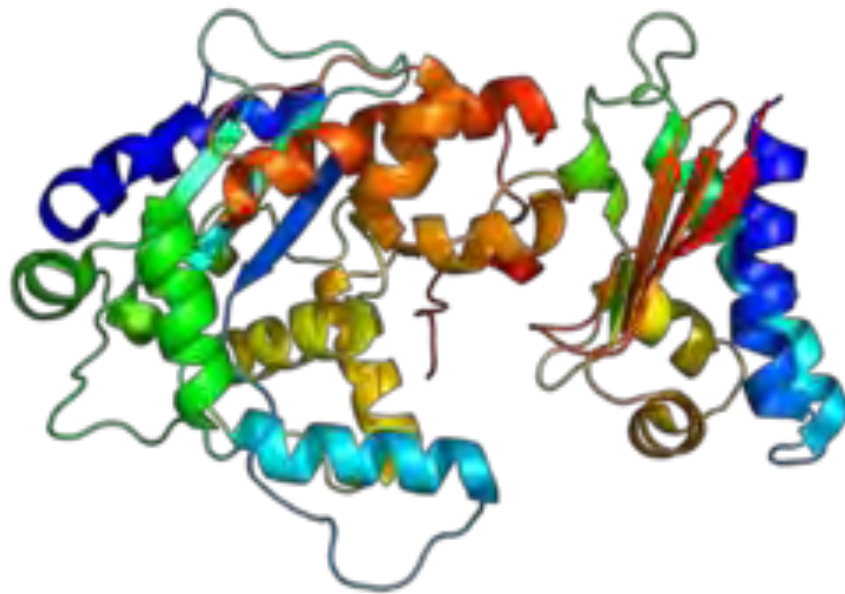




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΗΜΟΥΛΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ
ΤΗΣ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΗΣ CNOT7
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2011

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέπων καθηγητή τον κ. Μπαλατσό Νικόλαο.

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

- Νικόλαος Μπαλατσός, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Δημήτριος Λεωνίδας, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Σταματίνα Γιαννούλη, Λέκτορας επί συμβάσει (ΠΔ 407/80) Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ τον κύριο Μπαλατσό που με εμπιστεύτηκε για την ανάθεση αυτής της εργασίας, για τις γνώσεις που μου προσέφερε και για τις πολύτιμες συμβουλές του. Επίσης οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές του εργαστηρίου Λειτουργικής Βιοχημείας. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και στους φίλους μου που με στήριξαν και με υποστηρίζουν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1 ΣΥΝΘΕΣΗ MRNA
- 1.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ MRNA
 - 1.2.1 ΤΑ CIS ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ MRNA
 - 1.2.2 ΟΙ TRANS ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ MRNA
- 1.3 ΩΡΙΜΑΝΣΗ MRNA
- 1.4 ΜΑΤΙΣΜΑ (SPLICING)
 - 1.4.1 ΚΑΛΥΜΜΑ ΣΤΟ 5' ΑΚΡΟ (5'-CAP)
 - 1.4.2 ΠΟΛΥΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗ-ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΠΟΛΥ(A) ΟΥΡΑΣ
- 1.5 ΡΟΛΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ, ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ, ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΙΟΝΤΩΝ
- 1.6 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ MRNA
- 1.7 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΩΝ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ MRNAS
- 1.8 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗΣ CCR4-NOT
- 1.9 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ CNOT7
 - 1.9.1 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ
 - 1.9.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ CNOT7
- 1.10 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ MRNA ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ
 - 1.10.1 ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ – ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ
 - 1.10.2 ΠΩΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ, ΠΩΣ ΚΑΙ ΠΟΤΕ ΜΕΤΡΟΥΝΤΑΙ ΟΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ
 - 1.10.3 ΕΡΕΥΝΑ ΣΤΟ ΠΕΔΙΟ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ
 - 1.10.4 ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ
 - 1.10.5 ΠΟΛΥ(A) ΟΥΡΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ
 - 1.10.6 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ
 - 1.10.7 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ CNOT7 ΣΤΗΝ ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

2. ΣΚΟΠΟΣ

3. ΥΛΙΚΑ

3.1 ΧΗΜΙΚΑ

3.2 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

3.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

3.4 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

3.5 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.5.1 BRADFORD PROTEIN ASSAY

3.5.2 ΛΗΨΗ ΟΡΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ

3.5.3 ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ
ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΠΟ ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

3.5.4 TCA PRECIPITATION PROTOCOL

3.5.5 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ WESTERN BLOT

3.5.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA

3.5.7 PCR ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ (RT-PCR)

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ WESTERN BLOT

4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟ RT-PCR

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΙΚΟΝΕΣ – ΠΙΝΑΚΕΣ

Εικόνα εξωφύλλου: Δομή CNOT7 (www.wikipedia.org)

Εικόνα 1: Σύνθεση και μετάφραση του mRNA

(www.schenectady.k12.ny.us/putman/biology/data/translation/leuk.html)

Εικόνα 2: Δομή mRNA (www.molecularstation.com)

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

Εικόνα 4: Ωρίμανση mRNA (Alberts et al, 2002)

Εικόνα 5: Διεργασία του 3'-άκρου. (www.nobelprize.com)

Εικόνα 6: Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA (www.nature.com)

Πίνακας 1: Κατάταξη αποαδενυλασών (Goldstrohm et al., 2008)

Εικόνα 7: Σύμπλοκο CCR4-NOT (www.nature.com)

Εικόνα 8: Δομή CNOT7 (www.wikipedia.org)

Εικόνα 9: Κύτταρα λευχαιμίας (www.ygeiaonline.gr)

Εικόνα 10: Ανώμαλος πολλαπλασιασμός κυττάρων του αίματος (www.meds.com)

Εικόνα 11: Χρόνια λεμφολυτική λευχαιμία

Εικόνα 12: Οξεία λεμφολυτική λευχαιμία

Πίνακας 2 : Ταξινόμηση ριβονουκλεασών

(Holzmann et al., 2008; D'Alessio et al., 1997; Gerdes et al., 1995)

Εικόνα 13: Τροποποιημένος μετα-μεταγραφικός έλεγχος στον καρκίνο

Πίνακας 3: Προέλευση και αριθμός δειγμάτων

Εικόνα 14: Διαχωριστική φυγοκέντρηση για απομόνωση λεμφοκυττάρων

Εικόνα 15: Μεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή σε μεμβράνη PVDF
(www.peptide2.com)

Εικόνα 16: Απεικόνιση της μεθόδου western blot

Πίνακας 3: Απαιτούμενες ποσότητες αντιδραστηρίων για PCR-RT

Πίνακας 4: Συνθήκες αντίδρασης

Εικόνα 17: Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της CNOT7 και β-actin

Εικόνα 18: Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της CNOT7 και β-actin

Εικόνα 19: Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της CNOT7 και β-actin

Εικόνα 20: Διάγραμμα διάστασης mRNA CNOT7 (RT-PCR)

Εικόνα 21: Σχετικά επίπεδα έκφρασης (relative chart) mRNA της CNOT7

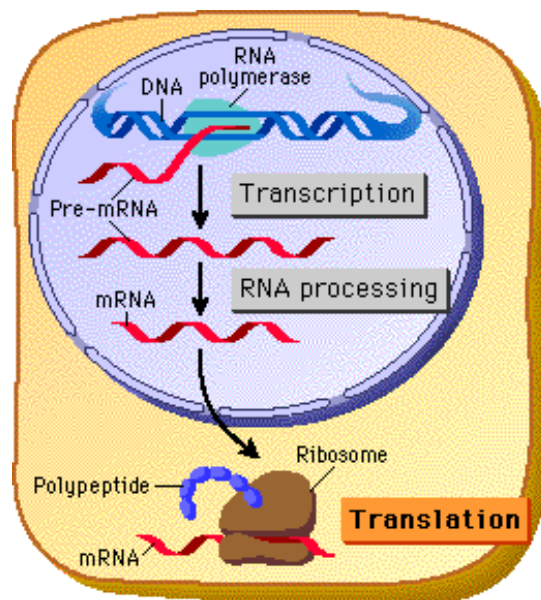
ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ρύθμιση της αποικοδόμησης του mRNA είναι ένα σημαντικό σημείο ελέγχου στην γονιδιακή έκφραση. Η σταθερότητα του mRNA ελέγχεται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δομικών του στοιχείων και των πρωτεϊνών που συνδέονται με αυτό. Σε συγκεκριμένες δυσλειτουργίες, όπως για παράδειγμα σε μία νεοπλασία, η απορρύθμιση της σταθερότητας του mRNA είναι δυνατόν να οδηγήσει σε μία μη φυσιολογική συνάθροιση των mRNAs καθώς και των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν. Οπότε, η ακριβής γονιδιακή έκφραση απαιτεί συνεχή έλεγχο των επιπέδων του mRNA. Από τα cis-στοιχεία του mRNA η πολυ(A) ουρά παίζει σπουδαίο ρόλο στον κύκλο ζωής των mRNAs. Η πολυ(A) ουρά συμμετέχει στις διαδικασίες ωρίμανσης του mRNA, στην έξοδό του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, στην έναρξη της μετάφρασης και από εκεί ξεκινά κατά κύριο λόγο η αποικοδόμησή τους. Η τελευταία διαδικασία γίνεται από ένζυμα γνωστά ως αποαδενυλάσες και συγκεκριμένα στον άνθρωπο συμμετέχουν τα συστατικά του συμπλόκου CCR4-NOT. Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην μελέτη των επιπέδων έκφρασης της CNOT7 σε ασθενείς με λευχαιμία. Αρχικά έγινε η ανίχνευση της CNOT7 σε ορούς ασθενών με λευχαιμίες και η διερεύνησή για το πώς μεταβάλλεται η έκφρασή της σε σχέση με τα μη παθολογικά άτομα. Τα αποτελέσματα υπήρξαν ενθαρρυντικά μιας και δείχτηκε πώς υπήρχε διαφοροποίηση στα επίπεδα έκφρασής της. Για να επαληθεύσουμε τα αποτελέσματα του Western blot μετρήσαμε τα επίπεδα του mRNA της CNOT7 με Real Time PCR. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης και της RT-PCR στα δείγματα έδειξαν διαφορετική έκφραση τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο mRNA.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΣΥΝΘΕΣΗ mRNA

Το mRNA (messenger RNA, mRNA), είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά της γενετικής πληροφορίας από το DNA στα ριβοσώματα για τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών στο κύτταρο. Το mRNA παράγεται με τη διαδικασία της μεταγραφής κατά την οποία χρησιμοποιεί ως εκμαγείο έναν από τους δύο κλώνους του DNA που φέρει την πληροφορία για την σύνθεση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης και στη συνέχεια. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το πρώιμο mRNA (pre-mRNA) υποβάλλεται σε μια πολύπλοκη διαδικασία ωρίμανσης πριν την εξοδό του στο κυτταρόπλασμα. Με την ολοκλήρωσή της, το ώριμο πλέον mRNA εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα, όπου ακολουθεί η βιοσύνθεση των πρωτεϊνών στα ριβοσώματα που μεταφράζουν την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του mRNA σε αλληλουχία αμινοξέων που συγκροτούν μια πρωτεΐνη. Δεν μεταφράζεται ολόκληρο το μόριο του mRNA αλλά κάθε mRNA διαθέτει μια κωδική περιοχή, η οποία αντιστοιχεί σε μια πρωτεϊνική αλληλουχία.



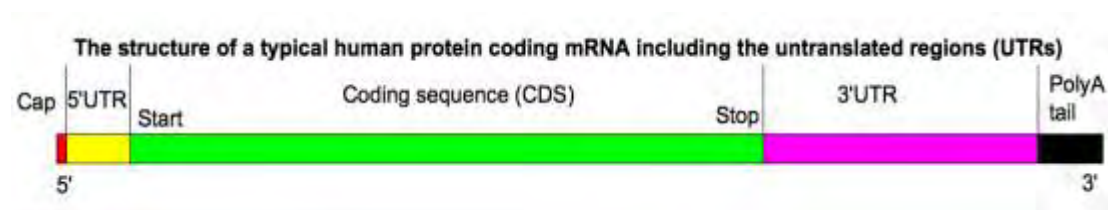
Εικόνα 1: Σύνθεση και μετάφραση του mRNA

1.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ mRNA

Η διάρκεια ζωής των ευκαρυωτικών mRNAs ποικίλει από μερικά λεπτά μέχρι και μήνες. Στις ζύμες για παράδειγμα το RNA διατηρείται σταθερό για από 2 λεπτά μέχρι και 15 ενώ στα κύτταρα των θηλαστικών από 15 λεπτά μέχρι 24 ώρες. Έχει παρατηρηθεί ότι τα μικρής διάρκειας mRNAs κωδικοποιούν για ρυθμιστικές πρωτεΐνες (π.χ ένζυμα). Η ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA, της μετάφρασης και της υποκυτταρικής του τοποθέτησης καθορίζουν το χρόνο, τον εντοπισμό και την ποσότητα της πρωτεΐνης που παράγεται κατά τη μετάφραση του mRNA.

Διάφορες παράμετροι όπως η πρωτογενής και η δευτερογενής δομή, ο ρυθμός μετάφρασης, η ενδοκυτταρική εντόπιση και άλλοι, μπορούν να επηρεάσουν την σταθερότητα του mRNA. Ακόμα και μικρές αλλαγές στην δομή μπορούν να επηρεάσουν την σταθερότητα του mRNA σε κάποιο βαθμό, ενώ αλλαγές σε κάποιες αλληλουχίες είναι δυνατόν να επηρεάσουν άμεσα τον χρόνο ημίσειας ζωής του mRNA. (Nelson *et al.*, 2008; Proudfoot *et al.*, 2002) Είναι σημαντικό ότι τα mRNAs περιέχουν δύο ή και περισσότερους καλά διαχωρισμένους παράγοντες σταθερότητας και κάθε παράγοντας είναι δυνατόν να ορίζει ένα ξεχωριστό μονοπάτι αποικοδόμησης ως ανταπόκριση σε κάποιο ρυθμιστικό παράγοντα.

Στην σταθερότητα του mRNA κύριο ρόλο παίζουν τα cis δραστικά στοιχεία και οι trans δραστικοί παράγοντες. (Ross *et al.*, 1995) Cis-στοιχείο, είναι μία περιοχή του DNA ή RNA που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που βρίσκονται στο ίδιο μόριο του DNA ή του RNA. Είναι συχνά θέσεις δέσμευσης για ένα ή περισσότερους trans-ενεργούς παράγοντες. Ένα cis-στοιχείο μπορεί εντοπιστεί στο άκρο 5' με τη κωδική αλληλουχία του γονιδίου που ελέγχει (π.χ. στην περιοχή του υποκινητή) σε ένα ιντρόνιο ή στο άκρο 3'. Αντιθέτως, τα trans-στοιχεία είναι διάχυτοι παράγοντες, συνήθως πρωτεΐνες, που μπορούν να τροποποιήσουν την έκφραση των γονιδίων μακριά από το γονίδιο που αρχικά μεταγράφηκε για να τους δημιουργήσει.



Εικόνα 2: Δομή mRNA

1.2.1 Τα cis στοιχεία της σταθερότητας του mRNA

Σε αυτά ανήκουν τα εξής:

- *5'-κάλυμμα (5- cap)*
- *πολυ(A) ουρά*
- *Κωδικές περιοχές του mRNA*

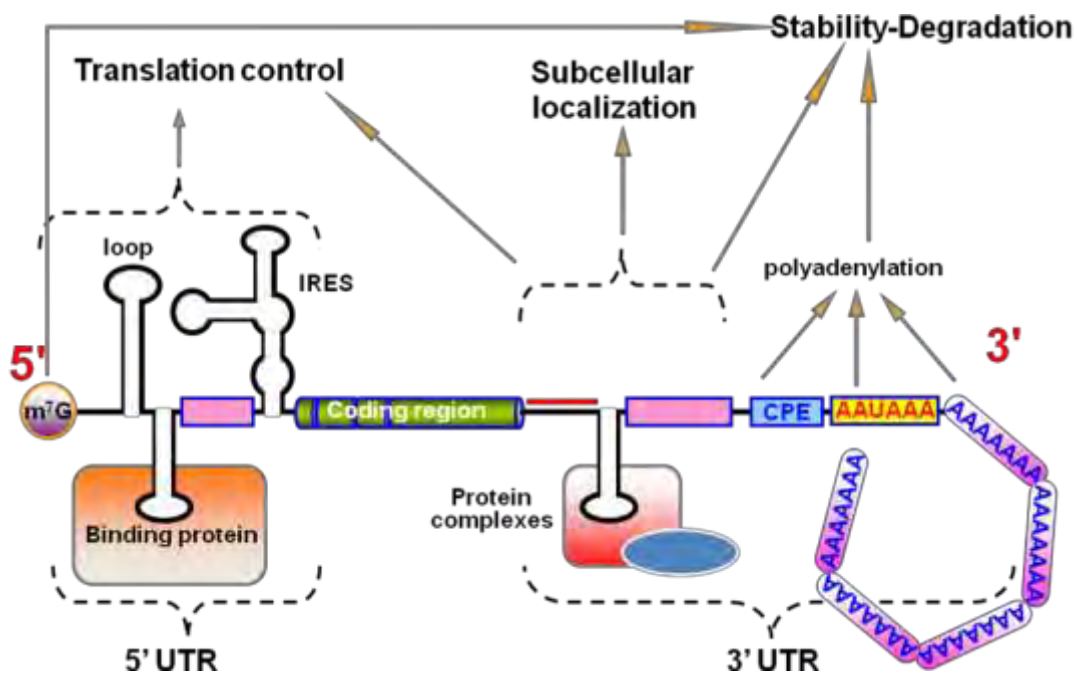
Οι κωδικές περιοχές, αποτελούνται από κωδικόνια τα οποία έχουν αποκωδικοποιηθεί και μεταφραστεί σε πρωτεΐνες από τα ριβοσώματα. Αυτές οι περιοχές σταθεροποιούνται περισσότερο με τη παρουσία εσωτερικών ζευγών βάσεων, εμποδίζοντας έτσι την αποσύνθεση τους. Μεταλλάξεις που λαμβάνουν χώρα στις κωδικές περιοχές αλλάζουν κατά πολύ το χρόνο ζωής ενός mRNA. Σε περιπτώσεις, όπου σε κάποια mRNAs απουσιάζει η περιοχή 3'UTR έχει βρεθεί ότι ο χρόνος ζωής τους μειώνεται σε δύο με μία ώρες σε σχέση με άλλα mRNAs, κάτι που οφείλεται σε κάποιο παράγοντα αστάθειας σε αυτές τις περιοχές. Επίσης, όταν το 5'τμήμα της κωδικής περιοχής, υφίσταται μια μη νοηματική μετάλλαξη πάλι έχουμε αποσταθεροποίηση του mRNA.

- *5'- και 3'-αμετάφραστες περιοχές (5'UTR και 3'UTR)*

Αμετάφραστες περιοχές (untranslated regions, UTRs), είναι τμήματα του mRNA που δεν μεταφράζονται και εντοπίζονται πριν από το κωδικόνιο έναρξης και μετά το κωδικόνιο τερματισμού. Μεταγράφονται μαζί με τη κωδική περιοχή και είναι εξώνια, αφού υπάρχουν και στο ώριμο RNA. Διάφοροι ρόλοι τους έχουν αποδοθεί συμπεριλαμβανομένων τη σταθερότητα του mRNA και την αποδοτικότητα της μετάφρασης. Η σταθερότητα των mRNAs μπορεί να ελέγχεται από αυτές τις περιοχές αυτές εξαιτίας της διαφορετικής συγγένειας των ριβονουκλεασών προς το RNA και κάποιων πρωτεϊνών που προωθούν ή αναστέλλουν την αποσύνθεση του RNA. (Abaza *et al.*, 2008) Η αποτελεσματικότητα της μετάφρασης, συμπεριλαμβάνοντας και την πλήρη αναστολή της, επηρεάζεται από τις UTRs. Επιπλέον, πρόσδεση πρωτεϊνών στις 3' ή 5'UTR, μπορεί να επηρεάσει τη μετάφραση με το να επιδρά στην ικανότητα του ριβοσώματος να προσδένει το mRNA.

Ακόμη, microRNAs δεσμευμένα στην 3'UTR είναι πιθανόν να προκαλέσουν διαφοροποιήσεις. (Ramsingh et al., 2010)

Συγκεκριμένα, στη περιοχή 3'UTR περιλαμβάνονται στοιχεία απόκρισης σε σίδηρο {Iron- responsive elements (IREs)}, παράγοντας αύξησης II που μοιάζει με την ινσουλίνη (IGFII), αλληλουχίες AU (AREs).



Εικόνα 3: Τα cis-δραστικά στοιχεία του mRNA. Με κόκκινο δηλώνεται η περιοχή όπου συνήθως δεσμεύονται τα miRNAs.

1.2.2 Οι trans παράγοντες σταθερότητας του mRNA

Μερικά mRNAs δεν έχουν σταθερούς χρόνους ζωής. Η σταθερότητά τους μεταβάλλεται σε ανταπόκριση με περιβαλλοντικούς παράγοντες. Μερικά mRNAs είναι περισσότερο ευαίσθητα στην επίθεση ριβονουκλεασών αλλά πιστεύεται ότι ενδοκυτταρικά ο χρόνος ζωής μερικών ή και των περισσότερων mRNAs προσδιορίζονται από άλλους παράγοντες. (Ross et al., 1995).

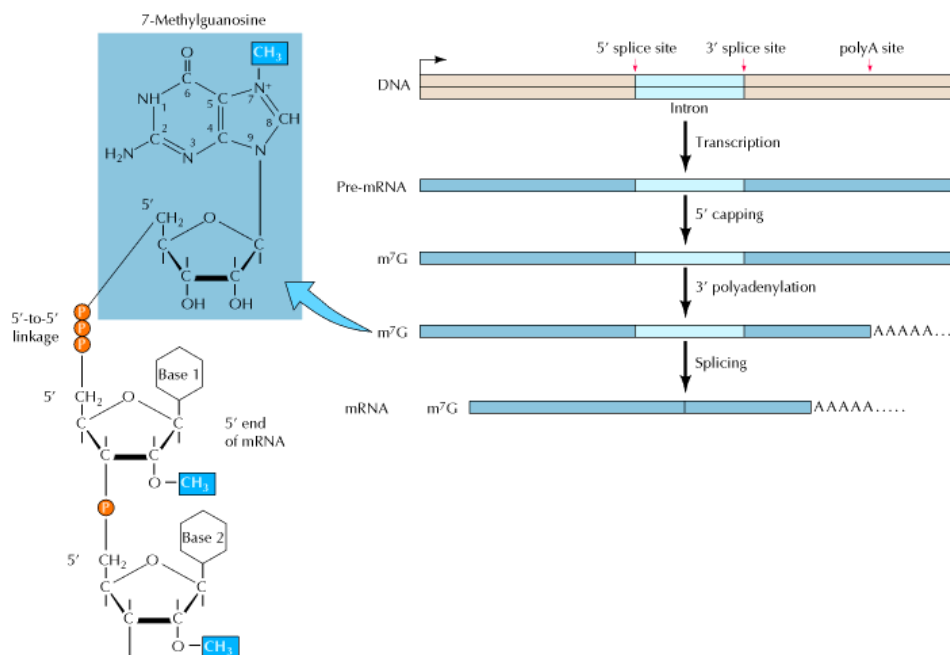
Θα πρέπει να αναφερθούν τρία γενικά χαρακτηριστικά. Πρώτον, μερικοί παράγοντες είναι δυνατόν να έχουν ένα αυθεντικά ρυθμιστικό ρόλο και δεν δρουν απλά ως σταθεροποιητές ή αποσταθεροποιητές.

Δεύτερον, μερικές συνδεδεμένες πρωτεΐνες φαίνεται να σταθεροποιούν το mRNA ενώ άλλες δρουν ως αποσταθεροποιητές. Τρίτον, η σταθερότητα ή η αστάθεια ενός mRNA μπορεί να είναι το αποτέλεσμα συνδυασμένων δράσεων διαφορετικών ρυθμιστικών παραγόντων.

1.3 ΩΡΙΜΑΝΣΗ mRNA

Σε αντίθεση με τα προκαρυωτικά κύτταρα, στα ευκαρυωτικά το pre-mRNA (πρόδρομο mRNA) υπόκειται σε μια διαδικασία ωρίμανσης έτσι ώστε να πάρει την τελική μορφή του mRNA και να περάσει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Η διαδικασία *απαρτίζεται* από τρία στάδια: η προσθήκη του καλύμματος (capping), το μάτισμα (splicing) και η πολυαδενυλίωση (polyadenylation).

Η πορεία του ευκαρυωτικού αγγελιοφόρου RNA περιλαμβάνει μετασχηματισμό του 5' άκρου με 7-μεθυλογουανοσίνη (m^7G), μετασχηματισμό του 3' άκρου μέσω πολυαδενυλίωσης και απομάκρυνση των ιντρονίων μέσω ματίσματος. Το 5' κάλυμμα σχηματίζεται με την προσθήκη ενός GTP σε αντίστροφη φορά από το 5' άκρο του mRNA, σχηματίζοντας ένα 5'-5' δεσμό. Το προστιθέμενο G τότε μεθυλιώνεται στην N-7 θέση, και μεθυλικές ομάδες προστίθενται στις ριβόζες του πρώτου ή και του δεύτερου νουκλεοτιδίου στο mRNA (Alberts et al., 2002).



Εικόνα 4: Ωρίμανση mRNA

1.4 ΜΑΤΙΣΜΑ (SPLICING)

Η διαδικασία του ματίσματος περιλαμβάνει την αποκοπή των εσωνίων και την συρραφή των εξωνίων. Τα εσώνια είναι τμήματα του DNA που δεν περιέχουν αλληλουχίες. Έτσι στο τελικό μετάγραφο απομένει το τμήμα του γονιδίου που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη. (*Proudfoot et al., 2002*)

1.4.1 Κάλυμμα στο 5' άκρο (5'-cap)

Προστίθεται ένα κάλυμμα 7μεθυλογουανιλικού νουκλεοτιδίου στο 5' άκρο του pre-mRNA μέσω μιας 5'-5'-τριφωσφορικής σύνδεσης που ξεκινά λίγο μετά τη μεταγραφή. Αυτή η τροποποίηση συμβάλλει πολύ στην σταθεροποίηση του mRNA καθώς το προστατεύει από ριβονουκλεάσες που δρουν στο 5' άκρο (εξωνουκλεάσες). Επίσης, τα καλυμμένα mRNAs μεταφράζονται πιο αποδοτικά, διότι αναγνωρίζονται από το ριβόσωμα για το σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης, ενισχύοντας έτσι την διαδικασία της μετάφρασης. (*Graff and Zimmer, 2003*).

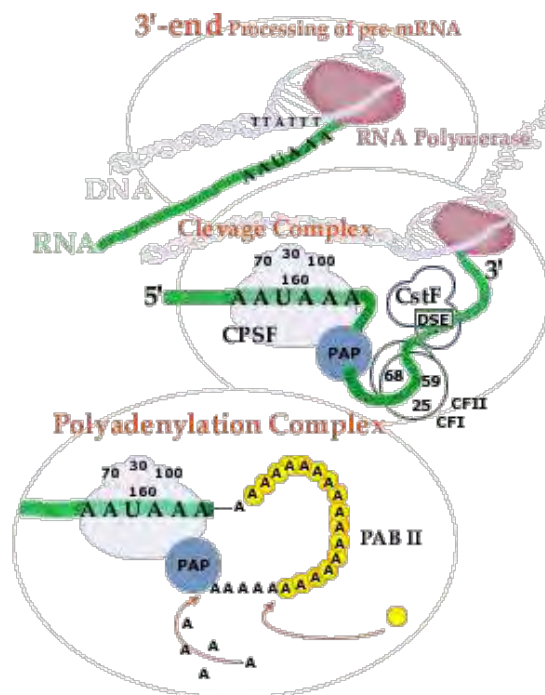
1.4.2 Πολυαδενυλίωση-προσθήκη Πολυ(A) ουράς

Στο 3'-άκρο των ευκαρυωτικών pre-mRNAs προστίθεται μια αλληλουχία 200-300 νουκλεοτιδίων αδενοσίνης γνωστή και ως πολυ(A)ουρά. Η προσθήκη της ουράς είναι το αποτέλεσμα της διεργασίας του 3'-άκρου (3'-end processing), μιας πολύπλοκης αντίδρασης δύο σταδίων που καταλύεται από το ένζυμο πολυ(A)-πολυμεράση (PAP). Αυτή η προσθήκη είναι πολύ σημαντική, αφού επηρεάζει τη μεταφορά του mRNA από το πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, στην επεξεργασία των pre-mRNAs μέσα στο πυρήνα και στη σταθερότητά τους. Η πολυαδενυλίωση, είναι μια διαδικασία ανεξάρτητη από το εκμαγείο του DNA, δηλαδή δεν υπάρχει αλληλουχία στο DNA που να κωδικοποιεί την προσθήκη 200-300 αδενοσινών με βάση το κανόνα συμπληρωματικότητας. Αντίθετα, το σήμα που ταυτοποιεί το σημείο πολυαδενυλίωσης, η αλληλουχία AAUAAA, βρίσκεται εντός του pre-mRNA και σηματοδοτεί την έναρξη της διαδικασίας της προσθήκης της ουράς.

Η πολυ(Α)ουρά λειτουργεί με δύο τρόπους:

α) Συνδέεται με διάφορους πρωτεϊνικούς παράγοντες και κυρίως με τη πολυ(Α)-προσδενόμενη πρωτεΐνη [PAPB, poly(A)-binding protein], προστατεύοντας έτσι την ουρά από την αποικοδόμηση αλλά και τη βιωσιμότητα του mRNA, αφού αλληλεπιδρά με διάφορους παράγοντες. Επίσης συμβάλλει στη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης. (*Melo et al., 2003*)

β) Σταδιακά το μήκος της μειώνεται και τα mRNAs με μικρή πολυ(Α)ουρά, μεταφράζονται λιγότερο. Η βράχυνση της ουράς κάτω από ένα συγκεκριμένο μήκος (περίπου 60 - 70 νουκλεοτίδια Α, στα θηλαστικά) σηματοδοτεί την έναρξη της αποικοδόμησης του mRNA. Έτσι, ο ρυθμός αποικοδόμησης της πολυ(Α)ουράς επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό και το χρόνο ημιζώης των mRNAs. (*Guhaniyogi et al., 2001*)



Εικόνα 5 : Διεργασία του 3'-άκρου. Τμήση και Πολυαδενυλίωση.

Φαίνονται οι διάφοροι παράγοντες που συμμετέχουν. DSE: Downstream Element, CPSF: Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor, CstF: Cleavage stimulation Factor, CF I και CF II: Cleavage Factors I και II, PAP: poly(A) polymerase, PAB: poly(A)-binding protein.

1.5 ΡΟΛΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ, ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ, ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΙΟΝΤΩΝ

Έχει παρατηρηθεί ότι διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες επιδρούν στη μεταγραφή του mRNA και κατ' επέκταση μεταβάλλουν και τη σταθερότητα του. Ένα τέτοιο παράδειγμα μπορεί να θεωρηθεί ένας παράγοντας διαφοροποίησης, ο οποίος σταθεροποιεί ή όχι ορισμένα mRNAs επηρεάζοντας στη συνέχεια το χρόνο ημίσειας ζωής τους και ευνοώντας την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Δηλαδή, δεν έχουμε άμεση επίδραση αυτού του παράγοντα αλλά έμμεση, αφού βλέπουμε τροποποίηση στο στάδιο διαφοροποίησης. Βέβαια, μέχρι τώρα δεν έχουν διερευνηθεί πλήρως οι μηχανισμοί δράσης τους όπως και εάν έχουν άμεσο ή έμμεσο ρόλο. Όσον αφορά τον ρόλο των πρωτεϊνών, είναι πιο ξεκάθαρος. Μπορούμε να διακρίνουμε τις εξής περιπτώσεις:

- Πρωτεΐνες που συνδέονται με περιοχές που περιέχουν AU λόγω υψηλής συγγένειας

Είναι μια ομάδα πρωτεϊνών, που μπορούν και προσδέονται σε mRNAs που περιέχουν αλληλουχίες πλούσιες σε AU ή πλούσιες σε U. Τις πρωτεΐνες αυτές μπορούμε να τις εντοπίσουμε στο κυτταρόπλασμα, μέσα στο πυρήνα ή ανάμεσα σε αυτά τα διαμερίσματα. Έχει βρεθεί ότι σταθεροποιούν mRNA μέσω της αλληλεπίδρασης τους με αλληλουχίες ARES. Αυτές οι αλληλουχίες εμπεριέχονται στην 3'UTR κάποιων ασταθών mRNAs που κωδικοποιούν παράγοντες μεταγραφής.

- Ρυθμιστική πρωτεΐνη σιδήρου (IRP)

Σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου, η IRP προσδέεται με ένα ή περισσότερα IRES του υποδοχέα της τρανσφερίνης, προστατεύοντας τα από την επίδραση ενδονουκλεασών. Αυτό, βέβαια αλλάζει όταν η συγκέντρωση του σιδήρου στον οργανισμό είναι αυξημένη, καθώς σε τέτοιες συνθήκες παρατηρείται μείωση της συγγένειας αυτής της πρωτεΐνης με τα IRES στοιχεία. (*Hentze and Kühn, 1996*).

- Πρωτεΐνες και Πολυ(A)ουρά

Η πολυ(A)ουρά σχετίζεται άμεσα με τη σταθερότητα του mRNA. Από διάφορες μελέτες, έχει αποδειχθεί ότι mRNAs που διαθέτουν πολυ(A)ουρά εμφανίζονται πιο σταθερά από άλλα mRNAs που έχουν αρχίσει να αποσυντίθεται, δηλαδή είναι αποαδενυλιωμένα. Γνωρίζουμε, ακόμη ότι το mRNA συμπλέκεται με τη πρωτεΐνη PABP προστατεύοντας το από την αποσύνθεση. Σε περίπτωση που δεν επιτυγχάνεται αυτή η αντίδραση, το mRNA οδηγείται σε γρήγορη αποικοδόμηση. (*Guhaniyogi et al., 2001*)

1.6 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ mRNA

Μέσα στο ίδιο κύτταρο, διαφορετικά mRNAs έχουν διαφορετικούς χρόνους ζωής, άρα και διαφορετική σταθερότητα. Στα βακτηριακά κύτταρα, διαφορετικά mRNAs μπορούν επιζήσουν από κάποια δευτερόλεπτα έως περισσότερο από μία ώρα, ενώ στα κύτταρα θηλαστικών, ο χρόνος ζωής των mRNAs ποικίλλει από αρκετά λεπτά μέχρι και μέρες. Όσο μεγαλύτερη είναι η σταθερότητα ενός mRNA, τόσο περισσότερη αναμένεται η ποσότητα πρωτεΐνης που θα μπορεί να παράγει. Η περιορισμένη διάρκεια ζωής του mRNA καθιστά ικανό ένα κύτταρο να αλλάζει τις συνθήκες της πρωτεϊνικής σύνθεσης γρήγορα, έτσι ώστε να μπορέσει να ανταποκριθεί στις διάφορες ανάγκες του. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι ιδιαίτερα κρίσιμες σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος, όπου mRNAs που δεν θα έπρεπε να εκφράζονται ή να εκφράζονται για λίγο χρόνο, έχουν αυξημένη επιβίωση και ως εκ τούτου παράγουν μεγάλες ποσότητες των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν, απορρυθμίζοντας έτσι κρίσιμες κυτταρικές διεργασίες.

Η αποαδενυλίωση, είναι το πρώτο στάδιο της αποικοδόμησης του mRNA κατά το οποίο έχουμε βράχυνση της πολυ(A)ουράς από μια κατηγορία ενζύμων, τις αποαδενυλάσες. (*Tucker et al., 2000; Mitchell et al., 2001*) Μόνο όταν έχει αποικοδομηθεί σε ένα συγκεκριμένο μήκος, όπου απομένουν περίπου 60-70 κατάλοιπα αδενοσίνης (από τα περίπου 300 του ολικού μήκους) αρχίζει η ολική αποικοδόμηση του mRNA. Η αποικοδόμηση μπορεί να γίνει είτε κατά την φορά 3' → 5', είτε και αντίθετα.

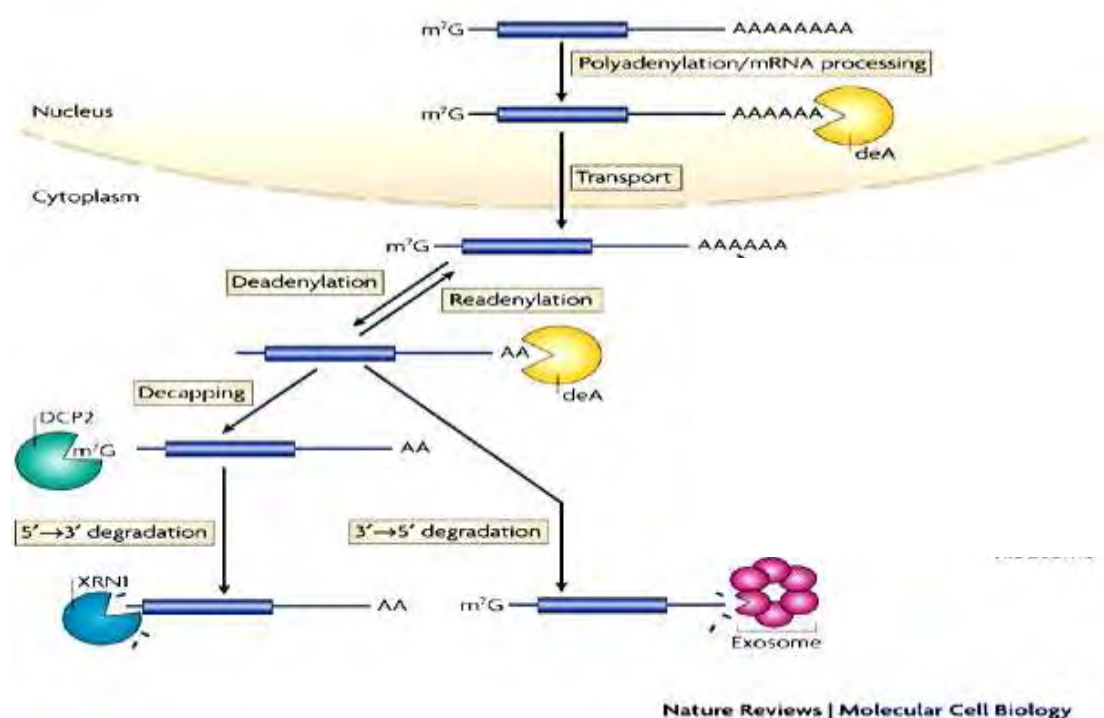
Στη συνέχεια, ένα ειδικό ένζυμο αποτελούμενο από δύο υπομονάδες (Dcp1p και Dcp2p), αφαιρεί το 5'cap, εκθέτοντας το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την Xrn1p, μια 5'→3'εξωνουκλεάση. Μετά την αποαδενυλίωση, το mRNA είναι δυνατόν αποικοδομηθεί μέσω ενός δεύτερου μονοπατιού, το οποίο έχει κατεύθυνση 3'→5' και πραγματοποιείται από ένα σύμπλοκο 3'→5' εξωνουκλεασών, το κυτταροπλασματικό εξώσωμα. (*Garneau et al., 2004; Anderson et al., 1998; Chen et al., 2001; Wang and Kiledjian, 2001; Mukherjee et al., 2002*)

Σε αυτή την περίπτωση, το ολιγονουκλεοτίδιο-καλύπτρα που απομένει υδρολύεται από το ένζυμο DcpS. (*Liu et al., 2002*) Επιπλέον, ορισμένα mRNAs αποικοδομούνται μετά από ενδονουκλεολυτική διάσπαση από ειδικές ενδονουκλεάσες ή εξαιτίας της δράσης των miRNAs (microRNA) και siRNAs (small interference RNA). (*Dodson et al., 2002*) Τα mRNAs που μεταφράζονται είναι συνδεδεμένα σε ριβοσώματα, τους παράγοντες έναρξης μεταγραφής (eIF-4E και eIF-4G) καθώς και την πρωτεΐνη PABP. Οι παράγοντες εκκίνησης παρεμποδίζουν το ένζυμο DCP2 που είναι υπεύθυνο για την αφαίρεση του 5'cap, ενώ η PABP εμποδίζει το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, προστατεύοντας το άκρο του μηνύματος. Η ισορροπία ανάμεσα στην μετάφραση και στην αποικοδόμηση αντικατοπτρίζεται στο μέγεθος και στην αφθονία των κυτταροπλασματικών δομών, γνωστά ως P-bodies. (*Parker et al., 2007*) Η πολυ(A) ουρά μικραίνει με τη δράση ειδικών εξωνουκλεασών, διαταράσσοντας έτσι το μήνυμα με συνέπεια να υποβάλλεται σε αποσύνθεση. Με αυτό τον τρόπο, τα ανενεργά μηνύματα καταστρέφονται πολύ γρήγορα σε αντίθεση με τα ενεργά, που παραμένουν άθικτα (mRNA turnover). Ο μηχανισμός παύσης της μεταγραφής και αποικοδόμησης του μηνύματος ακόμη δεν είναι ξεκάθαρος.

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

Εναλλακτικά, τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν εξειδικευμένα μονοπάτια αποικοδόμησης που έχουν την ικανότητα να εντοπίζουν και να αποικοδομούν ταχύτατα mRNAs που φέρουν βλάβες, όπως mRNA με πρώιμα κωδικόνια τερματισμού ή χωρίς καθόλου κωδικόνια τερματισμού. Τα κύτταρα σε μια διαδικασία που αναφέρεται και ως nonsense mediated decay (NMD) τα mRNA που περιέχουν ένα πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται.

Τέτοια μετάγραφα αποικοδομούνται είτε από αφαίρεση της καλύπτρας σε μία διαδικασία η οποία είναι ανεξάρτητη από την αποαδενλίωση, είτε από επιτάχυνση της αποαδενλίωσης και της 3'→5' αποικοδόμησης από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα. Παρομοίως, σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως nonstop decay (NSD) τα mRNA στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα. (Muhlard and Parker et al., 1994; Gao and Parker et al., 2003; Mitchell et al., 2003; Takahashi et al., 2003) Στα μονοπάτια αυτά συμμετέχουν τα ίδια ένζυμα που αποικοδομούν τα φυσιολογικά mRNAs.



Εικόνα 6: Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA

1.7 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΩΝ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ MRNAS.

Οι αποαδενυλάδες είναι εξωριβονουκλεάσες που υδρολύουν πολυ(A) ουρές με κατεύθυνση 3'→5' και η ενεργότητά τους εξαρτάται από ιόντα Mg(II). Όλες οι γνωστές αποαδενυλάδες ανήκουν σε δύο ομάδες : την ομάδα DEDD και την ομάδα EEP (πίνακας 1).

Ο ρόλος της πολυ(A) ουράς στην μετάφραση ανταγωνίζεται από ειδικά μονοπάτια καταστολής της μετάφρασης και της αποικοδόμησης του mRNA.

Οι αποαδενυλάσες κόβουν τις πολύ(A) ουρές και παίζουν ρόλο κλειδί στην διαδικασία της μεταφραστικής καταστολής. Στον πυρήνα η διαδικασία της αποαδενυλίωσης περιορίζει τις πολύ (A) ουρές των νεοσυντιθέμενων mRNAs στα κατάλληλα μήκη τους. Στο κυτταρόπλασμα όμως, η εκτεταμένη αποαδενυλίωση ενός mRNA σηματοδοτεί την έναρξη της αποικοδόμησης ή της καταστολής του. Η αποαδενυλίωση είναι συχνά ένα βήμα περιορισμού του ρυθμού αποικοδόμησης του mRNA και της μεταφραστικής καταστολής. Το μήκος της πολύ(A) ουράς ενός mRNA είναι δυνατόν να ποικίλλει κάτω από διαφορετικές συνθήκες ή ανάλογα με την φάση του κυτταρικού κύκλου.

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

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

Πίνακας 1 : Κατάταξη αποαδενυλασών

Group	Name	SC	CE	DM	XL	MM	HS
DEDD nucleases	CAF1Z	-	+	-	+	+	+
	CNOT7/POP2	+	+	+	+	+	+
	CNOT8	-	-	-	+	+	+
	PAN2	+	+	+	+	+	+
	PARN	-	+	-	+	+	+
EED nucleases	CNOT6/CCR4	+	+	+	+	+	+
	CNOT6L	-	-	-	-	+	+
	CCR4C/NOC	-	-	+	+	+	+
	2'PDE	-	+	+	+	+	+

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

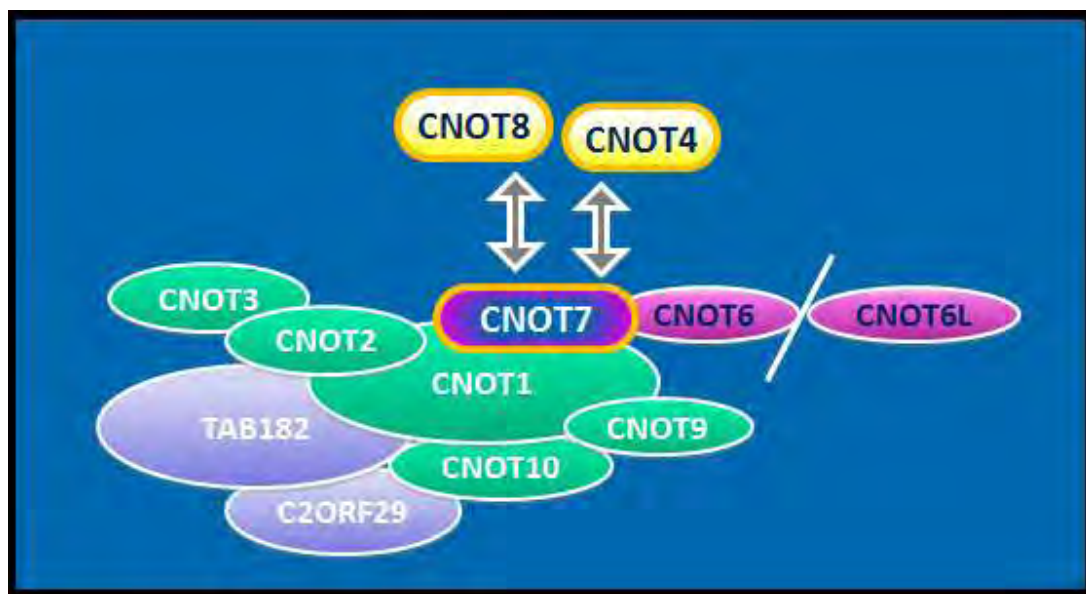
Η ενζυμική ενεργότητα αποαδενυλίωσης έχει δειχθεί πειραματικά (+), ή προβλεφθεί βάσει εργαλείων βιοπληροφορικής (+).

1.8 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗΣ

CCR4-NOT

Το εξελικτικά συντηρημένο σύμπλοκο CCR4-NOT είναι απαραίτητο σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες τόσο του πυρήνα όσο και του κυτταροπλάσματος. Είναι ένα ετερογενές και πολυλειτουργικό σύμπλοκο αφού περιλαμβάνει πρωτεϊνικές υπομονάδες οι οποίες εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην μεταγραφή και αποικοδόμηση του mRNA, στην επιτήρηση ανώμαλων mRNAs και στην μεταγωγή σήματος. Η CCR4 υπομονάδα 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. (*Meyer et al., 2004*)

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, η οποία επηρεάζει το μήκος των τελομερών και την μιτωτική άτρακτο και την C20RF29 με άγνωστη λειτουργία. Στον πυρήνα αυτό από πρωτεΐνες βρίσκονται συνδεδεμένες οι CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 οι οποίες είναι μεταβλητές υπομονάδες εντός του συμπλόκου. Είναι ενδιαφέρον να σημειώσουμε ότι οι αποαδενυλάσες CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 είναι σχετικά λιγότερο παρούσες στα κύτταρα σε σχέση με τις υπόλοιπες CNOT πρωτεΐνες. (*Lau et al., 2009*)



Εικόνα 7: Σταθερές και μεταβλητές υπομονάδες του CCR4-NOT

1.9 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ CNOT7

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την υπομονάδα CNOT7 εντοπίζεται στο όγδοο χρωμόσωμα στη θέση p22. Οι πρωτεΐνες CNOT7 και CNOT8 καθορίζουν το ανθρώπινο σύμπλοκο CCR4-NOT ενώ η CNOT6L και η CNOT6 σχηματίζουν σταθερότερα σύμπλοκα με την CNOT7 από ότι με την CNOT8. Οι δύο τελευταίες αποαδενυλάσες ανταγωνίζονται για τη θέση πρόσδεσης στην πρωτεΐνη CNOT1, που αποτελεί τον πυρήνα γύρω από τον οποίο δομείται το σύμπλοκο CCR4-NOT. Τα σύμπλοκα CCR4-NOT που έχουν την υπομονάδα CNOT7 έχει βρεθεί ότι μετακινούνται μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος. Επιπλέον πειράματα, έχουν δείξει την άμεση συμμετοχή της υπομονάδας CNOT7 στο μάτισμα του mRNA, στην μεταφορά και στον υποκυτταρικό εντοπισμό του. Η CNOT7 αποκωδώνει αποκλειστικά πολύ(A) ουρές.

1.9.1 Αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες

Οι αποαδενυλάσες CNOT6, CNOT7 και CNOT9 κάνουν αποτελεσματική τη μετάφραση που διαμεσολαβείται από διάφορους πυρηνικούς υποδοχείς (π.χ ER,RAR). Το σύμπλοκο CCR4-NOT, εκτός από το σπουδαίο ρόλο που έχει στην αποκωδόνιση του mRNA, διαμεσολαβεί στη μεταγραφική ενεργοποίηση αλλά και στην μεταγραφική καταστολή. Η αποαδενυλιωτική δραστηριότητα του συμπλόκου CCR4-NOT ενισχύεται μέσω αλληλεπιδράσεων με το σύμπλοκο αποσίωπησης RISC (miRNAs και πρωτεΐνες Argonautes). Οι αποαδενυλάσες CNOT7 και CNOT8 έχει βρεθεί να αλληλεπιδρούν με μέλη της BTG/Tob οικογένειας (anti-proliferate proteins) οι οποίες εμπλέκονται στην ανακύκλωση του mRNA και στην μεταγραφή.

1.9.2 Δομή και δραστηριότητα της CNOT7

Στα θηλαστικά, ένα ένζυμο που εκδηλώνει αποαδενυλιωτική ικανότητα είναι η CNOT7. Ανήκει στην υπεροικογένεια DEDD που το όνομά της ορίζεται από τα τέσσερα συντηρημένα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, 3 ασπαρτικά οξέα (D) και ένα γλουταμικό οξύ (E) τα οποία κατέχουν βασικό ρόλο στην κατάλυση (*Moser et al,1997; Zuo et al 2001*)

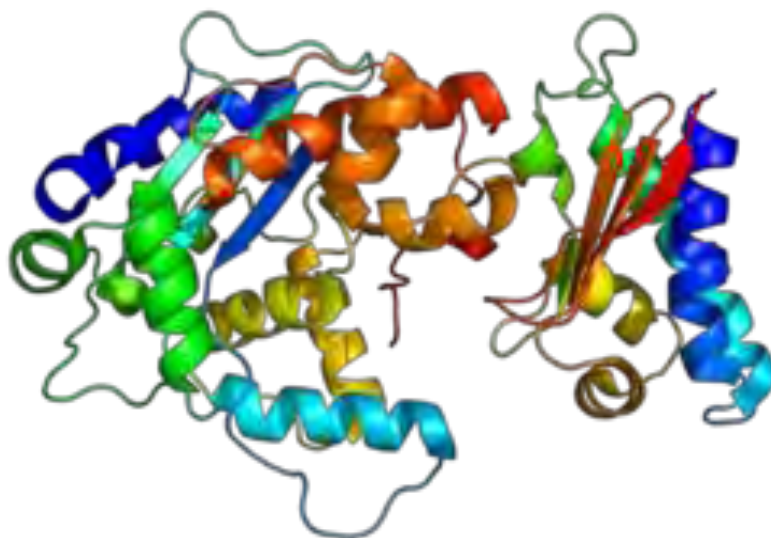
Στην οικογένεια των ριβονουκλεασών, RNase D ανήκουν η DNA πολυμεράση I, η DNA πολυμεράση III, η Pop2 της ζύμης και η e186 από τη

Escherichia coli. Είναι συντηρημένη σε πολλούς ευκαρυώτες αλλά απουσιάζει από το *Saccharomyces cerevisiae* και τη *Drosophilla melanogaster* (*Parker et al, 2004*)

Βιοχημικές μελέτες συνδυασμένες με μεταλλάξεις αποκάλυψαν ότι είναι μια ολιγομερής πολυ(A) εξωνουκλεάση που παράγει 5'AMP και είναι εξαρτώμενη από δισθενή ιόντα μετάλλων (*Korner et al, 1997*). Συγκεκριμένα, το ελάχιστο μήκος υποστρώματος που είναι ικανή να δεσμεύσει είναι δι- ή τρι-αδενοσίνη, ανάλογα με το ποιο μέταλλο βρίσκεται στο ενεργό κέντρο. Ένα ακόμα στοιχείο που τη χαρακτηρίζει είναι ότι προσδένεται στο 5' κάλυμμα του mRNA, κάτι που όχι μόνο διεγείρει την αποαδενυλίωση αλλά και ενισχύει τη διαδικασία της αντίδρασης (*Martinez et al, 2000*).

Η CNOT7 αποτελείται από α και β υπομονάδες. Η κεντρική κοιλότητα της CNOT7 εκτείνεται από τις β υπομονάδες προς το εσωτερικό τους και περιβάλλεται από α-έλικες και θηλιές. Το ενεργό κέντρο της είναι στο πιο εσωτερικό σημείο της κοιλότητας και αποτελείται από κατάλοιπα του C-τελικού άκρου της β2, α10 και α6 υπομονάδας. Η ιστιδίνη που είναι σημαντική για την κατάλυση βρίσκεται σε θηλιά που εκτείνεται από το N-τελικό άκρο της α10 υπομονάδας. (*Anette Thyssen Jonstrup et al, 2007*)

Η CNOT7 συνδέεται με ένα αντι-πολλαπλασιαστική πρωτεΐνη, που ρυθμίζει αρνητικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η δέσμευση των δύο πρωτεϊνών, που οδηγείται από φωσφορυλίωση της αντι-πολλαπλασιαστικής πρωτεΐνης, προκαλεί σηματοδοτικά γεγονότα στην κυτταρική διαίρεση, που οδηγούν σε αλλαγές στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που συνδέονται με την επικοινωνία των κυττάρων.



Εικόνα 8: Δομή CNOT7

1.10 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ MRNA ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ – ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

1.10.1 Καρκινικοί δείκτες – δείκτες κινδύνου

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

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

1.10.2 Πώς χρησιμοποιούνται, πώς και πότε μετρούνται οι καρκινικοί δείκτες

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

Τα επίπεδα καρκινικών δεικτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ελεγχθεί η απόκριση στην θεραπεία. Μια επιστροφή σε κανονικά επίπεδα υποδηλώνει ανταπόκριση στην θεραπεία ενώ μία αύξηση ότι δεν έχουμε ανταπόκριση. Οι καρκινικοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τον έλεγχο της υποτροπής.

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

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

Ένας ιδανικός δείκτης νεοπλασίας θα πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- 1) Να προσδιορίζεται εύκολα και με χαμηλό κόστος
- 2) Να είναι ειδικός για την υπό μελέτη κακοήθεια
- 3) Η μεταβολή της συγκέντρωσής του να συναρτάται με την μεταβολή του μεγέθους του όγκου ή/και τον βαθμό κακοήθειας.
- 4) Τα επίπεδα των συγκεντρώσεών του στο αίμα να μην υπόκειται σε έντονες μεταβολές ανεξάρτητες των μεταβολών του μεγέθους του όγκου.
- 5) Αν ο καρκινικός δείκτης ανευρίσκεται και στον ορό των φυσιολογικών ατόμων, η συγκέντρωσή του στον ορό των ασθενών να είναι στατιστικά σημαντικότερη.

1.10.3 Η έρευνα στο πεδίο των καρκινικών δεικτών

Οι επιστήμονες συνεχίζουν να μελετούν καρκινικούς δείκτες και τον πιθανό ρόλο τους στην πρώιμη διάγνωση και ανίχνευση του καρκίνου. Οι ερευνητές στρέφονται προς την πρωτεομική με την ελπίδα ανάπτυξης καλύτερων μεθόδων ανίχνευσης του καρκίνου.

Η πρωτεομική χρησιμοποιείται για την έρευνα πρωτεϊνών που είναι δυνατόν να χρησιμεύσουν ως δείκτες ασθένειας στα πρώιμα στάδια της ή στην πρόβλεψη της αποτελεσματικότητας μίας θεραπείας ή την πιθανότητα υποτροπής.

1.10.4 Λευχαιμία

Η λευχαιμία ανήκει σε μία ευρύτερη κατηγορία ασθενειών που ονομάζονται νεοπλάσματα του αιμοποιητικού συστήματος και αποτελεί την συχνότερη μορφή καρκίνου στα παιδιά. Είναι ο καρκίνος του ιστού που παράγει το αίμα, γι' αυτό και ονομάζεται και καρκίνος του αίματος. Προσβάλλει το αιμοποιητικό σύστημα και συγκεκριμένα το μυελό των οστών που αποτελείται από διάφορα κύτταρα, διαφορετικής λειτουργίας και σχήματος.

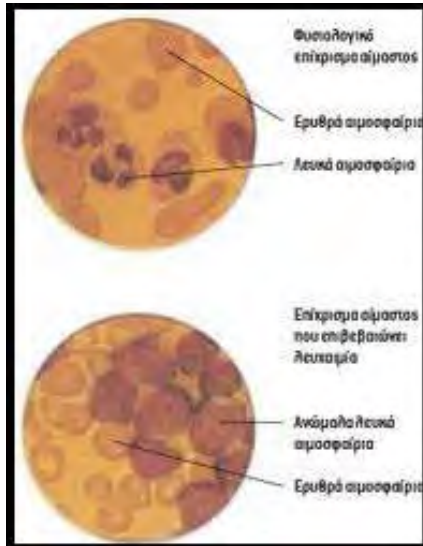
Σύμφωνα με τις διάφορες μορφές που παίρνουν κατά τη διάρκεια της εξέλιξης τους αυτά τα κύτταρα, μπορούμε να τα ομαδοποιήσουμε σε τρεις κατηγορίες(σειρές):

1. Ερυθρά σειρά: ανήκουν τα κύτταρα που εξελίσσονται στα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών στους ιστούς του σώματος καθώς και για την αποβολή άχρηστων προϊόντων μέσω των πνευμόνων.

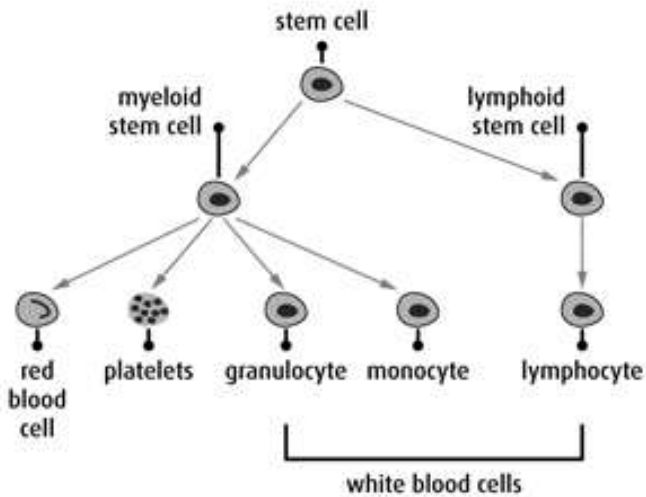
2. Κοκκιώδης σειρά: ανήκουν τα λευκά αιμοσφαίρια, τα οποία ευθύνονται για την άμυνα του οργανισμού.

3. Μεγακαρυοκυτταρική σειρά: ανήκουν τα κύτταρα που εξελίσσονται σε αιμοπετάλια, που παίζουν καθοριστικό πόλο στην πήξη του αίματος.

Όταν ένα άτομο πάσχει από λευχαιμία, ο μυελός των οστών αρχίζει να παράγει λευκά αιμοσφαίρια ,που για άγνωστο λόγο, δεν ωριμάζουν φυσιολογικά και συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται με ανεξέλεγκτο ρυθμό, χωρίς να μπορέσει ο οργανισμός να ρυθμίσει την παραγωγή τους. Ως αποτέλεσμα, τα παθολογικά λευκά αιμοσφαίρια υπερτερούν των φυσιολογικών και εξαιτίας του γεγονότος ότι δεν μπορούν να επιτελέσουν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες, εμφανίζονται τα πρώτα συμπτώματα της λευχαιμίας.



Εικόνα 9: Κύτταρα λευχαιμίας



Εικόνα 10: Ανώμαλος πολλαπλασιασμός κυττάρων του αίματος

Τα πιο συνηθισμένα είδη λευχαιμίας είναι η μυελογενής και η λεμφοκυτταρική που μπορεί να είναι οξείες ή χρόνιες. Οι όροι αυτοί καθορίζουν το τύπο των κυττάρων που εμπλέκονται στη κάθε περίπτωση.

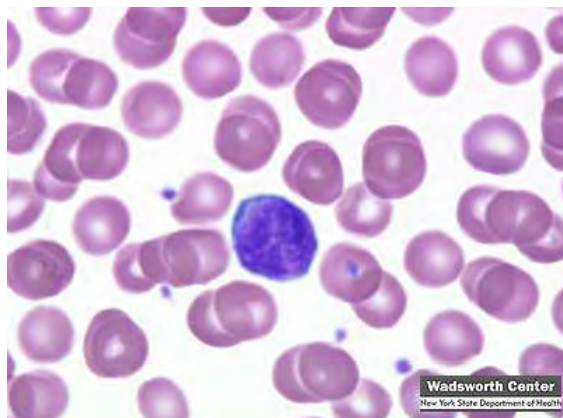
Η οξεία λευχαιμία είναι μία ραγδαία εξελισσόμενη ασθένεια που επηρεάζει κυρίως τα κύτταρα που δεν έχουν ακόμη διαφοροποιηθεί. Αυτά τα ανώριμα κύτταρα δεν μπορούν να επιτελέσουν τις κανονικές τους λειτουργίες.

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

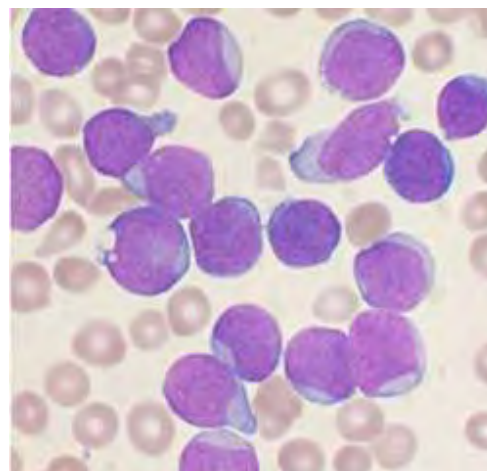
Συνεπώς, οι τέσσερις τύποι λευχαιμίας είναι οι εξής :

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

Παρακάτω παρατίθενται οι εικόνες λευχαιμικών κυττάρων από χρόνια και οξεία λεμφολυτική λευχαιμία, αντίστοιχα.



Εικόνα 11: Χρόνια λεμφολυτική λευχαιμία



Εικόνα 12: Οξεία λεμφολυτική λευχαιμία

Γνωρίζουμε μερικούς καρκινικούς δείκτες για την λευχαιμία όπως :

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

1.10.5 Πολύ(A) ουρά και καρκίνος

Η πολύ(A) ουρά είναι παρούσα στο 3' άκρο των mRNAs και επηρεάζει την κυτταροπλασματική σταθερότητα και μεταφρασιμότητα του mRNA. (*Sachs et al., 1993*) Ο σχηματισμός αυτής της δομής περιλαμβάνει την ενδονουκλεολυτική πέψη του πρόδρομου mRNA μαζί με την σύνθεση της πολύ(A) ουράς μία αντίδραση η οποία απαιτεί πολλούς πρωτεϊνικούς παράγοντες. Δύο πρωτεϊνικοί παράγοντες καθώς επίσης και η PAP συνδέονται στο σύμπλοκο και απαιτούνται για τον σχηματισμό της πολύ(A) ουράς.

Η PAP είναι ένα ένζυμο το οποίο εμπλέκεται στον σχηματισμό της πολύ(A) ουράς στο 3' άκρο του mRNA. Επίσης, υψηλά επίπεδα δραστηριότητας αυτού του ενζύμου σχετίζονται με γρήγορα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Η δραστηριότητα της PAP έχει αναφερθεί στο παρελθόν να έχει προγνωστική αξία τουλάχιστον στις χρόνιες λευχαιμίες. (*Pangalis et al.,1985; Sasaki,1990*)

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

Τα επίπεδα της δραστηριότητας της PAP στον καρκίνο του μαστού είναι δυνατόν να είναι μία παράμετρος που σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό και την δραστηριότητα μεταγραφής του καρκινικού κυττάρου. Υψηλά επίπεδα δραστηριότητας της PAP είναι δυνατόν να αντικατοπτρίζει απορρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης, το οποίο πιθανόν να συμβάλλει στον κακοήγη φαινότυπο του κυττάρου. Τα δεδομένα δείχνουν πως υψηλά επίπεδα της δραστηριότητας της PAP χαρακτηρίζουν έναν περισσότερο επιθετικό τύπο καρκίνου και η PAP έχει δειχθεί πως είναι ένας καινούργιος ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης. (*Scorilas et al., 2000*)

1.10.6 Ο ρόλος των ριβονουκλεασών στον καρκίνο

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

Οι διαδικασίες που αναφέρονται στην σταθερότητα του mRNA, στην μεταγραφική καταστολή και στην αποικοδόμηση μεταγράφων συνδέονται πολύπλοκα μεταξύ τους και μπορούν να επηρεαστούν από διάφορα cis-acting στοιχεία όπως η πολύ (A) ουρά, τα στοιχεία ARES (αλληλουχίες πλούσιες σε AU) και από trans-acting παράγοντες όπως τα μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs), RBPs (οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το RNA), οι ριβονουκλεάσες.

Τα miRNAs αποτελούνται από 20-25 νουκλεοτίδια που παράγονται από ενδονουκλεολυτική επεξεργασία με τον μηχανισμό της παρεμβολή του RNA. Συνδέονται στην 3' UTR (αμετάφραστη περιοχή) των mRNAs είτε για να αναστείλουν την μετάφρασή του είτε για να γίνει η έναρξη της αποικοδόμησής του.

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

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

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

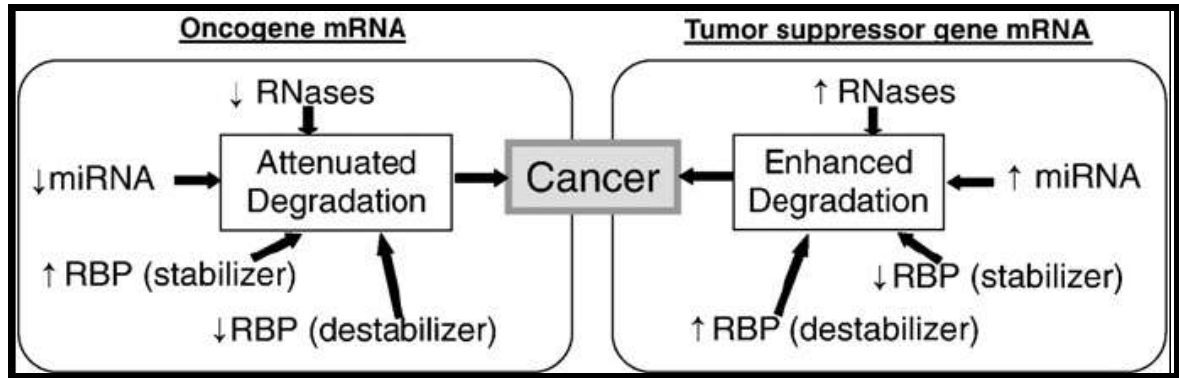
Τα κύτταρα έχουν μηχανισμούς για την αποτροπή μίας τέτοιας ανώμαλης αποικοδόμησης του mRNA ρυθμίζοντας αυτές τις ενδοριβονουκλεάσες. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι ορισμένες από αυτές ελέγχονται από κυτταρικά σήματα. Έτσι τα κύτταρα ανταποκρίνονται ικανοποιητικά σε αλλαγές του περιβάλλοντός τους ρυθμίζοντας την γονιδιακή έκφραση σε επίπεδο mRNA. (*Brennecke, et al.,2003; Cuellar,et al.,2005; Poy et al.,2004; Chen, et al.,2004; Wilfred, et al.,2007; Harfe et al.,2005; Lim et al.,2005; Lagos-Quintana, et al.,2003*).

Πίνακας 2 : Ταξινόμηση ριβονουκλεασών

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

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

Από την άλλη, αυξημένη αποικοδόμηση των ογκοκατασταλτικών mRNAs μπορεί επίσης να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου σε περίπτωση που έχουμε αυξημένη δραστικότητα ριβονουκλεασών ή των miRNAs που αναστέλλουν την μετάφρασή τους.



Εικόνα 13: Τροποποιημένος μετα-μεταγραφικός έλεγχος στον καρκίνο

1.10.7 Ο ρόλος της CNOT7 στην βιογένεση του καρκίνου

Οι ριβονουκλεάσες έχουν δείξει ότι ελέγχουν τα επίπεδα των mRNAs αλληλεπιδρώντας με τις πρωτεΐνες που συνδέονται με το RNA (RBPs, RNA binding proteins). Η CNOT7 είναι ένα τέτοιο παράδειγμα ριβονουκλεάσης. Η αποαδενυλιωτική δραστηριότητα της CNOT7 συνδυαζόμενη με αποσταθεροποιητικές δράσεις των πρωτεϊνών που συνδέονται με το mRNA (RBPs) μπορεί να δράσει ως καταστολέας όγκου προκαλώντας αποικοδόμηση των mRNAs που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η βράχυνση της πολυ(A) ουράς, είναι το πρώτο καθοριστικό βήμα στην αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs, καθορίζοντας το χρόνο ζωής τους και κατ' επέκταση τη ποσότητα τη παραγόμενης πρωτεΐνης. Σε μια παθολογική κατάσταση, όπως ο καρκίνος, παρατηρείται αυξημένη έκφραση παραγόντων, όπως προϊόντα ογκογονιδίων, γεγονός που σημαίνει πως τα mRNAs τους επιβιώνουν για περισσότερο χρόνο, ενώ αντίθετα άλλα παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση. Είναι προφανές ότι η αποικοδόμηση των mRNAs είναι καθοριστικής σημασίας για το κύτταρο. Αυτό επίσης θα μπορούσε να σημαίνει πως η λειτουργία κάποιων αποαδενυλασών δεν είναι ρυθμισμένη όπως στους φυσιολογικούς ιστούς με αποτέλεσμα ο χρόνος ζωής mRNAs ογκογονιδίων ή καταστολέων όγκων να αλλάζει με σοβαρό αντίκτυπο στο κύτταρο.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι η μελέτη των επιπέδων της αποαδενυλάσης CNO7 σε δείγματα ατόμων που πάσχουν από λευχαιμία και η σύγκρισή τους με μη παθολογικά δείγματα. Αρχικά επιχειρήθηκε η ανίχνευση της CNOT7 σε ορούς ασθενών με λευχαιμίες και στην συνέχεια σε δείγματα που είχαν ληφθεί από τον μυελό των οστών ασθενών με λευχαιμίες. Τα τελευταία χρόνια η διερεύνηση της βιολογικής σημασίας και του τρόπου λειτουργίας του συμπλόκου CCR4-NOT και των υπομονάδων του είναι απαραίτητη για τη κατανόηση των μηχανισμών που ρυθμίζουν την αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs και την πιθανή συσχέτισή τους με παθολογικές καταστάσεις.

3. ΥΛΙΚΑ

3.1 ΧΗΜΙΚΑ

- ❖ Acrylamide (Sigma)
 - APS (Ammonium Persulfate) (Sigma)
 - Αιθανόλη (Merck)
 - Ακετόνη (Merck)
 - Αμμωνία (Merck)
 - Αναστολείς πρωτεασών (complete) (Roche)

- ❖ Bioquant Protein (Merck)
 - Bis-acrylamide (Sigma)
 - Bromophenol blue (Research Organics)
 - 2-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel de Haen)
 - Βρωμιούχο αιθίδιο (Merck)

- ❖ Γλυκερόλη (Panreac)
 - Γλυκίνη (AppliChem)
 - Full Range Rainbow MW Markers (Amersham)

- ❖ Ισοπροπανόλη (Scharlau)
 - Μεθανόλη (Merck)

- ❖ HCl (Merck)
 - KCl (Merck)
 - KH₂PO₄ (Merck)
 - NaH₂PO₄ (Merck)
 - NaCl (Panreac)
 - NaOH (Merck)
 - Ponceau Red (Sigma)
 - SDS (Sodium dodecyl sulphate) (Sigma)
 - Skimmed milk (Scharlau)
 - TCA (Fluka)
 - Temed (ResearchOrganics)
 - Tween 20 (Euroclone)

3.2 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Anti-CNOT7 (CCR4-NOT)	Aviva Systems Biology
Anti-Actin	Aviva Systems Biology
BSA Fraction V	Merck
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Chemicon
Protease Inhibitors	Roche

3.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

1. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

- 30% bis/acrylamide (29:1 / acrylamide:bis-acrylamide) σε ddH₂O
- 10% SDS
- Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl pH 8.8 1M
- Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl pH 6.8 1M
- Ρυθμιστικό Διάλυμα 10x pH 8.3: Tris-base 1,5%, Γλυκίνη 7,2%, SDS 0,5%
- Loading Buffer (1M Tris pH 6.8, 10% glycerol, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% bromophenol blue)

Οι αναλογίες των παραπάνω διαλυμάτων καθορίζονται κάθε φορά από την επιθυμητή περιεκτικότητα σε πολυακρυλαμίδιο και την χωρητικότητα της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια, προσθέτονται και οι καταλύτες TEMED και 10% APS.

2. 30% Acrylamide-Bis (100ml)

30gr acrylamide
1gr bis
100ml dH₂O

3. RUNNING BUFFER 10X (500ml)

72gr γλυκίνη 1,92M M.B= 75,04
15gr TRIS 0,25M M.B=121,1
5gr SDS 0,035M M.B= 288,4

**4. ΔΙΑΛΥΜΑ ΓΙΑ TRANSFER GEL ΠΟΛΥΑΚΡΙΑΜΙΔΙΟΥ ΣΕ PVDF
MEMBRANE, TRANSFER BUFFER**

Tris 48mM

Γλυκίνη 39mM

SDS 1,3mM

Μεθανόλη 20%

5. PONCEAU RED

1) 0,1% ponceau w/v σε 5% οξικό οξύ ή

2) 2% ponceau w/v σε 30% TCA και 30% sulfosalicylic acid

6. PBS 1x

137mM NaCl

2.7mM KCl

4.3mM Na₂HPO₄

1.47mM KH₂PO₄

7. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ DETECTION

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

**8. ΔΙΑΛΥΜΑ ΓΙΑ ΑΠΟΣΥΝΔΕΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ PVDF
MEMBRANE, STRIPPING BUFFER**

100mM 2-μερκαπτοαιθανόλη

2% SDS

62.5mM Tris-HCl pH 6.7

9. LYSIS BUFFER

600Mm KCl

20mM Tris-HCl pH=7,8

20% γλυκερόλη

4% αναστολείς πρωτεασών

3.4 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

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

Πίνακας 3 : Προέλευση και αριθμός δειγμάτων

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ	ΑΡΙΘΜΟΣ		ΣΥΝΟΛΟ
	ΟΡΟΙ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ	ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΥΕΛΟΣ	
ΟΞΕΙΑ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	6	1	7
ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	3	1	4
ΧΡΟΝΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	2	1	3
ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	5	2	7
ΜΑΡΤΥΡΕΣ	2	2	4
<i>ΣΥΝΟΛΟ</i>			25

3.5 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.5.1. Bradford Protein Assay

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

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

Πρότυπη καμπύλη

Μπορεί να πραγματοποιηθεί σε τρεις διαφορετικές διατάξεις, την ανάλυση σε κυψελίδες των 5mL και 1mL, και την ανάλυση σε μικροπλάκα των 250 μ L. Το εύρος της γραμμικότητας των μεθόδων με χρήση BSA είναι 125-1000 $\mu\text{g/mL}$.

Ανακινούμε τη χρωστική μερικές φορές πριν τη χρήση.

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

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

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

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

Κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη σε γραφική παράσταση με τις τιμές των απορροφήσεων στον άξονα ψ και τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων ($\mu\text{g/mL}$) στον άξονα χ . Προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση των αγνώστων δειγμάτων χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη.

Αν τα δείγματα έχουν αραιωθεί υπολογίζουμε την τελική συγκέντρωση πολλαπλασιάζοντας με τον συντελεστή αραιώσης.

Απορρίπτουμε τιμές που ξεφεύγουν της γραμμικότητας της καμπύλης για μεγαλύτερη ακρίβεια.

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

- Λήψη ορού

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

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

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

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

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

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

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

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

- Υλικά και όργανα

- 1) διάλυμα Ficol-Isopaque (ή Ficoll-Hypaque, Lymphoprep, Histopaque)
- 2) αίμα με αντιπηκτικό (ηπαρίνη ή EDTA)
- 3) σωλήνες φυγοκέντρου 15 ml (πλαστικοί, κωνικοί), φυγόκεντρος
- 4) Hanks. balanced salt solution (HBSS), θρεπτικό μέσο RPMI
- 5) Πιπέτες Pasteur, πιπέτες Gilson και tips
- 6) αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) και καλυπτρίδες
- 7) φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας
- 8) διάλυμα Tuerk (95 ml dH₂O, 3 ml οξικό οξύ, 4-5 σταγόνες Giemsa)
- 9) χρωστική Trypanblue (άλας νατρίου 0.4% (w/v) σε φυσιολογικό ορό)

- Μέθοδος

1. Αραιώνουμε το αίμα σε ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων (π.χ. Hanks. balanced salt solution, HBSS) ή σε θρεπτικό μέσο 1:1.
2. Προσθέτουμε 5 ml Ficoll-Isopaque(ή άλλο παρόμοιο υλικό) σε κωνικό σωλήνα φυγοκέντρου (ειδικό βάρος φικόλης= 1.078).
3. Προσεκτικά επιστοιβάζουμε το αραιωμένο αίμα (περίπου 10 ml) επάνω στο στρώμα της Ficoll-Isopaque.
4. Φυγοκέντρηση (1700 RPM, 25 min, 20 °C).
5. Παρατηρούμε το διαχωρισμό των κυττάρων σε ζώνες. Με πιπέτα Pasteur απομακρύνουμε το επάνω στρώμα χωρίς να πειράξουμε το στρώμα των λεμφοκυττάρων. Το πάνω στρώμα περιέχει τα αιμοπετάλια και το πλάσμα.
6. Με άλλη πιπέτα Pasteur μεταφέρουμε το στρώμα των λεμφοκυττάρων σε σωλήνα φυγοκέντρου.(Το στρώμα της φικόλης περιέχει τα κοκκιοκύτταρα και στον πυθμένα βρίσκονται τα ερυθρά και νεκρά κύτταρα).
7. Προσθέτουμε στο στρώμα των λεμφοκυττάρων 15 ml Hanks. balanced salt solution (HBSS) (ή θρεπτικό μέσο που περιέχει 5-10% ορό μοσχारीού) και ανακατεύουμε με πιπέτα.
8. Φυγοκέντρηση(1400 RPM, 10 min, 20 °C).
9. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο με πιπέτα.
10. Προσθέτουμε πάλι 10 ml HBSS (ή θρεπτικό μέσο) και ανακατεύουμε προσεκτικά.
11. Φυγοκέντρηση(1400 RPM, 10 min, 20 °C).
12. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αιωρούμε τα λεμφοκύτταρα σε 1 ml θρεπτικό μέσο
13. Παρατήρηση και μέτρηση κυττάρων στο μικροσκόπιο.
14. Αποθήκευση των κυττάρων σε 1 ml freezing medium στους -80 °C

- Μέτρηση κυττάρων

1. Για την παρατήρηση και μέτρηση των μονοπύρηνων κυττάρων που συλλέξαμε στο θρεπτικό μέσο, αραιώνουμε τα κύτταρα ως εξής:

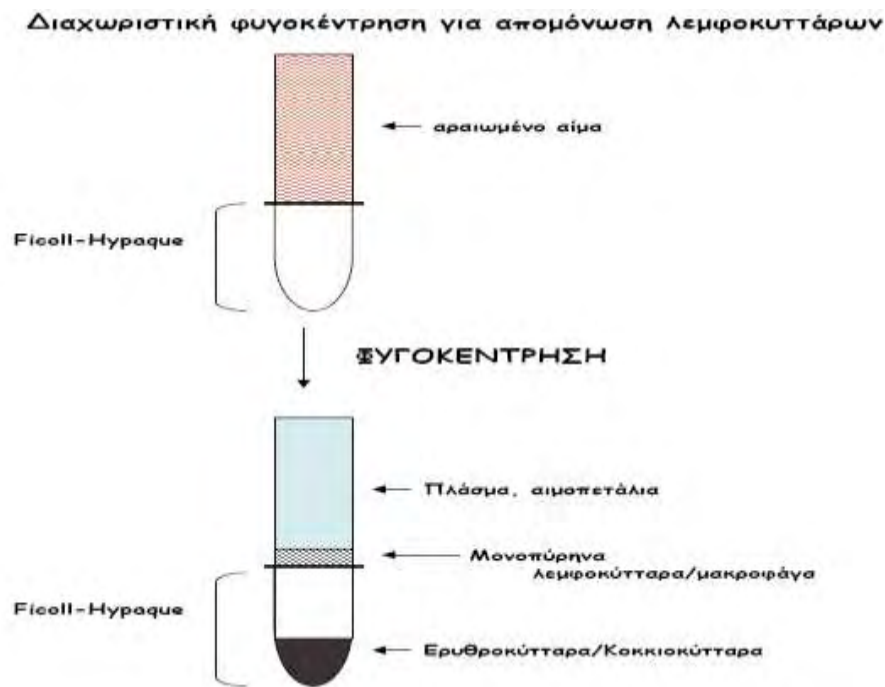
A. 20 μl αιώρημα κυττάρων και 380 μl διάλυμα Tuerk (παρατήρηση κυττάρων)

B. 200μl αιώρημα κυττάρων, 300 μl HBSS και 500μl διάλυμα Trypanblue (αραίωση 1:5) (το Trypanblue χρωματίζει μπλε τα νεκρά κύτταρα)

2. Ανακατεύουμε προσεκτικά και περιμένουμε 5-10 min.

3. Τοποθετούμε 1 σταγόνα στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, στην ειδική εσοχή κάτω από την καλυπτρίδα.

4. Μετράμε τα κύτταρα



Εικόνα 14: Διαχωριστική φυγοκέντρηση για απομόνωση λεμφοκυττάρων

3.5.3 Λύση των κυττάρων των δειγμάτων με κύτταρα από μυελό των οστών

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

3.5.4 TCA precipitation protocol (κατακρήμνιση πρωτεΐνης)

Αντιδραστήρια:

- TCA 100%
- TCA 2,5%
- DOC 0,15%
- Ακετόνη
- Loading Buffer
- Αμμωνία (ατμοί) ή Tris

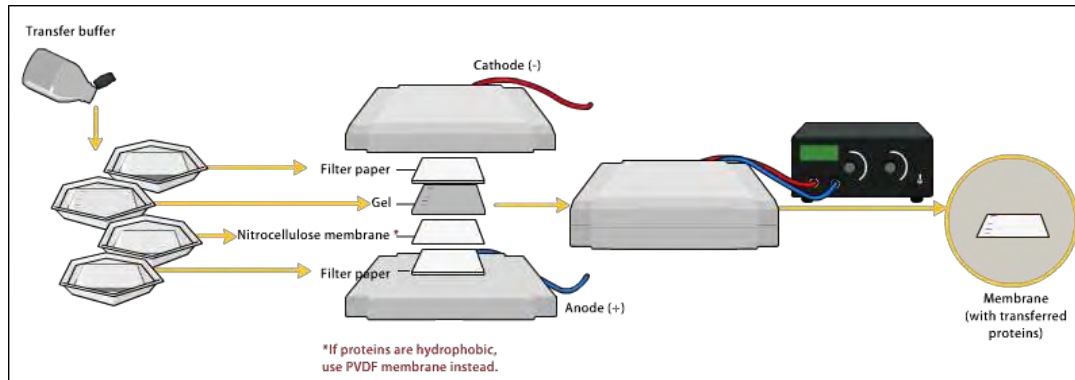
Τα βήματα της μεθόδου είναι τα εξής : (τα δείγματά σε πάγο)

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

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

3.5.5 Ανίχνευση πρωτεϊνών με Western blot

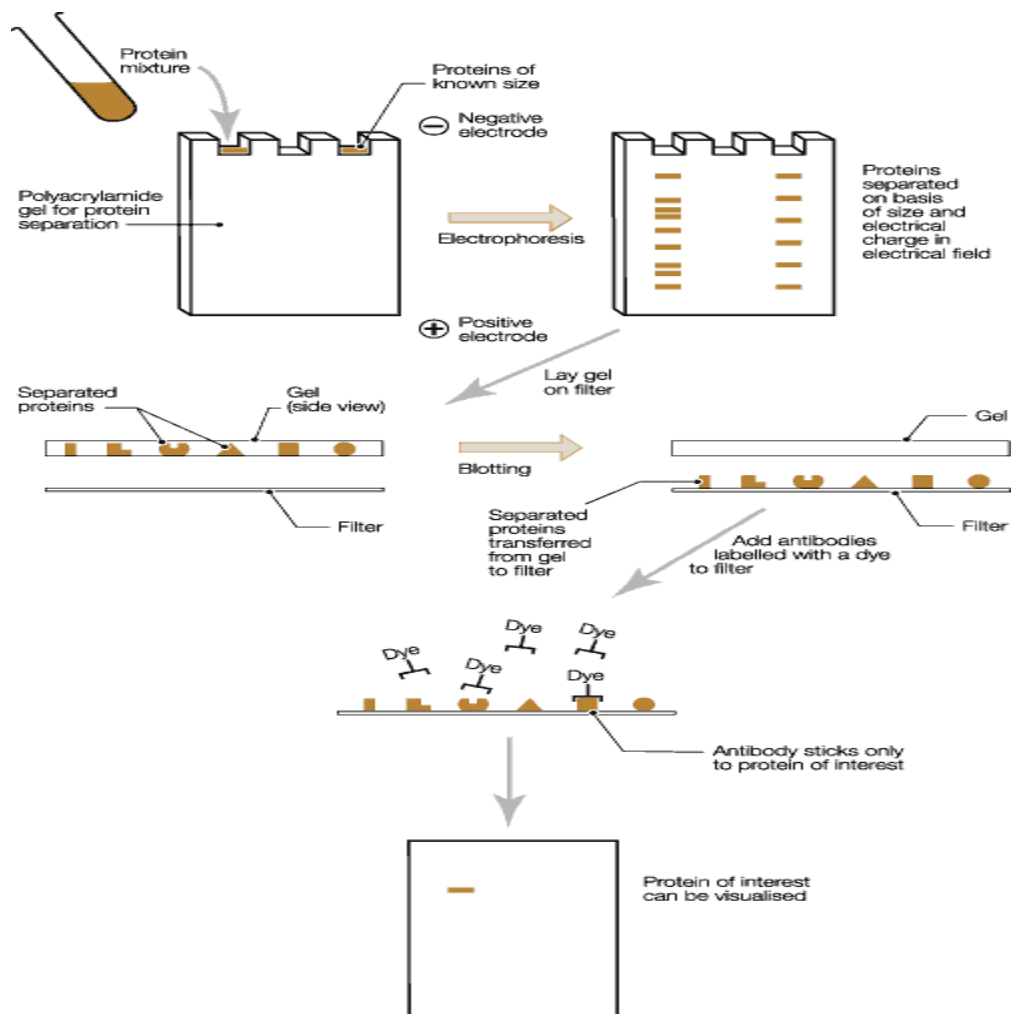
Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε 7,5% SDS-τζελ πολυακρυλαμιδίου στα 130V για το stacking και στα 170V για το running gel. Η τάση είναι αυτή που καθορίζει το πόσο γρήγορα τρέχουν οι πρωτεΐνες στο τζελ. Αφού τρέξουν τα δειγματά στο τζελ μεταφέρονται οι πρωτεΐνες σε PVDF μεμβράνη. Η μεταφορά γίνεται με τη συσκευή Semidry Transfer System στα 270mA για 40 λεπτά. Βαφή της μεμβράνης με Ponceau red επιβεβαιώνει τη μεταφορά.



Σχήμα 15: Μεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή σε μεμβράνη PVDF

Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με Blocking Buffer για 1 ώρα, υπό συνεχή ανάδευση σε rollers. Το πρώτο anti-CNOT7 αντίσωμα προστίθεται σε αραιώση 1:1000 και επώαζεται όλο το βράδυ στους 4°C. Συνεχίζουμε με 4 πλυσίματα με washing Buffer για 15 λεπτά το καθένα. Η αραιώση του δεύτερου αντισώματος goat anti-rabbit IgG-HRP αντιστοιχεί σε 1:10000 και η επώασή του γίνεται για 1 ώρα σε rollers.

Ακολουθούν 4 πλυσίματα με PBS-T (washing buffer) για 10-15 λεπτά το καθένα. Η εμφάνιση (ECL ή ECL Plus) γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Amersham. Για επανάληψη της ανοσοανίχνευσης με το ίδιο αντίσωμα ή για επώαση με διαφορετικό (reprobing), ακολουθείται η διαδικασία της αποσύνδεσης (stripping) των αντισωμάτων σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Amersham.



Source: Konrad Bishop, BSE Inquiry, London, 2000

Εικόνα 16 : Απεικόνιση της μεθόδου western blot

3.5.6 Απομόνωση ολικού RNA

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

Nucleospin® RNA II Nucleospin® RNA L

Macherey-Nagel

3.5.7 PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)

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

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

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

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

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

Στα δείγματά (κύτταρα από μυελό των οστών) έγινε εξαγωγή του RNA σύμφωνα με το RNA/protein extraction kit. Στην συνέχεια έγινε η φωτομέτρησή τους για να βρεθεί η περιεκτικότητα σε RNA. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της invitrogen η αρχική ποσότητα - δείγμα RNA θα πρέπει να κυμαίνεται από 1 pgf έως 1μg στα 50 μl αντίδρασης. Για κάθε δείγμα απαιτούνται 3 αντιδράσεις για κάθε ένα παράγοντα που θέλουμε να ελέγξουμε, για παράδειγμα την διαφοροποίηση των επιπέδων έκφρασης της αποαδενύλασης CNOT7 σε ασθενείς με λευχαιμία και σε φυσιολογικά άτομα.

Στις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε ως χρωστική αναφοράς η ROX και ως εσωτερικό πρότυπο για τη κανονικοποίηση του σήματος των ειδικών προϊόντων, το ιδιοσυστατικό γονίδιο της β-ακτίνης. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και οι ποσότητες τους προστέθηκαν και υπολογίστηκαν με βάση το qPCR kit KAPA SYBR® FAST της εταιρίας KAPABIOSYSTEMS.

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων και των συνθηκών που επικρατούν σε μια PCR-PT παρατίθεται παρακάτω:

Πίνακας 3: Απαιτούμενες ποσότητες αντιδραστηρίων για PCR-RT

Components	Final Concentration	20μl rxn
PCR grade water up to 20MI		0.4μl
KAPA SYBR® FAST Qpcr Master Mix(2X) Universal	1X	10μl
Forward Primer (10μM)	200nM	0.4μl
Reverse Primer (10μM)	200nM	0.4μl
Template DNA	(<20ng/20μl rxn)	1μl
ROX Low (50X)	50X	0.4μl

Πίνακας 4: Συνθήκες αντίδρασης

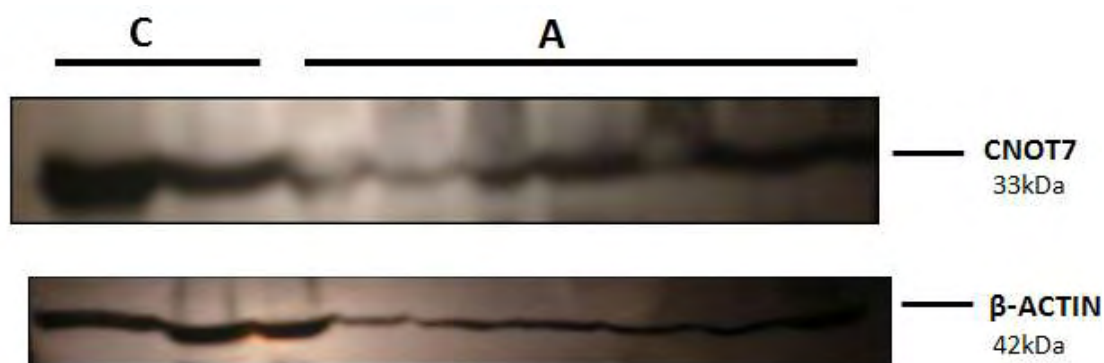
Cycling conditions	Temperature-Time
1 cycle	95 ⁰ C- 3min
40 cycles	95 ⁰ C- 3sec 60 ⁰ C-30sec 72 ⁰ C-11sec
1cycle	95 ⁰ C-1min 55 ⁰ C-30sec 95 ⁰ C-30sec
1 cycle	25 ⁰ C-3min

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ WESTERN BLOT

Αρχικά, επεξεργαστήκαμε ορούς από περιφερικό αίμα από 18 άτομα με λευχαιμία πάσχουν από λευχαιμία και δύο φυσιολογικά με την αποαδενύλαση CNOT7. Σε κάθε δείγμα έγινε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford ώστε να μπορούμε να υπολογίσουμε πόση ποσότητα θα πάρουμε από κάθε δείγμα για να καταβυθίσουμε τις πρωτεΐνες του και να φορτωθεί η ίδια ποσότητα πρωτεΐνης στο πήκτωμα ώστε να εξασφαλιστεί η εγκυρότητα της σύγκρισης της έντασης των ζωνών. Εφαρμόσαμε τη μέθοδο της Western Blot και στην συνέχεια, ανιχνεύσαμε το σήμα. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν μείωση των επιπέδων της CNOT7 στους ασθενείς απ' ότι στους φυσιολογικούς. Τα στοιχεία που είχαμε ήταν αρκετά ενθαρρυντικά αλλά απαιτούν περισσότερη μελέτη για να ελέγξουμε εάν η διαφορά που είχαμε στα επίπεδα της CNOT7 σε άτομα με χρόνια και οξεία λευχαιμία ισχύει και σε άλλες μορφές καρκίνου ή και ακόμη αν συμβαίνει το ίδιο φαινόμενο και με τις υπόλοιπες αποαδενυλάσες.

Μία πρώτη εικόνα λήφθηκε με western blot για την μεταβολή της έκφρασης της CNOT7 σε μη παθολογικά άτομα και σε άτομα με λευχαιμία.

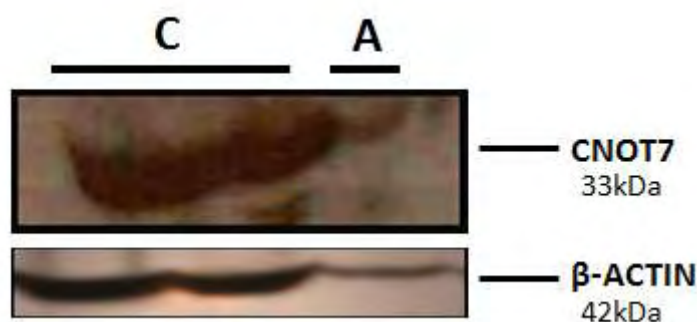


Εικόνα 17: Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της CNOT7 και β-actin σε δείγματα από μη παθολογικά άτομα (C) και ασθενών με λευχαιμία (A). Ο αριθμός δεξιά δηλώνει τη μοριακή μάζα του ενζύμου.

Ακόμα δυο εικόνες που φαίνεται η μεταβολή της έκφρασης της CNOT7.



Εικόνα 18: Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της CNOT7 και β-actin



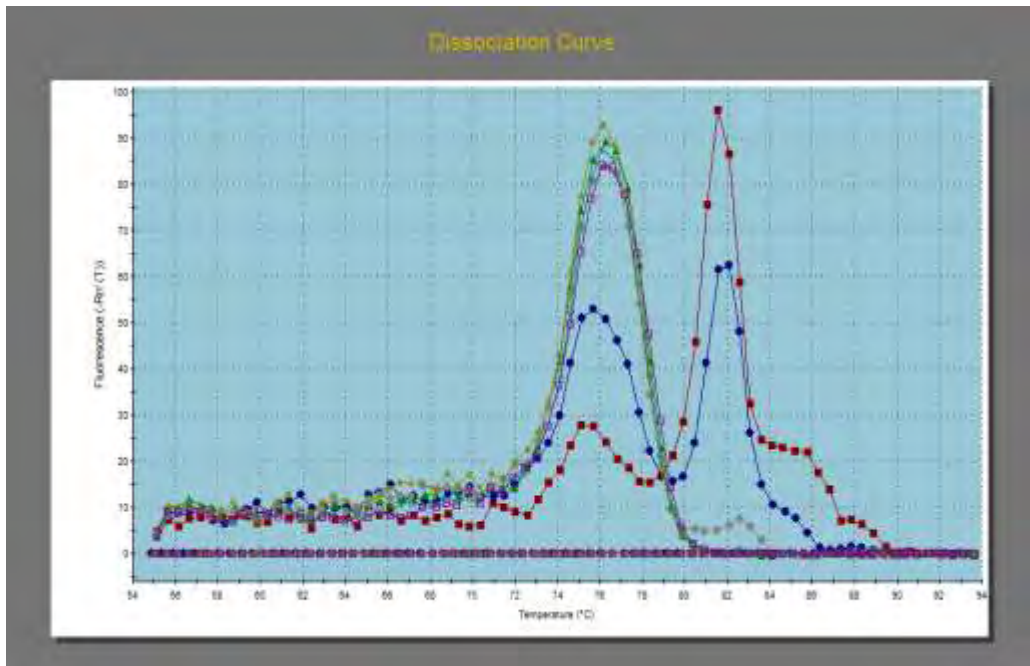
Εικόνα 19: Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της CNOT7 και β-actin

Στις εικόνες 17,18,29 φαίνεται η διαφοροποίηση της έκφρασης της CNOT7. Τα ασθενή άτομα παρουσιάζουν λιγότερο έντονες ζώνες σε σχέση με τους μάρτυρες.

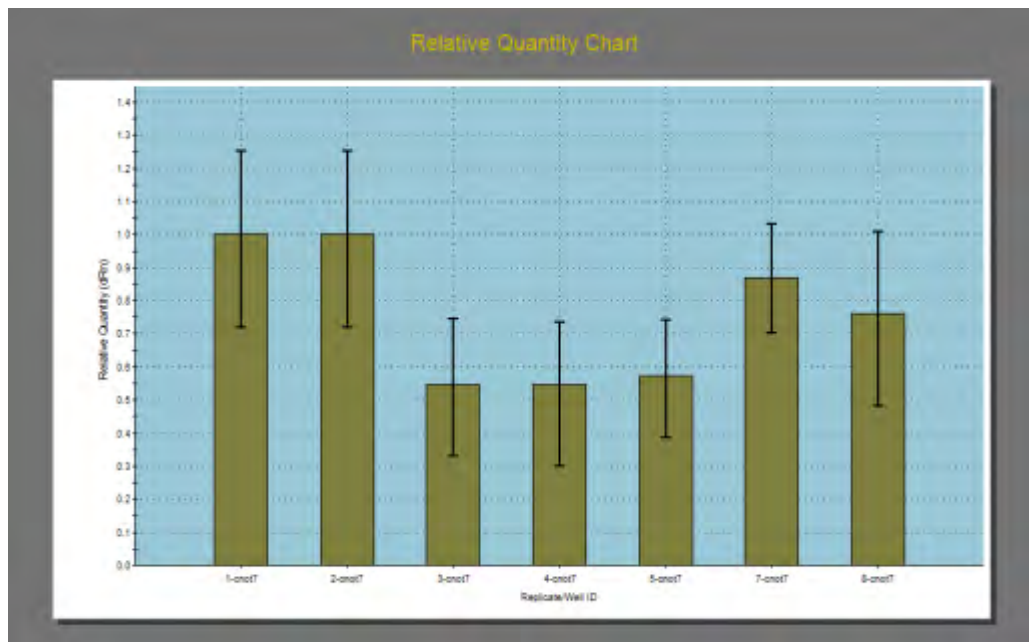
4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ RT-PCR

Επεξεργαστήκαμε με τη μέθοδο της PCR-RT συνολικά 7 δείγματα ατόμων από κύτταρα του μυελού των οστών, εκ των οποίων τα 2 δείγματα είναι μη παθολογικά και τα υπόλοιπα 5 δείγματα προέρχονται από ασθενείς με λευχαιμία. Με το κατάλληλο πρωτόκολλο, έγινε εξαγωγή του RNA από τα κύτταρα, ύστερα ακολούθησε μετατροπή του σε cDNA, καθώς σε αυτή τη μορφή διαρκεί περισσότερο και μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί για ανάλυση πολλές φορές. Τέλος, προσθέτοντας και τα κατάλληλα αντιδραστήρια τοποθετήσαμε τα δείγματα μας για ανάλυση στο μηχάνημα της RT-PCR. Επεξεργαστήκαμε της αποαδενυλάσης CNOT7 και τα αποτελέσματά μας είναι τα εξής :

ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ CNOT7 ΜΕ RT-PCR



Εικόνα 20: Επίπεδα έκφρασης CNOT7 σε δείγματα μυελού των οστών από φυσιολογικά άτομα και ασθενείς με λευχαιμία. Διάγραμμα διάστασης (dissociation plot). Επίπεδα mRNA της CNOT7 (επίπεδα φθορισμού με χρωστική SYBR Green) σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Τα ειδικά προϊόντα της RT-PCR αναμένονται σε $T_m > 78^{\circ}\text{C}$.



Εικόνα 21: Σχετικά επίπεδα έκφρασης (relative chart) mRNA της CNOT7 (επίπεδα φθορισμού με χρωστική SYBR Green), μάρτυρες (στήλες 1, 2) και δείγματα ασθενών (στήλες 3,4,5,6,7).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ρύθμιση της αποαδενυλιωτικής δραστηριότητας, είναι πολύ σημαντική για το κύτταρο. Σταθερά και ενεργά mRNAs θα πρέπει να προστατεύονται από την αποαδενυλίωση ενώ ασταθή και ελαττωματικά mRNAs θα πρέπει να αποαδενυλιώνονται και να υποβαθμίζονται. (*Lejeune et al.,2003; Chen et al., 2003*)

Η πολυ(A) ουρά είναι ένα στοιχείο σταθερότητας του mRNA, οπότε είναι απαραίτητη η διερεύνηση της λειτουργίας της και των παραγόντων που την επηρεάζουν. Για αυτό το λόγο είναι σημαντική η παρακολούθηση των αποαδενυλασών. Στην παρούσα εργασία παρακολούθησαμε τα επίπεδα έκφρασης της CNOT7 σε ασθενείς με λευχαιμία.

Αρχικά ανιχνεύσαμε την αποαδενυλάση CNOT7 σε ορούς ασθενών με λευχαιμίες με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (εικόνες 17-19). Στις εικόνες φαίνονται οι ζώνες της CNOT7 στους ασθενείς και οι πιο έντονες ζώνες στα μη παθολογικά άτομα πράγμα που υποδηλώνει τα αυξημένα επίπεδα της αποαδενυλάσης. Συμπεραίνουμε ότι τα επίπεδα της CNOT7 είναι μειωμένα στα ασθενή άτομα με λευχαιμίες σε σύγκριση με τα μη παθολογικά. Πρέπει να σημειωθεί ότι η εγκυρότητα της σύγκρισης της έντασης των ζωνών εξασφαλίστηκε φορτώνοντας την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης και από τα ασθενή και από τα μη παθολογικά άτομα σε δείγματα ορών, και με πρωτεΐνη – μάρτυρα στα δείγματα μυελών. Ο έλεγχος του φορτώματος έγινε με β-ακτίνη ως μάρτυρα. Τα αποτελέσματα στη συνέχεια διασταυρώθηκαν και με την μέθοδο της PCR αντίστροφης μεταγραφής όπως φαίνονται στις εικόνες 20,21. Έχουμε το διάγραμμα διάστασης από τη CNOT7, και το ραβδόγραμμα που δείχνει τα επίπεδα της σε μη παθολογικούς και ασθενείς. Παρατηρούμε ότι τα επίπεδα mRNA της CNOT7 στους ασθενείς με λευχαιμίες ήταν περίπου τα μισά σε σχέση με αυτά των υγιή ατόμων.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν είναι πολύ ενδιαφέροντα και ιδιαίτερος ενθαρρυντικά, καθώς η μειωμένη παρουσία της αποαδενυλάσης CNOT7 στον ανθρώπινο οργανισμό θα μπορούσε να αποτελέσει ένδειξη ότι το συγκεκριμένο άτομο δύναται να εμφανίσει καρκίνο. Γι' αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η περαιτέρω έρευνα των μηχανισμών αποαδενυλίωσης, των συνθηκών που πραγματοποιούνται όπως και των παραγόντων που τους επηρεάζουν.

Ακόμα, αποκτήσαμε μια πρώτη εικόνα για τα επίπεδα έκφρασης της αποαδενυλάσης CNOT7 σε ασθενείς με λευχαιμία όπου παρατηρήσαμε μειωμένα επίπεδα της CNOT7 σε παθολογική κατάσταση. Οπότε, ίσως η αποαδενυλιωτική ικανότητα του συμπλέγματος CCR4-NOT και των υπομονάδων του, να εμπλέκεται άμεσα ή έμμεσα στην εμφάνιση καρκινικών κυττάρων και κρίνεται απαραίτητη η διερεύνηση σε ποια μονοπάτια και με ποιους μηχανισμούς επιτυγχάνεται αυτό. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στη περαιτέρω μελέτη της έκφρασης και άλλων αποαδενυλασών σε διάφορες μορφές καρκίνου.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>. Retrieved 2009-08-17
- Cancer Research UK (January 2007). "[UK cancer incidence statistics by age](http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/incidence/age/)". <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/incidence/age/>
- [WHO](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/) (February 2006). "[Cancer](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/)". World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- [American Cancer Society](http://www.reuters.com/article/healthNews/idUSN1633064920071217) (December 2007). "[Report sees 7.6 million global 2007 cancer deaths](http://www.reuters.com/article/healthNews/idUSN1633064920071217)" <http://www.reuters.com/article/healthNews/idUSN1633064920071217>.
- "[Cancer Cancer](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/)". *World Health Organization*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
- "[What Is Cancer?](http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer)" [National Cancer Institute](http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer). <http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>. Retrieved 2009-08-17
- "[Cancer Fact Sheet](http://www.atsdr.cdc.gov/COM/cancer-fs.html)". Registry. 2002-08-30. <http://www.atsdr.cdc.gov/COM/cancer-fs.html>.
- "[WHO Disease and injury country estimates](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates_country/en/index.html)". *World Health Organization*, 2009. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates_country/en/index.html. Retrieved Nov. 11, 2009.
- "[Cancer](http://www.who.int/nmh/publications/fact_sheet_cancers_en.pdf)" (PDF). *World Health Organization* http://www.who.int/nmh/publications/fact_sheet_cancers_en.pdf.
- "[The History of Cancer](http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_6x_the_history_of_cancer_72.asp)". American Cancer Society. September 2009. http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_6x_the_history_of_cancer_72.asp
- *The Basic Science of Oncology* 4th ed. Tannock IF, Hill RP *et al.* (eds.) (2005). McGraw-Hill. [ISBN 0-07138-774-9](http://www.mhprofessional.com/ISBN/0-07-138-774-9).
- Jemal A, Siegel R, Ward E *et al.* (2008). *CA Cancer J Clin* 58 (2): 71–96.
- Abaza I, Cebauer F., Trading translation with RNA-binding proteins. *RNA* 14: 404–408 (2008)
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. New York and London: Garland Science; c2002
- 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)
- Cao D. & Parker R., (2003), *Cell* 113, 533–545.

- Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F., and Bartel, D. P., MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303, 83-86 (2004)
- Chen, C.Y. et al., AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451–464 (2001)
- Chen, C.Y. & Shyu, A.B., Rapid deadenylation triggered by a nonsense codon precedes decay of the RNA body in a mammalian cytoplasmic nonsense mediated decay pathway. *Mol. Cell Biol.* 23 4805-4813 (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)
- Frischmeyer P.A. *et al.*, (2002), *Science* 295 : 2258–2261.
- Garneau, N., Wilusz, J. & Wilusz, C., The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 113–126 (2007)
- Guhaniyogi I, J. Breuer G, Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* 265 11-23 (2001)
- Hentze MW, Kühn LC, Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (16) 8175-82 (1996)
- Lau Nga-Chi, Kolkman Annemieke, Van Schaik Frederik M.A., Mulder Klaas W., Pijnappel W.W. M. Pim, Heck Albert J.R. and Timmers H.Th. Marc, Human Ccr4-Not complexes contain variable deadenylase subunits. *Biochem J* VOL 422:443-453 (2009)
- Leujene 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)
- 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)
- 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. *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).
- Moser M.J., Holley W.R., Chatterjee A., Mian I.S. (1997). *Nucleic Acids Res*
- Muhlrad D. & Parker R, (1994), *Nature* 370 : 578–581.

- Mukherjee, D. et al., The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.* 21: 165–174 (2002)
- Parker, R.; Sheth, U., [P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation](#). *Molecular Cell* 25 (5): 635–646 (2007)
- Pangalis, G. A., Trangas T., Roussou P. A., Tsiapalis C. M., 1985, *Acta Haematol.*, 74: 31–34
- Rudolph et al.,(1999), *Anal Biochem* 269 : 66-71.
- Ross J., mRNA Stability in Mammalian Cells, (1995), American society for Microbiology, vol. 59 : 423-450
- Sachs, A., and Wahle, E., 1993, *J. Biol. Chem.*, 268: 22955–22958
- Sasaki R., Minowada J., Bollum F. J., and Miura Y. *Leuk. Res.*, 1990, Scorilas A, Talieri M, Ardavanis A, Courtis N., Dimitriadis E., *Yotis* 14: 273–278
- Scorilas A, Talieri M, Ardavanis A, Courtis N., Dimitriadis E., Yotis J., Milton C., Trangas T., *Cancer Research* 60 : 5427–5433 (2000)
- Takahashi S., Araki Y., Sakuno T. & Katada T.,(2003), *EMBO J.* 22 : 3951–3959.
- Tucker, M. & Parker R., *Annu. Rev. Biochem.* 69, 571–595 (2000).
- Wong M.L. and Medrano F., 2005, *Biotechniques*, 39
- Zuo Y., Deutscher M.P., (2001). *Nucleic Acids Res* 29:1017–1026.
- Anette Thyssen Jonstrup, Kasper R. Andersen, Lan B. Van and Ditlev E. Brodersen (2007). The 1.4-Å crystal structure of the *S. pombe* Pop2p deadenylase subunit unveils the configuration of an active enzyme