

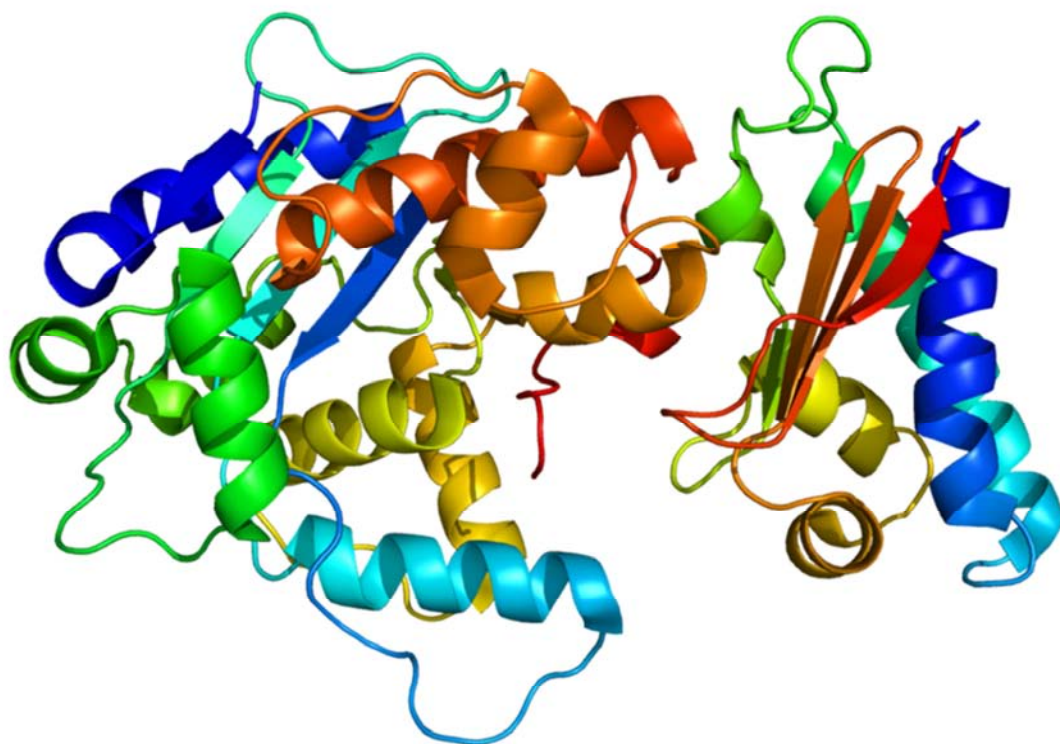


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΛΑΜΠΡΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ 7 ΤΟΥ
ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ CCR4-NOT



ΛΑΡΙΣΑ 2010

Μελέτες του ρόλου της ανθρώπινης υπομονάδας 7 του συμπλόκου
CCR4-NOT

Υπεύθυνος Καθηγητής:

- Ζίφα Αιμιλία, *Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας (Νευροβιολογίας), Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.*

Τριμελής Επιτροπή:

- Μπαλατσός Νικόλαος, *Λέκτορας Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.*
- Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, *Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Πατρών.*
- Ζίφα Αιμιλία, *Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας (Νευροβιολογίας), Τμήματος*

- 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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA	9
1.2 Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει κάλυμμα	11
1.3 Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται	11
1.4 Αποικοδόμηση του mRNA - Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA	13
1.5 Έλεγχος ποιότητας του mRNA - Surveillance mechanisms	16
1.6 Αποαδενυλάσεις - Κατάταξη, βιολογικές λειτουργίες και έλεγχος της δραστηριότητάς τους	18
1.7 Δομή του ανθρώπινου συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT	21
1.8 Ο ρόλος της υπομονάδας CNOT7	22
1.9 Αλληλεπιδράσεις της CNOT7 με άλλες πρωτεΐνες	23
1.10 Φυσιολογικός ρόλος της CNOT7	24
1.11 Ριβονουκλεάσες και καρκίνος-λευχαιμία	25
1.12 CCR4b και καρκίνος-λευχαιμία	27
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	28
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
3.1 Υλικά	29
3.1.1 Χημικές ουσίες	29
3.1.2 Διαλύματα	30
3.1.3 Αντισώματα	32
3.1.4 Κυτταρικές σειρές	33
3.1.5 Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων (competent cells)	33
3.1.6 Πλασμιδιακοί φορείς	34
3.1.7 Εκκινητές	39
3.1.8 Δείγματα από ασθενείς με λευχαιμία	44
3.2 Μέθοδοι	45
3.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	45
3.2.2 Διαχωρισμός τμημάτων DNA	45

3.2.3 Καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης (gel extraction).....	46
3.2.4 Σύνδεση τμημάτων DNA (ligation).....	47
3.2.5 Μεταφορά πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα <i>E. coli</i> (transformation).....	48
3.2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation).....	49
3.2.7 Ανάλυση με ένζυμα περιορισμού (digestion).....	50
3.2.8 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με TCA/DOC.....	51
3.2.9 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη PVDF και Ανοσοανίχνευση.....	51
3.2.10 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών.....	54
3.2.11 Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε ένα βήμα (One step Real Time PCR).....	56
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	58
4.1 Επίπεδα έκφρασης mRNA της CNOT7 με Quantitative Real-Time PCR από δείγματα ασθενών με λευχαιμία.....	58
4.2 Ανίχνευση της CNOT7 σε ορούς ασθενών με λευχαιμία.....	58
4.3 Έλεγχος της αποσιώπησης της CNOT7 με Real-Time PCR.....	59
4.4 Επίδραση της αποσιώπησης της CNOT7 σε επιλεγμένους παράγοντες (72 ώρες μετά την διαμόλυνση).....	61
4.5 Επίδραση της αποσιώπησης της CNOT7 στα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών PARN και Nocturnin (24 και 48 μετά τη διαμόλυνση).....	68
4.6 Έλεγχος της παρουσίας της CNOT7 στις cDNA βιβλιοθήκες.....	70
4.7 Εισαγωγή του γονιδίου cnot7 με πλασμιδιακό φορέα pSC-A.....	71
4.8 Μεταφορά του πλασμιδιακού φορέα σε κύτταρα <i>E. coli</i>	72
4.9 Απομόνωση του pSC-A που φέρει το γονίδιο <i>cnot7</i> και ανάλυση με ένζυμα περιορισμού.....	73
4.10 Υποκλωνοποίηση του γονιδίου της CNOT7 στον πλασμιδιακό φορέα pET15b.....	75
4.11 Διαδικασία μετασχηματισμού με electroporation και επιλογή αποικιών.....	76
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	78
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	84

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γονιδιακή έκφραση αποτελεί συνδυασμό πολλών διαδικασιών, όπως η μεταγραφή, η διαδικασία σύνθεσης πρώιμου mRNA, η μεταφορά του mRNA στο κυτταρόπλασμα, η μετάφραση, η αποικοδόμηση του mRNA, και η πρωτεϊνική τροποποίηση και αποσύνθεση. Πολλές αλλαγές στα πλαίσια της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιούνται κατά την ανάπτυξη, την διαφοροποίηση και την γήρανση. Τα επίπεδα των mRNA και πρωτεϊνών αντικατοπτρίζουν αυτές τις αλλαγές. Η αποικοδόμηση του mRNA αποτελεί σημαντικό σημείο ελέγχου και κύριο παράγοντα της γονιδιακής έκφρασης. Η 3'-πολυ(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 έχοντας πρώτο και καθοριστικό βήμα τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς. Η βράχυνση της ουράς καταλύεται από ένζυμα γνωστά ως αποαδενυλάσες. Τα ένζυμα αυτά χαρακτηρίζονται από διαφορετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, βιολογικές λειτουργίες και εξειδίκευση ως προς το mRNA-υπόστρωμα. Ο ρόλος της ύπαρξης πολλών τέτοιων ενζύμων που επιτελούν τη συγκεκριμένη διεργασία δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Σκοπός της εργασίας είναι να μελετηθεί ο ρόλος μιας αποαδενυλάσης στα πλαίσια μιας μεταπτυχιακής δαριβής, συμβάλλοντας στην κατανόηση του γενικότερου ερωτήματος της βιολογικής σημασίας της ύπαρξης πολλών αποαδενυλασών. Ως ένζυμο μελέτης επιλέχθηκε η υπομονάδα 7 του συμπλόκου CCR4-NOT (CNOT7). Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του ενζύμου και διερευνήθηκε η βιολογική σημασία της CNOT7. Συγκεκριμένα, επιλέξαμε να εξετάσουμε τα επίπεδα έκφρασης της CNOT7 σε ασθενείς με λευχαιμία, και την επίδραση της αποσιώπησης του ενζύμου στα επίπεδα έκφρασης επιλεγμένων mRNAs. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση του γονιδίου της CNOT7 από cDNA βιβλιοθήκες από εγκέφαλο, καρδιά και ήπαρ, με απώτερο σκοπό τον βιοχημικό χαρακτηρισμό του ενζύμου.

ABSTRACT

Gene expression is a combination of many processes, including transcription, pre-mRNA processing, nucleocytoplasmic transport of mRNA, translation, mRNA decay, and protein modification and decay. Many changes in the programs of gene expression occur during development, differentiation, and aging. These alterations are reflected at both the mRNA and protein levels. mRNA decay is now emerging as an important control point and a major contributor to gene expression as well. The 3'-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 begins with the shortening of poly(A) which is the first and most determined step of this process, 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. Aim of the present study is to survey the role of a deadenylase in order to realize the biological purpose of deadenylases' existence. So, we have chosen to study the CCR4-NOT transcription complex subunit 7 (CNOT7). Especially, we monitored the biological characterization of the enzyme in order to elucidate the biological significance of protein CNOT7. Thus, we examined the expression levels of protein CNOT7 in leukemia patients' samples in comparison with healthy samples, and we surveyed the effect of human CNOT7 silencing on the expression levels of selected target mRNAs. Finally, we

cloned the gene encoding CNOT7 from brain, heart and liver cDNA libraries in order to characterize the enzyme biochemically, after the over-expression and isolation of the enzyme.

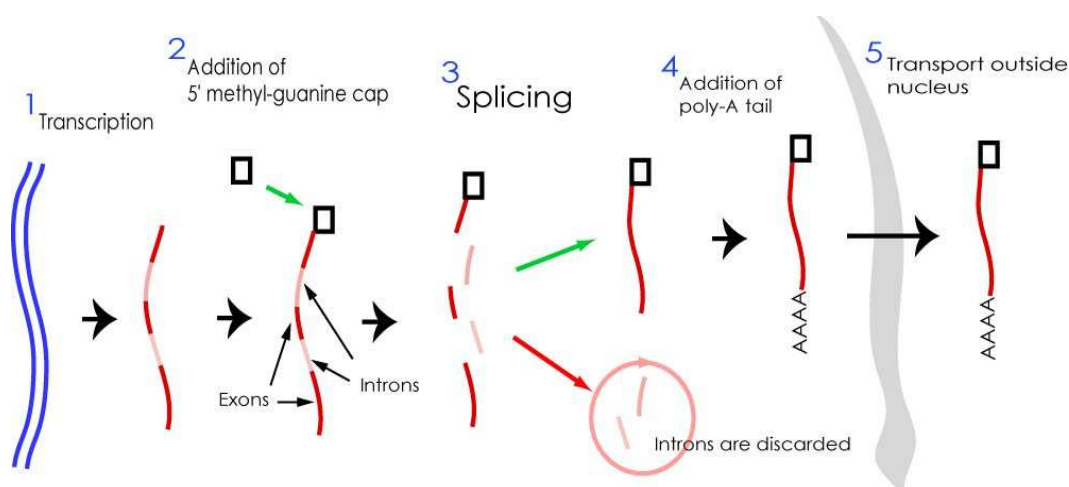
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA.

Το ριβονουκλεϊκό οξύ, RNA, είναι ένα μόριο κεντρικής σημασίας για τη γονιδιακή έκφραση. Η διεργασία της μεταγραφής (*transcription*) παράγει ένα μονόκλωνο μόριο RNA όμοιο στην αλληλουχία με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. 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*). 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.

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 (Lewin B, GENES VIII).



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

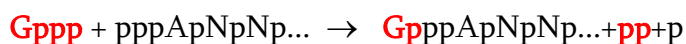
στους ζυμομύκητες είναι σχετικά μικρός και κυμαίνεται από 1 έως 60 min. Υπάρχει μια αξιοσημείωτη αύξηση της σταθερότητας στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς: το mRNA των ζωικών κυττάρων είναι σχετικά σταθερό, με χρόνο ημιζωής μεταξύ 1 - 24 ωρών. Οι τροποποιήσεις και στα δυο άκρα του mRNA συνεισφέρουν σε αυτή τη σταθερότητα (Lewin B, GENES VIII).

1.2 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:

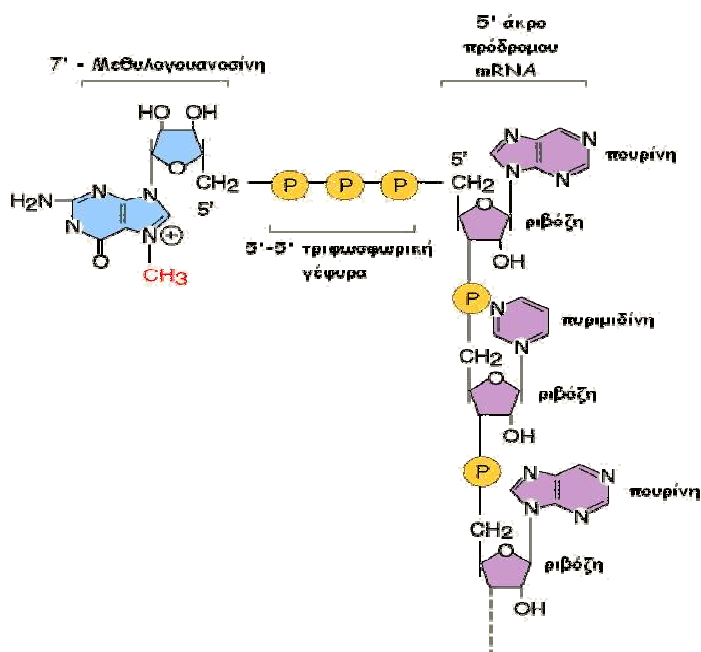


Το νέο κατάλοιπο G, που προστίθεται στο άκρο του RNA, έχει αντίστροφο προσανατολισμό (5'-5') από όλα τα άλλα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας. Το κάλυμμα αποτελεί υπόστρωμα για αρκετές αντιδράσεις μεθυλίωσης. Οι τύποι των καλυμμάτων διακρίνονται από το πλήθος των μεθυλίωσεων που φέρουν. Η πρώτη μεθυλίωση 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.

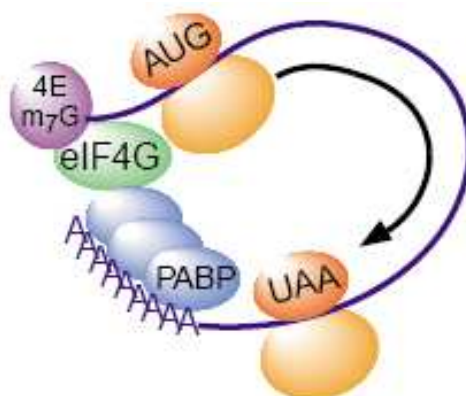
1.3 Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται.

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



Εικόνα 2: Το κάλυμμα στο 5' άκρο του mRNA

Ο ρόλος της πολυ(A) ουράς είναι κεντρικής σημασίας για το mRNA. Προστατεύει το 3' άκρο του mRNA από εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, συμμετέχει σε διεργασίες όπως η έξοδος στο κυτταρόπλασμα και από αυτή ξεκινά και το κύριο μονοπάτι αποικοδόμησης του mRNA. Στις διαδικασίες αυτές η πολυ(A) ουρά συμμετέχει κυρίως μέσω των πρωτεϊνικών παραγόντων που προσδένονται σε αυτή, και κυρίως την πολυ(A) προσδενόμενη 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.

1.4 Αποικοδόμηση του mRNA- Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA

Η αποικοδόμηση του ευκαρυωτικού mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στον ποιοτικό έλεγχο της βιοσύνθεσης mRNA και στην αντιϊκή προστασία (Dykxhoom et al., 2003; Maquat et al., 2000; Hoofvan et al., 1999). Αποτελεί το καθοριστικό βήμα στην αποικοδόμηση των μορίων mRNA και την μεταφραστική αποσιώπηση, γεγονός που την καθιστά ιδανικό σημείο ελέγχου και των δύο διεργασιών.

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

Η αποικοδόμηση του mRNA συνήθως ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο του (αποαδενυλίωση) από διάφορα ένζυμα, γνωστά ως αποαδενυλάσες (Tucker et al., 2000; Mitchell et al., 2001). Ακολουθώντας την αποαδενυλίωση ένα ειδικό ένζυμο που αποτελείται από δύο υπομονάδες (Dcp1p και Dcp2p) αφαιρεί το κάλυμμα, εκθέτοντας το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την Xrn1p, μια 5'→3' εξωνουκλεάση. Εναλλακτικά, μετά την

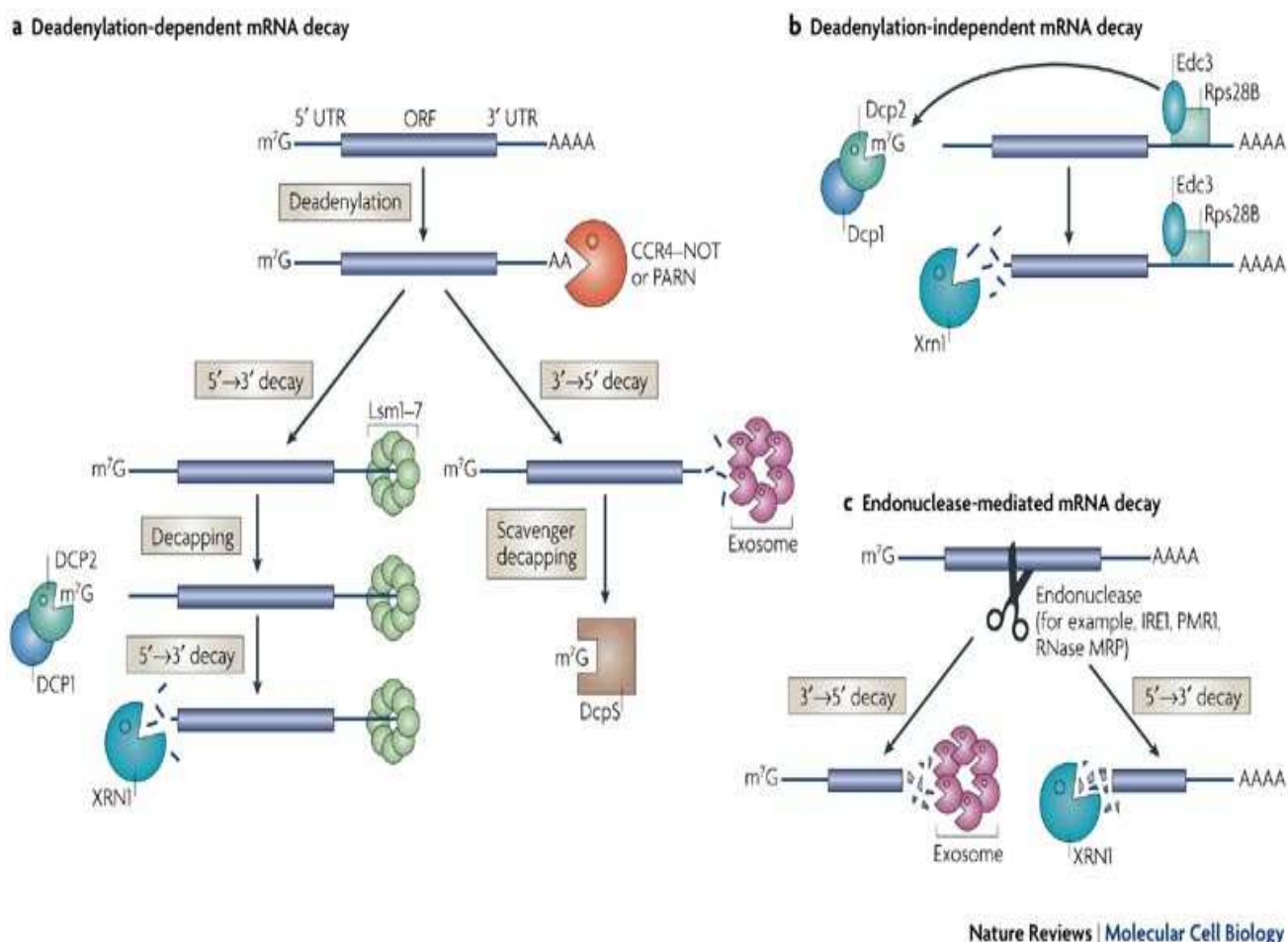
αποαδενυλίωση, το mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'→5 από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών (Μονοπάτι αποικοδόμησης εξαρτώμενο από την αποδενυλίωση) (Garneau et al., 2004; Anderson et al., 1998; Chen et al., 2001; Wang and Kiledjian, 2001; Mukherjee et al., 2002). Στην 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"> • Dcp1p/Dcp2p 	<ul style="list-style-type: none"> • Dcp1/Dcp2 	Ede1p; Ede2p; Ede3p; Pat1p; Lsm1-7; Dhh1p; PABPC
IIb	cap hydrolysis	<ul style="list-style-type: none"> • Dcs1p 	<ul style="list-style-type: none"> • DcpS 	
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

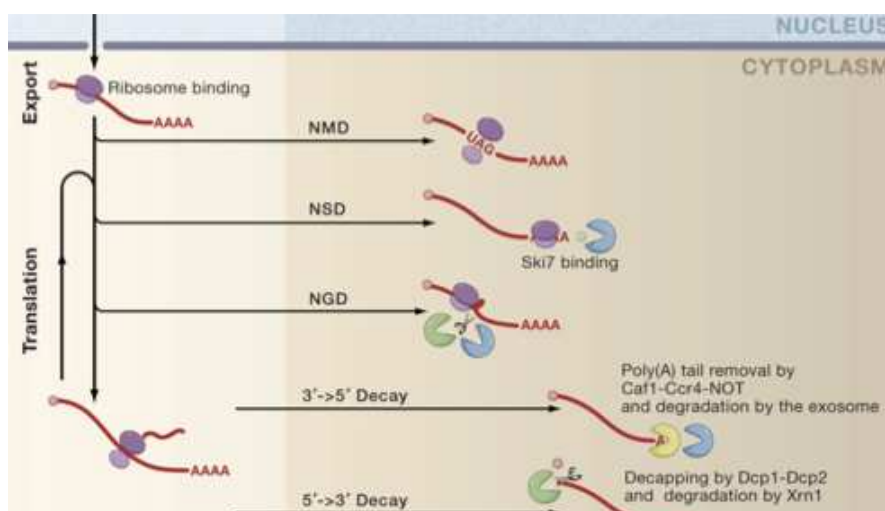
ενδονουκλεασών παράγονται δύο θραύσματα με απροστάτευτα άκρα, τα οποία και αποικοδομούνται στη συνέχεια με τη δράση του εξωσώματος και της Xrn1p (εικόνα 4c). Επίσης, τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν ειδικά μονοπάτια αποικοδόμησης που αναγνωρίζουν και αποικοδομούν ταχύτατα ανώμαλα mRNAs χρησιμοποιώντας τα ίδια ένζυμα που αποικοδομούν φυσιολογικά mRNAs.



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

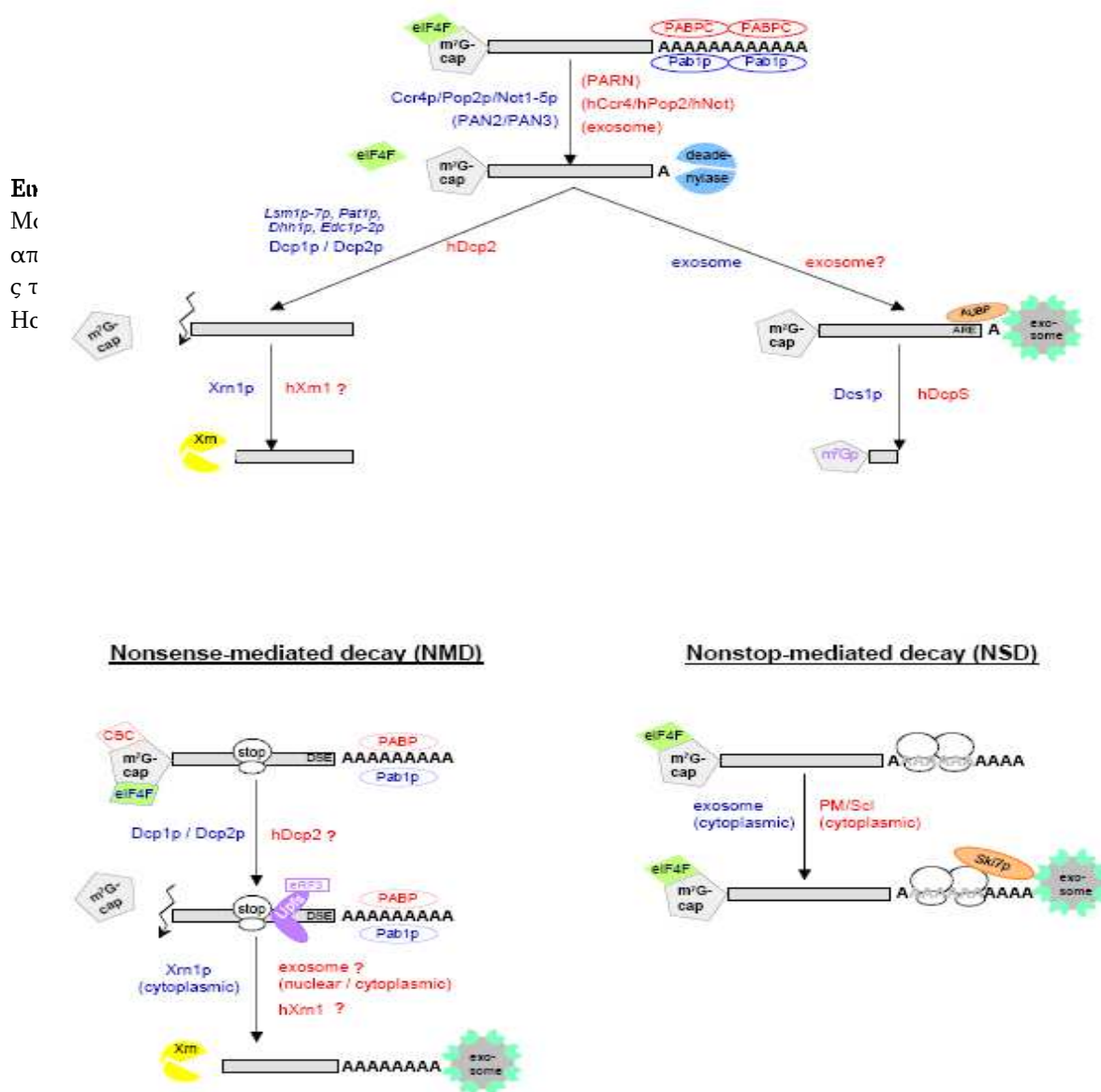
1.5 Έλεγχος ποιότητας του mRNA – Surveillance mechanisms.

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 μεταγράφα 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



ριβοσώμα
τος στο
ανοιχτό
πλαίσιο
ανάγνωση
ς 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 στις **εικόνες 5 και 6**.



Εικόνα 6: Τα mRNAs τα οποία δεν περιέχουν, ή περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αποικοδομούνται ταχύτατα (Frischmeyer et al., 2002).

1.6 Αποαδενυλάσες - Κατάταξη, βιολογικές λειτουργίες και έλεγχος δραστηριότητάς τους

Ως αποαδενυλάσες ορίζουμε τις εξωριβονουκλεάσες που αποικοδομούν την πολυ(A) ουρά των mRNAs με κατεύθυνση 3'→5' απελευθερώνοντας 5'-AMP. Οι αποαδενυλάσες εκδηλώνουν μια σαφή προτίμηση για 3'- πολυ(A) ως υπόστρωμα, παρά το γεγονός πως σε ορισμένες περιπτώσεις έχει δειχτεί ότι αποικοδομούν λιγότερο αποτελεσματικά και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Όλες οι γνωστές αποαδενυλάσες είναι Mg^{2+} -εξαρτώμενα ένζυμα που μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες υπερ-οικογένειες με βάση την παρουσία συγκεκριμένων συντηρημένων καταλοίπων στο καταλυτικό τους κέντρο. Η DEDD υπερ-οικογένεια έχει λάβει το όνομά της από τα καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu που βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ τριών μοτίβων εξωνουκλεάσης, τα οποία προσανατολίζουν τα ιόντα Mg^{2+} . Μέλη αυτής της ομάδας αποτελούν η POP2 (γνωστή και ως CAF1), η CAF1Z, η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), καθώς και οι οικογένειες των PAN2 αποαδενυλασών. Από την άλλη μεριά η υπερ-οικογένεια των εξωνουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών (exonuclease-endonuclease-phosphatase, EEP), περιλαμβάνει αποαδενυλάσες που φέρουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στις δομικές περιοχές νουκλεάσης τους. Παραδείγματα EEP ενζύμων αποτελούν οι αποαδενυλάσες 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 (πίνακας 2)(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 δραστικότητα 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 (mRNA turnover). Επιτελούν όμως και αρκετούς εξειδικευμένους, ρυθμιστικούς ρόλους. Κάποιες είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των οργανισμών, ενώ μεταλλάγματα άλλων επιφέρουν μια ποικιλία ενδιαφερόντων φαινοτύπων. Επιπλέον, συγκεκριμένες αποαδενυλάσες είναι απαραίτητες για συγκεκριμένες βιολογικές διεργασίες, γεγονός που αποδεικνύει πως ο έλεγχος ορισμένων mRNAs είναι καθοριστικής σημασίας για την ομαλή λειτουργία αυτών των διεργασιών (Goldstrohm and Wickens, 2008; Parke and Song, 2004). Για παράδειγμα, αρκετές αποαδενυλάσες, συμπεριλαμβανομένων της PARN του *Xenopus laevis* και της CCF-1 του *C. elegans*, είναι σημαντικές κατά την πρώιμη ανάπτυξη, ενώ άλλες απαιτούνται για τη γονιμότητα (όπως η CNOT7 στα ποντίκια) και τη μεταβολική ομοιόσταση (ποντίκια που στερούνται Nocturnin, λαμβάνουν λιγότερο σωματικό βάρος και λίπος σε σύγκριση με τα ποντίκια που τη διαθέτουν, κάτω από ίδιες συνθήκες διατροφής και συμπεριφοράς).

Η ρύθμιση της δραστικότητας 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, ενώ αναστέλλει την PARN). 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 κιρκάδιο 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 δραστηριότητα των αποαδενυλασών. Για παράδειγμα, η PAN2 δεσμεύεται στην PAN3 που με τη σειρά της αλληλεπιδρά με την PABP. Η τελευταία στρατολογεί όπως αναφέρθηκε το σύμπλοκο PAN2-PAN3 στην πολυ(A) ουρά των mRNA-στόχων (Hammet et al., 2002). Άλλες αποαδενυλάσες σχηματίζουν ομοδιμερή και άλλες ετεροδιμερή. Ο ετεροδιμερισμός αυξάνει σημαντικά το ρεπερτόριο των συμπλόκων των αποαδενυλασών, καθώς διαφορετικά ετεροδιμερή έχουν και διαφορετικές ενζυμικές και ρυθμιστικές ιδιότητες. Η δυνατότητα για έλεγχο της αποαδενυλίωσης καθίσταται τεράστια και ιδιαίτερα πολύπλοκη αν σε όλα αυτά συνυπολογίσουμε την αλληλεπίδραση των πολυάριθμων πιθανών συμπλόκων αποαδενυλασών με την τεράστια ποικιλία των ρυθμιστών τους και την αλληλεπίδραση των τελευταίων με μία εξίσου μεγάλη ποικιλία διαφορετικών ρυθμιστικών στοιχείων επί των 3'-UTR περιοχών των mRNA-στόχων (Goldstrohm and Wickens, 2008).

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

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

		<i>SC</i>	<i>CE</i>	<i>DM</i>	<i>XL</i>	<i>MM</i>	<i>HS</i>
<i>DEDD nucleases</i>	CNOT7/PO P2	+	+	+	+	+	+
	CNOT8	-	-	-	+	+	+
	CAF1Z	-	+	-	+	+	+
	PARN	-	+	-	+	+	+
	PAN2	+	+	+	+	+	+
<i>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*,

1.7 Δομή του ανθρώπινου συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT.

Το εξελικτικά συντηρημένο σύμπλοκο CCR4-NOT είναι απαραίτητο σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες τόσο του πυρήνα όσο και του κυτταροπλάσματος. Είναι ένα ετερογενές και πολυλειτουργικό σύμπλοκο αφού περιλαμβάνει πρωτεϊνικές υπομονάδες οι οποίες εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην μεταγραφή (επιδρώντας στη δομή της χρωματίνης) και αποικοδόμηση του mRNA, στην επιτήρηση ανώμαλων mRNAs και στην μεταγωγή σήματος (Goldstrohm and Wickens 2008). Επίσης η ενεργότητα E3 λιγάσης της hNot υπομονάδας αποδεικνύει τη συμμετοχή του συμπλόκου σε μονοπάτια ουβικουιτινίωσης (Albert et al 2002). Ωστόσο η CNOT4E3 λιγάση δεν είναι δομική υπομονάδα του ανθρώπινου συμπλόκου (Lau et al 2009). Η CCR4 υπομονάδα στη ζύμη όπως και στα θηλαστικά λειτουργεί ως πολυ(A)-εξειδικευμένη εξωριβονουκλεάση *in vitro* απουσία των άλλων υπομονάδων του συμπλόκου, πράγμα που προτείνει την ύπαρξη διαφορετικών τύπων CCR4-NOT συμπλόκων που καταλύουν την αποαδενυλίωση (Mayer et al.2004).

Η υπομονάδα CCR4p του συμπλόκου είναι η κύρια RNA αποαδενυλάση στις ζύμες αλλά τα κύτταρα των θηλαστικών απαιτούν, ακόμη και τη

δραστηριότητα τόσο του συμπλόκου CNOT6/hCCR4 και του CNOT7/hCaf1. Ο πυρήνας του ανθρώπινου CCR4-NOT συμπλόκου έχει μελετηθεί πολύ πρόσφατα και βρέθηκε ότι αποτελείται από επτά υπομονάδες, τις πρωτεΐνες CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT9, CNOT10 TAB182, η οποία επηρεάζει το μήκος των τελομερών και την μιτωτική άτρακτο και την C20Rf29 με άγνωστη λειτουργία. Στον πυρήνα αυτό από πρωτεΐνες βρίσκονται συνδεδεμένες οι CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 οι οποίες είναι μεταβλητές υπομονάδες εντός του συμπλόκου CCR4-NOT τα οποία διαφέρουν μόνο στις τέσσερις μεταβλητές υπομονάδες. Στα ανθρώπινα κύτταρα φαίνεται να υπάρχουν διάφορα σύμπλοκα. Είναι ενδιαφέρον να σημειώσουμε ότι οι αποαδενυλάσες CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 είναι σχετικά λιγότερο παρούσες στα κύτταρα σε σχέση με τις υπόλοιπες CNOT πρωτεΐνες (Lau et al 2009).

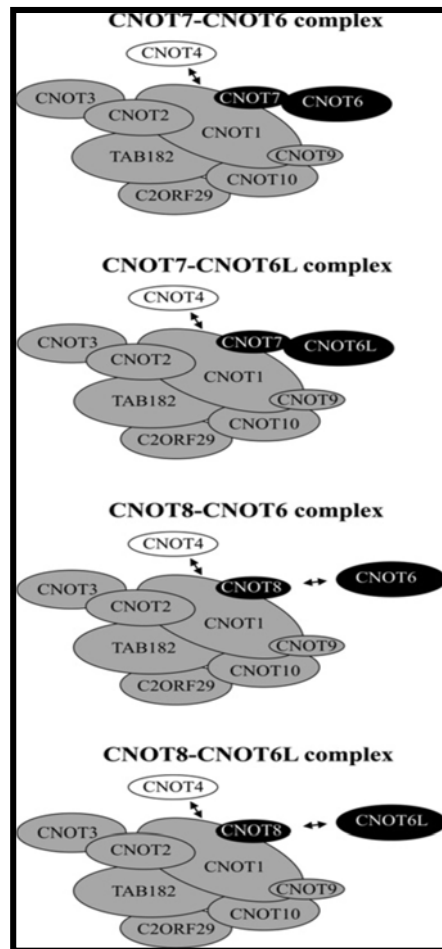
Οι CNOT6 (hCcr4/Ccr4a) και CNOT6L (hCcr4like-Ccr4b) περιέχουν μια περιοχή εξωνουκλεάσης/ενδονουκλεάσης/φωσφατάσης (Exonuclease-Endonuclease-Phosphatase - EEP) η οποία ευθύνεται για την δράση ριβονουκλεάσης. Επιπλέον, αυτές οι πρωτεΐνες δρουν μέσω μιας περιοχής πλούσια σε λευκίνη με τις CNOT7 (hCaf1/Caf1a) και CNOT8 (hPop2/Caf1b/Calif), οι οποίες έχουν δραστηριότητες ριβονουκλεάσης που αποδίδεται στις DEDD περιοχές (Akhmed et al 2009).

1.8 Ο ρόλος της υπομονάδας CNOT7.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την υπομονάδα CNOT7 εντοπίζεται στο όγδοο χρωμόσωμα στη θέση 8p22 (λόγω αυτής της θέσης του ήταν υποψήφιο ως καταστολέας του καρκίνου του παχέως εντέρου αλλά η θεωρία διαψεύστηκε Flanagan et al 2003).

Οι πρωτεΐνες CNOT7 και CNOT8 καθορίζουν με ευκρίνεια το ανθρώπινο σύμπλοκο CCR4-NOT ενώ η CNOT6L και η CNOT6 σχηματίζουν σταθερότερα σύμπλοκα με την CNOT7 από ότι με την CNOT8 (εικόνα 7). Οι δύο τελευταίες αποαδενυλάσες ανταγωνίζονται για τη θέση πρόσδεσης στην πρωτεΐνη

σκαλωσιάς (scaffold) CNOT1. Τα σύμπλοκα CCR4-NOT που έχουν την υπομονάδα CNOT7 έχει βρεθεί ότι μετακινούνται μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος. Συγκεκριμένα, ο κυτταρικός εντοπισμός της hCaf1 και το κυτταρικό περιεχόμενο σε σύμπλοκα που εμπεριέχουν την hCaf1 αλλάζουν καθώς τα κύτταρα προχωρούν από την αδράνεια στην S φάση του κυτταρικού κύκλου. Στις G0 και G1 φάσεις η hCaf1 συγκεντρώνεται σχεδόν αποκλειστικά στον πυρήνα του κυττάρου, όμως όταν το κύτταρο μπαίνει στην φάση S η πλειοψηφία αυτής βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (Morel et al 2003). Επιπλέον πειράματα, έχουν δείξει την άμεση συμμετοχή της υπομονάδας CNOT7 στο μάτισμα του mRNA, στην μεταφορά και στην υποκυτταρική του τοποθέτηση. Το ενζυμικό υπόστρωμα για την CNOT7 και για την CNOT8 είναι διαφορετικό οπότε η αποικοδόμηση ρυθμίζεται διαφορετικά από αυτές τις δύο (Lau et al 2009). Η CNOT7 αποικοδομεί αποκλειστικά πολυ(A) ουρές (Bianchin et al 2005).



Εικόνα 7: Οι σταθερές υπομονάδες που συγκροτούν τον πυρήνα του ενζύμου φαίνονται με γκρι χρώμα. Οι μεταβλητές υπομονάδες φαίνονται με μαύρο. Τα τόξα δείχνουν που υπάρχει ασταθής αλληλεπίδραση. *LAU et al. Biochem J (2009)*

1.9 Αλληλεπιδράσεις της CNOT7 με άλλες πρωτεΐνες.

Οι αποαδενυλάσες CNOT6, CNOT7 και CNOT9 κάνουν αποτελεσματική τη μετάφραση που διαμεσολαβεί από διάφορους πυρηνικούς υποδοχείς (π.χ ER,RAR) Το σύμπλοκο CCR4-NOT, εκτός από το σπουδαίο ρόλο που έχει στην αποικοδόμηση του mRNA, διαμεσολαβεί στη μεταγραφική ενεργοποίηση αλλά και στην μεταγραφική καταστολή. Οι πρωτεΐνες CNOT7 και CNOT8 συμβάλλουν στην δραστική κυτταρική ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Η δραστικότητα

αποαδενυλάσης της CNOT7 είναι υπεύθυνη για τη συμμετοχή της στην κυτταρική αύξηση (Aslam et al 2009).

Έχει βρεθεί ότι το σύμπλοκο Tob περιέχει συστατικά του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT CNOT1,2,3,CNOT6/CCR4 και CNOT7/Caf1. Η πρωτεΐνη Tob φαίνεται να καταστέλλει την αποαδενυλιωτική δραστηριότητα του CCR4-NOT συμπλόκου. Οι πρωτεΐνες Tob έχουν κατασταλτικό, μετα-μεταφραστικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη γιατί ελέγχουν τη σταθερότητα των mRNAs στόχων και εμπλέκονται στην μεταφραστική ρύθμιση (Miyasaka T 2008). Η αποαδενυλιωτική δραστηριότητα του συμπλόκου CCR4-NOT ενισχύεται μέσω αλληλεπιδράσεων με το σύμπλοκο αποσίωπησης RISC (miRNAs και πρωτεΐνες Argonautes) (Goldstrohm and Wickens 2008). Οι αποαδενυλάσες CNOT7 και CNOT8 έχει βρεθεί να αλληλεπιδρούν με μέλη της BTG/Tob οικογένειας (anti-proliferate proteins) οι οποίες εμπλέκονται στην ανακύκλωση του mRNA (mRNA turnover) και στην μεταγραφή. Η BTG/Tob οικογένεια εμπλέκετε στην κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση και επιβίωση. Συγκεκριμένα, η BTG2 αλληλεπιδρά in vivo με την πρωτεΐνη hCCR4 μέσω της hCaf1 και της hPop2.

Η συνδυασμένη μείωση της CNOT7 και CNOT8 σε ανθρώπινα κύτταρα οδηγεί σε μειωμένη αποαδενυλίωση των "απροστάτευτων" mRNAs. Οι CNOT7 και CNOT8 απαιτούνται για τον αποτελεσματικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μελέτες του κυτταρικού κύκλου υποδεικνύουν ότι η ελάττωση της CNOT7 επιφέρει μια σημαντική κυτταρική συσσώρευση στην G1 φάση και μια επακόλουθη μείωση κυττάρων που βρίσκονται στην S φάση του κυτταρικού κύκλου. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν διαπιστωθεί και για την CNOT8 (Akhmed et al 2009).

1.10 Φυσιολογικός ρόλος της CNOT7.

Τα CNOT7-Knockout ποντίκια είναι βιώσιμα και χωρίς εμφανή σωματικά ελαττώματα ωστόσο παρατηρείται ελαττωματική σπερματογένεση με αποτέλεσμα τα αρσενικά να είναι στείρα. Σε ίδια ποντίκια παρατηρήθηκε επίσης, αύξηση της οστικής μάζας εξαιτίας του ενισχυμένου σχηματισμού οστών. Αντιθέτως, υπερέκφραση της CNOT7 στα θηλαστικά προκαλεί μείωση της κυτταρικής ανάπτυξης (Goldstrohm and Wickens 2008).

1.11 Ριβονουκλεάσες και καρκίνος-λευχαιμία.

Οι ρυθμιστικές δυσλειτουργίες στην γονιδιακή έκφραση είναι χαρακτηριστικό πολλών καρκίνων. Μελέτες των δέκα τελευταίων ετών έχουν αποκαλύψει την σημαντικότητα του μετα-μεταγραφικού μηχανισμού στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, ειδικά στο πεδίο της αποικοδόμησης του mRNA. Οι διαδικασίες που αναφέρονται στην σταθερότητα του mRNA, στην αναστολή της μετάφρασης και στην αποικοδόμηση μεταγράφων συνδέονται πολύπλοκα μεταξύ τους και μπορούν να επηρεαστούν από διάφορα cis-στοιχεία όπως η πολυ(A) ουρά, τα στοιχεία ARES (αλληλουχίες πλούσιες σε AU) και από trans-στοιχεία όπως τα μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs), RBPs (οι πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο RNA) και οι ριβονουκλεάσες.

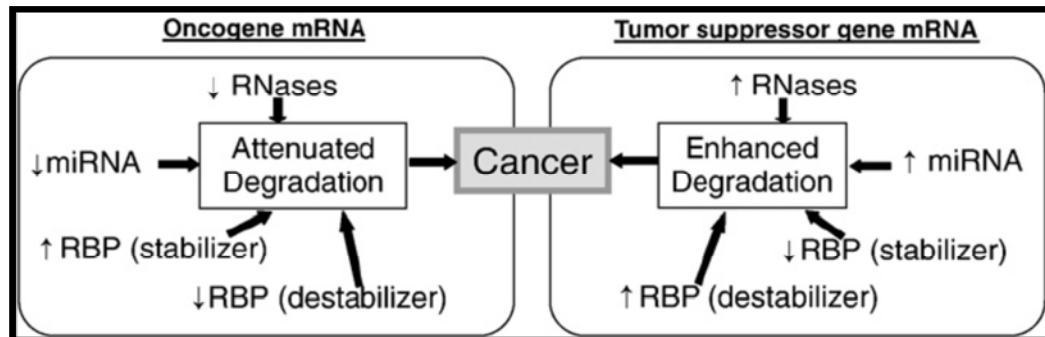
Προηγούμενες μελέτες έχουν υποδείξει ότι υπάρχει σημαντικός σύνδεσμος μεταξύ καρκινογένεσης και δυσλειτουργικών trans-στοιχείων στον μεταβολισμό του mRNA. Επίσης, στοιχεία από το μονοπάτι αποαδενυλίωσης μαζί με άλλες ριβονουκλεάσες μπορούν να προσληφθούν από ncRNAs και RBPs για να ρυθμίσουν τα mRNAs από ογκογονίδια και γονίδια καταστολής του όγκου (TSG, tumor suppressor gene). Οπότε, σημαντική είναι η μελέτη στοιχείων που υποδεικνύουν ότι οι ριβονουκλεάσες δρουν ως ογκοπρωτεΐνες ή καταστολείς του όγκου ώστε να επέλθει η ανάπτυξη των ριβονουκλεασών είτε για θεραπεία του καρκίνου είτε για την ταυτοποίησή τους ως μοριακή στόχοι για την αντιμετώπιση του καρκίνου.

Διάφορες ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στο στάδιο αποαδενυλίωσης του mRNA και μερικές εξωριβονουκλεάσες κόβουν περαιτέρω τα 3' ή 5' άκρα των mRNAs που έχουν υποστεί αφαίρεση καλύπτρας και πολυ(A) ουράς. Αντιθέτως, οι ενδοριβονουκλεάσες παρακάμπτουν τα στάδια αποαδενυλίωσης και αφαίρεσης της καλύπτρας και κόβουν εσωτερικά το mRNA ώστε να παράγουν προϊόντα που αποικοδομούνται από τις εξωριβονουκλεάσες. Απουσία ρυθμιστικών μηχανισμών οι ενδοριβονουκλεάσες έχουν μία προφανή επίδραση στην γονιδιακή έκφραση αφού μία και μόνο ενδονουκλεολυτική κοπή οδηγεί στην αδρανοποίηση του mRNA. Τα κύτταρα έχουν μηχανισμούς για την αποτροπή μίας τέτοιας ανώμαλης αποικοδόμησης του mRNA ρυθμίζοντας αυτές τις ενδοριβονουκλεάσες. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι ορισμένες από αυτές ελέγχονται από κυτταρικά σήματα. Έτσι τα κύτταρα ανταποκρίνονται ικανοποιητικά σε αλλαγές του περιβάλλοντός τους ρυθμίζοντας την γονιδιακή έκφραση σε επίπεδο mRNA.

Πίνακας 3: Κατάταξη ριβονουκλεασών [69-71]

ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ	
ΕΝΔΟΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ	ΕΞΩΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ
RNase A	Polynucleotide Phosphorylase (PNPase)
RNase H	RNase PH
RNase I	RNase II
RNase III	RNase R
RNase L	RNase D
RNase P	RNase T
RNase PhyM	Oligoribonuclease
RNase T1	Exoribonuclease I
RNase T2	Exoribonuclease II
RNase U2	-

RNase U1	-
RNase U	-



Εικόνα 8: Εναλλακτικός μετα-μεταγραφικός έλεγχος στον καρκίνο.

Η μειωμένη αποικοδόμηση ογκογόνων mRNAs (εικόνα 8) μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου. Στην παραπάνω εικόνα αριστερά φαίνεται πως η μείωση της δραστηριότητας των ριβονουκλεασών και των miRNAs που αναστέλλουν την μετάφραση ογκογόνων mRNAs και προάγουν την αποικοδόμηση των ογκογόνων mRNAs, οδηγεί σε μείωση της αποικοδόμησής τους. Παρόμοιες επιδράσεις έχουν η αυξημένη δραστηριότητα των σταθεροποιητικών πρωτεϊνών RBP που συνδέονται με το mRNA ή η μειωμένη δραστηριότητα των αποσταθεροποιητικών RBP.

Από την άλλη πλευρά, η αυξημένη αποικοδόμηση των ογκοκατασταλτικών mRNAs μπορεί επίσης να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου σε περίπτωση που έχουμε αυξημένη δραστηριότητα ριβονουκλεασών ή miRNAs που αναστέλλουν την μετάφρασή του και προάγουν την αποικοδόμησή τους. Σημαντικό ρόλο κατέχουν οι πρωτεΐνες δεσμεύονται στο mRNA (RBPs) όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα δεξιά.

1.12 CCR4b και καρκίνος-λευχαιμία.

Υπάρχουν ποικίλες ομάδες ενζύμων που διενεργούν την σημαντική διαδικασία της αποαδενυλίωσης και αναφέρεται ότι αυτά τα ένζυμα, όπως PAN2-PAN3, CCR4b-NOT και PARN, ξεκινούν την αποικοδόμηση του mRNA

και δρουν σε ένα κρίσιμο στάδιο προσδιορισμού του ποσοστού ανακύκλωσης mRNA (mRNA turnover) και των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης (Wan-Cheol K. 2009).

Η CCR4b αποαδενυλάση του συμπλόκου CCR4b-NOT, επάγει την ανάπτυξη ινοβλαστικών κυτταρικών σειρών με την δράση της και πιστεύεται ότι είναι ένα πρωτοογκογονίδιο. Σε φυσιολογικές συνθήκες, αυτό το ένζυμο αναφέρεται ότι ρυθμίζει το επίπεδο του p27Kip1 mRNA, ενός ογκοκαταστολέα που αναστέλλει τις κινάσες εξαρτόμενες από κυκλίνη, και την κυτταρική ανάπτυξη. Επιπροσθέτως, όταν τα κύτταρα έχουν μειωμένη CCR4b, αυξάνονται τα επίπεδα p27Kip1 και προκύπτει βλάβη στην ανάπτυξη. Επίσης, η CCR4b αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη Tob (παράγοντας κατά του πολλαπλασιασμού) και αναστέλλεται, κάτι που επαληθεύει προηγούμενα ευρήματα ότι η δραστηριότητα της CCR4b προάγει την κυτταρική ανάπτυξη (Wan-Cheol K. 2009).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν μια μεγάλη ποικιλία αποαδενυλασών, τα οποία αφαιρούν πολυ(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 συμβολή στην κατανόηση του βιολογικού ρόλου της CNOT7 και για αυτό αποσιωπήθηκε η έκφρασή της σε καλλιέργειες

κυττάρων Her2 και εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης επιλεγμένων παραγόντων. Με βάση τα αποτελέσματα και το ρόλο των ριβονουκλεασών στον καρκίνο, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης της CNOT7 σε ασθενείς με λευχαιμία, ως μια πρώτη προσέγγιση του ρόλου των αποαδενυλασών σε αυτές τις ασθένειες. Τέλος, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του γονιδίου της υπομονάδας 7 του συμπλόκου CCR4-NOT (CNOT7) από cDNA βιβλιοθήκες από εγκέφαλο, καρδιά και ήπαρ, ώστε να χρησιμοποιηθεί σε βιοχημικές μελέτες, όπως προσδιορισμού της δομής της, την αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης της και την περαιτέρω διαλεύκανση αλληλεπιδράσεων με άλλους παράγοντες, καθώς και το σχεδιασμό μορίων που θα τροποποιούν τη δράση της.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΥΛΙΚΑ

3.1.1 Χημικές ουσίες

- Acrylamide (Sigma)
- Agarose (SeaKem)
- Αιθανόλη (Merck)
- Ακετόνη (Merck)
- Αμπικιλλίνη (Sigma)
- Antibiotic-Antimycotic (Biosera)

- APS (Ammonium Persulfate) (Sigma)
- ATP (Fluka)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haen)
- BamHI (New England Biolabs)
- 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)
- Εκκινητές (sense-antisense Invitrogen)
- Full Range Rainbow MW Markers (Amersham)
- HCl (Merck)
- Ισοπροπανόλη (Scharlau)
- IPTG (Isopropyl ThioGalactosyl) (Fermentas)
- KCl (Merck)
- KH₂PO₄ (Merck)
- LB Broth (Scharlau)
- LB Agar (Scharlau)
- Μεθανόλη (Merck)
- Na₂HPO₄ (Merck)
- NaVO₃ (Sigma)
- NaF (Sigma)
- NaMoO₃ (Sigma)
- NaCl (Panreac)
- NaOH (Merck)
- Οξικό οξύ (Merck)
- Platinum Taq Polymerase (Invitrogen)
- Pfx Platinum Polymerase (Invitrogen)
- Ponceau Red (Sigma)
- Protease Inhibitors (Roche)
- Puromycin (Sigma)
- SDS (Sodium dodecyl sulfate) (Sigma)
- Skimmed Milk (Scharlau)
- T4 λυγάση (Takara)
- TCA (Fluka)
- Temed (N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine) (Research Organics)
- Tris base (Merck)
- Tween 20 (Euroclone)
- XhoI (New England Biolabs)
- X-gal (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοσίδη) (Sigma)

3.1.2 Διαλύματα

Διάλυμα για την λύση κυττάρων (Lysis Buffer)

- Ρυθμιστικό διάλυμα για την λύση των κυττάρων: KCl 600mM, Tris-HCl

20mM pH 7,8 , Glycerol 20%, αναστολείς πρωτεασών 4%

PBS 1x (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na₂HPO₄, 1,47mM KH₂PO₄)

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)

Διαλύματα για την αποσύνδεση αντισωμάτων από PVDF μεμβράνη

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

Θρεπτικά Διαλύματα

- Υγρό θρεπτικό μέσο (LB Broth):

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Τυπική αναλογία (g/l)</i>
Tryptone	10,0
Yeast extract	5,0

Πίνακας 4: Σύσταση υγρού θρεπτικού μέσου (LB Broth) pH 7,2.

- Στερεό θρεπτικό μέσο (LB Agar):

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Τυπική αναλογία (g/l)</i>
Tryptone	10,0
Yeast extract	5,0
Άγαρ	15,0

Πίνακας 5: Σύσταση στερεού θρεπτικού μέσου (LB Agar) pH 7,2.

- SOC medium (υγρό θρεπτικό μέσο):

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Ποσότητα</i>
Tryptone	2g
Yeast extract	0,5g
NaCl 1M	1ml
KCl 1M	0,25ml
δ/μα Mg^{2+} 2M	1ml
Γλυκόζη 2M	1ml

Πίνακας 6: Σύσταση SOC medium pH 7 για τελικό όγκο 100ml.

Κατά την παρασκευή του διαλύματος SOC προστίθενται τα 4 πρώτα αντιδραστήρια και αφού προστεθεί απιονισμένο H_2O μέχρι τα 97 ml, γίνεται αποστείρωση. Ακολουθεί προσθήκη των άλλων δύο συστατικών και συμπλήρωση με αποστειρωμένο H_2O μέχρι τα 100ml.

Το διάλυμα Mg^{2+} 2M παρασκευάζεται με 20,33g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ και 24,65g $MgSO_4$ σε τελικό όγκο 100ml.

3.1.3 Αντισώματα

- Anti-CNOT7 (CCR4-NOT) (Aviva Systems Biology)

- Anti-lamin A/C (Signalling)
- Goat anti-rabbit IgG-HRP (Chemicon)
- BSA Fraction V (Merk)

3.1.4 Κυτταρικές σειρές

➤ 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.

- #### ➤ DH5a: Στέλεχος *E. coli* που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή και κλωνοποίηση πλασμιδιακού DNA.

3.1.5 Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων (competent cells)

Για τη δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος CaCl₂.

- #### ➤
- Αρχικά σε 3 ml θρεπτικού υλικού LB Broth ενοφθαλμίζονται τα κύτταρα που επιθυμούμε να καταστήσουμε επιδεκτικά. Στην περίπτωση των κυττάρων DH5a προστίθεται στο θρεπτικό υλικό και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100 mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 100 mg/ml, ενώ στην περίπτωση

ενοφθαλμισμού κυττάρων Rosseta και BL21 codon plus προστίθεται χλωραμφαινικόλη (34 mg/ml), επίσης σε τελική συγκέντρωση 100 mg/ml. Οι υγρές καλλιέργειες έπειτα τοποθετούνται στους 37 °C και στις 210 rpm για 12-16 ώρες (overnight).

- Από την overnight καλλιέργεια λαμβάνεται 1 ml και τοποθετείται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100 ml θρεπτικό LB Broth. Έπειτα από ήπια ανάδευση, φωτομετρείται 1 ml από την καλλιέργεια στα 600 nm. Η οπτική απορρόφηση (OD_{600}) πρέπει να είναι γύρω στο 0,04. Ακολούθως η καλλιέργεια επώαζεται στους 37 °C και στις 210 rpm. Πραγματοποιούνται φωτομετρήσεις άνα τακτά χρονικά διαστήματα έως ότου η οπτική απορρόφηση είναι $OD_{600}=0,4$, καθώς τα κύτταρα στο σημείο εκείνο βρίσκονται στην εκθετική φάση της ανάπτυξης τους.
- Τα 100 ml της καλλιέργειας των κυττάρων μοιράζονται σε δύο αποστειρωμένα και παγωμένα falcons των 50 ml (υπό φλόγα) και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο για 10 λεπτά.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 λεπτά και στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα falcons τοποθετούνται ανάποδα ώστε να απομακρυνθούν και τα τελευταία ίχνη.
- Σε κάθε falcon προστίθεται 30 ml διάλυμα $MgCl_2$ - $CaCl_2$ (80 mM/20 mM) και πραγματοποιείται ελαφρά ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.
- Τα falcons φυγοκεντρούνται εκ νέου στις 4.000 rpm για 10 λεπτά και στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα falcons τοποθετούνται ανάποδα.
- Σε κάθε falcon προστίθεται 2 ml παγωμένου διαλύματος $CaCl_2$ 0.1 M, αναδιαλύεται το ίζημα και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο.
- Εισάγονται 70 μ l DMSO σε κάθε falcon και ακολουθεί ανάδευση (το DMSO διατηρεί τα κύτταρα δεκτικά για περισσότερο διάστημα και εμποδίζει τυχόν διαφυγή των τμημάτων τους). Έπειτα αφήνονται στον πάγο για 15 λεπτά.
- Προστίθενται άλλα 70 μ l DMSO στα falcons και αφού αναδευτούν, τοποθετούνται στον πάγο.

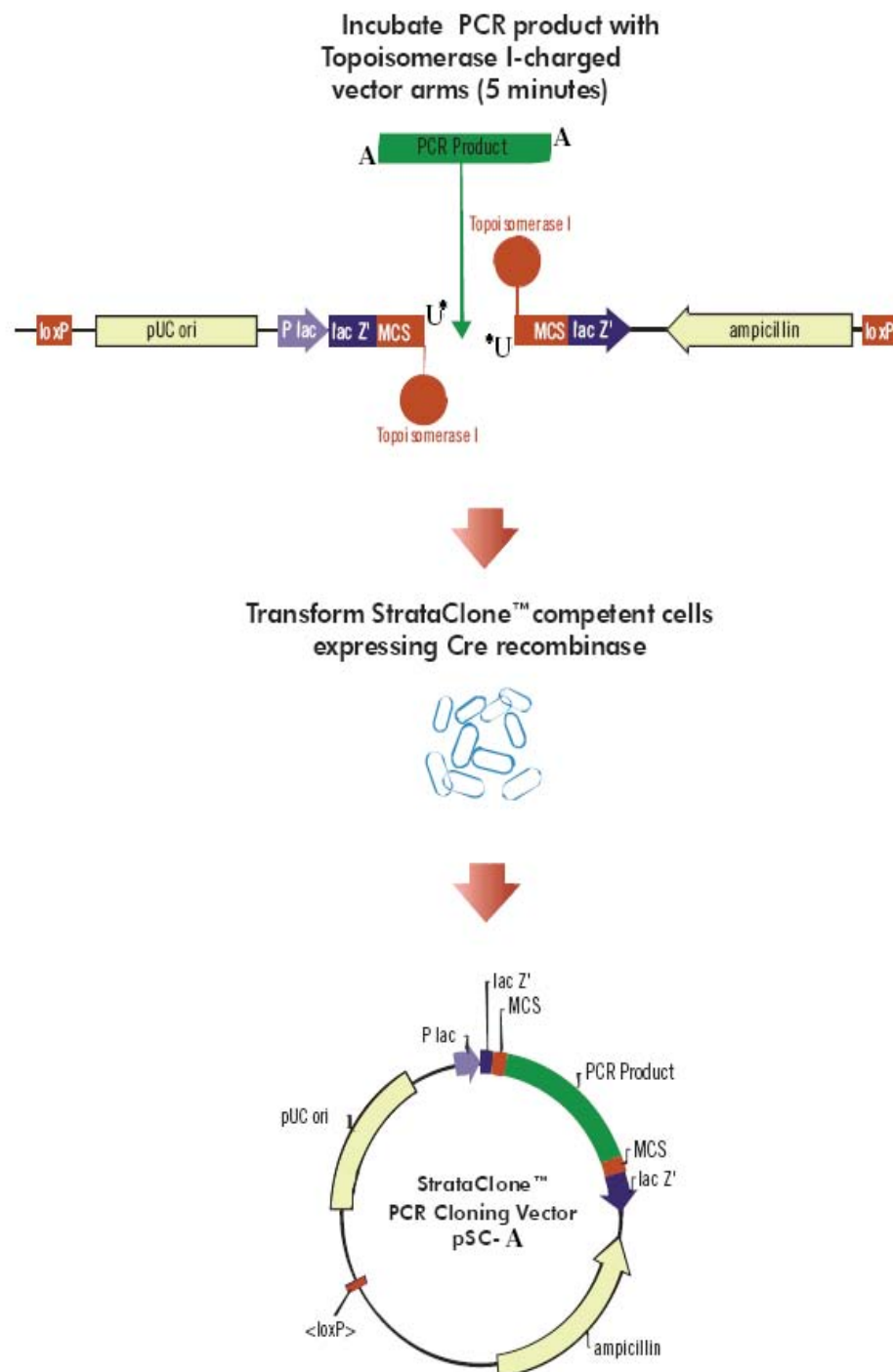
- Πολύ γρήγορα μοιράζεται η ποσότητα των επιδεκτικών κυττάρων (200 μ l ανά σωλήνα των 1.5 ml) και τοποθετούνται προς φύλαξη στους -80°C .

3.1.6 Πλασμιδιακοί φορείς

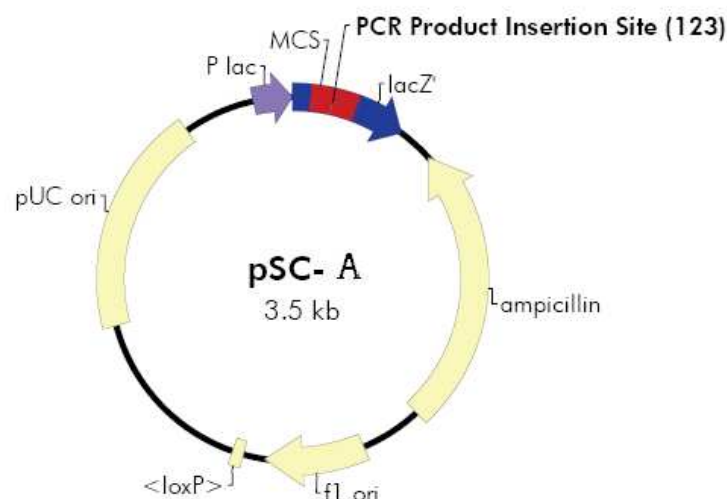
pSC-A: Πρόκειται για πλασμιδιακό φορέα μεγέθους 3.5kb που χρησιμοποιείται για τη κλωνοποίηση γονιδίων (Stratagene). Η διαδικασία της κλωνοποίησης με το συγκεκριμένο φορέα εκμεταλλεύεται τις συνδιασμένες δράσεις της τοποϊσομεράσης I από το ιό Vaccinia και της ρεκομπινάσης Cre από τον βακτηριοφάγο P1. *In vivo*, η τοποϊσομεράση I συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA χαλαρόνοντας 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 9). 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

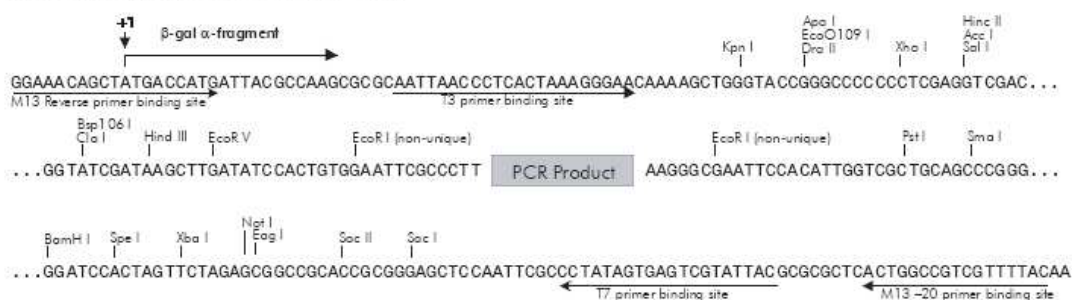
ανασυνδιάζει τις περιοχές loxP στα άκρα του γραμμικού μορίου. Έτσι, σχηματίζεται ο κυκλικός φορέας pSC-A (εικόνα 10) που έχει την ικανότητα ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο παρουσία αμπικιλίνης και περιέχει το σπερόνιο της λακτόζης (lacZ) προκειμένου να είναι δυνατή η επιλογή με white/blue screening.



Εικόνα 9: Σύνοψη της μεθόδου στην οποία στηρίζεται ο μετασχηματισμός με τη βοήθεια του Strataclone PCR cloning kit.



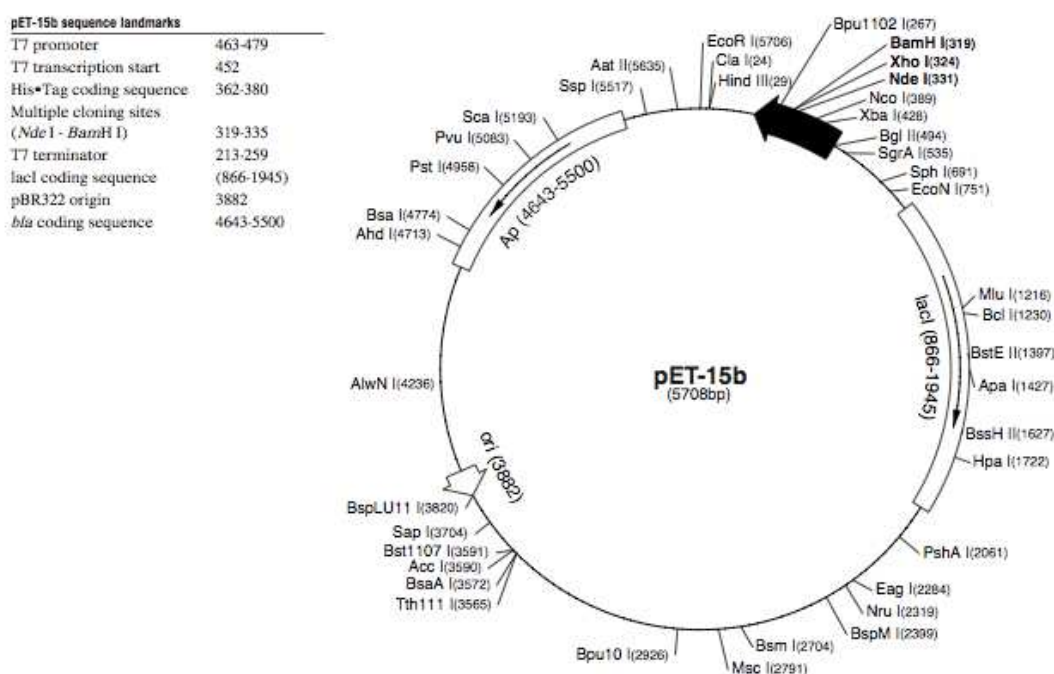
pSC-A PCR Cloning Vector PCR Product Insertion Site Region
(sequence shown 3460–3469, 1–252)



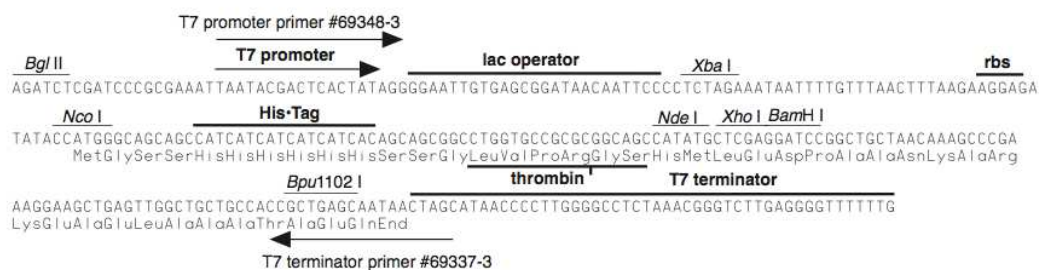
Feature	Nucleotide Position
β -galactosidase α -fragment coding sequence (<i>lacZ'</i>)	1–354
Multiple cloning site (MCS)	57–197
PCR product insertion site	123
ampicillin resistance (<i>bla</i>) ORF	465–1322
f1 origin of ss-DNA replication	1514–1820
<loxP> (mutant <i>loxP</i> -derived sequence <i>lox66/71</i> ; nonfunctional in Cre-mediated recombination)	1887–1920
pUC origin of replication	2461–3128
<i>lac</i> promoter	3350–3469

Εικόνα 10: 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.

pET-15b: Πρόκειται για πλασμιδιακό φορέα μεγέθους 5708bp (Novagen), ο οποίος διαθέτει το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη (εικόνα 11). 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. Επίσης, ο pET-15b φέρει μία N-terminal His•Tag αλληλουχία (εικόνα 12).



Εικόνα 11: Ο πλασμιδιακός φορέας pET-15b.



pET-15b cloning/expression region

Εικόνα 12: 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 XhoI και BamHI, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας.

Έτσι, με τη χρήση των κατάλληλων ενζύμων είναι δυνατή η εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου, όπως είναι στη συγκεκριμένη περίπτωση το γονίδιο της CNOT7 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 CNOT7 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.

3.1.7 Εκκινητές

Για την ενίσχυση του γονιδίου της CNOT7 από τις cDNA βιβλιοθήκες χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί εκκινητές CNOT7 XhoI Forward primer και CNOT7 BamHI Reverse primer, οι οποίοι αποτελούν εξειδικευμένα ολιγονουκλεοτίδια

μήκους 47 και 25 βάσεων. Οι εκκινητές αυτοί σχεδιάστηκαν ειδικά για cDNA βιβλιοθήκες και ελέγχθηκαν με Blastn.

CNOT7 XhoI Forward primer
5' -GCTCGAGCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCATGCCAGCGGCAACTG- 3'
GC Content 63%, Tm=72 °C

CNOT7 BamHI Reverse primer
5' -GGATCCTCATGACTGCTTGTGTTGGC - 3'
GC Content 56% , Tm=56 °C

Στον CNOT7 XhoI Forward εκκινητή εμπεριέχεται μια ειδική αλληλουχία αναγνώρισης για την PreScission Protease, ώστε μετά την απομόνωση και κατά την διαδικασία του καθαρισμού της CNOT7 να απομακρυνθεί η His•Tag αλληλουχία μέσω της πέψης με την PreScission πρωτεάση:

5' – CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCC – 3'
 5'- Leu-Glu-P4-Leu-Phe-Gln-cut-Gly-Pro - 3'

Οι δύο εκκινητές περιλαμβάνουν τις αλληλουχίες που αντιστοιχούν στις θέσεις δράσης των ενζύμων περιορισμού XhoI και BamHI, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία για την κλωνοποίηση του *cnot7* γονιδίου.

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης της CNOT7 και των υπολοίπων εξεταζόμενων παραγόντων (περιγράφονται στον **πίνακα 7**) με Quantitative 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 7: Συνοπτική παρουσίαση των επιλεγμένων παραγόντων, των οποίων τα επίπεδα εξετάστηκαν μετά την αποσιώπηση της CNOT7 (παρατίθενται και οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση της RT-PCR καθώς και τα αναμενόμενα μεγέθη των ενισχυμένων προϊόντων).

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	Primers (5'→3')- Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
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 πολυ(A)αποικοδόμησης η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση PARN.	Fwd: GTCCTCTGTGAA GGGGTCAA Rev: GACTGCTTGT TGGCTTCTC 419bp
PARN		Fwd: CAGCAGAAACA TGCCAAAGA Rev: CCAAGAGTCTGG GGAAAACA 211bp
NOCTURNIN	Αποαδενυλάση διαφορετικής κατηγορίας (EEP) από τις δύο προηγούμενες (CNOT7, PARN). Υπόκειται σε κερκάδιο έλεγχο.	Fwd: GCCAAGACACTG AACAGCAG Rev: GGCAATCTGTCC TCAGATCC 175bp

Πίνακας 7 (Συνέχεια)

LSM	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).	Fwd: GCTTCGAGAT GGAAGGACAC Rev: ATACTTGCTGG AGGGGTGTG 209bp
BTG2	Κύριο μέλος της οικογένειας των TOB πρωτεϊνών (anti-proliferative proteins). Εμπλέκεται στην κυτταρική ανάπτυξη, την διαφοροποίηση και την επιδιόρθωση του	Fwd: AGCGAGCAGA GGCTTAAGGT Rev: TGGAGACTGC

	DNA, Έχει αντι-αποπτωτικό ρόλο στην νευρογένεση. Αλληλεπιδρά με τον παράγοντα CAF1 και τον POP2, που είναι τα κύρια συστατικά του CCR4-NOT συμπλόκου καταστέλλοντας την ενεργότητα αποαδενυλάσης της CAF1 (Yang, 2009).	CATCACGTAG 477bp
AGO2	Σχηματίζει το σύμπλοκο με τα miRNAs και τα siRNAs (σύμπλοκο RNA αποσιώπησης) (RISC/miRNPs). Η ενδογενής πρωτεΐνη Ago2 προσδένεται 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).	Fwd: GACAACCAGA CCTCGACCAT Rev: GGTGAGGTCT TGACCACGTT 599bp
H2A	Το νουκλεόσωμα αποτελείται από 146 bp DNA το οποίο είναι τυλιγμένο γύρω από το οκταμερές ιστονών (ένα ζευγάρι από καθεμία από τις ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4). Οι ιστόνες έχουν δομικό και λειτουργικό ρόλο, ελέγχοντας την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση της χρωματίνης. Οι παραλλαγές της H2A συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διαδικασίες (μεταγραφική ενεργοποίηση, επιδιόρθωση του DNA, απόπτωση, μείωση) (<i>Ausio and Abbott, 2002</i>). Το 3' άκρο του mRNA των ιστονών είναι το υπεύθυνο στοιχείο για την αποικοδόμηση του mRNA. Το mRNA των ιστονών είναι το μοναδικό που δεν πολυαδενυλιώνεται, παρά μόνο το άκρο του έχει μία δομή θηλιάς (loop-structure) η οποία είναι απαραίτητη για την γρήγορη αποικοδόμηση του mRNA. Αυτή η δομή θηλιάς αναγνωρίζεται από μία πρωτεΐνη, την SLBP. Το πρώτο βήμα της αποικοδόμησης είναι η προσκόλληση μιας πολυU ουράς στο 3' άκρο παρέχοντας έτσι μια πλατφόρμα όπου θα προσδεθούν παράγοντες αποικοδόμησης (Mullen et al., 2008; Kaygun and Marzluff, 2005).	Fwd: CGGTAAGGCT GGAAAGGACT Rev: TGCAAGTGAC GAGGGGTAAT 255bp

Πίνακας 7 (Συνέχεια)

PABPC	Κατά την έξοδο του mRNA στο κυτταρόπλασμα, η poly (A) προσδεμένη πρωτεΐνη (PABP) συνδέεται στην	Fwd: ATGGCAGCTATCCC
-------	---	----------------------------

	ουρά και το σταθεροποιεί διευκολύνοντας την μετάφραση. Το σύμπλοκο PABP-παραγόντων έναρξης μετάφρασης (eIF4G) προσδένεται στην cap-binding protein eIF4E και ενισχύει την μετάφραση του mRNA (Goldstrohm and Wickens, 2008)	ACAGAC Rev: GTAGGGTGCATGGC TTGAAT 500bp
b-GLOBIN	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-Aγ-δ-β-3'). Η θέση αυτή του γονιδίου ρυθμίζει την μεταγραφή, την δομή της χρωματίνης και την ικανότητα αντιγραφής (Reik et al., 1998).	200bp
CBP20 - CBP80	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).	(CBP20)Fwd: ACGCCATGC GGTACATAAAT Rev: TGTGCCAGTTTTCCA TAGCC 175bp (CBP80)Fwd: GCCCTCTGT TTAGCTGTTGC Rev: GATGGTTCCTCCAG ACCTCA 292bp
eIF4E	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	Fwd: CAGGAGGTTGCTAA CCCAGA Rev: CTCCCCGTTTGT TCTCA 256bp

	al., 2007; Robert and Pelletier, 2009; Oridate et al., 2005).	
--	---	--

Πίνακας 7 (Συνέχεια)

HIF1-a (Hypoxia-inducible factor 1a)	Ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην αγγειογένεση, στην κυτταρική επιβίωση, στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην προσαρμοστική απόκριση των κυττάρων στη υποξία, προκαλώντας βιολογικά γεγονότα σχετιζόμενα με την επιθετικότητα του καρκίνου. Υπερέκφραση του HIF1-a παρατηρήθηκε σε υπερπλασίες (61%) και καρκινώματα (87%) και αυξάνει την αγγειογένεση (Horée et al., 2007; Semenza, 2003).	Fwd: CCCAATGGATGA TGACTTCC Rev: CCTTTTCCTGCTC TGTTTGG 327bp
SLC2A1 (GLUT-1)	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. (<i>Raffaele De Caro 2009</i>) Πειράματα επώασης καρκινικών κυττάρων από μαστό και πνεύμονα με αντισώματα anti-Glut-1 αποκαλύπτουν μείωση της κυτταρικής αύξησης (κατά 50% και 75% αντίστοιχα) και αύξηση του ρυθμού απόπτωσης (Rastogi et al., 2007).	Fwd: GGGCCAAGAGT GTGCTAAAG Rev: ACAGCGACACGA CAGTGAAG 309bp
K-Ras	Η k-ras είναι μια κυτταροπλασματική (στην εσωτερική πλευρά) GTPάση που κωδικοποιείται στον άνθρωπο από το γονίδιο <i>KRAS</i> και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές πορείες μεταγωγής σήματος. Συσώρευση μεταλλάξεων στο <i>KRAS</i> μπορεί να το μετατρέψει σε ογκογονίδιο. Το 30% περίπου των ανθρώπινων καρκίνων, εμφανίζουν μετάλλαξη στο γονίδιο αυτό. Η οικογένεια των πρωτεϊνών ras εμπλέκεται σε μια σειρά διεργασιών όπως ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η	Fwd: TGTGGTAGTTGG AGCTGGTG Rev: AAAGAAAGCCCT CCCCAGT 221bp

	διαφοροποίηση, η απόπτωση, η μνήμη και η μάθηση (Kranenburg, 2005).	
C-Myc	Μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων myc, τα μέλη της οποίας πιστεύεται πως ελέγχουν την έκφραση του 15% του συνόλου των ανθρώπινων γονιδίων μέσω δέσμευσης σε E-boxes και επιστρατεύοντας ακετυλ-τρανσφεράσες των ιστονών. Επάγει την έκφραση αρκετών γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη, ενώ λειτουργεί και αντι-αποπτωτικά.	Fwd: CAGCGACTCTGA GGAGGAAC Rev: TCGGTTGTTGCT GATCTGTC 274bp

3.1.8 Δείγματα από ασθενείς με λευχαιμία

Τα δείγματα ελήφθησαν από ασθενείς με οξεία ή χρόνια λευχαιμία, σε συνεργασία με το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Τα δείγματα αυτά είναι οροί από περιφερικό αίμα και κύτταρα από μυελό των οστών και θα χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση πιθανής διαφοράς στην έκφραση της CNOT7 μεταξύ ασθενών με λευχαιμία και φυσιολογικών ατόμων, με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (Western Blot).

Δείγματα ατόμων με	Οροί από περιφερικό αίμα	Κύτταρα από μυελό των οστών	Σύνολο
Οξεία Λευχαιμία	7	9	16
Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία	1	6	7
Χρόνια Λευχαιμία	2	1	3
Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία	3	1	4
Χρόνια Λεμφοκυτταρική	-	1	1

Λευχαιμία			
Φυσιολογικά	6	3	9
Σύνολο	40		

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος της PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου της CNOT7 από cDNA βιβλιοθήκες που προέρχεται από ανθρώπινο ιστό εγκεφάλου, καρδιάς και ήπατος. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι οι CNOT7 XhoI Forward sense και CNOT7 BamHI Reverse antisense. Έτσι, μετά το πέρας της αντίδρασης ενίσχυσης των επιθυμητών γονιδίων, προκύπτουν προϊόντα που στα άκρα τους φέρουν θέσεις κοπής για τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και BamHI. Η αντίδραση PCR ξεκινάει με ένα στάδιο μετουσίωσης σε θερμοκρασία 94°C για 4 λεπτά. Ακολουθούν 35 κύκλοι, καθένας από τους οποίους αποτελείται από ένα βήμα μετουσίωσης στους 94°C για 1

λεπτό, ένα στάδιο υβριδισμού για την σύνδεση των εκκινητών στους 53°C για 1 λεπτό και ένα στάδιο πολυμερισμού κατά το οποίο δρα η πολυμεράση στους 72°C για 2 λεπτά. Η αντίδραση ολοκληρώνεται με ένα στάδιο σε θερμοκρασία υβριδισμού 72°C για 10 λεπτά όπου προσθέτουμε με μεγάλη προσοχή 0,5 μl Taq πολυμεράση (Fermentas) από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* προκειμένου να προστεθεί στα προϊόντα του πολυμερισμού μία πολύ-A ουρά, καθώς η Invitrogen Platinum Taq πολυμεράση δεν έχει την ικανότητα αυτή. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή μειγμάτων τελικού όγκου 50μl φαίνονται παρακάτω.

Αντιδραστήρια	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (10x)	5 μl
Premixed dNTPs (10 mM)	1,25 μl
MgCl ₂ (50mM)	1,5 μl
Εκκινητές CNOT7 XhoI sense (100pmol/μl)	0,2 μl
Εκκινητές CNOT7 BamHI antisense (100pmol/μl)	0,2 μl
cDNA βιβλιοθήκη	2 μl
Invitrogen Platinum Taq πολυμεράση (5U/μl)	0,5 μl
Sterile H ₂ O	39,35 μl
Συνολικός όγκος	50 μl

3.2.2 Διαχωρισμός τμημάτων DNA

Για το διαχωρισμό τμημάτων DNA και τον προσδιορισμό του μεγέθους του καθενός χρησιμοποιείται η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης. Χρησιμοποιείται πηκτή αгарόζης 0,8% ή 1%, ανάλογα με το μέγεθος του DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε και να ανιχνεύσουμε, το οποίο παρασκευάζεται με την προσθήκη 0,32gr αгарόζης ή 0,40gr αгарόζης, αντίστοιχα, σε 40ml TAE buffer 1x. Στη συνέχεια, θερμαίνεται το διάλυμα μέχρι να διαλυθεί όλη η ποσότητα της αгарόζης και να γίνει διαυγές. Αφού κρυώσει ακολουθεί προσθήκη 3μl βρωμιούχου αιθιδίου 1%, ήπια ανάδευση και στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου και αφήνεται να πήξει. Προετοιμάζονται τα δείγματα και οι μάρτυρες του μοριακού βάρους που

πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν με την προσθήκη σε αυτά loading buffer 6x. Όταν η πηκτή πήξει, πληρώνεται με TAE buffer 1x μέχρι να καλυφθεί και φορτώνονται τα δείγματα στις ειδικές υποδοχές (πηγαδάκια) της πηκτής. Ακολούθως, συνδέονται τα ηλεκτρόδια της ηλεκτροφορητικής συσκευής με τη συσκευή τροφοδότησης έτσι ώστε το θετικό ηλεκτρόδιο να βρίσκεται στο κάτω μέρος της συσκευής όπου κατευθύνονται τα δείγματα τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα. Τέλος, εφαρμόζεται τάση 120 V και μετά από 30 περίπου λεπτά είναι δυνατή η ανίχνευση του DNA με τη μορφή ζωνών κάτω από το υπεριώδες φως, γεγονός που επιτυγχάνεται μέσω της ενσωμάτωσης των μορίων του βρωμιούχου αιθιδίου, μιας ουσίας που απορροφά στο υπεριώδες, στις διπλές έλικες του DNA. Ταυτόχρονα, είναι δυνατός ο προσδιορισμός του μεγέθους των ζωνών μέσω της σύγκρισής τους με τους μάρτυρες του μοριακού βάρους.

3.2.3 Καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης (gel extraction)

Η απομόνωση και ο καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης (DNA extraction from agarose gels) έγινε με βάση το πρωτόκολλο Invitrogen PureLink Quick Gel Extraction.

1) Εξαγωγή του τμήματος DNA - Διάλυση της πηκτής:

Αρχικά εξάγεται από την πηκτή αγαρόζης η ζώνη με το τμήμα του DNA που επιθυμούμε να απομονώσουμε με την βοήθεια ενός αποστειρωμένου ξυραφιού. Η εξαγωγή πραγματοποιείται με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί όσο το δυνατόν ο περιττός όγκος της πηκτής. Το κομμάτι αυτό διαλύεται σε buffer GS1 σε αναλογία 30μl buffer για κάθε 10mg πηκτής αγαρόζης (για πηκτή αγαρόζης μέχρι και 2%). Η διάλυση επιτυγχάνεται με θέρμανση της πηκτής στους 50°C για 15 λεπτά με ανάδευση κάθε 3 λεπτά. Αφού λιώσει η πηκτή, αφήνω στους 50°C για 5 λεπτά ακόμη. Παράλληλα προθερμαίνω το TE buffer στους 65-70°C.

2) Δέσμευση του DNA- Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης

Το δείγμα φορτώνεται σε στήλη, η οποία τοποθετείται σε ένα συλλεκτικό σωλήνα (collecting tube) των 2ml. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 12000 x g, απομακρύνεται το έκλουσμα και επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα. Ακολούθως, προστίθενται ακόμη 500μl GS1 buffer, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 12000 x g και απομακρύνεται το έκλουσμα. Η στήλη επανατοποθετείται στο συλλεκτικό σωλήνα. Στη συνέχεια, προστίθενται 700μl buffer W9 (περιέχει αιθανόλη) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 12000 x g, απομακρύνεται το έκλουσμα και επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα.

3) Ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης- Έκλουση του DNA

Τα δείγμα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 12000 x g με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση του οποιουδήποτε buffer. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο γιατί έτσι επιτυγχάνεται η απομάκρυνση της αιθανόλης που περιέχει το buffer W9, η οποία είναι πιθανόν να αναστείλει ακόλουθες αντιδράσεις. Ακολούθως, η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωλήνα (Recovery Tube) και προστίθενται 50μl του TE buffer που είχε προθερμανθεί. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό με σκοπό την αύξηση της απόδοσης της έκλουσης του DNA. Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στις 12000 x g. Το εκλούμενο DNA φυλάσσεται στους -20°C.

3.2.4 Σύνδεση τμημάτων DNA (ligation)

Επώαζεται γραμμικός φορέας παρουσία των τμημάτων, που επιθυμούμε να συνδέσουμε, σε αναλογία φορέα προς τμήμα DNA 1:3, με την προσθήκη 1 Unit T4 DNA λιγάσης (400u/μl) (Takara). Επιπλέον, είναι απαραίτητη η προσθήκη στο διάλυμα του ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος της λιγάσης το οποίο κατασκευάζεται από την ίδια εταιρεία, καθώς επίσης και ATP (50mM) τελικής συγκέντρωσης 5mM. Το διάλυμα επώαζεται για 12-14h στους 4°C στην

περίπτωση που το ένθεμα ενώνεται με το φορέα pGEM-T Easy, ενώ στους 16 °C και για το ίδιο χρονικό διάστημα στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ο φορέας pET-15b.

Στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί ο πλασμιδιακός φορέας pSC-A, προστίθενται με την ακόλουθη σειρά τα εξής συστατικά:

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

Ακολούθως, πραγματοποιείται 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.

3.2.5. Μεταφορά πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα *E. coli* (Transformation)

Σε 200µl επιδεκτικών κυττάρων γίνεται προσθήκη 3µl του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση στον πάγο για 20 λεπτά και ακολούθως heatshock στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα. Έπειτα τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 2 λεπτά και εν συνεχεία προστίθενται σε κάθε καλλιέργεια 400µl SOC medium. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 37°C υπό ανάδευση (160 rpm). Τέλος, επιστρώνονται 250µl της μετασχηματισμένης καλλιέργειας σε τριβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB agar το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό, ανάλογα με τα γονίδια ανθεκτικότητας που διαθέτει το εκάστοτε πλασμίδιο που χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό (π.χ. αμπικιλίνη). Επίσης, σε περίπτωση που το πλασμίδιο που χρησιμοποιείται διαθέτει το οπερόνιο της λακτόζης (π.χ. pGEM-Teasy), είναι απαραίτητη η προσθήκη 16µl X-gal (50mg/ml) και 100µl IPTG 0,1M (Isopropyl

Thio Galactosyl) στα τριβλία άγαρ πριν την επίστρωση των κυττάρων, για να είναι δυνατή, στη συνέχεια, η επιλογή των λευκών αποικιών που θα περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο (blue/white screening). Το IPTG δεσμεύει και απομακρύνει τον καταστολέα LacIQ από το DNA επιτρέποντας έτσι την έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης. Με αυτόν τον τρόπο, το γονίδιο της CNOT7 που έχει εισαχθεί μετά το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης στον πλασμιδιακό φορέα, εκφράζεται. Τέλος, πραγματοποιείται επώαση των τριβλίων στους 37°C για 12-14h.

3.2.6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

Οι λευκές αποικίες ενοφθαλμίζονται σε 5ml LB broth 1% NaCl που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη). Ακολουθεί επώαση των καλλιιεργειών για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Η ακόλουθη διαδικασία πραγματοποιείται με βάση το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από κύτταρα E. coli NucleoSpin (Plasmid QuickPure).

1) Καλλιέργεια και συλλογή των βακτηριακών κυττάρων:

Μεταφέρονται 1,5ml από την καλλιέργεια E. coli που αναπτύχθηκε σε ένα σωλήνα και 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. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα 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 (750μl max) που έχει προκύψει από τη φυγοκέντρηση του προηγούμενου βήματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε μέγιστη ταχύτητα και απομάκρυνση του εκλούσματος.

4) Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης:

Επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα και προστίθενται 500μl προθερμασμένο buffer AW (50°C). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις σε μέγιστη ταχύτητα. Απομακρίνεται το έκλουσμα και προστίθενται 600μl buffer A4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε μέγιστη ταχύτητα και αποχύνεται το έκλουσμα. Τέλος, πραγματοποιείται απομάκρυνση του εκλούσματος και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα.

5) Εκλούση 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 σε μέγιστη ταχύτητα.

3.2.7. Ανάλυση με ένζυμα περιορισμού (Digestion)

Η ενζυμική πέψη με τη χρήση ενζύμων περιορισμού έχει σκοπό την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA. Πλασμιδιακό DNA επωάζεται με το ένζυμο σε αναλογία 2 Units (ενζυμικές μονάδες)/μg DNA, παρουσία του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο προτείνεται από την κατασκευαστική εταιρεία. Η ενζυμική μονάδα (Unit) ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που υδρολύει 1 μg DNA από βακτηριοφάγο σε μια ώρα, στους 37°C. Η αντίδραση διαρκεί 3 ώρες στους 37°C. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία είναι τα BamHI (20000u/ml) και XhoI (20000u/ml) της εταιρίας New England Biolabs. Στην **εικόνα 13** φαίνονται οι αλληλουχίες του DNA που αναγνωρίζουν τα συγκεκριμένα περιοριστικά ένζυμα και οι αντίστοιχες θέσεις κοπής τους.



Εικόνα 13: Οι αλληλουχίες του DNA που αναγνωρίζουν τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και XhoI και οι θέσεις κοπής τους.

Στην εταιρεία New England Biolabs ανήκουν και τα ρυθμιστικά διαλύματα (10x) των ενζύμων (NEBuffer 1-4) σε καθένα από τα οποία το εκάστοτε ένζυμο παρουσιάζει διαφορετική δραστικότητα (πίνακας 8).

	BamHI	XhoI
NEBuffer 1	75%	75%
NEBuffer 2	100%	100%
NEBuffer 3	100%	100%
NEBuffer 4	100%	100%

Πίνακας 8: Οι δραστικότητες των περιοριστικών ενζύμων NcoI και XhoI στο εκάστοτε buffer.

Κατά την διαδικασία της ενζυμικής πέψης προστίθεται επιπλέον και BSA (100x), μια ουσία η οποία δεσμεύεται στα τοιχώματα των δοκιμαστικών σωλήνων, εμποδίζοντας έτσι την δέσμευση των περιοριστικών ενδονουκλεασών σε αυτά, με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η μείωση της δραστικότητας αυτών των ενζύμων.

3.2.8 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με TCA/DOC

Για την κατακρήμνιση πρωτεϊνών από τα συλλεχθέντα δείγματα ασθενών με λευχαιμία και φυσιολογικών, πραγματοποιούνται 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.
- 4) Ακολουθεί επώαση του δείγματος στους -20° C για 30 min.
- 5) Φυγοκέντρωση για 15 min στα 12000rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- 6) Πλύση ιζήματος με 200 μl TCA 2,5%.
- 7) Πλύση με 200μl παγωμένη ακετόνη (2 φορές) και φυγοκέντρωση 15 min στα 12000rpm.
- 8) Αφήνουμε την περίσσεια ακετόνης να εξατμιστεί και ακολούθως προσθέτουμε 20 μl Loading Buffer 1X. Βράζουμε το δείγμα για 5 min, το οποίο πλέον είναι έτοιμο για φόρτωμα σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.

3.2.9 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη PVDF και Ανοσοανίχνευση

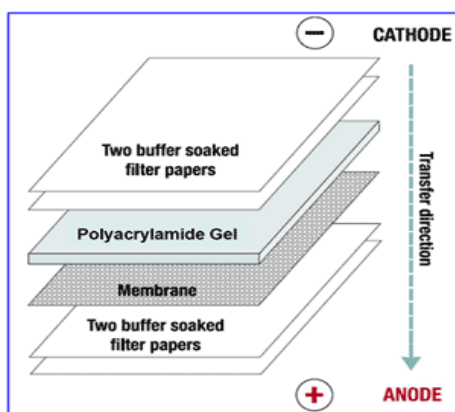
Ηλεκτρομεταφορά

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 καθιλώνονται στη μεμβράνη λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η μεμβράνη και η πηκτή μεταφέρονται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (*Transfer buffer*). Στην περίπτωση της PVDF μεμβράνης προηγείται ένα στάδιο 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 14). 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.



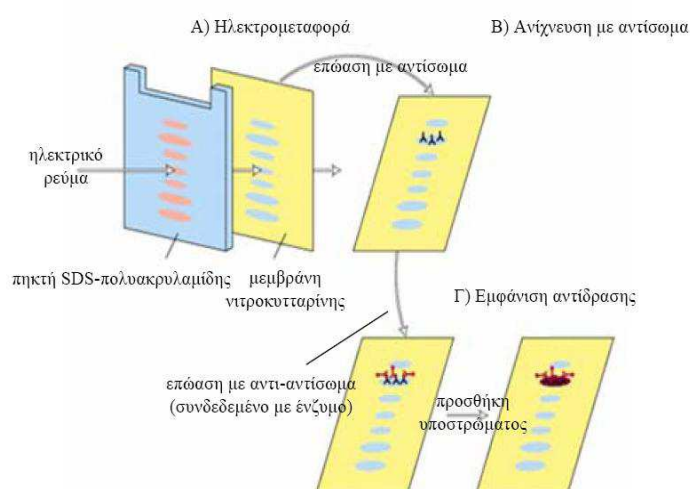
Εικόνα 14: Συναρμολόγηση συσκευής ηλεκτρομεταφοράς

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 blotting 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 αρραίωση 1:500 σε blotto buffer). Κατόπιν η μεμβράνη επώαζεται 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 δεύτερου 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 15: Συνοπτική παρουσίαση των διαδικασιών ηλεκτρομεταφοράς, ανοσοανίχνευσης και εμφάνισης σήματος.

3.2.10 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών

Για την απομόνωση ολικού RNA από τα δείγματα ορού ασθενών με λευχαιμία και φυσιολογικών ατόμων, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό Total RNA Isolation kit Nucleospin RNAII της Macherey Nagel. Επίσης, η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση ολικού RNA από επεξεργασμένα και μη (controls) με shRNAs κύτταρα. 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 16**. Αρχικά περίπου 5×10^6 κύτταρα από κάθε δείγμα διαλυτοποιούνται ή 30mg κυττάεων 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 erppendorf, 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 H_2O 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 x 10 ⁶ cultured cells or 5 mg tissue samples
2	Lyse and homogenize cells		100 µl RA1 2 µl TCEP Mix
3	Add Carrier RNA		5 µl Carrier RNA working solution Mix
4	Filtrate lysate (optional)	 	11,000 x g 30 s
5	Adjust RNA binding condition		100 µl 70% ethanol Mix
6	Bind RNA	 	Load lysate 11,000 x g 30 s
7	Desalt silica membrane	 	100 µl MDB 11,000 x g 30 s
8	Digest DNA		25 µl DNase reaction mixture RT 15 min
9	Wash and dry silica membrane	 	1 st wash 100 µl RA2 RT, 2 min 11,000 x g, 30 s 2 nd wash 400 µl RA3 11,000 x g, 2 min 3 rd wash 200 µl RA3 11,000 x g, 2 min
10	Elute highly pure RNA	 	10 µl RNase-free H ₂ O 11,000 x g 30 s

Εικόνα 16: Συνοπτική παρουσίαση του πρωτοκόλλου απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών.

3.2.11 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 αλυσίδες του δίκλωνου DNA.

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία εφαρμόσαμε την ποσοτική one-step RT-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Invitrogen “SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit” προκειμένου να ελέγξουμε τα επίπεδα έκφρασης της 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 7**, 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 9** και **10** αντίστοιχα.

Πίνακας 9: 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

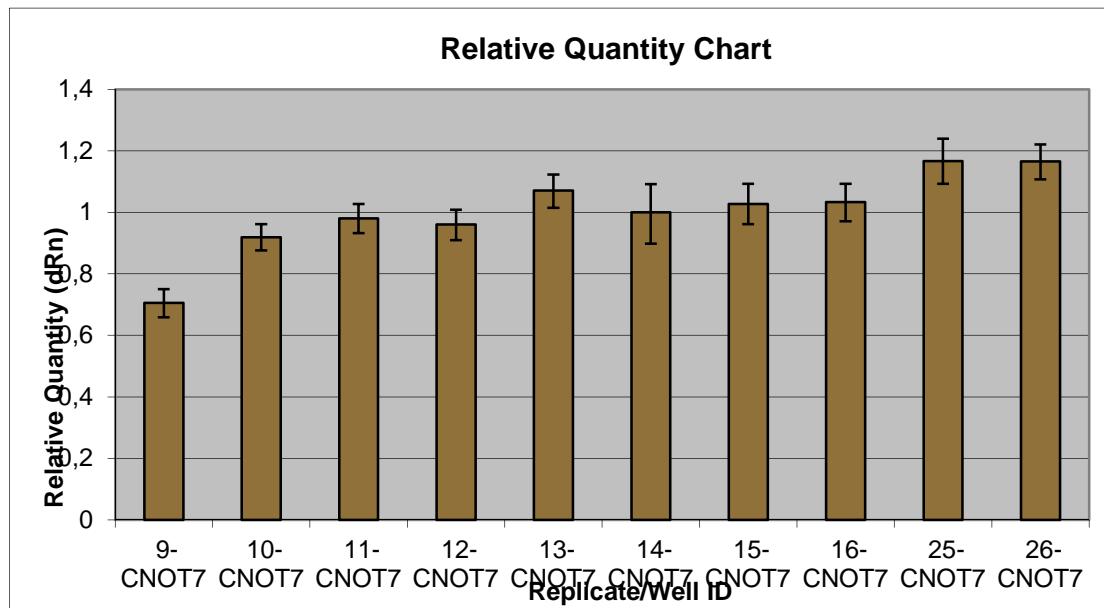
Πίνακας 10: Συνθήκες αντίδρασης RT-PCR για την ενίσχυση των επιλεγμένων παραγόντων.

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 Επίπεδα έκφρασης mRNA της CNOT7 με Quantitative Real-Time PCR από δείγματα ασθενών με λευχαιμία

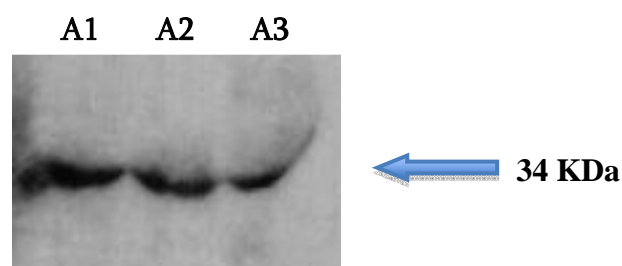
Αρχικά, ασχοληθήκαμε με δείγματα που περιέχουν κύτταρα από μυελό των οστών από ασθενείς με λευχαιμία σε σύγκριση με φυσιολογικά υγιή άτομα. Στόχος μας να ερευνήσουμε πως μεταβάλλεται η έκφραση της αποαδενυλάσης CNOT7 με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (western blot), καθώς και η διασταύρωση των αποτελεσμάτων αυτών με την reverse transcription PCR (αντίστροφης μεταγραφής). Ακολούθησε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης. Το αποτέλεσμα της qRT-PCR απεικονίζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Εικόνα 17: Σχετικά επίπεδα έκφρασης (relative chart) mRNA της CNOT7 (επίπεδα φθορισμού με χρωστική SYBR Green) δειγμάτων ασθενών (στήλες 9, 10, 11, 12, 13, 16, 25) με μάρτυρες (στήλες 14, 15, 26).

4.2 Ανίχνευση της CNOT7 σε ορούς ασθενών με λευχαιμία

Για να διερευνήσουμε αν η έκφραση της αποαδενυλάσης CNOT7 μεταβάλλεται σε ασθενείς με λευχαιμία σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα έγινε η απομόνωση πρωτεϊνών από δείγματα ορού. Σε κάθε δείγμα έγινε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford. Ακολούθησε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης (Western Blot) με αντισώματα έναντι της CNOT7. Οι παρακάτω εικόνες (παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες επιτυχείς προσπάθειες) που προέκυψαν από την ανοσοαποτύπωση, απεικονίζουν την έκφραση της CNOT7 σε ασθενείς και φυσιολογικά άτομα. Παρατηρείται διαφορά στην έκφραση της CNOT7, καθώς η ένταση των ζωνών σε ασθενή άτομα (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7) είναι μεγαλύτερη σε σχέση αυτές των φυσιολογικών (C1, C2), και στις ζωνώσεις, καθώς υπάρχει μια δεύτερη ζώνη σε ασθενή άτομα που απουσιάζει από τα φυσιολογικά.



Εικόνα 18: Ανίχνευση της CNOT7 σε δείγματα ορών από ασθενείς με λευχαιμίες.



Εικόνα 19: Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της CNOT7 σε δείγματα ορού από φυσιολογικά άτομα (C) και ασθενών με λευχαιμία (A). Παρατηρείται διαφορά στις ζωνώσεις καθώς και στην έντασή τους.

Συνεπώς, ενώ δεν παρατηρούμε ιδιαίτερες μεταβολές από την RT-PCR, ίσως και μείωση των επιπέδων της CNOT7, εντούτοις, με την ανοσοαποτύπωση ανιχνεύουμε την ύπαρξη διαφορετικών μορφών του ενζύμου.

4.3 Έλεγχος της αποσιώπησης της CNOT7 με Quantitative Real-Time PCR

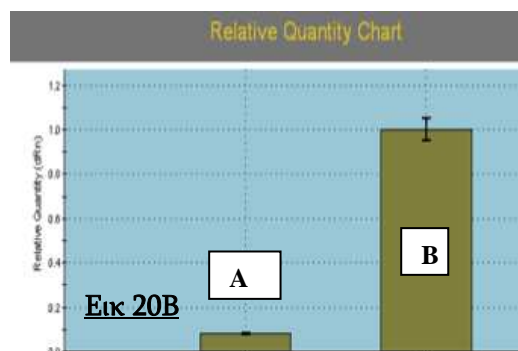
Θέλοντας να συμβάλλουμε στην κατανόηση του ρόλου των αποαδενυλασών στον καρκίνο, αλλά και- κυρίως- της ύπαρξης πολλών τέτοιων ενζύμων, επιχειρούμε την αποσιώπηση της CNOT7 σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων Hep2. Η επιβεβαίωση της αποσιώπησης της CNOT7 έγινε και με την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης ποσοτικής RT-PCR σε ένα βήμα, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ολικό RNA (100ng) τόσο από διαμολυσμένα όσο και από control κύτταρα που συλλέχθηκαν 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση. Χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες και οι συγκεντρώσεις που αναγράφονται στους πίνακες 9 και 10 για την προετοιμασία των αντιδράσεων. Εκτός από τα επίπεδα

έκφρασης της CNOT7, εξετάστηκαν και τα αντίστοιχα των παραγόντων του πίνακα 7. 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.

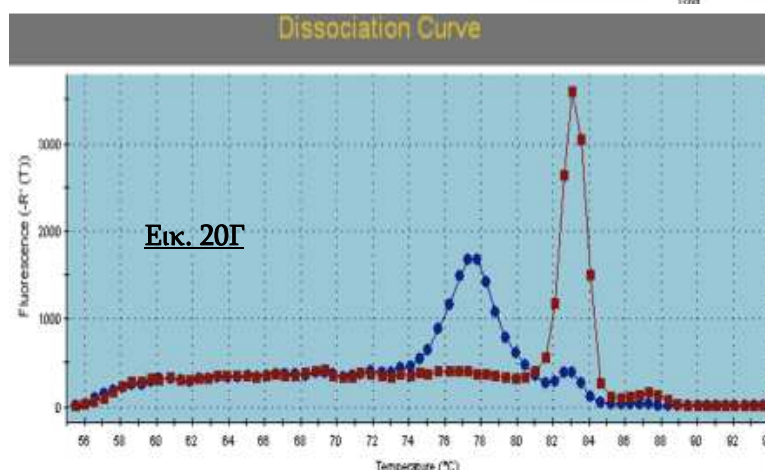
CNOT7



Εικ. 20Α



Εικ 20Β



Εικ. 20Γ

Εικ. 20Α: Εικόνα από ηλεκτροφόρηση, σε gel αгарόζης 1%, των προϊόντων της RT-PCR.. Η CNOT7 αναμένεται στα 419bp.

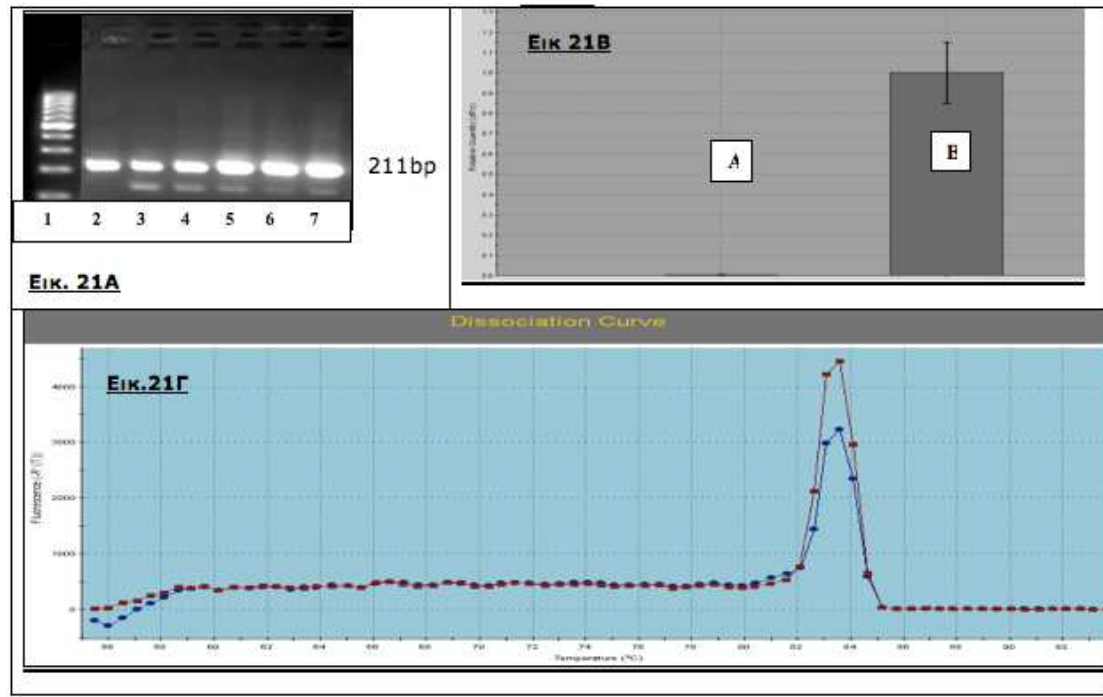
Εικ. 20Β: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την RT-PCR [συγκεκριμένα παρουσιάζονται τα Relative quantity charts, $-Rn'(T)^*$]. Η στήλη Α αντιπροσωπεύει τα σχετικά επίπεδα mRNA της CNOT7 από τα διαμολυσμένα κύτταρα ενώ η στήλη Β τα αντίστοιχα επίπεδα από τα φυσιολογικά, τα μη διαμολυσμένα κύτταρα (controls) 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

Εικ. 20Γ: 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.

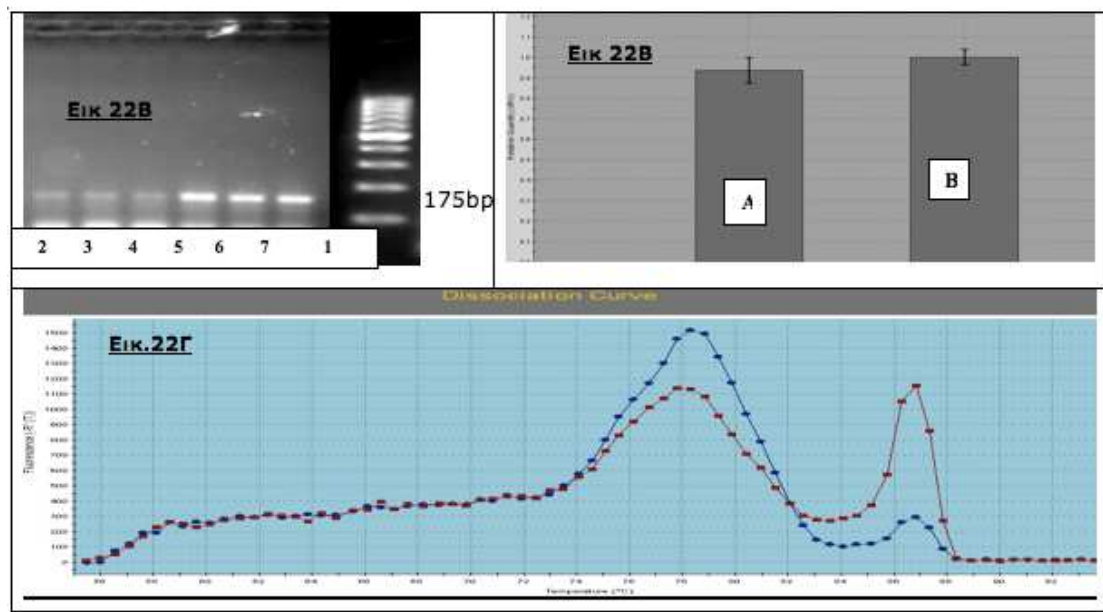
- ❖ $-Rn'(T)$ = the first derivative of the reference dye-normalized fluorescence reading multiplied by -1.

4.4 Επίδραση της αποσιώπησης της CNOT7 σε επιλεγμένους παράγοντες (72 ώρες μετά τη διαμόλυνση)

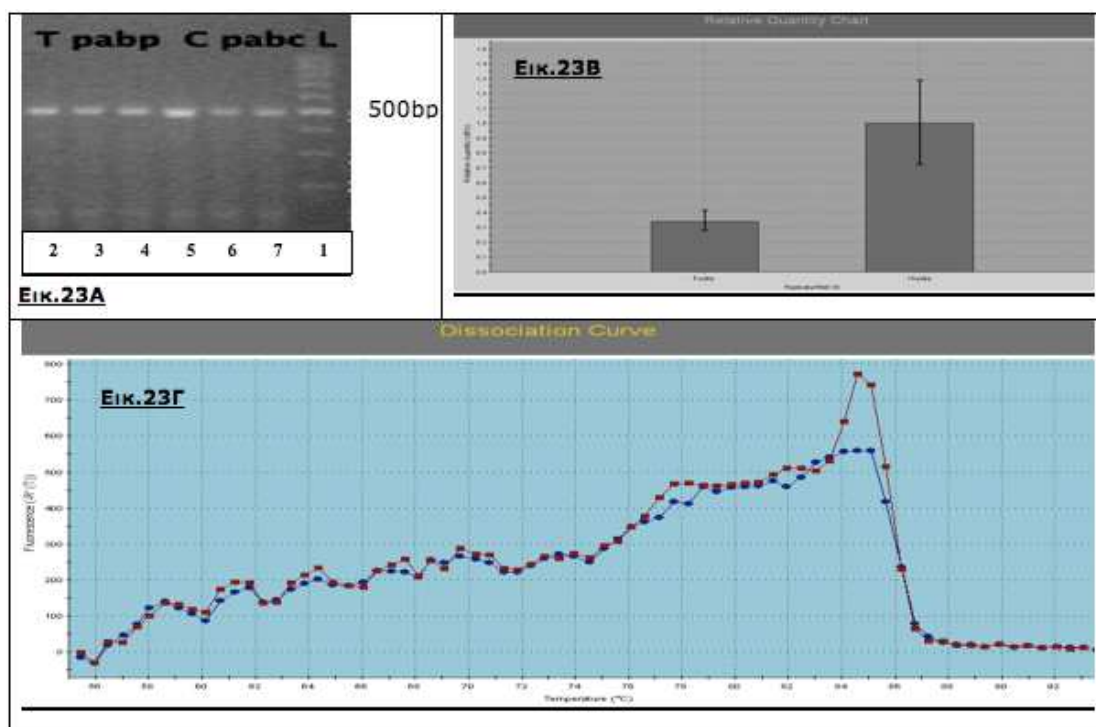
PARN



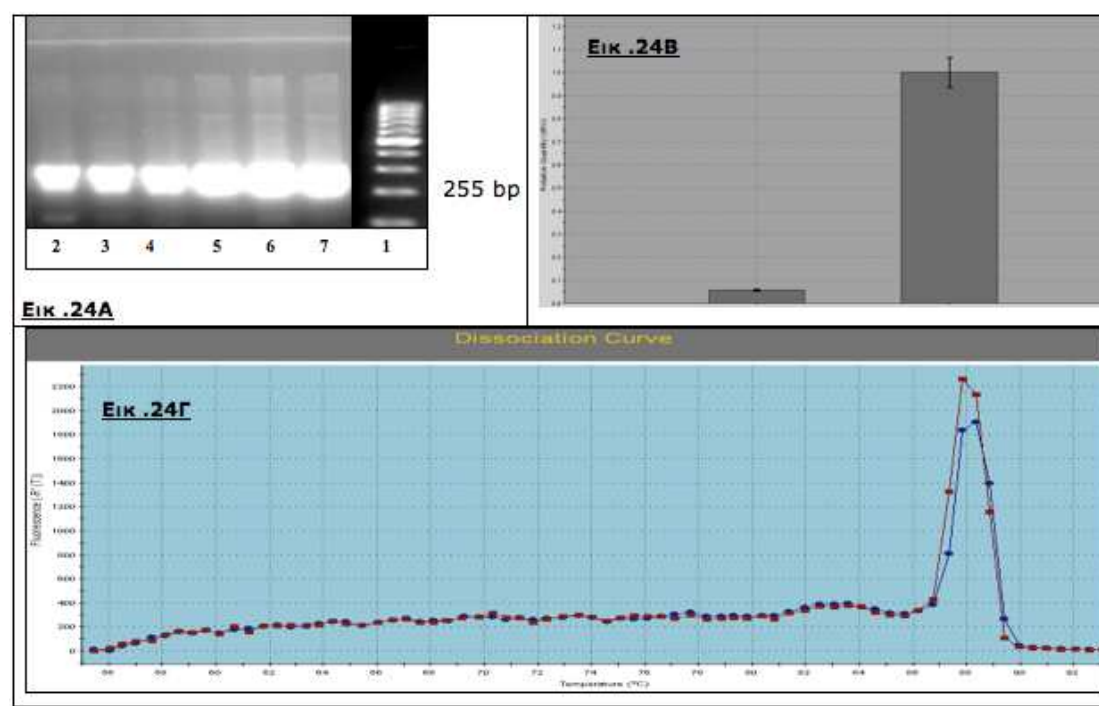
NOC



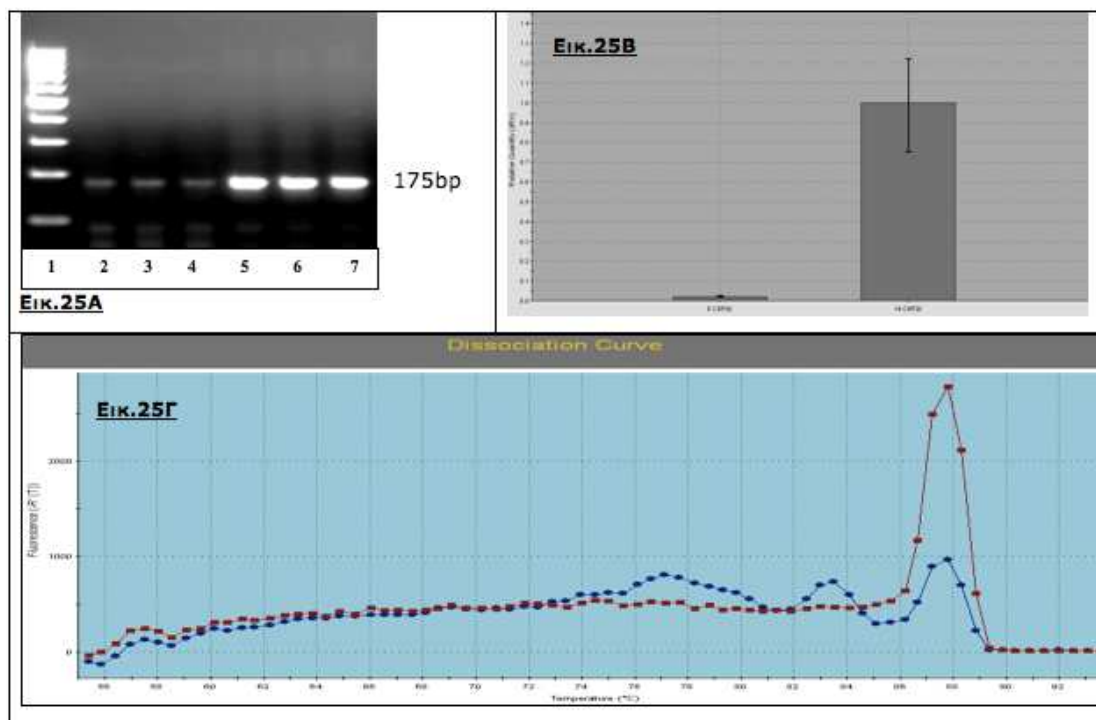
PABP(C)



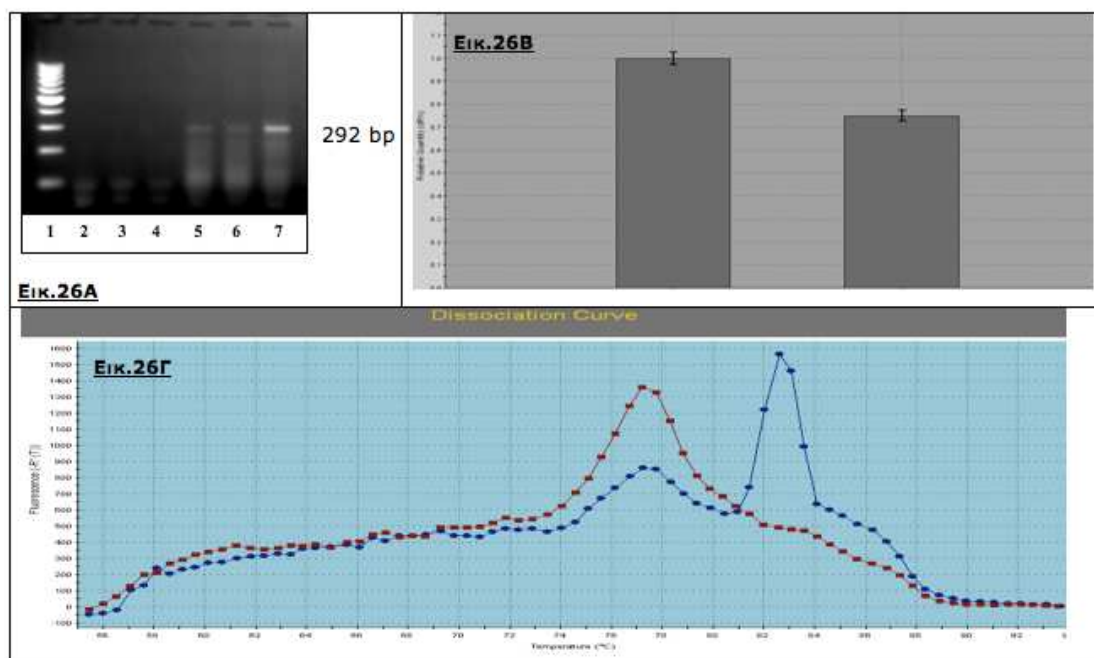
H2A



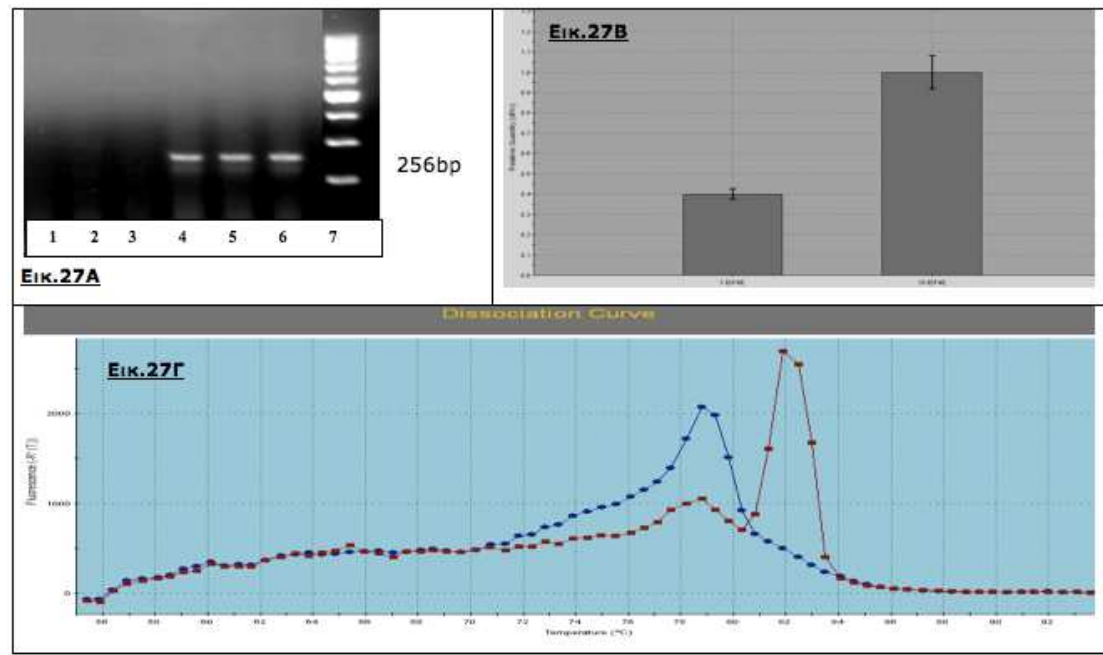
CBP20



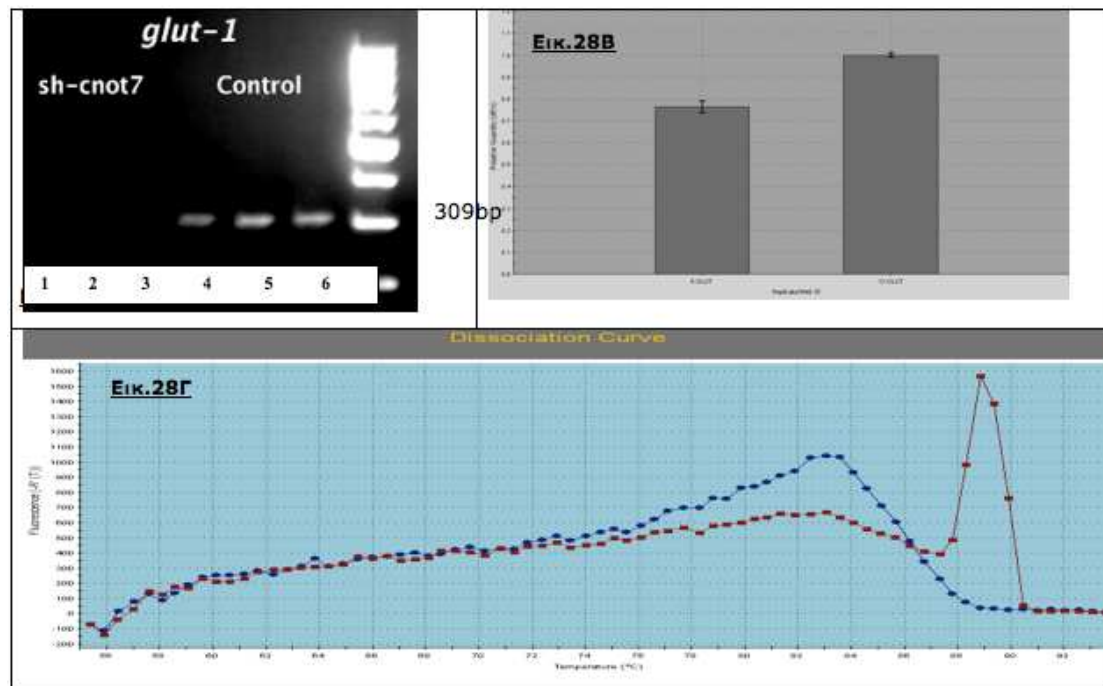
CBP80



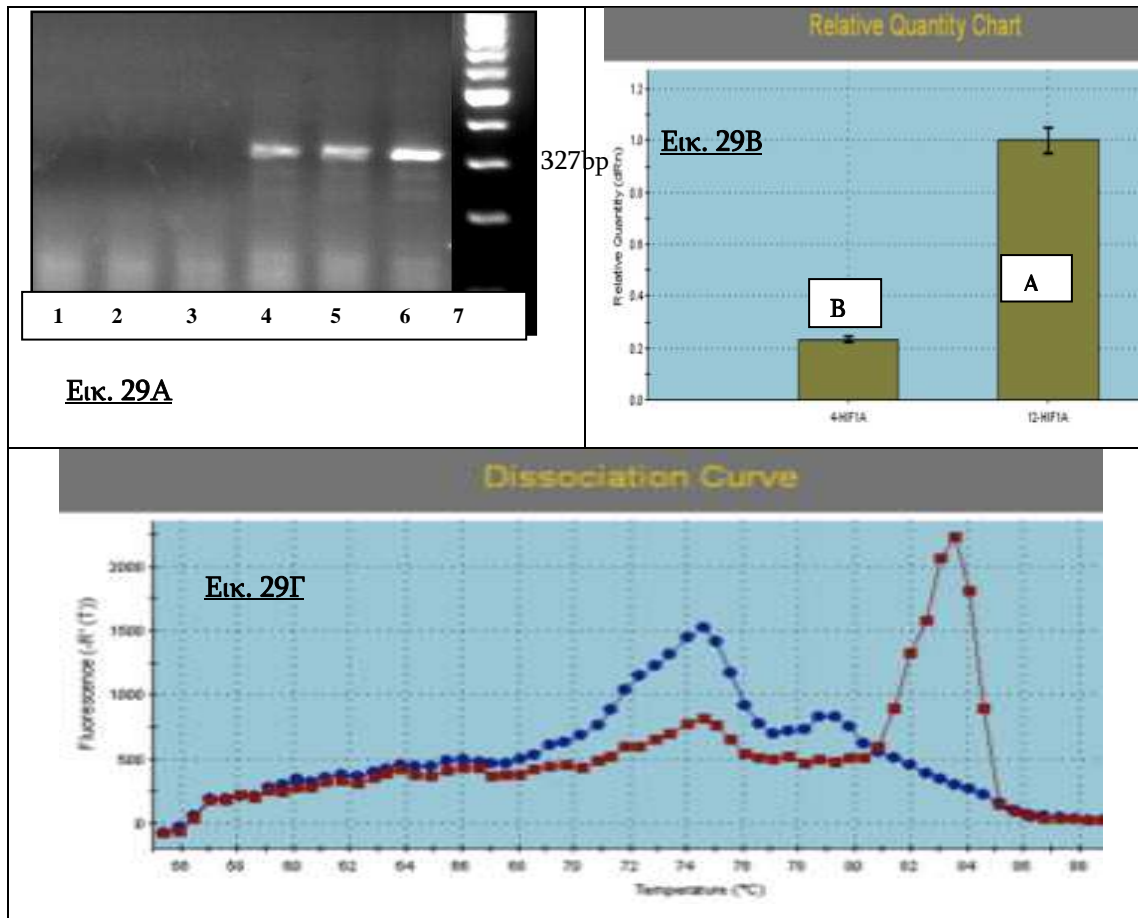
EIF4E



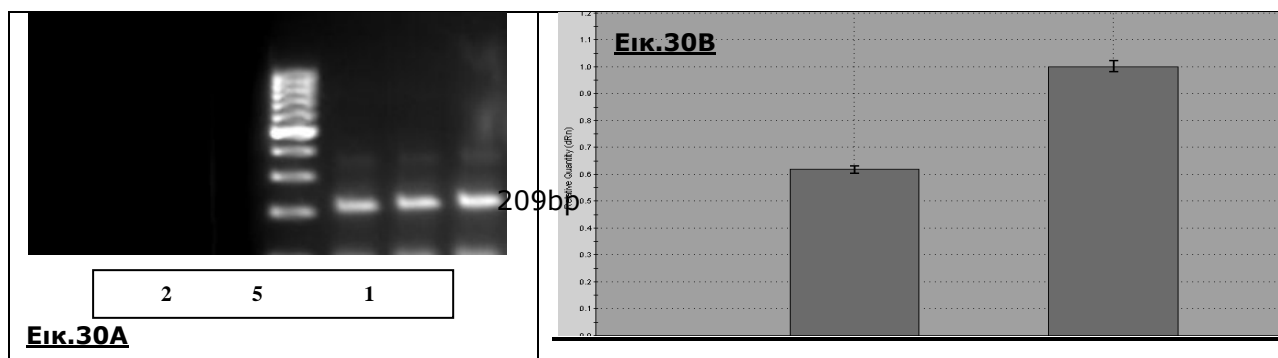
SLC2A1 (GLUT-1)

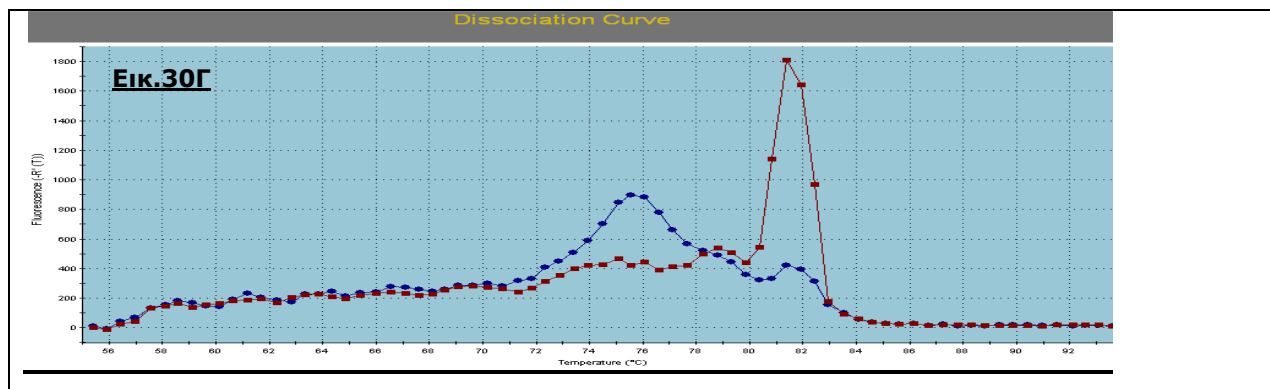
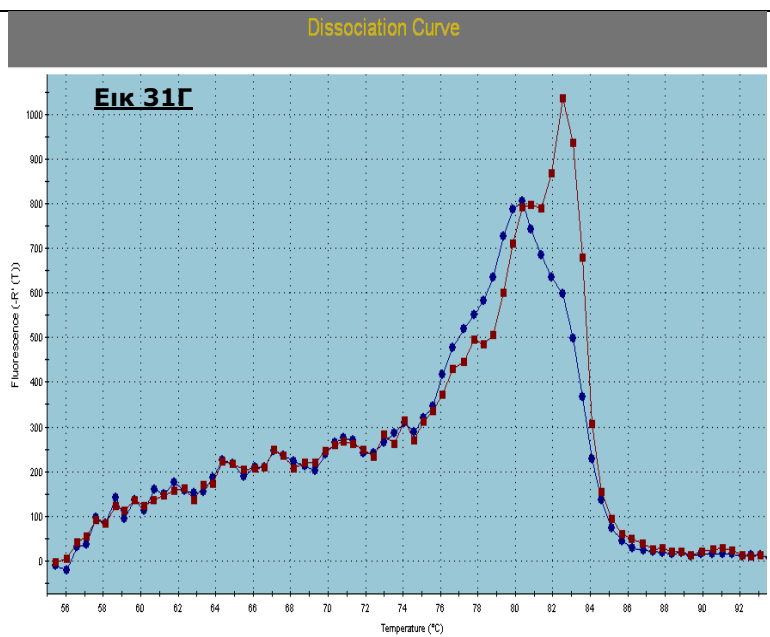
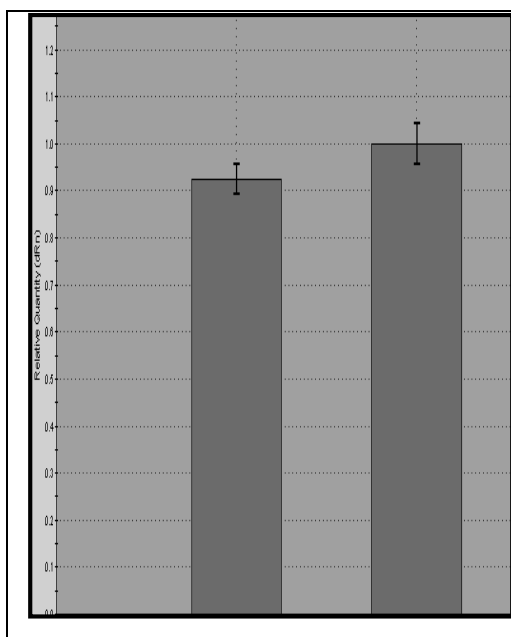


HIF 1-a



LSM

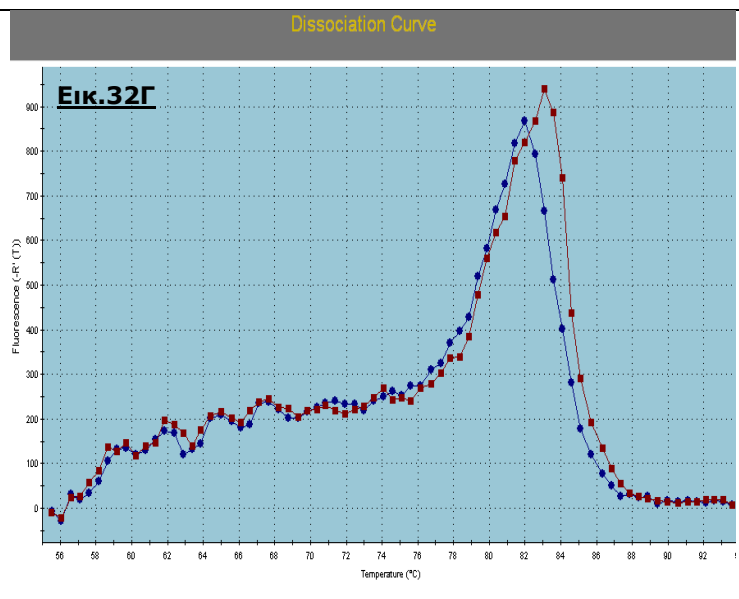
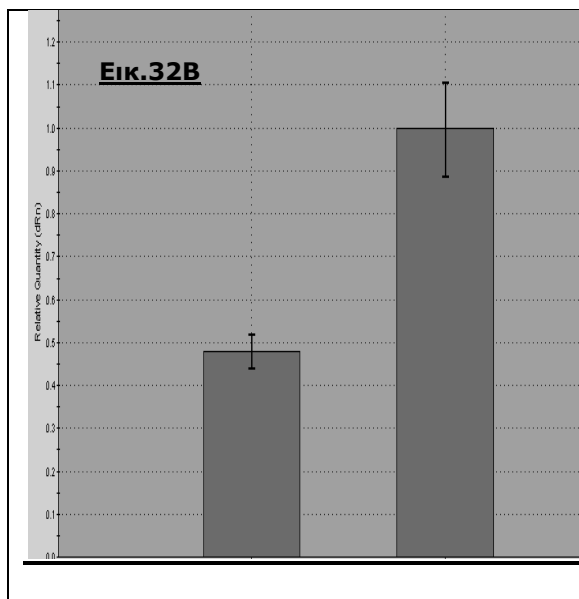




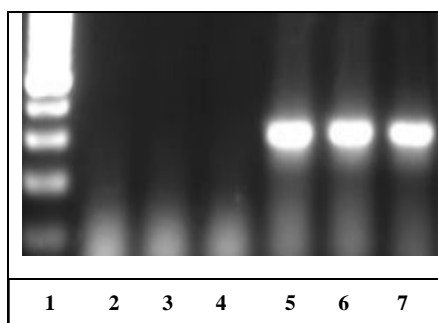
BTG2

Eik.31B

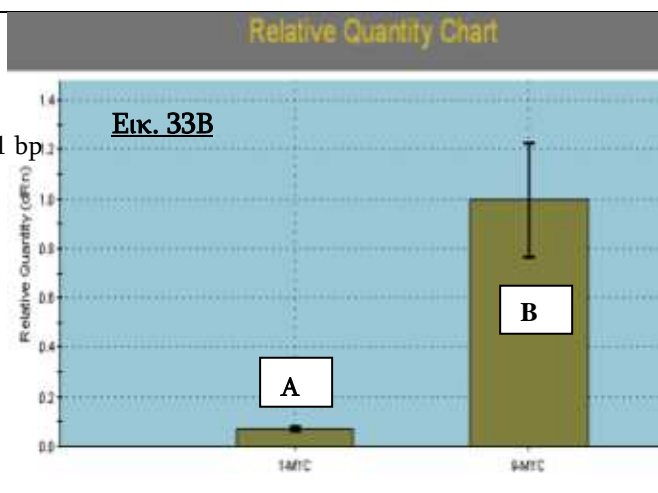
AGO2

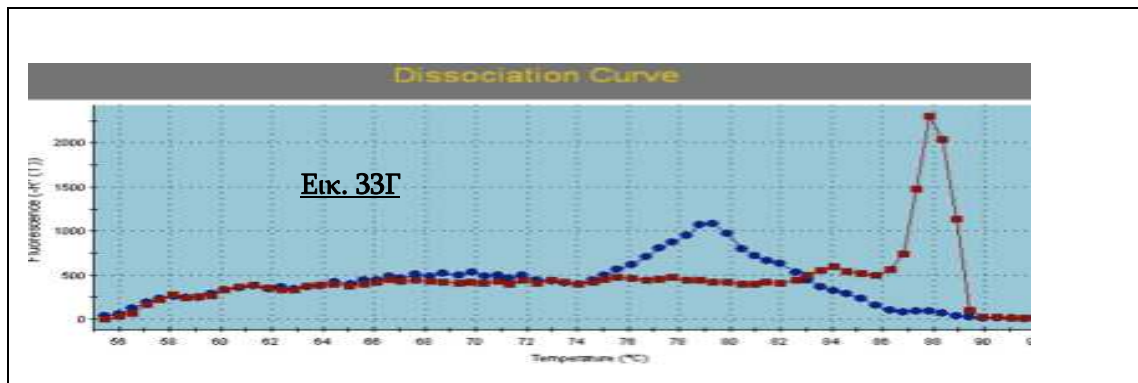


c-MYC

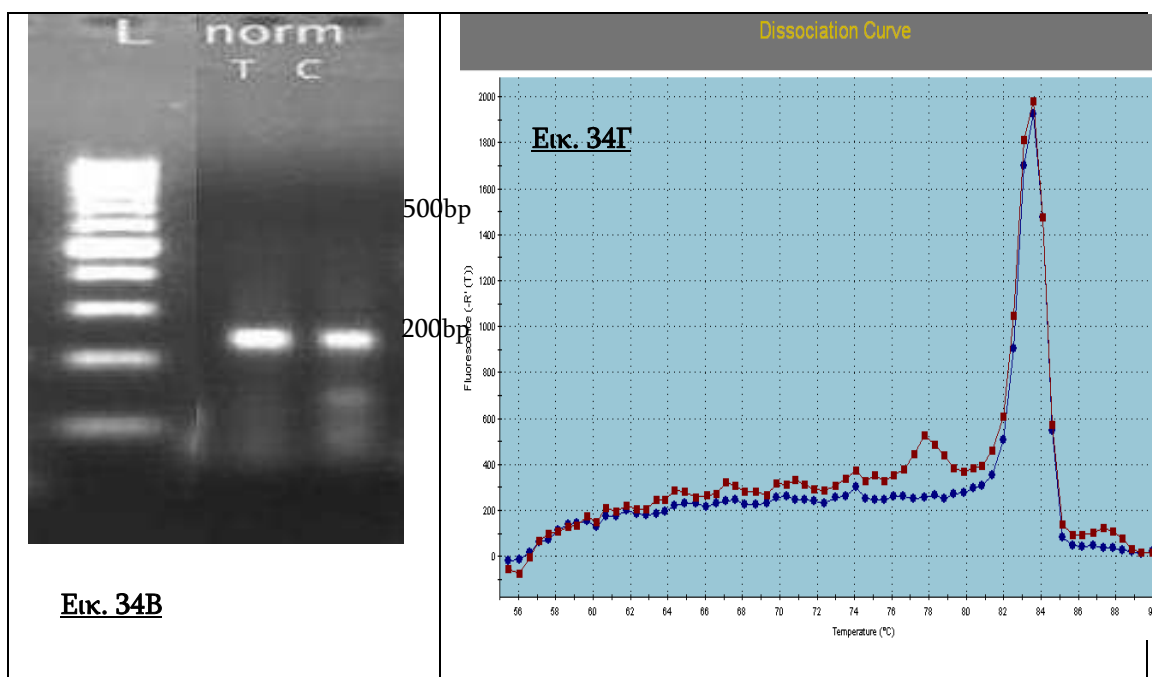


Εικ.33A





B-GLOBIN



Εικ. 21-34A: Αποτελέσματα από ηλεκτροφόρηση, σε gel αγαρόζης 1% , των προϊόντων της RT-PCR όπου φαίνονται τα μοριακά βάρη των 14 παραγόντων των οποίων τα επίπεδα έκφρασης εξετάστηκαν (στην περίπτωση των Ago2 και Btg2 δεν είχαμε ανιχνεύσιμο οπτικά προϊόν).

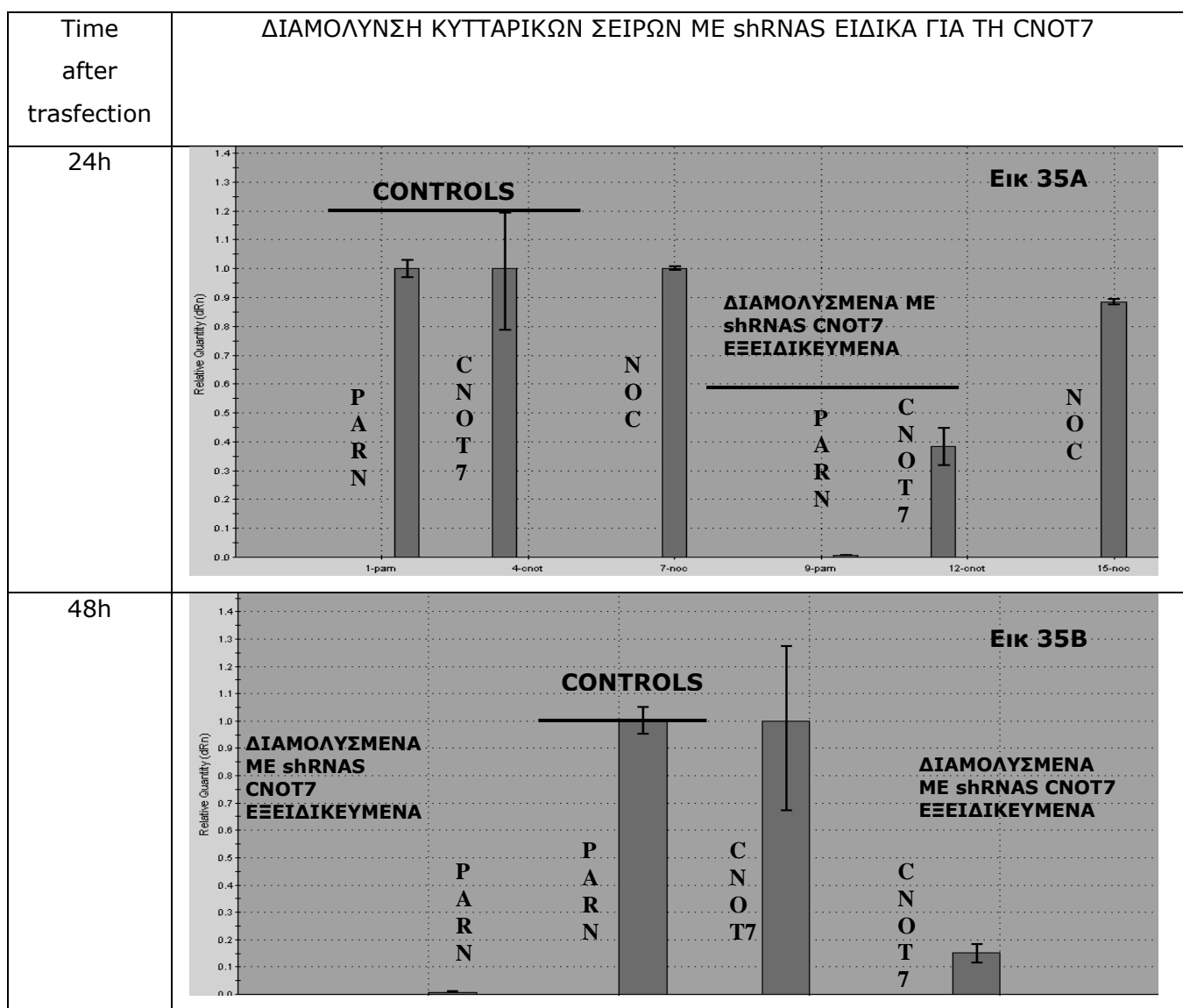
Εικ. 21-34B: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR [συγκεκριμένα παρουσιάζονται τα Relative quantity charts, $-Rn'(T)^*$]. Η στήλη A αντιπροσωπεύει τα σχετικά επίπεδα mRNA της CNOT7 από τα διαμολυσμένα κύτταρα ενώ η στήλη B τα αντίστοιχα επίπεδα από τα φυσιολογικά, τα μη διαμολυσμένα κύτταρα (controls) 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

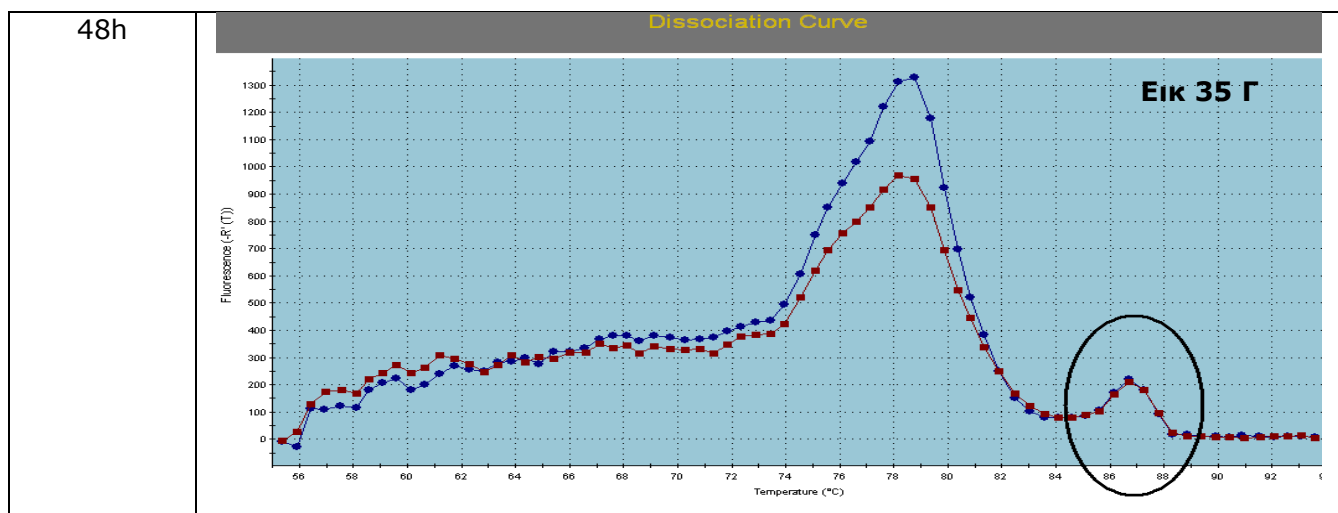
Εικ. 21-34Γ: Διαγράμματα διάστασης σήματος φθορισμού (dissociation plots). Η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από διαμολυσμένα κύτταρα ενώ η κόκκινη τα προϊόντα από μη

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.

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





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

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

Πίνακας 11: Συγκριτικός πίνακας επίδρασης αποσιώπησης της PARN και αποσιώπησης της CNOT7 στα επίπεδα mRNA επιλεγμένων παραγόντων.

Factor	PARN silencing	CNOT7 silencing
CBP20	16*	44
CBP80	20	42
eIF4E	8	28
PABPC	12	73
CNOT7	2	23
PARN	50	79
NOC	17	61
AGO2	130	98
MYC	2	35
RAS	147	120
H2A	100	100

* % των επιπέδων mRNA των μη διαμολυσμένων κυττάρων

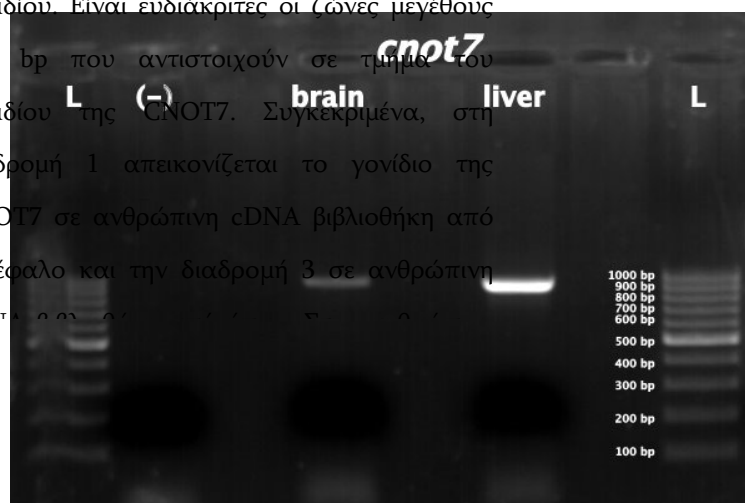
4.6 Έλεγχος της παρουσίας της CNOT7 στις cDNA βιβλιοθήκες

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση του γονιδίου της CNOT7 σε ανθρώπινες cDNA βιβλιοθήκες. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl και εφαρμόστηκε θερμοκρασία υβριδισμού 53°C. Χρησιμοποιήθηκαν, όπως προαναφέρθηκε, οι εκκινητές CNOT7 XhoI sense και CNOT7 BamHI antisense, με αποτέλεσμα να προκύψουν προϊόντα ενίσχυσης τα οποία διαθέτουν στα άκρα τους τις

αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και XhoI. Μετά την ολοκλήρωση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης σε πήκτωμα αγαρόζης (0,8%). Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έγιναν ορατά σε υπεριώδη ακτινοβολία (εικόνα), ενώ πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του μεγέθους των τμημάτων DNA με βάση τον μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder 1kb). Η εικόνα που προέκυψε επιβεβαίωσε την ορθότητα της ενίσχυσης εφόσον είναι ευδιάκριτες ζώνες που αντιστοιχούν στις **858bp**, όσο δηλαδή, είναι και το μέγεθος του γονιδίου της CNOT7 (εικόνα 36). Επιπλέον, είχε προηγηθεί έλεγχος της παρουσίας της CNOT7 στις cDNA βιβλιοθήκες από εγκέφαλο, καρδιά και ήπαρ, με εκκινητές που εντοπίζουν ένα μικρό τμήμα του γονιδίου (εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της quantitative real-time PCR) και διαπιστώθηκε πως στην βιβλιοθήκη της καρδιάς απουσιάζει (εικόνα 37). Επίσης, επαληθεύτηκε η παρουσία του γονιδίου της CNOT7 με sequencing.



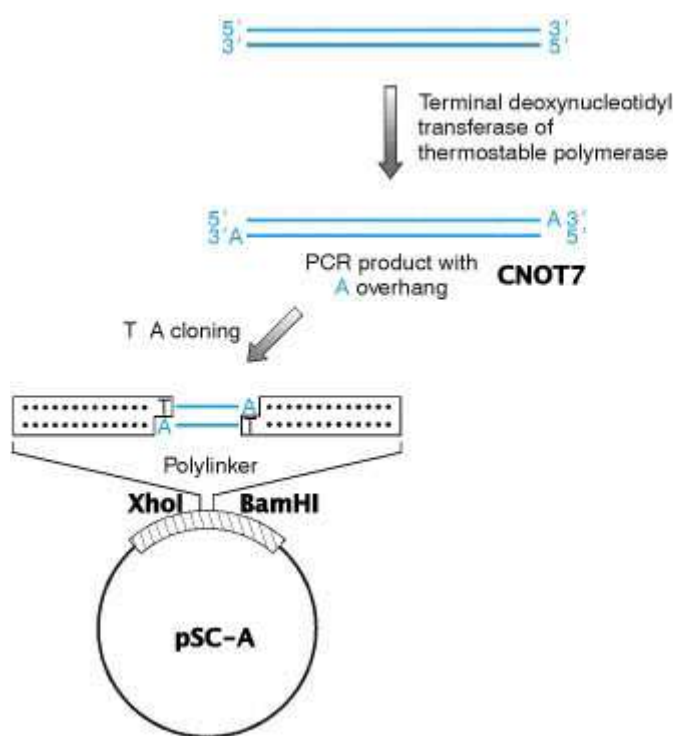
Εικόνα 36: Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης του προϊόντων της PCR με εκκινητές που εντοπίζουν ένα μικρό τμήμα του γονιδίου. Είναι ευδιάκριτες οι ζώνες μεγέθους 419 bp που αντιστοιχούν σε τμήμα του γονιδίου της CNOT7. Συγκεκριμένα, στη διαδρομή 1 απεικονίζεται το γονίδιο της CNOT7 σε ανθρώπινη cDNA βιβλιοθήκη από εγκέφαλο και την διαδρομή 3 σε ανθρώπινη



Εικόνα 37: Ενίσχυση του γονιδίου CNOT7 από βιβλιοθήκες ανθρώπινου εγκεφάλου και ήπατος. Είναι ευδιάκριτες οι ζώνες μεγέθους 858 bp που αντιστοιχούν στο ενισχυμένο γονίδιο της CNOT7 σε cDNA βιβλιοθήκες από εγκέφαλο και ήπαρ.

4.7 Εισαγωγή του γονιδίου *cnot7* με πλασμιδιακό φορέα pSC-A

Ακολούθησε καθαρισμός και απομόνωση από το πήκτωμα αγαρόζης των ενισχυμένων τμημάτων DNA που αντιστοιχούν στις επιθυμητές ζώνες με τη βοήθεια του πρωτοκόλλου PureLink Quick Gel Extraction της Invitrogen, ακριβώς όπως έχει ήδη περιγραφεί. Ο τελικός όγκος έκλουσης ήταν τα 50μl. Στη συνέχεια τα προϊόντα που εξήχθησαν από την πηκτή, χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της ένωσης με τον πλασμιδιακό φορέα pSC-A που παρέχεται στο Strataclone PCR Cloning kit της Stratagene. Η σύνδεση των ενισχυμένων γονιδίων της CNOT7 με τον φορέα, βασίστηκε στη μέθοδο του TA cloning, καθώς τα γονίδια διέθεταν μετά το τέλος της PCR 3' προεξοχές δεοξυαδενοσίνης (A) (χάρη στη δράση της Taq πολυμεράσης που προστέθηκε κατά το τελευταίο βήμα υβριδισμού της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης) και ο φορέας είναι κατασκευασμένος με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να διαθέτει προεξοχές δεοξυθυμιδίνης (T) (εικόνα 38).



Εικόνα 38: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας κλωνοποίησης με τη μέθοδο του TA cloning, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή του γονιδίου της CNOT7 στον πλασμιδιακό φορέα pSC-A. Ο φορέας έχει γραμμοποιηθεί έτσι ώστε να διαθέτει 3' προεξοχές (overhangs) δεοξυθυμιδίνης (T), ενώ το προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου που πρόκειται να κλωνοποιηθεί διαθέτει 3' προεξοχές δεοξυαδενοσίνης (A) εξαιτίας της δράσης της Taq πολυμεράσης. Ακολούθως, πραγματοποιείται η αντίδραση σύνδεσης μέσω των συμπληρωματικών άκρων του προϊόντος της PCR (3' A) και του φορέα (3' T), παρουσία μιας λιγάσης (T4 DNA λιγάση). Το ανασυνδυασμένο, πλέον, πλασμίδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μετασχηματισμό και ακόλουθο έλεγχο των θετικών κλώνων που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο με τη μέθοδο της ανάλυσης με ένζυμα περιορισμού (στην προκειμένη περίπτωση τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και XhoI).

4.8 Μεταφορά του πλασμιδιακού φορέα σε κύτταρα *E. coli*

Το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας περιελάμβανε τη μεταφορά των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης σε στελέχη *E. coli* και συγκεκριμένα σε κύτταρα DH5a, τα οποία προηγουμένως είχαν καταστεί επιδεκτικά. Αρχικά, αναπτύχθηκαν καλλιέργειες κύτταρων DH5a και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός, για τη μεταφορά των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στα κύτταρα. Για την ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37°C σε τριβλία άγαρ με το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml. Εφόσον το πλασμίδιο προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, οι αποικίες που θα αναπτυχθούν παρουσία αυτού του αντιβιοτικού θα είναι αποκλειστικά εκείνες που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο. Επίσης, είναι απαραίτητη η προσθήκη X-gal στα τριβλία άγαρ, καθώς ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας διαθέτει το οπερόνιο LacZ με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η επιλογή των λευκών αποικιών που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο, έναντι των μπλε (blue/white screening). Ακολούθησε δημιουργία stock των μετασχηματισμένων κυττάρων σε 50% γλυκερόλη (με αναλογία 700μl κύτταρα και 300μl γλυκερόλη) και αποθήκευση στους -80°C.

4.9 Απομόνωση του pSC-A που φέρει το γονίδιο *cpot7* και ανάλυση με ένζυμα περιορισμού

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις επιλεγμένες λευκές αποικίες κυττάρων που έλαβαν επιτυχώς το πλασμίδιο pSC-A σε μικρή κλίμακα (minipreps) (με τη βοήθεια του Nucleospin Plasmid kit της Macherey Nagel) και έλεγχος του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA για την επιτυχία της ενσωμάτωσης του επιθυμητού ενθέματος με χρήση των περιοριστικών ενζύμων XhoI και BamHI. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ξεχωριστή αντίδραση πέψης, δηλαδή αρχικά πραγματοποιήθηκε πέψη με XhoI και ακολούθησε στο ίδιο διάλυμα πέψη με BamHI. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν οι εξής αντιδράσεις:

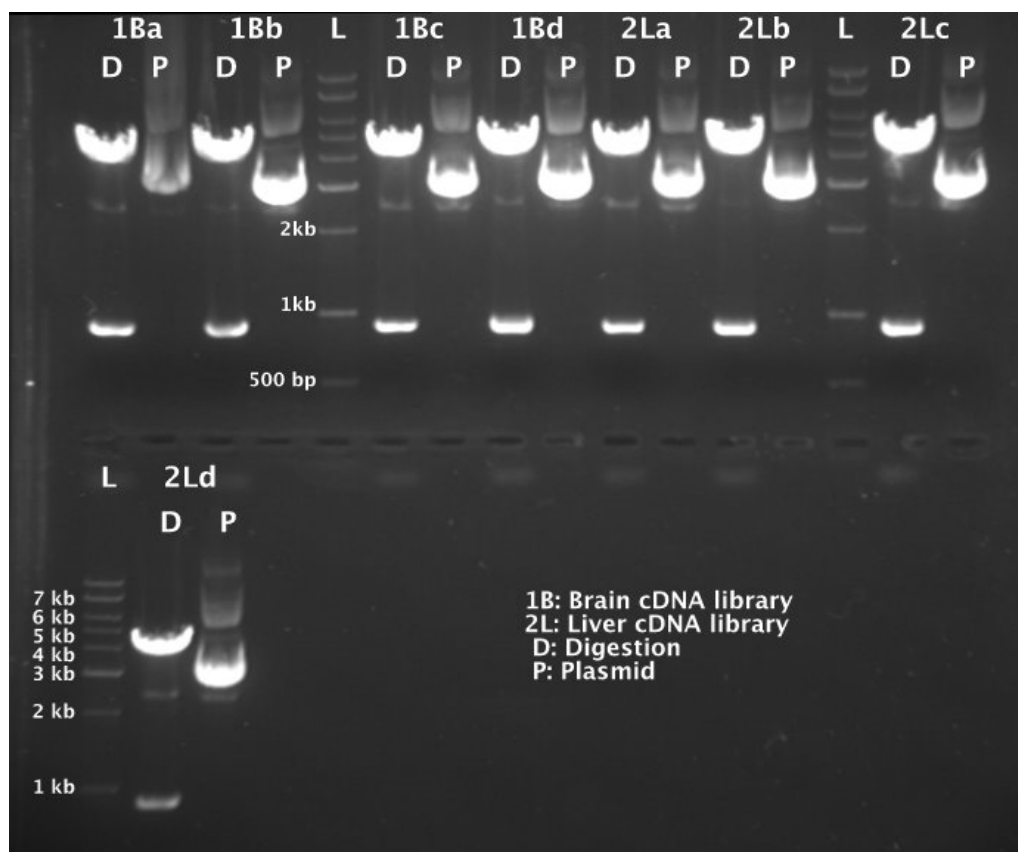
pSCA-insert	30 µl
Buffer 3 (10X)	5 µl
BSA 100X	0,5 µl
XhoI	3 µl
ddH ₂ O	11,5 µl
Total	50 µl

Η αντίδραση διήρκησε 2 ώρες στους 37°C.

Με το πέρας των 2 ωρών έγινε προσθήκη του δεύτερου ενζύμου, δηλαδή 3µl BamHI, στην αρχική αντίδραση. Η διάρκεια αυτής της αντίδρασης ήταν 2 ώρες στους 37°C. Οι ξεχωριστές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν διότι οι θέσεις κοπής των ενζύμων περιορισμού στον φορέα pET15b βρίσκονται πολύ κοντά.

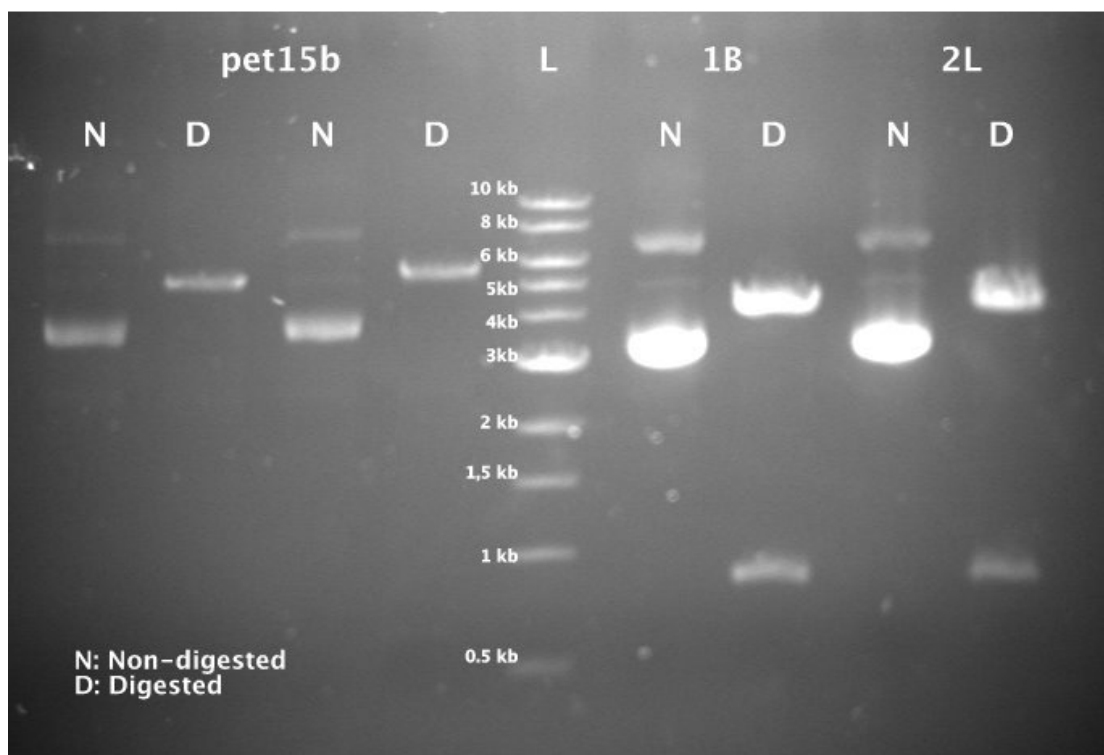
Όπως αναμενόταν μετά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης και έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία, προέκυψαν μία ζώνη μεγέθους περίπου 3,5kb που αντιστοιχεί στον γραμμοποιημένο πλασμιδιακό φορέα pSC-A

και μία ζώνη μεγέθους 858pb που αντιστοιχεί στο γονίδιο της CNOT7 (εικόνα 39). Η επιτυχία της ένθεσης επιβεβαιώθηκε αργότερα και με αλληλούχηση (sequencing).



Εικόνα 39: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης του πλασμιδιακού φορέα pSCA-insert, με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες XhoI και BamHI σε σύγκριση με το άκοπο πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της CNOT7. Οι ζώνες στις 858pb αντιστοιχούν στο γονίδιο της CNOT7, οι ζώνες στις 4,5kb αντιστοιχούν στο κομμένο φορέα pSC-A, ενώ οι ζώνες στις 3kb αντιστοιχούν στο άκοπο φορέα pSCA-insert.

Παράλληλα, έγινε με την ίδια διαδικασία η πέψη του πλασμιδιακού φορέα pET-15b με τα ένζυμα περιορισμού XhoI και BamHI. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων επιβεβαιώνει την ορθότητα της αντίδρασης πέψης, εφόσον παρατηρείται η ζώνη μεγέθους περίπου 5,8kb, η οποία αντιστοιχεί στον φορέα pET-15b ευθυγραμμισμένο (εικόνα 40).



Εικόνα 40: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης του πλασμιδιακού φορέα pET15b, με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες XhoI και BamHI σε σύγκριση με το άκοπο πλασμίδιο. Οι ζώνες στις 5,8kb αντιστοιχούν στον pET15b, οι ζώνες στις 858pb αντιστοιχούν στο γονίδιο της CNOT7, οι ζώνες στις 4,5kb αντιστοιχούν στο κομμένο φορέα pSC-A, ενώ οι ζώνες στις 3kb περίπου αντιστοιχούν στο άκοπο φορέα pSCA-insert.

4.10 Υποκλωνοποίηση του γονιδίου της CNOT7 στον πλασμιδιακό φορέα pET15b

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή των ζωνών μεγέθους 858bp που αντιστοιχούν στο γονίδιο της CNOT7 από το πήκτωμα αγαρόζης της παραπάνω εικόνας, καθώς και εξαγωγή της ζώνης μεγέθους 5,8kb που αντιστοιχεί στον γραμμοποιημένο πλασμιδιακό φορέα pET-15b. Ακολούθησε υποκλωνοποίηση του γονιδίου της CNOT7 στον πλασμιδιακό φορέα pET15b που απομονώθηκαν από τα πηκτώματα αγαρόζης, μέσω της δράσης της T4 DNA λιγάσης. Η αντίδραση της ένωσης πραγματοποιήθηκε στους 14°C O/N, και στηρίχθηκε στη

δημιουργία κολλωδών συμπληρωματικών άκρων μετά από πέψη με κοινά περιοριστικά ένζυμα (BamHI και XhoI).

pET15b	6 µl
insert	8 µl
Buffer (5X)	2 µl
ATP (50mM)	2 µl
T4 DNA ligase οίκου Invitrogen	1 µl
ddH ₂ O	1 µl
Total	20 µl

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε η ίδια αντίδραση σύνδεσης με τη διαφορά ότι αντί του insert προσθέτουμε επιπλέον H₂O και αυτό έγινε για να διαπιστωθεί αν η T4 λιγάση κυκλοποιεί τον φορέα χωρίς να συμπεριλάβει το insert.

4.11 Διαδικασία μετασχηματισμού με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) και επιλογή αποικιών

Τέλος, ακολούθησε η μεταφορά του προϊόντος της αντίδρασης σύνδεσης σε επιδεκτικά κύτταρα DH5a, με τη διαδικασία του μετασχηματισμού με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation). Η ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων έγινε στους 37°C σε τριβλία άγαρ με το αντιβιοτικό αμικικιλίνη στη συγκέντρωση που ήδη αναφέρθηκε. Ο πλασμιδιακός φορέας pET-15b δεν διαθέτει το οπερόνιο LacZ με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η επιλογή των κλώνων που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο με το επιθυμητό ένθετο, με βάση το χρώμα τους. Ακολούθως, χρησιμοποιήθηκε μία από τις αναπτυχθείσες αποικίες για την δημιουργία υγρής καλλιέργειας σε LB broth με αμικικιλίνη, για να γίνει

στην συνέχεια απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με mini preparation σε τελικό όγκο 50μl. Αυτό είναι απαραίτητο για έλεγχο του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA ο οποίος θα επιτευχθεί μέσω της πέψης του με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και XhoI. Αυτά τα ένζυμα, όπως αναφέρθηκε, αναγνωρίζουν θέσεις κοπής που εντοπίζονται στα άκρα του γονιδίου της CNOT7, το οποίο έχει εισαχθεί στον φορέα pET-15b, με αποτέλεσμα να αναμένεται η ανίχνευση δύο ζωνών κατά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης. Η μία ζώνη θα έχει μέγεθος 858bp περίπου και θα αντιστοιχεί στο γονίδιο της CNOT7 και η δεύτερη θα έχει μέγεθος 5,8kb και θα αντιστοιχεί στον pET-15b. Εν τέλει αρκετές από τις αποικίες που ελέγχθηκαν παρουσιάζουν το αναμενόμενο πρότυπο με αποτέλεσμα να έχουμε το γονίδιο της CNOT7 από cDNA βιβλιοθήκες εγκεφάλου και ήπατος σε φορέα pET15b ώστε να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω για υπερέκφραση και απομόνωση της πρωτεΐνης CNOT7.

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). Ο κεντρικός ρόλος της CNOT7 στην αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs, καθιστά την ταυτοποίηση των πιθανών mRNA-στόχων της ένα ερευνητικό πεδίο με πολλές προκλήσεις.

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 CNOT7 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 CNOT7 στα επίπεδα των mRNAs τους.

Αρχικά, κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη της έκφρασης της CNOT7 σε δείγματα από κύτταρα από μυελό των οστών ασθενών με λευχαιμίες. Στη **εικόνα 19** που ενδεικτικά παρουσιάζεται εδώ, απεικονίζεται το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης και είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι υπάρχει μια δεύτερη ζώνη η οποία απουσιάζει από τα υγιή άτομα και έτσι κρίθηκε αναγκαία η διερεύνηση της παρουσίας περισσότερων μορφών της CNOT7 στα ασθενή άτομα. Πιθανή αιτία αυτών των μορφών είναι η φωσφορυλίωση, η οποία θα μπορούσε να εξηγήσει την παρουσία των πολλαπλών αυτών μορφών μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών δειγμάτων. Άλλωστε είναι γνωστό ότι η φωσφορυλίωση σημαντικών πρωτεϊνών είναι δυνατόν να μεταβάλλει τα επίπεδα της έκφρασής τους. Τα αποτελέσματα αυτά ελέγχθηκαν και με την μέθοδο της qReal-Time PCR και το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **εικόνα 17**. Παρατηρούμε ότι διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της CNOT7 σε ασθενείς με λευχαιμίες σε σύγκριση με υγιή άτομα.

Ακολούθησε η μελέτη της έκφρασης της CNOT7 σε ασθενείς με λευχαιμία και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μέθοδο την ανοσοαποτύπωσης υποδηλώνουν την αυξημένη έκφραση της CNOT7 στους ασθενείς σε σύγκριση με τα υγιή άτομα (**εικόνα 18**). Τα δείγματα των εικόνων αυτών είναι από ορούς από περιφερικό αίμα. Στην **εικόνα 18** παρατηρούμε τις εντονότερες ζώνες στα ασθενή άτομα σε σύγκριση με τις ζώνες των φυσιολογικών ατόμων, κάτι που υποδηλώνει τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της CNOT7 στους ασθενείς. Η αυξημένη έκφραση της CNOT7 που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα δραστηριότητας

αυτής θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει την απορρύθμιση της έκφρασης άλλων παραγόντων και έτσι να συμβάλλει στον κακοήγη φαινότυπο του κυττάρου.

Βασισμένοι στο ρόλο των ριβονουκελασών στον καρκίνο και των αποαδενυλασών στο χρόνο ζωής των mRNAs, αλλά και σε πρόσφατες εργασίες στο εργαστήριό μας στην έκφραση της PARN σε λευχαιμίες, εξετάσαμε σε ασθενείς με λευχαιμίες την έκφραση μιας αποαδενυλάσης (mRNA και πρωτεΐνες), και βρήκαμε πως τα επίπεδα διαφέρουν, τουλάχιστον σε επίπεδο πρωτεΐνης. Αυτό θα μπορούσε να σημαίνει πως τα επίπεδα έκφρασης είναι αλλαγμένα (αυξημένα εν προκειμένω) γιατί επηρεάζουν -μεταξύ άλλων- την έκφραση συγκεκριμένων παραγόντων κρίσιμων για το κύτταρο, όπως ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικούς παράγοντες. Για τον λόγο αυτό κάνουμε την αποσιώπηση της αποαδενυλάσης σε καρκινική σειρά και ελέγχουμε παράγοντες όπως c-myc και ras. Πρέπει να σημειωθεί ότι η εγκυρότητα της σύγκρισης της έντασης των ζωνών εξασφαλίστηκε φορτώνοντας την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης και από τα ασθενή και από τα υγιή άτομα. Για τους λόγους αυτούς η συγκεκριμένη μελέτη θα μπορούσε να αποτελέσει αφετηρία μελετών για την αποτίμηση της προγνωστικής αξίας της CNOT7 σε περιπτώσεις ασθενών με λευχαιμία ή και άλλων μορφών καρκίνου.

Με ποσοτική Real Time PCR ελέγχθηκε σε επίπεδο mRNA η έκφραση της CNOT7, η 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 CNOT7 με τα αντίστοιχα από την αποσιώπηση άλλων σημαντικών αποαδενυλασών όπως η PARN, φανερώνει κάποια διαφορετικότητα όσων αφορά τουλάχιστον σε ορισμένα mRNAs. Η επιτυχία της σίγησης επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα της RT-PCR, τα οποία έδειξαν μείωση κατά 70% (κανονικοποίηση με τη β-σφαιρίνη) των επιπέδων του mRNA της CNOT7 στα διαμολυσμένα κύτταρα (72 ωρών) σε σύγκριση πάντα με τα κύτταρα μάρτυρες (control, επίσης 72 ωρών). 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. Ωστόσο από τις εικόνες **24B** και **24Γ** φαίνεται πως η αποσιώπηση έχει επίδραση στα επίπεδα των ιστονών καθώς μειώνονται στα διαμολυσμένα κύτταρα. Η πραγματική εικόνα όμως του αποτελέσματος φαίνεται από το gel ηλεκτροφόρησης (εικόνα **24A**) η οποία μας δείχνει ότι τα επίπεδα της ιστόνης δεν παρουσιάζουν τόσο έντονη απόκλιση μεταξύ των αποσιωπημένων και των φυσιολογικών. Αυτή η διαφορά στο αποτέλεσμα οφείλεται πιθανόν σε εσφαλμένη κανονικοποίηση. Επίσης, μια άλλη εξήγηση για αυτή τη παρατήρηση θα μπορούσε να είναι η πιθανότητα τα κύτταρα να συλλέχθηκαν ενώ η πλειοψηφία τους βρισκόταν σε φάση S του κυτταρικού κύκλου, καθώς είναι γνωστό ότι η σύνθεση των ιστονών πραγματοποιείται κυρίως στο συγκεκριμένο στάδιο και κατά συνέπεια μειώνονται δραματικά τα επίπεδα των mRNAs τους (Wu and Bonner;1981 et al, 2002).

Τα αποτελέσματα από την RT-PCR για τους υπόλοιπους παράγοντες έδειξαν πως η αποσιώπηση δεν είναι τόσο ειδική μόνο για την CNOT7 καθώς τα επίπεδα mRNA και άλλων παραγόντων μειώνονται. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα των άλλων δύο αποαδενυλασών PARN και NOC μειώνονται εξίσου. Τα επίπεδα της πρώτης μειώνονται δραματικά ενώ της δεύτερης παρουσιάζουν μικρή αλλά σημαντική μείωση. Επίσης, μείωση παρατηρείται σε όλους τους εξεταζόμενους παράγοντες εκτός από τον BTG2 που παραμένει σε σταθερά επίπεδα. Αυτό ίσως να οφείλεται στο ότι αυτός ο παράγοντας δεν αλληλεπιδρά με την CNOT7 αλλά με άλλες υπομονάδες του συμπλόκου CCR4-NOT. Στους παράγοντες LSM, BTG2, AGO2, CBP20,80, EIF4E, HIF1A και GLUT-1 δεν πήραμε σήμα στο gel αγαρόζης από τα δείγματα των διαμολυσμένων κυττάρων αλλά στο διάγραμμα διάστασης (dissociation plot) φαίνεται να υπάρχουν ειδικά προϊόντα καθώς υπάρχουν πληθυσμοί σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από του 78°C. Πιθανόν, η ποσότητα των προϊόντων της RT-PCR δεν είναι αρκετή ώστε να δώσει σήμα στο gel ηλεκτοφόρησης αφού η RT-PCR είναι πολύ πιο ευαίσθητη τεχνική από την ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης. Αυτά τα mRNAs που μειώνονται πιθανόν να υπόκεινται σε διαφορετικό μηχανισμό ελέγχου των επιπέδων τους μετά την αποσιώπηση της CNOT7, 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).

Στις εικόνες **35A**, **35B** και **35Γ** φαίνονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της αποσιώπησης με shRNA-CNOT7 εξειδικευμένα, στις αποαδενυλάσες CNOT7, PARN και nocturnin (NOC). Οι μετρήσεις των επιπέδων του mRNA των τριών αποαδενυλασών έγιναν σε χρόνο 24 (εικ.35A) και 48 ωρών (εικ.35B και 35Γ) μετά την διαμόλυνση των κυττάρων με τα shRNAs. Οι εικόνες από το Relative quantity chart δεν ήταν αντιπροσωπευτικές λόγω των αυξημένων μη ειδικών προϊόντων. Η εικόνα από το διάγραμμα διάσπασης δείχνει την ύπαρξη ειδικών προϊόντων χωρίς να μειώνονται αυτά από τα διαμολυσμένα κύτταρα. Στην εικόνα 40A παρατηρούμε ότι τη σημαντικότερη μείωση υπέστη η PARN. Τα

μειωμένα επίπεδα αυτής της αποαδενυλάσης διατηρούνται με την πάροδο του χρόνου, ακόμα και 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση (εικ. 35B). Αντίθετα, η μείωση των επιπέδων της CNOT7 γίνεται εντονότερη με την πάροδο του χρόνου. Σε διάστημα 24 ωρών η CNOT7 στα διαμολυσμένα κύτταρα, μειώνεται κατά τα 3/5 σε σχέση με τα επίπεδα της στα φυσιολογικά κύτταρα. Μετά από 48 ώρες από την διαμόλυνση τα επίπεδα της CNOT7 μειώνονται στο 1/10 και 72 ώρες μετά το ποσοστό γίνεται μικρότερο από 1/10. Η nocturnin στις πρώτες 24 ώρες φαίνεται να μειώνεται σε μικρό βαθμό. Μετά το πέρας των 48 και 72 ωρών αυτή η διαφορά των επιπέδων μεταξύ διαμολυσμένων και φυσιολογικών κυττάρων τείνει να εξισορροπηθεί.

Το πρότυπο έκφρασης που προέκυψε μετά την αποσιώπηση της υπομονάδας CNOT7 (**πίνακας 11**) του συμπλέγματος CCR4-NOT συγκρίθηκε με το αντίστοιχο πρότυπο μετά την αποσιώπηση της PARN (η αποσιώπηση αυτή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια άλλης εργασίας). Μια προσεκτική παρατήρηση του **πίνακα 11** αποκαλύπτει σημαντικές διαφορές όσον αφορά τις μεταβολές στα επίπεδα mRNA τουλάχιστον σε κάποιους από τους επιλεγμένους παράγοντες (π.χ Nocturnin και PABPC). Αυτές οι διαφορές στα πρότυπα έκφρασης που προκύπτουν μετά την αποσιώπηση της CNOT7 και της PARN 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. Επίσης, η αύξηση των επιπέδων έκφρασης θα μπορούσε να σημαίνει πως η αποαδενυλάση ρυθμίζει άμεσα την έκφρασή τους (γιατί προστατεύεται το mRNA από τη δράση της). Η μείωση των επιπέδων έκφρασης θα μπορούσε να σημαίνει πως το mRNA για άγνωστους λόγους εκτίθεται στην δράση άλλων αποαδενυλασών και αποικοδομείται. Σε αυτό θα μπορούσαν να συμβάλλουν άλλοι παράγοντες που αλληλεπιδρούν τόσο με το RNA όσο και με τις αποαδενυλάσες, οι οποίοι όμως ρυθμίζουν με διαφορετικό τρόπο την δράση των ενζύμων αυτών, είτε ενεργοποιώντας είτε

αναστέλλοντας τη δράση τους, επιτρέποντάς τους να δράσουν σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές και άλλες συνθήκες στο κύτταρο. Για να έχουμε όμως σαφέστερη εικόνα απαιτείται η αποσιώπηση και άλλων αποαδενυλασών, και η σύγκριση των κατατομών έκφρασης των παραγόντων που προκύπτουν.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και κλωνοποίηση του γονιδίου της CNOT7 ώστε να ακολουθήσει η υπερέκφραση και ο καθαρισμός της CNOT7 πρωτεΐνης, προκειμένου να γίνουν διαθέσιμα τα υποστρώματα για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων αυτής με άλλους πιθανούς παράγοντες στα πλαίσια της διαδικασίας της αποαδενυλίωσης. Ο εντοπισμός του γονιδίου της CNOT7 έγινε με την μέθοδο της PCR σε ανθρώπινες cDNA βιβλιοθήκες από εγκέφαλο και ήπαρ (εικόνα 36) και η επαλήθευση του αποτελέσματος με αλληλούχηση αποτέλεσε το πρώτο βήμα αυτής της εργασίας. Ακολούθησε η απομόνωση και η κλωνοποίηση του γονιδίου της CNOT7 (εικόνα 37). Η πλασμιδιακή κατασκευή pET-15b-CNOT7 (εικόνα 40), που δημιουργήθηκε ως αποτέλεσμα του συγκεκριμένου πειράματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την έκφραση, απομόνωση και καθαρισμό μεγάλων ποσοτήτων της CNOT7, προκειμένου να αποτελέσουν το κατάλληλο υπόστρωμα για μελέτες προσδιορισμού της δομής της με κρυσταλλογραφία ακτίνων X (στο μέλλον) και αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης της CNOT7.

Συνοψίζοντας, αποσιωπήσαμε την CNOT7 *in vivo* και εξετάσαμε την επίδραση στα επίπεδα mRNA μιας σειράς παραγόντων, στα πλαίσια μιας πρώτης προσπάθειας να ταυτοποιηθούν τα mRNAs-στόχοι της και να δοθεί μια απάντηση στο ερώτημα της ύπαρξης μιας τόσο μεγάλης ποικιλίας αποδενυλασών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Albert et al. “ Identification of a ubiquitin-protein ligase subunit within the CCR4-NOT transcription repressor complex” EMBO J VOL 21:355-364 (2002).

- Albert et al. "Isolation and characterization of human orthologs of yeast CCR4-NOT complex subunits" Oxford University Press VOL 28:809-817 (2000).
- 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).
- Aslam et al. "The CCR4-NOT deadenylase subunits CNOT7 and CNOT8 have overlapping roles and modulate cell proliferation" *Mol Biol Cell* VOL20:3840-50 (2009).
- Bianchin et al., "Conservation of the deadenylase activity of proteins of the Caf1 family in human. *RNA* VOL 11:487-494 (2005).
- Brewer Gary et al. Messenger RNA decay during aging and development. *Ageing Research Reviews* 1:607-625 (2002).
- Brouwer et al. "Three novel components of the human exosome". *Journal of Biological Chemistry* VOL 276: 6177–84 (2001).
- 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).
- Ezzeddine et al. Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation. *Mol Cell Biol.* VOL27:7791-801 (2007)

- Flanagan et al. “Analysis of the transcription regulator, CNOT7 as a candidate chromosome 8 tumor suppressor gene in colorectal cancer” VOL 106:505-9 (2003)
- 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).
- Frischmeyer, P.A. et al. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 295: 2258–2261 (2002).
- Funakoshi et al. “Mechanism of mRNA deadenylation:evidence for molecular interlay between translation termination factor eRF3 and deadenylases” *Genes* VOL 21:3135-48 (2007)
- 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).
- Goldstrohm, Hook & Wickens. Regulated deadenylation in vitro. *Methods in Enzymology*, Chapter 5, Volume 448 (2008).
- 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).
- 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).
- Houseley Jonathan & Tollervey David. The many pathways of RNA degradation. *Cell* 136, 763–776, February 20 (2009).
- 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).
- Lau et al. Human Ccr4-Not complexes contain variable deadenylase subunits. *Biochem J* VOL 422:443–453 (2009)
- 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.
- 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).
- Mauxion et al. The BTG2 protein is general activator of mRNA deadenylation. *EMBO J.* VOL27:1039-48 (2008)
- 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).
- Morel A. et al. BTG2 antiproliferative protein interacts with the human CCR4 complex existing in vivo in three cell- cycle-regulated forms. *Journal of Cell Science* 116, 2929-2936 (2003).
- Miyaska T et al. Interaction of antiproliferative protein Tob with the CCR4-

NOT deadenylase complex. *Cancer Sci* VOL 99:755-61 (2008)

- Muhlrاد, 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)
- Tucker, M. & Parker, R. Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 571–595 (2000).
- Wan-Cheol Kim, Chow H. Lee. The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1796 (2009) 99-113.
- 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, R.S. & Bonner, W.M. Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell* 27 (2 Pt 1): 321–330 (1981).
- Yang, X. Crystal structure of human BTG2 and mouse TIS21 involved in suppression of CAF1 deadenylase activity. *Nucleic Acids Res* (2009).