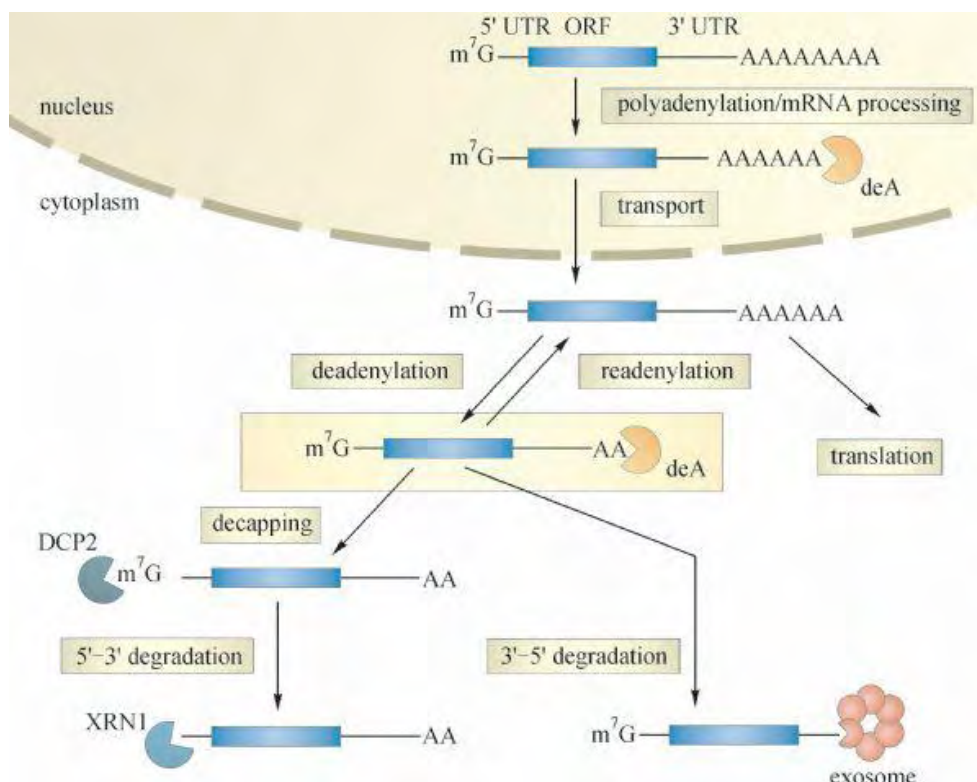




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΠΑΔΕΝΥΛΑΣΩΝ PARN, CNOT6, CNOT6-LIKE,
CNOT7 ΚΑΙ CNOT8 ΣΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ RNAs**



ΚΟΥΛΤΟΥΚΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2017

**"Αποτίμηση της δράσης των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6-LIKE,
CNOT7 και CNOT8 στη σταθερότητα RNAs"**

"Assessment of PARN, CNOT6, CNOT6-LIKE, CNOT7 και CNOT8 deadenylases
action in RNA stability"

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέπων καθηγητή τον κ. Μπαλατσό Νικόλαο.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων η βοήθεια, η υποστήριξη και οι υποδείξεις υπήρξαν πολύτιμες για την διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Όλα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Ν. Μπαλατσό, για την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας και τους Α.Κυρίτση και Μ. Λάμπρου για την σημαντική συμβολή τους στη διεξαγωγή των πειραμάτων και την άψογη συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια της συνύπαρξής μας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 6 |
| ABSTRACT | 7 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 8 |
| 1.1 Το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA) | 8 |
| 1.2 Το mRNA παράγεται με μεταγραφή | 8 |
| 1.3 Ωρίμανση του mRNA | 8 |
| 1.4 Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει καλύπτρα | 9 |
| 1.5 Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται | 10 |
| 1.6 Σταθερότητα του mRNA | 10 |
| 1.7 Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA | 16 |
| 1.8 Απαδενυλάσεις | 17 |
| 1.9 Απαδενυλάσεις στον καρκίνο | 24 |
| 1.10 Επιλεγμένα mRNAs που σχετίζονται με τον καρκίνο | 25 |
| 2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ | 29 |
| 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 30 |
| 3.1 Κυτταρικές σειρές – Χειρισμοί | 30 |
| 3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation) | 33 |
| 3.3 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με χρήση λιποσωμάτων | 35 |
| 3.4 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών | 43 |
| 3.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε δύο βήματα (Two-step RealTime PCR) | 45 |
| 3.6 Προσδιορισμός της κατάστασης πολυαδενυλίωσης των επιλεγμένων mRNAs των παραγόντων ERHA7, ROBO2 και CYTH4 με δοκιμή LM-PAT μετά από αποσιώπηση των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6-LIKE, CNOT7, CNOT8 | 50 |
| 3.7 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR (LM-PAT) σε πηκτή αγαρόζης | 56 |
| 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 58 |
| 4.1 Έλεγχος της αποσιώπησης των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8, με ποσοτική RT-PCR (qPCR) | 58 |
| 4.2 Επίδραση της αποσιώπησης των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 στο μήκος των πολυ(A) ουρών των μεταγράφων ERHA7, ROBO2, CYTH4 | 67 |
| 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ | 71 |
| 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 73 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι απαδενυλάσες είναι εξωριβονουκλεάσες που εμπλέκονται στη διαδικασία αποικοδόμησης των mRNAs προάγοντας την απαδενυλίωσή τους, και θεωρούνται μείζονες ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης. Η πολυ(A) ουρά και η πρωτεΐνη PABP που προσδένεται σε αυτή, είναι κρίσιμοι παράγοντες στη ρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs, καθώς συμβάλλουν στην προστασία των mRNAs από ποικίλες ριβονουκλεάσες. Έτσι, η αφαίρεση της πολυ(A) ουράς με απαδενυλίωση αποτελεί καθοριστικό βήμα για την αποτελεσματικότητα της αποικοδόμησης του mRNA. Η απορρύθμιση της αποικοδόμησης των mRNAs μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη σύνθεση προϊόντων ογκογονιδίων ή/και μείωση των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών, γεγονότα που οδηγούν στην ανάπτυξη του καρκίνου. Πρόσφατες μελέτες ενισχύουν τον πιθανό ρόλο των απαδενυλασών στην ανάπτυξη καρκίνου και την εμπλοκή τους στην εκδήλωση οξείας λευχαιμίας. Επιπλέον, μεταβολές της έκφρασης των απαδενυλασών, επηρεάζουν το μήκος της πολυ(A) ουράς και κατ' επέκταση τα επίπεδα έκφρασης ενός mRNA καθώς και τη σταθερότητά του. Στην παρούσα εργασία, με τη χρήση short-hairpin RNAs (shRNAs) έγινε αποσιώπηση των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6-LIKE, CNOT7, και CNOT8 σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά από καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα (NCI-H520). Ο έλεγχος για την επιτυχία της αποσιώπησης έγινε με ποσοτική Real Time PCR, όπου εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των απαδενυλασών σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος έφερε αλληλουχία που κωδικοποιεί shRNAs έναντι των συγκεκριμένων απαδενυλασών, και σε κύτταρα διαμολυσμένα με πλασμιδιακό φορέα που έφερε μια εξειδικευμένη αλληλουχία shRNA, η οποία δεν έχει ομολογία προς κανένα γνωστό γονίδιο των θηλαστικών (mock shRNA, MSH). Ακολούθησε μελέτη της κατάστασης πολυαδενυλίωσης επιλεγμένων mRNAs που σχετίζονται με τον καρκίνο και πιθανόν ελέγχονται ειδικά από συγκεκριμένες απαδενυλάσες. Έτσι, επιχειρήσαμε να εντοπίσουμε μεταβολές στα μήκη των πολυ(A) ουρών των επιλεγμένων mRNAs πραγματοποιώντας LM-PAT δοκιμασίες. Αυτές οι δοκιμασίες, αποκάλυψαν ότι το μήκος της πολυ(A) ουράς των επιλεγμένων mRNAs που εξετάσαμε πράγματι εμφάνισαν διαφορές μεταξύ MSH και knockdown κυττάρων, όπως είχε προβλεφθεί από προηγούμενες αναλύσεις μικροσυστοιχιών. Συλλογικά, τα αποτελέσματά μας ενισχύουν τις παρατηρήσεις μας σχετικά με την αποσαφήνιση του ρόλου των απαδενυλασών στη σταθερότητα των mRNAs και τον εντοπισμό πιθανών mRNAs στόχων αυτών των απαδενυλασών.

ABSTRACT

Deadenylases are exoribonucleases involved in mRNA degradation by promoting deadenylation and are considered major regulators of gene expression. Poly(A) tail and PABP proteins that bind to the poly(A) tail are critical factors in regulating mRNA stability, as they protect mRNA from various ribonucleases. Thus, removal of the poly(A) tail via deadenylation is a key step for the efficiency of mRNA degradation. Deregulation of mRNA degradation can lead to increased synthesis of oncogene products and/or reduction of tumor suppressor proteins, which lead to cancer development. Recent studies enhance the potential role of deadenylases in cancers and their involvement in acute leukemia. Furthermore, changes in deadenylase expression may affect the length of the poly (A) tail and thus the expression of mRNA levels and mRNA stability. In this work, NCI-H520 cells (human cell line of squamous cell carcinoma) were transfected with plasmid DNA containing short-hairpin RNAs (shRNAs) sequences targeting PARN, CNOT6, CNOT6-like, CNOT7, and CNOT8 deadenylases. The efficiency of the process of silencing was verified with quantitative RealTime PCR. Herein we examined the deadenylases mRNA levels in cells transfected with shRNAs, as well as in cells transduced with non-target shRNA vector served as control (mocksh RNA, MSH). Subsequently, we examined the polyadenylation status of selected cancer-related mRNAs, which possibly are specifically controlled by some deadenylases. The poly(A) tail lengths of chosen transcripts were directly measured using the ligation-mediated poly(A) tail length (LM-PAT) assay. These assays revealed that the poly(A) tail length of the chosen mRNAs we tested indeed exhibited changes between MSH and knockdown cells, as predicted from microarray analyses. Collectively, our results extend our observations on clarifying the role of specific deadenylases in mRNA stability, and identifying potential target mRNAs of these deadenylases.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA)

Το ριβονουκλεϊκό οξύ, ή αλλιώς RNA, είναι ένα πολυμερές μακρομόριο ζωτικής σημασίας με σημαντικό ρόλο στην κωδικοποίηση, τη ρύθμιση και την έκφραση των γονιδίων.

Οι τρεις κύριες τάξεις RNA είναι το αγγελιοφόρο (mRNA), το μεταφορικό (tRNA) και το ριβοσωμικό (rRNA).

- Το mRNA είναι ένα ενδιάμεσο μόριο το οποίο φέρει το αντίγραφο μιας αλληλουχίας DNA που αντιστοιχεί σε πρωτεΐνη.
- Τα tRNA είναι μικρά RNA τα οποία προμηθεύουν τα αμινοξέα που αντιστοιχούν σε κάθε συγκεκριμένο κωδικόνιο του mRNA.
- Τα rRNA είναι συστατικά του ριβοσώματος, ενός μεγάλου ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου που περιέχει πολλές πρωτεΐνες καθώς και συστατικά RNA και το οποίο στην πράξη παρέχει το μηχανισμό για τον πολυμερισμό των αμινοξέων σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα.

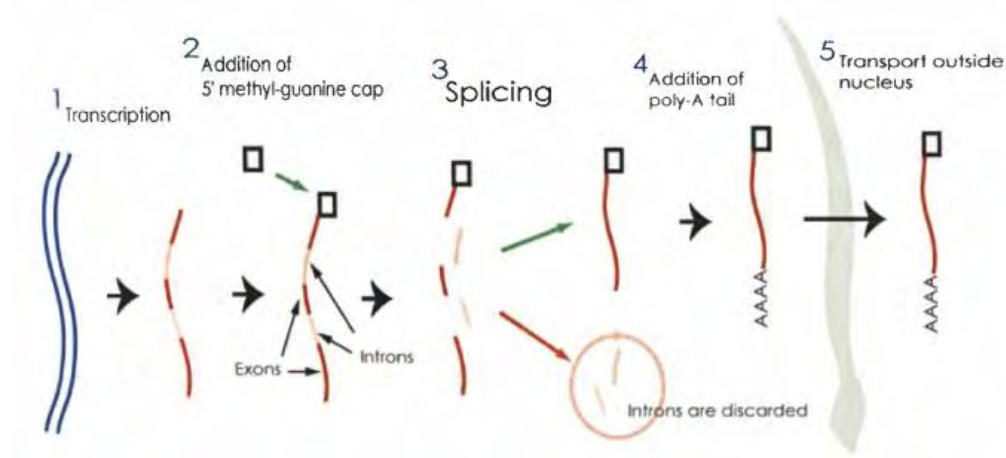
1.2 Το mRNA παράγεται με μεταγραφή

Το mRNA συντίθεται από το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) μέσω της διαδικασίας της μεταγραφής, η οποία παράγει ένα μονόκλωνο μόριο RNA όμοιο στην αλληλουχία με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Η μεταγραφή λαμβάνει χώρα στον πυρήνα. Η γένεση του mRNA είναι ένα στάδιο από τα πολλά που υπάρχουν για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης.

1.3 Ωρίμανση του mRNA

Το πρώτο ευκαρυωτικό mRNA (pre-mRNA) που συντίθεται υπόκειται σε μια διαδικασία ωρίμανσης η οποία δίνει το τελικό ώριμο mRNA. Η ωρίμανση περιλαμβάνει την προσθήκη του καλύμματος στο 5' άκρο (capping), την προσθήκη της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο (polyadenylation) και το μάτισμα (splicing) για την απομάκρυνση των ιντρονίων και τη συρραφή των εξωνίων (Εικόνα 1). Μόνο μετά την ολοκλήρωση όλων των τροποποιήσεων και της επεξεργασίας μπορεί το mRNA να εξαχθεί από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Κατά μέσο όρο, το mRNA

καθυστερεί περίπου 20 λεπτά για να εξέλθει από τον πυρήνα. Μόλις το mRNA εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα και μεταφράζεται.



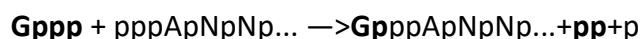
Εικόνα 1: Στάδια ωρίμανσης ευκαρυωτικού mRNA

1.4 Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει καλύπτρα

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



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



Το νέο κατάλοιπο G, που προστίθεται στο άκρο του RNA, έχει αντίστροφο προσανατολισμό (5'-5') από όλα τα άλλα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας. Η καλύπτρα αποτελεί υπόστρωμα για αρκετές αντιδράσεις μεθυλίωσης. Οι τύποι των καλυμμάτων διακρίνονται από το πλήθος των μεθυλίώσεων που φέρουν. Η πρώτη μεθυλίωση γίνεται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και αποτελείται από

την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στη θέση N7 της ακραίας γουανίνης, μια αντίδραση που καταλύεται από την 7-μεθυλο-τρανσφεράση της γουανίνης. Μιακαλύπτρα που έχει μόνο αυτή τη μεθυλομάδα ονομάζεται καλύπτρα 0 (cap 0).

Η παρουσία της καλύπτρας είναι κρίσιμη για την αναγνώριση από το ριβόσωμα και την προστασία από ριβονουκλεάσες (Lewin B, GENES VIII).

1.5 Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται

Αφού ολοκληρωθεί η μεταγραφή, το πρόδρομο mRNA λαμβάνει στο 3'-OH άκρο του μια αλληλουχία που αποτελείται από περίπου 250 νουκλεοτίδια αδενοσίνης, γνωστή ως πολυ(A) ουρά. Η διαδικασία αυτή, γνωστή ως πολυαδενυλίωση, πραγματοποιείται στον πυρήνα με τη δράση του ενζύμου πολυ(A)-πολυμεράση.

Η πολυ(A) ουρά εμποδίζει τις 3'→5' εξωνουκλεάσες να διασπάσουν το 3' άκρο. Επίσης, συμμετέχει σε διεργασίες όπως η έξοδος του mRNA στο κυτταρόπλασμα και από αυτή ξεκινά και το κύριο μονοπάτι αποικοδόμησης του mRNA. Η πολυαδενυλίωση μπορεί να επηρεάσει τόσο τη σταθερότητα του μηνύματος όσο και την έναρξη της μετάφρασης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να ενισχύσει τη μετάφραση των mRNA που ήδη μεταφράζονται σε χαμηλό επίπεδο, ή να ενεργοποιήσει τη μετάφραση ενός βωβού mRNA (Gorgoni and Gray, 2004). Στις διαδικασίες αυτές η πολυ(A) ουρά συμμετέχει κυρίως μέσω των πρωτεϊνικών παραγόντων που προσδένονται σε αυτή, και κυρίως την πολυ(A) προσδεόμενη πρωτεΐνη [poly(A)-binding protein, PABP]. Ένα μονομερές PABP των 70 kDa συνδέεται σε περίπου 24 βάσεις της πολυ(A) ουράς. Ο βασικότερος ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι αφενός να προστατεύει την ίδια την ουρά από αποικοδόμηση και αφετέρου να αλληλεπιδρά με άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες ρυθμίζοντας έτσι την βιωσιμότητα του mRNA. (Mitchell et al., 2001; Gorgoni and Gray, 2004).

Σχεδόν όλα τα κυτταρικά mRNAs περιέχουν πολυ(A) ουρά. Μια σημαντική εξαίρεση είναι τα mRNAs που κωδικοποιούν τις ιστόνες, ωστόσο η σημασία της απουσίας της πολυ(A) αυτής της περίπτωσης δεν είναι κατανοητή.

1.6 Σταθερότητα του mRNA

Ο κύκλος ζωής του ευκαρυωτικού mRNA είναι πιο παρατεταμένος από αυτόν του βακτηριακού. Η μεταγραφή στα ζωικά κύτταρα συμβαίνει με τη ίδια περίπου ταχύτητα που συμβαίνει και στα βακτήρια, δηλαδή περίπου 40 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο. Πολλά ευκαρυωτικά γονίδια είναι μεγάλα: ένα γονίδιο 10.000 bp χρειάζεται περίπου 5 λεπτά για να μεταγραφεί. Η μεταγραφή του

mRNA δεν τερματίζεται με την αποδέσμευση του ενζύμου της RNA πολυμεράσης από το DNA, αντίθετα, το ένζυμο συνεχίζει τη μεταγραφή και μετά το τέλος του γονιδίου. Μια συντονισμένη σειρά γεγονότων δημιουργεί το 3' άκρο του mRNA με αποκοπή ενός τμήματος και προσθήκη μιας αλληλουχίας πολυ(A) στο πρόσφατα δημιουργημένο 3' άκρο (Lewin B, GENES VIII).

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

Η ρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs στα ευκαρυωτικά κύτταρα παρέχει έναν μηχανισμό ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης. Στον καρκίνο, η απορρύθμιση των μηχανισμών που ελέγχουν τη σταθερότητα των mRNAs, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη παραγωγή ογκογόνων προϊόντων και/ή μείωση ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών (Kim and Lee, 2009).

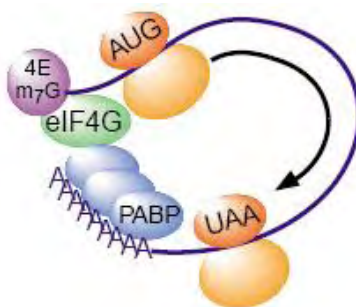
Οι διαδικασίες με τις οποίες ελέγχεται η σταθερότητα ή η αποικοδόμηση του mRNA επηρεάζονται από *cis*-δραστικά στοιχεία, όπως η πολυ(A) ουρά, η 5' καλύπτρα και τα στοιχεία AREs (AU-rich elements), και από *trans*-δραστικούς παράγοντες, όπως τα μη-κωδικά μόρια RNA (non-coding RNAs, ncRNAs), οι RNA-συνδεδεμένες πρωτεΐνες (RNA-binding proteins, RBPs) και οι ριβονουκλεάσες. (Kim and Lee, 2009).

Όσον αφορά τα *cis*-δραστικά στοιχεία της 5'-καλύπτρας και της πολυ(A) ουράς, φαίνεται ότι αυτά αποτελούν στοιχεία πρωταρχικής σημασίας για τη ρύθμιση του mRNA. Και η σταθερή συγκέντρωση αλλά και η αποτελεσματικότητα της μετάφρασης του ευκαρυωτικού mRNA, είναι ιδιαίτερα εξαρτώμενα από την καλύπτρα 7-μεθυλ-γουανοσίνης στο 5'-άκρο και την πολυ(A)ουρά στο 3'-άκρο του μορίου. Οι δομές αυτές δρουν ως σημαντικά στοιχεία αναγνώρισης από ρυθμιστικές και καταλυτικές πρωτεΐνες — όπως είναι οι ριβονουκλεάσες — καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής του mRNA (Garneau et al., 2007, Shatkin & Manley, 2000, Wilusz et al., 2001). Κατά την αποικοδόμηση του mRNA, η υδρόλυση και της 5'-καλύπτρας και της πολυ(A)ουράς αποτελούν κρίσιμα γεγονότα, και η αφαίρεση της πολυ(A)ουράς — με απαδενυλίωση από ριβονουκλεάσες — είναι συχνά το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποτελεσματικότητα της αποικοδόμησης του mRNA (Meyer et al 2004, Parker & Song 2004). Η αποτελεσματικότητα της απαδενυλίωσης, επηρεάζει κατ' αυτό τον τρόπο άμεσα τον ρυθμό της αποικοδόμησης του mRNA και κατά συνέπεια την συγκέντρωση ενός mRNA σε συγκεκριμένα στάδια ή φυσιολογικές συνθήκες. Για την ακρίβεια, η συγκέντρωση ενός mRNA καθορίζεται από τον λόγο της σύνθεσης και της αποικοδόμησης (Ross 1995), όπου η πολυ(A)πολυμεράσες (PAPs) και οι ριβονουκλεάσες (π.χ.

απαδενυλάσες) είναι υπεύθυνες για την σύνθεση και την αποικοδόμηση της πολυ(Α)ουράς, αντίστοιχα.

Η πολυ(Α) ουρά είναι από μόνη της μια εξαιρετικά δυναμική δομή. Το μήκος της ποικίλλει σημαντικά κατά τη διάρκεια της ζωής ενός mRNA και σε απόκριση σε διαφορετικά φυσιολογικά ερεθίσματα (Eckmann et al. 2011, Richter & Lasko 2011, Schoenberg & Maquat 2012, Wickens, 1990). Αρχικά, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, μετά τη σύνθεσή του στον πυρήνα, σχηματίζεται η πολυ(Α)ουρά των mRNAs με πολυαδενυλίωση, η οποία στα θηλαστικά, φτάνει μέχρι και 250 κατάλοιπα αδενοσίνης σε μήκος.

Κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνοσύνθεσης, η παρουσία της 5'-καλύπτρας και το μήκος της πολυ(Α)ουράς, παίζουν καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της έναρξης της μετάφρασης (Sachs and Varani 2000). Η δομή της 5'-καλύπτρας αναγνωρίζεται από τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E (Marcotrigiano et al. 1997, Hinnebusch and Lorsch 2012, Sonenberg and Dever 2003). Η αναγνώριση της 5'-καλύπτρας είναι σημαντική, καθώς καθορίζει την αποτελεσματική στρατολόγηση του ριβοσώματος στο mRNA. Το σύμπλοκο έναρξης eIF4F περιέχει επίσης τον παράγοντα eIF4G, ο οποίος με τη σειρά του αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική πολυ(Α)-συνδεόμενη πρωτεΐνη PABPC, που προσδένεται στην πολυ(Α)ουρά του mRNA. Η αλληλεπίδραση eIF4G και PABPC, κυκλοποιεί το mRNA φέρνοντας κοντά το 5' με το 3'-άκρο (Amrani et al. 2008, Tarun and Sachs 1996, Wells et al. 1998) (Εικόνα 2). Το κυκλοποιημένο mRNA διευκολύνει την στρατολόγηση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας και την επακόλουθη συγκρότηση του πλήρως λειτουργικού 80S ριβοσώματος. Έτσι, η παρουσία της 5'- m7G-καλύπτρας και της πολυ(Α)ουράς εγείρει την έναρξη και την επανέναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης και συνεπώς καθορίζουν την ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης.



Εικόνα 2. Η αλληλεπίδραση eIF4G και PABPC κυκλοποιεί το mRNA φέρνοντας κοντά το 5' με το 3'-άκρο.

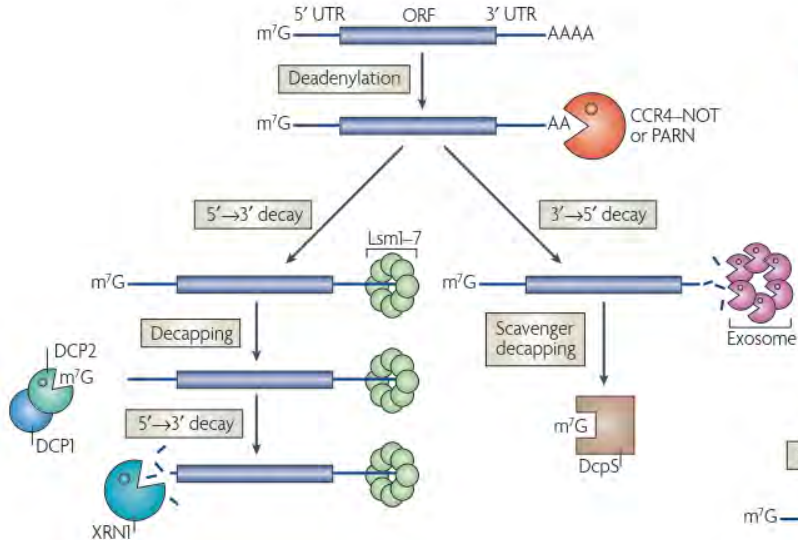
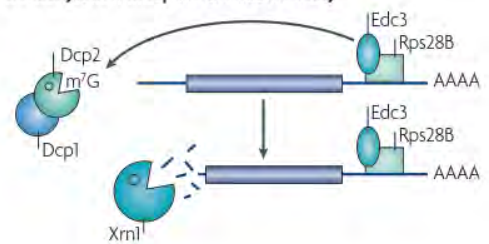
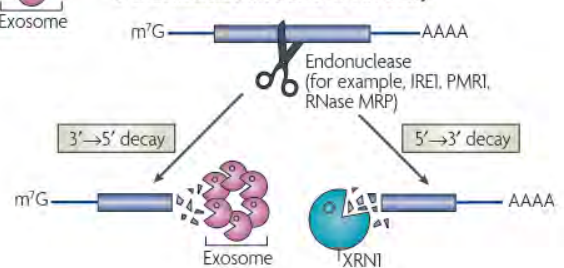
Η ρύθμιση της πολυ(Α)ουράς στο κυτταρόπλασμα, είναι στενά συνδεδεμένη με τον έλεγχο της μετάφρασης. Συνήθως μια πολυ(Α)ουρά μεγάλου μήκους σχετίζεται με αποτελεσματική πρωτεϊνοσύνθεση.

Από τα παραπάνω, είναι φανερό ότι οι καταλυτικές οντότητες που εμπλέκονται στη σύνθεση, την τροποποίηση, την επεξεργασία και την αποικοδόμηση της 5'-καλύπτρας και της πολυ(Α)ουράς, επηρεάζουν τη λειτουργία και την αφθονία του mRNA στο κύτταρο (Garneau et al. 2007, Goldstrohm and Wickens 2008, Meyer et al. 2004, Parker and Song, 2004, Schoenberg and Maquat 2012, Wu and Brewer 2012).

Οι ριβονουκλεάσες (RNases) αποτελούν μια ομάδα ενζύμων, η οποία τέμνει μόρια RNA — συμπεριλαμβανομένου των mRNAs — σε φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, έχοντας ως αποτέλεσμα ποικίλες βιολογικές συνέπειες. Οι ριβονουκλεάσες παίζουν μείζονα ρόλο, δρώντας με ενορχηστρωμένο τρόπο στη ρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs, ελέγχοντας μ' αυτό τον τρόπο τη γονιδιακή έκφραση στα κύτταρα των θηλαστικών οργανισμών (Parker and Song 2004). Πολλές ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των mRNAs, προάγοντας την απαδενυλίωσή τους, ενώ μερικές εξωριβονουκλεάσες, αποικοδομούν περαιτέρω τα απαδενυλιωμένα και /ή τα mRNAs, από τα οποία έχει αφαιρεθεί η 5'-καλύπτρα, στα 3' και/ή 5' άκρα τους, αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, οι ενδοριβονουκλεάσες, δεν προαπαιτούν την αφαίρεση της καλύπτρας ή απαδενυλίωση προκειμένου να δράσουν, τέμνοντας έτσι εσωτερικά τα mRNAs, παράγοντας προϊόντα που αποικοδομούνται περαιτέρω από άλλα ένζυμα (Εικόνα 3) (Kim and Lee 2009). Τα μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA αναλύονται περισσότερο σε επόμενες παραγράφους.

Σε συνθήκες έλλειψης μηχανισμών ελέγχου, οι ενδοουκλεάσες μπορεί να έχουν μια βαθιά επίδραση στη γονιδιακή έκφραση, καθώς μια και μόνο ενδοουκλεολυτική τμήση στο εσωτερικό του mRNA, συνεπάγεται την αδρανοποίησή του (Εικόνα 4C). Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που εμποδίζουν τέτοιου είδους ανώμαλης αποικοδόμησης των mRNAs, μέσω της ρύθμισης των ενδοουκλεασών. Για παράδειγμα, μερικές από αυτές έχει δειχθεί να είναι ισχυρά ρυθμιζόμενες μέσω κυτταρικών σημάτων (Clemens and Williams 1978, Sidrauski and Walter 1997, Peng and Schoenberg 2007). Μ' αυτό τον τρόπο, τα κύτταρα αποκρίνονται αποτελεσματικά στις αλλαγές του περιβάλλοντός τους με τη ρύθμιση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA.

Οι ριβονουκλεάσες μπορούν να δράσουν μόνες ή ενορχηστρωμένα με άλλους παράγοντες αποικοδόμησης, αλλά και μεταξύ τους, προκειμένου να προορίσουν mRNAs προς αποικοδόμηση. Οι απαδενυλάσες, όπως είναι η πολυ(Α)ριβονουκλεάση PARN (Poly(A)-specific ribonuclease) και οι υπομονάδες Caf1 and Ccr4 του συμπλόκου CCR4–NOT, αφαιρούν την πολυ(Α) ουρά του mRNA-στόχου, ενώ άλλα ένζυμα αφαιρούν την 5'-m7GmRNA καλύπτρα.

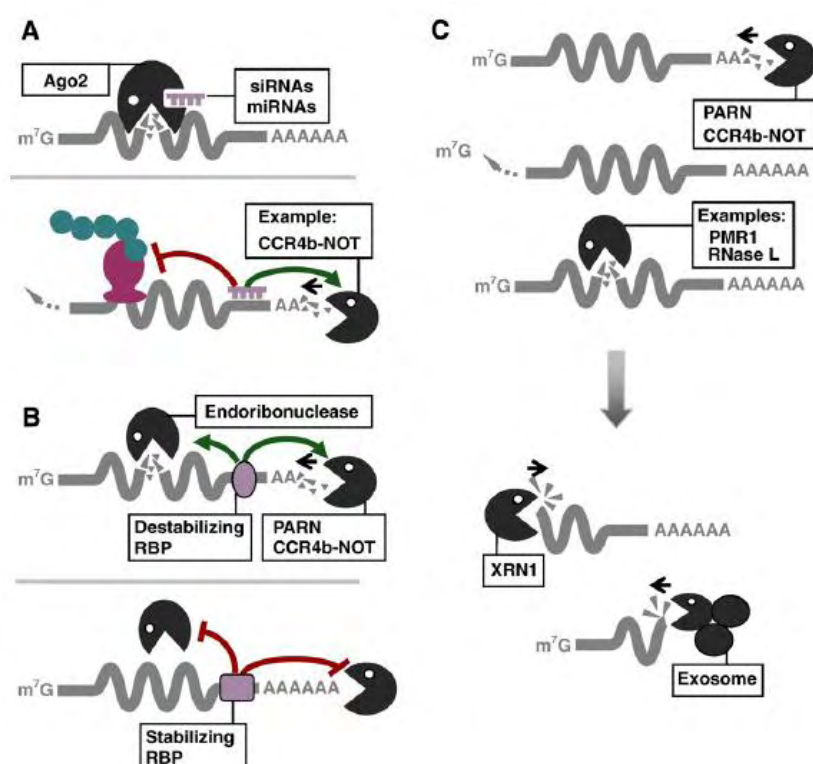
a Deadenylation-dependent mRNA decay**b Deadenylation-independent mRNA decay****c Endonuclease-mediated mRNA decay****Εικόνα 3:** Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA.

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι RNA-συνδεόμενες πρωτεΐνες (RNA-binding proteins, RBPs) μπορούν να επηρεάσουν δραματικά τη σταθερότητα των mRNAs (Paschoud et al. 2006, Gherzi, et al. 2006, Pulcrano et al. 2007). Αυτές δεν επιτρέπουν μόνο τη διακύμανση των χρόνων ημιζωής των mRNAs (Zhao et al. 2008), αλλά είναι επίσης ικανές να ελέγχουν το ρυθμό αποικοδόμησης συγκεκριμένων mRNAs ως απόκριση σε διαφορετικά ερεθίσματα. Η δράση αυτή έχει παρατηρηθεί σε μεταγράφα που κωδικοποιούν κυτταροκίνες ή πρωτο-ογκογονίδια, τα οποία φέρουν αλληλουχίες ARE στην 3'-αμετάφραστη περιοχή τους (3'-UTR) (Ross 1995).

Οι πρωτεΐνες RBPs μπορούν να προσδένονται στις 3' UTRs καθώς και στην κωδική περιοχή του mRNA και να τα προστατεύουν από διαδικασίες αποικοδόμησης. Έχει δειχθεί ότι η πρωτεΐνη HuR μπορεί να προάγει την υπερέκφραση ενός ογκογόνου βιοδείκτη, αυξάνοντας το χρόνο ημιζωής του mRNA του (Guo and Hartley 2006). Άλλες RBPs, όπως η KSRP, μπορούν να διεγείρουν την αποικοδόμηση πολλών κυτταρικών mRNAs τα οποία φέρουν τα στοιχεία ARE, μέσω στρατολόγησης ενδοριβονουκλεασών και παραγόντων απαδενυλίωσης προκειμένου να ρυθμίσουν την έκφρασή τους (Εικόνα 4B) (Gherzi et al. 2004, Chou et al. 2006, Mazan-Mamczarz and Gartenhaus 2007). Οι RBPs έχουν διαφορετικές επιδράσεις στα κύτταρα, που εξαρτώνται από τα mRNAs με τα οποία αλληλεπιδρούν. Για παράδειγμα, δείχθηκε ότι η υπερέκφραση της HuR είναι υπεύθυνη για την αύξηση ενός ογκογόνου mRNA στους ινοβλάστες (Sobue et al. 2008), ενώ η ίδια πρωτεΐνη μπορεί να σταθεροποιήσει ένα mRNA ογκοκατασταλτικού παράγοντα (Tumor Suppressor Gene, TSG), σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη (Quann et al. 2007). Η ρυθμιστική ικανότητα των RBPs

έγκειται στην ισορροπία μεταξύ της πυροδότησης ή της καθυστέρησης της αποικοδόμησης των mRNAs.

Έχει δειχθεί ότι οι πρωτεΐνες RBPs, καθώς και τα μη-κωδικά μόρια RNA (ncRNAs) μπορούν και στρατολογούν συστατικά του μονοπατιού απαδενυλίωσης, τα οποία σε συνδυασμό με άλλες ριβονουκλεάσες, ρυθμίζουν mRNA ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών παραγόντων (Valencia-Sanchez et al. 2006, Jackson ands tandart 2007). Η PARN αποτελεί ένα τέτοιο παράδειγμα (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Ρόλος των ριβονουκλεασών, των miRNAs και των RNA-συνδεόμενων πρωτεϊνών στη ρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs.

Τα μη-κωδικά μόρια RNAs (ncRNAs) είναι μετάγραφα οποιουδήποτε μεγέθους που δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. Από τα microRNAs (miRNAs) έως και μεγαλύτερα αντιονοματικά μετάγραφα, τα ncRNAs περιλαμβάνουν ένα σημαντικό κομμάτι των μεταγράφων του γονιδιώματος των θηλαστικών. Τα miRNAs είναι μικρά ncRNAs (μήκους 20-25 νουκλεοτίδια) που παράγονται από ενδονουκλεολυτική επεξεργασία μεγαλύτερων μεταγράφων μέσω μηχανισμών της παρεμβολής RNA (RNAi). Ο κύριος τρόπος δράσης τους στη γονιδιακή ρύθμιση είναι μέσω σύνδεσης στην 3'αμετάφραστη περιοχή (UTR) του mRNA, είτε για να αναστείλουν τη μετάφραση του mRNA είτε να προωθήσουν την αποικοδόμησή του. Η πρόσδεση ενός miRNA μέσω συμπληρωματικότητας στο mRNA, πυροδοτεί την

έναρξη της αποικοδόμησής του από την υπομονάδα AGO του συμπλόκου RISC, η οποία έχει ενεργότητα ριβονουκλεάσης. Εναλλακτικά, η πρόσδεση ενός miRNA στο mRNA, προκαλεί τη στρατολόγηση απαδενυλασών, ένζυμα τα οποία επιτελούν την βράχυνση της πολυ(Α)ουράς — το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμηση — ενώ παράλληλα καταστέλλεται και η μετάφραση του μεταγράφου (Εικόνα 4Α) (Kim and Lee, 2009).

Ειδικές αλληλουχίες στο εσωτερικό του mRNA μπορεί να το σταθεροποιούν ή να το αποσταθεροποιούν. Το πιο συνηθισμένο σημείο για στοιχεία αποσταθεροποίησης είναι μέσα στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή. Για παράδειγμα, τα mRNAs των οποίων οι 3'UTRs περιέχουν αλληλουχίες πλούσιες σε AU, μήκους περίπου 50 βάσεων (AU-rich elements, ARES), τείνουν να είναι ασταθή. Η παρουσία ενός τέτοιου στοιχείου προκαλεί την αποικοδόμηση του mRNA, μειώνοντας έτσι τη διάρκεια ζωής του.

1.7 Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA

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

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενες παραγράφους, στον πυρήνα, με την διαδικασία της απαδενυλίωσης περιορίζονται οι νεοοσυντιθέμενες πολυ(Α) ουρές, στο κατάλληλο μήκος. Οι πολυ(Α) ουρές όταν είναι σε προκαθορισμένο σωστό μήκος είναι απαραίτητες για την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα και όταν αυτό φτάσει στο κυτταρόπλασμα του προσδίδουν σταθερότητα και έναυσμα για μετάφραση. Στο κυτταρόπλασμα, η εκτεταμένη απαδενυλίωση του mRNA, πέρα από ένα συγκεκριμένο μήκος, σηματοδοτεί την αποικοδόμηση του.

Η αποικοδόμηση του mRNA συνήθως ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ(Α) ουράς στο 3' άκρο του από τις απαδενυλάσες (Tucker et al., 2000; Mitchell et al., 2001). Ακολουθώντας την απαδενυλίωση ένα ειδικό ένζυμο που ονομάζεται σύμπλοκο DCP1–DCP2 αφαιρεί το κάλυμμα, εκθέτοντας το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την XRN1, μια 5'→3' εξωνουκλεάση. Εναλλακτικά, μετά την απαδενυλίωση, το mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών (Μονοπάτι αποικοδόμησης εξαρτώμενο από την απαδενυλίωση) (Garneau et al., 2004; Anderson et al., 1998; Chen et al., 2001; Wang and Kiledjian, 2001; Mukherjee et al., 2002). Στην περίπτωση αυτή το κάλυμμα υδρολύεται από το DcpS (Liu et al., 2002) (Chen and Shyu, 2011) (Εικόνα 3α).

Υπάρχει βέβαια και το μονοπάτι αποικοδόμησης το οποίο είναι ανεξάρτητο της απαδενυλίωσης στον *S. cerevisiae*, όπου είναι απαραίτητη η στρατολόγηση της πρωτεϊνικής μηχανής απομάκρυνσης του καλύμματος (Εικόνα 3b). Ωστόσο η αποικοδόμηση ορισμένων μορίων mRNA μπορεί να ξεκινήσει με ενδονουκλεοτιδική διάσπαση είτε από ειδικές ενδονουκλεάσες είτε από το μηχανισμό του RNAi (Μονοπάτι αποικοδόμησης διαμεσολαβούμενο από ενδονουκλεάσες) (Dodson et al., 2002). Στο μονοπάτι αυτό μετά τη δράση των ενδονουκλεασών παράγονται δύο θραύσματα με απροστάτευτα άκρα, τα οποία και αποικοδομούνται στη συνέχεια με τη δράση του εξωσώματος και της XRN1 (Εικόνα 3c). Επίσης, τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν ειδικά μονοπάτια αποικοδόμησης που αναγνωρίζουν και αποικοδομούν ταχύτατα ανώμαλα mRNAs χρησιμοποιώντας τα ίδια ένζυμα που αποικοδομούν φυσιολογικά mRNAs.

1.8 Απαδενυλάσες

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, εκτός από τη δράση των ενδοριβονουκλεασών, η αποικοδόμηση των mRNAs στα κύτταρα των θηλαστικών, ξεκινά και με απαδενυλίωση (Parker and Song 2004).

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

Όλες οι γνωστές απαδενυλάσες είναι Mg^{2+} -εξαρτώμενα ένζυμα που μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες υπερικογένειες με βάση την παρουσία συγκεκριμένων συντηρημένων καταλοίπων στο καταλυτικό τους κέντρο. την υπερικογένεια DEDD ή την EEP. Η υπερικογένεια DEDD πήρε το όνομά της από τα καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu που βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ τριών μοτίβων εξωνουκλεάσης, τα οποία συντονίζονται από τα ιόντα Mg^{2+} . Τα μέλη αυτής της ομάδας περιλαμβάνουν τις POP2 (επίσης γνωστή ως CAF1 και περιλαμβάνει τις CNOT7 και CNOT8), CAF1Z, πολυ (Α)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN) και τις οικογένειες PAN2. Τα ένζυμα της υπερικογένειας EEP έχουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στην επικράτεια νουκλεάσης τους. Τα ένζυμα τύπου EEP περιλαμβάνουν τις CCR4 (CNOT6 και CNOT6L), Nocturnin και Angel.

Τα μέλη των οικογενειών POP2, CCR4, PAN2 και Angel είναι παρόντα σε όλους τους ευκαρυώτες, ενώ άλλες απαδενυλάσες είναι λιγότερο συντηρημένες (Goldstrohm and Wickens 2008). Η τεράστια ποικιλότητα και η ποικιλομορφία των απαδενυλασών υποδηλώνει πως πιθανότατα συγκεκριμένες απαδενυλάσες

στοχεύουν συγκεκριμένα mRNAs επιτάσσοντας τον έλεγχό τους στη δραστικότητα ενός μόνο ενζύμου. Από την άλλη, διαφορετικές απαδενυλάσες μπορούν να δράσουν στο ίδιο mRNA με διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες λειτουργίες. Στον πίνακα 1 παρουσιάζεται συνοπτικά η κατάταξη των απαδενυλασών στις δύο υπεροικογένειες καθώς και ενδεικτικά παραδείγματα ενζύμων που εντοπίζονται σε αντιπροσωπευτικά είδη οργανισμών.

Πίνακας 2. Κατάταξη των απαδενυλασών στις δύο μεγάλες υπεροικογένειες και εντοπισμός τους σε αντιπροσωπευτικά είδη οργανισμών.

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

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

Οι απαδενυλάσες όπως αναφέρθηκε, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γενική διαδικασία αποικοδόμησης του mRNA. Επιτελούν όμως και αρκετούς εξειδικευμένους, ρυθμιστικούς ρόλους. Κάποιες είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των οργανισμών, ενώ μεταλλάγματα άλλων επιφέρουν μια ποικιλία ενδιαφερόντων φαινοτύπων. Επιπλέον, συγκεκριμένες απαδενυλάσες είναι απαραίτητες για συγκεκριμένες βιολογικές διεργασίες, γεγονός που αποδεικνύει πως ο έλεγχος ορισμένων mRNAs είναι καθοριστικής σημασίας για την ομαλή λειτουργία αυτών των διεργασιών (Goldstrohm and Wickens, 2008; Parker and Song, 2004). Για παράδειγμα, αρκετές απαδενυλάσες, συμπεριλαμβανομένης της PARN του *Xenopus laevis*, είναι σημαντικές κατά την πρώιμη ανάπτυξη, ενώ άλλες απαιτούνται για τη γονιμότητα (όπως η CNOT7 στα ποντίκια) και τη μεταβολική ομοιόσταση.

Η ρύθμιση της δραστικότητας των απαδενυλασών είναι απαραίτητη, καθώς συνθήκες ανεξέλεγκτης απαδενυλίωσης θα οδηγούσαν σε καταστροφή και θάνατο

του κυττάρου. Σταθερά και μεταγραφικά ενεργά mRNAs πρέπει να προστατευθούν από την απαδενυλίωση ενώ τα ασταθή και μη φυσιολογικά θα πρέπει να απαδενυλώνονται και να οδηγούνται στην αποικοδόμηση.

Ο ρυθμός της απαδενυλίωσης ποικίλλει μεταξύ των διάφορων mRNAs. Αυτή η διαδικασία ελέγχεται από ρυθμιστικούς παράγοντες οι οποίοι προσδένονται σε εξειδικευμένες αλληλουχίες των mRNAs. Ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται συνήθως στις 3' αμετάφραστες περιοχές συγκεκριμένων mRNAs (3'-UTR) διαμεσολαβούν και ενισχύουν την απαδενυλίωση τους. Αυτά τα στοιχεία αναγνωρίζονται από παράγοντες οι οποίοι στρατολογούν τις απαδενυλάσες προωθώντας έτσι την απαδενυλίωση. Παραδείγματα παραγόντων που δεσμεύονται στις 3'-UTR περιοχές των mRNA, αποτελούν τα miRNAs και οι CUG-BP, PUF και CPEB πρωτεΐνες (Goldstrohm and Wickens 2008, Kadyrova et al. 2007, Hook et al. 2007). Εναλλακτικά, προώθηση της απαδενυλίωσης μπορεί να επιτευχθεί μέσω αλληλεπίδρασης της PABP —πρωτεΐνη που αναγνωρίζει και προσδένεται στην πολυ(Α)ουρά (Mitchell et al. 2001) — και συγκεκριμένων απαδενυλασών (π.χ η PABP στρατολογεί το σύμπλοκο PAN2-PAN3). Επίσης, το 5' κάλυμμα του mRNA μπορεί να επηρεάσει θετικά την απαδενυλίωση διεγείροντας την δραστικότητα και την ικανότητα επεξεργασίας κάποιων απαδενυλασών (χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η PARN). Ο ρυθμός απαδενυλίωσης επηρεάζεται από δύο μορφές χωρικού ελέγχου: τον πυρρηνο-κυτταροπλασματικό διαχωρισμό των απαδενυλασών και την εντόπισή τους σε κοκκία. Στην πρώτη περίπτωση, προβλήματα σωστού διαχωρισμού των απαδενυλασών μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος μπορούν να αποβούν μοιραία για την τύχη mRNAs που δεν θα έπρεπε να αποικοδομηθούν. Από τη άλλη μεριά, συγκεκριμένες απαδενυλάσες εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά κοκκία, τα οποία περιέχουν κατεσταλμένα mRNAs, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να ενεργοποιηθούν. Η συνεντόπιση αυτών των απαδενυλασών με τα υποστρώματά τους πιθανότατα διευκολύνει την κινητική της απαδενυλίωσης (Goldstrohm and Wickens 2008).

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

PARN

Η PARN αποτελεί μοναδική ευκαρυωτική ριβονουκλεάση με πολυ(Α) αποικοδομητική ενεργότητα. Είναι η μόνη απαδενυλάση που έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά άμεσα κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης της πολυ(Α) ουράς και με τη

δομή της 5'-καλύπτρας και με την πολυ(A) ουρά του mRNA (Dehlin et al. 2000, Gao et al. 2000, Martinez et al. 2000, 2001). Η ιδιότητα αυτή υπαινίσσεται ότι η PARN συμμετέχει στον μεταβολισμό του mRNA και ότι είναι πιθανός ρυθμιστής των ευκαρυωτικών mRNAs, αφού είναι τα μόνα που φέρουν καλύπτρα και πολυ(A) ουρά.

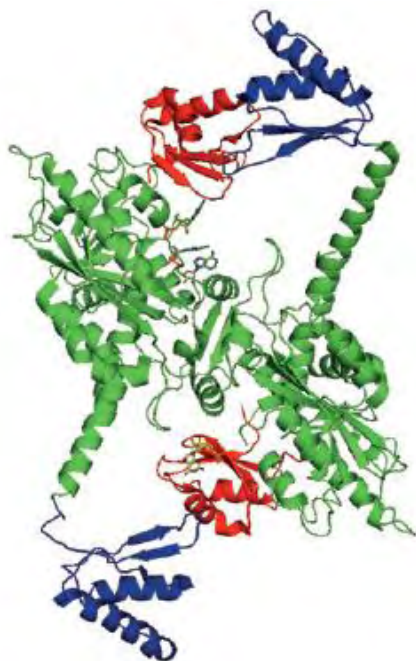
Η PARN ανήκει στην DnaQ-like υπερικογένεια των 3'-5' εξωριβονουκλεασών (Körner et al. 1998, Mian 1997, Moser et al. 1997), οι οποίες μοιράζονται έναν συντηρημένο καταλυτικό πυρήνα, που περιέχει το DEDD μοτίβο αποτελούμενο από τα τέσσερα καταλυτικά αμινοξέα Asp, Glu, Asp και Asp (Marchler-Bauer et al. 2011, Zuo and Deutscher 2001). Συνίσταται από 639 αμινοξέα, με προβλεπόμενο μοριακό βάρος 73.5 kDa (Körner et al. 1998, Martinez et al., 2000). Η αμινοτελική περιοχή της φαίνεται να είναι πιο συντηρημένη ανάμεσα στα ομόλογα της PARN στους οργανισμούς, σε αντίθεση με την καρβοξυτελική. Η PARN έχει ενεργότητα εξαρτώμενη από δισθενή ιόντα Mg^{2+} και απαιτεί ως υπόστρωμα μονόκλωνο RNA, με ελεύθερη ομάδα υδροξυλίου στο 3'-άκρο του (Korner and Wahle 1997).

Όσον αφορά τη δομή της PARN, ο καταλυτικός πυρήνας της σχηματίζει μία αρνητικά φορτισμένη κοιλότητα, η οποία εντοπίζεται σε μία επικράτεια, επονομαζόμενη ως επικράτεια νουκλεάσης (Körner et al. 1998, Ren et al. 2002a,b, Wu et al. 2005) (Εικόνα 6). Παράλληλα με την επικράτεια νουκλεάσης, δύο άλλες νουκλεάσες με RNA-συνδεόμενες ιδιότητες, έχουν προσδιοριστεί στην PARN. Το μοτίβο αναγνώρισης RNA, RRM (Copeland and Wormington 2001, Monecke et al. 2008, Nagata et al. 2008, Nilsson et al. 2007, Wu et al. 2009) και το μοτίβο αναγνώρισης RNA, αναφερόμενο ως επικράτεια R3H (Wu et al. 2005). Η RRM επικράτεια απαιτείται για την πρόσδεση της 5'-m7G-καλύπτρας (Nilsson et al. 2007), ενώ η R3H για την σύνδεση της PARN στην πολυ(A)ουρά (Wu et al. 2005). Επίσης έχει προταθεί η RRM επικράτεια να σταθεροποιεί την συνολική τρισδιάστατη δομή της PARN (Zhang et al. 2007). Οι περιοχές των επικρατειών και τα αμινοξέα λειτουργικής σημασίας φαίνονται στην Εικόνα 5.



Εικόνα5: Σχηματική αναπαράσταση των επικρατειών της ανθρώπινης απαδενυλάσης PARN (639 αα), όπου με πράσινο χρώμα αναπαρίσταται η επικράτεια ριβονουκλεάσης, με μπλε η επικράτεια R3H, με κόκκινο η επικράτεια RRM, και με λευκό η μη συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή. Αναπαρίστανται επίσης και τα λειτουργικώς σημαντικότερα αμινοξέα της πρωτεΐνης.

Η PARN σχηματίζει ένα στενά συνδεδεμένο ομοδιμερές, οι υπομονάδες του οποίου συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω μιας πλούσιας σε αρωματικό αμινοξέα διεπιφάνεια και από έναν δισουλφιδικό δεσμό (...S—S...) που ενώνει τις δύο επικράτειες νουκλεάσης της PARN (Martinez et al. 2000, Wu et al. 2005, 2009, Niedzwiecka et al. 2011) (Εικόνα 22). Έχει δειχθεί ότι ο διμερισμός αυτός είναι ζωτικής σημασίας για την ικανότητα κατάλυσης της PARN (Wu et al. 2005).



Εικόνα 6: Τρισδιάστατη διμερής δομή της ανθρώπινης απαδενυλάσης PARN, όπου με πράσινο χρώμα αναπαρίσται η δομή που προκύπτει από την επικράτεια ριβονουκλεάσης, με μπλε η δομή από την επικράτεια R3H, και με κόκκινο η δομή από την επικράτεια RRM.

Η PARN συμμετέχει σε μια σειρά κυτταρικών μηχανισμών και αποκρίσεων. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται σε κυτταρική απόκριση στο στρες (Cevher et al., 2010, Reinhardt et al., 2010), στην αποικοδόμηση των πολλαπλά ματισμένων HIV-1 mRNAs κατά τη μόλυνση από HIV-1 (Zhu et al., 2011). Επίσης, έχει προταθεί ως ένας πιθανός δείκτης της καρκινικής ανάπτυξης (Maragozidis et al., 2012).

Η PARN εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα, όμως μέσω παλινδρομικής κίνησης μπορεί και μετακινείται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (Yamashita et al., 2005, Uhlen et al., 2010) ενώ στον πυρήνα, βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στα nucleoli και στα Cajal bodies (Berndt et al., 2012). Έτσι, με έκπληξη, βρέθηκε ότι η PARN δεν εμπλέκεται αποκλειστικά μόνο στη ρύθμιση της λειτουργίας των mRNAs, αλλά συμμετέχει επίσης και στην επεξεργασία μη-κωδικών μορίων RNA, όπως είναι τα μικρά nucleolar RNAs (snoRNAs) και τα μικρά Cajal body RNAs (scaRNAs) (Berndt et al., 2012).

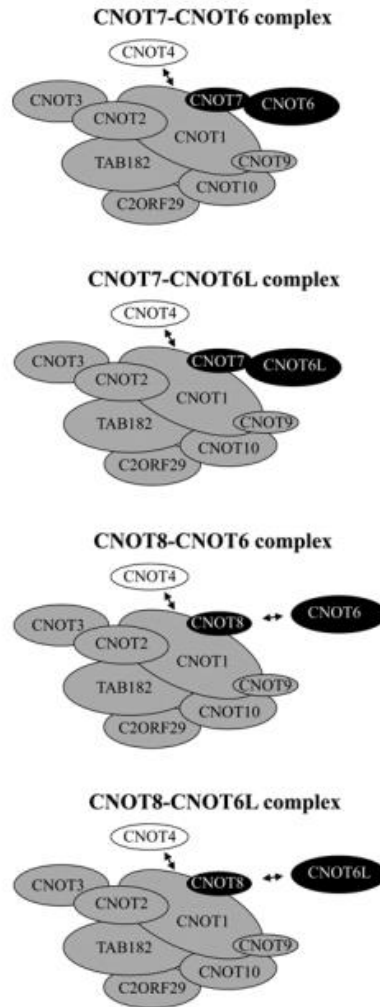
Το σύμπλοκο CCR4-NOT

Το σύμπλοκο Ccr4-Not είναι ένα συντηρημένο συγκρότημα πολλών υπομονάδων παρόν σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, που συμβάλλει στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε όλα τα στάδια, από την παραγωγή του mRNA στον πυρήνα μέχρι την αποικοδόμησή τους στο κυτταρόπλασμα. Συστατικά του Ccr4-Not έχουν εντοπιστεί τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα (Martine 2012).

Έρευνες δείχνουν ότι το Ccr4-Not στον άνθρωπο αποτελείται από έναν πυρήνα επτά υπομονάδων οι οποίες περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT9, CNOT10, TAB182 και C2ORF29 και τις συνδεδεμένες απαδενυλάσες CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 (Εικόνα 6). Η συνδυασμένη μοριακή μάζα αυτών των συστατικών είναι περίπου 0,9 MDa (Lau et al 2009).

Έχει βρεθεί ότι αρκετές πρωτεΐνες CNOT (CNOT2, CNOT7, CNOT8 και CNOT9) αλληλεπιδρούν με τη μεγαλύτερη υπομονάδα του συμπλόκου, τη CNOT1, υποδεικνύοντας ότι η τελευταία δρα ως ικρίωμα. Τα ανθρώπινα κύτταρα περιέχουν πολλές απαδενυλάσες οι οποίες έχουν διαφορετικές ιδιότητες πρόσδεσης. Πειράματα δείχνουν ότι η CNOT6 αλληλεπιδρά λιγότερο σταθερά με τη CNOT8 σε σύγκριση με τη CNOT7. Οι CNOT7 και CNOT8 συνδέουν τη CNOT6 με το υπόλοιπο CCR4-Not. Επίσης, η CNOT3 δεν συνδέεται άμεσα με τη CNOT1 συνδέεται όμως με τη CNOT2 (Εικόνα 6).

Στη ζύμη, το Ccr4-Not περιέχει δύο υπομονάδες με δράση απαδενυλάσης, τις Ccr4p και Caf1p. Τα ανθρώπινα κύτταρα περιέχουν δύο ορθόλογα της Ccr4p, τις CNOT6/hCcr4a και CNOT6L/hCcr4b (ανήκουν στην κατηγορία EEP), και δύο ορθόλογα της Caf1p, τις CNOT7 και CNOT8 (ανήκουν στην κατηγορία DEDD). Όλα αυτά τα ορθόλογα έχουν δράση 3' → 5' πολυ(A) εξωριβονουκλεάσης in vitro. Οι εξαιρετικά ομόλογες πρωτεΐνες CNOT7 και CNOT8 βρίσκονται σε ξεχωριστά σύμπλοκα. Είναι πιθανό ότι οι CNOT7 και CNOT8 ανταγωνίζονται για την ίδια θέση δέσμευσης με την CNOT1 επιτρέποντας τη σύνδεση είτε με τη CNOT7 είτε με τη CNOT8. Επιπλέον, η ύπαρξη της CNOT6 αποκλείει την παρουσία της CNOT6L και το αντίστροφο. Γίνεται κατανοητό ότι μόνο μια υπομονάδα της κατηγορίας DEDD και μια υπομονάδα της κατηγορίας EEP μπορούν να είναι παρόντα σε ένα συγκεκριμένο σύμπλοκο.



Εικόνα 7: Μοντέλο του ανθρώπινου συμπλόκου Ccr4-Not. Οι σταθερές υπομονάδες απεικονίζονται με γκρι χρώμα και οι μεταβλητές απαδενυλάσες με μαύρο. Τα βέλη μεταξύ των CNOT6/CNOT6L και CNOT8 δείχνουν την λιγότερο σταθερή αλληλεπίδρασή τους.

Πιστεύεται ότι οι Pan2-Pan3 απαδενυλάσες είναι αυτές που ξεκινούν την αποικοδόμηση της πολυ(A) ουράς και ακολούθως το σύμπλοκο CCR4-NOT αποικοδομεί το εναπομείναν τμήμα της πολυ(A)ουράς (Yamashita et al., 2005). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τα επικρατή στοιχεία, στα κύτταρα των θηλαστικών η απαδενυλίωση του mRNA διεξάγεται ως επί το πλείστον από το σύμπλοκο CCR4-NOT ενώ ο ρόλος της PARN προορίζεται για ειδικές περιπτώσεις ή περιστάσεις. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι η PARN επάγεται και ενεργοποιείται μέσω της ακτινοβολίας UV (Harnisch et al. 2012).

1.9 Απαδενυλάσες στον καρκίνο

Στον καρκίνο, η απορρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη σύνθεση των προϊόντων ογκογονιδίων ή/και μείωση των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών. Οι απαδενυλάσες είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες που ελέγχουν την αφθονία των mRNAs, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Ο ρόλος των ριβονουκλεασών, και συγκεκριμένα των απαδενυλασών διαφαίνεται καθοριστικής σημασίας για τη σταθερότητα των mRNAs. Μείωση της αποικοδόμησης των mRNAs σε παθολογικές καταστάσεις, μπορεί να απορρέει άμεσα μέσω υπερέκφρασης των παραγόντων που σταθεροποιούν το mRNA, ή μέσω υποέκφρασης των αποσταθεροποιητικών παραγόντων, όπως είναι οι απαδενυλάσες. Κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει σε μία επιμηκυμένη σταθερή κατάσταση των επιπέδων των ογκογόνων mRNAs, με αποτέλεσμα την πρόκληση του καρκίνου. Παράδειγμα καταστολής των ριβονουκλεασών που μπορεί να συμβάλει στη μείωση της αποικοδόμησης του mRNA αποτελούν στοιχεία ερευνών, σύμφωνα με τα οποία η έκφραση της P-γλυκοπρωτεΐνης αυξάνει κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης σε αρουραίους και το mRNA της φαίνεται να έχει επιμηκυμένο χρόνο ημιζωής σε καρκίνους του ήπατος σε σύγκριση με μη παθολογικούς ιστούς. Η Pgp είναι μια πρωτεΐνη μεταφοράς που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη και σχετίζεται με την πολυφαρμακευτική αντίσταση σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές. Στα υγιή ηπατικά κύτταρα, το mRNA της Pgp πιστεύεται ότι αποικοδομείται από ενδονουκλεάσες ή / και εξωνουκλεάσες. Ωστόσο, ο παρατεταμένος χρόνος ζωής του mRNA και τα μικρά επίπεδα αποικοδόμησής του σε όγκους του ήπατος συνάδουν με μελέτες που έδειξαν σημαντική μείωση της δράσης των ριβονουκλεασών σε καρκίνους του ήπατος (Kim and Lee 2009). Από την άλλη, αυξημένα επίπεδα ριβονουκλεασών μπορούν επίσης να προωθήσουν την ογκογένεση. Για παράδειγμα, η αγγειογενίνη που ανήκει στην οικογένεια των ριβονουκλεασών, μπορεί να επεξεργαστεί 28S και 18S rRNAs και η δράση της είναι απαραίτητη για την αγγειογένεση. Μελέτες έχουν δείξει υπερέκφραση της αγγειογενίνης σε πολλά δείγματα όγκου και η έκφρασή της συσχετίζεται με την εξέλιξη του όγκου και την κακή πρόγνωση.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση αρκετών απαδενυλασών, συμπεριλαμβανομένων των PARN, CNOT6L και CNOT8 μεταβάλλεται σε δείγματα καρκίνου εκ πλάκωδων κυττάρων του πνεύμονα (Maragozidis et al. 2015) ενώ στην οξεία λευχαιμία βρέθηκε αλλαγμένη η έκφραση των PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7 (Maragozidis et al. 2012). Στην δεύτερη περίπτωση, τα αυξημένα επίπεδα των PARN και CNOT6 ενδέχεται να αντισταθμίζουν τη μειωμένη έκφραση των CNOT6L και/ή CNOT7.

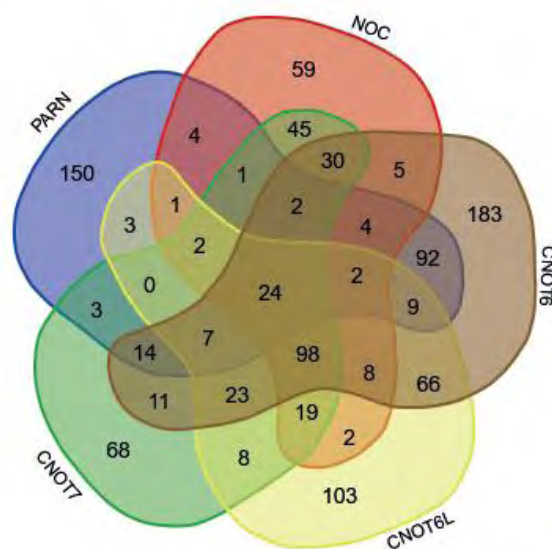
Επιπλέον, οι απαδενυλάσες CNOT6L και PARN έχουν συσχετιστεί με την έκφραση συγκεκριμένων mRNAs που σχετίζονται με τον καρκίνο. Η CNOT6L, που πιθανολογείται ότι είναι προϊόν πρωτο-ογκογονιδίου. Σε φυσιολογικές συνθήκες, το

ένζυμο φάνηκε να ρυθμίζει τα επίπεδα του mRNA του p27Kip1, ενός ογκοκατασταλτικού παράγοντα που αναστέλλει τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες Cdk, και να προάγει την κυτταρική ανάπτυξη. Επιπλέον, όταν κύτταρα στερούνταν την CNOT6L, τα επίπεδα του p27Kip1 ήταν αυξημένα, ενώ η κυτταρική αύξηση μειωμένη (Morita et al., 2007). Η PARN, από την άλλη μπορεί να δράσει δυνητικά ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας, προκαλώντας αποικοδόμηση mRNAs που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες, όπως είναι η IL-8 και ο VEGF (Maragozidis et al. 2015). Επίσης, η PARN και το σύμπλοκο εξωσώματος φαίνεται να στρατολογούνται από τον KSRP και/ή τον DHAU, συμμετέχοντας στην αποσταθεροποίηση πολλών mRNAs, συμπεριλαμβανομένου των c-jun και uPA τα οποία είναι αυξημένα στους διαφόρους τύπους καρκίνων (Chou, et al. 2006, Tran, et al. 2003).

1.10 Επιλεγμένα mRNAs που σχετίζονται με τον καρκίνο

Σε προηγούμενες μελέτες έγινε προσπάθεια κατανόησης της επίδρασης των απαδενυλασών στη γονιδιακή έκφραση στο καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα (SCC). Σε αυτές τις μελέτες, πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση συγκεκριμένων απαδενυλασών σε κύτταρα NCI-H520 και με τη χρήση μικροσυστοιχιών βρέθηκαν ορισμένα μετάγραφα με αυξημένα επίπεδα έκφρασης, σε σύγκριση με κύτταρα WT (Εικόνα 8). Αυτά τα μετάγραφα αποτελούν πιθανούς στόχους των απαδενυλασών καθώς η διαγραφή των ενζύμων μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη σταθερότητα των mRNAs (Maragozidis et al, 2015).

Στη συγκεκριμένη εργασία, μελετήσαμε 2μετάγραφα που εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης μετά από αποσιώπηση της CNOT6, τα ERHA7 και ROBO2, και το μετάγραφο CYTH4 που εμφάνισε αυξημένη έκφραση μετά από αποσιώπηση της CNOT6L. Αυτοί οι παράγοντες αποτελούν πιθανούς αποκλειστικούς στόχους της κάθε απαδενυλάσης. Η εμπλοκή των συγκεκριμένων μεταγράφων στον καρκίνο του πνεύμονα αναλύεται στις επόμενες παραγράφους.



Εικόνα 8: Μετάγραφα που εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης μετά από αποσιώπηση απαδενυλασών στην κυτταρική σειρά NCI-H520.

ΕΡΗΑ7

Ο παράγοντας ΕΡΗΑ7 (Ephrin type-A receptor 7) ανήκει στην υποοικογένεια των υποδοχέων εφρίνης (Ephs), οι οποίοι αποτελούν τη μεγαλύτερη γνωστή υποοικογένεια υποδοχέων κινάσης τυροσίνης. Οι υποδοχείς Eph ενεργοποιούνται μετά από σύνδεσή τους με τις πρωτεΐνες εφρίνες και εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η αλληλεπίδραση κυττάρου-κυττάρου, η κυτταρική συγκόλληση και μετανάστευση, ο σχηματισμός ορίων μεταξύ ιστών/κυττάρων και η αγγειογένεση. (Surawska et al 2004).

Οι υποδοχείς Eph έχουν μελετηθεί για τους πιθανούς τους ρόλους στην ανάπτυξη του καρκίνου. Για παράδειγμα, στον καρκίνο του παχέος εντέρου έχουν παρατηρηθεί μειωμένα επίπεδα έκφρασης του ΕΡΗΑ7 (Wang et al 2007). Αντιθέτως, έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση του ΕΡΗΑ7 σε πολλές μορφές καρκίνου και στους περισσότερους καρκίνους του πνεύμονα στον άνθρωπο. Μεταλλάξεις στα γονίδια των Ephs και των εφρινών φαίνεται να συσχετίζονται με διαφορετικούς τύπους καρκίνου (Lisabeth et al, 2013).

Η εκκρινόμενη μορφή του mRNA του ΕΡΗΑ7 (ΕΡΗΑ7-S) βρέθηκε σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα. Ο ρόλος της μορφής ΕΡΗΑ7-S στο μηχανισμό καρκινογένεσης στον πνεύμονα του ανθρώπου δεν είναι σαφής, αλλά η παρουσία της θα μπορούσε να αποκλείσει το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα από τις υπόλοιπες κατηγορίες, δηλαδή, το καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων, το μικροκυτταρικό καρκίνωμα και το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα, καθώς η έκφραση της μορφής ΕΡΗΑ7-S παρατηρήθηκε κυρίως σε μη-αδενοκαρκινώματα (Masaru et al 2009). Επίσης, στοιχεία δείχνουν ότι ο παράγοντας ΕΡΗΑ7 μπορεί να έχει ρόλο

ογκογονιδίου στην καρκινογένεση του πνεύμονα, ωστόσο απαιτούνται κλινικές μελέτες για να επιβεβαιώσουν κάτι τέτοιο. Έρευνες έδειξαν, ακόμη, ότι ο ERHA7 δρα είτε ως ογκογονίδιο σε ένα όργανο, είτε ως ογκοκατασταλτικό σε άλλο.

ROBO2

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *Robo2* ανήκει στην οικογένεια ROBO που είναι μέλος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας της πρωτεΐνης slit homolog 2 και παίζει ρόλο στην ανάπτυξη νευρικού συστήματος, τη μετανάστευση των κυττάρων, και άλλες αναπτυξιακές διαδικασίες σε διάφορα όργανα, όπως οι πνεύμονες, το ήπαρ και τα νεφρά.

Στους περισσότερους τύπους καρκίνου, το σηματοδοτικό μονοπάτι Slit/Robo έχει ογκοκατασταλτική δράση καθώς αναστέλλει την κυτταρική διήθηση και μετανάστευση. Επίσης, στον καρκίνο του πνεύμονα έχει παρατηρηθεί καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης Slit2 (Rishi K. Gara et al, 2015).

Ομόζυγες εξαλείψεις ή απώλεια ετεροζυγωτίας στο χρωμόσωμα 3p12 είναι κοινά χαρακτηριστικά των καρκινωμάτων του πνεύμονα και πολλών άλλων κακοηθειών. Επειδή η κρίσιμη αυτή περιοχή περιέχει το γονίδιο *Robo2* (τα εξώνια 1 και 2 του ανθρώπινου *Robo2* βρίσκονται σε ένα εγγενώς ασταθές τμήμα DNA στο χρωμόσωμα 3p12.3.), έχει εξαχθεί το συμπέρασμα ότι αυτό το γονίδιο μπορεί να λειτουργεί μόνο ως ογκοκατασταλτικό (Ying et al 2006).

CYTH4

Το γονίδιο *Cyth4* κωδικοποιεί ένα μέλος της οικογένειας cytohesin (CYTH), παλαιότερα γνωστής ως οικογένεια PSCD (pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains). Τα μέλη αυτής της οικογένειας λειτουργούν ως παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEFs) για παράγοντες ADP-ριβοσυλίωσης (ARFs). Η πρωτεΐνη cytohesin-4, εκφράζεται κυρίως στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Οι παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης είναι πρωτεΐνες ή περιοχές πρωτεϊνών (domains) που ενεργοποιούν μονομερείς GTPάσες διεγείροντας την απελευθέρωση της διφωσφορικής γουανοσίνης (GDP) ώστε να επιτραπεί η σύνδεση της τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP). Οι GTPάσες δρουν ως μοριακοί διακόπτες σε ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης και έχουν πολλούς καθοδικούς στόχους. Οι πιο γνωστές GTPases περιλαμβάνουν την

υπεροικογένεια Ras και εμπλέκονται σε απαραίτητες κυτταρικές διεργασίες όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός, η οργάνωση του κυτταροσκελετού και η πυρηνική μεταφορά. Οι GTPάσες είναι ενεργές όταν συνδέονται με GTP και ανενεργές όταν συνδέεται με το GDP, επιτρέποντας τη δραστηριότητά τους να ρυθμίζεται από τις GEFs και τις πρωτεΐνες απενεργοποίησης GTPάσης (GAPS). Οι παράγοντες ριβοζυλίωσης του ADP (ARFs) της υπερικογένειας Ras είναι πρωτεΐνες που συνδέονται με GTP (GTPases) και χρειάζονται βοήθεια από άλλες πρωτεΐνες για την εναλλαγή δέσμευσης μεταξύ GTP και GDP. Οι GAPS αναγκάζουν τις πρωτεΐνες ARF να υδρολύουν το δεσμευμένο GTP σε GDP, και οι παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης αναγκάζουν τις ARF να δεσμεύσουν ένα νέο μόριο GTP στη θέση ενός δεσμευμένου GDP.

Όσον αφορά τον καρκίνο, οι GEFs είναι πιθανός στόχος για την θεραπεία της ασθένειας λόγω του ρόλου τους σε πολλές οδούς σηματοδότησης, ιδιαίτερα τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Για παράδειγμα, πολλοί τύποι καρκίνου προκαλούνται από μεταλλάξεις στο μονοπάτι MAPK/ERK και οδηγούν σε ανεξέλεγκτη ανάπτυξη. Η GEF SOS1 ενεργοποιεί τις Ras, των οποίων στόχος είναι η κινάση Raf. Η Raf είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο επειδή μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη αυτή έχουν βρεθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου (Quilliam et al., 2002). Η Rho GTPάση Vav1, η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί από τον υποδοχέα GEF, έχει δειχθεί ότι προάγει τον πολλαπλασιασμό των όγκων σε καρκίνο του παγκρέατος (Fernandez-Zapico et al., 2005). Οι GEFs αντιπροσωπεύουν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους, δεδομένου ότι μπορούν ενδεχομένως να παίζουν ρόλο στη ρύθμιση αυτών των οδών μέσω της ενεργοποίησης των GTPασών.

Στοιχεία ερευνών έχουν δείξει, επίσης, την εμπλοκή των πρωτεϊνών cytohesins στην ενεργοποίηση των υποδοχέων ErbB. Υπερβολική σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων αυτών μπορεί να είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη πολλών τύπων καρκίνου (Cho, and Leahy, 2002).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

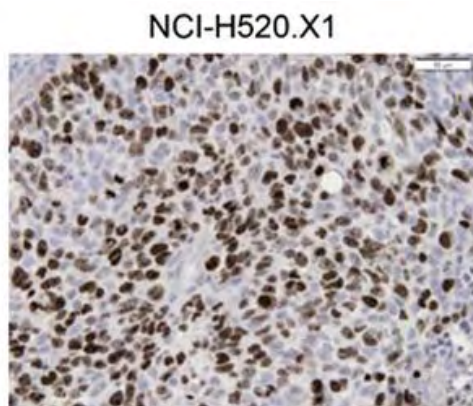
Πολλά ένζυμα αποικοδόμησης του mRNA, γνωστά ως ριβονουκλεάσες, συσχετίζονται με την ανάπτυξη ανθρώπινων καρκίνων. Οι απαδενυλάσες είναι εξωριβονουκλεάσες που επιτελούν τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο του mRNA, μια διαδικασία που είναι συχνά το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποτελεσματικότητα της αποικοδόμησής του. Η ρύθμιση της αποικοδόμησης του mRNA είναι κρίσιμη για την εμφάνιση καρκίνου, καθώς μειωμένη αποικοδόμηση του mRNA μπορεί να σταθεροποιήσει και να παρατείνει τα επίπεδα ογκογόνων μορίων, που συχνά οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης. Από την άλλη, αυξημένοι ρυθμοί αποικοδόμησης του mRNA μπορεί να προκαλέσουν ογκογένεση μέσω μείωσης ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών. Δημοσιεύσεις και προκαταρκτικές μελέτες από το εργαστήριο δείχνουν πως συγκεκριμένες απαδενυλάσες στοχεύουν επιλεκτικά συγκεκριμένα μετάγραφα, ενώ άλλα μετάγραφα μπορούν να επηρεάζονται από περισσότερες.

Στόχος της παρούσης πειραματικής διαδικασίας είναι να μελετήσουμε την επίδραση των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6-LIKE, CNOT7 και CNOT8 στη σταθερότητα των επιλεγμένων mRNAs των παραγόντων ERHA7, ROBO2 και CYTH4. Η επιλογή των παραγόντων έγινε με βάση δεδομένα και δημοσιεύσεις του εργαστηρίου και το γνωστό ρόλο των παραγόντων αυτών στον καρκίνο. Αναμένεται έτσι να έχουμε πληρέστερη εικόνα για το ρόλο των επιλεγμένων απαδενυλασών στη σταθερότητα των συγκεκριμένων mRNA και τη σημασία των ενζύμων στις αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης που παρατηρείται στον καρκίνο.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Κυτταρικές σειρές – Χειρισμοί

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά NCI-H520. Πρόκειται για ανθρώπινη κυτταρική σειρά από καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα. Τα κύτταρα της κυτταρικής αυτής σειράς σχηματίζουν μονόστιβες επιθηλιακές επιφάνειες στο ταπήτιο ανάπτυξης (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Κύτταρα NCI-H520

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα DH5a. Πρόκειται για στέλεχος *E. coli* που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή και κλωνοποίηση πλασμιδιακού DNA. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των πλασμιδίων που περιέχουν τα ειδικά shRNAs για τη σίγηση των απαδενυλασών.

Απόψυξη κυττάρων

- 1) Εμβαπτίζουμε τα φιαλίδια (cryovials) που περιέχουν τα κύτταρα από τους -80°C όπου ήταν αποθηκευμένα, σε υδατόλουτρο (37°C), με ήπια ανάδευση.
- 2) Αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα, καθαρίζουμε εξωτερικά το φιαλίδιο με αιθανόλη (70%).
- 3) Μεταφέρουμε το αιώρημα των κυττάρων σε φάλκον 15ml με επιπλέον προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού μέχρι τα 10ml.
- 4) Φυγοκεντρούμε το αιώρημα στις 1500 rpm για 2min.
- 5) Μεταφέρουμε στον απαγωγό και απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προκειμένου να αποβάλουμε το DMSO που περιέχεται στο αρχικό κρυοπροστατευτικό θρεπτικό υλικό των κυττάρων και δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξή τους.
- 6) Προσθέτουμε 10 ml θρεπτικού RPMI (10% FBS) και μεταφέρουμε σε T75 flask.

- 7) Επωάζουμε τα κύτταρα στους 37°C μέχρι να προσκολληθούν στο ταπήτιο της φλάσκας.
- 8) Αφού η πληρότητα των κυττάρων φτάσει το 90-100%, θρυψινοποιούμε τα κύτταρα.

Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας – Θρυψινοποίηση

Όταν επιθυμούμε να ανακαλλιεργήσουμε τα κύτταρα είναι απαραίτητη μια διαδικασία γνωστή ως θρυψινοποίηση. Για να προβούμε σε θρυψινοποίηση πρέπει η πληρότητα των κυττάρων στο ταπήτιο της φλάσκας ανάπτυξης να είναι 90-100%. Ακολουθούμε, λοιπόν, τα εξής βήματα:

- 1) Παρατηρούμε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο. Ελέγχουμε και σημειώνουμε τη μορφολογία των κυττάρων και την πληρότητα του ταπητίου (confluency).
- 2) Απομακρύνουμε με αναρρόφηση το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας.
- 3) Κάνουμε δύο πλύσεις στα κύτταρα με διάλυμα PBS 1x * (φιάλη 75 cm²).
- 4) Προσθέτουμε διάλυμα τρυψίνης-EDTA 0.05% (0,5ml για φιάλη 75 cm²).
- 5) Ανακινούμε τη φιάλη ώστε το διάλυμα θρυψίνης να καλύψει όλο το ταπήτιο.
- 6) Μεταφέρουμε τα κύτταρα στον επωαστήρα (κλίβανος 37°C) για περίπου 2 min. Παρατηρούμε το σχήμα των κυττάρων στο μικροσκόπιο και ελέγχουμε αν έχουν αποκτήσει σφαιρική μορφή.
- 7) Προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού RPMI, 1% Antibiotic-antimycotic (10 ml θρεπτικού για φιάλη 75cm²).
- 8) Επαναιωρούμε τα κύτταρα και τα διασπείρουμε ομοιόμορφα με πιπέτα.
- 9) Στο σημείο αυτό μπορούμε να χωρίσουμε τα κύτταρα σε δύο ή περισσότερες φλάσκες ή απλά να απομακρύνουμε μέρος των κυττάρων στην ήδη υπάρχουσα φλάσκα.
- 10) Κάθε φορά που γίνεται η θρυψινοποίηση, καταγράφεται ως πέρασμα (π.χ. πέρασμα p25-passagen 25).

* Σημείωση: το PBS διάλυμα που χρησιμοποιείται στον χειρισμό των κυττάρων, είναι φιλτραρισμένο και αποστειρωμένο.

Συλλογή των κυττάρων

- 1) Απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό και κάνουμε πλύση των κυττάρων με παγωμένο και αποστειρωμένο PBS 1x (3 φορές).
- 2) Θρυψινοποιούμε τα κύτταρα σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται παραπάνω.

- 3) Ομογενοποιούμε τα αποκολλημένα κύτταρα με πιπετάρισμα σε PBS 1x (ή RPMI), και τα μεταφέρουμε σε tubes 1,5 ml.
- 4) Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα για 5 min στις 3000 rpm στους 4°C.
- 5) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά και αποθηκεύουμε το ίζημα στους -80°C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν πειραματικά.

Σημείωση: Τα βήματα 1-3 πραγματοποιούνται σε απαγωγό καθέτου νηματικής ροής.

Ψύξη των κυττάρων

- 1) Θρυψινοποίηση κυττάρων.
- 2) Προσθήκη θρεπτικού υλικού (10 ml για T75 flask).
- 3) Μεταφορά αιωρήματος σε φάλλον 15 ml.
- 4) Φυγοκέντριση στις 1500 rpm για 3 min στους 6°C.
- 5) Μεταφορά στον απαγωγό και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- 6) Επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 1800 μl RPMI (10% FBS).
- 7) Προσθήκη 200μl κρυοπροστατευτικού DMSO (τελικό κρυοπροστατευτικό διάλυμα 20% DMSO).
- 8) Μεταφορά σε cryovial.
- 9) Αργή ψύξη μέσα σε cryobox (1°C/1 min) στους -80°C.
- 10) Αποθήκευση στους -80°C ή σε υγρό άζωτο.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- Θρεπτικούυλικό: RPMI, 10% FBS, 1% Antibiotic-antimycotic
- PBS 1x (Phosphate Buffer Salts): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄
- RPMI (Biosera)
- FBS (Biosera)
- Antibiotic-antimycotic (Gibco)
- DMSO (Sigma)
- Θρυψίνη (Biosera)
- EDTA (Merck)
- NaCl (Merck)
- KCl (Merck)
- Na₂HPO₄ (Merck)
- KH₂PO₄ (Merck)
- Αιθανόλη (Sigma)

3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

Βακτηριακά κύτταρα (συνήθως από stock γλυκερόλης) ενοφθαλμίζονται σε 3ml LB broth που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί επώαση των 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/Plasmid (NoLid) - Isolation of high-copy plasmid DNA.

1. Καλλιέργεια και συλλογή των βακτηριακών κυττάρων:

Μεταφέρουμε 1,5 ml καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων *E.coli* που αναπτύχθηκε σε ένα σωλήνα, φυγοκεντρούμε για 30 sec στα 11.000 xg. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναλαμβάνουμε αυτό το βήμα.

2. Λύση των κυττάρων που περιέχονται στο ίζημα:

Προσθέτουμε 250 µL Buffer A1 και κάνουμε vortex μέχρι να διαλυθεί το ίζημα. Προσθέτουμε 250 µL Buffer A2 και ανακινούμε ήπια 6-8 φορές αποφεύγοντας τη χρήση του vortex. Επώαζουμε το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 min. Προσθέτουμε 300 µL Buffer A3 και ανακινούμε 6-8 φορές.

3. Καθαρισμός του εκχυλίσματος:

Φυγοκεντρούμε για 10 min στα 11.000 xg και κρατάμε το υπερκείμενο.

4. Δέσμευση του DNA:

Τοποθετούμε μια στήλη NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) σε ένα συλλεκτικό σωλήνα (collectiontube) των 2 mL και φορτώνουμε σε αυτή το υπερκείμενο του βήματος 3. Φυγοκεντρούμε για 1 min στα 11.000 xg, απομακρύνουμε το έκλουσμα και τοποθετούμε τη στήλη πίσω στο συλλεκτικό σωλήνα. Το DNA έχει προσδεθεί στη στήλη.

5. Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης:

Πλύση της στήλης με 500 µL Buffer AW, φυγοκέντριση για 1 min στα 11.000 xg (απομακρύνουμε το έκλουσμα). Προσθέτουμε 600 µL Buffer A4, φυγοκεντρούμε για 1 min στα 11.000 xg, πετάμε στο έκλουσμα και τοποθετούμε τη στήλη πίσω στον άδειο συλλεκτικό σωλήνα.








6. Ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης:

Φυγοκεντρούμε για 2 min στα 11.000 xg και πετάμε το συλλεκτικό σωλήνα.

7. Έκλυση του DNA:

Τοποθετούμε τη στήλη σε νέο σωλήνα και προσθέτουμε 50 µL Buffer AE και έπειτα επώαζουμε το δείγμα για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, φυγοκεντρούμε για 1 min στα 11.000 xg.

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται περιληπτικά το πρωτόκολλο:

| | | | |
|----------|--|---|--|
| 1 | Cultivate and harvest bacterial cells |  | 11,000 x g, 30 s |
| 2 | Cell lysis |  | 250 µL Buffer A1 250 µL Buffer A2 RT, up to 5 min 300 µL Buffer A3 |
| 3 | Clarification of the lysate |  | 11,000 x g, 5–10 min |
| 4 | Bind DNA |  | Load supernatant 11,000 x g, 1 min |
| 5 | Wash silica membrane |  | <i>(Optional: 500 µL Buffer AW: RT or 50 °C)</i> 600 µL Buffer A4 11,000 x g, 1 min |
| 6 | Dry silica membrane |  | 11,000 x g, 2 min |
| 7 | Elute DNA |  | 50 µL Buffer AE RT, 1 min 11,000 x g, 1 min |

Εικόνα 10: Συνοπτική παρουσίαση του πρωτοκόλλου για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα.

3.3 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με χρήση λιποσωμάτων

Η τεχνολογία του RNA interference (RNAi)

Το RNAi αποτελεί ένα ισχυρό φαινόμενο εξειδικευμένης γονιδιακής σίγησης που πυροδοτείται από δίκλωνα μόρια RNA. Είναι ένα φυσικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα σε φυτά, μύκητες και ζώα αποτελώντας μηχανισμό προστασίας έναντι ξένων νουκλεϊκών οξέων. Το RNAi θεωρείται σημαντικό εργαλείο για θεραπευτικές δραστηριότητες που στοχεύουν το mRNA ενός γονιδίου που σχετίζεται με μια ασθένεια.

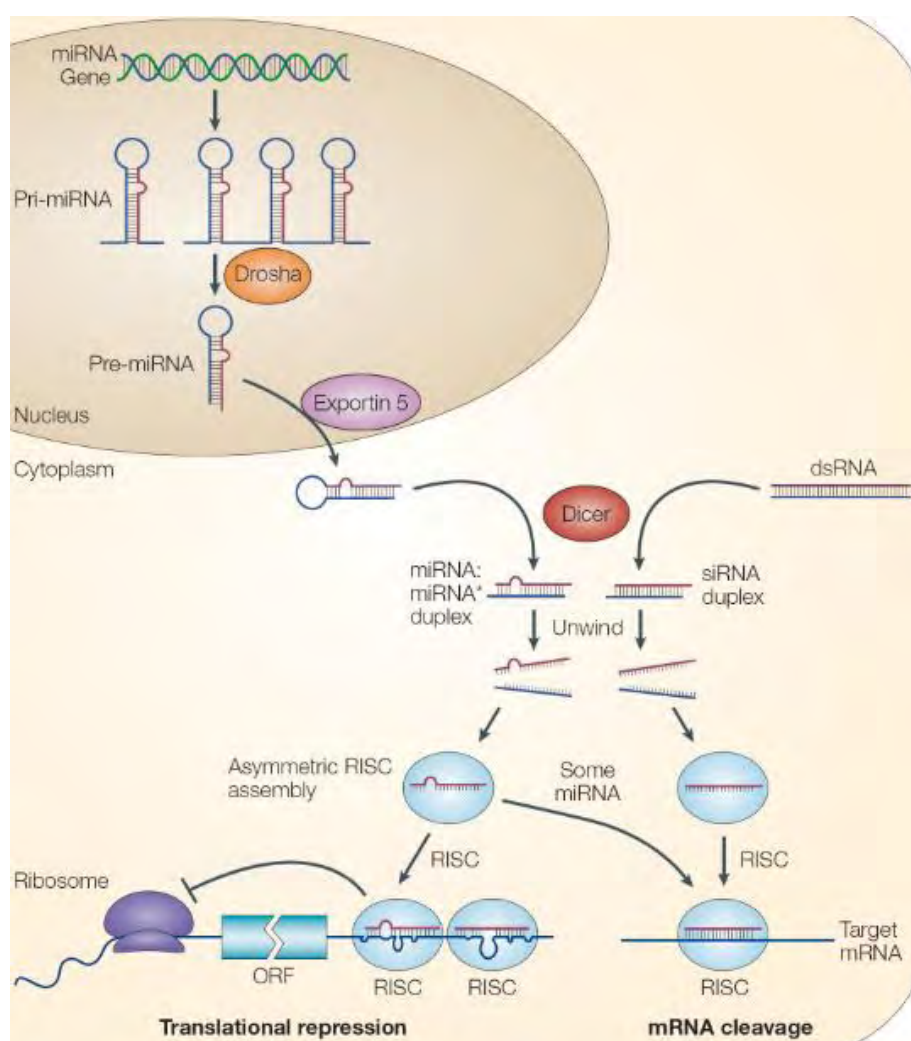
Τα δίκλωνα μόρια που προκαλούν τη γονιδιακή σίγηση στο RNAi, είτε παράγονται ενδογενώς από μικρά μη-μεταφραζόμενα RNAs γνωστά ως miRNAs, είτε χορηγούνται εξωγενώς στο κύτταρο και ονομάζονται μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs). Σε αντίθεση με τα miRNAs, τα siRNAs σχετίζονται με την αποσιώπηση που προκύπτει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

Μονοπάτι siRNA: Επιμήκη δίκλωνα μόρια RNA (dsRNA) ή δίκλωνα μόρια RNA με δομή φουρκέτας (hairpin RNA, shRNA) επεξεργάζονται από το σύμπλοκο Dicer, ένα ένζυμο με δράση παρόμοια με την RNAάση III. Ως αποτέλεσμα παράγονται μικρότερα μόρια, τα siRNAs, τα οποία φέρουν μονόκλωνα δινουκλεοτιδικά 3' άκρα και φωσφορυλιωμένα 5' άκρα, ενώ το μήκος τους δεν ξεπερνά τα 19 ζεύγη βάσεων. Εναλλακτικά, μπορούν να εισαχθούν στο κύτταρο έτοιμα siRNAs μήκους 19-23 νουκλεοτιδίων (αυτά παρακάμπτουν πιο εύκολα την αντίδραση ιντερφερόνης του κυττάρου συγκριτικά με τα μεγάλα δίκλωνα μόρια RNA?), τα οποία και φωσφορυλιώνονται από κυτταρικές κινάσες. Ακολούθως τα παραγόμενα siRNAs ενσωματώνονται στο σύμπλοκο σίγησης επαγόμενο από RNA - RISC. Το τελευταίο καταλύει το ξετύλιγμα των δύο κλώνων των siRNAs με ένα ATP-εξαρτώμενο τρόπο και οι ξετυλιγμένοι αντινοσηματικοί κλώνοι οδηγούν το RISC στα συμπληρωματικά mRNAs-στόχους, γεγονός που πυροδοτεί την ενδονουκλεοτιδική τμήση των mRNAs (Εικόνα 11).

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

ένας τρίτος λιγότερο μελετημένος μηχανισμός τα εμπλέκει στην αναδιοργάνωση της ετεροχρωματίνης (Derek et al., 2003; Lippman and Martienssen, 2004).

Τα miRNAs μεταγράφονται από την RNA pol III σε μεγάλα δίκλωνα μόρια RNA που φέρουν δομές βρόχου και καλούνται pri-miRNAs. Αυτά κόβονται από το σύμπλεγμα Drosha και παράγονται τα pre-miRNAs (70 νουκλεοτίδια), τα οποία με τη σειρά τους εξέρχονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα όπου και αναλαμβάνει δράση η Dicer. Η τελευταία παράγει μικρά μονόκλωνα miRNAs (των 22 νουκλεοτιδίων) τα οποία ενσωματώνονται στο σύμπλεγμα miRNP που καθοδηγείται στο mRNA-στόχο πυροδοτώντας την καταστολή της έκφρασης του (Εικόνα 11).



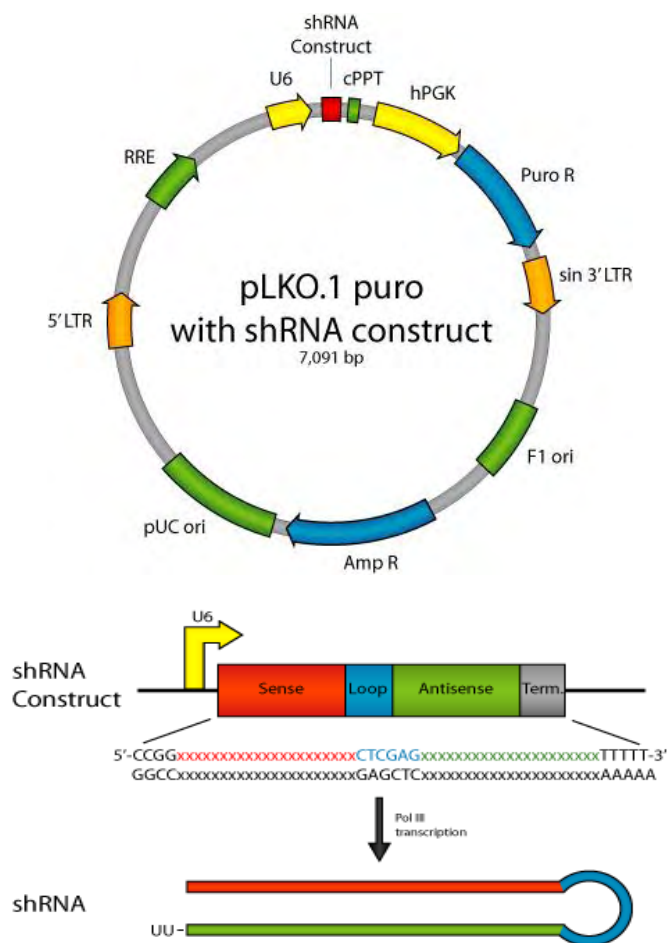
Εικόνα 11: Μονοπάτια παραγωγής miRNAs και siRNAs μορίων

Αποσιώπηση απαδενυλασών

Προκειμένου να γίνει αποσιώπηση των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6-LIKE, CNOT7 και CNOT8 και να ελεγχθεί η επίδραση της αποσιώπησης τους στα μήκη των πολυ(A) ουρών των μεταγράφων που μελετάμε, έγινε διαμόλυνση των κυττάρων NCI-H520 με πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος έφερε αλληλουχία που κωδικοποιεί shRNAs έναντι των πέντε απαδενυλασών.

Short-Hairpin RNAs (shRNAs)

Για την αποσιώπηση των απαδενυλασών χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά shRNAs για κάθε ένζυμο, κλωνοποιημένα στο λεντι-ϊκό πλασμιδιακό φορέα pLKO.1-puro (Εικόνα 12). 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 από μετασχηματισμό βακτηρίων με αυτό. Ο pLKO.1-puro περιέχει γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και την πουρομυκίνη για δυνατότητα επιλογής βακτηριακών και ευκαρυωτικών κυττάρων αντιστοίχως, που έλαβαν επιτυχώς το πλασμίδιο.

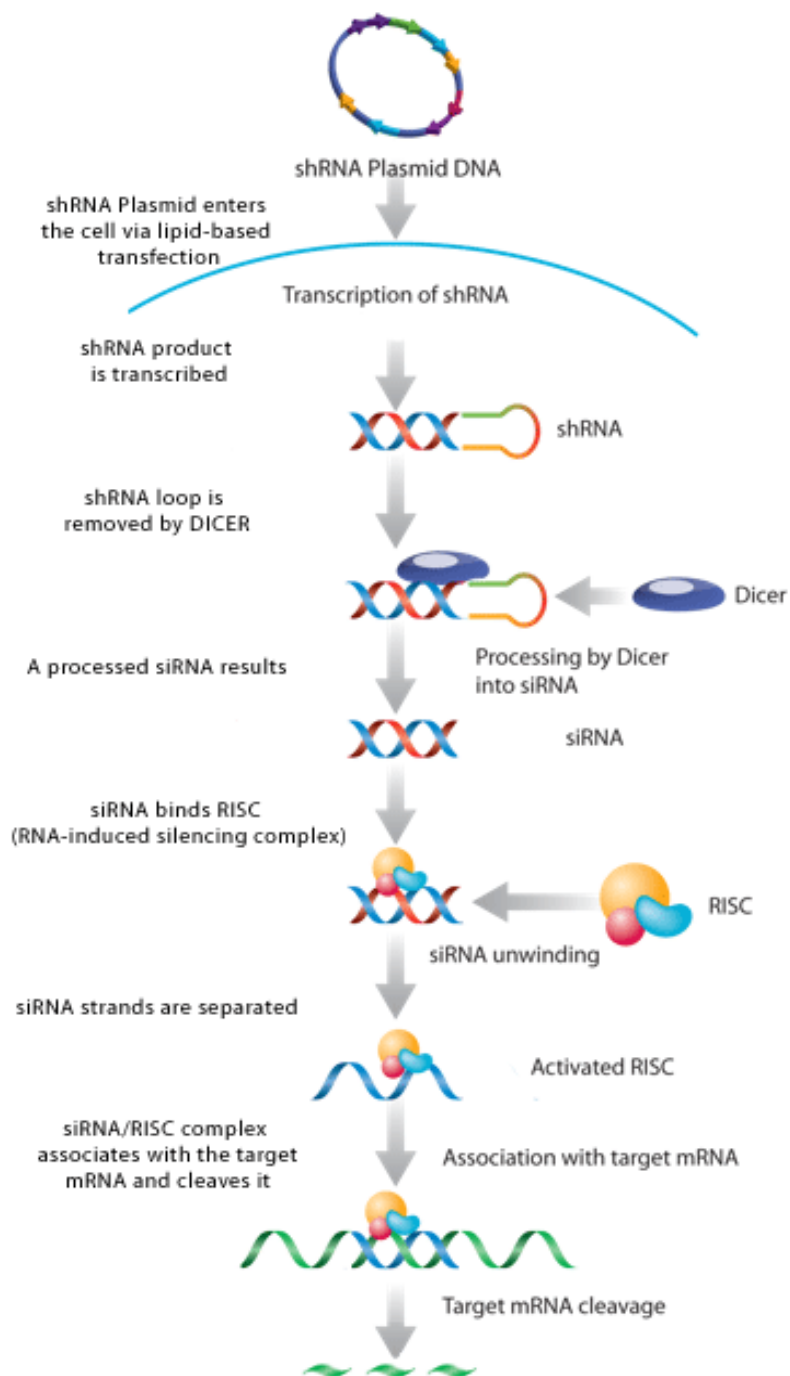


| Description | Vector Element |
|-------------|---|
| U6 | Human U6 promoter drives RNA Polymerase III transcription for generation of shRNA transcripts. |
| cPPT | Central polypurine tract, cPPT, improves transduction efficiency by facilitating nuclear import of the vector's preintegration complex in the transduced cells. |
| hPGK | Human phosphoglycerate kinase promoter drives expression of puromycin. |
| Puro R | Puromycin resistance gene for selection of pLKO.1 plasmid in mammalian cells. |
| sin 3'LTR | 3' Self-inactivating long terminal repeat. |
| f1 ori | f1 bacterial origin of replication. |
| Amp R | Ampicillin resistance gene for selection of pLKO.1 plasmid in bacterial cells |
| pUC ori | pUC bacterial origin of replication. |
| 5'LTR | 5' long terminal repeat. |
| RRE | Rev response element. |

Εικόνα 12: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pLKO.1- puro της Sigma. Παρατίθεται και ένας πίνακας με σημαντικές αλληλουχίες-στοιχεία του φορέα.

Ο μηχανισμός δράσης των shRNAs έγκειται στην ενδοκυττάρια μεταγραφή της κλωνοποιημένης στο φορέα αλληλουχίας shRNA με την παραγωγή μικρών δίκλωνων μορίων RNA που φέρουν μια δευτεροταγή δομή φουρκέτας. Στη συνέχεια αυτά τα δίκλινα μόρια επεξεργάζονται από τη Dicer και παράγουν μια ομάδα από siRNAs που αναγνωρίζουν ειδικά τον επιθυμητό mRNA-στόχο, ο οποίος αποικοδομείται μέσω του συμπλόκου σίγησης RISC (Εικόνα 13).

Τα siRNAs/shRNAs για να είναι αποτελεσματικά θα πρέπει να διαθέτουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (Taxman et al., 2006), τα οποία παρατίθενται στον πίνακα 3.



Εικόνα 13: Μηχανισμός αποσιώπησης μέσω πλασμιδιακών φορέων που μεταγράφουν shRNAs.

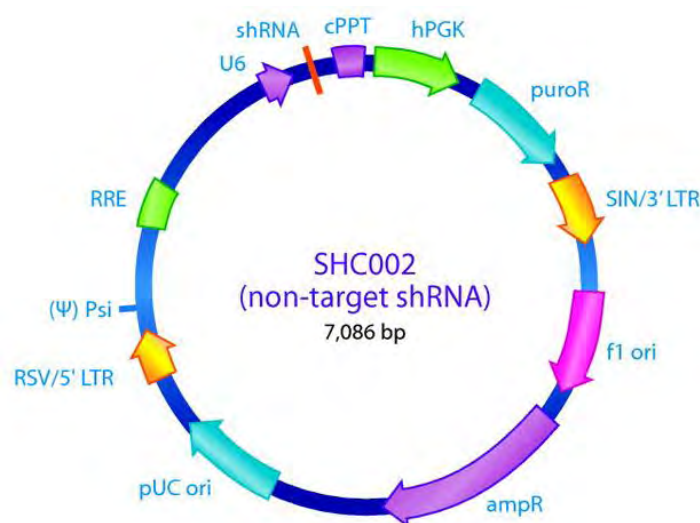
Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά βάσει των οποίων επιλέχθηκαν τα shRNAs.

| Κριτήρια επιλογής siRNAs/ shRNAs |
|---|
| Μέγεθος siRNA: ~21nt με αρχή AA |
| Επιλογή 2-4 αλληλουχιών στόχων |
| Αποφυγή καταλοίπων G στα άκρα |
| 5' AA και 3' UU (μεγάλη αποτελεσματικότητα) |
| 30%-50% GC (υψηλό ποσοστό GC μειώνει την αποτελεσματικότητα) |
| Όχι πολλές επαναλήψεις T ή A γιατί αποτελούν σήμα τερματισμού μεταγραφής από την RNA πολυμεράση |
| Επιλογή τμημάτων mRNA σε διαφορετικές θέσεις κατά μήκος του γονιδίου |

Όλα τα shRNAs στοχεύουν σε διαφορετικές θέσεις κατά μήκος του mRNA των απαδενυλασών και έχουν τη γενική δομή:

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

Ως control στην αποσιώπηση των απαδενυλασών χρησιμοποιήθηκαν, εκτός από κύτταρα WT, και κύτταρα στα οποία εισήχθη πλασμίδιο pLKO.1 που φέρει μια εξειδικευμένη αλληλουχία shRNA, η οποία δεν έχει ομολογία προς κανένα γνωστό γονίδιο των θηλαστικών, τα επονομαζόμενα MockSH κύτταρα (MSH).



Εικόνα 14: Πλασμιδιακός φορέας pLKO.1

Η επιλογή των κυττάρων που έχουν λάβει το πλασμίδιο, έγινε με πουρομυκίνη (6μg/mL), 12h μετά από τη διαμόλυνση.

Πρωτόκολλοδιαμόλυνσης (Xfect™ Transfection Reagent Protocol-At-A-Glance):

- 1) Πρώτο βήμα αποτελεί η θρυψινοποίηση των κυττάρων μιας T75 flask στην οποία η πληρότητα των κυττάρων είναι 95%-100%.
- 2) Σε κάθε well ενός 12-well plate προσθέτουμε το 1/12 από τα παραπάνω θρυψινοποιημένα κύτταρα έτσι ώστε σε κάθε well να έχουμε πληρότητα περίπου 90-95% μετά από 24h, μετά από επώαση στους 37°C. Η πληρότητα αυτή ενδείκνυται για τη διαμόλυνση.
- 3) Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε το X-fect reagent, το οποίο περιέχει το X-fect Polymer και το X-fect Reaction Buffer. Το X-fect Polymer σχηματίζει κατιονικά λιποσωμάτια και επιτρέπει τη διαμόλυνση πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα των θηλαστικών με πολύ μεγάλη απόδοση. Το αντιδραστήριο αυτό συνδυαζόμενο με DNA, σχηματίζει λιποσώματα που συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων και αποχύνουν το περιεχόμενο DNA στο εσωτερικό του κυττάρου (στην περίπτωση μας μιλάμε για πλασμίδια που φέρουν shRNAs) (Felger et al., 1994). Μεταβολές των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων DNA και X-fect Polymer είναι απαραίτητες για την βελτιστοποίηση της διαμόλυνσης. Επίσης, είναι αναγκαία στα πειράματα αποσιώπησης και η ύπαρξη κυττάρων που χρησιμεύουν ως control και τα οποία δε διαμολύνονται, καθώς και ως αρνητικό control κύτταρα τα οποία διαμολύνονται με πλασμιδιακό φορέα που φέρει μια εξειδικευμένη αλληλουχία shRNA, η οποία δεν έχει ομολογία προς κανένα γνωστό γονίδιο των θηλαστικών επονομαζόμενα ως κύτταρα MSH (MockSH). Η σύγκριση στα επίπεδα έκφρασης των απαδενυλασών των διαμολυσμένων κυττάρων θα γίνει με τα κύτταρα MSH.
- 4) Για το σχηματισμό των λιποσωμάτων ετοιμάζουμε δύο διαλύματα: ένα DNAmix και ένα X-fectmix σύμφωνα με τις εξής ενδείξεις:
 - α. DNA mix: 1,5 μg πλασμιδίου σε 50 μl X-fect Reaction Buffer ανά well
 - β. X-fect mix: 0,45 μl X-fect Polymer σε 50 μl X-fect Reaction Buffer ανά well
- 5) Παρασκευή του transfectionmix: Αναμιγνύουμε τα DNAmix και X-fectmix και τα αφήνουμε να επωαστούν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- 6) Παράλληλα απομακρύνουμε από κάθε well το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και ξεπλένουμε τα κύτταρα με κρύο και αποστειρωμένο PBS 1x (0,5 ml) δύο φορές. Πριν την προσθήκη του transfectionmix προσθέτουμε θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά-αντιμυκητωτικά και χωρίς ορό (FBS) σε κάθε well (0,5 mlRPMI/well).
- 7) Μετά το πέρας του χρόνου επώασης του transfectionmix, μοιράζουμε το τελευταίο με κυκλικό τρόπο στα κύτταρα που προορίζονται για διαμόλυνση και αφήνουμε το 12-well plate να επωαστεί στους 37°C.

8) Μετά από 6 ώρες απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από τα διαμολυσμένα κύτταρα και το αντικαθιστούμε μετά από δύο πλύσεις με 0,5 ml PBS 1x, με 0,5 ml φρέσκο RPMI (10% FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic) το οποίο περιέχει επιπλέον και το αντιβιοτικό επιλογής (στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πουρομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 1-10 µg/ml θρεπτικού υλικού).

Η συλλογή των διαμολυσμένων κυττάρων έγινε 48 ώρες μετά από τη διαμόλυνση (σύμφωνα με το πρωτόκολλο της σχετικής ενότητας).





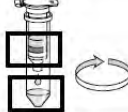
Υλικά-Αντιδραστήρια






- Total DNA, RNA, and protein isolation kit NucleoSpin® TriPrep (Macherey-Nagel)
- Θρεπτικού υλικό: RPMI, 10% FBS, 1% Antibiotic-antimycotic
- PBS 1x (Phosphate Buffer Salts): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄
- Τρυψίνη: 0,05% EDTA
- X-fect reagent (Clontech)
- shRNAs (Sigma)
- pLKO.1-puro vector (Sigma)
- Puromycin (Sigma)
- RPMI (Biosera)
- FBS (Biosera)
- Antibiotic-antimycotic (Gibco)
- Τρυψίνη (Biosera)
- EDTA (Merck)
- NaCl (Merck)
- KCl (Merck)
- Na₂HPO₄(Merck)
- KH₂PO₄(Merck)
- Αιθανόλη(Sigma)

3.4 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών

Για την απομόνωση του ολικού RNA από τα κύτταρα NCI-H520 χρησιμοποιήθηκε το TotalDNA, RNA, and protein isolation kit NucleoSpin® TriPrep της MachereyNagel. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

1. Συλλέγουμε από το 12 wellplate 0,5 ml κυττάρων, διαλυτοποιημένων σε PBS.
2. Για την λύση του δείγματος προσθέτουμε στο ίζημα 350 μ L Buffer RP1 και 3,5 μ L β -μερκαπτοαιθανόλη και κάνουμε vortex για 10 sec.
3. Τοποθετούμε την στήλη NucleoSpin® Filter (violet ring) σε ένα συλλεκτικό σωλήνα (2 mL), προσθέτουμε το μίγμα και φυγοκεντρούμε για 1 min στα 11.000 xg.
4. Απορρίπτουμε τη στήλη, προσθέτουμε 350 μ L αιθανόλης (70%) και αναδεύουμε πιπετάρωντας για περίπου 5 φορές.
5. Για κάθε δείγμα παίρνουμε μια στήλη NucleoSpin® TriPrep Column (light blue ring) τοποθετημένη σε ένα συλλεκτικό σωλήνα και προσθέτουμε το εκχύλισμα. Το RNA και το DNA είναι προσδεμένο στη στήλη, ενώ οι πρωτεΐνες βρίσκονται στο έκλουσμα.
6. Προσθέτουμε 500 μ L DNA Wash (1^η πλύση) στη στήλη και φυγοκεντρούμε για 1 min στα 11.000 xg. Απορρίπτουμε το έκλουσμα και ξαναχρησιμοποιούμε το συλλεκτικό σωλήνα.
Για τη δεύτερη πλύση προσθέτουμε 500 μ L DNA Wash στη στήλη και φυγοκεντρούμε για 1 min στα 11.000 xg. Απορρίπτουμε το συλλεκτικό σωλήνα με το έκλουσμα.
7. Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα συλλεκτικό σωλήνα 1,5 mL. Ανοίγουμε το πώμα της στήλης και αφήνουμε να στεγνώσει για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Προσθέτουμε 100 μ L DNA Elute στη στήλη και επωάζουμε για 1-5 min. Με φυγοκέντρωση για 1 min στα 11.000 xg επιτυγχάνεται η έκλυση του DNA.
9. Για την απομάκρυνση του εναπομείναντος στη στήλη DNA προσθέτουμε 95 μ L rDNase reaction mixture (10 μ L reconstituted rDNase + 90 μ L Reaction Buffer for rDNase) και επωάζουμε για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Προσθέτουμε 200 μ L Buffer RA2, φυγοκεντρούμε για 1 min στα 11.000 x g και τοποθετούμε τη στήλη σε νέο συλλεκτικό σωλήνα (2 mL).
11. Προσθέτουμε 600 μ L Buffer RA3, φυγοκεντρούμε για 30 sec στα 11.000 x g, πετάμε το διήθημα και τοποθετούμε τη στήλη πίσω στο συλλεκτικό σωλήνα.
12. Προσθέτουμε 250 μ L Buffer RA3, φυγοκεντρούμε για 2 min στα 11.000 x g και τοποθετούμε τη στήλη σε ένα συλλεκτικό σωλήνα ελεύθερο ριβονουκλεασών (1,5 mL).
13. Εκλούουμε το RNA σε 60 μ L H₂O ελεύθερο ριβονουκλεασών και φυγοκεντρούμε για 1 min στα 11.000 x g.

| | | | |
|---|---------------------------------------|---|---|
| 1 | Homogenize sample |  | Up to 30 mg |
| 2 | Lyse sample |  | 350 μ L RP1 3.5 μ L β -mercaptoethanol (or comparable reducing agent) |
| 3 | Filtrate lysate |  | 1 min, 11,000 x <i>g</i> |
| 4 | Adjust DNA and RNA binding conditions |  | 350 μ L ethanol (70 %) |
| 5 | Bind DNA and RNA |  | Load sample 30 s, 11,000 x <i>g</i> |

| | | | |
|----|------------------------------|---|---|
| 6 | Wash silica membrane |  | 1 st and 2 nd wash each: 500 μ L <i>DNA Wash</i> 1 min, 11,000 x <i>g</i> |
| 7 | Dry membrane | | RT, 3 min (with open lid) |
| 8 | Elute DNA |  | 100 μ L <i>DNA Elute</i> Incubate 1 min 1 min, 11,000 x <i>g</i> |
| 9 | Digest residual DNA |  | 95 μ L DNase reaction mixture RT, 15 min |
| 10 | Wash and dry silica membrane |  | 1 st wash 200 μ L RA2 2 nd wash 600 μ L RA3 30 s, 11,000 x <i>g</i> 3 rd wash 250 μ L RA3 2 min, 11,000 x <i>g</i> |
| 11 | Elute highly pure RNA |  | 60 μ L H ₂ O (RNase-free) 1 min, 11,000 x <i>g</i> |

Εικόνα 15: Συνοπτική παρουσίαση του πρωτοκόλλου για την απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών

3.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε δύο βήματα (Two-step Real Time PCR)

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

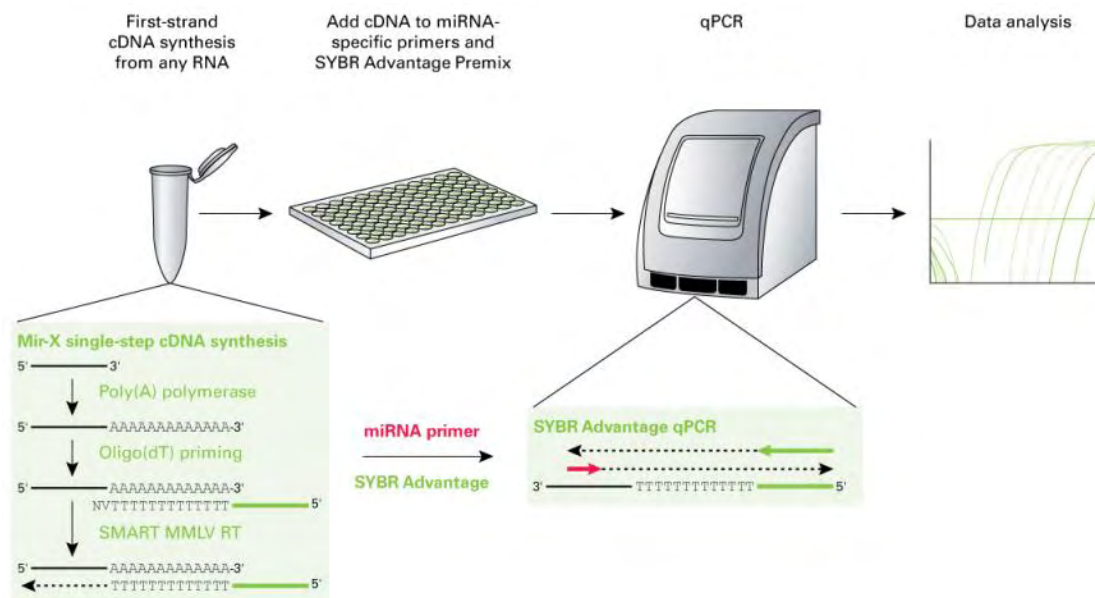
Η Real Time PCR επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου σε όλη τη διάρκεια της PCR. Ύστερα από μια αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα,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

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

Στην παρούσα πειραματική εργασία εφαρμόσαμε την ποσοτική RT-PCR δύο σταδίων. Για τη σύνθεση του cDNA ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis and SYBR® της Clontech, ενώ για την ενίσχυση με qRT-PCR ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο KAPA SYBR® FASTqPCR της Kapa Biosystems. Στο πρώτο στάδιο, λοιπόν, έγινε σύνθεση cDNA με μήτρα μόρια RNA, συμπεριλαμβανομένου των miRNAs, ενώ στο δεύτερο στάδιο έγινε η ποσοτικοποίηση των μορίων με ενίσχυση qRT-PCR.

Το Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit χρησιμοποιείται για τη μετατροπή των μορίων mRNA σε cDNA, και των εξειδικευμένων μορίων miRNAs, τα οποία δεν φέρουν πολυ(A) ουρά, σε αντίθεση με τα mRNAs, και η ποσοτικοποίηση με RT-PCR θα ήταν αδύνατη σε ένα μόνο βήμα. Έτσι, λοιπόν, σε μία μονή αντίδραση όλα τα μόρια RNA πολυαδενυλιώνονται από την πολυ(A)πολυμεράση, και ακολουθεί

αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA, με τη βοήθεια αντίστροφης μεταγραφάσης. Η τελευταία χρησιμοποιεί ως εκκινητή τον oligo-dT primer που έχει συμπληρωματικότητα με την πολυ(A) ουρά. Με αυτό τον τρόπο, μπορούμε να εξετάσουμε τις αλλαγές στα επίπεδα επιλεγμένων miRNAs και mRNAs (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Βήματα που ακολουθούνται στην two-step RT-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Clontech Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis.

Σύνθεση cDNA

Για τη σύνθεση του cDNA ακολουθούμε την εξής διαδικασία:

1. Σε ένα tube 0,2 ml ελεύθερο ριβονουκλεασών συνδυάζονται τα εξής αντιδραστήρια:

| Reagent | Volume (μl) |
|------------------------|-------------|
| mRQ Buffer (2x) | 5 |
| RNA sample (0.25–8 μg) | 3.75 |
| mRQ Enzyme | 1.25 |
| Total volume | 10 |

2. Επώαση σε θερμοκυκλοποιητή στους 37°C για μία ώρα και ακολουθεί αδρανοποίηση των ενζύμων στους 85°C για 5 min.
3. Αραίωση του νεοσυντιθέμενου δείγματος cDNA με προσθήκη 90 μl ddH₂O (έως τελικό όγκο 100 μl).
4. Το δείγμα cDNA που προκύπτει είναι έτοιμο προς χρήση στην qRT-PCR. Αποθηκεύουμε το δείγμα cDNA στους -20°C, έως ότου γίνει προετοιμασία της PCR, ή αν επιθυμούμε η τελευταία να γίνει άλλη χρονική στιγμή.

qRT-PCR

Για την ποσοτικοποίηση των mRNAs των απαδενυλασών εφαρμόστηκε συγκριτική ποσοτική Real TimePCR (Comparative qRT-PCR) με τη μέθοδο $\Delta\Delta Ct$, με την οποία η κανονικοποίηση γίνεται με τη βοήθεια ιδιοσυστατικών γονιδίων αναφοράς. Με την εν λόγω μέθοδο, τα επίπεδα των mRNAs των απαδενυλασών καθορίστηκαν συγκριτικά με τα επίπεδα του γονιδίου αναφοράς (β-ακτίνη).

Μέθοδος $\Delta\Delta Ct$

Ο προσδιορισμός των επιπέδων των mRNAs μεταξύ δύο δειγμάτων (control και εξεταζόμενο δείγμα) γίνεται βάσει της παρακάτω εξίσωσης:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Ct_{\text{target (control-treated)}}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref (control-treated)}}}}$$

Όπου:

E_{target} ο βαθμός ενίσχυσης του mRNA.

E_{ref} ο βαθμός ενίσχυσης του γονιδίου αναφοράς (β-ακτίνης).

Ct_o ο κύκλος αντίδρασης κατά τον οποίο επιτυγχάνεται η ουδός φθορισμού της χρωστικής παρακολούθησης της ενίσχυσης (SYBR Green dye).

$\Delta Ct_{\text{target}}$ η διαφορά $Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{treated}}$ του mRNA στο control και στο εξεταζόμενο δείγμα αντίστοιχα.

$\Delta Ct_{\text{reference}}$ η διαφορά $Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{treated}}$ β-ακτίνης στο control και στο εξεταζόμενο δείγμα.

Ο βαθμός ενίσχυσης E, θεωρητικά προσεγγίζει την τιμή 2, κάτι που σημαίνει ότι σε κάθε κύκλο αντίδρασης της PCR, ο στόχος διπλασιάζεται.

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την qRT-PCR παρουσιάζονται στον πίνακα 4, ενώ το θερμικό προφίλ του κυκλοποιητή της αντίδρασης PCR ορίστηκε όπως φαίνεται στον πίνακα 5.

Πίνακας 4. Ενίσχυση mRNA των PARN, CNOT6L, CNOT6, CNOT7, CNOT8 και β-ακτίνης.

| Reagent Volume (μl) | |
|------------------------|-----|
| KAPA SYBRMix 10 | |
| Forward Primer (10 μM) | 0,2 |
| Reverse Primer (10 μM) | 0,2 |
| ROX dye low | 0,4 |
| cDNA2 | |
| ddH ₂ O | 7,2 |
| Total volume | 20 |

Όπου:

KAPASYBR mix αποτελεί μίγμα πολυ(A) πολυμεράσης, dNTPs, ιόντων Mg²⁺ και χρωστικής παρακολούθησης SYBR Green.

Forward και Reverse Primerοι εξειδικευμένοι εκκινητέςγια το mRNAτης κάθε απαδενυλάσης.

ROXdye η χρωστική αναφοράς, η οποία μειώνει το θόρυβο του μηχανήματος (θερμοκυκλοποιητή).

Πίνακας 5. Θερμικό προφίλ ενίσχυσης mRNAs των απαδενυλασών και της β-ακτίνης

| Type of reaction | Cycling conditions |
|----------------------------|--------------------|
| Denaturation (1 cycle) | 95°C, 3min |
| Amplification (x40 cycles) | 95°C, 3sec |
| | 60°C, 30sec |
| | 72°C, 11sec |
| Dissociation | 95°C, 1min |
| | 55 °C, 30sec |
| | 95 °C, 30sec |
| (1 cycle) | 25°C, 3min |

Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα, οι αντιδράσεις για την ποσοτικοποίηση των mRNAs πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Για κάθε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών, στην αντίδραση συμπεριλήφθηκε ως αρνητικό control, αντίδραση NTC που στερούνταν δείγματος cDNA (No Template Control).

Η ανάλυση των δεδομένων μετά την ενίσχυση των δειγμάτων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος MxPro.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα 6.

Πινάκας 6. Εκκινητές των παραγόντων που μελετήθηκαν

| | | |
|-------------------|----------------|----------------------|
| PARN | FORWARD | CAGCAGAAACATGCCAAAGA |
| | REVERSE | CCAAGAGTCTGGGGAAAACA |
| CNOT6-LIKE | FORWARD | CGGCTCTTCCAGCTACAAAC |
| | REVERSE | GGAAGCTGCTCGGATGAAC |
| CNOT6 | FORWARD | TTGCCAAGCTTCACAATCTG |
| | REVERSE | CCGTCTTGTTCCATCTGGTT |
| CNOT7 | FORWARD | GGATTACAGGAGGTGGCAGA |
| | REVERSE | GAACCAGAACCAAGGCCATA |
| CNOT8 | FORWARD | GGATTTGCAGAGGATTGGAA |
| | REVERSE | TCACTGCTGCATGTTGTTGA |
| b-actin | FORWARD | GGACTTCGAGCAAGAGATGG |
| | REVERSE | AGCACTGTGTTGGCGTACAG |

Υλικά & Αντιδραστήρια

- Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis kit (Clontech)
- K-SYBR® qRT-PCR kit (Kapa)

3.6 Προσδιορισμός της κατάστασης πολυαδενυλίωσης των επιλεγμένων mRNAs των παραγόντων ERHA7, ROBO2 και CYTH4 με δοκιμή LM-PAT μετά από αποσιώπηση των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6-LIKE, CNOT7, CNOT8

Η πολυαδενυλίωση είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα των περισσότερων ευκαρυωτικών mRNAs και εμπλέκεται σε πολλές πτυχές της λειτουργίας του mRNA. Οι πτυχές αυτές περιλαμβάνουν την επεξεργασία του mRNA, τη μεταφορά, τη σταθερότητα, και την αποτελεσματικότητα της μετάφρασής του (Salles et. al 1999). Η σταθερότητα και η αποικοδόμηση του mRNA είναι κρίσιμες για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Hedda et al 2007). Μεταβολές στην έκταση της πολυαδενυλίωσης μπορεί να επηρεάσουν τη γονιδιακή έκφραση με διαφορετικούς τρόπους. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια σπερματογένεσης στον ποντικό, η βράχυνση της πολυ(A) ουράς μπορεί να συσχετιστεί με μεταφραστική ενεργοποίηση. Αντίθετα στα ωοκύτταρα του ποντικού, η απαδενυλίωση συσχετίζεται με μεταφραστική καταστολή ενώ η κυτταροπλασματική επιμήκυνση της πολυ(A) ουράς συνδέεται με μεταφραστική ενεργοποίηση (Salles et. al, 1999). Η ρύθμιση της απαδενυλίωσης κρίνεται απαραίτητη, καθώς συνθήκες ανεξέλεγκτης απαδενυλίωσης θα οδηγούσαν σε καταστροφή και θάνατο του κυττάρου. Τα σταθερά και μεταγραφικά ενεργά mRNAs πρέπει να προστατευθούν από την απαδενυλίωση, ενώ τα ασταθή και μη φυσιολογικά θα πρέπει να απαδενυλιώνονται και να οδηγούνται σε αποικοδόμηση (Goldstrohm & Wickens, 2008). Στον καρκίνο, η απορρύθμιση των μηχανισμών που ελέγχουν τη σταθερότητα των mRNAs, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη παραγωγή ογκογόνων προϊόντων και/ή μείωση ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών (Kim and Lee, 2009). Επομένως, για να είναι δυνατή μια πλήρης κατανόηση της γονιδιακής ρύθμισης, απαιτούνται δοκιμασίες πολυαδενυλίωσης που μπορούν να παρακολουθούν με ευαισθησία αλλαγές στο μήκος της πολυ(A) ουράς (Salles et. al, 1999).

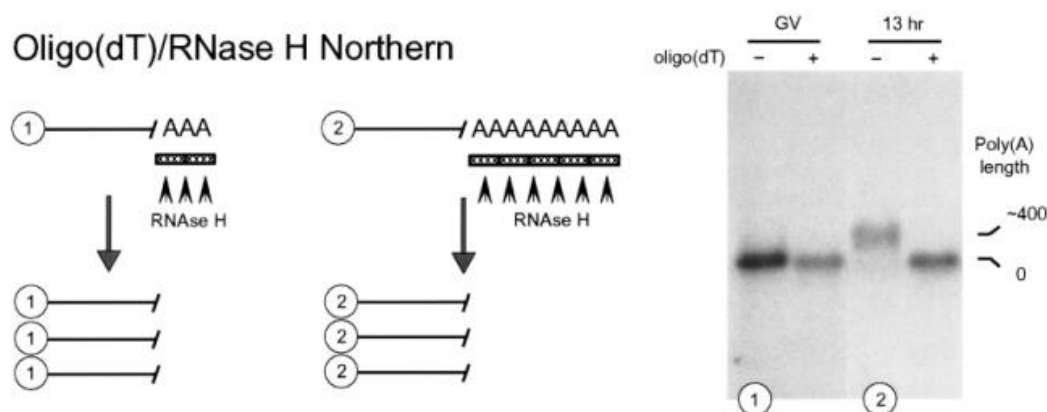
Οι κυριότερες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της κατάστασης πολυαδενυλίωσης ενός mRNA στο πλαίσιο του συνολικού κυτταρικού RNA είναι τρεις.

1) ολιγο(dT)/RNase H-Northern

Η κλασική δοκιμή για τον καθορισμό της κατάστασης πολυαδενυλίωσης ονομάζεται ολιγο(dT)/RNase H-Northern και περιλαμβάνει ανάλυση Northern απομονωμένου RNA που επωάζεται παρουσία της ριβονουκλεάσης H (RNaseH) με ή χωρίς την προσθήκη ολιγο(dT). Τα ολιγο(dT) υβριδοποιούνται με την πολυ(A) ουρά

των mRNAs. Η ριβονουκλεάση Η αναγνωρίζει τα υβρίδια RNA:DNA [ολιγο(dT):πολυ(A) ουρά] και κόβει το RNA (Εικόνα 17) (Salles et. al, 1999).

Ενώ αυτή η δοκιμή είναι χρονοβόρα, απαιτεί απομόνωση μεγάλης ποσότητας RNA και δεν είναι αρκετά ευαίσθητη, μπορεί να είναι χρήσιμη, ιδίως όταν αποδεικνύεται προβληματικό το στάδιο της PCR στις μεθόδους που ακολουθούν. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί, όταν είναι εφικτό, για την επικύρωση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με τις υπόλοιπες δοκιμασίες PAT.



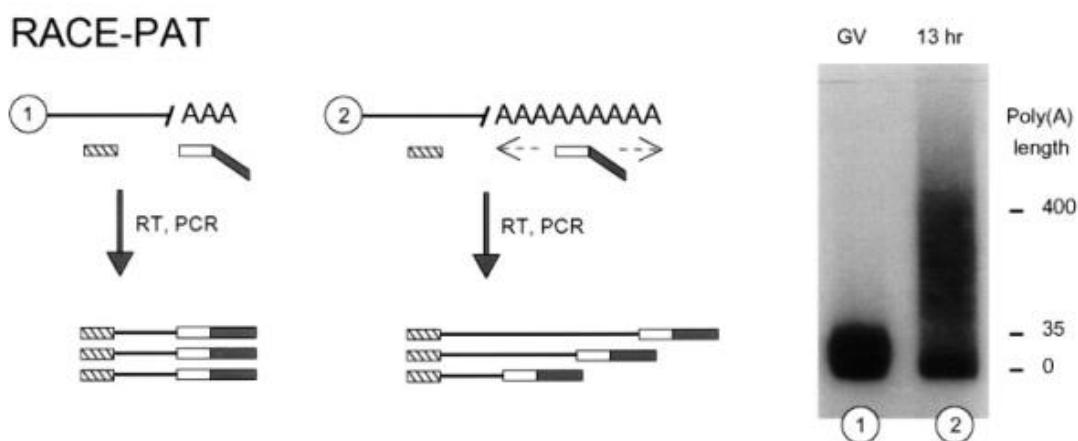
Εικόνα 17: Δοκιμή ολιγο(dT)/RNase H-Northern. Το crosshatched box αντιπροσωπεύει τα ολιγο(dT). Στο παράδειγμα, το ① απεικονίζει την κατάσταση πριν την πολυαδενυλίωση, ενώ το ② την κατάσταση μετά την πολυαδενυλίωση, όπου το μήκος της ουράς είναι μεγαλύτερο.

Πρόσφατα, ωστόσο, έχουν αναπτυχθεί δύο τεχνικές που βασίζονται στη σύνθεση cDNA από έναν εκκινητή ολιγο(dT) και την επακόλουθη ενίσχυση των προϊόντων cDNA με PCR, οι οποίες παρέχουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με την παραπάνω μέθοδο. Αυτές οι δοκιμασίες, η RACE-PAT [rapid amplification of cDNA ends PAT] και η LM-PAT [ligase-mediated PAT], επιτρέπουν τη γρήγορη και ακριβή ποσοτικοποίηση του μήκους της πολυ(A) ουράς ανεξάρτητα από το μέγεθος του mRNA. Η δοκιμή RACE-PAT είναι κατάλληλη για την ανάλυση πολλών διαφορετικών δειγμάτων ή σε περιπτώσεις όπου υπάρχουν μεγάλες αλλαγές στην πολυαδενυλίωση. Το LM-PAT θυσιάζει ένα μέρος του χρόνου για να κερδίσει περισσότερο ακριβή ποσοτικοποίηση του μήκους της πολυ(A) ουράς. Προτιμάται όταν αναλύονται πολυ(A) ουρές μικρού μήκους ή όταν παρατηρούνται λιγότερο δραματικές αλλαγές στο μήκος της ουράς (Salles et. al, 1999).

Και οι δύο δοκιμασίες είναι δοκιμασίες δύο σταδίων: αρχικά, συντίθενται PAT cDNAs. Στη συνέχεια, το μήκος της πολυ(A) ουράς του κάθε mRNA εντός του δείγματος προσδιορίζεται με μια πρότυπη αντίδραση PCR.

2) RACE-PAT (Rapid Amplification of cDNA Ends-Poly(A) Test)

Στη δοκιμή RACE-PAT το ολικό RNA μεταγράφεται αντίστροφα με έναν εκκινητή ολιγο(dT) συνδεδεμένο σε μια αλληλουχία πλούσια σε G/C που ονομάζεται άγκυρα ολιγο(dT) [oligo(dT) anchor]. Υβριδοποίηση του εκκινητή ολιγο(dT) στις πολυ(A) ουρές του mRNA μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε σημείο κατά μήκος της πολυ(A) ουράς. Έτσι, συντίθεται με αντίστροφη μεταγραφή ένα ετερογενές σύνολο cDNAs που έχει υβριδοποιηθεί σε όλες τις πιθανές θέσεις (Εικόνα 18). Επακόλουθη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αυτού του συνόλου με έναν εξειδικευμένο εκκινητή (message-specific primer) και τον oligo(dT) anchor αποδίδει ένα μίγμα προϊόντων ενισχυμένων με PCR που αντιπροσωπεύουν το μήκος της πολυ(A) ουράς του mRNA που εξετάζεται. Η αλληλουχία anchor του oligo(dT) anchor χρησιμεύει στην προστασία της ουράς κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης με PCR. Μόλις συντεθούν τα first-strand cDNAs, είναι σταθερά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της κατάστασης της πολυ(A) ουράς οποιοδήποτε mRNA μέσα στο σύνολο με μια απλή PCR (Salles et. al, 1999).

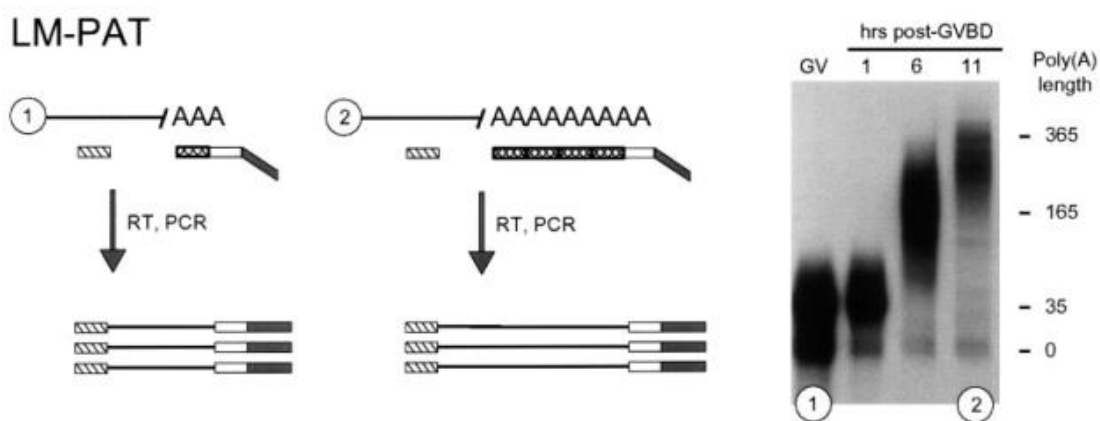


Εικόνα 18: Δοκιμή RACE-PAT. Στο παράδειγμα, το ① απεικονίζει την κατάσταση πριν την πολυαδενυλίωση, ενώ το ② την κατάσταση μετά την πολυαδενυλίωση, όπου το μήκος της ουράς είναι μεγαλύτερο. Λόγω της ικανότητας του ολιγο(dT) anchor να ξεκινήσει την αντίστροφη μεταγραφή από οποιοδήποτε σημείο κατά μήκος της ουράς, τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως smear. Το half-open/half-filled box αντιπροσωπεύει τον oligo(dT) anchor, ενώ το diagonal hatched box τον message-specific primer.

3) LM-PAT [Ligase-Mediated Poly(A) Test]

Η δοκιμή LM-PAT είναι μία τροποποίηση της δοκιμής RACE-PAT, που έχει σχεδιαστεί ώστε να είναι πιο ευαίσθητη στις μεταβολές του μήκους της πολυ(A) ουράς, στοχεύοντας ειδικά τον oligo(dT) anchor στο 3' άκρο της πολυ(A) ουράς. Για

να επιτευχθεί αυτό, η πολυ(A) ουρά κορένεται με φωσφορυλιωμένα ολιγο(dT)₁₂₋₁₈ [p(dT)₁₂₋₁₈] στους 42°C, παρουσία της DNA λιγάσης T4 (Εικόνα 19). Η λιγάση ενώνει τα φωσφορυλιωμένα ολιγο(dT) μεταξύ τους, δημιουργώντας ένα *insitu* αντίγραφο ολιγο(dT) της πολυ(A) ουράς. Σε μερικά μόρια RNA, το 5' και/ή το 3' άκρο της πολυ(A) ουράς μένει μη ζευγαρωμένο λόγω δυσμενούς υβριδοποίησης με τα p(dT)₁₂₋₁₈ στους 42°C. Στη συνέχεια, προστίθεται στην αντίδραση ο ολιγο(dT) anchor σε μία πενταπλάσια μοριακή περίσσεια [πάνω από το p(dT)₁₂₋₁₈] και ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας, ευνοώντας την υβριδοποίηση του ολιγο(dT) anchor στα μη ζευγαρωμένα άκρα. Αυτός ο προσδεμένος εκκινητής στη συνέχεια χρησιμοποιείται για να ξεκινήσει την αντίστροφη μεταγραφή του mRNA. Μόλις συντεθούν τα first-strand cDNAs, είναι σταθερά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της κατάστασης της πολυ(A) ουράς οποιουδήποτε mRNA ενός δείγματος με μια απλή PCR.



Εικόνα 19: Δοκιμή LM-PAT. Στο παράδειγμα, το ① απεικονίζει την κατάσταση πριν την πολυαδενυλίωση, ενώ το ② την κατάσταση μετά την πολυαδενυλίωση, όπου το μήκος της ουράς είναι μεγαλύτερο. Το cross hatched box αντιπροσωπεύει τα φωσφορυλιωμένα ολιγο(dT), το half-white/half-diagonally hatched box αντιπροσωπεύει τον oligo(dT) anchor, το diagonal hatched box αντιπροσωπεύει τον message-specific primer.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή LM-PAT, με σκοπό να καθοριστεί το μήκος της πολυ(A) ουράς των επιλεγμένων mRNAs – EPHA7, ROBO2 και CYTH4 – πριν και μετά την αποσιώπηση των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8. Τα συγκεκριμένα μετάγραφα παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε κύτταρα καρκινώματος εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα, στα οποία είχε γίνει σίγηση των CNOT6 και CNOT6L. Αυτό σημαίνει ότι οι παράγοντες αυτοί μπορεί να αποτελούν στόχοι των δύο απαδενυλασών. Έτσι, θέλοντας να εξετάσουμε αν ισχύει αυτό, και ταυτόχρονα να ελέγξουμε την επίδραση των υπόλοιπων απαδενυλασών στη σταθερότητα των mRNAs, επιχειρήσαμε να εντοπίσουμε διαφορές στα μήκη των πολυ(A) ουρών των mRNAs

ανάμεσα στα αποσιωπημένα κύτταρα και στα κύτταρα στα οποία δεν είχε γίνει αποσιώπηση των απαδενυλασών.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τη δοκιμή LM-PAT περιγράφεται στο κείμενο του 'Assaying the Polyadenylation State of mRNAs' (Salles et. al, 1999), το οποίο περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

Σύνθεση cDNA

1. Τοποθετούμε 5 μ l RNA από κάθε δείγμα (αποσιωπημένα κύτταρα και κύτταρα MockSH) κατάλληλης συγκέντρωσης (ιδανικά 250 ng ολικού RNA) σε αποστειρωμένο microfuge tube ελεύθερο ριβονουκλεασών.
2. Προσθέτουμε 2 μ l $\rho(\text{dT})_{12-18}$ (10 ng/ μ l) σε κάθε δείγμα RNA.
3. Θερμαίνουμε στους 65°C για 10 min
4. Μεταφέρουμε αμέσως τα tubes στους 42°C. Η απευθείας μεταφορά στους 42°C βοηθά στην αποτροπή τηςυβριδοποίησης των $\rho(\text{dT})_{12-18}$ στο τέλοςτης πολυ (A) ουράς.
5. Προσθέτουμε 13 μ l από το ακόλουθο προθερμασμένο (42°C) μίγμα και αναμιγνύουμε με πιπέτα:
 - 4 μ l 5X ρυθμιστικό της αντίστροφης μεταγραφάσης Primescript
 - 1 μ l αναστολείς ριβονουκλεάσης (40 U/ μ l)
 - 4 μ l DTT 0,05 M
 - 1 μ l μίγμα dNTPs 10 mM
 - 1 μ l ATP 10 mM (απαιτείται από την λιγάση)
 - 2 μ l T4 DNA λιγάση (10 WeissU/ μ l) (6-40 U)
6. Επωάζουμε στους 42°C για 30 min.
7. Στο τέλος της επώασης, και όσο τα δείγματα είναι στους 42°C, προσθέτουμε 1 μ l oligo(dT) anchor συγκέντρωσης 200 ng/ μ l. Κάνουμε vortex, spindown, και επωάζουμε στους 12°C για 2 ώρες.
8. Μεταφέρουμε τα δείγματα στους 42°C για 2 min (αντίδραση λιγάσης)
9. Προσθέτουμε 0,5 μ l αντίστροφης μεταγραφάσης Primescript (10 U / ml). Κάνουμε vortex και επωάζουμε στους 42°C για 1 ώρα. Η θερμική αδρανοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης και της λιγάσης γίνεται με επώαση στους 65 ° C για 20 λεπτά.
10. Η σύνθεση του cDNA έχει πλέον ολοκληρωθεί και το cDNA είναι έτοιμο για ενίσχυση με PCR ή μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C.

PCR

Με επακόλουθη αντίδραση PCR ενισχύουμε τα επιλεγμένα μετάγραφα ΕΡΗΑ7, ROBO2 και CYTH4, χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι τα παρακάτω:

- 5 µl 10X Kapa Taq PCR buffer
- 1 µl dNTP mix 10 mM
- 2 µl ολιγο (dT) anchor 200 ng/µl (Reverse primer)
- 2 µl message-specific primer 25 pmol/µl (Forward primer)
- 0,2 µl πολυμεράση Kapa Taq
- 3 µl PAT cDNA
- 36,8 µl H₂O (έως τελικό όγκο 50 µl)

Το θερμικό προφίλ του θερμοκυκλοποιητή της αντίδρασης PCR καθώς και οι αλληλουχίες των message-specific primers που χρησιμοποιήθηκαν απεικονίζονται στους πίνακες 7 και 8.

Πίνακας 7. Θερμικό προφίλ ενίσχυσης των παραγόντων ΕΡΗΑ7, ROBO2, CYTH4.

| Type of reaction | Cycling conditions |
|---------------------------|---|
| Initial denaturation | 95°C, 3 min |
| Amplification (x35cycles) | 95 °C, 30 sec 55 °C (ή 50 °C), 45 sec* 72 °C, 1 min |
| Final extension | 72 °C, 7 min |

*Το Ta που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση ενίσχυσης των ROBO2 και CYTH4 ήταν 55°C, ενώ για τον ΕΡΗΑ7 ήταν 50°C, καθώς το T_m του είναι χαμηλότερο από το T_m των υπόλοιπων παραγόντων.

Πίνακας 8. Εκκινητές των παραγόντων ΕΡΗΑ7, ROBO2, CYTH4, τα T_m αυτών και τα μεγέθη των προϊόντων.

| mRNA | Primer Sequence 5'→3' | T _m (°C) | Product size (bp) |
|-------|-----------------------|---------------------|-------------------|
| ROBO2 | GTACTTCAAATGAAACACCAT | 52 | 339 |
| ΕΡΗΑ7 | GTGTTTTTAAGACAATTA | 42.3 | 382 |
| CYTH4 | GTCACCTCATTGGTCCATG | 56.7 | 247 |

Η αλληλουχία των φωσφορυλιωμένων ολιγο(dT)₁₂₋₁₈ (10 ng/μl) [p(dT)₁₂₋₁₈] και του oligo (dT) anchor (200 ng/ul) ήταν αντίστοιχα οι εξής:

p(dT)₁₂₋₁₈: pTTTTTTTTTTTTTTTTT

Oligo(dT) anchor: 5'-GGGGATCCGCGGTTTTTTTTTT-3'

Υλικά-Αντιδραστήρια

- Reverse transcriptase Primescript (Takara)
- RT Buffer 5x (Takara)
- T4 DNA ligase
- 10x PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500 mM KCl, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl₂) (Kapa)
- Taq polymerase (Kapa)

3.7 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR (LM-PAT) σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR του LM-PAT πραγματοποιήθηκε σε πηκτή αγαρόζης υψηλής ανάλυσης (high resolution agarose) 2,5%. Ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα TBE 1X*, με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 60V και παρακολούθηση των χρωστικών που ενυπάρχουν στο loading buffer.

*Σημείωση:

Χρησιμοποιούμε TBE αντί TAE γιατί:

-Το TBE (Tris-borate-EDTA) είναι καλύτερο αγωγίμο μέσο σε σύγκριση με το TAE (Tris-acetate-EDTA), οπότε είναι λιγότερο επιρρεπές στην υπερθέρμανση και χρησιμοποιείται για μεγάλες διαδρομές.

-Το TBE δίνει καλύτερη ανάλυση μπάντας DNA σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης σε σύγκριση με το TAE.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- TBE 10X: Tris base 121,14 g/mol, βορικό οξύ 61,83 g/mol, EDTA 0,5M pH=8
- Loading buffer 6x: Bromophenol Blue 0,09%, Xylene Cyanol 0,09%, Γλυκερόλη 60%, EDTA 60 mM
- Αγαρόζη (Sigma)
- DNA μοριακός μάρτυρας GeneRuler 1 kb Plus (Thermo Fischer)
- DNA μοριακός μάρτυρας RTU 1 kb (GeneDireX)

- Midori Green DNA stain (Nippon Genetics)
- Bromophenolblue (Research Organics)
- Xylene Cyanol (Merck)
- Γλυκερόλη(Panreac)
- EDTA (Merck)
- Tris (Merck)
- Βορικό οξύ (Merck)

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

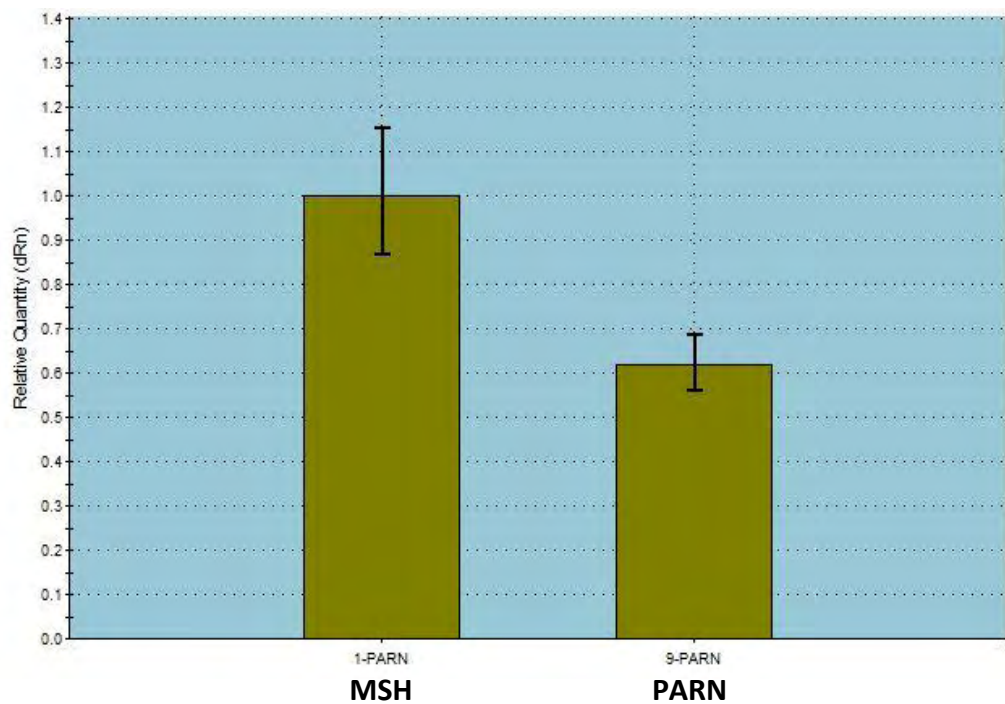
4.1 Έλεγχος της αποσιώπησης των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8, με ποσοτική RT-PCR (qPCR)

Αρχικά, έγινε διαμόλυνση καρκινικών κύτταρων NCI-H520 με shRNAs έναντι των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8. Για κάθε απαδενυλάση χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά shRNA. Το σχετικό πρωτόκολλο διαμόλυνσης περιγράφεται στην ενότητα 3.3. Η επιλογή των κυττάρων που έλαβαν το πλασμίδιο έγινε με πουρομυκίνη και η συλλογή τους έγινε 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση, ικανό χρονικό διάστημα για να επιτύχουμε τη μέγιστη αποσιώπηση. Ως μάρτυρες της αποτελεσματικότητας και της εξειδίκευσης της διαδικασίας της διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν, εκτός από κύτταρα φυσικού τύπου (WT), κύτταρα που διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα που έφερε μια εξειδικευμένη αλληλουχία shRNA, η οποία δεν έχει ομολογία προς κανένα γνωστό mRNA θηλαστικών (mock shRNA, MSH), ώστε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο οι όποιες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των απαδενυλασών να οφείλονται στην διαδικασία της διαμόλυνσης καθ' αυτή. Ακολούθησε η συλλογή των κυττάρων NCI-H520 και η απομόνωση ολικού RNA, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα 3.4.

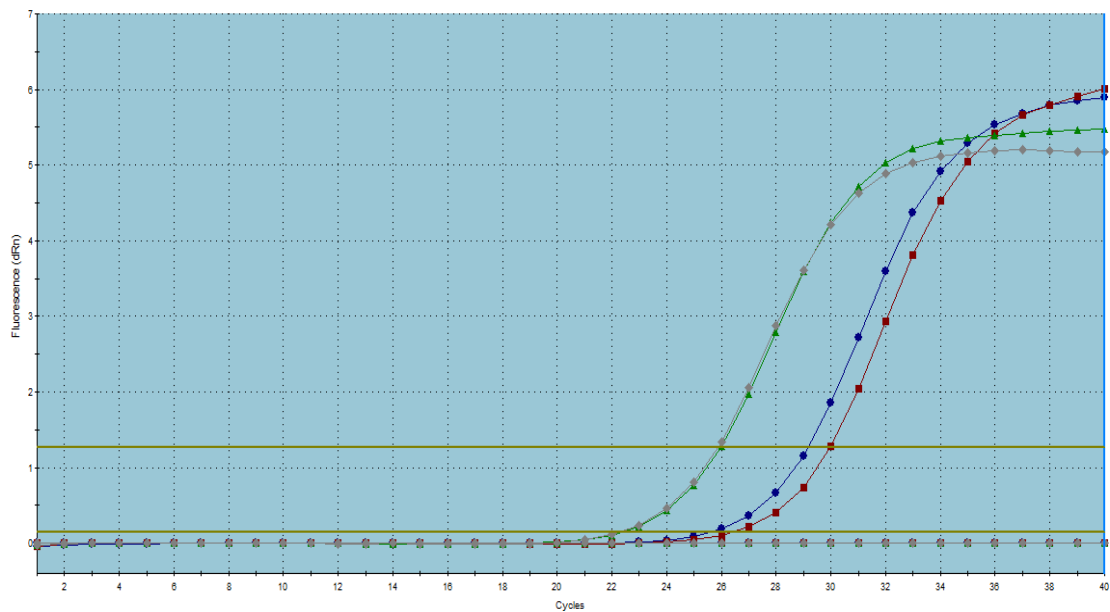
Έπειτα, προκειμένου να γίνει ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης των απαδενυλασών και κατ' επέκταση να ελεγχθεί εάν η αποσιώπηση των ενζύμων ήταν επιτυχής, εφαρμόστηκε συγκριτική ποσοτική RealTime PCR (Comparative qRT-PCR), όπου ενισχύθηκαν τα mRNAs των απαδενυλασών αυτών. Η μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των mRNAs κανονικοποιήθηκε με το πρότυπο έκφρασής τους στα κύτταρα MSH, στα οποία δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή σε σχέση με τα κύτταρα WT. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-ακτίνης. Η ανάλυση των δεδομένων μετά την ενίσχυση των δειγμάτων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος MxPro.

Στις εικόνες που ακολουθούν φαίνεται ότι τα επίπεδα έκφρασης της κάθε απαδενυλάσης είναι μειωμένα, μετά από την αποσιώπησης της με τη χρήση των shRNAs, σε σύγκριση με τα κύτταρα MockSH.

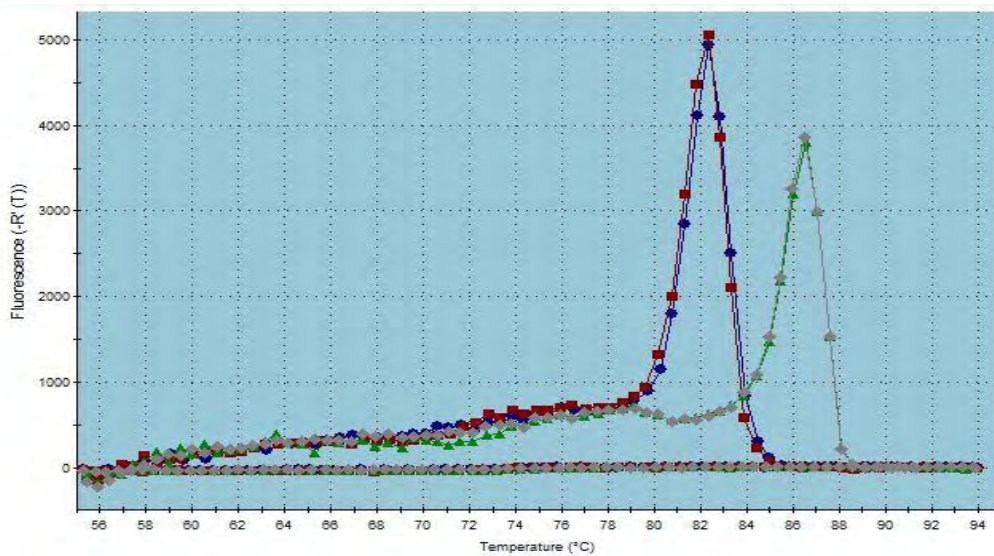
Αποσιώπηση της PARN



Εικόνα 20: Επίπεδα έκφρασης της PARN, μετά από αποσιώπηση της PARN, σε κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα με shRNAs έναντι αυτής (**PARN**), σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασής της σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα που έφερε αλληλουχία shRNA, η οποία δεν έχει ομολογία προς κανένα γνωστό γονίδιο των θηλαστικών, MockSH (**MSH**), τα οποία ανακτήθηκαν από το διάγραμμα Relative Quantitative Chart.

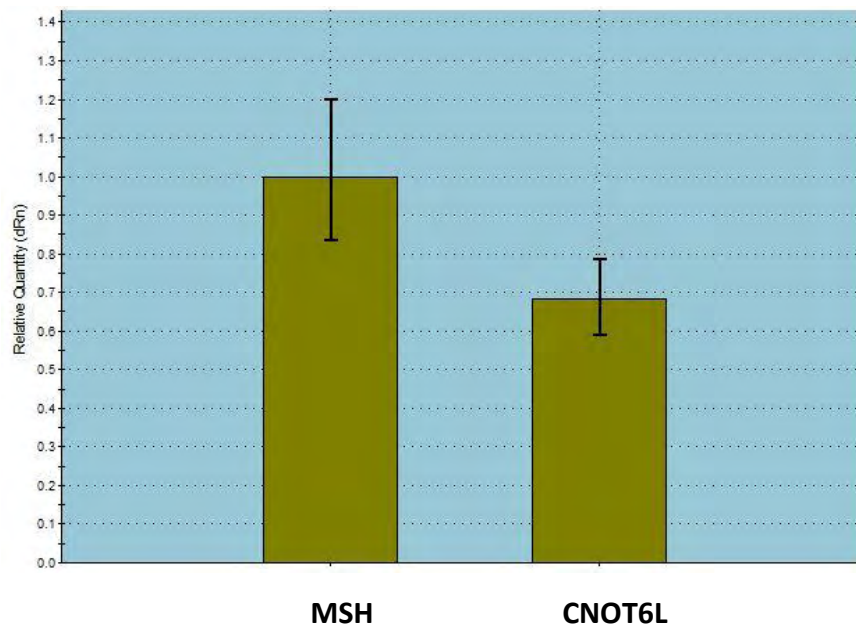


Εικόνα 21: Έλεγχος αποσιώπησης PARN: καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού (Amplification Plot). Οι καμπύλες με Ct=26 αντιστοιχούν σε προϊόντα της β-ακτίνης, ενώ οι καμπύλες με Ct=30 αντιστοιχούν σε προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της PARN.

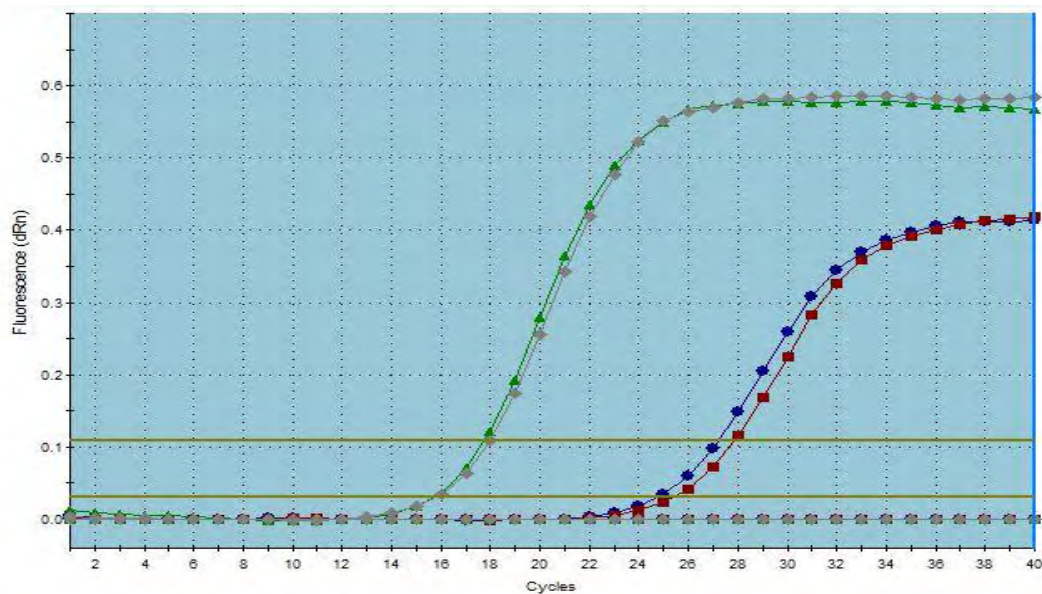


Εικόνα 22: Έλεγχος αποσιώπησης PARN: διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού (Dissociation Curve). Η καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού στη θερμοκρασία 82°C αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της PARN, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού στη θερμοκρασία 87°C, αντιστοιχεί σε προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75 °C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα.

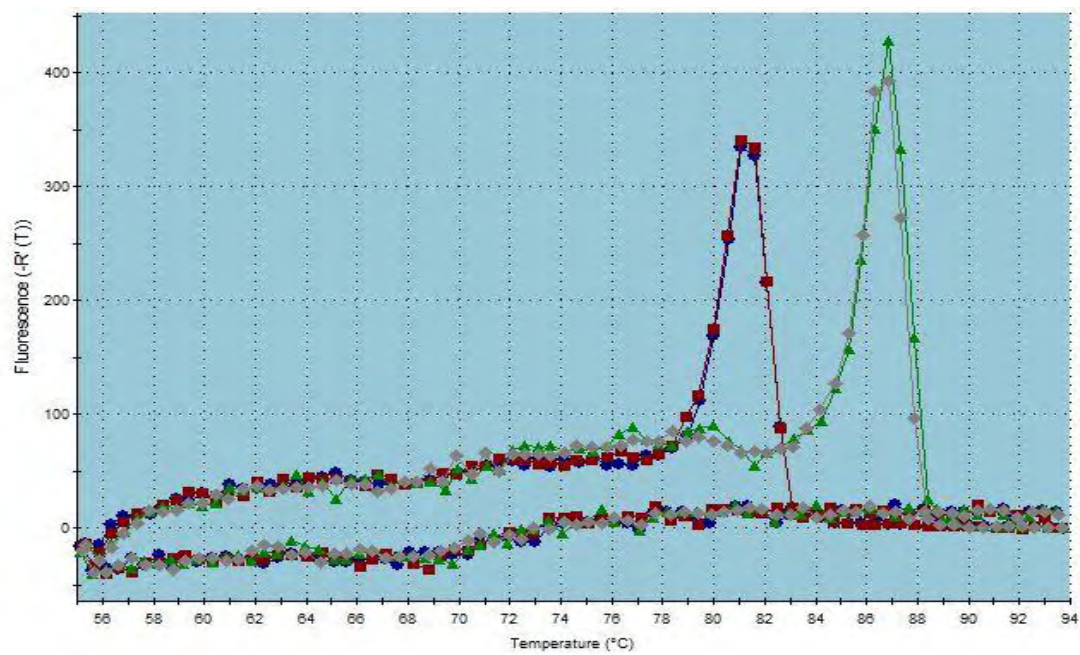
Αποσιώπηση της CNOT6-LIKE



Εικόνα 23: Επίπεδα έκφρασης της CNOT6L, μετά από αποσιώπηση της CNOT6L, σε κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα με shRNAs έναντι αυτής (**CNOT6L**), σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασής της σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα που έφερε αλληλουχία shRNA, η οποία δεν έχει ομολογία προς κανένα γνωστό γονίδιο των θηλαστικών, MockSH (**MSH**), τα οποία ανακτήθηκαν από το διάγραμμα Relative Quantitative Chart.

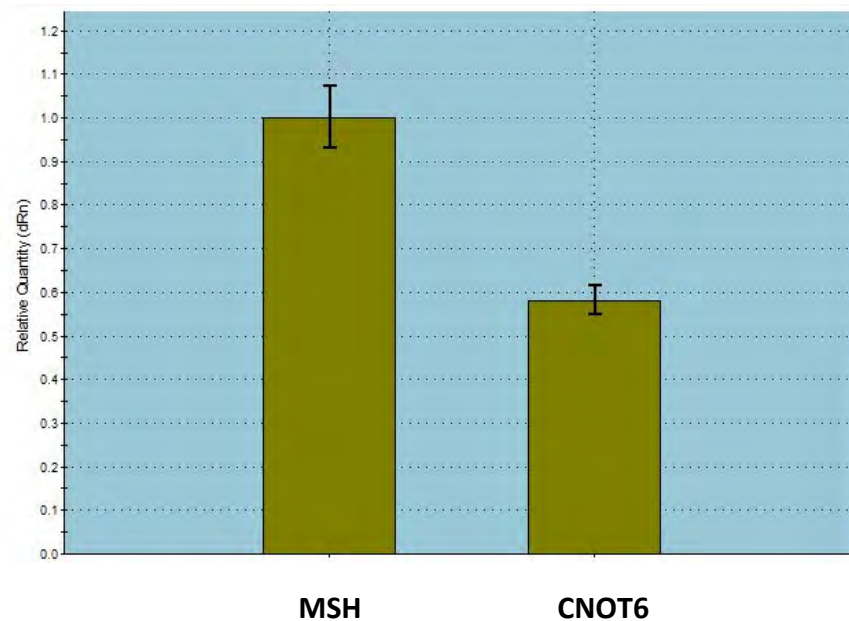


Εικόνα 24: Έλεγχος αποσιώπησης CNOT6-LIKE: καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού (Amplification Plot). Οι καμπύλες με Ct=18 αντιστοιχούν σε προϊόντα της β-ακτίνης, ενώ οι καμπύλες με Ct=28 αντιστοιχούν σε προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της CNOT6L.

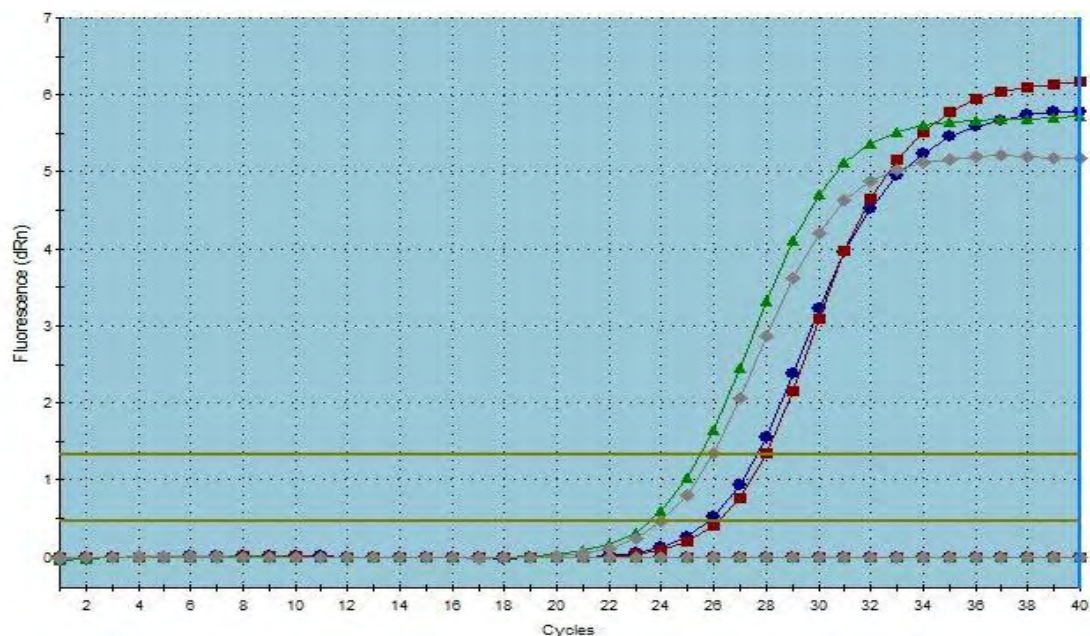


Εικόνα 25: Έλεγχος αποσιώπησης CNOT6-LIKE: διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού (Dissociation Curve). Η καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 81°C αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της CNOT6L, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 87°C, αντιστοιχεί στα προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75 °C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

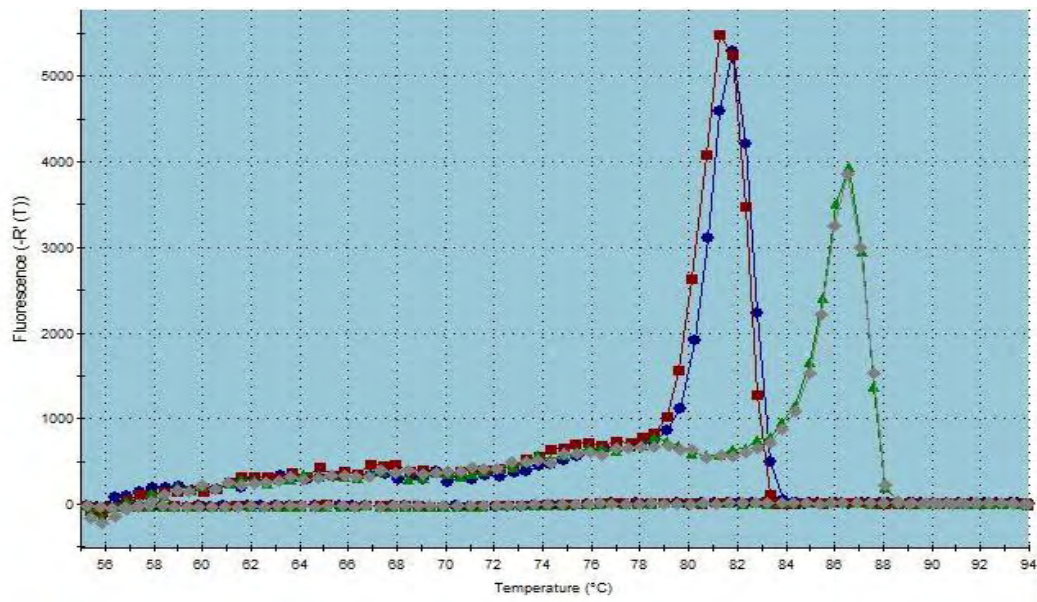
Αποσιώπηση της CNOT6



Εικόνα 26: Επίπεδα έκφρασης της CNOT6, μετά από αποσιώπηση της CNOT6, σε κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα με shRNAs (**CNOT6**), σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασής της σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα που έφερε αλληλουχία shRNA, η οποία δεν έχει ομολογία προς κανένα γνωστό γονίδιο των θηλαστικών, MockSH (**MSH**), τα οποία ανακτήθηκαν από το διάγραμμα Relative Quantitative Chart.

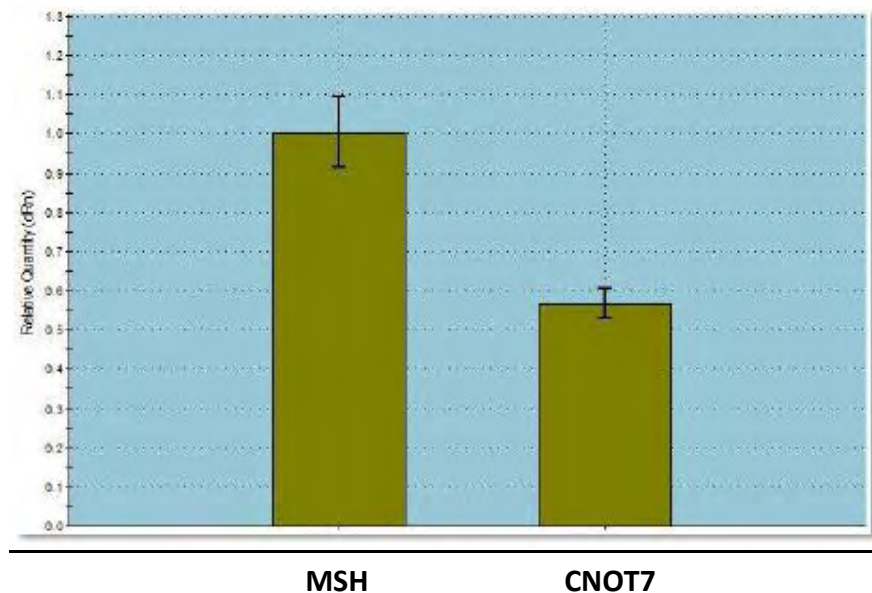


Εικόνα 27: Έλεγχος αποσιώπησης CNOT6: καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού (Amplification Plot). Οι καμπύλες με Ct=26 αντιστοιχούν σε προϊόντα της β-ακτίνης, ενώ οι καμπύλες με Ct=28 αντιστοιχούν σε προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της CNOT6.

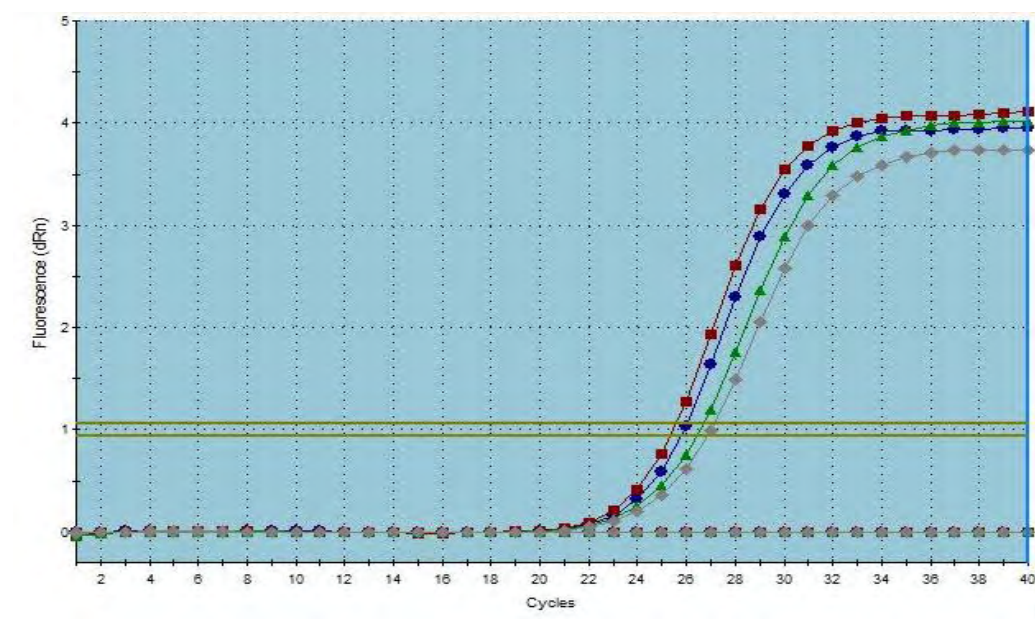


Εικόνα 28: Έλεγχος αποσιώπησης CNOT6: διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού (Dissociation Curve). Η καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 82°C αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της CNOT6, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 87°C, αντιστοιχεί στα προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75 °C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

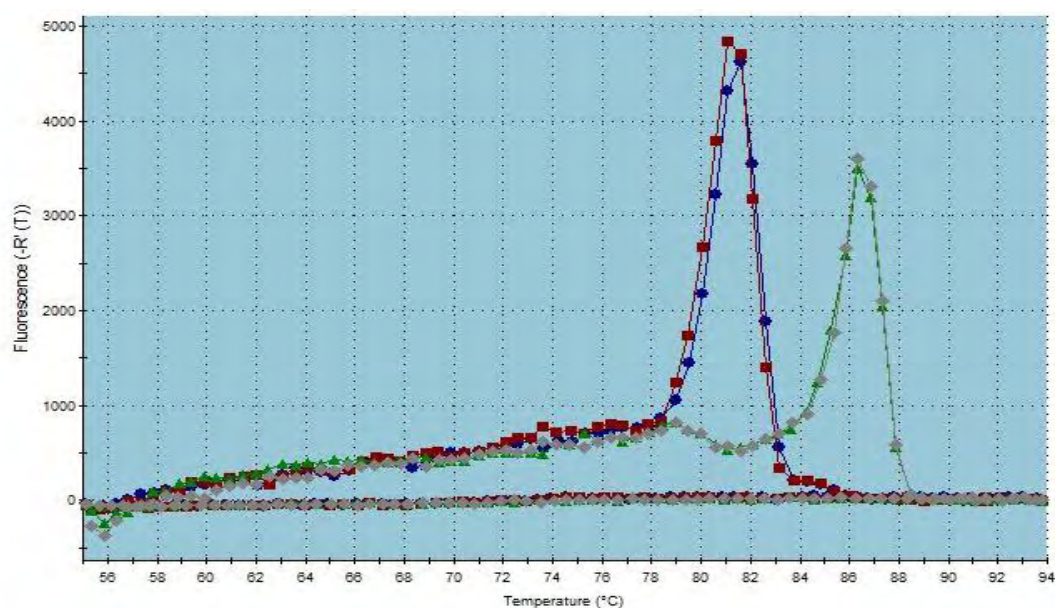
Αποσιώπηση της CNOT7



Εικόνα 29: Επίπεδα έκφρασης της CNOT7, μετά από αποσιώπηση της CNOT7, σε κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα με shRNAs (**CNOT7**), σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασής της σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα που έφερε αλληλουχία shRNA, η οποία δεν έχει ομολογία προς κανένα γνωστό γονίδιο των θηλαστικών, MockSH (**MSH**), τα οποία ανακτήθηκαν από το διάγραμμα Relative Quantitative Chart.

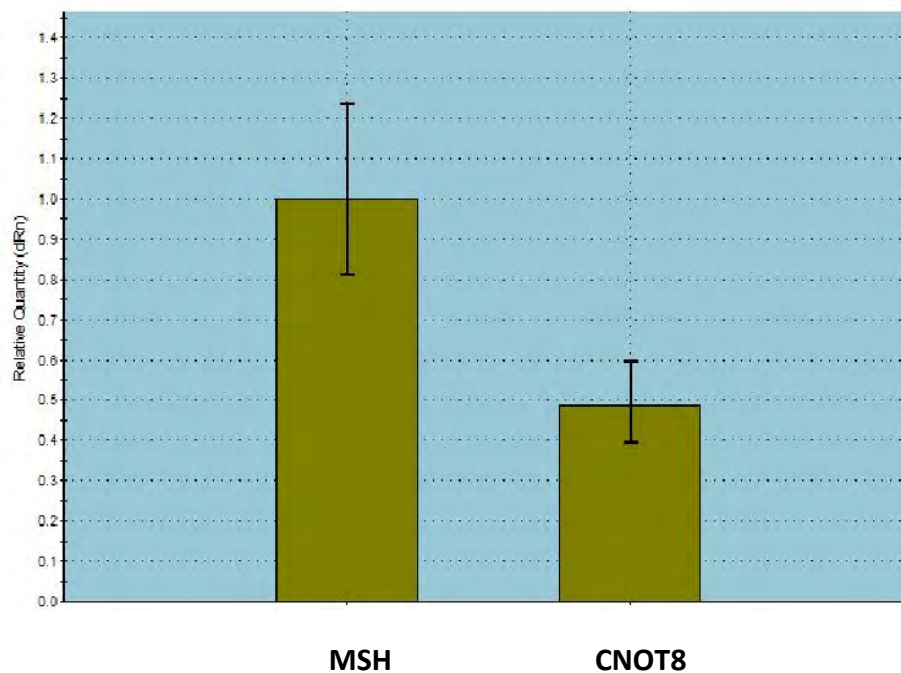


Εικόνα 30: Έλεγχος αποσιώπησης CNOT7: καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού (Amplification Plot). Οι καμπύλες με Ct=27 αντιστοιχούν σε προϊόντα της β-ακτίνης, ενώ οι καμπύλες με Ct=25 αντιστοιχούν σε προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της CNOT7.

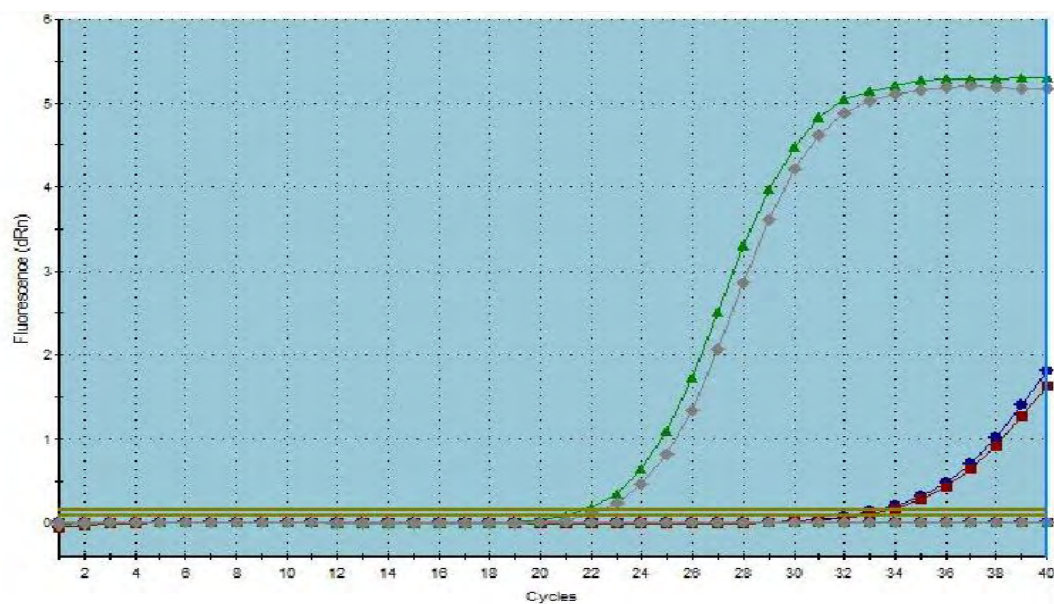


Εικόνα 31: Έλεγχος αποσιώπησης CNOT7: διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού (Dissociation Curve). Η καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 82°C αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της CNOT7, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 86°C, αντιστοιχεί στα προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75 °C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

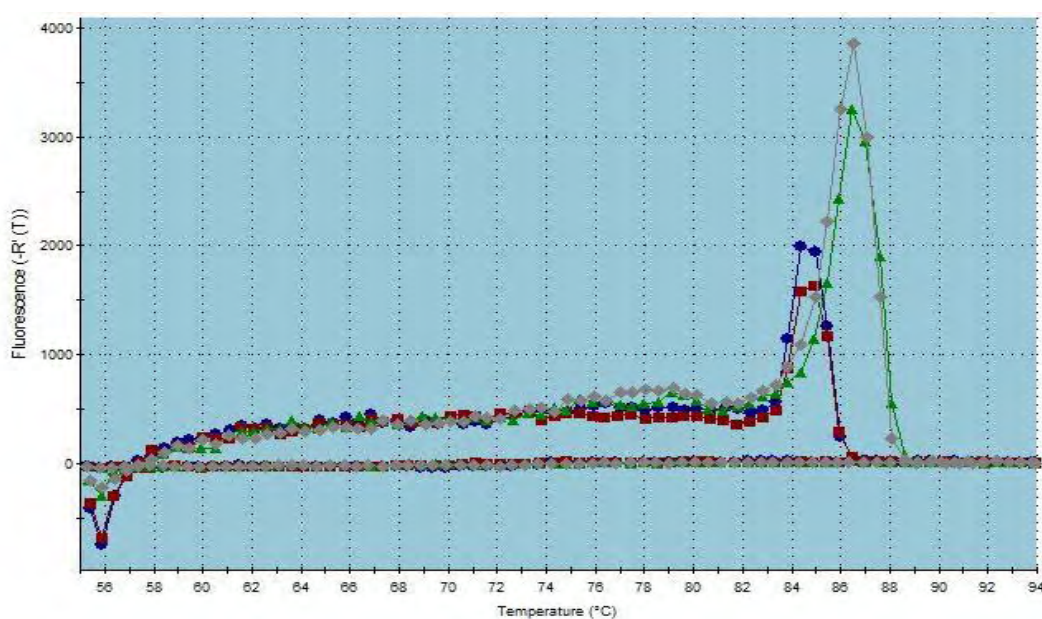
Αποσιώπηση της CNOT8



Εικόνα 32: Επίπεδα έκφρασης της CNOT8, μετά από αποσιώπηση της CNOT8, σε κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα με shRNAs (**CNOT8**), σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασής της σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα που έφερε αλληλουχία shRNA, η οποία δεν έχει ομολογία προς κανένα γνωστό γονίδιο των θηλαστικών, MockSH (**MSH**), τα οποία ανακτήθηκαν από το διάγραμμα Relative Quantitative Chart.



Εικόνα 33: Έλεγχος αποσιώπησης CNOT8: καμπύλη ενίσχυσης φθορισμού (Amplification Plot). Οι καμπύλες με Ct=22 αντιστοιχούν σε προϊόντα της β-ακτίνης, ενώ οι καμπύλες με Ct=34 αντιστοιχούν σε προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της CNOT8.



Εικόνα 34: Έλεγχος αποσιώπησης CNOT8: διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού (Dissociation Curve). Η καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 84°C αντιπροσωπεύει τα προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της CNOT8, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 87°C, αντιστοιχεί στα προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75 °C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

4.2 Επίδραση της αποσιώπησης των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 στο μήκος των πολυ(A) ουρών των μεταγράφων ERHA7, ROBO2, CYTH4

Μετά την επιβεβαίωση της αποσιώπησης των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8, ακολούθησε ο προσδιορισμός της κατάστασης πολυαδενυλίωσης των επιλεγμένων μεταγράφων ERHA7, ROBO2 και CYTH4, με τη δοκιμή LM-PAT, τόσο σε αποσιωπημένα κύτταρα NCI-H520, όσο και σε κύτταρα MockSH (μη αποσιωπημένα). Η δοκιμή LM-PAT περιλαμβάνει τη σύνθεση cDNA από το ολικό RNA των κυττάρων, με τη βοήθεια ενός εκκινητή ολιγο(dT) που στοχεύει ειδικά στο 3' άκρο της πολυ(A) ουράς, και την επακόλουθη ενίσχυση των υπό μελέτη μεταγράφων με τη μέθοδο της PCR. Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του cDNA και την PCR περιγράφονται στην ενότητα 3.6.

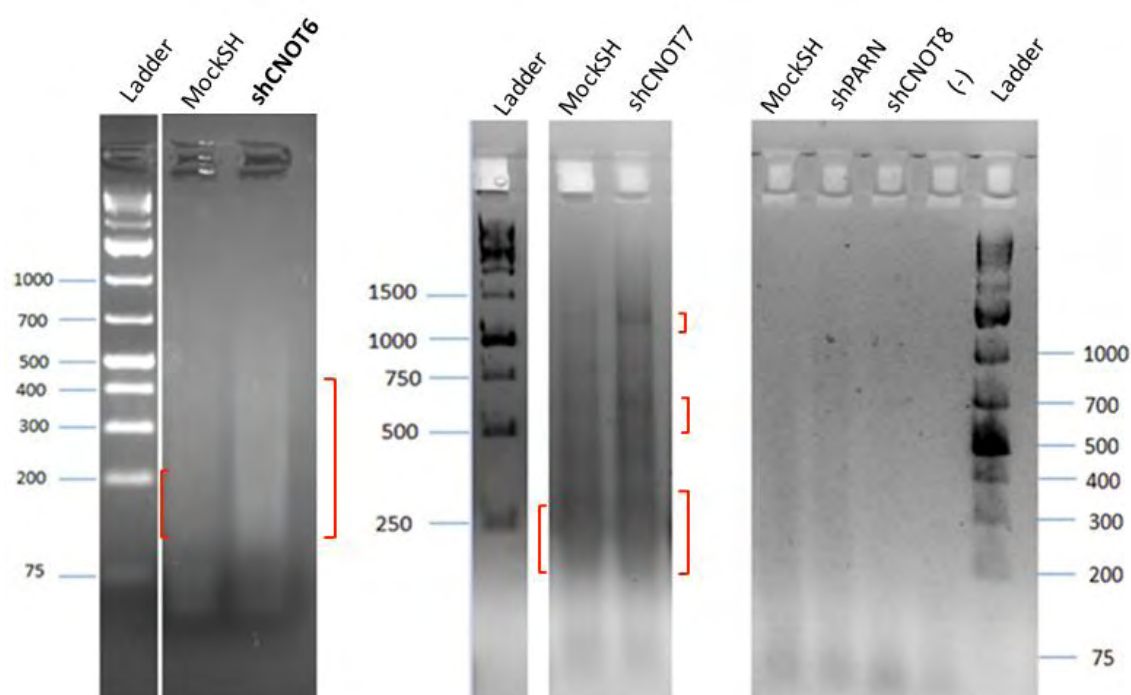
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, σε πηκτή αгарόζης υψηλής ανάλυσης 2,5%. Παρακάτω παρατίθενται οι εικόνες των

ηλεκτροφορήσεων. Σε συγκεκριμένα μετάγραφα βλέπουμε πως υπάρχουν εμφανείς διαφορές μεταξύ των κυττάρων που έχουν υποστεί αποσιώπηση και των MSH.

Να σημειωθεί ότι σε κάθε αποσιώπηση η σύγκριση γίνεται με συγκεκριμένο MockSH (σύμφωνα με τη διάταξη κάθε εικόνας), γιατί έχουν προκύψει από διαφορετικά πειράματα αποσιώπησης.

Επίσης, τα κόκκινα βέλη και οι γραμμές που υπάρχουν στις εικόνες που ακολουθούν απεικονίζουν αλλαγές στην πολυ(A) ουρά των μεταγράφων.

ROBO2 (product size: 339 bp)



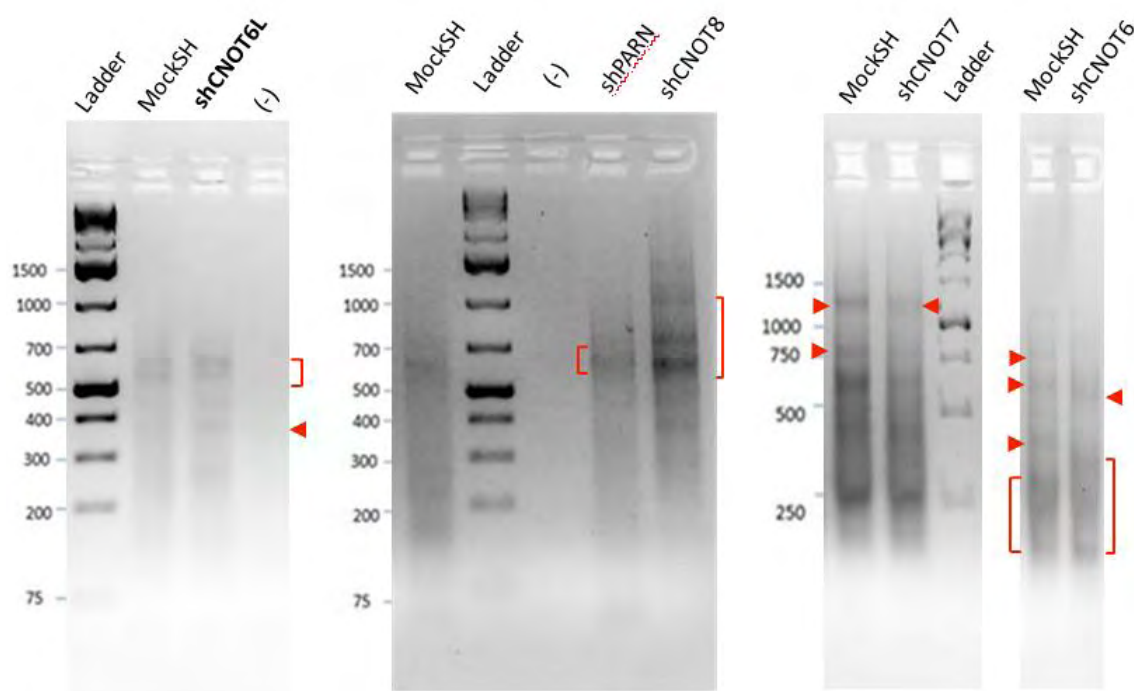
Εικόνα 35: Δοκιμή LM-PAT για το μετάγραφο ROBO2 σε κύτταρα NCI-H520 μετά από αποσιώπηση καθε μιάς από τις απαδενυλάσες PARN, CNOT6, CNOT7, CNOT8 (shPARN, shCNOT6, shCNOT7, shCNOT8) και σε κύτταρα που δεν είχαν υποστεί αποσιώπηση (κύτταρα MockSH). Οι κόκκινες αγκύλες υποδεικνύουν πολυ(A) ουρές.

ROBO2:

Όσον αφορά παράγοντα ROBO2, ήδη γνωρίζουμε από προκαταρκτικά πειράματα μικροσυστοιχιών του εργαστηρίου που προηγήθηκαν ότι επηρεάζεται από την απαδενυλάση CNOT6 (Μαραγκοζίδης Π, 2016). Η ανάλυση με την τεχνική LM-PAT έδειξε ότι εκτός από αυτή, επηρεάζεται και από την απαδενυλάση CNOT7,

καθώς παρατηρούμε διαφοροποίηση στην κατανομή της πολυ(A) ουράς του μεταγράφου στα αποσιωπημένα κύτταρα (shCNOT7) σε σύγκριση με τα κύτταρα MockSH (Εικόνα 35).

CYTH4 (product size: 247 bp)

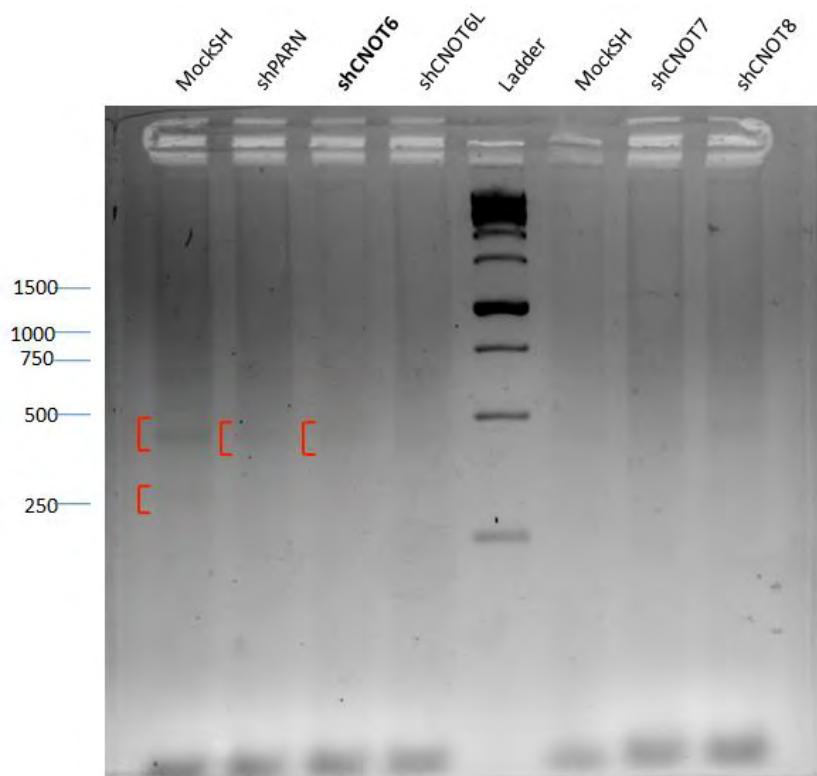


Εικόνα 36: Δοκιμή LM-PAT για το μετάγραφο CYTH4 σε κύτταρα NCI-H520 μετά από αποσιώπηση καθε μίας από τις απαδενυλάσες PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7, CNOT8 (shPARN, shCNOT6, shCNOT6L, shCNOT7, shCNOT8) και σε κύτταρα που δεν είχαν υποστεί αποσιώπηση (κύτταρα MockSH). Οι κόκκινες αγκύλες και τα βέλη υποδεικνύουν πολυ(A) ουρές.

CYTH4:

Όσον αφορά τον παράγοντα CYTH4, γνωρίζουμε από προκαταρκτικά πειράματα μικροσυστοιχιών του εργαστηρίου που προηγήθηκαν ότι επηρεάζεται από την απαδενυλάση CNOT6L (Μαραγκοζίδης Π, 2016). Η ανάλυση με την τεχνική LM-PAT έδειξε ότι εκτός από αυτή, επηρεάζεται και από άλλες απαδενυλάσες. Πιο συγκεκριμένα μπορούμε να δούμε ότι επηρεάζεται από τις απαδενυλάσες CNOT8, CNOT7 και CNOT6, γιατί παρατηρούμε ότι καθορίζουν με διαφορετικό τρόπο την κατανομή της πολυ(A) ουράς του CYTH4 (Εικόνα 36).

EPHA7 (product size: 382 bp)



Εικόνα 37: Δοκιμή LM-PAT για το μετάγραφο EPHA7 σε κύτταρα NCI-H520 μετά από αποσιώπηση καθε μιάς από τις απαδενυλάσες PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7, CNOT8 (shPARN, shCNOT6, shCNOT6L, shCNOT7, shCNOT8) και σε κύτταρα που δεν είχαν υποστεί αποσιώπηση (κύτταρα MockSH). Οι κόκκινες αγκύλες υποδεικνύουν πολυ(A) ουρές.

EPHA7:

Ο παράγοντας EPHA7 γνωρίζουμε από τα πειράματα μικροσυστοιχιών ότι επηρεάζεται από την απαδενυλάση CNOT6. Όσον αφορά, όμως, από την ανάλυση της κατάστασης πολυαδενυλίωσης με την τεχνική LM-PAT για τον παράγοντα EPHA7, δεν παρατηρούμε ιδιαίτερες αλλαγές στην κατανομή των πολυ(A) ουρών μεταξύ των κυττάρων στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση των απαδενυλασών και στα κύτταρα MockSH (Εικόνα 37), οπότε δεν μπορούμε να εξάγουμε συμπέρασμα για το αν οι υπόλοιπες απαδενυλάσες επηρεάζουν το συγκεκριμένο παράγοντα.

5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ένα από τα γνωρίσματα που χαρακτηρίζουν τον καρκίνο αποτελεί η απορρύθμιση της αποικοδόμησης του mRNA. Μειωμένη αποικοδόμηση ογκογόνων mRNA μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη σταθερότητα ογκογόνων μεταγράφων, ενώ αυξημένη αποικοδόμηση ογκοκατασταλτικών mRNA μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένα επίπεδα ογκοκατασταλτικών προϊόντων. Πρώτο και καθοριστικό βήμα στην αποικοδόμηση του mRNA είναι η βράχυνση της πολυ(A) ουράς που υπάρχει στο 3' άκρο του, μια διαδικασία που ονομάζεται απαδενυλίωση και καταλύεται από τα ένζυμα απαδενυλάσες. Επομένως, τα ένζυμα αυτά είναι πιθανόν σημαντικοί παράγοντες στη διαδικασία της ογκογένεσης.

Μελέτες πάνω στο βιολογικό ρόλο των απαδενυλασών στην καρκινογένεση του πνεύμονα έχουν ήδη πραγματοποιηθεί. Κάποιες από αυτές έχουν δείξει ότι τα επίπεδα έκφρασης πολλών απαδενυλασών είναι διαφοροποιημένα σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, σε σύγκριση με μη παθολογικά δείγματα. Επίσης στοιχεία δείχνουν την εμπλοκή πολλών απαδενυλασών στην εκδήλωση οξείας λευχαιμίας.

Στην παρούσα εργασία γίνεται μια προσπάθεια να μελετηθεί περαιτέρω ο ρόλος των απαδενυλασών στον καρκίνο του πνεύμονα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6-LIKE, CNOT7 και CNOT8 στα επιλεγμένα mRNAs των παραγόντων Ephrin type-A receptor 7 (EPHA7), Roundabout Guidance Receptor 2 (ROBO2), Cytohesin-4 (CYTH4). Η επιλογή των παραγόντων βασίστηκε σε ανάλυση δεδομένων μικροσυστοιχιών του εργαστηρίου. Μετά από αποσιώπηση των απαδενυλασών CNOT6 και CNOT6-LIKE, βρέθηκε ότι εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε δείγματα από καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα (κυτταρική σειρά NCI-H520), οπότε πιθανώς να ελέγχονται ειδικά από αυτές. Για να ελεγχθεί αυτό, έγινε αποσιώπηση των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7 ΚΑΙ CNOT8 σε NCI-H520 κύτταρα, που αποτελούν κυτταρική σειρά από καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα, με τη χρήση πλασμιδιακού φορέα, ο οποίος φέρει αλληλουχία που κωδικοποιεί shRNAs έναντι των συγκεκριμένων απαδενυλασών, και σε κύτταρα διαμολυσμένα με πλασμιδιακό φορέα που έφερε μια εξειδικευμένη αλληλουχία shRNA, η οποία δεν έχει ομολογία προς κανένα γνωστό γονίδιο των θηλαστικών (MSH). Η επιτυχία της αποσιώπησης επιβεβαιώθηκε με ποσοτική Real Time PCR, συγκρίνοντας τα επίπεδα έκφρασης των απαδενυλασών ανάμεσα σε κύτταρα NCI-H520 που διαμολύνθηκαν με shRNAs και σε κύτταρα NCI-H520 MSH. Ακολούθησε σύγκριση του μήκους των πολυ(A) ουρών επιλεγμένων mRNAs, με τη τεχνική LM-PAT, στα διαμολυσμένα κύτταρα.

Τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας έδειξαν ότι οι απαδενυλάσες επηρέασαν με διαφορετικό τρόπο το μήκος των πολυ(A) ουρών των επιλεγμένων mRNAs. Για παράδειγμα, ο παράγοντας ROBO2 επηρεάστηκε τόσο από την CNOT6,

όσο και από την CNOT7, γεγονός που δείχνει ότι υπάρχει διαφοροποίηση από τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών. Πιθανόν, περισσότερες απαδενυλάσεις ελέγχουν τη σταθερότητα ενός mRNA, λειτουργώντας συμπληρωματικά μεταξύ τους, ώστε να εξασφαλισθεί η αποτελεσματική αποικοδόμηση του mRNA. Όσον αφορά στην περίπτωση όπου ένα μετάγραφο επηρεάζεται από μία απαδενυλάση, θα πρέπει να εξεταστεί ο ρόλος και άλλων παραγόντων που ελέγχουν τη δραστηριότητα του ενζύμου, όπως πρωτεΐνες ή ρυθμιστικά μόρια. Με δεδομένη τη σημασία της πολυ(A) ουράς στη σταθερότητα του mRNA. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης εμπλουτίζουν την εικόνα του ρόλου των αποαδενυλασών στην παθογένεια σημαντικών νοσημάτων όπως ο καρκίνος του πνεύμονα. Είναι απαραίτητη η πραγματοποίηση περαιτέρω μελετών οι οποίες θα αποσαφηνίσουν την εξειδικευμένη δράση των αποαδενυλασών στα mRNA-στόχους τους, όπως για παράδειγμα ο προσδιορισμός της σταθερότητας και χρόνου ζωής των mRNA. Επίσης, η τροποποίηση/βελτίωση του πρωτοκόλλου, η εξέταση περισσότερων μεταγράφων, καθώς και η χρήση νέων πειραματικών προσεγγίσεων θα μπορούσαν να προσθέσουν περισσότερες πληροφορίες και να βελτιώσουν την εικόνα του ρόλου των ενζύμων αυτών στον καρκίνο και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ambros et al.** A uniform system for microRNA annotation *RNA* 9: 277-279 (2003).
- Amrani N**, Ghosh S, Mangus DA, Jacobson A. (2008). Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature* 453:1276–80.
- Anderson, J.S.J. & Parker, R.** The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* 17: 1497-1506 (1998)
- Balatsos NA**, Maragozidis P, Anastasakis D, Stathopoulos C. (2012). Modulation of poly(A)-specific ribonuclease (PARN): current knowledge and perspectives. *Curr Med Chem* 19:4838–49.
- Berndt H**, Harnisch C, Rammelt C, et al. (2012). Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA* 18:958–72
- C. Sidrauski, P. Walter**, The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response, *Cell* 90 (1997) 1031–1039
- C.F. Chou**, A. Mulky, S. Maitra, W.J. Lin, R. Gherzi, J. Kappes, C.Y. Chen, Tethering KSRP, a decay-promoting AU-rich element-binding protein, to mRNAs elicits mRNA decay, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 3695–3706.
- Carrington, J.C., and Ambros V.** Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301:336–338 (2003).
- Chen and Ann-Bin Shyu** 2011 Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2011 ; 2(2): 167–183
- Chen CY**, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Raijmakers R, Pruijn GJ, Stoecklin G, Moroni C, Mann M, Karin M. (2001) AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451-464
- Christiane Harnisch**, Bodo Moritz, Christiane Rammelt, Claudia Temme, Elmar Wahle (2012) Activity and Function of Deadenylases. *The Enzymes*, Volume 31
- Collart M.A., Panasenko O.O.** (2012) The Ccr4–Not complex *Gene* 492 42–53
- Copeland PR**, Wormington M. (2001). The mechanism and regulation of deadenylation: identification and characterization of Xenopus PARN. *RNA* 7:875–86
- Dehlin E**, Wormington M, Köfner CG, Wahle E. (2000). Cap-dependent deadenylation of mRNA. *Embo J* 19:1079–86
- Derek, M., Novina, C. & Sharp, P.A.** Killing the messenger: short RNAs that silence expression. *Nature* Vol4 (2003).
- Dodson, R.E. & Shapiro, D.J.** Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72: 129-164 (2002).
- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. & Sharp, P.A.** Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 457–4-67 (2003)
- E.J. Quann**, F. Khwaja, D. Djakiew, The p38 MAPK pathway mediates aryl propionic acid induced messenger RNA stability of p75 NTR in prostate cancer cells, *Cancer Res.* 67 (2007) 11402–11410.
- Eckmann CR**, Rammelt C, Wahle E. (2011). Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2:348–61
- Erika M. Lisabeth**, Giulia Falivelli, and Elena B. Pasquale. (2013) Eph Receptor Signaling and Ephrins. Cold Spring Harbor Laboratory Press

- Felger, J.H.** et al. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulation. *JB. Biol.Chem* . 28:2550-61(1994).
- Fernandez-Zapico, M. E.,** Gonzalez-Paz, N. C., Weiss E., Savoy D. N., Molina J. R., Fonseca R., Smyrk T. C., Chari S. T., Urrutia, R.; Billadeau, D. D. (2005). Ectopic expression of VAV1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis. *Cancer Cell*. 7 (1), pg. 39–49.
- G. Pulcrano,** R. Leonardo, M. Piscopo, E. Nargi, A. Locascio, F. Aniello, M. Branno, L. Fucci, PLAUF binding to the 3' UTR of the H3.3 histone transcript affects mRNA stability, *Gene* 406 (2007) 124–133.
- Gao M,** Fritz DT, Ford LP, Wilusz J. (2000). Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 50 cap influences mRNA deadenylation rates in vitro. *Mol Cell* 5:479–88.
- Garneau, N.,** Wilusz, J. & Wilusz, C. The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 113–126(2007).
- Goldstrohm & Wickens.** Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature Publishing Group* Vol 9:337-344 (2008).
- Gorgoni, B. & Gray, N.** The roles of cytoplasmic poly (A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective. *Brief Funct. Genomic Proteomic* 3: 125-141 (2004)
- Grishok, A.** et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106:23-34 (2001).
- H. Tran,** F. Maurer, Y. Nagamine, Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2, *Mol. Cell Biol.* 23 (2003) 7177–7188.
- Hedda A. Meijer,** Martin Bushell, Kirsti Hill, Timothy W. Gant, Anne E. Willis, Peter Jones, and Cornelia H. de Moor (2007) A novel method for poly(A) fractionation reveals a large population of mRNAs with a short poly(A) tail in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 2007, Vol. 35, No. 19 e132
- Hoof van, A. & Parker, R.** The exosome: a proteasome for RNA? *Cell* (1999)
- Hook, B.,** Goldstrohm, A. C., Seay, D. J. & Wickens, M. Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. *Biol. Chem.* 282: 15430-15438 (2007).
- Hyun-Soo Cho, Daniel J. Leahy** Structure of the Extracellular Region of HER3 Reveals an Interdomain Tether *Science* 2002: Vol. 297, Issue 5585, pp. 1330-1333
- J. Zhao,** J. Chen, B. Lu, L. Dong, H. Wang, C. Bi, G. Wu, H. Guo, M. Wu, Y. Guo, TIP30 induces apoptosis under oxidative stress through stabilization of p53 messenger RNA in human hepatocellular carcinoma, *Cancer Res.* 68 (2008) 4133–4141.
- K. Mazan-Mamczarz, R.B. Gartenhaus,** Post-transcriptional control of the MCT-1-associated protein DENR/DRP by RNA-binding protein AUF1, *Cancer Genomics Proteomics* 4 (2007) 233–239.
- Kadyrova, L. Y.,** Habara, Y., Lee, T. H., & Wharton, R. P. Translational control of maternal cyclin B mRNA by nanos in the *Drosophila* germline. *Development* 134: 1519-1527 (2007)
- Kim Wan-Cheol and Chow H. Lee** 2009. The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer.
- Körner CG, Wahle E.** (1997). Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-5' exoribonuclease. *J Biol Chem* 272:10448–56.
- Körner CG,** Wormington M, Muckenthaler M, et al. (1998). The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during

the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Embo J* 17:5427–37.

Lau et al 2009 Human Ccr4–Not complexes contain variable deadenylase subunits *Biochemical Journal*,422(3)443-453;

Lewin B. GENES VIII, κεφάλαιο 5

Lippman & Martienssen. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431:364-370 (2004).

Liu, H., Rodgers, N.D., Jiao, X. & Kiledjian, M. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J.* 21:4699-4708 (2002)

M.A. Valencia-Sanchez, J. Liu, G.J. Hannon, R. Parker, Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs, *Genes Dev.* 20 (2006) 515–524.

M.J. Clemens, B.R. Williams, Inhibition of cell-free protein synthesis by pppA2'p5'A2'p5'A: a novel oligonucleotide synthesized by interferon-treated L cell extracts, *Cell* 13 (1978) 565–572

Maquat, L.E. & Carmichael, G.G. Quality control of mRNA function. *Cell* 26: 173-176 (2000)

Maragozidis P, Papanastasi E, Scutelnic D, Totomi A, Kokkori I, Zarogiannis SG, Kerenidi T, Gourgoulanis KI, Balatsos NA. Poly(A)-specific ribonuclease and Nocturnin in squamous cell lung cancer: prognostic value and impact on gene expression. *Mol Cancer.* 2015; 14:187.

Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Omelchenko MV, Robertson CL, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Zhang N, Zheng C, Bryant SH. (2011). CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* 39:D225–9.

Martinez J, Ren YG, Nilsson P, et al. (2001). The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation. *J Biol Chem* 276:27923–9.

Martinez J, Ren YG, Thuresson AC, et al. (2000). A 54-kDa fragment of the poly(A)-specific ribonuclease is an oligomeric, processive, and cap-interacting poly(A)-specific 30 exonuclease. *J Biol Chem* 275:24222–30

Masahiro Morita, Toru Suzuki, Takahisa Nakamura, Kazumasa Yokoyama, Takashi Miyasaka, and Tadashi Yamamoto 2007. Depletion of Mammalian CCR4b Deadenylase Triggers Elevation of the *p27Kip1* mRNA Level and Impairs Cell Growth. *Molecular and cellular biology*, July 2007, p. 4980–4990

Masaru et al 2009 Secreted form of EphA7 in lung cancer.) *International journal of oncology* 36: 635-640, 2010

Meyer S, Temme C, Wahle E. (2004). Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39:197–216.

Mian IS. (1997). Comparative sequence analysis of ribonucleases HII, III, II PH and D. *Nucleic Acids Res* 25:3187–95.

Mitchell, P. & Tollervey, D. mRNA turnover. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 320–325 (2001).

Mitchell, P. & Tollervey, D. mRNA turnover. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 320-325 (2001).

Monecke T, Schell S, Dickmanns A, Ficner R. (2008). Crystal structure of the RRM domain of poly(A)-specific ribonuclease reveals a novel m(7)G-cap-binding mode. *J Mol Biol* 382:827–34.

Moser MJ, Holley WR, Chatterjee A, Mian IS. (1997). The proofreading domain of *Escherichia coli* DNA polymerase I and other DNA and/or RNA exonuclease domains. *Nucleic Acids Res* 25:5110–18.

Mukherjee, D. et al. The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs

that contain AU-rich elements. *EMBO J.* 21: 165-174 (2002).

Murat A Cevher, Xiaokan Zhang, Sully Fernandez, Sergey Kim, Jorge Baquero, Per Nilsson, Sean Lee, Anders Virtanen, and Frida E Kleiman (2010). Nuclear deadenylation/polyadenylation factors regulate 30 processing in response to DNA damage. *EMBO J* 29:1674–87.

Murray and Schoenberg 2008 Assays for determining poly(A) tail length and the polarity of mRNA decay in mammalian cells. *Methods Enzymol.*; 448: 483–504.

Nagata T, Suzuki S, Endo R, et al. (2008). The RRM domain of poly(A)-specific ribonuclease hsa a noncanonical binding site for mRNA cap analog recognition. *Nucleic Acids Res* 36:4754–67.

Niedzwiecka A, Lekka M, Nilsson P, Virtanen A. (2011). Global architecture of human poly(A)-specific ribonuclease by atomic force microscopy in liquid and dynamic light scattering. *Biophys Chem* 158:141–9

Nilsson P, Henriksson N, Niedzwiecka A, et al. (2007). A multifunctional RNA recognition motif in poly(A)-specific ribonuclease with cap and poly(A) binding properties. *J Biol Chem* 282:32902–11

Parker R, Song H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 11:121–7.

R. Gherzi, K.Y. Lee, P. Briata, D. Wegmüller, C. Moroni, M. Karin, C.Y. Chen, A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery, *Mol. Cell* 14 (2004) 571–583.

R. Gherzi, M. Trabucchi, M. Ponassi, T. Ruggiero, G. Corte, C. Moroni, C.Y. Chen, K.S. Khabar, J.S. Andersen, P. Briata, The RNA-binding protein KSRP promotes decay of beta-catenin mRNA and is inactivated by PI3K-AKT signaling, *PLoS Biol.* 5 (2006) e5.

R.J. Jackson, N. Standart, How do microRNAs regulate gene expression? *Sci. STKE*367 (2007) re1

Reinhardt HC, Hasskamp P, Schmedding I, Morandell S, van Vugt MA, Wang X, Linding R, Ong SE, Weaver D, Carr SA, Yaffe MB. (2010). DNA damage activates a spatially distinct late cytoplasmic cell-cycle checkpoint network controlled by MK2-mediated RNA stabilization. *Mol Cell* 40:34–49

Ren YG, Martinez J, Kirsebom LA, Virtanen A. (2002a). Inhibition of Klenow DNA polymerase and poly(A)-specific ribonuclease by aminoglycosides. *RNA* 8:1393–400.

Ren YG, Martinez J, Virtanen A. (2002b). Identification of the active site of poly(A)-specific ribonuclease by site-directed mutagenesis and Fe⁽²⁺⁾-mediated cleavage. *J Biol Chem* 277:5982–7.

Richter JD, Lasko P. (2011). Translational control in oocyte development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a002758.

Rishi K. Gara, Sonam Kumari, Aditya Ganju, Murali M. Yallapu, Meena Jaggi, and Subhash C. Chauhan (2015) Slit/Robo pathway: a promising therapeutic target for cancer *Drug Discov Today.* 20(1): 156–164

Ross J. (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* 59:423–50.

S. Paschoud, A.M. Dogar, C. Kuntz, B. Grisoni-Neupert, L. Richman, L.C. Kühn, Destabilization of interleukin-6 mRNA requires a putative RNA stem-loop structure, an AU-rich element, and the RNA-binding protein AUF1, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 8228–8241

S. Sobue, M. Murakami, Y. Banno, H. Ito, A. Kimura, S. Gao, A. Furuhashi, A. Takagi, T. Kojima, M. Suzuki, Y. Nozawa, T. Murate, v-Src oncogene product increases sphingosine kinase 1 expression through mRNA stabilization: alteration of AU-rich element-binding proteins, *Oncogene* 27 (2008) 6023–6033

- Sachs AB, Varani G.** (2000). Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *Nat Struct Biol* 7:356–61.
- Salles Richards WG, Strickland S.** (1999) Assaying the Polyadenylation State of mRNAs. *A Companion to Methods in Enzymology* 17, 38 – 45
- Schoenberg DR, Maquat LE.** (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* 13:246–59.
- Shatkin AJ, Manley JL.** (2000). The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat Struct Biol* 7:838–42.
- Surawska et al** 2004 The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews* , Volume 15 , Issue 6 , 419 - 433
- Tarun Jr SZ, Sachs AB.** (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *Embo J* 15:7168–77
- Taxman et al.** Criteria for effective design, construction, and gene knockdown by shRNA vectors. *BMC Biotechnology*, 6:7(2006).
- Tucker, M. & Parker, R.** Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 571-595 (2000).
- Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, et al.** (2010). Towards a knowledgebased human protein atlas. *Nat Biotechnol* 28:1248–50.
- Virtanen Anders, Niklas Henriksson, Per Nilssony, and Mikael Nissbeck** 2013. Poly(A)-specific ribonuclease (PARN): An allosterically regulated, processive and mRNA cap-interacting deadenylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013; 48(2): 192–209.
- Wang et al** 2007 Differential expression of EphA7 receptor tyrosine kinase in gastric carcinoma. *Human Pathology* , Volume 38 , Issue 11 , 1649 - 1656
- Wang, Z. & Kiledjian, M.** Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* 107: 751-762 (2001).
- Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB.** (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* 2:135–40.
- Wickens M.** (1990). In the beginning is the end: regulation of poly(A) addition and removal during early development. *Trends Biochem Sci* 15:320–4.
- Wilusz CJ, Wormington M, Peltz SW.** (2001). The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:237–46.
- Wu M, Nilsson P, Henriksson N, et al.** (2009). Structural basis of m(7)GpppG binding to poly(A)-specific ribonuclease. *Structure* 17:276–86.
- Wu M, Reuter M, Lilie H, et al.** (2005). Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *Embo J* 24:4082–93.
- Wu X, Brewer G.** (2012). The regulation of mRNA stability in Mammalian Cells: 2.0. *Gene* 500(1): 10–21.
- X. Guo, R.S. Hartley,** HuR contributes to cyclin E1 deregulation in MCF-7 breast cancer cells, *Cancer Res.* 66 (2006) 7948–7956.
- Y. Peng, D.R. Schoenberg,** c-Src activates endonuclease-mediated mRNA decay, *Mol. Cell* 25 (2007) 779–787
- Yamashita A, Chang TC, Yamashita Y, Zhu W, Zhong Z, Chen CY, Shyu AB** (2005). Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1054–1063.
- Yue Y, Grossmann B, Galetzka D, Zechner U, Haaf T.** (2006) 'Isolation and differential expression of two isoforms of the ROBO2/Robo2 axon guidance receptor gene in humans and mice' *Genomics* Volume 88, Issue 6, , Pages 772–778

Zhang A, Liu WF, Yan YB. (2007). Role of the RRM domain in the activity, structure and stability of poly(A)-specific ribonuclease. Arch Biochem Biophys 461:255–62.

Zuo Y, Deutscher MP. (2001). Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. Nucleic Acids Res 29:1017–26

Μαραγκοζίδης Π. «Μελέτες στη βιολογική σημασία των ανθρώπινων αποαδενυλασών και ο ρόλος τους σε νοσήματα του πνεύμονα», Διδακτορική Διατριβή, Λάρισα 2016.