



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**Διερεύνηση της κερκάδιας έκφρασης της πολυ(Α)-εξειδικευμένης
ριβονουκλεάσης (PARN) και επιλεγμένων microRNA σε θηλαστικά**

Διπλωματική εργασία
Δημήτριος Δαλκίδης

Λάρισα 2020



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



**Examination of the circadian expression of poly (A) –specific
ribonuclease (PARN) and selected microRNAs in mammals**

**Diploma thesis
Dimitrios Dalkidis**

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' στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος»

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, από τον Οκτώβριο του 2018 έως τον Αύγουστο του 2019, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Βιοχημείας Δρ Μπαλατσού Νικόλαου.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ Μπαλατσό Νικόλαο, για την υπόδειξη του θέματος και την επιστημονική του καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής Δρ Λεωνίδα Δημήτριο και Δρ Δημήτριο Κλέτσα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την συνεργασία και την αμέριστη βοήθεια για την ομαλή διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το αξίζει η υποψήφια διδάκτορας του τμήματος Ραφαηλία Μπέτα, για την άψογη καθοδήγηση, τις συμβουλές και τη συμπαράσταση της, για την υπομονή που έδειξε και τις ατελείωτες ώρες πειραμάτων που κάναμε μαζί. Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω του φίλους μου και την οικογένεια μου, για την αμέριστη υποστήριξη που μου έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου και παρέμειναν στο πλευρό μου στα εύκολα και στα δύσκολα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1.	ΚΙΡΚΑΔΙΟΣ ΡΥΘΜΟΣ	8
1.2.	ΚΙΡΚΑΔΙΟΣ ΡΥΘΜΟΣ ΣΤΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ.....	8
1.3.	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΙΡΚΑΔΙΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ	10
1.4.	ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ mRNA ΚΑΙ ΚΙΡΚΑΔΙΟΣ ΡΥΘΜΟΣ.....	12
1.4.1.	ΑΠΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗ	13
1.4.2.	Η απαδενυλάση PARN.....	14
1.5.	microRNA.....	16
1.5.1.	ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΤΩΝ MIRNA	17
1.5.2.	ΑΠΑΔΕΝΥΛΑΣΕΣ ΚΑΙ MICRORNA	20
1.5.3.	miRNA ΚΑΙ ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΙ	21
1.5.4.	miR-29a.....	21
1.5.5.	miR-1207	22
1.5.6.	miR-101a.....	23
1.5.7.	miR-122	23
2.	ΣΚΟΠΟΣ.....	24
3.	Μεθοδολογία	25
3.1.	ΥΛΙΚΑ	25
3.1.1.	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	25
3.1.2.	KITS	26
3.1.3.	ΔΕΙΚΤΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΑΖΩΝ.....	26
3.1.4.	ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	26
3.1.5.	ΥΛΙΚΑ-ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	27
3.1.6.	Αντισώματα	28
3.1.7.	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	28
3.1.8.	ΖΩΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ	29
3.2.	ΜΕΘΟΔΟΙ	29
3.2.1.	ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ	29
3.2.2.	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (SDS-PAGE), ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΗΣ, ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ PVDF ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ	30
3.2.3.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ	32
3.2.4.	ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ	33
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
4.1.	Έκφραση γονιδίων.....	37
4.1.1.	CLOCK	37

4.1.2.	PARN	38
4.1.3.	pri-miR-101a	39
4.1.4.	pri-miR-122	40
4.1.5.	micro-RNA: miR-101, miR-122, miR-29a και miR-1207	41
4.2.	ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΚΙΡΚΑΔΙΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ PARN ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ	45
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κιρκάδιοι ρυθμοί αποτελούν ένα αναπόσπαστο κομμάτι της ρύθμισης των ευκαρυωτικών οργανισμών, καθώς είναι μηχανισμοί που ελέγχουν τον συγχρονισμό της φυσιολογίας σε επίπεδο κυττάρου, ιστού και εν τέλει οργανισμού σε άμεση σύνδεση με τις αλλαγές του εξωτερικού περιβάλλοντος. Μεγάλο ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία των κιρκάδιων ρολογιών διαδραματίζει η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και πιο συγκεκριμένα η ρύθμιση της διάρκειας ζωής των mRNA. Η βασικότερη κατηγορία ενζύμων που εμπλέκονται και έχουν κύριο ρόλο στην αποικοδόμηση των mRNA είναι οι απαδενυλάσες. Πέραν των απαδενυλασών εξίσου σημαντικός είναι και ο ρόλος των microRNA. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η περιοδικότητα στα επίπεδα της PARN, μιας κύριας απαδενυλάσης των θηλαστικών, και επιλεγμένων microRNA σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο. Χρησιμοποιήσαμε ένα πειραματικό μοντέλο που βασίστηκε στην ρυθμικότητα γονιδίων με κεντρικό ρόλο στον κιρκάδιο ρυθμό σε ήπαρ ποντικών. Παρατηρήθηκε ρυθμικότητα στα επίπεδα της PARN, σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης, ωστόσο είναι αναγκαία η πραγματοποίηση περαιτέρω πειραμάτων. Όσον αφορά στην έκφραση των miRNA, αυτή χαρακτηρίζεται από έντονη ρυθμικότητα τόσο στην πρώιμη όσο και την ώριμη μορφή τους.

I. ABSTRACT

Circadian rhythms are an integral part of the regulation of eukaryotes, as they are mechanisms that control the synchronization of physiology at the cellular, tissue and ultimately organism level as a consequence of external environmental changes. Regulation of circadian gene expression plays a major role in the proper function of circadian clocks, and more specifically the regulation of mRNA lifespan. The enzymes involved in mRNA degradation are called deadenylases. Apart from deadenylation, the role of microRNAs is equally important in the regulation of circadian gene expression. Herein, the role of PARN, a major deadenylase in mammals, and selected microRNAs at the gene and protein level was studied. We used an experimental model based on rhythmic genes with a central role in circadian rhythms in mouse liver. Although rhythmicity in PARN expression was observed, further experimentation is necessary. As for the levels of miRNAs, it is characterized by intense rhythmicity both in their primary and mature form.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

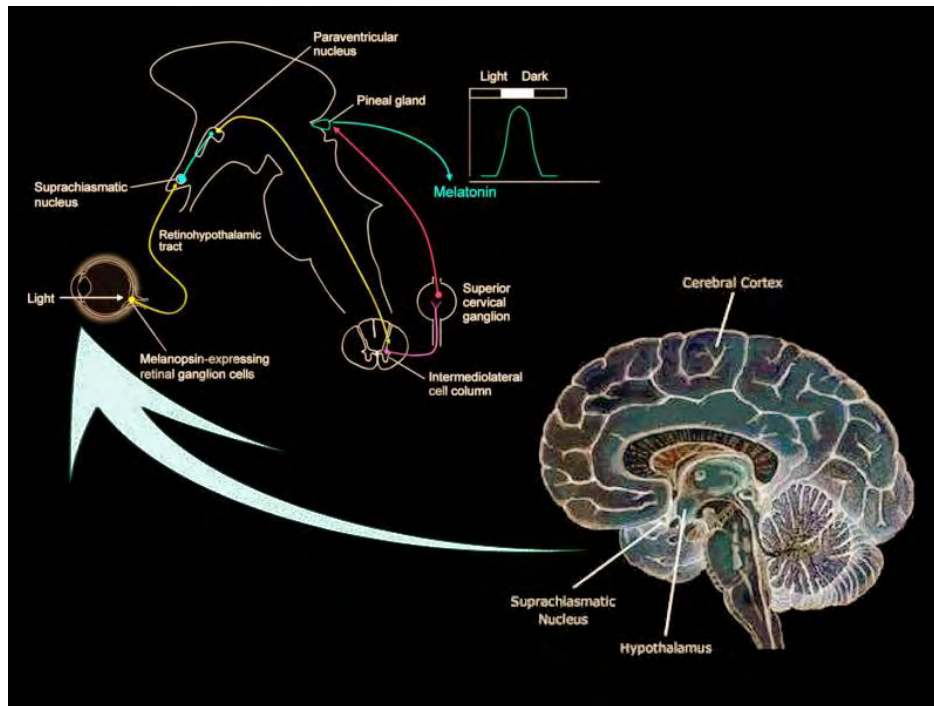
1.1. ΚΙΡΚΑΔΙΟΣ ΡΥΘΜΟΣ

Το κirkάδιο ρολόι είναι ένας χρονικός μηχανισμός που συναντάται σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς από όλα τα φύλα. Είναι μια προσαρμογή στην περιστροφή της γης, προσδίδοντας μια διάρκεια 24 ωρών σε διαδικασίες σε όλα τα επίπεδα - από τη γονιδιακή έκφραση έως τη συμπεριφορά. Προβλέπουν περιβαλλοντικούς κύκλους και ελέγχουν τους καθημερινούς ρυθμούς στη βιοχημεία, τη φυσιολογία και τη συμπεριφορά [1, 2]. Οι περισσότεροι οργανισμοί, υποβάλλονται καθημερινά σε ρυθμικές αλλαγές με αποτέλεσμα η συμπεριφορά και η φυσιολογία τους να συγχρονίζεται με τις αλλαγές του φυσικού περιβάλλοντος[3]. Τα κirkάδια ρολόγια είναι αυτόνομα και είναι ικανά να συντηρούν τους ρυθμούς των 24 ωρών ακόμη και απουσία καθημερινών περιβαλλοντικών σημάτων (zeitgebers) [1, 2]. Η ικανότητα δημιουργίας συγκεκριμένου καθημερινού ρυθμού είναι μια κυτταρική ιδιότητα. Αυτά τα κυτταρικά ρολόγια σχηματίζουν δίκτυα που δημιουργούν το κirkάδιο πρόγραμμα σε ιστούς, όργανα και ολόκληρο τον οργανισμό[1].

Οι εσωτερικοί ταλαντωτές που ρυθμίζουν τους ημερήσιους αυτούς ρυθμούς ονομάζονται κirkάδια ρολόγια, ένας όρος που προέρχεται από το «circa» που σημαίνει «περίπου» και «dies» που σημαίνει «ημέρα». Επίσης, ελέγχουν την ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος και της πίεσης του αίματος, την παραγωγή κυκλοφορούντων ορμονών, τον μεταβολισμό, τη δραστηριότητα των νευρώνων, τη γονιδιακή έκφραση και άλλες φυσιολογικές παραμέτρους/ή παραμέτρου της φυσιολογίας[4].

1.2. ΚΙΡΚΑΔΙΟΣ ΡΥΘΜΟΣ ΣΤΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

Τα θηλαστικά συγχρονίζουν την κirkάδια τους δραστηριότητα κυρίως με τους κύκλους του φωτός και του σκοταδιού στο περιβάλλον όπως προαναφέρθηκε. Η διατήρηση αυτή οφείλεται σε κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς του ρολογιού που ενέχονται σε όλους τους ιστούς του σώματος και συντονίζονται σε ολόκληρο τον οργανισμό από περιβαλλοντικά ερεθίσματα (όπως το φως), νευροχημικούς παράγοντες ή άλλα ερεθίσματα[4]. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω οφθαλμικής φωτοαντίληψης που μεταδίδει σήματα στον υπερχιασματικό πυρήνα (suprachiasmatic nucleus: SCN) στον υποθαλάμο του εγκεφάλου. Τα σήματα από το SCN προκαλούν το συγχρονισμό ανεξάρτητων κirkάδιων ρολογιών σε όλο το σώμα σε κατάλληλες φάσεις. Τα σήματα που μπορούν να ρυθμίσουν αυτά τα περιφερειακά ρολόγια περιλαμβάνουν χημικά σήματα, μεταβολικούς παράγοντες και μεταβολές στη θερμοκρασία του σώματος[4]. Ως κύριος ταλαντωτής (pacemaker), αναγνωρίζεται ο υπερχιασματικός πυρήνας (suprachiasmatic nucleus: SCN) του εγκεφάλου. Με τον όρο ταλάντωση περιγράφεται ο ρυθμός με τον οποίο εκφράζονται τα γονίδια του ρολογιού. Το SCN περιλαμβάνει περίπου 20.000 νευρώνες που είναι συγκεντρωμένοι σε ένα αμφίπλευρο ζεύγος σφαιρών, καθένας με διάμετρο μικρότερη από 1 mm, και στις δύο πλευρές της τρίτης κοιλίας, πάνω από τη διέλευση του οπτικού νεύρου. Καθένας από αυτούς τους νευρώνες, θεωρείται ότι περιέχει έναν αυτόνομο κirkάδιο ταλαντωτή, δηλαδή ρυθμοδότη, σε επίπεδο κυττάρου, οι οποίοι ενώνονται και λειτουργούν ως ένα ενιαίο δίκτυο που ταλαντώνεται με ένα συγκεκριμένο τρόπο[5]. Ο SCN, είναι ο κύριος συγχρονιστής όχι όμως και ο δημιουργός του ρυθμού. Όπως έχει αποδειχθεί οι ιστοί και τα κύτταρα εμφανίζουν κirkάδια ρυθμικότητα ακόμα και όταν απομονωθούν από τον SCN, διότι οι μεταγραφικοί και όχι οι συναπτικοί μηχανισμοί αποτελούν τις μακροχρόνιες σταθερές στο κirkάδιο εύρος. Ο ρόλος του SCN είναι ουσιαστικά ο συγχρονισμός των ταλαντώσεων των μεμονωμένων ιστών και κυττάρων μέσω μονοπατιών μεταγωγής σήματος για την ορθή λειτουργία του οργανισμού βάσει οποιουδήποτε ερεθίσματος[4, 6].



Εικόνα 1: Υπερχιασματικός πυρήνας (Suprachiasmatic nucleus-SCN)[7]

Ένα πολύ σημαντικό στοιχείο στην ρύθμιση του κερκάδιου ρολογιού αποτελούν οι *χρονοδότες* ή *zeitgebers*, οι οποίοι είναι περιβαλλοντικά σήματα που επηρεάζουν την λειτουργία του SCN. Ο κυριότερος χρονοδότης είναι το φως της ημέρας. Το φως μπορεί να μετατοπίσει φάση τον ενδογενή ταλαντωτή στο SCN, συγχρονίζοντας τον με τον περιβαλλοντικό κύκλο ημέρας-νύχτας. Οι ρυθμοί που σχετίζονται με ημερονύκτιες συμπεριφορές ελέγχονται από τον SCN. Πιο συγκεκριμένα μέσω της μελανοψίνης, ενός φωτοχημικού συστατικού που είναι υπεύθυνο για την εγγενή ευαισθησία αυτών των κυττάρων στο φως, καθώς εκφράζεται επιλεκτικά στο μικρό υποσύνολο των γαγγλίων κυττάρων που είναι εγγενώς φωτοευαίσθητα και νευρώνουν το SCN, το φωτεινό σήμα λαμβάνεται μέσω οφθαλμικών υποδοχέων, τα ραβδία και τα κωνία, και φτάνει στον SCN με τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς που την περιέχουν. Αυτά τα κύτταρα ονομάζονται *εγγενώς φωτοευαίσθητα γάγγλια του αμφιβληστροειδούς* ipRGCs (intrinsically photosensitive retinal ganglion cells) και συμβάλλουν στη ρύθμιση μέσω της ρετινο-υποθαλαμικής οδού (retinohypothalamic tract: RHT)[8, 9]. Εκτός του φωτός, η θερμοκρασία αποτελεί επίσης ένας από τους κύριους χρονοδότες που επηρεάζει τις αποκρίσεις των κερκάδιων ρυθμών. Τα περισσότερα είδη εκτίθενται σε πολλές ημερήσιες θερμοκρασιακές ταλαντώσεις και το γεγονός ότι διατηρούν την ίδια περίοδο σε διαφορετικές θερμοκρασίες δεν σημαίνει ότι αγνοούν αλλαγές σε αυτήν[10].

Πέραν των κύριων γονιδίων που ρυθμίζουν το κερκάδιο ρολόι έχουν παρατηρηθεί πληθώρα γονιδίων που εκφράζονται με κερκάδιο ρυθμό σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών, αλλά δεν υπάρχει αντίστοιχα ο ανάλογος αριθμός γονιδίων ρολογιού (core clock genes)[11, 12].

Αυτό επιβεβαιώνει την ύπαρξη ταλαντωτών διαφορετικών από αυτούς στα κύτταρα του SCN, γνωστοί και ως περιφερικοί ταλαντωτές. Το κερκάδιο ρολόι έχει τη δυνατότητα μέσω των γονιδίων του να ρυθμίζει διαφορετικές λειτουργίες σε διαφορετικές φάσεις, διατηρώντας πάντα τον ίδιο ρυθμό[13]. Οι περιφερικοί ταλαντωτές ενεργούν με τέτοιο τρόπο σε κάθε διαφορετικό ιστό έτσι ώστε να καλύπτουν τις ανάγκες του στο βέλτιστο δυνατό. Έχουν αποκτήσει δική τους φάση δράσης, παρουσιάζοντας άλλα χρονικά μέγιστα και ελάχιστα στην έκφραση των γονιδίων τους[14]. Με σκοπό τον βέλτιστο συγχρονισμό των περιφερικών ταλαντωτών στη φάση του SCN, έτσι ώστε να είναι ευκολότερη η λειτουργία

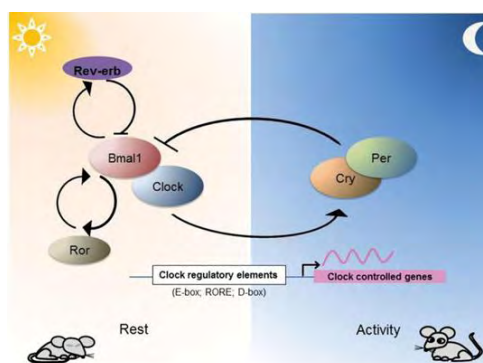
κάθε ιστού σε όλη τη διάρκεια του κερκάδιου κύκλου, έχουν προσαρμόσει τα κερκάδια μεταγραφόμετά τους, χρησιμοποιώντας συνδυασμούς των σημάτων στην φυσιολογική φάση, που είναι μοναδικοί για κάθε ιστό[15].

1.3. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΙΡΚΑΔΙΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Η εναλλαγή μέρας και νύχτας, η απουσία ή όχι φωτός ουσιαστικά, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες ρύθμισης του κερκάδιου ρολογιού. Η ικανότητα να εκμεταλλεύεται ο κάθε οργανισμός την διαθέσιμη ποσότητα φωτός πυροδοτεί καταρράκτες αντιδράσεων που αποσκοπούν στην ρύθμιση το ρολογιού. Προκειμένου να διατηρείται η ρυθμικότητα του κερκάδιου ρολογιού, σωστή λειτουργία του και συγκεκριμένα ο μοριακός του μηχανισμός, παίζουν πολύ μεγάλο ρόλο οι μεταγραφικοί, συμμεταγραφικοί και μετα-μεταφραστικοί μηχανισμοί των διαφορετικών προτύπων έκφρασης, καθώς και η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, για την διαμόρφωση μίας παροδικής γονιδιακής έκφρασης[16, 17]. Στα θηλαστικά, ο βασικός μοριακός μηχανισμός της κερκάδιας συμπεριφοράς και της φυσιολογίας του κεντρικού ταλαντωτή βασίζεται σε μια γενική αρχή αυτορρύθμισης μέσω αλληλένδετων μεταγραφικών και μεταφραστικών βρόχων ανατροφοδότησης (transcription/translation feedback loops :-TTFL) στους οποίους εμπλέκονται τα κεντρικά γονίδια του ρολογιού, που τελικά καθορίζουν τη ρυθμική έκφραση γονιδίων που ελέγχονται από το ρολόι και είναι καλά διατηρημένοι[18].

Μερικά από τα βασικά γονίδια που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κερκάδιου ρολογιού στα θηλαστικά είναι τα εξής: CLOCK: BMAL1, ERB-ERVa, RORa και PER:CRY.

Το CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) και το BMAL1, επίσης γνωστό ως ARNTL ή MOP3 (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1) είναι βασικοί μεταγραφικοί παράγοντες, με δομή έλικα-βρόγχος-έλικα [bHLH-PAS (basic helix-loop-helix; Period-Arnt-Single-minded)]. Τα CLOCK και BMAL1 ετεροδιμερίζονται για να ξεκινήσουν την μεταγραφή γονιδίων που περιέχουν αλληλουχίες ενισχυτών στους εκκινήτές τους, γνωστά ως E-boxes. Το CLOCK εμφανίζει δραστικότητα ακετυλοτρανσφεράσης ιστόνης (Histone acetyl transferase-HAT), η οποία ενισχύεται με τον διμερισμό της με το BMAL1[18]. Ο λόγος NAD⁺ προς NADH μοιάζει να ρυθμίζει την ικανότητα του ετεροδιμερούς CLOCK/BMAL1 να προσδέεται στο DNA *in vitro*, υποδεικνύοντας πως ο μεταβολισμός των κυττάρων έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων και της φάσης του ρολογιού[19, 20].



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των κύκλων ανατροφοδότησης των κεντρικών γονιδίων του ρολογιού κατά τη διάρκεια της ημέρας και της νύκτας[21]

Το PER (Period) και το CRY (Cryptochrome) σχηματίζουν ετεροδιμερή και αναστέλλουν την επιπλέον μεταγραφική δραστηριότητα του CLOCK:BMAL1 επιτρέποντας στον κύκλο να επαναληφθεί από ένα επίπεδο χαμηλής μεταγραφικής ενεργότητας. Το PER είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής τομέα PAS του κερκαδικού ρολογιού. Το CRY διαθέτει έναν τομέα που είναι ομόλογος προς φωτολυάση του αμινοτελικού άκρου, μέσω του οποίου μπορεί να συνδέσει το FAD και ένα μπλε χρωμοφόρο μόριο συγκομιδής φωτός, παρόλο που δεν εκδηλώνει καμία ενζυματική δραστηριότητα. Στα θηλαστικά, αμφισβητείται ότι το CRY λειτουργεί ως φωτοϋποδοχέας[18, 22, 23].

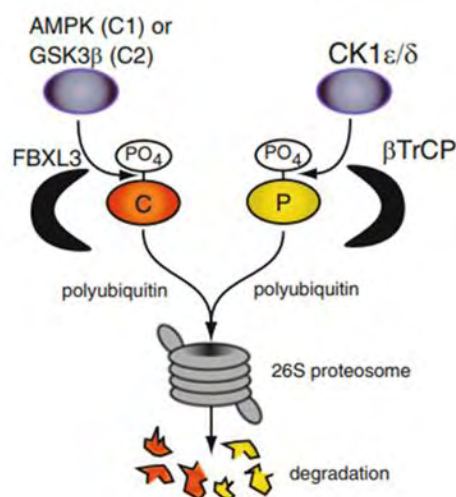
Για να τερματιστεί η ανασταλτική φάση και να ξεκινήσει ένας νέος κύκλος μεταγραφής, η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών PER και CRY είναι αναγκαία. Η πρωτεΐνη PER φωσφορυλιώνεται από την κινάση της καζεΐνης 1ε (CK1ε). Η κινάση της καζεΐνης 1δ (CK1δ)¹ έχει επίσης ως στόχο το γονίδιο PER, ενώ η συνδυαστική φωσφορυλίωση και από τις δύο κινάσες αποτελεί το σήμα για την έναρξη της ουβικουιτίνωσης και της αποικοδόμησης της PER από το 26S πρωτεάσωμα[24, 25]. Όσον αφορά τώρα τα γονίδια CRY, υφίστανται πολυουβικουιτίνωση και οδηγούνται προς το πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση από την FBXL3 (F-Box And Leucine Rich Repeat Protein 3)[26]. Παρόλα αυτά οι διαφορετικές πρωτεΐνες CRY μπορούν να αποτελούν και στόχο διαφορετικών κινασών. Πιο συγκεκριμένα, η CRY1 φωσφορυλιώνεται από την AMPK1 (AMP-activated protein kinase), ενώ η CRY2 μέσω του καταρράκτη DYRK1A/GSK-3β. Η φωσφορυλίωση όπως και στην περίπτωση των PER γονιδίων αποτελεί σήμα ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της ουβικουιτίνωσης[27, 28] (Εικόνα 3).

Η ενεργοποίηση του BMAL1 γίνεται κατά τη διάρκεια της ημέρας, οδηγώντας στη μεταγραφή των γονιδίων *Per* και *Cry* το απόγευμα και τη συσσώρευση των πρωτεϊνών PER και CRY αργά το απόγευμα ή το βράδυ. Οι πρωτεΐνες PER και CRY αλληλεπιδρούν μεταξύ τους όπως και με τις CK1δ και CK1ε και εισέρχονται στον πυρήνα τη νύχτα, όπου αλληλεπιδρούν με το διμερές CLOCK:BMAL1 για να καταστείλουν τη δική τους μεταγραφή[2, 29].

Ένας ακόμη μοριακός μηχανισμός για την ρύθμιση των κερκάδιων συστημάτων βρίσκεται στην ομάδα γονιδίων PAR bZIP από τα οποία προκύπτουν μεταγραφικοί παράγοντες, δημιουργούν έναν ακόμα πιθανό βρόχο μεταγραφής που περιλαμβάνει γονίδια των οικογενειών HLF, DBP, TEF και Nfil3. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες προσδένονται σε στοιχεία απόκρισης D-box στους υποκινητές των γονιδίων στόχων τους. Αυτά τα στοιχεία απόκρισης μαζί παρέχουν την απαραίτητη καθυστέρηση για τον κύκλο σε σχεδόν 24h: E-box το πρωί και D-box κατά τη διάρκεια της ημέρας. Οι οικογένειες των γονιδίων με τα D-box παρόλο που δεν είναι απαραίτητες για τη λειτουργία του ρολογιού, μπορεί να έχουν την ικανότητα να καταστήσουν πιο έντονες τις ταλαντώσεις και να προσθέσουν ακρίβεια στην περίοδο της ταλάντωσης[30, 31].

Τα μέρη του βρόχου που διαμεσολαβούν την αρνητική ρύθμιση και συγκεκριμένα τα γονίδια PER, δρουν ως σταθερές μεταβλητές στο μηχανισμό[32], κάτι που σημαίνει πως τα συγκεκριμένα επίπεδα αυτών των πρωτεϊνών επηρεάζουν τη φάση του ρολογιού. Τη νύχτα, όταν τα επίπεδα των PER πρωτεϊνών είναι χαμηλά, οξεία χορήγηση φωτός προκαλεί επαγωγή της μεταγραφής των *Per1* και *Per2*[33-35]. Με την έκθεση στο φως νωρίς τη νύχτα παρατηρείται καθυστέρηση φάσης και αυτό οδηγεί αύξηση που επάγεται από το φως και των δύο πρωτεϊνών (PER1 , PER2), ενώ στο υπόλοιπο της νύχτας μόνο τα επίπεδα του PER1 αυξάνονται με την έκθεση στο φως[36]. Η φωτοεπαγόμενη ενεργοποίηση των γονιδίων *Per* επιτυγχάνεται μέσω της δράσης του σηματοδοτικού μονοπατιού CREB/MAPK σε στοιχεία CRE (cAMP-response elements) του *Per* υποκινητή[37].

¹ CK1ε, CK1δ : κινάσες σερίνης-θρεονίνης



Εικόνα 3: Αποικοδόμηση των πρωτεϊνών CRY (πορτοκαλί σφαίρα) και PER (κίτρινη σφαίρα) από το πρωτεάσωμα 26S[4]

Πίνακας 1. Τα κύρια γονίδια του μηχανισμού του ρολογιού (core clock genes) και οι λειτουργίες τους.

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΠΛΗΡΕΣ ΟΝΟΜΑ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
Clock	Circadian locomotor output cycles kaput	Ελέγχει την διάρκεια του κηκκάδιου κύκλου σε διάφορα κηκκάδια γονίδια με το να αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα
Bmal1	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 (BMAL1, γνωστό και ως MOP3)	Δρα ως μεταγραφικός παράγοντας μέσω του συμπλόκου που δημιουργεί με το CLOCK, το οποίο προσδέεται στα στοιχεία E-box
Erb-Erva	Γνωστό και ως NR1D1 (nuclear receptor subfamily1, group D, member1)	Μεταγραφικός αναστολέας και ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων Rev-ErbA
Rora	RAR-related orphan receptor alpha	Πυρηνικός υποδοχέας, προσδέεται στα στοιχεία απόκρισης ROR/REV-ERB (RRE) στον υποκινητή του Bmal1, οδηγώντας στην trans-ενεργοποίηση του
Per1	Period homolog 1	Κωδικοποιεί συστατικά των κηκκάδιων ρολογιών που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό κ.α.
Per2	Period homolog 2	Μεταγραφικός παράγοντας επάγει την έκφραση του BMAL1
Per3	Period homolog 3	Κωδικοποιεί συστατικά των κηκκάδιων ρολογιών που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό κ.α.
Cry1	Cryptochrome homolog 1	Αποτελεί έναν ανεξάρτητο από το φως αναστολέα των συστατικών CLOCK-BMAL1 του ρολογιού
Cry2	Cryptochrome homolog 2	Αποτελεί έναν ανεξάρτητο από το φως αναστολέα των συστατικών CLOCK-BMAL1 του ρολογιού

1.4. ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ mRNA ΚΑΙ ΚΗΚΚΑΔΙΟΣ ΡΥΘΜΟΣ

Οι κύκλοι μεταγραφής ενός γονιδίου ξεκινούν με τη δέσμευση ενεργοποιητών και την επακόλουθη πρόσδεση RNA πολυμεράσης II στους προαγωγούς (promoters). Η μεταγραφή συνδυάζεται ταυτόχρονα και μηχανικά με την επεξεργασία των πρόδρομων mRNA (pre-mRNAs). Η επεξεργασία του mRNA ξεκινά αμέσως μετά τη μεταγραφή και μπορεί να δημιουργήσει πολλαπλές παραλλαγές ενός μόνο μεταγράφου ως αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος ή και πολυαδενυλίωσης. Η συμμεταγραφική επεξεργασία βελτιώνει την αποτελεσματικότητα και την ακρίβεια της ωρίμανσης, επιτρέποντας ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις, όπως σημεία ελέγχου επιμήκυνσης, επικοινωνία μεταξύ τροποποιήσεων του εναλλακτικού ματίσματος και χρωματίνης ή έλεγχο της επεξεργασίας των 3' άκρων από παράγοντες σύνδεσης. Κατά τη μεταφορά τους στο κυτταρόπλασμα, ορισμένα mRNA υφίστανται άμεση σμίκρυνση της πολυ(A) ουράς και αποικοδομούνται, ενώ άλλα μπορούν να επανα-πολυαδενυλιωθούν ή να αποθηκευτούν σε κυτταροπλασματικά διαμερίσματα, έως ότου καταστραφούν. Εναλλακτικά, τα αντίγραφα μπορούν να μεταφραστούν σε

πρωτεΐνη αμέσως μετά την είσοδο τους στο κυτταρόπλασμα ή να αλληλεπιδράσουν με παράγοντες που θα μεταφερθούν σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό διαμέρισμα για τοπική μετάφραση [18]. Όλα αυτά τα βήματα πρέπει να συντονιστούν για να διασφαλιστούν τα κατάλληλα επίπεδα έκφρασης mRNA και σύνθεσης πρωτεϊνών.

Η πολυαδενυλίωση είναι ένα από τα βασικά στάδια ώστε τα mRNA να είναι έτοιμα για την έναρξη της μετάφρασης. Πρόκειται για μια συμμεταγραφική διαδικασία που χαρακτηρίζεται από την προσθήκη ουράς πολυ(A) στο 3' άκρο των μεταγράφων. Η πολυαδενυλίωση επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη σταθερότητα του mRNA, τη μετατόπιση του μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος και τη μετάφραση. Η αντίστροφη αυτής της διαδικασίας, ονομάζεται απαδενυλίωση και περιλαμβάνει την αποικοδόμηση της ουράς πολυ(A) στο κυτταρόπλασμα. Το μήκος της ουράς πολυ(A) έχει συνδεθεί με την κικκάδια ρύθμιση στα θηλαστικά μετά από παρατήρηση της ημερήσιας διακύμανσης του μήκους της ουράς πολυ(A) ενός μεγάλου αριθμού mRNA. Μετάγραφα με πιο μακριές ουρές πολυ(A) παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της ημέρας, ενώ mRNA με βραχύτερες ουρές φαίνεται να επικρατούν κατά τη διάρκεια της νύκτας [18, 38]. Οι παραπάνω μεταβολές στη σταθερότητα των mRNA αντικατοπτρίζονται στη ρυθμική βιοσύνθεση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν. Η αποτελεσματικότητα της έκφρασης σε πρωτεϊνικό επίπεδο μπορεί να επηρεαστεί από το μήκος της ουράς πολυ(A), καθώς αυτό σχετίζεται με τη σταθερότητα του mRNA. Μετάγραφα που χαρακτηρίζονται από ύπαρξη μεγάλης ουράς πολυ(A) φαίνεται να έχουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης, ενώ, ανεξάρτητα με την σταθερότητα, η αποικοδόμηση της ουράς μέχρι ένα κρίσιμο σημείο συνεπάγεται αυξημένη αποτελεσματικότητα μετάφρασης [18].

1.4.1. ΑΠΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗ

Σε σύγκριση με την έναρξη της μεταγραφής, η αποικοδόμηση των mRNA είναι μια παραμελημένη αλλά εξαιρετικά ρυθμιζόμενη διαδικασία που συμβάλλει σημαντικά στη συνολική διαμόρφωση της έκφρασης του κικκαδικού γονιδίου και τις μεταδόσης εξωκυτταρικών σημάτων. Το πρώτο και καθοριστικό βήμα στη αποικοδόμηση του mRNA είναι η βράχυνση των πολυ(A) ουρών, από ένζυμα γνωστά ως απαδενυλάσες που καθορίζουν τη σταθερότητα και τη διάρκεια ζωής του mRNA. Η ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA είναι απαραίτητη για τη ρυθμική έκφραση του mRNA. Οι ρυθμοί αποικοδόμησης του mRNA συσχετίζονται με τα μήκη των πολυ(A) ουρών που υποδηλώνουν ότι πρέπει να πραγματοποιηθεί μετα-μεταγραφική τροποποίηση για να είναι σταθερά τα επιπέδων mRNA.

Ως απαδενυλάσες ορίζονται οι εξωριβονουκλεάσες που αποικοδομούν την ουρά πολυ(A) των mRNA με κατεύθυνση 3' → 5' απελευθερώνοντας παράλληλα 5'- AMP, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις έχει δείχτεί ότι μπορούν να αποικοδομούν και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή, με μικρότερη ωστόσο αποτελεσματικότητα [39]. Όλες οι γνωστές απαδενυλάσες αποτελούν ένζυμα που ταξινομούνται σε δύο μεγάλες υπερικογένειες και των οποίων η δραστηριότητα εξαρτάται από Mg^{2+} . Μέχρι σήμερα, έχουν εντοπιστεί περισσότερες από 10 απαδενυλάσες σε θηλαστικά και 26 στην Arabidopsis. Ο λόγος μιας τέτοιας πληθώρας δεν είναι σαφής, διότι συγκεκριμένες απαδενυλάσες μπορεί να στοχεύουν σε συγκεκριμένες ομάδες γονιδίων ή πολλαπλές απαδενυλάσες να δρουν στο ίδιο mRNA, με διακριτές αλλά αλληλεπικαλυπτόμενες λειτουργίες [18].

Ο διαχωρισμός τους γίνεται με βάση την παρουσία συγκεκριμένων συντηρημένων καταλοίπων στο καταλυτικό τους κέντρο:

(i) η DEDD υπερικογένεια, έχει λάβει το όνομά της από τα καταλυτικά αμινοξέα ασπαρτικού (D) και γλουταμινικό (E), τα οποία συντονίζουν τα ιόντα Mg^{2+} και είναι απαραίτητα για την κατάλυση. Μέλη αυτής της ομάδας αποτελούν η απαδενυλάση POP2

(γνωστή και ως CAF1), η CAF1Z, η πολύ(A)- εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), καθώς και η PAN2.

(ii) η EEP υπεροικογένεια των εξωνουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών (exonuclease-endonuclease-phosphatase), περιλαμβάνει απαδενυλάσες που φέρουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος (Asp) και ιστιδίνης (His) στο καταλυτικό/ενεργό κέντρο νουκλεάσης τους. Παραδείγματα EEP ενζύμων αποτελούν οι απαδενυλάσες CCR4 και Angel.

Οι απαδενυλάσες δεν απαντώνται μόνες τους, αλλά σε μεγάλο βαθμό αποτελούν τμήμα συμπλόκων με πολλές υπομονάδες. Ο ρόλος των υπολοίπων πρωτεϊνών του συμπλόκου είναι να επηρεάζουν τη δραστηριότητα των απαδενυλασών. Άλλες απαδενυλάσες σχηματίζουν ομοδιμερή και άλλες ετεροδιμερή. Ο ετεροδιμερισμός αυξάνει σημαντικά το εύρος των συμπλόκων των αποαδενυλασών, καθώς διαφορετικά ετεροδιμερή έχουν και διαφορετικές ενζυμικές και ρυθμιστικές ιδιότητες[40].

Ο αριθμός και η ποικιλία των απαδενυλασών διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό. Αυτή η ποικιλότητα πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός πως συγκεκριμένες αποαδενυλάσες στοχεύουν συγκεκριμένα mRNA. Από την άλλη, διαφορετικές απαδενυλάσες μπορούν να τροποποιούν το ίδιο mRNA με διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες λειτουργίες. Κάθε διαφορετικό mRNA έχει και τον δικό του ρυθμό απαδενυλίωσης. Η διαδικασία ελέγχεται από ρυθμιστικούς παράγοντες που προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες των mRNA. Ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται συνήθως στις 3' αμετάφραστες περιοχές (3'-UTR) ενισχύουν την απαδενυλίωση, η οποία προωθείται και μέσω αλληλεπίδρασης της PABP (πολύ(A) συνδεόμενη πρωτεΐνη) και συγκεκριμένων αποαδενυλασών. Επιπρόσθετα, η 5' καλύπτρα μπορεί να επηρεάσει θετικά την απαδενυλίωση, μιας και μπορεί να διεγείρει τη δραστηριότητα και την επεξεργαστικότητα κάποιων απαδενυλασών. Ο ρόλος των απαδενυλασών στην ανακύκλωση του mRNA είναι πάρα πολύ σπουδαίος, γεγονός που φαίνεται από την κατοχή εξειδικευμένων ρυθμιστικών ρόλων σε διάφορες βιολογικές διεργασίες μέσω του ελέγχου της έκφρασης, παραγωγής και δράσης τους, αλλά και της διατήρησης της λειτουργίας τους[39, 41, 42].

		SC	CE	DM	XL	MM	HS
<i>DEDD nucleases</i>	CNOT7/POP2	+	+	+	+	+	+
	CNOT8	-	-	-	+	+	+
	CAF1Z	-	+	-	+	+	+
	PARN	-	+	-	+	+	+
	PAN2	+	+	+	+	+	+
<i>EEP nucleases</i>	CNOT6/CCR4	+	+	+	+	+	+
	CNOT6L	-	-	-	-	+	+
	NOC	-	-	+	+	+	+
	2'PDE	-	+	+	+	+	+

SC, *S. cerevisiae*; CE, *C. Elegans*; DM, *D. Melanogaster*; XL, *X. Laevis*; MM, *M. Musculus*; HS, *H. Sapiens*
+, verified; +, predicted

Εικόνα 4: Οι δύο υπεροικογένειες των απαδενυλασών. [39]

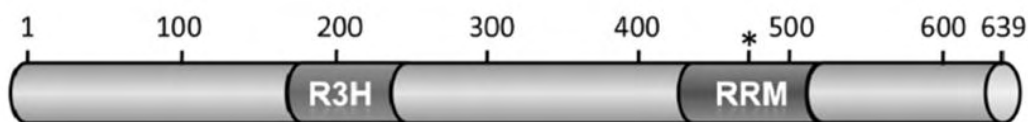
1.4.2. Η ΑΠΑΔΕΝΥΛΑΣΗ PARN

Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση –PARN, είναι μία εξωριβονουκλεάση των ευκαρυωτών, η οποία καταλύει την αντίδραση υδρόλυσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των καταλοίπων αδενοσίνης της ουράς πολυ(A) με κατεύθυνση 3'→5', απομακρύνοντας τα κατάλοιπα αδενοσίνης και έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά άμεσα με

τη δομή της 5'-καλύπτρας ταυτόχρονα με την ουρά πολυ(A) των mRNA. Είναι ένα ομοδιμερές ένζυμο με υψηλή εξειδίκευση για μονόκλωνες ουρές πολυ(A), απαιτεί την ύπαρξη μίας ελεύθερης 3' υδροξυλομάδας και δισθενών ιόντων Mg^{2+} για αποτελεσματικότερη δραστηριότητα, απελευθερώνοντας 5'-AMP κατά τη διάρκεια της απαδενυλίωσης. Ο διμερισμός της PARN είναι ζωτικής σημασίας. Εντοπίζεται σε μεγάλες ποσότητες στον πυρήνα (κυρίως στον πυρηνίσκο και στα σωμάτια Cajal), ενώ μπορεί να μετακινείται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Αποτελείται από 639 αμινοξέα, με μοριακή μάζα 74 kDa και ανήκει στην υπερικογένεια των DEDD 3'-5' εξωριβονουκλεασών, όπως προαναφέρθηκε. Οι απαδενυλάσες τις συγκεκριμένης υπερικογένειας μοιράζονται έναν συντηρημένο καταλυτικό πυρήνα, που περιέχει το DEDD μοτίβο, αποτελούμενο από τα τέσσερα καταλυτικά αμινοξέα: Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382. Η συνολικής δραστηριότητας του ενζύμου επηρεάζεται δραστικά αν προκύψει κάποια μετάλλαξη σε ένα από αυτά τα τέσσερα αμινοξέα. Η PARN διατηρείται σχεδόν σε όλους τους ευκαρυώτες, συμπεριλαμβανομένων των φυτών και του ανθρώπου. Ωστόσο, παρόλο που τα ομόλογα της έχουν εντοπιστεί στα γονιδιώματα των *Schizosaccharomyces rombe* και *Anopheles*, φαίνεται ότι απουσιάζουν κυρίως από τα *Saccharomyces cerevisiae* και *Drosophila melanogaster*[43-47].

Η αλληλουχία της PARN έχει τρεις χαρακτηριστικές δομές: αυτή της καταλυτικής νουκλεάσης (κατάλοιπα 1-177 και 246-391), ο καταλυτικός πυρήνας της σχηματίζει μία αρνητικά φορτισμένη κοιλότητα και δύο δομές σύνδεσης RNA, την δομή R3H (κατάλοιπα 178-245) και την περιοχή δέσμησης RNA ή αλλιώς μοτίβο αναγνώρισης RNA (RNA recognition motif-RRM) (κατάλοιπα 437-510) που πιθανότατα συμβάλλουν στην παραγωγικότητα του ενζύμου[46](Εικόνα 5).

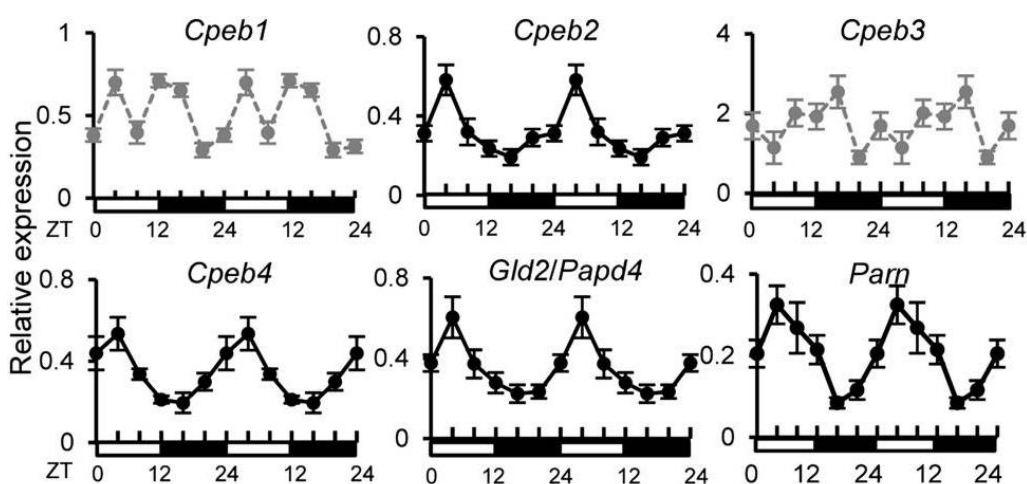
Σύμφωνα με μελέτες έχουν αποδειχθεί δύο επιπλέον σημαντικά βιοχημικά χαρακτηριστικά της PARN: ο τρόπος δράσης της και η επίδραση της 5'-m7G-καλύπτρα στην ενεργότητα απαδενυλάσης. Η περιοχή δέσμησης του RNA απαιτείται για την πρόσδεση της 5'-m7G-καλύπτρας, ενώ η R3H για την σύνδεση της στην πολυ(A) ουρά. Επίσης, έχει προταθεί, ότι η περιοχή πρόσδεσης του RNA σταθεροποιεί τη συνολική τρισδιάστατη δομή της PARN (Εικόνα 3)[48].



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της ανθρώπινης PARN και των ρυθμιστικών της περιοχών. Η επικράτεια νουκλεάσης (κατάλοιπα 1-177 και 246-391) περιβάλλουν την περιοχή R3H (κατάλοιπα 175-245). Ο αστερίσκος υποδηλώνει την Trp475 εντός της RRM επικράτειας, που είναι κρίσιμη για την δέσμηση με την 5'-m7G-καλύπτρα[46]

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ρύθμιση της δραστηριότητας της PARN, καθώς επιτελείται από διάφορους trans RNA-συνδεδεμένους παράγοντες, που δεσμεύονται σε cis-δραστικά στοιχεία και μπορούν να προσελκύουν, να διεγείρουν ή να αναστέλλουν την PARN[46]. Πιο συγκεκριμένα ορισμένοι μηχανισμοί ρύθμισης της δραστηριότητας του ενζύμου αποτελούν οι εξής: α) διέγερση της PARN εξαιτίας της απευθείας αλληλεπίδρασής της με το 5' κάλυμμα[44, 45], β) αναστολή της PARN λόγω της πρόσδεσης και αλληλεπίδρασης της κυτταροπλασματικής πολυ(A)-δεσμευτικής πρωτεΐνης C (PABPC) με την ουρά πολυ(A)[44], γ) συναγωνισμός μεταξύ της PARN και του ρυθμιστικού παράγοντα eIF4E για την πρόσδεση στο 5' κάλυμμα[44], δ) διέγερση της αποικοδόμησης των ουρών πολυ(A) από πρωτεΐνες που συνδέονται σε περιοχές πλούσιες σε AU κατάλοιπα, γνωστές ως ARE[49] και ε) αναστολή της PARN από πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο 5' κάλυμμα (cap-binding proteins, CPBs) των

mRNA-στόχων[50]. Η παρατήρηση ότι η PARN εμπλέκεται και στην βιογένεση μη-κωδικών μορίων, οδήγησε στην κατάδειξη της ως ένα μόριο που μπορεί να εμπλέκεται και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες εκτός από τον έλεγχο των ευκαρυωτικών mRNA μέσω της απαδενυλίωσης μεταξύ των οποίων και η εμπλοκή της στον ημερονύκτιο ρυθμό[38]. Τα επίπεδα των mRNA αρκετών μορίων που ρυθμίζουν την κυτταρική απαδενυλίωση σε σταθερή κατάσταση στο ήπαρ, συμπεριλαμβανομένων της PARN και άλλων όπως τα Creb2, Creb4, και Gld2, εκφράζονται ρυθμικά με φάσεις παρόμοιες με την πλειονότητα των mRNA της κατηγορίας 3 PAR (poly(A) rhythmic mRNA), που κορυφώνονται νωρίς την ημέρα(Εικόνα 6). Τα PAR mRNA κατηγορίας 3 που εμφανίζουν ρυθμικότητα στο μήκος της πολυ(A) ουράς, αλλά όχι σε επίπεδα pre-RNA ή mRNA σταθερής κατάστασης, είναι τα πιο σταθερά και ρυθμίζονται από μηχανισμούς κυτταροπλασματικής πολυαδενυλίωσης. Η πλειονότητα των PAR mRNA της κατηγορίας 3 είχαν το μεγαλύτερο μήκος πολύ(A) ουράς κατά τη διάρκεια της ημέρας και βρίσκονται υπό τον κερκαδικό έλεγχο της κυτταροπλασματικής πολυαδενυλίωσης που εξαρτάται από CPEB πρωτεΐνες (cytoplasmic polyadenylation element-binding proteins), καθώς πολλά από τα συστατικά αυτού του μηχανήματος εμφανίζουν μοτίβα ρυθμικής έκφρασης [38]. Επίσης, έχει προταθεί ως ένας πιθανός δείκτης της καρκινικής ανάπτυξης[46].



Εικόνα 6: Η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του mRNA μορίων που εμπλέκονται σε μηχανισμούς κυτταροπλασματικής πολυαδενυλίωσης, που δείχνει ότι πολλά είναι ρυθμικά. Τα γραφήματα με μαύρους κύκλους και συμπαγείς γραμμές αντιπροσωπεύουν ρυθμικά εκφρασμένα mRNA, ενώ τα γραφήματα με γκριζούς κύκλους και διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν μη ρυθμικά mRNA[38].

1.5. microRNA

Τα microRNA, ή miRNA, αποτελούν μία ομάδα μικρών, ενδογενών, μη κωδικών μορίων RNA μεγέθους περίπου 20-25 ζεύγη βάσεων. Μέχρι σήμερα, η βάση δεδομένων miRBase² απαριθμεί περισσότερα από 2000 αναγνωρισμένα miRNA, πιστεύεται ότι ρυθμίζουν συλλογικά το ένα τρίτο των γονιδίων στο γονιδίωμα. Τα miRNAs έχουν συνδεθεί με πολλές ανθρώπινες ασθένειες και επιδιώκονται ως κλινικά διαγνωστικά και ως θεραπευτικοί στόχοι. Έχει βρεθεί ότι τα miRNA συμμετέχουν σε πολλές πτυχές της κυτταρικής βιολογίας όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, ο μεταβολισμός, η ανάπτυξη, η απόπτωση και η φλεγμονή, ενώ έχουν αναφερθεί και σε ασθένειες. Μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει η ικανότητα των miRNA να ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο μέσω δέσμευσης σε μετάγραφα στο κυτταρόπλασμα, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αποικοδόμηση του

² miRBase: πρόκειται για μία βάση δεδομένων στην οποία περιέχονται δημοσιευμένες αλληλουχίες miRNA καθώς επίσης και αναφορά γνωστών χαρακτηριστικών τους συμπεριλαμβανομένου του χρωμοσώματος στο οποίο βρίσκεται, υποκυττάριο εντοπισμό, λειτουργίες κ.α.

μεταγράφου στόχου ή σε αναστολή της διαδικασίας της μετάφρασης. Συναντώνται σχεδόν σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς, όπως τα φυτά, τα αρθρόποδα και τα σπονδυλωτά, υποδεικνύοντας ότι αντιπροσωπεύουν ένα εξελικτικά πολύ παλιό μηχανισμό επιγενετικής γονιδιακής ρύθμισης. Όλες οι οικογένειες miRNA υποβάλλονται σε μια σειρά βημάτων βιογένεσης που μετατρέπουν το πρωτογενές μετάγραφο του miRNA σε ενεργό, δηλαδή ώριμο. Το ώριμο miRNA συνδέεται με το RNA induced silencing complex-RISC, όπου κατευθύνει το σύμπλοκο να στοχεύει mRNAs, οδηγώντας σε καταστολή μετάφρασης και αποικοδόμηση mRNA στόχου[51].

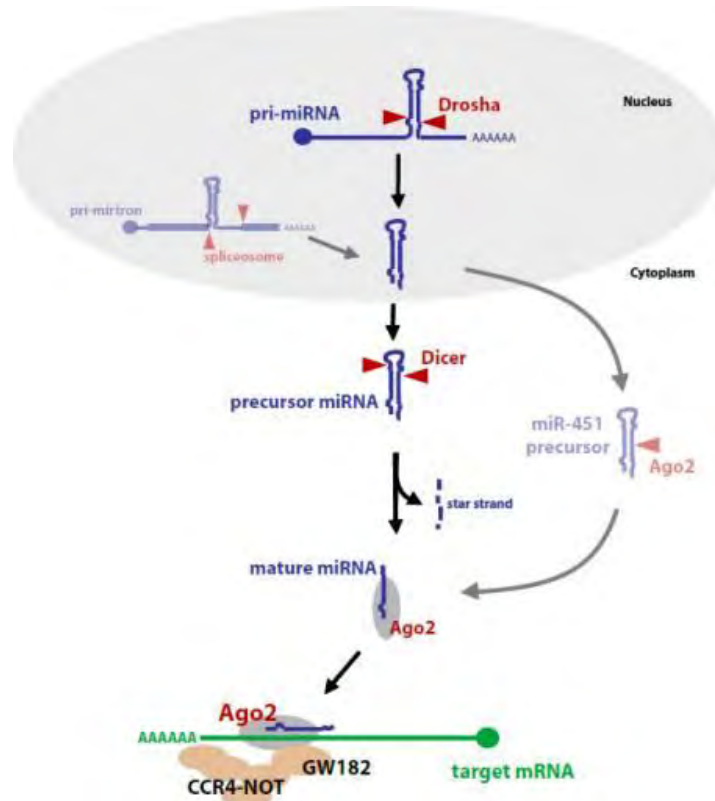
1.5.1. ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΤΩΝ MIRNA

Με τον όρο βιογένεση των microRNA, εννοείται η διαδικασία που ακολουθείται έτσι ώστε από το αρχικό γονίδιο να προκύψει ένα ώριμο μόριο microRNA με βιολογική δραστηριότητα, μέσω διαδοχικών σταδίων ωρίμανσης. Η πλειοψηφία των πρώιμων microRNA των θηλαστικών βρίσκονται σε εσόνια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή σε μεταγραφικές μονάδες που εντοπίζονται μεταξύ γονιδίων και δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, ενώ πιο σπάνια βρίσκονται σε εξόνια (Εικόνα 7)[52].

Τα μονοπάτια βιογένεσης των microRNAs χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

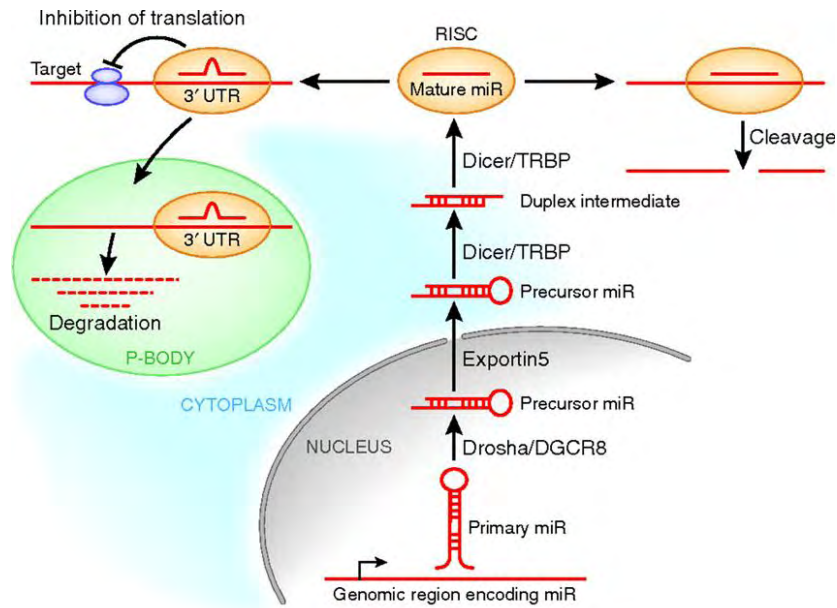
- το κανονικό (canonical) και
- τα εναλλακτικά (non-canonical)

Το πρώτο μονοπάτι αναφέρεται στα μετάγραφα που προκύπτουν με δράση της πολυμεράσης II του RNA (RNAP II), τα οποία επεξεργάζονται από δύο ριβονουκλεάσες, τη Drosha και τη Dicer (αποτελούν RNase III) παράγοντας την πλειονότητα των miRNA και ονομάζεται κανονικό[53]. Το κανονικό μονοπάτι βιοσύνθεσης, ξεκινάει με τη σύνθεση ενός πρώιμου μορίου RNA από την πολυμεράση II του RNA το οποίο ονομάζεται pri-miRNA. Στο pri-miRNA παρατηρείται μία δομή φουρκέτας αποκόπτεται από ένα σύμπλοκο που ονομάζεται μικρο-επεξεργαστής (*Microprocessor*) και αποτελείται από τις πρωτεΐνες DROSHA και DGCR8 (RNA binding protein)[54].



Εικόνα 7: Η κανονική οδός βιογένεσης miRNA φαίνεται στο κεντρικό τμήμα του σχήματος. Τα miRNA μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II. Η μεταγραφή pri-miRNA κόβεται από το ένζυμο Drosha αποδίδοντας το πρόδρομο miRNA. Μετά τη διάσπαση του Dicer, το ώριμο miRNA φορτώνεται στο σύμπλεγμα τελεστών RISC όπου κατευθύνει τη μεταφραστική καταστολή των στόχων mRNA. Οι mirtrons παρακάμπτουν το βήμα επεξεργασίας Drosha, μια αντίδραση ματίσματος παράγει το πρόδρομο. Τα επόμενα στάδια βιογένεσης είναι τα ίδια. Η δεύτερη μη κανονική διαδρομή που εμφανίζεται είναι συγκεκριμένη για το miR-451. Αυτό το πρόδρομο miRNA συνδέεται άμεσα και κόβεται από το Argonaute 2 σε ανεξάρτητη αντίδραση με την Dicer. Το υπόλοιπο RNA κόβεται πίσω για να δώσει ένα ώριμο miRNA. [51]

Αφού η φουρκέτα απελευθερωθεί μέσω της δράσης του μικρο-επεξεργαστή, χαρακτηρίζεται ως πρόδρομο miRNA (pre-miRNA). Εφόσον ένα pre-miRNA φέρει μία μικρή δομή στελέχους-βρόχου και μία 3' προεξοχή, δηλαδή έχει επεξεργαστεί, έχει την δυνατότητα να απελευθερωθεί από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα μέσω της *Exportin5* (XPO5) με ένα *Ran-GTP* εξαρτώμενο μηχανισμό [55-57]. Εκεί το pre-miRNA, υφίσταται επιπλέον επεξεργασία από την DICER, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός δίκλωνου RNA, απουσία βρόχου, περίπου 22 νουκλεοτιδίων που φέρει δύο προεξέχοντα νουκλεοτιδία στα 3' άκρα του. Παράλληλα με την επεξεργασία από τα ένζυμα Drosha/Dicer, τα pre-miRNA υπόκεινται σε τροποποιήσεις που ρυθμίζουν τη βιογένεση των miRNA. Στην εικόνα 8 φαίνεται ένα κανονικό μονοπάτι στην βιοσύνθεση των miRNA.

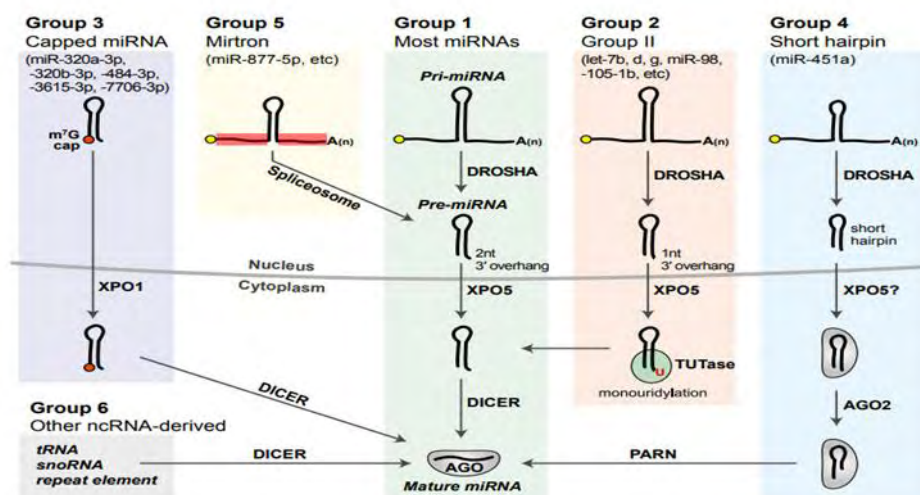


Εικόνα 8: Το κανονικό μονοπάτι βιογένεσης και μηχανισμοί δράσης των *microRNA*[58]

Τα miRNA που ακολουθούν κάποιο εναλλακτικό μονοπάτι βιοσύνθεσης, έχουν ως κύριο χαρακτηριστικό ότι παραλείπεται κάποιο από τα βασικά στάδια του κανονικού μονοπατιού. Χαρακτηριστικά παραδείγματα miRNA που ακολουθούν κάποιο non-canonical μονοπάτι βιοσύνθεσης είναι:

- τα miRNAs, τα οποία δεν απαιτούν την DROSHA για την παραγωγή τους[59]
- miRNA που μπορούν να προκύψουν από μικρά πυρηνικά RNA με έναν μηχανισμό εξαρτώμενο από την DICER αλλά ανεξάρτητο από την DROSHA[60]
- ενδογενή siRNA των οποίων η βιοσύνθεση εξαρτάται από την DICER αλλά δεν απαιτείται η εμπλοκή της DROSHA[61]

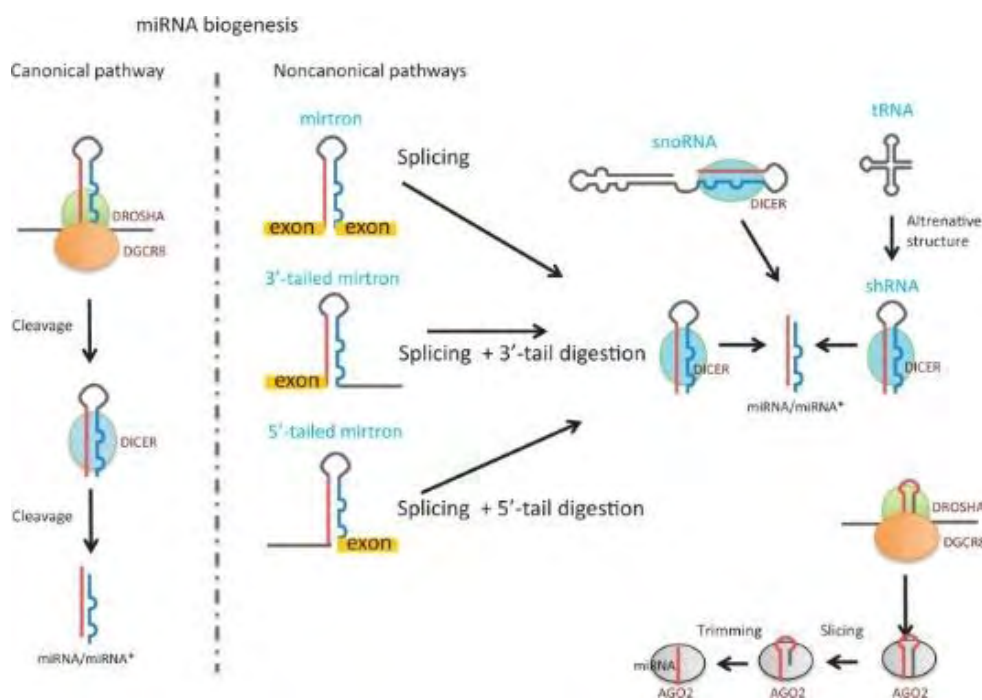
Στην εικόνα 9 φαίνεται όλες οι ομάδες των διαφορετικών μονοπατιών βιοσύνθεσης των miRNA. Τα περισσότερα ωστόσο ανήκουν στην κατηγορία 1.



Εικόνα 9: Κατηγοριοποίηση των miRNA με βάση το μονοπάτι βιοσύνθεσης τους[53]

Το ώριμο *microRNA* που έχει δημιουργηθεί, αναγνωρίζεται από τις πρωτεΐνες Αργοναύτες (AGO), όπου ο ένας κλώνος παραμένει συνδεδεμένος στην πρωτεΐνη AGO ενώ ο άλλος απομακρύνεται. Τα miRNA που προέρχονται από τα 5' και 3' άκρα του pre-miRNA

ονομάζονται 5p και 3p miRNA αντίστοιχα. Τα θηλαστικά διαθέτουν 4 στενά συγγενικές πρωτεΐνες Αργοναύτες (Ago1-4) οι οποίες αλληλεπιδρούν επίσης με παράγοντες απαδενυλίωσης ενώ εμπλέκονται και στο μηχανισμό της μετάφρασης με σκοπό να επάγουν την αποικοδόμηση των mRNA και την καταστολή της μετάφρασης[53]. Το microRNA σε συνδυασμό με τις πρωτεΐνες DICER, Ago και τις TRBP, PACT συμβάλλουν στη δημιουργία του συμπλόκου miRISC (RNA induced silencing complex), το οποίο κατευθύνεται τελικά προς το mRNA στόχο προκειμένου να πραγματοποιηθεί επαγόμενη από miRNA σίγηση[62].



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση για τη γνωστή βιογενετική οδό επεξεργασίας και ωρίμανσης των miRNA[61].

1.5.2. ΑΠΑΔΕΝΥΛΑΣΕΣ ΚΑΙ MICRORNA

Οι απαδενυλάσες εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση στη δράση τους ως προς επιλεγμένους mRNA-στόχους. Τα microRNA (miRNA) έχουν κεντρικό ρόλο στον συγκεκριμένο μηχανισμό ο οποίος είναι υπεύθυνος γι' αυτήν την εξειδίκευση. Τα miRNA είναι μη κωδικά RNA που έχουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με αλληλουχίες στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (UTR) του mRNA-στόχου, με αποτέλεσμα την αναστολή της μετάφρασής του και την προσέλκυση απαδενυλασών, κάτι που θα προκαλέσει την αποσταθεροποίηση και την αποικοδόμησή του[63]. Επίσης, τα miRNA μπορεί να προσδεθούν σε πολλά διαφορετικά mRNA. Η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται από τη συνεργατική δράση των miRNA και των απαδενυλασών.

Τα miRNA εμφανίζουν κιρκάδια ρύθμιση σε θηλαστικά και έντομα και είναι ρυθμιστές διαφόρων παραγόντων του κεντρικού ταλαντωτή. Τα miRNA είναι μια διατηρημένη κατηγορία μικρών μη κωδικοποιητικών RNA (ncRNA) που εμπλέκονται στη ρύθμιση της πλειονότητας των βιολογικών διεργασιών. Τα miRNA συγκεντρώνονται με πρωτεΐνες Argonaute (AGO) σε συμπλέγματα που προκαλούν σίγηση που επάγεται από miRNA (miRNA-induced silencing complexes-miRISCs) και υβριδοποιούνται με τα mRNA στόχους τους, με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίησή και τη μεταφραστική καταστολή τους. Ο μηχανισμός της

μεσολαβούμενης από miRNA αποικοδόμησης ξεκινά με απαδενυλίωση, όπου οι πρωτεΐνες AGO δεσμεύουν απαδενυλάσες για να κόψουν την πολυ(A) ουρά[18].

Μεταξύ των miRNA με κερκάδια έκφραση, το miR-122 έχει κεντρικό ρόλο. Το miR-122 είναι από τα πιο υψηλά παραγόμενα miRNA στο ήπαρ (περίπου 70% των miRNA). Οι πρόδρομες μορφές του (pri-miR-122 και pre-miR-122) έχουν έντονη ταλάντωση κατά τη διάρκεια του 24ώρου, ενώ η ώριμη μορφή του φαίνεται να διατηρεί σταθερά επίπεδα. Η μεταγραφή του miR-122 είναι ρυθμική και ελέγχεται από τον REV-ERBα, που είναι ένα από τα βασικά γονίδια[64]. Το παράδειγμα του miR-122 αποδεικνύει περίτρανα τη στενή σχέση μεταξύ miRNA και απαδενυλασών. Το miR-122 στοχεύει το mRNA της Nocturnin συμβάλλοντας στο κερκάδιο προφίλ έκφρασής της και από την άλλη μεριά η σταθερότητα του miR-122 ρυθμίζεται από την επαναλαμβανόμενη πολυαδενυλίωση. Ειδικότερα, η GLD-2, μια κυτταροπλασματική πολυ(A) πολυμεράση σταθεροποιεί το miR-122 προσθέτοντας μια ουρά 30 αδενοσινών, ενώ η PARN προσελκύεται σε αυτή την ολιγοαδενυλιωμένη ουρά από την CUGBP1 (μια πρωτεΐνη που προσδένεται σε επαναλήψεις CUG του RNA) οδηγώντας στην αποικοδόμησή του[65-67].

1.5.3. miRNA ΚΑΙ ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΟΛΟΙ

Η καθυστέρηση στην εμφάνιση των πρωτεϊνών των γονιδίων του ρολογιού, σε σύγκριση με τα συγγενή τους μετάγραφα, εξηγείται από το γεγονός ότι δεν υπάρχει ένας μοναδικός μηχανισμός ρύθμισης της μετάφρασης, αλλά ρυθμίζεται μέσω πολλαπλών μηχανισμών, μέσα στους οποίους εμπλέκονται και microRNA, σε ένα ποσοστό της τάξης του 30% στα θηλαστικά[29, 68]. Η θέση των miRNA στο κερκάδιο ρολόι και στους μηχανισμούς ρύθμισής του, υπόκειται σε έλεγχο σημάτων εισόδου και εξόδου και σε απευθείας επιρροή του κεντρικού ταλαντωτή. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι τα miRNA μπορεί να εμφανίζουν ημερήσιες διακυμάνσεις, ωστόσο δεν χρειάζεται να χαρακτηρίζονται τα ίδια από περιοδικότητα προκειμένου να μπορούν να επηρεάσουν το κερκάδιο ρολόι και την ταλάντωση άλλων μορίων[69].

Μερικά από τα miRNA που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κερκάδιου ρολογιού και πειράματα στα οποία περιγράφονται παρακάτω είναι τα miR101a, miR122, miR28a και miR1207 καθώς και τα pri-miR101a και pri-miR122. Σχετικά περισσότερες είναι οι μελέτες που έχουν επικεντρωθεί σε μηχανισμούς της εξαρτώμενης από miRNA ρύθμισης των μονοπατιών εξόδου του ρολογιού. Τα μετάγραφα του πρόδρομου miR-122 βρέθηκε ότι ταλαντώνονται στο ήπαρ, με μέγιστο νωρίς το πρωί, ωστόσο το ώριμο miR-122 παραμένει σταθερό σε τη διάρκεια της ημέρας. Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι το miR-122 απαντάται σε περίπου 65000 αντίγραφα ανά κύτταρο, το οποίο αντιπροσωπεύει περίπου το 70% του συνόλου των ηπατικών miRNA, όντας ένα από τα υψηλότερα εκφραζόμενα miRNA σε όλους τους ιστούς[64]. Η σταθερότητα του ίδιου του miR-122 ρυθμίζεται από την δυναμική ισορροπία πολυαδενυλίωσης/απαδενυλίωσης (από την PARN).

1.5.4. miR-29a

Μία από τις πιο γνωστές και καλά μελετημένες οικογένειες microRNA, σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες, είναι αυτή των miR-29, για τις υπόλοιπες είναι ακόμα γνωστές ελάχιστες πληροφορίες. Πολλά γονιδιώματα θηλαστικών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου, κωδικοποιούν την οικογένεια των miR-29 microRNA, η οποία μετρά τρία ώριμα μέλη, τα miR-29a, miR-29b, και miR-29c. Αυτά κωδικοποιούνται από δύο μεταγραφικές ομάδες (clusters) γονιδίων. Το miR-29a και το miR-29b-1 προκύπτουν από ένα ιντρόνιο ενός long non-coding γονιδίου που χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 7q32.3 ενώ τα miR-29b-2 και miR-29c εντοπίζονται στο 1q32.2 και μεταγράφονται μαζί. Τα miR-29b-1 και miR-29b-2 έχουν πανομοιότυπη αλληλουχία. Στις περιοχές των υποκινητών τους έχουν βρεθεί θέσεις

δέσμευση πολλών μεταγραφικών παραγόντων. Η αλληλουχίες από τις οποίες κωδικοποιούνται τα δύο miRNA εντός των cluster απέχουν <1kb. Παρόλα αυτά, η διαφορετική ρύθμιση και σε αρκετές περιπτώσεις και διαφορετική υποκυτταρική κατανομή που παρουσιάζουν, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η λειτουργική τους σημασία μπορεί να μην είναι ίδια. Τα διαφορετικά miR29 εντοπίζονται σε διαφορετικά επίπεδα μεταξύ των διαφορετικών υποκυτταρικών διαμερισμάτων. Το miR29a πιο συγκεκριμένα, εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα ενώ μπορεί να βρεθεί και σε αρκετά μικρότερες ποσότητες στον πυρήνα (miRBase).

Τα miR29 έχουν αρκετές ιδιότητες, κάποιες από τις οποίες είναι αντιφλεγμονώδεις δράσεις που έχουν επιβεβαιωθεί στην καρδιά και τους νεφρούς, εμπλοκή στην επιβίωση των κυττάρων διαδραματίζοντας ρόλο προαποπτωτικών παραγόντων και ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης. Η σημασία των miR29 στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης φαίνεται καλύτερα από το ρόλο τους σε διάφορους καρκίνους. Εξαιτίας της αρνητικής ρύθμισης των μελών της οικογένειας αυτής έχουν συσχετιστεί με τύπους καρκίνου όπως η λευχαιμία, το μελάνωμα, ο καρκίνος του ήπατος, του παχέος εντέρου και του τραχήλου της μήτρας. Επομένως, κατά κύριο λόγο λειτουργούν ογκοκατασταλτικά ενώ σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να εμπλέκονται και στην επαγωγή του όγκου όπως για παράδειγμα στον καρκίνο του μαστού, όπου παρατηρείται υπερέκφρασή τους. Εκτός όλων αυτών, τα miR29 μπορεί να έχουν ρόλο και στη φυσιολογική διαφοροποίηση των ιστών. Μετά από μελέτη σε κυτταρικά μοντέλα φάνηκε ότι η θετική ρύθμιση των miR29 μπορεί να περιορίσει την ανασταλτική δράση του TGF- β στη μυογένεση μέσω στόχευσης ενός από τους βασικούς αναστολείς της διαφοροποίησης των μυών (HDAC4)[70].

1.5.5. miR-1207

Στον άνθρωπο το miR1207 έχει ταυτοποιηθεί ότι κωδικοποιείται από μια ασταθή γονιδιωματική περιοχή του χρωμοσώματος 8q24. Διακρίνονται δύο ισομορφές, το miR1207-5p και το miR1207-3p για τις οποίες δεν έχουν καταγραφεί μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (miRBase). Έχει βρεθεί ότι το miR1207 παίζει ρόλο σε ρυθμιστικούς μηχανισμούς ανατροφοδότησης. Η βιολογική συμπεριφορά του μορίου και τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται χρειάζονται περαιτέρω μελέτη, ωστόσο είναι γνωστή η εμπλοκή του στον καρκίνο του προστάτη όπου το miR1207-3p μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός βιοδείκτης. Στα καρκινικά κύτταρα στον καρκίνο του προστάτη υπάρχει απώλεια έκφρασης του miR-1207-3p, είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων του προστάτη[71].

Στον καρκίνο του πνεύμονα όπου το miR1207-5p αναστέλλει την αύξηση και την μετάσταση του όγκου στοχεύοντας τον παράγοντα CSF1 (colony stimulating factor 1) και στην καταστολή των σηματοδοτικών μονοπατιών STAT3 και AKT. Το miR-1207-5p μπορεί να ρυθμίσει μερικά από τα σημαντικά μόρια που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα, όπως το Snail, το Smad 2, το Smad3, το Smad7, το Vimentin και το ZEB1, γεγονός που δείχνει τον ανασταλτικό ρόλο του miR-1207-5p στην εισβολή όγκου και τη μετάσταση. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί σε πειραματικά μοντέλα ότι καταστέλλει και την ανάπτυξη του καρκίνου του στομάχου στοχεύοντας την τελομεράση[72].

1.5.6. miR-101a

Το miR-101a λειτουργεί ως ένας τροποποιητής της μικρογλοιακής μορφολογίας. Επιπλέον, αναστέλλει την ανάπτυξη όγκων ρυθμίζοντας την οδό κυκλοοξυγενάσης-2. Μελέτες έδειξαν ότι προάγει την ανάπτυξη μη δεσμευμένων αιματοποιητικών προγόνων σε μυελοειδή κύτταρα και προάγει τη διαφοροποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων που προέρχονται από το μυελό των οστών και της παραγωγής κυτοκίνης από τα μικρογλοία[73]. Ακόμη, το miR-101a είναι ένα ρυθμιζόμενο γονίδιο το οποίο σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως νευροβλάστωμα, γαστρικός καρκίνος, καρκίνος του προστάτη, ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, καθώς αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την εισβολή και λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό καταστέλλοντας την πρωτεΐνη EZH2[73, 74]. Γενικά, η λειτουργία του miR-101a είναι συμβατή με τη διαδικασία της μυογένεσης. Παρόλα αυτά, λίγα είναι γνωστά για το πρότυπο έκφρασης και τον ρυθμιστικό ρόλο του miR-101a στην ανάπτυξη σκελετικών μυών[74, 75].

1.5.7. miR-122

Το miR-122 εκφράζεται με μεγάλη σημασία στο αναπτυσσόμενο και ενήλικο ήπαρ και έχει αναφερθεί ότι αποτελεί βασικό ρυθμιστή του ηπατικού λιπαρού ιστού, του μεταβολισμού της χοληστερόλης, της οξείδωση λιπαρών οξέων και του μεταβολισμού των λιπιδίων. Επιπλέον, το miR-122 έχει διάφορους άλλους ρυθμιστικούς ρόλους που σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση και την απόκριση στο στρες, την κερκάδια ρύθμιση των ηπατικών γονιδίων, τον μεταβολισμό του σιδήρου και τη διάδοση συγκεκριμένων ιών που παράγουν ηπατίτιδα[76, 77].

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η ρύθμιση της διάρκειας ζωής των mRNA είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη διεργασία του κυττάρου ώστε τα επίπεδα των παραγόμενων πρωτεϊνών να αντικατροπτρίζουν την ανάγκη του κυττάρου και κατ' επέκταση του ιστού για συγκεκριμένα πρωτεϊνικά προϊόντα σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές. Στο πλαίσιο του κερκάρδιου ρυθμού, παράγοντες όπως οι απαδενυλάσες και ρυθμιστικά μόρια όπως τα microRNA, φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Είναι γνωστό πως οι απαδενυλάσες προσελκύονται από miRNA για την αποικοδόμηση επιλεγμένων mRNA-στόχων, όμως οι επιμέρους δράσεις τους ή η μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις στο κερκάρδιο ρολόι αποτελούν ένα πεδίο που δεν έχει μελετηθεί σε βάθος.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εξέταση της περιοδικής έκφρασης της απαδενυλάσης PARN, καθώς και επιλεγμένων miRNA, είτε στην πρώιμη είτε στην ώριμη μορφή τους, με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου τους στον κερκάρδιο ρυθμό.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1. ΥΛΙΚΑ

3.1.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια

Acetic Acid	Merck
Acrylamide	SERVA
Agarose	SIGMA
Ammonium Persulfate (APS)	Applichem
Blotting paper	Whatman
Bovine Serum Albumin (BSA)	SIGMA
Bromophenol Blue	Research Organics
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka
DEPC (Diethylpyrocarbonate)	Serva
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Merck
Ethanol Absolute	SIGMA
Fixer/Developer	Kodak/ Ilford
Glycerol	Applichem
Glycine	SERVA
Hydrochloric Acid (HCl)	Merck
Isopropanol	Honeywell
Methanol	Honeywell
N'N' methylene- bis Acrylamide	SERVA
NP-40	Applichem
PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)	Applichem
Ponceau S	Applichem
Potassium Chloride (KCl)	Merck
Potassium Hydroxide (KOH)	Merck
Protease Inhibitor Cocktail Set X	Calbiochem
PVDF membrane	Macherey-Nagel
SDS (Sodium dodecyl Sulfate)	SERVA
Sodium Chloride (NaCl)	Applichem
Sodium Deoxycolate	Serva
Sodium diHydrogen Phosphate	Merck
Sodium Hydrogen Phosphate	Merck
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine)	Invitrogen
TRI-Reagent	Sigma-Aldrich
Tris Base	Applichem
Triton-X 100	Merck
X-ray film	Fuji Film
β- Mercaptoethanol	Riedel de Haën

3.1.2. KITS

Kapa Sybr Fast Universal kit	Sigma-Aldrich
MiR-X miRNA First strand synthesis kit	TaKaRa
Monarch total RNA extraction	New England Biolabs
PrimeScript 1 st strand synthesis kit	TaKaRa
Protein Quantitation Kit	Macherey-Nagel
Sybr Select 2× Master Mix	Applied Biosystems

3.1.3. ΔΕΙΚΤΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΑΖΩΝ

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Nippon Genetics

3.1.4. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Διαλύματα για την λύση ιστού θηλαστικών για εκχύλιση πρωτεϊνών:

Η λύση των ιστών πραγματοποιήθηκε με TRI Reagent είτε δύο διαφορετικά διαλύματα RIPA.

- RIPA BUFFER 1: 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% DOC, 0,1% SDS, Tris pH 7,4 25mM, dH₂O
- RIPA BUFFER 2: NaCl 150 mM, 1% NP-40, 0,25% DOC, Tris pH7.4 50 mM, EDTA 1mM, DTT 2mM, dH₂O

Διαλύμα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης (50×):

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-acetate-EDTA (TAE) 10×: Tris 24,2% v/w, Οξικό οξύ 5,71% w/w, EDTA 0,05M, pH 8,6.

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται TAE 1x το οποίο προκύπτει με κατάλληλη αραιώση.

Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου:

- Ρυθμιστικό διάλυμα (10x)-Running buffer: Tris 1,5%, Γλυκίνη 7,2% v/w, SDS 0,5%, pH 8,3, (για να διαλυθεί θερμαίνεται υπό ανάδευση).

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με Running Buffer 1x, το οποίο προκύπτει με κατάλληλη αραιώση. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων SDS-PAGE 4x (Sample Buffer): Tris-HCl 240mM pH 6,8, Glycerol 40%, SDS 8%, β- mercaptoethanol 5%, Bromophenol Blue 0,04%.

Διατηρείται στους -20°C. Το SDS αποτελεί τον κύριο αποδιατακτικό παράγοντα που αποδιάταξε τη δευτεροταγή και την τριτοταγή δομή και επιπλέον αποδίδει στις πρωτεΐνες ενιαίο αρνητικό φορτίο, ανάλογο της μάζας κάθε μορίου. Η αποδιάταξη της τριτοταγούς δομής γίνεται με θέρμανση τους 95 °C. Η προσθήκη β- mercaptoethanol ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς με στόχο την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στην αποδιάταξη της τεταρτοταγούς δομής των πρωτεϊνών σε υπομονάδες. Το Bromophenol Blue προστίθεται ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης, καθώς έχει ταχύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα από τις πρωτεΐνες.

- Μίγμα ακρυλαμίδιου 30% v/w: ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο : 29/1 σε ddH₂O. Φυλάσσεται/Διατηρείται στους 4°C / στο σκοτάδι.

Διαλύματα για τη χρώση του πηκτώματος ακρυλαμίδιου:

- Διάλυμα χρώσης Coomassie 0.1%: 40% Methanol, 10% Acetic Acid, Coomassie Blue Brilliant R-250 0.05%
- Διάλυμα αποχρωματισμού: Οξικό οξύ 10%

Η χρωστική προσδένεται μη ειδικά σε όλες τις πρωτεΐνες. Το πήκτωμα επωάζεται με το διάλυμα της χρωστικής και όση χρωστική δεν έχει προσδεθεί σε πρωτεΐνες διαχέεται από την πηκτή στα επακόλουθα βήματα της χρώσης, τα οποία είναι θέρμανση του πηκτώματος παρουσία του οξικού οξέος μέχρι να κοχλάζει 5-6 φορές.

Διαλύματα για ανοσοαποτύπωση (Western blot) σε μεμβράνη PVDF:

Ponceau S: 0.1% Ponceau S w/v σε 1% οξικό οξύ. Χρώση της μεμβράνης PVDF με σκοπό να επιβεβαιωθεί η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε αυτή.

- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer buffer) 10x : Tris 25mM, Glycine 192mM, SDS 0,1%, MetOH 10% (προστίθεται στην τελική αραιώση 1x).

Διαλύματα για την ανοσο-ανίχνευση πρωτεϊνών ακινητοποιημένων σε μεμβράνη PVDF:

- Διάλυμα κορεσμού (Blocking Buffer): 5% Άπαχο γάλα σε σκόνη σε PBS-T
PBS-T: 0,1% Tween 20 σε PBS 1x
- PBS 1x: NaCl 130mM, KCl 2mM, Na₂HPO₄ 8mM, KH₂PO₄ 1,5mM. Ρύθμιση τιμής pH στο 7,4 και αποστείρωση

Διάλυμα χημειοφωταύγειας (ECL):

- Lumisensor HRP substrate (Genscript)
- Immobilon Crescendo Western HRP substrate (Merck Millipore)
- Διάλυμα λουμινόλης/κουμαρικού/υπεροξειδίου → luminol 0,022 %: διαλύεται σε 100mM Tris pH 8,5 , υπό ανάδευση στο σκοτάδι, p-cumaric acid 0,0112 %: διαλύεται σε DMSO 100%, 3% v/v H₂O₂: αραιώνεται κατάλληλα σε νερό

Διάλυμα για την αποσύνδεση αντισωμάτων από μεμβράνη PVDF (Stripping buffer):

Stripping buffer: για 100mL buffer χρειάζονται: 1,5% w/v Glycine, 0,1% w/v SDS, 1% v/v Tween 20, pH 2,2.

Η μεμβράνη επωάζεται 2 φορές για 5 λεπτά με το διάλυμα υπό ανάδευση και στη συνέχεια ξεπλένεται δυο φορές για 10 λεπτά με PBS. Έπειτα, ξεπλένεται 2 φορές για 5 λεπτά με PBS-T. Τέλος, τοποθετείται για 20 με 30 δευτερόλεπτα σε MetOH για να ενεργοποιηθεί.

3.1.5. ΥΛΙΚΑ-ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαθέσιμα στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας καθώς επίσης και στους κοινόχρηστους χώρους του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας. Αναφέρονται τα σημαντικότερα εξ αυτών:

Αυτόματες πιπέτες	Gilson, Eppendorf, Nichiryo
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης mini-PROTEAN tetracell	Biorad
Μετρητής pH	Metrohm
Φυγόκεντροι	Eppendorf, Hermle
Whatman 3mm paper	Whatman
Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς Yrdimes Semi-dry Blotter	Wealtec
Φασματοφωτόμετρο ορατού- υπεριώδους UV 1600-PC	VWR
Θερμοκυκλοποιητής MJ Mini	BIORAD
Θερμοκυκλοποιητής πραγματικού χρόνου Step One Plus	Applied Biosystems
Sonicator	Witeg

Nanodrop	Thermo Scientific
UV cabinet for PCR	Biosan
Ομογενοποιητής WiseStir	Witeg
Hypercassete	Amersham
Plate reader Enspire	Perkin Elmer

3.1.6. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Δευτερογενές αντίσωμα αίγας έναντι IgG ποντικού συζευγμένο με περοξειδάση του χρένου (HRP-conjugated secondary goat anti-mouse IgG)	Pierce
Δευτερογενές αντίσωμα αίγας έναντι IgG κονίκλου συζευγμένο με περοξειδάση του χρένου (HRP-conjugated secondary goat anti-rabbit IgG)	Pierce
Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι ανθρώπινης ακτίνης (b-actin)	SIGMA-ALDRICH
Πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι ανθρώπινης PARN	Santa Cruz
Αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης PARN μήκους 74 kDa	Ευγενική προσφορά του Καθ. Α. Virtanen, Uppsala University, Σουηδία

3.1.7. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των εξεταζόμενων παραγόντων με ημιποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR), σχεδιάστηκαν εκκινητές (primers) ειδικοί ως προς το mRNA του κάθε υπό μελέτη παράγοντα. Στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) παρουσιάζονται τα επιλεγμένα γονίδια και οι αλληλουχίες των εκκινητών.

Πίνακας 3. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην διπλωματική εργασία. Ο αριθμός στην παρένθεση δείχνει το αναμενόμενο μήκος του προϊόντος (bp).

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ		ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
B2M(103)	FWD	GTTCGGCTTCCCATTCTCC
	REV	GGTCTTTCTGGTGCTTGTCTCA
CLOCK (166)	FWD	ACCACAGCAACAGCAACAAC
	REV	AAAGGCAGCAGAGAGGATGA
PARN (155)	FWD	CCATGCACTGGGTTCCAAAG
	REV	TCCTGCTCTCCTTTTGCG
pri-miR29a (131)	FWD	CAGCTGAACGGTGCTCTTCC
	REV	CTTCCCAGTGACATGACCTC
pri-miR1207	FWD	CAAGAGGCAAACATCTCGAA
	REV	GGAGCCCTTCTTTTCTG
mmiR29a-3p		GGGTAGCACCATCTGAAATCGGTTA
miR1207 5p		TGGCAGGGAGGCTGGGAG
miR122		GGGAACACCATTGTCACACTCCA
miR101-3p		GCGGAGTACTGTGATAACTGAA

Ο σχεδιασμός ειδικών εκκινητών γίνεται μέσω του genome browser. Γίνεται επιλογή του επιθυμητού γονιδίου και δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στον οργανισμό που επιλέγεται. Αφού,

επιλεχθεί το κύριο μετάγραφο του γονιδίου, επιλέγεται μία περιοχή δυο εξονίων που να έχουν απόσταση τουλάχιστον 1000 αζωτούχες βάσεις. Αντιγράφεται η αλληλουχία των δύο εξονίων, εδώ χρειάζεται προσοχή να βρίσκονται στην σωστή σειρά. Στη συνέχεια, η αλληλουχία εισάγεται στο πρόγραμμα primer 3, το οποίο δίνει διάφορα ζεύγη πιθανών εκκινητών. Στη συνέχεια, γίνεται επιλογή κάθε ζεύγους και υπόκειται σε έλεγχο έτσι ώστε να μην δημιουργούν δευτεροταγείς δομές. Έπειτα, πραγματοποιείται *in silico* έλεγχος του προϊόντος PCR που προκύπτει από τους εκκινητές. Το ιδανικό μέγεθος του προϊόντος για την qPCR είναι 100-200 ζεύγη βάσεων, καθώς επιτρέπει να ενωθεί ο εκκινητής και να πραγματοποιηθεί η ενίσχυση χωρίς την ανάγκη για κατανάλωση μεγάλης ποσότητας υλικών και παράλληλα είναι ικανό για να δώσει επαρκές σήμα. Το ιδανικό μέγεθος του κάθε εκκινητή είναι 18-22 νουκλεοτίδια.

Τα γονίδια U6[78] και B2M είναι γονίδια αναφοράς (control). Τα γονίδια αναφοράς χρησιμοποιούνται για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, δηλαδή την σύγκριση με ένα γνωστό γονίδιο το οποίο εκφράζεται ιδιосύστατα και δεν υπόκειται σε κιρκάδια ρύθμιση.

3.1.8. ΖΩΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Το πειραματικό πρωτόκολλο διαδικασιών σε ζώα (μύες) αξιολογήθηκε και έλαβε έγκριση από την αρμόδια Διεύθυνση της Περιφέρειας Αττικής για πειραματισμό σε ζώα εργαστηρίου με Αρ.Πρωτ.: 3752/20-07-2018. Η λήψη των ιστών πραγματοποιήθηκε σε κατάλληλα χρονικά σημεία του 24ώρου σύμφωνα με τα διεθνή πρωτόκολλα [38, 75, 79-82] από το Εκτροφείο Πειραματόζων του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Για κάθε χρονικό σημείο θυσιάστηκαν 2 αρσενικά ποντίκια ηλικίας οκτώ εβδομάδων, σε συμφωνία με τις Οδηγίες της αρμόδιας Διεύθυνσης Περιφέρειας Αττικής για πειράματα με το λιγότερο δυνατό αριθμό ζώων εργαστηρίου.

Σύμφωνα με το σχεδιασμό, χρησιμοποιείται ήπαρ ποντικού. Πιο συγκεκριμένα, η εκτροφή των πειραματοζώων (μύες C57BL/6J) πραγματοποιήθηκε σε δυο ομάδες και προβλέπει και δείγματα θετικού μάρτυρα. Η μία ομάδα ανατράφηκε σε κανονικό κύκλο ημέρας/νύκτας (12h/12h· Light/Dark, L/D) μέχρι τη στιγμή της δειγματοληψίας. Η άλλη ομάδα σε συνθήκες συνεχούς νύκτας (ημέρα/νύκτα: 0h/24h· Dark/Dark, D/D) 2 εβδομάδες πριν τη δειγματοληψία.

3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1. ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Η απομόνωση του συνόλου των πρωτεϊνών από ήπαρ μύος πραγματοποιείται είτε με το αντιδραστήριο TRI-Reagent, είτε με την ανάδευση/ομογενοποίησή του με ρυθμιστικό διάλυμα RIPA παρουσία αναστολέων πρωτεασών.

1. Κοπή με νυστέρι ενός μικρού τμήματος του ήπατος, με μεγάλη προσοχή και αποστειρωμένα εργαλεία, έως 0,2g.

2. Ομογενοποίηση για 35 έως 50 δευτερόλεπτα σε ομογενοποιητή διάσπασης ιστών τύπου Potter-Elvehjem

3. Ακολούθως, προστίθεται Sample buffer 4x και ακολουθεί μηχανική λύση με χρήση υπερήχων (6 κύκλοι των 20 δευτερολέπτων).

4. Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά σε 15000rpm στους 7°C και συλλογή του υπερκείμενου που αποτελεί το εκχύλισμα του συνόλου των πρωτεϊνών. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, αφού ποσοτικοποιηθούν αποθηκεύονται στους -20°C.

3.2.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (SDS-PAGE), ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΗΣ, ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ PVDF ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE): Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή πως ένα φορτισμένο μόριο θα μεταναστεύσει σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η κοινή πορεία, από την κάθοδο προς την άνοδο, όλων των μορίων που περιέχονται σε κάθε δείγμα, εξασφαλίζεται με την προσθήκη του αποδιατακτικού παράγοντα SDS, ο οποίος θα καταργήσει τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων φορτίζοντάς τα αρνητικά και προσδίδοντάς τους ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα, ώστε να μεταναστεύσουν όλα προς την άνοδο, και να διαχωριστούν όχι βάσει του φορτίου τους, αλλά βάσει του μοριακού τους βάρους, καθώς έχουν ίδιο φορτίο. Οι πρωτεΐνες ανάλογα με το μέγεθός τους εμφανίζουν αντίστοιχη αύξηση της τριβής κατά την κίνησή τους διαμέσου των πόρων της πηκτής, όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης, άρα και όσο μεγαλύτερο το μέγεθός της, τόσο μικρότερη είναι η κινητικότητα του μορίου αυτού στην πηκτή. Ουσιαστικά οι πρωτεΐνες με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος συναντώνται πιο κοντά στο σημείο εισόδου.

Στις περισσότερες περιπτώσεις η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής, δηλαδή πραγματοποιείται σε δύο διαδοχικές πηκτές διαφορετικής πυκνότητας: μία πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel), η οποία έχει σταθερή πυκνότητα 5% και μια πηκτή διαχωρισμού (separating gel) της οποίας η πυκνότητα επιλέγεται κάθε φορά έτσι ώστε να διαχωρίζονται καλά οι προς μελέτη πρωτεΐνες. Ο ρόλος της πηκτής επιστοιβάξης είναι να κινηθούν οι πρωτεΐνες και να στοιβαχθούν σε μια κοινή ζώνη, έτσι ώστε να εισέλθουν ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού και να δημιουργηθεί ένα ενιαίο μέτωπο κατά την ηλεκτροφόρηση. Ο σχηματισμός της πηκτής γίνεται με αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και δι-ακρυλαμιδίου σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία των παραγόντων υπερθειικό αμμώνιο (APS) και TEMED. Το TEMED είναι επιταχυντής και καταλύει την αντίδραση του πολυμερισμού των ελευθέρων ριζών θείου του ακρυλαμιδίου που δημιουργούνται από το APS. Επιπλέον, μπορεί να πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση με πηκτή διαχωρισμού διαβαθμιζόμενης συγκέντρωσης. Η συγκεκριμένη τεχνική στοχεύει στον αποτελεσματικότερο διαχωρισμό των πρωτεϊνών, εξαιτίας της διαφορετικής συγκέντρωσης κατά μήκος της πηκτής. Μόλις ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, τοποθετείται μαζί με το ικρίωμά της σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer 1x) ώστε να είναι σε άμεση επαφή με την πηκτή και στο πάνω και στο κάτω μέρος της συσκευής. Οι όγκοι των δειγμάτων που θα ηλεκτροφορηθούν υπολογίζονται έτσι ώστε σε όλα τα πηγάδια της πηκτής να φορτωθεί ίση συγκέντρωση πρωτεϊνών. Σε ένα από τα πηγάδια φορτώνεται και ο μάρτυρας γνωστών μοριακών μαζών. Με τη βοήθεια τροφοδοτικού διαβιβάζεται ρεύμα σταθερής τάσης 110-140V στο κλειστό κύκλωμα που δημιουργείται μεταξύ της δεξαμενής και της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF:

Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF (ή νιτροκυτταρίνης) βασίζεται στο γεγονός ότι τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-SDS είναι αρνητικά φορτισμένα και επομένως με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου θα μετακινηθούν προς την άνοδο με αποτέλεσμα να εξέλθουν από την πηκτή και να στερεωθούν στη μεμβράνη λόγω

υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων. Η τοποθέτηση της πηκτής και της μεμβράνης στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς γίνεται ανάμεσα από ένα ζεύγος τριών διηθητικών χαρτιών Whatman με τη μεμβράνη προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και την πηκτή στον αρνητικό. Πριν την τοποθέτηση τους στη συσκευή, τόσο τα φύλλα Whatman όσο και η πηκτή και η μεμβράνη εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer). Στην περίπτωση της PVDF, προηγείται και ένα στάδιο εμβάπτισης της μεμβράνης σε 100% μεθανόλη για 25-30 δευτερόλεπτα πριν τη μεταφορά στο Transfer Buffer. Η επαφή μεταξύ της πηκτής και της μεμβράνης πρέπει να είναι άμεση χωρίς την ύπαρξη φυσαλίδων αέρα καθώς παρεμποδίζουν τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Επίσης απαιτείται πολλή προσοχή για να μην υπάρχει τραυματισμός της πηκτής ή της μεμβράνης, καθώς έτσι δεν θα πραγματοποιηθεί σωστά η μεταφορά. Η μεταφορά των πρωτεϊνών στην παρούσα διπλωματική υπό σταθερή ένταση ρεύματος 270mA για χρόνο που κυμαινόταν μεταξύ 52-54 λεπτών, χρόνος που μπορεί να διαφέρει σε κάθε περίπτωση ανάλογα με την πυκνότητα της πηκτής. Η επιβεβαίωση της μεταφοράς γίνεται σε πρώτο στάδιο με παρατήρηση της μεταφοράς του έγχρωμου μάρτυρα και στη συνέχεια με χρώση της μεμβράνης με Ponceau S.

Ανοσοανίχνευση:

Η ανοσοανίχνευση είναι μία τεχνική η οποία επιτρέπει τον εντοπισμό των καθηλωμένων πρωτεϊνών σε μεμβράνη με τη χρήση αντισωμάτων και τη δημιουργία σήματος. Βασίζεται στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη, και βρίσκεται προσδεμένη στην μεμβράνη, μπορεί εύκολα να αλληλεπιδράσει με ένα ειδικό ως προς την πρωτεΐνη αυτή αντίσωμα. Ουσιαστικά, το αντίσωμα συνδέεται με την πρωτεΐνη σε πρώτη φάση και στη συνέχεια το σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου, δηλαδή πρωτεΐνη-πρωτογενές αντίσωμα, συνδέεται με ένα δευτερογενές αντίσωμα. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι αυτό που οδηγεί στην ανίχνευση της πρωτεΐνης, καθώς φέρει μία περιοχή που έχει μεγάλη εξειδίκευση για την σταθερή περιοχή του πρωτογενούς αντισώματος. Αρχικά, επώάζεται σε διάλυμα κορεσμού (Blocking Buffer) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ήπια ανάδευση, έτσι ώστε οι μεγαλομοριακές πρωτεΐνες του γάλακτος να καλύψουν τις μη ειδικές θέσεις σύνδεσης και να αποφευχθούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα. Ακολουθεί επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία 4°C για 12-16 ώρες. Εν συνεχεία, γίνεται έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα PBS-T, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος. Ο χρόνος και ο αριθμός των επαναλήψεων των πλύσεων εξαρτάται κάθε φορά από το αντίσωμα. Έπειτα, η μεμβράνη επώάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση με το δευτερογενές αντίσωμα για μία ώρα. Πριν τη διαδικασία της εμφάνισης του σήματος πραγματοποιούνται και πάλι πλύσεις με PBS-T. Η οπτικοποίηση της ειδικής πρόσδεσης του πρώτου αντισώματος γίνεται με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Ως χημειοφωταύγεια ορίζεται η εκπομπή φωτός που προέρχεται από την απελευθέρωση ενέργειας από ένα υπόστρωμα που βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση και επηρεάζεται από μια χημική αντίδραση. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, το δευτερογενές αντίσωμα φέρει προσδεμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης (HRP), το οποίο παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε αλκαλικό περιβάλλον, καταλύει την οξειδωση της λουμινόλης (luminol) με ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων, που μπορεί να αποτυπωθεί σε ακτινογραφικό φιλμ με τη μορφή σκοτεινής ζώνης. Η ενισχυμένη χημειοφωταύγεια επιτυγχάνεται όταν η οξειδωση της λουμινόλης από την υπεροξειδάση

(HRP) πραγματοποιείται παρουσία χημικών ενισχυτών, όπως οι φαινόλες. Αφού ολοκληρωθούν λοιπόν και οι πλύσεις μετά την επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, η μεμβράνη επάζεται για τρία λεπτά στο σκοτάδι με τα αντιδραστήρια ανίχνευσης ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Η ανίχνευση επιτυγχάνεται είτε με έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας, είτε σε μηχανήμα ανίχνευσης χημειοφωταύγειας. Ο χρόνος της εμφάνισης μπορεί να ποικίλλει από 30 δευτερόλεπτα μέχρι και 1 ώρα, ανάλογα με την ένταση του σήματος, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από την ποσότητα της πρωτεΐνης προς ανίχνευση[83].

3.2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Η απομόνωση του ολικού RNA από τα ηπατικό ιστό των πειραματοζώων πραγματοποιείται με το αντιδραστήριο TRI Reagent, προτιμάται η συγκεκριμένη μέθοδος καθώς έχουμε πλήρη διαχωρισμό μεταξύ πρωτεϊνών, DNA και RNA. Το αντιδραστήριο TRI συνδυάζει τη φαινόλη και τη θειοκυανική γουανιδίνη σε ένα μονοφασικό διάλυμα για να διευκολύνει την άμεση και αποτελεσματικότερη αναστολή της δραστηριότητας RNase και χρησιμοποιείται για την απομόνωση DNA, RNA και πρωτεΐνης από βιολογικά δείγματα ανθρώπων, ζώων, φυτών, ζύμης, βακτηρίων και ιών. Το αντιδραστήριο TRI απομονώνει υψηλής ποιότητας RNA από ποικίλο βιολογικό υλικό, συμπεριλαμβανομένων ζωικών και φυτικών ιστών πλούσιων σε πολυσακχαρίτες και πρωτεογλυκάνες. Κατά τον διάχωρισμό διακρίνονται τρεις φάσεις, στο κάτω μέρος μια οργανική φάση όπου περιέχονται οι πρωτεΐνες (ροζ χρώμα), στην επιφάνεια μια υδατική φάση όπου περιέχεται το RNA (διαυγής) και στο ενδιάμεσο η ζώνη του DNA (λευκό χρώμα). Εάν εκτελεστεί σε αυξημένη θερμοκρασία, μια υπολειμματική ποσότητα DNA μπορεί να δεσμευτεί στην υδατική φάση. Η θειοκυανική γουανιδίνη είναι ένα από τα πιο αποτελεσματικά μετουσιωτικά πρωτεϊνών που είναι γνωστά. Η χρήση της γουανιδίνης για λύση των κυττάρων αναπτύχθηκε αρχικά για να επιτρέψει τον καθαρισμό του RNA από κύτταρα υψηλά σε ενδογενείς ριβονουκλεάσες. Η μέθοδος ενός σταδίου απομόνωσης RNA που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία βασίζεται στην ικανότητα του RNA να παραμένει υδατοδιαλυτό σε διάλυμα που περιέχει 4M θειοκυανική γουανιδίνη, pH 4, παρουσία μιας οργανικής φάσης φαινόλης/ κλωροφορμίου. Υπό τέτοιες όξινες συνθήκες, οι περισσότερες πρωτεΐνες και μικρά θραύσματα DNA (50 βάσεις έως 10 kb) θα βρεθούν στην οργανική φάση ενώ μεγαλύτερα θραύσματα DNA και μερικές πρωτεΐνες παραμένουν στην ενδιάμεση φάση. Ο κατακερματισμός του DNA κατά την ομογενοποίηση βοηθά στην απομάκρυνση του DNA από την υδατική φάση.

Ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Προσθήκη κατάλληλου όγκου TRI Reagent (1V) στο ίζημα των κυττάρων, λύση μέσω ήπιας ανάδευσης και στη συνέχεια επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Επώαση των δειγμάτων παρουσία 1-bromo-3-chloropropane (0,1V) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με έντονη ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 12.000g για 15 λεπτά στους 4°C
3. Στο σημείο αυτό το RNA βρίσκεται στην υδατική φάση, η οποία και μεταφέρεται με ιδιαίτερη προσοχή σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf 1,5mL. Εδώ έχει πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός RNA, DNA και πρωτεϊνών. Το DNA και οι πρωτεΐνες δεν μας είναι χρήσιμες σε αυτό το στάδιο. Το DNA απορρίπτεται, καθώς δεν μας είναι χρήσιμο σε κανένα μέρος της διαδικασίας, ενώ οι πρωτεΐνες συλλέγονται και ακολουθούν την αντίστοιχη διαδικασία που περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα.

4. Επανάληψη του βήματος της φυγοκέντρησης με σκοπό την αύξηση της καθαρότητας του δείγματος
5. Προσθήκη ισοπροπανόλης (0,5V) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου
6. Φυγοκέντρηση σε 12.000g για 10 λεπτά στους 4°C και απόρριψη υπερκείμενου
7. Έκπλυση του ιζήματος με κατάλληλο όγκο παγωμένης αιθανόλης 75% (1-2V) και τοποθέτηση των δειγμάτων στους -20°C για 30 λεπτά. Η χαμηλή θερμοκρασία βοηθάει στην κατακρήμνιση του ιζήματος.
8. Φυγοκέντρηση σε 12.000g για 5 λεπτά στους 4°C.
9. Προσεκτική αφαίρεση της αιθανόλης και το ίζημα RNA αφήνεται να στεγνώσει πλήρως σε αποστειρωμένο περιβάλλον.
10. Επαναιώρηση με νερό ελεύθερο ριβονουκλεασών (RNase-free ή DEPC-treated water) στους 55°C.
11. Αποθήκευση των δειγμάτων RNA στους -80°C.

3.2.3.1. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ RNA ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Μετά την απομόνωση του RNA ακολουθεί μία διαδικασία καθαρισμού του δείγματος με σκοπό την ύπαρξη αποκλειστικά RNA και όχι DNA μέσω του Monarch™ Total RNA isolation kit. Η ανάγκη για περαιτέρω καθαρισμό του δείγματος προκύπτει καθώς μπορεί να υπάρχει πρόσμιξη του RNA με DNA, πιθανώς λόγω κακής μεταχείρισης του δείγματος, ο όγκος του αντιδραστήριου που χρησιμοποιήθηκε για την ομογενοποίηση του δείγματος μπορεί να ήταν πολύ μικρός, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση μπορεί να περιέχουν οργανικούς διαλύτες, ισχυρά ρυθμιστικά διαλύματα ή αλκαλικό διάλυμα.

Ουσιαστικά γίνεται πέψη του δείγματος με DNάση και φιλτράρισμά του από ειδικές στήλες, που συγκρατούν το RNA, το οποίο εκλούεται στο τέλος της διαδικασίας και συλλέγεται. Πριν και μετά τον καθαρισμό του RNA, πραγματοποιείται μέτρηση της ποσότητάς του με τη χρήση nanodrop (Thermo Scientific). Σύμφωνα με το αποτέλεσμα της μέτρησης υπολογίζεται η ποσότητα δείγματος που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για να υπάρχει η κατάλληλη ποσότητα RNA κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Επιπλέον, με το nanodrop μετριέται και η καθαρότητα του δείγματός μας, στη συγκεκριμένη περίπτωση γίνεται υπολογίζοντας τον λόγο της απορρόφησης στα 260nm προς 280nm, πρέπει να είναι μεταξύ 1,8 και 2. Διαλέγονται αυτά τα μήκη κύματος καθώς τα νουκλεϊκά οξέα εμφανίζουν μέγιστο απορρόφησης στα 260nm. Επιπλέον, ελέγχεται και ο λόγος της απορρόφησης στα 260nm προς την απορρόφηση στα 230nm. Ο δεύτερος λόγος δείχνει την καθαρότητα από άλλες προσμίξεις όπως άλατα και πρωτεΐνες και πρέπει να είναι κοντά στο 1.

3.2.4. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ

Κατά την συμβατική PCR, τα δεδομένα συλλέγονται αφού η αντίδραση ενίσχυσης έχει ολοκληρωθεί (συνήθως 30-40 κύκλους) και η τελική ποσότητα φθορισμού χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί η ποσότητα του αρχικού DNA στόχου, χρησιμοποιώντας πηκτική αγαρόζης. Αυτή η μέθοδος ποσοτικοποίησης είναι χρονοβόρα, αφού χρειάζεται επεξεργασία των δεδομένων και μετά το πέρας της αντίδρασης. Επιπλέον, μπορεί να δώσει αντιφατικά αποτελέσματα επειδή η αποδοτικότητα της μειώνεται κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού, καθώς τα αντιδραστήρια καταναλώνονται και έτσι η αλληλουχία στόχος δεν διπλασιάζεται πλέον σε κάθε κύκλο. Επίσης, η κινητική της αντίδρασης μειώνεται από τη συσσώρευση αναστολέων. Η επίδραση αυτών των παραμέτρων μπορεί να ποικίλει από δείγμα σε δείγμα, οδηγώντας σε παραλλακτικότητα των τελικών δεδομένων, η οποία υποδηλώνει ότι η συμβατική PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για ποιοτικές μελέτες.

Αντίθετα, η PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR), η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία, είναι μία εξέλιξη της συμβατικής PCR η οποία επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου, σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Κατά την PCR πραγματικού χρόνου, το RNA που έχει απομονωθεί με τη χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης μετατρέπεται σε cDNA και ενισχύεται.[84]

Ύστερα από μια αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα, ακολουθεί μία εκθετική φάση αύξησης. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την έλευση της εκθετικής φάσης σε διαφορετικές αντιδράσεις, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα στις αντιδράσεις. Είναι μία ιδιαίτερα ευαίσθητη και εξειδικευμένη τεχνική καθώς μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και ένα αντίγραφο ενός mRNA ή ακόμα και διαφορετική ένταση έκφρασης μεταξύ δύο δειγμάτων σε ποσοστό έως και 23%. Έτσι, αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων.

3.2.4.1. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ cDNA ΚΛΩΝΟΥ

Το mRNA μετατρέπεται σε cDNA καθώς το RNA δεν είναι σταθερό και τα ένζυμα της PCR είναι περισσότερο αποδοτικά όταν χρησιμοποιούν ως μήτρα DNA αντί για RNA. Αυτό συμβαίνει επειδή:

1. εξαιτίας της δυναμικής κατάστασης στα κύτταρα υπάρχει μία εγγενής διακύμανση στο RNA.
2. το καθαρισμένο RNA μπορεί να μην είναι σε σταθερή ποιότητα, δηλαδή μπορεί να υπάρχουν ακόμα προσμίξεις και καθώς έχει μόλις εκχυλιστεί είναι ασταθές.
3. η αποτελεσματικότητα της μετατροπής RNA σε cDNA εξαρτάται από την αφθονία της αρχικής ποσότητας του RNA, επηρεάζεται αρνητικά από μη ειδικό ή νουκλεϊκό οξύ που βρίσκεται ως υπόβαθρο και υπάρχει στην αντίδραση RT.
4. Το cDNA μπορεί να συντεθεί χρησιμοποιώντας τυχαίους εκκινητές, ολιγο-dT, εκκινητές ειδικούς για γονίδια στόχους ή συνδυασμό ολιγο-dT και τυχαίων εκκινητών, υπάρχουν διάφοροι τρόποι που πραγματοποιείται η διαδικασία[85].

3.2.4.1.1. ΣΤΟΧΟΙ mRNA

Η σύνθεση του πρώτου κλώνου του cDNA, έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της TaKaRa Bio χρησιμοποιώντας το PrimeScript™ 1st strand cDNA synthesis kit. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο αυτό, η αντίστροφη μεταγραφάση του ιού MMLV (Moloney Murine Leukemia virus), συνθέτει τον πρώτο κλώνο του cDNA, χρησιμοποιώντας ως μήτρα ολικό RNA ή RNA που διαθέτει ουρά πολυ(A). Το ένζυμο αυτό είναι πολύ αποτελεσματικό και μπορεί να συνθέσει ένα κλώνο μήκους έως και 12kb ακόμη και αν το RNA μήτρα, είναι πλούσιο σε αλληλουχίες GC ή δευτεροταγείς δομές. Αυτό βοηθά, ώστε να αποφεύγονται υψηλές θερμοκρασίες, αποσκοπούν στο ξεδίπλωμα των δευτεροταγών δομών, με αποτέλεσμα την μείωση του κινδύνου αποικοδόμησης RNA που μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια συμβατικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

Έχει παρατηρηθεί ότι περιοχές του RNA με υψηλότερη περιεκτικότητα σε GC έχουν πιο σταθερές δευτεροταγείς δομές από τους κλώνους RNA με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε GC. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η ταχύτητα με την οποία κινείται η πολυμεράση κατά μήκος ενός κλώνου RNA εξαρτάται από τη δευτεροταγή δομή που αντιμετωπίζει η πολυμεράση και λειτουργεί με βραδύτερο ρυθμό όταν έρχεται αντιμέτωπη με περισσότερα τέτοια στοιχεία δομής. Η πολυμεράση σταματά στη βάση ή λίγο πριν από τη δευτεροταγή δομή. Περιοχές

χαμηλότερου περιεχομένου GC έχουν ένα μεγαλύτερο εύρος ανάγνωσης και περιοχές υψηλότερου περιεχομένου GC παρουσιάζουν πολύ πιο στενό εύρος ανάγνωσης[86]. Η αντίδραση ετοιμάζεται σε μικρά σωληνάκια τύπου erpendorf ως εξής:

Πίνακας 4. Συστατικά αντίδρασης για τη σύνθεση cDNA

Αντιδραστήριο	Τελικές ποσότητες (όγκος αντίδρασης 10μL)
Oligo dT Primer (50μM)	1μL
dNTP Mixture (10μM each)	1μL
Template RNA	500 ng/rxn
RNase free dH ₂ O	έως 10μL

Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 5 λεπτά στους 65°C, για να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA και για την πρόσδεση των εκκινητών στο στόχο. Έπειτα, τα δείγματα μεταφέρονται απευθείας σε πάγο. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη των παρακάτω αντιδραστηρίων, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 20μL.

Πίνακας 5. Συστατικά 2^{ης} αντίδρασης για τη σύνθεση cDNA

Αντιδραστήριο	Τελικές ποσότητες (όγκος αντίδρασης 20μL)
1 st Rxn Mix	10 μL
5x PrimeScript™ Buffer	4 μL (1x)
RNasin (αναστολέας RNασών 40 U/μL)	0,5 μL (20 units)
PrimeScript™ RTase (200 U/μL)	1 μL (200 units)
Rnase free dH ₂ O	4,5 μL

Η προσθήκη του αναστολέα RNασών είναι κομβικής σημασίας, διότι οι RNασες είναι ένζυμα που αποικοδομούν το RNA. Ο αναστολέας, επομένως, δεν επιτρέπει να συμβεί αυτό.

Ανάδευση και επώαση για μία ώρα σε θερμοκρασία 42 °C και στην συνέχεια για 15 λεπτά στους 70 °C ώστε να αδρανοποιηθεί το ένζυμο.

Οι επωάσεις πραγματοποιούνται στον κυκλοποιητή MJ Mini real-time PCR detection system της BioRad.

3.2.4.1.2. ΣΤΟΧΟΙ miRNA

Η παραπάνω διεργασία δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί για τη σύνθεση cDNA όταν οι υπομελέτη στόχοι είναι οι ώριμες μορφές των microRNA, καθώς αυτά τα μόρια είναι πολύ μικρά σε μέγεθος και δεν φέρουν ουρά πολυ(A), ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση και θα είναι μη ανιχνεύσιμα στην επακόλουθη αντίδραση real-time PCR.

Πίνακας 6: Συστατικά αντίδρασης cDNA synthesis

Αντιδραστήριο	Τελικές ποσότητες (για όγκο αντίδρασης 10 μL)
mRQ Buffer (2x)	5 μL
mRq Enzyme	1,25 μL
RNA sample	500 ng/rxn
RNase free dH ₂ O	Ανάλογη ποσότητα για τελικό όγκο 10 μL

Στη συνέχεια τα δείγματα αραιώνονται με 90 μL dH₂O. Αυτό γίνεται καθώς το δείγμα χωρίς την αραιώση είναι πολύ πυκνό και έτσι σε περίπτωση που χρησιμοποιηθεί κατευθείαν για qPCR, τα συστατικά της αντίδρασης μπορεί να την αναστείλουν.

3.2.4.2. Real Time PCR

Για τον προσδιορισμό του προϊόντος της PCR στο τέλος κάθε κύκλου υπάρχουν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις, όλες όμως βασίζονται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας ετικέτας (tag), η οποία συνδέεται σε κάθε μόριο που συντίθεται. Οι πρώτες ετικέτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το βρωμιούχο αιθίδιο και το SYBR Green I. Και τα δύο εισχωρούν στις αλυσές του δίκλωνου DNA. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε ημιποσοτική PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Thermo Fisher SYBR Select Master Mix. Με βάση το πρωτόκολλο αυτό, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *clock*, *PARN*, *pri-miR29a* και *pri-miR101a* και *pri-miR122* και των *micro-RNA* *miR101*, *miR122*, *miR29a* και *miR1207* από ήπαρ των πειραματοζώων που περιγράφηκαν στην παράγραφο 3.1.8. Ως γονίδιο αναφοράς, χρησιμοποιήθηκε το ιδιосуστατικά εκφραζόμενο γονίδιο της το γονίδιο *snRNP6*, το γονίδιο *B2M*. Αναλυτικότερα, οι ποσότητες των επιμέρους αντιδραστηρίων και οι συνθήκες αντίδρασης παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες. Όλα τα δείγματα γίνονται εις διπλούν (duplicates), ενώ παράλληλα κάθε αντίδραση έχει το κατάλληλο No Template Control (NTC) και No Reverse Transcriptase (NRT).

Πίνακας 7. Συστατικά αντίδρασης qPCR

Αντιδραστήριο	Τελική ποσότητα/ αντίδραση
ΚΑΡΑ SYBR	10 μ L
Πρόσθιος εκκινητής (FWD 10 μ M)	0,05 μ M
Ανάστροφος εκκινητής (REV 10 μ M)	0,05 μ M
RNase free dH ₂ O	7,8 μ L
cDNA	50 ng

Πίνακας 8. Συνθήκες αντίδρασης qPCR

Βήματα qPCR	Θερμοκρασία / Χρόνος	Κύκλοι
Αποδιάταξη (denaturation)	95°C 03:00	1
Ενίσχυση (amplification)- επέκταση	95 °C 00:03 60 °C 00:30	μέτρηση 40
Διάσπαση (dissociation)	95 °C 01:00 55 °C 00:30	melt curve ³ 1

Κατά το στάδιο της ενίσχυσης έχουμε ένα πρώτο βήμα στους 95 °C για να γίνει ευκολότερη η αποδιάταξη των δύο κλώνων του DNA. Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται για να γίνει αυτό, σχετίζεται με την αρχική συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου, όπως και οι τιμές της έντασης φθορισμού συσχετίζονται με τη συγκέντρωση των προϊόντων της PCR. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του αρχικού DNA-στόχου στο δείγμα, τόσο πιο γρήγορα θα ξεπεράσει η καμπύλη το όριο threshold. Το σημείο ανίχνευσης του σήματος φθορισμού πάνω από το «θόρυβο» της αντίδρασης ορίζεται ως κατώφλι, και ο αριθμός των κύκλων που αντιστοιχεί σε αυτό το σημείο ονομάζεται threshold cycle ή Ct.

Η παραπάνω διαδικασία ακολουθείται για την εξέταση των επιπέδων των γονιδίων *clock* και *parn* και των πρόδρομων μορφών των *micro-RNA* *pri-miR29a* και *pri-miR101a* και *pri-miR122*.

³ Καμπύλη τήξης (melt curve): Είναι μία διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται εκτίμηση των χαρακτηριστικών διάσπασης του δίκλωνου DNA κατά τη θέρμανση. Η αύξηση της θερμοκρασίας, οδηγεί το δίκλωνο DNA σε αποδιάταξη με αποτέλεσμα την αύξηση της έντασης της απορρόφησης. Η θερμοκρασία στην οποία το 50% του DNA βρίσκεται σε δίκλωνη μορφή και το υπόλοιπο 50% σε μονόκλωνη ονομάζεται θερμοκρασία τήξης (melting temperature). Μέσω της ανάλυσης της είναι δυνατή η εύρεση μη ειδικών προϊόντων που επηρεάζουν τη θερμοκρασία τήξης.

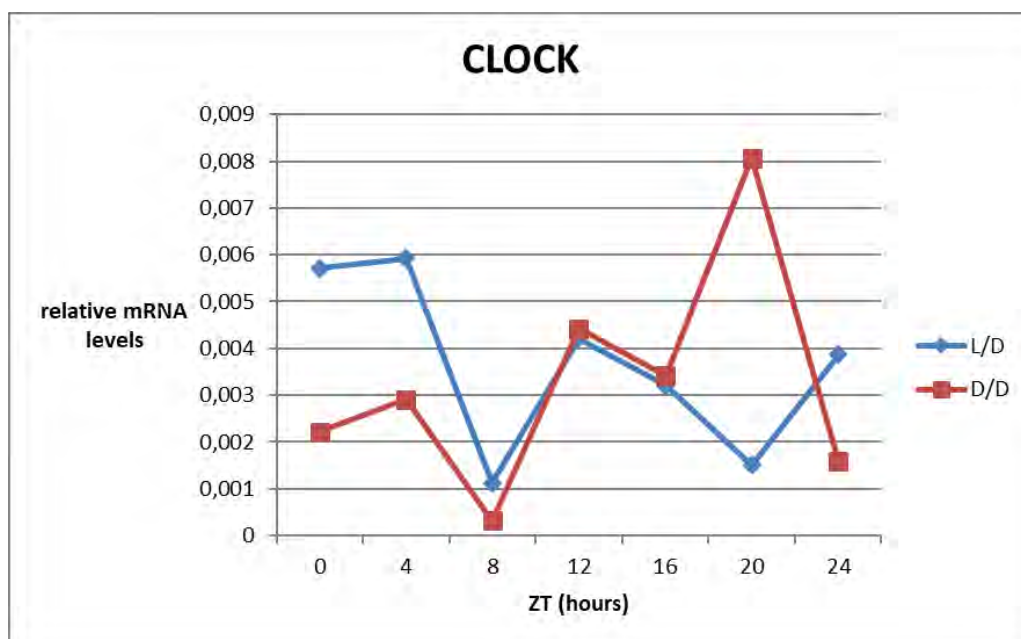
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. ΈΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Σύμφωνα με το σχεδιασμό, ο έλεγχος της περιοδικής έκφρασης πραγματοποιήθηκε σε δείγματα ήπατος ποντικού. Συγκεκριμένα μύες (C57BL/6J) ανατράφηκαν σε δύο ομάδες: μία ομάδα ανατράφηκε σε κανονικό κύκλο ημέρας/νύκτας διάρκειας 12h (12h/12h· Light/Dark, L/D) μέχρι τη στιγμή της δειγματοληψίας. Η άλλη ομάδα σε συνθήκες συνεχούς νύκτας (ημέρα/νύκτα: 0h/24h· Dark/Dark, D/D) 2 εβδομάδες πριν τη δειγματοληψία. Έτσι, θα ελεγχθεί η κιρκάδια ταλάντωση των υπό εξέταση στόχων, καθώς τα πρότυπα έκφρασής τους στη διάρκεια του 24ώρου αναμένεται να διατηρούν τη ρυθμικότητά τους και σε συνθήκες συνεχούς νύκτας, ώστε να πληρούνται τα κριτήρια για το χαρακτηρισμό των μορίων αυτών ως «κιρκάδια».

4.1.1. clock

Ο έλεγχος της περιοδικότητας των γονιδίων clock, parrn, (pri-)miR101A και pri-miR(122) έγινε με πραγματοποίηση αντίδρασης RT-PCR, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα cDNA που συντέθηκε από ολικό RNA από κάθε χρονικό σημείο των δύο συνθηκών εκτροφής των πειραματοζώων. Οι συγκεντρώσεις και οι συνθήκες των αντιδράσεων αναγράφονται στην ενότητα των μεθόδων 3.2.5. Για την κανονικοποίηση (normalization) των αποτελεσμάτων επιλέχθηκε το B2M ως ένα γονίδιο που εκφράζεται ιδιοσυστατικά και δεν επηρεάζεται από το κιρκάδιο ρολόι ως εσωτερικός μάρτυρας.

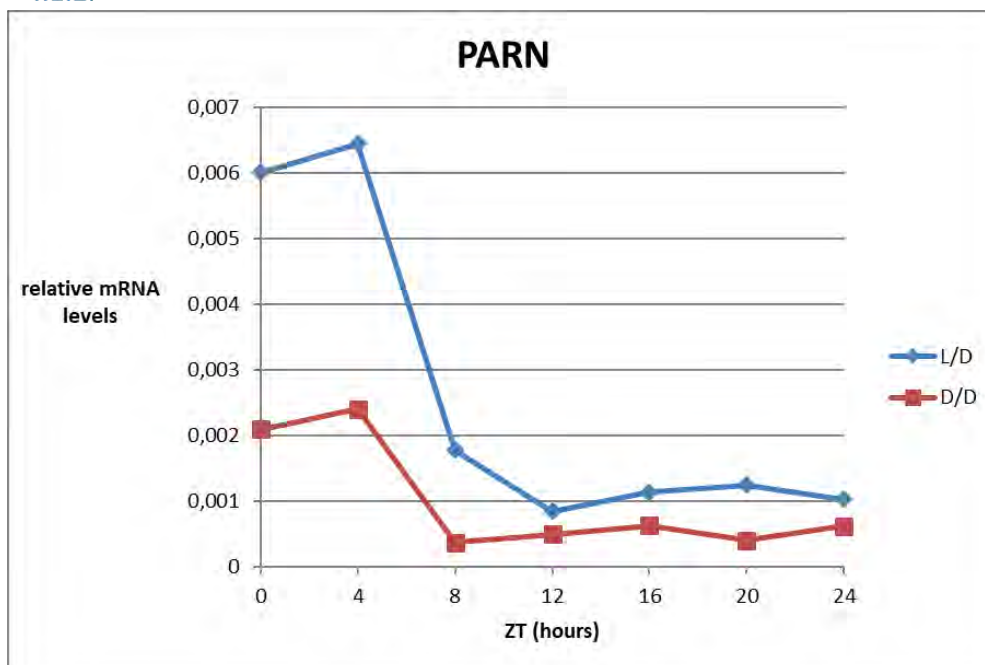


Γράφημα 1. Έκφραση του γονιδίου CLOCK σε ηπατικά κύτταρα ποντικών. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR. L/D, κύκλος φωτός/σκότους 12h/12h· D/D, ανάπτυξη σε συνθήκες συνεχούς σκότους.

Στο διάγραμμα φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου Clock κανονικοποιημένα με το γονίδιο B2M, σε διάστημα ενός εικοσιτετράωρου. Παρατηρούμε ότι είναι ξεκάθαρη η περιοδικότητα του γονιδίου, το οποίο στη συνθήκη L/D εμφανίζει μέγιστα στις 4, 12 και 24 ώρες και ελάχιστα στις 8 και 20 ώρες, ενώ στη συνθήκη D/D παρουσιάζει μέγιστα στις 4, 12 και 20 ώρες και ελάχιστα στις 8, 16 και 24 ώρες.

Κατά τη διάρκεια της ημέρας, επάγεται από το φως η μεταγραφή των γονιδίων *Bmal1* και *Clock* και η μετατόπιση των αντίστοιχων πρωτεϊνών στον πυρήνα για τη σύνδεσή του ετεροδιμερούς στα στοιχεία E-box των γονιδίων στόχων τους[87], κάτι που παρατηρείται και στα πειράματά μας καθώς τα μέγιστα επίπεδα για το γονίδιο *clock* παρατηρούνται λίγο πριν την έλευση της μέρας (ZT 20), όπου θεωρητικά η συσσώρευση του mRNA του *clock* οδηγεί στη σύνθεση της πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά, φαίνεται πως υπάρχει μια διαφορά συγκριτικά με τη βιβλιογραφία η οποία μπορεί να οφείλεται στις διαφορές των ωρών που έγινε η δειγματοληψία στο δικό μας πειραματικό σχεδιασμό. Είναι δυνατή η στατιστική ανάλυση. Τέλος, μεταξύ μεταγραφής και μετάφρασης είναι αναμενόμενη μια χρονοκαθυστέρηση στην παρατήρηση της αύξησης των επιπέδων της πρωτεΐνης που παράγεται από το αντίστοιχο μόριο mRNA, οπότε θα παρουσίαζε ιδιαίτερο ενδιαφέρον να πραγματοποιηθεί ανάλυση κατά Western στα ίδια δείγματα με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης CLOCK ώστε να διαπιστωθεί εάν η παραγωγή της πρωτεΐνης ακολουθεί το ίδιο πρότυπο με τη συσσώρευση των επιπέδων mRNA.

4.1.2. PARN



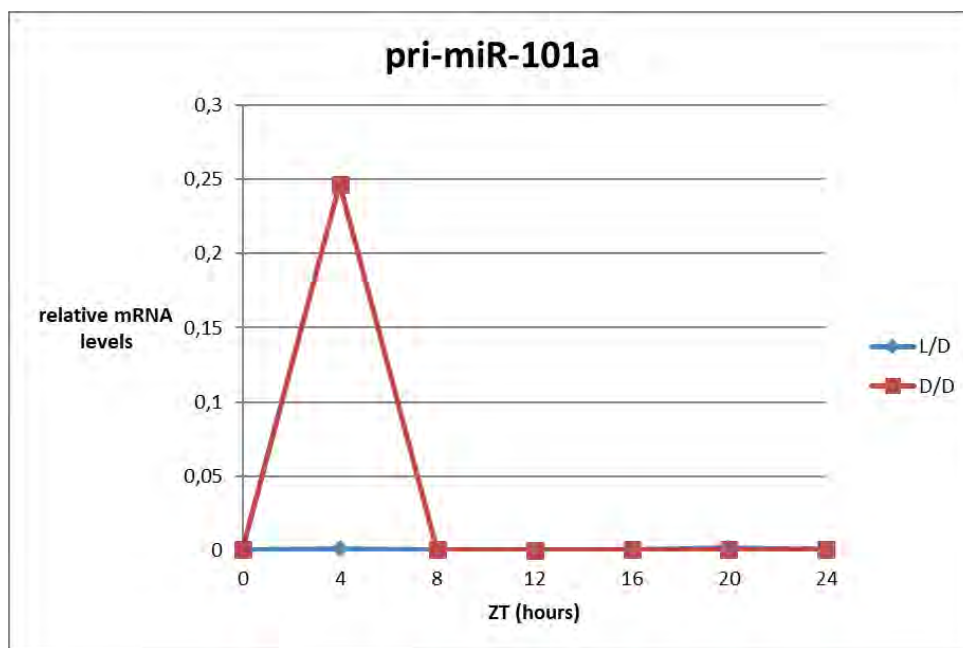
Γράφημα 2. Έκφραση του γονιδίου της PARN. Επίπεδα του mRNA της PARN σε ηπατικά κύτταρα ποντικών. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από αντιδράσεις RT-PCR.

Στο διάγραμμα φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου PARN κανονικοποιημένα με το γονίδιο *B2M*, σε διάστημα ενός εικοσιτετράωρου. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η περιοδικότητα του γονιδίου δεν είναι εμφανής, ωστόσο στη συνθήκη L/D εμφανίζει κάποια μέγιστα στις 4 και 20 ώρες και ελάχιστο στις 12 ώρες, ενώ στη συνθήκη D/D παρουσιάζει μέγιστα στις 4, 16 και 24 ώρες και ελάχιστα στις 8 και 20 ώρες.

Η απαδενυλάση PARN, έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζει ρυθμικά επίπεδα mRNA κατά τη διάρκεια του 24ώρου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, εκφράζεται ρυθμικά κατά τη διάρκεια της ημέρας, εμφανίζοντας μέγιστα επίπεδα κατά της πρωινές ώρες[38] (Εικόνα 6). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, τα μέγιστα επίπεδα έκφρασης της *parn* είναι κατά τη διάρκεια της ημέρας (ZT 0-4), αλλά αυτά δε φαίνεται να επανέρχονται μετά το πέρας της νύχτας (ZT 20-24). Συνεπώς, συμπεραίνουμε πως είναι

απαραίτητο να ελεγχθούν ξανά τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου, με σκοπό να παρατηρηθούν τυχόν αλλαγές στην έκφραση της PARN που πιθανόν να οφείλονται στους πειραματικούς χειρισμούς, αλλά και διενέργεια βιολογικών επαναλήψεων ώστε τα αποτελέσματα να επιτρέπουν εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

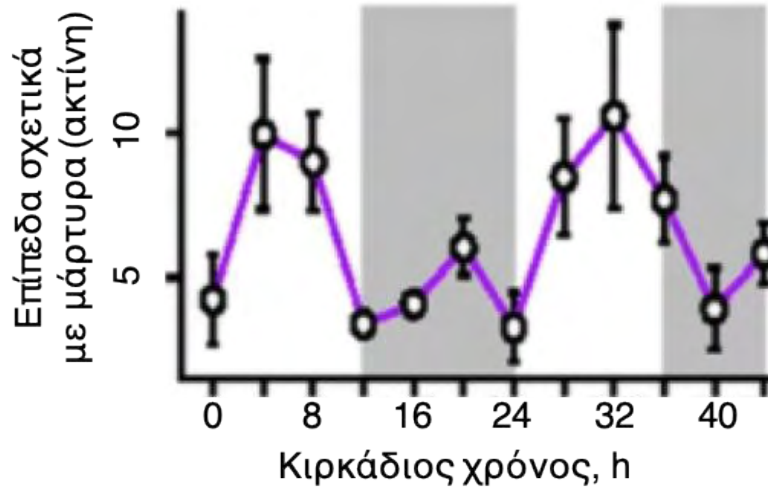
4.1.3. pri-miR-101a



Γράφημα 3. Επίπεδα του pri-miR-101a σε ηπατικά κύτταρα ποντικών. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR.

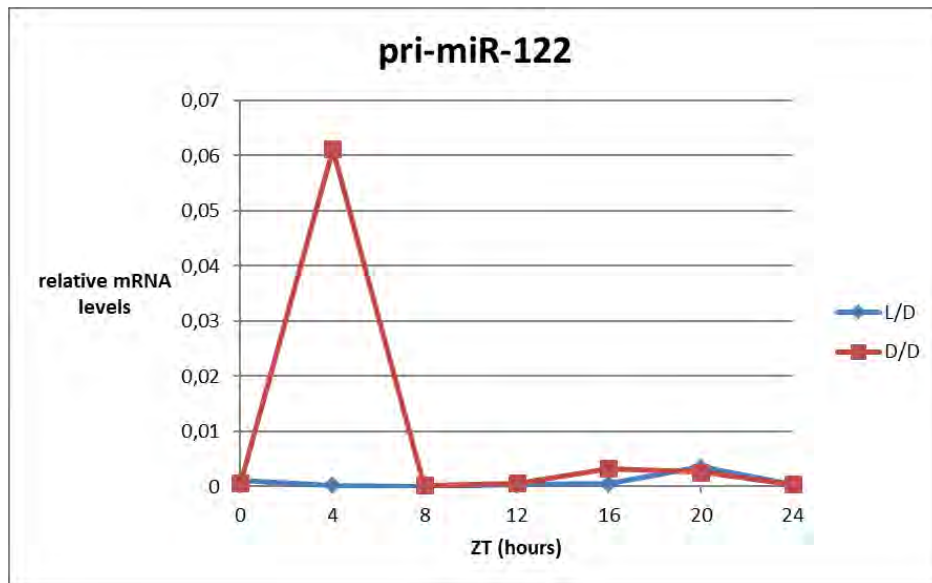
Στο παραπάνω διαγράμματα φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου pri-miR-101a κανονικοποιημένο με το γονίδιο B2M, σε διάστημα ενός εικοσιτετράωρου. Το pri-miR-101a δεν έδειξε να έχει περιοδικότητα, μάλιστα τα επίπεδα έκφρασής του ήταν πάρα πολύ μικρά. Και στις δύο περιπτώσεις, έχουμε ελάχιστη έκφραση του γονιδίου στη συνθήκη L/D και επιπλέον στη συνθήκη D/D υπάρχει μία ιδιαίτερα μεγάλη αύξηση στις 4 ώρες (ZT 4) συγκριτικά με τα υπόλοιπα χρονικά σημεία.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 11, το pri-miR-101a εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα τις πρωινές ώρες ενώ η τάση των σημείων του γραφήματος 3 φαίνεται να ακολουθεί παρόμοιο πρότυπο. Παρόλα αυτά, κρίνεται απαραίτητη η διενέργεια τεχνικών και βιολογικών επαναλήψεων για να διαπιστωθεί η ακρίβεια των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 11: Έκφραση του μεταγραφών του pri-miR-101a. Ο άξονας x αντιπροσωπεύει τον κιρκαδικό χρόνο (CT), ενώ ο άξονας y αντιπροσωπεύει τις σχετικές τιμές έκφρασης που κανονικοποιούνται από αυτές της Actb (ακτίνη). Οι λευκές περιοχές αντιπροσωπεύουν ημέρα, ενώ οι γκριζες περιοχές αντιπροσωπεύουν νύχτα[75].

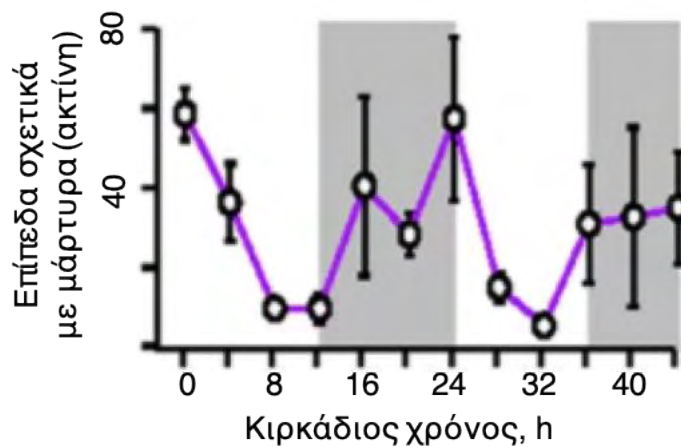
4.1.4. pri-miR-122



Γράφημα 4. Επίπεδα του pri-miR-122 σε ηπατικά κύτταρα ποντικών. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR.

Στα παραπάνω διαγράμματα φαίνονται τα επίπεδα του pri-miR-122 κανονικοποιημένα με το γονίδιο B2M, σε διάστημα ενός εικοσιτετράωρου. Το pri-miR-122 εμφανίζει μία μικρή περιοδικότητα κυρίως μετά τις 4 ώρες στην συνθήκη D/D. Τα αποτελέσματα εμφανίζουν μια ομοιότητα με αυτά του pri-miR-122, δηλαδή μια μέγιστη έκφραση στις 4 ώρες (ZT 4) στη

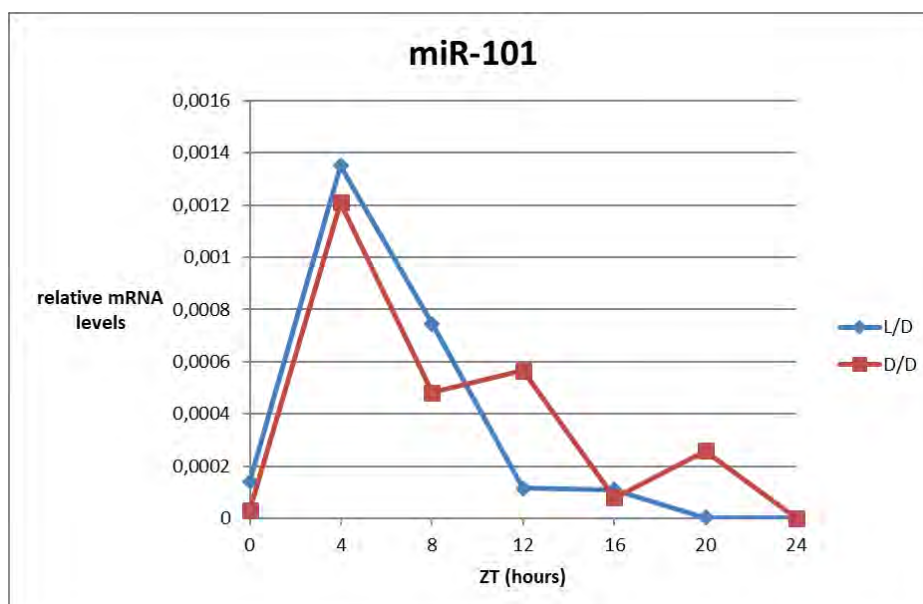
συνθήκη D/D, ενώ στα υπόλοιπα χρονικά σημεία αλλά και στη συνθήκη L/D τα επίπεδα είναι στο όριο ανίχνευσης μας υποδεικνύουν πως επιβάλλεται η επανάληψή τους.



Εικόνα 12: Έκφρασης των μεταγραφών του κιρκαδικού pri-miR-122. Ο άξονας x αντιπροσωπεύει τον κιρκαδικό χρόνο (CT), ενώ ο άξονας y αντιπροσωπεύει τις σχετικές τιμές έκφρασης που κανονικοποιούνται από αυτές της Actb. Οι λευκές περιοχές αντιπροσωπεύουν ημέρα, ενώ οι γκριζες περιοχές αντιπροσωπεύουν νύχτα[75].

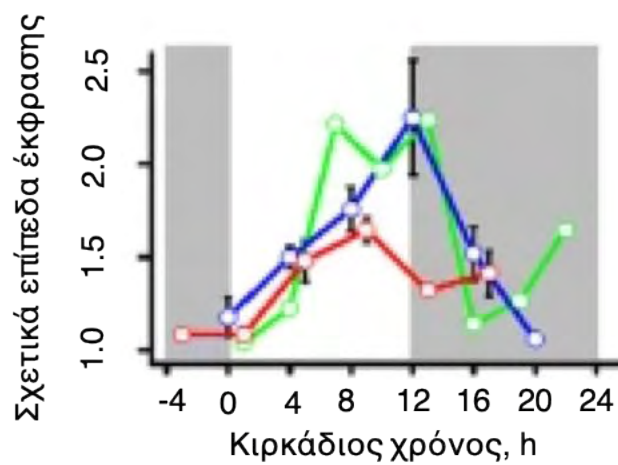
4.1.5. micro-RNA: miR-101, miR-122, miR-29a και miR-1207

Στη συνέχεια έγινε ανάλυση σε miRNA με περιοδική έκφραση, επιλέχθηκαν προς μελέτη τα miR-101, miR-122, miR-29a και miR-1207. Η ανάλυση έγινε με πραγματοποίηση αντίδρασης RT-PCR, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα cDNA που συντέθηκε από ολικό RNA από κάθε χρονικό σημείο των δύο συνθηκών εκτροφής των πειραματοζώων. Οι συγκεντρώσεις και οι συνθήκες των αντιδράσεων, όπως και παραπάνω αναγράφονται στην ενότητα των μεθόδων 3.2.5. Για την κανονικοποίηση (normalization) των αποτελεσμάτων επιλέχθηκε το U6 ως ένα γονίδιο που εκφράζεται ιδιοσυστατικά και δεν επηρεάζεται από το κιρκάδιο ρολόι ως εσωτερικός μάρτυρας[78].

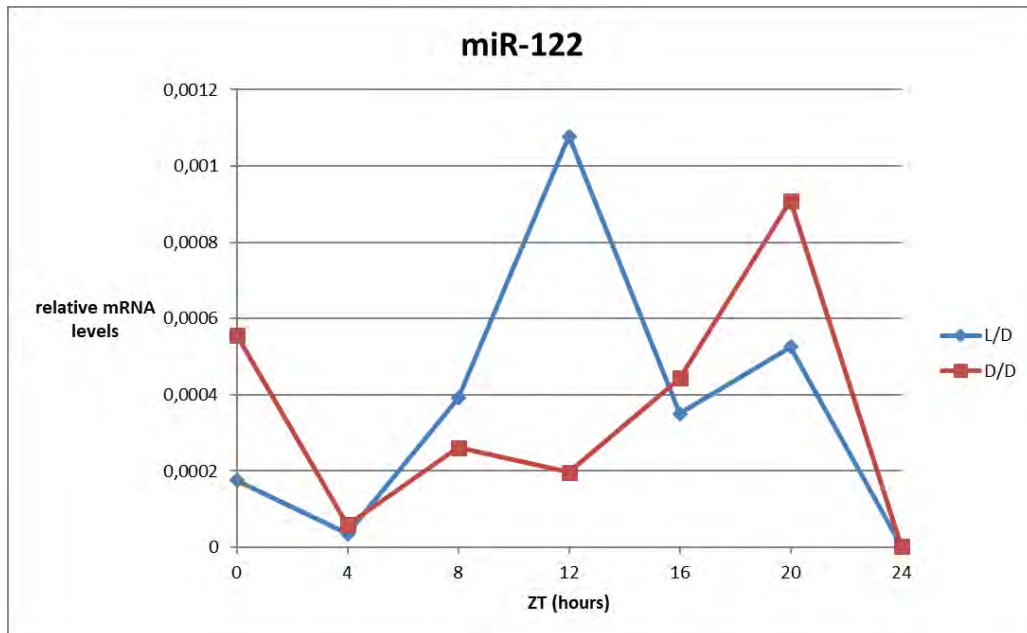


Γράφημα 5. Επίπεδα του miR-101 σε ηπατικά κύτταρα ποντικών. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR.

Το miR-101 έχει κανονικοποιηθεί με το γονίδιο U6. Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνονται τα επίπεδα έκφρασής του σε διάστημα ενός εικοσιτετραώρου. Παρατηρείται η εμφάνιση περιοδικότητας του γονιδίου και στις δύο συνθήκες εκτροφής των πειραματόζων. Κατά την συνθήκη L/D έχουμε μέγιστα στις 4 και 16 ώρες και ελάχιστα στις 0, 12 και 20 ώρες, ενώ στις 24 ώρες δεν ανιχνεύτηκαν σημαντικά επίπεδα του γονιδίου. Βάση αυτών δεν μπορεί να χαρακτηριστεί με ακρίβεια η περιοδικότητά του. Στη συνθήκη D/D, παρατηρείται παρόμοιο πρότυπο έκφρασης. Τα αποτελέσματά μας φαίνεται να συνάδουν με της διεθνούς βιβλιογραφίας (Εικόνα 11) αν και η ακρίβεια των χειρισμών και των μετρήσεων θα επιβεβαιωθεί μετά τη διενέργεια τεχνικών και βιολογικών επαναλήψεων ώστε να γίνει και κατάλληλη στατιστική ανάλυση.



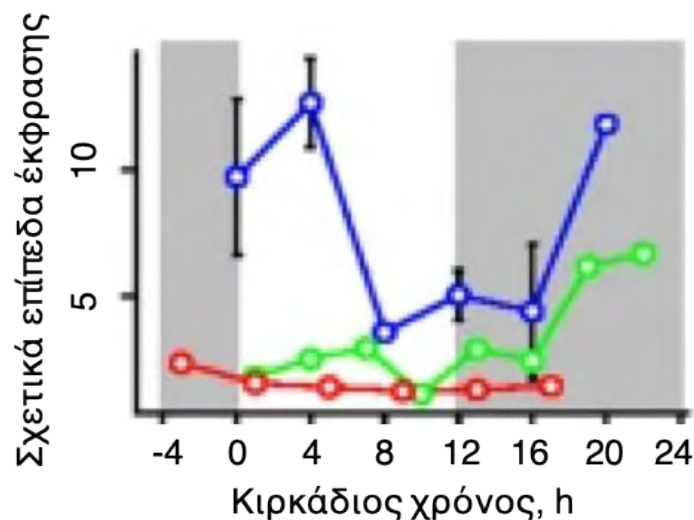
Εικόνα 13: Σύγκριση της έκφρασης του κιρκάδιου miR-101a-3p. Οι πράσινες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις τιμές έκφρασης των πρωτογενών μεταγραφών από το GRO-seq. Οι μπλε γραμμές αντιπροσωπεύουν τις τιμές έκφρασης των πρωτογενών μεταγραφών από το Nascent-seq. Οι κόκκινες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις τιμές έκφρασης των ώριμων μεταγραφών από το miRNA-seq. Ο άξονας x αντιπροσωπεύει τον κιρκάδιο χρόνο (CT), ενώ ο άξονας y αντιπροσωπεύει τις σχετικές τιμές έκφρασης. Οι λευκές περιοχές αντιπροσωπεύουν υποκειμενική ημέρα, ενώ οι γκριζες περιοχές αντιπροσωπεύουν υποκειμενική νύχτα[75].



Γράφημα 6. Έκφραση του miR-122 σε ηπατικά κύτταρα ποντικών. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR.

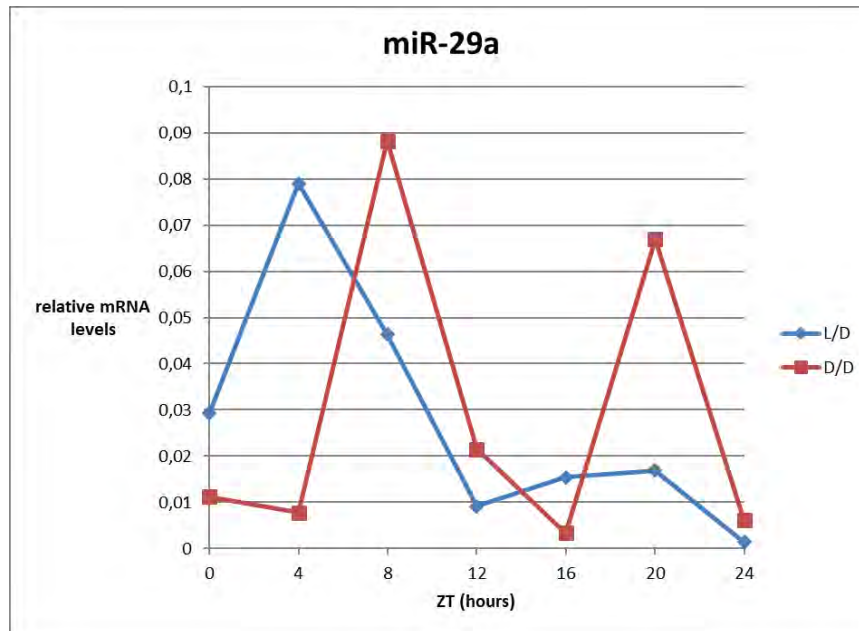
Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνονται τα επίπεδα έκφρασής του σε διάστημα ενός εικοσιτετράωρου. Παρατηρείται και εδώ η εμφάνιση περιοδικότητας του γονιδίου και στις δύο συνθήκες εκτροφής των πειραματόζων. Κατά την συνθήκη L/D έχουμε μέγιστα στις 12 και 20 ώρες και ελάχιστα στις 4, 16 και 24 ώρες. Βάση αυτών θα μπορούσαμε να χαρακτηρίσουμε την περίοδο στις 8 ώρες. Κατά την συνθήκη D/D βλέπουμε μέγιστα στις 0, 8 και 20 ώρες και ελάχιστα στις 4, 12 και 24 ώρες. Η περίοδος μπορεί να προσδιοριστεί στις 8 ώρες.

Η απαδενυλίωση των miRNA, όπως και του miR-122, έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει τη σταθερότητά τους και τη λειτουργία τους σε κύτταρα θηλαστικών. Η PARN σταθεροποιεί ορισμένα miRNA αφαιρώντας τις ουρές ολιγο(A) που διαφορετικά θα προσλάμβαναν εξελουκλεάσες 3' έως 5' για την αποικοδόμηση τους. Ουσιαστικά, η PARN ρυθμίζει τη σταθερότητα διαφορετικών miRNA στα ανθρώπινα κύτταρα[88].

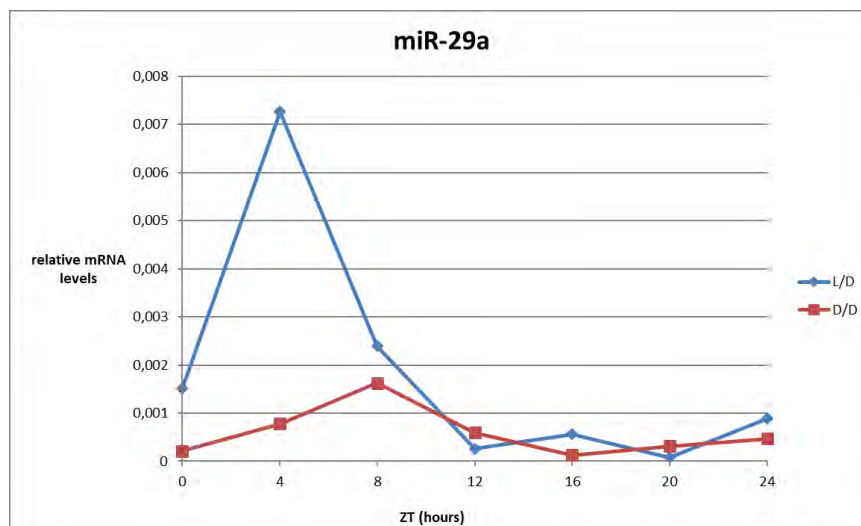


Εικόνα 14: Σύγκριση της έκφρασης των μεταγραφών του κιρκαδικού miR-122-3p. Οι πράσινες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις τιμές έκφρασης των πρωτογενών μεταγραφών από το GRO-seq. Οι μπλε γραμμές

αντιπροσωπεύουν τις τιμές έκφρασης των πρωτογενών μεταγραφών από το Nascent-seq. Οι κόκκινες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις τιμές έκφρασης των ώριμων μεταγραφών από το miRNA-seq. Ο άξονας x αντιπροσωπεύει τον κικραδικό χρόνο (CT), ενώ ο άξονας y αντιπροσωπεύει τις σχετικές τιμές έκφρασης. Οι λευκές περιοχές αντιπροσωπεύουν υποκειμενική ημέρα, ενώ οι γκριζες περιοχές αντιπροσωπεύουν υποκειμενική νύχτα[75]



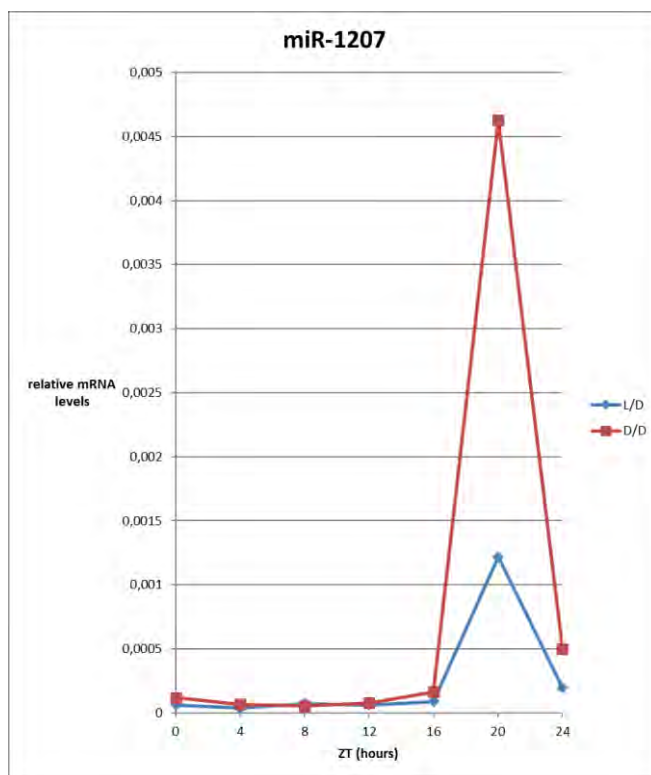
Γράφημα 7. Έκφραση του miR-29a σε ηπατικά κύτταρα ποντικών. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR.



Γράφημα 8. Έκφραση του miR-29a σε ηπατικά κύτταρα ποντικών. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR.

Στα γραφήματα 9 και 10 φαίνεται η έκφραση του γονιδίου miR-29a, το οποίο έχει κανονικοποιηθεί με το γονίδιο U6. Παρατηρείται και στις δύο περιπτώσεις η εμφάνιση περιοδικότητας του γονιδίου και για τις δύο συνθήκες εκτροφής των πειραματόζων. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην ποσότητα του γονιδίου, αλλά ακολουθείται ένα συγκεκριμένο μοτίβο. Κατά την συνθήκη L/D έχουμε μέγιστα στις 4 και 16 ώρες και ελάχιστα στις 0, και 12 ώρες. Μετά το πέρας των 16 ωρών έχουμε διαφορετική απόκριση του γονιδίου στις δύο διαφορετικές qPCR. Θα μπορούσαμε να χαρακτηρίσουμε την

περίοδο στις 8 ώρες. Κατά την συνθήκη D/D βλέπουμε μέγιστα στις 8 και 20 ώρες και ελάχιστα στις 4, και 16 ώρες, ενώ στην πρώτη qPCR ελάχιστο έχουμε και στις 24 ώρες. Η περίοδος μπορεί να προσδιοριστεί στις 12 ώρες.



Γράφημα 9. Έκφραση του miR-1207 σε ηπατικά κύτταρα ποντικών. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αντιδράσεις RT-PCR.

Το miR-1207 έχει κανονικοποιηθεί με το U6. Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης του σε διάστημα ενός εικοσιτετράωρου. Εδώ δεν παρατηρείται κάποια εμφανής ύπαρξη περιοδικότητας, καθώς η έκφραση του γονιδίου δεν αυξάνεται παρά μόνο στις 20 ώρες, κάτι που παρατηρείται και στις δύο συνθήκες εκτροφής των πειραματόζων.

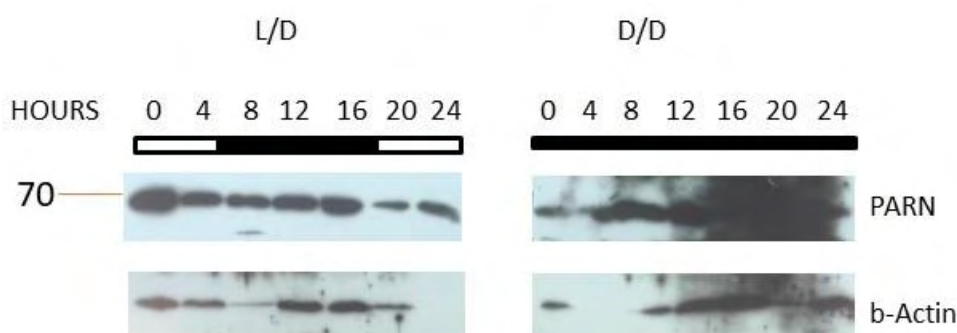
Οι qPCR πρέπει να επαναληφθούν για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας και τον ακριβή υπολογισμό του σφάλματος. Συγκεκριμένα, στα microRNA για τα οποία δεν υπάρχει αρκετή γνωστή βιβλιογραφία τα επαναληπτικά πειράματα θα οδηγήσουν στην βεβαιότητα της ακρίβειας των πειραμάτων και θα περιορίσουν την πιθανότητα των τυχαίων αποτελεσμάτων. Επίσης, μπορούν να δοκιμαστούν αλλαγές στα στάδια απομόνωσης και καθαρισμού του RNA, έτσι ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη ποσότητα σε καλύτερη ποιότητα. Ακόμη, χρειάζεται να συγχρονιστούν τα αποτελέσματα στην PARN και σε επίπεδο γονιδίου και πρωτεΐνης. Μελλοντικά, θα μπορούσαν να ελεγχθούν και άλλες γνωστές απαδενυλάσες για τον πλήρη χαρακτηρισμό της έκφρασής τους σχετικά με το κερκάδιο ρολόι.

4.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΚΙΡΚΑΔΙΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ PARN ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ήπαρ αρσενικών ποντικών, ηλικίας 8 εβδομάδων. Για να μελετηθεί η κερκάδια έκφραση οι ιστοί έχουν ληφθεί σε διάστημα ενός εικοσιτετράωρου ανά τέσσερις ώρες. Για κάθε διαφορετικό σημείο του εικοσιτετράωρου λήφθηκε ένα διαφορετικό κομμάτι ιστού για κάθε συνθήκη, μεγέθους περίπου μέχρι τα 0,2g. Στο συγκεκριμένο σημείο η λήψη του ιστού πρέπει να γίνει με μεγάλη προσοχή, έτσι ώστε να

μην προκληθεί φθορά σε ολόκληρο το ήπαρ, να είναι αποστειρωμένα τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται και να μην μείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα το ήπαρ εκτός κατάψυξης για να μην ξεπαγώσει. Στην συνέχεια ο ιστός ομογενοποιείται σε ομογενοποιητή διάσπασης ιστών τύπου Potter-Elvehjem, με τη χρήση είτε παρουσία αντιδραστηρίου TRI-reagent, είτε ενός εκ των δύο RIPA buffer που αναφέρθηκαν στην ενότητα 3.1.4. Στην συνέχεια ακολούθησε προσθήκη Sample Buffer 4× και μηχανική λύση με χρήση υπερήχων, φυγοκέντρηση και συλλογή του υπερκειμένου που αποτελεί το εκχύλισμα του συνόλου των πρωτεϊνών. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ποσοτικοποιήθηκαν με Protein Quantification Assay, με σκοπό να υπολογισθεί η απαραίτητη ποσότητα δείγματος που απαιτείται για να υπάρχουν 50μg πρωτεΐνης για την ανοσοανίχνευση.

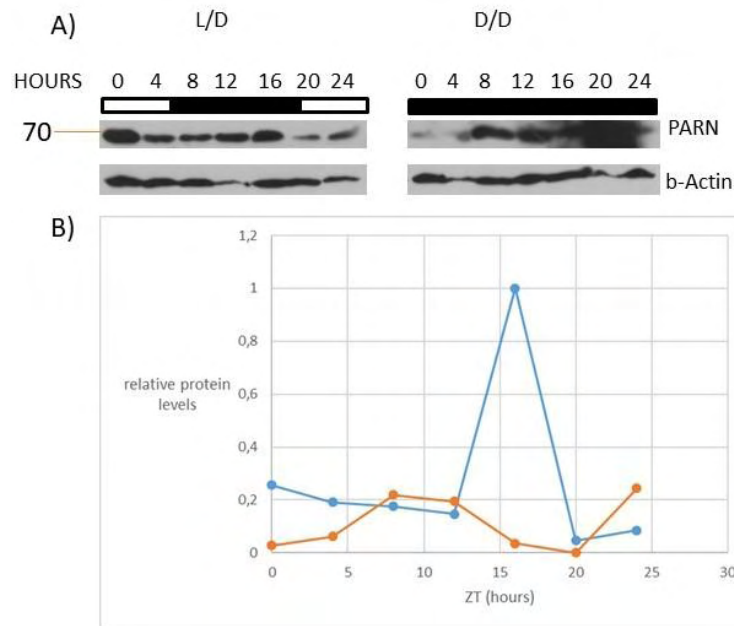
Το πρότυπο έκφρασης της PARN μελετήθηκε σε πρωτεϊνικό επίπεδο μετά από ηλεκτρομεταφορά του ολικού εκχυλίσματος των πρωτεϊνών από τα διαφορετικά χρονικά σημεία, στα οποία λήφθηκαν τα ήπατα των ποντικών, από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF και επακόλουθη ανοσοανίχνευση με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται τα αποτελέσματα από διαφορετικές διαδικασίες ανοσοανίχνευσης. Οι διαφορές μεταξύ τους υπόκεινται στον τρόπο απομόνωσης των πρωτεϊνών, την πυκνότητα τη πηκτής που χρησιμοποιήθηκε και στους χρόνους επώασης με τα διαλύματα χημειοφωταύγειας.



Εικόνα 15 Επίπεδα πρωτεΐνης PARN σε συνθήκες εναλλαγής φωτός/σκότους (L/D) και συνεχούς σκότους (D/D). Η β-ακτίνη χρησιμοποιείται ως μάρτυρας.

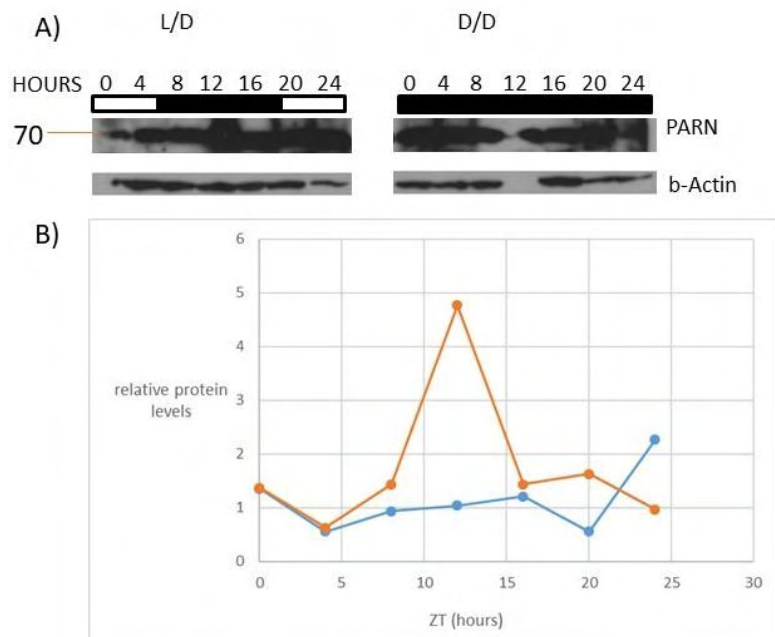
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 15, η PARN ανιχνεύεται λίγο χαμηλότερα από την αναμενόμενη μοριακή της μάζα (74kDa). Επιπλέον, στα δείγματα D/D (δεξιά) φαίνεται να υπάρχει μη ειδικό σήμα το οποίο εμποδίζει την ανίχνευση ξεχωριστών ζωνών για κάθε διαδρομή, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η ποσοτικοποίησή τους. Ομοίως, η β-ακτίνη, εμφανίζει μη ειδικό σήμα, λόγω υπερέκθεσης του φιλμ στη μεμβράνη αλλά και πιθανόν λόγω ελλιπούς διαχωρισμού των πρωτεϊνών στην πηκτή. Λόγω των παραπάνω, δεν μας επιτρέπεται η ασφαλής ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επανάληψη της διαδικασίας για τα ίδια δείγματα, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στην εικόνα 16. Παρατηρείται σαφής βελτίωση της εικόνας, αλλά δυστυχώς και πάλι δεν είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση λόγω του ότι υπάρχει έντονο μη ειδικό σήμα, ιδιαίτερα στα δείγματα D/D, αλλά και επειδή οι ζώνες δεν ξεχωρίζουν μεταξύ των διαδρομών.



Εικόνα 16. Α) Επίπεδα πρωτεΐνης PARN σε συνθήκες εναλλαγής φωτός/σκότους (L/D) και συνεχούς σκότους (D/D). Η β-ακτίνη χρησιμοποιείται ως μάρτυρας. Πηκτή 12%. Η ζώνη της PARN αντιστοιχεί στα 74kDa ενώ της ακτίνης στα 43kDa. Β) Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε απεικονίζονται τα πειραματόζωα που έχουν εκτραφεί σε συνθήκη L/D και με πορτοκαλί τα πειραματόζωα που έχουν εκτραφεί σε συνθήκη D/D.

Για να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνών στην πηκτή ώστε η ανοσοανίχνευση να είναι πιο επιτυχής, επαναλήφθηκε η ανοσοαποτύπωση κατά western με τα ίδια δείγματα, αλλά σε πηκτή διαχωρισμού διαβαθμισμένης συγκέντρωσης 6-15%, σε αντίθεση με την πηκτή της παραπάνω εικόνας που είναι πηκτή διαχωρισμού σταθερής συγκέντρωσης 12%. Παρατηρείται βελτίωση στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών (Εικόνα 17) ιδιαίτερα για τη β-ακτίνη. Όσον αφορά στην ανίχνευση της PARN, δεν ήταν δυνατή η έκθεση του φιλμ στη μεμβράνη έτσι ώστε να αποτυπωθούν καθαρές ζώνες χωρίς να αποτυπώνεται και μη ειδικό σήμα. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί, πως στο δείγμα ZT12 (Εικόνα 17.A –δεξιά) δεν παρατηρείται ζώνη για την ακτίνη, γεγονός που υποδηλώνει κάποιο σφάλμα κατά την εκχύλιση των πρωτεϊνών.



Εικόνα 17. Α) Επίπεδα πρωτεΐνης PARN σε συνθήκες εναλλαγής φωτός/σκότους (L/D) και συνεχούς σκότους (D/D). Η β-ακτίνη χρησιμοποιείται ως μάρτυρας. Πηκτή διαβαθμισμένης συγκέντρωσης 6%-15%. Η ζώνη της PARN αντιστοιχεί στα 74kDa ενώ της ακτίνης στα 43kDa. Β) Με μπλε απεικονίζονται τα πειραματόζωα που έχουν εκτραφεί σε συνθήκη L/D και με πορτοκαλί τα πειραματόζωα που έχουν εκτραφεί σε συνθήκη D/D.

Η PARN εμφανίζει διαφορετικά επίπεδα μέσα στο 24ωρο ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες έχουν ανατραφεί τα πειραματόζωα. Στη συνθήκη εναλλαγής μέρας/νύχτας η PARN δεν έχει μεγάλη αλλαγή στην παραγωγή της. Με εξαίρεση το χρονικό σημείο των 16 ωρών στα πειραματόζωα L/D, που παρατηρείται μία αύξηση, η συγκέντρωση της παραμένει σε σταθερά επίπεδα. Τα επίπεδα σε αυτό το χρονικό σημείο (16h, L/D) πρέπει να επανεξεστούν, καθώς προκύπτει πολύ πιθανό για πειραματικό σφάλμα. Παρότι το φιλμ υπερεκτέθηκε στη μεμβράνη, με αποτέλεσμα να μην είναι ακριβής η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με τα επίπεδα της β-ακτίνης, φαίνεται ότι η PARN, εκτός από ρυθμικά επίπεδα mRNA φαίνεται να παρουσιάζει κάποια ρυθμικότητα και σε επίπεδο πρωτεΐνης.

Η περιοδικότητά της φαίνεται πολύ έντονα στα πειραματόζωα που έχουν αναπτυχθεί σε συνθήκες συνεχούς νύχτας. Και στις δύο περιπτώσεις που φαίνεται να υπάρχει μεγαλύτερη περιοδικότητα όταν τα πειραματόζωα ανατράφηκαν σε συνθήκες συνεχούς νύχτας, με περίοδο 8 ωρών και έχουν ομογενοποιηθεί με το RIPA Buffer 2 (βλ. 3.1.4).

Όπως αναφέρθηκε, μελέτες έδειχναν πως η PARN δεν φαινόταν αρχικά να έχει περιοδική έκφραση σε επίπεδο πρωτεΐνης. Αργότερα όμως, η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε πως επίπεδα του mRNA της PARN ταλαντώνονται ρυθμικά σε κύτταρα ποντικού στη διάρκεια της ημέρας. [38]. Όσον αφορά την διαδικασία του πρωτεϊνικού προσδιορισμού, η ανάλυση της PARN χρειάζεται βελτιστοποίηση. Ξεκινώντας από το στάδιο της απομόνωσης μπορούν να πραγματοποιηθούν αλλαγές στη διαδικασία ανάκτησης των πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα λύσης διαφορετικής σύστασης. Μπορούν επίσης να εξεταστούν αντισώματα από διαφορετική πηγή προέλευσης (ζώο) ή μονοκλωνικό αντισώμα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Roenneberg, T. and M. Mewes, *The Circadian Clock and Human Health*. Curr Biol, 2016. **26**(10): p. R432-43.
2. Lowrey, P.L. and J.S. Takahashi, *Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms*. Adv Genet, 2011. **74**: p. 175-230.
3. Pett, J.P., et al., *Feedback Loops of the Mammalian Circadian Clock Constitute Repressilator*. PLoS Comput Biol, 2016. **12**(12): p. e1005266.
4. Buhr, E.D. and J.S. Takahashi, *Molecular components of the Mammalian circadian clock*. Handb Exp Pharmacol, 2013(217): p. 3-27.
5. Herzog, E.D., *Neurons and networks in daily rhythms*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(10): p. 790-802.
6. Ko, C.H., et al., *Emergence of noise-induced oscillations in the central circadian pacemaker*. PLoS Biol, 2010. **8**(10): p. e1000513.
7. Ma, M.A. and E.H. Morrison, *Neuroanatomy, Nucleus Suprachiasmatic*, in *StatPearls*. 2020: Treasure Island (FL).
8. Berson, D.M., *Phototransduction in ganglion-cell photoreceptors*. Pflugers Arch, 2007. **454**(5): p. 849-55.
9. Ecker, J.L., et al., *Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors: cellular diversity and role in pattern vision*. Neuron, 2010. **67**(1): p. 49-60.
10. Chen, S.K., T.C. Badea, and S. Hattar, *Photoentrainment and pupillary light reflex are mediated by distinct populations of ipRGCs*. Nature, 2011. **476**(7358): p. 92-5.
11. Stratmann, M. and U. Schibler, *Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators*. J Biol Rhythms, 2006. **21**(6): p. 494-506.
12. Brown, S.A. and A. Azzi, *Peripheral circadian oscillators in mammals*. Handb Exp Pharmacol, 2013(217): p. 45-66.
13. Nagoshi, E., et al., *Circadian gene expression in cultured cells*. Methods Enzymol, 2005. **393**: p. 543-57.
14. Welsh, D.K., et al., *Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression*. Curr Biol, 2004. **14**(24): p. 2289-95.
15. Yamazaki, S., et al., *Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats*. Science, 2000. **288**(5466): p. 682-5.
16. Brunner, M. and T. Schafmeier, *Transcriptional and post-transcriptional regulation of the circadian clock of cyanobacteria and Neurospora*. Genes Dev, 2006. **20**(9): p. 1061-74.
17. Henriques, R. and P. Mas, *Chromatin remodeling and alternative splicing: pre- and post-transcriptional regulation of the Arabidopsis circadian clock*. Semin Cell Dev Biol, 2013. **24**(5): p. 399-406.
18. Beta, R.A.A. and N.A.A. Balatsos, *Tales around the clock: Poly(A) tails in circadian gene expression*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2018: p. e1484.
19. Rutter, J., et al., *Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors*. Science, 2001. **293**(5529): p. 510-4.
20. Marcheiva, B., et al., *Circadian clocks and metabolism*. Handb Exp Pharmacol, 2013(217): p. 127-55.
21. Dudek, M. and Q.J. Meng, *Running on time: the role of circadian clocks in the musculoskeletal system*. Biochem J, 2014. **463**(1): p. 1-8.
22. Griffin, E.A., Jr., D. Staknis, and C.J. Weitz, *Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock*. Science, 1999. **286**(5440): p. 768-71.
23. Sangoram, A.M., et al., *Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription*. Neuron, 1998. **21**(5): p. 1101-13.

24. Camacho, F., et al., *Human casein kinase Idelta phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2*. FEBS Lett, 2001. **489**(2-3): p. 159-65.
25. Eide, E.J., et al., *Control of mammalian circadian rhythm by CKepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(7): p. 2795-807.
26. Siepk, S.M., et al., *Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression*. Cell, 2007. **129**(5): p. 1011-23.
27. Lamia, K.A., et al., *AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation*. Science, 2009. **326**(5951): p. 437-40.
28. Kurabayashi, N., et al., *DYRK1A and glycogen synthase kinase 3beta, a dual-kinase mechanism directing proteasomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(7): p. 1757-68.
29. Gallego, M. and D.M. Virshup, *Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(2): p. 139-48.
30. Ukai-Tadenuma, M., et al., *Delay in feedback repression by cryptochrome 1 is required for circadian clock function*. Cell, 2011. **144**(2): p. 268-81.
31. Luo, A.H. and G. Aston-Jones, *Circuit projection from suprachiasmatic nucleus to ventral tegmental area: a novel circadian output pathway*. Eur J Neurosci, 2009. **29**(4): p. 748-60.
32. Edery, I., J.E. Rutila, and M. Rosbash, *Phase shifting of the circadian clock by induction of the Drosophila period protein*. Science, 1994. **263**(5144): p. 237-40.
33. Albrecht, U., et al., *A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light*. Cell, 1997. **91**(7): p. 1055-64.
34. Shearman, L.P., et al., *Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei*. Neuron, 1997. **19**(6): p. 1261-9.
35. Shigeyoshi, Y., et al., *Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript*. Cell, 1997. **91**(7): p. 1043-53.
36. Yan, L. and R. Silver, *Resetting the brain clock: time course and localization of mPER1 and mPER2 protein expression in suprachiasmatic nuclei during phase shifts*. Eur J Neurosci, 2004. **19**(4): p. 1105-9.
37. Travnickova-Bendova, Z., et al., *Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7728-33.
38. Kojima, S., E.L. Sher-Chen, and C.B. Green, *Circadian control of mRNA polyadenylation dynamics regulates rhythmic protein expression*. Genes Dev, 2012. **26**(24): p. 2724-36.
39. Goldstrohm, A.C. and M. Wickens, *Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(4): p. 337-44.
40. Hammet, A., B.L. Pike, and J. Heierhorst, *Posttranscriptional regulation of the RAD5 DNA repair gene by the Dun1 kinase and the Pan2-Pan3 poly(A)-nuclease complex contributes to survival of replication blocks*. J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22469-74.
41. Kadyrova, L.Y., et al., *Translational control of maternal Cyclin B mRNA by Nanos in the Drosophila germline*. Development, 2007. **134**(8): p. 1519-27.
42. Parker, R. and H. Song, *The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(2): p. 121-7.
43. Dehlin, E., et al., *Cap-dependent deadenylation of mRNA*. EMBO J, 2000. **19**(5): p. 1079-86.
44. Gao, M., et al., *Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro*. Mol Cell, 2000. **5**(3): p. 479-88.
45. Martinez, J., et al., *The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation*. J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 27923-9.
46. Balatsos, N.A., et al., *Modulation of poly(A)-specific ribonuclease (PARN): current knowledge and perspectives*. Curr Med Chem, 2012. **19**(28): p. 4838-49.

47. Godwin, A.R., et al., *Kiss your tail goodbye: the role of PARN, Nocturnin, and Angel deadenylases in mRNA biology*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1829**(6-7): p. 571-9.
48. Wu, M., et al., *Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN*. *EMBO J*, 2005. **24**(23): p. 4082-93.
49. Chen, C.Y., et al., *AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs*. *Cell*, 2001. **107**(4): p. 451-64.
50. Balatsos, N.A., et al., *Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC)*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(7): p. 4517-22.
51. Hammond, S.M., *An overview of microRNAs*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015. **87**: p. 3-14.
52. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. *Science*, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
53. Kim, Y.K., B. Kim, and V.N. Kim, *Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(13): p. E1881-9.
54. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(8): p. 509-24.
55. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. *Genes Dev*, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
56. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. *Science*, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
57. Bohnsack, M.T., K. Czaplinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. *RNA*, 2004. **10**(2): p. 185-91.
58. Kato, M., L. Arce, and R. Natarajan, *MicroRNAs and their role in progressive kidney diseases*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009. **4**(7): p. 1255-66.
59. Berezikov, E., et al., *Mammalian mirtron genes*. *Mol Cell*, 2007. **28**(2): p. 328-36.
60. Ruby, J.G., C.H. Jan, and D.P. Bartel, *Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing*. *Nature*, 2007. **448**(7149): p. 83-6.
61. Castellano, L. and J. Stebbing, *Deep sequencing of small RNAs identifies canonical and non-canonical miRNA and endogenous siRNAs in mammalian somatic tissues*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(5): p. 3339-51.
62. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. *Nature*, 2005. **436**(7051): p. 740-4.
63. Stubblefield, J.J., J. Terrien, and C.B. Green, *Nocturnin: at the crossroads of clocks and metabolism*. *Trends Endocrinol Metab*, 2012. **23**(7): p. 326-33.
64. Chang, J., et al., *miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1*. *RNA Biol*, 2004. **1**(2): p. 106-13.
65. Kojima, S., et al., *MicroRNA-122 modulates the rhythmic expression profile of the circadian deadenylase Nocturnin in mouse liver*. *PLoS One*, 2010. **5**(6): p. e11264.
66. Katoh, T., et al., *Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2*. *Genes Dev*, 2009. **23**(4): p. 433-8.
67. Katoh, T., H. Hojo, and T. Suzuki, *Destabilization of microRNAs in human cells by 3' deadenylation mediated by PARN and CUGBP1*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(15): p. 7521-34.
68. Lewis, B.P., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. *Cell*, 2003. **115**(7): p. 787-98.
69. Xu, S., et al., *MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(34): p. 25053-66.
70. Kriegel, A.J., D. Mladinov, and M. Liang, *Translational study of microRNAs and its application in kidney disease and hypertension research*. *Clin Sci (Lond)*, 2012. **122**(10): p. 439-47.

71. Das, D.K., et al., *miR-1207-3p regulates the androgen receptor in prostate cancer via FNDC1/fibronectin*. *Exp Cell Res*, 2016. **348**(2): p. 190-200.
72. Dang, W., et al., *miR-1207-5p suppresses lung cancer growth and metastasis by targeting CSF1*. *Oncotarget*, 2016. **7**(22): p. 32421-32.
73. Saika, R., et al., *MicroRNA-101a regulates microglial morphology and inflammation*. *J Neuroinflammation*, 2017. **14**(1): p. 109.
74. Li, D., et al., *Role of microRNA-101a in the regulation of goat skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation*. *Gene*, 2015. **572**(2): p. 198-204.
75. Wang, H., et al., *Oscillating primary transcripts harbor miRNAs with circadian functions*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 21598.
76. Dai, Y., et al., *Role of microRNA-122 in hepatic lipid metabolism of the weanling female rat offspring exposed to prenatal and postnatal caloric restriction*. *J Nutr Biochem*, 2019. **73**: p. 108220.
77. Gatfield, D., et al., *Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression*. *Genes Dev*, 2009. **23**(11): p. 1313-26.
78. Didychuk, A.L., S.E. Butcher, and D.A. Brow, *The life of U6 small nuclear RNA, from cradle to grave*. *RNA*, 2018. **24**(4): p. 437-460.
79. Menet, J.S., et al., *Nascent-Seq reveals novel features of mouse circadian transcriptional regulation*. *Elife*, 2012. **1**: p. e00011.
80. Liu, Y., et al., *Cold-induced RNA-binding proteins regulate circadian gene expression by controlling alternative polyadenylation*. *Sci Rep*, 2013. **3**: p. 2054.
81. Palfi, A., et al., *microRNA regulatory circuits in a mouse model of inherited retinal degeneration*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 31431.
82. Shende, V.R., et al., *MicroRNAs function as cis- and trans-acting modulators of peripheral circadian clocks*. *FEBS Lett*, 2014. **588**(17): p. 3015-22.
83. Taylor, S.C. and A. Posch, *The design of a quantitative western blot experiment*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 361590.
84. Bachman, J., *Reverse-transcription PCR (RT-PCR)*. *Methods Enzymol*, 2013. **530**: p. 67-74.
85. Bustin, S.A., et al., *Quantitative real-time RT-PCR--a perspective*. *J Mol Endocrinol*, 2005. **34**(3): p. 597-601.
86. Price, A., J. Garhyan, and C. Gibas, *The impact of RNA secondary structure on read start locations on the Illumina sequencing platform*. *PLoS One*, 2017. **12**(2): p. e0173023.
87. Chen, L. and G. Yang, *Recent advances in circadian rhythms in cardiovascular system*. *Front Pharmacol*, 2015. **6**: p. 71.
88. Shukla, S., et al., *The RNase PARN Controls the Levels of Specific miRNAs that Contribute to p53 Regulation*. *Mol Cell*, 2019. **73**(6): p. 1204-1216 e4.