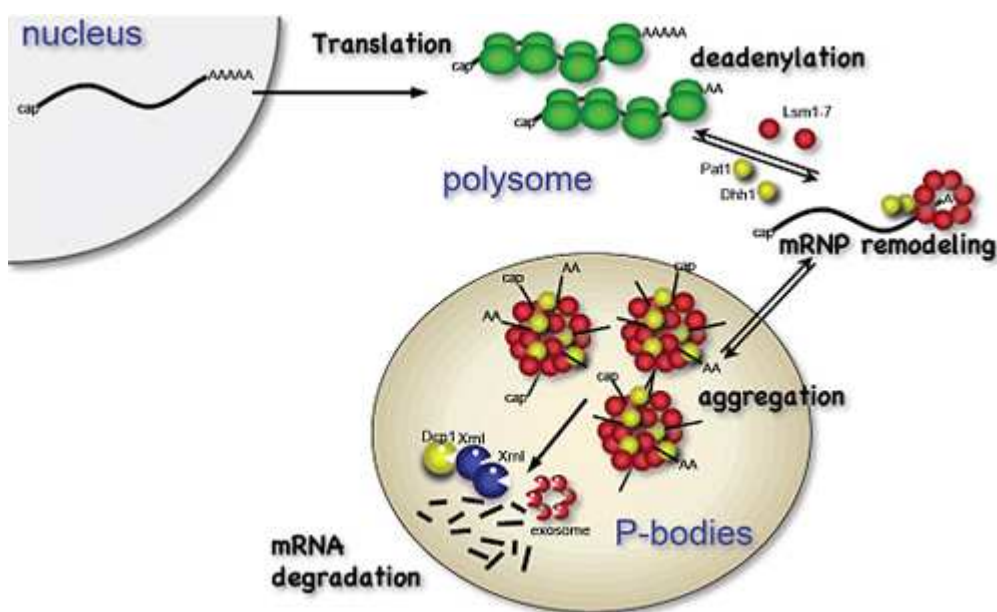




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΠΑΠΑΣΠΥΡΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΩΝ ΣΕ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ



ΛΑΡΙΣΑ 2010

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΩΝ ΣΕ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

- **Μπαλατσός Νικόλαος, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**
- **Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**
- **Κομιώτης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτα, τον κ. Μπαλατσό Νικόλαο που μου εμπιστεύθηκε την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας καθώς και για την άψογη συνεργασία και τη διαρκή υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές του εργαστηρίου της Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο οποίο πραγματοποιήθηκε το πειραματικό κομμάτι της εργασίας, για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και ιδιαιτέρως, τον διδακτορικό φοιτητή Μαραγκοζίδη Παναγιώτη, για την πολύτιμη βοήθεια και συμβολή του στην υλοποίηση της.

Παράλληλα, να ευχαριστήσω τη κα. Ματσουκά Παναγιώτα και Σαλατάϊ Εράλντα από την Αιματολογική Κλινική του Παν/κου Νοσοκομείου Λάρισας για τα δείγματα των λευχαιμιών και των μη παθολογικών, καθώς και τον κ. Γουργουλιάνη Κων/νο και Κερενίδη Νόρα από τη Πνευμονολογική Κλινική του Παν/κου Νοσοκομείου Λάρισας για τα δείγματα των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα.

Τέλος, ευχαριστώ τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Καραγγέλη Μαρία που μας δάνεισε το διάγραμμα με τα επίπεδα mRNAs της αποαδενυλάσης PARN που επεξεργάστηκε στην εργασία της 'Μελέτη της Πολυ(Α) ριβονουκλεάσης (PARN) σε ασθενείς με λευχαιμία ' για να το χρησιμοποιήσουμε στη παρούσα εργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1 Σύνθεση mRNA
- 1.2 Ωρίμανση mRNA
 - 1.2.1 Μάτισμα (splicing)
 - 1.2.2 Κάλυμμα στο 5' άκρο (5'-cap)
 - 1.2.3 Πολυαδενυλίωση- προσθήκη Πολυ(A) ουράς
- 1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα του mRNA
 - 1.3.1 Cis-ρυθμιστικά στοιχεία
 - 1.3.2 Trans-ρυθμιστικά στοιχεία
 - 1.3.3 Ρόλος πρωτεϊνών, αυξητικών παραγόντων, ορμονών και ιόντων
- 1.4 Αποικοδόμηση mRNA
- 1.5 Αποαδενυλάσες και mRNA
- 1.6 Κατηγορίες αποαδενυλασών

2. Λευχαιμία

- 2.1 Καρκινικοί δείκτες
- 2.2 Συσχέτιση Πολυ(A) ουράς και καρκίνου
- 2.3 Ριβονουκλεάσες και καρκίνος

3. ΣΚΟΠΟΣ

4. ΥΛΙΚΑ/ΜΕΘΟΔΟΙ

- 4.1 Υλικά
 - 4.1.1 Χημικά
 - 4.1.2 Διαλύματα
- 4.2 Μέθοδοι
 - 4.2.1 Bradford Protein Assay
 - 4.2.2 Παραλαβή ορού και απομόνωση κυττάρων από δείγματα ασθενών με λευχαιμία
 - 4.2.3. Κυτταρική λύση των δειγμάτων με κύτταρα από μυελό των οστών
 - 4.2.4. TCA Precipitation Protocol (μέθοδος κατακρήμνισης πρωτεϊνών)

4.2.5. Western Blot method

4.2.6 Προκατεργασία δειγμάτων που περιέχουν κύτταρα από μυελό των οστών για επεξεργασία τους με τη μέθοδο της PCR-RT

4.2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR ή qRT-PCR)

5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Αποτελέσματα δειγμάτων με Western blot

5.2 Αποτελέσματα δειγμάτων με τη μέθοδο της qPCR-RT

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΙΚΟΝΕΣ ΚΑΙ ΠΙΝΑΚΕΣ

Εικόνα εξωφύλλου (www.phar.nagoya-cu.ac.jp/english/re_13.html)

Εικόνα 1.1: Σύνθεση και μετάφραση mRNA

(www.daviddarling.info/encyclopedia/M/mRNA.html)

Εικόνα 1.2.1: Ωρίμανση mRNA

(http://www.nature.com/ncb/journal/v11/n3/fig_tab/ncb0309228_F1.html)

Εικόνα 1.2.2 : Διεργασία του 3'-άκρου. Τμήση και Πολυαδενυλίωση, όπου φαίνονται οι διάφοροι παράγοντες που συμμετέχουν

(http://nobelprize.org/educational/medicine/dna/a/splicing/splicing_endformation.html)

Σχήμα 1.3.1 : Δομή mRNA

Εικόνα 1.3.1.1: Το ARE μεσολαβεί στην αποσύνθεση του mRNA, το εξώσωμα και η PARN κατευθύνονται στα mRNAs-στόχοι μέσω του KSRP, οδηγώντας σε 3'→5' αποσύνθεση

Εικόνα 1.4.1: Μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA (Clark et al., 2009)

Εικόνα 1.4.2: Nonsense-mediated decay (NMD)

(http://www.nature.com/nrm/journal/v5/n2/fig_tab/nrm1310_F3.html)

Εικόνα 1.4.3: Non-stop decay (NSD) (Garneau et al., 2009)

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

Εικόνα 1.6.1 : CCR4 complex (CCR4 σύμπλοκο)

(http://www.nature.com/nri/journal/v10/n1/fig_tab/nri2685_F2.html)

Εικόνα 2.1: Χρόνια λεμφολυτική λευχαιμία

Εικόνα 2.2: Οξεία λεμφολυτική λευχαιμία

Πίνακας 2 : Ταξινόμηση ριβονουκλεασών (Holzmann et al., 2008;D'Alessio et al., 1997;Gerdes et al., 1995)

Πίνακας 3 : Κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA

Σχήμα 4.2.5.1. Μεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή σε μεμβράνη PVDF

(http://www.peptide2.com/peptide/Western_blot_wikipedia_the_free.html)

Σχήμα 4.2.5.1 Western Blot μέθοδο

(<http://www.molecularstation.com/protein/western-blot/>)

Σχήμα 4.2.7.1: Συνοπτικά στάδια της μεθόδου qPCR-RT (http://www.iba-go.com/naps/naps_p_rg_real.html)

Πίνακας 3: Απαιτούμενες ποσότητες αντιδραστηρίων για PCR-RT

Πίνακας 4: Συνθήκες αντίδρασης

Πίνακας 5 : Sequences of the primers (αλληλουχίες των εκκινήτων)

Εικόνα 5.1.1 : Επίπεδα έκφρασης CNOT6 σε δείγματα μυελού των οστών από φυσιολογικά άτομα και ασθενείς με λευχαιμία

Εικόνα 5.1.2: Επίπεδα έκφρασης CNOT6L σε δείγματα μυελού των οστών από φυσιολογικά άτομα και ασθενείς με λευχαιμία

Εικόνα 5.1.3: Επίπεδα έκφρασης PARNL σε δείγματα μυελού των οστών από φυσιολογικά άτομα και ασθενείς με λευχαιμία

Εικόνα 5.1.4: Επίπεδα της CNOT6 και της CNOT6L σε δείγματα μυελού των οστών από άτομα με οξεία λευχαιμία (Α) και σε μη παθολογικά δείγματα (Φ)

Εικόνα 5.1.5: Σχετικά επίπεδα έκφρασης mRNA της PARN σε άτομα με λευχαιμία με ασθενείς στις στήλες 1,2,3,4,5,8,17 και μάρτυρες στις στήλες 6,7,18

Εικόνα 5.1.6: Σχετικά επίπεδα mRNA της PARNL σε ασθενείς με οξεία λευχαιμία (Α) και μη παθολογικά άτομα (C)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το πρόδρομο mRNA (pre-mRNA) περνάει από το στάδιο της ωρίμανσης για να πάρει την τελική του μορφή, να περάσει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και να μεταφραστεί. Κατά τη ωρίμανση, το pre-mRNA υπόκειται σε διάφορες τροποποιήσεις, μία από τις οποίες είναι η προσθήκη πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο του, η οποία αρχικά προστατεύει το mRNA από αποικοδόμηση και συμμετέχει σε διάφορες διεργασίες, όπως η έξοδος από τον πυρήνα και η μετάφραση. Φυσιολογικά, όταν ολοκληρωθεί ο κύκλος ζωής των ευκαρυωτικών κυττάρων η πολυ(A) ουρά σταδιακά μικραίνει, σηματοδοτώντας την αποικοδόμησή τους. Ο ρυθμός αποικοδόμησής της επηρεάζει άμεσα τη βιωσιμότητα των mRNAs και τη σταθερότητά τους, αφού ασταθή mRNAs μεταφράζονται σε μικρότερο βαθμό και αποσυντίθεται πολύ γρήγορα. Σε μια παθολογική κατάσταση, όπως ο καρκίνος, παρατηρείται αυξημένη έκφραση παραγόντων, όπως προϊόντα ογκογονιδίων, γεγονός που σημαίνει πως τα mRNAs επιβιώνουν περισσότερο χρόνο, ενώ αντίθετα άλλα έχουν μειωμένη έκφραση. Είναι προφανές ότι η αποικοδόμηση των mRNAs είναι κρίσιμης σημασίας για το κύτταρο. Την τελευταία διαδικασία καταλύουν οι αποαδενυάσες. Τα ένζυμα αυτά είναι εξειδικευμένες ριβονουκλεάσες και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις DEDD και EEP νουκλεάσες.

Με δεδομένο τον κεντρικό ρόλο της αποαδενυλίωσης στο χρόνο ζωής των mRNAs σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να εξετάσουμε τα επίπεδα έκφρασης ορισμένων αποαδενυλασών σε λευχαιμίες. Ειδικότερα, εξετάστηκε η έκφραση των αποαδενυλασών CNOT6, CNOT6L και PARNL και από τις δύο κατηγορίες των αποαδενυλασών σε δείγματα από άτομα με οξεία λευχαιμία, με τη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (PCR-RT). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η έκφραση αυτών των αποαδενυλασών αλλάζει στις λευχαιμίες σε σχέση με μη παθολογικά δείγματα.

ABSTRACT

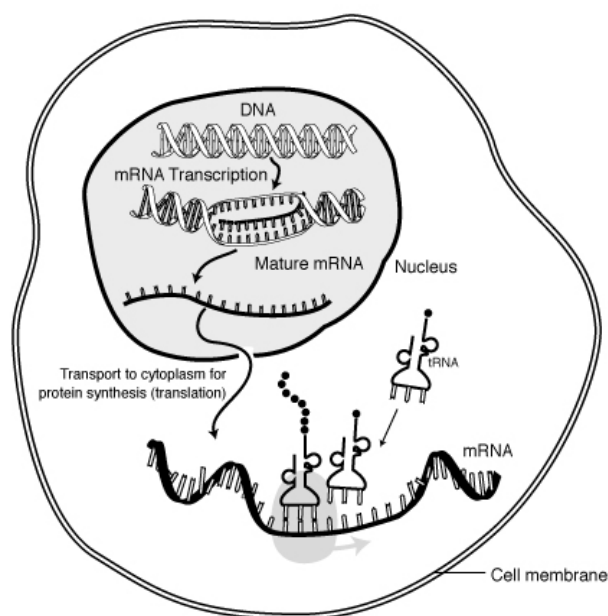
In eukaryotic cells, the precursor mRNA (pre-mRNA) has to pass from the stage of maturation to take its final form, pass from the nucleus to the cytoplasm and, then to be translated. During maturation, pre- mRNA is subjected to several modifications, one of which is the addition of poly(A) tail at its 3'-end, which initially protects the mRNA from degradation and participates in various processes such as, the exit of mRNA from the nucleus and the translation. Normally, when the life cycle of the eukaryotic cells is completed, the poly(A) tail gradually becomes shorter and gives the signal to start their degradation. The rate of degradation of the poly(A) tail, directly affects the viability and the stability of mRNAs, since unstable mRNAs are being translated to a lesser extent, while degrade quickly. In a pathological condition, such as cancer, there is increased expression of factors like products of oncogenes, which means that their mRNAs survive longer, while others display reduced expression. It is obvious that degradation of mRNAs is critical for the cell. The last process is catalyzed by the deadenylases. These enzymes are specific exoribonucleases and divided into two categories, the DEDD and EEP nucleases.

Given the central role of deadenylation, in the lifetime of the mRNAs, purpose of this study is to examine the expression levels of certain deadenylases in leucemias. We have examined the expression of deadenylases CNOT6, CNOT6L and PARNL from both categories of deadenylases in samples from patients with acute leucemia with the technique of polymerase chain reaction in real time (PCR-RT). The results showed that the expression of these deadenylases change in leucemias compared with non-pathological samples.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΣΥΝΘΕΣΗ mRNA

Το mRNA (messenger RNA), είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά πληροφοριών από το DNA στις περιοχές των ριβοσωμάτων της πρωτεϊνικής σύνθεσης στο κύτταρο. Μόλις το mRNA μεταγραφεί από DNA εξάγεται από το πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (στα ευκαρυωτικά κύτταρα υποβάλλεται σε μια πολύπλοκη διαδικασία ωρίμανσης πριν την εξαγωγή), όπου συνδέεται στα ριβοσώματα και μεταφράζεται σε πρωτεΐνη. Στην παρακάτω εικόνα, μπορούμε να δούμε σχηματικά πώς δημιουργείται το mRNA σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο και την πορεία του για να μεταφραστεί.



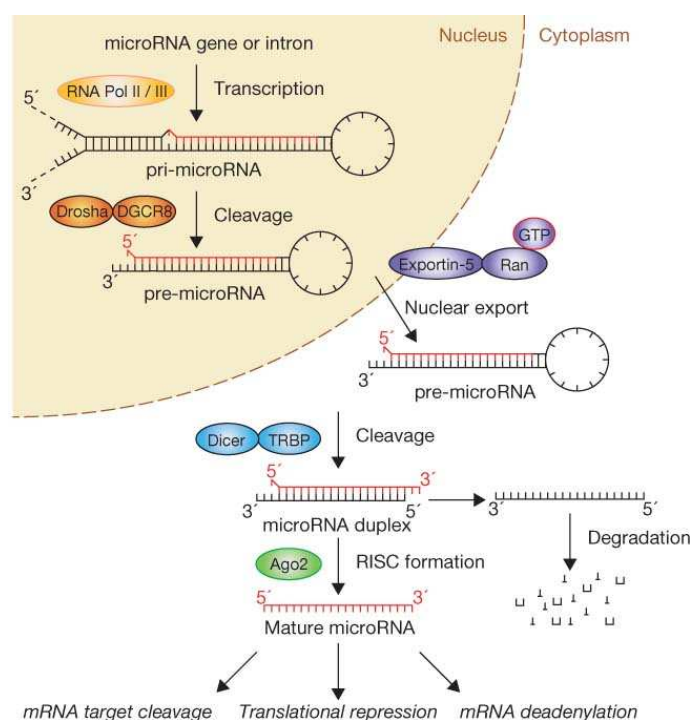
Εικόνα 1.1 : Σύνθεση και μετάφραση του mRNA
(www.daviddarling.info/encyclopedia/M/mRNA.html)

Συγκεκριμένα, το mRNA παράγεται με τη διαδικασία της μεταγραφής κατά την οποία χρησιμοποιεί ως εκμαγείο έναν από τους κλώνους του DNA που φέρει την πληροφορία για την σύνθεση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης και στη συνέχεια, ακολουθεί το στάδιο της μετάφρασης στο οποίο έχουμε τη μετατροπή της

αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του mRNA σε αλληλουχία αμινοξέων που συγκροτούν μια πρωτεΐνη. Δεν μεταφράζεται ολόκληρο το μόριο του mRNA αλλά κάθε mRNA διαθέτει μια κωδική περιοχή, τουλάχιστον, η οποία αντιστοιχεί σε μια πρωτεϊνική αλληλουχία.

1.2 ΩΡΙΜΑΝΣΗ mRNA

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



Εικόνα 1.2.1 :Ωρίμανση mRNA

(http://www.nature.com/ncb/journal/v11/n3/fig_tab/ncb0309228_F1.htm)

1.2.1 Μάτισμα (splicing)

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

1.2.2 Κάλυμμα στο 5' άκρο (5'-cap)

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

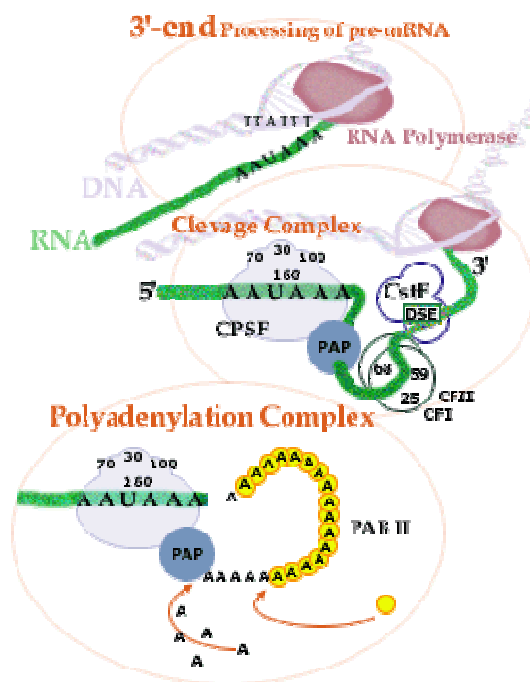
1.2.3 Πολυαδενυλίωση-προσθήκη Πολυ(A) ουράς

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

Η πολυ(Α)ουρά λειτουργεί με δύο τρόπους:

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

β) Η πολυ(Α)ουρά των περισσότερων mRNAs σταδιακά μικραίνει και τα mRNAs με μικρή πολυ(Α)ουρά, μεταφράζονται λιγότερο και υποβαθμίζονται πιο γρήγορα. Αυτή η διαδικασία της αποαδενυλίωσης εμποδίζεται από τη παρουσία αυτής της ουράς, αφού προστατεύει την γρήγορη αποικοδόμηση των mRNAs. Επίσης, ο ρυθμός αποικοδόμησης της πολυ(Α)ουράς επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό και το χρόνο ημιζωής των mRNAs (*Guhaniyogi et al., 2001*).



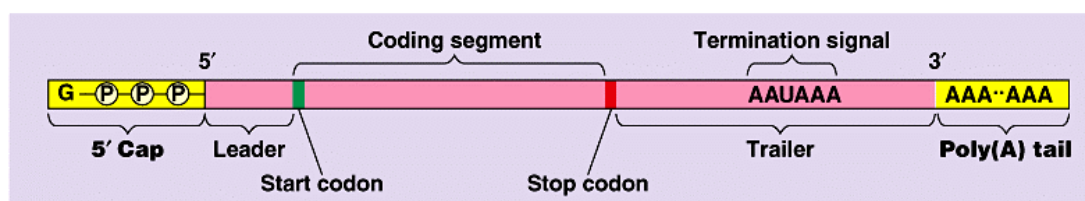
Εικόνα 1.2.2 : Διεργασία του 3'-άκρου. Τμήση και Πολυαδενυλίωση, όπου φαίνονται οι διάφοροι παράγοντες που συμμετέχουν. DSE: Downstream Element, CPSF: Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor, CstF: Cleavage stimulation Factor, CF I και CF II: Cleavage Factors I και II, PAP: poly(A) polymerase, PAB: poly(A)-binding protein.

(http://nobelprize.org/educational/medicine/dna/a/splicing/splicing_endformation.html)

1.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ mRNA

Η σταθερότητα του mRNA συμβάλλει κατά πολύ στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση των κύτταρων, αλλά και στην ανταπόκρισή τους στο περιβάλλον. Ακόμη και ο τρόπος που εκφράζονται τα γονίδια στους διάφορους οργανισμούς, εξαρτάται από αυτή τη παράμετρο. Βέβαια, θα πρέπει να αναφέρουμε και το γεγονός ότι τα mRNAs εμπεριέχουν δύο ή και παραπάνω παράγοντες σταθερότητας, όπου ο κάθε ένας από αυτούς οδηγεί σε ξεχωριστό μονοπάτι αποικοδόμησης.

Έχει παρατηρηθεί ότι πολλές διεργασίες επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη σταθερότητα του mRNA με διάφορους τρόπους. Μία από αυτές είναι και η χαρακτηριστική του δομή, όπου διαθέτει στοιχεία σταθερότητας το 5' κάλυμμα και την πολυ(Α)ουρά στο 3' άκρο του mRNA που αυξάνει την περίοδο ημιζωής του μορίου (*Nelson et al., 2008; Proudfoot et al., 2002*). Αυτό φαίνεται και από το σχήμα που δίνεται στη συνέχεια.



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Σχήμα 1.3.1: Δομή mRNA

Μία άλλη παράμετρος αναφέρεται στην μετάφραση του mRNA, όπου η πλειονότητα των mRNAs φαίνεται να παρουσιάζονται πιο σταθερά όταν τα κύτταρα βρίσκονται εκτεθειμένα σε παράγοντες που δρουν ανασταλτικά στο συγκεκριμένο στάδιο. Επίσης, δομικές αλλαγές στο μόριο πιθανόν να επηρεάσουν την εξέλιξη της μετάφρασης μεγαλώνοντας ή μικραίνοντας το χρόνο ζωής των mRNAs, όπως για παράδειγμα μία αλλαγή στην αλληλουχία της περιοχής 5' UTR.

Βασικό ρόλο κατέχουν και τα cis και trans ρυθμιστικά στοιχεία του RNA (*Ross et al., 1995*). Cis-στοιχείο, είναι μία περιοχή του DNA ή RNA που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που βρίσκονται στο ίδιο μόριο του DNA. Είναι συχνά θέσεις δέσμευσης για ένα ή περισσότερους trans-ενεργούς παράγοντες. Ένα cis-στοιχείο μπορεί εντοπιστεί στο άκρο 5' με τη κωδική αλληλουχία του γονιδίου που ελέγχει (π.χ. στην περιοχή του υποκινητή) σε ένα ιντρόνιο ή στο άκρο 3' με κωδική αλληλουχία του γονιδίου είτε στην αμετάφραστη περιοχή είτε στη μη μεταγραφημένη.

Αντιθέτως, τα trans-στοιχεία είναι διάχυτοι παράγοντες, συνήθως πρωτεΐνες, που μπορούν να τροποποιήσουν την έκφραση των γονιδίων μακριά από το γονίδιο που αρχικά μεταγράφηκε για να τους δημιουργήσει. Για παράδειγμα, ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει ένα γονίδιο στο χρωμόσωμα 6 είναι πιθανόν να έχει μεταγραφεί από ένα γονίδιο του χρωμοσώματος 11.

1.3.1 Cis- ρυθμιστικά στοιχεία

Σε αυτά ανήκουν τα εξής:

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

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

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

Αμετάφραστες περιοχές (untranslated regions,UTRs), είναι τμήματα του mRNA που δεν μεταφράζονται και εντοπίζονται πριν από το κωδικόνιο έναρξης και μετά το κωδικόνιο τερματισμού. Μεταγράφονται μαζί με τη κωδική περιοχή και είναι εξώνια, αφού υπάρχουν και στο ώριμο RNA. Διάφοροι ρόλοι τους έχουν αποδοθεί συμπεριλαμβανομένων τη σταθερότητα του mRNA και την αποδοτικότητα της μετάφρασης. Η σταθερότητα των mRNAs μπορεί να ελέγχεται από αυτές τις περιοχές αυτές εξαιτίας της διαφορετικής συγγένειας των ριβονουκλεασών προς το RNA και κάποιων πρωτεϊνών που προωθούν ή αναστέλλουν την αποσύνθεση του RNA (*Abaza et al., 2008*). Η αποτελεσματικότητα της μετάφρασης, συμπεριλαμβάνοντας και την πλήρη αναστολή της, επηρεάζεται από τις UTRs. Επιπλέον, πρόσδεση πρωτεϊνών σε 3' ή 5'UTR, μπορεί να επηρεάσει τη μετάφραση με το να επιδρά στην ικανότητα του ριβοσώματος να προσδένεται στο mRNA. Ακόμη, microRNAs δεσμευμένα στην 3'UTR είναι πιθανόν να προκαλέσουν διαφοροποιήσεις (*Ramsingh et al., 2010*)

Συγκεκριμένα, στη περιοχή 3'UTR περιλαμβάνονται τα εξής ρυθμιστικά στοιχεία:

I. Στοιχεία απόκρισης σε σίδηρο{Iron- responsive elements (IREs)}

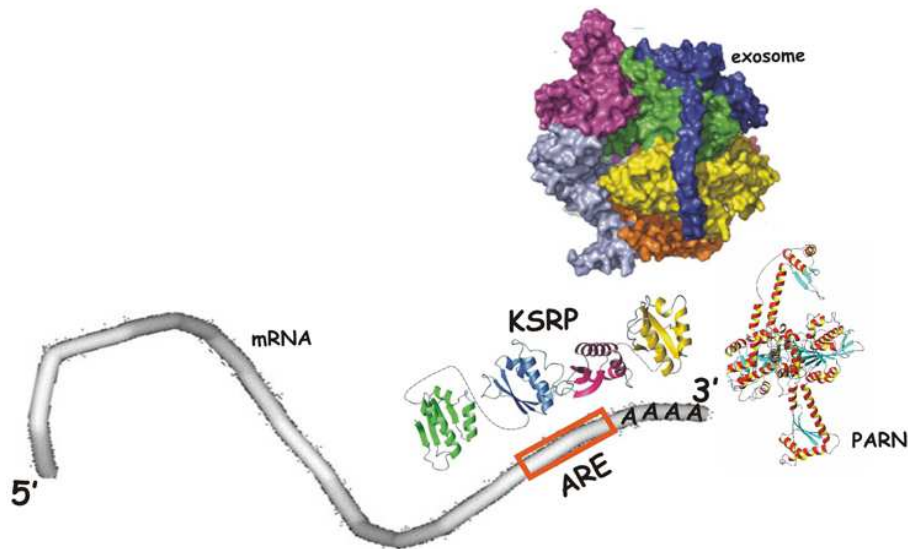
Τα IREs βρίσκονται στις αμετάφραστες περιοχές πολλών mRNAs, των οποίων τα προϊόντα εμπλέκονται στο μεταβολισμό του σιδήρου. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι τα mRNAs της φερριτίνης (πρωτεΐνη αποθήκευσης σιδήρου) και του υποδοχέα της τρανσφερίνης. Η σύνδεση πολλαπλών IREs στο 3'UTR του υποδοχέα της τρανσφερίνης (μεταφορά σιδήρου μέσα στα κύτταρα), οδηγεί σε αυξημένη σταθερότητα του mRNA. Έχει βρεθεί ότι υπάρχουν πέντε IREs από τα οποία τα τρία είναι υπεύθυνα για τις διάφορες αλλαγές. Αντιστοίχως, στο mRNA της φερριτίνης υπάρχει ένα IRE στην 5'UTR. Όταν η συγκέντρωση του σιδήρου είναι χαμηλή, IRPs (iron responsive proteins), δεσμεύουν το IRE του mRNA της φερριτίνης, με αποτέλεσμα τη καταστολή της μετάφρασης. Αυτές οι δραστηριότητες αποτελούν τη βάση της ομοιόστασης του σιδήρου (*Hentze and Kühn, 1996*).

II. Παράγοντας αύξησης II που μοιάζει με την ινσουλίνη (IGFII)

Είναι πολυπεπίδια με υψηλή συγγένεια των αλληλουχιών τους με αυτές της ινσουλίνης. Είναι μέρος ενός πολύπλοκου συστήματος, που διαθέτουν τα κύτταρα για να επικοινωνήσουν με το φυσικό τους περιβάλλον. Αυτό το σύστημα αποτελείται από τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας IGF1R and IGF2R, τα προσδέματα (ligands) IGF-1 και IGF-2, την οικογένεια πρωτεϊνών IGFBP 1-6.. Η IGF-2, θεωρείται ότι είναι ένας πρωταρχικός αυξητικός παράγοντας που χρειάζεται στην πρόωμη ανάπτυξη. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν και τροποποιούν τη δραστηριότητα τους συμμετέχοντας σε σύμπλοκα που ενισχύουν ή αποτρέπουν την έκφρασή τους (*Cohen et al., 1991*). Εκφράζεται πρωτίστως σε εμβρυικά κύτταρα αλλά ανιχνεύεται και σε ορούς από ενήλικες.

III. Αλληλουχίες AU (ARES)

Έχει βρεθεί ότι mRNAs που διαθέτουν στοιχεία με πολλές τέτοιες αλληλουχίες, εμφανίζονται αρκετά ασταθή. Πειράματα εισαγωγής στοιχείων ARES σε φυσιολογικά mRNAs έδειξαν μεγάλη μείωση του χρόνου ημιζωής του καινούργιου mRNA εξαιτίας της γρήγορης αποικοδόμησης αυτών των αλληλουχιών. Φυσικά, κάθε τέτοιο στοιχείο επηρεάζει διαφορετικά το mRNA (*Barreau et al., 2006; Shaw et al., 1986*).



Εικόνα 1.3.1.1: Το ARE μεσολαβεί στην αποσύνθεση του mRNA, το εξώσωμα και η PARN κατευθύνονται στα mRNAs-στόχοι μέσω του KSRP, οδηγώντας σε 3'→5' αποσύνθεση.

IV. Το mRNA των ιστονών

Οι ιστόνες, είναι πολύ σημαντικές για την κυτταρική διαίρεση, καθώς συμπλέκονται με DNA για να σχηματίσουν χρωματίνη. Ο σχηματισμός της χρωματίνης πραγματοποιείται στην φάση S. Από τα mRNA των ιστονών υπολείπεται η πολυ(Α)ουρά και η 3'UTR τους φαίνεται ότι μεταβάλλει την φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία του mRNA. Έχουν παρατηρηθεί τα εξής: το mRNA στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου είναι σε αρκετά χαμηλά επίπεδα ενώ στη φάση S αυξάνονται κατά πολύ. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης ο χρόνος ημίσειας ζωής του mRNA εκτιμάται ότι είναι 40min ενώ στο τέλος μειώνεται στα 10min με απομάκρυνση του mRNA από το κύτταρο. Θεωρείται ότι τα σήματα που είναι υπεύθυνα για την αποσταθεροποίηση του mRNA εμπεριέχονται στα 30 νουκλεοτίδια σε δομή στελέχους-βρόγχου και στις γειτονικές αλληλουχίες (*Ross et al., 1995*).

Η 5'αμετάφραστη περιοχή, αποτελείται από περίπου 170 νουκλεοτίδια (πιο μικρή από τη 3'UTR) και επηρεάζει το χρόνο ημίσειας ζωής του mRNA με τη

εισαγωγή μιας δομής βρόγχου-θηλιάς σε αυτή τη περιοχή (*Pickening and Willis, 2005*).

1.3.2 Trans-ρυθμιστικά στοιχεία

Σε αυτά συγκαταλέγονται ορισμένες συνδεδεμένες πρωτεΐνες που μπορεί να σταθεροποιούν ή το αντίθετο το mRNA, ορισμένοι παράγοντες με κρίσιμο ρυθμιστικό ρόλο αλλά και συνδυασμένη δράση διαφόρων παραγόντων (*Ross et al., 1995*).

1.3.3 Ρόλος πρωτεϊνών, αυξητικών παραγόντων, ορμονών και ιόντων

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

Όσον αφορά τον ρόλο των πρωτεϊνών, είναι πιο ξεκάθαρος. Μπορούμε να διακρίνουμε τις εξής περιπτώσεις:

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

Είναι μια ομάδα πρωτεϊνών, που μπορούν και προσδένονται σε mRNAs που περιέχουν αλληλουχίες πλούσιες σε AU ή πλούσιες σε U εξαιτίας πολύ μεγάλης συγγένειας με τα mRNAs. Τις πρωτεΐνες αυτές μπορούμε να τις εντοπίσουμε στο κυτταρόπλασμα, μέσα στο πυρήνα ή ανάμεσα σε αυτά τα διαμερίσματα.

Σταθεροποιούν ή το αντίθετο το mRNA μέσω της αλληλεπίδρασης τους με αλληλουχίες ARES. Αυτές οι αλληλουχίες εμπεριέχονται στην 3'UTR κάποιων ασταθών mRNAs που κωδικοποιούν παράγοντες μεταγραφής.

- Ρυθμιστική πρωτεΐνη σιδήρου (IRP)

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

- Πρωτεΐνες και Πολυ(A)ουρά

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

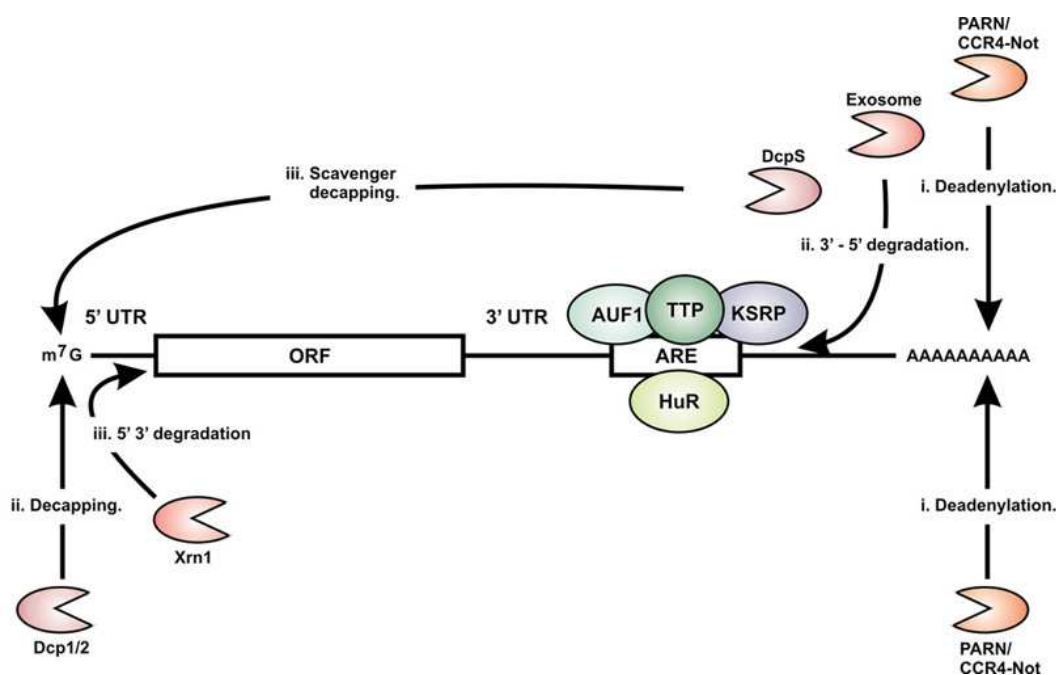
1.4 ΑΠΟΙΚΟΛΟΜΗΣΗ mRNA

Μέσα στο ίδιο κύτταρο, διαφορετικά mRNAs έχουν διαφορετικούς χρόνους ημίσειας ζωής, άρα και διαφορετική σταθερότητα. Στα βακτηριακά κύτταρα, διαφορετικά mRNAs μπορούν επιζήσουν από κάποια δευτερόλεπτα έως περισσότερο από μία ώρα, ενώ στα κύτταρα θηλαστικών, ο χρόνος διάρκειας ζωής των mRNAs ποικίλλει από αρκετά λεπτά μέχρι και μέρες. Όσο μεγαλύτερη είναι η σταθερότητα

ενός mRNA, τόσο περισσότερη ποσότητα πρωτεΐνης θα μπορεί να παράγει. Η περιορισμένη διάρκεια ζωής του mRNA καθιστά ικανό ένα κύτταρο να αλλάζει τις συνθήκες της πρωτεϊνικής σύνθεσης γρήγορα, έτσι ώστε να μπορέσει να ανταποκριθεί στις διάφορες ανάγκες του. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι ιδιαίτερα κρίσιμες σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος, όπου mRNAs που δεν θα έπρεπε να εκφράζονται ή να εκφράζονται για λίγο χρόνο, έχουν αυξημένη επιβίωση και ως εκ τούτου παράγουν μεγάλες ποσότητες των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν.

Η αποαδενυλίωση, είναι το πρώτο στάδιο της αποικοδόμησης του mRNA κατά το οποίο έχουμε βράχυνση της πολυ(A)ουράς από μια κατηγορία ενζύμων, τις αποαδενυλάσες (*Tucker et al., 2000; Mitchell et al., 2001*). Μόνο όταν έχει αποικοδομηθεί σε ένα συγκεκριμένο μήκος, όπου απομένουν περίπου 60-70 κατάλοιπα αδενοσίνης (από τα περίπου 300 του ολικού μήκους) αρχίζει η ολική αποικοδόμηση. Στη συνέχεια, ένα ειδικό ένζυμο αποτελούμενο από δύο υπομονάδες (Dcp1p και Dcp2p), αφαιρεί το 5' cap, εκθέτοντας το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την Xrn1p, μια 5'→3' εξωνουκλεάση. Μετά την αποαδενυλίωση, το mRNA είναι δυνατόν αποικοδομηθεί μέσω ενός δεύτερου μονοπατιού, το οποίο έχει κατεύθυνση 3'→5' και πραγματοποιείται από ένα σύμπλοκο 3'→5' εξωνουκλεασών, το λεγόμενο κυτταροπλασματικό εξώσωμα (*Garneau et al., 2004; Anderson et al., 1998; Chen et al., 2001; Wang and Kiledjian, 2001; Mukherjee et al., 2002*). Σε αυτή την περίπτωση, το ολιγονουκλεοτίδιο-καλύπτρα που προκύπτει υδρολύεται από το DcpS (*Liu et al., 2002*). Επιπλέον, κάποια mRNAs αποικοδομούνται μετά από κάποια ενδονουκλεοτιδική διάσπαση από ειδικές ενδονουκλεάσες ή εξαιτίας των miRNAs (microRNA) και siRNAs (small interference RNA) (*Dodson et al., 2002*). Επίσης, τα ευκαρυωτικά κύτταρα κατέχουν εξειδικευμένα μονοπάτια αποικοδόμησης που έχουν την ικανότητα να εντοπίζουν και να αποικοδομούν ταχύτατα ανώμαλα mRNAs τα ίδια ένζυμα που αποικοδομούν τα φυσιολογικά mRNAs. Ενεργά μηνύματα που μεταφράζονται είναι συνδεδεμένα σε ριβοσώματα, τους παράγοντες εκκίνησης eIF-4E και eIF-4G και την πρωτεΐνη PABP. Οι παράγοντες εκκίνησης, μπλοκάρουν το ένζυμο DCP2 που είναι υπεύθυνο για την αφαίρεση του 5' cap, ενώ η PABP εμποδίζει το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, προστατεύοντας το άκρο του μηνύματος. Η ισορροπία ανάμεσα στην μετάφραση και στην αποικοδόμηση αντικατοπτρίζεται στο μέγεθος και στην αφθονία των κυτταροπλασματικών δομών, γνωστά ως P-bodies (*Parker et al., 2007*). Η πολυ(A) ουρά μικραίνει με τη δράση ειδικών εξωνουκλεασών, διαταράσσοντας έτσι το μήνυμα με συνέπεια να υποβάλλεται σε

αποσύνθεση. Με αυτό τον τρόπο, ανενεργά μηνύματα καταστρέφονται πολύ γρήγορα σε αντίθεση με τα ενεργά, που παραμένουν άθικτα (mRNA turnover). Ο μηχανισμός παύσης της μεταγραφής και αποικοδόμησης του μηνύματος ακόμη δεν είναι ξεκάθαρος. Στη παρακάτω εικόνα, παρατηρούμε τα διάφορα μονοπάτια αποικοδόμησης.



Εικόνα 1.4.1: Μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA (Clark et al., 2009)

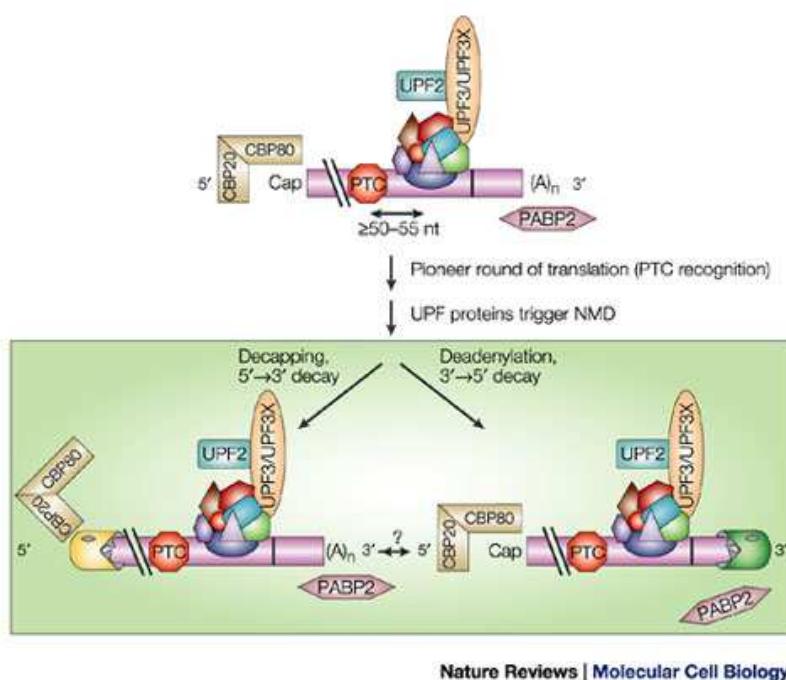
Πολλές φορές, η ωρίμανση των mRNAs δεν γίνεται με επιτυχία με αποτέλεσμα το κύτταρο να έχει αναπτύξει μηχανισμούς απομάκρυνσης των λανθασμένων μεταγράφων για να προστατευτεί από τυχόν τοξικά παράγωγα.

Γνωρίζουμε τρία τέτοια μονοπάτια αποικοδόμησης:

a) Nonsense-mediated decay (NMD):

Είναι ένας κυτταρικός μηχανισμός ελέγχου του mRNA που εντοπίζει διάφορες μεταλλάξεις και εμποδίζει την έκφρασή τους σε ελαττωματικές πρωτεΐνες. Ειδικότερα, εντοπίζονται και καταστρέφονται mRNAs με πρώιμα κωδικόνια τερματισμού, η μετάφραση των οποίων θα οδηγούσε σε σοβαρές μεταλλάξεις. Η αποικοδόμηση πραγματοποιείται είτε με αφαίρεση του 5' cap μέσω μιας διαδικασίας

ανεξάρτητης της αποαδενυλίωσης είτε από επιτάχυνση της αποαδενυλίωσης και της 3'→5' αποικοδόμησης από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα (*Muhldard and Parker et al., 1994; Gao and Parker et al., 2003; Mitchell et al., 2003; Takahashi et al., 2003*). Με αυτό τον τρόπο, ελέγχεται και η φυσιολογική γονιδιακή έκφραση. Είναι το πιο καλά μελετημένο μονοπάτι αποικοδόμησης. Η διαδικασία περιγράφεται και στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 1.4.2: Nonsense-mediated decay (NMD)

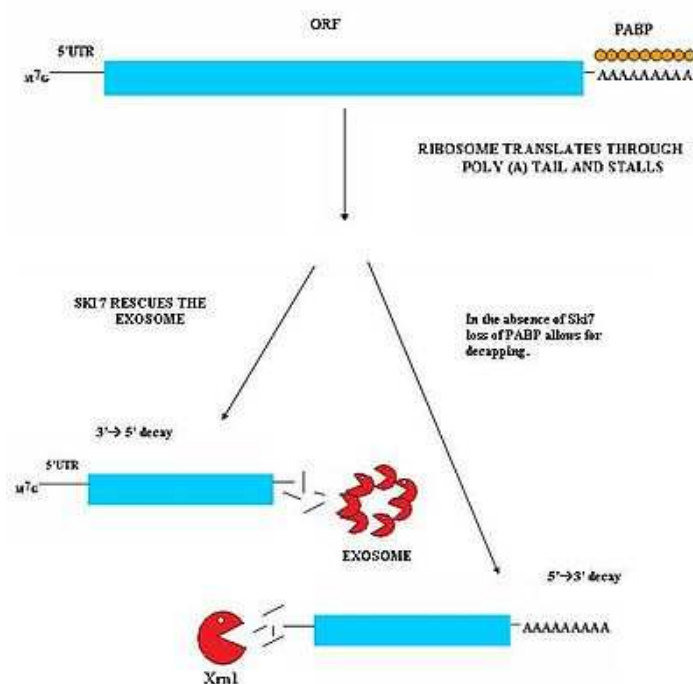
(http://www.nature.com/nrm/journal/v5/n2/fig_tab/nrm1310_F3.html)

b) No-go decay (NGD):

Σε αυτή τη περίπτωση, έχουμε ακινητοποίηση του ριβοσώματος στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης εξαιτίας μιας δευτεροταγούς δομής μη φυσιολογικού mRNA με συνέπεια να λαμβάνει χώρα αποικοδόμηση του mRNA από ενδονουκλεάσες και αποδέσμευση του ριβοσώματος. Αυτό το μονοπάτι, ανακαλύφθηκε στη ζύμη και δεν έχει μελετηθεί πλήρως, ακόμη (*Doma, 2008*).

c) Non-stop decay (NSD):

Αποτελεί ένα διαφορετικό μηχανισμό που έχει αναπτύξει το κύτταρο για να εντοπίζει mRNAs τα οποία δεν φέρουν κωδικόνιο λήξης και τα εμποδίζει να μεταφραστούν. Η αποικοδόμηση, πραγματοποιείται από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα με κατεύθυνση $3' \rightarrow 5'$ (Frischmeyer et al., 2002; Van Hoof et al., 2002), όπως μπορούμε να δούμε και στο ακόλουθο σχήμα :



Εικόνα 1.4.3: Non-stop decay (NSD) (Garneau et al., 2009)

1.5 ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΕΣ ΚΑΙ mRNA

Αποαδενυλάσες, ονομάζονται οι εξωριβονουκλεάσες που υδρολύουν το mRNA με κατεύθυνση $3' \rightarrow 5'$, χρησιμοποιώντας ως κύριο υπόστρωμα τις πολυ(Α)ουρές με αποτέλεσμα την απελευθέρωση $5'$ -AMP. Η δράση τους εξαρτάται από δισθενή ιόντα, κυρίως Mg^{+2} . Ταξινομούνται σε δύο μεγάλες οικογένειες, τις DEDD (από τα αμινοξέα που αποτελούν το καταλυτικό τους κέντρο) και EEP(exonuclease-endonuclease-phosphatase) νουκλεάσες. Η DEDD οικογένεια, έχει

κοινό χαρακτηριστικό τα καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu τα οποία βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ τριών μοτίβων εξωνουκλεάσης και συντονίζονται από τα ιόντα Mg^{+2} . Παραδείγματα τέτοιων νουκλεασών είναι: η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), η POP2 (ή CAF1), η CAFZ και η PAN2. Η EEP οικογένεια, αποτελείται από αποαδενυλάσες που περιλαμβάνουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στις δομικές περιοχές των νουκλεασών. Σε αυτή την κατηγορία, ανήκουν οι αποαδενυλάσες Angel, Nocturnin, CCR4 και η ομάδα των 2'-φωσφοδιεστερασών. Αυτό το διαχωρισμό μπορούμε να τον συνοψίσουμε στον επόμενο πίνακα.

Πίνακας 1: Ταξινόμηση αποαδενυλασών (Goldstrohm and Wickens, 2008)

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

Κατά τη διάρκεια ζωής ενός mRNA, η πολυ(A)ουρά του συνεχώς αλλάζει μήκος εξαιτίας πολλών διεργασιών. Στον πυρήνα, έχουμε την προσθήκη πολυ(A)ουράς κατά τη διαδικασία σχηματισμού των mRNAs, ενώ κατά την έξοδο του στο κυτταρόπλασμα, η πρωτεΐνη PABP συνδέεται στην ουρά σταθεροποιώντας το mRNA. Συγκεκριμένα, η PABP συνδέεται στον παράγοντα eIF4G και στη συνέχεια, προσδένεται στην πρωτεΐνη eIF4E. Αυτό το σύμπλοκο, λοιπόν ενισχύει την μετάφραση του mRNA. Ο ρόλος της πολυ(A)ουράς είναι πολύ σημαντικός για το

mRNA καθώς προωθεί την μετάφραση του mRNA αλλά και εμποδίζει την αποικοδόμηση του. Σε αρκετές περιπτώσεις, οι παραπάνω διαδικασίες συνδέονται με αλλαγές που συμβαίνουν στην πολυ(Α)ουρά των mRNAs όπως είναι η μείωση του μήκους της από διάφορους καταστολείς ή η επιμήκυνση της από ενεργοποιητές. Τα ένζυμα που εμπλέκονται στην αποαδενυλίωση, τα οποία μειώνουν το μήκος της ουράς θεωρείται ότι παίζουν κρίσιμο ρόλο στη καταστολή της μετάφρασης. Γι' αυτό το λόγο η ρύθμιση της δράσης των αποαδενυλασών είναι απαραίτητη, αφού ανεξέλεγκτη αποαδενυλίωση θα είχε ως αποτέλεσμα την καταστροφή του κυττάρου. Τα φυσιολογικά mRNAs θα πρέπει να προστατεύονται από τη αποαδενυλίωση με τη παρουσία της πολυ(Α)ουράς σε αντίθεση με τα ελαττωματικά mRNAs που είναι απαραίτητο να αποαδενυλιωθούν και στη συνέχεια, να αποικοδομηθούν.

Ο ρυθμός αποαδενυλίωσης δεν είναι ίδιος για όλα τα mRNAs. Είναι μια διαδικασία ελεγχόμενη από παράγοντες-ρυθμιστές, που συνδέονται με συγκεκριμένες αλληλουχίες των mRNAs. Επίσης, η αμετάφραστη περιοχή 3' ευνοεί την αποαδενυλίωση, καθώς πολλά ρυθμιστικά στοιχεία περιλαμβάνονται σε αυτή. Τα στοιχεία αυτά, συμπλοκοποιούνται με διάφορους παράγοντες που με τη σειρά τους ενεργοποιούν συγκεκριμένες αποαδενυλάσες ενισχύοντας τη διαδικασία. Τέτοιου είδους παράγοντες είναι: microRNAs (miRNAs), CPEB και CUG-PB (*Goldstrohm and Wickens et al., 2008; Kadyrova et al., 2007; Hook et al., 2007*). Ακόμη, η δραστηριότητα των αποαδενυλασών, αυξάνεται με τη παρουσία του 5'cap με χαρακτηριστικό παράδειγμα την PARN, αφού δεν φαίνεται να επιδρά στις υπόλοιπες αποαδενυλάσες. Ένας άλλος ενισχυτικός παράγοντας της αποαδενυλίωσης θεωρείται η πρωτεΐνη PABP, η οποία φαίνεται να αλληλεπιδρά με διάφορες αποαδενυλάσες.

Οι αποαδενυλάσες, συνηθίζουν να σχηματίζουν σύμπλοκα και χαρακτηρίζονται από τη ύπαρξη πολλών υπομονάδων, ενώ οι άλλες πρωτεΐνες των συμπλόκων (π.χ NOT, PUF proteins) επηρεάζουν τη δράση τους. Αυτό το μοτίβο, ακολουθεί η PAN2 η οποία προσδένεται στην PAN3 και στη συνέχεια με την PABP. Η τελευταία ενεργοποιεί το σύμπλοκο PAN2-PAN3 στην πολυ(Α)ουρά των mRNAs (*Hammet et al., 2002*). Επιπλέον, κάποιες αποαδενυλάσες σχηματίζουν ομοδιμερή και κάποιες ετεροδιμερή. Στη περίπτωση του ετεροδιμερισμού, ενισχύεται ο σχηματισμός συμπλόκων των αποαδενυλασών, αφού οι ιδιότητες των διαφορετικών ετεροδιμερών, ρυθμιστικές και ενζυμικές διαφέρουν σημαντικά. Τα ένζυμα αυτά, επιτελούν διάφορες σημαντικές βιολογικές λειτουργίες. Συγκεκριμένες αποαδενυλάσες ενεργοποιούνται από διάφορους ρυθμιστές όπως είναι: οι KSRP,

CPEB, miRNAs, Smaug και τα σύμπλοκά τους είτε δρούν ανασταλτικά για τη διαδικασία της μετάφρασης, είτε καταστροφικά για το mRNA.

Στη συγκεκριμένη εργασία, ασχοληθήκαμε με αρκετές αποαδενυλάσες που θα εξετάσουμε στη συνέχεια.

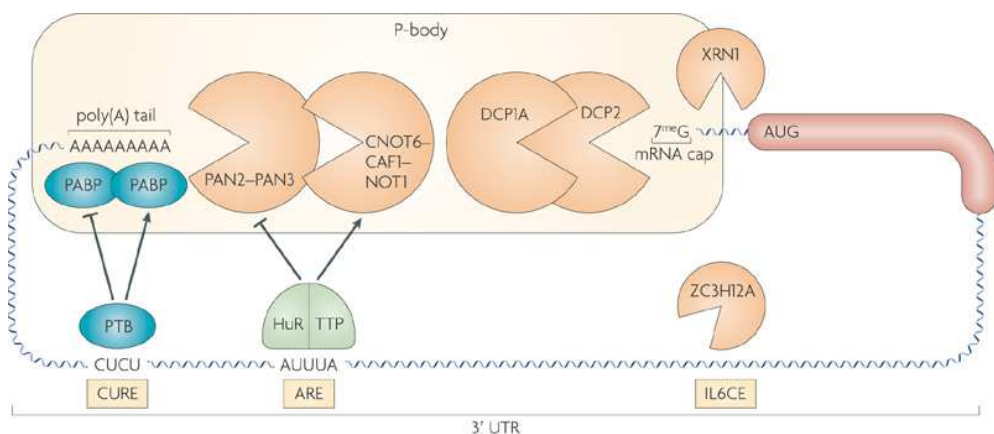
1.6 Κατηγορίες αποαδενυλασών

I) CCR4-complex, CNOT6 και CNOT6-like (CNOT6L):

Η κύρια αποαδενυλάση στη ζύμη, θεωρείται το σύμπλοκο CCR4-NOT, το οποίο είναι εξελικτικά συντηρημένο στα θηλαστικά και στη *Drosophila*. Πειράματα που απέδειξαν ότι αυτό το σύμπλοκο λειτουργεί ως πιθανός ρυθμιστής της μεταγραφής είναι πολύ πρόσφατα. Αποτελείται από πρωτεϊνικές υπομονάδες, οι οποίες εμπλέκονται, επίσης στην αποικοδόμηση του mRNA, στον εντοπισμό των μεταλλαγμένων mRNAs αλλά και στη μεταγωγή σήματος (**Goldstrohm and Wickens, 2008**). Το σύμπλοκο έχει ακολουθία παρόμοια με την ακολουθία μιας οικογένειας Mg^{+2} -εξαρτώμενων νουκλεασών που σχετίζεται με την εξωνουκλεάση III της *E.coli*. Απουσία αυτού του συμπλόκου, προκαλεί μείωση του ρυθμού της αποαδενυλίωσης και προσδίδει σταθερότητα στα mRNAs. Ακόμη, το Ccr4p στις ζύμες καθώς και το ομόλογο του στα θηλαστικά ενεργούν ως πολυ(A)-εξειδικευμένη εξωριβονουκλεάση *in vitro* όταν απουσιάζουν οι άλλες υπομονάδες του συμπλόκου, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν διάφοροι τύποι CCR4-NOT συμπλόκων που καταλύουν την αποαδενυλίωση (**Meyer et al., 2004**).

Έχει βρεθεί ότι ο πυρήνας του CCR4-NOT complex στον άνθρωπο αποτελείται από επτά υπομονάδες και συγκεκριμένα από τις πρωτεΐνες CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT9, CNOT10, TAB182, η οποία μεταβάλλει ανάλογα το μήκος των τελομερών και τη μιτωτική άτρακτο και την C20Rf29, της οποίας η λειτουργία ακόμη δεν έχει διερευνηθεί. Μέσα σε αυτό το πυρήνα, βρίσκονται συνδεδεμένες και οι CNOT6, CNOT6L που λειτουργούν ως μεταβλητές υπομονάδες. Στα ανθρώπινα

κύτταρα, αυτές οι αποαδενυλάσεις υπάρχουν σε μικρότερο ποσοστό σε σχέση με τις υπόλοιπες CNOT πρωτεΐνες (*Lau et al., 2009*). Στην παρακάτω εικόνα βλέπουμε πώς λειτουργεί αυτό το σύμπλοκο :



Nature Reviews | Immunology

Εικόνα 1.6.1 : CCR4 complex (CCR4 σύμπλοκο)
(http://www.nature.com/nri/journal/v10/n1/fig_tab/nri2685_F2.html)

Συγκεκριμένα, η αποαδενυλάση CNOT6L/CCR4b, εντοπίζεται στον άνθρωπο, ομόλογο προς το σύμπλοκο CCR4 εξαιτίας της ύπαρξης επαναλαμβανόμενων περιοχών 3 LRR (πλούσιες σε λευκίνη) και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4 στη θέση q21.1. Το σύμπλοκο στο οποίο συμμετέχει, περιλαμβάνει τουλάχιστον τις CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT8, CNOT9, CNOT10 και TNKS1BP1. Μια πρώτη δομή της αποαδενυλάσης CNOT6L, περιλαμβάνει την αναδίπλωση της σε μία δομή α/β sandwich τυπική των υδρολασών παρόμοια του APE1 (απουρινική/απυριμιδινική ενδονουκλεάση). Το ενεργό κέντρο της CNOT6L, φαίνεται ότι αναγνωρίζει το RNA υπόστρωμα μέσω της αρνητικά φορτισμένης επιφάνειας της. Η περιοχή του πυρήνα της CNOT6L παρουσιάζει Mg^{+2} – εξαρτώμενη αποαδενυλωτική δραστηριότητα αναγνωρίζοντας ως υπόστρωμα αυστηρά μόνο poly(A)RNA (*Wang et al., 2010*).

Οι αλληλεπιδράσεις της CNOT6L με τις υπόλοιπες του συμπλέγματος CCR4 είναι ποικίλες.. Αλληλεπιδρά με περιοχές πλούσιες σε λευκίνη, οι οποίες περιέχονται στη ζύμη CAF1 (Pop2) ή στην αποαδενυλάση CNOT7, καθώς εμφανίζουν δραστηριότητες RNA νουκλεάσης που αποδίδονται σε περιοχές DEDD (*Daugeron et al.2001; Dupressoir et al.,2001; Clark et al.,2004;Viswanathan et al., 2004;Bianchin et al., 2005*). Επιπλέον, η δραστηριότητα της επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω της ρύθμισης των επιπέδων του mRNA του κυτταρικού κύκλου του αναστολέα p27^{kip1} σε αντίθεση με την CNOT6, η οποία φαίνεται να μην επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (*Morita et al., 2009*).

Η αποαδενυλάση CNOT6/CCR4a, εντοπίζεται και αυτή στα ανθρώπινα κύτταρα, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5 στη θέση q35.3 και συμμετέχει σε σύμπλοκα που περιλαμβάνουν τις: CHAF1A, CHAF1B, CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT4 και CNOT8. Παρομοίως με τη CNOT6L, αλληλεπιδρά με τη CNOT7 σχηματίζοντας σταθερά σύμπλοκα. Σε έρευνες που έγιναν διαπιστώθηκε ότι η CNOT6 έχει διαφορετική λειτουργικότητα από τη CNOT6L, καθώς απουσίαζε η τελευταία σε σύμπλοκα της CNOT6 και δεν επηρεάζει το κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ακόμη, πιθανολογείται η ενίσχυση της μεταγραφής διαμέσου διαφόρων πυρηνικών υποδοχέων, συμπεριλαμβάνοντας τις ER και RAR (*Prevot et al., 2001*), η οποία μπορεί να διαμεσολαβείται μέσω αλληλεπιδράσεων με το πυρηνικό συνενεργοποιητή υποδοχέα NIF1(*Garapaty et al., 2008*). Ένα ακόμη στοιχείο ότι δεν εμπλέκεται άμεσα στην εξαγωγή του πυρηνικού mRNA είναι και το γεγονός ότι η CNOT6 ότι εντοπίστηκε στην περιοχή ανάμεσα στο πυρήνα και το κυτταρόπλασμα.

II. PARN-PARNL

Η αποαδενυλάση poly(A)-specific ribonuclease (PARN), ανήκει στην οικογένεια DEDD και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16 και στη θέση 16p13 και αποτελείται από 639 αμινοξέα. Η δομή της ανθρώπινης PARN προσδιορίστηκε σε ένα τμήμα της και έχει κομμένο το C-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-430), περιλαμβάνει τη περιοχή της νουκλεάσης και την πρώτη περιοχή πρόσδεσης RNA, ενώ λείπει η δεύτερη περιοχή πρόσδεσης RNA [όπου προσδένεται το 5' κάλυμμα, αλλά αναγνωρίζει και το πολυ(A)]. Η κολοβωμένη αυτή μορφή είναι λειτουργική,

παρουσιάζει όμως χαμηλότερη δραστηριότητα από την ολικού μήκους PARN (*Wu, 2005*). Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι παρουσία mRNAs με περιοχές πλούσιες σε AU, η PARN επιταχύνει τη διαδικασία της αποαδενυλίωσης των mRNAs (*Lai et al., 2003*) ενώ παρουσία RBPs, μπορεί να δράσει ως καταστολέας όγκου, με συνέπεια να αποικοδομούνται mRNAs που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες.

Η αποαδενυλάση poly(A)-specific ribonuclease (PARN)-like, PARNL βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 και στη θέση q25.3 και ανήκει στην οικογένεια CAF1. Η ανακάλυψη της έχει γίνει πολύ πρόσφατα, με αποτέλεσμα να γνωρίζουμε ελάχιστα για τον ακριβή ρόλο της αλλά και τη λειτουργία της. Μια καινούργια μελέτη, έδειξε ότι αποτελείται από 942 ζεύγη βάσεων. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία στην 5' περιοχή έδειξε την παρουσία αλληλουχίας της θέσης δέσμευσης του ριβοσώματος (*Ohnishi et al., 2004*).

2. ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

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

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

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

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

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

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

Η λευχαιμία διακρίνεται σε δύο κύριες κατηγορίες:.

1.Οξείες

2. Χρόνιες

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

Συνεπώς, έχουμε τέσσερα είδη λευχαιμίας:

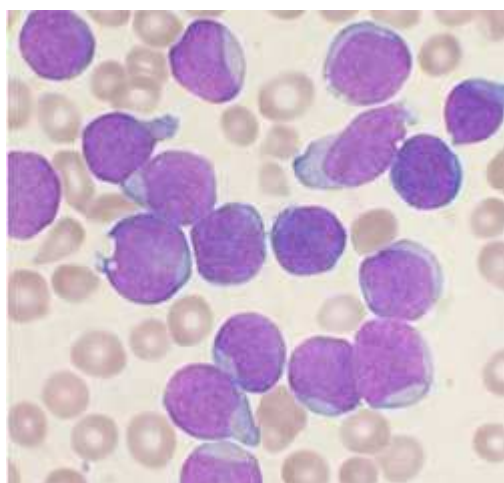
- **Οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία** (Acute lymphocytic leukemia, ALL)
- **Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία** (Chronic lymphocytic leukemia, CLL)
- **Οξεία μυελογενής λευχαιμία** (Acute myelogenous leukemia, AML)
- **Χρόνια μυελογενής λευχαιμία** (Chronic myelogenous leukemia, CML)

Στην περίπτωση της οξείας λευχαιμίας, τα λευχαιμικά κύτταρα που είναι ανώριμα και μη λειτουργικά αναπτύσσονται με πολύ γρήγορο ρυθμό με αποτέλεσμα η νόσος να εξελίσσεται ραγδαία σε αντίθεση με την χρόνια λευχαιμία, όπου η ασθένεια εξελίσσεται με αργό ρυθμό καθώς ο μυελός των οστών στα πρώτα στάδια λειτουργεί κανονικά παράγοντας και φυσιολογικά κύτταρα μαζί με κάποιο αριθμό λευχαιμικών, με συνέπεια τα συμπτώματα της ασθένειας να εμφανίζονται αρκετά αργότερα.

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



Εικόνα 2.1: Χρόνια λεμφολυτική λευχαιμία



Εικόνα 2.2: Οξεία λεμφολυτική λευχαιμία

2.1 ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Καρκινικός δείκτης, θεωρείται κάθε ουσία βιολογικής φύσεως η οποία μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά ή να εκτιμηθεί ποιοτικά και η μέτρηση της ή η παρουσία της μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη, τη φύση, το μέγεθος, την υποτροπή ή τη μεταστατική εξάπλωση μιας κακοήθους διεργασίας στον οργανισμό. Αυξημένες τιμές στους διάφορους καρκινικούς δείκτες εμφανίζονται, κατά κύριο λόγο, σε ορισμένα είδη καρκίνου αλλά επίσης και σε ορισμένες μη καρκινικές παθολογικές καταστάσεις. Τα επίπεδα των καρκινικών δεικτών ασθενών σε προκαρκινική κατάσταση, επίσης, μπορεί να ποικίλλουν. Αυτές τις ουσίες, εντοπίζονται στο αίμα, στα ούρα, στους καρκινικούς ιστούς, αλλά και σε άλλους τύπους ιστών. Σε κάποιες περιπτώσεις, η εμφάνιση καρκίνου οφείλεται σε μετάλλαξη ορισμένων γονιδίων. Η παρουσία μιας τέτοιας αλλαγής ονομάζεται, δείκτης κινδύνου. Πρέπει να επισημάνουμε ότι, οι δείκτες κινδύνου, υποδηλώνουν τη πιθανότητα να εμφανιστεί σε ένα ασθενή καρκίνος, ενώ οι καρκινικοί δείκτες, την παρουσία καρκίνου.

Τα επίπεδα των καρκινικών δεικτών, μετρούνται με διάφορους τρόπους όπως βιοψία, εξέταση αίματος, ούρων, δείγματος ιστού, τα οποία αποστέλλονται στο κλινικοχημικό εργαστήριο. Η σημασία της μέτρησης τους είναι σημαντική, καθώς ανάλογα με την αυξομείωση τους μπορεί να γίνει εκτίμηση του τύπου του καρκίνου του ασθενούς, αξιολόγηση της πορείας της θεραπείας ή ακόμη και πιθανή υποτροπή.

Ένα τρόπος ανίχνευσης καρκίνου σε πρώιμο στάδιο είναι τα screening tests. Για να είναι αποτελεσματικά, θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και να είναι εξειδικευμένα. Η ευαισθησία, αναφέρεται στην ικανότητα του τεστ να ανιχνεύει τους ασθενείς, ενώ η εξειδίκευση, αναφέρεται στην ικανότητα του τεστ να ανιχνεύει τους φυσιολογικούς. Δυστυχώς, οι περισσότεροι καρκινικοί δείκτες δεν παρουσιάζουν αρκετή ευαισθησία ή εξειδίκευση για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για καρκίνο πρώιμου σταδίου.

Οι επιστήμονες συνεχίζουν τη διερεύνηση της λειτουργίας των καρκινικών δεικτών στρέφοντας το ενδιαφέρον τους τα τελευταία χρόνια, στη πρωτεομική ανάλυση (μελέτη μορφής πρωτεΐνης, λειτουργίας). Έχει σκοπό τη μελέτη πρωτεϊνών, που ενδεχομένως χρησιμεύσουν ως δείκτες ασθένειας σε πρώιμο στάδιο ή στη πρόβλεψη αποτελεσματικότητας μιας θεραπείας.

Οι καρκινικοί δείκτες, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τα εξής:

1) Έλεγχος ενός υγιούς πληθυσμού ή πληθυσμού με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου.

2) Διάγνωση καρκίνου ή ενός ειδικού τύπου καρκίνου.

3) Δυνατότητα πρόγνωσης της ασθένειας.

4) Έλεγχος της δοσολογίας φαρμάκων του ασθενούς.

Μέχρι τώρα κανένα τεστ δεν πληροί τις παραπάνω προϋποθέσεις, κάτι που οφείλεται στην έλλειψη ευαισθησίας και εξειδίκευσης των διαθέσιμων τεστ

Τα χαρακτηριστικά ενός ιδανικού καρκινικού δείκτη είναι:

1) Να παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία.

2) Η μεταβολή της συγκέντρωσης του να είναι συνάρτηση της μεταβολής του όγκου ή/ και το βαθμό κακοήθειας.

3) Να είναι ειδικός για το κάθε τύπο κακοήθειας.

4) Τα επίπεδα των συγκεντρώσεών του στο αίμα να μη παρουσιάζουν μεγάλες μεταβολές ανεξάρτητες των μεταβολών του μεγέθους του όγκου.

5) Σε περίπτωση που οι καρκινικοί δείκτες εντοπίζονται και σε ορό των φυσιολογικών ατόμων, θα πρέπει η συγκέντρωση του σε ορό ασθενών να είναι στατιστικά σημαντικότερη.

Ο πρώτος καρκινικός δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για διάγνωση καρκίνου, είναι ανθρώπινη χοριακή γονατροπίνη. Ο έλεγχος γινόταν σε γυναίκες μετά το πέρας της εγκυμοσύνης και σε όσες είχαν μεγάλη μήτρα. Υψηλά επίπεδα αυτής της ορμόνης στο αίμα, μπορεί να ήταν ένδειξη καρκίνου του πλακούντα.

Με τα χρόνια έγιναν προσπάθειες ανίχνευσης καρκινικών δεικτών μέσω μιας απλής εξέτασης αίματος. Ένας από τους πρώτους δείκτες με αυτό τον τρόπο, είναι το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (CEA) που βρέθηκε στο αίμα ορισμένων ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου. Αλλά, κανένας δεν μπόρεσε να χρησιμοποιηθεί για διάγνωση καρκίνου σε πρώιμο στάδιο. Ο μόνος που εφαρμόζεται ευρέως για τη πρώιμη ανίχνευση καρκίνου, είναι το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA). Ο δείκτης αυτός παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα. Προέρχεται μόνο από προστατικά κύτταρα και μια αύξηση στα επίπεδα του, υποδηλώνει πρόβλημα στο προστάτη. Σε πρώιμο στάδιο, τα επίπεδα αυτού του δείκτη είναι υψηλά και μπορεί να γίνει κάποια διάγνωση. Βέβαια, και σε άλλες περιπτώσεις ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα του συγκεκριμένου δείκτη, με αποτέλεσμα να μην είναι αξιόπιστος σε όλες τις περιπτώσεις.

Για τη λευχαιμία, οι καρκινικοί δείκτες είναι:

- 1) Beta-2-microglobulin: αξιόπιστος δείκτης στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία.
- 2) Calcitonin: δείκτης για τη μυελογενή λευχαιμία
- 3) CD52: χρήσιμος καρκινικός δείκτης στο προσδιορισμό του σταδίου στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία.
- 4) Ferritin: δείκτης στη μυελοειδή λευχαιμία.
- 5) Wilms tumor gene (WT1).

2.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΥ(Α)ΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Γνωρίζουμε ότι η πολυ(Α) ουρά εντοπίζεται στο 3' άκρο των mRNAs, επηρεάζοντας το στάδιο της μετάφρασης τους καθώς και τη σταθερότητα των κυττάρων (*Sachs et al., 1993*). Η προσθήκη της γίνεται παράλληλα με την πέψη των pre-mRNAs και απαιτεί πολλούς πρωτεϊνικούς παράγοντες και τη παρουσία του ενζύμου PAP, της οποίας η δραστηριότητά έχει βρεθεί ότι έχει προγνωστική αξία κυρίως για τις χρόνιες λευχαιμίας (*Pangalis et al., 1985; Sasaki, 1990*).

Μια πρώτη μελέτη της προγνωστικής αξίας της PAP έγινε στο καρκίνο του μαστού. Η δραστηριότητά της συσχετίστηκε με παραμέτρους όπως η ηλικία, το μέγεθος του όγκου, η κατάσταση των λεμφαδένων. Τα δεδομένα που λήφθηκαν, δείχνουν ότι η δραστηριότητά της μπορεί να είναι ανεξάρτητος παράγοντας μιας όχι τόσο καλής πρόγνωσης.

Πρώιμες μελέτες συνδέουν τα αυξημένα επίπεδα της δραστηριότητας της PAP με τη φωσφορυλίωση. Οι ποικίλες μορφές της PAP, χαρακτηρίζονται από διάφορους βαθμούς φωσφορυλίωσης, από τις οποίες αυτές που παρουσιάζουν μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα είναι οι φωσφορυλιωμένες μορφές της. Έχει βρεθεί ότι η PAP είναι δυνατόν να φωσφορυλιωθεί *in vivo* και *in vitro* από το p34(cdc2)/cyclin B, που είναι ο παράγοντας προώθησης της μίτωσης.

Στο καρκίνο του μαστού, τα επίπεδα δραστηριότητας της PAP μπορούν να χρησιμοποιηθεί ως παράμετρος που σχετίζεται με το πολλαπλασιασμό και τη μεταγραφή του καρκινικού κυττάρου. Παρομοίως, όταν η PAP βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα μπορεί να συνδέεται με απορρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης, το οποίο με τη σειρά του ενδεχομένως συμβάλλει στο κακοήγη φαινότυπο του κυττάρου. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι όταν η PAP είναι σε υψηλά επίπεδα αντιπροσωπεύει έναν αρκετά επιθετικό τύπο καρκίνου, όπως επίσης και ότι θεωρείται ένας καινούργιος ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης (*Scorilas et al., 2000*).

2.3 ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι ο μετα-μεταγραφικός μηχανισμός παίζει σπουδαίο ρόλο στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης και πιο ειδικά στην αποικοδόμηση του mRNA. Οι διαδικασίες που αφορούν τη σταθερότητα του mRNA, τη μεταγραφική καταστολή και την αποικοδόμηση μεταγράφων σχετίζονται μεταξύ τους με πολύπλοκο τρόπο και είναι δυνατόν να επηρεαστούν από διάφορα cis-στοιχεία (όπως πολυ(A) ουρά, στοιχεία ARES) και trans-στοιχεία (όπως ncRNAs, RBPs, ριβονουκλεάσες) (*Kim et al., 2009*).

Τα ncRNAs, είναι μη κωδικοποιητικά μετάγραφου διαφόρων μεγεθών, τα οποία δε μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. Τα miRNAs, είναι μετα-μεταγραφικοί ρυθμιστές που προσδένονται σε συμπληρωματικές αλληλουχίες των περιοχών 3'UTRs των mRNAs που συνήθως οδηγεί σε αποσιώπηση του γονιδίου (*Bartel, 2009; Bartel 2004*). Είναι μια κατηγορία ncRNAs, μεγέθους περίπου 22 νουκλεοτιδίων, που παράγονται μέσω ενδονουκλεολυτικής διεργασίας ακολουθώντας το μηχανισμό της παρεμβολής του RNA. Η έρευνα τα τελευταία χρόνια, έχει αποκαλύψει ότι παίζει αρνητικό ρόλο όπως υποβάθμιση της μεταγραφής, καταστολή της μετάφρασης αλλά και θετικό ρόλο όπως επιτάχυνση της αφαίρεσης της πολυ(A) ουράς με συνέπεια την επίσπευση της υποβάθμισης του mRNA. Με το να επηρεάζει την γονιδιακή ρύθμιση, είναι πολύ πιθανόν τα miRNAs να εμπλέκονται σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες (*Brennecke, et al.,2003; Cuellar,et al.,2005; Poy et al.,2004; Chen, et al.,2004; Wilfred, et al.,2007; Harfe et al.,2005; Lim et al.,2005; Lagos-Quintana, et al.,2003*).

Οι RBPs, είναι πρωτεΐνες που συνδέονται με το mRNA και επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το χρόνο ζωής των mRNAs. Προσδένονται στην περιοχή 3' UTR των mRNAs αλλά και στη κωδική περιοχή των mRNAs, προφυλάσσοντάς τα από αποικοδόμηση. Ανάλογα με τον τρόπο που ανταποκρίνονται στα διάφορα ερεθίσματα, ο ρυθμός αποσύνθεσής τους διαφέρει.

Έρευνες έχουν δείξει ότι η ύπαρξη δυσλειτουργικών trans-acting παραγόντων στο μεταβολισμό του mRNA συσχετίζεται άμεσα με την εμφάνιση καρκίνου. Η σύνδεση κάποιων ειδών ριβονουκλεοπρωτεϊνών με ορισμένο αριθμό

μεταγράφων, μπορεί να οδηγήσει σε δημιουργία ογκογονιδίου ή καταστολείς ογκογονιδίων. Επίσης, οι ριβονουκλεάσες δύναται να δράσουν ως ογκοπρωτεΐνες ή καταστολείς των όγκων έχοντας αντίκτυπο στην αφθονία του mRNA και στη ρύθμιση της μετάφρασης (*Kim et al., 2009*).

Η μείωση της δραστηριότητας των miRNAs και των ριβονουκλεασών εμποδίζει τη μετάφραση των ογκογόνων mRNAs που με τη σειρά τους οδηγούν σε μειωμένη αποικοδόμησή τους. Με παρόμοιο τρόπο επιδρούν, η μειωμένη δραστηριότητα των αποσταθεροποιητών (destabilizer RBP) ή αυξημένη δραστηριότητα των σταθεροποιητικών πρωτεϊνών.

Σε περίπτωση που, τα miRNAs ή οι ριβονουκλεάσες παρουσιάζουν αυξημένη δραστηριότητα παρατηρείται αυξημένη αποσύνθεση των ογκοκατασταλτικών mRNAs, γεγονός που ενδεχομένως να οδηγήσει σε ανάπτυξη καρκίνου. Επίσης, οι πρωτεΐνες που προσδένονται στα mRNAs φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο (*Kim et al., 2009*).

Οι ριβονουκλεάσες ταξινομούνται σε ενδοριβονουκλεάσες και εξωριβονουκλεάσες. Οι πρώτες, κόβουν εσωτερικά το mRNA και τα προϊόντα τους αποικοδομούνται από τις εξωριβονουκλεάσες ενώ οι τελευταίες, αποικοδομούν τα RNAs από τα ελεύθερα άκρα τους. Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν και οι αποαδενυλάσες που αναφέρθηκαν εκτενέστερα παραπάνω. Έτσι, οι εξωριβονουκλεάσες είναι αυτές που αφαιρούν τη πολυ(A) ουρά, το 5'-cap, αλλά και τα προϊόντα της ενδονουκλεολυτικής τμήσης των RNAs. Όταν οι απαραίτητοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί υπολειπτούν, παρατηρείται αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση. Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι η αδρανοποίηση του mRNA προκαλείται από μία μόνο ενδονουκλεολυτική κοπή. Τα κύτταρα όμως έχουν αναπτύξει κατάλληλους μηχανισμούς για να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη δράση τους (*Kim et al., 2009*). Ο πίνακας που ακολουθεί παρουσιάζει την ταξινόμηση των ριβονουκλεασών (*Holzmann et al. 2008; D'Alessio and Riordan 1997; Gerdes et al. 2005*).

Πίνακας 2 : Ταξινόμηση ριβονουκλεασών*

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

***βάσει Holzmann, et al., 2008;D'Alessio, et al, 1997;Gerdes, et al., 1995**

3. ΣΚΟΠΟΣ

Η βράχυνση της πολυ(A) ουράς, είναι το πρώτο καθοριστικό βήμα στην αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs, καθορίζοντας το χρόνο ζωής τους και κατ' επέκταση τη ποσότητα τη παραγόμενης πρωτεΐνης. Η αφαίρεση των πολυ(A) ουρών καταλύεται από τις αποαδενυλάσες, εξειδικευμένες ριβονουκλεάσες που χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις DEDD και EEP νουκλεάσες. Σε μια παθολογική κατάσταση, όπως ο καρκίνος, παρατηρείται αυξημένη έκφραση παραγόντων, όπως προϊόντα ογκογονιδίων, γεγονός που σημαίνει πως τα mRNAs τους επιβιώνουν για περισσότερο χρόνο, ενώ αντίθετα άλλα παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση. Είναι προφανές ότι η αποικοδόμηση των mRNAs είναι καθοριστικής σημασίας για το κύτταρο.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι η μελέτη των επιπέδων των αποαδενυλασών CNOT6, CNOT6L και PARNL σε δείγματα ατόμων που πάσχουν από οξεία λευχαιμία και η σύγκρισή τους με μη παθολογικά δείγματα. Οι συγκεκριμένες αποαδενυλάσες ανήκουν και στις δύο κατηγορίες που προαναφέρθηκαν, ανακαλύφθηκαν τα τελευταία χρόνια και η διερεύνηση της βιολογικής τους σημασίας καθώς και του τρόπου λειτουργίας τους κρίνεται απαραίτητη για τη κατανόηση των μηχανισμών που ρυθμίζουν την αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs και τη συσχέτισή τους με παθολογικές καταστάσεις.

4.ΥΛΙΚΑ/ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΥΛΙΚΑ

4.1.1 ΧΗΜΙΚΑ

- ❖ Acrylamide (Sigma)
 - APS (Ammonium Persulfate) (Sigma)
 - Αιθανόλη (Merck)
 - Ακετόνη (Merck)
 - Αμμωνία (Merck)
 - Αναστολείς πρωτεασών (complete) (Roche)
- ❖ Bioquant Protein (Merck)
 - Bis-acrylamide (Sigma)
 - Bromophenol blue (Research Organics)
 - 2-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel de Haen)
 - Βρωμιούχο αιθίδιο (Merck)
- ❖ Γλυκερόλη (Panreac)
 - Γλυκίνη (AppliChem)
 - Full Range Rainbow MW Markers (Amersham)
- ❖ Ισοπροπανόλη (Scharlau)
 - Μεθανόλη (Merck)
- ❖ HCl (Merck)
 - KCl (Merck)
 - KH₂PO₄ (Merck)
 - NaH₂PO₄ (Merck)
 - NaCl (Panreac)
 - NaOH (Merck)
 - Ponceau Red (Sigma)
 - SDS (Sodium dodecyl sulphate) (Sigma)
 - Skimmed milk (Scharlau)

TCA (Fluka)

Temed (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) (Research Organics)

Tween 20 (Euroclone)

4.1.2 ΔΙΑΔΥΜΑΤΑ

➤ **Lysis buffer (Δ/μα λύσης κυττάρων) :**

600mM KCl

20mM Tris-HCl pH= 7.8

20% Glycerol

4% Αναστολείς πρωτεασών

➤ **PBS (Phosphate Buffer Salts) 1x :**

137mM NaCl

2.7mM KCl

4.3mM NaH₂PO₄

1.47mM KH₂PO₄

➤ **30% Acrylamide-bis (100ml) :**

30gr acrylamide

1gr bis

100ml dH₂O

➤ **Ponceau Red :**

I) 0.1% ponceau w/v σε 5% οξικό οξύ ή

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

➤ **Running buffer (500 ml) :**

72gr γλυκίνη 1.92M

15gr tris-HCl 0,25M

5gr SDS 0.035M

➤ **Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου :**

30% bis-acrylamide (29:1/acrylamide:bis-acrylamide)
σε ddH₂O

10% SDS

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH= 8.8 1M

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH= 6.8 1M

Ρυθμιστικό διάλυμα 10x pH 8.3 :Tris base 1.5%,
7.2% γλυκίνη, 0.5% SDS

Loading buffer : 1M Tris pH 6.8, 10% γλυκερόλη,
10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% κυανό της
βρωμοφαινόλης

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

➤ **Διάλυμα για transfer gel πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF :**

Transfer buffer : Tris 48mM, γλυκίνη 39mM, SDS
1.3mM, μεθανόλη 20%)

➤ **Διαλύματα για detection :**

Blocking buffer : 5% skimmed milk, 0.1% Tween
20 σε PBS

PBS-T : 0.1% Tween 20 σε PBS

ECL : Solution A και B

ECL : Solution A και B

Developer solution, Kodak

Fixer solution, Kodak

➤ **Διάλυμα για αποσύνδεση αντισωμάτων από μεμβράνη
PVDF (Stripping buffer) :**

100mM 2-μερκαπτοαιθανόλη

2% SDS

62.5mM Tris-HCl pH=6.7

➤ **Πρωτεΐνες, αντισώματα και ένζυμα :**

BSA Fraction V

Merck

Goat anti-rabbit IgG-HRP

Chemicon

Protease Inhibitors

Roche

Anti-lamin A/C

Cell Signalling

Anti-PARN 74 (Ευγενική

προσφορά του Καθ.Α.

Virtanen. Upsala

University. Upsala,

Σουηδία)

4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1 Bradford Protein Assay

Η μέθοδος Bradford, ανήκει στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για το ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών. Βασίζεται στη πρόσδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 στις πρωτεΐνες (Bradford 1976). Τη συγκεκριμένη χρωστική μπορούμε να τη συναντήσουμε σε τρεις μορφές : κατιονική (κόκκινη), ουδέτερη (πράσινη) και ανιονική (μπλε). Όταν η χρωστική προσδένεται

στη πρωτεΐνη μετατρέπεται στη σταθερή αποπρωτονιωμένη μορφή ($A_{\max} = 595 \text{ nm}$), η οποία ανιχνεύεται με τη βοήθεια ενός φασματοφωτομέτρου.

Σε κάθε πρωτεϊνική ανάλυση, η πρωτεΐνη που είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας είναι ένα εξευγενισμένο παρασκεύασμα της προς ανάλυση πρωτεΐνης. Όταν αυτό δεν είναι εφικτό, καταφεύγουμε σε άλλες μεθόδους, από τις οποίες η πιο συνηθισμένη περιλαμβάνει τη κατασκευή της πρότυπης καμπύλης με BSA (Bovine Serum Albumin) ή γ -globulin.

Πρότυπη Καμπύλη :

- Μπορεί να πραγματοποιηθεί σε τρεις διαφορετικές διατάξεις: την ανάλυση σε κυψελίδες των 5mL και 1mL και την ανάλυση σε μικροπλάκα των 250 μ L. Το εύρος της γραμμικότητας των μεθόδων με χρήση BSA είναι 125-1000 μ g/mL.
- Ανακινούμε τη χρωστική μερικές φορές πριν τη χρήση.
- Για την ανάλυση σε κυψελίδα 1mL χρειαζόμαστε 20 μ L δείγματος και 1mL χρωστικής.
- Η προετοιμασία των δειγμάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί και με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων όπως παρατηρούμε στον πίνακα 2. Σε αυτή την περίπτωση, τα δείγματα φτάνουν για τρεις επαναλήψεις.
- Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 5min. Σε καμιά περίπτωση η επώαση δεν πρέπει να ξεπερνά την 1h.
- Ρυθμίζουμε το φασματοφωτόμετρο στα 595nm. Μηδενίζουμε με το τυφλό δείγμα και μετράμε τις απορροφήσεις.
- Κατασκευάζουμε την πρότυπη καμπύλη σε γραφική παράσταση με τις τιμές των απορροφήσεων (595nm) στον άξονα ψ και τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων (μ g/mL) στον άξονα χ . Προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση των άγνωστων δειγμάτων χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη. Σε περίπτωση που τα δείγματα έχουν αραιωθεί υπολογίζουμε τη τελική συγκέντρωση πολλαπλασιάζοντας τον παράγοντα αραιώσης.
- Απορρίπτουμε τιμές που είναι εκτός της γραμμικότητας της καμπύλης για μεγαλύτερη ακρίβεια.

Πίνακας 3 : Κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA

Tube #	Standard Volume (μl)	Source of Standard	Diluent Volume (μl)	Final [Protein] (μg/ml)
1	70	2mg/mL stock	0	2000
2	75	2mg/mL stock	25	1500
3	70	2mg/mL stock	70	1000
4	35	tube 2	35	750
5	70	tube 3	70	500
6	70	tube 5	70	250
7	70	tube 6	70	125
8	-	-	70	0

4.2.2. Παραλαβή ορού και απομόνωση κυττάρων από δείγματα ασθενών με λευχαιμία

I) Παραλαβή ορού :

Το περιφερικό αίμα (4mL) φυγοκεντρείται στις 3500 στροφές (RPM) για 10min και ακολουθεί λήψη του υπερκείμενου (ορός). Το κατώτερο στρώμα που αντιστοιχεί στο 45% του συνολικού όγκου του αίματος, είναι κόκκινου χρώματος και περιέχει ερυθροκύτταρα. Το μεσαίο στρώμα, αντιστοιχεί στο 1% του ολικού όγκου και είναι χρώματος άσπρου-φαιού. Σε αυτό, βρίσκονται τα λευκοκύτταρα που διακρίνονται σε 5 τύπους στον άνθρωπο : λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα. Το ανώτερο στρώμα της στήλης (υπερκείμενο), εμπεριέχει το πλάσμα, δηλαδή το υγρό μέρος του αίματος πρωτεϊνικής σύστασης με ελαφρά αλκαλικό pH και χρώματος κιτρινωπού.

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

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται απομόνωση λεμφοκυττάρων αρκετά εύκολα από το περιφερικό αίμα και το μυελό των οστών κάνοντας φυγοκέντρηση πυκνότητας σε κλίση φικόλης (Ficoll) και μετριζιμίδης (Hypaque).

Η φικόλη, είναι μια συνθετική ουσία υψηλού μοριακού βάρους, ενώ η μετριζιμίδα χρησιμεύει στη δημιουργία τέτοιων συνθηκών πυκνότητας και ώσμωσης έτσι ώστε τα λεμφοκύτταρα να διαχωρίζονται από τα άλλα κύτταρα.

Τα κύτταρα καθιζάνουν με διαφορετική ταχύτητα στα παρασκευάσματα Ficoll-Hypaque εξαιτίας της διαφορετικής πυκνότητας της μάζας τους. Ο διαχωρισμός αυτός , γίνεται διότι τα λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν μικρότερη πυκνότητα από τα κοκκιοκύτταρα και ερυθροκύτταρα. Το δείγμα (αίμα-μυελός) που παραλαμβάνεται, τοποθετείται αμέσως σε φιαλίδιο με αντιπηκτικό. Στη συνέχεια, αραιώνεται με ιστό καλλιέργειας και επιστοιβάζεται προσεκτικά στην επιφάνεια του υγρού στρώματος φικόλης (Ficoll-Hypaque), η οποία βρίσκεται μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα. Αυτό γίνεται, γιατί η φικόλη έχει μεγαλύτερη πυκνότητα από εκείνη των λεμφοκυττάρων αλλά μικρότερη από εκείνη των ερυθροκυττάρων και κοκκιοκυττάρων (π.χ. ουδετερόφιλων).

Ακολουθεί φυγοκέντρηση, με αποτέλεσμα τα λεμφοκύτταρα και τα πολυμορφοπύρηννα ουδετερόφιλα να διέρχονται διαμέσου της φικόλης σχηματίζοντας ίζημα στον πυθμένα του σωλήνα, ενώ τα λεμφοκύτταρα και ελάχιστα μονοπύρηννα παραμένουν στη μεσαία στοιβάδα, πάνω από το στρώμα της φικόλης. Με αυτό τον τρόπο, μπορούν να παραληφθούν εύκολα από το στρώμα διαχωρισμού. Αυτά τα κύτταρα, ονομάζονται μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC). Το παρασκεύασμα των λεμφοκυττάρων διαχωρίζεται περαιτέρω από τα μακροφάγα (μονοπύρηννα) με τη προσθήκη ρινισμάτων σιδήρου. Τα ρινίσματα προλαμβάνονται από τα φαγοκύτταρα, τα οποία μπορούν να απομακρυνθούν με ένα μαγνήτη.

Μία άλλη μέθοδος απομάκρυνσης των μονοπύρηννων (μακροφάγα), είναι να αφήσουμε το εναίωρημα των κυττάρων να καθιζάνει σε πλαστικό τριβλίο. Τα μακροφάγα προσκολλώνται στο πλαστικό σε αντίθεση με τα λεμφοκύτταρα που μπορούν να απομακρυνθούν με πλύσιμο.

Υλικά/Όργανα :

1. Αίμα με αντιπηκτικό (ηπαρίνη ή EDTA)
2. Δ/μα Ficoll-Isopaque (ή Ficoll-Hypaque, Lymphoprep, Histopaque)
3. D/ma Tuerk (95mL dH₂O, 3mL οξικό οξύ, 4-5 σταγόνες Giemsa)
4. Χρωστική Trypanblue (άλας νατρίου 0,4% (w/v) σε φυσιολογικό ορό)
5. Hanks Balanced Salt Solution (HBSS), θρεπτικό μέσο RPMI
6. Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας
7. Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) και καλυπτρίδες
8. Σωλήνες φυγόκεντρου 15mL (πλαστικοί, κωνικοί), φυγόκεντρος
9. Πιπέτες Pasteur, πιπέτες Gilson

Μέθοδος :

1. Αραιώνουμε το αίμα σε ρυθμιστικό δ/μα αλάτων (π.χ. Hanks Balances Salt Solution, HBSS) ή σε θρεπτικό μέσο 1:1.
2. Προσθέτουμε 5mL Ficoll-Isopaque (ή άλλο παρόμοιο υλικό) σε κωνικό σωλήνα φυγόκεντρου (ειδικό βάρος φικόλης= 1.078)
3. Επιστοιβάζουμε με προσοχή το αραιωμένο αίμα (περίπου 10mL) πάνω στο στρώμα της Ficoll-Isopaque.
4. Φυγοκεντρούμε στις 1700 στροφές (rpm) για 25min(θ= 20 °C).
5. Έχουμε διαχωρισμό κυττάρων σε ζώνες. Με μια πιπέτα Pasteur απομακρύνουμε το πάνω στρώμα (περιέχει τα αιμοπετάλια και το πλάσμα) χωρίς να πειραχτεί το στρώμα με τα λεμφοκύτταρα.
6. Με μια άλλη πιπέτα Pasteur μεταφέρουμε το στρώμα των λεμφοκυττάρων σε μια σωλήνα φυγόκεντρου (το στρώμα της φικόλης περιέχει τα κοκκιοκύτταρα ενώ στον πυθμένα, είναι τα ερυθρά και νεκρά κύτταρα).
7. Στη στοιβάδα των λεμφοκυττάρων, προσθέτουμε 15mL HBSS (ή θρεπτικό μέσο που περιέχει 5-10% ορό μοσχαριού) και ανακατεύουμε με μια πιπέτα.
8. Φυγοκεντρούμε στις 1400 rpm για 10min (θ=20 °C)
9. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο με μια πιπέτα και στη συνέχεια, προσθέτουμε πάλι 10mL HBSS (ή θρεπτικό μέσο) και ανακατεύουμε με προσοχή.
10. Φυγοκεντρούμε στις 1400 rpm για 10min (θ=20 °C), απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αιωρούμε τα λεμφοκύτταρα σε 1mL θρεπτικό μέσο.
11. Παρατήρηση και μέτρηση κυττάρων με τη χρήση μικροσκοπίου.

12. Αποθήκευση των κυττάρων σε 1mL freezing medium στους -80 °C.

Μέτρηση κυττάρων:

1. Για τη παρατήρηση και μέτρηση των μονοπύρηνων κυττάρων που συλλέξαμε στο θρεπτικό μέσο, αραιώνουμε τα κύτταρα με τον εξής τρόπο :

A. 20μL αιώρημα κυττάρων και 380μL δ/μα Tuerk (παρατήρηση κυττάρων)

B. 200μL αιώρημα κυττάρων, 300μL HBSS και 500μL δ/μα Trypanblue (αραίωση 1:5). Το Trypanblue χρωματίζει μπλε τα νεκρά κύτταρα.

2. Ανακατεύουμε προσεκτικά και περιμένουμε 5-10min.

3. Τοποθετούμε μία σταγόνα στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer στην ειδική εσοχή κάτω από τη καλυπτρίδα.

4. Μετράμε τα κύτταρα.

4.2.3. Κυτταρική λύση των δειγμάτων με κύτταρα από μνελό των οστών

Αυτό επιτυγχάνεται με φυγοκέντρηση στις 1000-12000 στροφές για 4-5min. Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 20μL lysis buffer, παρουσία αναστολέων πρωτεασών. Ψύξη των δειγμάτων σε υγρό άζωτο, μεταφορά στους 60 °C για 3min και ανάδευση (vortex). Επανάληψη του παραπάνω κύκλου 3 φορές. Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 1min και λήψη του υπερκείμενου (*Rudolph et al., 1999*).

4.2.4. TCA Precipitation Protocol (μέθοδος κατακρήμνισης πρωτεϊνών)

Αντιδραστήρια:

TCA 100% (ή 72%)

TCA 2.5%

DOC 0,15%

Ακετόνη

Loading buffer

Ατμοί αμμωνίας

Μέθοδος :

Η διαδικασία προϋποθέτει τα δείγματα στο πάγο καθ' όλη τη διάρκεια της.

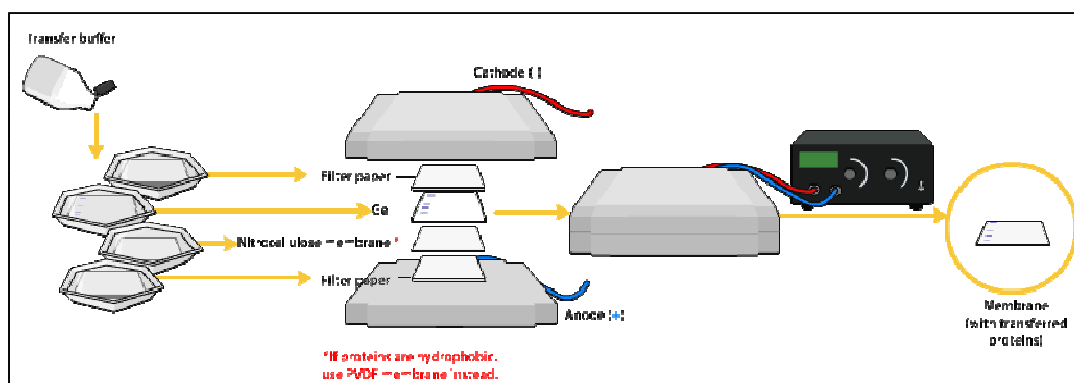
Τα βήματα είναι τα εξής:

1. Αν ο όγκος των δειγμάτων είναι μικρότερος από 100μL, συμπληρώνουμε μέχρι τελικού όγκου 100μL.
2. Προσθήκη DOC 0.15% που να αντιστοιχεί στο 10% του όγκου του δείγματος και επώαση του δείγματος στο πάγο για 10min.
3. Προσθήκη TCA 100% που να αντιστοιχεί στο 10% του όγκου του δείγματος και επώαση του δείγματος σε πάγο για 10min.
4. Τοποθέτηση των δειγμάτων για 30min στους -20°C για επώαση.
5. Φυγοκέντρηση 1200rpm για 15min($\theta=4^{\circ}\text{C}$)
6. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
7. Ξέπλυμα του ιζήματος με 200μL TCA 2.5% (με προσοχή, ώστε να μη διαλυθεί το ίζημα).
8. Προσθήκη 200μL ακετόνης με αναδευτικές κινήσεις.
9. Φυγοκέντρηση full speed για 15 λεπτά ($\theta=4^{\circ}\text{C}$).
10. Ξέπλυμα του ιζήματος με 200μL ακετόνης (με προσοχή, ώστε να μη διαλυθεί το ίζημα).
11. Προσθήκη σε κάθε δείγμα 20μL Loading buffer 1X.
12. Σε περίπτωση που παρατηρείται αλλαγή χρώματος από μπλε σε κίτρινο, απαιτείται προσθήκη αέριας αμμωνίας (ατμοί αμμωνίας) για αλλαγή του pH.
13. Βράσιμο των δειγμάτων στους 95°C για 5min και αποθήκευση στους -20°C .

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται καθαρισμός και απομόνωση της προς ανάλυση πρωτεΐνης και με την επαναδιάλυση των δειγμάτων σε Loading buffer 1X, τα δείγματά μας είναι έτοιμα να τα φορτώσουμε και να τα ηλεκτροφορήσουμε με τη μέθοδο Western Blot.

4.2.5. Western Blot method

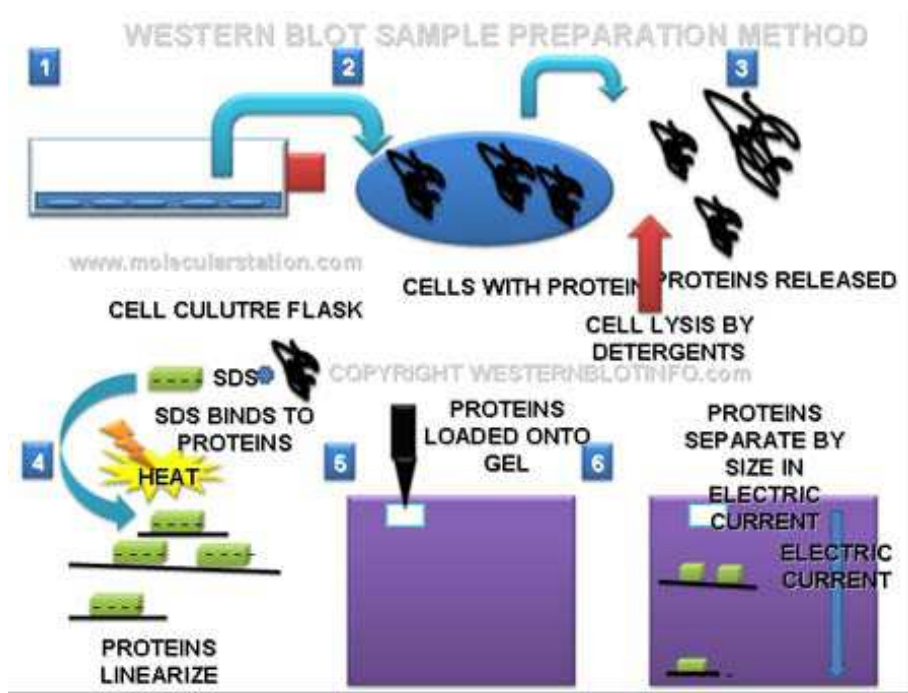
Είναι μια διαδικασία διαχωρισμού και ανίχνευσης πρωτεϊνών, που πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων με βάση το μοριακό τους βάρος, αφού τα έχουμε φορτώσει στα πηγαδάκια, σε 10% SDS-gel polyacrylamide στα 160V. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-SDS, τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα, μετακινούνται προς την άνοδο με την επίδραση του ηλεκτρικού ρεύματος. Εξέρχονται από τη πηκτή και καθιλώνονται στη μεμβράνη εξαιτίας υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, αρχικά εμβαπτίζεται η μεμβράνη PVDF σε 100% μεθανόλη για να ενεργοποιηθεί και έπειτα μεταφέρονται με το gel σε transfer buffer. Ακολουθεί η τοποθέτηση τους στη συσκευή Semidry Transfer System στα 270mA για 40 λεπτά για τη μεταφορά των πρωτεϊνών. Στη πάνω και κάτω επιφάνεια τοποθετούνται τρία χαρτιά Whatman, αντίστοιχα και ανάμεσά τους παρεμβάλλονται το gel με προσανατολισμό στον αρνητικό πόλο και τη μεμβράνη στον θετικό πόλο. Η διαδικασία αυτή φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα. Προσοχή πρέπει να δοθεί και στη τοποθέτησή τους, καθώς η ύπαρξη φυσαλίδων ανάμεσά τους παρεμποδίζει τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η επιβεβαίωση της μεταφοράς τους γίνεται με βαφή της μεμβράνης με τη χρωστική Ponceau red.



Σχήμα 4.2.5.1. Μεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή σε μεμβράνη PVDF

(http://www.peptide2.com/peptide/Western_blot_wikipedia_the_free.html)

Στη συνέχεια, επωάζουμε τη μεμβράνη σε blocking buffer για 1 ώρα, υπό συνεχή ανάδευση σε rollers. Μετά, προστίθεται το πρώτο rabbit anti-PARN74 αντίσωμα σε αραιώση 1:1000 (σε blocking buffer) και αφήνεται για επώαση όλο το βράδυ στους 4 °C. Αφού έχουν περάσει τουλάχιστον 24h, ξεπλένουμε τη μεμβράνη με washing buffer με τη κάθε πλύση να διαρκεί 15 λεπτά. Ύστερα, προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα goat anti-rabbit IgG-HRP σε αραιώση 1:10000 (σε blocking buffer) και επωάζεται για 1 ώρα υπό ανάδευση σε rollers. Στο τέλος, ακολουθούν 4 πλύσεις με δ/μα PBS-Tween 20, με τη κάθε μία να διαρκεί 10-15 λεπτά και η μεμβράνη είναι έτοιμη για εμφάνιση. Η εμφάνιση (ECL ή ECL plus) γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο Amersham και βασίζεται στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας που παρατηρείται όταν το ειδικό δεύτερο αντίσωμα αντιδρά με το κατάλληλο αντιδραστήριο, με ταυτόχρονη παραγωγή φωτός. Η ανίχνευση ειδικού σήματος μπορεί να αποτυπωθεί σε φωτογραφικό φιλμ με τη μορφή σκοτεινής ζώνης. Σε περίπτωση που απαιτείται επανάληψη της ανοσοανίχνευσης με το ίδιο αντίσωμα ή για επώαση με διαφορετικό (reprobing), εφαρμόζουμε τη διαδικασία της αποσύνδεσης (stripping) των αντισωμάτων ακολουθώντας το πρωτόκολλο της Amersham.



Σχήμα 4.2.5.1 Western blot μέθοδο
[\(http://www.molecularstation.com/protein/western-blot/\)](http://www.molecularstation.com/protein/western-blot/)

4.2.6 Προκατεργασία δειγμάτων που περιέχουν κύτταρα από μυελό των οστών για επεξεργασία τους με τη μέθοδο της PCR-RT

Από τα δείγματα αρχικά, απομονώνεται το RNA, με το RNA/protein extraction kit. Στη συνέχεια, απαιτείται η μετατροπή του RNA σε cDNA, γιατί διατηρείται περισσότερο σε αυτή τη μορφή καθώς το RNA υδρολύεται μετά από κάποιο χρονικό διάστημα και μας δίνει τη δυνατότητα χρήσης του για πολλές αναλύσεις. Αυτό επιτυγχάνεται εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο Superscript II Reverse transcription χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο kit της εταιρίας Invitrogen, δουλεύοντας με τα δείγματα μέσα στο πάγο σε όλη τη διαδικασία. Η μετατροπή αυτή γίνεται με το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης και χρησιμοποιούνται διάφορα ολιγινουκλεοτίδια, τυχαία εξαμερή ή ειδικοί εκκινητές. Έστερα, μετράμε τις απορροφήσεις των δειγμάτων με ένα φωτόμετρο για να μπορέσουμε να τα κανονικοποιήσουμε με τη κατάλληλη αραίωση.

Έπειτα ακολουθεί καθαρισμός των δειγμάτων για την απομάκρυνση διαφόρων προσμίξεων που ενδεχομένως μας οδηγήσουν σε λανθασμένα αποτελέσματα. Σύμφωνα με το αντίστοιχο πρωτόκολλο, η μέθοδος είναι η εξής:

1. Προσθήκη στα δείγματα αποστειρωμένου H₂O μέχρι τελικού όγκου 100μL.
2. Προσθήκη 1V φαινόλης-χλωροφόρμιο
3. Φυγοκέντρηση στις 11.000 rpm για 1min.
4. Λήψη της υδατικής φάσης (πάνω φάση), προσθήκη 1V φαινόλης-χλωροφορμίου και vortex.
5. Φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1min.
6. Λήψη υδατικής φάσης (πάνω φάση)
7. Προσθήκη NaCl μέχρι τελικής συγκέντρωσης 250mM και στη συνέχεια, προσθήκη 3V EtOH 100% ice cold.
8. Επώαση για 20min στους -80 °C.
9. Φυγοκέντρηση στις 14000rpm για 30min (θ=4 °C).
10. Αφαίρεση EtOH και προσθήκη 250μL EtOH 70% ice cold

11. Φυγοκέντρωση στις 14000rpm για 5min ($\theta=4^{\circ}\text{C}$).
12. Αφαίρεση αιθανόλης και αφήνονται τα δείγματα να στεγνώσουν.
13. Επαναδιαλυτοποίηση σε H_2O (αποστειρωμένο).

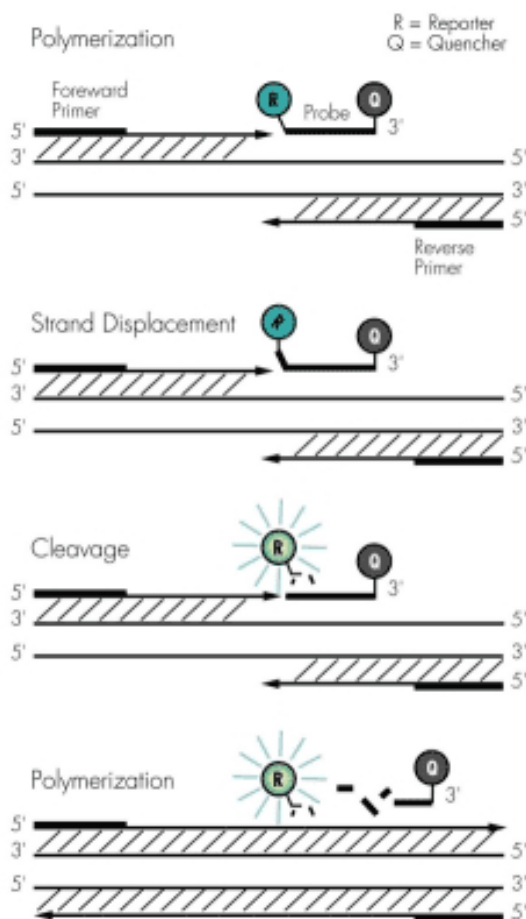
Μετά τον καθαρισμό, ξαναφωτομετρούμε και συγκρίνουμε τις απορροφήσεις πριν και μετά για να επιβεβαιώσουμε ότι τα δείγματα απαλλάχτηκαν από τυχόν προσμίξεις.

4.2.7.....Αλυσιδωτή.....αντίδραση.....πολυμεράσης.....σε.....πραγματικό χρόνο(Real Time PCR ή qRT-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, είναι μία αρκετά εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία χρόνια. Η εργαστηριακή αυτή τεχνική, επιτρέπει τόσο την ανίχνευση όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό είτε από ένα πληθυσμό κυττάρων (ιστός ή κυτταροκαλλιέργεια) είτε και από ένα μόνο κύτταρο. Σε πραγματικό χρόνο, εφαρμόζεται συνήθως για να καθοριστεί η έκφραση mRNA ενός γονιδίου και τα επίπεδα έκφρασης του (αριθμός αντιγράφων mRNA) στα διάφορα κύτταρα. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε δείγματα ασθενών μέσω της σύγκρισης των κανονικών δειγμάτων (δείγματα ελέγχου) δίνοντάς μας πληροφορίες για τις αλλαγές έκφρασης τους που προκαλούνται από ενδεχόμενη παθογένεση. Ένα ισχυρό πλεονέκτημα της σε σχέση με τις παραδοσιακές τεχνικές PCR είναι η δυνατότητα μέτρησης της κινητικής της αντίδρασης στα πρώτα στάδια της αντίδρασης και όχι στο τελικό στάδιο της αντίδρασης όπως γίνεται με τις υπόλοιπες. Γι' αυτό το λόγο έχει και πολλές διαγνωστικές και εργαστηριακές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα την ανίχνευση γονιδίων σχετικών με διάφορες ασθένειες, όπως ο καρκίνος.

Σε αρχικό στάδιο, το προϊόν της PCR δεν είναι ανιχνεύσιμο εφόσον βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα όμως στη πορεία ακολουθώντας μια εκθετική αύξηση παρατηρούμε ότι η ποσότητά του διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Βασική προϋπόθεση

είναι ένα ζεύγος εκκινητών (primers) που είναι συμπληρωματικοί προς μια καθορισμένη αλληλουχία σε κάθε ένα από τα δύο σκέλη του DNA. Στη μέθοδο που εφαρμόσαμε, χρησιμοποιήθηκε επίσης και μια φθορίζουσα ουσία, η SYBR® Green, η οποία έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται σε double-stranded DNA και όχι σε single-stranded DNA και να φθορίζει, διευκολύνοντας τη παρακολούθηση της αντίδρασης. Επίσης, βοηθάει και στην ποσοτικοποίηση της αντίδρασης καθώς συσσωρεύεται σε κάθε κύκλο ενίσχυσης. Βέβαια, ένα μειονέκτημα χρήσης της, είναι το γεγονός ότι η χρωστική δεσμεύεται τόσο σε ειδικά όσο και σε μη-ειδικά προϊόντα, τα οποία δίνουν σήμα. Ένα γενικό πλάνο της μεθόδου, φαίνεται στο παρακάτω σχήμα :



Σχήμα 4.2.7.1: Συνοπτικά στάδια της μεθόδου qPCR-RT
(http://www.iba-go.com/naps/naps_p_rg_real.html)

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

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

Πίνακας 3: Απαιτούμενες ποσότητες αντιδραστηρίων για PCR-RT

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

Πίνακας 4: Συνθήκες αντίδρασης

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

Οι primers (εκκινητές), που χρησιμοποιήθηκαν στη PCR-RT είναι των αποαδενυλασών CNOT6, CNOT6L και PARNL των οποίων οι αλληλουχίες είναι οι εξής:

Πίνακας 5 : Sequences of the primers (αλληλουχίες των εκκινητών)

Αποαδενυλάση	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος, bp
CNOT6	LP TTGCCAAGCTTCACAATCTG RP CCGTCTTGTTCATCTGGTT	236
CNOT6L	LP TGGAAGCTCAGAAGGGAGAA RP CTGAAGGGATGTGAGGGTGT	224
PARNL	LP GACCCCTCCCAGAAAGCTAC RP GGGGCACTTTGTCTCAACAT	236

*** FP: Forward Primer, RP: Reverse Primer**

Στην εργασία αυτή, ασχοληθήκαμε με δείγματα ατόμων που πάσχουν από οξεία λευχαιμία και καρκίνο του πνεύμονα, τα οποία ελήφθησαν σε συνεργασία με το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Πιο συγκεκριμένα, 30 δείγματα από κύτταρα από μυελό των οστών επεξεργάστηκαν με τη τεχνική της qPCR-RT από τα οποία τα 10 δείγματα προέρχονται από φυσιολογικά (υγιή) άτομα και τα υπόλοιπα 20, από ασθενείς με οξεία λευχαιμία. Επίσης, επεξεργαστήκαμε 3 δείγματα από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και 3 δείγματα από φυσιολογικούς από ορούς και αντίστοιχα κύτταρα από μυελό των οστών με τη μέθοδο της Western blot.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

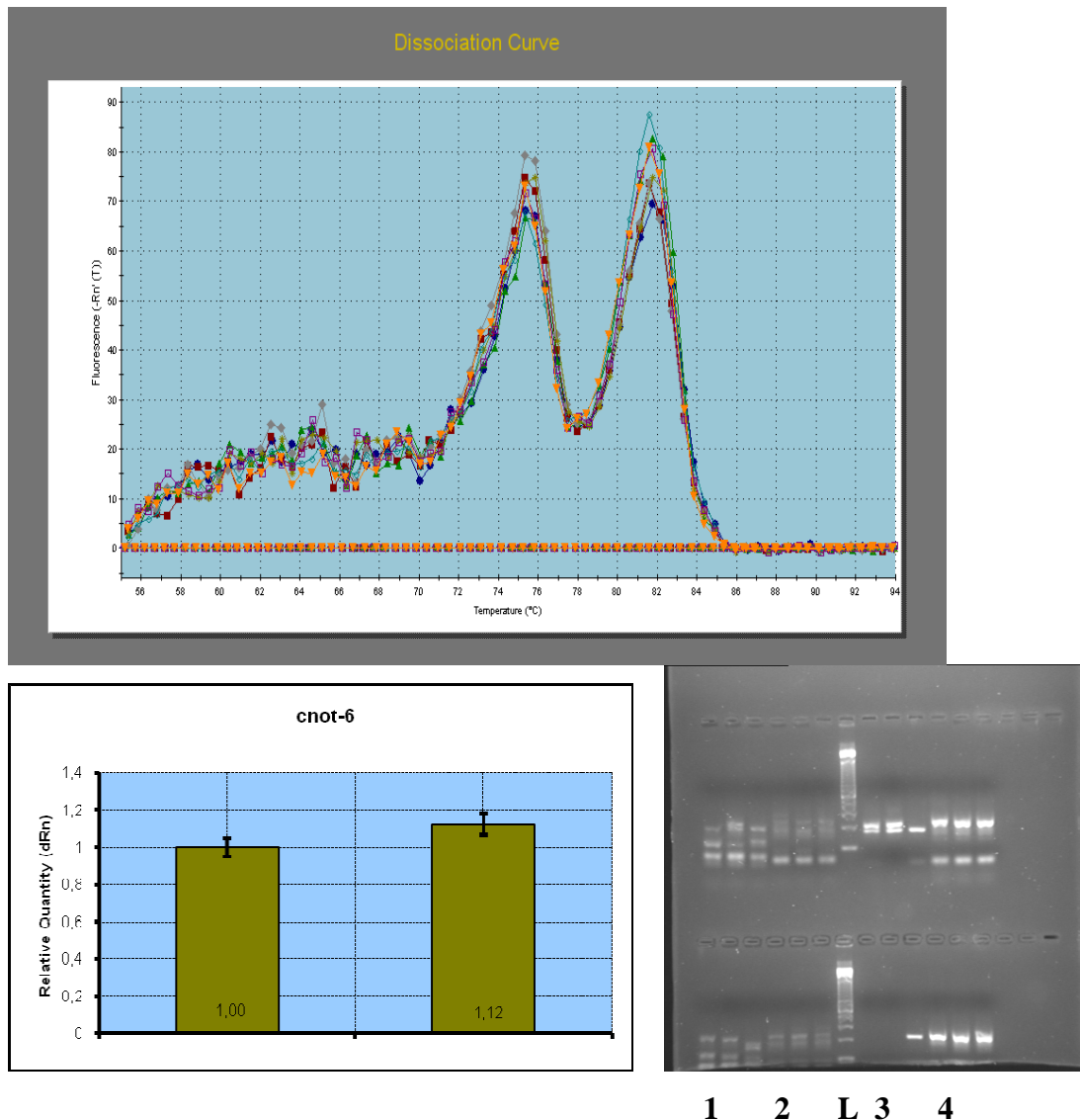
5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ WESTERN BLOT

Αρχικά, επεξεργαστήκαμε ορούς και κύτταρα από μυελό των οστών από τρία άτομα που πάσχουν από καρκίνο του πνεύμονα και τρία φυσιολογικά με την αποαδενύλαση PARN. Κατακρημνίσαμε τις πρωτεΐνες τους, εφαρμόσαμε τη μέθοδο της Western Blot και στην συνέχεια, ανιχνεύσαμε το σήμα. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν μια αύξηση των επιπέδων της PARN στους ασθενείς απ' ότι στους φυσιολογικούς αλλά η γενική εικόνα που είχαμε δεν ήταν αρκετά ξεκάθαρη, ώστε να την συμπεριλάβουμε στην παρούσα εργασία. Βέβαια, τα στοιχεία που είχαμε ήταν αρκετά ενθαρρυντικά αλλά απαιτούν περισσότερη μελέτη για να ελέγξουμε εάν η διαφορά που είχαμε στα επίπεδα της PARN σε άτομα με χρόνια και οξεία λευχαιμία ισχύει και σε άλλες μορφές καρκίνου ή και ακόμη αν συμβαίνει το ίδιο φαινόμενο και με τις υπόλοιπες αποαδενυλάσες.

5.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ qPCR-RT

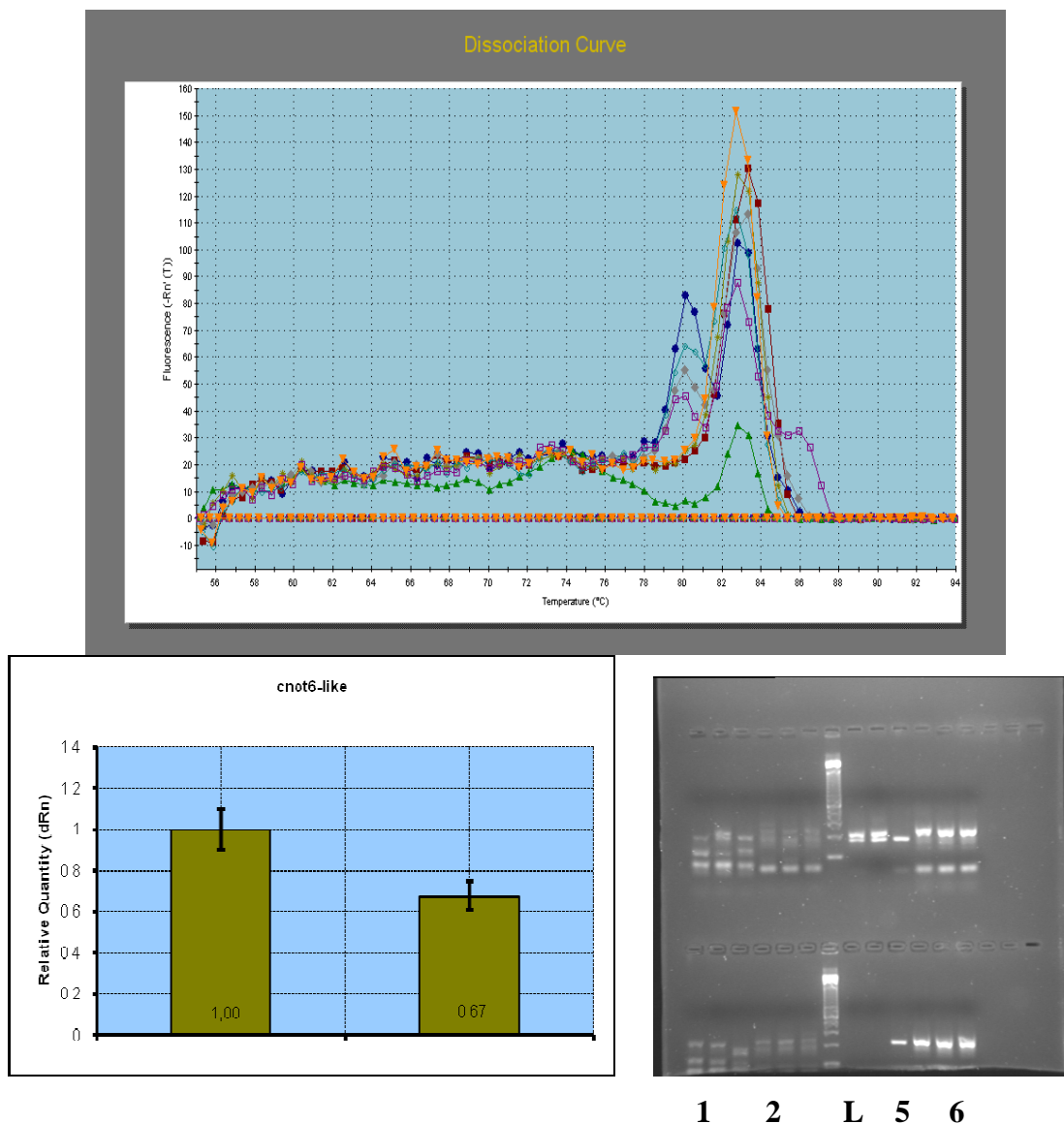
Όπως αναφέραμε και στη παραπάνω ενότητα, επεξεργαστήκαμε με τη μέθοδο της PCR-RT συνολικά 30 δείγματα ατόμων από κύτταρα του μυελού των οστών, εκ των οποίων τα 10 δείγματα είναι μη παθολογικά και τα υπόλοιπα 20 δείγματα προέρχονται από ασθενείς με οξεία λευχαιμία. Με το κατάλληλο πρωτόκολλο, έγινε εξαγωγή του RNA από τα κύτταρα, ύστερα ακολούθησε μετατροπή του σε cDNA, καθώς σε αυτή τη μορφή διαρκεί περισσότερο και μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί για ανάλυση πολλές φορές και τέλος, προσθέτοντας και τα κατάλληλα αντιδραστήρια τοποθετήσαμε τα δείγματα μας για ανάλυση στο μηχάνημα της PCR-RT. Επεξεργαστήκαμε τις αποαδενυλάσες CNOT6, CNOT6L και PARNL και τα αποτελέσματά μας είναι τα εξής :

Αποαδενυλάση CNOT6



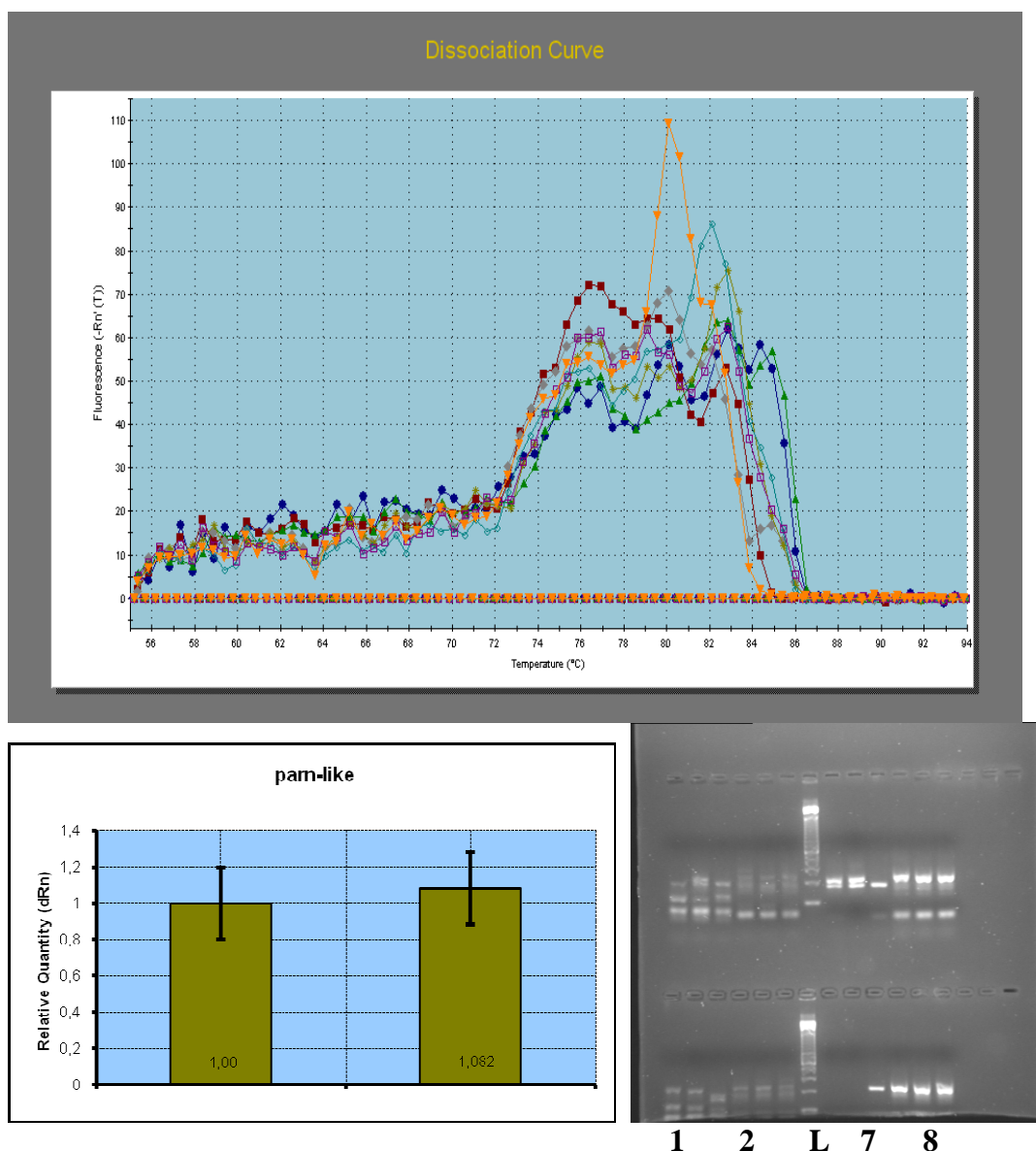
Εικόνα 5.2.1 : Επίπεδα έκφρασης CNOT6 σε δείγματα μυελού των οστών από φυσιολογικά άτομα και ασθενείς με λευχαιμία : α) Διάγραμμα διάστασης (dissociation plot) :Επίπεδα mRNA της CNOT6 (επίπεδα φθορισμού με χρωστική SYBR Green) συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Τα ειδικά προϊόντα της RT-PCR αναμένονται σε $T_m > 80^{\circ}\text{C}$, β) Ραβδόγραμμα που δείχνει τα επίπεδα mRNA της CNOT6 σε μη παθολογικούς (πρώτη στήλη) και σε ασθενείς (δεύτερη στήλη), γ) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της qPCR-RT, σε πήκτωμα αγαρόζης 2% , όπου στην πάνω σειρά φορτώσαμε τους φυσιολογικούς και στην κάτω σειρά, τους ασθενείς. Ο δείκτης μοριακών μαζών (L), κυμαίνεται από 100 έως 600bp (ζεύγη βάσεων), ενώ τα προϊόντα της CNOT6 παρατηρούνται στις 236bp. Τα υπόλοιπα είναι διάφορα παραπροϊόντα (όπως διμερή,κ.λ.π).

Αποαδενύλαση CNOT6L



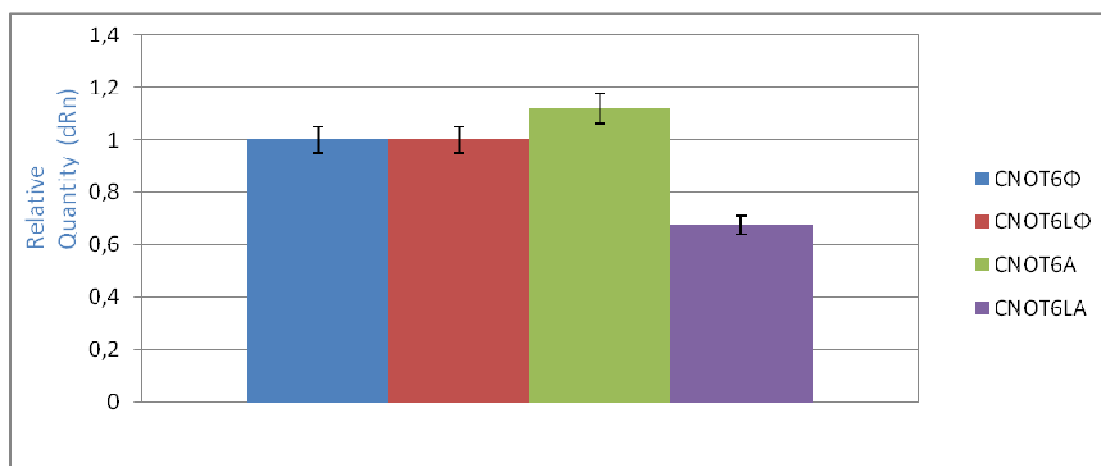
Εικόνα 5.2.2: Επίπεδα έκφρασης CNOT6L σε δείγματα μυελού των οστών από φυσιολογικά άτομα και ασθενείς με λευχαιμία : α) Διάγραμμα διάστασης (dissociation plot) :Επίπεδα mRNA της CNOT6L (επίπεδα φθορισμού με χρωστική SYBR Green) συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Τα ειδικά προϊόντα της RT-PCR αναμένονται σε $T_m > 80^{\circ}\text{C}$, β) Ραβδόγραμμα που δείχνει τα επίπεδα mRNA της CNOT6L σε μη παθολογικούς (πρώτη στήλη) και σε ασθενείς (δεύτερη στήλη), γ) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της qPCR-RT, σε πήκτωμα αγαρόζης 2% , όπου στην πάνω σειρά φορτώσαμε τους φυσιολογικούς και στην κάτω σειρά, τους ασθενείς. Ο δείκτης μοριακών μαζών (L), κυμαίνεται από 100 έως 600bp (ζεύγη βάσεων), ενώ τα προϊόντα της CNOT6L παρατηρούνται στις 224bp. Τα υπόλοιπα είναι διάφορα παραπροϊόντα (όπως διμερή, κ.λ.π).

Αποαδενύλαση PARNL

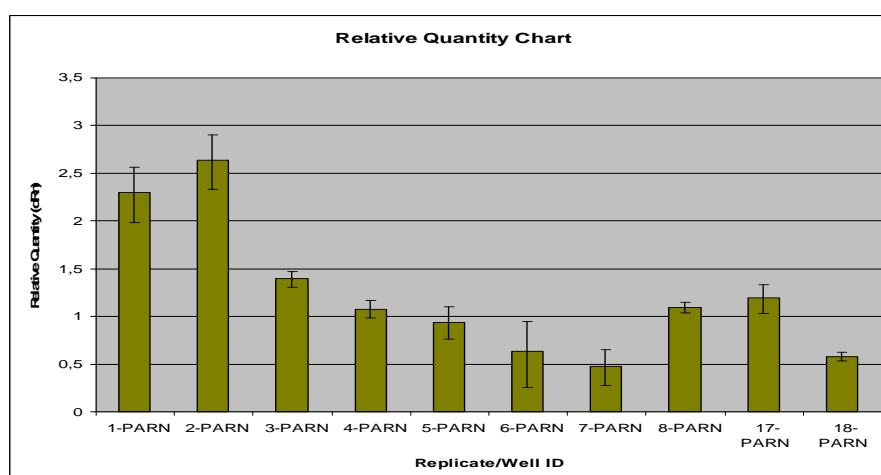


Εικόνα 5.2.3: Επίπεδα έκφρασης PARNL σε δείγματα μυελού των οστών από φυσιολογικά άτομα και ασθενείς με λευχαιμία : α) Διάγραμμα διάστασης (dissociation plot) :Επίπεδα mRNA της PARNL (επίπεδα φθορισμού με χρωστική SYBR Green) συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Τα ειδικά προϊόντα της RT-PCR αναμένονται σε $T_m > 80^{\circ}\text{C}$, β) Ραβδόγραμμα που δείχνει τα επίπεδα mRNA της PARNL σε μη παθολογικούς (πρώτη στήλη) και σε ασθενείς (δεύτερη στήλη), γ) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της qPCR-RT, σε πήκτωμα αγαρόζης 2% , όπου στην πάνω σειρά φορτώσαμε τους φυσιολογικούς και στην κάτω σειρά, τους ασθενείς. Ο δείκτης μοριακών μαζών (L), κυμαίνεται από 100 έως 600bp (ζεύγη βάσεων), ενώ τα προϊόντα της PARNL παρατηρούνται στις 236bp. Τα υπόλοιπα είναι διάφορα παραπροϊόντα (όπως διμερή, κ.λ.π).

Ακολούθως, έχουμε σχεδιάσει τα συγκεντρωτικά διαγράμματα των επιπέδων της CNOT6 και της CNOT6L:

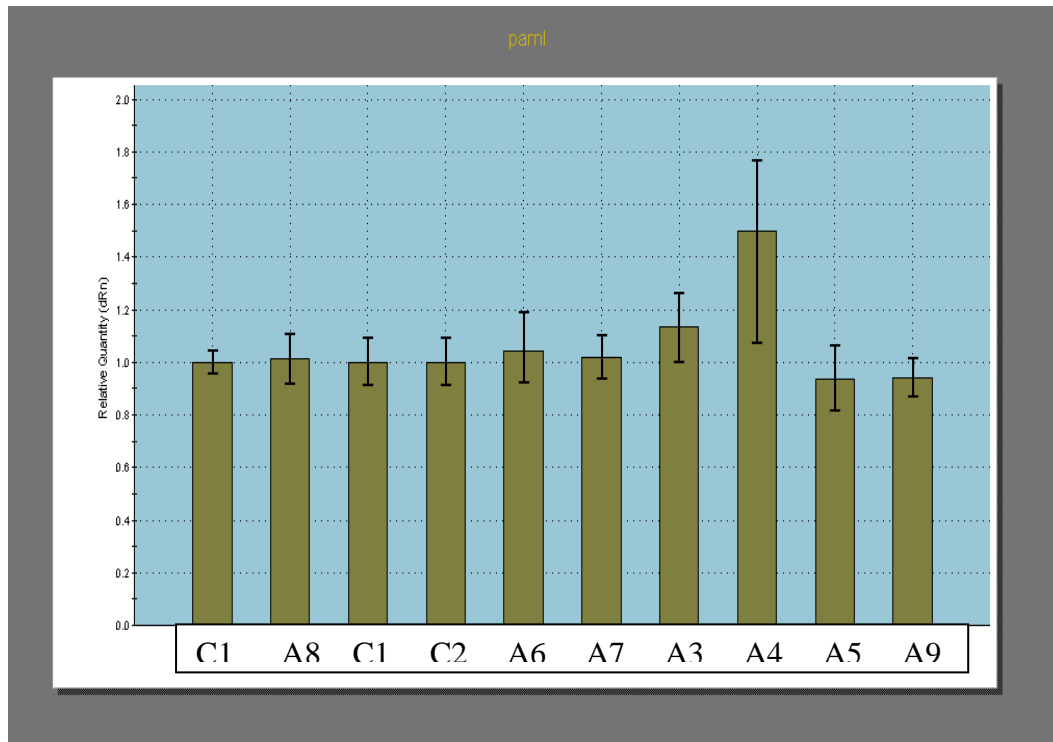


Εικόνα 5.2.4 : Επίπεδα της CNOT6 και της CNOT6L σε δείγματα μυελού των οστών από άτομα με οξεία λευχαιμία (Α) και σε μη παθολογικά δείγματα (Φ).



Εικόνα 5.2.5: Σχετικά επίπεδα έκφρασης mRNA της PARN σε άτομα με λευχαιμία με ασθενείς στις στήλες 1,2,3,4,5,8,17 και μάρτυρες στις στήλες 6,7,18.

Τα αντίστοιχα επίπεδα της PARNL που επεξεργαστήκαμε είναι:



Εικόνα 5.2.6 : Σχετικά επίπεδα mRNA της PARNL σε ασθενείς με οξεία λευχαιμία (A) και μη παθολογικά άτομα (C).

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

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

Η έκφραση των αποαδενυλασών και οι ρυθμιστές τους, υπαγορεύουν πού και πότε μπορεί να γίνουν αυτές οι μεταβολές. Για παράδειγμα, η nocturnin είναι ρυθμική πιθανώς μέσω καρδιακού ελέγχου (*Green et al., 2007*) ενώ άλλες αποαδενυλάσες όπως διάφορα μέλη των οικογενειών POP2 & CCR4 εκφράζονται ευρέως (*Morita et al., 2007; Prevot et al., 2001*). Κάτω από διάφορες συνθήκες stress, όπως υπερϊώδης ακτινοβολία, ωσμωτικό σοκ ή έλλειψη γλυκόζης, η διαδικασία της αποαδενυλίωσης γρήγορα αναστέλλεται μέσω ενός μηχανισμού που ακόμη δεν έχει διερευνηθεί πλήρως (*Gowrishankar, et al., 2006; Hilgers, et al., 2006; Bonisch, et al., 2007*).

Ένα στοιχείο σταθερότητας του mRNA, είναι η πολυ(A) ουρά της οποίας η παρουσία καθορίζει τον χρόνο ζωής του (*Scorilas et al., 2000*) και γι' αυτό το λόγο κρίνεται απαραίτητη η διερεύνηση του τρόπου λειτουργίας της αλλά και των παραγόντων που την επηρεάζουν. Η παρακολούθηση των ειδικών ενζύμων που επιτελούν την αποαδενυλίωση, γνωστά ως αποαδενυλάσες, μπορεί να μας δώσει περισσότερες πληροφορίες για τους μηχανισμούς αποικοδόμησης του mRNA, για τις συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιούνται και ακόμη, τις συνέπειες της γρήγορης αποσύνθεσης του mRNA.

Στη συγκεκριμένη εργασία, ερευνήσαμε τα επίπεδα των mRNAs σε φυσιολογικά άτομα και άτομα που πάσχουν από οξεία λευχαιμία χρησιμοποιώντας τις αποαδενυλάσες CNOT6, CNOT6L και PARNL με τη τεχνική της qPCR-RT. Στους πίνακες 5.2.1, 5.2.2, 5.2.3 φαίνονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης μας. Στην εικόνα 5.2.1, έχουμε το διάγραμμα διάστασης από τη CNOT6, το ραβδόγραμμα που δείχνει τα επίπεδα της σε φυσιολογικούς και ασθενείς και το gel αγαρόζης που ηλεκτροφορήσαμε τα προϊόντα της PCR-RT. Παρατηρούμε ότι τα επίπεδα της CNOT6 είναι αυξημένα σε ασθενείς σε σχέση με τα αντίστοιχα των φυσιολογικών ατόμων. Στην εικόνα 5.2.2, βλέπουμε τα αντίστοιχα διαγράμματα της αποαδενυλάσης CNOT6L, της οποίας τα επίπεδα εμφανίζονται μειωμένα στους ασθενείς σε αντίθεση

με αυτά των φυσιολογικών και στην τρίτη εικόνα 5.2.3 από τα διαγράμματα από επεξεργασία με την PARNL, φαίνεται να υπάρχει μια μικρή αύξηση των επιπέδων της στους ασθενείς σε σχέση με τους φυσιολογικούς. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν είναι πολύ ενδιαφέροντα και ιδιαιτέρως ενθαρρυντικά.

Γνωρίζουμε ότι η αποαδενυλάση CNOT6 σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με την αποαδενυλάση CNOT7 και η τελευταία έχει βρεθεί ότι προωθεί την ανάπτυξη καρκίνου στο στήθος (*Aslam et al., 2009*). Τα στοιχεία αυτά είναι πολύ σημαντικά, καθώς η αυξημένη παρουσία τους στον ανθρώπινο οργανισμό θα μπορούσε να αποτελέσει ένδειξη ότι το συγκεκριμένο άτομο δύναται να εμφανίσει καρκίνο.

Η CNOT6L, βρέθηκε να είναι σε χαμηλότερα επίπεδα από την CNOT6 όπως μπορούμε να δούμε στο συγκριτικό διάγραμμα 5.2.4. Από διάφορες μελέτες που έχουν γίνει με τις δύο αυτές αποαδενυλάσες, η CNOT6L δεν βρέθηκε να είναι μαζί με την CNOT6, αποδεικνύοντας ότι πρόκειται για δύο ξεχωριστές αποαδενυλάσες με διαφορετικές ενζυμικές δράσεις παρά τις όποιες δομικές ομοιότητες παρουσιάζουν, όπως το γεγονός ότι η CNOT6L επηρεάζει την ανάπτυξη των κυττάρων ενώ κάτι τέτοιο δεν ισχύει για την CNOT6 (*Lau et al., 2009*). Αυτό ακριβώς αποδεικνύουν και τα αποτελέσματα που πήραμε και μάλιστα φαίνεται τα επίπεδα τους να αυξομειώνονται αντιστρόφως ανάλογα παρουσιάζοντας μια αλληλοεξάρτηση μεταξύ τους. Αυτό είναι ένα πρώτο στοιχείο ότι υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ τους που φυσικά χρειάζεται περισσότερη έρευνα για τον ακριβή τρόπο αλληλεπίδρασης των δύο αυτών αποαδενυλασών.

Στη συνέχεια, βλέπουμε από το διάγραμμα της PARNL ότι τα επίπεδα της αυξάνονται στα άτομα με οξεία λευχαιμία απ' ότι στα φυσιολογικά άτομα, με παρόμοιο τρόπο όπως βλέπουμε και στο διάγραμμα της PARN. Παρατηρούμε ότι και αυτές οι αποαδενυλάσες παρουσιάζουν μια ανάλογη αύξηση των επιπέδων τους και μάλιστα διαφορετική από τις υπομονάδες του συμπλόκου CCR4, που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση για τον ακριβή μηχανισμό του τρόπου δράσης τους.

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματά μας, η CNOT6 όπως και η αποαδενυλάση PARN ήταν σε μεγαλύτερο ποσοστό στους ασθενείς απ' ότι στους υγιείς, στοιχείο που θα μπορούσε μελλοντικά να χρησιμοποιήσουμε για να έχουμε ένα καλό και αξιόπιστο προγνωστικό καρκινικό δείκτη για διάφορες μορφές καρκίνου. Επίσης, η διαδικασία της αποαδενυλίωσης του mRNA αποδεικνύεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου, αφού βλέπουμε να επιταχύνεται σε τέτοιες καταστάσεις. Ακριβώς, γι' αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η

περαιτέρω έρευνα των μηχανισμών αποδενυλίωσης, των συνθηκών που πραγματοποιούνται όπως και των παραγόντων που τους επηρεάζουν.

Επιπλέον, αποκτήσαμε μια πρώτη εικόνα του τρόπου δράσης αυτών των ενζύμων και εάν σχετίζονται ή όχι με τα ομόλογά τους, δηλαδή η CNOT6 με την CNOT6L και η PARN με την PARNL. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι πράγματι υπάρχει μια ισχυρή εξάρτηση ανάμεσά τους και ότι τα επίπεδα τους ποικίλουν με την παρουσία του ομολόγου τους ή όχι σε ασθενείς. Αυτό είναι ένα πολύ σημαντικό συμπέρασμα που όμως απαιτεί περισσότερη μελέτη αυτών των αποαδενυλασών. Το μόνο σίγουρο είναι ότι η αποαδενυλιωτική ικανότητα του συμπλέγματος CCR4-NOT και των υπομονάδων του, εμπλέκεται άμεσα στην εμφάνιση καρκινικών κυττάρων και κρίνεται απαραίτητη η διερεύνηση των παραγόντων που το ρυθμίζουν και της μελέτης των διαφορετικών υπομονάδων του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abaza I., Cebauer F., Trading translation with RNA-binding proteins. *RNA* 14: 404–409 (2008)
- 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 A. Mittal S., Koch F., Andrau JC and. Winkler G. S., The Ccr4-NOT deadenylase subunits CNOT7 and CNOT8 have overlapping roles and modulate cell proliferation. *MBoc*, Vol.20, Issue 17, 3840-3850 (2009)
- Bartel, D. P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297 (2004)
- Bartel, DP., 'MicroRNAs: target recognition and regulatory functions' *Cell* **136** (2): 215–33 (2009)
- Barreau C., Paillard L. and Osborne H. B., AU- rich elements and associated factors: are there unifying principles?. *Nucleic Acids Res* **33** (22): 7138–7150 (2006)
- Bianchin, C., Mauxion, F., Sentis, S., Seraphin, B., and Corbo, L., Conservation of the deadenylase activity of proteins of the Caf1 family in human. *RNA* 11, 487–494 (2005)
- Bonisch, C., Temme, C., Moritz, B. & Wahle, E., Degradation of *hsp 70* and other mRNAs in *Drosophila* via the 5' → 3' pathway and its regulation by heat shock. *J. Biol. Chem.* 282, 21818-21828 (2007)
- Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B., and Cohen, S. M. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 113, 25-36 (2003)
- Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F., and Bartel, D. P., MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303, 83-86 (2004)

- Chen, C.Y. et al., AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451–464 (2001)
- Chen, C.Y. & Shyu, A.B., Rapid deadenylation triggered by a nonsense codon precedes decay of the RNA body in a mammalian cytoplasmic nonsense mediated decay pathway. *Mol. Cell Biol.* 23 4805-4813 (2003)
- Clark A., Dean J., Tudor C., Saklatvala J., Post-transcriptional gene regulation by MAP kinases via AU-rich elements. *Front Biosci.* 14: 847-71 (2009)
- Clark, L. B., Viswanathan, P., Quigley, G., Chiang, Y. C., McMahon, J. S., Yao, G., Chen, J., Nelsbach, A., and Denis, C. L., Systematic mutagenesis of the leucine-rich repeat (LRR) domain of CCR4 reveals specific sites for binding to CAF1 and a separate critical role for the LRR in CCR4 deadenylase activity. *J. Biol. Chem* 279, 13616–13623 (2004)
- Cohen P., Peehl M.D., Lamson G., Rosenfeld G. R., Insulin-like growth factors (IGFS), IGF receptors and IGF-binding proteins in primary cultures of prostate epithelial cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol.73 No.2 401-407 (1991)
- Cuellar, T. L., and McManus, M. T., MicroRNAs and endocrine biology. *J Endocrinol* 187, 327-332 (2005)
- D'Alessio G and Riordan JF, Ribonucleases: Structures and Functions, Academic Press (1997)
- Daugeron MC, Mauxion F, Séraphin B., The yeast PoP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Res* 29, 2448–2455 (2001)
- Dodson, R.E. & Shapiro, D.J., Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72: 129–164 (2002)
- Doma MK, Chapter 1. Methods to study no-go mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymo.* 449;3-21 (2008)
- Dupressoir A, Morel AP, Barbot W, Loireau MP, Corbo L, Heidmann T. Identification of four families of yCCR4- and Mg²⁺-dependent endonuclease-related proteins in higher eukaryotes, and characterization of orthologs of yCCR4 with a conserved leucine-rich repeat essential for hCAF1/hPOP2 binding. *BMC Genomics* 2, 9 (2001)
- Frischmeyer, P.A. et al., An mRNA surveillance mechanism that eliminates tran-

- scripts lacking termination codons. *Science* 295: 2258–2261 (2002)
- Gao, D. & Parker, R., Computational modeling and experimental analysis of nonsense-mediated decay in yeast. *Cell* 113: 533–545 (2003)
 - Garapaty, S. R., Mahajan, M. A., and Samuels, H.H, Components of the CCR4-not complex function as nuclear hormone receptor coactivators via association with the NRC interacting factor, NIF-1. *J. Biol. Chem* 283, 6806–6816 (2008)
 - Garneau, N., Wilusz, J. & Wilusz, C., The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 113–126 (2007)
 - Gerdes K, Christensen SK and Lobner-Olesen A., *Nat. Rev. Microbiol.* (3): 371–382 (2005)
 - Goldstrohm & Wickens, Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature Publishing Group Vol 9*:337-344 (2008).
 - Gowrishankar G., et al., Inhibition of mRNA deadenylation and degradation by different types of cell stress. *Biol. Chem.* 387 323-327 (2006)
 - Graff JR, Zimmer SG, Translational control and metastatic progression : enhanced activity of the mRNA cap-binding protein eIF-4E selectively enhances translation of metastasis-related mRNAs. *Clin.Exp.Metastasis* 20 (3) 265-73 (2003)
 - Green C.B. et al., Loss of nocturnin, a circadian deadenylase, confers resistance to hepatic steatosis and diet-induced obesity. *Proc.Natl Acad Sci. USA* 104, 9888-9893 (2007)
 - Guhaniyogi I, J.Breuer G, Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* 265 11-23 (2001)
 - Hammet, A., Pike, B.L. & Heierhorst, J., Posttranscriptional regulation of the RAD5 DNA repair gene by the dun1 kinase and the Pan2-Pan3 poly(A)-nuclease complex contributes to survival of replication blocks. *J. Biol. Chem.* 277: 22469–22474 (2002)
 - Hentze MW, Kühn LC, Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (16) 8175-82 (1996)
 - Harfe, B. D., McManus, M. T., Mansfield, J. H., Hornstein, E., and Tabin, C. J., The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not

- patterning of the vertebrate limb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10898-10903 (2005)
- Hilgrees, V., Teixeira, D.& Parker, R., Translation-independent inhibition of mRNA deadenylation during stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 12, 1835-1845 (2006)
 - Holzmann J. , Frank P., Löffler E., Bennett K., Gerner C.and Rossmann W., *Cell*, 135 : 462–474 (2008)
 - 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)
 - Kadyrova, L. Y., Habara, Y., Lee, T. H., & Wharton, R. P., Translational control of maternal cyclin B mRNA by nanos in the *Drosophila* germline. *Development* 134: 1519–1527 (2007)
 - Kim Wan-Cheol, Lee Chow H., Elsevier, *Biochimica et Biophysica Acta* 1796 : 99-113 (2009)
 - Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A., and Tuschl, T., New microRNAs from mouse and human. *Rna* 9, 175-179 (2003)
 - Lai W.S., Kennington E.A., Blackshear P.J., *Mol Cell Biol* 23: 3798–3812 (2005)
 - Lau Nga-Chi, Kolkman Annemieke, Van Schaik Frederik M.A., Mulder Klaas W., Pijnappel W.W. M. Pim, Heck Albert J.R. and Timmers H.Th. Marc, Human Ccr4-Not complexes contain variable deadenylase subunits. *Biochem J* VOL 422:443-453 (2009)
 - Leujene F., Li, X.& Maquat L.E., Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating and exonucleolytic activities. *Mol.Cell* 12 675-687 (2003)
 - Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S., and Johnson, J.M., Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769-773 (2005)
 - 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)

- Mitchell, P. & Tollervey, D., An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol. Cell* (2003).
- Melo O.E., Dhalia R., Martins de Saz C., Standart N., Neto de melo O.P., Identification of a C-terminal Poly(A)-binding Protein(PABP) interaction Domain: Role in cooperative binding to poly(A) and efficient cap distal translational repression. *J. Biol. Chem.* 278: 46357-46368. (2003)
- Meyer, S., Temme, C. & Wahle, E., Messenger RNA Turnover in Eukaryotes: Pathways and Enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 39:197–216 (2004)
- Mitchell, P. & Tollervey. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13,320–325 (2001)
- Morita Masahiro, Ito Kentaro, Suzuki Toru and Yamamoto Tadashi, Involvement of the CCR4-NOT Deadenylase Complex in the Control of Cell Growth. *Systems Biology*, III, 229-237, DOI: 10.1007/978-4-431-87704-2_24 (2009)
- Muhlrads, D. & Parker, R., Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370: 578–581 (1994)
- Mukherjee, D. et al., The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.* 21: 165–174 (2002)
- Nelson DL, Cox MM Lehninger, Principles of Biochemistry. 2nd edition, chapter 8, Freeman (2008)
- Ohnishi H., Nishida T., Yoshida A., Kamio Y. and Izaki K., Nucleotide sequence of pnl gene from *Erwinia carotovora* Er. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 176, Issue 1 Pages 321-327 (2004)
- Pangalis, G. A., Trangas T., Roussou P. A., Tsiapalis C. M., *Acta Haematol.*, 74: 31–34 (1985)
- Parker, R.; Sheth, U., P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Molecular Cell* 25 (5): 635–646 (2007)
- Pickering BM and Willis, The implications of structured 5'untranslated regions on translation and disease. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, Volume 16, Issue 1, Pages: 39-47 (2005)
- Poy, M. N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., Macdonald, P. E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P., and Stoffel, M., A

- pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432, 226-230 (2004)
- Prevot D., Morel A. P., Voeltzel T., Rostan M. C., Rimokh R., Magaud J. P., Corbo L., Relationships of the antiproliferative proteins BTG1 and BTG2 with CAF1, the human homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional complex: involvement in estrogen receptor alpha signaling pathway. *J. Biol. Chem.*;276: 9640–9648 (2001)
 - Proudfoot N.J., Fuger A., Dye MS, Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*, Volume 8, Issue 4 501-512 (2002)
 - Ramsingh G, Koboldt DC, Trissal M, Chiappinelli KB, Wylie T, Koul S, Chang LW, Nagarajan R, Fehniger TA, Goodfellow P, Magrini V, Wilson RK, Ding L, Ley TG, Mardis ER, Link DC, Complete characterization of the microRNAome in a patient with acute myeloid leucemia. *Blood (προς δημοσίευση)* (2010)
 - Ross J., mRNA Stability in Mammalian Cells. *Microbiol. Rev.*, American society for Microbiology, vol. 59 : 423-450 (1995)
 - Rudolph et al. *Anal Biochem* 269 : 66-71 (1999)
 - Sachs, A., and Wahle, E., *J. Biol. Chem.*, 268: 22955–22958 (1993).
 - Sasaki R., Minowada J., Bollum F. J., and Miura Y., Polyadenylic acid polymerase activity in chronic myelogenous leucemia. *Leuk. Res.*,14: 273–278 (1990).
 - Scorilas A, Talieri M, Ardavanis A, Courtis N., Dimitriadis E., Yotis J., Milton C., Trangas T., *Cancer Research* 60 : 5427–5433 (2000)
 - Shaw G, Kamen R, A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46 (5): 659–67 (1986)
 - 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., *Annu. Rev. Biochem.* 69, 571–595 (2000).,
 - Van Hoof, A. & Parker, R., The exosome: a proteasome for RNA?. *Cell* (1999)
 - Viswanathan, P., Ohn, T., Chiang, Y. C., Chen, J., and Denis, C. L., Mouse CAF1 can function as a processive deadenylase/3'-5'-exonuclease in vitro but

in yeast the deadenylase function of CAF1 is not required for mRNA poly(A) removal. *J. Biol. Chem* 279, 23988–23995 (2004)

- Wang, Z. & Kiledjian, M., Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* 107: 751–762 (2001)
- Wang Hui, Morita Masahiro, Yang Xiuna, Suzuki Toru, Yang Wen, Wang Jiao, Ito Kentaro, Wang Quan, Zhao Cong, Bartlam Mark, Yamamoto Tadashi and Rao Zihe, Crystal structure of the human CNOT6L nuclease domain reveals strict poly(A) substrate specificity. *The EMBO Journal* 29, 2566 – 2576 (2010)
- Wilfred, B. R., Wang, W. X., and Nelson, P. T., Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol Genet Metab.* 91, 209-217 (2007)
- Wu M.et al., *EMBO J.*, 1-12 (2005)