



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Κωνσταντίνος Ι. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ

Διδακτορική Διατριβή

**" ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ
ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΩΝ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΕ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ "**

υπό

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗ ΜΑΡΑΓΚΟΖΙΔΗ

Βιοχημικού - Βιοτεχνολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων

για την απόκτηση του Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2016

© 2016 Παναγιώτης Μαραγκοζίδης

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

**" ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΩΝ
ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΕ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ "**

Παναγιώτης Μαραγκοζίδης

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Κωνσταντίνος Ι. Γουργουλιάνης**, Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (*Επιβλέπων*),
2. **Δρ. Θεοδώρα Κερενίδη**, Επίκουρος Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,
3. **Δρ. Νικόλαος Α.Α. Μπαλατσός**, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (5^η/01-04-2009 ΓΣΕΣ):

- 1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)** Δρ. Κωνσταντίνος Ι. **Γουργουλιάνης**
Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** Δρ. Θεοδώρα **Κερενίδη**
Επίκουρος Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3^{ος} Εξεταστής** Δρ. Νικόλαος Α.Α. **Μπαλατσός**
Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 4^{ος} Εξεταστής** Δρ. Δημήτριος **Λεωνίδας**,
Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** Δρ. Ζήσης **Μαμούρης**, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών,
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** Δρ. Χρήστος **Παπανδρέου**, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** Δρ. Σωτήριος **Ζαρογιάννης**, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση μιας Διδακτορικής Διατριβής είναι ένα μακρύ ταξίδι. Σε αυτές τις λίγες γραμμές θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων οι υποδείξεις, η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για την διεκπεραίωση αυτής της εργασίας.

Αρχικά, να ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής. Τους Καθηγητές, Κων. Ι Γουργουλιάνη και Νικ. Α. Α. Μπαλατσό, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια αναθέτοντάς μου τη συγκεκριμένη Διατριβή, όπως επίσης και την Θεοδ. Κερενίδη για την πολύτιμη βοήθειά της για την ολοκλήρωση της Διατριβής.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστηρίου Δομικής & Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, καθώς και της Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την άψογη συνεργασία και αλληλοβοήθεια όλο αυτό το διάστημα. Ιδιαίτερη μνεία στην Ματίνα, τον Θάνο, την Δήμητρα και την Νατάσα.

Φυσικά χωρίς την υποστήριξη της οικογένειάς μας, δεν μπορούμε να καταφέρουμε πολλά πράγματα. Ακόμη και ένα τεράστιο ευχαριστώ ίσως δεν είναι αρκετό για αυτή την περίπτωση. Λάκη, Γεωργία, Τάσο, Μαρία, Γιώτα και λοιποί, σας είμαι ευγνώμων!

Τέλος, να ευχαριστήσω και όλους τους φίλους μου, οι οποίοι είναι η δεύτερη οικογένειά μου, για την αμέριστη κατανόηση και συμπαράσταση.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Μαραγκοζίδης Παναγιώτης
Ημερομηνία γέννησης: 14 Μαρτίου 1986
Τόπος γέννησης: Θεσσαλονίκη
Διεύθυνση κατοικίας: Λιτοχώρου 17, 60131 Κατερίνη
e-mail: ramarago@hotmail.com
rmarago@med.uth.gr

ΣΠΟΥΔΕΣ

2009-2016: Υποψήφιος Διδάκτωρ του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας,
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επιβλέπων: Καθηγητής Γουργουλιάνης Κων/νος

2003-2008: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας,
Πτυχίο Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.
Βαθμός Πτυχίου: **Λίαν Καλώς.**

11/2007 – 05/2008: Πτυχιακή εργασία
Τίτλος: «Επίδραση νουκλεοτιδίων και αναλόγων τους στην πολύ(A)-
εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN)».
Επιβλέπων: Μπαλατσός Νικόλαος, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ξένες γλώσσες: Αγγλικά

- First Certificate in English, University of Cambridge (2001).
- Basic Certificate in English, PALSO (1999).

Η/Υ: ECDL Profile (2015).
«Βασικές δεξιότητες χρήσης ΤΠΕ» (2008),

«ΔΗΜΗΤΡΑ» Κέντρο Ενημέρωσης και Επιμόρφωσης Α.Ε.

Επιχειρηματικότητα: Παρακολούθηση των μαθημάτων «Εισαγωγή στην Επιχειρηματικότητα» και «Ανάπτυξη Επιχειρηματικών Σχεδίων» στο πλαίσιο της δράσης «Ενθάρρυνση επιχειρηματικής δράσης, καινοτομικών εφαρμογών και μαθημάτων επιλογής φοιτητών Πανεπιστημίου Θεσσαλίας», πρόγραμμα ΕΠΕΑΕΚ II. (2006-2007).

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 04/2009 - 11/2016** Υποψήφιος Διδάκτορας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
Επιβλέποντες: Καθηγητής Γουργουλιάνης Κων.,
Επίκουρος Καθ. Κερενίδη Θεοδ.,
Επίκουρος Καθ. Μπαλατσός Νικ.
- 12/2009 - 12/2013** Εξωτερικός συνεργάτης της Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Μελέτη Καταγραφής Ύπνου.
Επιβλέπων: Καθηγητής Γουργουλιάνης Κων/νος
- 11/2007 - 05/2008** Πτυχιακή εργασία στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας στο Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.
Επιβλέπων: Μπαλατσός Νικόλαος, Λέκτορας Τ.Β.Β.
- 07/2006 - 08/2006** Πρακτική άσκηση στο ερευνητικό εργαστήριο της Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.
Υπεύθυνος: Δρ. Κυρόπουλος Θεόδωρος
- 07/2005 - 08/2005** Πρακτική άσκηση σε Μικροβιολογικό εργαστήριο.
Υπεύθυνος Ιατρός: Παναγιώτης Κωνσταντίνου

Συμμετοχή σε εθνικά και διεθνή συνέδρια

1. Kyritsis A., Del Vescovo V., **Maragozidis P.**, Papikinos K., Gourgoulianis K.I., Denti M.A., Balatsos N.A.A. 'New' roles for an 'old' deadenylase? Poster in 66th Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), Athens Greece, 11-13 December 2015.
2. Vavougiotis G., Panagis P., Karetsi E., Papanikolaou I., Bardaka F., **Maragozidis P.**, Stavrou V., Gourgoulianis K.I., Daniil Z. The effect of exercise on serum amyloid A levels in patients with sarcoidosis: A preliminary report. Poster in International Congress of the European Respiratory Society (ERS), Amsterdam Netherlands 26-30 September 2015.
3. **Maragozidis P.**, Aliprante M., Kokkori I., Zarogiannis S., Kerenidi T., Gourgoulianis K.I., Balatsos N.A.A.. Expression of Deadenylases as Prognostic Marker in Lung Cancer. Poster in 64th HSBMB Conference, Athens Greece, 6-8 December 2013.
4. Scutelnic D., Kyritsis A., **Maragozidis P.**, Fontana F., del Vescovo V., Grasso M., Gourgoulianis K.I., Denti M.A., Balatsos N.A.A.. miR-29a-3p and poly(A)-specific ribonuclease expression: a dynamic relation. Oral presentation in 64th HSBMB Conference, Athens Greece, 6-8 December 2013.
5. Kokkori I., **Maragozidis P.**, Kerenidi T., Gourgoulianis K.I., Balatsos N.A.A.. The clinical significance of deadenylases expression in small cell lung cancer (SCLC). Oral presentation in 22nd Panhellenic Respiratory Congress (Hellenic Thoracic Society, HTS), Athens Greece, 5-7 December 2013.
6. Tsaoussoglou M., Hatzinikolaou S., Lianou L., **Maragozidis P.**, Balatsos N., Panaghiotopoulou-Gartagani P., Chrousos G., Kaditis A.. Expression of biosynthetic enzymes for leukotrienes B4 and C4 in tonsillar tissue of children with OSA. Poster in ERS Annual Congress, Barcelona Spain, 7-11 September 2013.
7. Scutelnic D., **Maragozidis P.**, Kyritsis T., Del Vescovo V., Chatzileontiadiou D., Gourgoulianis K.I., Denti M.A., Balatsos N.A.A.. Deadenylases and miRNA expression; a dynamic relation? Oral presentation and poster in 35th Conference of the Hellenic Society of Biological Sciences (HSBS), Nauplion Greece, 21-23 May 2013.
8. **Maragozidis P.**, Papanastasi E., Gómez C., Del Vescovo V., Denti M., Gourgoulianis K.I., Balatsos N.A.A.. Deadenylases affect the expression of specific mRNAs and microRNAs

- in lung cancer. Poster in 63rd HSBMB Conference, Heraklion Greece, 9-11 November 2012.
9. **Maragozidis P.**, Papanastasi E., Papadopoulos D., Kazakou A., Del Vescovo V., Denti M., Kerenidi T., Gourgoulianis K.I., Balatsos N.A.A.. Studies on the biological significance of deadenylases and their role in lung cancer. Oral presentation in 21st HTS Congress, Athens Greece, 18-21 October 2012.
 10. **Maragozidis P.**, Papanastasi E., Totomi A., Chatzileontiadou D., Kyritsis A., Gómez-Abad C., Kazakou A., Papadopoulos D., Tsilioni E., Kerenidi T., Gourgoulianis K., Balatsos N.. Studies on the biological significance of deadenylases in lung cancer. Poster in mRNA fate 2012 Workshop, Riva Del Garda Italy, 23-26 May 2012.
 11. Chatzileontiadou D., Hamakou C., **Maragozidis P.**, Bougiatioti S., Skamnaki V.T., Parmenopoulou V., Manta S., Delbe J., Courty J., Komiotis D., Balatsos N., Leonidas D.. Novel synthetic nucleoside analogs as Angiogenin inhibitors. Poster in mRNA fate 2012 Workshop, Riva Del Garda Italy, 23-26 May 2012.
 12. Papanastasi E., Totomi A., **Maragozidis P.**, Kazakou., Papadopoulos D., Tsilioni E., Kerenidi T., Gourgoulianis K., Balatsos N.. Study of deadenylase expression in lung cancer patients. Oral presentation and poster in 34th HSBS Conference, Trikala Greece, 17-19 May 2012.
 13. **Maragozidis P.**, Chatzileontiadou D., Gómez C., Anastasakis D., Gourgoulianis K., Stathopoulos C., Balatsos N.. The diversity of deadenylases modulates gene expression. Poster in 62nd HSBMB Conference, Athens Greece, 9-11 December 2011.
 14. Bougiatioti S., **Maragozidis P.**, Skamnaki V.T., Parmenopoulou V., Manta S., Komiotis D., Balatsos N., Leonidas D.D.. Effect of novel synthetic nucleoside analogs on Ribonuclease A: kinetic and structural studies. Poster in 62nd HSBMB Conference, Athens Greece, 9-11 December 2011.
 15. **Maragozidis P.**, Totomi A., Karetsi E., Papadopoulos D., Tsolaki V., Lada M., Tsilioni E., Kerenidi T., Balatsos N., Gourgoulianis K.. Study of deadenylase expression in lung cancer patients. Poster in 20th HTS Congress, Athens Greece, 24-27 November 2011.
 16. Chatzileontiadou D., **Maragozidis P.**, Lambrou M., Pournaras S., Gourgoulianis K., Balatsos N.. Effect of CNOT6 or CNOT8 deadenylases silencing on the expression of

- genes that regulate important cellular pathways. Oral presentation and poster in 33rd HSBS Conference, Edessa Greece 19-21 May 2011.
17. **Maragozidis P.**, Skoutelnic D., Kyritsis A., Stathopoulos K., Balatsos N.. Effect of CCR4C deadenylase silencing on genes expression that regulate key cellular pathways. Poster in 61st HSBMB Conference, Alexandroupolis Greece, 15-17 October 2010.
 18. Anastasakis D., **Maragozidis P.**, Kyritsis A., Grafanaki K., Balatsos N., Stathopoulos C.. Effect of PAN2 deadenylase silencing on the expression of essential genes that regulate major cellular pathways. Poster in 61st HSBMB Conference, Alexandroupolis Greece, 15-17 October 2010.
 19. **Maragozidis P.**, Anastasakis D., Manta S., Leventi D., Komiotis D., Balatsos N. Stathopoulos K.. Effect of purine, pyrimidine nucleotides and synthetic analogues in poly(A) tail decay. Oral presentation and poster in 30th HSBS Conference, Thessaloniki Greece, 22-24 May 2008.

Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά

1. **Maragozidis P.**, Papanastasi I., Scutelnic D, Totomi A., Kokkori I., Zarogiannis S.G., Kerenidi T., Gourgoulisianis K.I., Balatsos N.A.A.. 2015. Poly(A)-specific ribonuclease and Nocturnin in squamous cell lung cancer: prognostic value and impact on gene expression. *Mol. Cancer* 14(1): p. 187.
2. Skouras V.S., Magkouta S.F., Psallidas I., Tsilioni I., **Maragozidis P.**, Gourgoulisianis K.I., Kalomenidis I.. 2015. Interleukin-27 improves the ability of adenosine deaminase to rule-out tuberculous pleural effusion regardless of pleural tuberculosis prevalence. *Infect Dis (Lond)* 47:477-483.
3. Tsaoussoglou M., Hatzinikolaou S., Baltatzis G.E., Lianou L., **Maragozidis P.**, Balatsos N.A.A., Chrousos G., Kaditis A.G.. 2014. Expression of Leukotriene Biosynthetic Enzymes in Tonsillar Tissue of Children with Obstructive Sleep Apnea: A Prospective Nonrandomized Study. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 140:944-950.
4. Alexopoulos E.I., Theologi V., Malakasioti G., **Maragozidis P.**, Tsilioni I., Chrousos G., Gourgoulisianis K., Kaditis A.G.. 2013. Obstructive sleep apnea, excessive daytime sleepiness, and morning plasma TNF α levels in Greek children. *Sleep*; 36(11):1633-1638.

5. Balatsos N.A.A., **Maragozidis P.**, Anastasakis D., Stathopoulos C.. 2012 Modulation of Poly(A)-specific Ribonuclease (PARN): Current Knowledge and Perspectives. *Curr. Med. Chem.* *19*, 4838-4849.
6. Parmenopoulou V., Chatzileontiadou D.S.M., Manta S., Bougiatioti S., **Maragozidis P.**, Gkaragkouni D.N., Kaffesaki E., Kantsadi A.L., Skamnaki V.T., Zographos S.E., Zounpoulakis P., Balatsos N.A.A., Komiotis D., Leonidas D.D.. 2012. Triazole pyrimidine nucleosides as inhibitors of Ribonuclease A. Synthesis, biochemical, and structural evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* *20*, 7184–7193.
7. Tsaousoglou M, Lianou L, **Maragozidis P**, Hatzinikolaou S, Mavromati M, Orologas N, Gartagani-Panaghiotopoulou P, Rassidakis G, Balatsos N, Chrousos G, Kaditis A. G. 2012. Cysteinyl Leukotriene Receptors in Tonsillar T and B Lymphocytes from Children with Obstructive Sleep Apnea. *Sleep Medicine* *13*,879–885.
8. **Maragozidis P**, Karangeli M, Papaspyrou K, Labrou M, Dimoulou G, Salataj E, Stathopoulos C, Pournaras S, Matsouka P, Gourgoulianis KI, Balatsos NAA. 2012. Alterations of Deadenylase Expression in Acute Leukemias: Evidence for Poly(A)-Specific Ribonuclease as a Potential Biomarker. *Acta Haematol* *128*, 39-46.
9. Balatsos NAA, Vlachakis D, **Maragozidis P**, Manta S, Anastasakis D, Kyritsis A, Vlassi M, Komiotis D and Stathopoulos C. 2009. Competitive inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by synthetic fluoro-pyranosyl nucleosides. *Biochemistry* *48*, 6044–6051.

Κεφάλαια βιβλίων

1. Μετάφραση ενός κεφαλαίου για την ελληνική έκδοση του “Fundamentals of Enzymology. The Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins”, by Price and Stevens, Third Edition. Εκδόσεις Παρσιάνου Α.Ε. (2015) *ISBN: 9789603947387*
2. Giannouli S, **Maragozidis P**, Gourgoulianis K.I.I. Balatsos N. 2012. Micro-RNAs: From Regulators of Gene Expression to Cancer Biomarkers. In: Cancer Biomarkers. *CRC Press, Boca Raton, FL. ISBN: 9781578087617*

Υποτροφίες - Βραβεία

- 2016** **Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία:** 2^ο Βραβείο Καλύτερης Εργασίας που δημοσιεύθηκε σε διεθνές περιοδικό κατά την περίοδο 1^η Νοεμβρίου 2015 έως 31^η Μαρτίου 2016 για το άρθρο “*Poly(A)-specific ribonuclease and Nocturnin in squamous cell lung cancer: prognostic value and impact on gene expression*”, στο 25^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 23-26 Ιουνίου 2016.
- 2013** **Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας:** Υποτροφία συμμετοχής και παρακολούθησης στο 64^ο Συνέδριο Ε.Ε.Β.Μ.Β., Αθήνα, 6-8 Δεκεμβρίου 2013.
- 2012** **Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία:** Έπαινος για την παρουσίαση της εργασίας “Μελέτες στη βιολογική σημασία των ανθρώπινων αποαδενυλασών και ο ρόλος τους στον καρκίνο του πνεύμονα”, στο 21^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 18-21 Οκτωβρίου 2012.
- Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας:** Υποτροφία συμμετοχής και παρακολούθησης στο 63^ο Συνέδριο Ε.Ε.Β.Μ.Β., Ηράκλειο Κρήτης 9-11 Νοεμβρίου 2012.
- 2011** **Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία:** Υποτροφία για την εργασία “*Studies on the biological significance of deadenylases in lung cancer*”, στα πλαίσια της Διδακτορικής Διατριβής.
- Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας:** Υποτροφία συμμετοχής και παρακολούθησης στο 62^ο Συνέδριο Ε.Ε.Β.Μ.Β., Αθήνα 9-11 Δεκεμβρίου 2011.

Μέλος επιστημονικών εταιρειών

Αρωγό μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας (Ε.Ε.Β.Μ.Β.)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ.....	7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	15
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	19
ABSTRACT.....	21
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	23
Εισαγωγή στο RNA.....	25
Ωρίμανση των ευκαρυωτικών mRNAs.....	26
Αποικοδόμηση του mRNA	29
<i>Αποικοδόμηση φυσιολογικών mRNAs</i>	<i>29</i>
<i>Αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNAs</i>	<i>32</i>
<i>Σήματα που ρυθμίζουν την αποικοδόμηση του mRNA.....</i>	<i>33</i>
Σταθερότητα των ευκαρυωτικών mRNAs	35
Ένζυμα και έλεγχος αποαδενυλίωσης	35
Δομή και λειτουργίες του συμπλόκου CCR4-NOT.....	39
<i>Λειτουργίες των υπομονάδων CAF1 και CCR4 στον άνθρωπο</i>	<i>42</i>
Το σύμπλοκο PAN2/PAN3.....	44
Η πολυ(Α)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A)-specific ribonuclease, PARN].....	45
Η αποαδενυλάση NOCTURNIN.....	48
<i>Γενικά χαρακτηριστικά.....</i>	<i>48</i>
<i>Μεταγραφική ρύθμιση της NOC.....</i>	<i>49</i>
<i>Η NOC ως γονίδιο άμεσης απόκρισης.....</i>	<i>49</i>
<i>Η NOC εμπλέκεται στον μεταβολισμό λιπιδίων και υδατανθράκων</i>	<i>50</i>
Ο ρόλος των ριβονουκλεασών στον καρκίνο.....	52
Καρκίνος του πνεύμονα.....	53

Ιστολογικοί τύποι.....	54
Σταδιοποίηση.....	55
Αιτιοπαθογένεια καρκίνου του πνεύμονα.....	56
Μοριακή βιολογία καρκίνου του πνεύμονα.....	57
Καρκινικοί δείκτες.....	60
Σκοπός της Διατριβής.....	63
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	65
Υλικά.....	67
Αντιδραστήρια.....	67
Βακτηριακό στέλεχος.....	68
Κυτταρικές σειρές.....	68
Πλασμιδιακοί φορείς.....	68
Εκκινητές.....	70
Βιολογικά δείγματα συμμετεχόντων.....	70
Μέθοδοι.....	72
Λήψη ορού και απομόνωση κυττάρων από τα δείγματα ασθενών με λευχαιμία και υγιών μαρτύρων.....	72
Λύση των κυττάρων των δειγμάτων με κύτταρα από μυελό των οστών.....	74
TCA precipitation protocol (κατακρήμνιση πρωτεΐνης).....	74
Ανίχνευση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση (Western blot).....	75
Απομόνωση ολικού RNA.....	76
Real Time PCR δύο βημάτων (two-step Real Time PCR, qRT-PCR).....	76
Ηλεκτροδιάτρηση δεκτικών κυττάρων DH5a (E.coli) με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1.....	80
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation).....	80
Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με X-fect.....	81
cDNA Μικροσυστοιχίες (Microarrays).....	82
Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού (functional enrichment analysis).....	83
Υπολογιστική μεταγραφομική ανάλυση (Computational transcriptomic analysis).....	83

<i>Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά</i>	<i>84</i>
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	85
Υπολογιστική μεταγραφομική ανάλυση (Computational transcriptomic analysis) της έκφρασης των αποαδενυλασών στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα	87
Έκφραση των αποαδενυλασών σε δείγματα ασθενών με SCC	89
Συσχέτιση της έκφρασης των αποαδενυλασών με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά.....	89
Συσχέτιση της έκφρασης των αποαδενυλασών με την πρόγνωση ασθενών με SCC	92
Μετάγραφα και μονοπάτια που επηρεάζονται από τις PARN και NOC στο SCC	93
Μετάγραφα και μονοπάτια που επηρεάζονται από τις CNOT6 και CNOT7 σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές.....	97
Αλληλεπικαλυπτόμενη δράση των CNOT6 και CNOT6L στο SCC	100
Μετάγραφα που ελέγχονται αποκλειστικά από συγκεκριμένες αποαδενυλάσες.....	102
Έκφραση αποαδενυλασών σε ασθενείς με οξεία λευχαιμία.....	106
Ανίχνευση PARN και CNOT7 σε δείγματα ασθενών με ALL με ανοσοαποτύπωση	108
Η PARN εμφανίζει φωσφορυλιωμένες μορφές στην ALL.....	109
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	111
Η έκφραση των αποαδενυλασών είναι απορρυθμισμένη στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα	113
Η έκφραση των αποαδενυλασών είναι απορρυθμισμένη στην οξεία λευχαιμία.....	114
Συσχέτιση των αποαδενυλασών με άλλα νοσήματα του πνεύμονα.....	114
Η επίδραση των αποαδενυλασών στη γονιδιακή έκφραση	115
<i>PARN</i>	<i>115</i>
<i>NOCTURNIN.....</i>	<i>117</i>
<i>Σύμπλοκο CCR4-NOT.....</i>	<i>119</i>
Συμπερασματικά	120
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	121
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	147

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Στις νεοπλασίες, η απορρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης. Η αποαδενυλίωση είναι συνήθως το στάδιο που καθορίζει το ρυθμό της αποικοδόμησης και καταστολής της μετάφρασης του mRNA και οι αποαδενυλάσες τα ένζυμα μέσω των οποίων γίνεται η βράχυνση των πολυ(A) ουρών των ευκαρυωτικών mRNAs. Η απάντηση στο ερώτημα γιατί να υπάρχουν τόσες αποαδενυλάσες δεν είναι σαφής.

Σκοπός: Ερευνάται η διαφοροποίηση της έκφρασης των αποαδενυλασών σε καρκινικούς ιστούς πνεύμονα, σε σχέση με παρακείμενο φυσιολογικό ιστό, ενώ παράλληλα μελετάται η έκφρασή τους και στην οξεία λευχαιμία, για να εξεταστεί η καθολικότητα του φαινομένου. Επίσης αποσιωπούμε τα ένζυμα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και να εξετάσουμε την επίπτωση που έχουν στην γονιδιακή έκφραση.

Υλικά και μέθοδοι: Μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNAs των αποαδενυλασών με Ποσοτική PCR Πραγματικού Χρόνου (RT-PCR) σε ασθενείς που διαγνώστηκαν με οξεία λεμφοκυτταρική ή μυελογενή λευχαιμία, καθώς και ασθενείς που διαγνώστηκαν με πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα. Η αποσιώπηση των αποαδενυλασών έγινε στις κυτταρικές σειρές NCI-H520 και HEP2 εισάγοντας shRNAs που στοχεύουν την κάθε αποαδενυλάση μέσω του μηχανισμού του RNAi. Η ανάλυση της έκφρασης έγινε με μικροσυστοιχίες σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος, καθώς και με RT-PCR σε συγκεκριμένους παράγοντες.

Αποτελέσματα: Η έκφραση των αποαδενυλασών μεταβάλλεται τόσο σε ασθενείς πλακώδες καρκίνωμα αλλά και με οξεία λευχαιμία. Η έκφραση των PARN, CNOT6 και NOC συσχετίζεται με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και με την πρόγνωση των ασθενών. Η ανάλυση της έκφρασης έδειξε πως υπάρχουν συγκεκριμένα μετάγραφα και μονοπάτια που είναι πιθανοί στόχοι μόνο μιας αποαδενυλάσης, ενώ τα περισσότερα ελέγχονται από περισσότερα ένζυμα λόγω αντισταθμιστικής δράσης των αποαδενυλασών.

Συμπεράσματα: Αν και ο μηχανισμός δράσης των αποαδενυλασών παραμένει μια τεράστια πρόκληση, είναι όλο και πιο σαφές ότι οι διάφορες αποαδενυλάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες ρυθμίζοντας τη ζωή των mRNAs.

ABSTRACT

Introduction: In tumors, deregulation of mRNAs stability may result in loss of gene expression control. Deadenylation is usually the first and rate-limiting step of mRNA degradation, and deadenylases are the enzymes which mediate the shortening of the poly (A) tails of eukaryotic mRNAs. The answer to the question why there are so many deadenylases is unclear.

Purpose: We study the expression of deadenylases in lung cancer tissues compared to adjacent normal tissue, and also in acute leukemia samples, to test the universality of the phenomenon. We also silence these enzymes in cancer cell lines to study their impact on gene expression.

Materials and methods: Deadenylases expression was measured by quantitative real-time PCR (RT-PCR) in patients diagnosed with acute lymphocytic or myelogenous leukemia and patients diagnosed with squamous cell lung carcinoma. The silencing of deadenylases held on NCI-H520 and HEP2 cell lines by introducing shRNAs targeting each deadenylase through the RNAi mechanism. Gene expression analysis was done using full genome microarrays, as well as RT-PCR to specific factors.

Results: Deadenylases expression varied both in patients with squamous cell carcinoma and acute leukemia. Expression of PARN, CNOT6, and NOC correlated with clinicopathological features and patient prognosis. Gene expression analysis showed that there are specific transcripts and pathways that are potential targets of only one deadenylase, while most of them are controlled by more enzymes due to compensatory effect of deadenylases.

Conclusions: Although the deadenylation mechanism remains a huge challenge, it is increasingly clear that the various deadenylases play an important role in several cellular processes regulating mRNAs lives.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Εισαγωγή στο RNA

Η μεταφορά της γενετικής πληροφορίας από το DNA στις πρωτεΐνες είναι μια θεμελιώδης διαδικασία για τη βιωσιμότητα του κυττάρου. Το κεντρικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας, όπως αυτό διατυπώθηκε το 1958 από τον Crick, αποτελεί ουσιαστικά μια αναπαράσταση της ροής της γενετικής πληροφορίας από το DNA στις πρωτεΐνες (Crick 1958). Αρχικά, η πορεία που περιγραφόταν από το δόγμα αυτό αποτελούνταν από τρία διακριτά βήματα: την αντιγραφή του DNA, τη μεταγραφή του σε μόρια αγγελιοφόρου RNA (messenger RNA, mRNA) και τη μετάφραση των τελευταίων σε αμινοξέα για τη δημιουργία πρωτεϊνών. Σήμερα, μετά από εκτεταμένες μελέτες στο πεδίο της ροής της γενετικής πληροφορίας και το χαρακτηρισμό μεγάλου αριθμού οργανισμών, το απλό αυτό σχήμα έχει εμπλουτιστεί με επιπλέον διεργασίες, όπως είναι η αντίστροφη μεταγραφή και ο αυτοδιπλασιασμός του RNA (**Εικόνα 1.1**). Η γονιδιακή έκφραση (gene expression) χαρακτηρίζεται από τις διαδικασίες της μεταγραφής και μετάφρασης. Τα κύτταρα ενός οργανισμού, παρά το ότι φέρουν το ίδιο γενετικό υλικό, πραγματοποιούν διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες λόγω διαφορετικής γονιδιακής έκφρασης.



Εικόνα 1.1 Κεντρικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας. Η μεταφορά της γενετικής πληροφορίας από το DNA στις πρωτεΐνες περιλαμβάνει τις διαδικασίες της αντιγραφής του DNA, μεταγραφής και μετάφρασης, όπως επίσης και της αντίστροφης μεταγραφής και τον αυτοδιπλασιασμό του RNA.

Το ριβονουκλεϊκό οξύ (ribonucleic acid, RNA), είναι ένα από τα τρία βασικά μακρομόρια (συμπεριλαμβανομένου του DNA και των πρωτεϊνών), που είναι απαραίτητα για όλες τις μορφές ζωής. Πολλά RNAs δεν κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και ονομάζονται μη-κωδικά (non-coding RNAs, ncRNAs), παίζουν όμως σημαντικό ρόλο στα κύτταρα, καταλύοντας βιολογικές αντιδράσεις και ρυθμίζοντας τη γονιδιακή έκφραση, αποκρινόμενα

σε κυτταρικά σήματα. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν τα μεταφορικά (tRNAs) και τα ριβοσωμικά RNAs (rRNAs), που συμμετέχουν στη διαδικασία της μετάφρασης (Mattick and Gagen 2001). Ορισμένα ncRNAs μπορούν να καταλύουν χημικές αντιδράσεις, όπως τμήση και επανένωση άλλων RNA μορίων και το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού στο ριβόσωμα και είναι γνωστά ως ριβοένζυμα (Nissen et al. 2000).

Όσον αφορά το mRNA, η σύνθεσή του στα ευκαρυωτικά κύτταρα καταλύεται από το ένζυμο RNA πολυμεράση II, χρησιμοποιώντας το DNA ως μήτρα, μία διαδικασία γνωστή ως μεταγραφή (transcription). Η έναρξη της μεταγραφής ξεκινά με την πρόσδεση του ενζύμου στην αλληλουχία του υποκινητή του DNA και ακολουθεί η αποδιάταξη της διπλής έλικας του μορίου λόγω της ενεργότητας ελικάσης της RNA πολυμεράσης. Εν συνεχεία, το ένζυμο προχωρά κατά μήκος της αλυσίδας-μήτρας (κατεύθυνση 3'→5') και συνθέτει ένα συμπληρωματικό RNA μόριο, επιμηκύνοντας με κατεύθυνση 5'→3' (Nudler and Gottesman 2002). Το πρόδρομο αυτό αγγελιαφόρο RNA (pre-mRNA), το οποίο μεταφέρει την πληροφορία για την πρωτεϊνική αλληλουχία στα ριβοσώματα (τα «εργοστάσια» σύνθεσης πρωτεϊνών του κυττάρου), προτού μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα για να μεταφραστεί σε πρωτεΐνη, υπόκειται σε επεξεργασία. Κατά μέσο όρο, το ώριμο mRNA χρειάζεται περίπου 20 min για να εξέλθει από τον πυρήνα καθώς τροποποιείται από ένζυμα προκειμένου να «ωριμάσει», με την προσθήκη μίας πολυ(A) ουράς στο 3'. Έτσι, το ώριμο πλέον mRNA, που περιέχει τουλάχιστον μία κωδική περιοχή (coding region), κωδικοποιεί για μια πρωτεϊνική αλληλουχία μέσω του γενετικού κώδικα: κάθε νουκλεοτιδική τριπλέτα (κωδικόνιο) της κωδικής περιοχής αντιστοιχεί σε ένα αμινοξύ (Cooper and Hausman 2004).

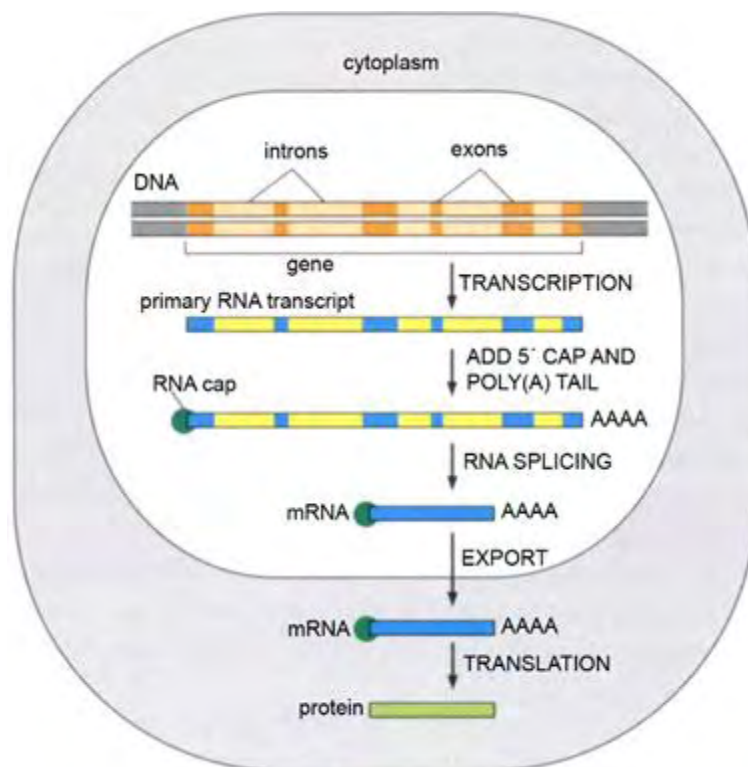
Ωρίμανση των ευκαρυωτικών mRNAs

Τα ευκαρυωτικά mRNAs προκύπτουν από μεγάλα πρόδρομα μετάγραφα (pre-mRNAs) αφού μεσολαβήσει η διαδικασία της προσθήκης καλύπτρας στο 5' άκρο (cap), του ματίσματος (splicing) και της προσθήκης της πολυαδενυλικής ουράς στο 3' άκρο (polyadenylation), όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.2**.

Σε αντίθεση με τα προκαρυωτικά mRNAs που αρχίζουν με rppA ή rppG, στα ευκαρυωτικά mRNAs η *καλύπτρα* σχηματίζεται με την προσθήκη μιας τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP) στην πρώτη βάση του μεταγράφου μέσω ενός 5'-5' δεσμού, που είναι

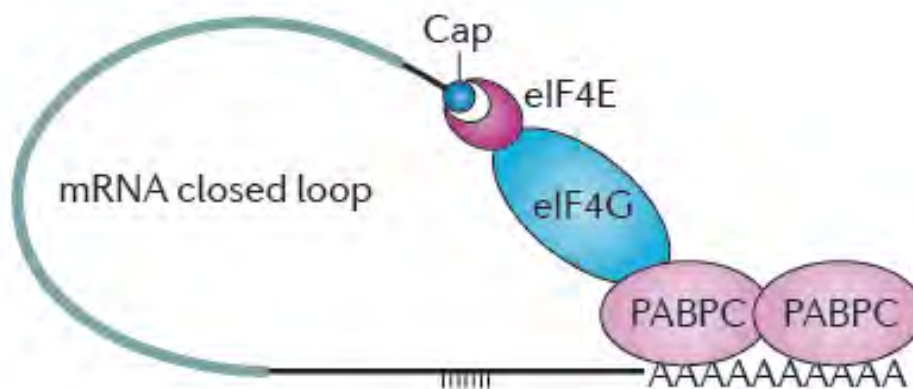
ένα τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο (συνήθως μια πουρίνη, A ή G). Η αρχική αλληλουχία του μεταγράφου μπορεί να αναπαρασταθεί ως 5' rppA/GpNpNpNr... Η προσθήκη της γουανίνης στο 5' άκρο καταλύεται από το πυρηνικό ένζυμο γουανύλυλο-τρανσφεράση (guanylyl transferase) και τοποθετείται για να εξυπηρετήσει δύο λειτουργίες: 1) καλυμμένα mRNAs μεταφράζονται πιο αποδοτικά διότι αναγνωρίζονται από το ριβόσωμα για το σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης και 2) σταθεροποιεί τα mRNAs, προστατεύοντάς τα από ριβονουκλεάσες που δρουν στο 5' άκρο (5' εξωριβονουκλεάσες).

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



Εικόνα 1.2 Ωρίμανση ευκαρυωτικού mRNA. Τα ευκαρυωτικά mRNAs προκύπτουν από μεγάλα πρόδρομα μετάγραφα (pre-mRNAs) αφού μεσολαβήσει η διαδικασία της προσθήκης καλύπτρας στο 5' άκρο (cap), του ματίσματος (splicing) και της προσθήκης της πολυαδενυλικής ουράς στο 3' άκρο (polyadenylation). (Lewin 2004)

Η τελευταία επεξεργασία που υπόκεινται τα πρόδρομα ευκαρυωτικά mRNAs είναι η πολυαδενυλίωση, κατά την οποία λαμβάνουν στο 3' άκρο τους μια χαρακτηριστική αλληλουχία από 200-300 νουκλεοτίδια αδενοσίνης, γνωστής ως πολυ(A) ουρά. Η μεταγραφική αυτή τροποποίηση ονομάζεται διεργασία του 3' άκρου (3' end processing) και πραγματοποιείται ως μέρος μιας πολύπλοκης αντίδρασης στην οποία το 3' άκρο δημιουργείται (με αποκοπή) και τροποποιείται από ένα σύμπλοκο ενζύμων. Η αντίδραση της προσθήκης καταλύεται από το ένζυμο πολυ(A)-πολυμεράση [poly(A) polymerase, PAP]. Ο ρόλος της πολυ(A) ουράς είναι κεντρικής σημασίας για το mRNA. Προστατεύει το 3' άκρο του mRNA από εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, συμμετέχει σε διεργασίες όπως η έξοδος στο κυτταρόπλασμα και από αυτή ξεκινά και το κύριο μονοπάτι αποικοδόμησης του mRNA. Στις διαδικασίες αυτές η πολυ(A) ουρά συμμετέχει κυρίως μέσω των πρωτεϊνικών παραγόντων που προσδέονται σε αυτή, και κυρίως την πολυ(A) προσδεδεμένη πρωτεΐνη [poly(A)-binding protein, PABP]. Ομόλογα αυτής της πρωτεΐνης απαντώνται σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ένα μονομερές PABPC των ~70 kDa συνδέεται σε κάθε 10-20 βάσεις της πολυ(A) ουράς. Έτσι, μια πολυ(A) ουρά από 240 νουκλεοτίδια φέρει περίπου 10 μόρια PABPC. Ο βασικότερος ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι αφενός να προστατεύει την ίδια την ουρά από αποικοδόμηση και αφετέρου να αλληλεπιδρά με άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες ρυθμίζοντας έτσι τη βιωσιμότητα του mRNA. Για παράδειγμα, η αλληλεπίδραση της PABP με τον παράγοντα έναρξης της μεταγραφής eIF4G δημιουργεί έναν κλειστό βρόχο, στον οποίο τα 5' και 3' άκρα του mRNA συγκρατούνται από το ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο και έτσι προσλαμβάνεται από τη μεταφραστική μηχανή όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 1.3** (Huntzinger and Izaurralde 2011).



Εικόνα 1.3 Η πρόσδεση της PABP στον παράγοντα έναρξης eIF4G δημιουργεί έναν κλειστό βρόχο. (Huntzinger and Izaurralde 2011)

Αποικοδόμηση του mRNA

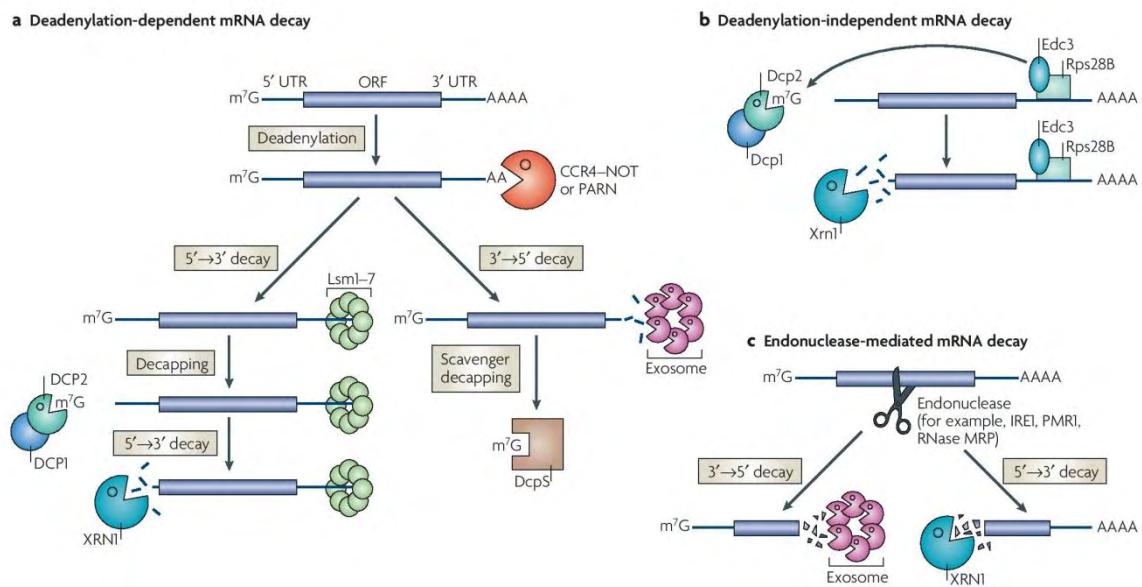
Αποικοδόμηση φυσιολογικών mRNAs

Η ρύθμιση της αποικοδόμησης του mRNA αποτελεί σημαντική συνιστώσα της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, αφού η σταθερή συγκέντρωση του mRNA στο κύτταρο καθορίζεται τόσο από το ρυθμό σύνθεσης, όσο και από το ρυθμό αποικοδόμησης (Meyer et al. 2004). Υπάρχουν τρεις κύριες τάξεις ενδοκυτταρικών ενζύμων αποικοδόμησης (ριβονουκλεάσες ή RNases): οι ενδοριβονουκλεάσες, οι οποίες διασπούν μόρια RNA σε εσωτερικές θέσεις, οι 3' εξωνουκλεάσες, που διασπούν το RNA από το 3' άκρο με κατεύθυνση 3'→5' και οι 5' εξωνουκλεάσες, που αποικοδομούν το RNA από το 5' άκρο με κατεύθυνση 5'→3'. Μέσα στο κύτταρο υπάρχει πληθώρα ριβονουκλεασών και αυτή η αφθονία πιθανώς ενισχύει την αποτελεσματικότητα των μονοπατιών αποικοδόμησης (Houseley and Tollervey 2009). Όπως αναφέρθηκε, τα ώριμα ευκαρυωτικά mRNAs φέρουν δύο καθοριστικούς παράγοντες σταθερότητας: την καλύπτρα και την πολυ(A) ουρά. Προκειμένου να ξεκινήσει η αποικοδόμηση θα πρέπει, είτε ένας από αυτούς τους παράγοντες να απομακρυνθεί, είτε το mRNA να υποστεί ενδονουκλεολυτική πέψη όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 1.4**.

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το μεγαλύτερο ποσοστό των mRNAs αποικοδομείται μέσω ενός μονοπατιού, το οποίο ξεκινά με τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς και είναι γνωστό ως *μονοπάτι αποικοδόμησης που εξαρτάται από αποαδενυλίωση* (**Εικόνα 1.4a**). Στον πυρήνα, με τη διαδικασία της αποαδενυλίωσης περιορίζονται οι νεοπροστιθέμενες πολυ(A) ουρές στο κατάλληλο μήκος, ώστε το mRNA να εξαχθεί στο κυτταρόπλασμα και να ξεκινήσει η μετάφρασή του. Αντίθετα, η εκτεταμένη αποαδενυλίωση του mRNA στο κυτταρόπλασμα πέρα από ένα συγκεκριμένο μήκος, σηματοδοτεί την αποικοδόμηση του. Η αποαδενυλίωση καταλύεται από 3' εξωριβονουκλεάσες, τις αποαδενυλάσες. Ακολουθώντας την αποαδενυλίωση, δύο μηχανισμοί μπορούν να οδηγήσουν στην αποικοδόμηση του mRNA: είτε αφαίρεση της καλύπτρας και αποικοδόμηση με κατεύθυνση 5'→3', είτε αποικοδόμηση 3'→5'. Στο πρώτο μονοπάτι, το σύμπλεγμα πρωτεϊνών Lsm 1-7 αλληλεπιδρά με το 3' άκρο του μεταγράφου, επάγοντας την αφαίρεση της καλύπτρας μέσω του συμπλόκου DCP1-DCP2 και εκθέτοντας έτσι το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την XRN1, μια 5'→3' εξωνουκλεάση.

Εναλλακτικά, το αποαδενυλιωμένο mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών. Στην περίπτωση αυτή η καλύπτρα υδρολύεται από το ένζυμο DcpS (Balagopal et al. 2012; Garneau et al. 2007). Οι πρωτεϊνικοί παράγοντες που εμπλέκονται στο μονοπάτι αποικοδόμησης εξαρτώμενο από αποαδενυλίωση, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.1**.

Στην **Εικόνα 1.4b** παρουσιάζεται το μονοπάτι αποικοδόμησης το οποίο είναι ανεξάρτητο από την αποαδενυλίωση στον *Saccharomyces cerevisiae*, στο οποίο απαιτείται η προσέλκυση της πρωτεϊνικής μηχανής για την αφαίρεση του καλύμματος. Ωστόσο, η αποικοδόμηση ορισμένων μορίων mRNA μπορεί να ξεκινήσει με ενδονουκλεολυτική διάσπαση, είτε από ειδικές ενδονουκλεάσες, είτε μέσω του μηχανισμού παρεμβολής RNA (RNAi). Πρόκειται για το μονοπάτι αποικοδόμησης διαμεσολαβούμενο από ενδονουκλεάσες, στο οποίο το mRNA πέπτεται εσωτερικά και προκύπτουν δύο θραύσματα με απροστάτευτα άκρα, τα οποία και αποικοδομούνται στη συνέχεια με τη δράση του εξωσώματος και της XRN1 (**Εικόνα 1.4c**) (Balagopal et al. 2012; Garneau et al. 2007).



Εικόνα 1.4 Μηχανισμοί αποικοδόμησης φυσιολογικών mRNAs. **a** Μονοπάτι αποικοδόμησης που εξαρτάται από αποαδενυλίωση. **b** μονοπάτι αποικοδόμησης το οποίο είναι ανεξάρτητο από την αποαδενυλίωση στον *Saccharomyces cerevisiae*. **c** Μονοπάτι αποικοδόμησης διαμεσολαβούμενο από ενδονουκλεάσες. (Garneau et al. 2007)

Πίνακας 1.1 Παράγοντες που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του mRNA.

Decay factor	Protein components	Protein domains	Functions and characteristics	Localization	Other functions
Deadenylation					
CCR4–NOT	Ccr4	3'→5' exonuclease	Main deadenylase in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; inhibited by PABP	Nucleus; cytoplasm; P bodies	Transcription; protein degradation
	Caf1 (Pop2)	3'→5' exonuclease			
	Caf40 (Rcd1)	Rcd1-like			
	Caf130	Not known			
	Not1	Not known			
	Not2	Not2, Not3 and Not5 share a domain of unknown function			
	Not3	Not2, Not3 and Not5 share a domain of unknown function			
	Not4	Ubiquitin ligase			
	Not5	Not2, Not3 and Not5 share a domain of unknown function			
PAN2–PAN3	PAN2	WD40 repeat	Involved in first phase of poly(A) shortening	Nucleus; cytoplasm	Not known
	PAN3	3'→5' exonuclease			
PARN	PARN	3'→5' exonuclease	Cap-dependent deadenylase activity; inhibited by PABP and nuclear cap-binding complex	Nucleus; cytoplasm	Translation inhibition
5'→3' decay					
Decapping enzyme	DCP1A, DCP1B	EVH1	Produces ^{7mC} GDP; Hedls not found in yeast	Cytoplasm; P bodies	mRNA localization
	DCP2	Nudix Mut T			
	Hedls (Ge-1)	WD40 repeat			
Dhh1 (RCK/p54, Me31B)	Dhh1	DEXD/H-box RNA helicase	Required for decapping	Cytoplasm; P bodies	Translational repression
Edc proteins	Edc1, Edc2 (<i>S. cerevisiae</i>)	Not known	Enhance decapping	P bodies (EDC3)	Not known
	EDC3 (Lsm16)	Sm-like; YjeF_N			
Lsm complex	Lsm1–7	Sm-like	Required for decapping; heptameric	Cytoplasm; P bodies	Nuclear Lsm2–8 involved in splicing
Pat1	Pat1	Not known	Yeast specific	Cytoplasm	Translational repression
XRN1, (Sep1, Kem1)	XRN1	5'→3' exonuclease	Degrades decapped 5'-monophosphate RNA	Cytoplasm; P bodies	Microtubule polymerization
3'→5' decay					
Cytoplasmic exosome	RRP41 (Ski6), RRP42, RRP45 (PM-Sc175), RRP46, Mtr3, OIP2	RNase PH	RNase PH domain subunits form a six-membered ring structure; RNase PH domain has affinity for AU-rich sequences; RRP44 is not present in human exosome preparations	Nucleus; cytoplasm; evidence for cytoplasmic foci; Ski7 is exclusively cytoplasmic	Processing of small RNAs; nuclear mRNA surveillance
	CSL4 (Ski4), RRP4, RRP40	S1 RNA binding; KH RNA binding			
	RRP44 (Dis3)	PIN RNA binding; RNase II			
	Ski2	DEVH RNA helicase			
	Ski3	Tetratricopeptide repeat			
	Ski7	EF1α-like GTPase			
	Ski8	WD40 repeat			
	Scavenger-decapping enzyme	Dcp5			

(Garneau et al. 2007)

Παράγοντες που εμπλέκονται στην έναρξη της μετάφρασης, την αποαδενυλίωση, την αφαίρεση της καλύπτρας, την εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση 5'→3', την αποικοδόμηση μη νοηματικών μεταγράφων - δηλαδή μεταγράφων που φέρουν πρώιμα κωδικόνια τερματισμού (nonsense-mediated decay) και στην microRNA (miRNA) διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση, συνεντοπίζονται σε κοκκώδεις κυτταροπλασματικές δομές, τα P bodies, τα οποία θεωρούνται τόποι αποικοδόμησης των mRNAs (Balagopal et al. 2012).

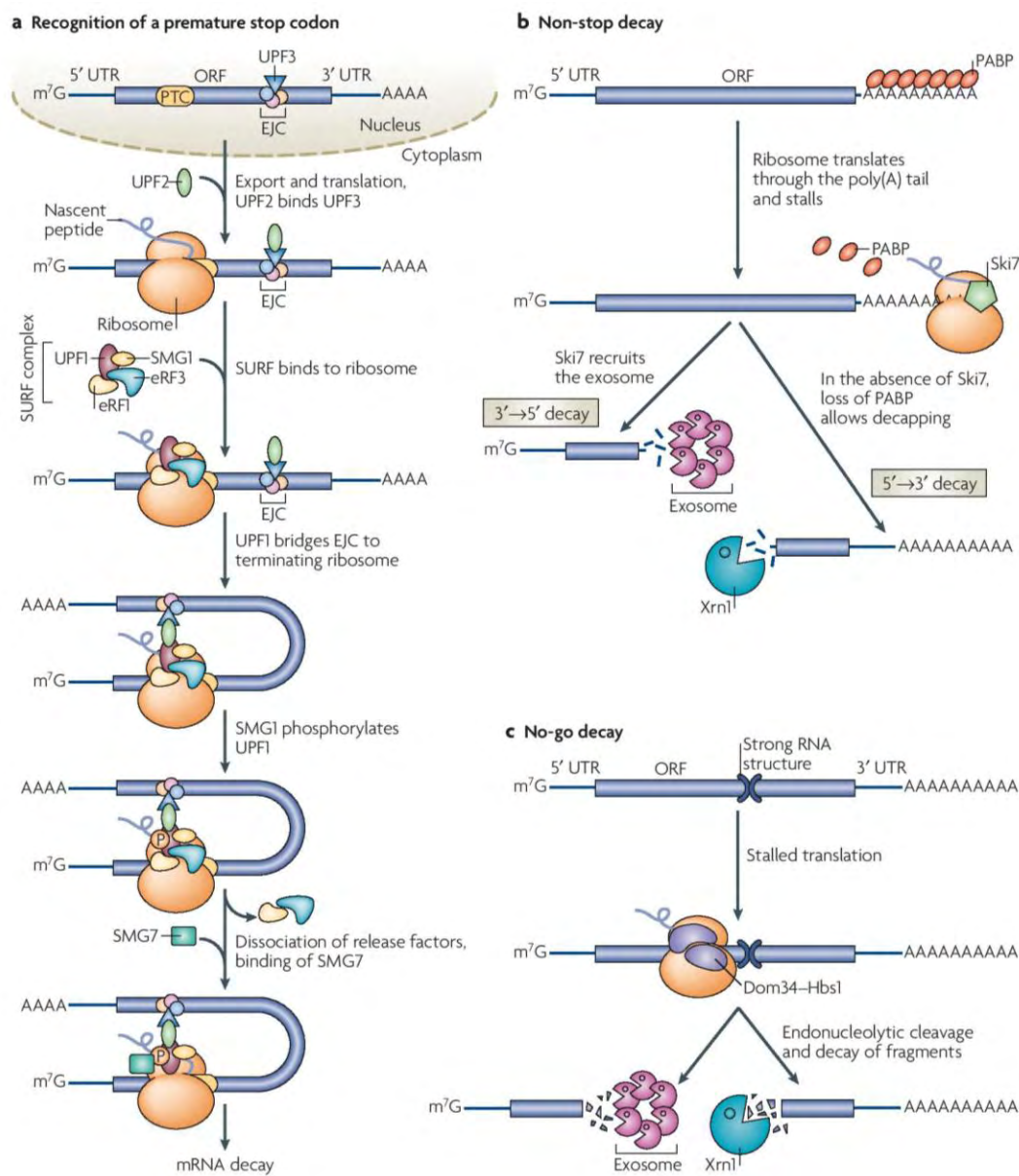
Αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNAs

Προκειμένου να διατηρηθεί η πιστότητα της μετάφρασης, το κύτταρο διαθέτει μηχανισμούς οι οποίοι ανιχνεύουν και αποικοδομούν ελαττωματικά μεταγραφα, προστατεύοντάς το έτσι από την παραγωγή τοξικών πρωτεϊνών. Ο έλεγχος ποιότητας και επεξεργασίας ακατάλληλων mRNA μορίων γίνεται στον πυρήνα, ενώ υπάρχουν τρία μονοπάτια εξαρτώμενα από τη μετάφραση που ανιχνεύουν ελαττωματικά σύμπλοκα mRNA και ριβονουκλεοπρωτεϊνών (mRNPs) στο κυτταρόπλασμα (Muhlemann and Jensen 2012).

Στο πρώτο από αυτά, σε μια πορεία που αναφέρεται και ως αποικοδόμηση μη νοηματικών μεταγράφων (nonsense-mediated decay, NMD) τα mRNAs που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται. Τέτοια μεταγραφα αποικοδομούνται είτε μετά από αφαίρεση του καλύμματος σε μία διαδικασία η οποία είναι ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση, είτε από επιτάχυνση της αποαδενυλίωσης και της 3'→5' αποικοδόμησης από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα (**Εικόνα 1.5a**) (Conti and Izaurralde 2005; Muhlemann and Lykke-Andersen 2010). Ομοίως, σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως αποικοδόμηση μη-τερματισμού (non-stop decay, NSD), τα mRNAs στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα (**Εικόνα 1.5b**) (Frischmeyer et al. 2002). Τέλος, στη ζύμη έχει ανακαλυφθεί και η no-go αποικοδόμηση (no-go decay, NGD) στην οποία παρατηρείται ακινητοποίηση του ριβοσώματος στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης λόγω σχηματισμού ειδικής δευτεροταγούς δομής στο ελαττωματικό mRNA. Ως αποτέλεσμα, πυροδοτείται η διαμεσολαβούμενη από ενδονουκλεάσες αποικοδόμηση του mRNA και η απελευθέρωση του ριβοσώματος (**Εικόνα 1.5c**) (Doma and Parker 2006).

Σήματα που ρυθμίζουν την αποικοδόμηση του mRNA

Οι καθοριστές της σταθερότητας των mRNAs, βρίσκονται κυρίως στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) όπου τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα προστατεύονται από τη διάσχιση των ριβοσωμάτων κατά μήκος των mRNAs, αλλά και στην 5' UTR και στην κωδική περιοχή. Τα πιο καλά μελετημένα στοιχεία σταθερότητας των mRNAs, αποτελούν οι περιοχές που είναι πλούσιες σε αλληλουχίες AU (πενταμερές AUUUA), ή αλλιώς οι αλληλουχίες ARE (AU Rich Element). Βρίσκονται στην 3' UTR περιοχή πολλών μεταγράφων που κωδικοποιούν κυρίως για κυτοκίνες, πρωτο-ογκογονίδια και μεταγραφικούς παράγοντες. Οι παράγοντες που προσδένονται σε αυτές τις αλληλουχίες έχει βρεθεί πως στρατολογούν τη μηχανή αποικοδόμησης των mRNAs, όπως μεταξύ άλλων τις αποαδενυλάσες (PARN, σύμπλοκο CCR4-NOT), τους DCP1-2 και το εξώσωμα. Παραδείγματα τέτοιων αποσταθεροποιητικών παραγόντων, αποτελούν οι: AUF1, CUG-BP, KSRP, RHAU, TIAR, Tristetraprolin. Υπάρχουν όμως και πρωτεΐνες που προσδένονται σε ARE, όπως είναι οι πρωτεΐνες ELAV (HuR και HuD), οι οποίες σταθεροποιούν τα mRNAs είτε μέσω ανταγωνισμού με τις αποσταθεροποιητικές πρωτεΐνες για την πρόσδεση, είτε μέσω μεταφοράς των ίδιων των mRNAs από τα P-bodies στα πολυσώματα. Άλλα στοιχεία που σχετίζονται με τη σταθερότητα των mRNAs, αποτελούν οι πρωτεΐνες PUF που αναγνωρίζουν αλληλουχίες πλούσιες σε UG και επιταχύνουν την αποικοδόμηση των υποστρωμάτων τους προσελκύοντας το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (Garneau et al. 2007).



Εικόνα 1.5 Μονοπάτια αποικοδόμησης ελαττωματικών mRNAs. **a** Στην μη-νοηματικά (ανερμηνεύσιμα) διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (nonsense-mediated decay, NMD) τα mRNAs που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται. **b** Στην αποικοδόμηση μη-τερματισμού (non-stop decay, NSD), τα mRNAs στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα. **c** Στην περίπτωση ακινητοποίησης του ριβοσώματος στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης λόγω σχηματισμού ειδικής δευτεροταγούς δομής, λαμβάνει χώρα η no-go αποικοδόμηση (no-go decay, NGD). (Garneau et al. 2007)

Σταθερότητα των ευκαρυωτικών mRNAs

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, ενώ υπάρχει μια αξιοσημείωτη αύξηση της σταθερότητας στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Το mRNA των ζωικών κυττάρων είναι σχετικά σταθερό, με χρόνο ημιζωής μεταξύ 1 έως 24 ωρών. Οι τροποποιήσεις και στα δυο άκρα του mRNA συνεισφέρουν σ' αυτή τη σταθερότητα (Lewin 2004). Η σταθερότητα του mRNA επηρεάζει την γονιδιακή έκφραση σε σχεδόν όλους τους οργανισμούς, από τα βακτήρια έως τα θηλαστικά. Οι διαδικασίες που ρυθμίζουν την ημιζωή του mRNA, μπορούν με τη σειρά τους να επηρεάσουν το πώς ένα κύτταρο αυξάνεται, διαφοροποιείται και αποκρίνεται στο περιβάλλον του. Τα επίπεδα ενός mRNA μέσα σε ένα κύτταρο εξαρτώνται από το ρυθμό σύνθεσης και αποικοδόμησής του. Η σταθερότητα των ευκαρυωτικών mRNAs παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης. Αναλύσεις έχουν δείξει ότι ~20-50% των αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης του κυττάρου σε διάφορες περιπτώσεις μπορεί να αποδοθεί σε μεταβολές στη σταθερότητα του mRNA παρά στο ρυθμό μεταγραφής. Επιπλέον, η σταθερότητα του RNA παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της ποιότητας της συνολικής γονιδιακής έκφρασης στο κύτταρο. Η ακρίβεια της γονιδιακής έκφρασης βασίζεται στον αποτελεσματικό ποιοτικό έλεγχο (quality control) που έχει εξελιχθεί μέσα στο κύτταρο, δημιουργώντας σημεία ελέγχου για να παρακολουθεί στενά την έκφραση των mRNAs (Muhlemann and Jensen 2012).

Ένζυμα και έλεγχος αποαδενυλίωσης

Όπως αναφέρθηκε, η αποικοδόμηση του mRNA υπό φυσιολογικές συνθήκες συνήθως ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ(A) ουράς, μιας διεργασίας γνωστής ως αποαδενυλίωση. Η αποαδενυλίωση αποτελεί ένα κομβικό σημείο για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, καθώς ελέγχει το ρυθμό αποικοδόμησης των mRNAs. Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για αυτή τη διεργασία είναι οι αποαδενυλάσες (deadenylases). Οι αποαδενυλάσες είναι εξωριβονουκλεάσες με ποικίλες βιολογικές λειτουργίες. Υδρολύουν τα μόρια RNA με κατεύθυνση 3'→5' με αποτέλεσμα την απελευθέρωση 5'-AMP και η δράση

τους εξαρτάται από ιόντα μαγνησίου. Οι πολυ(A) ουρές αποτελούν το βασικό υπόστρωμα αυτών των ενζύμων, ωστόσο έχει δείξει ότι αποικοδομούν λιγότερο αποτελεσματικά και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή (Goldstrohm and Wickens 2008).

Ο αριθμός των γνωστών αποαδενυλασών αυξάνεται συνεχώς και με βάση την παρουσία συγκεκριμένων συντηρημένων καταλοίπων στο καταλυτικό τους κέντρο, ταξινομούνται σε δύο μεγάλες υπερ-οικογένειες νουκλεασών: αυτή των DEDD και των EEP νουκλεασών. Η DEDD υπερ-οικογένεια έχει λάβει το όνομά της από τα αμινοξέα ασπαρτικό (Asp, D) και γλουταμινικό (Glu, E) που απαντούν στο καταλυτικό κέντρο και βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ τριών μοτίβων εξωνουκλεάσης, τα οποία συντονίζουν τα ιόντα Mg^{2+} . Μέλη αυτής της ομάδας αποτελούν οι αποαδενυλάσες POP2/ CAF1 (CNOT7 & CNOT8), η CAF1Z, η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A)-specific ribonuclease, PARN], καθώς και οι οικογένειες των PAN2 αποαδενυλασών. Από την άλλη, η υπερ-οικογένεια EEP των εξωνουκλεασών - ενδονουκλεασών - φωσφατασών (*exonuclease-endonuclease-phosphatase, EEP*), περιλαμβάνει αποαδενυλάσες που φέρουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα ασπαρτικού (Asp) και ιστιδίνης (His) στις δομικές περιοχές νουκλεάσης τους. Μέλη της οικογένειας αποτελούν οι αποαδενυλάσες Nocturnin (Ccrn4l, NOC), CCR4 (CCR4a/ CNOT6 & CCR4b/ CNOT6L), Angel και 2' PDE (**Πίνακας 1.2**) (Goldstrohm and Wickens 2008).

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

Οι αποαδενυλάσες όπως αναφέρθηκε, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γενική διαδικασία ανακύκλωσης του mRNA, επιτελούν όμως και αρκετούς εξειδικευμένους, ρυθμιστικούς ρόλους. Κάποιες είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των οργανισμών, ενώ μεταλλάγματα άλλων επιφέρουν μια ποικιλία φαινοτύπων. Κάποιες από αυτές είναι σημαντικές κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, ενώ άλλες απαιτούνται για τη γονιμότητα, τη μεταβολική ομοιόσταση, την ανάπτυξη και τον κυτταρικό κύκλο (στα θηλαστικά, υπερέκφραση της CNOT7 ή της CAF1Z, καθώς και αποσιώπηση της CNOT6L, εμποδίζει την κυτταρική αύξηση) (Bogdan et al. 1998; Morita et al. 2007). Το γεγονός, πως

συγκεκριμένες αποαδενυλάσες είναι απαραίτητες για συγκεκριμένες βιολογικές διεργασίες, αποδεικνύει πως ο έλεγχος ορισμένων mRNAs είναι καθοριστικής σημασίας για την ομαλή λειτουργία αυτών των διεργασιών. Η ρύθμιση λοιπόν, της δραστηριότητας των αποαδενυλασών κρίνεται απαραίτητη, καθώς συνθήκες ανεξέλεγκτης αποαδενυλίωσης θα οδηγούσαν σε καταστροφή και θάνατο του κυττάρου. Σταθερά και μεταγραφικά ενεργά mRNAs πρέπει να προστατευθούν από την αποαδενυλίωση ενώ τα ασταθή και μη φυσιολογικά θα πρέπει να αποαδενυλιώνονται και να αποικοδομούνται (Goldstrohm and Wickens 2008; Parker and Song 2004).

Πίνακας 1.2 Ποικιλομορφία των αποαδενυλασών.

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

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

(+): είναι παρούσα στον οργανισμό, (-): δεν είναι παρούσα στον οργανισμό.

(Goldstrohm and Wickens 2008)

Ο ρυθμός της αποαδενυλίωσης ποικίλλει μεταξύ των διάφορων mRNAs. Όπως προαναφέρθηκε, παραδείγματα παραγόντων - ρυθμιστών που προωθούν την αποαδενυλίωση αποτελούν οι CUG-BP, miRNAs, PUF και CPEB (Goldstrohm and Wickens 2008; Hook et al. 2007). Εναλλακτικά, προώθηση της αποαδενυλίωσης μπορεί να επιτευχθεί και μέσω της PABP, η οποία στρατολογεί το σύμπλοκο PAN2-PAN3 στο mRNA στόχο. Ακόμη, στα θηλαστικά η PABP μπορεί να στρατολογεί το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CCR4-CAF1-NOT, μέσω αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες TOB, που λειτουργούν σαν

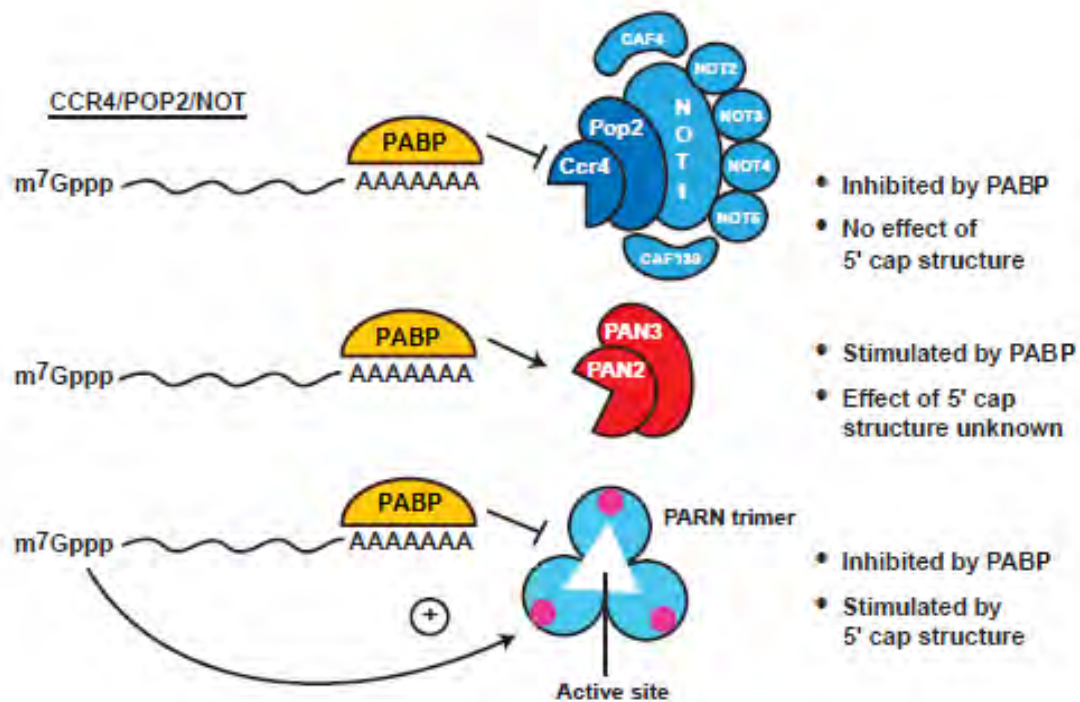
γέφυρα η οποία συνδέει το σύμπλοκο με την PABP. (Ezzeddine et al. 2007; Funakoshi et al. 2007). Επίσης, το 5' κάλυμμα του mRNA μπορεί να επηρεάσει θετικά την αποαδενυλίωση διεγείροντας την πρόσδεση και τη δραστικότητα αποαδενυλασών και συγκεκριμένα της PARN (Balatsos et al. 2006).

Η έκφραση των αποαδενυλασών και των αντίστοιχων ρυθμιστών τους υποδεικνύει το χρόνο και τον τόπο, στον οποίο μπορεί να συμβεί ρύθμιση της αποαδενυλίωσης. Για παράδειγμα, η έκφραση της Nocturnin είναι ρυθμική και ελέγχεται από τον κηκκάδιο ρυθμό, ενώ οι αποαδενυλάσες της οικογένειας POP2/ CAF1 και CCR4 δρουν ιδιοστατικά. Η αναστολή της ενεργότητάς τους, παρέχει έναν άλλο τρόπο ελέγχου. Η αποαδενυλίωση σταματά όταν για παράδειγμα το κύτταρο υποβάλλεται σε διάφορες μορφές stress, όπως ακτινοβολία UV, οξειδωση, οσμωτική πίεση ή έλλειψη γλυκόζης (Gowrishankar et al. 2005; Prieto et al. 2000).

Η αποαδενυλίωση επηρεάζεται επίσης από δύο μορφές χωρικού ελέγχου: τον διαχωρισμό των αποαδενυλασών μεταξύ πυρήνα-κυτταροπλάσματος και τον εντοπισμό τους στα P-bodies. Πολλές αποαδενυλάσες μεταφέρονται μεταξύ πυρήνα και κυτοσολίου και αλλαγές στη διαμερισματοποίηση τους, μπορούν να αποβούν μοιραίες για την τύχη mRNAs που δεν θα έπρεπε να αποικοδομηθούν. Από την άλλη μεριά, συγκεκριμένες αποαδενυλάσες εντοπίζονται στα P-bodies, τα οποία όπως αναφέρθηκε περιέχουν κατασταλμένα mRNAs, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να ενεργοποιηθούν με επιμήκυνση των πολυ(A) ουρών τους. Ο συνεντοπισμός αυτών των αποαδενυλασών με τα υποστρώματά τους, πιθανότατα διευκολύνει την κινητική της αποαδενυλίωσης (Goldstrohm and Wickens 2008; Wagner et al. 2007; Yamashita et al. 2005).

Οι αποαδενυλάσες συνήθως αποτελούν τμήμα συμπλόκων με πολλές υπομονάδες. Άλλες σχηματίζουν ομοδιμερή και άλλες ετεροδιμερή. Στον άνθρωπο για παράδειγμα υπάρχουν τρία σύμπλοκα αποαδενυλασών (**Εικόνα 1.6**): το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο CCR4-NOT, το ετεροδιμερές PAN2-PAN3 στο οποίο καταλυτικά ενεργή υπομονάδα είναι η PAN2 και η PARN που σχηματίζει ένα ομοδιμερές (Parker and Song 2004). Ο ετεροδιμερισμός αυξάνει σημαντικά το ρεπερτόριο των συμπλόκων των αποαδενυλασών, καθώς διαφορετικά ετεροδιμερή έχουν και διαφορετικές ενζυμικές και ρυθμιστικές ιδιότητες. Η δυνατότητα για έλεγχο της αποαδενυλίωσης καθίσταται ιδιαίτερα εκτενής και πολύπλοκη, αν συνυπολογίσουμε την αλληλεπίδραση των πολυάριθμων πιθανών

συμπλόκων αποαδενυλασών με την ευρύτατη ποικιλία των ρυθμιστών τους και την αλληλεπίδραση των τελευταίων με μία εξίσου μεγάλη ποικιλία διαφορετικών ρυθμιστικών στοιχείων επί των περιοχών 3'-UTR των mRNA-στόχων. Τα σύμπλοκα των αποαδενυλασών είναι πολυλειτουργικά, καθώς περιέχουν εκτός των ενζύμων αποαδενυλίωσης, παράγοντες που καταστέλλουν τη μετάφραση και ενισχύουν την αποικοδόμηση του mRNA. Η πολυλειτουργικότητα αυτή παρέχει προϋποθέσεις για πολυάριθμα σημεία ρύθμισης της μετάφρασης, της αποαδενυλίωσης και της αποικοδόμησης των mRNAs, είτε ξεχωριστά είτε συντονισμένα (Goldstrohm and Wickens 2008).



Εικόνα 1.6 Σύμπλοκα ευκαρυωτικών αποαδενυλασών. Το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο CCR4-NOT, το ετεροδιμερές PAN2-PAN3 στο οποίο καταλυτικά ενεργή υπομονάδα είναι η PAN2 και η PARN που σχηματίζει ένα ομοδιμερές. (Parker and Song 2004)

Δομή και λειτουργίες του συμπλόκου CCR4-NOT

Το σύμπλοκο CCR4-NOT χαρακτηρίστηκε αρχικά στον *S.Cerevisiae* ως μεταγραφικό σύμπλοκο ρυθμιζόμενο από την γλυκόζη, το οποίο καταστέλλει την RNA πολυμεράση II και αποτελεί το κύριο σύμπλοκο αποαδενυλίωσης (J. Chen et al. 2001). Σχηματίζει δύο κυρίαρχες δομές *in vivo* με μοριακά βάρη 0,9-1,2 MDa και 1,9-2.0 MDa. Περιέχει δύο

υπομονάδες με ενεργότητα αποαδενυλάσης, την Caf1 (Pop2-DEDD) και την Ccr4 (EEP), με την Ccr4 να υπερτερεί της Caf1 (Tucker et al. 2001), με την υπομονάδα Ccr4 να έχει αρχικά ταυτοποιηθεί, ως ενεργοποιητής της έκφρασης του γονιδίου ADH2 (Denis and Chen 2003). Ένας σημαντικός ρόλος της Caf1 είναι η στρατολόγηση της Ccr4 στο σύμπλοκο, μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της Caf1 και της LRR (leucine-rich repeat) περιοχής της Ccr4 (Clark et al. 2004). Επιπλέον, το σύμπλοκο περιέχει και ένα σύνολο άλλων υπομονάδων, όπως οι Not1p-Not5p, Caf130p, Caf40p και BTT1. Οι υπομονάδες του, αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες όπως: Dhh1p, Caf4p, Caf16p, Dbf2p και Mob1p (Bartlam and Yamamoto 2010).

Το σύμπλοκο CCR4-NOT είναι απαραίτητο καθώς οι διαφορετικές υπομονάδες του συμμετέχουν σε πολλές και διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες:

- Συμμετέχει στη ρύθμιση της μεταγραφής, μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των NOT υπομονάδων του κυρίως με τον παράγοντα TFIID και το σύμπλοκο SAGA (ακετυλίωση ιστονών). Επιπλέον, η υπομονάδα CCR4 σχετίζεται με το σύμπλοκο PAF1-RNA πολυμεράση II, συμμετέχοντας στην επιμήκυνση της μεταγραφής. Εκτός από την CCR4 και η CAF1 προσδένει παράγοντες επιμήκυνσης. Είναι πιθανό, το σύμπλοκο να μεταφέρεται μαζί με άλλους παράγοντες κατά τη διάρκεια της μεταγραφής έτσι ώστε να προσδεθεί στη συνέχεια στην πολυ(A) ουρά (Denis and Chen 2003). Σύμφωνα με τις λειτουργίες του συμπλόκου Ccr4-Not στη ζύμη, ένας σημαντικός αριθμός πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων υποδηλώνει ένα ξεχωριστό ρόλο του συμπλόκου στη μεταγραφή, σε ανθρώπινα κύτταρα. Συγκεκριμένα, αρκετές υπομονάδες έχουν αναφερθεί, να ρυθμίζουν τη δράση πυρηνικών υποδοχέων (Garapaty et al. 2008; Govindan et al. 2009; Winkler et al. 2006). Η υπομονάδα CNOT1, αποτελεί ένα καταστολέα της μεταγραφής που εξαρτάται από προσδέτες και επάγεται από ορμονικούς υποδοχείς, όπως είναι ο ERα (estrogen receptor α) (Winkler et al. 2006). Αντιθέτως, οι CNOT6, CNOT7 και CNOT9 ενισχύουν τη μεταγραφή που επάγεται από πυρηνικούς υποδοχείς (όπως ERα και RARα- retinoic acid receptor α) μεταγραφή (Garapaty et al. 2008; Hiroi et al. 2002; Morel et al. 2003; Prevot et al. 2001).
- Στην αποικοδόμηση του mRNA μέσω της αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη Dhh1 (DDX6/Rck/p54 στον άνθρωπο) και τις αποαδενυλάσες του, καθώς και στη

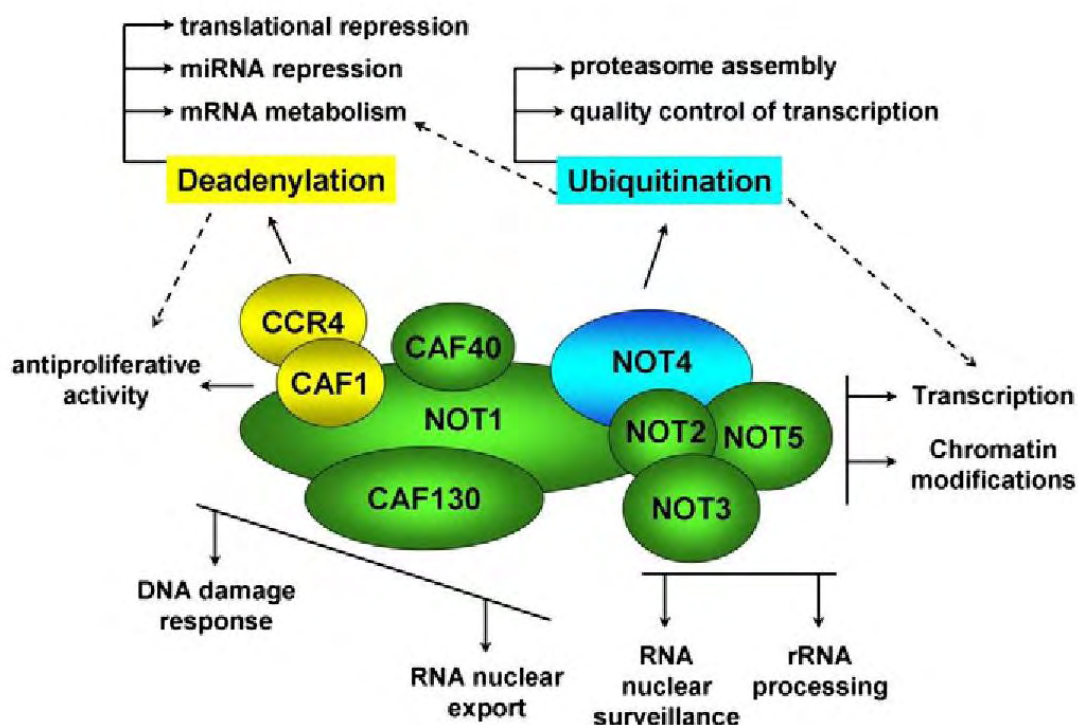
μετα-μεταφραστική τροποποίηση πρωτεϊνών μέσω της αλληλεπίδρασής του με τη φωσφατάση Glc7.

- Έχει βρεθεί ότι συμβάλλει στον έλεγχο των κυτταρικών αποκρίσεων σε συνθήκες “stress”, όπως κατά την έλλειψη γλυκόζης και θερμικού σοκ (Collart and Timmers 2004).

- Συμμετέχει στην έξοδο του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Kerr et al. 2011).

Στα θηλαστικά και συγκεκριμένα στον άνθρωπο, τα ομόλογα αυτών των πρωτεϊνών, επίσης σχηματίζουν ένα όμοιο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, που παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση ποικίλων κυτταρικών μηχανισμών και κυρίως στην αποικοδόμηση του mRNA (Temme et al. 2010; Yamashita et al. 2005). Στην **Εικόνα 1.7** παρουσιάζεται ένα μοντέλο της δομής του συμπλόκου CCR4-NOT στον άνθρωπο. Ο πυρήνας του έχει μελετηθεί πρόσφατα και βρέθηκε ότι αποτελείται από τις εξής υπομονάδες: CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT4, CNOT9, CNOT10, TAB182. Η υπομονάδα CNOT1 λειτουργεί ως «σκαλωσιά», καθώς σ’ αυτή προσδέεται η πλειοψηφία των υπόλοιπων υπομονάδων CNOT. Η CNOT4, αποτελεί μία λιγάση ουβικουϊτίνης E3, που συμμετέχει σε μονοπάτια αποικοδόμησης πρωτεϊνών μέσω του πρωτεασώματος και δεν είναι σταθερά προσδεσμένη στο σύμπλοκο. Ακόμη, στον πυρήνα βρίσκονται συνδεδεμένες οι CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 οι οποίες είναι μεταβλητές υπομονάδες εντός του συμπλόκου και αποτελούν ομόλογα των Caf1 και Ccr4 της ζύμης (Bartlam and Yamamoto 2010; Collart and Timmers 2004).

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



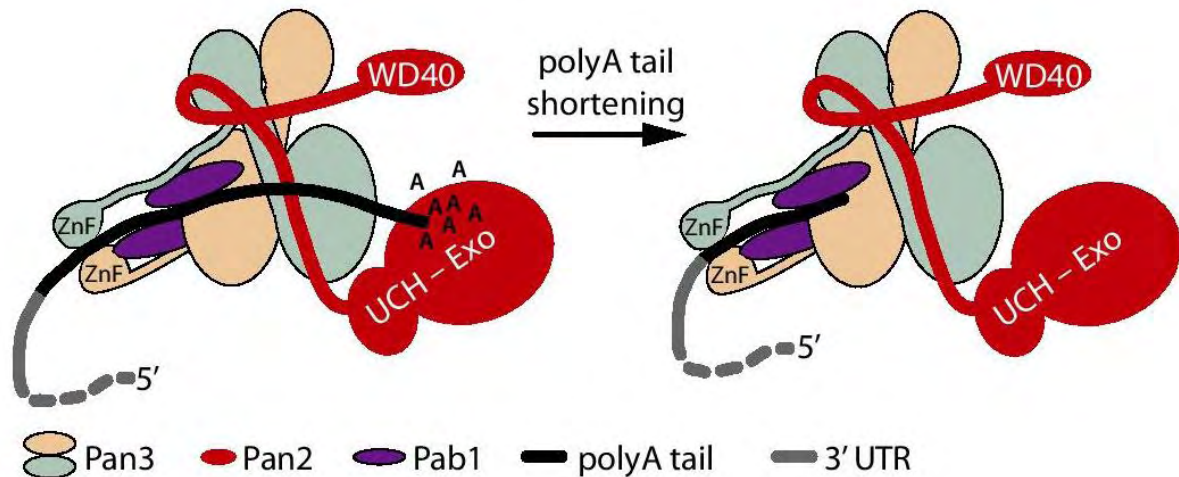
Εικόνα 1.7 Μοντέλο του συμπλόκου CCR4-NOT στον άνθρωπο. Η υπομονάδα CNOT1 λειτουργεί σαν σκαλωσιά στην οποία προσδέεται η πλειοψηφία των υπόλοιπων CNOT υπομονάδων, CNOT2, CNOT3, CNOT4, CNOT5, CAF40, CAF130 και οι αποαδενυλάσες CCR4 (CNOT6 ή CNOT6L) και CAF1 (CNOT7 ή CNOT8) οι οποίες είναι μεταβλητές υπομονάδες. (Collart and Panasencko 2012)

Λειτουργίες των υπομονάδων CAF1 και CCR4 στον άνθρωπο

Τα παράλογα CAF1a (CNOT7) και CAF1b (CNOT8) είναι συστατικά του ανθρώπινου CCR4-NOT, ενώ το ομόλογο Caf1z/TOE, σχηματίζει ένα χωριστό πυρηνικό σύμπλοκο που εμπλέκεται στο μεταβολισμό του mRNA (Wagner et al., 2007). Έχει βρεθεί ότι σε κύτταρα ινοσαρκώματος, η συνδυασμένη αποσιώπηση των CNOT7 και CNOT8, προκαλεί αύξηση στο μήκος των πολυ(A) ουρών, κάτι που δεν παρατηρήθηκε με αποσιώπηση των CNOT6/ CNOT6L. Είναι λοιπόν πιθανό, στα κύτταρα των θηλαστικών, οι αποαδενυλάσες CNOT7 και CNOT8 να συνεισφέρουν περισσότερο στην αποαδενυλίωση (Schwede et al. 2008). Σε κυτταρικό επίπεδο, αποσιώπηση της CNOT7 ή/ και της CNOT8 οδηγεί σε προβλήματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού, που εξαρτάται εν μέρει από την καταλυτική ενεργότητα αυτών των υπομονάδων (Aslam et al. 2009). Τα δύο αυτά παράλογα, αλληλεπιδρούν με μέλη της οικογένειας των BTG/TOB αντιπολλαπλασιαστικών πρωτεϊνών, που εμποδίζουν

την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στην S (Bogdan et al. 1998; Ikematsu et al. 1999; Prevot et al. 2001; Yoshida et al. 2001). Επιπλέον, μετά από ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, ύστερα από την αποσιώπηση των δύο αυτών υπομονάδων, φαίνεται η CNOT7 και η CNOT8 να εμφανίζουν μερική συμπληρωματικότητα και είτε να καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό, είτε να ρυθμίζουν θετικά την έκφραση γονιδίων που επάγουν τον πολλαπλασιασμό (Aslam et al. 2009). Τέλος, οι δύο αυτές υπομονάδες έχουν σχετιστεί και με ανθρώπινες ασθένειες. Συγκεκριμένα, έλλειψη του γονιδίου της CNOT8, η οποία χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 5, στην περιοχή 5q31-q33, προκαλεί μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (Collart and Timmers 2004).

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



Εικόνα 1.8 Μοντέλο του συμπλόκου PAN2/PAN3 στη ζύμη *S.cerevisiae*. (Wolf et al. 2014)

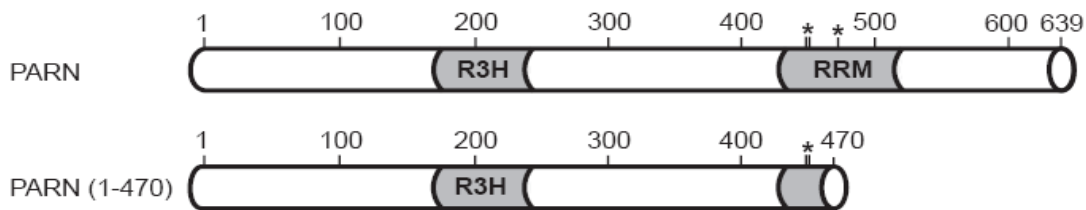
Το σύμπλοκο PAN2/PAN3

Το δεύτερο ενζυμικό σύμπλοκο που καταλύει την αποαδενυλίωση του mRNA είναι ένα διατηρημένο σύμπλοκο και αποτελείται από τις πρωτεΐνες Pan2p και Pan3p. Ο ρόλος των Pan στην αποαδενυλίωση έχει δείχθει με στελέχη ζύμης *Ccr4Δ* όπου απουσιάζει ο κύριος τρόπος αποαδενυλίωσης, οπότε η αποαδενυλίωση εξαρτάται από την Pan2p. Μια εκτίμηση του μοριακού βάρους του συμπλόκου PAN2/PAN3 στη ζύμη, υπολογισμένο με μοριακή διήθηση, είναι 155 kDa και αποτελείται από τις υπομονάδες Pan2p (127 kDa) και Pan3p (76kDa) σε αναλογία 1:1. Ωστόσο, άλλες μέθοδοι προτείνουν πιθανό ολιγομερισμό της Pan3p όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.8** (Wahle and Winkler 2013; Wolf and Passmore 2014). Στη ζύμη και πιθανόν σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η PAN εμπλέκεται σε ένα πρώιμο στάδιο της ζωής του mRNA, όπου μία αρκετά μακριά πολυ(A) ουρά βραχύνεται μέχρι να φτάσει τα 55-75 νουκλεοτίδια, αριθμός που κάθε φορά εξαρτάται από το συγκεκριμένο mRNA (Brown and Sachs 1998). Οι Pan2p και Por2p φαίνεται να παίζουν ρόλο στην ειδική ρύθμιση του mRNA της RAD5 σε απόκριση σε αντιγραφικό στρες (Hammet et al. 2002). Αναλύσεις αλληλουχιών δείχνουν ότι η καρβοξυτελική περιοχή της Pan2p, όπως και της Por2p ανήκει στην οικογένεια των RNaseD, και περιλαμβάνουν τα καταλυτικά κατάλοιπα και μηχανισμό υδρόλυσης που εξαρτάται από δύο δισθενή ιόντα. Ο πιθανός ρόλος της Pan3p είναι η διέγερση της Pan2p. Η Pan3p αλληλεπιδρά με την Dun1p, που φαίνεται να παίζει ρόλο στην ρύθμιση του mRNA της RAD5. Επιπλέον η Pan3p αλληλεπιδρά

με την Mex67p, μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην εξαγωγή του mRNA και μπορεί να ευθύνεται για την παράδοση του Pan2/Pan3p στο νεοσυντιθέμενο mRNA για την αρχική αποαδενυλίωση της πολυ(A) ουράς (Ito et al. 2001).

Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A)-specific ribonuclease, PARN]

Το τρίτο κύριο ένζυμο που αποικοδομεί πολυ(A) ουρές mRNA είναι η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [*poly(A) specific ribonuclease, PARN*]. Η PARN αρχικά απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε σε κύτταρα θηλαστικών (Astrom et al. 1992; Korner and Wahle 1997). Αναλύσεις αλληλουχιών δείχνουν ότι η PARN όπως και η Pan2p και Pop2p ανήκει στην οικογένεια των RNaseD νουκλεασών που φέρει το χαρακτηριστικό μοτίβο DEDD. Είναι συντηρημένη σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς αλλά απουσιάζει από τον *S.cerevisiae* και την *D.melanogaster*, ενώ μεταλλάξεις στα προβλεπόμενα καταλυτικά κατάλοιπα (*DEDD*) αναστέλλουν τη δράση της (Lai et al. 2003; Ren et al. 2002). Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η ενεργότητα της PARN εξαρτάται από δισθενή μεταλλικά ιόντα ενώ μεγαλύτερη δραστικότητα έχει παρουσία ιόντων Mg(II) τα οποία βρίσκονται στο ενεργό κέντρο παίζοντας καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό της κατάλυσης. Το ελάχιστο μήκος υποστρώματος είναι τα δι- ή τρι-νουκλεοτίδα αδενοσίνης ανάλογα με το ποιο μεταλλικό ιόν βρίσκεται στο ενεργό κέντρο. Το ένζυμο στον άνθρωπο απαντά σε δύο ισόμορφες, μία πυρηνική 74 kDa και μία κυτταροπλασματική 54 kDa. Η τελευταία είναι πρωτεολυμένο παράγωγο της πρώτης από το οποίο απουσιάζει το εύκαμπτο καρβοξυτελικό άκρο. Η περιοχή αυτή ευθύνεται και για την μετακίνηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα αφού περιέχει την αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (*nuclear localization signal, NLS*). Η PARN επίσης περιέχει δύο μοτίβα αναγνώρισης RNA: Το *μοτίβο αναγνώρισης RNA (RNA recognition motif, RRM)*, που προσδένει το πολυ(A) αλλά και το κάλυμμα (Nilsson et al. 2007). Το RRM σημειώνεται πως απουσιάζει από την κρυσταλλική δομή. Το δεύτερο μοτίβο είναι μια συντηρημένη περιοχή R3H που φαίνεται να έχει δομή όμοια με αυτήν της καρβοξυτελικής περιοχής ενός παράγοντα έναρξης της μετάφρασης (*Initiation Factor 3, IF3*) (Wu et al. 2005). Η R3H περιοχή προσδένεται σε μονόκλιωνα νουκλεϊκά οξέα και πιθανόν κατευθύνει την PARN στο πολυαδενυλιωμένο mRNA (**Εικόνα 1.9**).

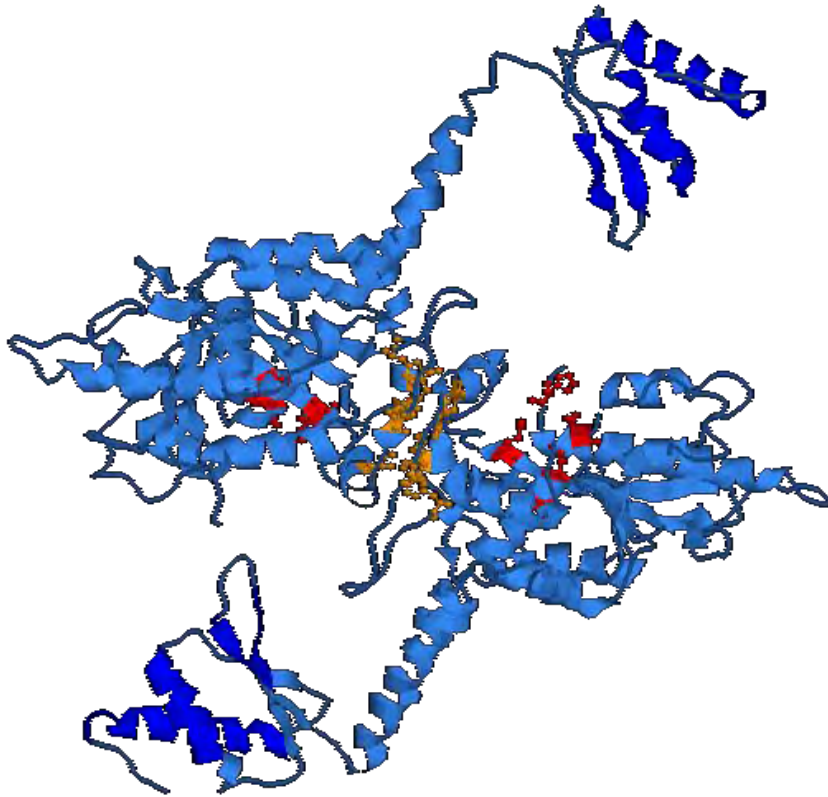


Εικόνα 1.9 Οι δύο ισομορφές της ανθρώπινης PARN. Σημειώνονται οι RRM και R3H περιοχές. Με αστερίσκο δηλώνονται σημαντικά αμινοξέα που συμμετέχουν στην πρόσδεση του καλύμματος.

Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 1.10**, η κρυσταλλική δομή της ανθρώπινης PARN, από την οποία λείπει το καρβοξυτελικό άκρο (κατάλοιπα 1-430 σε σύνολο 639), έδειξε πως το ένζυμο είναι ομοδιμερές, όπου κάθε υπομονάδα αναδιπλώνεται σε δύο περιοχές, μία συντηρημένη και την περιοχή της νουκλεάσης. Το ενεργό κέντρο περιέχει τέσσερα συντηρημένα κατάλοιπα, ένα γλουταμικό και τρία ασπαρτικά οξέα και μια ιστιδίνη (*Asp28, Glu30, Asp292, Asp382* και *His377*) κατά το μοτίβο DEDDh, τα οποία κατευθύνουν κύρια καταλυτικά δισθενή ιόντα, όπως Mg^{2+} . Παρόλα αυτά η κρυσταλλική δομή της κολοβωμένης PARN δεν έδειξε την ύπαρξη ιόντων $Mg(II)$ στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Ren et al. 2002; Wu et al. 2005).

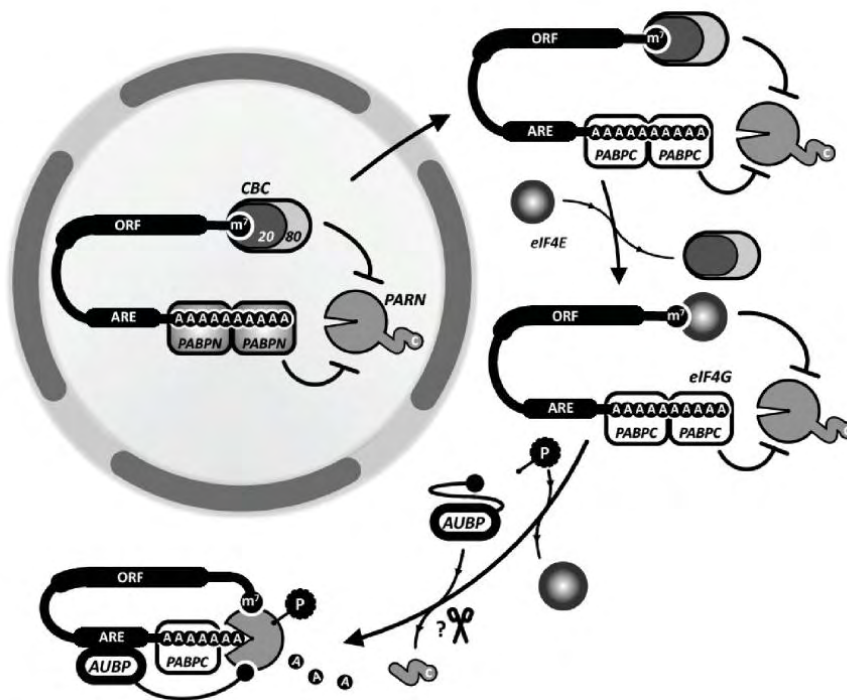
Η δραστηριότητα της PARN φαίνεται πως ρυθμίζεται με τουλάχιστον έξι διαφορετικούς τρόπους: (α) διέγερσή της μέσω απευθείας αλληλεπίδρασης της PARN και του καλύμματος στο 5' άκρο (Dehlin et al. 2000; Gao et al. 2000; Martinez et al. 2000; Martinez et al. 2001), (β) αναστολή της από μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια πουρινών, ένα ανάλογο του καλύμματος, καθώς και συνθετικά νουκλεοσίδια (fluoro-pyranosyl nucleosides) (Balatsos et al. 2009; Martinez et al. 2000), (γ) αναστολή από την κυτταρο-πλασματική πολυ(A)-προσδενόμενη πρωτεΐνη C (*PABPC*), πιθανόν λόγω της πρόσδεσης και αλληλεπίδρασης της τελευταίας με την πολυ(A) ουρά (Gao et al. 2000; Korner and Wahle 1997), (δ) αλληλεπίδραση της PARN με την CUG-BP mRNA-προσδενόμενη πρωτεΐνη, η οποία είναι το ανθρώπινο ανάλογο της πρωτεΐνης του *Xenopus* EDEN-BP· η αλληλεπίδραση αυτή διεγείρει την βράχυνση των πολυ(A) ουρών (Gao et al. 2001), (ε) διέγερση της αποικοδόμησης του πολυ(A) από πρωτεΐνες που προσδένονται σε περιοχές γνωστές ως ARE (Lai et al. 2003), (στ) συναγωνισμός μεταξύ της PARN και του eIF4E για την πρόσδεση του καλύμματος (Gao et al.

2000). Στην **Εικόνα 1.11** συνοψίζονται μερικοί από τους προαναφερθέντες μηχανισμούς ρύθμισης της PARN.



Εικόνα 1.10 Κρυσταλλική δομή της hPARN (αμινοξέα 1-430). Με κόκκινο χρώμα η περιοχή νουκλεάσης, με μπλε η περιοχή R3H, με χρυσό η περιοχή διμερισμού.

Η PARN φαίνεται επίσης να είναι απαραίτητη για ταχεία αποαδενυλίωση, επαγόμενη από την πλούσια σε AU αλληλουχία, την ARE binding protein τριστετραπρολίνη (Lai et al. 2003; Lejeune et al. 2003). Ωστόσο η PARN βρίσκεται και σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στο *Xenopus laevis* η PARN απαιτείται σε έναν εξελικτικά διατηρημένο μηχανισμό κατά τον οποίο αποσιωπούνται τα μητρικά mRNA κατά την ωρίμανση του ωαρίου (Copeland and Wormington 2001). Στο *Arabidopsis thaliana* φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της ανάπτυξης και στην αποαδενυλίωση μιας συγκεκριμένης ομάδας mRNA (Chiba et al. 2004).



Εικόνα 1.11 Ρύθμιση της δράσης της PARN. Η δράση της PARN αναστέλλεται από το σύμπλοκο πρόσδεσης του καλύματος (Cap Binding Complex, CBC), την πολύ(A) προσδεδεμένη πρωτεΐνη (Poly(A) Binding Protein Nuclear/cytoplasm, PABPN/C) και τον παράγοντα έναρξης της της μετάφρασης eIF4E. Η διέγερση της PARN πραγματοποιείται από πρωτεΐνες που προσδέονται σε περιοχές ARE (AUBP). (Balatsos et al. 2012)

Η αποαδενυλάση NOCTURNIN

Γενικά χαρακτηριστικά

Η Nocturnin (NOC) έχει ενεργότητα αποαδενυλάσης, αφού εμπλέκεται στην διαδικασία της αποαδενυλίωσης, με μοριακό βάρος 40kDa. Πήρε το όνομά της λόγω του μεγάλου εύρους έκφρασής της τη νύχτα (nocturnal), με τη μέγιστη έκφρασή της να εκδηλώνεται 2-4 ώρες μετά την έναρξη του σκότους. Η έκφραση του γονιδίου της NOC παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στα ραβδοειδή κύτταρα και στους κωνοειδείς φωτουποδοχείς του αμφιβληστροειδή χιτώνα στον *Xenopus laevis* (Baggs and Green 2003).

Όπως και οι προηγούμενες αποαδενυλάσες, είναι μια 3'-εξωνουκλεάση που αποικοδομεί την 3'-πολυ(A) ουρά κάποιων mRNAs. Η ενεργότητα νουκλεάσης της NOC εξαρτάται από τα Mg^{2+} , καθώς πειράματα μεταλλαξιγένεσης του καταλοίπου γλουταμικού

στη θέση 152 (E152A) που δεσμεύει το Mg^{2+} , η NOC δεν παρουσίαζε πια ενεργότητα αποαδενυλάσης. Το γεγονός αυτό την κατατάσσει στην υπεροικογένεια νουκλεασών APE1 (DNA-repair apurinic/aprimidinic endonuclease) (Baggs and Green 2003). Έχει δειχθεί ότι η NOC έχει γενετική και αμινοξική ομοιότητα στο N-τελικό αλλά και στο C-τελικό άκρο με την αποαδενυλάση CCR4 της ζύμης, γι' αυτό και αποτελεί μία CCR4-like protein και ονομάζεται Ccrn4l (carbon catabolite repression 4 like). Η CCR4 ως υπομονάδα του συμπλόκου CCR4-NOT, αποτελεί και μεταγραφικό συνενεργοποιητή ο οποίος προσδέεται όχι απευθείας πάνω στο DNA αλλά πάνω σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες μέσω της περιοχής πλούσια σε λευκίνη και έτσι προκαλεί τη μεταγραφή γονιδίων (Garbarino-Pico et al. 2007). Το γεγονός αυτό γεννά το ερώτημα για το αν η NOC εκτός από την ενεργότητα αποαδενυλάσης που έχει, μπορεί να κατευθύνει και την μεταγραφή γονιδίων μέσω μιας περιοχής πλούσιας σε λευκίνη.

Μεταγραφική ρύθμιση της NOC

Στην περιοχή 5' του γονιδίου της NOC βρέθηκε ένα στοιχείο 59 ζευγών βάσεων το οποίο είναι υπεύθυνο για την εξειδικευμένη μεταγραφή της στους φωτοϋποδοχείς του αμφιβληστροειδή (photoreceptor conserved element II, PCE II) (Liu and Green 2001). Άλλο ένα στοιχείο που προκαλεί τη μεταγραφή της NOC είναι το E-box που βρίσκεται πιο μπροστα από το PCE II στην 5' περιοχή, στην οποία προσδέονται μεταγραφικοί παράγοντες, όπως το ετεροδιμερές που αποτελείται από τους παράγοντες CLOCK και BMAL1 (Arntl1) (Green 2003). Αν και το σύμπλοκο CLOCK/BMAL1 εμπλέκεται στη ρύθμιση διάφορων κικκάδιων γονιδίων μέσω της πρόσδεσής του στο στοιχείο E-box *in vitro*, λίγα γνωρίζουμε για το πώς το κικκάδιο ρολόι ελέγχει ρυθμικά γονίδια *in vivo*. (Liu and Green 2001). Προς το παρόν δεν έχει αναφερθεί εάν οι παράγοντες αυτοί μπορούν να κατευθύνουν και την έκφραση της NOC (Ciarleglio et al. 2008).

Η NOC ως γονίδιο άμεσης απόκρισης

Τα γονίδια άμεσης απόκρισης (Immediate early genes, IEGs) ενεργοποιούνται παροδικά και ταχέως σε απόκριση μίας ευρείας ποικιλίας κυτταρικών διεγέρσεων. Αντιπροσωπεύουν ένα μηχανισμό αντίδρασης που ενεργοποιείται σε μεταγραφικό επίπεδο στον πρώτο γύρο της ανταπόκρισης σε ερεθίσματα, προτού συντεθούν νέες πρωτεΐνες. Εκ τούτου τα IEGs είναι διαφορετικά από τα γονίδια «αργής απόκρισης» (late response genes),

τα οποία ενεργοποιούνται μόνο μετά την σύνθεση των προϊόντων των γονιδίων άμεσης απόκρισης. Πολλά κιρκάδια γονίδια επάγονται από εξωκυτταρικές διεγέρσεις. Σε πείραμα που έγινε σε κύτταρα NIH3T3 από ινοβλάστες ποντικού, τα οποία δεν σχετίζονται με κιρκάδιο ρυθμό, δείχθηκε ότι υπήρχε άμεση απόκριση της NOC σε δύο εξωκυτταρικές διεγέρσεις: καλλιέργεια των κυττάρων απουσία ορού (FBS) ή παρουσία φορβολικού εστέρα (TPA), ο οποίος προάγει την ανάπτυξη όγκων, προκάλεσε άμεση επαγωγή της έκφρασης της NOC, αφού τα επίπεδα του mRNA της αυξήθηκαν κατά πολύ. Αξιοσημείωτα, αυτές οι ισχυρές επιδράσεις είναι εξειδικευμένες για τη NOC, καθώς άλλες αποαδενυλάσες όπως η CCR4, CAF1, PAN2 και PARN δεν επάχθηκαν από τους παράγοντες αυτούς. Επιπλέον της κιρκάδιας ρύθμισής της, η έκφραση της NOC μπορεί να ρυθμιστεί ισχυρά από εξωκυτταρικά σήματα και υπονοεί ότι μπορεί να αποκριθεί άμεσα και εξειδικευμένα σε φυσιολογικές συνθήκες. Η NOC λοιπόν ως γονίδιο άμεσης απόκρισης μπορεί και δρα με την ιδιότητα αποαδενυλάσης καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων ως απόκριση σε αυτά τα εξωκυτταρικά σήματα (Garbarino-Pico et al. 2007).

Η NOC εμπλέκεται στον μεταβολισμό λιπιδίων και υδατανθράκων

Τα περιφερικά κιρκάδια ρολόγια που υπάρχουν σε διάφορους ιστούς του σώματος, ελέγχουν τη ρυθμική έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου και γονιδίων του μεταβολισμού. Στοχευμένη αδρανοποίηση του γονιδίου της NOC που έγινε στα ποντίκια, επέφερε αντίσταση στην ανάπτυξη παχυσαρκίας και στην ηπατική στεάτωση (**Εικόνα 1.12** δεξιά εικόνα). Τα NOC απογονιδιακά (knock out) ποντίκια παραμένουν αδύνατα σε διατροφές με πολλά λιπαρά, ενώ έχουν χαμηλότερο σωματικό βάρος και μειωμένο κοιλιακό λίπος σε σχέση με τα φυσικού τύπου (**Εικόνα 1.12** αριστερή εικόνα).

Τα ποντίκια αυτά υστερούν στον μεταβολισμό των λιπιδίων αλλά και στην πρόσληψη γλυκόζης, ενώ παρατηρούνται και αλλαγές ως προς την ευαισθησία του οργανισμού προς τη γλυκόζη και προς την ινσουλίνη. Η αδρανοποίηση της NOC έχει συσχετιστεί με μειωμένη έκφραση λιπογενών γονιδίων, μειωμένη αποθήκευση λιπιδίων στον λιπώδη ιστό, μειωμένη συσσώρευση λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα, αυξημένη οξείδωση λιπιδίων σε σχέση με ποντίκια φυσικού τύπου αλλά και με μεταβολές στην ομοιόσταση της γλυκόζης (Green et al. 2007).



Εικόνα 1.12 Η NOC εμπλέκεται στον μεταβολισμό λιπιδίων και υδατανθράκων. **(αριστερή εικόνα)** Τα NOC knock out ποντίκια παραμένουν αδύνατα σε διατροφές με πολλά λιπαρά, ενώ έχουν χαμηλότερο σωματικό βάρος και μειωμένο κοιλιακό λίπος. **(δεξιά εικόνα)** Το πάνω ήπαρ από φυσιολογικό ποντίκι περιέχει μεγάλες ποσότητες λίπους μετά από διατροφή υψηλή σε λιπαρά. Αντίθετα, το κάτω ήπαρ από ένα NOC-/- ποντίκι, περιέχει φυσιολογικές ποσότητες λίπους και παραμένει υγιές μετά από διατροφή υψηλή σε λιπαρά. (Green et al. 2007)

Η NOC εκφράζεται ισχυρά στα βλαστοκύτταρα του νωτιαίου μυελού (BMSC), στα ηπατοκύτταρα και στα λιποκύτταρα των θηλαστικών. Πειράματα σε κύτταρα BMSC που εκτέθηκαν στον rosiglitazone, έναν αγωνιστή του PPAR-γ (peroxisome proliferator-activated receptor-γ), η έκφραση της NOC αυξήθηκε κατά 30 φορές. Ο PPAR-γ αποτελεί κρίσιμο μεταγραφικό παράγοντα για τη λιπογένεση αλλά και τον μεταβολισμό της γλυκόζης. Η NOC φαίνεται να προσδένεται στον PPAR-γ και να επάγει την μεταγραφική ικανότητά του με το να οδηγεί την πυρηνική μετάθεσή του ούτως ώστε να λειτουργήσει ως μεταγραφικός παράγοντας επάγοντας συγκεκριμένα γονίδια. Με αυτόν τον τρόπο η NOC μπορεί και επάγει την λιπογένεση, όπως και τη διαφοροποίηση των BMSC βλαστοκυττάρων και τελικά τη σύσταση του οργανισμού. Όλα τα παραπάνω προτείνουν την NOC να έχει κεντρικό ρόλο στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων του μεταβολισμού και της αποθήκευσης των λιπιδίων, του μεταβολισμού των υδατανθράκων αλλά και άλλων σημαντικών μεταβολικών μονοπατιών για τη σύσταση του σκελετικού συστήματος (Kawai et al. 2010).

Άλλος ένας παράγοντας που έχει βρεθεί πρόσφατα ότι ρυθμίζει την μετα-

μεταγραφική έκφραση της NOC είναι το microRNA-122, ένα εξειδικευμένο microRNA των κυττάρων του ήπατος του ποντικού. Σ' αυτή τη μελέτη βρέθηκε ότι η 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA της NOC περιέχει μία θέση αναγνώρισης για το microRNA-122, η οποία είναι συντηρημένη στα θηλαστικά. Η πρόσδεση του miR-122 πάνω στο mRNA της NOC προκαλεί την άμεση αποσιώπησή της καθώς με στοχευμένη αδρανοποίηση του microRNA φάνηκε ότι τα επίπεδα τα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης NOC αυξήθηκαν κατακόρυφα κατά τη διάρκεια της νύχτας. Άλλες μελέτες υποδεικνύουν τη NOC αλλά και το miR-122 να παίζουν ρόλο όχι μόνο στην κirkάδια ρύθμιση αλλά και το μεταβολισμό των λιπιδίων (Kojima et al. 2011).

Ο ρόλος των ριβονουκλεασών στον καρκίνο

Οι ρυθμιστικές διαταραχές στην γονιδιακή έκφραση είναι χαρακτηριστικό πολλών καρκίνων. Μελέτες τα τελευταία χρόνια έχουν αποκαλύψει την σημαντικότητα του μετα-μεταγραφικού μηχανισμού στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης ειδικά στο πεδίο της αποικοδόμησης του mRNA. Οι διαδικασίες που αναφέρονται στην σταθερότητα του mRNA, στην μεταγραφική καταστολή και στην αποικοδόμηση μεταγράφων συνδέονται πολύπλοκα μεταξύ τους και μπορούν να επηρεαστούν από διάφορα *cis* δραστικά στοιχεία όπως η πολύ(A) ουρά, τα στοιχεία ARES (αλληλουχίες πλούσιες σε AU) και από *trans* δραστικούς παράγοντες όπως τα μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs), πρωτεΐνες που συνδέονται με το RNA (RNA binding proteins, RBPs) και οι ριβονουκλεάσες (Kim and Lee 2009).

Μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει ένας σημαντικός σύνδεσμος μεταξύ καρκινογένεσης και δυσλειτουργικών *trans-acting* παραγόντων στον μεταβολισμό του mRNA. Ορισμένα μέλη ριβονουκλεοπρωτεϊνών, που συνδέονται με ένα σημαντικό αριθμό μεταγράφων, ενοχοποιούνται ως ογκογονίδια ή καταστολείς ογκογονιδίων που μεσολαβούν στην αποικοδόμηση και στην σταθερότητα των μεταγράφων. Οι ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στην καρκινογένεση και έχουν σημαντική επίδραση στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Οι ριβονουκλεάσες μπορούν να δράσουν ως ογκοπρωτεΐνες ή καταστολείς όγκων δίνοντας μία άλλη στροφή στην ρύθμιση της αφθονίας του mRNA και στους ρυθμούς μετάφρασης (Kim and Lee 2009).

Ειδικές ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στο στάδιο αποαδενυλίωσης του mRNA. Συγκεκριμένες εξωριβονουκλεάσες αποκόπτουν τα 3' και 5' άκρα των mRNA μετά την αφαίρεση της καλύπτρας και της πολύ(A) ουράς, ενώ ενδοριβονουκλεάσες κόβουν εσωτερικά το mRNA και παράγουν προϊόντα που αποικοδομούνται από τις εξωριβονουκλεάσες. Απουσία ρυθμιστικών μηχανισμών, οι ενδοριβονουκλεάσες έχουν μία προφανή επίδραση στην γονιδιακή έκφραση, αφού μία και μόνο ενδονουκλεολυτική κοπή οδηγεί στην αδρανοποίηση του mRNA. Τα κύτταρα έχουν μηχανισμούς για την αποτροπή μίας τέτοιας ανώμαλης αποικοδόμησης του mRNA ρυθμίζοντας αυτές τις ενδοριβονουκλεάσες. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι ορισμένες από αυτές ελέγχονται από κυτταρικά σήματα. Έτσι τα κύτταρα ανταποκρίνονται ικανοποιητικά σε αλλαγές του περιβάλλοντός τους ρυθμίζοντας την γονιδιακή έκφραση σε επίπεδο mRNA (Kim and Lee 2009; Peng and Schoenberg 2007).

Τα μειωμένα επίπεδα ογκογόνων mRNAs μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρκίνου. Παρόμοιες επιδράσεις έχουν η αυξημένη δραστικότητα των σταθεροποιητικών πρωτεϊνών που συνδέονται με το mRNA ή η μειωμένη δραστικότητα των αποσταθεροποιητικών (destabilizer RBP). Από την άλλη, αυξημένη αποικοδόμηση των ογκοκατασταλτικών mRNAs μπορεί επίσης να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου σε περίπτωση που έχουμε αυξημένη δραστικότητα ριβονουκλεασών ή των miRNAs που αναστέλλουν την μετάφρασή τους (Kim and Lee 2009).

Καρκίνος του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα προκαλείται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό μη φυσιολογικών κυττάρων στον έναν ή και στους δύο πνεύμονες. Αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες και την τρίτη στις γυναίκες (μετά τον καρκίνο του μαστού και τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας).

Το 2010, στους άνδρες, οι πιο συχνές μορφές καρκίνου είναι εκείνες του πνεύμονα, του προστάτη, των βρόγχων και παχέους εντέρου, που μαζί αντιπροσωπεύουν το 52% όλων των νέων κρουσμάτων σε παγκόσμιο επίπεδο και η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο, αντιπροσωπεύοντας 23-26% του συνόλου των θανάτων από καρκίνο. Ο καρκίνος του πνεύμονα, όπως οι περισσότεροι συμπαγείς όγκοι, αναγνωρίζεται αργά σε σχέση με τη

φυσική εξέλιξή του. Η μεγαλύτερη συχνότητα του καρκίνου του πνεύμονα παρατηρείται μεταξύ των ηλικιών 55 και 65 ετών. Επιπλέον, παραμένει η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο στις Ηνωμένες Πολιτείες, καθώς ευθύνεται για το θάνατο 163.000 ασθενών το χρόνο. Στην Ελλάδα ο καρκίνος του πνεύμονα είναι υπεύθυνος για το 30% των θανάτων από κακοήγη νεοπλάσματα στους άνδρες, αλλά μόνο για το 10% στις γυναίκες (Boyero et al. 2013; Hamilton W 2004).

Η μέση τιμή 5-ετούς επιβίωσης είναι μόλις 67% για ασθενείς με στάδιο TNM IA και 57% για στάδιο IB με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. Η 5-ετής θνησιμότητα από τη στιγμή που θα διαγνωστεί ο καρκίνος του πνεύμονα παραμένει στο 85-90%. Η θνησιμότητα σχετίζεται με το στάδιο νόσου κατά τη διάγνωση. Υπολογίζεται, με βάση τα μέχρι τώρα δεδομένα και την αύξηση του πληθυσμού παγκοσμίως, ότι το 2050 ο ρυθμός ανάπτυξης του καρκίνου θα έχει διπλασιαστεί. Μολαταύτα η έγκαιρη διάγνωση φαίνεται ότι βελτιώνει την πρόγνωση του καρκίνου του πνεύμονα (Beckles et al. 2003; Boyero et al. 2013).

Ιστολογικοί τύποι

Οι όγκοι του πνεύμονα σε γενικές γραμμές κατηγοριοποιούνται σε μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC), που είναι υπεύθυνος για σχεδόν τα 2/3 των ασθενών με χαμηλό ποσοστό επιβίωσης και στον μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (Small Cell Lung Cancer, SCLC). Και οι δύο τύποι ανταποκρίνονται σε διαφορετικές μορφές θεραπείας. Αυτό οδηγεί στην ανάγκη να προσδιορισθούν με ακρίβεια παθολογικές διαφορές μεταξύ αυτών των δύο τύπων. Πρότυπα γονιδιακής έκφρασης από την ανάλυση μικροσυστοιχιών επέτρεψαν στην υπο-κατηγοριοποίηση των τύπων καρκίνου του πνεύμονα που σχετίζεται με το βαθμό διαχωρισμού του όγκου, την φύση της θεραπείας και το ποσοστό επιβίωσης (Ramani and Jacob 2013).

Ο μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα αντιπροσωπεύει το 20-25% όλων των περιπτώσεων του καρκίνου του πνεύμονα και έχει δυσμενή πρόγνωση. Αναπτύσσεται ενδοβρογχικώς, προκαλώντας συνήθως συγκεντρική στένωση του αυλού του βρόγχου και μεθίσταται ταχύτατα στους πυλαίους λεμφαδένες. Αιματογενείς μεταστάσεις αναπτύσσονται ταχύτατα σε σημείο ώστε κατά τη στιγμή της διάγνωσης η νόσος να έχει εξαπλωθεί σε πολλά όργανα. Τα καρκινικά κύτταρα του SCLC είναι μικρά σε μέγεθος ενώ το

σχήμα τους μπορεί να είναι είτε πολυπλευρικό είτε ατρακτοειδές. Ο κύριος παράγοντας που οδηγεί στην εμφάνιση μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα είναι το κάπνισμα.

Ο μη-μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα αντιπροσωπεύει το 75-80% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα και υποδιαιρείται σε τρεις επιμέρους ομάδες με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά η καθεμία.

1. *Πλακώδες καρκίνωμα (ακανθοκυτταρικός, squamous cell carcinoma, SCC):* είναι ο συχνότερος βρογχογενής καρκίνος και αποτελεί το 30% όλων των περιπτώσεων του καρκίνου του πνεύμονα. Ιστολογικώς χαρακτηρίζεται από επιδερμοειδή κύτταρα που παρουσιάζουν ενδοκυτταρικές γέφυρες. Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονται κατά στρώματα και σχηματίζουν «φωλιές» με κερατινοποιημένες εστίες. Ο ακανθοκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα αναπτύσσεται ενδοβρογχικώς και προκαλεί απόφραξη του βρόγχου και ατελεκτασία.

2. *Αδενοκαρκίνωμα (adenocarcinoma):* αποτελεί το 35% των καρκίνων, ενώ η συχνότητά του αυξάνει. Αναπτύσσεται στην περιφέρεια του πνεύμονα και συχνά προσβάλλει τον υπεζωκότα. Ιστολογικώς αποτελείται από κυβικά ή κυλινδρικά κύτταρα, τα οποία σχηματίζουν αδενικούς σχηματισμούς που περιβάλλονται από υπόστρωμα συνδετικού ιστού. Προκαλεί συχνά λεμφογενείς και αιματογενείς μεταστάσεις, πριν ακόμη η αρχική εντόπιση προκαλέσει συμπτώματα.

3. *Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (large cell carcinoma):* αποτελεί το 10% των καρκίνων του πνεύμονα και αναπτύσσεται συχνά στην περιφέρεια του πνεύμονα, όπως το αδενοκαρκίνωμα. Ιστολογικώς μοιάζει με το πλακώδες καρκίνωμα. Το νεόπλασμα αναπτύσσεται γρήγορα και μεθίσταται λεμφογενώς και αιματογενώς.

Σταδιοποίηση

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα συνίσταται στον καθορισμό της ανατομικής εξάπλωσης της νεοπλασίας. Στο σύστημα περιγραφής των σταδίων που έχει επικρατήσει χρησιμοποιούνται τα ψηφία: T για τον αρχικό όγκο (primary tumor), N για τους προσβεβλημένους λεμφαδένες (regional lymph nodes) και M για τις απομακρυσμένες μεταστάσεις (distant metastases), καθώς και αριθμητικοί δείκτες, από 0-3, για τον προσδιορισμό του βαθμού και της έκτασης της προσβολής. Το σύστημα σταδιοποίησης τροποποιήθηκε το 2009, κατατάσσοντας τα διάφορα στάδια του συστήματος TNM σε

υποκατηγορίες, με βάση τις παρατηρήσεις των σημαντικών διαφορών σε ποσοστά επιβίωσης. Η *Union Internationale Contre le Cancer* και η *American Joint Committee on Cancer*, καθιέρωσαν νέα κριτήρια για τη σταδιοποίηση με βάση το σύστημα TNM του καρκίνου του πνεύμονα, με βάση το μέγεθος του όγκου, την ανεύρεση καρκινικών κυττάρων στους λεμφαδένες και τη μετάστασή τους σε άλλα όργανα και η πρόγνωση ορίστηκε εκ νέου για τις διάφορες ομάδες του TNM (Goldstraw et al. 2007):

- **Στάδιο I:** Το μέγεθος των όγκων δε ξεπερνά τα 3cm και δεν διηθούν τους λεμφαδένες ή τους κύριους βρόγχους
- **Στάδιο II:** Οι όγκοι εμφανίζουν μέγεθος μεγαλύτερο από 3cm, περιλαμβάνουν τους κύριους βρόγχους ή διηθούν τον περισπλάχνιο υπεζωκότα.
- **Στάδιο III:** Οι όγκοι δεν έχουν συγκεκριμένο μέγεθος, διηθούν το θωρακικό τοίχωμα, το διάφραγμα, τον μεσοπνευμόνιο υπεζωκότα, το περίτονο περικάρδιο και τους λεμφαδένες.
- **Στάδιο IV:** Οι όγκοι μεθίστανται σε άλλα όργανα.

Αιτιοπαθογένεια καρκίνου του πνεύμονα

Η ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα είναι μία πολυσχιδής διαδικασία πρόκλησης γενετικών κυτταρικών βλαβών από διάφορους αιτιολογικούς παράγοντες, σημαντικότερος από τους οποίους είναι το κάπνισμα. Ο καπνός περιέχει εκατοντάδες από τις γνωστές καρκινογόνες ουσίες, μεταξύ των οποίων οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες που προκαλούν βλάβες στο DNA. Παρατηρείται σχεδόν μια γραμμική σχέση μεταξύ της συχνότητας του καρκίνου του πνεύμονα και των πακέτων-ετών (pack-years, PYS) καπνίσματος. Ο κίνδυνος είναι 60 φορές μεγαλύτερος στους βαρείς καπνιστές (δύο πακέτα ημερησίως για 20 χρόνια). Αν και η παύση του καπνίσματος μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα με την πάροδο του χρόνου, δεν μπορεί ποτέ να επιστρέψει στα αρχικά επίπεδα. Επίσης το παθητικό κάπνισμα αυξάνει τον κίνδυνο του καρκίνου του πνεύμονα περίπου δύο φορές σε σχέση με τους μη καπνιστές. Ωστόσο ένας αριθμός περιπτώσεων της νόσου μπορεί να οφείλεται σε άλλα περιβαλλοντικά αίτια που επιδρούν είτε ανεξάρτητα είτε συνεργικά με το κάπνισμα. Η επίδραση περιβαλλοντικών καρκινογόνων όπως το ραδόνιο, ο αμίαντος ή το αρσενικό είναι περισσότερο εμφανής σε εργασιακούς χώρους, όπου η υπεύθυνη ουσία βρίσκεται σε

σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις. Εκτιμάται ότι η κακοήθης εξαλλαγή ενός φυσιολογικού κυττάρου του πνεύμονα προϋποθέτει μία πολυσταδιακή σειρά γονιδιακών μεταλλάξεων, οι οποίες συντελούν στην ενεργοποίηση ογκογονιδίων και στην απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Οι γενετικές τροποποιήσεις προκαλούν παθολογοανατομικές βλάβες. Αρχικά εμφανίζεται μεταπλασία των βρόγχων η οποία εξελίσσεται σταδιακά σε δυσπλασία, καρκίνωμα *in situ*, διηθητικό καρκίνωμα και μεταστατικό καρκίνο. Στην εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα συμβάλλουν διαταραχές στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) (Park and Altorki 2002).

Μοριακή βιολογία καρκίνου του πνεύμονα

Η μοριακή-γενετική ταξινόμηση του καρκίνου, που γίνεται μέσω της ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης, χρησιμοποιείται συχνά σε συνδυασμό με τα κλινικά χαρακτηριστικά για την πραγματοποίηση δύσκολων διαγνώσεων. Το μοριακό προφίλ των όγκων και ο προσδιορισμός των νέων υπογραφών της γονιδιακής έκφρασης, μέσω μικροσυστοιχιών, συμβάλλουν στην αποσαφήνιση μοριακών γεγονότων που συνδέονται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου του πνεύμονα (Bovero et al. 2013).

Τα βρογχογενή καρκινώματα, όπως και τα καρκινώματα σε πολλές άλλες ανατομικές περιοχές, προκύπτουν από μια σταδιακή συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών που έχουν ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του καλοήθους βρογχικού επιθηλίου σε νεοπλασματικό. Η ακολουθία ανάπτυξης των μοριακών μεταβολών δεν είναι τυχαία, αλλά ακολουθεί μια προβλέψιμη ακολουθία παράλληλη με την ιστολογική εξέλιξη προς τον καρκίνο. Για παράδειγμα, η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 3p εμφανίζεται πολύ νωρίς, ενώ οι μεταλλάξεις στο TP53 ή η ενεργοποίηση του ογκογονιδίου K-RAS συμβαίνουν σχετικά αργά (**Πίνακας 1.4**). Σημαντικότερο είναι το γεγονός ότι ορισμένες γενετικές μεταβολές, όπως η απώλεια υλικού του χρωμοσώματος 3p, μπορούν να ανευρεθούν ακόμη και στο καλοήθες βρογχικό επιθήλιο ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, καθώς και στο αναπνευστικό επιθήλιο καπνιστών χωρίς καρκίνο του πνεύμονα. Σε αυτό το πρόσφορο έδαφος, τα κύτταρα που συσσωρεύουν πρόσθετες μεταλλάξεις αναπτύσσουν τελικά καρκίνο (Kumar et al. 2003).

Εκτός από το κάπνισμα και την γενετική προδιάθεση, έχουν προταθεί και άλλοι παράγοντες, όπως γενετικές, ορμονικές, και ιογενείς λοιμώξεις (π.χ των ανθρωπίνων

θηλωμάτων), μεταλλάξεις, μεθυλίωση υποκινητή και γενικά μεταγραφικών αλλαγών. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να παραμείνουν μακροπρόθεσμα και τελικά να οδηγήσουν σε παρεκκλίνουσα ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού και της κυτταρικής λειτουργίας (π.χ. πολλαπλασιασμό και απορρυθμισμένη απόπτωση) (Burstein and Schwartz 2008).

Επιγραμματικά τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από:

- ⤴ αυτο-επάρκεια σε αυξητικά σήματα, λόγω μεταλλάξεων σε πρωτοογκογονίδια,
- ⤴ απώλεια ευαισθησίας σε αντι-αυξητικά σήματα, λόγω μεταλλάξεων σε ογκοκατασταλτικά γονίδια,
- ⤴ αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), λόγω της υπερέκφρασης αντιαποπτωτικών μορίων ή της χαμηλής έκφρασης προαποπτωτικών μορίων,
- ⤴ απεριόριστη δυνατότητα αντιγραφής του DNA, εξαιτίας της δράσης της τελομεράσης,
- ⤴ διατήρηση της αγγειογένεσης,
- ⤴ προσβολή του ιστού και μετάσταση.

Πίνακας 1.3 Συχνές χρωμοσωμικές ατυπίες σε καρκίνο πνεύμονα ανάμεσα στους δύο τύπους καρκίνου SCLC και NSCLC.

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

(Burstein and Schwartz 2008)

Πίνακας 1.4 Σύγκριση κυτταρογενετικών αλλαγών στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (SCLC) και στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC).

Μοριακές αλλαγές	SCLC	NSCLC
Αδρανοποίηση του FHIT	~75%	~50 - 75%
Ανωμαλίες βασικών ογκογονιδίων		
Μεταλλάξεις K-RAS	< 1	~20
Υπερέκφραση οικογένειας MYC	15-30%	5-10%
Υπερέκφραση του BCL-2	75-95%	10-35%
Υπερέκφραση ERB1/EGFR	~ 60%	-
Υπερέκφραση ERB2/HER/NEU	~ 20%	-
Δραστικότητα τελομεράσης	~ 100%	~ 80-85%
Ανωμαλίες ογκοκατασταλτικών γονιδίων		
Ελλείψεις 3p	> 90%	> 80%
Απενεργοποίηση RB (έλλειψη/μετάλλαξη)	~90%	~15-30%
Απενεργοποίηση p16/CDKN2A (έλλειψη/ μετάλλαξη/ υπερμεθυλίωση)	0-10 %	~70%
Απενεργοποίηση TP53 (έλλειψη/μετάλλαξη)	80-90%	~50%

(Kumar et al. 2003)

Οι παραπάνω βιοχημικές/μοριακές αλλαγές μπορούν να συμβούν είτε σε επίπεδο αυξημένης είτε μειωμένης έκφρασης γονιδίου, ενώ είναι δυνατό να συμβάλλουν σε αυτές η πρόκληση σημειακών μεταλλάξεων, η απώλεια ετεροζυγωτίας, χρωμοσωμικές ατυπίες που συνοδεύονται από απώλεια ή περίσσεια αλλήλων, η μικροδορυφορική αστάθεια καθώς και η διαφοροποιημένη μεθυλίωση του DNA (Bowman et al. 2006). Στους πίνακες 1.3 και 1.4 παρουσιάζονται συχνές κυτταρογενετικές και μοριακές αλλαγές στον καρκίνο του πνεύμονα.

Καρκινικοί δείκτες

Καρκινικός δείκτης (tumor marker) θεωρείται κάθε βιολογική ουσία που παράγεται και εκκρίνεται από κακοήγη κύτταρα στο αίμα ή σε άλλα βιολογικά υγρά ασθενών με καρκίνο. Ένας καρκινικός δείκτης μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά ή να εκτιμηθεί ποιοτικά και η μέτρησή του ή η παρουσία του, μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη, τη φύση, το μέγεθος, την υποτροπή και τη μεταστατική εξάπλωση μιας κακοήθους διεργασίας στον οργανισμό. Έχουν προταθεί και μετρώνται ως καρκινικοί δείκτες, διάφορες ουσίες όπως ορμόνες, αντιγόνα, ένζυμα, πρωτεΐνες κλπ, οι οποίες εκπληρώνουν σε πολύ μεγάλο βαθμό τις παραπάνω προϋποθέσεις.

Η ανάπτυξη καινοτόμων διαγνωστικών τεχνικών στην ταυτοποίηση καρκίνου του πνεύμονα είναι αναγκαία, καθώς διευκολύνει την ανίχνευση της νόσου σε αρχικά στάδια συμβάλλοντας έτσι στην αποτελεσματικότερη θεραπεία του και κατ' επέκταση σε καλύτερη πρόγνωση. Μερικοί από τους προγνωστικούς δείκτες που έχουν ερευνηθεί έως σήμερα στον καρκίνο του πνεύμονα είναι (α) το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (carcinoembryogenic antigen, CEA), όπου πρόκειται για μία γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, ενώ μετά τη γέννηση παράγεται κυρίως σε καρκινώματα και κυκλοφορεί στο αίμα, (β) η ειδική νευρωνική ενολάση (neuron specific enolase, NSE), που πρόκειται για διαλυτό γλυκολυτικό μεταλλοένζυμο που παρέχει απαραίτητα συστατικά για την αερόβια γλυκόλυση, (γ) το αντιγόνο καρκινώματος πλακωδών κυττάρων (squamous cell carcinoma antigen, SCC - Ag), που αποτελεί ένα από τα 14 κλάσματα του καρκινικού αντιγόνου TA-4 και (δ) η κυττοκερατίνη 19 (cytokeratin 19 fragment, CYFRA 21- 1), που είναι μία πρωτεΐνη κυτταροσκελετού των επιθηλιακών κυττάρων (Diez et al. 1995; Ebert and Muley 1999; Jin et al. 2001; Sanchez De Cos et al. 1994).

Άλλοι καρκινικοί δείκτες που αναζητούνται στον καρκίνο του πνεύμονα είναι το ιστικό πουλπεπτιδικό αντιγόνο (TPA), το ειδικό ιστικό πολυπεπτιδικό αντιγόνο (TPS), το καρκινικό αντιγόνο 15-3 (CA 15-3), ενώ νεότεροι δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι οι υποδοχείς στεροειδικών ορμονών, καθώς και μοριακοί και γενετικοί δείκτες όπως ογκογονίδια και ογκοπρωτεΐνες, ογκοκατασταλτικά γονίδια και πρωτεΐνες, αυξητικοί παράγοντες του όγκου, παραγωγή χιμαιρικών πρωτεϊνών, απώλεια ετεροζυγωτίας και μικροδορυφορικό DNA,

προσδιορισμός τελομεράσης.

Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν τη σημασία του μεταβολισμού των mRNAs στον καρκίνο του πνεύμονα, αλλά και παραγόντων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί δείκτες. Σε αυτές τις μελέτες παρατηρήθηκε ότι (α) η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα αποκάλυψε τη μεταβολή της έκφρασης ενός σημαντικού αριθμού γονιδίων (Leclerc et al. 2011), (β) η αποικοδόμηση των RNAs σχετίζεται με την επιβίωση σε περιπτώσεις ασθενών με αδενοκαρκίνωμα (Valk et al. 2010) και (γ) η έκφραση ορισμένων γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό του RNA σχετίζεται με την πρόγνωση ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Valles et al. 2012).

Σκοπός της Διατριβής

Οι διαταραχές στη γονιδιακή έκφραση είναι από τα κύρια χαρακτηριστικά του καρκίνου, ενώ οι παράγοντες που διαδραματίζουν κύριο ρόλο σε αυτή δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς. Οι αποαδενυλάσες είναι ένζυμα που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του mRNA και κατ' επέκταση αποτελούν ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης. Μέχρι πρόσφατα η συσχέτιση των αποαδενυλασών με καρκινικούς όγκους, περιοριζόνταν σε δύο εξ' αυτών, τις αποαδενυλάσες PARN και CCR4b (CNOT6-LIKE) και μόνο για συγκεκριμένα γονίδια. Όσον αφορά τον καρκίνο του πνεύμονα, ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης αποκάλυψε ότι η έκφραση ενός σημαντικού αριθμού γονιδίων μεταβάλλεται, υπονοώντας τη συμμετοχή παραγόντων ελέγχου που θα μπορούσαν να είναι και οι αποαδενυλάσες. Σκοπός της παρούσας Διατριβής είναι μέσω των νοσημάτων του πνεύμονα και ειδικότερα του καρκίνου, να μελετήσουμε τη βιολογική σημασία των αποαδενυλασών στον άνθρωπο. Θα εξετάσουμε με ποιό τρόπο τα ένζυμα αυτά ρυθμίζουν την έκφραση παραγόντων που έχουν δειχθεί να εμπλέκονται σε νοσήματα του πνεύμονα. Εστιάζουμε στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα και συγκρίνουμε τα αποτελέσματα των συμπαγών όγκων (solid tumors) με νεοπλασίες του αίματος (οξείες λευχαιμίες) που αποτελούνται από διαλυτούς όγκους (non-solid tumors).

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά

Αντιδραστήρια

Antibiotic-Antimycotic	(Biosera)
Αγαρόζη	(BIO-RAD)
Αιθανόλη	(Merck)
Αμπικιλλίνη	(Sigma)
Bromophenol Blue	(Research Organics)
β-μερκαπτοαιθανόλη	(Riedel-de Haen)
GelRed Nuclein Acid Stain	(Biotium)
Γλυκερόλη	(Panreac)
D(+) Γλυκόζη	(Panreac)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	(Sigma)
MEM	(Biosera)
DNA 1KB marker	(GenScript)
DNA marker 100 bp	(Invitrogen)
Fetal Bovine Serum (FBS)	(Gibco)
Ισοπροπανόλη	(Scharlau)
KH ₂ PO ₄	(Merck)
LB Agar	(Scharlau)
LB Broth	(Scharlau)
MEM	(Biosera)
Na ₂ HPO ₄	(Merck)
NaCl	(Panreac)
NaOH	(Merck)
Οξικό οξύ	(Merck)
Phosphate buffered saline (PBS Tablets)	(Calbiochem)
Protease Inhibitors	(Roche)
Puromycin	(Sigma)
Tris base	(Merck)
Trypan blue solution 0,4%	(Sigma)
Trypsin-EDTA 5% 10x	(Gibco)

Βακτηριακό στέλεχος

Escherichia coli DH5a: F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG
Φ80d/lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-

Στέλεχος *E. coli* που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή και κλωνοποίηση πλασμιδιακού DNA. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για την αναγέννηση των πλασμιδίων που περιέχουν τα ειδικά shRNAs για τη σίγηση (αποσιώπηση) των αποαδενυλασών.

Κυτταρικές σειρές

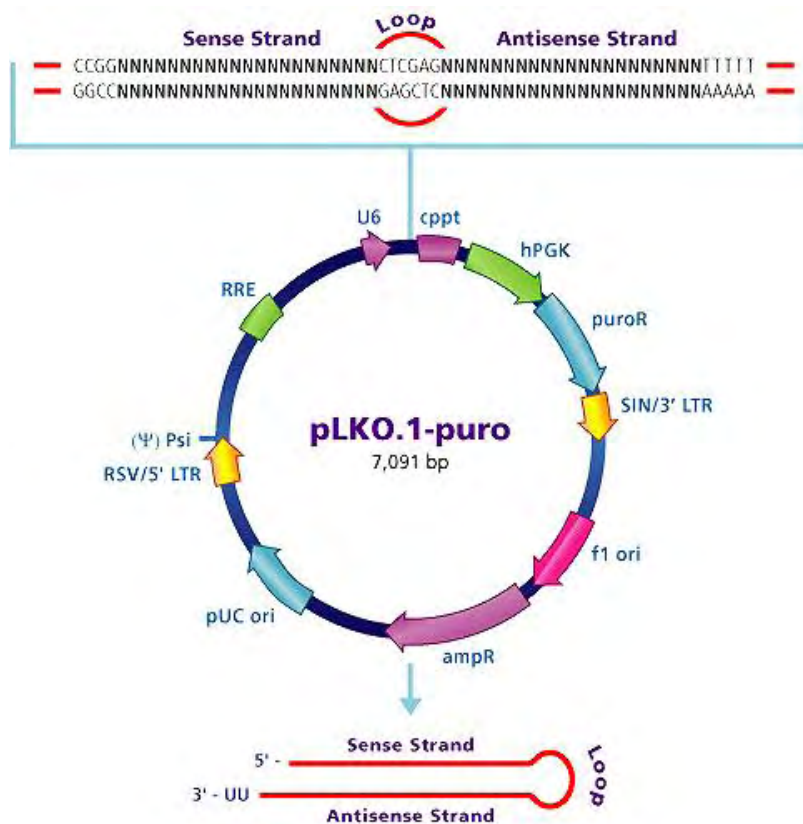
NCI-H520: Ανθρώπινη καρκινική σειρά προερχόμενη από ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα. Καλλιέργεια/συντήρηση κυττάρων σε θρεπτικό μέσο, RPMI 1640, w/L- glutamine, εμπλουτισμένο με 10 % FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic και επώαση στους 37°C, σε 5 % CO₂.

HEp2: Ανθρώπινη, ετεροπλοειδείς, καρκινική κυτταρική σειρά (συγκεκριμένα προέρχεται από επιδερμικό καρκίνωμα του λάρυγγα μετά από επιμόλυνση με κύτταρα HeLa). Σχηματίζουν μονόστιβες επιθηλιακές επιφάνειες στο ταπήτιο ανάπτυξης. Συντήρηση κυττάρων σε θρεπτικό μέσο MEM εμπλουτισμένο με 10 % FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic και επώαση στους 37°C, σε 5 % CO₂.

Πλασμιδιακοί φορείς

Για την αποσιώπηση των αποαδενυλασών χρησιμοποιήθηκαν shRNAs κλωνοποιημένα στο λεντι-ϊϊκό πλασμιδιακό φορέα pLKO.1-puro (**Εικόνα 2.1**). Τα shRNAs και τα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου φορέα παρέχουν ένα ισχυρό μοριακό εργαλείο μακροπρόθεσμης, σταθερής αποσιώπησης του επιθυμητού γονιδίου, μέσω του συστήματος του RNAi, καθώς και τη δυνατότητα αναγέννησης του πλασμιδίου μετά το μετασχηματισμό βακτηρίων με αυτό. Ο pLKO.1-puro περιέχει γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και την πουρομυκίνη για δυνατότητα επιλογής βακτηριακών και ευκαρυωτικών κυττάρων αντιστοίχως, που έλαβαν επιτυχώς το πλασμίδιο. Τα ακόλουθα shDNA πλασμίδια αγοράστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για να αποσιωπηθούν οι αντίστοιχες αποαδενυλάσες (MISSION® shRNA, SIGMA): PARN (NM_002582), CNOT6 (NM_15455), CNOT6L

(NM_012118), CNOT7 (NM_013354), CNOT8 (NM_004779), NOCTURNIN (NM_012118), και non-targeting control (SHC016).



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

Εικόνα 2.1 Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pLKO.1- puro της Sigma. Παρατίθεται και ένας πίνακας με σημαντικές αλληλουχίες-στοιχεία του φορέα. (<http://www.sigmaaldrich.com/>)

Εκκινητές

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των αποαδενυλασών και των υπολοίπων εξεταζόμενων παραγόντων με Real Time PCR, σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος PRIMER 3 εκκινητές (primers) ειδικοί για το mRNA (για την ακρίβεια cDNA) του κάθε υπό μελέτη παράγοντα. Ο κάθε εκκινητής ελέγχθηκε ως προς την εξειδίκευση του για το αντίστοιχο cDNA-στόχο με Blastn (**Πίνακας 2.1**).

Βιολογικά δείγματα συμμετεχόντων

Στην παρούσα Διατριβή συμμετείχαν ασθενείς της Αιματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας που διαγνώστηκαν με οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία (acute lymphoblastic leukemia, ALL) ή οξεία μυελογενή λευχαιμία (acute myeloid leukemia, AML) σύμφωνα με τα διεθνή κριτήρια FAB (Harris et al. 1999) κατά το διάστημα Μάιος 2009 - Απρίλιος 2010, ενώ ως μάρτυρες συμμετείχαν άτομα που δεν σχετίζονται με αιματολογικές ασθένειες. Τα δείγματα ήταν οροί από περιφερικό αίμα ενώ άλλα περιείχαν κύτταρα από μυελό των οστών. Τα χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων παρουσιάζονται στον **Πίνακας 2.2**.

Επίσης, στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν 25 ασθενείς που διαγνώστηκαν με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (non-small cell lung cancer, NSCLC) στην Πνευμονολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας και στο Θεαγένειο Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης κατά τα έτη 2010 – 2012. Ελήφθη παθολογικός και παρακείμενος φυσιολογικός ιστός από κάθε ασθενή, όπου ο φυσιολογικός ιστός ήταν τουλάχιστον 5 cm μακριά από το τέλος του όγκου των αντίστοιχων δειγμάτων. Σε όλες τις περιπτώσεις, πραγματοποιήθηκε ιστολογική αξιολόγηση των τμημάτων του ιστού. Τα δείγματα που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη είχαν >70% περιεκτικότητα σε κακοήγη κύτταρα. Η κλινική σταδιοποίηση των δειγμάτων έγινε με το αναθεωρημένο Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης του καρκίνου του πνεύμονα (Goldstraw et al. 2007). Τα δεδομένα των ασθενών, συμπεριλαμβανομένου του φύλου, της ηλικίας κατά τη διάγνωση, την ιστολογία του όγκου, το κλινικό στάδιο, και το ιστορικό καπνίσματος, επίσης συλλέχθηκαν από τα ιατρικά αρχεία τους και έγινε συσχέτιση με τα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών **Πίνακας 3.1**.

Η Επιτροπή Ηθικών ζητημάτων του νοσοκομείου έλαβε γνώση και ενέκρινε τη μελέτη, ενώ όλοι οι συμμετέχοντες, υγιείς και ασθενείς ενημερώθηκαν για τη μελέτη και κατόπιν συμπλήρωσαν έντυπο συγκατάθεσης.

Πίνακας 2.1 Αλληλουχίες των εκκινητών και τα αναμενόμενα μεγέθη των ενισχυμένων προϊόντων.

Target gene	forward/ reverse	primer sequence	product size (bp)
PARN	fwd	5'-CAGCAGAAACATGCCAAAGA-3'	211
	rvs	5'-CCAAGAGTCTGGGGAAAACA-3'	
CNOT6	fwd	5'-AGCTGTCATGGGAAGAATGG-3'	236
	rvs	5'-GGGCAGCCACTGATGTTATT-3'	
CNOT6L	fwd	5'-CGGCTCTCCAGCTACAAAC-3'	143
	rvs	5'-GGAAGCTGCTCTGGATGAAC-3'	
CNOT7	fwd	5'-GTCCTCTGTGAAGGGGTCAA-3'	411
	rvs	5'-GACTGCTTGTGGCTTCCTC-3'	
NOC	fwd	5'-GCCAAGACACTGAACAGCAG-3'	175
	rvs	5'-GGCAATCTGTCCTCAGATCC-3'	
PTGIR	fwd	5'-CTCCAGCGACTCAAGCTCT-3'	239
	rvs	5'-CTTCTGCTTTGGACGACGTT-3'	
FGFBP2	fwd	5'-CAAGGCCACAGTGAAACTCA-3'	151
	rvs	5'-GGCCTTCTTCTTTGCTTCCT-3'	
AATK	fwd	5'-CCTGGCTCACTGCAAGTACA-3'	179
	rvs	5'-GCTCAAAGAGCTCCCAGATG-3'	
DPPA3	fwd	5'-CACAAATGCTCACCGAAGAA-3'	182
	rvs	5'-TTCGATTTCCCTGAGGACTG-3'	
β-actin	fwd	5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'	234
	rvs	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'	
18S rRNA	fwd	5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3'	253
	rvs	5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'	

Πίνακας 2.2 Χαρακτηριστικά συμμετεχόντων με λευχαιμία και υγιών μαρτύρων.

	ALL	AML	Control
Άτομα	21	19	9
Ηλικία	63.6 ± 9.8	54.6 ± 10.4	51.8 ± 10.2
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	12/9	11/8	4/5

Μέθοδοι

Λήψη ορού και απομόνωση κυττάρων από τα δείγματα ασθενών με λευχαιμία και υγιών μαρτύρων

Λήψη ορού

Το περιφερικό αίμα (4ml) φυγοκεντρείται στις 3500 στροφές/λεπτό (rpm) για δέκα λεπτά και ακολουθεί λήψη του υπερκειμένου (ορός). Το κατώτερο στρώμα αντιστοιχεί στο 45% του συνολικού όγκου αίματος είναι κόκκινου χρώματος και αποτελείται από ερυθροκύτταρα. Πάνω από αυτό βρίσκεται ένα πιο λεπτό στρώμα χρώματος λευκού-φαιού που αντιστοιχεί στο 1% του ολικού όγκου. Πρόκειται για τα λευκοκύτταρα, που με τη σειρά τους διακρίνονται στον άνθρωπο σε πέντε τύπους: λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα. Το ανώτερο στρώμα της στήλης (υπερκείμενο) αποτελείται από το πλάσμα, το υγρό μέρος του αίματος, πρωτεϊνικής σύστασης, με pH ελαφρά αλκαλικό κιτρινωπού χρώματος.

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

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται απομόνωση λεμφοκυττάρων πολύ εύκολα από το περιφερικό αίμα και το μυελό των οστών με την εφαρμογή φυγοκεντρήσεως πυκνότητας σε κλίση φικόλης (Ficoll) και μετριζιμίδης (Hypaque).

1. Αραιώνουμε το αίμα σε ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων (π.χ. Hanks. balanced salt solution, HBSS) ή σε θρεπτικό μέσο1:1.

2. Προσθέτουμε 5 ml Ficoll-Isopaque σε κωνικό σωλήνα φυγοκέντρου (ειδικό βάρος φικόλης= 1.078).
3. Προσεκτικά επιστοιβάζουμε το αραιωμένο αίμα (περίπου 10 ml) επάνω στο στρώμα της Ficoll-Isopaque.
4. Φυγοκέντρηση (1700 rpm, 25 min, 20 °C).
5. Παρατηρούμε το διαχωρισμό των κυττάρων σε ζώνες. Με πιπέτα Pasteur απομακρύνουμε το επάνω στρώμα χωρίς να πειράζουμε το στρώμα των λεμφοκυττάρων. Το πάνω στρώμα περιέχει τα αιμοπετάλια και το πλάσμα.
6. Με άλλη πιπέτα Pasteur μεταφέρουμε το στρώμα των λεμφοκυττάρων σε σωλήνα φυγοκέντρου (Το στρώμα της φικόλης περιέχει τα κοκκιοκύτταρα και στον πυθμένα βρίσκονται τα ερυθρά και νεκρά κύτταρα).
7. Προσθέτουμε στο στρώμα των λεμφοκυττάρων 15 ml HBSS και ανακατεύουμε με πιπέτα.
8. Φυγοκέντρηση (1400 rpm, 10 min, 20 °C).
9. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο με πιπέτα.
10. Προσθέτουμε πάλι 10 ml HBSS και ανακατεύουμε προσεκτικά.
11. Φυγοκέντρηση (1400 rpm, 10 min, 20 °C).
12. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αιωρούμε τα λεμφοκύτταρα σε 1 ml θρεπτικό μέσο.
13. Παρατήρηση και μέτρηση κυττάρων στο μικροσκόπιο.
14. Αποθήκευση των κυττάρων σε 1 ml υλικό κατάψυξης στους -80 °C.

Μέτρηση κυττάρων

1. Για την παρατήρηση και μέτρηση των μονοπύρηνων κυττάρων που συλλέξαμε στο θρεπτικό μέσο, αραιώνουμε τα κύτταρα ως εξής:
 - A. 20 ml αιώρημα κυττάρων και 380 ml διάλυμα Tuerk (παρατήρηση κυττάρων)

B. 200μl αιώρημα κυττάρων, 300 μl HBSS και 500μl διάλυμα Trypanblue (αραίωση 1:5) (το Trypanblue χρωματίζει μπλε τα νεκρά κύτταρα)

2. Αναδεύουμε προσεκτικά και περιμένουμε 5-10 min.

3. Τοποθετούμε 1 σταγόνα στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, στην ειδική εσοχή κάτω από την καλυπτρίδα.

4. Μετράμε τα κύτταρα.

Λύση των κυττάρων των δειγμάτων με κύτταρα από μυελό των οστών

Φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 5 λεπτά. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 20μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης κυττάρων (lysis buffer), παρουσία αναστολέων πρωτεασών. Ψύξη των δειγμάτων σε υγρό άζωτο, μεταφορά στους 60°C για 3 λεπτά και ανάδευση (vortex). Επανάληψη του παραπάνω κύκλου 3 φορές. Φυγοκέντρηση σε 10.000 rpm για 1 λεπτό και λήψη του υπερκείμενου.

TCA precipitation protocol (κατακρήμνιση πρωτεΐνης)

Με τη μέθοδο αυτή απομονώνονται από το δείγμα όλες τις πρωτεΐνες που αυτό περιέχει και γίνεται η διαλυτοποίησή τους στο ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli (Laemmli Buffer) και επομένως είναι έτοιμες να διαχωριστούν σε SDS-PAGE gel και να ακολουθήσει η western blot για τον εντοπισμό και την οπτικοποίηση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει.

Αντιδραστήρια

- TCA 100% (ή 72%)
- TCA 2,5%
- DOC 0,15%
- Ακετόνη
- Laemmli Buffer
- Αμμωνία (ατμοί)

Τα βήματα της μεθόδου είναι (τα δείγματα σε πάγο):

1) Εάν ο όγκος των δειγμάτων μας των οποίων την πρωτεΐνη θέλουμε να καταβυθίσουμε είναι < 100μl συμπληρώνουμε μέχρι τελικού όγκου 100μl.

- 2) Προσθήκη DOC 0,15%: 10% του όγκου του δείγματος, επώαση για 10 min.
- 3) Προσθήκη TCA 100%: 10% του όγκου του δείγματος, επώαση για 10 min.
- 4) Τοποθέτηση των δειγμάτων για 30 min στους -20°C .
- 5) Φυγοκέντρηση 12.000 rpm για 15min στους 4°C .
- 6) Αφαίρεση του υπερκείμενου.
- 7) Έκπλυση του ιζήματος με 200μl TCA 2,5% (να μην διαλυθεί το ίζημα).
- 8) Προσθήκη ακετόνης (200μl) με ανάδευση.
- 9) Φυγοκέντρηση full speed/15min/ 4°C .
- 10) Έκπλυση του ιζήματος με 200μl ακετόνης (να μην διαλυθεί το ίζημα).
- 11) Προσθήκη σε κάθε δείγμα 20μl Laemmli Buffer 1X.
- 12) Στην περίπτωση που το χρώμα του Laemmli Buffer μεταβληθεί σε κίτρινο προσθέτουμε ατμούς αμμωνίας.
- 13) Βράσιμο των δειγμάτων στους $95^{\circ}\text{C}/5$ min, αποθήκευση σε -20°C .

Ανίχνευση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση (Western blot)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες (10% SDS-PAGE) στα 160V. Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται σε μεμβράνη PVDF με τη συσκευή Semidry Transfer System σε συνθήκες 270mA, 40 min. Βαφή της μεμβράνης με Ponceau red επιβεβαιώνει τη μεταφορά.

Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με Blocking Buffer για 1 ώρα, υπό ήπια ανάδευση. Προστίθεται το πρώτο αντίσωμα σε κατάλληλη αραίωση 1:1000 και επώαζεται όλο το βράδυ στους 4°C . Ακολουθούν 4 πλύσεις με washing Buffer για 15 λεπτά η καθεμία. Η αραίωση του δεύτερου αντισώματος goat anti-rabbit IgG-HRP αντιστοιχεί σε 1:10.000 και η επώασή του γίνεται για 1 ώρα υπό ήπια ανάδευση. Ακολουθούν 4 πλύσεις με PBS-T για 15 λεπτά η καθεμία. Η εμφάνιση (ECL ή ECL Plus) γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Amersham. Για επανάληψη της ανοσοανίχνευσης με το ίδιο αντίσωμα ή για επώαση με διαφορετικό (reprobing), ακολουθείται η διαδικασία της αποσύνδεσης (stripping) των αντισωμάτων σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Amersham.

Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση του RNA έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRI (SIGMA) βάσει του πρωτοκόλλου:

TRI Reagent (SIGMA) Protocol

1. Φυγοκέντρηση κυττάρων 3000g, 3 min, 4°C.

Διατηρούμε το ίζημα και απορρίπτουμε το υπερκείμενο.

2. Προσθέτουμε **1V** TRI Reagent στο ίζημα (0,2 -1,0 mL).

Λύση κυττάρων με επαναλαμβανόμενο πιπετάρισμα έως 5 min.

3. Προσθέτουμε **0,1V** 1-bromo-3-chloropropane.

Ανακατεύουμε έντονα για 15 sec. Αφήνουμε για 15 min.

Φυγοκέντρηση 12000g για 15 min, 4°C.

4. Μεταφορά υδατικής φάσης σε νέο σωληνάκι

Προσθέτουμε **0,5V** 2-propanol, ανακατεύουμε, RT 10 min.

Φυγοκέντρηση 12000g για 10 min, 4°C.

5. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο.

Πλύση ιζήματος RNA **1-2 V** EtOH75%, vortex.

Φυγοκέντρηση 12000g για 5 min, 4°C.

6. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο προσεκτικά. Στεγνώνουμε το ίζημα RNA.

Επαναδιάλυση σε ddH₂O πιπετάροντας στους 55°C.

Αποθήκευση στους -80°C

Real Time PCR δύο βημάτων (two-step Real Time PCR, qRT-PCR)

Η Real Time PCR αποτελεί μία ιδιαίτερα ακριβή και ευαίσθητη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού, που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της έκφρασης των επιπέδων mRNA ενός γονιδίου, ακόμη και σε περιπτώσεις που αυτή είναι πολύ χαμηλή. Στην παρούσα εργασία εφαρμόζεται η Real Time PCR δύο βημάτων (two-step Real Time PCR), κατά την

οποία πραγματοποιείται αρχικά η σύνθεση του cDNA των μεταγράφων και σε επόμενο βήμα η ενίσχυση του παραγόμενου cDNA.

1^ο Βήμα: Σύνθεση του cDNA κλώνου

Για τη μετατροπή του ολικού RNA σε cDNA προκειμένου να ενισχυθεί στη συνέχεια με απλή RT-PCR χρησιμοποιήθηκε το Prime 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara). Η αντίστροφη μεταγραφή που χρησιμοποιήθηκε απομονώνεται από τον Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) και μπορεί να συνθέσει cDNA μήκους μέχρι και 12000 βάσεων.

1. Ετοιμάζουμε σε ένα μικρό eppendorf τα εξής:

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

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

3. Στη συνέχεια προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια, μέχρι τον τελικό όγκο που είναι 20 μl και ξεκινά η μετατροπή του ολικού RNA σε cDNA στους 42 °C για 60 min.

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

4. Τερματίζουμε την αντίδραση στους 70 °C για 15 min και τοποθετούμε το eppendorf στον πάγο.

2ο Βήμα: Real Time PCR

Κατά την Real Time PCR, πραγματοποιείται η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης και καταγραφής της αύξησης του φθορισμού μιας συγκεκριμένης φθορίζουσας ουσίας. Ευρέως χρησιμοποιούμενη ουσία αποτελεί η SYBR green η οποία διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497nm και εκπέμπει στα 520nm. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της SYBR green είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας – στόχο, ενώ σημαντικό μειονέκτημά της είναι ότι προσδένεται σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύψουν. Ωστόσο ο σωστός σχεδιασμός ειδικών εκκινητών καθώς και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, μπορούν να συμβάλλουν στην αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών. Η ένταση φθορισμού μετράται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μία καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει την παρακολούθηση ολόκληρης της διαδικασίας της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την αντίδραση συστατικά βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Στη συνέχεια επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία ορισμένα από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά και αναστολείς της αντίδρασης, Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητά της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau).

Στη συγκεκριμένη εργασία η μελέτη των επιπέδων έκφρασης πραγματοποιήθηκε με την ποσοτική PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της “KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kit – Master Mix (2X) Universal”. Στις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ως χρωστική αναφοράς η ROX και ως εσωτερικό control για την κανονικοποίηση του σήματος των ειδικών προϊόντων, το ιδιοσυστατικό γονίδιο της β-ακτίνης και του 18S rRNA. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε cDNA, από ολικό RNA απομονωμένο από τα εξεταζόμενα δείγματα. Οι ποσότητες των

επιμέρους αντιδραστηρίων των αντιδράσεων και οι συνθήκες αυτών παρουσιάζονται στους **Πίνακας 2.3** και **Πίνακας 2.4** αντίστοιχα.

Πίνακας 2.3 Συστατικά αντίδρασης RT-PCR.

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

Πίνακας 2.4 Συνθήκες αντίδρασης qPCR για την ενίσχυση των επιλεγμένων παραγόντων.

Βήματα qPCR	Συνθήκες αντίδρασης
Αποδιάταξη (Denaturation, Hot Start)	95°C, 3min (1 κύκλος)
Ενίσχυση (Amplification)	95°C, 3sec 60°C, 30sec 72°C, 11sec } (40 κύκλοι)
Διάσπαση (Dissociation)	95°C, 1min 55°C μέχρι 95°C (1 κύκλος)

Ηλεκτροδιάτρηση δεκτικών κυττάρων DH5a (*E.coli*) με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1

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

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

Τα βακτηριακά κύτταρα DH5a στα οποία εισάγαμε τον πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 ενοφθαλμίζονται σε 5ml LB broth που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη). Ακολουθεί επώαση των καλλιεργειών για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Η ακόλουθη διαδικασία πραγματοποιείται με βάση το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli*, NucleoSpin Plasmid QuickPure. Το παραχθέν

πλασμίδιο θα χρησιμοποιηθεί για την διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με το πρωτόκολλο της Xfect.

Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με X-fect

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

1. Αρχικά μια μέρα πριν τη διαμόλυνση σε κάθε T25 φλάσκα τοποθετούμε κύτταρα σε πληρότητα 40-50%.

2. Για κάθε φλάσκα ετοιμάζονται δύο διαλύματα:

Σωληνάκι 1 (πλασμιδιακό DNA)	Σωληνάκι 2 (Πολυμερές)
__μl (10 μg) Πλασμιδιακό DNA	3 μl Xfect Polymer
__μl Xfect Reaction Buffer	197 μl Xfect Reaction Buffer
200 μl Τελικός όγκος	200 μl Τελικός όγκος

3. Ανακινούμε καλά το κάθε σωληνάκι.

4. Για την παρασκευή του διαλύματος διαμόλυνσης (transfection mix) αναμιγνύουμε το σωληνάκι 1 με το σωληνάκι 2 και ανακινούμε για 10 sec.

5. Τα αφήνουμε να επωαστούν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου

6. Παράλληλα απομακρύνουμε από κάθε φλάσκα το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και ξεπλένουμε τα κύτταρα με κρύο και αποστειρωμένο PBS 1X δύο φορές. Πριν την προσθήκη του transfection mix προσθέτουμε 2ml θρεπτικού υλικού χωρίς αντιβιοτικά-αντιμυκητοκικά και χωρίς ορό (FBS) σε κάθε φλάσκα.

7. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης του transfection mix, μοιράζουμε 400 μl στα κύτταρα που προορίζονται για διαμόλυνση και αφήνουμε τη φλάσκα να επωαστεί στους 37°C.

8. Μετά από 12h απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από τα διαμολυσμένα κύτταρα και το αντικαθιστούμε με RPMI 1640 10% FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic το οποίο περιέχει επιπλέον και το αντιβιοτικό επιλογής (στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πουρομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 1-10μg/ml θρεπτικού υλικού. Πραγματοποιήσαμε τέντ ανθεκτικότητας των NCI-H520 στην πουρομυκίνη και η βέλτιστη συγκέντρωση, στην οποία απεβίωσε το 100% των κυττάρων που δεν φέρουν πλασμίδιο ανθεκτικότητας σε 48h μετά την αρχική έκθεση, είναι 5μg/ml).

9. Μετά από 72h συλλέγουμε τα κύτταρα.

cDNA Μικροσυστοιχίες (Microarrays)

Τα πειράματα των μικροσυστοιχιών έγιναν από τη NIMGenetics, στη Μαδρίτη της Ισπανίας. Επιλεγμένες αποαδενυλάσεις αποσιωπήθηκαν με shRNAs σε κύτταρα NCI-H520 (προέλευσης καρκίνου του πνεύμονα) και HEp2 (απλή καρκινική σειρά). Απομονώθηκε ολικό RNA από δείγματα κυττάρων, με βάση το πρωτόκολλο RNeasy kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) και έγινε ανάλυση της έκφρασης με μικροσυστοιχίες σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος (full-genome analysis). Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

1. Κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 που φέρει αλληλουχίες shRNA έναντι των αποαδενυλασών CNOT6, CNOT6L και CNOT7, CNOT8, NOC και PARN.

2. Κύτταρα φυσικού τύπου (WT).

3. Κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 που δεν φέρει αλληλουχία shRNA (MV).

4. Κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 που φέρει μία αλληλουχία shRNA η οποία δεν στοχεύει κανένα mRNA εντός του κυττάρου (MSH).

Τα δείγματα 2, 3 και 4 χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (control). Τα δείγματα RNA στα οποία έγινε ανάλυση του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης, υβριδίστηκαν σε μικροσυστοιχία ολιγονουκλεοτιδίων-Whole Human Genome Agilent 4X44K oligonucleotide Microarray (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA). Η απομόνωση, ο καθαρισμός, η ενίσχυση, η σήμανση και ο υβριδισμός στην πλατφόρμα (Agilent 44K Human Whole Genome microarrays) των δειγμάτων RNA, καθώς και η σάρωση των αρχείων εικόνας,

πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η κανονικοποίηση των δεδομένων έγινε μέσω του προγράμματος Feature Extraction (v. 10.7.3.1). Τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών κατατέθηκαν στην βάση δεδομένων Gene Expression Omnibus (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo, accession numbers GSE67536 και GSE67598).

Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού (functional enrichment analysis)

Για να ταυτοποιήσουμε τις διεργασίες όπου εμπλέκονται τα αυξορρευτισμένα μετάγραφα, πραγματοποιήσαμε μια ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού (functional enrichment analysis) των συγκεκριμένων μεταγράφων. Αρχικά έγινε ανάλυση της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης (fold-change analysis), προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα γονίδια τα οποία εκφράζονται διαφορετικά στις δύο ομάδες σύγκρισης (κάθε δείγμα συγκρίθηκε με τα mock κύτταρα (MS), έτσι ώστε να αποκλείονται οι μεταβολές που οφείλονται στην επαγωγή του μηχανισμού RNAi). Μόνο τα γονίδια που παρουσιάζουν τιμές > 2-fold change, θεωρούνται ότι μεταβάλλονται σημαντικά. Τα μετάγραφα των οποίων η έκφραση αυξάνεται έπειτα από αποσιώπηση των αποαδενυλασών, χρησιμοποιήθηκαν για να προβλεφθούν τυχόν μονοπάτια ή ομάδες γονιδίων (gene ontologies, GO) που επηρεάζονται. Η ανάλυση GO πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα GeneMANIA [www.genemania.org (Warde-Farley et al. 2010)] για τα μετάγραφα που επηρεάζονται από τις αποαδενυλάσες PARN και NOC τον Απρίλιο του 2015 και το Consensus Pathway DB-human [<http://consensuspathdb.org/>] (Kamburov et al. 2009; Kamburov et al. 2013)] για τα μετάγραφα που επηρεάζονται από τις αποαδενυλάσες CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 τον Οκτώβριο του ίδιου έτους. Για την απεικόνιση με διαγράμματα Venn χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Excel (MS Office), Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>) και Venn Diagrams (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Υπολογιστική μεταγραφομική ανάλυση (Computational transcriptomic analysis)

Το μεταγράφομα (transcriptome) είναι το σύνολο όλων των μορίων αγγελιαφόρου RNA (mRNA) σε ένα κύτταρο ή έναν πληθυσμό κυττάρων. Σε αντίθεση με το γονιδίωμα (genome), το οποίο είναι κατά προσέγγιση σταθερό για μια δεδομένη κυτταρική σειρά, το σύνολο των μεταγράφων του κυττάρου (μεταγράφομα) μπορεί να ποικίλει με τις

εξωτερικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Επίσης, το μεταγράφομα αντανακλά τα γονίδια που εκφράζονται ενεργά σε κάθε δεδομένη στιγμή. Η μελέτη της μεταγραφομικής (transcriptomics) εξετάζει το επίπεδο έκφρασης των mRNAs σε ένα δεδομένο κυτταρικό πληθυσμό, συχνά χρησιμοποιώντας τεχνικές υψηλής απόδοσης με βάση την τεχνολογία μικροσυστοιχιών DNA (microarrays). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης από μια μελέτη καρκίνου του πνεύμονα που ήταν κατατεθειμένη στη βάση δεδομένων Gene Expression Omnibus [www.ncbi.nlm.nih.gov/geo, accession number GSE19188 (Hou et al. 2010)], όπου η στατιστική ανάλυση έγινε με τη διαδικτυακή πλατφόρμα Oncomine (www.oncomine.org), με σκοπό να ερευνησουμε τα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών. Η επιλογή της συγκεκριμένης μελέτης έγινε καθώς ήταν η μοναδική που περιλάμβανε δείγματα από 27 ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (SCC) και 65 υγιή άτομα. Αναλύσαμε τα δεδομένα για τις PARN, NOC, PAN2, CNOT6, CNOT6L, CNOT7, CNOT8, ANGEL1 and ANGEL2 με σκοπό να διαπιστώσουμε αν η έκφρασή τους διαφοροποιείται στον SCC σε σχέση με τα μη-παθολογικά δείγματα. Η έκφραση των αποαδενυλασών λαμβάνεται πως είναι διαφορετική όταν η αλλαγή της έκφρασης στα δείγματα από τον SCC είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα GraphPad Prism 4.0 for Mac (GraphPad Software, San Diego, USA). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε τον Ιούλιο του 2013.

Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά

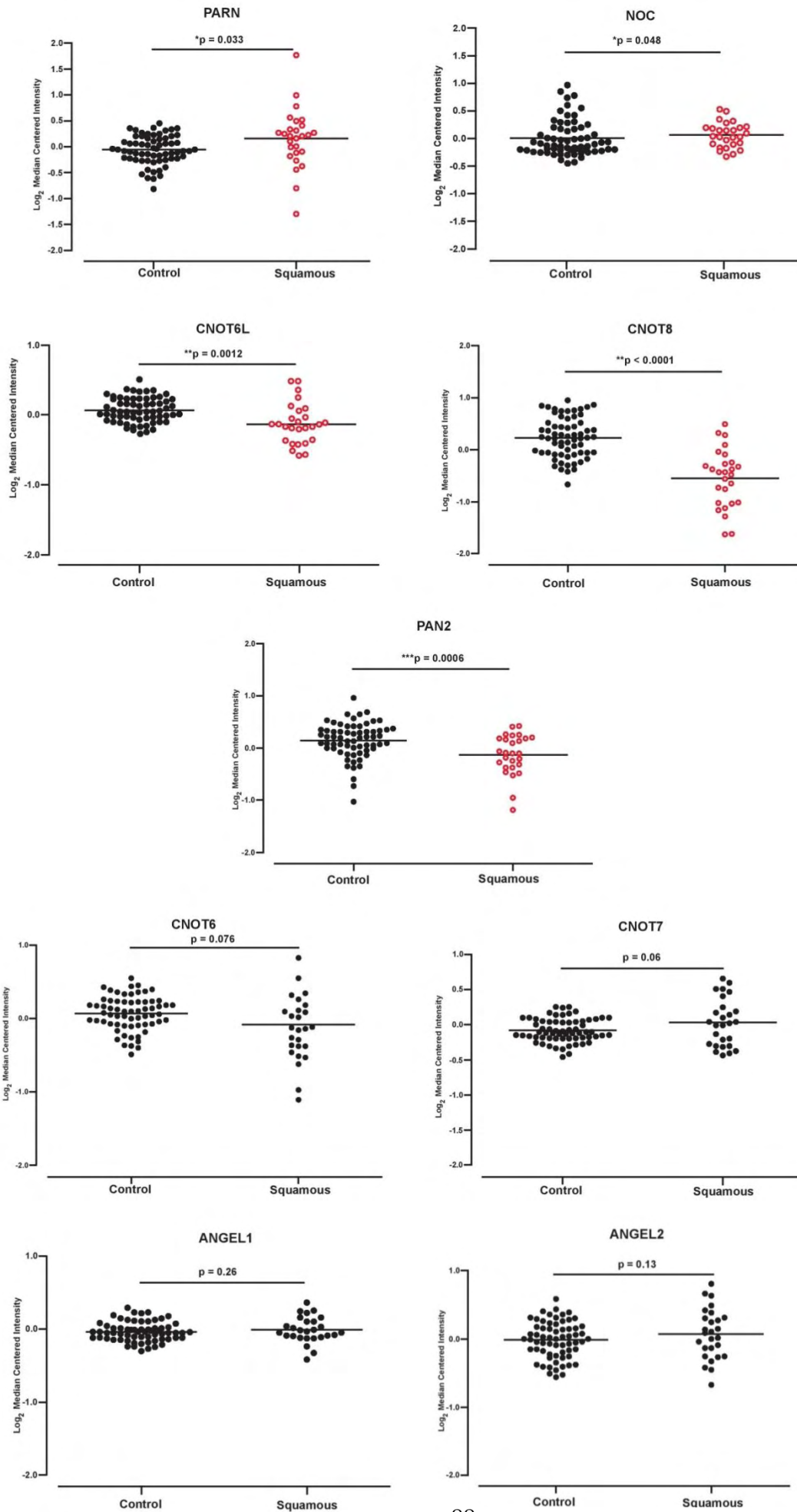
Για την συσχέτιση της έκφρασης των αποαδενυλασών με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και την πρόγνωση των ασθενών (καμπύλες επιβίωσης) χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPad Prism 4.0 for Mac (GraphPad Software, San Diego, USA). Τα δείγματα μοιράστηκαν σε δυο ομάδες, όπου η έκφραση της κάθε αποαδενυλάσης είναι αυξημένη ή μειωμένη στα παθολογικά δείγματα σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά και ακολούθησε η επιθυμητή στατιστική ανάλυση. Τα δείγματα που δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική μεταβολή δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογιστική μεταγραφομική ανάλυση (Computational transcriptomic analysis) της έκφρασης των αποαδενυλασών στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα

Σκοπός της Διατριβής είναι η μελέτη των αποαδενυλασών σε ασθένειες του πνεύμονα. Από τις διάφορες ασθένειες επιλέξαμε τον καρκίνο του πνεύμονα, καθώς σε διάφορους καρκίνους παρατηρούνται αρκετοί παράγοντες με αλλαγή των επιπέδων έκφρασής τους. Εστίασαμε στο πλακώδες καρκίνωμα (squamous cell lung cancer, SCC), καθώς μαζί με το αδενοκαρκίνωμα αποτελούν το 80% των περιπτώσεων του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου, που με τη σειρά του αποτελεί το 80% των περιπτώσεων του καρκίνου του πνεύμονα παγκοσμίως (Perez-Moreno et al. 2012; Petersen 2011). Αρχικά, επιχειρήσαμε να εκτιμήσουμε με υπολογιστική μεταγραφομική ανάλυση το προφίλ έκφρασης όλων των γνωστών αποαδενυλασών στο SCC συγκρινόμενο με μη-παθολογικά δείγματα. Επομένως, χρησιμοποιήσαμε δεδομένα μικροσυστοιχιών που ανακτήθηκαν από μια μελέτη στη βάση δεδομένων Oncomine Research Premium Edition Cancer Microarray database (www.oncomine.org) και υπολογίσαμε τη μεταβολή (fold-change, FC) της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ παθολογικών και μη δειγμάτων (Hou et al. 2010). Παρατηρήσαμε πως η έκφραση της PARN ($p = 0,033$) και της Nocturnin (NOC, $p = 0,048$) ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένες σε σύγκριση με μη-παθολογικά δείγματα. Αντιθέτως, η έκφραση των CNOT6L ($p = 0,0012$), CNOT8 ($p < 0,0001$) και PAN2 ($p = 0,0006$) ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένες στο SCC. Η έκφραση των CNOT6 ($p = 0,076$), CNOT7 ($p = 0,06$), ANGEL1 ($p = 0,26$) και ANGEL2 ($p = 0,13$) δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ των δυο ομάδων (**Εικόνα 3.1**) (Maragozidis et al. 2015).

Εικόνα 3.1 Βιοπληροφορική ανάλυση της έκφρασης των αποαδενυλασών στο πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα (SCC). Τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών ανακτήθηκαν από την βάση δεδομένων Oncomine. Η PARN ($p = 0,033$) και η NOC ($p = 0,048$) υπερεκφράζονται, ενώ η CNOT6L ($p = 0,0012$), η CNOT8 ($p < 0,0001$) και η PAN2 ($p = 0,0006$) υποεκφράζονται. Η έκφραση της CNOT6 ($p = 0,076$), της CNOT7 ($p = 0,06$), της ANGEL1 ($p = 0,26$) και της ANGEL2 ($p = 0,13$) δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική μεταβολή στο SCC. (Maragozidis et al. 2015)

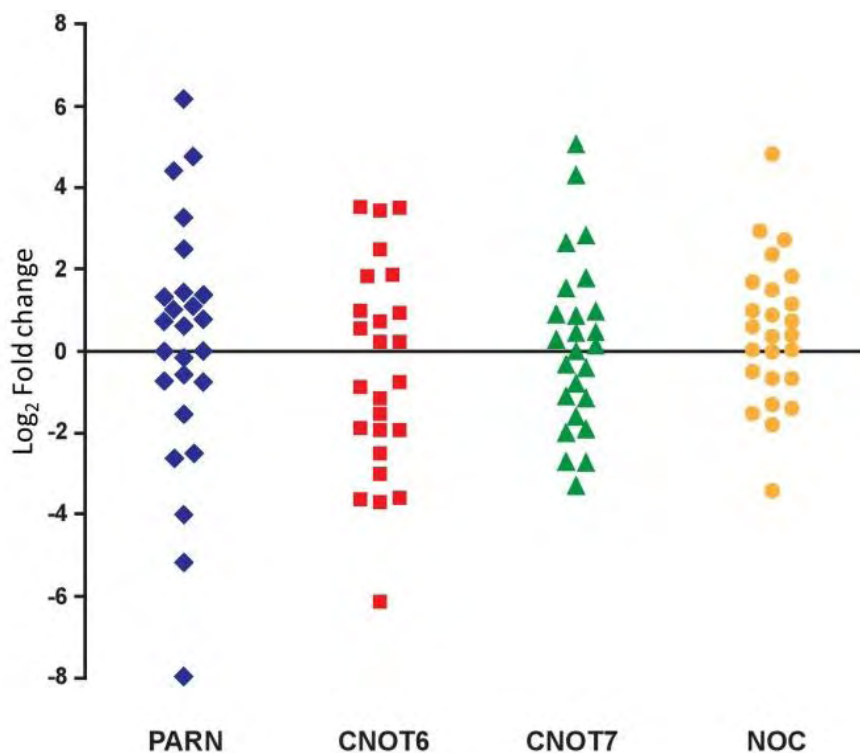


Έκφραση των αποαδενυλασών σε δείγματα ασθενών με SCC

Η υπολογιστική μεταγραφομική ανάλυση μας ώθησε να εξετάσουμε την έκφραση των αποαδενυλασών με μεγαλύτερη ακρίβεια σε δείγματα ασθενών με SCC. Πραγματοποιήσαμε συγκριτική ποσοτικοποίηση (comparative quantification) σε δείγματα 25 ασθενών με SCC με τα αντίστοιχα μη-παθολογικά δείγματα των ίδιων ασθενών και αναλύσαμε τα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών από τις δυο υπεροικογένειες, DEDD και EEP. Από τις υπό εξέταση αποαδενυλάσες, η PARN και η CNOT7 (που ανήκουν στις DEDD νουκλεάσες), και η NOC και η CNOT6 (που ανήκουν στις EEP νουκλεάσες), παρουσίασαν τις πιο σημαντικές μεταβολές. Οι PAN2 και CNOT8 δεν ήταν σε ανιχνεύσιμα επίπεδα και δεν εξετάστηκαν περαιτέρω. Όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 3.2**, τα επίπεδα mRNA της PARN ήταν αυξημένα σε 13 δείγματα SCC (52%, $\log_2 FC > 0$), ενώ σε 10 δείγματα η έκφραση ήταν μειωμένη (40%, $\log_2 FC < 0$). Σε δυο δείγματα η έκφραση της PARN ήταν ίδια μεταξύ του παθολογικού και του παρακείμενου φυσιολογικού δείγματος (8%, $\log_2 FC = 0$). Τα επίπεδα της CNOT6 ήταν αυξημένα σε 12 παθολογικά δείγματα (48%) και ήταν μειωμένα σε 13 (52%). Η NOC βρέθηκε υπερεκφρασμένη σε 14 δείγματα (56%), υποεκφρασμένη σε 8 δείγματα (32%) και 3 δείγματα (12%) έδειξαν σταθερή έκφραση. Η CNOT7 ήταν υπερεκφρασμένη σε 12 (48%) και υποεκφρασμένη σε 12 δείγματα (48%), ενώ ήταν αμετάβλητη σε ένα δείγμα (4%) (Maragozidis et al. 2015).

Συσχέτιση της έκφρασης των αποαδενυλασών με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά

Για να συσχετίσουμε τα προηγούμενα αποτελέσματα με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, χωρίσαμε τα δείγματα σε δυο ομάδες, όπου η έκφραση της κάθε αποαδενυλάσης είναι αυξημένη ή μειωμένη στα παθολογικά δείγματα σε σχέση με τα αντίστοιχα μη-παθολογικά. Τα δείγματα που δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική μεταβολή δεν μελετήθηκαν περαιτέρω (2 δείγματα για την PARN, 1 για την CNOT7 και 3 για την έκφραση της NOC). Παρόμοια προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την ταυτοποίηση των γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό του RNA, όπου οι ασθενείς χωρίστηκαν σύμφωνα με υψηλά και χαμηλά επίπεδα έκφρασης του mRNA (Valles et al. 2012).



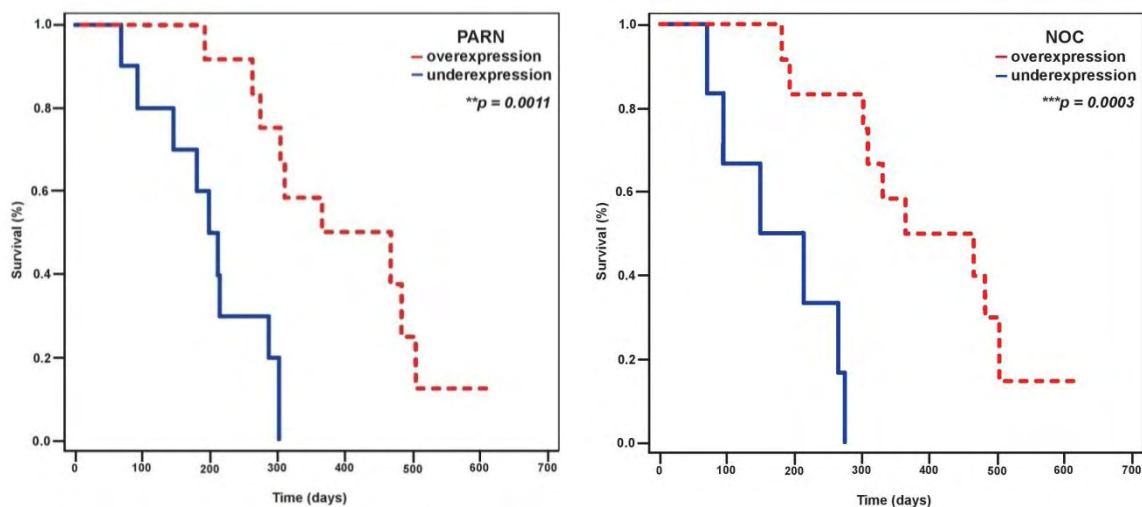
Εικόνα 3.2 Συγκριτική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των αποαδενυλασών στο πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα (SCC). Τα επίπεδα mRNA των PARN (ρόμβος), CNOT6 (τετράγωνο), CNOT7 (τρίγωνο) και NOC (κύκλος) μετρήθηκαν με Real-Time PCR σε κυτταρικά εκχυλίσματα SCC και εκφράζονται ως μεταβολές σε σχέση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό (\log_2 fold-change). Η έκφραση των μη-παθολογικών δειγμάτων καθορίστηκε ως 0. * $p < 0,05$. (Maragozidis et al. 2015)

Τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά που εξετάσαμε ήταν η ηλικία των ασθενών (κάτω ή άνω των 65 ετών), το μέγεθος του όγκου (T1-2 έναντι T3-4), η μετάσταση στους λεμφαδένες (N0-1 έναντι N2-3) και η μετάσταση σε άλλα όργανα (M0 έναντι M1). Στον **Πίνακα 3.1** συνοψίζονται τα αποτελέσματα, στα οποία παρατηρούμε πως η PARN και η CNOT6 σχετίζονται με ορισμένα από τα χαρακτηριστικά. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται πως η PARN υπερεκφράζεται σε 8 από τα 9 παθολογικά δείγματα (88,8%, $p = 0,03$) τα οποία προέρχονται από ασθενείς κάτω των 65 ετών. Η έκφραση της CNOT6 είναι αυξημένη σε 11 δείγματα που δεν παρουσιάζουν μετάσταση (78,6 %), ενώ υποεκφράζεται σε 10 δείγματα που εμφανίζουν μεταστάσεις (91%, $p = 0,075$). Αυτή η παρατήρηση υπαινίσσεται πως η μειωμένη έκφραση της CNOT6 μπορεί να σχετίζεται με μεταστάσεις. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των CNOT7 και NOC με τα εξεταζόμενα κλινικά χαρακτηριστικά (Maragozidis et al. 2015).

Πίνακας 3.1 Συσχέτιση της έκφρασης των PARN, CNOT6, CNOT7 και NOC με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά στο SCC.

Χαρακτηριστικά	Αριθμός ασθενών	PARN		CNOT6		CNOT7		NOC	
		High ^a (%)	<i>p</i>	High (%)	<i>p</i>	High (%)	<i>p</i>	High (%)	<i>p</i>
Ηλικία									
≤ 65	9	8 (88,8)	*	7 (77,8)		5 (55,5)		5 (55,5)	
≥ 65	16	7 (43,8)		6 (37,5)		10 (62,5)		12 (75,0)	
Καπνιστική συνήθεια									
Καπνιστές	21	11 (52,4)		12 (57,1)		12 (57,1)		14 (66,7)	
Πρώην καπνιστές	4	3 (75,0)		1 (25,0)		3 (75,0)		2 (50,0)	
Μέγεθος όγκου									
T1-T2	9	5 (55,5)		7 (77,8)		4 (45,5)		5 (55,5)	
T3-T4	16	9 (56,3)		6 (37,5)		10 (62,5)		12 (75,0)	
Μετάσταση λεμφαδένων									
Αρνητική (N0-N1)	6	3 (50)		4 (66,7)		3 (50,0)		4 (66,7)	
Θετική (N2-N3)	19	11 (57,9)		9 (47,4)		12 (63,1)		13 (68,4)	
Μακρινή μετάσταση									
Αρνητική (M0)	14	11 (78,6)		11 (78,6)		10 (71,4)		11 (78,6)	
Θετική (M1)	11	3 (27,3)		1 (9,0)	**	5 (45,5)		4 (36,4)	

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ^a δείγματα με αυξημένα επίπεδα έκφρασης (Maragozidis et al. 2015)



Εικόνα 3.3 Συσχέτιση της έκφρασης των αποαδενυλασών PARN και NOC με την πρόγνωση των ασθενών. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε δυο ομάδες, όπου η έκφραση της κάθε αποαδενυλάσης είναι αυξημένη ή μειωμένη στα παθολογικά δείγματα σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Από την ανάλυση με καμπύλες επιβίωσης Kaplan Meier προκύπτει ότι οι ασθενείς στους οποίους η PARN υπερεκφράζεται στον παθολογικό ιστό η συνολική επιβίωση ήταν κατά 7 μήνες περισσότερο ($p = 0,0011$). Για τους ασθενείς στους οποίους η NOC υπερεκφράζεται στον παθολογικό ιστό η συνολική επιβίωση αυξήθηκε κατά 7,9 μήνες σε σχέση με αυτούς όπου η NOC υποεκφράζεται ($p = 0,003$). (Maragozidis et al. 2015)

Συσχέτιση της έκφρασης των αποαδενυλασών με την πρόγνωση ασθενών με SCC

Με τον ίδιο τρόπο σχεδιάστηκαν οι καμπύλες επιβίωσης (Kaplan-Meier) για να αξιολογήσουμε την σημασία της έκφρασης των αποαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT7 και NOC στην πρόγνωση των ασθενών με SCC. Από την ανάλυση προκύπτει ότι οι ασθενείς στους οποίους η PARN υπερεκφράζεται στον παθολογικό ιστό, η συνολική επιβίωση ήταν κατά 7 μήνες περισσότερη από αυτούς όπου η PARN υποεκφράζεται (μέσος όρος 13,8 μήνες έναντι 6,8 μήνες, $p = 0,0011$). Για τους ασθενείς στους οποίους η NOC υπερεκφράζεται στον παθολογικό ιστό η συνολική επιβίωση αυξήθηκε κατά 7,9 μήνες σε σχέση με αυτούς όπου η NOC υποεκφράζεται (μέσος όρος 13,8 μήνες έναντι 5,9 μήνες, $p = 0,003$). Δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά για τους ασθενείς στους οποίους υπερεκφράζεται η CNOT6 (μέσος όρος 11,0 μήνες έναντι 9,3 μήνες, $p = 0,27$) ή η CNOT7 (μέσος όρος 11,3 μήνες έναντι 8,9 μήνες, $p = 0,0898$).

Αυτές οι παρατηρήσεις υπαινίσσονται πως η αυξημένη έκφραση των PARN και NOC μπορεί να σχετίζεται με την αυξημένη επιβίωση των ασθενών με SCC (**Εικόνα 3.3**) (Maragozidis et al. 2015).

Μετάγραφα και μονοπάτια που επηρεάζονται από τις PARN και NOC στο SCC

Η συσχέτιση της έκφρασης των αποαδενυλασών με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά αλλά και την πρόγνωση των ασθενών με SCC, μας ενθάρρυναν να διερευνήσουμε περαιτέρω τον ρόλο των αποαδενυλασών στην ογκογένεση. Για αυτό το σκοπό αποσιωπήσαμε τα επίπεδα συγκεκριμένων αποαδενυλασών διαμολύνοντας κύτταρα NCI-H520 (προέρχονται από SCC) με ειδικά shRNAs και εξετάσαμε την επίπτωση στη γονιδιακή έκφραση με μικροσυστοιχίες. Αρχικά αποσιωπήσαμε τις αποαδενυλάσες PARN και NOC που η αυξημένη έκφρασή τους στα παθολογικά δείγματα φέρεται να σχετίζεται με την αυξημένη επιβίωση των ασθενών με SCC. Η ανάλυση με μικροσυστοιχίες έπειτα από αποσιώπηση της PARN αποκάλυψε 322 μετάγραφα που η έκφρασή τους αυξάνεται (αυξορρυθμισμένα, $\log_2 FC > 2$) και 85 μετάγραφα που η έκφρασή τους μειώνεται (μειορρυθμισμένα, $\log_2 FC < -2$). Στον **Πίνακα 4.1** του Παραρτήματος περιλαμβάνονται τα αυξορρυθμισμένα μετάγραφα· 233 mRNAs και 89 μετάγραφα που αντιστοιχούν σε ψευδογονίδια, μη-κωδικά RNAs και υποθετικές πρωτεΐνες που είναι πιθανοί στόχοι της PARN. Για να ταυτοποιήσουμε τις διεργασίες όπου εμπλέκονται τα αυξορρυθμισμένα μετάγραφα, πραγματοποιήσαμε ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού (functional enrichment analysis) των συγκεκριμένων μεταγράφων. Χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα GeneMANIA (www.genemania.org) και πραγματοποιήσαμε μια ανάλυση που βασίζεται σε λειτουργικά συνδεδεμένα δεδομένα που είναι ενσωματωμένα στο πρόγραμμα (Wardle-Farley et al. 2010). Η ανάλυση αποκάλυψε τον εμπλουτισμό 36 γονιδιακών οντολογιών (Gene Ontologies, GOs), οι οποίες προβλέπεται πως επηρεάζουν βιολογικές αντιδράσεις ως αποτέλεσμα της αποσιώπησης της PARN (**Πίνακας 4.2 Παραρτήματος**). Αρκετές από τις προβλεπόμενες GOs σχετίζονται με *διεργασίες κυτταρικής διασύνδεσης και προσκόλλησης (cell-cell junction and adhesion), συγκρότησης και οργάνωσης συνάψεων (synapse assembly and organization), και διάφορες διεργασίες σχετιζόμενες με μύες*

(muscle-related processes). Αφετέρου, η αποσιώπηση της NOC οδήγησε στην αυξορρύθμιση 307 και την μειορρύθμιση 165 μεταγράφων. Στον **Πίνακας 4.3** του Παραρτήματος περιλαμβάνονται τα αυξορρυθμισμένα μετάγραφα· 212 mRNAs και 95 μετάγραφα που αντιστοιχούν σε ψευδογονίδια, μη-κωδικά RNAs και υποθετικές πρωτεΐνες, που είναι πιθανοί στόχοι της NOC. Το GeneMANIA προέβλεψε τον εμπλουτισμό 118 GOs από αυτά τα μετάγραφα, όπου οι περισσότερες GOs σχετίζονται με διεργασίες που σχετίζονται με τον μεταβολισμό και τον κικκάδιο ρυθμό (**Πίνακας 4.4 Παραρτήματος**).

Για να ελέγξουμε αν τα συγκεκριμένα αποτελέσματα είναι ειδικά για το SCC, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία και σε μια άλλη καρκινική κυτταρική σειρά, τα HEp2. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά έχει χρησιμοποιηθεί για αυτό το σκοπό σε παλαιότερες μελέτες που έγιναν πάνω στον καρκίνο του πνεύμονα (Goel et al. 2007; Kobayashi et al. 2004). Στα συγκεκριμένα κύτταρα, η αποσιώπηση της PARN οδήγησε στην αυξορρύθμιση 203 μεταγράφων, ενώ μόλις 4 μετάγραφα ήταν κοινά και στις δυο κυτταρικές σειρές (**Εικόνα 3.4A** και **Πίνακας 4.5 Παραρτήματος**). Στον **Πίνακας 4.6** του Παραρτήματος συνοψίζονται οι 20 εμπλουτισμένες GOs, όπως προβλέφθηκαν από το GeneMANIA, όπου αρκετές από αυτές σχετίζονται με το μεταβολισμό νουκλεοτιδίων και σηματοδοτικά μονοπάτια. Ανάμεσα στα κοινά αυξορρυθμισμένα μετάγραφα, βρίσκονται τα *PTGIR* (*Prostaglandin I2 Receptor*) και *AATK* (*apoptosis-associated tyrosine kinase*). Το *PTGIR* σχετίζεται με το NSCLC (Tennis et al. 2010) ενώ το *AATK* με άλλους τύπους καρκίνου όπως εγκεφαλικοί όγκοι, και καρκίνοι του μαστού και του πνεύμονα (Haag et al. 2014; Yamanaka et al. 2006). Επίσης μειώθηκε η έκφραση 1796 μεταγράφων, όπου 15 από αυτά να είναι κοινά και στις δυο κυτταρικές σειρές (**Πίνακας 4.5 Παραρτήματος**) και 20 προβλεπόμενες από το GeneMANIA εμπλουτισμένες GOs (**Πίνακας 4.7 Παραρτήματος**). Το *C4orf6* (Chromosome 4 Open Reading Frame 6, Expressed In Neuroblastoma) που ήταν μειορρυθμισμένο και στις δυο κυτταρικές σειρές, κωδικοποιεί μια μη-χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη που σχετίζεται με το νευροβλάστωμα (Kito et al. 1997).

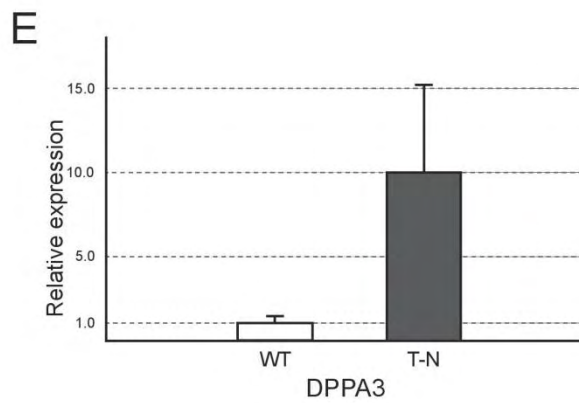
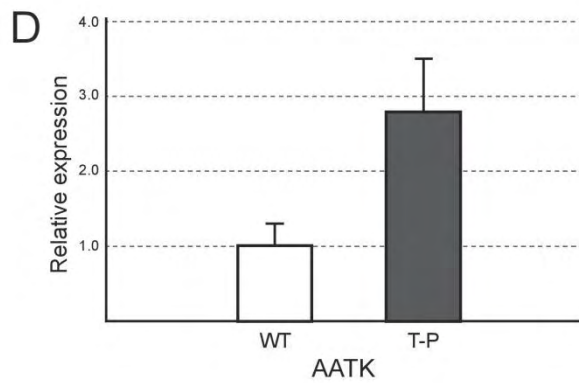
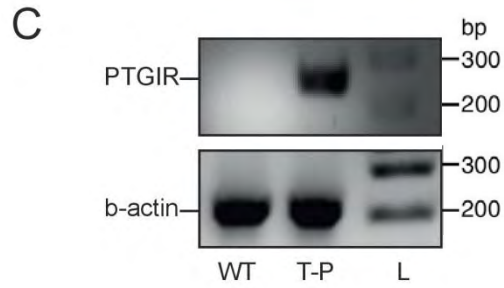
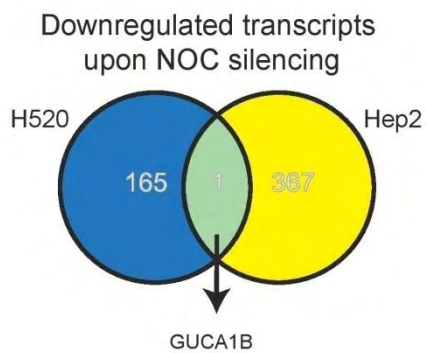
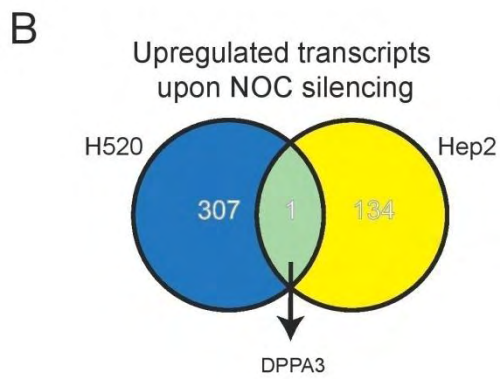
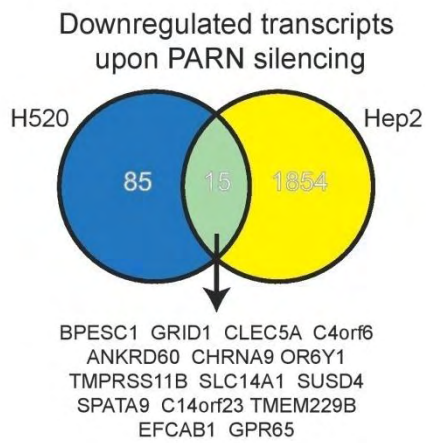
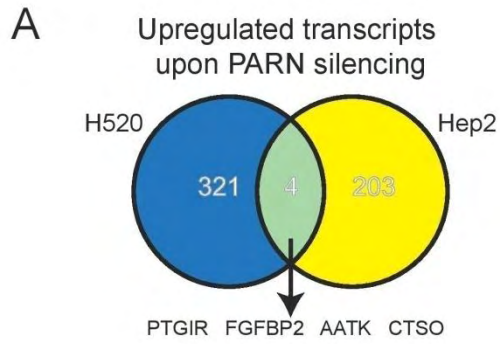
Ακόμη, η αποσιώπηση της NOC αποκάλυψε την αύξηση της έκφρασης 134 μεταγράφων στα HEp2 κύτταρα, με μόλις ένα κοινό μετάγραφο με τα NCI-H520, το *developmental pluripotency associated 3* (*DPPA3*). Επιπλέον, 367 μετάγραφα

μειορρυθμίστηκαν έχοντας μόνο ένα κοινό μετάγραφο με τα NCI-H520, το *guanylate cyclase activator 1B (GUCA1B)* όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3.4B** και 8 προβλεπόμενες από το GeneMANIA εμπλουτισμένες GOs (**Πίνακας 4.8 Παραρτήματος**).

Εν συνεχεία, για να επιβεβαιώσουμε ότι τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών πράγματι αντικατοπτρίζουν τις αλλαγές έκφρασης των συγκεκριμένων μεταγράφων, ελέγξαμε την έκφραση τους με RT-qPCR, εστιάζοντας στα αυξορρυθμισμένα μετάγραφα που αποτελούν πιθανούς στόχους των ενζύμων και του ρόλου τους στον καρκίνο. Έτσι, έπειτα από αποσιώπηση της PARN παρατηρήσαμε αύξηση στα επίπεδα mRNA του PTGIR, παρόλο που τα επίπεδά του δεν είναι ανιχνεύσιμα στο NSCLC, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλη μελέτη (**Εικόνα 3.4C**) (Tennis et al. 2010). Επίσης τα επίπεδα έκφρασης του *AATK* αυξήθηκαν πάνω από δυο φορές (**Εικόνα 3.4D**), ενώ αύξηση παρατηρήθηκε και για το *DPPA3* μετά από αποσιώπηση της NOC (**Εικόνα 3.4E**).

Τα προηγούμενα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η PARN και η NOC επηρεάζουν διαφορετικά μετάγραφα και οντολογίες στα κύτταρα SCC και εμπλέκονται στη ρύθμιση διαφορετικών μονοπατιών. Επιπλέον, η αποσιώπηση της PARN και της NOC σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές επηρεάζει διαφορετικούς πληθυσμούς μεταγράφων, με ελάχιστα κοινά γονίδια, προτείνοντας διαφορετικούς ρόλους για κάθε αποαδενυλάση σε διαφορετικό τύπο κυττάρων (Maragozidis et al. 2015).

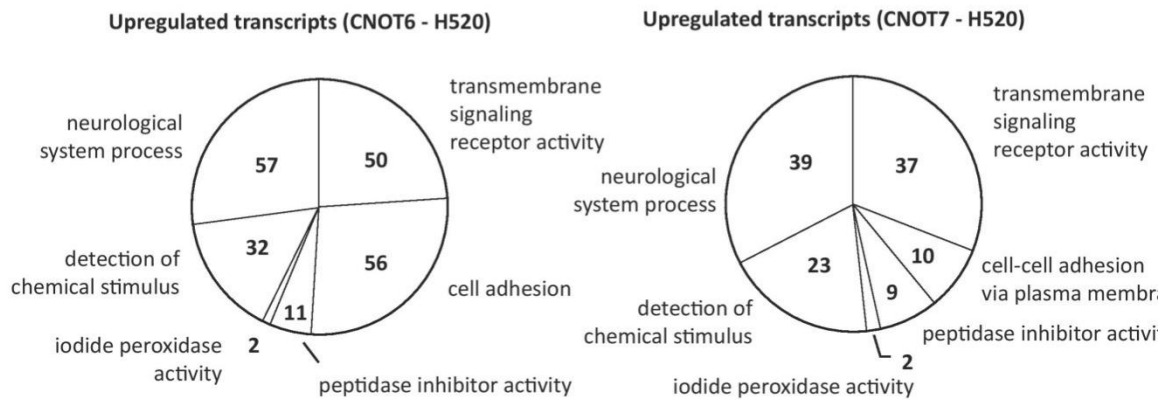
Εικόνα 3.4 Μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης σε NCI-H520 και HEp2 κύτταρα ύστερα από αποσιώπηση της PARN και της NOC. **A, B** Σύγκριση της μεταβολής της γονιδιακής έκφρασης ανάμεσα στα NCI-H520 και HEp2 κύτταρα έπειτα από αποσιώπηση της PARN (**A**) και της NOC (**B**). Οι αριθμοί υποδηλώνουν τα μετάγραφα που μεταβάλλονται. **C-E** Η έκφραση των mRNAs των *PTGIR*, *AATK* και *DPPA3* σε NCI-H520 κύτταρα έπειτα από αποσιώπηση της PARN και της NOC. L, DNA molecular mass marker, οι αριθμοί στο πλάι υποδηλώνουν βάσεις DNA (bp). Το εύρος σφάλματος (error bar) αντιπροσωπεύει την τυπική απόκλιση (standard deviation). (Maragozidis et al. 2015)



Μετάγραφα και μονοπάτια που επηρεάζονται από τις CNOT6 και CNOT7 σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές

Εκτός από τις PARN και NOC, η έκφραση των CNOT6 και CNOT7 επίσης επηρεάζεται στο SCC, οπότε αποσιωπήσαμε την έκφραση των συγκεκριμένων αποαδενυλασών σε κύτταρα NCI-H520 και εξετάσαμε την επίπτωση που έχουν στην γονιδιακή έκφραση με μικροσυστοιχίες. Η αποσιώπηση της CNOT6 είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης 578 μεταγράφων και τη μείωση της έκφρασης σε 59, ενώ η αποσιώπηση της CNOT7 οδήγησε στην αυξορρύθμιση 355 και τη μειορρύθμιση 130 μεταγράφων, με όριο επιλογής ± 2 φορές μεταβολή έκφρασης (\log_2 fold change). Επίσης παρατηρήθηκαν 209 αυξορρυθμισμένα και 42 μειορρυθμισμένα κοινά μετάγραφα και στις δυο αποσιωπήσεις, κάτι που έχει αναφερθεί και σε άλλη μελέτη μετά από αποσιώπηση των CNOT6 και CNOT7 σε κύτταρα MCF7 (Mittal et al. 2011). Ακολούθως, χρησιμοποιώντας τα μετάγραφα των οποίων η έκφραση επηρεάζεται από την αποσιώπηση των CNOT6 και CNOT7, ελέγξαμε ποιες μοριακές λειτουργίες και βιολογικές διεργασίες επηρεάζονται χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ConsensusPathDB-human (Over-Representation Analysis of Gene Ontology categories, <http://consensuspathdb.org/>) (Kamburov et al. 2009; Kamburov et al. 2013). Όσον αφορά στην αποσιώπηση της CNOT6, η ανάλυση των αυξορρυθμισμένων μεταγράφων ανέδειξε 20 εμπλουτισμένες GOs (**Πίνακας 4.9 Παραρτήματος**), όπου τα περισσότερα από αυτά συνδέονται με διεργασίες που σχετίζονται με *σηματοδότηση μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων* (transmembrane signaling receptor activity), *κυτταρική προσκόλληση* (cell adhesion), και *διεργασίες νευρολογικού συστήματος* (neurological system process) (**Εικόνα 3.5**). Τα μειορρυθμισμένα μετάγραφα εμπλούτισαν μόνο δυο GOs: την *συναπτική διαβίβαση* (synaptic transmission) και την *δραστηριότητα διαμεμβρανικού μεταφορέα ιόντων* (ion transmembrane transporter activity) (**Πίνακας 4.9 Παραρτήματος**). Τα αυξορρυθμισμένα μετάγραφα που προέκυψαν από την αποσιώπηση της CNOT7 εμπλούτισαν 17 GOs (**Πίνακας 4.10 Παραρτήματος**) όπου τα περισσότερα από αυτά συνδέονται με διεργασίες που σχετίζονται με *σηματοδότηση μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων* (transmembrane signaling receptor activity), *διεργασίες νευρολογικού συστήματος* (neurological system process), και *ανίχνευση χημικού ερεθίσματος* (detection of chemical stimulus involved in sensory perception)

(**Εικόνα 3.5**). Τα μειορρυθμισμένα μετάγραφα εμπλούτισαν μόνο μια GO· την αρνητική ρύθμιση της διεργασίας του ανοσοποιητικού συστήματος (negative regulation of immune system process) (**Πίνακας 4.10 Παραρτήματος**).

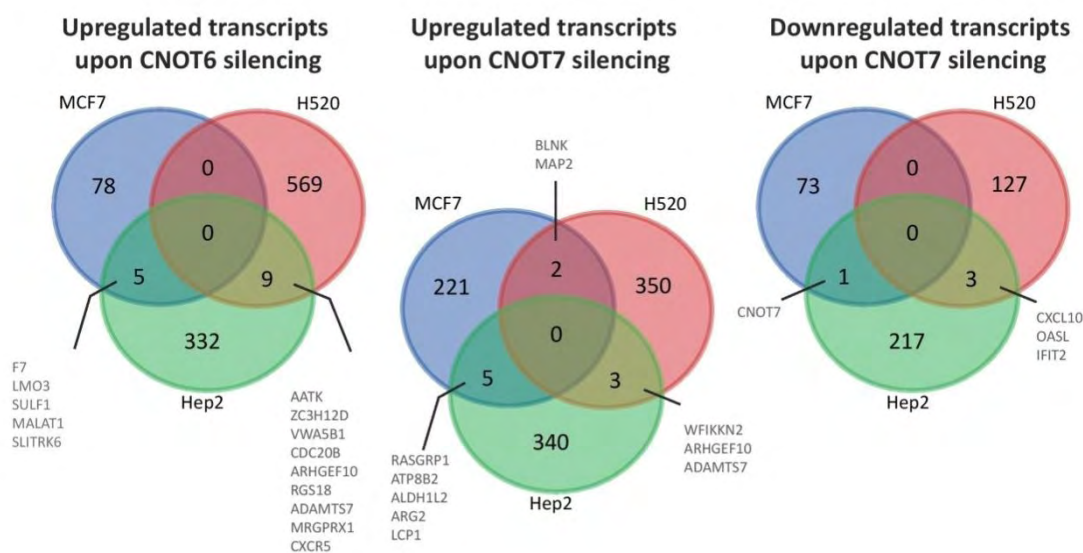


Εικόνα 3.5 Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού στα αυξορρυθμισμένα μετάγραφα έπειτα από αποσιώπηση της CNOT6 (αριστερά) και της CNOT7 (δεξιά) σε κύτταρα NCI-H520. (Maragozidis et al. 2017, *in preparation*)

Για να διαπιστώσουμε αν οι αποαδενυλάσες CNOT6 και CNOT7 επηρεάζουν τους ίδιους ή διαφορετικούς πληθυσμούς μεταγράφων σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, όπως ισχύει για τις PARN και NOC, αποσιωπήσαμε τις CNOT6 και CNOT7 στα κύτταρα HEr2 και ακολουθήσαμε την ίδια διαδικασία. Επίσης, χρησιμοποιήσαμε τα αποτελέσματα μιας άλλης μελέτης όπου γίνεται αποσιώπηση των CNOT6 και CNOT7 σε κύτταρα MCF7 (καρκίνου του μαστού) για να συγκρίνουμε τα αποτελέσματά μας (Mittal et al. 2011). Η αποσιώπηση της CNOT6 στα HEr2 κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης 337 μεταγράφων και τη μείωση της έκφρασης σε 235, ενώ η αποσιώπηση της CNOT7 οδήγησε στην αυξορρύθμιση 345 και τη μειορρύθμιση 218 μεταγράφων, με 171 αυξορρυθμισμένα και 130 μειορρυθμισμένα κοινά μετάγραφα και στις δυο αποσιωπήσεις. Η αποσιώπηση των CNOT6/6L στα κύτταρα MCF7 είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης 83 μεταγράφων και τη μείωση της έκφρασης σε 7, ενώ η αποσιώπηση των CNOT7/8 οδήγησε στην αυξορρύθμιση 228 και τη μειορρύθμιση 74 μεταγράφων. Από αυτά, κοινά μετάγραφα και στις δυο αποσιωπήσεις ήταν 25 αυξορρυθμισμένα και 1 μειορρυθμισμένο. Η σύγκριση των διαφορεικά

εκφραζόμενων μεταγράφων μετά από αποσιώπηση της κάθε αποαδενυλάσης στις τρεις κυτταρικές σειρές αποκάλυψε πως υπάρχουν μόνο 14 κοινά αυξορρυθμισμένα και κανένα μειορρυθμισμένο μετάγραφο μετά από αποσιώπηση της CNOT6, ενώ επίσης βρέθηκαν 10 κοινά αυξορρυθμισμένα και 4 μειορρυθμισμένα μετάγραφα μετά από αποσιώπηση της CNOT7 (**Εικόνα 3.6**). Παρόμοια αποτελέσματα παίρνουμε και μετά από ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού, όπου έχει προβλεφθεί πως εμπλουτίζονται 14 GOs από τα μειορρυθμισμένα μετάγραφα λόγω αποσιώπησης της CNOT6 (**Πίνακας 4.11 Παραρτήματος**), ενώ έχει προβλεφθεί πως εμπλουτίζεται μια GO με βάση τα αυξορρυθμισμένα μετάγραφα λόγω αποσιώπησης της CNOT7 και 4 GOs με βάση τα μειορρυθμισμένα μετάγραφα (**Πίνακας 4.12 Παραρτήματος**).

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν πως οι αποαδενυλάσες CNOT6 και CNOT7 έχουν πιθανόν αρκετά κοινά μετάγραφο-στόχους στα κύτταρα NCI-H520, MCF7 και HEP2 και ελέγχουν κοινές μοριακές λειτουργίες και βιολογικές διεργασίες. Επηρεάζουν όμως διαφορετικούς πληθυσμούς mRNA σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, υποδηλώνοντας ένα διακριτό ρόλο για κάθε ένζυμο σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων (Maragozidis et al. 2017, *in preparation*).



Εικόνα 3.6 Σύγκριση των διαφορικά εκφραζόμενων μεταγράφων μετά από αποσιώπηση των CNOT6 και CNOT7 στις κυτταρικές σειρές NCI-H520, MCF7 και HEP2. (Maragozidis et al. 2017, *in preparation*)

Αλληλεπικαλυπτόμενη δράση των CNOT6 και CNOT6L στο SCC

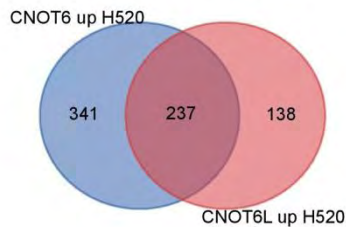
Προηγούμενες μελέτες έδειξαν πως η δράση της CNOT6 μπορεί να αντικατασταθεί εν μέρει από την CNOT6L, όπως επίσης και της CNOT7 από την CNOT8 σε κύτταρα MCF7, λόγω της μεγάλης ομολογίας των αλληλουχιών των ενζύμων (Aslam et al. 2009; Mittal et al. 2011). Με βάση αυτή την πληροφορία, αποσιωπήσαμε την CNOT6L σε κύτταρα NCI-H520, ώστε να μελετήσουμε την επίδραση στη γονιδιακή έκφραση και να συγκρίνουμε τα διαφορικά εκφραζόμενα μετάγραφα με αυτά που προκύπτουν από την αποσιώπηση της CNOT6. Η ανάλυση των μικροσυστοιχιών έδειξε την αύξηση της έκφρασης 375 μεταγράφων και τη μείωση της έκφρασης σε 111, όπου 237 αυξορρυθμισμένα και 39 μειορρυθμισμένα μετάγραφα παρατηρούνται και μετά από αποσιώπηση της CNOT6 (**Εικόνα 3.7A**). Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια και με ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού, όπου προβλέπεται ο εμπλουτισμός 14 GOs από τα αυξορρυθμισμένα μετάγραφα, συμπεριλαμβανομένων διεργασίες που σχετίζονται με σηματοδότηση μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων (transmembrane signaling receptor activity), κυτταρική προσκόλληση (cell adhesion), και διεργασίες νευρολογικού συστήματος (neurological system process), και 16 GOs με βάση τα μειορρυθμισμένα μετάγραφα, συμπεριλαμβανομένου της διαμεμβρανικής μεταφοράς και συναπτικής μετάδοσης (**Εικόνα 3.7B** και **Πίνακας 4.13 Παραρτήματος**).

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την CNOT8, που παρουσιάζει ομολογία με την CNOT7, αλλά επειδή η έκφρασή της ήταν σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στα κύτταρα NCI-H520, η αποσιώπηση και περαιτέρω μελέτη της έγινε στα HEP2 κύτταρα. Η ανάλυση των μικροσυστοιχιών έδειξε την αύξηση της έκφρασης 354 μεταγράφων και τη μείωση της έκφρασης σε 346, όπου 88 αυξορρυθμισμένα και 121 μειορρυθμισμένα μετάγραφα παρατηρούνται και μετά από αποσιώπηση της CNOT7 (**Εικόνα 3.7B**). Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια και με ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού, όπου προβλέπεται ο εμπλουτισμός 12 GOs από τα αυξορρυθμισμένα μετάγραφα, συμπεριλαμβανομένων της ανάπτυξης πολυκύτταρου οργανισμού (multicellular organism development), της ρύθμισης της ανάπτυξης (regulation of growth), της ομοιοστατικής διεργασίας (homeostatic process) και της κυτταρικής σηματοδότησης (cell-cell signaling), και μια GO με βάση τα μειορρυθμιζόμενα μετάγραφα (**Εικόνα 3.7B** και **Πίνακας 4.14 Παραρτήματος**). Η ανάλυση έδειξε επίσης πως υπάρχουν μόνο 4

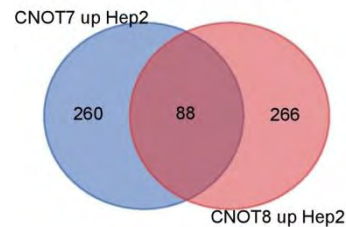
κοινά αυξορρυθμισμένα μετάγραφα μετά από αποσιώπηση της CNOT8 στα HEp2 και MCF7 κύτταρα (*C10orf81*, *ST6GALNAC2*, *PLEKHA5*, *ZFYVE9*), ενώ δεν εντοπίστηκαν κοινά μετάγραφα μετά από αποσιώπηση της CNOT6L στα HEp2 και MCF7 κύτταρα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα ουσιαστικά αναδεικνύουν πως η CNOT6 και η CNOT6L αντισταθμίζουν η μια τη λειτουργία της άλλης σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων, όπως επίσης η CNOT7 και η CNOT8, αλλά σε μικρότερο βαθμό (Maragozidis et al. 2017, *in preparation*).

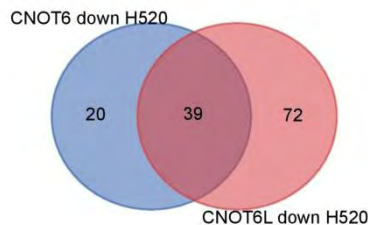
A Upregulated transcripts upon CNOT6 / CNOT6L silencing



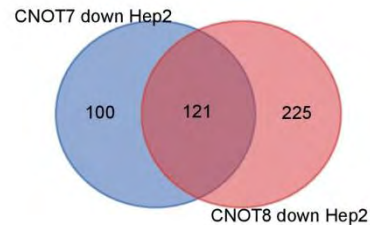
Upregulated transcripts upon CNOT7 / CNOT8 silencing



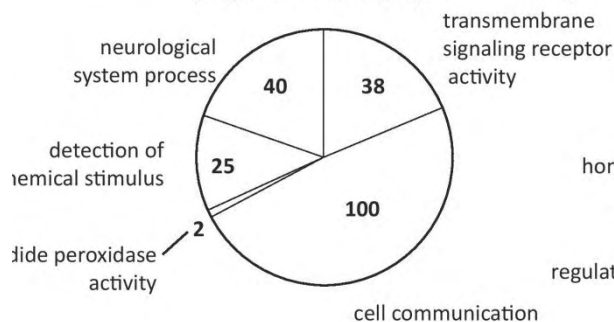
Downregulated transcripts upon CNOT6 / CNOT6L silencing



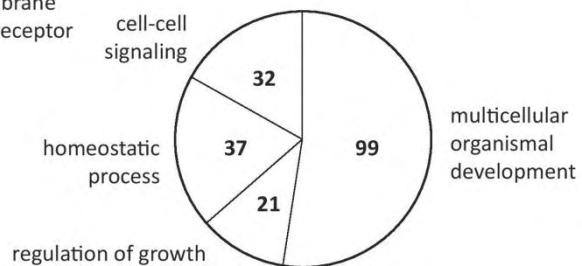
Downregulated transcripts upon CNOT7 / CNOT8 silencing



B Upregulated transcripts (CNOT6L - H520)



Upregulated transcripts (CNOT8 - Hep2)



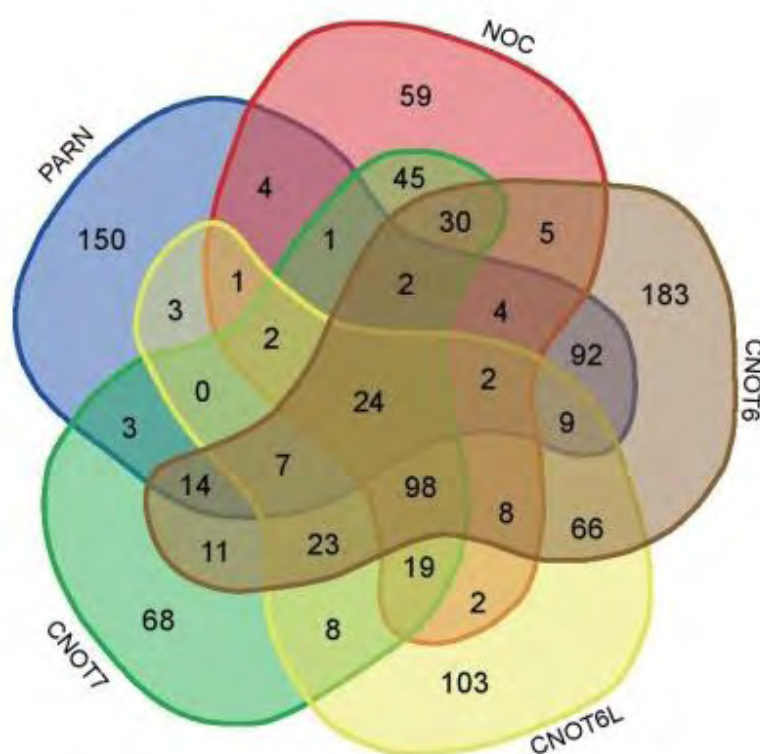
Εικόνα 3.7 Επίδραση των αποαδενυλασών του συμπλόκου CCR4-NOT στη γονιδιακή έκφραση. **A** Σύγκριση των διαφορετικά εκφραζόμενων μεταγράφων μετά από αποσιώπηση των CNOT6 και CNOT6L στα κύτταρα NCI-H520, και των CNOT7 και CNOT8 στα κύτταρα HEp2. **B** Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού των αυξορρυθμισμένων μεταγράφων μετά από αποσιώπηση της CNOT6L στα NCI-H520 και της CNOT8 στα HEp2. (Maragozidis et al. 2017, *in preparation*)

Μετάγραφα που ελέγχονται αποκλειστικά από συγκεκριμένες αποαδενυλάσες

Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα από τα πειράματα γονιδιακής έκφρασης μετά από τις αποσιωπήσεις των αποαδενυλασών PARN, NOC, CNOT6, CNOT6L και CNOT7 στα κύτταρα NCI-H520, παρατηρήσαμε πως υπάρχουν μετάγραφα των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται μετά από αποσιώπηση α) μόνο μιας αποαδενυλάσης, β) από περισσότερες αποαδενυλάσες ή γ) όλων των αποαδενυλασών που μελετήσαμε (**Πίνακας 4.15 Παραρτήματος**). Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση 664 (/1289) μεταγράφων επηρεάζεται από μόνο μια αποαδενυλάση, 567 μετάγραφα επηρεάζονται από περισσότερες αποαδενυλάσες, ενώ υπάρχουν και 55 μετάγραφα που επηρεάζονται και από τις πέντε αποαδενυλάσες. Τα μετάγραφα που αυξορρυθμίζονται μετά από αποσιώπηση μόνο μιας αποαδενυλάσης είναι πιθανοί στόχοι της συγκεκριμένης αποαδενυλάσης και έχει βρεθεί περιορισμένος αριθμός τέτοιων μεταγράφων όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 3.8**. 183 μετάγραφα αυξορρυθμίζονται μετά από αποσιώπηση της CNOT6, 103 μετά από αποσιώπηση της CNOT6L, 68 μετά από αποσιώπηση της CNOT7, 59 μετά από αποσιώπηση της NOC και 150 μετά από αποσιώπηση της PARN, ενώ αντίθετα 24 μετάγραφα είναι πιθανοί στόχοι και των πέντε αποαδενυλασών.

Στη συνέχεια, η ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού των πιθανών αποκλειστικών στόχων της CNOT6 εμπλούτισε τις GOs της *ρύθμισης της μετανάστευσης λευκοκυττάρων* (regulation of leukocyte migration) και της *αρνητικής χημειοταξίας* (negative chemotaxis), η ανάλυση των στόχων της CNOT6L εμπλούτισε την GO *δραστηριότητα παράγοντα ανταλλαγής ARF γουανυλο-νουκλεοτιδίου* (ARF guanyl-nucleotide exchange factor activity), η ανάλυση των στόχων της CNOT7 εμπλούτισε την

GOs της δραστηριότητας υποδοχέα πεπτιδίων (peptide receptor activity), της δραστηριότητας ρύθμισης της ενδοπεπτιδάσης (endopeptidase regulator activity) και της δραστηριότητας αναστολής της πεπτιδάσης (peptidase inhibitor activity), η ανάλυση των στόχων της NOC εμπλούτισε τις GOs της επαγωγής της ανοχής (tolerance induction), της δραστηριότητας υποδοχέα πεπτιδίων (peptide receptor activity) και της πρόσδεσης της ακτίνης (actin binding), ενώ η ανάλυση των στόχων της PARN εμπλούτισε την GO της σηματοδότησης μέσω μεμβρανικών υποδοχέων (transmembrane signaling receptor activity) (Πίνακας 3.2).



Εικόνα 3.8 Μετάγραφα με αυξημένη έκφραση έπειτα από αποσιώπηση των αποαδενυλασών PARN, NOC, CNOT6, CNOT6L και CNOT7 στα κύτταρα NCI-H520. (Maragozidis et al. 2017, *in preparation*)

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται στη γονιδιακή έκφραση σε κύτταρα HEp2, όπου αποσιωπήθηκαν οι αποαδενυλάσες PARN, NOC, CNOT6, CNOT7 και CNOT8, όπου η έκφραση 2553 (/3169) μεταγράφων επηρεάζεται από μόνο μια αποαδενυλάση, 534 μετάγραφα επηρεάζονται από περισσότερες αποαδενυλάσες, ενώ υπάρχουν και 82 μετάγραφα που επηρεάζονται και από τις πέντε αποαδενυλάσες. Και σε αυτή την περίπτωση έχει βρεθεί περιορισμένος αριθμός αποκλειστικών μεταγράφων στόχων

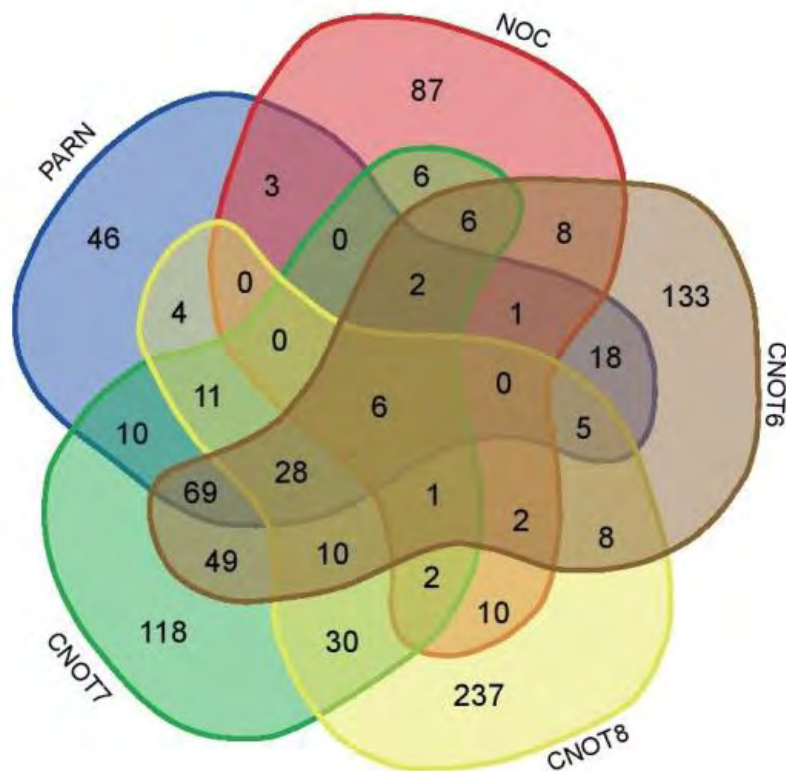
μιας αποαδενυλάσης· 133 μετάγραφα αυξορρυθμίζονται μετά από αποσιώπηση της CNOT6, 118 μετά από αποσιώπηση της CNOT7, 237 μετά από αποσιώπηση της CNOT8, 87 μετά από αποσιώπηση της NOC και 46 μετά από αποσιώπηση της PARN, ενώ αντίθετα 6 μετάγραφα είναι πιθανοί στόχοι και των πέντε αποαδενυλασών όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 3.9** (και **Πίνακας 4.16 Παραρτήματος**). Η ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού των πιθανών αποκλειστικών στόχων της CNOT6 εμπλούτισε 4 GOs, των στόχων της CNOT7 δεν εμπλούτισε κάποια GO, των στόχων της CNOT8 εμπλούτισε 27 GOs, των στόχων της NOC εμπλούτισε 13 GOs και των στόχων της CNOT7 εμπλούτισε 1 GO (**Πίνακας 4.17 Παραρτήματος**).

Πίνακας 3.2 Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού των πιθανών αποκλειστικών στόχων της κάθε αποαδενυλάσης σε κύτταρα NCI-H520.

	Gene Ontology Term (overexpressed transcripts)	Category, level	Set size	Candidates contained
CNOT6	GO:0002685 regulation of leukocyte migration	BP 4	143	6 (4,2%)*
	GO:0050919 negative chemotaxis	BP 4	22	3 (13,6%)*
CNOT6L	GO:0005086 ARF guanyl-nucleotide exchange factor activity	MF 3	18	2 (11,1%)*
	GO:0001653 peptide receptor activity	MF 4	137	3 (2,2%)*
CNOT7	GO:0061135 endopeptidase regulator activity	MF 4	177	3 (1,7%)*
	GO:0030414 peptidase inhibitor activity	MF 4	181	3 (1,7%)*
NOC	GO:0002507 tolerance induction	BP 2	25	2 (8,0%)*
	GO:0001653 peptide receptor activity	MF 4	137	3 (2,2%)*
	GO:0003779 actin binding	MF 4	392	4 (1,0%)*
PARN	GO:0004888 transmembrane signaling receptor activity	MF 4	1272	16 (1,3%)*

* *p-value* < 0,01, *q-value* < 0,5. (Maragozidis et al. 2017, *in preparation*)

Από τα τελευταία αποτελέσματα συμπεραίνουμε πως η έκφραση της συντριπτικής πλειοψηφίας των μεταγράφων ελέγχεται προσεκτικά από το κύτταρο, μιας και ελάχιστα mRNAs από το σύνολο που υπάρχουν σε κάθε κύτταρο είναι αποκλειστικοί στόχοι μόνο μιας αποαδενυλάσης. Για να ισχύει το προηγούμενο συμπέρασμα, θα πρέπει οι υπόλοιπες αποαδενυλάσες να καλύπτουν το κενό της αποσιωπημένης (Maragozidis et al. 2017, *in preparation*).



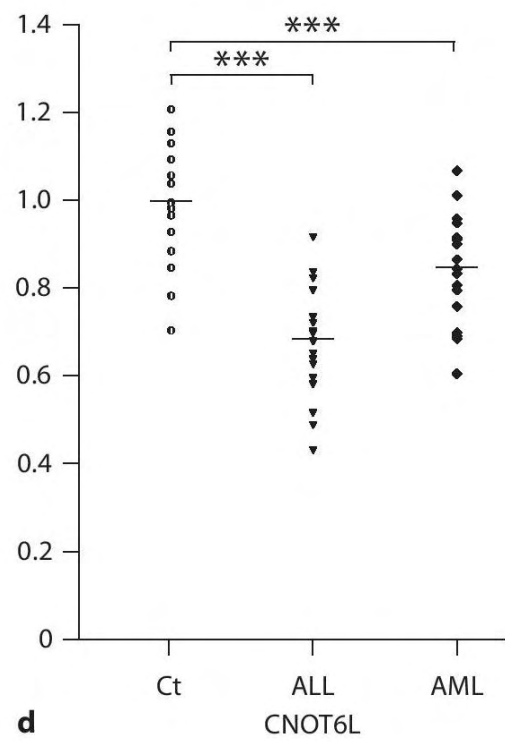
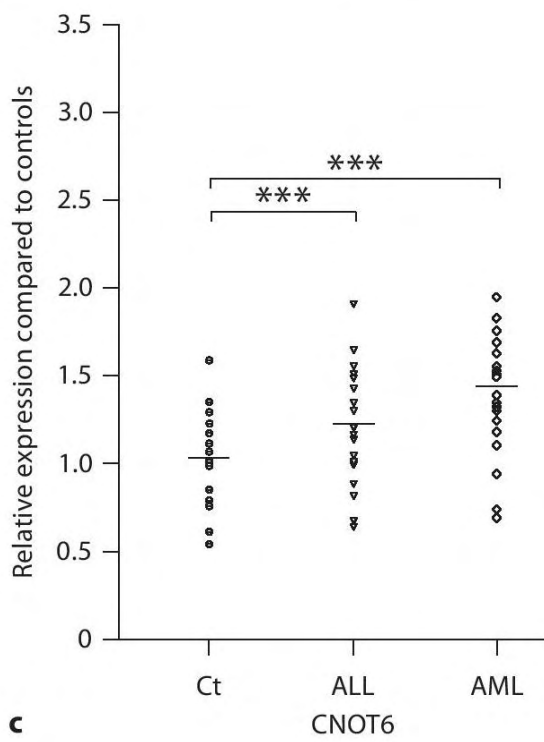
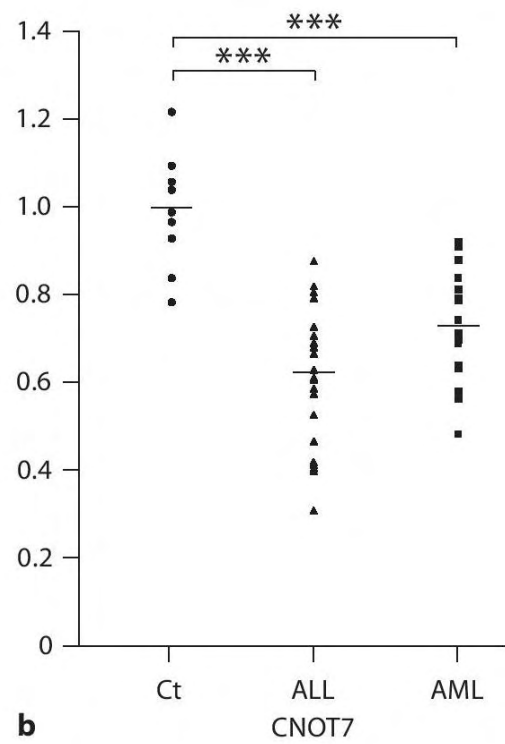
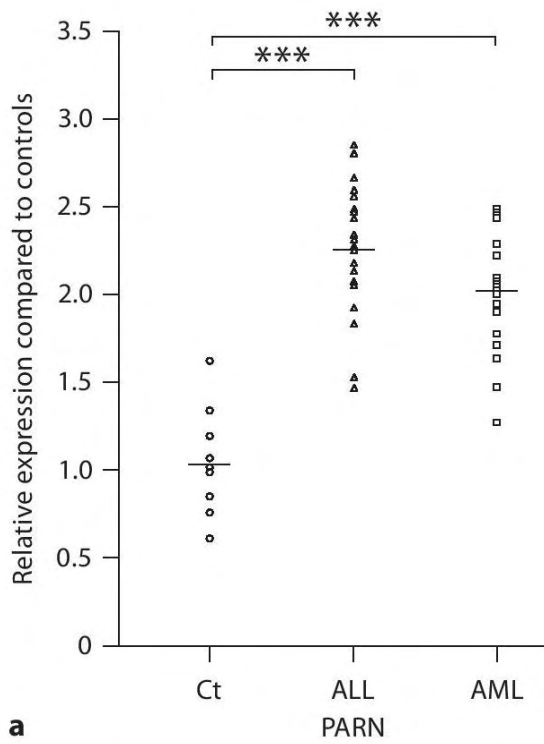
Εικόνα 3.9 Μετάγραφα με διαφορετική έκφραση έπειτα από αποσιώπηση των αποαδενυλασών PARN, NOC, CNOT6, CNOT7 και CNOT8 στα κύτταρα HEp2. (Maragozidis et al. 2017, *in preparation*)

Έκφραση αποαδενυλασών σε ασθενείς με οξεία λευχαιμία

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των αποσιωπήσεων των αποαδενυλασών σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, παρατηρήσαμε πως επηρεάζονται διαφορετικοί πληθυσμοί μεταγράφων, προτείνοντας διαφορετικούς ρόλους για κάθε αποαδενυλάση σε διαφορετικό τύπο κυττάρων. Γι αυτό στη συνέχεια, θέλοντας να εξακριβώσουμε αν τα αποτελέσματα της έκφρασης των αποαδενυλασών είναι ειδικά για το SCC, μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων αποαδενυλασών σε ασθενείς με νεοπλασίες του αίματος (οξείες λευχαιμίες), που αποτελούνται από διαλυτούς όγκους (non-solid tumors) και συγκρίναμε τα αποτελέσματα με αυτά του πλακώδους καρκινώματος που αποτελεί συμπαγή όγκο (solid tumor). Οι μελέτες έγιναν τόσο σε δείγματα από μυελό των οστών όσο και σε ορούς περιφερικού αίματος. Μελετήθηκαν τα επίπεδα mRNA των καταλυτικών υπομονάδων του συμπλόκου CCR4-NOT, CNOT6, CNOT6L και CNOT7, καθώς και της PARN σε δείγματα ασθενών με οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία (acute lymphoblastic leukemia, ALL) και οξεία μυελογενή λευχαιμία (acute myeloid leukemia, AML) με Real Time-PCR. Στην **Εικόνα 3.10** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της έκφρασης των αποαδενυλασών σε ALL και AML, ενώ στον **Πίνακα 3.3** οι μέσες τιμές, με την έκφραση της PARN να παρουσιάζει την μεγαλύτερη αύξηση σε σχέση με τα υγιή άτομα (άτομα που δεν συνδέονται με αιματολογικές κακοήθειες) (219,8%, $p < 0,001$) και την CNOT7 την μεγαλύτερη μείωση (62,5%, $p < 0,001$) (Maragozidis et al. 2012).

Εικόνα 3.10 Έκφραση των αποαδενυλασών σε ALL και AML. Τα επίπεδα mRNA των PARN (a), CNOT7 (b), CNOT6 (c) and CNOT6L (d) μετρήθηκαν με qRT-PCR σε AML και ALL και εκφράζονται ως ποσοστό της σχετικής έκφρασης σε σχέση με τις τιμές των μαρτύρων.

Ct = Δείγματα μαρτύρων. *** $p < 0,001$. (Maragozidis et al. 2012)



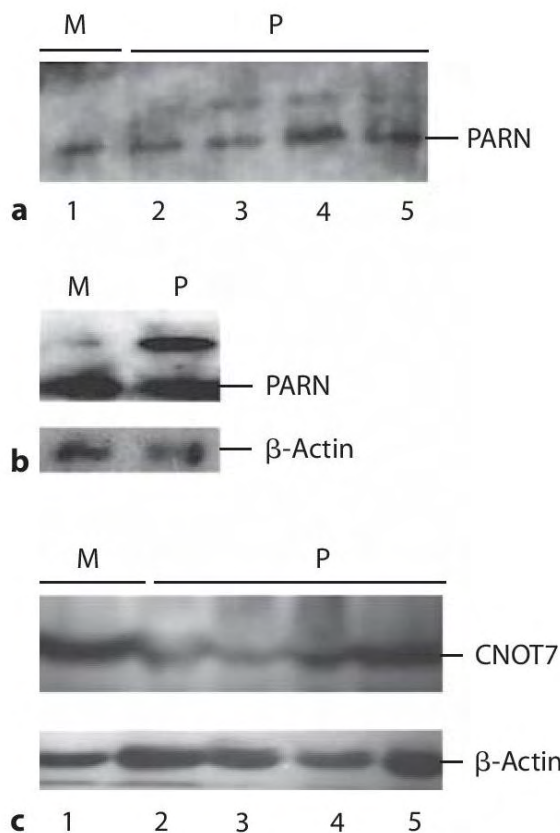
Πίνακας 3.3 Επίπεδα mRNA των CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και PARN σε AML και ALL σε σύγκριση με μη-παθολογικά δείγματα.

Αποαδενυλάσες	επίπεδα mRNA, μεταβολή % σε σχέση με μη-παθολογικά δείγματα			
	ALL		AML	
	μέση τιμή ± SD	<i>p</i>	μέση τιμή ± SD	<i>p</i>
PARN	219,8 ±22	<0,001	202,6 ±57	<0,001
CNOT6	116,25±24	<0,001	145,7±41	<0,001
CNOT6L	67,8±19	<0,001	85,5±29	<0,001
CNOT7	62,5±15	<0,001	71,2±21	<0,001

(Maragozidis et al. 2012)

Ανίχνευση PARN και CNOT7 σε δείγματα ασθενών με ALL με ανοσοαποτύπωση

Τα προηγούμενα αποτελέσματα έδειξαν πως η έκφραση των PARN και CNOT7 παρουσίασε τη μεγαλύτερη μεταβολή σε δείγματα ασθενών με ALL σε σύγκριση με μη-παθολογικά δείγματα. Για το λόγο αυτό εξετάστηκαν τα επίπεδά τους και σε πρωτεϊνικό επίπεδο με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (western blot). Στόχος ήταν να μελετηθεί αν οι μεταβολές των επιπέδων των επιπέδων mRNA αντικατοπτρίζονται και σε αυτά των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Σε κάθε δείγμα έγινε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford, ώστε να χρησιμοποιηθεί η ίδια ποσότητα πρωτεΐνης από κάθε δείγμα στην ηλεκτροφόρηση και να εξασφαλιστεί η εγκυρότητα της σύγκρισης της έντασης των ζωνών. Τα αποτελέσματα δείχνουν μειωμένα επίπεδα της CNOT7 και αυξημένα επίπεδα της PARN σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα όπως παρατηρείται και σε επίπεδο mRNA. Επίσης παρατηρείται η παρουσία πολλαπλών μορφών της PARN (**Εικόνα 3.11**) (Maragozidis et al. 2012).



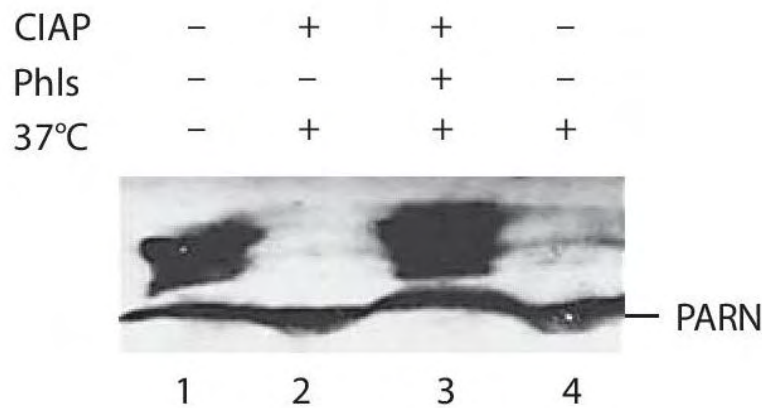
Εικόνα 3.11 Πρωτεϊνικά επίπεδα των PARN και CNOT7 στην ALL. Πρωτεϊνικά δείγματα από ορό (a) και μυελό των οστών (b) ασθενών με ALL και μαρτύρων διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE και ακολούθησε ανίχνευση των επιπέδων της PARN με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος. c Ανίχνευση των επιπέδων της CNOT7 σε ορό με Western blot με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος. Οι πειραματικές συνθήκες ήταν όμοιες με το b.

Η β-actin χρησιμοποιήθηκε σαν εσωτερικό control. M = Μάρτυρες, P = ασθενείς. (Maragozidis et al. 2012)

Η PARN εμφανίζει φωσφορυλιωμένες μορφές στην ALL

Τα προηγούμενα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία πολλαπλών μορφών της PARN σε δείγματα ασθενών με ALL σε αντίθεση με μη-παθολογικά δείγματα (**Εικόνα 3.11**). Δεδομένα της βιβλιογραφίας δείχνουν πως η PARN φωσφορυλιώνεται σε συνθήκες στέρησης ορού (Seal et al. 2005). Για να διερευνηθεί εάν οι επιπλέον μορφές που παρατηρούνται οφείλονται σε φωσφορυλίωση, τα δείγματα κατεργάστηκαν με αλκαλική φωσφατάση (CIAP). Έγινε η λήψη ίσων ποσοτήτων από δύο δείγματα, των οποίων έχει υπολογιστεί η συγκέντρωση σε πρωτεΐνη. Στην μία ποσότητα του δείγματος προστέθηκε αλκαλική φωσφατάση (CIAP) με επώαση των δειγμάτων για 1 ώρα στους 37°C. Παράλληλα ελέγχθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην

αποτελεσματικότητα της δράσης της φωσφατάσης, επωάζοντας τα δείγματα στους 37°C. Τέλος για να ελεγχθεί η πιθανή ύπαρξη ενδογενών φωσφατασών τα δείγματα επώαστηκαν στους 37°C για 1 ώρα, απουσία αναστολέων φωσφατασών (NaF, NaVO₃, Na₂MoO₄). Στην **Εικόνα 3.12** παρατηρείται ότι στα δείγματα που προστέθηκε αλκαλική φωσφατάση απουσιάζουν οι ζώνες που αντιστοιχούν σε μορφές μικρότερης κινητικότητας. Η χρήση αναστολέων φωσφατασών ήρε την απουσία αυτή. Η επώαση στους 37°C για 1 ώρα απουσία αναστολέων προκάλεσε ξανά την εξαφάνιση των μεγαλύτερων μορφών. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως οι μεγαλύτερης μοριακής μάζας μορφές της PARN που παρατηρούνται στα δείγματα των ασθενών οφείλονται πιθανόν σε φωσφορυλιωμένα παράγωγα του ενζύμου (Maragozidis et al. 2012).



Εικόνα 3.12 Η PARN είναι φωσφορυλιωμένη στην ALL. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα από δείγμα μυελού των οστών επώαστηκε στους 37°C για 1h παρουσία αλκαλικής φωσφατάσης (CIAP, 2,3) με απουσία ή παρουσία αναστολέων φωσφατασών (2,3 αντίστοιχα) και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε ανοσοαποτύπωση με τη χρήση αντισώματος έναντι της PARN.

PhIs, αναστολείς φωσφατασών. (Maragozidis et al. 2012)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η έκφραση των αποαδενυλασών είναι απορρυθμισμένη στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα

Η ρύθμιση της αποαδενυλίωσης, είναι πολύ σημαντική για το κύτταρο. Το κάθε μετάγραφο έχει συγκεκριμένο χρόνο ζωής που καθορίζεται από διάφορους παράγοντες εντός του κυττάρου. Τα σταθερά και ενεργά mRNAs προστατεύονται από την αποαδενυλίωση, ενώ τα ασταθή και ελαττωματικά mRNAs αποαδενυλιώνονται και αποικοδομούνται (C. Y. Chen and Shyu 2003; Lejeune et al. 2003). Μέχρι πρόσφατα η συσχέτιση των αποαδενυλασών με καρκινικούς όγκους, περιοριζόνταν σε δύο εξ' αυτών, τις αποαδενυλάσες PARN και CNOT6L και μόνο για συγκεκριμένα γονίδια (Kim and Lee 2009). Στην παρούσα μελέτη, προσδιορίστηκαν για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία τα επίπεδα των αποαδενυλασών σε παθολογικές καταστάσεις όπως είναι ο καρκίνος του πνεύμονα και η λευχαιμία.

Με υπολογιστική μεταγραφομική ανάλυση, που πραγματοποιήθηκε σε δεδομένα μικροσυστοιχιών, παρατηρήθηκε πως η έκφραση αρκετών αποαδενυλασών είναι διαφοροποιημένη στο SCC, όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 3.1**. Ως εκ τούτου, εξετάστηκε η έκφραση αυτών των αποαδενυλασών με συγκριτική ποσοτικοποίηση μεταξύ δειγμάτων SCC με μη-παθολογικό ιστό του κάθε ασθενή, και παρατηρήσαμε πως υπήρχαν ασθενείς που η έκφραση της κάθε αποαδενυλάσης ήταν είτε αυξημένη ή μειωμένη (**Εικόνα 3.2**). Η περαιτέρω ανάλυση αυτών των δεδομένων έδειξε πως η έκφραση των PARN και CNOT6 σχετίζεται με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, καθώς τα επίπεδα της PARN ήταν αυξημένα σε ασθενείς με ηλικία < 65 ($p = 0.03$) και η έκφραση της CNOT6 ήταν μειωμένη σε ασθενείς που εμφάνισαν μετάσταση ($p = 0,007$). Η τελευταία παρατήρηση θα μπορούσε να συνεπάγεται μια πιθανή προστατευτική δράση αυτού του ενζύμου από την διήθηση του καρκίνου του πνεύμονα και μπορεί να είναι μια ισχυρή ένδειξη της μη μετάστασης στο SCC (**Πίνακας 3.1**). Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα των PARN και NOC φαίνεται να σχετίζονται με την αυξημένη επιβίωση των ασθενών κατά 7,0 και 7,9 μήνες αντίστοιχα (**Εικόνα 3.3**). Οι παραπάνω παρατηρήσεις δείχνουν πως τα τρία αυτά ένζυμα, PARN, NOC και CNOT6, μπορούν να διερευνηθούν περαιτέρω ώστε να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη ως προγνωστικοί δείκτες.

Η έκφραση των αποαδενυλασών είναι απορρυθμισμένη στην οξεία λευχαιμία

Για να εξακριβώσουμε αν τα αποτελέσματα της έκφρασης των αποαδενυλασών είναι ειδικά για το SCC, εξετάσαμε τα επίπεδα των αποαδενυλασών και σε ένα διαφορετικό τύπο καρκίνου, την οξεία λευχαιμία. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως η έκφραση των αποαδενυλασών είναι απορρυθμισμένη και στην οξεία λευχαιμία (ALL και AML) τόσο σε επίπεδο mRNA (**Εικόνα 3.10**) αλλά και πρωτεϊνών (**Εικόνα 3.11**). Ωστόσο, το πρότυπο έκφρασής τους είναι εντελώς διαφορετικό από αυτό του SCC, κάτι που υπαινίσσεται διαφορετική δράση των αποαδενυλασών σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε πως ένα μέρος της PARN στα παθολογικά δείγματα είναι φωσφορυλιωμένο (**Εικόνα 3.12**). Είναι γνωστό πως η δραστηριότητα της PARN ρυθμίζεται με πολλούς τρόπους, μεταξύ των οποίων είναι η αλληλεπίδραση με το 5' κάλυμμα και παράγοντες που συνδέονται με αυτό, παράγοντες που προσδένονται στην πολυ(A) ουρά (π.χ. η PABP), καθώς και ομοιοπολικές τροποποιήσεις του ενζύμου όπως η φωσφορυλίωση. Γνωρίζουμε όμως ότι η φωσφορυλίωση κρίσιμων πρωτεϊνών είναι δυνατόν να μεταβάλλει τα επίπεδα της μετάφρασης (Mitchell and Tollervey 2000). Αυτή η αλλαγή, που ενδεχομένως οδηγεί στην διατάραξη φυσιολογικών λειτουργιών του κυττάρου, μπορεί να οδηγεί σε φαινότυπο διαφορετικό του φυσιολογικού. Σε κύτταρα U2OS, που απομονώθηκαν από οστεοσάρκωμα, βρέθηκε πως η PARN φωσφορυλιώνεται, αλλά σε αυτή την περίπτωση η φωσφορυλίωση παρεμπόδισε την αποικοδόμηση του mRNA του Gadd45α, το οποίο εμπλέκεται σε ένα σημείο έλεγχου σε καρκινικά κύτταρα (Lai et al. 2003). Έτσι με βάση τα παραπάνω, η PARN μπορεί να αποτελέσει έναν υποσχόμενο βιοδείκτη και για την οξεία λευχαιμία.

Συσχέτιση των αποαδενυλασών με άλλα νοσήματα του πνεύμονα

Τα τελευταία χρόνια γίνονται αρκετές αναφορές σε μελέτες που συσχετίζουν κάποια από τις αποαδενυλάσες με άλλα νοσήματα του πνεύμονα πέραν του καρκίνου, όπως προκύπτει από τη διεθνή βιβλιογραφία. Σε μία μελέτη με ασθενείς από τη Βραζιλία, οι Couto και συν. αναφέρουν πως υπάρχουν συγκεκριμένοι γενετικοί πολυμορφισμοί στα γονίδια των CCRN4L (αποαδενυλάση NOC) και PER3 (μιας

πρωτεΐνης που ελέγχεται από το κερκάδιο ρολόι) που αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την δημιουργία και ανάπτυξη μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC) (Couto et al. 2014). Σε μια άλλη μελέτη, όπου μελετήθηκαν οι μοριακοί μηχανισμοί της παθογένεσης του εμπυήματος, η έκφραση της αποαδενυλάσης CNOT6 βρέθηκε να αυξάνεται κατά 4 φορές σε μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα (pleural mesothelial cell line, PMC) κατά τις πρώτες στιγμές που αυτά έρχονται σε επαφή με τον στρεπτόκοκκο (*Streptococcus pneumoniae*, Spn) *in vitro* (Heath et al. 2015). Σε κύτταρα προέλευσης καρκίνου του παγκρέατος, η κανθαριδίνη (cantharidin) μπορεί να καταστείλει τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων μέσω της αναστολής της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP2 από τις αποαδενυλάσεις CNOT7 και PARN (Shen et al. 2015). Τέλος, μεταλλάξεις στο γονίδιο της PARN έχουν συνδεθεί με ασθένειες των τελομερών, συμπεριλαμβανομένων της οικογενούς ιδιοπαθούς κυστικής ίνωσης (familial idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) και της συγγενούς δυσκεράτωσης (dyskeratosis congenita) (Dhanraj et al. 2015; Moon et al. 2015; Stuart et al. 2015; Tummala et al. 2015). Όλες αυτές οι αναφορές αναδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο των αποαδενυλασών στη γονιδιακή έκφραση, τόσο στη φυσιολογική λειτουργία του κυτάρου, όσο και σε διάφορες άλλες παθολογικές καταστάσεις.

Η επίδραση των αποαδενυλασών στη γονιδιακή έκφραση

Στην παρούσα Διατριβή επιχειρήσαμε να μελετήσουμε τη βιολογική σημασία των αποαδενυλασών στον άνθρωπο μέσω των νοσημάτων του πνεύμονα, εστιάζοντας καταρχήν στον καρκίνο του πνεύμονα. Ωστόσο, υπάρχουν παλαιότερες αλλά και πρόσφατες εργασίες που έχουν μελετήσει το ρόλο αποαδενυλασών στην γονιδιακή έκφραση, που αφορά είτε στην έκφραση συγκεκριμένων παραγόντων και κυτταρικών διεργασιών, είτε σε διάφορες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ή σε ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στη συνέχεια, συνοψίζονται οι μελέτες αυτές.

PARN

Η επίδραση της PARN στην γονιδιακή έκφραση μελετήθηκε πρόσφατα από τον Lee και συν. σε μυοβλάστες ποντικού. Η αποσιώπηση της PARN οδήγησε στη σταθεροποίηση των επιπέδων έκφρασης 40 μεταγράφων, συμπεριλαμβανομένων

παραγόντων που απαιτούνται για την κυτταρική μετανάστευση και προσκόλληση (Lee et al. 2012). Στον καρκίνο του στομάχου, οι Zhang και Yan μελέτησαν την έκφραση της PARN σε δυο κυτταρικές σειρές, καθώς και σε δεδομένα από την βάση Oncomine. Η αποσιώπηση της PARN στις κυτταρικές σειρές προκάλεσε την αναστολή του πολλαπλασιασμού και διακοπή του κυτταρικού κύκλου μέσω του p21. Ωστόσο, η PARN επηρέασε την διήθηση και παρουσίασε διαφορετικά αποτελέσματα στην κυτταρική μετανάστευση σε σύγκριση με την προηγούμενη μελέτη στους μυοβλαστών ποντικού, που υπαινίσσεται ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιήσουν διαφορετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς κυτταρικής κίνησης στους μυοβλάστες ποντικού (Zhang and Yan 2014).

Στην παρούσα Διατριβή αποσιωπήσαμε την PARN στα NCI-H520 και HEP2 κύτταρα για να προσδιορίσουμε τις αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, που πιθανώς σχετίζονται με την διαφορετική έκφραση των ενζύμων που παρατηρήθηκε στα δείγματα SCC. Η ανάλυση των μικροσυστοιχιών αποκάλυψε την αυξορρύθμιση 233 μεταγράφων, τα οποία είναι πιθανοί στόχοι της PARN στο SCC, ενώ η ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού (functional enrichment analysis) αποκάλυψε τον εμπλουτισμό 36 γονιδιακών οντολογιών (Gene Ontologies, GOs), μεταξύ των οποίων οι *διεργασίες κυτταρικής διασύνδεσης και προσκόλλησης* (cell-cell junction and adhesion), *συγκρότησης και οργάνωσης συνάψεων* (synapse assembly and organization), και *διάφορες διεργασίες σχετιζόμενες με μύες* (muscle-related processes). Επιπλέον, η απορρύθμιση της *κυτταρικής διασύνδεσης και προσκόλλησης* εμπλέκεται στην διαδικασία της μη-κλασικής, παθολογικής επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (non-classical, pathological epithelial-mesenchymal transition, EMT), που οδηγεί σε ογκογόνο μετασχηματισμό και μετάσταση (Knights et al. 2012; Talbot et al. 2012). Αυτά τα ευρήματα θα μπορούσαν εν μέρει να ερμηνεύσουν τα αποτελέσματα από τις καμπύλες επιβίωσης, όπου η υπερέκφραση της PARN σχετίζεται με την παρατεταμένη επιβίωση των ασθενών. Για να διαπιστωθεί αν η PARN επηρεάζει συγκεκριμένα μονοπάτια στον SCC, αποσιωπήθηκε η έκφρασή της σε μια σειρά που δεν προέρχεται από καρκίνο του πνεύμονα (HEP2). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η PARN επηρέασε διαφορετικό πληθυσμό μεταγράφων σε σύγκριση με τα NCI-H520, υποδηλώνοντας πως η επίδραση είναι ειδική για το SCC (**Εικόνα 3.4**), ωστόσο εντοπίστηκαν και κάποια κοινά

μετάγραφα. Μεταξύ των κοινών μειορρυθμισμένων μεταγράφων είναι και το C4orf6 (Chromosome 4 Open Reading Frame 6, Expressed In Neuroblastoma), μια μη-χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη η οποία σχετίζεται με ένα ακόμα καρκίνο, το νευροβλάστωμα (Kito et al. 1997). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τα πειράματα γονιδιακής έκφρασης μετά από τις αποσιωπήσεις των αποαδενυλασών PARN, NOC, CNOT6, CNOT6L και CNOT7 στα κύτταρα NCI-H520, εντοπίσαμε 150 μετάγραφα που είναι πιθανοί αποκλειστικοί στόχοι της PARN (**Εικόνα 3.8**), ενώ η ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού ανέδειξε πως πιθανόν επηρεάζεται το μονοπάτι της *σηματοδότησης μέσω μεμβρανικών υποδοχέων* (transmembrane signaling receptor activity) (**Πίνακας 3.2**). Αυτά τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να αποτελέσουν αντικείμενο μελέτης μελλοντικής εργασίας για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της αποαδενυλίωσης στον καρκίνο του πνεύμονα. Λαμβάνοντας υπόψιν τις παρατηρήσεις μας στην οξεία λευχαιμία, στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα και στον καρκίνο του στομάχου, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η PARN επηρεάζει ένα διακριτό υποσύνολο των mRNAs στο SCC.

NOCTURNIN

Η Nocturnin (Ccrn4l, NOC) είναι μέλος της EEP υπεροικογένειας αποαδενυλασών, η οποία είναι συντηρημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και εκφράζεται σε αρκετούς ιστούς (Godwin et al. 2013; Goldstrohm and Wickens 2008). Η έκφραση της NOC καθοδηγείται από το βιολογικό ρολόι, ένα χαρακτηριστικό που τη διακρίνει από τις υπόλοιπες γνωστές αποαδενυλάσες. Λόγω της ρυθμικής έκφρασης, η NOC μπορεί να έχει κυτταρο-ειδικούς στόχους, αλλά ακόμη δεν έχουν ταυτοποιηθεί mRNAs που υπόκεινται σε αποαδενυλίωση από την NOC *in vivo*, ενώ έχει προταθεί ότι η NOC μπορεί να συμβάλλει στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης ανεξάρτητα από την δραστηριότητα αποαδενυλάσης (Godwin et al. 2013). Η αδρανοποίηση της NOC έχει συσχετιστεί με μειωμένη έκφραση λιπογενών γονιδίων, μειωμένη αποθήκευση λιπιδίων στον λιπώδη ιστό, μειωμένη συσσώρευση λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα, αυξημένη οξείδωση λιπιδίων σε σχέση με ποντίκια φυσικού τύπου, με μεταβολές στην ομοιόσταση της γλυκόζης και με ενίσχυση της οστεογένεσης (Green et al. 2007; Guntur et al. 2011). Η διακοπή ή απορρύθμιση του κερκάδιου ρολογιού συνδέεται με

υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου, ταχύτερη εξέλιξή του και μικρότερη επιβίωση (Hrushesky 1985; Mormont et al. 2000; Silberfarb et al. 1993; Viswanathan et al. 2007; Zhu et al. 2007). Αν και η συσχέτιση της NOC με παθολογικές καταστάσεις είναι περιορισμένη μέχρι στιγμής, γενετικοί πολυμορφισμοί (single nucleotide polymorphisms, SNPs) σε γονίδια που σχετίζονται με τον κερκάδιο ρυθμό θεωρείται ότι είτε προσδίδουν επιπλέον κίνδυνο ή προστασία από τον καρκίνο. Έτσι, τα γονίδια *Per1* και *Per2* θεωρούνται ογκοκατασταλτικά και συνδέονται με τον αριθμό των όγκων και τους ρυθμούς ανάπτυξης του καρκίνου (Wood et al. 2007), ενώ προβληματικοί κερκαδικοί ρυθμοί έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με προχωρημένο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Hrushesky et al. 2009).

Στην παρούσα μελέτη, η υπερέκφραση της NOC σχετίζεται με την αυξημένη επιβίωση στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα (μέσος όρος 13,8 μήνες έναντι 5,9 μήνες, $p = 0,003$), όπως παρατηρήθηκε και με την PARN (**Εικόνα 3.3**). Επιπλέον, η αποσιώπηση της NOC στα κύτταρα NCI-H520 οδήγησε στην αυξορρύθμιση 212 μεταγράφων τα οποία αποτελούν πιθανούς στόχους του ενζύμου στο SCC (**Πίνακας 4.15**). Η ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού φαίνεται να επιβεβαιώνει αυτό το σκεπτικό καθώς αποκάλυψε τον εμπλουτισμό γονιδιακών οντολογιών που σχετίζονται με τον μεταβολισμό και τον κερκάδιο ρυθμό (**Πίνακας 4.4 Παραρτήματος**). Η σύγκριση των απορρυθμισμένων μεταγράφων μεταξύ των δυο κυτταρικών σειρών, NCI-H520 και HEp2, εμφάνισε μόνο δυο κοινά μετάγραφα, υπονοώντας πως επηρεάζονται διαφορετικά μονοπάτια από την NOC στο SCC σε σύγκριση με άλλες κυτταρικές σειρές. Ένα από αυτά, το DPPA3 (Developmental Pluripotency Associated 3), έχει συσχετιστεί με όγκους γεννητικών κυττάρων (germ cell tumors) σε παλαιότερη μελέτη (Bowles et al. 2003). Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα από τα πειράματα γονιδιακής έκφρασης μετά από τις αποσιωπήσεις των αποαδενυλασών PARN, NOC, CNOT6, CNOT6L και CNOT7 στα κύτταρα NCI-H520, εντοπίσαμε 59 μετάγραφα που είναι πιθανοί αποκλειστικοί στόχοι της NOC (**Εικόνα 3.8**), ενώ η ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού ανέδειξε πως πιθανόν επηρεάζονται τρία μονοπάτια (**Πίνακας 3.2**).

Σύμπλοκο CCR4-NOT

Το σύμπλοκο CCR4-NOT είναι απαραίτητο για τα ευκαρυωτικά κύτταρα καθώς οι διαφορετικές υπομονάδες του συμμετέχουν σε πολλές και διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η ρύθμιση της μεταγραφής και η αποαδενυλίωση (Denis and Chen 2003). Πρόσφατες μελέτες πάνω στις αποαδενυλάσες του συμπλόκου CCR4-NOT έχουν δείξει πως α) οι υπομονάδες CNOT6 και CNOT6L του συμπλόκου επηρεάζουν την κυτταρική επιβίωση, αναστέλλουν την απόπτωση και επάγουν την έκφραση του p53, β) οι CNOT7 και CNOT8 επηρεάζουν τη συγκέντρωση των P-bodies και γ) οι CNOT6 και CNOT6L επηρεάζουν διαφορετικούς πληθυσμούς μεταγράφων από τις CNOT7 και CNOT8 (Aslam et al. 2009; Mittal et al. 2011). Ακόμη, η CNOT7 εμπλέκεται στην ρύθμιση της έκφρασης των ICAM (intercellular adhesion molecule-1) και IL-8 (interleukin-8) στα κύτταρα HPMEC (Pulmonary Microvascular Endothelial Cells), μόρια που παίζουν σημαντικό ρόλο στο οξύ αναπνευστικό σύνδρομο των ενηλίκων (acute respiratory distress syndrome, ARDS) (Shi et al. 2014). Η CNOT7 αλληλεπιδρά επίσης με τον μεταγραφικό παράγοντα STAT1 και ρυθμίζει αρνητικά το σηματοδοτικό μονοπάτι ιντερφερόνης (IFN)/STAT1, επηρεάζοντας διαφορετικά βήματα αυτού του μονοπατιού. Η αποσιώπηση της CNOT7 (σε κύτταρα MCF7, HeLa και U937) οδήγησε σε υπερενεργοποίηση (αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα) αρκετών γονιδίων που ελέγχονται από τον STAT1, σε καθυστερημένη κυτταρική ανάπτυξη και σε ενισχυμένη απάντηση από ιική μόλυνση (Charpat et al. 2013). Τέλος, η CNOT7 είναι κρίσιμη για την αποαδενυλίωση των μητρικών μεταγράφων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των οωκυττάρων του ποντικού (Ma et al. 2015).

Στην παρούσα εργασία, αποσιωπήσαμε την έκφραση των αποαδενυλασών του συμπλόκου CCR4-NOT σε κύτταρα NCI-H520 και HEp2 και ακολούθως εξετάσαμε την επίπτωση που έχουν στην γονιδιακή έκφραση με μικροσυστοιχίες. Η αποσιώπηση της κάθε αποαδενυλάσης είχε ως αποτέλεσμα την διαφορική έκφραση αρκετών μεταγράφων (**Πίνακας 4.15 Παραρτήματος**), ενώ πιθανότατα επηρεάζονται και αρκετές μοριακές λειτουργίες και βιολογικές διεργασίες όπως δείχνει η ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού (**Εικόνα 3.5** και **Εικόνα 3.7B**). Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα από τα πειράματα γονιδιακής έκφρασης μετά από τις αποσιωπήσεις των αποαδενυλασών PARN, NOC, CNOT6, CNOT6L και CNOT7 στα κύτταρα NCI-H520, εντοπίσαμε αρκετά

μετάγραφα που είναι πιθανοί αποκλειστικοί στόχοι της κάθε αποαδενυλάσης (**Εικόνα 3.8** και **Πίνακας 4.15 Παραρτήματος**), ενώ η ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού ανέδειξε συγκεκριμένες GOs που δεν είχαν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες (**Πίνακας 3.2**). Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες αναφορές που υποστηρίζουν ότι η CNOT6 και η CNOT6L αντισταθμίζουν η μια τη λειτουργία της άλλης σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων, όπως επίσης η CNOT7 και η CNOT8 σε μικρότερο βαθμό. Επίσης οι αποαδενυλάσες CNOT6 και CNOT7 πιθανόν έχουν αρκετά κοινά μετάγραφα στόχους στα κύτταρα NCI-H520, MCF7 και HEP2 και ελέγχουν κοινές μοριακές λειτουργίες και βιολογικές διεργασίες, επηρεάζουν όμως διαφορετικούς πληθυσμούς mRNA σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, υποδηλώνοντας ένα διακριτό ρόλο για κάθε ένζυμο σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων.

Συμπερασματικά

Η έκφραση των αποαδενυλασών μεταβάλλεται τόσο σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα αλλά και με οξεία λευχαιμία. Τα επίπεδα των PARN, CNOT6 και NOC συσχετίζονται με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και με την πρόγνωση των ασθενών στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα, γεγονός που τις καθιστά παράγοντες προς περαιτέρω διερεύνηση ώστε να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη ως προγνωστικοί δείκτες. Τα τελευταία χρόνια γίνονται ολοένα και περισσότερες αναφορές σε μελέτες που συσχετίζουν κάποια από τις αποαδενυλάσες με άλλες παθολογικές καταστάσεις και άλλα νοσήματα του πνεύμονα. Σε μοριακό επίπεδο, η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης έπειτα από αποσιώπηση της κάθε αποαδενυλάσης έδειξε πως υπάρχουν συγκεκριμένα μετάγραφα και μονοπάτια που είναι πιθανοί στόχοι μόνο μιας αποαδενυλάσης, ενώ τα περισσότερα ελέγχονται από περισσότερα ένζυμα λόγω αντισταθμιστικής δράσης των αποαδενυλασών. Αν και ο μηχανισμός δράσης των αποαδενυλασών παραμένει μια σημαντική πρόκληση, είναι όλο και πιο σαφές ότι οι διάφορες αποαδενυλάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες ρυθμίζοντας τη σταθερότητα και το χρόνο ζωής των mRNAs.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 4.1 Αυξορρυθμισμένα μετάγραφα μετά από αποσιώπηση της PARN σε κύτταρα NCI-H520.

βλ. Maragozidis et al. 2015 Table S1

Πίνακας 4.2 Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού των μεταγράφων που αυξορρυθμίστηκαν έπειτα από αποσιώπηση της PARN σε κύτταρα NCI-H520.

Function	FDR	Coverage
query genes	n/a	233 / 233
<i>calcium-dependent cell-cell adhesion</i>	1.17E-12	12 / 20
<i>cell junction assembly</i>	5.36E-9	21 / 164
<i>cell junction organization</i>	5.36E-9	22 / 181
<i>adherens junction organization</i>	2.51E-6	13 / 76
<i>cell-cell adhesion</i>	1.45E-5	21 / 256
<i>cell-cell junction organization</i>	2.22E-5	16 / 150
<i>blood microparticle</i>	1.18E-4	13 / 108
<i>synapse assembly</i>	7.63E-4	9 / 54
<i>hemidesmosome assembly</i>	2.24E-3	5 / 12
<i>platelet degranulation</i>	2.46E-3	10 / 82
<i>synapse organization</i>	2.46E-3	10 / 82
<i>cardiac muscle tissue morphogenesis</i>	4.58E-3	7 / 38
<i>muscle filament sliding</i>	4.58E-3	7 / 38
<i>actin-myosin filament sliding</i>	4.58E-3	7 / 38
<i>muscle tissue morphogenesis</i>	5.74E-3	7 / 40
<i>muscle organ morphogenesis</i>	5.74E-3	7 / 40
<i>platelet alpha granule</i>	1.06E-2	8 / 61
<i>actin-mediated cell contraction</i>	1.55E-2	7 / 47
<i>platelet alpha granule lumen</i>	1.7E-2	7 / 48
<i>muscle system process</i>	1.76E-2	14 / 211
<i>muscle contraction</i>	2.15E-2	13 / 188
<i>I band</i>	3.23E-2	7 / 54
<i>myofibril</i>	4.95E-2	9 / 102
<i>structural constituent of muscle</i>	4.95E-2	6 / 41
<i>actin filament-based movement</i>	4.95E-2	7 / 59
<i>contractile fiber part</i>	4.95E-2	9 / 102
<i>secretory granule lumen</i>	6.5E-2	7 / 62
<i>exocytosis</i>	7.2E-2	12 / 191
<i>cardiac muscle tissue development</i>	7.2E-2	8 / 85

<i>ventricular cardiac muscle tissue morphogenesis</i>	7.2E-2	5 / 29
<i>ventricular cardiac muscle tissue development</i>	7.2E-2	5 / 29
<i>Z disc</i>	7.2E-2	6 / 45
<i>sarcomere</i>	7.2E-2	8 / 86
<i>contractile fiber</i>	7.75E-2	9 / 112
<i>striated muscle tissue development</i>	9.7E-2	10 / 142
<i>cell-substrate junction assembly</i>	9.91E-2	6 / 49

*FDR: false discovery rate

Πίνακας 4.3 Αυξορρυθμισμένα μετάγραφα μετά από αποσιώπηση της NOC σε κύτταρα NCI-H520.

βλ. Maragozidis et al. 2015 Table S3

Πίνακας 4.4 Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού των μεταγράφων που αυξορρυθμίστηκαν έπειτα από αποσιώπηση της NOC σε κύτταρα NCI-H520.

Function	FDR	Coverage
query genes	n/a	212 / 212
<i>triglyceride-rich lipoprotein particle remodeling</i>	8.26E-7	7 / 11
<i>very-low-density lipoprotein particle remodeling</i>	8.26E-7	7 / 11
<i>triglyceride-rich lipoprotein particle</i>	7.62E-6	7 / 15
<i>very-low-density lipoprotein particle</i>	7.62E-6	7 / 15
<i>reverse cholesterol transport</i>	1.07E-5	7 / 16
<i>protein activation cascade</i>	1.11E-5	11 / 61
<i>high-density lipoprotein particle</i>	1.28E-5	7 / 17
<i>cholesterol homeostasis</i>	1.34E-5	10 / 50
<i>sterol homeostasis</i>	1.34E-5	10 / 50
<i>plasma lipoprotein particle organization</i>	2.68E-5	8 / 29
<i>protein-lipid complex subunit organization</i>	3.27E-5	8 / 30
<i>plasma lipoprotein particle</i>	5.46E-5	7 / 22
<i>plasma lipoprotein particle assembly</i>	5.46E-5	6 / 14
<i>detection of stimulus</i>	5.46E-5	18 / 230
<i>plasma lipoprotein particle remodeling</i>	5.46E-5	7 / 23
<i>protein-lipid complex remodeling</i>	5.46E-5	7 / 23
<i>macromolecular complex remodeling</i>	5.46E-5	7 / 23
<i>protein-lipid complex</i>	5.46E-5	7 / 23
<i>cholesterol efflux</i>	5.46E-5	8 / 33
<i>protein-lipid complex assembly</i>	7.37E-5	6 / 15
<i>lipid homeostasis</i>	1.67E-4	10 / 70
<i>humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin</i>	2.24E-4	5 / 10
<i>sterol transporter activity</i>	3.87E-4	5 / 11
<i>detection of abiotic stimulus</i>	5.64E-4	12 / 122
<i>phospholipid transport</i>	9.64E-4	7 / 35
<i>blood microparticle</i>	1.07E-3	11 / 108
<i>alcohol binding</i>	1.08E-3	8 / 51
<i>high-density lipoprotein particle remodeling</i>	1.32E-3	5 / 14

<i>regulation of plasma lipoprotein particle levels</i>	1.4E-3	7 / 38
<i>muscle filament sliding</i>	1.4E-3	7 / 38
<i>actin-myosin filament sliding</i>	1.4E-3	7 / 38
<i>cholesterol transport</i>	1.6E-3	8 / 55
<i>sterol transport</i>	1.6E-3	8 / 55
<i>lipid localization</i>	1.92E-3	11 / 118
<i>detection of external stimulus</i>	1.92E-3	11 / 118
<i>quaternary ammonium group binding</i>	2.19E-3	5 / 16
<i>actin filament-based movement</i>	2.45E-3	8 / 59
<i>lipoprotein particle receptor binding</i>	2.82E-3	5 / 17
<i>positive regulation of steroid metabolic process</i>	2.82E-3	5 / 17
<i>actin-mediated cell contraction</i>	4.77E-3	7 / 47
<i>regulation of triglyceride metabolic process</i>	4.91E-3	5 / 19
<i>phototransduction, visible light</i>	5.34E-3	9 / 87
<i>regulation of lipid catabolic process</i>	5.8E-3	6 / 33
<i>cholesterol transporter activity</i>	5.8E-3	4 / 10
<i>cholesterol metabolic process</i>	6.6E-3	8 / 69
<i>blood coagulation, fibrin clot formation</i>	7.46E-3	5 / 21
<i>organophosphate ester transport</i>	8.06E-3	7 / 52
<i>detection of visible light</i>	8.78E-3	9 / 94
<i>immunoglobulin mediated immune response</i>	8.79E-3	6 / 36
<i>sequence-specific DNA binding RNA polymerase II transcription factor activity</i>	8.91E-3	13 / 199
<i>phototransduction</i>	1.05E-2	9 / 97
<i>lipid transport</i>	1.05E-2	11 / 147
<i>steroid esterification</i>	1.06E-2	4 / 12
<i>sterol esterification</i>	1.06E-2	4 / 12
<i>cholesterol esterification</i>	1.06E-2	4 / 12
<i>B cell mediated immunity</i>	1.06E-2	6 / 38
<i>neutral lipid catabolic process</i>	1.19E-2	5 / 24
<i>acylglycerol catabolic process</i>	1.19E-2	5 / 24
<i>organic hydroxy compound transport</i>	1.27E-2	9 / 101
<i>muscle system process</i>	1.35E-2	13 / 211

<i>detection of light stimulus</i>	1.35E-2	9 / 102
<i>sterol metabolic process</i>	1.42E-2	8 / 80
<i>muscle contraction</i>	1.82E-2	12 / 188
<i>regulation of sterol transport</i>	1.91E-2	5 / 27
<i>complement activation</i>	1.91E-2	6 / 43
<i>regulation of cholesterol transport</i>	1.91E-2	5 / 27
<i>plasma lipoprotein particle clearance</i>	2.26E-2	5 / 28
<i>lipid transporter activity</i>	2.34E-2	6 / 45
<i>endoplasmic reticulum lumen</i>	2.71E-2	10 / 140
<i>skeletal muscle contraction</i>	2.85E-2	4 / 16
<i>positive regulation of lipid catabolic process</i>	2.85E-2	4 / 16
<i>adenylate cyclase-modulating G-protein coupled receptor signaling pathway</i>	2.85E-2	8 / 90
<i>cholesterol binding</i>	2.92E-2	5 / 30
<i>rhythmic process</i>	3.26E-2	7 / 69
<i>retinoid metabolic process</i>	3.53E-2	7 / 70
<i>glycerolipid catabolic process</i>	3.86E-2	5 / 32
<i>diterpenoid metabolic process</i>	4.11E-2	7 / 72
<i>response to light stimulus</i>	4.21E-2	12 / 210
<i>G-protein coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second messenger</i>	4.88E-2	9 / 125
<i>sterol binding</i>	4.88E-2	5 / 34
<i>endocrine pancreas development</i>	4.88E-2	5 / 34
<i>regulation of transmembrane transport</i>	5.03E-2	9 / 126
<i>peptidyl-glutamic acid modification</i>	5.03E-2	4 / 19
<i>steroid binding</i>	5.32E-2	6 / 54
<i>regulation of lipid transport</i>	5.82E-2	6 / 55
<i>terpenoid metabolic process</i>	5.94E-2	7 / 78
<i>positive regulation of lipid metabolic process</i>	5.94E-2	7 / 78
<i>regulation of fatty acid biosynthetic process</i>	5.94E-2	4 / 20
<i>protein heterodimerization activity</i>	6.12E-2	11 / 190
<i>regulation of lipid biosynthetic process</i>	6.21E-2	7 / 79
<i>triglyceride metabolic process</i>	6.21E-2	7 / 79

<i>actomyosin structure organization</i>	6.47E-2	5 / 37
<i>sensory perception of chemical stimulus</i>	6.55E-2	7 / 80
<i>regulation of lipid metabolic process</i>	6.55E-2	10 / 162
<i>steroid metabolic process</i>	7.48E-2	11 / 196
<i>regulation of glutamate receptor signaling pathway</i>	7.5E-2	4 / 22
<i>regulation of Cdc42 protein signal transduction</i>	7.5E-2	4 / 22
<i>triglyceride homeostasis</i>	7.5E-2	4 / 22
<i>triglyceride catabolic process</i>	7.5E-2	4 / 22
<i>ionotropic glutamate receptor complex</i>	7.5E-2	4 / 22
<i>glycoprotein binding</i>	7.5E-2	5 / 39
<i>acylglycerol homeostasis</i>	7.5E-2	4 / 22
<i>phospholipid binding</i>	7.72E-2	11 / 199
<i>detection of chemical stimulus involved in sensory perception</i>	7.72E-2	6 / 60
<i>negative regulation of cell differentiation</i>	7.72E-2	13 / 266
<i>transcription regulatory region DNA binding</i>	7.72E-2	13 / 266
<i>regulatory region DNA binding</i>	7.85E-2	13 / 267
<i>regulatory region nucleic acid binding</i>	7.85E-2	13 / 267
<i>acylglycerol metabolic process</i>	8.01E-2	7 / 85
<i>neutral lipid metabolic process</i>	8.01E-2	7 / 85
<i>negative regulation of cholesterol transport</i>	8.01E-2	3 / 10
<i>negative regulation of sterol transport</i>	8.01E-2	3 / 10
<i>sensory perception</i>	8.11E-2	12 / 235
<i>sensory perception of smell</i>	8.43E-2	5 / 41
<i>structural constituent of muscle</i>	8.43E-2	5 / 41
<i>endocrine system development</i>	8.98E-2	6 / 63
<i>circadian rhythm</i>	9.29E-2	5 / 42
<i>lipoprotein metabolic process</i>	9.93E-2	7 / 89

*FDR: false discovery rate

Πίνακας 4.5 Κοινά αυξο- και μειορρυθμισμένα μετάγραφα έπειτα από αποσιώπηση της PARN και της NOC σε κύτταρα NCI-H520 και HEP2.

<i>Common upregulated transcripts after PARN silencing</i>	
PTGIR	Prostaglandin I2 Receptor
FGFBP2	Fibroblast Growth Factor Binding Protein
AATK	apoptosis-associated tyrosine kinase
CTSO	Cathepsin O
<i>Common downregulated transcripts after PARN silencing</i>	
BPESC1	Blepharophimosis, Epicanthus Inversus And Ptosis, Candidate 1 (Non-Protein Coding)
GRID1	Glutamate Receptor, Ionotropic, Delta 1
CLEC5A	C-Type Lectin Domain Family 5, Member A
C4orf6	Chromosome 4 Open Reading Frame 6, Expressed In Neuroblastoma, Uncharacterized Protein C4orf6
ANKRD60	Ankyrin Repeat Domain 60
CHRNA9	Cholinergic Receptor, Nicotinic, Alpha 9 (Neuronal)
OR6Y1	Olfactory Receptor, Family 6, Subfamily Y, Member 1
TMPRSS11B	Transmembrane Protease, Serine 11B
SLC14A1	Solute Carrier Family 14 (Urea Transporter), Member 1 (Kidd Blood Group)
SUSD4	Sushi Domain Containing 4
SPATA9	Spermatogenesis Associated 9
C14orf23	Chromosome 14 Open Reading Frame 23
TMEM229B	Transmembrane Protein 229B
EFCAB1	EF-Hand Calcium Binding Domain 1
GPR65	G Protein-Coupled Receptor 65
<i>Common upregulated transcript after NOC silencing</i>	
DPPA3	Developmental Pluripotency Associated 3
<i>Common downregulated transcript after NOC silencing</i>	
GUCA1B	Guanylate Cyclase Activator 1B (Retina)

Πίνακας 4.6 Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού των μεταγράφων που αυξορρυθμίστηκαν και στις δυο κυτταρικές σειρές NCI-H520 και HEP2 έπειτα από αποσιώπηση της PARN.

Function	FDR	Coverage
query genes	n/a	4 / 4
<i>G-protein coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second messenger</i>	4.48E-24	22 / 116
<i>adenylate cyclase-modulating G-protein coupled receptor signaling pathway</i>	4,03E-21	18 / 77
<i>G-protein beta/gamma-subunit complex binding</i>	4,17E-13	9 / 17
<i>regulation of nucleotide metabolic process</i>	3,37E-12	19 / 284
<i>regulation of purine nucleotide metabolic process</i>	3,37E-12	19 / 281
<i>heterotrimeric G-protein complex</i>	6,83E-12	9 / 23
<i>extrinsic to internal side of plasma membrane</i>	8,52E-12	10 / 36
<i>extrinsic to plasma membrane</i>	2,42E-11	11 / 57
<i>regulation of cyclic nucleotide biosynthetic process</i>	1.1E-9	11 / 80
<i>extrinsic to membrane</i>	1.14E-9	11 / 81
<i>internal side of plasma membrane</i>	1.16E-9	11 / 83
<i>regulation of nucleotide biosynthetic process</i>	1.16E-9	11 / 83
<i>regulation of purine nucleotide biosynthetic process</i>	1.16E-9	11 / 83
<i>regulation of cyclic nucleotide metabolic process</i>	1.23E-9	11 / 84
<i>regulation of adenylate cyclase activity</i>	3.84E-9	9 / 47
<i>cyclic purine nucleotide metabolic process</i>	3.84E-9	11 / 94
<i>cyclic nucleotide biosynthetic process</i>	4.07E-9	11 / 95
<i>regulation of cyclase activity</i>	7.48E-9	9 / 51
<i>regulation of cAMP biosynthetic process</i>	7.49E-9	10 / 74
<i>regulation of cAMP metabolic process</i>	8.17E-9	10 / 75

*FDR: false discovery rate

Πίνακας 4.7 Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού των μεταγράφων που μειορρυθμίστηκαν και στις δυο κυτταρικές σειρές NCI-H520 και HEp2 έπειτα από αποσιώπηση της PARN.

Function	FDR	Coverage
query genes	n/a	14 / 14
<i>glutamate receptor signaling pathway</i>	5.21E-13	12 / 46
<i>neuron part</i>	9.06E-10	17 / 251
<i>neuron projection</i>	1.06E-9	16 / 219
<i>ionotropic glutamate receptor complex</i>	1.47E-9	8 / 22
<i>regulation of excitatory postsynaptic membrane potential</i>	9.99E-7	6 / 16
<i>regulation of postsynaptic membrane potential</i>	1.76E-6	6 / 18
<i>protein localization to membrane</i>	1.76E-6	9 / 77
<i>positive regulation of excitatory postsynaptic membrane potential</i>	6.61E-6	5 / 11
<i>receptor complex</i>	8.08E-6	10 / 128
<i>dendritic spine</i>	1.24E-5	7 / 45
<i>neuron spine</i>	1.24E-5	7 / 45
<i>synapse</i>	1.26E-5	10 / 138
<i>positive regulation of membrane potential</i>	1.74E-5	5 / 14
<i>dendrite</i>	2.53E-5	9 / 112
<i>PDZ domain binding</i>	2.59E-5	7 / 52
<i>Wnt-activated receptor activity</i>	7.73E-5	5 / 19
<i>synaptic membrane</i>	7.73E-5	6 / 37
<i>cell projection part</i>	1.03E-4	12 / 283
<i>synapse part</i>	1.23E-4	8 / 100
<i>Wnt-protein binding</i>	1.82E-4	5 / 23

*FDR: false discovery rate

Πίνακας 4.8 Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού των μεταγράφων που μειορρυθμίστηκαν και στις δυο κυτταρικές σειρές NCI-H520 και HEp2 έπειτα από αποσιώπηση της NOC.

Function	FDR	Coverage
query genes	n/a	1 / 1
<i>pigment granule</i>	7.3E-4	3 / 16
<i>melanosome</i>	7.3E-4	3 / 16
<i>regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway</i>	3.4E-2	3 / 63
<i>secondary metabolic process</i>	2.84E-1	2 / 22
<i>aromatic amino acid family metabolic process</i>	2.84E-1	2 / 23
<i>pigment biosynthetic process</i>	3.8E-1	2 / 29
<i>copper ion binding</i>	4.76E-1	2 / 35
<i>pigment metabolic process</i>	5.45E-1	2 / 40

*FDR: false discovery rate

Πίνακας 4.9 Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού των διαφορετικά εκφραζόμενων μεταγράφων έπειτα από αποσιώπηση της CNOT6 σε κύτταρα NCI-H520.

Gene Ontology Term (overexpressed transcripts)		Category, level	Set size	Candidates contained	p-value	q-value
GO:0098742	cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules	BP 4	218	25 (11.5%)	6.13e-13	3.11e-10
GO:0050907	detection of chemical stimulus involved in sensory perception	BP 4	470	32 (6.8%)	4.28e-10	1.09e-07
GO:0051606	detection of stimulus	BP 2	744	41 (5.5%)	8.48e-10	6.36e-08
GO:0050906	detection of stimulus involved in sensory perception	BP 3	522	33 (6.3%)	1.5e-09	4.6e-07
GO:0009593	detection of chemical stimulus	BP 3	509	32 (6.3%)	3.08e-09	4.73e-07
GO:0050877	neurological system process	BP 4	1323	57 (4.3%)	3.97e-09	6.73e-07
GO:0003008	system process	BP 3	1962	73 (3.7%)	1.05e-08	1.08e-06
GO:0007155	cell adhesion	BP 2	1421	56 (4.0%)	1.17e-07	4.38e-06
GO:0098609	cell-cell adhesion	BP 3	869	40 (4.6%)	1.91e-07	1.47e-05
GO:0044707	single-multicellular organism process	BP 2	6658	172 (2.6%)	2.6e-07	6.51e-06
GO:0004888	transmembrane signaling receptor activity	MF 4	1272	50 (4.0%)	6.12e-07	4.53e-05
GO:0004872	receptor activity	MF 2	1583	57 (3.6%)	1.56e-06	4.98e-05
GO:0038023	signaling receptor activity	MF 3	1372	50 (3.7%)	5.38e-06	0.000344
GO:0004447	iodide peroxidase activity	MF 3	2	2 (100.0%)	0.000358	0.0115
GO:0030414	peptidase inhibitor activity	MF 4	181	11 (6.1%)	0.000635	0.0235
GO:0004871	signal transducer activity	MF 2	1663	50 (3.0%)	0.000659	0.0105
GO:0008037	cell recognition	BP 3	129	9 (7.0%)	0.000797	0.0447
GO:0009566	fertilization	BP 3	159	10 (6.3%)	0.000929	0.0447
GO:0045123	cellular extravasation	BP 3	41	5 (12.2%)	0.00102	0.0447
GO:0050900	leukocyte migration	BP 2	351	16 (4.6%)	0.00112	0.0209
Gene Ontology Term (underexpressed transcripts)						
Gene Ontology Term (underexpressed transcripts)		Category, level	Set size	Candidates contained	p-value	q-value
GO:0007268	synaptic transmission	BP 4	729	8 (1.1%)	7.2e-05	0.00597
GO:0015075	ion transmembrane transporter activity	MF 4	828	6 (0.7%)	0.00529	0.037

Πίνακας 4.10 Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού των διαφορεικά εκφραζόμενων μεταγράφων έπειτα από αποσιώπηση της CNOT7 σε κύτταρα NCI-H520.

Gene Ontology Term (overexpressed transcripts)		Category, level	Set size	Candidates contained	p-value	q-value
GO:0050907	detection of chemical stimulus involved in sensory perception	BP 4	470	23 (4.9%)	6.52e-09	2.17e-06
GO:0050906	detection of stimulus involved in sensory perception	BP 3	522	24 (4.6%)	1.01e-08	2.16e-06
GO:0009593	detection of chemical stimulus	BP 3	509	23 (4.5%)	2.87e-08	3.08e-06
GO:0050877	neurological system process	BP 4	1323	39 (3.0%)	5.87e-08	9.77e-06
GO:0038023	signaling receptor activity	MF 3	1372	39 (2.9%)	1.41e-07	8.06e-06
GO:0051606	detection of stimulus	BP 2	744	27 (3.6%)	1.54e-07	9.68e-06
GO:0004888	transmembrane signaling receptor activity	MF 4	1272	37 (2.9%)	1.75e-07	1.02e-05
GO:0004872	receptor activity	MF 2	1583	40 (2.5%)	1.97e-06	6.9e-05
GO:0003008	system process	BP 3	1962	46 (2.4%)	2.44e-06	0.000174
GO:0004871	signal transducer activity	MF 2	1663	39 (2.4%)	1.56e-05	0.000272
GO:0004447	iodide peroxidase activity	MF 3	2	2 (100.0%)	0.000134	0.00383
GO:0098742	cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules	BP 4	218	10 (4.6%)	0.000243	0.0269
GO:0030414	peptidase inhibitor activity	MF 4	181	9 (5.0%)	0.000252	0.00732
GO:0071688	striated muscle myosin thick filament assembly	BP 4	3	2 (66.7%)	0.0004	0.0333
GO:0061134	peptidase regulator activity	MF 3	216	9 (4.2%)	0.00092	0.0175
GO:0031433	telethonin binding	MF 4	5	2 (40.0%)	0.00131	0.0254
GO:0044707	single-multicellular organism process	BP 2	6658	99 (1.5%)	0.00135	0.0425
Gene Ontology Term (underexpressed transcripts)						
GO:0002683	negative regulation of immune system process	BP 4	369	8 (2.2%)	0.000221	0.0432

Πίνακας 4.11 Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού των διαφορετικά εκφραζόμενων μεταγράφων έπειτα από αποσίωψη της CNOT6 σε κύτταρα HEp2.

Gene Ontology Term (underexpressed transcripts)		Category, level	Set size	Candidates contained	p-value	q-value
GO:0045087	innate immune response	BP 3	1036	25 (2.4%)	9.92e-06	0.00267
GO:0006955	immune response	BP 2	1569	31 (2.0%)	4.02e-05	0.00293
GO:0009888	tissue development	BP 3	1781	33 (1.9%)	8.15e-05	0.011
GO:0048731	system development	BP 3	4205	60 (1.4%)	0.000156	0.014
GO:0042097	interleukin-4 biosynthetic process	BP 3	3	2 (66.7%)	0.000254	0.0171
GO:0048856	anatomical structure development	BP 2	5056	68 (1.3%)	0.000277	0.0101
GO:0007275	multicellular organismal development	BP 3	4759	64 (1.3%)	0.000482	0.0252
GO:0070887	cellular response to chemical stimulus	BP 3	2572	40 (1.6%)	0.000563	0.0252
GO:0048144	fibroblast proliferation	BP 3	84	5 (6.0%)	0.0011	0.0398
GO:0048869	cellular developmental process	BP 3	3957	54 (1.4%)	0.00118	0.0398
GO:0048513	organ development	BP 3	3050	44 (1.4%)	0.00134	0.0399
GO:0007155	cell adhesion	BP 2	1421	25 (1.8%)	0.00138	0.0261
GO:0044707	single-multicellular organism process	BP 2	6658	81 (1.2%)	0.00143	0.0261
GO:0044767	single-organism developmental process	BP 2	5607	69 (1.2%)	0.00323	0.0471

Πίνακας 4.12 Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού των διαφορεικά εκφραζόμενων μεταγράφων έπειτα από αποσιώπηση της CNOT7 σε κύτταρα HEp2.

Gene Ontology Term (overexpressed transcripts)		Category, level	Set size	Candidates contained	p-value	q-value
GO:0007626	locomotory behavior	BP 2	201	11 (5.5%)	0.000122	0.00856
Gene Ontology Term (underexpressed transcripts)		Category, level	Set size	Candidates contained	p-value	q-value
GO:0048678	response to axon injury	BP 4	61	5 (8.2%)	0.000191	0.0534
GO:0072678	T cell migration	BP 4	37	4 (10.8%)	0.000295	0.0534
GO:0001948	glycoprotein binding	MF 3	94	5 (5.3%)	0.0014	0.0427
GO:0008201	heparin binding	MF 3	149	6 (4.0%)	0.00199	0.0427

Πίνακας 4.13 Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού των διαφορεικά εκφραζόμενων μεταγράφων έπειτα από αποσιώπηση της CNOT6L σε κύτταρα NCI-H520.

Gene Ontology Term (overexpressed transcripts)		Category, level	Set size	Candidates contained	p-value	q-value
GO:0050906	detection of stimulus involved in sensory perception	BP 3	522	27 (5.2%)	1.56e-10	3.95e-08
GO:0051606	detection of stimulus	BP 2	744	32 (4.3%)	3,00E-10	1.92e-08
GO:0050907	detection of chemical stimulus involved in sensory perception	BP 4	470	25 (5.3%)	4.36e-10	1.66e-07
GO:0009593	detection of chemical stimulus	BP 3	509	25 (4.9%)	2.25e-09	2.86e-07
GO:0050877	neurological system process	BP 4	1323	40 (3.0%)	4.21e-08	8.02e-06
GO:0004888	transmembrane signaling receptor activity	MF 4	1272	38 (3.0%)	1.22e-07	7.07e-06
GO:0038023	signaling receptor activity	MF 3	1372	38 (2.8%)	8.19e-07	4.42e-05
GO:0003008	system process	BP 3	1962	48 (2.5%)	9.37e-07	7.93e-05
GO:0004872	receptor activity	MF 2	1583	40 (2.5%)	3.98e-06	0.000127
GO:0004871	signal transducer activity	MF 2	1663	39 (2.4%)	2.96e-05	0.000473
GO:0004447	iodide peroxidase activity	MF 3	2	2 (100.0%)	0.000142	0.00383
GO:0044700	single organism signaling	BP 2	6125	99 (1.6%)	0.000159	0.00508
GO:0007154	cell communication	BP 3	6343	100 (1.6%)	0.000395	0.0251
GO:0044707	single-multicellular organism process	BP 2	6658	103 (1.6%)	0.000649	0.0139
Gene Ontology Term (underexpressed transcripts)		Category, level	Set size	Candidates contained	p-value	q-value
GO:0055085	transmembrane transport	BP 3	1336	15 (1.1%)	0.000167	0.0237
GO:0034220	ion transmembrane transport	BP 4	970	12 (1.2%)	0.000344	0.0436
GO:0007268	synaptic transmission	BP 4	729	10 (1.4%)	0.000509	0.0436
GO:0006811	ion transport	BP 4	1537	15 (1.0%)	0.000739	0.0436
GO:0022838	substrate-specific channel activity	MF 4	410	7 (1.7%)	0.00108	0.0207

GO:0022803	passive transmembrane transporter activity	MF 3	433	7 (1.6%)	0.00148	0.036
GO:0015267	channel activity	MF 4	433	7 (1.6%)	0.00148	0.0207
GO:0022891	substrate-specific transmembrane transporter activity	MF 3	895	10 (1.1%)	0.0024	0.036
GO:0022892	substrate-specific transporter activity	MF 2	1055	11 (1.0%)	0.00249	0.0413
GO:0042166	acetylcholine binding	MF 3	25	2 (8.0%)	0.00427	0.0373
GO:0022857	transmembrane transporter activity	MF 2	975	10 (1.0%)	0.00443	0.0413
GO:0016702	oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen, incorporation of two atoms of oxygen	MF 4	26	2 (7.7%)	0.00461	0.0314
GO:0015075	ion transmembrane transporter activity	MF 4	828	9 (1.1%)	0.00478	0.0314
GO:0016701	oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen	MF 3	27	2 (7.4%)	0.00497	0.0373
GO:0030594	neurotransmitter receptor activity	MF 4	94	3 (3.3%)	0.00561	0.0314
GO:0042165	neurotransmitter binding	MF 2	31	2 (6.5%)	0.00651	0.0413

Πίνακας 4.14 Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού των διαφορεικά εκφραζόμενων μεταγράφων έπειτα από αποσιώπηση της CNOT8 σε κύτταρα HEP2.

Gene Ontology Term (overexpressed transcripts)		Category, level	Set size	Candidates contained	p-value	q-value
GO:0007275	multicellular organismal development	BP 3	4759	99 (2.1%)	2.14e-05	0.00654
GO:0042476	odontogenesis	BP 4	118	9 (7.6%)	5.32e-05	0.0285
GO:0021684	cerebellar granular layer formation	BP 3	9	3 (33.3%)	0.000233	0.0286
GO:0040008	regulation of growth	BP 3	623	21 (3.4%)	0.000281	0.0286
GO:0044767	single-organism developmental process	BP 2	5607	107 (1.9%)	0.000337	0.0202
GO:0021683	cerebellar granular layer morphogenesis	BP 3	11	3 (27.3%)	0.000448	0.0341
GO:0048856	anatomical structure development	BP 2	5056	97 (1.9%)	0.000656	0.0202
GO:0044707	single-multicellular organism process	BP 2	6658	121 (1.8%)	0.000832	0.0202
GO:0042592	homeostatic process	BP 3	1502	37 (2.5%)	0.000884	0.0417
GO:0007267	cell-cell signaling	BP 3	1238	32 (2.6%)	0.000926	0.0417
GO:0021681	cerebellar granular layer development	BP 3	14	3 (21.4%)	0.000957	0.0417
GO:0016049	cell growth	BP 2	454	15 (3.3%)	0.00249	0.0454
Gene Ontology Term (underexpressed transcripts)		Category, level	Set size	Candidates contained	p-value	q-value
GO:0030881	beta-2-microglobulin binding	MF 3	11	3 (27.3%)	0.000396	0.0285

Πίνακας 4.15 Μετάγραφα με διαφορετική έκφραση έπειτα από αποσιώπηση των αποαδενυλασών PARN, NOC, CNOT6, CNOT6L και CNOT7 στα κύτταρα NCI-H520.
βλ. Maragozidis et al. 2017 Table S7

Πίνακας 4.16 Μετάγραφα με διαφορετική έκφραση έπειτα από αποσιώπηση των αποαδενυλασών PARN, NOC, CNOT6, CNOT7 και CNOT8 στα κύτταρα HEp2.
βλ. Maragozidis et al. 2017 Table S8

Πίνακας 4.17 Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού των πιθανών αποκλειστικών στόχων της κάθε αποαδενύλασης σε κύτταρα HEP2.

	Gene Ontology Term (overexpressed transcripts)		Category, level	Set size	Candidates contained
CNOT6	GO:007089	lipoteichoic acid binding	MF 3	4	2 (50.0%)
	GO:0015459	potassium channel regulator activity	MF 3	46	3 (6.5%)
	GO:0005328	neurotransmitter:sodium symporter activity	MF 3	19	2 (10.5%)
	GO:0001530	lipopolysaccharide binding	MF 3	20	2 (10.0%)
CNOT8	GO:0042476	odontogenesis	BP 4	118	9 (7.6%)
	GO:0048878	chemical homeostasis	BP 4	988	26 (2.6%)
	GO:0007275	multicellular organismal development	BP 3	4759	74 (1.6%)
	GO:0042592	homeostatic process	BP 3	1502	32 (2.1%)
	GO:0021684	cerebellar granular layer formation	BP 3	9	3 (33.3%)
	GO:0021683	cerebellar granular layer morphogenesis	BP 3	11	3 (27.3%)
	GO:0065008	regulation of biological quality	BP 2	3431	55 (1.6%)
	GO:0055082	cellular chemical homeostasis	BP 4	624	17 (2.7%)
	GO:0044707	single-multicellular organism process	BP 2	6658	91 (1.4%)
	GO:0044767	single-organism developmental process	BP 2	5607	79 (1.4%)
	GO:002168	cerebellar granular layer development	BP 3	14	3 (21.4%)
	GO:0005102	receptor binding	MF 3	1430	28 (2.0%)
	GO:0040008	regulation of growth	BP 3	623	16 (2.6%)
GO:0048513	organ development	BP 3	3050	48 (1.6%)	

	GO:0048856	anatomical structure development	BP 2	5056	71 (1.4%)
	GO:0032844	regulation of homeostatic process	BP 3	359	11 (3.1%)
	GO:0042391	regulation of membrane potential	BP 3	367	11 (3.0%)
	GO:0021697	cerebellar cortex formation	BP 3	22	3 (13.6%)
	GO:0060021	palate development	BP 3	83	5 (6.0%)
	GO:0019725	cellular homeostasis	BP 3	752	17 (2.3%)
	GO:0048731	system development	BP 3	4205	60 (1.4%)
	GO:0055085	transmembrane transport	BP 3	1336	25 (1.9%)
	GO:0022857	transmembrane transporter activity	MF 2	975	20 (2.1%)
	GO:0016049	cell growth	BP 2	454	12 (2.6%)
	GO:0022892	substrate-specific transporter activity	MF 2	1055	21 (2.0%)
	GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	BP 2	2616	41 (1.6%)
	GO:0032879	regulation of localization	BP 3	2301	37 (1.6%)
NOC	GO:0010469	regulation of receptor activity	BP 3	88	5 (5.7%)
	GO:2000310	regulation of N-methyl-D-aspartate selective glutamate receptor activity	BP 4	15	3 (20.0%)
	GO:0022898	regulation of transmembrane transporter activity	BP 4	181	6 (3.3%)
	GO:0051336	regulation of hydrolase activity	BP 4	1250	14 (1.1%)
	GO:0032409	regulation of transporter activity	BP 3	195	6 (3.1%)
	GO:0034220	ion transmembrane transport	BP 4	970	12 (1.2%)
	GO:0034762	regulation of	BP 4	385	7 (1.8%)

	transmembrane transport				
GO:0002020	protease binding	MF 4	103	4 (3.9%)	
GO:0061134	peptidase regulator activity	MF 3	216	5 (2.3%)	
GO:0007342	fusion of sperm to egg plasma membrane	BP 4	13	2 (15.4%)	
GO:0016247	channel regulator activity	MF 2	136	4 (2.9%)	
GO:0055085	transmembrane transport	BP 3	1336	12 (0.9%)	
GO:0006811	ion transport	BP 4	1537	13 (0.8%)	
PARN	GO:0048598	embryonic morphogenesis	BP 3	590	6 (1.0%)

* *p-value* < 0.01, *q-value* < 0.5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andrei, M. A., et al. (2005), 'A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies', *RNA*, 11 (5), 717-27.
- Aslam, A., et al. (2009), 'The Ccr4-NOT deadenylase subunits CNOT7 and CNOT8 have overlapping roles and modulate cell proliferation', *Mol Biol Cell*, 20 (17), 3840-50.
- Astrom, J., Astrom, A., and Virtanen, A. (1992), 'Properties of a HeLa cell 3' exonuclease specific for degrading poly(A) tails of mammalian mRNA', *J Biol Chem*, 267 (25), 18154-9.
- Baggs, J. E. and Green, C. B. (2003), 'Nocturnin, a deadenylase in *Xenopus laevis* retina: a mechanism for posttranscriptional control of circadian-related mRNA', *Curr Biol*, 13 (3), 189-98.
- Balagopal, V., Fluch, L., and Nissan, T. (2012), 'Ways and means of eukaryotic mRNA decay', *Biochim Biophys Acta*, 1819 (6), 593-603.
- Balatsos, N. A., et al. (2012), 'Modulation of poly(A)-specific ribonuclease (PARN): current knowledge and perspectives', *Curr Med Chem*, 19 (28), 4838-49.
- Balatsos, N. A., et al. (2006), 'Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC)', *J Biol Chem*, 281 (7), 4517-22.
- Balatsos, N. A., et al. (2009), 'Competitive inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by synthetic fluoro-pyranosyl nucleosides', *Biochemistry*, 48 (26), 6044-51.
- Bartlam, M. and Yamamoto, T. (2010), 'The structural basis for deadenylation by the CCR4-NOT complex', *Protein Cell*, 1 (5), 443-52.
- Beckles, M. A., et al. (2003), 'Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes', *Chest*, 123 (1 Suppl), 97S-104S.
- Bogdan, J. A., et al. (1998), 'Human carbon catabolite repressor protein (CCR4)-associative factor 1: cloning, expression and characterization of its interaction with the B-cell translocation protein BTG1', *Biochem J*, 336 (Pt 2), 471-81.
- Bowles, J., et al. (2003), 'Dppa3 is a marker of pluripotency and has a human homologue that is expressed in germ cell tumours', *Cytogenet Genome Res*, 101 (3-4), 261-5.
- Bowman, R. V., et al. (2006), 'Epigenetics of lung cancer', *Respirology*, 11 (4), 355-65.
- Boyer, L., et al. (2013), 'Survival, classifications, and desmosomal plaque genes in non-small cell lung cancer', *Int J Med Sci*, 10 (9), 1166-73.
- Brown, C. E. and Sachs, A. B. (1998), 'Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation', *Mol Cell Biol*, 18 (11), 6548-59.
- Burstein, H. J. and Schwartz, R. S. (2008), 'Molecular origins of cancer', *N Engl J Med*, 358 (5), 527.
- Chapat, C., et al. (2013), 'hCAF1/CNOT7 regulates interferon signalling by targeting STAT1', *EMBO J*, 32 (5), 688-700.

- Chen, C. Y. and Shyu, A. B. (2003), 'Rapid deadenylation triggered by a nonsense codon precedes decay of the RNA body in a mammalian cytoplasmic nonsense-mediated decay pathway', *Mol Cell Biol*, 23 (14), 4805-13.
- Chen, C. Y., et al. (2009), 'Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps', *Nat Struct Mol Biol*, 16 (11), 1160-6.
- Chen, J., et al. (2001), 'Purification and characterization of the 1.0 MDa CCR4-NOT complex identifies two novel components of the complex', *J Mol Biol*, 314 (4), 683-94.
- Chiba, Y., et al. (2004), 'AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in Arabidopsis', *Gene*, 328, 95-102.
- Ciarleglio, C. M., et al. (2008), 'Genetic differences in human circadian clock genes among worldwide populations', *J Biol Rhythms*, 23 (4), 330-40.
- Clark, L. B., et al. (2004), 'Systematic mutagenesis of the leucine-rich repeat (LRR) domain of CCR4 reveals specific sites for binding to CAF1 and a separate critical role for the LRR in CCR4 deadenylase activity', *J Biol Chem*, 279 (14), 13616-23.
- Collart, M. A. and Timmers, H. T. (2004), 'The eukaryotic Ccr4-not complex: a regulatory platform integrating mRNA metabolism with cellular signaling pathways?', *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 77, 289-322.
- Collart, M. A. and Panasenko, O. O. (2012), 'The Ccr4--not complex', *Gene*, 492 (1), 42-53.
- Conti, E. and Izaurralde, E. (2005), 'Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species', *Curr Opin Cell Biol*, 17 (3), 316-25.
- Cooper, Geoffrey M. and Hausman, Robert E. (2004), *The cell: a molecular approach* (3rd edn.; Washington, D.C. Sunderland, Mass.: ASM Press; Sinauer Associates) xx, 713 p.
- Copeland, P. R. and Wormington, M. (2001), 'The mechanism and regulation of deadenylation: identification and characterization of Xenopus PARN', *RNA*, 7 (6), 875-86.
- Cougot, N., Babajko, S., and Seraphin, B. (2004), 'Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells', *J Cell Biol*, 165 (1), 31-40.
- Couto, P., et al. (2014), 'Association between CLOCK, PER3 and CCRN4L with nonsmall cell lung cancer in Brazilian patients', *Mol Med Rep*, 10 (1), 435-40.
- Crick, F. H. (1958), 'On protein synthesis', *Symp Soc Exp Biol*, 12, 138-63.
- Dehlin, E., et al. (2000), 'Cap-dependent deadenylation of mRNA', *EMBO J*, 19 (5), 1079-86.
- Denis, C. L. and Chen, J. (2003), 'The CCR4-NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism', *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 73, 221-50.
- Dhanraj, S., et al. (2015), 'Bone marrow failure and developmental delay caused by mutations in poly(A)-specific ribonuclease (PARN)', *J Med Genet*, 52 (11), 738-48.
- Diez, M., et al. (1995), 'Serum CEA, CA125, and SCC antigens and tumor recurrence in resectable non-small cell lung cancer', *Int J Biol Markers*, 10 (1), 5-10.

- Doma, M. K. and Parker, R. (2006), 'Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation', *Nature*, 440 (7083), 561-4.
- Dupressoir, A., et al. (2001), 'Identification of four families of yCCR4- and Mg²⁺-dependent endonuclease-related proteins in higher eukaryotes, and characterization of orthologs of yCCR4 with a conserved leucine-rich repeat essential for hCAF1/hPOP2 binding', *BMC Genomics*, 2, 9.
- Ebert, W. and Muley, T. (1999), 'CYFRA 21-1 in the follow-up of inoperable non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy', *Anticancer Res*, 19 (4A), 2669-72.
- Ezzeddine, N., et al. (2007), 'Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation', *Mol Cell Biol*, 27 (22), 7791-801.
- Fabian, M. R., et al. (2009), 'Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation', *Mol Cell*, 35 (6), 868-80.
- Frischmeyer, P. A., et al. (2002), 'An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons', *Science*, 295 (5563), 2258-61.
- Funakoshi, Y., et al. (2007), 'Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases', *Genes Dev*, 21 (23), 3135-48.
- Gao, M., et al. (2000), 'Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro', *Mol Cell*, 5 (3), 479-88.
- Gao, M., et al. (2001), 'A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements', *EMBO J*, 20 (5), 1134-43.
- Garapaty, S., Mahajan, M. A., and Samuels, H. H. (2008), 'Components of the CCR4-NOT complex function as nuclear hormone receptor coactivators via association with the NRC-interacting Factor NIF-1', *J Biol Chem*, 283 (11), 6806-16.
- Garbarino-Pico, E., et al. (2007), 'Immediate early response of the circadian polyA ribonuclease nocturnin to two extracellular stimuli', *RNA*, 13 (5), 745-55.
- Garneau, N. L., Wilusz, J., and Wilusz, C. J. (2007), 'The highways and byways of mRNA decay', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (2), 113-26.
- Godwin, A. R., et al. (2013), 'Kiss your tail goodbye: the role of PARN, Nocturnin, and Angel deadenylases in mRNA biology', *Biochim Biophys Acta*, 1829 (6-7), 571-9.
- Goel, A., et al. (2007), '7,8-Dihydroxy-4-methylcoumarin induces apoptosis of human lung adenocarcinoma cells by ROS-independent mitochondrial pathway through partial inhibition of ERK/MAPK signaling', *FEBS Lett*, 581 (13), 2447-54.
- Goldstraw, P., et al. (2007), 'The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours', *J Thorac Oncol*, 2 (8), 706-14.
- Goldstrohm, A. C. and Wickens, M. (2008), 'Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (4), 337-44.
- Govindan, M., et al. (2009), 'Identification of CCR4 and other essential thyroid hormone receptor co-activators by modified yeast synthetic genetic array analysis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (47), 19854-9.

- Gowrishankar, G., et al. (2005), 'Inhibition of mRNA deadenylation and degradation by ultraviolet light', *Biol Chem*, 386 (12), 1287-93.
- Green, C. B. (2003), 'Molecular control of Xenopus retinal circadian rhythms', *J Neuroendocrinol*, 15 (4), 350-4.
- Green, C. B., et al. (2007), 'Loss of Nocturnin, a circadian deadenylase, confers resistance to hepatic steatosis and diet-induced obesity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (23), 9888-93.
- Guntur, A. R., et al. (2011), 'An essential role for the circadian-regulated gene nocturnin in osteogenesis: the importance of local timekeeping in skeletal homeostasis', *Ann N Y Acad Sci*, 1237, 58-63.
- Haag, T., et al. (2014), 'The apoptosis associated tyrosine kinase gene is frequently hypermethylated in human cancer and is regulated by epigenetic mechanisms', *Genes Cancer*, 5 (9-10), 365-74.
- Hamilton W, Sharp D (2004), *Diagnosis of lung cancer in primary care*.
- Hammet, A., Pike, B. L., and Heierhorst, J. (2002), 'Posttranscriptional regulation of the RAD5 DNA repair gene by the Dun1 kinase and the Pan2-Pan3 poly(A)-nuclease complex contributes to survival of replication blocks', *J Biol Chem*, 277 (25), 22469-74.
- Harris, N. L., et al. (1999), 'World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997', *J Clin Oncol*, 17 (12), 3835-49.
- Heath, C. J., et al. (2015), 'Co-Transcriptomes of Initial Interactions In Vitro between Streptococcus Pneumoniae and Human Pleural Mesothelial Cells', *PLoS One*, 10 (11), e0142773.
- Hiroi, N., et al. (2002), 'Mammalian Rcd1 is a novel transcriptional cofactor that mediates retinoic acid-induced cell differentiation', *EMBO J*, 21 (19), 5235-44.
- Hook, B. A., et al. (2007), 'Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA', *J Biol Chem*, 282 (21), 15430-8.
- Hou, J., et al. (2010), 'Gene expression-based classification of non-small cell lung carcinomas and survival prediction', *PLoS One*, 5 (4), e10312.
- Houseley, J. and Tollervey, D. (2009), 'The many pathways of RNA degradation', *Cell*, 136 (4), 763-76.
- Hrushesky, W. J. (1985), 'Circadian timing of cancer chemotherapy', *Science*, 228 (4695), 73-5.
- Hrushesky, W. J., et al. (2009), 'Circadian clock manipulation for cancer prevention and control and the relief of cancer symptoms', *Integr Cancer Ther*, 8 (4), 387-97.
- Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2011), 'Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay', *Nat Rev Genet*, 12 (2), 99-110.
- Ikematsu, N., et al. (1999), 'Tob2, a novel anti-proliferative Tob/BTG1 family member, associates with a component of the CCR4 transcriptional regulatory complex capable of binding cyclin-dependent kinases', *Oncogene*, 18 (52), 7432-41.

- Ito, T., et al. (2001), 'A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (8), 4569-74.
- Jin, B., Zhao, L., and Zhou, C. (2001), '[The prognostic value of serum neuron specific enolase detection in small cell lung cancer]', *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 24 (12), 722-4.
- Kamburov, A., et al. (2009), 'ConsensusPathDB--a database for integrating human functional interaction networks', *Nucleic Acids Res*, 37 (Database issue), D623-8.
- Kamburov, A., et al. (2013), 'The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update', *Nucleic Acids Res*, 41 (Database issue), D793-800.
- Kawai, M., et al. (2010), 'A circadian-regulated gene, Nocturnin, promotes adipogenesis by stimulating PPAR-gamma nuclear translocation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (23), 10508-13.
- Kerr, S. C., et al. (2011), 'The Ccr4-Not complex interacts with the mRNA export machinery', *PLoS One*, 6 (3), e18302.
- Kim, W. C. and Lee, C. H. (2009), 'The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer', *Biochim Biophys Acta*, 1796 (2), 99-113.
- Kito, K., Ito, T., and Sakaki, Y. (1997), 'Fluorescent differential display analysis of gene expression in differentiating neuroblastoma cells', *Gene*, 184 (1), 73-81.
- Knights, A. J., et al. (2012), 'Holding Tight: Cell Junctions and Cancer Spread', *Trends Cancer Res*, 8, 61-69.
- Kobayashi, K., et al. (2004), 'Identification of genes whose expression is upregulated in lung adenocarcinoma cells in comparison with type II alveolar cells and bronchiolar epithelial cells in vivo', *Oncogene*, 23 (17), 3089-96.
- Kojima, K., et al. (2011), 'MicroRNA122 is a key regulator of alpha-fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma', *Nat Commun*, 2, 338.
- Korner, C. G. and Wahle, E. (1997), 'Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease', *J Biol Chem*, 272 (16), 10448-56.
- Kumar, Vinay, Cotran, Ramzi S., and Robbins, Stanley L. (2003), *Robbins basic pathology* (7th edn.; Philadelphia, PA: Saunders) xii, 873 p.
- Lai, W. S., Kennington, E. A., and Blackshear, P. J. (2003), 'Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease', *Mol Cell Biol*, 23 (11), 3798-812.
- Lau, N. C., et al. (2009), 'Human Ccr4-Not complexes contain variable deadenylase subunits', *Biochem J*, 422 (3), 443-53.
- Leclerc, J., et al. (2011), 'Xenobiotic metabolism and disposition in human lung: transcript profiling in non-tumoral and tumoral tissues', *Biochimie*, 93 (6), 1012-27.
- Lee, J. E., et al. (2012), 'The PARN deadenylase targets a discrete set of mRNAs for decay and regulates cell motility in mouse myoblasts', *PLoS Genet*, 8 (8), e1002901.

- Lejeune, F., Li, X., and Maquat, L. E. (2003), 'Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylation, and exonucleolytic activities', *Mol Cell*, 12 (3), 675-87.
- Lewin, Benjamin (2004), *Genes VIII* (Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall) xxi, 1027 p.
- Liu, X. and Green, C. B. (2001), 'A novel promoter element, photoreceptor conserved element II, directs photoreceptor-specific expression of nocturnin in *Xenopus laevis*', *J Biol Chem*, 276 (18), 15146-54.
- Ma, J., Fukuda, Y., and Schultz, R. M. (2015), 'Mobilization of Dormant Cnot7 mRNA Promotes Deadenylation of Maternal Transcripts During Mouse Oocyte Maturation', *Biol Reprod*, 93 (2), 48.
- Maragozidis, P., et al. (2015), 'Poly(A)-specific ribonuclease and Nocturnin in squamous cell lung cancer: prognostic value and impact on gene expression', *Mol Cancer*, 14 (1), 187.
- Maragozidis, P., et al. (2012), 'Alterations of deadenylase expression in acute leukemias: evidence for poly(a)-specific ribonuclease as a potential biomarker', *Acta Haematol*, 128 (1), 39-46.
- Martinez, J., et al. (2001), 'The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation', *J Biol Chem*, 276 (30), 27923-9.
- Martinez, J., et al. (2000), 'A 54-kDa fragment of the Poly(A)-specific ribonuclease is an oligomeric, processive, and cap-interacting Poly(A)-specific 3' exonuclease', *J Biol Chem*, 275 (31), 24222-30.
- Mattick, J. S. and Gagen, M. J. (2001), 'The evolution of controlled multitasked gene networks: the role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms', *Mol Biol Evol*, 18 (9), 1611-30.
- Mauxion, F., Faux, C., and Seraphin, B. (2008), 'The BTG2 protein is a general activator of mRNA deadenylation', *EMBO J*, 27 (7), 1039-48.
- Meyer, S., Temme, C., and Wahle, E. (2004), 'Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes', *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 39 (4), 197-216.
- Mitchell, P. and Tollervey, D. (2000), 'mRNA stability in eukaryotes', *Curr Opin Genet Dev*, 10 (2), 193-8.
- Mittal, S., et al. (2011), 'The Ccr4a (CNOT6) and Ccr4b (CNOT6L) deadenylase subunits of the human Ccr4-Not complex contribute to the prevention of cell death and senescence', *Mol Biol Cell*, 22 (6), 748-58.
- Moon, D. H., et al. (2015), 'Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 3'-end maturation of the telomerase RNA component', *Nat Genet*, 47 (12), 1482-8.
- Morel, A. P., et al. (2003), 'BTG2 antiproliferative protein interacts with the human CCR4 complex existing in vivo in three cell-cycle-regulated forms', *J Cell Sci*, 116 (Pt 14), 2929-36.
- Morita, M., et al. (2007), 'Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers elevation of the p27Kip1 mRNA level and impairs cell growth', *Mol Cell Biol*, 27 (13), 4980-90.

- Mormont, M. C., et al. (2000), 'Marked 24-h rest/activity rhythms are associated with better quality of life, better response, and longer survival in patients with metastatic colorectal cancer and good performance status', *Clin Cancer Res*, 6 (8), 3038-45.
- Muhlemann, O. and Lykke-Andersen, J. (2010), 'How and where are nonsense mRNAs degraded in mammalian cells?', *RNA Biol*, 7 (1), 28-32.
- Muhlemann, O. and Jensen, T. H. (2012), 'mRNP quality control goes regulatory', *Trends Genet*, 28 (2), 70-7.
- Nilsson, P., et al. (2007), 'A multifunctional RNA recognition motif in poly(A)-specific ribonuclease with cap and poly(A) binding properties', *J Biol Chem*, 282 (45), 32902-11.
- Nissen, P., et al. (2000), 'The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis', *Science*, 289 (5481), 920-30.
- Nudler, E. and Gottesman, M. E. (2002), 'Transcription termination and anti-termination in *E. coli*', *Genes Cells*, 7 (8), 755-68.
- Park, B. J. and Altorki, N. K. (2002), 'Diagnosis and management of early lung cancer', *Surg Clin North Am*, 82 (3), 457-76, v.
- Parker, R. and Song, H. (2004), 'The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover', *Nat Struct Mol Biol*, 11 (2), 121-7.
- Peng, Y. and Schoenberg, D. R. (2007), 'c-Src activates endonuclease-mediated mRNA decay', *Mol Cell*, 25 (5), 779-87.
- Perez-Moreno, P., et al. (2012), 'Squamous cell carcinoma of the lung: molecular subtypes and therapeutic opportunities', *Clin Cancer Res*, 18 (9), 2443-51.
- Petersen, I. (2011), 'The morphological and molecular diagnosis of lung cancer', *Dtsch Arztebl Int*, 108 (31-32), 525-31.
- Piao, X., et al. (2010), 'CCR4-NOT deadenylates mRNA associated with RNA-induced silencing complexes in human cells', *Mol Cell Biol*, 30 (6), 1486-94.
- Prevot, D., et al. (2001), 'Relationships of the antiproliferative proteins BTG1 and BTG2 with CAF1, the human homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional complex: involvement in estrogen receptor alpha signaling pathway', *J Biol Chem*, 276 (13), 9640-8.
- Prieto, S., de la Cruz, B. J., and Scheffler, I. E. (2000), 'Glucose-regulated turnover of mRNA and the influence of poly(A) tail length on half-life', *J Biol Chem*, 275 (19), 14155-66.
- Ramani, R. G. and Jacob, S. G. (2013), 'Improved classification of lung cancer tumors based on structural and physicochemical properties of proteins using data mining models', *PLoS One*, 8 (3), e58772.
- Ren, Y. G., Martinez, J., and Virtanen, A. (2002), 'Identification of the active site of poly(A)-specific ribonuclease by site-directed mutagenesis and Fe(2+)-mediated cleavage', *J Biol Chem*, 277 (8), 5982-7.
- Sanchez-Perez, I., et al. (2009), 'hCCR4/cNOT6 targets DNA-damage response proteins', *Cancer Lett*, 273 (2), 281-91.

- Sanchez De Cos, J., et al. (1994), 'Squamous cell carcinoma antigen (SCC Ag) in the diagnosis and prognosis of lung cancer', *Chest*, 105 (3), 773-6.
- Schwede, A., et al. (2008), 'A role for Caf1 in mRNA deadenylation and decay in trypanosomes and human cells', *Nucleic Acids Res*, 36 (10), 3374-88.
- Seal, R., et al. (2005), 'Serum-deprivation stimulates cap-binding by PARN at the expense of eIF4E, consistent with the observed decrease in mRNA stability', *Nucleic Acids Res*, 33 (1), 376-87.
- Shen, M., et al. (2015), 'Cantharidin represses invasion of pancreatic cancer cells through accelerated degradation of MMP2 mRNA', *Sci Rep*, 5, 11836.
- Shi, J. X., et al. (2014), 'CNOT7/hCAF1 is involved in ICAM-1 and IL-8 regulation by tristetraprolin', *Cell Signal*, 26 (11), 2390-6.
- Silberfarb, P. M., et al. (1993), 'Assessment of sleep in patients with lung cancer and breast cancer', *J Clin Oncol*, 11 (5), 997-1004.
- Stuart, B. D., et al. (2015), 'Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening', *Nat Genet*, 47 (5), 512-7.
- Talbot, L. J., Bhattacharya, S. D., and Kuo, P. C. (2012), 'Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies', *Int J Biochem Mol Biol*, 3 (2), 117-36.
- Temme, C., et al. (2010), 'Subunits of the Drosophila CCR4-NOT complex and their roles in mRNA deadenylation', *RNA*, 16 (7), 1356-70.
- Tennis, M. A., et al. (2010), 'Prostacyclin inhibits non-small cell lung cancer growth by a frizzled 9-dependent pathway that is blocked by secreted frizzled-related protein 1', *Neoplasia*, 12 (3), 244-53.
- Tucker, M., et al. (2001), 'The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*', *Cell*, 104 (3), 377-86.
- Tummala, H., et al. (2015), 'Poly(A)-specific ribonuclease deficiency impacts telomere biology and causes dyskeratosis congenita', *J Clin Invest*, 125 (5), 2151-60.
- Valk, K., et al. (2010), 'Gene expression profiles of non-small cell lung cancer: survival prediction and new biomarkers', *Oncology*, 79 (3-4), 283-92.
- Valles, I., et al. (2012), 'Identification of novel deregulated RNA metabolism-related genes in non-small cell lung cancer', *PLoS One*, 7 (8), e42086.
- Viswanathan, A. N., Hankinson, S. E., and Schernhammer, E. S. (2007), 'Night shift work and the risk of endometrial cancer', *Cancer Res*, 67 (21), 10618-22.
- Wagner, E., Clement, S. L., and Lykke-Andersen, J. (2007), 'An unconventional human Ccr4-Caf1 deadenylase complex in nuclear cajal bodies', *Mol Cell Biol*, 27 (5), 1686-95.
- Wahle, E. and Winkler, G. S. (2013), 'RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-not and Pan2-Pan3 complexes', *Biochim Biophys Acta*, 1829 (6-7), 561-70.
- Warde-Farley, D., et al. (2010), 'The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function', *Nucleic Acids Res*, 38 (Web Server issue), W214-20.

- Winkler, G. S., et al. (2006), 'Human Ccr4-Not complex is a ligand-dependent repressor of nuclear receptor-mediated transcription', *EMBO J*, 25 (13), 3089-99.
- Wolf, J. and Passmore, L. A. (2014), 'mRNA deadenylation by Pan2-Pan3', *Biochem Soc Trans*, 42 (1), 184-7.
- Wolf, J., et al. (2014), 'Structural basis for Pan3 binding to Pan2 and its function in mRNA recruitment and deadenylation', *EMBO J*, 33 (14), 1514-26.
- Wood, L. D., et al. (2007), 'The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers', *Science*, 318 (5853), 1108-13.
- Wu, M., et al. (2005), 'Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN', *EMBO J*, 24 (23), 4082-93.
- Yamanaka, R., et al. (2006), 'Identification of expressed genes characterizing long-term survival in malignant glioma patients', *Oncogene*, 25 (44), 5994-6002.
- Yamashita, A., et al. (2005), 'Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover', *Nat Struct Mol Biol*, 12 (12), 1054-63.
- Yoshida, Y., et al. (2001), 'Association of ANA, a member of the antiproliferative Tob family proteins, with a Caf1 component of the CCR4 transcriptional regulatory complex', *Jpn J Cancer Res*, 92 (6), 592-6.
- Zhang, L. and Yan, Y. (2014), 'Depletion of poly(A)-specific ribonuclease (PARN) inhibits proliferation of human gastric cancer cells by blocking cell cycle progression', *Biochim Biophys Acta*.
- Zhu, Y., et al. (2007), 'Ala394Thr polymorphism in the clock gene NPAS2: a circadian modifier for the risk of non-Hodgkin's lymphoma', *Int J Cancer*, 120 (2), 432-5.

