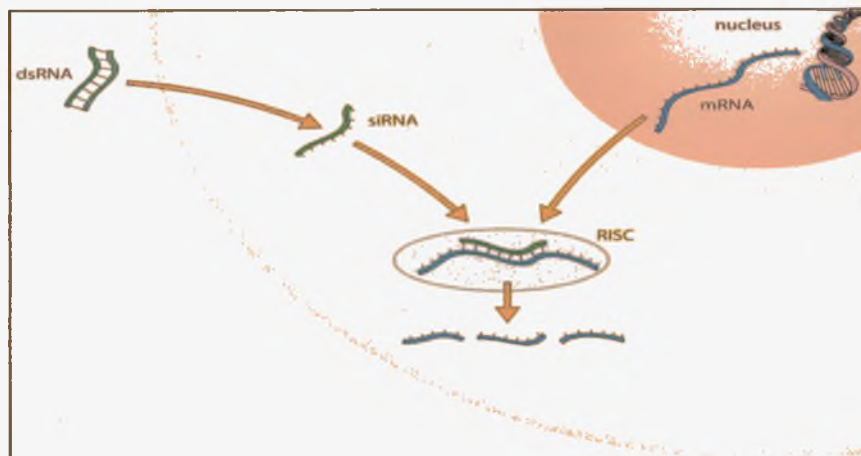




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥ(A) ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ
(PARN) ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΔΙΚΛΩΝΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA ΣΕ
ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ



Δημοπούλου Θεοδοσία

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2008



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 6582/1
Ημερ. Εισ.: 01-04-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2008
ΔΗΜ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087317

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Μπαλατσός Νικόλαος

Λέκτορας Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

- Νικόλαος Μπαλατσός, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.
- Κοντού Μαρία, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.
- Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Ευχαριστώ,

Όλους όσους με εμπιστεύτηκαν και μου ανάθεσαν αυτή την εργασία. Αρχικά, ευχαριστώ τον κύριο και καθηγητή μου Νικόλαο Μπαλατσό για το πρωτότυπο του θέματος που αποφάσισε να πραγματοποιήσει, παρόλο τις όποιες δυσκολίες που συναντήσαμε για την διεκπεραίωσή του. Η συνεργασία μας ήταν ευχάριστη και εκτός από την πληθώρα γνώσεων που μου προσέφερε και την εμπιστοσύνη του, οι συμβουλές του ήταν καταλυτικές για ενθάρρυνση του έργου μας αλλά και για την περαιτέρω πορεία μου. Επίσης, ευχαριστώ τον κύριο Σταθόπουλο που με δέχτηκε στο εργαστήριό του και που συνεισέφερε με τις καθοδηγήσεις του στην επίτευξη του στόχου μας. Τέλος, νομίζω ότι πρέπει να ευχαριστήσω τους διδακτορικούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές για τη βοήθειά τους και την όμορφη σχέση που αναπτύξαμε. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και σε όσους με στήριξαν και συνεχίζουν να με στηρίζουν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Περίληψη.....	4
2. Εισαγωγή.....	5
2.1. Μονοπάτια αποικοδομής του mRNA.....	5
2.2. Δομή και δραστικότητα της PARN.....	7
2.3. Μηχανισμός RNAi.....	10
2.3.1. Καταστολή πρωτεϊνσύνθεσης με το μηχανισμό των miRNAs.....	13
2.3.2. Δίκλινα RNAs διαφορετικής προέλευσης και λειτουργίας.....	14
3. Σκοπός.....	19
4. Υλικά και Μέθοδοι.....	20
4.1. Υλικά	
4.1.1. Χημικά	
4.1.2. Καρκινική Κυτταρική Σειρά	
4.1.3. Θρεπτικά Υλικά	
4.1.4. Πρωτεΐνες, Ένζυμα και Αντισώματα	
4.1.5. siRNA	
4.1.6. Transfection Reagents	
4.1.7. Διαλύματα	
4.2. Μέθοδοι	
4.2.1. Σχεδιασμός siRNAs για αποσιώπηση mRNA της PARN	
4.2.2. Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας με θρυψίνη	
4.2.3. α. Κατάψυξη κυττάρων	
4.2.3. β. Απόψυξη κυττάρων	
4.2.4. Διαμόλυνση καρκινικών ανθρώπινων κυττάρων	
4.2.5. Λύση για κύτταρα θηλαστικών	
4.2.6. Ανίχνευση πρωτεϊνών με Western blot	
5. Αποτελέσματα.....	27
6. Συζήτηση.....	32
7. Βιβλιογραφία.....	36

1. Περίληψη

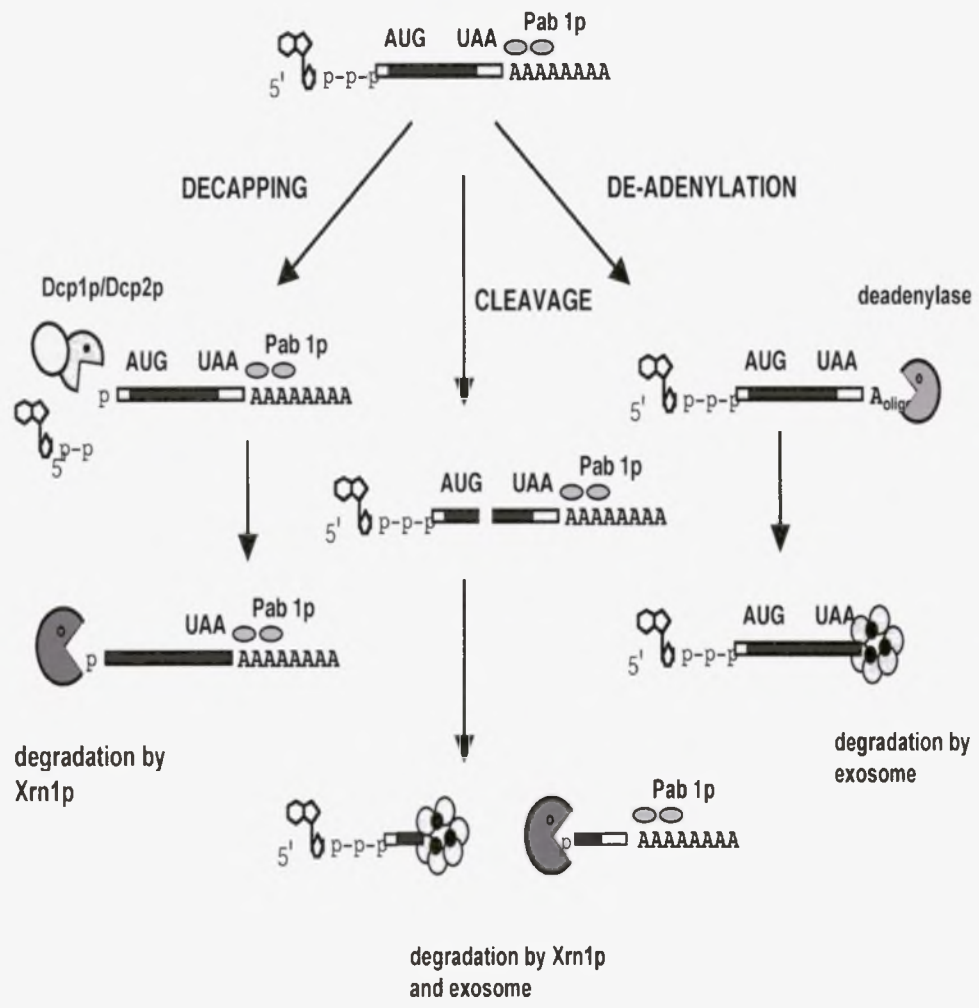
Η πολυ(A) ουρά κατέχει σπουδαίο ρόλο στον κύκλο ζωής των mRNAs. Συμμετέχει στις διαδικασίες ωρίμανσης του mRNA, στην έξοδο στο κυτταρόπλασμα, στην έναρξη της μετάφρασης, ενώ από αυτή ξεκινά η αποικοδόμησή τους. Η τελευταία διαδικασία γίνεται κατά τη φορά 3'-5' από ένζυμο γνωστά ως αποαδενυλάσες. Στα θηλαστικά, η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN είναι το κύριο ένζυμο αποικοδόμησης των πολυ(A) ουρών. Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην αποσιώπηση της PARN σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων. Σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν μικρά δίκλινα μόρια RNA (siRNA) για την αποσιώπηση του ενζύμου σε κύτταρα Hep2. Χρησιμοποιήθηκαν τρία siRNAs, όπου όλα αποσιώπησαν επιτυχώς το ένζυμο, όπως φάνηκε σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης. Ακόμα, διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα του συνδυασμού και των τριών siRNAs. Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έδειξε πως η ταυτόχρονη διαμόλυνση των κυττάρων και με τα τρία διαφορετικά siRNAs πέτυχαν εξίσου ικανοποιητική αποσιώπηση της PARN. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως τα siRNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για τη μελέτη του ρόλου του ενζύμου στα επίπεδα έκφρασης πληθυσμών RNA του κυττάρου.

2. Εισαγωγή

2.1. Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA

Η αποικοδόμηση του ευκαρυωτικού mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στον ποιοτικό έλεγχο της βιοσύνθεσης mRNA και στην αντιϊκή προστασία [1,2,3].

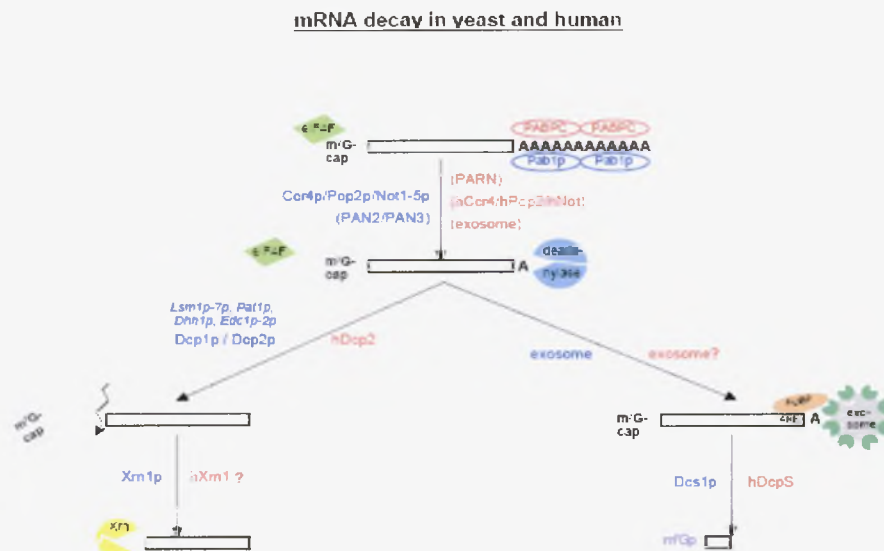
Η αποικοδόμηση του mRNA συνήθως ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο του (αποαδενυλίωση) από διάφορες αποαδενυλάσες [4,5]. Ακολουθώντας την αποαδενυλίωση ένα ειδικό ένζυμο που αποτελείται από δύο υπομονάδες (Dcp1p και Dcp2p) αφαιρεί την 5' δομή καλύπτρας , εκθέτοντας το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από μια 5'→3' εξωνουκλεάση, την Xrn1p. Εναλλακτικά, μετά την αποαδενυλίωση, το mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με την κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο 3'→5' εξωνουκλεασών [6-9]. Στην περίπτωση αυτή το προκύπτον ολιγονουκλεοτιδίο-καλύπτρα υδρολύεται από το DcpS [10]. Ωστόσο η αποικοδόμηση ορισμένων mRNA μπορεί να πυροδοτηθεί από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση είτε από ειδικές ενδονουκλεάσες είτε σε απόκριση από miRNA ή siRNA [11]. Επίσης τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν ειδικά μονοπάτια αποικοδόμησης (Εικόνα 1) που αναγνωρίζουν και αποικοδομούν ταχύτατα ανώμαλα mRNA χρησιμοποιώντας τα ίδια ένζυμα που αποικοδομούν φυσιολογικά mRNA. Για παράδειγμα pre-mRNA που αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν την διαδικασία ωρίμανσης μπορεί να κατακρατηθούν στον πυρήνα και / ή να αποικοδομηθούν με μια διαδικασία που φαίνεται πως εξαρτάται από το εξώσωμα [12].



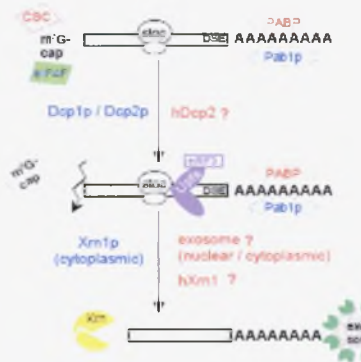
Εικόνα 1: Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA.

Εναλλακτικά, τα κύτταρα μπορούν να υπολογίζουν την μεταφραστική χωρητικότητα των mRNA. Σε μια διαδικασία που αναφέρεται και ως nonsense mediated decay (NMD) τα mRNA που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται. Τέτοια μετάγραφα αποικοδομούνται είτε από αφαίρεση της καλύπτρας σε μία διαδικασία η οποία είναι ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση, είτε από επιτάχυνση της αποαδενυλίωσης και της 3'→5' αποικοδόμησης από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα [13-16]. Παρομοίως σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως nonstop decay (NSD) τα mRNA στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και

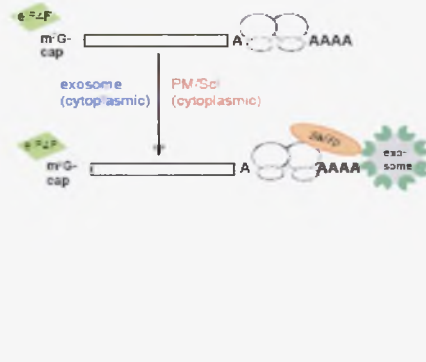
αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα (Εικόνα 2) [17,18].



Nonsense-mediated decay (NMD)



Nonstop-mediated decay (NSD)



Εικόνα 2 : Τα mRNA τα οποία δεν περιέχουν, ή περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αποικοδομούνται ταχύτατα.

2.2 Δομή και δραστικότητα της PARN

Στα θηλαστικά, ένα ένζυμο που εκδηλώνει αποαδενυλιωτική ικανότητα είναι η πολυ(A) ειδική εξωριβονουκλεάση (PARN) [19,20]. Ανήκει στην υπεροικογένεια DEDD που το όνομά της ορίζεται από τα τέσσερα

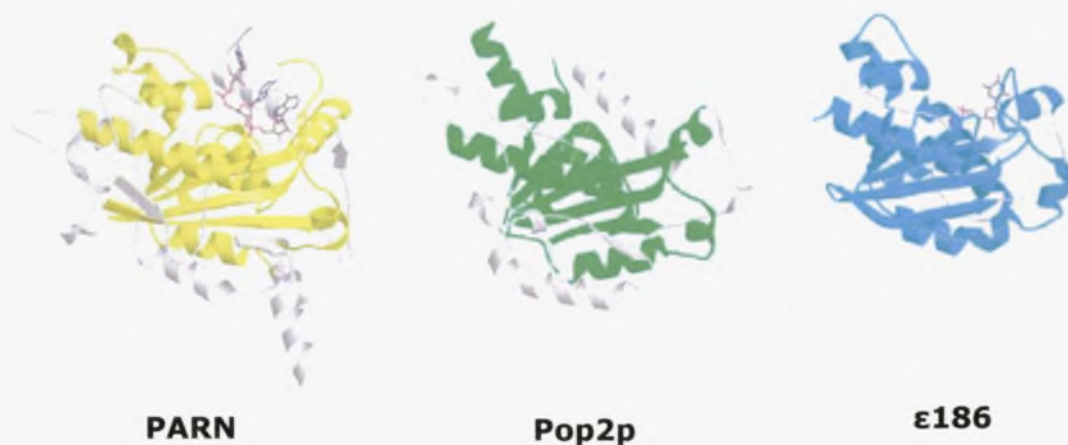
συντηρημένα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, 3 ασπαρτικά οξέα (D) και ένα γλουταμικό οξύ (E) τα οποία κατέχουν βασικό ρόλο στην κατάλυση [21,22]. Στην οικογένεια των ριβονουκλεασών, RNase D ανήκουν η DNA πολυμεράση I, η DNA πολυμεράση III, η Pop2 της ζύμης και η ε186 από τη *Escherichia coli*. Είναι συντηρημένη σε πολλούς ευκαρυώτες αλλά απουσιάζει από το *Saccharomyces cerevisiae* και τη *Drosophilla melanogaster* [23].

Παλαιότερες μελέτες, έδειξαν ότι η PARN έχει μεγάλη ειδικότητα για τη μονόκλωνη πολυ(A) ουρά και για την ενεργότητά της απαιτείται μια 3' υδροξυλική ομάδα [19]. Η συντηρημένη R3H περιοχή της διευκολύνει τη σύνδεση με το πολυαδενυλιωμένο mRNA καθώς λειτουργεί σε μια μονόκλωνη νουκλεοτιδική δομή [24]. Βιοχημικές μελέτες συνδυασμένες με μεταλλάξεις αποκάλυψαν ότι είναι μια ολιγομερής πολυ(A) εξωνουκλεάση που παράγει 5' AMP και είναι εξαρτώμενη από δισθενή ιόντα μετάλλων [20,25,26,27,28]. Συγκεκριμένα, το ελάχιστο μήκος υποστρώματος που είναι ικανή να δεσμεύσει είναι δι- ή τρι-αδενοσίνη, ανάλογα με το ποιο μέταλλο βρίσκεται στο ενεργό κέντρο. Ένα ακόμα στοιχείο που τη χαρακτηρίζει είναι ότι προσδένεται στο 5' κάλυμμα του mRNA, κάτι που όχι μόνο διεγείρει την αποαδενυλίωση αλλά και ενισχύει τη διαδικασία της αντίδρασης [26,29,30].



Εικόνα 3: Κρυσταλλική δομή της PARNn [31].

Η προσδιορισθείσα δομή αφορά στην ανθρώπινη PARN με κομμένο το C-τελικό άκρο (1-430 αμινοξέα σε σύνολο 639) που αποτελείται μόνο από την περιοχή R3H και την περιοχή με δράση νουκλεάσης ενώ λείπει η ειδική περιοχή για το 5' κάλυμμα (Εικόνα 3). Η κρυσταλλική δομή της PARNn προσδιορίστηκε σε δύο μορφές: μια ελεύθερη και μια δεσμευμένη με RNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη, όπου κάθε υπομονάδα της δεσμεύει τρία νουκλεοτίδια αδενοσίνης σε αντίθεση με τις ε186 και Pop2p εξωριβονουκλεάσες που η περιοχή της νουκλεάσης είναι μονομερής. Ωστόσο, η περιοχή της νουκλεάσης της PARNn με την αντίστοιχη της Pop2p ταυτίζονται όταν τοποθετηθούν η μια πάνω στην άλλη παρόλο το γεγονός ότι οι αλληλουχίες τους έχουν ομοιότητα μόνο στο 17% (Εικόνα 4) . Η καθαρή μορφή της PARNn αν και ενεργή για την αποκοπή της πολυ(A) ουράς σημειώνει χαμηλή δραστικότητα [31].



Εικόνα 4: Σύγκριση της δομικής περιοχής νουκλεάσης της PARN με τις αντίστοιχες των ε186 και Pop2p εξωριβονουκλεασών.

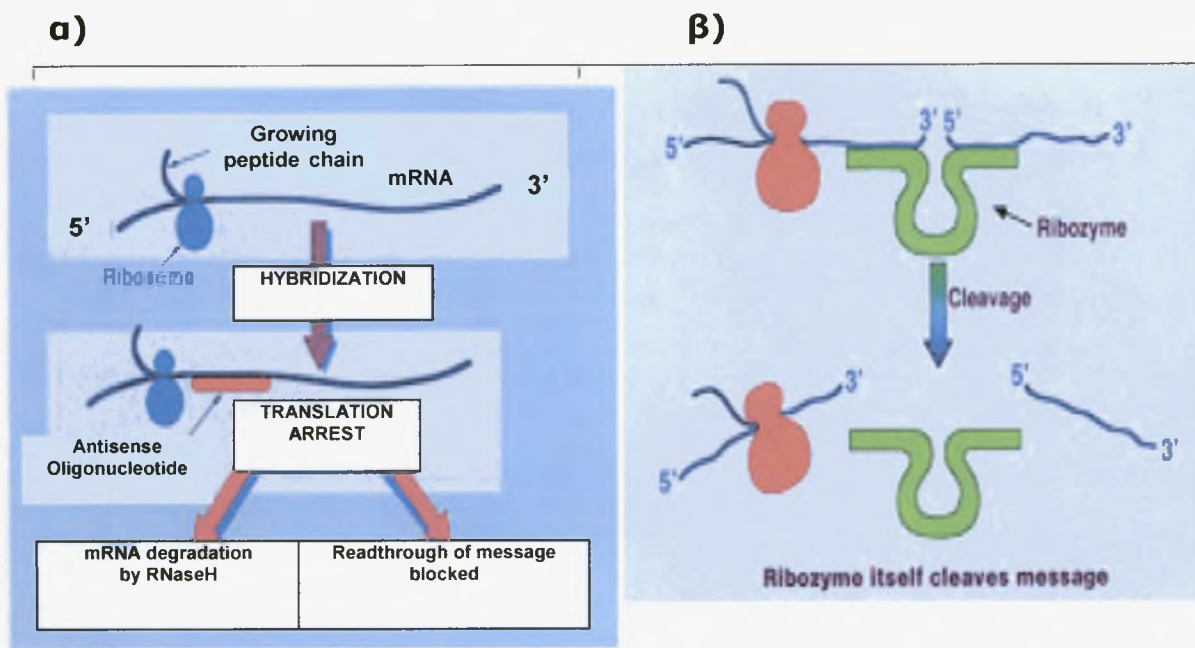
Στο ενεργό της κέντρο τα κατάλοιπα Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382 σχηματίζουν μια αρνητικά φορτισμένη κοιλότητα. Επίσης υπάρχει η His377, που όπως αποδείχτηκαν από πειράματα αντικατάστασής της, είναι απαραίτητη για την καταλυτική ενεργότητα και λόγω αυτής η PARN ανήκει στη DEDDh υποοικογένεια. Κανένα Mg^{2+} ή άλλο δισθενές μέταλλο δε

βρέθηκε στο ενεργό κέντρο αλλά τα αμινοξικά του κατάλοιπα φάνηκε ότι αλληλεπιδρούν με ετεροπολικούς δεσμούς με τα μέταλλα [27,28]. Η υψηλή ομοιότητα των δομών των ενεργών κέντρων μεταξύ της PARN και της ε186 υποδηλώνει έντονα ότι τα πέντε αμινοξικά κατάλοιπα παίζουν τον ίδιο καταλυτικό ρόλο στη δράση εξωνουκλεάσης και για αυτό θα πρέπει και ο καταλυτικός μηχανισμός να είναι πιθανόν ο ίδιος μεταξύ των δύο ενζύμων.

Στα κύτταρα θηλαστικών η PARN αναστέλλεται από την πρωτεΐνη Pab1p που δεσμεύεται στο πολυ(A) [20]. Επιπλέον είναι απαραίτητη για τη γρήγορη αποαδενυλίωση των mRNAs με περιοχές πλούσιες σε AU (ARE) ενώ επάγεται από την τριστετραπρόληνη, μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται στα ARE στοιχεία [32,33]. Η γρήγορη αποαδενυλίωση των θηλαστικών έχει επίσης βρεθεί ότι σχετίζεται με την παρουσία των κυτταροπλασματικών Ρ-σωματίων, που λειτουργούν μέσω του miRNA μονοπατιού σε συνδυασμό με ένζυμα αποικοδόμησης [38]. Στο *Xenopus laevis* η PARN χρησιμοποιείται στην αποσιώπηση μητρικών mRNAs κατά την ωρίμανση ωαρίου [34,35]. Στο *Arabidopsis thaliana* αποδεικνύεται ως απαραίτητο ένζυμο για τα πρώτα στάδια ανάπτυξης [36] και είναι υπεύθυνη για την αποαδενυλίωση μιας συγκεκριμένης ομάδας mRNAs [37].

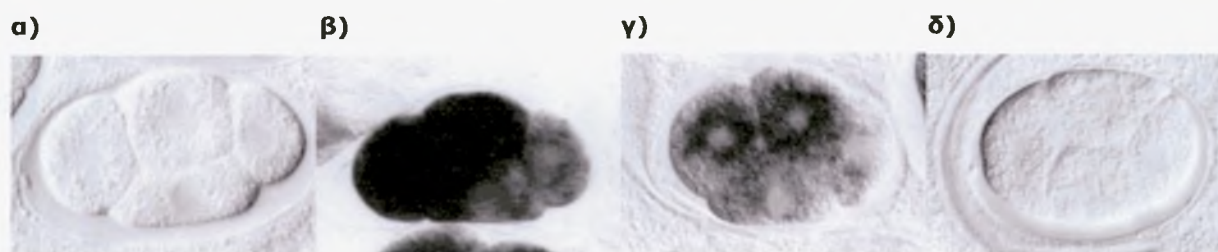
2.3. Μηχανισμός RNAi

Γενικά, μέθοδοι για καταστολή γονιδιακής έκφρασης είναι τα αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (ODNs), το καταλυτικό ριβόσωμα και το RNAi [39]. Τα αρνητικά φορτισμένα ολιγονουκλεοτίδια, ODNs ζευγαρώνουν με το mRNA στόχο κατά Watson-Crick και το υβρίδιο DNA-RNA υδρολύεται από την ενδογενή RNάση H. Έτσι, το RNA διαχωρίζεται αφήνοντας το ODN να ανακυκλωθεί. Από την άλλη, το ριβόσωμα είτε σε σχήμα φουρκέτας είτε ως σφυροκέφαλο με τον καταλυτικό πυρήνα των ριβονουκλεοτιδίων του, διασπά το mRNA στόχο (Εικόνα 5).



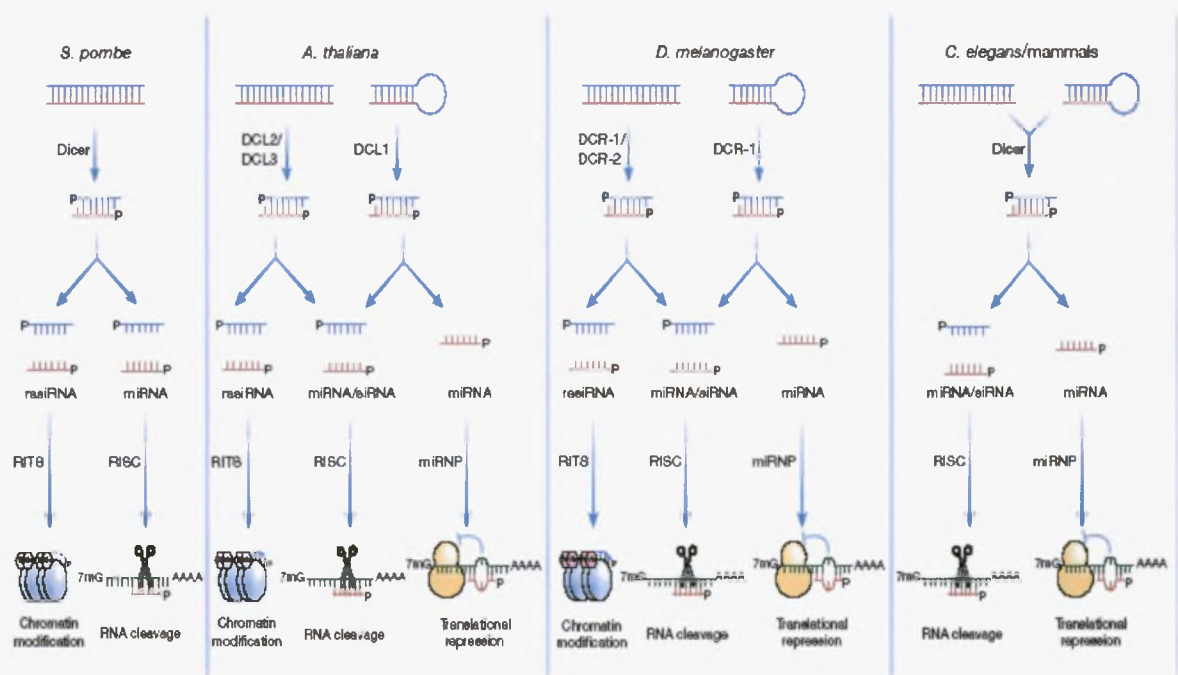
Εικόνα 5 : Μηχανισμός καταστολής γονιδιακής έκφρασης με α) αντινοσηματικό DNA και μεσολάβηση RNάσης Η και β) τον καταλυτικό πυρήνα του ριβοσώματος [40].

Η έκρηξη για τη λειτουργία του RNAi σηματοδοτείται με τα πειράματα των Fire και Mello το 1998 στο *C.elegans* (Εικόνα 6) [41] και αργότερα, το 2001 σε κύτταρα θηλαστικών [42,43] όπου βρέθηκε ότι δίκλινα RNAs (dsRNAs) καταφέρνουν να αποικοδομήσουν συμπληρωματικές με αυτά αλληλουχίες μέσω ενός ενεργού τους ενδιάμεσου, το οποίο καλείται μικρό παρεμβαλλόμενο RNA (siRNA). Το siRNA μπορεί να συντεθεί χημικά ή να εκφραστεί από πλασμιδιακούς ή ιικούς φορείς. Η εφαρμογή του είναι ευρεία σε φυτά, ζώα και πολλούς μύκητες και επιτρέπει, μέσα από την προσωρινή ή μόνιμη σίγηση ενός γονιδίου, τη μελέτη της λειτουργίας του και της σημασίας του για το κύτταρο .



Εικόνα 6 : RNAi έναντι mex-3 RNA σε έμβρυα *C. Elegans*. α) Αρνητικό control για τον ανιχνευτή. β) Έμβρυο από μη διαμολυνθέντα πατέρα. γ) Έμβρυο από αντινοσηματικό mex-3 RNA. δ) Έμβρυο από δίκλινο mex-3 RNA.

Η επεξεργασία των siRNA γίνεται από ένα ένζυμο που δρα όπως η RNάση III και ονομάζεται Dicer [44]. Παρόλο που τα μονοπάτια αποσιώπησης στο RNAi είναι καλά συντηρημένα, αυτό το ένζυμο κλειδί διαφοροποιείται τόσο δομικά όσο και αριθμητικά ανάμεσα στις διαφορετικές τάξεις. Έτσι, ενώ στα θηλαστικά, στο *C.elegans* και στη ζύμη υπάρχει μία, η *Drosophila melanogaster* έχει δύο και το φυτό *Arabidopsis thaliana* έχει τέσσερις πρωτείνες με δράση dicer (DCL) [45]. Η DCL1 και DCL4 του *A. thaliana* περιέχουν ένα ή περισσότερα σήματα για πυρηνικό εντοπισμό (NLS), αν και υπάρχουν επιπλέον αποδείξεις ότι η DC1 είναι πυρηνική [46]. Η διαδικασία του RNAi στον πυρήνα συμβαίνει και σε άλλους οργανισμούς (Εικόνα 7) : στη *Drosophila* η μια από τις δύο dicer περιέχει σήμα NLS καθώς και η μοναδική dicer των θηλαστικών[45]. Παρόλο που η Dicer των θηλαστικών έχει αναφερθεί ότι εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, μια πρόσφατη έρευνα προτείνει ότι η επεξεργασία των μη πολυαδενυλιωμένων dsRNAs συναντάται στον πυρήνα [47]. Ωστόσο, και οι δυο μορφές μπορεί να μην είναι παρούσες σε όλους τους οργανισμούς. Η Dicer δρα σε σύμπλοκα με άλλες πρωτείνες, συμπεριλαμβανομένων των μελών της οικογένειας Argonaute και των HEN1 [48,49,50].



Εικόνα 7: Τα μονοπάτια του RNAi σε διαφορετικούς οργανισμούς και τα διαφορετικά είδη της Dicer.

Σε πειράματα στο νηματώδη *C. elegans* βρέθηκε ότι αποτελεσματικές είναι μόνο οι δίκλωνες δομές των siRNA (Πίνακας 1) και ότι οι επιδράσεις είναι ορατές στα διαμολυσμένα ζώα αλλά και στους απογόνους τους [41].

Πίνακας 1 : Συνέπειες νοσηματικών, αντινοσηματικών και δίκλωνων RNAs στους απογόνους των διαμολυσμένων ζώων.

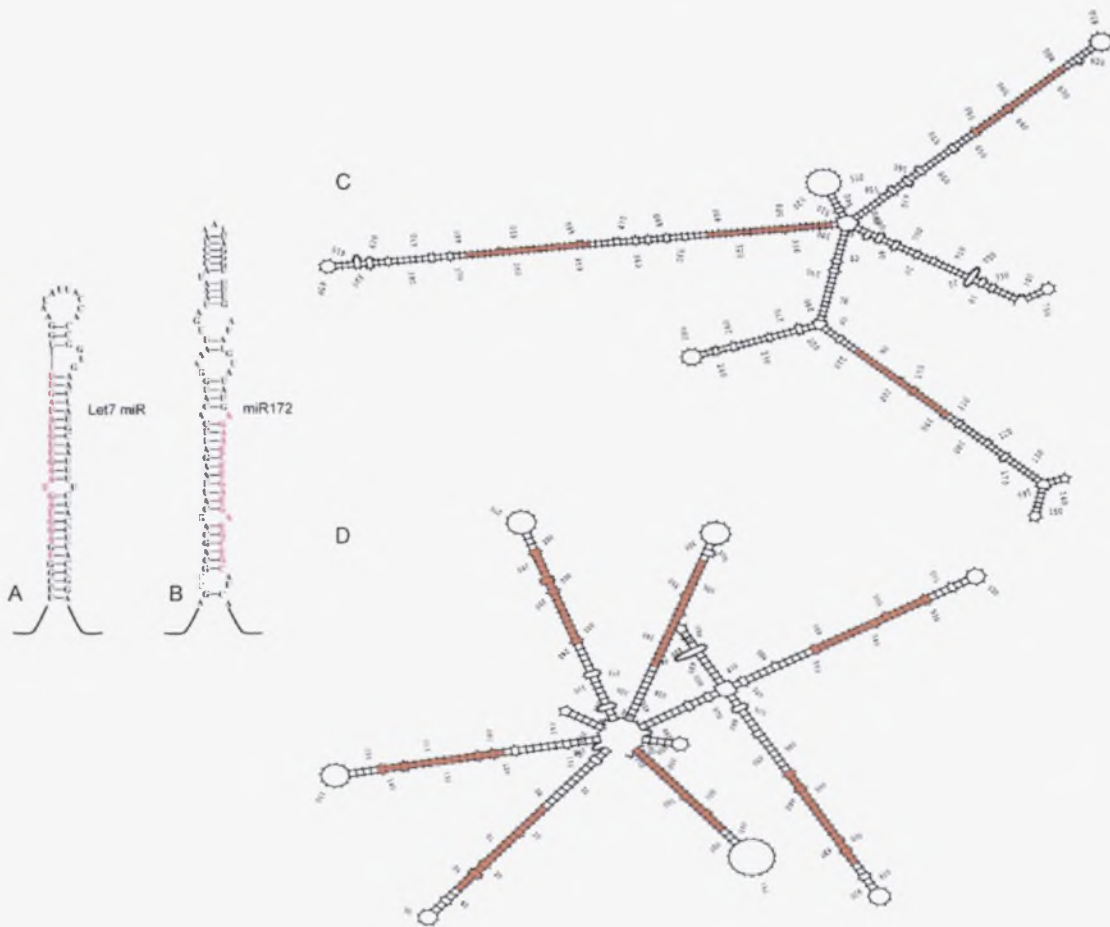
Gene	segment	Size (kilobases)	Injected RNA	F1 phenotype
<i>unc-22</i>				<i>unc-22</i> -null mutants: strong twitchers
<i>unc22A*</i>	Exon 21-22	742	Sense	Wild type
			Antisense	Wild type
			Sense + antisense	Strong twitchers (100%)
<i>unc22B</i>	Exon 27	1,033	Sense	Wild type
			Antisense	Wild type
			Sense + antisense	Strong twitchers (100%)
<i>unc22C</i>	Exon 21-22†	785	Sense + antisense	Strong twitchers (100%)
<i>fem-1</i>				<i>fem-1</i> -null mutants: femal (no sperm)
<i>fem1A</i>	Exon 10‡	531	Sense	Hermaphrodite (98%)
			Antisense	Hermaphrodite (>98%)
			Sense + antisense	Female (72%)
<i>fem1B</i>	Intron 8	556	Sense + antisense	Hermaphrodite (>98%)

**unc-22* : μιονίδιο, άφθονη πρωτεΐνη αλλά όχι απαραίτητη, *fem-1* : περιέχει επαναλήψεις αγκυρίνης, υπεύθυνη για παραγωγή σπέρματος

2.3.1 Καταστολή πρωτεϊνοσύνθεσης με το μηχανισμό των miRNAs

Τα miRNAs είναι μικρά RNAs που καταστέλλουν την έκφραση ενδογενών γονιδίων, σημαντικών για φυσιολογικά προγράμματα ζώων και φυτών. Η έκφραση τους είναι ειδική για συγκεκριμένους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια και το προφίλ τους αλλάζει σε διάφορες ανθρώπινες ασθένειες. Προκύπτουν από δίκλινα, ατελώς ζευγαρωμένα RNAs, μήκους 70-100 νουκλεοτιδίων που κωδικοποιούνται από μεσογονιδιακές περιοχές και διαχωρίζονται από τη *dicer* [51,52]. Αυτά αποτελούν πρόδρομα

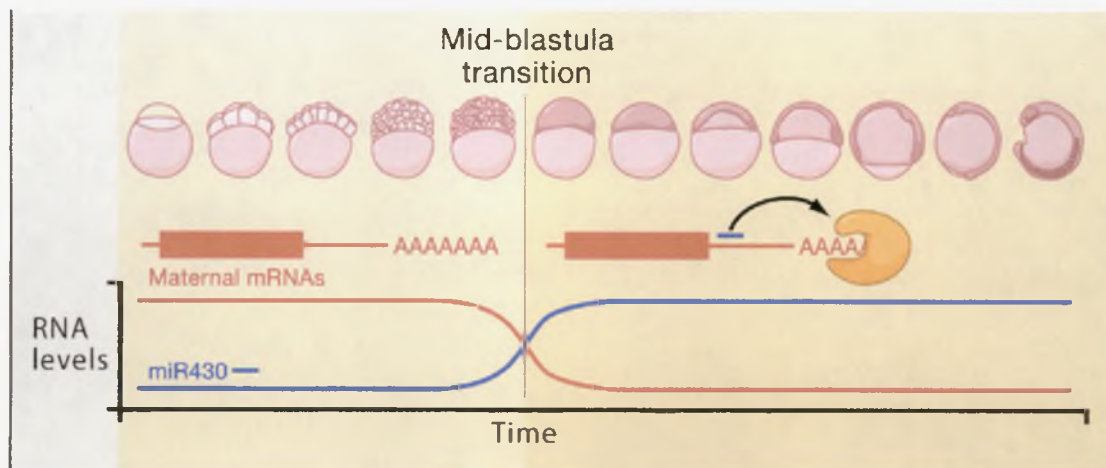
μετάγραφα (pri-miRNAs) που κόβονται από την πυρηνική Drosha παράγοντας πρόδρομες θηλιές (pre-miRNAs). Τα ώριμα miRNAs προκύπτουν μέσω της Dicer που κόβει αυτές τις θηλιές (Εικόνα 8). Μόνο σε μερικά miRNAs έχουν προσδιοριστεί οι στόχοι και οι βιολογικές λειτουργίες τους αλλά είναι πια ξεκάθαρο ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση σχεδόν κάθε διαδικασίας που έχει ερευνηθεί [53,54,55].



Εικόνα 8 : Πρόδρομα miRNA ζώων και φυτών. A pre-miRNA let-7 νηματώδη. B pre-miRNA-172 *Arabidopsis*. C πολυκιστρονικό pri-miRNA στο ρύζι. D πολυκιστρονικό pri-miRNA στους νηματώδεις

Τα miRNAs επηρεάζουν την ανάπτυξη των ζώων [54,56] κάτι που πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία προσωρινών ρυθμιστικών στοιχείων στους προαγωγείς των miRNA γονιδίων, όπως έχει φανεί για το miRNA let-7 στο *C.elegans* [57]. Μεταλλάγματα κυττάρων με ελαττωματική λειτουργία τους οδηγούν σε δυσλειτουργίες που ποικίλλουν από κυτταρικό

θάνατο μέχρι μη φυσιολογικές κυτταρικές διαδικασίες [54,56,58,59]. Έμβρυα *Zebrafish*, με μεταλλάγματα τόσο της μητρικής όσο και της ζυγωτικής Dicer παρουσιάζουν προβλήματα κατά τη γαστριδιοποίηση και τη μορφογένεση του εγκεφάλου [60]. Το miR430 που είναι το πιο άφθονο miRNA κατά την πρώιμη εμβρυογένεση, υπολογίζεται ότι φτάνει πάνω από το 90% τέσσερις ώρες μετά τη γονιμοποίηση [60,61]. Καθώς ξεκινάει η ζυγωτική μεταγραφή, τα επίπεδά του αυξάνουν και δεσμεύοντας τη 3' UTR των μητρικών mRNAs επιταχύνει την αποαδενυλίωση τους και κατά συνέπεια, οδηγεί στην αποικοδόμηση αυτών των μηνυμάτων (Εικόνα 9) [62].



Εικόνα 9 : Το miR430 επιταχύνει την αποαδενυλίωση των μητρικών mRNAs κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του *Zebrafish* [63].

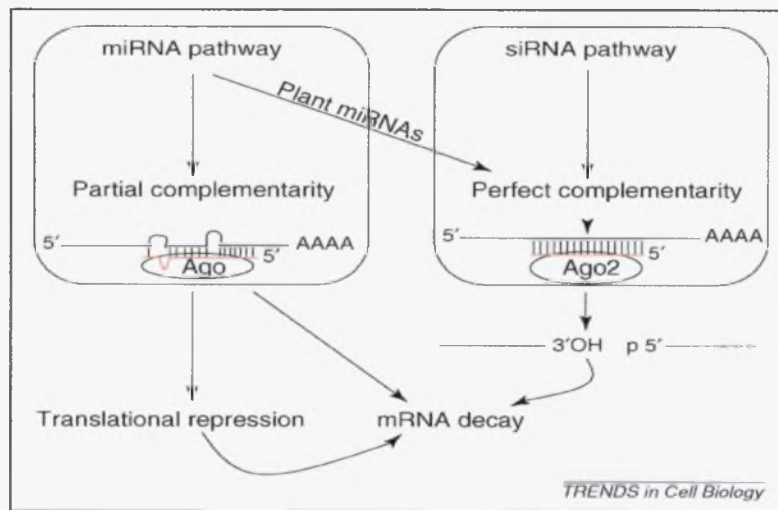
MiRNAs σχετιζόμενα με το miR430 παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάβαση από τη μητρική στη ζυγωτική μορφή σε πολλά, αν όχι σε όλα τα σπονδυλωτά. Στα έμβρυα *Xenopus* υπάρχει ένα παρόμοιο πρότυπο για την αποικοδόμηση της μητρικής κυκλίνης A1 [64]. Ωστόσο, στις μύγες λείπει το miR430 σύστημα. Στα σωματικά mRNAs, έχει βρεθεί ότι ένα άλλο miRNA, το miR16 είναι υπεύθυνο για τη σταθεροποίηση της ARE περιοχής με την τριστετραπρολίνη οδηγώντας στην αποαδενυλίωση των mRNAs με ARE στοιχεία [65]. Στα θηλαστικά η αποαδενυλίωση επιταχύνεται μέσω

των κυτταροπλασματικών Ρ-σωματίων, τα οποία αποτελούνται από miRNAs, mRNAs-στόχους και Argonautes πρωτεΐνες όπου προσελκύουν ένζυμα αποικοδόμησης όπως αποαδενυλάσες, 3'-5' εξωνουκλεάσες και ένζυμα αφαίρεσης καλύμματος [38].

Έχει εκτιμηθεί πως ο συνολικός αριθμός miRNA γονιδίων στον άνθρωπο κυμαίνεται στα 200-250 ενώ στο *C.elegans* περίπου 123 [66]. Αυτό που απομένει είναι να ταυτοποιηθούν οι στόχοι των miRNA γονιδίων.

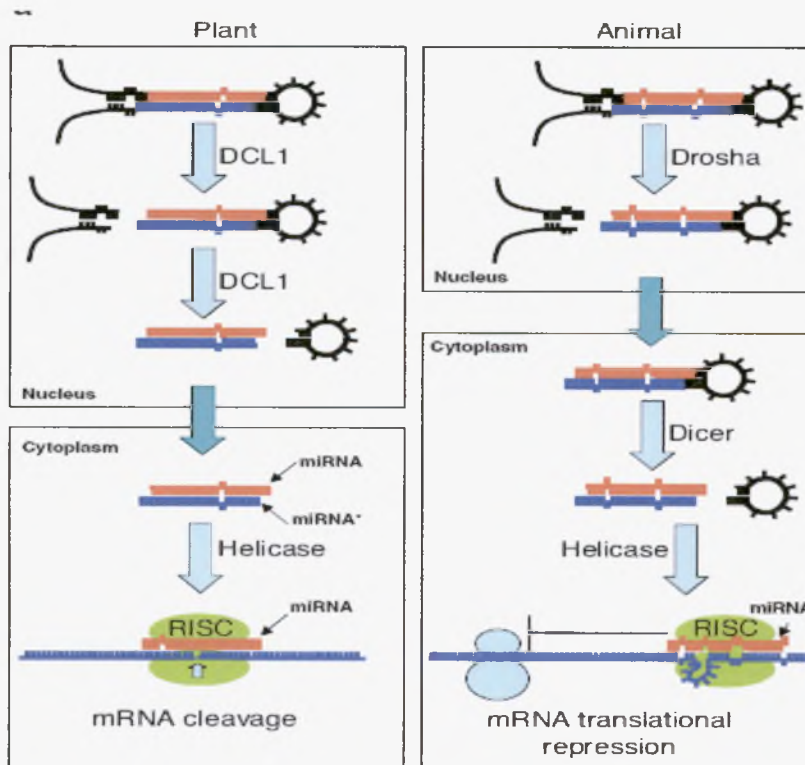
2.3.2 Δίκλιωνα RNAs διαφορετικής προέλευσης και λειτουργίας

Σε αντίθεση με τα miRNAs, τα siRNAs σχετίζονται με την αποσιώπηση που προκύπτει από διαγονίδια, ιούς, τρανσποζόνια και εισαγόμενα RNA και έτσι, μπορούν να θεωρηθούν ενδιάμεσα στα μονοπάτια άμυνας εναντίον ξένων νουκλεοτιδίων. Πρώτα ανακαλύφθηκαν στα φυτά το 1999 [67]. Γενικά, τα siRNAs μπορούν να προέλθουν από όλες τις περιοχές των δίκλωνων, τέλεια ζευγαρωμένων RNA, τα οποία προκύπτουν από τη μεταγραφή ενός διαγονιδίου-φουρκέτα. Αλληλεπιδρούν με ένα σύμπλοκο που περιέχει ενδονουκλεάση και ονομάζεται RISC (RNA induced silencing complex) [68], προκαλώντας αποικοδόμηση συγγενικών mRNAs. Αυτή η διαδικασία στα ζώα συμβαίνει τόσο στα miRNAs όσο και στα siRNAs σε μετά-μεταφραστικό επίπεδο. Παρόμοια αλληλεπίδραση με ένα σύμπλοκο RISC-like εμφανίζεται στα miRNAs και ανάλογα με το βαθμό συμπληρωματικότητας με το miRNA και το στόχο του, παρουσιάζονται δύο μονοπάτια: στο ένα ζευγαρώνουν στη 3' UTR των mRNAs οδηγώντας στην καταστολή μετάφρασης [69], ενώ στο άλλο δρουν όπως και τα siRNAs, καταλήγοντας στην αποικοδόμηση των mRNAs (Εικόνα 10) [50,70,71].



Εικόνα 10: Μοντέλα αποικοδόμησης mRNA μέσω miRNA ή siRNA μονοπατιού [72].

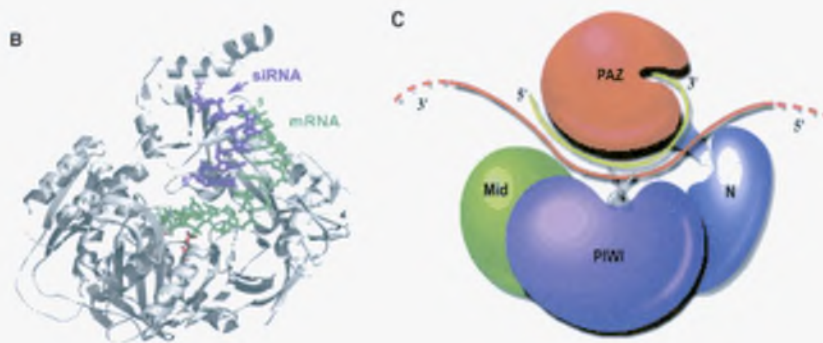
Κυρίως στα ζώα, από τη στιγμή που ζευγαρώνουν ατελώς στη 3' UTR, ο επικρατέστερος τρόπος είναι η καταστολή της μετάφρασης, σε αντίθεση με πολλά miRNA των φυτών που συχνά εμφανίζουν τέλεια συμπληρωματικότητα με τους στόχους τους είτε στην κωδική περιοχή είτε στη 3' UTR και έτσι ακολουθείται ενδονουκλεοτική διάσπαση του στόχου (Εικόνα 11) [70,71,73].



Εικόνα 11: Διαφορές ζώων και φυτών στον τρόπο δημιουργίας και δράσης των miRNAs.

Παρόλο που η τέλεια συμπληρωματικότητα μόνο σε μια περιοχή θεωρείται επαρκής για το διαχωρισμό του mRNA στόχου, έρευνες έχουν δείξει ότι για αποτελεσματική καταστολή μετάφρασης απαιτούνται συνήθως πολλαπλές θέσεις με μερική συμπληρωματικότητα, που αναγνωρίζονται από το ίδιο ή διαφορετικά miRNAs [74-77]. Η μοριακή του εξήγηση παραμένει άγνωστη.

Από τις τέσσερις πρωτεΐνες Argonaute, Ago1-Ago4 μόνο η Ago2 ή Slicer λειτουργεί ως ενδονουκλεάση στο RNAi διαχωρίζοντας το mRNA-siRNA (Εικόνα 12) ενώ όλες φαίνεται να συμμετέχουν στην καταστολή μέσω miRNA μονοπατιού [78-80]. Στη *Drosophila* η dAgo1 συμμετέχει μόνο στο miRNA μονοπάτι και η dAgo2 μόνο στο RNAi [81,82].



Εικόνα 12 : Σύμπλεγμα siRNA-mRNA με τις πρωτεΐνες Argonaute και ο επικείμενος διαχωρισμός τους.

Ο μηχανισμός του RNAi αδιαμφισβήτητα είναι ένα ισχυρό εργαλείο για στοχευμένη αναστολή οποιασδήποτε γονιδιακής έκφρασης. Δίνει τη δυνατότητα να μελετηθεί και να κατανοηθεί η λειτουργία ενός γονιδίου, εμπλέκεται σε αναπτυξιακά προγράμματα, αλλάζει τη δομή της χρωματίνης με μεθυλίωση ή τροποποίηση των ιστονών και στα φυτά μπορεί να επάγει ακόμα και αποσιώπηση σε μακρινά σημεία [83]. Σίγουρα λοιπόν αποτελεί ένα καλό παράδειγμα για να καταλάβουμε τη ρύθμιση των ευκαρυωτικών γονιδίων και επιπλέον, έχει αποκαλύψει ένα καινοτόμο ενδοκυττάριο τρόπο άμυνας εναντίον ιών και τρανσποζονίων.

3. Σκοπός Εργασίας

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν αρκετά ένζυμα που αφαιρούν τις πολυ(A) ουρές από τα 3' άκρα των mRNA. Παρόλα αυτά δεν είναι γνωστός ο ρόλος ύπαρξης πολλών τέτοιων ενζύμων, αν και εικάζεται πως γίνεται για λόγους εξειδίκευσης υποστρωμάτων, ή πως έχουν επικαλυπτόμενες λειτουργίες. Για την αποκάλυψη του ρόλου των διαφόρων αποαδενυλασών επιλέγεται η αποσιώπηση κατά πρώτον και κατά δεύτερον η ανάλυση της κατανομής των επιπέδων έκφρασης των υποστρωμάτων. Στην παρούσα εργασία επιδιώκεται η αποσιώπηση *in vivo* του ενζύμου σε επίπεδο RNA μέσω του ενδοκυττάριου μηχανισμού RNAi. Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά μικρά μόρια RNA (siRNA), έγινε εισαγωγή τους σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα Hep2 και η αποσιώπηση ελέγχθηκε σε επίπεδο πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωση.

4. Υλικά και Μέθοδοι

4.1. Υλικά

1) Χημικά

Acrylamide	Sigma
Antibiotic-Antimycotic	Biosera
APS (Ammonium Persulfate)	Sigma
BCIP/NBT Alkaline Phosphatase System	KPL
Bioquant Protein	Merck
Bis-acrylamide	Sigma
Bromophenol Blue	Research Organics
FBS	Gibco
Full Range Rainbow MW Markers	Amersham
HCl	Merck
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
MEM	Biosera
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaCl	Panreac
NaOH	Merck
Ponceau Red	Sigma
SDS	Sigma
Skimmed Milk	Scharlau
TCA	Fluka
Temed	Research Organics
Trypsin-EDTA 5% 10x	Gibco
Tween 20	Euroclone
Αιθανόλη	Merck
Ακετόνη	Merck
Αμμωνία	Merck
Γλυκερόλη	Panreac
Γλυκίνη	AppliChem
Ισοπροπανόλη	Scharlau
Μεθανόλη	Merck
2-μερκαπτοαιθανόλη	Riedel de Hann

2) Καρκινική Κυτταρική Σειρά

Hep2 p89

3) Θρεπτικά Υλικά

Antibiotic-antimycotic 100x	Biosera
FBS	Biosera
MEM	Biosera

4) Πρωτεΐνες, Ένζυμα και Αντισώματα

Anti-lamin A/C	Signalling
Anti-PARN 74 (gift from Prof. A. Virtanen, Uppsala University, Uppsala, Sweden)	
BSA Fraction V	Merck
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Chemicon

Protease Inhibitors Roche

5) siRNA

siRNA AM11754 Ambion

6) Transfection Reagents

-Lamin A/C kit (AM 4619)
(-) control
siRNA silencer Ambion

-siImporter
siRNA Transfection Reagent
siRNA Diluent Upstate

7) Διαλύματα

- Lysis Buffer (600mM KCl, 20mM Tris-HCl pH=7.8, 20% Glycerol, 4% Protease Inhibitors)
- PBS 1x (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄, 1.47mM KH₂PO₄)
- Κρυοπροστατευτικό Διάλυμα : 10% DMSO, 20% FBS και MEM

i) Θρεπτικά Διαλύματα

MEM (5-10% FBS, 1% Antibiotic-antimycotic)

ii) Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

Stock Διαλύματα

- 30% bis/acrylamide (29:1 / acrylamide:bis-acrylamide) σε ddH₂O
- 10% SDS
- Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl pH 8.8 1M
- Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl pH 6.8 1M
- Ρυθμιστικό Διάλυμα 10x pH 8.3: Tris-base 1,5%, Γλυκίνη 7,2%, SDS 0,5%
- Laemmli Buffer (1M Tris pH 6.8, 10% glycerol, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% bromophenol blue)

Ανάλογα με την περιεκτικότητα σε πολυακρυλαμίδιο και με τη χωρητικότητα της συσκευής αναμειγνύονται οι σωστές αναλογίες των stock διαλυμάτων και στο τέλος γίνεται η προσθήκη των καταλυτών 10% APS και TEMED.

iii) Για βαφή του gel

- Coomassie Brilliant Blue 0,01% (40% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ)
- Destaining Buffer (30% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ)

iv) Διαλύματα για Transfer gel πολυακρυλαμιδίου σε PVDF μεμβράνη

Transfer Buffer (Tris 48mM, Glycine 39mM, SDS 1.3mM, Methanol 20%)

v) Διαλύματα για Detection

- Blotto Buffer (5% Skim Milk, 0,1 % Tween 20 σε PBS)
- PBS-T (0,1% Tween 20 σε PBS)
- ECL : Solution A και B
- ECL : Solution A και B
- Developer Solution Kodac

- Fixer Solution

Kodac

vi) **Διάλυμα για αποσύνδεση αντισωμάτων από PVDF μεμβράνη** Stripping Buffer (2-μερκαπτοαιθανόλη 100mM, 2% SDS, 62.5mM Tris-HCl pH 6.7)

4.2. Μέθοδοι

3.2.1. Σχεδιασμός siRNAs για αποσιώπηση mRNA της PARN

Ο σχεδιασμός δίκλωνων siRNAs έναντι ενός ειδικού γονιδίου απαιτεί τη γνώση τουλάχιστον 20 νουκλεοτιδίων της κωδικής περιοχής του mRNA στόχου. Οι αλληλουχίες ιντρονίων των pre-mRNAs δεν πρέπει να στοχεύονται, γιατί τα μη ματισμένα mRNAs παραμένουν στον πυρήνα σε αντίθεση με το RNAi που επικρατεί, αν όχι αποκλειστικά, στο κυτταρόπλασμα.

Τα siRNAs σχεδιάστηκαν σύμφωνα με τον αλγόριθμο της Ambion. Συγκεκριμένα, δύο επιλέχτηκαν βάσει ορισμένων κριτηρίων (παρατίθενται στη Συζήτηση) ώστε να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της διαμόλυνσης ενώ τα άλλα τρία συντέθηκαν από την ίδια εταιρεία.

3.2.2. Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας με θρυψίνη

Παρατηρήστε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο και σημειώστε:

α.Μορφολογία κυττάρων, β.Πληρότητα ταπητίου (confluency). Απομακρύνετε το υλικό της καλλιέργειας και πλύνετε με διάλυμα PBS 1X. Προσθέστε διάλυμα θρυψίνης-EDTA 0.05% (2ml για φιάλη 75cm² και 1ml για φιάλη 25 cm²). Ανακινείτε τη φιάλη έτσι ώστε το διάλυμα της θρυψίνης να καλύψει όλο το ταπήτιο. Παρατηρείστε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο. Μεταφέρετε τα κύτταρα στον κλίβανο 37°C για περίπου 1-2'. Παρατηρείστε πάλι το σχήμα των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Για να

αποκολληθούν τα κύτταρα χτυπήστε ελαφρά τη φιάλη στο πλάι (flick). Προσθέστε την κατάλληλη ποσότητα υλικού (10ml για φιάλη 75cm² και 5ml για φιάλη 25 cm²) για την επαναιώρηση των κυττάρων και αναδεύστε έντονα τη φιάλη για ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων [84,85,86].

3.2.3.α. Φύλαξη κυττάρων

Ακολουθείται η διαδικασία θρυψινοποίησης κυττάρων (3.2.2). Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 0,5 ml κρουπροστατευτικού υλικού για T25 flask (MEM + 20% FBS+10% DMSO). Για ένα φιαλίδιο (cryovial) απαιτούνται 2 T25 flasks ή 1 T75 flask. Τοποθετείστε μέσα σε cryobox για αργό πάγωμα (1°C/1 min) στους -80°C. Αποθήκευση στους -80°C ή σε υγρό άζωτο [84,85,86].

3.2.3.β. Απόψυξη κυττάρων

Τα αποθηκευμένα φιαλίδια (cryovials) στους -80°C, εμβαπτίζονται αμέσως σε υδατόλουτρο 37°C με ήπια ανάδευση. Αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα γίνεται καθαρισμός του φιαλιδίου με 70% αιθανόλη. Ακολουθεί μεταφορά του αιωρήματος των κυττάρων σε flask και γίνεται προσθήκη υλικού MEM με 10% ορό (FBS) . Τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C για 6-8 ώρες μέχρι να προσκολληθούν (adherent). Προτιμάται η απομάκρυνση του υλικού και η προσθήκη φρέσκου υλικού με 10% ορό [84,85,86].

3.2.4. Διαμόλυνση καρκινικών ανθρώπινων κυττάρων (Transfection)

1. Επιστρώνονται κύτταρα σε 6-well plate μια μέρα πριν τη διαμόλυνση, ώστε την επομένη να υπάρχουν περίπου 180.000 κύτταρα σε κάθε πηγαδάκι(www.ambion.com/siRNA/delivery).
2. Διαλύονται 5μl siRNA Transfection Reagent (www.upstate.com/product/, product number 64-101SP) με 25μl θρεπτικού υλικού (siIMPORTER διάλυμα). Το υλικό να είναι προθερμασμένο σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Αναμειγνύεις με pipetting.
4. Αναμειγνύεις 25μl siRNA Diluent (Upstate) με 10μl θρεπτικού υλικού(siRNA διάλυμα). Προσθέτεις κατόπιν την κατάλληλη ποσότητα siRNA για να έχεις τελική συγκέντρωση 30nM (Ambion).
5. Αναμειγνύεις με pipetting(όχι vortex).
6. Προσθέτεις το siRNA διάλυμα (βήμα 4) με το siIMPORTER διάλυμα (βήμα 2). Επωάζεις σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά (όχι πάνω από 30 λεπτά).
7. Προσθέτεις το μείγμα (βήμα 6) στο 6-well plate με τα κύτταρα. Επωάζεις στους 37°C για 24 ώρες. Ορισμένα κύτταρα μεγαλώνουν καλύτερα αν ο ορός απουσιάζει για τις πρώτες 4 ώρες. Μετά από 4 ώρες μπορεί να γίνει προσθήκη θρεπτικού υλικού με 20% ορό.

Προσέξτε ότι οι παραπάνω ποσότητες είναι υπολογισμένες για ένα πηγαδάκι (well) από ένα 6-well plate για τελικό όγκο 1ml, σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας των αντιδραστηρίων (Upstate). Το θρεπτικό υλικό πρέπει να είναι χωρίς ορό και αντιβιοτικά. Κάθε δείγμα πρέπει να είναι εις τριπλούν: μη διαμολυθέντα κύτταρα (control), κύτταρα διαμολυθέντα με siRNA, όχι ειδικό για κάποια γνωστή αλληλουχία του οργανισμού (αρνητικό control) και κύτταρα διαμολυθέντα με siRNA έναντι της πρωτεΐνης στόχου. Ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκε το lamin A/C kit (Ambion) .

3.2.5. Λύση για κύτταρα θηλαστικών

Εκροφήστε το υλικό από τα κύτταρα και ξεπλύνετε με 1ml κρύο PBS κάθε πηγαδάκι. Απομακρύνετε και ακολουθήστε τη διαδικασία θρυψινοποίησης κυττάρων(3.2.2.) ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα. Ομογενοποιήστε με πιπετάρισμα, ξύστε τα υπόλοιπα κύτταρα και μεταφέρετε σε erpendorf. Τα παραπάνω βήματα πρέπει να γίνουν σε απαγωγό καθέτου νηματικής ροής. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 1λεπτό. Απομακρύνετε προσεχτικά το υπερκείμενο και επαναδιαλύστε το ίζημα σε 25μl 4x lysis buffer, παρουσία αναστολέων πρωτεασών. Παγώστε τα δείγματα σε υγρό άζωτο, μεταφέρετε στους 60°C για 3 λεπτά και αναδεύστε (vortex) .Επαναλάβετε τον παραπάνω κύκλο 3 φορές. Φυγοκεντρήστε σε μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό και κρατήστε το υπερκείμενο [87].

3.2.6. Ανίχνευση πρωτεϊνών με Western blot

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε 10% SDS-τζελ πολυακρυλαμιδίου στα 130V για το separating gel και στα 170V για το running gel. Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται σε PVDF μεμβράνη με τη συσκευή Semidry Transfer System στα 240mA για 25 λεπτά. Βαφή της μεμβράνης με Ponceau red επιβεβαιώνει τη μεταφορά.

Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με Blocking Buffer για 1 ώρα, υπό συνεχή ανάδευση σε rollers. Το πρώτο rabbit anti-PARN74 αντίσωμα προστίθεται σε αραιώση 1:1000 και επωάζεται όλο το βράδυ στους 4°C. Συνεχίζεις με 1 πλύσιμο με Wash Buffer για 1 λεπτό και 2 πλυσίματα με Blocking Buffer για 20 λεπτά το καθένα. Η αραιώση του δεύτερου αντισώματος goat anti-rabbit IgG-HRP αντιστοιχεί σε 1:2000 και η επώασή του γίνεται για 1 ώρα σε rollers. Ακολουθούν 5 πλυσίματα με PBS-T για 10-15 λεπτά το καθένα. Η εμφάνιση ECL ή ECL Plus γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Amersham. Εναλλακτικά, αποτέλεσμα λαμβάνεται επίσης και με τη χρήση δεύτερου αντισώματος συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση. Σε αυτή την περίπτωση, γίνεται ανάμειξη των χρωμογόνων

υποστρωμάτων, BCIP και NBI σε αναλογία 1:1 σε 10 μέρη Tris Buffer Solution. Επώζεις τη μεμβράνη με το διάλυμα υποστρώματος για 10-15 λεπτά ή μέχρι να εμφανιστεί το επιθυμητό χρώμα. Ο τερματισμός της αντίδρασης επιτυγχάνεται με πλύση με dH₂O και φυλάσσεται σε σκοτεινό χώρο.

Για επανάληψη της ανοσοανίχνευσης με το ίδιο αντίσωμα ή για επώαση με διαφορετικό (reprobing), ακολουθείται η διαδικασία της αποσύνδεσης (stripping) των αντισωμάτων σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Amersham.

5. Αποτελέσματα

5.1. Σχεδιασμός siRNAs

Αρχικά, πέντε siRNAs ήταν υποψήφια προς χρήση αλλά επιλέχθηκαν να δοκιμαστούν μόνο τα τρία για ευκολία χρήσης και εξοικονόμηση χρόνου. Παρακάτω παρατίθενται οι αλληλουχίες των δίκλωνων siRNAs με τις αντίστοιχες περιοχές mRNA που στοχεύουν:

1) siRNA 6

Θέση στην αλληλουχία mRNA : 349

Περιεχόμενο GC : 42,9%

Target 22: 5'- AATAGATCCTCACCAGATGTC -3'

Sense siRNA strand: 5'- UAGAUCUCACCAGAUGUCtt -3'

Antisense siRNA strand: 3'- ttAUCUAGGAGUGGUCUACAG -5'

2) siRNA 7

Θέση στην αλληλουχία mRNA : 755

Περιεχόμενο GC : 33,3%

Target 59: 5'- AAAAGAAGGAGCGATATATAG -3'

Sense siRNA strand: 5'- AAGAAGGAGCGAUUAUAUAGtt -3'

Antisense siRNA strand: 3'- ttUUCUCCUCGCUAUAUAUC -5'

3) siRNA 8

Το τρίτο siRNA σχεδιάστηκε και συντέθηκε από την Ambion (www.ambion.com/siRNA, product number AM11754).

Περιεχόμενο GC : 33%

Target: 5' - AAGGTTTTCCAAGTTATGACA -3'
Sense siRNA strand: 5' - GGUUUCCAAGUUUAUGACAtt-3'
Antisense siRNA strand: 3' - ttCCAAAGGUUCAUACUGU -5'

5.2. Διαμόλυνση καρκινικών ανθρώπινων κυττάρων

Η επιτυχία της εισαγωγής των siRNAs φέρει μέγιστης προσοχής για την πραγματοποίηση της αναμενόμενης αποσώπησης. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, ο αριθμός των κυττάρων καθώς και ο τρόπος χειρισμού είναι καθοριστικοί παράγοντες.

Η διαμόλυνση εφαρμόστηκε σε 6-well plates. Δοκιμάστηκαν διαφορετικές πυκνότητες κυττάρων Hep2 : 360.000, 250.000 και 180.000 ανά well για να βρεθεί η βέλτιστη. Τελικά, διαπιστώθηκε, όπως προτείνει και η Ambion, ότι 180.000 κύτταρα ανά ταπήτιο αποτελούν την ευνοϊκότερη συνθήκη. Έτσι, τα κύτταρα είναι βιώσιμα, το ταπήτιο της επόμενης μέρας της επίστρωσης εξασφαλίζει ποσοστό γύρω στο 40-50% ενώ μέχρι και την τελευταία μέρα έκθεσης (96 ώρες) υπάρχει χώρος για διαίρεση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Η συγκέντρωση των siRNAs υπολογίστηκε σύμφωνα με την προτεινόμενη της Ambion, που είναι και η κατασκευάστρια εταιρεία. Για 180.000 Hep2 κύτταρα εισήχθησαν 27 nM ή 67.5 pmol siRNA ανά well. Το πρώτο αντίσωμα anti-PARN καθώς και anti-laminA/C χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:1000.

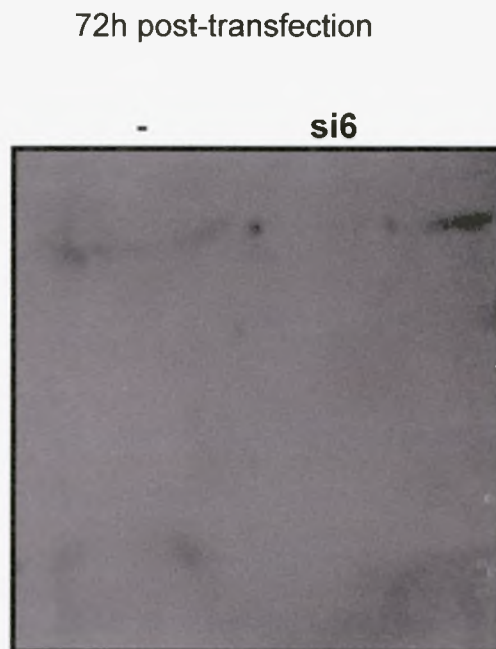
Εισήχθησαν τρία διαφορετικά δίκλινα siRNAs μήκους 21 νουκλεοτιδίων σε κύτταρα Hep2 και διαπιστώθηκε η αποτελεσματικότητα του καθενός χωριστά, όπως επίσης και η συνδυασμένη δράση τους στην αποσώπηση της PARN. Η εισαγωγή πραγματοποιήθηκε απευθείας με διαμόλυνση (transfection) μέσω κατιόντων λιποσωματίου. Ο έλεγχος των αποτελεσμάτων έγινε σε επίπεδο πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωση.

5.3. Έλεγχος φορτώματος

Η ίδια πυκνότητα κυττάρων και η ίδια ποσότητα αντιδραστηρίων που έχουν τοποθετηθεί ανά well καθώς και ότι 'φορτώθηκε' η ίδια ποσότητα κυττάρων στις διαδρομές του τζελ πολυακρυλαμιδίου εξασφαλίζει την εγκυρότητα της σύγκρισης έντασης των ζωνών. Για επιβεβαίωση οι μεμβράνες βάφθηκαν με Rhodamine Red, που δεσμεύεται στις πρωτεΐνες και τις χρωματίζει. Ακόμα, ακολουθήθηκε η διαδικασία αποσύνδεσης αντισωμάτων και επανανίχνευσης με πρώτο αντίσωμα lamin A/C, που αποτελεί δομική πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου, οπότε εκφράζεται συνεχώς και σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους.

5.4. Διαμόλυνση με siRNA 6

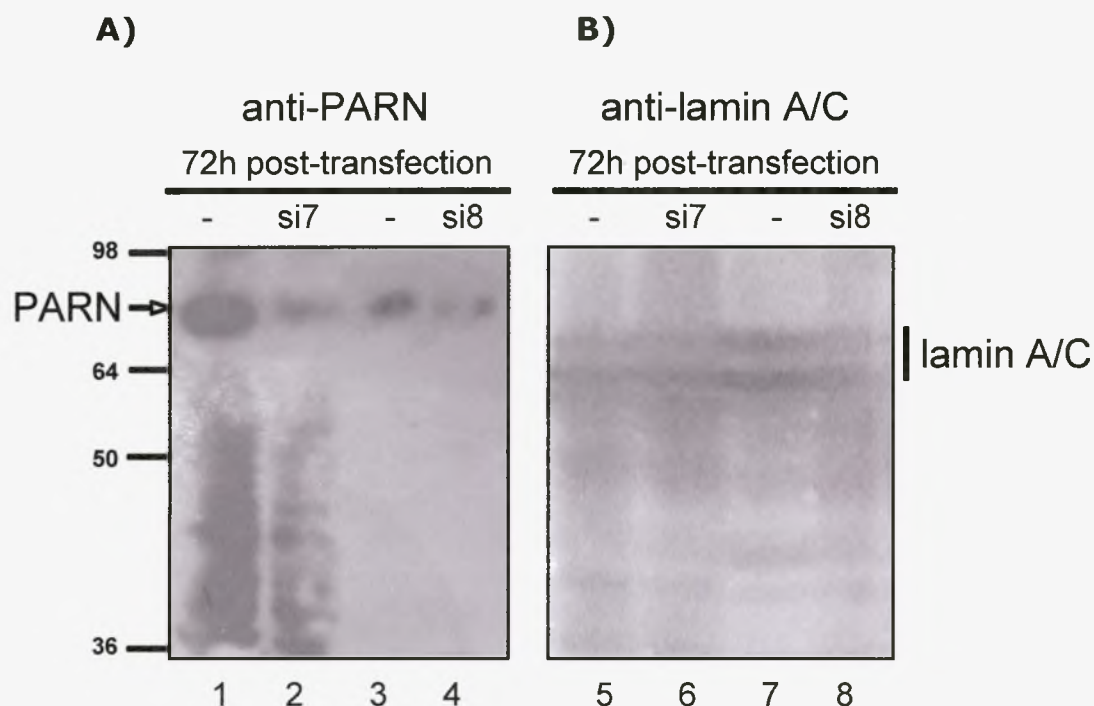
Μια πρώτη εικόνα της επίδρασης των μικρών, δίκλωνων siRNAs λήφθηκε εισάγοντας το siRNA 6 (Εικόνα 13). Η εμφάνιση σήματος έγινε χρησιμοποιώντας το ενζυματικό πρωτόκολλο της αλκαλικής φωσφατάσης.



Εικόνα 13: Διαμόλυνση Hep2 με siRNA 6 και ανοσοαποτύπωση έναντι της PARN με τη μέθοδο της αλκαλικής φωσφατάσης στις 72 ώρες. - : αρνητικό control. si 6 : δείγμα διαμολυσμένο με siRNA 6.

5.5. Διαμόλυνση με siRNA 7 και siRNA 8

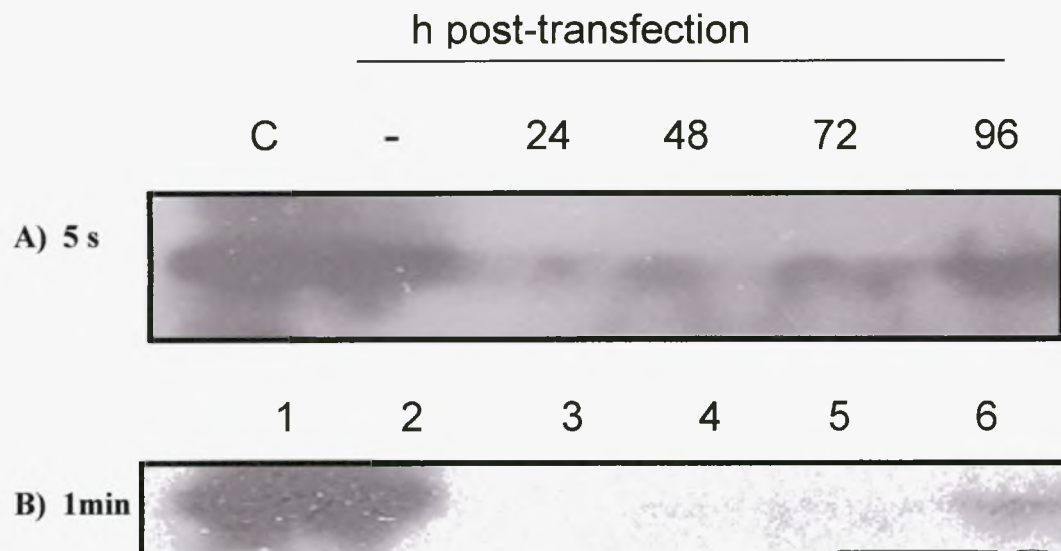
Ακολουθήθηκε διαμόλυνση των Hep2 με τα άλλα δύο siRNAs για να ερευνηθεί καλύτερα η αποσιώπηση του ενζύμου. Αυτή τη φορά η εμφάνιση της ανοσοαποτύπωσης έγινε με το ECL PLUS, μιας βελτιωμένης μη ραδιοενεργής μεθόδου. Η εμφάνιση σήματος χημειοφωταύγειας στηρίζεται στην οξείδωση της λουμινόλης από horseradish υπεροξειδάση (HRP) συνδεδεμένης με αντίσωμα (Εικόνα 14).



Εικόνα 14 : Διαμόλυση με siRNA 7 και siRNA 8 ξεχωριστά και ανοσοαποτύπωση έναντι A) της PARN και B) της lamin A/C με ECL PLUS.-:αρνητικό control. si7 & si8 : δείγματα διαμολυσμένα με siRNA 7 και 8, αντίστοιχα. Η ίδια μεμβράνη έχει υποστεί αποσύνδεση και επανανίχνευση με lamin A/C.

5.6. Συνδυασμός των τριών siRNAs έναντι της PARN

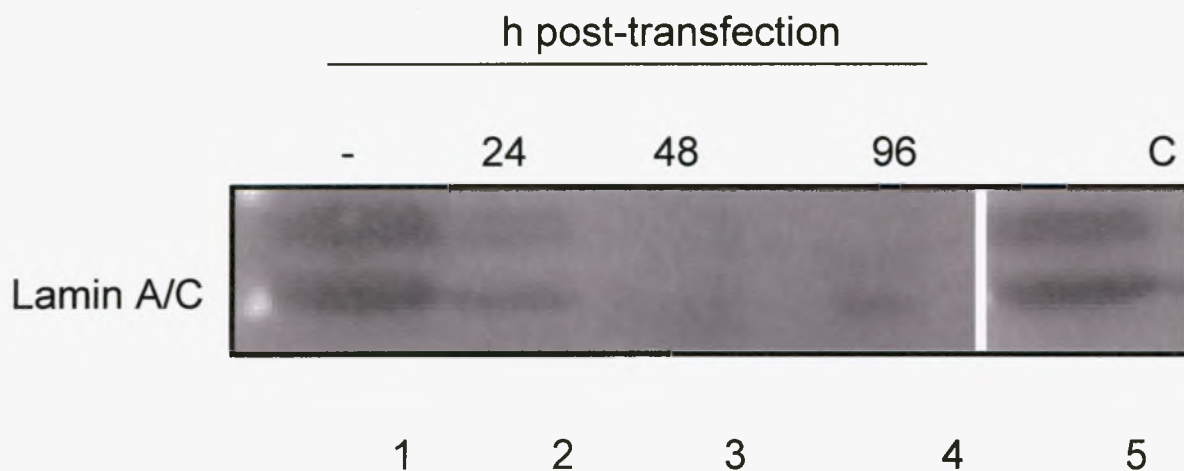
Πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη διαμόλυση και με τα τρία siRNAs και ελέγχθηκε η δράση τους (Εικόνα 15). Λόγω συνδυασμού των τριών siRNAs αναμείχθηκαν 1.5 μl από το καθένα ώστε και πάλι η τελική συγκέντρωση να είναι 27 nM siRNA/well. Η εμφάνιση των επιπέδων της πρωτεΐνης έγινε με ECL PLUS σε διαφορετικούς χρόνους έκθεσης των φιλμ : 5 δευτερόλεπτα αρχικά και στη συνέχεια 1 λεπτό.



Εικόνα 15 : Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι PARN. Κύτταρα Hep2 διαμολύνθηκαν με τρία διαφορετικά siRNAs για χρόνους που δείχνονται στο άνω μέρος (διαδρομές 3-6). Έκθεση μεμβράνης σε φιλμ για A) 5' και B) 1 min. Διαδρομές 1: μη διαμολυσμένα κύτταρα (C), 2: αρνητικός μάρτυρας 24 ωρών (-), 3-6: διαμόλυνση για 24, 48, 72 και 96h, αντίστοιχα.

5.7. Έλεγχος με μάρτυρες (controls)

Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν θετικό και αρνητικό control έναντι της lamin A/C (Ambion) (Εικόνα 16). Τα αποτελέσματα του αρνητικού μάρτυρα αντικατοπτρίζουν αυτά των μη διαμολυσμένων κυττάρων.



Εικόνα 16 : Έλεγχος απόδοσης διαμόλυνσης με θετικό και αρνητικό control έναντι lamin A/C. -:αρνητικό control.24-96: σίγηση λαμίνης σε 24,48,96 ώρες(θετικό control).C : μη διαμολυσμένα κύτταρα.

6. Συζήτηση

6.1 Σχεδιασμός siRNAs

Η αποσιώπηση της PARN επιτεύχθηκε σε καλλιέργειες καρκινικών ανθρώπινων κυττάρων με τη χρήση δίκλωνων siRNAs. Προηγούμενες έρευνες αναφέρουν ότι για την επιτυχή έκβαση καταστολής της γονιδιακής έκφρασης η δομή των siRNAs απαιτεί να ακολουθεί κάποιους κανόνες. Η δίκλωνη μορφή, ο μικρός αριθμός μορίων που εισάγεται ανά κύτταρο [41] και το καθορισμένο μήκος των 20-22 νουκλεοτιδίων [88] αποτελούν βασικές προϋποθέσεις για στοχευμένη αποσιώπηση.

Η εισαγωγή δίκλωνων siRNA, αποτελούμενα από 21 νουκλεοτίδια στη νοηματική και 21 νουκλεοτίδια στην αντι-νοηματική αλυσίδα και συμπληρωματικά με τέτοιο τρόπο ώστε στα 3' άκρα τους να υπάρχουν 2 αζευγάρωτα νουκλεοτίδια επιτεύχθηκε τόσο σε ομογενοποιημένα εμβρύων *Drosophila melanogaster* [88] όσο και σε κύτταρα θηλαστικών, παρόλο ορισμένων διαφορών [89].

Συγκεκριμένα, οι περιοχές-στόχοι επιλέχτηκαν στη cDNA αλληλουχία της PARN, από τη βάση δεδομένων του NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/Database.html) ξεκινώντας 50-100 νουκλεοτίδια καθοδικά του κωδικονίου έναρξης [90]. Αν και παλαιότερα αποφεύγονταν οι 3' μη κωδικές περιοχές, σε πρόσφατα πειράματα [91] δεν παρουσιάστηκαν προβλήματα στοχεύοντας είτε περιοχές του αναγνωστικού πλαισίου είτε της 3' μη κωδικής περιοχής. Οι περιοχές ακολουθούν το μοτίβο NA(N21), όπου N: οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο και το GC περιεχόμενο κυμαίνεται σε 30-50% [90,92] γιατί υψηλότερο του 50% τις καθιστά λιγότερο ενεργές [90]. Η δευτεροταγής δομή φαίνεται να μην επηρεάζει την ικανότητα αποσιώπησης καθώς πάνω από 20 γονίδια μέχρι το 2004, είχαν επιτυχία με την επιλογή και μόνο ενός απαραίτητως μοναδιαίου δίκλωνου siRNA [93].

Τα αζευγάρωτα 2 νουκλεοτίδια στο 3' άκρο της αλυσίδας siRNA δε συνεισφέρουν στην ειδικότητα αναγνώρισης του στόχου ενώ κακό ταίριασμα ή μοναδιαία μετάλλαξη στο κέντρο του μπορούν να εμποδίσουν την αποικοδόμηση του mRNA στόχου [88]. Στα 3' άκρα χρησιμοποιήθηκε 2'-δεοξυθυμιδίνη που προτιμάται σε σχέση με τα κατάλοιπα ουριδίνης

λόγω χαμηλότερου κόστους, μεγαλύτερης αποτελεσματικότητας και συγχρόνως ίδιας αποτελεσματικότητας. Ακόμα, ο σχεδιασμός δίκλωνων siRNA με συμμετρικά TT άκρα εξασφαλίζει ότι το RISC σχηματίζεται από περίπου ίση αναλογία νοηματικών και συμπλόκων αντι-νοηματικών αλυσίδων με RNA στόχους [88,91]. Επειδή τα 5' μη φωσφορυλιωμένα siRNA δεν επιδρούν αρνητικά στη λειτουργία τους συντέθηκαν χωρίς 5'-φωσφορική ομάδα.

Τέλος, ο σχεδιασμός των siRNA έναντι της PARN συγκρίθηκε με miRNA του ανθρώπου από τις γενωμικές βάσεις δεδομένων (<http://microna.sanger.ac.uk/targets/>) και (<http://cbio.mskcc.org/cgi-bin/mirnaviewer/mirnaviewer>) που εφόσον εκφράζονται στον οργανισμό είναι αναμφίβολα αποτελεσματικά. Για την εξασφάλιση ότι τα επιλεγμένα siRNAs στοχεύουν μόνο το mRNA της PARN εφαρμόστηκε το πρόγραμμα Blast-search (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

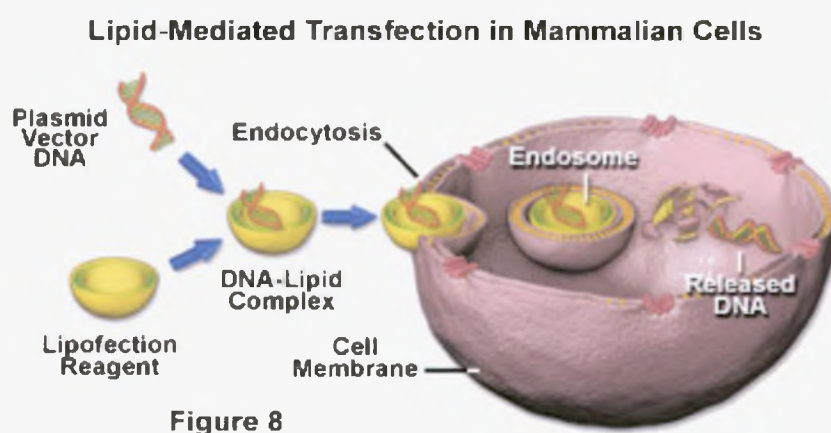
Στο miRNA μονοπάτι η συμπληρωματικότητα miRNA-mRNA μόνο σε μια περιοχή θεωρείται επαρκής. Ωστόσο, για αποτελεσματική καταστολή μετάφρασης απαιτούνται συνήθως πολλαπλές θέσεις που να αναγνωρίζονται από ίδιο ή διαφορετικά miRNA [74-77]. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι δύο λειτουργικά siRNAs πρέπει να χρησιμοποιούνται ανεξάρτητα στον ίδιο στόχο. Με αυτό τον τρόπο, εξασφαλίζεται ότι το αποτέλεσμα προέκυψε από την αποσιώπηση του γονιδίου-στόχου και όχι ενός μη στοχευμένου γονιδίου.

Παράλληλα, χρήση siRNAs έχει εφαρμοστεί για τη μελέτη της δράσης και λειτουργίας της PARN όπου και βρέθηκε ότι τα ελαττωμένα επίπεδα έκφρασης της αυξάνουν τα επίπεδα ορισμένων mRNAs (non-sense containing mRNAs) [94]. Βάσει των παραπάνω, ακολουθήθηκε ο σχεδιασμός των siRNAs έναντι της PARN. Χρησιμοποιήθηκαν τρία δίκλινα siRNAs 21 νουκλεοτιδίων, με TT-αζευγάρωτα νουκλεοτίδια στα 3' άκρα και με GC περιεχόμενο 30-50% περίπου ώστε να είναι λειτουργικά. Οι στόχοι επιλέχτηκαν τυχαία είτε μέσα από το αναγνωστικό πλαίσιο είτε από τη 3' μη κωδική περιοχή.

6.2. Διαμόλυνση καρκινικών ανθρώπινων κυττάρων

In vivo, η εισαγωγή δίκλωνων siRNA επιτεύχθηκε εύκολα στη *D. melanogaster* και σε ανθρώπινα σωματικά κύτταρα, εφαρμόζοντας τη μέθοδο της διαμόλυνσης (transfection) με κατιόντα λιποσωματίου [95]. Αυτή η τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί σε κάθε γονιδιακό προϊόν όπως έχει διαπιστωθεί από πρόσφατες έρευνες [93]. Η εξωγενής παροχή των δίκλωνων siRNA μέσω λιποσωματίων υπερτερεί έναντι άλλων αντιδραστηρίων γιατί το λιπόσωμα δεν είναι κυτταροτοξικό, δε χρειάζεται να αλλαχθεί το υλικό μετά τη διαμόλυνση ενώ η αποτελεσματικότητά του είναι περίπου 90-95% [90].

Η απόδοση της διαμόλυνσης εξαρτάται από την κυτταρική σειρά, την πληρότητα του ταπητίου και τον αριθμό ανακαλλιέργειας (passage number) . Επίσης, ο χρόνος και ο τρόπος σχηματισμού των συμπλόκων siRNA -λιπόσωμα (π.χ. με έντονη ή ήπια ανάδευση) καθώς και τα διαφορετικά κατιόντα λιποσωματίων που είναι διαθέσιμα στην αγορά, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο.



Εικόνα 17 : Διαμόλυνση μέσω λιποσωματίου σε κύτταρα θηλαστικών.

Στην παρούσα εργασία η επιλογή των αντιδραστηρίων, η σχεδίαση των siRNAs και γενικά, ο τρόπος που διεκπεραιώθηκε η διαμόλυνση απέδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η χρήση του κατιονικού λιποσωματίου (Upstate) για την άμεση εισαγωγή των δίκλωνων siRNAs (Ambion) ήταν

απλή και εύκολη, χωρίς ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Επιπλέον παράγοντες που συνέβαλαν ήταν το είδος της κυτταρικής σειράς, Hep2, η συγκέντρωσή τους, 180.000 κύτταρα ανά ταπήτιο καθώς και η ποσότητα siRNA, 27nM.

6.3. Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αποσιώπηση της PARN επιτεύχθηκε στις 24-72 ώρες ενώ τα επίπεδα του ενζύμου επανέρχονται στις 96 ώρες. Ο μέγιστος βαθμός σίγησης ωστόσο συναντάται στις 72 ώρες. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η PARN αποτελεί ένζυμο που δεν εκφράζεται ιδιοστατικά αλλά στις συγκεκριμένες συνθήκες που έχει ανάγκη το κύτταρο. Οπότε, τα εισαγόμενα siRNAs υβριδίζουν με τη συμπληρωματική τους περιοχή και προκαλούν σχεδόν άμεση αποσιώπηση. Στη συνέχεια, τα siRNAs αποικοδομούνται ενδοκυττάρια, η διαδικασία της μετάφρασης δεν εμποδίζεται και η πρωτεΐνη επανέρχεται στα φυσιολογικά της επίπεδα. Ακόμα, η αποτελεσματικότητα του RNAi εξαρτάται από το χρόνο ζωής του mRNA, τον τόπο δράσης του ενζύμου και την ευαισθησία προσβολής από εξωγενείς παράγοντες.

Το siRNA 6 απέδωσε μια πρώτη εκτίμηση της αποτελεσματικότητας του RNAi μονοπατιού, αν και όχι τόσο ξεκάθαρη (Εικόνα 13). Ικανοποιητικές εικόνες έδωσαν τόσο το siRNA 7 όσο και το siRNA 8, όπου έγινε φανερός ο βέλτιστος χρόνος δράσης των μικρών, δίκλωνων μορίων RNAs. Συγκεκριμένα, δείξαμε ότι οι 72 ώρες συγκεντρώνουν τη μέγιστη απόδοση αποσιώπησης σε ποσοστό περίπου 70% και 80% για το siRNA 7 και το siRNA 8, αντιστοίχως (Εικόνα 14).

Ο συνδυασμός των τριών siRNAs αναμενόμενα πέτυχε αποδοτικότερη αποσιώπηση του ενζύμου (Εικόνα 15). Αυτό στηρίζεται στο γεγονός ότι όταν διαφορετικά siRNAs υβριδίζουν σε διαφορετικά σημεία της ίδιας αλληλουχίας, καταφέρνουν σε μεγαλύτερο ποσοστό να καταστείλουν την πορεία της μετάφρασης [90]. Παράλληλα, το φαινόμενο του siRNA όπως παρατίθεται στα αποτελέσματα είναι σχετικά σταθερό κατά

το πέρασμα του χρόνου και η αποσιώπηση διατηρείται σε αρκετές κυτταρικές γενιές [92].

Το control lamin A/C που χρησιμοποιήθηκε εξασφαλίζει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Έτσι, με το θετικό control ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης παρακολουθώντας τα επίπεδα της λαμίνης, πρωτεΐνης που εντοπίζεται εύκολα καθώς εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα μέσα στα κύτταρα θηλαστικών. Με το αρνητικό control ελέγχθηκαν τυχόν αλλαγές στο προφίλ έκφρασης των γονιδίων, που πιθανόν να προέκυπταν από την υποβολή του κυττάρου στη διαμόλυνση. Ακόμα, έτσι είναι δυνατό να ελεγχθούν και μη ειδικές επιδράσεις του siRNA [96].

Τα siRNAs λοιπόν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καταστείλουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω του RNAi μονοπατιού. Η εφαρμογή τους στα θηλαστικά δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης και ενισχύει την πιθανότητα για θεραπεία μέσω γονιδιακής σίγησης. Η υπόσχεση αυτή εξαρτάται από την πρόοδο που θα σημειωθεί στο μηχανισμό RNAi με την τεχνολογία των μικρών δίκλωνων RNAs [97].

Η εφαρμογή τους στην παρούσα εργασία συνέβαλλε καταλυτικά στην αποσιώπηση της πολύ(A) εξωριβονουκλεάσης, PARN in vivo σε καλλιέργειες κυττάρων. Μελλοντικά, η σκέψη είναι να επιτευχθεί και μόνιμη αποσιώπηση in vivo ώστε να τονιστεί ο ιδιαίτερος ρόλος αυτής της αποαδενυλάσης για το χρόνο ζωής των mRNAs (mRNA turnover) και κατά συνέπεια, για τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου.

7. Βιβλιογραφία

1. Hoof van, A. & Parker, R. (1999). *Cell* 99, 347–350.
2. Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. & Sharp, P.A. (2003). *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 457–467.
3. Maquat, L.E. & Carmichael, G.G. (2000). *Cell* 26, 173–176.
4. Tucker, M. & Parker, R. (2000). *Annu. Rev. Biochem.* 69, 571–595.
5. Mitchell, P. & Tollervey. *Curr. Opin.* (2001). *Cell Biol.* 13,320–325.
6. Anderson, J.S.J. & Parker, R. (1998). *EMBO J.* 17, 1497–1506.
7. Chen, C.Y. *et al.* (2001). *Cell* 107, 451–464.
8. Wang, Z. & Kiledjian, (2001).M. *Cell* 107, 751–762.
9. Mukherjee, D. *et al.* (2002).*EMBO J.* 21, 165–174.
10. Liu, H., Rodgers, N.D., Jiao, X. & Kiledjian. (2002).M. *EMBO J.* 21, 4699–4708.
11. Dodson, R.E. & Shapiro, D.J. (2002). *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72, 129–164.
12. Moore, M.J. (2002).*Cell* 108, 431–434.
13. Muhlrad, D. & Parker, R. (1994). *Nature* 370, 578–581.
14. Cao, D. & Parker, R. (2003). *Cell* 113, 533–545.
15. Mitchell, P. & Tollervey, D. (2003).*Mol. Cell* 11, 1405–1413.
16. Takahashi, S., Araki, Y., Sakuno, T. & Katada, T. (2003).*EMBO J.* 22, 3951–3959.
17. Frischmeyer, P.A. *et al.* (2002). *Science* 295, 2258–2261.
18. Van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C. & Parker, R. (2002). *Science* 295, 2262–2264.
19. Astrom J, Astrom A, Virtanen A. (1992) . J Biol Chem 267: 18154–18159.
20. Korner CG, Wahle E .(1997) . J Biol Chem 272:10448–10456.
21. Moser MJ, Holley WR, Chatterjee A, Mian IS (1997). *Nucleic Acids Res* 25:5110–5118.
22. Zuo Y, Deutscher MP (2001). *Nucleic Acids Res* 29:1017–1026.
23. Parker R, Song H (2004) . *Nat Struct Mol Biol* 11: 121–127.
24. Grishin NV (1998). *Trends Biochem Sci* 23: 329–330.
25. Martinez J, Ren YG, Nilsson P, Ehrenberg M, Virtanen A (2001). *J Biol Chem* 276:27923–27929.
26. Martinez J, Ren YG, Thuresson AC, Hellman U, Astrom J, Virtanen A (2000). *J Biol Chem* 275: 24222–24230.
27. Ren YG, Kirsebom LA, Virtanen A (2004).*J Biol Chem* 279: 48702–48706.
28. Ren YG, Martinez J, Virtanen A (2002). *J Biol Chem* 277: 5982–5987.
29. Dehlin E, Wormington M, Korner CG, Wahle E (2000). *EMBO J* 19: 1079–1086.
30. Gao M, Fritz DT, Ford LP, Wilusz J (2000). *Mol Cell* 5: 479–488.
31. Moushen Wu *et al.* (2005).*EMBO J.*, 1–12.
32. Lai WS, Kennington EA, Blackshear PJ (2003). *Mol Cell Biol* 23: 3798–3812.
33. Lejeune F, Li X, Maquat LE (2003). *Mol Cell* 12: 675–687.
34. Korner CG, Wormington M, Muckenthaler M, Schneider S, Dehlin E, Wahle E (1998). *EMBO J* 17: 5427–5437.
35. Copeland PR, Wormington M (2001). *RNA* 7: 875–886.

36. Chiba Y, Johnson MA, Lidder P, Vogel JT, van Erp H, Green PJ (2004). *Gene* 328: 95–102.
37. Reverdatto SV, Dutko JA, Chekanova JA, Hamilton DA, Belostotsky DA (2004). *RNA* 10: 1200–1214.
38. Carrington, J. and Ambros, V. (2003). *Science* 301, 336–338.
39. Lisa J. Scherer and John Rossi. (2003). Volume 21, Number 12, 1457–1465.
40. *Pharmaceutical Journal*. (1999). 263, 542–543.
41. Fire, A. et al. (1998). *Nature* 391, 806–811.
42. Elbashir, S.M. et al. (2001). *Nature* 411, 494–498.
43. Caplen et al. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9747–9747.
44. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. (2001). *Nature* 409, 363–366.
45. Schauer et al. (2002). *Trends Plant Sci.* 7, 487–491.
46. Papp et al. (2003). *Plant Physiol.* 132, 1382–1390.
47. Shinagawa and Ishii. (2003). *Genes Dev.* 17, 1340–1345.
48. Carmel et al. (2002). *Nature Struct. Biol.* 10, 91–92.
49. Park et al. (2002). *Curr. Biol.* 12, 1484–1495.
50. Boutet et al. (2003). *Curr. Biol.* 13, 843–848.
51. Grishok, A. et al. (2001). *Cell* 106, 23–34.
52. Ambros et al. (2003). *RNA* 9, 277–279.
53. Ambros, V. (2004). *Nature* 431, 350–355.
54. Bartel, D.P. (2004). *Cell* 116, 281–297.
55. Wienholds, E. and Plasterk, R.H. (2005). *FEBS Lett.* 579, 5911–5922.
56. Alvarez-Garcia, E. A. Miska, (2005). *Development* 132, 4653.
57. Johnson et al. (2003). *Dev. Biol.* 259, 364–379.
58. R. C. Lee, R. L. Feinbaum, V. Ambros, (1993). *Cell* 75, 843.
59. B. J. Reinhart et al., (2000). *Nature* 403, 901.
60. J. Giraldez et al., *Science* 308, 833 (2005); published online 17 March 2005 (10.1126/science.1109020).
61. P. Y. Chen et al., (2005). *Genes Dev.* 19, 1288.
62. A.J. Giraldez et al. (2006). *Science* 312, 75–79.
63. Kimmel et al. (1995). *Dev. Dyn.* 203, 253–310.
64. Aufsätze (2002). *EMBO J.* 21, 6832–6841.
65. Q. Jing et al., (2005). *Cell* 120, 623.
66. Lim et al (2003). *Science* 299, 1540.
67. Hamilton and Baulcombe, (1999). *Science* 286, 950–952.
68. Hammond et al (2000). *Nature* 404, 293–296.
69. Olson and Ambros (1999). *Dev. Biol.* 216, 671–680.
70. Llave et al. (2002b). *Science* 297, 2053–2056.
71. Kasschau et al. (2003). *Dev. Cell* 4, 205–217.
72. Ramesh S. Pillai, Suvendra N. Bhattacharyya and Witold Filipowicz. (2007), *Trends in Cell Biology* 17, 118–126.
73. Tang et al. (2003). *Genes Dev.* 17, 49–63
74. Kim, V.N. (2005). *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 376–385.
75. Tomari, Y. and Zamore, P.D. (2005). *Genes Dev.* 19, 517–529.
76. Zamore, P.D. and Haley, B. (2005). *Science* 309, 1519–1524.
77. Filipowicz, W. (2005). *Cell* 122, 17–20.
78. Meister, G. et al. (2004). *Mol. Cell* 15, 185–197
79. Liu, J. et al. (2004). *Science* 305, 1437–1441
80. Pillai, R.S. et al. (2004). *RNA* 10, 1518–1525
81. Okamura, K. et al. (2004). *Genes Dev.* 18, 1655–1666

- 82.Miyoshi, K. et al. (2005) . *Genes Dev.* 19, 2837–2848
- 83.Mlotshwa et al (2002). *Plant Cell* 14 Suppl., S289-S301
- 84.Freshney, R.I.(1993). *Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique.*3rd ed. New-York: Wiley-Liss.
- 85.Ausubel, F.M. et al. (1991). *Current Protocols in Molecular Biology.* New York: Wiley Interscience.
- 86.Spector D. , Goldman, R.R. and Leinwand.(1998). *Cells: a Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 87.Rudolph et al.(1999). *Anal Biochem* 269, 66-71.
- 88.S.M.Elbashir et al.(2001). *EMBO J.* 20, 6877-6888.
- 89.N.J. Caplen et al.(2001). *Acad Sci.USA* 98, 9742-9747.
- 90.S.M.Elbashir, Jens Harborth, Klaus Weber and T. Tuschl.(2002). *Academic Press, Methods* 26, 199-213.
- 91.S.M.Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl. (2001). *Genes Dev.* 15, 188-200.
- 92.Tuschl Lab. (2004). *The siRNA user guide.* AG 05 Tuschl:siRNA. J.
- 93.Harborth et al. (2001). *Cells Sci.* 114, 4557-4565.
- 94.F.Lejeune, Xiaojie Li and Lynne E. Maquat. (2003),*Molecular Cell* 12, 675-687.
- 95.S.M. Elbashir et al. (2001).*Nature* 411, 494-498.
- 96.Editorial *Nature Cell Biology* 5,489-490.
- 97.Derek M. Dykxhoorn, Carl D. Noviva and Phillip A. Sharp. (2003). *Mol. Cell Bio.* 4,457-467.

