



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ  
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,  
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Καραγγέλη Κ. Μαρία

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ  
ΠΟΛΥ(Α) ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ (PARN)  
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ



ΛΑΡΙΣΑ 2010



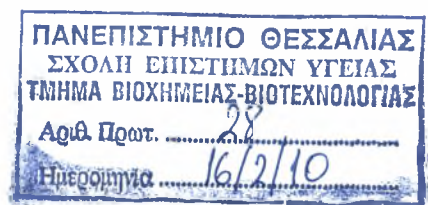
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 8121/1  
Ημερ. Εισ.: 12-03-2010  
Δωρεά:  
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ  
572.88  
ΚΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087129



Μελέτη  
της έκφρασης της πολυ(Α)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN)  
σε ασθενείς με λευχαιμία

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλη τριμελής επιτροπής:

- Νικόλαος Μπαλατσός, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Κομιώτης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ τον Θεό που μου έδωσε για μία ακόμη φορά την ευκαιρία και την δυνατότητα. Ευχαριστώ τους γονείς μου που πάντα με στηρίζουν σε ότι και αν κάνω με ανεκτικότητα και αγάπη. Ευχαριστώ τον κ. Ν. Μπαλατσό που υπήρξε πολύτιμος δάσκαλος και καθοδηγητής κάθε φορά που αντιμετώπιζα δυσκολίες και εμπόδια. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Σαλατάι Άντα η οποία ασχολήθηκε με την λήψη ορού και την απομόνωση κυττάρων από τα δείγματα ασθενών με λευχαιμίες. Ευχαριστώ όλους εκείνους τους ανθρώπους με τους οποίους ήρθα σε συνεργασία στο διάστημα της διεκπεραίωσης αυτής της όμορφης εργασίας.

Εικόνα εξώφυλλου : κρυσταλλική δομή της αποαδενυλάσης PARN  
(Wu et al.(2005).EMBO J., 1-12)

Καραγγέλη Μαρία

Email : mkar\_2001@yahoo.com

τηλ. : 6978944962

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### 1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 2.1. Η σταθερότητα του mRNA

##### 2.1.1. Τα cis στοιχεία της σταθερότητας του mRNA

##### 2.1.2. Οι trans παράγοντες σταθερότητας του mRNA

2.1.2.1. Πρωτεΐνες που συνδέονται με το mRNA και που το προστατεύουν από την αποικοδόμηση.

2.1.2.2. Επιδράσεις ορμονών, αυξητικών παραγόντων και ιόντων στην σταθερότητα του mRNA

##### 2.1.2.3. Σταθερότητα mRNA και μετάφραση

##### 2.1.3. Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA

2.1.4. Ο ρόλος των αποαδενυλασών στον έλεγχο της μετάφρασης και της σταθερότητας των mRNAs.

#### 2.2. Δομή και δραστηριότητα της PARN

#### 2.3. Σταθερότητα mRNA και καρκίνος – λευχαιμία

##### 2.3.1. Καρκινικοί δείκτες – δείκτες κινδύνου

##### 2.3.2. Πώς χρησιμοποιούνται, πώς και πότε μετρούνται οι καρκινικοί δείκτες

##### 2.3.3. Τι έρευνα έχει γίνει πάνω σε αυτό το πεδίο

##### 2.3.4. Χαρακτηριστικά ενός ιδανικού δείκτη νεοπλασίας

##### 2.3.5. Η ιστορία των καρκινικών δεικτών

##### 2.3.6. Λευχαιμία

##### 2.3.7 Πολύ(A) ουρά και καρκίνος

##### 2.3.8 Ο ρόλος των ριβονουκλεασών στον καρκίνο

##### 2.3.9 Ο ρόλος της PARN στην βιογένεση του καρκίνου

### 3. Σκοπός

### 4. Υλικά και Μέθοδοι

#### 4.1. Υλικά -Χημικά

#### 4.2. Μέθοδοι

##### 4.2.1. Bradford Protein Assay

4.2.2. Λήψη ορού και απομόνωση κυττάρων από τα δείγματα ασθενών με λευχαιμίες

4.2.3. Λύση των κυττάρων των δειγμάτων με κότταρα από μυελό των οστών

4.2.4. *TCA precipitation protocol* (κατακρήμνιση πρωτεΐνης)

4.2.5. Ανίχνευση πρωτεϊνών με *Western blot*

4.2.6. Απομόνωση ολικού RNA

4.2.7. *PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse transcription-PCR, RT-PCR), quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)*

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1. Ανίχνευση *PARN* σε ορούς ασθενών με λευχαιμίες.

5.2. Ανίχνευση της αποαδενύλασης *PARN* σε δείγματα με κότταρα από μυελό των οστών σε ασθενείς με λευχαιμίες.

5.3. Επίπεδα έκφρασης *mRNA PARN* με *quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)*

5.4. Μελέτη της έκφρασης της αποαδενύλασης *PARN* σε ορούς ασθενών με λευχαιμίες με την επίδραση της αλκαλικής φωσφατάσης.

## 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**ΕΙΚΟΝΕΣ – ΠΙΝΑΚΕΣ**

Εικόνα 1 : 5' κάλυμμα – 3' πολύ (A) ουρά mRNA

Εικόνα 2 : Οι τροποποιήσεις των άκρων του mRNA το προστατεύουν από την αποικοδόμηση. Εσωτερικές αλληλουχίες μπορεί να ενεργοποιήσουν τα συστήματα αποικοδόμησης.

Εικόνα 3 : Τα *cis*-δραστικά στοιχεία του mRNA

Εικόνα 4 : (I) Μια αλληλουχία ARE στην 3' UTR προκαλεί την αποικοδόμηση του mRNA (II) Μια αλληλουχία IRE στην 3' UTR προκαλεί την αποικοδόμηση του mRNA.

Εικόνα 5 : Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA [68]

Εικόνα 6 : Κρυσταλλική δομή της PARN [40]

Εικόνα 7 : Η λευχαιμία χαρακτηρίζεται από ανώμαλο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του αίματος, συνήθως των λευκοκυττάρων [<http://www.meds.com>]

Εικόνα 8 : Τροποποιημένος μετα-μεταγραφικός έλεγχος στον καρκίνο [66]

Εικόνα 9: Διαχωριστική φυγοκέντρηση για απομόνωση λεμφοκυττάρων

Εικόνα 10 : Απεικόνιση της μεθόδου western blot

Εικόνα 11 : Μεταβολή της έκφρασης της αποαδενύλασης PARN σε φυσιολογικά άτομα (C) και σε ασθενή (A) με λευχαιμία.

Εικόνα 12 : Μεταβολή της έκφρασης της αποαδενύλασης PARN σε φυσιολογικά άτομα (C) και σε ασθενή (A) με λευχαιμία.

Εικόνα 13 : Μεταβολή της έκφρασης της αποαδενύλασης PARN σε φυσιολογικά άτομα (C) και σε ασθενή (A) με λευχαιμία.

Εικόνα 14 : Μεταβολή της έκφρασης της PARN σε φυσιολογικά άτομα (C) και σε ασθενή (A) με λευχαιμία.

Εικόνα 15: Ανοσοαποτύπωμα με αντίσωμα έναντι της PARN δειγμάτων μυελού οστών σε ασθενείς με λευχαιμία (I). Ο έλεγχος του φορτώματος έγινε με λαμίνη A/C ως μάρτυρα (II).

Εικόνα 16 : Έκφραση της αποαδενύλασης PARN σε ασθενείς με λευχαιμία

Εικόνα 17 : Διάγραμμα διάστασης (dissociation plot). Επίπεδα mRNA της PARN (επίπεδα φθορισμού με χρωστική SYBR Green) σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Τα ειδικά προϊόντα της RT-PCR αναμένονται σε  $T_m > 78^{\circ}\text{C}$ .

Εικόνα 18 : Σχετικά επίπεδα έκφρασης (relative chart) mRNA της PARN (επίπεδα φθορισμού με χρωστική SYBR Green) δειγμάτων ασθενών (στήλες 1, 2, 3, 4, 5, 8, 17) με μάρτυρες (στήλες 6, 7,18).

Εικόνα 19 : Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης, των προϊόντων της RT-PCR, L: μάρτυρας μοριακού βάρους.

Εικόνα 20 : Μεταβολή της έκφρασης της αποαδενύλασης PARN σε φυσιολογικό άτομο ( C) και σε ασθενείς (A) με λευχαιμίες.

Εικόνα 21 : Έκφραση της αποαδενύλασης PARN σε ασθενείς με λευχαιμία (A) και σε φυσιολογικά άτομα (C) με την επίδραση της αλκαλικής φωσφατάσης (CIAP).

Πίνακας 1 : Κατάταξη αποαδενυλασών [27],

Πίνακας 2 : Κατάταξη ριβονουκλεασών [69-71]

Πίνακας 3 : Προέλευση και αριθμός δειγμάτων

Πίνακας 4. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης προσδιορισμού πρωτεϊνών κατά Bradford. Standard Assay 1ml.

Πίνακας 5 : Χαρακτηριστικά της αποαδενύλασης PARN και αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος που αναμένεται από την RT-PCR.

Πίνακας 6 : Μέσος όρος σχετικής ποσότητας έκφρασης των προϊόντων της PARN στην RT-PCR για ασθενείς και μάρτυρες, όπως προκύπτει από την Εικόνα 18.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ρύθμιση της αποικοδόμησης του mRNA είναι ένα σημαντικό σημείο ελέγχου στην γονιδιακή έκφραση. Η σταθερότητα του mRNA ελέγχεται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δομικών του στοιχείων και πρωτεϊνών που συνδέονται με αυτό. Η ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA επιτυγχάνεται μέσω διακυμάνσεων στον χρόνο ζωής του σε ανταπόκριση ερεθισμάτων του περιβάλλοντος καθώς και σε καταστάσεις stress. Επιπλέον, σε συγκεκριμένες δυσλειτουργίες, όπως για παράδειγμα σε μία νεοπλασία, η απορρύθμιση της σταθερότητας του mRNA είναι δυνατόν να οδηγήσει σε μία μη φυσιολογική συνάθροιση των mRNAs καθώς και των πρωτεϊνών που αυτά κωδικοποιούν. Από τα cis-στοιχεία του mRNA η πολυ(A) ουρά παίζει σπουδαίο ρόλο στον κύκλο ζωής των mRNAs. Η πολυ(A) ουρά συμμετέχει στις διαδικασίες ωρίμανσης του mRNA, στην έξοδό του στο κυτταρόπλασμα, στην έναρξη της μετάφρασης, ενώ από αυτή ξεκινά κατά κύριο λόγο η αποικοδόμησή τους. Η τελευταία διαδικασία γίνεται από ένζυμα γνωστά ως αποαδενυλάσες. Στα θηλαστικά το κύριο ένζυμο βράχυνσης των πολυ(A) ουρών είναι η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN). Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην μελέτη των επιπέδων έκφρασης της PARN σε ασθενείς με λευχαιμία. Αρχικά έγινε η ανίχνευση της PARN σε ορούς ασθενών με λευχαιμίες και η διερεύνησή το πώς μεταβάλλεται η έκφρασή της σε σχέση με φυσιολογικά υγιή άτομα. Τα αποτελέσματα υπήρξαν ενθαρρυντικά μιας και δείχτηκε πώς υπήρχε διαφοροποίηση στα επίπεδα έκφρασής της. Ακολούθως, εξετάστηκαν δείγματα τα οποία είχα ληφθεί από τον μυελό των οστών ασθενών με λευχαιμίες. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης και της RT-PCR στα δείγματα αυτά έδειξαν διαφορετική έκφραση τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο mRNA. Σε μια προσπάθεια διερεύνησης των μηχανισμών που μπορεί να τροποποιούν την έκφραση της PARN, μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας, και ομοιοπολικών τροποποιήσεων του ενζύμου όπως η φωσφορυλίωση. Η κατεργασία δειγμάτων ασθενών με αλκαλική φωσφατάση και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η φωσφορυλίωση της PARN μπορεί να είναι ένας μηχανισμός ρύθμισης του ενζύμου σε καταστάσεις εξαλλαγής.

## 2. Εισαγωγή

### 2.1. Η σταθερότητα του mRNA



Εικόνα 1 : 5' κάλυμμα – 3' πολύ (A) ουρά mRNA

Η σταθερότητα του mRNA επηρεάζει την γονιδιακή έκφραση σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς από τα βακτήρια μέχρι τα θηλαστικά. Οι διαδικασίες που ρυθμίζουν τον χρόνο ημίσειας ζωής του mRNA μπορεί να επηρεάσει πως ένα κύτταρο μεγαλώνει, διαφοροποιείται και ανταποκρίνεται στο περιβάλλον του.

Η παραγωγή της σταθεράς αποσύνθεσης του mRNA βασίζεται στην υπόθεση ότι η αποσύνθεση του mRNA είναι μία τυχαία ή στατιστική διαδικασία. Συνεπώς, η συγκέντρωσή του σε μία δεδομένη χρονική στιγμή είναι μία διαδικασία πρώτης σειράς και βασίζεται στην ποσότητα του mRNA που υπάρχει εκείνη την στιγμή. Ο απλούστερος τρόπος για να εξαχθεί ο ρυθμός αλλαγής είναι να φανταστούμε μία ιδανική κατάσταση όπου η μεταγραφή ενός συγκεκριμένου γονιδίου σταματάει εντελώς σε μία χρονική στιγμή μηδέν. Παρόλα αυτά όμως:

1) Σε καταστάσεις φυσιολογικής κυτταρικής ανάπτυξης και σε απουσία αναστολέων μεταγραφής φαίνεται απίθανο η μεταγραφή να σταματάει απότομα.

2) Σε ένα πληθυσμό κυττάρων είναι απίθανο να συμβαίνει καταστολή της μετάφρασης με υψηλό επίπεδο συγχρονισμού ώστε η κένωση του mRNA να ξεκινάει ταυτόχρονα σε όλα τα κύτταρα.

3) Δεν έχει ποτέ ικανοποιητικά δείχτει ότι η αποσύνθεση του mRNA είναι εντελώς μία τυχαία ή στατιστική διαδικασία.

Οι σταθερότητες μερικών βραχύβιων mRNA μεταβάλλεται ως ανταπόκριση σε περιβαλλοντικούς και άλλους παράγοντες. Η σταθερότητα του mRNA επίσης επηρεάζει τον ρυθμό αλλαγής της αφθονίας του mRNA που ακολουθείται από μία αύξηση στην μεταγραφή.

Διάφορες παράμετροι (πρωτογενής-δευτερογενής δομή, ρυθμός μετάφρασης, ενδοκυτταρική εντόπιση και άλλοι) μπορούν να επηρεάσουν την σταθερότητα του mRNA ακόμα και μικρές αλλαγές στην δομή μπορούν να επηρεάσουν την σταθερότητα του mRNA σε κάποιο βαθμό, ενώ αλλαγές και σε κάποιες αλληλουχίες είναι δυνατόν να επηρεάσουν άμεσα τον χρόνο ημίσειας ζωής του mRNA. Είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι τα mRNAs περιέχουν δύο ή και περισσότερους καλά διαχωρισμένους παράγοντες σταθερότητας και κάθε παράγοντας είναι δυνατόν να ορίζει ένα ξεχωριστό μονοπάτι αποικοδόμησης ως ανταπόκριση σε κάποιο ρυθμιστικό παράγοντα. Στην σταθερότητα του mRNA κύριο ρόλο παίζουν τα cis δραστικά στοιχεία και οι trans δραστικοί παράγοντες (εικόνα 2) [67].



Εικόνα 2 : Οι τροποποιήσεις των άκρων του mRNA το προστατεύουν από την αποικοδόμηση. Εσωτερικές αλληλουχίες μπορεί να ενεργοποιήσουν τα συστήματα αποικοδόμησης.

### 2.1.1. Τα cis στοιχεία της σταθερότητας του mRNA

*Πολύ (A) ουρά.*

Φαίνεται ότι η πολύ(A) ουρά των mRNAs έχει πολλαπλές λειτουργίες επηρεάζοντας την επεξεργασία των pre- mRNAs στον πυρήνα, την μεταφορά τους στο κυτταρόπλασμα, την μετάφραση και την σταθερότητά τους. Δύο παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι η πολύ(A) ουρά προστατεύει τα mRNAs από τη αποσύνθεσή τους.

1) Η αποαδενύλιωση είναι το πρώτο βήμα στην αποσύνθεση αρκετών mRNAs. Εάν η

αποαδενυλίωση είναι ένα υποχρεωτικό στάδιο χωρίς το οποίο το mRNA δεν αποικοδομείται τότε αυτό σημαίνει ότι η πολύ(A) ουρά προστατεύει τα mRNAs.

2) Το σύμπλοκο PABP (πρωτεΐνη) που συνδέεται με την πολύ (A) ουρά στο 3' άκρο του mRNA το προστατεύει από την αποικοδόμηση.

Δεν σημαίνει ότι η αποαδενυλίωση είναι το ερέθισμα για την αποικοδόμηση του mRNA διότι ορισμένα αποαδενυλιωμένα mRNAs είναι σχετικά σταθερά μέσα στα κύτταρα. Απλά υποδηλώνεται ότι η πολύ (A) ουρά παίζει ένα ρόλο προστατευτικό για τα mRNAs από ραγδαία και αδιάκριτη αποικοδόμηση [67]. Ένα μόριο mRNA, που δεν έχει πολύ(A) ουρά συνήθως είναι πολύ λιγότερο αποτελεσματικό ως εκμαγείο για σύνθεση πρωτεϊνών από ότι αυτό που έχει πολύ (A) ουρά. Μερικά μόρια mRNA αποθηκεύονται με μία μη αδενυλιωμένη μορφή και αποκτούν την πολύ(A) ουρά μόνο όταν επίκειται μετάφραση. Η περίοδος ημιζωής ενός μορίου mRNA μπορεί να προσδιοριστεί εν μέρει από τον ρυθμό αποικοδόμησης της πολύ(A) ουράς [82].

#### *Cap (καλύπτρα)*

Το 5' άκρο του mRNA τροποποιείται με την προσθήκη του καλύμματος και αυτή η μεταβολή διατηρείται καθώς το προ-mRNA μετατρέπεται σε mRNA. Τα καλύμματα συμβάλλουν στην σταθερότητα των μορίων mRNA προστατεύοντας τα 5' άκρα τους από την δράση φωσφατασών και νουκλεασών. Επιπλέον, ενισχύουν την μετάφραση του mRNA από τα ευκαρυωτικά συστήματα σύνθεσης πρωτεϊνών (μια ριβοσωμική υπομονάδα 40S προσκολλάται στο κάλυμμα του 5' άκρου του ευκαρυωτικού mRNA) [82].

#### *Η 3' αμετάφραστη περιοχή (3'UTR)*

Σε διάφορες έρευνες που ασχολούνται με την σταθερότητα του mRNA έχει βρεθεί ότι υπάρχουν σήματα αποικοδόμησης του στην 3' αμετάφραστη περιοχή υποδηλώνοντας ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής των περισσότερων mRNAs επηρεάζονται από αυτή την περιοχή. Οι παράγοντες στην 3' αμετάφραστη περιοχή που επηρεάζουν την σταθερότητα του mRNA είναι :

### *mRNA ιστονών*

Σε αυτά τα mRNA λείπει η πολύ(A) ουρά αλλά η 3' αμετάφραστη περιοχή τους επηρεάζει τους ρυθμούς με τους οποίους το mRNA επεξεργάζεται στον πυρήνα, μεταφέρεται, μεταφράζεται και αποικοδομείται. Το mRNA είναι λίγο κατά την διάρκεια της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου αλλά αυξάνεται πολύ σε ποσότητα κατά την διάρκεια της φάσης S. Τα γονίδια της ιστόνης αντιγράφονται γρήγορα και ο χρόνος ημίσειας ζωής του mRNA είναι περίπου στα 40 min κατά την διάρκεια της φάσης S. Στο τέλος της φάσης S πέφτει ο ρυθμός μεταγραφής ο χρόνος ημίσειας ζωής του mRNA είναι περίπου στα 10 min οδηγώντας σε μία ξαφνική απομάκρυνση του mRNA από το κύτταρο. Τα σήματα για τη σταθεροποίηση του mRNA στο τέλος της φάσης S περιέχονται στα 30 νουκλεοτίδια που έχουν την χαρακτηριστική δομή στελέχους βρόχου. Συνεπώς, τα σήματα που απαιτούνται για την επεξεργασία του mRNA της ιστόνης και την σταθερότητά τους βρίσκονται στην δομή στελέχους βρόχου και στις γειτονικές αλληλουχίες [67].

### *Στοιχεία πλούσια σε αλληλουχίες AU (ARES)*

Δύο παρατηρήσεις συνδέουν τα στοιχεία αυτά με τη αστάθεια του mRNA. Πρώτον, τα mRNAs που περιέχουν τέτοια στοιχεία στην 3' αμετάφραστη περιοχή τους τείνουν να είναι λιγότερο σταθερά. Δεύτερον, εάν ένα τέτοιο στοιχείο από ένα ασταθές mRNA εισαχθεί στην 3' αμετάφραστη περιοχή ενός mRNA β-γλοβουλίνης τότε ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι λιγότερο από 30min ενώ το mRNA β-γλοβουλίνης που δεν έχει το στοιχείο αυτό είναι σταθερό για περισσότερο από 2 ώρες. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι διαφορετικά στοιχεία ARES επηρεάζουν τον χρόνο ημίσειας ζωής του mRNA σε διαφορετικό βαθμό.

### *Iron –responsive elements (IRES)*

Τα mRNAs τα οποία κωδικοποιούν τον υποδοχέα τρανσφερίνης και την φερίτινη, τα οποία και τα δύο επηρεάζουν την ομοιοστασία του σιδήρου ρυθμίζονται μετα-μεταγραφικά από διαδικασίες που εξαρτώνται από την ενδοκυτταρική συγκέντρωση σιδήρου. Οι υποδοχείς τρανσφερίνης εισάγουν τον σίδηρο μέσα στα κύτταρα και η φερίτινη είναι μία πρωτεΐνη η οποία είναι η ενδοκυτταρική αποθήκη



σιδήρου. Τα στοιχεία IRES λειτουργούν συνδεδεμένα με μία πρωτεΐνη ρυθμιστική του σιδήρου και έχει διαφορετικές επιδράσεις ανάλογα με τη θέση του μέσα στο mRNA. Η 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA του υποδοχέα της τρανσφερίνης περιέχει πέντε IRES τα τρία από τα οποία ρυθμίζουν τον χρόνο ημίσειας ζωής του mRNA.

#### *Ο παράγοντας αύξησης II που μοιάζει με την ινσουλίνη*

Ο παράγοντας αυτός εκφράζεται κυρίως στα εμβρυικά κύτταρα αλλά ανευρίσκεται και στον ορό των ενηλίκων και πιθανώς παίζει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην διαφοροποίηση. Μία δομή στελέχους βρόχου στην 3' αμετάφραστη περιοχή των mRNAs του IGFII είναι ένας παράγοντας καθορισμού της σταθερότητας του mRNA.

#### *Η κωδική περιοχή του mRNA*

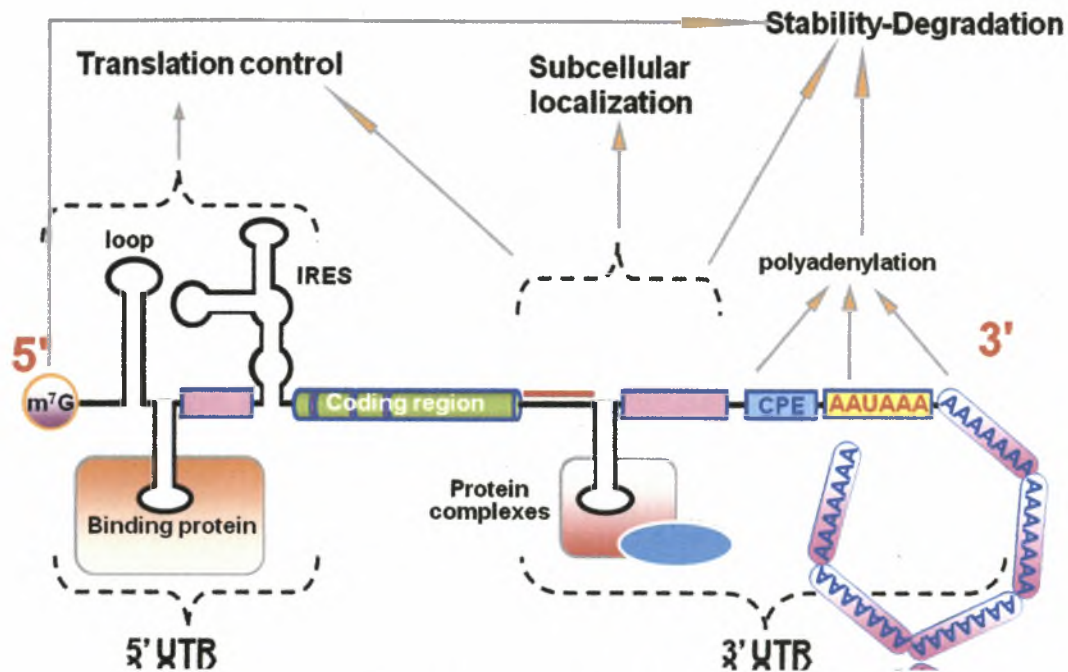
Τρεις παρατηρήσεις δείχνουν εμφανώς την σημασία της κωδικής περιοχής στον προσδιορισμό του χρόνου ζωής του mRNA. Πρώτον, μεταλλάξεις στην κωδική περιοχή οδηγούν σε σημαντικές αλλαγές στον χρόνο ζωής του mRNA. Μερικοί παράγοντες σταθερότητας στην κωδική περιοχή είναι επίσης και θέσεις σύνδεσης πρωτεϊνών. Ο χρόνος ζωής των mRNAs στα οποία λείπει η 3' UTR είναι μόνο μία με δύο ώρες που είναι ένας σχετικά βραχύς χρόνος σε σχέση με άλλα mRNAs. Σε αυτά τα mRNAs υπάρχει ένας παράγοντας αστάθειας ο οποίος βρίσκεται στην 5' αμετάφραστη περιοχή ή στην κωδική περιοχή. Τρίτον, η εισαγωγή μίας μη νοηματικής μετάλλαξης στο 5' τμήμα της κωδικής περιοχής του mRNA το αποσταθεροποιεί.

#### *Η 5'UTR και οι επιδράσεις της εντόπισης του mRNA.*

Θεωρητικά ο χρόνος ζωής κάθε mRNA μπορεί να επηρεαστεί από το πώς η 5' αμετάφραστη περιοχή επηρεάζει την μεταφραστική αποδοτικότητα και η εισαγωγή μίας δομής βρόχου θηλιάς σε αυτή την περιοχή μπορεί να μεταβάλλει τον χρόνο ζωής του mRNA.

Όλα τα τμήματα του mRNA μπορούν να επηρεάσουν την σταθερότητα του mRNA επηρεάζοντας την εντόπισή του. Ο χρόνος ζωής των mRNAs των

ανοσοσφαιρινών και ιστονών αλλάζει εάν αυτά ανακατευθυνθούν από ένα κυτταροπλασματικό διαμέρισμα σε άλλο [67].



Εικόνα 3 : Τα *cis*-δραστικά στοιχεία του mRNA

### 2.1.2. Οι *trans* παράγοντες σταθερότητας του mRNA

Μερικά mRNAs δεν έχουν σταθερούς χρόνους ζωής. Η σταθερότητά τους μεταβάλλεται σε ανταπόκριση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Μερικά mRNAs είναι περισσότερο ευαίσθητα στην επίθεση ριβονουκλεασών αλλά πιστεύεται ότι ενδοκυτταρικά ο χρόνος ζωής μερικών ή και των περισσότερων mRNAs προσδιορίζονται από άλλους παράγοντες. Θα πρέπει να αναφερθούν τρία γενικά χαρακτηριστικά. Πρώτον, μερικοί παράγοντες είναι δυνατόν να έχουν ένα αυθεντικά ρυθμιστικό ρόλο και δεν δρουν απλά ως σταθεροποιητές ή αποσταθεροποιητές. Δεύτερον, μερικοί συνδεόμενες πρωτεΐνες φαίνεται να σταθεροποιούν το mRNA ενώ άλλες δρουν ως αποσταθεροποιητές. Τρίτον, η σταθερότητα ή η αστάθεια ενός mRNA μπορεί να είναι το αποτέλεσμα συνδυασμένων δράσεων διαφορετικών ρυθμιστικών παραγόντων [67].

### ***2.1.2.1. Πρωτεΐνες που συνδέονται με το mRNA και που το προστατεύουν από την αποικοδόμηση.***

*Οι πρωτεΐνες που συνδέονται με την πολύ(A) ουρά*

Η πολύ(A) ουρά παίζει σημαντικό ρόλο στην σταθερότητα του mRNA. Η αποαδενυλίωση είναι το πρώτο βήμα στην αποσύνθεση αρκετών mRNAs. Έχειδειχτεί ότι τα mRNAs με πολύ (A) ουρά είναι περισσότερο σταθερά από εκείνα τα οποία είναι αποαδενυλιωμένα.

Η PABP συνδέεται με το mRNA σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που το προστατεύει από την ραγδαία αποικοδόμησή του. Αποτυχία δημιουργίας του συμπλόκου αυτού οδηγεί σε ταχεία αποικοδόμηση πράγμα που υποδηλώνει ότι η PABP προστατεύει τα πολυαδενυλιωμένα mRNAs.

*Πρωτεΐνες που συνδέονται με περιοχές πλούσιες σε AU*

Είναι μία οικογένεια πρωτεϊνών που έχουν την ικανότητα να συνδέονται με υψηλή συγγένεια με τα mRNAs που περιέχουν αλληλουχίες πλούσιες σε AU και σε μερικές περιπτώσεις σε περιοχές πλούσιες σε U. Μερικά μέλη της οικογένειας αυτής εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, άλλα μέλη εντοπίζονται στον πυρήνα και τέλος κάποια από αυτά πηγαινοέρχονται μεταξύ αυτών των δύο διαμερισμάτων. Οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν με τις αλληλουχίες ARES επηρεάζοντας την σταθερότητα του mRNA.

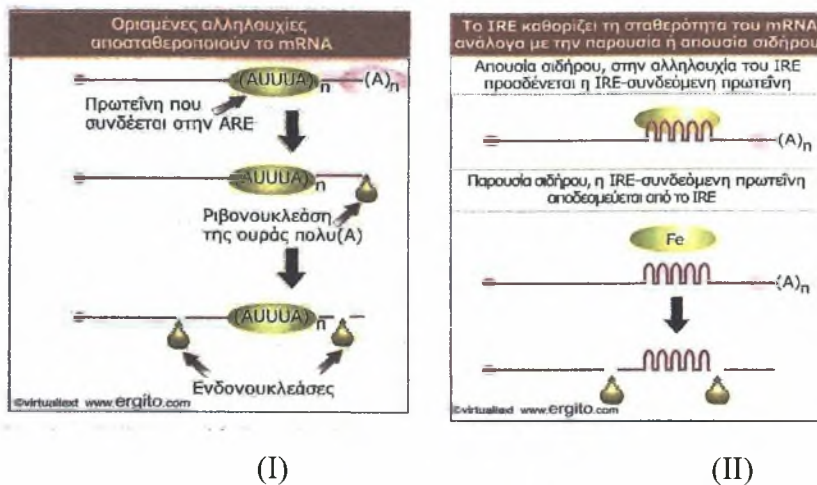
Μερικά μη σταθερά mRNAs που κωδικοποιούν παράγοντες μεταγραφής περιέχουν αλληλουχίες ARES στην 3' UTR. Οι αφθονία των πρωτεϊνών που συνδέονται με τις αλληλουχίες αυτές αυξάνεται ή μειώνεται την ίδια περίοδο που τα mRNAs σταθεροποιούνται σε ανταπόκριση σε ορισμένα ερεθίσματα (εικόνα 4).

*Η πρωτεΐνη ρυθμιστική του σιδήρου (IRP)*

Η πρωτεΐνη αυτή είναι ίσως το καλύτερο παράδειγμα συνδεόμενης πρωτεΐνης με το RNA που προστατεύει ένα συγκεκριμένο mRNA από αποικοδόμηση. Όταν υπάρχει ανεπάρκεια σε σίδηρο η πρωτεΐνη συνδέεται με υψηλή συγγένεια με ένα ή περισσότερα IRES του mRNA του υποδοχέα της τρανσφερίνης και το



προστατεύει από ενδονουκλεολυτική επίθεση. Όταν ο σίδηρος είναι άφθονος μειώνεται η συγγένεια σύνδεσης της πρωτεΐνης με τα στοιχεία IRES (εικόνα 4).



Εικόνα 4 : (I) Μια αλληλουχία ARE στην 3' UTR προκαλεί την αποικοδόμηση του mRNA (II) Μια αλληλουχία IRE στην 3' UTR προκαλεί την αποικοδόμηση του mRNA.

Οι συνδεόμενες πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται για την ενεργοποίηση επειγόντων μονοπατιών αποσύνθεσης σε mRNAs που περιέχουν δύο ή περισσότερους παράγοντες σταθερότητας. Κάθε παράγοντας εξυπηρετεί μία ξεχωριστή λειτουργία και μπορεί να βρίσκεται σε αδράνεια σε όλες εκτός από μερικές καταστάσεις. Ένας παράγοντας ο οποίος βρίσκεται σε αδράνεια υπό κανονικές συνθήκες είναι δυνατόν να ενεργοποιηθεί σε άλλες ειδικές καταστάσεις, όπως σε συνθήκες stress (πείνα, φλεγμονή) στις οποίες είναι απαραίτητη η καταστροφή του mRNA πάρα πολύ γρήγορα [67].

### 2.1.2.2. Επιδράσεις ορμονών, αυξητικών παραγόντων και ιόντων στην σταθερότητα του mRNA

Αν και διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν την μεταγραφή φαίνεται ότι υπάρχουν διάφορες ομάδες παραγόντων που επηρεάζουν την σταθερότητα του mRNA. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι μηχανισμοί δράσης τους δεν ορίζονται ικανοποιητικά και δεν είναι ξεκάθαρο αν δρουν άμεσα ή έμμεσα. Για παράδειγμα, ένας παράγοντας διαφοροποίησης είναι δυνατόν να σταθεροποιεί ή όχι

μία ομάδα mRNAs προάγοντας την ανάπτυξη του κυττάρου, στην οποία περίπτωση ο τροποποιημένος χρόνος ημίσειας ζωής θα αντικατόπτριζε το στάδιο της διαφοροποίησης και όχι την άμεση επίδραση του παράγοντα.

### **2.1.2.3. Σταθερότητα mRNA και μετάφραση**

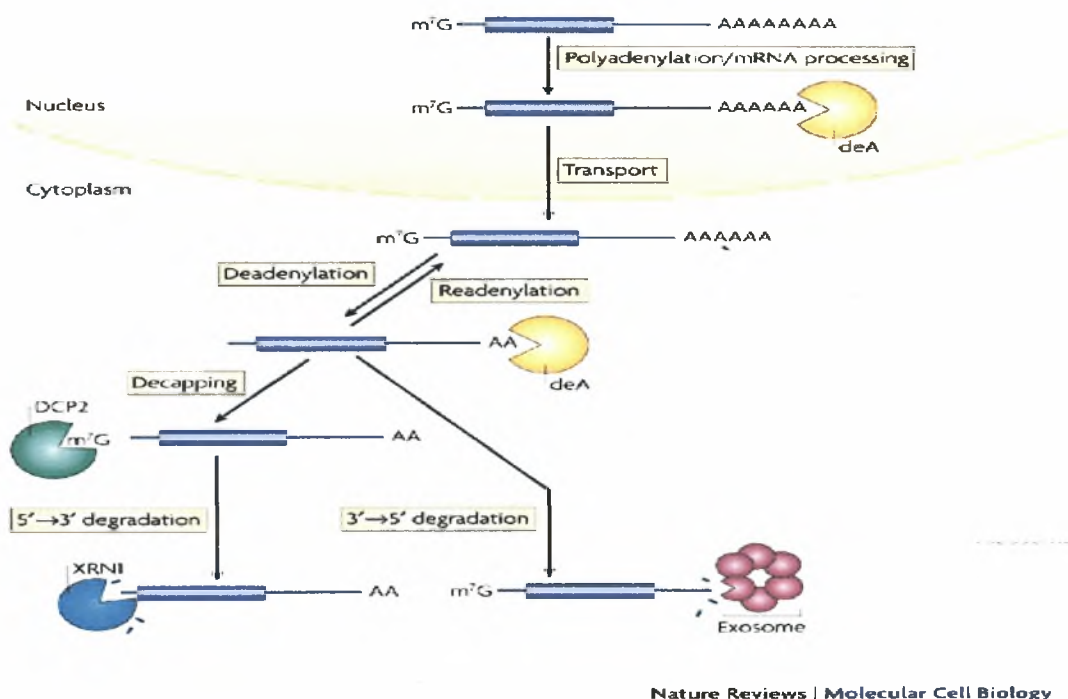
Δύο γενικές παρατηρήσεις υποδεικνύουν την σύνδεση μεταξύ χρόνου ζωής mRNA και μετάφραση. Πρώτον, τα περισσότερα mRNAs σταθεροποιούνται σε κύτταρα που εκτίθενται σε αναστολές μετάφρασης. Όμως, διαφορετικά mRNAs είναι δυνατόν να σταθεροποιούνται για διαφορετικές αιτίες. Δεύτερον, ο χρόνος ζωής του mRNA συνήθως επηρεάζεται από αλλαγές στην δομή του με τρόπο που επηρεάζει την μετάφραση. Για παράδειγμα αλλαγές στην αλληλουχία στην 5' UTR μπορεί να επηρεάσει την έναρξη της μετάφρασης. Πολλές τέτοιες αλλαγές των οποίων οι πρωταρχικές επιδράσεις φαίνονται στην μετάφραση επηρεάζουν επίσης τον χρόνο ζωής του mRNA [67].

### **2.1.3. Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA**

Η αποικοδόμηση του ευκαρυωτικού mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στον ποιοτικό έλεγχο της βιοσύνθεσης mRNA και στην αντιϊκή προστασία [47, 48, 49]

Η αποικοδόμηση του mRNA συνήθως ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο του (αποαδενυλίωση) από διάφορες αποαδενυλάσες [50,51]. Ακολουθώντας την αποαδενυλίωση ένα ειδικό ένζυμο που αποτελείται από δύο υπομονάδες (Dcp1p και Dcp2p ) αφαιρεί την 5' δομή καλύπτρας , εκθέτοντας το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από μια 5'→3'εξωνουκλεάση, την Xrn1p. Εναλλακτικά, μετά την αποαδενυλίωση, το mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με την κατεύθυνση 3'→5'από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο 3'→5' εξωνουκλεασών [52-55]. Στην περίπτωση αυτή το προκύπτον ολιγονουκλεοτιδιοκαλύπτρα υδρολύεται από το DcpS [56]. Ωστόσο η αποικοδόμηση ορισμένων mRNA μπορεί να πυροδοτηθεί από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση είτε από ειδικές ενδονουκλεάσες είτε σε απόκριση από miRNA η siRNA [57]. Επίσης τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν ειδικά μονοπάτια αποικοδόμησης που αναγνωρίζουν και αποικοδομούν ταχύτατα ανώμαλα mRNA χρησιμοποιώντας τα ίδια ένζυμα που

αποικοδομούν φυσιολογικά mRNA. Για παράδειγμα pre-mRNA που αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν την διαδικασία ωρίμανσης μπορεί να κατακρατηθούν στον πυρήνα και / ή να αποικοδομηθούν με μια διαδικασία που φαίνεται πως εξαρτάται από το εξώσωμα [59-62].



Εικόνα 5 : Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA [68]

Εναλλακτικά, τα κύτταρα μπορούν να υπολογίζουν την μεταφραστική χωρητικότητα των mRNA. Σε μια διαδικασία που αναφέρεται και ως nonsense mediated decay (NMD) τα mRNA που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται. Τέτοια μετάγραφα αποικοδομούνται είτε από αφαίρεση της καλύπτρας σε μία διαδικασία η οποία είναι ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση, είτε από επιτάχυνση της αποαδενυλίωσης και της 3'→5' αποικοδόμησης από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα. Παρομοίως σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως nonstop decay (NSD) τα mRNA στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα [63-64].

#### **2.1.4. Ο ρόλος των αποαδενυλασών στον έλεγχο της μετάφρασης και της σταθερότητας των mRNAs.**

Οι αποαδενυλάδες είναι Mg – εξαρτώμενες εξωριβονουκλεάσες που υδρολύουν το mRNA με κατεύθυνση 3'→ 5'. Οι πολύ(A) ουρές είναι το κύριο υπόστρωμα αυτών των ενζύμων.

Όλες οι γνωστές αποαδενυλάσες ανήκουν σε δύο ομάδες : την ομάδα DEDD και την ομάδα EEP (πίνακας 1).

Η ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA και η εντόπισή του προσδιορίζουν πόση πρωτεΐνη θα παραχθεί κατά την διάρκεια της μετάφρασής του. Αυτά τα επίπεδα ελέγχου διαπερνούν την βιολογία από την εμβρυική ανάπτυξη μέχρι την μάθηση και την μνήμη.

Αλλαγές στο μήκος της πολύ(A) ουράς συμβαίνουν σε όλη την διάρκεια ζωής ενός mRNA. Στον πυρήνα η επεξεργασία των νεοσυντιθέμενων mRNA συνοδεύεται από την προσθήκη μίας πολύ(A) ουράς. Κατά την εξαγωγή του στο κυτταρόπλασμα η PABP συνδέεται με την πολύ(A) ουρά η οποία είναι μία πρωτεΐνη που σταθεροποιεί το mRNA και διευκολύνει την μετάφραση.

Ο ρόλος της πολύ(A) ουράς στην μετάφραση ανταγωνίζεται από ειδικά μονοπάτια καταστολής της μετάφρασης και της αποικοδόμησης του mRNA. Τα ένζυμα αποαδενυλίωσης που κονταίνουν τις πολύ(A) ουρές παίζουν ρόλο κλειδί στην διαδικασία της μεταφραστικής καταστολής. Οι αποαδενυλάσες κόβουν τις πολύ(A) ουρές. Στον πυρήνα η διαδικασία της αποαδενυλίωσης περιορίζει τις πολύ (A) ουρές των νεοσυντιθέμενων mRNAs στα κατάλληλα μήκη τους. Στο κυτταρόπλασμα η εκτεταμένη αποαδενυλίωση ενός mRNA σηματοδοτεί την έναρξη της αποικοδόμησης ή της καταστολής του. Η αποαδενυλίωση είναι συχνά ένα βήμα περιορισμού του ρυθμού αποικοδόμησης του mRNA και της μεταφραστικής καταστολής. Το μήκος της πολύ(A) ουράς ενός mRNA είναι δυνατόν να ποικίλλει κάτω από διαφορετικές συνθήκες ή ανάλογα με την φάση του κυτταρικού κύκλου. Η ρύθμιση της αποαδενυλίωσης δρα ως ροοστάτης τροποποιώντας την μετάφραση με μία διαβάθμιση. Μπορεί να προκαλέσει ταχεία καταστολή και αποικοδόμηση του mRNA.

Η ρύθμιση της αποαδενυλιωτικής δραστηριότητας είναι ζωτική καθώς η ανεξέλεγκτη αποαδενυλίωση θα οδηγούσε στην καταστροφή. Τα μη σταθερά και ανώμαλα mRNAs θα πρέπει να αποικοδομηθούν ενώ τα σταθερά να προστατευθούν από την αποαδενυλίωση της πολύ(A) ουράς.

Η έκφραση των αποαδενυλασών και οι ρυθμιστές τους υπαγορεύουν πότε και που θα συμβεί η ρύθμιση. Επίσης, η αναστολή της ενζυματικής δραστηριότητας προβάλλει ένα δεύτερο τρόπο ελέγχου της αποαδενυλίωσης. Σε διάφορες καταστάσεις stress όπως για παράδειγμα στέρηση γλυκόζης, θερμικό stress αναστέλλεται η αποαδενυλίωση.

Χαρακτηριστικά του mRNA στόχου είναι δυνατόν να επηρεάσουν την αποαδενυλίωση. Το 5' κάλυμμα του mRNA είναι δυνατόν να επηρεάσει την αποαδενυλίωσή του διεγείροντας την δραστηριότητα και την επεξεργασιμότητα της PARN ενώ δεν έχει επίδραση στην δραστηριότητα άλλων αποαδενυλασών. Αυτή η μοναδική ιδιότητα πετυχαίνει η απευθείας αλληλεπίδραση της PARN με το 5' κάλυμμα του mRNA [27].

Πίνακας 1 : Κατάταξη αποαδενυλασών [27],

		SC	CE	DM	XL	MM	HS
<b>DEDD nucleases</b>	<b>CNOT7/PO P2</b>	+	+	+	+	+	+
	<b>CNOT8</b>	-	-	-	+	+	+
	<b>CAF1Z</b>	-	+	-	+	+	+
	<b>PARN</b>	-	+	-	+	+	+
	<b>PAN2</b>	+	+	+	+	+	+
<b>EEP nucleases</b>	<b>CNOT6/CC R4</b>	+	+	+	+	+	+
	<b>CNOT6L</b>	-	-	-	-	+	+
	<b>NOC</b>	-	-	+	+	+	+
	<b>2'PDE</b>	-	+	+	+	+	+

SC, *S. cerevisiae*; CE, *C. Elegans*; DM, *D. Melanogaster*; XL, *X Laevis*; MM, *M Musculus*; HS, *H Sapiens*  
adapted from Goldstrohm and Wickens *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008; 9: 337

(+ : έχει ελεγχθεί η δράση της, + : έχει προβλεφθεί η ύπαρξη της αποαδενυλάσης με εργαλεία βιοπληροφορικής)

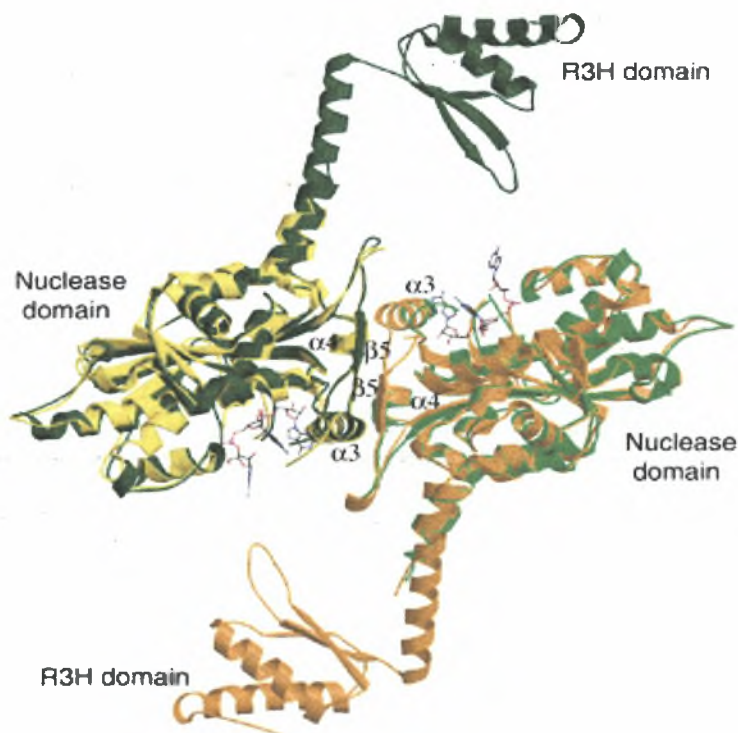
## 2.2. Δομή και δραστηριότητα της PARN

Στα θηλαστικά, ένα ένζυμο που εκδηλώνει αποαδενυλιωτική ικανότητα είναι η πολυ(A) ειδική εξωριβονουκλεάση (PARN) [28-29]. Ανήκει στην υπερικογένεια



DEDD που το όνομά της ορίζεται από τα τέσσερα συντηρημένα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, 3 ασπαρτικά οξέα (D) και ένα γλουταμικό οξύ (E) τα οποία κατέχουν βασικό ρόλο στην κατάλυση [30-31]. Στην οικογένεια των ριβονουκλεασών, RNase D ανήκουν η DNA πολυμεράση I, η DNA πολυμεράση III, η Pop2 της ζύμης και η ε186 από τη *Escherichia coli*. Είναι συντηρημένη σε πολλούς ευκαρυώτες αλλά απουσιάζει από το *Saccharomyces cerevisiae* και τη *Drosophilla melanogaster* [32].

Παλαιότερες μελέτες, έδειξαν ότι η PARN έχει μεγάλη ειδικότητα για τη μονόκλωνη πολυ(A) ουρά και για την ενεργότητά της απαιτείται μια 3'υδροξυλική ομάδα [28]. Η συντηρημένη R3H περιοχή της διευκολύνει τη σύνδεση με το πολυαδενυλιωμένο mRNA καθώς λειτουργεί σα μια μονόκλωνη νουκλεοτιδική δομή [33]. Βιοχημικές μελέτες συνδυασμένες με μεταλλάξεις αποκάλυψαν ότι είναι μια ολιγομερής πολυ(A) εξωνουκλεάση που παράγει 5'AMP και είναι εξαρτώμενη από δισθενή ιόντα μετάλλων [29,34-37]. Συγκεκριμένα, το ελάχιστο μήκος υποστρώματος που είναι ικανή να δεσμεύσει είναι δι- ή τρι-αδενοσίνη, ανάλογα με το ποιο μέταλλο βρίσκεται στο ενεργό κέντρο. Ένα ακόμα στοιχείο που τη χαρακτηρίζει είναι ότι προσδένεται στο 5' κάλυμμα του mRNA, κάτι που όχι μόνο διεγείρει την αποαδενυλίωση αλλά και ενισχύει τη διαδικασία της αντίδρασης [35,38,39].



Εικόνα 6 : Κρυσταλλική δομή της PARN [40]

Η προσδιορισθείσα δομή αφορά στην ανθρώπινη PARN με κομμένο το C-τελικό άκρο (1-430 αμινοξέα σε σύνολο 639) που αποτελείται μόνο από την περιοχή R3H και την περιοχή με δράση νουκλεάσης ενώ λείπει η ειδική περιοχή για το 5' κάλυμμα. Η κρυσταλλική δομή της PARNn προσδιορίστηκε σε δύο μορφές: μια ελεύθερη και μια δεσμευμένη με RNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη, όπου κάθε υπομονάδα της δεσμεύει τρία νουκλεοτίδια αδενοσίνης σε αντίθεση με τις ε186 και Pop2p εξωριβονουκλεάσες που η περιοχή της νουκλεάσης είναι μονομερής. Ωστόσο, η περιοχή της νουκλεάσης της PARNn με την αντίστοιχη της Pop2p ταυτίζονται όταν τοποθετηθούν η μια πάνω στην άλλη παρόλο το γεγονός ότι οι αλληλουχίες τους έχουν ομοιότητα μόνο στο 17%. Η καθαρή μορφή της PARNn αν και ενεργή για την αποκοπή της πολυ(A) ουράς σημειώνει χαμηλή δραστηριότητα [40].

Στο ενεργό της κέντρο τα κατάλοιπα Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382 σχηματίζουν μια αρνητικά φορτισμένη κοιλότητα. Επίσης υπάρχει η His377, που όπως αποδείχτηκαν από πειράματα αντικατάστασής της, είναι απαραίτητη για την καταλυτική ενεργότητα και λόγω αυτής η PARN ανήκει στη DEDDh υποοικογένεια. Κανένα Mg<sup>2+</sup> ή άλλο δισθενές μέταλλο δε βρέθηκε στο ενεργό κέντρο αλλά τα αμινοξικά του κατάλοιπα φάνηκε ότι αλληλεπιδρούν με ετεροπολικούς δεσμούς με τα μέταλλα [36-37]. Η υψηλή ομοιότητα των δομών των ενεργών κέντρων μεταξύ της PARN και της ε186 υποδηλώνει έντονα ότι τα πέντε αμινοξικά κατάλοιπα παίζουν τον ίδιο καταλυτικό ρόλο στη δράση εξωνουκλεάσης και για αυτό θα πρέπει και ο καταλυτικός μηχανισμός να είναι πιθανόν ο ίδιος μεταξύ των δύο ενζύμων.

Στα κύτταρα θηλαστικών η PARN αναστέλλεται από την πρωτεΐνη Pab1p που δεσμεύεται στο πολυ(A) [29]. Επιπλέον είναι απαραίτητη για τη γρήγορη αποαδενυλίωση των mRNAs με περιοχές πλούσιες σε AU (ARE) ενώ επάγεται από την τριστετραπρόληνη, μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται στα ARE στοιχεία [41-42]. Η γρήγορη αποαδενυλίωση των θηλαστικών έχει επίσης βρεθεί ότι σχετίζεται με την παρουσία των κυτταροπλασματικών P-σωματίων, που λειτουργούν μέσω του miRNA μονοπατιού σε συνδυασμό με ένζυμα αποικοδόμησης. Στο *Xenopus laevis* η PARN χρησιμοποιείται στην αποσιώπηση μητρικών mRNAs κατά την ωρίμανση ωαρίου [43-44]. Στο *Arabidopsis thaliana* αποδεικνύεται ως απαραίτητο ένζυμο για τα πρώτα στάδια ανάπτυξης [45] και είναι υπεύθυνη για την αποαδενυλίωση μιας συγκεκριμένης ομάδας mRNAs [46].

## **2.3. Σταθερότητα mRNA και καρκίνος – λευχαιμία**

### **2.3.1. Καρκινικοί δείκτες – δείκτες κινδύνου**

Οι καρκινικοί δείκτες είναι ουσίες που παράγονται από καρκινικά κύτταρα ή από άλλα κύτταρα του σώματος ως αντίδραση στην παρουσία καρκίνου ή εξαιτίας καλοήθους προκαρκινικής κατάστασης. Αυτές οι ουσίες είναι δυνατόν να βρεθούν στο αίμα, στα ούρα, στον καρκινικό ιστό ή και σε άλλους ιστούς. Διαφορετικοί καρκινικοί δείκτες υπάρχουν σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Επίσης, τα επίπεδα του ίδιου καρκινικού δείκτη μεταβάλλονται σε κάθε τύπο καρκίνου. Επιπροσθέτως, τα επίπεδα ενός καρκινικού δείκτη δεν μεταβάλλονται σε όλους τους ανθρώπους με καρκίνο, ειδικά εάν ο καρκίνος είναι σε πρώιμο στάδιο. Τα επίπεδα καρκινικών δεικτών είναι δυνατόν να μεταβάλλονται σε ασθενείς με προκαρκινικές καταστάσεις.

Μερικοί άνθρωποι έχουν την δυνατότητα ανάπτυξης ορισμένων τύπου καρκίνου εξαιτίας μίας αλλαγής γνωστή ως μετάλλαξη σε κάποια γονίδια. Η παρουσία μίας τέτοιας αλλαγής καλείται δείκτης κινδύνου. Τα τεστ για δείκτες κινδύνου είναι δυνατόν να οδηγήσουν στον υπολογισμό της πιθανότητας ενός ατόμου να αναπτύξει καρκίνο. Οι δείκτες κινδύνου υποδηλώνουν την πιθανότητα να συμβεί ο καρκίνος ενώ οι καρκινικοί δείκτες υποδηλώνουν την παρουσία καρκίνου.

### **2.3.2. Πώς χρησιμοποιούνται, πώς και πότε μετρούνται οι καρκινικοί δείκτες**

Οι καρκινικοί δείκτες χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση, διάγνωση και διαχείριση ορισμένων τύπων καρκίνου. Αν και η παρουσία ενός μη φυσιολογικού επιπέδου ενός καρκινικού δείκτη υποδηλώνει καρκίνο από μόνο του αυτό το εύρημα δεν είναι αρκετό για διάγνωση καρκίνου. Τέτοιου είδους ευρήματα συνδυάζονται με άλλα τεστ όπως βιοψία για να γίνει διάγνωση καρκίνου. Τα επίπεδα καρκινικών δεικτών μετρούνται για τον σχεδιασμό από τον ιατρό της κατάλληλης θεραπείας. Σε ορισμένους τύπους καρκίνου τα επίπεδα καρκινικών δεικτών αντικατοπτρίζουν το στάδιο της ασθένειας.

Τα επίπεδα καρκινικών δεικτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ελεγχθεί η απόκριση στην θεραπεία. Μια επιστροφή σε κανονικά επίπεδα υποδηλώνει



ανταπόκριση στην θεραπεία ενώ μία αύξηση ότι δεν έχουμε ανταπόκριση. Οι καρκινικοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τον έλεγχο της υποτροπής.

Ο ιατρός μετά από λήψη αίματος, ούρου, δείγματος ιστού το στέλνει στο εργαστήριο, όπου χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι για την μέτρηση επιπέδων ενός καρκινικού δείκτη. Εάν ο καρκινικός δείκτης χρησιμοποιείται για να δούμε εάν δουλεύει ή όχι μία θεραπεία ή εάν υπάρχει υποτροπή τα επίπεδα μετρούνται σε τακτά χρονικά διαστήματα για να δούμε εάν τα επίπεδα αυξάνονται ή μειώνονται. Αυτές οι διαδοχικές μετρήσεις είναι περισσότερο σημαντικές από ότι μία μέτρηση. Τα επίπεδα του καρκινικού δείκτη ελέγχονται κατά τον χρόνο της διάγνωσης, πριν κατά την διάρκεια και μετά την θεραπεία και μετά περιοδικά για τον έλεγχο υποτροπής.

Τα screening τέστ είναι ένας τρόπος ανίχνευσης καρκίνου σε πρώιμο στάδιο προτού καν υπάρχουν συμπτώματα. Τα τέστ αυτά για να είναι αποτελεσματικά θα πρέπει να έχουν ευαισθησία και ειδικότητα. Η ευαισθησία αναφέρεται στην ικανότητα του τέστ να ανιχνεύει ανθρώπους που έχουν την ασθένεια. Η ειδικότητα αναφέρεται στην ικανότητα του τέστ να ανιχνεύει ανθρώπους που δεν έχουν την ασθένεια. Οι περισσότεροι καρκινικοί δείκτες δεν έχουν αρκετή ευαισθησία ή ειδικότητα για να χρησιμοποιηθούν για ανίχνευση καρκίνου σε πρώιμο στάδιο.

Ακόμα και τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα τέστ μπορεί να μην είναι ευαίσθητα ή ειδικά. Για παράδειγμα, το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του καρκίνου του προστάτη στους άντρες αλλά αυτό είναι αντιφατικό. Δεν είναι ακόμη γνωστό εάν η πρώιμη ανίχνευση με PSA σώζει ζωές. Αυξημένα επίπεδα αυτού του δείκτη μπορεί να προκληθούν από καρκίνο του προστάτη ή καλοήθεις καταστάσεις και πολλοί άντρες με αυξημένα επίπεδα αυτού του δείκτη αποδεικνύεται ότι δεν έχουν καρκίνο του προστάτη.

Ένας άλλος καρκινικός δείκτης ο CA 125 χρησιμοποιείται μερικές φορές για την πρώιμη διάγνωση σε γυναίκες που έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών. Οι μετρήσεις αυτού του δείκτη δεν είναι αρκετά ευαίσθητες και ειδικές για να χρησιμοποιηθεί για πρώιμη διάγνωση σε γυναίκες. Χρησιμοποιείται κυρίως για έλεγχο ανταπόκρισης στην θεραπεία και για έλεγχο τυχόν υποτροπής.

### ***2.3.3. Η έρευνα στο πεδίο των καρκινικών δεικτών***

Οι επιστήμονες συνεχίζουν να μελετούν καρκινικούς δείκτες και τον πιθανό ρόλο τους στην πρώιμη διάγνωση και ανίχνευση του καρκίνου. Οι ερευνητές

στρέφονται προς την πρωτεομική ( μελέτη μορφής πρωτεΐνης, λειτουργίας, μοτίβα έκφρασης ) με την ελπίδα ανάπτυξης καλύτερων μεθόδων ανίχνευσης του καρκίνου. Η πρωτεομική χρησιμοποιείται για την έρευνα πρωτεϊνών που είναι δυνατόν να χρησιμεύσουν ως δείκτες ασθένειας στα πρώιμα στάδια της ή στην πρόβλεψη της αποτελεσματικότητας μίας θεραπείας ή την πιθανότητα υποτροπής.

Ο ιδανικός καρκινικός δείκτης θα μπορούσε να είναι ένα τέστ αίματος του οποίου το θετικό αποτέλεσμα θα ανευρίσκονταν μόνο σε ασθενείς με κακοήθεια, ένας δείκτης ο οποίος θα μπορούσε να συσχετιστεί με το στάδιο της ασθένειας και την ανταπόκριση στην θεραπεία και ο οποίος θα μπορούσε εύκολα να μετρηθεί. Κανένας τέτοιος καρκινικός δείκτης δεν είναι διαθέσιμος αυτή την στιγμή.

Οι καρκινικοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για έναν από τους ακόλουθους τέσσερις λόγους :

1) έλεγχος ενός υγιή πληθυσμού ή ενός πληθυσμού με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας για την παρουσία καρκίνου

2) διάγνωση καρκίνου ή ενός ειδικού τύπου καρκίνου

3) προσδιορισμός της πρόγνωσης ενός ασθενούς

4) έλεγχος της δοσολογίας φαρμάκων του ασθενούς

Κανένα τέστ δεν παρέχει όλες αυτές τις απαιτήσεις. Ειδικότερα κανένας καρκινικός δείκτης δεν έχει εδραιωθεί σαν ένα πρακτικό εργαλείο ανίχνευσης είτε σε υγιείς πληθυσμούς ή σε πληθυσμούς με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Η αιτία αυτού είναι η σχετική έλλειψη ευαισθησίας και ειδικότητας των διαθέσιμων τέστ δίνοντας μία χαμηλή παρουσία του καρκίνου στους περισσότερους πληθυσμούς. Ακόμη και τέστ που έχουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα είναι δυνατόν να έχουν χαμηλές τιμές πρόβλεψης.

Οι καρκινικοί δείκτες είναι ουσίες οι οποίες δεν είναι μπορούν με ευκολία να οργανωθούν συστηματικά. Κανένας δείκτης δεν είναι μοναδικός για τα καρκινικά κύτταρα. Αντιπροσωπεύουν ανώμαλη παραγωγή ενός φυσιολογικού στοιχείου. Μερικοί δείκτες παράγονται από τον οργανισμό σε ανταπόκριση στην παρουσία καρκίνου.

#### **2.3.4. Χαρακτηριστικά ενός ιδανικού δείκτη νεοπλασίας**

1) Να προσδιορίζεται εύκολα και με χαμηλό κόστος

2) Να είναι ειδικός για την υπό μελέτη κακοήθεια

3) Η μεταβολή της συγκέντρωσής του να συναρτάται με την μεταβολή του μεγέθους του όγκου ή/και τον βαθμό κακοήθειας.

4) Τα επίπεδα των συγκεντρώσεών του στο αίμα να μην υπόκειται σε έντονες μεταβολές ανεξάρτητες των μεταβολών του μεγέθους του όγκου.

5) Αν ο καρκινικός δείκτης ανευρίσκεται και στον ορό των φυσιολογικών ατόμων, η συγκέντρωσή του στον ορό των ασθενών να είναι στατιστικά σημαντικότερη.

### **2.3.5. Η ιστορία των καρκινικών δεικτών**

Ο πρώτος καρκινικός δείκτης ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για ανίχνευση και διάγνωση καρκίνου είναι η ανθρώπινη χοριακή γονατροπίνη η ουσία που οι γιατροί ψάχνουν στα τέστ διάγνωσης κυοφορίας. Σε γυναίκες που έχει τελειώσει η κυοφορία τους και έχουν μεγάλη μήτρα ελέγχονται γι 'αυτή την ορμόνη. Υψηλά επίπεδα αυτής της ορμόνης στο αίμα μπορεί να είναι ένδειξη καρκίνου του πλακούντα.

Η ελπίδα στην έρευνα για τους καρκινικούς δείκτες είναι να ανιχνεύονται με ένα απλό τέστ αίματος.

Η πρώτη επιτυχία για την ανάπτυξη ενός τέστ αίματος ήρθε το 1965 όταν το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο βρέθηκε στο αίμα μερικών ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου (CEA). Μέχρι το τέλος του 1970 διάφορα άλλα τέστ αίματος αναπτύχθηκαν για διάφορους τύπους καρκίνου (CA 19-9, CA 15-3, CA 125). Στην συνέχεια βρέθηκαν και άλλοι καρκινικοί δείκτες επειδή όμως δεν έδειξαν να έχουν κάποιο επιπλέον πλεονέκτημα με τους ήδη γνωστούς δείκτες εγκαταλείφθηκε η μελέτη τους.

Κανένας από αυτούς τους καρκινικούς δείκτες δεν μπορούσαν να κάνουν διάγνωση το καρκίνου σε πρώιμο στάδιο. Υπήρχαν ορισμένοι λόγοι γι αυτό όπως:

1) Σχεδόν κάθε άνθρωπος έχει μικρή ποσότητα αυτών των δεικτών στο αίμα και είναι δύσκολη η πρώιμη εντόπιση των όγκων με τα τέστ αίματος.

2) Τα επίπεδα των δεικτών τείνουν να ξεπερνούν τα φυσιολογικά επίπεδα όταν ο καρκίνος είναι σε προχωρημένο στάδιο.

3) Μερικοί άνθρωποι με καρκίνο δεν έχουν υψηλά επίπεδα αυτών των δεικτών.

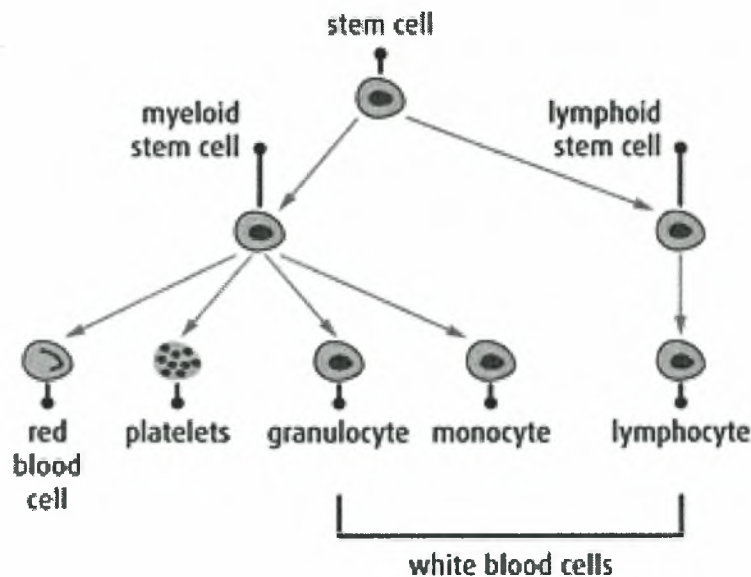
4) Ακόμα και όταν τα επίπεδα ενός δείκτη είναι αυξημένα αυτό δεν σημαίνει ότι το άτομο ασθενεί.

Αυτοί είναι οι λόγοι που οι καρκινικοί δείκτες χρησιμοποιήθηκαν κυρίως σε ασθενείς στους οποίους είχε γίνει ήδη διάγνωση με καρκίνο για να δούμε την ανταπόκριση στην θεραπεία ή την περίπτωση υποτροπής.

Ο μόνος καρκινικός δείκτης που έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί για την πρόωμη ανίχνευση του καρκίνου είναι το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA). Ο δείκτης αυτός έχει τα εξής πλεονεκτήματα : προέρχεται μόνο από προστατικά κύτταρα, συνεπώς μία αύξηση στα επίπεδά του υποδηλώνει πρόβλημα στον προστάτη. Τα επίπεδα αυτού του δείκτη είναι υψηλά και σε πρώιμους καρκίνους έτσι μπορεί να γίνει διάγνωση σε πρώιμο στάδιο. Αλλά το τεστ αυτό δεν είναι τέλειο. Μερικοί άντρες έχουν υψηλά επίπεδα αυτού του δείκτη και σε άλλες καταστάσεις του προστάτη. Επίσης, ορισμένοι άντρες με καρκίνο του προστάτη δεν έχουν αυξημένα επίπεδα αυτού του δείκτη [1-26].

### 2.3.6. Λευχαιμία

Η λευχαιμία είναι ο καρκίνος του αίματος ή του μυελού των οστών και χαρακτηρίζεται από ανώμαλο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του αίματος συνήθως των λευκοκυττάρων (εικόνα 7).



Εικόνα 7 : Η λευχαιμία χαρακτηρίζεται από ανώμαλο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του αίματος, συνήθως των λευκοκυττάρων [<http://www.meds.com>]

Είναι ένα κομμάτι της μεγάλης ομάδας ασθενειών που καλούνται νεοπλάσματα του αιμοποιητικού.

Οι κύριες μορφές της λευχαιμίας διαιρούνται σε τέσσερις κατηγορίες :

- 1) Την μυελογενή (οξεία, χρόνια)
- 2) Λεμφοκυτταρική λευχαιμία (οξεία, χρόνια).

Οι όροι μυελογενής και λεμφοκυτταρική υποδηλώνουν τον τύπο κυττάρων που εμπλέκονται.

Η οξεία λευχαιμία είναι μία ραγδαία εξελισσόμενη ασθένεια που επηρεάζει κυρίως τα κύτταρα που δεν έχουν ακόμη διαφοροποιηθεί. Αυτά τα ανώριμα κύτταρα δεν μπορούν να επιτελέσουν τις κανονικές τους λειτουργίες.

Η χρόνια λευχαιμία εξελίσσεται αργά και επιτρέπει την ανάπτυξη μεγαλύτερου αριθμού περισσότερο ώριμων κυττάρων. Αυτά τα ώριμα κύτταρα μπορούν να επιτελέσουν μερικές από τις κανονικές τους λειτουργίες.

Συνεπώς, οι τέσσερις τύποι λευχαιμίας είναι οι εξής :

- 1) οξεία μυελογενής λευχαιμία
- 2) χρόνια μυελογενής λευχαιμία
- 3) οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία
- 4) χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία.

Καρκινικοί δείκτες για την λευχαιμία είναι :

- 1) Beta-2-microglobulin : ένας αξιόπιστος δείκτης στην χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία
- 2) Calcitonin : ένας καρκινικός δείκτης για την μυελογενή λευχαιμία
- 3) CD52 : ένας καρκινικός δείκτης ο οποίος έχει φανεί χρήσιμος στον προσδιορισμό του σταδίου και στην διαχείριση του ασθενούς στην χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία.
- 4) Ferritin : χρήσιμος καρκινικός δείκτης στην μυελοειδή λευχαιμία
- 5) Wilms tumor gene (WT1).

### **2.3.7. Πολύ(A) ουρά και καρκίνος**

Η πολύ(A) ουρά είναι παρούσα στο 3' άκρο των mRNAs και επηρεάζει την κυτταροπλασματική σταθερότητα και μεταφρασιμότητα του mRNA (73). Ο σχηματισμός αυτής της δομής περιλαμβάνει την ενδονουκλεολυτική πέψη του πρόδρομου mRNA μαζί με την σύνθεση της πολύ(A) ουράς μία αντίδραση η οποία



απαιτεί πολλούς πρωτεϊνικούς παράγοντες. Δύο πρωτεϊνικοί παράγοντες καθώς επίσης και η PAP συνδέονται στο σύμπλοκο και απαιτούνται για τον σχηματισμό της πολύ(A) ουράς. Η PAP είναι ένα ένζυμο το οποίο εμπλέκεται στον σχηματισμό της πολύ(A) ουράς στο 3' άκρο του mRNA. Επίσης, υψηλά επίπεδα δραστηριότητας αυτού του ενζύμου σχετίζονται με γρήγορα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα.

Η δραστηριότητα της PAP έχει αναφερθεί στο παρελθόν να έχει προγνωστική αξία τουλάχιστον στις χρόνιες λευχαιμίες (74-75).

Έχει γίνει μία πρώτη μελέτη της προγνωστικής αξίας της δραστηριότητας της PAP στον καρκίνο του μαστού. Η δραστηριότητα της PAP προστέθηκε στην προγνωστική αξία παραμέτρων όπως η ηλικία, η κατάσταση των λεμφαδένων, το μέγεθος του όγκου. Τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η δραστηριότητα της PAP μπορεί να είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας φτωχής πρόγνωσης.

Πρώιμες μελέτες αποδίδουν τα αυξημένα επίπεδα της δραστηριότητας της PAP στην νεοπλασία στην φωσφορυλίωση. Μεταξύ των διαφόρων μορφών της PAP που χαρακτηρίζονται από ποικίλους βαθμούς φωσφορυλίωσης οι φωσφορυλιωμένες μορφές έχουν μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα. Έχει δειχθεί ότι η PAP μπορεί να φωσφορυλιωθεί *in vivo* και *in vitro* από το p34(cdc2)/cyclin B, τον παράγοντα δηλαδή προώθησης της μίτωσης.

Τα επίπεδα της δραστηριότητας της PAP στον καρκίνο του μαστού είναι δυνατόν να είναι μία παράμετρος που σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό και την δραστηριότητα μεταγραφής του καρκινικού κυττάρου. Υψηλά επίπεδα δραστηριότητας της PAP είναι δυνατόν να αντικατοπτρίζει απορρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης, το οποίο πιθανόν να συμβάλλει στον κακοήγη φαινότυπο του κυττάρου. Τα δεδομένα δείχνουν πως υψηλά επίπεδα της δραστηριότητας της PAP χαρακτηρίζουν έναν περισσότερο επιθετικό τύπο καρκίνου και η PAP έχει δειχθεί πως είναι ένας καινούργιος ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης [72].

### **2.3.8. Ο ρόλος των ριβονουκλεασών στον καρκίνο**

Οι ρυθμιστικές ανωμαλίες στην γονιδιακή έκφραση είναι χαρακτηριστικό πολλών καρκίνων. Μελέτες τα τελευταία δέκα χρόνια έχουν αποκαλύψει την σημαντικότητα του μετα-μεταγραφικού μηχανισμού στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης ειδικά στο πεδίο της αποικοδόμησης του mRNA. Οι διαδικασίες που αναφέρονται στην σταθερότητα του mRNA, στην μεταγραφική καταστολή και στην

αποικοδόμηση μεταγράφων συνδέονται πολύπλοκα μεταξύ τους και μπορούν να επηρεαστούν από διάφορα cis-acting στοιχεία όπως η πολύ (A) ουρά, τα στοιχεία ARES (αλληλουχίες πλούσιες σε AU) και από trans-acting παράγοντες όπως τα μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs), RBPs (οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το RNA), οι ριβονουκλεάσες [66].

Τα ncRNAs (μη κωδικοποιητικά) είναι μετάγραφα οποιουδήποτε μεγέθους που δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. Τα miRNAs είναι μία τάξη ncRNAs (20-25 νουκλεοτίδια) που παράγονται από ενδονουκλεολυτική επεξεργασία με τον μηχανισμό της παρεμβολή του RNA. Συνδέονται στην 3' UTR (αμετάφραστη περιοχή) των mRNAs είτε για να αναστείλουν την μετάφρασή του είτε για να γίνει η έναρξη της αποικοδόμησής του.

Οι RBPs (οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το mRNA) επηρεάζουν σημαντικά τον χρόνο ζωής των mRNAs. Επιτρέπουν την ποικιλία των χρόνων ημίσειας ζωής των mRNAs και ρυθμίζουν τους ρυθμούς αποσύνθεσής του σε ανταπόκριση σε διάφορα ερεθίσματα. Συνδέονται στην 3' UTR (αμετάφραστη περιοχή) των mRNAs καθώς και στην κωδικοποιητική περιοχή του mRNA προστατεύοντάς το από αποικοδόμηση.

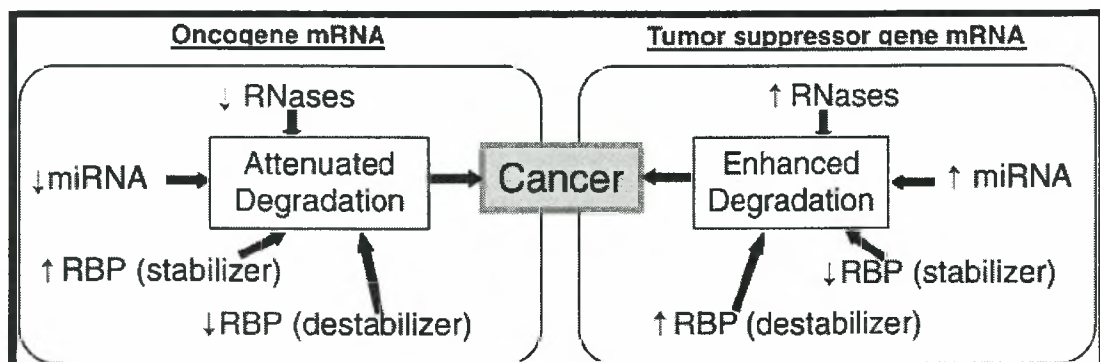
Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει ένας σημαντικός σύνδεσμος μεταξύ καρκινογένεσης και δυσλειτουργικών trans-acting παραγόντων στον μεταβολισμό του mRNA. Ορισμένα μέλη ριβονουκλεοπρωτεϊνών που συνδέονται με ένα σημαντικό αριθμό μεταγράφων ενοχοποιούνται ως ογκογονίδια ή καταστολείς ογκογονιδίων που μεσολαβούν στην αποικοδόμηση και στην σταθερότητα των μεταγράφων. Οι ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στην καρκινογένεση και έχουν σημαντική επίδραση στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Οι ριβονουκλεάσες μπορούν να δράσουν ως ογκοπρωτεΐνες ή καταστολείς όγκων δίνοντας μία άλλη στροφή στην ρύθμιση της αφθονίας του mRNA και στους ρυθμούς μετάφρασης [66].

Διάφορες ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στο στάδιο αποαδενυλίωσης του mRNA και μερικές εξωριβονουκλεάσες κόβουν τα 3', 5' άκρα των mRNA μετά την αφαίρεση καλύπτρας και πολύ (A) ουράς. Οι ενδοριβονουκλεάσες κόβουν εσωτερικά το mRNA και παράγουν προϊόντα που αποικοδομούνται από τις εξωριβονουκλεάσες. Απουσία ρυθμιστικών μηχανισμών οι ενδοριβονουκλεάσες έχουν μία προφανή επίδραση στην γονιδιακή έκφραση αφού μία και μόνο ενδονουκλεολυτική κοπή οδηγεί στην αδρανοποίηση του mRNA. Τα κύτταρα έχουν μηχανισμούς για την

αποτροπή μίας τέτοιας ανώμαλης αποικοδόμησης του mRNA ρυθμίζοντας αυτές τις ενδοριβονουκλεάσες. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι ορισμένες από αυτές ελέγχονται από κυτταρικά σήματα. Έτσι τα κύτταρα ανταποκρίνονται ικανοποιητικά σε αλλαγές του περιβάλλοντός τους ρυθμίζοντας την γονιδιακή έκφραση σε επίπεδο mRNA [66].

Πίνακας 2 : Κατάταξη ριβονουκλεασών [69-71]

ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ	
ΕΝΔΟΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ	ΕΞΩΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ
RNase A	Polynucleotide Phosphorylase (PNPase)
RNase H	RNase PH
RNase I	RNase II
RNase III	RNase R
RNase L	RNase D
RNase P	RNase T
RNase PhyM	Oligoribonuclease
RNase T1	Exoribonuclease I
RNase T2	Exoribonuclease II
RNase U2	-
RNase U1	-
RNase U	-



Εικόνα 8 : Τροποποιημένος μετα-μεταγραφικός έλεγχος στον καρκίνο [66]



Η μειωμένη αποικοδόμηση ογκογόνων mRNAs (εικόνα 6) μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου. Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται πως η μείωση στην δραστικότητα των ριβονουκλεασών και των miRNAs που αναστέλλουν την μετάφρασή ογκογόνων mRNAs οδηγούν σε μειωμένη αποικοδόμησή τους. Παρόμοιες επιδράσεις έχουν η αυξημένη δραστικότητα των σταθεροποιητικών πρωτεϊνών που συνδέονται με το mRNA ή η μειωμένη δραστικότητα των αποσταθεροποιητικών (destabilizer RBP).

Από την άλλη, αυξημένη αποικοδόμηση των ογκοκατασταλτικών mRNAs μπορεί επίσης να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου σε περίπτωση που έχουμε αυξημένη δραστικότητα ριβονουκλεασών ή των miRNAs που αναστέλλουν την μετάφρασή τους. Σημαντικό ρόλο κατέχουν οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το mRNA όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα [66].

### **2.3.9. Ο ρόλος της PARN στην βιογένεση του καρκίνου**

Οι ριβονουκλεάσες έχουν δείξει ότι ελέγχουν τα επίπεδα των mRNAs αλληλεπιδρώντας με τις πρωτεΐνες που συνδέονται με το RNA (RBPs, RNA binding proteins). Η PARN είναι ένα τέτοιο παράδειγμα ριβονουκλεάσης. Η αποαδενυλιωτική δραστικότητα της PARN συνδυαζόμενη με αποσταθεροποιητικές δράσεις των πρωτεϊνών που συνδέονται με το mRNA (RBPs) μπορεί να δράσει ως καταστολέας όγκου προκαλώντας αποικοδόμηση των mRNAs που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες. Σε μία έρευνα αποδείχτηκε ότι η ελαττωματική RBP δεν μπορούσε να στρατολογήσει την PARN σε κακοήθη κύτταρα (66).

### 3. Σκοπός

Η πολυ(A) ουρά των ευκαρυωτικών mRNAs είναι ένας κρίσιμος παράγοντας σταθερότητάς τους. Η ουρά προστίθεται μετά τη μεταγραφή από ένα κυρίως ένζυμο, την πολυ(A) πολυμεράση, PAP. Η αφαίρεσή της γίνεται από μια οικογένεια ενζύμων γνωστών ως αποαδενυλάσες, και σηματοδοτεί την αποικοδόμηση του mRNA. Η PAP έχει δειχθεί πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης πρόγνωσης καρκίνου του μαστού.

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να διερευνήσουμε εάν μεταβάλλεται η έκφραση της PARN σε ασθενείς με λευχαιμία σε σύγκριση με φυσιολογικά υγιή άτομα.

Αρχικά επιχειρήθηκε η ανίχνευση της PARN σε ορούς ασθενών με λευχαιμίες και στην συνέχεια σε δείγματα που είχαν ληφθεί από τον μυελό των οστών ασθενών με λευχαιμίες. Στη συνέχεια επιχειρήθηκε να διερευνηθούν τα αίτια των διαφορών της έκφρασης της PARN που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με λευχαιμία και τους μάρτυρες.

## 4. Υλικά και Μέθοδοι

### 4.1. Υλικά -Χημικά

#### 1) Χημικά

Acrylamide	Sigma
APS (Ammonium Persulfate)	Sigma
Alkaline Phosphatase System	KPL
Bioquant Protein	Merck
Bis-acrylamide	Sigma
Bromophenol Blue	Research Organics
Full Range Rainbow MW Markers	Amersham
HCl	Merck
KCl	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
NaVO <sub>3</sub>	Sigma
NaF	Sigma
Na <sub>2</sub> MoO <sub>3</sub>	Sigma
NaCl	Panreac
NaOH	Merck
Ponceau Red	Sigma
SDS	Sigma
Skimmed Milk	Scharlau
TCA	Fluka
Temed	Research Organics
Tween 20	Euroclone
Αιθανόλη	Merck
Ακετόνη	Merck
Αμμωνία	Merck
Γλυκερόλη	Panreac
Γλυκίνη	AppliChem

Ισοπροπανόλη	Scharlau
Μεθανόλη	Merck
2-μερκαπτοαιθανόλη	Riedel de Haen
Αναστολείς πρωτεασών (complete)	Roche

## 2) Δείγματα

Τα δείγματα ελήφθησαν σε συνεργασία με το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας από άτομα ασθενή με οξεία ή χρόνια λευχαιμία. Τα δείγματα ήταν οροί από περιφερικό αίμα ενώ άλλα περιείχαν κύτταρα από μυελό των οστών (πίνακας 3).

Πίνακας 3 : Προέλευση και αριθμός δειγμάτων

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ	ΑΡΙΘΜΟΣ		ΣΥΝΟΛΟ
	ΟΡΟΙ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ	ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΥΕΛΟΣ	
ΟΞΕΙΑ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	7	9	16
ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	1	6	7
ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	2	1	3
ΧΡΟΝΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	3	1	4
ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ		1	1
Μάρτυρες	6	3	9
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>			<b>40</b>

## 3) Πρωτεΐνες, Ένζυμα και Αντισώματα

Anti-lamin A/C	Cell Signalling
	Anti-PARN 74 Ευγενική προσφορά του Καθ. A. Virtanen , Uppsala University, Uppsala, Σουηδία
BSA Fraction V	Merck
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Chemicon
Protease Inhibitors	Roche

## 4) Διαλύματα

Διάλυμα λύσης κυττάρων (*Lysis Buffer*),

600mM KCl, 20mM Tris-HCl pH=7.8, 20% Glycerol, 4% Αναστολείς Πρωτεασών.

PBS 1x (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου

*Stock Διαλύματα*

30% bis/acrylamide (29:1 / acrylamide:bis-acrylamide) σε ddH<sub>2</sub>O

10% SDS

Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl pH 8.8 1M

Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl pH 6.8 1M

Ρυθμιστικό Διάλυμα 10x pH 8.3: Tris-base 1,5%, Γλυκίνη 7,2%, SDS 0,5%

Laemmli Buffer (1M Tris pH 6.8, 10% glycerol, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% κυανό της βρωμοφαινόλης).

Ανάλογα με την περιεκτικότητα σε πολυακρυλαμίδιο και με τη χωρητικότητα της συσκευής αναμειγνύονται οι σωστές αναλογίες των stock διαλυμάτων και στο τέλος γίνεται η προσθήκη των καταλυτών 10% APS και TEMED.

*Χρώση του gel*

Coomassie Brilliant Blue 0,01% (40% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ)

Destaining Buffer (30% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ)

*Διαλύματα για Transfer gel πολυακρυλαμιδίου σε PVDF μεμβράνη*

Transfer Buffer (Tris 48mM, Glycine 39mM, SDS 1.3mM, Methanol 20%)

*Διαλύματα για Detection*

Blotto Buffer (5% Skim Milk, 0,1 % Tween 20 σε PBS)

PBS-T (0,1% Tween 20 σε PBS)

ECL : Solution A και B

ECL : Solution A και B

Developer Solution, Kodak

Fixer Solution, Kodak

*Διάλυμα για αποσύνδεση αντισωμάτων από PVDF μεμβράνη (Stripping Buffer):* 100mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 2% SDS, 62.5mM Tris-HCl pH 6.7.

**4.2. Μέθοδοι****4.2.1. Bradford Protein Assay**

Η μέθοδος Bradford είναι μια απλή διαδικασία για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε ένα διάλυμα. Η τεχνική βασίζεται στην πρόσδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 στις πρωτεΐνες (Bradford 1976). Η χρωστική συναντάται σε τρεις μορφές: κατιονική (κόκκινη), ουδέτερη (πράσινη) και ανιονική (μπλε). Όταν η χρωστική προσδένεται στην πρωτεΐνη μετατρέπεται στην σταθερή αποπρωτονιωμένη μορφή ( $A_{\max}=595\text{nm}$ ) η οποία ανιχνεύεται με τη χρήση ενός φασματοφωτομέτρου.

Σε κάθε πρωτεϊνική ανάλυση η ιδανικότερη πρωτεΐνη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μάρτυρας είναι ένα εξευγενισμένο παρασκεύασμα της πρωτεΐνης που αναλύεται. Σε περίπτωση που δεν μπορεί να επιτευχθεί αυτό, χρησιμοποιούνται παρεμφερείς μέθοδοι με συνηθέστερη την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης με BSA (Bovine Serum Albumin) ή  $\gamma$ -globulin.

### Πρότυπη καμπύλη

Μπορεί να πραγματοποιηθεί σε τρεις διαφορετικές διατάξεις, την ανάλυση σε κυψελίδες των 5mL και 1mL, και την ανάλυση σε μικροπλάκα των 250μL. Το εύρος της γραμμικότητας των μεθόδων με χρήση BSA είναι 125-1000 μg/mL.

Ανακινούμε τη χρωστική μερικές φορές πριν τη χρήση.

Για ανάλυση σε κυψελίδα 1ml χρειάζονται: 20μl δείγματος, 1ml χρωστικής.

Η προετοιμασία των δειγμάτων γίνεται με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων (πίνακας 4). Τότε τα δείγματα επαρκούν για τρεις επαναλήψεις.

Επιάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 5min. Σε καμία περίπτωση η επώαση δεν πρέπει να ξεπερνά την 1h.

Ρυθμίζουμε το φασματοφωτόμετρο στα 595nm. Μηδενίζουμε με το τυφλό και μετράμε τις απορροφήσεις.

Κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη σε γραφική παράσταση με τις τιμές των απορροφήσεων στον άξονα  $\psi$  και τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων (μg/mL) στον άξονα  $\chi$ . Προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση των αγνώστων δειγμάτων χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη. Αν τα δείγματα έχουν αραιωθεί υπολογίζουμε την τελική συγκέντρωση πολλαπλασιάζοντας με τον συντελεστή αραιώσης. Απορρίπτουμε τιμές που ξεφεύγουν της γραμμικότητας της καμπύλης για μεγαλύτερη ακρίβεια.

Πίνακας 4. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης προσδιορισμού πρωτεϊνών κατά Bradford. Standard Assay 1ml.

Tube #	Standard Volume (μl)	Source of Standard	Diluent Volume (μl)	Final [Protein] (μg/ml)
1	70	2mg/mL stock	0	2000
2	75	2mg/mL stock	25	1500
3	70	2mg/mL stock	70	1000
4	35	tube 2	35	750
5	70	tube 3	70	500
6	70	tube 5	70	250
7	70	tube 6	70	125
8	-	-	70	0

#### *4.2.2. Λήψη ορού και απομόνωση κυττάρων από τα δείγματα ασθενών με λευχαιμίες*

##### *Λήψη ορού*

Το περιφερικό αίμα (4ml) φυγοκεντρείται στις 3500 στροφές (RPM) για δέκα λεπτά και ακολουθεί λήψη του υπερκείμενου (ορός). Το κατώτερο στρώμα αντιστοιχεί στο 45% του συνολικού όγκου αίματος είναι κόκκινου χρώματος και αποτελείται από ερυθροκύτταρα. Πάνω από αυτό βρίσκεται ένα πιο λεπτό στρώμα χρώματος άσπρου-φαιού που αντιστοιχεί στο 1% του ολικού όγκου. Πρόκειται για τα λευκοκύτταρα, που με τη σειρά τους διακρίνονται στον άνθρωπο σε πέντε τύπους: λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα. Το επάνω στρώμα της στήλης (υπερκείμενο) αποτελείται από το πλάσμα, το υγρό μέρος του αίματος, πρωτεϊνικής σύστασης, με pH ελαφρά αλκαλικό κιτρινωπού χρώματος.

##### *Διαχωρισμός μονοπύρηνων (περιφερικού αίματος, μυελού των οστών) σε φικόλη*

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται απομόνωση λεμφοκυττάρων πολύ εύκολα από το περιφερικό αίμα και το μυελό των οστών με την εφαρμογή φυγοκεντρήσεως πυκνότητας σε κλίση φικόλης (Ficoll) και μετριζιμίδης (Hypaque).

Η φικόλη είναι συνθετική ουσία υψηλού μοριακού βάρους. Η λειτουργία της μετριζιμίδης είναι να δημιουργεί πυκνότητα και ώσμωση τέτοια ώστε να απομακρύνονται από τα λεμφοκύτταρα τα άλλα κύτταρα. Οι διάφοροι τύποι κυττάρων λόγω διαφορετικής πυκνότητας της μάζας τους καθιζάνουν με διαφορετική ταχύτητα στα παρασκευάσματα της Ficoll-paque.

Ο διαχωρισμός βασίζεται στο ότι τα λεμφοκύτταρα έχουν μικρότερη πυκνότητα από τα ερυθροκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα. Το δείγμα (αίμα-μυελός) που λαμβάνεται, τοποθετείται αμέσως σε φιαλίδιο με αντιπηκτικό. Το δείγμα αυτό αραιώνεται με υλικό ιστοκαλλιέργειας και επιστοιβάζεται προσεκτικά στην επιφάνεια του υγρού στρώματος φικόλης (Ficoll-Hypaque), η οποία βρίσκεται μέσα στο δοκιμαστικό σωλήνα. Η φικόλη έχει μεγαλύτερη πυκνότητα από εκείνη των λεμφοκυττάρων, αλλά μικρότερη από αυτή των ερυθροκυττάρων και κοκκιοκυττάρων (π.χ. ουδετεροφίλων).



Μετά από φυγοκέντρωση, τα ερυθροκύτταρα και τα πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα διέρχονται διαμέσου της φικόλης για να σχηματίσουν ίζημα στον πυθμένα του σωληναρίου, ενώ τα λεμφοκύτταρα και ελάχιστα μονοπύρηνα παραμένουν πάνω από το στρώμα της φικόλης, στη μεσοστοιβάδα. Έτσι, μπορούν να παραληφθούν από το στρώμα διαχωρισμού.

Αυτά τα κύτταρα ονομάζονται τα μονοπύρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC). Το παρασκεύασμα των λεμφοκυττάρων μπορεί να απαλλαγεί περαιτέρω από τα μακροφάγα (μονοπύρηνα) με την προσθήκη ρινισμάτων σιδήρου. Τα ρινίσματα προσλαμβάνονται από τα φαγοκύτταρα, τα οποία μπορούν να απομακρυνθούν με έναν ισχυρό μαγνήτη.

Εναλλακτικά, τα μονοπύρηνα (μακροφάγα) μπορούν να απομακρυνθούν εάν αφήσουμε το εναιώρημα των κυττάρων να καθιζάνει σε πλαστικό τρυβλίο. Τα μακροφάγα προσκολλώνται στο πλαστικό, ενώ τα λεμφοκύτταρα μπορούν να απομακρυνθούν με πλύσιμο.

#### *Υλικά και όργανα*

- 1) διάλυμα Ficol-Isopaque(ή Ficoll-Hypaque, Lymphoprep, Histopaque)
- 2) αίμα με αντιπηκτικό (ηπαρίνη ή EDTA)
- 3) σωλήνες φυγοκέντρου 15 ml (πλαστικοί, κωνικοί), φυγόκεντρος
- 4) Hanks. balanced salt solution (HBSS), θρεπτικό μέσο RPMI
- 5) Πιπέτες Pasteur, πιπέτες Gilson και tips
- 6) αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) και καλυπτρίδες
- 7) φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας
- 8) διάλυμα Tuerk (95 ml dH<sub>2</sub>O, 3 ml οξικό οξύ, 4-5 σταγόνες Giemsa)
- 9) χρωστική Trypanblue (άλας νατρίου 0.4% (w/v) σε φυσιολογικό ορό)

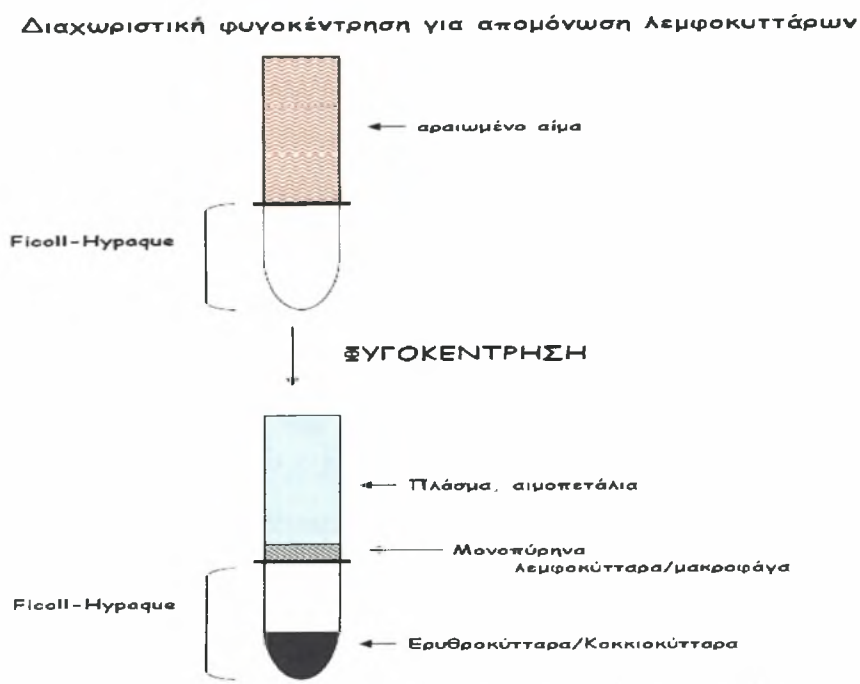
#### *Μέθοδος*

1. Αραιώνουμε το αίμα σε ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων (π.χ. Hanks. balanced salt solution, HBSS) ή σε θρεπτικό μέσο 1:1.
2. Προσθέτουμε 5 ml Ficoll-Isopaque(ή άλλο παρόμοιο υλικό) σε κωνικό σωλήνα φυγοκέντρου (ειδικό βάρος φικόλης= 1.078).

3. Προσεκτικά επιστοιβάζουμε το αραιωμένο αίμα (περίπου 10 ml) επάνω στο στρώμα της Ficoll-Isopaque.
4. Φυγοκέντρηση (1700 RPM, 25 min, 20 °C).
5. Παρατηρούμε το διαχωρισμό των κυττάρων σε ζώνες. Με πιπέτα Pasteur απομακρύνουμε το επάνω στρώμα χωρίς να πειράζουμε το στρώμα των λεμφοκυττάρων. Το πάνω στρώμα περιέχει τα αιμοπετάλια και το πλάσμα.
6. Με άλλη πιπέτα Pasteur μεταφέρουμε το στρώμα των λεμφοκυττάρων σε σωλήνα φυγοκέντρου. (Το στρώμα της φικόλης περιέχει τα κοκκιοκύτταρα και στον πυθμένα βρίσκονται τα ερυθρά και νεκρά κύτταρα).
7. Προσθέτουμε στο στρώμα των λεμφοκυττάρων 15 ml Hanks balanced salt solution (HBSS) (ή θρεπτικό μέσο που περιέχει 5-10% ορό μοσχαριού) και ανακατεύουμε με πιπέτα.
8. Φυγοκέντρηση (1400 RPM, 10 min, 20 °C).
9. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο με πιπέτα.
10. Προσθέτουμε πάλι 10 ml HBSS (ή θρεπτικό μέσο) και ανακατεύουμε προσεκτικά.
11. Φυγοκέντρηση (1400 RPM, 10 min, 20 °C).
12. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αιωρούμε τα λεμφοκύτταρα σε 1 ml θρεπτικό μέσο
13. Παρατήρηση και μέτρηση κυττάρων στο μικροσκόπιο.
14. Αποθήκευση των κυττάρων σε 1 ml freezing medium στους -80 °C

#### *Μέτρηση κυττάρων*

1. Για την παρατήρηση και μέτρηση των μονοπύρηνων κυττάρων που συλλέξαμε στο θρεπτικό μέσο, αραιώνουμε τα κύτταρα ως εξής:
  - A. 20 μl αιώρημα κυττάρων και 380 μl διάλυμα Tuerk (παρατήρηση κυττάρων)
  - B. 200 μl αιώρημα κυττάρων, 300 μl HBSS και 500 μl διάλυμα Trypanblue (αραίωση 1:5) (το Trypanblue χρωματίζει μπλε τα νεκρά κύτταρα)
2. Ανακατεύουμε προσεκτικά και περιμένουμε 5-10 min.
3. Τοποθετούμε 1 σταγόνα στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, στην ειδική εσοχή κάτω από την καλυπτρίδα.
4. Μετράμε τα κύτταρα



Εικόνα 9: Διαχωριστική φυγοκέντρηση για απομόνωση λεμφοκυττάρων

#### 4.2.3. Λύση των κυττάρων των δειγμάτων με κύτταρα από μυελό των οστών

Φυγοκέντρηση στις 1000-1200 στροφές για 4-5λεπτά. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 20μl lysis buffer, παρουσία αναστολέων πρωτεασών. Ψύξη των δειγμάτων σε υγρό άζωτο, μεταφορά στους 60°C για 3 λεπτά και ανάδευση (vortex) .Επανάληψη του παραπάνω κύκλου 3 φορές. Φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό και λήψη του υπερκείμενου [65].

#### 4.2.4. TCA precipitation protocol (κατακρήμνιση πρωτεΐνης)

Αντιδραστήρια

- 1) TCA 100% (ή 72%)
- 2) TCA 2,5%
- 3) DOC 0,15%
- 4) Ακετόνη
- 5) Laemmli Buffer
- 6) Αμμωνία (ατμοί)

Τα βήματα της μεθόδου είναι τα εξής : (τα δείγματα σε πάγο)

- 1) Εάν ο όγκος των δειγμάτων μας των οποίων την πρωτεΐνη θέλουμε να καταβυθίσουμε είναι < 100μl συμπληρώνουμε μέχρι τελικού όγκου 100μl.
- 2) 10% του όγκου του δείγματος DOC 0,15% και χρονομετρώ 10 min
- 3) 10% του όγκου του δείγματος TCA 100% και χρονομετρώ 10 min
- 4) Τοποθέτηση των δειγμάτων για 30 min στους -20 °C
- 5) Φυγοκέντρηση 12000rpm/15min/4 °C
- 6) Αφαίρεση του υπερκείμενου
- 7) Ξέπλυμα του ιζήματος με 200μl TCA 2,5% (να μην διαλυθεί το ίζημα)
- 8) Προσθήκη 200μl ακετόνης με αναδευτικές κινήσεις
- 9) Φυγοκέντρηση full speed/15min/4 °C
- 10) Ξέπλυμα του ιζήματος με 200μl ακετόνης (να μην διαλυθεί το ίζημα)
- 11) Προσθήκη σε κάθε δείγμα 20μl Laemmli Buffer 1X
- 12) Στην περίπτωση που το χρώμα του Laemmli Buffer μεταβληθεί σε κίτρινο ρίχνουμε αέρια αμμωνίας
- 13) Βράσιμο των δειγμάτων στους 95 °C/5 min, αποθήκευση σε -20°C.

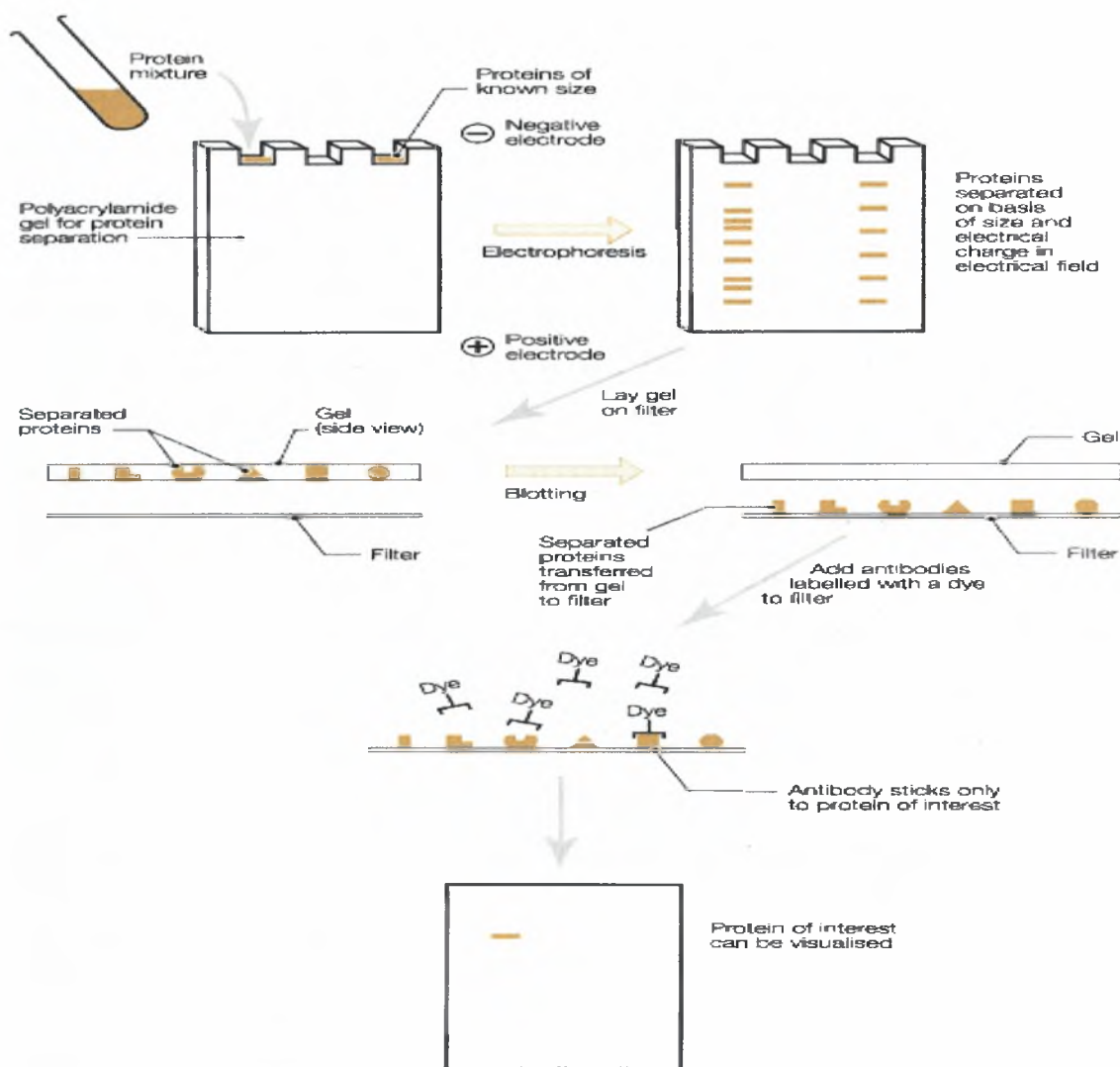
Με τη μέθοδο αυτή έχουμε απομονώσει από το δείγμα όλες τις πρωτεΐνες που αυτό περιέχει και έχει γίνει η διαλυτοποίησή τους στο Laemmli Buffer και επομένως είναι έτοιμες για να τις φορτώσουμε στα πηγαδάκια του SDS-τζελ πολυακρυλαμιδίου και να ακολουθήσει η western blot για τον εντοπισμό και την οπτικοποίηση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει.

#### **4.2.5. Ανίχνευση πρωτεϊνών με Western blot**

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε 10% SDS-τζελ πολυακρυλαμιδίου στα 160V. Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται σε PVDF μεμβράνη με τη συσκευή Semidry Transfer System στα 270mA για 40 λεπτά. Βαφή της μεμβράνης με Ponceau red επιβεβαιώνει τη μεταφορά.

Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με Blocking Buffer για 1 ώρα, υπό συνεχή ανάδευση σε rollers. Το πρώτο rabbit anti-PARN74 αντίσωμα προστίθεται σε αραιώση 1:1000 και επωάζεται όλο το βράδυ στους 4°C. Συνεχίζουμε με 4 πλυσίματα με washing Buffer για 15 λεπτά το καθένα. Η αραιώση του δεύτερου αντισώματος goat anti-rabbit IgG-HRP αντιστοιχεί σε 1:10000 και η επώασή του γίνεται για 1 ώρα σε rollers. Ακολουθούν 4 πλυσίματα με PBS-T για 10-15 λεπτά το καθένα. Η

εμφάνιση (ECL ή ECL Plus) γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Amersham. Για επανάληψη της ανοσοανίχνευσης με το ίδιο αντίσωμα ή για επώαση με διαφορετικό (reprobing), ακολουθείται η διαδικασία της αποσύνδεσης (stripping) των αντισωμάτων σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Amersham (Εικόνα 10).



Sources: Konrad Bishop. BSE Inquiry, London, 2000

Εικόνα 10 : Απεικόνιση της μεθόδου western blot

#### 4.2.6. Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση του RNA έγινε βάσει του πρωτοκόλλου Total RNA isolation.

Nucleospin® RNA II Nucleospin® RNA L

Macherey-Nagel

#### 4.2.7. PCR αντίστροφης μεταγραφής (*Reverse transcription-PCR, RT-PCR*), *quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)*

Η PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR, RT-PCR) καθώς και η PCR αντίστροφης μεταγραφής έχουν μεταβάλλει δραματικά το πεδίο μέτρησης της γονιδιακής έκφρασης. Η RT-PCR είναι μία τεχνική συλλογής των δεδομένων κατά την διάρκεια της διαδικασίας της PCR, δηλαδή καθώς αυτή πραγματοποιείται, αφού συνδυάζει την ενίσχυση και την ανίχνευση σε ένα μόνο βήμα. Η RT-PCR αποτελεί ένα πολύτιμο και ευαίσθητο εργαλείο για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο RNA διότι χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ταχύτητα και ευαισθησία.

Στην RT-PCR ως αρχικό δείγμα χρησιμοποιείται το RNA αντί του DNA. Το RNA μετατρέπεται σε cDNA, με το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Για τη μεταγραφή αυτή χρησιμοποιούνται τυχαία εξαμερή ή εννεαμερή, ολιγοdT<sub>s</sub> ή ειδικοί εκκινητές συμπληρωματικοί ως προς την αλληλουχία στόχο και το cDNA που θα παραχθεί θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για την DNA πολυμεράση στην συνήθη τεχνική της PCR.

Εξελίξεις στην RT-PCR περιλαμβάνουν την ανάπτυξη απλών πρωτοκόλλων στα οποία η σύνθεση cDNA και η αντίδραση PCR εκτελούνται σε ένα στάδιο (one step RT-PCR). Τα πρωτόκολλα αυτά βασίζονται στην αξιοποίηση της διπλής ιδιότητας ορισμένων θερμοσταθερών DNA πολυμερασών όπως η *T. Thermophilus* (Tth) DNA πολυμεράση να μεταγράψουν αντίστροφα RNA παρουσία  $Mn^{2+}$ , ενώ ταυτόχρονα δρουν και ως DNA πολυμεράσες. Τα πρωτόκολλα αυτά προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα λόγω της απλούστερης διαδικασίας αλλά κυρίως προστασία από κίνδυνο επιμόλυνσης.

Μπορεί να διεξαχθεί σε ένα βήμα (one step reaction), όπου η όλη διαδικασία από τη σύνθεση του cDNA μέχρι την αντίδραση πολυμεράσης συμβαίνει στο ίδιο tube ή σε δύο βήματα (two-steps) όπου η διαδικασία συμβαίνει σε διαφορετικά tubes. Η Real time PCR one step θεωρείται ότι μειώνει την πειραματική απόκλιση γιατί οι ενζυμικές αντιδράσεις συμβαίνουν στο ίδιο tube. Ωστόσο αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί μία αρχική RNA μήτρα η οποία είναι επιρρεπής σε αποικοδόμηση, οπότε η one step αντίδραση μπορεί να είναι αναποτελεσματική σε πειράματα όπου αναλύεται το ίδιο δείγμα RNA για κάποιο χρονικό διάστημα. (83)

Η RT-PCR εκτελέστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Invitrogen “SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit”.



Στα δείγματα (κύτταρα από μυελό των οστών) έγινε εξαγωγή του RNA σύμφωνα με το RNA/protein extraction kit. Στην συνέχεια έγινε η φωτομέτρησή τους για να βρεθεί η περιεκτικότητα σε RNA. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της invitrogen η αρχική ποσότητα - δείγμα RNA θα πρέπει να κυμαίνεται από 1 pg στα 50 μl αντίδρασης έως 1μg στα 50 μl αντίδρασης. Για κάθε δείγμα απαιτούνται 3 αντιδράσεις για κάθε ένα παράγοντα που θέλουμε να ελέγξουμε, για παράδειγμα την διαφοροποίηση των επιπέδων έκφρασης της αποαδενύλασης PARN σε ασθενείς με λευχαιμία και σε φυσιολογικά άτομα. Υπολογίζω για κάθε παράγοντα τι ποσότητες θα βάλω από τα αντιδραστήρια της Invitrogen :

#### Μίγμα Αντίδρασης

Thermoscript Plus/Platinum Taq Enzyme Mix

2X thermoscript reaction mix

Template RNA (δείγμα)

Forward primer

Reverse primer

RNaseOUT

DEPC-treated water

#### Cycling Program

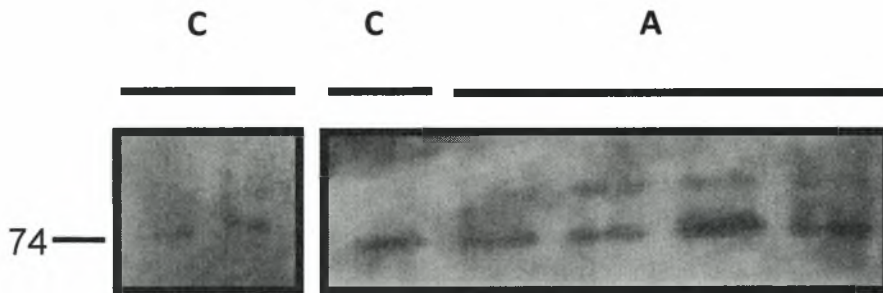
cDNA synthesis :	50-70 °C ,	15-30 min
	95 °, 5 min	(1 cycle)
	35-40 cycles	
	95°C,	15 sec
	55-60 °C	30 sec
	68-72 °C	1min/Kb

## 5. Αποτελέσματα

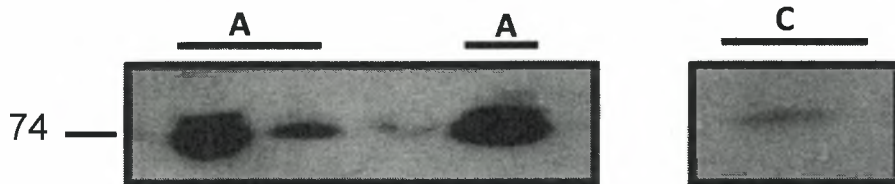
### 5.1. Ανίχνευση PARN σε ορούς ασθενών με λευχαιμίες.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σκοπός αυτής της εργασίας είναι να διερευνήσουμε εάν μεταβάλλεται η έκφραση της αποαδενυλάσης PARN σε ασθενείς με λευχαιμία σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα. Τα πρώτα δείγματα που εξετάσαμε ήταν οροί από περιφερικό αίμα από άτομα με λευχαιμία. Σε κάθε δείγμα έγινε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford ώστε να μπορούμε να υπολογίσουμε πόση ποσότητα θα πάρουμε από κάθε δείγμα για να καταβυθίσουμε τις πρωτεΐνες του και να φορτωθεί η ίδια ποσότητα πρωτεΐνης στο gel ώστε να εξασφαλιστεί η εγκυρότητα της σύγκρισης της έντασης των ζωνών.

Μία πρώτη εικόνα λήφθηκε με western blot για την μεταβολή της έκφρασης της PARN σε φυσιολογικά άτομα και σε άτομα με λευχαιμία (Εικόνα 11).



Εικόνα 11 : Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της PARN σε δείγματα από φυσιολογικά άτομα (C) και ασθενών με λευχαιμία (A). Ο αριθμός αριστερά δηλώνει τη μοριακή μάζα του ενζύμου.



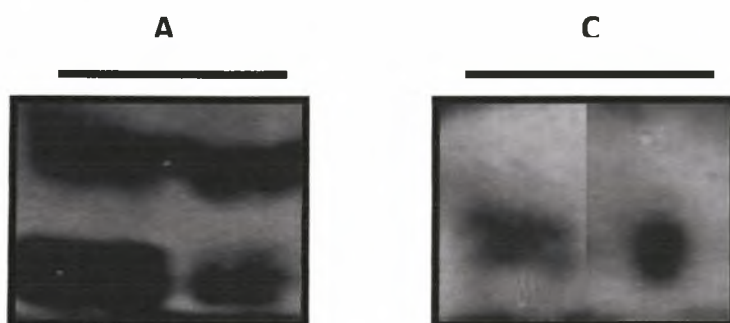
Εικόνα 12 : Μεταβολή της έκφρασης της PARN σε φυσιολογικά άτομα (C) και σε ασθενή με λευχαιμία (A). Ο αριθμός αριστερά δηλώνει τη μοριακή μάζα του ενζύμου.

Στις εικόνες 11,12 βλέπουμε την απεικόνιση της έκφρασης της PARN σε ορούς σε ασθενή άτομα (A) σε σύγκριση με τα υγιή φυσιολογικά (C). Οι ζώνες των ασθενών είναι εντονότερες και επιπλέον στην εικόνα 11 απεικονίζεται και μία δεύτερη ζώνη η οποία απουσιάζει από τα υγιή άτομα.

Μία άλλη εικόνα όπου φαίνεται η μεταβολή της έκφρασης της PARN σε ορούς από περιφερικό αίμα είναι :



Εικόνα 13 : Μεταβολή της έκφρασης της PARN σε φυσιολογικά άτομα (C) και σε ασθενή (A) με λευχαιμία. Δείγμα από περιφερικό αίμα

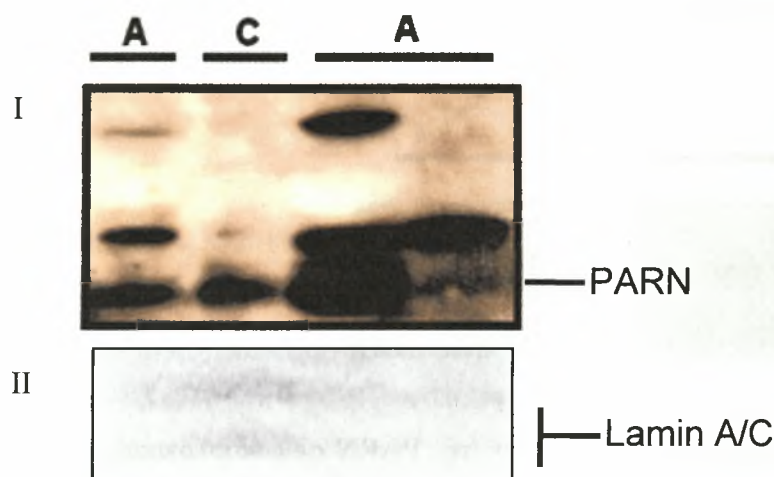


Εικόνα 14 : Μεταβολή της έκφρασης της PARN σε φυσιολογικά άτομα (C) και σε ασθενή (A) με λευχαιμία. Δείγμα από περιφερικό αίμα.

Ομοίως, στις εικόνες 13,14 φαίνεται η διαφοροποίηση της έκφρασης της PARN. Τα ασθενή άτομα παρουσιάζουν εντονότερες ζώνες σε σχέση με τους μάρτυρες και στην εικόνα 14 απεικονίζεται και πάλι μία δεύτερη ζώνη στους ασθενείς.

### 5.2. Ανίχνευση της PARN σε δείγματα μυελού των οστών σε ασθενείς με λευχαιμίες.

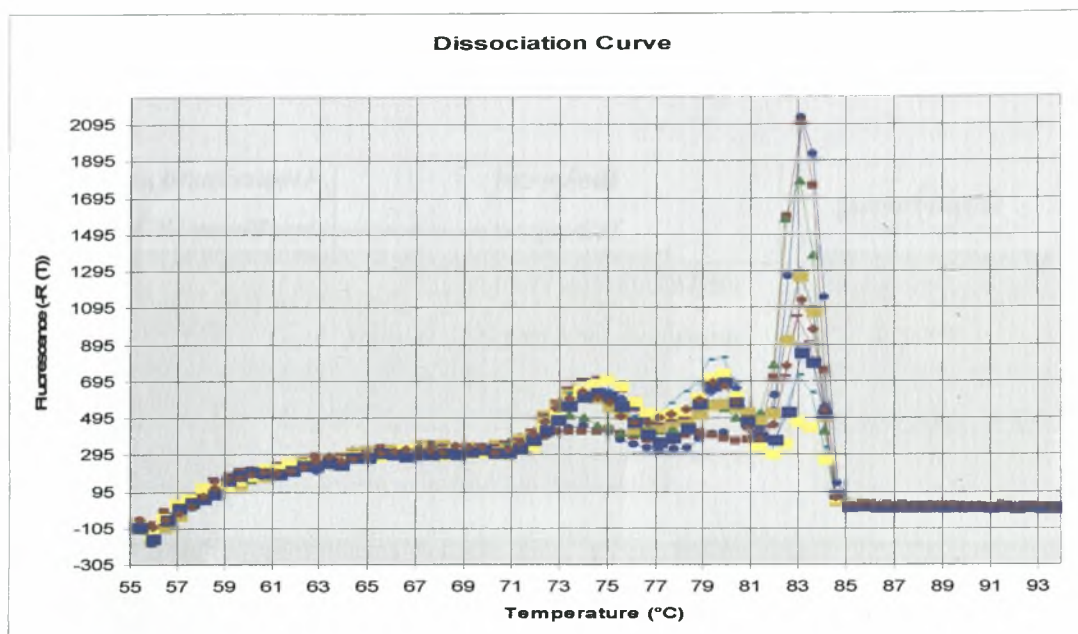
Στην συνέχεια έγινε η επεξεργασία και η ανάλυση των δειγμάτων με κύτταρα από μυελό των οστών για να διαπιστωθεί η μεταβολή της έκφρασης της PARN (Εικόνα 6).



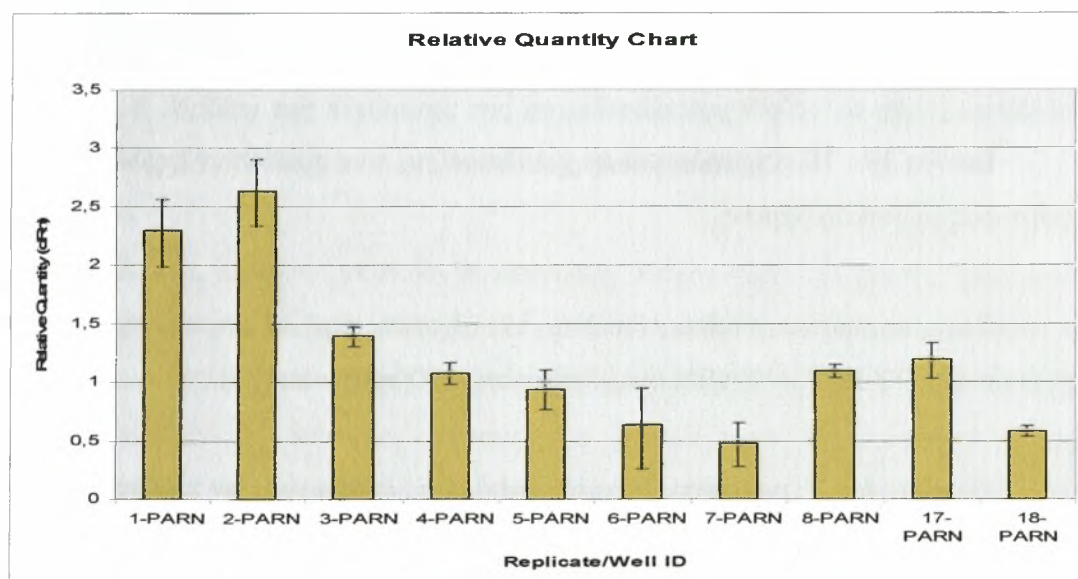
Εικόνα 15: Ανοσοαποτύπωμα με αντίσωμα έναντι της PARN δειγμάτων μυελού οστών σε ασθενείς με λευχαιμία (I). Ο έλεγχος του φορτώματος έγινε με λαμίνη A/C ως μάρτυρα (II).

### 5.3. Επίπεδα έκφρασης mRNA PARN με quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Στην συνέχεια του πειραματικού μας σχεδίου ασχοληθήκαμε με δείγματα που περιέχουν κύτταρα από μυελό των οστών από ασθενείς με λευχαιμία σε σύγκριση με φυσιολογικά υγιή άτομα. Στόχος μας να ερευνήσουμε πως μεταβάλλεται η έκφραση της αποαδενυλάσης PARN με την μέθοδο της western blot καθώς και η διασταύρωση των αποτελεσμάτων αυτών με την reverse transcription PCR (αντίστροφης μεταγραφής). Ακολούθησε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης. Τα αποτελέσματα της RT-PCR απεικονίζονται στις παρακάτω εικόνες :



Εικόνα 17 : Διάγραμμα διάστασης (dissociation plot). Επίπεδα mRNA της PARN (επίπεδα φθορισμού με χρωστική SYBR Green) σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Τα ειδικά προϊόντα της RT-PCR αναμένονται σε  $T_m > 78^{\circ}\text{C}$ .

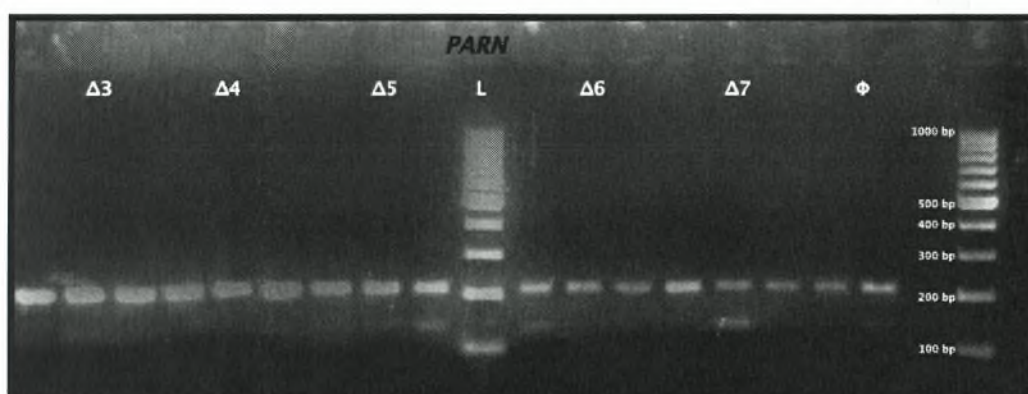


Εικόνα 18 : Σχετικά επίπεδα έκφρασης (relative chart) mRNA της PARN (επίπεδα φθορισμού με χρωστική SYBR Green) δειγμάτων ασθενών (στήλες 1, 2, 3, 4, 5, 8, 17) με μάρτυρες (στήλες 6, 7, 18).



Πίνακας 5 : Χαρακτηριστικά της αποαδενυλάσης PARN και αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος που αναμένεται από την RT-PCR.

Παράγοντας	Βιολογική λειτουργία	Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
PARN	DEDD αποαδενυλάση / αποικοδόμηση πολύ(A) ουρών mRNAs	200



Εικόνα 19 : Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης, των προϊόντων της RT-PCR, L: μάρτυρας μοριακού βάρους.

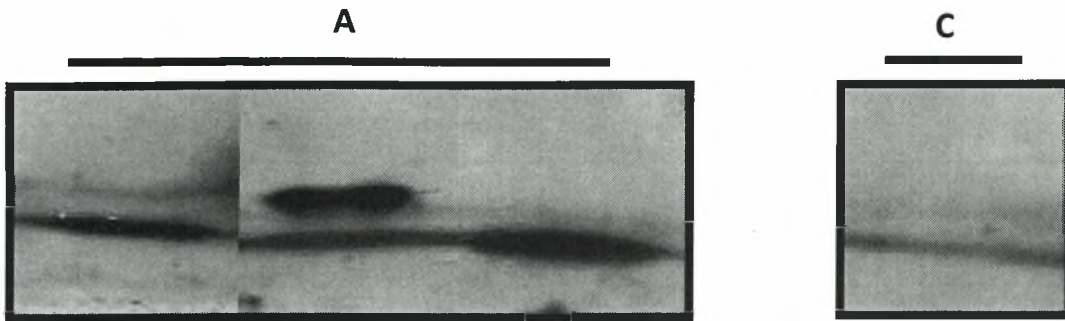
Στην παραπάνω εικόνα (εικόνα 19) έχουμε την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR. Η PARN αναμένεται στις 200 bp (πίνακας 6).

Πίνακας 6 : Μέσος όρος σχετικής ποσότητας έκφρασης των προϊόντων της PARN στην RT-PCR για ασθενείς και μάρτυρες, όπως προκύπτει από την Εικόνα 18.

PARN Replicate	ΑΣΘΕΝΕΙΣ, A	MARTYPEΣ, M	Μεταβολή έκφρασης (A-M/M)x100	Μεταβολή έκφρασης (A/M)
Μέσος Όρος Relative Quantity	1,23	0,56	119,6%	2,2



Τα ίδια δείγματα εξετάστηκαν για τα επίπεδα έκφρασης της PARN σε επίπεδο πρωτεΐνης με western blot. Τα αποτελέσματα δίνονται στην Εικόνα 20 :



Εικόνα 20 : Μεταβολή της έκφρασης της αποαδενυλάσης PARN σε φυσιολογικό άτομο ( C ) και σε ασθενείς ( A ) με λευχαιμίες.

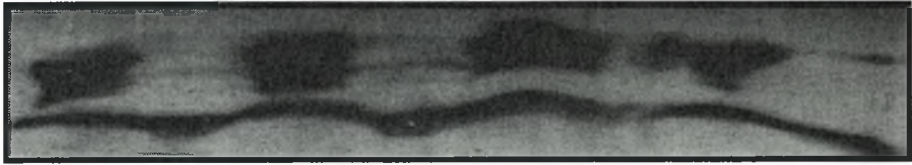
Στην εικόνα 20 βλέπουμε τις εντονότερες ζώνες της PARN στους ασθενείς με λευχαιμίες καθώς και την ύπαρξη μίας δεύτερης ζώνης της PARN που ενισχύει τα προηγούμενα αποτελέσματα.

#### **5.4. Μελέτη της έκφρασης της αποαδενυλάσης PARN σε ορούς ασθενών με λευχαιμίες με την επίδραση της αλκαλικής φωσφατάσης.**

Σε ένα επόμενο επίπεδο διερεύνησης επιλέχθηκαν δείγματα ορού από περιφερικό αίμα από άτομα με λευχαιμία για να διαπιστωθεί πως διαφοροποιείται η έκφραση της PARN. Η χρήση της αλκαλικής φωσφατάσης έγινε με στόχο να διαπιστωθεί εάν οι διάφορες μορφές της PARN που ανιχνεύθηκαν στους προηγούμενους πειραματικούς σχεδιασμούς οφείλονται στην κατάσταση φωσφορυλίωσης του ενζύμου. Έγινε η λήψη ίσων ποσοτήτων από δύο δείγματα, των οποίων η συγκέντρωση σε πρωτεΐνη έχει υπολογιστεί. Στην μία ποσότητα του δείγματος έγινε κανονικά η διαδικασία της καταβύθισης με το TCA precipitation protocol ενώ στην άλλη ποσότητα προσθέσαμε αλκαλική φωσφατάση (CIAP) με επώαση των δειγμάτων μας για 1 ώρα στους 37°C και στην συνέχεια ακολούθησε το TCA precipitation protocol. Παράλληλα ελέγχθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην αποτελεσματικότητα της δράσης της φωσφατάσης, επωάζοντας τα δείγματα στους 37°C. Τέλος ελέγχθηκε η πιθανή ύπαρξη ενδογενών φωσφατασών που μπορεί

να επηρεάζουν τα δείγματα (διαδρομές 4 και 8). Για το λόγο αυτό, τα δείγματα επώαστηκαν στους 37°C για 1 ώρα, απουσία αναστολέων φωσφατασών (NaF, NaVO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>). Ο πειραματικός σχεδιασμός και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 21.

Δείγμα	01				02			
CIAP	-	+	+	-	-	+	+	-
PhIs	-	-	+	-	-	-	+	-
37 °C	-	-	+	+	-	-	+	+

1      2      3      4      5      6      7      8

Εικόνα 21 : Επίδραση αλκαλικής φωσφατάσης (CIAP) σε δύο δειγμάτων ορού ασθενών. PhIs, αναστολείς φωσφατασών.

Στην παραπάνω εικόνα (εικόνα 21) παρατηρούμε ότι στα δείγματα που προστέθηκε αλκαλική φωσφατάση απουσιάζουν οι ζώνες που αντιστοιχούν σε μορφές μικρότερης κινητικότητας. Η χρήση αναστολέων φωσφατασών ήρε την απουσία αυτή. Η επώαση στους 37°C για 1 ώρα απουσία αναστολέων (διαδρομές 4 και 8) προκάλεσε ξανά την εξαφάνιση των μεγαλύτερων μορφών. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως οι μεγαλύτερης μοριακής μάζας μορφές της PARN που παρατηρούμε στα δείγματα των ασθενών οφείλονται πιθανόν σε φωσφορυλιωμένα παράγωγα του ενζύμου.

## 6. Συζήτηση

Στόχος της εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης της PARN σε λευχαιμίες. Η PARN είναι ένα ένζυμο (ριβονουκλεάση) με αποαδενυλιωτική δραστικότητα [28,29]. Αφαιρεί δηλαδή τις πολύ(A) ουρές των mRNAs. Στον πυρήνα η διαδικασία της αποαδενυλίωσης περιορίζει τις πολύ (A) ουρές των νεοσυντιθέμενων mRNAs στα κατάλληλα μήκη τους. Στο κυτταρόπλασμα η εκτεταμένη αποαδενυλίωση ενός mRNA σηματοδοτεί την έναρξη της αποικοδόμησης ή της καταστολής του [27]. Συνεπώς, η πολύ(A) ουρά που αποκτά το mRNA είναι σημαντική στην έναρξη της μετάφρασης και στον προσδιορισμό της σταθερότητας του mRNA [72]. Η δραστικότητα της PARN ρυθμίζεται με πολλούς τρόπους. Μεταξύ αυτών είναι η αλληλεπίδραση με το 5' κάλυμμα και παράγοντες που συνδέονται με αυτό, παράγοντες που προσδέονται στην πολύ(A) ουρά (π.χ. η PABP), καθώς και ομοιοπολικές τροποποιήσεις του ενζύμου όπως η φωσφορυλίωση. Ειδικότερα για το τελευταίο, έχειδειχθεί πως η PARN είναι μία φωσφοπρωτεΐνη [80]. Αλλαγές στην κατάσταση φωσφορυλίωσής της είναι δυνατόν να είναι υπεύθυνες για τον παρατηρούμενο ρυθμό αποσύνθεσης του mRNA προάγοντας τις αλληλεπιδράσεις καλύμματος και αποαδενυλάσης PARN. Πολλαπλά κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης στην PARN έχουν προβλεφθεί ως πιθανές θέσεις για φωσφορυλίωση. Αυτές οι αλλαγές στην κατάσταση φωσφορυλίωσης είναι δυνατόν να καθορίσουν εάν το mRNA θα μεταφραστεί ή θα καταστραφεί [80]. Μπορεί να αναλογιστεί κανείς τις συνέπειες αυτών των αλλαγών γνωρίζοντας πως η αποαδενυλιωτική δραστικότητα της PARN συνδυαζόμενη με αποσταθεροποιητικές δράσεις των πρωτεϊνών που συνδέονται με το mRNA (RBPs) μπορεί να δράσει ως καταστολέας όγκου προκαλώντας αποικοδόμηση των mRNAs που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες [66].

Ανάλογες παρατηρήσεις με ένζυμα που σχετίζονται με την πολύ(A) ουρά έχουν γίνει και παλιότερα. Για παράδειγμα, έχειδειχθεί πως η πολύ(A) πολυμεράση, το ένζυμο που προσθέτει την πολύ(A) ουρά, απαντά σε πολλαπλές μορφές σε καρκινικά κύτταρα (REF). Οι μορφές αυτές φαίνεται πως είναι φωσφορυλιωμένα παράγωγα μιας μικρότερης μοριακής μάζας μορφής. Στην φωσφορυλίωση έχουν αποδοθεί και η αύξηση της δραστικότητας της PAP σε ασθενείς με καρκίνου του μαστού [81], αν και έχει αναφερθεί πως η PAP φωσφορυλιώνεται από τον MPF

(mitosis promoting factor) κατά τη φάση της μίτωσης και μειώνεται η δραστηριότητά της. Παρόλα αυτά, η υψηλή δραστηριότητα της PAP σε δείγματα ασθενών με καρκίνο και καρκινικών κυττάρων συνδέεται με αυξημένη έκφραση του ενζύμου [72]. Έχει γίνει μία πρώτη μελέτη της προγνωστικής αξίας της δραστηριότητας της PAP στον καρκίνο του μαστού και έχειδειχθεί ότι μπορεί να αποτελέσει έναν δείκτη πρόγνωσης [72]. Έχειδειχθεί ότι η φωσφορυλίωση κρίσιμων πρωτεϊνών είναι δυνατόν να μεταβάλλει τα επίπεδα της μετάφρασης [76-79].

Με βάση την παραπάνω γνώση επιχειρήσαμε να μελετήσουμε την έκφραση της PARN σε ασθενείς με λευχαιμίες. Τα αποτελέσματα της μελέτης της έκφρασης της σε ορούς και σε κύτταρα ασθενών με λευχαιμίες σε σύγκριση πάντα με φυσιολογικά υγιή άτομα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά. Αυτό που αρχικά επιτεύχθηκε ήταν η ανίχνευση της σε ορούς ασθενών με λευχαιμίες με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (εικόνες 11-14). Στις εικόνες 11 -14 φαίνονται οι ζώνες της PARN στα υγιή φυσιολογικά άτομα και οι πιο έντονες ζώνες των ασθενών πράγμα που υποδηλώνει τα αυξημένα επίπεδα της αποαδενυλάσης στους τελευταίους. Επιπλέον, στην εικόνα 11 στους ασθενείς βλέπουμε μία δεύτερη ζώνη η οποία απουσιάζει από τα φυσιολογικά υγιή άτομα.

Στη συνέχεια, μελετήσαμε την έκφραση της PARN σε δείγματα με κύτταρα από μυελό των οστών ασθενών με λευχαιμίες. Στις εικόνες 15, 16 και 20 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης. Στην εικόνα 20 φαίνονται οι εντονότερες ζώνες στα ασθενή άτομα σε σύγκριση με την ζώνη του φυσιολογικού υγιούς ατόμου. Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται να ενισχύσει το προηγούμενο των πειραμάτων σε ορούς ασθενών. Δηλαδή τα επίπεδα της PARN είναι αυξημένα στα ασθενή άτομα με λευχαιμίες σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα. Τα αποτελέσματα διασταυρώθηκαν και με την μέθοδο της PCR αντίστροφης μεταγραφής όπως φαίνονται στις εικόνες 17, 18,19. Τα επίπεδα mRNA της PARN στους ασθενείς με λευχαιμίες ήταν περίπου διπλάσια σε σχέση με αυτά των υγιή ατόμων (πίνακας 7). Επιπλέον, στις εικόνες 15,16,20 βλέπουμε στα αποτελέσματα τις διάφορες μορφές της PARN στα ασθενή άτομα. Πρέπει να σημειωθεί ότι η εγκυρότητα της σύγκρισης της έντασης των ζωνών εξασφαλίστηκε φορτώνοντας την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης και από τα ασθενή και από τα υγιή άτομα σε δείγματα ορών, και με πρωτεΐνη – μάρτυρα στα δείγματα μυελών. Ο έλεγχος του φορτώματος έγινε με λαμίνη A/C ως μάρτυρα (εικόνα 15,II).

Τέλος, επιχειρήσαμε να προσεγγίσουμε το ερώτημα που οφείλονται οι περισσότερες μορφές της PARN στα ασθενή άτομα σε σχέση με τους μάρτυρες. Με βάση τα παραπάνω για τη ρύθμιση της δράσης της PARN αλλά και της PAP, διερευνήσαμε εάν διάφορες μορφές της PARN προκύπτουν από αλλαγή στην κατάσταση φωσφορυλίωσής της. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως η φωσφορυλίωση θα μπορούσε να εξηγήσει την ύπαρξη των πολλαπλών μορφών της PARN και να ευθύνεται για τις διαφορετικές μορφές που παρατηρούνται μεταξύ ασθενών – μαρτύρων. Το πώς λειτουργούν αυτές οι φωσφορυλιωμένες μορφές και η αλλαγή της δραστηριότητά τους (αυξημένη ή μειωμένη) είναι αντικείμενο για μελλοντικές μελέτες. Γνωρίζουμε όμως ότι η φωσφορυλίωση κρίσιμων πρωτεϊνών είναι δυνατόν να μεταβάλλει τα επίπεδα της μετάφρασης [76-79]. Αυτή η αλλαγή που ενδεχομένως οδηγεί στην παρεμπόδιση φυσιολογικών λειτουργιών του κυττάρου μπορεί να οδηγεί σε φαινότυπο διαφορετικό του φυσιολογικού. Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα δραστηριότητας της PARN θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει σε απορρύθμιση της έκφρασης παραγόντων και να συμβάλλει στον κακοήθη φαινότυπο του κυττάρου. Μια προσέγγιση στο ερώτημα αυτό θα ήταν να επιδιωχθεί αποσιώπηση της PARN και να εξεταστούν τα επίπεδα έκφρασης παραγόντων που σχετίζονται με διεργασίες εξαλλαγής, όπως ογκογονίδια. Η παρούσα εργασία είναι η πρώτη που μελετά τα επίπεδα έκφρασης μιας αποαδενυλάσης σε λευχαιμίες. Θα μπορούσε να αποτελέσει αφετηρία μελετών για την αποτίμηση της προγνωστικής αξίας της PARN σε περιπτώσεις ασθενών με λευχαιμίες ή και άλλων μορφών καρκίνου. Επίσης μπορεί να οδηγήσει στη μελέτη της έκφρασης και άλλων αποαδενυλασών σε καρκίνους.



## 7. Βιβλιογραφία

1. National Cancer Institute.  
<http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>. Retrieved 2009-08-17
2. Cancer Research UK (January 2007). "UK cancer incidence statistics by age".  
<http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/incidence/age/>
3. WHO (February 2006). "Cancer". World Health Organization.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
4. American Cancer Society (December 2007). "Report sees 7.6 million global 2007 cancer deaths"  
<http://www.reuters.com/article/healthNews/idUSN1633064920071217>.
5. Kinzler, Kenneth W., Vogelstein Bert, (2002), "Introduction". The genetic basis of human cancer (2nd, illustrated, revised ed.). New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division ISBN 978-0-07-137050-9.  
<http://books.google.co.uk/books?id=pYG09OPbXp0C&pg=PA5&dq=%22from+defects+in+oncogenes%22&lr=&ei=EJ8pSujtDYWKygSqi8ikBw#PPA6,M1>
6. Nelson D.A., Tan T.T., Rabson A.B., Anderson D., Degenhardt K., White E., (September 2004), *Genes & Development* 18 (17): 2095–107.
7. Merlo L.M., Pepper J.W., Reid B.J., Maley C.C., (December 2006), *Nat. Rev. Cancer* 6 (12): 924–35.
8. English D.R., Armstrong B.K., Krickler A., Fleming C., (May 1997), *Cancer causes & control: CCC* 8 (3): 271–83.
9. Pagano J.S., Blaser M., Buendia M.A. *et al.*, (December 2004), *Semin. Cancer Biol.* 14 (6): 453–71.
10. Dingli D., Nowak M.A., (September 2006), *Nature* 443 (7107): 35–6.
11. "Cancer Spread By Transplantation Extremely Rare: In Very Rare Case, Woman Develops Leukemia from Liver Transplant".  
[http://www.cancer.org/docroot/NWS/content/NWS\\_1\\_1x\\_Cancer\\_Spread\\_By\\_Transplantation\\_Extremely\\_Rare.asp](http://www.cancer.org/docroot/NWS/content/NWS_1_1x_Cancer_Spread_By_Transplantation_Extremely_Rare.asp).
12. "Cancer Cancer". *World Health Organization*.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.



13. Danaei G., Vander Hoorn S., Lopez A.D., Murray C.J., Ezzati M. (2005). *Lancet* 366 (9499): 1784–93.
14. Michaud D.S., Liu S., Giovannucci E., Willett W.C., Colditz G.A., Fuchs C.S., (2002), *J Natl Cancer Inst* 94 (17): 1293–300.
15. Moynihan T., MayoClinic.com, retrieved 22 Feb 2008
16. "What Is Cancer?". National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>. Retrieved 2009-08-17
17. "Cancer Fact Sheet". Registry. 2002-08-30. <http://www.atsdr.cdc.gov/COM/cancer-fs.html>.
18. "WHO Disease and injury country estimates". *World Health Organization*, 2009. [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates\\_country/en/index.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates_country/en/index.html). Retrieved Nov. 11, 2009.
19. "Cancer" (PDF). *World Health Organization*. [http://www.who.int/nmh/publications/fact\\_sheet\\_cancers\\_en.pdf](http://www.who.int/nmh/publications/fact_sheet_cancers_en.pdf).
20. "Cancer Cancer". *World Health Organization*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
21. Jemal A, Siegel R, Ward E *et al.* (2008). *CA Cancer J Clin* 58 (2): 71–96. <http://caonline.amcancersoc.org/cgi/content/full/58/2/71>.
22. "The History of Cancer". American Cancer Society. September 2009. [http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI\\_2\\_6x\\_the\\_history\\_of\\_cancer\\_72.asp](http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_6x_the_history_of_cancer_72.asp)
23. *The Basic Science of Oncology* 4th ed. Tannock IF, Hill RP *et al.* (eds.) (2005). McGraw-Hill. ISBN 0-07138-774-9.
24. Kleinsmith, LJ (2006). *Principles of Cancer Biology*. Pearson Benjamin Cummings. ISBN 0-80534-003-3.
25. Parkin D., Bray F., Ferlay J., Pisani P. (2005). *CA Cancer J Clin* 55 (2): 74–108. <http://caonline.amcancersoc.org/cgi/content/full/55/2/74>.
26. Weinberg, Robert A., (September 1996). *Scientific American*: 62–70. <http://www.bme.utexas.edu/research/orly/teaching/BME303/Weinberg.pdf>.
27. Aaron Goldstrom, Marvin Wickens, (2008). *Molecular cell biology*, vol.9 : 337-343

28. Astrom J., Astrom A., Virtanen A., (1992). *J Biol Chem* 267: 18154–18159.
29. Korner C.G., Wahle E., (1997). *J Biol Chem* 272:10448–10456.
30. Moser M.J., Holley W.R., Chatterjee A., Mian I.S. (1997). *Nucleic Acids Res* 25:5110–5118.
31. Zuo Y., Deutscher M.P., (2001). *Nucleic Acids Res* 29:1017–1026.
32. Parker R., Song H., (2004). *Nat Struct Mol Biol* 11: 121–127.
33. Grishin N.V., (1998). *Trends Biochem Sci* 23: 329–330.
34. Martinez J., Ren Y.G., Nilsson P., Ehrenberg M., Virtanen A., (2001). *J Biol Chem* 276:27923–27929.
35. Martinez J., Ren Y.G., Thuresson A.C., Hellman U., Astrom J., Virtanen A., (2000). *J Biol Chem* 275: 24222–24230.
36. Ren Y.G., Kirsebom L.A., Virtanen A., (2004). *J Biol Chem* 279: 48702–48706.
37. Ren Y.G., Martinez J., Virtanen A., (2002). *J Biol Chem* 277: 5982–5987.
38. Dehlin E., Wormington M., Korner C.G., Wahle E., (2000). *EMBO J* 19: 1079–1086.
39. Gao M., Fritz D.T., Ford L.P., Wilusz J., (2000). *Mol Cell* 5: 479–488.
40. Moushen Wu et al.(2005). *EMBO J.*, 1-12.
41. Lai W.S., Kennington E.A., Blackshear P.J., (2003). *Mol Cell Biol* 23: 3798–3812.
42. Lejeune F., Li X., Maquat L.E., (2003). *Mol Cell* 12: 675–687.
43. Korner C.G., Wormington M., Muckenthaler M., Schneider S., Dehlin E., Wahle E., (1998). *EMBO J* 17: 5427–5437.
44. Copeland P.R., Wormington M., (2001). *RNA* 7: 875–886.
45. Chiba Y., Johnson M.A., Lidder P., Vogel J.T., Van Erp. H, Green PJ (2004). *Gene* 328: 95–102.
46. Reverdatto S.V., Dutko J.A., Chekanova J.A., Hamilton D.A., Belostotsky D.A., (2004), *RNA* 10: 1200–1214.
47. Hoof van, A. & Parker, R., (1999), *Cell* 99, 347–350.
48. Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. & Sharp, P.A., (2003), *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 457–
49. Maquat, L.E. & Carmichael, G.G.,(2000), *Cell* 26, 173–176.

50. Tucker, M. & Parker R., (2000), *Annu. Rev. Biochem.* 69, 571–595.
51. Mitchell, P. & Tollervey. *Curr. Opin.* (2001), *Cell Biol.* 13,320–325.
52. Anderson J.S.J. & Parker R.,(1998), *EMBO J.* 17, 1497–1506.
53. Chen, C.Y. *et al.*, (2001),*Cell* 107, 451–464.
54. Wang, Z. & Kiledjian M., (2001), *Cell* 107, 751–762.
55. Mukherjee D. *et al.*, (2002),*EMBO J.* 21, 165–174.
56. Liu, H. Rodgers, N.D. Jiao, X. & Kiledjian M., (2002), *EMBO J.* 21, 4699–4708.
57. Dodson R.E. & Shapiro D.J., (2002), *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72, 129–164.
58. Moore M.J., (2002),*Cell* 108 : 431–434.
59. Muhlrud D. & Parker R., (1994), *Nature* 370 : 578–581.
60. Cao D. & Parker R., (2003), *Cell* 113, 533–545.
61. Mitchell P. & Tollervey D., (2003), *Mol. Cell* 11 : 1405–1413.
62. Takahashi S., Araki Y., Sakuno T. & Katada T.,(2003), *EMBO J.* 22 : 3951–3959.
63. Frischmeyer P.A. *et al.*, (2002), *Science* 295 : 2258–2261.
64. Van Hoof A., Frischmeyer P.A., Dietz H.C. & Parker R., (2002), *Science* 295, 2262–2264.
65. Rudolph *et al.*,(1999), *Anal Biochem* 269 : 66-71.
66. Wan-Cheol Kim, Chow H. Lee, (2009), Elsevier, *Biochemica et Biophysica Acta* 1796 : 99-113.
67. Ross J., mRNA Stability in Mammalian Cells, (1995), American society for Microbiology, vol. 59 : 423-450
68. Goldstrohm Wickens, *Nature Rev Mol Cell Biol.*, 2008; 9:337-344
69. J. Holzmann Frank P., Löffler E., Bennett K., Gerner C. & Rossmanith W., (2008), *Cell*, 135 : 462–474.
70. D'Alessio G and Riordan JF,(1997), *Ribonucleases: Structures and Functions*, Academic Press.
71. Gerdes K, Christensen SK and Lobner-Olesen A.,(2005), *Nat. Rev. Microbiol.* (3): 371–382.
72. Scorilas A, Talieri M, Ardavanis A, Courtis N., Dimitriadis E., Yotis J., Milton C., Trangas T., 2000, *Cancer Research* 60 : 5427–5433, October 1,
73. Sachs, A., and Wahle, E., 1993, *J. Biol. Chem.*, 268: 22955–22958

74. Pangalis, G. A., Trangas T., Roussou P. A., Tsiapalis C. M., 1985, *Acta Haematol.*, 74: 31–34
75. Sasaki R., Minowada J., Bollum F. J., and Miura Y. *Leuk. Res.*, 1990, 14: 273–278,
76. Gingras A., Raught B. and Sonenberg N., (1999), *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 913–963.
77. Jackson R.J. and Wickens M., (1997), *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 7, 233–241.
78. Mitchell P. and Tollervey D., (2000) , *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 10, 193–198.
79. Stover P.J., (2003), *Nutr. Rev.*, 61, 427–431.
80. Seal R., Temperley R., Wilusz J., Lightowlers R. and Zofia M., Chrzanowska-Lightowlers A, 2005, 376–387 *Nucleic Acids Research*, Vol. 33, No. 1
81. Jacob, S. T., and Rose, K. M., 1984, Phosphorylation and immunology of poly(A) polymerase. *Adv. Enzyme Regul.*, 22: 485–497,
82. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., *Βιοχημεία, Τόμος II*
83. Wong M.L. and Medrano F., 2005, *Biotechniques*, 39