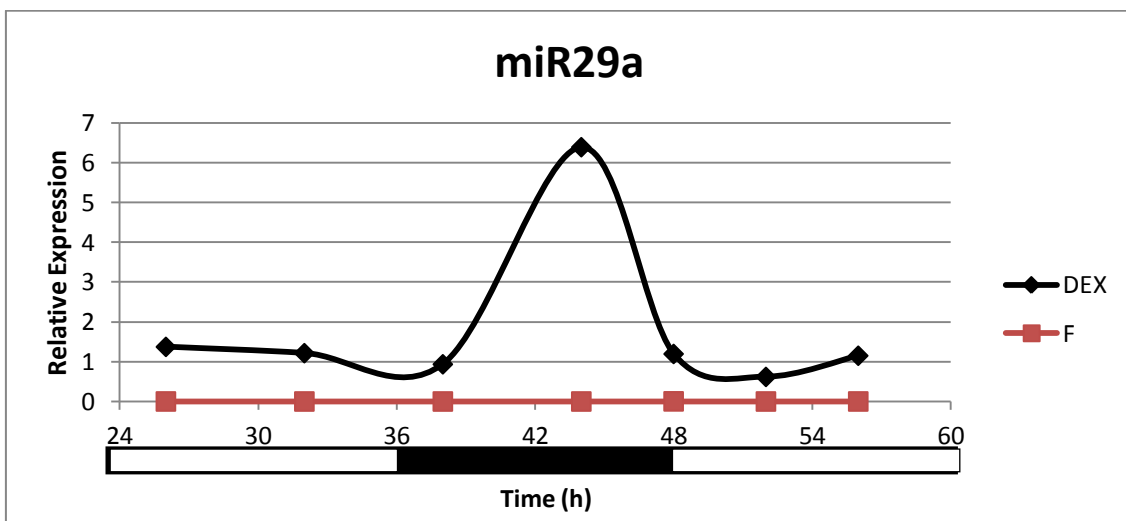
Γράφημα 4: Έκφραση του γονιδίου pri-miR29a σε συγχρονισμένα κύτταρα HEK293T. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR. Η καμπύλη DEX αντιστοιχεί στα σχετικά επίπεδα mRNA του *pri-miR29a* και η ταλάντωση των δειγμάτων που είναι συγχρονισμένα ως προς το κικκάδιο ρολόι (μετά από κανονικοποίηση τους ως προς τα δείγματα με το DMSO). Το F αντιπροσωπεύει τα αντίστοιχα επίπεδα για τα ασυγχρόνιστα κύτταρα. Οι σκιασμένες με λευκό χρώμα περιοχές αντιστοιχούν στις ώρες της ημέρας ενώ οι σκιασμένες με μαύρο το τι συμβαίνει κατά τη διάρκεια της νύκτας.

Προχωρώντας στην εύρεση miRNA με περιοδική έκφραση, επιλέχθηκαν προς μελέτη το miR29a και το miR1207 καθώς στοχεύουν την PARN που όπως αναγράφεται παραπάνω εμφανίζει ρυθμικότητα. Το miR29a, είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι στην πρώιμη μορφή του ακολουθεί κικκάδιο ρυθμό έκφρασης κάτι που φαίνεται και στο δικό μας πειραματικό μοντέλο. Παρά το γεγονός ότι τα μέγιστα και ελάχιστα δεν ταυτίζονται απόλυτα με αυτά της βιβλιογραφίας εμφανίζουν αρκετή ομοιότητα σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Επιπλέον, προκαταρκτικές μελέτες από το εργαστήριό μας δείχνουν πως τα miR-29a και miR-1207 ρυθμίζουν την έκφραση της PARN [124,125].

## Έκφραση miR-29a



Εικόνα 17: Έκφραση του γονιδίου miR29a σε συγχρονισμένα κύτταρα HEK293T. Διαγράμματα ενίσχυσης (Amplification curves): α) χρονικά σημεία 26-32, β) χρονικά σημεία 38-44, γ) χρονικό σημείο 48, δ) χρονικά σημεία 52-56. Με μωβ χρώμα, απεικονίζονται τα δείγματα για το γονίδιο *miR29a*, ενώ οι καμπύλες με το κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στο *U6* που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας.

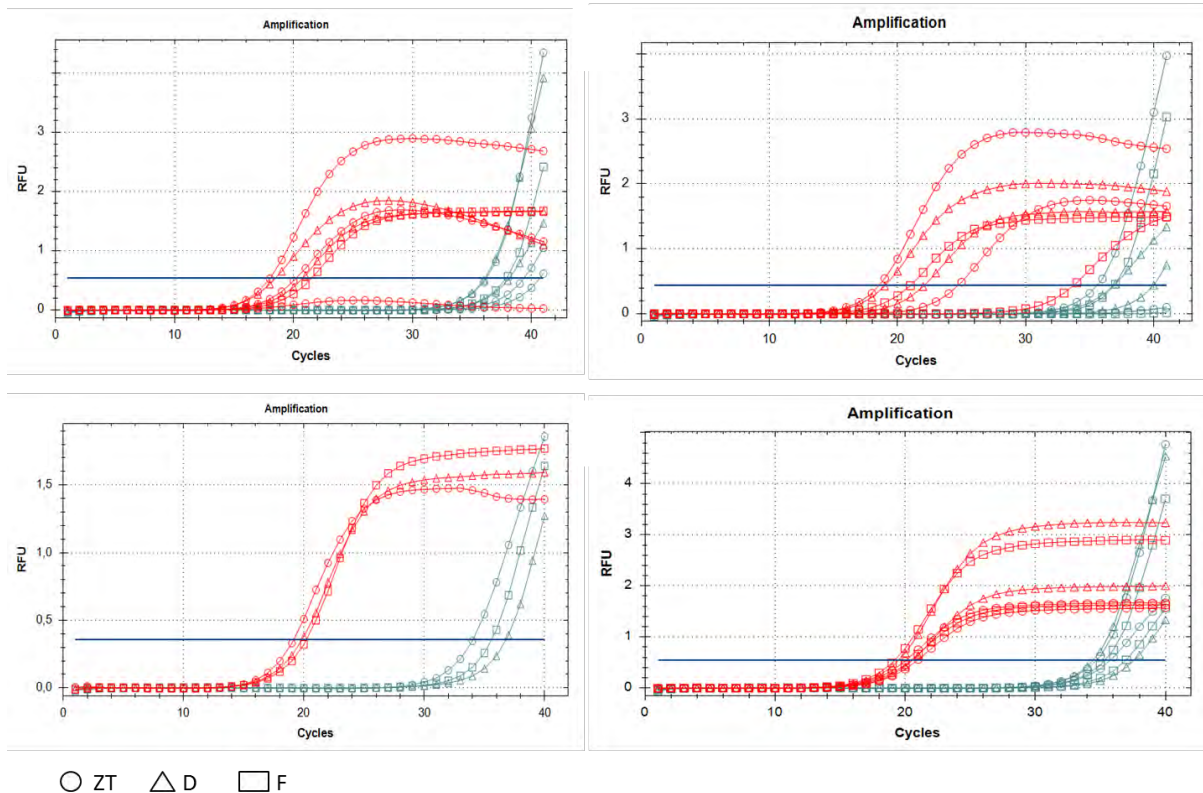


Γράφημα 5: Έκφραση του γονιδίου miR29a σε συγχρονισμένα κύτταρα HEK293T. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR. Η καμπύλη DEX αντιστοιχεί στα σχετικά επίπεδα mRNA του *miR29a* και η ταλάντωση των δειγμάτων που είναι συγχρονισμένα ως προς το κικκάδιο ρολόι (μετά από κανονικοποίηση τους ως προς τα δείγματα με το DMSO). Το F αντιπροσωπεύει τα αντίστοιχα επίπεδα για τα ασυγχρόνιστα κύτταρα. Οι σκιασμένες με λευκό χρώμα περιοχές αντιστοιχούν στις ώρες της ημέρας ενώ οι σκιασμένες με μαύρο το τι συμβαίνει κατά τη διάρκεια της νύκτας.

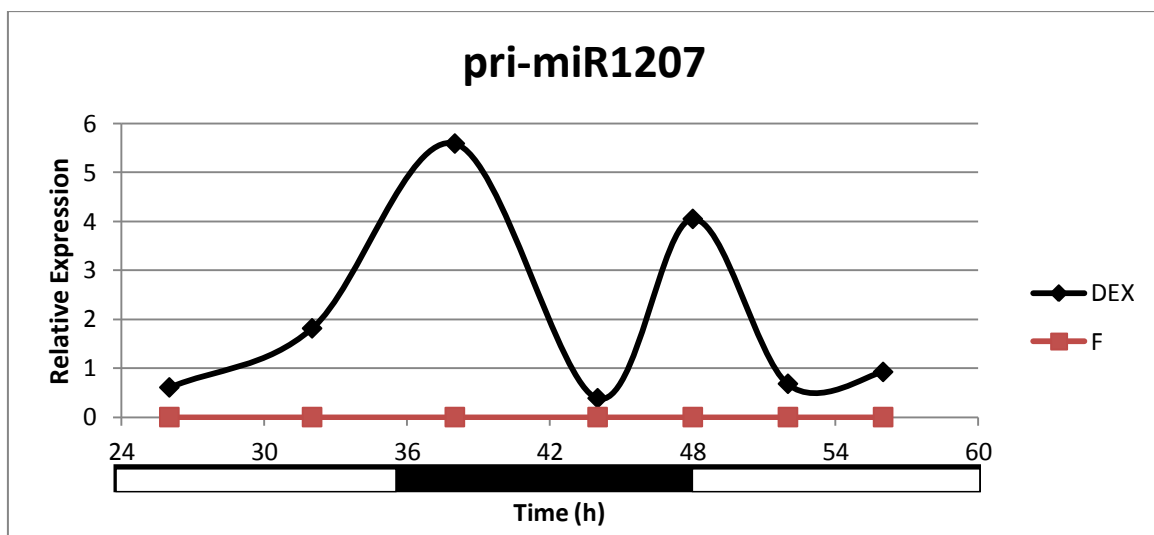
Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, το miR29a εμφανίζει ρυθμικά επίπεδα έκφρασης στην πρώιμη μορφή του (pri-miR29a), ενώ δεν υπάρχει κάποια αναφορά για τη συμπεριφορά του ώριμου miR29a στο πλαίσιο του κικκάδιου ρολογιού. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας με τη χρήση του συγκεκριμένου πειραματικού μοντέλου, φάνηκε ότι και το ώριμο miR29a βρίσκεται υπό την επίδραση του ρολογιού και μάλιστα παρουσιάζει ένα προφίλ έκφρασης που ταιριάζει στην κατηγορία των γονιδίων που ανήκει και η NOC, που εκδηλώνουν δηλαδή μέγιστο κατά τη διάρκεια την νύκτας. Μία ακόμα παρατήρηση που εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, είναι ότι τα προφίλ των δύο διαφορετικών μορφών του miR29a διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους. Πολύ χαρακτηριστική χρονική στιγμή για να παρατηρηθεί αυτή η διαφορά είναι οι 48 ώρες μετά την επώαση με τη DEX όπου η έκφραση του pri-miR29a φαίνεται να μειώνεται, ενώ το ώριμο miR29a βρίσκεται στο μέγιστο της έκφρασης του.

## Έκφραση pri-miR1207

actin pri-miR1207



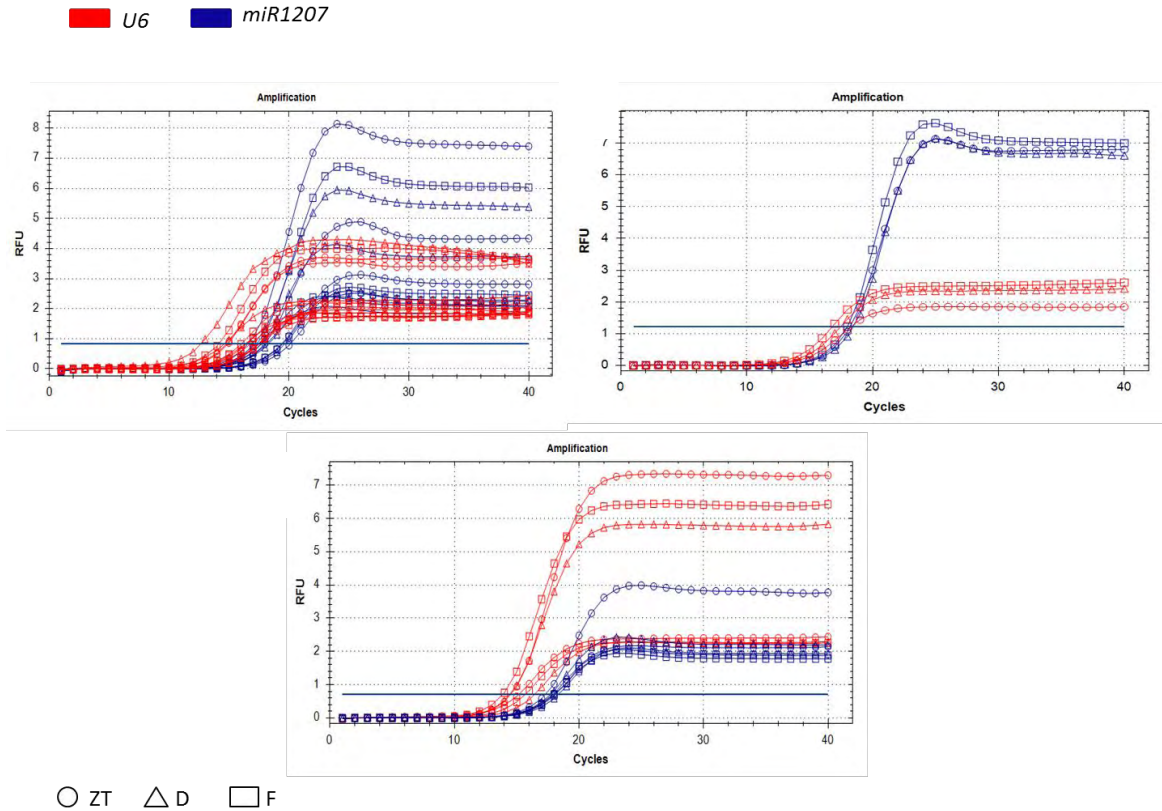
Εικόνα 18: Έκφραση του γονιδίου pri-miR1207 σε συγχρονισμένα κύτταρα HEK293T. Διαγράμματα ενίσχυσης (Amplification curves): α) χρονικά σημεία 26-32, β) χρονικά σημεία 38-44, γ) χρονικό σημείο 48, δ) χρονικά σημεία 52-56. Με γκριζό χρώμα, απεικονίζονται τα δείγματα για το γονίδιο *pri-miR1207*, ενώ οι καμπύλες με το κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στην ακτίνη που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας.



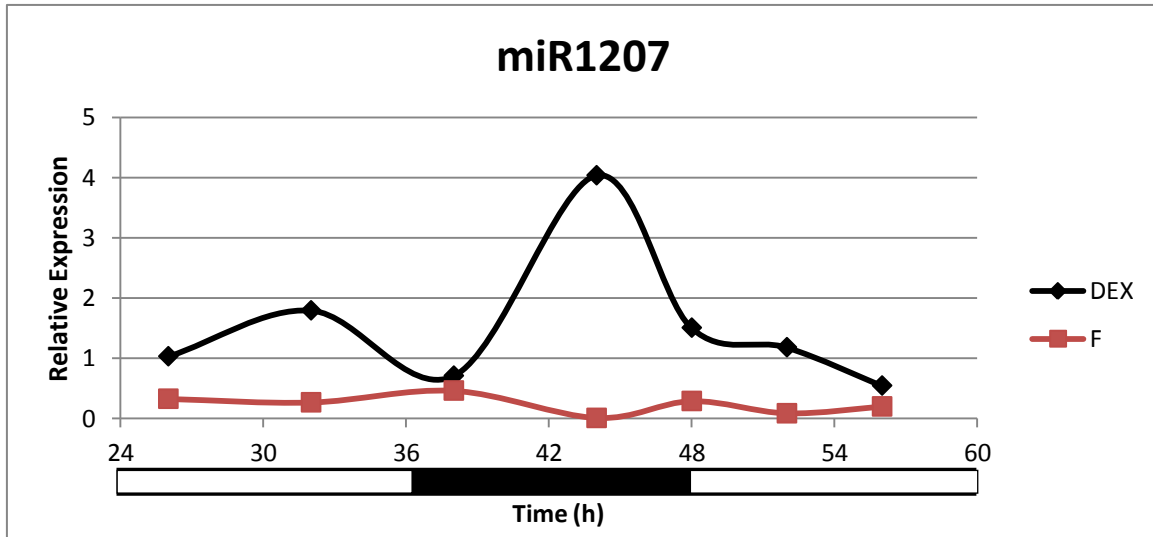
Γράφημα 6: Έκφραση του γονιδίου pri-miR1207 σε συγχρονισμένα κύτταρα HEK293T. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR. Η καμπύλη DEX αντιστοιχεί στα σχετικά επίπεδα mRNA του *pri-miR1207* και η ταλάντωση των δειγμάτων που είναι συγχρονισμένα ως προς το κirkάδιο ρολόι (μετά από κανονικοποίηση τους ως προς τα δείγματα με το DMSO). Το F αντιπροσωπεύει τα αντίστοιχα επίπεδα για τα ασυγχρόνιστα κύτταρα. Οι σκιασμένες με λευκό χρώμα περιοχές αντιστοιχούν στις ώρες της ημέρας ενώ οι σκιασμένες με μαύρο το τι συμβαίνει κατά τη διάρκεια της νύκτας.

Στη συνέχεια εξετάστηκε το προφίλ έκφρασης του πρώιμου pri-miR1207 και παρόλο που στην βιβλιογραφία δεν αναγράφεται κάποια συσχέτιση του μορίου αυτού με το κirkάδιο ρολόι παρατηρείται μια πολύ έντονη ταλάντωση με τις μέγιστες κορυφές να εμφανίζονται νωρίς τη νύκτα, και πιο συγκεκριμένα 38 ώρες μετά την επώαση με την DEX, καθώς επίσης και στις 48 ώρες στην αλλαγή από νύκτα σε μέρα. Η περίοδος του στηριζόμενοι στις μέχρι τώρα αποστάσεις των μέγιστων και των ελάχιστων επιπέδων έκφρασης φαίνεται να προσεγγίζει τις 10 ώρες.

## Έκφραση miR-1207



Εικόνα 19: Έκφραση του γονιδίου miR1207 σε συγχρονισμένα κύτταρα HEK293T. Διαγράμματα ενίσχυσης (Amplification curves): α) χρονικά σημεία 26-32-38-44, β) χρονικό σημείο 48, γ) χρονικά σημεία 52-56. Με μπλε χρώμα, απεικονίζονται τα δείγματα για το γονίδιο *miR1207*, ενώ οι καμπύλες με το κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στο *U6* που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας.



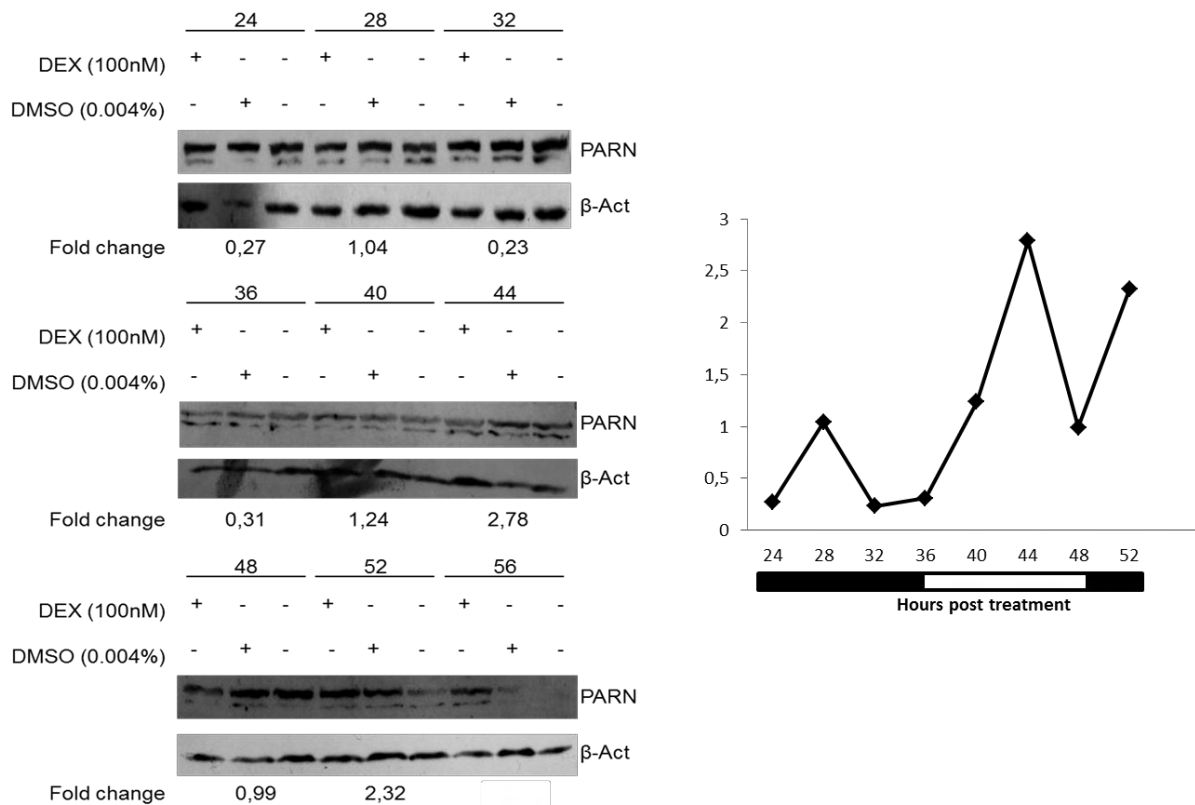
Γράφημα 7: Έκφραση του γονιδίου miR1207 σε συγχρονισμένα κύτταρα HEK293T. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR. Η καμπύλη DEX αντιστοιχεί στα σχετικά επίπεδα mRNA του *miR1207* και η ταλάντωση των δειγμάτων που είναι συγχρονισμένα ως προς το κικκάδιο ρολόι (μετά από κανονικοποίηση τους ως προς τα δείγματα με το DMSO). Το F αντιπροσωπεύει τα αντίστοιχα επίπεδα για τα ασυγχρόνιστα κύτταρα. Οι σκιασμένες με λευκό χρώμα περιοχές αντιστοιχούν στις ώρες της ημέρας ενώ οι σκιασμένες με μαύρο το τι συμβαίνει κατά τη διάρκεια της νύκτας.

Τέλος, μέσω RT-PCR μελετήθηκε και το ώριμο miR1207, για το οποία επίσης δεν υπάρχει κάποια προϋπάρχουσα αναφορά που να υποδηλώνει την εμπλοκή του ή την επίδραση του κικκάδιου ρολογιού στα επίπεδα έκφρασης του. Όπως παρατηρείται στην περίπτωση του πρώιμου miR1207, έτσι και στο ώριμο η ταλάντωση είναι αρκετά έντονη με τα μέγιστα επίπεδα να εκδηλώνονται κατά τη διάρκεια της νύκτας (44 ώρες μετά την επώαση με τη DEX), ενώ αρκετά διακριτή είναι και μία κορυφή κοντά στο τέλος της φωτοπεριόδου (32 ώρες μετά την επώαση με τη DEX). Παρατηρούμε λοιπόν, ότι και σε αυτήν την περίπτωση το προφίλ έκφρασης

της πρόωμης και της ώριμης μορφής δεν ταυτίζονται, με τις χρονικές στιγμές που το ένα βρίσκεται σε μέγιστα επίπεδα το άλλο να εντοπίζεται σε πολύ χαμηλά.

### 4.3. Έλεγχος της κερκάδιας παραγωγής την PARN και της NOC σε επίπεδο πρωτεΐνης

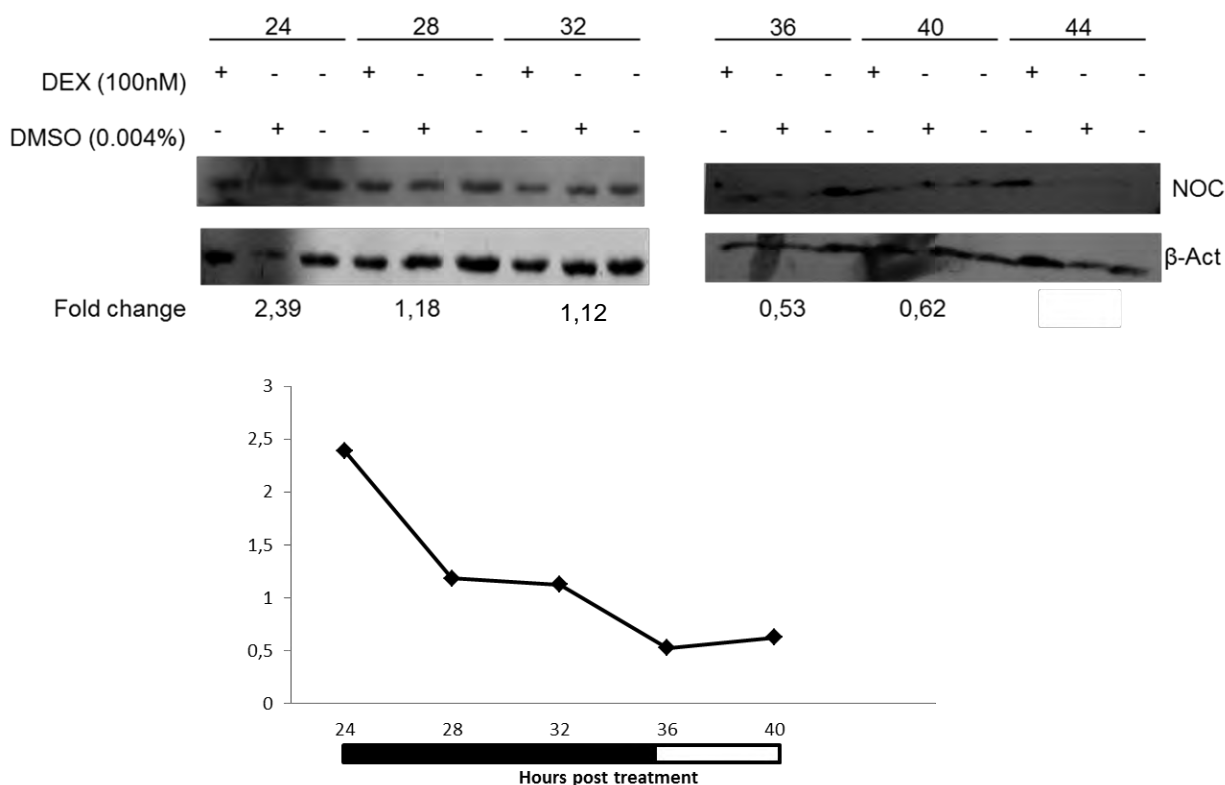
Το πρότυπο έκφρασης της PARN και την NOC μελετήθηκε και σε πρωτεϊνικό επίπεδο μετά από ηλεκτρομεταφορά του ολικού εκχυλίσματος των πρωτεϊνών και από τις τρεις ομάδες κυττάρων (ZT,D,F) από πηκτή πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη PVDF και επακόλουθη ανοσοανίχνευση με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων.



Εικόνα20: Η PARN εκδηλώνει κερκάδια παραγωγή σε επίπεδο πρωτεΐνης. α) Ακτινογραφικά φιλμ ανοσοανίχνευσης όπου φαίνεται η παραγωγή της PARN σε ένα χρονικό διάστημα 24 έως 56 ωρών μετά από την επώαση με τη DEX και στους τρεις κυτταρικού πληθυσμούς σε σύγκριση με τα επίπεδα της ακτίνης. Η ζώνη της PARN αντιστοιχεί στα 74kDa ενώ της ακτίνης στα 43kDa. Τα +/- υποδεικνύουν ποια συνθήκη πληρείται και επομένως ποια ζώνη αντιστοιχεί σε ποιον κυτταρικό πληθυσμό. β) Σχηματική απεικόνιση της παραγωγής της PARN μετά από ποσοτικοποίηση και κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοανίχνευσης. Οι τιμές που χρησιμοποιήθηκαν αντιστοιχούν στην επί της % αύξηση της παραγωγής της PARN στα κύτταρα που επώαστηκαν με DEX σε σχέση με τον πληθυσμό που επώαστηκε με DMSO και κατόπιν με τον ασυγχρόνιστο πληθυσμό και αναγράφονται ως fold change στο αριστερά μέρος της εικόνας στο κάτω μέρος των φιλμ.

Η εικόνα της ανοσοανίχνευσης υποδεικνύει ότι η απαδενυλάση PARN, εκτός από ρυθμικά επίπεδα mRNA φαίνεται να παρουσιάζει κάποια ρυθμικότητα και σε επίπεδο πρωτεΐνης με περίοδο που φαίνεται να προσεγγίζει τις 16 ώρες καθώς η μέγιστη παραγωγή παρατηρείται 28, 44 και 52 ώρες μετά την επώαση με τη DEX και η ελάχιστη 32 και 48 ώρες μετά την επώαση με τη DEX. Οι χρονικές αυτές στιγμές δεν ταυτίζονται με τις κορυφές των μέγιστων και των ελάχιστων τιμών των επιπέδων του mRNA (μέγιστα: 24,36 και 48 ώρες μετά την επώαση με τη DEX, ελάχιστα: 32,36 και 56 ώρες μετά την επώαση). Ωστόσο, η διαφορά φάσης μεταξύ μεταγράφων και πρωτεϊνών παρατηρείται. Για το δείγμα των 56 ωρών μετά την επώαση με τη DEX μόνο η ομάδα ZT έδωσε διακριτή ζώνη κατά την ανοσοανίχνευση και επομένως δεν ήταν δυνατή η ποσοτικοποίηση.





Εικόνα21: Κιρκάδια έκφραση της NOC. α) Ακτινογραφικά φιλμ ανοσοανίχνευσης όπου φαίνεται η παραγωγή της NOC σε ένα χρονικό διάστημα 24 έως 44 ωρών μετά από την επώαση με τη DEX και στους τρεις κυτταρικού πληθυσμούς σε σύγκριση με τα επίπεδα της ακτίνης. Η ζώνη της NOC αντιστοιχεί στα 40kDa ενώ της ακτίνης στα 43kDa. Τα +/- υποδεικνύουν ποια συνθήκη πληρείται και επομένως ποια ζώνη αντιστοιχεί σε ποιον κυτταρικό πληθυσμό. β) Σχηματική απεικόνιση της παραγωγής της NOC μετά από ποσοτικοποίηση και κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοανίχνευσης. Οι τιμές που χρησιμοποιήθηκαν αντιστοιχούν στην επί της % αύξηση της παραγωγής της NOC στα κύτταρα που επώαστηκαν με DEX σε σχέση με τον πληθυσμό που επώαστηκε με DMSO και κατόπιν με τον ασυγχρόνιστο πληθυσμό και αναγράφονται ως fold change στο πάνω μέρος της εικόνας στο κάτω μέρος των φιλμ.

Το προφίλ των πρωτεϊνικών επιπέδων της NOC επαληθεύει επίσης τη βιβλιογραφία όπως παρατηρήσαμε και για τα επίπεδα του mRNA. Και σε αυτή την περίπτωση λοιπόν φαίνεται μια αύξηση σε σχέση με τον ασυγχρόνιστο πληθυσμό νωρίς τη νύκτα (24 ώρες μετά την επώαση με τη DEX). Αν και τα επίπεδα της φαίνεται να πέφτουν κατά τη διάρκεια της νύκτας παραμένουν παραμένουν υψηλότερα από αυτά που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της ημέρας. Για το δείγμα των 44 ωρών μετά την επώαση με τη DEX μόνο η ομάδα ZT έδωσε διακριτή ζώνη κατά την ανοσοανίχνευση και επομένως δεν ήταν δυνατή η ποσοτικοποίηση, ενώ προς την κατεύθυνση αυτή εξετάστηκαν και τα χρονικά σημεία 48, 52, 56 ωρών, για να δούμε τι συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ημέρας, ωστόσο τα αποτελέσματα στο ακτινογραφικό φιλμ δεν ήταν διακριτά σε βαθμό που να μπορεί να γίνει ποσοτικοποίηση.

Επίσης, εξετάστηκαν τα επίπεδα των παραγόντων *Bmal1*, *Cry1* και *Per2*. Όμως τα αποτελέσματα δεν μας έδειξαν ξεκάθαρη εικόνα, πιθανόν διότι συνθήκες με τις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι διαδικασίες της SDS-PAGE, της ηλεκτρομεταφοράς και της υβριδοποίησης αντισώματος πρωτεΐνης να μην ήταν οι βέλτιστες, οπότε δεν είμαστε σε θέση να εξάγουμε οποιοδήποτε συμπέρασμα γι'αυτούς. Κατά συνέπεια, τα δεδομένα αυτά δεν περιλαμβάνονται στα αποτελέσματα.

Η παρατήρηση πως η PARN εκδηλώνει περιοδική έκφραση σε επίπεδο πρωτεΐνης σε κύτταρα HEK293T χρήζει σχολιασμού. Όπως αναφέρθηκε, η PARN δεν φαινόταν να έχει περιοδική έκφραση σε επίπεδο πρωτεΐνης. Αυτή η παρατήρηση αναφέρθηκε σε εργασία όπου περιέγραφε πως η Nocturnin δρα ως απαδενυλάση και μελετούσε την κιρκάδια παραγωγή της σε επίπεδο πρωτεΐνης σε κύτταρα από αμφιβληστροειδή χιτώνα βατράχου [88], όπου η PARN χρησιμοποιήθηκε ως μια απαδενυλάση που δεν αναμενόταν να έχει κιρκάδια έκφραση. Όμως, αργότερα δείχθηκε από την ίδια ερευνητική ομάδα πως επίπεδα του mRNA της PARN ταλαντώνονται ρυθμικά σε κύτταρα ποντικού στη διάρκεια της ημέρας [63]. Επιπλέον, δεδομένα της βιβλιογραφίας δείχνουν η PARN αποσταθεροποιεί το miR-122, ενώ το pri-miR-122

εκδηλώνει περιοδική έκφραση. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν πως η PARN εκδηλώνει περιοδική έκφραση σε κύτταρα θηλαστικών. Επιπλέον, miRNA που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων της, όπως το miR-29a και το miR-1207, επίσης εκδηλώνουν κιρκάδια έκφραση. Οι φάσεις που εκδηλώνουν μέγιστα επίπεδα τόσο των δύο miRNA όσο και της PARN φαίνεται να συμβαδίζουν, γεγονός που θα μπορούσε να δείχνει τη συνεργασία τους για την αποσταθεροποίηση RNA που σχετίζονται με τον κιρκάδιο ρυθμό. Περαιτέρω μελέτες, όπως ανοσοκατακρήμνιση RNA ή προσδιορισμού του χρόνου ζωής κιρκάδιων RNA όταν διαταράσσεται η έκφραση των miRNA και της PARN θα μπορούσαν να δώσουν απαντήσεις σε αυτά τα ερωτήματα. Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν πως η PARN πιθανόν έχει ρόλο σε ένα ανεξερεύνητο πεδίο δράσης της, αυτό της κιρκάδιας γονιδιακής έκφρασης, και ανοίγουν το δρόμο για την σε βάθος εξέταση των μηχανισμών ρύθμισης της από τα miRNA στον κιρκάδιο ρυθμό.

1. Buhr, E.D. and J.S. Takahashi, *Molecular components of the Mammalian circadian clock*. Handb Exp Pharmacol, 2013(217): p. 3-27.
2. Lowrey, P.L. and J.S. Takahashi, *Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms*. Adv Genet, 2011. **74**: p. 175-230.
3. Delis, C., et al., *AtHESPERIN: a novel regulator of circadian rhythms with poly(A)-degrading activity in plants*. RNA Biol, 2016. **13**(1): p. 68-82.
4. Pett, J.P., et al., *Feedback Loops of the Mammalian Circadian Clock Constitute Repressilator*. PLoS Comput Biol, 2016. **12**(12): p. e1005266.
5. Liu, S., et al., *Chronobiological analysis of circadian patterns in transcription of seven key clock genes in six peripheral tissues in mice*. Chronobiol Int, 2007. **24**(5): p. 793-820.
6. Mohawk, J.A., C.B. Green, and J.S. Takahashi, *Central and peripheral circadian clocks in mammals*. Annu Rev Neurosci, 2012. **35**: p. 445-62.
7. Ko, C.H., et al., *Emergence of noise-induced oscillations in the central circadian pacemaker*. PLoS Biol, 2010. **8**(10): p. e1000513.
8. Herzog, E.D., *Neurons and networks in daily rhythms*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(10): p. 790-802.
9. Berson, D.M., F.A. Dunn, and M. Takao, *Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock*. Science, 2002. **295**(5557): p. 1070-3.
10. Guler, A.D., et al., *Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 102-5.
11. Chen, S.K., T.C. Badea, and S. Hattar, *Photoentrainment and pupillary light reflex are mediated by distinct populations of ipRGCs*. Nature, 2011. **476**(7358): p. 92-5.
12. Stratmann, M. and U. Schibler, *Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators*. J Biol Rhythms, 2006. **21**(6): p. 494-506.
13. Brown, S.A. and A. Azzi, *Peripheral circadian oscillators in mammals*. Handb Exp Pharmacol, 2013(217): p. 45-66.
14. Nagoshi, E., et al., *Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells*. Cell, 2004. **119**(5): p. 693-705.
15. Welsh, D.K., et al., *Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression*. Curr Biol, 2004. **14**(24): p. 2289-95.
16. Vitaterna, M.H., J.S. Takahashi, and F.W. Turek, *Overview of circadian rhythms*. Alcohol Res Health, 2001. **25**(2): p. 85-93.
17. Yamazaki, S., et al., *Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats*. Science, 2000. **288**(5466): p. 682-5.
18. Brunner, M. and T. Schafmeier, *Transcriptional and post-transcriptional regulation of the circadian clock of cyanobacteria and Neurospora*. Genes Dev, 2006. **20**(9): p. 1061-74.
19. Henriques, R. and P. Mas, *Chromatin remodeling and alternative splicing: pre- and post-transcriptional regulation of the Arabidopsis circadian clock*. Semin Cell Dev Biol, 2013. **24**(5): p. 399-406.
20. Beta, R.A.A. and N.A.A. Balatsos, *Tales around the clock: Poly(A) tails in circadian gene expression*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2018: p. e1484.
21. Lee, J., et al., *Identification of a novel circadian clock modulator controlling BMAL1 expression through a ROR/REV-ERB-response element-dependent mechanism*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **469**(3): p. 580-6.
22. Gekakis, N., et al., *Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism*. Science, 1998. **280**(5369): p. 1564-9.
23. Griffin, E.A., Jr., D. Staknis, and C.J. Weitz, *Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock*. Science, 1999. **286**(5440): p. 768-71.
24. Sangoram, A.M., et al., *Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription*. Neuron, 1998. **21**(5): p. 1101-13.
25. Doi, M., J. Hirayama, and P. Sassone-Corsi, *Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase*. Cell, 2006. **125**(3): p. 497-508.

26. Rutter, J., et al., *Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors*. Science, 2001. **293**(5529): p. 510-4.
27. Marcheva, B., et al., *Circadian clocks and metabolism*. Handb Exp Pharmacol, 2013(217): p. 127-55.
28. Camacho, F., et al., *Human casein kinase Idelta phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2*. FEBS Lett, 2001. **489**(2-3): p. 159-65.
29. Eide, E.J., et al., *Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(7): p. 2795-807.
30. Siepka, S.M., et al., *Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression*. Cell, 2007. **129**(5): p. 1011-23.
31. Lamia, K.A., et al., *AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation*. Science, 2009. **326**(5951): p. 437-40.
32. Kurabayashi, N., et al., *DYRK1A and glycogen synthase kinase 3beta, a dual-kinase mechanism directing proteasomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(7): p. 1757-68.
33. Guillaumond, F., et al., *Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors*. J Biol Rhythms, 2005. **20**(5): p. 391-403.
34. Preitner, N., et al., *The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator*. Cell, 2002. **110**(2): p. 251-60.
35. Sato, T.K., et al., *A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock*. Neuron, 2004. **43**(4): p. 527-37.
36. Chen, L. and G. Yang, *Recent advances in circadian rhythms in cardiovascular system*. Front Pharmacol, 2015. **6**: p. 71.
37. Ukai-Tadenuma, M., et al., *Delay in feedback repression by cryptochrome 1 is required for circadian clock function*. Cell, 2011. **144**(2): p. 268-81.
38. Luo, A.H. and G. Aston-Jones, *Circuit projection from suprachiasmatic nucleus to ventral tegmental area: a novel circadian output pathway*. Eur J Neurosci, 2009. **29**(4): p. 748-60.
39. Ederly, I., J.E. Rutila, and M. Rosbash, *Phase shifting of the circadian clock by induction of the Drosophila period protein*. Science, 1994. **263**(5144): p. 237-40.
40. Albrecht, U., et al., *A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light*. Cell, 1997. **91**(7): p. 1055-64.
41. Shearman, L.P., et al., *Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei*. Neuron, 1997. **19**(6): p. 1261-9.
42. Shigeyoshi, Y., et al., *Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript*. Cell, 1997. **91**(7): p. 1043-53.
43. Yan, L. and R. Silver, *Resetting the brain clock: time course and localization of mPER1 and mPER2 protein expression in suprachiasmatic nuclei during phase shifts*. Eur J Neurosci, 2004. **19**(4): p. 1105-9.
44. Travnickova-Bendova, Z., et al., *Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7728-33.
45. Gallego, M. and D.M. Virshup, *Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(2): p. 139-48.
46. Dudek, M. and Q.J. Meng, *Running on time: the role of circadian clocks in the musculoskeletal system*. Biochem J, 2014. **463**(1): p. 1-8.
47. Dickmeis, T., *Glucocorticoids and the circadian clock*. J Endocrinol, 2009. **200**(1): p. 3-22.
48. Kaneko, M., N. Hernandez-Borsetti, and G.M. Cahill, *Diversity of zebrafish peripheral oscillators revealed by luciferase reporting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(39): p. 14614-9.
49. Oster, H., et al., *The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock*. Cell Metab, 2006. **4**(2): p. 163-73.
50. Oster, H., et al., *Transcriptional profiling in the adrenal gland reveals circadian regulation of hormone biosynthesis genes and nucleosome assembly genes*. J Biol Rhythms, 2006. **21**(5): p. 350-61.
51. Reddy, A.B., et al., *Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome*. Hepatology, 2007. **45**(6): p. 1478-88.
52. Irvine, C.H. and S.L. Alexander, *Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse*. Domest Anim Endocrinol, 1994. **11**(2): p. 227-38.
53. Jacobson, L., *Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis regulation*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2005. **34**(2): p. 271-92, vii.

54. Watts, A.G., S. Tanimura, and G. Sanchez-Watts, *Corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin gene transcription in the hypothalamic paraventricular nucleus of unstressed rats: daily rhythms and their interactions with corticosterone*. *Endocrinology*, 2004. **145**(2): p. 529-40.
55. Oakley, R.H. and J.A. Cidlowski, *The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease*. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. **132**(5): p. 1033-44.
56. de Kloet, E.R., *Hormones, brain and stress*. *Endocr Regul*, 2003. **37**(2): p. 51-68.
57. Kino, T. and G.P. Chrousos, *Glucocorticoid and mineralocorticoid resistance/hypersensitivity syndromes*. *J Endocrinol*, 2001. **169**(3): p. 437-45.
58. Radic, R., et al., *Circadian rhythm of blood leptin level in obese and non-obese people*. *Coll Antropol*, 2003. **27**(2): p. 555-61.
59. Kino, T., *Glucocorticoid Receptor*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
60. Yamamoto, T., et al., *Acute physical stress elevates mouse period1 mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(51): p. 42036-43.
61. So, A.Y., et al., *Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(41): p. 17582-7.
62. Torra, I.P., et al., *Circadian and glucocorticoid regulation of Rev-erbalpha expression in liver*. *Endocrinology*, 2000. **141**(10): p. 3799-806.
63. Kojima, S., E.L. Sher-Chen, and C.B. Green, *Circadian control of mRNA polyadenylation dynamics regulates rhythmic protein expression*. *Genes Dev*, 2012. **26**(24): p. 2724-36.
64. Goldstrohm, A.C. and M. Wickens, *Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(4): p. 337-44.
65. Hammet, A., B.L. Pike, and J. Heierhorst, *Posttranscriptional regulation of the RAD5 DNA repair gene by the Dun1 kinase and the Pan2-Pan3 poly(A)-nuclease complex contributes to survival of replication blocks*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(25): p. 22469-74.
66. Kadyrova, L.Y., et al., *Translational control of maternal Cyclin B mRNA by Nanos in the Drosophila germline*. *Development*, 2007. **134**(8): p. 1519-27.
67. Parker, R. and H. Song, *The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover*. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. **11**(2): p. 121-7.
68. Stubblefield, J.J., J. Terrien, and C.B. Green, *Nocturnin: at the crossroads of clocks and metabolism*. *Trends Endocrinol Metab*, 2012. **23**(7): p. 326-33.
69. Beta, R.A. and N.A. Balatsos, *Tales around the clock: poly(A) tails in circadian gene expression* *WIREs RNA*, 2018(in press).
70. Chang, J., et al., *miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1*. *RNA Biol*, 2004. **1**(2): p. 106-13.
71. Kojima, S., et al., *MicroRNA-122 modulates the rhythmic expression profile of the circadian deadenylase Nocturnin in mouse liver*. *PLoS One*, 2010. **5**(6): p. e11264.
72. Katoh, T., et al., *Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2*. *Genes Dev*, 2009. **23**(4): p. 433-8.
73. Katoh, T., H. Hojo, and T. Suzuki, *Destabilization of microRNAs in human cells by 3' deadenylation mediated by PARN and CUGBP1*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(15): p. 7521-34.
74. Dehlin, E., et al., *Cap-dependent deadenylation of mRNA*. *EMBO J*, 2000. **19**(5): p. 1079-86.
75. Gao, M., et al., *Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro*. *Mol Cell*, 2000. **5**(3): p. 479-88.
76. Martinez, J., et al., *The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(30): p. 27923-9.
77. Balatsos, N.A., et al., *Modulation of poly(A)-specific ribonuclease (PARN): current knowledge and perspectives*. *Curr Med Chem*, 2012. **19**(28): p. 4838-49.
78. Ren, Y.G., J. Martinez, and A. Virtanen, *Identification of the active site of poly(A)-specific ribonuclease by site-directed mutagenesis and Fe(2+)-mediated cleavage*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(8): p. 5982-7.
79. Ren, Y.G., L.A. Kirsebom, and A. Virtanen, *Coordination of divalent metal ions in the active site of poly(A)-specific ribonuclease*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(47): p. 48702-6.
80. Godwin, A.R., et al., *Kiss your tail goodbye: the role of PARN, Nocturnin, and Angel deadenylases in mRNA biology*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1829**(6-7): p. 571-9.
81. Wu, M., et al., *Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN*. *EMBO J*, 2005. **24**(23): p. 4082-93.

82. Niedzwiecka, A., et al., *Molecular recognition of mRNA 5' cap by 3' poly(A)-specific ribonuclease (PARN) differs from interactions known for other cap-binding proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1864**(4): p. 331-45.
83. Copeland, P.R. and M. Wormington, *The mechanism and regulation of deadenylation: identification and characterization of Xenopus PARN*. *RNA*, 2001. **7**(6): p. 875-86.
84. Balatsos, N.A., et al., *Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC)*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(7): p. 4517-22.
85. Chen, C.Y., et al., *AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs*. *Cell*, 2001. **107**(4): p. 451-64.
86. Lai, W.S., E.A. Kennington, and P.J. Blackshear, *Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(11): p. 3798-812.
87. Green, C.B., *Molecular control of Xenopus retinal circadian rhythms*. *J Neuroendocrinol*, 2003. **15**(4): p. 350-4.
88. Baggs, J.E. and C.B. Green, *Nocturnin, a deadenylase in Xenopus laevis retina: a mechanism for posttranscriptional control of circadian-related mRNA*. *Curr Biol*, 2003. **13**(3): p. 189-98.
89. Garbarino-Pico, E., et al., *Immediate early response of the circadian polyA ribonuclease nocturnin to two extracellular stimuli*. *RNA*, 2007. **13**(5): p. 745-55.
90. Meyer, S., C. Temme, and E. Wahle, *Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2004. **39**(4): p. 197-216.
91. Lau, N.C., et al., *Human Ccr4-Not complexes contain variable deadenylase subunits*. *Biochem J*, 2009. **422**(3): p. 443-53.
92. Wang, Y., et al., *Rhythmic expression of Nocturnin mRNA in multiple tissues of the mouse*. *BMC Dev Biol*, 2001. **1**: p. 9.
93. Green, C.B. and J.C. Besharse, *Identification of a novel vertebrate circadian clock-regulated gene encoding the protein nocturnin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(25): p. 14884-8.
94. Ciarleglio, C.M., et al., *Genetic differences in human circadian clock genes among worldwide populations*. *J Biol Rhythms*, 2008. **23**(4): p. 330-40.
95. Hammond, S.M., *An overview of microRNAs*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015. **87**: p. 3-14.
96. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. *Science*, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
97. Kim, Y.K., B. Kim, and V.N. Kim, *Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(13): p. E1881-9.
98. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(8): p. 509-24.
99. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. *Nature*, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
100. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. *Nature*, 2004. **432**(7014): p. 231-5.
101. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. *Nature*, 2004. **432**(7014): p. 235-40.
102. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing*. *Genes Dev*, 2004. **18**(24): p. 3016-27.
103. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. *Genes Dev*, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
104. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. *Science*, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
105. Bohnsack, M.T., K. Czaplinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. *RNA*, 2004. **10**(2): p. 185-91.
106. Yang, W., et al., *Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases*. *Nat Struct Mol Biol*, 2006. **13**(1): p. 13-21.
107. Kato, M., L. Arce, and R. Natarajan, *MicroRNAs and their role in progressive kidney diseases*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009. **4**(7): p. 1255-66.
108. Berezikov, E., et al., *Mammalian mirtron genes*. *Mol Cell*, 2007. **28**(2): p. 328-36.
109. Ruby, J.G., C.H. Jan, and D.P. Bartel, *Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing*. *Nature*, 2007. **448**(7149): p. 83-6.
110. Castellano, L. and J. Stebbing, *Deep sequencing of small RNAs identifies canonical and non-canonical miRNA and endogenous siRNAs in mammalian somatic tissues*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(5): p. 3339-51.

111. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 740-4.
112. Lewis, B.P., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell, 2003. **115**(7): p. 787-98.
113. Xu, S., et al., *MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster*. J Biol Chem, 2007. **282**(34): p. 25053-66.
114. Mehta, N. and H.Y. Cheng, *Micro-managing the circadian clock: The role of microRNAs in biological timekeeping*. J Mol Biol, 2013. **425**(19): p. 3609-24.
115. Han, S., et al., *Rhythmic expression of adenylyl cyclase VI contributes to the differential regulation of serotonin N-acetyltransferase by bradykinin in rat pineal glands*. J Biol Chem, 2005. **280**(46): p. 38228-34.
116. Cheng, H.Y., et al., *microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment*. Neuron, 2007. **54**(5): p. 813-29.
117. Chen, R., M. D'Alessandro, and C. Lee, *miRNAs are required for generating a time delay critical for the circadian oscillator*. Curr Biol, 2013. **23**(20): p. 1959-68.
118. Yoo, S.H., et al., *Period2 3'-UTR and microRNA-24 regulate circadian rhythms by repressing PERIOD2 protein accumulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(42): p. E8855-E8864.
119. Wang, H., et al., *Oscillating primary transcripts harbor miRNAs with circadian functions*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 21598.
120. Kriegel, A.J., D. Mladinov, and M. Liang, *Translational study of microRNAs and its application in kidney disease and hypertension research*. Clin Sci (Lond), 2012. **122**(10): p. 439-47.
121. Das, D.K., et al., *miR-1207-3p regulates the androgen receptor in prostate cancer via FNDC1/fibronectin*. Exp Cell Res, 2016. **348**(2): p. 190-200.
122. Dang, W., et al., *miR-1207-5p suppresses lung cancer growth and metastasis by targeting CSF1*. Oncotarget, 2016. **7**(22): p. 32421-32.
123. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
124. Σκουτέλις Ντ. «ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟ ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΩΝ ΚΑΙ microRNAs ΣΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ mRNAs». 2013. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
125. Kyritsis A, Scutelnic D, Vescovo V, Moutopoulou P, Stravocephalou V, Samiotaki M, Panayotou G, Denti MA, Balatsos NAA. «Poly(A)-specific ribonuclease regulates the biogenesis of a subset of microRNAs”. Υπό συγγραφή.