



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Διερεύνηση της κirkάδιας έκφρασης της  
πολυ(Α)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης**

**Διπλωματική εργασία**  
**Ραφαέλα Αβρααμίδου του Αντώνη**

**Λάρισα 2020**



**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**SCHOOL OF HEALTH SCIENCES**  
**FACULTY OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY**

**Investigation of the circadian expression of  
poly-(A) -specific ribonuclease**

**Diploma thesis**  
**Rafaela Avraamidou Antoni**

**Larissa 2020**

Επιβλέπων καθηγητής:

**Νικόλαος Μπαλατσός**, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

**Δημήτριος Λεωνίδας**, Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Νικόλαος Μπαλατσός**, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Δημήτριος Κλέτσας**, Ερευνητής Α', ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος"

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Βιοχημείας Δρ Μπαλατσού Νικόλαου.

### **Ευχαριστίες,**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ Νικόλαο Μπαλατσό, για την υπόδειξη του θέματος και την επιστημονική του καθοδήγηση σε καθημερινή βάση κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής Δρ Δημήτριο Λεωνίδα και Δρ Δημήτριο Κλέτσα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την συνεργασία, την βοήθεια και την συμβολή τους για την ομαλή διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στην υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Ραφαηλία Μπέτα, για την άψογη καθοδήγηση, τις συμβουλές και τη συνεχή συμπαράσταση. Τέλος, ευχαριστίες προς τους φίλους μου και την οικογένεια μου, που ήταν πάντα το στήριγμα μου καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

# Περιεχόμενα

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
1.1. Ημερήσιος - Βιολογικός ρυθμός. ....	8
1.1.1. Κιρκάδιο ρολόι των θηλαστικών. ....	8
1.1.1.1. Μοριακός μηχανισμός του κιρκάδιου ρολογιού. ....	9
1.1.2. Αντίληψη του φωτός και κιρκάδιος ρυθμός. ....	11
1.1.2.1. Επιλογή ήπατος ποντικού (Mus musculus - C57BL/6J) ως μοντέλο για μελέτη του κιρκάδιου ρυθμού υπό την επίδραση του φωτός. ....	11
1.1.3. Γλυκοκορτικοειδή και κιρκάδιος ρυθμός.....	12
1.1.3.1. Ρύθμιση κιρκάδιου ρυθμού από γλυκοκορτικοειδή .....	13
1.1.3.2. Επιλογή κυττάρων HEK293T για μελέτη του κιρκάδιου ρυθμού υπό την επίδραση της DEX .....	14
1.2. Πολυ-(A) ουρά στα μόρια mRNA και ο ρόλος της .....	14
1.2.1. Απαδενυλίωση των μορίων mRNA .....	15
1.2.2. Απαδενυλάσες.....	16
1.2.3. Απαδενυλίωση στο κιρκάδιο ρολόι .....	17
1.2.4. PARN.....	17
2. ΣΚΟΠΟΣ .....	19
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
3.1. Υλικά.....	20
3.1.1.Αντιδραστήρια .....	20
3.1.2. Δείκτες μοριακών μαζών.....	21
3.1.3. Αντισώματα .....	21
3.1.4 Διαλύματα .....	21
3.2. Μέθοδοι .....	23
3.2.1. Πειραματικά πρωτόκολλα.....	23
3.2.2. Λύση κυττάρων, απομόνωση πρωτεϊνών και ποσοτικοποίησή τους .....	24
3.2.2.1. Λύση κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνών .....	24
3.2.2.1.1. Λύση κυττάρων HEK και HeLa και απομόνωση πρωτεϊνών.....	24
3.2.2.1.2. Λύση ηπατικού ιστού ποντικών και απομόνωση πρωτεϊνών.....	25
3.2.2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών των δειγμάτων .....	25
3.2.2.2.1. Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford .....	25

3.2.3. Στύπωμα τύπου Western .....	27
3.2.3.1. Δημιουργία πηκτής πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, SDS-PAGE και Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών .....	27
3.2.3.2. Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών.....	30
3.2.3.3. Χρώση της πηκτής πολυακρυλαμιδίου .....	31
3.2.3.4. Αποτύπωση στη μεμβράνη PVDF.....	31
3.2.3.5. Ανοσοανίχνευση.....	32
3.2.3.6. Αποδέσμευση των αντισωμάτων από την μεμβράνη PVDF (Stripping) .....	33
4. Αποτελέσματα.....	34
4.1.Βελτιστοποίηση στυπώματος τύπου Western .....	34
4.1.1. Βελτιστοποίηση χρήσης πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της PARN (sc-135242, Santa Cruz Biotechnology) .....	34
4.1.2. Βελτιστοποίηση χρήσης μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της PARN (ab188333, Abcam)..	35
4.1.2.1. Εξέταση αποτελεσματικότητας του μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της PARN (ab188333, Abcam) σε κύτταρα HEK.....	36
4.1.2.2. Εξέταση αποτελεσματικότητας του μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της PARN (ab188333, Abcam) σε ήπαρ μυών .....	37
4.2. Εξέταση των επιπέδων της PARN σε ήπαρ μυών .....	38
4.3. Εξέταση των επιπέδων της PARN σε κύτταρα HEK.....	41
5. Συζήτηση .....	44
6. Βιβλιογραφία .....	46

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κirkάδιος ρυθμός αναφέρεται σε οποιαδήποτε βιολογική διεργασία που συμβαίνει μέσα σε ένα εικοσιτετράωρο και έχει σκοπό στον συγχρονισμό του εσωτερικού – αυτοσυντηρούμενου ρολογιού του κάθε οργανισμού με τα εξωτερικά ερεθίσματα του περιβάλλοντος. Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση του κirkάδιου ρυθμού. Η βράχυνση της ουράς πολυ-(A) των μορίων mRNA είναι το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμησή τους και καταλύεται από ένζυμα γνωστά ως απαδενυλάσες. Έχει δειχθεί πως αυτή η διεργασία είναι ρυθμική στα θηλαστικά

Σύμφωνα με τα παραπάνω, φαίνεται πως η δράση των απαδενυλασών συμμετέχει στη ρύθμιση της κirkάδιας γονιδιακής έκφρασης, παρότι λίγα είναι γνωστά για κirkάδια ρυθμιζόμενες απαδενυλάσες. Έτσι, στην παρούσα διπλωματική, μελετήθηκε η απαδενυλάση PARN και η κirkάδια έκφρασή της σε κύτταρα HEK293T αλλά και σε ήπαρ ποντικών (*Mus musculus* - C57BL/6J) για να αποσαφηνιστεί αν το μόριο αυτό διαθέτει ρυθμικότητα σε επίπεδο πρωτεΐνης. Η ρυθμικότητά της επιβεβαιώθηκε και στους δύο οργανισμούς, έχοντας μέγιστα επίπεδα τη μέρα για τους ημερήσιους και τη νύχτα για τους νυκτόβιους οργανισμούς.

## ABSTRACT

The circadian rhythm refers to any biological process that occurs within a 24-hour period and serves to synchronize the internal – self-sustaining clock of an organism with the external stimuli of the environment. The regulation of the gene expression seems to have a key role in the maintenance of circadian rhythm. The shortening of the poly-(A) tail of mRNA molecules is the first and decisive step in their destabilization and the catalysis is achieved by enzymes known as deadenylases. It has been established that this process is rhythmical in mammals.

Hence, it seems that the deadenylase activity is involved in the regulation of the circadian gene expression, although little is known for circadian-regulated deadenylases. Thus, the present study investigated the PARN deadenylase protein and its circadian expression on HEK293T cells and also on mouse livers (*Mus musculus* - C57BL/6J) in order to clarify whether this molecule possesses rhythmicity on a protein level. Both organisms showed that the PARN deadenylase protein possesses indeed rhythmicity on protein level, reaching its maximum levels during the day for diurnal organisms and during the night for nocturnal organisms.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Ημερήσιος - Βιολογικός ρυθμός.

Ο ημερήσιος - βιολογικός ρυθμός είναι ένας ρυθμός που διατηρεί τον κάθε οργανισμό σε μια εσωτερική περίοδο κοντά στις 24 ώρες, λόγω της περιστροφής της Γης, ακόμη και χωρίς την παρουσία εξωτερικών ερεθισμάτων. Με τον όρο εξωτερικά ερεθίσματα εννοούνται τα ερεθίσματα που θα προκαλέσουν αλλαγές στον ημερήσιο ρυθμό όπως είναι το φως, η θερμοκρασία, η υγρασία και η διαθεσιμότητα των τροφίμων. Εντούτοις, λαμβάνονται υπόψη αυτοί οι περιβαλλοντικοί παράμετροι ώστε να συγχρονίζεται ο εσωτερικός και ο εξωτερικός ρυθμός (Jud, Schmutz et al. 2005). Αυτός ο εσωτερικός ημερήσιος ρυθμός, υποδεικνύει την παρουσία ενός αυτόνομου συστήματος χρονομέτρησης ειδικό για κάθε οργανισμό το οποίο ονομάζεται κικκάδιο ρολόι ή κικκάδιος ρυθμός. Η λέξη κικκάδιο είναι επινοούμενη των λέξεων *circa* που σημαίνει περίπου και *dies* που σημαίνει ημέρα, στα Λατινικά (Hirota and Fukada 2004). Ο κικκάδιος ρυθμός επιτρέπει στους οργανισμούς να προβλέπουν και να προσαρμόζουν την φυσιολογία και τη συμπεριφορά τους στις επαναλαμβανόμενες περιβαλλοντικές αλλαγές που γίνονται κατά την περιστροφή της Γης γύρω από τον άξονά της, ώστε να συγχρονίζουν το εσωτερικό-αυτοσυντηρούμενο ρολόι με το εξωτερικό που οφείλεται στην περιστροφή της Γης και την επίδραση που έχουν τα εξωτερικά ερεθίσματα (Archer and Oster 2015, Peirson, Brown et al. 2018).

#### 1.1.1. Κικκάδιο ρολόι των θηλαστικών.

Το κικκάδιο ρολόι είναι αυτόνομο, αυτοσυντηρούμενο και παράλληλα διεγείρεται συνεχώς από εξωτερικά ερεθίσματα που ονομάζονται «Zeitgeber». Το «Zeitgeber» σημαίνει συγχρονιστής και προκύπτει από τις λέξεις *zeit* (χρόνος) και *geben* (δίνω) στα γερμανικά (Chung, Son et al. 2011). Το ρολόι αυτό είναι ένα σύστημα πολλαπλών ταλαντώσεων (ταλάντωση αναφέρεται οποιαδήποτε παλινδρομική περιοδική μεταβολή), ιεραρχικά διαμορφωμένο και οργανωμένο (Archer and Oster 2015). Αναλυτικότερα, ένας κεντρικός - κύριος ταλαντωτής θεωρείται το κεντρικό ρολόι καθώς λαμβάνει σήματα από τα εξωτερικά ερεθίσματα και συγχρονίζει περιφερειακά βασισμένα στον ιστό ρολόγια, τα οποία λαμβάνουν σήμα από αυτόν, με αποτέλεσμα τα περιφερειακά ρολόγια να συγχρονίζονται και μεταξύ τους (Reddy, Maywood et al. 2007). Ο κεντρικός ταλαντωτής - βηματοδότης εντοπίζεται στον υποθάλαμο, κοντά στο χάσμα των δύο οπτικών νεύρων και ονομάζεται υπερχιασματικός πυρήνας (SCN - suprachiasmatic nucleus) (Ripperger, Jud et al. 2011). Αυτός, συγχρονίζει τα δευτερεύοντα – περιφερειακά ρολόγια ως προς τους ρυθμούς συμπεριφοράς και γονιδιακής έκφρασης (Archer and Oster 2015) καθώς τα δεύτερα συντονίζουν τις βασικές οδούς για την εγκαθίδρυση μεταβολικών προγραμμάτων ώστε να διασφαλίσουν την κατάλληλη φάση της χρονικής λειτουργίας του κάθε οργάνου (Reddy, Maywood et al. 2007).

Η διατήρηση σταθερών σχέσεων στο κικκάδιο σύστημα κρίνεται απαραίτητη και υποδεικνύεται από μελέτες των περιφερειακών κυτταρικών ταλαντωτών σε καλλιέργειες. Αυτοί μπορούν να διατηρούν τη ρυθμικότητα τους μόνο για κάποιο χρονικό διάστημα. Από ένα σημείο και μετά απαιτείται ο SCN για τη διατήρηση του συγχρονισμού μεταξύ των περιφερειακών ρολογιών και μιας σταθερής σχέσης τους με τον εξωτερικό χρόνο και περιβάλλον (Archer and Oster 2015). Ο τρόπος που συγχρονίζονται τα περιφερειακά μεταγραφόμενα σε ολόκληρο τον οργανισμό και η σχετική συμβολή τους στον κικκάδιο ρυθμό παρουσιάζεται στη συνέχεια. Έχουν εντοπιστεί σε



πολλές μελέτες ότι μεγάλα όργανα όπως το ήπαρ, οι νεφροί και η καρδιά συμμετέχουν στον κirkάδιο ρυθμό και στον κύκλο ανατροφοδότησης (Reddy, Maywood et al. 2007).

### **1.1.1.1. Μοριακός μηχανισμός του κirkάδιου ρολογιού.**

Το σύστημα του κirkάδιου ρολογιού των θηλαστικών αποτελείται από τρία βασικά συστατικά: 1) τα μονοπάτια εισόδου, 2) τον αυτοσυντηρούμενο κεντρικό ρολόι (ή ταλαντωτή) και 3) τα μονοπάτια εξόδου της σηματοδότησης. Τα μονοπάτια εισόδου ενσωματώνουν τα Zeitgebers με τη λειτουργία ρολογιού, το οποίο στη συνέχεια δημιουργεί μονοπάτια εξόδου που ελέγχουν διάφορες βιολογικές διεργασίες. Τα μονοπάτια εξόδου διαμορφώνονται από τους κirkάδιους μεταγραφικούς παράγοντες και συν-παράγοντες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων που ακολουθούν κirkάδιο ρυθμό. Επομένως, το κirkάδιο ρολόι είναι ένας σύνθετος μηχανισμός χρονομέτρησης που ενσωματώνει τα ερεθίσματα εισόδου, και τα μονοπάτια αυτών, και μεταδίδει μονοπάτια εξόδου, με τρόπο συγχρονισμένο σε περίοδο 24 ωρών (Beta and Balatsos 2018) Όσον αφορά την αυτοσυντηρούμενη φύση του κirkάδιου συστήματος, αυτή επιτυγχάνεται από τον γενετικό μηχανισμό γνωστό ως το μοριακό κirkάδιο ρολόι. Τα κεντρικά γονίδια του ρολογιού αυτού (core Clock genes) κρίνονται απαραίτητα για τη δημιουργία και τη σταθεροποίηση του κirkάδιου ρυθμού στον οργανισμό αλλά και σε μεμονωμένα κύτταρα (Chung, Son et al. 2011). Ο μοριακός μηχανισμός του κirkάδιου ρολογιού βασίζεται κυρίως σε μια κοινή αρχή αυτορρυθμικής μέσω μεταγραφικών/ή και μεταφραστικών βρόχων ανατροφοδότησης (TTFL, Transcription/Translation Feedback Loop). Τόσο τα ρολόγια του SCN όσο και αυτά των περιφερειακών ιστών διαθέτουν τέτοιους βρόχους ανατροφοδότησης (Ripperger, Jud et al. 2011, Figueiredo Almeida 2018). Σε αυτούς τους βρόχους ανατροφοδότησης έχουν κυρίαρχο ρόλο τα κεντρικά γονίδια του ρολογιού και καθορίζουν την ρυθμική έκφραση γονιδίων που υπόκεινται σε κirkάδιο ρυθμό. Δύο κεντρικά στοιχεία αυτού του δικτύου στα οποία συμμετέχουν κεντρικά γονίδια είναι τα σύμπλοκα πρωτεϊνών CLOCK:BMAL1 και PER:CRY. Το κάθε μέλος του συμπλόκου θεωρείται μεταγραφικός παράγοντας κι έτσι έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων του ρολογιού (Figueiredo Almeida 2018).

Το CLOCK:BMAL1 είναι ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο των δύο μεταγραφικών παραγόντων CLOCK (100 kDa) και BMAL1 (78 kDa) που ανήκουν στην υπερ-οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων bHLH-PAS (basic helix-loop-helix-Period-ARNT-single-minded). Το σύμπλοκο αυτό συνδέεται στα E-box (enhancer box) των υποκινητών των γονιδίων-στόχων και ενεργοποιεί τη μεταγραφή τους με αποτέλεσμα να αποτελεί το κύριο θετικό βρόχο ανατροφοδότησης του κirkάδιου ρολογιού. Στα γονίδια που επάγεται η έκφρασή τους συμπεριλαμβάνονται και οι αρνητικοί ρυθμιστές του συμπλόκου CLOCK:BMAL1 που είναι τα Period (PERs: PER1, PER2 και PER3) και τα Cryptochrome (CRYs: CRY1 και CRY2) (Chung, Son et al. 2011). Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες PER και CRY που παράγονται ετεροδιμερίζονται και σχηματίζουν το σύμπλοκο PER:CRY. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο εισέρχεται στον πυρήνα και συνδέεται στους υποκινητές των CLOCK και BMAL1, εμποδίζοντας την έκφρασή τους. Αυτό αποτελεί τον κύριο αρνητικό βρόχο ανατροφοδότησης του κirkάδιου ρολογιού στα θηλαστικά(**Εικόνα 1**).

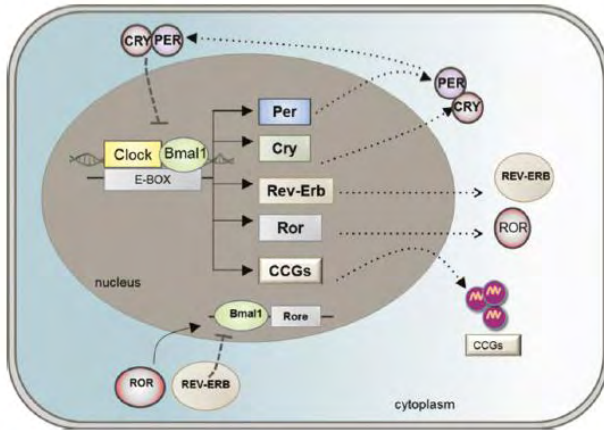
Παράλληλα με την ενεργοποίηση των PER και CRY από τη δράση του συμπλόκου CLOCK:BMAL1, ενεργοποιείται και η έκφραση των πυρηνικών υποδοχέων Ror και Rev. Τα μόρια ROR και REV-ERB ανήκουν στις οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων που είναι επίσης

σημαντικοί για τη ρύθμιση του ρολογιού (**Πίνακας 1**). Οι πρωτεΐνες ROR ενεργοποιούν τα γονίδια Clock και Bmal1, σχηματίζοντας ένα θετικό βρόχο ανατροφοδότησης, ενώ οι REV-ERB θεωρούνται καταστολείς αυτών, σχηματίζοντας ένα αρνητικό βρόχο ανατροφοδότησης. Αναλυτικότερα, τα RORα και REV-ERBα ανταγωνίζονται για δέσμευση στον υποκινητή του BMAL1 (Mirizio, Mendes Nunes et al. 2018) (Figueiredo Almeida 2018).

Όνομα	Πλήρες όνομα	Λειτουργία
CLOCK	Circadian Locomotor Output Cycles Kaput	Μεταγραφικός παράγοντας της υπερ-οικογένειας (bHLH)-PAS
BMAIL1	Γνωστό και ως MOP3 και ARNT-L 1 (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1)	Μεταγραφικός παράγοντας υπερ-οικογένειας (bHLH)-PAS
ERB-ERVα	Γνωστό και ως NR1D1 (nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1)	Μεταγραφικός αναστολέας που δρα στον πυρήνα, πυρηνικός υποδοχέας
RORα	Γνωστό και ως NR1F1 RAR-related orphan receptor alpha	Μεταγραφικός ενεργοποιητής που δρα στον πυρήνα, πυρηνικός υποδοχέας
PER	Period	Αρνητικός ρυθμιστής του κικκάδιου ρολογιού
CRY	Cryptochrome	Αναστολέας του συμπλόκου CLOCK-BMAL1

Πίνακας 1 Συγκεντρωτική παρουσίαση των κεντρικών γονιδίων του ρολογιού.

Εκτός από τη ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής ή/και μετάφρασης, οι κικκάδιες κεντρικές πρωτεΐνες του ρολογιού υπόκεινται και σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις με χαρακτηριστικό παράδειγμα την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών PER και CRY, από τις κινάσες της καζεΐνης 1ε (CK1ε) και 1δ (CK1δ) οι οποίες οδηγούν στην αποικοδόμησή τους και την επαναφορά του κικκάδιου ρυθμού. Επίσης, το BMAL1 σουμοϋλιώνεται και προάγει την αλληλεπίδραση με το CLOCK με αποτέλεσμα να προκαλείται η αδρανοποίηση των μορίων. Μια ακόμη, μετα-μεταφραστική τροποποίηση που υπόκειται το BMAL1 είναι η ακετυλίωση του που οδηγεί στη στρατολόγηση του CRY στο σύμπλοκο CLOCK:BMAL1 προωθώντας τη καταστολή του και τη διατήρηση του κικκάδιου ρυθμού. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση του CLOCK από την πρωτεΐνη κινάση C (PKC) και η επακόλουθη στρατολόγηση συμπαραγόντων στο σύμπλοκο CLOCK:BMAL1 φαίνεται να είναι σημαντική για την επαναφορά φάσης του κικκάδιου ρολογιού των θηλαστικών (Foster, Hughes et al. 2020) (Chung, Son et al. 2011).



Εικόνα 1 Ρύθμιση των κεντρικών γονιδίων του ρολογιού (Mirizio, Mendes Nunes et al. 2018).

### 1.1.2. Αντίληψη του φωτός και κιρκάδιος ρυθμός.

Το φως και οι πληροφορίες που λαμβάνονται σχετικά με την ώρα μέσω της ακτινοβολίας του φωτός αποτελούν τον πιο ισχυρό επαγωγέα του κιρκάδιου ρολογιού (Ripperger, Jud et al. 2011). Στα θηλαστικά οι αποκρίσεις στο φως διαμεσολαβούνται μέσω φωτοϋποδοχέων του αμφιβληστροειδούς (Peirson, Brown et al. 2018). Περιλαμβάνονται τα ραβδία και τα κωνία αλλά και τα φωτοευαίσθητα γαγγλιοκύτταρα του αμφιβληστροειδούς (pRGCs - Photosensitive Retinal Ganglion Cells) που εκφράζουν τον φωτοευαίσθητο φωτοϋποδοχέα μελανοψίνη (κωδικοποιείται από το γονίδιο *orn4*). Ως αποτέλεσμα, τα ραβδία ανιχνεύουν αμυδρό φως, τα κωνία ανιχνεύουν ενδιάμεσες και υψηλότερες εντάσεις φωτός και ενσωματώνουν διαλείπουσες αλλαγές στα επίπεδα φωτός. Η μελανοψίνη ανιχνεύει υψηλότερες εντάσεις φωτός για παρατεταμένες χρονικές περιόδους (Foster, Hughes et al. 2020). Στη συνέχεια, αφού ανιχνευτεί η ακτινοβολία του φωτός από τους φωτοϋποδοχείς, ο SCN λαμβάνει αυτές τις πληροφορίες και τις μεταφέρει στα περιφερειακά ρολόγια (Archer and Oster 2015). Έτσι, ενεργοποιείται η δράση διαφόρων γονιδίων σε συγκεκριμένους ιστούς ώστε να επαχθούν διάφορες βιολογικές διεργασίες που είναι απαραίτητες να πραγματοποιηθούν μετά την επαγωγή του φωτός. Μερικές από αυτές θεωρούνται οι διεργασίες που σχετίζονται με την έκφραση των γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια αλλά και ο μεταβολισμός υδατανθράκων και λιπιδίων (Chung, Son et al. 2011).

#### 1.1.2.1. Επιλογή ήπατος ποντικού (*Mus musculus* - C57BL/6J) ως μοντέλο για μελέτη του κιρκάδιου ρυθμού υπό την επίδραση του φωτός.

Το ποντίκι *Mus musculus* αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο λόγω της ευκολίας του γενετικού χειρισμού με σχετικά υψηλό ρυθμό αναπαραγωγής και ταχείας ανάπτυξης αλλά και λόγω της πλήρους αλληλούχησης του γονιδιώματός του. Από μελέτες που έγιναν σε αυτό κατανοήθηκε ο κιρκάδιος ρυθμός των θηλαστικών, καθώς προσδιορίστηκαν στοιχεία του ρολογιού και αποκαλύφθηκαν μεταβολικές, φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες που συνδέονται με το κιρκάδιο σύστημα (Ripperger, Jud et al. 2011).

Το ποντίκι ως νυκτόβιο τρωκτικό δραστηριοποιείται τη νύχτα, σε αντίθεση με τον άνθρωπο που είναι ημερήσιος οργανισμός και δραστηριοποιείται τη μέρα. Το τρωκτικό δεν εξαρτάται από το οπτικό του σύστημα καθώς η οπτική του οξύτητα είναι κακή, αλλά βασίζεται σε οσφρητικά, απτικά και ακουστικά ερεθίσματα για την επιβίωσή του (Peirson, Brown et al. 2018).

Παρόλα αυτά, μελέτες έχουν δείξει ότι εμφανίζει συμπεριφορές που καθοδηγούνται από την όραση, γι' αυτό τα ποντίκια συμμετέχουν σε μελέτες που σχετίζονται με την αντίληψη του φωτός και επαγωγή του σήματός του (Peirson, Brown et al. 2018). Τα εργαστηριακά ποντίκια συνήθως επάγονται σε κερκάδιο κύκλο 12 ώρες μέρα (Light) και 12 ώρες νύχτα (Dark) (12L:12D ή LD) που πλησιάζει τον φυσιολογικό κύκλο των ποντικών. Επίσης, υπάρχει και ο κερκάδιος κύκλος των σταθερών συνθηκών, δηλαδή 24 ώρες μέρα (24L:0D ή LL) και 24 ώρες νύχτα (0L:24D ή DD) (Jud, Schmutz et al. 2005). Οι συνεχείς συνθήκες έχουν ως αποτέλεσμα την αλλοίωση του φυσιολογικού κύκλου ημέρας/νύχτας των ποντικών διότι η έκφραση μερικών γονιδίων μεταβάλλεται. Συγκεκριμένα, τα γονίδια που υπόκεινται σε κερκάδια έκφραση έχουν την τάση να προσαρμόζονται και να εκφράζονται στα ίδια επίπεδα που εκφράζονταν όταν υφίστανται οι φυσιολογικές συνθήκες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το ρολόι είναι αυτόνομο και αυτοσυντηρούμενο και οι ρυθμοί δεν επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό απουσία φυσιολογικού κύκλου, εκτός αν υπάρχουν μεταλλάξεις στα κεντρικά γονίδια του ρολογιού ή χειρουργική αφαίρεση του SCN ή των οφθαλμών. Γι' αυτό επιλέγεται η εφαρμογή συνεχών συνθηκών στις πειραματικές διαδικασίες. Αντίθετα, τα γονίδια που δεν ακολουθούν τον κερκάδιο ρυθμό θα εκφραστούν διότι δεν διαθέτουν το πλεονέκτημα του συγχρονισμού.

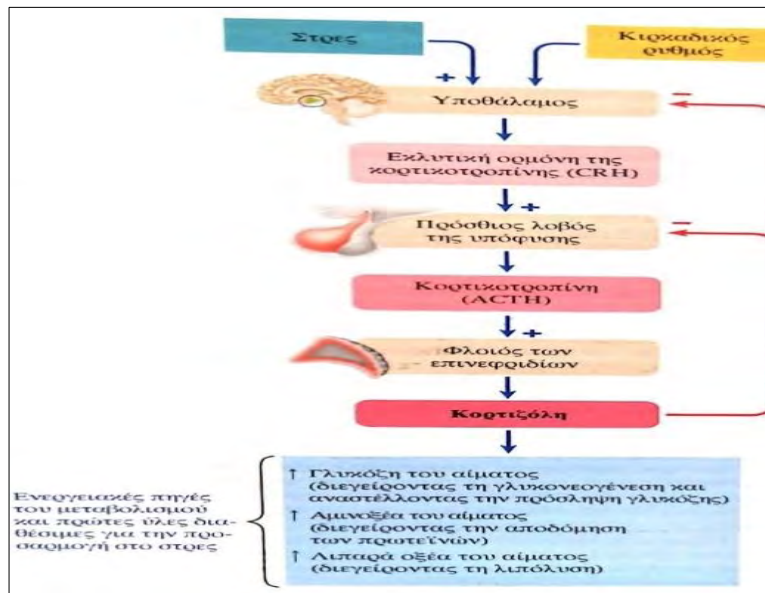
Μελέτες διαφόρων βιολογικών διεργασιών διεξάγονται σε καλλιέργειες αλλά και σε ποικίλους ιστούς και όργανα. Συγκεκριμένα για την μελέτη του κερκάδιου ρυθμού επιλέγεται συνήθως το ήπαρ διότι όπως αναφέρθηκε και παραπάνω συμμετέχει στο κερκάδιο ρυθμό αλλά και λόγω του ότι οι χειρισμοί σε αυτό είναι εύκολοι καθώς αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα όργανα του οργανισμού.

### **1.1.3. Γλυκοκορτικοειδή και κερκάδιος ρυθμός**

Πολλές ορμόνες μπορούν να επηρεάσουν τον κερκάδιο ρυθμό αλλά δίνεται έμφαση στα γλυκοκορτικοειδή. Ο φλοιός των επινεφριδίων εκκρίνει στεροειδείς ορμόνες που συντίθενται από ένα κοινό πρόγονο, τη χοληστερόλη. Μια κατηγορία επινεφριδικών στεροειδών είναι τα γλυκοκορτικοειδή με κύρια την κορτιζόλη (Bereshchenko, Bruscoli et al. 2018). Τα γλυκοκορτικοειδή συμμετέχουν στον μεταβολισμό της γλυκόζης, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων και στην προσαρμογή του στρες. Επίσης, ασκούν αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές δράσεις.

Η έκκριση των γλυκοκορτικοειδών δέχεται ρύθμιση από το κερκάδιο ρολόι των επινεφριδίων. Τα μέγιστα επίπεδα αυτών επιτυγχάνονται στην φάση δραστηριότητας του κάθε οργανισμού, δηλαδή την ημέρα για τους ημερήσιους οργανισμούς και τη νύχτα για τους νυκτόβιους (Sherwood 2016). Η έκκριση των γλυκοκορτικοειδών ακολουθεί το συνηθισμένο σύστημα αρνητικής ανάδρασης και την ιεραρχία υποθάλαμος - υπόφυση - φλοιός επινεφριδίων. Συγκεκριμένα, υπό την επίδραση του κερκάδιου ρυθμού ή άλλων ερεθισμάτων, όπως είναι το στρες, ο υποθάλαμος εκκρίνει την ορμόνη

της κορτικοτροπίνης (CRH – Corticotropin Releasing Hormone) που διεγείρει τα κορτικοτρόπα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης να παράξουν κορτικοτροπίνη (ACTH - Adrenocorticotrophic hormone). Έπειτα, αυτή διεγείρει τον φλοιό των επινεφριδίων στην έκκριση του γλυκοκορτικοειδούς – κορτιζόλη. Η ορμόνη αυτή με τη σειρά της, είτε ενεργοποιεί διεργασίες όπως είναι ο μεταβολισμός είτε αναστέλλει η ίδια την έκκρισή της μέσω του βρόχου ανατροφοδότησης διατηρώντας τον κιρκάδιο ρυθμό της (Εικόνα 2.) (Sherwood 2016).



Εικόνα 2 Έλεγχος της έκκρισης της κορτιζόλης μετά την επαγωγή του κιρκάδιου ρυθμού ή του στρες. Εμφανίζονται το μονοπάτι που επάγει την έκκρισή της αλλά και τα αποτελέσματα της από αυτή την έκκριση που περιλαμβάνουν θετικές αποκρίσεις σε διάφορους ιστούς αλλά και τον βρόχο ανατροφοδότησης για τον έλεγχο της έκκρισής της (Sherwood 2016).

### 1.1.3.1. Ρύθμιση κιρκάδιου ρυθμού από γλυκοκορτικοειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή υπόκεινται σε κιρκάδια έκφραση αλλά ταυτόχρονα συγχρονίζουν την έκφραση πολλών γονιδίων. Μελέτες έδειξαν ότι τα γλυκοκορτικοειδή είναι σε θέση, από μόνα τους, να συγχρονίζουν την έκφραση του 60% του κιρκάδιου μεταγραφώματος συμπεριλαμβανομένων των κεντρικών γονιδίων του ρολογιού Per1, Bmal1, Cry1 (Reddy, Maywood et al. 2007). Από αυτό φαίνεται ότι απουσία άλλων ρυθμικών ερεθισμάτων, τα γλυκοκορτικοειδή είναι επαρκή για να ασκήσουν ταχεία και εκτεταμένη επίδραση σε κιρκάδια μετάγραφα σε μεγάλα όργανα όπως είναι το ήπαρ και οι νεφροί (Reddy, Maywood et al. 2007).

Ο συγχρονισμός των κύριων γονιδίων του ρολογιού που επάγονται από τα γλυκοκορτικοειδή διεξάγεται από τη σύνδεση των γλυκοκορτικοειδών στους υποδοχείς των επινεφριδικών στεροειδών. Ο ιππόκαμπος του εγκεφάλου έχει δύο τύπους ενδοκυτταρικών υποδοχέων

επινεφριδικών στεροειδών με δράση μεταγραφικού παράγοντα, τον υποδοχέα αλατοκορτικοειδών (MR - mineralocorticoid receptor) και τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR - glucocorticoid receptor). Απουσία προσδέτη, οι υποδοχείς εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα ενώ όταν συνδεθεί η ορμόνη/προσδέτης μπορούν είτε να μετατοπιστούν στον πυρήνα είτε να παραμείνουν στο κυτταρόπλασμα ανάλογα με την σηματοδότηση που ακολουθηθεί. Στην περίπτωση που μετακινηθούν στον πυρήνα, συνδέονται σε αλληλουχίες του DNA που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs - Glucocorticoid Response Elements) καθώς αυτοί οι υποδοχείς διαθέτουν περιοχές που συνδέονται στο DNA (DBD, DNA-binding domain) (Kino 2000, Kino and Chrousos 2001). Στη συνέχεια, οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς δρουν άμεσα σε κύρια (Per1, Bmal1, Cry1) και μη γονίδια του ρολογιού επάγοντας τη μεταγραφή τους, με τη σύνδεσή τους στα στοιχεία GRE των υποκινητών τους (Reddy, Maywood et al. 2007).

### **1.1.3.2. Επιλογή κυττάρων HEK293T για μελέτη του κικκάδιου ρυθμού υπό την επίδραση της DEX**

Η δεξαμεθαζόνη (DEX - Dexamethasone) είναι συνθετικό γλυκοκορτικοειδές (Masferrer, Seibert et al. 1992) και προκαλεί τα ίδια αποτελέσματα με τα ενδογενή γλυκοκορτικοειδή. Χορηγείται σε διάφορες περιπτώσεις, μια εξ αυτών είναι η εξέταση της διαταραχής των επινεφριδίων που ονομάζεται σύνδρομο Cushing (Castro, Elias et al. 1999). Μελέτες σε εμφυτεύματα ιστών και καλλιέργειες ινοβλαστών έδειξαν ότι οι περιφερειακοί κυτταρικοί ταλαντωτές χάνουν τον συγχρονισμό τους απουσία οποιουδήποτε ερεθίσματος που επάγει τον συγχρονισμό (Reddy, Maywood et al. 2007). Το συνθετικό αυτό γλυκοκορτικοειδές έχει την ικανότητα να συγχρονίζει τον κικκάδιο ρυθμό, ρυθμίζοντας τα επίπεδα των κεντρικών γονιδίων του ρολογιού. Παράδειγμα αυτής της επίτευξης του συγχρονισμού, ακόμη και απουσία του SCN, αποτελεί η επώαση ανθρώπινων εμβρυϊκών νεφρικών κυττάρων (HEK293T - Human Embryonic Kidney) με DEX (Figueiredo Almeida 2018).

Οι μελέτες συνήθως διεξάγονται σε κύτταρα HEK293 καθώς χρησιμοποιούνται ευρέως στην κυτταρική βιολογία και βιοτεχνολογία. Αποτελεί τη δεύτερη κατά σειρά επιλογή μετά τα κύτταρα HeLa στη συχνότητα χρήσης (Lin, Boone et al. 2014). Τα κύτταρα HEK293 χαρακτηρίζονται από γρήγορη και εύκολη αναπαραγωγή και εύκολη συντήρηση. Επίσης, μέσω μιας ποικιλίας μεθόδων επιτυγχάνεται η διαμόλυνσή τους και αποτελούν εργαλείο ενισχυμένης έκφρασης πρωτεϊνών παράγοντας μεγάλη ποσότητα πρωτεϊνών σε λίγες εβδομάδες, διαδικασία που είναι περισσότερο χρονοβόρα για άλλες κυτταρικές σειρές (Thomas and Smart 2005).

## **1.2. Πολυ-(A) ουρά στα μόρια mRNA και ο ρόλος της**

Τα μόρια mRNA υπόκεινται σε πολλές συ-μεταγραφικές τροποποιήσεις κατά τη βιογένεσή τους, συμπεριλαμβανομένων του εναλλακτικού ματίσματος, προσθήκη 5' καλύπτρας και πολυ-(A) ουράς στο 3' άκρο αυτών των μορίων. Η τελευταία τροποποίηση, δηλαδή η προσθήκη της πολυ-(A) ουράς είναι ένα μακρύ τμήμα που αποτελείται από νουκλεοτίδια αδενίνης. Η προσθήκη αυτής, διαδικασία γνωστή ως πολυαδενυλίωση, διεξάγεται από την πολυ-(A) πολυμεράση και μια μεγάλη ποικιλία συμπαραγόντων. Αναλυτικότερα, μόλις συντεθούν τα πρώτα mRNA στον πυρήνα μέσω

της δράσης της RNA πολυμεράσης II, προστίθεται σε αυτά πολυ-(A) ουρά στο 3'-άκρο και καλύπτρα 7-μεθυλογουανωσίνης στο 5'-άκρο, ώστε να ωριμάσουν για να μεταφερθούν στο κυτταρόπλασμα όπου εκεί θα μεταφραστούν σε πρωτεΐνες (Bardwell, Zarkower et al. 1990).

Η προσθήκη της πολυ-(A) ουράς θεωρείται μια διεργασία που σταθεροποιεί τα ασταθή μόρια mRNA και τα προστατεύει από την παρουσία των εξωνουκλεασών που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα (Bardwell, Zarkower et al. 1990). Ειδικότερα, απουσία της πολυ-(A) ουράς, πολλά μόρια εξωνουκλεασών αναγνωρίζουν τα ασταθή μόρια mRNA με αποτέλεσμα να μεταβάλλουν την συγκέντρωσή τους και την ποσότητα αυτών που θα μεταφραστούν σε πρωτεΐνες οδηγώντας στη διαφορετική τύχη και σηματοδότηση των μορίων αυτών (Funakoshi, Doi et al. 2007). Άρα, έχει καταλυτικό ρόλο η προσθήκη της πολυ-(A) ουράς για την τύχη αυτών των μορίων.

### 1.2.1. Απαδενυλίωση των μορίων mRNA

Καθώς η σταθεροποίηση είναι ζωτικής σημασίας για την τύχη των μορίων mRNA, η αντίθετη διεργασία δηλαδή η αποσταθεροποίηση τους είναι εξίσου σημαντική διότι οδηγεί στην αποικοδόμηση των μορίων mRNA, μέσω διαφόρων μονοπατιών. Αναλυτικότερα, μερικά mRNA υπόκεινται σε τροποποιήσεις που αποσκοπούν στην αποσταθεροποίηση τους. Τα mRNA που αποικοδομούνται ανήκουν κυρίως στις εξής κατηγορίες: 1) mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, 2) μετάγραφα που έχουν αποσταθεροποιητικά στοιχεία πλούσια σε AU (ARE, AU-rich element), 3) mRNA που έχουν κωδικόνια πρόωρου τερματισμού που μεσολαβείται από μη-νοηματικές (nonsense) μεταλλάξεις και 4) μετάγραφα που αποσυντίθενται από την δράση των miRNA (Funakoshi, Doi et al. 2007).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η προσθήκη της πολυ-(A) ουράς είναι σημαντική διεργασία και οδηγεί στην σταθεροποίηση ενώ η αφαίρεση της πολυ-(A) ουράς οδηγεί στην αποσταθεροποίηση και την αποικοδόμησή των μορίων mRNA. Η διεργασία αυτή γνωστή ως απαδενυλίωση είναι μια μετα-μεταγραφική διεργασία. Μεταξύ των μορίων που προκαλούν αποσταθεροποίηση ανήκουν τα μόρια απαδενυλάσες που αφαιρούν την πολυ-(A) ουρά των mRNA. Μόρια mRNA που περιέχουν στοιχεία πλούσια σε AU προσελκύνονται από τις απαδενυλάσες και αποικοδομούνται (Siwaszek, Ukleja et al. 2014). Επίσης, πολλά μόρια mRNA αποσυντίθενται μέσω της έμμεσης δράσης των μορίων miRNA σε αυτά προκαλώντας αποσιώπηση της έκφρασης των γονιδίων μέσω αποικοδόμησης του mRNA και/ή αναστολής της μετάφρασης (Eulalio, Huntzinger et al. 2009). Αναλυτικότερα, στους ευκαρυώτες, η διαδικασία της αποικοδόμησης των περισσότερων mRNA αρχίζει με βράχυνση της πολυ-(A) ουράς στο 3' άκρο, το οποίο ακολουθείται από την απομάκρυνση της 5'-καλύπτρας και της επακόλουθης αποικοδόμησης μέσω δύο μονοπατιών στα οποία δρουν εξωνουκλεάσες με κατεύθυνση 5' προς 3' και 3' προς 5' (Funakoshi, Doi et al. 2007, Eulalio, Huntzinger et al. 2009). Η διαδικασία μείωσης της πολυ-(A) ουράς, που αναφέρεται ως απαδενυλίωση, έχει αντίκτυπο ως προς τον προσδιορισμό της ποσότητας πρωτεΐνης που παράγεται από το mRNA, μέσω της μετάφρασης. Αποτελεί το πρώτο και καθοριστικό στάδιο για τον έλεγχο της αποικοδόμησης των mRNA καθώς τα μόρια αυτά αποσταθεροποιούνται (Funakoshi, Doi et al. 2007).

### 1.2.2. Απαδενυλάσες

Η απομάκρυνση της πολυ-(A) ουράς πραγματοποιείται από τη δράση των απαδενυλασών. Οι απαδενυλάσες είναι εξωριβονουκλεάσες, που καταλύουν την αντίδραση απομάκρυνσης μορίων αδερίνης από την πολυ(A) ουρά με κατεύθυνση 3' προς 5' προκαλώντας μεταβολή των επιπέδων των mRNA σε όλα σχεδόν τα ευκαρυωτικά μονοπάτια (Siwaszek, Ukleja et al. 2014).

Οι απαδενυλάσες κατηγοριοποιούνται σε δύο υπερ-οικογένειες νουκλεασών, τις DEDD (Asp-Glu-Asp-Asp) και EEP (Exonuclease-Endonuclease-Phosphatase), με βάση τη δομή της καταλυτικής περιοχής (**Πίνακας 2.**) (Son, Park et al. 2018). Οι απαδενυλάσες είναι εξωριβονουκλεάσες των οποίων η δραστηριότητα εξαρτάται από  $Mg^{2+}$  και αποικοδομούν το RNA με κατεύθυνση 3' προς 5'. Η οικογένεια DEDD χαρακτηρίζεται από την παρουσία των καταλοίπων Asp και Glu σε τρία ενεργά μοτίβα (Siwaszek, Ukleja et al. 2014). Αυτά τα κατάλοιπα σχηματίζουν την κοιλότητα του ενεργού κέντρου και εμπλέκονται στη σύνδεση δύο ιόντων μετάλλου, τα οποία είναι σημαντικά για την κατάλυση (Balatsos, Maragozidis et al. 2012). Η οικογένεια EEP περιέχει στο ενεργό κέντρο τα καταλυτικά διατηρημένα κατάλοιπα Asp, Glu και His και καταλύουν την υδρόλυση φωσφορικού εστέρα με τη βοήθεια δύο ιόντων μαγνησίου. Από τις οχτώ απαδενυλάσες οι κύριες είναι το σύμπλεγμα CCR4-NOT, το PAN2-PAN3 και η PARN (Siwaszek, Ukleja et al. 2014). Η υπερ-οικογένεια DEDD μπορεί να χωριστεί σε δύο υποομάδες, DEDDy και DEDDh, σύμφωνα με την παρουσία ενός πέμπτου διατηρημένου καταλοίπου Τυροσίνης (Y) ή Ιστιδίνης (H), που συμβάλλουν στην ενεργοποίηση ενός μορίου νερού ή ενός ιόντος υδροξυλίου ώστε να διασπαστεί ο φωσφοδιεστερικός δεσμός (Balatsos, Maragozidis et al. 2012). Τα σπονδυλωτά διαθέτουν απαδενυλάσες με διακριτό υποκυτταρικό εντοπισμό και συμπαράγοντες σύνδεσης, στοχεύοντας συγκεκριμένα μόρια ή συγκεκριμένους τρόπους ρύθμισης των μεταβολικών οδών των RNA (Son, Park et al. 2018).

DEDD νουκλεάσες	EEP νουκλεάσες
CNOT7/POP2	CNOT6/CCR4
CNOT8	CNOT6L
CAF1Z	2'PDE
PARN	
PAN2	

Πίνακας 2 Μέλη που περιλαμβάνονται στις δύο οικογένειες DEDD και EEP (Son, Park et al. 2018).



### 1.2.3. Απαδενυλίωση στο κερκάδιο ρολόι

Η ρύθμιση της μεταγραφής, η πολυαδενυλίωση, η απαδενυλίωση, η βιογένεση μορίων και η αποικοδόμηση των RNA είναι διαδικασίες που ακολουθούν τον κερκάδιο ρυθμό. Ελέγχονται από την αφθονία και τη δράση διαφόρων μορίων όπως είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες, οι απαδενυλάσες και πολυ-(A)-πολυμεράσες. Όταν λαμβάνονται υπόψη το μήκος της πολυ-(A) ουράς του RNA και η επίδρασή του στη διαδικασία της μετάφρασης, η ρυθμική απαδενυλίωση εμφανίζεται ως ο πιο σημαντικός ρυθμικός έλεγχος (Kojima, Sher-Chen et al. 2012).

Η βράχυνση της πολυ-(A) ουράς των mRNA είναι μια εξαιρετικά ρυθμιζόμενη διαδικασία και συμβάλλει στην κερκάδια έκφραση του γονιδίου διότι η απαδενυλίωση καθορίζει τη σταθερότητα και τη διάρκεια ζωής του mRNA. Επίσης, μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση μερικών γονιδίων ήταν ρυθμική μετά την αφαίρεση του περιφερειακού ρολογιού. Στα γονίδια αυτά που περέμειναν ρυθμικά, αναφέρθηκαν και πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο και συγκεκριμένα στη διεργασία της απαδενυλίωσης (Beta and Balatsos 2018).

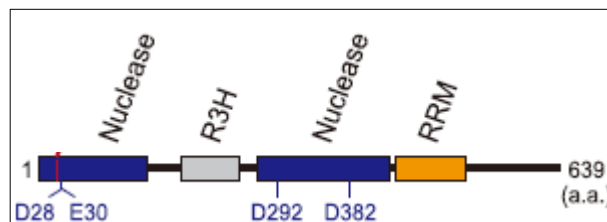
### 1.2.4. PARN

Η PARN (poly-(A)-specific ribonuclease, EC 3.1.13.4) είναι μέλος της οικογένειας D ριβονουκλεασών (RNase), η οποία αποτελεί μέλος της υπερ-οικογένειας εξωνουκλεασών DEDD και συγκεκριμένα ταξινομείται ως νουκλεάση DEDDh λόγω παρουσίας του καταλοίπου His377 (Balatsos, Maragozidis et al. 2012, Lee, Park et al. 2019). Η PARN διατηρείται στους περισσότερους ευκαρυώτες, με εξαίρεση τη *Drosophila melanogaster* και το *Saccharomyces cerevisiae* (Siwaszek, Ukleja et al. 2014, Lee, Park et al. 2019). Η PARN είναι ένα ομοδιμερές ένζυμο που το κάθε μονομερές δεσμεύει έναν κλώνο RNA μέσω της 5' καλύπτρας και της πολυ-(A) ουράς. Ο διμερισμός είναι απαραίτητος για την δράση της PARN. Το ένζυμο απαιτεί την παρουσία δισθενών ιόντων  $Mg^{2+}$  και ενός ελεύθερου 3'-υδροξυλίου με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται 5'-AMP κατά τη δράση του ενζύμου καθώς διασπάται ο φωσφοδιεστερικός δεσμός. Η PARN του ανθρώπου αποτελείται από 639 αμινοξέα και το μονομερές έχει μοριακή μάζα ίση με 74 kDa. Η αλληλουχία της PARN έχει τρεις χαρακτηριστικές περιοχές: την περιοχή της καταλυτικής νουκλεάσης (κατάλοιπα 1-177 και 246-391) και δύο περιοχές σύνδεσης στο στόχο RNA (**Εικόνα 3.**). Συγκεκριμένα, την περιοχή R3H (κατάλοιπα 178-225) και την περιοχή σύνδεσης RNA ή το μοτίβο αναγνώρισης RNA (RRM, RNA Recognition Motif) (κατάλοιπα 437-510) που συμβάλλουν στην δράση του ενζύμου. Το ενεργό κέντρο βρίσκεται εντός της περιοχής νουκλεάσης, η οποία συνδέεται με την περιοχή R3H μέσω μιας μεγάλης έλικας. Η περιοχή R3H συνδέεται στην πολυ-(A) ουρά του μορίου-στόχου και στρατολογεί την PARN προς αυτό. Το μοτίβο RRM συνδέεται και αυτό στην πολυ-(A) ουρά αλλά κυρίως είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση της 5' καλύπτρας του στόχου, σε διαφορετικές θέσεις σύνδεσης, και περιέχει σημαντικά αμινοξέα που ευνοούν τη σύνδεση με την 5' καλύπτρα, όπως είναι η Trp475. Επίσης, το μοτίβο RRM συμβάλλει στη συνολική αναδίπλωση και σταθεροποίηση της PARN και αλληλεπιδρά με την περιοχή R3H. Το μοτίβο αυτό δίνει στο ένζυμο τη μοναδική ιδιότητα μεταξύ των απαδενυλασών, διότι το ένζυμο αυτό έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά και με την 5' καλύπτρα του μορίου στόχου. Η 5' καλύπτρα των mRNA διεγείρει τη δραστηριότητα της PARN

και συμβάλλει στην κατάλυση της αντίδρασης, ενώ δεν έχει καμία επίδραση στη δραστικότητα άλλων απαδενυλασών (Balatsos, Maragozidis et al. 2012). Η 5' καλύπτρα ρυθμίζει τη δράση της PARN και έχει τη δυνατότητα να την αναστείλει όταν το πυρηνικό σύμπλεγμα που συνδέεται στην 5'-καλύπτρα (CBC, cap-binding complex) δεσμεύεται στο C-τελικό άκρο της PARN (Balatsos, Maragozidis et al. 2012).

Λόγω της μοναδικής ικανότητάς της να αλληλεπιδρά με την καλύπτρα στο 5' άκρο αλλά και με την πολυ-(A) ουρά στο 3' άκρο των mRNA, η PARN θεωρείται ότι εμπλέκεται έμμεσα στον μεταβολισμό των mRNA (Son, Park et al. 2018) (Lee, Park et al. 2019). Παράλληλα, η PARN προωθεί άμεσα την ωρίμανση των ncRNA (Non-coding RNA) περιλαμβανομένων των miRNAs (microRNA), των snoRNA (small nucleolar RNAs), των scaRNA (small Cajal body-specific RNAs), το συστατικό RNA τελομεράσης (TERC) και των Y RNA (Son, Park et al. 2018) (Shukla, Bjerke et al. 2019). Καθώς, η PARN εμπλέκεται και στην βιογένεση μη-κωδικών μορίων, αυτό οδηγεί στην κατάδειξη της ως ένα μόριο που μπορεί να εμπλέκεται και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες εκτός από τον έλεγχο της απαδενυλίωσης των mRNA μεταξύ των οποίων και η συμμετοχή της στον κικκάδιο ρυθμό. Όσο αφορά τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης PARN αποδείχθηκε ότι εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα και συγκεκριμένα σε πυρηνικά σωμάτια όπως είναι ο πυρηνίσκος και τα σωμάτια Cajal, αν και μία μελέτη δεν εντόπισε την πρωτεΐνη αυτή σε κύτταρα HeLa (Berndt, Harnisch et al. 2012, Son, Park et al. 2018). Σε αυτά τα πυρηνικά σωμάτια ωριμάζουν τα ncRNA (non-coding RNAs). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι μετακινείται μεταξύ του πυρήνα και του κυτοπλάσματος (Son, Park et al. 2018).

Ο εντοπισμός των μορίων-στόχων της PARN πραγματοποιείται με τη σύνδεση της πρωτεΐνης CUG-BP που δεσμεύεται ειδικά σε RNA-στόχους τα οποία περιέχουν στοιχεία πλούσια σε AU (ARE, AU-rich elements) (Funakoshi, Doi et al. 2007). Σε μια μελέτη αποδείχθηκε ότι η δράση της PARN δεν απαιτεί ιδιαίτερα την παρουσία συμπαραγόντα/συμπαραγόντων εκτός από την πρωτεΐνη που δεσμεύει το RNA, CUGBP1, η οποία όμως δεν έχει τον καθοριστικό ρόλο για τη δράση της PARN. Αυτό υποδηλώνει ότι ορισμένοι trans δραστικοί παράγοντες ίσως να κατευθύνουν την PARN προς τους στόχους της. Αυτό αποδείχθηκε όταν ανασυνδυασμένη PARN από E.coli πραγματοποίησε τη βράχυνση τμήματος του 3'-άκρου του miR-362-5p, αποκλείοντας την πιθανότητα ότι η PARN μπορεί να απαιτεί συμπαραγόντα/συμπαραγόντες (Lee, Park et al. 2019).



Εικόνα 3 Παρουσιάζεται το μονομερές της πρωτεΐνης PARN του ανθρώπου και οι περιοχές που συμβάλλουν στην δράση αυτού του ενζύμου (Lee, Park et al. 2019).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Το κερκάδιο ρολόι ελέγχει την έκφραση πολλών γονιδίων σε ποικίλα όργανα αλλά παράλληλα πολλά μετάγραφα και πρωτεΐνες αυτών των γονιδίων ρυθμίζουν το κερκάδιο ρολόι ώστε να επιτυγχάνεται η διατήρησή του και ο συγχρονισμός.

Καθώς η PARN είναι μια κύρια απαδενυλάση στα θηλαστικά και λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η έκφρασή της σε επίπεδο mRNA ρυθμίζεται από το κερκάδιο ρολόι, επιχειρήθηκε η συσχέτισή των επιπέδων της με το κερκάδιο ρυθμό σε επίπεδο πρωτεΐνης.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της PARN σε επίπεδο πρωτεΐνης ώστε να αποσαφηνιστεί αν όντως και η πρωτεΐνη διαθέτει κερκάδιο ρυθμό αλλά και η μελέτη των επιπέδων της κατά την διάρκεια του εικοσιτετράωρου. Η μελέτη αυτή στηρίζεται στην κυτταρική σειρά HEK293T και σε ήπαρ μυών C57BL/6J εφαρμόζοντας στύπωμα τύπου Western ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία της PARN στα κύτταρα. Έτσι, επιτεύχθηκε ο εντοπισμός της πρωτεΐνης στους δύο οργανισμούς και στη συνέχεια εκτιμήθηκαν τα επίπεδά της κατά τη διάρκεια του εικοσιτετράωρου.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. Υλικά

##### 3.1.1. Αντιδραστήρια

Acetic acid
Acrylamide
Ammonium persulfate (APS)
<i>N,N'</i> -methylene-bisacrylamide (bisacrylamide)
β- mercaptoethanol
Bovine serum albumin (BSA)
Bradford Protein assay
Bromophenol Blue
Coomassie Brilliant Blue G-250
Coomassie Brilliant Blue R-250
Dexamethasone (DEX)
Dithiothreitol (DTT)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
Glycerol
Glycine
Hydrochloric Acid (HCl)
HEPES
Isopropanol
Luminol
Methanol
Αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη
NP-40
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)
Ponceau S
Potassium Chloride (KCl)
Potassium Phosphate, monobasic (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
Sodium Chloride (NaCl)
Sodium Hydrogen Phosphate (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamine (TEMED)
Tris Base
Triton X-100
Tween-20

### 3.1.2. Δείκτες μοριακών μαζών

PageRuler™ Prestained Protein Ladder

### 3.1.3. Αντισώματα

Αντίσωμα	Εταιρεία
Δευτερογενές αντίσωμα αίγας έναντι IgG μύος ποντικού συζευγμένο με περοξειδάση του χρένου (HRP-conjugated secondary goat anti-mouse IgG), 1:25000	Pierce
Δευτερογενές αντίσωμα αίγας έναντι IgG κονίκλου συζευγμένο με περοξειδάση του χρένου (HRP-conjugated secondary goat anti-rabbit IgG), 1:50000	Pierce
Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της ανθρώπινης ACTIN ( $\beta$ - ACTIN) (1:3000)	Sigma-Aldrich
Μονοκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι του ανθρώπινου GAPDH (1:1000, 1:2000)	Cell Signaling Technology
Μονοκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι της ανθρώπινης PARN (1:200, 1:300, 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10000)	Abcam
Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της ανθρώπινης PARN (1:1000)	Santa Cruz

Πίνακας 3 Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην πτυχιακή. Οι αραιώσεις που αναγράφονται στον πίνακα είναι αυτές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

### 3.1.4 Διαλύματα

Ρυθμιστικά διαλύματα για τη λύση των κυττάρων

- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (Lysis Buffer- IP150): 20mM HEPES pH=7,9 ,150mM KCl, 0,05% NP-40, 1% Triton X-100. Στη συνέχεια, για την λύση των κυττάρων και τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών δημιουργείται το complete Lysis buffer- IP150 που περιέχει: 2mM DTT, 1x αναστολείς πρωτεασών (PIS), IP150 και σε κάποιες περιπτώσεις και 1mM EDTA.
- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (Lysis Buffer): 1mM PMSF, 2mM DTT, 1mM EDTA, 1x αναστολείς πρωτεασών (PIS)  
Προσθήκη 1μl αναστολείς πρωτεασών στα 100μl ρυθμιστικό διάλυμα λύσης IP150 .

#### Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

- Διαλύματα για την πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Tris-HCl): Βασίζονται στην περιεκτικότητα και στην συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου, η οποία συγκέντρωση καθορίζεται από τους διαφορετικούς οργανισμούς. Αναζήτηση από τους πίνακες, που παρατίθενται στη συνέχεια, για την αναλογία των διαλυμάτων που θα πρέπει να προστεθούν (**Πίνακας 4.**).  
Μίγμα ακρυλαμιδίου 30% v/w: ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο: 29:1 σε ddH<sub>2</sub>O.  
Μίγμα ακρυλαμιδίου 40% v/w: ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο: 37,5:1 σε ddH<sub>2</sub>O.  
1,5M Tris pH=8,8 για την πηκτή διαχωρισμού και 1M Tris pH=6,8 για το πηκτή επιστοίβαξης, 10% SDS, 10% APS, TEMED.
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10x (Running Buffer, Tris-Glycine): 25mM Tris base pH=8,3, 190mM Glycine, 0,1% SDS.  
Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται Running Buffer 1x.
- Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων 4x Laemmli ή 4x DTT Laemmli αντικαθιστώντας την β-mercaptoethanol με DTT: 240mM Tris-HCl pH=6,8, 40% Glycerol, 8% SDS, 5% β-mercaptoethanol or DTT, 0,04% Bromophenol Blue.

#### Διαλύματα για τη χρώση της πηκτής πολυακρυλαμιδίου

- Διάλυμα χρώσης Coomassie 0,1%: 40% Methanol, 10% Acetic Acid, 0,05% Coomassie Blue Brilliant R-250

#### Διαλύματα για ηλεκτρομεταφορά στη μεμβράνη PVDF

- Ponceau S: 0,1% w/v Ponceau S σε 1% οξικό οξύ.
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer buffer):  
Towbin Buffer 10X, pH=8,3-8,6 (25mM Tris, 192mM Glycine, 0,1% SDS, Methanol).  
Για την ηλεκτρομεταφορά χρησιμοποιείται Towbin Buffer 1X. Στην τελική αραιώση προστίθεται 15% ή 20% Methanol.

#### Διαλύματα για ανοσοαποτύπωση και ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών στη μεμβράνη PVDF

- Ρυθμιστικό διάλυμα παρεμπόδισης (Blocking Buffer):  
5% ή 10% Αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη, 0,1% Tween-20 σε TBS 1x.
- TBS-T: 0,1% Tween-20 σε TBS 1x
- PBS-T: 0,1% Tween-20 σε PBS 1x
- PBS 1x, pH=7,4: 130mM NaCl, 2mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- TBS 1x, pH=7,6: 50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl
- Διάλυμα χημειοφωταύγειας (ECL- Enhanced ChemiLuminescence): \_\_Immobilon Crescendo Western HRP substrate (Merck Millipore)

### Διάλυμα για την αποδέσμευση των αντισωμάτων από την μεμβράνη PVDF (Stripping buffer)

1. Ρυθμιστικό διάλυμα αποδέσμευσης (ABCAM Stripping buffer 1L, pH=2,2):  
Glycine 1,5% w/v, SDS 0,1% w/v, Tween-20 1% w/v.

Παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος αποδέσμευσης στον επιθυμητό όγκο φτάνοντας το pH=2,2 προσθέτοντας HCL, μετρώντας συνεχώς το pH με τον μετρητή pH. Προσθήκη νερού φτάνοντας τον τελικό όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος αποδέσμευσης και έλεγχος pH με τον μετρητή pH.

## **3.2. Μέθοδοι**

### **3.2.1. Πειραματικά πρωτόκολλα**

Το πειραματικό πρωτόκολλο για τα ποντίκια προέβλεπε για 28 αρσενικούς μύες C57BL/6J ηλικίας 8 εβδομάδων, οι οποίοι εκτράφηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες φωτοπεριόδου [12 ώρες μέρα (Light) και 12 ώρες νύχτα (Dark)]. Δύο εβδομάδες πριν τη θυσία, οι μύες χωρίστηκαν σε δυο ισάριθμες ομάδες όπου οι μισοί (14) μεταφέρθηκαν σε συνθήκες διαρκούς νύκτας (DD) και οι άλλοι μισοί εκτράφηκαν σε συνθήκες φυσιολογικής φωτοπεριόδου (LD). Έπειτα, θυσιάστηκαν ανά τέσσερις ώρες στο διάστημα ενός 24ώρου. Για κάθε χρονικό σημείο θυσιάστηκαν 2 μύες από κάθε ομάδα (LD και DD) κι έτσι υπάρχουν δύο επαναλήψεις (2 σετ).

Για τον έλεγχο της περιοδικότητας των κικκάδιων πρωτεϊνών στα κύτταρα HEK293T διεξήχθη συγχρονισμός τους με το κικκάδιο ρολόι μέσω επώασης των κυττάρων αυτών για δύο ώρες σε θρεπτικό υλικό παρουσία DEX. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν ανά τέσσερις ώρες συμπληρώνοντας ένα εικοσιτετράωρο και εξετάστηκαν οι εξής συνθήκες:

- 1) κύτταρα που επώαστηκαν για δύο ώρες με θρεπτικό υλικό που περιείχε 100nM DEX (ομάδα ZT, όπου ZT προσδιορίζει το Zeitgeber Time),
- 2) κύτταρα που επώαστηκαν για δύο ώρες με θρεπτικό υλικό που περιείχε 0,004% DMSO που αποτελεί το διαλύτη του DEX (ομάδα D, όπου D προσδιορίζει το DMSO) και
- 3) κύτταρα που δεν επώαστηκαν με κάποια ουσία, αλλά υποβλήθηκαν σε αλλαγές θρεπτικού υλικού όπως και οι άλλες δύο ομάδες (ασυγχρόνιστη ομάδα F, όπου F προσδιορίζει το θρεπτικό ελεύθερο ουσιών -Free).

Η παρουσία της ομάδας D προσφέρει τη δυνατότητα κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων ώστε οποιεσδήποτε αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που οφείλονται στην παρουσία του DMSO και όχι της DEX να μην επηρεάσουν τα τελικά αποτελέσματα και μετρήσεις.

Η επιλογή της ασυγχρόνιστης κυτταρικής σειράς έχει σκοπό τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών σε συνθήκες συγχρονισμού και μη με το κικκάδιο ρυθμό.

### **3.2.2. Λύση κυττάρων, απομόνωση πρωτεϊνών και ποσοτικοποίησή τους**

Η λύση των κυττάρων ακολουθεί το βήμα της συλλογής τους από την καλλιέργεια (HEK293T) ή μετά τη συλλογή του ιστού (ήπαρ μυών C57BL/6J). Με την λύση των κυττάρων επιτυγχάνεται η εύκολη πρόσβαση στα επιθυμητά μόρια που είναι οι πρωτεΐνες. ποσοτικοποιούνται ώστε να είναι γνωστή η συγκέντρωση των πρωτεϊνών (mg/ml) που περιέχει το κάθε δείγμα.

#### **3.2.2.1. Λύση κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνών**

Αρχικό στάδιο είναι η λύση των κυττάρων καταστρέφοντας τις κυτταροπλασματικές και πυρηνικές μεμβράνες των κυττάρων και σε επόμενο στάδιο απομονώνονται οι πρωτεΐνες, απομακρύνοντας το DNA και το RNA.

Όλη η διεργασία της λύσης των κυτταροπλασματικών και απομόνωσης των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε πάγο. Η διάσπαση των κυτταροπλασματικών και πυρηνικών μεμβρανών με υπερήχους (sonication) φέρει καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με την λύση που γίνεται μόνο με το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης διότι είναι μια μηχανική διαδικασία με μηχανική πίεση.

Επίσης, η λύση των κυττάρων στα ποντίκια είναι πιο δύσκολη, λόγω του ότι απαιτείται διάσπαση συμπαγούς ιστού με αποτέλεσμα η καταστροφή των μεμβρανών και η μετέπειτα απομόνωση των πρωτεϊνών να δυσχεραίνονται (Shao, Guo et al. 2016). Γι' αυτό πραγματοποιείται ομογενοποίηση του ιστού με αποτέλεσμα ο ιστός να λειαίνεται και να τεμαχίζεται σε μικρότερα κομμάτια και η διαδικασία της καταστροφής των μεμβρανών με υπερήχους (sonication) να απαιτεί περισσότερες επαναλήψεις.

##### **3.2.2.1.1. Λύση κυττάρων HEK και HeLa και απομόνωση πρωτεϊνών**

1. Επαναδιάλυση του ιζήματος, που αποθηκεύτηκε μετά από την συλλογή των κυττάρων, σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης.
2. Επώαση των δειγμάτων για 20min στον πάγο, πραγματοποιώντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα ανάδευση των δειγμάτων με την πιπέτα και έντονη ανάδευση (vortex) ώστε να διαλυτοποιηθεί το ίζημα.
3. Σπάσιμο των κυτταροπλασματικών και πυρηνικών μεμβρανών με υπερήχους σε πάγο (sonication: cycle: 1, amplitude: 40%, 2x15sec on, 2x15sec off)
4. Φυγοκέντριση των δειγμάτων σε 15000rpm για 20min, σε θερμοκρασία 4°C και έπειτα συλλογή του υπερκείμενου.



### 3.2.2.1.2. Λύση ηπατικού ιστού ποντικών και απομόνωση πρωτεϊνών

1. Συλλογή κομματιών από ήπαρ ποντικών, που βρίσκεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , με τη βοήθεια νυστεριού.
2. Ζύγισμα των δειγμάτων
3. Λύση των κυττάρων των δειγμάτων προσθέτοντας ρυθμιστικό διάλυμα λύσης.  
Στα 100mg δείγμα προσθήκη 1ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης.
4. Επώαση των δειγμάτων για 20-30min στον πάγο.
5. Ομογενοποίηση του ιστού με υπερήχους σε κύκλους 20-30 δευτερόλεπτων, αποφεύγοντας την ανεπιθύμητη δημιουργία αφρού διότι οι πρωτεΐνες έχουν μετουσιωθεί όταν εμφανίζεται ο αφρός λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας που προκαλείται από τους επαναλαμβανόμενους κύκλους.
6. Σπάσιμο των κυτταροπλασματικών και πυρηνικών μεμβρανών με υπερήχους σε πάγο (sonication: cycle: 1, amplitude: 40%, 3x15sec on, 3x15sec off)
7. Φυγοκέντριση στις 15000rpm για 20min, σε θερμοκρασία  $4^{\circ}\text{C}$  και έπειτα συλλογή του υπερκλειμένου.

### 3.2.2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών των δειγμάτων

Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών διεξάγεται ώστε να είναι γνωστή η συγκέντρωση των πρωτεϊνών (mg/ml) που περιέχει το κάθε δείγμα αλλά και για να φορτωθεί στην πηκτή η ίδια ποσότητα πρωτεϊνών από το κάθε δείγμα. Με αυτό τον τρόπο, το καθοριστικό κριτήριο διαμόρφωσης των αποτελεσμάτων θα είναι η μεταβολή της ώρας και η επιρροή αυτής στον κερκάρδιο ρυθμό των πρωτεϊνών, και δεν θα οφείλονται στις διαφορετικές ποσότητες πρωτεϊνών που φορτώθηκαν, οδηγώντας σε ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

#### 3.2.2.2.1. Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η δοκιμασία Bradford είναι μια μέθοδος ειδική για πρωτεΐνες που ποσοτικοποιεί την παρουσία πρωτεϊνών του κυτταρικού εκχυλίσματος. Ο προσδιορισμός Bradford βασίζεται στη δέσμευση των ομάδων σουλφονικού οξέος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 με τα βασικά (αμίνες) και τα αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών. Υπό όξινες συνθήκες, η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 είναι στην πρωτονιωμένη-κατιονική μορφή και υπάρχουν πολλά κατιόντα, δίνοντας κόκκινο χρώμα σε αυτή. Σε συνθήκες μείωσης των κατιόντων με επακόλουθη αύξηση του pH, η χρωστική είναι πράσινη ενώ η ανιονική μορφή έχει μπλε χρώμα (Jones, Daniel Hare et al. 1989). Το εργοστασιακό αντιδραστήριο Bradford που χρησιμοποιήθηκε στην διπλωματική είναι ένα διάλυμα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 και έχει κόκκινο χρώμα λόγω του χαμηλού pH του διαλύματος. Αυτό, παρουσία πρωτεϊνών, έχει σαν αποτέλεσμα την χρωματική αλλαγή του διαλύματος από κόκκινο σε μπλε και την μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής  $A_{\max}$ , από 470nm (απουσία πρωτεϊνών) σε 595nm. Έτσι, η ποσότητα πρωτεϊνών σε ένα δείγμα ποσοτικοποιείται άμεσα, μετρώντας την απορρόφηση στα 595nm καθώς, η ποσότητα της μπλε-ανιονικής μορφής της χρωστικής είναι ανάλογη με την ποσότητα πρωτεϊνών του δείγματος (Zor and Selinger 1996).

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που περιέχει το κάθε δείγμα υπολογίζεται σε mg/ml και στηρίζεται στην εξίσωση πρότυπης καμπύλης  $y=ax +b$ , όπου  $x$  είναι η συγκέντρωση των πρωτεϊνών και  $y$  η τιμή της απορρόφησης. Αυτή κατασκευάζεται βάσει γνωστών συγκεντρώσεων του BSA.

Αντιδραστήρια της δοκιμασίας Bradford για το κάθε δείγμα:

-20μl δείγματος

-780μl dH<sub>2</sub>O

-200μl αντιδραστήριο Bradford (5x Bradford)

Ταυτόχρονα, με τα δείγματα προς ποσοτικοποίηση ετοιμάζεται και ένα δείγμα μάρτυρας-τυφλό, το οποίο περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα λύσης αντί για κυτταρικό εκχύλισμα. Στο δείγμα μάρτυρα πραγματοποιείται η ίδια αραίωση και διαδικασία με όλα τα υπόλοιπα δείγματα.

Για την διεξαγωγή της ποσοτικοποίησης ακολουθούνται τα εξής βήματα:

1. Μετά τη λύση των κυττάρων και απομόνωσης των πρωτεϊνών, λαμβάνεται μικρή ποσότητα από κάθε δείγμα σε ένα σωλήνα τύπου erpendorf 1,5ml.
2. Πραγματοποιείται ανάλογη αραίωση των δειγμάτων.
3. Προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων στο κάθε δείγμα.
4. Επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 5-10min σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Μέτρηση φασματοφωτομετρικής απορρόφησης των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 595nm.
6. Υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που περιέχει το κάθε δείγμα σε mg/ml μέσω της εξίσωσης πρότυπης καμπύλης του BSA,  $y=ax +b$ , λαμβάνοντας υπόψη την αραίωση που έγινε προηγουμένως.
7. Φύλαξη των δειγμάτων στους -20°C ή -80°C.

Το εύρος συγκεντρώσεων των προτύπων (όπως BSA) καλύπτει το γραμμικό εύρος της ανάλυσης Bradford. Τα δείγματα αραιώνονται ώστε να βρίσκονται εντός του γραμμικού εύρους της ανάλυσης, στο οποίο είναι ακριβής ο προσδιορισμός. Αναλυτικότερα, απαιτείται αραίωση των δειγμάτων όταν η συγκέντρωση των πρωτεϊνών είναι υψηλότερη από τη συγκέντρωση στο γραμμικό εύρος της πρότυπης καμπύλης, με συνέπεια να προκύπτει ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα διότι η πρότυπη καμπύλη φτάνει σε κορεσμό σε υψηλές συγκεντρώσεις χρωστικής κι έτσι η ποσότητα σε πρωτεΐνες στο άγνωστο δείγμα υποεκτιμάται. Επίσης, απαιτείται αραίωση των δειγμάτων όταν η συγκέντρωση σε πρωτεΐνες του άγνωστου δείγματος είναι χαμηλότερη και προκύπτει το ακριβώς αντίθετο αποτέλεσμα και η ποσότητα σε πρωτεΐνες υπερεκτιμάται (Stoscheck 1990).

### 3.2.3. Στύπωμα τύπου Western

Το στύπωμα τύπου Western χρησιμεύει στον εντοπισμό πολυπεπτιδικών αλυσίδων που έχουν μεταφερθεί σε ένα λεπτό και μεμβρανώδες υλικό, αφού έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά. Οι πρωτεΐνες εντοπίζονται με ειδικά προς αυτές μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα (Tropp 2014). Η διαδικασία εντοπισμού της πρωτεΐνης στηρίζεται στην ειδική σύνδεσή της με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο εντοπίζεται και συνδέεται ειδικά με το δευτερογενές αντίσωμα που είναι τροποποιημένο και φέρει συζευγμένο ένζυμο περοξειδάση του χρένου ή αλκαλική φωσφατάση. Αυτό το ένζυμο μέσω της αντίδρασης που καταλύει παρουσία υποστρώματος εκπέμπεται φως και έτσι υποδεικνύεται η παρουσία της πρωτεΐνης – στόχου (Mahmood and Yang 2012).

Ακόμη, ο εντοπισμός της πρωτεΐνης – στόχου επιτυγχάνεται από τις ειδικές συνδέσεις μεταξύ του στόχου και του πρωτογενούς αντισώματος αλλά και από τις ειδικές συνδέσεις του πρωτογενούς με το δευτερογενές αντίσωμα. Όσο αφορά την πρώτη σύνδεση στηρίζεται στη θεωρία της σύνδεσης του αντιγόνου με το αντίσωμα, όταν επάγεται ο μηχανισμός άμυνας του οργανισμού από την εισβολή του ξένου προς τον οργανισμό αντιγόνου - πρωτεΐνη. Αναλυτικότερα, η θεωρία της σύνδεσης επιτυγχάνεται μέσω ειδικής αναγνώρισης της περιοχής επιτόπου της πρωτεΐνης – στόχου από το πρωτογενές αντίσωμα μέσω των μεταβλητών (V- Variable) περιοχών του (Kindt, Goldsby et al. 2007). Όσον αφορά τη δεύτερη σύνδεση, πραγματοποιείται μέσω της ειδικής και ισχυρής σύνδεσης των σταθερών περιοχών του πρωτογενούς αντισώματος με τις μεταβλητές περιοχές του δευτερογενούς (Ni, Xu et al. 2017).

#### 3.2.3.1. Δημιουργία πηκτής πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, SDS-PAGE και Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών

Ο σχηματισμός μιας πηκτής πραγματοποιείται ώστε να γίνει ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν. Δημιουργείται από τα μονομερή ακρυλαμίδιο και δισ-ακρυλαμίδιο τα οποία πολυμερίζονται δημιουργώντας το πολυακρυλαμίδιο, σε θερμοκρασία δωματίου. Το δισ-ακρυλαμίδιο δημιουργεί εγκάρσιες συνδέσεις με το ακρυλαμίδιο, δημιουργώντας το πλέγμα του πολυακρυλαμίδιου. Ο πολυμερισμός επάγεται από το APS που αποσυντίθεται αυθόρμητα σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες οι οποίες επάγουν τον πολυμερισμό. Το TEMED θεωρείται καταλύτης σχηματισμού ελευθέρων ριζών επιταχύνοντας τον πολυμερισμό (Menter and Laboratories 2000). Τα δύο αυτά αντιδραστήρια προστίθενται αφού έχουν προστεθεί όλα τα υπόλοιπα.

Οι πηκτές πολυακρυλαμίδιου αποτελούνται από δύο διαδοχικές πηκτές διαφορετικής πυκνότητας, την ανώτερη-επιστοιβαξής (stacking gel) pH=6,8 και την κατώτερη-διαχωρισμού (separating gel) pH=8,8. Το μειωμένο pH της πηκτής επιστοιβαξής και η μικρότερη συγκέντρωσή του πολυακρυλαμίδιου σε σχέση με την πηκτή διαχωρισμού εξυπηρετούν στον ίδιο σκοπό. Αναλυτικότερα, η συγκέντρωση του πολυακρυλαμίδιου στην πηκτή επιστοιβαξής είναι σταθερή και μικρότερη από αυτή της πηκτής διαχωρισμού διότι η πηκτή επιστοιβαξής δεν έχει στόχο των διαχωρισμό των πρωτεϊνών αλλά την κίνησή τους μέσα από τους μεγάλους πόρους ώστε να ευθυγραμμιστούν σε ένα ενιαίο μέτωπο φτάνοντας στην πηκτή διαχωρισμού ταυτόχρονα και να

διαχωριστούν σε αυτήν βάσει της μοριακής μάζας (Mahmood and Yang 2012). Οι πηκτές διαχωρισμού χαρακτηρίζονται από ποικίλες συγκεντρώσεις πολυακρυλαμιδίου λόγω των διαφορετικών ποσοστών μονομερών (Glavac and Dean 1993). Αυτή η συγκέντρωση καθορίζεται από το μέγεθος της υπό-μελέτης πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, όσο μειώνεται η συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου στην πηκτή διαχωρισμού, το μέγεθος των πόρων αυξάνεται και οι μεγαλομοριακές πρωτεΐνες διαχωρίζονται καλύτερα. Αντίθετα, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου, το μέγεθος των πόρων μειώνεται και οι μικρότερες πρωτεΐνες διαχωρίζονται καλύτερα (Bio-rad).

Η ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Sodium Dodecyl Sulfate–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και την ανάλυση αποδιαταγμένων αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών με βάση το μέγεθος τους καθώς αυτές κινούνται σε απόκριση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Βασίζεται στην κοινή έναρξη και πορεία των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών προς το ηλεκτρόδιο αντίθετου φορτίου, δηλαδή από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο (Mahmood and Yang 2012). Ο αποδιατακτικός παράγοντας SDS (ανιονικό απορρυπαντικό) συμβάλλει στην διεργασία αυτή λόγω του διττού ρόλου που έχει. Πιο συγκεκριμένα, η υδρόφιλη κεφαλή του SDS καταστρέφει τους μη-ομοιοπολικούς δεσμούς (δεσμοί υδρογόνου, ιοντικοί δεσμοί, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις) των πρωτεϊνών με συνέπεια την μερική απώλεια της τριτοταγούς δομής τους, δημιουργώντας επιμήκη μόρια (Bhuyan 2010). Επίσης, η υδρόφοβη ουρά του απορρυπαντικού αλληλεπιδρά με τα υδρόφοβα αμινοξέα των πρωτεϊνών μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων προσθέτοντάς τους αρνητικό φορτίο (Rath, Glibowicka et al. 2009). Ως αποτέλεσμα προκύπτουν επιμήκη αρνητικά φορτισμένα μόρια. Συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερη είναι η μοριακή μάζα και το μέγεθος μιας πρωτεΐνης τόσο μικρότερη είναι η κινητικότητα της στην πηκτή (Mahmood and Yang 2012).

### Πειραματική διαδικασία

Πρώτο βήμα είναι η δημιουργία της πηκτής διαχωρισμού, επιλέγοντας την κατάλληλη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου για να διαχωριστούν κατάλληλα οι πρωτεΐνες (**Πίνακας 4.**). Ένα μικρό στρώμα ισοπροπανόλης (2-προπανόλη) προστίθεται πάνω από την πηκτή διαχωρισμού πριν από τον πολυμερισμό για να απομακρυνθούν οι ανεπιθύμητες φυσαλίδες αέρα αλλά και να αποτραπεί η είσοδος του μοριακού οξυγόνου στην πηκτή, επιταχύνοντας τον πολυμερισμό. Μόλις πολυμεριστεί η πηκτή, η ισοπροπανόλη απομακρύνεται με dH<sub>2</sub>O και δημιουργείται η πηκτή επιστοιβαξής με σταθερή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου (**Πίνακας 4.**). Έπειτα, τοποθετείται η χτένα για τη δημιουργία των θέσεων υποδοχής των δειγμάτων, ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων, και αναμονή μέχρι να γίνει ο πολυμερισμός. Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, τοποθετώντας την πηκτή μαζί με το ικρίωμά της σε αυτήν. Επίσης, προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer 1x) που να καλύπτει πλήρως και την πηκτή και τη συσκευή ηλεκτροφόρησης αλλά και παγοκύστη για διατήρηση της θερμοκρασίας σε συνεχή σταθερά επίπεδα. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερο διαχωρισμό των πρωτεϊνών αλλά και σε καθαρότερες ως προς το σχήμα ζώνες.

Πριν το φόρτωμα των δειγμάτων έχει υπολογιστεί ο όγκος (μl) των δειγμάτων που θα ηλεκτροφορηθούν έτσι ώστε σε όλα τα πηγάδια να φορτωθεί ίση ποσότητα πρωτεϊνών. Τα δείγματα προετοιμάζονται κατάλληλα πριν ηλεκτροφορηθούν και φορτωθούν στις θέσεις υποδοχής της πηκτής επιστοιβαξής. Συγκεκριμένα, προστίθεται σε αυτά ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων, γίνεται μια γρήγορη φυγοκέντρηση και τέλος θερμαίνονται στους 95°C για 5min στο

heat block. Η θέρμανση κρίνεται αναγκαία διότι βοηθάει στην πλήρη μετουσίωση των πρωτεϊνών και συμβάλλει στο πιο εύκολο φόρτωμα των δειγμάτων. Εκτενέστερα, τα δείγματα πρωτεϊνών συνήθως είναι κολλώδη λόγω της παρουσίας του DNA που πιθανόν να παρέμεινε από την διαδικασία απομόνωσης των πρωτεϊνών. Έτσι, μέσω της θέρμανσης καταστρέφεται το DNA, τα δείγματα καθίστανται λιγότερο κολλώδη και το φόρτωμα στην πηκτή διευκολύνεται.

Έπειτα, η ηλεκτροφόρηση εκκινεί σε ένα κλειστό κύκλωμα με τη βοήθεια τροφοδοτικού που διαβιβάζει ρεύμα με τάση 100V, αφού πρώτα φορτωθεί στο πρώτο πηγάδι ο μάρτυρας γνωστών μοριακών μαζών.

<b>Πηκτή Διαχωρισμού (Separating gel) 5ml</b>		
	<b>10% (για τα κύτταρα HEK)</b>	<b>12% (για κύτταρα ήπατος ποντικού)</b>
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	2,425	2,175
<b>40% Acrylamide Mix (37,5:1)</b>	1,25	1,5
<b>1M Tris pH=8,8</b>	1,25	1,25
<b>10% SDS</b>	0,05	0,05

<b>Πηκτή Επιστοίβαξης (Stacking gel)</b>	
	<b>4% (3,5ml)</b>
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	2,66
<b>40% Acrylamide Mix (37,5:1)</b>	0,35
<b>1M Tris pH=6,8</b>	0,437
<b>10% SDS</b>	0,03465
<b>10% APS</b>	0,0175
<b>TEMED (μl)</b>	3,5

Πίνακας 4 Διαλύματα για την δημιουργία της πηκτής πολυακρυλαμίδιου.

### 3.2.3.2. Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών

Έπειτα από την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών ακολουθεί η ηλεκτρομεταφορά τους σε μεμβράνη. Η συγκεκριμένη διαδικασία προσφέρει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα σε σύγκριση με την παραμονή των πρωτεϊνών στη πηκτή: (α) οι μεμβράνες είναι εύκαμπτες και είναι εύκολες στο χειρισμό σε σύγκριση με τις πηκτές, (β) είναι πιο εύκολη η πρόσβαση των πρωτεϊνών που ακινητοποιούνται στη μεμβράνη με διαφορετικά αντισώματα, (γ) απαιτείται μικρή ποσότητα αντιδραστηρίων και οι χρόνοι επώασης με αυτά είναι πιο σύντομοι διότι οι αντιδράσεις είναι επιφανειακές και (δ) είναι δυνατή η παρατεταμένη αποθήκευση της μεμβράνης με τις προσδεσμένες πρωτεΐνες μετά την ολοκλήρωση ενός πειράματος στρώματος τύπου Western και η μετέπειτα χρήση της για πολλαπλές διαδοχικές αναλύσεις (Kurien and Scofield 2015).

Οι μεμβράνες που χρησιμοποιούνται για την διεξαγωγή αυτού του σταδίου είναι οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και PVDF (Polyvinylidene fluoride) αλλά προτιμάται η PVDF μεμβράνη διότι είναι πιο ανθεκτική και διαθέτει υψηλότερη ικανότητα δέσμευσης πρωτεϊνών. Πιο αναλυτικά, η μεμβράνη αυτή χαρακτηρίζεται από μεγάλη υδροφοβικότητα. Όταν όμως υποστεί κατάλληλη επεξεργασία, μέσω της ενυδάτωσής της από τη μεθανόλη, μειώνει την υδροφοβικότητά της, καθίσταται εν μέρει υδρόφιλη με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρά με τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες μέσω διπόλων και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (Akashi and Kuroda 2014). Αντίθετα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες μόνο μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.

Όσο αφορά την διεργασία της ηλεκτρομεταφοράς, δηλαδή την μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή και τη δέσμευσή τους στη μεμβράνη, αυτή διεξάγεται από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο αφού οι πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες λόγω του SDS. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε καθ' όλη τη διεξαγωγή της πτυχιακής είναι η Yrdimes Semidry Blotting Unit της Wealtec και απαιτείται το σύστημα στοίβαξης (sandwich) να είναι αυστηρά πακεταρισμένο και να έχουν απομακρυνθεί τις φυσαλίδες, ειδικότερα ανάμεσα στη μεμβράνη και στην πηκτή, καθώς εμποδίζουν τη διέλευση του ρεύματος και αποτρέπουν την μεταφορά των πρωτεϊνών (Ni, Xu et al. 2017). Επίσης, είναι απαραίτητος ο συνεχής εμποτισμός όλων των επιπέδων της ηλεκτρομεταφοράς με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς.

#### Πειραματική διαδικασία

Η ηλεκτρομεταφορά ξεκινά με την αφαίρεση της πηκτής από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης, το ξέπλυμα της πηκτής με  $dH_2O$ , την απομάκρυνση της πηκτής επιστοίβαξης και την τοποθέτηση της πηκτής διαχωρισμού στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς 1x (με μεθανόλη) για 10min. Έπειτα, κόβονται έξι διηθητικά χαρτιά Whatman για κάθε πηκτή και έχουν όλα το ίδιο μέγεθος με τη πηκτή (6cmx9cm). Τοποθετούνται και αυτά σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς για 10min. Η μεμβράνη PVDF κόβεται στο ίδιο μέγεθος με τα χαρτιά Whatman, ενεργοποιείται-ενυδατώνεται για 30sec σε 100% μεθανόλη, (Kurien and Scofield 2015) και τοποθετείται στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς για 10min. Τέλος στην κασέτα της ηλεκτρομεταφοράς τοποθετούνται με τη σειρά: τρία διηθητικά χαρτιά Whatman, η μεμβράνη προσανατολισμένη στο θετικό πόλο, η πηκτή προσανατολισμένη στον αρνητικό πόλο και τέλος ακόμη τρία διηθητικά χαρτιά Whatman. Για την συγκεκριμένη διπλωματική, η ηλεκτρομεταφορά διεξάγεται με σταθερή ένταση ρεύματος 0,27A για 52min για τα κύτταρα HEK293T και 54min/55min/56min για τα δείγματα C57BL/6J. Αφού τελειώσει η ηλεκτρομεταφορά σημειώνονται οι ζώνες του μάρτυρα που μεταφέρθηκαν, γεγονός που σημαίνει ότι έχει γίνει με επιτυχία η διαδικασία της μεταφοράς

των πρωτεϊνών και έπειτα, η μεμβράνη εμβαπτίζεται για 1-2min στην κόκκινη χρωστική Ponceau S. Εκεί διαπιστώνεται και η μεταφορά των πρωτεϊνών (Ni, Xu et al. 2017).

### 3.2.3.3. Χρώση της πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Μετά το τέλος της ηλεκτρομεταφοράς, ώστε να ελεγχθεί η απόδοση, και να εκτιμηθεί αν έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες στη μεμβράνη, μπορεί να γίνει χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue R-250. Η διαδικασία αρχίζει με την επώαση της πηκτής σε 10% οξικό οξύ με θέρμανση, μέχρι να βράσει. Έτσι, μονιμοποιούνται οι πρωτεΐνες στην πηκτή και ευνοούνται οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις πρωτεΐνες και τη χρωστική, που θα προστεθεί στη συνέχεια (Goldring 2018). Έπειτα, προστίθεται το διάλυμα χρώσης Coomassie και θερμαίνεται η πηκτή για 1min. Ακολουθεί, ανάδευση της πηκτής για 10min, ξέπλυμά του σε 10% οξικό οξύ, θέρμανση μέχρι να βράσει, ξέπλυμά του σε 10% οξικό οξύ και θέρμανση μέχρι να βράσει. Στο τέλος, η διαδικασία επιτυγχάνεται όταν παρατηρηθούν οι πρωτεΐνες.

### 3.2.3.4. Αποτύπωση στη μεμβράνη PVDF

Το στάδιο της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών ακολουθεί η επώαση της μεμβράνης σε ρυθμιστικό διάλυμα παρεμπόδισης-Blocking buffer για την αποφυγή των μη-ειδικών συνδέσεων των αντισωμάτων σε θέσεις που δεν έχουν δεσμευτεί πρωτεΐνες στη μεμβράνη PVDF κατά την ηλεκτρομεταφορά. Έπειτα, προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα, γίνονται πλύσεις, προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα και διεξάγονται πλύσεις.

Το ρυθμιστικό διάλυμα παρεμπόδισης προστίθεται με σκοπό να βελτιωθεί η αναλογία σήματος προς θόρυβο της μεμβράνης PVDF, προσθέτοντας πρωτεΐνες άλλης πηγής όπως είναι οι πρωτεΐνες του γάλακτος (καζεΐνες και πρωτεΐνες ορού γάλακτος) ή BSA, οι οποίες περιέχονται σε αυτό, διαλυμένες σε TBS-T ή PBS-T. Η εξήγηση μπορεί να δοθεί ως ακολούθως. Η μεμβράνη PVDF έχει πόρους στους οποίους δεσμεύονται οι πρωτεΐνες κατά την ηλεκτρομεταφορά. Παρόλα αυτά, υπάρχουν πόροι στους οποίους δεν έχουν δεσμευτεί πρωτεΐνες και έτσι με την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος παρεμπόδισης οι πόροι αυτοί καλύπτονται από πρωτεΐνες άλλης πηγής (Ni, Xu et al. 2017) (Cercek, Cercek et al. 1994). Ως αποτέλεσμα αυτού είναι η «κατευθυνόμενη» σύνδεση των αντισωμάτων προς τις επιθυμητές πρωτεΐνες βελτιώνοντας το λόγο σήματος προς θόρυβο. Η παρουσία του TBS-T ή PBS-T συμβάλλει στην μείωση των μη-ειδικών συνδέσεων. Στην παρούσα διπλωματική παρασκευάστηκε 5% ή 10% αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη διαλυμένο σε TBS-T και στην συνέχεια η μεμβράνη επωαζόταν με αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα παρεμπόδισης για 50min-1h σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.

Στη συνέχεια ακολουθεί το βήμα επώασης του πρωτογενούς αντισώματος αφού γίνει μια γρήγορη έκπλυση με TBS-T ή PBS-T. Το αντίσωμα αυτό έναντι της υπό μελέτη πρωτεΐνης προέρχεται είτε από ποντικό (πρωτογενή αντισώματα έναντι της ACTIN) είτε από κόνικλο (πρωτογενή αντισώματα έναντι των GAPDH, PARN) και συνδέεται ειδικά στην εξεταζόμενη πρωτεΐνη. Προστίθεται με κατάλληλη αραίωση και με το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, ολονύχτια ή για παραπάνω ώρες, στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθως, αφαιρείται το πρωτογενές αντίσωμα, γίνονται τρεις με πέντε πλύσεις για 5min ή 10min η καθεμιά υπό ανάδευση, με TBS-T

ή PBS-T. Οι πλύσεις αυτές συμβάλλουν στην μείωση των μη-ειδικών συνδέσεων των αντισωμάτων και την απομάκρυνση της περίσσειας ποσότητας του αντισώματος (Ni, Xu et al. 2017). Το Tween 20 που περιέχεται σε αυτά απομακρύνει όσες μη-ειδικές συνδέσεις πραγματοποιήθηκαν, μειώνοντας τον ανεπιθύμητο φθορισμό (Jyoti, Neha et al. 2019) (Cercek, Cercek et al. 1994).

Έπειτα, προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα που προέρχεται από αίγα έναντι του πρωτογενούς αντισώματος του ποντικού ή του κονίκλου και δεσμεύεται ειδικά και ισχυρά σε αυτό. Προστίθεται με κατάλληλη αραιώση και με το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, για μία ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Τέλος, ακολουθούν τρεις με πέντε πλύσεις για 5min ή 10min η καθεμία υπό ανάδευση, με TBS-T (ή PBS-T).

Τα ρυθμιστικά διαλύματα των πρωτογενών και των δευτερογενών αντισωμάτων έχουν ως στόχο την μείωση των μη - ειδικών συνδέσεων. Παρασκευάζονται από BSA ή γάλα, διαλυμένα σε TBS ή PBS, παρουσία Tween 20 ή και όχι, επιλέγοντας και την κατάλληλη συγκέντρωσή τους (%). Η επιλογή του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος των αντισωμάτων βασίζεται στα αντισώματα και τη δομή των πρωτεϊνών επειδή μπορεί να μεταβάλουν τα αποτελέσματα (Ni, Xu et al. 2017) (Jyoti, Neha et al. 2019).

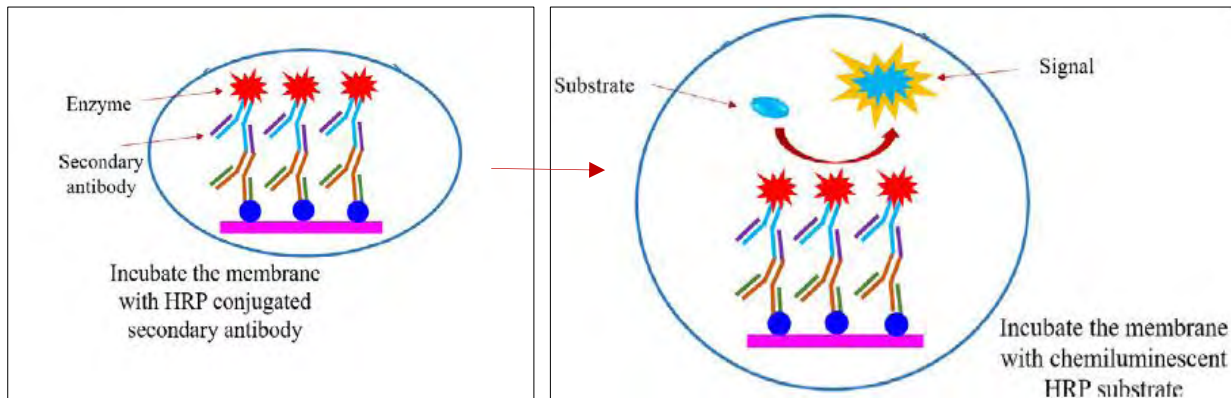
Να σημειωθεί ότι το πρωτογενές αντίσωμα προστίθεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από το δευτερογενές γιατί το δευτερογενές συνδέεται πιο εύκολα και πιο ειδικά σε σχέση με το άλλο. Η σύνδεση είναι πιο εύκολη καθώς η επώαση του γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Επίσης, υπάρχει δυνατότητα σύνδεσης πολλών δευτερογενών αντισωμάτων στο ίδιο πρωτογενές με αποτέλεσμα να ενισχύεται το σήμα. Η εξήγηση που μπορεί να δοθεί γι' αυτό είναι ότι οι σταθερές περιοχές μεταξύ δύο βαριών αλυσίδων είναι πανομοιότυπες στα αντισώματα με αποτέλεσμα να υπάρχει δυνατότητα σύνδεσης περισσότερων του ενός δευτερογενούς.

### 3.2.3.5. Ανοσοανίχνευση

Η ανοσοανίχνευση είναι μια τεχνική που επιτρέπει τον εντοπισμό των πρωτεϊνών που έχουν δεσμευτεί στη μεμβράνη και αποτελεί το τελευταίο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας του στυπώματος τύπου Western. Στηρίζεται στο γεγονός ότι το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με φθοροφόρο ή υπεροξειδάση (ή περοξειδάση) χρένου HRP ή αλκαλική φωσφατάση και η υπό μελέτη πρωτεΐνη ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας φθορισμό ή χρωμογόνα ή λουμινόλη (Ni, Xu et al. 2017). Στην παρούσα διπλωματική το δευτερογενές αντίσωμα ήταν συζευγμένο με το ένζυμο HRP και μέσω της αντίδρασης χημειοφωταύγειας εντοπίζονται οι πρωτεΐνες. Πιο συγκεκριμένα, σε αλκαλικό περιβάλλον το ένζυμο αυτό όταν προστεθεί εξωγενώς υπόστρωμα υδροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης εκπέμποντας φως το οποίο σημαίνει την παρουσία της υπό μελέτης πρωτεΐνης (**Εικόνα 4.**) (Cercek, Cercek et al. 1994). Η ανίχνευση των πρωτεϊνών στην διπλωματική πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη του υποστρώματος Immobilon Crescendo Western HRP substrate στη μεμβράνη και ακολούθησε η εμφάνιση της μεμβράνης και η ανίχνευση της πρωτεΐνης - στόχος. Για την ανίχνευση του σήματος χρησιμοποιήθηκαν τα μηχανήματα Uvitec Imager (Cambridge) και ImageQuant 800 Fluor (Cytiva). Ο χρόνος της εμφάνισης κυμαίνεται από δευτερόλεπτα μέχρι και ώρα ανάλογα την ποσότητα της πρωτεΐνης των δειγμάτων. Οι εμφανίσεις αλλά και οι ποσοτικοποιήσεις και οι κανονικοποιήσεις των δειγμάτων έγιναν μέσω του ImageJ ώστε να εκτιμηθεί ο κερκάδιος ρυθμός των πρωτεϊνών. Τα μόρια κανονικοποίησης, ACTIN (43 kDa) και GAPDH (37kDa),



χρησιμοποιούνται συγκρίνοντάς τα επίπεδά τους με αυτά των υπό μελέτη πρωτεϊνών ώστε να εκτιμηθούν οι μεταβολές στα επίπεδα των υπό μελέτη μορίων.



Εικόνα 4 Ανίχνευση της υπό μελέτης πρωτεΐνης μέσω αντίδρασης χημειοφωταύγειας (Jyoti, Neha et al. 2019).

### 3.2.3.6. Αποδέσμευση των αντισωμάτων από την μεμβράνη PVDF (Stripping)

Μερικές φορές μπορεί να γίνει αποσύνδεση των πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων από μια μεμβράνη, ώστε να επανεμφανιστεί συνδέοντας διαφορετικά αντισώματα. Με την τεχνική της αποδέσμευσης μειώνονται οι πιθανότητες να εμφανιστούν τα αποτελέσματα του αρχικού αντισώματος. Επίσης, η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για εξοικονόμηση δειγμάτων, χρόνου και για επανεμφάνιση κάποιας μεμβράνης με ένα διαφορετικό πρωτογενές αντίσωμα. Ακόμη, λόγω του ότι η μεμβράνη PVDF αναπτύσσει γενικά υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με ποικίλα μόρια (όχι μόνο με τις εξεταζόμενες πρωτεΐνες), η διαδικασία της αποσύνδεσης κρίνεται απαραίτητη ώστε να μην εμφανίζεται σήμα που να προέρχεται από θόρυβο. Τα βήματα για την αποδέσμευση των αντισωμάτων είναι τα ακόλουθα:

2. Παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος αποδέσμευσης στον επιθυμητό όγκο.
3. Δύο πλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα αποδέσμευσης, των πέντε λεπτών η καθεμιά Δύο πλύσεις με TBS, των δέκα λεπτών η καθεμιά Δύο πλύσεις με TBS-T, των πέντε λεπτών η καθεμιά
4. Χρώση της μεμβράνης με τη χρωστική Ponceau S. για 1-2min ώστε να ελεγχθεί η παρουσία των υφιστάμενων πρωτεϊνών παρέχοντας μια ποιοτική εκτίμηση (Ni, Xu et al. 2017) .
5. Ενεργοποίηση μεμβράνης με 100% μεθανόλη για 30sec.
6. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια με αυτήν που πραγματοποιείται όταν γίνει από την αρχή πείραμα στυπώματος τύπου Western.

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1.Βελτιστοποίηση στυπώματος τύπου Western

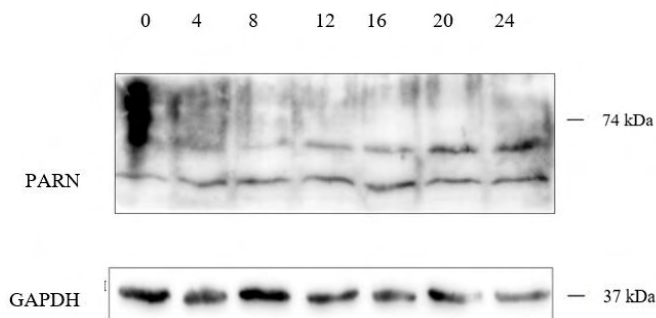
Το στύπωμα τύπου Western είναι μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδος ανίχνευσης πρωτεϊνών με τη χρήση ειδικών προς αυτές αντισωμάτων. Παρότι οι γενικές αρχές της μεθόδου και της μεθοδολογίας είναι επίσης ευρέως γνωστές, οι συνθήκες και τα επιμέρους βήματα της τεχνικής αυτής μπορούν να προσαρμόζονται ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε πειράματος. Παρακάτω, ακολουθούν οι προσπάθειες βελτιστοποίησης του στυπώματος τύπου Western για δείγματα C57BL/6J.

#### 4.1.1. Βελτιστοποίηση χρήσης πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της PARN (sc-135242, Santa Cruz Biotechnology)

Η επώαση του πρωτογενούς αντισώματος με τη μεμβράνη γίνεται σε αναδευτήρα κυκλικής ή οριζόντιας κίνησης. Στην παρούσα διπλωματική εξετάστηκε εάν ο οριζόντιος αναδευτήρας επηρεάζει αρνητικά την πρόσδεση του πρωτογενούς αντισώματος στη μεμβράνη.

Στην εικόνα 5 φαίνεται η εμφάνιση για τα αντισώματα της PARN και της GAPDH σε δείγματα ήπατος μυών C57BL/6J. Κάθε διαδρομή αφορά και ένα διαφορετικό χρονικό σημείο του 24ώρου κατά το οποίο έγινε η δειγματοληψία. Στην πηκτή φορτώθηκαν 50μg ολικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών.

Παρατηρείται πως η χρήση του αναδευτήρα οριζόντιας κίνησης δεν επηρεάζει την πρόσδεση του αντισώματος στη μεμβράνη καθώς η εμφάνιση των ζωνών της GAPDH είναι η αναμενόμενη. Παρόλα αυτά, παρατηρείται πως η πηκτή δεν έχει πολυμεριστεί σωστά, με αποτέλεσμα να μην έχουν διαχωριστεί σωστά οι πρωτεΐνες στη διαδρομή 2 (χρονικό σημείο 4). Επιπλέον, παρατηρείται πως το πολυκλωνικό αντίσωμα της PARN που έχει χρησιμοποιηθεί στο συγκεκριμένο πείραμα δεν εμφανίζει ειδικό σήμα (αναμενόμενη μοριακή μάζα PARN 74kDa). Για τους παραπάνω λόγους, επιβάλλεται η επανάληψη του πειράματος ώστε να εξεταστεί εάν η ανίχνευση της PARN δεν ήταν επιτυχής επειδή δεν διαχωρίστηκαν οι πρωτεΐνες στην πηκτή.



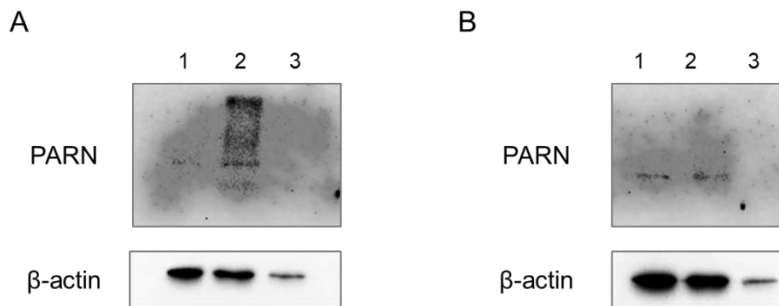
Εικόνα 5. Πείραμα στυπώματος τύπου Western με αύξηση της ποσότητας σε πρωτεΐνες από 30μg σε 50μg για κάθε δείγμα σε κύτταρα ήπατος ποντικού.

Η εμφάνιση του μη ειδικού σήματος για το πολυκλωνικό αντίσωμα της PARN είναι επαναλαμβανόμενη. Ως εκ τούτου, συμπεραίνουμε πως η χρήση μονοκλωνικού αντισώματος για

την ανίχνευση της PARN από εκχύλισμα πρωτεϊνών από ήπαρ μυών ίσως έχει καλύτερα αποτελέσματα.

#### 4.1.2. Βελτιστοποίηση χρήσης μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της PARN (ab188333, Abcam)

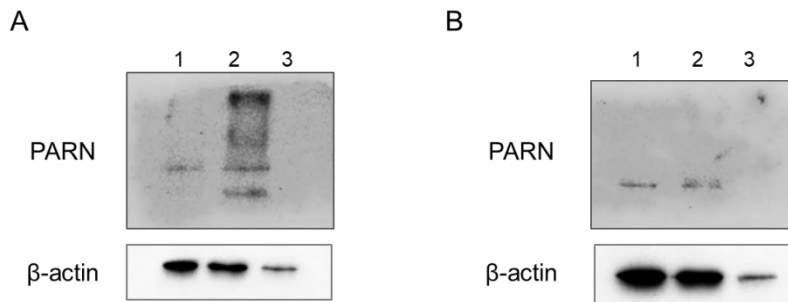
Για τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της PARN εξετάστηκαν αρκετές αραιώσεις για το αντίσωμα. Για την εξέταση της αποτελεσματικότητας του αντισώματος, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα πρωτεϊνών από κύτταρα και ιστούς που είναι επιβεβαιωμένη η ύπαρξη της πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα κυττάρων HeLa και HEK καθώς είναι γνωστό πως παράγουν PARN σε επίπεδα ικανά για την ανίχνευση με τη μέθοδο της Western. Καθώς οι κυτταρικές σειρές αυτές είναι ανθρώπινης προέλευσης, χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα πρωτεϊνών από ήπαρ μυός C57BL/6J ώστε να διαπιστωθεί εάν το αντίσωμα μπορεί να ανιχνεύσει τη ορθόλογη PARN του ποντικού.



Εικόνα 6. Στύπωμα τύπου Western σε εκχύλισμα πρωτεϊνών. Α. Αραίωση αντισώματος PARN 1:500, Β. Αραίωση αντισώματος PARN 1:1000. Και στις δυο εικόνες, η αραίωση για το αντίσωμα της β-ακτίνης είναι ίδια. 1: φαίνεται εκχύλισμα κυττάρων HeLa, 2: εκχύλισμα HEK, 3: εκχύλισμα ήπατος ποντικού

Λόγω συντομίας, στην εικόνα 6 φαίνονται δυο από τις αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για το αντίσωμα της PARN. Πιο συγκεκριμένα οι αραιώσεις 1:500 (Εικόνα 6.Α) και 1:1000 (Εικόνα 6.Β). Παρατηρείται πως το αντίσωμα δεν έχει προσδεθεί στο μόριο στόχο. Η επιβεβαίωση πως δεν πρόκειται για κάποιο λάθος χειρισμό προκύπτει από την ταυτόχρονη επώαση του κάτω μέρους της μεμβράνης με αντίσωμα ειδικό για τη β-ακτίνη, το οποίο φαίνεται να έχει προσδέσει ειδικά το μόριο αυτό για όλα τα δείγματα. Επιπλέον, φαίνεται πως η αποτελεσματικότητα της πρόσδεσης του αντισώματος μεταξύ των δυο συγκεντρώσεων αντισώματος είναι συγκρίσιμες. Σημειώνεται, πως το ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης του αντισώματος είναι 5% BSA σε TBS-T.

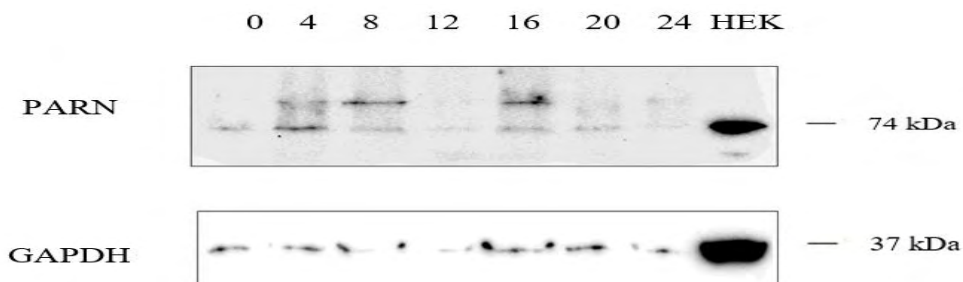
Πραγματοποιήθηκε επανάληψη της επώασης των μεμβρανών της εικόνας 6 με πρωτογενές αντίσωμα PARN στις ίδιες συγκεντρώσεις με τη χρήση διαφορετικού διαλύματος. Πιο συγκεκριμένα, το αντίσωμα της PARN αραιώθηκε εκ νέου σε συγκέντρωση 1:500 και 1:1000 σε ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης του αντισώματος είναι 1% BSA σε TBS. Στην εικόνα 7 φαίνονται τα αποτελέσματα της εμφάνισης. Παρατηρείται μια μικρή βελτίωση στην πρόσδεση του αντισώματος κυρίως στο εκχύλισμα των κυττάρων HEK, χωρίς ωστόσο η εικόνα να είναι ικανοποιητική.



Εικόνα 7. Στύπωμα τύπου Western σε εκχύλισμα πρωτεϊνών. Α. Αραίωση αντισώματος PARN 1:500, Β. Αραίωση αντισώματος PARN 1:1000. Και στις δυο εικόνες, η αραίωση για το αντίσωμα της β-ακτίνης είναι ίδια. 1: φαίνεται εκχύλισμα κυττάρων HeLa, 2: εκχύλισμα HEK, 3: εκχύλισμα ήπατος ποντικού

#### 4.1.2.1. Εξέταση αποτελεσματικότητας του μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της PARN (ab188333, Abcam) σε κύτταρα HEK

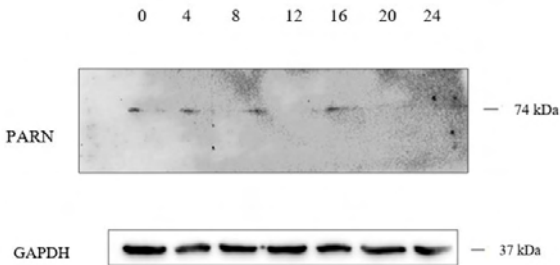
Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κυττάρων HEK μετά από πείραμα συγχρονισμού τους με το κερκάδιο ρολόι ομάδας ZT. Η απομόνωση των πρωτεϊνών στα κύτταρα αυτά είχε γίνει στο πλαίσιο παλιότερου πειράματος από την υπ. διδάκτορα Ραφαηλία Μπέτα και είχαν φυλαχθεί στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Παράλληλα με αυτά τα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε και ένα εκχύλισμα κυττάρων HEK από το οποίο εκχυλίστηκαν οι πρωτεΐνες την προηγούμενη μέρα της διαδικασίας του στυπώματος. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε επώαση της μεμβράνης με μεγαλύτερη συγκέντρωση αντισώματος (1:200). Στην εικόνα 8 φαίνονται τα αποτελέσματα του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται πως τα δείγματα από το παλαιότερο πείραμα έχουν οριακά ανιχνεύσιμα επίπεδα PARN, ενώ το πρόσφατο δείγμα από τα κύτταρα HEK φαίνεται να έχει μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεΐνης. Συμπεραίνουμε, πως τα παλαιότερα δείγματα δεν ήταν κατάλληλα για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της πρόσδεσης του αντισώματος καθότι φαίνεται να μην είναι πλέον ακέραια όσον αφορά στο πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο, κάτι που φαίνεται και από τα επίπεδα της GAPDH, η οποία ομοίως με την PARN, είναι οριακά ανιχνεύσιμη στα παλαιότερα δείγματα, αλλά ιδιαίτερα έντονη στο πρόσφατο δείγμα HEK.



Εικόνα 8. Πείραμα στυπώματος τύπου Western σε εκχύλισμα κυττάρων HEK (θετικός μάρτυρας) και κυττάρων HEK της ομάδας ZT με αραίωση 1:200 για το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της PARN.

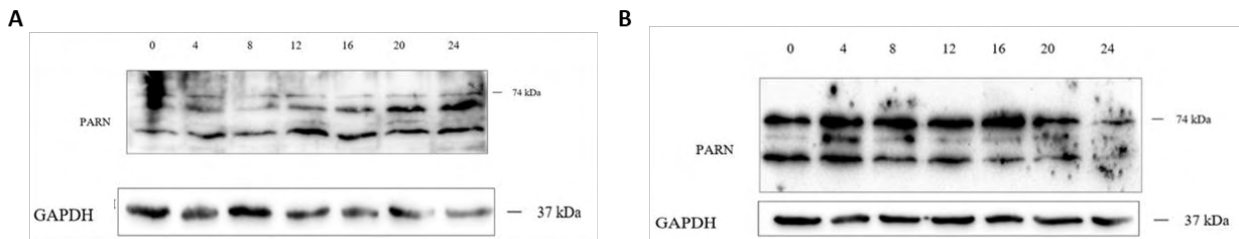
#### 4.1.2.2. Εξέταση αποτελεσματικότητας του μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της PARN (ab188333, Abcam) σε ήπαρ μυών

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε εκχύλισμα πρωτεϊνών από ήπαρ μυός C57BL/6J για όλα τα χρονικά σημεία του 24ώρου και χρήση του αντισώματος έναντι της PARN. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στην ομάδα LD ποντικών. Παρατηρήθηκαν εξαιρετικά αγνές ζώνες για την πρωτεΐνη προς μελέτη (εικόνα 9).

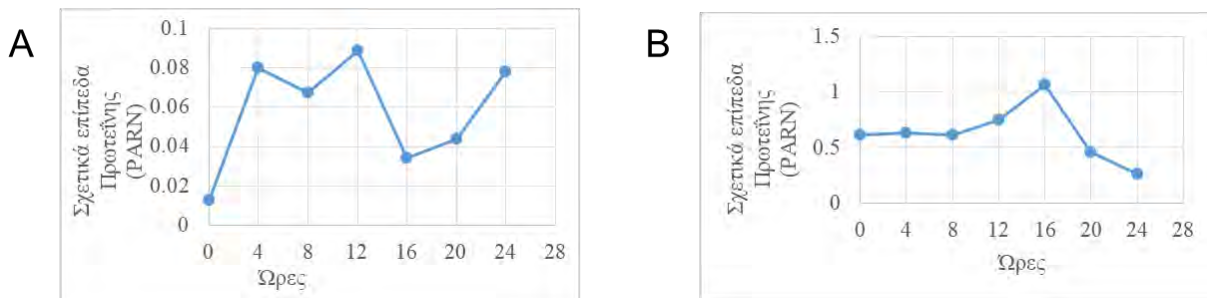


Εικόνα 9. Στύπωμα τύπου Western για εκχυλίσματα πρωτεϊνών ήπατος ποντικού.

Κατόπιν αυτού, επιχειρήσαμε την εκ νέου επώαση της μεμβράνης με πρωτογενές αντίσωμα έναντι της PARN για παραπάνω από 12-16 ώρες που είναι το σύνηθες. Πιο συγκεκριμένα, η μεμβράνη που φαίνεται στην εικόνα 9 αλλά και η μεμβράνη στην εικόνα 5 επώαστηκαν εκ νέου με πρωτογενές αντίσωμα έναντι της PARN. Σημειώνεται, πως η μεμβράνη της εικόνας 5 είχε επωαστεί αρχικά με το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της PARN. Στην εικόνα 10 φαίνεται πως οι 36 ώρες επώασης οδήγησαν στην ανίχνευση ειδικού σήματος για την PARN. Συγκεκριμένα, στην εικόνα 10.A παρατηρείται η ζώνη στα 74kDa ακριβώς, ενώ όταν επώαστηκε με το πολυκλωνικό αντίσωμα αυτή η ζώνη δεν είχε ανιχνευθεί. Στην εικόνα 10.B, παρατηρείται επίσης μια έντονη ζώνη στα 74kDa, αν και παρατηρούνται και άλλες δυο ζώνες χαμηλότερης μοριακής μάζας.



Εικόνα 10. Επανάληψη επώασης μεμβρανών με πρωτογενές αντίσωμα για 36 ώρες.

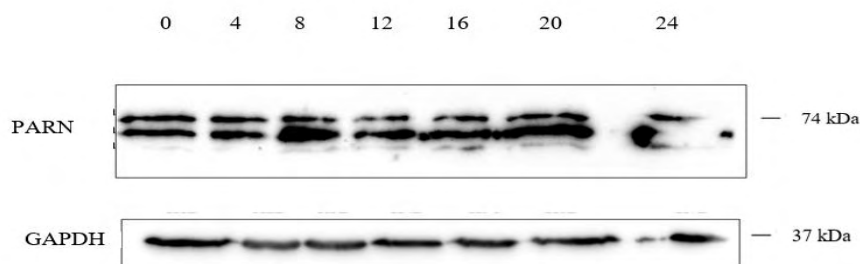


Διάγραμμα 1. Ποσοτικοποίηση των σχετικών πρωτεϊνικών επιπέδων της PARN. Η κανονικοποίηση πραγματοποιείται με τη σύγκριση των επιπέδων της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος (PARN) με τα επίπεδα της πρωτεΐνης αναφοράς (GAPDH).

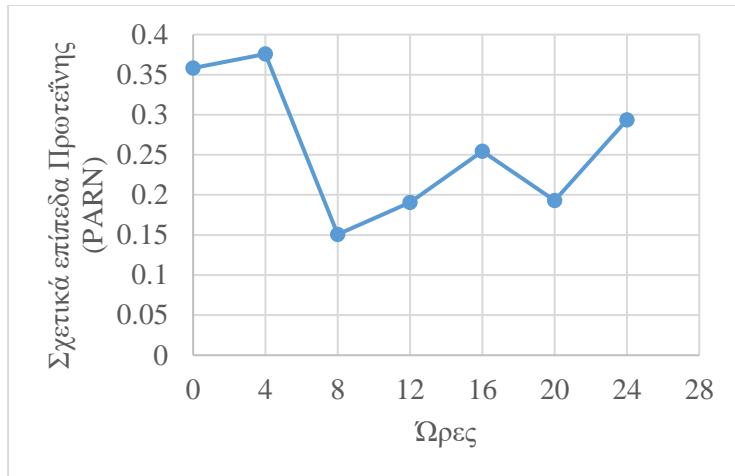
Στο διάγραμμα, παρουσιάζεται κικκάδιος ρυθμός της PARN που συνάδει περίπου με το κύκλο των ποντικών που δραστηριοποιούνται κυρίως τη νύχτα (χρονικό διάστημα 8 ως 16 για τα κύτταρα ήπατος ποντικών) κατά την οποία τα επίπεδα της είναι αυξημένα. Τα διαγράμματα απεικονίζουν την κανονικοποίηση των παρατηρούμενων επιπέδων της PARN σε σύγκριση με την GAPDH που εμφανίζονται στην εικόνα 10. Στο διάγραμμα A, τα επίπεδα είναι αυξημένα και στο χρονικό σημείο 4 αλλά και στο 24 που πιθανόν αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι η εμφάνιση στην εικόνα 10.A προήλθε από πείραμα που αρχικά έγινε με το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της PARN (εικόνα 5).

#### 4.2. Εξέταση των επιπέδων της PARN σε ήπαρ μυών

Εφόσον ταυτοποιήθηκαν οι συνθήκες στις οποίες το αντίσωμα είναι αποτελεσματικό, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε εκχύλισμα πρωτεϊνών από ήπαρ μυός C57BL/6J για όλα τα χρονικά σημεία του 24ώρου και χρήση του αντισώματος έναντι της PARN. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στην ομάδα DD ποντικών. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 11.

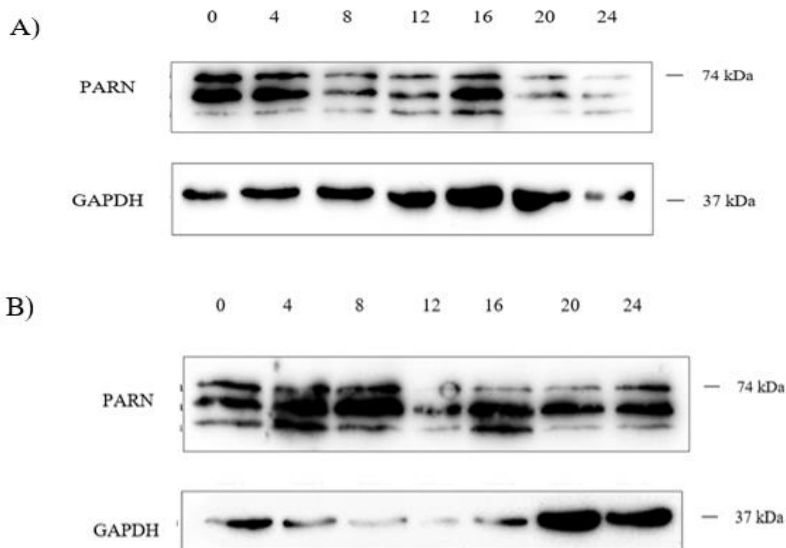


Εικόνα 11 Πείραμα στυπώματος τύπου Western σε κύτταρα ήπατος ποντικού για τα δείγματα DD.

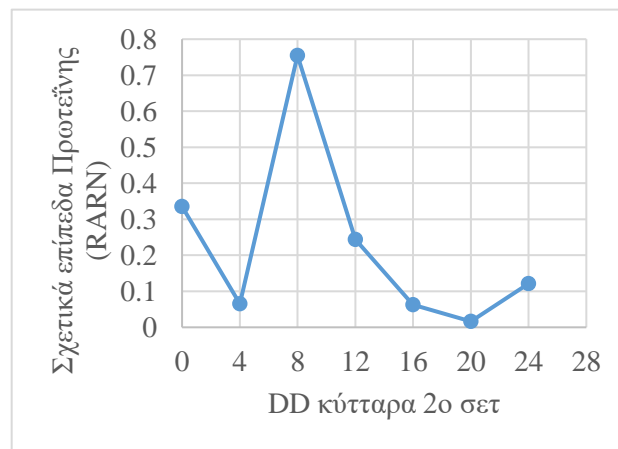
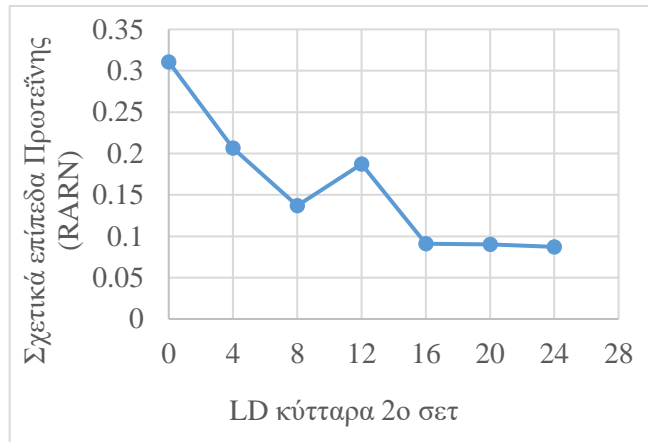


Διάγραμμα 2. Από την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι η PARN διατηρεί τον κερκάρδιο ρυθμό της φτάνοντας στα μέγιστα επίπεδα στο χρονικό διάστημα 8 ως 16 που αντιστοιχεί στη νύχτα.

Εφόσον ήταν δυνατή η ανίχνευση της PARN, τόσο στα δείγματα LD όσο και στα DD, προχωρήσαμε στην εξέταση των επιπέδων PARN στη δεύτερη ομάδα ποντικών LD και DD που αποτελεί βιολογική επανάληψη του ίδιου πειράματος.



Εικόνα 12 Πειράματα στυπώματος τύπου Western των A) LD και B) DD του 2ου σετ σε ποντίκια. Η επώαση του πρωτογενούς αντισώματος έναντι της PARN πραγματοποιήθηκε σε 24 ώρες.



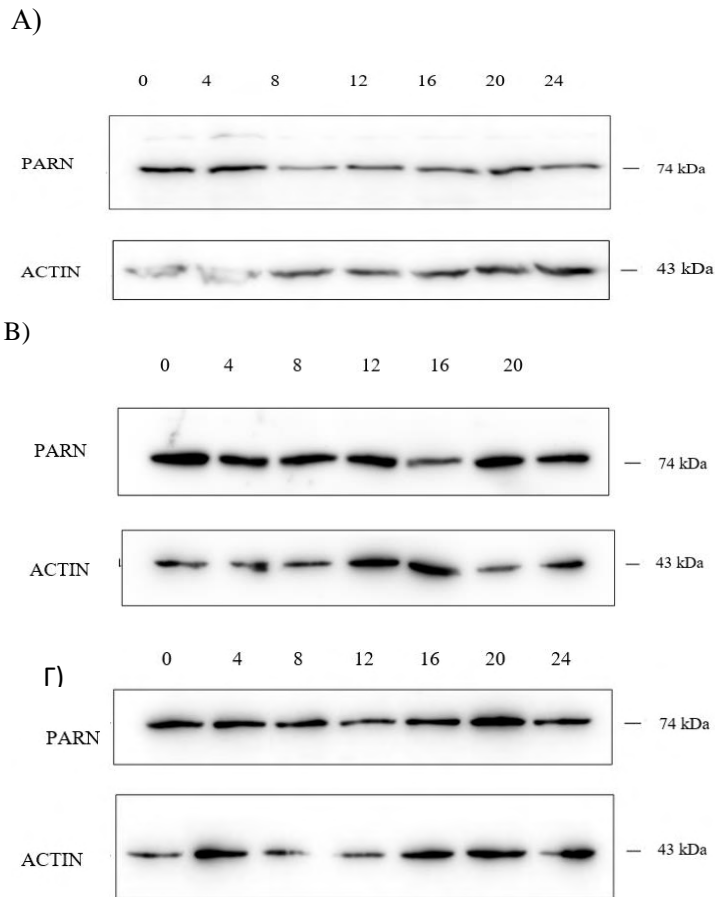
Διάγραμμα 3 Πάνω παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της εικόνας 12 A και κάτω το αποτέλεσμα της εικόνας 12 B

Στα διαγράμματα φαίνεται ότι η πρωτεΐνη PARN ακολουθεί κιρκάδιο ρυθμό. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η PARN έχει μέγιστα επίπεδα τη νύχτα (χρονικό διάστημα 8 ως 16 για τα κύτταρα ήπατος ποντικών) στους νυκτόβιους οργανισμούς ανεξαρτήτως του κύκλου φωτός/νύχτα. Τα διαγράμματα είναι σχεδόν σύμφωνα με το δεδομένο αυτό κι έτσι επιβεβαιώνεται ότι η PARN ακολουθεί κιρκάδιο ρυθμό.

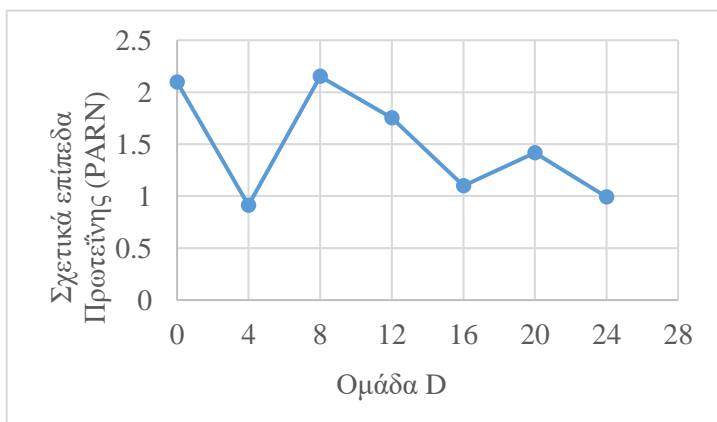
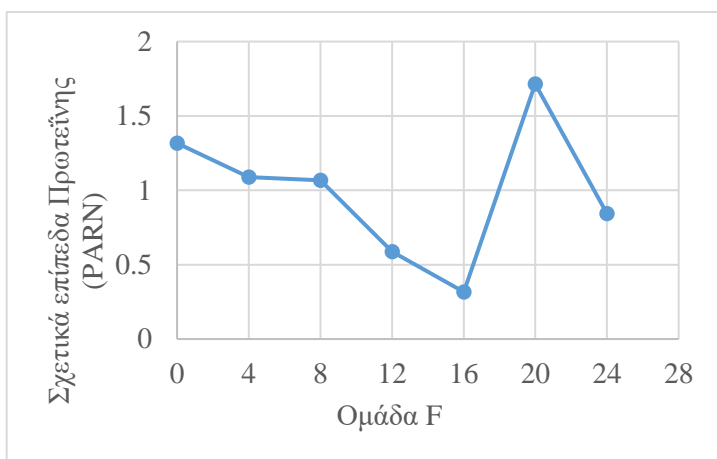
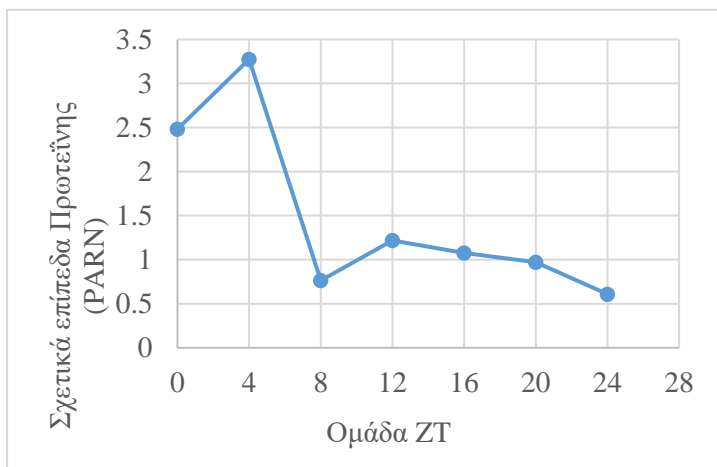


### 4.3. Εξέταση των επιπέδων της PARN σε κύτταρα HEK

Σε συνέχεια των προηγούμενων, πραγματοποιήθηκε στύπωμα τύπου Western για την ανίχνευση της PARN σε κύτταρα HEK μετά από πείραμα συγχρονισμού τους με το κερκάδιο ρολόι. Η διαδικασία συγχρονισμού με το ρολόι στα κύτταρα είχε γίνει στο πλαίσιο παλιότερου πειράματος από την υπ. διδάκτορα Ραφαηλία Μπέτα και το ίζημα των κυττάρων είχε φυλαχθεί στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Η εκχύλιση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε λίγες ημέρες πριν τη διαδικασία του στυπώματος. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στην εικόνα 13.



Εικόνα 13. Πειράματα στυπώματος τύπου Western των κυττάρων HEK των ομάδων A) ZT, B) F και Γ) D με αραιώση 1:500 σε 1% BSA/TBS για το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της PARN και με νέα απομόνωση και ποσοτικοποίηση των δειγμάτων στις ομάδες D και F.



Διάγραμμα 4 Το διάγραμμα της ομάδας ZT αντιστοιχεί στην εικόνα 13 Α, της ομάδας F στην εικόνα 13 Β και της ομάδας D στην εικόνα 13 Γ.

Στην ομάδα ZT που επάχθηκε ο συγχρονισμός όλων των κυττάρων HEK293T με το κινκάρδιο ρολόι παρατηρείται ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης διαθέτουν ρυθμικότητα καθώς αντιλαμβάνονται το εξωτερικό ερέθισμα, DEX. Η PARN έχει τα μέγιστα της επίπεδα στο χρονικό σημείο 4. Στην

ομάδα D παρατηρείται διαφορετική ρυθμικότητα των επιπέδων της PARN σε σύγκριση με αυτά της ομάδας ZT. Άρα, η παρουσία του DMSO από ότι φαίνεται επηρεάζει τα αποτελέσματα. Στην ομάδα F που δεν επάχθηκε ο συγχρονισμός των κυττάρων με το κινκάρδιο ρυθμό μέσω της DEX φαίνεται ότι η PARN δεν διαθέτει την ίδια κινκάρδια έκφραση με την ομάδα ZT καθώς το κάθε κύτταρο ακολουθεί τον δικό τους αυτοσυντηρούμενο ρυθμό.

## 5. Συζήτηση

Η ρύθμιση της μεταγραφής, η πολυαδενυλίωση, η απαδενυλίωση, η βιογένεση μορίων και η αποικοδόμηση των RNA είναι διαδικασίες που ακολουθούν τον κερκάρδιο ρυθμό. Ελέγχονται από την αφθονία και τη δράση διαφόρων μορίων όπως είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες, οι απαδενυλάσες και πολυ-(A)-πολυμεράσες. Η ρυθμική απαδενυλίωση θεωρείται ως ο πιο σημαντικός ρυθμικός έλεγχος καθώς η πολυ-(A) ουρά του RNA καθορίζει την ποσότητά του RNA που θα μεταφραστεί σε πρωτεΐνη. Όσο αφορά τις απαδενυλάσες έχει αποδειχθεί ότι μεγάλος αριθμός αυτών παρουσιάζουν ρυθμικότητα συμπεριλαμβανομένων των PARN και Pan2 (Yao, Kojima et al. 2020). Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι τα επίπεδα mRNA των Creb2, Creb4, PARN και Gld2, εκφράστηκαν ρυθμικά (Kojima, Sher-Chen et al. 2012). Η μελέτη του κερκάρδιου ρυθμού σε επίπεδο πρωτεΐνης ενός μορίου πέραν της μελέτης του σε επίπεδο mRNA είναι αναγκαία διότι το mRNA ενός γονιδίου παράγεται αλλά δεν είναι βέβαιο αν παράγεται απευθείας και η πρωτεΐνη του γονιδίου αυτού. Τις πλείστες περιπτώσεις υπάρχει μια χρονοκαθυστέρηση ως προς την παραγωγή της πρωτεΐνης διότι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις εμπλέκονται μεταξύ μεταγραφής και μετάφρασης.

Ακόμη μια μελέτη σε ήπαρ ποντικού έδειξε ότι τα ερεθίσματα που επάγουν τον ρυθμό ελέγχουν και τη ρυθμική έκφραση απαδενυλασών. Παράδειγμα αυτού αποτελεί η PARN με τα επίπεδα της να κορυφώνονται γύρω από το ZT 5 (ZT, Zeitgeber time, όπου ZT 0 ορίζεται ως ο χρόνος που το φως είναι ανοιχτό και ZT 12 ως ο χρόνος που το φως δεν υφίσταται πλέον) (Yao, Kojima et al. 2020).

Τα αποτελέσματα που εξάγονται από την συγκεκριμένη εργασία είναι ότι η PARN σε επίπεδο πρωτεΐνης παρουσιάζει ρυθμικότητα και διατηρεί την ρυθμικότητά της ακόμη και απουσία εξωτερικού ερεθίσματος, όπως φάνηκε στα πειράματα που διεξάχθηκαν σε ήπαρ ποντικών υπό σταθερές συνθήκες αλλά και στα κύτταρα HEK293T της ομάδας F. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία DMSO μεταβάλλει τα αποτελέσματα και τη ρυθμικότητα των μορίων και επίσης επιβεβαιώθηκε ότι το κάθε κύτταρο διατηρεί την αυτοσυντηρούμενη ρυθμικότητά του που είναι χαρακτηριστικό του εσωτερικού περιφερειακού ρολογιού του κάθε ιστού. Επίσης, η μελέτη της επίδρασης του φωτός και του σκότους έχοντας ως αντίκτυπο τον κερκάρδιο ρυθμό και η μετέπειτα επίδρασή τους στα επίπεδα της πρωτεΐνης σε ήπαρ μυών C57BL/6J διεξάχθηκαν και φάνηκε ότι η πρωτεΐνη είναι ρυθμική (συνθήκες των LD κυττάρων) αλλά και ότι διατηρεί αυτήν την ρυθμικότητά απουσία εξωτερικού ερεθίσματος (συνθήκες των DD κυττάρων).

Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης PARN ακολούθησε μια πορεία βημάτων αρχίζοντας από την χρήση πολυκλωνικού αντισώματος. Αναλυτικότερα, η σειρά που διεξήχθη για τον εντοπισμό της PARN μέσω της χρήσης του πολυκλωνικού αντισώματος είναι η ακόλουθη: 1) έγινε αλλαγή αναδευτήρα που εκτελεί οριζόντια ανάδευση και 2) αυξήθηκε η ποσότητα σε πρωτεΐνες για το φόρτωμα κατά την ηλεκτροφόρηση. Όλα αυτά δυστυχώς δεν επέφεραν τα επιθυμητά αποτελέσματα διότι δεν εντοπιζόταν η PARN και εμφανιζόταν μη-ειδικό σήμα. Γι' αυτό, η βασική παράμετρος που έδωσε τροπή και άλλαξε την αποτελεσματικότητα των πειραμάτων ήταν η εφαρμογή μονοκλωνικού ως πρωτογενές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης PARN. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν παλιότερα στο εργαστήριο ήταν πολυκλωνικά και εμφανιζόταν καθόλου ή πολύ έντονο μη-ειδικό

σήμα. Παρόλο που τα πολυκλωνικά έχουν ευρεία εφαρμογή για ερευνητικούς σκοπούς στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν ήταν αποτελεσματική η χρήση τους. Αναλυτικότερα, τα πολυκλωνικά αντισώματα παράγονται από διαφορετικούς κλώνους Β λεμφοκυττάρων και μπορούν να συνδεθούν σε πολλούς διαφορετικούς επιτόπους ενός αντιγόνου. Αντίθετα, τα μονοκλωνικά αντισώματα παράγονται από ένα μεμονωμένο κλώνο Β λεμφοκυττάρων και έχουν την δυνατότητα να αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο επίτοπο ενός αντιγόνου. Λόγω των διαφορετικών ιδιοτήτων τους μπορούν παρουσιάζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Όσον αφορά τα πολυκλωνικά, ο εντοπισμός διευκολύνεται διότι στοχεύονται πολλαπλοί επίτοποι κι έτσι υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα ανίχνευσης του στόχου. Εντούτοις η χρήση των πολυκλωνικών αντισωμάτων πιθανότατα να προκαλέσουν διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με αποτέλεσμα να συνδεθούν με ένα άλλο αντιγόνο που έχει παρόμοιους επιτόπους. Σε αυτό το μειονέκτημα βρίσκουν εφαρμογή τα μονοκλωνικά αντισώματα. Αυτά, παρέχουν υψηλή εξειδίκευση σε ένα μόνο επίτοπο με συνέπεια να αυξάνεται ο λόγος σήματος προς θόρυβο (Kindt, Goldsby et al. 2007) (Krouse, Derebery et al. 2008). Όπως φάνηκε και από τις εμφανίσεις, τα αποτελέσματα ήταν τα επιθυμητά, χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα.

Όσον αφορά τον εντοπισμό της PARN μέσω της χρήσης του μονοκλωνικού αντισώματος ακολουθήθηκε μια σειρά βημάτων μέχρι τον εντοπισμό του συγκεκριμένου μορίου. Ειδικότερα, έγιναν προσπάθειες εύρεσης της κατάλληλης αραίωσης και του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. Για τα κύτταρα HEK293T η αραίωση 1:500 σε 1% BSA/TBS θεωρείται ικανοποιητική ενώ για τα κύτταρα ήπατος ποντικών C57BL/6J συνίσταται η αραίωση 1:200 σε 1% BSA/ TBS. Επίσης, αποδείχθηκε ότι για να επιτευχθούν τα μέγιστα αποτελέσματα του εντοπισμού της PARN και των εμφανίσεών της η λύση των κυττάρων HEK, αλλά και του ήπατος των ποντικών που ήδη εφαρμοζόταν, απαιτεί λύση των κυττάρων με υπερήχους, αύξηση της ποσότητας σε πρωτεΐνες (50μg) για το φόρτωμα κατά την ηλεκτροφόρηση αλλά και αύξηση του χρόνου επώασης του πρωτογενούς αντισώματος έναντι της PARN σε 36-40 ώρες.

Η παρουσία των ζωνών στα 60kDa και 69kDa στις εμφανίσεις της PARN στα κύτταρα ήπατος ποντικών, ίσως να είναι μη-ειδικό σήμα που είναι συχνό φαινόμενο σε πειράματα (Abcam). Πιο συγκεκριμένα η σύνδεση του αντισώματος σε μη-ειδικές θέσεις στη μεμβράνη αποτελεί συχνό πρόβλημα και παρουσιάστηκε πολλές φορές στα πειράματα της παρούσας μελέτης, πράγμα το οποίο δυσχέραινε την ομαλή διεξαγωγή των πειραμάτων και την εύρεση της πρωτεΐνης PARN. Ακόμη μια εξήγηση που μπορεί να δοθεί για την εμφάνιση αυτών των ζωνών είναι η πιθανή παρουσία εναλλακτικών μορφών της πρωτεΐνης PARN. Αυτό είναι μια άλλη υπόθεση διότι στον άνθρωπο έχει ταυτοποιηθεί ένα εναλλακτικό μετάγραφο της πρωτεΐνης που ονομάζεται AS1, το οποίο στερείται μίας περιοχής μήκους 83 ζευγών βάσεων από το εξόνιο 1 (Politi 2018). Όλα αυτά αποτελούν πρόκληση και μελέτη ώστε να αποσαφηνιστούν και να δοθούν απαντήσεις. Ακόμη, η γνώση για τις απαδενυλάσεις σε επίπεδο πρωτεΐνης και mRNA και πιο συγκεκριμένα της πρωτεΐνης PARN που εμπλέκεται στον κερκάδιο ρυθμό είναι περιορισμένη και αυτό αποτελεί πρόκληση. Ακόμη, δεν είναι γνωστό αν μια απαδενυλάση που δεν παρουσιάζει ρυθμικότητα μπορεί να δράσει σε ένα RNA-στόχο που να υφίσταται περιοδική έκφραση.

## 6. Βιβλιογραφία

- Abcam "Western blot troubleshooting tips." 6.
- Akashi, N. and S. I. Kuroda (2014). "Protein immobilization onto poly (vinylidene fluoride) microporous membranes activated by the atmospheric pressure low temperature plasma." *Polymer-Elsevier*: 2780-2791.
- Archer, S. N. and H. Oster (2015). "How sleep and wakefulness influence circadian rhythmicity: effects of insufficient and mistimed sleep on the animal and human transcriptome." *J Sleep Res* **24**(5): 476-493.
- Balatsos, N. A., P. Maragozidis, D. Anastasakis and C. Stathopoulos (2012). "Modulation of poly(A)-specific ribonuclease (PARN): current knowledge and perspectives." *Curr Med Chem* **19**(28): 4838-4849.
- Bardwell, V. J., D. Zarkower, M. Edmonds and M. Wickens (1990). "The enzyme that adds poly(A) to mRNAs is a classical poly(A) polymerase." *Mol Cell Biol* **10**(2): 846-849.
- Bereshchenko, O., S. Bruscoli and C. Riccardi (2018). "Glucocorticoids, Sex Hormones, and Immunity." *Front Immunol* **9**: 1332.
- Berndt, H., C. Harnisch, C. Rammelt, N. Stohr, A. Zirkel, J. C. Dohm, H. Himmelbauer, J. P. Tavanez, S. Huttelmaier and E. Wahle (2012). "Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming." *RNA* **18**(5): 958-972.
- Beta, R. A. A. and N. A. A. Balatsos (2018). "Tales around the clock: Poly(A) tails in circadian gene expression." *Wiley Interdiscip Rev RNA*: e1484.
- Bhuyan, A. K. (2010). "On the mechanism of SDS-induced protein denaturation." *Biopolymers* **93**(2): 186-199.
- Bio-rad "A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection." 92.
- Castro, M., P. C. Elias, A. R. Quidute, F. P. Halah and A. C. Moreira (1999). "Out-patient screening for Cushing's syndrome: the sensitivity of the combination of circadian rhythm and overnight dexamethasone suppression salivary cortisol tests." *J Clin Endocrinol Metab* **84**(3): 878-882.
- Cercek, B., B. Cercek, K. Roby and L. Cercek (1994). "Effect of oxygen abstraction on the peroxidase-luminol-perborate system: relevance to the HRP enhanced chemiluminescence mechanism." *J Biolumin Chemilumin* **9**(4): 273-277.
- Chung, S., G. H. Son and K. Kim (2011). "Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications." *Biochim Biophys Acta* **1812**(5): 581-591.
- Eulalio, A., E. Huntzinger, T. Nishihara, J. Rehwinkel, M. Fauser and E. Izaurralde (2009). "Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation." *RNA* **15**(1): 21-32.
- Figueiredo Almeida, S. F. (2018). Synchronization of biological oscillators : modeling, analysis and coupling of the mammalian cell cycle and circadian clock. Université Côte d'Azur.
- Foster, R. G., S. Hughes and S. N. Peirson (2020). "Circadian Photoentrainment in Mice and Humans." *Biology (Basel)* **9**(7).
- Funakoshi, Y., Y. Doi, N. Hosoda, N. Uchida, M. Osawa, I. Shimada, M. Tsujimoto, T. Suzuki, T. Katada and S. Hoshino (2007). "Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases." *Genes Dev* **21**(23): 3135-3148.
- Glavac, D. and M. Dean (1993). "Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations." *Hum Mutat* **2**(5): 404-414.
- Goldring, J. P. D. (2018). "The Roles of Acetic Acid and Methanol During Fixing and Staining Proteins in an SDS-Polyacrylamide Electrophoresis Gel." *Methods Mol Biol* **1853**: 15-18.
- Hirota, T. and Y. Fukada (2004). "Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals." *Zool Sci* **21**(4): 359-368.
- Jones, C. G., J. Daniel Hare and S. J. Compton (1989). "Measuring plant protein with the Bradford assay : 1. Evaluation and standard method." *J Chem Ecol* **15**(3): 979-992.

Jud, C., I. Schmutz, G. Hampp, H. Oster and U. Albrecht (2005). "A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions." Biol Proced Online **7**: 101-116.

Jyoti, R., J. Neha, S. Garima, D. Basudeb and M. Bibekanand (2019). Small RNA proteome as disease biomarker: An incognito treasure of clinical utility.

Kindt, T. J., R. A. Goldsby and B. A. Osborne (2007). Ανοσολογία. New York.

Kino, T. (2000). Glucocorticoid Receptor. Endotext. K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce et al. South Dartmouth (MA).

Kino, T. and G. P. Chrousos (2001). "Glucocorticoid and mineralocorticoid resistance/hypersensitivity syndromes." J Endocrinol **169**(3): 437-445.

Kojima, S., E. L. Sher-Chen and C. B. Green (2012). "Circadian control of mRNA polyadenylation dynamics regulates rhythmic protein expression." Genes Dev **26**(24): 2724-2736.

Krouse, J. H., M. J. Derebery and S. J. Chadwick (2008). Managing the Allergic Patient.

Kurien, B. T. and R. H. Scofield (2015). "Western blotting: an introduction." Methods Mol Biol **1312**: 17-30.

Lee, D., D. Park, J. H. Park, J. H. Kim and C. Shin (2019). "Poly(A)-specific ribonuclease sculpts the 3' ends of microRNAs." RNA **25**(3): 388-405.

Lin, Y. C., M. Boone, L. Meuris, I. Lemmens, N. Van Roy, A. Soete, J. Reumers, M. Moisse, S. Plaisance, R. Drmanac, J. Chen, F. Speleman, D. Lambrechts, Y. Van de Peer, J. Tavernier and N. Callewaert (2014). "Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations." Nat Commun **5**: 4767.

Mahmood, T. and P. C. Yang (2012). "Western blot: technique, theory, and trouble shooting." N Am J Med Sci **4**(9): 429-434.

Masferrer, J. L., K. Seibert, B. Zweifel and P. Needleman (1992). "Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(9): 3917-3921.

Menter, P. and B. R. Laboratories (2000). "Acrylamide polymerization - a practical approach."

Mirizio, G. G., R. S. Mendes Nunes, A. L. Castillo Figueroa, I. D. S. Junior, A. P. Ferreira and E. Vieira (2018). The impact of physical exercise on the skeletal muscle clock genes. Brazil.

Ni, D., P. Xu and S. Gallagher (2017). "Immunoblotting and Immunodetection." Curr Protoc Protein Sci **88**: 10 10 11-10 10 37.

Peirson, S. N., L. A. Brown, C. A. Pothecary, L. A. Benson and A. S. Fisk (2018). "Light and the laboratory mouse." J Neurosci Methods **300**: 26-36.

Politi, A. (2018). Alternative transcripts of poly (A)-specific ribonuclease, PARN, in mesothelium, University of thessaly.

Rath, A., M. Glibowicka, V. G. Nadeau, G. Chen and C. M. Deber (2009). "Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(6): 1760-1765.

Reddy, A. B., E. S. Maywood, N. A. Karp, V. M. King, Y. Inoue, F. J. Gonzalez, K. S. Lilley, C. P. Kyriacou and M. H. Hastings (2007). "Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome." Hepatology **45**(6): 1478-1488.

Ripperger, J. A., C. Jud and U. Albrecht (2011). "The daily rhythm of mice." FEBS Lett **585**(10): 1384-1392.

Shao, S., T. Guo, V. Gross, A. Lazarev, C. C. Koh, S. Gillissen, M. Joerger, W. Jochum and R. Aebersold (2016). "Reproducible Tissue Homogenization and Protein Extraction for Quantitative Proteomics Using MicroPestle-Assisted Pressure-Cycling Technology." J Proteome Res **15**(6): 1821-1829.

Sherwood, L. (2016). Introduction to human physiology. Alexandroupoli, Greece.

Shukla, S., G. A. Bjerke, D. Muhrad, R. Yi and R. Parker (2019). "The RNase PARN Controls the Levels of Specific miRNAs that Contribute to p53 Regulation." Mol Cell **73**(6): 1204-1216 e1204.

Siwaszek, A., M. Ukleja and A. Dziembowski (2014). "Proteins involved in the degradation of cytoplasmic mRNA in the major eukaryotic model systems." RNA Biol **11**(9): 1122-1136.

Son, A., J. E. Park and V. N. Kim (2018). "PARN and TOE1 Constitute a 3' End Maturation Module for Nuclear Non-coding RNAs." Cell Rep **23**(3): 888-898.

Stoscheck, C. M. (1990). "Quantitation of Protein." **182**(6).

Thomas, P. and T. G. Smart (2005). "HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins." J Pharmacol Toxicol Methods **51**(3): 187-200.

Tropp, B. E. (2014). Principles of molecular biology. Alexandroupoli, Greece.

Yao, X., S. Kojima and J. Chen (2020). "Critical role of deadenylation in regulating poly(A) rhythms and circadian gene expression." PLoS Comput Biol **16**(4): e1007842.

Zor, T. and Z. Selinger (1996). "Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies." Anal Biochem **236**(2): 302-308.