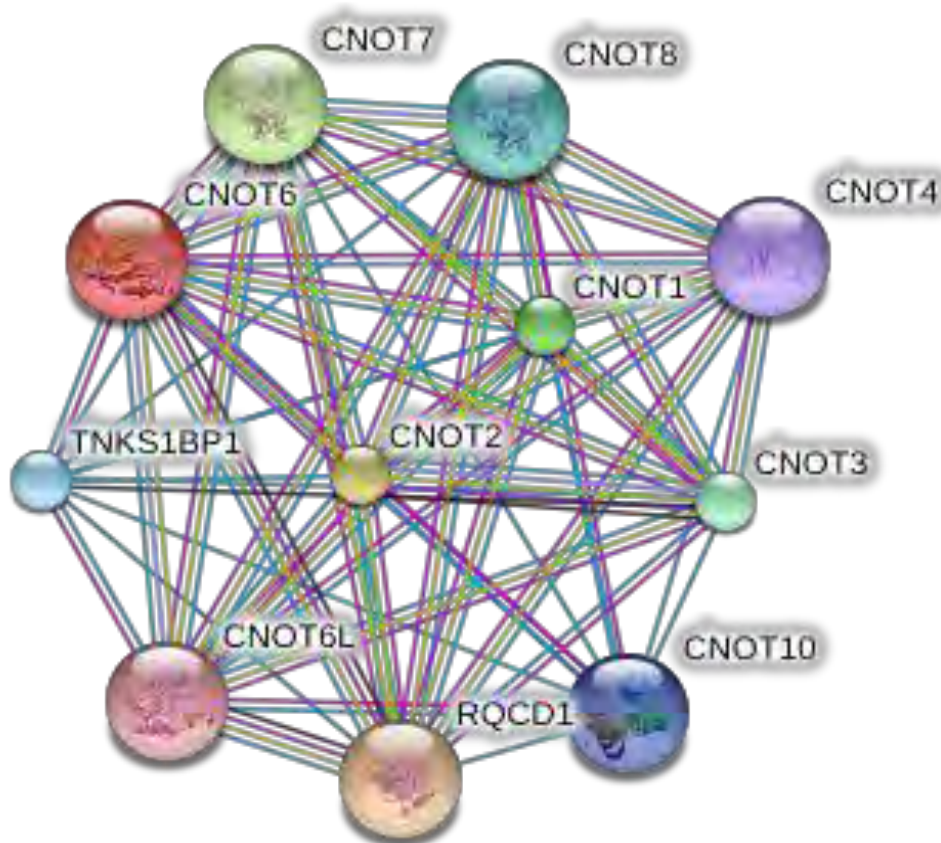




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ
ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΧΑΤΖΗΛΕΟΝΤΙΑΔΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΩΝ CNOT6
ΚΑΙ CNOT8 ΜΕ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ RNAi»**



ΛΑΡΙΣΑ, 2011

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΩΝ CNOT6
ΚΑΙ CNOT8 ΜΕ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ RNAi

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Μπαλατσός Νικόλαος, Λέκτορας Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (επιβλέπων),

Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,

Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας – Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Εικόνα εξωφύλλου: Αλληλεπιδράσεις των υπομονάδων του συμπλόκου CCR4-NOT - String Database (String 9.0).

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

Ευχαριστίες,

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων οι υποδείξεις, η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για την διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Την τριμελή επιτροπή και ιδιαίτερα τον καθηγητή μου, κύριο Μπαλατσό Νικόλαο, για την αμέριστη ηθική και επιστημονική συμπαράσταση και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής εργασίας. Επίσης, τα μέλη των εργαστηρίων Λειτουργικής Βιοχημείας και Μικροβιολογίας - Ιολογίας (Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας) και ιδιαίτερα τον Παναγιώτη Μαραγκοζίδη για τη σημαντική συμβολή του στη διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και τη Σταματίνα Γιαννούλη. Οφείλω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στους διδακτορικούς φοιτητές της Μοριακής Μικροβιολογίας (Παν/κό Νοσοκομείο Λάρισας) και ιδιαίτερα στη Μαρία Λάμπρου για την άψογη συνεργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Εισαγωγή στο RNA	8
1.2 Ωρίμανση και σταθερότητα των ευκαρυωτικών mRNAs	9
1.3 Αποικοδόμηση του mRNA	13
1.3.1 Αποικοδόμηση φυσιολογικών mRNAs	13
1.3.2 Αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNAs	17
1.3.3 Σήματα που ρυθμίζουν την αποικοδόμηση του mRNA	18
1.4 Κατάταξη και δράση των αποαδενυλασών	20
1.5 Δομή και λειτουργίες του συμπλόκου CCR4-NOT	24
1.5.1 Λειτουργίες των υπομονάδων CAF1 και CCR4 στον άνθρωπο	27
1.6 Η τεχνολογία του RNA interference (RNAi)	29
2.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	32
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
3.1 Υλικά	33
3.1.1 Χημικές ουσίες	33
3.1.2 Διαλύματα	33
3.1.3 Κυτταρικές σειρές	34
3.1.4 Short-Hairpin RNAs (shRNAs)	35
3.1.5 Εκκινητές	39
3.2 Μέθοδοι	45
3.2.1 Απόψυξη κυττάρων Hep2	45
3.2.2 Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας – Τρυψινοποίηση	46
3.2.3 Κατάψυξη κυττάρων	46
3.2.4 Συλλογή και λύση κυττάρων θηλαστικών	47
3.2.5 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών	48
3.2.6 Ηλεκτροδιάτρηση δεκτικών κυττάρων DH5a (E.coli) με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 (puro-amp)	49
3.2.7 Stock γλυκερόλης	50

3.2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)	50
3.2.9 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με χρήση λιποσωμάτων (Lipofection)	52
3.2.10 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου δύο βημάτων (RT-qPCR)	53
3.2.11 DNA μικροσυστοιχίες (Microarrays)	58
4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	60
4.1 Έλεγχος της αποσιώπησης των αποαδενυλασών CNOT6 και CNOT8 με RT-qPCR	60
4.2 Επίδραση της αποσιώπησης της CNOT6 σε επιλεγμένους παράγοντες (72 ώρες μετά την αποσιώπηση)	63
4.3 Επίδραση της αποσιώπησης της CNOT8 σε επιλεγμένους παράγοντες (72 ώρες μετά την αποσιώπηση)	64
4.4 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα επίδρασης της αποσιώπησης της CNOT6 ή της CNOT8 στα επίπεδα mRNA επιλεγμένων παραγόντων	65
4.5 cDNA Microarray Analysis	67
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	76
5.1 Η επίδραση της αποσιώπησης των CNOT6 ή CNOT8 στην έκφραση των υπολοίπων αποαδενυλασών και επιλεγμένων παραγόντων	77
5.2 Η επίδραση της αποσιώπησης των CNOT6 ή CNOT8 στη γονιδιακή έκφραση	82
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	86

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs είναι η βράχυνση των πολυ(A) ουρών τους από τις αποαδενυλάσες. Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί εννέα αποαδενυλάσες. Η απάντηση στο ερώτημα γιατί να υπάρχουν τόσες αποαδενυλάσες δεν είναι σαφής. Έχει προταθεί πως ειδικές αποαδενυλάσες στοχεύουν συγκεκριμένες ομάδες mRNAs, ή πως διάφορες από αυτές δρουν στο ίδιο mRNA με επικαλυπτόμενες λειτουργίες. Για να κατανοήσουμε τη βιολογική σημασία της ύπαρξης πολλών αποαδενυλασών, επιλέγουμε να τις αποσιωπήσουμε μία προς μία και να μελετήσουμε πως μεταβάλλεται η έκφραση των υπολοίπων αποαδενυλασών, καθώς και γονιδίων που μετέχουν σε κρίσιμα κυτταρικά μονοπάτια. Στην παρούσα εργασία εστιάζομαστε στο κυριότερο σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CCR4-NOT στον άνθρωπο, αποσιωπώντας με shRNAs δύο από τις καταλυτικές του υπομονάδες, τις αποαδενυλάσες CNOT6 (CCR4a) και CNOT8 (CAF1b), σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα Hep2. Η ανάλυση με RT-qPCR αποκάλυψε πως η έκφραση των υπόλοιπων αποαδενυλασών και κυρίως της PAN2 μεταβάλλεται σημαντικά και στις δύο αποσιωπήσεις. Ανάλογες παρατηρήσεις έγιναν για τα γονίδια p53, c-MYC και AGO2, τον μεταφορέα γλυκόζης GLUT1, τον HIF-1α, την PABP και τον BTG2 που σχετίζεται με την αποαδενυλίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σημειώνεται πως οι αλλαγές της έκφρασης των παραγόντων ήταν διαφορετικές στην αποσιώπηση της CNOT6 από αυτές της CNOT8, αλλά συγκρίνοντας τις δύο καταστάσεις παρουσιάζονται κοινά πρότυπα. Επιπλέον, μέσω πειραμάτων DNA μικροσυστοιχιών μετά την αποσιώπηση της CNOT6 ή της CNOT8, προσδιορίστηκαν μεταβολές στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης, αποκαλύπτοντας νέες σχέσεις μεταξύ κυτταρικών μονοπατιών. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως οι CNOT6 και CNOT8 συμμετέχουν ενεργά στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, πιθανόν συμμετέχοντας στην αποικοδόμηση συγκεκριμένων mRNAs. Τα αποτελέσματά μας ενισχύουν την κύρια άποψη που υποστηρίζει πως οι αποαδενυλάσες δρουν ενορχηστρωμένα για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

ABSTRACT

The first and rate-limiting step in eukaryotic mRNA decay is the shortening of the poly(A) tail by deadenylases. In humans, at least nine deadenylases have been recognized so far, yet it is not clear what the advantage is to have so many enzymes catalyzing the same reaction. It is hypothesised that specific deadenylases may target unique subsets of mRNAs, or multiple deadenylases can act on the same mRNA, with discrete but overlapping functions. To understand the biological significance of the diversity of these enzymes we silence each one of them and analyse the effect on the mRNA expression of the other deadenylases, as well as of specific reporter genes that are essential to several major cellular pathways. Herein, we focus on CCR4-NOT, the major deadenylation complex in humans, and we silence two of its catalytic subunits, the deadenylases CNOT6 (CCR4a) and CNOT8 (CAF1b), using shRNAs in Hep2 cancer cells. RT-qPCR analysis revealed that CNOT6 or CNOT8 silencing altered the expression of the other deadenylases, especially that of PAN2. The silencing also affected the expression of most of the reporter genes studied, including p53, c-MYC and AGO2 genes, the glucose transporter GLUT1, the hypoxia-induced factor HIF-1 α , the poly(A) binding protein PABPC and the antiproliferative factor BTG2. Importantly, the profile of the alterations for CNOT6 silencing was different than the one observed for CNOT8, even though same expression patterns are observed in both cases. Moreover, gene expression analysis via DNA microarrays experiments, after the silencing of CNOT6 or CNOT8 deadenylase, revealed new relations between cellular pathways. The findings presented in this work indicate that CNOT6 and CNOT8 are actively involved in gene expression regulation, most likely by triggering the degradation of specific mRNAs. Importantly, taken together with reports by other laboratories and our previous observations, it is suggested that deadenylases may act in concert to regulate gene expression.

1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εισαγωγή στο RNA

Το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA), είναι ένα από τα τρία βασικά μακρομόρια (συμπεριλαμβανομένου του DNA και των πρωτεϊνών), που είναι απαραίτητα για όλες τις μορφές ζωής. Κάποια μόρια RNA παίζουν σημαντικό ρόλο στα κύτταρα, καταλύοντας βιολογικές αντιδράσεις και ρυθμίζοντας τη γονιδιακή έκφραση, αποκρινόμενα σε κυτταρικά σήματα.

Ενώ το RNA και το DNA είναι νουκλεϊκά οξέα, υπάρχουν τρεις σημαντικές διαφορές μεταξύ τους: το RNA είναι μονόκλωνο και όχι δίκλωνο, περιέχει το σάκχαρο ριβόζη και όχι τη δεοξυριβόζη, πράγμα που το κάνει να είναι λιγότερο σταθερό σε σχέση με το DNA και τέλος, συμπληρωματική βάση της αδενίνης είναι η ουρακίλη (U) και όχι η θυμίνη (T) (Berg et al., 2002). Τα περισσότερα βιολογικά ενεργά μόρια RNA, όπως το mRNA, tRNA, rRNA, snRNAs και άλλα μη-κωδικοποιούμενα (non-coding) RNAs, περιέχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες που τους επιτρέπουν να αναδιπλώνονται και να σχηματίζουν μικρές διπλές έλικες οι οποίες στοιβάζονται μαζί, δημιουργώντας δομές όμοιες με αυτές των πρωτεϊνών και μπορούν να λειτουργούν σαν ένζυμα όπως για παράδειγμα το ριβόσωμα, το ενεργό κέντρο του οποίου αποτελείται εξ' ολοκλήρου από RNA. (Higgs 2000).

Η σύνθεση του RNA καταλύεται από το ένζυμο RNA πολυμεράση, χρησιμοποιώντας το DNA ως μήτρα, μία διαδικασία γνωστή ως μεταγραφή (transcription). Η έναρξη της μεταγραφής ξεκινά με την πρόσδεση του ενζύμου στην αλληλουχία του υποκινητή του DNA και ακολουθεί η αποδιάταξη της διπλής έλικας του μορίου λόγω της ενεργότητας ελικάσης της RNA πολυμεράσης. Εν συνεχεία, το ένζυμο προχωρά κατά μήκος της αλυσίδας-μήτρας (κατεύθυνση 3'→5') και συνθέτει ένα συμπληρωματικό RNA μόριο, επιμηκύνοντας με κατεύθυνση 5'→3' (Nudler et al., 2002).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το πρόδρομο αυτό αγγελιαφόρο RNA (pre-mRNA), το οποίο μεταφέρει την πληροφορία για την πρωτεϊνική αλληλουχία στα ριβοσώματα (τα «εργοστάσια» σύνθεσης πρωτεϊνών του κυττάρου),

προτού μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα για να μεταφραστεί σε πρωτεΐνη, υπόκειται σε επεξεργασία. Κατά μέσο όρο, το mRNA καθυστερεί περίπου 20min για να εξέλθει από τον πυρήνα καθώς τροποποιείται από ένζυμα προκειμένου να «ωριμάσει», με την προσθήκη μίας πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο, μίας 5' καλύπτρας και με την απομάκρυνση των ιντρονίων μέσω της διαδικασίας του ματίσματος (splicing) – διαδικασίες που θα αναλυθούν στη συνέχεια. Έτσι, το ώριμο πλέον mRNA, που περιέχει τουλάχιστον μία κωδική περιοχή (coding region), κωδικοποιεί για μια πρωτεϊνική αλληλουχία μέσω του γενετικού κώδικα: κάθε νουκλεοτιδική τριπλέτα (κωδικόνιο) της κωδικής περιοχής αντιστοιχεί σε ένα αμινοξύ (Cooper et al., 2004).

Πολλά RNAs δεν κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και ονομάζονται non-coding RNAs (ncRNAs). Τέτοια παραδείγματα αποτελούν τα μεταφορικά RNAs (tRNAs) και ριβοσωμικά RNAs (rRNAs) που συμμετέχουν στη διαδικασία της μετάφρασης (Mattick et al., 2001). Ορισμένα ncRNAs, μπορούν να καταλύουν χημικές αντιδράσεις όπως, κόψη και επανένωση άλλων RNA μορίων (Rossi 2004) και το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού στο ριβόσωμα και είναι γνωστά ως ριβοένζυμα (Nissen et al., 2000).

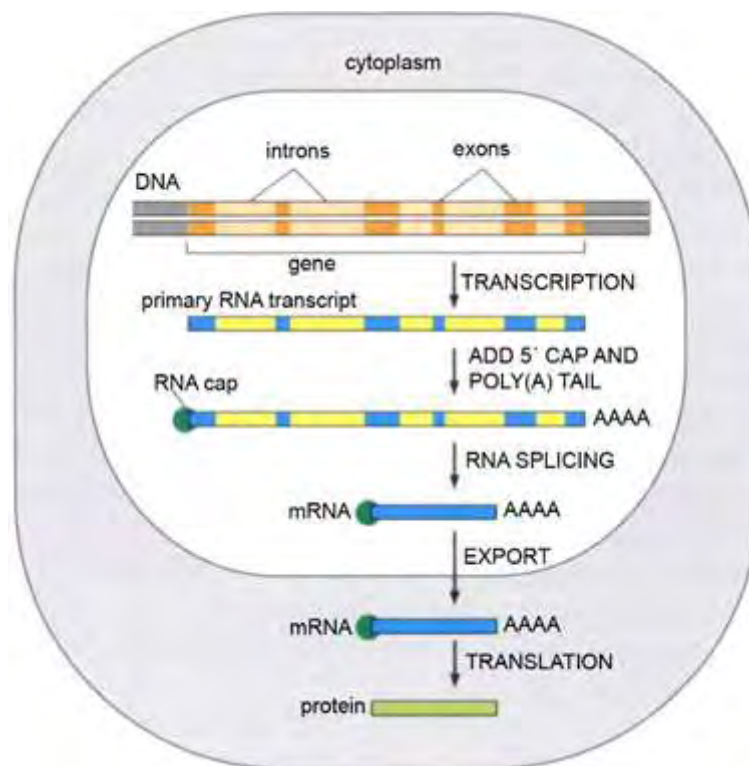
1.2 Ωρίμανση και σταθερότητα των ευκαρυωτικών mRNAs

Τα ευκαρυωτικά mRNAs προκύπτουν από μεγάλα πρόδρομα μετάγραφα (pre-mRNAs) αφού μεσολαβήσει η διαδικασία του ματίσματος (splicing), της προσθήκης καλύπτρας στο 5' άκρο (cap) και της προσθήκης της πολυαδενυλικής ουράς στο 3' άκρο (polyadenylation), όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1**.

Η διαδικασία του ματίσματος περιλαμβάνει την αποκοπή των εσονίων και τη συρραφή των εξονίων, με στόχο να παραμείνει στο μετάγραφο, το κωδικέον τμήμα του γονιδίου. Η διαδικασία αυτή καταλύεται από ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα που συγκροτούνται από snRNAs και πρωτεΐνες.

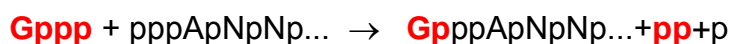
Σε αντίθεση με τα προκαρυωτικά mRNAs που αρχίζουν με rrrA ή rrrG, στα ευκαρυωτικά mRNAs η 5' καλύπτρα σχηματίζεται με την προσθήκη μιας τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP) στην πρώτη βάση του μεταγράφου

μέσω ενός 5'-5' δεσμού, που είναι ένα τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο (συνήθως μια πουρίνη, A ή G). Η αρχική αλληλουχία του μεταγράφου μπορεί να αναπαρασταθεί ως: 5'pppA/GpNpNpNp...



Εικόνα 1: Ωρίμανση ευκαρυωτικού mRNA

Η προσθήκη της G στο 5' άκρο καταλύεται από το πυρηνικό ένζυμο γουανύλο- τρανσφεράση. Η αντίδραση αυτή συμβαίνει τόσο γρήγορα μετά την έναρξη της μεταγραφής, που δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθούν παρά μόνο ίχνη του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου στο πυρηνικό RNA. Η συνολική αντίδραση μπορεί να αναπαρασταθεί ως μία συμπύκνωση μεταξύ του GTP και του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου του RNA όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα:

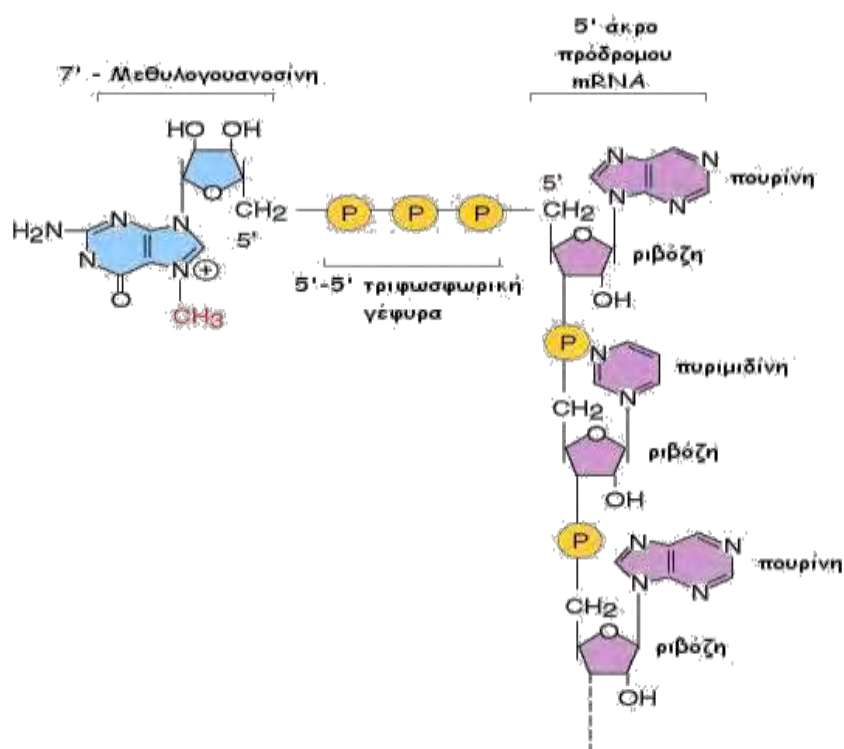


Η καλύπτρα αποτελεί υπόστρωμα για αρκετές αντιδράσεις μεθυλίωσης. Οι τύποι των καλυπτρών διακρίνονται από το πλήθος των μεθυλιώσεων που φέρουν. Η πρώτη μεθυλίωση γίνεται σε όλους τους ευκαρυωτικούς

οργανισμούς και αποτελείται από την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στη θέση N7 της ακραίας γουανίνης, μια αντίδραση που καταλύεται από την 7-μεθυλοτρανσφεράση της γουανίνης. Μία καλύπτρα που έχει μόνο αυτή τη μεθυλομάδα ονομάζεται καλύπτρα 0 (cap 0). Στην **Εικόνα 2** παρουσιάζεται η δομή της καλύπτρας μετά την προσθήκη μεθυλομάδων. Η καλύπτρα τοποθετείται για να εξυπηρετήσει δύο λειτουργίες:

1) καλυμμένα mRNAs μεταφράζονται πιο αποδοτικά διότι αναγνωρίζονται από το ριβόσωμα για το σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης και

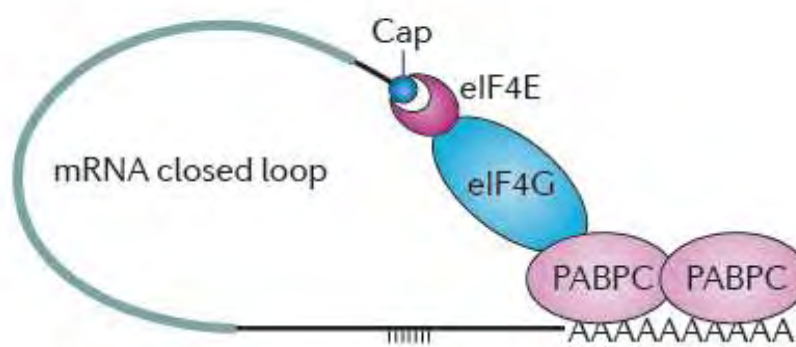
2) σταθεροποιεί τα mRNAs, προστατεύοντάς τα από ριβονουκλεάσες που δρουν στο 5' άκρο (5' εξωριβονουκλεάσες).



Εικόνα 1: Δομή της καλύπτρας στο 5' άκρο του mRNA

Η τελευταία επεξεργασία που υπόκεινται τα πρόδρομα ευκαρυωτικά mRNAs είναι η πολυαδενυλίωση, κατά την οποία λαμβάνουν στο 3' άκρο τους μια χαρακτηριστική αλληλουχία από 200-300 νουκλεοτίδια αδενοσίνης, γνωστής ως πολυ(A) ουρά. Η μετα-μεταγραφική αυτή τροποποίηση ονομάζεται διεργασία του 3' άκρου (3' end processing) και πραγματοποιείται

ως μέρος μιας πολύπλοκης αντίδρασης στην οποία το 3' άκρο δημιουργείται (με αποκοπή) και τροποποιείται από ένα σύμπλοκο ενζύμων. Η αντίδραση της προσθήκης καταλύεται από το ένζυμο πολυ(A)-πολυμεράση. Ο ρόλος της πολυ(A) ουράς είναι κεντρικής σημασίας για το mRNA. Προστατεύει το 3' άκρο του mRNA από εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, συμμετέχει σε διεργασίες όπως η έξοδος στο κυτταρόπλασμα και από αυτή ξεκινά και το κύριο μονοπάτι αποικοδόμησης του mRNA. Στις διαδικασίες αυτές η πολυ(A) ουρά συμμετέχει κυρίως μέσω των πρωτεϊνικών παραγόντων που προσδένονται σε αυτή, και κυρίως την πολυ(A) προσδενόμενη πρωτεΐνη [poly(A)-binding protein, PABP]. Ομόλογα αυτής της πρωτεΐνης απαντώνται σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ένα μονομερές PABPC των ~70 kDa συνδέεται σε κάθε 10-20 βάσεις της πολυ(A) ουράς. Έτσι, μια πολυ(A) ουρά από 240 νουκλεοτίδια φέρει περίπου 10 μόρια PABPC. Ο βασικότερος ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι αφενός να προστατεύει την ίδια την ουρά από αποικοδόμηση και αφετέρου να αλληλεπιδρά με άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες ρυθμίζοντας έτσι τη βιωσιμότητα του mRNA. Για παράδειγμα, η αλληλεπίδραση της PABP με τον παράγοντα έναρξης της μεταγραφής eIF4G δημιουργεί έναν κλειστό βρόχο, στον οποίο τα 5' και 3' άκρα του mRNA συγκρατούνται από το ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο και έτσι προσλαμβάνεται από τη μεταφραστική μηχανή όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3** (Huntzinger and Izaurralde, 2011).



Εικόνα 3: Η πρόσδεση της PABP στον παράγοντα έναρξης eIF4G δημιουργεί έναν κλειστό βρόχο (Huntzinger and Izaurralde, 2011).

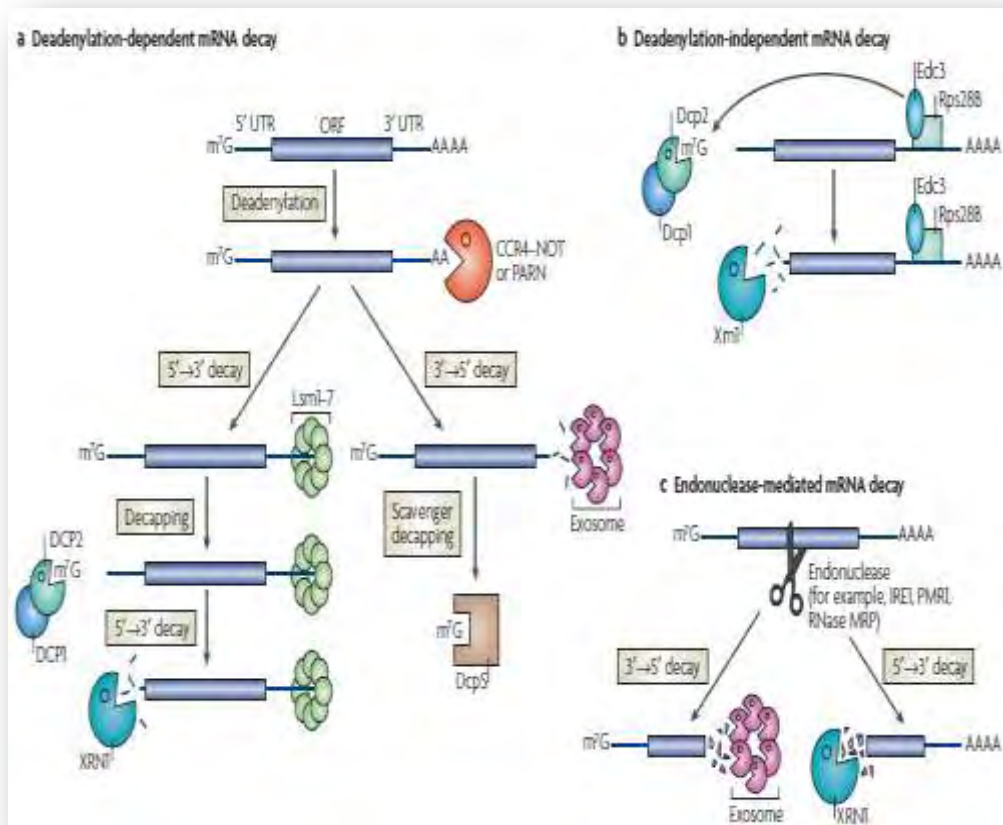
Η αφαίρεση της πολυ(A) ουράς αναστέλλει την έναρξη της μετάφρασης *in vitro* και η μείωση των επιπέδων της PABP έχει το ίδιο αποτέλεσμα σε ζυμομύκητες *in vivo*. Αυτές οι επιδράσεις μπορεί να εξαρτώνται από την πρόσδεση της PABP στο σύμπλοκο έναρξης, στο 5' άκρο του mRNA. Σε μερικές περιπτώσεις, τα mRNAs αποθηκεύονται σε μη πολυαδενυλιωμένη μορφή και η πολυ(A) προστίθεται όταν είναι απαραίτητη η μετάφραση τους. Σε άλλες περιπτώσεις, τα πολυαδενυλιωμένα mRNAs αποαδενυλιώνονται, με συνέπεια τη μείωση της μετάφρασής τους (Lewin B, GENES VIII). Σε αντίθεση όμως με την πολυαδενυλίωση των mRNAs στο κυτταρόπλασμα που συνεπάγεται την προστασία τους, η πολυαδενυλίωση των RNAs στον πυρήνα από το σύμπλοκο TRAMP οδηγεί στην αποικοδόμησή τους. Το σύμπλοκο αυτό περιέχει την Ttf4 πολυ(A)-πολυμεράση, μία RNA προσδενόμενη πρωτεΐνη μοτίβου δακτύλου ψευδαργύρου και μία RNA ελικάση. Ελαττωματικά πυρηνικά μόρια RNA σημαίνονται για αποικοδόμηση με την προσθήκη μίας πολυ(A) ουράς από το σύμπλοκο TRAMP το οποίο και στρατολογεί το εξώσωμα (Houseley and Tollervey, 2009).

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

1.3 Αποικοδόμηση του mRNA

1.3.1 Αποικοδόμηση φυσιολογικών mRNAs

Η ρύθμιση της αποικοδόμησης του mRNA αποτελεί σημαντική συνιστώσα της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, αφού η σταθερή συγκέντρωση του mRNA στο κύτταρο καθορίζεται τόσο από το ρυθμό σύνθεσης, όσο και από το ρυθμό αποικοδόμησης (Meyer et al., 2004).



Εικόνα 4: Μηχανισμοί αποικοδόμησης φυσιολογικών mRNAs (Garneau et al., 2007).

Υπάρχουν τρεις κύριες τάξεις ενδοκυτταρικών ενζύμων αποικοδόμησης (ριβονουκλεάσες ή RNases): οι ενδοριβονουκλεάσες, οι 3' εξωνουκλεάσες και οι 5' εξωνουκλεάσες. Μέσα στο κύτταρο υπάρχει πληθώρα ριβονουκλεασών και αυτή η αφθονία πιθανώς ενισχύει την αποτελεσματικότητα των μονοπατιών αποικοδόμησης (Houseley and Tollervey, 2009).

Τα ώριμα ευκαρυωτικά mRNAs φέρουν δύο καθοριστικούς παράγοντες σταθερότητας: την 5' καλύπτρα και την 3' πολυ(A) ουρά. Προκείμενου να ξεκινήσει η αποικοδόμηση θα πρέπει, είτε ένας από αυτούς τους παράγοντες να απομακρυνθεί, είτε το mRNA να υποστεί ενδονουκλεολυτική πέψη όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 4**.

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το μεγαλύτερο ποσοστό των mRNAs αποικοδομείται μέσω ενός μονοπατιού, το οποίο ξεκινά με τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς και είναι γνωστό ως *μονοπάτι αποικοδόμησης εξαρτώμενο από αποαδενυλίωση (Εικόνα 4a)*. Στον πυρήνα, με τη διαδικασία της αποαδενυλίωσης περιορίζονται οι νεοπροστιθέμενες πολυ(A) ουρές, στο

κατάλληλο μήκος, ώστε το mRNA να εξαχθεί στο κυτταρόπλασμα και να ξεκινήσει η μετάφρασή του. Αντίθετα, η εκτεταμένη αποαδενυλίωση του mRNA στο κυτταρόπλασμα πέρα από ένα συγκεκριμένο μήκος, σηματοδοτεί την αποικοδόμηση του. Η αποαδενυλίωση καταλύεται από μαγνήσιο-εξαρτώμενες εξωριβονουκλεάσες, τις αποαδενυλάσες. Ακολουθώντας την αποαδενυλίωση, δύο μηχανισμοί μπορούν να οδηγήσουν στην αποικοδόμηση του mRNA: είτε αφαίρεση της 5' καλύπτρας και αποικοδόμηση με κατεύθυνση 5'→3', είτε αποικοδόμηση 3'→5'. Στο πρώτο μονοπάτι, το σύμπλεγμα πρωτεϊνών Lsm 1-7 αλληλεπιδρά με το 3' άκρο του μεταγράφου επάγοντας την αφαίρεση της καλύπτρας μέσω του συμπλόκου DCP1-DCP2 και εκθέτοντας έτσι το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την XRN1, μια 5'→3' εξωνουκλεάση. Εναλλακτικά, το αποαδενυλιωμένο mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών. Στην περίπτωση αυτή η καλύπτρα υδρολύεται από το ένζυμο DcpS (Garneau et al., 2007). Οι πρωτεϊνικοί παράγοντες που εμπλέκονται στο μονοπάτι αποικοδόμησης εξαρτώμενο από αποαδενυλίωση, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1**.

Στην **Εικόνα 4b** φαίνεται το *μονοπάτι αποικοδόμησης το οποίο είναι ανεξάρτητο από την αποαδενυλίωση* στον *Saccharomyces cerevisiae*, στο οποίο απαιτείται η στρατολόγηση της πρωτεϊνικής μηχανής απομάκρυνσης του καλύμματος. Ωστόσο, η αποικοδόμηση ορισμένων μορίων mRNA μπορεί να ξεκινήσει με ενδονουκλεολυτική διάσπαση, είτε από ειδικές ενδονουκλεάσες, είτε μέσω του μηχανισμού παρεμβολής RNA (RNAi). Πρόκειται για το *μονοπάτι αποικοδόμησης διαμεσολαβούμενο από ενδονουκλεάσες*, στο οποίο το mRNA πέπτει εσωτερικά και προκύπτουν δύο θραύσματα με απροστάτευτα άκρα, τα οποία και αποικοδομούνται στη συνέχεια με τη δράση του εξωσώματος και της XRN1 (**Εικόνα 4c**) (Garneau et al., 2007).

Παράγοντες που εμπλέκονται στην έναρξη της μετάφρασης, την αποαδενυλίωση, την αφαίρεση της καλύπτρας, την 5'→3' εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, την ανερμηνεύσιμα διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (nonsense-mediated decay) και στην microRNA (miRNA) διαμεσολαβούμενη

Πίνακας 1: Παράγοντες που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του mRNA (Garneau et al., 2007).

Decay factor	Protein components	Protein domains	Functions and characteristics	Localization	Other functions
<i>Deadenylation</i>					
CCR4-NOT	Ccr4	3'→5' exonuclease	Main deadenylase in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; inhibited by PABP	Nucleus; cytoplasm; P bodies	Transcription; protein degradation
	Caf1 (Pop2)	3'→5' exonuclease			
	Caf40 (Rcd1)	Rcd1-like			
	Caf130	Not known			
	Not1	Not known			
	Not2	Not2, Not3 and Not5 share a domain of unknown function			
	Not3	Not2, Not3 and Not5 share a domain of unknown function			
	Not4	Ubiquitin ligase			
	Not5	Not2, Not3 and Not5 share a domain of unknown function			
PAN2-PAN3	PAN2	WD40 repeat	Involved in first phase of poly(A) shortening	Nucleus; cytoplasm	Not known
	PAN3	3'→5' exonuclease			
PARN	PARN	3'→5' exonuclease	Cap-dependent deadenylase activity; inhibited by PABP and nuclear cap-binding complex	Nucleus; cytoplasm	Translation inhibition
<i>5'→3' decay</i>					
Decapping enzyme	DCP1A, DCP1B	EVH1	Produces ^{7m} GDP; Hedls not found in yeast	Cytoplasm; P bodies	mRNA localization
	DCP2	Nudix Mut T			
	Hedls (Ge-1)	WD40 repeat			
Dhh1 (RCK/p54, Me31B)	Dhh1	DExD/H-box RNA helicase	Required for decapping	Cytoplasm; P bodies	Translational repression
Edc proteins	Edc1, Edc2 (<i>S. cerevisiae</i>)	Not known	Enhance decapping	P bodies (EDC3)	Not known
	EDC3 (Lsm16)	Sm-like; YjeF_N			
Lsm complex	Lsm1-7	Sm-like	Required for decapping; heptameric	Cytoplasm; P bodies	Nuclear Lsm2-8 involved in splicing
Pat1	Pat1	Not known	Yeast specific	Cytoplasm	Translational repression
XRN1, (Sep1, Kem1)	XRN1	5'→3' exonuclease	Degrades decapped 5'-monophosphate RNA	Cytoplasm; P bodies	Microtubule polymerization
<i>3'→5' decay</i>					
Cytoplasmic exosome	RRP41 (Ski6), RRP42, RRP45 (PM-Sc17 5), RRP46, Mtr3, OIP2	RNase PH	RNase PH domain subunits form a six-membered ring structure; RNase PH domain has affinity for AU-rich sequences; RRP44 is not present in human exosome preparations	Nucleus; cytoplasm; evidence for cytoplasmic foci; Ski7 is exclusively cytoplasmic	Processing of small RNAs; nuclear mRNA surveillance
	CSL4 (Ski4), RRP4, RRP40	S1 RNA binding; KH RNA binding			
	RRP44 (Dis3)	PIN RNA binding; RNase II			
	Ski2	DEVH RNA helicase			
	Ski3	Tetratricopeptide repeat			
	Ski7	EF1α-like GTPase			
	Ski8	WD40 repeat			
Scavenger-decapping enzyme	Dcp5	HIT pyrophosphatase	Produces ^{7m} GMP from ^{7m} GpppG	Predominantly nucleus	Facilitates 5'→3' decay

αποικοδόμηση, συνεντοπίζονται σε κοκκώδεις κυτταροπλασματικές δομές, τα P bodies, τα οποία θεωρούνται τόπιοι αποικοδόμησης των mRNAs.

Τα P bodies στρατολογούνται όταν υπάρχουν πολλά μόρια RNA τα οποία αποικοδομούνται μέσω του συστήματος 5'→3' αποικοδόμησης, ή όταν η αποικοδόμηση των mRNAs παρεμποδίζεται λόγω μεταλλαγών σε διάφορους παράγοντες. Αντίθετα, μειώνονται σε μέγεθος και αριθμό όταν μειώνεται και ο αριθμός των μορίων mRNA προς αποικοδόμηση. Παρεμπόδιση της μεταγραφής ή της μετάφρασης καθώς και μεταλλάξεις σε παράγοντες που εμπλέκονται στα αρχικά στάδια της αποικοδόμησης όπως το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CCR4-NOT και το σύμπλοκο Lsm, επίσης έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση των P bodies. Αποτελούν λοιπόν δομές που σχηματίζονται, για να ρυθμίσουν την «αλληλεπίδραση» μεταξύ μετάφρασης και αποικοδόμησης. Ακόμη, οι δομές αυτές, είναι πιθανό να σχηματίζονται μόνο όταν το 5'→3' μονοπάτι αποικοδόμησης είναι υπερφορτωμένο με υπόστρωμα ή διαταράσσεται η φυσιολογική λειτουργία του, ή εναλλακτικά, μπορεί να απομονώνουν μόρια mRNA τα οποία έχουν σημανθεί για αποικοδόμηση και με αυτόν τον τρόπο να αποφεύγεται η παραγωγή ελαττωματικών πρωτεϊνών (Garneau et al., 2007; Parker and Song 2004).

1.3.2 Αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNAs

Προκειμένου να διατηρηθεί η πιστότητα της μετάφρασης, το κύτταρο διαθέτει μηχανισμούς οι οποίοι ανιχνεύουν και αποικοδομούν ελαττωματικά μετάγραφα, προστατεύοντάς το έτσι από την παραγωγή τοξικών πρωτεϊνών. Ο έλεγχος ποιότητας και επεξεργασίας ακατάλληλων mRNA μορίων γίνεται στον πυρήνα, ενώ υπάρχουν τρία μονοπάτια εξαρτώμενα από τη μετάφραση που ανιχνεύουν ελαττωματικά σύμπλοκα mRNA και ριβονουκλεοπρωτεϊνών (mRNP) στο κυτταρόπλασμα (Garneau et al., 2007).

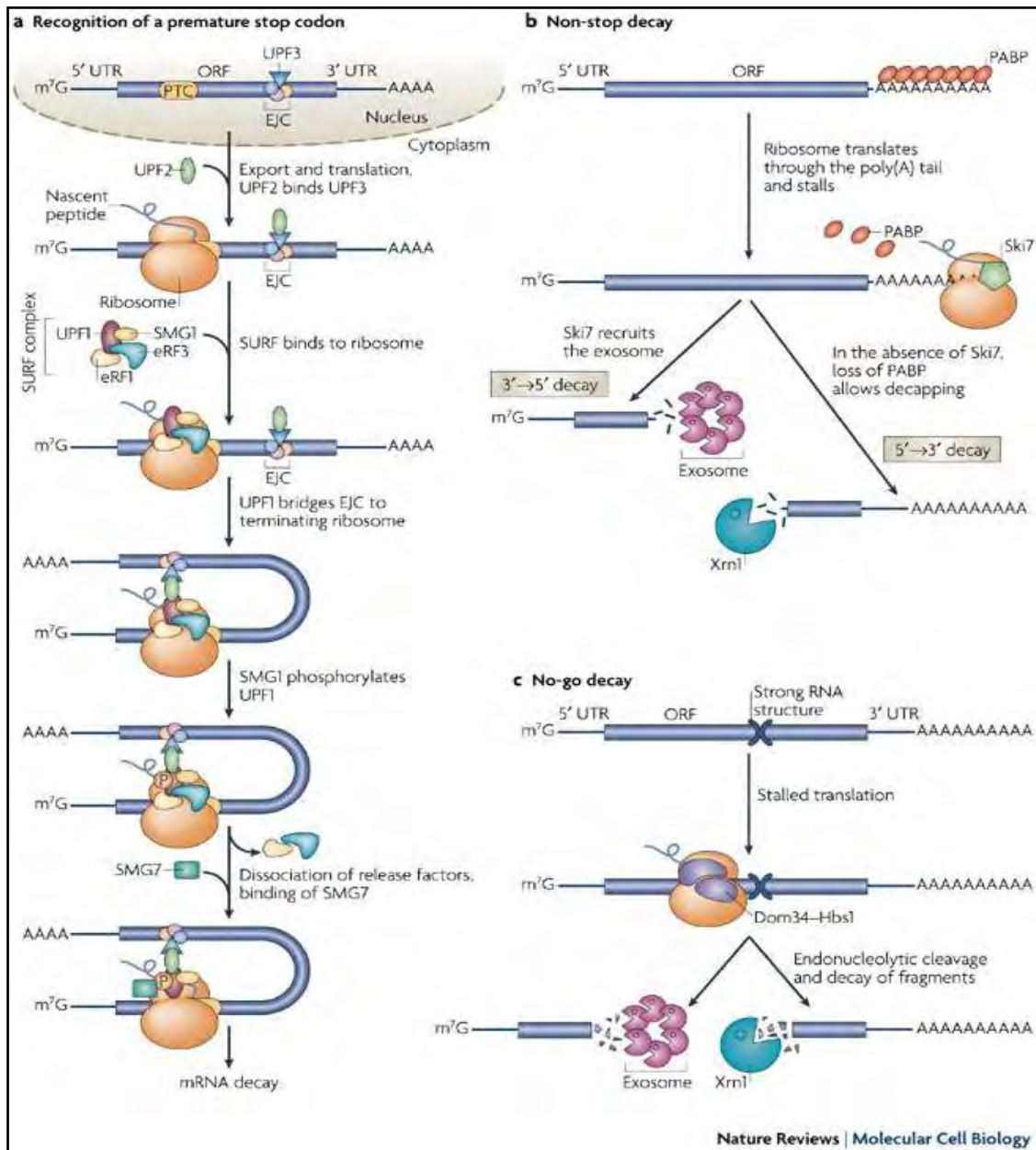
Στο πρώτο από αυτά, σε μια πορεία που αναφέρεται και ως μη-νοηματικά (ανερμηνεύσιμα) διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (nonsense-mediated decay, NMD) τα mRNAs που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται. Τέτοια μετάγραφα αποικοδομούνται είτε μετά από αφαίρεση του καλύμματος σε μία διαδικασία η

οποία είναι ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση, είτε από επιτάχυνση της αποαδενυλίωσης και της 3'→5' αποικοδόμησης από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα (**Εικόνα 5a**) (Conti and Izaurralde, 2005). Ομοίως, σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως αποικοδόμηση μη-τερματισμού (non-stop decay, NSD), τα mRNAs στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα (**Εικόνα 5b**) (Frischmeyer et al., 2002). Τέλος, στη ζύμη έχει ανακαλυφθεί και η No-Go αποικοδόμηση (no-go decay, NGD) στην οποία παρατηρείται ακινητοποίηση του ριβοσώματος στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης λόγω σχηματισμού ειδικής δευτεροταγούς δομής στο ελαττωματικό mRNA. Ως αποτέλεσμα, πυροδοτείται η διαμεσολαβούμενη από ενδονουκλεάσες αποικοδόμηση του mRNA και η απελευθέρωση του ριβοσώματος (**Εικόνα 5c**) (Doma and Parker, 2006).

1.3.3 Σήματα που ρυθμίζουν την αποικοδόμηση του mRNA

Οι καθοριστές της σταθερότητας των mRNAs, βρίσκονται κυρίως στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) όπου τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα προστατεύονται από τη διάσχιση των ριβοσωμάτων κατά μήκος των mRNAs, αλλά και στην 5' UTR και στην κωδική περιοχή. Τα πιο καλά μελετημένα στοιχεία σταθερότητας των mRNAs, αποτελούν οι περιοχές που είναι πλούσιες σε AU αλληλουχίες (πενταμερές AUUUA), ή αλλιώς οι αλληλουχίες ARE. Βρίσκονται στην 3' UTR περιοχή πολλών μεταγράφων που κωδικοποιούν κυρίως για κυτοκίνες, πρωτοογκογονίδια και μεταγραφικούς παράγοντες. Οι παράγοντες που προσδένονται σε αυτές τις αλληλουχίες έχει βρεθεί πως στρατολογούν τη μηχανή αποικοδόμησης των mRNAs, όπως μεταξύ άλλων, τις αποαδενυλάσες (PARN, CCR4-NOT), τους DCP1-2 και το εξώσωμα. Παραδείγματα τέτοιων αποσταθεροποιητικών παραγόντων, αποτελούν οι: AUF1, CUG-BP, KSRP, RHAU, TIAR, Tristetraprolin. Υπάρχουν όμως και ARE- προσδενόμενες πρωτεΐνες, όπως είναι οι ELAV πρωτεΐνες (HuR και HuD), οι οποίες σταθεροποιούν τα mRNAs είτε μέσω ανταγωνισμού με τις αποσταθεροποιητικές πρωτεΐνες για την πρόσδεση, είτε μέσω μεταφοράς των ίδιων των mRNAs από τα P- bodies στα πολυσώματα.

Άλλα στοιχεία που σχετίζονται με τη σταθερότητα των mRNAs, αποτελούν οι πρωτεΐνες PUF που αναγνωρίζουν πλούσιες σε UG αλληλουχίες και επιταχύνουν την αποικοδόμηση των υποστρωμάτων τους στρατολογώντας το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (Garneau et al., 2007).



Εικόνα 5: Μονοπάτια αποικοδόμησης ελαττωματικών mRNAs (Garneau et al., 2007)

1.4 Κατάταξη και δράση των αποαδενυλασών

Οι αποαδενυλάσες είναι μαγνησιο-εξαρτώμενες εξωριβονουκλεάσες με ποικίλες βιολογικές λειτουργίες. Υδρολύουν τα μόρια RNA με κατεύθυνση 3'→5' με αποτέλεσμα την απελευθέρωση 5'- AMP. Οι πολυ(A) ουρές αποτελούν το βασικό υπόστρωμα αυτών των ενζύμων, ωστόσο έχειδειχτεί ότι αποικοδομούν λιγότερο αποτελεσματικά και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Ο αριθμός των γνωστών αποαδενυλασών αυξάνεται συνεχώς και με βάση την παρουσία συγκεκριμένων συντηρημένων καταλοίπων στο καταλυτικό τους κέντρο, ταξινομούνται σε δύο μεγάλες υπερ-οικογένειες: αυτή των DEDD νουκλεασών και αυτή των EEP νουκλεασών. Η DEDD υπερ-οικογένεια, έχει λάβει το όνομά της από τα καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu που βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ τριών μοτίβων εξωνουκλεάσης, τα οποία συντονίζουν τα ιόντα Mg^{2+} . Μέλη αυτής της ομάδας αποτελούν η αποαδενυλάσες POP2/ CAF1 (CNOT7 & CNOT8), η CAF1Z, η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), καθώς και οι οικογένειες των PAN2 αποαδενυλασών. Από την άλλη μεριά η υπερ-οικογένεια των εξωνουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών (*exonuclease-endonuclease-phosphatase, EEP*), περιλαμβάνει αποαδενυλάσες που φέρουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στις δομικές περιοχές νουκλεάσης τους. Παραδείγματα τέτοιων ενζύμων αποτελούν οι αποαδενυλάσες Nocturnin, CCR4 (CCR4a/ CNOT6 & CCR4b/ CNOT6L), Angel και 2' PDE (**Πίνακας 2**) (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Η μεγάλη ποικιλότητα και ποικιλομορφία των αποαδενυλασών υποδηλώνει, πως πιθανότατα ειδικές αποαδενυλάσες στοχεύουν συγκεκριμένες ομάδες mRNAs, ή πως διάφορες από αυτές δρουν στο ίδιο mRNA με επικαλυπτόμενες λειτουργίες (Meyer et al., 2004; Parker and Song, 2004; Goldstrohm and Wickens, 2008). Για παράδειγμα, στα κύτταρα των θηλαστικών, η PAN2 αρχικά, αφαιρεί τη μισή περίπου πολυ(A) ουρά και έπειτα το σύμπλοκο CCR4-POP2-NOT αποικοδομεί την υπόλοιπη (Yamasita et al., 2005).

Οι αποαδενυλάσες όπως αναφέρθηκε, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γενική διαδικασία ανακύκλωσης του mRNA, επιτελούν όμως και αρκετούς εξειδικευμένους, ρυθμιστικούς ρόλους. Κάποιες είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των οργανισμών, ενώ μεταλλάγματα άλλων επιφέρουν μια ποικιλία φαινοτύπων. Κάποιες από αυτές είναι σημαντικές κατά την πρώιμη

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

Group	Name	SC	CE	DM	XL	MM	HS
DEDD nucleases	CNOT7/Caf1a	+	+	+	+	+	+
	CNOT8/Caf1b	-	-	-	+	+	+
	PAN2	+	+	+	+	+	+
	PARN	-	+	-	+	+	+
	CAF1Z	-	+	-	+	+	+
EEP nucleases	CNOT6/CCR4a	+	+	+	+	+	+
	CNOT6L/CCR4b	-	-	-	-	+	+
	NOC/CCR4C	-	-	+	+	+	+
	2'PDE	-	+	+	+	+	+

SC: *S.cerevisiae*, CE: *C. elegans*, DM: *D.melanogaster*, XL: *X.laervis*, MM: *M. musculus*, HS: *H.sapiens* (+): είναι παρούσα στον οργανισμό (-): δεν είναι παρούσα στον οργανισμό.

εμβρυϊκή ανάπτυξη, ενώ άλλες απαιτούνται για τη γονιμότητα, τη μεταβολική ομοίωση, την ανάπτυξη και τον κυτταρικό κύκλο (στα θηλαστικά, υπερέκφραση της CNOT7 ή της CAF1Z, καθώς και αποσιώπηση της CNOT6L, εμποδίζει την κυτταρική αύξηση) (Morita et al., 2007; Bogdan et al., 1998). Το γεγονός, πως συγκεκριμένες αποαδενυλάσες είναι απαραίτητες για συγκεκριμένες βιολογικές διεργασίες, αποδεικνύει πως ο έλεγχος ορισμένων mRNAs είναι καθοριστικής σημασίας για την ομαλή λειτουργία αυτών των διεργασιών. Η ρύθμιση λοιπόν, της δραστηριότητας των αποαδενυλασών κρίνεται απαραίτητη, καθώς συνθήκες ανεξέλεγκτης αποαδενυλίωσης θα οδηγούσαν σε καταστροφή και θάνατο του κυττάρου. Σταθερά και μεταγραφικά ενεργά mRNAs πρέπει να προστατευθούν από την

αποαδενυλίωση ενώ τα ασταθή και μη φυσιολογικά θα πρέπει να αποαδενυλιώνονται και να αποικοδομούνται (Goldstrohm and Wickens, 2008; Parker and Song, 2004).

Ο ρυθμός της αποαδενυλίωσης ποικίλλει μεταξύ των διάφορων mRNAs. Όπως προαναφέρθηκε, παραδείγματα παραγόντων- ρυθμιστών που προωθούν την αποαδενυλίωση αποτελούν οι CUG-BP, miRNAs, PUF και CPEB (Goldstrohm and Wickens, 2008; Hook et al., 2007). Εναλλακτικά, προώθηση της αποαδενυλίωσης μπορεί να επιτευχθεί και μέσω της PABP, η οποία στρατολογεί το σύμπλοκο PAN2-PAN3 στο mRNA στόχο. Ακόμη, στα θηλαστικά η PABP μπορεί να στρατολογεί το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CCR4-CAF1-NOT, μέσω αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες TOB, που λειτουργούν σαν γέφυρα η οποία συνδέει το σύμπλοκο με την PABP. (Funakoshi et al., 2007; Ezzeddine et al. 2007). Επίσης, το 5' κάλυμμα του mRNA μπορεί να επηρεάσει θετικά την αποαδενυλίωση διεγείροντας την πρόσδεση και τη δραστηριότητα αποαδενυλασών και συγκεκριμένα της PARN.

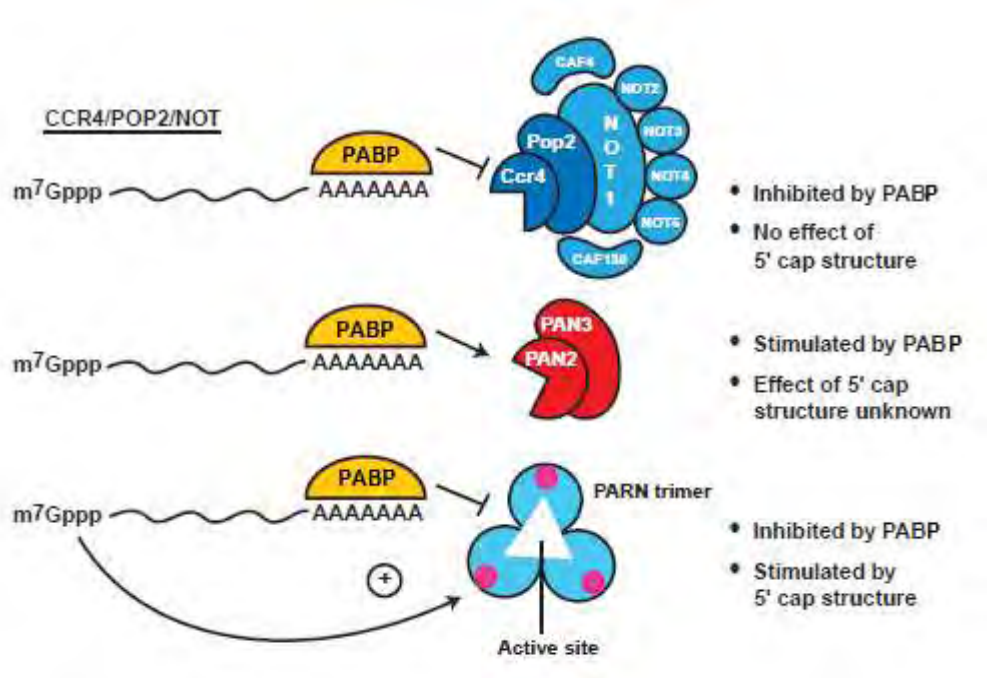
Η έκφραση των αποαδενυλασών και των αντίστοιχων ρυθμιστών τους υποδεικνύει το χρόνο και τον τόπο, στον οποίο μπορεί να συμβεί ρύθμιση της αποαδενυλίωσης. Για παράδειγμα, η έκφραση της Nocturnin είναι ρυθμική και ελέγχεται από τον κιρκάδιο ρυθμό, ενώ οι αποαδενυλάσες της οικογένειας POP2/ CAF1 και CCR4 δρουν ιδιοστατικά. Η αναστολή της ενεργότητάς τους, παρέχει έναν άλλο τρόπο ελέγχου. Η αποαδενυλίωση σταματά όταν για παράδειγμα, το κύτταρο υποβάλλεται σε διάφορες μορφές stress, όπως UV, οξειδωση, οσμωτική πίεση ή έλλειψη γλυκόζης.

Η αποαδενυλίωση επηρεάζεται επίσης από δύο μορφές χωρικού ελέγχου: τον πυρηνο-κυτταροπλασματικό διαχωρισμό των αποαδενυλασών και τον εντοπισμό τους στα P-bodies. Πολλές αποαδενυλάσες μεταφέρονται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος και αλλαγές στη διαμερισματοποίηση τους, μπορούν να αποβούν μοιραίες για την τύχη mRNAs που δεν θα έπρεπε να αποικοδομηθούν. Από την άλλη μεριά, συγκεκριμένες αποαδενυλάσες εντοπίζονται στα P-bodies, τα οποία όπως αναφέρθηκε περιέχουν κατασταλαμένα mRNAs, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να ενεργοποιηθούν. Ο συνεντοπισμός αυτών των αποαδενυλασών με τα υποστρώματα τους,

πιθανότατα διευκολύνει την κινητική της αποαδενυλίωσης (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Οι αποαδενυλάσες συνήθως αποτελούν τμήμα συμπλόκων με πολλές υπομονάδες. Άλλες σχηματίζουν ομοδιμερή και άλλες ετεροδιμερή. Στον άνθρωπο για παράδειγμα υπάρχουν τρία σύμπλοκα αποαδενυλασών (**Εικόνα 6**): το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο CCR4-NOT, το ετεροδιμερές PAN2-PAN3 στο οποίο καταλυτικά ενεργή υπομονάδα είναι η PAN2 και η PARN που σχηματίζει ένα ομοδιμερές (Piao et al. 2010). Ο ετεροδιμερισμός αυξάνει σημαντικά το ρεπερτόριο των συμπλόκων των αποαδενυλασών, καθώς διαφορετικά ετεροδιμερή έχουν και διαφορετικές ενζυμικές και ρυθμιστικές ιδιότητες. Η δυνατότητα για έλεγχο της αποαδενυλίωσης καθίσταται τεράστια και ιδιαίτερα πολύπλοκη, αν σε όλα αυτά συνυπολογίσουμε την αλληλεπίδραση των πολυάριθμων πιθανών συμπλόκων αποαδενυλασών με την τεράστια ποικιλία των ρυθμιστών τους και την αλληλεπίδραση των τελευταίων με μία εξίσου μεγάλη ποικιλία διαφορετικών ρυθμιστικών στοιχείων επί των 3'-UTR περιοχών των mRNA-στόχων (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Τα σύμπλοκα των αποαδενυλασών είναι πολυλειτουργικά, καθώς περιέχουν εκτός των ενζύμων αποαδενυλίωσης, παράγοντες που καταστέλλουν τη μετάφραση και ενισχύουν την αποικοδόμηση του mRNA. Η πολυλειτουργικότητα αυτή παρέχει ευκαιρίες για πολυάριθμα σημεία ρύθμισης της αποαδενυλίωσης, της μετάφρασης και της αποικοδόμησης των mRNAs, είτε ξεχωριστά είτε συντονισμένα (Goldstrohm and Wickens, 2008).



Εικόνα 6: Σύμπλοκα ευκαρυωτικών αποαδενυλασών (Parker and Song, 2004)

1.5 Δομή και λειτουργίες του συμπλόκου CCR4-NOT

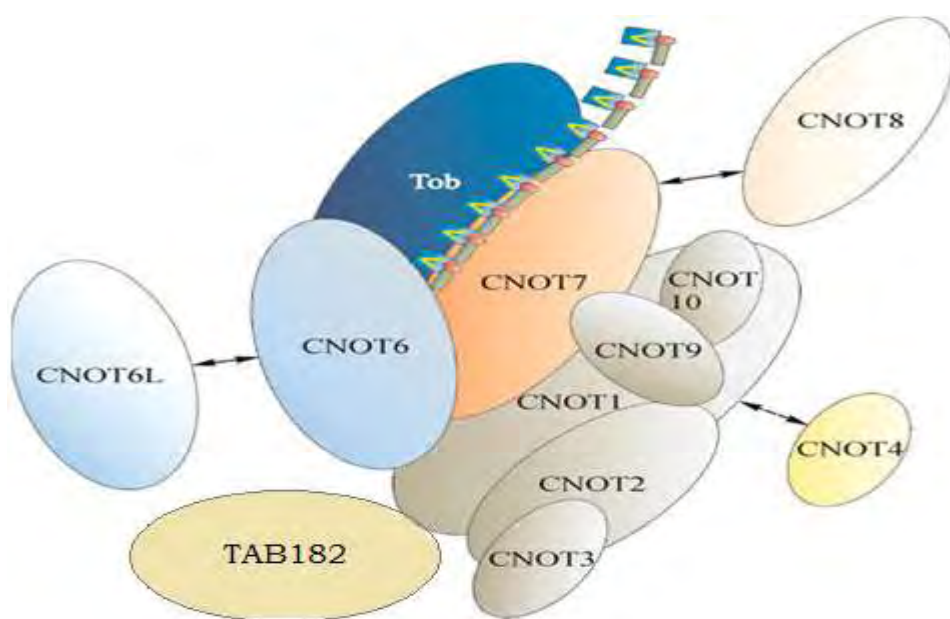
Το σύμπλοκο CCR4-NOT χαρακτηρίστηκε αρχικά στον *S. Cerevisiae* ως μεταγραφικό σύμπλοκο ρυθμιζόμενο από γλυκόζη, το οποίο καταστέλλει την RNA πολυμεράση II και αποτελεί το κύριο σύμπλοκο αποαδενυλίωσης (Garneau et al., 2007). Σχηματίζει δύο κυρίαρχες δομές in vivo με μοριακά βάρη 0,9-1,2 MDa και 1,9-2.0 MDa. Περιέχει δύο υπομονάδες με ενεργότητα αποαδενυλάσης, την Caf1 (Pop2-DEDD) και την Ccr4 (EEP), με την Ccr4 να υπερτερεί της Caf1 (Tucker et al., 2002). Η υπομονάδα Ccr4 ταυτοποιήθηκε αρχικά, ως ενεργοποιητής της έκφρασης του γονιδίου ADH2 (Denis and Chen, 2003). Ένας σημαντικός ρόλος της Caf1 είναι η στρατολόγηση της Ccr4 στο σύμπλοκο, μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της Caf1 και της LRR (leucine-rich repeat) περιοχής της Ccr4 (Clark et al. 2004). Επιπλέον, το σύμπλοκο περιέχει και ένα σύνολο άλλων υπομονάδων, όπως οι Not1p-Not5p, Caf130p, Caf40p και BTT1. Οι υπομονάδες του, αλληλεπιδρούν με

πρωτεΐνες όπως: Dhh1p, Caf4p, Caf16p, Dbf2p και Mob1p (Bartlam and Yamamoto, 2010).

Το σύμπλοκο CCR4-NOT είναι απαραίτητο καθώς οι διαφορετικές υπομονάδες του συμμετέχουν σε πολλές και διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες. Πρώτον, συμμετέχει στη ρύθμιση της μεταγραφής, μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των NOT υπομονάδων του κυρίως με τον παράγοντα TFIID και το σύμπλοκο SAGA (ακετυλίωση ιστονών). Επιπλέον, η CCR4 υπομονάδα σχετίζεται με το σύμπλοκο PAF1-RNA πολυμεράση II, συμμετέχοντας στην επιμήκυνση της μεταγραφής. Εκτός από την CCR4 και η CAF1 προσδένει παράγοντες επιμήκυνσης. Είναι πιθανό, το σύμπλοκο να μεταφέρεται μαζί με άλλους παράγοντες κατά τη διάρκεια της μεταγραφής έτσι ώστε να προσδεθεί στη συνέχεια στην πολυ(A) ουρά (Denis and Chen, 2003). Σύμφωνα με τις λειτουργίες του συμπλόκου Ccr4-Not στη ζύμη, ένας σημαντικός αριθμός πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων υποδηλώνει ένα ξεχωριστό ρόλο του συμπλόκου στη μεταγραφή, σε ανθρώπινα κύτταρα. Συγκεκριμένα, αρκετές υπομονάδες έχουν αναφερθεί, να ρυθμίζουν τη δράση πυρηνικών υποδοχέων (Winkler et al., 2006; Garapaty et al., 2008; Govindan et al., 2009). Η υπομονάδα CNOT1, αποτελεί ένα προσδετο-εξαρτώμενο καταστολέα της μεταγραφής που επάγεται από ορμονικούς υποδοχείς, όπως είναι ο Estrogen Receptor α (ER α) (Winkler et al., 2006). Αντιθέτως, οι CNOT6, CNOT7 και CNOT9 ενισχύουν την επαγόμενη από πυρηνικούς υποδοχείς μεταγραφή, όπως ο ER α και ο Retinoic Acid Receptor α (RAR α) (Prevot et al., 2001; Hiroi et al., 2002; Morel et al., 2003; Garapaty et al., 2008). Δεύτερον, στην αποικοδόμηση του mRNA μέσω της αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη Dhh1 (DDX6/Rck/p54 στον άνθρωπο) και τις αποαδενυλάσες του, καθώς και στη μετα-μεταφραστική τροποποίηση πρωτεϊνών μέσω της αλληλεπίδρασης του με τη φωσφατάση Glc7. Τρίτον, έχει βρεθεί ότι συμβάλλει στον έλεγχο των κυτταρικών αποκρίσεων σε συνθήκες “stress”, όπως κατά την έλλειψη γλυκόζης και θερμικού σοκ (Collart and Timmers, 2004). Τέταρτον, συμμετέχει στην έξοδο του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Kerr et al., 2011).

Στα θηλαστικά και συγκεκριμένα στον άνθρωπο, τα ομόλογα αυτών των πρωτεϊνών, επίσης σχηματίζουν ένα όμοιο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, που

παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση ποικίλων κυτταρικών μηχανισμών και κυρίως στην αποικοδόμηση του mRNA (Temme et al., 2010; Yamasita et al., 2005). Στην **Εικόνα 7** παρουσιάζεται ένα μοντέλο της δομής του συμπλόκου CCR4-NOT στον άνθρωπο. Ο πυρήνας του έχει μελετηθεί πρόσφατα και βρέθηκε ότι αποτελείται από τις εξής υπομονάδες: CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT4, CNOT9, CNOT10, TAB182. Η υπομονάδα CNOT1 λειτουργεί σαν «σκαλωσιά», καθώς σ' αυτή προσδένεται η πλειοψηφία των υπόλοιπων CNOT υπομονάδων. Η CNOT4, αποτελεί μία E3 λιγάση ουβικουϊτίνης που συμμετέχει σε μονοπάτια αποικοδόμησης πρωτεϊνών μέσω του πρωτεασώματος και δεν είναι σταθερά προσδεδεμένη στο σύμπλοκο (Bartlam and Yamamoto, 2010; Collart and Timmers, 2004). Ακόμη, στον πυρήνα βρίσκονται συνδεδεμένες οι CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 οι οποίες είναι μεταβλητές υπομονάδες εντός του συμπλόκου και αποτελούν ομόλογα των Caf1 και Ccr4 της ζύμης.



Εικόνα 7: Μοντέλο του συμπλόκου CCR-NOT στον άνθρωπο (Bartlam and Yamamoto, 2010)

Ο ακριβής μηχανισμός στρατολόγησης του συμπλόκου στους στόχους mRNA δεν είναι ξεκάθαρος. Όπως προαναφέρθηκε, παράγοντες όπως οι

πρωτεΐνες PUF και τα μέλη της οικογένειας BTG/Tob, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο σ' αυτή τη διαδικασία. Η πρωτεΐνη Tob και η BTG2 που αλληλεπιδρούν με τις υπομονάδες CNOT7 και CNOT8, πυροδοτούν την αποαδενυλίωση. Έχει προταθεί ακόμη, πως κατά τη διάρκεια τερματισμού της μετάφρασης, η πρόσδεση της Tob πρωτεΐνης και της PABPC1 μπορεί να οδηγήσει στην πρόσδεση του συμπλόκου (Ezzeddine et al., 2007; Mauxion et al., 2008). Επίσης, μελέτες σε κύτταρα θηλαστικών έχουν δείξει ότι γονιδιακή καταστολή επαγόμενη από microRNA, σχετίζεται με την αποαδενυλίωση και την αποικοδόμηση του mRNA και εμπλέκει τη στρατολόγηση του CCR4-NOT μέσω συστατικών του μηχανισμού microRNA (AGO2, GW182, RISC) (Chen et al., 2009; Fabian et al., 2009; Piao et al., 2010).

1.5.1 Λειτουργίες των υπομονάδων CAF1 και CCR4 στον άνθρωπο

Τα παράλογα CAF1a (CNOT7) και CAF1b (CNOT8) είναι συστατικά του ανθρώπινου CCR4-NOT, ενώ το ομόλογο Caf1z/TOE, σχηματίζει ένα χωριστό πυρηνικό σύμπλοκο που εμπλέκεται στο μεταβολισμό του mRNA (Wagner et al., 2007). Σε αντίθεση με τον *S. Cerevisiae*, σε κύτταρα ινοσαρκώματος, έχει βρεθεί ότι συνδυασμένη αποσιώπηση των CNOT7 και CNOT8, προκαλεί αύξηση στο μήκος των πολυ(A) ουρών, ενώ δεν παρατηρείται κάτι τέτοιο με αποσιώπηση των CNOT6/ CNOT6L. Είναι λοιπόν πιθανό, στα κύτταρα των θηλαστικών, οι αποαδενυλάσες CNOT7 και CNOT8 να συνεισφέρουν περισσότερο στην αποαδενυλίωση (Schwede et al., 2008). Σε κυτταρικό επίπεδο, αποσιώπηση της CNOT7 ή/και της CNOT8 οδηγεί σε προβλήματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού, που εξαρτάται εν μέρει από την καταλυτική ενεργότητα αυτών των υπομονάδων (Aslam et al., 2009). Τα δύο αυτά παράλογα, αλληλεπιδρούν με μέλη της οικογένειας των BTG/TOB αντιπολλαπλασιαστικών πρωτεϊνών, που εμποδίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στην S (Bogdan et al., 1998; Ikematsu et al., 1999; Prevot et al., 2001; Yoshida et al., 2001). Επιπλέον, μετά από ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, ύστερα από την αποσιώπηση των δύο αυτών υπομονάδων, φαίνεται η CNOT7 και η CNOT8 να εμφανίζουν μερική

συμπληρωματικότητα και είτε να καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό, είτε να ρυθμίζουν θετικά την έκφραση γονιδίων που επάγουν τον πολλαπλασιασμό (Aslam et al., 2009). Τέλος, οι δύο αυτές υπομονάδες έχουν σχετιστεί και με ανθρώπινες ασθένειες. Συγκεκριμένα, έλλειψη του γονιδίου της CNOT8, η οποία χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 5, στην περιοχή 5q31-q33, προκαλεί μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (Collart and Timmers, 2004).

Πέντε ομόλογα της Ccr4 έχουν ταυτοποιηθεί σε ανθρώπινα κύτταρα, αλλά μόνο η CCR4a (CNOT6) και η CCR4b (CNOT6L) περιέχουν την αμινοτελική LRR περιοχή που είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδρασή τους με τις CNOT7/CNOT8 (Dupressoir et al., 2001). Τα παράλογα αυτά CCR4, παίζουν ρόλο στην κυτταρική επιβίωση και καταστέλλουν την κυτταρική γήρανση, αντίθετα με τα παράλογα CAF1. Συγκεκριμένα, οι CNOT6 και CNOT6L, ταυτοποιήθηκαν ως ρυθμιστές κλειδιά του παράγοντα IGFBP5 (insulin-like growth factor-binding protein 5), που επάγει το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου και τη γήρανση, μέσω του εξαρτώμενου από την p53 μονοπατιού (Mittal et al., 2011). Είναι επίσης γνωστό, πως οι δύο αυτές υπομονάδες, CNOT6L και CNOT6, σχηματίζουν σταθερότερα σύμπλοκα με την CNOT7 από ότι με την CNOT8 (Lau et al., 2009). Η υπομονάδα CNOT6L, αλλά όχι η παράλογή της CNOT6, επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο, ρυθμίζοντας τα επίπεδα mRNA του αναστολέα p27/Kip1 σε κύτταρα ινοβλαστών ποντικού (Morita et al., 2007). Για τη CNOT6, το γονίδιο της οποίας χαρτογραφείται στην περιοχή 5q35.3, έχει βρεθεί, ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση των κυττάρων σε βλάβες του DNA (DDR). Όταν υπάρχει βλάβη στο DNA, μπλοκάρει την καταλυτική ενεργότητα της CHK2 κινάσης και αυτή η αναστολή αυξάνει την κυτταροτοξικότητα αντικαρκινικών φαρμάκων, όπως είναι η σισπλατίνη και η μπλεομυκίνη (Sanchez-Perez et al., 2008). Τέλος, η υπομονάδα αυτή αποτελεί συστατικό των P-bodies και απαιτείται για τον σχηματισμό τους σε κύτταρα HeLa (Cougot et al., 2004; Andrei et al., 2005).

1.6 Η τεχνολογία του RNA interference (RNAi)

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

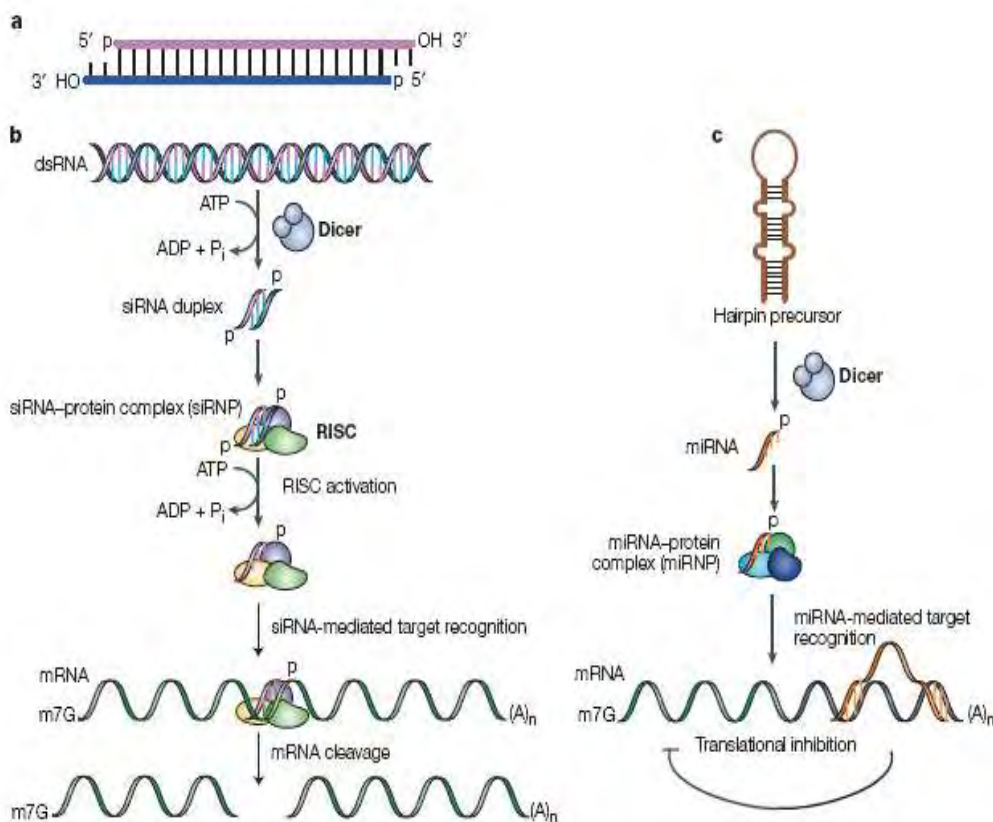
Το RNAi είναι ένα φυσικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα τόσο στα φυτά όσο και στους μύκητες και τα ζώα. Σε όλα τα ζωικά βασίλεια δίκλινα μόρια RNA εμπλέκονται σε αυτό το μηχανισμό. Μόλις το 2001 εφαρμόστηκε και σε κύτταρα θηλαστικών. (Fire et al., 1998; Elbashir et al., 2001).

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

Μονοπάτι siRNA: Επιμήκη δίκλινα μόρια RNA (dsRNA) ή δίκλινα μόρια RNA με δομή φουρκέτας (hairpin RNA), επεξεργάζονται από τη Dicer, ένα ένζυμο με ενεργότητα RNAάσης III. Ως αποτέλεσμα παράγονται μικρότερα μόρια, τα siRNAs, τα οποία φέρουν μονόκλινα δινουκλεοτιδικά 3' άκρα και φωσφορυλιωμένα 5' άκρα, ενώ το μήκος τους δεν ξεπερνά τα 19 ζεύγη βάσεων. Εναλλακτικά, μπορούν να εισαχθούν στο κύτταρο έτοιμα siRNAs μήκους 19-23 νουκλεοτιδίων (αυτά παρακάμπτουν πιο εύκολα την αντίδραση ιντερφερόνης του κυττάρου συγκριτικά με τα μεγάλα δίκλινα μόρια RNA), τα οποία και φωσφορυλιώνονται από κυτταρικές κινάσες. Ακολούθως τα παραγόμενα siRNAs ενσωματώνονται στο RNA-επαγόμενο σύμπλεγμα σίγησης το RISC. Το τελευταίο καταλύει το ξετύλιγμα των δύο κλώνων των siRNAs, με ATP-εξαρτώμενο τρόπο και οι ξετυλιγμένοι αντινοσηματικοί (antisense) κλώνοι οδηγούν το RISC στα συμπληρωματικά mRNAs-στόχους,

γεγονός που πυροδοτεί την ενδονουκλεολυτική πέψη των mRNAs (**Εικόνα 12b**).

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



Εικόνα 12: Μονοπάτια siRNA και miRNA (Derek et al., 2003).

Τα miRNAs μεταγράφονται από την RNA pol II σε μεγάλα δίκλιωνα μόρια RNA που φέρουν δομές βρόχου και καλούνται pri-miRNAs. Αυτά κόβονται από το σύμπλεγμα Drosha και παράγονται τα pre-miRNAs (70 νουκλεοτίδια), τα οποία με τη σειρά τους εξέρχονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα όπου και αναλαμβάνει δράση η Dicer. Η τελευταία παράγει μικρά μονόκλιωνα miRNAs (των 22 νουκλεοτιδίων) τα οποία ενσωματώνονται στο σύμπλεγμα miRNP που καθοδηγείται στο mRNA-στόχο πυροδοτώντας την καταστολή της έκφρασης του (**Εικόνα 12c**).

2) ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι αποαδενυλάσες εμπλέκονται στη ρύθμιση του χρόνου ζωής των mRNAs, καταλύοντας το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμηση τους, που είναι η βράχυνση των πολυ(A) ουρών, ρυθμίζοντας έτσι τη γονιδιακή έκφραση. Σκοπός της εργασίας είναι η κατανόηση της βιολογικής σημασίας των αποαδενυλασών CNOT6 και CNOT8, καθώς αποτελούν δύο από τις τέσσερις καταλυτικές υπομονάδες, του κυριότερου συμπλόκου αποαδενυλίωσης στον άνθρωπο, CCR4-NOT. Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας κρίθηκε απαραίτητη η *in vivo* αποσιώπηση των αποαδενυλασών CNOT6 και CNOT8, μίας κάθε φορά με τη χρήση μικρών δίκλωνων shRNA μορίων. Ακολούθησε η ανάλυση της επίδρασής της στα επίπεδα έκφρασης ενός συνόλου επιλεγμένων παραγόντων (αποαδενυλάσες, ογκογονίδια, πρωτεΐνες που σχετίζονται με το mRNA κ.α.), μέσω της τεχνικής RT-qPCR και πραγματοποιήθηκε τέλος, ανάλυση της έκφρασης σε επίπεδο γονιδιώματος μέσω πειραμάτων DNA μικροσυστοιχιών (microarrays).

3) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Χημικές ουσίες

- Antibiotic-Antimycotic (Biosera)
- Αγαρόζη (BIO-RAD)
- Αιθανόλη (Merck)
- Αμπικιλίνη (Sigma)
- Bromophenol Blue (Research Organics)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haen)
- GelRed Nuclein Acid Stain (Biotium)
- Γλυκερόλη (Panreac)
- D(+) Γλυκόζη (Panreac)
- Dimethyl sulfoxide DMSO (Sigma)
- DMEM (Biosera)
- DNA KB marker (GenScript)
- DNA marker 100 bp (Invitrogen)
- Fetal Bovine Serum FBS (Gibco)
- Ισοπροπανόλη (Scharlau)
- KH₂PO₄ (Merck)
- LB Agar (Scharlau)
- LB Broth (Scharlau)
- MEM (Biosera)
- Na₂HPO₄ (Merck)
- NaCl (Panreac)
- NaOH (Merck)
- Οξικό οξύ (Merck)
- Phosphate buffered saline PBS Tablets (Calbiochem)
- Protease Inhibitors (Roche)
- Puromycin (Sigma)
- Tris base (Merck)
- Trypan blue solution 0,4%(Sigma)
- Trypsin-EDTA 5% 10x (Gibco)

3.1.2 Διαλύματα

Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων:

- I. Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης (50x): Tris base 24,2% v/w, Οξικό οξύ 5,71% w/w, EDTA 0,05M, pH 8,6

- II. Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων (6x)-
διάλυμα φορτώματος δειγμάτων: Bromophenol Blue 0,09%, Xylene
Cyanol 0,09%, Γλυκερόλη 60%, EDTA 60mM

Διάλυμα λύσης Hep2 κυττάρων:

600mM KCl, 20mM Tris-HCl pH=7,8, 20% γλυκερόλη, 4% αναστολείς
πρωτεασών

Θρεπτικά Διαλύματα:

- I. MEM: 2 ή 10% FBS (ανάλογα τον επιθυμητό ρυθμό ανάπτυξης,
1% Antibiotic-antimycotic)
- II. Διάλυμα κρουπροστασίας Hep2 κυττάρων: 10% DMSO, 20%
FBS, MEM
- III. LB Broth
- IV. LB Agar
- V. SOB

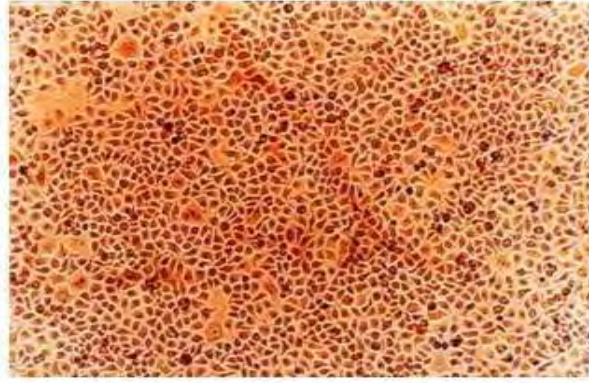
Διαλύματα για τη διαμόλυνση Hep2 κυττάρων:

Lipofectamine™ 2000 και Lipofectanine Plus Reagent (Invitrogen)

3.1.3 Κυτταρικές σειρές

DH5a: Στέλεχος *E. coli* που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή και κλωνοποίηση πλασμιδιακού DNA. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για την αναγέννηση των πλασμιδίων που περιέχουν τα ειδικά shRNAs για την αποσιώπηση των CNOT6 και CNOT8.

Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα *Hep2*: Πρόκειται για ανθρώπινη, ετεροπλοειδή, καρκινική κυτταρική σειρά (συγκεκριμένα προέρχεται από επιδερμικό καρκίνωμα του λάρυγγα μετά από επιμόλυνση με κύτταρα HeLa). Σχηματίζουν μονόστιβες επιθηλιακές επιφάνειες στο ταπήτιο ανάπτυξης (**Εικόνα 8**).

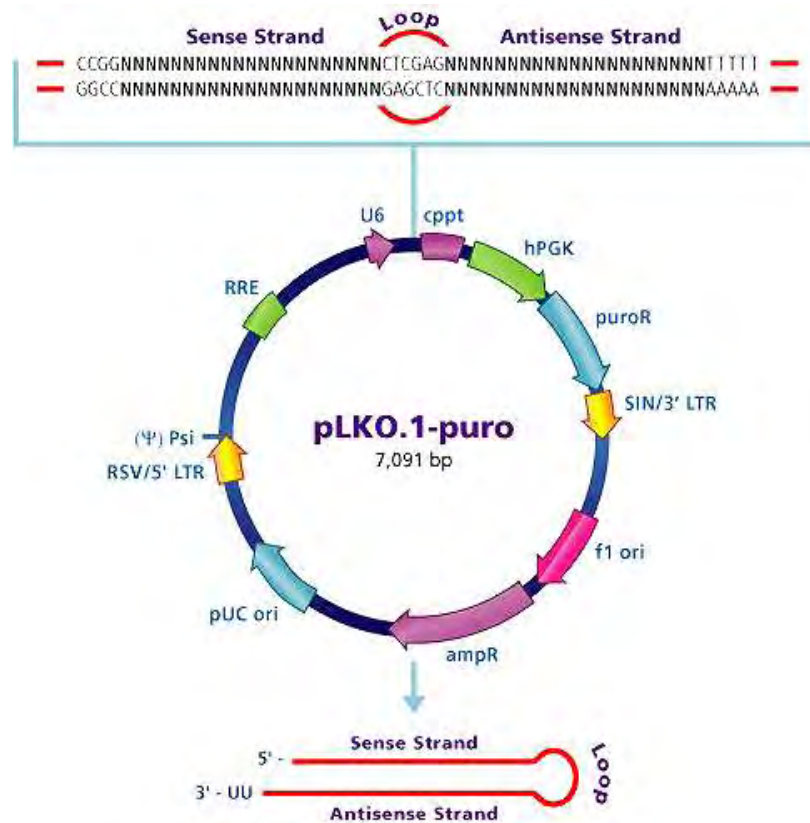


Εικόνα 8: Κύτταρα Hep2, μεγέθυνση 10x.

3.1.4 Short-Hairpin RNAs (shRNAs)

Για την αποσιώπηση της CNOT6 ή της CNOT8, χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικά shRNAs κλωνοποιημένα στο λεντι-ϊϊκό πλασμιδιακό φορέα pLKO.1-puro (Εικόνα 9). Τα shRNAs και τα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου φορέα παρέχουν ένα ισχυρό μοριακό εργαλείο μακροπρόθεσμης, σταθερής αποσιώπησης του επιθυμητού γονιδίου, μέσω του μηχανισμού RNAi καθώς και τη δυνατότητα αναγέννησης του πλασμιδίου μετά το μετασχηματισμό βακτηρίων με αυτό. Ο φορέας pLKO.1-puro, περιέχει γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και την πουρομυκίνη, παρέχοντας τη δυνατότητα επιλογής των βακτηριακών και ευκαρυωτικών κυττάρων αντίστοιχα, που έλαβαν επιτυχώς το πλασμίδιο.

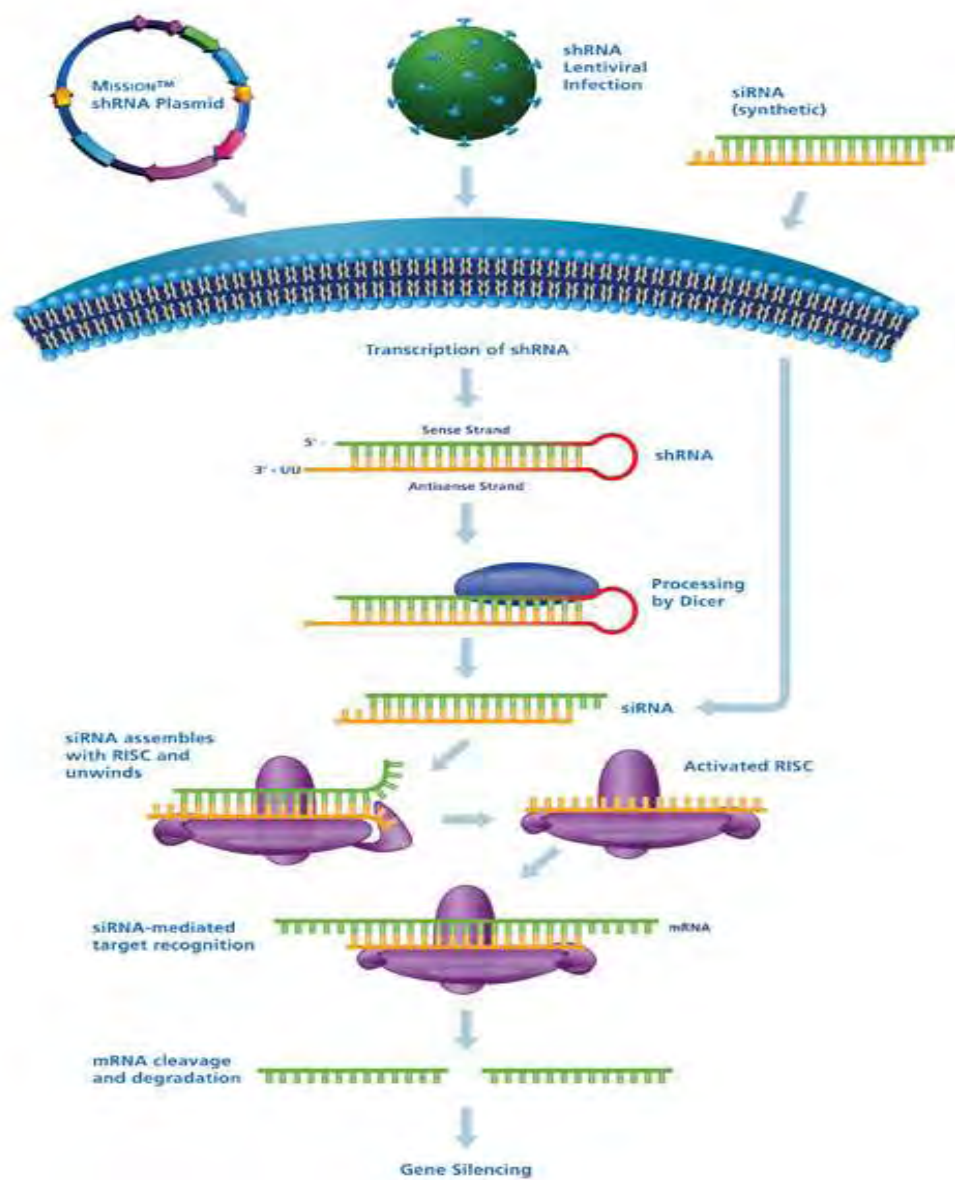
Ο μηχανισμός δράσης των shRNAs, έγκειται στην *in vivo* μεταγραφή, της κλωνοποιημένης στο φορέα, αλληλουχίας του shRNA και στην παραγωγή ενός μικρού δίκλωνου μορίου RNA που φέρει μια δευτεροταγή δομή φουρκέτας. Στην περίπτωση αυτού του τύπου συνθετικού RNA, η ώριμη μορφή του που προκαλεί την αποσιώπηση είναι δύσκολο να καταταγεί στα miRNA ή στα siRNA. Ενώ είναι πανομοιότυπο με τα pre-miRNA, σε αντίθεση με τα φυσικά ενδογενή miRNA, δεν προέρχεται από ένα μόριο pri-miRNA και στις διαδικασίες επεξεργασίας του στα ζώα δεν εμπλέκεται η Droscha, που είναι υπεύθυνη για το πρώτο στάδιο της βιογένεσης των miRNA. Αντίθετα, ακολουθεί το τυπικό μονοπάτι βιογένεσης των siRNA, τα οποία προκύπτουν με απευθείας επεξεργασία από την Dicer, μία RNase III.



Name	Description
cppt	Central polypurine tract
hPGK	Human phosphoglycerate kinase eukaryotic promoter
puroR	Puromycin resistance gene for mammalian selection
SIN/LTR	3' self inactivating long terminal repeat
f1 ori	f1 origin of replication
ampR	Ampicillin resistance gene for bacterial selection
pUC ori	pUC origin of replication
5' LTR	5' long terminal repeat
Psi	RNA packaging signal
RRE	Rev response element

Εικόνα 9: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pLKO.1- puro της Sigma. Παρατίθεται και πίνακας με σημαντικές αλληλουχίες-στοιχεία του φορέα.

Εν συνεχεία, τα μικρά (19-23 nt) αυτά δίκλινα μόρια RNA (siRNA), στρατολογούνται στο σύμπλοκο RISC, που περιέχει τη νουκλεάση Argonaute καθώς και πληθώρα άλλων κυτταρικών παραγόντων. Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο siRISC, στο οποίο περιέχεται πλέον μόνο ο ένας κλώνος του siRNA μορίου, ο κλώνος οδηγός, καθοδηγείται στο στόχο mRNA και τον πέπτει (**Εικόνα 10**) (Watson et al., Recombinant DNA).



Εικόνα 10: Μηχανισμός αποσιώπησης μέσω πλασμιδιακών φορέων που μεταγράφουν shRNAs (Sigma).

Βάσει του πρωτοκόλλου της Sigma σχεδιάστηκαν πέντε ειδικά και εξειδικευμένα shRNAs, έναντι του mRNA της ανθρώπινης CNOT6 και άλλα πέντε για την αποσιώπηση της ανθρώπινης CNOT8, των οποίων τις αλληλουχίες επιλέξαμε από τον κατάλογο της Sigma. Σχεδιάστηκε, μία ακόμη αλληλουχία shRNA, η οποία δεν στοχεύει κανένα γονίδιο εντός του κυτάρου και χρησιμοποιείται ως αρνητικό control (Non target shRNA control vector). Η

αλληλουχία αυτή περιέχει τέσσερις αναντιστοιχίες ζευγών βάσεων, για κάθε γνωστό ανθρώπινο γονίδιο. Αυτό μας επιτρέπει να εξετάσουμε την επίδραση της διαμόλυνσης του κυττάρου με ένα shRNA, στη γονιδιακή έκφραση και να ερμηνεύσουμε συγκριτικά, την επίδραση της αποσιώπησης που επιτυγχάνεται με τη χρήση των ειδικών shRNAs. Τα siRNAs/shRNAs για να είναι αποτελεσματικά θα πρέπει να διαθέτουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Taxman et al., 2006):

Κριτήρια επιλογής siRNAs/ shRNAs

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

Στον **Πίνακα 3** συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά των επιλεγμένων shRNAs. Όλα τα shRNAs που σχεδιάστηκαν, στοχεύουν σε διαφορετικές θέσεις κατά μήκος του mRNA της CNOT6 ή της CNOT8 και έχουν τη γενική δομή:

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

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά των σχεδιασμένων shRNAs έναντι των CNOT8 και CNOT6. Με πράσινα και μπλε γράμματα παρουσιάζονται το 5' και 3' άκρο αντίστοιχα, ενώ με κόκκινα η αλληλουχία της φουρκέτας. Εκατέρωθεν αυτής, με μαύρα γράμματα η κωδική και μη κωδική αλληλουχία.

Αλληλουχία θηλιάς (5'→3')	Θέση στο mRNA	Αλληλουχία των 5 shRNAs
shRNAs έναντι της CNOT8		
CTCGAG	567	CCGGCCCATCCATTTATGATGTGAACTCGAGTTCACATCATAAAATGGATGGGTTTT
CTCGAG	228	CCGGGCTGGGCCTTACATTCACAAACTCGAGTTTGTGAATGTAAGGCCAGCTTTT
CTCGAG	849	CCGGCCTGGCGATTATCAACAACATCTCGAGATGTTGTTGATAATCGCCAGGTTTT
CTCGAG	656	CCGGGCTGACAGGAATGGCTTTCTTCTCGAGAAGAAAGCCATTCTGTGAGCTTTTT
CTCGAG	142	CCGGGTGCGACCAATTGGTGAATTTCTCGAGAAATTCACCAATTGGTCGCACTTTTG
shRNAs έναντι της CNOT6		
CTCGAG	163	CCGGGCTTTGCATTTGAGTGACAATCTCGAGATTGTCACCTCAAATGCAAAGCTTTTTG
CTCGAG	399	CCGGCCAGGATATATTGAACCTTTACTCGAGTAAAGGTTCAATATATCCTGGTTTTG
CTCGAG	1175	CCGGGCAACCTCAAATCCAGTGTTCTCGAGAAACACTGGATTGAGGTTGCTTTTTG
CTCGAG	131	CCGGGCGCATCTTTGTGGTCACTAACTCGAGTTAGTGACCACAAAGATGCGCTTTTTG
CTCGAG	1458	CCGGCAAGGGTATAATAGACTACATCTCGAGATGTAGTCTATTATACCCTTGTTTTG

3.1.5 Εκκινητές

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης της CNOT6, της CNOT8 και των υπολοίπων εξεταζόμενων παραγόντων (περιγράφονται στον **Πίνακα 4**) με Real Time PCR, σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος PRIMER 3, εκκινητές (primers) ειδικοί για το cDNA του κάθε υπό μελέτη παράγοντα. Ο κάθε εκκινητής ελέγχθηκε ως προς την εξειδίκευση του για το αντίστοιχο cDNA-στόχο, με το πρόγραμμα Blastn.

Πίνακας 4: Συνοπτική παρουσίαση των επιλεγμένων παραγόντων, των οποίων τα επίπεδα εξετάστηκαν μετά την αποσιώπηση της CNOT6 ή της CNOT8 (παρατίθενται και οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση της RT-PCR καθώς και τα αναμενόμενα μεγέθη των ενισχυμένων προϊόντων).

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	Primers (5'→3') - Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
<u>CNOT6</u> (CCR4-NOT transcription complex, subunit 6)	Αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (<i>Lau et al., 2009</i>)	Fwd AGCTGTCATGGGAAGAATGG Rev GGGCAGCCACTGATGTTATT 221bp
<u>CNOT8</u> (CCR4-NOT transcription complex, subunit 8)	Αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (<i>Lau et al., 2009</i>)	Fwd GGATTTGCAGAGGATTGGAA Rev TCACTGCTGCATGTTGTTGA 232bp
<u>CNOT7</u>	Οι CNOT7 και PARN ανήκουν στην ίδια οικογένεια αποαδενυλασών DEDD, συμβάλλοντας στην αποαδενυλίωση του mRNA. Στους περισσότερους ευκαρυώτες εκτός από το αποαδενυλάσες των συμπλόκων CCR4-NOT και PAN2-PAN3 υπάρχει και ένα τρίτο ένζυμο αποαδενυλίωσης, η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση PARN.	Fwd GTCCTCTGTGAAGGGGTCAA Rev GACTGCTTGTGGCTTCTC 419bp
<u>PARN</u>		Fwd CAGCAGAAACATGCCAAAGA Rev CCAAGAGTCTGGGGAAAACA 211bp
<u>CNOT6L</u> (CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like)	Αποτελεί μεταβλητή υπομονάδα του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (<i>Lau et al., 2009</i>)	Fwd CGGCTCTTCCAGCTACAAAC Rev GGAAGCTGCTCTGGATGAAC 143bp
<u>NOCTURNIN</u> (CCR4 carbon)	Αποαδενυλάση κατηγορίας EEP, εξαρτώμενη από δισθενή κατιόντα Mg ²⁺ . Υπόκειται σε κικράδιο έλεγχο (<i>Goldstrohm A. and Wickens M., 2008</i>)	Fwd GCCAAGACTGAACAGCAG Rev

catabolite repression 4-like)		GGCAATCTGTCCTCAGATCC 175bp
<u>PARNL</u> (PNLDC1 poly(A)-specific ribonuclease (PARN)-like domain containing 1)	Ανήκει στην DEDD υπεροικογένεια αποαδενυλασών (Goldstrohm A. and Wickens M., 2008)	Fwd GACCCCTCCAGAAAGCTAC Rev GGGGCACTTTGTCTCAACAT 236bp
<u>PAN2</u>	Ανήκει στην υπεροικογένεια αποαδενυλασών DEDD με συντηρημένα κατάλοιπα Asp και Glu στο καταλυτικό κέντρο. Αποικοδομεί το μισό μήκος της πολυ(A) ουράς μέσα στον πυρήνα, ενώ το υπόλοιπο μέρος αποικοδομείται από τις αποαδενυλάσες CAF1 και CCR4 στο κυτταρόπλασμα (Goldstrohm A. and Wickens M., 2008)	Fwd CTCATCGGGGGACTCTGTTA Rev CCAGGCCTGTGTATTCTGGT 205bp
<u>ANGEL 1</u>	Ανήκει στην EEP υπεροικογένεια αποαδενυλασών με συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στο ενεργό κέντρο. Υπάρχει σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Goldstrohm A. and Wickens M., 2008)	Fwd AGCATAGCACCTGAGCCTGT Rev GGTCCTGAGCCAGGATGTTA 220bp
<u>ANGEL2</u>	Ανήκει στην EEP υπεροικογένεια αποαδενυλασών με συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στο ενεργό κέντρο. Υπάρχει σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Goldstrohm A. and Wickens M., 2008)	Fwd GTGTTGCCACCAGAAAGAT Rev GGGGCCAAATTGGAATAGAT 195bp
<u>2'-PDE</u> (PDE12 phosphodiesterase 12)	Η 2'-PDE είναι μια φωσφοδιεστεράση των θηλαστικών και βρίσκεται σε πολλά σημεία του εγκεφάλου. Η ανθρώπινη 2' PDE αποτελεί αποαδενυλάση καθώς αποικοδομεί πολυ(A) ουρές όταν τα 5' φωσφορικά από κάθε αδενοσίνη είναι ιοντικά συνδεδεμένα ανάμεσα στις 2' και 3' υδροξυλιωμένες θέσεις. Έχει δειχθεί ότι η 2'-PDE μειώνει τα επίπεδα του cAMP μέσω αύξησης του cGMP (Goldstrohm A. and Wickens M., 2008)	Fwd CGCCAGAACCTTATCCAGAA Rev CTCGAGGGCTTCGTAGAATG 228bp
<u>PAPOLA</u>	Πολυ(A) πολυμεράση A. Αδενυλιώνει το 3' άκρο των mRNAs.	Fwd AATGACAGCAGCCTCGACTT Rev TGTACCCCTGAGCTTTCAC 216bp

<u>PABPC</u>	Κατά την έξοδο του mRNA στο κυτταρόπλασμα, η πολυ(A) προσδεμένη πρωτεΐνη (PABP) συνδέεται στην ουρά και το σταθεροποιεί διευκολύνοντας την μετάφραση. Το σύμπλοκο PABP-παραγόντων έναρξης μετάφρασης (eIF4G) προσδένεται στην cap-binding protein eIF4E και ενισχύει την μετάφραση του mRNA (Goldstrohm A. and Wickens M., 2008)	Fwd ATGGCAGCTATCCCACAGAC Rev GTAGGGTGCATGGCTTGAAT 500bp
<u>eIF4E</u>	Η μη ρύθμιση της μετάφρασης προκαλεί ανώμαλη κυτταρική αύξηση και επιβίωση. Ο παράγοντας eIF4E προσδένεται στο 5' άκρο του mRNA ελέγχοντας την μετάφραση. Υπερέκφραση του παράγοντα μπορεί να οδηγήσει σε μετάφραση ενός υποσυνόλου mRNAs και να παρεμποδίσει την απόπτωση. Επίσης μπορεί να προκαλέσει μεταμόρφωση κυττάρων του πλακώδους επιθηλίου. Η αποσιώπηση αυτού του παράγοντα, πιθανώς να είναι χρήσιμη για θεραπεία του καρκίνου (Mamane et al., 2007; Robert and Pelletier, 2009; Oridate et al., 2005)	Fwd CAGGAGGTTGCTAACCCAGA Rev CTCCCCGTTTGTCTCTCA 256bp
<u>CBP20 –CBP80</u>	Ο CBP20 σχετίζεται με την nonsense αποικοδόμηση του mRNA. Μαζί με τον παράγοντα CBP80 αποτελούν συστατικά του πυρηνικού συμπλόκου πρόσδεσης καλύμματος το οποίο προστίθεται μετα-μεταφραστικά. Ο παράγοντας CBP20 σχετίζεται με τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4G (Maquat et al., 2001)	(CBP20) Fwd ACGCCATGCGGTACATAAAT Rev TGTGCCAGTTTTCCATAGC 175bp (CBP80) Fwd GCCCTCTGTTAGCTGTTGC Rev GATGGTTCCTCCAGACCTCA 292bp
<u>LSM</u>	Οι πρωτεΐνες Lsm 2p- 8p αλληλεπιδρούν με το U6 snRNA και συμβάλουν στο μάτισμα του pre-mRNA. Ο ακριβής μηχανισμός των πρωτεϊνών στο μάτισμα παραμένει άγνωστος. Οι Lsm 1-7 ενεργοποιούν την αφαίρεση της 5' καλύπτρας του mRNA (Weihsai and Parker, 2000)	Fwd GCTTCGAGATGGAAGGACAC Rev ATACTTGCTGGAGGGGTGTG 209bp
<u>AGO2</u>	Ενδονουκλεάση που αποτελεί συστατικό του συμπλόκου RISC. Σχηματίζει σύμπλοκο με τα miRNAs και τα siRNAs (σύμπλοκο RNA αποσιώπησης) (RISC/miRNPs). Η ενδογενής πρωτεΐνη Ago2 προσδένεται άμεσα στα pre-miRNAs ανεξάρτητα από την πρωτεΐνη Dicer (έχει μία dsRNA-προσδεδεμένη	Fwd GACAACCAGACCTCGACCAT Rev GGTGAGGTCTTGACCACGTT 599bp

	περιοχή) και τα σύμπλοκα Ago2-pre-miRNA βρίσκονται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των ανθρώπινων κυττάρων. Είναι αυτή που πέπτει το στόχο mRNA (Kiriakidou et al. 2009).	
<u>BTG2</u>	Κύριο μέλος της οικογένειας των TOB αντιπολλαπλασιαστικών πρωτεϊνών. Εμπλέκεται στην κυτταρική ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την επιδιόρθωση του DNA. Έχει αντι-αποπτωτικό ρόλο στη νευρογένεση. Αλληλεπιδρά με τον παράγοντα CAF1a και τον CAF1b, που είναι τα κύρια συστατικά του CCR4-NOT συμπλόκου καταστέλλοντας την ενεργότητα αποαδενυλάσης της CAF1 (Yang, 2009)	Fwd AGCGAGCAGAGGCTTAAGGT Rev TGGAGACTGCCATCACGTAG 477bp
<u>HIF1-a</u> (Hypoxia-inducible factor 1a)	Ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην αγγειογένεση, στην κυτταρική επιβίωση, στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην προσαρμοστική απόκριση των κυττάρων στη υποξία και σχετίζεται με την επιθετικότητα του καρκίνου. Υπερέκφραση του HIF1-a παρατηρήθηκε σε υπερπλασίες (61%) και καρκινώματα (87%) και αυξάνει το ρυθμό αγγειογένεσης (Horrée et al., 2007; Semenza, 2003)	Fwd CCCAATGGATGATGACTTCC Rev CCTTTTCCTGCTCTGTTTGG 327bp
<u>SLC2A1</u> (GLUT-1)	Οι μεταφορείς γλυκόζης (Glut) διευκολύνουν την πρόσληψη γλυκόζης και συνήθως υπερεκφράζονται σε διάφορα είδη καρκίνου, ειδικά ο Glut-1. Στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, τα οποία έχουν χαμηλό ρυθμό διαφοροποίησης και πολλαπλασιάζονται γρήγορα, έχει παρατηρηθεί αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του μεταφορέα Glut-1 παρέχει ένα χρήσιμο προγνωστικό δείκτη για το καρκίνο του παγκρέατος (Pizzi S, 2009). Πειράματα επώασης καρκινικών κυττάρων από μαστό και πνεύμονα με αντισώματα anti-Glut-1, αποκαλύπτουν μείωση της κυτταρικής αύξησης (κατά 50% και 75% αντίστοιχα) και αύξηση του ρυθμού απόπτωσης (Rastogi et al., 2007).	Fwd GGGCCAAGAGTGTGCTAAAG Rev ACAGCGACACGACAGTGAAG 309bp
<u>K-Ras</u>	Η k-ras είναι μια κυτταροπλασματική (στην εσωτερική πλευρά) GTPάση που κωδικοποιείται στον άνθρωπο από το γονίδιο KRAS και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές πορείες μεταγωγής σήματος. Συσσωρευση μεταλλάξεων στο KRAS, μπορεί	Fwd TGTGGTAGTTGGAGCTGGTG Rev AAAGAAAGCCCTCCCCAGT 221bp

	να το μετατρέψει σε ογκογονίδιο. Το 30% περίπου των ανθρώπινων καρκίνων, εμφανίζουν μετάλλαξη στο γονίδιο αυτό. Η οικογένεια των πρωτεϊνών <i>ras</i> εμπλέκεται σε μια σειρά διεργασιών όπως ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η διαφοροποίηση, η απόπτωση, η μνήμη και η μάθηση (Kranenburg, 2005).	
<u>C-Myc</u>	Μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων <i>myc</i> , τα μέλη της οποίας πιστεύεται πως ελέγχουν την έκφραση του 15% του συνόλου των ανθρώπινων γονιδίων μέσω δέσμευσης σε E-boxes και επιστρατεύοντας ακετυλ-τρανσφεράσες των ιστονών. Επάγει την έκφραση αρκετών γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη, ενώ λειτουργεί και αντι-αποπτωτικά.	Fwd CAGCGACTCTGAGGAGGAAC Rev TCGGTTGTGCTGATCTGTC 274bp
<u>P53</u>	Ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, που κωδικοποιείται από το γονίδιο TP53. Αποτρέπει τη δημιουργία μεταλλάξεων στο γονιδίωμα, ενεργοποιώντας επιδιορθωτικά γονίδια ως απόκριση σε βλάβες του DNA. Προκαλεί σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1/S, κατά την DDR. Επάγει την απόπτωση, όταν η βλάβη είναι μη αναστρέψιμη (Matlashewski et al. 1984; Read P, Strachan T, 1999)	Fwd TCAACAAGATGTTTTGCCAACTG Rev ATGTGCTGTGACTGCTGTAGATG 101bp
<u>18S rRNA</u>	Μέλος του ριβοσωμικού RNA. Αποτελεί συστατικό της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας 40S. Είναι το ευκαρυωτικό πυρηνικό ομόλογο του 16S rRNA των προκαρυωτών και των μιτοχονδρίων. Είναι ένα από τα βασικά συστατικά όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων. Δεν έχει πολυ(A) ουρά, καθώς δεν μεταφράζεται και θεωρείται ως housekeeping gene, γιατί τα επίπεδά του εντός του κυττάρου παραμένουν σταθερά (Lewin, GENES VIII)	Fwd AGAAGGCTGGGGCTCATTTG Rev AGGGGCCATCCACAGTCTTC 253 bp
<u>GAPDH</u>	Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης. Το ένζυμο αυτό, καταλύει το έκτο βήμα της γλυκόλυσης. Εμπλέκεται ακόμη και σε μη μεταβολικές διεργασίες, όπως είναι η ενεργοποίηση της μεταγραφής, η έναρξη της απόπτωσης και η μεταφορά των κυστιδίων από το ενδοπλασματικό δίκτυο στη συσκευή Golgi. Θεωρείται ως housekeeping gene, γιατί	Fwd AGAAGGCTGGGGCTCATTTG Rev AGGGGCCATCCACAGTCTTC 258 bp

	τα επίπεδά του εντός του κυττάρου παραμένουν σταθερά (Stryer, Biochemistry)	
<u><i>β-actin</i></u>	<p>Η βήτα- ακτίνη είναι μία από τις 6 διαφορετικές ισομορφές ακτίνης που έχουν ταυτοποιηθεί στους ανθρώπους. Είναι μία από τις δύο ακτίνες του κυτταροσκελετού, που δεν βρίσκονται στους μύες. Είναι υψηλά διατηρημένη πρωτεΐνη και εμπλέκεται στην κινητικότητα, τη δομή και την ακεραιότητα του κυττάρου. Τα επίπεδά της παραμένουν σταθερά και χρησιμοποιείται έτσι, σαν control, μεταξύ άλλων, όσων αφορά την ακεραιότητα των κυττάρων, την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και σε τεχνικές όπως Western Blotting (“Entrez Gene: ACTB actin, beta”)</p>	<p>Fwd GGACTTCGAGCAAGAGATGG</p> <p>Rev AGCACTGTGTTGGCGTACAG</p> <p>234 bp</p>

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Απόψυξη κυττάρων Hep2

- 1) Τα φιαλίδια (cryovials) που περιέχουν τα κύτταρα από το υγρό N2 όπου ήταν αποθηκευμένα, εμβαπτίζονται αμέσως σε υδατόλουτρο 37°C με ήπια ανάδευση.
- 2) Αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα γίνεται καθαρισμός του φιαλιδίου με 70% αιθανόλη εξωτερικά.
- 3) Ακολουθεί μεταφορά του αιωρήματος των κυττάρων σε πλαστική φλάσκα-75T και γίνεται προσθήκη υλικού MEM με 10% ορό (FBS) και 1% αντιβιοτικό/ αντιμυκοτικό (penicillin-streptomycin).
- 4) Επώαση των κυττάρων στους 37°C για 4-8 ώρες μέχρι να προσκολληθούν στο ταπήτιο της φλάσκας.
- 5) Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και προσθήκη φρέσκου, με 10% ορό καθώς το DMSO που περιέχεται στο αρχικό κρυοπροστατευτικό θρεπτικό υλικό των κυττάρων δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξή τους.

3.2.2 Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας-Τρυψινοποίηση

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

- 1) Αρχικά παρατηρούμε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο. Ελέγχουμε και σημειώνουμε: α. Μορφολογία κυττάρων και β. Πληρότητα ταπητίου (confluency)
- 2) Απομακρύνουμε (με αναρρόφηση) το υλικό της καλλιέργειας.
- 3) «Ξεπλένουμε» τα κύτταρα με διάλυμα PBS 1X.
- 4) Προσθέτουμε διάλυμα θρυψίνης-EDTA 0.05% (0.5ml για φιάλη 75cm²).
- 5) Ανακινούμε τη φλάσκα έτσι ώστε το διάλυμα της θρυψίνης να καλύψει όλο το ταπήτιο και το αφήνουμε για 1'. Παρατηρούμε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο και εν συνεχεία αφαιρούμε την τρυψίνη.
- 6) Μεταφέρουμε τα κύτταρα στον επωαστήρα (κλίβανος 37°C) για περίπου 2'-3'. Παρατηρούμε το σχήμα των κυττάρων στο μικροσκόπιο.
- 7) Χτυπάμε ελαφρά τη φλάσκα στο πλάι, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα.
- 8) Προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού (10ml για φιάλη 75cm²).
- 9) Επαναιωρούμε τα κύτταρα και τα διασπείρουμε ομοιόμορφα με πιπέτα (των 10ml).
- 10) Στο σημείο αυτό μπορούμε να χωρίσουμε τα κύτταρα σε δύο ή περισσότερες φλάσκες ή απλά να απομακρύνουμε τα μισά κύτταρα στην ήδη υπάρχουσα φλάσκα, ανάλογα με την πληρότητα που θέλουμε να έχουν.

3.2.3 Κατάψυξη κυττάρων

- 1) Θρυψινοποίηση κυττάρων.

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

3.2.4 Συλλογή και λύση κυττάρων θηλαστικών

Συλλογή κυττάρων:

- 1) Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων με αποστειρωμένο PBS 1X (2 φορές).
- 2) Θρυψινοποίηση των κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2. και χρήση ειδικών πλαστικών scrapers για την αποκόλληση στο σύνολό τους.
- 3) Ομογενοποίηση των αποκολλημένων κυττάρων με πιπετάρισμα σε PBS 1X ή MEM και μεταφορά τους σε tubes 1,5ml.
- 4) Φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5 min στις 3000rpm στους 4°C.
- 5) Απομάκρυνση του υπερκείμενου προσεκτικά και φύλαξη του ιζήματος στους -80°C.

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














Λύση κυττάρων:

- 1) Επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος που συλλέξαμε και αποθηκεύσαμε, σε 25μL Lysis Buffer 4X, παρουσία αναστολέων πρωτεασών.
- 2) Πάγωμα σε υγρό άζωτο και ακολούθως θέρμανση του δείγματος στους 60°C για 3min (επανάληψη βήματος 3 φορές).
- 3) Φυγοκέντρηση δείγματος σε μέγιστη ταχύτητα για 1min και συλλογή υπερκείμενου, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτες σε πρωτεϊνικό κυρίως επίπεδο.

3.2.5 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών

Για την απομόνωση ολικού RNA από τα επεξεργασμένα με shRNAs κύτταρα που συλλέχθηκαν με το πρωτόκολλο της παραγράφου 3.2.4, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό Total RNA Isolation kit Nucleospin RNAII της Macherey Nagel. Η διαδικασία απομόνωσης είναι βασισμένη στην μέθοδο των Chomczynski και Sacchi στην οποία χρησιμοποιείται στο αρχικό στάδιο της ομογενοποίησης ιστού και εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων σε όξινο φαινολικό διάλυμα θειοκυανικής γουανιδίνης. Συνοπτικά, η διαδικασία φαίνεται στην **Εικόνα 11**. Αρχικά περίπου 30 mg από κάθε δείγμα ομογενοποιούνται με την προσθήκη 350 μ L διαλύματος RA1 παρουσία 3.5 μ L β -μερκαπτοαιθανόλης. Το ομογενοποίημα τοποθετείται σε ειδικές στήλες οι οποίες επιτρέπουν το φιλτράρισμα του δείγματος μετά από φυγοκέντρηση στις 11000 x g για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διηθημένο μίγμα μεταφέρεται σε νέους αποστειρωμένους σωλήνες erpendorf, στο οποίο προστίθενται 0.350 ml αιθανόλης 70%. Ακολουθεί δέσμευση του ολικού RNA σε μικρές στήλες χρωματογραφίας και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8000 x g για 30 sec σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απομάκρυνση τυχόν αλάτων με ειδικό διάλυμα (Membrane Desalting Buffer, MDB) και επώαση του δείγματος παρουσία DNAάσης I, για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το βήμα αυτό εξασφαλίζει την ελάχιστη δυνατή επιμόλυνση του δείγματός μας με γονιδιωματικό DNA, γεγονός το οποίο θα επηρέαζε την τελική ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR. Ακολουθούν σταδιακές φυγοκεντρήσεις του δείγματος, κατά τις οποίες απομακρύνονται τα παραπροϊόντα της πέψης με την DNAάση I.

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

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

Εικόνα 11: Συνοπτική παρουσίαση του πρωτοκόλλου απομόνωσης ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών.

3.2.6 Ηλεκτροδιάτρηση δεκτικών κυττάρων DH5a (E.coli) με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 (puro-amp)

- 1) Ξεπαγώνουμε το θρεπτικό (SOB) και στεγνώνουμε το επιστρωμένο, με LB-άγαρ και αμπικιλίνη, τρυβλίο στους 37°C.

- 2) Τοποθετούμε την ειδική κυψελίδα της συσκευής ηλεκτροδιάτρησης (electroporator) στον πάγο.
- 3) Σε 990μl SOB προσθέτουμε 10μl 2M γλυκόζης για τη δημιουργία του διαλύματος SOC.
- 4) Ξεπαγώνουμε τα ηλεκτροδεκτικά βακτηριακά κύτταρα από τους -80°C.
- 5) Προσθέτουμε 1μl πλασμιδίου σε 40μl δεκτικών κυττάρων DH5a.
- 6) Ανακατεύουμε με την πιπέτα και τοποθετούμε όλη την ποσότητα στην κυψελίδα, την οποία και εφαρμόζουμε στη συσκευή.
- 7) Για την εκδήλωση του φαινομένου της ηλεκτροδιάτρησης, υπάρχει ένα κατώφλι της τάσης του ηλεκτρικού ρεύματος, που διαπερνά τη μεμβράνη και κυμαίνεται από 0,5-1 V κατά τη διάρκεια ενός παλμού (περίπου 4msec).
- 8) Αμέσως μετά την εφαρμογή του παλμού, προσθέτουμε στα κύτταρα 200μl διαλύματος SOC.
- 9) Επιστρώνουμε 50μl στο τρυβλίο και αφήνουμε να αναπτυχθούν αποικίες O/N, 37°C.
- 10) 12-14h μετά, ενοφθαλμίζεται μία αποικία που επιλέγουμε σε 5ml LB broth που περιέχει αμπικιλίνη. Ακολουθεί επώαση των καλλιεργειών για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm).

3.2.7 Stock γλυκερόλης

Σε 700μl βακτηριακών κυττάρων σε υγρή καλλιέργεια, προσθέτουμε 300μl 50% αποστειρωμένης γλυκερόλης και αποθηκεύουμε στους -80°C.

3.2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

Βακτηριακά κύτταρα DH5a (συνήθως από stock γλυκερόλης) ενοφθαλμίζονται σε 5ml LB broth που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί επώαση των καλλιεργειών για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Η ακόλουθη διαδικασία πραγματοποιείται με βάση το πρωτόκολλο

απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli* , NucleoSpin Plasmid QuickPure:

Καλλιέργεια και συλλογή των βακτηριακών κυττάρων:

Μεταφέρονται 1,5ml από την καλλιέργεια *E. coli* που αναπτύχθηκε σε ένα σωλήνα και φυγοκεντρώνται για 1 min στις 14000 x g. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται αυτό το βήμα.

Λύση των κυττάρων:

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

Δέσμευση του DNA:

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

Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης:

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

Έκλουση του DNA:

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

3.2.9 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με χρήση λιποσωμάτων (Lipofection)

- 1) Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει θρυψινοποίηση μιας T75 flask στην οποία η πληρότητα σε κύτταρα είναι περίπου 90%. Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται μετά από μέτρηση σε πλάκα Newbuer, και σε αυτή τη φλάσκα ο αριθμός τους φτάνει τα $6 \cdot 10^6$ κύτταρα.
- 2) Σε κάθε πηγαδάκι ενός 6-well plate προσθέτουμε το 1/10 από τα παραπάνω θρυψινοποιημένα κύτταρα έτσι ώστε να έχουμε πληρότητα περίπου 90-95% την επόμενη μέρα σε κάθε well μετά από επώαση στους 37°C. Η πληρότητα αυτή ενδείκνυται για τη διαμόλυνση.
- 3) Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε λιποφεκταμίνη, ένα πολυκατιονικό συνθετικό λιπίδιο αναμειγμένο με φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη. Το αντιδραστήριο αυτό συνδυαζόμενο με DNA, σχηματίζει λιποσώματα που συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων και απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους στο εσωτερικό του κυττάρου (στην περίπτωση μας μιλάμε για πλασμίδια που φέρουν shRNAs) (Felger et al., 1994). Μεταβολές των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων DNA και λιποφεκταμίνης είναι απαραίτητες για την βελτιστοποίηση της διαμόλυνσης. Επίσης, είναι αναγκαία στα πειράματα αποσιώπησης και η ύπαρξη control κυττάρων τα οποία διαμολύνονται με το Non Target shRNA control vector, όπως προαναφέρθηκε.
- 4) Για το σχηματισμό των λιποσωμάτων ετοιμάζουμε δύο διαλύματα: ένα DNA mix και ένα Lipo mix σύμφωνα με τους εξής κανόνες:
 - ο λόγος $\mu\text{g DNA} / \mu\text{l χρησιμοποιούμενης Λιποφεκταμίνης} = 1/2$
 - 250μl MEM/ $\mu\text{g DNA}$ (για προετοιμασία του DNA mix)

- 250μl MEM/ 2 μl λιποφεκταμίνης (για την προετοιμασία του Lipo mix)
 - 0,5-4μg DNA απαιτούνται για τη διαμόλυνση των κυττάρων σε κάθε well ενός 6-well plate (Στη συγκεκριμένη εργασία, ως DNA θεωρούμε το μείγμα πλασμιδίων που φέρουν και τα 5 είδη shRNAs έναντι της CNOT6 ή της CNOT8 – ανάλογα με το ποια αποσιωπούμε κάθε φορά. Για την καρκινική σειρά Hep2 που χρησιμοποιούμε, η βέλτιστη ποσότητα DNA για μία επιτυχή διαμόλυνση, είναι 3μg).
- 5) Παρασκευή του transfection mix: Αναμιγνύουμε τα DNA mix και Lipo mix και τα αφήνουμε να επωαστούν για 5-20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
 - 6) Παράλληλα απομακρύνουμε από κάθε well το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και ξεπλένουμε τα κύτταρα με κρύο και αποστειρωμένο PBS 1X δύο φορές. Πριν την προσθήκη του transfection mix προσθέτουμε θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά-αντιμυκοτικά και χωρίς ορό (FBS) σε κάθε well (2ml/well).
 - 7) Μετά το πέρας του χρόνου επώασης του transfection mix, μοιράζουμε το τελευταίο στα κύτταρα που προορίζονται για διαμόλυνση και αφήνουμε το 6-well plate να επωαστεί στους 37°C.
 - 8) Την επόμενη μέρα απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από τα διαμολυσμένα κύτταρα και το αντικαθιστούμε με MEM 10% FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic το οποίο περιέχει επιπλέον και το αντιβιοτικό επιλογής (στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πουρομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 1-10μg/mL θρεπτικού υλικού. Πραγματοποιήσαμε τέστ ανθεκτικότητας των Hep2 στην πουρομυκίνη και η βέλτιστη συγκέντρωση, στην οποία ψοφάει το 100% των κυττάρων που δεν φέρουν πλασμίδιο ανθεκτικότητας σε 48h μετά την αρχική έκθεση, είναι 3μg/mL).

3.2.10 Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου δύο βημάτων (RT-qPCR)

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

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

Βήμα 1^ο: Σύνθεση του cDNA κλώνου

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

- 1) Ετοιμάζουμε σε ένα μικρό eppendorf τα εξής:

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

*Σε περίπτωση που θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε ειδικούς εκκινητές για κάποιο γονίδιο, όπως παραδείγματος χάριν το 18S rRNA που δεν έχει πολυ(A) ουρά, η τελική συγκέντρωση του εκκινητή πρέπει να είναι 2pmol.

**Στην παρούσα εργασία η μήτρα RNA που χρησιμοποιούμε έχει συγκέντρωση 400ng/rxn.

- 2) 5 min στους 65° C, για να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA και για την πρόσδεση των εκκινητών στο στόχο. Έπειτα μεταφέρουμε την αντίδραση απευθείας στον πάγο.
- 3) Προσθέτουμε στη συνέχεια τα αντιδραστήρια που παρουσιάζονται παρακάτω, μέχρι τον τελικό όγκο που είναι 20μl.

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

- 4) Αναδεύουμε και επωάζουμε το μείγμα της αντίδρασης στους 42° C για 52 min. Αυτή είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου.
- 5) Επώαση στους 70° C για 5 min, ώστε να αδρανοποιηθεί το ένζυμο.

Βήμα 2^ο: Real Time PCR

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

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

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία εφαρμόσαμε την ποσοτική PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Kapa Biosystems "KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kit - Master Mix (2X) Universal". Ελέγξαμε με βάση το πρωτόκολλο αυτό, τα επίπεδα έκφρασης της CNOT6, της CNOT8 και των υπολοίπων επιλεγμένων παραγόντων σε κύτταρα Hep2 στα οποία εισήχθησαν αντι-CNOT6 ή αντι-CNOT8 shRNAs, και σε κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με το Non target shRNA και χρησιμοποιούνται ως control. Οι αντιδράσεις προετοιμάστηκαν χρησιμοποιώντας τους primers του **Πίνακα 4**, ενώ ως χρωστική αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η ROX. Ως εσωτερικά control για την κανονικοποίηση του σήματος των ειδικών προϊόντων, ορίστηκαν τα ιδιοσυστατικά γονίδια της β-ακτίνης, της GAPDH και του 18S rRNA, τα οποία εμφανίζουν το ίδιο ακριβώς πρότυπο. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε cDNA, από ολικό RNA απομονωμένο από τα εξεταζόμενα δείγματα. Αναλυτικότερα, οι ποσότητες των επιμέρους αντιδραστηρίων των

αντιδράσεων και οι συνθήκες αυτών παρουσιάζονται στους **Πίνακες 5** και **6** αντίστοιχα.

Πίνακας 5: Συστατικά αντίδρασης qPCR

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

Πίνακας 6: Συνθήκες αντίδρασης qPCR για την ενίσχυση των επιλεγμένων παραγόντων

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

3.2.11 DNA Μικροσυστοιχίες (Microarrays)

Μέσω της τεχνικής των DNA μικροσυστοιχιών, έγινε ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε Hep2 κύτταρα μετά την αποσιώπηση της αποαδενυλάσης CNOT6 ή της CNOT8, σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος (full-genome analysis). Απομονώθηκε ολικό RNA από δείγματα κυττάρων, με βάση το πρωτόκολλο RNeasy kit (Qiagen Inc., Valencia, CA). Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

1. Κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 που φέρει μία αλληλουχία shRNA έναντι της CNOT6
2. Κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 που φέρει μία αλληλουχία shRNA έναντι της CNOT8
3. Κύτταρα αγρίου τύπου (MW)*
4. Κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 που δεν φέρει κάποια αλληλουχία shRNA (MV)*
5. Κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 που φέρει μία αλληλουχία shRNA η οποία δεν στοχεύει κανένα mRNA εντός του κυττάρου (MS)*

*Τα δείγματα 3, 4 και 5 χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (control).

Τα δείγματα RNA στα οποία έγινε ανάλυση του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης, υβριδίστηκαν σε μικροσυστοιχία ολιγονουκλεοτιδίων - Whole Human Genome Agilent 4X44K oligonucleotide Microarray (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA). Η απομόνωση, ο καθαρισμός, η ενίσχυση, η σήμανση και ο υβριδισμός στην πλατφόρμα (Agilent 44K Human Whole Genome microarrays) των δειγμάτων RNA, καθώς και η σάρωση των αρχείων εικόνας, πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η κανονικοποίηση των δεδομένων έγινε μέσω του προγράμματος Feature Extraction (v. 10.7.3.1).

Βιοπληροφορική: Έγινε ανάλυση της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης (fold-change analysis), προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα γονίδια τα οποία

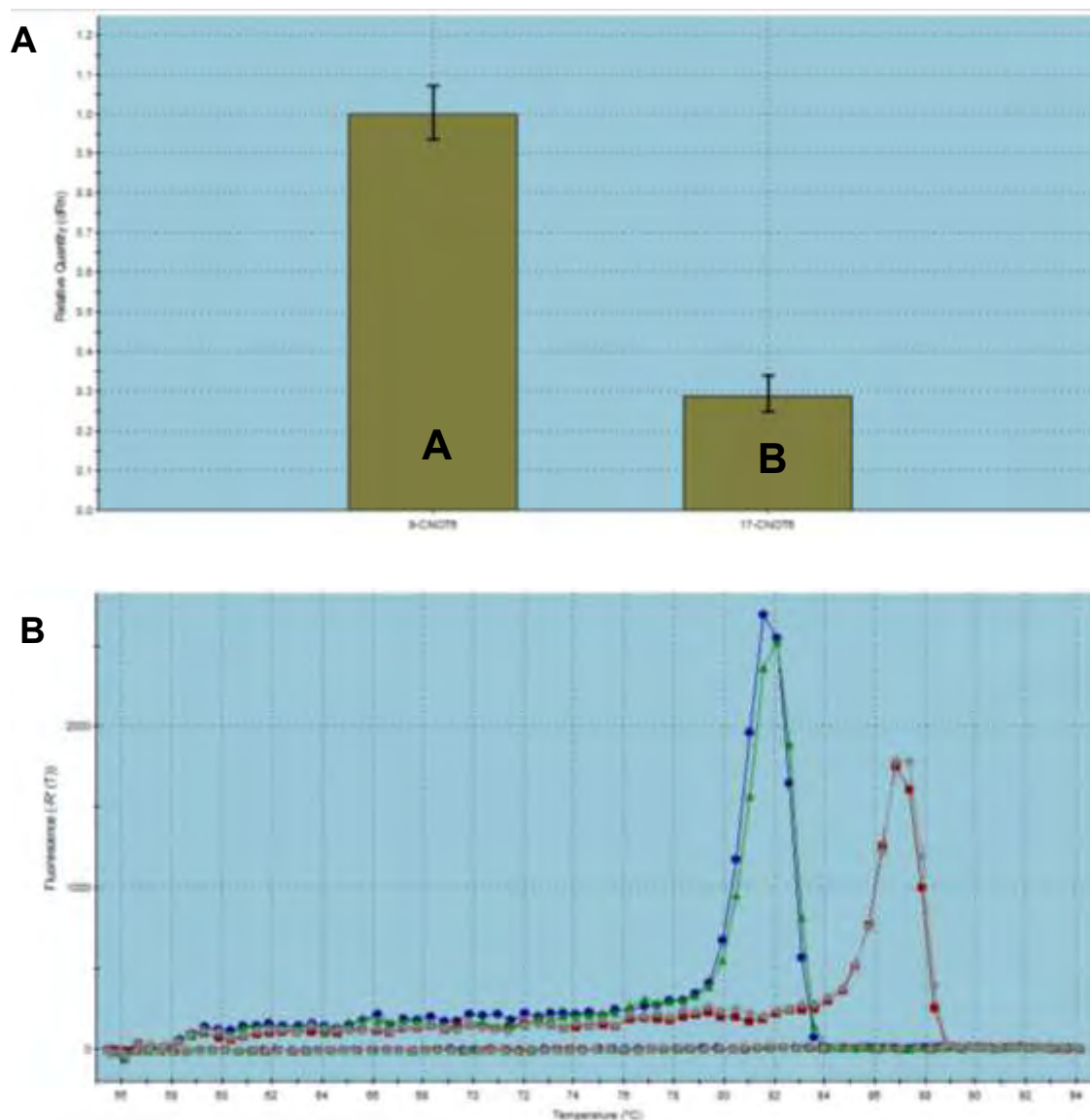
εκφράζονται διαφορεικά στις δύο ομάδες σύγκρισης (κάθε δείγμα συγκρίθηκε με τα mock κύτταρα (MS), έτσι ώστε να αποκλείονται οι μεταβολές που οφείλονται στην επαγωγή του μηχανισμού RNAi). Μόνο τα γονίδια που παρουσιάζουν τιμές >2-fold change, θεωρούνται ότι μεταβάλλονται σημαντικά. Η βάση δεδομένων GSEA (Gene Set Enrichment Analysis), χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση λειτουργικών ομάδων γονιδίων. Οι επιλεγμένες ομάδες συγκρίθηκαν με ομάδες γονιδίων που συμμετέχουν σε κυτταρικά μονοπάτια τα οποία είναι καταχωρημένα στις βάσεις: BioCarta, KEGG και REACTOME.

4) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Έλεγχος της αποσιώπησης των αποαδενυλασών CNOT6 και CNOT8 με RT-qPCR

Για την αποσιώπηση των αποαδενυλασών CNOT6 ή CNOT8, διαμολύναμε καρκινικά κύτταρα Hep2 και με τα 5 διαθέσιμα shRNAs ταυτόχρονα. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε το πρωτόκολλο διαμόλυνσης που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.9. Ελέγχθηκε η αποσιώπηση της CNOT6 καθώς και της CNOT8, 24, 48, 72 και 96 ώρες μετά την διαμόλυνση. Ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το Non-target shRNA (mock), για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο πως οι όποιες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των επιλεγμένων παραγόντων, οφείλονται στη διαδικασία της διαμόλυνσης και μόνο. Τα μεγαλύτερα ποσοστά αποσιώπησης των αποαδενυλασών CNOT6 και CNOT8, επιτυγχάνονται 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση, όπως αποδείχτηκε μετά από μία αντίδραση Real time-PCR δύο βημάτων.

Απομονώθηκε ολικό RNA από κύτταρα τα οποία συλλέχθηκαν 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση και πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις Real Time-PCR δύο βημάτων, προκειμένου να ελέγξουμε εκτός από τα επίπεδα έκφρασης των ίδιων των αποαδενυλασών που αποσιωπούμε και τα αντίστοιχα των παραγόντων του **Πίνακα 4**. Χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες και οι συγκεντρώσεις που περιγράφονται στην παράγραφο 3.2.11 για την προετοιμασία των αντιδράσεων. Για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, για την κανονικοποίηση (*normalization*) των αποτελεσμάτων επιλέξαμε το γονίδιο που μεταγράφει για το 18S rRNA καθώς δεν αποτελεί στόχο των αποαδενυλασών (δεν φέρει πολυ(A) ουρά), καθώς και το γονίδιο της β-ακτίνης και GAPDH. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα γονίδια αυτά εκφράζονται ιδιосуστατικά σε όλα τα κύτταρα, διατηρώντας σταθερά τα επίπεδά τους (housekeeping genes). Όπως βλέπουμε και στις **Εικόνες 13 και 14**, αποσιωπήσαμε την αποαδενυλάση CNOT6 σε ποσοστό ~70% και την CNOT8 ~85%.

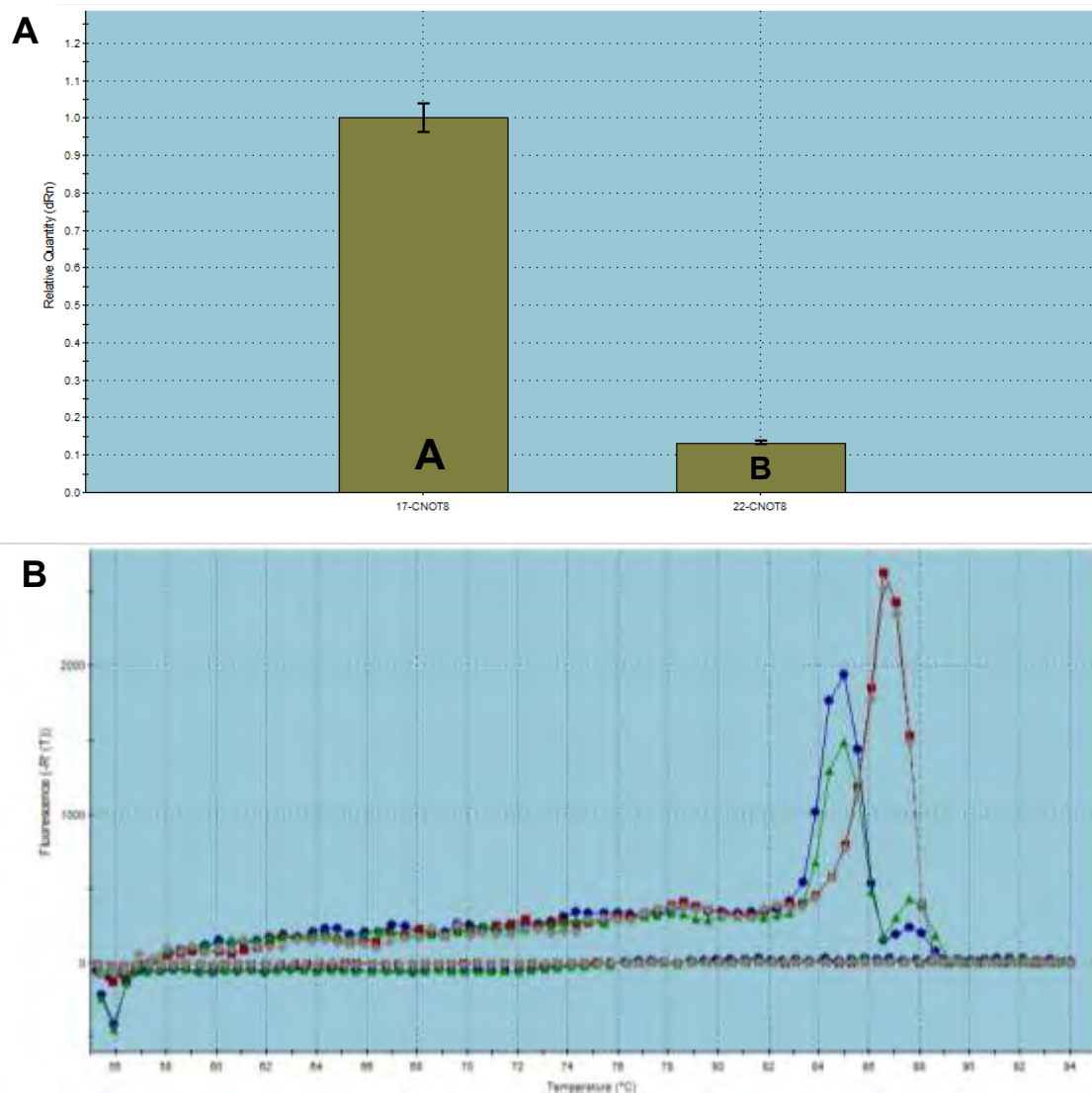


Εικόνα 13: Αποσιώπηση της αποαδενυλάσης CNOT6 σε κύτταρα Hep2

A Relative Quantitative Chart: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την RT-qPCR [Rn'(T)*]. Η στήλη B αντιπροσωπεύει τα σχετικά επίπεδα mRNA της CNOT6 από τα αποσιωπημένα κύτταρα ενώ η στήλη A τα αντίστοιχα επίπεδα από τα mock κύτταρα, 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

B Dissociation Curve: Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού. Η πράσινη καμπύλη αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία αποσιωπήθηκε η CNOT6, ενώ η μπλε, τα προϊόντα από τα mock κύτταρα. Οι άλλες δύο καμπύλες αντιπροσωπεύουν τα προϊόντα του εσωτερικού μάρτυρα. Αντιπροσωπευτικά, στο συγκεκριμένο παράδειγμα χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη η κόκκινη στα mock και η γκρι στα αποσιωπημένα για τη CNOT6, κύτταρα. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75 °C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

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

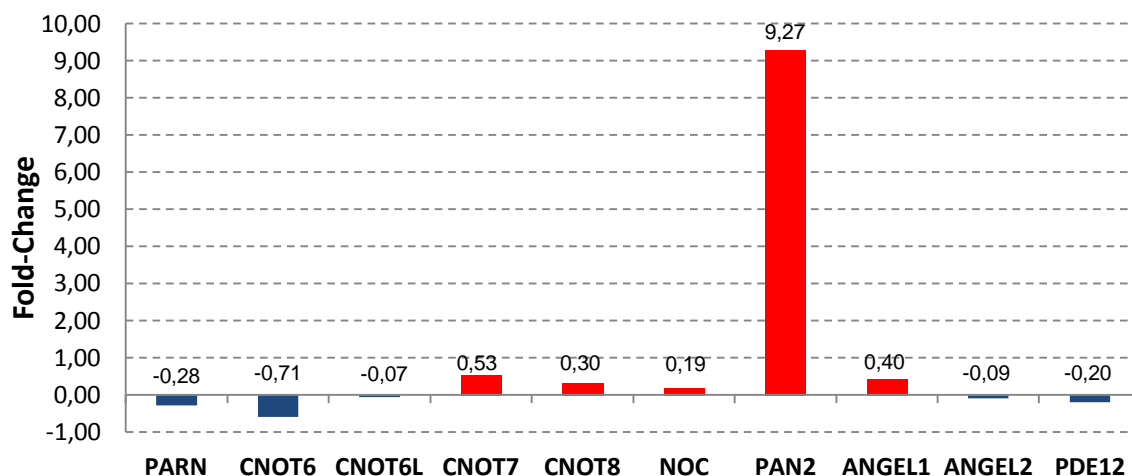


Εικόνα 14: Αποσιώπηση της αποαδενύλασης CNOT8 σε κύτταρα Hep2

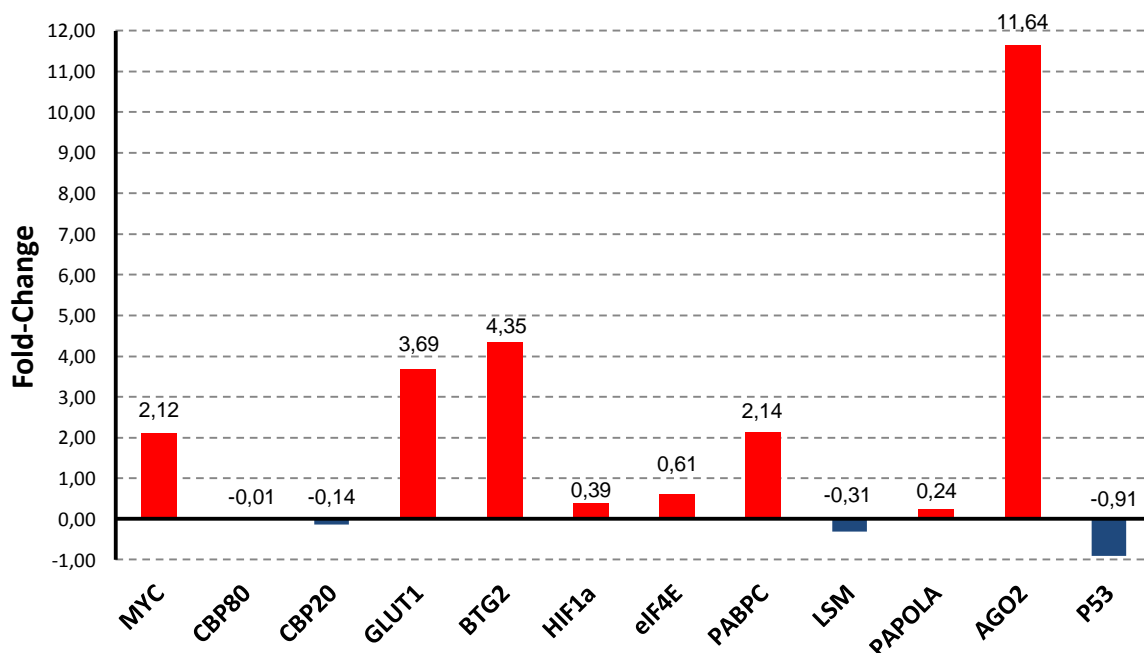
A Relative Quantitative Chart: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την RT-qPCR [$\text{Rn}'(\text{T})$]. Η στήλη B αντιπροσωπεύει τα σχετικά επίπεδα mRNA της CNOT8 από τα αποσιωπημένα κύτταρα, ενώ η στήλη A τα αντίστοιχα επίπεδα από τα mock κύτταρα, 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

B Dissociation Curve: Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού (dissociation plot). Η πράσινη καμπύλη αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία αποσιωπήθηκε η CNOT8, ενώ η μπλε, τα προϊόντα από τα mock κύτταρα. Οι άλλες δύο καμπύλες αντιπροσωπεύουν τα προϊόντα του housekeeping γονιδίου, της β-ακτίνης: η κόκκινη στα mock και η γκρι στα αποσιωπημένα για τη CNOT8, κύτταρα. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75°C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

4.2 Επίδραση της αποσιώπησης της CNOT6 σε επιλεγμένους παράγοντες (72 ώρες μετά τη διαμόλυνση)

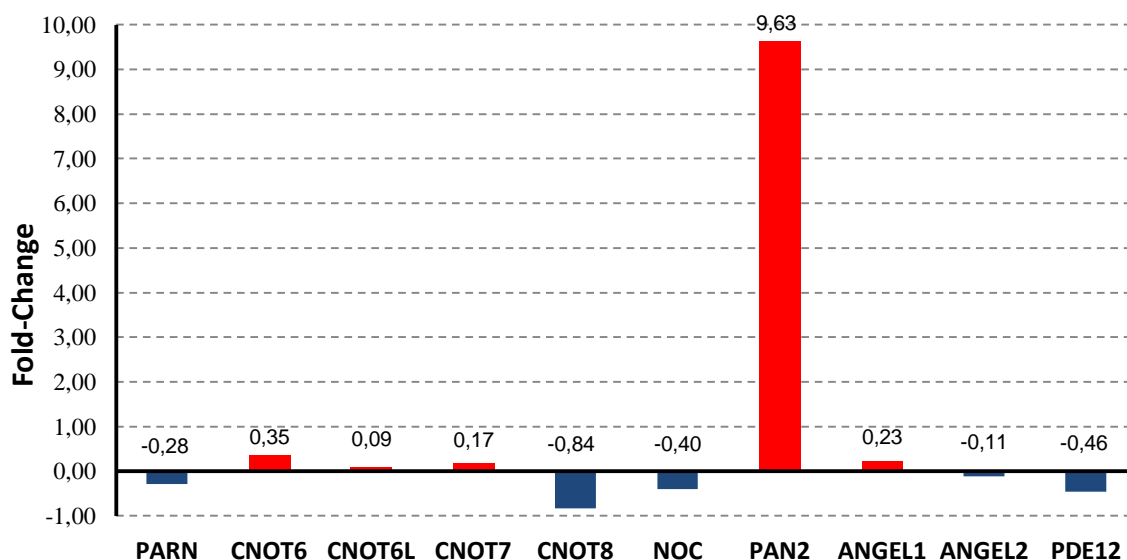


Εικόνα 15: Η επίδραση της αποσιώπησης της CNOT6 στις υπόλοιπες αποαδενυλάσες. Παρουσιάζεται το ποσό μεταβολής της κάθε αποαδενυλάσης στα αποσιωπημένα για τη CNOT6 κύτταρα, σε σχέση με τα κύτταρα mock στα οποία θεωρείται ότι ποσό μεταβολής είναι ίσο με το 0,00.

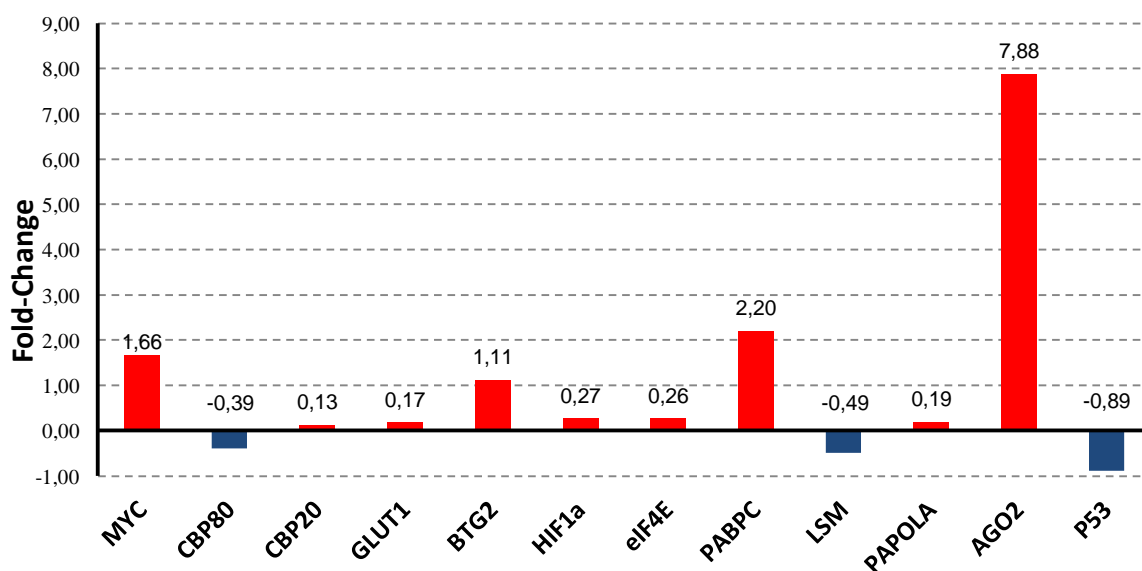


Εικόνα 16: Η επίδραση της αποσιώπησης της CNOT6 στους υπόλοιπους επιλεγμένους παράγοντες. Παρουσιάζεται το ποσό μεταβολής του κάθε παράγοντα στα αποσιωπημένα για τη CNOT6 κύτταρα, σε σχέση με τα κύτταρα mock στα οποία θεωρείται ότι ποσό μεταβολής είναι ίσο με το 0,00.

4.3 Επίδραση της αποσιώπησης της CNOT8 σε επιλεγμένους παράγοντες (72 ώρες μετά τη διαμόλυνση)



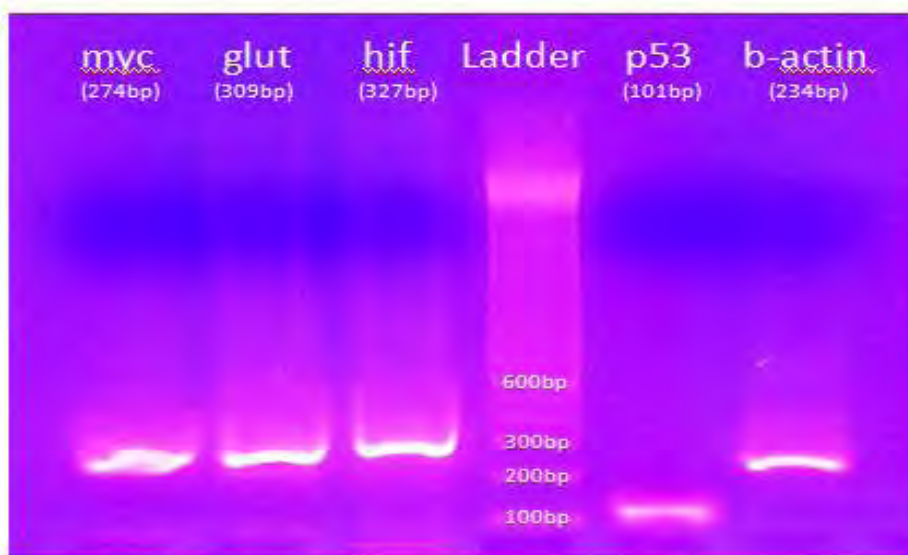
Εικόνα 17: Η επίδραση της αποσιώπησης της CNOT8 στις υπόλοιπες αποαδενυλάσες. Παρουσιάζεται το ποσό μεταβολής της κάθε αποαδενυλάσης στα αποσιωπημένα για τη CNOT8 κύτταρα, σε σχέση με τα κύτταρα mock στα οποία θεωρείται ότι ποσό μεταβολής είναι ίσο με το 0,00.



Εικόνα 18: Η επίδραση της αποσιώπησης της CNOT8 στους υπόλοιπους επιλεγμένους παράγοντες. Παρουσιάζεται το ποσό μεταβολής του κάθε παράγοντα στα αποσιωπημένα για τη CNOT8 κύτταρα, σε σχέση με τα κύτταρα mock, στα οποία θεωρείται ότι το ποσό μεταβολής είναι ίσο με το 0,00.

4.4 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα επίδρασης της αποσιώπησης της CNOT6 ή της CNOT8 στα επίπεδα mRNA των εξεταζόμενων παραγόντων

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα ποσοστά (%) μεταβολής των επιπέδων mRNA του κάθε παράγοντα μετά την αποσιώπηση της CNOT6 και μετά την αποσιώπηση της CNOT8, συγκριτικά με τα mock κύτταρα. Τα ποσοστά του πίνακα υπολογίσθηκαν βάσει των τιμών $-Rn'(T)$ που αντιστοιχούν στις κορυφές των ειδικών προϊόντων στα διαγράμματα αποδιάταξης σήματος φθορισμού. Αξίζει να σημειωθεί πως τα ποσοστά μεταβολής που υπολογίσθηκαν δεν συμπίπτουν πάντα και με τις μεταβολές στα αντίστοιχα relative quantity charts, καθώς αυτά συνυπολογίζουν τόσο τα ειδικά όσο και τα μη ειδικά ενισχυμένα προϊόντα. Για την εξαγωγή των σχετικών ποσοστών, λήφθηκαν υπ' όψιν εκτός από τις dissociation curves και οι εικόνες ηλεκτροφόρησης (μερικές από τις οποίες δίνονται ενδεικτικά την **Εικόνα 19**), τα relative quantity charts και τα Ct's (threshold cycles) από την RT-PCR. Οι % μεταβολές υπολογίζονται με τη β-ακτίνη ως εσωτερικό μάρτυρα.



Εικόνα 19: Αποτελέσματα από ηλεκτροφόρηση σε gel αραρόζης 2%, των προϊόντων της RT-PCR, όπου φαίνονται ενδεικτικά τα μοριακά βάρη κάποιων από των παραγόντων που μελετήθηκαν.

Πίνακας 7: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	% ΜΕΤΑΒΟΛΗ		ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	% ΜΕΤΑΒΟΛΗ	
	αποσιώπηση			αποσιώπηση	
	CNOT6	CNOT8		CNOT6	CNOT8
CNOT6 Υπομονάδα του συμπλόκου CCR4-NOT	-70	+35	GLUT1 Μεταφορέας γλυκόζης	+350	+15
CNOT6L Υπομονάδα του συμπλόκου CCR4-NOT	-5	+10	HIF1A Παράγοντας που επάγεται κατά την υποξία	+40	+25
CNOT7 Υπομονάδα του συμπλόκου CCR4-NOT	+50	+15	P53 Ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη	-90	-90
CNOT8 Υπομονάδα του συμπλόκου CCR4-NOT	+30	-85	BTG2 Αντιπολλαπλασιαστική πρωτεΐνη της οικογένειας TOB	+400	+100
PARN πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση	-30	-30	AGO2 Καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου RISC	+1100	+800
PAN2 DEDD αποαδενυλάση	+900	+950	LSM μάτισμα και αφαίρεση της καλύπτρας του mRNA	-30	-50
ANGEL1 ΕΕΡ αποαδενυλάση	+40	+20	CBP20 Μέλος του συμπλόκου πρόσδεσης της καλύπτρας	-15	+10
ANGEL2 ΕΕΡ αποαδενυλάση	-10	-10	CBP80 Μέλος του συμπλόκου πρόσδεσης της καλύπτρας	0	-40
2' PDE Φωσφοδιεστεράση 12 – ΕΕΡ αποαδενυλάση	-20	-45	PAPOLA Πολυ(A) πολυμεράση A	+20	+20
NOC υπόκειται σε κικκάδιο έλεγχο ΕΕΡ αποαδενυλάση	+20	-40	PABPC Πολυ(A) προσδεδεμένη πρωτεΐνη	+200	+200
MYC Πρώτο-ογκογονίδιο/ μεταγραφικός παράγοντας	+200	+150	eIF4E Παράγοντας έναρξης της μετάφρασης	+60	+25

Μελετώντας τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι, αποσιώπηση της CNOT6 προκαλεί αύξηση των επιπέδων των άλλων δύο υπομονάδων του συμπλόκου CCR4-NOT, CNOT7 και CNOT8, ενώ τα επίπεδα της CNOT6L δεν φαίνεται να μεταβάλλονται. Παρατηρείται σχετικά μικρή αύξηση των επιπέδων της ANGEL1 και NOC και μείωση των PARN και PDE12. Όσον αφορά στα επίπεδα έκφρασης της αποαδενυλάσης PAN2, φαίνεται να αυξάνονται σημαντικά (9 φορές πάνω από το κανονικό), πράγμα που παρατηρείται και για τους παράγοντες MYC, GLUT1, BTG2, PABPC και AGO2. Μικρότερη αύξηση παρουσιάζουν και οι HIF1a, eIF4E ενώ τα επίπεδα της p53 μειώνονται σχεδόν 100%.

Η αποσιώπηση της CNOT8 ομοίως, προκαλεί αύξηση των επιπέδων mRNA των άλλων δύο υπομονάδων του συμπλόκου CCR4-NOT, CNOT7 και CNOT6, με τα επίπεδα της CNOT6L να παραμένουν σχεδόν σταθερά και πολύ σημαντική αύξηση των: PAN2, MYC, BTG2, PABP, AGO2. Παρατηρείται ακόμη, μικρή αύξηση των επιπέδων έκφρασης της ANGEL1, του HIF1a, του eIF4E, της PAPOLA και μείωση των PARN, NOC, PDE12, CBP80 και LSM. Τέλος τα επίπεδα της p53 μειώνονται και πάλι σχεδόν 100%, όπως και κατά την αποσιώπηση της CNOT6.

Παρατήρηση: Στα αποτελέσματα δεν περιλαμβάνονται οι παράγοντες PARNL και K-Ras που εξετάστηκαν, καθώς οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι RT-qPCR ίσως δεν ήταν οι κατάλληλες ώστε να ενισχυθεί το προϊόν τους, οπότε δεν είμαστε σε θέση να εξάγουμε οποιοδήποτε συμπέρασμα γι' αυτούς.

4.5 cDNA Microarray Analysis

Ανάλυση των δεδομένων έκφρασης έδειξε ότι η αποσιώπηση της CNOT6 οδήγησε σε μεταβολές των επιπέδων 1001 γονιδίων (διαφορική έκφραση >2-fold συγκριτικά με τα MS, $p < 0,05$), εκ των οποίων τα 406 δείχνουν μείωση και τα 595 αύξηση. Ως αποτέλεσμα της αποσιώπησης της CNOT8 μειώνονται σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης 745 γονιδίων και αυξάνονται 704 γονιδίων.

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα κυτταρικά μονοπάτια που φαίνεται να επηρεάζονται είτε θετικά (up-regulated), είτε αρνητικά (down-regulated). Στους **Πίνακες 8 και 9** παρουσιάζονται τα μονοπάτια που μεταβάλλονται όταν συγκρίνουμε τα control δείγματα MW και MV με τα MS. Στους **Πίνακες 10 και 12**, τα μονοπάτια καθώς και οι απορρυθμισμένοι παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτά (**Πινάκες 11 και 13**), όταν συγκρίνουμε τα αποσιωπημένα για τη CNOT6 ή τη CNOT8 δείγματα με τα MS.

Πίνακας 8: MW vs MS

A. Θετικά σχετιζόμενα μονοπάτια B. Αρνητικά σχετιζόμενα μονοπάτια

Στην πρώτη και δεύτερη στήλη καταγράφονται τα μονοπάτια που απορρυθμίζονται στα MW δείγματα συγκρινόμενα με τα MS και τα χαρακτηριστικά τους αντίστοιχα. Στις επόμενες στήλες αναφέρεται το μέγεθος (ο αριθμός των γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι), η p value (στατιστική παράμετρος/ τιμές < 0.05 υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα) και η FDR value (false discovery rate, στατιστική μέθοδος/ τιμές < 0.25 υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα).

A. Θετικά σχετιζόμενα μονοπάτια

Όνομα μονοπατιού	Χαρακτηριστικά	Μέγεθος	NOM p-val	FDR q-val
REOVIRUS_HEK293_DN	Down-regulated at any timepoint up to 24 hours following infection of HEK293 cells with reovirus strain T3Abney	97	0	0,00122192
UVC_TTD_4HR_UP	Up-regulated at 4 hours following treatment of XPB/TTD fibroblasts with 3 J/m ² UVC	30	0	0,0056509
NKCELLSPATHWAY	Natural Killers cells pathway	13	0,003	0,00583905
UVC_TTD_ALL_UP	Up-regulated at any timepoint following treatment of XPB/TTD fibroblasts with 3 J/m ² UVC	31	0	0,00538805
HSA00280_VALINE_LEUCINE_AND_ISOLEUCINE_DEGRADATION	Degradation of valine, leucine and isoleucine	22	0	0,00676926
VITCSPATHWAY	Vitamin C in the BrainPathway	6	0	0,01260702
KREBS_TCA_CYCLE	Citric acid cycle	12	0	0,01134602
HSA00100_BIOSYNTHESIS_OF_STEROIDS	Biosynthesis of steroids	11	0	0,02623926
HSA00072_SYNTHESIS_AND_DEGRADATION_OF_KETONE_BODIES	Synthesis and degradation of ketone bodies	7	0	0,02584191
BENZOATE_DEGRADATION_VIA_COA_LIGATION	Benzoate degradation via CoA ligation	5	0	0,04134319
BIOSYNTHESIS_OF_STEROIDS	Biosynthesis of steroids	5	0	0,04061589
MITOCHONDRIAL_FATTY_ACID_BETAOXIDATION	Oxidation of fatty acids in the mitochondria	5	0	0,05014044
HSA00020_CITRATE_CYCLE	Citric acid cycle	12	0,007	0,04847389
UVC_TTD-XPCS_COMMON_UP	Up-regulated at any timepoint following treatment of both XPB/CS and XPB/TTD fibroblasts with 3 J/m ² UVC	7	0	0,05325859
KERATAN_SULFATE_BIOSYNTHESIS	Biosynthesis of keratosulfate	8	0	0,0510545

B. Αρνητικά σχετιζόμενα μονοπάτια

Όνομα μονοπατιού	Χαρακτηριστικά	Μέγεθος	NOM p-val	FDR q-val
HSA03010_RIBOSOME	Genes involved in ribosome	60	0	0
RIBOSOMAL_PROTEINS	Ribosomal proteins	78	0	0
HINATA_NFKB_UP	Genes upregulated by NF-kappa B	69	0	0,00375483
TNFA_NFKB_DEP_UP	Up-regulated at any timepoint following TNFa treatment, only with functional NfKb	12	0	0,00538052
H2O2_CSBRESCUED_UP	Upregulated by H2O2 in CSB-rescued fibroblasts	32	0	0,00505236
HSA05060_PRION_DISEASE	Genes involved in prion disease	8	0	0,00639971
LINDSTEDT_DEND_8H_VS_4_8H_UP	Genes up-regulated in DC stimulated for 8 h as compared to DC stimulated for 48 h	41	0	0,0101699
MENSSEN_MYC_UP	Genes up-regulated by MYC in HUVEC (umbilical vein endothelial cell)	17	0	0,01100818
GALINDO_ACT_UP	Most significant genes up-regulated by enterotoxin Act in macrophages from 0 to 2 h as determined by four separate analysis methods	49	0	0,00998944
MYC_TARGETS	Myc-responsive genes reported in multiple systems	27	0	0,01113603
HCC_SURVIVAL_GOOD_VS_POOR_DN	Hepatocellular carcinoma (HCC, also called malignant hepatoma)	52	0	0,01259017
LEE_MYC_TGFA_UP	Genes up-regulated in hepatocellular carcinoma (HCC) tissue of MYC and TGFA double transgenic mice	40	0	0,0174503
HDAC1_COLON_CURSUL_UP	Upregulated by both curcumin and sulindac at any timepoint up to 48 hrs in SW260 colon carcinoma cells	21	0,0012	0,02314482
ADIP_DIFF_CLUSTER2	Strongly upregulated at 2 hours during differentiation of 3T3-L1 fibroblasts into adipocytes (cluster 2)	28	0	0,021692
LEE_E2F1_UP	Genes up-regulated in hepatocellular carcinoma (HCC) induced by overexpression of E2F1	44	0	0,02236369
RORIE_ES_PNET_DN	Neuroblastoma markers down-regulated in neuroblastoma cell lines expressing ESWR1-FLI1 fusion protein	21	0	0,02154568
POMEROY_DESMOPLASIC_V_S_CLASSIC_MD_UP	Genes expressed in desmoplastic medulloblastomas. (p<0.01)	37	0	0,02027829
STRESS_ARSENIC_SPECIFIC_UP	Genes up-regulated 4 hours following arsenic treatment that discriminate arsenic from other stress agents	68	0	0,02013539
TSA_PANC50_UP	50 "most interesting" genes upregulated by TSA treatment in at least one of four pancreatic cancer cell lines, but not in normal (HPDE) cells	26	0	0,02001347
ZELLER_MYC_UP	Genes up-regulated by MYC	14	0	0,01957236

Πίνακας 9: MV vs MS – Θετικά σχετιζόμενα μονοπάτια

Στην πρώτη και δεύτερη στήλη καταγράφονται τα μονοπάτια που απορρυθμίζονται στα MV δείγματα συγκρινόμενα με τα MS και τα χαρακτηριστικά τους αντίστοιχα. Στις επόμενες στήλες αναφέρεται το μέγεθος, η p value και η FDR value.

Όνομα μονοπατιού	Χαρακτηριστικά	Μέγεθος	NOM p-val	FDR q-val
UVB_NHEK3_C2	Cluster 2: genes changed in primary keratinocytes by UVB irradiation.	16	0	0,00252247
UVC_TTD_4HR_DN	Down-regulated at 4 hours following treatment of XPB/TTD fibroblasts with 3 J/m ² UVC	115	0	0,0037857
UVB_NHEK1_C6	Cluster G6: genes increasingly down-regulated in NHEK cells (normal keratinocyte) after UV-B irradiation	48	0	0,0025238
CMV_HCMV_TIMECO URSE_18HRS_UP	Genes up-regulated in primary fibroblast cell culture after infection with HCMV (AD169 strain) at 18 h time point that were not up-regulated at the previous time point, 16 h.	31	0	0,01576708
UVC_TTD-XPCS_COMMON_DN	Down-regulated at any timepoint following treatment of both XPB/CS and XPB/TTD fibroblasts with 3 J/m ² UVC / DNA damage response	49	0	0,04244323
UVC_HIGH_D8_DN	Cluster d8: genes progressively down-regulated in WS1 cells (fibroblast) through 18 h after irradiation with high dose UV-C.	16	0	0,05835546
UVB_NHEK1_DN	Genes down-regulated in NHEK cells (normal keratinocytes) by UV-B irradiation.	101	0	0,09190646
MOREAUX_TACI_HI_V S_LOW_DN	Genes distinguishing in multiple myeloma (MM) samples with lower expression of TACI	36	0	0,08861123
ARFPATHWAY	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoform 4 - pathway	9	0	0,13338228
UVC_XPCS_4HR_DN	Down-regulated at 4 hours following treatment of XPB/CS fibroblasts with 3 J/m ² UVC	89	0	0,13027231
CDC42RACPATHWAY	CDC42/RAC pathway	5	0,0043	0,12808815
DOX_RESIST_GASTRIC_DN	Genes differentially expressed in gastric cancer cell lines: doxorubicin resistant vs sensitive	11	0	0,13082866
TSA_HEPATOMA_CAN CER_DN	Cancer related genes down-regulated in any of four hepatoma cell lines following 24 h treatment with TSA	8	0	0,1277641
UVC_HIGH_D6_DN	Cluster d6: genes progressively down-regulated in WS1 cells (fibroblast) through 18 h after irradiation with high dose UV-C.	11	0	0,12323007
UVC_HIGH_ALL_DN	Selected genes down-regulated in WS1 (fibroblast) in response to irradiation with high dose UV-C	104	0	0,14836669
UVC_XPCS_8HR_DN	Down-regulated at 8 hours following treatment of XPB/CS fibroblasts with 3 J/m ² UVC	153	0	0,15136187
MITOCHONDRIAL_FAT TY_ACID_BETAOXIDATION	Oxidation of fatty acids in the mitochondria	5	0,0043	0,14571942
BRCA1KO_MEF_DN	Down-regulated in mouse embryonic fibroblasts following targeted deletion of BRCA1 (exon 11) compared to wild-type MEFs	32	0	0,18008733
BCNU_GLIOMA_MGM T_48HRS_UP	Genes up-regulated in T98G cells (glioma, express MGMT) by carmustine at 48h	11	0,0068	0,17087361
BRENTANI_TRANSPORT_OF_VESICLES	Cancer related genes involved in vesicle transport	14	0,0083	0,1896035

Πίνακας 10: CNOT6 vs MS – Αρνητικά σχετιζόμενα μονοπάτια

Στην πρώτη και δεύτερη στήλη καταγράφονται τα μονοπάτια που απορρυθμίζονται και τα χαρακτηριστικά τους στα CNOT6 δείγματα συγκρινόμενα με τα MS. Στις επόμενες στήλες αναφέρεται το μέγεθος, η p value και η FDR value.

Όνομα μονοπατιού	Χαρακτηριστικά	Μέγεθος	NOM p-val	FDR q-val
RADAEVA_IFNA_UP	Regulation of genes contributing to the antiviral and antitumor activities of IFN	31	0	0,001346
IFNA_HCMV_6HRS_UP	HCMV triggered induction of antiviral pathways/ Genes up-regulated in primary fibroblast culture after treatment with interferon alpha for 6 h.	28	0	0,001309
SANA_IFNG_ENDOTHELIAL_UP	Genes up-regulated in five primary endothelial cell types (lung, aortic, iliac, dermal, and colon) by IFNG	41	0	0,114087
IFNA_UV_CMV_COMMON_HCMV_6HRS_UP	Up-regulated in fibroblasts at 6 hours following either infection with UV-inactivated CMV or interferon-alpha	16	0	0,104769
IFNALPHA_HCC_UP	IFN-alpha activated genes which may contribute to its antiviral and antitumor activities	16	0,0076	0,244119
CELL_GROWTH_AND_OR_MAINTENANCE	Any process required for the survival and growth of a cell.	33	0,0059	0,235323

Πίνακας 11: CNOT6 vs MS - Απορρυθμισμένα γονίδια στο κάθε μονοπάτι (down-regulated)

Σύμβολο γονιδίου	Όνομα γονιδίου	Σύμβολο γονιδίου	Όνομα γονιδίου
RADAEVA_IFNA_UP		IFNA_HCMV_6HRS_UP	
IFI44	interferon-induced protein 44	PSMB9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)
EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
IRF1	interferon regulatory factor 1	TLR3	toll-like receptor 3
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	MYD88	myeloid differentiation primary response gene (88)
IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)	STX11	syntaxin 11
SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1	GBP2	guanylate binding protein 2, interferon-inducible
KLK3	kallikrein 3, (prostate specific antigen)	RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1-like
IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	ZBTB20	zinc finger and BTB domain containing 20
PIAS4	protein inhibitor of activated STAT, 4	ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa
MXD4	MAX dimerization protein 4	RARRES3	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	PML	promyelocytic leukemia
CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like
BAX	BCL2-associated X protein	MAP2	microtubule-associated protein 2
ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier
RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6	KIF5C	kinesin family member 5C
IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27
SANA_IFNG_ENDOTHELIAL_UP		IFNA_UV-CMV_COMMON_HCMV_6HRS_UP	

PLA1A	phospholipase A1 member A	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
APOL1	apolipoprotein L, 1	TLR3	toll-like receptor 3
HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	MYD88	myeloid differentiation primary response gene (88)
CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)	STX11	syntaxin 11
HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa
RABL3	RAB, member of RAS oncogene family-like 3	RARRES3	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3
GBP3	guanylate binding protein 3	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like
APOL2	apolipoprotein L, 2	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
UBD	ubiquitin D	KIF5C	kinesin family member 5C
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27
APOL4	apolipoprotein L, 4	IFNALPHA_HCC_UP	
ST8SIA4	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)
RARRES3	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	IRF1	interferon regulatory factor 1
APOL3	apolipoprotein L, 3	IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)
ETV7	ets variant gene 7 (TEL2 oncogene)	SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1
CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	KLK3	kallikrein 3, (prostate specific antigen)
GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	MXD4	MAX dimerization protein 4
CELL_GROWTH_AND_OR_MAINTENANCE		ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier
RASD1	RAS, dexamethasone-induced 1	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27
EXTL3	exostoses (multiple)-like 3		
GAS2L1	growth arrest-specific 2 like 1		
EXT1	exostoses (multiple) 1		
TACC3	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3		
RHCG	Rh family, C glycoprotein		
IL6R	interleukin 6 receptor		
GATA2	GATA binding protein 2		
MXD4	MAX dimerization protein 4		
SKI	v-ski sarcoma viral oncogene homolog (avian)		
GPC3	glypican 3		
IRF5	interferon regulatory factor 5		

Πίνακας 12: CNOT8 vs MS – Αρνητικά σχετιζόμενα μονοπάτια

Στην πρώτη και δεύτερη στήλη καταγράφονται τα μονοπάτια που απορρυθμίζονται και τα χαρακτηριστικά τους στα CNOT8 δείγματα συγκρινόμενα με τα MS. Στις επόμενες στήλες αναφέρεται το μέγεθος, η p value και η FDR value.

Όνομα μονοπατιού	Χαρακτηριστικά	Μέγεθος	NOM p-val	FDR q-val
HSA03010_RIBOSOME	Genes involved in ribosome	60	0	0
RIBOSOMAL_PROTEINS	Ribosomal proteins	78	0	0
FERRANDO_MLL_T_ALL_DN	Top 100 genes positively (UP) and negatively (DN) associated with T-cell acute lymphoblastic leukemia MLL T-ALL) expressing MLL-ENL fusion	41	0	0,03962371
HOUSTIS_ROS	Genes known to modulate ROS or whose expression changes in response to ROS	21	0	0,14984941
FLOTHO_CASP8AP2_MRD_DIFF	Associated with minimal residual disease in ALL	41	0	0,18065563

Πίνακας 13: CNOT8 vs MS - Απορρυθμιζόμενα γονίδια στο κάθε μονοπάτι (down-regulated)

Σύμβολο γονιδίου	Όνομα γονιδίου	Σύμβολο γονιδίου	Όνομα γονιδίου
HSA03010_RIBOSOME		RIBOSOMAL_PROTEINS	
RPL18	ribosomal protein L18	RPL36	ribosomal protein L36
RPS16	ribosomal protein S16	RPL18	ribosomal protein L18
RPL18A	ribosomal protein L18a	RPS16	ribosomal protein S16
RPL39	ribosomal protein L39	RPL4	ribosomal protein L4
RPL6	ribosomal protein L6	RPL39	ribosomal protein L39
RPL36AL	ribosomal protein L36a-like	RPL6	ribosomal protein L6
RPL37A	ribosomal protein L37a	RPL7	ribosomal protein L7
RPL7	ribosomal protein L7	RPS4X	ribosomal protein S4, X-linked
RPSA	ribosomal protein SA	RPS15	ribosomal protein S15
RPL3	ribosomal protein L3	UBA52	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1
RPL35A	ribosomal protein L35a	RPL3	ribosomal protein L3
RPL3L	ribosomal protein L3-like	RPL35A	ribosomal protein L35a
RPL9	ribosomal protein L9	RPL3L	ribosomal protein L3-like
RPS23	ribosomal protein S23	RPL9	ribosomal protein L9
RPS3A	ribosomal protein S3A	RPS23	ribosomal protein S23
RPL24	ribosomal protein L24	RPS3A	ribosomal protein S3A
RPS21	ribosomal protein S21	RPL24	ribosomal protein L24
RPS11	ribosomal protein S11	RPS21	ribosomal protein S21
RPL34	ribosomal protein L34	RPS11	ribosomal protein S11
RPL11	ribosomal protein L11	RPL5	ribosomal protein L5
RPS24	ribosomal protein S24	RPS19	ribosomal protein S19
RPS29	ribosomal protein S29	RPS6KA2	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2
RPL27	ribosomal protein L27	RPL11	ribosomal protein L11
RPS25	ribosomal protein S25	RPS24	ribosomal protein S24
RPL8	ribosomal protein L8	RPS29	ribosomal protein S29

RPL28	ribosomal protein L28	RPL27	ribosomal protein L27
RPS20	ribosomal protein S20	RPS25	ribosomal protein S25
RPL27A	ribosomal protein L27a	RPLP0	ribosomal protein, large, P0
FAU	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived); ribosomal protein S30	RPL10	ribosomal protein L10
RPL32	ribosomal protein L32	RPL8	ribosomal protein L8
RPS13	ribosomal protein S13	RPL28	ribosomal protein L28
RPL41	ribosomal protein L41	RPS20	ribosomal protein S20
RPL37	ribosomal protein L37	RPL27A	ribosomal protein L27a
RPL13A	ribosomal protein L13a	FAU	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived); ribosomal protein S30
RPL35	ribosomal protein L35	RPL32	ribosomal protein L32
RPS26	ribosomal protein S26	RPS13	ribosomal protein S13
RPL38	ribosomal protein L38	RPL41	ribosomal protein L41
RPS18	ribosomal protein S18	RPL37	ribosomal protein L37
RPL21	ribosomal protein L21	RPL13A	ribosomal protein L13a
RPS7	ribosomal protein S7	RPL35	ribosomal protein L35
RPL10A	ribosomal protein L10a	RPS27A	ribosomal protein S27a
RPS6	ribosomal protein S6	RPL38	ribosomal protein L38
RPS12	ribosomal protein S12	RPL23	ribosomal protein L23
RPL12	ribosomal protein L12	RPS18	ribosomal protein S18
RPL13	ribosomal protein L13	RPL7A	ribosomal protein L7a
RPL36A	ribosomal protein L36a	RPL21	ribosomal protein L21
RPL31	ribosomal protein L31	RPS7	ribosomal protein S7
RPL23A	ribosomal protein L23a	RPS6	ribosomal protein S6
RPL14	ribosomal protein L14	RPS12	ribosomal protein S12
RPL19	ribosomal protein L19	RPL12	ribosomal protein L12
RPS28	ribosomal protein S28	RPLP2	ribosomal protein, large, P2
RPS27	ribosomal protein S27 (metalloproteinase 1)	RPL13	ribosomal protein L13
RPS10	ribosomal protein S10	RPL31	ribosomal protein L31
RPS8	ribosomal protein S8	RPL14	ribosomal protein L14
RPL26	ribosomal protein L26	RPS14	ribosomal protein S14
RPS2	ribosomal protein S2	RPL19	ribosomal protein L19
FERRANDO_MLL_T_ALL_DN			
LST1	leukocyte specific transcript 1	RPS28	ribosomal protein S28
HBB	hemoglobin, beta	RPS17	ribosomal protein S17
RANBP1	RAN binding protein 1	RPS27	ribosomal protein S27 (metalloproteinase 1)
RRM1	ribonucleotide reductase M1 polypeptide	UBB	ubiquitin B
MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	RPS10	ribosomal protein S10
TCEB1	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1 (15kDa, elongin C)	UBC	ubiquitin C
TXN	thioredoxin	RPS8	ribosomal protein S8
ATP5G3	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C3 (subunit 9)	RPLP1	ribosomal protein, large, P1
HINT1	histidine triad nucleotide binding protein 1	RPS2	ribosomal protein S2
PRDX6	peroxiredoxin 6	HOUSTIS_ROS	
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	PRDX2	peroxiredoxin 2
PTP4A2	protein tyrosine phosphatase type IVA,	CP	ceruloplasmin (ferroxidase)
		PRDX1	peroxiredoxin 1

	member 2		
PKMYT1	protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1	GLRX	glutaredoxin (thioltransferase)
GCGR	glucagon receptor	PRDX6	peroxiredoxin 6
KPNB1	karyopherin (importin) beta 1	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
S100A4	S100 calcium binding protein A4	HP	haptoglobin
HMGA1	high mobility group AT-hook 1	SOD1	superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult))
UBE2C	ubiquitin-conjugating enzyme E2C	GPX1	glutathione peroxidase 1
EEF1D	eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein)	MT1A	metallothionein 1A (functional)
DOCK2	dedicator of cytokinesis 2	MT2A	metallothionein 2A
HMG2	high-mobility group nucleosomal binding domain 2	XDH	xanthine dehydrogenase
UBE2S	ubiquitin-conjugating enzyme E2S	FTH1	ferritin, heavy polypeptide 1
KHSRP	KH-type splicing regulatory protein (FUSE binding protein 2)	GPX3	glutathione peroxidase 3 (plasma)
HIST1H4C	histone cluster 1, H4c	GPX5	glutathione peroxidase 5 (epididymal androgen-related protein)
PLCB2	phospholipase C, beta 2	TXNIP	thioredoxin interacting protein
IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa		
LMNB1	lamin B1		
	Σύμβολο γονιδίου		Όνομα γονιδίου
FLOTHO_CASP8AP2_MRD_DIFF			
	RPS16		ribosomal protein S16
	POLD1		polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit 125kDa
	ZNF135		zinc finger protein 135
	RPL6		ribosomal protein L6
	TPT1		tumor protein, translationally-controlled 1
	CA12		carbonic anhydrase XII
	RPL5		ribosomal protein L5
	RPS19		ribosomal protein S19
	RPL27		ribosomal protein L27
	RPLP0		ribosomal protein, large, P0
	SLC38A2		solute carrier family 38, member 2
	RPS20		ribosomal protein S20
	FAU		Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived); ribosomal protein S30
	OLFML2A		olfactomedin-like 2A
	RPL13A		ribosomal protein L13a
	RPS6		ribosomal protein S6
	CD8B		CD8b molecule
	IL12RB1		interleukin 12 receptor, beta 1
	CD34		CD34 molecule
	TCL6		T-cell leukemia/lymphoma 6
	LMNB1		lamin B1

5) ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η αφαίρεση της πολυ(A) ουράς των ευκαρυωτικών mRNAs αποτελεί το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμησή τους. Ο αριθμός των ενζύμων που καταλύουν την αντίδραση αυτή, των αποαδενυλασών, συνεχώς αυξάνεται και ο μηχανισμός ρύθμισής τους παραμένει άγνωστος. Ποια είναι λοιπόν η βιολογική σημασία αυτής της μεγάλης ποικιλομορφίας αποαδενυλασών; Είναι πιθανόν αυτό να συμβαίνει για λόγους εξειδίκευσης. Οι αποαδενυλάσες μπορεί να έχουν διακριτές ή/ και επικαλυπτόμενες δράσεις επί συγκεκριμένων ομάδων mRNAs καθορίζοντας την τύχη τους (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Το σύμπλοκο CCR4-NOT, αποτελεί το κυριότερο σύμπλοκο αποαδενυλίωσης στον άνθρωπο (Meyer et al., 2004). Μελετώντας τις δύο από τις τέσσερις καταλυτικές υπομονάδες του συμπλόκου, τη CNOT6 (παράλογη της CNOT6L) και τη CNOT8 (παράλογη της CNOT7), επιχειρούμε να προσεγγίσουμε και να κατανοήσουμε, αφενός το βιολογικό ρόλο αυτών καθ' αυτών των γονιδίων και αφετέρου τις πιθανές επιπτώσεις στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καταλυτικών υπομονάδων του συμπλόκου και τη λειτουργία του ως σύνολο. Ο κεντρικός ρόλος των δύο αυτών αποαδενυλασών στην αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs, καθιστά την ταυτοποίηση των πιθανών mRNA-στόχων τους, ένα ερευνητικό πεδίο με πολλές προκλήσεις.

Για το σκοπό αυτό, στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση των αποαδενυλασών CNOT6 και CNOT8, μίας κάθε φορά και ανάλυση της επίδρασής της μέσω δύο τεχνικών: της RT-qPCR και των DNA μικροσυστοιχιών. Επιλέχθηκε μία σειρά από παράγοντες, όπως πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με το mRNA, παραγόντων-κλειδιά στο μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων (όπως ογκογονίδια), καθώς και οι υπόλοιπες γνωστές αποαδενυλάσες, και εξετάσθηκε η επίδραση της αποσιώπησης είτε της CNOT6 είτε της CNOT8 στα επίπεδα των mRNAs τους μέσω RT-qPCR. Εν συνεχεία, μέσω της τεχνικής των DNA μικροσυστοιχιών, έγινε ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος (whole-genome analysis).

5.1 Η επίδραση της αποσιώπησης των CNOT6 ή CNOT8 στην έκφραση των υπολοίπων αποαδενυλασών και επιλεγμένων παραγόντων

Η επιτυχία της αποσιώπησης της CNOT6 ή της CNOT8 επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα της RT-qPCR, δείχνοντας μείωση των επιπέδων mRNA κατά 70% και 85% αντίστοιχα, σε σύγκριση πάντα με τα mock κύτταρα. Η κανονικοποίηση των Real time-PCR έγινε με τους εσωτερικούς μάρτυρες σταθερής έκφρασης: b-actin, αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) και 18S rRNA. Η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης εξασφαλίστηκε με τη χρήση κατιονικών λιποσωμάτων για τη διαμόλυνση των κυττάρων Hep2, καθώς δεν είναι τοξικά για τα κύτταρα και παρέχουν δυνατότητα επιτυχούς εισαγωγής γενετικού υλικού, σε ποσοστό 90%. Επίσης, για την επιτυχία της διαμόλυνσης κρίθηκε απαραίτητη η ταυτόχρονη χρήση και των πέντε διαθέσιμων shRNAs έναντι της CNOT6 ή της CNOT8, τα οποία στοχεύουν σε διαφορετικές περιοχές κατά μήκος του mRNA. Τέλος, το ολικό RNA, που απομονώθηκε τόσο από τα mock όσο και από τα αποσιωπημένα για τη CNOT6 ή CNOT8 κύτταρα, ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για την ακεραιότητά του, ενώ πριν την χρησιμοποίησή του ως υπόστρωμα στην RT-qPCR προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή του.

Σε τεχνικές μελέτης της γονιδιακής έκφρασης, είναι αναγκαία η χρήση ενός ιδιοστατικού γονιδίου (*housekeeping gene*), για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων (Wong and Medrano, 2005). Ως εσωτερικό control για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων της RT-qPCR της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του ιδιοστατικού γονιδίου της β-ακτίνης. Δοκιμάστηκαν ακόμη, τα επίπεδα έκφρασης του ιδιοστατικού γονιδίου της GAPDH και του 18S rRNA, καθώς το τελευταίο δεν αποτελεί στόχο των αποαδενυλασών εφόσον δε φέρει πολυ(A) ουρά, τα οποία εμφανίζουν παρόμοια πρότυπα έκφρασης με αυτό της β-ακτίνης.

Παρατηρούμε ότι κατά την αποσιώπηση είτε της CNOT6 είτε της CNOT8, σημειώνονται σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα mRNA των

περισσότερων εξεταζόμενων παραγόντων. Ένα mRNA του οποίου τα επίπεδα αυξάνονται σημαντικά λόγω αποσιώπησης μίας εκ των δύο αποαδενυλασών που μελετούμε, πιθανότατα αποτελεί άμεσο στόχο της. Περαιτέρω διερεύνηση μέσω πειραμάτων υπερέκφρασης της συγκεκριμένης αποαδενυλάσης θα μπορούσε να αποσαφηνίσει αυτή την υπόθεση. Μπορούμε ωστόσο να εικάσουμε ότι μια αύξηση της τάξης του 100% και πάνω όπως συμβαίνει με τους παράγοντες: PAN2, MYC, BTG2, PABPC και AGO2, κατά την αποσιώπηση της CNOT6 ή της CNOT8, κάθε άλλο παρά τυχαία μπορεί να είναι.

Όσον αφορά την PAN2, η έκφρασή των επιπέδων του mRNA της αυξάνεται 9 και 10 περίπου φορές πάνω από το κανονικό όταν αποσιωπάται η CNOT6 ή η CNOT8 αντίστοιχα. Είναι γνωστό πως η αποαδενυλίωση στο κυτταρόπλασμα γίνεται σε δύο φάσεις. Η PAN2 ξεκινά τη βράχυνση των πολυ(A) ουρών κατά την πρώτη φάση και το σύμπλοκο CCR4-NOT την ολοκληρώνει κατά τη δεύτερη. Επιπλέον, έχει βρεθεί πως όταν υπάρχει καταστολή της δράσης της PAN2, το σύμπλοκο CCR4-NOT είναι αυτό που αναλαμβάνει εξ' ολοκλήρου την αποαδενυλίωση (Yamashita et al., 2005). Είναι λοιπόν πιθανό, η αύξηση που παρατηρείται στα επίπεδα της PAN2 όταν αποσιωπούμε μία από τις καταλυτικές υπομονάδες του συμπλόκου CCR4-NOT (όπως τη CNOT6 ή CNOT8), να συμβαίνει προκειμένου να εξασφαλιστεί η αποικοδόμηση του mRNA στόχου του συμπλόκου από μία άλλη αποαδενυλάση, την PAN2. Είναι επίσης πιθανό, η PAN2 να αποτελεί στόχο των δύο αυτών αποαδενυλασών.

Ο παράγοντας BTG2, ο οποίος αποτελεί κύριο μέλος της οικογένειας των TOB αντιπολλαπλασιαστικών πρωτεϊνών, είναι γνωστό πως αλληλεπιδρά με τις υπομονάδες CNOT7 και CNOT8 πυροδοτώντας την αποαδενυλίωση. Έχει προταθεί ακόμη, πως κατά τη διάρκεια τερματισμού της μετάφρασης, η πρόσδεση της Tob πρωτεΐνης και της PABPC μπορεί να οδηγήσει στην πρόσδεση του συμπλόκου CCR4-NOT (Ezzeddine et al., 2007; Mauxion et al., 2008). Θα μπορούσε λοιπόν το mRNA του BTG2 να αποαδενυλιώνεται από τη CNOT6 και τη CNOT8, διότι η έκφρασή του αυξάνεται κατά 400% και 110%, όταν αποσιωπούμε την πρώτη ή τη δεύτερη, αντίστοιχα. Εναλλακτικά, οι ίδιες αυτές αποαδενυλάσεις μπορεί να είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση της

έκφρασης ογκογονιδίων, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στην περίπτωση του γονιδίου c-myc. Έτσι όταν “σβήνουμε” μία από αυτές, τα επίπεδα του ογκογονιδίου αυξάνουν, ενεργοποιώντας αμυντικούς μηχανισμούς, αυξάνοντας την έκφραση του BTG2.

Όπως αναφέρθηκε, το αντι-αποπτωτικό γονίδιο c-myc, ίσως να αποτελεί έναν ακόμη στόχο των δύο αυτών αποαδενυλασών. Κατά την αποσιώπηση της CNOT6 τα επίπεδα mRNA του γονιδίου αυξάνουν κατά 200% και στην περίπτωση που αποσιωπούμε τη CNOT8, κατά 150%. Είναι λοιπόν πιθανό, μεταλλάξεις στα γονίδια των δύο αυτών αποαδενυλασών, να μπορούσαν να οδηγήσουν σε διάφορες μορφές καρκίνου.

Δύο ακόμη παράγοντες των οποίων τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης αυξάνουν σημαντικά, είναι η πολυ(A) προσδενόμενη πρωτεΐνη (PABP) και η ενδονουκλεάση AGO2. Η αποσιώπηση των CNOT6 και CNOT8 προκάλεσε αύξηση του PABP mRNA κατά 2 φορές, ενώ για την AGO2 η αύξηση ήταν 11 και 8 φορές για κάθε αποαδενυλάση αντίστοιχα. Όσον αφορά την PABPC, μας κάνει να σκεφτούμε ότι ο παράγοντας αυτός ίσως αποτελεί στόχο των CNOT6 και CNOT8, οι οποίες αποαδενυλιώνοντας τα μετάγραφα του, προσπαθούν να μειώσουν τη σταθερότητα και αποτελεσματική μετάφραση τους. Αυτό θα σήμαινε λιγότερη PABP (πρωτεΐνη), μη επαρκή προστασία των πολυ(A) ουρών των mRNAs του κυττάρου και αυξημένη πιθανότητα αποικοδόμησης. Όμως αυτά εξαρτώνται και από άλλες συνθήκες, όπως η φάση του κυτταρικού κύκλου, η φάση ανάπτυξης κ.α. Η AGO2, αποτελεί ένα από τα βασικά συστατικά του συμπλόκου RISC. Έχει δείξει πως το σύμπλοκο αυτό προωθεί την αποαδενυλίωση των mRNAs που στοχεύονται από mi/siRNAs στρατολογώντας το σύμπλοκο CCR4-NOT σε ανθρώπινα κύτταρα (Piao et al., 2010). Μπορούμε λοιπόν να υποθέσουμε ότι η αύξηση των επιπέδων mRNA της AGO2 είναι αποτέλεσμα της αποσιώπησης των CNOT6 και CNOT8, οι οποίες με τον τρόπο αυτό μπορεί να εμπλέκονται στην αποικοδόμηση mRNAs που στοχεύονται από miRNAs.

Όταν αποσιωπούμε την υπομονάδα CCR4a (CNOT6) του συμπλόκου CCR4-NOT, παρατηρούμε και μία πολύ σημαντική αύξηση του μεταφορέα γλυκόζης 1 (GLUT1) της τάξης του 400%. Είναι γνωστό ότι η CNOT6 παρουσιάζει ομολογία με την NOC (CCR4C) και βάσει προηγούμενων

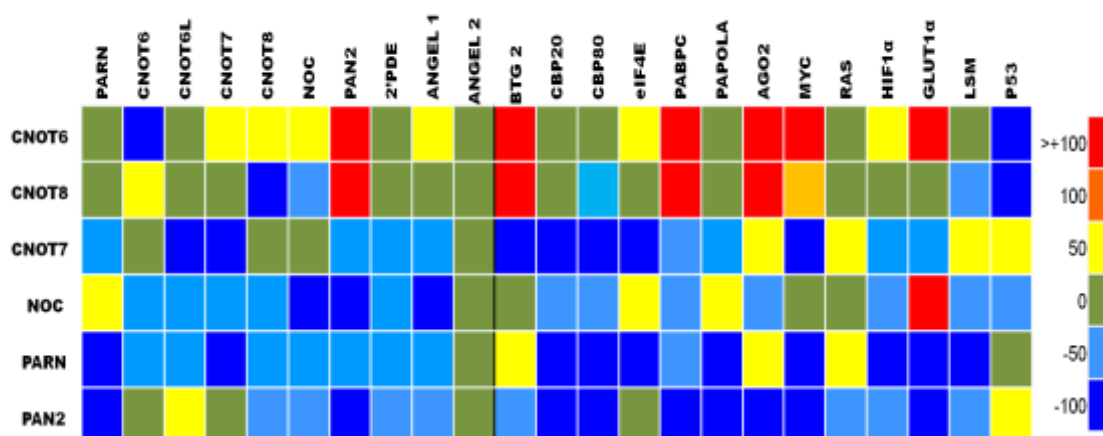
μελετών του εργαστηρίου μας, αποσιώπηση της NOC προκαλεί επίσης σημαντική αύξηση του παράγοντα αυτού. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με έρευνες που έδειξαν ότι στα NOC-knock out ποντίκια, η ευαισθησία προς τη γλυκόζη ήταν αυξημένη, επομένως η NOC εμπλέκεται στον μεταβολισμό της γλυκόζης και ίσως να εμπλέκεται με το να έχει στόχο το μεταφορέα της γλυκόζης στα κύτταρα όπου αυτή εκφράζεται κανονικά (wild type cells). Είναι λοιπόν πιθανό το ίδιο να συμβαίνει και στην περίπτωση της CNOT6 (Green et al., 2007).

Η αύξηση των επιπέδων του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E κατά 60% όταν αποσιωπούμε την CNOT6 και κατά 25% όταν αποσιωπούμε την CNOT8, μας κάνει να σκεφτούμε ότι πιθανώς το mRNA του να αποαδενυλιώνεται από αυτές και με τον τρόπο αυτό να μειώνεται η πιθανότητα μετάφρασης κάποιων γονιδίων. Επίσης, η μικρή αύξηση της πολυ(A) πολυμεράσης (Parola), κατά 20% και στις δύο περιπτώσεις, μας κάνει να υποθέσουμε ότι μπορεί και αυτή να αποτελεί στόχο της CNOT6 και CNOT8, οι οποίες με αυτόν τον έμμεσο τρόπο προσπαθούν να μειώσουν το εύρος των αδενυλιωμένων mRNA μέσα στο κύτταρο, είτε οδηγώντας στην καταστολή της μετάφρασής τους, είτε στην αποικοδόμησή τους. Τέλος, το γεγονός πως και ο παράγοντας που επάγεται κατά την υποξία (Hif1a), είναι πιθανό να αποτελεί έναν ακόμη στόχο τους, μπορεί να σημαίνει πως οι αποαδενυλάσες αυτές ίσως να ρυθμίζουν και άλλα γονίδια των οποίων η έκφραση επάγεται σε καταστάσεις στρες του κυττάρου. Ίσως όμως τέτοιες αυξήσεις, της τάξης του 10-30% να είναι τυχαίες.

Από την άλλη, όταν τα επίπεδα ενός mRNA ελαττώνονται, η κατάσταση περιπλέκεται. Πιθανότατα, τα συγκεκριμένα mRNAs υπόκεινται σε διαφορετικό μηχανισμό ελέγχου των επιπέδων τους μετά την αποσιώπηση της CNOT6 ή της CNOT8, ο οποίος είτε σχετίζεται με την ενεργοποίηση άλλων αποαδενυλασών που καταστρέφουν χωρίς ρύθμιση το mRNA-στόχο είτε με την ενεργοποίηση εναλλακτικών μονοπατιών αποικοδόμησης όπως τα miRNAs. Παρατηρούμε ότι μετά από αποσιώπηση της CNOT6 καθώς και της CNOT8, μειώνονται πάρα πολύ τα επίπεδα του γονιδίου της p53 και σημαντικά τα επίπεδα του παράγοντα LSM και των αποαδενυλασών PARN και PDE12. Κατά την αποσιώπηση της CNOT8 μειώνονται σημαντικά τα

επίπεδα της NOC και του παράγοντα πρόσδεσης στην καλύπτρα CBP80. Υποθέτουμε ότι όταν απουσιάζει η δράση είτε της CNOT6 είτε της CNOT8, μπορούν και δρουν άλλες αποαδενυλάσες που πιθανώς να αποτελούν στόχο της, οι οποίες σ' αυτή την περίπτωση έχουν ως στόχο τους παράγοντες που μειώνονται.

Στην **Εικόνα 20** παρουσιάζονται συγκεντρωτικά, τα επίπεδα έκφρασης mRNA των παραγόντων που μελετήθηκαν, μετά την αποσιώπηση διαφόρων αποαδενυλασών. Η αποσιώπηση των υπολοίπων αποαδενυλασών (εκτός της CNOT6 και CNOT8), πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια άλλων εργασιών.



Εικόνα 20: Μεταβολές στην έκφραση mRNA επιλεγμένων παραγόντων, ως αποτέλεσμα της αποσιώπησης των αποαδενυλασών σε κύτταρα Hep2. Οι αποσιωπημένες αποαδενυλάσες παρουσιάζονται στα αριστερά, ενώ οι παράγοντες στο πάνω μέρος. Τα επίπεδα έκφρασης από τα αποσιωπημένα κύτταρα δίνονται ως ποσοστό σε σύγκριση με αυτά από τα mock, σύμφωνα με τη διαβάθμιση χρώματος/ ποσοστού που φαίνεται στα δεξιά.

Παρατηρώντας αρχικά τα πρότυπα έκφρασης που προκύπτουν μετά την αποσιώπηση των αποαδενυλασών CNOT6 και CNOT8, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι οι δύο αυτές αποαδενυλάσες επηρεάζουν σημαντικά την έκφραση των υπολοίπων αποαδενυλασών και παραγόντων. Η αποσιώπηση της CNOT6 συγκεκριμένα, προκαλεί αύξηση όλων σχεδόν των υπόλοιπων αποαδενυλασών, πράγμα που σημαίνει ότι, είτε αποτελούν άμεσους στόχους της, είτε οι αποαδενυλάσες δρουν σινεργιστικά προκειμένου να ρυθμίσουν τη

γονιδιακή έκφραση, αντισταθμίζοντας το αποτέλεσμα που έχει η αποσιώπηση της CNOT6.

Ενώ οι CNOT6 και CNOT8 εμφανίζουν κοινά πρότυπα έκφρασης, δεν φαίνεται να υπάρχουν σημαντικές ομοιότητες με την άλλη υπομονάδα του συμπλόκου, CNOT7. Αυτό είναι πιθανό να σημαίνει πως οι υπομονάδες του συμπλόκου CCR4-NOT, παρουσιάζουν μη επικαλυπτόμενες λειτουργίες και έτσι το σύμπλοκο έχει πληθώρα διαφορετικών mRNA στόχων, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο πολλά γονίδια.

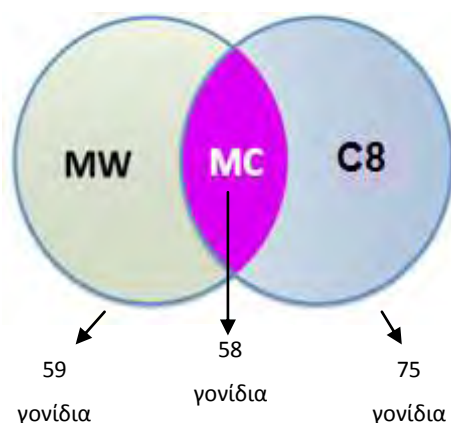
Τέλος, προσεκτική παρατήρηση της εικόνας στο σύνολό της, αποκαλύπτει σημαντικές διαφορές όσον αφορά τις μεταβολές στα επίπεδα mRNA των περισσότερων από τους επιλεγμένους παράγοντες. Αυτές οι διαφορές στα πρότυπα έκφρασης που προκύπτουν μετά την αποσιώπηση της κάθε αποαδενυλάσης, αποτελούν μια πρώτη ένδειξη για διαφορετικότητα στη ρύθμιση των εξεταζόμενων mRNAs και μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι αποαδενυλάσες δρουν ενορχηστρωμένα για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

5.2 Η επίδραση της αποσιώπησης των CNOT6 ή CNOT8 στη γονιδιακή έκφραση

Προκειμένου να πληροφορηθούμε περαιτέρω για το μηχανισμό μέσω του οποίου η CNOT6 και η CNOT8 επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση διενεργήθηκε ανάλυση της έκφρασης σε επίπεδο γονιδιώματος. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, υπάρχουν αρκετές εργασίες κατά τις οποίες μελετάται η επίδραση της αποσιώπησης αποαδενυλασών μέσω πειραμάτων μικροσυστοιχιών. Σε εργασίες όπου αποσιωπούνται οι CNOT7/CNOT8 και CNOT6/CNOT6L, οι ερευνητές εστιάζονται σε γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση (Aslam et al., 2009; Mittal et al., 2011), ενώ κατά την αποσιώπηση της CNOT6L, σε γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, όπως για παράδειγμα το γονίδιο p27kip1 (Morita et al., 2007). Στην παρούσα εργασία όμως, δεν εστιάζομαστε σε συγκεκριμένα μονοπάτια και γονίδια, αλλά μελετούμε το σύνολο των γονιδίων των οποίων

τα επίπεδα έκφρασης μεταβάλλονται σημαντικά καθώς και όλα τα κυτταρικά μονοπάτια που επηρεάζονται όταν αποσιωπούμε τη CNOT6 ή τη CNOT8.

Μετά την ανάλυση της έκφρασης, η σύγκριση των προτύπων μεταξύ των control δειγμάτων MV και MW με τα MS, αποκάλυψε τα μονοπάτια τα οποία απορρυθμίζονται λόγω της επαγωγής του μηχανισμού RNAi στα κύτταρα και της διαδικασίας της διαμόλυνσης. Αποσιώπηση της αποαδενυλάσης CNOT6 ή της CNOT8 προκάλεσε απορρύθμιση πολλών κυτταρικών μονοπατιών, μειώνοντας τα επίπεδα των γονιδίων που συμμετέχουν σε αυτά. Η αποσιώπηση της CNOT6 για παράδειγμα, οδήγησε σε μείωση των επιπέδων γονιδίων που συμβάλλουν στις αντιϊκές και αντιπολλαπλασιαστικές λειτουργίες των ιντερφερονών (IFN) καθώς και γονιδίων που σχετίζονται με την επιβίωση και ανάπτυξη των κυττάρων. Αποσιώπηση της CNOT8, προκάλεσε μείωση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε μονοπάτια ογκογονιδίων, γονιδίων που επάγονται κατά το σχηματισμό δραστικών ενώσεων οξυγόνου καθώς και γονιδίων που κωδικοποιούν για ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Στους πίνακες των μονοπατιών, παρατηρούμε ότι το μονοπάτι των ριβοσωμικών πρωτεϊνών μεταβάλλεται (down regulated) όταν συγκρίνουμε τα διαμολυσμένα έναντι της CNOT8 με τα MS κύτταρα, μεταβάλλεται όμως και όταν συγκρίνουμε το MW με το MS δείγμα (**Εικόνα 21**). Παρ' ότι το μονοπάτι είναι κοινό, τα γονίδια που συμμετέχουν σε αυτό στις δύο περιπτώσεις, παρουσιάζουν διαφορές. Έτσι αν αποκλείσουμε τα κοινά γονίδια (**MC Εικόνα 21**), κατά την αποσιώπηση της CNOT8 και μόνο, μεταβάλλονται σημαντικά τα επίπεδα 17 γονιδίων που κωδικοποιούν για ριβοσωμικές πρωτεΐνες, γεγονός που μας κάνει να υποθέσουμε ότι η CNOT8 συμμετέχει ενεργά στη ρύθμιση της μετάφρασης.



Εικόνα 21: Διάγραμμα Venn που δείχνει την επικάλυψη των ομάδων γονιδίων ριβοσωμικών πρωτεϊνών που η έκφραση απορρυθμίστηκε σημαντικά κατά τις αποσιωπήσεις. Ως ιδανική αποσιώπηση-μάρτυρας θεωρείται αυτή όπου η διαμόλυνση γίνεται με φορέα που φέρει shRNA χωρίς κανένα mRNA-στόχο (MS). Το προφίλ έκφρασης από αυτή την αποσιώπηση συγκρίνεται α) με αυτό από κύτταρα αγρίου τύπου και προκύπτει το σύνολο MW και β) με αυτό με διαμόλυνση με φορέα που φέρει shRNA έναντι της CNOT8 και προκύπτει το σύνολο C8. MC (Mock Common) είναι τα κοινά γονίδια από την τομή των δύο συνόλων.

Κατά την αποσιώπηση της CNOT6 ή της CNOT8, δεν μεταβάλλονται κοινά μονοπάτια. Αντίθετα, στην περίπτωση που αποσιωποούνται οι αποαδενυλάσες CNOT7 ή CNOT8 και στην περίπτωση της αποσιώπησης της CNOT6 ή της CNOT6L, παρατηρούνται αλληλεπικαλύψεις στα πρότυπα έκφρασης (Aslam et al., 2009; Mittal et al., 2011), υποδεικνύοντας ότι οι υπομονάδες αυτές ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την πρόσδεση στο σύμπλοκο CCR4-NOT. Φαίνεται λοιπόν ότι οι υπομονάδες CNOT6 και CNOT8 του συμπλόκου, δεν παρουσιάζουν επικαλυπτόμενες λειτουργίες, ρυθμίζοντας την έκφραση διαφορετικών γονιδίων, με αποτέλεσμα όταν γίνεται σίγηση της μίας να μην αντισταθμίζεται το αποτέλεσμα από την παρουσία της άλλης. Είναι πιθανό, όταν αποσιωπούμε είτε τη μία είτε την άλλη, να ενεργοποιούνται άλλες αποαδενυλάσες, όπως για παράδειγμα η CNOT6L κατά την αποσιώπηση της CNOT6 και η CNOT7 κατά την αποσιώπηση της CNOT8, προκειμένου να επιτευχθεί η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Εκτός από τα γονίδια αυτά, που συμμετέχουν σε συγκεκριμένα κυτταρικά μονοπάτια, τα οποία και παρουσιάζονται στην συγκεκριμένη εργασία, η αποσιώπηση της CNOT6 ή της CNOT8 οδήγησε σε στατιστικά σημαντικές μεταβολές των επιπέδων >1000 γονιδίων, εκ των οποίων ένας πολύ σημαντικός αριθμός δείχνει αύξηση (τα δεδομένα αυτά δεν παρουσιάζονται). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με το ρόλο των δύο αυτών αποαδενυλασών, στην αποικοδόμηση των mRNAs. Το σύμπλοκο όμως CCR4-NOT, εμπλέκεται και στη ρύθμιση της μεταγραφής, είτε θετικά είτε αρνητικά. Έτσι, η έκφραση ορισμένων γονιδίων είναι πιθανό να αυξάνεται μετά την αποσιώπηση κάποιας από τις υπομονάδες του συμπλόκου (CNOT6/CNOT8), γιατί έτσι μπορεί να παρεμποδίζεται η λειτουργία του συμπλόκου ως ρυθμιστής της μεταγραφής.

Συνοψίζοντας, οι αποαδενυλάσες του συμπλόκου CCR4-NOT, CNOT6 και CNOT8, φαίνεται να συμμετέχουν ενεργά στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και η κάθε μία να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε διαφορετικές βιολογικές διεργασίες του κυττάρου. Βέβαια, πληρέστερη εικόνα θα έχουμε μετά την ταυτόχρονη αποσιώπηση των δύο αυτών αποαδενυλασών, καθώς

και την επιβεβαίωση των πληροφοριών που προέρχονται από την ανάλυση του πειράματος μικροσυστοιχιών, μέσω της Real-Time PCR.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ambros et al. (2003). “A uniform system for microRNA annotation”. *RNA* 9: 277-279
- Andrei A, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R, Luhrmann R. (2005). “A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies”. *RNA* 11, 717–727
- Aslam A, Mittal S, Koch F, Andrau JC, Winkler GS (2009). “The Ccr4–Not deadenylase subunits CNOT7 and CNOT8 have overlapping roles and modulate cell proliferation”. *Mol Biol Cell* 20, 3840–3850
- Bartlam M., Yamamoto T. (2010). “The structural basis for deadenylation by the CCR4-NOT complex”. *Protein Cell*, 1(5): 443–452
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002). *Biochemistry* (5th ed.). WH Freeman and Company. pp. 118–19, 781–808
- Bogdan A. et al. (1998). “Human carbon catabolite repressor protein (CCR4)-associative factor 1: cloning, expression and characterization of its interaction with the B-cell translocation protein BTG-1”. *Biochem. J.* 336, 471-481
- Carrington J.C. and Ambros V. (2003). “Role of microRNAs in plant and animal development”. *Science* 301:336–338
- Chen CY, Zheng D, Xia Z, Shyu AB (2009). “Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps”. *Nat Struct Mol Biol* 16, 1160–1166
- Clark LB, Viswanathan P, Quigley G, Chiang YC, McMahon JS, Yao G, Chen J, Nelsbach A, Denis CL (2004). “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
- Collart M., Timmers M. (2004). “The Eukaryotic Ccr4-Not Complex: A Regulatory Platform Integrating mRNA Metabolism with Cellular Signaling Pathways?”. *Nucleic Acid Research and Mol. Biol.*, vol. 77

- Conti E, Izaurralde E. (2005). “Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species”. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 316–325
- Cooper GC, Hausman RE (2004). *The Cell: A Molecular Approach* (3rd ed.). Sinauer. pp. 261–76, 297, 339–44
- Cougot N, Babajko S, Seraphin B (2004). “Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells”. *J Cell Biol* 165, 31–40
- Denis C., Chen J. (2003). “The CCR4–NOT Complex Plays Diverse Roles in mRNA Metabolism”. *Nucleic Acid Research and Mol. Biol.*, vol. 73
- Derek M., Novina C. & Sharp A. (2003). “Killing the messenger: short RNAs that silence expression”. *Nature* Vol4
- Doma M. K., Parker R. (2006). “Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation”. *Nature* 440, 561–564
- Dupressoir A, Morel AP, Barbot W, Loireau MP, Corbo L, Heidmann T (2001). “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
- Elbashir et al. (2001). “Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells”. *Nature* 411: 494-498
- Ezzeddine N, Chang TC, Zhu W, Yamashita A, Chen CY, Zhong Z, Yamashita Y, Zheng D, Shyu AB (2007). “Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation”. *Mol Cell Biol* 27, 7791–7801
- Fabian MR *et al.* (2009). “Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation”. *Mol Cell* 35, 868–880
- Felger J.H. et al. (1994). “Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulation”. *JB. Biol.Chem.* 28:2550-61
- Fire A. et al. (1998) “Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*”. *Nature* 391:806-811

- Frischmeyer P. A. et al. (2002). "An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons". *Science* 295, 2258–2261
- Funakoshi Y. et al. (2007). "Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases". *Genes Dev.* 21, 3135–3148
- Garapaty SR, Mahajan MA, Samuels HH (2008). "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
- Garneau N, Wilusz J, Wilusz C (2007). "The highways and byways of mRNA decay". *Nature reviews, Molecular cell Biology* vol.8
- Goldstrohm A, Wickens M. (2008). "Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control". *Nature reviews, Molecular cell Biology*, vol.9
- Govindan M, Meng X, Denis CL, Webb P, Baxter JD, Walfish PG (2009). "Identification of CCR4 and other essential thyroid hormone receptor coactivators by modified yeast synthetic genetic array analysis". *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 19854–19859.
- Grishok A. et al. (2001). "Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing". *Cell* 106:23-34
- Higgs PG (2000). "RNA secondary structure: physical and computational aspects". *Quarterly Reviews of Biophysics* 33: 199–253
- Hiroi N., Ito T., Yamamoto H., Ochiya T., Jinno S., and Okayama H. (2002). "Mammalian Rcd1 is a novel transcriptional cofactor that mediates retinoic acid-induced cell differentiation". *EMBO J.* 21, 5235–5244
- Hook B., Goldstrohm A. C., Seay D. J., Wickens M. (2007). "Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA". *J. Biol. Chem.* 282, 15430–15438
- Horr e et al. (2007). "Hypoxia and angiogenesis in endometrioid endometrial". *Cellular Oncology IOS Press* 29:219-227

- Houseley J, and Tollervey D (2009). "The Many Pathways of RNA Degradation". *Cell* 136, 763–776
- Huntzinger E., Izaurralde E. (2011). "Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay". *Nature Reviews Genetics* 12, 99-110
- Ikematsu N., Yoshida Y., Kawamura-Tsuzuku J., Ohsugi M., Onda M., Hirai M., Fujimoto J., and Yamamoto T. (1999). "Tob2, a novel anti-proliferative Tob/BTG1 family member, associates with a component of the CCR4 transcriptional regulatory complex capable of binding cyclin-dependent kinases". *Oncogene* 18, 7432–7441.
- Kerr S, Azzouz N, Fuchs S, Collart M, Strahl B, Corbett A, Larabee N. (2011). "The Ccr4-Not Complex Interacts with the mRNA Export Machinery". *PLoS ONE* 6(3): e18302
- Kiriakidou M. et al. (2009). "Expanded RNA-binding activities of mammalian Argonaute 2" *Nucleic Acids Res*
- Kranenburg O. (2005). "The KRAS oncogene: past, present, and future". *Biochim. Biophys. Acta* 1756 2: 81–2
- Lau at al. (2009). "Human Ccr4-Not complexes contain variable deadenylase subunits". *Biochem J* 422, 443-453
- Lewin B, GENES VIII
- Lippman and Martienssen (2004). "The role of RNA interference in heterochromatic silencing". *Nature* 431:364-370
- Mamane et al. (2007). "Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation". *PLoS One* 21:242
- Maquat L.E., Carmichael G.G (2000). "Quality control of mRNA function". *Cell* 26: 173–176
- Matlashewski G, Lamb P, Pim D, Peacock J, Crawford L, Benchimol S (1984). "Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene". *EMBO J.* 3 (13): 3257–62
- Mattick JS, Gagen MJ (2001). "The evolution of controlled multitasked gene networks: the role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms". *Mol. Biol. Evol.* 18 (9): 1611–30

- Mauxion F, Faux C, Seraphin B (2008). "The BTG2 protein is a general activator of mRNA deadenylation". *EMBO J* 27, 1039–1048
- Meyer S, Temme C, Wahle (2004). "Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes". *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 39:197-216
- Mittal S, Aslam A, Doidge R, Medica R, and Winkler S. (2011). "The Ccr4a (CNOT6) and Ccr4b (CNOT6L) deadenylase subunits of the human Ccr4–Not complex contribute to the prevention of cell death and senescence". *Molecular Biology of the Cell*, vol. 22
- Morel A. P., Sentis S., Bianchin C., Le Romancer M., Jonard L., Rostan M. C., Rimokh R., and Corbo L. (2003). "BTG2 antiproliferative protein interacts with the human CCR4 complex existing in vivo in three cell-cycleregulated forms". *J. Cell Sci.* 116, 2929–2936
- Morita M, Suzuki T, Nakamura T, Yokoyama K, Miyasaka T, Yamamoto T (2007). "Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers elevation of the p27Kip1 mRNA level and impairs cell growth". *Mol Cell Biol* 27, 4980–4990
- Nissen P, Hansen J, Ban N, Moore PB, Steitz TA (2000). "The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis". *Science* 289 (5481): 920–30
- Nudler E, Gottesman ME (2002). "Transcription termination and anti-termination in *E. coli*". *Genes to Cells* 7: 755–68
- Oridate et al. (2005). "Growth inhibition of head and neck squamous cells by small interfering RNAs targeting eIF4E or cyclin D1 alone or combined with cisplatin". *Cancer Biol Ther* 4(3):318-23
- Parker R, Song H. (2004). "The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover". *Nature Structural & Molecular Biology*, vol.11
- Piao X. et al (2010). "CCR4-NOT Deadenylates mRNA Associated with RNA-Induced Silencing Complexes in Human Cells". *Mol. Cell Biol.* 30, 1486-1494
- Pizzi S, Porzionato A, Pasquali C, Guidolin D, Sperti C, Fogar P, Macchi V, De Caro R, Pedrazzoli S, Parenti A. (2009). "Glucose transporter-1

- expression and prognostic significance in pancreatic carcinogenesis”. *Cellular and Molecular Biology* 24(2):175-85
- Prevot D., Morel A. P., Voeltzel T., Rostan M. C., Rimokh R., Magaud J. P., and Corbo L. (2001). “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
 - Rastogi et al. (2007). “Glut-1 antibodies induce growth arrest and apoptosis in human cancer cell lines”. *Cancer Letters*, 257: 24-251
 - Read P, Strachan T. (1999). "Chapter 18: Cancer Genetics". *Human molecular genetics 2*
 - Robert and Pelletier (2009). “Translation initiation: a critical signalling node in cancer”. *Expert Opin Ther Targets* 13(11):1279-93
 - Rossi, JJ (2004). "Ribozyme diagnostics comes of age". *Chemistry & Biology* 11(7): 894–95
 - Sanchez-Perez I, Manguan-Garcia C, Menacho-Marquez M, Murguva JR, Perona R. (2008). “hCCR4/cNOT6 targets DNA-damage response proteins”. *Cancer Letters* 273, 281–291
 - Schwede A, Ellis L, Luther J, Carrington M, Stoecklin G, Clayton C (2008). “A role for Caf1 in mRNA deadenylation and decay in trypanosomes and human cells”. *Nucleic Acids Res* 36, 3374–3388
 - Semenza (2003). “Targeting HIF-1 for cancer therapy”. *Nat Rev Cancer* 3(10): 721-32
 - Stryer L, Berg M, Tymoczko L. (2002). *Biochemistry, Fifth Edition & Lecture Notebook*
 - Taxman et al. (2006). “Criteria for effective design, construction, and gene knockdown by shRNA vectors”. *BMC Biotechnology*, 6:7
 - Temme C, Zhang L, Kremmer E, Ihling C, Chartier A, Sinz A, Simonelig M, Wahle E (2010). “Subunits of the *Drosophila* CCR4-NOT complex and their roles in mRNA deadenylation”. *RNA* 16, 1356–1370
 - Tucker M, Staples RR, Valencia-Sanchez MA, Muhlrads D, Parker R (2002). “Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA

- deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*". EMBO J 21, 1427–1436
- Wagner E, Clement SL, Lykke-Andersen J (2007). "An unconventional human Ccr4-Caf1 deadenylase complex in nuclear Cajal bodies". Mol Cell Biol 27, 1686–1695
 - Watson J, Caudy A, Myers R, Witkowski J. "Recombinant DNA (Genes and Genomes- a short course)". 3rd edition
 - Weihai and Parker (2000). "Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing". *Cell Biology* 12:346-350
 - Winkler GS, Mulder KW, Bardwell VJ, Kalkhoven E, Timmers HT (2006). "Human Ccr4-Not complex is a ligand-dependent repressor of nuclear receptor-mediated transcription". EMBO J 25, 3089–3099
 - Wong L. and Medrano, J. F. (2005). "Real-time PCR for mRNA quantification". *Biotechniques* 39 No1
 - Yamashita A, Chang TC, Yamashita Y, Zhu W, Zhong Z, Chen CY, Shyu AB (2005). "Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover". Nat Struct Mol Biol 12, 1054–1063
 - Yang X. (2009). "Crystal structure of human BTG2 and mouse TIS21 involved in suppression of CAF1 deadenylase activity". *Nucleic Acids Res*
 - Yoshida Y., Hosoda E., Nakamura T., and Yamamoto T. (2001). "Association of ANA, a member of the antiproliferative Tob family proteins, with a Caf1 component of the CCR4 transcriptional regulatory complex". Jpn. J. Cancer Res. 92, 592–596