



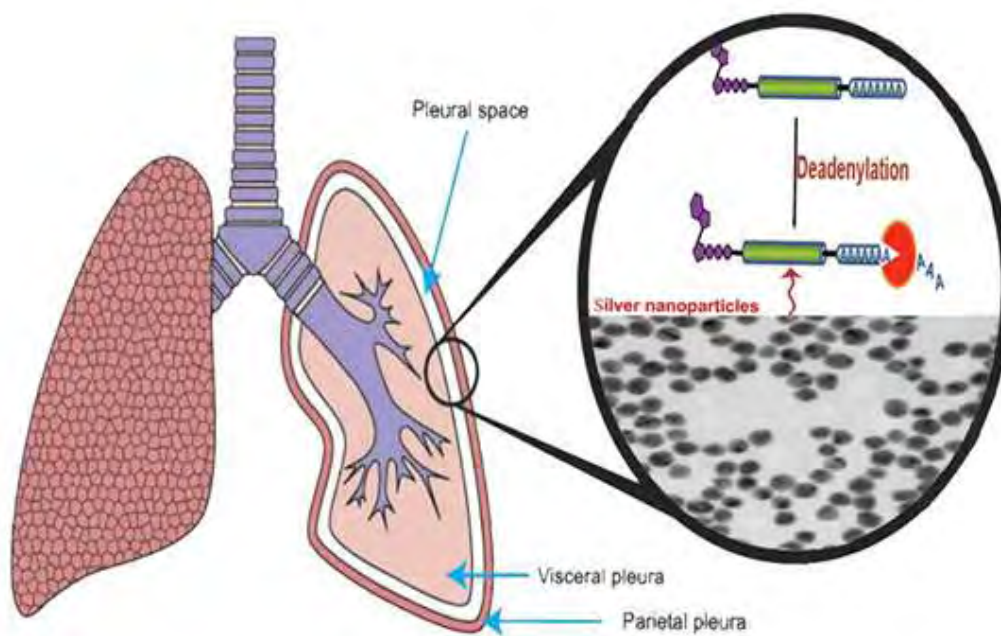
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΖΩΗ ΑΡΣΕΝΟΠΟΥΛΟΥ

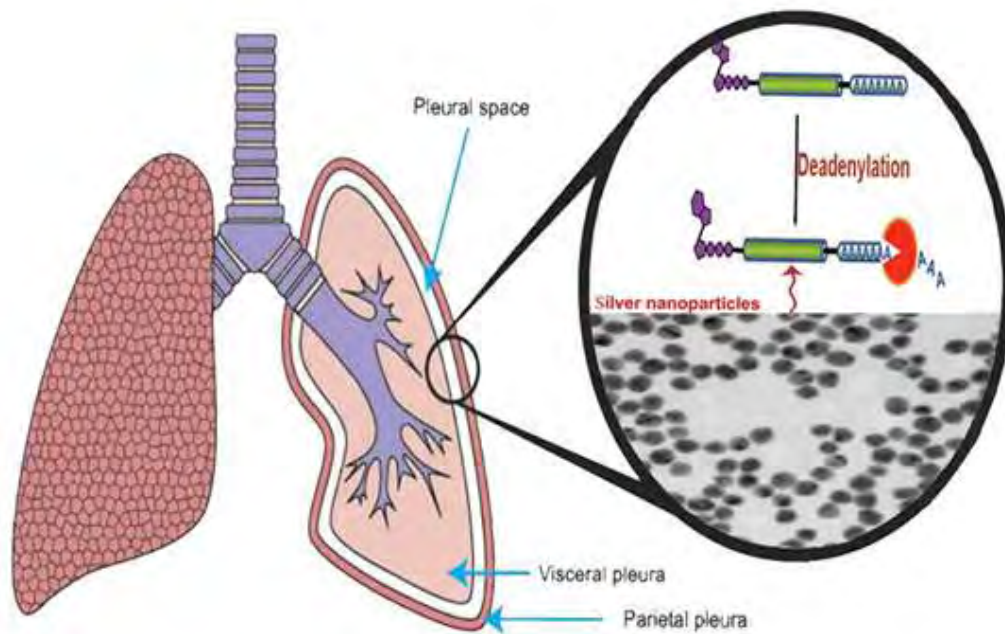
ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΡΓΥΡΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΟΛΥ(Α)-
ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ
ΜΕΣΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ



ΛΑΡΙΣΑ 2015

“Επιδράσεις των νανοσωματιδίων αργύρου και της πολυ(Α)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης στην κινητικότητα των μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα”.

“Effects of silver nanoparticles and poly(A)-specific ribonuclease on the motility of pleural mesothelial cells”.



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ζαρογιάννης Σωτήριος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Εικόνα εξωφύλλου: Σύνθεση των εικόνων 14 (Murphy et al., 2011), 17 και 19 (Kim and Lee, 2009; Goldstrohm and Wickens, 2008) που εμφανίζονται παρακάτω στην παρούσα εργασία.

Η εν λόγω εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για την διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Τους καθηγητές μου για την αμέριστη συμπαράσταση και εμπιστοσύνη τους, τους διδακτορικούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τις συμβουλές και υποδείξεις τους, καθώς και τους συμφοιτητές μου με τους οποίους η συνεργασία ήταν ευχάριστη και εποικοδομητική. Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Νικόλαο Μπαλατσό για την αμέριστη ηθική και επιστημονική συμπαράσταση και καθοδήγησή του, κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Ι. Γουργουλιάνη καθώς και τον κ. Σωτήρη Ζαρογιάννη, που αποτελούν μέλη της τριμελούς επιτροπής, για τη συμβολή τους στη διεξαγωγή της διπλωματικής εργασίας. Ιδιαίτερος ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτορα Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου για την αμέριστη βοήθεια της, τη σημαντική συμβολή της στη διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και για την άψογη συνεργασία μας. Τέλος ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|-----------|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 7 |
| ABSTRACT | 8 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 9 |
| 1.1 Δομή και φυσιολογία του υπεζωκότα..... | 9 |
| 1.2 Μετανάστευση και αναγέννηση μεσοθηλιακών κυττάρων..... | 11 |
| 1.3 Νανοσωματίδια..... | 13 |
| 1.3.1 Η επιστήμη της νανοτεχνολογίας: ορισμός και σημασία..... | 13 |
| 1.3.2 Κατηγορίες νανοσωματιδίων..... | 14 |
| 1.3.3 Εφαρμογές των νανοσωματιδίων..... | 15 |
| 1.3.4 Είσοδος νανοσωματιδίων στα κύτταρα..... | 17 |
| 1.3.5 Αλληλεπίδραση νανοσωματιδίων με δομές του πνεύμονα..... | 18 |
| 1.3.6 Εισπνεόμενα νανοσωματίδια και καρκίνος..... | 20 |
| 1.3.7 Νανοσωματίδια και υπεζωκότας: επιδράσεις νανοσωλήνων άνθρακα στον υπεζωκότα..... | 24 |
| 1.3.8 Νανοσωματίδια αργύρου: εφαρμογές, in vitro και in vivo μελέτες..... | 25 |
| 1.3.9 Τα υπό μελέτη νανοσωματίδια αργύρου..... | 27 |
| 1.4 Ριβονουκλεάσες..... | 28 |
| 1.4.1 Αποαδενυλάσες | 33 |
| 1.4.2 Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN)..... | 37 |
| 2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ | 42 |
| 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 43 |
| 3.1 Κυτταρικές σειρές - Χειρισμοί κυτταροκαλλιιεργειών..... | 43 |
| 3.2 Δοκιμή επούλωσης πληγής (wound healing assay)..... | 45 |
| 3.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)..... | 52 |
| 3.4 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με χρήση λιποσωμάτων..... | 53 |
| 3.4.1 Η τεχνολογία του RNA interference (RNAi)..... | 53 |
| 3.4.2 Αποσιώπηση της PARN..... | 55 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών..... | 62 |
| 3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε δύο βήματα (Two step Real Time PCR)..... | 63 |
| 3.7 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της RT-qPCR σε πηκτή αγαρόζης..... | 68 |
| 3.8 Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα θηλαστικών..... | 69 |
| 3.9 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με TCA/DOC..... | 70 |
| 3.10 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blotting)..... | 71 |
| 3.11 Πρότυπη καμπύλη Bradford με BSA (bovine serum albumin)..... | 75 |
| 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 77 |
| 4.1 Επιδράσεις νανοσωματιδίων αργύρου στην κυτταρική μετανάστευση..... | 77 |
| 4.2 Έλεγχος επιπέδων mRNA της PARN στα Met-5A και στα M14K..... | 81 |
| 4.3 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-qPCR σε πηκτή αγαρόζης..... | 82 |
| 4.4 Έλεγχος της PARN σε επίπεδο πρωτεΐνης στα Met-5A και στα M14K..... | 83 |
| 4.5 Επιδράσεις AgNPs 20nm και 60nm στα επίπεδα mRNA της PARN..... | 84 |
| 4.6 Επιδράσεις αποσιώπησης της PARN και έκθεσης σε AgNPs στη μετανάστευση της κυτταρικής σειράς M14K..... | 86 |
| 4.7 Αντιπροσωπευτικές εικόνες των M14K κατά την δοκιμή επούλωσης πληγής υπό την επίδραση διαφόρων συνθηκών..... | 88 |
| 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ | 90 |
| 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 95 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εκτεταμένη χρήση των μηχανοποιημένων νανοσωματιδίων σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών εγείρει ανησυχίες σχετικά με τις πιθανές τοξικές επιδράσεις τους στην ανθρώπινη υγεία. Όσον αφορά το αναπνευστικό σύστημα, υπάρχουν ήδη ενδείξεις ότι η έκθεση σε νανοσωματίδια μπορεί να οδηγήσει σε φλεγμονή του πνεύμονα και του υπεζωκότα, ίνωση και καρκίνο. Τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) χρησιμοποιούνται ευρέως λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους και συμβάλλουν στην επούλωση των πληγών. Ωστόσο, η γνώση σχετικά με τους μοριακούς στόχους και τους μηχανισμούς δράσης των νανοσωματιδίων αργύρου παραμένει περιορισμένη. Έγινε διερεύνηση των παραγόντων που εμπλέκονται στην κυτταρική κινητικότητα για να μελετηθούν οι πιθανές επιδράσεις των νανοσωματιδίων αργύρου. Μεταξύ αυτών των παραγόντων, η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN) εμπλέκεται σε αρκετές διεργασίες που κυμαίνονται από την πρόωμη ανάπτυξη μέχρι την κυτταρική κινητικότητα. Η PARN είναι μία αποαδενυλάση που καταλύει τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς και παίζει βασικό ρόλο στη σταθερότητα του mRNA και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Προς αυτήν την κατεύθυνση, μελετήθηκαν οι επιδράσεις των μηχανοποιημένων AgNPs στην κινητικότητα των κυττάρων κακοήθους μεσοθηλιώματος (M14K) και των ανθρώπινων καλοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων (Met-5A) καθώς και στα επίπεδα mRNA και πρωτεϊνών της PARN. Η κυτταρική σειρά M14K εκφράζει την PARN ενώ στη σειρά Met-5A τα επίπεδα του ενζύμου είναι περιορισμένα. Μετά από έκθεση των κυττάρων σε AgNPs μεγέθους 20nm, η κυτταρική μετανάστευση μεταβλήθηκε και στις δύο κυτταρικές σειρές. Έκθεση των κυττάρων σε AgNPs 60nm αύξησε σημαντικά την έκφραση της PARN, ακόμη και στα Met-5A, ενώ τα AgNPs 20nm δεν προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές. Η αποσιώπηση της PARN στα M14K οδήγησε σε αύξηση της μετανάστευσης κατά την δοκιμή επούλωσης της πληγής. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η σταθερότητα του mRNA είναι ένα πιθανό μονοπάτι μέσω του οποίου τα AgNPs ασκούν τις επιδράσεις τους.

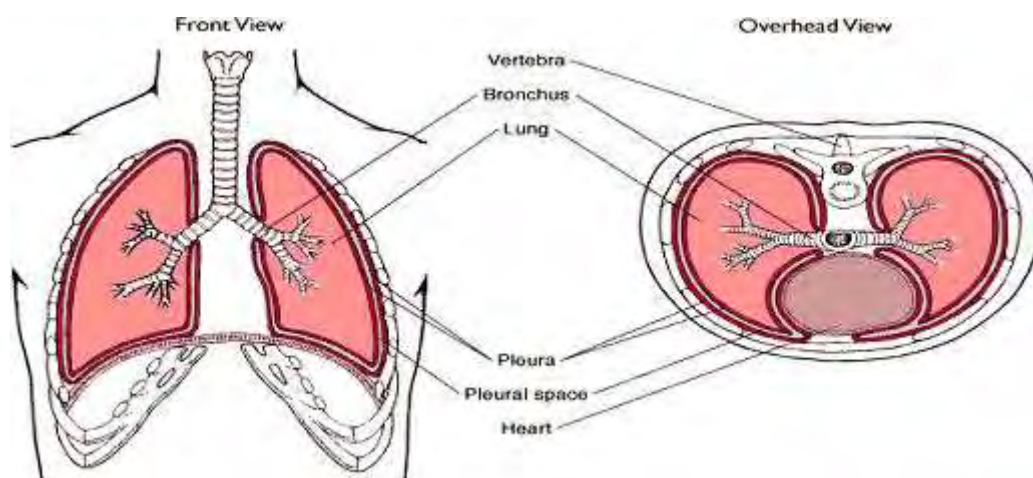
ABSTRACT

The extensive use of engineered nanoparticles in a wide range of applications has raised concerns as to their potential toxic effects on the human health. Regarding the respiratory system, there are already indications that such exposures may lead to lung and pleural inflammation, fibrosis and cancer. Silver nanoparticles (AgNPs) are widely used mainly due to their antimicrobial and wound healing properties. However, our knowledge on the molecular targets and mechanisms of action of AgNPs remains limited. We searched for factors involved in cell motility to study the potential effects of AgNPs. Among these, poly(A)-specific ribonuclease (PARN) is involved in several processes ranging from early development to cell motility. PARN is a deadenylase that catalyze the shortening of poly(A) tails and plays key role in mRNA turnover and in the regulation of gene expression. In this direction, we investigated the effects of engineered AgNPs on the motility of malignant pleural mesothelioma cells (M14K) and benign human mesothelial cells (Met-5A), as well as on PARN mRNA and protein levels. M14K express PARN, while the levels of the enzyme in Met-5A are limited. After treatment of cells with 20nm of AgNPs, cell migration was altered in both cell lines. Treatment of both cell lines with 60nm AgNPs significantly increased PARN expression, even in Met-5A, while 20nm AgNPs did not produce significant alterations. Silencing of PARN expression in M14K and treatment with 60nm AgNPs led to faster migration in the wound healing assay. These results suggest mRNA stability as a possible target pathway through which AgNPs may exert their effects.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Δομή και φυσιολογία του υπεζωκότα

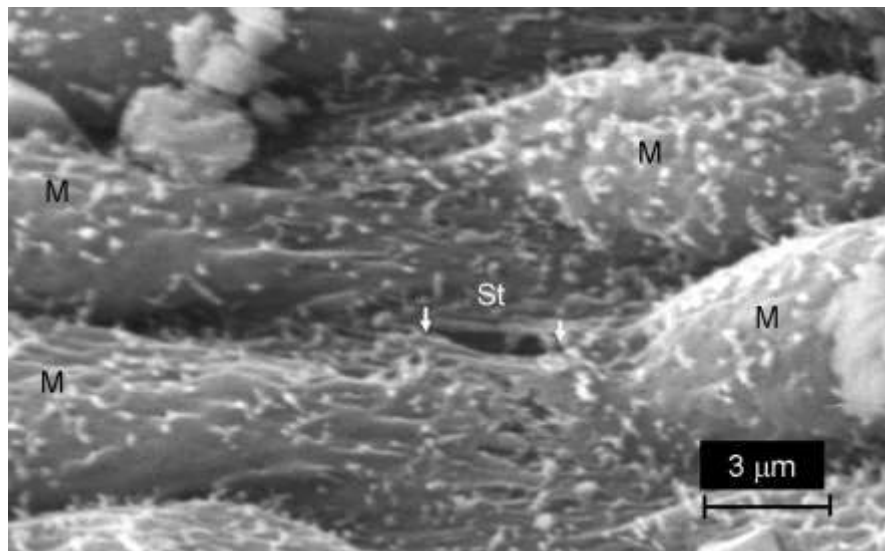
Ο υπεζωκότας είναι ένας ημιδιαφανής υμένας που καλύπτει τους πνεύμονες, το μεσαύλιο, το διάφραγμα και το εσωτερικό τοίχωμα του θώρακα. Αποτελείται από δύο πέταλα: το σπλαχνικό (visceral), που καλύπτει όλο τον πνεύμονα και τις μεσολόβιες σχισμές, και το τοιχωματικό (parietal), που καλύπτει την έσω επιφάνεια του θώρακα, το μεσαύλιο και το διάφραγμα (εικόνα 1). Ιστολογικώς ο υπεζωκότας αποτελείται από μία μονήρη στιβάδα μεσοθηλιακών κυττάρων που έχουν σχήμα αποπεπλατυσμένο, κυβοειδές ή κυλινδρικό. Ο τοιχωματικός υπεζωκότας είναι προσκολλημένος στο θωρακικό τοίχωμα και καλύπτεται από μία συνεχή στιβάδα τοιχωματικών μεσοθηλιακών κυττάρων ενώ ο σπλαχνικός υπεζωκότας αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της επιφάνειας των πνευμόνων και καλύπτεται από την σπλαχνική μεσοθηλιακή στιβάδα κυττάρων.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση του υπεζωκότα (pleura).

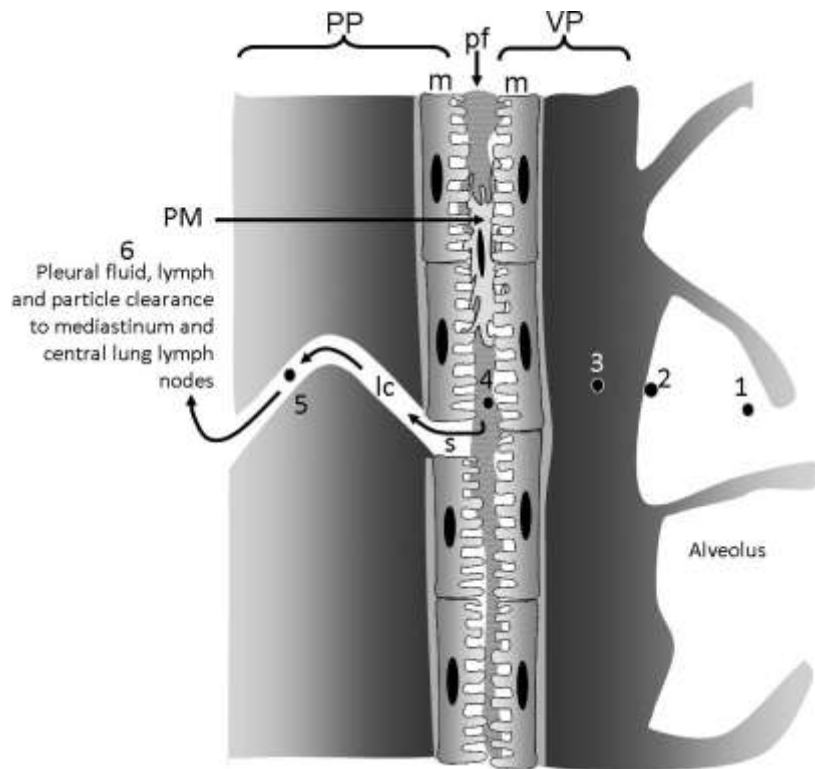
Η υπεζωκοτική κοιλότητα ορίζεται από το σπλαχνικό και το τοιχωματικό πέταλο του υπεζωκότα. Περιέχει μικρή ποσότητα πλευριτικού υγρού, που διατηρεί το θώρακα και τους πνεύμονες σε συνάφεια και επιτρέπει την ευχερή μεταξύ τους διολίσθηση. Η υπεζωκοτική κοιλότητα είναι στενή, φθάνει έως τα 20μm σε πρόβατα και θεωρείται ότι είναι παρόμοια σε μέγεθος και στους ανθρώπους (Agostoni and Zocchi, 2007). Τα λεμφαγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα επικοινωνούν με το

πλευριτικό υγρό με τα “στόματα”. Τα στόματα είναι ανοίγματα μεταξύ 3μm και 10μm σε διάμετρο, στην επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα όπως φαίνεται στην **εικόνα 2** (Donaldson et al., 2010). Το πλευριτικό υγρό συνεχώς εξέρχεται διαμέσου των στομάτων του τοιχωματικού (όχι του περισπλάχνιου) υπεζωκότα προς τα λεμφαγγεία.



Εικόνα 2. Μικροφωτογραφία ηλεκτρονικής σάρωσης του θωρακικού τοιχώματος ενός αρουραίου που δείχνει την επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα των μεσοθηλιακών κυττάρων (M) και ένα στόμα (λευκά βέλη, St) που έχει διάμετρο περίπου 3μm.

Η στενή προσαρμογή των πνευμόνων στο εσωτερικό του θωρακικού τοιχώματος σημαίνει ότι οι δύο μεσοθηλιακές στιβάδες (m) είναι πολύ κοντά. Ανάμεσα στον τοιχωματικό (PP) και τον σπλαχνικό υπεζωκότα (VP) υπάρχει η υπεζωκοτική κοιλότητα που περιέχει μικρό όγκο πλευριτικού υγρού (pf) καθώς και τα μακροφάγα του υπεζωκότα (PM) όπως απεικονίζεται στην **εικόνα 3**. Ένα αερομεταφερόμενο σωματίδιο (1) που φθάνει στις απομακρυσμένες κυψελίδες (2), περνάει στο διάμεσο ιστό (3), εισέρχεται στην υπεζωκοτική κοιλότητα (4) και εξέρχεται διαμέσου ενός στόματος του τοιχωματικού υπεζωκότα (s) μέσα στα λεμφαγγεία (lc, 5) για να εισέλθει μέσω της λεμφικής ροής στους λεμφαδένες του μεσοπνευμονίου και του πνεύμονα (Donaldson et al., 2010).



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ σπλαχνικού και τοιχωματικού υπεζωκότα.

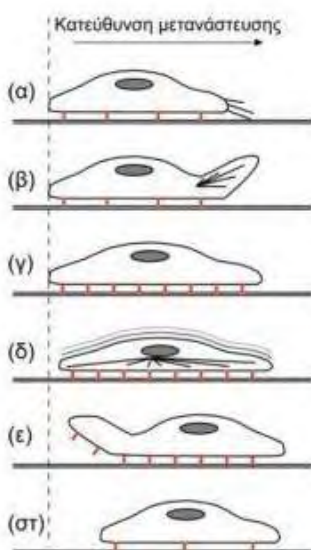
1.2 Μετανάστευση και αναγέννηση μεσοθηλιακών κυττάρων

Η μετανάστευση αποτελεί μία από τις κυτταρικές λειτουργίες. Η διαδικασία της μετανάστευσης κατευθύνεται από χημειοτακτικά και άλλα ερεθίσματα, περιλαμβάνει συνήθως αποικοδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας ενώ απαιτεί και την ενεργοποίηση διαφόρων μονοπατιών μεταγωγής σήματος που οδηγούν σε αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού.

Η διαρκής αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης οδηγεί σε δομές που ονομάζονται φιλοπόδια, λαμελλιπόδια και ινίδια στρες, και τα οποία είναι απαραίτητα για την κυτταρική μετανάστευση. Τα φιλοπόδια είναι μεμβρανικές προεξοχές που περιέχουν μακριά, παράλληλα ινίδια ακτίνης σε στενή σύνδεση. Είναι συγκεκριμένες δομές που δρουν ως αισθητήρες των κινούμενων ερεθισμάτων. Τα λαμελλιπόδια είναι κυτταροπλασματικές προεξοχές που σχηματίζονται στο κύτταρο που μεταναστεύει από το άκρο που προηγείται και προς την κατεύθυνση της μετανάστευσης. Οι διαστάσεις τους είναι περίπου 1-5μm μήκος και 2μm εύρος. Τα

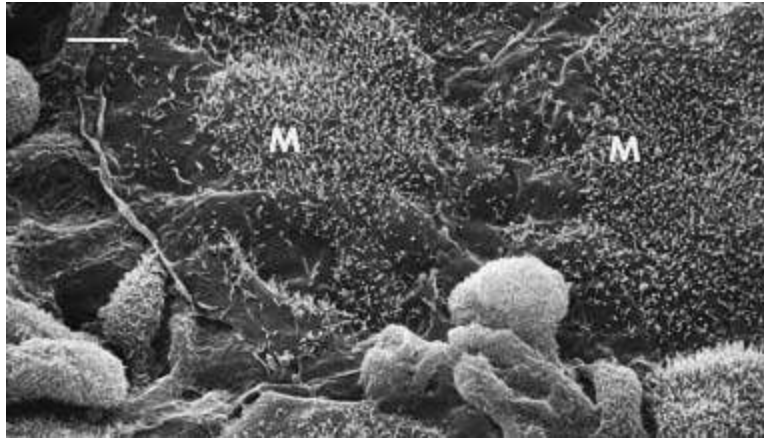
ινίδια στρες είναι ινίδια ακτίνης με ανεστραμμένη πολικότητα που συνδέονται με μόρια α-ακτινίνης και μυοσίνης και κατανέμονται κατά μήκος των συσταλτικών ινιδίων.

Και οι τρεις δομές είναι απαραίτητες για να πραγματοποιηθούν τα ακόλουθα στάδια της μετανάστευσης (**εικόνα 4**): α) Ανίχνευση του μεταναστευτικού σήματος από τα φιλοπόδια, β) δημιουργία και προεξοχή των λαμελλιποδίων και αμοιβαδοειδή κίνηση προς τα εμπρός, γ) προσκόλληση σε προεξοχές της εξωκυττάριας μήτρας (ECM), δ) συστολή του σώματος του κυττάρου που ρυθμίζεται από τα ινίδια στρες για να διευκολυνθεί η κίνηση προς τα εμπρός, ε) απελευθέρωση του οπίσθιου τμήματος του κυττάρου και στ) ανακύκλωση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην προσκόλληση και τη μεταγωγή σήματος του κυττάρου.



Εικόνα 4. Βασικά βήματα κυτταρικής μετανάστευσης (Lamallice et al., 2007).

Το μεσοθήλιο είναι ένας ιστός που αναγεννάται αργά και μπορεί να διεγερθεί από πολλούς παράγοντες και από άμεση φυσική πρόκληση βλάβης για να αυξήσει το ρυθμό αναγέννησής του. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα που πολλαπλασιάζονται γύρω από την πληγή παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αποκατάστασης, με πολλά από αυτά να μεταναστεύουν κατά μήκος του τραυματισμένου μεσοθηλίου από την άκρη της πληγής προς το κέντρο (**εικόνα 5**).



Εικόνα 5. Μικροφωτογραφία σάρωσης ηλεκτρονικού μικροσκοπίου μιας αλλοίωσης του ορογόνου υμένα 48 ώρες μετά τον τραυματισμό. Στην άκρη της βλάβης απεικονίζονται μεγάλα πεπλατυσμένα μεσοθηλιακά κύτταρα (M), με ποικίλους αριθμούς μικρολαχνών και λαμελλιποδίων που προεξέχουν.

Ωστόσο η απλή μετανάστευση των κυττάρων δεν είναι ο μόνος μηχανισμός αναγέννησης καθώς αυτός δεν εξηγεί πως οι μεγάλες και οι μικρές πληγές του μεσοθηλίου μπορούν να επουλωθούν συγχρόνως. Πιστεύεται ότι το μεσοθήλιο που αναγεννάται μετά από κάποια πληγή, είναι πιθανόν να προέρχεται εκτός από τη μετανάστευση των κυττάρων, από έναν πρόδρομο μεσεγχυματικής προέλευσης υπό των μεσοθηλιακών κυττάρων ή από την προσκόλληση των μεσοθηλιακών κυττάρων που επιπλέουν ελεύθερα στο υγρό του ορογόνου υμένα πάνω στην επιφάνεια της πληγής (Mutsaers, 2002).

1.3 Νανοσωματίδια

1.3.1 Η επιστήμη της νανοτεχνολογίας: ορισμός και σημασία

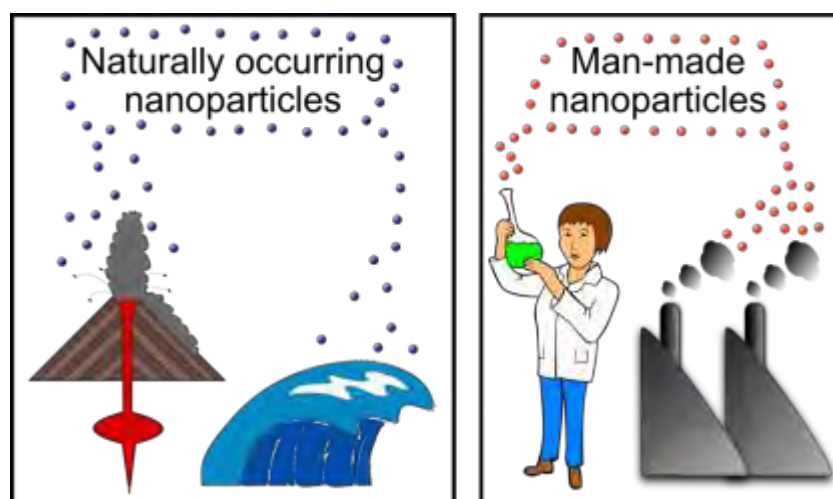
Η νανοτεχνολογία είναι μία από τις πιο σημαντικές εξελίξεις της βιομηχανίας στην οποία η μηχανική ενσωματώνεται με τη βιολογία, τη χημεία και τη φυσική (Lehn, 2002). Η νανοτεχνολογία εστιάζει στην αλλαγή των φυσικών ιδιοτήτων των υλικών μέσω της μικρογράφησης. Καθώς το μέγεθος ενός υλικού μειώνεται, οι φυσικές και οι χημικές ιδιότητές του αλλάζουν σε σχέση με το αρχικό υλικό (Schmidt et al., 2003). Είναι σημαντικό να κατανοήσουμε το ρόλο των νανοϋλικών μέσα στα βιολογικά συστήματα με σκοπό να αποφεύγονται οι ανεπιθύμητες επιδράσεις τους. Η

δημιουργία βιοσυμβατών και ασφαλών προϊόντων νανοτεχνολογίας θα οδηγήσει στην ευρύτερη χρήση τους σε πολλούς τομείς.

Νανοςωματίδια ονομάζονται τα σωματίδια μεγέθους μεταξύ 0,1nm και 100nm. Για να οριστεί ένα σωματίδιο ως νανοςωματίδιο θα πρέπει να έχει τουλάχιστον μία διάσταση μικρότερη από 100nm. Σήμερα τα νανοςωματίδια και οι νανοϊνες είναι από τα πιο συχνά μελετημένα υλικά για τις πιθανές βλάβες τους στους ανθρώπους επειδή στο μέλλον αυτά θα είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα νανο-υλικά σε τεχνολογίες όπως οι μέθοδοι στοχευμένης θεραπείας και μεταμοσχεύσεων (Lehn, 2002). Η νανοϊατρική είναι ένας ταχέως εξελισσόμενος τομέας με μεγάλες δυνατότητες για την ανάπτυξη νέων μεθόδων έρευνας, διάγνωσης και θεραπευτικών προσεγγίσεων για τις ασθένειες των πνευμόνων και κατ' επέκταση του υπεζωκότα.

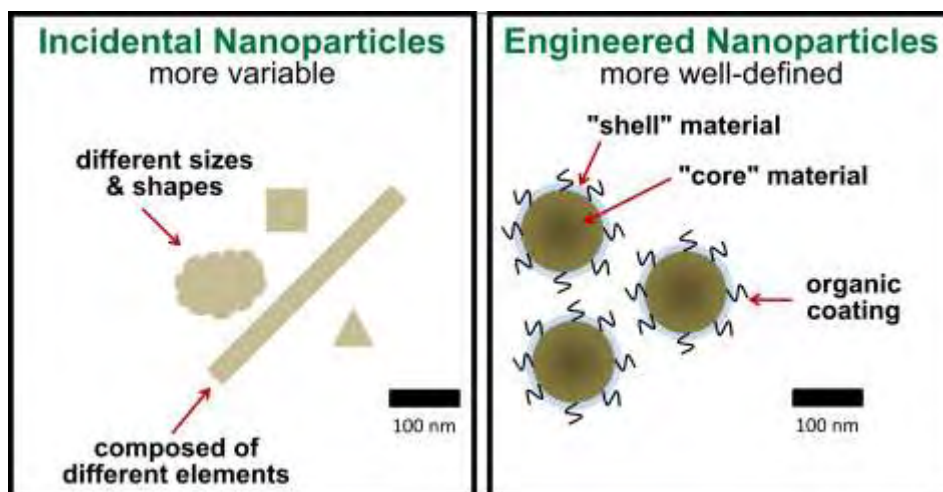
1.3.2 Κατηγορίες νανοςωματιδίων

Τα νανοςωματίδια είναι αποτέλεσμα πολλών ειδών φυσικών και χημικών διεργασιών. Υπάρχουν τα νανοςωματίδια που είναι απόρροια των φυσικών διεργασιών και αυτά που προέρχονται από τις ανθρώπινες δραστηριότητες (εικόνα 6). Τα νανοςωματίδια που παράγονται φυσικά, μπορεί να βρεθούν στην ηφαιστειακή τέφρα, στη θάλασσα, στην ψιλή άμμο ή στη σκόνη.



Εικόνα 6. Φυσικά και τεχνητά νανοςωματίδια (www.sustainable-nano.com)

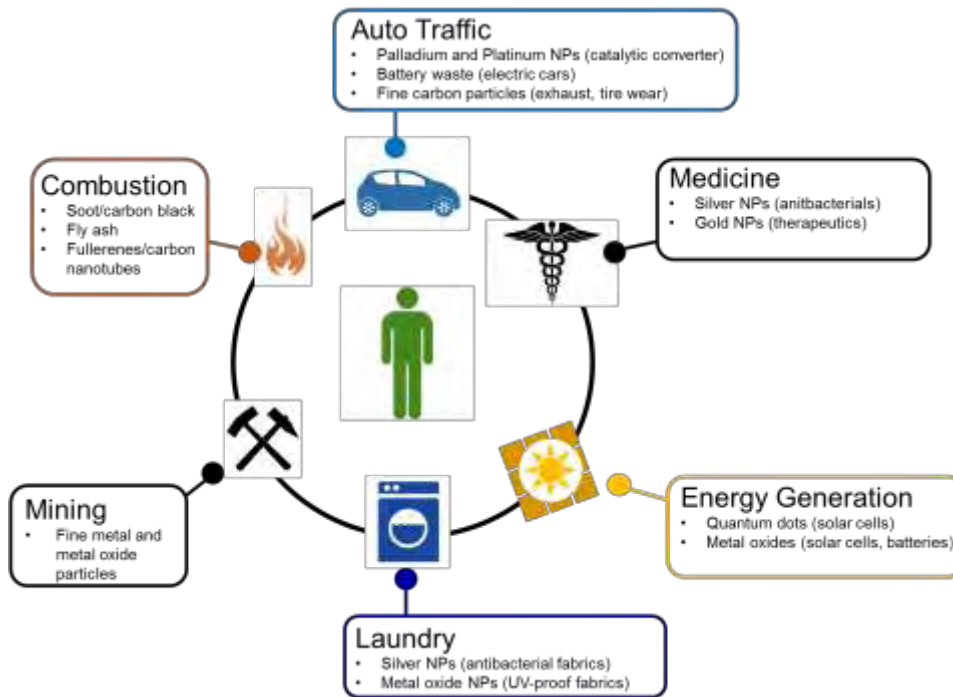
Τα τεχνητά νανοσωματίδια χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τα “τυχαία” και τα “μηχανοποιημένα” (εικόνα 7). Τα τυχαία (incidental) νανοσωματίδια είναι παραπροϊόντα των ανθρώπινων δραστηριοτήτων, με μη ελεγχόμενα μεγέθη και σχήματα και αποτελούν συνονθύλευμα διαφορετικών στοιχείων. Προέρχονται από κινητήρες που λειτουργούν με ντίζελ, από εξόρυξη μεγάλης κλίμακας ακόμη και από την έναρξη μιας πυρκαγιάς. Τα μηχανοποιημένα (engineered) νανοσωματίδια από την άλλη πλευρά, συντίθενται από τον άνθρωπο και έχουν ελεγχόμενα μεγέθη, σχήματα και σύνθεση. Μπορεί ακόμη να περιέχουν στρώματα με διαφορετικές χημικές συνθέσεις (για παράδειγμα έναν πυρήνα φτιαγμένο από χρυσό, που καλύπτεται από περίβλημα πυριτίου επικαλυμμένο με ειδικά επιλεγμένα αντισώματα).



Εικόνα 7. Τυχαία και μηχανοποιημένα νανοσωματίδια (www.sustainable-nano.com)

1.3.3 Εφαρμογές των νανοσωματιδίων

Μεταξύ των ανθρώπινων δραστηριοτήτων που μπορούν να απελευθερώσουν νανοσωματίδια είναι η καύση ορυκτών καυσίμων, η μεγάλης κλίμακας εξόρυξη και η κυκλοφορία των αυτοκινήτων. Τα νανοσωματίδια βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορους τομείς όπως στην ιατρική, στη βιομηχανία, στην παραγωγή ενέργειας, σε ηλεκτρονικές συσκευές και σε πολλά καταναλωτικά προϊόντα (εικόνα 8).



Εικόνα 8. Πηγές έκθεσης σε νανοσωματίδια (www.sustainable-nano.com)

Νανοσωματίδια περιέχονται σε είδη ένδυσης, αντηλιακά, καλλυντικά, αθλητικά είδη, μπαταρίες, συσκευασίες τροφίμων και σε συμπληρώματα διατροφής όπως φαίνεται στην **εικόνα 9** (Maynard et al., 2006). Υπάρχουν σαμπουάν που περιέχουν νανοσωματίδια χαλκού, οδοντόκρεμες με νανοσωματίδια αργύρου, αντηλιακά με νανοσωματίδια διοξειδίου του τιτανίου ή οξειδίου του ψευδαργύρου, ρακέτες του τένις με νανοσωματίδια άνθρακα. Τα νανοσωματίδια πυριτικού άλατος βρίσκουν εφαρμογή σε μία πλαστική μεμβράνη που χρησιμοποιείται στις συσκευασίες τροφίμων καθώς εμποδίζουν την είσοδο αερίων (όπως το οξυγόνο) ή υγρασίας. Τα νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία για την επικάλυψη ξύλου, πλαστικού και υφασμάτων με σκοπό την προστασία τους από την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (Ju-Nam and Lead, 2008).



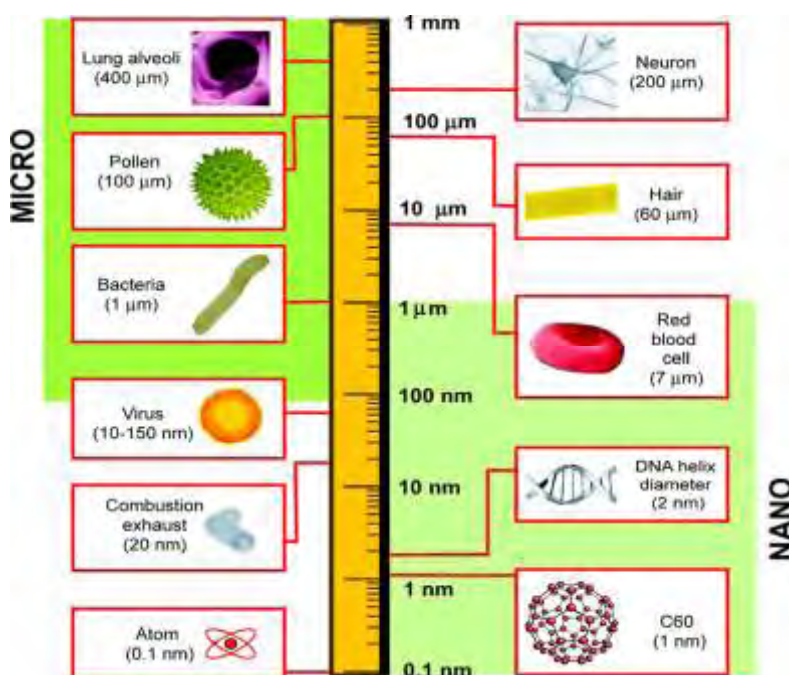
Εικόνα 9. Προϊόντα που περιέχουν νανοσωματίδια

Στον τομέα της ιατρικής τα νανοσωματίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών ή εμβολίων. Εξετάζεται η χρήση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων συνδεδεμένων σε ένα είδος νανοσωματιδίων που ονομάζονται νανοδιαμάντια, για τη θεραπεία όγκων του εγκεφάλου (Xi et al., 2014) ή της λευχαιμίας (Man et al., 2014). Επίσης, τα νανοδιαμάντια συνδεδεμένα με μόρια πρωτεϊνών μπορούν να ευνοήσουν την ανάπτυξη των οστών σε μοσχεύματα αρθρώσεων (Moore et al., 2013). Ορισμένα νανοσωματίδια όπως αυτά του οξειδίου του δημητρίου δρουν ως αντιοξειδωτικά, απομακρύνοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που υπάρχουν στην κυκλοφορία του αίματος ασθενούς μετά από τραυματική κάκωση (Lee et al., 2013) ενώ τα νανοσωματίδια χρυσού μελετώνται για στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων σε νεοπλασματικούς όγκους (Obaid et al., 2015).

1.3.4 Είσοδος νανοσωματιδίων στα κύτταρα

Τα νανοσωματίδια λόγω του μικρού μεγέθους τους μπορούν να διεισδύσουν στα κύτταρα και να συσσωρευτούν σε κυτταρικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια ή ο πυρήνας όπου η παρουσία τους μπορεί να έχει επιβλαβείς επιδράσεις. Αυτή η ικανότητα είναι ιδιαίτερα σημαντική για τα νανοσωματίδια που έχουν σχεδιαστεί για να διεισδύουν στις κυτταρικές μεμβράνες και να στοχεύουν δομές όπως ο πυρήνας για τη μεταφορά θεραπευτικών ουσιών (Donaldson and Poland, 2012). Υπάρχουν in

in vitro μελέτες που υποστηρίζουν ότι τα μηχανοποιημένα νανοσωματίδια μπορούν να εισέλθουν στον πυρήνα όπως για παράδειγμα για τους νανοσωλήνες άνθρακα, που μπορούν να προκαλέσουν γενετικές ανωμαλίες (Donaldson and Poland, 2012). Στην **εικόνα 10** (Buzea et al., 2007) μπορούμε να διακρίνουμε το μέγεθος διαφόρων δομών και μικροοργανισμών σε σύγκριση με τα νανοσωματίδια που παράγονται από εξατμίσεις και καύσεις (combustion exhaust 20nm). Αυτά τα νανοσωματίδια για παράδειγμα είναι πολύ μικρότερα από τις κυψελίδες του πνεύμονα (lung alveoli) και μπορούν εύκολα να εισέλθουν σε αυτές.



Εικόνα 10. Σύγκριση μεγέθους νανοσωματιδίων και διαφόρων δομών και μικροοργανισμών

1.3.5 Αλληλεπίδραση νανοσωματιδίων με δομές του πνεύμονα

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις των νανοσωματιδίων με τις δομές του πνεύμονα. Αρχικά, τα νανοσωματίδια που εισέρχονται στον οργανισμό μέσω της εισπνοής, αλληλεπιδρούν με τα κυψελιδικά μακροφάγα. Ωστόσο, ένα μεγάλο μέρος των νανοσωματιδίων δεν ανευρίσκεται στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα πιθανόν λόγω πρόσδεσης σε πρωτεΐνες της επιφάνειας των επιθηλιακών κυττάρων ή λόγω πρόσληψής τους από τα επιθηλιακά κύτταρα ή λόγω μετατόπισης πάνω από το κυψελιδικό επιθήλιο.

Μία μελέτη σε κυψελιδικά μακροφάγα πνεύμονα σε αρουραίους έδειξε ότι μετά από έκθεση σε νανοσωματίδια TiO_2 μέσω εισπνοής, μόνο ένα μικρό μέρος των νανοσωματιδίων παραλαμβάνεται από τα κυψελιδικά μακροφάγα (Geiser et al., 2008). Εκτός από την πρόσληψη από τα μακροφάγα, έχει αναφερθεί και εντόπιση των νανοσωματιδίων στο διάμεσο ιστό του πνεύμονα μετά από εισπνοή νανοσωματιδίων TiO_2 σε μελέτη που έγινε σε αρουραίους (Geiser et al., 2005). Ένας άλλος μηχανισμός είναι η παρακυτταρική μεταφορά των νανοσωματιδίων στον πνεύμονα η οποία μπορεί να γίνει όταν η διαπερατότητα αυξηθεί για παράδειγμα λόγω υπεροξειδίου του υδρογόνου ή ισταμίνης (Meiring et al., 2005). Η ενδοκυττάρωση είναι ο κύριος τρόπος πρόσληψης των σωματιδίων όπως αναφέρεται σε πολλές μελέτες (Shukla et al., 2005; Singh et al., 2007). Μετά την εισπνοή σωματιδίων χρυσού σε μία μελέτη σε αρουραίους, παρατηρήθηκαν τα σωματίδια μέσα σε κυστίδια της μεμβράνης των κυψελιδικών μακροφάγων και των κυψελιδικών κυττάρων τύπου I (Takenaka et al., 2006).

Οι δυνατές αλληλεπιδράσεις των νανοσωματιδίων με πνευμονικές δομές συνοψίζονται στο διάγραμμα ροής (**εικόνα 11**) όπου περιλαμβάνει μία επισκόπηση των υποθετικών αλληλεπιδράσεων που βρίσκονται υπό διερεύνηση (Mühlfeld et al., 2008). Μετά την εισπνοή, τα νανοσωματίδια φθάνουν στην περιοχή ανταλλαγής αερίων στις κυψελίδες. Εκεί μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις πρωτεΐνες A και D του επιφανειοδραστικού (SP-A, SP-D) ή να εισέλθουν σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου των κυψελιδικών τύπου II (AE2) ή τύπου I (AEI), των κυψελιδικών μακροφάγων (AM) ή των κυψελιδικών δενδριτικών κυττάρων (DC). Η είσοδος στα κύτταρα μπορεί να επηρεάσει συγκεκριμένες κυτταρικές λειτουργίες (μεταβολισμός επιφανειοδραστικού στα AEII) ή να οδηγήσει στην έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου- α (TNF- α). Οι φλεγμονώδεις πρωτεΐνες μπορεί να οδηγήσουν στην παρακυτταρική μετατόπιση των νανοσωματιδίων, η οποία δεν είναι συχνή σε υγιείς πνεύμονες. Η μετατόπιση λαμβάνει χώρα μέσω των AEI προς το διάμεσο ιστό και τελικά στην κυκλοφορία του αίματος από τα ενδοθηλιακά κύτταρα.



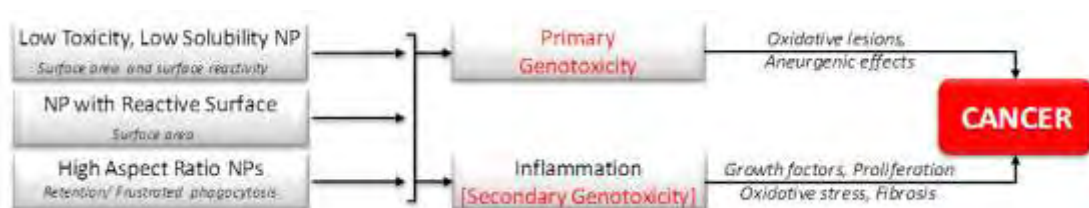
Εικόνα 11. Σύνοψη των πιθανών αλληλεπιδράσεων των νανοσωματιδίων με τις δομές του πνεύμονα.

1.3.6 Εισπνεόμενα νανοσωματίδια και καρκίνος

Τα μηχανοποιημένα νανοσωματίδια όπως του διοξειδίου του τιτανίου (TiO_2), του μαύρου άνθρακα και του πυριτίου, παράγονται εδώ και πολλές δεκαετίες αλλά υπάρχει ανησυχία ότι μπορεί να θέσουν σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία. Τα μηχανοποιημένα νανοσωματίδια αντιπροσωπεύουν ένα μεγάλο μέρος της βιομηχανίας λόγω των χρήσιμων ιδιοτήτων τους και η εισπνοή τους μπορεί εν δυνάμει να προκαλέσει καρκίνο του πνεύμονα. Δεν υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα μηχανοποιημένα νανοσωματίδια έχουν καρκινογόνες ιδιότητες. Ωστόσο, οι ιδιότητες αυτές μπορεί να διαφέρουν ανάμεσα σε διαφορετικά υλικά, μεγέθη, σχήματα και στη διαφορετική σύνθεση των εκάστοτε νανοσωματιδίων.

Τα νανοσωματίδια χαμηλής τοξικότητας και χαμηλής διαλυτότητας (Low Toxicity Low Solubility NP) είναι απίθανο να προκαλέσουν κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου καθώς δεν είναι βιολογικά ενεργά. Τα νανοσωματίδια που έχουν μία πιο δραστική επιφάνεια (NP with Reactive Surface) μπορεί να προκαλέσουν την ανάπτυξη φλεγμονής πιο εύκολα και η φλεγμονή μπορεί να είναι έντονη ώστε να

οδηγήσει σε δευτερογενή καρκινογένεση. Τα νανοσωματίδια με υψηλή αναλογία διαστάσεων (High aspect ratio nanoparticles) που έχουν σχήμα ινών όπως ο αμίαντος, μπορεί να αποτελούν ιδιαίτερο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου στον πνεύμονα και στο μεσοθήλιο του υπεζωκότα και του περιτοναίου, όπως φαίνεται στην **εικόνα 12** (Donaldson and Poland, 2012).



Εικόνα 12. Διάγραμμα που δείχνει τις πιθανές διαδικασίες που θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην καρκινογένεση των μηχανοποιημένων νανοσωματιδίων.

Μελέτες σε αρουραίους που εκτέθηκαν σε νανοσωματίδια μέσω της εισπνοής, δείχνουν ότι μερικά σωματίδια έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν καρκίνο του πνεύμονα μετά από μακροχρόνια έκθεση και συσσώρευση επαρκούς δόσης. Ορισμένα είδη νανοσωματιδίων προκαλούν την παραγωγή οξειδωτικού στρες, την ανάπτυξη φλεγμονής και την εμφάνιση γενετοξικότητας, διεργασίες οι οποίες είναι συνδεδεμένες με την εμφάνιση καρκίνου (Donaldson and Poland, 2012).

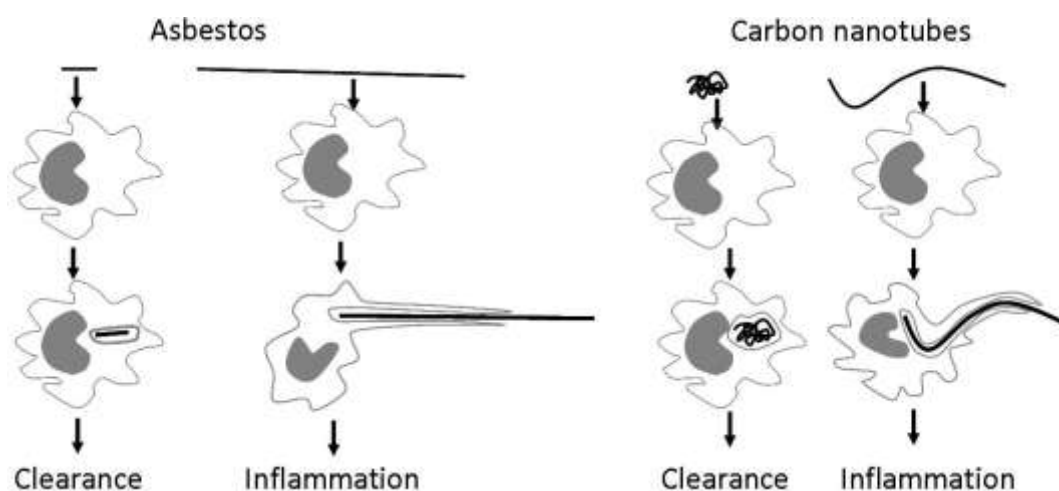
Η έκθεση σε αμίαντο, ένα φυσικό ινώδες νανοσωματίδιο, έχει συσχετιστεί με τη δημιουργία καρκίνου του πνεύμονα και μεσοθηλιώματος. Οι δυσμενείς επιδράσεις του αμιάντου στην υγεία φαίνονται στον **πίνακα 1** (Donaldson et al., 2009) και συγκεκριμένα στον υπεζωκότα εμφανίζεται ίνωση, υπεζωκοτικές πλάκες και μεσοθηλίωμα. Το κακόηθες μεσοθηλίωμα είναι ένας πολύ επιθετικός καρκίνος που προέρχεται από μεσοθηλιακά κύτταρα όπως αυτά του υπεζωκότα (Lehn, 2002).

Οι ίνες αμιάντου με υψηλή αναλογία διαστάσεων (μήκος προς πλάτος) είναι αρκετά λεπτές ώστε μέσω της εισπνοής μπορούν να εισέλθουν στον πνεύμονα και να καταστούν παθογόνες. Οι ιδιότητες των ινών όπως η διάμετρος, το μήκος και η βιοδιατήρηση δηλαδή η διάρκεια παραμονής των ινών στους πνεύμονες, επηρεάζουν την παθογένειά τους. Για παράδειγμα οι μακριές (μήκος μεγαλύτερο των 10 μm), λεπτές ίνες που παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους πνεύμονες είναι ικανές να προκαλέσουν μία σειρά από διεργασίες οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση (Donaldson et al., 2010).

Πίνακας 1. Δυσμενείς επιδράσεις αμιάντου στην υγεία

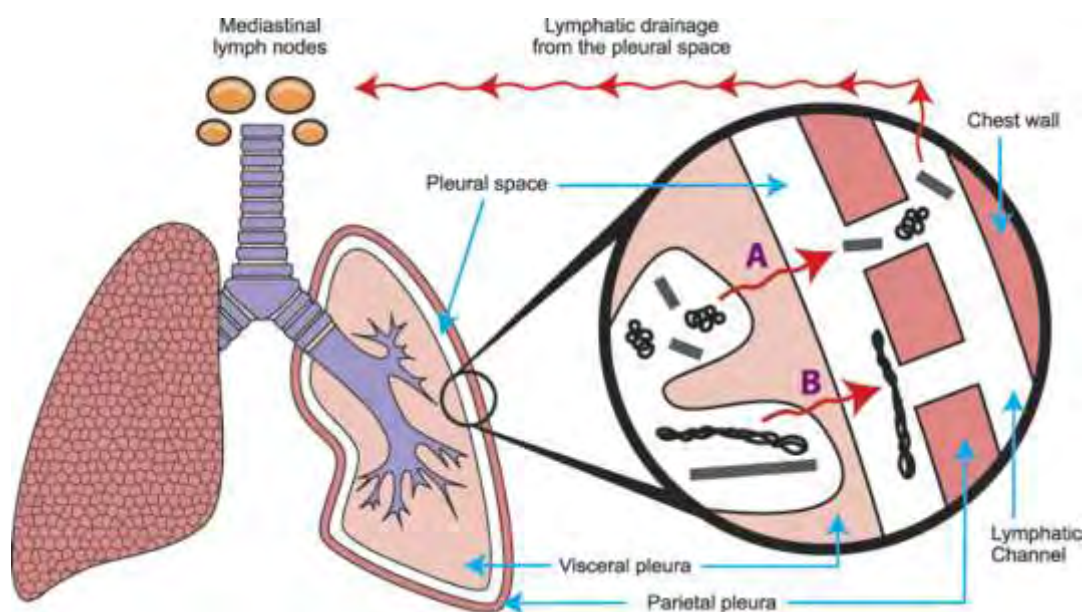
| Adverse effects | | |
|-----------------|--|---|
| Particle | Pulmonary | Extra-pulmonary |
| Asbestos | Interstitial fibrosis, bronchogenic carcinoma, pleural mesothelioma, pleural fibrosis, pleural plaques | Peritoneal mesothelioma, Autoimmune disease |

Οι μακριές και λεπτές ίνες μπορούν επίσης να προκαλέσουν χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση μέσω της απογοητευμένης φαγοκυττάρωσης, ένα φαινόμενο όπου τα μακροφάγα αποτυγχάνουν να περικλείουν πλήρως τις μακριές ίνες και αυτές διεγείρουν την παραγωγή κυτταροκινών και άλλων ιστοτοξικών προϊόντων. Η απογοητευμένη φαγοκυττάρωση των μακρών ινών που πιθανόν ισχύει για τον αμιάντο και για τους νανοσωλήνες άνθρακα, απεικονίζεται στην **εικόνα 13** (Donaldson et al., 2010). Οι μεγάλοι νανοσωλήνες άνθρακα πιθανόν προκαλούν φλεγμονή μέσω αυτής της διαδικασίας όταν έχουν μήκος μεγαλύτερο από περίπου 15 μm (Poland et al., 2008).



Εικόνα 13. Το παράδειγμα της απογοητευμένης φαγοκυττάρωσης για τις μακριές και βραχείες ίνες αμιάντου (αριστερά) και για διάφορους τύπους νανοσωλήνων άνθρακα (δεξιά). Τα μακροφάγα είναι ικανά να φαγοκυτταρώσουν τις βραχείες ίνες αμιάντου ή τα μπερδεμένα (tangled), συμπαγή σωματίδια νανοσωλήνων άνθρακα. Αντίθετα, τα μακροφάγα δεν μπορούν να επεκταθούν ώστε να περιβάλλουν τις μακριές ίνες αμιάντου ή τους μεγάλους νανοσωλήνες, με αποτέλεσμα την ατελή ή απογοητευμένη φαγοκυττάρωση η οποία οδηγεί σε φλεγμονή.

Τα νανοσωματίδια με υψηλή αναλογία διαστάσεων όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα και τα νανοσύρματα του οξειδίου του νικελίου δείχνουν παθογένεια που εξαρτάται από το μήκος τους, παρόμοια με αυτή του αμιάντου στα μεσοθηλιακά κύτταρα (Poland et al., 2008; 2012). Έγχυση μακρών νανοϊνών στην υπεζωκοτική κοιλότητα οδηγεί σε επίμονη φλεγμονή και τελικά ίνωση στο τοιχωματικό μεσοθήλιο, απ' όπου ανακύπτει το μεσοθηλίωμα και μπορεί να προέρχονται άλλες παθολογικές καταστάσεις του υπεζωκότα (Donaldson et al., 2010). Αντίθετα, οι βραχείες νανοϊνες προκαλούν μέτρια φλεγμονή ή καθόλου, χωρίς παθολογικά χαρακτηριστικά στον τοιχωματικό υπεζωκότα (εικόνα 14). Αυτή η διαφορά που παρατηρείται στις διαφορετικού μήκους ίνες οφείλεται στο ότι οι μακριές ίνες διατηρούνται (σε σχέση με τις βραχείες) στα στόματα του τοιχωματικού υπεζωκότα ενώ οι βραχείες ίνες ακολουθούν τη λεμφική ροή προς τους μεσοπνευμόνιους λεμφαδένες (Murphy et al., 2011).



Εικόνα 14. Διαγραμματική απεικόνιση της εξαρτώμενης από το μήκος απομάκρυνσης σωματιδίων από την υπεζωκοτική κοιλότητα. **A:** Οι βραχείες ίνες και οι μικροί νανοσωλήνες άνθρακα που φτάνουν στις κυψελίδες, μεταναστεύουν στην υπεζωκοτική κοιλότητα και εξέρχονται με τη ροή του πλευριτικού υγρού διαμέσου των στομάτων όπου ακολουθούν τη λεμφική ροή προς τους μεσοπνευμόνιους λεμφαδένες. **B:** Οι μακριές ίνες και οι μεγάλοι νανοσωλήνες άνθρακα επίσης φτάνουν στην υπεζωκοτική κοιλότητα από τις κυψελίδες αλλά δεν μπορούν να υπερικήσουν τα στόματα και διατηρούνται όπου προκαλούν φλεγμονή και ενδεχομένως μακροχρόνια νόσο.

Ένα μέρος όλων των σωματιδίων φθάνουν στον υπεζωκότα και ένας μηχανισμός απομάκρυνσης των σωματιδίων είναι διαμέσου των στομάτων του τοιχωματικού υπεζωκότα. Τα στόματα είναι το μέρος όπου διατηρούνται οι μεγάλες ίνες, οδηγώντας σε φλεγμονή και σε παθολογία του υπεζωκότα συμπεριλαμβανομένου του μεσοθηλιώματος (Donaldson et al., 2010).

1.3.7 Νανοσωματίδια και υπεζωκότας: επιδράσεις νανοσωλήνων άνθρακα στον υπεζωκότα

Οι νανοσωλήνες άνθρακα που είναι από τα πιο καλά μελετημένα σωματίδια, χρησιμοποιούνται σε ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών, από ηλεκτρονικές συσκευές μέχρι την ιατρική. Ενώ υπάρχουν πολλές μελέτες σχετικά με τις επιδράσεις τους σε διάφορα όργανα, οι επιδράσεις τους στον υπεζωκότα περιγράφονται σε περιορισμένο αριθμό *in vivo* και *in vitro* μελετών (Dikensoy and Bayram, 2010).

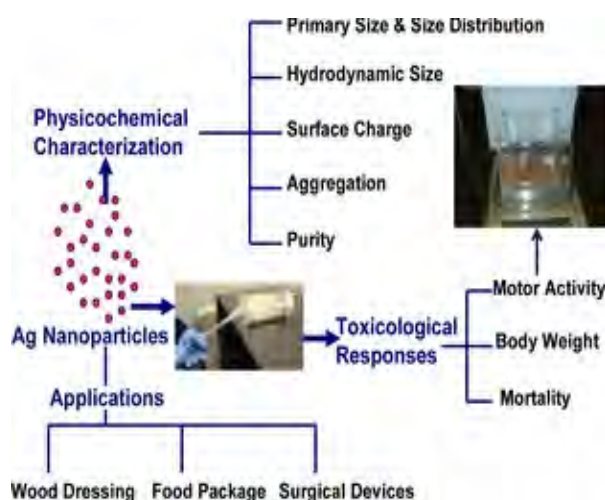
Οι νανοσωλήνες άνθρακα έχουν πολλές δομικές ομοιότητες με τον αμιάντο (έχουν μορφή ίνας ή ράβδου με παρόμοιες αναλογίες μήκους/διαμέτρου) και πιστεύεται ότι μπορεί να προκαλέσουν παρόμοια παθοφυσιολογία στον υπεζωκότα. Σε μία μελέτη που διεξήχθη στην Κίνα, εξετάστηκαν υπεζωκοτικά υγρά και υλικά 7 γυναικών που εκτέθηκαν σε νανοϋλικά για 5-13 μήνες στο χώρο εργασίας τους. Στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα, των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα και στο υπεζωκοτικό υγρό εντοπίστηκαν νανοσωματίδια μεγέθους 30nm. Τα παθολογικά ευρήματα του πνεύμονα και του υπεζωκότα που εμφάνισαν αυτές οι γυναίκες αποδόθηκαν στην παρουσία των νανοσωματιδίων (Song et al., 2009).

Όσον αφορά τις *in vivo* μελέτες, σε μία από αυτές έγινε ενδοπεριτοναϊκή έγχυση νανοσωλήνων άνθρακα διαφορετικών μεγεθών σε ποντικούς C57B1/6. Μετά από την ανάλυση του περιτοναϊκού εκπλύματος και του διαφράγματος παρατηρήθηκε φλεγμονή και κοκκίωμα. Η ιστολογική εξέταση έδειξε την παρουσία απογοητευμένης φαγοκυττάρωσης στα μακροφάγα. Μόνο οι μακριές ίνες προκάλεσαν την απογοητευμένη φαγοκυττάρωση και την ανάπτυξη του κοκκιώματος. Όσον αφορά τις *in vitro* μελέτες, έκθεση φυσιολογικών και καρκινικών

μεσοθηλιακών κυττάρων σε νανοσωλήνες άνθρακα προκάλεσε βλάβη στο DNA (Pacurari et al., 2008), αλλαγές στην κυτταρική βιωσιμότητα και μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ενώ σε κάποιες μελέτες παρατηρήθηκε και κυτταροτοξικότητα (Tabet et al., 2009)

1.3.8 Νανοδομημένα αργύρου: εφαρμογές, *in vitro* και *in vivo* μελέτες

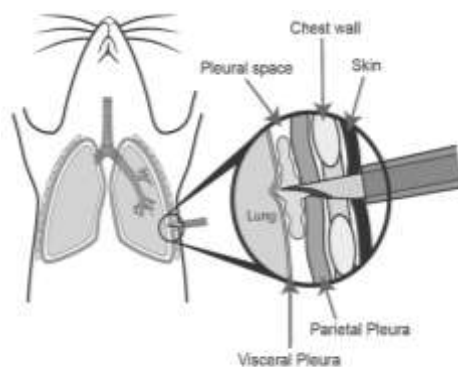
Τα νανοδομημένα αργύρου χρησιμοποιούνται ευρέως λόγω των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων (εικόνα 15). Έχουν πολλές εφαρμογές σε αντιμικροβιακά, ηλεκτρονικά και βιοϊατρικά προϊόντα. Νανοδομημένα αργύρου χρησιμοποιούνται σαν αντιμικροβιακοί παράγοντες σε προϊόντα όπως τα ενδύματα που είναι ανθεκτικά στην οσμή, σε οδοντόκρεμες, σε χειρουργικά εργαλεία και μάσκες, σε επιδέσμους τραυμάτων, σε συσκευασίες τροφίμων, σε ηλεκτρονικές συσκευές ακόμη και στην απολύμανση του νερού. Μία από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες εφαρμογές των νανοδομημένων αργύρου είναι στην επούλωση των πληγών. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει την καλύτερη αποτελεσματικότητα των νανοδομημένων αργύρου στο χρόνο επούλωσης και στην επίτευξη καλύτερου αισθητικού αποτελέσματος μετά την επούλωση (Liu et al., 2010; Kwan et al., 2011; Dhapte et al., 2014).



Εικόνα 15. Εφαρμογές νανοδομημένων αργύρου (www.nanotechproject.org)

Υπάρχουν αρκετές *in vitro* μελέτες όπου εξετάζουν την κυτταροτοξικότητα και τη γενετοξικότητα που προκαλεί η έκθεση σε νανοσωματίδια αργύρου. Οι επιδράσεις των νανοσωματιδίων εξαρτώνται από το μέγεθος, τη συγκέντρωση και το χρόνο έκθεσης σε αυτά. Η κυτταροτοξικότητα βασίζεται κυρίως στην παραγωγή οξειδωτικού στρες. Πιο συγκεκριμένα, η έκθεση σε νανοσωματίδια αργύρου προκαλεί μείωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), αυξημένα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), βλάβες στο DNA, απόπτωση και νέκρωση (Tran et al., 2013).

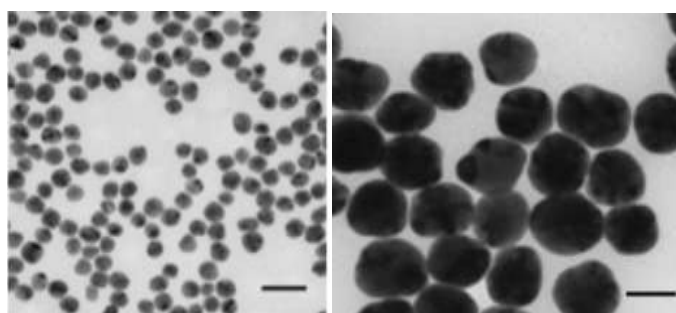
Υπάρχουν επίσης αρκετές *in vivo* μελέτες που εξετάζουν τις επιδράσεις των νανοσωματιδίων αργύρου στην κυτταροτοξικότητα και στη γενετοξικότητα. Τα νανοσωματίδια λόγω του μικρού μεγέθους τους μπορούν να μετακινούνται από την οδό έκθεσης (εισπνοή, κατάποση, δερματική επαφή) σε ζωτικά όργανα και να διεισδύουν μέσα στα κύτταρα (Tran et al., 2013). Μία μόνο μελέτη εξετάζει τις επιδράσεις των νανοσωματιδίων αργύρου στον υπεζωκότα. Σε αυτήν έγινε ενδο-υπεζωκοτική έγχυση νανοϊνών σε ποντικούς (**εικόνα 16**). Μελετήθηκαν οι επιδράσεις νανοϊνών αργύρου 5 καθορισμένων κατηγοριών μήκους και βρέθηκε ότι ίνες μήκους πάνω από 4μm ήταν παθογόνες για τον υπεζωκότα (Schinwald et al., 2012).



Εικόνα 16. Εικονογράφιση της ενδο-υπεζωκοτικής έγχυσης δείχνοντας μία βελόνα που διαπερνά το θωρακικό τοίχωμα για τη χορήγηση των νανοϊνών στην υπεζωκοτική κοιλότητα (Murphy et al., 2011).

1.3.9 Τα υπό μελέτη νανοσωματίδια αργύρου

Σε αντίθεση με την προηγούμενη μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν νανο-ίνες αργύρου, στη συγκεκριμένη εργασία εξετάστηκαν οι επιδράσεις σφαιρικών νανοσωματιδίων αργύρου σε μεσοθηλιακές κυτταρικές σειρές του υπεζωκότα. Χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα νανοσωματιδίων αργύρου 20nm και 60nm σε διάμετρο, τα οποία φαίνονται στην **εικόνα 17**. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων και ο αριθμός των νανοσωματιδίων που περιείχαν όπως παραλήφθηκαν από τη Sigma φαίνονται στον **πίνακα 2**.



Εικόνα 17. Νανοσωματίδια αργύρου 20nm (αριστερά) και 60nm (δεξιά).
(Transmission electron microscopy images from Sigma)

Πίνακας 2. Συσχέτιση μεταξύ της διαμέτρου των νανοσωματιδίων, της συγκέντρωσης μάζας και της συγκέντρωσης του αριθμού.

| Διάμετρος νανοσωματιδίων | Συγκέντρωση μάζας | Συγκέντρωση αριθμού |
|-------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| (nm) | (mg/mL) | (nanoparticles/mL) |
| 20 nm | 0.02 mg/mL | 4.5×10^{11} |
| 60 nm | 0.02 mg/mL | 1.7×10^{10} |

1.4 Ριβονουκλεάσες

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

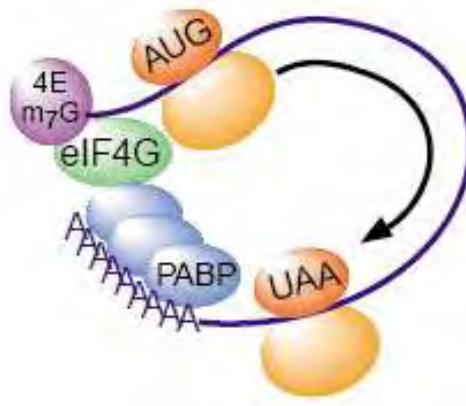
Οι διαδικασίες με τις οποίες ελέγχεται η σταθερότητα ή η αποικοδόμηση των mRNAs, διενεργούνται από cis-δραστικά στοιχεία — όπως είναι η πολυ(A)ουρά, η 5'-καλύπτρα και τα στοιχεία ARE (AU-rich elements) — και από trans-δραστικούς παράγοντες, όπως είναι τα μη-κωδικά μόρια RNA (non-coding RNAs, ncRNAs),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

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

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

Κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνοσύνθεσης, η παρουσία της 5'-καλύπτρας και το μήκος της πολυ(A) ουράς, παίζουν καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της έναρξης της μετάφρασης (Sachs and Varani, 2000). Η δομή της 5'-καλύπτρας αναγνωρίζεται από τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E (Marcotrigiano et al., 1997; Hinnebusch and Lorsch, 2012; Sonenberg and Dever, 2003). Η αναγνώριση της 5'-καλύπτρας είναι σημαντική, καθώς καθορίζει την αποτελεσματική στρατολόγηση του ριβοσώματος στο mRNA. Το σύμπλοκο έναρξης eIF4F περιέχει επίσης τον παράγοντα eIF4G, ο οποίος με τη σειρά του αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική πολυ(A)-συνδεδεμένη πρωτεΐνη PABPC, που προσδένεται στην πολυ(A)ουρά του mRNA. Η αλληλεπίδραση eIF4G και PABPC, κυκλοποιεί το mRNA φέρνοντας κοντά το 5' με το 3'-άκρο (Amrani et al., 2008; Tarun and Sachs, 1996; Wells et al., 1998) (εικόνα 18). Το κυκλοποιημένο mRNA διευκολύνει την στρατολόγηση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας και την επακόλουθη συγκρότηση του πλήρως λειτουργικού 80S ριβοσώματος. Έτσι, η παρουσία της 5'- m7G-καλύπτρας και της πολυ(A) ουράς εγείρει την έναρξη και την επανέναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης και συνεπώς καθορίζουν την ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Η ρύθμιση της πολυ(A) ουράς στο κυτταρόπλασμα, είναι στενά συνδεδεμένη με τον έλεγχο της μετάφρασης. Συνήθως μια πολυ(A) ουρά μεγάλου μήκους σχετίζεται με αποτελεσματική πρωτεϊνοσύνθεση.

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



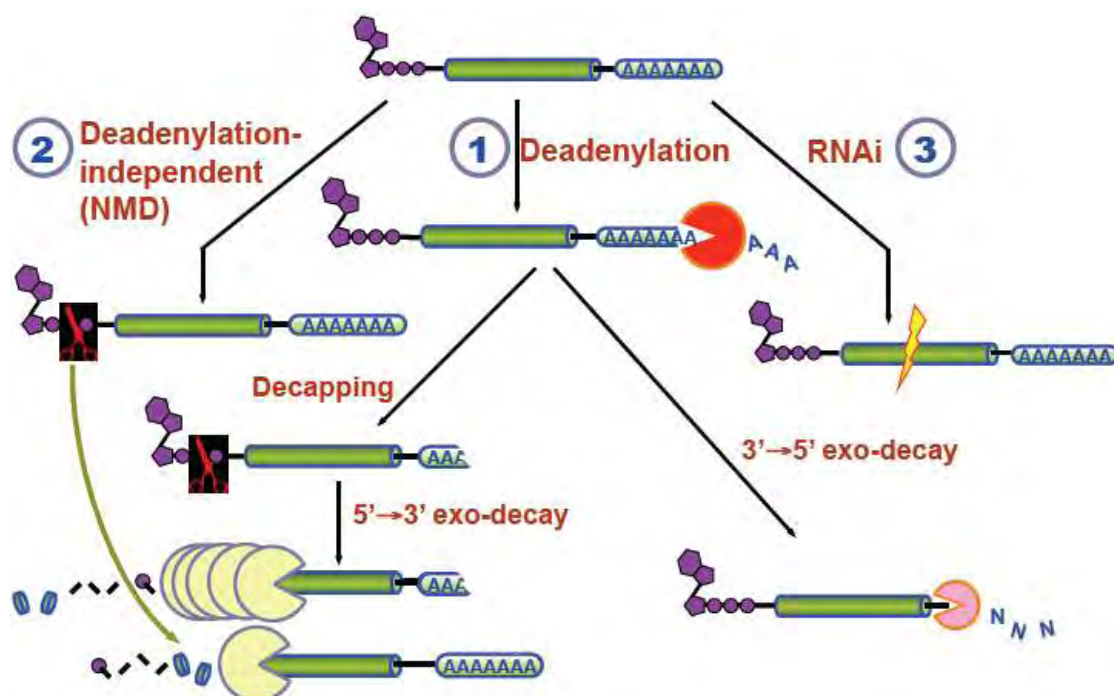
Εικόνα 18. Η αλληλεπίδραση eIF4G και PABPC, κυκλοποιεί το mRNA φέρνοντας κοντά το 5' με το 3'-άκρο (Mitchell and Tollervey, 2001).

Οι ριβονουκλεάσες (RNases) αποτελούν μια ομάδα ενζύμων, που καταλύουν την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών σε μόρια RNA — συμπεριλαμβανομένου των mRNAs — σε φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, έχοντας ως αποτέλεσμα ποικίλες βιολογικές συνέπειες. Οι ριβονουκλεάσες παίζουν μείζονα ρόλο, δρώντας με ενορχηστρωμένο τρόπο στη ρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs, ελέγχοντας μ' αυτό τον τρόπο τη γονιδιακή έκφραση στα κύτταρα των θηλαστικών οργανισμών (Parker and Song, 2004). Πολλές ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των mRNAs, προάγοντας την αποαδενυλίωσή τους, ενώ μερικές εξωριβονουκλεάσες, αποικοδομούν περαιτέρω τα αποαδενυλιωμένα και /ή τα mRNAs, από τα οποία έχει αφαιρεθεί η 5'-καλύπτρα, στα 3' και/ή 5' άκρα τους, αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, οι ενδοριβονουκλεάσες (π.χ. οι PMR1 και RNase L), δεν προαπαιτούν την αφαίρεση της καλύπτρας ή αποαδενυλίωση προκειμένου να δράσουν, πέπτοντας έτσι εσωτερικά τα mRNAs, παράγοντας προϊόντα που αποικοδομούνται περαιτέρω από τις εξωριβονουκλεάσες με κατεύθυνση 5'–3' (XRN1) ή 3'–5' (Exosome complex) (**εικόνα 19**) (Kim and Lee, 2009).

Σε συνθήκες έλλειψης μηχανισμών ελέγχου, οι ενδοουκλεάσες μπορεί να έχουν μια σημαντική επίδραση στη γονιδιακή έκφραση, καθώς μια και μόνο ενδοουκλεολυτική τμήση στο εσωτερικό του mRNA, συνεπάγεται την αδρανοποίησή του (**εικόνα 20C**). Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που εμποδίζουν τέτοιου είδους ανώμαλη αποικοδόμηση των mRNAs, μέσω της ρύθμισης των ενδοουκλεασών. Για παράδειγμα, μερικές από αυτές (RNase L, IRE1 και

PMR1) έχει δειχθεί να ρυθμίζονται αυστηρά μέσω κυτταρικών σημάτων (Sidrauski and Walter, 1997; Peng and Schoenberg, 2007). Μ' αυτό τον τρόπο, τα κύτταρα αποκρίνονται αποτελεσματικά στις αλλαγές του περιβάλλοντός τους μέσω ρύθμισης της έκφρασης σε επίπεδο mRNA.

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



Εικόνα 19. Μονοπάτια αποικοδόμησης των mRNAs (Σχέδιο βάσει Kim and Lee, 2009 και Goldstrohm and Wickens, 2008).

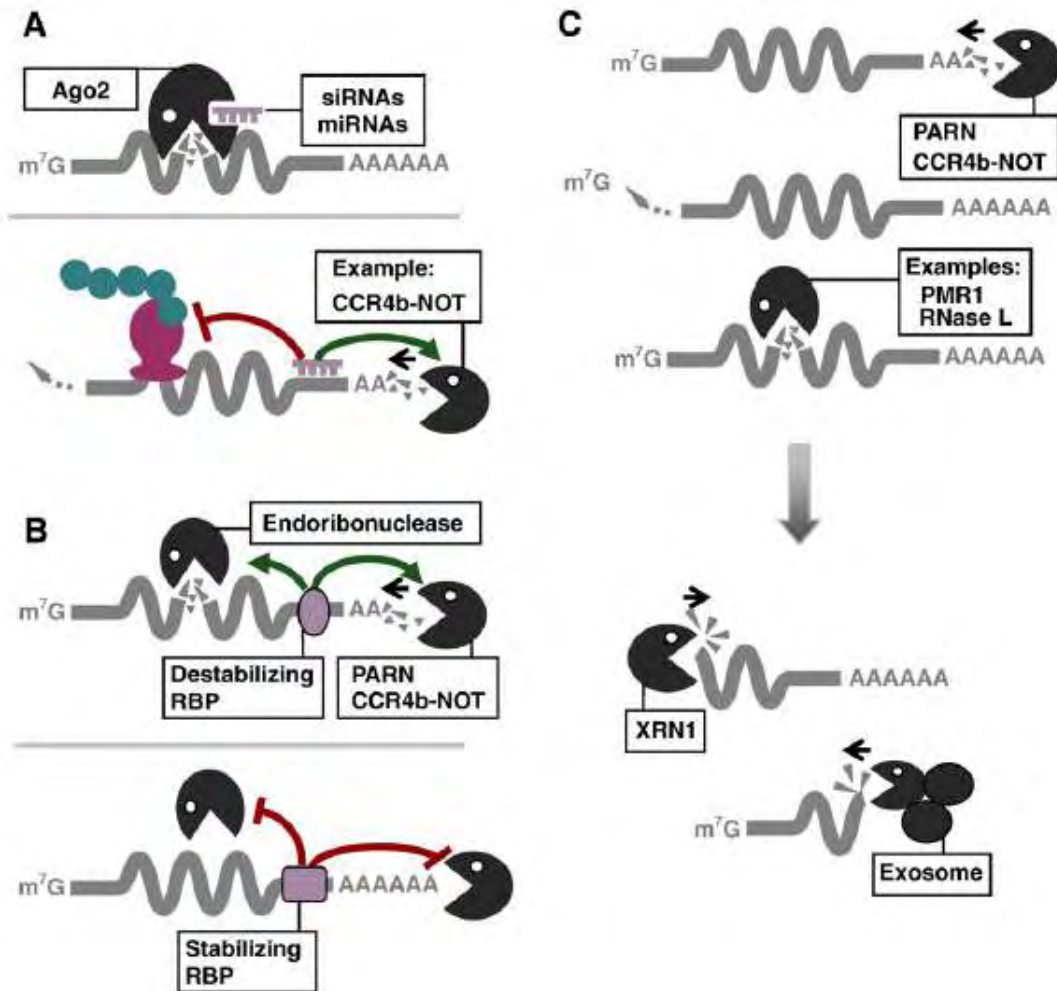
Μελέτες έχουν δείξει ότι οι RNA-συνδεόμενες πρωτεΐνες (RNA-binding proteins, RBPs) μπορούν να επηρεάσουν δραματικά τη σταθερότητα των mRNAs (Paschoud et al., 2006). Αυτές δεν επιτρέπουν μόνο τη διακύμανση των χρόνων ημιζωής των mRNAs, αλλά είναι επίσης ικανές να ελέγχουν το ρυθμό αποικοδόμησης συγκεκριμένων mRNAs ως απόκριση σε διαφορετικά ερεθίσματα. Η δράση αυτή έχει παρατηρηθεί σε μετάγραφα που κωδικοποιούν κυτταροκίνες ή

πρωτο-ογκογονίδια, τα οποία φέρουν ARE αλληλουχίες στην 3'-αμετάφραστη περιοχή τους (3'-UTR) (Ross, 1995).

Οι RBPs μπορούν να προσδένονται στις 3'-μη μεταφραζόμενες περιοχές των mRNAs, αλλά και στην κωδική τους περιοχή και να τα προστατεύουν από τους μηχανισμούς αποικοδόμησης (**εικόνα 20B**). Έχειδειχθεί ότι η πρωτεΐνη HuR μπορεί να προάγει την υπερέκφραση ενός ογκογόνου βιοδείκτη, αυξάνοντας το χρόνο ημιζωής του mRNA του (Guo and Hartley, 2006). Άλλες RBPs, όπως η KSRP, μπορούν να εγείρουν την αποικοδόμηση πολλών κυτταρικών mRNAs τα οποία φέρουν τα στοιχεία ARE, μέσω στρατολόγησης ενδοριβονουκλεασών και παραγόντων αποαδενυλίωσης προκειμένου να ρυθμίσουν την έκφρασή τους (**εικόνα 20B**) (Gherzi et al., 2004). Οι RBPs έχουν διαφορετικές επιδράσεις στα κύτταρα, που εξαρτώνται από τα mRNAs με τα οποία αλληλεπιδρούν. Για παράδειγμα, δείχθηκε ότι η υπερέκφραση της HuR είναι υπεύθυνη για την αύξηση ενός ογκογόνου mRNA στους ινοβλάστες (Sobue et al., 2008), ενώ η ίδια πρωτεΐνη μπορεί να σταθεροποιήσει ένα mRNA ογκοκατασταλτικό παράγοντα (Tumour Suppressor Gene, TSG), σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη (Quann et al., 2007). Η ρυθμιστική ικανότητα των RBPs έγκειται στην ισορροπία μεταξύ της πυροδότησης ή της καθυστέρησης της αποικοδόμησης των mRNAs.

Έχειδειχθεί ότι οι πρωτεΐνες RBPs, καθώς και τα μη-κωδικά μόρια RNA (ncRNAs) μπορούν και στρατολογούν συστατικά του μονοπατιού αποαδενυλίωσης, τα οποία σε συνδυασμό με άλλες ριβονουκλεάσες, ρυθμίζουν mRNA ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών παραγόντων (Jackson and Standart, 2007). Η PARN αποτελεί ένα τέτοιο παράδειγμα (**εικόνα 20**).

Η λειτουργία των μη-κωδικών μορίων RNA (ncRNAs) στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης επιτελείται μέσω του μηχανισμού RNAi που περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.4.3. Η πρόσδεση ενός siRNA/miRNA μέσω συμπληρωματικότητας στο mRNA, πυροδοτεί την έναρξη της αποικοδόμησής του από την υπομονάδα AGO του συμπλόκου RISC, η οποία έχει ενεργότητα ριβονουκλεάσης. Εναλλακτικά, η πρόσδεση ενός miRNA στο mRNA, προκαλεί τη στρατολόγηση αποαδενυλασών, ένζυμα τα οποία επιτελούν την βράχυνση της πολυ(A)ουράς — το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμηση — ενώ παράλληλα καταστέλλεται και η μετάφραση του μεταγράφου (**εικόνα 20A**).



Εικόνα 20. Ρόλος των ριβονουκλεασών, των miRNAs και των RNA-συνδεόμενων πρωτεϊνών στη ρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs (Kim and Lee, 2009).

1.4.1 Αποαδενυλάσες

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

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

λιγότερο αποτελεσματικά και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή (Goldstrohm 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 συντονίζονται από τα ιόντα Mg^{2+} . Μέλη αυτής της ομάδας αποτελούν η αποαδενυλάση POP2 (γνωστή και ως CAF1), η CAF1Z, η πολυ(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 CCR4, Nocturnin και Angel. Τα μέλη των οικογενειών POP2, CCR4, PAN2 και Angel είναι παρόντα σε όλους τους ευκαρυώτες, ενώ άλλες αποαδενυλάσες είναι λιγότερο συντηρημένες (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. Στον **πίνακα 3** παρουσιάζεται συνοπτικά η κατάταξη των αποαδενυλασών στις δύο υπερ-οικογένειες καθώς και ενδεικτικά παραδείγματα ενζύμων που εντοπίζονται σε αντιπροσωπευτικά είδη οργανισμών.

Οι αποαδενυλάσες, εκτός από τον ρόλο που έχουν στη διαδικασία αποικοδόμησης των mRNAs, επιτελούν και αρκετούς εξειδικευμένους, ρυθμιστικούς, ρόλους. Κάποιες είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των οργανισμών. Άλλες, όπως είναι η PARN (*Xenopus laevis*) είναι σημαντικές κατά την πρόωμη ανάπτυξη, ενώ άλλες απαιτούνται για τη γονιμότητα και τη μεταβολική ομοιόσταση (CNOT7 και Nocturnin στα ποντίκια).

Πίνακας 3. Κατάταξη των αποαδενυλασών στις δύο μεγάλες υπερικογένειες και εντοπισμός τους σε αντιπροσωπευτικά είδη οργανισμών.

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

Goldstrohm and Wickens, 2008. SC: *S.cerevisiae*, CE: *C. elegans*, DM: *D.melanogaster*, XL: *X.laevis*, MM: *M. musculus*, HS: *H.sapiens*,

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 ρυθμιστικούς παράγοντες οι οποίοι προσδένονται σε εξειδικευμένες αλληλουχίες των mRNAs. Ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται συνήθως στις 3' αμετάφραστες περιοχές συγκεκριμένων mRNAs (3'-UTR) διαμεσολαβούν και ενισχύουν την αποαδενυλίωση τους. Αυτά τα στοιχεία αναγνωρίζονται από παράγοντες οι οποίοι στρατολογούν τις αποαδενυλάσες προωθώντας έτσι την αποαδενυλίωση. Παραδείγματα παραγόντων που δεσμεύονται στις 3'-UTR περιοχές των mRNA, αποτελούν τα miRNAs και οι CUG-BP, PUF και CPEB πρωτεΐνες (Goldstrohm and Wickens, 2008, Kadyrova et al., 2007).

Εναλλακτικά, προώθηση της αποαδενυλίωσης μπορεί να επιτευχθεί μέσω αλληλεπίδρασης της PABP —πρωτεΐνη που αναγνωρίζει και προσδένεται στην πολυ(A) ουρά (Mitchell and Tollervey, 2001) — και συγκεκριμένων αποαδενυλασών (π.χ η PABP στρατολογεί το σύμπλοκο PAN2-PAN3). Επίσης, η 5' καλύπτρα του

mRNA μπορεί να επηρεάσει θετικά την αποαδενλίωση διεγείροντας την δραστικότητα και την ικανότητα επεξεργασίας κάποιων αποαδενυλασών (χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η PARN). Ο ρυθμός αποαδενλίωσης επηρεάζεται από δύο μορφές χωρικού ελέγχου: τον πυρήνο-κυτταροπλασματικό διαχωρισμό των αποαδενυλασών και την εντόπισή τους σε κοκκία. Στην πρώτη περίπτωση, προβλήματα σωστού διαχωρισμού των αποαδενυλασών μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος μπορούν να αποβούν μοιραία για την τύχη mRNAs που δεν θα έπρεπε να αποικοδομηθούν. Από την άλλη μεριά, συγκεκριμένες αποαδενυλάσες εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά κοκκία, τα οποία περιέχουν κατεσταλμένα mRNAs, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να ενεργοποιηθούν. Η συν-εντόπιση αυτών των αποαδενυλασών με τα υποστρώματά τους πιθανότατα διευκολύνει την κινητική της αποαδενλίωσης (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Οι αποαδενυλάσες συνήθως αποτελούν τμήμα συμπλόκων. Οι παρακείμενες υπομονάδες, επηρεάζουν τη δραστικότητα των αποαδενυλασών. Για παράδειγμα, η PAN2 δεσμεύεται στην PAN3, που με τη σειρά της αλληλεπιδρά με την PABP. Η τελευταία στρατολογεί το σύμπλοκο PAN2-PAN3 στην πολυ(A) ουρά των mRNA-στόχων (Hammet et al. 2002). Άλλες αποαδενυλάσες σχηματίζουν ομοδιμερή και άλλες ετεροδιμερή. Ο ετεροδιμερισμός αυξάνει σημαντικά το ρεπερτόριο των συμπλόκων των αποαδενυλασών που σχηματίζονται, καθώς διαφορετικά ετεροδιμερή έχουν και διαφορετικές ενζυμικές και ρυθμιστικές ιδιότητες. Η δυνατότητα για έλεγχο της αποαδενλίωσης καθίσταται τεράστια και ιδιαίτερα πολύπλοκη, λόγω της αλληλεπίδρασης 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 αποαδενλίωσης, συστατικά που καταστέλλουν τη μετάφραση και συστατικά που ενισχύουν την αποικοδόμηση του mRNA. Η πολυλειτουργικότητα αυτή παρέχει ευκαιρίες για πολυάριθμα σημεία ρύθμισης της αποαδενλίωσης, της μετάφρασης και της αποικοδόμησης των mRNAs, είτε ξεχωριστά είτε συντονισμένα (Goldstrohm and Wickens, 2008).

1.4.2 Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN)

Η PARN αποτελεί μοναδική ευκαρυωτική ριβονουκλεάση με πολυ(A)αποικοδομητική ενεργότητα. Είναι η μόνη αποαδενυλάση που έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά άμεσα κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης της πολυ(A) ουράς και με τη δομή της 5'-καλύπτρας και με την πολυ(A) ουρά του mRNA (Dehlin et al., 2000). Αυτή η ιδιότητα της PARN την καθιστά ικανή να συμμετέχει στον μεταβολισμό του mRNA και ότι είναι πιθανός ρυθμιστής των ευκαρυωτικών mRNAs, αφού είναι τα μόνα που φέρουν καλύπτρα και πολυ(A) ουρά.

Η PARN ανήκει στην DnaQ-like υπερ-οικογένεια των 3'-5' εξωριβονουκλεασών (Körner et al., 1998), οι οποίες μοιράζονται έναν συντηρημένο καταλυτικό πυρήνα, που περιέχει το DEDD μοτίβο (πίνακας 3) αποτελούμενο από τα τέσσερα καταλυτικά αμινοξέα Asp, Glu, Asp και Asp (Marchler-Bauer et al., 2011). Συνίσταται από 639 αμινοξέα, με προβλεπόμενο μοριακό βάρος 73.5 kDa (Körner et al., 1998). Η αμινοτελική περιοχή της φαίνεται να είναι πιο συντηρημένη ανάμεσα στα ομόλογα της PARN στους οργανισμούς, σε αντίθεση με την καρβοξυτελική. Η ενεργότητα της PARN είναι εξαρτώμενη από δισθενή ιόντα Mg^{2+} και απαιτεί ως υπόστρωμα μονόκλωνο RNA, με ελεύθερη ομάδα υδροξυλίου (-OH) στο 3'-άκρο του (Körner and Wahle, 1997).

Μελέτες έχουν δείξει δύο επιπλέον διακριτά βιοχημικά χαρακτηριστικά της PARN: τον επεξεργαστικό τρόπο δράσης της και την επίδραση στην ενεργότητα αποαδενυλάσης από την 5'-m7G-καλύπτρα (Dehlin et al., 2000). Η «επεξεργαστικότητα» αναφέρεται σε μια ενζυμική ενεργότητα που επιτελεί επανειλημμένως την ίδια αντίδραση χωρίς το ένζυμο να αποσπάται από το σύμπλοκο με το υπόστρωμά του, σε κάθε κύκλο κατάλυσης (Nossal and Singer, 1968). Έχει προταθεί ότι η PARN θα μπορούσε να επηρεάζει την έναρξη της μετάφρασης μέσω παρεμβολής στην κυκλοποίηση μεταξύ 5'-καλύπτρας — eIF4E/eIF4G — πολυ(A) ουράς, αλλά και την αποικοδόμηση των mRNAs, μέσω παρεμβολής με την αντίδραση αφαίρεσης της καλύπτρας.

Όσον αφορά τη δομή της PARN, ο καταλυτικός πυρήνας της σχηματίζει μία αρνητικά φορτισμένη κοιλότητα, η οποία εντοπίζεται σε μία επικράτεια, επονομαζόμενη ως επικράτεια νουκλεάσης (Körner et al., 1998) (εικόνα 22). Παράλληλα με την επικράτεια νουκλεάσης, δύο άλλες επικράτειες πρόσδεσης στο

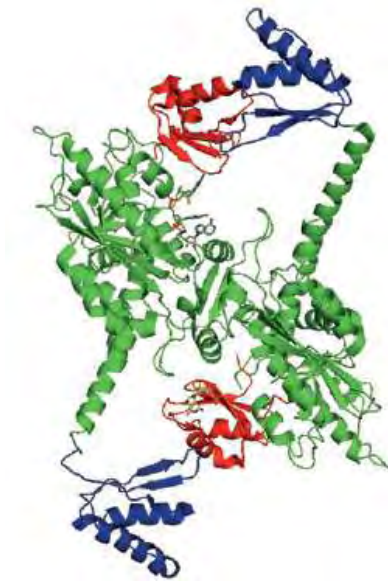
RNA, έχουν προσδιοριστεί στην PARN. Το μοτίβο αναγνώρισης RNA, RRM (Nilsson et al., 2007) και το μοτίβο αναγνώρισης RNA, αναφερόμενο ως επικράτεια R3H (Wu et al., 2005). Η RRM επικράτεια απαιτείται για την πρόσδεση της 5'-m7G-καλύπτρας (Nilsson et al., 2007), ενώ η R3H για την σύνδεση της PARN στην πολυ(A) ουρά (Wu et al., 2005). Επίσης έχει προταθεί η RRM επικράτεια να σταθεροποιεί την συνολική τρισδιάστατη δομή της PARN (Zhang et al., 2007). Οι περιοχές των επικρατειών και τα αμινοξέα λειτουργικής σημασίας φαίνονται στην **εικόνα 21**.



Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση των επικρατειών της ανθρώπινης αποαδενυλάσης PARN (639 αα), όπου με πράσινο χρώμα αναπαρίσταται η επικράτεια ριβονουκλεάσης, με μπλε η επικράτεια R3H, με κόκκινο η επικράτεια RRM, και με λευκό η μη συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή. Αναπαρίστανται επίσης και τα λειτουργικώς σημαντικότερα αμινοξέα της πρωτεΐνης (Virtanen et al., 2013)

Η PARN σχηματίζει ένα στενά συνδεδεμένο ομοδιμερές, οι υπομονάδες του οποίου συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω μιας πλούσιας σε αρωματικό αμινοξέα διεπιφάνεια και από έναν δισουλφιδικό δεσμό (...S—S...) που ενώνει τις δύο επικράτειες νουκλεάσης της PARN (Wu et al., 2005) (**εικόνα 22**). Έχει δειχθεί ότι ο διμερισμός αυτός είναι ζωτικής σημασίας για την ικανότητα κατάλυσης της PARN (Wu et al., 2005).

Το τμήμα του mRNA που αποτελεί την 5'- m7G-καλύπτρα μπορεί να θεωρηθεί ως ένας αλλοστερικός ρυθμιστής της ενεργότητας της PARN διότι: α) η 5'-m7G-καλύπτρα των πολυαδενυλιωμένων mRNA υποστρωμάτων επηρεάζει τον ρυθμό αποικοδόμησης της πολυ(A)ουράς από την PARN (Dehlin et al., 2000), μέσω της ενίσχυσης της επεξεργαστικότητας του ενζύμου (Martinez et al., 2001), και β) λόγω της θέσης πρόσδεσης της 5'- m7G-καλύπτρας (Wu et al., 2009), η οποία βρίσκεται εκτός του καταλυτικού κέντρου της PARN.



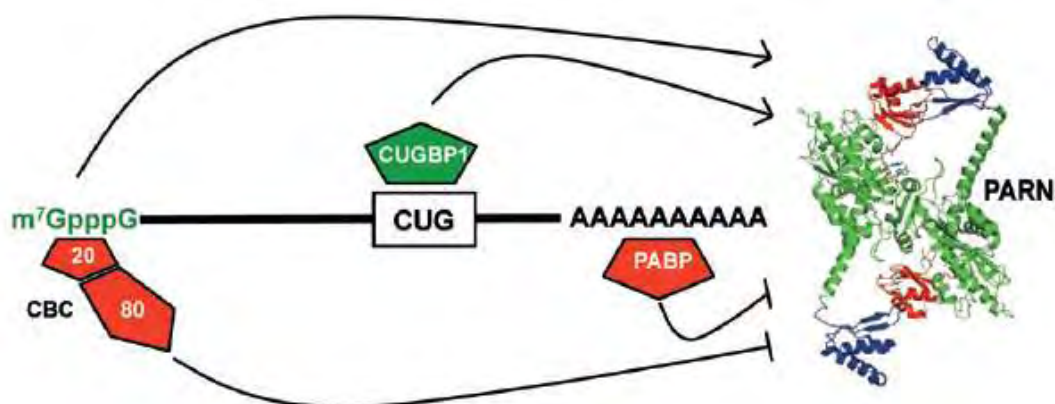
Εικόνα 22. Τρισδιάστατη διμερής δομή της ανθρώπινης αποαδενυλάσης PARN, όπου με πράσινο χρώμα αναπαρίσταται η δομή που προκύπτει από την επικράτεια ριβονουκλεάσης, με μπλε η δομή από την επικράτεια R3H, και με κόκκινο η δομή από την επικράτεια RRM (Virtanen et al., 2013).

Η PARN συμμετέχει σε μια σειρά κυτταρικών μηχανισμών και αποκρίσεων. Για παράδειγμα, έχειδειχθεί ότι η PARN εμπλέκεται σε κυτταρική απόκριση στο στρες (Cevher et al., 2010), στην αποικοδόμηση των πολλαπλά ματισμένων HIV-1 mRNAs κατά τη μόλυνση από HIV-1 (Zhu et al., 2011). Επίσης, έχει προταθεί ως ένας πιθανός δείκτης της καρκινικής ανάπτυξης (Maragozidis et al., 2012).

Η ρύθμιση της PARN φαίνεται να επιτελείται εκτός από την 5'- m7G-καλύπτρα και την 3'-πολυ(A)ουρά, και από άλλα cis-δραστικά στοιχεία, όπως είναι τα στοιχεία AU και GU (**εικόνα 23**) (Balatsos et al., 2012; Goldstrohm & Wickens, 2008; Parker & Song, 2004).

Στα στοιχεία αυτά, προσδένονται διάφορες RNA-συνδεόμενες πρωτεΐνες, οι οποίες ενισχύουν ή αναστέλλουν τη δράση της PARN. Στο κυτταρόπλασμα, ένας αναστολέας της PARN, η πρωτεΐνη CBC, αντικαθίσταται στο mRNA, από τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E (Marcotrigiano et al., 1997), ο οποίος αποτελεί τμήμα του eIF4F συμπλόκου, που είναι ζωτικής σημασίας για την αποτελεσματική έναρξη της μετάφρασης στους ευκαρυώτες. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης PABP στην πολυ(A) ουρά, επίσης αναστέλλει την ενεργότητα της PARN (**εικόνα 23**). Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί με τον σχηματισμό του PABP/poly(A)

συμπλόκου, που παρεμβαίνει στην αλληλεπίδραση των αποαδενυλασών με το πολυ(A) υπόστρωμα (Kim and Richter, 2007).



Εικόνα 23. Ρύθμιση της πρωτεΐνης PARN μέσω RNA-συνδεόμενων πρωτεϊνών (Virtanen et al., 2013).

Η PARN εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα, όμως μέσω παλίνδρομης κίνησης μπορεί και μετακινείται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (Yamashita et al., 2005) Στον πυρήνα βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στα nucleoli and Cajal bodies (Berndt et al., 2012). Έτσι, με έκπληξη, βρέθηκε ότι η PARN δεν εμπλέκεται αποκλειστικά μόνο στη ρύθμιση της λειτουργίας των mRNAs, αλλά συμμετέχει επίσης και στην επεξεργασία μη-κωδικών μορίων RNA, όπως είναι τα μικρά nucleolar RNAs (snoRNAs) και τα μικρά Cajal body RNAs (scaRNAs) (Berndt et al., 2012). Τα snoRNAs και τα scaRNAs είναι κρίσιμα για την θεσεο-εξαρτώμενη τροποποίηση μη-κωδικών μορίων, όπως είναι τα ριβοσωμικά rRNAs και τα μικρά U πυρηνικά snRNAs του συμπλόκου ματίσματος (Kiss et al., 2010). Φαίνεται ότι η αποαδενυλίωση από την PARN αποτελεί σημαντικό βήμα για τον έλεγχο της αφθονίας και την ωρίμανση των sno/scaRNA μορίων (Berndt et al., 2012). Η παρατήρηση ότι η PARN εμπλέκεται και στην βιογένεση μη-κωδικών μορίων, κατέδειξε ότι η PARN είναι κάτι περισσότερο από μια αποαδενυλάση η οποία εξελίχθηκε για τον έλεγχο των ευκαρυωτικών mRNA, αλλά ότι μπορεί να εμπλέκεται και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες.

Η πιθανή εμπλοκή της PARN σε διεργασίες όπως είναι η καρκινογένεση διαφαίνεται από τα παρακάτω δεδομένα. Πολλά mRNAs τα οποία περιέχουν τα στοιχεία ARE (πλούσια σε AU κατάλοιπα), αποτελούν πρωτο-ογκογονίδια (π.χ. c-myc, c-fos και c-jun), κυτταροκίνες (π.χ. TNFα), χυμοκίνες, αυξητικοί παράγοντες

και ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (Schoenberg and Maquat, 2012). Τα εν λόγω mRNAs, ρυθμίζονται από τις ARE-συνδεδεμένες πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν εμπλακεί σε διεργασίες δρώντας ως ενεργοποιητές ή πρωτεΐνες στρατολόγησης της PARN (Lai et al., 1999; 2000; 2003). Επίσης, σε μελέτες όπου έγινε υποέκφραση της PARN, με την τεχνολογία των αντινοσηματικών μορίων shRNAs, εξετάστηκαν τα επίπεδα μιας σειράς mRNAs. Από αυτά, μόνο ένα μικρό υποσύνολο είχε διαφοροποιημένη έκφραση. Αυτό όμως που έχει ενδιαφέρον, είναι ότι πολλά από αυτά τα mRNAs, κωδικοποιούσαν πρωτεΐνες, οι οποίες είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην καρκινική μετανάστευση των κυττάρων και πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.

Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει σε μία μελέτη όπου δείχνει ότι η PARN ρυθμίζει την κινητικότητα των κυττάρων σε μυοβλάστες ποντικών (Lee et al., 2012). Η αποσιώπηση της PARN μείωσε τα επίπεδα πολλών mRNAs, που κωδικοποιούν παράγοντες που απαιτούνται για την κυτταρική μετανάστευση και προσκόλληση. Η βιολογική σημασία αυτής της παρατήρησης αποδεικνύεται από το γεγονός ότι κύτταρα όπου έχει γίνει αποσιώπηση της PARN, μεταναστεύουν ταχύτερα σε δοκιμασίες επούλωσης πληγής. Επομένως αυτή η αποαδενυλάση εμπλέκεται στον έλεγχο γονιδίων που είναι απαραίτητα για την κίνηση των κυττάρων.

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

2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

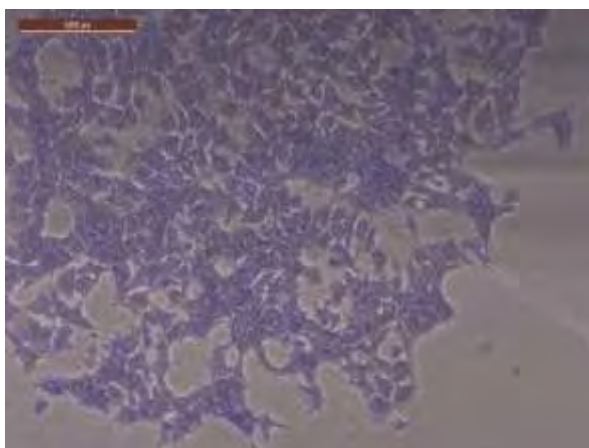
Τα μηχανοποιημένα νανοσωματίδια λόγω των μοναδικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Η εκτεταμένη χρήση τους εγείρει ανησυχίες για τις πιθανές αρνητικές επιδράσεις τους στη δομή και στη λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκθεση σε νανοσωματίδια μπορεί να προκαλέσει φλεγμονή του πνεύμονα και του υπεζωκότα, ίνωση και καρκίνο. Τα νανοσωματίδια αργύρου τα οποία μελετούμε στη συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιούνται ευρέως σε πολλά προϊόντα λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους. Έρευνες έχουν δείξει ότι βελτιώνουν την επούλωση των πληγών καθώς και ότι προκαλούν κυτταροτοξικότητα και γενετοξικότητα σε διάφορους τύπους κυττάρων. Ωστόσο, οι πιθανοί μοριακοί στόχοι των νανοσωματιδίων αργύρου και οι μηχανισμοί δράσης τους, δεν είναι πλήρως γνωστοί.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να διερευνηθεί ένας πιθανός μοριακός στόχος των νανοσωματιδίων αργύρου που σχετίζεται με τη μετανάστευση των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν οι επιδράσεις των μηχανοποιημένων νανοσωματιδίων αργύρου στη μετανάστευση καλοήθων και καρκινικών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα. Μελετήθηκε η έκφραση της πολυ(A)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN) στα κύτταρα του υπεζωκότα και τα επίπεδα mRNA του ενζύμου μετά από έκθεση των κυττάρων σε νανοσωματίδια αργύρου. Έγινε αποσιώπηση της PARN σε κύτταρα κακοήθους μεσοθηλιώματος και μελετήθηκε η επίδραση της αποσιώπησης σε συνδυασμό με την έκθεση σε νανοσωματίδια στην μετανάστευση των κυττάρων. Ως πιθανός μοριακός στόχος των νανοσωματιδίων επιλέχθηκε η PARN, καθώς είναι ένα ένζυμο που έχει σχετιστεί με την κυτταρική κινητικότητα. Η κυτταρική μετανάστευση αξιολογήθηκε με τη δοκιμή της επούλωσης πληγής ενώ τα επίπεδα mRNA και πρωτεϊνών αναλύθηκαν με τις τεχνικές qRT-PCR και Western blotting αντίστοιχα. Η αποσιώπηση της PARN έγινε με τη χρήση δίκλωνων μορίων shRNAs.

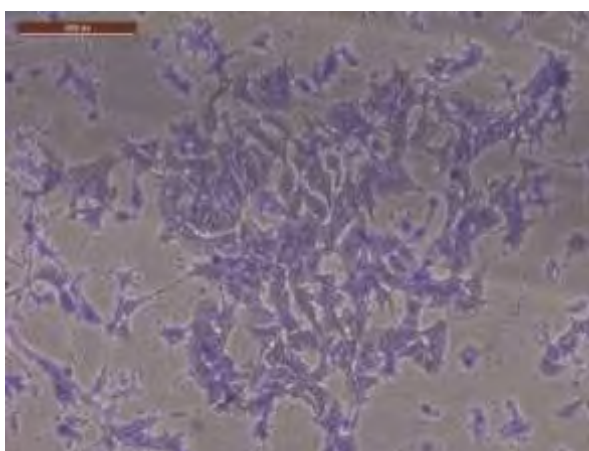
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Κυτταρικές σειρές - Χειρισμοί κυτταροκαλλιιεργειών

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές Met-5A και M14K. Πρόκειται για ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα. Η σειρά Met-5A αποτελεί αθανατοποιημένα κύτταρα από φυσιολογικό μεσοθήλιο και απεικονίζεται στην **εικόνα 24** ενώ η σειρά M14K προέρχεται από κακήθες μεσοθηλίωμα (επιθηλιοειδής τύπος μεσοθηλιώματος) και απεικονίζεται στην **εικόνα 25**. Και οι δύο κυτταρικές σειρές σχηματίζουν μονόστιβες επιθηλιακές επιφάνειες στο ταπήτιο ανάπτυξης.



Εικόνα 24. Κυτταρική σειρά Met-5A



Εικόνα 25. Κυτταρική σειρά M14K

Απόψυξη κυττάρων

1. Τα φιαλίδια (cryovials) που περιέχουν τα κύτταρα μεταφέρονται από το υγρό άζωτο όπου ήταν αποθηκευμένα, και εμβαπτίζονται σε υδατόλουτρο (37°C) με ήπια ανάδευση.
2. Ακολουθεί μεταφορά του αιωρήματος των κυττάρων σε φάλκον 15ml με επιπλέον προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού μέχρι τα 10ml.
3. Φυγοκέντρωση του αιωρήματος στις 1500 rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
4. Μεταφορά στον απαγωγό κάθετης νηματικής ροής και απομάκρυνση του υπερκειμένου, προκειμένου να αποβάλουμε το DMSO που περιέχεται στο αρχικό κρυοπροστατευτικό θρεπτικό υλικό των κυττάρων και δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξή τους.
5. Προσθήκη 5ml θρεπτικού RPMI (που περιέχει 10% FBS) και μεταφορά σε T25 flask.
6. Επώαση των κυττάρων στους 37°C μέχρι να προσκολληθούν στο ταπήτιο της φλάσκας.
7. Αφού η πληρότητα των κυττάρων φτάσει το 90-100%, μεταφέρουμε τα κύτταρα μετά από τρυψινοποίηση σε T75 flask.

Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας

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

1. Παρατηρούμε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο. Ελέγχουμε και σημειώνουμε:
 - α. Μορφολογία κυττάρων και
 - β. Πληρότητα ταπητίου (confluency).
2. Απομακρύνουμε (με αναρρόφηση) το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας.
3. Πλύση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffered Saline).

4. Προσθέτουμε διάλυμα τρυψίνης-EDTA 0.05% (1ml για φλάσκα 75cm²). Ανακινούμε τη φλάσκα για να καλύψει όλο το ταπήτιο το διάλυμα τρυψίνης.
5. Μεταφέρουμε τα κύτταρα στον επωαστήρα (κλίβανος 37°C) για 2 λεπτά.
6. Παρατηρούμε το σχήμα των κυττάρων στο μικροσκόπιο, και ελέγχουμε αν έχουν αποκτήσει σφαιρική μορφή.
7. Προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού RPMI που περιέχει 10% FBS, 1% L-glutamine και 1% penicillin-streptomycin. (10ml θρεπτικού για φλάσκα 75cm²) και επαναιωρούμε τα κύτταρα.
8. Φυγοκεντρούμε στις 1500 rpm για 5 λεπτά στους 4°C και απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προκειμένου να αποβάλουμε την τρυψίνη που είχαμε προσθέσει.
9. Επαναιωρούμε τα κύτταρα σε RPMI και τα διασπείρουμε ομοιόμορφα με πιπέτα.
10. Στο σημείο αυτό μπορούμε να χωρίσουμε τα κύτταρα σε δύο ή περισσότερες φλάσκες ή να απομακρύνουμε μέρος των κυττάρων στην ήδη υπάρχουσα φλάσκα ή να μεταφέρουμε τα κύτταρα σε well plates. Κάθε φορά που γίνεται η τρυψινοποίηση, καταγράφεται ως πέρασμα επόμενης γενιάς (π.χ. πέρασμα p25-passage 25).

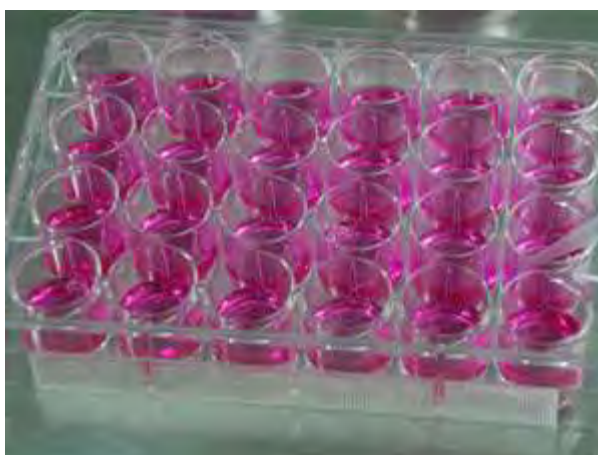
3.2 Δοκιμή επούλωσης πληγής (wound healing assay)

Η δοκιμή επούλωσης πληγής είναι μία μέθοδος για τη μελέτη της κυτταρικής μετανάστευσης *in vitro*. Δημιουργείται μια τεχνητή πληγή (χαραγή) στην επιφάνεια του μονόστιβου της κυτταροκαλλιέργειας και αφήνοντας τα κύτταρα με τον υπό μελέτη παράγοντα για ένα χρονικό διάστημα μπορεί να διαπιστωθεί ο ρυθμός της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων.

Πειραματική πορεία

1^η ημέρα

- Στην εξωτερική επιφάνεια του κάτω μέρους ενός 24 well plate σχεδιάζουμε οριζόντιες ευθείες γραμμές που περνούν από το κέντρο κάθε πηγαδιού (well).
- Προσθέτουμε 500μl διαλύματος φιβρονεκτίνης πλάσματος 50μg/ml σε κάθε πηγάδι (**εικόνα 26**) και τοποθετούμε το 24 well plate στον επωαστήρα. Μετά από 30 λεπτά αφαιρούμε τη φιβρονεκτίνη.

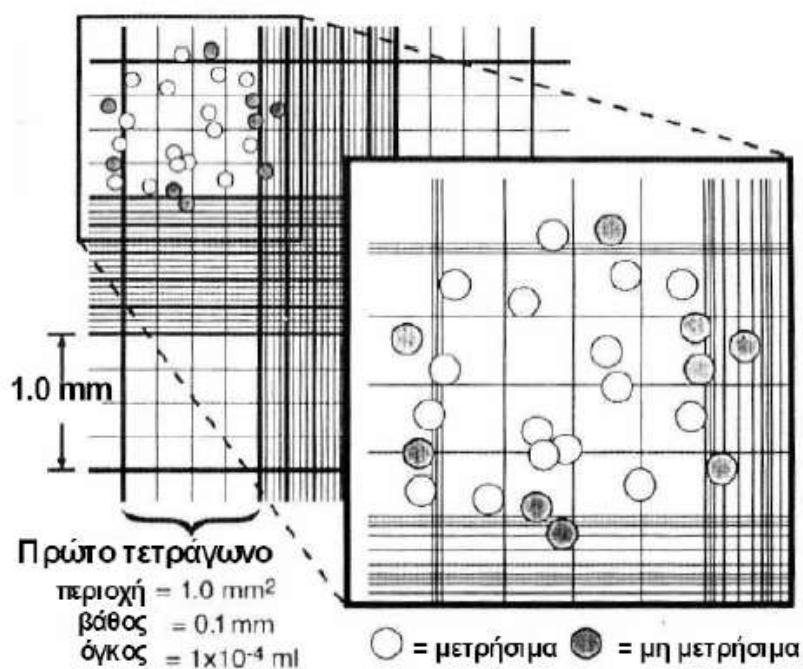


Εικόνα 26. 24-well plate στο οποίο έχει τοποθετηθεί φιβρονεκτίνη.

- Τρυφίνοποιούμε τα κύτταρα από μία T75 φλάσκα με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω και επαναιωρούμε τα κύτταρα με τη βοήθεια πιπέτας, μέχρις ότου να μην υπάρχουν συσσωματώματα.
- Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται μετά από μέτρηση σε πλάκα Neubauer. Προσθήκη 10μl από το εναιώρημα των κυττάρων σε 90μl trypan blue και μετά από πιπετάρισμα προσθήκη 10μl στην πλάκα Neubauer. Ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων γίνεται στο μικροσκόπιο.

Η πλάκα Neubauer (εικόνα 27) είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δυο κατάλληλα επεξεργασμένες, λείες επιφάνειες. Κάθε μια από αυτές έχει ένα τετραγωνισμένο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm (εμβαδόν 1 mm²). Κάθε τετράγωνο ορίζεται από παράλληλες γραμμές, των οποίων η μεταξύ τους απόσταση είναι 2,5 μm, που χρησιμεύουν για τον καθορισμό του εάν τα κύτταρα θεωρηθούν ότι βρίσκονται μέσα ή έξω από το πλέγμα.

Επίσης, κάθε ένα από τα αρχικά τετράγωνα, έχει επιπλέον διαβαθμίσεις (χωρίζεται σε μικρότερα τετράγωνα) για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται 0,1 mm χαμηλότερα από δυο προεξοχές στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης γυαλισμένης επιφάνειας και των σημείων όπου στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια τοποθετείται το κυτταρικό εναιώρημα και με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια. Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που θα καλύπτει ένα από εννέα τετράγωνα είναι $0,1 \text{ mm}^3$ ($1,0 \text{ mm}^2 * 0,1 \text{ mm}$) ή $1 * 10^{-4} \text{ ml}$. Έτσι, η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα (σε κύτταρα / ml) είναι: Μέτρηση στο ένα από τα κύρια τετράγωνα * 10^4 .



Εικόνα 27. Πλάκα Neubauer. Παρουσιάζεται σχηματικά και ο τρόπος υπολογισμού των κυττάρων.

- Μετά από τους κατάλληλους υπολογισμούς μεταφέρουμε τα κύτταρα στα πηγάδια του 24-well plate που έχουν προ-επικαλυφθεί με φιμπρονεκτίνη, σε πυκνότητα 150.000 κύτταρα/well.

- Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό RPMI με 10% FBS για 24 ώρες ώστε να επιτευχθεί προσκόλληση στη στερεά επιφάνεια.

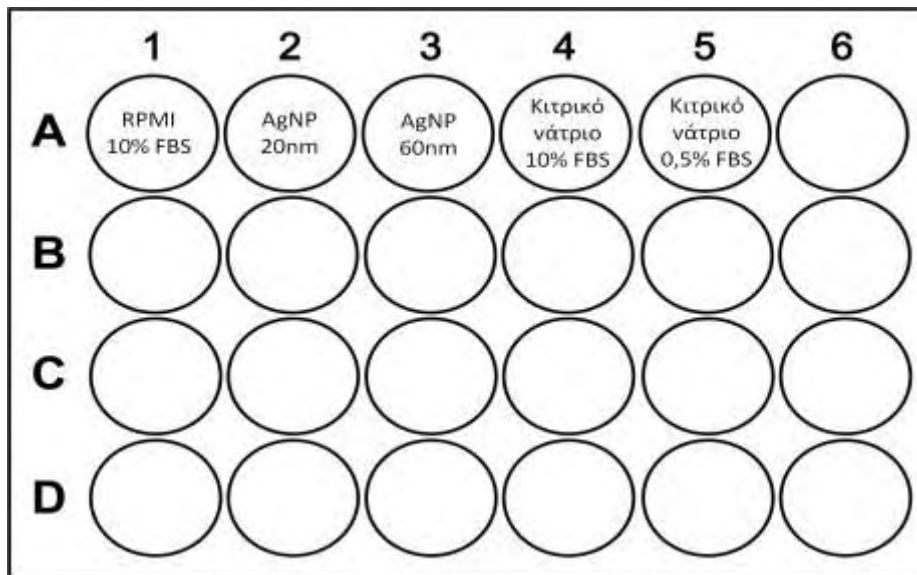
2η ημέρα

- Η κυτταρική πληρότητα έχει φτάσει στο 80% των πηγαδιών. Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε νέο RPMI με 0,5% FBS (στέρηση ορού) για 24 ώρες για να συγχρονίσουμε τα κύτταρα.

3^η ημέρα

- Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα (με στέρηση ορού) και βάζουμε τις ακόλουθες συνθήκες που φαίνονται σχηματικά στην **εικόνα 28** για 16 ώρες:

1. RPMI με 10% FBS
2. Διάλυμα νανοσωματιδίων αργύρου (AgNP) μεγέθους 20nm συγκέντρωσης 2μg/ml σε RPMI με 10% FBS
3. Διάλυμα AgNP μεγέθους 60nm συγκέντρωσης 2μg/ml σε RPMI με 10% FBS
4. Διάλυμα κιτρικού νατρίου 0,2mM (το σταθεροποιητικό διάλυμα στο οποίο είναι διαλυμένα τα AgNP) σε RPMI με 10% FBS
5. Διάλυμα κιτρικού νατρίου 0,2mM σε RPMI με 0.5% FBS



Εικόνα 28. Συνθήκες επώασης των κυττάρων σε 24-well plate.

4^η ημέρα

- Η πληρότητα των κυττάρων βρίσκεται στο 100% και ο πυθμένας του κάθε πηγαδιού έχει καλυφθεί πλήρως από κύτταρα. Με τη χρήση του ρύγχους (tip) των 10μl μιας πιπέτας δημιουργούμε μία ασυνέχεια ή αλλιώς μία τεχνητή πληγή (wound) στη μονοστιβάδα των κυττάρων κατά μήκος της επιφάνειας της καλλιέργειας, έτσι ώστε στην επιφάνεια επαφής με το ρύγχος να αποκολληθούν τα κύτταρα.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό και ακολουθεί πλύση με διάλυμα PBS ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα που είχαν αποκολληθεί.
- Προσθέτουμε νέο θρεπτικό υλικό με τις εκάστοτε συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω και παίρνουμε μία φωτογραφία από κάθε πηγάδι με ανάστροφο μικροσκόπιο στο οποίο έχει ενσωματωθεί κάμερα (Leica Application Suite Version 3.4.0). Η λήψη της εικόνας γίνεται ακριβώς πάνω από τη γραμμή που είχαμε σχεδιάσει αρχικά, στο σημείο της πληγής και μετά τη λήψη φωτογραφιών από όλο το 24-well plate, το μεταφέρουμε στον επωαστικό θάλαμο.
- 8 ώρες μετά την τοποθέτησή του στον επωαστικό θάλαμο (24 ώρες επώασης των κυττάρων με τις εκάστοτε συνθήκες) παίρνουμε ξανά μία φωτογραφία

από τα μεταναστεύοντα κύτταρα στο ίδιο ακριβώς σημείο με τις πρώτες φωτογραφίες που είχαν ληφθεί αμέσως μετά τη δημιουργία της πληγής.

Συνοπτικά η πειραματική πορεία φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα:

| 1 ^η μέρα | 2 ^η μέρα | 3 ^η μέρα | 4 ^η μέρα |
|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|--|
| Μεταφορά κυττάρων σε 24-well plate | 80% πληρότητα (σε RPMI με 10% FBS) | Προσθήκη RPMI με 0,5% FBS για 24 ώρες | t=0 Προσθήκη συνθηκών |
| | | | 16 ώρες Δημιουργία πληγής & λήψη φωτογραφιών |
| | | | 8 ώρες |
| | | | 24 ώρες Λήψη φωτογραφιών & συλλογή κυττάρων |

Συλλογή των κυττάρων

1. Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων με PBS.
2. Τρυψινοποίηση των κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται παραπάνω. Για τη συλλογή των κυττάρων από τα well plates μετά την προσθήκη τρυψίνης και θρεπτικού γίνεται απόξεση του πυθμένα των πηγαδιών με tip για την αποκόλληση των κυττάρων.
3. Ομογενοποίηση των αποκολλημένων κυττάρων με πιπετάρισμα σε RPMI και μεταφορά τους σε tubes 1,5ml.
4. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 3000rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
5. Απομάκρυνση του υπερκείμενου προσεκτικά και αποθήκευση του ιζήματος στους -80 °C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν πειραματικά.

Ψύξη των κυττάρων

1. Τρυψινοποίηση κυττάρων.
2. Προσθήκη θρεπτικού υλικού RPMI (10% FBS).
3. Μεταφορά αιωρήματος σε φάλλον 15ml.
4. Φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
5. Μεταφορά στον απαγωγό κάθετης νηματικής ροής και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
6. Επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε κρυοπροστατευτικό διάλυμα (RPMI με 20% FBS και 10% DMSO).

7. Μεταφορά σε cryovial.
8. Αργή ψύξη μέσα σε cryobox (1°C/1 min) στους -80°C.
9. Αποθήκευση στους -80°C ή σε υγρό άζωτο.

Υλικά - Αντιδραστήρια

- Θρεπτικό υλικό: RPMI, 10% FBS, 1% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin
- PBS 1x (Phosphate Buffered Saline): 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄
- RPMI (Biosera)
- FBS: Fetal Bovine Serum (Biosera)
- Penicillin-Streptomycin (Sigma)
- DMSO: Dimethyl sulfoxide (Sigma)
- Τρυψίνη (Biosera)
- EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid (Merck)
- NaCl (Merck)
- KCl (Merck)
- Na₂HPO₄ (Merck)
- KH₂PO₄ (Merck)
- Αιθανόλη (Sigma)
- Φιμπρονεκτίνη πλάσματος: fibronectin from bovine plasma (Merck)
- Trypan blue solution 0,4% (Sigma)
- Διάλυμα AgNP: Silver dispersion 20nm (Sigma)
- Διάλυμα AgNP: Silver dispersion 60nm (Sigma)
- Κιτρικό νάτριο: citric acid trisodium salt (Sigma)
- Neubauer (Poly Optik GmbH)

3.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

Βακτηριακά κύτταρα DH5a (συνήθως από stock γλυκερόλης υγρών καλλιιεργειών βακτηριακών κυττάρων που είναι αποθηκευμένα στους -80°C) ενοφθαλμίζονται σε 5ml LB broth που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί επώαση των καλλιιεργειών για 12-14 ώρες 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 tube και φυγοκεντρώνονται για 1 λεπτό στις $14000 \times g$. 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. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις $11000 \times g$ 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 φυγοκέντρωση του προηγούμενου βήματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις $11000 \times g$ και απομάκρυνση του εκλούσματος.

4. Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης:

Επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα και προστίθενται 450μl buffer AQ (με αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στις $11000 \times g$ όπου και επιτυγχάνεται ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης. Τέλος,

πραγματοποιείται απομάκρυνση του εκλούσματος και φυγοκέντρωση 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 φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11000 x g.

3.4 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με χρήση λιποσωμάτων

3.4.1 Η τεχνολογία του RNA interference (RNAi)

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

Το RNAi είναι ένα φυσικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα τόσο στα φυτά όσο και στους μύκητες και τα ζώα. Σε όλα τα ζωικά βασίλεια δίκλινα μόρια RNA εμπλέκονται σε αυτό το μηχανισμό. Μόλις το 2001 εφαρμόστηκε και σε κύτταρα θηλαστικών (Fire et al.,1998; Elbashir et al., 2001).

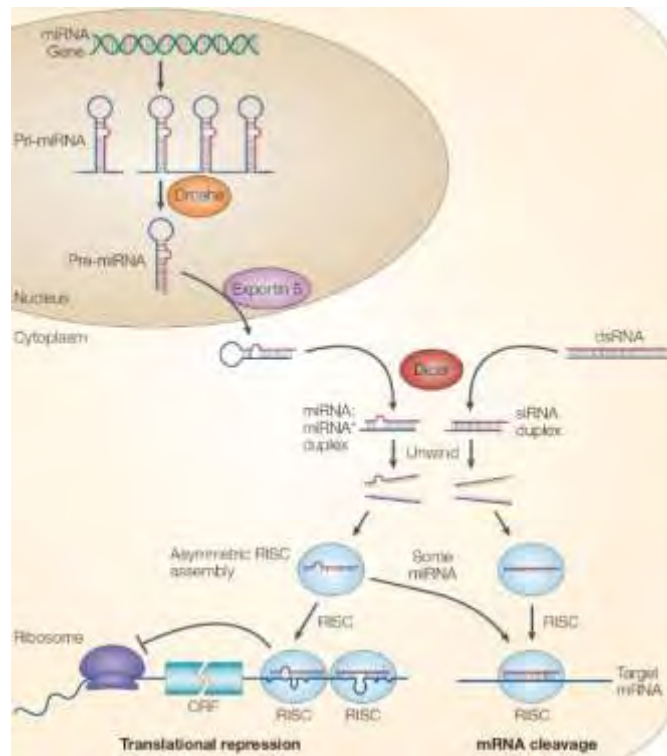
Τα δίκλινα μόρια που προκαλούν τη γονιδιακή σίγηση στο RNAi, είτε παράγονται ενδογενώς από μικρά μη-μεταφραζόμενα RNAs γνωστά ως miRNAs, είτε χορηγούνται εξωγενώς στο κύτταρο και ονομάζονται μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs). Σε αντίθεση με τα miRNAs, τα siRNAs σχετίζονται με την αποσιώπηση που προκύπτει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

Μονοπάτι siRNA: Επιμήκη δίκλινα μόρια RNA (dsRNA) ή δίκλινα μόρια RNA με δομή φουρκέτας (hairpin RNA, shRNA) επεξεργάζονται από το σύμπλοκο Dicer, ένα ένζυμο με δράση παρόμοια με την RNAάση III. Ως αποτέλεσμα παράγονται μικρότερα μόρια, τα siRNAs, τα οποία φέρουν 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 δίκλιωνα μόρια RNA), τα οποία και φωσφορυλιώνονται από κυτταρικές κινάσες. Ακολουθώς τα παραγόμενα siRNAs ενσωματώνονται στο σύμπλοκο σίγησης επαγόμενο από RNA - RISC. Το τελευταίο καταλύει το ξετύλιγμα των δύο κλώνων των siRNAs με ένα ATP-εξαρτώμενο τρόπο και οι ξετυλιγμένοι αντινοηματικοί (antisense) κλώνοι οδηγούν το RISC στα συμπληρωματικά mRNA-στόχους, γεγονός που πυροδοτεί την ενδονουκλεοτιδική τμήση των τελευταίων (**εικόνα 29**).

Μονοπάτι miRNA: Τα miRNAs εμπλέκονται σε μια ποικιλία φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών που περιλαμβάνουν την απόπτωση, την αιμοποίηση, την ανάπτυξη και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η έκφραση τους είναι ειδική για συγκεκριμένους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια και το προφίλ τους αλλάζει σε διάφορες ανθρώπινες ασθένειες (Grishok et al., 2001; Ambros et al., 2003; Carrington and Ambros, 2003). Σε αντίθεση με τα siRNAs, τα miRNAs δεν οδηγούν συνήθως σε τμήση του mRNA-στόχου αλλά σε καταστολή της μετάφρασής του. Έχει δειχθεί πως ενισχύουν επίσης και την αποικοδόμηση του mRNA, ενώ ένας τρίτος λιγότερο μελετημένος μηχανισμός τα εμπλέκει στην αναδιοργάνωση της ετεροχρωματίνης (Dykxhoorn et al., 2003; Lippman and Martienssen, 2004).

Τα miRNAs μεταγράφονται από την RNA pol II σε μεγάλα δίκλιωνα μόρια RNA που φέρουν δομές βρόχου και καλούνται pri-miRNAs. Αυτά κόβονται από το σύμπλεγμα Drosha και παράγονται τα pre-miRNAs (70 νουκλεοτίδια), τα οποία με τη σειρά τους εξέρχονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα όπου και αναλαμβάνει δράση η Dicer. Η τελευταία παράγει μικρά μονόκλιωνα miRNAs (των 22 νουκλεοτιδίων) τα οποία ενσωματώνονται στο σύμπλεγμα miRNP που καθοδηγείται στο mRNA-στόχο πυροδοτώντας την καταστολή της έκφρασης του (**εικόνα 29**).



Εικόνα 29. Μονοπάτια παραγωγής miRNAs και siRNAs μορίων.

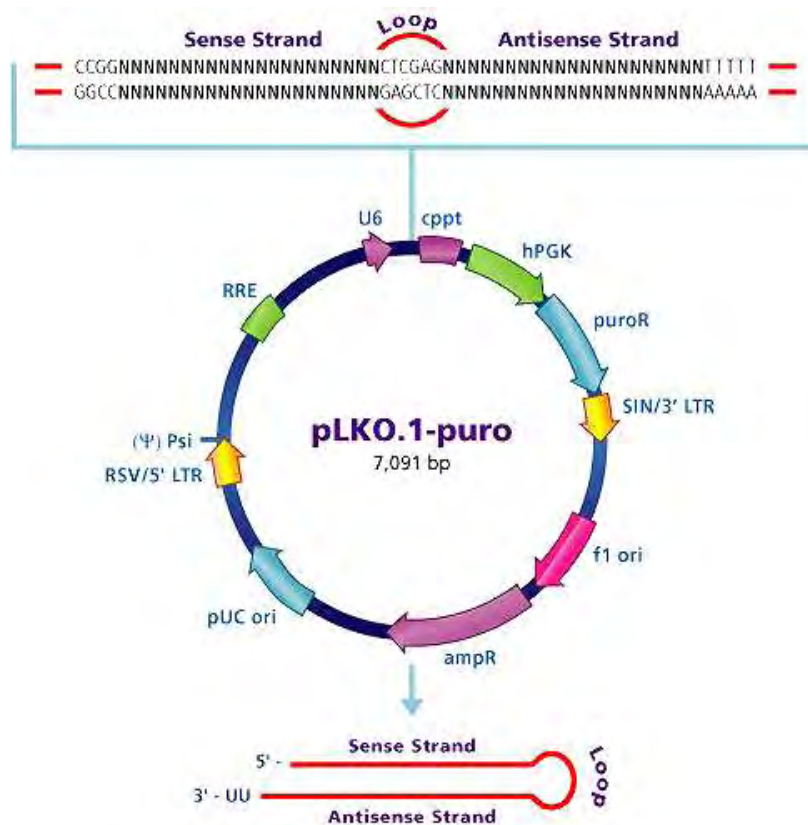
3.4.2 Αποσιώπηση της PARN

Προκειμένου να γίνει αποσιώπηση της PARN και να ελεγχθεί η επίδραση της αποσιώπησης της στη μετανάστευση των μεσοθηλιακών κυττάρων, έγινε διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς M14K με πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος έφερε αλληλουχία που κωδικοποιεί Short-Hairpin RNAs έναντι αυτής της αποαδενύλασης.

Short-Hairpin RNAs (shRNAs)

Για την αποσιώπηση της PARN χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά shRNAs κλωνοποιημένα στο λεντι-ϊικό πλασμιδιακό φορέα pLKO.1-puro (εικόνα 30). Τα shRNAs και τα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου φορέα παρέχουν ένα ισχυρό μοριακό εργαλείο μακροπρόθεσμης, σταθερής αποσιώπησης του επιθυμητού γονιδίου, μέσω του συστήματος του RNAi καθώς και τη δυνατότητα αναγέννησης του πλασμιδίου μετά από μετασηματισμό βακτηρίων με αυτό. Ο pLKO.1-puro περιέχει γονίδια ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη και την πουρομυκίνη για

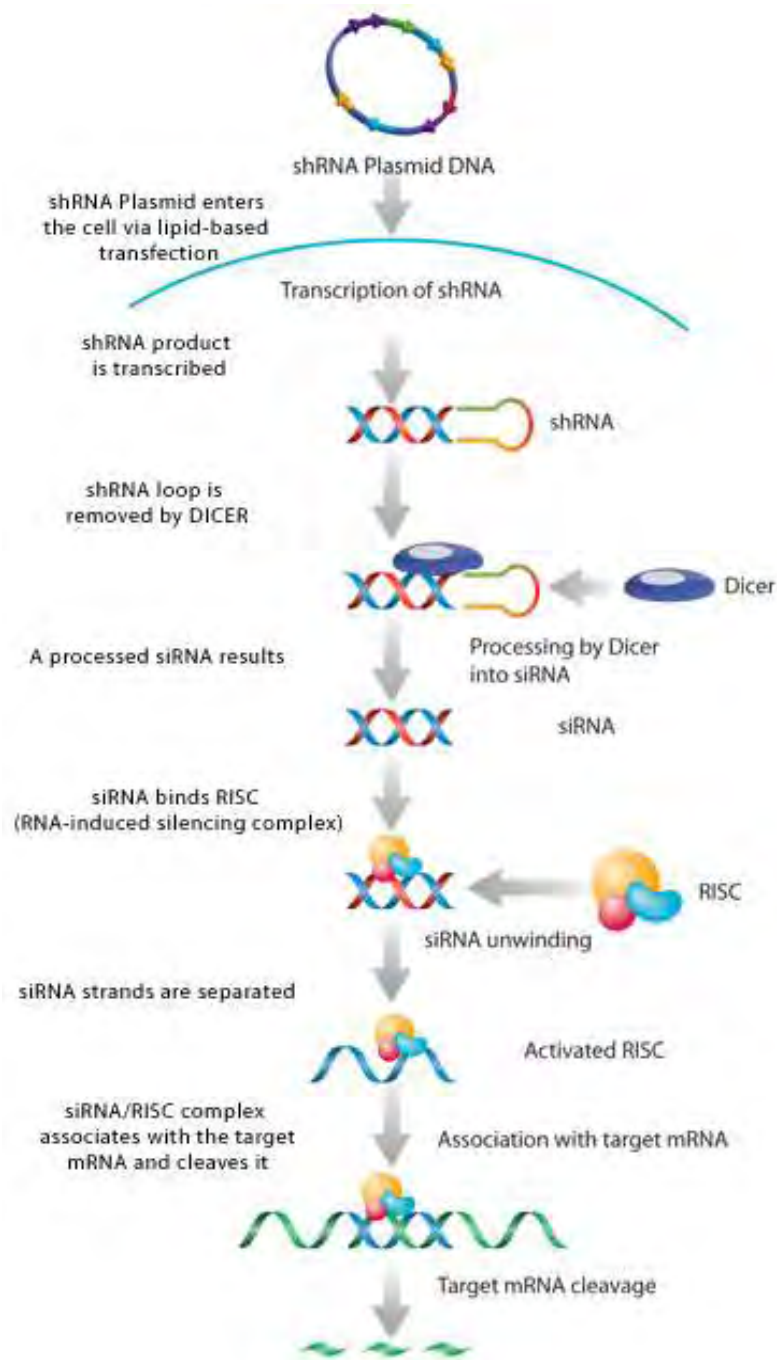
δυνατότητα επιλογής βακτηριακών και ευκαρυωτικών κυττάρων αντιστοίχως, που έλαβαν επιτυχώς το πλασμίδιο.



| 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 ori | 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 30. 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 ενδοκυττάρια μεταγραφή της κλωνοποιημένης στο φορέα αλληλουχίας shRNA με την παραγωγή μικρών δίκλωνων μορίων RNA που φέρουν μια δευτεροταγή δομή φουρκέτας. Στη συνέχεια αυτά τα δίκλιωνα μόρια επεξεργάζονται από τη Dicer και παράγουν μια ομάδα από siRNAs που αναγνωρίζουν ειδικά τον επιθυμητό mRNA-στόχο, ο οποίος αποικοδομείται μέσω του συμπλόκου σίγησης RISC (εικόνα 31).



Εικόνα 31. Μηχανισμός αποσίωσης μέσω πλασμιδικών φορέων που μεταγράφουν shRNAs.

Βάσει του πρωτοκόλλου της Ambion σχεδιάσαμε τέσσερα ειδικά και εξειδικευμένα shRNAs για την αποσιώπηση της PARN. 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 εταιρεία Sigma-Aldrich. Τα siRNAs/shRNAs για να είναι αποτελεσματικά θα πρέπει να διαθέτουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (Taxman et al., 2006), τα οποία παρατίθενται στον **πίνακα 4**.

Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά βάσει των οποίων σχεδιάστηκαν τα shRNAs

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

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

5' — Sense sequence — Hairpin sequence — Antisense sequence — 3'

Στον **πίνακα 5** συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά των επιλεγμένων shRNAs:

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά των σχεδιασμένων shRNAs έναντι της PARN.

| Αλληλουχία θηλιάς (5'→3) | Θέση στο mRNA | Περιεχόμενο % GC | Νοηματική αλυσίδα shRNA (5'→3) | Αντινοηματική αλυσίδα shRNA (5'→3) |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------------|---|
| UUCAAGA GA | 396 | 31,6 | CGAAGUCAUUUAACUUCUAtt | UAGAAGUUA AAUGACUUC Gtt |
| UUCAAGA GA | 923 | 52,6 | CAGGAGGAGCUGAAUGAUGtt | CAUCAUUA GCUCCUCCUG tt |
| UUCAAGA GA | 1713 | 33,3 | GAAAGUGGACUGAAGAUAGt t | CUAUCUUA GUCCACUUUC tt |
| UUCAAGA GA | 2414 | 52,6 | AGAGCUGACAUCCAGCUGtt | CAGCUGGAA UGUCAGCUC Utt |

Πρωτόκολλο διαμόλυνσης:

1^η ημέρα

- Η πειραματική πορεία είναι η ίδια με την 1^η ημέρα της δοκιμής επούλωσης πληγής με τη διαφορά ότι ο αριθμός των κυττάρων M14K που μεταφέρουμε στο 24-well plate είναι 80.000 κύτταρα/well για τα control και 90.000 κύτταρα/well για τα κύτταρα που θα γίνει αποσιώπηση της PARN.

2^η ημέρα

- Η κυτταρική πληρότητα έχει φτάσει στο 70% των πηγαδιών. Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό, κάνουμε μία πλύση με PBS και προσθέτουμε νέο RPMI με 10% FBS χωρίς penicillin-streptomycin 8 ώρες πριν αρχίσει η διαμόλυση.
 - Για τη διαμόλυση χρησιμοποιήθηκε το X-fect reagent, το οποίο περιέχει το X-fect Polymer και το X-fect Reaction Buffer. Το X-fect Polymer σχηματίζει κατιονικά λιποσωμάτια και επιτρέπει τη διαμόλυση πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα των θηλαστικών με πολύ μεγάλη απόδοση. Το αντιδραστήριο αυτό συνδυαζόμενο με DNA, σχηματίζει λιποσώματα που συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων και αποχύνουν το περιεχόμενο DNA στο εσωτερικό του κυττάρου (στην περίπτωση μας μιλάμε για πλασμίδια που φέρουν shRNAs) (Felgner et al., 1994). Μεταβολές των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων DNA και X-fect Polymer είναι απαραίτητες για την βελτιστοποίηση της διαμόλυσης. Επίσης, είναι αναγκαία στα πειράματα αποσιώπησης και η ύπαρξη κυττάρων που χρησιμεύουν ως control και τα οποία δεν διαμολύνονται. Έτσι, η σύγκριση στα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών των διαμολυσμένων κυττάρων θα γίνει με τα control κύτταρα.
1. Για το σχηματισμό των λιποσωμάτων ετοιμάζουμε δύο διαλύματα: ένα DNA mix και ένα X-fect mix σύμφωνα με τις εξής ενδείξεις:
 - a. DNA mix: 1μg πλασμιδίου σε 25μl X-fect Reaction Buffer / well
 - b. X-fect mix: 0,3μl X-fect Polymer σε 25μl X-fect Reaction Buffer/well
 2. Για την παρασκευή του transfection mix αναμιγνύουμε τα DNA mix και X-fect mix και τα αφήνουμε να επωαστούν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
 3. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης απομακρύνουμε από κάθε well το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση, μοιράζουμε το transfection mix με κυκλικό τρόπο στα κύτταρα που προορίζονται για διαμόλυση και αφήνουμε το 24-well plate να επωαστεί στους 37°C.

3^η ημέρα

- 13 ώρες μετά τη διαμόλυνση απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από τα διαμολυσμένα κύτταρα και το αντικαθιστούμε μετά από δύο πλύσεις με PBS με νέο RPMI (10% FBS).
- 25 ώρες μετά τη διαμόλυνση (12 ώρες μετά την αλλαγή του θρεπτικού όπου απομακρύνουμε τα πλασμίδια από τα διαμολυσμένα κύτταρα) αφαιρούμε το RPMI με 10% FBS και προσθέτουμε νέο RPMI με 0,5% FBS.

4^η ημέρα

- 45 ώρες μετά τη διαμόλυνση αφαιρούμε το RPMI με 0,5% FBS και βάζουμε τις συνθήκες που είχαμε και στη δοκιμή επούλωσης της πληγής για 16 ώρες.

5^η ημέρα

- Η πειραματική διαδικασία είναι η ίδια με την 4^η ημέρα της δοκιμής επούλωσης της πληγής. 61 ώρες μετά τη διαμόλυνση δημιουργούμε την τεχνητή πληγή στα κύτταρα και γίνεται λήψη της πρώτης εικόνας από κάθε πηγάδι και 69 ώρες μετά τη διαμόλυνση (8 ώρες μετά τη δημιουργία της πληγής) γίνεται η λήψη της δεύτερης εικόνας των κυττάρων που έχουν μεταναστεύσει καθώς και η συλλογή τους με τη διαδικασία που έχει περιγραφεί.

Το πρωτόκολλο διαμόλυνσης μπορεί να αποτυπωθεί στο ακόλουθο σχήμα:

| 1 ^η μέρα | 2 ^η μέρα | 0 | 3 ^η μέρα | 4 ^η μέρα | 5 ^η μέρα | | |
|------------------------------------|------------------------------------|---|--|--------------------------------------|------------------------------|--|---|
| Μεταφορά κυττάρων σε 24-well plate | 70% πληρότητα (σε RPMI με 10% FBS) | t=0 Διαμόλυνση (250μl RPMI ανά well) | 13 ώρες Αλλαγή θρεπτικού (RPMI με 10%FBS) | 25 ώρες Προσθήκη RPMI με 0,5% FBS | 45 ώρες Προσθήκη συνθηκών | 16 ώρες 61 ώρες Δημιουργία πληγής & λήψη φωτογραφιών | 8 ώρες 69 hrs Λήψη φωτογραφιών & συλλογή κυττάρων |

Υλικά - Αντιδραστήρια

- Nucleospin Plasmid kit (Macherey Nagel)
- X-fect reagent (Clontech)
- shRNAs (Sigma)
- pLKO.1-puro vector (Sigma)

3.5 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών

Για την απομόνωση του RNA από τα κύτταρα Met-5A και M14K έγινε χρήση του TRIzol reagent kit.

Πρωτόκολλο TRIzol reagent kit:

1. Μετά τη συλλογή των διαμολυσμένων και μη κυττάρων (όπως περιγράφεται στο ενότητα 3.2), ακολουθεί λύση με την προσθήκη στο ίζημα των κυττάρων ενός όγκου TRI reagent (1V). Ανάλογα με την ποσότητα των κυττάρων που έχουν καθιζάνει, ορίζεται και ο όγκος. Για τα 24-well plates που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση στο παρόν πείραμα, ένας όγκος του 0,5ml είναι αρκετός. Ακολουθεί διάλυση των κυττάρων με πιπετάρισμα. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
2. Ακολούθως προσθέτουμε 50μl 1-bromo-3-chloropropane (0,1V), ανακινούμε και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης φυγοκεντρούμε στα 12000g για 15 λεπτά στους 4 °C. Με τον τρόπο αυτό γίνεται διαχωρισμός των φάσεων, κατά τον οποίο το ολικό RNA μεταπίπτει στην υδατική φάση, ενώ οι πρωτεΐνες στην οργανική.
3. Συλλογή και μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο tube, όπου και γίνεται προσθήκη 0,25ml 2-propanol (0,5V), προκειμένου να γίνει καθίζηση του RNA. Ανακινούμε και επωάζουμε για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 12000g για 10 λεπτά στους 4 °C.
4. Γίνεται αφαίρεση του υπερκειμένου. Ακολουθεί καθαρισμός από προσμίξεις με προσθήκη 1ml αιθανόλης 75% (2V) στο ίζημα του RNA. Ανακινούμε και

- επώαζουμε για 20 λεπτά στους -20°C . Τέλος, φυγοκεντρούμε στα 12000g για 5 λεπτά στους 4°C .
5. Αφαιρούμε το υπερκείμενο προσεκτικά μέσα σε hood και αφήνουμε το ίζημα να αφυδατωθεί, προκειμένου να μην παραμείνει καθόλου αιθανόλη.
 6. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε ddH₂O με διαρκές πιπετάρισμα και επώαση για 5 λεπτά στους 55°C .
 7. Τέλος, αποθηκεύουμε το RNA στους -80°C .

Υλικά-Αντιδραστήρια

- TRIzol reagent kit (Sigma)

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

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

Βήμα 1^ο: Σύνθεση του cDNA κλώνου

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

- 1) Ετοιμάζουμε σε ένα μικρό eppendorf τα εξής:

| Αντιδραστήρια | Όγκος |
|------------------------------|---|
| Oligo dT Primer (50 μM)* | 1.0 μl |
| dNTP Mixture (10 mM each) | 1.0 μl |
| Template RNA | (Ολικό RNA : < 5 μg*, πολυ(A) ⁺ RNA : < 1 μg**) |
| RNase free dH ₂ O | μέχρι 10 μl |

Τα δείγματα RNA και των δύο κυτταρικών σειρών έχουν προηγουμένως φωτομετρηθεί και η συγκέντρωσή τους έχει υπολογιστεί στα 100ng/μl.

- 2) 5 λεπτά στους 65^ο C, για την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του RNA και για την πρόσδεση των εκκινητών στο στόχο. Έπειτα μεταφέρουμε την αντίδραση απευθείας στον πάγο.
- 3) Προσθέτουμε στη συνέχεια τα αντιδραστήρια που παρουσιάζονται παρακάτω, μέχρι τον τελικό όγκο που είναι 20μl.

| Αντιδραστήρια | Όγκος |
|-------------------------------|--------------------|
| Template RNA Primer Mixture | μέχρι 10.0μl |
| 5 X PrimeScript™ Buffer | 4 μl (1X) |
| RNase Inhibitor (40 U/μl) | 0.5 μl (20 units) |
| PrimeScript™ RTase (200 U/μl) | 1.0 μl (200 units) |
| RNase free dH ₂ O | μέχρι 20.0 μl |

- 4) Αναδεύουμε και επωάζουμε το μείγμα της αντίδρασης στους 42° C για 52 λεπτά. Αυτή είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου.
- 5) Επώαση στους 70° C για 5 λεπτά, ώστε να αδρανοποιηθεί το ένζυμο.
- 6) Αραιώνουμε το νεοσυντιθέμενο δείγμα cDNA προσθέτοντας 90μl ddH₂O, φέρνοντας τον τελικό όγκο στα 100μl.
- 7) Το δείγμα cDNA που προκύπτει είναι έτοιμο προς χρήση στην RT-qPCR. Αποθηκεύουμε το δείγμα cDNA στους -20°C, έως ότου γίνει προετοιμασία της PCR, ή αν επιθυμούμε η τελευταία να γίνει άλλη χρονική στιγμή.

Βήμα 2°: Real Time PCR

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.

Η ευρέως χρησιμοποιούμενη ουσία, SYBR Green I διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497nm και εκπέμπει στα 520 nm. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της SYBR Green είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας – στόχο, ενώ σημαντικό μειονέκτημά της είναι ότι προσδένεται σε όλα τα δίκλιωνα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύπτουν. Ωστόσο ο σωστός σχεδιασμός ειδικών εκκινητών καθώς και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, μπορούν να συμβάλλουν στην αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών.

Η ένταση φθορισμού μετράται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μία καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει την παρακολούθηση ολόκληρης της διαδικασίας της αντίδρασης από τον ερευνητή. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την αντίδραση συστατικά βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Στη συνέχεια επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία ορισμένα από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά και αναστολείς της αντίδρασης. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητά της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau).

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία εφαρμόσαμε την ποσοτική PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Kapa Biosystems “KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kit - Master Mix (2X) Universal”. Ελέγξαμε με βάση το πρωτόκολλο αυτό, τα επίπεδα έκφρασης της PARN σε κύτταρα Met-5A και M14K που είχαν υποστεί τη δοκιμασία της επούλωσης πληγής και είχαν επωαστεί με τις εκάστοτε συνθήκες για 24 ώρες καθώς και στα M14K που είχαν διαμολυνθεί πριν τη δοκιμασία της

επούλωσης πληγής (στα οποία εισήχθησαν αντι-PARN shRNAs). Οι αντιδράσεις προετοιμάστηκαν χρησιμοποιώντας τους εκκινητές του **πίνακα 6**, ενώ ως χρωστική αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η ROX. Ως εσωτερικά control για την κανονικοποίηση του σήματος των ειδικών προϊόντων, ορίστηκε το ιδιοσυστατικό γονίδιο της β-ακτίνης (b-actin). Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε cDNA, από ολικό RNA απομονωμένο από τα εξεταζόμενα δείγματα. Αναλυτικότερα, οι ποσότητες των επιμέρους αντιδραστηρίων και οι συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρουσιάζονται στους **πίνακες 7 και 8** αντίστοιχα.

Πίνακας 6. Εκκινητές των παραγόντων που μελετήθηκαν και μέγεθος των ειδικών προϊόντων

| | | | |
|----------------|----------------|--|-----------------------------------|
| PARN | FORWARD | GCACAACCGATTTTCCAC T | Product size: 212bp |
| | REVERSE | CTCTTGTGAGGCCTTTCCT G | |
| b-actin | FORWARD | GGACTTCGAGCAAGAGAT GG | 234bp |
| | REVERSE | AGCACTGTGTTGGCGTAC AG | |

Πίνακας 7. Συστατικά αντίδρασης qPCR

| | Final concentration | 20 µl rxn |
|---|----------------------------|------------------|
| KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Universal | 1X | 10.0µl |
| Forward Primer (10 µM) | 200nM | 0.4µl |
| Reverse Primer (10 µM) | 200nM | 0.4µl |
| Template DNA | (<20 ng/20 µl rxn) | Variable |
| ROX Low | 50nM | 0.4µl |
| PCR grade water up to 20 µl | | As required |

Όπου:

KAPA SYBR Master Mix αποτελεί μίγμα πολυ(A) πολυμεράσης, dNTPs, ιόντων Mg²⁺, και χρωστικής παρακολούθησης SYBR Green,

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

Πίνακας 8. Συνθήκες αντίδρασης qPCR για την ενίσχυση των επιλεγμένων παραγόντων

| qPCR steps | Cycling conditions | |
|---------------------------------|--------------------|---------------|
| Denaturation (Hot Start) | 95°C, 3min | (1 cycle) |
| Amplification | 95°C, 3sec | } (40 cycles) |
| | 60°C, 30sec | |
| | 72°C, 11sec | |
| Dissociation | 95°C, 1min | (1 cycle) |
| | 55°C, 30sec | |
| | 95°C, 30sec | |
| | 25°C, 3min | (1 cycle) |

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

Οι εκκινητές της PARN και της β-ακτίνης σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος PRIMER 3. Ο κάθε εκκινητής ελέγχθηκε ως προς την εξειδίκευση του για το αντίστοιχο cDNA-στόχο με Blastn. Η ανάλυση των δεδομένων μετά την ενίσχυση των δειγμάτων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος MxPro.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- K-SYBR® qRT-PCR kit (Kapa)

3.7 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της RT-qPCR σε πηκτή αγαρόζης

Μετά την πραγματοποίηση των RT- qPCR και την ανάλυση των δεδομένων με τη βοήθεια του προγράμματος MxPro, η επιβεβαίωση των ειδικών προϊόντων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης.

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR στις οποίες έγινε ενίσχυση των mRNAs της PARN έγινε σε πηκτή αγαρόζης 1,5%. Το ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση των νουκλεϊκών οξέων που χρησιμοποιήθηκε είναι το TAE 1x, με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 120V και παρακολούθηση του μετώπου των χρωστικών που ενυπάρχουν στο loading buffer.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- TAE 50x: Tris base 24,2% v/w, ακετοξικό οξύ 5,71% w/w, EDTA 0,05M, pH 8,6
- Loading buffer 6x: Bromophenol Blue 0,09%, Xylene Cyanol 0,09%, Γλυκερόλη 60%, EDTA 60mM
- Αγαρόζη (Sigma)
- DNA μοριακός μάρτυρας 100 bp (Fermentas)
- Midori Green DNA stain (Nippon Genetics)
- Bromophenol blue (Rasearch Organics)
- Xylene Cyanol (Merck)
- Γλυκερόλη (Panreac)
- EDTA (Merck)
- Tris (Merck)
- Ακετοξικό οξύ (Merck)

3.8 Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα θηλαστικών

1. Τρυψινοποίηση των κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.1. Μετά τη φυγοκέντρωση, απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε PBS που περιέχει 1mM αναστολείς πρωτεασών.
2. Φυγοκέντρωση στις 1500rpm για 5 λεπτά στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκειμένου.

3. Διάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε RIPA buffer (100μl ανά 1×10^6 κύτταρα) με πιπετάρισμα και επώαση στους 4°C υπό ανάδευση για 8 ώρες.
4. Sonication και φυγοκέντρηση στις 13000g για 15 λεπτά στους 4°C .
5. Συλλογή υπερκείμενου, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτες σε πρωτεϊνικό κυρίως επίπεδο.

3.9 Κατακρήμιση πρωτεϊνών με TCA/DOC

Για την κατακρήμιση πρωτεϊνών από τα συλλεχθέντα υπερκείμενα του πρωτοκόλλου 3.8 πραγματοποιούμε τα εξής βήματα:

- 1) Αραίωση δείγματος ως τα 100μl.
- 2) Προσθήκη 10 μl DOC (Na-deoxycholate) 0,15% και επώαση του δείγματος στον πάγο για 10 λεπτά.
- 3) Προσθήκη 10 μl TCA 100% ή 72% και εκ νέου επώαση στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολουθεί επώαση του δείγματος στους -20°C για 30 λεπτά.
- 4) Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 12000rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- 5) Πλύση ιζήματος με 200 μl TCA 2,5%.
- 6) Πλύση με παγωμένη ακετόνη (2 φορές) και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 12000rpm.
- 7) Αφήνουμε την περίσσεια ακετόνης να εξατμιστεί και ακολούθως προσθέτουμε 20 μl protein loading buffer 4x. Βράζουμε το δείγμα για 5 λεπτά, το οποίο πλέον είναι έτοιμο για φόρτωση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

3.10 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blotting)

SDS-PAGE

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών των υπό ανάλυση δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου δύο φάσεων (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Η μία φάση του πηκτώματος αποτελεί το Stacking gel (5%), στην οποία έγινε φόρτωση των δειγμάτων των πρωτεϊνών και το «πακετάρισμά» τους στο ίδιο ύψος προκειμένου όλες οι διαδρομές να τρέξουν σύγχρονα. Τη δεύτερη φάση αποτελεί το πήκτωμα διαχωρισμού ή separating gel (10%), όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, κάτω από εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου.

Η παρασκευή του διαφασικού πηκτώματος έγινε σύμφωνα με τα συστατικά των παρακάτω **πινάκων 9 και 10** (Lab Faqs-Roche):

Πίνακας 9. Stacking gel 5%

| Components | ml |
|-------------------------------|------------|
| H ₂ O | 2,1 |
| 30% acryl-bisacrylamide mix | 0,5 |
| 1,5M Tris (pH 6.8) | 0,38 |
| 10% SDS | 0,03 |
| 10% APS (ammonium persulfate) | 0,03 |
| TEMED | 0,003 |
| Vtot | 3ml |

Πίνακας 10. Separating gel 10%

| Components | ml |
|-------------------------------|-------------|
| H ₂ O | 4 |
| 30% acryl-bisacrylamide mix | 3.3 |
| 1,5M Tris (pH 8.8) | 2.5 |
| 10% SDS | 0.1 |
| 10% APS (ammonium persulfate) | 0.1 |
| TEMED | 0.004 |
| Vtot | 10ml |

Προσθέτουμε τελευταίους τους καταλύτες APS και TEMED για την πήξη των πηκτωμάτων. Μετά την προσθήκη του loading buffer (που αναφέρθηκε στο κεφάλαιο

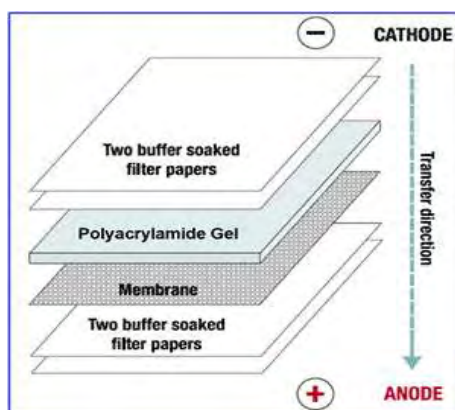
3.9) ακολουθεί βρασμός των δειγμάτων στους 95 °C για 5 λεπτά, προκειμένου να γίνει αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών και διαχωρισμός των πρωτεϊνών, χωρίς διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού. Μετά από πλήρη διαλυτοποίηση των δειγμάτων, έγινε εμβάπτιση του πηκτώματος σε running buffer 1x μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα. Οι ποσότητες των δειγμάτων που φορτώθηκαν, υπολογίστηκαν βάσει της καμπύλης Bradford που κατασκευάστηκε (βλ. κεφάλαιο 3.11). Στο πήκτωμα φορτώθηκαν 100μg πρωτεΐνης για κάθε κυτταρική σειρά. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στα 120V, ενώ ο χρόνος εφαρμογής προσδιορίστηκε με βάση την παρακολούθηση του μετώπου της διαδρομής της χρωστικής που ενυπάρχει στο loading buffer (bromophenol blue).

Ανοσοαποτύπωση-Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών και διαχωρισμό τους ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, ακολουθεί ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη PVDF, γνωστή ως Western blotting. Η ηλεκτρομεταφορά 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 καθιλώνονται 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 ενεργοποίησής της με εμβάπτιση της μεμβράνης σε μεθανόλη 100% πριν βυθιστεί στο διάλυμα μεταφοράς.

Η τοποθέτηση 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 32). 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 στα 270 mA, για 50 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.



Εικόνα 32. Συναρμολόγηση συσκευής ηλεκτρομεταφοράς

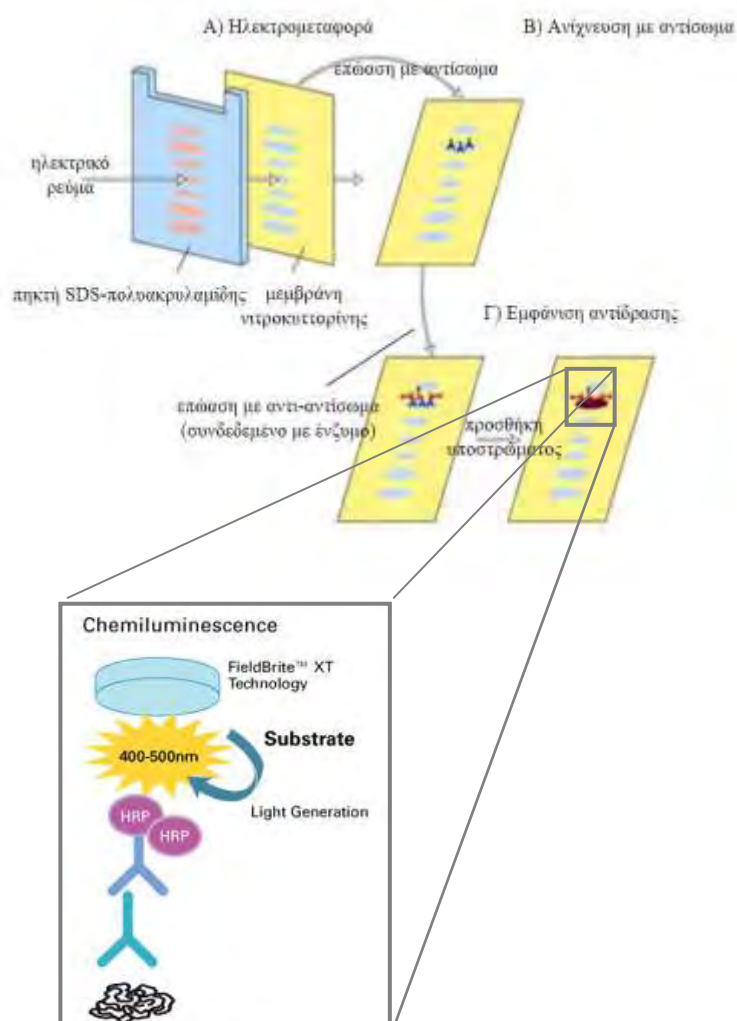
Ανοσοανίχνευση

Αφού μεταφερθούν οι πρωτεΐνες στη μεμβράνη PVDF, γίνεται οπτικοποίησή τους με ανοσοανίχνευση. Η ανοσοανίχνευση είναι μια τεχνική που επιτρέπει τον εντοπισμό μιας καθηλωμένης στη 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 blocking buffer ώστε να κορεστεί η μεμβράνη από την καζεΐνη του γάλακτος, η οποία δεσμεύει τις μη ειδικές θέσεις πάνω στη μεμβράνη. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγονται οι μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα που είναι ειδικό για την επιθυμητή πρωτεΐνη. Κατόπιν, η μεμβράνη επωάζεται με το πρώτο αντίσωμα υπό συνεχή ανάδευση overnight στους 4°C. Στην προκειμένη περίπτωση ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε ορός μετά από ανοσοποίηση κουνελιού με PARN (rabbit anti-PARN) σε αραιώση 1:1000 σε blocking buffer. Ακολουθούν 3 πλύσεις της

μεμβράνης με PBS-T (washing buffer) έκαστης 30 λεπτά υπό ανάδευση, και στη συνέχεια επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα παρουσία του δευτέρου αντισώματος (φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένη υπεροξειδάση), υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ως δεύτερο αντίσωμα στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε goat anti-rabbit IgG-HRP αραιωμένο 1:10.000. Της διαδικασίας εμφάνισης του σήματος προηγούνται τρεις πλύσεις της μεμβράνης με PBS-T των 30 λεπτών.

Η ανίχνευση του 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 αποτυπώθηκε σε φωτογραφικό φιλμ με τη μορφή σκοτεινής ζώνης (εικόνα 33).



Εικόνα 33. Συνοπτική παρουσίαση των διαδικασιών ηλεκτρομεταφοράς, ανοσοανίχνευσης και εμφάνισης του σήματος.

Η εμφάνιση γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο του συστήματος ανοσοανίχνευσης ECL Plus (Amersham).

3.11 Πρότυπη καμπύλη Bradford με BSA (bovine serum albumin)

Από stock διαλύματος πρωτεΐνης BSA 2mg/ml, παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης (0 μέχρι 2,00mg/ml) και στη συνέχεια έγινε επώαση των διαλυμάτων με το αντιδραστήριο Bradford για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η πρότυπη καμπύλη έγινε μετρώντας τις απορροφήσεις των διαλυμάτων στα 595nm με τη βοήθεια του φωτομέτρου. Προέκυψε μια γραμμική σχέση με εξίσωση:

$$A = 0,9899 \times C + 0,0289$$

Όπου:

A η απορρόφηση του δείγματος στα 595nm, και

C η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού δείγματος σε mg/ml.

Με τη βοήθεια της εξίσωσης που προέκυψε, υπολογίστηκε η ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών στα δείγματα της πειραματικής διαδικασίας.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- RIPA buffer: 50mM Tris-HCl pH=7,4, 150mM NaCl, 1% Triton, 0,25% Na-deoxycholate, 1mM αναστολείς πρωτεασών
- Protein loading buffer 4x: 1M Tris pH 6.8, 10% γλυκερόλη, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% bromophenol blue
- Running buffer 10x: 25mM Tris, 192mM Glycine, SDS 0,1%, 500 ml dH₂O
- Transfer buffer 1x: 10% running buffer 10x, 10% Methanol (100%), dH₂O
- Blocking buffer: 0,1% Tween, 5% γάλα, PBS 1x
- Washing buffer (PBS-T): 0,1% Tween, PBS 1x

- Αναστολείς πρωτεασών: Protease Inhibitors (Roche)
- Acryl-bisacrylamide mix (Merck)
- APS (Merck)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Merck)
- Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent (BioRad)
- Bromophenol blue (Rasearch Organics)
- ECL Plus (Amersham)
- Glycine (Merck)
- Goat anti-rabbit IgG-HRP (Chemicon)
- Γάλα σε σκόνη
- Γλυκερόλη (Merck)
- HCl (Merck)
- Μεθανόλη (Merck)
- NaCl (Merck)
- Na-deoxycholate (Sigma)
- Protein ladder (Nippon Genetics)
- Rabbit anti-PARN serum (ευγενική παραχώρηση κ. A.Virtanen)
- SDS (Merck)
- TCA (Fluka)
- Tris (Merck)
- Triton (Sigma)
- TEMED (Life Invitrogen)
- Tween (EuroClone)

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Επιδράσεις νανοσωματιδίων αργύρου στην κυτταρική μετανάστευση

Η μελέτη της κυτταρικής μετανάστευσης έγινε με τη δοκιμή της επούλωσης πληγής στις κυτταρικές σειρές Met-5A και M14K υπό την επίδραση νανοσωματιδίων αργύρου μεγέθους 20nm και 60nm όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2. Ως πειράματα αναφοράς (control) ορίστηκαν τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε διάλυμα κιτρικού νατρίου 0,2mM σε θρεπτικό RPMI με 10% FBS καθώς το διάλυμα των νανοσωματιδίων αργύρου περιέχει κιτρικό νάτριο της ίδιας συγκέντρωσης σαν σταθεροποιητή. Σαν εσωτερικό control της δοκιμής επούλωσης πληγής χρησιμοποιήθηκε μία συνθήκη με κιτρικό νάτριο σε RPMI με 0,5% FBS. Αναμένεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις συνθήκες κιτρικού νατρίου με 10% και 0,5% FBS (μικρότερη μετανάστευση στα κύτταρα με στέρηση ορού στο θρεπτικό υλικό) για να μπορεί να θεωρηθεί επιτυχής η δοκιμή της επούλωσης πληγής.

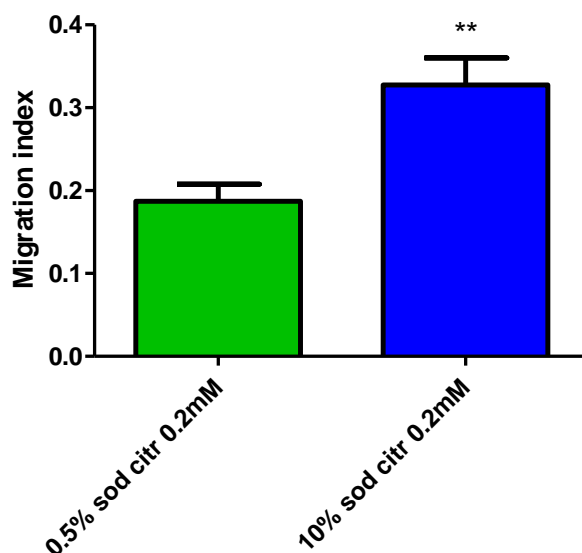
Μετά τη λήψη των εικόνων με κάμερα (Leica Application Suite Version 3.4.0) ενσωματωμένη στο μικροσκόπιο, έγινε επεξεργασία των εικόνων με το πρόγραμμα Image J και μετρήθηκε η επιφάνεια της πληγής (που μένει ακάλυπτη από κύτταρα) τη στιγμή $t=0$ και 8 ώρες μετά ($t=8$). Ο δείκτης κυτταρικής μετανάστευσης (Migration Index) εισήχθη για να μετρηθεί η ικανότητα των κυττάρων να κλείσουν την πληγή και μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Migration Index} = (A_0 - A_{8\text{hrs}}) / A_0$$

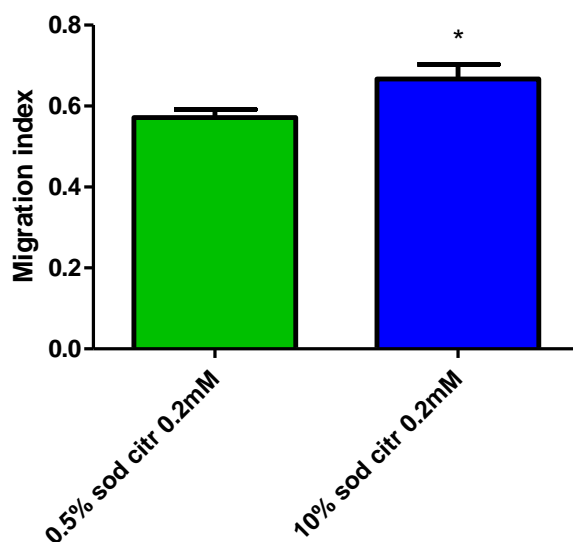
όπου A υποδηλώνει την περιοχή της πληγής (που παραμένει ακάλυπτη από κύτταρα) που μετρήθηκε με το Image J. Όταν ο δείκτης της πληγής είναι ίσος με 1 σημαίνει ότι η περιοχή της πληγής έχει κλείσει πλήρως (έχει καλυφθεί από κύτταρα). Ο αριθμός των επαναλήψεων για κάθε πειραματική συνθήκη ήταν $n=6$ και η στατιστική ανάλυση έγινε στο Prism (Student's t test). Το * υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών με $p < 0.05$.

Στα Met-5A με στέρηση ορού η μετανάστευση είναι σημαντικά μειωμένη σε σχέση με αυτά που έχουν 10% ορό στο θρεπτικό υλικό. Επίσης τα M14K υπό στέρηση ορού μεταναστεύουν με πιο αργό ρυθμό σε σχέση με αυτά που έχουν 10%

ορό στο θρεπτικό υλικό. Στις εικόνες 34 και 35 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της κυτταρικής μετανάστευσης υπό την επίδραση κιτρικού νατρίου (sodium citrate) μεταξύ 0,5% FBS και 10% FBS στα Met-5A και στα M14K αντίστοιχα.

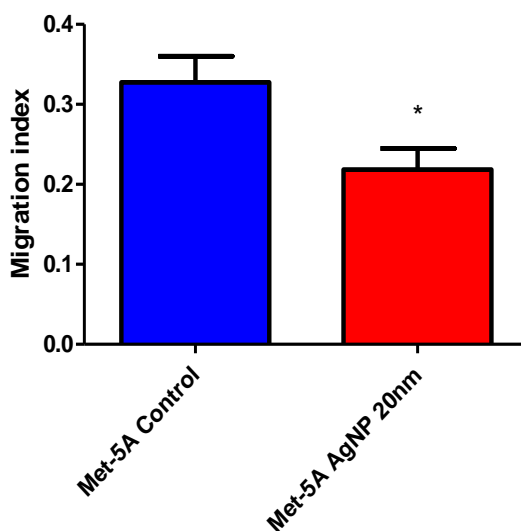


Εικόνα 34. Δείκτης κυτταρικής μετανάστευσης στα **Met-5A** σε χρονικό διάστημα 8 ωρών υπό την επίδραση κιτρικού νατρίου σε θρεπτικό RPMI με 0,5% FBS (αριστερή στήλη) και 10% FBS (δεξιά στήλη).

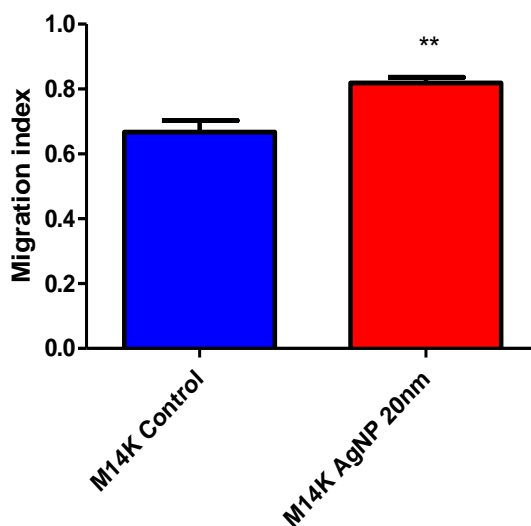


Εικόνα 35. Δείκτης κυτταρικής μετανάστευσης στα **M14K** σε χρονικό διάστημα 8 ωρών υπό την επίδραση κιτρικού νατρίου σε θρεπτικό RPMI με 0,5% FBS (αριστερή στήλη) και 10% FBS (δεξιά στήλη).

Η κυτταρική μετανάστευση των Met-5A αναστέλλεται μερικώς ($p < 0.05$) στα κύτταρα που εκτέθηκαν σε διάλυμα AgNPs 20nm σε σχέση με τα control. Αντίθετα, στα M14K η κυτταρική μετανάστευση αυξάνεται σημαντικά ($p < 0.01$) στα κύτταρα που εκτέθηκαν σε διάλυμα AgNPs 20nm σε σχέση με τα control. Στις **εικόνες 36 και 37** απεικονίζονται οι δείκτες μετανάστευσης για την αξιολόγηση της δοκιμής επούλωσης πληγής μετά από έκθεση των Met-5A και των M14K αντίστοιχα, σε AgNPs μεγέθους 20nm.

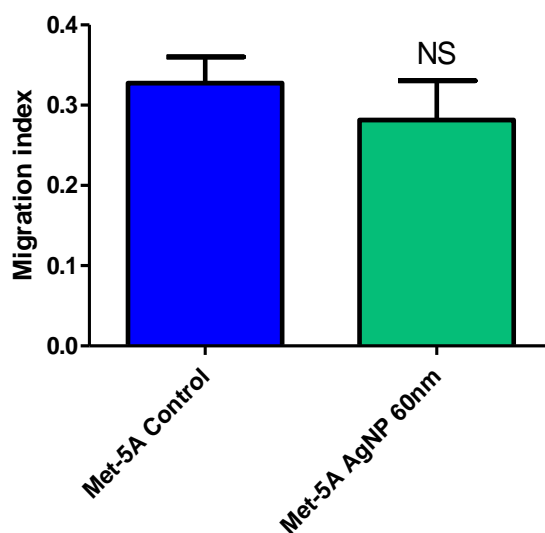


Εικόνα 36. Δείκτης κυτταρικής μετανάστευσης στα Met-5A σε χρονικό διάστημα 8 ωρών υπό την επίδραση AgNPs μεγέθους 20nm.

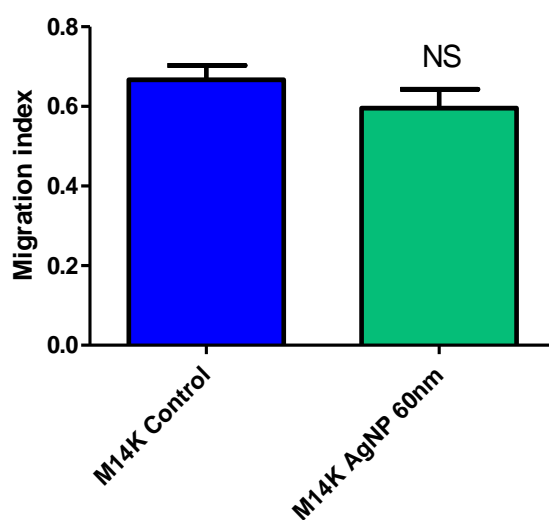


Εικόνα 37. Δείκτης κυτταρικής μετανάστευσης στα M14K σε χρονικό διάστημα 8 ωρών υπό την επίδραση AgNPs μεγέθους 20nm.

Η έκθεση των κυττάρων σε AgNPs 60nm δεν φέρει κάποια σημαντική επίδραση στην μετανάστευση των Met-5A και των M14K ($p>0.05$). Στις **εικόνες 38 και 39** απεικονίζονται οι δείκτες μετανάστευσης για την αξιολόγηση της δοκιμής επούλωσης πληγής μετά από έκθεση των Met-5A και των M14K αντίστοιχα, σε AgNPs μεγέθους 60nm.



Εικόνα 38. Δείκτης κυτταρικής μετανάστευσης στα Met-5A σε χρονικό διάστημα 8 ωρών υπό την επίδραση AgNPs μεγέθους 60nm.

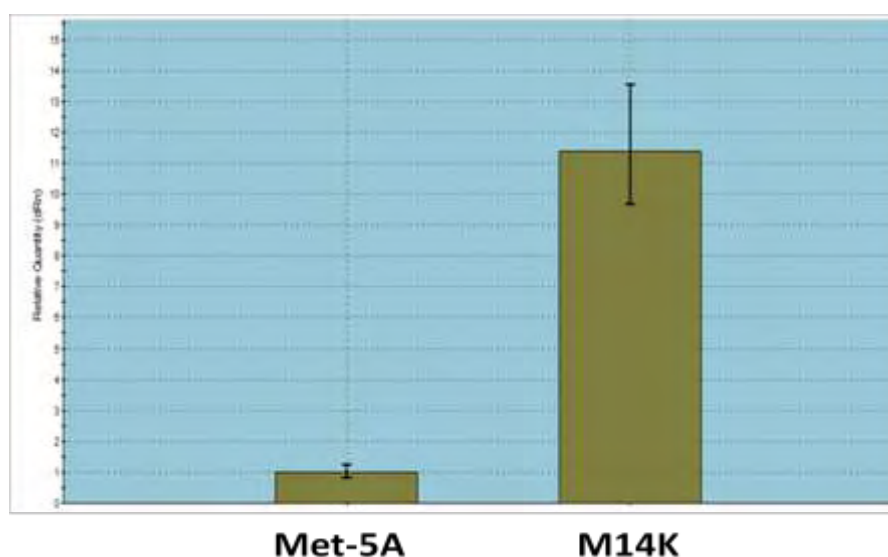


Εικόνα 39. Δείκτης κυτταρικής μετανάστευσης στα M14K σε χρονικό διάστημα 8 ωρών υπό την επίδραση AgNPs μεγέθους 60nm.

4.2 Έλεγχος επιπέδων mRNA της PARN στα Met-5A και στα M14K

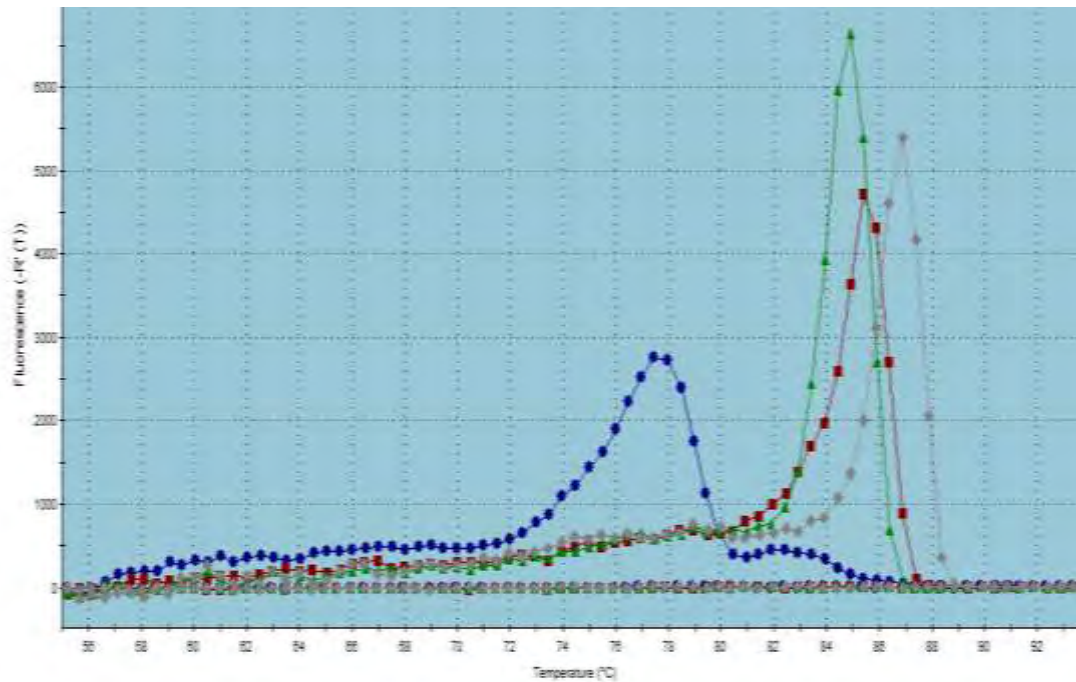
Απομονώθηκε ολικό RNA από τις δύο κυτταρικές σειρές και πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις Real Time - PCR δύο βημάτων προκειμένου να ελεγχουμε τα επίπεδα έκφρασης της PARN. Χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες που περιγράφονται στην ενότητα 3.6 για την προετοιμασία των αντιδράσεων. Για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων και την κανονικοποίηση (normalization) των αποτελεσμάτων επιλέχθηκε το γονίδιο της β-ακτίνης.

Τα επίπεδα mRNA της PARN είναι περιορισμένα στην κυτταρική σειρά Met-5A σε σχέση με την M14K. Στα Met-5A παρατηρούνται κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 80°C που αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα της PCR. Επομένως δεν υπάρχει σημαντική μεταγραφική έκφραση της PARN στην κυτταρική σειρά Met-5A. Αντίθετα, στα M14K παρατηρείται σημαντική μεταγραφική έκφραση της PARN καθώς παρατηρούνται ειδικά προϊόντα με κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C. Τα αποτελέσματα της RT-qPCR απεικονίζονται με τη μορφή στηλών στο Relative Quantitative Chart και με τη μορφή διαγράμματος στο Dissociation Curve όπως φαίνονται στις εικόνες 40 και 41 αντίστοιχα.



Εικόνα 40. Relative Quantitative Chart: αποτελέσματα από την RT-qPCR [$Rn'(T)^*$]. Τα επίπεδα mRNA της PARN είναι περιορισμένα στην κυτταρική σειρά Met-5A σε σχέση με την M14K.

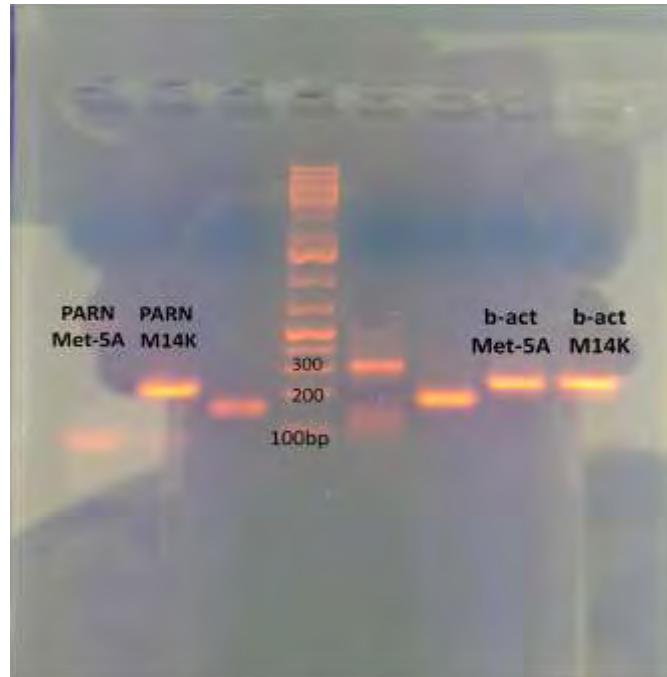
* $-Rn'(T)$ = the first derivative of the reference dye-normalized fluorescence reading multiplied by -1.



Εικόνα 41. Dissociation Curve: Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού. Η πράσινη καμπύλη αντιπροσωπεύει τα προϊόντα της PARN στα M14K κύτταρα ενώ η μπλε τα προϊόντα της PARN στα Met-5A. Οι άλλες δύο καμπύλες αντιπροσωπεύουν τα προϊόντα της β-ακτίνης: η κόκκινη στα Met-5A και η γκρι στα M14K. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες σε μη ειδικά προϊόντα.

4.3 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-qPCR σε πηκτή αγαρόζης

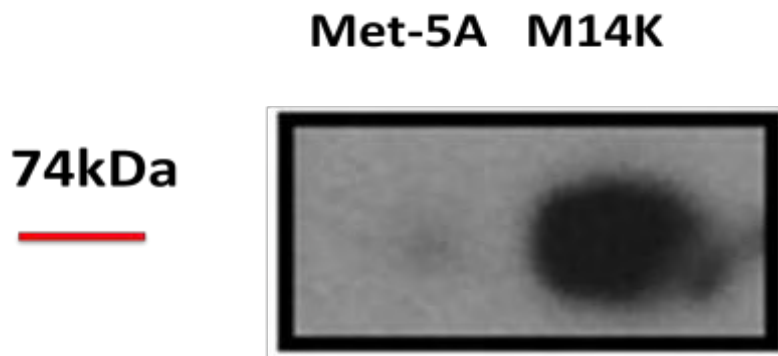
Τα ειδικά προϊόντα της RT-qPCR επιβεβαιώθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης όπως περιγράφεται στην *ενότητα 3.7*. Το ειδικό προϊόν της PARN αναμένεται στις 212bp και φαίνεται να υπάρχει μόνο στα M14K. Το ειδικό προϊόν της β-ακτίνης αναμένεται στις 234bp και υπάρχει και στις δύο κυτταρικές σειρές. Στην **εικόνα 42** παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων όπου ενισχύθηκε το mRNA της PARN και της β-ακτίνης, το οποίο αποτέλεσε το γονίδιο αναφοράς, για τα Met-5A και τα M14K.



Εικόνα 42. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR όπου ενισχύθηκε το mRNA της PARN και της β-ακτίνης.

4.4 Έλεγχος της PARN σε επίπεδο πρωτεΐνης στα Met-5A και στα M14K

Εκτός από έλεγχο της PARN σε επίπεδο mRNA, έγινε και έλεγχος σε επίπεδο πρωτεΐνης στις δύο κυτταρικές σειρές. Τα επίπεδα πρωτεΐνης ελέγχθηκαν με ανοσοαποτύπωση (Western blot) όπως περιγράφεται στην *ενότητα 3.10*. Μετά από ηλεκτρομεταφορά των απομονωμένων πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF, ακολούθησε ανοσοανίχνευση με τη χρήση Anti-PARN αντισώματος. Παρατηρήθηκε μάλιστα στα 74kDa στην κυτταρική σειρά M14K. Η πρωτεϊνική έκφραση της PARN στην κυτταρική σειρά Met-5A είναι περιορισμένη σε σχέση με την M14K. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης απεικονίζονται στην **εικόνα 43**.

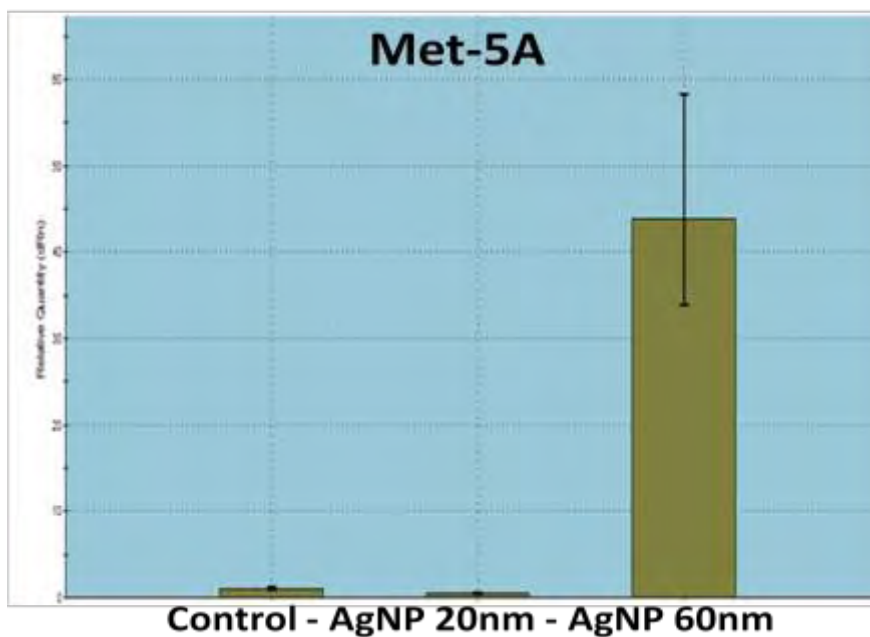


Εικόνα 43. Εικόνα ανοσοαποτύπωσης της PARN όπου φαίνονται τα επίπεδα πρωτεϊνών στις δύο κυτταρικές σειρές. Η πρωτεϊνική έκφραση της PARN στα 74kDa είναι περιορισμένη στην κυτταρική σειρά Met-5A σε σχέση με την M14K.

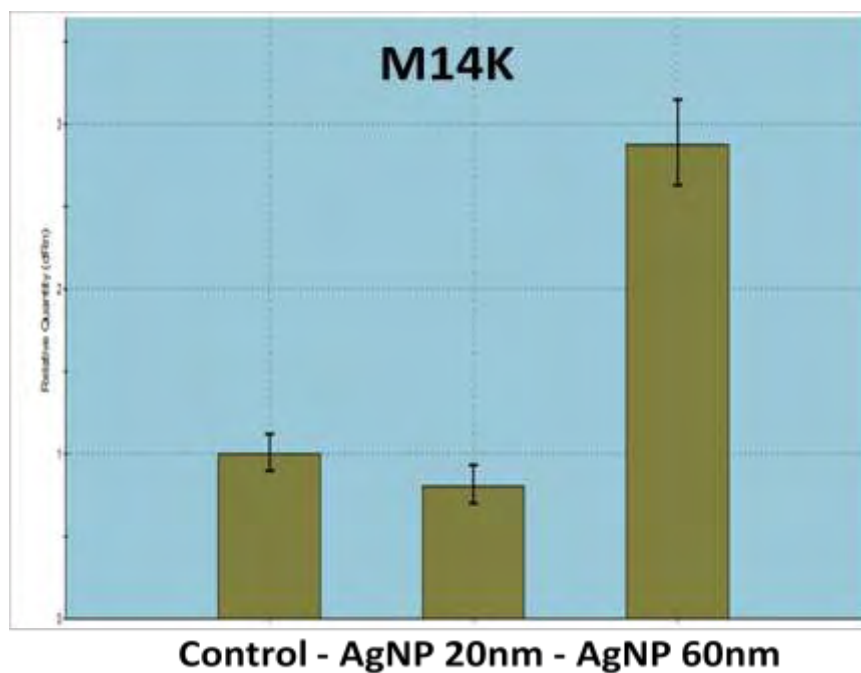
4.5 Επιδράσεις AgNPs 20nm και 60nm στα επίπεδα mRNA της PARN

Μετά τη δοκιμή επούλωσης πληγής που περιγράφεται στην ενότητα 3.2, έγινε συλλογή των κύτταρων και απομόνωση ολικού RNA από τα Met-5A και τα M14K. Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις Real Time - PCR δύο βημάτων προκειμένου να ελέγξουμε τα επίπεδα έκφρασης της PARN μετά την έκθεση των κυττάρων σε AgNPs 20nm και 60nm για 24 ώρες. Χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες που περιγράφονται στην ενότητα 3.6 για την προετοιμασία των αντιδράσεων. Για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων και την κανονικοποίηση (normalization) των αποτελεσμάτων επιλέχθηκε το γονίδιο της β-ακτίνης. Ως πειράματα αναφοράς (control) ορίστηκαν τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε διάλυμα κιτρικού νατρίου 0,2mM σε θρεπτικό RPMI με 10% FBS καθώς το διάλυμα των νανοσωματιδίων αργύρου περιέχει κιτρικό νάτριο της ίδιας συγκέντρωσης σαν σταθεροποιητή.

Η έκθεση των δύο κυτταρικών σειρών σε AgNPs των 20nm για 24 ώρες, δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα mRNA της PARN. Η έκθεση σε AgNPs των 60nm για 24 ώρες, ενεργοποίησε σημαντικά την έκφραση της PARN στην κυτταρική σειρά Met-5A και αύξησε τα επίπεδα mRNA της PARN στην σειρά M14K. Τα αποτελέσματα της RT-qPCR απεικονίζονται με τη μορφή στηλών στα Relative Quantitative Charts όπως φαίνεται στις εικόνες 44 και 45.



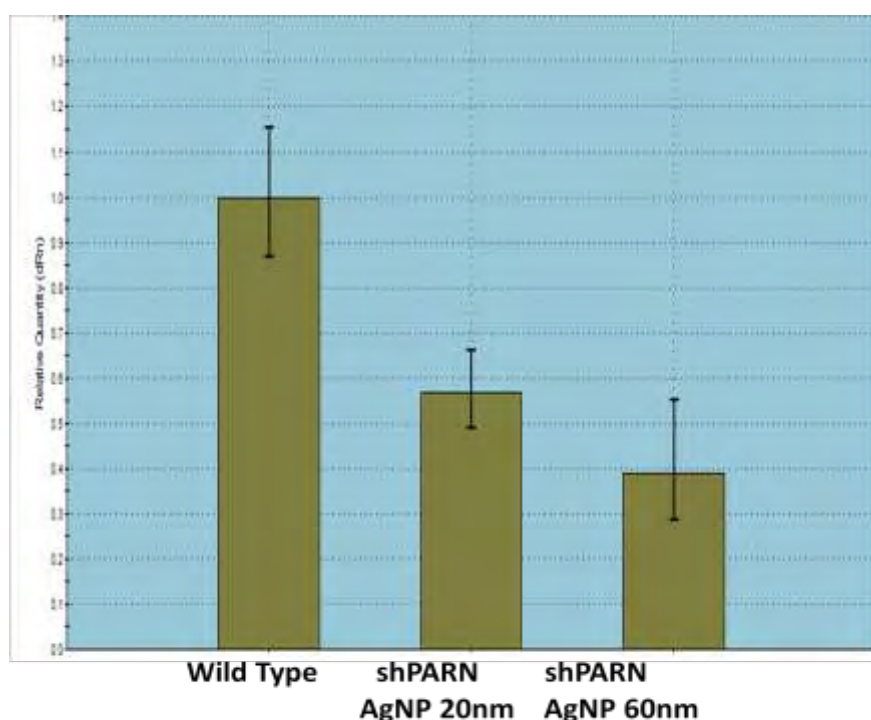
Εικόνα 44. Relative Quantitative Chart: αποτελέσματα από την RT-qPCR. Επίπεδα mRNA της PARN μετά από έκθεση των Met-5A σε AgNPs 20nm και 60nm για 24 ώρες.



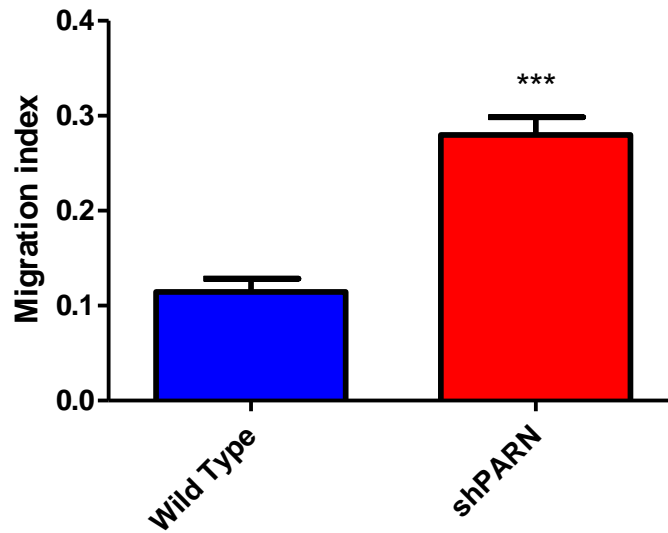
Εικόνα 45. Relative Quantitative Chart: αποτελέσματα από την RT-qPCR. Επίπεδα mRNA της PARN μετά από έκθεση των M14K σε AgNPs 20nm και 60nm για 24 ώρες.

4.6 Επιδράσεις αποσιώπησης της PARN και έκθεσης σε AgNPs στη μετανάστευση της κυτταρικής σειράς M14K

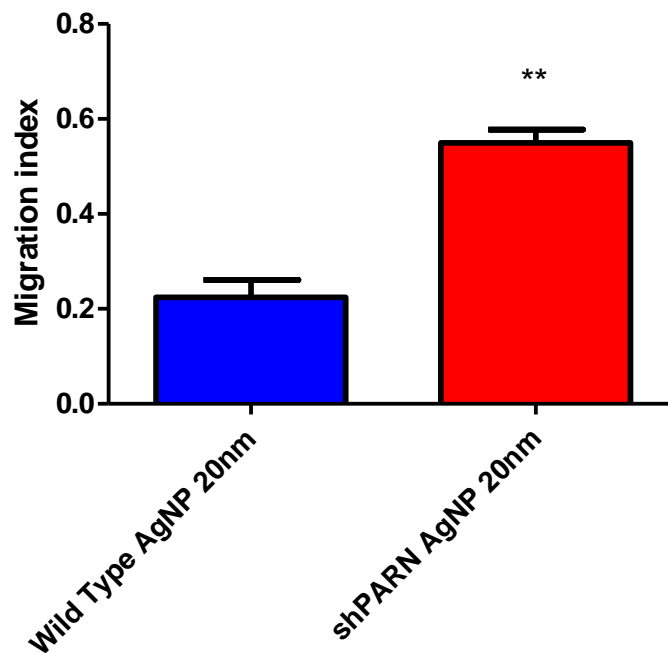
Για την αποσιώπηση της PARN έγινε διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς M14K με shRNAs σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα 3.4. Ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα αγρίου τύπου (wild type) στα οποία εφαρμόστηκε η διαδικασία του πρωτόκολλου διαμόλυνσης χωρίς όμως την προσθήκη των shRNAs. Η αποσιώπηση της PARN στην κυτταρική σειρά M14K μετά από έκθεση σε AgNPs, επιβεβαιώθηκε από τα μειωμένα επίπεδα mRNA της PARN όπως φαίνεται στην **εικόνα 46**. Η μείωση των επιπέδων mRNA της PARN και η έκθεση σε AgNPs οδήγησε σε σημαντική αύξηση της κυτταρικής μετανάστευσης. Συγκεκριμένα στην κυτταρική σειρά M14K ο δείκτης μετανάστευσης αυξήθηκε σημαντικά στα κύτταρα όπου έγινε αποσιώπηση της PARN (shPARN) σε σχέση με τα wild type κύτταρα (**εικόνα 47**). Η μετανάστευση αυξήθηκε επίσης στα αποσιωπημένα κύτταρα όπου εκτέθηκαν σε AgNP 20nm (**εικόνα 48**) και AgNP 60nm (**εικόνα 49**) σε σύγκριση με τις αντίστοιχες συνθήκες των wild type κυττάρων.



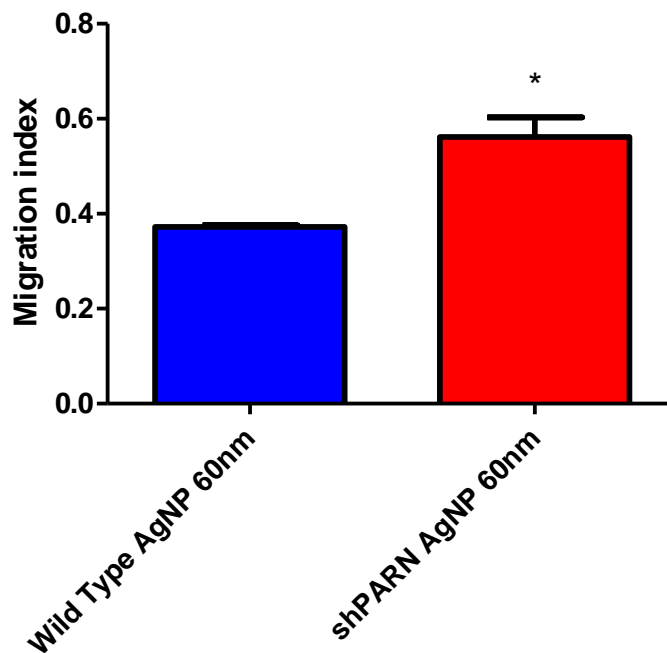
Εικόνα 46. Relative Quantitative Chart: Αποσιώπηση της PARN. Τα αποτελέσματα της RT-qPCR επαλήθευσαν την αποσιώπηση της PARN στην κυτταρική σειρά M14K μετά από έκθεση σε AgNPs 20nm και 60nm.



Εικόνα 47. Δείκτης κυτταρικής μετανάστευσης στα M14K σε χρονικό διάστημα 8 ωρών σε κύτταρα αγρίου τύπου (αριστερά) και σε κύτταρα όπου έγινε αποσιώπηση της PARN (δεξιά).



Εικόνα 48. Δείκτης κυτταρικής μετανάστευσης στα M14K σε χρονικό διάστημα 8 ωρών υπό την επίδραση AgNPs 20nm σε κύτταρα αγρίου τύπου (αριστερά) και σε κύτταρα όπου έγινε αποσιώπηση της PARN (δεξιά).

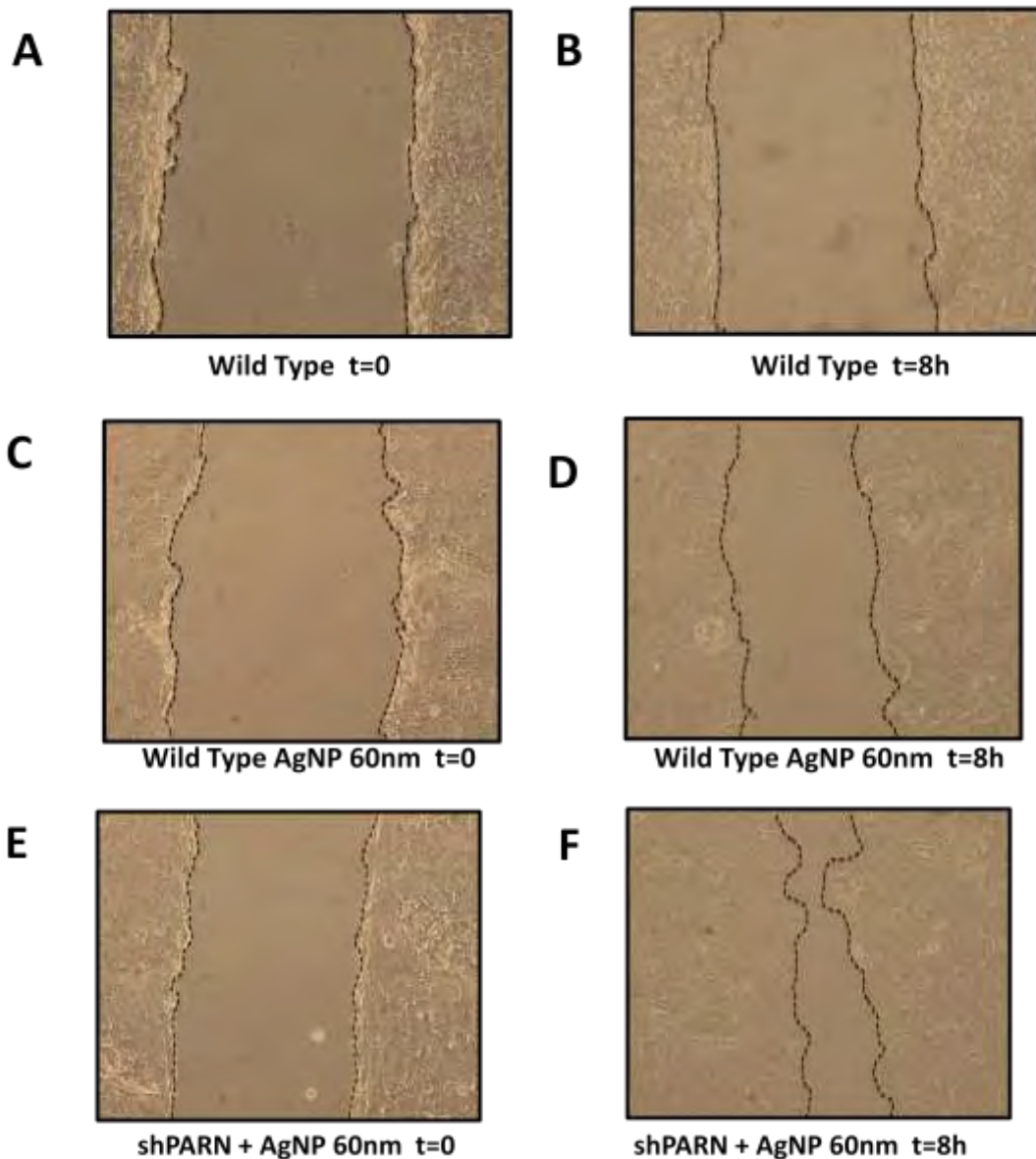


Εικόνα 49. Δείκτης κυτταρικής μετανάστευσης στα M14K σε χρονικό διάστημα 8 ωρών υπό την επίδραση AgNPs 60nm σε κύτταρα αγρίου τύπου (αριστερά) και σε κύτταρα όπου έγινε αποσιώπηση της PARN (δεξιά).

4.7 Αντιπροσωπευτικές εικόνες των M14K κατά την δοκιμή επούλωσης πληγής υπό την επίδραση διαφόρων συνθηκών

Στις εικόνες που ακολουθούν φαίνεται η μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων M14K κατά την δοκιμή επούλωσης της πληγής σε χρονικό διάστημα 8 ωρών. Η μετανάστευση των wild type κυττάρων (εικόνα 50 A και B) σε σχέση με τα wild type κύτταρα, τα οποία έχουν εκτεθεί σε AgNP 60nm για 24 ώρες (εικόνα 50 C και D) δεν φαίνεται να μεταβάλλεται σημαντικά. Αντίθετα, η μετανάστευση των κυττάρων όπου έχει γίνει αποσιώπηση της PARN υπό την επίδραση AgNP 60nm (εικόνα 50 E και F) φαίνεται να είναι σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με τα wild type κύτταρα καθώς και σε σύγκριση με τα wild type κύτταρα όπου έχουν υποστεί την έκθεση σε AgNP 60nm. Τα AgNPs των 60nm βελτίωσαν σημαντικά τη μετανάστευση των M14K μόνο εκεί όπου έγινε αποσιώπηση της PARN.

Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την δοκιμή επούλωσης της πληγής



Εικόνα 50. Κύτταρα αγρίου τύπου M14K τη στιγμή t=0 (αμέσως μετά τη δημιουργία της πληγής στη μονοστιβάδα των κυττάρων) και 8 ώρες μετά (**A και B**). M14K αγρίου τύπου μετά από έκθεση σε AgNPs 60nm τη στιγμή t=0 και t=8h (**C και D**). M14K στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση της PARN μετά από έκθεση σε AgNPs 60nm τη στιγμή t=0 και t=8h (**E και F**). Τα AgNPs των 60nm (στις συγκεκριμένες εικόνες) βελτίωσαν σημαντικά τη μετανάστευση των M14K μόνο εκεί όπου έγινε αποσιώπηση της PARN.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι επιδράσεις των μηχανοποιημένων νανοσωματιδίων αργύρου στη μετανάστευση μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα και διερευνήθηκε ένας πιθανός μοριακός στόχος των νανοσωματιδίων που σχετίζεται με την κυτταρική κινητικότητα. Μετά από έκθεση των κυττάρων σε νανοσωματίδια αργύρου παρατηρήθηκε μεταβολή στο ρυθμό της μετανάστευσης κατά την δοκιμή της επούλωσης της πληγής. Στην κυτταρική σειρά Met-5A περιορίστηκε σημαντικά η μετανάστευση ενώ στην M14K αυξήθηκε η μετανάστευση, υπό την επίδραση νανοσωματιδίων αργύρου 20nm. Σε προηγούμενες μελέτες διάφοροι τύποι νανοσωματιδίων επηρέασαν επίσης την κυτταρική μετανάστευση. Νανοσωματίδια διοξειδίου του τιτανίου (TiO_2) και του πυριτίου (SiO_2) μείωσαν τη μετανάστευση σε επιθηλιακά κύτταρα βλεννογόνου του στόματος (TR146). Η περιορισμένη κυτταρική κινητικότητα ήταν αποτέλεσμα της διαταραχής του ενδοκυτταρικού δικτύου των μικροσωληνίσκων, από τα νανοσωματίδια που είχαν εισέλθει μέσα στα κύτταρα καθώς και της ισχυρής προσκόλλησης των κυττάρων στο υπόστρωμα (Tay et al., 2014).

Σε μία άλλη μελέτη σε κύτταρα ανθρώπινου κερατοειδή χιτώνα αναφέρεται ότι τα μηχανοποιημένα νανοσωματίδια επιβραδύνουν την επούλωση των πληγών και την κυτταρική μετανάστευση με έναν τρόπο που εξαρτάται από τη σύνθεση, τη δόση, το μέγεθος και το είδος των νανοσωματιδίων (Zhou et al., 2014). Σε αυτήν τη μελέτη τα νανοσωματίδια χαλκού και ψευδαργύρου μείωσαν τη μετανάστευση των κυττάρων, φαινόμενο το οποίο παρατηρήθηκε και στην παρούσα εργασία μετά από έκθεση των Met-5A σε νανοσωματίδια αργύρου 20nm. Ωστόσο, τα νανοσωματίδια αργύρου είναι γνωστά για τις θετικές επιδράσεις τους στην επούλωση πληγών του δέρματος. Τα νανοσωματίδια αργύρου αυξάνουν το κλείσιμο των πληγών, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων (Liu et al., 2010). Αύξηση της μετανάστευσης παρατηρήθηκε στην κυτταρική σειρά M14K της παρούσας εργασίας, μετά από έκθεση σε νανοσωματίδια αργύρου 20nm.

Αντίθετα, τα νανοσωματίδια αργύρου των 60nm δεν επηρέασαν σημαντικά την μετανάστευση των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα. Αυτά τα

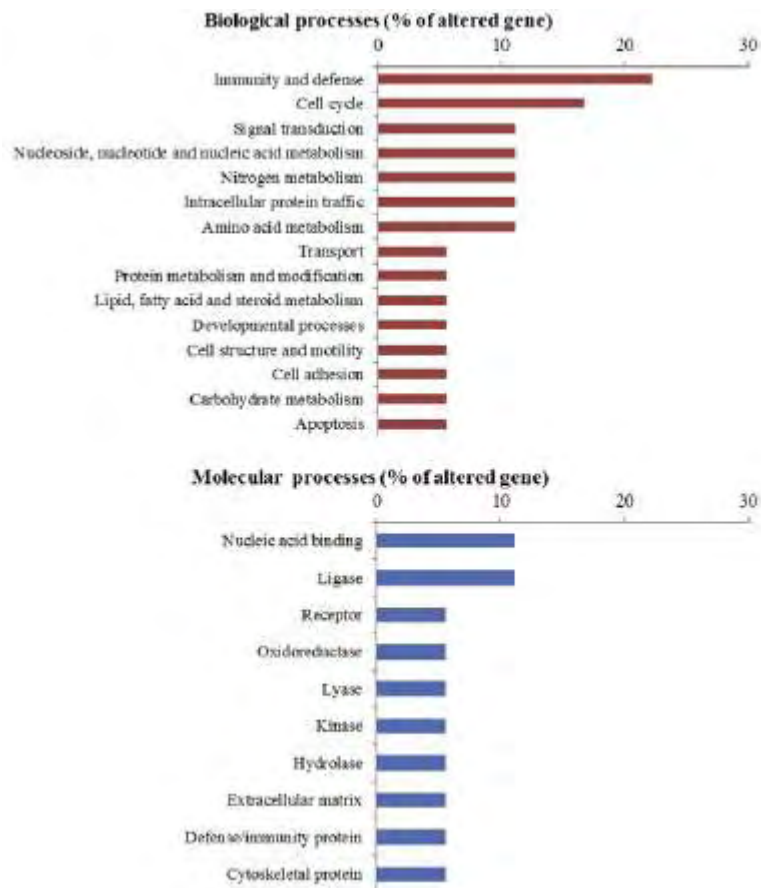
αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων αργύρου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις διαφορετικές επιδράσεις τους. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι η κυτταρική πρόσληψη των νανοσωματιδίων καθώς και οι επιδράσεις που αυτά που προκαλούν εξαρτώνται από το μέγεθός τους και άλλους παράγοντες. (Hillaireau and Couvreur, 2009; Mailander and Landfester, 2009). Μελέτη σε κύτταρα βρογχικού επιθηλίου έχει δείξει ότι η κυτταροτοξικότητα των νανοσωματιδίων αργύρου εξαρτάται από το μέγεθός τους και ορισμένοι παράγοντες που εμπλέκονται είναι η πρόσληψη των νανοσωματιδίων από τα κύτταρα, η δημιουργία συσσωματωμάτων και η ελευθέρωση ιόντων αργύρου από αυτά (Gluga et al., 2014).

Η έκφραση της PARN τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνών βρέθηκε αρκετά αυξημένη στα καρκινικά μεσοθηλιακά κύτταρα σε σύγκριση με την καλοήγη κυτταρική σειρά Met-5A. Η πιθανή εμπλοκή της PARN σε διεργασίες όπως είναι η καρκινογένεση διαφαίνεται από τα παρακάτω δεδομένα. Πολλά mRNAs τα οποία περιέχουν τα στοιχεία ARE (πλούσια σε AU κατάλοιπα), αποτελούν πρωτογονογονίδια (π.χ. c-myc, c-fos και c-jun), κυτταροκίνες (π.χ. TNF α), χυμοκίνες, αυξητικοί παράγοντες και ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (Schoenberg and Maquat, 2012). Τα εν λόγω mRNAs, ρυθμίζονται από τις ARE-συνδεδεμένες πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν εμπλακεί σε διεργασίες δρώντας ως ενεργοποιητές ή πρωτεΐνες στρατολόγησης της PARN (Lai et al., 1999; 2000; 2003). Επίσης, σε μελέτες όπου έγινε αποσιώπηση της PARN, με την τεχνολογία των αντινοσηματικών μορίων shRNAs, εξετάστηκαν τα επίπεδα μιας σειράς mRNAs. Από αυτά, μόνο ένα μικρό υποσύνολο είχε διαφοροποιημένη έκφραση. Αυτό όμως που έχει ενδιαφέρον, είναι ότι πολλά από αυτά τα mRNAs, κωδικοποιούσαν πρωτεΐνες, οι οποίες είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην καρκινική μετανάστευση των κυττάρων και πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Επίσης, η PARN έχει προταθεί ως ένας πιθανός δείκτης της καρκινικής ανάπτυξης (Maragozidis et al., 2012).

Στην παρούσα εργασία είδαμε ότι η έκφραση της PARN σε επίπεδο mRNA, αυξήθηκε σημαντικά μετά από έκθεση και των δύο κυτταρικών σειρών σε νανοσωματίδια αργύρου 60nm, υποστηρίζοντας την άποψη ότι τα νανοσωματίδια αργύρου μπορεί να συμμετέχουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Έχουν αναφερθεί μελέτες που δείχνουν τις πιθανές επιδράσεις των νανοσωματιδίων αργύρου στη γονιδιακή έκφραση. Σε μία από αυτές φαίνεται ότι τα νανοσωματίδια αργύρου

ενεργοποιούν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε κυτταρικές διεργασίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και ο μεταβολισμός, στο φυτό *Arabidopsis* (Syu et al., 2014). Επίσης, τα νανοσωματίδια αργύρου επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση του παράγοντα ανάπτυξης των ινοβλαστών 2 (FGF2) και του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα ανάπτυξης A (VEGFA), οι οποίοι εμπλέκονται στην αναγέννηση των ιστών (Hotowy et al., 2012).

Σε μία άλλη έρευνα εξετάστηκε ο μηχανισμός με τον οποίο τα νανοσωματίδια αργύρου επιδρούν στα Jurkat T κύτταρα (αθανατοποιημένα T λεμφοκύτταρα) μέσω mRNA microarray (Eom et al., 2014). Βρέθηκαν 15 γονίδια που διαφοροεκφράζονται μετά από έκθεση των κυττάρων σε νανοσωματίδια αργύρου για 24 ώρες. Η ανάλυση έδειξε ότι οι μεταλλοθειονίνες 2A, 1H, 1F και 1A καθώς και η ενδονουκλεάση G like 1 (ENDOGL1) αύξησαν την έκφρασή τους στα κύτταρα που εκτέθηκαν σε νανοσωματίδια αργύρου σε σχέση με τα control. Η λειτουργική ανάλυση αποκάλυψε ότι η ανοσία, η κυτταρική άμυνα και ο κυτταρικός κύκλος είναι από τις βιολογικές διεργασίες που επηρεάστηκαν περισσότερο, ενώ η σύνδεση του νουκλεϊκού οξέως και η λιγύση αποτελούν τις μοριακές διεργασίες που επηρεάστηκαν περισσότερο (**εικόνα 51**). Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δοθεί στο ότι ανάμεσα στις βιολογικές διεργασίες των γονιδίων που μεταβλήθηκαν, μετά από έκθεση σε νανοσωματίδια αργύρου, είναι η κυτταρική δομή και κινητικότητα (cell structure and motility) καθώς και η κυτταρική προσκόλληση (cell adhesion). Αυτές οι βιολογικές λειτουργίες είναι άμεσα συνδεδεμένες με την κυτταρική μετανάστευση η οποία μελετήθηκε στην παρούσα εργασία. Φαίνεται λοιπόν ότι τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με την προηγούμενη μελέτη καθώς τα νανοσωματίδια αργύρου επηρέασαν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται λειτουργικά με την κυτταρική μετανάστευση.



Εικόνα 51. Ανάλυση mRNA microarray σε κύτταρα Jurkat T που εκτέθηκαν σε AgNPs για 24 ώρες.

Έχει δειχθεί επίσης, ότι η έκθεση σε αμίαντο αυξάνει την έκφραση του υποδοχέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου της ουροκινάσης (uPAR) σε μεσοθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από φυσιολογικό ιστό και συγκεκριμένα στη σειρά Met-5A. Αυτός ο υποδοχέας μεσολαβεί σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες ανάμεσα στις οποίες είναι και η κυτταρική μετανάστευση (Perkins et al., 1999). Στην ίδια κυτταρική σειρά βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη LRP-1 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1) ρυθμίζει την μετανάστευση των κυττάρων μέσω της εξάρτησης από τον παράγοντα uPA (urokinase plasminogen activator), που ενισχύει την μετανάστευση των Met-5A (Tucker et al., 2012).

Σε κύτταρα κακοήθους μεσοθηλιώματος, η αποσιώπηση του γονιδίου του uPAR έδειξε επίσης ότι αυτός ο παράγοντας συμβάλλει στην ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν (Tucker et al., 2010). Η αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα των μεσοθηλιακών κυττάρων κακοήθους μεσοθηλιώματος έχει βρεθεί ότι

οφείλεται σε αύξηση της έκφρασης της CD26 διαμεμβρανικής πρωτεΐνης, η οποία ρυθμίζει την έκκριση περιοστίνης από τα κύτταρα (Komiya et al., 2014). Επιπλέον, η υπερέκφραση των ακτιβινών A και B (μελών της οικογένειας των παραγόντων ανάπτυξης του TGF-β) στο κακόηθες μεσοθηλίωμα σε σχέση με τα φυσιολογικά μεσοθηλιακά κύτταρα φαίνεται ότι ρυθμίζει την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων μεσοθηλιώματος μέσω της ενεργοποίησης των ERK κινασών σε δοκιμές επούλωσης πληγών (Tamminen et al., 2014). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε κυτταρικές σειρές από ασθενείς με κακόηθες μεσοθηλίωμα δεν εκφράζεται το miR-31, ένα microRNA που έχει την ικανότητα να εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Ivanov et al., 2010). Επομένως αυτές μπορεί να είναι κάποιες από τις πιθανές αιτίες που παρατηρήθηκε αυξημένη μετανάστευση στην καρκινική σειρά M14K.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, η αποσιώπηση της PARN οδήγησε σε αύξηση της μετανάστευσης κατά τη δοκιμασία της επούλωσης πληγής, φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενη μελέτη σε μυοβλάστες ποντικών (Lee et al., 2012). Αυτή η παρατήρηση ενισχύεται από το γεγονός ότι η αποσιώπηση της PARN μειώνει τα επίπεδα πολλών mRNAs, που κωδικοποιούν παράγοντες που απαιτούνται για την κυτταρική μετανάστευση και προσκόλληση (Lee et al., 2012). Επομένως αυτή η αποαδενυλάση εμπλέκεται στον έλεγχο γονιδίων που είναι απαραίτητα για την κινητικότητα των κυττάρων.

Συμπερασματικά τα νανοσωματίδια αργύρου επηρεάζουν την μετανάστευση των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα. Παρατηρείται διαφορά στη μεταβολή της μετανάστευσης μεταξύ μεσοθηλιακών κυττάρων φυσιολογικού και καρκινικού ιστού ενώ τα νανοσωματίδια αργύρου προκαλούν διαφορετικές επιδράσεις ανάλογα με το μέγεθός τους. Μετά από έκθεση σε νανοσωματίδια αργύρου παρατηρείται αύξηση των επιπέδων mRNA της PARN. Αποσιώπηση της αποαδενυλάσης οδήγησε σε σημαντική αύξηση της μετανάστευσης. Επομένως ένας πιθανός μηχανισμός της δράσης των νανοσωματιδίων αργύρου στην κυτταρική μετανάστευση είναι να στοχεύουν παράγοντες που ρυθμίζουν τη σταθερότητα του mRNA.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Agostoni E.** and Zocchi L. Pleural liquid and its exchanges. *Respir Physiol Neurobiol*, 159:311-323 (2007).
- **Ambros V.** et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, 9:277-279 (2003).
- **Amrani N.** et al. Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature*, 453:1276–1280 (2008).
- **Balatsos N.A.** et al. Modulation of poly(A)-specific ribonuclease (PARN): current knowledge and perspectives. *Curr Med Chem*, 19:4838–4849 (2012).
- **Berndt H.** et al. Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA*, 18:958–972 (2012).
- **Buzea C.** et al. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2:MR17-71 (2007).
- **Carrington J.C.** and Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 301:336–338 (2003).
- **Cevher M.A.** et al. Nuclear deadenylation/polyadenylation factors regulate 30 processing in response to DNA damage. *EMBO J*, 29:1674–1687 (2010).
- **Chou C.F.** et al. Tethering KSRP, a decay-promoting AU-rich element-binding protein, to mRNAs elicits mRNA decay. *Mol Cell Biol*, 26:3695–3706 (2006).
- **Dehlin E.** et al. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *Embo J*, 19:1079–1086 (2000).
- **Dhapte V.** et al. Probing the wound healing potential of biogenic silver nanoparticles. *J Wound Care*, 23:431-432, 434, 436 (2014).
- **Dikensoy O.** and Bayram H. The current data on nanoparticles and pleura. *Tuberk Toraks*, 58:455-458 (2010).
- **Donaldson K.** and Poland C.A. Inhaled nanoparticles and lung cancer - what we can learn from conventional particle toxicology. *Swiss Med Wkly*, 142:w13547 (2012).

- **Donaldson K.** et al. Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part Fibre Toxicol*, 7:5 (2010).
- **Donaldson K.** et al. The limits of testing particle-mediated oxidative stress in vitro in predicting diverse pathologies; relevance for testing of nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*, 6:13 (2009).
- **Dykxhoorn D.M.,** Novina C.D. & Sharp P.A. Killing the messenger: short RNAs that silence expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4:457-467 (2003).
- **Eckmann C.R.** et al. Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2:348–361 (2011).
- **Elbashir S.M.** et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411:494-498 (2001).
- **Eom H.J.** et al. Integrated mRNA and micro RNA profiling reveals epigenetic mechanism of differential sensitivity of Jurkat T cells to AgNPs and Ag ions. *Toxicol Lett*, 229:311-318 (2014).
- **Felgner J.H.** et al. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem*, 269:2550-2561 (1994).
- **Fire A.** et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391:806-811 (1998).
- **Garneau N.** et al. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8:113–126 (2007).
- **Geiser M.** et al. The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 38:371-376 (2008).
- **Geiser M.** et al. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs, and in cultured cells. *Environ Health Perspect*, 113:1555–1560 (2005).
- **Gherzi R.** et al. A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol Cell*, 14:571-583 (2004).
- **Gliga A.R.** et al. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol*, 11:11 (2014).

- **Goldstrohm** A.C. and Wickens M. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature Publishing Group*, 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).
- **Guo** X. and Hartley R.S. HuR contributes to cyclin E1 deregulation in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res*, 66:7948-7956 (2006).
- **Hammet** A. et al. 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).
- **Hillaireau** H. and Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci*, 66:2873-2896 (2009).
- **Hinnebusch** A.G. and Lorsch J.R. The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4:a011544 (2012).
- **Hotowy** A. et al. Silver nanoparticles administered to chicken affect VEGFA and FGF2 gene expression in breast muscle and heart. *Nanoscale Res Lett*, 7:418 (2012).
- **Ivanov** S.V. et al. Pro-tumorigenic effects of miR-31 loss in mesothelioma. *J Biol Chem*, 285:22809-22817 (2010).
- **Jackson** R.J. and Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? *Sci STKE*, 367:re1 (2007).
- **Ju-Nam** Y. and Lead J.R. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci Total Environ*, 400:396-414 (2008).
- **Kadyrova** L.Y. et al. Translational control of maternal cyclin B mRNA by nanos in the *Drosophila* germline. *Development*, 134:1519–1527 (2007).
- **Kim** J.H. and Richter J.D. RINGO/cdk1 and CPEB mediate poly(A) tail stabilization and translational regulation by ePAB. *Genes Dev*, 21:2571–2579 (2007).
- **Kim** W.C. and Lee C.H. The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1796:99-113 (2009).

- **Kiss T.** et al. Box H/ACA small ribonucleoproteins. *Mol Cell*, 37:597–606 (2010).
- **Komiya E.** et al. CD26-mediated regulation of periostin expression contributes to migration and invasion of malignant pleural mesothelioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 447:609-615 (2014).
- **Körner C.G.** and Wahle E. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J Biol Chem*, 272:10448–10456 (1997).
- **Körner C.G.** et al. The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Embo J*, 17:5427–5437 (1998).
- **Kwan K.H.L.** et al. Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7:497-504 (2011).
- **Lai W.S.** et al. Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol Cell Biol*, 19:4311–4323 (1999).
- **Lai W.S.** et al. Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to AU-rich elements and destabilization of mRNA. *J Biol Chem*, 275:17827–17837 (2000).
- **Lai W.S.** et al. 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).
- **Lamallice L.** et al. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*, 100:782-294 (2007).
- **Lee J.E.** et al. The PARN deadenylase targets a discrete set of mRNAs for decay and regulates cell motility in mouse myoblasts. *PLoS Genet*, 8:e1002901 (2012).
- **Lee S.S.** et al. Antioxidant properties of cerium oxide nanocrystals as a function of nanocrystal diameter and surface coating. *ACS Nano*, 7:9693-9703 (2013).
- **Lehn JM.** Toward self-organization and complex matter. *Science*, 295:2400-2403 (2002).
- **Lippman Z.** & Martienssen R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature*, 431:364-370 (2004).

- **Liu X.** et al. Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing. *Chem Med Chem*, 5:468-475 (2010).
- **Mailänder V.** and Landfester K. Interaction of nanoparticles with cells. *Biomacromolecules*, 10:2379-2400 (2009).
- **Man H.B.** et al. Synthesis of nanodiamond-daunorubicin conjugates to overcome multidrug chemoresistance in leukemia. *Nanomedicine*, 10:359-369 (2014).
- **Maragozidis P.** et al. Alterations of deadenylase expression in acute leukemias: evidence for poly(a)-specific ribonuclease as a potential biomarker. *Acta Haematol*, 128:39–46 (2012).
- **Marchler-Bauer A.** et al. CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res*, 39:D225–229 (2011).
- **Marcotrigiano J.** et al. Cocystal structure of the messenger RNA 50 cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell*, 89:951–961 (1997).
- **Martinez J.** et al. The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation. *J Biol Chem*, 276:27923–27929 (2001).
- **Maynard A.D.** et al. Safe handling of nanotechnology. *Nature*, 444:267-269 (2006).
- **Meiring J.J.** et al. The influence of hydrogen peroxide and histamine on lung permeability and translocation of iridium nanoparticles in the isolated perfused rat lung. *Part Fibre Toxicol*, 2:3 (2005).
- **Meyer S.** et al. Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 39:197–216 (2004).
- **Mitchell P.** and Tollervey D. mRNA turnover. *Curr Opin Cell Biol*, 13:320–325 (2001).
- **Moore L.** et al. Multi-protein delivery by nanodiamonds promotes bone formation. *J Dent Res*, 92:976-981 (2013).
- **Moraes K.C.** et al. CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase, *RNA*, 12:1084–1091 (2006).
- **Mühlfeld C.** et al. Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 294:L817-829 (2008).

- **Murphy** F.A. et al. Length-dependent retention of carbon nanotubes in the pleural space of mice initiates sustained inflammation and progressive fibrosis on the parietal pleura. *Am J Pathol*, 178:2587–2600 (2011).
- **Mutsaers** S.E. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology*, 7:171-191 (2002).
- **Nilsson** P. et al. A multifunctional RNA recognition motif in poly(A)-specific ribonuclease with cap and poly(A) binding properties. *J Biol Chem*, 282:32902–32911 (2007).
- **Nossal** N.G. and Singer M.F. The processive degradation of individual polyribonucleotide chains. I. Escherichia coli ribonuclease II. *J Biol Chem*, 243:913–922 (1968).
- **Obaid** G. et al. Cancer targeting with biomolecules: a comparative study of photodynamic therapy efficacy using antibody or lectin conjugated phthalocyanine-PEG gold nanoparticles. *Photochem Photobiol Sci*, [Epub ahead of print] (2015).
- **Pacurari** M. et al. Raw single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress and activate mapks, ap-1, nf-kappab, and akt in normal and malignant human mesothelial cells. *Environ Health Perspect*, 116:1211-1217 (2008).
- **Parker** R. and Song H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol*, 11:121–127 (2004).
- **Paschoud** S. et al. Destabilization of interleukin-6 mRNA requires a putative RNA stem-loop structure, an AU-rich element, and the RNA-binding protein AUF1. *Mol Cell Biol*, 26:8228-8241 (2006).
- **Peng** Y. and Schoenberg D.R. c-Src activates endonuclease-mediated mRNA decay. *Mol Cell*, 25:779-787 (2007).
- **Perkins** R.C. et al. Asbestos upregulates expression of the urokinase-type plasminogen activator receptor on mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 21:637-646 (1999).
- **Poland** C.A. et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol*, 3:423–428 (2008).

- **Poland C.A.** et al. Length-dependent pathogenic effects of nickel nanowires in the lungs and the peritoneal cavity. *Nanotoxicology*, 6:899-911 (2012).
- **Quann E.J.** et al. The p38 MAPK pathway mediates aryl propionic acid induced messenger RNA stability of p75 NTR in prostate cancer cells, *Cancer Res*, 67:11402–11410 (2007).
- **Richter J.D.** and Lasko P. Translational control in oocyte development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3:a002758 (2011).
- **Ross J.** mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev*, 59:423–450 (1995).
- **Sachs A.B.** and Varani G. Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *Nat Struct Biol*, 7:356–361 (2000).
- **Schinwald A.** et al. The threshold length for fiber-induced acute pleural inflammation: shedding light on the early events in asbestos-induced mesothelioma. *Toxicol Sci*, 128:461-470 (2012).
- **Schmidt G.** et al. Small dimensions and material properties. Europäische Akademie Graue Reihe. *In a definition of nanotechnology Bad Neuenahr*, 134 (2003).
- **Schoenberg D.R.** and Maquat L.E. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet*, 13:246–259 (2012).
- **Shatkin A.J.** and Manley J.L. The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat Struct Biol*, 7:838–842 (2000).
- **Shukla R.** et al. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir*, 21:10644-10654 (2005).
- **Sidranski C.** and Walter P. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, 90:1031-1039 (1997).
- **Singh S.** et al. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl Pharmacol*, 222:141–151 (2007).

- **Sobue S.** et al. v-Src oncogene product increases sphingosine kinase 1 expression through mRNA stabilization: alteration of AU-rich element-binding proteins. *Oncogene*, 27:6023-6033 (2008).
- **Sonenberg N.** and Dever T.E. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol*, 13:56–63 (2003).
- **Song Y.** et al. Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma. *Eur Respir J*, 34:559-567 (2009).
- **Syu Y.Y.** et al. Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression. *Plant Physiol Biochem*, 83:57-64 (2014).
- **Tabet L.** et al. Adverse effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human pulmonary cells. *J Toxicol Environ Health A*, 72:60-73 (2009).
- **Takenaka S.** et al. Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung. *Inhal Toxicol*, 18:733–740 (2006).
- **Tamminen J.A.** et al. Overexpression of activin-A and -B in malignant mesothelioma - Attenuated Smad3 signaling responses and ERK activation promote cell migration and invasive growth. *Exp Cell Res*, pii:S0014-4827(14)00551-5 (2014).
- **Tarun S.Z. Jr.** and Sachs A.B. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *Embo J*, 15:7168–7177 (1996).
- **Taxman D.J.** et al. Criteria for effective design, construction, and gene knockdown by shRNA vectors. *BMC Biotechnol*, 6:7 (2006).
- **Tay C.Y.** et al. Nanoparticles strengthen intracellular tension and retard cellular migration. *Nano Lett*, 14:83-88 (2014).
- **Tran Q.H.** et al. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.*, 4:033001 (2013).
- **Tucker T.A.** et al. Lipoprotein receptor-related protein 1 regulates collagen 1 expression, proteolysis, and migration in human pleural mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 46:196-206 (2012).
- **Tucker T.A.** et al. The urokinase receptor supports tumorigenesis of human malignant pleural mesothelioma cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 42:685-696 (2010).

- **Virtanen** A. et al. Poly(A)-specific ribonuclease (PARN): An allosterically regulated, processive and mRNA cap-interacting deadenylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 48:192–209 (2013).
- **Wells** S.E. et al. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell*, 2:135–140 (1998).
- **Wickens** M. In the beginning is the end: regulation of poly(A) addition and removal during early development. *Trends Biochem Sci*, 15:320–324 (1990).
- **Wilusz** C.J. et al. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2:237–246 (2001).
- **Wu** M. et al. Structural basis of m⁷GpppG binding to poly(A)-specific ribonuclease. *Structure*, 17:276–286 (2009).
- **Wu** M. et al. Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *Embo J*, 24:4082–4093 (2005).
- **Xi** G. et al. Convection-enhanced delivery of nanodiamond drug delivery platforms for intracranial tumor treatment. *Nanomedicine*, 10:381-391 (2014).
- **Yamashita** A. et al. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol*, 12:1054–1063 (2005).
- **Zhang** A. et al. Role of the RRM domain in the activity, structure and stability of poly(A)-specific ribonuclease. *Arch Biochem Biophys*, 461:255–262 (2007).
- **Zhou** E.H. et al. Assessing the impact of engineered nanoparticles on wound healing using a novel in vitro bioassay. *Nanomedicine*, 9:2803-2815 (2014).
- **Zhu** Y. et al. Zinc-finger antiviral protein inhibits HIV-1 infection by selectively targeting multiply spliced viral mRNAs for degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108:15834–15839 (2011).