

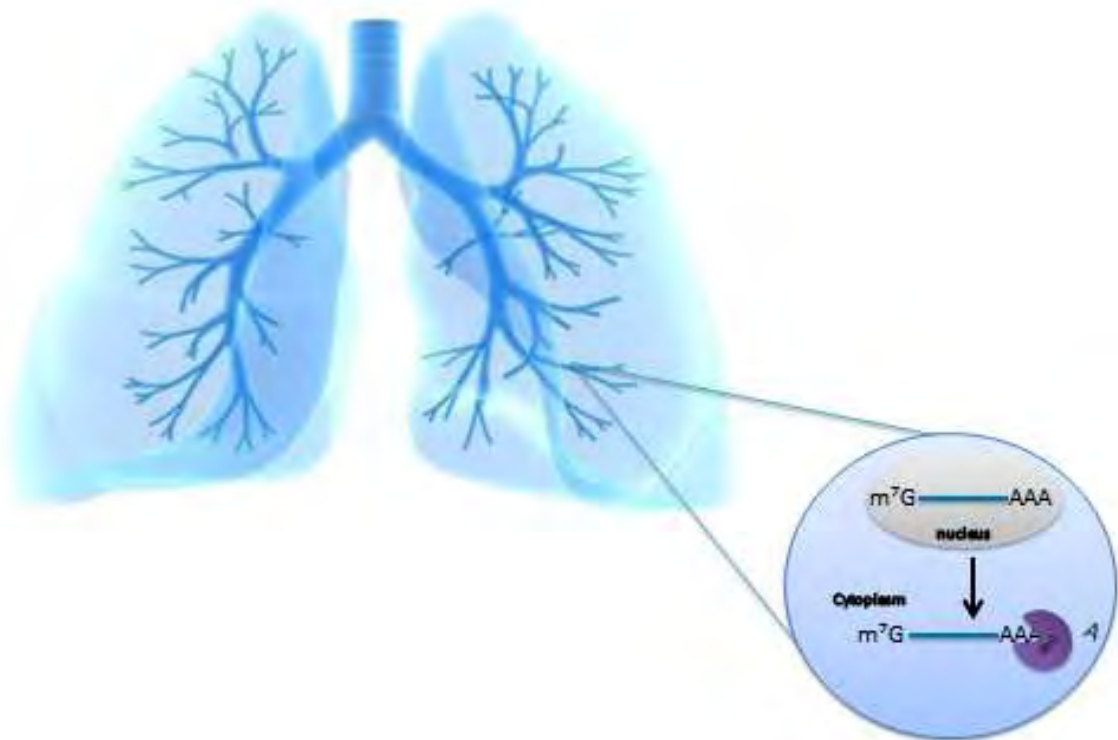


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

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

ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΗ ΕΙΡΗΝΗ

## ΕΝΖΥΜΑ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ RNA ΩΣ ΝΕΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ



ΛΑΡΙΣΑ 2012

**ENZYMA ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ RNA ΩΣ ΝΕΟΙ  
ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ**

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

#### **ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

- Μπαλατσός Νικόλαος, Λέκτορας Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Υπεύθυνος διπλωματικής εργασίας ).
- Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

#### *Ευχαριστίες*

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μπαλατσό Νικόλαο για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την παρούσα εργασία καθώς επίσης και για τις γνώσεις και τις εμπειρίες που μου μετέδωσε και το χρόνο που διέθεσε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Λεωνίδα Δημήτριο και την κ. Ζίφα Αιμιλία που αποτελούν μέλη της τριμελούς επιτροπής για τη συμβολή τους στη διεξαγωγή της διπλωματικής.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Καθηγητή Κωνσταντίνο Ι. Γουργουλιάνη και τη Δρ. Θεοδώρα Κερενίδη από την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για την παραχώρηση των δειγμάτων από καρκίνο του πνεύμονα και την στήριξή τους σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα Π. Μαραγκοζίδη για τη αμέριστη βοήθεια του, τη σημαντική συμβολή του στη διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς και για την άψογη συνεργασία μας.

Τέλος ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

## Περιεχόμενα

|   |    |
|---|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....   | 6  |
| ABSTRACT .....  | 7  |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1  |    |
| <i>Καρκίνος του πνεύμονα</i>                                |    |
| 1.1 Εισαγωγή.....   | 8  |
| 1.2 Ταξινόμηση του καρκίνου του πνεύμονα.....               | 8  |
| 1.3 Σταδιοποίηση.....                                       | 12 |
| 1.4 Αιτιοπαθογένεια.....                                    | 13 |
| 1.5 Μοριακή βιολογία του καρκίνου του πνεύμονα.....         | 14 |
| 1.6 Διάγνωση, πρόγνωση του καρκίνου του πνεύμονα .....      | 16 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2  |    |
| <i>RNA</i>  |    |
| 2.1 Εισαγωγή.....   | 18 |
| 2.2 Ωρίμανση mRNA.....                                      | 18 |
| 2.3 Αποικοδόμηση mRNA .....                                 | 20 |
| 2.4 Αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNA .....                   | 23 |
| 2.5 Παράγοντες που ρυθμίζουν την αποικοδόμηση του mRNA..... | 26 |
| 2.6 Αποαδενυλάσες.....                                      | 27 |
| 2.7 Σύμπλοκα αποαδενυλασών .....                            | 29 |
| 2.8 Βιολογικές λειτουργίες.....                             | 32 |
| 2.9 Ρύθμιση αποαδενυλίωσης mRNA .....                       | 33 |
| 2.10 Ριβονουκλεάσες και καρκίνος .....                      | 35 |
| <i>Σκοπός</i> .....   | 38 |
| 3. Υλικά και μέθοδοι  |    |
| <i>3.1 Υλικά</i>  |    |
| 3.1.1 Χημικά.....   | 39 |
| 3.1.2 Kit.....  | 40 |

|   |    |
|---|----|
| 3.1.3 Διαλύματα.....  | 40 |
| 3.1.4 Θρεπτικά μέσα .....   | 40 |
| 3.1.5 Βακτηριακά στελέχη .....  | 41 |
| 3.1.6 Πλασμιδιακοί φορείς.....  | 41 |
| 3.1.7 Κυτταρική σειρά .....   | 41 |
| 3.1.8 Δείγματα .....  | 41 |
| 3.1.9 Short-Hairpin RNAs (shRNAs) .....   | 42 |
| 3.1.10 Εκκινητές.....   | 44 |
| 3.2 Μέθοδοι   |    |
| 3.2.1 Ηλεκτροδιάτρηση δεκτικών κυττάρων DH5a (E.coli) με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 (puro-amp) .....                                      | 47 |
| 3.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation) .....  | 48 |
| 3.2.3 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με X-fect .....  | 49 |
| 3.2.4 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών.....  | 50 |
| 3.2.5 Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου δύο βημάτων (RT-qPCR).....  | 52 |
| 3.2.6 cDNA Μικροσυστοιχίες (Microarrays).....   | 55 |
| 4. Αποτελέσματα   |    |
| 4.1 Επίπεδα έκφρασης mRNA αποαδενυλασών σε ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα με quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)..... | 57 |
| 4.2 Επίπεδα έκφρασης mRNA αποαδενυλασών σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα με quantitative Real Time PCR (qRT-PCR).....     | 58 |
| 4.3 cDNA Μικροσυστοιχίες.....   | 59 |
| 5.Συζήτηση.....   | 64 |
| <i>Συμπεράσματα</i> .....   | 68 |
| Βιβλιογραφία .....  | 69 |
| Παράρτημα .....   | 78 |

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs παρέχει στα ευκαρυωτικά κύτταρα ένα μηχανισμό ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης. Μέσω αυτής ρυθμίζεται η σταθερή και ακριβής μετάφραση και αποικοδόμησή τους, και κατ' επέκταση η ποιότητα και η ποσότητα των πρωτεϊνών που συνθέτονται. Στις νεοπλασίες, η απορρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη παραγωγή ογκογόνων και/ή μειωμένη παραγωγή ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών. Έτσι, η μελέτη των παραγόντων που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των mRNAs είναι σημαντική για την κατανόησή του ρόλου τους στον καρκίνο. Το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs είναι η βράχυνση των πολυ(A) ουρών τους από μια οικογένεια ενζύμων, τις αποαδενυλάσες. Τουλάχιστον εννέα αποαδενυλάσες έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο. Στην παρούσα εργασία ερευνάται η διαφοροποίηση της έκφρασης των αποαδενυλασών σε καρκινικούς ιστούς πνεύμονα, σε σχέση με παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Για να κατανοήσουμε το ρόλο των αποαδενυλασών στον καρκίνο του πνεύμονα σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης αποσιωπήθηκε η έκφραση των αποαδενυλασών CNOT6, CNOT6L και CNOT7 σε κύτταρα προέλευσης καρκίνου του πνεύμονα (squamous cell carcinoma) και αναλύθηκε η επίδραση της διεργασίας στην έκφραση του συνόλου του γονιδιώματος. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως η έκφραση των αποαδενυλασών αλλάζει στον καρκίνο του πνεύμονα. Ενώ μέσω των πειραμάτων DNA μικροσυστοιχιών, προσδιορίστηκαν μεταβολές στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης, αποκαλύπτοντας νέες σχέσεις μεταξύ κυτταρικών μονοπατιών. Οι παρατηρήσεις μας, σε συνδυασμό με την τεκμηριωμένη αλλαγή έκφρασης ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών παραγόντων, θα μπορούσαν να δώσουν νέα προοπτική στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών του καρκίνου μέσω των μηχανισμών αποικοδόμησης των mRNAs, αναδεικνύοντας τους παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτούς ως υποσχόμενο στόχο θεραπείας.

## ABSTRACT

The regulation of mRNAs stability in eukaryotic cells provides a mechanism for control of gene expression. Through this, stable and accurate translation and degradation of mRNAs is regulated, reflected to the quality and quantity of the newly synthesized proteins. In cancer, deregulation of mRNAs stability can lead to increased production of oncogene products and/or decrease of tumor suppressor protein levels. Thus, the study of factors involved in mRNA degradation is important for understanding their role in cancer. The first and rate-limiting step of mRNA degradation is the shortening of their poly(A) tail catalyzed by deadenylases. At least 9 deadenylases have been recognized in humans, yet it is not clear the advantage to have so many poly(A)-degrading enzymes. We study the expression of deadenylases in lung cancer tissues, compared to adjacent normal tissues. To understand their diversity in lung cancer we silence the expression of CNOT6, CNOT6L and CNOT7 in human NCI-H520 cells and study the impact on gene expression using microarrays. The analysis showed that the expression of deadenylases alters significantly in lung cancer compared to controls. Moreover, gene expression analysis via DNA microarrays experiments, revealed new relations between cellular pathways. Our observations, combined with the documented changes in expression of oncogenes or tumor suppressors could provide new perspective on our understanding of the molecular mechanisms in cancer through the mechanisms of mRNA degradation, revealing the factors involved as promising candidate targets for therapy.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## *Καρκίνος του πνεύμονα*

### **1.1 Εισαγωγή**

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ο πιο κοινός και θανατηφόρος καρκίνος παγκοσμίως. Αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου καρκίνου στους άνδρες και την τρίτη στις γυναίκες (μετά τον καρκίνο του μαστού και τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας). Κάθε χρόνο διαγιγνώσκονται περισσότερα από 1,2 εκατομμύρια νέα περιστατικά καρκίνου του πνεύμονα (Stewart και Kleihues, 2003). Τα άτομα που προσβάλλονται έχουν δυσμενή πρόγνωση και μόνο το 14% έχει προσδόκιμο επιβίωσης πέντε χρόνια στις Η.Π.Α., ενώ το ποσοστό στην Ευρώπη κυμαίνεται στο 10% και στις αναπτυσσόμενες χώρες ανέρχεται στο 8,9% (Parkin και συν., 2005). Στην Ελλάδα ο καρκίνος του πνεύμονα είναι υπεύθυνος για το 30% των θανάτων από κακοήγη νεοπλάσματα στους άνδρες αλλά μόνο για το 10% στις γυναίκες. Η θνησιμότητα από καρκίνο του πνεύμονα παρουσιάζει συνεχή αυξητική πορεία, ανάλογη με την πορεία της θνησιμότητας από άλλα κακοήγη νεοπλάσματα και δεν εμφανίζει την πτωτική τάση που παρουσιάζεται στον ανδρικό πληθυσμό σε άλλες χώρες (World Health Organization).

### **1.2 Ταξινόμηση του καρκίνου του πνεύμονα**

Σύμφωνα με την ιστοπαθολογική ταξινόμηση (WHO, 1997), ο καρκίνος του πνεύμονα ταξινομείται βάσει των βιολογικών και κλινικών του χαρακτηριστικών σε δύο τύπους.

Οι δύο αυτοί τύποι είναι ο μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα (Small Cell Lung Cancer, SCLC), και ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα (Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC). Ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις όπου ο καρκίνος του πνεύμονα εμφανίζει χαρακτηριστικά τόσο του SCLC όσο και του NSCLC, και ονομάζεται



«Συνδυασμένος μικροκυτταρικός/μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα». (Sekido και συν., 1998).

**1. Μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (NSCLC) 70-75%**

Καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο (επιδερμοειδές) 25-30%

Αδενοκαρκίνωμα (30-35%)

Καρκίνωμα από μεγάλα κύτταρα (10-15%)

**2. Μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (SCLC) 20-25%**

**3. Συνδυασμένοι τύποι (5-10%)**

Συνηθέστερα

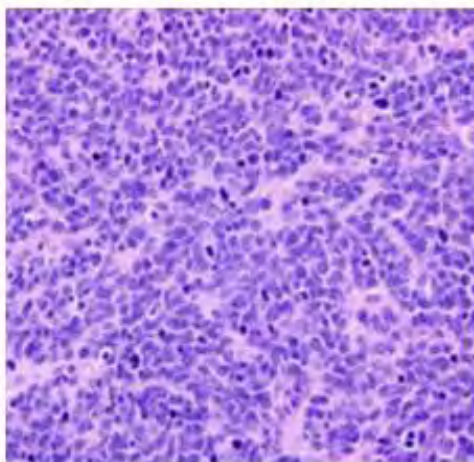
Μικτό καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο και αδενοκαρκίνωμα

Μικτό καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο και SCLC

**Πίνακας 1:** Ιστολογικής ταξινόμησης και επίπτωσης κατά προσέγγιση (Robbins και συν., 2002).

➤ *Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC)*

Ο ΜΚΠ αποτελεί περίπου 20%-25% όλων των περιπτώσεων του καρκίνου του πνεύμονα. Ο ΜΚΠ είναι η πιο επιθετική μορφή καρκίνου του πνεύμονα. Τα μικροκυτταρικά καρκινώματα εμφανίζονται γενικά ως ωχρές, φαιές μάζες με κεντρική εντόπιση, οι οποίες επεκτείνονται στο πνευμονικό παρέγχυμα και προσβάλλουν πρώιμα τους πυλαίους και τους μεσωθωρακικούς λεμφαδένες. Παρότι τα καρκινικά κύτταρα είναι μικρά, διπλασιάζονται γρήγορα, αναπτύσσονται επίσης πολύ γρήγορα και δημιουργούν μεγάλους όγκους. Οι όγκοι αυτοί συνήθως εξαπλώνονται γρήγορα σε άλλα όργανα του σώματος, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου, του ήπατος καθώς επίσης και στα οστά. Τα καρκινώματα αυτά αποτελούνται από κύτταρα με στρογγυλό έως και ατρακτοειδές σχήμα, ελάχιστο κυτταρόπλασμα και λεπτοκοκκώδη χρωματίνη. Κύρια αιτία της εμφάνισης του μικροκυτταρικού καρκίνου είναι το κάπνισμα (Elias, 1997· Robbins και συν., 2002).



**Εικόνα 1.1:** Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Travis, 2011).

➤ *Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC)*

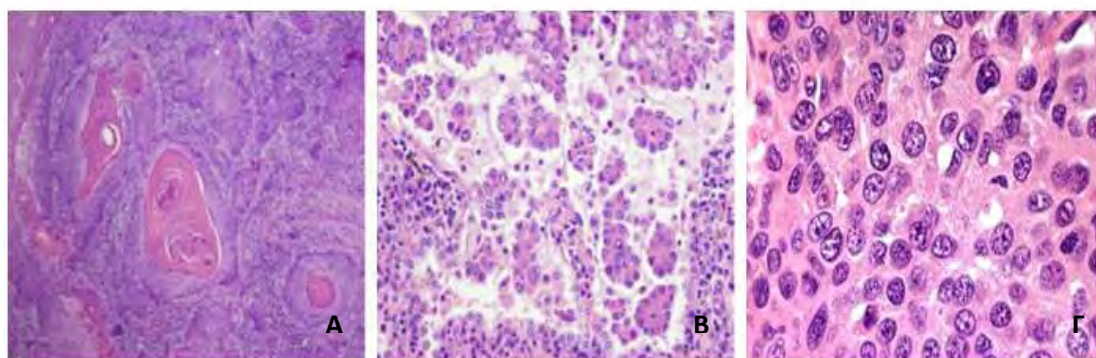
Ο ΜΜΚΠ είναι η πιο συνηθισμένη μορφή καρκίνου του πνεύμονα και ευθύνεται για περίπου 80% του συνόλου των περιστατικών. Από αυτούς ήδη το 80% παρουσιάζει διάσπαρτη ή τοπικά προχωρημένη νόσο (Park και Altorki, 2002 ). Ο τύπος αυτός περιλαμβάνει τρεις ιστολογικούς τύπους, τον πλακώδη, το αδενοκαρκίνωμα και τον μεγαλοκυτταρικό.

Καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο ή επιδερμοειδής καρκίνος (squamous cell carcinoma): είναι ο συχνότερος βρογχογενής καρκίνος και αποτελεί το 30% όλων των περιπτώσεων του καρκίνου του πνεύμονα. Τα καρκινώματα από πλακώδες επιθήλιο είναι συχνότερα στους άντρες από ότι στις γυναίκες. Εμφανίζουν την τάση να αναπτύσσονται κεντρικά, στους κύριους βρόγχους και να διασπείρονται στους επιχώριους πηλαίους, λεμφαδένες ενώ εξωθωρακική γενικευμένη διασπορά συμβαίνει αργότερα συγκριτικά με τους άλλους ιστολογικούς τύπους. Ιστολογικά οι όγκοι αυτοί κυμαίνονται από καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα από πλακώδες επιθήλιο που εμφανίζουν πέρλες κερατίνης και μεσοκυττάρια γέφυρες μέχρι πτωχά διαφοροποιημένα καρκινώματα με ελάχιστα υπολειμματικά χαρακτηριστικά πλακώδων κυττάρων.

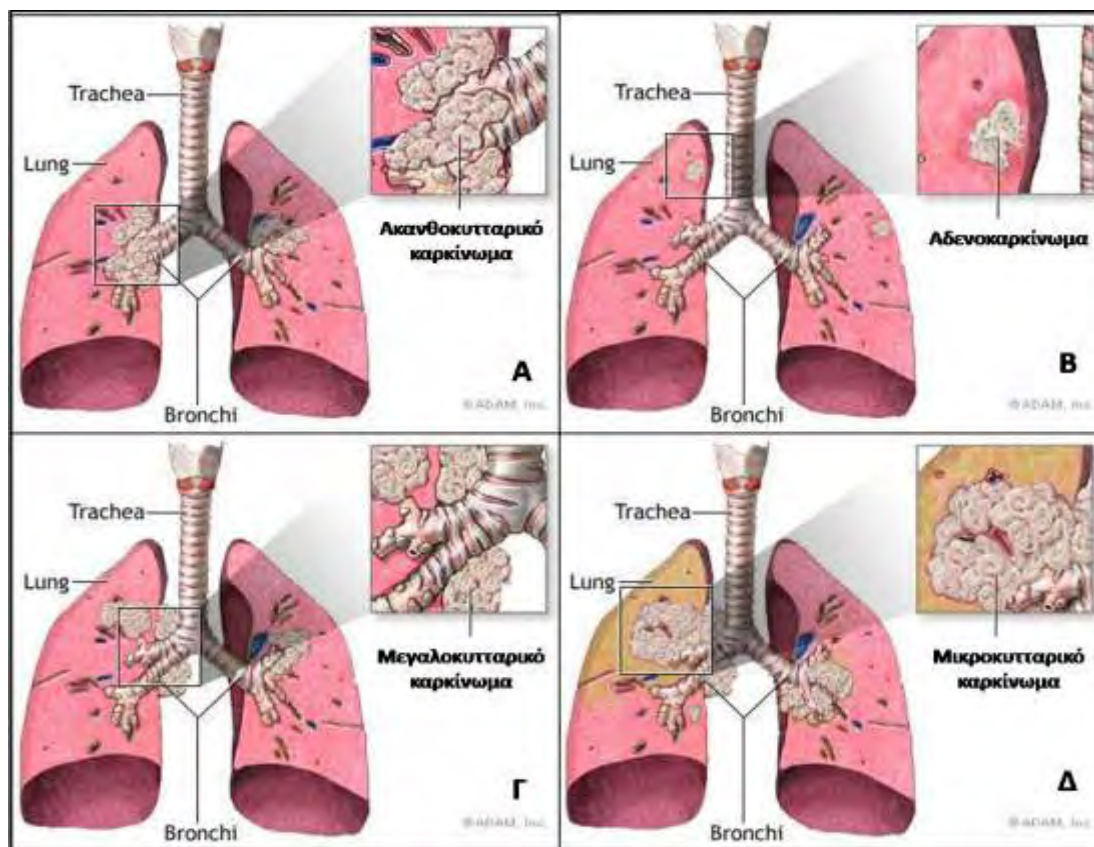
Αδενοκαρκίνωμα: είναι η πιο διαδεδομένη μορφή καρκίνου του πνεύμονα καθώς ευθύνεται για το 40% όλων των περιπτώσεων. Τα αδενοκαρκινώματα μπορούν να εμφανιστούν ως κεντρικές βλάβες όπως ο ιστολογικός τύπος από πλακώδη κύτταρα, αλλά συνήθως εντοπίζονται περιφερικότερα. Οι όγκοι αυτοί αναπτύσσονται αργά και σχηματίζουν μικρότερες μάζες συγκριτικά με τους άλλους ιστολογικούς τύπους

αλλά τείνουν να μεθίστανται ευρέως σε πρώιμο στάδιο. Ιστολογικά, επεξεργάζονται ποικίλη μορφολογία όπως κυψελίδωδη (σχηματίζει αδένες), θηλώδη και συμπαγή.

Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (large cell carcinoma): αποτελεί το 10% των καρκίνων του πνεύμονα και αναπτύσσεται συχνά στην περιφέρεια του πνεύμονα. Τα καρκινώματα από μεγάλα κύτταρα αποτελούν μια ομάδα νεοπλασμάτων που στερούνται κυτταρικής διαφοροποίησης και προφανώς αντιπροσωπεύουν είτε καρκινώματα από πλακώδες επιθήλιο είτε αδеноκαρκινώματα τα οποία είναι τόσο αδιαφοροποίητα ώστε δεν επιτρέπεται η περεταίρω ταυτοποίησή τους. Τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι μεγάλα, συνήθως αναπλαστικά και έχουν μεγάλους φυσαλιδώδεις πυρήνες με έντονα πυρήνια. Περιστασιακά οι όγκοι περιλαμβάνουν ένα επικρατούν στοιχείο γιγάντιων κυττάρων, πολλά από τα οποία είναι πολυπύρηννα, γιγαντοκυτταρικό καρκίνωμα, ενώ άλλοι αποτελούνται από ατρακτοειδή κύτταρα, ατρακτοκυτταρικό καρκίνωμα. Μερικοί όγκοι συνιστούν μείγμα και των δυο γιγαντοκυτταρικό και ατρακτοκυτταρικό καρκίνωμα. Τα καρκινώματα από μεγάλα κύτταρα έχουν κακή πρόγνωση λόγω της τάσης τους να διασπείρονται σε απομακρυσμένες περιοχές πρώιμα κατά την πορεία τους.



**Εικόνα 1.2** :Οι τρεις τύποι του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Α) Πλακώδες καρκίνωμα. Β) Αδеноκαρκίνωμα. Γ) Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (Travis, 2011).



**Εικόνα 1.3:** Οι τέσσερεις τύποι καρκινικών κυττάρων στον πνεύμονα και οι περιοχές του πνεύμονα που εμφανίζονται (ADAM, Inc).

### 1.3 Σταδιοποίηση

Με βάση το μέγεθος του όγκου, την ανίχνευση καρκινικών κυττάρων στους λεμφαδένες καθώς και την ανεύρεση μετάστασής τους σε άλλα όργανα, οι καρκινικοί αυτοί τύποι ταξινομούνται σε τέσσερα στάδια (στάδιο I-IV).

Σταδίου I: Το μέγεθος των όγκων δε ξεπερνά τα 3cm και δεν διηθούν τους λεμφαδένες ή τους κύριους βρόγχους.

Σταδίου II: Οι όγκοι έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από 3cm, περιλαμβάνουν τους κύριους βρόγχους ή διηθούν τον περισπλάχνιο υπεζωκότα.

Σταδίου III: Οι όγκοι έχουν οποιοδήποτε μέγεθος, διηθούν το θωρακικό τοίχωμα, το διάφραγμα, το μεσοπνευμόνιο υπεζωκότα, το περίτονο περικάρδιο και τους λεμφαδένες.

Σταδίου IV: Οι όγκοι παρουσιάζουν μεταστάσεις σε άλλα όργανα (Shields, 2001).

## 1.4 Αιτιοπαθογένεια

Το κάπνισμα και σε πολύ μικρότερο βαθμό άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες ευθύνονται για τις γενετικές μεταβολές που προκαλούν καρκίνο του πνεύμονα. Στατιστικά, περίπου το 90% των καρκίνων του πνεύμονα εμφανίζονται σε ενεργούς καπνιστές ή σε αυτούς που σταμάτησαν το κάπνισμα πρόσφατα. Το παθητικό κάπνισμα αυξάνει επίσης τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα περίπου δυο φορές σε σχέση με τους μη καπνιστές. Μεταξύ των ιστολογικών τύπων του καρκίνου του πνεύμονα, τα μικροκυτταρικά καρκινώματα και τα καρκινώματα από το πλακώδες επιθήλιο παρουσιάζουν την ισχυρότερη σχέση με έκθεση στο καπνό.

Άλλοι παράγοντες κινδύνου που ενέχονται στον καρκίνο του πνεύμονα είναι η έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους, η έκθεση σε χημικές ουσίες όπως στον αμίαντο, αρσενικό, χρώμιο, νίκελιο και βινυλοχλωρίδιο και υπερίτη (Williams και Sandler, 2001).

Εκτός από το κάπνισμα και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, γενετικοί παράγοντες ρυθμίζουν τη μεταλλοξιογόνο δράση των καρκινογόνων ουσιών. Οι πολυμορφισμοί των ογκοκατασταλτικών γονιδίων καθώς και οι αλληλικές παραλλαγές των γονιδίων που εμπλέκονται στην αποτοξίνωση, εμπλέκονται στο καρκίνο του πνεύμονα (Dialyna και συν., 2003). Για παράδειγμα πολλές χημικές ουσίες (προκαρκινικά) απαιτούν την ενεργοποίηση του ενζυμικού συστήματος P-450 για την μετατροπή τους σε καρκινικά. Ακόμη, προϋπάρχουσες μη-κακοήθεις πνευμονικές νόσοι, όπως χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση και φυματίωση, σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα καρκίνου πνεύμονα (Robbins και συν., 2002).

## 1.5 Μοριακή βιολογία του καρκίνου του πνεύμονα

Η ανάπτυξη και η εξέλιξη του καρκίνου του πνεύμονα είναι μια πολυπαραγοντική διεργασία που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση πολλών γενετικών, μοριακών και επιγενετικών αλλαγών (Sekido και συν., 2003). Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από:

- ⁴ αυτο-επάρκεια σε αυξητικά σήματα, λόγω μεταλλάξεων σε πρωτοογκογονίδια,
- ⁴ απώλεια ευαισθησίας σε αντι-αυξητικά σήματα, λόγω μεταλλάξεων σε ογκοκατασταλτικά γονίδια
- ⁴ αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση)
- ⁴ απεριόριστη δυνατότητα αντιγραφής, εξαιτίας της δράσης της τελομεράσης
- ⁴ διατήρηση της αγγειογένεσης
- ⁴ προσβολή του ιστού και μετάσταση (Panov, 2005).

### *Γενετικές και μοριακές ανωμαλίες*

Στο καρκίνο του πνεύμονα παρατηρείται είτε υπερέκφραση ογκογονιδίων είτε απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, δημιουργώντας έτσι αλλοιώσεις σε γονίδια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη. Επιπλέον εμφανίζονται χρωμοσωμιακές ανωμαλίες (ανεupλοειδία) που συνοδεύονται από απώλεια ή περίσσεια αλληλών και δομικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες (Sekido και συν., 2003). Επίσης, εμφανίζεται συχνά μικροδορυφορική αστάθεια που αφορά σε λίγους επιτόπους και εκδηλώνεται με μεταθέσεις μεμονωμένων ταινιών αλληλών σε σύγκριση με το φυσιολογικό DNA του ιδίου ασθενή. Η συνολική εμφάνιση μικροδορυφορικών μετατροπών σε μεμονωμένους επιτόπους εμφανίζεται στο 35% των μικροκυτταρικών και στο 22% των μη-μικροκυτταρικών καρκίνων του πνεύμονα (Sekido και συν., 1998).



| Γονίδιο              | Τροποποιήσεις                                       | Συχνότητα % |        |
|----------------------|---|-------------|--------|
|                      |   | SCLC        | NSCLC  |
| <b>FHIT</b>          | Έλλειψη/Μετάλλαξη                                   | ~80         | ~40    |
| <b>Ras</b>           | Μετάλλαξη   | <1          | ~20    |
| <b>ERB1/EGFR</b>     | Υπερέκφραση   | -           | ~60    |
| <b>ERB2/HER2/NEU</b> | Υπερέκφραση   | -           | ~20    |
| <b>Myc</b>           | Υπερέκφραση   | 15-30       | 5-10   |
| <b>BCL-2</b>         | Υπερέκφραση   | 75-95       | 10-35  |
| <b>p16ink4a</b>      | Απενεργοποίηση<br>(Έλλειψη/Μετάλλαξη/Υπερμεθυλίωση) | 0-10        | ~70    |
| <b>Rb</b>            | Απενεργοποίηση<br>(Έλλειψη/Μετάλλαξη)               | ~90         | ~15-30 |
| <b>p53</b>           | Απενεργοποίηση<br>(Έλλειψη/Μετάλλαξη)               | 80-90       | ~50    |

**Πίνακας 2:** Συχνές κυτταρογενετικές αλλαγές σε καρκίνο πνεύμονα (Mitsuuchi και Testa, 2002).

| Τροποποιήσεις    | SCLC                              | NSCLC  |
|------------------|-----------------------------------|--|
| <b>Ελλείψεις</b> | 3p, 4p, 4q, 5q, 8p, 10q, 13q, 17q | 3p, 6q, 8p, 9p, 9q, 13q, 17p, 18q, 19p, 21q, 22q |
| <b>Προσθήκες</b> | 3q, 5p, 8q, 19q, Xq               | 1p, 1q, 3q, 5p, 7p, 7q, 8q, 11q, 12 q            |

**Πίνακας 3:** Συχνές μοριακές γενετικές αλλαγές στο καρκίνο του πνεύμονα (Mitsuuchi και Testa, 2002).

#### Επιγενετικές αλλαγές

Οι επιγενετικοί αλλαγές είναι κληρονομήσιμες και δεν αφορούν αλλαγές στην αλληλουχία του DNA. Οι κυριότερες επιγενετικές τροποποιήσεις, είναι η παρεκκλίνουσα μεθυλίωση του DNA (υπομεθυλίωση και υπερμεθυλίωση των κυτοσινών σε συγκεκριμένες θέσεις), η μετα-μεταφραστική τροποποίηση των ιστονών (ακετυλίωση, φωσφορυλίωση και μεθυλίωση) και η επαγωγή γονιδιακής καταστολής από τη μεσολάβηση ποικίλων μορφών RNA, αντινοσηματικά μετάγραφα, μη κωδικό RNA ή RNAi (Bowman και συν., 2006).

## 1.6 Διάγνωση, πρόγνωση του καρκίνου του πνεύμονα

Σημαντικό εργαλείο για την ανίχνευση του καρκίνου του πνεύμονα, την πρόγνωση και την πρόβλεψη είναι οι καρκινικοί δείκτες. Πρόκειται για βιομόρια που ανιχνεύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα, στα ούρα, στους ιστούς, στο εγκεφαλονωτιαίο, ασκητικό, πλευριτικό υγρό. Δίνουν πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη, τη φύση, το μέγεθος, την υποτροπή ή την μεταστατική εξάπλωση μιας κακοήθους διεργασίας στον οργανισμό. Ωστόσο αυξημένες τιμές τους εμφανίζονται και σε ορισμένες μη καρκινικές παθολογικές καταστάσεις.

Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται συνήθως στην διάγνωση, την πρόγνωση και στην παρακολούθηση ασθενών με SCLC είναι το Pro-GRP και η ειδική νευρωνική ενολάση (NSE).

Αν και είναι δύσκολο να προσδιορίσουμε τα επίπεδα του GRP στον ορό εξαιτίας της αστάθειας του στο αίμα, χρησιμοποιείται ως ειδικός δείκτης για το SCLC το Pro-GRP που είναι σταθερό στο αίμα. Το Pro-GRP παίζει σημαντικό ρόλο στην διάγνωση των ασθενών με SCLC με ευαισθησία 65-80% και ειδικότητα 93-96% (Lamy και συν., 2000· Shibayama και συν., 2001). Τέλος, τα επίπεδα του Pro-GRP στον ορό παίζουν ρόλο στην παρακολούθηση της θεραπείας, στην ανίχνευση της υποτροπής και στην πορεία της νόσου των ασθενών ( Miyake και συν., 1994· Sunaga και συν., 1999· Niho και συν., 2000).

Η NSE χρησιμοποιείται επίσης στη διάγνωση ειδικότερα σε συνδυασμό με τους δείκτες TPS και CEA. Η NSE παρουσιάζει διαγνωστική ευαισθησία 76% (Kushlinsky και συν., 1996). Η NSE εμφανίζεται επίσης να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης επιβίωσης. Μελέτες έδειξαν ότι η NSE είναι πιο χρήσιμη στην παρακολούθηση των ασθενών με SCLC που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία (Carney και συν., 1982· Abbasciano και συν., 1999). Μέτρηση των επιπέδων της 21 μέρες μετά τη χημειοθεραπεία έδειξε ότι είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας σε αυτούς τους ασθενείς (Jin και συν., 2001).

Τα επίπεδα του Pro-GRP αυξάνονται κατά μέσο όρο 35 μέρες πριν την κλινική ένδειξη ύπαρξης υποτροπής ενώ τα επίπεδα του NSE αυξάνονται 20 μέρες μετά την ανίχνευση υποτροπής (Okusaka και συν., 1997).

Οι καρκινικοί δείκτες χρησιμοποιούνται στο NSCLC ως προγνωστικοί δείκτες της έκτασης της νόσου προεγχειρητικά σε ασθενείς με εντοπισμένη νόσο, στην λήψη



απόφασης για την εφαρμογή χημειοθεραπείας, στην παρακολούθηση ανταπόκρισης στη θεραπεία καθώς επίσης και στην μετεγχειρητική παρακολούθηση ασθενών

Το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (CEA), θεωρείται προγνωστικός δείκτης στον χειρουργήσιμο NSCLC, με οριακή τιμή 2,5 ng/ml. Αυξημένες τιμές φανερώνουν φτωχή πρόγνωση (Rubins και συν., 1998). Ενώ κάποιες άλλες έρευνες θεωρούν ότι ο προσδιορισμός του δεν έχει την απαιτούμενη ειδικότητα και ευαισθησία στην διερεύνηση του NSCLC (Dent και συν., 1978).

Το CA 125, φαίνεται να είναι ένας άλλος ανεξάρτητος προεγχειρητικός προγνωστικός δείκτης επιβίωσης, ελεύθερης νόσου, με οριακή τιμή 15U/ml. Όταν τα επίπεδα του δείκτη υπερβούν αυτήν την τιμή παρουσιάζεται αυξημένος κίνδυνος υποτροπών (Diez και συν., 1994· Diez και συν., 1995).

Επίσης ο CYFRA 21-1 (τιμήμα της κυτοκερατίνης 19 )έχει υψηλή προγνωστική αξία στον NSCLC με οριακή τιμή 3,3 ng/ml και διαγνωστική ευαισθησία 72% (Kushlinsky και συν., 1996· Stieber και συν., 1999). Σε μελέτη 67 ατόμων με NSCLC, υψηλότερα επίπεδα CYFRA 21-1 από 3,6 ng/ml στον ορό βρέθηκε να σχετίζονται με φτωχή πρόγνωση και για την ολική επιβίωση και για την επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου σε ασθενείς με χειρουργήσιμο καρκίνο. Ο CYFRA 21-1 μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στην αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της χημειοθεραπείας (Van der Gaast και συν., 1994· Ebert και Muley, 1999). Τέλος, κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι η μεταβολή του CYFRA κατά 10% έχει προγνωστική αξία στον προσδιορισμό των υποτροπών, με ευαισθησία 60% και ειδικότητα 100% ενώ κάποιες άλλες μελέτες αξιολογούν την μεταβολή του CYFRA κατά 30% ((Hamzaoui και συν., 1997· Ebert και Muley, 1999 ).

Το SCC-Ag (squamous cell carcinoma antigen ) μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως καρκινικός δείκτης στο NSCLC με οριακή τιμή 2,5 ng/ml (Body και συν., 1986· Mino και συν, 1988). Αύξηση του αντιγόνου προεγχειρητικά συνοδεύεται από φτωχή πρόγνωση (Niklinski και συν., 1992<sup>a,b</sup>). Το σύμπλοκο μεταλλοπρωτεϊνών μπορεί να είναι εξίσου χρήσιμο στην κλινική έρευνα για ασθενείς με NSCLC. Η υπερέκφραση του MMP2 φανερώνει φτωχή πρόγνωση σε πρώιμο στάδιο NSCLC (Passlick και συν., 2000). Η MMP9 είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης σε ασθενείς με χειρουργήσιμο καρκίνο (Sienel και συν., 2003).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### *RNA*

#### 2.1 Εισαγωγή

Η απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου. Είναι απαραίτητος, λοιπόν ο μετα-μεταγραφικός μηχανισμός για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Τα μετα-μεταγραφικά γεγονότα περιλαμβάνουν τη επεξεργασία του mRNA, την εξαγωγή του mRNA από το πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, τον εντοπισμό του mRNA, τη σταθερότητα του mRNA και τη μεταφραστική ρύθμιση. Ο ρυθμός σύνθεσης του mRNA καθώς επίσης και ο ρυθμός αποικοδόμησής του επηρεάζει σημαντικά τη σταθερότητά του (Audic και Hartley, 2004).

#### 2.2 Ωρίμανση mRNA

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα για να εξαχθεί το mRNA από το πυρήνα υφίσταται μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις ώστε το πρώιμο μετάγραφο να μετατραπεί σε ώριμο mRNA και να είναι λειτουργικό. Οι τροποποιήσεις αυτές είναι η προσθήκη της 5' καλύπτρας (capping), το μάτισμα (splicing) και η προσθήκη poly(A) ουράς στο 3' άκρο (πολυαδενοσύλιωση).

Η τροποποίηση του 5' άκρου του mRNA έγκειται στη προσθήκη μιας γουανίνης που είναι μεθυλιωμένη στη θέση 7, από τη 7-μεθυλο-τρανσφεράση της γουανίνης. Η γουανίνη ενώνεται μέσω μιας πυροφωσφορικής γέφυρας με το 5' άκρο του τελικού νουκλεοτιδίου του mRNA και έτσι δημιουργείται ένας 5'-5' τριφωσφορικός δεσμός. Στην προσθήκη αυτή συμμετέχουν τρία ένζυμα, μία φωσφατάση, μία γουανυλοτρανσφεράση, και μία μεθυλάση. Εκτός από τη μεθυλίωση στο N-7 της γουανίνης συμβαίνουν και άλλες δυο μεθυλίωσεις στις δυο προηγούμενες ριβόζες. Έτσι διακρίνονται τρία είδη καλύμματος ανάλογα με το πλήθος μεθυλίωσεων που φέρουν: κάλυμμα 0, όταν δεν υπάρχει επιπρόσθετη μεθυλίωση, κάλυμμα 1 όταν το

πρώτο σάκχαρο της ριβόζης είναι καθοδικά μεθυλιωμένο, κάλυμμα 2 όταν και τα δύο σάκχαρα της ριβόζης είναι καθοδικά μεθυλιωμένα. Οι μεθυλιώσεις αυτές σταθεροποιούν το mRNA και το προστατεύουν από την αποικοδόμηση από τις 5'-νουκλεάσες και τις φωσφατάσες. Επιπλέον, η καλύπτρα βοηθά στην αποκοπή και στην απομάκρυνση των ιντρονίων και στην αύξηση της μεταμεταφραστικής ικανότητας του mRNA από τη μεταμεταφραστική μηχανή του κυττάρου (Μαρμαράς και Λαμπροπούλου, 2005).

Το δεύτερο μετα-μεταγραφικό γεγονός που υφίσταται το πρώιμο mRNA είναι το μάτισμα. Το μάτισμα επιτυγχάνει την αφαίρεση ιντρονίων και τη συρραφή εξονίων ώστε να δημιουργηθεί το ώριμο mRNA. Κατά το μάτισμα είναι απαραίτητη η συνεργασία αρκετών μικρών μορίων RNA και πρωτεϊνών που σχηματίζουν ένα μεγάλο σύμπλοκο, το σωματίο ματίσματος (spliceosomes). Η συγκρότηση αυτών των σωματίων γίνεται στα όρια εξονίων-ιντρονίων χάρη σε φυλογενετικά συντηρημένες cis-αλληλουχίες. Τα σωματίδια ματίσματος απαρτίζονται από μικρά πυρηνικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (snRNPs) U1, U2, U4/6 και U5 και άλλες ειδικές πρωτεΐνες, όπως οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες του ματίσματος. Η πολυπλοκότητα του ματίσματος αυξάνει σημαντικά από το ζυμομύκητα στα θηλαστικά (Lewin, 2004).

Το τελευταίο στάδιο στην μετα-μεταγραφική επεξεργασία του mRNA είναι η πολυαδενυλίωση του. Το πρώιμο μετάγραφο υφίσταται μία ενδονουκλεολυτική απομάκρυνση από το σημείο μεταγραφής του και στο 3' άκρο του προστίθεται 250-300 νουκλεοτίδια αδενοσίνης, poly (A) ουρά. Η πολυαδενυλίωση καταλύεται από μια poly (A) πολυμεράση. Η RNA πολυμεράση II όταν φτάσει στο τέλος του γονιδίου δεν σταματά τη μεταγραφή αλλά τη συνεχίζει τουλάχιστον για 1500 ακόμη νουκλεοτίδια. Πριν το τέλος της αλληλουχίας που κωδικοποιεί την πολυπεπτιδική αλυσίδα μεταγράφεται η αλληλουχία AAUAAA. Η αλληλουχία AAUAAA αποτελεί σήμα για την προσθήκη της poly (A) ουράς και βρίσκεται 10-30 περίπου νουκλεοτίδια ανοδικά της τελικής θέσης της πολυαδενυλίωσης στα ευκαρυωτικά γονίδια. Το σήμα αυτό αναγνωρίζεται από ένα ειδικό πρωτεϊνικό παράγοντα CPSF. Στο σημείο αυτό προσδένονται και άλλοι πρωτεϊνικοί παράγοντες.

Ο ρόλος της poly (A) ουράς δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι ενισχύει την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης και τη σταθερότητα του mRNA. Το mRNA που δεν έχει poly (A) ουράς μπορεί να μεταφέρεται έξω από τον πυρήνα ωστόσο ένα μόριο mRNA, που δεν έχει poly (A) ουρά συνήθως είναι

λιγότερο αποτελεσματικό ως εκμαγείο για σύνθεση πρωτεϊνών από αυτό που έχει poly (A) ουρά. Μερικά μόρια mRNA αποθηκεύονται με μια μη αδενυλιωμένη μορφή και αποκτούν την poly (A) ουρά μόνο όταν επίκειται μετάφραση. Η σταθεροποίηση του mRNA οφείλεται στη πρόσδεση της poly (A) προσδεδεμένης πρωτεΐνης (poly(A)-binding protein), PABP. Η PABP προστατεύει την poly (A) ουρά από τις νουκλεάσες και αυξάνει την ευαισθησία του σε μια ειδική poly A ριβονουκλεάση (Μαρμαράς και Λαμπροπούλου, 2005· Stryer και συν., 2002).

## 2.3 Αποικοδόμηση mRNA

Η αποικοδόμηση mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η αποικοδόμηση του mRNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα συμβαίνει μέσω διαφόρων οδών οι οποίες διαφοροποιούνται ανάλογα με το αν η αποικοδόμηση του «σώματος» του mRNA συμβαίνει με κατεύθυνση 5'→3' ή 3'→5' και αν η αποαδενυλίωση προηγείται ή όχι της αποικοδόμησης αυτής (Beelman και Parker, 1995).

### *A. Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από αποαδενυλίωση*

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η πλειοψηφία των mRNAs αποικοδομείται μέσω ενός μονοπατιού, το οποίο ξεκινά με τη αφαίρεση της poly (A) ουράς, γνωστό ως μονοπάτι αποικοδόμησης εξαρτώμενο από αποαδενυλίωση (Εικόνα 2.1A). Η αντίδραση καταλύεται από μαγνήσιο-εξαρτώμενες εξωριβονουκλεάσες, τις αποαδενυλάσες. Αφού πραγματοποιηθεί η 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, εκθέτοντας έτσι το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την XRN1 εξωριβονουκλεάση. Εναλλακτικά, το αποαδενυλιωμένο mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'→5' από το εξώσωμα. (Garneau και συν., 2007). Πρόκειται για ένα σύμπλοκο 10-

12 υπομονάδων που αποτελείται από 6 πρωτεΐνες με σημαντική ομολογία 3'→5' φωσφορυλιτικών εξωρινοβουκλεασών, αρκετές πρωτεΐνες με ομολογία 3'→5' υδρολυτικών εξωνουκλεασών και Rna ελικάσες (Houseley και συν., 2006). Κάθε μία από τις καταλυτικές υπομονάδες του εξώσωματος έχει μια PH περιοχή RNase η οποία ενδέχεται να συμβάλλει στην καταλυτική δράση. Ωστόσο, παραμένει ασαφές αν όλοι οι υπομονάδες είναι καταλυτικά ενεργές ή αν κάποιες από αυτές παίζουν ρόλο στην αναγνώριση και την τοποθέτηση του υποστρώματος. Το εξώσωμα εκτός από την κυτταροπλασματική διάσπαση του mRNA συμμετέχει στην 3' επεξεργασία των μη-κωδικοποιούμενων (noncoding) mRNA στο πυρήνα. Μετά την 3'→5' αποικοδόμηση, τα ολιγομερή της 5' καλύπτρα που έχουν απομείνει μεταβολίζονται από το ένζυμο DcpS (Liu και συν., 2002). Τα δύο αυτά μονοπάτια δεν είναι απαραίτητα ανεξάρτητα. Στο *S. cerevisiae* αποσιωπώντας συστατικά του 3'→5' ή 5'→3' μονοπατιού παρατηρήθηκε ότι το μεταγραφώσωμα επηρεάζεται ελάχιστα, γεγονός που υποδηλώνει πλεονασμό των μηχανισμών αποικοδόμησης (He και συν., 2003· Houalla και συν., 2006).

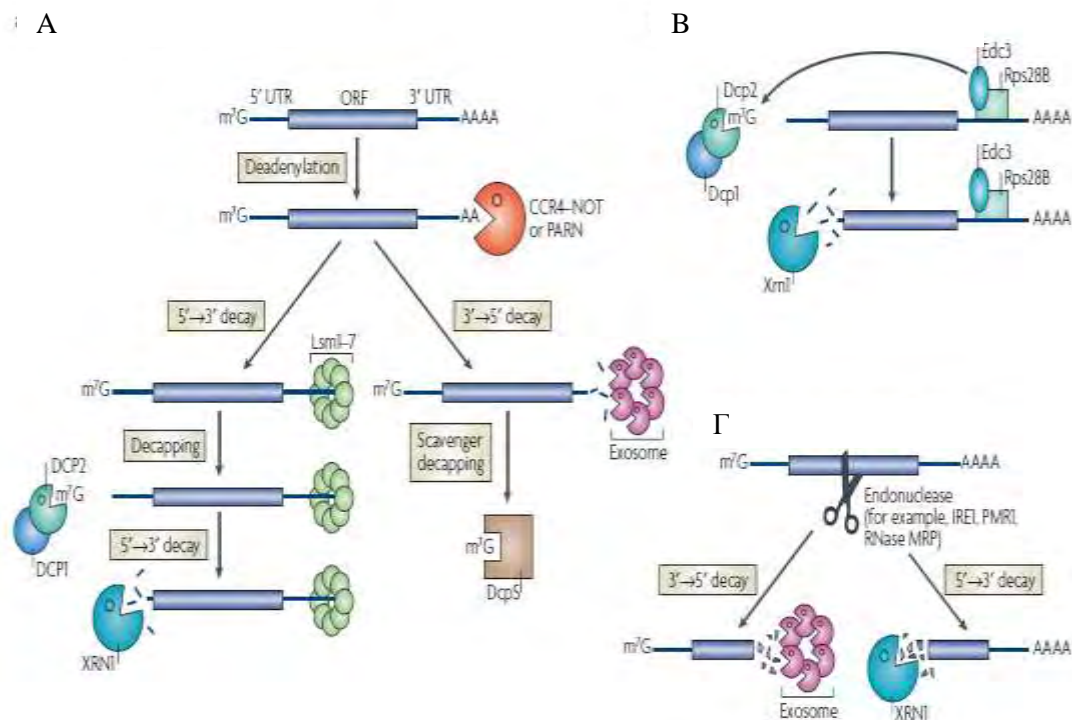
#### *B. Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αφαίρεση της καλύπτρας*

Δύο μη συνδεδεμένα μετάγραφα RPS28B και EDC1 παρακάμπτουν την αποαδενυλίωση, προκαλώντας άμεσα την αφαίρεση της καλύπτρας (Εικόνα 2.1B). Η Rps28B του *S. cerevisiae* οδηγεί στην αποικοδόμηση μέσω ενός αυτορυθμιστικού μηχανισμού. Η πρωτεΐνη Rps28B προσδένεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή του δικού της mRNA και στρατολογεί την Edc3, έναν ενισχυτή αφαίρεσης της καλύπτρας. Αυτό προφανώς επιφέρει σύνδεση και άλλων παραγόντων αφαίρεσης της καλύπτρας και επιτρέπει την αποικοδόμηση που είναι ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση (Cheadle και συν., 2005). Το EDC1 mRNA του *S. cerevisiae*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Edc1 που ρυθμίζει την αφαίρεση της καλύπτρας, επίσης αποικοδομείται μέσω μονοπατιών ανεξάρτητων της αποαδενυλίωσης. Συγκεκριμένα, η αποαδενυλίωση φαίνεται να προλαμβάνεται από την αλληλεπίδραση της poly(A) ουράς και την περιοχή poly (U) στο 3' UTR. Αυτό το ενδομοριακό ζευγάρισμα βάσεων εμποδίζει την πρόσβαση των αποαδενυλασών. Ωστόσο η αφαίρεση του EDC1 mRNA απαιτεί την παρουσία υπομονάδων του συμπλόκου CCR4–NOT

γεγονός που φανερώνει μια ενδιαφέρουσα συσχέτιση μεταξύ της αποαδενυλίωσης και της αφαίρεσης της καλύπτρας (Muhlrاد και Parker 2005).

### Γ. Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση

Αποικοδόμηση του mRNA μπορεί να συμβεί και μέσω ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης, όπου παράγονται δύο τμήματα με απροστάτευτα άκρα (Εικόνα 2.1Γ). Πρόσφατα έχουν χαρακτηριστεί διάφορες ενδονουκλεάσες που στοχεύουν το mRNA όπως οι PMR1, IRE1 καθώς επίσης το ένζυμο επεξεργασίας του ριβοσωμικού RNA, RNase MRP, το οποίο φαίνεται να επιτελεί επιπρόσθετο ρόλο αφού επιτίθεται και σε συγκεκριμένα μόρια mRNA. Τα τμήματα που προκύπτουν από τη διάσπαση, αποικοδομούνται από το XRN1 και το εξώσωμα. Επιπλέον ενδονουκλεάσες που δεν έχουν ταυτοποιηθεί έχουν εμπλακεί στην αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNAs (He και συν., 2003· Houalla και συν., 2006). Τα siRNAs επίσης προκαλούν την αποικοδόμηση μέσω ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης με τη μεσολάβηση των Argonaute protein-2 (Ago2) (Liu και συν., 2004· Song και συν., 2004).



**Εικόνα 2.1:** Μηχανισμοί αποικοδόμησης. Α) Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από αποαδενυλίωση. Β) Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αφαίρεση της καλύπτρας. Γ) Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση (Garneau και συν., 2007).

Η αποικοδόμηση των mRNA λαμβάνει χώρα σε κυτταροπλασματικές κοκκώδεις δομές, στα P bodies όπου βρίσκονται παράγοντες που εμπλέκονται στην έναρξη της μετάφρασης, στην αποαδενυλίωση, στην αφαίρεση της καλύπτρας, στην 5'→3' εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, στην ανερμηνεύσιμα διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (nonsense-mediated decay) και στην microRNA (miRNA) διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση. 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 εξαιτίας μεταλλάξεων στους παράγοντες αφαίρεσης της καλύπτρας ή στην εξωνουκλεάση XRN1. Αντίθετα τα P bodies μειώνονται σε αριθμό και μέγεθος ή εξαφανίζονται όταν μειώνεται ο αριθμός των μορίων mRNA προς αποικοδόμηση καθώς και όταν παρεμποδίζεται η μεταγραφή, η μετάφραση ή η επικοινωνία (communication) μεταξύ της μετάφρασης και των μηχανισμών αποικοδόμησης του mRNA. Επίσης η μείωση των P bodies μπορεί να οφείλεται και σε μεταλλάξεις παράγοντων που εμπλέκονται στα αρχικά στάδια της αποικοδόμησης όπως το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CCR4-NOT και το σύμπλοκο Lsm (Garneau και συν., 2007· Parker και Song 2004).

## 2.4 Αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNA

Κατά την παραγωγή ενός ώριμου mRNA μεταγράφου ενδέχεται η εισαγωγή λάθους. Για την διαφύλαξη της πιστότητας της μετάφρασης, το κύτταρο διαθέτει μηχανισμούς ώστε να εντοπίζει τα ελαττωματικά μεταγράφα και να τα αποικοδομεί, προστατεύοντας το από τις τοξικές πρωτεΐνες. Ο έλεγχος της ωρίμανσης του mRNA γίνεται στον πυρήνα, ενώ υπάρχουν τρεις οι οδοί που εξαρτώνται από τη μετάφραση και ανιχνεύουν ελαττωματικά ριβονουκλεϊνικά σύμπλοκα στο κυτταρόπλασμα (Garneau και συν., 2007).

### *A. Μη-νοηματικά (ανερμηνεύσιμα) διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (Nonsense-mediated decay)*

Στο μονοπάτι αυτό τα mRNA που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται. Η πρόωρη αλληλουχία τερματισμού μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις, μετατοπίσεις του αναγνωστικού πλαισίου, αναποτελεσματική επεξεργασία, στην ελαττωματική έναρξη της μετάφρασης και

εκτενή 3' αμετάφραστη περιοχή. Η αποικοδόμηση αυτών των μεταγράφων συμβαίνει 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. Το μονοπάτι αυτό έχει βρεθεί σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και τα κυριότερα συστατικά του NMD συμπλόκου UPF1, UPF2 και UPF3, είναι διατηρημένα (Conti και Izaurralde, 2005).

Μετά την ωρίμανση του mRNA στον πυρήνα, το σύμπλοκο σύνδεσης εξωνίων (EJC), το οποίο περιέχει UPF3, συνδέεται με το μεταγράφο και το προκύπτον mRNA εξάγεται στο κυτταρόπλασμα. Στο κυτταρόπλασμα, μια δεύτερη πρωτεΐνη NMD, η UPF2, συνδέεται με τη UPF3. Κατά τη μετάφραση όταν το ριβόσωμα συναντήσει το πρόωρο κωδικόνιο λήξης (PTC), σταματά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σύμπλοκο SURF (που περιλαμβάνει SMG1, UPF1 και πεπτιδικούς-παράγοντες απελευθέρωσης eRF1 και eRF3) να προσδεθεί στο ριβόσωμα. Η UPF1 προσδένεται στη UPF2, συνδέοντας το EJC στην PTC. Η φωσφορυλίωση της UPF1 από τη SMG1 οδηγεί στην αποσύνδεση του eRF1 και eRF3 και στη δέσμευση των πρωτεϊνών του SMG7 προσαρμογέα. Έτσι το mRNA αποικοδομείται (εικόνα 2.2A) (Kashima και συν., 2006).

#### B. Αποικοδόμηση μη-τερματισμού (*Non-stop decay*)

Η διαδικασία αυτή στοχεύει ομοίως σε mRNA τα οποία δεν έχουν κωδικόνιο τερματισμού, έτσι αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα. Τέτοια μετάγραφα μπορούν να προκύψουν από διάσπαση, από την απουσία αλληλουχίας τερματισμού μέσα στην κωδικοποιούμενη περιοχή καθώς επίσης και από πρόωρη πολυαδενυλίωση κατά την μεταγραφή. Στο μονοπάτι αυτό το ριβόσωμα διέρχεται από την poly (A) ουρά εκτοπίζοντας την PABP, και ακινητοποιείται στο 3' άκρο του mRNA. Στη ζύμη και στα θηλαστικά, ο Ski7, ένας πρωτεϊνικός προσαρμογέας που μιμείται μοριακά το tRNA, προσδένεται στην A περιοχή του ακινητοποιημένου ριβοσώματος για να αποδεσμεύσει το μετάγραφο και να στρατολογήσει το εξώσωμα που το αποικοδομεί (Van Hoof A. και συν., 2002· Frischmeyer και συν., 2002).

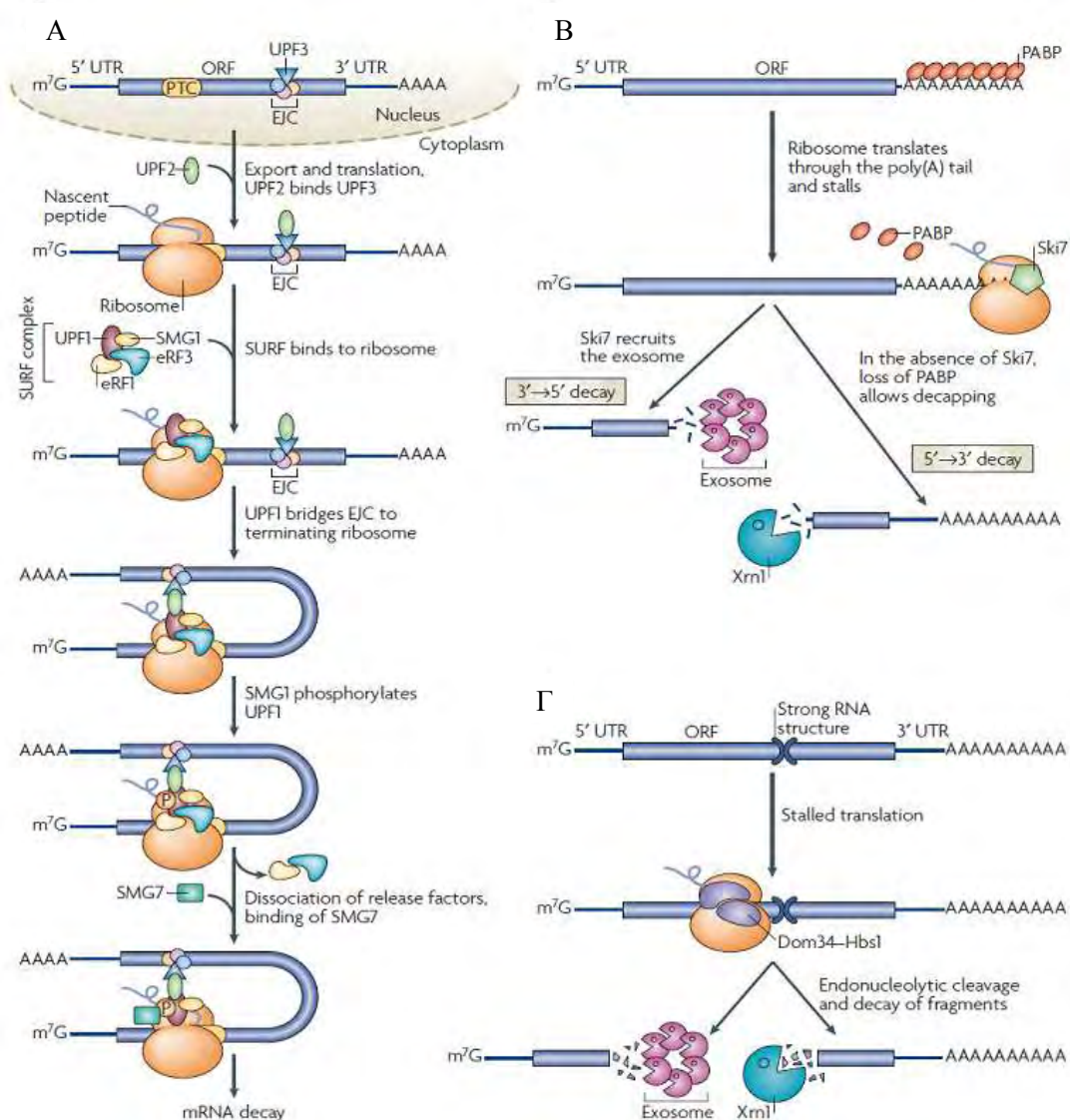
Ένα άλλο μονοπάτι που έχει περιγραφεί στο *S. cerevisiae*, απουσία του Ski7, είναι ότι η μετατόπιση της PABP από το ριβόσωμα καθιστά το mRNA ευπαθή στην



αφαίρεση της καλύπτρας και στην αποικοδόμηση 5'→3' από την 5'→3' εξωριβονουκλεάση Xrn1 (εικόνα 2.2B) (Inada και Aiba, 2005).

### Γ. No-go αποικοδόμηση (No-go decay)

Ο μηχανισμός αυτός ανακαλύφθηκε πρόσφατα στον ζυμομύκητα. Το ριβόσωμα ακινητοποιείται στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης λόγω σχηματισμού ειδικής δευτεροταγούς δομής στο ελαττωματικό mRNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να πυροδοτείται η διαμεσολαβούμενη από ενδονουκλεάσες αποικοδόμηση του mRNA και η απελευθέρωση του ριβοσώματος (εικόνα 2.1Γ) (Doma και Parker, 2006).



**Εικόνα 2.2:** Μονοπάτια αποικοδόμησης ελαττωματικών mRNAs: A) Nonsense-mediated decay. B) Non-stop decay. Γ) No-go decay (Garneau και συν., 2007)

## 2.5 Παράγοντες που ρυθμίζουν την αποικοδόμηση του mRNA

Microarrays αναλύσεις αποκάλυψαν ότι το 40-50% των αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης σε απάντηση στα κυτταρικά μηνύματα εμφανίζεται στο επίπεδο σταθερότητας του mRNA. Οι αλλαγές αυτές συνήθως προκαλούνται από αλλαγές στη σύνθεση των mRNPs που είτε αναστέλλουν ή διεγείρουν την αποικοδόμηση. Βρέθηκε ότι 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 (Garneau και συν., 2007). Τα πιο καλά μελετημένα στοιχεία σταθερότητας των mRNAs, είναι οι αλληλουχίες που περιέχουν βάσεις A και U σε διάφορα μοτίβα (AU-rich elements, ARE). Οι αλληλουχίες αυτές βρίσκονται στην 3' UTR περιοχή πολλών μεταγράφων που κωδικοποιούν κυτοκίνες, πρωτοογκογονίδια και μεταγραφικούς παράγοντες. Το πιο απλό μοτίβο ενός στοιχείου ARE συνίσταται στο πεντανουκλεοτίδιο AUUUA, ενώ η αποσταθεροποίηση που προκαλείται από τα στοιχεία αυτά είναι αποτέλεσμα οργάνωσης των διαφόρων μοτίβων (πεντανουκλεοτίδια AUUUA, εννιαμερή UUAUUUUA (U/A)(U/A), κ.α.) σε δευτεροταγείς ή τριτοταγείς δομές. Ανάλογα με το μοτίβο του στοιχείου ARE και την αντίστοιχη κινητική της αποικοδόμησης του μορίου mRNA που το περιέχει, χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

Τα ARE τύπου I που αποτελούνται από 1-3 επαναλήψεις του μοτίβου AUUUA και απαντώνται συνήθως στα mRNA των «γονιδίων πρώιμης απόκρισης» (early-responsegens) που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες π.χ. c-fos.

Τα ARE τύπου II που αποτελούνται από περισσότερα μοτίβα AUUUA (5-6 αντίγραφα) και βρίσκονται συνήθως σε γονίδια κυτοκινών, π.χ. GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-3.

Τα ARE τύπου III, τα οποία δεν περιέχουν το μοτίβο AUUUA, αλλά επαναλήψεις U (U-stretches), π.χ. ο μεταγραφικός παράγοντας c-jun.

Στα στοιχεία ARE τύπου I και τύπου III η αποικοδόμηση πραγματοποιείται σε δυο στάδια— στο πρώτο στάδιο συμβαίνει η αποαδενυλίωση όπου η νουκλεοτιδική αλληλουχία του mRNA δεν μεταβάλλεται, και στο δεύτερο στάδιο τα μόρια mRNA αποικοδομούνται ταχύτατα και έχουν πλέον μια πολύ μικρή poly (A) ουρά (30-60

βάσεις αδενοσίνης). Η κινητική της αποδόμησης στις περιπτώσεις των ARE τύπου II, διαφέρει στο ότι η αποαδενυλίωση και η αποικοδόμηση του μορίου mRNA συμβαίνουν ταυτόχρονα (Xu και συν., 1997).

Οι πρωτεΐνες που συνδέονται με τα στοιχεία ARE μπορεί να είναι είτε ειδικές όπως παράγοντες AUBFs (AU-rich binding factors, AUBFs), είτε να ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών hnRNP. Αρκετοί τέτοιοι παράγοντες έχουν ταυτοποιηθεί όπως : AUF1, TTP, KSRP, RHAU, TIAR. Οι παράγοντες αυτοί αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με παράγοντες που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση mRNA όπως οι αποαδενυλάσες (PARN, CCR4-NOT), τα DCP1-2 και το εξώσωμα. Αναλυτικότερα το AUF1 αλληλεπιδρά με το εξώσωμα, το KSRP και το RHAU προσδένονται στην αποαδενυλάση PARN και στο εξώσωμα, με αποτέλεσμα αυτό να οδηγεί σε αυξημένη διάσπαση του mRNA-στόχου (Garneau και συν., 2007).

## 2.6 Αποαδενυλάσες

Πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs είναι η βράχυνση της poly (A) ουράς, αποαδενυλίωση, από μια οικογένεια ενζύμων τις αποαδενυλάσες. Πρόκειται για μαγνησο-εξαρτώμενες εξωριβονουκλεάσες, οι οποίες υδρολύουν το mRNA με 3'→5' κατεύθυνση, απελευθερώνοντας 5' – AMP. Η poly (A) ουρά αποτελεί κύριο υπόστρωμα αυτών των ενζύμων. Οι αποαδενυλάσες ταξινομούνται σε δυο μεγάλες υπερ-οικογένειες βάση της παρουσίας συγκεκριμένων συντηρημένων καταλοίπων στο καταλυτικό τους κέντρο την DEDD ή την exonuclease–endonuclease–phosphatase (EEP) υπέρ-οικογένεια. Οι DEDD νουκλεάσες ονομάστηκαν έτσι εξαιτίας των συντηρημένων καταλυτικών αμινοξικών καταλοίπων Asp και Glu τα οποία είναι διάσπαρτα σε τρία μοτίβα εξωνουκλεάσης που δεσμεύουν ιόντα μαγνησίου. Μέλη της ομάδας αυτής είναι οι οικογένειες της POP2 (CAF1), η poly(A) εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), η CAF1Z, και η PAN2. Τα ένζυμα της ομάδας EEP έχουν συντηρημένα κατάλοιπα Asp και His στην περιοχή με δράση νουκλεάσης. Μέλη της ομάδας αυτής είναι η CCR4, η Nocturnin, η ANGEL και η 2' phosphodiesterase (2'PDE). Πιθανόν να υπάρχουν και άλλες

νουκλεάσες εκτός των υπέρ-οικογενειών DEDD και EEP ωστόσο δεν έχει ταυτοποιηθεί καμία ακόμη (Dlakic, 2000).

Οι ποικιλία των αποαδενυλασών μεταβάλλεται μεταξύ των ειδών. Μέλη των οικογενειών POP2, CCR4, PAN2 και ANGEL εντοπίζονται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ενώ άλλες αποαδενυλάσες είναι λιγότερο συντηρημένες. Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον εννέα αποαδενυλάσες (Goldstrohm και Wickens, 2008).

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

**Πίνακας 1:** Ποικιλομορφία των αποαδενυλασών SC: *S.cerevisiae*, CE: *C. elegans*, DM: *D.melanogaster*, XL: *X.laevis*, MM: *M. musculus*, HS: *H.sapiens* (+): είναι παρούσα στον οργανισμό (-): δεν είναι παρούσα στον οργανισμό (Goldstrohm και Wickens, 2008).

## 2.7 Σύμπλοκα αποαδενυλασών

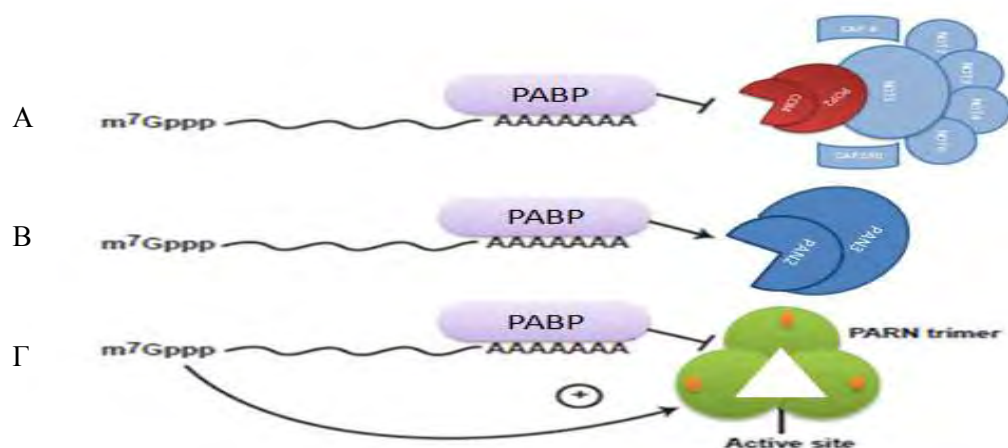
Οι αποαδενυλάσες συνήθως σχηματίζουν σύμπλοκα ενώ άλλες ομοδιμερή ή ετεροδιμερή όπως το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο CCR4-NOT, το ετεροδιμερές PAN2-PAN3 και το ομοδιμερές της PARN (Piao και συν., 2010). Ο ετεροδιμερισμός αυξάνει σημαντικά το ρεπερτόριο των συμπλόκων των αποαδενυλασών. Διάφορα ετεροδιμερή μπορεί να έχουν διαφορετική ενζυμική ή ρυθμιστική ικανότητα. Για παράδειγμα η CNOT8 που ανήκει στην οικογένεια της POP2, έχει την ικανότητα να προσδένεται στην PUF ρυθμιστική πρωτεΐνη περισσότερο από ότι προσδένεται η CNOT7, που επίσης ανήκει στην οικογένεια POP2 (Goldstrohm και συν., 2006). Τα σύμπλοκα των αποαδενυλασών πέρα της συμμετοχής τους στην αποικοδόμηση το mRNA προσθέτουν σε επίπεδο οργάνωσης επιπλέον λειτουργίες και ρυθμιστική δυνατότητα.

Το πολύπρωτεϊνικό σύμπλοκο CCR4 -NOT είναι συντηρημένο από τη ζύμη έως τον άνθρωπο. Αρχικά χαρακτηρίστηκε στον *S. Cerevisiae* ως μεταγραφικό σύμπλοκο ρυθμιζόμενο από γλυκόζη, το οποίο καταστέλλει την RNA πολυμεράση II και αποτελεί το κύριο σύμπλοκο αποαδενυλίωσης (Garneau και συν., 2007). Στη ζύμη το σύμπλοκο αποτελείται από από την Pop2/Caf1, Ccr4, Not1-5, Caf 40, Caf 130 (Chen και συν., 2001). Στον άνθρωπο το σύμπλοκο αποτελείται από τις καταλυτικές υπομονάδες CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 και τις μη καταλυτικές υπομονάδες CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT9 και CNOT10. Η υπομονάδα CNOT1 λειτουργεί σαν «σκαλωσιά», αφού σε αυτή προσδένονται οι υπόλοιπες CNOT υπομονάδες (Bartlam και Yamamoto 2010). Μέλη της οικογένειας BTG/TOB μπορεί να συμβάλλουν στη στρατολόγηση του συμπλόκου. Τόσο η TOB και η BTG2 αλληλεπιδρούν με τις υπομονάδες Caf1a(CNOT7)/Caf1b (CNOT8) και ενισχύεται η αποαδενυλίωση. Οι πρωτεΐνες TOB προάγουν την αποαδενυλίωση στρατολογώντας το σύμπλοκο CAF1-CCR4 στο τέλος 3' άκρου του mRNA με ταυτόχρονη πρόσδεση της CAF1 και της PABP. Ωστόσο, ο ακριβής μοριακός μηχανισμός προώθησης της αποαδενυλίωσης μέσω των TOB παραμένει ασαφής (Ezzeddine και συν., 2012). Ωστόσο παλαιότερες μελέτες δείχνουν ότι η Pabp1 αναστέλλει την ενεργότητα της Ccr4p (Tucker και συν., 2002). Οι PUF πρωτεΐνες που στοχεύουν ειδικά στην 3' αμετάφραστη περιοχή των RNAs μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη στρατολόγηση του συμπλόκου CCR4-NOT, όπως συμβαίνει με τη COX17 (Olivas και Parker, 2000).

Πρόσφατες μελέτες στη *Drosophila* και σε κύτταρα θηλαστικών έχουν δείξει ότι η καταστολή γονιδίου μεσολαβούμενη από microRNA σχετίζεται με την αποαδενυλίωση και αποικοδομήση του mRNA και ότι συστατικά του μηχανισμού micro RNAs αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο CCR4-NOT (Fabian και συν., 2009). Επιπλέον η δραστηριότητα του συμπλόκου μπορεί να ρυθμίζεται μετά την στρατολόγησή του στο mRNA (Morozov και συν., 2010).

Ένα άλλο σύμπλοκο αποαδενυλάσεων που έχει ταυτοποιηθεί στη ζύμη και στα θηλαστικά είναι η PAN. Η PAN είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από τη καταλυτική PAN2 και τη ρυθμιστική PAN3 υπομονάδες. Η αποαδενυλίωση PAN2 προσδένεται στην PAN3 η οποία με την σειρά της αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη PABP. Η PABP ρυθμίζει την δράση του συμπλόκου προσελκύοντας το στην poly(A) ουρά, η οποία με την σειρά της αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη PABP (Uchida και συν., 2004). Στις ζύμες και πιθανόν και σε άλλα ευκαρυωτικά κύτταρα, η PAN συμμετέχει στο πρώιμο στάδιο του μεταβολισμού του mRNA όπου η poly (A) ουρά μειώνεται κατά 55-75 νουκλεοτίδια, ανάλογα με τα mRNAs διαφόρων ειδών (Brown και Sachs, 1998). Στο *S. cerevisiae* το σύμπλοκο PAN2-PAN3 ενέχεται στην βράχυνση της poly (A) ουράς μήκους 60-80 νουκλεοτιδίων (Brown και συν., 1996). Σε κύτταρα θηλαστικών, η PAN2 αφαιρεί την μισή ουρά, οπότε μέλη της POP2 και CCR4 αποικοδομούν την υπόλοιπη. Στα θηλαστικά, το σύμπλοκο PAN2-PAN3 πραγματοποιεί μια αρχική βράχυνση της poly (A) ουράς του μεταγράφου της β-γλοβίνης από το συνήθες μήκος 200 νουκλεοτιδίων σε 80 νουκλεοτίδια. Η αποαδενυλίωση σε αυτό το σημείο συνεχίζεται από ένα άλλο σύμπλοκο, το CCR4-NOT (Yamashita και συν., 2005).

Η PARN έχει την κύρια ενεργότητα αποαδενυλάσης στα θηλαστικά σε συστήματα *in vitro* αποικοδόμησης mRNA. Ο ομοδιμερισμός της είναι απαραίτητος για την ενεργότητά της (Wu και συν., 2005). Η δράση της ενισχύεται από την παρουσία της 5' καλύπτρας ενώ αναστέλλεται από προσδετώμενες πρωτεΐνες στη καλύπτρα (Gao και συν., 2000). Στα ωοκύτταρα του *Xenopus laevis* φαίνεται ότι η PARN εμπλέκεται στη αποαδενυλίωση των μητρικών mRNAs κατά την ωρίμανση καθώς επίσης είναι η κύρια αποαδενυλίωση σε κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα που προέρχονται από διάφορες κυτταρικές σειρές (Korner και συν., 1998· Opyrchal και συν., 2005).



**Εικόνα 2.3 :** Σύμπλοκα ευκαρυωτικών αποαδενυλασών. Α) Το σύμπλοκο CC4R-POP2-NOT αναστέλλεται από την PABP και δεν αλληλεπιδρά με την 5' καλύπτρα. Β) Το σύμπλοκο PAN2-PAN3 ενεργοποιείται από τη PABP και αλληλεπιδρά με την 5' καλύπτρα. Γ) Η PARN αναστέλλεται από τη PABP και ενεργοποιείται από την 5' καλύπτρα (Parker και Song, 2004).

Η ανθρώπινη ANGEL έχει βρεθεί να σχετίζεται με σύμπλοκα αποαδενυλίωσης και να διατηρεί τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου, ενώ η Ngl2, μια ορθόλογη της ANGEL στον μύκητα, είναι μία εξωνουκλεάση ((Wagner και συν., 2007· Faber και συν., 2002). Η ανθρώπινη 2'PDE μπορεί να διασπά το poly(A) όταν το 5' φωσφορικό κάθε αδενοσίνης είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με το 2' ή 3' υδροξύλιο. Πρόσφατα βρέθηκε ότι ο μοναδικός βιολογικός ρόλος της 2'PDE είναι η αποικοδόμηση του 2'-5' oligo(A) (Kubota και συν., 2004).

Τα σύμπλοκα των αποαδενυλασών εκτός από τα ένζυμα αποαδενυλίωσης, έχουν 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 και Wickens, 2008).

## 2.8 Βιολογικές λειτουργίες

Οι αποαδενυλάσες έχουν διάφορες βιολογικές λειτουργίες. Κάποιες από αυτές είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των οργανισμών, ενώ μεταλλάξεις άλλων αποαδενυλασών παρουσιάζουν μια ποικιλία φαινοτύπων. Αρκετές αποαδενυλάσες συμμετέχουν στην εμβρυογένεση, στον κυτταρικό κύκλο, στην ανάπτυξη, στη γονιμότητα, στη μεταβολική ομοιόσταση. Για παράδειγμα η PARN της *A. Thaliana* και του *X. laevis*, η CCR4 της *D.melanogaster* και η CCF1 του *C. elegans* είναι απαραίτητες για την πρόιμη εμβρυική ανάπτυξη (Chiba και συν., 2004· Korner και συν., 1998· Morris και συν., 2005· Molin και συν., 2005). Στα θηλαστικά, υπερέκφραση της CNOT7 ή της CAF1Z ή αποσιώπηση της CNOT6L εμποδίζει την κυτταρική αύξηση (Morita και συν., 2007· Bogdan και συν., 1998). Οι μη καταλυτικές υπομονάδες του συμπλόκου CCR4-NOT, η CNOT1 και η CNOT3 είναι απαραίτητες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά δεν συμβάλλουν στην κυτταρική επιβίωση. Επίσης οι υπομονάδες Ccr4a (CNOT6) και Ccr4b (CNOT6) του συμπλόκου CCR4-NOT αναστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο και τη γήρανση (Mittal και συν., 2011). Επιπλέον depletions είτε της υπομονάδας CNOT1 είτε της CNOT2 επάγουν κυτταρικό θάνατο μέσω του ERstress (Ito και συν., 2011<sup>a,b</sup>).

| οικογένεια      | Βιολογικές λειτουργίες  |
|-----------------|---|
| DEED νουκλεάσες |   |
| POP2            | Καταστροφή DNA<br>Κυτταρικό κύκλο (Sc)<br>Ανάπτυξη<br>Γονιμότητα (Ce)<br>Κυτταρική μάζα<br>Ρύθμιση miRNA (Dm)<br>Σπερματογένεση<br>Οστική μάζα (Mm)<br>ND |
| CAF1Z           | ND  |
| PARN            | Ωοκύτωση<br>Ωρίμανση (Xl)<br>NMD (Hs)   |
| PAN2            | Βράχυνση poly (A)<br>Replication stress (Sc)  |



| <b>ΕΕΡ νουκλεάσες</b> |  |
|-----------------------|--|
| CCR4                  | Καταστροφή DNA                                       |
|                       | Κυτταρικό κύκλο                                      |
|                       | Replication stress (Sc)                              |
|                       | Ωογένεση (Dm)  |
|                       | NMD (Mm)   |
| Nocturnin             | Κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Mm)                        |
|                       | Καρδιακός ρυθμός (Xl, Mm)                            |
|                       | Ομοιόσταση (Mm)                                      |
| Angel                 | Επεξεργασία του 5,8S rRNA                            |
|                       | Πηγή άνθρακα (Sc)                                    |
| 2' PDE                | Αποικοδόμηση του 2'-5' oligo(A) από ιντερφερόνη (Hs) |

**Πίνακας 2:** Ταξινόμηση αποαδενυλασών (Goldstrohm και Wickens, 2008).

Εξαιτίας της ικανότητας των αποαδενυλασών να στοχεύουν σε διακριτές ομάδες mRNA ώστε να ελέγχεται κάθε ομάδα από την δράση ενός ενζύμου καθώς επίσης και να δρουν στο ίδιο mRNA με διακριτές αλλά αλληλοεπικαλυπτόμενες δράσεις, δικαιολογείται η μεγάλη ποικιλότητα και ποικιλομορφία τους. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για να ταυτοποιηθούν όλες οι δραστικές αποαδενυλάσες και να διευκρινιστεί ο βιολογικός τους ρόλος (Goldstrohm και Wickens, 2008).

## 2.9 Ρύθμιση αποαδενυλίωσης mRNA

Η ρύθμιση της δραστικότητας των αποαδενυλασών είναι απαραίτητη, καθώς η ανεξέλεγκτη αποαδενυλίωση θα οδηγούσε στο θάνατο του κυττάρου.

Τα σταθερά και ενεργά μετάγραφα mRNA θα πρέπει να προστατευτούν από την αποαδενυλίωση ενώ τα ασταθή ή ελαττωματικά mRNA θα πρέπει να αποαδενυλιώνονται ή να αποικοδομούνται. Ο ρυθμός αποαδενυλίωσης ποικίλει στα διάφορα υποστρώματα mRNA για αυτό οι αποαδενυλάσεις ρυθμίζονται τόσο σε γενικό όσο και σε ειδικό επίπεδο (Goldstrohm και Wickens, 2008).

Η έκφραση των αποαδενυλασών και των ρυθμιστών τους υπαγορεύουν το χρόνο και το τόπο που θα συμβεί η ρύθμιση της αποαδενυλίωσης. Για παράδειγμα η έκφραση

της Nocturnin είναι ρυθμική, ενδεχομένως ελέγχεται από τον κιρκάδιο ρυθμό. Άλλες αποαδενυλάσες όπως μέλη της οικογένειας POP2 και CCR4 είναι σταθερά και εκφράζονται ιδιοσυστατικά. Η αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας αποτελεί έναν άλλο τρόπο γενικού ελέγχου της αποαδενυλίωσης. Σε συνθήκες στρες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, τα οξειδωτικά, η οσμωτική πίεση ή το θερμικό στρες, η έλλειψη γλυκόζης, η αποαδενυλίωση αναστέλλεται· ο μοριακός μηχανισμός που ρυθμίζει αυτή την αναστολή δεν είναι ακόμα γνωστός (Goldstrohm και Wickens, 2008).

Η αποαδενυλίωση επηρεάζεται επίσης από δύο μορφές χωρικού ελέγχου από τον πυρηνο-κυτταροπλασματικό διαχωρισμό των αποαδενυλασών και τον εντοπισμό τους στα P-bodies. Αρκετές αποαδενυλάσες μετακινούνται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Αλλαγές στη διαμερισματοποίησή τους μπορούν να επιφέρουν δραματικές συνέπειες, για παράδειγμα στα αμφίβια, η αποσύνθεση του πυρήνα κατά την μείωση απελευθερώνει την PARN στο κυτταρόπλασμα όπου και αποαδενυλιώνει μητρικά mRNAs (Goldstrohm και Wickens, 2008).

Ορισμένες αποαδενυλάσες έχουν εντοπιστεί σε ενδοκυτταρικά κοκκία. Τα κοκκία αυτά όπως τα γαμετοκύτταρα, τα νευρωνικά κοκκία και τα P-bodies περιέχουν mRNA μόρια σε καταστολή τα οποία μπορούν να ενεργοποιηθούν (Eulalio και συν., 2007). Ενδεχομένως, ο συνεντοπισμός αποαδενυλασών και των υποστρωμάτων τους μπορεί να αυξήσει την κινητική της αποαδενυλίωσης. Η αποαδενυλίωση δεν περιορίζεται στα κοκκία γιατί οι ίδιες αποαδενυλάσες έχουν βρεθεί σε όλο το κυτταρόπλασμα.

Τα χαρακτηριστικά των mRNAs στόχων μπορούν επίσης να επηρεάσουν την αποαδενυλίωση. Η 5' cap μπορούν να επηρεάσει την αποαδενυλίωση διεγείροντας την ενεργότητα της PARN, ενώ δεν έχει επίδραση στην δράση άλλων αποαδενυλασών. Αυτή η μοναδική ιδιότητα μεσολαβείται από την άμεση αλληλεπίδραση της PARN με την 5' cap του mRNA (Garneau και συν., 2007). Σε ορισμένα mRNAs, η poly (A) ουρά μπορεί να προστατεύεται από τις αποαδενυλάσες μέσω ζευγαρώματος βάσεων. Για παράδειγμα η πλούσια σε ουριδίνη περιοχή στο πυρηνικό RNA της PAN στο σάρκωμα Kaposi, προκαλούμενο από τον ερπητοϊό, αποτρέπει την αποαδενυλίωση του με ζευγάριμα βάσεων με την poly(A) ουρά (Conrad και συν., 2007). Η πλούσια σε ουριδίνη περιοχή του mRNA Edc1 του *S. cerevisiae* μπορεί να λειτουργήσει παρομοίως (Muhldard και Parker, 2005).

Επιπλέον η ρύθμιση ειδικών mRNAs εξαρτάται από συγκεκριμένες αλληλουχίες που εντοπίζονται στο 3' UTR και ενισχύουν την αποαδενυλίωση. Διάφοροι παράγοντες δεσμεύονται στις αλληλουχίες αυτές και στρατολογούν τις αποαδενυλάσες. Παράγοντες όπως οι CUG-BP, PUF και CPEB, αλληλεπιδρούν άμεσα με τις αποαδενυλάσες και τις στρατολογούν στο mRNA (Goldstrohm και Wickens, 2008).

Η συνδυαστική δράση των ρυθμιστών επεκτείνει την πολυπλοκότητα των διαδικασιών αποαδενυλίωσης. Πολλαπλοί καταστολείς, είτε πρωτεΐνες είτε miRNAs, μπορούν να προσδένονται στο ίδιο mRNA 3' UTR και σύμπλοκα να προσδένονται στο 3'-UTR μέσω διαφορετικών υπομονάδων. Επίσης η αποαδενυλίωση μπορεί να ελέγχεται με τροποποίηση της πρόσδεσης του ρυθμιστή με ένα mRNA ή την αποαδενυλάση ή με την αλληλεπίδραση ρυθμιστή-αποαδενυλάσης (Goldstrohm και Wickens, 2008).

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την αποαδενυλίωση είναι η PABP. Το υπόστρωμα των αποαδενυλασών, η poly (A) ουρά του mRNA, επικαλύπτεται με μόρια PABP που εμποδίζουν την πρόσβαση των αποαδενυλασών (Gorgoni και Gray, 2004). Η PABP του ζυμομύκητα αναστέλλει την δραστικότητα της απομονωμένης Ccr4 ενώ στα θηλαστικά αναστέλλει την PARN (Tucker και συν., 2002; Korner και Wahlel, 1997). Αντίθετα η ρυθμιζόμενη αποδέσμευση της PABP από την poly (A) ουρά ή η αλληλεπίδραση της PABP με μία αποαδενυλάση μπορεί να επάγει την αποαδενυλίωση. Η PABP μπορεί να ενεργοποιήσει την αποαδενυλίωση στρατολογώντας το σύμπλοκο PAN2–PAN3 στο mRNA στόχο. Στα θηλαστικά η PABP μπορεί να στρατολογήσει το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CCR4-CAF1-NOT, μέσω αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες TOB (Ezzedine και συν., 2007).

## 2.10 Ριβονουκλεάσες και καρκίνος

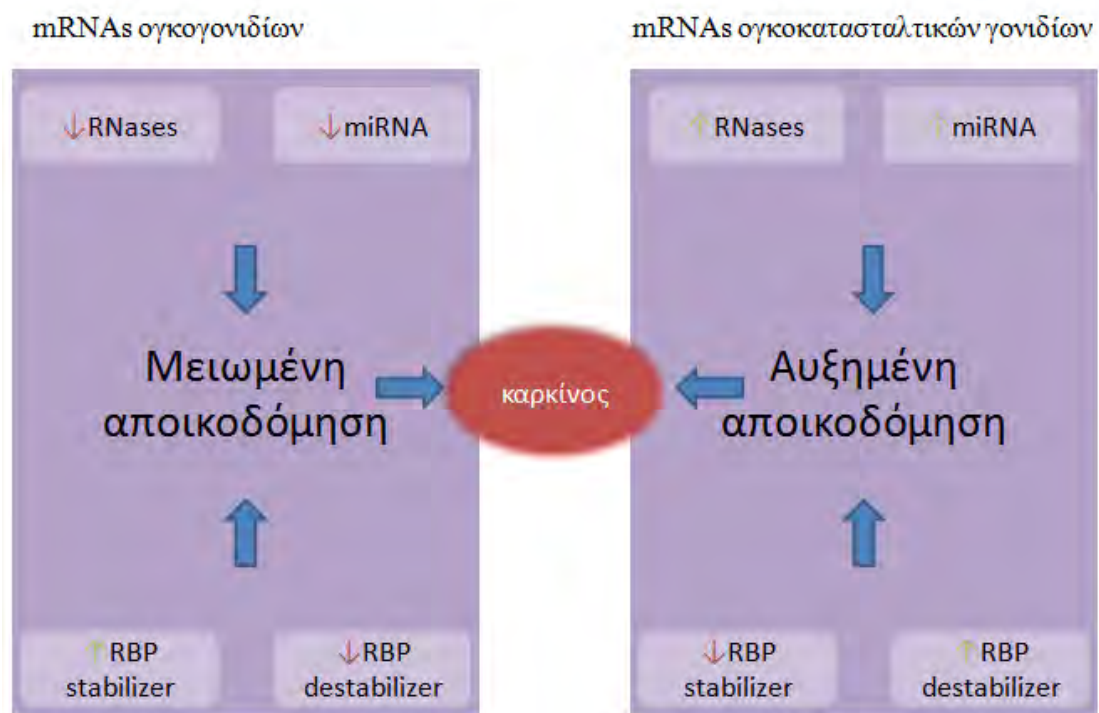
Η απορρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs μπορεί να οδηγήσει σε νεοπλασίες. Η μειωμένη αποικοδόμηση ογκογονιδίων mRNAs λόγω της αυξημένης δραστικότητας των σταθεροποιητικών πρωτεϊνών που συνδέονται με το mRNA ή της μειωμένης δραστικότητας των αποσταθεροποιητικών παραγόντων (destabilizer RBP) και των miRNAs που αναστέλλουν τη μετάφραση μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη

καρκίνου. Από την άλλη, η αυξημένη αποικοδόμηση των ογκοκατασταλτικών mRNAs λόγω αυξημένης δραστηριότητας ριβονουκλεασών ή των miRNAs μπορεί επίσης να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου (εικόνα 4) (Kim και Lee, 2009).

Η αποαδενυλάση CCR4b του συμπλόκου CCR4–NOT επάγει την αύξηση των ινοβλαστών σε κυτταρικές σειρές ως πρώτο-ογκογονίδιο. Σε φυσιολογικές συνθήκες το ένζυμο αυτό ρυθμίζει τα επίπεδα του p27Kip1 mRNA, ενός ογκοκατασταλτικού που αναστέλλει κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες και προάγει τον κυτταρικό θάνατο. Σε κύτταρα όπου λείπει η CCR4b, τα επίπεδα του p27Kip1 αυξάνονται και αναστέλλεται η ανάπτυξη των κυττάρων. Ωστόσο δεν υπάρχει καμία μελέτη με αλλαγή των επιπέδων της CCR4b σε όγκους, ενώ δεν υπάρχουν μελέτες που να σχετίζουν μία πλεονάζουσα δράση του ενζύμου με τα επίπεδα ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε καρκινικές σειρές (Mortia και συν., 2007).

Η CCR4d (ANGEL) ρυθμίζει την έκφραση του p21 μέσω του p53-ανεξάρτητου μονοπατιού. Η θετική ρύθμιση της p21 από τη Ccr4d και αναστολή της ανάπτυξης από την επίδραση της Ccr4d υποδηλώνουν ότι ενδεχομένως η Ccr4d να εμπλέκεται στην καρκινογένεση. Η Ccr4d υποεκφράζεται σε καρκίνους που προέρχονται από διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των νεφρών, της ουροδόχου κύστης, του αιδοίου, του προστάτη, θυρεοειδούς, δέρμα, λεπτό έντερο, και το πάγκρεας (Υί και συν., 2012).

Η αποαδενυλιωτική ενεργότητα της PARN σε συνδυασμό με τις αποσταθεροποιητικές δράσεις των RBPs, μπορεί ενδεχομένως να ενεργήσει ως ογκοκαταστολέας, προκαλώντας αποικοδόμηση των mRNAs που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες όπως τον IL-8 και τον VEGF. Υπερέκφραση του αποσταθεροποιητικού παράγοντα TTP σε κακοήγη γλοιοκύτταρα, οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του RNA της IL-8 και του VEGF (Lai και συν., 2003· Suswam και συν., 2008). Μεταλλάξεις του TTP στα μεταστατικά γλοιοκύτταρα εμποδίζουν τη στρατολόγηση της PARN. Επίσης η PARN και το σύμπλοκο εξωσώματος στρατολογούνται από τις KSRP και DHAU με αποτέλεσμα να αποσταθεροποιούνται τα επίπεδα του c-jun και της uPA, τα οποία αυξάνονται στον καρκίνο (Tran και συν., 2003). Η CUG-BP προσδένεται σε υποστρώματα mRNA και στρατολογεί τη PARN με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση των mRNAs των c-fos και TNF-alpha (Moraes και συν., 2006).



**Εικόνα 2.4:** Μετά-μεταφραστικός έλεγχος στο καρκίνο. Οι δυσλειτουργικοί trans-acting παραγόντες στον μεταβολισμό του mRNA οδηγούν σε καρκινογένεση (Kim and Lee, 2009).

Πρόσφατα από το εργαστήριό μας ανακοινώθηκε πως τα επίπεδα έκφρασης ορισμένων αποαδενυλασών, όπως της PARN και CNOT7, αλλάζουν την έκφρασή τους σε οξείες λευχαιμίες, τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και πρωτεΐνης. Προτάθηκε επίσης πως θα μπορούσε να διερευνηθεί η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν τα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων αυτών ως πιθανοί βιοδείκτες στο μέλλον (Maragozidis et al. 2012; Balatsos et al 2011).

## **Σκοπός**

Με βάση τις πρόσφατες παρατηρήσεις του εργαστηρίου μας στην έκφραση των αποαδενυλασών στις λευχαιμίες, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της βιολογικής σημασίας των αποαδενυλασών στο καρκίνο του πνεύμονα. Στόχος είναι να εξεταστεί αν οι αλλαγές στην έκφραση των ενζύμων αυτών αφορούν ένα γενικότερο φαινόμενο στον καρκίνο.

Για την προσέγγιση του σκοπού της εργασίας, επιχειρήθηκε η ανάλυση των επιπέδων mRNAs των αποαδενυλασών σε δείγματα ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο και πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα. Παράλληλα, αποσιωπήθηκε η έκφραση επιλεγμένων αποαδενυλασών σε καλλιέργειες κυττάρων από καρκίνο του πνεύμονα και εξετάστηκε η επίδρασή της στη γονιδιακή έκφραση.

### 3. Υλικά και μέθοδοι

#### 3.1 Υλικά

##### 3.1.1 Χημικά

|                                       |                   |
|---------------------------------------|-------------------|
| Antibiotic-Antimycotic                | BIOSERA           |
| Αγαρόζη                               | BIO-RAD           |
| Αιθανόλη                              | MERCH             |
| Αμπικιλλίνη                           | SIGMA             |
| Bromophenol Blue                      | RESEARCH ORGANICS |
| β-μερκαπτοαιθανόλη                    | RIEDEL-DE HAEN    |
| GelRed Nuclein Acid Stain             | BIOTIUM           |
| Γλυκερόλη                             | SDS               |
| D(+) Γλυκόζη                          | PANREAC           |
| Dimethyl sulfoxide DMSO               | SIGMA             |
| RPMI 1640                             | SIGMA             |
| DNA KB marker                         | GEN SCRIPT        |
| DNA marker 100 bp                     | INVITROGEN        |
| Fetal Bovine Serum FBS                | GIBCO             |
| Ισοπροπανόλη                          | SCHARLAU          |
| LB Agar                               | SCHARLAU          |
| LB Broth                              | SCHARLAU          |
| 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 Kit

|  |                 |
|--|-----------------|
| KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kit -                        | KAPA BIOSYSTEMS |
| Master Mix (2X) Universal                          |                 |
| NucleoSpin Plasmid QuickPure                       | MACHEREY NAGEL  |
| PrimeScript™ 1 <sup>st</sup> strand cDNA synthesis | TAKARA BIO      |
| Total RNA Isolation kit Nucleospin                 | MACHEREY NAGEL  |
| Xfect Transfection Reagent                         | CLONTECH        |

### 3.1.3 Διαλύματα

#### Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

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

### 3.1.4 Θρεπτικά μέσα

#### Θρεπτικά υλικά για την καλλιέργεια βακτηρίων

- Υγρό θρεπτικό μέσο (LB Broth) 0,5% v/w yeast extract, 1% v/w tryptone, 0,5% v/w NaCl, pH 7,2.
- Στερεό θρεπτικό μέσο (LB Agar) 0,5% v/w yeast extract, 1% v/w tryptone, 0,5% v/w NaCl, 1,5% agar, pH 7,2.
- SOC (υγρό θρεπτικό μέσο για μετασχηματισμό βακτηρίων) 0,5% v/w yeast extract, 1% v/w tryptone, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM glucose.



Για την καλλιέργεια ανθρώπινων κυτταρικών σειρών

- Πλήρης θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιιεργειών RPMI 1640 w/ 25 mM HEPES και όξινο ανθρακικό νάτριο, L- glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS), Antibiotic-Antimycoti (10000 units penicillin and 10000 µg streptomycin per ml).
- Διάλυμα ψύξης: 20% FBS, 10% DMSO, RPMI 1640.

### **3.1.5 Βακτηριακά στελέχη**

DH5α (γονότυπος: F-φ80lacZΔM15 Δ(lacZY A-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 rela1 λ-).

### **3.1.6 Πλασμιδιακοί φορείς**

Plko.1-puro: Ο φορέας pLKO.1-puro περιέχει γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και την πουρομυκίνη για δυνατότητα επιλογής βακτηριακών και ευκαρυωτικών κυττάρων αντιστοίχως, που έλαβαν επιτυχώς το πλασμίδιο.

### **3.1.7 Κυτταρική σειρά**

NCI-H 520: Ανθρώπινη καρκινική σειρά προερχόμενη από ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα. Συντήρηση κυττάρων σε θρεπτικό μέσο, RPMI 1640, w/L- glutamine, εμπλουτισμένο με 10 % FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic και επώαση στους 37°C, σε 5 % CO<sub>2</sub>.

### **3.1.8 Δείγματα**

Πραγματοποιήθηκε λήψη παθολογικού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού με βρογχοσκόπηση από ασθενείς με μικροκυτταρικό και πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα.

|                          | SCLC               | SCC                |
|--------------------------|--------------------|--------------------|
| <b>Αριθμός δειγμάτων</b> | 10                 | 22                 |
| <b>Φύλο</b>              | Άνδρες             | Άνδρες             |
| <b>Μ.Ο ηλικίας</b>       | 64,3 ( $\pm 6,9$ ) | 65,8 ( $\pm 6,9$ ) |
| <b>Ιστορικό</b>          | Καπνιστές          | Καπνιστές          |

**Πίνακας 1:** Αριθμός και προέλευση δειγμάτων.

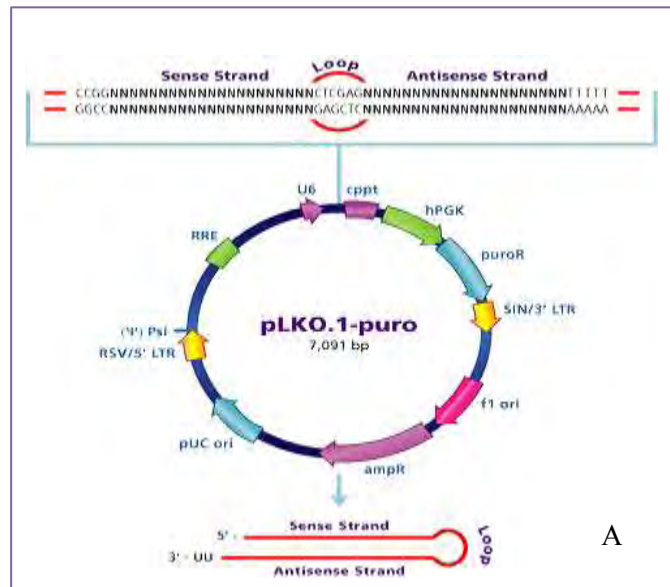
### 3.1.9 Short-Hairpin RNAs (shRNAs)

Για την αποσιώπηση της κάθε αποαδενυλάσης χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά shRNAs από τη Sigma, κλωνοποιημένα στο πλασμιδιακό φορέα pLKO.1-puro. Τα shRNAs και τα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου φορέα παρέχουν ένα ισχυρό μοριακό εργαλείο μακροπρόθεσμης, σταθερής αποσιώπησης του επιθυμητού γονιδίου, μέσω του συστήματος του RNAi καθώς και τη δυνατότητα αναγέννησης του πλασμιδίου μετά το μετασχηματισμό βακτηρίων με αυτό.

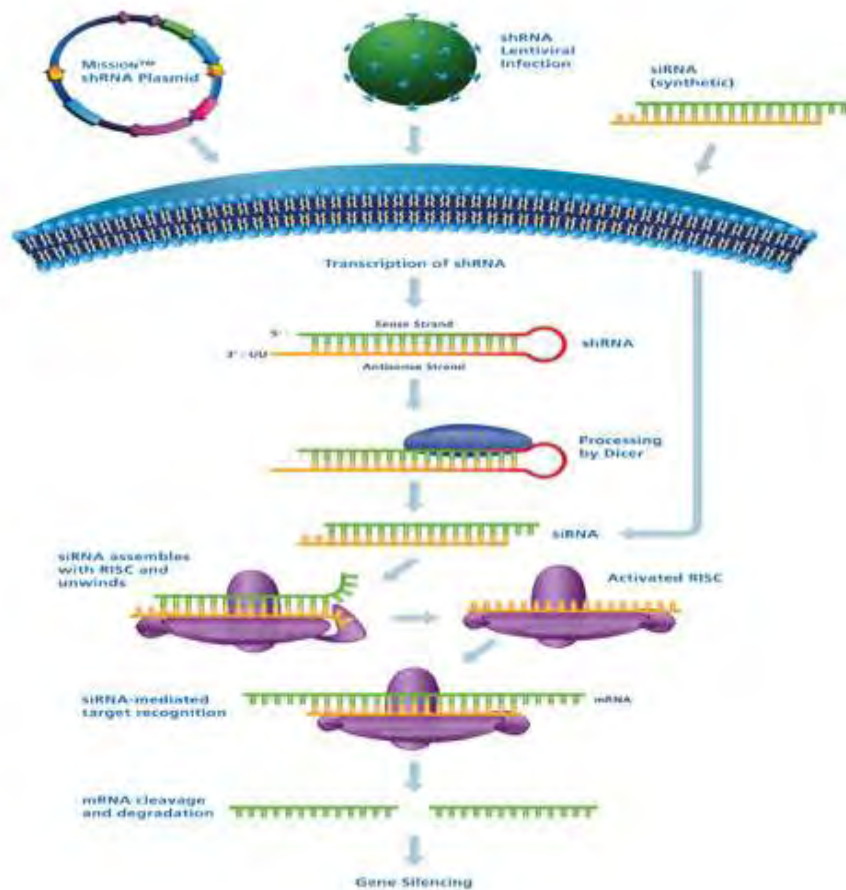
Ο μηχανισμός δράσης των shRNAs έγκειται στην *in vivo* μεταγραφή της κλωνοποιημένης στο φορέα αλληλουχίας του shRNA ενδοκυτταρικά και στην παραγωγή μικρών δίκλωνων μορίων RNA που φέρουν μια δευτεροταγή δομή φουρκέτας. Στη συνέχεια αυτά τα δίκλωνα μόρια επεξεργάζονται από τη Dicer και παράγουν μια ομάδα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

Τα siRNAs αυτά 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.

Εκτός από τα τρία ειδικά και εξειδικευμένα shRNAs, έναντι του mRNA της κάθε αποαδενυλάσης, σχεδιάστηκε, μία ακόμη αλληλουχία shRNA, η οποία δεν στοχεύει κανένα γονίδιο εντός του κυττάρου 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.



A



B

**Εικόνα 1:** Α. Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pLKO.1- puro. Β. Μηχανισμός αποσιώπησης μέσω πλασμιδιακών φορέων που μεταγράφουν shRNAs (Sigma).

[43]

| Αλληλουχία<br>θηλιάς (5'→3') | Αλληλουχία των 3 shRNAs                                     |
|------------------------------|---|
| shRNAs έναντι της CNOT6      |   |
| CTCGAG                       | CCGGGCTTTGCATTTGAGTGACAATCTCGAGATTGTCACTCAAATGCAAAGCTTTTGT  |
| CTCGAG                       | CCGGCCAGGATATATTGAACCTTTACTCGAGTAAAGGTTCAATATATCCTGGTTTTGT  |
| CTCGAG                       | CCGGGCAACCTCAAATCCAGTGTTTCTCGAGAAACACTGGATTGAGGTTGCTTTTTGT  |
| shRNAs έναντι της CNOT6L     |   |
| CTCGAG                       | CCGGCCGGTACAAGCAGACTCTATACTCGAGTATAGAGTCTGCTTGTACCGGTTTTGT  |
| CTCGAG                       | CCGGCCAAGAGGTGGACCACTATTTCTCGAGAAATAGTGGTCCACCTCTTGGTTTTGT  |
| CTCGAG                       | CCGGTTTAATCACAGGAGTCTATTTCTCGAGAAATAGACTCCTGTGATTAAATTTTTGT |
| shRNAs έναντι της CNOT7      |   |
| CTCGAG                       | CCGGGCTACTAACAACATCTGGTATCTCGAGATACCAGATGTTGTTAGTAGCTTTTT   |
| CTCGAG                       | CCGGGCTGACTATCAATACCAACTACTCGAGTAGTTGGTATTGATAGTCAGCTTTTT   |
| CTCGAG                       | CCGGCGGTGTAATGTAGACTTGTACTCGAGTAACAAGTCTACATTACACCGTTTT     |

**Πίνακας 2:** Χαρακτηριστικά των σχεδιασμένων shRNAs έναντι των αποαδευναλασών. 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.

### 3.1.10 Εκκινητές

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης της των αποαδευναλασών καθώς και των υπόλοιπων παραγόντων που εξετάστηκαν χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που παρουσιάζονται στον Πίνακα . Ο κάθε εκκινητής ελέγχθηκε ως προς την εξειδίκευση του για το αντίστοιχο cDNA-στόχο, με το πρόγραμμα Blastn.

| Παράγοντας  | Βιολογική λειτουργία   | Primers (5'→3')<br>Αναμενόμενο μέγεθος<br>προϊόντος PCR (bp)        |
|---|--|---|
| <b><u>ANGEL1</u></b>  | Ανήκει στην EEP υπεροικογένεια αποαδενυλασών. Υπάρχει σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Goldstrohm A. and Wickens M., 2008) | Fwd<br>AGCATAGCACCTGAGCCTGT<br>Rev<br>GGTCCTGAGCCAGGATGTTA<br>220bp |
| <b><u>ANGEL2</u></b>  | Ανήκει στην EEP υπεροικογένεια αποαδενυλασών. Υπάρχει σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Goldstrohm A. and Wickens M., 2008) | Fwd<br>GTGTTGCCACCAAGAAAGAT<br>Rev<br>GGGGCCAAATTGGAATAGAT<br>195bp |
| <b><u>PARN</u></b>  | Ανήκει στην DEDD υπεροικογένεια αποαδενυλασών (Goldstrohm A. και Wickens M., 2008)                                       | Fwd<br>GACCCCTCCAGAAAGCTAC<br>Rev<br>GGGGCACTTTGTCTCAACAT<br>236bp  |
| <b><u>PARNL</u></b><br><b>(PNLDC1 poly(A)-<br/>specific<br/>ribonuclease<br/>(PARN)-like<br/>domain containing<br/>1)</b> | Ανήκει στην DEDD υπεροικογένεια αποαδενυλασών (Goldstrohm A. and Wickens M., 2008)                                       | Fwd<br>GACCCCTCCAGAAAGCTAC<br>Rev<br>GGGGCACTTTGTCTCAACAT<br>236bp  |
| <b><u>CNOT6</u></b><br><b>(CCR4-NOT<br/>transcription<br/>complex, subunit<br/>6)</b>                                     | Αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (Lau και συν., 2009)  | Fwd<br>AGCTGTCATGGGAAGAATGG<br>Rev<br>GGGCAGCCACTGATGTTATT<br>221bp |
| <b><u>CNOT6L</u></b><br><b>(CCR4-NOT<br/>transcription<br/>complex, subunit<br/>6-like)</b>                               | Αποτελεί μεταβλητή υπομονάδα του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (Lau και συν., 2009)                                  | Fwd<br>CGGCTCTTCCAGCTACAAAC<br>Rev<br>GGAAGCTGCTCTGGATGAAC<br>143bp |
| <b><u>CNOT7</u></b>   | Ανήκει στην DEDD υπεροικογένεια (Goldstrohm A. και Wickens M., 2008)   | Fwd<br>GTCCTCTGTGAAGGGGTCAA<br>Rev<br>GACTGCTTGTGGCTTCTC<br>419bp   |
| <b><u>CNOT8</u></b><br><b>(CCR4-NOT<br/>transcription<br/>complex, subunit<br/>8)</b>                                     | Αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (Lau και συν., 2009)  | Fwd<br>GGATTTGCAGAGGATTGGAA<br>Rev<br>TCACTGCTGCATGTTGTTGA<br>232bp |

|  |  |  |
|--|--|--|
| <b><u>NOCTURNIN</u></b><br><b>(CCR4 carbon catabolite repression 4-like)</b> | Αποαδενυλάση κατηγορίας EEP, εξαρτώμενη από δισθενή κατιόντα Mg <sup>2+</sup> . Υπόκειται σε κιρκάδιο έλεγχο (Goldstrohm A. και Wickens M., 2008)  | Fwd<br>GCCAAGACACTGAACAGCAG<br>Rev<br>GGCAATCTGTCCTCAGATCC<br>175bp  |
| <b><u>PAN2</u></b>   | Ανήκει στην υπεροικογένεια DEDD αποαδενυλασών. Αποικοδομεί το μισό μήκος της πολύ(A) ουράς μέσα στον πυρήνα, ενώ το υπόλοιπο μέρος αποικοδομείται από τις αποαδενυλάσες CAF1 και CCR4 στο κυτταρόπλασμα (Goldstrohm A. και Wickens M., 2008)   | Fwd<br>CTCATCGGGGGACTCTGTTA<br>Rev<br>CCAGGCCTGTGTATTCTGGT<br>205bp  |
| <b><u>b-actin</u></b>  | Η β- 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") | Fwd<br>GGACTTCGAGCAAGAGATGG<br>Rev<br>AGCACTGTGTTGGCGTACAG<br>234 bp |
| <b><u>18S rRNA</u></b>   | 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<br>AGAAGGCTGGGGCTCATTTG<br>Rev<br>AGGGGCCATCCACAGTCTTC<br>253 bp |

**Πίνακας 3:** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη REAL TIME PCR.

### 3.2 Μέθοδοι

#### 3.2.1 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 πλασμίδιου 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 καλλιιεργειών για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm).

### **3.2.2 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 καλλιιεργειών για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Η ακόλουθη διαδικασία πραγματοποιείται με βάση το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από κύτταρα E. coli, NucleoSpin Plasmid QuickPure:

#### Καλλιέργεια και συλλογή των βακτηριακών κυττάρων:

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

#### Λύση των κυττάρων:

Προστίθενται 250μl buffer A1 και επαναδιαλύεται το ίζημα με τη βοήθεια πιπέτας και έντονη ανάδευση στο vortex. Ακολουθεί προσθήκη 250μl buffer A2 και ανάμειξη αναποδογυρίζοντας ήπια μερικές φορές χωρίς τη χρήση του vortex. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά. Ακολούθως προστίθενται 300μl buffer A3 και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση αναποδογυρίζοντας μερικές φορές (6-8) αποφεύγοντας τη χρήση του vortex. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά 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 φυγοκέντρωση του προηγούμενου βήματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11000 x g και απομάκρυνση του εκλούσματος.

#### Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης:

Επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα και προστίθενται 450μl buffer AQ (με αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στις 11000 x g όπου και



επιτυγχάνεται ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης. Τέλος, πραγματοποιείται απομάκρυνση του εκλούσματος και φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα.

#### Έκλωση 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 φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11000 x g.

### **3.2.3 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με X-fect**

Η διαμόλυνση κυττάρων πραγματοποιήθηκε βάσει του πρωτοκόλλου Xfect Transfection Reagent της Clontech.

1. Αρχικά μια μέρα πριν τη διαμόλυνση σε κάθε T25 flask τοποθετούμε κύτταρα σε πληρότητα 40-50%.
2. Για κάθε flask ετοιμάζονται δύο διαλύματα:

| <b>Tube 1 (πλασμιδιακό DNA)</b> | <b>Tube 2 (Πολυμερές)</b>    |
|---------------------------------|------------------------------|
| μl (10 μg) Πλασμιδιακό DNA      | 3 μl Xfect Polymer           |
| μl Xfect Reaction Buffer        | 197 μl Xfect Reaction Buffer |
| 200 μl Τελικός όγκος            | 200 μl Τελικός όγκος         |

3. Ανακινούμε καλά το κάθε tube.
4. Για την παρασκευή του διάλυμα διαμόλυνσης (transfection mix) αναμιγνύουμε το tube 1 με το tube 2 και ανακινούμε για 10 sec.
5. Τα αφήνουμε να επωαστούν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου
6. Παράλληλα απομακρύνουμε από κάθε flask το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και ξεπλένουμε τα κύτταρα με κρύο και αποστειρωμένο PBS 1X δύο φορές. Πριν την προσθήκη του transfection mix προσθέτουμε 2ml θρεπτικού υλικού χωρίς αντιβιοτικά-αντιμυκητοκικά και χωρίς ορό (FBS) σε κάθε flask .














7. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης του transfection mix, μοιράζουμε 400 μl στα κύτταρα που προορίζονται για διαμόλυνση και αφήνουμε τη flask να επωαστεί στους 37°C.
8. Μετά από 12h απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από τα διαμολυσμένα κύτταρα και το αντικαθιστούμε με RPMI 1640 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 NCI-H520 στην πουρομυκίνη και η βέλτιστη συγκέντρωση, στην οποία απεβίωσε το 100% των κυττάρων που δεν φέρουν πλασμίδιο ανθεκτικότητας σε 48h μετά την αρχική έκθεση, είναι 5μg/ml).
9. Μετά από 72h συλλέγουμε τα κύτταρα.

### **3.2.4 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. Αρχικά περίπου 30 mg από κάθε δείγμα ομογενοποιούνται με την προσθήκη 350 μL διαλύματος RA1 παρουσία 3.5 μL 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 eppendorf, 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

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

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

**Εικόνα 3.1:** Συνοπτική παρουσίαση του πρωτοκόλλου απομόνωσης ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών.

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

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού γονιδιακής έκφρασης. Είναι μία ιδιαίτερα διαδεδομένη 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 στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα ή σε δύο βήματα (two-steps) όπου η αντίστροφη μεταγραφή και η ενίσχυση του παραγόμενου cDNA πραγματοποιούνται σε διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες. 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.

#### 1<sup>ο</sup> Βήμα: Σύνθεση του cDNA κλώνου

Για τη μετατροπή του ολικού RNA σε cDNA που η χρησιμοποιήθηκε προκειμένου στη συνέχεια να πολλαπλασιαστεί σε απλή PCR χρησιμοποιήθηκε το Prime 1<sup>st</sup> Strand Cdna Synthesis Kit της εταιρίας Takara. Η αντίστροφη μεταγραφάση που χρησιμοποιήθηκε απομονώνεται από τον Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) και μπορεί να συνθέσει cDNA μήκους μέχρι και 12000 βάσεων.

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*,<br>πολυ(A) <sup>+</sup> RNA : < 1 μg**) |
| RNase free dH <sub>2</sub> 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(Α) ουρά, η τελική συγκέντρωση του εκκινητή πρέπει να είναι 2pmol.

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

2. Το μίγμα θερμαίνεται στους 65ο C για 5 min ώστε να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA και να γίνει η πρόσδεση των εκκινητών στο στόχο και στη συνέχεια τοποθετείται κατευθείαν στον πάγο

3. Στη συνέχεια προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια, μέχρι τον τελικό όγκο που είναι 20 μl.

| 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 <sub>2</sub> O  | μέχρι 20.0 μl      |

## 2ο Βήμα: Real Time PCR

Κατά την Real Time PCR, πραγματοποιείται η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος καθ'όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης και καταγραφής της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Ευρέως χρησιμοποιούμενη ουσία αποτελεί η SYBR green1 η οποία διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497nm και εκπέμπει στα 520 nm. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της SYBR green είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας – στόχο, ενώ σημαντικό μειονέκτημά της είναι ότι προσδένεται σε όλα τα δίκλιωνα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης., στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύπτουν. Ωστόσο ο σωστός σχεδιασμός ειδικών εκκινητών καθώς και η

βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, μπορούν να συμβάλλουν στην αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών. Η ένταση φθορισμού μετράται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μία καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει την παρακολούθηση ολόκληρης της διαδικασίας της αντίδρασης από τον ερευνητή. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την αντίδραση συστατικά βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Στη συνέχεια επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία ορισμένα από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά και αναστολές της αντίδρασης. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητά της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau).

Στη συγκεκριμένη εργασία η μελέτη των επιπέδων έκφρασης αποαδενυλασών και καρκινικών παραγόντων πραγματοποιήθηκε με την ποσοτική PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της "KAPA<sup>TM</sup> SYBR® FAST qPCR Kit – Master Mix (2X) Universal". Στις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ως χρωστική αναφοράς η ROX και ως εσωτερικό control για την κανονικοποίηση του σήματος των ειδικών προϊόντων, το ιδιοσυστατικό γονίδιο της β-ακτίνης και του 18S rRNA. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε cDNA, από ολικό RNA απομονωμένο από τα εξεταζόμενα δείγματα. Οι ποσότητες των επιμέρους αντιδραστηρίων των αντιδράσεων και οι συνθήκες αυτών παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 4 και 5).

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

**Πίνακας 4:** Συστατικά αντίδρασης qPCR.

[54]

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

**Πίνακας 5:** Συνθήκες αντίδρασης qPCR για την ενίσχυση των επιλεγμένων παραγόντων

### 3.2.6 cDNA Μικροσυστοιχίες (Microarrays)

Τα πειράματα των μικροσυστοιχιών και η ανάλυση έγινε από τη NIMGenetics, Tres Cantos, στη Μαδρίτη της Ισπανίας. Επιλεγμένες αποαδενυλάσες αποσιωπήθηκαν με shRNAs σε κύτταρα NCI-H520 (προέλευσης καρκίνου του πνεύμονα). Απομονώθηκε ολικό RNA από δείγματα κυττάρων, με βάση το πρωτόκολλο RNeasy kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) και έγινε ανάλυση της έκφρασης με μικροσυστοιχίες σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος (full-genome analysis). Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

1. Κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 που φέρει μία αλληλουχία shRNA έναντι των αποαδενυλασών CNOT6, CNOT6L και CNOT7.
2. Κύτταρα αγρίου τύπου (MW).
3. Κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 που δεν φέρει κάποια αλληλουχία shRNA (MV).
4. Κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 που φέρει μία αλληλουχία shRNA η οποία δεν στοχεύει κανένα mRNA εντός του κυττάρου (MSH).

Τα δείγματα 2, 3 και 4 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).

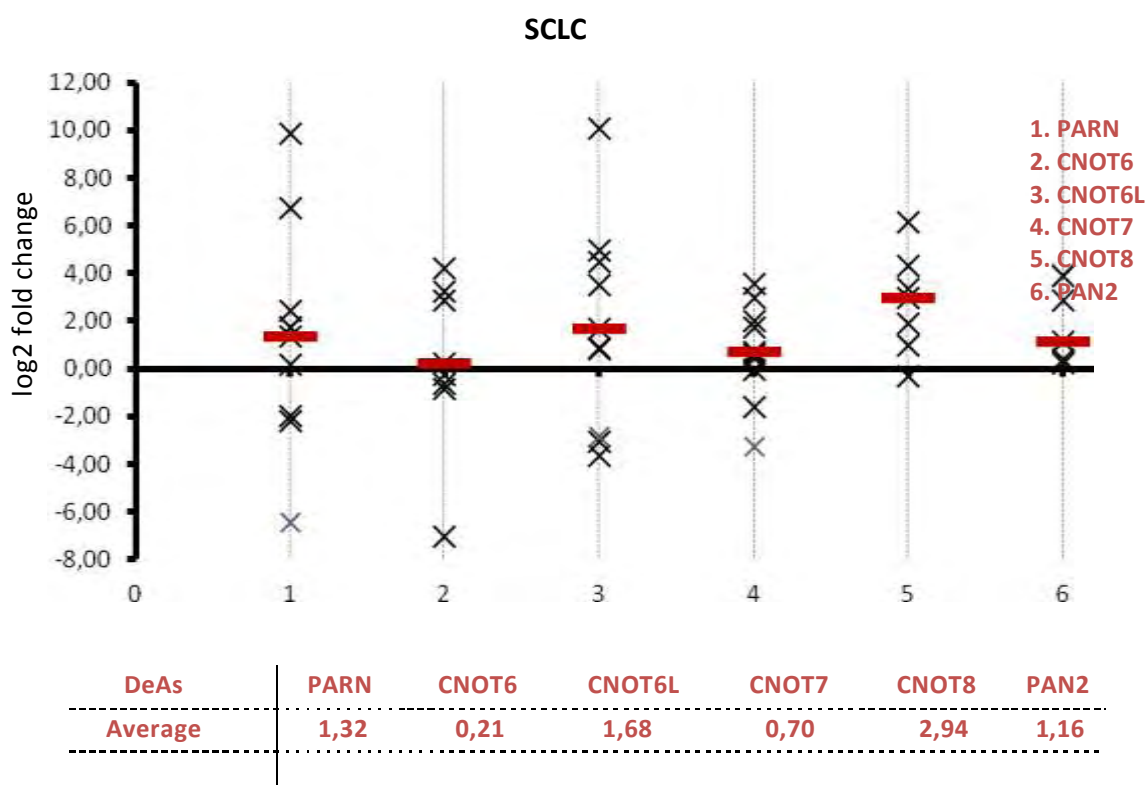
Βιοπληροφορική: Έγινε ανάλυση της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης (fold-change analysis), προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα γονίδια τα οποία εκφράζονται διαφορετικά στις δύο ομάδες σύγκρισης (κάθε δείγμα συγκρίθηκε με τα mock κύτταρα (MS), έτσι ώστε να αποκλείονται οι μεταβολές που οφείλονται στην επαγωγή 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. Αποτελέσματα

### 4.1 Επίπεδα έκφρασης mRNA αποαδενυλασών σε ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα με quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

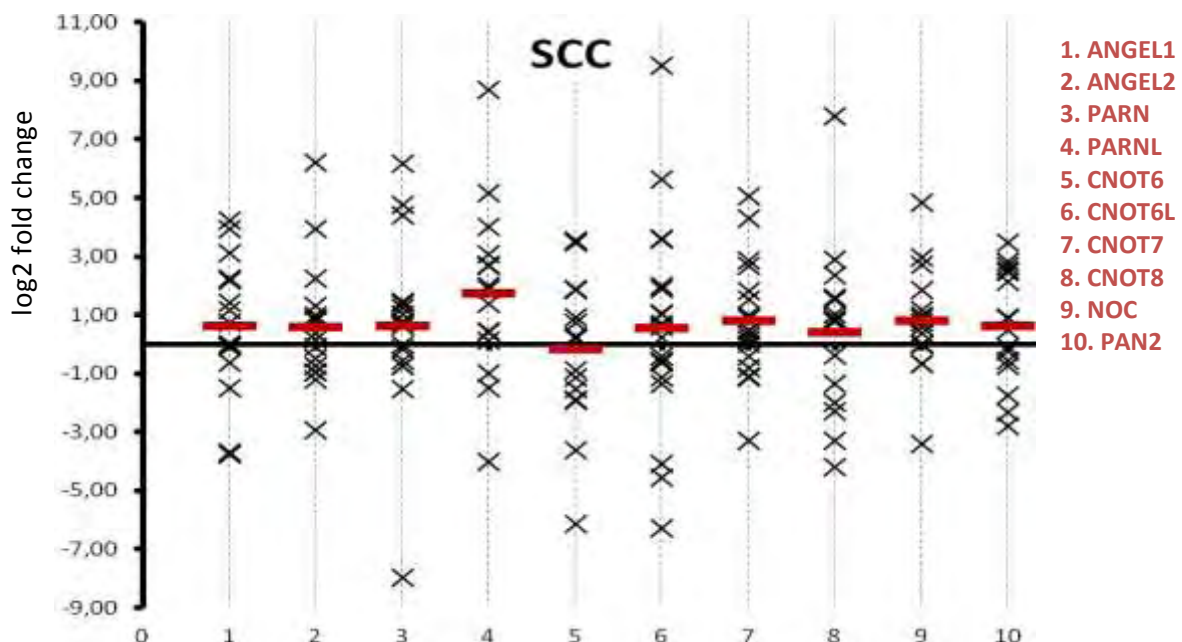
Πραγματοποιήθηκε λήψη παθολογικού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού με βρογχοσκόπηση από ασθενείς με μικροκυτταρικό του πνεύμονα. Μελετήθηκαν 10 δείγματα και μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών με qRT-PCR. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται δείγμα από μη παθολογικό ιστό του ίδιου ασθενούς. Αύξηση των επιπέδων έκφρασης παρατηρήθηκε στις αποαδενυλάσες PARN, CNOT6L, CNOT7, CNOT8, PAN2.



**Εικόνα 4.1:** Επίπεδα έκφρασης αποαδενυλασών και ο μέσος όρος έκφρασης (—) σε δείγματα από 11 ασθενείς με SCLC. Τα σημεία που εμφανίζονται αντιστοιχούν στη έκφραση αποαδενυλασών στον παθολογικό ιστό σε σχέση με την αντίστοιχη επί του φυσιολογικού ιστού (log2fold change).

## 4.2 Επίπεδα έκφρασης mRNA αποαδενυλασών σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα με quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Πραγματοποιήθηκε λήψη παθολογικού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού με βρογχοσκόπηση από ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα. Μελετήθηκαν 22 δείγματα και μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών με qRT-PCR. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται δείγμα από μη παθολογικό ιστό του ιδίου ασθενούς. Η ανάλυση έδειξε πως η έκφραση των αποαδενυλασών αλλάζει σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες. Ειδικότερα, οι περισσότερες αποαδενυλάσες έδειξαν διαφοροποίηση στην έκφρασή τους σε σύγκριση με τους μάρτυρες, όπως η αύξηση των ANGEL1, ANGEL2, PARN, CNOT7 και CNOT8 και μείωση της CNOT6L. όπως η αύξηση των ANGEL1, ANGEL2, PARN, PARNL και CNOT7 και μείωση της CNOT6L. Ενώ τα επίπεδα έκφρασης της CNOT6 και δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφοροποίηση.



| DeAs    | ANGEL1 | ANGEL2 | PARN | PARNL | CNOT6 | CNOT6L | CNOT7 | CNOT8 | NOC  | PAN2 |
|---------|--------|--------|------|-------|-------|--------|-------|-------|------|------|
| Average | 0,62   | 0,59   | 0,64 | 1,74  | -0,16 | 0,57   | 0,81  | 0,41  | 0,82 | 0,61 |

**Εικόνα 4.2:** Επίπεδα έκφρασης αποαδενυλασών και ο μέσος όρος έκφρασης (—) σε δείγματα από 22 ασθενείς με SCC. Τα σημεία που εμφανίζονται αντιστοιχούν στην έκφραση των αποαδενυλασών στον παθολογικό ιστό σε σχέση με την αντίστοιχη επί του φυσιολογικού ιστού (fold change).

### 4.3 cDNA Μικροσυστοιχίες

Για να εξετάσουμε την επίδραση της αποσιώπησης στο γονιδίωμα και πιθανά μονοπάτια που επηρεάζονται από τις αποαδενυλάσες πραγματοποιήσαμε ανάλυση μικροσυστοιχιών. Παρουσιάζεται η ανάλυση των δεδομένων για τρεις από αυτές, τις CNOT6, CNOT6L και CNOT7, που έδειξε ότι η αποσιώπηση της CNOT6 οδήγησε σε μεταβολές των επιπέδων 1117 γονιδίων (διαφορική έκφραση >2-fold συγκριτικά με τα MS,  $p < 0,05$ ), εκ των οποίων τα 112 δείχνουν μείωση και τα 1005 αύξηση. Ως αποτέλεσμα της αποσιώπησης της CNOT6L μειώνονται σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης 185 γονιδίων και αυξάνονται 646 γονιδίων. Στην αποσιώπηση της CNOT7 μειώθηκαν τα επίπεδα έκφρασης 213 ενώ αυξήθηκαν 680. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα κυτταρικά μονοπάτια που φαίνεται να επηρεάζονται είτε θετικά (up-regulated), είτε αρνητικά (down-regulated).

#### MV vs MSH

| Όνομα μονοπατιού | Μέγεθος | NOM p-val   | FDR q-val  |
|------------------|---------|-------------|------------|
| ACE2PATHWAY      | 12      | 0,002484472 | 0,23531255 |

#### A. Θετικά σχετιζόμενα μονοπάτια

| Όνομα μονοπατιού   | Μέγεθος | NOM p-val | FDR q-val  |
|--------------------|---------|-----------|------------|
| CALCINEURINPATHWAY | 18      | 0         | 0,08046725 |

#### B. Αρνητικά σχετιζόμενα μονοπάτια

**Πίνακας 1:** A. Θετικά σχετιζόμενα μονοπάτια B. Αρνητικά σχετιζόμενα μονοπάτια

Στην πρώτη καταγράφονται τα μονοπάτια που απορρυθμίζονται στα MV δείγματα συγκρινόμενα με τα MSH. 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).

### T-CNOT6 vs MSH

| Όνομα μονοπατιού                            | Μέγεθος | NOM p-val    | FDR q-val   |
|---|---------|--------------|-------------|
| NEUTROPHIL PATHWAY                          | 8       | 0            | 0,042454444 |
| DC PATHWAY                                  | 20      | 0            | 0,040114745 |
| HSA00591 LINOLEIC ACID METABOLISM           | 31      | 0            | 0,03396627  |
| MONOCYTE PATHWAY                            | 11      | 0            | 0,03835693  |
| LYMPHOCYTE PATHWAY                          | 9       | 0            | 0,04242203  |
| GAMMA HEXACHLOROCYCL OHEXANE DEGRADATION    | 27      | 0,0037546933 | 0,13010617  |
| COMP PATHWAY                                | 15      | 0,005524862  | 0,11827622  |
| CYTOKINE PATHWAY                            | 19      | 0,009536785  | 0,17123464  |
| HSA04640 HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE         | 87      | 0,0010976949 | 0,16245124  |
| BENZOATE DEGRADATION VIA COA LIGATION       | 9       | 0,010510511  | 0,16180834  |
| TRYPTOPHAN METABOLISM                       | 50      | 0,002361275  | 0,1684694   |
| HSA04610 COMPLEMENT AND COAGULATIN CASCADES | 68      | 0,0033259424 | 0,15924191  |
| PEPTIDE GPCRS                               | 66      | 0,0011185682 | 0,14943996  |
| COMPLEMENT ACTIVATION CLASSICAL             | 12      | 0,004237288  | 0,15484977  |
| LAIR PATHWAY                                | 16      | 0,009497965  | 0,14649454  |
| HSA00940 PHENYLPROPANOI D BIOSYNTHESIS      | 7       | 0,0060790274 | 0,13939546  |

[60]

|   |     |              |            |
|---|-----|--------------|------------|
| <b>HSA03010<br/>RIBOSOME</b>                                | 67  | 0,0056433408 | 0,14099811 |
| <b>HSA04940 TYPE I<br/>DIABETES<br/>MELLITUS</b>            | 44  | 0,010869565  | 0,15609321 |
| <b>STRIATED MUSCLE<br/>CONTRACTION</b>                      | 33  | 0,006142506  | 0,15259273 |
| <b>BL YMPHOCYTE<br/>PATHWAY</b>                             | 10  | 0,017291067  | 0,15939562 |
| <b>FATTY ACID<br/>BIOSYNTHESIS<br/>PATH 2</b>               | 8   | 0,022865854  | 0,16498205 |
| <b>GPCRDB CLASS A<br/>RHODOPSIN LIKE</b>                    | 163 | 0,0010362695 | 0,16381371 |
| <b>CLASSIC PATHWAY</b>                                      | 12  | 0,014450867  | 0,16307901 |
| <b>IL5 PATHWAY</b>  | 10  | 0,019746121  | 0,16217913 |
| <b>INFLAM PATHWAY</b>                                       | 28  | 0,015228426  | 0,17971636 |
| <b>C21 STEROID<br/>HORMONE<br/>METABOLISM</b>               | 10  | 0,024096385  | 0,18495302 |
| <b>NKT PATHWAY</b>  | 28  | 0,024875622  | 0,21875691 |
| <b>GLUCOCORTICOID<br/>MINERALOCORTIC<br/>OID METABOLISM</b> | 7   | 0,039694656  | 0,22735533 |

### Θετικά σχετιζόμενα μονοπάτια

**Πίνακας 2:** Στην πρώτη καταγράφονται τα μονοπάτια που απορρυθμίζονται στα TCNOT6 δείγματα συγκρινόμενα με τα MSH. Στις επόμενες στήλες αναφέρεται το μέγεθος, η p value 0.05 και η FDR value.

## TCNOT6-L vs MSH

| Όνομα μονοπατιού            | Μέγεθος | NOM p-val | FDR q-val   |
|-----------------------------|---------|-----------|-------------|
| STRIATED MUSCLE CONTRACTION | 33      | 0         | 0,049484037 |
| DC PATHWAY                  | 20      | 0         | 0,07849256  |
| HSP27 PATHWAY               | 15      | 0         | 0,11089081  |

### Θετικά σχετιζόμενα μονοπάτια

**Πίνακας 3:** Στην πρώτη και δεύτερη στήλη καταγράφονται τα μονοπάτια που απορρυθμίζονται και τα χαρακτηριστικά τους στα CNOT6L δείγματα συγκρινόμενα με τα MSH. Στις επόμενες στήλες αναφέρεται το μέγεθος, η p value και η FDR value.

## TCNOT7 vs MSH

| Όνομα μονοπατιού                    | Μέγεθος | NOM p-val    | FDR q-val  |
|-------------------------------------|---------|--------------|------------|
| STRIATED MUSCLE CONTRACTION         | 33      | 0            | 0,10950794 |
| HSA04640 HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE | 87      | 0            | 0,16339089 |
| DC PATHWAY                          | 20      | 0,0017793594 | 0,13182579 |

### Θετικά σχετιζόμενα μονοπάτια

**Πίνακας 4:** Στην πρώτη και δεύτερη στήλη καταγράφονται τα μονοπάτια που απορρυθμίζονται και τα χαρακτηριστικά τους στα CNOT7 δείγματα συγκρινόμενα με τα MSH. Στις επόμενες στήλες αναφέρεται το μέγεθος, η p value και η FDR value.

Οι αποαδενυλάσεις αυτές φαίνεται πως εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης κρίσιμων μονοπατιών και αρκετών γονιδίων συ μεταξύ συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής ανάπτυξης, της ανοσολογικής απόκρισης, της μυϊκής σύσπασης, της πρωτεϊνοσύνθεσης (Παράρτημα). Αρκετά μονοπάτια επηρεάζονται τουλάχιστον από

δυο αποαδενυλάσες, γεγονός που υπαινίσσεται αλληλεπικαλυπτόμενους ρόλους (Εικόνα 4.3).

**Positively correlated pathways/ genes**

| SILENCED DeA    | CNOT6                       |            |                                     | CNOT6L                      |            | CNOT7                       |            |                                     | OVERLAP |
|-----------------|-----------------------------|------------|-------------------------------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|------------|-------------------------------------|---------|
| PATHWAY         | STRIATED MUSCLE CONTRACTION | DC PATHWAY | HSA04640 HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE | STRIATED MUSCLE CONTRACTION | DC PATHWAY | STRIATED MUSCLE CONTRACTION | DC PATHWAY | HSA04640 HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE |         |
| Gene number     | 14                          | 12         | 51                                  | 15                          | 14         | 16                          | 12         | 30                                  |         |
| CNOT6           |                             |            |                                     | 13                          | 10         | 33                          | 10         | 28                                  |         |
| CNOT6L          | 13                          | 10         |                                     |                             |            | 14                          | 12         |                                     |         |
| CNOT7           | 13                          | 10         | 28                                  | 14                          | 12         |                             |            |                                     |         |
| OVERLAP (total) | 51                          |            |                                     | 26                          |            | 71                          |            |                                     |         |

**Εικόνα 4.3:** Κοινά μονοπάτια που απορυθμίζονται από τις αποαδενυλάσες CNOT6, CNOT6L και CNOT7. Οι αριθμοί δηλώνουν το σύνολο των απορρυθμισμένων γονιδίων και την αλληλοεπικάλυψη τους.

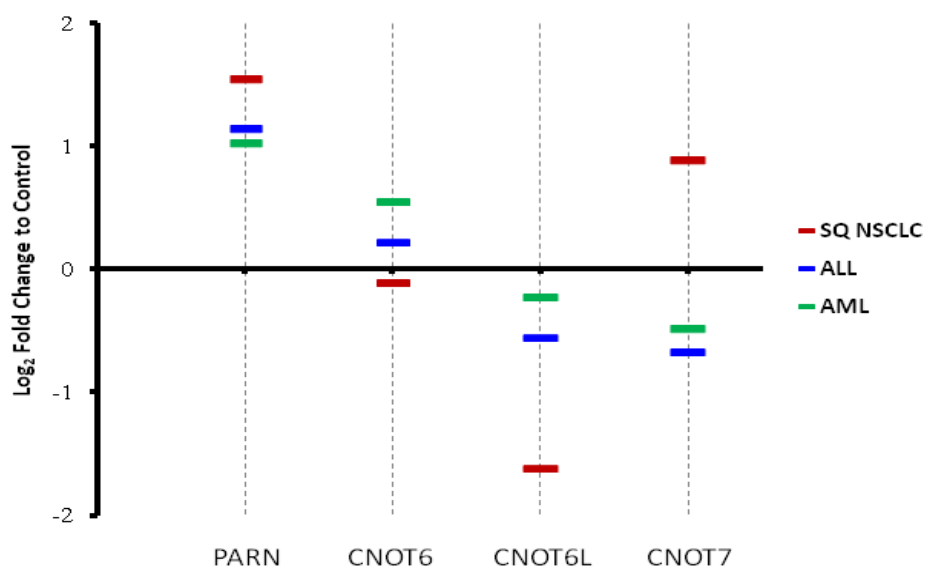
## 5. Συζήτηση

Προηγούμενες μελέτες που από το εργαστήριό μας σε δείγματα ασθενών με λευχαιμίες και έδειξαν ότι η έκφραση αποαδενυλασών, όπως η PARN και η CNOT7, μεταβάλλεται μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων, υπαινίσσοντας πως τα ένζυμα αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματικοί βιοδείκτες και πιθανόν ως χρήσιμα εργαλεία μελέτης της προόδου της θεραπείας (Maragozidis και συν., 2012). Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις επεκτείναμε τη μελέτη μας στον καρκίνο του πνεύμονα, ώστε να εξετάσουμε αν οι προηγούμενες παρατηρήσεις σχετικά με τη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των αποαδενυλασών αποτελούν ένα γενικότερο φαινόμενο στον καρκίνο. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε με τη μέθοδο της Real Time PCR, τα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7, CNOT8 και PAN2 σε παθολογικά και φυσιολογικά δείγματα ασθενών με Μικροκυτταρικό (SCLC) και των ANGEL1, ANGEL2, PARN, PARNL, CNOT6, CNOT6L, CNOT7, CNOT8, NOC, PAN2 σε πλακώδη καρκίνο (SCC) του πνεύμονα. Στις εικόνες 4.1 και 4.2 απεικονίζονται συγκριτικά οι μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών ανάμεσα στους δύο τύπους καρκίνου του πνεύμονα. Η PARN παρουσιάζει αυξημένη έκφραση έως και 2 φορές στα παθολογικά δείγματα ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο ενώ η έκφρασή αυξάνεται ασθενώς στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα. Επίσης τα επίπεδα έκφρασης των CNOT6 και PAN2 διαφοροποιούνται σημαντικά ανάμεσα στους δύο τύπους καρκίνου, εμφανίζοντας αύξηση στο Μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και μείωση στο Πλακώδες καρκίνωμα. Η CNOT6L παρουσιάζει σχετικά υψηλή έκφραση στους δύο τύπους καρκίνου, ενώ η CNOT7 εκφράζεται ασθενώς τόσο στο μικροκυτταρικό όσο και στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Τέλος η CNOT8 εμφανίζει ήπια αύξηση στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ενώ δεν εκφράζεται καθόλου στο πλακώδες καρκίνωμα.

Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν τις παρατηρήσεις από προηγούμενή μας εργασία, όπου δείχνεται πως αρκετές αποαδενυλάσες μεταβάλλουν την έκφρασή τους σε οξείες λευχαιμίες (Maragozidis et al., 2012). Η σύγκριση των αλλαγών μεταξύ των δύο ειδών καρκίνου (λευχαιμιών και πνεύμονα) αποκαλύπτει ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις (Εικόνα 5.1) Τα επίπεδα των PARN και CNOT6L μεταβάλλονται με τον ίδιο τρόπο στα δύο είδη· η PARN αυξάνεται ενώ η CNOT6L μειώνεται.



Αντίθετα, η CNOT7 ενώ αυξάνεται στον καρκίνο του πνεύμονα, μειώνεται στις οξείες λευχαιμίες. Ανάλογα παρατηρούνται και για την CNOT6L, αλλά αντίστροφα στα είδη καρκίνων και σε λιγότερη ένταση σε σχέση με την CNOT7. Οι παρατηρήσεις αυτές μπορεί να σημαίνουν πως συγκεκριμένες αποαδενυλάσες ελέγχουν συγκεκριμένα μονοπάτια ή κυτταρικές διεργασίες. Πρέπει να σημειώσουμε πρόσφατες μελέτες που δείχνουν πως σε κύτταρα προέλευσης από καρκίνο του μαστού οι CNOT6 και CNOT6L συμμετέχουν σε διεργασίες γήρανσης και κυτταρικού θανάτου (Mittal και συν., 2011), οι CNOT7 και CNOT8 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Aslam και συν., 2009). Επίσης δείχθηκε πως η PARN ελέγχει συγκεκριμένη ομάδα γονιδίων που εμπλέκονται στην κινητικότητα κυττάρων μυοβλαστών ποντικών (Lee και συν., 2012). Εάν οι αποαδενυλάσες ελέγχουν συγκεκριμένα μονοπάτια, μια άλλη ενδιαφέρουσα προοπτική είναι πως μπορεί οι αποαδενυλάσες να λειτουργούν αλληλοεπικαλυπτόμενα· σε περίπτωση που τα επίπεδα μιας μειώνονται (π.χ. CNOT6L) να την αντικαθιστά μια άλλη (CNOT7) ώστε να εξασφαλίζεται η αποικοδόμηση των mRNAs των παραγόντων που δεν θα γινόταν αν έλειπε η μία από αυτές (η CNOT6L στο εν λόγω παράδειγμα). Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται και έχουν δρομολογηθεί για να προσεγγισθούν αυτά τα ερωτήματα.



**Εικόνα 5.1.** Σύγκριση αποτελεσμάτων στα επίπεδα έκφρασης αποαδενυλασών σε ασθενείς με SCC (πλακώδες) και σε ασθενείς με Λευχαιμίες (ALL – Οξεία Λεμφοκυτταρική, AML – Οξεία Μυελογενής).

Με βάση αυτές τις προηγούμενες παρατηρήσεις επιχειρήσαμε να κατανοήσουμε το ρόλο των αποαδενλασών στον καρκίνο του πνεύμονα σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης. Για το σκοπό αυτό αποσιωπήθηκε η έκφραση των CNOT6, CNOT6L και CNOT7 σε κύτταρα προέλευσης καρκίνου του πνεύμονα (squamous cell carcinoma), ώστε να προσεγγίζει το είδος των κλινικών δειγμάτων που αναλύσαμε παραπάνω, και αναλύθηκε η επίδραση της διεργασίας στην έκφραση του συνόλου του γονιδιώματος. Όπως φαίνεται εκτενώς στα αποτελέσματα, οι αποαδενυλάσεις αυτές φαίνεται πως εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης κρίσιμων μονοπατιών και αρκετών γονιδίων (Πίνακας 1). Φαίνεται πως εμπλέκονται, μεταξύ άλλων, στη ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης, αιμοποίησης και μυϊκής σύσπασης. Αν και το τελευταίο είναι μάλλον αντιφατικό για ένα καρκινικό κύτταρο, εντούτοις μπορεί να σημαίνει πως το ένζυμο εμπλέκεται σε μηχανισμούς κυτταρικής κινητικότητας, που είναι κρίσιμη διεργασία για ένα καρκινικό κύτταρο. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι πως παράγοντες αιμοποίησης φαίνεται να ελέγχονται από κοινού από τις CNOT6 και CNOT7 (Εικόνα 4.3), γεγονός που θα μπορούσε ενισχύει την προηγούμενη υπόθεση της αλληλοεπικαλυπτόμενης δράσης των ενζύμων ως ένας μηχανισμός ρύθμισης για τον έλεγχο της λειτουργίας των μονοπατιών.

| CNOT6                                   |                                   |  |   |
|---|-----------------------------------|--|---|
| NEUTROPHIL PATHWAY                      | Ανοσολογική απόκριση              | TRYPTOPHAN METABOLISM                        | Μεταβολισμός τρυπτοφάνης                          |
| DC PATHWAY                              | Ανοσολογική απόκριση              | HSA04610 COMPLEMENT AND COAGULATION CASCADES | Ανοσολογική απόκριση                              |
| HSA00591 LINOLEIC ACID METABOLISM       | Μεταβολισμός του λινολεϊκού οξέος | PEPTIDE GPCRS                                | Σηματοδικά μονοπάτια                              |
| MONOCYTE PATHWAY                        | Ανοσολογική απόκριση              | COMPLEMENT ACTIVATION CLASSICAL              | Ανοσολογική απόκριση                              |
| LYMPHOCYTE PATHWAY                      | Ανοσολογική απόκριση              | LAIR PATHWAY                                 | Ανοσολογική απόκριση                              |
| GAMMA HEXACHLOROCYCLOHEXANE DEGRADATION | Μεταβολισμός                      | HSA00940 PHENYLPROPANOID BIOSYNTHESIS        | Βιοσύνθεση φαινυλοπροπανοειδών                    |
| COMP PATHWAY                            | Ανοσολογική απόκριση              | HSA03010 RIBOSOME                            | Γονίδια που εμπλέκονται στη ριβοσωμική λειτουργία |
| CYTOKINE PATHWAY                        | Ανοσολογική απόκριση              | HSA04940 TYPE I DIABETES MELLITUS            | Σακχαρώδης διαβήτης τύπου Ι                       |
| HSA04640 HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE     | Αιμοποίηση                        | STRIATED MUSCLE CONTRACTION                  | Μυϊκή σύσπαση                                     |

|                                       |  |                                     |                      |
|---------------------------------------|--|-------------------------------------|----------------------|
| BENZOATE DEGRADATION VIA COA LIGATION | Αποικοδόμηση βενζοϊκού οξέος μέσω σύνδεσης του CoA | B LYMPHOCYTE PATHWAY                | Ανοσολογική απόκριση |
| <b>CNOT6L</b>                         |  | <b>CNOT7</b>                        |                      |
| STRIATED MUSCLE CONTRACTION           | Μυϊκή σύσπαση                                      | STRIATED MUSCLE CONTRACTION         | Μυϊκή σύσπαση        |
| DC PATHWAY                            | Ανοσολογική απόκριση                               | DC PATHWAY                          | Ανοσολογική απόκριση |
| HSP27PATHWAY                          | Προστασία από την απόπτωση                         | HSA04640 HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE | Αιμοποίηση           |

**Πίνακας 1:** Τα θετικά σχετιζόμενα μονοπάτια και τα χαρακτηριστικά τους στα οποία εμπλέκονται οι αποαδενυλάσες CNOT6, CNOT6L και CNOT7.

Τα αποτελέσματα της εργασίας ανοίγουν νέες προοπτικές στο ρόλο των αποαδενυλασών στον καρκίνο του πνεύμονα και των ασθενειών αυτών γενικότερα. Για την καλύτερη κατανόηση του ρόλου τους στο σύνολό του απαιτείται η επέκταση της μελέτης και στις υπόλοιπες αποαδενυλάσες καθώς και παραγόντων που εμπλέκονται στη ρύθμιση τόσο των μονοπατιών, όσο και της γονιδιακής έκφρασης γενικότερα. Σε αυτή την τελευταία κατεύθυνση η μελέτη των στο επίπεδο των miRNAs σε σχέση με την αποαδενυλίωση αναμένεται να είναι ιδιαίτερα αποκαλυπτικός.

## *Συμπεράσματα*

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν πως η έκφραση των αποαδενυλασών αλλάζουν στον καρκίνο του πνεύμονα. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι σημαντικές γιατί μπορεί να σχετίζονται άμεσα με τις αλλαγές που κάναμε στην έκφραση άλλων κρίσιμων παραγόντων, όπως ογκογονιδίων και βιοδεικτών στον καρκίνο του πνεύμονα. Σε συνδυασμό με προηγούμενες παρατηρήσεις του εργαστηρίου που είναι υπό κρίση για δημοσίευση, υποστηρίζουν την ιδέα ότι οι αποαδενυλάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου. Θα μπορούσαν λοιπόν τα ένζυμα αυτά να εξετασθούν περεταίρω για να χρησιμοποιηθούν ως βοηθητικοί βιοδείκτες, ή ακόμη και για την παρακολούθηση της εξέλιξης των θεραπευτικών σχημάτων.

## Βιβλιογραφία

1. Abbasciano V., Sartori S., Trevisani L., Nielsen I., Ferrazzi E., Bononi A., Toso S., Crepaldi G., Bianchi M., Gilli G., Zavagli G., (1999), Neuron-specific enolase, thymidine kinase, and tissue polypeptide-specific antigen in diagnosis and response to chemotherapy of small-cell lung cancer, *Cancer Detect. Prev.*, 23(4):309-15.
2. Audic Y. and Hartley R., (2004), Post-transcriptional regulation in cancer, *Biology of the Cell*, 96; 479–498.
3. Aslam A., Mittal S., Koch F., Andrau J. and Winkler G.S., (2009), The Ccr4–Not Deadenylase Subunits CNOT7 and CNOT8 Have Overlapping Roles and Modulate Cell Proliferation, *Molecular Biology of the Cell*, 20: 3840–3850.
4. Bartlam M. and Yamamoto T., (2010), The structural basis for deadenylation by the CCR4-NOT complex, *Protein Cell*, 1(5): 443–452.
5. Beelman C.A. and Paker R., (1995), Degradation of mRNA in eukaryotes, *Cell*, 8: 179–183.
6. Body J.J., Sculier J.P., Raymakers N., (1986), Evaluation of SCC Antigen as a new marker for lung cancer, *Cancer*, 65:1552-155.
7. Bogdan J.A., Adams-Burton C., Pedicord D.L., Sukovich D.A., Benfield P.A., Corjay M.H., Stoltenborg J.K., Dicker I.B., (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.
8. Bowman R., Yang I., Semmler A. and Fong K., (2006), Epigenetics of lung cancer, *Respirology*, 11; 355–365.
9. Brown C.E. and Sachs A.B., (1998), Poly(A)Tail Length Control in *Saccharomyces cerevisiae* Occurs by Message-Specific Deadenylation, *Mol Cell Biol.*, 18(11): 6548–6559.
10. Brown, C.E., Tarun, S.Z., Boeck, R. and Sachs A.B., (1996), PAN3 encodes a subunit of the Pab1p-dependent poly(A) nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell Biol.*, 16;5744–5753.
11. Carney D.N., Marangos P.J., Ihde D.C., Bunn P.A. Jr, Cohen M.H., Minna J.D., Gazdar A.F., (1982), Serum neuron-specific enolase: a marker for disease extent and response to therapy of small-cell lung cancer, *Lancet*, 13;1(8272):583-5.
12. Cheadle C., Fan J., Cho-Chung Y.S., Werner T., Ray J., Do L., Gorospe M., Becker K.G., (2005), Control of gene expression during T cell activation: alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability, *BMC Genomics*, 6: 75.

13. Chiba Y., Johnson M.A., Lidder P., Vogel J.T., Van Erp H., Green P.J., (2004), AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in Arabidopsis, *Gene*, 328:95–102 .
14. Chen J., Rappsilber J., Chiang Y.C., Russell P., Mann M., Denis C.L., (2001), Purification and characterization of the 1.0 MDa CCR4-NOT complex identifies two novel components of the complex, *J. Mol. Biol.*, 314: 683–694.
15. Conrad N.K., Shu M.D., Uyhazi K.E., Steitz J.A., (2007), Mutational analysis of a viral RNA element that counteracts rapid RNA decay by interaction with the polyadenylate tail, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104: 10412–10417.
16. Conti E. and Izaurralde E., (2005), Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17; 316–325.
17. Dent P.B., McCulloch P.B., Wesley-James O., MacLaren R., Muirhead W., Dunnett C.W., (1978), Measurements of CEA in patients with bronchogenic carcinoma, *Cancer*, 42:1484-1491.
18. Dialyna I.A., Miyakis S., Georgatou N., Spandidos D.A., (2003), Genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer risk, *Oncol. Rep.*, 10(6):1829-35.
19. Diez M., Torres A., Pollan M., Gomez A. Ortega D., Maestro M.L., Granell J., Balibrea J.L., (1994), Prognostic significance of serum CA125 antigen assay in patients with non-small cell lung cancer, *Cancer*, 73:1358-1376.
20. Diez M., Gomez A., Hernando F., Ortega M.D., Maestro M.L., Torres A., Mugüerza J.M., Gutierrez A., Granell J., Balibrea J.L., (1995), Serum CEA, CA125, and SCC antigens and tumor recurrence in resectable non-small cell lung cancer, *Int. J. Biol. Markers*, 10:5-10.
21. Dlakic M., (2000), Functionally unrelated signalling proteins contain a fold similar to Mg<sup>2+</sup>-dependent endonucleases. *Trends Biochem. Sci.*, 25: 272–273.
22. Doma M.K. and Parker R., (2006), Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation, *Nature*, 440; 561–564.
23. Ebert W. and Muley T., (1999), CYFRA 21-1 in the follow-up of inoperable non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy, *Anticancer Res.*, 19(4A):2669-72.
24. Elias, (1997), Small cell lung cancer: State of the art in 1996, *Chest* ,**112**:251S-258S.
25. Eulalio A., Behm-Ansmant I. and Izaurralde E., (2007), P bodies: at the crossroads of posttranscriptional pathways, *Mol. Biol. Cell*, 8: 9–22.

26. Ezzeddine N, Chen CY, Shyu AB, (2012), Evidence providing new insights into TOB-promoted deadenylation and supporting a link between TOB's deadenylation-enhancing and anti-proliferative activities, *Mol. Cell Biol.*, 32(6):1089-98.
27. Ezzeddine N., Chang T.C., Zhu W., Yamashita A., Chen C.Y., Zhong Z., Yamashita Y., Zheng D., Shyu A.B., (2007), Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation, *Mol. Cell Biol.*, 27(22):7791-801.
28. Faber A. W., Van Dijk M., Raue H. A. and Vos J.C., (2002), Ngl2p is a Ccr4p-like RNA nuclease essential for the final step in 3'-end processing of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *RNA*, 8: 1095–1101.
29. Fabian M.R., Mathonnet G., Sundermeier T., Mathys H., Zipprich J.T., Svitkin Y.V., Rivas F., Jinek M., Wohlschlegel J., Doudna J.A. Chen C.Y., Shyu A.B., Yates J.R. 3rd, Hannon G.J., Filipowicz W., Duchaine T.F., Sonenberg N., (2009), Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation, *Mol. Cell*, 35: 868–880.
30. Frischmeyer P.A., Van Hoof A., O'Donnell K., Guerrierio A.L., Parker R. and Dietz H.C., (2002), An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons, *Science*, 295: 2258–2261.
31. Gao M., Fritz, D. T., Ford, L. P. and Wilusz, J., (2000), Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates *in vitro*. *Mol Cell*, 5; 479–488.
32. Garneau N. L., Wilusz J. and Wilusz C. J., (2007), The highways and byways of mRNA decay, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 8: 113–126.
33. Goldstrohm A.C. and Wickens M., (2008), Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9: 337–344.
34. Goldstrohm A.C., Hook B.A., Seay D.J. and Wickens, M., (2006), PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs, *Nature Struct. Mol. Biol.*, 13: 533–539.
35. Gorgoni B. and Gray N.K., (2004), The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: A developmental perspective, *Brief Funct. Genomic Proteomic*. Aug;3(2):125-41.
36. Hamzaoui A., Thomas P., Castelnau O., Roux N., Roux F., Kleisbauer JP., (1997), Usefulness of longitudinal evaluation of Cyfra 21-1 variations in advanced lung cancer monitoring, *Lung Cancer*, 16(2-3):191-202.
37. He F., Li X., Spatrick P., Casillo R., Dong S., Jacobson A., (2003), Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast, *Mol. Cell*, 6: 1439–1452.

38. Houalla R., Devaux F., Fatica A., Kufel J., Barrass D., Torchet C., Tollervey D., (2006), Microarray detection of novel nuclear RNA substrates for the exosome, *Yeast*, 6:439–454.
39. Houseley J., LaCava J. and Tollervey D., (2006), RNA-quality control by the exosome. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 7:529–539.
40. Inada T. and Aiba H., (2005), Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. *EMBO J*, 24; 1584–1595.
41. <sup>a</sup> Ito K, Takahashi A, Morita M, Suzuki T, Yamamoto T., (2011), The role of the CNOT1 subunit of the CCR4-NOT complex in mRNA deadenylation and cell viability, *Protein Cell.*, 2(9):755-63.
42. <sup>b</sup>Ito K, Inoue T, Yokoyama K, Morita M, Suzuki T, Yamamoto T. (2011) ,CNOT2 depletion disrupts and inhibits the CCR4–NOTdeadenylase complex and induces apoptotic cell death, *Genes to Cells*, 16 (4): 368–379.
43. Jin B., Zhao L., Zhou C., (2001) The prognostic value of serum neuron specific enolase detection in small cell lung cancer, *Honghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.*, 24(12):722-4.
44. Kashima I, Yamashita A. , Izumi N., Kataoka N. , Morishita R. , Hoshino S. , Ohno M. , Dreyfuss G. , and Ohno S., (2006), Binding of a novel SMG-1–Upf1– eRF1– eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and non sense mediated mRNA decay, *Genes Dev.*, 20:355–367.
45. Kim W.C. and Lee C.H., (2009), The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer, *Bioch. et Bioph. Acta*, 99-113.
46. Körner CG, Wormington M, Muckenthaler M, Schneider S, Dehlin E, Wahle E., (1998), The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes, *EMBO J.*, 15;17(18):5427-37.
47. Körner C.G. and Wahle E., (1997), Poly(A) Tail Shortening by a Mammalian Poly(A)-specific 3'-Exoribonuclease, *J. Biol. Chem.*, 272;10448-10456.
48. Kubota K, Nakahara K, Ohtsuka T, Yoshida S, Kawaguchi J, Fujita Y, Ozeki Y, Hara A, Yoshimura C, Furukawa H, Haruyama H, Ichikawa K, Yamashita M, Matsuoka T, Iijima Y., (2004) Identification of 2'-phosphodiesterase, which plays a role in the 2–5A system regulated by interferon, *J. Biol. Chem*, 279;37832–37841.
49. Kushlinsky NE, Lyubimova NY, Lemesko AO, (1996), Serum CYFRA 21-1 and Neuron Specific Enolase as markers of lung cancer. In 2nd international congress on lung cancer, Crete. Eds Monduzzi, Bologna (ITA).



50. Lai W.S., Kennington E.A., Blackshear P.J., (2003), Tristetraprolin and Its Family Members Can Promote the Cell-Free Deadenylation of AU-Rich Element-Containing mRNAs by Poly(A) Ribonuclease, *Mol. Cell Biol.*, 23(11): 3798–3812.
51. Lamy PJ, Grenier J, Kramar A, Pujol JL., (2000), Pro-gastrin-releasing peptide, neuron specific enolase and chromogranin A as serum markers of small cell lung cancer, *Lung Cancer*, 29(3):197-203.
52. Lee J.E., Lee J.Y., Trembly J, Wilusz J., Tian B., Wilusz C.J.,(2012) The PARN Deadenylase Targets a Discrete Set of mRNAs for Decay and Regulates Cell Motility in Mouse Myoblasts, *PLOS Genetics*, 8: e1002901.
53. Lewin B., (2004), Genes VIII, *Pearson Education*, ch:24.
54. Liu, H., Rodgers, N. D., Jiao, X. and Kiledjian, M., (2002), The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases, *EMBO J*, 21;4699–4708.
55. Liu J., Carmell MA., Rivas FV., Marsden C.G., Thomson J.M., Song J.J., Hammond S.M., Joshua-Tor L. and Hannon G.J., (2004), Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi, *Science*, 305: 1437–1441.
56. Maragozidis P., Karangeli M., Labrou M., Dimopoulou G., Papaspyrou K., Salataj E., Pournaras S., Matsouka K., Gourgoulialis K., Balatsos N., (2012), Alterations of Deadenylases Expression in Acute Leukemias: Evidence for Poly (A)-specific Ribonuclease as a Potential Biomarker, *Acta Haematol.*, 128:39–46.
57. Μαρμαράς Β., Μαρμαρά- Λαμπροπούλου Μ., (2005), Βιολογία κυττάρου: Μοριακή προσέγγιση, Εκδόσεις Typorama, κεφ 6.
58. Mitsuuchi Y. and Testa J., (2002), Cytogenetics and Molecular Genetics of Lung Cancer, *American Journal of Medical Genetics (Semin. Med. Genet.)*, 115:183–188 .
59. Mino N., Iio A., Hamamoto K., (1988), Availability of tumor antigen 4 as a marker of squamous cell carcinoma of the lung and other organs, *Cancer* , 62:730-734.
60. Mittal S., Aslam A., Doidge R, Medica R., and Winkler G.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, *Mol. Biol. Cell*, 22: 748.
61. Miyake Y., Kodama T., Yamaguchi K., (1994), Pro-gastrin-releasing peptide (31-98) is a specific tumor marker in patients with small cell lung carcinoma, *Cancer Res*, Apr 15;54(8):2136-40.
62. Molin, L. and Puisieux, A., (2005), C. elegans homologue of the Caf1 gene, which encodes a subunit of the CCR4–NOT complex, is essential for embryonic and larval development and for meiotic progression, *Gene*, 358; 73–81 .

63. Moraes K.C., Wilusz C.J., Wilusz J., (2006), CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase, *RNA*, 12(6):1084-91.
64. 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.
65. Morozov I.Y., Jones M.G., Spiller D.G., Rigden D.J., Dattenbock C., Novotny R., Strauss J., Caddick M.X., (2010), Distinct roles for Caf1, Ccr4, Edc3 and CutA in the co-ordination of transcript deadenylation, decapping and P-body formation in *Aspergillus nidulans*, *Mol. Microbiol.*, 76:503–516.
66. Morris J.Z., Hong A., Lilly M.A. and Lehmann R., (2005), Twin a CCR4 homolog, regulates cyclin poly(A) tail length to permit *Drosophila* oogenesis. *Development*, 132; 1165–1174.
67. Muhrad D. and Parker R., (2005), The yeast EDC1 mRNA undergoes deadenylation-independent decapping stimulated by Not2p, Not4p, and Not5p, *EMBO J.*, 24: 1033–1045.
68. Niho S., Nishiwaki Y., Goto K., Ohmatsu H., Matsumoto T., Hojo F., Ohe Y., Kakinuma R., Kodama T., (2000), Significance of serum pro-gastrin-releasing peptide as a predictor of relapse of small cell lung cancer: comparative evaluation with neuron-specific enolase and carcinoembryonic antigen. *Lung Cancer*, 27(3):159-67.
69. <sup>a</sup>Niklinski J., Furman M., Laudanski J., Kozlowski M., (1992), Prognostic value of pretreatment CEA, SCC-Ag, and CA 19-9 levels in sera of patients with non-small cell lung cancer, *Eur. J. Cancer Prev.*, 1:401-406.
70. <sup>b</sup>Niklinski J., Furman M., Laudanski J., Kozlowski M., (1992), Evaluation of squamous cell carcinoma antigen (SCC-Ag) in the diagnosis and follow up of patients with non-small cell lung carcinoma, *Neoplasma*, 39:279-282.
71. Okusaka T., Eguchi K., Kasai T., Kurata T., Yamamoto N., Ohe Y., Tamura T., Shinkai T., Saijo N., (1997), Serum levels of pro-gastrin-releasing peptide for follow-up of patients with small cell lung cancer, *Clin. Cancer Res.*, 3(1):123-7.
72. Olivas W. and Parker R., (2000), The Puf3 protein is a transcript-specific regulator of mRNA degradation in yeast, *EMBO J.*, 19(23): 6602–6611.
73. Opyrchal, M., Anderson, J. R., Sokoloski, K. J., Wilusz, C. J. and Wilusz, J. A., (2005), A cell-free mRNA stability assay reveals conservation of the enzymes and mechanisms of mRNA decay between mosquito and mammalian cell lines. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35:1321–1334.

74. Panov Sasho Z., (2005), Molecular biology of the lung cancer, *Radiol. Oncol.*, 39(3): 197-210.
75. Park and Altorki, (2002), Diagnosis and management of early lung cancer, *Surg. Clin. North Am.*, 82(3):457-76.
76. Parker R. and Song H., (2004), The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11(2):121-7.
77. Parkin, D.M., Bray F., Ferlay J. and Pisani, P., (2005), Global cancer statistics, *CA Cancer J Clin*, 74-108.
78. Pass H.I., MD, Mitchel J.B., Johnson D.H., Turrisi A.T. and Minna J.D., (2000), Lung cancer: principles and practice, 2nd edition, Williams and Wilkins or Shields, pp 1,408.
79. Passlick B., Sienel W., Seen-Hibler R., Wöckel W., Thetter O., Mutschler W., Pantel K., (2000), Overexpression of matrix metalloproteinase 2 predicts unfavorable outcome in early-stage non-small cell lung cancer, *Clin Cancer Res.*, 6(10):3944-8.
80. Piao Zhang X., Wu L., Belasco J.G., (2010), CCR4-NOT Deadenyates mRNA Associated with RNA-Induced Silencing Complexes in Human Cells, *Mol. Cell Biol.*, 30;1486-1494.
81. Robbins S.L., Kumar V., Cotran R.S., (2002), Robbins Basic Pathology, 7<sup>th</sup> Edition, W.B. Saunders Company, ch:13.
82. Rubins JB, Dunitz J., Rubins HB, Maddaus MA, Niewoehner DE., (1998), Serum carcinoembryonic antigen as an adjunct to preoperative staging of lung cancer, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 116:412-416.
83. Sekido Y., Fong K.M. and Minna, J.D., (2003), Molecular Genetics of Lung Cancer, *Annual Review of Medicine*, 54: 73-87.
84. Sekido Y., Fong K.M. and Minna, J.D., (1998) ,Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer, *Biochim. Biophys. Acta*, 19;1378(1):F21-59.
85. Sienel W., Hellers .J, Morresi-Hauf A., Lichtinghagen R., Mutschler W., Jochum M., Klein C., Passlick B., Pantel K., (2003), Prognostic impact of matrix metalloproteinase-9 in operable non-small cell lung cancer, *Int. J Cancer*, 20;103(5):647-51.
86. Shibayama T., Ueoka H., Nishii K., Kiura K., Tabata M., Miyatake K., Kitajima T., Harada M., (2001), Complementary roles of pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP) and neuron specific enolase (NSE) in diagnosis and prognosis of small-cell lung cancer (SCLC), *Lung Cancer*, 32(1):61-9.

87. Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J. and Joshua-Tor L., (2004), Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity, *Science*, 305: 1434–1437.
88. Stewart and Kleihues, (2003), World Cancer Report, *IARC Press*, 183-87.
89. Stieber P., Zimmermann A., Reinmiedl J., Muller C., Hoffmann H., Dienemann H., (1999), CYFRA 21-1 in the early diagnosis of recurrent disease in non-small cell lung carcinomas (NSCLC), *Anticancer Res*, 19:2665-2668.
90. Stryer L., Berg J.M, Tymoczko J.L, (2002), Biochemistry (5th ed.), *WH Freeman and Company*, pp: 118–19, 781–808.
91. Sunaga N., Tsuchiya S., Minato K., Watanabe S., Fueki N., Hoshino H., Makimoto T., Ishihara S., Saito R., Mori M., (1999), Serum pro-gastrin-releasing peptide is a useful marker for treatment monitoring and survival in small-cell lung cancer. *Oncology*, 57(2):143-8.
92. Suswam E., Li Y., Zhang X., Gillespie G.Y., Li X., Shacka J.J., Lu L., Zheng L., King P.H., (2008), Tristetraprolin down-regulates interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in malignant glioma cells, *Cancer Res.*, 68(3):674-82.
93. Travis, (2011), Classification of Lung Cancer, *Seminars in Roentgenology*, 46;3(7): 178-186.
94. Tucker M., Staples R.R., Valencia-Sanchez M.A., 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.
95. Uchida N., Hoshino S., Katada T., (2004), Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein, *J Biol Chem*, 279:1383–1391.
96. Van der Gaast A., Schoenmakers C.H., Kok T.C., Blijenberg B.G., Cornillie F., Splinter T.A. , (1994), Evaluation of a new tumour marker in patients with non-small-cell lung cancer: CYFRA 21.1.Br., *J Cancer*, 69(3):525-8.
97. Van Hoof A., Frischmeyer P.A., Dietz H.C. and Parker R., (2002), Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon, *Science*, 295: 2262–2264.
98. Wagner E., Clement S.L. and Lykke-Andersen J, (2007), An unconventional human CCR4–CAF1 deadenylase complex in nuclear cajal bodies, *Mol. Cell Biol*, 27: 1686–1695.
99. Williams and Sandler, (2001), The epidemiology of lung cancer, *Cancer Treat Res*, 105: 31-52.

100. Wu M, Reutter M, Lilie H, Liu Y, Wahle E and Song H, (2005), Structural insight into poly (A) binding and catalytic mechanism of human PARN, *EMBO J*, 24(23): 4082–4093.
101. Xu N., Chen C. and Shyu A., (1997), Modulation of the Fate of Cytoplasmic mRNA by AU-Rich Elements: Key Sequence Features Controlling mRNA Deadenylation and Decay, *Molecular and Cellular Biology*, 4611–4621.
102. Yamashita A., Chang T.C., Yamashita Y., Zhu W., Zhong Z., Chen C.Y., Shyu A.B., (2005), Concerted action of poly(A)nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nature Struct. Mol. Biol.*, 12;1054–1063.
103. Yi X., Hong M., Gui B., Chen Z., Li L., Xie G., Liang J., Wang X., Shang Y., (2012) RNA Processing and Modification Protein, Carbon Catabolite Repression 4 (Ccr4), Arrests the Cell Cycle through p21 dependent and p53-independent Pathway, *J. Biol. Chem.*, 15;287(25):21045-57.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

| NEUTROPHIL PATHWAY                |   |
|-----------------------------------|---|
| PECAM1                            | platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)  |
| SELE                              | selectin E (endothelial adhesion molecule 1)  |
| SELL                              | selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)   |
| ITGAL                             | integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)     |
| ITGAM                             | integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)   |
| ICAM1                             | intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor                                       |
| DCPATHWAY                         |   |
| IL4                               | interleukin 4   |
| ITGAX                             | integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)   |
| CD7                               | CD7 molecule  |
| IL12B                             | interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40) |
| IL5                               | interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)   |
| TLR9                              | toll-like receptor 9  |
| IL13                              | interleukin 13  |
| CD33                              | CD33 molecule   |
| IFNB1                             | interferon, beta 1, fibroblast  |
| CD2                               | CD2 molecule  |
| IFNG                              | interferon, gamma   |
| IL10                              | interleukin 10  |
| HSA00591 LINOLEIC ACID METABOLISM |   |
| PLA2G12B                          | phospholipase A2, group XIIB  |
| PLA2G5                            | phospholipase A2, group V   |
| RDH12                             | retinol dehydrogenase 12 (all-trans/9-cis/11-cis)   |
| CYP3A5                            | cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5   |
| CYP2C9                            | cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9   |
| PLA2G2F                           | phospholipase A2, group IIF   |
| CYP3A4                            | cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4   |
| CYP3A7                            | cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 7   |
| CYP1A2                            | cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2   |
| CYP2C18                           | cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18  |
| PLA2G1B                           | phospholipase A2, group IB (pancreas)   |
| CYP2C19                           | cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19  |
| CYP2E1                            | cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1   |
| PLA2G2E                           | phospholipase A2, group IIE   |
| MONOCYTE PATHWAY                  |   |
| PECAM1                            | platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)  |

|  |   |
|--|---|
| <b>SELE</b>                                    | selectin E (endothelial adhesion molecule 1)  |
| <b>SELL</b>                                    | selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)   |
| <b>ITGAL</b>                                   | integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide) |
| <b>ITGAM</b>                                   | integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)   |
| <b>ICAM1</b>                                   | intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor                                   |
| <b>LYMPHOCYTE PATHWAY</b>                      |   |
| <b>PECAM1</b>                                  | platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)  |
| <b>SELE</b>                                    | selectin E (endothelial adhesion molecule 1)  |
| <b>SELL</b>                                    | selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)   |
| <b>ITGAL</b>                                   | integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide) |
| <b>ICAM1</b>                                   | intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor                                   |
| <b>GAMMA HEXACHLOROCYCLOHEXANE DEGRADATION</b> |   |
| <b>CYP3A5</b>                                  | cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5   |
| <b>ACP5</b>                                    | acid phosphatase 5, tartrate resistant  |
| <b>CYP4F8</b>                                  | cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 8   |
| <b>CYP2C9</b>                                  | cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9   |
| <b>CYP3A4</b>                                  | cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4   |
| <b>CYP3A7</b>                                  | cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 7   |
| <b>CYP1A2</b>                                  | cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2   |
| <b>CYP2C18</b>                                 | cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18  |
| <b>CYP2C19</b>                                 | cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19  |
| <b>CYP2E1</b>                                  | cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1   |
| <b>CYP2F1</b>                                  | cytochrome P450, family 2, subfamily F, polypeptide 1   |
| <b>CYP2B6</b>                                  | cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6   |
| <b>CYP1A1</b>                                  | cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1   |
| <b>PON1</b>                                    | paraoxonase 1   |
| <b>COMP PATHWAY</b>                            |   |
| <b>C1QB</b>                                    | complement component 1, q subcomponent, B chain   |
| <b>MBL2</b>                                    | mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble (opsonic defect)  |
| <b>C8A</b>                                     | complement component 8, alpha polypeptide   |
| <b>C1S</b>                                     | complement component 1, s subcomponent  |
| <b>C6</b>                                      | complement component 6  |
| <b>C7</b>                                      | complement component 7  |
| <b>C4B</b>                                     | complement component 4B (Chido blood group)   |
| <b>C2</b>                                      | complement component 2  |
| <b>CYTOKINE PATHWAY</b>                        |   |
| <b>IL4</b>                                     | interleukin 4   |
| <b>TNF</b>                                     | tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)   |
| <b>IL1A</b>                                    | interleukin 1, alpha  |

[79]

|  |   |
|--|---|
| <b>IL12B</b>                                       | interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40) |
| <b>IL5</b>   | interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)   |
| <b>IL13</b>  | interleukin 13  |
| <b>IFNB1</b>                                       | interferon, beta 1, fibroblast  |
| <b>IFNG</b>  | interferon, gamma   |
| <b>IL10</b>  | interleukin 10  |
| <b>LTA</b>   | lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)   |
| <b>IL6</b>   | interleukin 6 (interferon, beta 2)  |
| <b>HSA04640<br/>HEMATOPOIETIC CELL<br/>LINEAGE</b> |   |
| <b>IL4</b>   | interleukin 4   |
| <b>ITGB3</b>                                       | integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)   |
| <b>DNTT</b>  | deoxynucleotidyltransferase, terminal   |
| <b>CD7</b>   | CD7 molecule  |
| <b>CD1A</b>  | CD1a molecule   |
| <b>IL5RA</b>                                       | interleukin 5 receptor, alpha   |
| <b>TNF</b>   | tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)   |
| <b>CR1</b>   | complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group)   |
| <b>IL1A</b>  | interleukin 1, alpha  |
| <b>CD19</b>  | CD19 molecule   |
| <b>ITGAM</b>                                       | integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)   |
| <b>FLT3</b>  | fms-related tyrosine kinase 3   |
| <b>CSF3</b>  | colony stimulating factor 3 (granulocyte)   |
| <b>HLA-DRB5</b>                                    | major histocompatibility complex, class II, DR beta 5   |
| <b>GP9</b>   | glycoprotein IX (platelet)  |
| <b>CD3E</b>  | CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)  |
| <b>MS4A1</b>                                       | membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1  |
| <b>CD1D</b>  | CD1d molecule   |
| <b>GP5</b>   | glycoprotein V (platelet)   |
| <b>CD38</b>  | CD38 molecule   |
| <b>IL5</b>   | interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)   |
| <b>IL1B</b>  | interleukin 1, beta   |
| <b>CSF1R</b>                                       | colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog    |
| <b>CD14</b>  | CD14 molecule   |
| <b>GP1BA</b>                                       | glycoprotein Ib (platelet), alpha polypeptide   |
| <b>CD33</b>  | CD33 molecule   |
| <b>CD2</b>   | CD2 molecule  |
| <b>HLA-DRB4</b>                                    | major histocompatibility complex, class II, DR beta 4   |
| <b>IL6</b>   | interleukin 6 (interferon, beta 2)  |
| <b>FCER2</b>                                       | Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)  |
| <b>CD1E</b>  | CD1e molecule   |
| <b>HLA-DRA</b>                                     | major histocompatibility complex, class II, DR alpha  |
| <b>CD8B</b>  | CD8b molecule   |



|  |   |
|--|---|
| <b>CD1C</b>  | CD1c molecule   |
| <b>CD3G</b>  | CD3g molecule, gamma (CD3-TCR complex)  |
| <b>THPO</b>  | thrombopoietin (myeloproliferative leukemia virus oncogene ligand, megakaryocyte growth and development factor) |
| <b>CD36</b>  | CD36 molecule (thrombospondin receptor)   |
| <b>ITGA4</b>   | integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)  |
| <b>ITGA2B</b>  | integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)                                |
| <b>ITGA1</b>   | integrin, alpha 1   |
| <b>IL9R</b>  | interleukin 9 receptor  |
| <b>CD1B</b>  | CD1b molecule   |
| <b>IL3</b>   | interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)   |
| <b>CD37</b>  | CD37 molecule   |
| <b>HLA-DRB3</b>                                      | major histocompatibility complex, class II, DR beta 3   |
| <b>ANPEP</b>   | alanyl (membrane) aminopeptidase (aminopeptidase N, aminopeptidase M, microsomal aminopeptidase, CD13, p150)    |
| <b>CD34</b>  | CD34 molecule   |
| <b>IL3RA</b>   | interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)  |
| <b>CD8A</b>  | CD8a molecule   |
| <b>IL1R2</b>   | interleukin 1 receptor, type II   |
| <b>HLA-DRB1</b>                                      | major histocompatibility complex, class II, DR beta 1   |
| <b>BENZOATE<br/>DEGRADATION VIA<br/>COA LIGATION</b> |   |
| <b>SDS</b>   | serine dehydratase  |
| <b>ACYP2</b>   | acylphosphatase 2, muscle type  |
| <b>EHHADH</b>  | enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase  |
| <b>TRYPTOPHAN<br/>METABOLISM</b>                     |   |
| <b>SDS</b>   | serine dehydratase  |
| <b>ASMT</b>  | acetylserotonin O-methyltransferase   |
| <b>TPH1</b>  | tryptophan hydroxylase 1 (tryptophan 5-monooxygenase)   |
| <b>CYP3A5</b>  | cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5   |
| <b>CYP4F8</b>  | cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 8   |
| <b>CYP2C9</b>  | cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9   |
| <b>CYP3A4</b>  | cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4   |
| <b>CYP3A7</b>  | cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 7   |
| <b>CYP1A2</b>  | cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2   |
| <b>CYP2C18</b>                                       | cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18  |
| <b>EHHADH</b>  | enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase  |
| <b>CYP2C19</b>                                       | cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19  |
| <b>CYP2E1</b>  | cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1   |
| <b>CYP2F1</b>  | cytochrome P450, family 2, subfamily F, polypeptide 1   |
| <b>ALDH1A2</b>                                       | aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2  |

| <b>HSA04610<br/>COMPLEMENT AND<br/>COAGULATION<br/>CASCADES</b> |   |
|---|---|
| <b>KNG1</b>   | kininogen 1   |
| <b>F13B</b>   | coagulation factor XIII, B polypeptide  |
| <b>C1QB</b>   | complement component 1, q subcomponent, B chain   |
| <b>CR1</b>  | complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group)                                   |
| <b>SERPIND1</b>   | serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1                              |
| <b>F10</b>  | coagulation factor X  |
| <b>C1QC</b>   | complement component 1, q subcomponent, C chain   |
| <b>MBL2</b>   | mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble (opsonic defect)                                |
| <b>C8A</b>  | complement component 8, alpha polypeptide   |
| <b>F11</b>  | coagulation factor XI (plasma thromboplastin antecedent)                                      |
| <b>C4BPA</b>  | complement component 4 binding protein, alpha   |
| <b>PLAU</b>   | plasminogen activator, urokinase  |
| <b>C3AR1</b>  | complement component 3a receptor 1  |
| <b>F2</b>   | coagulation factor II (thrombin)  |
| <b>KLKB1</b>  | kallikrein B, plasma (Fletcher factor) 1  |
| <b>C1S</b>  | complement component 1, s subcomponent  |
| <b>C6</b>   | complement component 6  |
| <b>SERPINE1</b>   | serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 |
| <b>F8</b>   | coagulation factor VIII, procoagulant component (hemophilia A)                                |
| <b>C7</b>   | complement component 7  |
| <b>PLAT</b>   | plasminogen activator, tissue   |
| <b>C8B</b>  | complement component 8, beta polypeptide  |
| <b>SERPINA1</b>   | serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1           |
| <b>CFB</b>  | complement factor B   |
| <b>SERPINA5</b>   | serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 5           |
| <b>C4B</b>  | complement component 4B (Chido blood group)   |
| <b>C5AR1</b>  | complement component 5a receptor 1  |
| <b>PLG</b>  | Plasminogen   |
| <b>PEPTIDE GPCRS</b>  |   |
| <b>GNRHR</b>  | gonadotropin-releasing hormone receptor   |
| <b>CCR4</b>   | chemokine (C-C motif) receptor 4  |
| <b>MC4R</b>   | melanocortin 4 receptor   |
| <b>SSTR4</b>  | somatostatin receptor 4   |
| <b>BRS3</b>   | bombesin-like receptor 3  |
| <b>EDNRB</b>  | endothelin receptor type B  |
| <b>CCR7</b>   | chemokine (C-C motif) receptor 7  |
| <b>C3AR1</b>  | complement component 3a receptor 1  |
| <b>TACR3</b>  | tachykinin receptor 3   |
| <b>PPYR1</b>  | pancreatic polypeptide receptor 1   |

|  |   |
|--|---|
| <b>EDNRA</b>                           | endothelin receptor type A  |
| <b>NTSR1</b>                           | neurotensin receptor 1 (high affinity)  |
| <b>CX3CR1</b>                          | chemokine (C-X3-C motif) receptor 1   |
| <b>SSTR3</b>                           | somatostatin receptor 3   |
| <b>NPY5R</b>                           | neuropeptide Y receptor Y5  |
| <b>NTSR2</b>                           | neurotensin receptor 2  |
| <b>OPRM1</b>                           | opioid receptor, mu 1   |
| <b>GALR1</b>                           | galanin receptor 1  |
| <b>AVPR1B</b>                          | arginine vasopressin receptor 1B  |
| <b>TRHR</b>                            | thyrotropin-releasing hormone receptor  |
| <b>FPR1</b>                            | formyl peptide receptor 1   |
| <b>CXCR4</b>                           | chemokine (C-X-C motif) receptor 4  |
| <b>TACR1</b>                           | tachykinin receptor 1   |
| <b>CXCR3</b>                           | chemokine (C-X-C motif) receptor 3  |
| <b>CXCR6</b>                           | chemokine (C-X-C motif) receptor 6  |
| <b>NPY6R</b>                           | neuropeptide Y receptor Y6 (pseudogene)   |
| <b>AVPR2</b>                           | arginine vasopressin receptor 2 (nephrogenic diabetes insipidus)                                      |
| <b>MC3R</b>                            | melanocortin 3 receptor   |
| <b>CCKAR</b>                           | cholecystokinin A receptor  |
| <b>OXTR</b>                            | oxytocin receptor   |
| <b>AVPR1A</b>                          | arginine vasopressin receptor 1A  |
| <b>SSTR1</b>                           | somatostatin receptor 1   |
| <b>CCR6</b>                            | chemokine (C-C motif) receptor 6  |
| <b>FSHR</b>                            | follicle stimulating hormone receptor   |
| <b>OPRL1</b>                           | opiate receptor-like 1  |
| <b>GHSR</b>                            | growth hormone secretagogue receptor  |
| <b>BDKRB1</b>                          | bradykinin receptor B1  |
| <b>MC2R</b>                            | melanocortin 2 receptor (adrenocorticotrophic hormone)  |
| <b>MC5R</b>                            | melanocortin 5 receptor   |
| <b>GRPR</b>                            | gastrin-releasing peptide receptor  |
| <b>COMPLEMENT ACTIVATION CLASSICAL</b> |   |
| <b>C1QB</b>                            | complement component 1, q subcomponent, B chain   |
| <b>C8A</b>                             | complement component 8, alpha polypeptide   |
| <b>C1S</b>                             | complement component 1, s subcomponent  |
| <b>C6</b>                              | complement component 6  |
| <b>C7</b>                              | complement component 7  |
| <b>C8B</b>                             | complement component 8, beta polypeptide  |
| <b>C2</b>                              | complement component 2  |
| <b>LAIR PATHWAY</b>                    |   |
| <b>TNF</b>                             | tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)   |
| <b>IL1A</b>                            | interleukin 1, alpha  |
| <b>ITGAL</b>                           | integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide) |
| <b>ICAM1</b>                           | intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus  |

[83]

|  |  |
|--|--|
|  | receptor   |
| <b>C6</b>  | complement component 6   |
| <b>C7</b>  | complement component 7   |
| <b>IL6</b>   | interleukin 6 (interferon, beta 2)   |
| <b>SELP</b>  | selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)   |
| <b>ITGA4</b>   | integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)   |
| <b>HSA00940<br/>PHENYLPROPANOID<br/>BIOSYNTHESIS</b> |  |
| <b>MPO</b>   | Myeloperoxidase  |
| <b>EPX</b>   | eosinophil peroxidase  |
| <b>GBA3</b>  | glucosidase, beta, acid 3 (cytosolic)  |
| <b>LPO</b>   | Lactoperoxidase  |
| <b>HSA03010 RIBOSOME</b>                             |  |
| <b>RPS4Y1</b>  | ribosomal protein S4, Y-linked 1   |
| <b>RPS13</b>   | ribosomal protein S13  |
| <b>RPL41</b>   | ribosomal protein L41  |
| <b>RPS12</b>   | ribosomal protein S12  |
| <b>RPL35A</b>  | ribosomal protein L35a   |
| <b>RPS8</b>  | ribosomal protein S8   |
| <b>RPL11</b>   | ribosomal protein L11  |
| <b>RPL26</b>   | ribosomal protein L26  |
| <b>RPS24</b>   | ribosomal protein S24  |
| <b>RPL38</b>   | ribosomal protein L38  |
| <b>RPS5</b>  | ribosomal protein S5   |
| <b>RPL27</b>   | ribosomal protein L27  |
| <b>RPL19</b>   | ribosomal protein L19  |
| <b>RPL35</b>   | ribosomal protein L35  |
| <b>FAU</b>   | Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived); ribosomal protein S30 |
| <b>RPS21</b>   | ribosomal protein S21  |
| <b>RPL30</b>   | ribosomal protein L30  |
| <b>RPL22L1</b>                                       | ribosomal protein L22-like 1   |
| <b>RPL6</b>  | ribosomal protein L6   |
| <b>RPL32</b>   | ribosomal protein L32  |
| <b>RPS20</b>   | ribosomal protein S20  |
| <b>RPS28</b>   | ribosomal protein S28  |
| <b>RPL18</b>   | ribosomal protein L18  |
| <b>RPL37A</b>  | ribosomal protein L37a   |
| <b>RPS3A</b>   | ribosomal protein S3A  |
| <b>RPS16</b>   | ribosomal protein S16  |
| <b>RPS9</b>  | ribosomal protein S9   |
| <b>RPS7</b>  | ribosomal protein S7   |
| <b>RPS25</b>   | ribosomal protein S25  |
| <b>RPL12</b>   | ribosomal protein L12  |

|  |   |
|--|---|
| <b>RPS27</b>                                 | ribosomal protein S27 (metalloproteinase 1)   |
| <b>RPL18A</b>                                | ribosomal protein L18a  |
| <b>RPS3</b>                                  | ribosomal protein S3  |
| <b>RPS10</b>                                 | ribosomal protein S10   |
| <b>RPL36A</b>                                | ribosomal protein L36a  |
| <b>RPS18</b>                                 | ribosomal protein S18   |
| <b>RPL36AL</b>                               | ribosomal protein L36a-like   |
| <b>RPS11</b>                                 | ribosomal protein S11   |
| <b>RPL9</b>                                  | ribosomal protein L9  |
| <b>RPL24</b>                                 | ribosomal protein L24   |
| <b>RPL8</b>                                  | ribosomal protein L8  |
| <b>HSA04940 TYPE I<br/>DIABETES MELLITUS</b> |   |
| <b>CD80</b>                                  | CD80 molecule   |
| <b>FASLG</b>                                 | Fas ligand (TNF superfamily, member 6)  |
| <b>TNF</b>                                   | tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)   |
| <b>IL1A</b>                                  | interleukin 1, alpha  |
| <b>HLA-DRB5</b>                              | major histocompatibility complex, class II, DR beta 5   |
| <b>HLA-DQB1</b>                              | major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1   |
| <b>PTPRN</b>                                 | protein tyrosine phosphatase, receptor type, N  |
| <b>IL12B</b>                                 | interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40) |
| <b>IL1B</b>                                  | interleukin 1, beta   |
| <b>CD86</b>                                  | CD86 molecule   |
| <b>HLA-DMA</b>                               | major histocompatibility complex, class II, DM alpha  |
| <b>HLA-DOB</b>                               | major histocompatibility complex, class II, DO beta   |
| <b>HLA-DMB</b>                               | major histocompatibility complex, class II, DM beta   |
| <b>IFNG</b>                                  | interferon, gamma   |
| <b>HLA-DRB4</b>                              | major histocompatibility complex, class II, DR beta 4   |
| <b>GZMB</b>                                  | granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)                              |
| <b>LTA</b>                                   | lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)   |
| <b>HLA-DQB2</b>                              | major histocompatibility complex, class II, DQ beta 2   |
| <b>PRF1</b>                                  | perforin 1 (pore forming protein)   |
| <b>HLA-DOA</b>                               | major histocompatibility complex, class II, DO alpha  |
| <b>INS</b>                                   | Insulin   |
| <b>HLA-DRA</b>                               | major histocompatibility complex, class II, DR alpha  |
| <b>HLA-DQA1</b>                              | major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1  |
| <b>HLA-DPA1</b>                              | major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1  |
| <b>STRIATED MUSCLE<br/>CONTRACTION</b>       |   |
| <b>MYBPC3</b>                                | myosin binding protein C, cardiac   |
| <b>MYL2</b>                                  | myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow  |
| <b>MYL3</b>                                  | myosin, light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow  |
| <b>MYBPC2</b>                                | myosin binding protein C, fast type   |
| <b>TNNI2</b>                                 | troponin I type 2 (skeletal, fast)  |

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| <b>MYL1</b>                 | myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast   |
| <b>MYH3</b>                 | myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic   |
| <b>MYH6</b>                 | myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha (cardiomyopathy, hypertrophic 1)                         |
| <b>NEB</b>                  | Nebulin   |
| <b>ACTN2</b>                | actinin, alpha 2  |
| <b>TNNI3</b>                | troponin I type 3 (cardiac)   |
| <b>TNNT1</b>                | troponin T type 1 (skeletal, slow)  |
| <b>MYL9</b>                 | myosin, light chain 9, regulatory   |
| <b>ACTA2</b>                | actin, alpha 2, smooth muscle, aorta  |
| <b>B LYMPHOCYTE PATHWAY</b> |   |
| <b>CD80</b>                 | CD80 molecule   |
| <b>CR1</b>                  | complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group)   |
| <b>ITGAL</b>                | integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide) |
| <b>ICAM1</b>                | intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor                                   |
| <b>FCGR2B</b>               | Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)   |
| <b>HLA-DRA</b>              | major histocompatibility complex, class II, DR alpha  |

**Πίνακας 1 :** CNOT6 vs MSH - Απορρυθμισμένα γονίδια στο κάθε μονοπάτι

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| <b>STRIATED MUSCLE CONTRACTION</b> |   |
| <b>MYH8</b>                        | myosin, heavy chain 8, skeletal muscle, perinatal                             |
| <b>MYL1</b>                        | myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast                                 |
| <b>MYBPC3</b>                      | myosin binding protein C, cardiac   |
| <b>TNNI2</b>                       | troponin I type 2 (skeletal, fast)  |
| <b>MYL2</b>                        | myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow                              |
| <b>TNNT1</b>                       | troponin T type 1 (skeletal, slow)  |
| <b>ACTA2</b>                       | actin, alpha 2, smooth muscle, aorta  |
| <b>MYBPC2</b>                      | myosin binding protein C, fast type   |
| <b>TCAP</b>                        | titin-cap (telethonin)  |
| <b>MYH3</b>                        | myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic                             |
| <b>MYL9</b>                        | myosin, light chain 9, regulatory   |
| <b>MYH6</b>                        | myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha (cardiomyopathy, hypertrophic 1) |
| <b>MYL3</b>                        | myosin, light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow                    |
| <b>TNNI3</b>                       | troponin I type 3 (cardiac)   |
| <b>NEB</b>                         | nebulin   |
| <b>DC PATHWAY</b>                  |   |
| <b>IL4</b>                         | interleukin 4   |
| <b>CD7</b>                         | CD7 molecule  |

|                      |   |
|----------------------|---|
| <b>CD33</b>          | CD33 molecule   |
| <b>IL12B</b>         | interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40) |
| <b>CD5</b>           | CD5 molecule  |
| <b>ITGAX</b>         | integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)   |
| <b>IL13</b>          | interleukin 13  |
| <b>TLR7</b>          | toll-like receptor 7  |
| <b>IL5</b>           | interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)   |
| <b>IL3</b>           | interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)   |
| <b>TLR9</b>          | toll-like receptor 9  |
| <b>IL10</b>          | interleukin 10  |
| <b>CD2</b>           | CD2 molecule  |
| <b>CSF2</b>          | colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)  |
| <b>HSP27 PATHWAY</b> |   |
| <b>FASLG</b>         | Fas ligand (TNF superfamily, member 6)  |
| <b>ACTA1</b>         | actin, alpha 1, skeletal muscle   |
| <b>IL1A</b>          | interleukin 1, alpha  |
| <b>TNF</b>           | tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)   |

**Πίνακας 2:** CNOT6L vs MSH - Απορρυθμισμένα γονίδια στο κάθε μονοπάτι.

|  |   |
|--|---|
| <b>STRIATED MUSCLE CONTRACTION</b>         |   |
| <b>MYBPC3</b>                              | myosin binding protein C, cardiac   |
| <b>MYL1</b>                                | myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast                                 |
| <b>MYL2</b>                                | myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow                              |
| <b>MYBPC2</b>                              | myosin binding protein C, fast type   |
| <b>TNNI2</b>                               | troponin I type 2 (skeletal, fast)  |
| <b>MYL3</b>                                | myosin, light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow                    |
| <b>TNNT1</b>                               | troponin T type 1 (skeletal, slow)  |
| <b>MYH3</b>                                | myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic                             |
| <b>NEB</b>                                 | Nebulin   |
| <b>ACTA2</b>                               | actin, alpha 2, smooth muscle, aorta  |
| <b>TCAP</b>                                | titin-cap (telethonin)  |
| <b>MYH8</b>                                | myosin, heavy chain 8, skeletal muscle, perinatal                             |
| <b>TNNI3</b>                               | troponin I type 3 (cardiac)   |
| <b>ACTN2</b>                               | actinin, alpha 2  |
| <b>MYH6</b>                                | myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha (cardiomyopathy, hypertrophic 1) |
| <b>TPM1</b>                                | tropomyosin 1 (alpha)   |
| <b>HSA04640 HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE</b> |   |
| <b>IL4</b>                                 | interleukin 4   |

|                   |   |
|-------------------|---|
| GP9               | glycoprotein IX (platelet)  |
| CD7               | CD7 molecule  |
| CD1D              | CD1d molecule   |
| HLA-DRB5          | major histocompatibility complex, class II, DR beta 5   |
| GP5               | glycoprotein V (platelet)   |
| CD1B              | CD1b molecule   |
| ITGAM             | integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)   |
| FLT3              | fms-related tyrosine kinase 3   |
| IL5RA             | interleukin 5 receptor, alpha   |
| CD33              | CD33 molecule   |
| IL1A              | interleukin 1, alpha  |
| MS4A1             | membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1  |
| TNF               | tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)   |
| IL3               | interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)   |
| CD19              | CD19 molecule   |
| CD14              | CD14 molecule   |
| HLA-DRA           | major histocompatibility complex, class II, DR alpha  |
| CD36              | CD36 molecule (thrombospondin receptor)   |
| CD3E              | CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)  |
| CD1A              | CD1a molecule   |
| CR1               | complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group)   |
| ITGB3             | integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)   |
| ITGA5             | integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)   |
| DNTT              | deoxynucleotidyltransferase, terminal   |
| CD2               | CD2 molecule  |
| CD38              | CD38 molecule   |
| IL5               | interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)   |
| CD5               | CD5 molecule  |
| FCER2             | Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)  |
| <b>DC PATHWAY</b> |   |
| IL4               | interleukin 4   |
| CD7               | CD7 molecule  |
| CD33              | CD33 molecule   |
| IL12B             | interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40) |
| IL3               | interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)   |
| ITGAX             | integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)   |
| IL13              | interleukin 13  |
| TLR9              | toll-like receptor 9  |
| CD2               | CD2 molecule  |
| IL5               | interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)   |
| CD5               | CD5 molecule  |
| IL10              | interleukin 10  |

**Πίνακας 3:** CNOT7 vs MSH - Απορρυθμισμένα γονίδια στο κάθε μονοπάτι.