

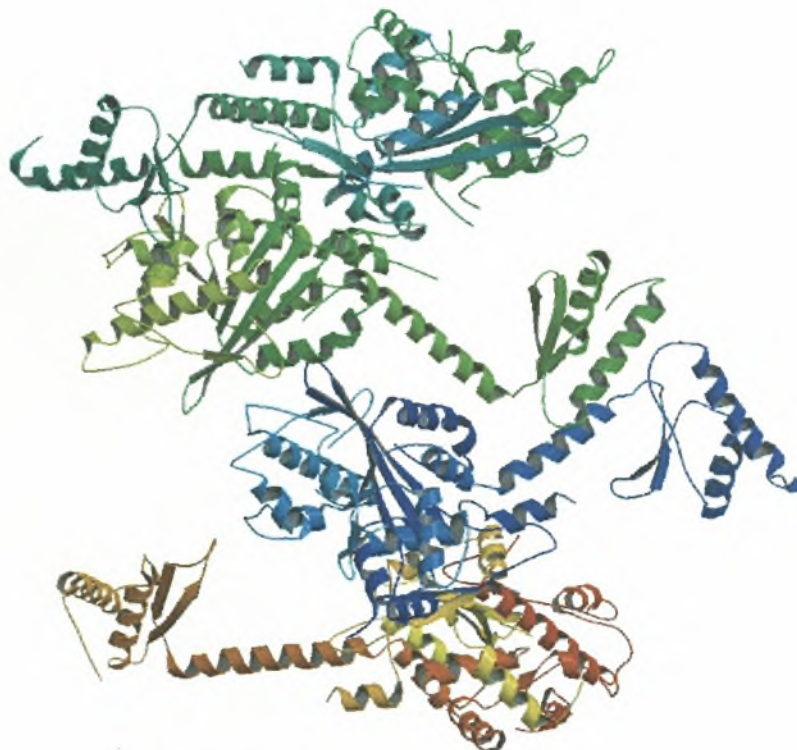
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Αριθ. Πρωτ. 21
Ημερομηνία 16-2-10



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ: ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ

ΠΟΛΥ(Α)-ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ - ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΚΥΡΙΤΣΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8100/1

Ημερ. Εισ.: 08-03-2010

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: Δ

572.88

ΚΥΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087132

Μελέτες στη βιολογική σημασία της ανθρώπινης πολυ-(A)
εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης

Υπεύθυνος Καθηγητής:

- Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, *Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Πατρών.*

Τριμελής Επιτροπή:

- Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, *Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Πατρών.*
- Κοντού Μαρία, *Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.*
- Μπαλατσός Νικόλαος, *Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.*

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

Ευχαριστίες:

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων οι υποδείξεις, η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για την διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές μου για την αμέριστη ηθική και επιστημονική συμπαράσταση και καθοδήγησή τους κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Όπως επίσης, τους διδακτορικούς, μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές των εργαστηρίων Λειτουργικής Βιοχημείας και Μικροβιολογίας -Ιολογίας (Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας) καθώς και Μοριακής Μικροβιολογίας (Παν/κό Νοσοκομείο Λάρισας) για τη σημαντική συμβολή τους στη διεξαγωγή των πειραμάτων και την άψογη συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια της συνύπαρξής μας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 "RNA world" hypothesis.....	7
1.2 Το mRNA παράγεται με μεταγραφή και μεταφράζεται.....	7
1.3 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA.....	8
1.4 Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει κάλυμμα.	9
1.5 Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται.....	10
1.6 Αποικοδόμηση του mRNA -Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA.....	12
1.7 Αποαδενυλάσες-Κατάταξη, βιολογικές λειτουργίες και έλεγχος της δραστικότητάς τους	17
1.8 Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A)-specific ribonuclease, PARN]	22
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	26
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
3.1 Υλικά	27
3.1.1 Χημικές ουσίες.....	27
3.1.2 Διαλύματα.....	28
3.1.3 Αντισώματα.....	30
3.1.4 Κυτταρικές σειρές.....	31
3.1.5 Short hairpin RNAs (shRNAs).....	31
3.1.6 Εκκινητές.....	35
3.2 Μέθοδοι.....	42
3.2.1_Απόψυξη κυττάρων Hep2.....	42
3.2.2 Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας-Θρυψινοποίηση.....	42
3.2.3 Κατάψυξη κυττάρων.....	43

3.2.4 Συλλογή και λύση κυττάρων θηλαστικών.....	43
3.2.5 Κατακρήμιση πρωτεϊνών με TCA/DOC.....	44
3.2.6 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών.....	45
3.2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation).....	46
3.2.8 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτική πολυακρυλαμίδου σε μεμβράνη PVDF και Ανοσοανίχνευση.....	48
3.2.9 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με χρήση λιποσωμάτων (Lipofection).....	51
3.2.10 Απομόνωση ιστονών από κύτταρα θηλαστικών.....	52
3.2.11 Η τεχνολογία του RNA interference (RNAi).....	53
3.2.12 Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε ένα βήμα (One step Real Time PCR).....	55
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	58
4.1 Έλεγχος της αποσιώπησης της PARN με ανοσοαποτύπωση.....	58
4.2 Έλεγχος της αποσιώπησης της PARN με Real-Time PCR.....	60
4.3 Επίδραση διαμόλυνσης με φορέα που δε φέρει shRNAs στην έκφραση της PARN.....	61
4.4 Επίδραση της αποσιώπησης της PARN στα επίπεδα έκφρασης της ιστόνης H2A (72 ώρες μετά τη διαμόλυνση).....	61
4.5 Επίδραση της αποσιώπησης της PARN σε επιλεγμένους παράγοντες (72 ώρες μετά τη διαμόλυνση).....	62
4.6 Επίδραση της αποσιώπησης της PARN στα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών CNOT7 και Nocturnin (24 και 48 μετά τη διαμόλυνση)	72
4.7 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα επίδρασης αποσιώπησης της PARN στα επίπεδα mRNA των εξεταζόμενων παραγόντων.....	73
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	74
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	79
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	91

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πολύ(A) ουρά των ώριμων ευκαρυωτικών mRNAs διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην μεταφορά, την μετάφραση και την αποικοδόμησή τους, παρέχοντας ένα σημαντικό μέσο ελέγχου της πρωτεϊνοσύνθεσης και της σταθερότητας των mRNAs. Η αποικοδόμηση των mRNAs ξεκινά συνήθως με τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς, με τα ένζυμα που συμμετέχουν στη διαδικασία να χαρακτηρίζονται από διαφορετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, βιολογικές λειτουργίες και εξειδίκευση ως προς το mRNA-υπόστρωμα. Η βράχυνση της ουράς καταλύεται από ένζυμα γνωστά ως αποαδενυλάσες. Ο ρόλος της ύπαρξης πολλών τέτοιων ενζύμων που επιτελούν τη συγκεκριμένη διεργασία δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Επιχειρούμε να προσεγγίσουμε το ερώτημα αυτό αποσιωπώντας κάποιες σημαντικές ευκαρυωτικές αποαδενυλάσες και αναλύοντας την επίδραση στα επίπεδα έκφρασης επιλεγμένων mRNAs. Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε η επίδραση της αποσιώπησης της ανθρώπινης πολυ(A)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN), στα επίπεδα έκφρασης των επιλεγμένων παραγόντων, στα πλαίσια μιας πρώτης προσπάθειας για τον προσδιορισμό των mRNA-στόχων της κάθε αποαδενυλάσης. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν 4 κατάλληλα shRNAs για την ειδική σίγηση της PARN και με αυτά διαμολύνθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα Hep2. Με ανοσοαποτύπωση και ποσοτική Real Time PCR ελέγξαμε σε επίπεδο πρωτεϊνών και mRNA αντίστοιχα, την επιτυχία της αποσιώπησης και τα επίπεδα έκφρασης των εξεταζόμενων παραγόντων σε εκχυλίσματα κυττάρων αγρίου τύπου και κυττάρων διαμολυσμένων με τα shRNAs. Σύγκριση του προτύπου έκφρασης μετά από αποσιώπηση της PARN με τα αντίστοιχα από την αποσιώπηση άλλων σημαντικών αποαδενυλασών όπως η CNOT7, φανερώνει κάποια διαφορετικότητα όσων αφορά τουλάχιστον σε ορισμένα mRNAs.

ABSTRACT

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

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 “RNA world” hypothesis

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

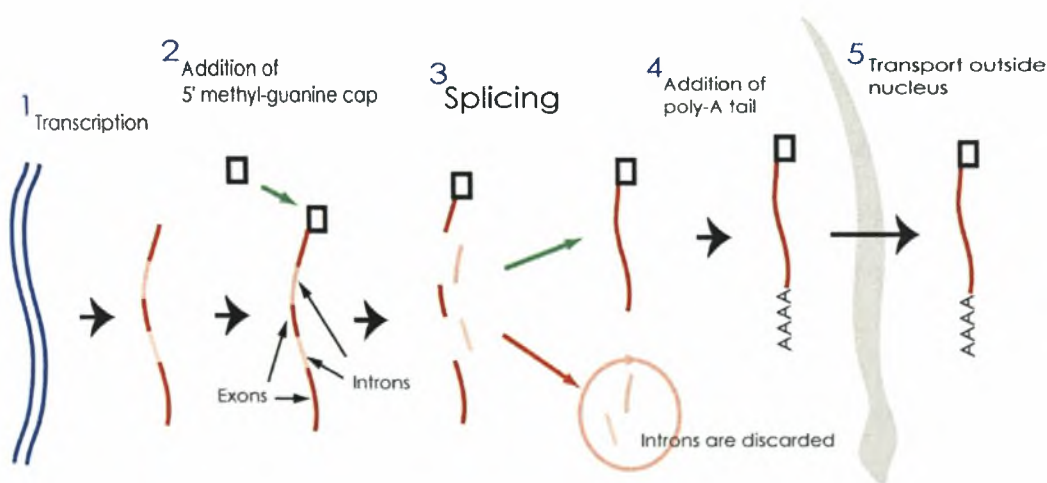
1.2 Το mRNA παράγεται με μεταγραφή και μεταφράζεται.

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

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

1.3 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA.

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



Εικόνα 1: Στάδια ωρίμανσης ευκαρυωτικού mRNA

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

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

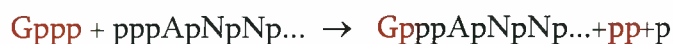
1.4 Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει κάλυμμα.

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



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

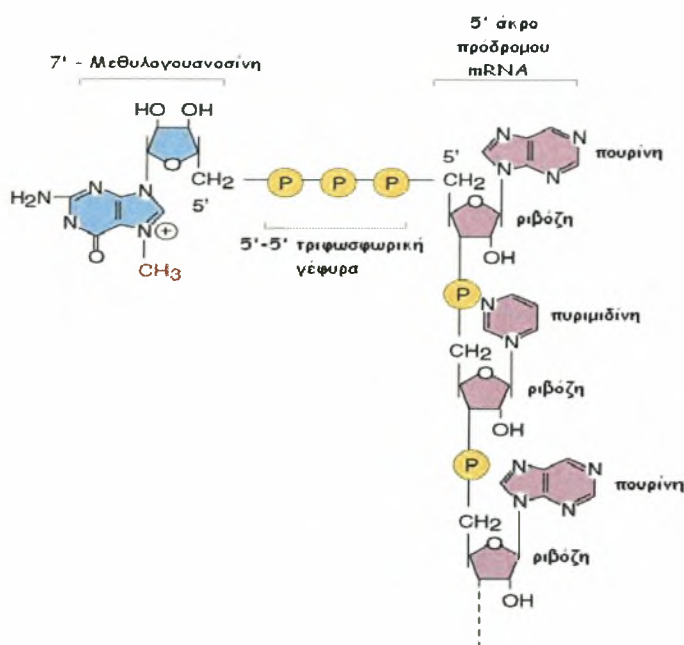
αντίδραση μπορεί να αναπαρασταθεί ως μία συμπύκνωση μεταξύ του GTP και του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου του RNA όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα:



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

1.5 Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται.

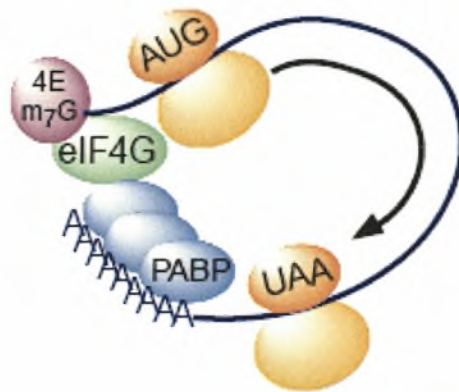
Τα πρόδρομα mRNAs λαμβάνουν στο 3' άκρο τους μια χαρακτηριστική αλληλουχία από 250-300 νουκλεοτίδια αδενοσίνης, γνωστής ως πολυ(A) ουρά. Η μετα-μεταγραφική αυτή τροποποίηση ονομάζεται διεργασία του 3' άκρου (*3' end processing*) και είναι μια πολύπλοκη αντίδραση σε δύο στάδια όπου συμμετέχουν τουλάχιστον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



Εικόνα 2: Το κάλυμμα στο 5' άκρο του mRNA

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

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



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

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

1.6 Αποικοδόμηση του mRNA- Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA

Η αποικοδόμηση του ευκαρυωτικού mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στον ποιοτικό έλεγχο της βιοσύνθεσης mRNA και στην αντιϊκή προστασία (Dykxhoom et al., 2003; Maquat et al., 2000; Hoofvan et al., 1999). Αποτελεί το καθοριστικό βήμα στην αποικοδόμηση των μορίων

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

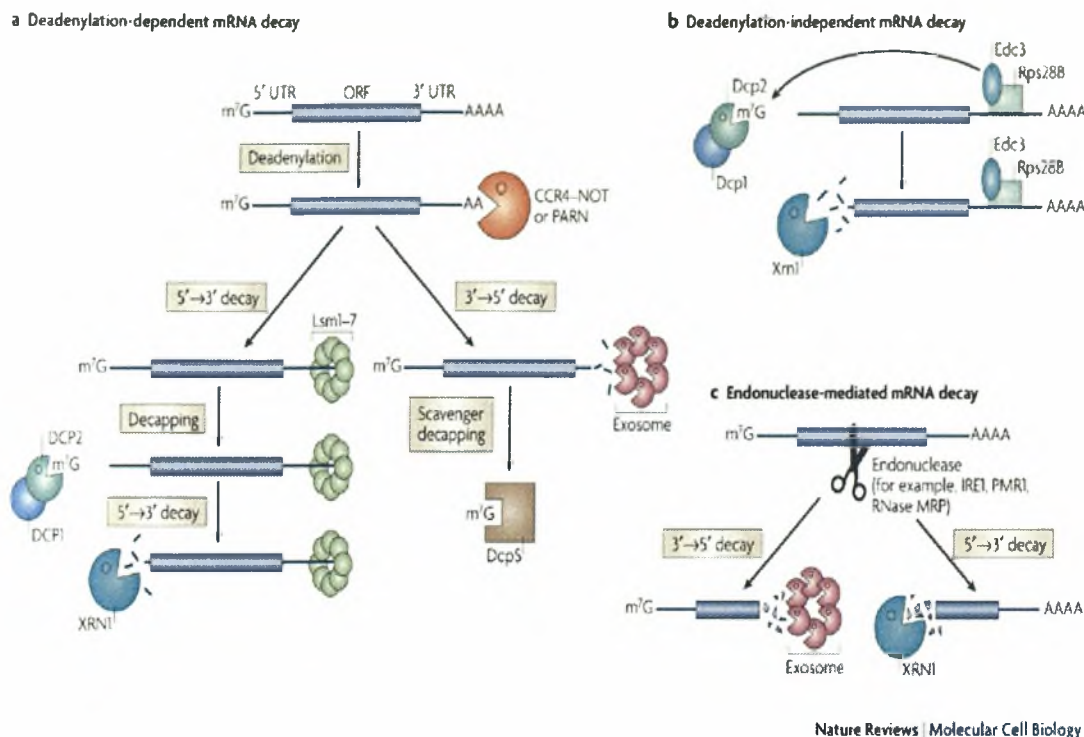
Στον πυρήνα, με την διαδικασία της αποαδενλίωσης περιορίζονται οι νεοπροστιθέμενες πολυ(A) ουρές, στο κατάλληλο μήκος. Οι πολυ(A) ουρές όταν είναι σε προκαθορισμένο σωστό μήκος είναι απαραίτητες για την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα και όταν αυτό φτάσει στο κυτταρόπλασμα του προσδίδουν σταθερότητα και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

Η αποικοδόμηση του mRNA συνήθως ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο του (αποαδενλίωση) από διάφορα ένζυμα, γνωστά ως αποαδενυλάσες (Tucker et al., 2000; Mitchell et al., 2001). Ακολουθώντας την αποαδενλίωση ένα ειδικό ένζυμο που αποτελείται από δύο υπομονάδες (Dcp1p και Dcp2p) αφαιρεί το κάλυμμα, εκθέτοντας το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την Xrn1p, μια 5'→3' εξωνουκλεάση. Εναλλακτικά, μετά την αποαδενλίωση, το mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'→5 από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών (Μονοπάτι αποικοδόμησης εξαρτώμενο από την αποαδενλίωση) (Garneau et al., 2004; Anderson et al., 1998; Chen et al., 2001; Wang and Kiledjian, 2001; Mukherjee et al., 2002). Στην περίπτωση αυτή το κάλυμμα υδρολύεται από το DcpS (Liu et al., 2002) (**εικόνα 4a**). Τα 2 κυριότερα μονοπάτια αποικοδόμησης του ευκαρυωτικού mRNA και οι πρωτεϊνικοί παράγοντες που εμπλέκονται σ' αυτά συνοψίζονται στον **πίνακα 1** (Meyer et al., 2004).

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

Reaction	Enzymes		Effectors
	Yeast	Mammals	
I deadenylation	<ul style="list-style-type: none"> • Pan2p/Pan3p • CCR4-NOT complex 	<ul style="list-style-type: none"> • Pan2/Pan3 • CCR4-NOT complex • PARN 	PABPC PABPC cap
IIa decapping	<ul style="list-style-type: none"> • Dep1p/Dep2p 	<ul style="list-style-type: none"> • Dep1/Dep2 	Edc1p; Edc2p; Edc3p; Pat1p; Lsm1-7; Dhh1p; PABPC
IIb cap hydrolysis	<ul style="list-style-type: none"> • Dcs1p 	<ul style="list-style-type: none"> • Dep5 	
III 5'-3' exonucleolytic decay	<ul style="list-style-type: none"> • Xrn1p 	<ul style="list-style-type: none"> • Xrn1 	
IV 3'-5' exonucleolytic decay	<ul style="list-style-type: none"> • exosome 	<ul style="list-style-type: none"> • exosome 	Ski2p; Ski3p; Ski7p; Ski8p

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

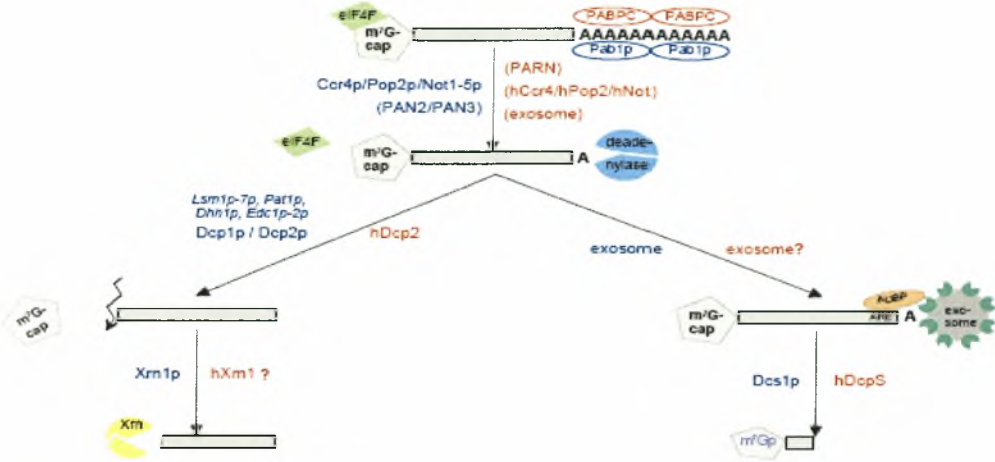


Nature Reviews | Molecular Cell Biology

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

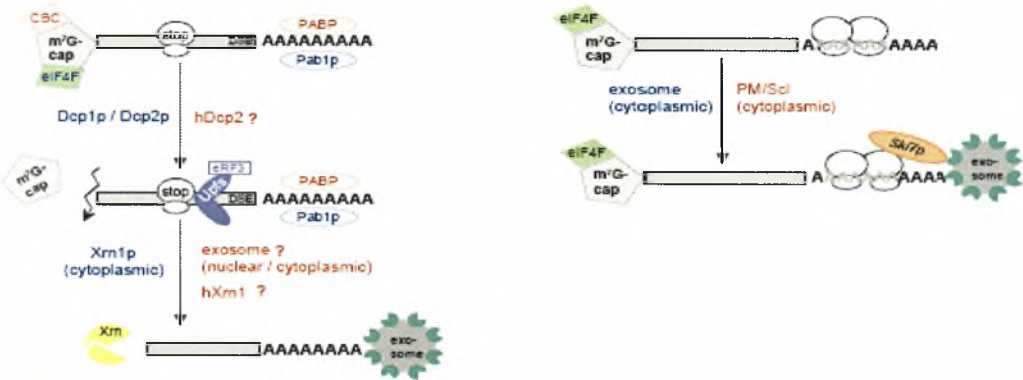
Όλα τα κύτταρα διαθέτουν συστήματα ελέγχου ποιότητας των νεοσυντιθέμενων mRNAs, έτσι ώστε να απομακρύνουν ταχύτατα μόρια που αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν την διαδικασία ωρίμανσης (Moore et al., 2002). Με αυτόν τον τρόπο προστατεύονται από πιθανώς τοξικές πρωτεΐνες που θα παράγονταν με τη μετάφραση των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

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



Nonsense-mediated decay (NMD)

Nonstop-mediated decay (NSD)



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

1.7 Αποαδενυλάσες-Κατάταξη, βιολογικές λειτουργίες και έλεγχος δραστηριότητάς τους

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Τα σύμπλοκα αποαδενυλασών που στρατολογούνται από ειδικούς ρυθμιστές είναι πολυλειτουργικά καθώς περιέχουν, εκτός των ενζύμων 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). Στον πίνακα 2 παρουσιάζεται συνοπτικά η κατάταξη των αποαδενυλασών στις δύο υπερ-οικογένειες καθώς και ενδεικτικά παραδείγματα ενζύμων που εντοπίζονται σε αντιπροσωπευτικά είδη οργανισμών.

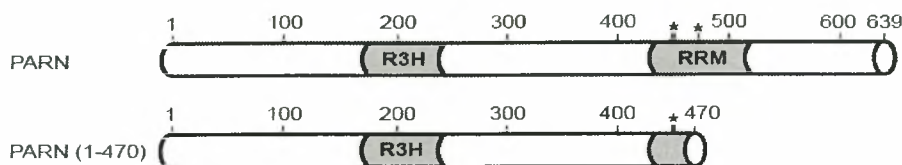
Πίνακας 2: Ποικιλομορφία των αποαδενυλασών (Goldstrohm and Wickens, 2008).

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

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

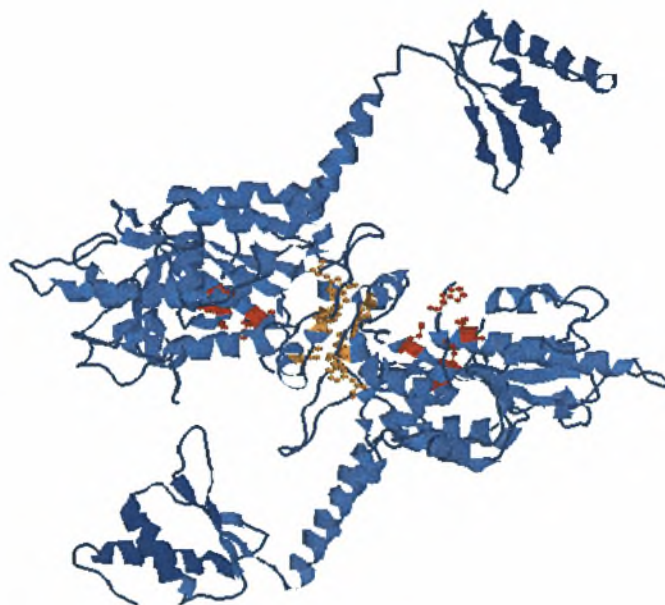
1.8 Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A)-specific ribonuclease, PARN]

Η PARN αρχικά απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε σε κύτταρα θηλαστικών (Åström et al., 1992; Körner et al., 1997). Αναλύσεις αλληλουχιών δείχνουν ότι η PARN, όπως και η Pan2p και Pop2p, ανήκει στην οικογένεια των RNaseD νουκλεασών που φέρει το χαρακτηριστικό μοτίβο DEDD. 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). Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η ενεργότητα της PARN εξαρτάται από δισθενή μεταλλικά ιόντα ενώ μεγαλύτερη δραστικότητα έχει παρουσία ιόντων Mg^{2+} , τα οποία πιθανόν βρίσκονται στο ενεργό κέντρο παίζοντας καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό της κατάλυσης. Το ελάχιστο μήκος υποστρώματος είναι τα δι- ή τρι- νουκλεοτίδα αδενοσίνης ανάλογα με το ποιο μεταλλικό ιόν βρίσκεται στο ενεργό κέντρο. Το ένζυμο στον άνθρωπο απαντά σε δύο ισόμορφες, μία πυρηνική 74 kDa και μία κυτταροπλασματική 54 kDa (62 kDa στον *Xenopus laevis*). Η τελευταία είναι πρωτεολυμένο παράγωγο 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. 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 προσδέεται σε μονόκλιωνα νουκλεϊκά οξέα και πιθανόν κατευθύνει την PARN στο πολυαδενυλιωμένο mRNA (εικόνα 6). Επίσης, η PARN περιέχει ένα μοτίβο αναγνώρισης RNA (*RNA recognition motif, RRM*), το οποίο σημειώνεται πως απουσιάζει από την προσδιορισθείσα κρυσταλλική δομή. Το RRM έχει ιδιότητες πρόσδεσης του πολυ(A) αλλά και του καλύμματος στον άνθρωπο μέσω του καταλοίπου τρυπτοφάνης W475 (Nilsson et al., 2007; Wu et al., 2009).



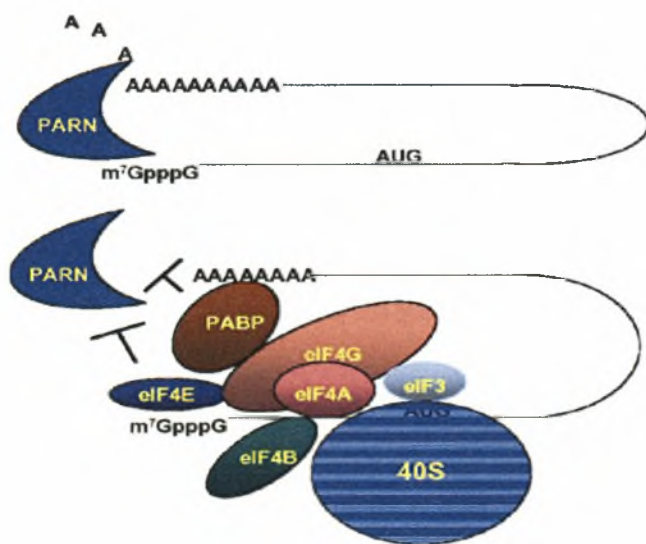
Εικόνα 6: Οι δύο ισομορφές της ανθρώπινης PARN. Σημειώνονται οι RRM και R3H περιοχές. Με αστερίσκο δηλώνονται σημαντικά αμινοξέα που συμμετέχουν στην πρόσδεση του καλύμματος

Η κρυσταλλική δομή της ανθρώπινης PARN, από την οποία λείπει το καρβοξυτελικό άκρο (κατάλοιπα 1-430 σε σύνολο 639), έδειξε πως το ένζυμο είναι ομοδιμερές, όπου κάθε υπομονάδα αναδιπλώνεται σε δύο περιοχές, μία συντηρημένη και την περιοχή της νουκλεάσης (εικόνα 7). Το ενεργό κέντρο περιέχει τέσσερα συντηρημένα κατάλοιπα, ένα γλουταμικό και τρία ασπαρτικά οξέα (*Asp28*, *Glu30*, *Asp292* και *Asp382*) κατά το μοτίβο DEDD, τα οποία κατευθύνουν κύρια καταλυτικά δισθενή ιόντα, όπως Mg^{2+} . Παρόλα αυτά η κρυσταλλική δομή της κολοβωμένης PARN δεν έδειξε την ύπαρξη ιόντων $Mg(II)$ στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Ren et al., 2002; Wu et al., 2005).



Εικόνα 7: Κρυσταλλική δομή της hPARN (αμινοξέα 1-430). Περιοχή νουκλεάσης, περιοχή R3H, περιοχή διμερισμού (Wu et al., 2005).

Η δραστηριότητα της PARN φαίνεται πως ρυθμίζεται με τουλάχιστον έξι διαφορετικούς τρόπους: (α) διέγερσή της μέσω απευθείας αλληλεπίδρασης της PARN και του καλύμματος στο 5' άκρο (Dehlin et al. 2000; Martinez et al., 2000; Martinez et al., 2001; Gao et al., 2000) αναστολή της από μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια πουρινών καθώς και από ένα ανάλογο του καλύμματος [44], (γ) αναστολή από την κυτταρο-πλασματική πολυ(A)-προσδεδόμενη πρωτεΐνη C (PABPC) (Gao et al., 2000; Köpfer et al., 1997), πιθανόν λόγω της πρόσδεσης και αλληλεπίδρασης της τελευταίας με την πολυ(A) ουρά, (δ) αλληλεπίδραση της PARN με την CUG-BP mRNA-προσδεδόμενη πρωτεΐνη, η οποία είναι το ανθρώπινο ανάλογο της πρωτεΐνης του *Xenopus* EDEN-BP· η αλληλεπίδραση αυτή διεγείρει την βράχυνση των πολυ(A) ουρών [46], (ε) διέγερση της αποικοδόμησης του πολυ(A) από πρωτεΐνες που προσδένονται σε περιοχές γνωστές ως ARE [41], (στ) συναγωνισμός μεταξύ της PARN και του eIF4E για την πρόσδεση του καλύμματος (Gao et al., 2001). Στην εικόνα 8 συνοψίζονται μερικοί από τους προαναφερθέντες μηχανισμούς ρύθμισης της PARN.



Εικόνα 8: Ρύθμιση της δράσης της PARN. Σημειώνεται ο ανασταλτικός ρόλος των eIF4E και PABP (Gao et al., 2000).

Η PARN φαίνεται επίσης να είναι απαραίτητη για ταχεία αποαδενυλίωση, επαγόμενη από την πλούσια σε AU αλληλουχία, την ARE binding protein τριστετραπρόληνη (Lai et al., 2003; Lejeune et al., 2003). Ωστόσο η PARN βρίσκεται και σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στο *Xenopus laevis* η PARN απαιτείται σε έναν εξελικτικά διατηρημένο μηχανισμό κατά τον οποίο αποσιωπούνται τα μητρικά mRNAs κατά την ωρίμανση του ωαρίου. Στο *Arabidopsis thaliana* φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της ανάπτυξης και στην αποαδενυλίωση μιας συγκεκριμένης ομάδας mRNAs (Copeland et al., 2001).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

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

Σκοπός της εργασίας είναι να συμβάλλει στην αποκάλυψη και τη μελέτη πιθανών mRNA-στόχων της ανθρώπινης PARN. Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας κρίθηκε απαραίτητη η αποσιώπηση *in vivo*, της αποαδενυλάσης PARN σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα Hep2, μέσω του ενδοκυττάριου μηχανισμού RNAi και η μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης αυτής στα επίπεδα έκφρασης ενός συνόλου επιλεγμένων παραγόντων. Στους παράγοντες αυτούς περιλαμβάνονται άλλες δύο αποαδενυλάσες (η CNOT7 υπομονάδα του σύμπλοκου αποαδενυλίωσης στον CCR4-NOT και η Nocturnin), πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το mRNA ή εμπλέκονται στο μηχανισμό του RNAi, παράγοντες σημαντικοί για το μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων, ογκογονίδια κτλ. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν μικρά δίκλινα shRNAs (short hairpin RNAs), για τη διαμόλυνση της καρκινικής κυταρικής σειράς Hep2. Τα αποτελέσματα της αποσιώπησης ελέγχθηκαν σε επίπεδο πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωση και σε επίπεδο mRNA με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου ενός βήματος (quantitative, one-step Real Time PCR).

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΥΛΙΚΑ

3.1.1 Χημικές ουσίες

- Acrylamide (Sigma)
- Αιθανόλη (Merck)
- Ακετόνη (Merck)
- Αμμωνία (Merck)
- Αμπικιλίνη (Sigma)
- Antibiotic-Antimycotic (Biosera)
- APS (Ammonium Persulfate) (Sigma)
- APS (Ammonium Persulfate) (Sigma)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haen)
- BCIP/NBT Alkaline Phosphatase System (KPL)
- Bioquant Protein (Merck)
- Bis-acrylamide (Sigma)
- Bromophenol Blue (Research Organics)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Merck)
- Coomassie Brilliant Blue (Fluka)
- Γλυκερόλη (Panreac)
- Γλυκίνη (AppliChem)
- DNA marker 1 kb (GenScript)
- Fetal Bovine Serum FBS (Gibco)
- Full Range Rainbow MW Markers (Amersham)
- HCl (Merck)
- Ισοπροπανόλη (Scharlau)
- KH₂PO₄ (Merck)
- LB Broth (Scharlau)
- LB Agar (Scharlau)
- Μεθανόλη (Merck)
- MEM (Biosera)
- Na₂HPO₄ (Merck)
- NaCl (Panreac)
- NaOH (Merck)
- Οξικό οξύ (Merck)
- Ponceau Red (Sigma)
- Protease Inhibitors (Roche)
- Puromycin (Sigma)
- SDS (Sodium dodecyl sulfate) (Sigma)
- Skimmed Milk (Scharlau)
- TCA (Fluka)
- Temed
(N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine)
(Research Organics)
- Tris base (Merck)
- Trypsin-EDTA 5% 10x (Gibco)
- Tween 20 (Euroclone)

3.1.2 Διαλύματα

Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

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

Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου

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

Διαλύματα stock για πήκτωμα ακρυλαμίδιου

- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl 1,5M, pH 8,8
- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS- HCl 0,5M, pH 6,8
- SDS 10% v/w
- Ακρυλαμίδιο 30% v/w (ακρυλαμίδιο/δις-ακρυλαμίδιο : 29/1) σε ddH₂O
- Loading Buffer (1M Tris pH 6.8, 10% glycerol, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% bromophenol blue)

Διαλύματα για το πήκτωμα ακρυλαμίδιου

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

Διαλύματα για βαφή του gel

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

Διαλύματα για ανοσοαποτύπωση (Western blot) σε μεμβράνη PVDF

- Ponceau Red για επιβεβαίωση της μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη PVDF: 1) 0,1% ponceau w/v σε 5% οξικό οξύ 2) 2% ponceau w/v σε 30% TCA και 30% sulfosalicylic acid
- Transfer buffer: Tris 48mM, Γλυκίνη 39mM, SDS 1,3mM, Μεθανόλη 20%
- Phosphate Buffer Salts (1x): 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄, 1.47mM KH₂PO₄

Διαλύματα για ανίχνευση σήματος σε PVDF μεμβράνη-Detection

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

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

Θρεπτικά Διαλύματα

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

Διαλύματα για τη διαμόλυνση Hep2 κυττάρων

- Lipofectamine TM 2000 και Lipofectamine Plus Reagent (Invitrogen)

Διαλύματα για την αποσύνδεση αντισωμάτων από PVDF μεμβράνη

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

Διάλυμα απομόνωσης ιστονών (Triton Extraction Buffer):

PBS που περιέχει 0,5% Triton X 100 v/v, 0.02% w/v NaN₃ και 2mM PMSF.

3.1.3 Αντισώματα

- Anti-PARN 74 (gift from Prof. A. Virtanen, Uppsala University, Uppsala, Sweden)
- Anti-lamin A/C (Signalling)
- Goat anti-rabbit IgG-HRP (Chemicon)
- Anti-H2A

3.1.4 Κυτταρικές σειρές

- DH5a: Στέλεχος *E. coli* που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή και κλωνοποίηση πλασμιδιακού DNA. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για την αναγέννηση των πλασμιδίων που περιέχουν τα ειδικά shRNAs για τη σίγηση της PARN.
- Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα Hep2: Πρόκειται για ανθρώπινη, ετεροπλοειδή, καρκινική κυτταρική σειρά (συγκεκριμένα προέρχεται από επιδερμικό καρκίνωμα του λάρυγγα μετά από επιμόλυνση με κύτταρα HeLa). Σχηματίζουν μονόστιβες επιθηλιακές επιφάνειες στο ταπήτιο ανάπτυξης (εικόνα 9).

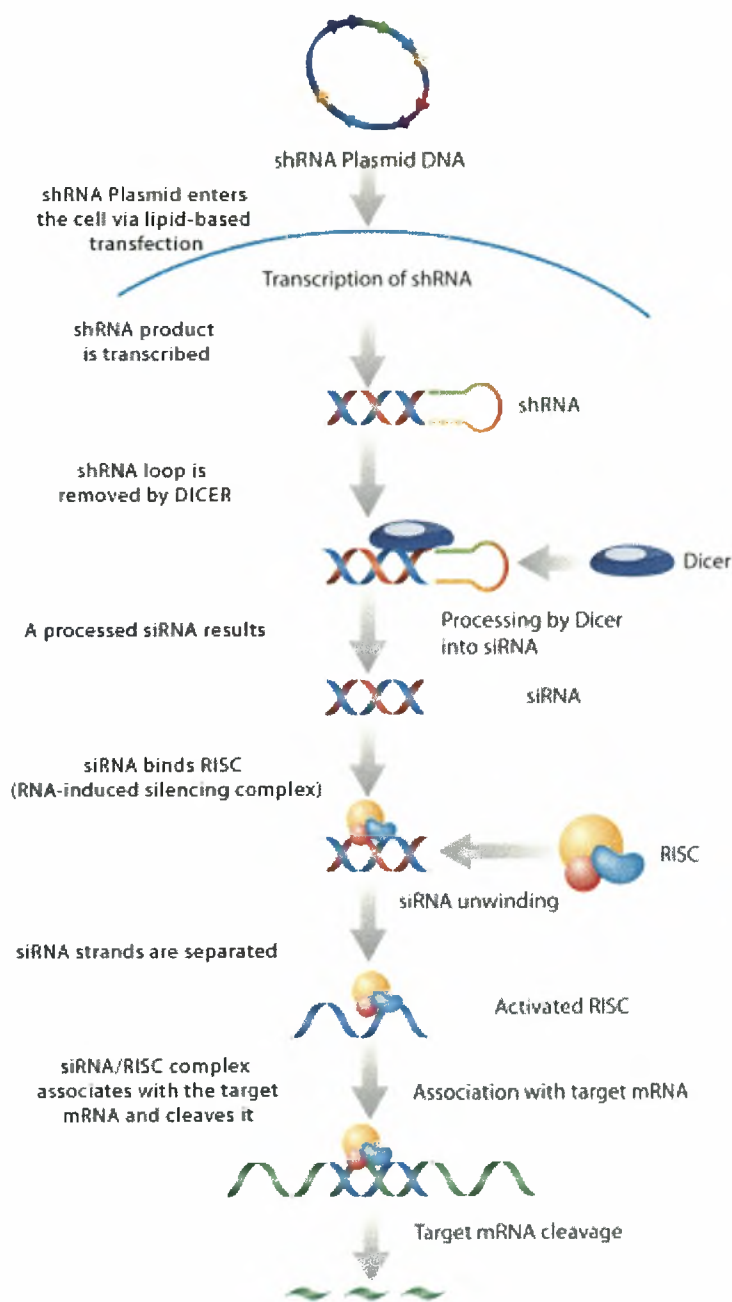


Εικόνα 9: Κύτταρα Hep2, μεγέθυνση 10x

3.1.5 Short-Hairpin RNAs (shRNAs)

Για την αποσιώπηση της PARN χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά shRNAs κλωνοποιημένα στο λεντι-ϊικό πλασμιδιακό φορέα pLKO.1-puro (εικόνα 10). Τα shRNAs και τα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου φορέα παρέχουν ένα ισχυρό μοριακό εργαλείο μακροπρόθεσμης, σταθερής αποσιώπησης του επιθυμητού γονιδίου, μέσω του συστήματος του RNAi καθώς και τη δυνατότητα αναγέννησης του πλασμιδίου μετά το μετασχηματισμό βακτηρίων με αυτό. Ο pLKO.1-puro περιέχει γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και την πουρομυκίνη για δυνατότητα επιλογής βακτηριακών και ευκαρυωτικών κυττάρων αντιστοίχως, που έλαβαν επιτυχώς το πλασμίδιο.

Ο μηχανισμός δράσης των shRNAs έγκειται στην *in vivo* μεταγραφή της κλωνοποιημένης στο φορέα αλληλουχίας του shRNA ενδοκυτταρικά και η παραγωγή μικρών δίκλωνων μορίων RNA που φέρουν μια δευτεροταγή δομή φουρκέτας. Στη συνέχεια αυτά τα δίκλινα μόρια επεξεργάζονται από τη Dicer και παράγουν μια ομάδα από siRNAs ειδικά για το επιθυμητό mRNA-στόχο (εικόνα 11).



Εικόνα 11: Μηχανισμός αποσιώπησης μέσω πλασμδικών φορέων που μεταγράφουν shRNAs.

Βάσει του πρωτοκόλλου της Ambion σχεδιάσαμε τέσσερα ειδικά και εξειδικευμένα shRNAs για την αποσιώπηση της ανθρώπινης PARN. Ο σχεδιασμός των shRNAs έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της oligoengine « pSUPER : Manual A Vector System for Expression of Short Interfering RNA». Τα siRNAs/shRNAs για να είναι αποτελεσματικά θα πρέπει να διαθέτουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τα οποία παρατίθενται παρακάτω (Taxman et al., 2006):

Κριτήρια επιλογής siRNAs/ shRNAs

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

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

BgIII — **Sense sequence** — **Hairpin sequence** — **Antisense sequence** — HindIII

Στον πίνακα 3 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά των επιλεγμένων shRNAs:

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά των σχεδιασμένων shRNAs έναντι της PARN.

Αλληλουχία θηλιάς (5'→3')	Θέση στο mRNA	Περιεχόμενο % GC	Νοηματική αλυσίδα shRNA (5'→3')	Αντισημαπτική αλυσίδα shRNA (5'→3')
UUCAAGA GA	396	31,6	CGAAGUCAUUAACUUCUAtt	UAGAAGUUA AAUGACUUCG tt
UUCAAGA GA	923	52,6	CAGGAGGAGCUGAAUGAUgtt	CAUCAUUCAG CUCCUCCUgtt
UUCAAGA GA	1713	33,3	GAAAGUGGACUGAAGAUAGtt	CUAUCUUCAG UCCACUUUgtt
UUCAAGA GA	2414	52,6	AGAGCUGACAUCCAGCUGtt	CAGCUGGAU GUCAGCUCUtt

3.1.6 Εκκινητές

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

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

ΠΑΡΑΓΟΝΤ ΑΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	Primers (5'→3')- Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
CNOT7	Οι CNOT7 και PARN ανήκουν στην ίδια οικογένεια αποαδενυλασών DEDD, συμβάλλοντας στην αποαδενυλίωση του mRNA. Στους περισσότερους ευκαρυώτες εκτός από το αποαδενυλάσες CCR4-NOT και PAN υπάρχει και ένα τρίτο ένζυμο πολύ(A)αποικοδόμησης η πολύ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση PARN.	Fwd GTCCTCTGTGAAGGG GTCAA Rev GAC TGCTTG TTGGCT TC TC 419bp
PARN		Fwd CAGCAGAAACATGCC AAAGA Rev CCAAGAGTCTGGGGA AAACA 211bp
NOCTURNIN	Αποαδενυλάση διαφορετικής κατηγορίας (EEP) από τις δύο προηγούμενες (CNOT7, PARN). Υπόκειται σε κερκάδιο έλεγχο.	Fwd GCCAAGACACTGAAC AGCAG Rev GGCAATCTGTCCTCA GATCC 175bp

Πίνακας 4 (Συνέχεια)

LSM	<p>Οι πρωτεΐνες Lsm 2p- 8p αλληλεπιδρούν με το U6 snRNA και συμβάλουν στο μάτισμα του pre-mRNA. Ο ακριβής μηχανισμός των πρωτεϊνών στο μάτισμα παραμένει άγνωστος. Οι Lsm 1-7 ενεργοποιούν την αφαίρεση της 5' καλύπτρας του mRNA. (Weihai and Parker, 2000).</p>	<p>Fwd GCTTCGAGATGGAAG GACAC Rev ATACTTGCTGGAGGG GTGTG</p> <p>209bp</p>
BTG2	<p>Κύριο μέλος της οικογένειας των TOB πρωτεϊνών (anti-proliferative proteins). Εμπλέκεται στην κυτταρική ανάπτυξη, την διαφοροποίηση και την επιδιόρθωση του DNA, Έχει αντι-αποπτωτικό ρόλο στην νευρογένεση. Αλληλεπιδρά με τον παράγοντα CAF1 και τον POP2, που είναι τα κύρια συστατικά του CCR4-NOT συμπλόκου καταστέλλοντας την ενεργότητα αποαδενύλασης της CAF1 (Yang, 2009).</p>	<p>Fwd AGCGAGCAGAGGCTT AAGGT Rev TGGAGACTGCCATCA CGTAG</p> <p>477bp</p>
AGO2	<p>Σχηματίζει το σύμπλοκο με τα miRNAs και τα siRNAs (σύμπλοκο RNA αποσιώπησης) (RISC/miRNPs). Η ενδογενής πρωτεΐνη Ago2 προσδέεται άμεσα στα pre-miRNAs ανεξάρτητα από την πρωτεΐνη Dicer (έχει μία dsRNA-προσδένουσα περιοχή) και τα σύμπλοκα Ago2:pre-miRNA βρίσκονται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των ανθρώπινων κυττάρων (Kiriakidou et al. 2009).</p>	<p>Fwd GACAACCAGACCTCG ACCAT Rev GGTGAGGTCTTGACC ACGTT</p> <p>599bp</p>

Πίνακας 4 (Συνέχεια)

<p>H2A</p>	<p>Το νουκλεόσωμα αποτελείται από 146 bp DNA το οποίο είναι τυλιγμένο γύρω από το οκταμερές των ιστονών (ένα ζευγάρι από καθμία από τις ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4). Οι ιστόνες έχουν δομικό και λειτουργικό ρόλο, ελέγχοντας την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση της χρωματίνης. Οι παραλλαγές της H2A συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διαδικασίες (μεταγραφική ενεργοποίηση, επιδιόρθωση του DNA, απόπτωση, μείωση) (Ausio and Abbott, 2002). Το 3' άκρο του mRNA των ιστονών είναι το υπεύθυνο στοιχείο για την αποικοδόμηση του mRNA. Το mRNA των ιστονών είναι το μοναδικό που δεν πολυαδενυλιώνεται, παρά μόνο το άκρο του έχει μία δομή θηλιάς (loop-structure) η οποία είναι απαραίτητη για την γρήγορη αποικοδόμηση του mRNA. Αυτή η δομή θηλιάς αναγνωρίζεται από μία πρωτεΐνη, την SLBP. Το πρώτο βήμα της αποικοδόμησης είναι η προσκόλληση μιας πολυU ουράς στο 3' άκρο παρέχοντας έτσι μια πλατφόρμα όπου θα προσδεθούν παράγοντες αποικοδόμησης (Mullen et al., 2008; Kaygun and Marzluff, 2005).</p>	<p>Fwd CGGTAAGGCTGGAAA GGACT</p> <p>Rev TGCAAGTGACGAGGG GTAAT</p> <p>255bp</p>
<p>PABPC</p>	<p>Κατά την έξοδο του mRNA στο κυτταρόπλασμα, η poly (A) προσδεμένη πρωτεΐνη (PABP) συνδέεται στην ουρά και το σταθεροποιεί διευκολύνοντας την μετάφραση. Το σύμπλοκο PABP-παραγόντων έναρξης μετάφρασης (eIF4G) προσδέεται στην cap-binding protein eIF4E και ενισχύει την μετάφραση του mRNA (Goldstrohm and Wickens, 2008)</p>	<p>Fwd ATGGCAGCTATCCCA CAGAC</p> <p>Rev GTAGGGTGCATGGCT TGAAT</p> <p>500bp</p>

Πίνακας 4 (Συνέχεια)

<p>b- GLOBIN</p>	<p>Η β-σφαιρίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Στους ενήλικες οι α- και β- σφαιρίνες σχηματίζουν δύο πολυπεπίδια τα οποία αποτελούν την αιμοσφαιρίνη (HbA). Το γονίδιο της β-σφαιρίνης βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11(11p15.5) και περιλαμβάνει πέντε ρυθμιζόμενα γονίδια (5'-ε-Gγ-Αγ-δ-β-3'). Η θέση αυτή του γονιδίου ρυθμίζει την μεταγραφή, την δομή της χρωματίνης και την ικανότητα αντιγραφής (Reik et al., 1998).</p>	<p>200bp</p>
<p>CBP20 - CBP80</p>	<p>Ο CBP20 σχετίζεται με την nonsense αποικοδόμηση του mRNA. Μαζί με τον παράγοντα CBP80 αποτελούν συστατικά του πυρηνικού συμπλόκου πρόσδεσης καλύμματος το οποίο προστίθεται μετα-μεταφραστικά. Ο παράγοντας CBP20 σχετίζεται με τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4G (Maquat et al., 2001).</p>	<p>(CBP20) Fwd ACGCCATGCGGTACA TAAAT Rev TGTGCCAGTTTTCCAT AGCC 175bp (CBP80) Fwd GCCCTCTGTTTAGCTG TTGC Rev GATGGTTCCTCCAGAC CTCA 292bp</p>
<p>eIF4E</p>	<p>Η μη ρύθμιση της μετάφρασης είναι ένας μηχανισμός που προκαλεί ανώμαλη κυτταρική αύξηση και επιβίωση. Ο παράγοντας eIF4E προσδένεται στο 5' άκρο του mRNA ελέγχοντας την μετάφραση. Υπερέκφραση του παράγοντα μπορεί να προκαλέσει τη μετάφραση ενός υποσυνόλου mRNAs και παρεμποδίζει την απόπτωση. Επίσης μπορεί να προκαλέσει μεταμόρφωση κυττάρων του πλακώδους επιθηλίου. Η αποσιώπηση αυτού του παράγοντα θα είναι χρήσιμη για θεραπεία του καρκίνου. (Mamane et al., 2007; Robert and Pelletier, 2009; Oridate et al., 2005).</p>	<p>Fwd CAGGAGGTTGCTAAC CCAGA Rev CTCCCCGTTTGTTTTT CTCA 256bp</p>

Πίνακας 4 (Συνέχεια)

<p>HIF1-a (Hypoxia-inducible factor 1a)</p>	<p>Ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην αγγειογένεση, στην κυτταρική επιβίωση, στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην προσαρμοστική απόκριση των κυττάρων στη υποξία, προκαλώντας βιολογικά γεγονότα σχετιζόμενα με την επιθετικότητα του καρκίνου. Υπερέκφραση του HIF1-a παρατηρήθηκε σε υπερπλασίες (61%) και καρκινώματα (87%) και αυξάνει την αγγειογένεση (Horrée et al., 2007; Semenza, 2003).</p>	<p>Fwd CCCAATGGATGATGA CTTCC Rev CCTTTTCCTGCTCTGT TTGG 327bp</p>
<p>SLC2A1 (GLUT-1)</p>	<p>Οι μεταφορείς γλυκόζης (Gluts) διευκολύνουν την πρόσληψη γλυκόζης και συνήθως υπερεκφράζονται σε διάφορους καρκίνους ειδικά ο Glut-1. Στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, τα οποία έχουν χαμηλό ρυθμό διαφοροποίησης και πολλαπλασιάζονται γρήγορα, έχει παρατηρηθεί αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του μεταφορέα Glut-1 παρέχει ένα χρήσιμο προγνωστικό δείκτη για το καρκίνο του παγκρέατος. (Raffaele De Caro 2009) Πειράματα επώασης καρκινικών κυττάρων από μαστό και πνεύμονα με αντισώματα anti-Glut-1 αποκαλύπτουν μείωση της κυτταρικής αύξησης (κατά 50% και 75% αντίστοιχα) και αύξηση του ρυθμού απόπτωσης (Rastogi et al., 2007).</p>	<p>Fwd GGGCCAAGAGTGTGC TAAAG Rev ACAGCGACACGACAG TGAAG 309bp</p>

Πίνακας 4 (Συνέχεια)

<p>K-Ras</p>	<p>Η <i>k-ras</i> είναι μια κυτταροπλασματική (στην εσωτερική πλευρά) GTPάση που κωδικοποιείται στον άνθρωπο από το γονίδιο <i>KRAS</i> και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές πορείες μεταγωγής σήματος. Συσσωρευση μεταλλάξεων στο <i>KRAS</i> μπορεί να το μετατρέψει σε ογκογονίδιο. Το 30% περίπου των ανθρώπινων καρκίνων, εμφανίζουν μετάλλαξη στο γονίδιο αυτό. Η οικογένεια των πρωτεϊνών <i>ras</i> εμπλέκεται σε μια σειρά διεργασιών όπως ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η διαφοροποίηση, η απόπτωση, η μνήμη και η μάθηση (Kranenburg, 2005).</p>	<p>Fwd TGTGGTAGTTGGAGC TGGTG</p> <p>Rev AAAGAAAGCCCTCCC CAGT</p> <p>221bp</p>
<p>C-Myc</p>	<p>Μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων <i>myc</i>, τα μέλη της οποίας πιστεύεται πως ελέγχουν την έκφραση του 15% του συνόλου των ανθρώπινων γονιδίων μέσω δέσμευσης σε E-boxes και επιστρατεύοντας ακετυλ-τρανσφεράσες των ιστονών. Επάγει την έκφραση αρκετών γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη, ενώ λειτουργεί και αντι-αποπτωτικά.</p>	<p>Fwd CAGCGACTCTGAGGA GGAAC</p> <p>Rev TCGGTTGTTGCTGATC TGTC</p> <p>274bp</p>

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Απόψυξη κυττάρων Hep2

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

3.2.2 Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας-Θρυψινοποίηση

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

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

ταπήτιο. Παρατηρούμε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο.

- 6) Μεταφέρουμε τα κύτταρα στον επωαστήρα (κλίβανος 37°C) για περίπου 1-2'. Παρατηρούμε το σχήμα των κυττάρων στο μικροσκόπιο.
- 7) Χτυπάμε ελαφρά τη φιάλη στο πλάι, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα.
- 8) Προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού (10ml για φιάλη 75cm²).
- 9) Επαναιωρούμε τα κύτταρα και τα διασπείρουμε ομοιόμορφα με πιπέτα (των 10ml).
- 10) Στο σημείο αυτό μπορούμε να χωρίσουμε τα κύτταρα σε δύο ή περισσότερες φλάσκες ή απλά να απομακρύνουμε τα μισά κύτταρα στην ήδη υπάρχουσα φλάσκα.

3.2.3 Κατάψυξη κυττάρων

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

3.2.4 Συλλογή και λύση κυττάρων θηλαστικών

Συλλογή κυττάρων:

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

5) Απομάκρυνση του υπερκείμενου προσεκτικά και φύλαξη του ιζήματος στους -80°C .

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

Λύση κυττάρων:

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

2) Πάγωμα σε υγρό άζωτο και ακολούθως θέρμανση του δείγματος στους 60°C για 3min (επανάληψη βήματος 3 φορές).

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

3.2.5 Κατακρήμιση πρωτεϊνών με TCA/DOC

Για την κατακρήμιση πρωτεϊνών από τα συλλεχθέντα υπερκείμενα του πρωτοκόλλου 3.2.4 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 10min.

3) Προσθήκη 10 μL TCA 100% ή 72% και εκ νέου επώαση στον πάγο για 10 min. Ακολουθεί επώαση του δείγματος στους -20°C για 30 min.

4) Φυγοκέντρηση για 15 min στα 12000rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου.

5) Πλύση ιζήματος με 200 μL TCA 2,5%.














6) Πλύση με παγωμένη ακετόνη (2 φορές) και φυγοκέντρηση 15 min στα 12000rpm.

7) Αφήνουμε την περίσσεια ακετόνης να εξατμιστεί και ακολούθως προσθέτουμε 20 μL Loading Buffer 4X. Βράζουμε το δείγμα για 5 min, το οποίο πλέον είναι έτοιμο για φόρτωμα σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.

3.2.6 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών

Για την απομόνωση ολικού RNA από τα επεξεργασμένα και μη (controls) με shRNAs κύτταρα που συλλέχθηκαν με το πρωτόκολλο της παραγράφου 3.2.4, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό Total RNA Isolation kit NucleoSpin RNAII της Macherey Nagel. Η διαδικασία απομόνωσης είναι βασισμένη στην μέθοδο των Chomczynski και Sacchi στην οποία χρησιμοποιείται στο αρχικό στάδιο της ομογενοποίησης ιστού και εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων σε όξινο φαινολικό διάλυμα θειοκυανικής γουανιδίνης. Συνοπτικά, η διαδικασία φαίνεται στην **εικόνα 12**. Αρχικά περίπου 30 mg από κάθε δείγμα ομογενοποιούνται με την προσθήκη 350 μ L διαλύματος RA1 παρουσία 3.5 μ L β -μερκαπτοαιθανόλης. Το ομογενοποίημα τοποθετείται σε ειδικές στήλες οι οποίες επιτρέπουν το φιλτράρισμα του δείγματος μετά από φυγοκέντρηση στις 11000 x g για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διηθημένο μίγμα μεταφέρεται σε νέους αποστειρωμένους σωλήνες erpendorf, στο οποίο προστίθενται 0.350 ml αιθανόλης 70%. Ακολουθεί δέσμευση του ολικού RNA σε μικρές στήλες χρωματογραφίας και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8000 x g για 30 sec σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απομάκρυνση τυχόν αλάτων με ειδικό διάλυμα (Membrane Desalting Buffer, MDB) και επώαση του δείγματος παρουσία DNAάσης I, για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το βήμα αυτό εξασφαλίζει την ελάχιστη δυνατή επιμόλυνση του δείγματός μας με γονιδιωματικό DNA, γεγονός το οποίο θα επηρέαζε την τελική ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR. Ακολουθούν σταδιακές φυγοκεντρήσεις του δείγματος, κατά τις οποίες απομακρύνονται τα υποπροϊόντα της πέψης με την DNAάση I.

Τέλος, ακολουθεί έκλυση του ολικού RNA του δείγματος με H₂O ελεύθερο ριβονουκλεασών (RNase-free ή DEPC-treated water). Κάθε δείγμα RNA που απομονώνεται ελέγχεται για τυχαία υδρόλυση μετά από ανάλυση τόσο σε πηκτή αγαρόζης 0,8% όσο και σε πηκτή αγαρόζης 1,2% παρουσία φορμαλδεΐδης και φυλάσσεται στους -80°C.

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

Εικόνα 12: Συνοπτική παρουσίαση του πρωτοκόλλου απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών.

3.2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

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

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

1) *Καλλιέργεια και συλλογή των βακτηριακών κυττάρων:*

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

2) *Λύση των κυττάρων:*

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

3) *Δέσμευση του DNA:*

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

4) *Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης:*

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

5) Έκλυση του DNA:

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

3.2.8 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη PVDF και Ανοσοανίχνευση

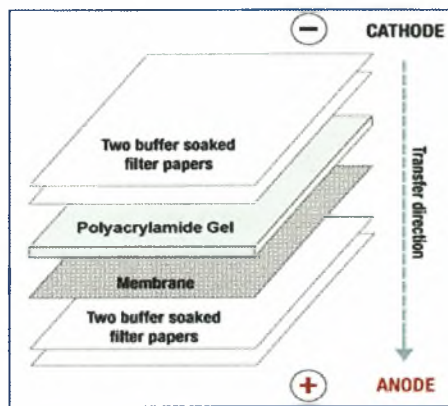
Ηλεκτρομεταφορά

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

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

Η τοποθέτησή του gel και της μεμβράνης στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (χρησιμοποιήθηκε Semidry Transfer System για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας) γίνεται ανάμεσα σε δύο ζεύγη από χαρτιά Whatman με τη μεμβράνη προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και την πηκτή στον αρνητικό (**εικόνα 13**). Η επαφή μεταξύ της πηκτής και της μεμβράνης πρέπει να είναι άμεση χωρίς την παρεμβολή φυσαλίδων που παρεμποδίζουν τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η μεταφορά των πρωτεϊνών στην συγκεκριμένη εργασία έγινε κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 270 mA για 40 min, χρόνος που μπορεί όμως να

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



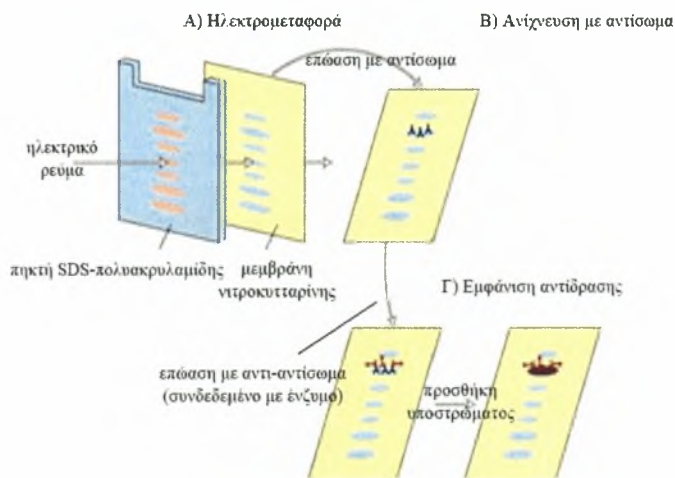
Εικόνα 13: Συναρμολόγηση συσκευής ηλεκτρομεταφοράς

Ανοσοανίχνευση

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

Αρχικά η μεμβράνη PVDF μετά την ηλεκτρομεταφορά εμβαπτίζεται υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα σε blotto buffer ώστε να κορεστεί η μεμβράνη από την καζεΐνη του γάλακτος και να αποφευχθούν οι μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα το ειδικό για την επιθυμητή πρωτεΐνη (στην προκειμένη περίπτωση ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε rabbit anti-PARN74 σε αραιώση 1:500 σε blotto buffer). Κατόπιν η μεμβράνη επωάζεται με το πρώτο αντίσωμα υπό συνεχή ανακίνηση

overnight στους 4°C. Ακολουθούν 2 πλύσεις της μεμβράνης με PBS-T 10 min έκαστη υπό ανάδευση και στη συνέχεια επώαση της μεμβράνης επίσης υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία του δευτέρου αντισώματος (φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένη υποοξειδάση) για 1 ώρα. Ως δεύτερο αντίσωμα στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε goat anti-rabbit IgG-HRP αραιωμένο 1:10000. Της διαδικασίας εμφάνισης του σήματος προηγούνται δύο πλύσεις της μεμβράνης με PBS-T για 15min. Η ανίχνευση ειδικού σήματος στη συνέχεια οφείλεται στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας, καθώς το δεύτερο αντίσωμα που είναι ειδικό έναντι rabbit IgG ανοσοσφαιρινών, μετά την προσθήκη κατάλληλου αντιδραστηρίου δίνει προϊόν που παράγει έντονο φως (συγκεκριμένα ως αποτέλεσμα οξείδωσης της λουμινόλης από την υπεροξειδάση), το οποίο μπορεί να αποτυπωθεί σε φωτογραφικό φιλμ με τη μορφή σκοτεινής ζώνης. Η εμφάνιση γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο του συστήματος ανοσοανίχνευσης ECL ή ECL Plus της Amersham.



Εικόνα 14: Συνοπτική παρουσίαση των διαδικασιών ηλεκτρομεταφοράς, ανοσοανίχνευσης και εμφάνισης σήματος.

3.2.9 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με χρήση λιποσωμάτων (Lipofection)

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

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

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

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

α. ο λόγος γ DNA/λ χρησιμοποιούμενης Λιποφεκταμίνης=1/2

β. 50λ MEM/ γ DNA (για προετοιμασία του DNA mix)

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

δ. 0,5 γ DNA απαιτείται για τη διαμόλυνση των κυττάρων κάθε well ενός

6-well plate (στην συγκεκριμένη εργασία ως DNA λαμβάνουμε μείγμα πλασμιδίων που φέρουν και τα 4 είδη shRNAs έναντι της PARN που χρησιμοποιήθηκαν).

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

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

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

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

3.2.10 Απομόνωση ιστονών από κύτταρα θηλαστικών

1) Συλλογή κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραγράφου 3.2.4

2) Επαναδιάλυση των κυττάρων σε Triton Extraction Buffer (TBE) (1ml/10⁷ κύτταρα)

3) Λύση κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραγράφου 3.2.4

4) Φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 10min στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.

- 5) Πλύση του κυτταρικού ιζήματος με το μισό του χρησιμοποιούμενου όγκου TBE. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 10min στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- 6) Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 0,2N HCl (1ml/4*10⁷ κύτταρα).
- 7) Επώαση overnight στους 4°C.
- 8) Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 2000rpm για 10min στους 4°C.
- 9) Συλλογή υπερκείμενου και προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε αυτό με τη χρήση του συστήματος Bradford.
- 10) Φύλαξη απομονωμένων ιστονών στους -20 °C.

3.2.11 Η τεχνολογία του RNA interference (RNAi)

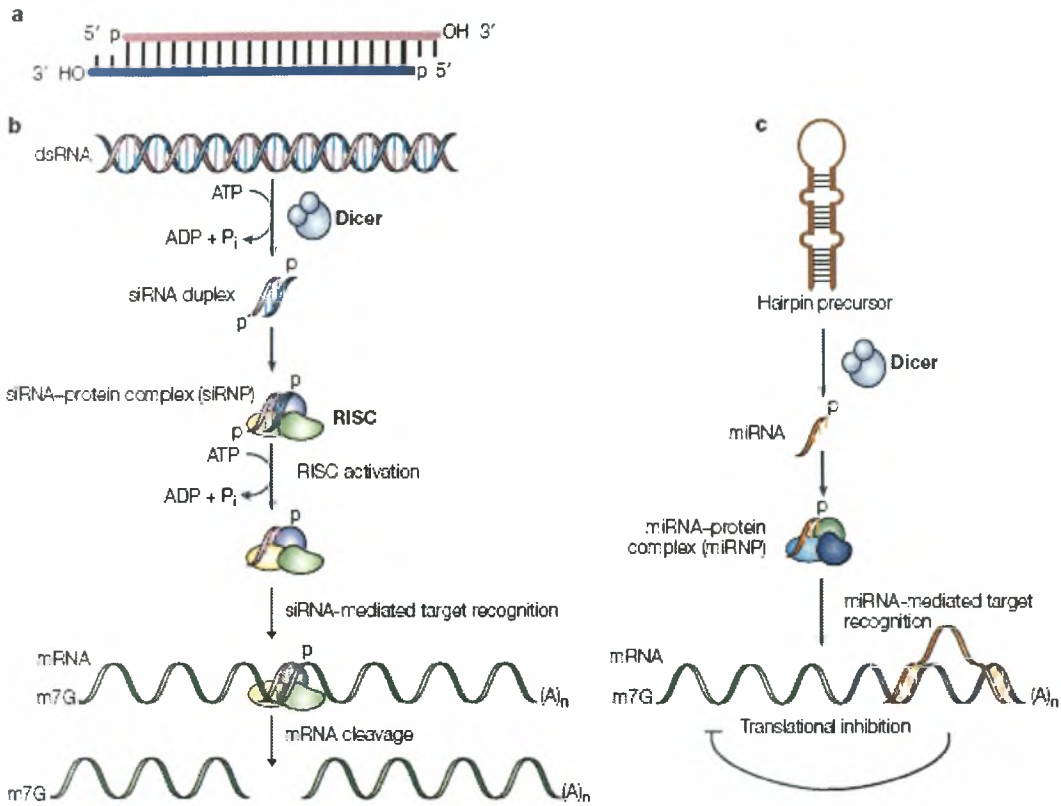
Το RNAi αποτελεί ένα ισχυρό φαινόμενο εξειδικευμένης γονιδιακής σίγησης που πυροδοτείται από δίκλινα μόρια RNA. Τα πειράματα των ομάδων των Fire και Mello το 1998 στο *C. elegans* (χάρη στα οποία έλαβαν και το βραβείο Nobel στην Ιατρική ή Φυσιολογία το 2006) έδωσαν μεγάλη ώθηση σε αυτή τη μεθοδολογία 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 εξωγενώς από μικρά μη-μεταφραζόμενα RNAs γνωστά ως miRNAs, είτε χορηγούνται εξωγενώς στο κύτταρο και ονομάζονται μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs). Σε αντίθεση με τα miRNAs, τα siRNAs σχετίζονται με την αποσιώπηση που προκύπτει από διαγονίδια, ιούς, τρανσποζόνια και εισαγόμενα RNA και έτσι, μπορούν να θεωρηθούν ενδιάμεσα στα μονοπάτια άμυνας εναντίον ξένων νουκλεοτιδίων.

Μονοπάτι siRNA: Επιμήκη δίκλιωνα μόρια RNA (dsRNA) ή δίκλιωνα μόρια RNA με δομή φουρκέτας (hairpin RNA) επεξεργάζονται από το σύμπλοκο Dicer, ένα ένζυμο με δράση παρόμοια με την RNAάση III. Ως αποτέλεσμα παράγονται μικρότερα μόρια, τα siRNAs, τα οποία φέρουν μη μονόκλιωνα 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. Ακολούθως τα παραγόμενα siRNAs ενσωματώνονται στο RNA-επαγώμενο σύμπλεγμα σίγησης το RISC. Το τελευταίο καταλύει το ξετύλιγμα των δύο κλώνων των siRNAs με ένα ATP-εξαρτώμενο τρόπο και ο ξετυλιγμένοι αντινοσηματικοί (antisense) κλώνοι οδηγούν το RISC στα συμπληρωματικά mRNAs-στόχους, γεγονός που πυροδοτεί την ενδονουκλεοτιδική τμήση των mRNAs (**εικόνα 15a**).

Μονοπάτι miRNA: Τα miRNAs εμπλέκονται σε μια ποικιλία φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών που περιλαμβάνουν την απόπτωση, την αιμοποίηση, την ανάπτυξη και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η έκφραση τους είναι ειδική για συγκεκριμένους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια και το προφίλ τους αλλάζει σε διάφορες ανθρώπινες ασθένειες. (Grishok et al., 2001; Ambros et al., 2003; Carrington and Ambros, 2003). Έχει εκτιμηθεί πως ο συνολικός αριθμός miRNA γονιδίων στον άνθρωπο κυμαίνεται στα 200-250. Σε αντίθεση με τα siRNAs, τα miRNAs δεν οδηγούν συνήθως σε τμήση του mRNA-στόχου αλλά σε καταστολή της μετάφρασής του. Πρόσφατα έχει δειχθεί πως ενισχύουν και την αποικοδόμηση του mRNA, ενώ ένας τρίτος λιγότερο μελετημένος μηχανισμός τα εμπλέκει στην αναδιοργάνωση της ετεροχρωματίνης (Derek et al., 2003; Lippman and Martienssen, 2004).



Εικόνα 15: Μονοπάτια siRNA και miRNA (Derek et al., 2003).

Τα miRNAs μεταγράφονται από την RNA pol II σε μεγάλα δίκλινα μόρια RNA που φέρουν δομές βρόχου και καλούνται pri-miRNAs. Αυτά κόβονται από το σύμπλεγμα Drosha και παράγονται τα pre-miRNAs (70 νουκλεοτίδια), τα οποία με τη σειρά τους εξέρχονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα όπου και αναλαμβάνει δράση η Dicer. Η τελευταία παράγει μικρά μονόκλινα miRNAs (των 22 νουκλεοτιδίων) τα οποία ενσωματώνονται στο σύμπλεγμα miRNP που καθοδηγείται στο mRNA-στόχο πυροδοτώντας την καταστολή της έκφρασης του (εικόνα 15b).

3.2.12 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε ένα βήμα (One step Real Time PCR)

Η Real Time PCR είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού γονιδιακής έκφρασης. Είναι μία ιδιαίτερα ευαίσθητη και

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

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

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

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία εφαρμόσαμε την ποσοτική one-step RT-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Invitrogen "SuperScript TM III

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

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

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

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

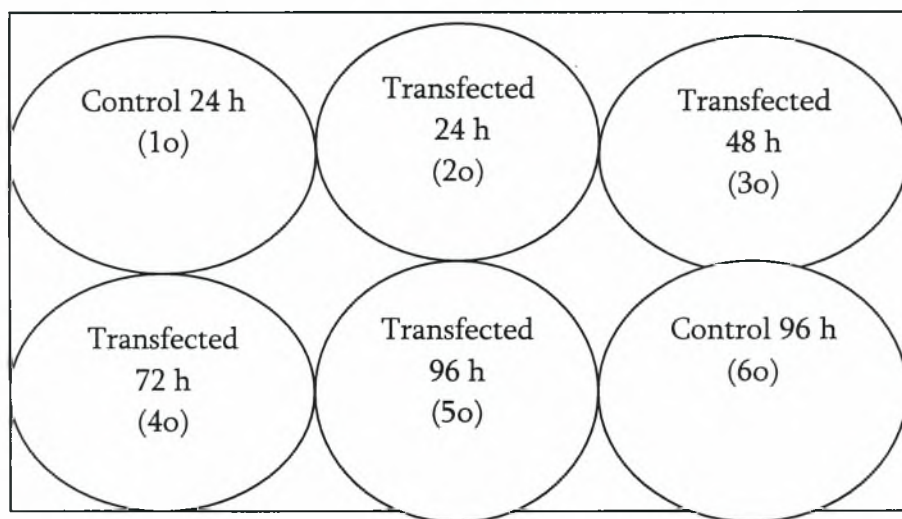
Type of reaction	Cycling conditions
cDNA synthesis	50-70°C, 15min
PCR	95 °C, 5min (1 cycle)
	95 °C, 15sec (35-40 cycles)
	55-60 °C, 30sec (35-40 cycles)
	68-72 °C, 1min/kb (35-40 cycles)

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Έλεγχος της αποσιώπησης της PARN με ανοσοαποτύπωση

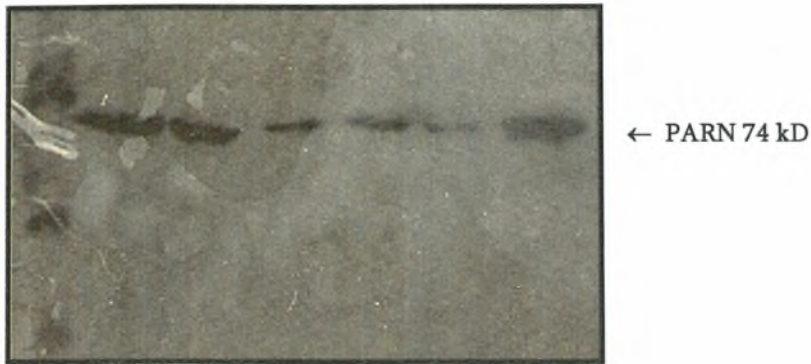
Για την αποσιώπηση της PARN διαμόλυναμε καρκινικά κύτταρα Hep2 και με τα 4 διαθέσιμα shRNAs ταυτόχρονα. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε το πρωτόκολλο διαμόλυνσης που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.9. Ελέγχθηκε η αποσιώπηση της PARN 24, 48, και 96 ώρες μετά την διαμόλυνση ενώ ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Hep2 αγρίου τύπου, τα οποία και δεν διαμόλυνθηκαν (συγκεκριμένα εξετάστηκαν control 24 και 96 ωρών) Έτσι, το 6-well plate που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα διαμόλυνσης είχε την παρακάτω μορφή:

6-well plate



Η επιτυχία της αποσιώπησης της PARN επιβεβαιώθηκε σε πρώτη φάση σε πρωτεϊνικό επίπεδο μετά από ηλεκτρομεταφορά των απομονωμένων πρωτεϊνών τόσο από τα controls όσο και από τα διαμολυσμένα κύτταρα από πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF και επακόλουθη ανοσοανίχνευση με τη χρήση Anti-PARN 74 αντισώματος (**εικόνα 16**).

C24h T24h T48h T72h T96h C96h

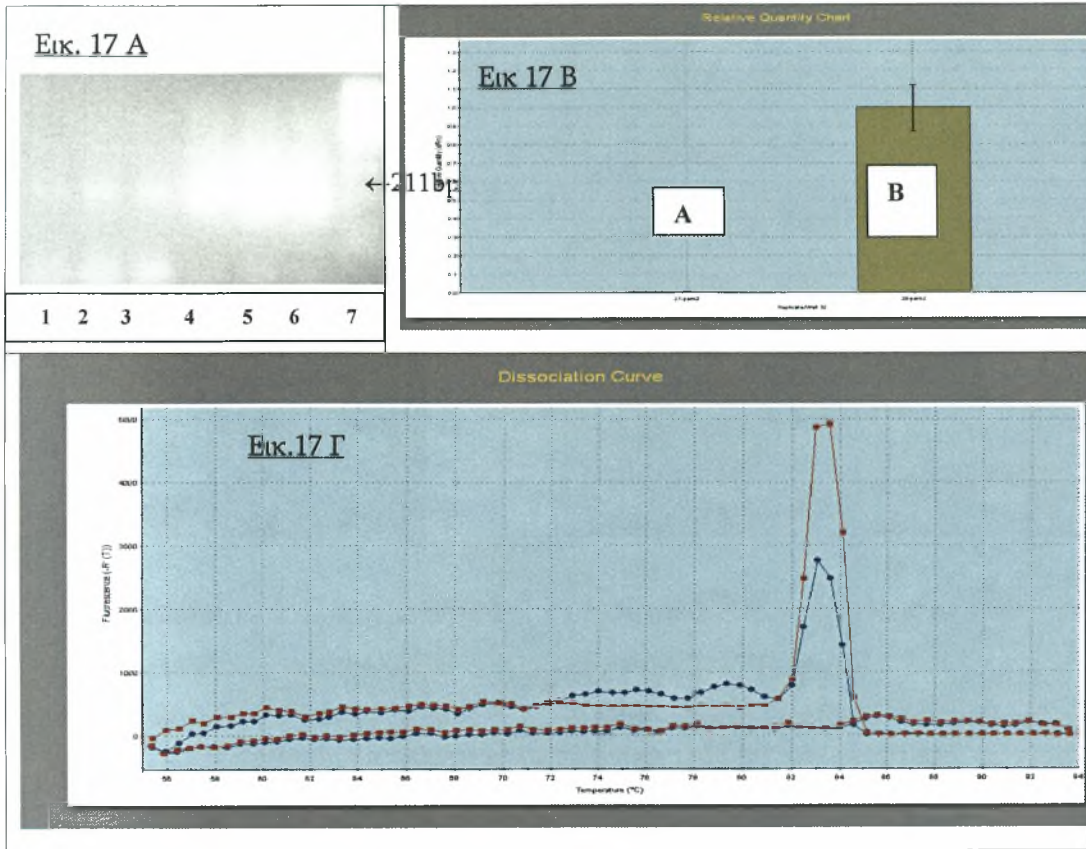


Εικόνα 16: Εικόνα ανοσοαποτύπωσης όπου φαίνεται η αποσιώπηση της PARN σε σύγκριση με τα controls ειδικά 72 και 96 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

Η επιβεβαίωση της αποσιώπησης της PARN έγινε και με την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης RT-PCR σε ένα βήμα, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ολικό RNA (100ng για την ακρίβεια) τόσο από διαμολυσμένα όσο και από control κύτταρα που συλλέχθηκαν 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση. Χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες και οι συγκεντρώσεις που αναγράφονται στους πίνακες 5 και 6 για την προετοιμασία των αντιδράσεων. Εκτός από τα επίπεδα έκφρασης της PARN, εξετάστηκαν και τα αντίστοιχα των παραγόντων του πίνακα 4. Για τη εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων για την κανονικοποίηση (*normalization*) των αποτελεσμάτων κρίθηκε αναγκαία η επιλογή 2 εσωτερικών μαρτύρων, της β-σφαιρίνης και της ιστόνης H2A. Τέλος, για να αποκλειστεί και το ενδεχόμενο πως οι οποιεσδήποτε μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των επιλεγμένων παραγόντων οφείλονται στη διαδικασία της διαμόλυνσης και μόνο, εξετάστηκε και η επίδραση της διαμόλυνσης των κυττάρων με πλασμιδιακό φορέα που δεν φέρει shRNAs (empty pSuper vector).

4.2 Έλεγχος της αποσιώπησης της PARN με Real-Time PCR

PARN



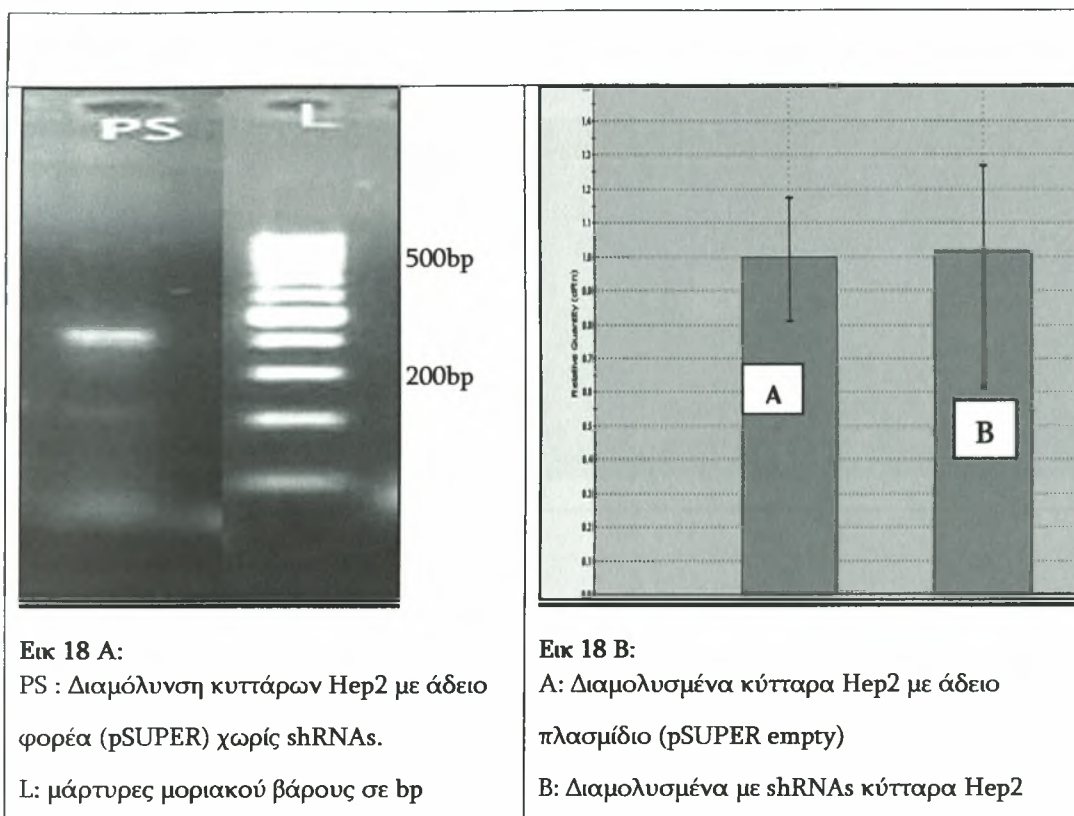
Εικ. 17Α: Εικόνα από ηλεκτροφόρηση, σε gel αγαρόζης 1%, των προϊόντων της RT-PCR.. Η PARN αναμένεται στα 211bp.

Εικ. 17Β: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την RT-PCR [συγκεκριμένα παρουσιάζονται τα Relative quantity charts, $-Rn'(T)^*$]. Η στήλη Α αντιπροσωπεύει τα σχετικά επίπεδα mRNA της PARN από τα διαμολυσμένα κύτταρα ενώ η στήλη Β τα αντίστοιχα επίπεδα από τα φυσιολογικά, τα μη διαμολυσμένα κύτταρα (controls) 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

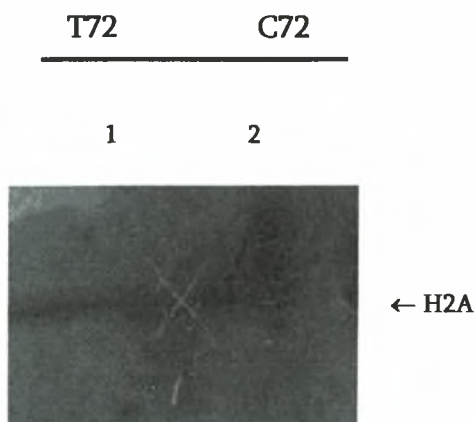
Εικ. 17Γ: Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού (dissociation plot). Η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από διαμολυσμένα κύτταρα, ενώ η κόκκινη τα προϊόντα από μη διαμολυσμένα κύτταρα. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75 °C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

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

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



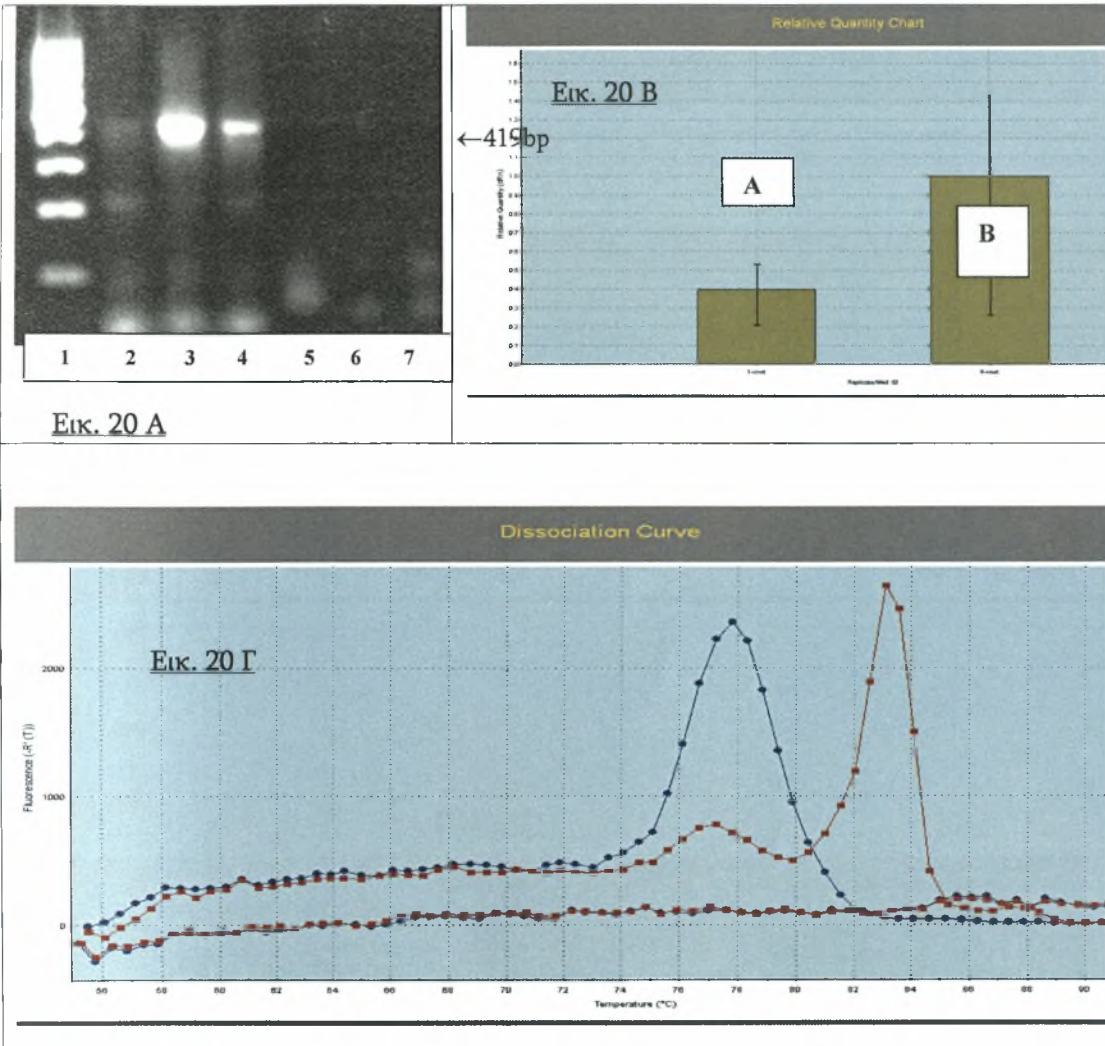
4.4 Επίδραση της αποσιώπησης της PARN στα επίπεδα έκφρασης της ιστόνης H2A (72 ώρες μετά τη διαμόλυνση)



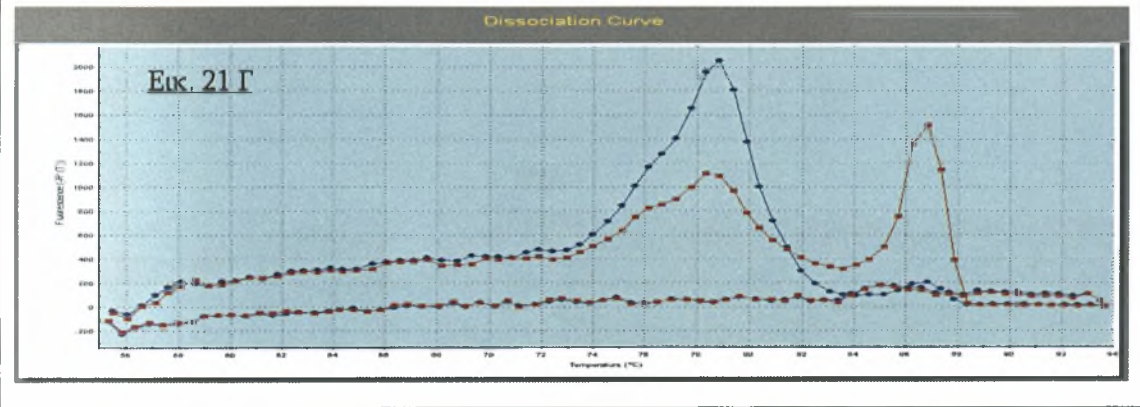
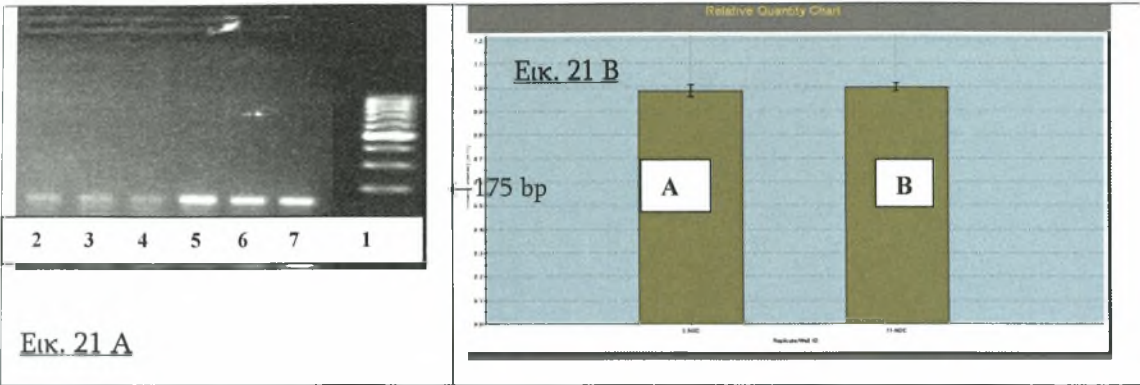
Εικόνα 19: Εικόνα ανοσοαποτύπωσης όπου φαίνεται πως η αποσιώπηση της PARN δεν επηρεάζει όπως αναμενόταν τα επίπεδα έκφρασης της H2A τουλάχιστον 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

4.5 Επίδραση της αποσιώπησης της PARN σε επιλεγμένους παράγοντες (72 ώρες μετά τη διαμόλυνση)

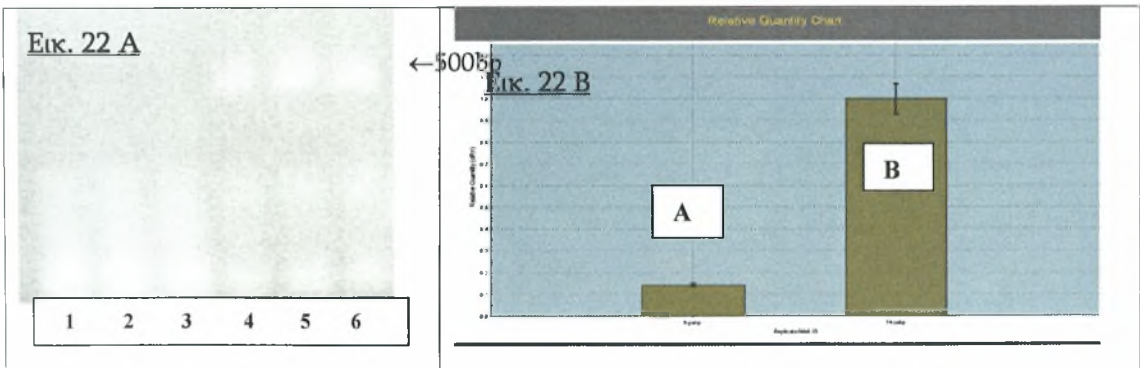
CNOT7

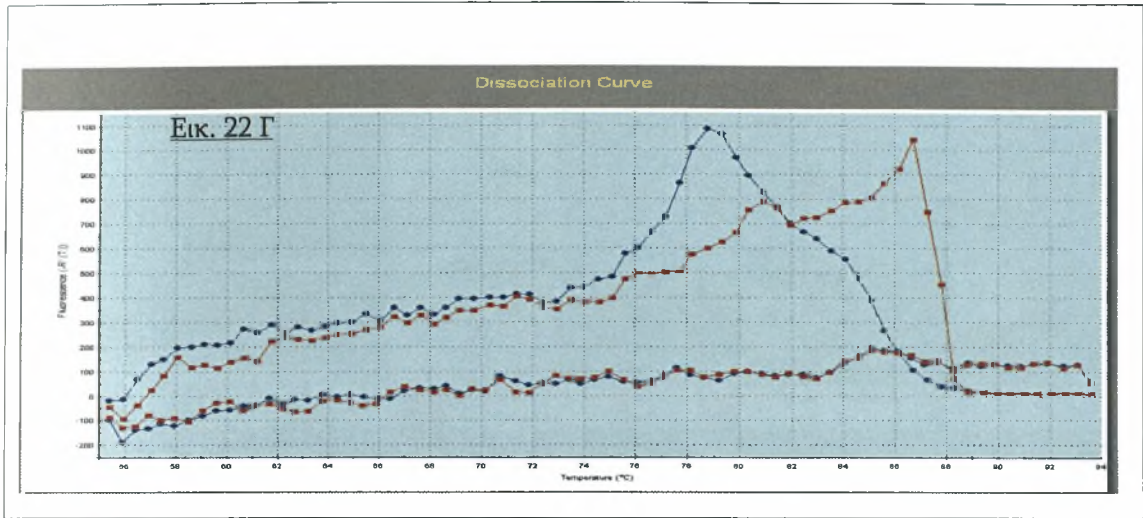


NOC

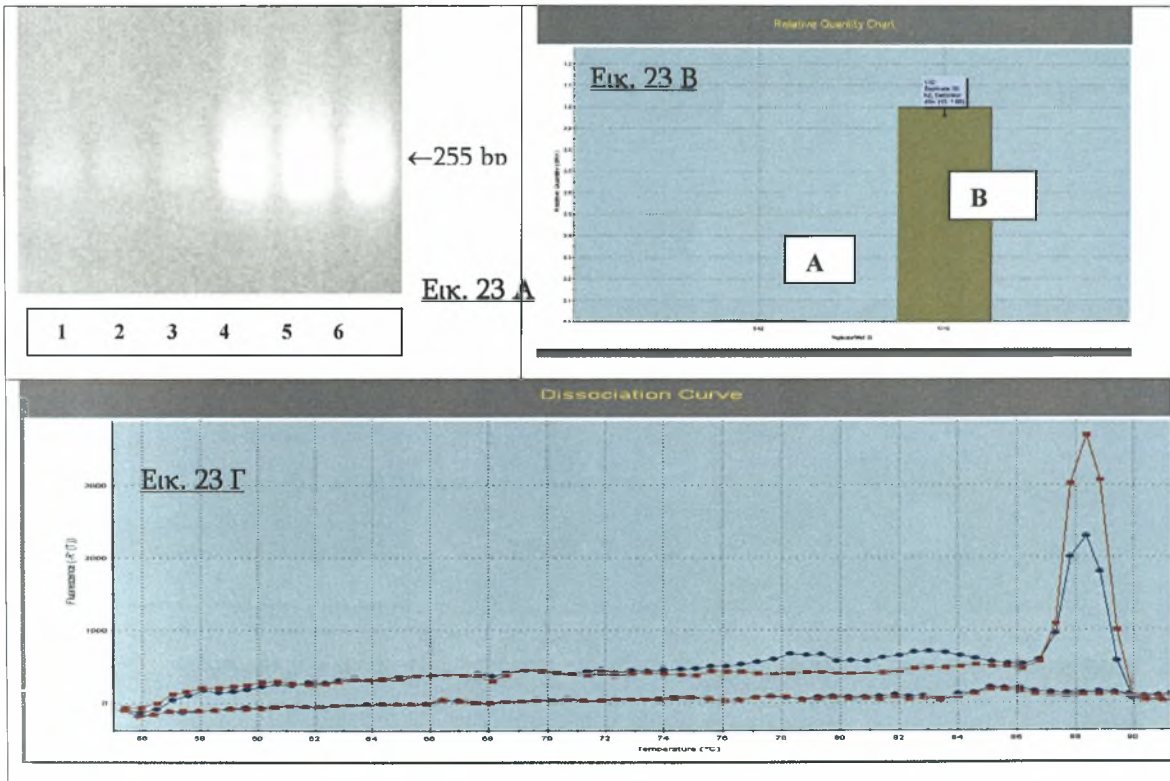


PABP(C)

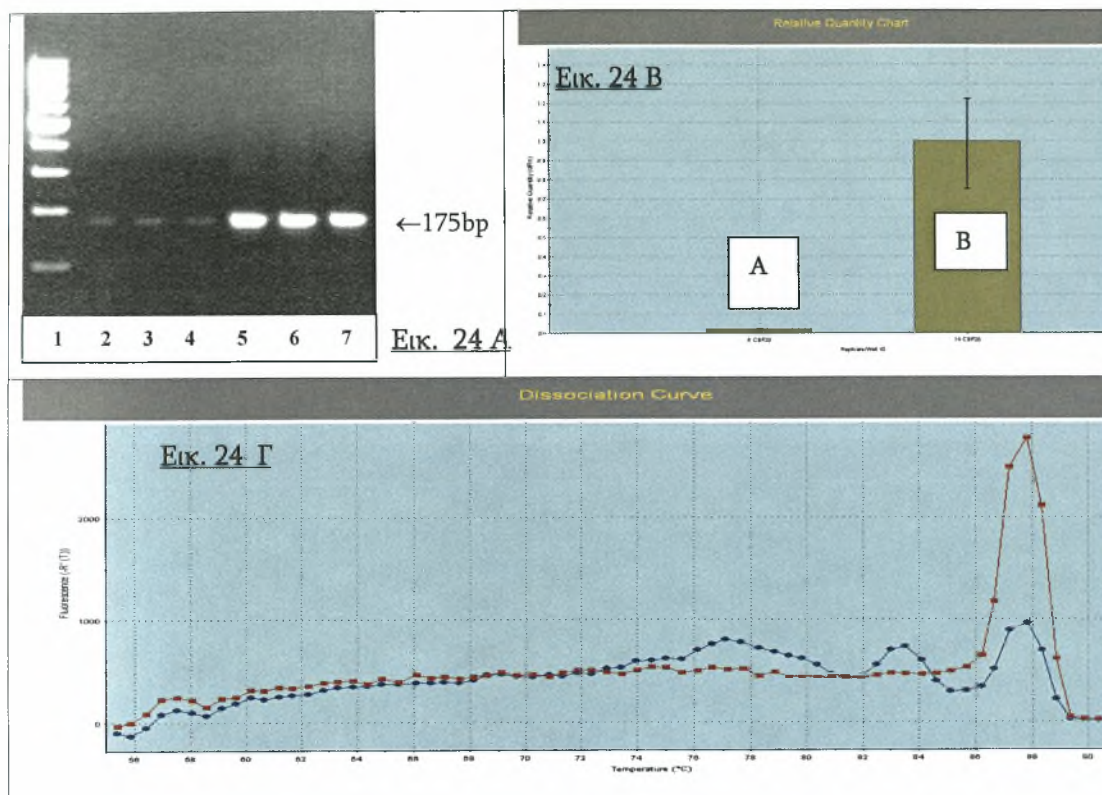




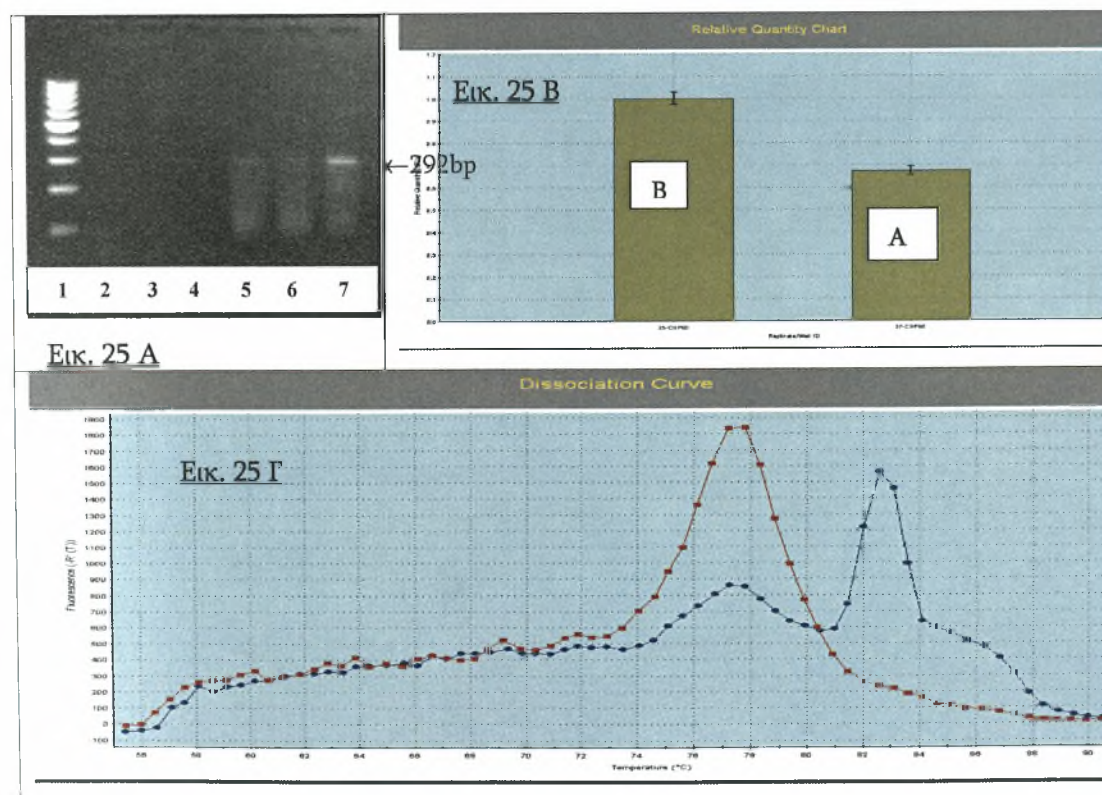
H2A



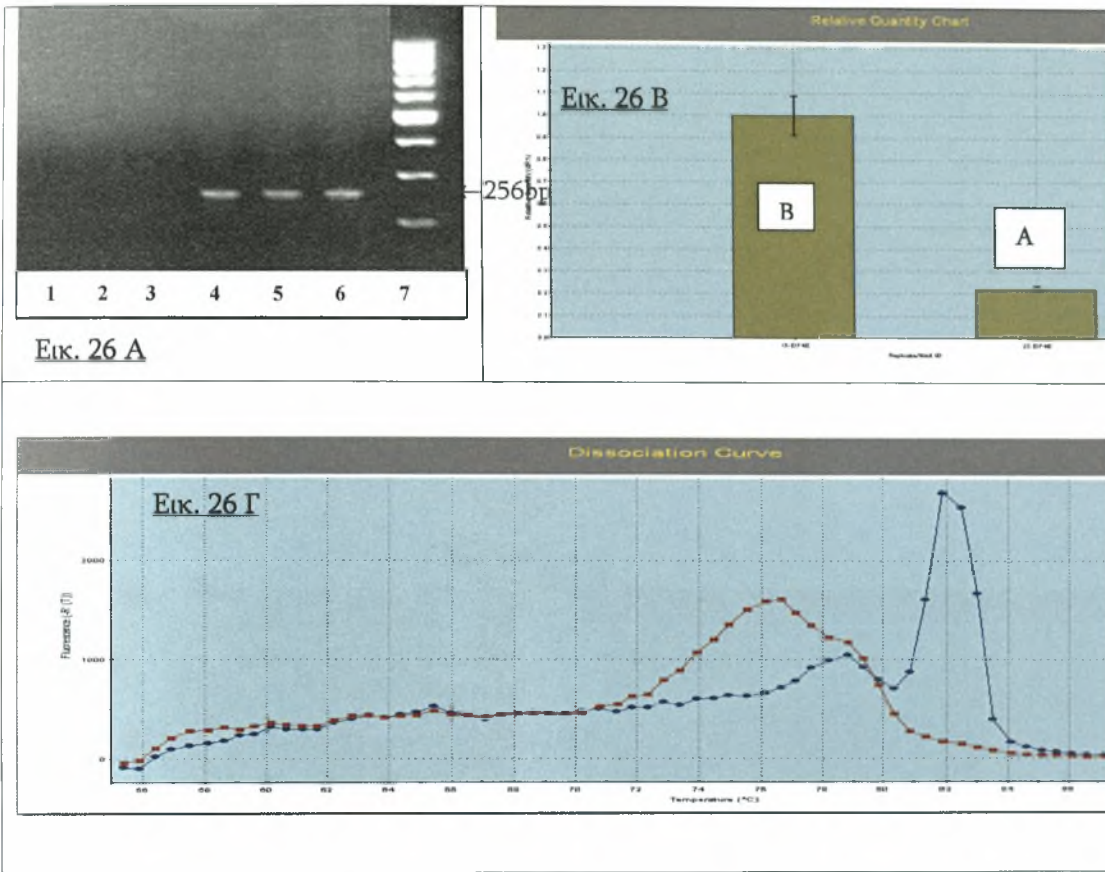
CBP20



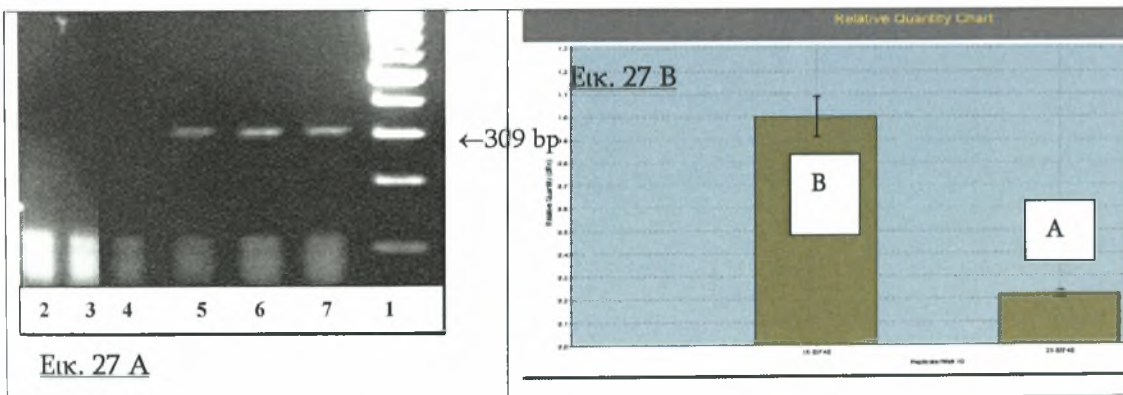
CBP80

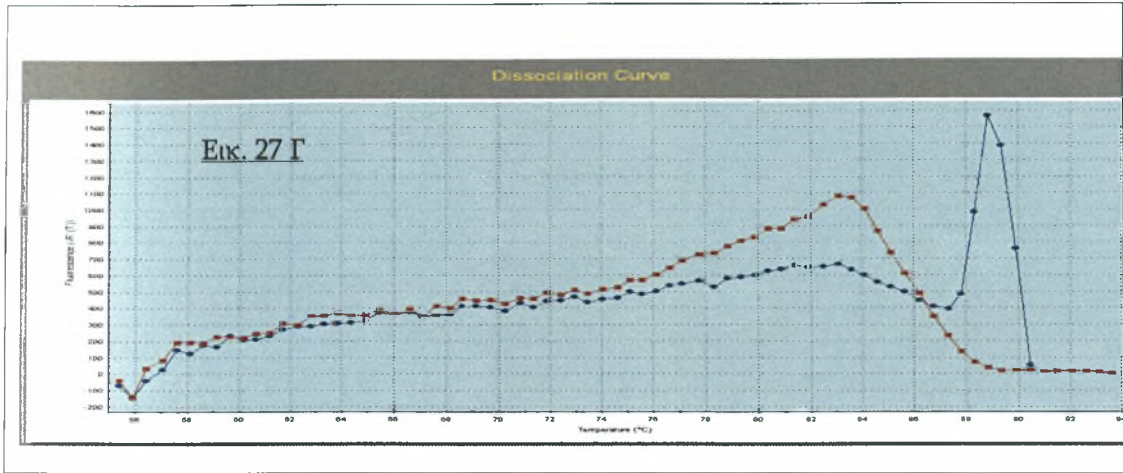


EIF4E

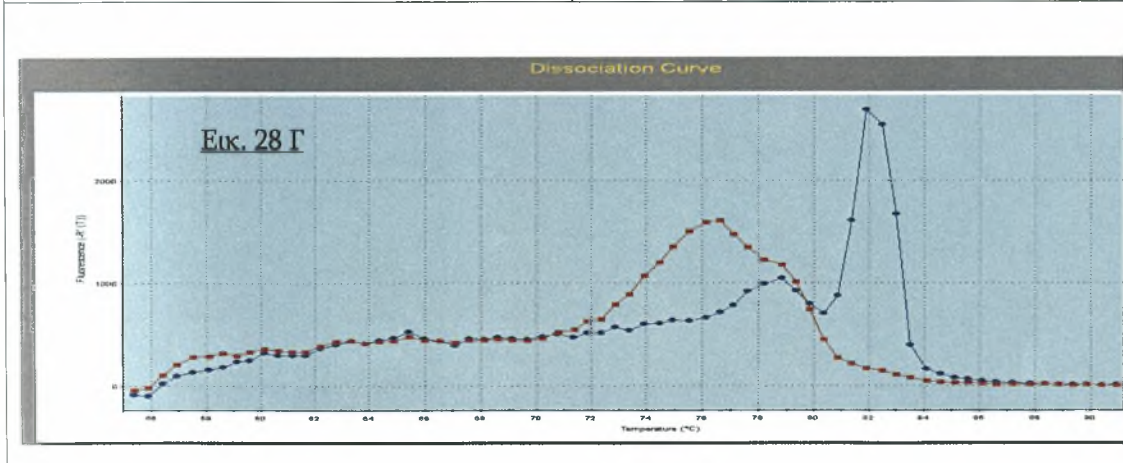
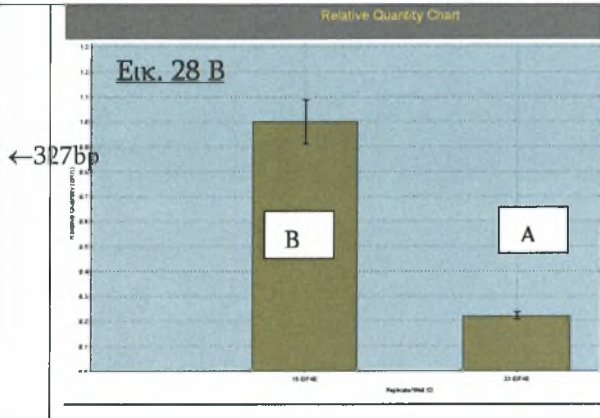
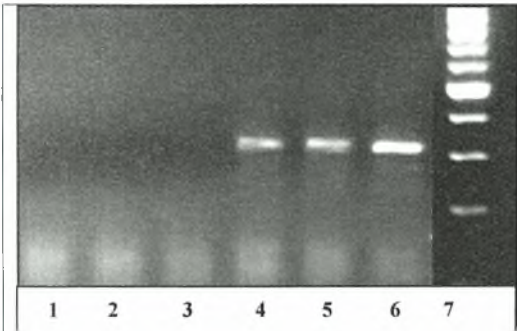


SLC2A1 (GLUT-1)

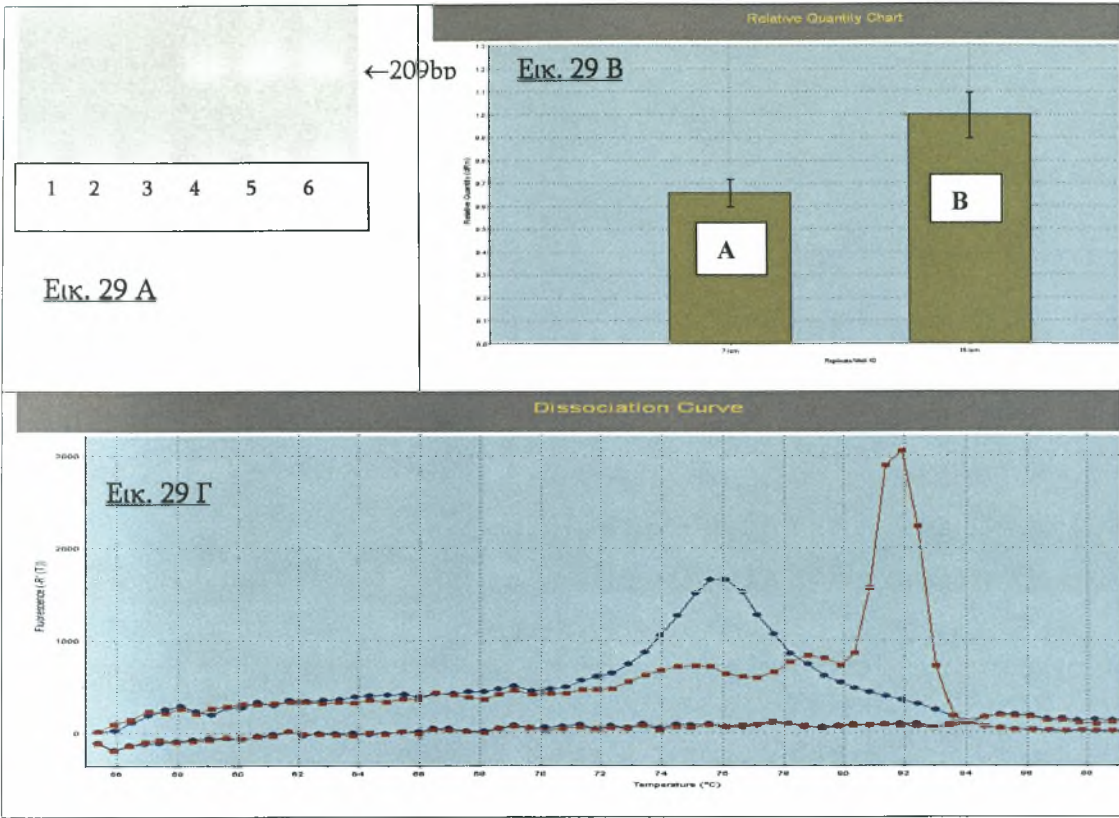




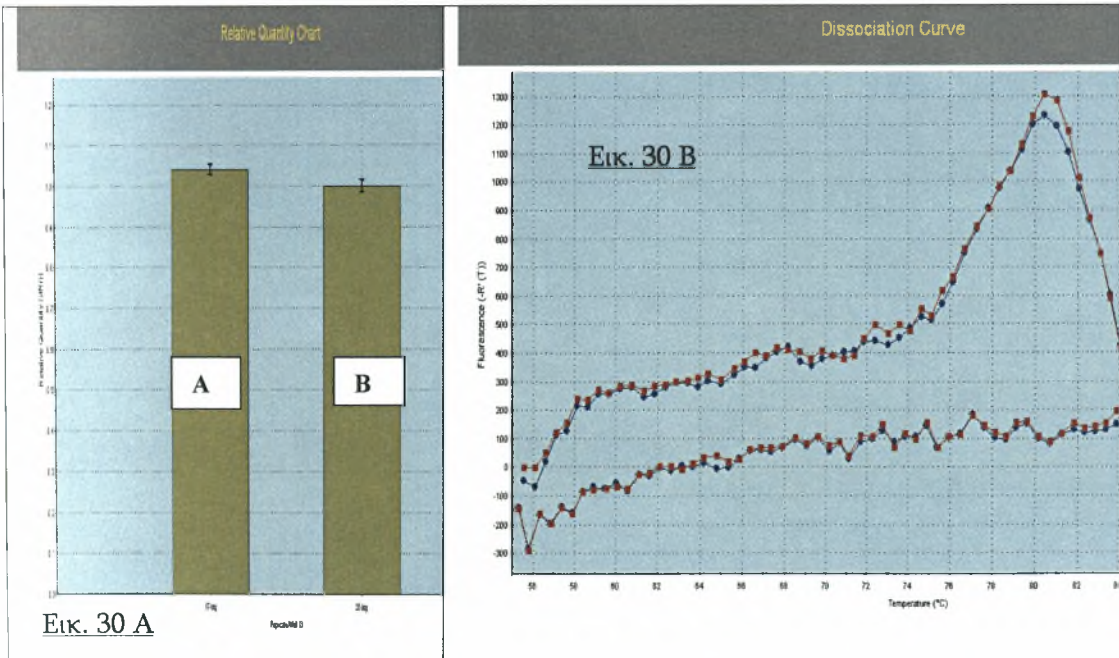
HIF 1-a



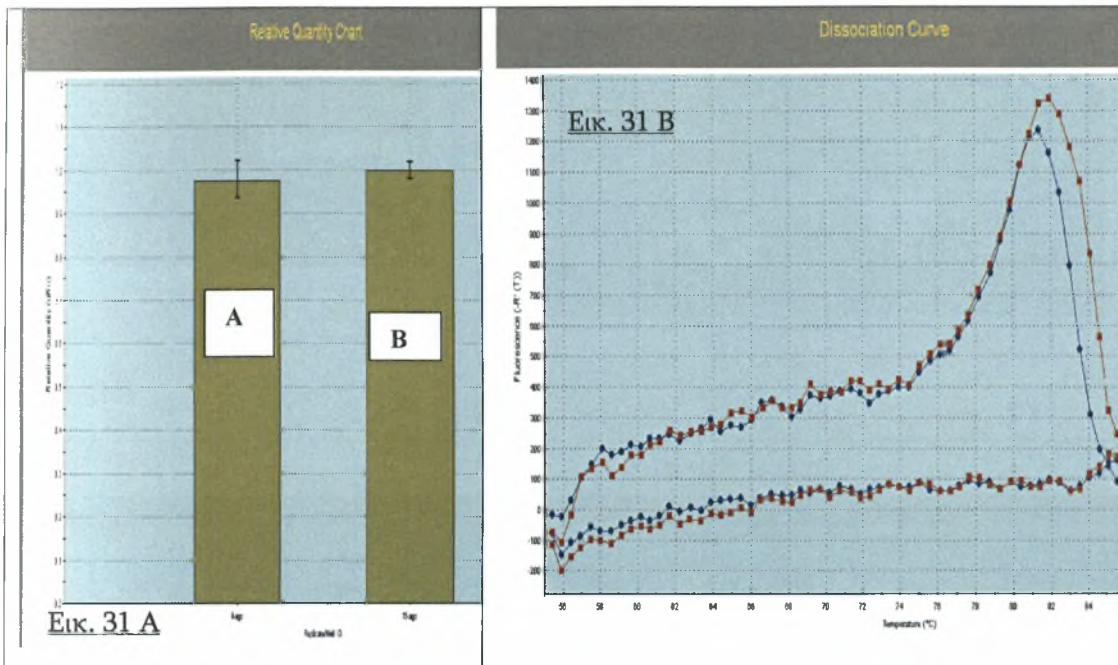
LSM



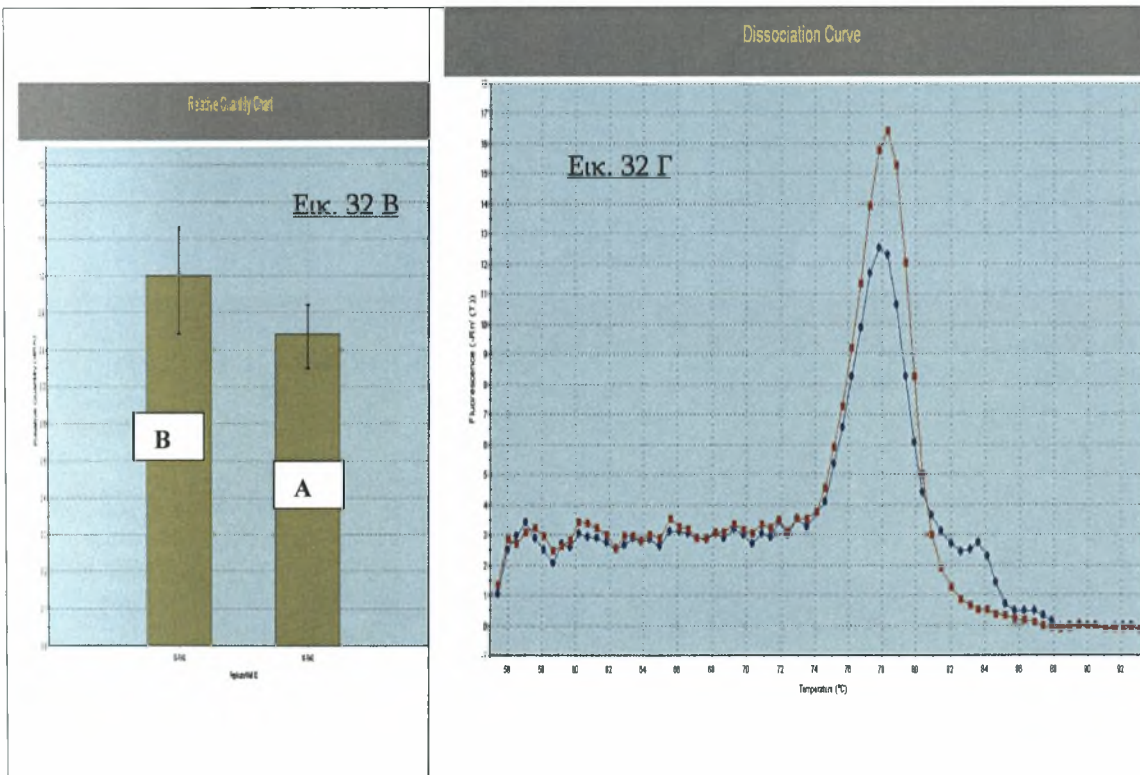
BTG2



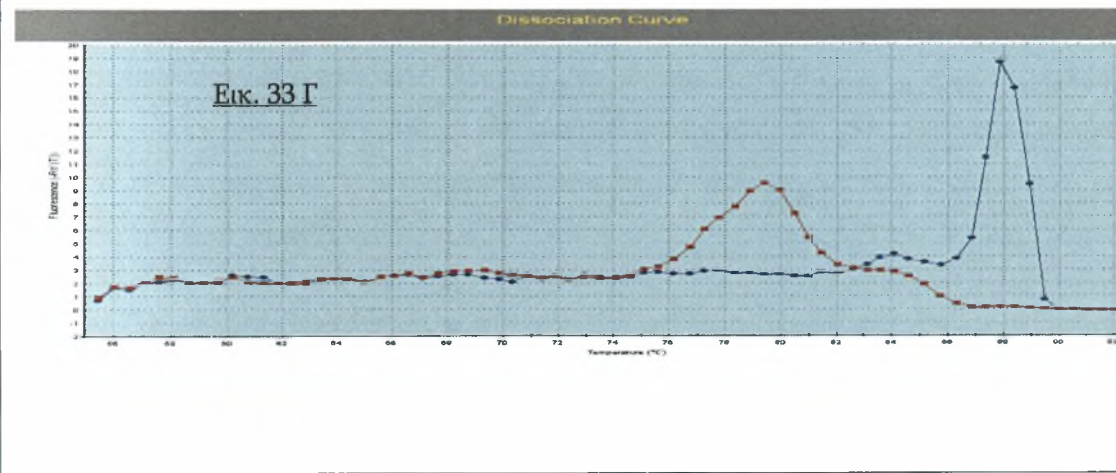
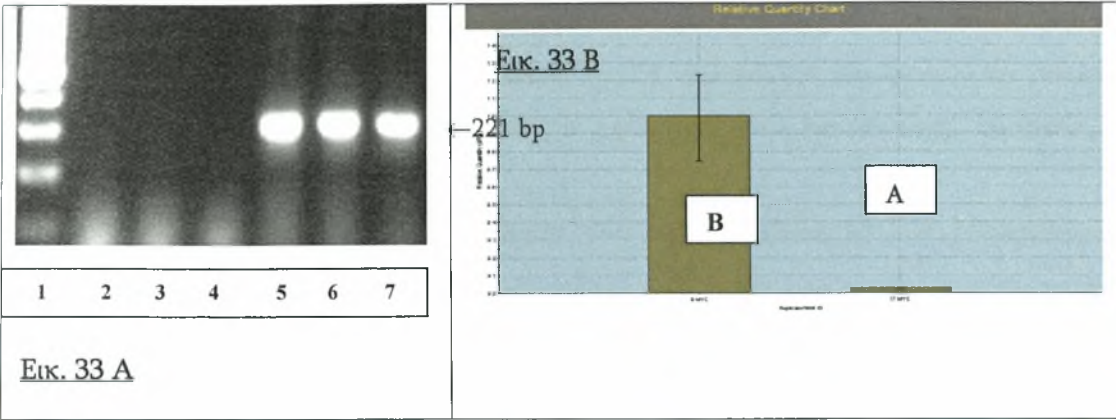
AGO2



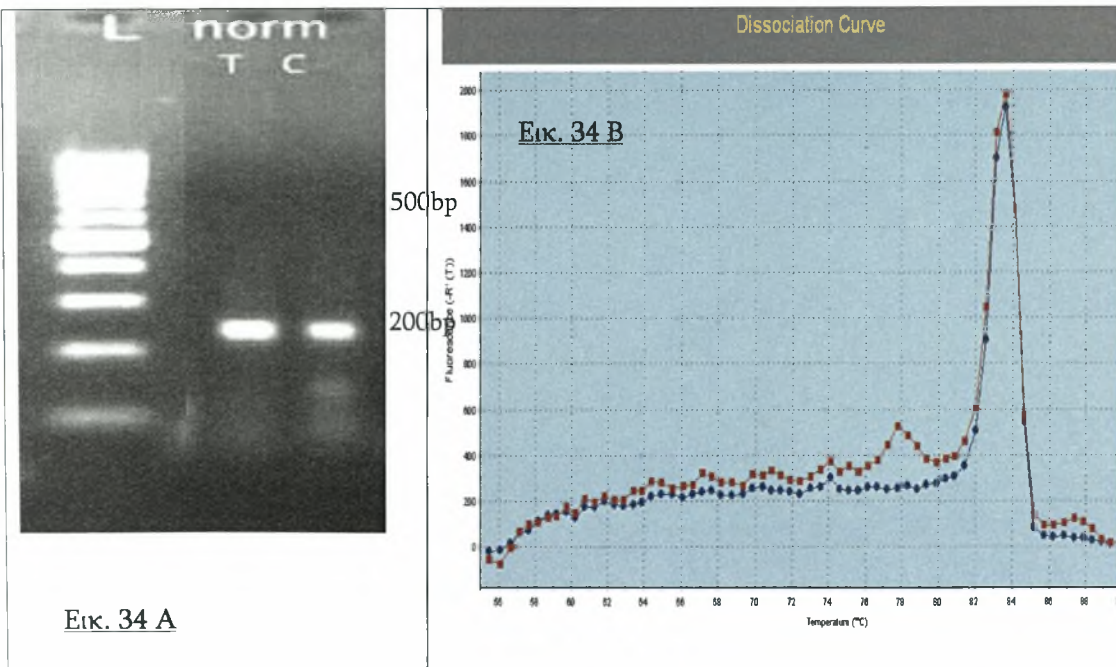
k-RAS



c-MYC



B-GLOBIN



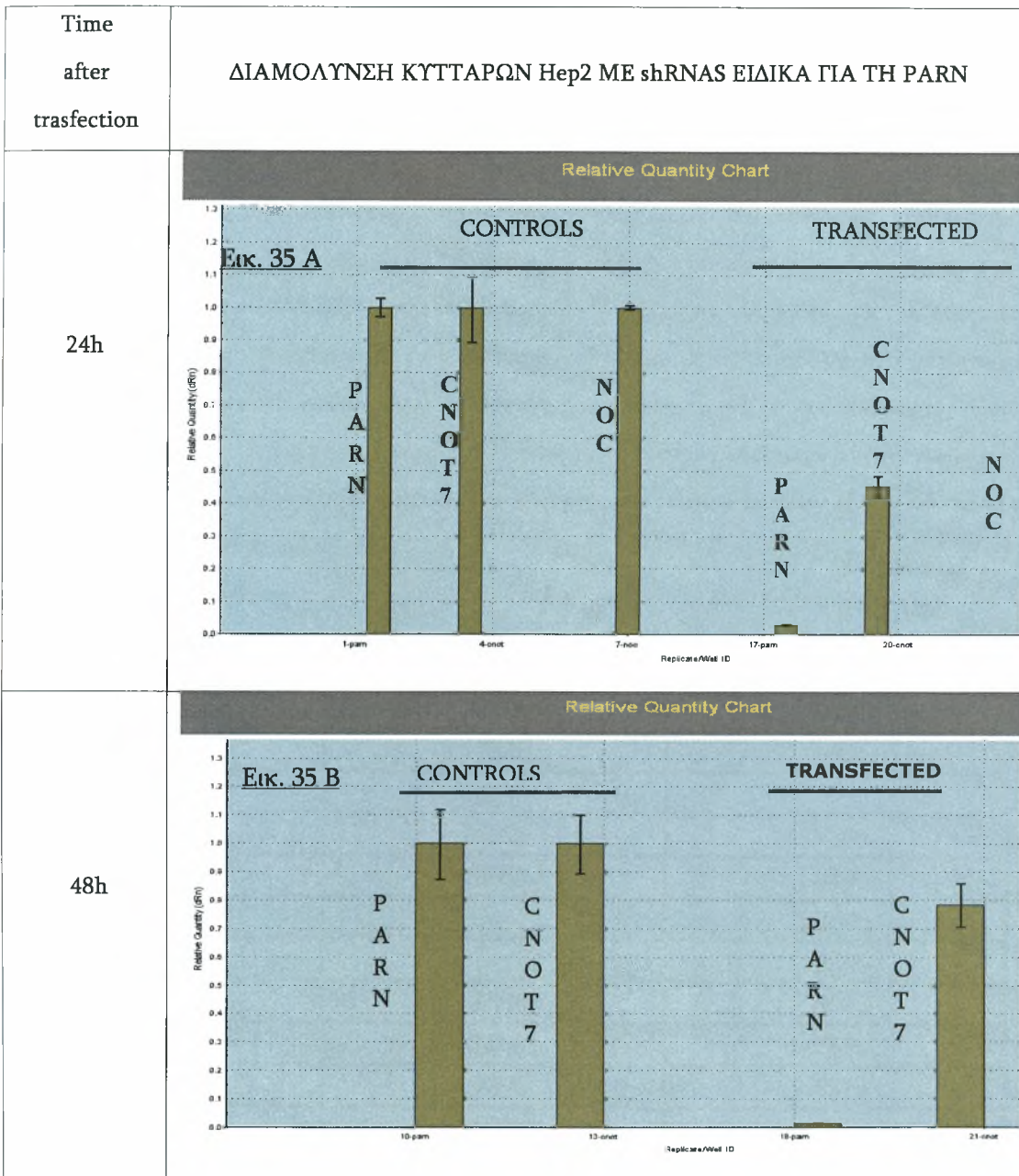
Εικ. 20-34A: Αποτελέσματα από ηλεκτροφόρηση, σε gel αγαρόζης 1% , των προϊόντων της RT-PCR όπου φαίνονται τα μοριακά βάρη των 15 παραγόντων των οποίων τα επίπεδα έκφρασης εξετάστηκαν (στην περίπτωση των Ago2, Btg2 και k-Ras δεν είχαμε ανιχνεύσιμο οπτικά προϊόν).

Εικ. 20-34B: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR [συγκεκριμένα παρουσιάζονται τα Relative quantity charts, $-Rn'(T)^*$]. Η στήλη A αντιπροσωπεύει τα σχετικά επίπεδα mRNA της PARN από τα διαμολυσμένα κύτταρα ενώ η στήλη B τα αντίστοιχα επίπεδα από τα φυσιολογικά, τα μη διαμολυσμένα κύτταρα (controls) 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

Εικ. 20-34Γ: Διαγράμματα διάστασης σήματος φθορισμού (dissociation plots). Η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από διαμολυσμένα κύτταρα ενώ η κόκκινη τα προϊόντα από μη διαμολυσμένα κύτταρα. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75°C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

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

4.6 Επίδραση της αποσιώπησης της PARN στα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών CNOT7 και Nocturnin (24 και 48 μετά τη διαμόλυνση)



Εικ. 35 A: Επίδραση της αποσιώπησης της PARN στα επίπεδα mRNA των αποαδενυλασών CNOT7 και Nocturnin 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

Εικ. 35 B: Επίδραση της αποσιώπησης της PARN στα επίπεδα mRNA των αποαδενυλασών CNOT7 και Nocturnin 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

4.7 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα επίδρασης αποσιώπησης της PARN στα επίπεδα mRNA των εξεταζόμενων παραγόντων

Πίνακας 7: Στην πρώτη στήλη του παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι εξεταζόμενοι παράγοντες. Στη δεύτερη στήλη παρουσιάζονται τα ποσοστά μείωσης/αύξησης % των επιπέδων mRNA του κάθε παράγοντα χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό control για κανονικοποίηση το ιδιосуστατικό γονίδιο της β-σφαιρίνης. Στην τρίτη στήλη παρουσιάζονται τα αντίστοιχα ποσοστά μεταβολής των επιπέδων mRNA του κάθε παράγοντα χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό control την ιστόνη H2A. Τα ποσοστά του πίνακα υπολογίστηκαν βάσει τις τιμές $-Rn'(T)$ που αντιστοιχούν στις κορυφές των ειδικών προϊόντων στα διαγράμματα αποδιάταξης σήματος φθορισμού. Αξίζει να σημειωθεί πως τα ποσοστά μεταβολής που υπολογίστηκαν δεν συμπίπτουν πάντα και με τις μεταβολές στα αντίστοιχα relative quantity charts, καθώς αυτά συνυπολογίζουν τόσο τα ειδικά όσο και τα μη ειδικά ενισχυμένα προϊόντα. Για την εξαγωγή των σχετικών ποσοστών, λήφθηκαν υπόψιν εκτός από τις dissociation curves και οι εικόνες ηλεκτροφόρησης, τα relative quantity charts και τα Ct's (threshold cycles) από την RT-PCR.

PARN	-75%	-70%
CNOT7	-80%	-74%
NOC	-75%	-68%
H2A	-41%	-
PABPC	-80%	-73%
LSM	-89%	-84%
AGO2	-	+30%
BTG2	-	+33%
GLUT1	-90%	-80%
HIF-1a	-80%	-75%
eIF4E	-78%	-65%
CBP20	-80%	-71%
CBP80	-77%	-67%
C-MYC	-90%	-80%
K-RAS	+10%	+42%

**ΜΕΤΑΒΟΛΗ %
(Με τη β-σφαιρίνη
ως εσωτερικό
control)**

**ΜΕΤΑΒΟΛΗ %
(Με την ιστόνη H2
A ως εσωτερικό
control)**

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

Οι περισσότεροι ευκαρυώτες διαθέτουν εκτός από την PAN και το σύμπλοκο της CCR4-NOT, ένα ακόμη ένζυμο αποαδενυλίωσης, την PARN (Meyer et al., 2004). Ο κεντρικός ρόλος της PARN στην αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs, καθιστά την ταυτοποίηση των πιθανών mRNA-στόχων της ένα ερευνητικό πεδίο με πολλές προκλήσεις.

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

Η εικόνα της ανοσοαποτύπωσης (**εικόνα 16**) αποδεικνύει σε πρώτη φάση την επιτυχία της *in vivo* αποσιώπησης της PARN σε επίπεδο πρωτεϊνών, ειδικότερα 72 και 96 ώρες μετά τη διαμόλυνση. Η επιτυχία της σίγησης επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα της RT-PCR, τα οποία έδειξαν μείωση κατά 75% (κανονικοποίηση με τη β-σφαιρίνη) των επιπέδων του mRNA της PARN στα διαμολυσμένα κύτταρα (72 ωρών) σε σύγκριση πάντα με τα κύτταρα μάρτυρες (control, επίσης 72 ωρών). Η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης εξασφαλίστηκε με τη χρήση λιποφεκταμίνης για τη διαμόλυνση των κυττάρων Her2 καθώς δεν είναι τοξική για τα κύτταρα και παρέχει δυνατότητα επιτυχούς εισαγωγής γενετικού υλικού σε ποσοστά 90-95%. Επιπλέον, για να αποκλεισθεί

και το ενδεχόμενο τα αποτελέσματα των αντιδράσεων να είναι πλασματικά λόγω της επίδρασης της διαδικασίας της διαμόλυνσης στα επίπεδα mRNA των επιλεγμένων παραγόντων, πραγματοποιήθηκε και διαμόλυνση κυττάρων Hep2 με άδειο πλασμιδιακό φορέα pSUPER. Τα αποτελέσματα της RT-PCR έδειξαν πως η διαμόλυνση αυτή καθ' αυτή δεν επηρεάζει τα επίπεδα της PARN. Επίσης, για την επιτυχία της διαμόλυνσης κρίθηκε απαραίτητη η ταυτόχρονη χρήση και των τεσσάρων διαθέσιμων shRNAs έναντι της PARN, τα οποία στοχεύουν σε διαφορετικές περιοχές κατά μήκος ολόκληρου του mRNA της PARN. Τέλος, το ολικό RNA που απομονώθηκε τόσο από τα control όσο και από τα διαμολυσμένα κύτταρα, ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για την ακεραιότητά του, ενώ πριν την χρησιμοποίησή του ως υπόστρωμα στην RT-PCR προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή του.

Σε τεχνικές μελέτης γονιδιακής έκφρασης είναι αναγκαία η χρήση ενός ιδιοσυστατικού γονιδίου, το οποίο πιστεύεται πως έχει σταθερή έκφραση (*housekeeping gene*) για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων (Wong and Medrano, 2005). Ως εσωτερικό control για τη εξαγωγή των αποτελεσμάτων της RT-PCR της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκε το ιδιοσυστατικό γονίδιο της β-σφαιρίνης. Για ακόμη μεγαλύτερη αξιοπιστία (καθώς δεν είναι γνωστό στην βιβλιογραφία αν το mRNA της β-σφαιρίνης αποτελεί ή όχι στόχο για την PARN) χρησιμοποιήθηκε και ένα δεύτερο εσωτερικό control, η ιστόνη H2A. Το mRNA των ιστονών είναι το μοναδικό που δεν πολυαδενυλιώνεται, παρά μόνο το άκρο του έχει μία συντηρημένη δομή θηλειάς (*loop-structure*) στην 3'-UTR περιοχή, η οποία είναι απαραίτητη για την γρήγορη αποικοδόμηση του mRNA. Εφόσον το mRNA των ιστονών δεν αποαδενυλιώνεται δεν θα έπρεπε να επηρεάζεται από τις αλλαγές των επιπέδων των αποαδενυλασών. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο αυτό γίνεται εμφανές από την **εικόνα** ανοσοαποτύπωσης **19**, όπου φαίνεται πως η αποσιώπηση της PARN δεν επηρεάζει τα επίπεδα της ιστόνης 2 A 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση. Ωστόσο από τις εικόνες **23 A, B** και **Γ** φαίνεται πως η αποσιώπηση έχει επίδραση στα επίπεδα mRNA της H2A καθώς

μειώνονται στα διαμολυσμένα κύτταρα. Μία εξήγηση για αυτή την παρατήρηση είναι η πιθανότητα τα κύτταρα να συλλέχθηκαν ενώ η πλειοψηφία τους βρισκόταν στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, καθώς είναι γνωστό πως η σύνθεση των ιστονών πραγματοποιείται κυρίως στο συγκεκριμένο στάδιο και κατά συνέπεια μειώνονται δραματικά τα επίπεδα των mRNAs τους (Wu and Bonner, 1981; Nelson et al., 2002).

Από τον **πίνακα 7**, γίνεται σαφές ότι η αποσιώπηση της PARN έχει ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση στα επίπεδα mRNA των παραγόντων Ago2, Btg2 και k-Ras (κανονικοποίηση με ιστόνη H2A), ενώ τα επίπεδα έκφρασης των υπολοίπων παραγόντων μειώνονται σε μεγάλο βαθμό. Ένα mRNA του οποίου τα επίπεδα αυξάνονται λόγω της αποσιώπησης της PARN (όπως αυτά των Ago2, Btg2 και k-Ras), πιθανότατα αποτελεί άμεσο στόχο της. Βέβαια, αυτό δεν μπορεί να ειπωθεί με απόλυτη σιγουριά και περαιτέρω διερεύνηση με επανάληψη του πειράματος και τη βοήθεια της τεχνικής των DNA μικροσυστοιχιών (*DNA microarrays*) μπορεί να αποσαφηνίσει αυτή την υπόθεση. Από την άλλη, όταν τα επίπεδα ενός mRNA ελαττώνονται, η κατάσταση περιπλέκεται. Πιθανότα, τα συγκεκριμένα mRNAs υπόκεινται σε διαφορετικό μηχανισμό ελέγχου των επιπέδων τους μετά την αποσιώπηση της PARN, ο οποίος είτε σχετίζεται με την ενεργοποίηση άλλων αποαδενυλασών που καταστρέφουν δίχως ρύθμιση το mRNA-στόχο είτε την εμπλοκή εναλλακτικών παραγόντων αποικοδόμησης (π.χ miRNAs).

Το πρότυπο έκφρασης που προέκυψε μετά την αποσιώπηση της PARN (**πίνακας 7**) συγκρίθηκε με το αντίστοιχο πρότυπο μετά την αποσιώπηση της υπομονάδας CNOT7 του συμπλέγματος CCR4-NOT (η αποσιώπηση αυτή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια άλλης εργασίας) (**πίνακας 8**).

Πίνακας 8: Συγκριτικός πίνακας επίδρασης αποσιώπησης της PARN και αποσιώπησης της CNOT7 στα επίπεδα mRNA επιλεγμένων παραγόντων (τα ποσοστά του πίνακα 8 προέχονται από περισσότερα δεδομένα και δεν υπολογίσθηκαν βάσει μόνο των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας).

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

* % των επιπέδων mRNA στα μη διαμολυσμένα κύτταρα (control)

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

Συνοψίζοντας, στην παρούσα εργασία αποσιωπήσαμε την PARN *in vivo* και εξετάσαμε την επίδραση στα επίπεδα mRNA μιας σειράς παραγόντων, στα πλαίσια μιας πρώτης προσπάθειας να ταυτοποιηθούν τα mRNAs-στόχοι της και να δοθεί μια απάντηση στο ερώτημα της ύπαρξης μιας τόσο μεγάλης ποικιλίας αποαδενυλασών. Βέβαια, πληρέστερη εικόνα τόσο για την PARN όσο και για

άλλες σημαντικές ευκαρυωτικές αποαδενυλάσες (εκπροσώπους τόσο των DEDD όσο και των EEP αποδενυλασών), θα έχουμε μετά τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών, στις οποίες θα είναι μόνιμα αποσιωπημένα τα συγκεκριμένα ένζυμα και η ακόλουθη επίδραση αυτών των σιγήσεων στα επίπεδα έκφρασης του συνόλου των παραγόντων που υπάρχουν στον άνθρωπο. Προς την κατεύθυνση αυτή και πάλι είναι απαραίτητη η χρήση της τεχνικής των DNA μικροσυστοιχιών.

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Κλωνοποίηση, Υπερέκφραση και Απομόνωση ενός μεταλλάγματος της ανθρώπινης PARN

Παράλληλα με το κύριο πείραμα της αποσιώπησης της PARN σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση και δοκιμασία υπερέκφρασης και απομόνωσης ενός μεταλλάγματος της ανθρώπινης PARN, από το οποίο λείπουν τα κατάλοιπα 524-639. Δηλαδή απουσιάζει η εύκαμπτη καρβοξυτελική ουρά που φέρει την αλληλουχία NLS, αλλά εμπεριέχεται η RRM περιοχή. Υπενθυμίζεται πως η ανθρώπινη PARN αποτελείται από 639 κατάλοιπα και μέχρι σήμερα έχει προσδιοριστεί η κρυσταλλική δομή της PARN 1-430. Η πλασμιδιακή κατασκευή pET-15b-PARN (1-523), που δημιουργήθηκε ως αποτέλεσμα του συγκεκριμένου πειράματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την έκφραση, απομόνωση και καθαρισμό μεγάλων ποσοτήτων της PARN (1-523), προκειμένου να αποτελέσουν το κατάλληλο υπόστρωμα για μελέτες προσδιορισμού της δομής της με κρυσταλλογραφία ακτίνων X και αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης της PARN.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση του τμήματος 1-523 του γονιδίου της hPARN. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της PARN κλωνοποιημένο στον πλασμιδιακό φορέα pET-33b και οι εκκινήτες της **εικόνας 36**. Αναλυτικά οι συνθήκες της αντίδρασης και οι ποσότητες των επιμέρους αντιδραστηρίων παρουσιάζονται στους **πίνακες 9** και **10** αντίστοιχα. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ακολουθεί ένα επιπλέον στάδιο σε θερμοκρασία 72°C για 10 λεπτά όπου τοποθετείται στο tube αντίδρασης 0,5 μl Taq πολυμεράση (New England Biolabs) από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* προκειμένου να προστεθεί στα προϊόντα

του πολυμερισμού μία πολύ-A ουρά, καθώς η Pfu πολυμεράση δεν έχει την ικανότητα αυτή. Η εικόνα που προέκυψε μετά την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πηκτή αγαρόζης 1%, επιβεβαίωσε την ορθότητα της ενίσχυσης εφόσον είναι ευδιάκριτη μια ειδική ζώνη που αντιστοιχεί στις 1,57 kb, όσο, δηλαδή, είναι και το αναμενόμενο μέγεθος του κολοβωμένου γονιδίου της PARN 1-523 (εικόνα 37).

Mutant PARN (1-523) NdeI Forward primer
5' - TCG CAT ATC GAG ATA ATC AGG AGC A - 3'
GC Content 44%, Tm=53 °C
Mutant PARN (1-523) XhoI Reverse primer
5' - CTC GAG TTA TTT GAT CTG CTT CTC TTC - 3'
GC Content 37% , Tm=55 °C

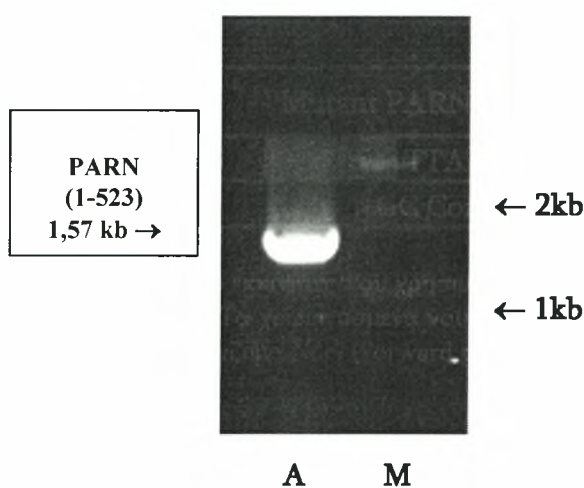
Εικόνα 36: Οι δύο εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του κολοβωμένου γονιδίου της PARN 1-523. Τα χρωματισμένα νουκλεοτίδια αντιστοιχούν στις επιθυμητές θέσεις κοπής από τα περιοριστικά ένζυμα NdeI (Forward primer) και XhoI (Reverse primer).

Πίνακας 9: Συστατικά αντίδρασης PCR

Component	μl /50μl of reaction
Pfu Ultra DNA polymerase	1
10X reaction buffer	5
Template DNA (20ng/μl)	5
FWD primer 10μM	1
REV primer 10μM	1
dNTPs 2,5mM each	5
Sterile water	Up to 50

Πίνακας 10: Συνθήκες αντίδρασης PCR για την ενίσχυση της PARN (1-523).

Βήμα αντίδρασης	Συνθήκες
μετουσίωση	95 °C, 4min (1 cycle)
μετουσίωση	95 °C, 30sec (35-40 cycles)
υβριδισμός	50 °C, 45sec (35-40 cycles)
πολυμερισμός	72 °C, 1,5min (35-40 cycles)



Εικόνα 37: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR σε πηκτή αγαρόζης 1%. Διακρίνεται καθαρά η ειδική ζώνη στις 1,57kb που αντιστοιχεί στο κολοβωμένο γονίδιο της PARN. A. δείγμα M. μάρτυρας DNA.

2. Ακολούθησε ένωση (ligation) της PARN 1-523 με τον πλασμιδιακό φορέα pSC-A που παρέχεται στο Strataclone PCR Cloning kit της Stratagene. Για την πραγματοποίηση του ligation προστέθηκαν με την ακόλουθη σειρά τα εξής συστατικά:

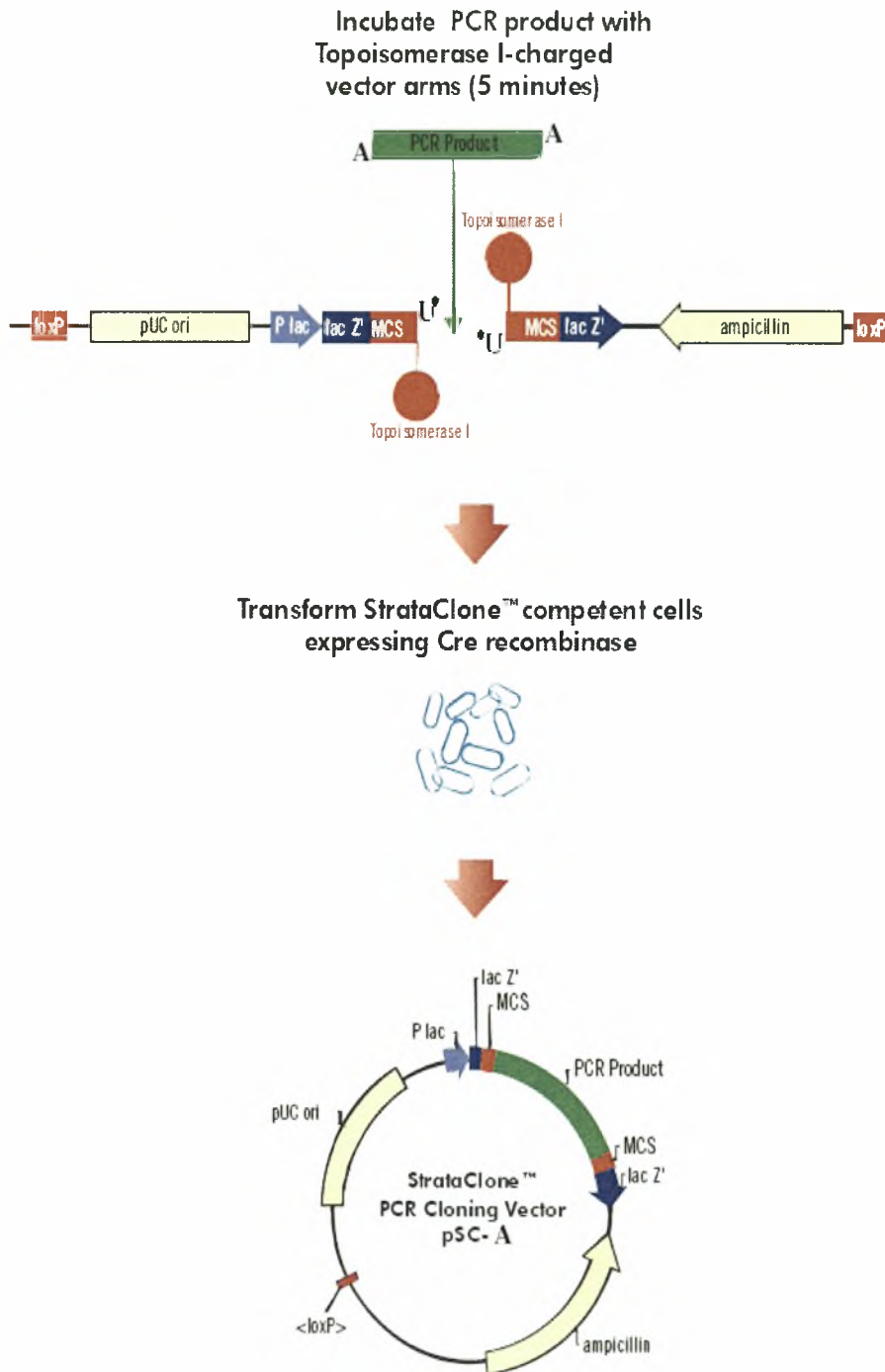
- 3 μl Strataclone Cloning Buffer
- 2 μl PCR product (5-50ng)
- 1 μl Strataclone Vector Mix

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και μετασχηματισμός με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο επιδεκτικών κυττάρων που παρέχονται επίσης από το kit (Strataclone™ Solopack Competent Cells). Για την ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε επίστρωση αυτών και επώαση στους 37°C σε τριβλία άγαρ περιέχοντα αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml καθώς και x-gal.

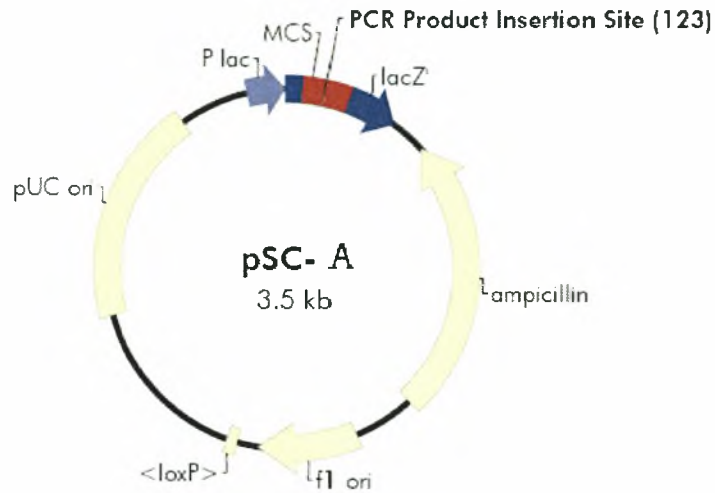
pSC-A: Πρόκειται για πλασμδιακό φορέα μεγέθους 3.5kb που χρησιμοποιείται για τη κλωνοποίηση γονιδίων (Stratagene). Η διαδικασία της κλωνοποίησης με το συγκεκριμένο φορέα εκμεταλλεύεται τις συνδυασμένες δράσεις της τοποϊσομεράσης I από το ιό Vaccinia και της ρεκομπινάσης Cre από τον βακτηριοφάγο P1. *In vivo*, η τοποϊσομεράση I συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA χαλαρώνοντας και επανασυνδέοντας τις έλικες του DNA. Ειδικότερα, η τοποϊσομεράση I κόβει τη φωσφοδιεστερική ραχοκοκαλιά μιας αλυσίδας DNA ακριβώς μετά την αλληλουχία '5-CCCTT δημιουργώντας μια ενδιάμεση ένωση DNA-ενζύμου, η οποία συντηρεί την ενέργεια δεσμού που πρόκειται να χρειαστεί για την επανελίκωση του κομμένου DNA πίσω στη σωστή έλικα. Από τη στιγμή που δημιουργηθεί το ενδιάμεσο αυτό, η αντίδραση επανελίκωσης μπορεί επίσης να συμβεί με ένα ετερόλογο τμήμα DNA. Η ρεκομπινάση Cre καταλύει τον ανασυνδιασμό μεταξύ δύο loxP αλληλουχιών αναγνώρισης.

Το μείγμα φορέων που παρέχεται με το PCR cloning kit της Stratagene περιέχει βραχίονες DNA δύο ειδών, καθένας από τους οποίους στο ένα άκρο του φέρει μια τοποϊσομεράση I και στο άλλο μια περιοχή αναγνώρισης loxP. Τα φορτισμένα με την τοποϊσομεράση άκρα διαθέτουν μια προεξοχή τροποποιημένης ουριδίνης (U*). Με αυτόν τον τρόπο τα ενισχυμένα με Taq πολυμεράση προϊόντα της PCR, τα οποία φέρουν '3-A προεξοχές μπορούν να ενωθούν αποτελεσματικά με τους παραπάνω βραχίονες μέσω του σχηματισμού δεσμών A- U*, ακολουθούμενου από την σύνδεση των αλυσίδων DNA με τη βοήθεια της τοποϊσομεράσης I (**εικόνα 38**). Το γραμμικό μόριο DNA που προκύπτει στη συνέχεια, μετασχηματίζει επιδεκτικά κύτταρα που έχουν την ικανότητα σύνθεσης της ρεκομπινάσης Cre, η οποία με τη σειρά της ανασυνδιάζει τις περιοχές loxP στα άκρα του γραμμικού μορίου. Έτσι, σχηματίζεται ο κυκλικός φορέας pSC-A (**εικόνα 39**) που έχει την ικανότητα ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο παρουσία

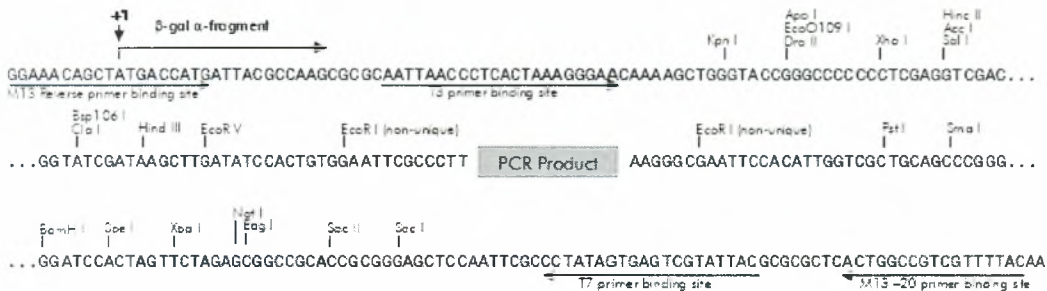
αμπικιλίνης και περιέχει το σπερόνιο της λακτόζης (*lacZ*) προκειμένου να είναι δυνατή η επιλογή με white/blue screening.



Εικόνα 38: Σύνοψη της μεθόδου στην οποία στηρίζεται ο μετασχηματισμός με τη βοήθεια του Strataclone PCR cloning kit.



pSC-A PCR Cloning Vector PCR Product Insertion Site Region
(sequence shown 3460–3469, 1–252)



Feature	Nucleotide Position
β -galactosidase α -fragment coding sequence (<i>lacZ'</i>)	1–354
Multiple cloning site (MCS)	57–197
PCR product insertion site	123
ampicillin resistance (<i>bla</i>) ORF	465–1322
f1 origin of ss-DNA replication	1514–1820
<loxP> (mutant <i>loxP</i> -derived sequence <i>lox66/77</i> ; nonfunctional in Cre-mediated recombination)	1887–1920
pUC origin of replication	2461–3128
<i>lac</i> promoter	3350–3469

Εικόνα 39: Ο κυκλικός φορέας pSC-A. Ο χάρτης της εικόνας αντιπροσωπεύει το προϊόν της ένωσης των βραχιόνων του φορέα με το επιθυμητό προϊόν της PCR στα πλαίσια μιας αντίδρασης που καταλύεται από την τοποϊσομεράση I και ακολουθείται από Cre-εξαρτώμενο ανασυνδιασμό. Επίσης, παραχωρείται και μια λίστα από σημαντικές αλληλουχίες του φορέα, όπως οι θέσεις κοπής των περιοριστικών ενζύμων, η περιοχή στην οποία οφείλεται η ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη κτλ.

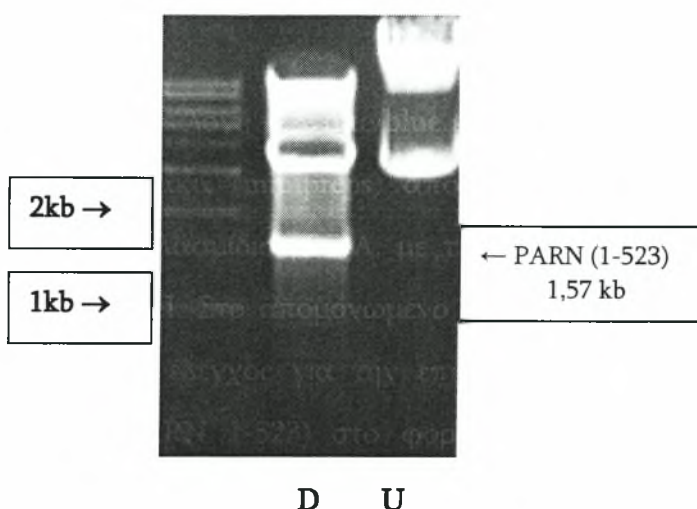
➤ Strataclone™ Solopack Competent Cells

Τα συγκεκριμένα κύτταρα παρέχονται από το Strataclone PCR Cloning Kit της Stratagene και διαθέτουν την ικανότητα έκφρασης της ρεκομπινάσης Cre, η οποία απαιτείται για την κυκλοποίηση των γραμμικών μορίων DNA που παράγονται κατά τη διάρκεια του καταλυόμενου από την τοποισομεράση I ligation. Επίσης, τα κύτταρα αυτά υποστηρίζουν την επιλογή βάσει των μπλε και άσπρων αποικιών (blue/white screening) όταν μετασχηματισθούν με το πλασμίδιο pSC-A, το οποίο παρέχεται από το ίδιο kit και εξασφαλίζουν μετασχηματισμό υψηλής απόδοσης.

3. Μετά από επιλογή με white/blue screening, απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA σε μικρή κλίμακα (minipreps) από λευκές αποικίες κυττάρων που έλαβαν επιτυχώς το πλασμίδιο pSC-A, με τη βοήθεια του Nucleospin Plasmid kit της Macherey Nagel. Στο απομονωμένο πλασμιδιακό DNA από κάθε εξεταζόμενη αποικία, έγινε έλεγχος για την επιτυχία της ενσωμάτωσης του επιθυμητού ενθέματος (PARN 1-523) στο φορέα pSC-A, με χρήση των περιοριστικών ενζύμων NdeI και XhoI (της εταιρίας Takara). Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε διπλή αντίδραση πέψης διάρκειας 2 ωρών στους 37°C. Όπως αναμενόταν μετά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης και έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία, στους θετικούς κλώνους προέκυψαν δύο ζώνες: μία μεγέθους περίπου 3,5kb που αντιστοιχεί στον γραμμοποιημένο πλασμιδιακό φορέα pSC-A και μία μεγέθους περίπου 1,57 kb που αντιστοιχεί στο ένθεμά μας. Η επιτυχία της ένθεσης επιβεβαιώθηκε αργότερα και με αλληλούχιση.

4. Η πειραματική διαδικασία συνεχίστηκε με υποκλωνοποίηση του γονιδίου της PARN 1-523 στον πλασμιδιακό φορέα pET15b. Η αντίδραση της ένωσης ανάμεσα στα δύο παραπάνω τμήματα πραγματοποιήθηκε στους 16°C O/N και στηρίχθηκε στη δημιουργία κολλωδών συμπληρωματικών άκρων μετά από πέψη με κοινά περιοριστικά ένζυμα (NdeI και XhoI). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η T4 DNA λιγάση της Fermentas. Έπειτα, ακολούθησε η

μεταφορά του προϊόντος της αντίδρασης σύνδεσης σε επιδεκτικά κύτταρα DH5a, με τη διαδικασία του μετασχηματισμού μέσω ηλεκτροδιάτρησης. Η ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων έγινε στους 37°C σε τριβλία άγαρ με το αντιβιοτικό αμικικιλίνη στη συγκέντρωση που ήδη αναφέρθηκε παραπάνω. Ο έλεγχος για την ύπαρξη θετικών κλώνων στηρίχθηκε και πάλι σε πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XhoI (**εικόνα 40**).

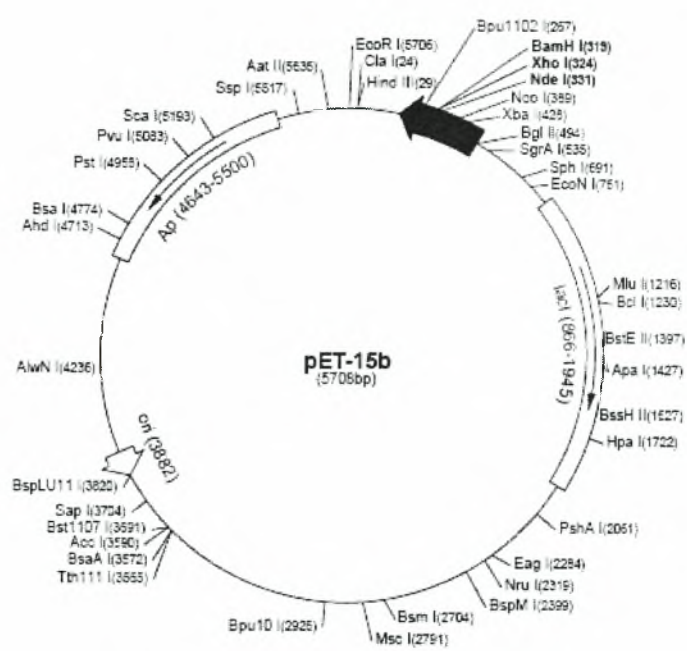


Εικόνα 40: Απεικόνιση των τμημάτων που προκύπτουν μετά την πέψη του ανασυνδυασμένου pET15b-PARN (1-523) με τα ένζυμα περιορισμού NdeI και XhoI. U: Πλασμίδιο που δεν έχει υποστεί πέψη. D: Πλασμίδιο που έχει υποστεί διπλή πέψη με NdeI και XhoI. Η ζώνη στις 1,57 kb του δείγματος D αντιστοιχεί στο κολοβωμένο γονίδιο της PARN, ενώ ύπαρξη κι άλλων ζωνών μεγαλύτερου μεγέθους υποδηλώνουν μερική πέψη και διάφορες μορφές υπερλίκωσης του ανασυνδυασμένου pET15b.

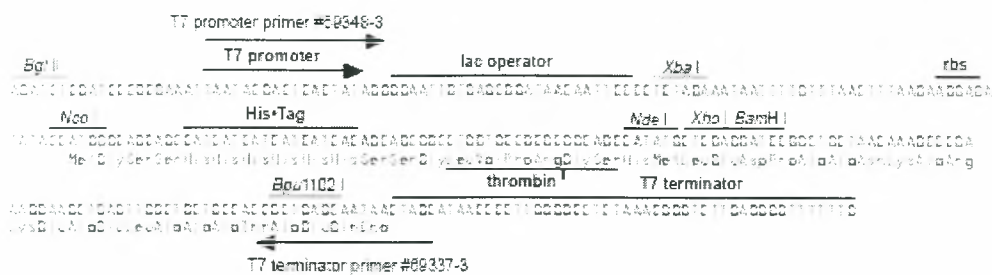
pET-15b: Πρόκειται για πλασμιδιακό φορέα μεγέθους 5708bp (Novagen), ο οποίος διαθέτει το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη (**εικόνα 41**). Χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση και έκφραση γονιδίων μέσω της T7 RNA πολυμεράσης. Στο πλασμίδιο pET-15b μετά τον προαγωγέα της T7 RNA πολυμεράσης υπάρχει ο πολυσυνδέτης (polylinker), όπου βρίσκονται όλες οι θέσεις αναγνώρισης και κοπής από τα ένζυμα περιορισμού (**εικόνα 42**). Φέρει επίσης His-tag στο αμινοτελικό άκρο.

Έτσι, με τη χρήση των κατάλληλων ενζύμων είναι δυνατή η εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου, όπως είναι στη συγκεκριμένη περίπτωση το γονίδιο του γονιδίου

της PARN 1-523 στο εσωτερικό του polylinker και στη συνέχεια, η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου αυτού μετά από την πρόσδεση της T7 RNA πολυμεράσης στον προαγωγέα της. Επιπλέον έξι τριάδες νουκλεοτιδίων που κωδικοποιούν έξι ιστιδίνες προστίθενται στην αρχή της αμινοξικής αλληλουχίας (αμινοτελικό άκρο) της PARN 1-523 και είναι απαραίτητες για τη διαδικασία καθαρισμού της με χρωματογραφία συγγένειας (συγκεκριμένα με στήλη νικελίου). Παρ' όλα αυτά, ο pET-15b δε διαθέτει το οπερόνιο της λακτόζης (lacZ), με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η επιλογή των αποικιών που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο με blue/white screening.



Εικόνα 41: Ο πλασμιδιακός φορέας pET-15b.



pET-15b cloning/expression region

Εικόνα 42: Ο προαγωγέας της T7 RNA πολυμεράσης και ο πολυσυνδέτης (polylinker) του φορέα pET-15b. Στο εσωτερικό του πολυσυνδέτη διακρίνονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων NdeI και XhoI, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας. Πριν τις συγκεκριμένες θέσεις διακρίνεται το His-Tag.

5. Το επόμενο πειραματικό στάδιο περιελάμβανε την μεταφορά της πλασμιαδικής κατασκευής pET-15b-PARN (1-523) σε επιδεικτικά κύτταρα BL 21 DE3 με την διαδικασία του μετασχηματισμού επίσης με ηλεκτροδιάτρηση.

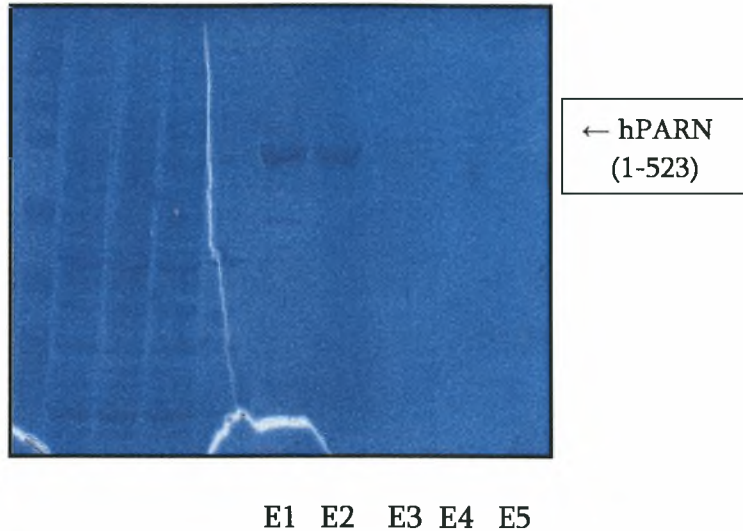
➤ **BL 21 DE3 :** Στέλεχος *E. coli* που δεν περιέχει ενδογενή ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό. Στερείται των πρωτεασών Iap και OmpT και φέρει το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης κάτω από την επίδραση του προαγωγέα lacUV5. Έτσι αποτελεί ιδανικό εργαλείο για την επαγωγίμη υπερέκφραση της εκάστοτε επιθυμητής πρωτεΐνης και μάλιστα σε ακέραιη μορφή.

6. Η επιβεβαίωση ολόκληρης της διαδικασίας κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκε με το τελευταίο πειραματικό στάδιο το οποίο περιελάμβανε την ανίχνευση του γονιδίου της PARN 1-523 σε επίπεδο πρωτεΐνης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε δοκιμασία υπερέκφρασης του γονιδίου σε υγρή καλλιέργεια 400ml κυττάρων BL21 DE3 μετασχηματισμένων με την κατασκευή pET-15b-PARN (1-523). Η επαγωγή της υπερέκφρασης έγινε με προσθήκη IPTG στην

καλλιέργεια (αφότου η οπτική της απορρόφηση στα 600 nm έφτασε μεταξύ 0,6-0,9 υποδηλώνοντας λογαριθμική φάση ανάπτυξης) σε τελική συγκέντρωση 1mM και επώαση στους 37°C για 4 ώρες υπό ανάδευση. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 4.000rpm για 20min στους 4°C, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα αποθηκεύτηκε στους -80°C.

Ακολούθως το κατεψυγμένο ίζημα των κυττάρων διαλυτοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (περίπου 10mL). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σπάσιμο των κυττάρων με χρήση υπερήχων (*sonicator*) μέσα σε πάγο. Μετά από φυγοκέντρηση στις 12.000rpm, για 60min στους 4°C διαχωρίστηκε το υπερκείμενο από το ίζημα και ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης της PARN 1-523 από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα.

Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκε ρητίνη νικελίου αγαρόζης (*NTA-Ni agarose*). Πρόκειται για είδος χρωματογραφίας συγγένειας. Η πρωτεΐνη δεσμεύεται στην ρητίνη μέσω σύνδεσης των ιστιδινών που περιέχει στο αμινοτελικό άκρο με τα άτομα του νικελίου και εκλούσθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης το οποίο περιέχει ιμιδαζόλιο σε συγκέντρωση 250mM. Ο ρόλος του ιμιδαζολίου είναι να δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα ιόντα νικελίου και να ανταγωνίζεται για δέσμευση με τις πρωτεΐνες συνδεδεμένες με ιστιδίνη (*His-tagged*). Από κάθε βήμα της απομόνωσης συλλέχθηκαν δείγματα για μέτρηση ολικής πρωτεΐνης και ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από τον καθαρισμό της PARN 1-523 έγινε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 7,5% (*SDS-PAGE*). Η **εικόνα 43** από την ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων από τη διαδικασία καθαρισμού επιβεβαίωσε την επιτυχία του καθαρισμού της κολοβωμένης PARN (φαίνεται χαρακτηριστικά στα κλάσματα έκλουσης 1-5), η οποία λόγω της απουσίας του καρβοξυτελικού της άκρου αναμένεται στα 64kD περίπου.



Εικόνα 43: Ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της PARN 1-523. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue. E1-E5: Δείγματα έκλουσης από την στήλη. Συγκέντρωση πρωτεΐνης που εντοπίζεται στα E1, 2 : 0,16mg/ml.

Διαλύματα για απομόνωση πρωτεΐνης

- Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCl, 0,1% Triton X-100, 10% γλυκερόλη, 2mM μερκαπτοαιθανόλη, 2,5mM ιμιδαζόλιο, PMSF 0,1mM, λυσοζύμη)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCl, 10% γλυκερόλη, 5mM ιμιδαζόλιο)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (20mM HEPES pH 7,9, 0,5M KCl, 10% γλυκερόλη, 250mM ιμιδαζόλιο)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ambros et al. A uniform system for microRNA annotation *RNA* 9: 277-279 (2003).
- Anderson, J.S.J. & Parker, R. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* 17: 1497–1506 (1998).
- Åström, J., Åström, A. & Virtanen, A. Properties of a HeLa cell 3' exonuclease specific for degrading poly(A) tails of mammalian mRNA. *J. Biol. Chem.* 267: 18154–18159 (1992).
- Cao, D. & Parker, R. Computational modeling and experimental analysis of nonsense-mediated decay in yeast. *Cell* 113: 533–545 (2003).
- Carrington, J.C., and Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301:336–338 (2003).
- Chen, C.Y. et al. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451–464 (2001).
- Copeland, P.R. & Wormington, M. The mechanism and regulation of deadenylation: Identification and characterization of Xenopus PARN. *RNA* 7: 875–886 (2001).
- Dehlin, E., Wormington, M., Körner, C.G. & Wahle, E. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.* 19: 1079–1086 (2000).
- Derek, M., Novina, C. & Sharp, P.A. Killing the messenger: short RNAs that silence expression. *Nature* Vol4 (2003).
- Dodson, R.E. & Shapiro, D.J. Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72: 129–164 (2002).
- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. & Sharp, P.A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 457–467 (2003).

- Gorgoni, B. & Gray, N. The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective. *Brief Funct. Genomic Proteomic* 3: 125–141 (2004).
- Elbashir, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498 (2001).
- Felger, J.H. et al. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulation. *JB. Biol.Chem.* 28:2550-61 (1994).
- Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811 (1998).
- Frischmeyer, P.A. et al. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 295: 2258–2261 (2002).
- Gao, M, Fritz, D.T., Ford, L.P. & Wilusz, J. Interaction between a Poly(A)-Specific Ribonuclease and the 5' Cap Influences mRNA Deadenylation Rates *In Vitro*. *Mol. Mol Cell* 5: 479-488 (2000).
- Gao, M., Wilusz, C.J., Peltz, S.W. & Wilusz, J. A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements *EMBO J.* 20: 1134–1143 (2001).
- Garneau, N., Wilusz, J. & Wilusz, C. The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 113–126 (2007).
- Goldstrohm & Wickens. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature Publishing Group* Vol 9:337-344 (2008).
- Grishok, A. et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106:23-34 (2001).
- Hammet, A., Pike, B.L. & Heierhorst, J. Posttranscriptional regulation of the *RAD5* DNA repair gene by the *dun1* kinase and the Pan2-Pan3 poly(A)-nuclease complex contributes to survival of replication blocks. *J. Biol. Chem.* 277: 22469–22474 (2002).
- Hoof van, A. & Parker, R. The exosome: a proteasome for RNA? *Cell* (1999).

- van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C. & Parker, R. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* 295: 2262–2264 (2002).
- Hook, B., Goldstrohm, A. C., Seay, D. J. & Wickens, M. Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. *J. Biol. Chem.* 282: 15430–15438 (2007).
- Horr e et al. Hypoxia and angiogenesis in endometrioid endometrial. *Cellular Oncology IOS Press* 29:219-227 (2007).
- Kadyrova, L. Y., Habara, Y., Lee, T. H., & Wharton, R. P. Translational control of maternal cyclin B mRNA by nanos in the *Drosophila* germline. *Development* 134: 1519–1527 (2007).
- Kaygun & Marzluff. Translation termination is involved in histone mRNA degradation when DNA replication is inhibited. *Molecular and Cellular Biology* 25(16):6879-6888 (2005).
- Kiriakidou, M. et al. “Expanded RNA-binding activities of mammalian Argonaute 2” *Nucleic Acids Res* (2009)
- Körner, C.G. & Wahle, E. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J. Biol. Chem.* 272: 10448–10456 (1997).
- Kranenburg O. The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim. Biophys. Acta* 1756 2: 81–2 (2005).
- Lai, W.S., Kennington, E.A. & Blackshear, P.J. Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol. Cell. Biol.* 23: 3798–3812 (2003).
- Lejeune, F., Li, X. & Maquat, L.E. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell* 12: 675–687 (2003).
- Lewin B. GENES VIII, κεφάλαιο 5.
- Lippman & Martienssen. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431:364-370 (2004).

- Liu, H., Rodgers, N.D., Jiao, X. & Kiledjian, M. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J.* 21: 4699–4708 (2002).
- Mamane et al. Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation. *PLoS One* 21:242 (2007).
- Martínez J., Ren Y., Thuresson, A., Hellman, U. Åström, J. & Virtanen, A. A 54- kDa Fragment of the Poly(A)-specific Ribonuclease Is an Oligomeric, Processive, and Cap-interacting Poly(A)-specific 3' Exonuclease. *J. Biol. Chem.* 275: 24222-24230 (2000).
- Martínez, J., Ren, Y.-G., Nilsson, P., Ehrenberg, M. & Virtanen, A. The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation. *J. Biol. Chem.* 276: 27923–27929 (2001).
- Maquat, L.E. & Carmichael, G.G. Quality control of mRNA function. *Cell* 26: 173–176 (2000).
- Maquat et al. Evidence for a Pioneer Round of mRNA Translation: mRNAs Subject to Nonsense-Mediated Decay in Mammalian Cells Are Bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 106:607-617 (2001).
- Meyer, S. , Temme, C. & Wahle, E. Messenger RNA Turnover in Eukaryotes: Pathways and Enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 39:197–216 (2004)
- Mitchell, P. & Tollervey, D. mRNA turnover. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 320–325 (2001).
- Mitchell, P. & Tollervey, D. An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol. Cell* (2003).
- Moore, M.J. Nuclear RNA turnover. *Cell* 108: 431–434 (2002).
- Muhlrads, D. & Parker, R. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370: 578–581 (1994).
- Mukherjee, D. et al. The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.* 21: 165–174 (2002).

- Mullen, et al. Cell-cycle regulation of histone mRNA degradation in mammalian cells: role of translation and oligouridylation. *Methods Enzymol.* 449:23-45 (2008).
- Nelson, D.M., Ye, X., Hall, C., Santos, H., Ma, T., Kao, G.D., Yen, T.J., Harper, J.W., Adams, P.D. Coupling of DNA synthesis and histone synthesis in S phase independent of cyclin/cdk2 activity. *Mol. Cell. Biol.* 22: 7459–72 (2002).
- Nilsson, P., Henriksson, N., Niedzwiecka, A., Balatsos, N.A., Kokkoris, K., Eriksson, J., Virtanen, A. A multifunctional RNA recognition motif (RRM) in poly(A)-specific ribonuclease (PARN) with cap and poly(A) binding properties. *J. Biol. Chem.* (2007).
- Oridate et al. Growth inhibition of head and neck squamous cells by small interfering RNAs targeting eIF4E or cyclin D1 alone or combined with cisplatin. *Cancer Biol Ther* 4(3):318-23 (2005).
- Parker, R. & Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 121–127(2004).
- Rastogi et al. Glut-1 antibodies induce growth arrest and apoptosis in human cancer cell lines. *Cancer Letters*, 257: 24-251 (2007).
- Reik et al. The Locus control region is unnecessary for gene expression in the Human β -globin locus but not the maintenance of an open chromatin structure in erythroids cells. *Molecular and Cellular Biology* 18: 5992-6000 (1998)
- Ren, Y.-G., Martínez, J. & Virtanen, A. Identification of the active site of poly(A)-specific ribonuclease by site-directed mutagenesis and Fe^{2+} -mediated cleavage. *J. Biol. Chem.* 277: 5982–5987 (2002).
- Robert & Pelletier. Translation initiation: a critical signalling node in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 13(11):1279-93 (2009)
- Semenza. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3(10): 721-32 (2003).
- Takahashi, S., Araki, Y., Sakuno, T. & Katada, T. Interaction between Ski7p and Upf1p is required for nonsense-mediated 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.*

22: 3951–3959 (2003)

- Taxman et al. Criteria for effective design, construction, and gene knockdown by shRNA vectors. *BMC Biotechnology*, 6:7(2006).
- Tucker, M. & Parker, R. Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 571–595 (2000).
- Wang, Z. & Kiledjian, M. Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* 107: 751–762 (2001).
- Weihai & Parker. Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing. *Cell Biology* 12:346-350 (2000).
- Wong, L. & Medrano, J. F. Real-time PCR for mRNA quantification. *Biotechniques* 39 No1 (2005).
- Wu, 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* 24: 4082–4093 (2005).
- Wu, M. et al. Structural basis of m⁷GpppG binding to Poly(A)-specific ribonuclease. *Structure* , 17: 276-286 (2009).
- Wu, R.S. & Bonner, W.M. Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell* 27 (2 Pt 1): 321–30 (1981).
- Yang, X. Crystal structure of human BTG2 and mouse TIS21 involved in suppression of CAF1 deadenylase activity. *Nucleic Acids Res* (2009).