

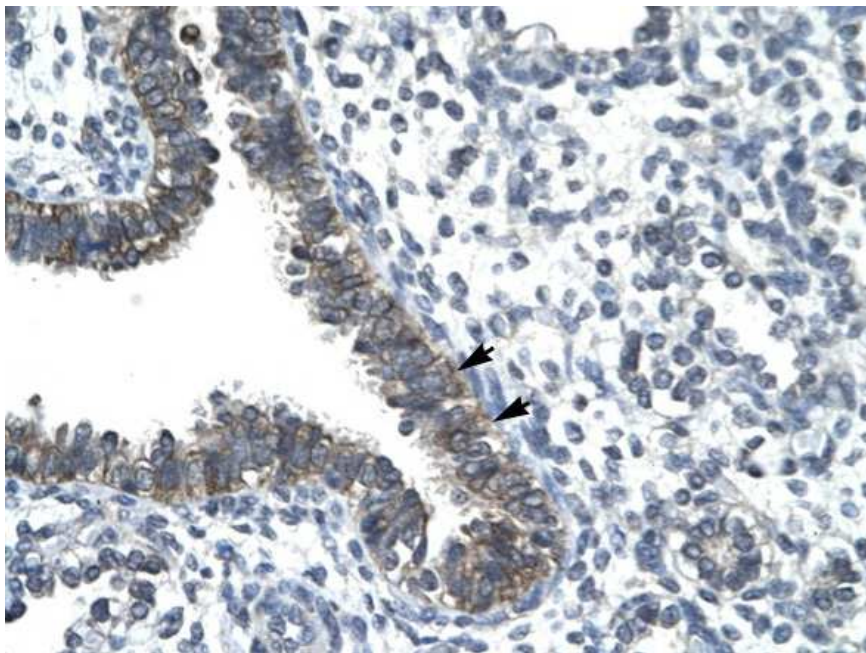


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

---

ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ

ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΗΣ NOCTURNIN



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ – ΣΚΟΥΤΕΛΝΙΚ ΝΤΙΑΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

Μελέτες στη βιολογική σημασία της ανθρώπινης αποαδενύλασης  
NOCTURNIN

Υπεύθυνος Καθηγητής:

- **Μπαλατσός Νικόλαος**, *Λέκτορας Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.*
- Τριμελής Επιτροπή:
- **Λεωνίδας Δημήτριος**, *Αναπληρωτής Καθηγητής, Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.*
- **Ζίφα Αιμιλία**, *Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας – Νευροβιολογίας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.*
- **Μπαλατσός Νικόλαος**, *Λέκτορας Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.*

**Εικόνα εξωφύλλου:** Immunohistochemistry - Nocturnin antibody

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

- Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Ευχαριστίες:**

*Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων οι υποδείξεις, η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για την διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ.Μπαλατσό για την αμέριστη ηθική και επιστημονική συμπαράσταση και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής. Όπως επίσης, τους διδακτορικούς, μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές των εργαστηρίων Λειτουργικής Βιοχημείας και Μικροβιολογίας -Ιολογίας (Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας) και ιδιαίτερα τον Π.Μαραγκοζίδη και τον Α.Κυρίτση για τη σημαντική συμβολή τους στη διεξαγωγή των πειραμάτων. Οφείλω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στους διδακτορικούς φοιτητές της Μοριακής Μικροβιολογίας (Παν/κό Νοσοκομείο Λάρισας) και ιδιαίτερα στην Μ.Λάμπρου για την άψογη συνεργασία μας.*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	<b>4</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>8</b>
1.1 "RNA world" hypothesis.....	8
1.2 Το mRNA παράγεται με μεταγραφή και μεταφράζεται.....	8
1.3 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA.....	9
1.4 Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει κάλυμμα. ....	10
1.5 Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται.....	11
1.6 Αποικοδόμηση του mRNA -Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA.....	13
1.7 Αποαδενυλάσες-Κατάταξη, βιολογικές λειτουργίες και έλεγχος της δραστικότητάς τους .....	18
1.8 Η αποαδενυλάση Nocturnin .....	23
1.8.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	23
1.8.2 Μεταγραφική ρύθμιση της NOC.....	26
1.8.3 Ρύθμιση της NOC σε ενδοκυτταρικό επίπεδο.....	27
1.8.4 Η NOC ως γονίδιο άμεσης απόκρισης.....	29
1.8.5 Η NOC εμπλέκεται στον μεταβολισμό λιπιδίων και υδατανθράκων.....	30
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....	<b>32</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>33</b>
3.1 Υλικά .....	33
3.1.1 Χημικές ουσίες.....	33
3.1.2 Διαλύματα.....	34
3.1.3 Αντισώματα.....	36

3.1.4 Κυτταρικές σειρές.....	36
3.1.5 Short hairpin RNAs (shRNAs).....	37
3.1.6 Εκκινητές.....	41
3.2 Μέθοδοι.....	51
3.2.1 Απόψυξη κυττάρων Hep2.....	51
3.2.2 Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας-Θρυψινοποίηση.....	51
3.2.3 Κατάψυξη κυττάρων.....	52
3.2.4 Συλλογή και λύση κυττάρων θηλαστικών.....	52
3.2.5 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών.....	53
3.2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation).....	55
3.2.7 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF και Ανοσοανίχνευση.....	57
3.2.8 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με χρήση λιποσωμάτων (Lipofection).....	60
3.2.9 Η τεχνολογία του RNA interference (RNAi).....	61
3.2.10 Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε ένα βήμα (One step Real Time PCR).....	64
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>67</b>
4.1 Έλεγχος της αποσιώπησης της NOC με ανοσοαποτύπωση.....	67
4.2 Έλεγχος της αποσιώπησης της NOC με Real-Time PCR.....	69
4.3 Επίδραση διαμόλυνσης με φορέα που δε φέρει shRNAs στην έκφραση της NOC.....	70
4.4 Επίδραση της αποσιώπησης της NOC σε επιλεγμένους παράγοντες (72 ώρες μετά τη διαμόλυνση).....	71
4.5 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα επίδρασης αποσιώπησης της NOC στα επίπεδα mRNA των εξεταζόμενων παραγόντων.....	98
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>101</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>108</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πολυ-(A) ουρά των ώριμων ευκαρυωτικών mRNAs διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην μεταφορά, την μετάφραση και την αποικοδόμησή τους, παρέχοντας ένα σημαντικό μέσο ρύθμισης της πρωτεϊνοσύνθεσης και της σταθερότητας των mRNAs. Η αποικοδόμηση των mRNAs ξεκινά συνήθως με τη βράχυνση της πολυ-(A) ουράς, με τα ένζυμα που συμμετέχουν στη διαδικασία να χαρακτηρίζονται από διαφορετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, βιολογικές λειτουργίες και εξειδίκευση ως προς το mRNA-υπόστρωμα. Η βράχυνση της πολυ-(A) ουράς καταλύεται από ένζυμα γνωστά ως αποαδενυλάσες. Ο ρόλος της ύπαρξης πολλών τέτοιων ενζύμων που επιτελούν τη συγκεκριμένη διεργασία δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Επιχειρούμε να προσεγγίσουμε το ερώτημα αυτό αποσιωπώντας την ανθρώπινη κιρκάδια αποαδενυλάση Nocturnin(NOC) και αναλύοντας την επίδραση της αποσιώπισής της στα επίπεδα έκφρασης επιλεγμένων mRNAs, στα πλαίσια μιας πρώτης προσπάθειας για τον προσδιορισμό των mRNA-στόχων της αποαδενυλάσης αυτής. Επιπλέον, παράλληλα με τον προσδιορισμό των στόχων της NOC λόγω της ιδότητάς της ως αποαδενυλάση, προσπαθούμε να δούμε σε ποιά μεταβολικά μονοπάτια εμπλέκεται, ώντας ένα κιρκάδιο γονίδιο που ρυθμίζεται από κιρκάδια ρολόγια του οργανισμού. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν ειδικά 5 κατάλληλα shRNAs για την ειδική σίγηση της NOC και με αυτά διαμολύνθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα Hep2. Με ανοσοαποτύπωση και ποσοτική Real Time PCR, ελέγχθηκε σε επίπεδο πρωτεϊνών και mRNA αντίστοιχα, η επιτυχία της αποσιώπησης και τα επίπεδα έκφρασης των εξεταζόμενων παραγόντων σε εκχυλίσματα κυττάρων αγρίου τύπου(μη διαμολυσμένων) και κυττάρων διαμολυσμένων με τα shRNAs. Σύγκριση του προτύπου έκφρασης μετά από αποσιώπηση της NOC με τα αντίστοιχα από την αποσιώπηση άλλων σημαντικών αποαδενυλασών όπως η CNOT7 και PARN, φανερώνει κάποια διαφορετικότητα όσων αφορά τουλάχιστον σε ορισμένα mRNAs.

## ABSTRACT

The poly(A) tail plays a crucial role in mature eukaryotic mRNA transport, translation and degradation and provides a widespread means of controlling protein production and mRNA stability. mRNA degradation usually begins with the shortening of poly(A) tail, with each enzyme involved in this process being characterized by different regulatory mechanisms, biological functions and mRNA specificity. The shortening of the poly(A) tail is catalyzed by a range of enzymes, known as deadenylases. Many such enzymes exist, but the advantage of having such a diversity of deadenylases is still unknown. In this work, we tested the effect of human circadian deadenylase Nocturnin(NOC) silencing on the expression levels of selected target mRNAs, in order to determine its role in metabolism and its function as a circadian gene being a part of the circadian clock. For this purpose, we designed and used five appropriate shRNAs, specific for NOC silencing, and with them we transfected human cancer cells (Hep2). Western blot and quantitative RT-PCR were used for the analysis of extracts from NOC-silenced and wild type cells(non transfected) in protein and mRNA level respectively. In parallel, we compared the expression levels of the selected mRNAs from PARN-silenced cells with those from the silencing of another major eukaryotic deadenylase, CNOT7. Preliminary data revealed an altered pattern of expression, at least for some of the mRNAs. These results are a first attempt for the elucidation of the substrate specificity of the major eukaryotic deadenylases.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 “RNA world” hypothesis

Το ριβονουκλεϊκό οξύ, RNA, είναι ένα μόριο κεντρικής σημασίας για τη γονιδιακή έκφραση. Αρχικά χαρακτηρίστηκε ως ενδιάμεσο προϊόν της πρωτεϊνοσύνθεσης, όμως έχουν ανακαλυφθεί πολλά είδη RNA που έχουν δομικούς ή λειτουργικούς ρόλους σε άλλα στάδια της γονιδιακής έκφρασης. Η εμπλοκή του RNA σε πολλές λειτουργίες που αφορούν την γονιδιακή έκφραση υποστηρίζει την γενική άποψη ότι ολόκληρη η διαδικασία μπορεί να έχει εξελιχθεί σε έναν «κόσμο RNA», στον οποίο αρχικά το RNA ήταν το ενεργό συστατικό του μηχανισμού διατήρησης και έκφρασης της γενετικής πληροφορίας. Αργότερα οι πρωτεΐνες υποβοήθησαν ή ανέλαβαν αποκλειστικά πολλές από αυτές τις λειτουργίες, γεγονός που είχε ως συνέπεια την αύξηση της προσαρμοστικότητας και πιθανόν της αποτελεσματικότητας. Οι τρεις κύριες τάξεις RNA είναι το αγγελιαφόρο (*mRNA*), το μεταφορικό (*tRNA*) και το ριβοσωμικό (*rRNA*) (Lewin B, GENES VIII).

### 1.2 Το mRNA παράγεται με μεταγραφή και μεταφράζεται.

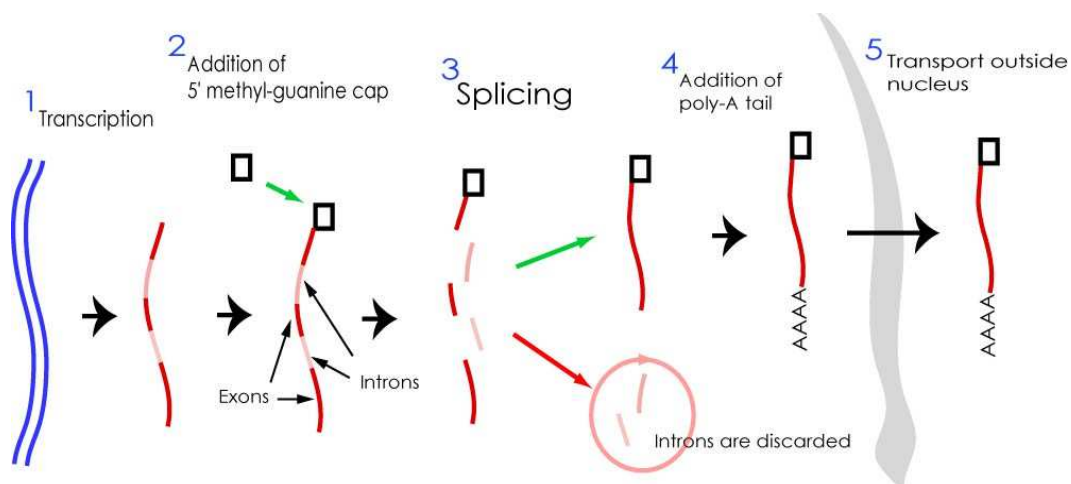
Η διεργασία της μεταγραφής (*transcription*) παράγει ένα μονόκλωνο μόριο RNA όμοιο στην αλληλουχία με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA, ενώ η μετάφραση (*translation*) μετατρέπει ακολούθως τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του mRNA στην αλληλουχία αμινοξέων που αποτελούν μια πρωτεΐνη. Ένα μόριο mRNA δε μεταφράζεται σε ολόκληρο το μήκος του, αλλά κάθε mRNA περιέχει τουλάχιστον μία κωδική περιοχή (*coding region*), η οποία σχετίζεται με μια πρωτεϊνική αλληλουχία μέσω του γενετικού κώδικα: κάθε νουκλεοτιδική τριπλέτα (*κωδικόνιο*) της κωδικής περιοχής αντιστοιχεί σε ένα αμινοξύ. Μόνο η μία αλυσίδα του δίκλωνου DNA μεταγράφεται σε αγγελιαφόρο RNA. Η μία αλυσίδα του DNA η οποία κατευθύνει τη σύνθεση του mRNA δημιουργώντας ζεύγη συμπληρωματικών βάσεων αποκαλείται αλυσίδα-μήτρα



(template strand) ή αντινοσηματική αλυσίδα (*antisense strand*). Ο όρος «αντινοσηματική» χρησιμοποιείται γενικά για την περιγραφή μιας αλληλουχίας του DNA ή του RNA που είναι συμπληρωματική με το mRNA ενώ η αλυσίδα του DNA που φέρει την ίδια αλληλουχία με το mRNA (με εξαίρεση ότι περιέχει T αντί για U) ονομάζεται κωδική αλυσίδα (*coding strand*) ή νοσηματική αλυσίδα (*sense strand*).

### 1.3 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA.

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



**Εικόνα 1:** Στάδια ωρίμανσης ευκαρυωτικού mRNA

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

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

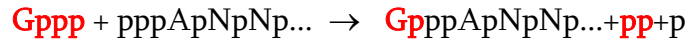
#### 1.4 Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει κάλυμμα.

Το 5' κάλυμμα σχηματίζεται με την προσθήκη μιας τριφωσφορικής γουανωσίνης (*GTP*) στην πρώτη βάση του μεταγράφου μέσω ενός 5'-5' δεσμού, που είναι ένα τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο (συνήθως μια πουρίνη, A ή G). Η αρχική αλληλουχία του μεταγράφου μπορεί να αναπαρασταθεί ως:



Η προσθήκη της G στο 5' άκρο καταλύεται από ένα πυρηνικό ένζυμο, τη γουανυλυλο-τρανσφεράση. Η αντίδραση αυτή συμβαίνει τόσο γρήγορα μετά την έναρξη της μεταγραφής, που δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθούν παρά μόνο ίχνη του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου στο πυρηνικό RNA. Η συνολική

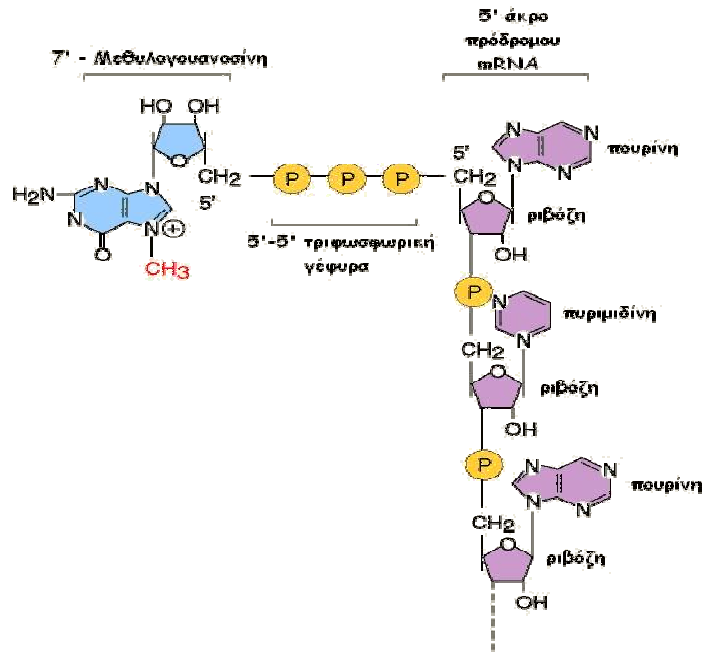
αντίδραση μπορεί να αναπαρασταθεί ως μία συμπύκνωση μεταξύ του GTP και του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου του RNA όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα:



Το νέο κατάλοιπο G, που προστίθεται στο άκρο του RNA, έχει αντίστροφο προσανατολισμό (5'-5') από όλα τα άλλα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας. Το κάλυμμα αποτελεί υπόστρωμα για αρκετές αντιδράσεις μεθυλίωσης. Οι τύποι των καλυμμάτων διακρίνονται από το πλήθος των μεθυλιώσεων που φέρουν. Η πρώτη μεθυλίωση γίνεται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και αποτελείται από την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στη θέση N7 της ακραίας γουανίνης, μια αντίδραση που καταλύεται από την 7-μεθυλο-τρανσφεράση της γουανίνης. Ένα κάλυμμα που έχει μόνο αυτή τη μεθυλομάδα ονομάζεται κάλυμμα 0 (*cap 0*). Στην **εικόνα 2** παρουσιάζεται η δομή του καλύμματος μετά την προσθήκη μεθυλομάδων.

### 1.5 Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται.

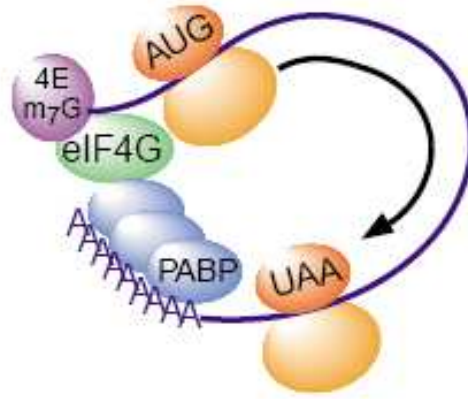
Τα πρόδρομα mRNAs λαμβάνουν στο 3' άκρο τους μια χαρακτηριστική αλληλουχία από 250-300 νουκλεοτίδια αδενοσίνης, γνωστής ως πολυ(A) ουρά. Η μετα-μεταγραφική αυτή τροποποίηση ονομάζεται διεργασία του 3' άκρου (*3' end processing*) και είναι μια πολύπλοκη αντίδραση σε δύο στάδια όπου συμμετέχουν τουλάχιστον επτά πρωτεϊνικοί παράγοντες. Η αντίδραση της προσθήκης καταλύεται από το ένζυμο πολυ(A)-πολυμεράση.



Εικόνα 2: Το κάλυμμα στο 5' άκρο του mRNA

Ο ρόλος της πολυ(A) ουράς είναι κεντρικής σημασίας για το mRNA. Προστατεύει το 3' άκρο του mRNA από εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, συμμετέχει σε διεργασίες όπως η έξοδος στο κυτταρόπλασμα και από αυτή ξεκινά και το κύριο μονοπάτι αποικοδόμησης του mRNA. Στις διαδικασίες αυτές η πολυ(A) ουρά συμμετέχει κυρίως μέσω των πρωτεϊνικών παραγόντων που προσδένονται σε αυτή, και κυρίως την πολυ(A) προσδεδόμενη πρωτεΐνη [*poly(A)-binding protein, PABP*]. Ομόλογα αυτής της πρωτεΐνης απαντώνται σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ένα μονομερές PABPC των 70 kDa συνδέεται σε περίπου 24 βάσεις της πολυ(A) ουράς. Έτσι, μια πολυ(A) ουρά από 240 νουκλεοτίδια φέρει περίπου 10 μόρια PABPC, δηλαδή περίπου 700 kDa. Ο βασικότερος ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι αφενός να προστατεύει την ίδια την ουρά από αποικοδόμηση και αφετέρου να αλληλεπιδρά με άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες ρυθμίζοντας έτσι την βιωσιμότητα του mRNA, όπως φαίνεται και σε επόμενες παραγράφους. Για παράδειγμα, η αλληλεπίδραση της PABP με τον παράγοντα έναρξης της μεταγραφής eIF4G δημιουργεί έναν

κλειστό βρόχο, στον οποίο τα 5' και 3' άκρα του mRNA συγκρατούνται από το ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο και έτσι προσλαμβάνεται από τη μεταφραστική μηχανή όπως φαίνεται και στην **εικόνα 3** (Mitchell et al., 2001; Gorgoni and Gray, 2004).



**Εικόνα 3:** Η πρόσδεση της PABP στον παράγοντα έναρξης eIF4G δημιουργεί έναν κλειστό βρόχο (Mitchell et al., 2001).

Η αφαίρεση της πολυ(A) ουράς αναστέλλει την έναρξη της μετάφρασης *in vitro* και η μείωση των επιπέδων της PABP έχει το ίδιο αποτέλεσμα σε ζυμομύκητες *in vivo*. Αυτές οι επιδράσεις μπορεί να εξαρτώνται από την πρόσδεση της PABP στο σύμπλοκο έναρξης, στο 5' άκρο του mRNA. Σε μερικές περιπτώσεις, τα mRNAs αποθηκεύονται σε μη πολυαδενυλιωμένη μορφή και η πολυ(A) προστίθεται όταν είναι απαραίτητη η μετάφραση τους. Σε άλλες περιπτώσεις, τα πολυαδενυλιωμένα mRNAs αποαδενυλιώνονται, με συνέπεια τη μείωση της μετάφρασής τους.

### 1.6 Αποικοδόμηση του mRNA- 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 (Dykxhoom et al., 2003; Maquat et al., 2000; Hoofvan et al., 1999). Αποτελεί το καθοριστικό βήμα στην αποικοδόμηση των μορίων

mRNA και την μεταφραστική αποσιώπηση, γεγονός που την καθιστά ιδανικό σημείο ελέγχου και των δύο διεργασιών.

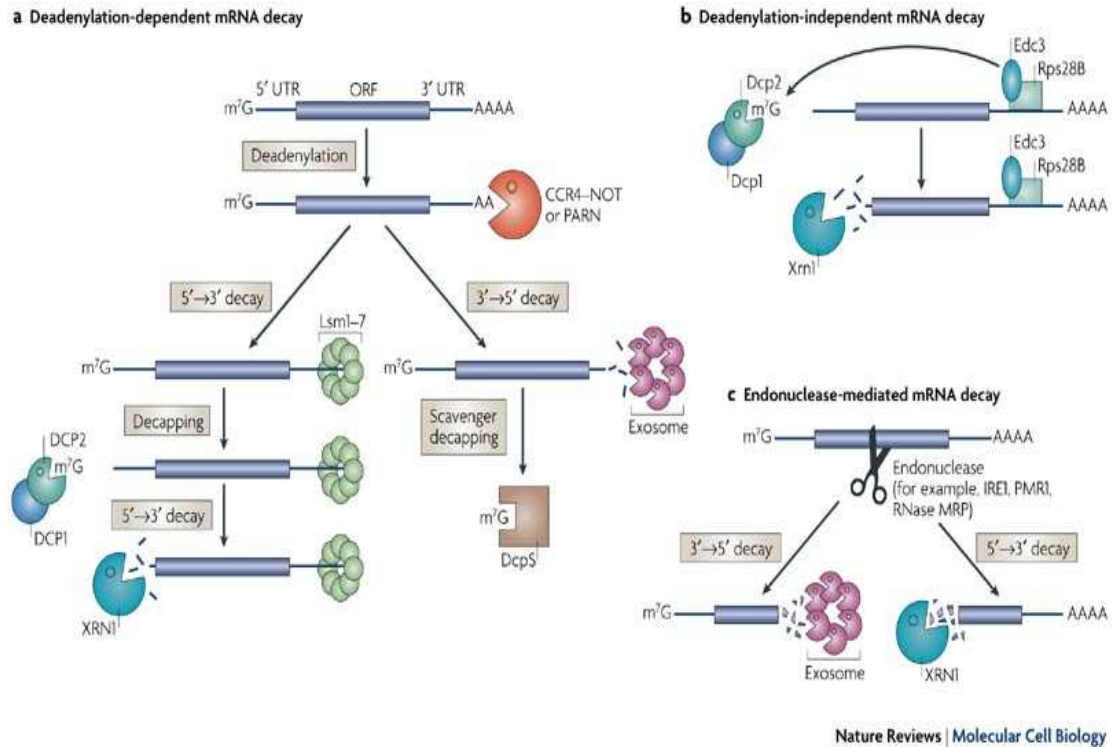
Στον πυρήνα, με την διαδικασία της αποαδενυλίωσης περιορίζονται οι νεοπροστιθέμενες πολυ(A) ουρές, στο κατάλληλο μήκος. Οι πολυ(A) ουρές όταν είναι σε προκαθορισμένο σωστό μήκος είναι απαραίτητες για την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα και όταν αυτό φτάσει στο κυτταρόπλασμα του προσδίδουν σταθερότητα και έναυσμα για μετάφραση. Στο κυτταρόπλασμα, η εκτεταμένη αποαδενυλίωση του mRNA, πέρα από ένα συγκεκριμένο μήκος, σηματοδοτεί την αποικοδόμηση του.

Η αποικοδόμηση του mRNA συνήθως ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο του (αποαδενυλίωση) από διάφορα ένζυμα, γνωστά ως αποαδενυλάσες (Tucker et al., 2000; Mitchell et al., 2001). Ακολουθώντας την αποαδενυλίωση ένα ειδικό ένζυμο που αποτελείται από δύο υπομονάδες (Dcp1p και Dcp2p) αφαιρεί το κάλυμμα, εκθέτοντας το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την Xtn1p, μια 5'→3' εξωνουκλεάση. Εναλλακτικά, μετά την αποαδενυλίωση, το mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'→5 από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών (Μονοπάτι αποκοδόμησης εξαρτώμενο από την αποαδενυλίωση) (Garneau et al., 2004; Anderson et al., 1998; Chen et al., 2001; Wang and Kiledjian, 2001; Mukherjee et al., 2002). Στην περίπτωση αυτή το κάλυμμα υδρολύεται από το DcpS (Liu et al., 2002) (εικόνα 4a). Τα 2 κυριότερα μονοπάτια αποικοδόμησης του ευκαρυωτικού mRNA και οι πρωτεϊνικοί παράγοντες που εμπλέκονται σ' αυτά συνοψίζονται στον **πίνακα 1** (Meyer et al., 2004).

**Πίνακας 1:** Τα δύο κύρια μονοπάτια αποικοδόμησης των ευκαρυωτικών mRNAs και οι κυριότεροι παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτά (ενισχυτές και αναστολείς) (Meyer et al., 2004).

Reaction		Enzymes		Effectors
		Yeast	Mammals	
<b>I</b>	deadenylation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pan2p/Pan3p</li> <li>• CCR4-NOT complex</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pan2/Pan3</li> <li>• CCR4-NOT complex</li> <li>• PARN</li> </ul>	PABPC PABPC cap
<b>IIa</b>	decapping	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dcp1p/Dcp2p</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dcp1/Dcp2</li> </ul>	Edc1p; Edc2p; Edc3p; Pat1p; Lsm1-7; Dhh1p; PABPC
<b>IIb</b>	cap hydrolysis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dcs1p</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dcp5</li> </ul>	
<b>III</b>	5'-3' exonucleolytic decay	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Xrn1p</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Xrn1</li> </ul>	
<b>IV</b>	3'-5' exonucleolytic decay	<ul style="list-style-type: none"> <li>• exosome</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• exosome</li> </ul>	Ski2p; Ski3p; Ski7p; Ski8p

Υπάρχει βέβαια και το μονοπάτι αποικοδόμησης το οποίο είναι ανεξάρτητο της αποαδενυλίωσης στον *S. cerevisiae*, όπου είναι απαραίτητη η στρατολόγηση της πρωτεϊνικής μηχανής απομάκρυνσης του καλύμματος (**εικόνα 4b**). Ωστόσο η αποικοδόμηση ορισμένων μορίων mRNA μπορεί να ξεκινήσει με ενδονουκλεοτιδική διάσπαση είτε από ειδικές ενδονουκλεάσες είτε από το μηχανισμό του RNAi (Μονοπάτι αποικοδόμησης διαμεσολαβούμενο από ενδονουκλεάσες) (Dodson et al., 2002). Στο μονοπάτι αυτό μετά τη δράση των ενδονουκλεασών παράγονται δύο θραύσματα με απροστάτευτα άκρα, τα οποία και αποικοδομούνται στη συνέχεια με τη δράση του εξωσώματος και της Xrn1p (**εικόνα 4c**). Επίσης, τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν ειδικά μονοπάτια αποικοδόμησης που αναγνωρίζουν και αποικοδομούν ταχύτατα ανώμαλα mRNAs χρησιμοποιώντας τα ίδια ένζυμα που αποικοδομούν φυσιολογικά mRNAs.

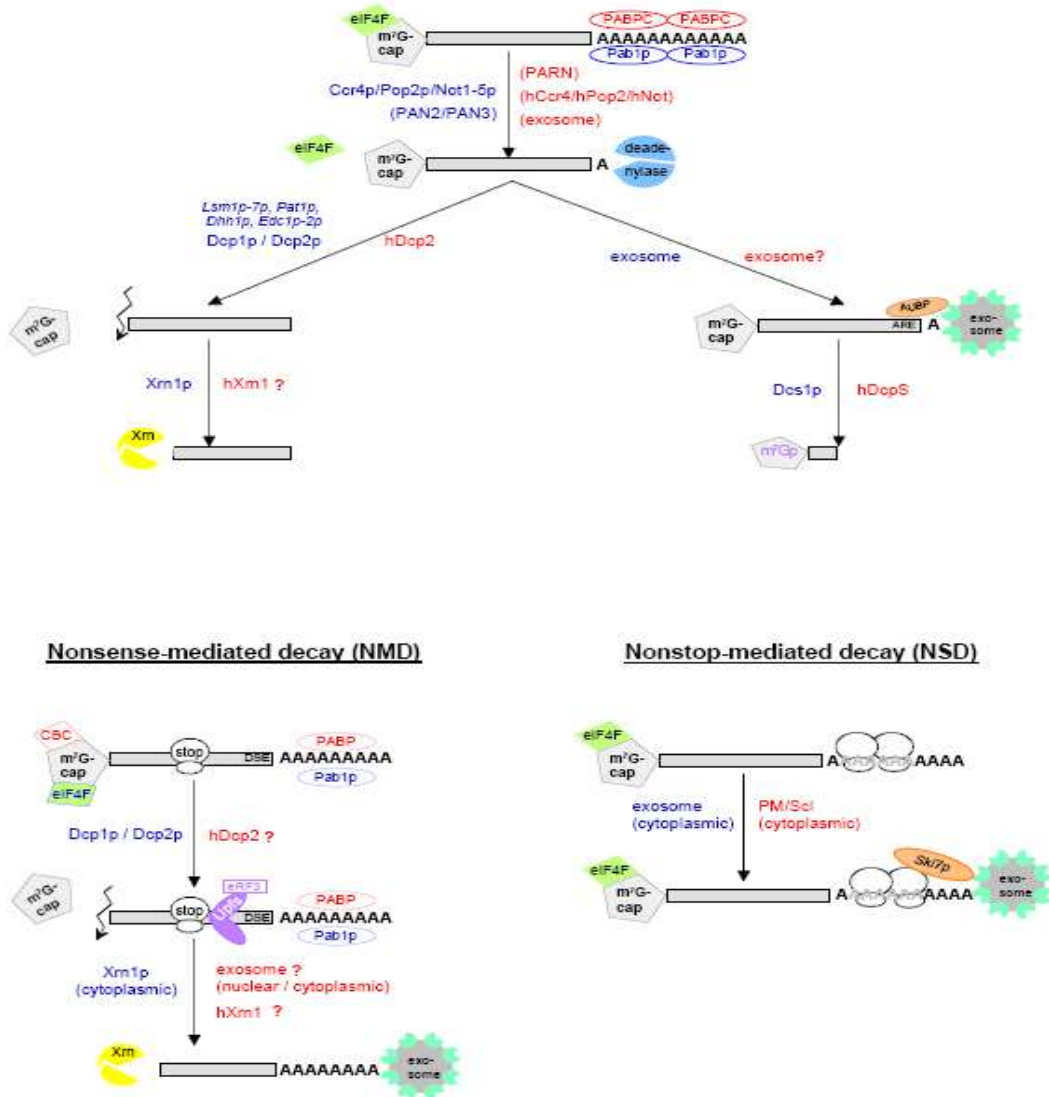


**Εικόνα 4:** Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Όλα τα κύτταρα διαθέτουν συστήματα ελέγχου ποιότητας των νεοσυντιθέμενων mRNAs, έτσι ώστε να απομακρύνουν ταχύτατα μόρια που αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν την διαδικασία ωρίμανσης (Moore et al., 2002). Με αυτόν τον τρόπο προστατεύονται από πιθανώς τοξικές πρωτεΐνες που θα παράγονταν με τη μετάφραση των ελαττωματικών μεταγράφων. Τρία μονοπάτια αποικοδόμησης ελαττωματικών mRNAs έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα. Στο πρώτο από αυτά, σε μια πορεία που αναφέρεται και ως μη-νοηματικά διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (*nonsense-mediated decay, NMD*) τα mRNAs που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται. Τέτοια μετάγραφα αποικοδομούνται είτε μετά από αφαίρεση του καλύμματος σε μία διαδικασία η οποία είναι ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση, είτε από επιτάχυνση της αποαδενυλίωσης και της 3'→5' αποικοδόμησης από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα (Muhlrad and Parker, 1994; Cao and Parker, 2003; Mitchell et al., 2003; Takahashi et al., 2003). Παρομοίως, σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως αποικοδόμηση μη-



τερματισμού (nonstop decay, NSD) τα mRNAs στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα (Frischmeyer et al., 2002; Van Hoof et al., 2002). Τέλος, ανακαλύφθηκε στη ζύμη και η No-Go αποικοδόμηση (*no-go decay, NGD*) στην οποία παρατηρείται ακινητοποίηση του ριβοσώματος στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης λόγω σχηματισμού ειδικής δευτεροταγούς δομής στο ελαττωματικό mRNA. Ως αποτέλεσμα πυροδοτείται η διαμεσολαβούμενη από ενδονουκλεάσες αποικοδόμηση του mRNA και η απελευθέρωση του ριβοσώματος. Οι διαδικασίες παρουσιάζονται σχηματικά στην **εικόνα 5**.



**Εικόνα 5:** Τα mRNAs τα οποία δεν περιέχουν, ή περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αποικοδομούνται ταχύτατα (Frischmeyer et al., 2002).

## 1.7 Αποαδενυλάσες-Κατάταξη, βιολογικές λειτουργίες και έλεγχος δραστηριότητάς τους

Ως αποαδενυλάσες ορίζουμε τις εξωριβονουκλεάσες που αποικοδομούν την πολύ(A) ουρά των mRNAs με κατεύθυνση 3'→5' απελευθερώνοντας 5'-AMP. Καθημερινά ο αριθμός των ταυτοποιημένων αποαδενυλασών αυξάνει ως αποτέλεσμα βιοχημικών και γενετικών ερευνών. Οι αποαδενυλάσες εκδηλώνουν μια σαφή προτίμηση για 3'- πολυ(A) ως υπόστρωμα, παρά το γεγονός πως σε

ορισμένες περιπτώσεις έχει δείχτει ότι αποικοδομούν λιγότερο αποτελεσματικά και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Όλες οι γνωστές αποαδενυλάσες είναι  $Mg^{2+}$ -εξαρτώμενα ένζυμα που μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες υπερ-οικογένειες με βάση την παρουσία συγκεκριμένων συντηρημένων καταλοίπων στο καταλυτικό τους κέντρο. Η DEDD υπερ-οικογένεια έχει λάβει το όνομά της από τα καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu που βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ τριών μοτίβων εξωνουκλεάσης, τα οποία συντονίζουν τα ιόντα  $Mg^{2+}$ . Μέλη αυτής της ομάδας αποτελούν η αποαδενυλάση POP2 (γνωστή και ως CAF1), η CAF1Z, η πολύ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (*PARN*), καθώς και οι οικογένειες των PAN2 αποαδενυλασών. Από την άλλη μεριά η υπερ-οικογένεια των εξωνουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών (*exonuclease-endonuclease-phosphatase*, *EEP*), περιλαμβάνει αποαδενυλάσες που φέρουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στις δομικές περιοχές νουκλεάσης τους. Παραδείγματα EEP ενζύμων αποτελούν οι αποαδενυλάσες Nocturnin, CCR4 και Angel.

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

Η τεράστια ποικιλότητα και η ποικιλομορφία των αποαδενυλασών υποδηλώνει πως πιθανότατα συγκεκριμένες αποαδενυλάσες στοχεύουν συγκεκριμένα mRNAs επιτάσσοντας τον έλεγχο τους στη δραστηριότητα ενός μόνο ενζύμου. Από την άλλη, διαφορετικές αποαδενυλάσες μπορούν να δράσουν στο ίδιο mRNA με διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες λειτουργίες [20-24].

Οι αποαδενυλάσες όπως αναφέρθηκε, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γενική διαδικασία ανακύκλωσης του mRNA. Επιτελούν όμως και αρκετούς εξειδικευμένους, ρυθμιστικούς ρόλους. Κάποιες είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των οργανισμών, ενώ μεταλλάγματα άλλων επιφέρουν μια ποικιλία

ενδιαφερόντων φαινοτύπων. Επιπλέον, συγκεκριμένες αποαδενυλάσες είναι απαραίτητες για συγκεκριμένες βιολογικές διεργασίες, γεγονός που αποδεικνύει πως ο έλεγχος ορισμένων mRNAs είναι καθοριστικής σημασίας για την ομαλή λειτουργία αυτών των διεργασιών (Goldstrohm and Wickens, 2008; Parke and Song, 2004). Για παράδειγμα, αρκετές αποαδενυλάσες, συμπεριλαμβανομένων της PARN του *Xenopus laevis* και της CCF-1 του *C. elegans*, είναι σημαντικές κατά την πρώιμη ανάπτυξη, ενώ άλλες απαιτούνται για τη γονιμότητα (όπως η CNOT7 στα ποντίκια) και τη μεταβολική ομοιόσταση (ποντίκια που στερούνται Nocturnin, λαμβάνουν λιγότερο σωματικό βάρος και λίπος σε σύγκριση με τα ποντίκια που τη διαθέτουν, κάτω από ίδιες συνθήκες διατροφής και συμπεριφοράς).

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

Ο ρυθμός της αποαδενυλίωσης ποικίλλει μεταξύ των διάφορων mRNAs. Αυτή η διαδικασία ελέγχεται από παράγοντες-ρυθμιστές οι οποίοι προσδένονται ειδικά σε συγκεκριμένες αλληλουχίες των mRNAs. Ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται συνήθως στις 3' αμετάφραστες περιοχές συγκεκριμένων mRNAs (3'-UTR) ενισχύουν την αποαδενυλίωση τους. Αυτά τα στοιχεία δεσμεύονται από παράγοντες οι οποίοι στρατολογούν συγκεκριμένες αποαδενυλάσες προωθώντας έτσι την αποαδενυλίωση. Τέτοια παραδείγματα παραγόντων που δεσμεύονται στις 3'-UTR περιοχές μορίων mRNA αποτελούν οι CUG-BP, miRNAs, PUF και CPEB (Goldstrohm and Wickens, 2008; Kadyrova et al., 2007; Hook et al., 2007). Εναλλακτικά, προώθηση της αποαδενυλίωσης μπορεί να επιτευχθεί και μέσω αλληλεπίδρασης της PABP και συγκεκριμένων αποαδενυλασών (π.χ η PABP στρατολογεί το σύμπλοκο PAN2-PAN3). Επίσης, το 5' κάλυμμα του mRNA μπορεί να επηρεάσει θετικά την αποαδενυλίωση

διεγείροντας την δραστικότητα και την επεξεργαστικότητα κάποιων αποαδενυλασών (χαρακτηριστότερο και μοναδικό γνωστό έως σήμερα παράδειγμα αποτελεί η PARN). Η έκφραση των αποαδενυλασών και των αντίστοιχων ρυθμιστών τους υποδεικνύει το χρόνο και τον τόπο, στον οποίο μπορεί να συμβεί ρύθμιση της αποαδενυλίωσης. Για παράδειγμα, η έκφραση της *Nocturnin* είναι ρυθμική και ελέγχεται από τον κερκάδιο ρυθμό, ενώ οι αποαδενυλάσες της οικογένειας των POP2 είναι ιδιοσυστατικές [30-32]. Επιπροσθέτως, όταν το κύτταρο υποβάλλεται σε διάφορες μορφές stress (UV, οξειδωση, οσμωτική πίεση ή έλλειψη γλυκόζης) τότε η αποαδενυλίωση σταματά αμέσως. Ο μοριακός μηχανισμός της αναστολής παραμένει άγνωστος. Η αποαδενυλίωση επηρεάζεται επίσης από δύο μορφές χωρικού ελέγχου: τον πυρηνο-κυτταροπλασματικό διαχωρισμό των αποαδενυλασών και την εντόπισή τους σε κοκκία. Στην πρώτη περίπτωση, προβλήματα σωστού διαχωρισμού των αποαδενυλασών μεταξύ πυρήνα και κυτοσολίου μπορούν να αποβούν μοιραία για την τύχη mRNAs που δεν θα έπρεπε να αποικοδομηθούν. Από τη άλλη μεριά, συγκεκριμένες αποαδενυλάσες εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά κοκκία, τα οποία περιέχουν κατασταλμένα mRNAs, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να ενεργοποιηθούν. Η συν-εντόπιση αυτών των αποαδενυλασών με τα υποστρώματα τους πιθανότατα διευκολύνει την κινητική της αποαδενυλίωσης (Goldstrohm and Wickens, 2008).

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

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

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

**Πίνακας 2:** Ποικιλομορφία των αποαδενυλασών (Goldstrohm and Wickens, 2008).

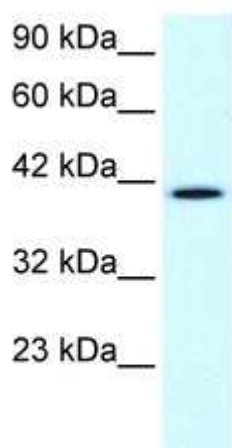
		<i>SC</i>	<i>CE</i>	<i>DM</i>	<i>XL</i>	<i>MM</i>	<i>HS</i>
<i>DEDD nucleases</i>	CNOT7/PO P2	+	+	+	+	+	+
	CNOT8	-	-	-	+	+	+
	CAF1Z	-	+	-	+	+	+
	PARN	-	+	-	+	+	+
	PAN2	+	+	+	+	+	+
<i>EED nucleases</i>	CNOT6/CC R4	+	+	+	+	+	+
	CNOT6L	-	-	-	-	+	+
	NOC	-	-	+	+	+	+
	2'PDE	-	+	+	+	+	+

SC: *S.cerevisiae*, CE: *C. elegans*, DM: *D.melanogaster*, XL: *X.laevis*, MM: *M. musculus*, HS: *H.sapiens*,

## 1.8 Η αποαδενυλάση NOCTURNIN

### 1.8.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η Nocturnin (NOC) έχει ενεργότητα αποαδενυλάσης, αφού εμπλέκεται στην διαδικασία της αποαδενυλίωσης, ενώ έχει μοριακό βάρος 40kDa. Πήρε το όνομά της λόγω του μεγάλου εύρους έκφρασής της τη νύχτα (nocturnal), με τη μ'εγιστη έκφρασή της να εκδηλώνεται 2-4 ώρες μετά την έναρξη του σκότους (C. B. Green, 2003). Η έκφραση του γονιδίου της NOC παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στα ραβδοειδή κύτταρα και στους κωνοειδείς φωτουποδοχείς του αμφιβληστροειδή χιτώνα στον *Xenopus laevis*. Με ανάλυση Western blot φάνηκε ξεκάθαρα η παρουσία της και προσδιορίστηκε το μοριακό της βάρος (εικόνα 6).

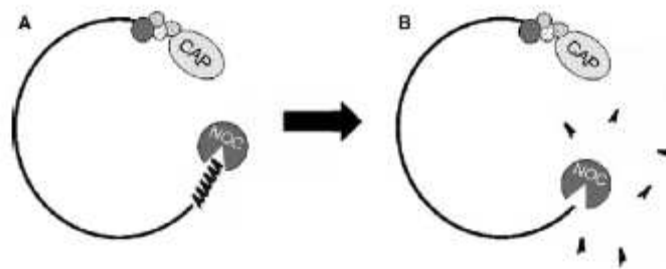


Εικόνα 6

Συγκεκριμένα είναι μια 3'-εξωνουκλεάση που αποικοδομεί την 3'-πολυ(A) ουρά κάποιων mRNAs (Julie E. Baggs and Carla B. Green, 2003). Η ενεργότητα νουκλεάσης της NOC είναι εξαρτώμενη από το δισθενές κατιόν  $Mg^{2+}$ , καθώς με πείραμα μεταλλαξιγένεσης του καταλοίπου δέσμευσης  $Mg^{2+}$ , η NOC δεν παρουσιάζει πια ενεργότητα αποαδενυλάσης. Το γεγονός αυτό την κατατάσσει στην APE1 (DNA-repair apurinic/apirimidinic endonuclease) υπερικογενεία νουκλεασών (Julie E. Baggs and Carla B. Green, 2003). Έχει δειχθεί ότι η NOC έχει γενετική και αμινοξική ομοιότητα στο N-τελικό αλλά και στο C-τελικό άκρο με την αποαδενυλάση CCR4 της ζύμης, γι' αυτό και αποτελεί μία CCR4 like protein και ονομάζεται **Ccrn4l** (carbon catabolite repression 4 like) (Eduardo Garbarino-Pico et al., 2007).

Έχουν 31% ταύτιση με την CCR4 ενώ η ομοιότητά τους ανέρχεται στο 49%. Το N-τελικό άκρο της NOC μοιάζει αρκετά με αυτό της CCR4 λόγω της επικράτειας φερμουάρ λευκίνης που φέρει. Οι NOC και CCR4 μοιράζονται όμοιο μηχανισμό κατάλυσης, όμως οι ενεργότητες αποαδενυλάσης που έχουν διαφέρουν. Στον άνθρωπο, το σύμπλοκο CCR4-NOT αποτελεί ένα ετερογενές και πολυλειτουργικό σύμπλοκο αποαδενυλίωσης που περιλαμβάνει πρωτεϊνικές υπομονάδες-όπως και την CCR4-οι οποίες εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην μεταγραφή και αποικοδόμηση του mRNA, στην επιτήρηση ανώμαλων mRNAs και στην μεταγωγή (Goldstrohm and Wickens 2008). Ο πυρήνας του ανθρώπινου CCR4-NOT συμπλόκου έχει μελετηθεί πολύ πρόσφατα και βρέθηκε ότι αποτελείται από επτά υπομονάδες, τις πρωτεΐνες CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT9, CNOT10 TAB182. Στον πυρήνα αυτό από πρωτεΐνες βρίσκονται συνδεδεμένες οι CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 οι οποίες είναι μεταβλητές υπομονάδες εντός του συμπλόκου. Η CCR4 υπομονάδα στη ζύμη όπως και στα θηλαστικά λειτουργεί ως πολύ(A)-εξειδικευμένη εξωριβονουκλεάση *in vitro* απουσία των άλλων υπομονάδων του συμπλόκου, πράγμα που προτείνει την ύπαρξη διαφορετικών τύπων CCR4-NOT συμπλόκων που καταλύουν την αποαδενυλίωση (Mayer et al. 2004). Η υπομονάδα CCR4 του συμπλόκου είναι η κύρια RNA αποαδενυλάση στις ζύμες αλλά τα κύτταρα των θηλαστικών απαιτούν, ακόμη και τη δραστικότητα τόσο του συμπλόκου CNOT6/hCCR4 και του CNOT7/hCaf1 (Lau et al 2009). Η CCR4 ως υπομονάδα του συμπλόκου CCR4-NOT, αποτελεί και μεταγραφικό συνενεργοποιητή ο οποίος προσδένεται όχι απευθείας πάνω στο DNA αλλά πάνω σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες μέσω της περιοχής πλούσια σε λευκίνη και έτσι προκαλεί τη μεταγραφή γονιδίων (Eduardo Garbarino-Pico et al., 2007). Το γεγονός αυτό γεννά το ερώτημα για το αν η NOC εκτός από την ενεργότητα αποαδενυλάσης που έχει, μπορεί να κατευθύνει και την μεταγραφή γονιδίων μέσω της επικράτειας πλούσια σε λευκίνη.





**Εικόνα 7.** Μετά-μεταγραφική αποαδενυλίωση mRNA από την εξωριβονουκλεάση νοκτουρνίνη.

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

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

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

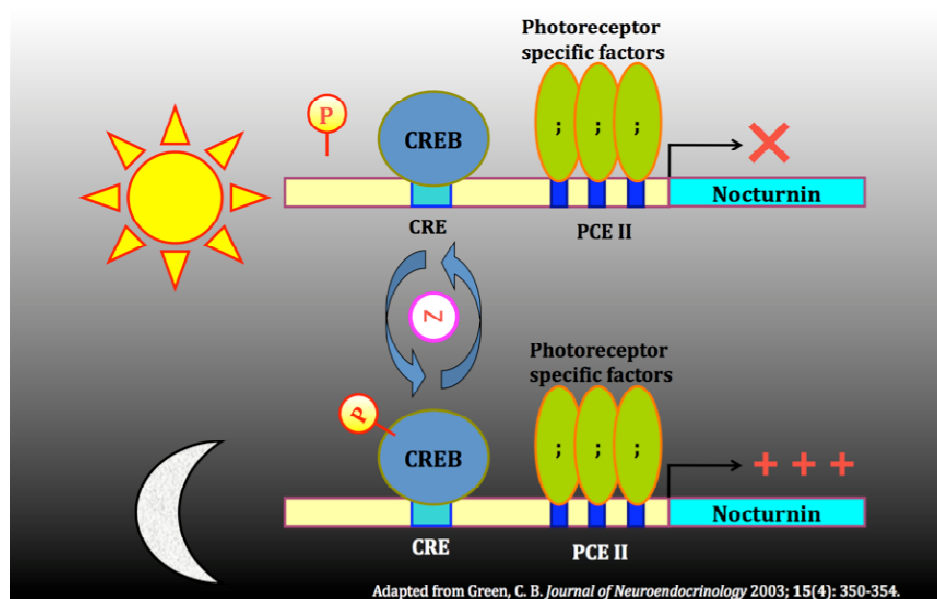
του κικκάδιου ρολογιού, ή ως επόμενος τελεστής σε παρακάτω μονοπάτι της λειτουργίας του κικκάδιου ρολογιού, ή ως μεταγραφικός παράγοντας μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες μέσω της επικράτειας του φερμουάρ λευκίνης. Μια υπόθεση προτείνει πως η NOC ως αποαδενυλάση μπορεί και ρυθμίζει τη διάρκεια ζωής των mRNA, οπότε και την ρυθμική έκφρασή τους, κι έτσι μπορεί να δρα ως κικκάδιος ρυθμιστής (Carla B. Green and Joseph C. Besharse, 1996).

### 1.8.2. Μεταγραφική ρύθμιση της NOC

Στην 5' περιοχή του γονιδίου της NOC βρέθηκε ένα στοιχείο 59 ζευγών βάσεων το οποίο είναι υπεύθυνο για την εξειδικευμένη μεταγραφή της στους φωτουποδοχείς του αμφιβληστροειδή. Περιέχει 3 επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες οι οποίες προσδένουν τους μεταγραφικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία που ευθύνεται για τη δέσμευση πρωτεϊνών είναι η CAGACAGGTATA και ονομάζεται photoreceptor conserved element II (PCE II). Η εξειδικευμένη έκφραση της NOC στους φωτουποδοχείς έγκειται στο γεγονός ότι το πρωτεϊνικό σύμπλοκο που προσδέεται στο PCE II, υπάρχει σε αφθονία στα κύτταρα αυτά (Liu and Green, 2001). Άλλο ένα στοιχείο που προκαλεί τη μεταγραφή της NOC είναι το E-box που βρίσκεται πιο μπροστα από το PCE II στην 5' περιοχή. Η αλληλουχία του στοιχείου E-box είναι η GACGTG και προσδένει διάφορους bHLH μεταγραφικούς παράγοντες, όπως το ετεροδιμερές που αποτελείται από το CLOCK και τον παράγοντα BMAL1 (C. B. Green, 2003). Ο παράγοντας BMAL1 είναι επίσης γνωστός ως Arntl. Ένας άλλος παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση κικκάδιων γονιδίων είναι ο BMAL2, γνωστός και ως Arntl2, που δρα επίσης ως σύμπλοκο με το CLOCK, αλλά και με τον HIF1- $\alpha$ . Προς το παρόν δεν έχει αναφερθεί εάν οι παράγοντες αυτοί μπορούν να κατευθύνουν και την έκφραση της NOC (Christopher M. Ciarleglio et al., 2008).

Αν και το σύμπλοκο CLOCK/BMAL1 εμπλέκεται στη ρύθμιση διάφορων

κιρκάδιων γονιδίων μέσω της πρόσδεσής του στο στοιχείο E-box in vitro, λίγα γνωρίζουμε για το πώς το κιρκάδιο ρολόι ελέγχει ρυθμικά γονίδια in vivo. Γνωρίζουμε ότι η ενεργότητα του συμπλόκου CLOCK/BMAL1 έχει τη μέγιστη έκφρασή της τα μεσάνυχτα όπου και επάγει τη μεταγραφή της NOC. Κοντά στο E-box προσδιορίστηκε ένα νέο στοιχείο NE, το οποίο λειτουργεί ως cAMP response element (CRE) προσδένοντας την CREB πρωτεΐνη (CRE binding protein). Σε μελέτη που έγινε, παρατηρήθηκε ότι η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη CREB έχει ρυθμικά επίπεδα στους φωτουποδοχείς, με φάση ίδια με αυτή της μεταγραφής της NOC. Έτσι, εικάζεται ότι η P-CREB ελέγχει τα ρυθμικά επίπεδα της NOC που έχει φάση νυκτός. Το στοιχείο NE μπορεί εξελικτικά να αποτελεί ενδιάμεσο στοιχείο των E-box και CRE, όπου τα δύο τελευταία εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταγραφής, με διαφορετική φάση ωστόσο (Liu and Green, 2002).



**Εικόνα 8 :** Προτεινόμενος μηχανισμός της κιρκάδιας ρύθμισης της μεταγραφής της νοκτουρνίνης (Green, 2003).

### 1.8.3 Ρύθμιση της NOC σε ενδοκυτταρικό επίπεδο

Ο μεταβολισμός, η φυσιολογία και η συμπεριφορά των περισσότερων οργανισμών αλλάζει μεταξύ ημέρας και νύχτας. Αυτές οι βιολογικές ταλαντώσεις γίνονται προφανείς ως ημερήσιοι ρυθμοί. Οι ημερήσιοι ρυθμοί των οργανισμών παραμένουν, ακόμα και όταν στερούνται εξωγενή χρονικά

ερεθίσματα, δείχνοντας ότι παράγονται από ένα ενδογενές βιολογικό κιρκάδιο ρολόι. Το κιρκάδιο ρολόι ελέγχει την ρυθμική έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων του μεταβολισμού και όχι μόνο, τα οποία ονομάζονται κιρκάδια γονίδια. Από ανάλυση που έγινε στο γονιδίωμα ποντικού από κύτταρα ήπατος, αποκαλύφθηκαν κιρκάδια γονίδια που ρυθμίζονται από το γονίδιο CLOCK - ανάμεσά τους και το γονίδιο της NOC. Κατ' αρχάς το CLOCK είναι ένα κιρκάδιο γονίδιο που είναι απαραίτητο για την παραγωγή μελατονίνης στα κωνοειδή κύτταρα του αμβιβληστροειδή. Επίσης εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο, στον μεταβολισμό των λιπιδίων, στη λειτουργία του ανοσοποιητικού και στην διαδικασία της πρωτεόλυσης στους περιφερικούς ιστούς. Το CLOCK αποτελεί κύριο κιρκάδιο ρυθμιστή των κιρκάδιων γονιδίων στο κεντρικό κιρκάδιο ρολόι στον υπερχιασματικό πυρήνα του εγκεφάλου των θηλαστικών. Σε πειράματα που έγιναν χρησιμοποιήθηκε RNA από ήπαρ μεταλλαγμένων clock<sup>-</sup> ποντικών και αναλύθηκε η μεταγραφή διαφόρων γονιδίων που ρυθμίζονται από CLOCK στους περιφερικούς ιστούς. Προσδιορίστηκαν πάνω από 100 κιρκάδια γονίδια των οποίων η έκφραση ήταν μειωμένη στα μεταλλάγματα clock<sup>-</sup>. Ακόμα βρέθηκε ότι το CLOCK ήταν απόλυτα συνδεδεμένο με την κιρκάδια μεταγραφή κάποιων γονιδίων στο ήπαρ, και μερικώς με την μεταγραφή κάποιων άλλων κιρκάδιων γονιδίων, όπως αυτό της NOC αλλά και των Per1 και Per2, η έκφραση των οποίων να μεν ελαττώνονταν, όμως παρέμενε ρυθμική στα μεταλλαγμένα ποντίκια. Τα περισσότερα από τα ρυθμιζόμενα από CLOCK γονίδια, είχαν μια περιοχή πρόσδεσης CLOCK και του παράγοντα BMAL1 στην 5' περιοχή. Άλλος ένας κιρκάδιος ρυθμιστής που επηρεάζει την έκφραση της NOC είναι το γονίδιο CRY(cryochrome). Τα μεταγραφικά επίπεδα της NOC στα διπλά μεταλλάγματα του cry<sup>-/-</sup> ήταν διαρκώς υψηλά - κάτι που καταδεικνύει το CRY ως αρνητικό ρυθμιστή της (Katsutaka Oishi et al., 2003).

Άλλος ένας παράγοντας που έχει βρεθεί πρόσφατα ότι ρυθμίζει την μετα-μεταγραφική έκφραση της NOC είναι το microRNA-122, ένα εξειδικευμένο microRNA των κυττάρων του ήπατος του ποντικού. Σ' αυτή τη μελέτη βρέθηκε

ότι η 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA της NOC περιέχει μία θέση αναγνώρισης για το microRNA-122, η οποία είναι συντηρημένη στα θηλαστικά. Η πρόσδεση του miR-122 πάνω στο mRNA της NOC προκαλεί την άμεση αποσιώπησή της καθώς με στοχευμένη αδρανοποίηση του microRNA φάνηκε ότι τα επίπεδα της NOC και του mRNA της αυξήθηκαν κατακόρυφα κατά τη διάρκεια της νύχτας. Άλλες μελέτες υποδεικνύουν τη NOC αλλά και το miR-122 να παίζουν ρόλο όχι μόνο στην κirkάδια ρύθμιση αλλά και στον μεταβολισμό των λιπιδίων, το οποίο θα αναφερθεί παρακάτω (Shihoko Kojima et al.).

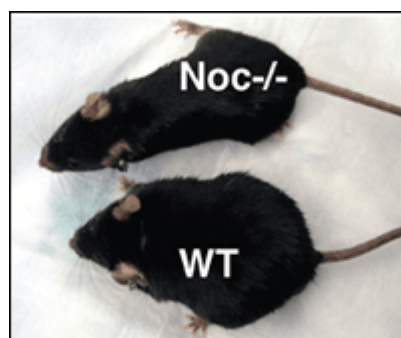
#### 1.8.4. Η NOC ως γονίδιο άμεσης απόκρισης

Πολλά κirkάδια γονίδια επάγονται από εξωκυτταρικές διεγέρσεις. Σε πείραμα που έγινε σε κύτταρα ινοβλαστών ποντικού, NIH3T3, τα οποία δεν σχετίζονται με κirkάδιο ρυθμό, δείχθηκε ότι υπήρχε άμεση απόκριση της NOC σε δύο εξωκυτταρικές διεγέρσεις. Όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται απουσία ορού(FBS) ή η χορήγηση φορβολικού εστέρα(TPA) στα κύτταρα αυτά τα οποία βρίσκονταν σε κατάσταση ηρεμίας, παρατηρήθηκε άμεση επαγωγή της έκφρασης της NOC, αφού τα επίπεδα του mRNA της αυξήθηκαν κατά πολύ. Ο ορός επάγει την αύξηση και των πρωτεϊνικών επιπέδων, ενώ ο χρόνος ημιζωής από την επαγωγή από το TPA είναι μικρός. Η καταστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης από κυκλοεξαμίδιο αποτρέπει την αποικοδόμηση του mRNA της NOC και τα επίπεδά του ανέρχονται μέχρι και 30 φορές πάνω από το φυσιολογικό 4 ώρες μετά από χωρήγηση TPA. Αφού λοιπόν αυτή η ισχυρή επαγωγή δεν εξαρτάται από την πρωτεϊνοσύνθεση, η NOC συμπεριφέρεται σαν άλλα γονίδια άμεσης απόκρισης. Αξιοσημείωτα, αυτές οι ισχυρές επιδράσεις είναι εξειδικευμένες για τη NOC, καθώς άλλες αποαδενυλάσες όπως η CCR4, CAF1, PAN2 και PARN δεν επάχθηκαν από τους παράγοντες αυτούς. Επιπλέον της κirkάδιας ρύθμισής της, η έκφραση της NOC μπορεί να ρυθμιστεί ισχυρά από εξωκυτταρικά σήματα και υπονοεί ότι μπορεί να αποκριθεί άμεσα και εξειδικευμένα σε φυσιολογικές συνθήκες. Η NOC λοιπόν ως γονίδιο άμεσης

απόκρισης μπορεί και δρα με την ιδιότητα αποαδενυλάσης καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων όταν απαιτείται να αποσιωπηθούν ως απόκριση σε αυτά τα εξωκυτταρικά σήματα (Eduardo Garbarino-Pico et al., 2007).

### 1.8.5. Η NOC εμπλέκεται στον μεταβολισμό λιπιδίων και υδατανθράκων

Τα περιφερικά κινκάρδια ρολόγια που υπάρχουν σε διάφορους ιστούς του σώματος, ελέγχουν τη ρυθμική έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου και γονιδίων του μεταβολισμού. Στοχευμένη αδρανοποίηση του γονιδίου της NOC που έγινε στα ποντίκια, επέφερε αντίσταση στην ανάπτυξη παχυσαρκίας και στην ηπατική στεάτωση(εικόνα 10). Τα NOC knock out(απογονιδιακά) ποντίκια παραμένουν αδύνατα σε διατροφές με πολλά λιπαρά, ενώ έχουν χαμηλότερο σωματικό βάρος και μειωμένο κοιλιακό λίπος(εικόνα 9).



Εικόνα 9(Besharse and Green, 2007)

Τα ποντίκια αυτά υστερούν στον μεταβολισμό των λιπιδίων αλλά και στην πρόσληψη γλυκόζης, ενώ παρατηρούνται και αλλαγές ως προς την ευαισθησία του οργανισμού προς τη γλυκόζη και προς την ινσουλίνη. Η αδρανοποίηση της NOC έχει συσχετιστεί με μειωμένη έκφραση λιπογενών γονιδίων, μειωμένη αποθήκευση λιπιδίων στον λιπώδη ιστό, μειωμένη συσσώρευση λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα, αυξημένη οξείδωση λιπιδίων σε σχέση με τα wt ποντίκια αλλά και με μεταβολές στην ομοιόσταση της γλυκόζης (Carla B. Green et al., 2007).



**Εικόνα 10 :** Το πάνω ήπαρ από φυσιολογικό ποντίκι περιέχει μεγάλες ποσότητες λίπους μετά από διατροφή υψηλή σε λιπαρά. Αντίθετα, το κάτω ήπαρ από ένα NOC-/- ποντίκι, περιέχει φυσιολογικές ποσότητες λίπους και παραμένει υγιές μετά από διατροφή υψηλή σε λιπαρά (University of Virginia (2007, May 18). Clock Gene Plays Role In Weight Gain, Study Finds. *ScienceDaily*, 2010)

Η NOC εκφράζεται ισχυρά στα βλαστοκύτταρα του νωτιαίου μυελού(BMSC), στα ηπατοκύτταρα και στα λιποκύτταρα των θηλαστικά. Σε πρόσφατο πείραμα σε κύτταρα BMSC που εκτέθηκαν στον αγωνιστή rosiglitazone του PPAR- $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ), η έκφραση της NOC αυξήθηκε κατά 30 φορές. Ο PPAR- $\gamma$  αποτελεί κρίσιμο μεταγραφικό παράγοντα για τη λιπογένεση αλλά και τον μεταβολισμό της γλυκόζης. Η NOC φαίνεται να προσδένεται στον PPAR- $\gamma$  και να επάγει την μεταγραφική ικανότητά του με το να οδηγεί την πυρηνική μετάθεσή του ούτως ώστε να λειτουργήσει ως μεταγραφικός παράγοντας επάγοντας συγκεκριμένα γονίδια. Μ' αυτόν τον τρόπο η NOC μπορεί και επάγει την λιπογένεση αλλά και τη διαφοροποίηση των BMSC βλαστοκυττάρων και τελικά τη σύσταση του οργανισμού. Όλα τα παραπάνω προτείνουν την NOC να έχει κεντρικό ρόλο στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων του μεταβολισμού και της αποθήκευσης των λιπιδίων, του μεταβολισμού των υδατανθράκων αλλά και άλλων σημαντικών μεταβολικών μονοπατιών για τη σύσταση του σκελετικού συστήματος (Masanobu Kawai et al., 2010).

## **2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

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

Σκοπός της εργασίας είναι να συμβάλει στην αποκάλυψη και τη μελέτη πιθανών mRNA-στόχων της ανθρώπινης αποαδενυλάσης NOCTURNIN. Παράλληλα, προσπαθούμε να προσδιορίσουμε σε ποια μεταβολικά μονοπάτια πιθανόν να εμπλέκεται η NOC λόγω της ιδιότητάς της ως κερκάδιο γονίδιο που ελέγχεται από κερκάδια ρολόγια του οργανισμού. Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας κρίθηκε απαραίτητη η αποσιώπηση *in vivo*, της αποαδενυλάσης NOC σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα Hep2, μέσω του ενδοκυττάριου μηχανισμού RNAi και η μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης αυτής στα επίπεδα έκφρασης ενός συνόλου επιλεγμένων παραγόντων. Στους παράγοντες αυτούς περιλαμβάνονται και άλλες αποαδενυλάσες, πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το mRNA ή εμπλέκονται στο μηχανισμό του RNAi, κερκάδια γονίδια, παράγοντες σημαντικοί για το μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων, ογκογονίδια κτλ. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν μικρά δίκλινα shRNAs (short hairpin RNAs), για τη διαμόλυνση της καρκινικής κυτταρικής σειράς Hep2. Τα αποτελέσματα της αποσιώπησης ελέγχθηκαν σε επίπεδο πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωση και σε επίπεδο mRNA με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου ενός βήματος (quantitative, one-step Real Time PCR).



### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. ΥΛΙΚΑ

##### 3.1.1 Χημικές ουσίες

- Acrylamide (Sigma )
- Αιθανόλη (Merck)
- Ακετόνη (Merck)
- Αμμωνία (Merck)
- Αμπικιλίνη (Sigma)
- Antibiotic-Antimycotic (Biosera)
- APS (Ammonium Persulfate) (Sigma)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haen)
- BCIP/NBT Alkaline Phosphatase System (KPL)
- Bioquant Protein (Merck)
- Bis-acrylamide (Sigma)
- Bromophenol Blue (Research Organics)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Merck)
- Coomassie Brilliant Blue (Fluka)
- Γλυκερόλη (Panreac)
- Γλυκίνη (AppliChem)
- DNA marker 1 kb (GenScript)
- Fetal Bovine Serum FBS (Gibco)
- Full Range Rainbow MW Markers (Amersham)
- HCl (Merck)
- Ισοπροπανόλη (Scharlau)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)
- LB Broth (Scharlau)
- LB Agar (Scharlau)
- Μεθανόλη (Merck)
- MEM (Biosera)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)
- NaCl (Panreac)
- NaOH (Merck)
- Οξικό οξύ (Merck)
- Ponceau Red (Sigma)
- Protease Inhibitors (Roche)
- Puromycin (Sigma)
- SDS (Sodium dodecyl sulfate) (Sigma)
- Skimmed Milk (Scharlau)
- Temed (N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine) (Research Organics)
- Tris base (Merck)
- Trypsin-EDTA 5% 10x (Gibco)
- Tween 20 (Euroclone)

### 3.1.2 Διαλύματα

#### Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

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

#### Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

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

#### Διαλύματα stock για πήκτωμα ακρυλαμιδίου

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

#### Διαλύματα για το πήκτωμα ακρυλαμιδίου

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

**Διαλύματα για βαφή του gel**

- Διάλυμα χρώσης Coomassie Brilliant Blue G250 0,1% w/v, ισοπροπανόλη 33%, οξικό οξύ 2%
- Διάλυμα αποχρωματισμού, Ισοπροπανόλη 9%, Οξικό οξύ 1%

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

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

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

**Διάλυμα λύσης Hep2 κυττάρων:** 600mM KCl, 20mM Tris-HCl pH=7,8, 20% γλυκερόλη, 4% αναστολείς πρωτεασών

### Θρεπτικά Διαλύματα

- MEM: 5 ή 10% FBS (ανάλογα τον επιθυμητό ρυθμό ανάπτυξης, 1% Antibiotic-antimycotic)
- Διάλυμα κρυοπροστασίας Hep2 κυττάρων: 10% DMSO, 20% FBS, MEM
- LB Broth
- LB Agar

### Διαλύματα για τη διαμόλυνση Hep2 κυττάρων

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

### Διαλύματα για την αποσύνδεση αντισωμάτων από PVDF μεμβράνη

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

### 3.1.3 Αντισώματα

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

### 3.1.4 Κυτταρικές σειρές

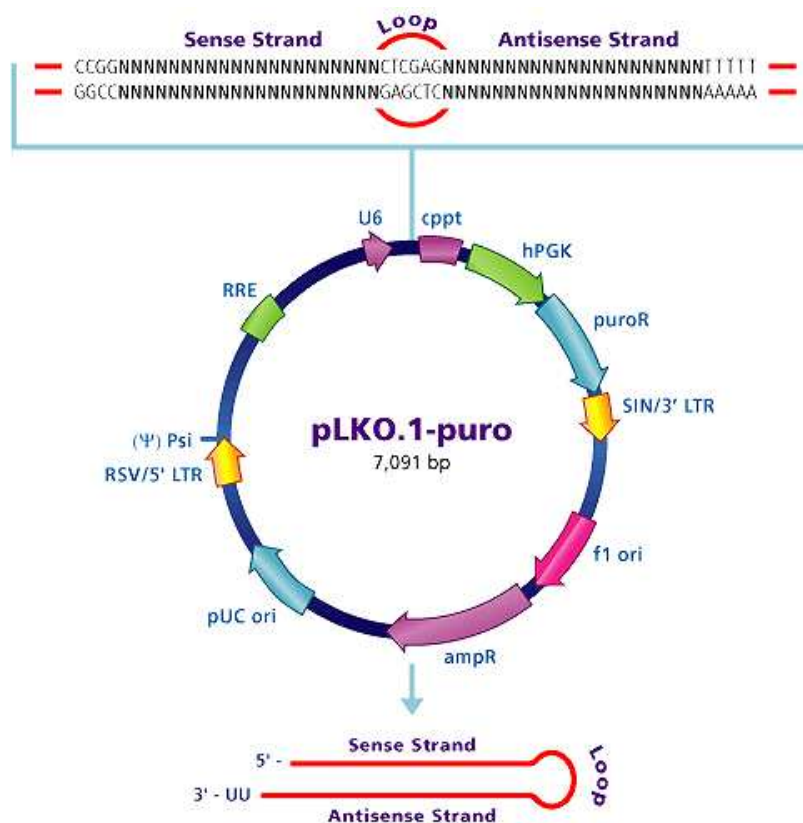
- DH5a: Στέλεχος *E. coli* που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή και κλωνοποίηση πλασμιδιακού DNA. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για την αναγέννηση των πλασμιδίων που περιέχουν τα ειδικά shRNAs για τη σίγηση της NOC.
- Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα Hep2: Πρόκειται για ανθρώπινη, ετεροπλοειδή, καρκινική κυτταρική σειρά (συγκεκριμένα προέρχεται από επιδερμικό καρκίνωμα του λάρυγγα μετά από επιμόλυνση με κύτταρα HeLa). Σχηματίζουν μονόστιβες επιθηλιακές επιφάνειες στο ταπήτιο ανάπτυξης (εικόνα 11).



**Εικόνα 11** : Κύτταρα Hep2, μεγέθυνση 10x

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

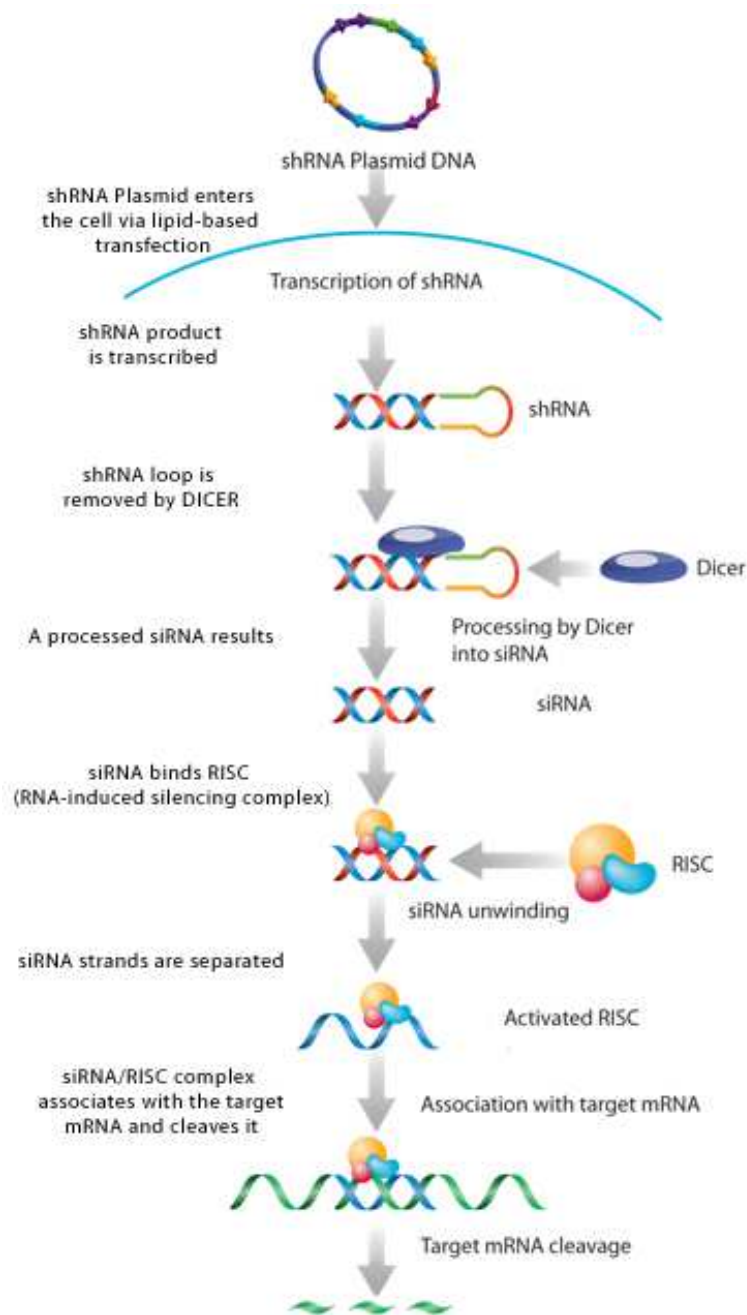
Για την αποσιώπηση της NOC χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικά shRNAs κλωνοποιημένα στο λεντι-ϊϊκό πλασμιδιακό φορέα pLKO.1-puro (**εικόνα 12**). Τα shRNAs και τα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου φορέα παρέχουν ένα ισχυρό μοριακό εργαλείο μακροπρόθεσμης, σταθερής αποσιώπησης του επιθυμητού γονιδίου, μέσω του συστήματος του RNAi καθώς και τη δυνατότητα αναγέννησης του πλασμιδίου μετά το μετασχηματισμό βακτηρίων με αυτό. Ο pLKO.1-puro περιέχει γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και την πουρομυκίνη για δυνατότητα επιλογής βακτηριακών και ευκαρυωτικών κυττάρων αντιστοίχως, που έλαβαν επιτυχώς το πλασμίδιο.



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

**Εικόνα 12 :** Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pLKO.1- puro της Sigma. Παρατίθεται και ένας πίνακας με σημαντικές αλληλουχίες-στοιχεία του φορέα

Ο μηχανισμός δράσης των shRNAs έγκειται στην *in vivo* μεταγραφή της κλωνοποιημένης στο φορέα αλληλουχίας του shRNA ενδοκυτταρικά και η παραγωγή μικρών δίκλωνων μορίων RNA που φέρουν μια δευτεροταγή δομή φουρκέτας. Στη συνέχεια αυτά τα δίκλιωνα μόρια επεξεργάζονται από τη Dicer και παράγουν μια ομάδα από siRNAs ειδικά για το επιθυμητό mRNA-στόχο το οποίο αποικοδομείται μέσω του συμπλόκου Argonaute που περιέχει την νουκλεάση RISC(εικόνα 13).



**Εικόνα 13:** Μηχανισμός αποσιώπησης μέσω πλασμιδικών φορέων που μεταγράφουν shRNAs.

Βάσει του πρωτοκόλλου της Ambion σχεδιάσαμε πέντε ειδικά και εξειδικευμένα shRNAs για την αποσιώπηση της ανθρώπινης NOC. Ο σχεδιασμός των shRNAs έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της oligoengine « pSUPER : Manual A Vector System for Expression of Short Interfering RNA». Ενώ διατέθηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich με τον κωδικό NM\_012118(CCR4 carbon catabolite repression 4-like (*S. cerevisiae*)/MISSION® shRNA Bacterial Glycerol Stock).

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

#### Κριτήρια επιλογής siRNAs/ shRNAs

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

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





Στον **πίνακα 3** συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά των επιλεγμένων shRNAs:

**Πίνακας 3:** Χαρακτηριστικά των σχεδιασμένων shRNAs έναντι της NOC.

Αλληλουχία θηλιάς (5'→3')	Θέση στο mRNA	Περιεχόμενο % GC	Αλληλουχία των 5 shRNAs
UUCAAGAGA	552	53,4%	CCGGGGCCTACCAGCCTGATATATTCTCGAGAAATATATCAGGCT GGTAGGCCTTTTTG
UUCAAGAGA	1172	53,4%	CCGGGCTCTCGATCTGCTCACTGAACTCGAGTTCAGTGAGCAGA TCGAGAGCTTTTT
UUCAAGAGA	1264	42%	CCGGAGCTTTACTGAGGAATCTGATCTCGAGATCAGATTCCTCA GTAAAGCTTTTTT
UUCAAGAGA	1267	39,6%	CCGGTTTAATCACAGGAGTCTATTTCTCGAGAAATAGACTCCTG TGATTAAATTTTTG
UUCAAGAGA	206	49%	CCGGCCGGTACAAGCAGACTCTATACTCGAGTATAGAGTCTGC TTGTACCGGTTTTTG

### 3.1.6 Εκκινητές

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης της NOC και των υπολοίπων εξεταζόμενων παραγόντων (περιγράφονται στον **πίνακα 4**) με Real Time PCR, σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος PRIMER 3 εκκινητές (primers) ειδικοί για το mRNA (για την ακρίβεια cDNA) του κάθε υπό μελέτη παράγοντα. Ο κάθε εκκινητής ελέγχθηκε ως προς την εξειδίκευση του για το αντίστοιχο cDNA-στόχο με Blastn.

**Πίνακας 4:** Συνοπτική παρουσίαση των επιλεγμένων παραγόντων, των οποίων τα επίπεδα εξετάστηκαν μετά την αποσιώπηση της PARN (παρατίθενται και οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση της RT-PCR καθώς και τα αναμενόμενα μεγέθη των ενισχυμένων προϊόντων).

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	Primers (5'→3')-Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
<b>NOCTURNIN</b> (CCR4 carbon catabolite repression 4-like)	Αποαδενυλάση κατηγορίας EEP εξαρτώμενη από δισθενή κατίοντα Mg <sup>2+</sup> . Υπόκειται σε κινκάρδιο έλεγχο(Aaron C. Goldstrohm and Marvin Wickens).	<b>Fwd</b> GCCAAGACACTGAACAGCAG <b>Rev</b> GGCAATCTGTCCTCAGATCC 175bp
<b>CNOT7</b>	Οι <b>CNOT7</b> και <b>PARN</b> ανήκουν στην ίδια οικογένεια αποαδενυλασών DEDD, συμβάλλοντας στην αποαδενυλίωση του mRNA. Στους περισσότερους ευκαρυώτες εκτός από το αποαδενυλάσες CCR4-NOT και PAN υπάρχει και ένα τρίτο ένζυμο	<b>Fwd</b> GTCCTCTGTGAAGGGGTCAA <b>Rev</b> GAC TGCTTG TTGGCT TC TC 419bp
<b>PARN</b>	πολύ(A)αποικοδόμησης η πολύ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση PARN.	<b>Fwd</b> CAGCAGAAACATGCCAAAGA <b>Rev</b> CCAAGAGTCTGGGGAAAACA 211bp
<b>PARNL</b> (PNLDC1 poly(A)-specific ribonuclease (PARN)-like domain containing 1)	Ανήκει στην DEDD υπεροικογένεια αποαδενυλασών(Aaron C. Goldstrohm and Marvin Wickens).	<b>Fwd</b> GACCCCTCCCAGAAAGCTAC <b>Rev</b> GGGGCACTTTGTCTCAACAT 236bp
<b>CNOT8</b> (CCR4-NOT transcription complex, subunit 8)	Αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (LAU <i>at al. Biochem J (2009)</i> )	<b>Fwd</b> GGATTTGCAGAGGATTGGAA <b>Rev</b> TCACTGCTGCATGTTGTTGA 232bp

<b>CNOT6</b> (CCR4-NOT transcription complex, subunit 6)	Αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT ( <i>LAU at al. Biochem J (2009)</i> )	<b>Fwd</b> AGCTGTCATGGGAAGAATGG <b>Rev</b> GGGCAGCCACTGATGTTATT 221bp
<b>CNOT6L</b> (CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like)	Αποτελεί μεταβλητή υπομονάδα του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT. ( <i>LAU at al. Biochem J (2009)</i> )	<b>Fwd</b> CGGCTCTTCCAGCTACAAAC <b>Rev</b> GGAAGCTGCTCTGGATGAAC 143bp
<b>ANGEL 1</b>	Ανήκει στην EEP υπεροικογένεια αποαδενυλασών με συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στο ενεργό κέντρο. Υπάρχει σε όλα τα ευκαρυωτικά( <i>Aaron C. Goldstrohm and Marvin Wickens</i> )	<b>Fwd</b> AGCATAGCACCTGAGCCTGT <b>Rev</b> GGTCCTGAGCCAGGATGTTA 220bp
<b>ANGEL2</b>	Ανήκει στην EEP υπεροικογένεια αποαδενυλασών με συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στο ενεργό κέντρο. Υπάρχει σε όλα τα ευκαρυωτικά ( <i>Aaron C. Goldstrohm and Marvin Wickens</i> )	<b>Fwd</b> GTGTTGCCACCAGAAAGAT <b>Rev</b> GGGGCCAAATTGGAATAGAT 195bp
<b>PAN2</b>	Ανήκει στην υπεροικογένεια αποαδενυλασών DEDD με συντηρημένα κατάλοιπα Asp και Glu στο καταλυτικό κέντρο. Αποικοδομεί το μισό μήκος της πολύ(A) ουράς μέσα στον πυρήνα, ενώ το υπόλοιπο μέρος αποικοδομείται από τις αποαδενυλάσες POP2 και CCR4 στοκυτταρόπλασμα( <i>Aaron C. Goldstrohm and Marvin Wickens</i> ).	<b>Fwd</b> CTCATCGGGGGACTCTGTTA <b>Rev</b> CCAGGCCTGTGTATTCTGGT 205bp
<b>CAF-1Z</b>	Ανήκει στην DEDD υπεροικογένεια αποαδενυλασών. Στα θηλαστικά, η υπερέκφραση της CAF-1Z επάγει την κυτταρική ανάπτυξη( <i>Aaron C. Goldstrohm and Marvin Wickens</i> ).	<b>Fwd</b> TTGGGGACAGGAAGAGTTTG <b>Rev</b> TTGAAGTTGAAGCCATGCTG

<p><b>2'-PDE</b> (PDE12 phosphodiesterase 12)</p>	<p>Η 2'-PDE είναι μια φωσφοδιεστεράση των θηλαστικών και βρίσκεται σε πολλά σημεία του εγκεφάλου. Η ανθρώπινη 2'PDE αποτελεί αποαδενυλάση καθώς αποικοδομεί πολύ(A) ουρές όταν τα 5' φωσφορικά από κάθε αδενοσίνη είναι ιοντικά συνδεδεμένα ανάμεσα από τις 2' και 3' υδροξυλιωμένες θέσεις. Έχει δειχθεί ότι η 2'-PDE μειώνει τα επίπεδα του cAMP μέσω αύξησης του cGMP( Aaron C. Goldstrohm and Marvin Wickens).</p>	<p><b>Fwd</b> CGCCAGAACCTTATCCAGAA <b>Rev</b> CTCGAGGGCTTCGTAGAATG 228bp</p>
<p><b>PAPOLA</b></p>	<p>Πολύ(A) πολυμεράση A. Αδενυλιώνει το 3' άκρο των mRNAs.</p>	<p><b>Fwd</b> AATGACAGCAGCCTCGACTT <b>Rev</b> TGTACCCCCTGAGCTTTCAC 216bp</p>
<p><b>PER1</b> (period homolog 1 (Drosophila))</p>	<p>Αποτελεί μέλος της οικογένειας των Period γονιδίων, ενώ εκφράζεται με κικκάδιο πρότυπο στον υπερχιασματικό πυρήνα του εγκεφάλου των θηλαστικών. Τα γονίδια αυτής της οικογένειας κωδικοποιούν συστατικά κικκάδιων ρολογιών που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό, τη μεταφορά κ.α. Η εξειδικευμένη λειτουργία του γονιδίου αυτού, δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. ("Entrez Gene: PER1 period homolog 1 (Drosophila)")</p>	<p><b>Fwd</b> CAATGGTTCAAGTGGCAATG <b>Rev</b> TGTAGGCAATGGAAGCTGCTG 176bp</p>
<p><b>PER2</b> (period homolog 2 (Drosophila))</p>	<p>Αποτελεί μέλος της οικογένειας των Period γονιδίων, ενώ εκφράζεται με κικκάδιο πρότυπο στον υπερχιασματικό πυρήνα του εγκεφάλου των θηλαστικών. Τα γονίδια αυτής της οικογένειας κωδικοποιούν συστατικά κικκάδιων ρολογιών που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό, τη μεταφορά κ.α. Το Per2 εμπλέκεται στην καταστολή όγκων ρυθμίζοντας τα μονοπάτια απόκρισης στη βλάβη του DNA. Επίσης δρα και ως μεταγραφικός</p>	<p><b>Fwd</b> CTGATTGAAACCCAGTGCT <b>Rev</b> ATGGGTTGATGAAGCTGGAC 181bp</p>

	<p>παράγοντας επάγοντας την έκφραση του BMAL1. (Katsutaka Oishi et al., 2003, Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF Jr, Reppert SM (Jan 1998).</p>	
<p><b>PER3</b> (period homolog 3 (Drosophila)</p>	<p>Αποτελεί μέλος της οικογένειας των Period γονιδίων, ενώ εκφράζεται με κικκάδιο πρότυπο στον υπερχιασματικό πυρήνα του εγκεφάλου των θηλαστικών. Γονίδια αυτής της οικογένειας κωδικοποιούν συστατικά κικκάδιων ρολογιών που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό, τη μεταφορά κ.α. Η εξειδικευμένη λειτουργία του γονιδίου αυτού, δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί(Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF Jr, Reppert SM (Jan 1998)</p>	<p><b>Fwd</b> AGCTACCTGCACCCTGAAGA <b>Rev</b> CGAACTTTATGCCGACCAAT  206bp</p>
<p><b>CLOCK</b> (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput)</p>	<p>Το CLOCK αποτελεί κικκάδιο γονίδιο το οποίο φαίνεται να ελέγχει την διάρκεια του κικκάδιου κύκλου σε διάφορα κικκάδια γονίδια με το να αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα. Δρα μέσω του συμπλόκου που δημιουργεί με τον παράγοντα BMAL-1, το οποίο προσδένεται στο στοιχείο E-box(Edey I (2000 Aug 9). "Circadian rhythms in a nutshell".)</p>	<p><b>Fwd</b> GGCTGAAAGACGACGAGAAC <b>Rev</b> GGTGTGAGGAAGGGTCTGA  210bp</p>
<p><b>ARNTL</b> (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like)</p>	<p>Συστατικό του κεντρικού κικκάδιου ρολογιού. Επίσης γνωστό ως BMAL1, το οποίο συμπλοκοποιείται με τον παράγοντα Clock και προσδένονται πάνω στο στοιχείο E-box ρυθμίζοντας την έκφραση πολλών κικκάδιων γονιδίων(Christopher M. Ciarleglio et al.,2008).</p>	<p><b>Fwd</b> TAGGATGTGACCGAGGGAAG  <b>Rev</b> GGCCCAGGGGTTATATCTGT  223bp</p>

<b>ARNTL2</b>	<p>Συστατικό του κεντρικού κικκάδιου ρολογιού. Επίσης γνωστό ως BMAL2, το οποίο συμπλοκοποιείται με τον παράγοντα Clock και προσδένονται πάνω στο στοιχείο E-box ρυθμίζοντας την έκφραση πολλών κικκάδιων γονιδίων. Το BMAL2 έχει την ικανότητα να συμπλοκοποιείται και με τον HIF1-α(Christopher M. Ciarleglio et al.,2008).</p>	<p><b>Fwd</b> GAGTCCAGGGACAAGACCAA</p> <p><b>Rev</b> TTGGTGTTCACCATCTTCCA</p> <p>220bp</p>
<b>AANAT</b> (arylalkylamine N-acetyltransferase)	<p>Αποτελεί κικκάδιο γονίδιο. Συγκεκριμένα, είναι μια ακετυλοτρανσφεράση η οποία είναι απαραίτητη για την σύνθεση της μελετονίνης ελέγχοντας την κικκάδια παραγωγή της στην επίφυση των σπονδυλωτών. Το ένζυμο αυτό είναι μέγιστης σημασίας καθώς η μελατονίνη είναι απαραίτητη για τη λειτουργία των κικκάδιων ρολογιών που ελέγχουν την δραστηριότητα και τον ύπνο. (Christopher M. Ciarleglio et al.,2008)</p>	<p><b>Fwd</b> AGTGAGTTTCGCTGCCTCAC</p> <p><b>Rev</b> GCGTCAGTGACTCCTGCAT</p> <p>229bp</p>
<b>LSM</b>	<p>Οι πρωτεΐνες Lsm 2p- 8p αλληλεπιδρούν με το U6 snRNA και συμβάλουν στο μάτισμα του pre-mRNA. Ο ακριβής μηχανισμός των πρωτεϊνών στο μάτισμα παραμένει άγνωστος. Οι Lsm 1-7 ενεργοποιούν την αφαίρεση της 5' καλύπτρας του mRNA. (Weihai and Parker, 2000).</p>	<p><b>Fwd</b> GCTTCGAGATGGAAGGACAC</p> <p><b>Rev</b> ATACTTGCTGGAGGGGTGTG</p> <p>209bp</p>
<b>BTG2</b>	<p>Κύριο μέλος της οικογένειας των TOB πρωτεϊνών (anti-proliferative proteins). Εμπλέκεται στην κυτταρική ανάπτυξη, την διαφοροποίηση και την επιδιόρθωση του DNA, Έχει αντι-αποπτωτικό ρόλο στην νευρογένεση. Αλληλεπιδρά με τον παράγοντα CAF1 και τον POP2, που είναι τα κύρια συστατικά του CCR4-NOT συμπλόκου καταστέλλοντας την ενεργότητα αποαδενυλάσης της CAF1 (Yang, 2009).</p>	<p><b>Fwd</b> AGCGAGCAGAGGCTTAAGGT</p> <p><b>Rev</b> TGGGAGACTGCCATCACGTAG</p> <p>477bp</p>

<b>AGO2</b>	Σχηματίζει το σύμπλοκο με τα miRNAs και τα siRNAs (σύμπλοκο RNA αποσιώπησης) (RISC/miRNPs). Η ενδογενής πρωτεΐνη Ago2 προσδέεται άμεσα στα pre-miRNAs ανεξάρτητα από την πρωτεΐνη Dicer (έχει μία dsRNA-προσδένουσα περιοχή) και τα σύμπλοκα Ago2:pre-miRNA βρίσκονται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των ανθρώπινων κυττάρων (Kiriakidou et al. 2009).	<b>Fwd</b> GACAACCAGACCTCGACCAT <b>Rev</b> GGTGAGGTCTTGACCACGTT 599bp
<b>H2A</b>	Το νουκλεόσωμα αποτελείται από 146 bp DNA το οποίο είναι τυλιγμένο γύρω από το οκταμερές των ιστονών (ένα ζευγάρι από καθεμία από τις ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4). Οι ιστόνες έχουν δομικό και λειτουργικό ρόλο, ελέγχοντας την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση της χρωματίνης. Οι παραλλαγές της H2A συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διαδικασίες (μεταγραφική ενεργοποίηση, επιδιόρθωση του DNA, απόπτωση, μείωση) ( <i>Ausio and Abbott, 2002</i> ). Το 3' άκρο του mRNA των ιστονών είναι το υπεύθυνο στοιχείο για την αποικοδόμηση του mRNA. Το mRNA των ιστονών είναι το μοναδικό που δεν πολυαδενυλιώνεται, παρά μόνο το άκρο του έχει μία δομή θηλιάς (loop-structure) η οποία είναι απαραίτητη για την γρήγορη αποικοδόμηση του mRNA. Αυτή η δομή θηλιάς αναγνωρίζεται από μία πρωτεΐνη, την SLBP. Το πρώτο βήμα της αποικοδόμησης είναι η προσκόλληση μιας πολυU ουράς στο 3' άκρο παρέχοντας έτσι μια πλατφόρμα όπου θα προσδεθούν παράγοντες αποικοδόμησης ( <i>Mullen et al., 2008; Kaygun and Marzluff, 2005</i> ).	<b>Fwd</b> CGGTAAGGCTGGAAAGGACT <b>Rev</b> TGCAAGTGACGAGGGGTAAT 255bp
<b>PABPC</b>	Κατά την έξοδο του mRNA στο κυτταρόπλασμα, η poly (A) προσδεμένη πρωτεΐνη (PABP) συνδέεται στην ουρά και το σταθεροποιεί διευκολύνοντας την	<b>Fwd</b> ATGGCAGCTATCCCACAGAC

	μετάφραση. Το σύμπλοκο PABP-παραγόντων έναρξης μετάφρασης (eIF4G) προσδένεται στην cap-binding protein eIF4E και ενισχύει την μετάφραση του mRNA (Goldstrohm and Wickens, 2008)	<b>Rev</b> GTAGGGTGCATGGCTTGAAT  500bp
<b>eIF4E</b>	Η μη ρύθμιση της μετάφρασης είναι ένας μηχανισμός που προκαλεί ανώμαλη κυτταρική αύξηση και επιβίωση. Ο παράγοντας eIF4E προσδένεται στο 5' άκρο του mRNA ελέγχοντας την μετάφραση. Υπερέκφραση του παράγοντα μπορεί να προκαλέσει τη μετάφραση ενός υποσυνόλου mRNAs και παρεμποδίζει την απόπτωση. Επίσης μπορεί να προκαλέσει μεταμόρφωση κυττάρων του πλακώδους επιθηλίου. Η αποσιώπηση αυτού του παράγοντα θα είναι χρήσιμη για θεραπεία του καρκίνου. (Mamane et al., 2007; Robert and Pelletier, 2009; Oridate et al., 2005).	<b>Fwd</b> CAGGAGGTTGCTAACCCAGA <b>Rev</b> CTCCCCGTTTGTTTTCTCA  256bp
<b>HIF1-a</b> (Hypoxia-inducible factor 1a)	Ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην αγγειογένεση, στην κυτταρική επιβίωση, στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην προσαρμοστική απόκριση των κυττάρων στη υποξία, προκαλώντας βιολογικά γεγονότα σχετιζόμενα με την επιθετικότητα του καρκίνου. Υπερέκφραση του HIF1-a παρατηρήθηκε σε υπερπλασίες (61%) και καρκινώματα (87%) και αυξάνει την αγγειογένεση (Horrée et al., 2007; Semenza, 2003).	<b>Fwd</b> CCCAATGGATGATGACTTCC <b>Rev</b> CCTTTTCCTGCTCTGTTGG  327bp
<b>SLC2A1</b> ( <b>GLUT-1</b> )	Οι μεταφορείς γλυκόζης (Gluts) διευκολύνουν την πρόσληψη γλυκόζης και συνήθως υπερεκφράζονται σε διάφορους καρκίνους ειδικά ο Glut-1. Στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, τα οποία έχουν χαμηλό ρυθμό διαφοροποίησης και πολλαπλασιάζονται γρήγορα, έχει παρατηρηθεί αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης. Η ανοσοϊστοχημική	<b>Fwd</b> GGGCCAAGAGTGTGCTAAAG <b>Rev</b> ACAGCGACACGACAGTGAAG  309bp



	<p>έκφραση του μεταφορέα Glut-1 παρέχει ένα χρήσιμο προγνωστικό δείκτη για το καρκίνο του παγκρέατος. (<i>Raffaele De Caro 2009</i>) Πειράματα επώασης καρκινικών κυττάρων από μαστό και πνεύμονα με αντισώματα anti-Glut-1 αποκαλύπτουν μείωση της κυτταρικής αύξησης (κατά 50% και 75% αντίστοιχα) και αύξηση του ρυθμού απόπτωσης (Rastogi et al., 2007).</p>	
<b>K-Ras</b>	<p>Η k-ras είναι μια κυτταροπλασματική (στην εσωτερική πλευρά) GTPάση που κωδικοποιείται στον άνθρωπο από το γονίδιο <i>KRAS</i> και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές πορείες μεταγωγής σήματος. Συσσώρευση μεταλλάξεων στο <i>KRAS</i> μπορεί να το μετατρέψει σε ογκογονίδιο. Το 30% περίπου των ανθρώπινων καρκίνων, εμφανίζουν μετάλλαξη στο γονίδιο αυτό. Η οικογένεια των πρωτεϊνών ras εμπλέκεται σε μια σειρά διεργασιών όπως ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η διαφοροποίηση, η απόπτωση, η μνήμη και η μάθηση (Kranenburg, 2005).</p>	<p><b>Fwd</b> TGTGGTAGTTGGAGCTGGTG</p> <p><b>Rev</b> AAAGAAAGCCCTCCCCAGT</p> <p>221bp</p>
<b>C-Myc</b>	<p>Μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων myc, τα μέλη της οποίας πιστεύεται πως ελέγχουν την έκφραση του 15% του συνόλου των ανθρώπινων γονιδίων μέσω δέσμευσης σε E-boxes και επιστρατεύοντας ακετυλ-τρανσφεράσες των ιστονών. Επάγει την έκφραση αρκετών γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη, ενώ λειτουργεί και αντι-αποπτωτικά.</p>	<p><b>Fwd</b> CAGCGACTCTGAGGAGGAAC</p> <p><b>Rev</b> TCGGTTGTTGCTGATCTGTC</p> <p>274bp</p>
<b>CBP20 –CBP80</b>	<p>Ο CBP20 σχετίζεται με την nonsense αποικοδόμηση του mRNA. Μαζί με τον παράγοντα CBP80 αποτελούν συστατικά του πυρηνικού συμπλόκου</p>	<p><b>(CBP20)</b></p> <p><b>Fwd</b> ACGCCATGCGGTACATAAAT</p>

	<p>πρόσδεσης καλύμματος το οποίο προστίθεται μετα-μεταφραστικά. Ο παράγοντας CBP20 σχετίζεται με τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4G (Maquat et al., 2001).</p>	<p><b>Rev</b> TGTGCCAGTTTTCCATAGC 175bp</p> <p><b>(CBP80)</b></p> <p><b>Fwd</b> GCCCTCTGTTTAGCTGTTGC</p> <p><b>Rev</b> GATGGTTCCTCCAGACCTCA</p> <p>292bp</p>
--	--	--

## 3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.2.1 Απόψυξη κυττάρων Hep2

- 1) Τα φιαλίδια (cryovials) που περιέχουν τα κύτταρα από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  όπου ήταν αποθηκευμένα, εμβαπτίζονται αμέσως σε υδατόλουτρο  $37^{\circ}\text{C}$  με ήπια ανάδευση.
- 2) Αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα γίνεται καθαρισμός του φιαλιδίου με 70% αιθανόλη εξωτερικά.
- 3) Ακολουθεί μεταφορά του αιωρήματος των κυττάρων σε πλαστική φλάσκα (συνήθως 25T) και γίνεται προσθήκη υλικού MEM με 10% ορό (FBS) .
- 4) Επώαση των κυττάρων στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 4-8 ώρες μέχρι να προσκολληθούν στο ταπήτιο της φλάσκας.
- 5) Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και η προσθήκη φρέσκου με 10% ορό καθώς το DMSO που περιέχεται στο αρχικό κρυοπροστατευτικό θρεπτικό υλικό των κυττάρων δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξή τους.

### 3.2.2 Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας-Τρυψινοποίηση

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

- 1) Αρχικά παρατηρούμε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο. Ελέγχουμε και σημειώνουμε: α. Μορφολογία κυττάρων και β. Πληρότητα ταπητίου (confluency)
- 2) Απομακρύνουμε (με αναρρόφηση) το υλικό της καλλιέργειας.
- 3) «Ξεπλένουμε» τα κύτταρα με διάλυμα PBS 1X.
- 4) Προσθέτουμε διάλυμα θρυψίνης-EDTA 0.05% (0.5ml για φιάλη  $75\text{cm}^2$ ).
- 5) Ανακινούμε τη φιάλη έτσι ώστε το διάλυμα της θρυψίνης να καλύψει όλο το

ταπήτιο. Παρατηρούμε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο.

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

### **3.2.3 Κατάψυξη κυττάρων**

- 1) Θρυψινοποίηση κυττάρων.
- 2) Προσθήκη 0,5 ml κρυοπροστατευτικού υλικού για T25 flask (MEM + 20% FBS+10% DMSO).
- 3) Για ένα cryovial απαιτούνται κύτταρα από 2 T25 flasks ή 1 T75 flask.
- 4) Αργή ψύξη μέσα σε cryobox (1°C/1 min) στους -80°C.
- 5) Αποθήκευση στους -80°C ή σε υγρό άζωτο.

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

*Συλλογή κυττάρων:*

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

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

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

*Λύση κυττάρων:*

1) Επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος που συλλέξαμε και αποθηκεύσαμε σε 25μL Lysis Buffer 4X, παρουσία αναστολέων πρωτεασών.

2) Πάγωμα σε υγρό άζωτο και ακολούθως θέρμανση του δείγματος στους  $60^{\circ}\text{C}$  για 3min (επανάληψη βήματος 3 φορές).














3) Φυγοκέντρηση δείγματος σε μέγιστη ταχύτητα για 1min και συλλογή υπερκείμενου, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτες σε πρωτεϊνικό κυρίως επίπεδο.

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

Για την απομόνωση ολικού RNA από τα επεξεργασμένα και μη (controls) με shRNAs κύτταρα που συλλέχθηκαν με το πρωτόκολλο της παραγράφου 3.2.4, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό Total RNA Isolation kit Nucleospin RNAII της Macherey Nagel. Η διαδικασία απομόνωσης είναι βασισμένη στην μέθοδο των Chomczynski και Sacchi στην οποία χρησιμοποιείται στο αρχικό στάδιο της ομογενοποίησης ιστού και εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων σε όξινο φαινολικό διάλυμα θειοκυανικής γουανιδίνης. Συνοπτικά, η διαδικασία φαίνεται στην **εικόνα 14**. Αρχικά περίπου 30 mg από κάθε δείγμα ομογενοποιούνται με την προσθήκη 350 μL διαλύματος RA1 παρουσία 3.5 μL β-μερκαπτοαιθανόλης. Το ομογενοποίημα τοποθετείται σε ειδικές στήλες οι οποίες επιτρέπουν το φιλτράρισμα του δείγματος μετά από φυγοκέντρηση στις  $11000 \times g$  για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διηθημένο μίγμα μεταφέρεται σε νέους αποστειρωμένους σωλήνες erpendorf, στο οποίο προστίθενται 0.350 ml αιθανόλης 70%. Ακολουθεί δέσμευση του ολικού RNA σε μικρές στήλες χρωματογραφίας και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις  $8000 \times g$  για 30 sec σε

θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απομάκρυνση τυχόν αλάτων με ειδικό διάλυμα (Membrane Desalting Buffer, MDB) και επώαση του δείγματος παρουσία DNAάσης I , για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το βήμα αυτό εξασφαλίζει την ελάχιστη δυνατή επιμόλυνση του δείγματός μας με γονιδιωματικό DNA, γεγονός το οποίο θα επηρέαζε την τελική ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR. Ακολουθούν σταδιακές φυγοκεντρήσεις του δείγματος, κατά τις οποίες απομακρύνονται τα υποπροϊόντα της πέψης με την DNAάση I.

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

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

**Εικόνα 14:** Συνοπτική παρουσίαση του πρωτοκόλλου απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών.

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

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

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

1) *Καλλιέργεια και συλλογή των βακτηριακών κυττάρων:*

Μεταφέρονται 1,5ml από την καλλιέργεια *E. coli* που αναπτύχθηκε σε ένα σωλήνα και φυγοκεντρούνται για 30s στις 11000 x g. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται αυτό το βήμα.

2) *Λύση των κυττάρων:*

Προστίθενται 250μl buffer A1 και επαναδιαλύεται το ίζημα με τη βοήθεια πιπέτας και έντονη ανάδευση στο vortex. Ακολουθεί προσθήκη 250μl buffer A2 και ανάμειξη αναποδογυρίζοντας ήπια μερικές φορές χωρίς τη χρήση του vortex. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά. Ακολούθως προστίθενται 300μl buffer A3 και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση αναποδογυρίζοντας μερικές φορές (6-8) αποφεύγοντας τη χρήση του vortex. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 11000 x g σε θερμοκρασία δωματίου.

3) *Δέσμευση του DNA:*

Τοποθετείται η στήλη NucleoSpin (Plasmid QuickPure σε ένα συλλεκτικό σωλήνα (collecting tube) των 2ml στην οποία φορτώνεται το υπερκείμενο που έχει προκύψει από τη φυγοκέντρηση του προηγούμενου βήματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 x g και απομάκρυνση του εκλούσματος.

4) *Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης:*

Επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα και προστίθενται 450μl buffer AQ (με αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 11000 x g όπου και επιτυγχάνεται ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης. Τέλος, πραγματοποιείται απομάκρυνση του εκλούσματος και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα.



### 5) Έκλυση του DNA:

Τοποθετείται η στήλη σε νέο σωλήνα και προστίθενται 50μl buffer AE. Στη συνέχεια, επωάζεται το δείγμα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 x g.

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

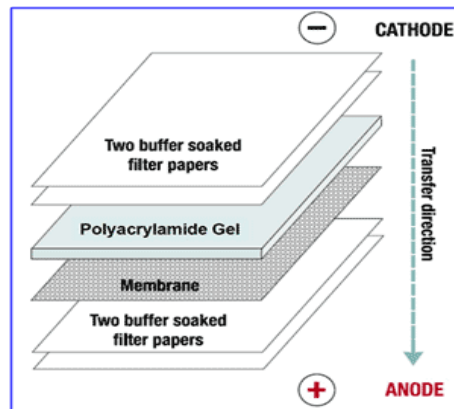
#### *Ηλεκτρομεταφορά*

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

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

Η τοποθέτησή του gel και της μεμβράνης στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (χρησιμοποιήθηκε Semidry Transfer System για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας) γίνεται ανάμεσα σε δύο ζεύγη από χαρτιά Whatman με τη μεμβράνη προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και την πηκτή στον αρνητικό (εικόνα 15). Η επαφή μεταξύ της πηκτής και της μεμβράνης πρέπει να είναι άμεση χωρίς την παρεμβολή φυσαλίδων που παρεμποδίζουν τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η μεταφορά των πρωτεϊνών στην συγκεκριμένη εργασία έγινε κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 270 mA για 40 min, χρόνος που μπορεί όμως να διαφέρει ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που πρόκειται να

μεταφερθούν. Μπορούν να παρακολουθηθούν οι μάρτυρες που θα μεταφερθούν από την πηκτή στη μεμβράνη και να εκτιμηθεί ο κατάλληλος χρόνος για την κάθε περίπτωση. Παράλληλα μπορεί να τοποθετηθεί και δεύτερη μεμβράνη κάτω από την πρώτη, ώστε να μεταφερθούν εκεί οι πρωτεΐνες αν εφαρμοστεί μεγαλύτερος χρόνος ή μεγαλύτερη ένταση ρεύματος. Η επιβεβαίωση της μεταφοράς έγινε με βαφή της μεμβράνης με Ponceau Red.



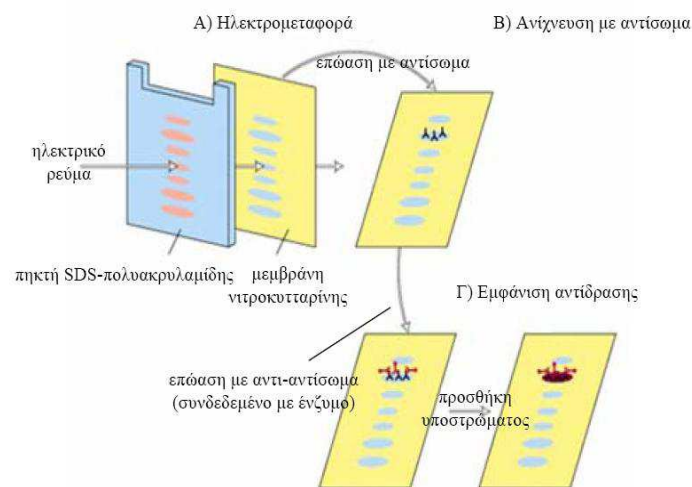
Εικόνα 15: Συναρμολόγηση συσκευής ηλεκτρομεταφοράς

### Ανοσοανίχνευση

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

Αρχικά η μεμβράνη PVDF μετά την ηλεκτρομεταφορά εμβαπτίζεται υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα σε blotto buffer ώστε να κορεστεί η μεμβράνη από την καζεΐνη του γάλακτος και να αποφευχθούν οι μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα το ειδικό για την επιθυμητή πρωτεΐνη (στην προκειμένη περίπτωση ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε rabbit anti-NOC σε αραιώση 1:500 σε blotto buffer). Κατόπιν η μεμβράνη επωάζεται με το πρώτο αντίσωμα υπό συνεχή ανακίνηση overnight στους 4°C. Ακολουθούν 2 πλύσεις της μεμβράνης με PBS-T 10 min έκαστη υπό

ανάδευση και στη συνέχεια επώαση της μεμβράνης επίσης υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία του δευτέρου αντισώματος (φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένη υπεροξειδάση) για 1 ώρα. Ως δεύτερο αντίσωμα στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε goat anti-rabbit IgG-HRP αραιωμένο 1:10000. Της διαδικασίας εμφάνισης του σήματος προηγούνται δύο πλύσεις της μεμβράνης με PBS-T για 15min. Η ανίχνευση ειδικού σήματος στη συνέχεια οφείλεται στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας, καθώς το δεύτερο αντίσωμα που είναι ειδικό έναντι rabbit IgG ανοσοσφαιρινών, μετά την προσθήκη κατάλληλου αντιδραστηρίου δίνει προϊόν που παράγει έντονο φως (συγκεκριμένα ως αποτέλεσμα οξείδωσης της λουμινόλης από την υπεροξειδάση), το οποίο μπορεί να αποτυπωθεί σε φωτογραφικό φιλμ με τη μορφή σκοτεινής ζώνης. Η εμφάνιση γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο του συστήματος ανοσοανίχνευσης ECL ή ECL Plus της Amersham.



**Εικόνα 16:** Συνοπτική παρουσίαση των διαδικασιών ηλεκτρομεταφοράς, ανοσοανίχνευσης και εμφάνισης σήματος.

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

1) Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει θρυψινοποίηση μιας T75 flask στην οποία η πληρότητα σε κύτταρα είναι περίπου 100%. Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται μετά από μέτρηση σε πλάκα Newbuer, και σε αυτή τη φλάσκα μπορούν να φτάσουν ως και  $42,5 \cdot 10^5$ .

2) Σε κάθε well ενός 6-well plate προσθέτουμε το 1/12 από τα παραπάνω θρυψινοποιημένα κύτταρα έτσι ώστε να έχουμε πληρότητα περίπου 90-95% την επόμενη μέρα σε κάθε well μετά από επώαση στους 37°C. Η πληρότητα αυτή ενδείκνυται για τη διαμόλυνση.

3) Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε λιποφεκταμίνη, ένα πολυκατιονικό συνθετικό λιπίδιο αναμειγμένο με φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη. Το αντιδραστήριο αυτό συνδυαζόμενο με DNA, σχηματίζει λιποσώματα που συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων και αποχύνουν το περιεχόμενο DNA στο εσωτερικό του κυττάρου (στην περίπτωση μας μιλάμε για πλασμίδια που φέρουν shRNAs) (Felger et al., 1994). Μεταβολές των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων DNA και λιποφεκταμίνης είναι απαραίτητες για την βελτιστοποίηση της διαμόλυνσης. Επίσης, είναι αναγκαία στα πειράματα αποσιώπησης και η ύπαρξη control κυττάρων τα οποία και δεν θα υποστούν διαμόλυνση, καθώς και control κυττάρων τα οποία διαμολύνονται με άδειο πλασμιακό φορέα που φέρει απλά ένα γονίδιο επιλογής.

4) Για το σχηματισμό των λιποσωμάτων ετοιμάζουμε δύο διαλύματα: ένα DNA mix και ένα Lipo mix σύμφωνα με τους εξής κανόνες:

α. ο λόγος  $\gamma$ DNA/λ χρησιμοποιούμενης Λιποφεκταμίνης=1/2

β. 50λ MEM/  $\gamma$  DNA (για προετοιμασία του DNA mix)

γ. 50λ MEM/2 λ Λιποφεκταμίνης (για την προετοιμασία του Lipo mix) .

δ. 0,5  $\gamma$  DNA απαιτείται για τη διαμόλυνση των κυττάρων κάθε well ενός

6-well plate (στην συγκεκριμένη εργασία ως DNA λαμβάνουμε μείγμα πλασμιδίων που φέρουν και τα 5 είδη shRNAs έναντι της NOC που χρησιμοποιήθηκαν).

5) Παρασκευή του transfection mix: Αναμιγνύουμε τα DNA mix και Lipo mix και τα αφήνουμε να επωαστούν για 5-20 min σε θερμοκρασία δωματίου.

6) Παράλληλα απομακρύνουμε από κάθε well το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και ξεπλένουμε τα κύτταρα με κρύο και αποστειρωμένο PBS 1X τρεις φορές. Πριν την προσθήκη του transfection mix προσθέτουμε θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά-αντιμυκητικά και χωρίς ορό (FBS) σε κάθε well (2ml/well).

7) Μετά το πέρας του χρόνου επώασης του transfection mix, μοιράζουμε το τελευταίο στα κύτταρα που προορίζονται για διαμόλυνση και αφήνουμε το 6-well plate να επωαστεί στους 37°C.

8) Την επόμενη μέρα απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από τα διαμολυσμένα κύτταρα και το αντικαθιστούμε με MEM 10% FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic το οποίο περιέχει επιπλέον και το αντιβιοτικό επιλογής (στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πουρομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 1-10μg/mL θρεπτικού υλικού).

### **3.2.9 Η τεχνολογία του RNA interference (RNAi)**

Το RNAi αποτελεί ένα ισχυρό φαινόμενο εξειδικευμένης γονιδιακής σίγησης που πυροδοτείται από δίκλινα μόρια RNA. Τα πειράματα των Fire και Mello το 1998 στο *C. elegans* (χάρη στα οποία έλαβαν και το βραβείο Nobel στην Ιατρική ή Φυσιολογία το 2006) έδωσαν μεγάλη ώθηση σε αυτή τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως σαν πειραματικό και θεραπευτικό εργαλείο.

Το RNAi είναι ένα φυσικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα τόσο στα φυτά όσο και στους μύκητες και τα ζώα. Σε όλα τα ζωικά βασίλεια δίκλινα μόρια RNA

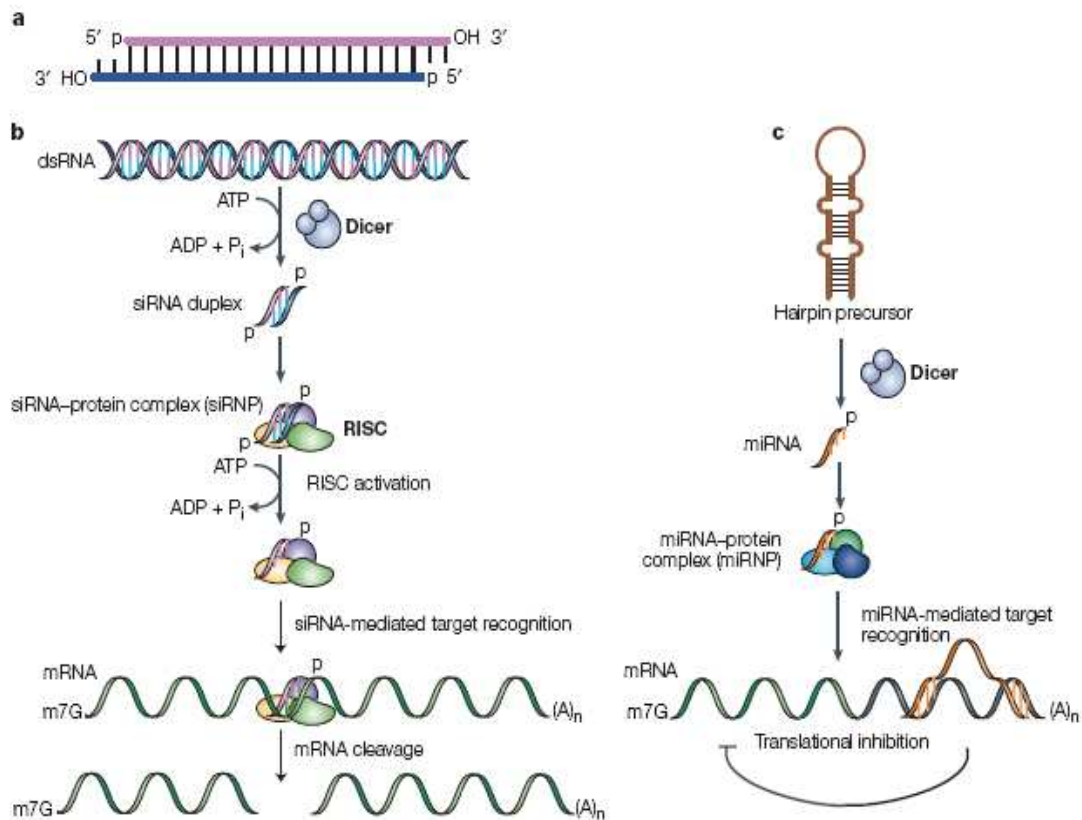
εμπλέκονται σε αυτό το μηχανισμό. Μόλις το 2001 εφαρμόστηκε και σε κύτταρα θηλαστικών. (Fire et al., 1998; Elbashir et al., 2001).

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

**Μονοπάτι siRNA:** Επιμήκη δίκλινα μόρια RNA (dsRNA) ή δίκλινα μόρια RNA με δομή φουρκέτας (hairpin RNA) επεξεργάζονται από το σύμπλοκο Dicer, ένα ένζυμο με δράση παρόμοια με την RNAάση III. Ως αποτέλεσμα παράγονται μικρότερα μόρια, τα siRNAs, τα οποία φέρουν μη μονόκλινα δινουκλεοτιδικά 3' άκρα και φωσφορυλιωμένα 5' άκρα, ενώ το μήκος τους δεν ξεπερνά τα 19 ζεύγη βάσεων. Εναλλακτικά, μπορούν να εισαχθούν στο κύτταρο έτοιμα siRNAs μήκους 19-23 νουκλεοτιδίων (αυτά παρακάμπτουν πιο εύκολα την αντίδραση ιντερφερόνης του κυττάρου συγκριτικά με τα μεγάλα δίκλινα μόρια RNA), τα οποία και φωσφορυλιώνονται από κυτταρικές κινάσες. Ακολούθως τα παραγόμενα siRNAs ενσωματώνονται στο RNA-επαγόμενο σύμπλεγμα σίγησης το RISC. Το τελευταίο καταλύει το ξετύλιγμα των δύο κλώνων των siRNAs με ένα ATP-εξαρτώμενο τρόπο και ο ξετυλιγμένοι αντισηματικοί (antisense) κλώνοι οδηγούν το RISC στα συμπληρωματικά mRNAs-στόχους, γεγονός που πυροδοτεί την ενδονουκλεοτιδική τμήση των mRNAs (εικόνα 17a).

**Μονοπάτι miRNA:** Τα miRNAs εμπλέκονται σε μια ποικιλία φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών που περιλαμβάνουν την απόπτωση, την αιμοποίηση, την ανάπτυξη και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η έκφραση τους είναι ειδική για συγκεκριμένους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια και το προφίλ τους αλλάζει σε διάφορες ανθρώπινες ασθένειες. (Grishok et al., 2001; Ambros et al., 2003; Carrington and Ambros, 2003). Έχει εκτιμηθεί πως ο συνολικός αριθμός miRNA

γονιδίων στον άνθρωπο κυμαίνεται στα 200-250. Σε αντίθεση με τα siRNAs, τα miRNAs δεν οδηγούν συνήθως σε τμήση του mRNA-στόχου αλλά σε καταστολή της μετάφρασής του. Πρόσφατα έχει δειχθεί πως ενισχύουν και την αποικοδόμηση του mRNA, ενώ ένας τρίτος λιγότερο μελετημένος μηχανισμός τα εμπλέκει στην αναδιοργάνωση της ετεροχρωματίνης (Derek et al., 2003; Lippman and Martienssen, 2004).



**Εικόνα 17:** Μονοπάτια siRNA και miRNA (Derek et al., 2003).

Τα miRNAs μεταγράφονται από την RNA pol II σε μεγάλα δίκλινα μόρια RNA που φέρουν δομές βρόχου και καλούνται pri-miRNAs. Αυτά κόβονται από το σύμπλεγμα Drosha και παράγονται τα pre-miRNAs (70 νουκλεοτίδια), τα οποία με τη σειρά τους εξέρχονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα όπου και αναλαμβάνει δράση η Dicer. Η τελευταία παράγει μικρά μονόκλινα miRNAs (των 22 νουκλεοτιδίων) τα οποία ενσωματώνονται στο σύμπλεγμα miRNP που

καθοδηγείται στο mRNA-στόχο πυροδοτώντας την καταστολή της έκφρασης του (εικόνα 17b).

### **3.2.10 Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε ένα βήμα (One step Real Time PCR)**

Η Real Time PCR είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού γονιδιακής έκφρασης. Είναι μία ιδιαίτερα ευαίσθητη και εξειδικευμένη τεχνική καθώς μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και ένα αντίγραφο ενός μεταγράφου ή ακόμα να ανιχνεύσει διαφορετικής έντασης έκφραση μεταξύ δύο δειγμάτων σε ποσοστό έως και 23%. Μπορεί να διεξαχθεί σε ένα βήμα (one step reaction), όπου η όλη διαδικασία από τη σύνθεση του cDNA μέχρι την αντίδραση πολυμεράσης συμβαίνει στο ίδιο tube ή σε δύο βήματα (two-steps) όπου η αντίστροφη μεταγραφή και η ενίσχυση του παραγόμενου cDNA πραγματοποιούνται σε διαφορετικά tubes. Η one step Real time PCR θεωρείται ότι μειώνει την πειραματική απόκλιση γιατί οι ενζυμικές αντιδράσεις συμβαίνουν στο ίδιο tube. Ωστόσο αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί μία αρχική RNA μήτρα η οποία είναι επιρρεπής σε αποικοδόμηση.

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



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

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία εφαρμόσαμε την ποσοτική one-step RT-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Invitrogen “SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit” προκειμένου να ελέγξουμε τα επίπεδα έκφρασης της NOC και των υπολοίπων επιλεγμένων παραγόντων σε κύτταρα Hep2 στα οποία εισήχθησαν αντι-NOC shRNAs και σε κύτταρα αγρίου τύπου στα οποία δεν έγινε αποσιώπηση. Οι αντιδράσεις προετοιμάστηκαν χρησιμοποιώντας τους primers του **πίνακα 4**, ενώ ως χρωστική αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η ROX. Ως εσωτερικό πρότυπο για την κανονικοποίηση του σήματος των ειδικών προϊόντων ορίστηκε το ιδιοσυστατικό γονίδιο της β-σφαιρίνης. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA απομονωμένο από τα εξεταζόμενα δείγματα. Αναλυτικότερα, οι ποσότητες των επιμέρους αντιδραστηρίων των αντιδράσεων και οι συνθήκες αυτών παρουσιάζονται στους **πίνακες 5** και **6** αντίστοιχα.

**Πίνακας 5:** Συστατικά αντίδρασης RT-PCR (one step)

Component	μl /50μl of reaction
Reverse transcriptase-DNA polymerase mix	1
2X reaction mix	25
Template RNA (10 pg-1μg)	X
FWD primer 10μM	1
REV primer 10μM	1
ROX dye	0.1
DEPC water	Up to 50

**Πίνακας 6:** Συνθήκες αντίδρασης RT-PCR για την ενίσχυση των επιλεγμένων παραγόντων.

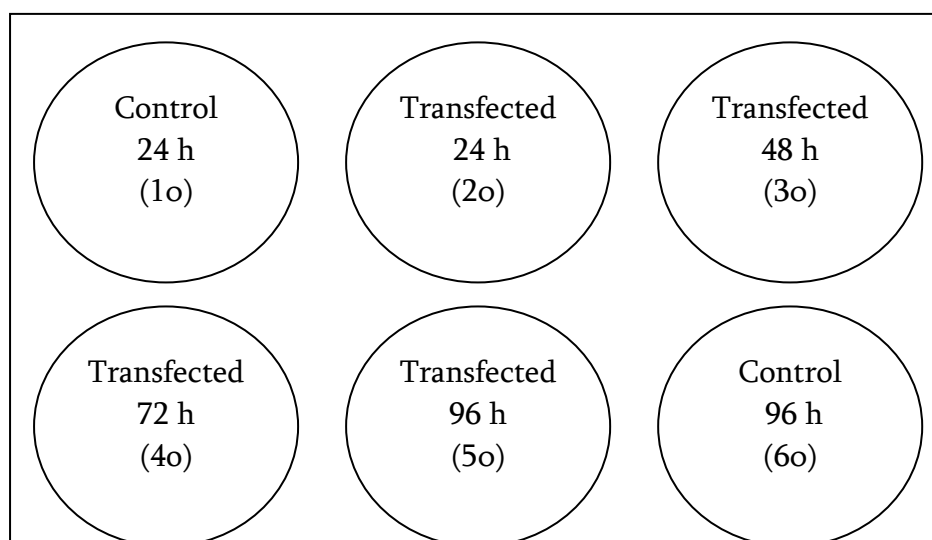
Type of reaction	Cycling conditions
cDNA synthesis	50-70°C, 15min
PCR	95 °C, 5min (1 cycle)
	95 °C, 15sec (35-40 cycles)
	55-60 °C, 30sec (35-40 cycles)
	68-72 °C, 1min/kb (35-40 cycles)

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

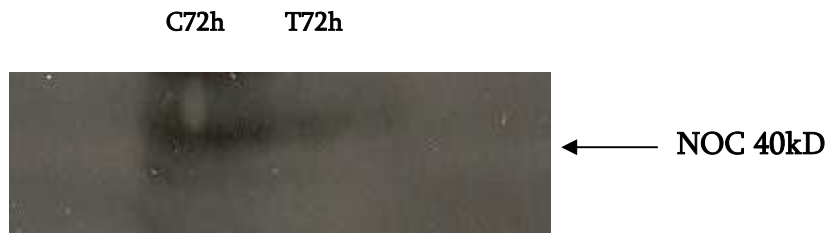
### 4.1 Έλεγχος της αποσιώπησης της NOC με ανοσοαποτύπωση

Για την αποσιώπηση της NOC διαμόλυναμε καρκινικά κύτταρα Hep2 και με τα 5 διαθέσιμα shRNAs ταυτόχρονα. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε το πρωτόκολλο διαμόλυνσης που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.9. Ελέγχθηκε η αποσιώπηση της NOC 24, 48, 72 και 96 ώρες μετά την διαμόλυνση ενώ ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Hep2 αγρίου τύπου, τα οποία και δεν διαμόλυνθηκαν (συγκεκριμένα εξετάστηκαν control 24 και 96 ωρών) Έτσι, το 6-well plate που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα διαμόλυνσης είχε την παρακάτω μορφή:

6-well plate



Η επιτυχία της αποσιώπησης της NOC επιβεβαιώθηκε σε πρώτη φάση σε πρωτεϊνικό επίπεδο μετά από ηλεκτρομεταφορά των απομονωμένων πρωτεϊνών τόσο από τα controls όσο και από τα διαμολυσμένα κύτταρα από πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF και επακόλουθη ανοσοανίχνευση με τη χρήση Anti-NOC αντισώματος (εικόνα 18).

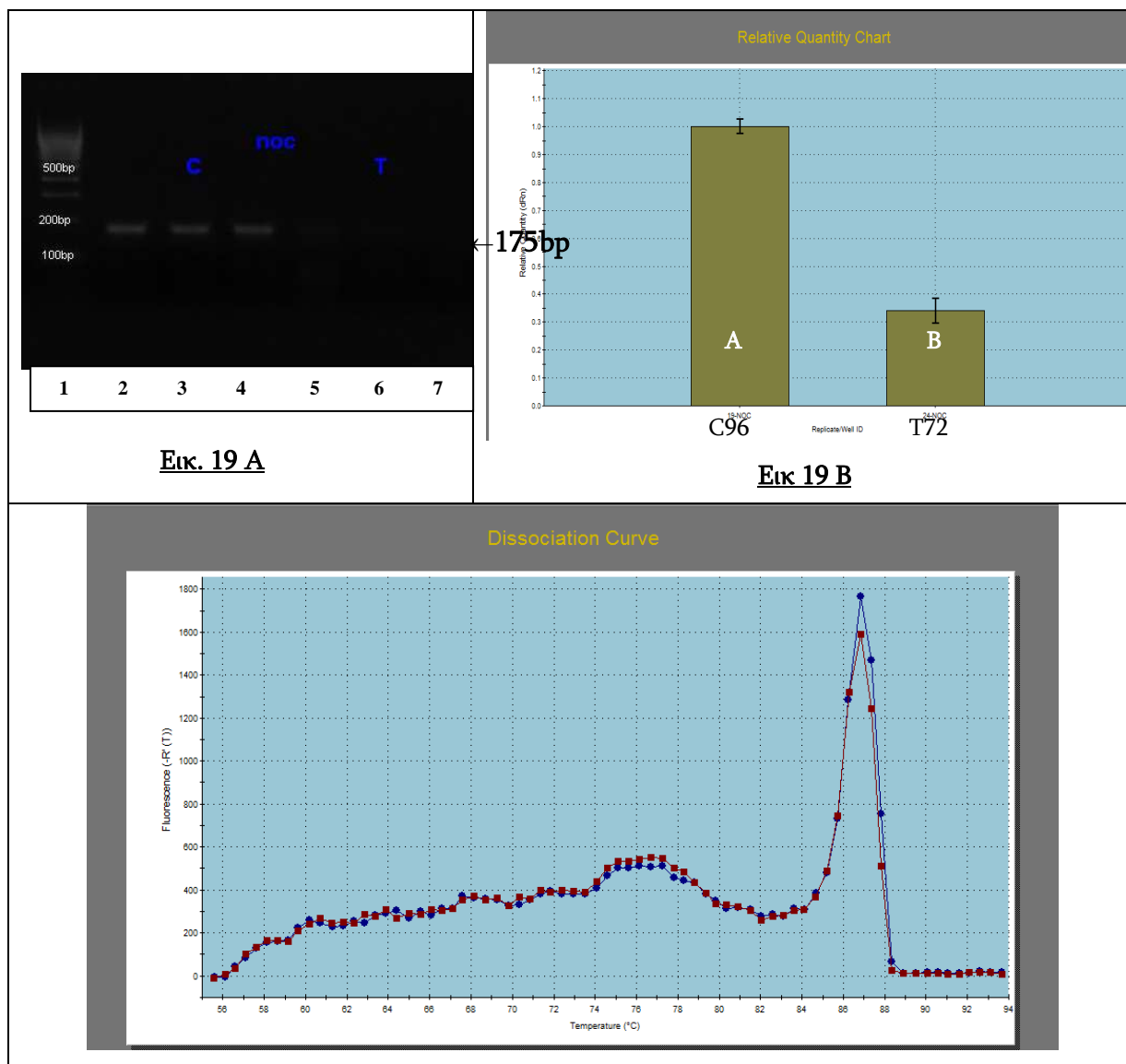


**Εικόνα 18:** Εικόνα ανοσοαποτύπωσης όπου φαίνεται η αποσιώπηση της NOC σε σύγκριση με τα controls 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση(C: μάρτυρας, T: διαμολυσμένα).

Η επιβεβαίωση της αποσιώπησης της NOC έγινε και με την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης RT-PCR σε ένα βήμα, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ολικό RNA (100ng) τόσο από διαμολυσμένα όσο και από control κύτταρα που συλλέχθηκαν 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση. Χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες και οι συγκεντρώσεις που αναγράφονται στους **πίνακες 5** και **6** για την προετοιμασία των αντιδράσεων. Εκτός από τα επίπεδα έκφρασης της NOC, εξετάστηκαν και τα αντίστοιχα των παραγόντων του **πίνακα 4**. Για τη εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων για την κανονικοποίηση (*normalization*) των αποτελεσμάτων κρίθηκε αναγκαία η επιλογή της ιστόνης H2A καθώς δεν αποτελεί στόχο των αποαδενυλασών και εκφράζεται ιδιοσυστατικά σε όλα τα κύτταρα. Τέλος, για να αποκλειστεί και το ενδεχόμενο πως οι οποιοσδήποτε μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των επιλεγμένων παραγόντων οφείλονται στη διαδικασία της διαμόλυνσης και μόνο, εξετάστηκε και η επίδραση της διαμόλυνσης των κυττάρων με πλασμιδιακό φορέα που δεν φέρει shRNAs (empty pSuper vector).

## 4.2 Έλεγχος της αποσιώπησης της NOC με Real-Time PCR

### NOC



**Εικ. 19 Α**

**Εικ 19 Β**

**Εικ.19 Γ**

**Εικ. 19Α:** Εικόνα από ηλεκτροφόρηση, σε gel αγαρόζης 1%, των προϊόντων της RT-PCR.. Η NOC αναμένεται στα 175bp.

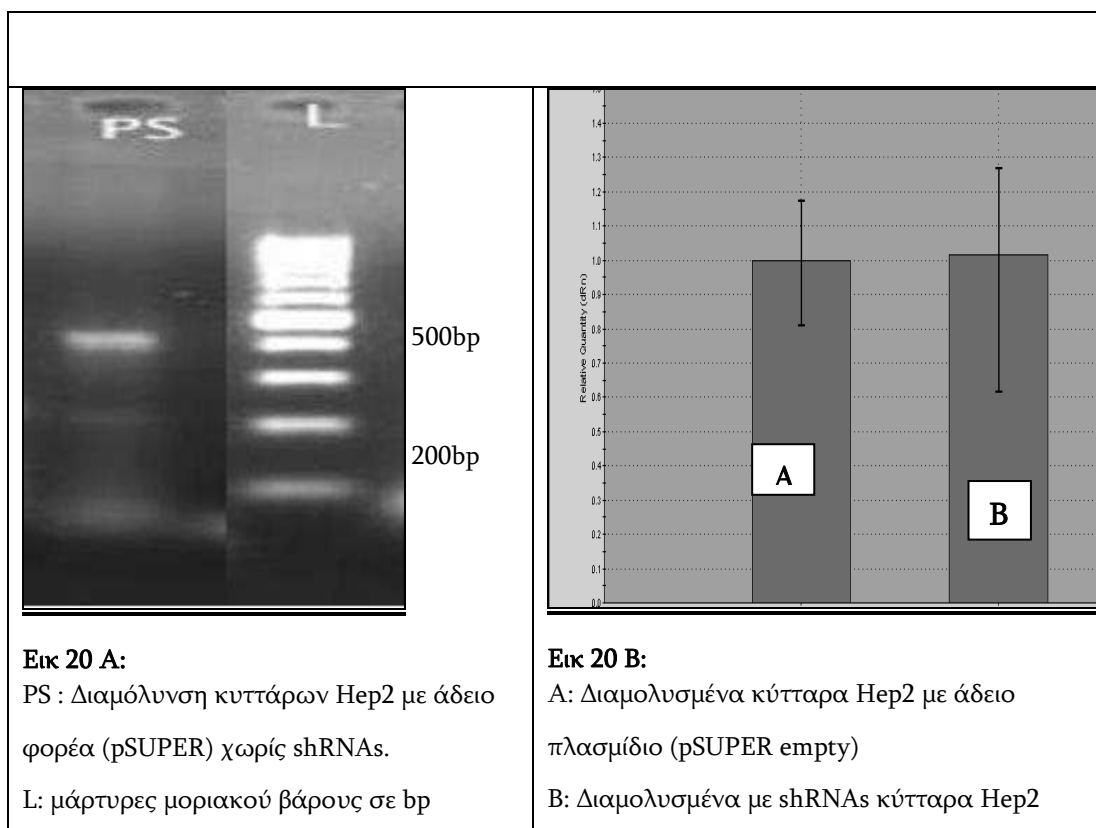
**Εικ. 19Β:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την RT-PCR [συγκεκριμένα παρουσιάζονται τα Relative quantity charts,  $-Rn'(T)^*$ ]. Η στήλη Β αντιπροσωπεύει τα σχετικά επίπεδα mRNA της NOC από τα διαμολυσμένα κύτταρα ενώ η στήλη Α αντίστοιχα επίπεδα από τα φυσιολογικά, τα μη διαμολυσμένα κύτταρα (controls) 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

**Εικ. 19Γ:** Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού (dissociation plot). Η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από διαμολυσμένα κύτταρα, ενώ η κόκκινη τα προϊόντα από μη

διαμολυσμένα κύτταρα. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75 °C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

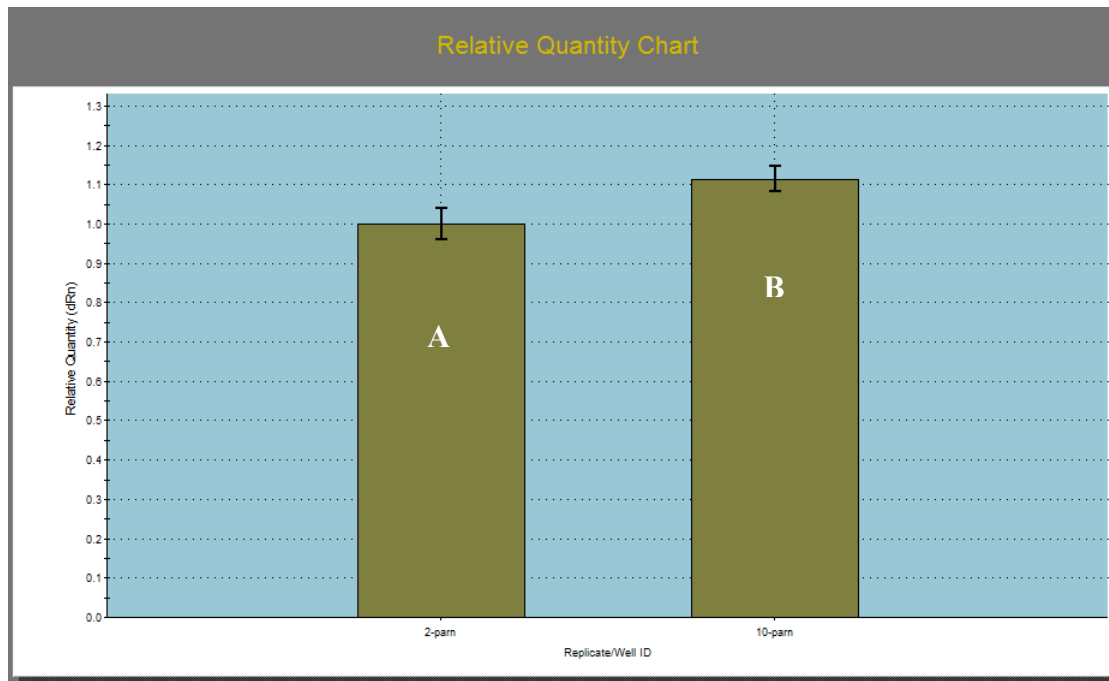
- ❖  $-Rn'(T)$ = the first derivative of the reference dye-normalized fluorescence reading multiplied by -1.

#### 4.3 Επίδραση διαμόλυνσης με φορέα που δε φέρει shRNAs στην έκφραση της NOC

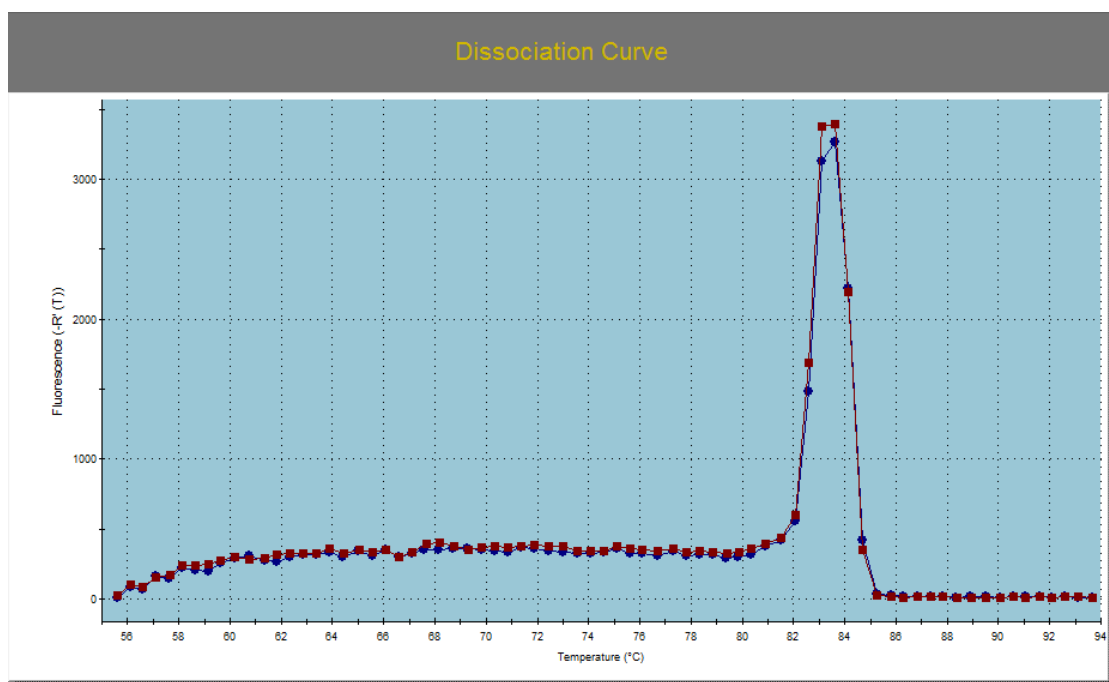


#### 4.4 Επίδραση της αποσιώπησης της NOC σε επιλεγμένους παράγοντες (72 ώρες μετά τη διαμόλυνση)

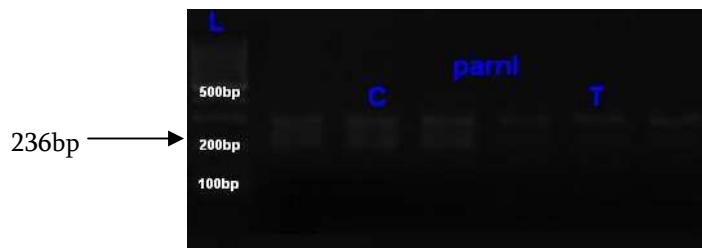
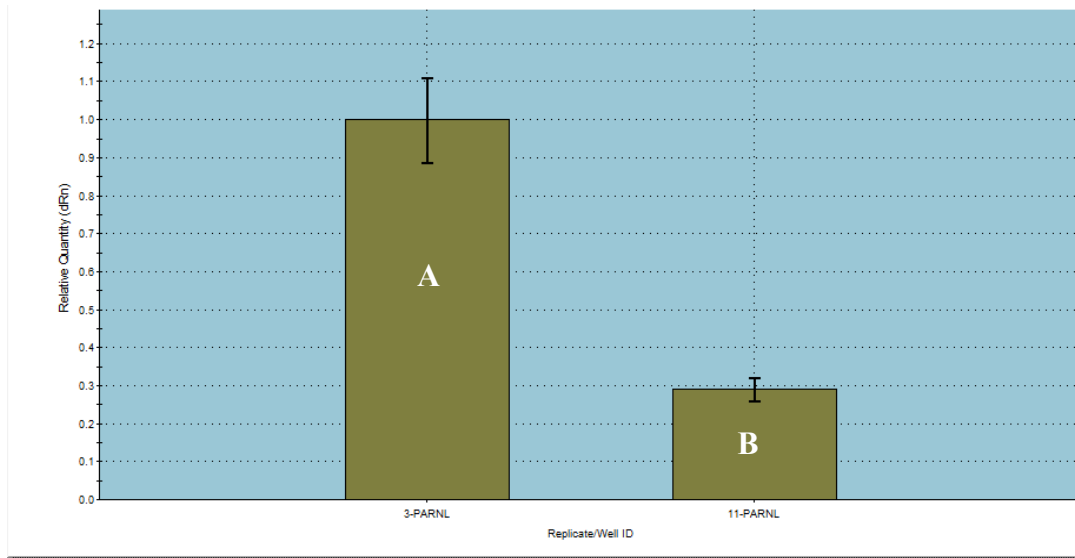
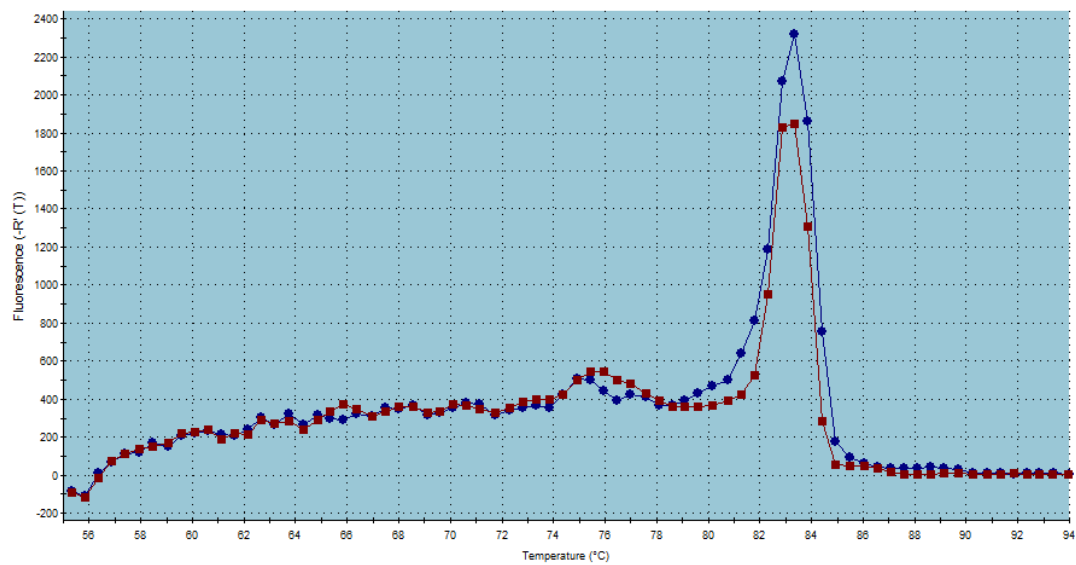
##### PARN



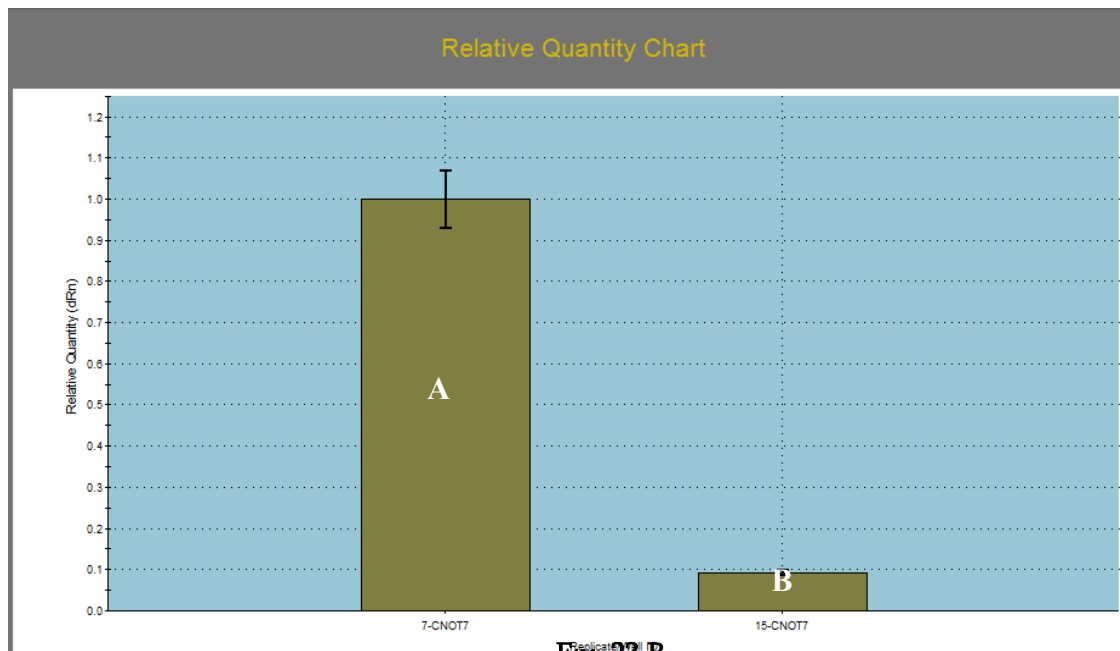
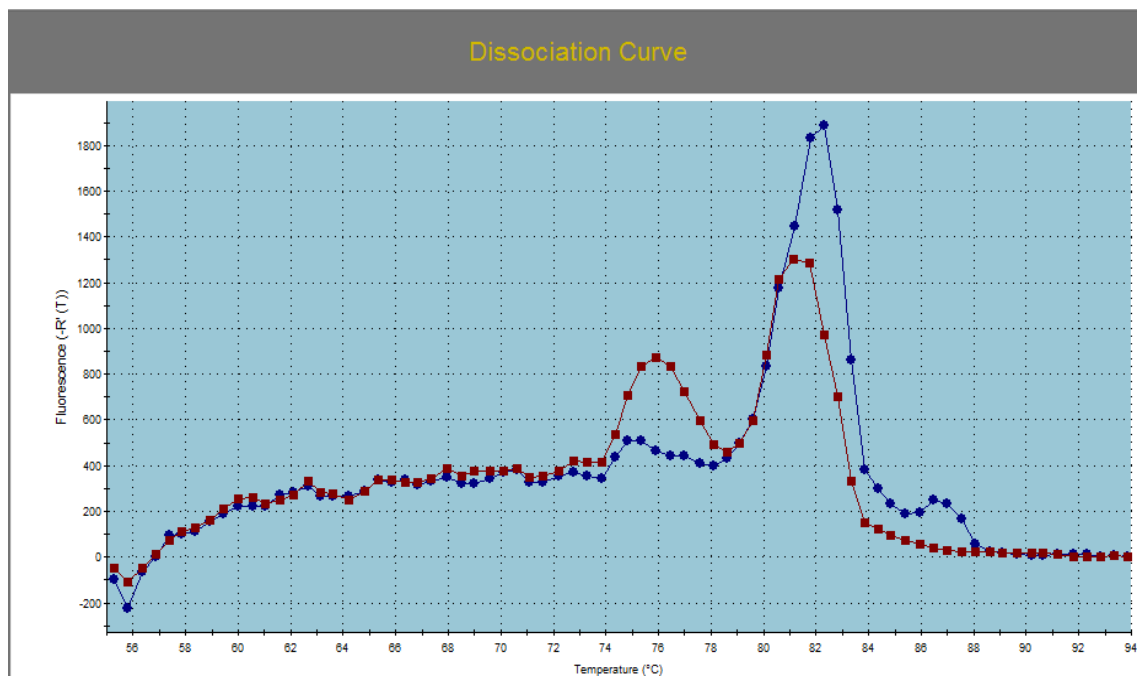
Εικ. 21 Β



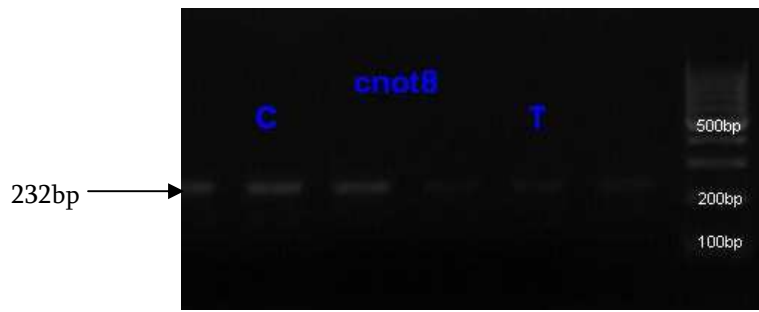
Εικ. 21 Γ

PARNLΕικ. 22 ΑΕικ. 22 ΒΕικ. 22 Γ

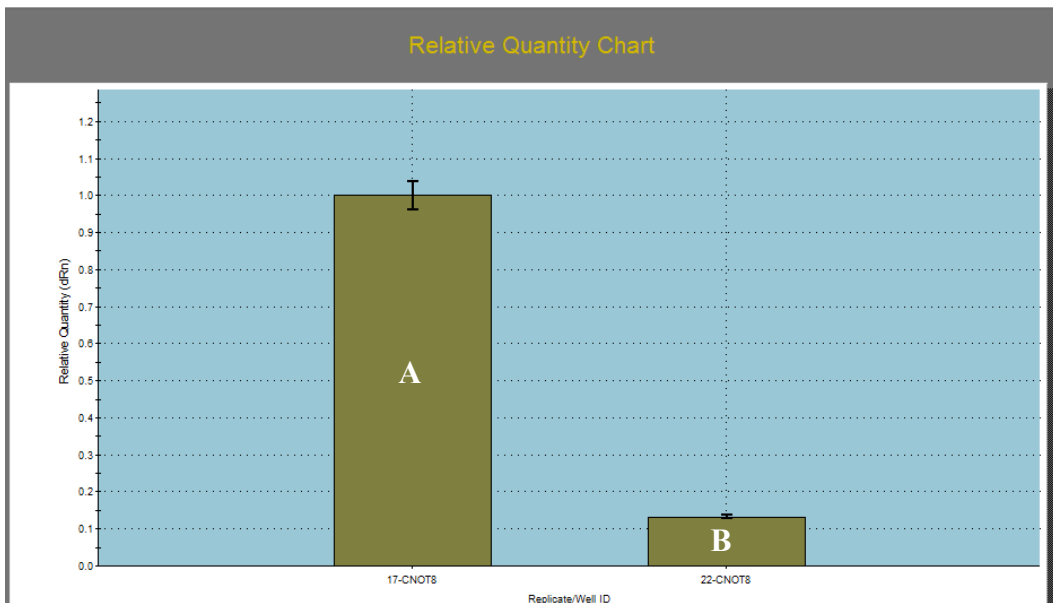


**CNOT7****Εικ. 23 Β****Εικ. 23 Γ**

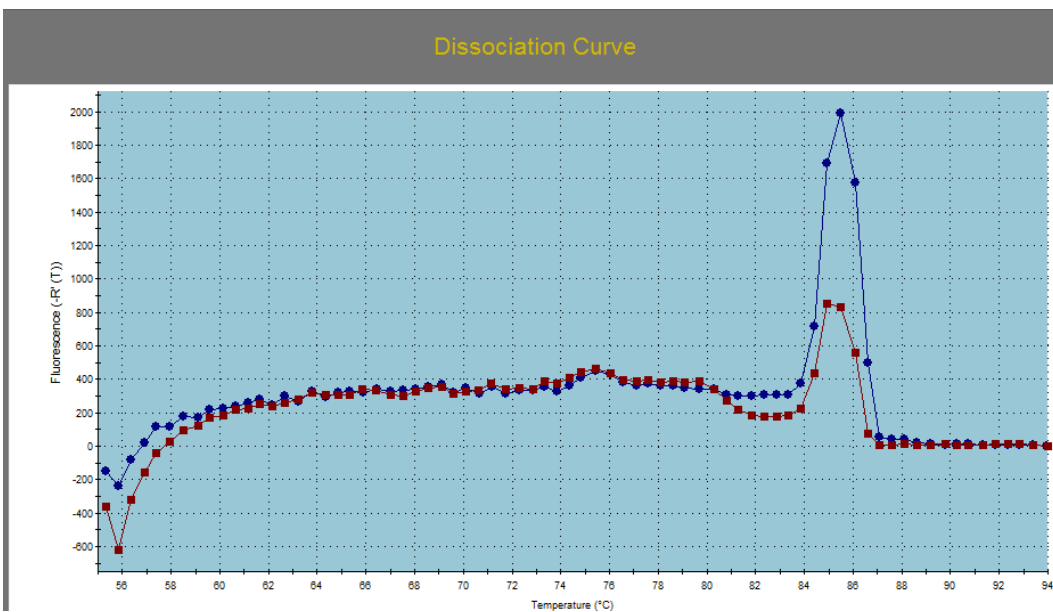
CNOT8



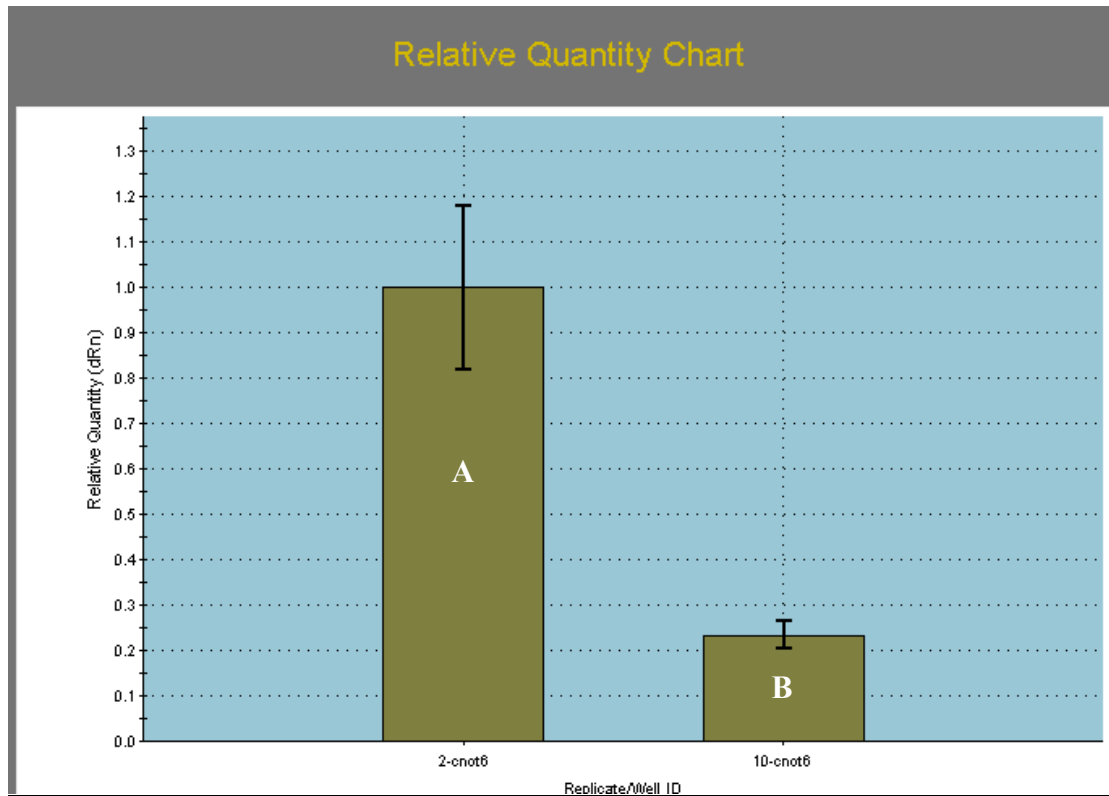
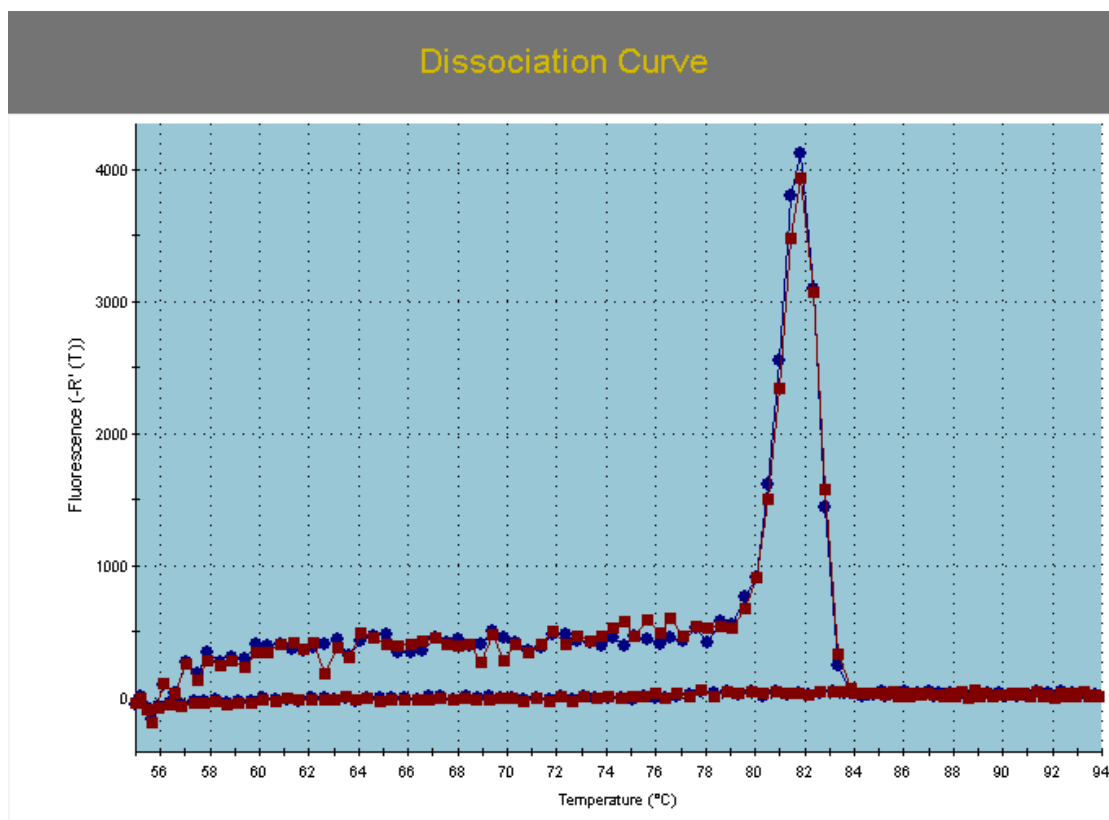
Εικ. 24 Α

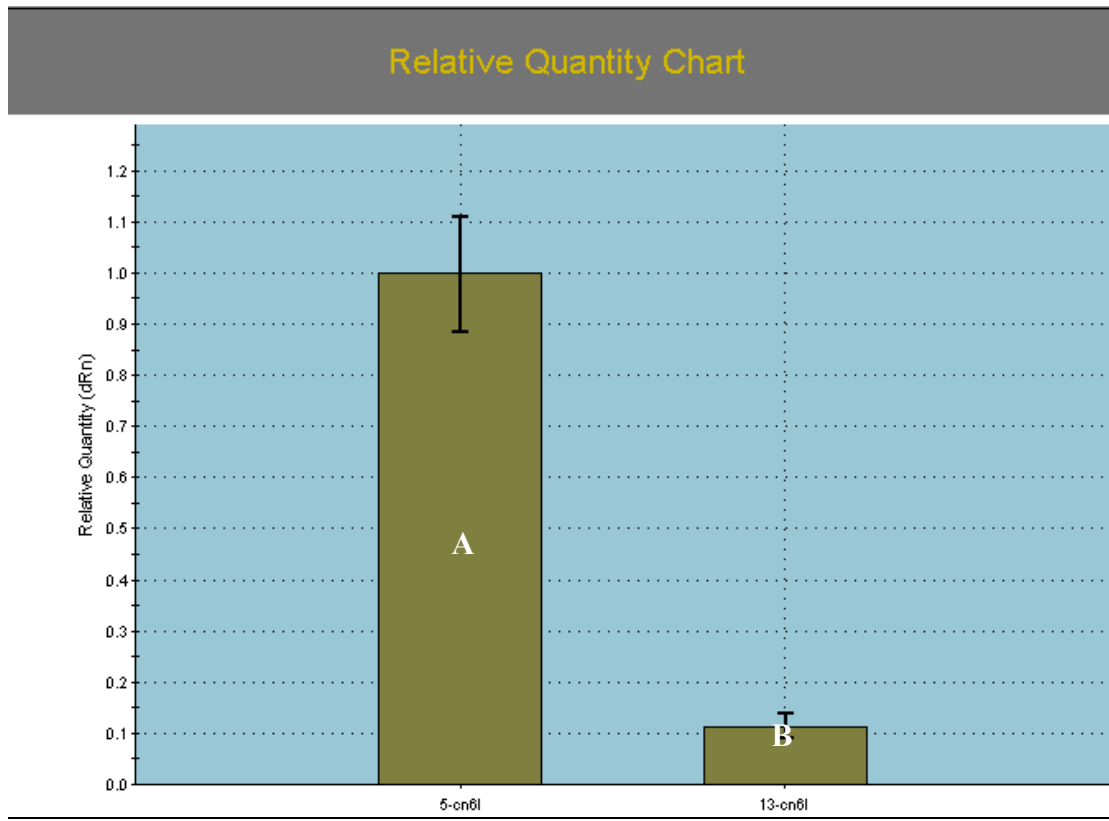
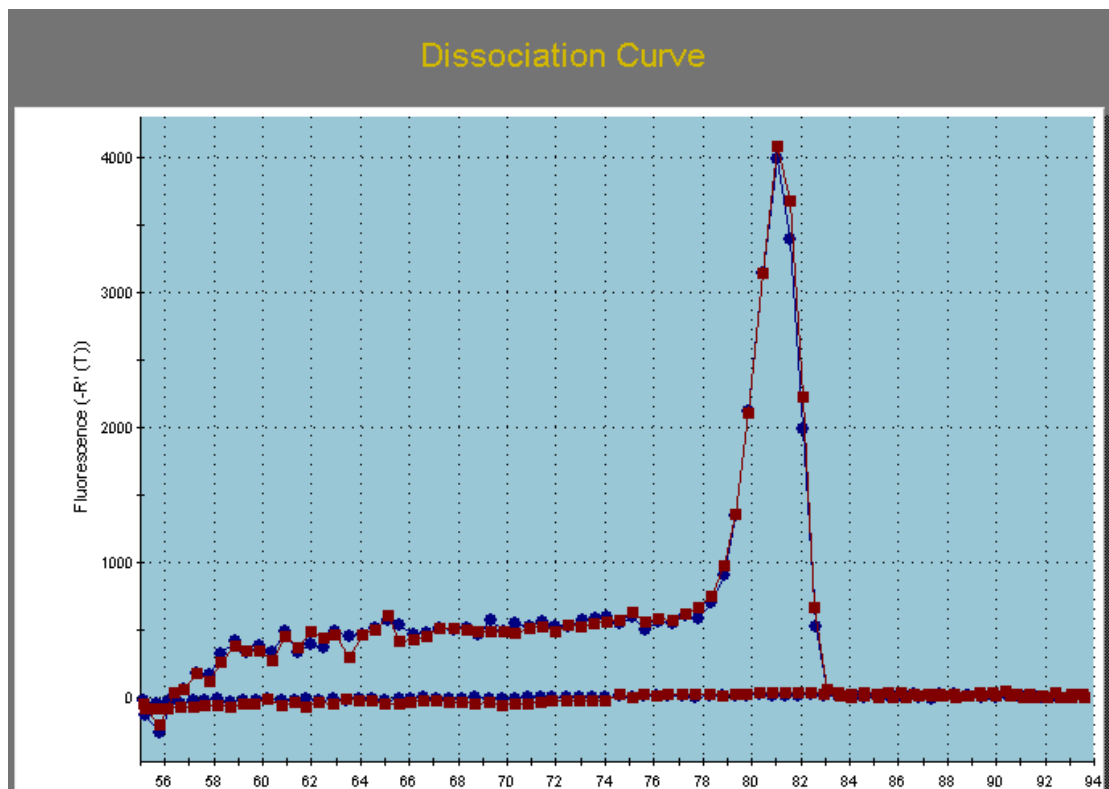


Εικ. 24 Β

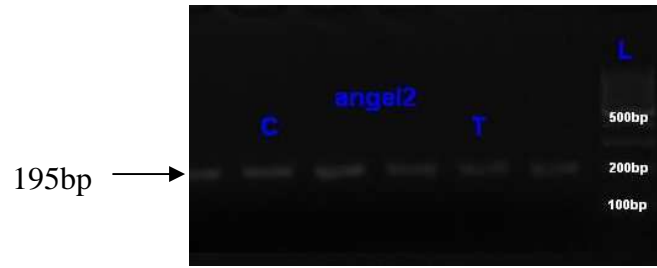


Εικ. 24 Γ

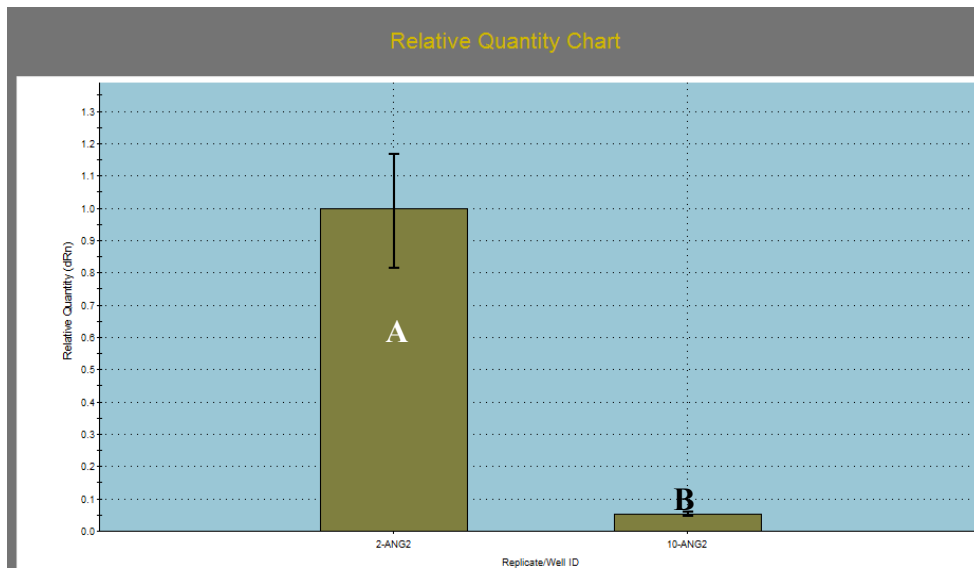
CNOT6Етк. 25 BЕтк. 25 Г

CNOT6LFig. 26 BFig. 26 Γ

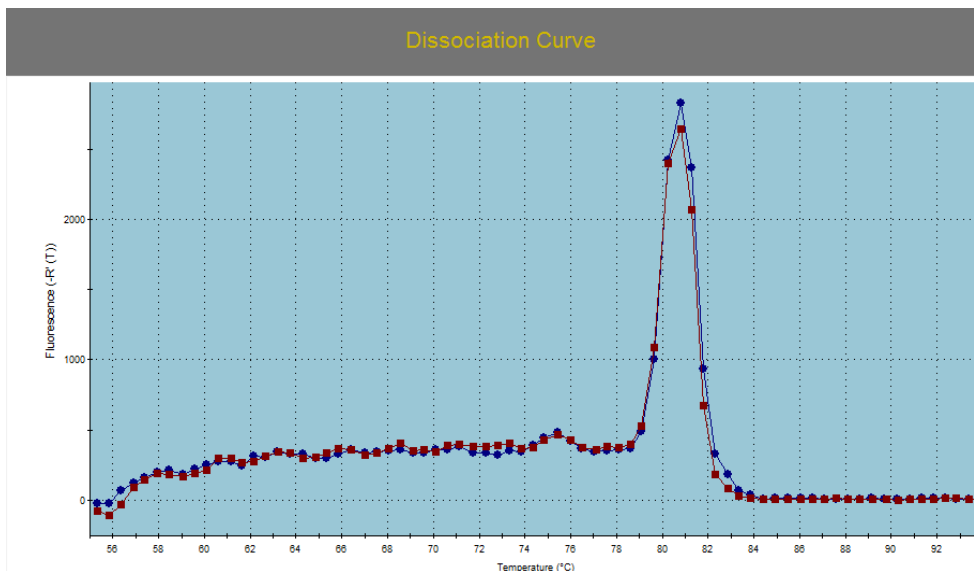
**ANGEL2**



**Etκ. 27 A**

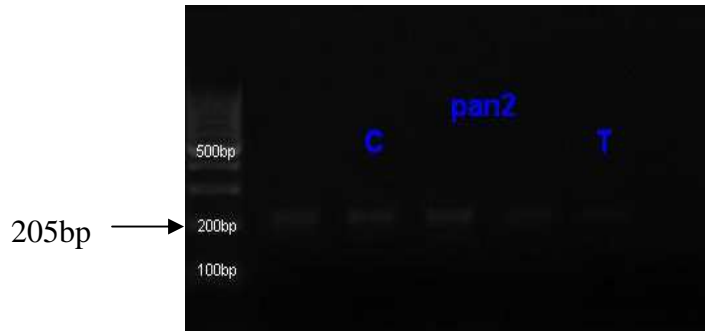


**Etκ. 27 B**

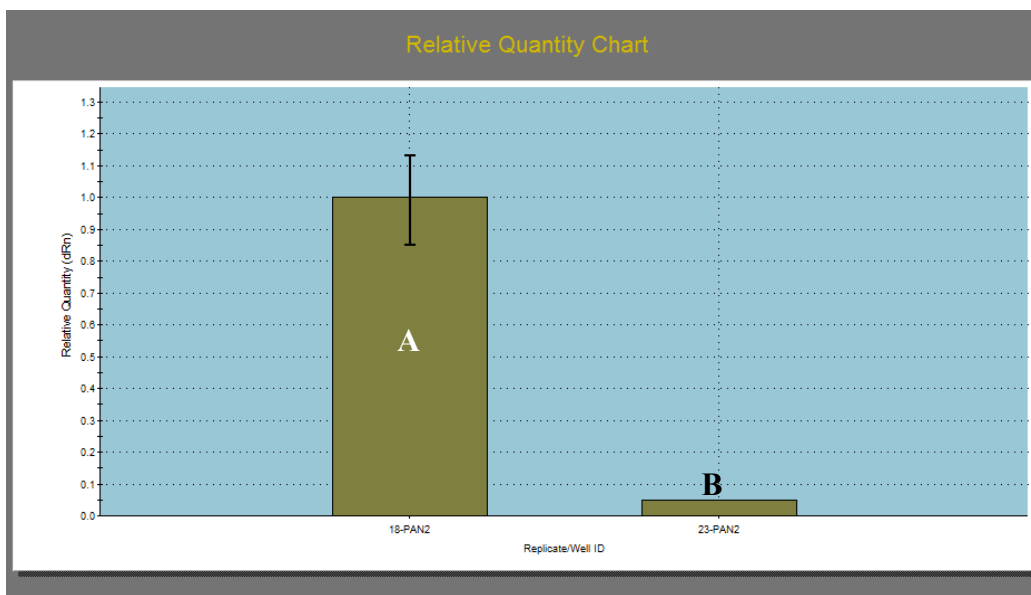


**Etκ. 27 Γ**

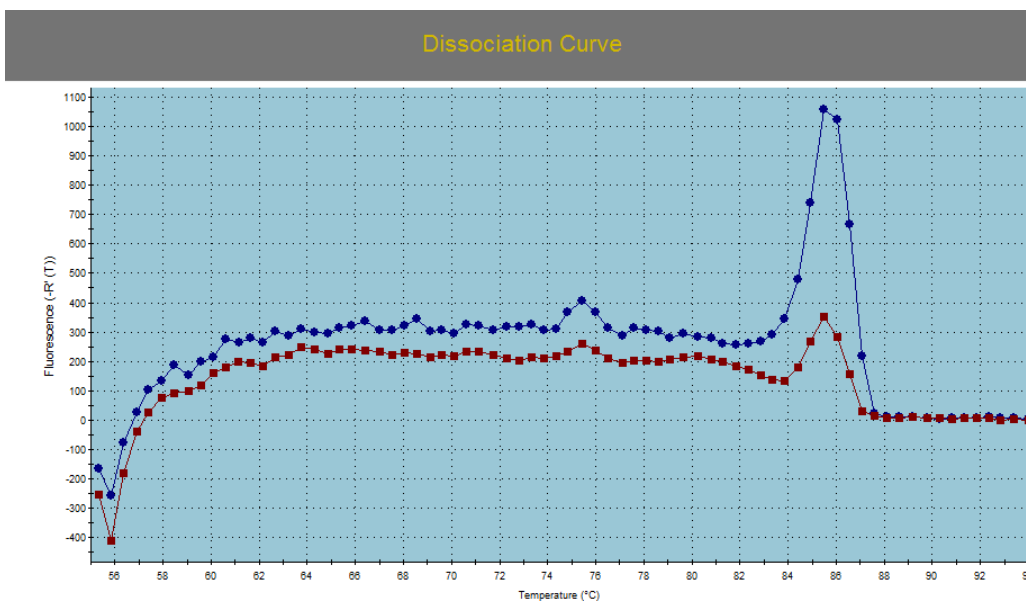
PAN2



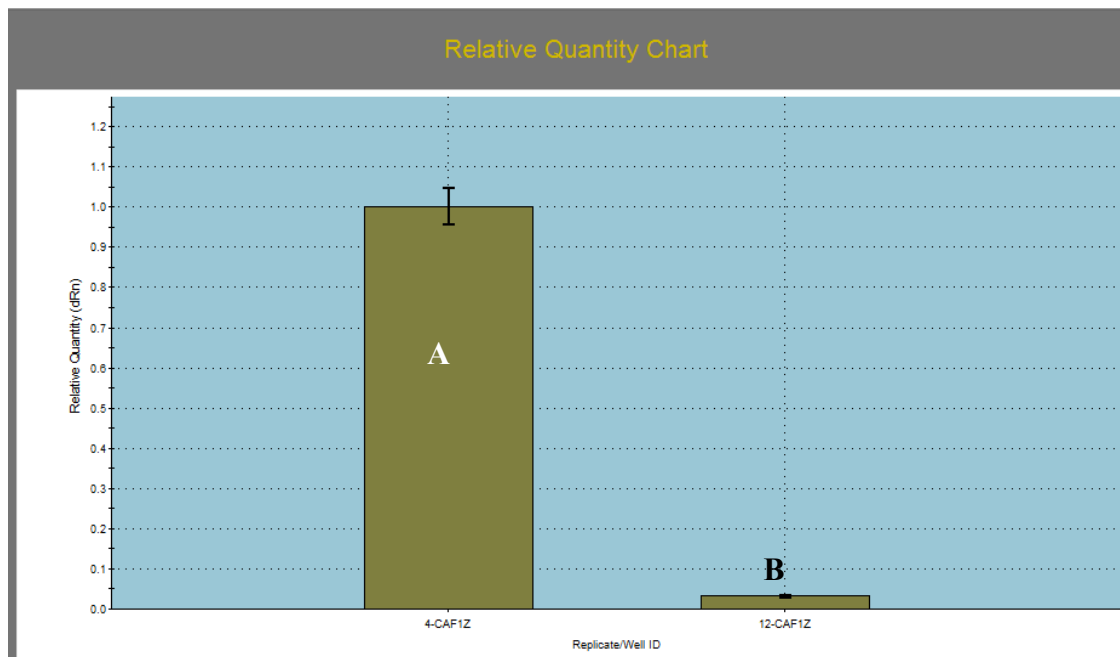
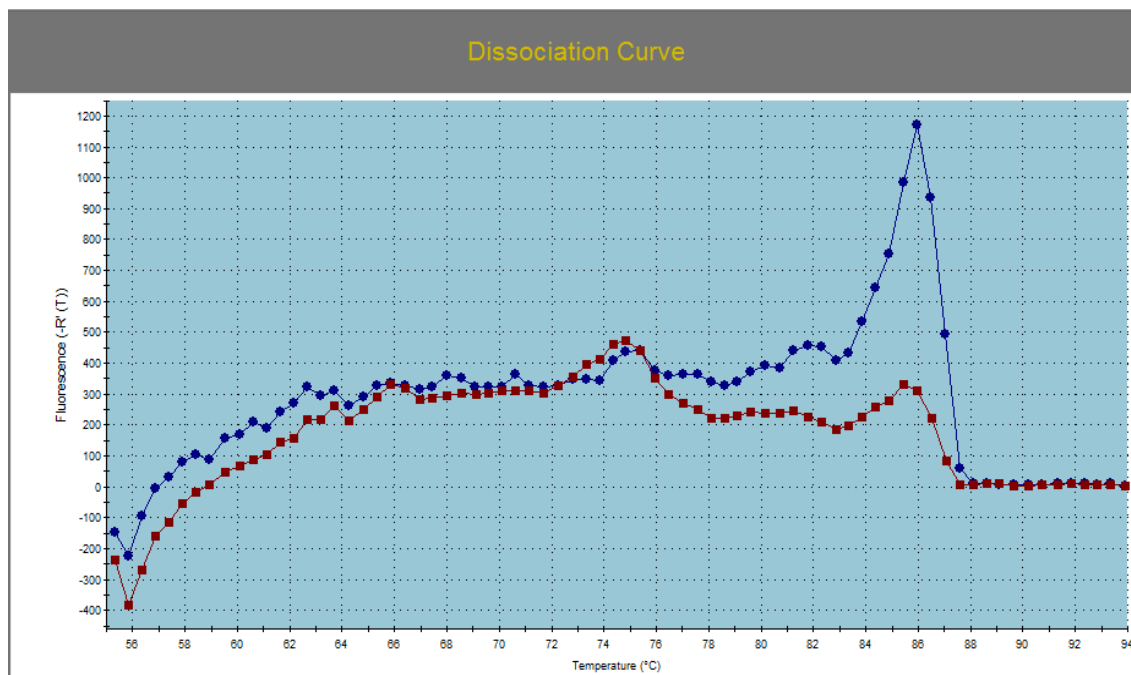
Εικ. 28 Α

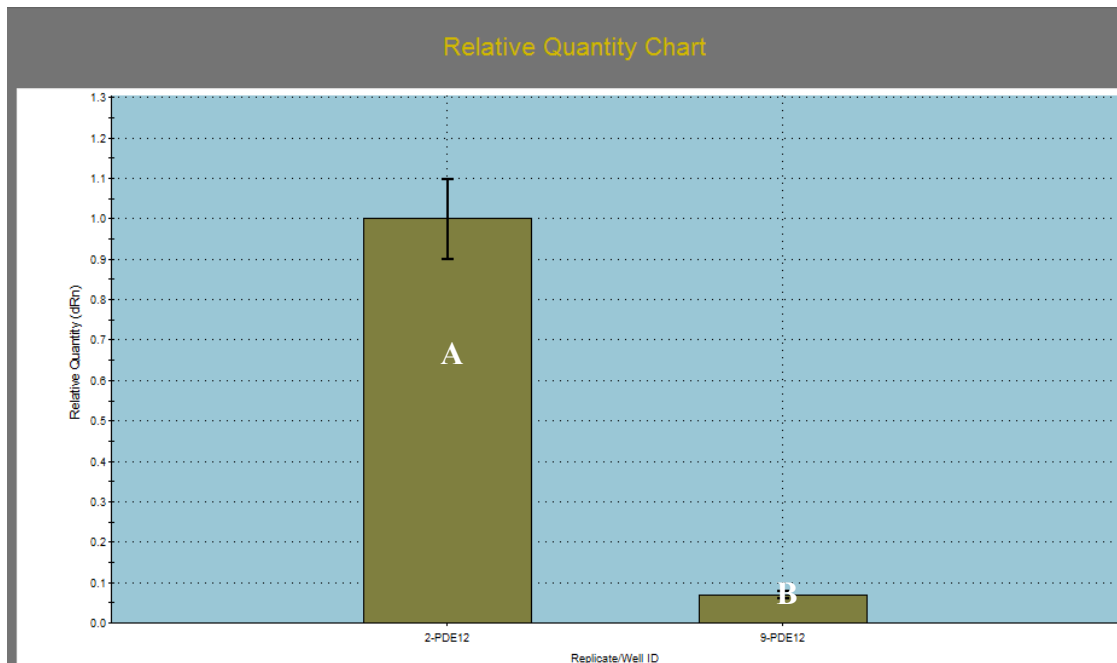
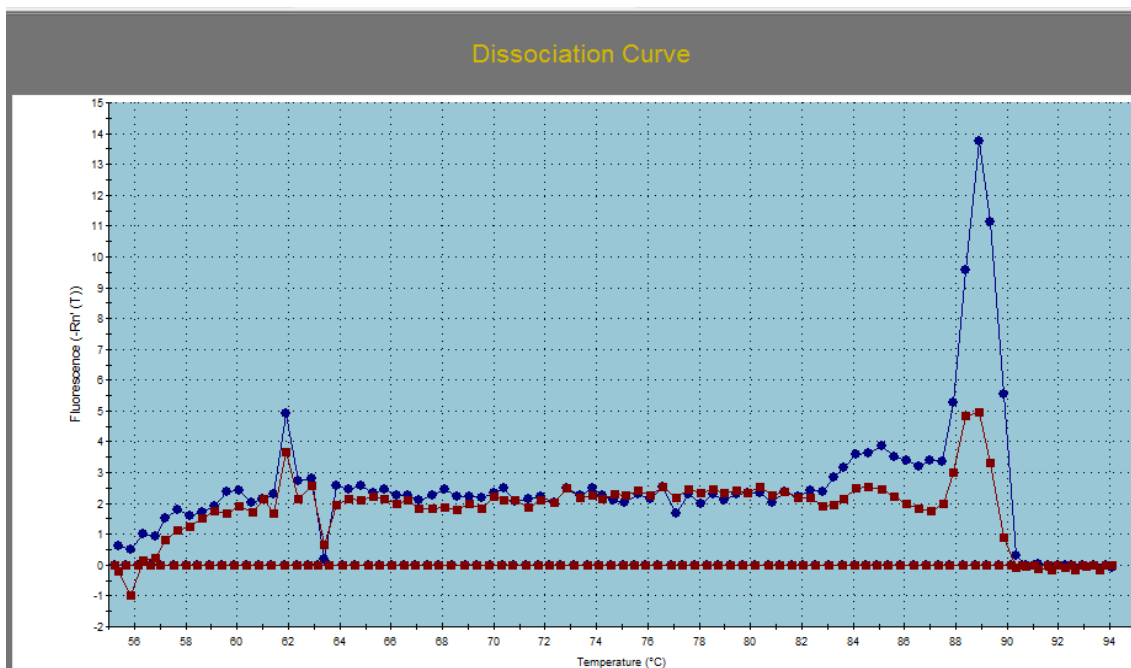


Εικ. 28 Β

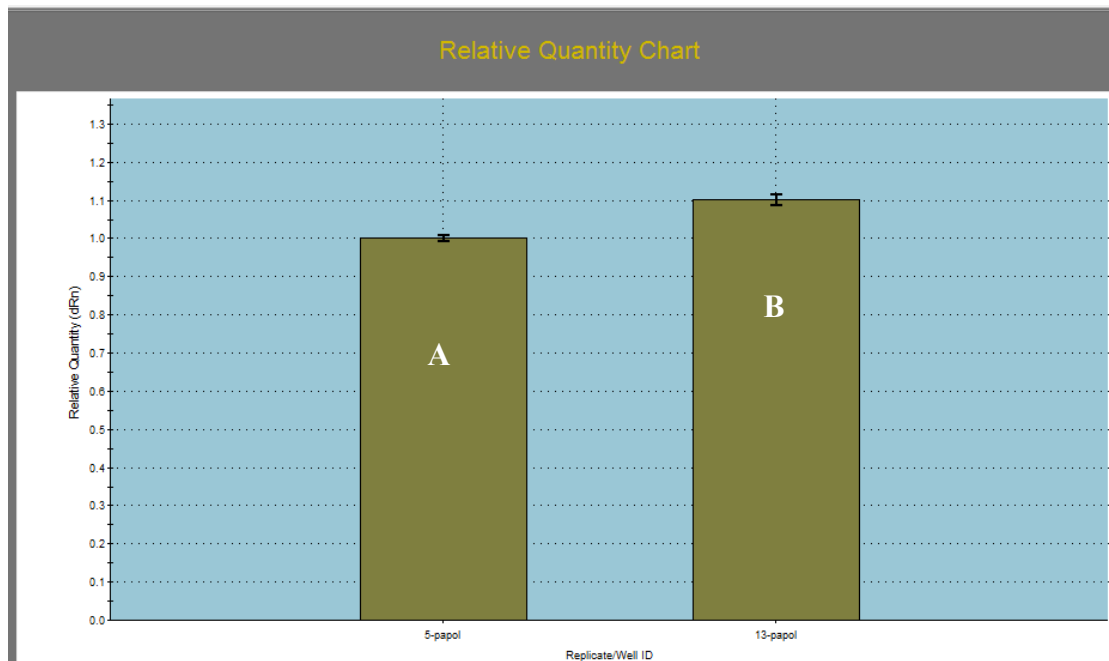
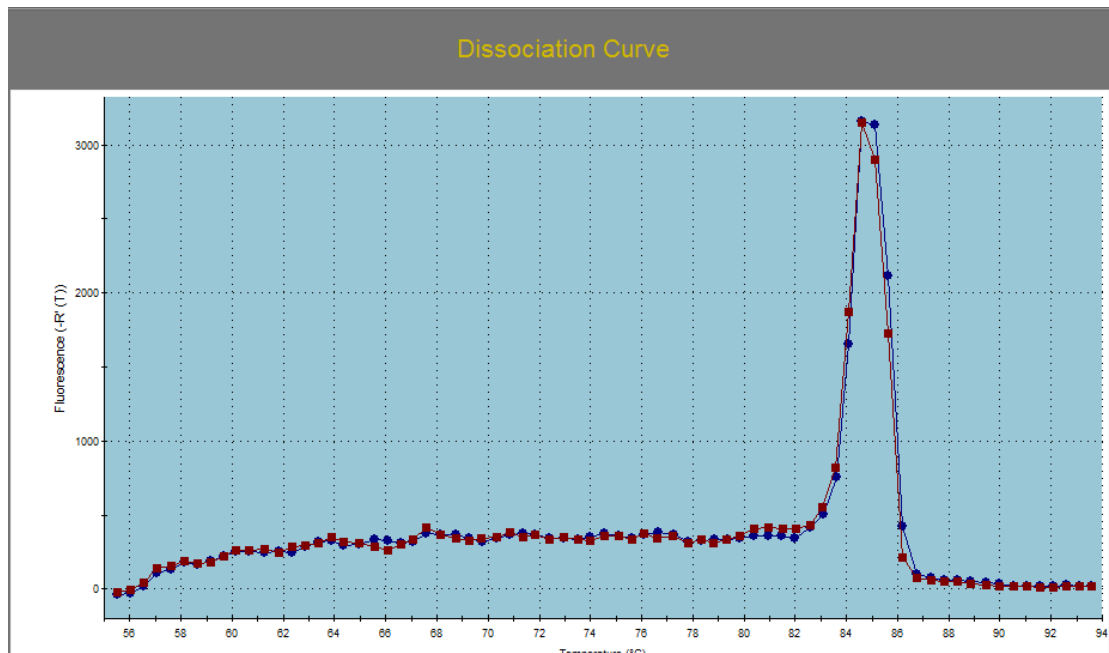


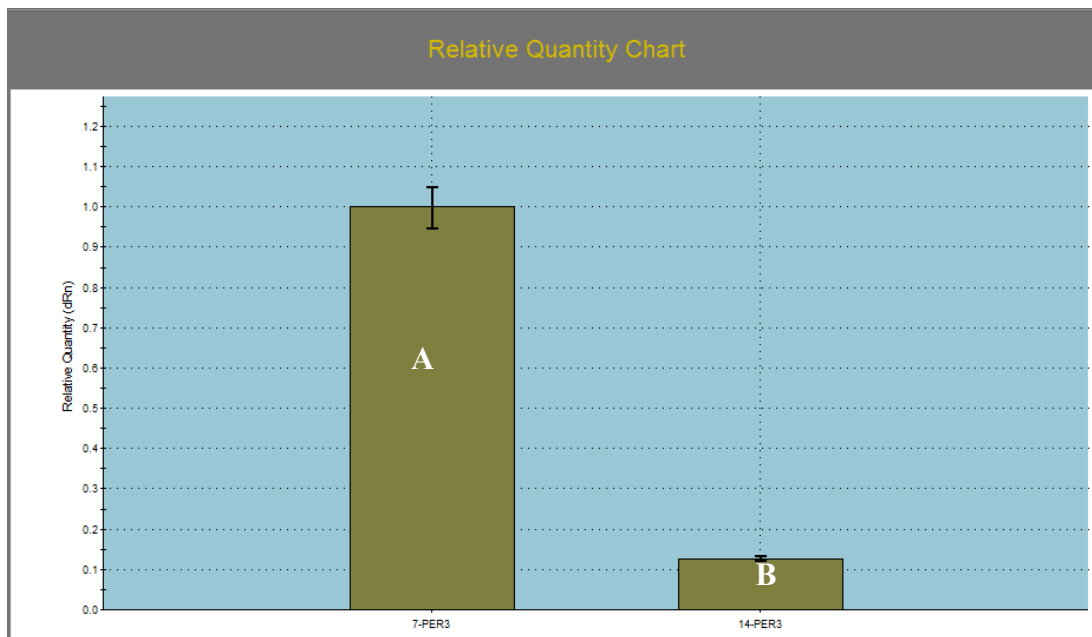
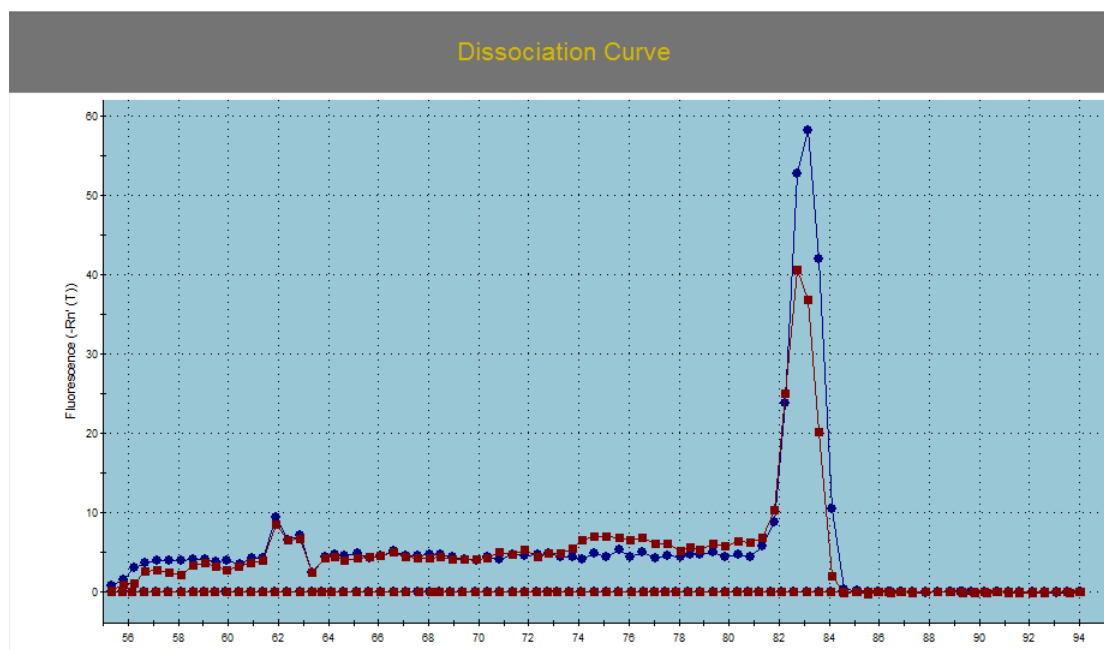
Εικ. 28 Γ

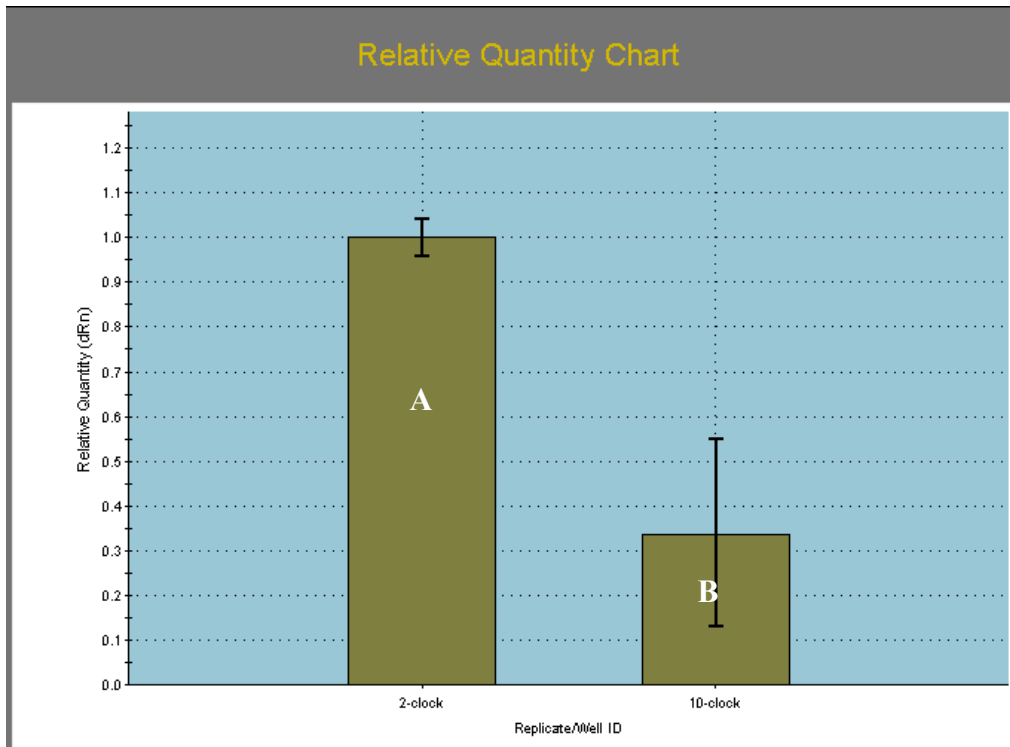
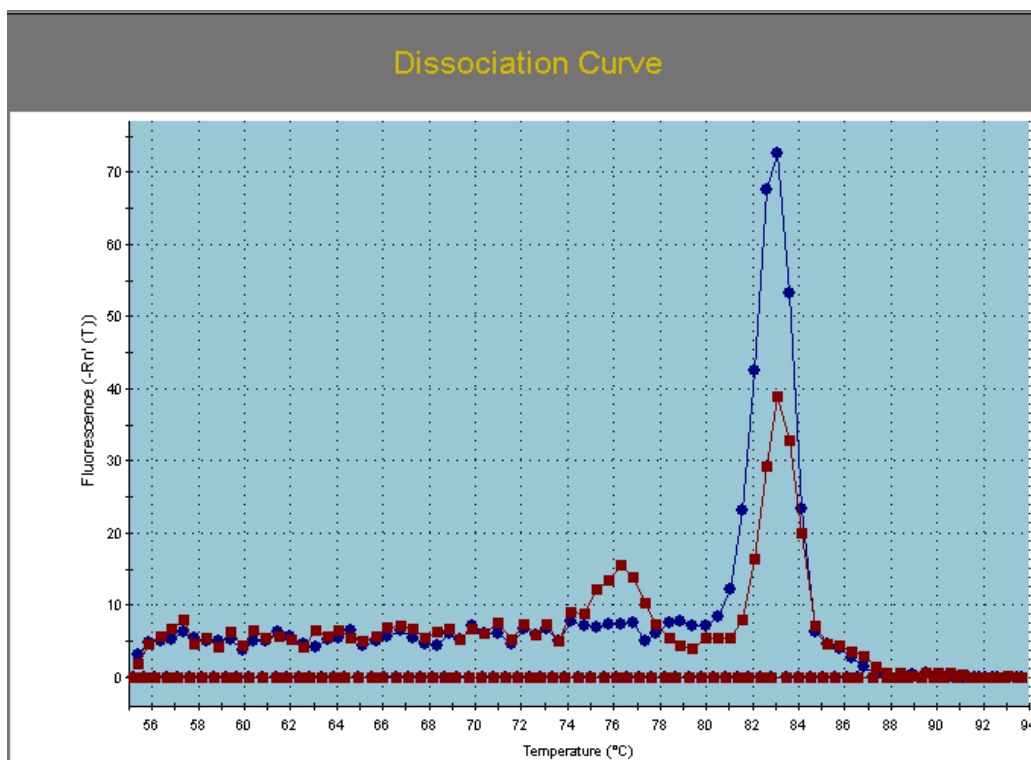
**CAF-1Z****Etк. 29 B****Etк. 29 Г**

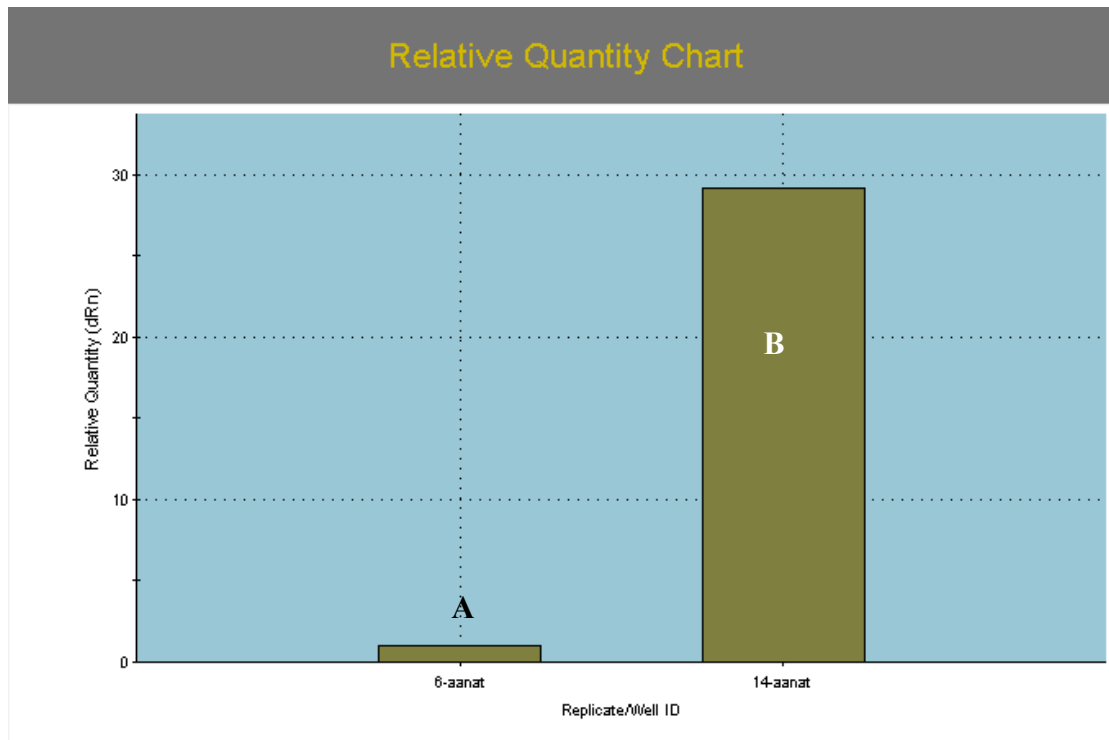
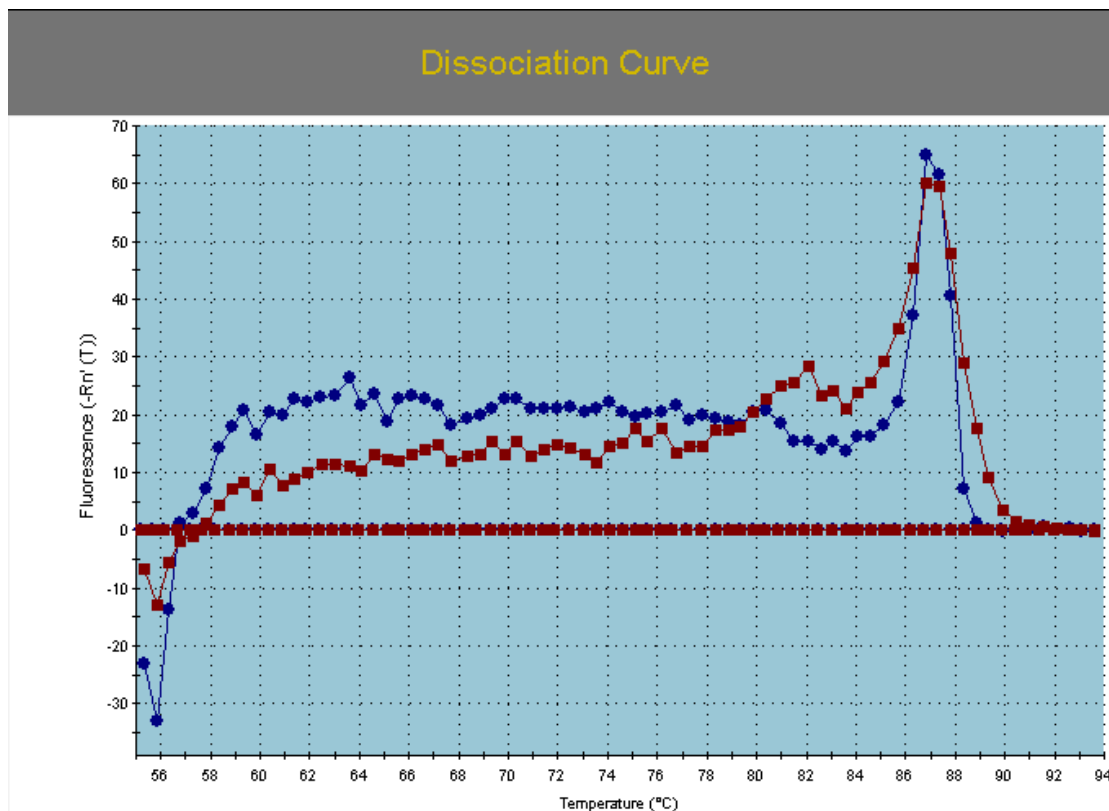
**2'-PDE****Etк. 30 B****Etк. 30 Г**

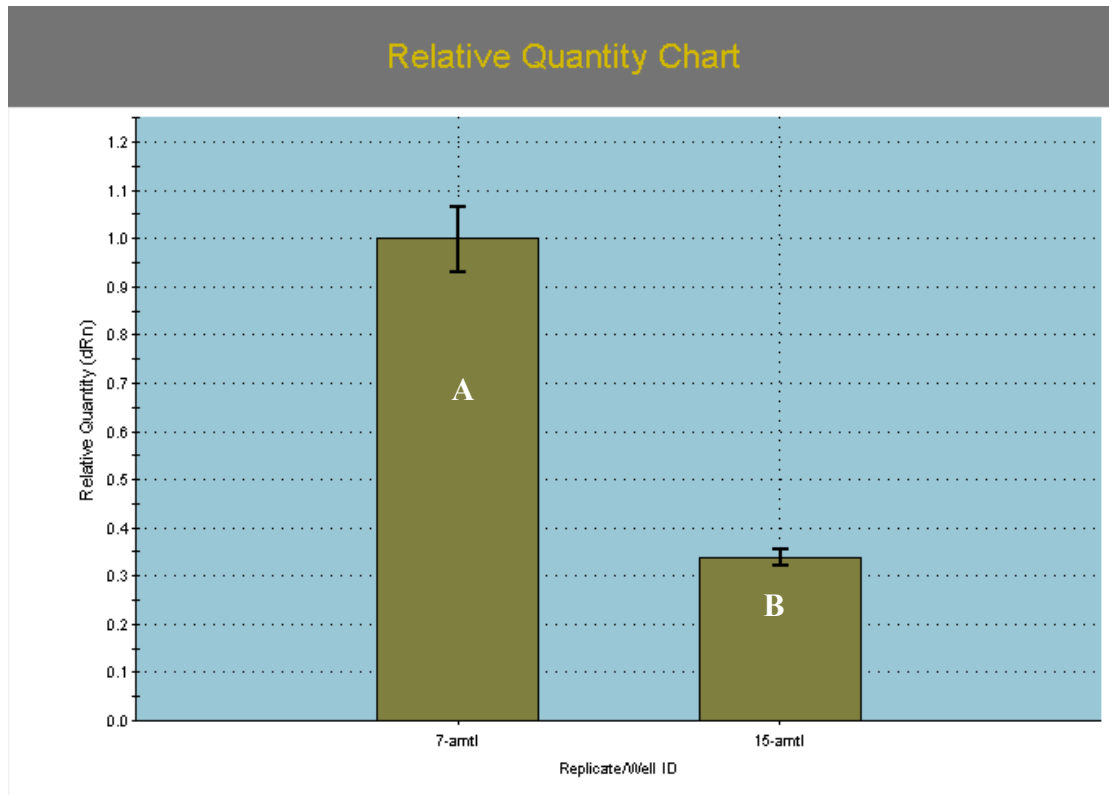
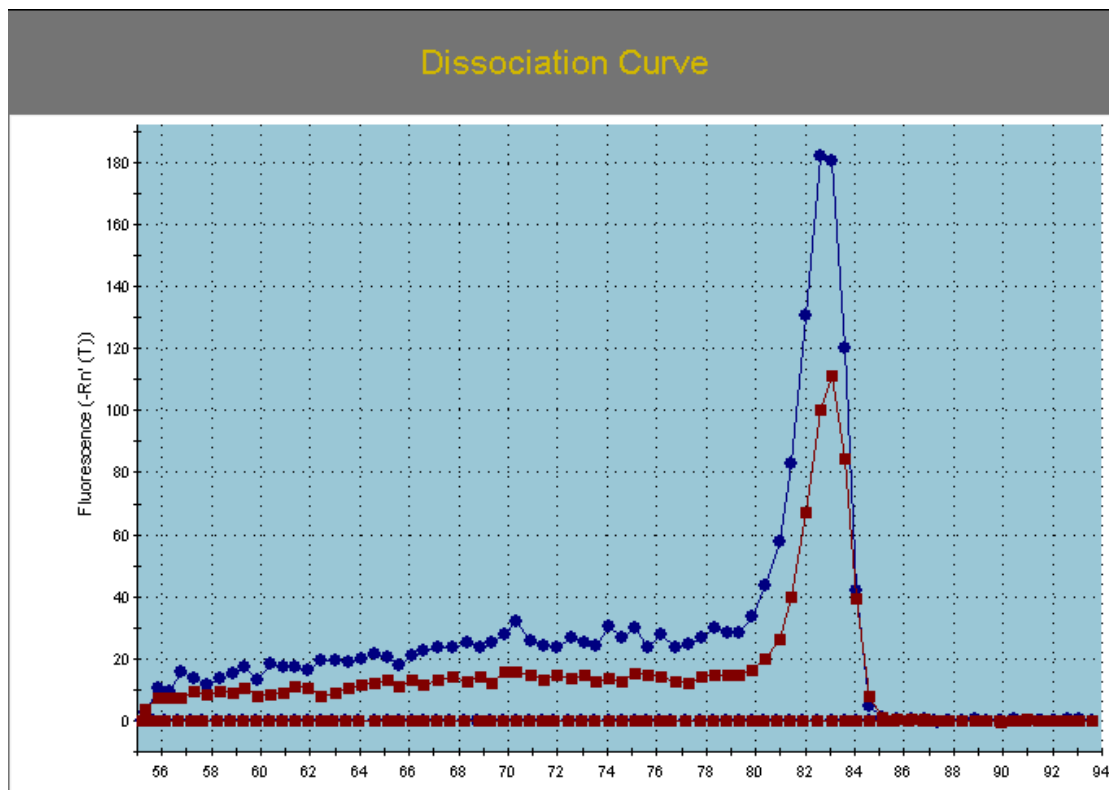


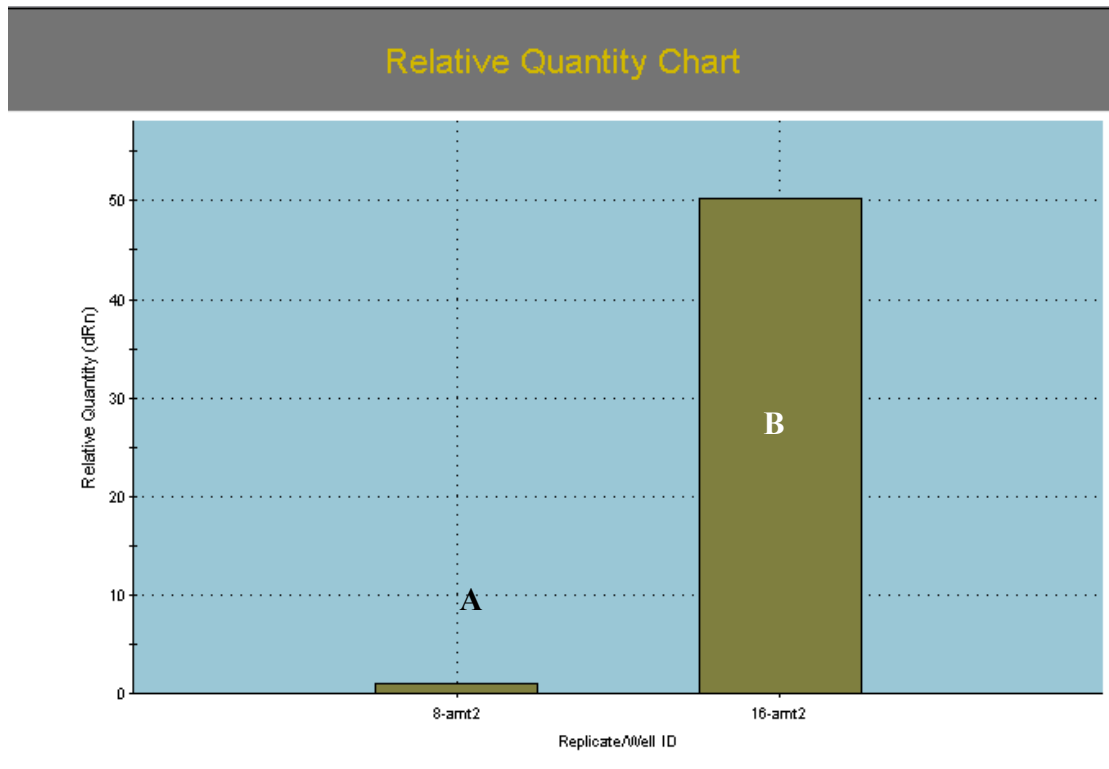
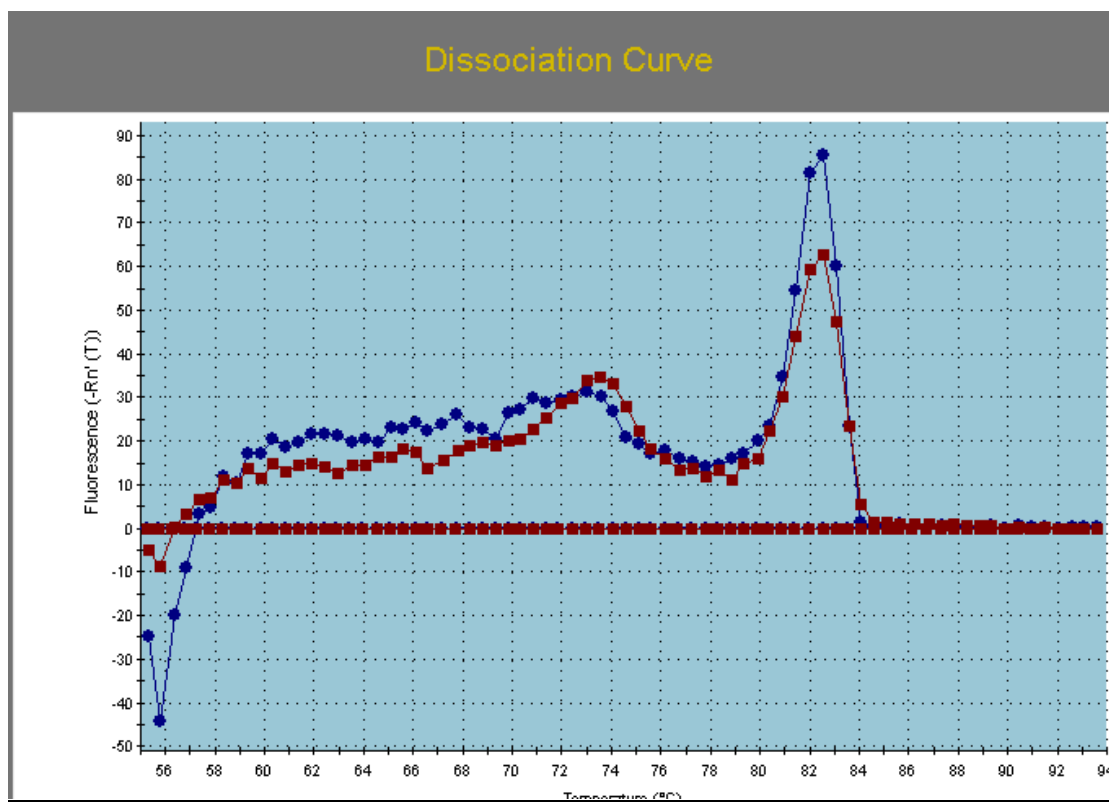
**PAPOLA****Εικ. 31 Β****Εικ. 31 Γ**

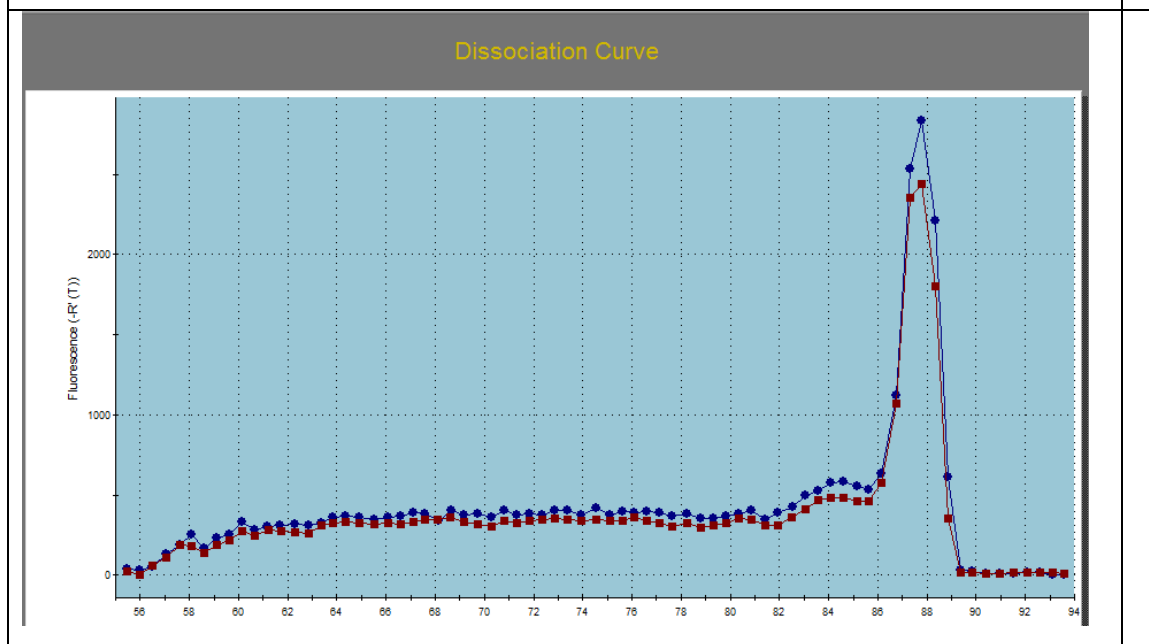
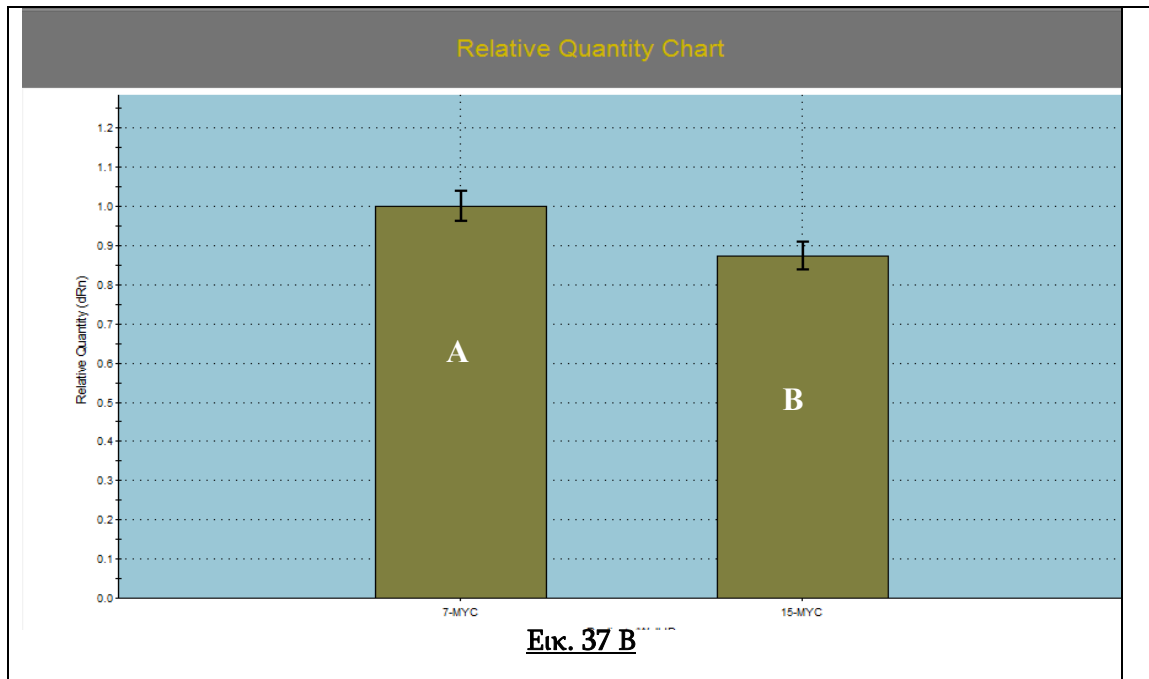
**PER3****Εικ. 32 Β****Εικ. 32 Γ**

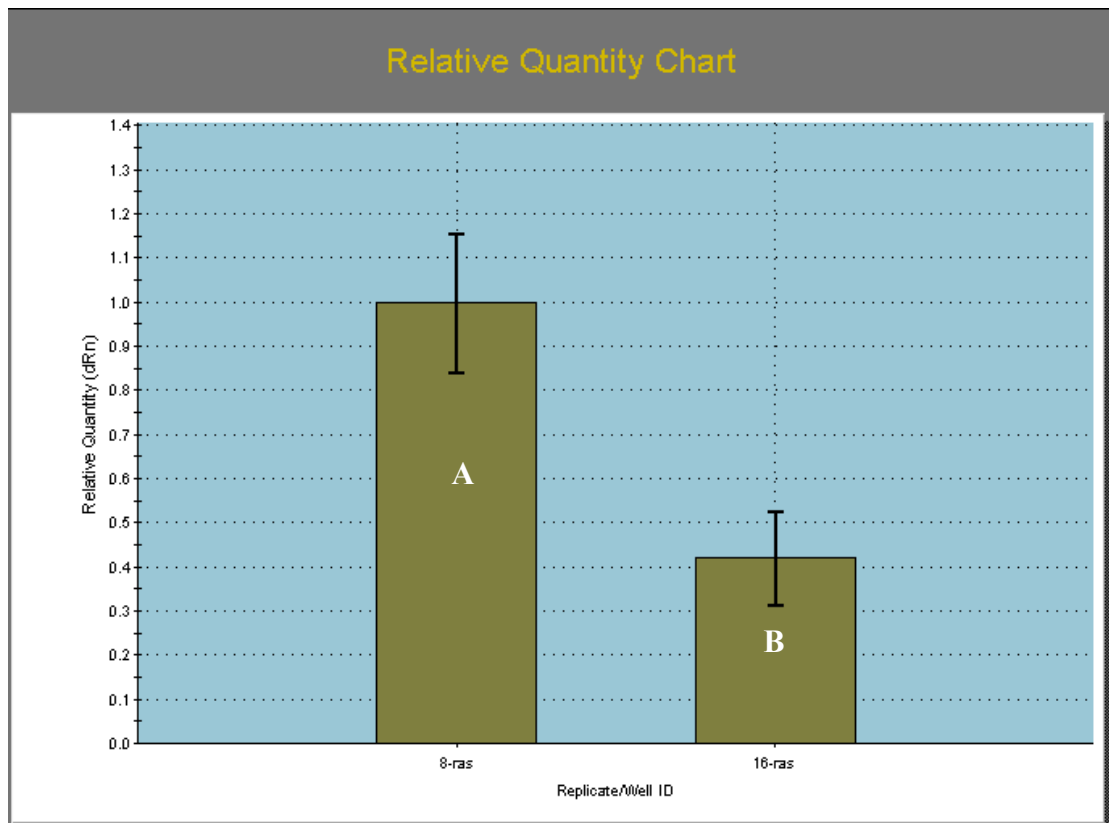
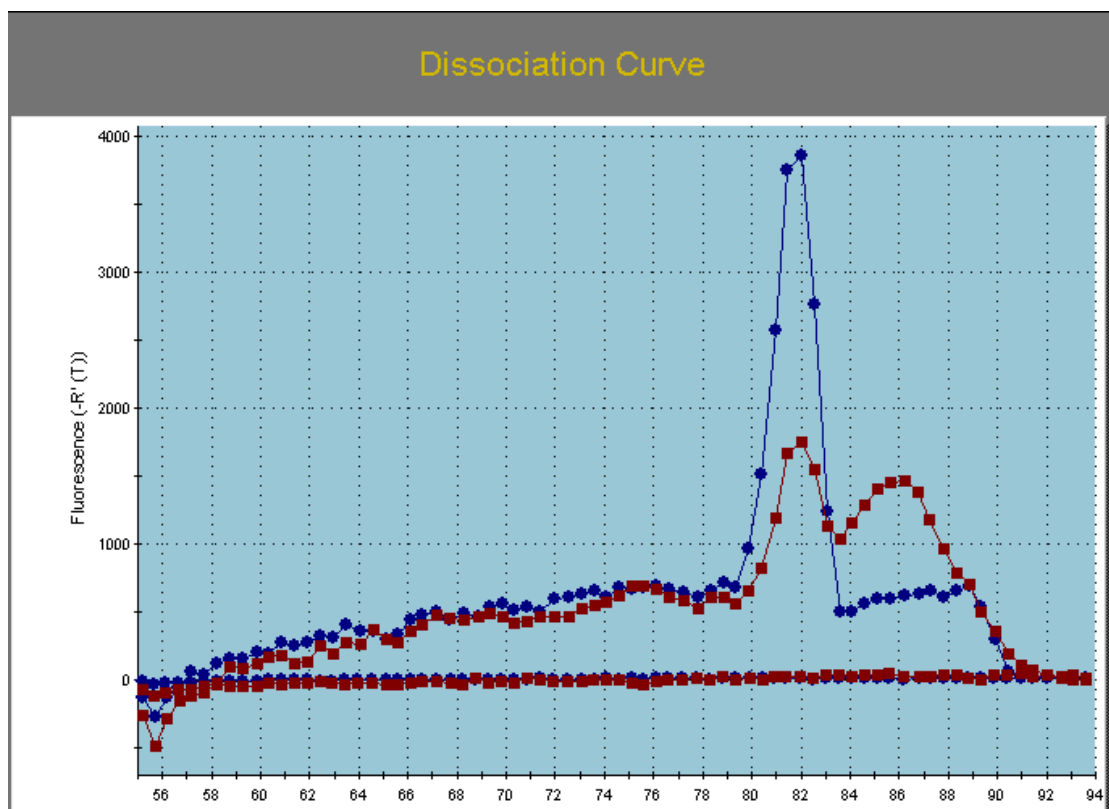
CLOCKFig. 33 BFig. 33 Г

AANATFig. 34 BFig. 34 Γ

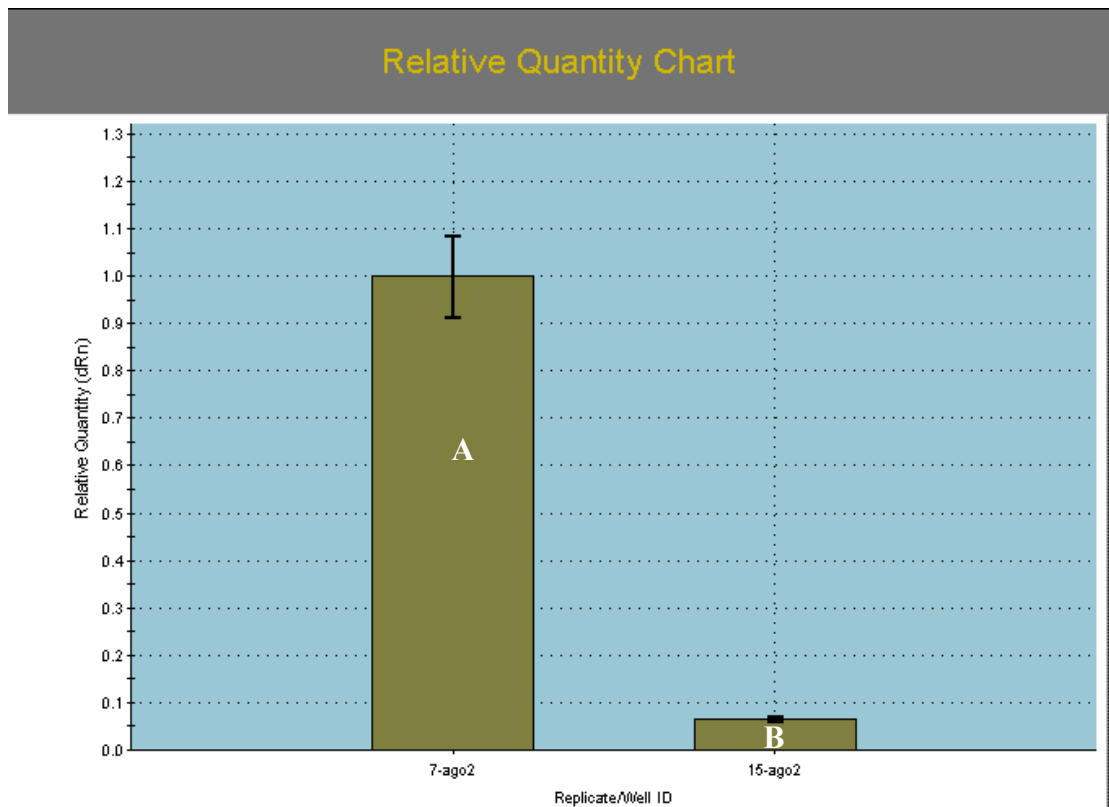
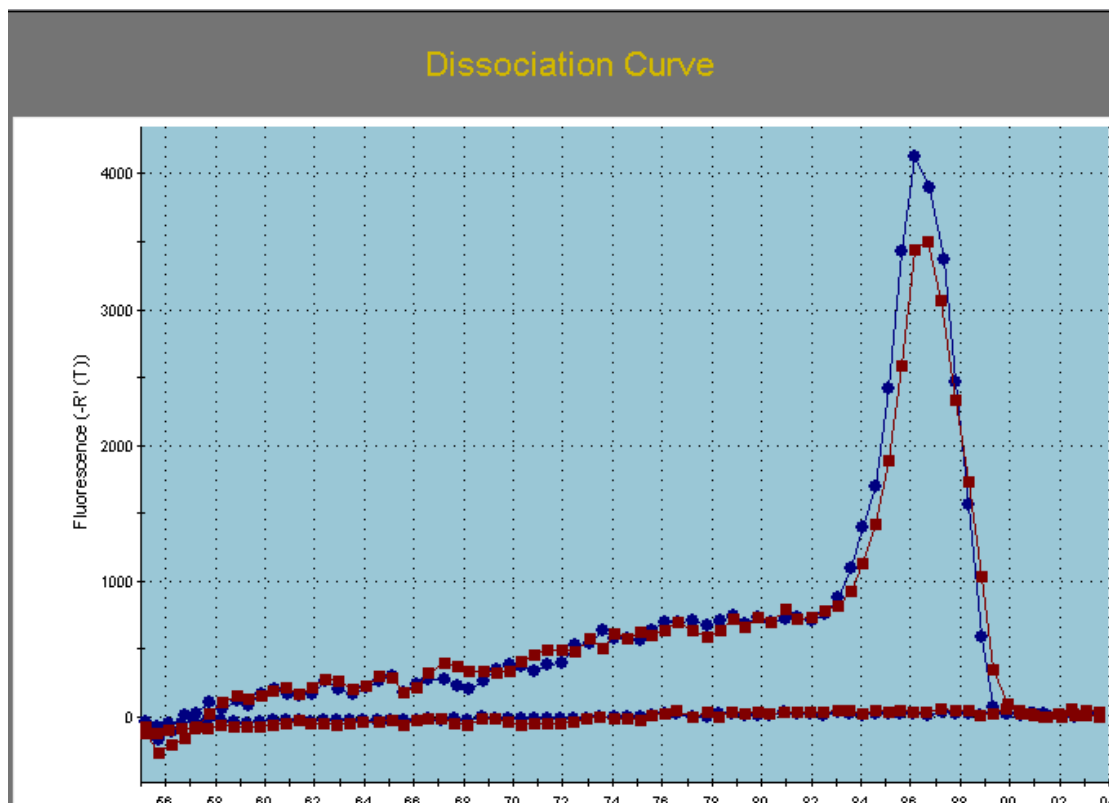
ARNTLΕικ. 35 ΒΕικ. 35 Γ

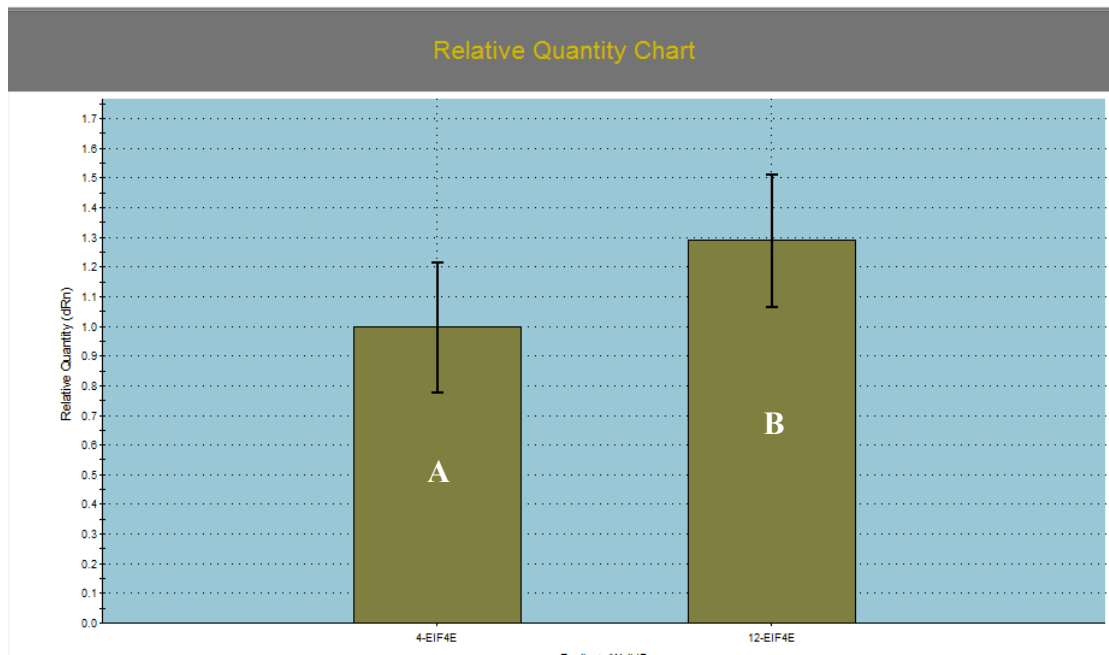
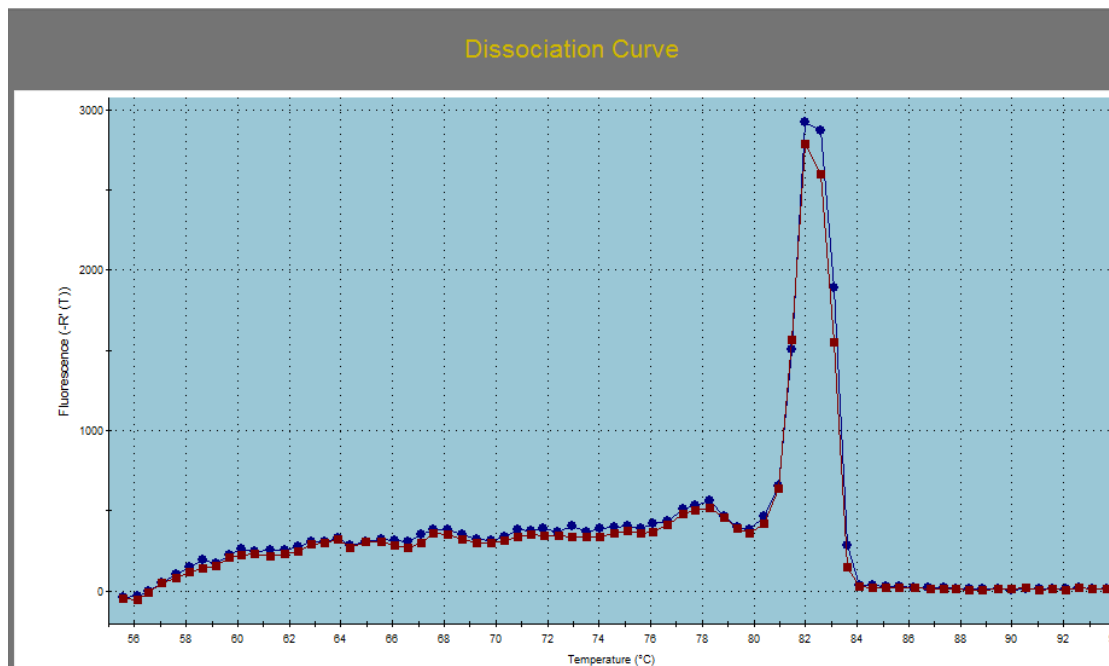
ARNTL2Fig. 36 BFig. 36 Γ

**C-MYC**

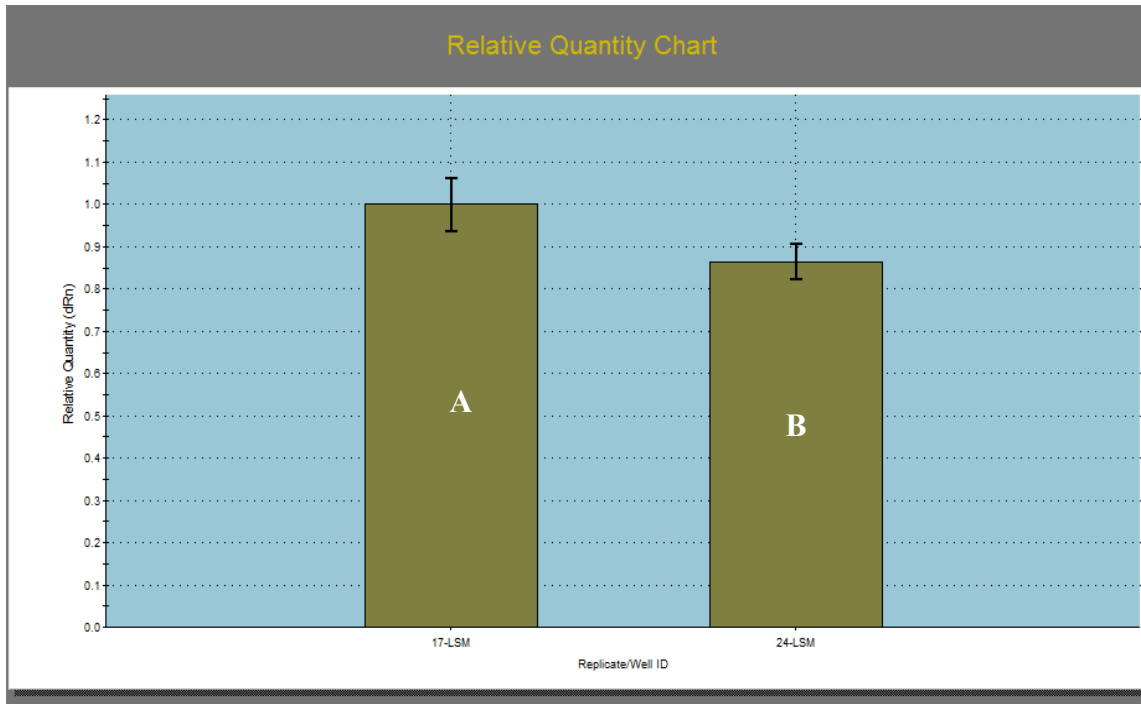
K-RASΕικ. 38 ΒΕικ. 38 Γ



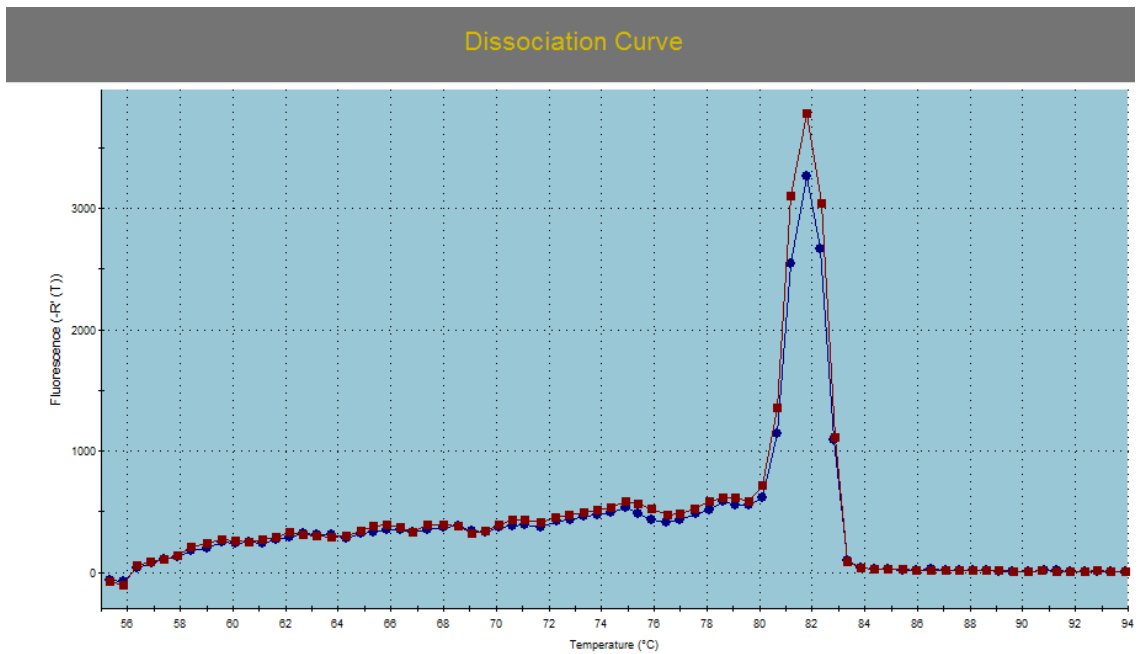
AGO2Εικ. 39 ΒΕικ. 39 Γ

eIF4EΕικ. 40 ΒΕικ. 40 Γ

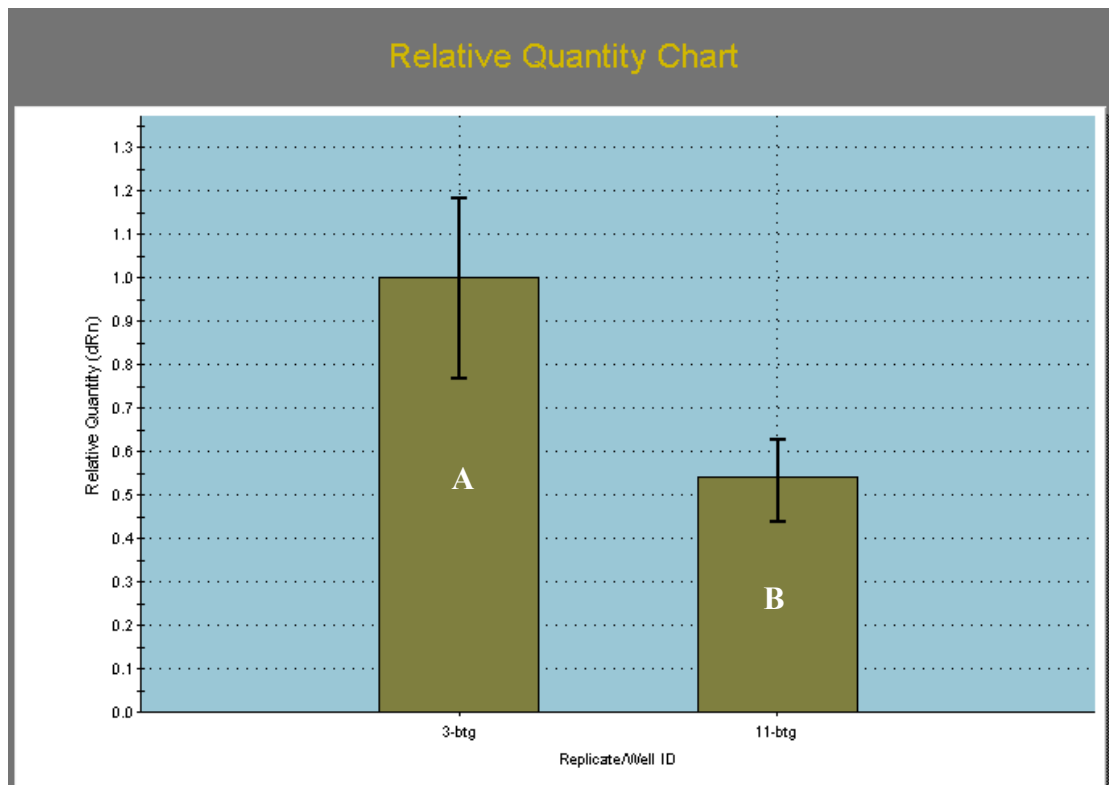
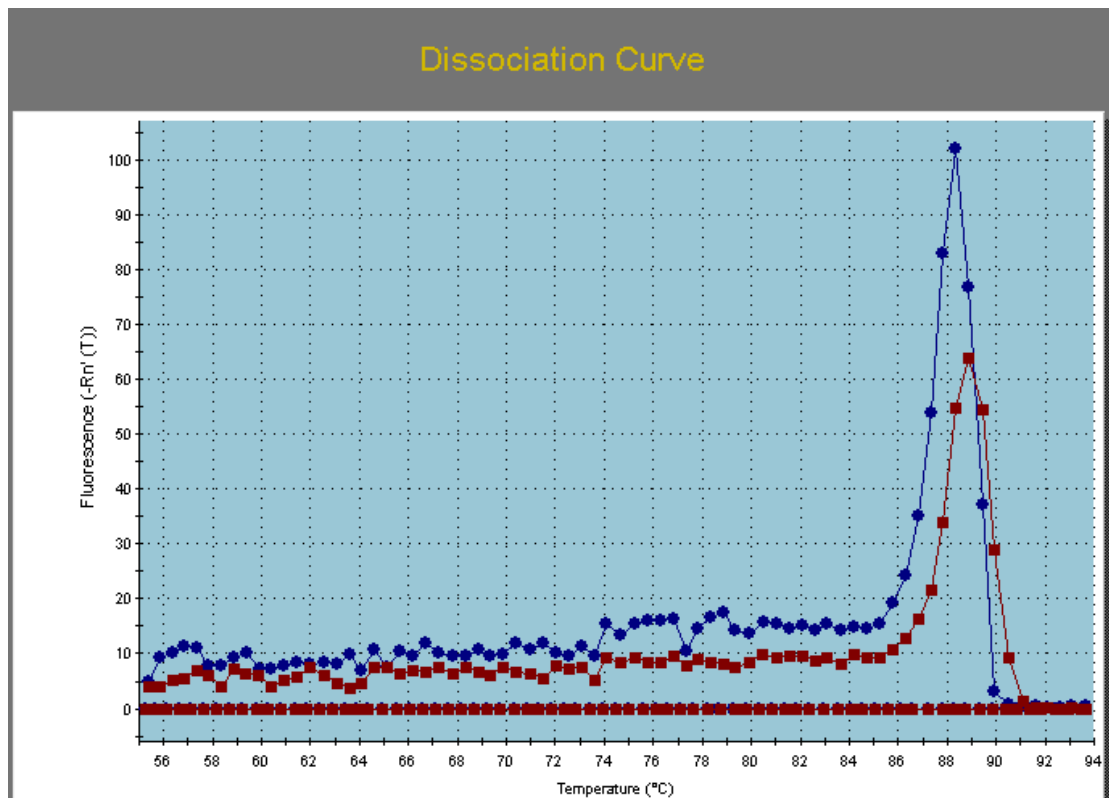
LSM



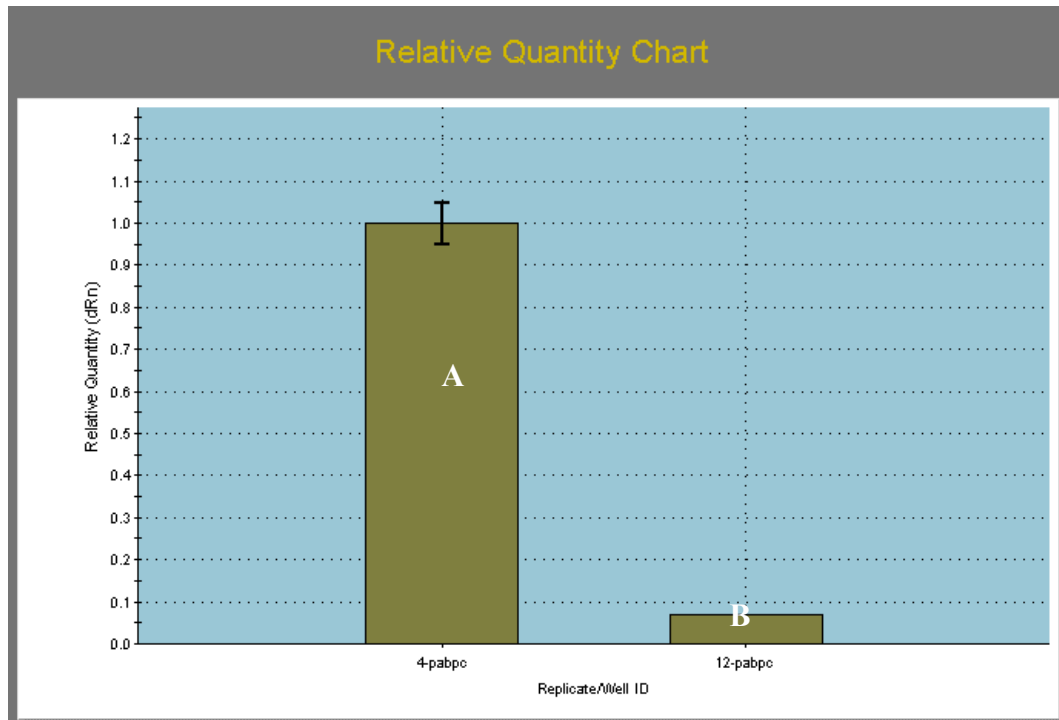
Εκ. 41 Β



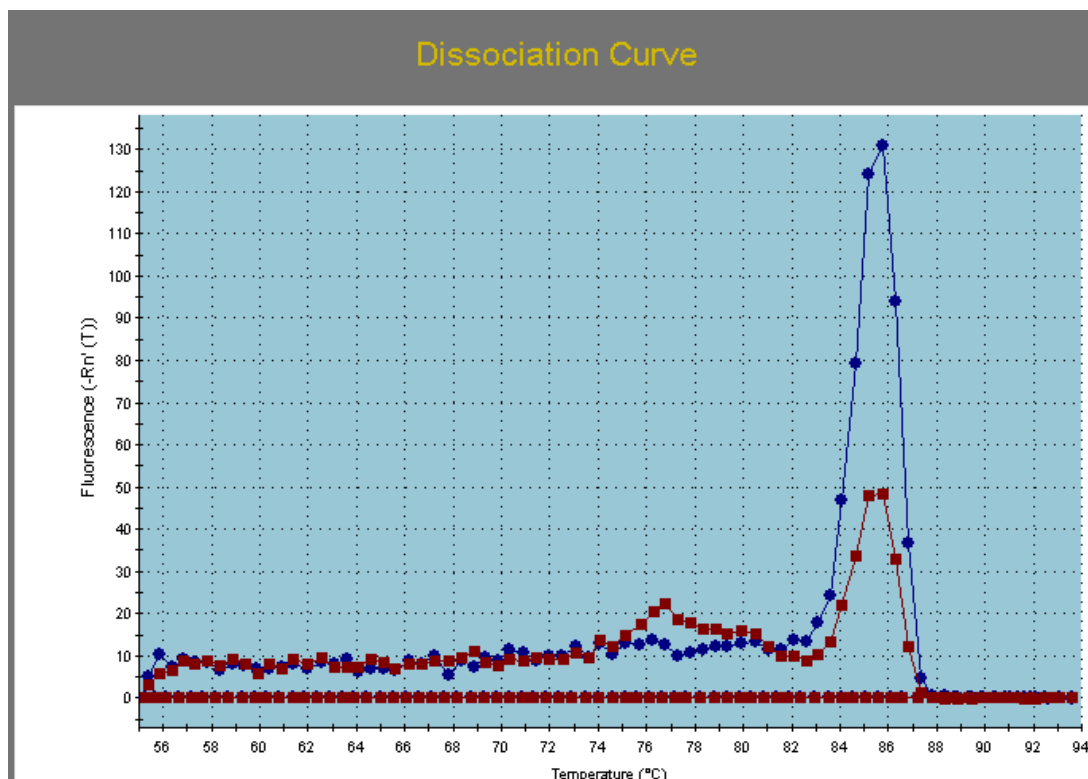
Εκ. 41 Γ

**BTG2****Etк. 42 B****Etк. 42 Г**

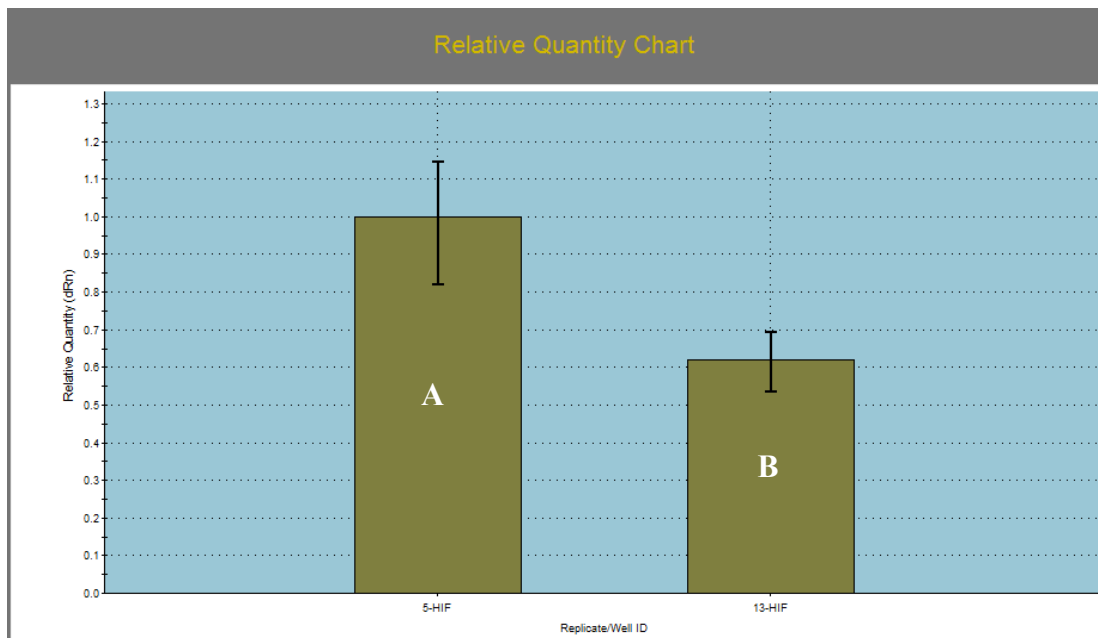
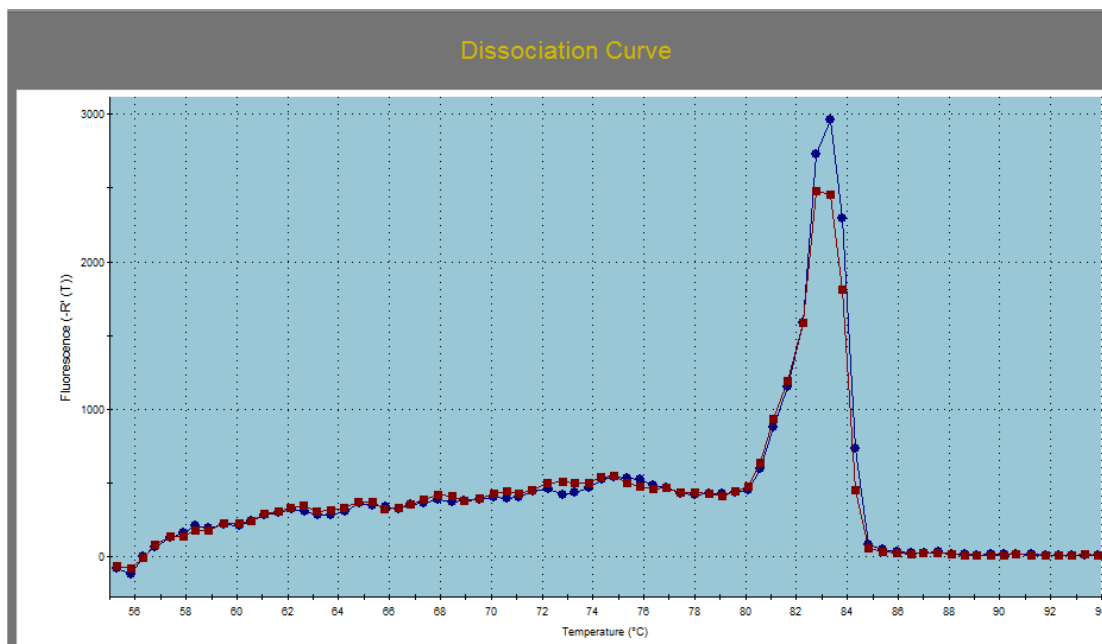
**PABPC**



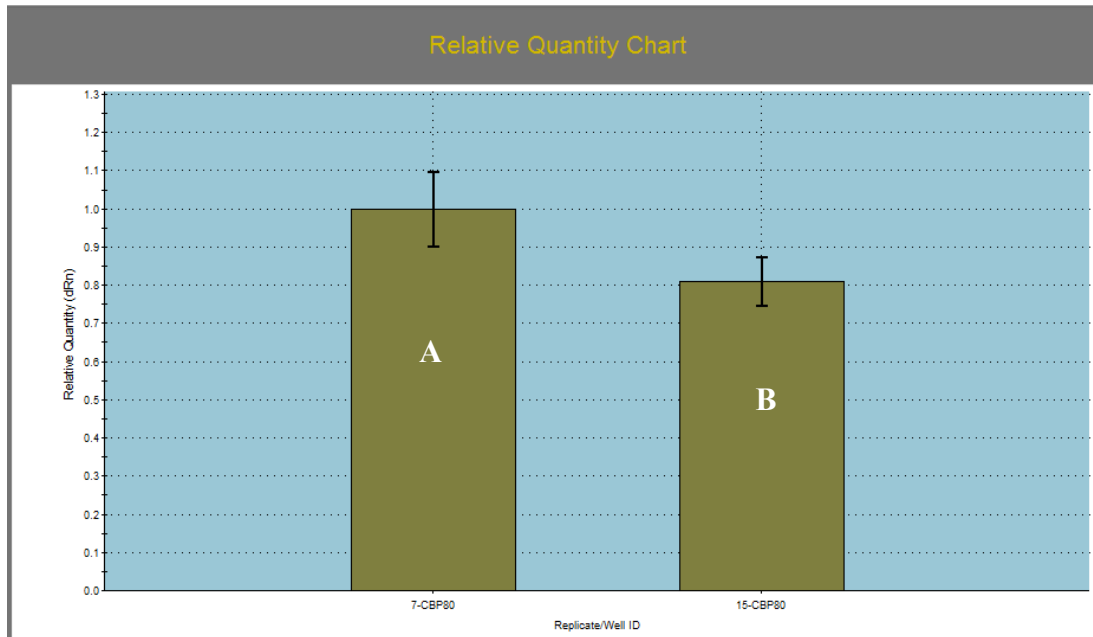
**Fig. 43 B**



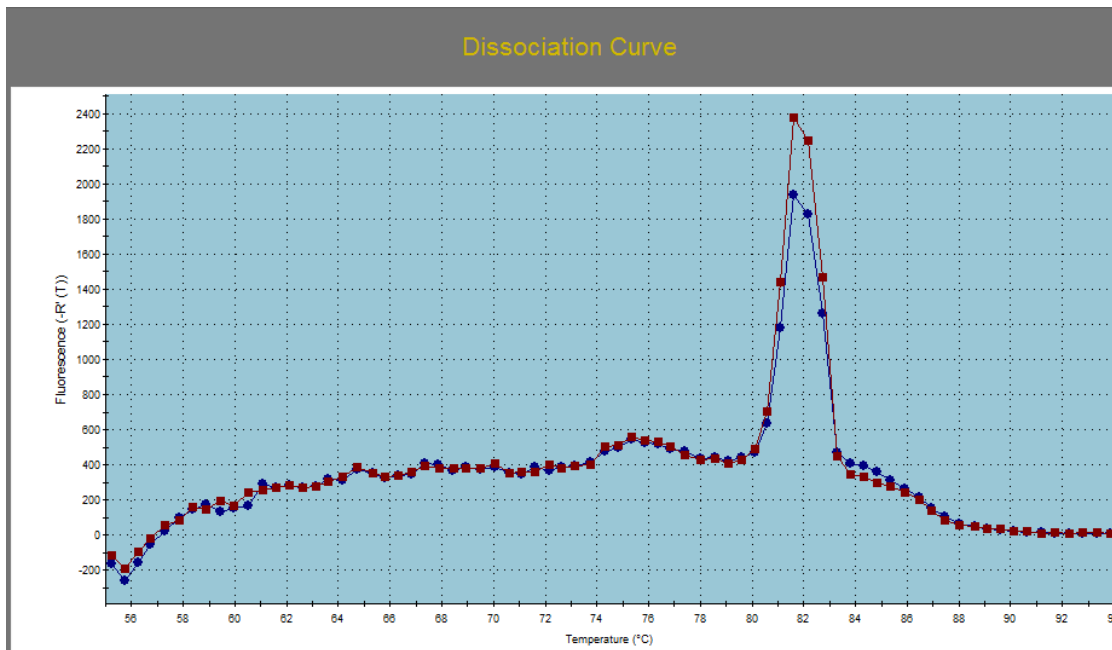
**Fig. 43 Г**

**HIF-1a****Fig. 44 B****Fig. 44 Г**

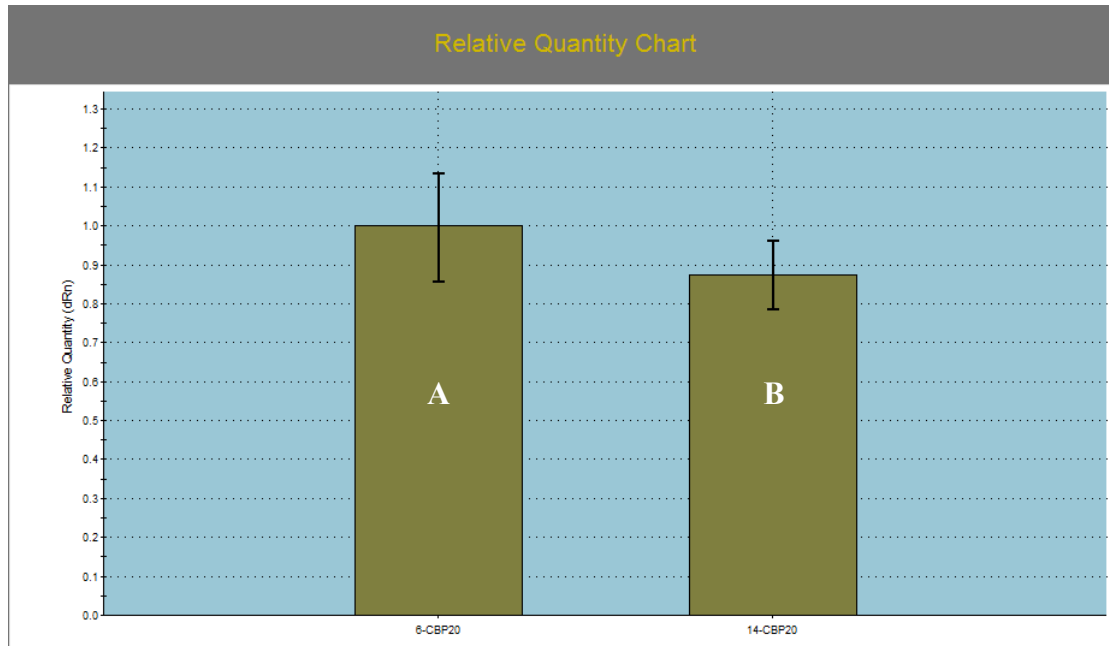
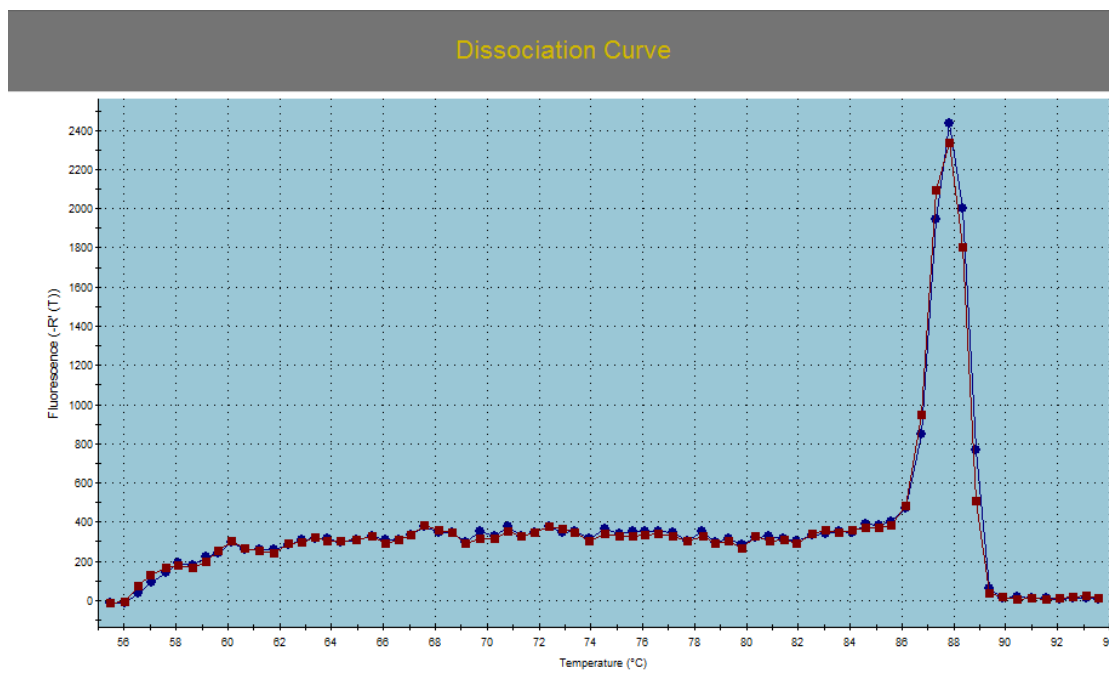
**CBP80**



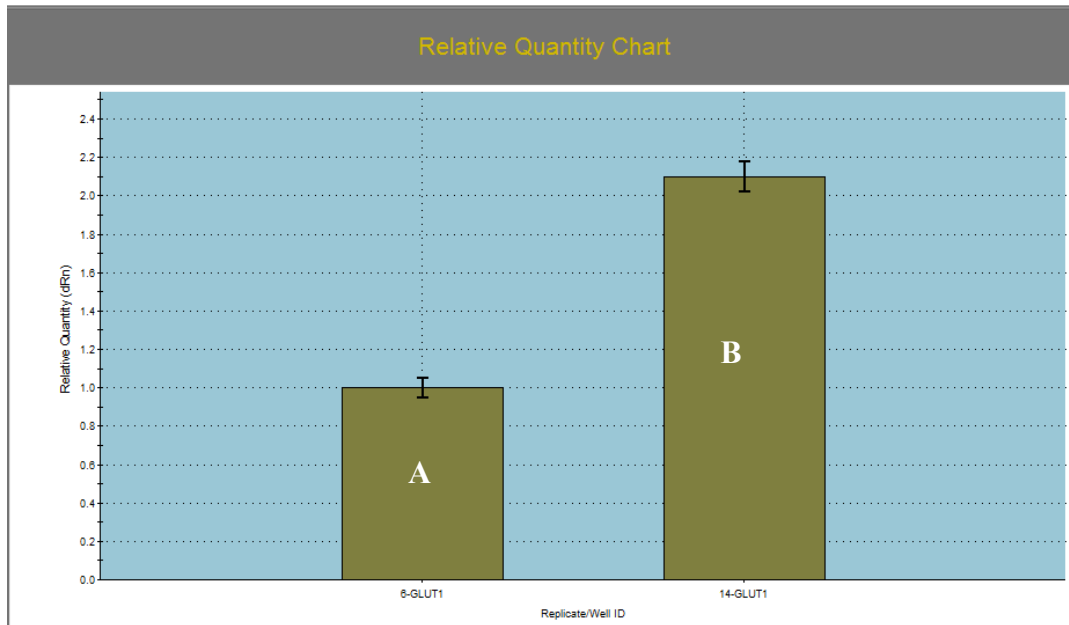
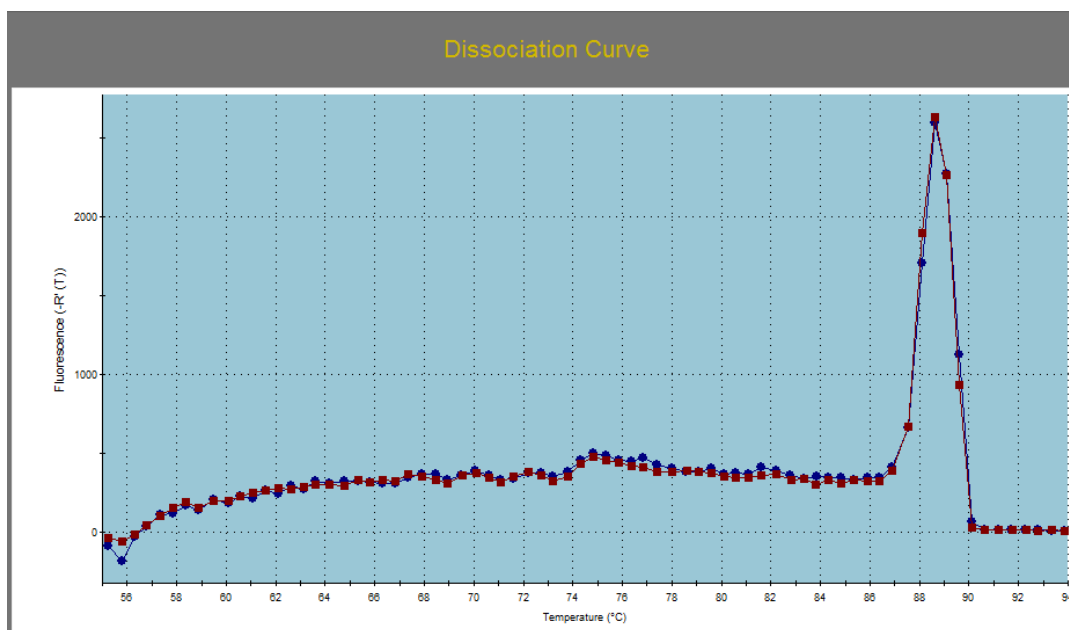
**Fig. 45 B**



**Fig. 45 Γ**

**CBP20****Εικ. 46 Β****Εικ. 46 Γ**



GLUT-1Εικ. 47 ΒΕικ. 47 Γ

**Εικ. 21-28Α:** Αποτελέσματα από ηλεκτροφόρηση, σε gel αγαρόζης 1% , των προϊόντων της RT-PCR όπου φαίνονται τα μοριακά βάρη παραγόντων των οποίων τα επίπεδα έκφρασης

εξετάστηκαν. Στους υπόλοιπους παράγοντες δεν υπήρχε ανιχνεύσιμη ζώνη προϊόντος, οπότε παραλήφθηκαν οι εικόνες από την ηλεκτροφόρηση.

**Εικ. 21-47B:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR [συγκεκριμένα παρουσιάζονται τα Relative quantity charts,  $-Rn'(T)^*$ ]. Η στήλη B αντιπροσωπεύει τα σχετικά επίπεδα mRNA της NOC από τα διαμολυσμένα κύτταρα ενώ η στήλη A τα αντίστοιχα επίπεδα από τα φυσιολογικά, τα μη διαμολυσμένα κύτταρα (controls) 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

**Εικ. 21-47Γ:** Διαγράμματα διάστασης σήματος φθορισμού (dissociation plots). Η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από διαμολυσμένα κύτταρα ενώ η κόκκινη τα προϊόντα από μη διαμολυσμένα κύτταρα. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75 °C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

- ❖  $-Rn'(T)$ = the first derivative of the reference dye-normalized fluorescence reading multiplied by -1.

**Παρατήρηση:** Στα αποτελέσματα δεν περιλαμβάνονται οι παράγοντες Angell1, Per1 και Per2 που εξετάστηκαν, καθώς οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι RT-PCR ίσως δεν ήταν οι κατάλληλες ώστε να ενισχυθεί το προϊόν τους, οπότε δεν είμαστε σε θέση να εξάγουμε οποιοδήποτε συμπέρασμα γι'αυτούς.

#### 4.5 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα επίδρασης αποσιώπησης της NOC στα επίπεδα mRNA των εξεταζόμενων παραγόντων

Τα παραπάνω αποτελέσματα περατίθενται συγκεντρωτικά στον παρακάτω **πίνακα 7**, στον οποίο φαίνεται συνοπτικά και η λειτουργία του κάθε παράγοντα που εξετάστηκε, καθώς και τα σχετικά επίπεδα mRNA των παραγόντων, όπως αυτά διαμορφώθηκαν μετά από την αποσιώπηση της αποαδενυλάσης NOC.

Πίνακας 7

Παράγοντας	Περιγραφή	%mRNA σε σχέση με καλλιέργεια μάρτυρα
<b>NOC</b>	κirkάδια αποαδενυλάση	<b>30%*</b>
<b>PARN</b>	αποαδενυλάση/μεταβολισμός	<b>110%</b>
PARNL	αποαδενυλάση	<b>30%</b>
CNOT8	υπομονάδα του αποαδενυλιωτικού συμπλόκου CCR4	<b>15%</b>
CNOT7	υπομονάδα του αποαδενυλιωτικού συμπλόκου CCR4	<b>10%</b>
CNOT6	υπομονάδα του αποαδενυλιωτικού συμπλόκου CCR4	<b>20%</b>
CNOT6L	μεταβλητή υπομονάδα του CCR4	<b>10%</b>
PAN2	αποαδενυλάση	<b>10%</b>
ANGEL2	αποαδενυλάση	<b>10%</b>
2'-PDE	αποαδενυλάση	<b>35%</b>
CAF-1Z	αποαδενυλάση	<b>5%</b>
<b>PAPOLA</b>	ωρίμανση mRNA	<b>110%</b>
PER3	κirkάδιο γονίδιο	<b>10%</b>
CLOCK	κirkάδιος μεταγραφικός παράγοντας	<b>60%</b>
ARNTL	ή BMAL1- μεταγραφικός παράγοντας	<b>30%</b>
<b>ARNTL2</b>	ή BMAL2- μεταγραφικός παράγοντας	<b>5000%</b>
<b>AANAT</b>	ακετυλοτρανσφεράση-σύνθεση μελατονίνης	<b>3000%</b>
c-MYC	μεταγραφικός παράγοντας	<b>85%</b>
k-RAS	κυτταροπλασματική GTPάση	<b>40%</b>
AGO2	δημιουργεί το σύμπλοκο RNA αποσιώπησης	<b>85%</b>
<b>eIF4E</b>	παράγοντας έναρξης της μετάφρασης	<b>130%</b>
<b>GLUT-1</b>	μεταφορέας γλυκόζης	<b>210%</b>
HIF-1a	μεταγραφικός παράγοντας	<b>60%</b>
BTG2	καταστολέας του CCR4	<b>50%</b>
CBP20	non-sense αποικοδόμηση mRNA	<b>85%</b>
CBP80	non-sense αποικοδόμηση mRNA	<b>80%</b>
PABPC	σταθεροποιεί το mRNA	<b>20%</b>
LSM	μάτισμα του pre-mRNA	<b>85%</b>
<b>H2A</b>	<b>ιδιοσυστατικό γονίδιο (ιστόνη)</b>	<b>100%</b>

ΜΕΤΑΒΟΛΗ %  
(Με την ιστόνη H2A ως εσωτερικό control)

\* Στην πρώτη στήλη του παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται οι εξεταζόμενοι παράγοντες. Στη δεύτερη στήλη παρουσιάζεται συνοπτικά η λειτουργία του κάθε παράγοντα. Ενώ στην τρίτη στήλη τα ποσοστά % των επιπέδων mRNA του κάθε παράγοντα σε σχέση με τα μη διαμολυσμένα κύτταρα, χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό control για κανονικοποίηση την ιστόνη H2A. Τα ποσοστά του πίνακα υπολογίσθηκαν βάσει τις τιμές  $-Rn'(T)$  που αντιστοιχούν στις κορυφές των ειδικών προϊόντων στα διαγράμματα αποδιάταξης σήματος φθορισμού. Αξίζει να σημειωθεί πως τα ποσοστά μεταβολής που υπολογίσθηκαν δεν συμπίπτουν πάντα και με τις μεταβολές στα αντίστοιχα relative quantity charts, καθώς αυτά συνυπολογίζουν τόσο τα ειδικά όσο και τα μη ειδικά ενισχυμένα προϊόντα. Για την εξαγωγή των σχετικών ποσοστών, λήφθηκαν υπόψιν εκτός από τις dissociation curves και οι εικόνες ηλεκτροφόρησης(όπου υπήρχαν), τα relative quantity charts και τα Ct's (*threshold cycles*) από την RT-PCR.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Όπως αναφέρθηκε, ο αριθμός των γνωστών αποαδενυλασών συνεχώς αυξάνεται. Η δράση τους όμως και ο μηχανισμός ρύθμισής τους παραμένει άγνωστος. Γεννάται λοιπόν το εξής ερώτημα: ποιο είναι το πλεονέκτημα από την ύπαρξη αυτής της τεράστιας ποικιλομορφίας αποαδενυλασών; Πιθανότα αυτό συμβαίνει για λόγους εξειδίκευσης. Οι αποδενυλάσες μπορεί να έχουν διακριτές ή/και επικαλυπτόμενες δράσεις επί συγκεκριμένων ομάδων mRNAs καθορίζοντας την τύχη τους (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Οι περισσότεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν εκτός από την PAN και την PARN, το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (Meyer et al., 2004). Μελετώντας την NOC που έχει ομολογία με την υπομονάδα CCR4 του συμπλόκου αυτού, θα έχει αποτέλεσμα όχι μόνο τον προσδιορισμό της λειτουργίας της ως κερκάδιο γονίδιο, αλλά ίσως μας δώσει νέα στοιχεία για τη λειτουργία του συμπλόκου CCR4-NOT. Ο κεντρικός ρόλος της NOC στην αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs, καθιστά την ταυτοποίηση των πιθανών mRNA-στόχων της ένα ερευνητικό πεδίο με πολλές προκλήσεις.

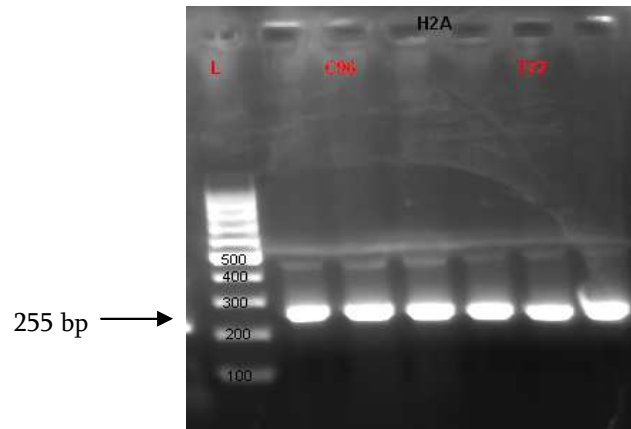
Για αυτό το σκοπό, στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε μια σειρά από παράγοντες (συμπεριλαμβανομένων άλλων σημαντικών αποδενυλασών, πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με το mRNA, παραγόντων-κλειδιά στο μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων, κερκάδιων γονιδίων, ογκογονιδίων κτλ.) και εξετάστηκε η επίδραση της αποσιώπησης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

Η εικόνα της ανοσοαποτύπωσης (**εικόνα 18**) αποδεικνύει σε πρώτη φάση την επιτυχία της *in vivo* αποσιώπησης της NOC σε επίπεδο πρωτεϊνών, ειδικότερα 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση. Η επιτυχία της σίγησης επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα της RT-PCR, τα οποία έδειξαν μείωση κατά 70% (κανονικοποίηση με την H2A ιστόνη) των επιπέδων του mRNA της NOC στα διαμολυσμένα κύτταρα (72 ωρών) σε σύγκριση πάντα με τα κύτταρα μάρτυρες

(control, επίσης 72 ωρών). Η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης εξασφαλίστηκε με τη χρήση λιποφεκταμίνης για τη διαμόλυνση των κυττάρων Hep2 καθώς δεν είναι τοξική για τα κύτταρα και παρέχει δυνατότητα επιτυχούς εισαγωγής γενετικού υλικού σε ποσοστά 90-95%. Επιπλέον, για να αποκλειστεί και το ενδεχόμενο τα αποτελέσματα των αντιδράσεων να είναι πλασματικά λόγω της επίδρασης της διαδικασίας της διαμόλυνσης στα επίπεδα mRNA των επιλεγμένων παραγόντων, πραγματοποιήθηκε και διαμόλυνση κυττάρων Hep2 με άδειο πλασμιδιακό φορέα pSUPER. Τα αποτελέσματα της RT-PCR έδειξαν πως η διαμόλυνση αυτή καθ' αυτή δεν επηρεάζει τα επίπεδα της NOC. Επίσης, για την επιτυχία της διαμόλυνσης κρίθηκε απαραίτητη η ταυτόχρονη χρήση και των πέντε διαθέσιμων shRNAs έναντι της NOC, τα οποία στοχεύουν σε διαφορετικές περιοχές κατά μήκος ολόκληρου του mRNA της. Τέλος, το ολικό RNA που απομονώθηκε τόσο από τα control όσο και από τα διαμολυσμένα κύτταρα, ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για την ακεραιότητά του, ενώ πριν την χρησιμοποίησή του ως υπόστρωμα στην RT-PCR προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή του.

Σε τεχνικές μελέτης γονιδιακής έκφρασης είναι αναγκαία η χρήση ενός ιδιοσυστατικού γονιδίου, το οποίο πιστεύεται πως έχει σταθερή έκφραση (*housekeeping gene*) για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων (Wong and Medrano, 2005). Ως εσωτερικό control για τη εξαγωγή των αποτελεσμάτων της RT-PCR της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκε το ιδιοσυστατικό γονίδιο της ιστόνης H2A, το οποίο παρέχει μέγιστη αξιοπιστία καθώς δεν αποτελεί στόχο της NOC. Το mRNA των ιστονών είναι το μοναδικό που δεν πολυαδενυλιώνεται, παρά μόνο το άκρο του έχει μία συντηρημένη δομή θηλειάς (*loop-structure*) στην 3'-UTR περιοχή, η οποία είναι απαραίτητη για την γρήγορη αποικοδόμηση του mRNA. Εφόσον το mRNA των ιστονών δεν αποαδενυλιώνεται δεν θα έπρεπε να επηρεάζεται από τις αλλαγές των επιπέδων των αποαδενυλασών. Επίσης, από την παρακάτω εικόνα φαίνεται πως η

αποσιώπηση δεν έχει επίδραση στα επίπεδα mRNA της H2A καθώς παραμένουν σταθερά στα διαμολυσμένα κύτταρα(εικόνα 48).



**Εικόνα 48.** Πήκτωμα αγαρόζης όπου απεικονίζονται τα επίπεδα του mRNA της ιστόνης H2A σε control κύτταρα των 96 ωρών και σε διαμολυσμένα κύτταρα των 72 ωρών όπου έχει γίνει αποσιώπηση της NOC μετά από RT-PCR

Από τον **πίνακα 7**, γίνεται σαφές ότι η αποσιώπηση της NOC έχει ως αποτέλεσμα μια πολύ μεγάλη αύξηση των παραγόντων AANAT και Arntl2, όπου τα επίπεδα των δύο παραγόντων είναι 30 φορές και 50 φορές πάνω από το κανονικό μετά από αποσιώπηση της NOC. Επίσης παρατηρείται σημαντική αύξηση στα επίπεδα mRNA του παράγοντα Glut-1 και του eIF4F, με μια μικρή αύξηση στα επίπεδα της Parola, ενώ τα επίπεδα έκφρασης των υπολοίπων παραγόντων μειώνονται σε πολύ μεγάλο βαθμό. Ένα mRNA του οποίου τα επίπεδα αυξάνονται λόγω της αποσιώπησης της αποαδενυλάσης NOC, πιθανότατα αποτελεί άμεσο στόχο της. Βέβαια, αυτό δεν μπορεί να ειπωθεί με απόλυτη σιγουριά και περαιτέρω διερεύνηση με επανάληψη του πειράματος και τη βοήθεια της τεχνικής των DNA μικροσυστοιχιών (*DNA microarrays*) μπορεί να αποσαφηνίσει αυτή την υπόθεση. Μπορούμε ωστόσο να εικάσουμε ότι μια αύξηση της τάξης του 110% του μεταφορέα της γλυκόζης Glut-1, κάθε άλλο παρά τυχαία μπορεί να είναι. Το γεγονός ότι ο μεταφορέας αυτός εκφράζεται κυρίως σε καρκινικά κύτταρα, ενώ παράλληλα έχουμε ισχυρή έκφραση και της NOC στα καρκινικά κύτταρα, μειώνει ακόμα περισσότερο το ενδεχόμενο της

τύχης. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με μελέτες που έγιναν και έδειξαν ότι στα NOC-knock out ποντίκια, η ευαισθησία προς τη γλυκόζη ήταν αυξημένη, επομένως η NOC εμπλέκεται στον μεταβολισμό της γλυκόζης και ίσως να εμπλέκεται με το να έχει στόχο τον μεταφορέα της γλυκόζης Glut-1 στα κύτταρα όπου αυτή εκφράζεται κανονικά(wild type cells) (Carla B. Green et al., 2007). Ωστόσο θα πρέπει να κρατήσουμε μια επιφυλακτικότητα για την περίπτωση όπου η παροχή θρεπτικού υλικού στα διαμολυσμένα κύτταρα επάγει και την έκφραση του μεταφορέα. Η αύξηση των επιπέδων του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4F κατά 30%, μας κάνει να σκεφτούμε ότι ο παράγοντας αυτός αποτελεί στόχο της NOC, η οποία αποαδενυλιώνοντάς τον, προσπαθεί να μειώσει την πιθανότητα μετάφρασης κάποιων γονιδίων. Η μικρή αύξηση της πολύ(A) πολυμεράσης Papolia μας κάνει να εικάζουμε ότι αποτελεί και αυτή στόχο της NOC, η οποία προσπαθεί να μειώσει το εύρος των αδενυλιωμένων mRNA μέσα στο κύτταρο με έναν τέτοιο έμμεσο τρόπο. Ίσως όμως μια τόσο μικρή αύξηση της τάξης του 10% να είναι τυχαία. Μια αύξηση όμως της τάξης του 3000%(30-fold) του παράγοντα AANAT δύσκολα μπορεί να θεωρηθεί τυχαία. Ο παράγοντας αυτός αποτελεί κικκάδιο γονίδιο το οποίο φαίνεται να είναι στόχος της NOC. Συγκεκριμένα, είναι μια ακετυλοτρανσφεράση η οποία είναι απαραίτητη για την σύνθεση της μελετονίνης ελέγχοντας την κικκάδια παραγωγή της στην επίφυση των σπονδυλωτών. Το ένζυμο αυτό είναι μέγιστης σημασίας καθώς η μελατονίνη είναι απαραίτητη για τη λειτουργία των κικκάδιων ρολογιών που ελέγχουν την δραστηριότητα και τον ύπνο. Μια τεράστια αύξηση παρατηρείται και στον παράγοντα Arntl2, τα επίπεδα του οποίου αυξάνονται 50 φορές από το κανονικό (50-fold). Ο Arntl2 αποτελεί κικκάδιο γονίδιο το οποίο λειτουργεί και ως μεταγραφικός παράγοντας ρυθμίζοντας την έκφραση πολλών άλλων κικκάδιων γονιδίων με την πρόσδεσή του στα στοιχεία E-box. Με προϋπόθεση λοιπόν ότι ο παράγοντας αυτός αποτελεί στόχο της NOC, αυτή θα μπορούσε να ρυθμίζει πληθώρα άλλων κικκάδιων γονιδίων που επάγονται από τον



μεταγραφικό παράγοντα Arntl2. Από την άλλη, όταν τα επίπεδα ενός mRNA ελαττώνονται, η κατάσταση περιπλέκεται. Πιθανότατα, τα συγκεκριμένα mRNAs υπόκεινται σε διαφορετικό μηχανισμό ελέγχου των επιπέδων τους μετά την αποσιώπηση της NOC, ο οποίος είτε σχετίζεται με την ενεργοποίηση άλλων αποαδενυλασών που καταστρέφουν δίχως ρύθμιση το mRNA-στόχο είτε την εμπλοκή εναλλακτικών παραγόντων αποικοδόμησης (π.χ miRNAs). Παρατηρούμε ότι μετά από αποσιώπηση της NOC, μειώνονται σημαντικά και τα επίπεδα των κirkάδιων γονιδίων Clock και PER3, όπου το Clock αποτελεί εν δυνάμει μεταγραφικό παράγοντα της NOC, λόγω της πρόσδεσής του στο E-box των κirkάδιων γονιδίων. Υποθέτουμε ότι όταν απουσιάζει η δράση της NOC, μπορούν και δρούν άλλες αποαδενυλάσες που αποτελούν στόχο της, οι οποίες σ' αυτή την περίπτωση έχουν ως στόχο τον παράγοντα Clock. Η λειτουργία του γονιδίου PER3 ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα.

Παρατηρούμε ότι υπάρχει αύξηση και στα επίπεδα της αποαδενυλάσης PARN - της τάξης του 10%. Επομένως η PARN μάλλον αποτελεί στόχο της NOC, γεγονός το οποίο έρχεται σε συμφωνία με αποτελέσματα άλλης μελέτης η οποία υποστηρίζει ότι οι δύο αυτές αποαδενυλάσες αποτελούν η μία στόχος της άλλης, με αποτέλεσμα η παρουσία της μίας σε ένα κυτταρικό διαμέρισμα να αποκλείει την ύπαρξη της άλλης (Baggs and Green, 2003).

Το πιο εντυπωσιακό όλων, είναι ότι η αποσιώπηση της NOC, προκαλεί την παράλληλη και σημαντική μείωση των επιπέδων όλων των άλλων αποαδενυλασών που εξετάστηκαν (PARNL, CNOT8, CNOT7, CNOT6, CNOT6L, PAN2, ANGEL2, 2'-PDE, CAF-1Z). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε κάποιον κοινό μηχανισμό ρύθμισης των εν λόγω αποαδενυλασών ο οποίος μπορεί να εκδηλώνεται αφ'ότου αποσιωπηθεί η NOC. Θα μπορούσε παραδείγματος χάρη να υπάρχουν κάποιοι καταστολείς των γονιδίων αυτών, οι οποίοι να αποτελούν στόχο της NOC, οπότε μετά από αποσιώπησή της, θα μπορούσαν να δράσουν κατασταλτικά στα γονίδια των αποαδενυλασών. Αυτή είναι ωστόσο μόνο μια εικασία. Αξίζει να επισημανθεί πως η αποσιώπηση της

NOC παράλληλα με την αύξηση της PARN προκάλεσε την μείωση PARNL, γεγονός που υπαινίσσεται την ενορχηστρωμένη δράση και απόκριση των δύο αυτών αποαδενυλασών.

Όλα τα παραπάνω μαρτυρούν μια ισχυρή αλληλεπίδραση ανάμεσα στις αποαδενυλάσες ενός κυττάρου, οι οποίες δρουν *ενορχηστρωμένα* σε κάθε συνθήκη που μπορεί να υποβληθεί το κύτταρο, προκειμένου να υπάρχει *λεπτή ρύθμιση* στην αποικοδόμηση των mRNAs.

Το πρότυπο έκφρασης που προέκυψε μετά την αποσιώπηση της NOC (πίνακας 7) συγκρίθηκε με το αντίστοιχο πρότυπο μετά την αποσιώπηση της υπομονάδας CNOT7 του συμπλέγματος CCR4-NOT αλλά και με το πρότυπο της PARN (η αποσιώπηση των δύο αποαδενυλασών πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια άλλων εργασιών) (πίνακας 8).

Πίνακας 8

Factor	NOC silencing	CNOT7 silencing	PARN silencing
CBP20	85*	44	21*
CBP80	80	42	23
eIF4E	130	28	22
PABPC	20	73	71
CNOT7	10	23	22
PARN	5	79	25
NOC	80	61	27
AGO2	85	98	101
MYC	85	35	37
RAS	40	120	110
H2A	100	100	100

\* % των επιπέδων mRNA σε σχέση με τα μη διαμολυσμένα κύτταρα (control)

Πίνακας 8: Συγκριτικός πίνακας επίδρασης αποσιώπησης της NOC, της PARN και αποσιώπησης της CNOT7 στα επίπεδα mRNA επιλεγμένων παραγόντων (τα ποσοστά του

πίνακα 8 προέχονται από περισσότερα δεδομένα και δεν υπολογίσθηκαν βάσει μόνο των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας).

Μια προσεκτική παρατήρηση του **πίνακα 8** αποκαλύπτει σημαντικές διαφορές όσον αφορά τις μεταβολές στα επίπεδα mRNA στους περισσότερους από τους επιλεγμένους παράγοντες (π.χ CBP80, CBP20 και RAS). Αυτές οι διαφορές στα πρότυπα έκφρασης που προκύπτουν μετά την αποσιώπηση της NOC, της PARN και της CNOT7 αποτελούν μια πρώτη ένδειξη για διαφορετικότητα στη ρύθμιση των εξεταζόμενων mRNAs και μια λιγότερο ασφαλή υπόθεση για την ύπαρξη εξειδίκευσης μεταξύ των δύο αποαδενυλασών ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου μια δεδομένη χρονική στιγμή.

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

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ambros et al. A uniform system for microRNA annotation *RNA* 9: 277-279 (2003).
- Anderson, J.S.J. & Parker, R. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* 17: 1497–1506 (1998).
- Åström, J., Åström, A. & Virtanen, A. Properties of a HeLa cell 3' exonuclease specific for degrading poly(A) tails of mammalian mRNA. *J. Biol. Chem.* 267: 18154–18159 (1992).
- Cao, D. & Parker, R. Computational modeling and experimental analysis of nonsense-mediated decay in yeast. *Cell* 113: 533–545 (2003).
- Carla B. Green and Joseph C. Besharse. Identification of a novel vertebrate circadian clock-regulated gene encoding the protein nocturnin (1996).
- Carla B. Green, Nicholas Douris, Shihoko Kojima, Carl A. Strayer, Joseph Fogerty, David Lourim, Susanna R. Keller, and Joseph C. Besharse. Loss of Nocturnin, a circadian deadenylase, confers resistance to hepatic steatosis and diet-induced obesity (2007).
- Carrington, J.C., and Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301:336–338 (2003).
- C. B. Green. Molecular Control of Xenopus Retinal Circadian Rhythms (2003).
- Chen, C.Y. et al. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451–464 (2001).
- Christopher M. Ciarleglio<sup>1</sup>, Kelli Ryckman, Stein V. Servick, Akiko Hida, Sam Robbins, Nancy Wells, Jennifer Hicks, Sydney A. Larson<sup>1</sup>, Joshua P. Wiedermann, Krista Carver, Nalo Hamilton, Kenneth K. Kidd, Judith R. Kidd, Jeffrey R. Smith, Jonathan Friedlaender, Douglas G. McMahon, Scott Williams, Marshall L. Summar, and Carl Hirschie Johnson. Genetic

Differences in Human Circadian Clock Genes Among Worldwide Populations (2008).

- Dehlin, E., Wormington, M., Körner, C.G. & Wahle, E. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.* 19: 1079–1086 (2000).
- Derek, M., Novina, C. & Sharp, P.A. Killing the messenger: short RNAs that silence expression. *Nature* Vol4 (2003).
- Dodson, R.E. & Shapiro, D.J. Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72: 129–164 (2002).
- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. & Sharp, P.A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 457–467 (2003).
- Eduardo Garbarino-Pico, Shuang Niu, Mark D. Rollag, Carl A. Strayer, Joseph C. Besharse and Carla B. Green. Immediate early response of the circadian polyA ribonuclease nocturnin to two extracellular stimuli (2007).
- Gorgoni, B. & Gray, N. The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective. *Brief Funct. Genomic Proteomic* 3: 125–141 (2004).
- Elbashir, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494–498 (2001).
- Felger, J.H. et al. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulation. *JB. Biol. Chem.* 28:2550–61 (1994).
- Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811 (1998).
- Frischmeyer, P.A. et al. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 295: 2258–2261 (2002).
- Gao, M., Wilusz, C.J., Peltz, S.W. & Wilusz, J. A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements *EMBO J.* 20: 1134–1143 (2001).
- Garneau, N., Wilusz, J. & Wilusz, C. The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 113–126 (2007).

- Goldstrohm & Wickens. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature Publishing Group* Vol 9:337-344 (2008).
- Grishok, A. et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106:23-34 (2001).
- Hammet, A., Pike, B.L. & Heierhorst, J. Posttranscriptional regulation of the *RAD5* DNA repair gene by the dun1 kinase and the Pan2-Pan3 poly(A)-nuclease complex contributes to survival of replication blocks. *J. Biol. Chem.* 277: 22469–22474 (2002).
- Hoof van, A. & Parker, R. The exosome: a proteasome for RNA? *Cell* (1999).
- van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C. & Parker, R. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* 295: 2262–2264 (2002).
- Hook, B., Goldstrohm, A. C., Seay, D. J. & Wickens, M. Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. *J. Biol. Chem.* 282: 15430–15438 (2007).
- Horrée et al. Hypoxia and angiogenesis in endometrioid endometrial. *Cellular Oncology IOS Press* 29:219-227 (2007).
- Julie E. Baggs and Carla B. Green. Nocturnin, a Deadenylase in *Xenopus laevis* Retina: A Mechanism for Posttranscriptional Control of Circadian-Related mRNA (2003),
- Kadyrova, L. Y., Habara, Y., Lee, T. H., & Wharton, R. P. Translational control of maternal cyclin B mRNA by nanos in the *Drosophila* germline. *Development* 134: 1519–1527 (2007).
- Katsutaka Oishi, Koyomi Miyazaki, Koji Kadota, Reiko Kikuno, Takahiro Nagase, Gen-ichi Atsumi, Naoki Ohkura, Takashi Azama, Miho Mesaki, Shima Yukimas, Hisato Kobayashi, Chisato Iitaka, Takashi Umehara, Masami Horikoshi, Takashi Kudo, Yoshihisa Shimizu, Masahiko Yano, Morito Monden, Kazuhiko Machida, Juzo Matsuda, Shuichi Horie, Takeshi Todo, and

Norio Ishida. Genome-wide Expression Analysis of Mouse Liver Reveals CLOCK-regulated Circadian Output Genes (2003).

- Kaygun & Marzluff. Translation termination is involved in histone mRNA degradation when DNA replication is inhibited. *Molecular and Cellular Biology* 25(16):6879-6888 (2005).
- Kiriakidou, M. et al. “Expanded RNA-binding activities of mammalian Argonaute 2” *Nucleic Acids Res* (2009)
- Kranenburg O. The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim. Biophys. Acta* 1756 2: 81–2 (2005).
- Lai, W.S., Kennington, E.A. & Blackshear, P.J. Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol. Cell. Biol.* 23: 3798–3812 (2003).
- Lejeune, F., Li, X. & Maquat, L.E. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell* 12: 675–687 (2003).
- Lewin B. GENES VIII, κεφάλαιο 5.
- Lippman & Martienssen. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431:364-370 (2004).
- Liu, H., Rodgers, N.D., Jiao, X. & Kiledjian, M. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J.* 21: 4699–4708 (2002).
- Mamane et al. Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation. *PLoS One* 21:242 (2007).
- Martínez, J., Ren, Y.-G., Nilsson, P., Ehrenberg, M. & Virtanen, A. The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation. *J. Biol. Chem.* 276: 27923–27929 (2001).
- Maquat, L.E. & Carmichael, G.G. Quality control of mRNA function. *Cell* 26: 173–176 (2000).

- Maquat et al. Evidence for a Pioneer Round of mRNA Translation: mRNAs Subject to Nonsense-Mediated Decay in Mammalian Cells Are Bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 106:607-617 (2001).
- Masanobu Kawaia, Carla B. Green, Beata Lecka-Czernikc, Nicholas Dourishb, Misty R. Gilbert, Shihoko Kojima, Cheryl Ackert-Bicknell, Neha Garge, Mark C. Horowitzf, Martin L. Adamoe, David R. Clemmonsg, and Clifford J. Rosen. A circadian-regulated gene, Nocturnin, promotes adipogenesis by stimulating PPAR- $\gamma$  nuclear translocation (2010).
- Meyer, S. , Temme, C. & Wahle, E. Messenger RNA Turnover in Eukaryotes: Pathways and Enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 39:197–216 (2004)
- Mitchell, P. & Tollervey, D. mRNA turnover. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 320–325 (2001).
- Mitchell, P. & Tollervey, D. An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol. Cell* (2003).
- Moore, M.J. Nuclear RNA turnover. *Cell* 108: 431–434 (2002).
- Muhlrads, D. & Parker, R. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370: 578–581 (1994).
- Mukherjee, D. et al. The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.* 21: 165–174 (2002).
- Mullen, et al. Cell-cycle regulation of histone mRNA degradation in mammalian cells: role of translation and oligouridylation. *Methods Enzymol.* 449:23-45 (2008).
- Nelson, D.M., Ye, X., Hall, C., Santos, H., Ma, T., Kao, G.D., Yen, T.J., Harper, J.W., Adams, P.D. Coupling of DNA synthesis and histone synthesis in S phase independent of cyclin/cdk2 activity. *Mol. Cell. Biol.* 22: 7459–72 (2002).
- Oridate et al. Growth inhibition of head and neck squamous cells by small interfering RNAs targeting eIF4E or cyclin D1 alone or combined with cisplatin. *Cancer Biol Ther* 4(3):318-23 (2005).



- Parker, R. & Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 121–127(2004).
- Rastogi et al. Glut-1 antibodies induce growth arrest and apoptosis in human cancer cell lines. *Cancer Letters*, 257: 24–251 (2007).
- Ren, Y.-G., Martínez, J. & Virtanen, A. Identification of the active site of poly(A)-specific ribonuclease by site-directed mutagenesis and Fe<sup>2+</sup>-mediated cleavage. *J. Biol. Chem.* 277: 5982–5987 (2002).
- Robert & Pelletier. Translation initiation: a critical signalling node in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 13(11):1279–93 (2009)
- Semenza. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3(10): 721–32 (2003).
- Shihoko Kojima, David Gatfield, Christine C. Esau and Carla B. Green. MicroRNA-122 Modulates the Rhythmic Expression Profile of the Circadian Deadenylase Nocturnin in Mouse Liver (2010).
- Takahashi, S., Araki, Y., Sakuno, T. & Katada, T. Interaction between Ski7p and Upf1p is required for nonsense-mediated 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.* 22: 3951–3959 (2003)
- Taxman et al. Criteria for effective design, construction, and gene knockdown by shRNA vectors. *BMC Biotechnology*, 6:7(2006).
- Tucker, M. & Parker, R. Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 571–595 (2000).
- Wang, Z. & Kiledjian, M. Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* 107: 751–762 (2001).
- Weihai & Parker. Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing. *Cell Biology* 12:346–350 (2000).
- Wong, L. & Medrano, J. F. Real-time PCR for mRNA quantification. *Biotechniques* 39 No1 (2005).
- Wu, R.S. & Bonner, W.M. Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell* 27 (2 Pt 1): 321–30 (1981).

- Xiaorong Liu and Carla B. Green. A Novel Promoter Element, Photoreceptor Conserved Element II, Directs Photoreceptor-specific Expression of Nocturnin in *Xenopus laevis* (2001).
- Xiaorong Liu and Carla B. Green. Circadian Regulation of *nocturnin* Transcription by Phosphorylated CREB in *Xenopus* Retinal Photoreceptor Cells (2002).
- Yang, X. Crystal structure of human BTG2 and mouse TIS21 involved in suppression of CAF1 deadenylase activity. *Nucleic Acids Res* (2009).
- Yunxia Wang, David L Osterbur, Pamela L Megaw, Gianluca Tosini, Chiaki Fukuhara, Carla B Green and Joseph C Besharse. Rhythmic expression of *Nocturnin* mRNA in multiple tissues of the mouse (2001).