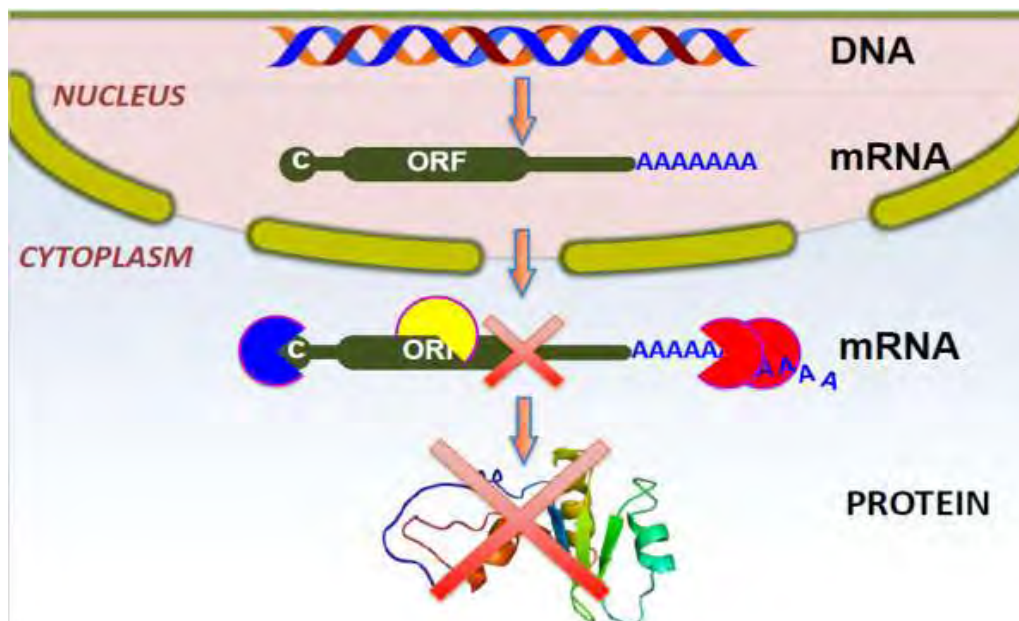




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών**  
**του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**  
**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ -**  
**ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

ΔΕΣΠΟΙΝΑ ΚΟΥΣΟΥΛΟΥ

**ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ και ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ**  
**ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΟΣ PARN(1-523) ΤΗΣ ΠΟΛΥ(Α)-ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗΣ**  
**ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ ΣΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ microRNAs**



ΛΑΡΙΣΑ 2016

**«Κλωνοποίηση και αποτίμηση του βιολογικού ρόλου του μεταλλάγματος PARN(1-523) της πολυ(A)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης στην σταθερότητα microRNAs»**

**“Cloning and evaluation of the biological role of PARN(1-523) mutant of poly(A)-specific ribonuclease in the stability of microRNAs”**

## **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**Μπαλατσός Νικόλαος**, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Μπαλατσός Νικόλαος**, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Λεωνίδας Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Παπαδόπουλος Γεώργιος**, , Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Εικόνα εξωφύλλου: ο κύκλος ζωής του mRNA, (Μαραγκοζίδης Π.και συν. 2012).

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## Ευχαριστίες

*Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τις πολύτιμες υποδείξεις, συμβουλές τους αλλά και την υποστήριξή τους καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.*

*Ιδιαίτερα θερμές ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Μπαλατσό για την απεριόριστη υπομονή του, καθώς και την αμέριστη ηθική και επιστημονική συμπαράσταση και καθοδήγησή του, που υπήρξαν καταλύτικες στην διεξαγωγή και ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού τούτου.*

*Τέλος, ένα μεγάλο «ευχαριστώ» στους υποψήφιους διδάκτορες: Ντιάνα Σκουτέλικ και Θάνο Κυρίτση και την υποψήφια μετα-διδάκτορα Μαρία Λάμπρου για το ενδιαφέρον τους, την συνεχή παρουσία τους τις πολύτιμες γνώσεις τους που μου προσέφεραν απλόχερα, αλλά και τον τεράστιο κόπο που κατέβαλαν συμβάλλοντας καθοριστικά στην επιτυχή εκπόνηση αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας.*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
<b>1.1. Σταθερότητα mRNA, πολυ(A) ουρά και ασθένειες.....</b>	<b>9</b>
1.2. Απαδενυλάσες.....	11
PARN.....	11
Μετάλλαγμα PARN(1-523).....	14
1.3. MicroRNAs.....	16
Κανονικό μονοπάτι βιοσύνθεσης microRNAs.....	17
Εναλλακτικά βιοσυνθετικά μονοπάτια microRNAs.....	18
microRNAs και φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες.....	20
Αναγνώριση στόχου από τα miRNAs.....	20
2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	22
3. ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ	
3.1 ΕΝΘΕΣΗ και ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΟΣ PARN(1-523).....	23
pcDNA 4.....	24
In-Fusion HD Cloning της Clontech.....	25
3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 1%.....	27
3.3 T-REx™ System.....	28
pcDNA 6.....	29
3.4 Xfect™ Transfection Reagent Protocol.....	30
3.5 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ NCI-H520.....	32
ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	
Απόψυξη κυττάρων.....	32
Ανακαλλιέργεια μονόστοιβης καλλιέργειας.....	33
Συλλογή των κυττάρων.....	34
Ψύξη των κυττάρων.....	34
Υλικά-Αντιδραστήρια.....	34
3.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA και ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	35
NUCLEOSPIN TRIPREP : DNA και RNA EXTRACTON.....	35
3.7 REAL TIME PCR.....	36
3.7 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ WESTERN.....	39
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
4.1 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 1%.....	41
4.2 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ, (WESTERN BLOTTING).....	42

4.3 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΟΣ PARN(1-523) ΣΕ ΚΑΡΚΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ NCI-H520.....	43
4.4 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ PARN wt και pri-miR-1207.....	44
4.5 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ PARN(1-523) και pri- miR-1207.....	45
4.6 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ PARN wt και pri-miR 29.....	46
4.7 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ PARN(1-523) και pri- miR-29.....	47
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	
5.1. ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ PARN(1-523) και pri-miR-1207 και pri-miR-29.....	50
5.2. ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ PARN wt και pri-miR-1207 και pri-miR-29.....	51
5.3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	52
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	54

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο έλεγχος του κύκλου ζωής των mRNA είναι κρίσιμης σημασίας για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Όπως έχει δειχθεί, τροποποίηση του mRNA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην γονιδιακή ρύθμιση.

Η απαδενυλίωση αποτελεί μια διαδικασία που καταλύεται από ποικιλία ενζύμων, των απαδενυλασών, οι οποίες εξασφαλίζουν τον έλεγχο των επιπέδων των mRNA και κατ' επέκταση της γονιδιακής έκφρασης. Η πολύ(A)- ειδική ριβονουκλεάση είναι μείζονος σημασίας απαδενυλάση στα θηλαστικά και είναι σημαντική στην εμβρυογένεση, στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης, στην καταστροφή του DNA και στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, ενώ είναι κρίσιμης σημασίας για διαδικασίες μεταβολισμού του mRNA, καθώς εμπλέκεται στην αποικοδόμηση πολλών καρκινοσυνδεόμενων γονιδίων, των οποίων η έκφραση διαφοροποιείται στον καρκίνο.

Από την άλλη πλευρά, τα MicroRNAs (miRNAs) αποτελούν μια εξελικτικά συντηρημένη κλάση μικρών μη κωδικών RNAs, τα οποία ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση μετα- μεταγραφικά, ζευγαρώνοντας συμπληρωματικά με αλληλουχίες στην 3' UTR των mRNA- στόχων. Τα MicroRNAs κατέχουν ένα κεντρικό ρυθμιστικό τόσο στο ζωικό όσο και στο φυτικό βασίλειο, στοχεύοντας εκλεκτικά mRNAs για αποικοδόμηση ή καταστολή της μετάφρασής τους. Απορύθμιση της σταθερότητας των mRNA είναι δυνατόν να οδηγήσει σε αυξημένη σύνθεση προϊόντων ογκογονιδίων και/ή σε μείωση ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών στον καρκίνο.

Οι απαδενυλάσες και τα και miRNAs παίζουν κρίσιμο ρόλο ελέγχοντας την αφθονία των mRNA. Πιο ειδικά, τα miR-1207 και miR-29 πιθανόν να αποτελούν δύο ειδικούς στόχους της απαδενυλάσης PARN. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν τα επίπεδα αυτών των δύο miRNAs υπό συνθήκες υπερέκφρασης του μεταλλάγματος της PARN, PARN(1-523), από το οποίο έχει αφαιρεθεί το καρβοξυτελικό άκρο. Η περιοχή αυτή είναι σημαντική για τις αλληλεπιδράσεις του ενζύμου με άλλες πρωτεΐνες που φαίνεται να ελέγχουν την δράση του. Το μετάλλαγμα, αρχικά σχεδιάστηκε εντός του φορέα pcDNA4/TO και κατόπιν υπερεκφράστηκε σε ανθρώπινα πλακώδη κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα, (NCI-H520) και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των miR-1207 και miR-29 στα κύτταρα αυτά. Για τον σκοπό αυτό, το μετάλλαγμα PARN(1-523) ενισχύθηκε με PCR και ακολούθως, έλαβε χώρα κλωνοποίηση με σύντηξη.

## ABSTRACT

The control of mRNA lifecycle is critical for the regulation of gene expression. The modulation of mRNA has been shown to play an important role in the regulation of gene expression. Deadenylation is a process catalysed by a diversity of deadenylases, which provide control of mRNA levels and gene expression by extension. Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) is a major mammalian deadenylase which is important during embryogenesis, early development, DNA damage, and in cell-cycle progression, PARN, also, is critical in processes beyond mRNA metabolism and is involved in the degradation of several cancer-related genes, while its expression is altered in cancer.

On the other hand, MicroRNAs (miRNAs) are an evolutionary conserved class of small non-coding RNAs, which regulate gene expression post-transcriptionally by base pairing to complementary sequences in the 3' UTR of target mRNA. MicroRNAs play a pivotal regulatory role in animals and plants by targeting specific mRNAs for degradation or translation repression. Deregulation of mRNA stability can lead to increased synthesis of oncogene products and/or decrease of tumor suppressor proteins in cancer.

Deadenylases and miRNAs are both playing a critical role by controlling mRNA abundance. Being more specific, MicroRNA1207 and microRNA29 are two of the special targets of PARN. The levels of these mRNAs were examined in this study, under condition of overexpression of a mutant of PARN, PARN(1-523). This mutant was designed in pcDNA4/TO vector, at first and then was overexpressed in the human cell line of squamous cell lung cancer (NCI-H520). Through this procedure, this study tried to evaluate the biological role of this mutant, by determination of the levels of miR-1207 and miR-29 in these cells. For this purpose the mutant PARN(1-523) was amplified with PCR and then, in fusion cloning took place.



# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Σταθερότητα mRNA, πολυ(A) ουρά και ασθένειες

Η σταθερότητα των ευκαρυωτικών mRNAs είναι ένα κρίσιμο σημείο ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης μιας και συμβάλλει στη ρύθμιση των επιπέδων των παραγόμενων πρωτεϊνών του κυττάρου. Κατά συνέπεια, τόσο *cis* στοιχεία, όσο και *trans* παράγοντες που σταθεροποιούν και/ή αποστεθεροποιούν τα mRNA αποκτούν ιδιαίτερη σημασία στη γονιδιακή έκφραση (Εικόνα 1). Ένα κρίσιμο στοιχείο σταθερότητας είναι η πολυ(A)-ουρά. Σχεδόν όλα τα mRNA των ευκαρυωτικών οργανισμών περιέχουν πολυ(A) ουρές στο 3' άκρο τους. Εξαιρεση αποτελούν τα mRNA που κωδικοποιούν τις ιστόνες των μεταζώων, χωρίς ο ρόλος της απουσίας της πολυ(A) ουράς να είναι πλήρως κατανοητός (Goldstrohm A, Wickens M, 2008). Η αλληλουχία πολυ(A) δεν κωδικοποιείται στο DNA, αλλά προστίθεται στο mRNA, στον πυρήνα, μετά τη μεταγραφή. Η προσθήκη της πολυ(A) ουράς καταλύεται από την πολυ(A)-τελική-αδενοσινοτρανσφεράση ή πολυ(A) πολυμεράση η οποία προσθέτει ~200 κατάλοιπα A στο 3'-OH άκρο του mRNA. Η διεργασία του 3' άκρου που οδηγεί στην προσθήκη της πολυ(A)-ουράς αποτελείται από δυο αντιδράσεις. Αρχικά γίνεται τμήση του RNA και δημιουργείται ένα νέο 3'-OH άκρο και ακολουθεί η αντίδραση σύνθεσης της πολυ(A)-ουράς, γνωστή ως πολυαδενυλίωση.

Η αντίδραση τμήσης και πολυαδενυλίωσης σε *in vitro* συστήματα είναι συζευγμένες, υπό την έννοια ότι δεν έχουν ανιχνευθεί ως τώρα, υπό φυσιολογικές συνθήκες, τετμημένα ενδιάμεσα χωρίς πολυ(A) ουρά. Η τμήση του πρόδρομου RNA δημιουργεί ένα ανοδικό θραύσμα, το οποίο πολυαδενυλιώνεται αμέσως από την πολυ(A) πολυμεράση.

Ο ρόλος της πολυ(A) ουράς είναι κεντρικής σημασίας για το mRNA. Προστατεύει το 3' άκρο του mRNA από εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, συμμετέχει σε διεργασίες, όπως η έξοδος στο κυτταρόπλασμα και από αυτή ξεκινά και το κύριο μονοπάτι αποικοδόμησης του mRNA. Οι πολυ(A) ουρές όταν είναι σε προκαθορισμένο σωστό μήκος είναι απαραίτητες για την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα και, όταν αυτό φτάσει στο κυτταρόπλασμα, του προσδίδουν σταθερότητα και έναυσμα για μετάφραση.

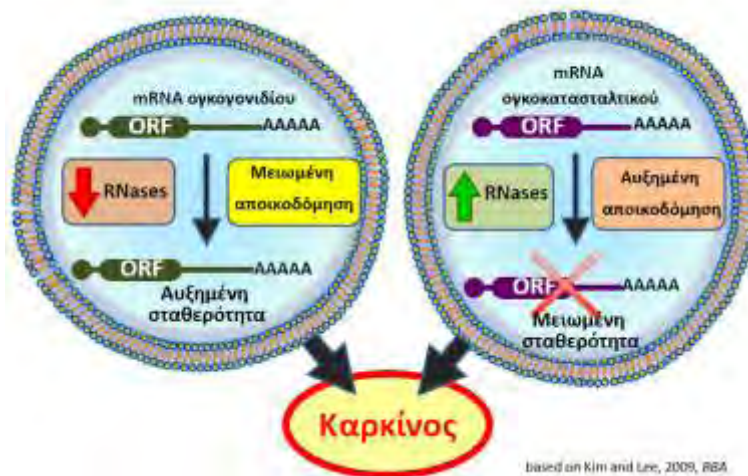
Η αφαίρεση της πολυ(A) ουράς αναστέλλει την έναρξη της μετάφρασης *in vitro*. Η αποικοδόμηση του mRNA συνήθως ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ(A) ουράς του (απαδενυλίωση) από διάφορα ένζυμα, γνωστά ως απαδενυλάσες (Goldstrohm A, Wickens M, 2008). Στον πυρήνα, με την διαδικασία της απαδενυλίωσης περιορίζονται οι νεοπροστιθέμενες πολυ(A) ουρές στο κατάλληλο μήκος. Στο κυτταρόπλασμα, η εκτεταμένη απαδενυλίωση του mRNA, πέρα από ένα συγκεκριμένο μήκος, σηματοδοτεί την αποικοδόμηση του.

Λόγω του κεντρικού ρόλου της πολυ(A)-ουράς στη σταθερότητα των mRNA και κατά συνέπεια στη γονιδιακή έκφραση, η μη σωστή ρύθμιση της αφαίρεσης της ουράς και της ακόλουθης αποικοδόμησης του mRNA σχετίζεται με ασθένειες. Μια τέτοια ασθένεια είναι ο καρκίνος, ένα κύριο χαρακτηριστικό της είναι η απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.



Εικ 1.: Σταθερότητα mRNA και ριβονουκλεάσες, RNases, (Μαραγκοζίδης Π. και συν. 2012)

Στην εικόνα 2, που ακολουθεί, συνοψίζονται οι μηχανισμοί ρύθμισης της αποικοδόμησης του mRNA και η κατάληξη αυτής σε καρκινογένεση:



Εικ. 2: Μηχανισμοί αποικοδόμησης mRNAs.

## 1.2 Απαδενυλάσες

Κατά την διάρκεια της ζωής του mRNA, οι πολυαδενυλικές ουρές αποικοδομούνται σε συνεχή βάση, ελαττώνοντας έτσι τον χρόνο ζωής του mRNA. Τα επακόλουθα στάδια της αποικοδόμησης του mRNA καθυστερούν ώσπου, η διαδικασία της απαδενυλύνωσης, να εξελιχθεί πέρα από ένα συγκεκριμένο κατώφλιο. Ως εκ τούτου, η απαδενυλύνωση θεωρείται ως καθοριστής του χρόνου αποικοδόμησης του mRNA και η παρουσία της πολυαδενυλικής ουράς ως μια τροποποίηση σταθεροποίησης του mRNA, (Houseley J, Tollervey D. 2009 και Schoenberg DR, Maquat LE. 2012).

Τυπικά, τα ένζυμα που καταλύουν την απαδενυλύνωση είναι ειδικά για αλληλουχίες πολυαδενινών και δεν προσβάλλουν το σώμα το mRNA, (Goldstrohm AC, Wickens M. 2008). Έχουν περιγραφεί τρεις ευρέως συντηρημένες απαδενυλάσες που, κατά σειρά ανακάλυψης είναι: η πυρηνική πολύ(A), PAN2-3, η ειδική πολύ(A) ριβονουκλεάση, PARN και το σύμπλοκο CCR4-NOT. Ο ρυθμός αποικοδόμησης συνεισφέρει στον έλεγχο των επιπέδων της σταθερής κατάστασης διαφορετικών mRNAs. Αλλαγές στην σταθερότητα των μορίων αυτών μπορεί να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των mRNAs, (Schoenberg DR, Maquat LE. 2012). Ο βασικός παράγοντας που καθορίζει το συνολικό ρυθμό αποικοδόμησης ενός μορίου mRNA είναι η απαδενυλύνωση αυτού. Κατά συνέπεια, οι απαδενυλάσες ελέγχονται από ειδικούς- mRNA παράγοντες.

### **PARN**

Στην παρούσα εργασία, βασικό αντικείμενο μελέτης ήταν η PARN, η οποία, εκ των υστέρων, περιγράφηκε, αρχικά, σε κυτταρικά εκχυλίσματα HeLa, όπου παρουσίαζε κυρίαρχη δράση απαδενυλύνωσης, (N.A.A. Balatsos et al 2012). Καθαρό και ομογενοποιημένο ένζυμο προήλθε από θύμο αδένος μοσχάρου, (Körner C, Wahle E. 1997 και Martinez J et al. 2000), καθώς και από ωοκύτταρα Xenopus, (Copeland PR, Wormington M. 2001). Σημειώνεται, ότι η PARN είναι σε μεγάλο βαθμό, αλλά όχι ολικά, συντηρημένη πρωτεΐνη και απουσιάζει από τον *S. cerevisiae* και την *Drosophila*.

Ως μέλος της υπεροικογένειας των απαδενυλασών με δράση 3'έξωνουκλεάσης, η PARN αποικοδομεί το RNA από το 3'άκρο του, με αποτέλεσμα να προκύπτουν 5'-NMPs. Η υδροξυλική ομάδα στο 3'άκρο του μορίου RNA σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το γλουταμικό οξύ στην θέση 30 της πρωτεΐνης, (Wu M, Reuter M. et al. 2005). Μία εκ των πλευρικών αλυσίδων εμπλέκεται στην δέσμευση ιόντων μετάλλων από το ένζυμο. Ειδικότερα, η υπεροικογένεια των απαδενυλασών, DEDD superfamily, διαιρείται σε δυο υποομάδες, τις DEDDy και τις DEDDh. Ο διαχωρισμός αυτός στηρίζεται στο πέμπτο συντηρημένο κατάλοιπο τυροσίνης ή ιστιδίνης, τα οποία διαδραματίζουν

σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση ενός μορίου νερού ή μιας ομάδας υδροξυλίου κατά την διάσπαση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού.

Ως εξωνουκλεάση με δράση εξαρτώμενη από το Mg(II), η PARN βελτιώνει την δραστηριότητά της παρουσία αυτών. Δεδομένου ότι, κάποιες εξωνουκλεάσες εξαρτώμενες από το Mg(II) ενεργοποιούνται παρουσία Fe(II), έχει δειχθεί ότι τα αμινοξέα που είναι απαραίτητα για την καταλυτική δράση της PARN είναι: Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382. Στην πραγματικότητα, τρία από αυτά τα αμινοξέα κατάλοιπα συνεργάζονται με δισθενή ιόντα: Glu30, Asp292 και Asp382. Επιπλέον, σημαντικό και απαραίτητο για την καταλυτική δράση της PARN είναι και το κατάλοιπο ιστιδίνης στην θέση 377. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η PARN έχει κατηγοριοποιηθεί στην υποκατηγορία των DEDDh, (N.A.A. Balatsos et al 2012).

Η ανθρώπινη PARN είναι ομοδιμερής από δύο όμοιες υπομονάδες, 74 kDa κάθε μία, (Wu M, Reuter M. et al. 2005), που στο σύνολο της, η PARN, αποτελείται από 639 αμινοξέα, (N.A.A. Balatsos et al 2012). Η μελέτη της δομής της PARN με ακτίνες X αποκάλυψε μια αμινοτελική πυρηνική περιοχή που διακόπτεται από μια περιοχή R3H και ακολουθείται από ένα μοτίβο αναγνώρισης RNA, RRM, (RNA Recognition Motif), (Wu M. et al. 2005, Wu M, et al. 2009). Η δομή της PARN φαίνεται στην εικόνα 1. Η μεγάλη επιφάνεια διμερισμού της PARN διαμορφώνεται από την πυρηνική περιοχή και, μεταλλάξεις που την διακόπτουν, επιφέρουν σημαντική μείωση στην ενζυμική δραστηριότητα του μορίου, (Wu M, et al. 2005). Τα 130 αμινοξέα που συγκροτούν το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης δεν φαίνεται έχουν συγκεκριμένη δομή και ενδέχεται να περιέχουν μια δεύτερη επιφάνεια διμερισμού, (Niedzwiecka A 2011).



Εικ.3: Μοντέλο ομοδιμερούς PARN, (Wu M, et al. 2009)

Η συνολική δομή της ανθρώπινης PARN, καθ' όλο το μήκος αυτής, εξακολουθεί να μην έχει αποκρυπτογραφηθεί ακόμη. Εναλλακτικές βιοφυσικές προσεγγίσεις, όπως μικροσκοπία ατομικής δύναμης, (AFM), έχουν επιστρατευτεί για τον σκοπό αυτό. Το αποτέλεσμα αυτών των προσεγγίσεων ήταν η αποκάλυψη ενός σφαιρικού, συμπαγούς και ελλειψοειδούς σχήματος του συνολικού μήκους διμερούς της PARN. Αυτό το εύρημα παρείχε μια σημαντική μεσοσκοπική περιγραφή της δομής της ανθρώπινης PARN, (Niedzwiecka A. et al 2011). Επιπλέον, στο καρβοξυτελικό άκρο της, η PARN φέρει μια μη δομημένη απόληξη από περίπου 130 αμινοξικά κατάλοιπα. Είναι πιθανόν, αυτή η απόληξη να λειτουργεί ως αναγνωριστικό μοτίβο ρυθμιστικών παραγόντων που σχετίζονται με την δράση του ενζύμου. Πρόσφατα προτάθηκε ότι αυτή η μη δομημένη απόληξη αποικοδομείται εγγενώς, (N.A.A. Balatsos et al 2012).

Μελέτη της αμινοξικής αλληλουχίας της PARN έδειξε ότι διαθέτει τρεις χαρακτηριστικές περιοχές: την καταλυτική, κατάλοιπα 1-177 και 246-391 και δύο περιοχές δέσμευσης RNA: την R3H, κατάλοιπα 178-245 και την RRM, κατάλοιπα 437-510. Οι περιοχές αυτές πιθανόν συμβάλλουν στην δυνατότητα επεξεργασίας του ενζύμου της PARN.

Στο σημείο αυτό, τονίζεται ότι, η κρυσταλλική δομή του δραστικού μεταλλάγματος PARN 1-430 έδειξε αδυναμία ανίχνευσης Mg(II) στο ενεργό κέντρο ενζύμου, παρά το γεγονός ότι περίσσεια των ιόντων αυτών παρείχετο κατά τις συνθήκες κρυστάλλωσης, (N.A.A. Balatsos et al 2012). Συνεπώς, ο ρόλος των Mg(II) είναι σημαντικός και αδιαμφισβήτητος στην ενεργότητα της PARN και γενικότερα, επηρεάζει την σταθερότητα πολλών ενζύμων.

Από ομοπολυμερή υποστρώματα, η PARN προτιμά την πολύ(A) ουρά. Ανάλογα με τις συνθήκες, η πολύ(U) ουρά αποικοδομείται λιγότερο αποτελεσματικά, ενώ πολύ(C) και πολύ(G) ουρές είναι ανθεκτικές στο ένζυμο αυτό.

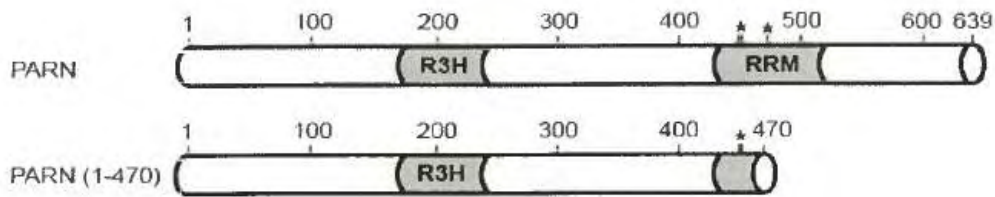
Όταν ως υπόστρωμα είναι το πολυαδενυλωμένο RNA, η πολύ(A) ουρά αποικοδομείται, το σώμα του RNA συσσωρεύεται παροδικά και κατόπιν, υδρολύεται, (Copeland PR, Wormington M. 2001). Η περιοχή RRM δεσμεύεται, ειδικά στην πολύ(A) ουρά, (Nilsson P, et al. 2007). Μεταλλαγμένη πρωτεΐνη PARN, όπου απουσιάζει αυτή η περιοχή, αν και είναι λιγότερο δραστική, διατηρεί την ειδικότητα της δέσμευσης, (Wu M, et al 2005). Επίσης, έλλειμμα της περιοχής R3H οδηγεί σε μετάλλαγμα της PARN με μειωμένη συγγένεια, αλλά όχι και ειδικότητα προς το υπόστρωμα, (Wu M, 2005).

Η PARN βρίσκεται στον κυτταρικό πυρήνα όπου αφθονεί, καθώς και στα σωματίδια Cajal, (Cajal bodies), (Yamashita A, et al. 2005 και Berndt H, et al. 2012). Η PARN που απομονώθηκε από το *Xenopus* έδωσε 2 πολυπεπτιδία, καθαρής μορφής, ένα 62 kDa και ένα 74 kDa. Το πρώτο αποτελεί προϊόν πρωτεόλυσης του δεύτερου. Παρόλο που και οι δύο αυτές μορφές μπορούν να προκύψουν λόγω πρωτεόλυσης κατά την διαδικασία καθαρισμού, έχει αναφερθεί

ότι προκύπτουν και *in vivo*, σε πρωταρχικά στάδια, (N.A.A. Balatsos et al 2012). Επιπροσθέτως, έχει δειχθεί ότι αυτές οι δύο μορφές διαχωρίζονται ξεκάθαρα σε κυτταρικό επίπεδο, με το πολυπεπτίδιο των 74 kDa να βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου και το πολυπεπτίδιο των 62 kDa να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, (N.A.A. Balatsos et al 2012). Η PARN αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες όπως το πυρηνικό σύμπλοκο CBC, ενώ συναγωνίζεται τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E για πρόσδεση στο κάλυμμα στο 5' άκρο (Seal et al., 2005). Επιπλέον, έχει δειχθεί πως το καρβοξυτελικό άκρο της PARN εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις με άλλους παράγοντες που ρυθμίζουν τη δράση της, όπως το σύμπλοκο CBC (Balatsos et al., 2006). Προκαταρκτικά δεδομένα του εργαστηρίου μας σε μελέτες του ρόλου της PARN στη βιοσύνθεση των microRNAs δείχνουν πως η PARN αλληλεπιδρά με τον παράγοντα πολυαδενυλίωσης CPSF6.

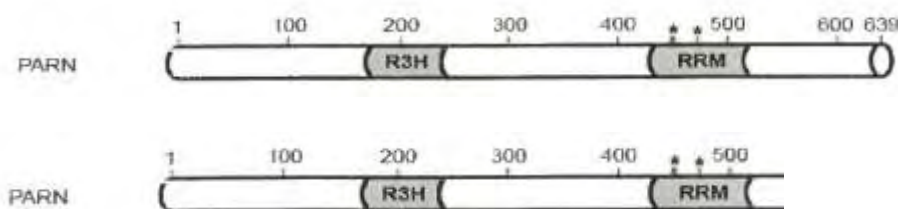
### **Μετάλλαγμα PARN (1-523)**

Η ανθρώπινη PARN απαντά σε δύο ισομορφές, μία πυρηνική 74 kDa και μία κυτταροπλασματική 54 kDa (62 kDa στον *Xenopus laevis*). Όπως προαναφέρθηκε, η τελευταία είναι παράγωγο πρωτεόλυσης της πρώτης, από το οποίο απουσιάζει το εύκαμπτο καρβοξυτελικό άκρο. Η περιοχή αυτή ευθύνεται και για την μετακίνηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα, αφού περιέχει την NLS (*nuclear localization signal*) αλληλουχία. Αναλύσεις αλληλουχιών δείχνουν ότι, η PARN ανήκει στην οικογένεια των RNaseD νουκλεασών που φέρει το χαρακτηριστικό μοτίβο DEDD και όπως έχει προειπωθεί, είναι συντηρημένη σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς, αλλά απουσιάζει από το *S.cerevisiae* και την *D. Melanogaster*. Μεταλλάξεις στα προβλεπόμενα καταλυτικά κατάλοιπα (DEDD) αναστέλλουν τη δράση της (Ren et al., 2002; Lai et al., 2003). Στο σημείο αυτό τονίζεται και πάλι ότι, βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι, η ενεργότητα της PARN εξαρτάται από διασθενή μεταλλικά ιόντα, ενώ μεγαλύτερη δραστικότητα έχει η παρουσία ιόντων Mg<sup>2+</sup>, τα οποία πιθανόν βρίσκονται στο ενεργό κέντρο παίζοντας καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό της κατάλυσης του ενζύμου.



Εικ.4: Οι δύο ισομορφές της ανθρώπινης PARN και οι χαρακτηριστικές περιοχές που φέρει κάθε μία. Η PARN(1-470) είναι η μορφή του κυττοσολίου, καθώς στερείται την NLS περιοχή που υπάρχει στην πυρηνική PARN, στα τελευταία 130, περίπου αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία απαρτίζουν το καρβοξυτελικό άκρο του ενζύμου.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η έκφραση του μεταλλάγματος 1-523 της PARN, από το οποίο λείπουν τα κατάλοιπα 524-639. Από την κανονική PARN αφαιρέθηκε το τμήμα από το αμινοξύ την 524 θέση μέχρι τέλους. Έτσι, προέκυψε μεταλλαγμένη PARN 1-523 η οποία, διαθέτει όλες τις απαραίτητες λειτουργικές περιοχές που απαιτεί η ενζυμική δράση της PARN, αλλά απουσιάζει η εύκαμπτη καρβοξυτελική ουρά που φέρει την αλληλουχία NLS, αλλά περιέχει η RRM περιοχή. Με δεδομένη την απουσία της περιοχής NLS, αναμένεται ότι το μετάλλαγμα PARN(1-523) δεν θα εμφανίζεται στον πυρήνα του κυττάρου, αλλά μόνο στο κυτταρόπλασμα. Επίσης, λείπει η περιοχή αυτή που φαίνεται πως παίζει ρόλο στις αλληλεπιδράσεις της PARN με άλλους παράγοντες, όπως το CBC (Balatsos et al., 2006). Το μετάλλαγμα PARN(1-523) απεικονίζεται στην κάτωθι εικόνα σε σύγκριση με την PARN wt:



Εικ.5: Κανονική PARN και μετάλλαγμα PARN(1-523)

Η PARN περιέχει μια δομική περιοχή νουκλεάσης, υπεύθυνη για την καταλυτική δράση του ενζύμου, όπου υπάρχει και μια συντηρημένη R3H περιοχή που φαίνεται να έχει δομή όμοια με αυτήν της IF3 καρβοξυτελικής περιοχής (Wu et al., 2005). Η R3H περιοχή προσδένεται σε μονόκλιωνα νουκλεϊκά οξέα και πιθανόν κατευθύνει την PARN στο πολυαδενυλιωμένο mRNA. Σύμφωνα με την παρακάτω εικόνα, η σταθερότητα των mRNAs εξαρτάται από την δράση ριβονουκλεασών, μεταξύ άλλων. Κατά συνέπεια, εξαρτάται και από την δράση της PARN ως πολύ(A) εξειδικευμένη ριβονουκλεάση.

### 1.3 *microRNAs*

Μελέτες του ανθρώπινου γονιδιώματος έχουν αποκαλύψει ότι το μεγαλύτερο μέρος αυτού αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, καθώς και από μοναδιαίες αλληλουχίες ανάμεσα στα γονίδια, οι οποίες ανέρχονται σε συνολικό ποσοστό 75%, καθώς και από τα ιντρόνια, που αποτελούν το 23% του γονιδιώματος (Lewin, Genes VIII). Ένα μικρό ποσοστό μεταγράφεται σε ένα ετερογενές ρεπερτόριο από λειτουργικά μη-κωδικά μόρια RNA (non-protein-coding RNAs, ncRNAs) (Eddy S.R. 2001, Mattick J.S. 2009).

Ο ρόλος των μη-κωδικών μορίων RNA συνίσταται συμμετοχή τους στην βιοσύνθεση πρωτεϊνών, όπως συμβαίνει με το μεταφορικό και με το ριβοσωμικό RNA, tRNA και rRNA αντίστοιχα. Επίσης, τα μη κωδικά μόρια RNA καταλύουν διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις, όπως η τμήση και η σύνδεση RNA μορίων και τον σχηματισμό πεπτιδικών δεσμών, οπότε σε αυτή την περίπτωση αποτελούν τα λεγόμενα ριβοζύμα, (ribozymes), (Rossi J.J. 1992, Nissen et al. 2000). Τέλος, τα μη-κωδικά μόρια RNA διαδραματίζουν έναν ευρύτερα ρυθμιστικό ρόλο, καθώς ο προσδιορισμός του μηχανισμού παρεμβολής του RNA, (RNAi), αποκάλυψε ότι εξειδικευμένα μη-κωδικά μόρια RNA αποτελούν κύριους μεταγραφικούς ρυθμιστικούς παράγοντες της γονιδιακής έκφρασης.

Το πρώτο small RNA ήταν το *lin-4*, το οποίο ανακαλύφθηκε το 1993 με γενετική απεικόνιση σε νηματώδεις. Κατόπιν, την ίδια χρονιά, ανακαλύφθηκε η ρυθμιστική δράση του *lin-4* επί του *lin-14*, γεγονός που υποδήλωνε τον ρυθμιστικό ρόλο των small RNAs, (R.C. Lee et al 1993, B.Wightman et al 1993). Σήμερα, το πιο μικρό RNA *lin-4* έχει αναγνωριστεί ως η πηγή προέλευσης μιας κλάσης μικρών ρυθμιστικών RNAs, που είναι πλέον γνωστά ως *microRNAs* (miRNAs), (F. Wahid et al 2010).

Πιο συγκεκριμένα, η κλάση των μικρών, μη κωδικών μορίων RNA που αποτελούν τα *MicroRNAs* (miRNAs), αποτελείται από μικρά ενδογενή RNA, μήκους 21–25 nts. Η κλάση των miRNAs διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στο ζωικό, όσο και στο φυτικό βασίλειο, καθώς στοχεύουν ειδικά, mRNA μόρια προκειμένου να τα αποικοδομήσουν ή να καταστείλουν την μετάφρασή τους, (F. Wahid et al 2010).

Η αναγνώριση του small RNA *lin-4* οδήγησε σε μια νέα εποχή στο πεδίο της γενωμικής των miRNA, η οποία, στην πραγματικότητα είχε ως αφετηρία της την ανακάλυψη του RNA *let-7* του *Caenorhabditis elegans*, (B.J. Reinhart et al 2000, F.J. Slack et al 2000).

Αρχικά οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι η πλειοψηφία των miRNAs βρίσκεται τοποθετημένη σε ενδογενείς περιοχές, αν και μερικά έχουν αναφερθεί ως περιοχές σε ιντρόνια, (N.C. Lau et al 2001, M. Lagos-Quintana et al 2001).

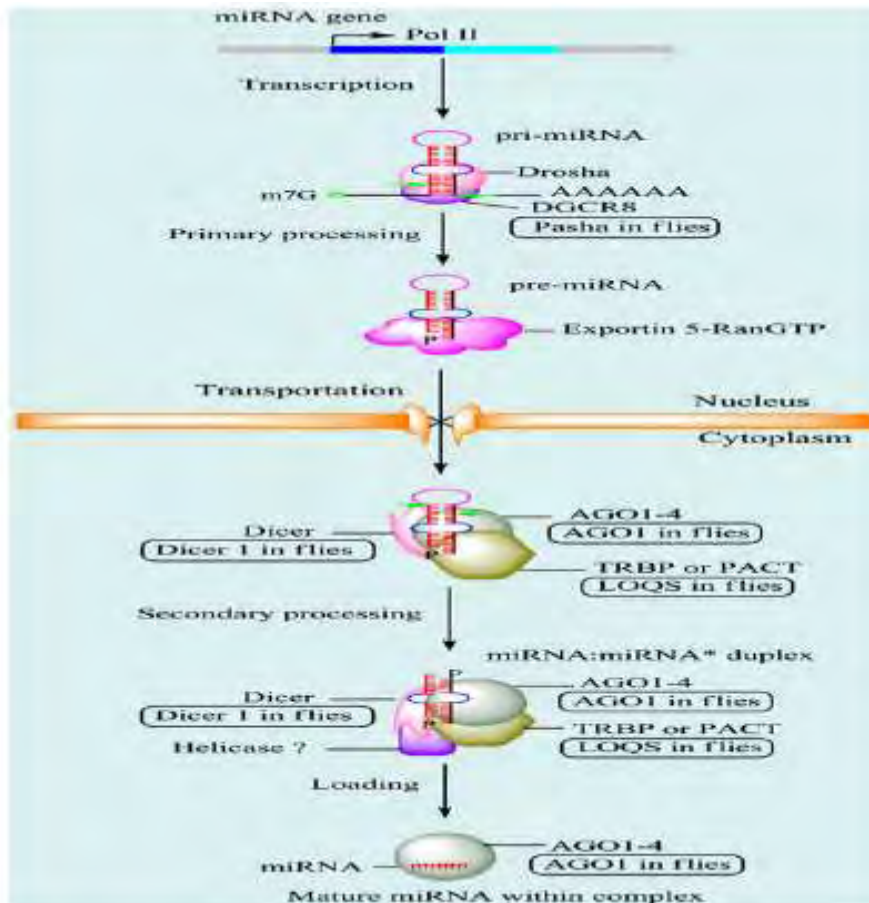
Περίπου το ήμισυ όλων των γνωστών miRNAs έχουν δείξει σημαντική εγγύτητα προς άλλα miRNAs. Αυτά τα ομαδοποιημένα miRNAs εκφράζονται ως πολυκιστρονικά πρώιμα μετάγραφα. Σε λίγες, όμως περιπτώσεις, έχει δειχθεί ότι



κάποια miRNAs μπορεί να μεταγραφούν ως μονοκιστρονικά πρώιμα μετάγραφα, (Y. Lee et al 2003, X. Cai et al 2004).

### Κανονικό μονοπάτι βιοσύνθεσης *microRNAs*

Στην εικόνα 6 περιγράφεται η βιοσύνθεση και ο μηχανισμός δράσης των miRNAs.



Εικ.6: Βιοσυνθετικό μονοπάτι ζωικών miRNAs , (F. Wahid et al 2010). Στα πλαίσια αναφέρονται οι αντίστοιχοι παράγοντες στις μύγες.

Αρχικά, τα γονίδια των miRNAs μεταγράφονται από την RNA polymerase II (Pol II). Επακόλουθο αυτής της μεταγραφής είναι η παραγωγή ενός πρώιμου microRNA, pri-miRNA. Στην συνέχεια, η πρωτεΐνη Drosha μαζί με την κρίσιμη περιοχή του γονιδίου 8, DGCR-8 διαμεσολαβούν το πρωταρχικό στάδιο επεξεργασίας, (primary processing), που καταλήξει στον σχηματισμό ενός μορίου pre-miRNA, μήκους ~65 nt. Αυτό το pre-miRNA διαθέτει ένα μικρό στέλεχος από 2-3 nt που προβάλλει στο 3'. Κατόπιν, αυτό το προβαλλόμενο

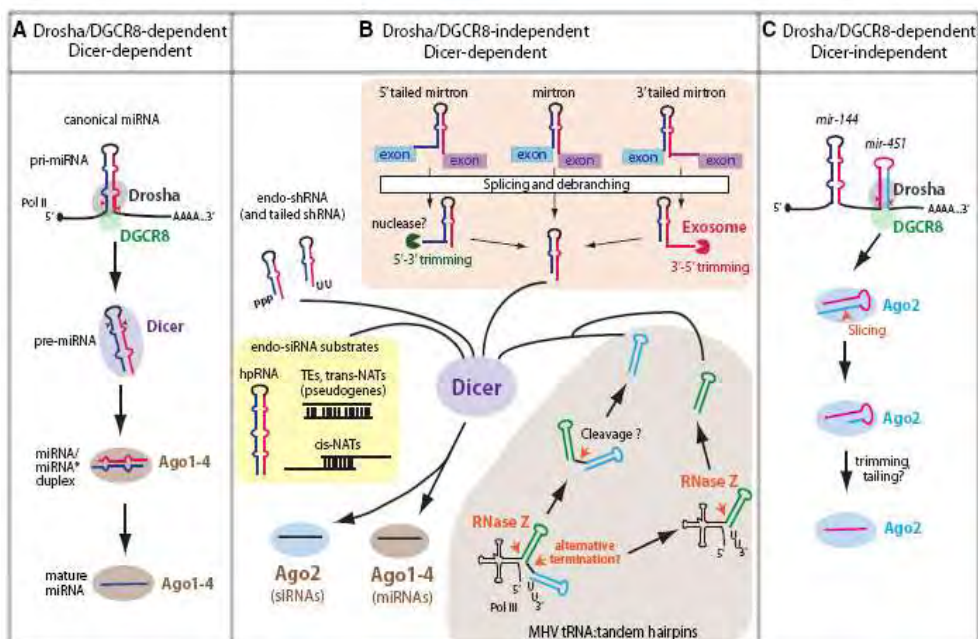
στέλεχος αναγνωρίζεται από την εξαπορτίνη 5, (EXP5), η οποία διαμεσολαβεί την μεταφορά του πρώιμου miRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα.

Στο κυτταρόπλασμα, η Dicer RNase III καταλύει το δεύτερο στάδιο επεξεργασίας, (secondary processing), το οποίο θα δώσει την γένεση ενός δίκλωνου miRNA/miRNA μορίου. Εν συνεχεία, οι πρωτεΐνες Dicer, TRBP και Argonaute1-4 (Ago 1-4) είναι υπεύθυνες για την περαιτέρω επεξεργασία του pre-miRNA, καθώς και για την συναρμολόγηση του συμπλόκου RISC (RNA-induced silencing complex). Πιστεύεται ότι, μια άγνωστη ελικάση εξυπηρετεί την χαλάρωση του δίκλωνου miRNA/miRNA μορίου, με αποτέλεσμα, ο ένας κλώνος να παραμένει στο ώριμο miRNA ε(F. Wahid et al 2010) πύ της Ago, ενώ ο άλλος κλώνος, να αποικοδομείται, .

### Εναλλακτικά βιοσυνθετικά μονοπάτια των miRNAs

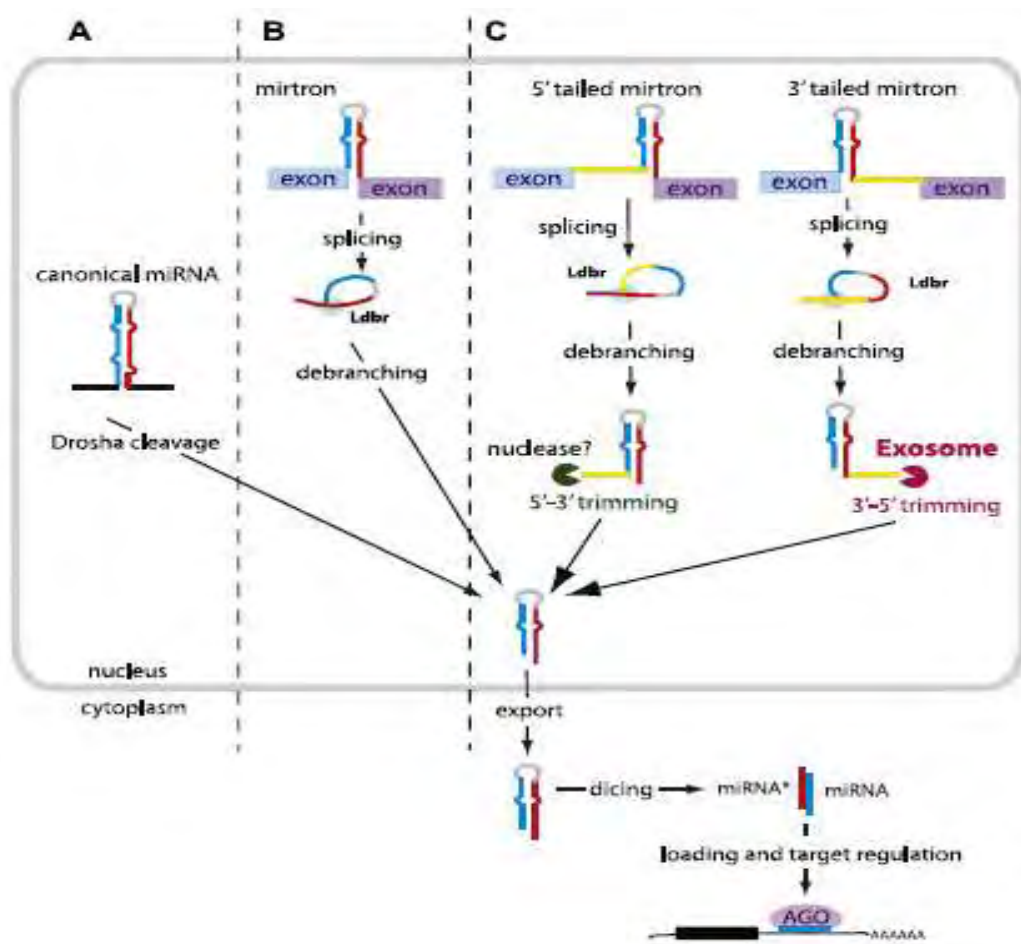
Τα κανονικά πρόδρομα miRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II (RNAP II) σε μεγάλα μετάγραφα (pri-miRNA) μερικών χιλιάδων νουκλεοτιδίων σε μήκος τα οποία αποκτούν 5' καλύπτρα και 3' -πολυ(A) ουρά στα άκρα τους (Lee et al. 2004). Εκτός όμως από το βιοσυνθετικό μονοπάτι των miRNAs που περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα, υπάρχουν και εναλλακτικά μονοπάτια βιοσύνθεσης, τα οποία παράγουν μη-κανονικά miRNAs. Αυτά τα εναλλακτικά μονοπάτια παρακάμπτον, συνήθως, ένα από τα βήματα επεξεργασίας από RNase III, είτε της Drosha, είτε της Dicer.

Τρία εναλλακτικά μονοπάτια βιοσύνθεσης των miRNAs συνοψίζονται στην εικόνα 7:



Εικ.7: Εναλλακτικά βιοσυνθετικά μονοπάτια miRNAs, (Yang et al., 2011)

Επίσης, η αναφορά ότι ιντρόνια μπορούν με κατάλληλη επεξεργασία να αποτελέσουν λειτουργικά miRNAs, αποκάλυψε μία απροσδόκητη πηγή προέλευσης των miRNAs. Αυτά τα pre-miRNAs/ιντρόνια, τα αποκαλούμενα mirtrons, μπορούν να παρακάμψουν την τμήση από τη Drosha, με δεδομένου ότι το ιντρόνιο που προκύπτει από το μάτισμα του mRNA έχει το κατάλληλο μήκος για να σχηματίσει βρόγχο παρόμοιο με ένα πρόδρομο miRNA (pre-miRNA) (Okamura et al. 2007, Ruby et al. 2007). Η εν λόγω διαδικασία φαίνεται στην εικόνα 8.



Εικ.8: Προέλευση miRNAs από ιντρόνια, (Westholm and Lai, 2011)

Συνοψίζοντας, το pre-miRNA προερχόμενο είτε από το κανονικό μονοπάτι, είτε από το mirtron μονοπάτι, συνίσταται περίπου από 60-75 nt και φέρει την μορφή βρόγχου ο οποίος διαθέτει και Είτε προέρχονται, είτε από, που προκύπτει, συνίσταται από ~ 60-75 νουκλεοτίδια, έχοντας μορφή και μία προεξοχή δύο νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο του (Lee et al. 2002, Bartel 2004, Cai et al. 2004, Han et al. 2004, Singh et al. 2008).

## ***microRNAs και φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες***

Η εκτενής μελέτη των miRNAs οφείλεται στην ανεύρεση εμπλοκής τους σε ποικίλες ζωτικές βιολογικές διεργασίες των κυττάρων, τόσο σε φυσιολογικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο ασθενειών. Στις φυσιολογικές κυττάρικες διεργασίες που εμπλέκονται τα miRNAs ανήκουν, μεταξύ άλλων, ο πολλαπλασιασμός και η ανάπτυξη των κυττάρων, η απόπτωση, αλλά και η αιμοποίηση. Σύμφωνα με τους Grishok et al. 2001, Ambros et al. 2003 και Carrington and Ambros 2003, η έκφραση των miRNAs είναι ιστοειδική και το προφίλ της έκφρασής τους διαφέρει μεταξύ των κυτταρικών αναπτυξιακών σταδίων.

Στον άνθρωπο, έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 1.000 miRNAs μέχρι τώρα, τα οποία έχειδειχθεί ότι ελέγχουν περισσότερα από το 60% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Friedman et al. 2009, Sayed and Abdellatif 2011).

Η έκφραση των miRNAs έχει σχετιστεί και με διάφορες ασθένειες, καθώς έχουν δείξει διαφορετικό προφίλ σε σοβαρές νόσους του ανθρώπου. Ιδιαίτερης σημασίας αλλά και ερευνητικού ενδιαφέροντος αποτελεί η συσχέτιση των miRNAs με τον καρκίνο, που έχει αποδοθεί στον εντοπισμό αλληλουχιών που μεταγράφονται σε miRNAs και οι οποίες ανευρίσκονται σε γενωμικές περιοχές που σχετίζονται με καρκινογένεση, καθώς και στο απορρυθμισμένο προτύπου έκφρασής των miRNAs σε κακοήθειες (Calin et al. 2004a, Calin et al. 2004b, Lu et al. 2005).

Ως απόρροια των όσων προαναφέρθηκαν, τα miRNAs αποτελούν υποψήφιους σημαντικούς προγνωστικούς και διαγνωστικούς δείκτες με μελλοντικές προοπτικές ως θεραπευτικοί στόχοι για τον καρκίνο.

## ***Αναγνώριση στόχου από τα miRNAs***

Ο κύριος ρόλος των miRNAs στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, είναι ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης.

Εν γένει, στα μετάζωα, τα miRNAs ζευγαρώνουν μέσω ατελούς συμπληρωματικότητας με τα mRNAs. Το γεγονός αυτό προκαλεί καταστολή της μεταφράσης λόγω αφαίρεσης της πολυ(A) ουράς. Η τελική έκβαση του ατελούς ζευγαρώματος των miRNAs με τα mRNAs είναι η ταχεία αποικοδόμηση του mRNA που συνεπάγεται την γονιδιακή σίγηση (Kedersha et al. 1991, Giraldez et al. 2006, Wu et al. 2006, Mashima et al. 2008).

Ωστόσο, λιγότερο συχνό είναι το φαινόμενο ένα miRNA να είναι πλήρως συμπληρωματικό με το mRNA-στόχο του. Στην περίπτωση αυτή, η αποικοδόμηση του στόχου μπορεί να λάβει χώρα, μέσω κατευθυνόμενης ενδονουκλεολυτικής διάσπασης στη θέση πρόσδεσης με το miRNA (Bass 2002, Nandy et al. 2009, Tanaka et al. 2009a, Lee et al. 2011).

Σε γενικές γραμμές, τα ζωικά miRNAs αναγνωρίζουν συμπληρωματικές περιοχές mRNA-στόχου, που εντοπίζονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή τους (3' untranslated region, 3'-UTR) και ζευγαρώνουν με αυτές μέσω συμπληρωματικότητας βάσεων κατά Watson-Crick. Η σύνδεση αυτή εξυπηρετείται από τη μία έλικα του miRNA, την λειτουργική έλικα-οδηγό, η κεντρική περιοχή της οποίας πλαισιώνεται από την περιοχή εκβλάστησης στο 5' άκρο και την περιοχή 3'.

Η πιο σημαντική προϋπόθεση στην αλληλεπίδραση miRNA-mRNA, είναι τα νουκλεοτίδια 2-8 της περιοχή 5', γνωστή ως 5'-seed περιοχή. Πιστεύεται ότι όχι μόνο η αλληλουχία της θέσης-στόχου, καθορίζει εάν ένα mRNA είναι στόχος ενός συγκεκριμένου miRNA, αλλά και το πλαίσιο στο οποίο βρίσκεται η 3'-αμετάφραστη περιοχή του mRNA (3'-UTR) (Bartel 2009, Grimson et al. 2007).

Το πρώτο βήμα αναγνώρισης του στόχου αποτελεί το ζευγάρι της 5'περιοχής του miRNA με την θέση στην 3'-UTR περιοχή του στόχου, η οποία πρέπει να είναι μια προσβάσιμη. Ακολούθως, λαμβάνει χώρα η διάδοση της αναγνώρισης, δηλαδή η διάρρηξη της τοπικής δευτεροταγούς δομής του mRNA, η επιμήκυνση και η δημιουργία ενός σταθερού συμπλόκου miRNA-στόχου (Filipowicz 2005, Tomari and Zamore 2005, Yuan et al. 2005, Long et al. 2007).

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι σχετικά πρόσφατα αποτελέσματα βασισμένα σε καταστολή των miRNAs μέσω συνθετικών αναστολέων, υποστηρίζουν ότι η 3'-περιοχή είναι εξίσου σημαντική για την αναγνώριση του στόχου (Robertson et al. 2010).

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως η PARN παίζει ρόλο στη βιοσύνθεση μιας ειδικής κατηγορίας microRNA. Ειδικότερα, η PARN προσδίδει το τελικό μήκος των πρόδρομων miR-451, μιας οικογένειας microRNAs που ωριμάζουν μέσω της ενδονουκλεάσης Ago2 (Yoda et al., 2013). Εκτός από το ρόλο της σε τελικά στάδια ωρίμανσης, προκαταρκτικές μελέτες του εργαστηρίου με μικροσυστοιχίες microRNAs δείχνουν πως η PARN καθορίζει τη σταθερότητα μιας ομάδας microRNAs, καθώς επίσης και πως παίζει ρόλο στην βιοσύνθεση των miRNAs, πιθανόν σε πολύ αρχικό στάδιο, όπου τα πρώιμα miRNAs (pri-miRNAs) λαμβάνουν την πολυ(A) ουρά (Kyritsis et al., *in preparation*).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως αναφέρθηκε, η PARN είναι ένα κύριο ένζυμο που αποικοδομεί τις πολυ(A) ουρές των ευκαρυωτικών mRNAs και συμμετέχει στα τελευταία στάδια της ωρίμανσης μιας κατηγορίας microRNAs. Επιπλέον, φαίνεται πως ρυθμίζει τη σταθερότητα microRNAs και πιθανόν συμμετέχει και σε πολύ πρώιμα στάδια της ωρίμανσής τους. Επίσης, φαίνεται πως το καρβοξυτελικό άκρο της παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων και κατά συνέπεια στη δραστηριότητά της.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί το μετάλλαγμα PARN(1-523) που στερείται του καρβόξυ τελικού άκρου της φυσικής μορφής, ως προς τον βιολογικό του ρόλο στα επίπεδα έκφρασης επιλεγμένων microRNAs σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων. Ειδικότερα, εξετάστηκαν τα επίπεδα των pri - miR-1207 και pri - miR-29, υπό συνθήκες υπερέκφρασης αυτού. Τα συγκεκριμένα miRs επιλέχθηκαν με βάση προηγούμενες μελέτες μας, που δείχνουν πως η PARN επηρεάζει, μεταξύ άλλων, και τα επίπεδα αυτών των δύο.

### 3. ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 ΕΝΘΕΣΗ και ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΟΣ PARN(1-523)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση και ενίσχυση του μεταλλάγματος PARN(1-523), με χρήση του φορέα pcDNA™4/TO. Υπενθυμίζεται ότι αυτό το μετάλλαγμα προέρχεται από την ανθρώπινη απαδενυλάση PARN και από αυτό απουσιάζει το εύκαμπτο καρβοξυτελικό άκρο με την περιοχή NLS, (κατάλοιπα 524-639), ενώ παραμένει η περιοχή RRM.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του γονιδίου της PARN wt που βρισκόταν εντός του φορέα PET33. Η PCR πραγματοποιήθηκε για τον σκοπό αυτό με χρήση READY MIX- KAPA HiFi. Λεπτομέρειες των υλικών και των συνθηκών για την εν λόγω PCR συνοψίζονται στους ακόλουθους πίνακες:

Reagent	Volume (μl)
ddH <sub>2</sub> O	21
KAPA	25
Forward primer	1,5
Reverse primer	1,5
PET 33/ PARN wt	1
Total volume	50

Εικ. 9: Αντιδραστήρια READY MIX- KAPA HiFi για ενίσχυση του γονιδίου PARN wt

Type of reaction	Cycling conditions
Denaturation (1 cycle)	95° C , 3 min
Amplification (x35)	95° C , 20s sec
	65° C, 15 sec
	72° C, 2 min
Dissociation	72 ° C, 10 min
HOLD	4° C

Εικ. 10: Θερμικό προφίλ ενίσχυσης γονιδίου PARN wt με PCR

## pcDNA 4

Το μετάλλαγμα PARN(1-523) κλωνοποιήθηκε στον φορέα pcDNA™4/TO, με βάση πρωτόκολλο *In-Fusion HD Cloning* της *Clontech*, που θα περιγραφεί παρακάτω.

Ο pcDNA™4/TO είναι ένας επαγωγίσιμος φορέας 5.1 kb που επιτρέπει την ρυθμισμένη έκφραση του επιθυμητού γονιδίου μέσω τετρακυκλίνης, σε κύτταρα θηλαστικών που έχουν συν-επιμολυνθεί με pcDNA™6/TR.

Ο φορέας pcDNA™4/TO φέρει τις ακόλουθες περιοχές:

- Υβριδικό υποκινητή αποτελούμενο από τον πρώιμο – ενδιάμεσο υποκινητή του ανθρώπινου κυτταρομεγαλιού, CMV και τις περιοχές χειριστών του οπερονίου της τετρακυκλίνης, TetO2, (Yao et al., 1998), για υψηλά επίπεδα ρυθμισμένης έκφρασης τετρακυκλίνης σε ένα ευρύ φάσμα κυττάρων θηλαστικών. Οι αλληλουχίες του οπερονίου της τετρακυκλίνης εξυπηρετούν, ως θέσεις δέσμευσης για 4 μόρια- καταστολείς τετρακυκλίνης, (συμπεριλαμβανομένων 2 ομοδιμερών καταστολέων τετρακυκλίνης) και συνδυάζουν την απόκριση της τετρακυκλίνης στο γονίδιο επιλογής. Ο καταστολέας της τετρακυκλίνης εκφράζεται από το πλασμίδιο pcDNA™6/TR.
- Zeocin, γονίδιο ανθεκτικότητας για επιλογή των σταθερών κυτταρικών σειρών, (Mulsant et al., 1988)

Πλασμίδιο ελέγχου, το pcDNA™4/TO/lacZ, επάγεται ως θετικό control για την διαμόλυνση, αλλά και για την ρυθμισμένη έκφραση της τετρακυκλίνης στις επιθυμητές κυτταρικές σειρές.

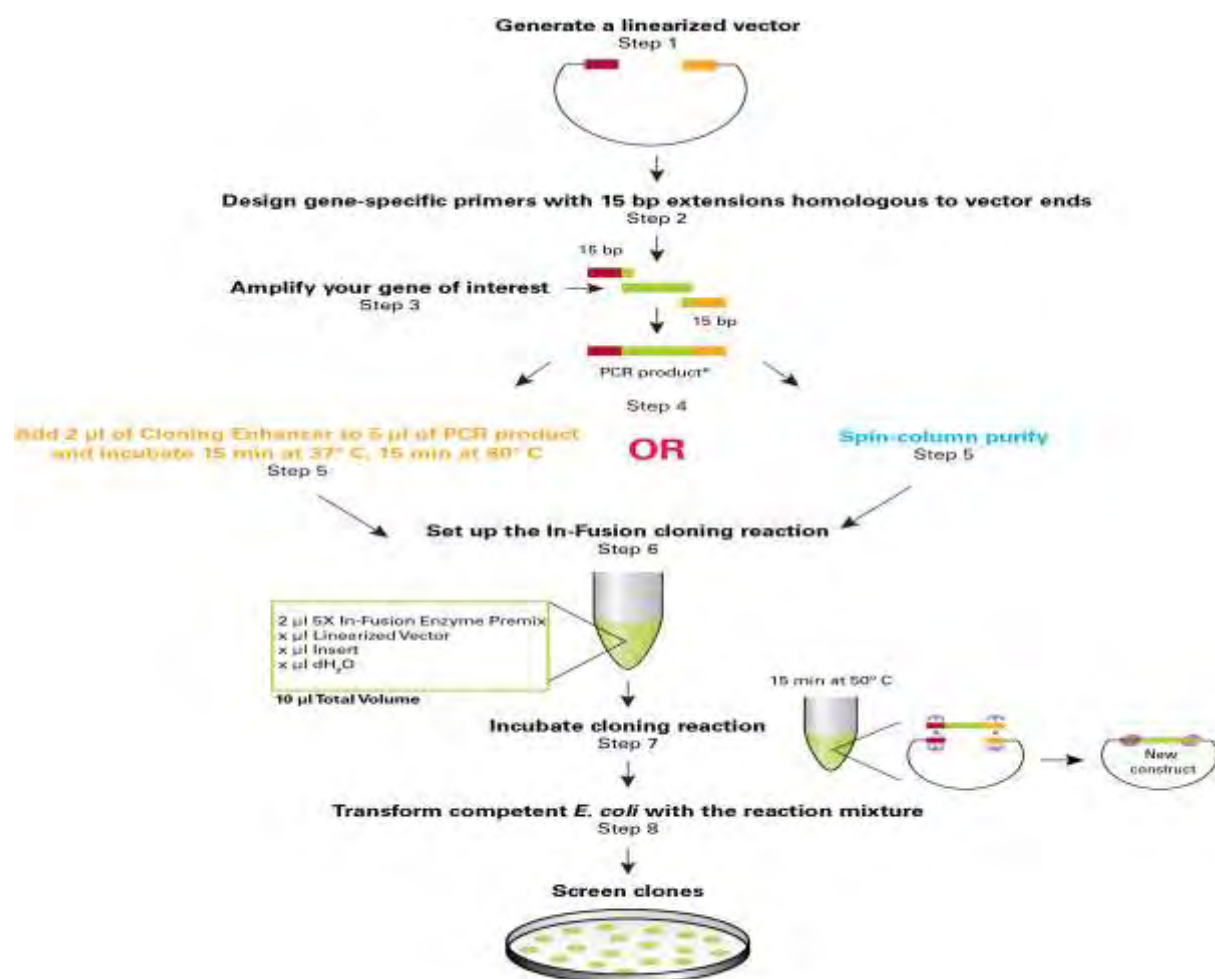


Εικ.11: pcDNA™4



## In-Fusion HD Cloning (Clontech)

Το συγκεκριμένο σύστημα αντιδραστηρίων σχεδιάστηκε με προορισμό την ταχεία και απευθείας κλωνοποίηση ενός ή περισσοτέρων θραυσμάτων DNA εντός οποιουδήποτε φορέα. Ακρογωνιαίο λίθο στην τεχνολογία κλωνοποίησης με σύντηξη αποτελούν τα ένζυμα σύντηξης που χρησιμοποιούνται από το σύστημα αυτό. Πιο συγκεκριμένα, τα ένζυμα αυτά συντήκουν ικανοποιητικά και με ακρίβεια, θραύσματα DNA, π.χ. προερχόμενα από PCR, με γραμμικούς φορείς, αναγνωρίζοντας μια αλληλοεπικάλυψη 15 bp στα άκρα. Αυτή την αλληλοεπικάλυψη εκμεταλλεύεται η γενετική μηχανική για σχεδιασμό εκκινητών που θα ενισχύσουν τις επιθυμητές αλληλουχίες. Η συνολική διαδικασία κλωνοποίησης με σύντηξη που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία συνοψίζεται στην ακόλουθη εικόνα:



\* If you obtain PCR product with non-specific background, isolate the target fragment by gel extraction first, then spin-column purify.

Εικ. 12: In fusion Cloning, με βάση το πρωτόκολλο της Clontech

Για την κλωνοποίηση του μεταλλάγματος PARN(1-523) σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές, (primers), της κάτωθι εικόνας:

<b>FW Primer (F1_FW)</b>	<b>CAGTGTGGTGGAAATTATGGAGATAATCAGGAGCAA</b>
<b>RV Primer (F1_RV)</b>	<b>GATATCTGCAGAATTCTACTTTCTTTTGATCTGCTT</b>

*Εικ.13: Primers που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση του μεταλλάγματος PARN(1-523)*

Πιο αναλυτικά, για τη κλωνοποίηση του μεταλλάγματος PARN(1-523) στον επαγωγίμο φορέα pcDNA4/TO χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά:

Reagent	Volume (μl)
EcoR I	1
Buffer H	2
pcDNA4, empty	10
ddH <sub>2</sub> O	7
Total volume	20

*Εικ. 14: Αντιδραστήρια για κλωνοποίηση του μεταλλάγματος PARN(1-523) με τον επαγωγίμο φορέα pcDNA4*

Η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών, (primers), που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της παρούσας κλωνοποίησης ήταν, T<sub>m</sub> = 69° C. Βάση της θερμοκρασίας τήξης των εκκινητών επιλέχθηκε και ακολουθήθηκε το κάτωθι θερμικό προφίλ καθ' όλη την διάρκεια της κλωνοποίησης:

Type of reaction	Cycling conditions
Denaturation (1 cycle)	95° C , 3 min
Amplification (x35)	98° C , 20 sec
	65° C, 15 sec
	72° C, 2 min
Dissociation	72 ° C, 10 min
HOLD	4° C

*Εικ.15: Θερμικό προφίλ κατά την κλωνοποίηση σύντηξης,( In fuson cloning).*

Με την διαδικασία κλωνοποίησης που ακολουθήθηκε, ο κυκλικός επαγωγίμος φορέας pcDNA4/TO αρχικά, μετατράπηκε σε γραμμικό, έπειτα από κατάλληλη θραύση αυτού από το περιοριστικό ένζυμο EcoR I. Μια μικρή αλληλουχία, περίπου 15 nt, όμοια και στα δύο άκρα του γραμμικού φορέα, αναγνωρίζεται από ομόλογες αλληλουχίες στο ένθεμα, δηλαδή στο μετάλλαγμα PARN(1-523), προκειμένου να επιτευχθεί η ένθεση του μεταλλάγματος στον φορέα.

Τα αποτελέσματα της PCR αναλύθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος MxPro και η επιβεβαίωση των ειδικών προϊόντων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, σύμφωνα με όσα ακολουθούν.

### **3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 1%**

Για την επιβεβαίωση της ορθότητας του αποτελέσματος της PCR που έλαβε χώρα κατά την κλωνοποίηση με σύντηξη, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%, με χρήση των κάτωθι υλικών:

- ✓ Ρυθμιστικού διαλύματος TAE
- ✓ Tris base 24,2% v/w
- ✓ Ακετοξικό οξύ 5,71% w/w
- ✓ EDTA 0,05M, pH 8,6
- ✓ Ηλεκτρικό πεδίο έντασης 120V.

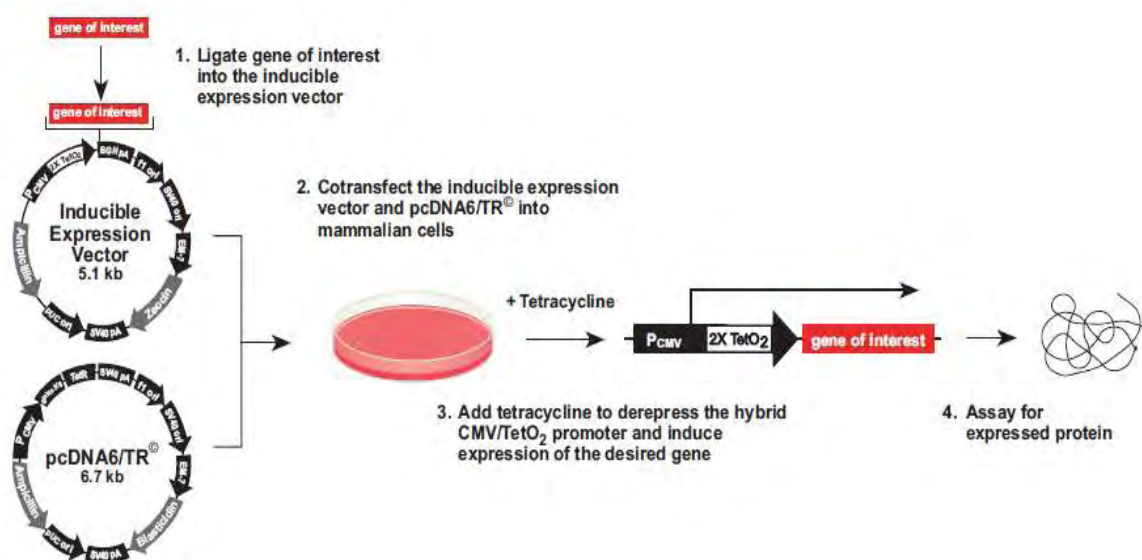
Μετά την ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε αφαίρεση των επιθυμητών ζωνών ηλεκτροφόρησης από την πηκτή αγαρόζης, προκειμένου το ενισχυμένο μετάλλαγμα(1-523) εντός του επαγωγίμου φορέα να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω χειρισμούς. Η διαδικασία του Gel Extraction δεν παρατίθεται στην παρούσα εργασία.

Ακολούθησε Μετασχηματισμός κυττάρων E.coli XL1BLUE με 5 μl του προϊόντος της πιο πάνω PCR και εφαρμόστηκαν τα παρακάτω βήματα:

- ✓ 4° C, 30 min
- ✓ Heat Shock, 42° C , 45 min
- ✓ 4° C, 1-2 min
- ✓ Προσθήκη 900 μl LB BROTH → μεταφορά σε epp. 1,5 mL
- ✓ Επώαση, 37° C και ανάδευση, (vortex)
- ✓ Επίστρωση 50 μl και 150 μl σε LB GEL plates
- ✓ Επώαση, 37° C, από 18h – overnight

### 3.3 T-REx™ System

Έπειτα από την κλωνοποίηση του επιθυμητού γονιδίου στον επαγωγίμο φορέα pcDNA™4, ακολούθησε απολίνωση του προϊόντος κλωνοποίησης με ένα κατάλληλο ρυθμιστικό φορέα. Υπενθυμίζεται ότι το επιθυμητό γονίδιο για την παρούσα εργασία ήταν το μεταλλάγμα PARN(1-523) και ο ρυθμιστικός φορέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pcDNA™6/TR. Ο συνδυασμός μεταλλάγματος PARN(1-523) με τον pcDNA™6/TR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με πρωτόκολλο του T-REx™ System το οποίο περιγράφεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικ 16.: Διαμόλυνση καρκινικών κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο T-REX System

Υστερα από τον συνδυασμό του μεταλλάγματος (1-523) - pcDNA™4 με τον ρυθμιστικό φορέα pcDNA™6, το πλασμίδιο που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε για την διαμόλυνση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων της σειράς NCI-H520. Ειδικότερα, τα κύτταρα αυτά υπέστησαν χειρισμούς με ανάλογα τετρακυκλίνης, (δοξυκυκλίνη), προκειμένου να κατασταλεί ο υβριδικός υποκινητής CMV/TetO<sub>2</sub> του επαγωγίμου φορέα, ώστε να κινητοποιηθεί η μεταγραφή του μεταλλάγματος (1-523) στα κύτταρα.

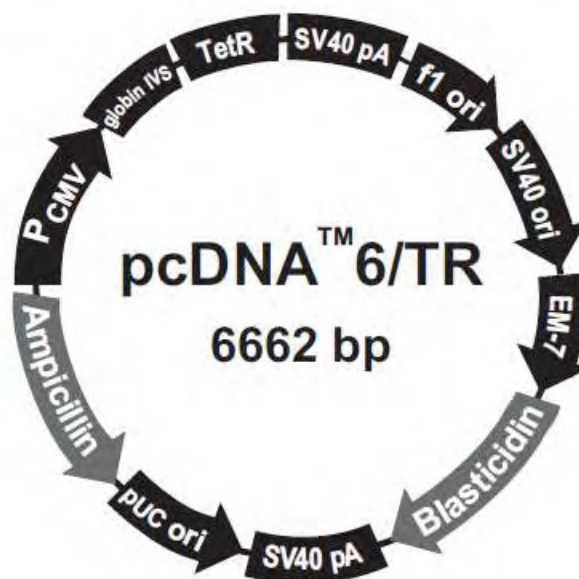
Ως θετικός φορέας ελέγχου που περιέχει το γονίδιο *lacZ* μπορεί να χρησιμοποιηθεί, προαιρετικά κατά την διαμόλυνση των κυττάρων, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι το σύστημα λειτουργεί στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά.

Τέλος, σταθερές κυτταρικές σειρές που εκφράζουν τον αναστολέα της τετρακυκλίνης από τον ρυθμιστικό φορέα pcDNA™6 δύνανται να

χρησιμοποιηθούν ως ξενιστές για την επαγωγίμη έκφραση των προϊόντων κλωνοποίησης.

### **pcDNA 6**

Ο pcDNA6 είναι ένας φορέας 6.7 kb που σχεδιάστηκε για χρήση με το T-REx™ System. Αυτός ο φορέας εκφράζει υψηλά επίπεδα του αναστολέα τετρακυκλίνης, (Tet<sup>r</sup>), υπό τον έλεγχο του υποκινητή του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού, CMV. Σταθερά και παροδικά υψηλά επίπεδα έκφρασης του αναστολέα τετρακυκλίνης μπορούν να επιτευχθούν στα περισσότερα κύτταρα των θηλαστικών. Η ρύθμιση της έκφρασης του επιθυμητού γονιδίου, μέσω τετρακυκλίνης, μπορεί να ελεγχθεί αλλάζοντας το πρότυπο της επαγόμενης έκφρασης του πλασμιδίου εντός κυττάρων – ξενιστών που εκφράζουν τον αναστολέα τη τετρακυκλίνης, (Invitrogen, pcDNA6/TR, A regulatory vector designed for use with the T-REx system).



Εικ.17: pcDNA6/TR, A ρυθμιστικό σύστημα, σχεδιασμένο για χρήση T-REx system, Invitrogen

Υπογραμμίζεται ότι, η χρήση των δύο φορέων, του επαγωγίμου pcDNA4 και του ρυθμιστικού pcDNA6, επιλέχθηκε με βάση το σκεπτικό ότι ο φορέας pcDNA6 εκφράζει υψηλά επίπεδα του αναστολέα τετρακυκλίνης και των αναλόγων της. Από την άλλη, ο pcDNA4 μπορεί να επάγει την έκφραση του γονιδίου επιλογής, εν προκειμένω του μεταλλάγματος PARN(1-523), σε περιβάλλον με τετρακυκλίνη ή ανάλογα αυτής. Κατά συνέπεια, η έκφραση του επιλεγμένου γονιδίου μπορεί να γίνει ελεγχόμενα, μεταβάλλοντας το πρότυπο

της επαγωγίμης επίδρασης του φορέα pcDNA4 εντός κυττάρων-ξενιστών όπου εκφράζεται ο αναστολέας τετρακυκλινών μέσα από τον pcDNA6.

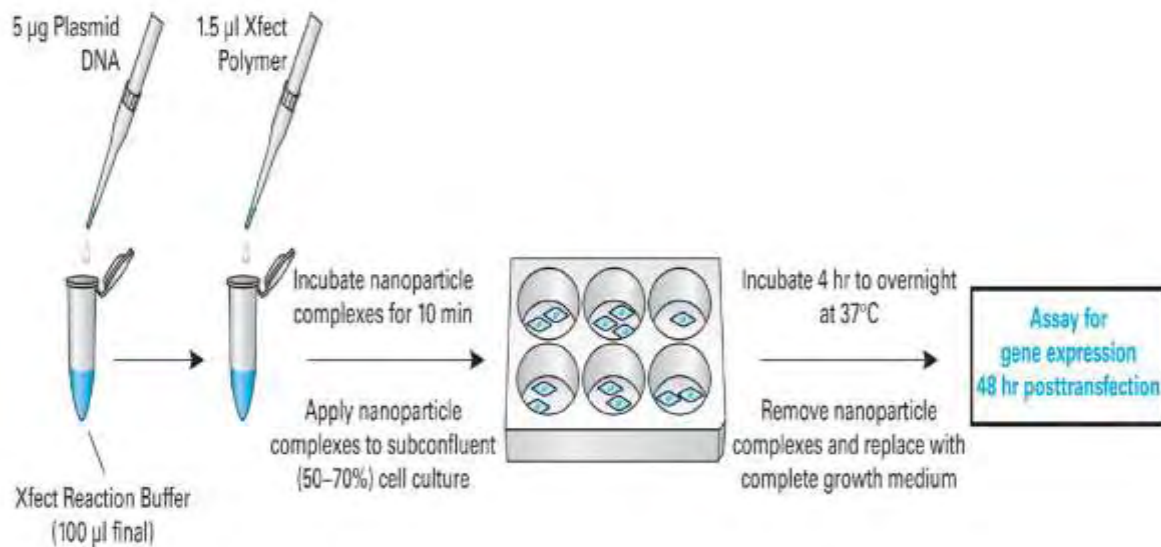
### 3.4 Xfect™ Transfection Reagent Protocol

Η διαμόλυνση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων NCI-H520 πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο Xfect™ Transfection με χρήση 12 -well plates, σύμφωνα με την βαθμίδωση που υπαγορεύεται στον κάτωθι πίνακα:

Table I. Scaling Xfect Transfections Up or Down					
Culture Vessel	Surface Area/ Well	Growth Medium	DNA	Final Dilution Volume (in Xfect Reaction Buffer)	Xfect Polymer Volume
24-well plate	2 cm <sup>2</sup>	250 µl	0.5–1 µg	25 µl	Always use 0.3 µl of Xfect Polymer for every 1 µg of plasmid
12-well plate	4 cm <sup>2</sup>	500 µl	1–2.5 µg	50 µl	
6-well plate	10 cm <sup>2</sup>	1 ml	2.5–7.5 µg	100 µl	
10 cm dish	60 cm <sup>2</sup>	10 ml	20–40 µg	600 µl	

*Εικ. 18: Πίνακας πρωτοκόλλου Xfect Transfection που ορίζει τις ποσότητες αντιδραστηρίων και δείγματος ανάλογα με τα τρυβλία καλλιέργειας που θα χρησιμοποιηθούν. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 12 - well plates.*

Στην εικόνα 19 που ακολουθεί φαίνεται η διαδικασία που ακολουθείται κατά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου Xfect™ Transfection:



Εικ.19: Πρωτόκολλο Xfect™ Transfection

Ειδικότερα, για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας τα υλικά και οι ποσότητες αυτών που χρησιμοποιήθηκαν για το μετάλλαγμα PARN(1-523), φαίνονται παρακάτω:

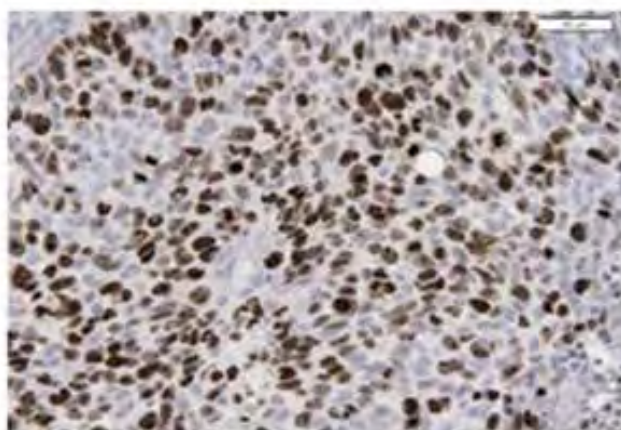
12 well plate of PARN(1-523)	
Reagent	Volume
Θρεπτικό υλικό	1 mL
Αιώρημα καρκινικών κυττάρων NCI-H520	0,5 mL
pcDNA 6	4 µL
pcDNA 4	0,8 µL
Reaction Buffer	45,2 µL
X-Fect poly	0,75 µL

}Total Volume = 50

Εικ. 20: Αντιδραστήρια και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για τα υπερεκφράσεις.

### **3.5 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ NCI-H520**

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά NCI-H520. Πρόκειται για ανθρώπινη κυτταρική σειρά πλακώδη κύτταρα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, NSCLC, Non-Small Cell Lung Cancer . Χαρακτηριστικό αυτής της κυτταρικής σειράς είναι ότι τα εν λόγω κύτταρα έχουν την ικανότητα να δημιουργούν μονόστοιβο επιθήλιο επί του υποστρώματος ανάπτυξης, όπως φαίνεται και στην κάτωθι εικόνα:



*Εικ.21: NCI-H520 . X1*

### **ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

#### **Απόψυξη κυττάρων**

- 1) Τα φιαλίδια (cryovials) που περιέχουν τα κύτταρα από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  (ή υγρό άζωτο) όπου ήταν αποθηκευμένα, εμβαπτίζονται σε υδατόλουτρο ( $37^{\circ}\text{C}$ ) με ήπια ανάδευση.
- 2) Αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα, γίνεται καθαρισμός του φιαλιδίου με αιθανόλη (70%) εξωτερικά.
- 3) Ακολουθεί μεταφορά του αιωρήματος των κυττάρων σε φάλλον 15ml με επιπλέον προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού μέχρι τα 10ml.
- 4) Φυγοκέντρηση του αιωρήματος στις 1500rpm για 2min.
- 5) Μεταφορά στον απαγωγό και απομάκρυνση του υπερκειμένου, προκειμένου να αποβάλουμε το DMSO που περιέχεται στο αρχικό κρυοπροστατευτικό θρεπτικό υλικό των κυττάρων και δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξή τους.



- 6) Προσθήκη 10 ml θρεπτικού RPMI (10% FBS) και μεταφορά σε T25 flask.
- 7) Επώαση των κυττάρων στους 37°C μέχρι να προσκολληθούν στο ταπήτιο της φλάσκας.
- 8) Αφού η πληρότητα των κυττάρων φτάσει το 90-100%, μεταφέρουμε τα κύτταρα μετά από τρυψινοποίηση σε T75 flask.

### **Ανακαλλιέργεια μονόστοιβης 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) «Ξεπλένουμε» τα κύτταρα με διάλυμα PBS 1x (\*).
- 4) Προσθέτουμε διάλυμα τρυψίνης-EDTA 0.05% (0.5ml για φιάλη 75cm<sup>2</sup>).
- 5) Ανακινούμε τη φιάλη έτσι ώστε το διάλυμα τρυψίνης να καλύψει όλο το ταπήτιο.
- 6) Μεταφέρουμε τα κύτταρα στον επωαστήρα (κλίβανος 37°C) για περίπου 1-2min. Παρατηρούμε το σχήμα των κυττάρων στο μικροσκόπιο, και ελέγχουμε αν έχουν αποκτήσει σφαιρική μορφή.
- 7) Προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού RPMI, 1% Antibiotic-antimycotic (10ml θρεπτικού για φιάλη 75cm<sup>2</sup>).
- 8) Επαναιωρούμε τα κύτταρα και τα διασπείρουμε ομοιόμορφα με πιπέτα (των 10ml).
- 9) Στο σημείο αυτό μπορούμε να χωρίσουμε τα κύτταρα σε δύο ή περισσότερες φλάσκες ή απλά να απομακρύνουμε μέρος των κυττάρων στην ήδη υπάρχουσα φιάσκα.
- 10) Κάθε φορά που γίνεται η τρυψινοποίηση, καταγράφεται ως πέρασμα (π.χ. πέρασμα p25-passage 25).

(\* ) Σημείωση: το PBS διάλυμα που χρησιμοποιείται στον χειρισμό των κυττάρων, είναι φιλτραρισμένο και αποστειρωμένο.

## Συλλογή των κυττάρων

- 1)\* Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων με παγωμένο και αποστειρωμένο PBS 1x (3 φορές).
- 2)\* Τρυψινοποίηση των κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται παραπάνω.
- 3)\* Ομογενοποίηση των αποκολλημένων κυττάρων με πιπετάρισμα σε PBS 1x (ή RPMI), και μεταφορά τους σε tubes 1,5ml.
- 4) Φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5 min στις 3000rpm στους 4°C.
- 5) Απομάκρυνση του υπερκείμενου προσεκτικά και φύλαξη του ιζήματος στους -80 °C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν πειραματικά.

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

## Ψύξη των κυττάρων

- 1) Τρυψινοποίηση κυττάρων.
- 2) Προσθήκη θρεπτικού υλικού (10ml για T75 flask).
- 3) Μεταφορά αιωρήματος σε φάλλον 15ml.
- 4) Φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 3min στους 6°C.
- 5) Μεταφορά στον απαγωγό και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- 6) Επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 1800μl RPMI (10%FBS).
- 7) Προσθήκη 200μl κρυοπροστατευτικού DMSO (τελικό κρυοπροστατευτικό διάλυμα 20% DMSO).
- 8) Μεταφορά σε cryovial.
- 9) Αργή ψύξη μέσα σε cryobox (1°C/1 min) στους -80°C.
- 10) Αποθήκευση στους -80°C ή σε υγρό άζωτο.






## Υλικά-Αντιδραστήρια

- |   |  |
|---|--|
| ❖ Θρεπτικό υλικό: RPMI, 10% FBS, 1% Antibiotic-antimycotic  | ❖ Antibiotic-antimycotic (Gibco)           |
| ❖ PBS 1x (Phosphate Buffer Salts): 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.47mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | ❖ DMSO (Sigma)                             |
| ❖ RPMI (Biosera)  | ❖ Τρυψίνη (Biosera)                        |
| ❖ FBS (Biosera)   | ❖ EDTA (Merck)                             |
|   | ❖ NaCl (Merck)                             |
|   | ❖ KCl (Merck)                              |
|   | ❖ Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck) |
|   | ❖ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)  |
|   | ❖ Αιθανόλη (Sigma)                         |









### 3.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA και ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Έπειτα από την διαμόλυνση και ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων NCI-H520 με το μετάλλαγμα PARN(1-523), ακολούθησε λήψη κυτταρικού ελαιωρήματος από το οποίο απομονώθηκαν RNA και Πρωτείνες σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που παρατίθενται παρακάτω:

#### NUCLEOSPIN TRIPREP : DNA και RNA EXTRACTON

1	Homogenize sample		Up to 30 mg
2	Lyse sample		350 $\mu$ L RP1 3.5 $\mu$ L $\beta$ -mercaptoethanol (or comparable reducing agent)
3	Filtrate lysate		1 min, 11,000 x g
4	Adjust DNA and RNA binding conditions		350 $\mu$ L ethanol (70%)
5	Bind DNA and RNA		Load sample 30 s, 11,000 x g

DNA and RNA Purification (both bound to the silica membrane)		Protein Purification (protein in the column flow-through)	
6	Wash silica membrane		1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> wash each: 500 $\mu$ L DNA Wash 1 min, 11,000 x g
7	Dry membrane		RT, 3 min (with open lid)
8	Elute DNA		100 $\mu$ L DNA Elute Incubate 1 min 1 min, 11,000 x g
9	Digest residual DNA		95 $\mu$ L DNase reaction mixture RT, 15 min
10	Wash and dry silica membrane		1 <sup>st</sup> wash 200 $\mu$ L RA2 2 <sup>nd</sup> wash 600 $\mu$ L RA3 30 s, 11,000 x g 3 <sup>rd</sup> wash 250 $\mu$ L RA3 2 min, 11,000 x g
11	Elute highly pure RNA		60 $\mu$ L H <sub>2</sub> O (RNase-free) 1 min, 11,000 x g
12	Precipitate protein		10–700 $\mu$ L flow-through 1 vol PP RT, 10 min 5 min, 11,000 x g
13	Wash protein pellet		500 $\mu$ L ethanol (50%) 1 min, 11,000 x g
14	Dry protein pellet		RT, 5–10 min
15	Prepare protein sample		20–100 $\mu$ L PSB-TCEP 3 min, 95–98 °C 1 min, 11,000 x g

Εικ.22: Πρωτόκολλα απομόνωσης RNA και Πρωτεϊνών από τις κυτταρικές καλλιέργειες υπερέκφρασης

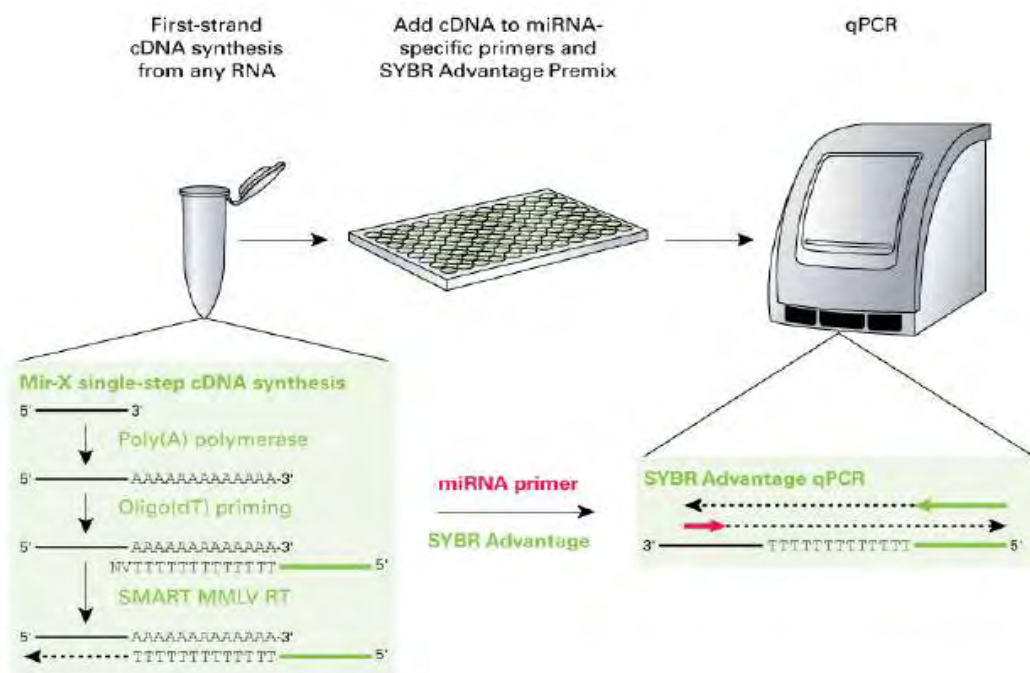
Στο παραπάνω σχέδιο απεικονίζονται τα στάδια του πρωτοκόλου που ακολουθήθηκαν κατά την απομόνωση RNA και πρωτεϊνών από το αιώρημα των καρκινικών κυττάρων NCI-H520, που επωάστηκαν με το μετάλλαγμα PARN(1-523).

### **3.7 REAL TIME PCR**

Μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού γονιδιακής έκφρασης είναι η Real Time PCR . Πρόκειται για μία ιδιαίτερα ευαίσθητη και εξειδικευμένη τεχνική που μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και ένα αντίγραφο ενός μεταγράφου, καθώς και διαφορετικής έντασης έκφραση μεταξύ δύο δειγμάτων σε ποσοστό έως και 23%. 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.

Η Real Time PCR είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί 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.

Στην παρούσα εργασία διεξήχθη Real Time PCR δύο βημάτων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Clontech Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis and SYBR® qRT-PCR. Η qRT-PCR χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη του απομονωθέντος RNA από τα διαμολυσμένα με το μετάλλαγμα PARN(1-523), καρκινικά κύτταρα NCI-H520, προκειμένου να ελεγχθούν τα επίπεδα των miR-29 και miR-1207 σε συνθήκες υπερέκφρασης του μεταλλάγματος αυτού. Έτσι, στο πρώτο στάδιο έλαβε χώρα η μετατροπή του RNA σε cDNA και ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των επιθυμητών μορίων, miR-29 και miR-1207, με qRT-PCR. Η όλη διαδικασία two-step RT-PCR, βάσει του πρωτοκόλλου της Clontech Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis απεικονίζεται στην εικόνα που ακολουθεί:



Εικ. 23: Η λογική μιας PCR για μελέτη miRNAs

Στους πίνακες που ακολουθούν παρατίθενται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση του cDNA και για την qRT-PCR:

Reagent	Volume ( μl)
mRQBuffer (2x)	5
RNA sample (0,25 - 8 μg)	3,75
mRQEnzyme	1,25
Total volume	10

Εικ. 24: Αντιδραστήρια σύνθεσης cDNA

Reagent	Volume (μl)
K -SYBR mix*	10
Forward primer	6,4
Reverse primer	6,4
ROX dye low**	12,8
ddH <sub>2</sub> O	230

Εικ. 25: Ενίσχυση mRNA PARN

Reagent	Volume (μl)
K -SYBR mix*	340
Forward primer	6,8
Reverse primer	6,8
ROX dye low**	13,6
ddH <sub>2</sub> O	244,8

Εικ. 26: Ενίσχυση β - ακτίνης

\*: **K-SYBR mix** μίγμα πολυ(A) πολυμεράσης, dNTPs, ιόντων Mg<sup>2+</sup>, και χρωστικής παρακολούθησης SYBR Green,

\*\* : **ROX dye** η χρωστική αναφοράς, η οποία μειώνει το θόρυβο του μηχανήματος (θερμοκυκλοποιητή).

Το θερμικό προφίλ που εφαρμόστηκε κατά την PCR παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα:

Type of reaction	Cycling conditions
Denaturation (1 cycle)	95° C , 3 min
Amplification (x40)	95° C , 3 sec
	60° C, 30 sec
	72° C, 11sec
	95° C, 1 min
Dissociation	55o C, 30 sec
	95° C , 30 sec
(1 cycle)	25o C, 3 min

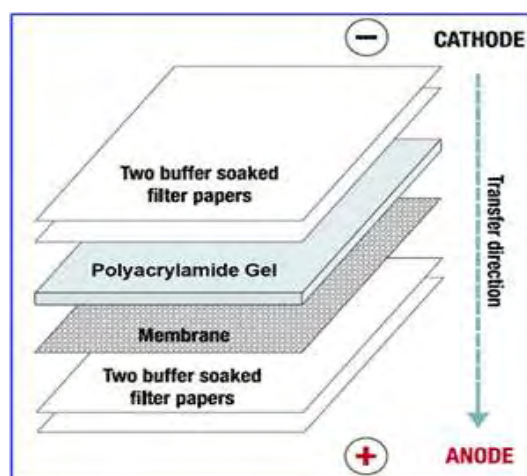
Εικ. 27: Θερμικό προφίλ ενίσχυσης mRNAs PARN

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του προγράμματος MxPro.

### 3.7 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ WESTERN BLOTTING

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των πρωτεϊνών των υπό ανάλυση δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση έγινε με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στα 240V και οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με βάση το μοριακό τους βάρος. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF, διαδικασία γνωστή ως Western blotting.

Η αρχή της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου στην PVDF μεμβράνη στηρίζεται στο γεγονός ότι τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-SDS, που είναι αρνητικά φορτισμένα, με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου μετακινούνται προς την άνοδο, εξέρχονται από την πηκτή και καθιλώνονται στη μεμβράνη λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη χαρτιών Whatman, ανάμεσα από τα οποία τοποθετήθηκαν, η μεμβράνη προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και η πηκτή στον αρνητικό πόλο. Η σχετική διάταξη απεικονίζεται στην ακόλουθη εικόνα:



Εικ.28 : Διάταξη μεμβράνης PVDF για ανοσοαποτύπωση

Για την διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης, εκτός της μεμβράνης PVDF με την διάταξη χαρτιών Whatman, όπως απεικονίζεται στην πιο πάνω εικόνα, χρησιμοποιήθηκαν και τα εξής υλικά:

- Gel ακρυλαμιδίου 8%
- SDS 10% αποστειρωμένο
- Running/Transfer Buffer- Διάλυμα Μεταφοράς
- Blocking Buffer – Διάλυμα Δέσμησης

- Wash Buffer – Διάλυμα Έκπλυσης
- PBS
- Loading Buffer – Διάλυμα Φόρτωσης

Η ποσοστική και ποιοτική σύσταση των ειδικών διαλυμάτων για την ανοσοαποτύπωση συνοψίζονται στους παρακάτω πίνακες:

<b>RUNNING / TRANSFER BUFFER, (500 mL)</b>	
Tris	25 mM
Glykine	192 mM
SDS	0,1%
ddH <sub>2</sub> O	500 mL

*Εικ. 29: Διάλυμα Μεταφοράς*

<b>BLOCKING BUFFER, (150 mL)</b>	
Tween 20	0,1%, (150 μL)
Γάλα Σκόνη	7,5 g
PBS	Ως 150 mL

*Εικ. 30: Διάλυμα Δέσμευσης*

<b>WASH BUFFER, (600 mL)</b>	
Tween 20	0,1%, (600 μL)
PBS	Ως 600 mL

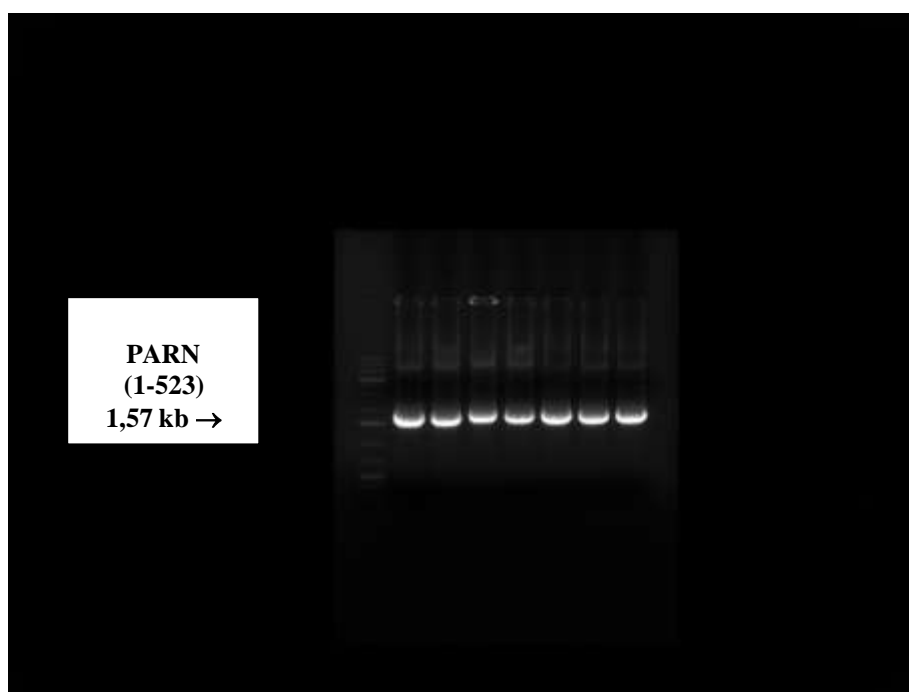
*Εικ. 31: Διάλυμα Έκπλυσης*



## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 1%

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το μετάλλαγμα της εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης PARN, το PARN(1-523), το οποίο και υπερεκφράστηκε εντός ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων NCI-H520. Η ορθότητα σχηματισμού του εν λόγω μεταλλάγματος, καθώς και η ψοτοποίηση του πρωτεϊνικού προϊόντος αυτού στα συγκεκριμένα κύτταρα ελέγχθηκαν με Ηλεκτροφόρηση και Ανοσοαποτύπωση, (Western Blotting). Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 1% έδωσε την ακόλουθη εικόνα:

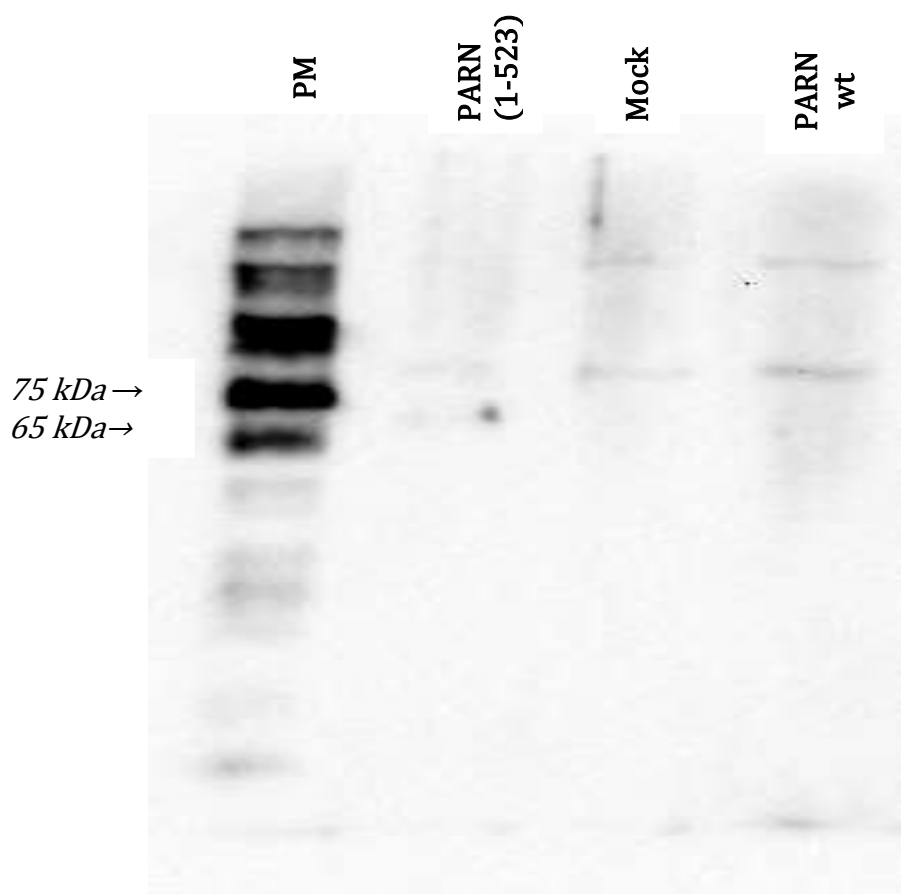


*Εικ. 32: Αποτέλεσμα Ηλεκτροφόρησης κλωνοποιημένου μεταλλάγματος PARN(1-523) σε pcDNA4. Η μοναδική ζώνη που παρατηρείται ανήκει στο μετάλλαγμα PARN(1-523) και αντιστοιχεί στα 1,57 kb.*

Η μοναδική ζώνη που προέκυψε από την ηλεκτροφόρηση αυτή, ανήκει στα 1,57 kb, τιμή που αντιπροσωπεύει το μετάλλαγμα PARN(1-523). Έτσι, αποδείχθηκε ότι η κλωνοποίηση πέτυχε και οι επαγώγιμοι φορείς pcDNA4 περιείχαν, στην πραγματικότητα, το μετάλλαγμα αυτό.

## 4.2 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ, (WESTERN BLOTTING)

Επιπλέον, μετά από τις υπερεκφράσεις του μεταλλάγματος PARN(1-523) στα καρκινικά κύτταρα και την απομόνωση RNA και πρωτεϊνών από αυτά, η παρουσία του μεταλλάγματος PARN(1-523) στα κύτταρα πιστοποιήθηκε, σε επίπεδο πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωση, Western Blotting. Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε ειδικό πρώτο αντίσωμα της PARN και γενικό δεύτερο αντίσωμα anti-rabbit IgG. Τα αποτελέσματα του στυπώματος φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:

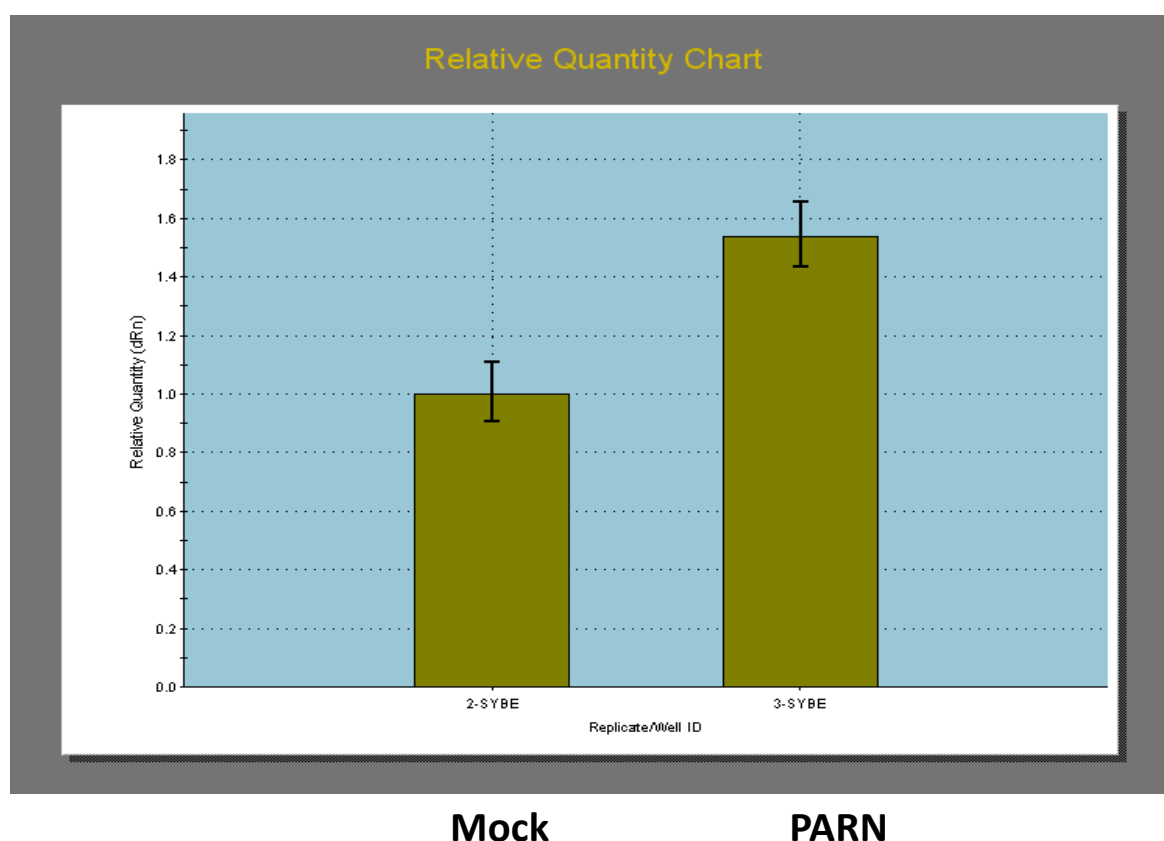


Εικ. 33: Western Blotting για το μετάλλαγμα PARN(1-523). η PARN wt εμφανίστηκε σε ζώνη περίπου στα 75 kDa και το μετάλλαγμα PARN(1-523) σε μικρότερη ζώνη, περίπου στα 65 kDa. Exposure time=10min, Anti-PARN Ab→ 1:500, 2<sup>nd</sup> Ab → ~ 1:50000 .

Το στύπωμα επιβεβαίωσε την παρουσία της φυσικής μορφής της PARN (wild-type PARN και στο εξής PARN wt) και του μεταλλάγματος της PARN(1-523) κατά τις υπερεκφράσεις στα καρκινικά κύτταρα NCI-H520 που χρησιμοποιήθηκαν, σε επίπεδο πρωτεΐνης.

### 4.3 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΟΣ PARN(1-523) ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ NCI-H520

Κατά την υπερέκφραση του μεταλλάγματος PARN(1-523) στα καρκινικά κύτταρα NCI-H520 που επιμολύνθηκαν με τα κατάλληλα τροποποιημένα πλασμίδια παρατηρήθηκε ότι : τα επίπεδα των mRNAs PARN(1-523) των τροποποιημένων κυττάρων ήταν αυξημένο σε σχέση με το αντίστοιχο των mock κυττάρων, όπως απεικονίζεται στο παρακάτω διάγραμμα:

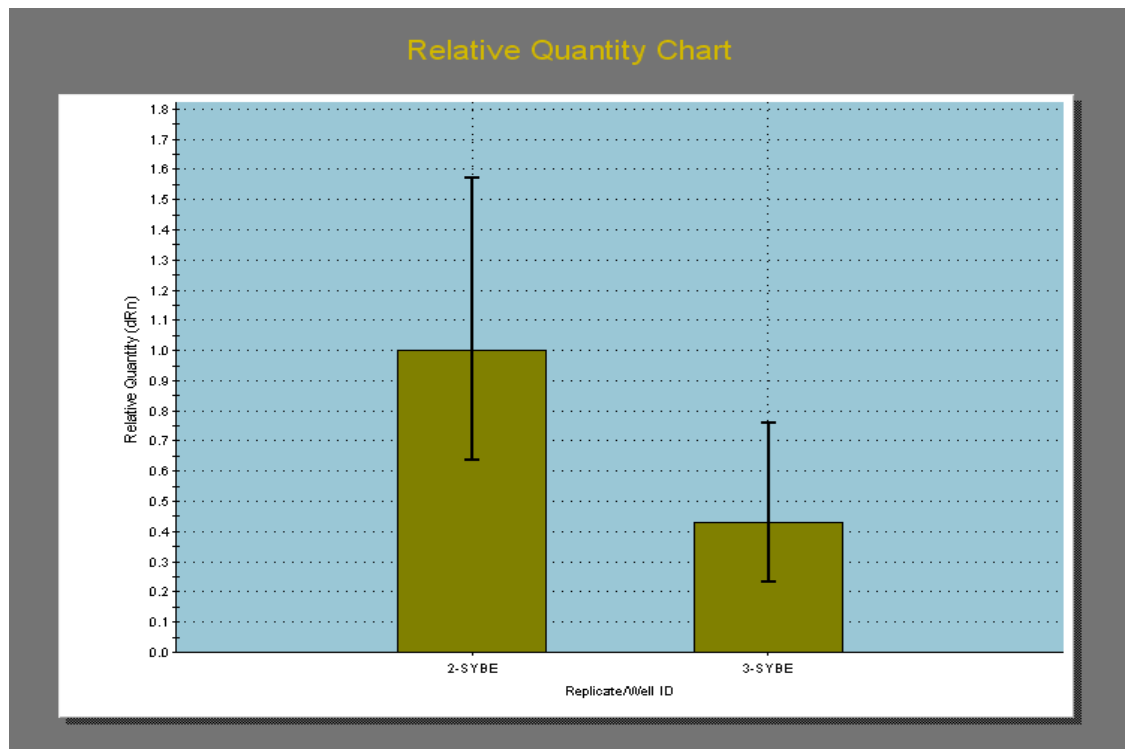


Εικ. 34: PARN overexpression- mRNA levels

Στο σημείο αυτό, υπενθυμίζεται ότι τα κύτταρα που αντιπροσώπευαν το Mock δεν περιείχαν το μετάλλαγμα της PARN και είχε πραγματοποιηθεί ένθεση κενών φορέων, pcDNA4 και pcDNA6, σε αυτά. Κατά συνέπεια, η PARN που εκφράζεται σε αυτά τα κύτταρα, θεωρητικά θα είναι η PARN wt. Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, επετεύχθη υπερέκφραση της PARN(1-523) στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα Mock.

#### 4.4 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ PARN wt και pri-miR-1207

Στο κάτωθι διάγραμμα απεικονίζονται τα επίπεδα του pri - miR-1207 σε συνθήκες υπερέκφρασης της PARN wt:



**Mock  
wtPARN**

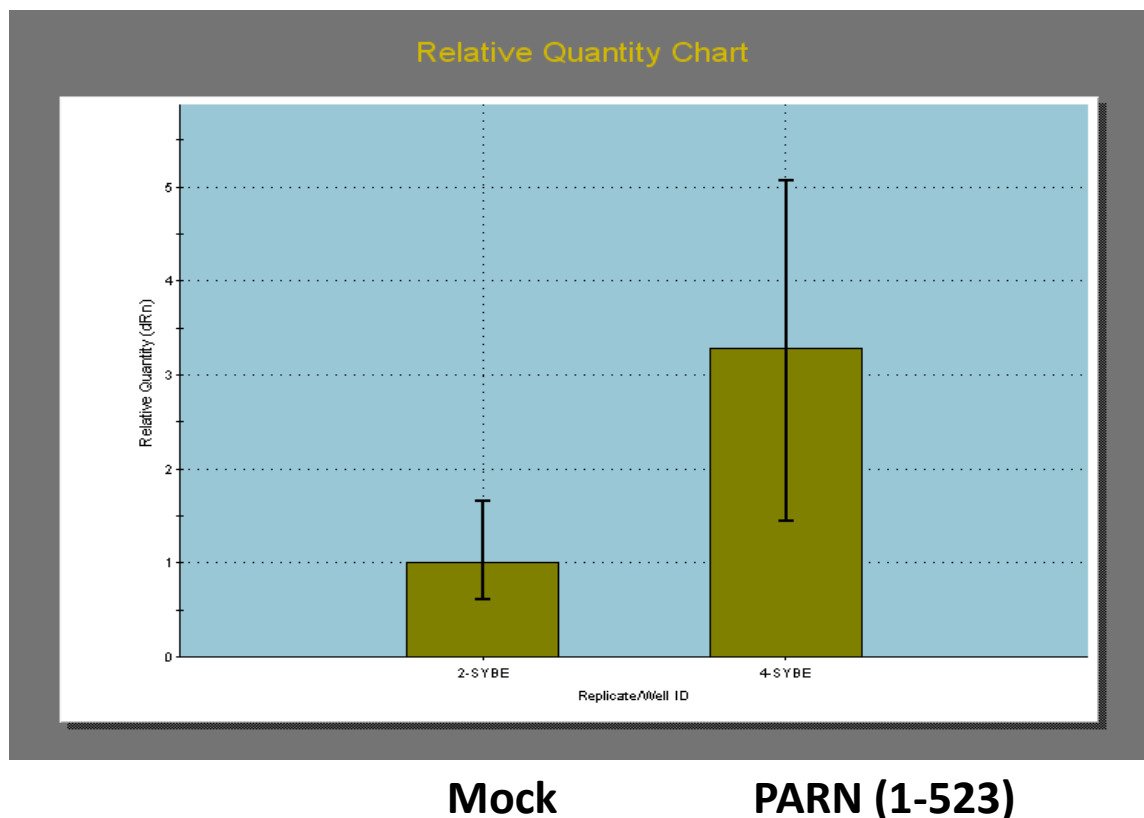
*Εικ. 35: Pri-miR-1207 levels upon PARN overexpression*

Σύμφωνα με το ανωτέρω διάγραμμα, κατά την υπερέκφραση της PARN wt στα καρκινικά κύτταρα NCI-H520, τα επίπεδα των pri-miR-1207 σημείωσαν μείωση σε σχέση με κύτταρα NCI-H520 Mock.

Αυτό υποδηλώνει ότι η έκφραση της PARN wt συνδέεται με την βιοσύνθεση των microRNA1207. Και τούτο, γιατί υπερέκφραση της PARN wt οδήγησε σε μείωση των pri-miR-1207, που σημαίνει ότι η PARN wt συμμετέχει στην βιοσυνθετική πορεία των miR-1207, τα οποία και στοχεύει στο στάδιο των πρωταρχικών miR, δηλαδή των pri-miR-1207.

#### 4.5 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ PARN(1-523) και pri- miR-1207

Τα αποτελέσματα των επιπέδων των pri - miR-1207 κατά την υπερέκφραση του μεταλλάγματος της PARN(1-523) απεικονίζονται στο κάτωθι διάγραμμα:



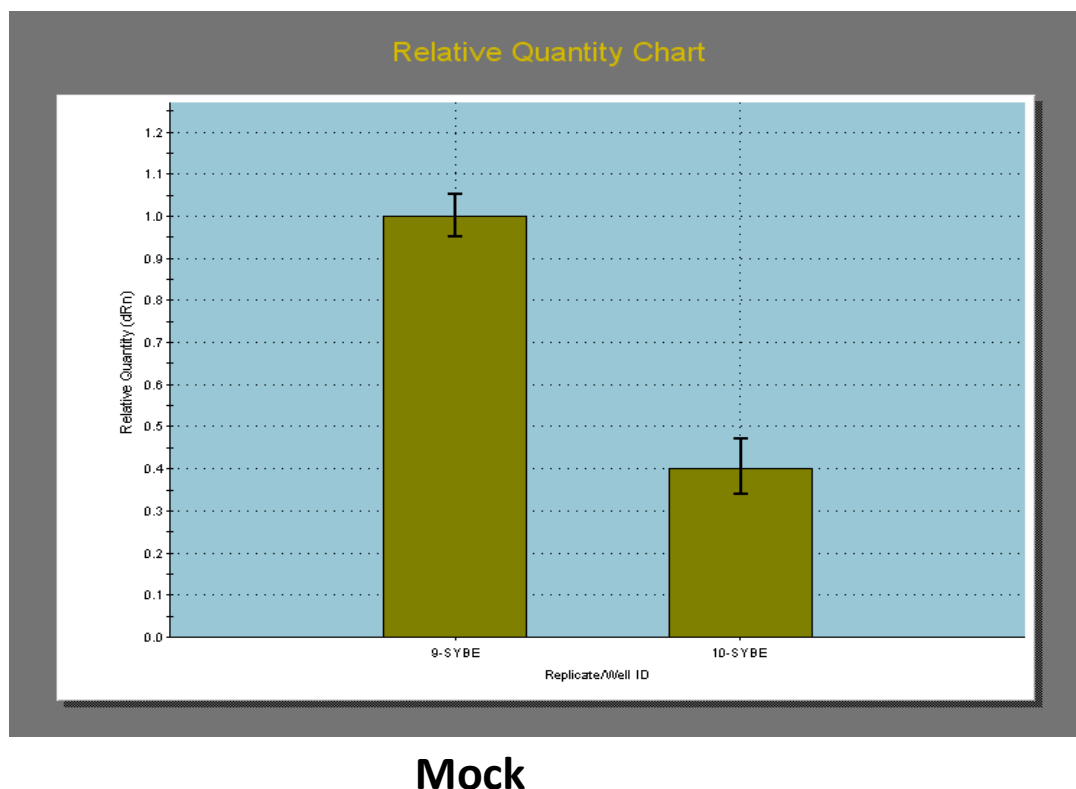
Εικ. 36: Pri-miR-1207 levels upon PARN (1-523)

Κατά την υπερέκφραση της μεταλλαγμένης PARN(1-523) στα καρκινικά κύτταρα NCI-H520 παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων των pri-miR-1207, συγκριτικά με τα καρκινικά κύτταρα NCI-H520 Mock.

Η αύξηση αυτή υποδηλώνει ότι τα pri-miR-1207 δεν επηρεάστηκαν από το μετάλλαγμα PARN(1-523). Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στην απουσία του καρβοξυτελικού άκρου από το μετάλλαγμα, πράγμα που ενδεχομένως να καθιστά το μετάλλαγμα PARN(1-523) ανίκανο να στοχεύσει τα pri-miR-1207. Έτσι τα επίπεδα αυτών των πρωταρχικών microRNAs αυξάνονται.

#### 4.6 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ PARN wt και pri-miR 29

Στο ακόλουθο διάγραμμα απεικονίζονται τα επίπεδα των pri - miR-29 σε συνθήκες υπερέκφρασης της PARN wt :



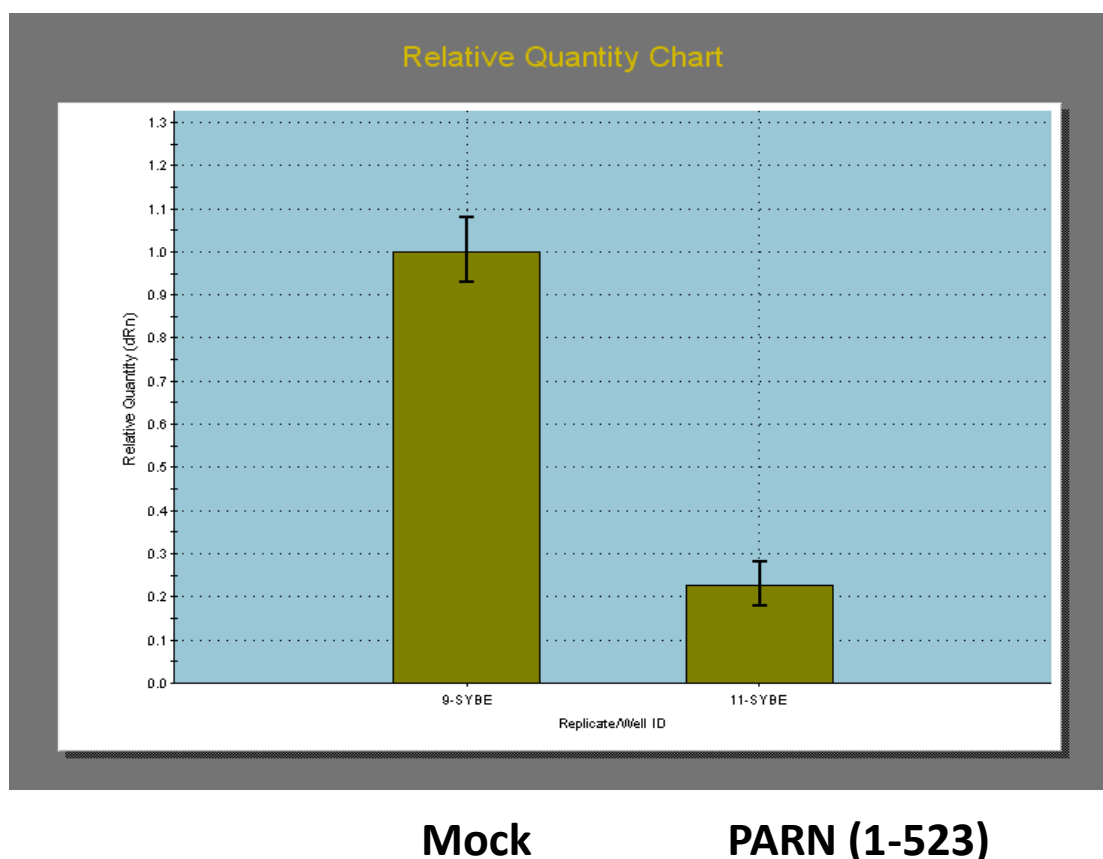
Εικ.37 : Pri-miR-29a levels upon PARN overexpression

Η υπερέκφραση της PARN wt στα καρκινικά κύτταρα NCI-H520 οδήγησε σε πτώση των επιπέδων των pri-miR-29, ως προς τα επίπεδά τους σε καρκινικά κύτταρα NCI-H520 Mock, όπως δείχνει το ανωτέρω διάγραμμα.

Αυτή η μείωση των επιπέδων των pri-miR-29 είναι δυνατόν να σχετίζεται με το γεγονός ότι η PARN wt στοχεύει στα pri-miR-29, συμμετέχοντας έτσι, στην βιοσύνθεση των miR-29. Για τον λόγο αυτό, τα επίπεδα των pri-miR-29 ελαττώθηκαν υπό συνθήκες υπερέκφρασης της PARN wt.

#### 4.7 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ PARN(1-523) και pri- miR-29

Η επίδραση της υπερέκφρασης του μεταλλάγματος της PARN(1-523) στα επίπεδα των pri-miR-29 φαίνεται στο διάγραμμα που ακολουθεί:



Εικ. 38: Pri-miR-29a levels upon PARN (1-523) overexpression

Στα καρκινικά κύτταρα NCI-H520, η υπερέκφραση του μεταλλάγματος PARN(1-523) προκάλεσε μείωση των επιπέδων των pri- miR-29, σε σχέση με τα καρκινικά κύτταρα NCI-H520 Mock.

Το μετάλλαγμα PARN(1-523), είναι πιθανόν ότι μπορεί να στοχεύσει τα pri- miR-29 και ως εκ τούτου ελαττώνονται τα επίπεδά τους. Έτσι, φαίνεται πως η απουσία της καρβοξυτελικής περιοχής που χαρακτηρίζει το μετάλλαγμα PARN(1-523), δεν επηρεάζει την στόχευση των pri- miR-29 και κατά συνέπεια, δεν παρεμποδίζεται η βιοσύνθεση των miR-29.

Ο παρακάτω πίνακας συνοψίζει τα αποτελέσματα της εργασίας:

Υπερέκφραση	Μεταβολή επιπέδων έκφρασης %	
	pri-miR-29a	pri-miR-1207
<i>PARN wt</i>	- 60	- 56
<i>PARN(1-523)</i>	- 78	+ 230



## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η βιογένεση των miRNAs ποικίλει, ακολουθώντας διαφορετικά μονοπάτια που αντανακλούν, τόσο την ρύθμιση των διεργασιών αυτών από διαφορετικούς μηχανισμούς, όσο και την εξελικτική τους ευελιξία.

Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι, η PARN δεν εμπλέκεται αποκλειστικά στη ρύθμιση της λειτουργίας των mRNAs, αλλά συμμετέχει και στην επεξεργασία μη-κωδικών μορίων RNA, καθώς σύμφωνα με τους Berndt et al. 2012, η απαδενυλίωσή τους από την PARN αποτελεί σημαντικό βήμα για τον έλεγχο της αφθονίας και της ωρίμανσής τους. Μέσα από αυτήν την σημαντική παρατήρηση η PARN αναδεικνύεται ως κάτι παραπάνω από μια απλή απαδενυλάση, η οποία εξελίχθηκε για τον έλεγχο των ευκαρυωτικών mRNA, και εν δυνάμει εμπλέκεται σε αρκετές κυτταρικές διεργασίες, όπως η βιογένεση μη-κωδικών μορίων RNA.

Τα miRNAs στοχεύουν την 3'-UTR περιοχή των mRNA-στόχων, προκαλώντας, έτσι είτε την αποικοδόμηση αυτών, είτε την καταστολή της μετάφρασής τους. Η αποικοδόμηση των mRNA-στόχων από τα miRNAs μπορεί να λάβει χώρα, τόσο μέσω του συμπλόκου γονιδιακής αποσιώπησης, RISC, όσο και μέσα από την εξειδικευμένη αποικοδόμηση των mRNA από τις απαδενυλάσες, μέσω βράχυνσης της πολυ(A) ουράς τους. Κατά συνέπεια, τα miRNAs συνιστούν σπουδαίους ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης σε κυτταρικό επίπεδο.

Επίσης, όπως έχει προαναφερθεί στην παρούσα εργασία, τα miRNAs συσχετίζονται με την καρκινογένεση και την ανάπτυξη καρκίνου γενικότερα. Σύμφωνα με βιβλιογραφία τα miRNAs εμφανίζουν ένα απορρυθμισμένο πρότυπο έκφρασης σε νεοπλασίες, ενώ ορισμένα από αυτά παρουσιάζουν ένα επαναλαμβανόμενο αποτύπωμα έκφρασης, που αφορά συγκεκριμένους τύπους καρκίνου (Calin et al. 2004a, Calin et al. 2004b και Lu et al. 2005). Μέσα από αυτά τα δεδομένα, ενισχύεται η υπόθεση και η μελέτη αυτής προς την κατεύθυνση παγίωσης των miRNAs ως χρήσιμων μοριακών δεικτών.

Επιπλέον, η αποκάλυψη άμεσης συσχέτισης ανάμεσα στις απαδενυλάσες και στις πρωτείνες που σχετίζονται με τα miRNAs (Kuzuoglu-Ozturk et al. 2012, Piao et al. 2010), καθώς και η εμπλοκή των απαδενυλασών σε οξείες λευχαιμίες (Maragozidis et al. 2012), ενισχύουν σε σημαντικό βαθμό τον πιθανό ρόλο των απαδενυλασών και των miRNAs στον καρκίνο.

## 5.1 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ PARN(1-523) και pri-miR-1207 και pri-miR-29

Το μετάλλαγμα της PARN που σχεδιάστηκε και μελετήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το PARN(1-523), από το οποίο απουσίαζε η καρβοξυτελική περιοχή, συμπεριλαμβανομένης της NLS domain.

Κατά την υπερέκφραση του μεταλλάγματος PARN(1-523) σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα NCI-H520 παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων των pri-miR-1207, συγκριτικά με τα MOCK NCI-H520 καρκινικά κύτταρα, από τα οποία απουσίαζε το μετάλλαγμα PARN(1-523). Τα επίπεδα των pri - miR-1207 ελαττώθηκαν στα MOCK NCI-H520 καρκινικά κύτταρα, προφανώς λόγω της παρουσίας της PARN wt σε αυτά.

Αντίθετα όμως με ό,τι συνέβη στα MOCK κύτταρα NCI-H520, στα κύτταρα NCI-H520 όπου υπερεκφράστηκε το μετάλλαγμα PARN(1-523), τα επίπεδα των pri - miR-1207 παρέμειναν υψηλά. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως το μετάλλαγμα PARN(1-523) δεν κατόρθωσε να στοχεύσει τα pri - miR-1207, πιθανόν εξαιτίας της απουσίας του καρβοξυτελικού άκρου. Κατά συνέπεια, το μετάλλαγμα PARN(1-523) αδυνατεί να στοχεύσει τα pri - miR-1207 και ως εκ τούτου τα υψηλά επίπεδα των pri - miR-1207 θα αντανakλούν σε υψηλά επίπεδα ώριμων μορίων miR-1207 στα καρκινικά κύτταρα που φέρουν το μετάλλαγμα PARN(1-523).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στο διάγραμμα της παραγράφου 4.7, (εικ. 38), κατά την υπερέκφραση του μεταλλάγματος PARN(1-523) στα καρκινικά κύτταρα NCI-H520 παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων των pri - miR-29 ως προς τα MOCK καρκινικά κύτταρα NCI-H520. Δεδομένου ότι τα MOCK καρκινικά κύτταρα NCI-H520 δεν φέρουν το μετάλλαγμα , σημειώθηκαν σε αυτά υψηλά επίπεδα των pri - miR-29 ως προς τα καρκινικά κύτταρα NCI-H520 που έφεραν το μετάλλαγμα PARN(1-523) υπερεκφρασμένο. Έτσι λοιπόν, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η υπερέκφραση του μεταλλάγματος PARN(1-523) στα καρκινικά κύτταρα NCI-H520 επηρέασε τον πληθυσμό των pri - miR-29, μειώνοντας τα επίπεδά τους. Κάτι τέτοιο σημαίνει πως η μεταλλαγμένη PARN(1-523) επέδρασε επί των pri - miR-29, όπως η PARN wt και οδήγησε σε ελάττωση των επιπέδων τους στα καρκινικά κύτταρα NCI-H520. Επίσης, είναι πιθανό μια άλλη απαδενυλάση να μεσολαβεί στην ωρίμανση του pri-miR-29, ανεξάρτητα από την παρουσία της PARN(1-523). Κατ' επέκταση, αυτή η δράση του μεταλλάγματος PARN(1-523) δείχνει πως, το συγκεκριμένο μπορεί να αλληλεπιδρά με τα pri - miR-29 εντός καρκινικών κυττάρων και να προκαλεί μείωση των επιπέδων τους .

Συνοψίζοντας, η υπερέκφραση του μεταλλάγματος PARN(1-523) στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα NCI-H520 δεν επηρέασε τον πληθυσμό των pri - miR-1207, διατηρώντας τον σε υψηλά επίπεδα, σε αντίθεση με τον πληθυσμό των pri - miR-29, του οποίου τα επίπεδα σημείωσαν πτώση. Ως εκ τούτου, το εν λόγω μετάλλαγμα είναι δυνατόν να αλληλεπιδράσει με τα pri - miR-29 και να τα

στοχεύσει, αλλά όχι και με τα pri - miR-1207. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην μετάλλαξη που οδηγεί σε απουσία του καρβοξυτελικού άκρου και της NLS περιοχής του PARN(1-523). Σε αυτή την κατεύθυνση, θα βοηθήσουν μελέτες της αλληλεπίδρασης της PARN(1-523) με τον παράγοντα πολυαδενυλίωσης CPSF6, που όπως προαναφέρθηκε, προκαταρκτικές μελέτες δείχνουν πως αλληλεπιδρά με την φυσικού τύπου PARN.

## **5.2 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ PARN wt και pri-miR-1207 και pri-miR-29**

Στα καρκινικά κύτταρα NCI-H520 πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση της PARN wt και παρατηρήθηκαν επιπτώσεις στα επίπεδα, τόσο των pri-miR-1207, όσο και των pri-miR-29.

Όπως φαίνεται από στο σχετικό διάγραμμα της παραγράφου 4.4, (εικ. 35), η υπερέκφραση της PARN wt συνοδεύτηκε από πτώση των επιπέδων των pri - miR-1207 στα καρκινικά κύτταρα NCI-H520 σε σχέση με τα MOCK NCI-H520 καρκινικά κύτταρα . Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει ότι η αυξημένη παρουσία της PARN wt στα καρκινικά κύτταρα, πιθανώς στοχεύει έντονα τα pri - miR-1207, παρεμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξή τους προς ώριμα miR-1207. Κατά συνέπεια, επιβεβαιώνεται η άμεση εμπλοκή της PARN wt στην βιοσύνθεση των microRNAs και εν προκειμένω του miR-1207, καταδεικνύοντας ότι η PARN wt παρεμποδίζει την δημιουργία miR-1207, επιδρώντας στα πρωταρχικά pri - miR-1207 και ελαττώνει τα επίπεδά τους στα καρκινικά κύτταρα.

Όπως φαίνεται και από το σχετικό διάγραμμα της παραγράφου 4.6, (εικ. 37), η υπερέκφραση της PARN wt οδήγησε σε πτώση των επιπέδων των pri - miR-29 στα καρκινικά κύτταρα NCI-H520 ως προς τα MOCK καρκινικά κύτταρα NCI-H520. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η PARN wt, όντας υπερεκφρασμένη στα καρκινικά κύτταρα, μείωσε τα pri - miR-29 σε αυτά, γεγονός που πιθανόν αντανακλά σε μείωση των ώριμων miR-29. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί ότι στην παρούσα εργασία δεν ελέγχθηκαν τα επίπεδα των miR-29, αλλά μόνο των πρωταρχικών miR-29, pri - miR-29.

Η μείωση των επιπέδων των pri - miR-1207, ύστερα από υπερέκφραση της PARN wt στα καρκινικά κύτταρα NCI-H520, αντικατοπτρίζει την, εύλογα πιθανή, μείωση των ώριμων μορίων miR-1207 στα ίδια κύτταρα. Σημειώνεται ότι στην παρούσα εργασία έγινε έλεγχος μόνο των επιπέδων των pri - miR-1207 και όχι των ώριμων μορίων miR-1207. Όμως, δεδομένου ότι η βιοσύνθεση pri - miRs αποτελεί ένα πρόδρομο στάδιο της διαδικασίας σύνθεσης των microRNAs, είναι λογικό πως μεταβολή των επιπέδων των pri - miRs θα αντανακλά σε ανάλογη μεταβολή των επιπέδων των ώριμων microRNAs.

Ομοίως, η μείωση των επιπέδων των pri - miR-29 υπό συνθήκες υπερέκφρασης της PARN wt δείχνει την εμπλοκή της PARN wt στην βιοσύνθεση

των microRNAs αυτών και προσδιορίζει αυτήν την εμπλοκή στο στάδιο των pri - miRs. Δεδομένου ότι, η PARN wt, ως απαδενυλάση, στοχεύει τα microRNAs, τα παρόντα αποτελέσματα ενισχύουν το δεδομένο αυτό. Συνεπώς, η PARN wt στοχεύει και αποικοδομεί τα pri - miR-29 κατά την υπερέκφρασή της σε καρκινικά κύτταρα, μειώνοντας τα επίπεδα αυτών και κατά συνέπεια και των ώριμων miR-29.

### 5.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας ενισχύουν μελέτες μας ότι η PARN wt εμπλέκεται στην βιοσύνθεση τόσο των miR-1207 όσο και των miR-29 στοχεύοντας στο στάδιο του πρωταρχικών miR αυτών, pri - miR-1207 και pri - miR-29, αντίστοιχα, (Kyritsis et al., in preparation).

Η υπόθεση συσχέτισης των δύο microRNAs, miR-29 και miR-1207, με την PARN wt ενισχύεται από τα ευρήματα προκαταρκτικών μελετών το εργαστηρίου, στις οποίες πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση της PARN wt σε καρκινικά κύτταρα NCI-H520 και εξετάστηκαν τα επίπεδα των miR-29 και miR-1207. Βάση αυτών των μελετών, η απουσία της PARN wt, μέσω αποσιώπησης αυτής, οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων των miR-29 και miR-1207. Το γεγονός αυτό ενισχύει το συμπέρασμα της παρούσας εργασίας, ότι η PARN wt, αλλά και το μετάλλαγμα αυτής, PARN(1-523), εμπλέκονται στην βιοσύνθεση των microRNAs και συγκεκριμένα, επιδρούν στα pri - miR-1207, μειώνοντας τα επίπεδα αυτών, καθώς και στα pri - miR-29, διατηρώντας τα επίπεδά τους αυξημένα. Δεδομένου ότι η δημιουργία των pri-miRs αποτελεί ενδιάμεσο στάδιο στην βιοσύνθεση των ώριμων miRs, πιστεύεται, σύμφωνα με την παρούσα εργασία, ότι οι διακυμάνσεις που παρατηρήθηκαν στους πληθυσμούς των pri - miR-1207 και των pri - miR-29 θα αντιστοιχούν σε αντίστοιχες διακυμάνσεις στους πληθυσμούς των ώριμων miR-1207 και miR-29.

Αυτές οι επιπτώσεις επί των pri - miR-1207 και των pri - miR-29 που παρατηρήθηκαν στην παρούσα εργασία, σχετίζονται με την βοήθεια της μεταλλαγμένης μορφής της PARN, την PARN(1-523), από την οποία λείπει το καρβοξυτελικό άκρο της μορφής του φυσικού τύπου, συμπεριλαμβανομένης και της περιοχής NLS. Τα παραπάνω αναδεικνύουν το ρόλο της PARN wt στην βιοσύνθεση των miR-29 και των miR-1207, πιθανόν στο στάδιο του πρώιμου miR, pri - miR-29 και pri - miR-1207, αντίστοιχα.

Τέλος, είναι σημαντικό να επισημανθεί πως προκαταρκτικά πειράματα από το εργαστήριό μας υπερέκφρασης των miR-29 και miR-1207 έδειξαν σημαντική μείωση των επιπέδων στην PARN (Kyritsis et al., in preparation). Συνεπώς, ενισχύεται η υπόθεση ότι τα δύο αυτά microRNAs, miR-29 και miR-1207, ρυθμίζουν τα επίπεδα της PARN. Με βάση αυτά τα ευρήματα, η

υπερέκφραση της PARN wt και η μείωση των επιπέδων των miR-1207 συμφωνούν με την υπόθεση ότι τα miR-1207 εξασκούν πιθανό αρνητικό έλεγχο στην PARN, αλλά και αντίστροφα, η PARN καθορίζει τα επίπεδα των miR-29a και miR-1207. Επομένως, το μετάλλαγμα PARN(1-523), που αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία θα μπορούσε να διαδραματίσει τον ρόλο ενός αρνητικού μάρτυρα, (μέσω υπερέκφρασής του σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα), επί των επιπέδων των pri - miR-1207 και pri - miR-29, καθώς οι αλληλεπιδράσεις του με άλλους παράγοντες, όπως ο CPSF6, αναμένεται να έχουν επηρεαστεί, προσδιορίζοντας τους άμεσους πειραματικές προοπτικές. Επιπλέον, οι προηγούμενες παρατηρήσεις ενισχύουν παλαιότερες υποθέσεις και ευρήματα σχετικά με την σύνδεση μεταξύ απαδενυλασών (και μάλιστα της PARN) με την καρκινογένεση, αλλά και με τα microRNAs, και υποστηρίζει νέες προοπτικές για αξιοποίηση των μορίων αυτών, ως μοριακών δεικτών, στην πρόγνωση ή/και διάγνωση του καρκίνου στον άνθρωπο.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ambros** et al. A uniform system for microRNA annotation *RNA* 9: 277-279 (2003).
- Balatsos** NA1, Nilsson P, Mazza C, Cusack S, Virtanen A. Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC). *J Biol Chem*. 2006 Feb 17;281(7):4517-22. Epub 2005 Nov 28.
- Balatsos** N.A.A, Maragozidis P, Anastasakis D., Stathopoulos C. Modulation of poly (A)- specific ribonuclease (PARN) : Current knowledge and prspectives *Current Medicinal Chemistry* 2012, 19
- Bartel DP.** MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 136: 215-233 (2009)
- Bass, B.L.** 2002. RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 817-846.
- Berndt H,** Harnisch C, Rammelt C, et al. (2012). Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA* 18:958–72.
- Cai X.,** C.H. Hagedorn, B.R. Cullen, Human MicroRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs, *RNA-Publ. RNA Soc.* 10 (2004) 1957–1966.
- Calin, G. A. et al.** Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 2999–3004 (2004)
- Calin, G. A. et al.** A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 353, 1793–1801 (2005).
- Carrington, J.C.,** and Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301:336–338 (2003).
- Christiane** Harnisch, Bodo Moritz, Christiane Rammelt, Claudia Temme, Elmar Wahle *The Enzymes*, Volume 31 2012 Elsevier Inc
- Clontech®** Laboratories, Inc. In-Fusion Cloning Kit User Manual
- Copeland PR,** Wormington M. The mechanism and regulation of deadenylation: identification and characterization of *Xenopus* PARN. *RNA* 2001;7:875–86.
- Fazli** Wahid,, Adeeb Shehzad, Taous Khan, You Young Kim *MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials* *Biochimica et Biophysica Acta* 1803 2010,1231–1243
- Filipowicz, W.** 2005. RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell* 122: 17-20.
- Friedman, R.C.,** K.K. Farh, C.B. Burge and D.P. Bartel. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19: 92-105
- Giraldez, A.J.,** Y. Mishima, J. Rihel, R.J. Grocock, S. Van Dongen, K. Inoue, A.J. Enright and A.F. Schier. 2006. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312: 75-79.
- Goldstrohm AC,** Wickens M. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:337–44.
- Grimson, A.,** K.K. Farh, W.K. Johnston, P. Garrett-Engele, L.P. Lim and D.P. Bartel. 2007. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* 27: 91-105.
- Grishok, A.,** A.E. Pasquinelli, D. Conte, N. Li, S. Parrish, I. Ha, D.L. Baillie, A. Fire, G. Ruvkun and C.C. Mello. 2001. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. Elegans* developmental timing. *Cell* 106: 23-34

- Han, J.**, Y. Lee, K.H. Yeom, Y.K. Kim, H. Jin and V.N. Kim. 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 18: 3016-3027
- Houseley J**, Tollervey D. The many pathways of RNA degradation. *Cell* 2009;136:763-76.
- Henriksson N**, Nilsson P, Wu M, Song H, Virtanen A. Recognition of adenosine residues by the active site of poly(A)-specific ribonuclease. *J Biol Chem* 2010;285:163-70.
- Invitrogen**, pcDNA6/TR, A regulatory vector designed for use with the TREx system
- Kedersha, N.L.**, J.E. Heuser, D.C. Chugani and L.H. Rome. 1991. Vaults. III. Vault ribonucleoprotein particles open into flower-like structures with octagonal symmetry. *J. Cell Biol.* 112: 225-235.
- Kořner C**, Wahle E. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 30-exoribonuclease. *J Biol Chem* 1997;272:10448-56.
- Kuzuoglu-Ozturk** et al. 2012. The *Caenorhabditis elegans* GW182 protein AIN-1 interacts with PAB-1 and subunits of the PAN2-PAN3 and CCR4-NOT deadenylase complexes. *Nucleic Acids Research*, 2012, Vol. 40, No. 12 5651-5665 doi:10.1093/nar/gks218
- Kyritsis A.**, et al. *in preparation*.
- Lagos-Quintana M.**, R. Rauhut, W. Lendeckel, T. Tuschl, Identification of novel genes coding for small expressed RNAs, *Science* 294 (2001) 853-858.
- Lau N.C.**, P.L. Lim, E.G. Weinstein, D.P. Bartel, An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*, *Science* 294 (2001) 858-862.
- Lee, K.**, N. Kunkeaw, S.H. Jeon, I. Lee, B.H. Johnson, G.Y. Kang, J.Y. Bang, H.S. Park, C. Leelayuwat and Y.S. Lee. 2011. Precursor miR-886, a novel noncoding RNA repressed in cancer, associates with PKR and modulates its activity. *RNA* 17: 1076-1089.
- Lee, R.C.** and V. Ambros. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 862-864.
- Lee R.C.**, R.L. Feinbaum, V. Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell* 75 (1993) 843-854.
- Lee Y.**, C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, V.N. Kim, The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing, *Nature* 425 (2003) 415-419.
- Long, D.**, R. Lee, P. Williams, C.Y. Chan, V. Ambros and Y. Ding. 2007. Potent effect of target structure on microRNA function. *Nat Struct Mol Biol* 14: 287-294.
- Lu, J.**, G. Getz, et al. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834-838.
- Lu, L.**, D. Katsaros, I.A. de la Longrais, O. Sochirca and H. Yu. 2007. Hypermethylation of *let-7a-3* in epithelial ovarian cancer is associated with low insulin-like growth factor-II expression and favorable prognosis. *Cancer Res.* 67: 10117-10122.
- Maragozidis P**, Karangeli M, Labrou M, et al. (2012). Alterations of deadenylase expression in acute leukemias: evidence for poly(a)-specific ribonuclease as a potential biomarker. *Acta Haematol* 128:39-46.
- Μαραγκοζίδης Π.**, Παπαναστάση Δ., Παπαδόπουλος Γ., Καζάκος Α., Del Vescovo V., Denti M., Κερενίδη Θ., Γουργουλιάνης Κ.Ι., Μπαλατσός Ν., Μελέτες στη βιολογική σημασία ανθρώπινων απαδενυλασών και ο ρόλος τους στον καρκίνο του πνεύμονα, 21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, 2012
- Martinez J**, Ren Y-G, Thuresson A-C, Hellman U, Astrom J, Virtanen A. A 54-kDa fragment of the poly(A)-specific ribonuclease is an oligomeric, processive and capinteracting poly(A)-specific 30 exonuclease. *J Biol Chem* 2000;275:24222-30.

- Mashima, T.,** M. Kudo, Y. Takada, A. Matsugami, S.C. Gopinath, P.K. Kumar and M. Katahira. 2008. Interactions between antitumor drugs and vault RNA. *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf)* 217-218.
- Mitchell, P.** και Tollervey, D. An NMD pathway in yeast involving accelerated deadeny-latin and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol. Cell* (2003).
- Nandy, C.,** J. Mrazek, H. Stoiber, F.A. Grasser, A. Huttenhofer and N. Polacek. 2009. Epstein-barr virus-induced expression of a novel human vault RNA. *J. Mol. Biol.* 388: 776-784.
- Niedzwiecka A,** Lekka M, Nilsson P, Virtanen A. Global architecture of human poly (A)-specific ribonuclease by atomic force microscopy in liquid and dynamic light scattering. *Biophys Chem* 2011;158:141–9.
- Nissen, P.,** J. Hansen, N. Ban, P.B. Moore and T.A. Steitz. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289: 920-930
- NucleoSpin®** TriPrep DNA, RNA, and protein purification
- Rossi, J.J.** 1992. Ribozymes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3: 3-7.
- Robertson, B.,** A.B. Dalby, J. Karpilow, A. Khvorova, D. Leake and A. Vermeulen. 2010. Specificity and functionality of microRNA inhibitors. *Silence* 1: 10.
- Reinhart B.J,** F.J. Slack, M. Basson, J.C. Bettinger, A.E. Pasquinelli, A.E. Rougvie, H.R. Horvitz, G. Ruvkun, The 21 nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 403 (2000) 901–906.
- Slack F.J.,** M. Basson, Z. Liu, V. Ambros, H.R. Horvitz, G. Ruvkun, The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor, *Mol. Cell. Biol.* 5 (2000) 659–669.
- Sayed, D. and M. Abdellatif.** 2011. MicroRNAs in development and disease. *Physiol.Rev.* 91: 827-887.
- Seal R,** Temperley R, Wilusz J, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM. Serum-deprivation stimulates cap-binding by PARN at the expense of eIF4E, consistent with the observed decrease in mRNA stability. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 14;33(1):376-87.
- Schoenberg DR,** Maquat LE. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* 2012;13:246–59.
- Tanaka, H.,** K. Kato, E. Yamashita, T. Sumizawa, Y. Zhou, M. Yao, K. Iwasaki, M. Yoshimura and T. Tsukihara. 2009a. The structure of rat liver vault at 3.5 angstrom resolution. *Science* 323: 384-388.
- Tomari, Y.** and P.D. Zamore. 2005. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19: 517-529.
- Tucker, M.** και Parker, R. Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 571-595 (2000).
- Wightman B.,** I. Ha, G. Ruvkun, Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. Elegans* *Cell* 75 (1993) 855–862.
- Wong M.L.** και Medrano J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechnics* 39
- Wu, L.,** J. Fan and J.G. Belasco. 2006. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103: 4034-4039.
- Wu M,** Reuter M, Lilie H, Liu Y, Wahle E, Song H. Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO J* 2005;24:4082–93.
- Wu M,** et al. Structural basis of m7G pppG binding to poly(A)-specific ribonuclease. *Structure* 2009;17:276–86.



**Yamashita A**, et al. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 2005;12:1054–63.

**Yanaihara, N.**, N. Caplen, et al. 2006. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9: 189-198

**Yang, J.S. and E.C. Lai.** 2011. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol. Cell* 43: 892-903.

**Yuan T., Y.R.**, Y. Pei, J.B. Ma, V. Kuryavyi, M. Zhadina, G. Meister, H.Y. Chen, Z. Dauter, Tuschl and D.J. Patel. 2005.

Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol. Cell* 19: 405-419.

**Yoda M.**, Daniel Cifuentes D., Izumi N., Sakaguchi Y., Suzuki T, Giraldez J.A., and Tomari Y. PARN mediates 3'-end trimming of Argonaute2-cleaved precursor microRNAs *Cell Rep.* 2013 November 14; 5(3): .  
doi:10.1016/j.celrep.2013.09.029

**Xfect™** Transfection Reagent Protocol