



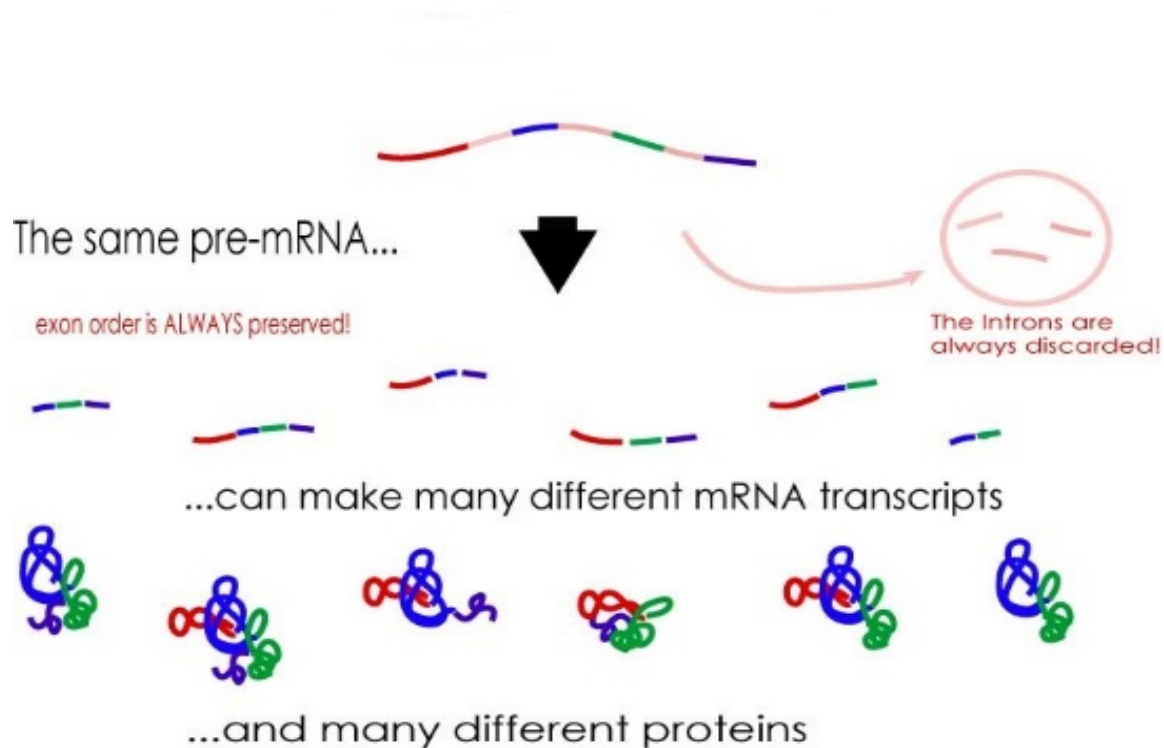
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Αναζήτηση εναλλακτικών μεταγράφων της Πολυ(Α)-εξειδικευμένης Ριβονουκλεάσης και διερεύνηση της βιολογικής τους σημασίας

Διονύσης Αντωνόπουλος



Λάρισα 2015

**Αναζήτηση εναλλακτικών μεταγράφων της Πολυ(Α)-
εξειδικευμένης Ριβονουκλεάσης και διερεύνηση της
βιολογικής τους σημασίας**

**Poly(A) specific Ribonuclease alternative transcripts
and their biological significance**

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

- Μπαλατσός Νικόλαος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Σαραφίδου Θεολογία: Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών,
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Σκαμνάκη Βασιλική: Λέκτορας Βιοχημείας και Μεταβολισμού
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
Abstract.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Το εναλλακτικό μάτισμα.....	9
1.1.1 Γενικά.....	9
1.1.2 Ο ρόλος του εναλλακτικού ματίσματος σε φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες.....	10
1.1.3 Η δομή του spliceosome και ο βιοχημικός μηχανισμός του ματίσματος.....	11
1.1.4 Οι κατηγορίες του εναλλακτικού ματίσματος.....	15
1.1.5 Η εξέλιξη του μηχανισμού του εναλλακτικού ματίσματος και των εναλλακτικών εξονίων.....	16
1.1.6 Ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος.....	20
1.1.7 Συνδυαστική ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος.....	25
1.1.8 Ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος μέσω μηχανισμών της μεταγραφής.....	27
1.1.9 Μοριακή βάση γενετικών ασθενειών που οφείλονται σε λάθη στο εναλλακτικό μάτισμα.....	30
1.1.10 Ο ρόλος του εναλλακτικού ματίσματος στον καρκίνο.....	32
1.1.11 Στόχευση του ματίσματος ως θεραπεία γενετικών ασθενειών.....	34
1.2 Οι 5΄μη μεταφραζόμενες περιοχές του mRNA.....	38
1.3 Η ρυθμιστική δράση των εναλλακτικών 5΄αμετάφραστων περιοχών.....	40
1.4 Η αποαδενυλάση PARN.....	41
1.5 Η ρυθμιστική δράση των miRNAs.....	43
1.6 Σκοπός εργασίας.....	46
2 ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ.....	47
2.1 Κυτταρικές σειρές.....	47
2.2 Απομόνωση ολικού RNA με το πρωτόκολλο Tri Reagent της Sigma Aldrich.....	47
2.3 Απομόνωση ολικού RNA και πρωτεϊνών με nucleospin Triprep της Macherey Nagel.....	48
2.3.1 Επιπρόσθετη πέψη με δεοξυριβονουκλεάση και καθαρισμός με Sodium Acetate Precipitation of Small Nucleic Acids της Life technologies	50
2.4 Παραγωγή cDNA με 1 st strand cDNA kit της TAKARA.....	51
2.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR).....	52
2.6 Ανάλυση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.....	55
2.7 Αποκοπή και καθαρισμός μπάντας Gel αγαρόζης kit PCR cleanup Gel extraction Macherey-Nagel.....	57
2.8 Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.....	58

2.9 Βιοπληροφορική πρόβλεψη πιθανών στόχων miRNA με το πρόγραμμα PITA.....	61
2.10 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF και Ανοσοανίχνευση.....	61
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	65
3.1 Σχεδιασμός εκκινητών.....	65
3.2 Αναζήτηση εναλλακτικών μεταγράφων σε 9 κυτταρικές σειρές.....	69
3.3 Αλληλούχιση των προϊόντων PCR και βιοπληροφορική επαιξεργασία.....	71
3.4 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων της PARN σε συνθήκες στέρησης ορού.....	74
3.5 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης του miR-1207 σε συνθήκες έλλειψης ορού.....	76
3.6 Ανοσοαποτύπωση PARN σε δείγματα πρωτεϊνών M14k κυττάρων σε κανονικές συνθήκες, και σε συνθήκες στέρησης ορού.....	78
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	79
Προοπτικές.....	82
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	83

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της εκπόνησης μεταπτυχιακής διατριβής του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας: «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας – Μοριακή Γενετική, Διαγνωστικοί Δείκτες».

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για την επίβλεψη της διπλωματικής μου εργασίας. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή της διπλωματικής μου εργασίας κ. Νικόλαο Μπαλατσό, επίκουρο καθηγητή στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας για την καθοδήγηση και επίβλεψη κατά τη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κ. Σαραφίδου Θεολογία, επίκουρο καθηγήτρια στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την εξαιρετικά σημαντική συμβολή της στο βιοπληροφορικό μέρος της διπλωματικής μου εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον φίλο μου υποψήφιο διδάκτορα Θάνο Κυρίτση για την πολύτιμη βοήθεια του, καθώς και όλους τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και υποψήφιους διδάκτορες για τη βοήθεια και συνεργασία.

Περίληψη

Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το εναλλακτικό μάτισμα είναι ένας σημαντικός μηχανισμός διεύρυνσης της κωδικοποιητικής ικανότητας των γονιδιωμάτων τους. Το 95% των ανθρώπινων γονιδίων μπορεί να εκφράσει πάνω από ένα μετάγραφο. Οι διαφορές μεταξύ των εναλλακτικών μεταγράφων κυμαίνονται από μικρές διαφορές στη ρύθμισή τους έως δραματικές διαφορές στην πρωτεϊνική δράση. Η απορρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος ρυθμιστικών γονιδίων έχει δείχθει πως παίζει σημαντικότατο ρόλο στα μετέπειτα στάδια του καρκίνου και κυρίως στη μετάσταση αλλά και στην εμφάνιση διαφόρων γενετικών ασθενειών. Η πολυ(A) εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN) είναι ένα ρυθμιστικό γονίδιο που παίζει ρόλο στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης. Η PARN έχει δράση αποαδενυλάσης καταλύοντας την 3' προς 5' εξονουκλεολυτική αποικοδόμηση της πολυ(A) ουράς συγκεκριμένων mRNAs.

Στην παρούσα εργασία ερευνήθηκε η έκφραση εναλλακτικών μεταγράφων της PARN. Για αυτό το σκοπό έγινε βιοπληροφορική ανάλυση με ESTs και βρέθηκε μια πιθανή εναλλακτική περιοχή. Για την πειραματική αναζήτηση του παραπάνω ευρήματος συλλέχθηκαν δείγματα από 9 κυτταρικές σειρές από τις οποίες απομονώθηκε RNA για την παραγωγή cDNA. Στα δείγματα cDNA έγιναν PCR με εκκινητές που σχεδιάστηκαν εντός και εκατέρωθεν της εναλλακτικής περιοχής έτσι ώστε η έκφραση κάθε εναλλακτικού μεταγράφου να παράγει προϊόν διαφορετικού μήκους. Με αυτό τον τρόπο βρέθηκε ότι στις κυτταρικές σειρές M14K και MCF7 δύο εναλλακτικά μετάγραφα της PARN συνεκφράζονται. Στη συνέχεια έγινε μελέτη της έκφρασης των δύο μεταγράφων. Με το πρόγραμμα PITA βρέθηκε ότι το miR-1207-5p πιθανώς να συνδέεται στο 5' UTR ενός μόνο εκ των δύο εναλλακτικών μεταγράφων. Έτσι εξετάσαμε την αλλαγή των επιπέδων έκφρασης αυτών των μεταγράφων και του miR-1207 σε κύτταρα M14K μετά από στέρηση ορού qRT-PCR. Τέλος έγινε οπτικοποίηση των δύο ισομορφών της PARN με στύπωμα κατά Western.

Abstract

Alternative splicing is a mechanism that has played a critical role in the expansion of the coding capacity of the higher eukaryote's genome. It has been shown that the 95% of the human genes encode multiple transcripts, the functional differences between them vary widely ranging from subtle regulatory differences to dramatic differences in their protein function. Deregulation of alternative splicing, especially in regulatory genes, has been shown to be a major factor in the later stages of cancer such as metastases and to be a causal factor in several genetic diseases. Poly(A) dependent ribonuclease (PARN) is a regulatory gene that has been shown to play a very important role in post transcriptional gene regulation. PARN is a 3'-5' deadenylase that catalyzes the exonucleolytic removal of the mRNA poly(A) tail.

In the present work we looked into the expression of the alternative transcripts of the PARN gene. To this end we performed a bioinformatics analysis looking for ESTs that can hint alternatively spliced regions and we found one such region. To test the aforementioned findings we isolated total RNA from 9 different cell lines from which we synthesized cDNA. PCR primers were designed to bind on the cDNA inside and on both sides of the putative alternative region. This way it was discovered that two alternative transcripts are coexpressed in M14K and MCF7 cell lines. Then we examined the expression of the two transcripts. We found with the help of the "PITA" miRNA target prediction program that miR-1207-5p may bind on one of the two transcript's on its 5'UTR. So we calculated the change of the expression of each transcript and of miR-1207 in control and serum deprived cells. Finally we visualized the protein products of the transcripts by Western Blotting.

1.Εισαγωγή

1.1 Το εναλλακτικό μάτισμα

1.1.1 Γενικά

Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το μεγαλύτερο μέρος της γενετικής πληροφορίας που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη είναι διακοπτόμενο. Αυτό συμβαίνει επειδή κατά την γονιδιακή έκφραση ενός ευκαρυωτικού γονιδίου, παρεμβάλλεται ένα στάδιο ωρίμανσης ανάμεσα στην μεταγραφή και τη μετάφρασή του. Σε αυτό το στάδιο αφαιρούνται ορισμένες αλληλουχίες από το πρώιμο μετάγραφο και συρράβονται οι υπόλοιπες διατηρώντας πάντα την αρχική σειρά. Κατά τη διάρκεια της μεταγραφής του γονιδίου, παράγεται το πρώιμο mRNA το οποίο τελικά περιέχει το πλήρες μήκος της αλληλουχίας του. Η διαδικασία της ωρίμανσης του πρώιμου mRNA λέγεται μάτισμα (splicing), οι αντίστοιχες περιοχές του γονιδίου που απαντώνται στα ώριμα mRNA λέγονται εξόνια (exons) και οι αντίστοιχες περιοχές που πάντα αφαιρούνται από το πρώιμο mRNA λέγονται εσώνια ή ιντρόνια (introns).

Η πλειοψηφία >95% των ανθρώπινων γονιδίων που περιέχουν πάνω από ένα εξόνιο έχουν τη δυνατότητα να παράγουν διαφορετικά μόρια mRNA [11,12]. Αυτό είναι δυνατό μέσω της χρήσης εναλλακτικών υποκινητών, εναλλακτικού ματίσματος ή μέσω άλλων μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων. Σύμφωνα με πρόσφατες αναλύσεις το 30%-50% των γονιδίων στον άνθρωπο έχουν εναλλακτικούς υποκινητές [3-7]. Με τη χρήση του εναλλακτικού υποκινητή ένα γονίδιο μπορεί να παράγει ένα μετάγραφο με διαφορετική 5' περιοχή. Αν ο εν λόγω εναλλακτικός υποκινητής βρίσκεται καθοδικά του κύριου, τότε το μετάγραφο δεν θα περιέχει κάποιο ή κάποια από τα αρχικά εξόνια, αντίστοιχα αν βρίσκεται ανοδικά του κύριου υποκινητή τότε συμπεριλαμβάνει πρόσθετα εξόνια στο 5' ακρο.

Πάνω από 90% των γονιδίων στον άνθρωπο έχουν τη δυνατότητα να παράγουν διαφορετικά μετάγραφα μέσω εναλλακτικού ματίσματος [2]. Στο εναλλακτικό μάτισμα επιλέγονται διαφορετικοί συνδυασμοί εξονίων που θα παραμείνουν στο ώριμο μετάγραφο διατηρώντας πάντοτε τη σειρά που έχουν στο αντίστοιχο γονίδιο. Ορισμένα εξόνια πάντα συμπεριλαμβάνονται στο ώριμο mRNA ενώ άλλα συμπεριλαμβάνονται μόνο σε συγκεκριμένες ισομορφές επίσης είναι δυνατό να συμπεριληφθεί μόνο ένα κομμάτι ενός εξονίου. Τις περισσότερες φορές όλα τα εναλλακτικά μετάγραφα ενός γονιδίου χρησιμοποιούν το ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης, υπάρχουν βέβαια και ενδιαφέρουσες εξαιρέσεις (GNAS1, XBP1, INK4A/ARF) γονιδίων που σε ορισμένα εναλλακτικά τους μετάγραφα αλλάζουν πλαίσιο ανάγνωσης [1,8,9].

Επίσης κατά την ωρίμανση το mRNA κόβεται σε ένα συγκεκριμένο σημείο, συνήθως μέσα στο 3' UTR και προστίθεται η πολυ(A) ουρά. Πολλά γονίδια μπορούν να παράγουν μετάγραφα με ποικίλο σημείο εισαγωγής της. Αυτά τα εναλλακτικά μετάγραφα έχουν διαφορετικό μήκος 3' UTR.. Τα 3' UTR περιλαμβάνουν θέσεις ρυθμιστικών μορίων, (RBPs, miRNAs) οπότε συνήθως έχουν διαφορετικό χρόνο ημιζωής στο κυτταρόπλασμα, διαφορετικό κυτταρικό εντοπισμό και διαφορετική ικανότητα μετάφρασης.

Άλλες εναλλακτικές μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις περιλαμβάνουν τη προσθήκη διαφορετικής 5'καλύπτρας αλλά και διαφορεικής φωσφορυλίωσης, σουμυλίωσης και ουβικιτινίωσης του RNA. Ο ρόλος των τελευταίων τροποποιήσεων είναι ανεπαρκώς διερευνημένος.

1.1.2 Ο ρόλος του εναλλακτικού ματίσματος σε φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες

Όλοι οι μηχανισμοί παραγωγής εναλλακτικών μεταγράφων έχουν ως κύριο ρόλο την επέκταση της ικανότητας κωδικοποίησης των ανώτερων ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων. Το Human Genome Project έδειξε ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει περίπου 24000 γονίδια, τέσσερις φορές περισσότερα απ' ό,τι ο ζυμομύκητας και πολύ λιγότερα από τα 100000 που είχε υπολογιστεί ότι χρειάζονται τα θηλαστικά. Είναι πια σαφές ότι ένα πολύ μεγάλο μέρος από την πληροφορία που φαινόταν ότι έλειπε παρέχεται τελικά από τη δυνατότητα των γονιδίων να παρ άγουν πολλά διαφορετικά μετάγραφα ως απόκριση σε διαφορετικές συνθήκες.

Ένας πολύ αποτελεσματικός μηχανισμός διεύρυνσης της ικανότητας κωδικοποίησης του γονιδιώματος είναι το εναλλακτικό μάτισμα. Επίσης έχειδειχθεί ότι οι αλλαγές στα επίπεδα ισομορφών πρωτεϊνών ως αποτέλεσμα του εναλλακτικού ματίσματος έχει σημαντικές λειτουργικές επιδράσεις. Έχειδειχθεί ότι αυτές οι ισομορφές πρωτεϊνών μπορούν να ρυθμίσουν την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών, μεταξύ πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων και μεταξύ πρωτεϊνών και μεμβρανών.

Η απορρύθμιση των μηχανισμών ρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος έχει διαπιστωθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο σε όλα τα στάδια του καρκίνου[14].

Γονιδιωματικές έρευνες έχουν δείξει ότι πολύ συχνά οι πρωτεϊνικοί επίτοποι που κωδικοποιούνται από εναλλακτικά εξόνια βρίσκονται σε θηλιές[15], ή σε μη δομημένες περιοχές στο εξωτερικό μέρος των πρωτεϊνών [16]. Οπότε τα εναλλακτικά εξόνια δεν αλλάζουν τη γενική δομή της πρωτεΐνης αλλά συνήθως επηρεάζουν δομές στην επιφάνειά της. Γενικά ο ρόλος των εύκαμπτων δομών στο εξωτερικό των πρωτεϊνών είναι το να αλληλοεπιδρούν με άλλα μόρια ή να είναι στόχοι ομοιοπολικής τροποποίησης από πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος. Με αυτά τα δεδομένα μπορούμε να καταλάβουμε ότι η κύρια δομική λειτουργία του εναλλακτικού ματίσματος είναι να τροποποιεί και όχι να αλλάζει ριζικά τη λειτουργία των πρωτεϊνών. Με αυτό τον τρόπο οι εναλλακτικές ισομορφές μπορούν να αλληλοεπιδράσουν και/ή να ρυθμιστούν από διαφορετικά μόρια οπότε να συμβάλλουν στην πολυπλοκότητα της ρύθμισης. Αξίζει να υπενθυμιστεί ότι στον παραπάνω κανόνα υπάρχουν και ενδιαφέρουσες εξαιρέσεις εναλλακτικών μεταγράφων που πράγματι μεταφράζονται σε πρωτεΐνες που έχουν εντελώς διαφορετική δομή και ιδιότητες.

Στη συνέχεια θα αναφέρουμε μερικά παραδείγματα ορισμένων περιπτώσεων στις οποίες το εναλλακτικό μάτισμα παίζει κρίσιμο ρόλο.

Ρύθμιση του κυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών. Το γονίδιο της λιπίνης (lipin) κωδικοποιεί για δύο εναλλακτικές ισόμορφες μία κυτταροπλασματική και μία πυρηνική, η πυρηνική ισομορφή δρα σαν μεταγραφικός παράγοντας ενώ η κυτταροπλασματική έχει ενζυμική δράση. Η μόνη διαφορά στην πρωτοταγή τους δομή είναι ότι στην πυρηνική ισομορφή περιλαμβάνεται ένα εξόνιο που κωδικοποιεί έναν επίτοπο που αποτελεί σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal) [17].

Τροποποίηση του μεταβολισμού του mRNA. Το γονίδιο SLC11A2 κωδικοποιεί για τουλάχιστων 2 εναλλακτικά μετάγραφα που διαφέρουν στις αμετάφραστες περιοχές, ο μεταβολισμός των συγκεκριμένων μεταγράφων ρυθμίζεται από διαφορετικά miRNA [18].

Αλλαγή στις ιδιότητες μεταγραφικών παραγόντων. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα FOXP2 μπορεί να εκφράσει δύο ισομορφές. Η διαφορά τους είναι ένα εναλλακτικό εξόνιο το οποίο κωδικοποιεί την περιοχή πρόσδεσης στο DNA. Η ανενεργή ισομορφή δεν περιέχει το συγκεκριμένο εξόνιο, οπότε δεν μπορεί να προσδεθεί στο DNA ώστε να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή γονιδίων. Αντίθετα εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα όπου μπορεί να σχηματίσει διμερή με την ενεργή ισομορφή, έχοντας με αυτό τον τρόπο την αντίθετη ρυθμιστική δράση σε σχέση με την τελευταία [19].

Αλλαγή στις ιδιότητες των ενζύμων. Η μελέτη των λειτουργικών διαφορών μεταξύ εναλλακτικών ισομορφών κινασών έχει δείξει ότι το εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να έχει πολύ δραματικά αποτελέσματα στη δομή και τη δράση τους. Εκτός από τις συνήθεις αλλαγές στις επιφανειακές ρυθμιστικές περιοχές που βλέπουμε σε εναλλακτικές ισομορφές στην πλειοψηφία πρωτεϊνών το γονίδιο της κυτταροπλασματικής φωσφωλιπάσης A2β (cytosolic phosphatase A2 beta) μπορεί να εκφράσει μεταξύ άλλων μία ισομορφή που έχει διαφορετικό υπόστρωμα. Η θεμελιώδης αυτή διαφορά οφείλεται στη χρήση εναλλακτικού εξονίου που κωδικοποιεί για διαφορετικό ενεργό κέντρο το οποίο βρίσκεται στο εσωτερικό της τριτοταγής δομής της πρωτεΐνης [20].

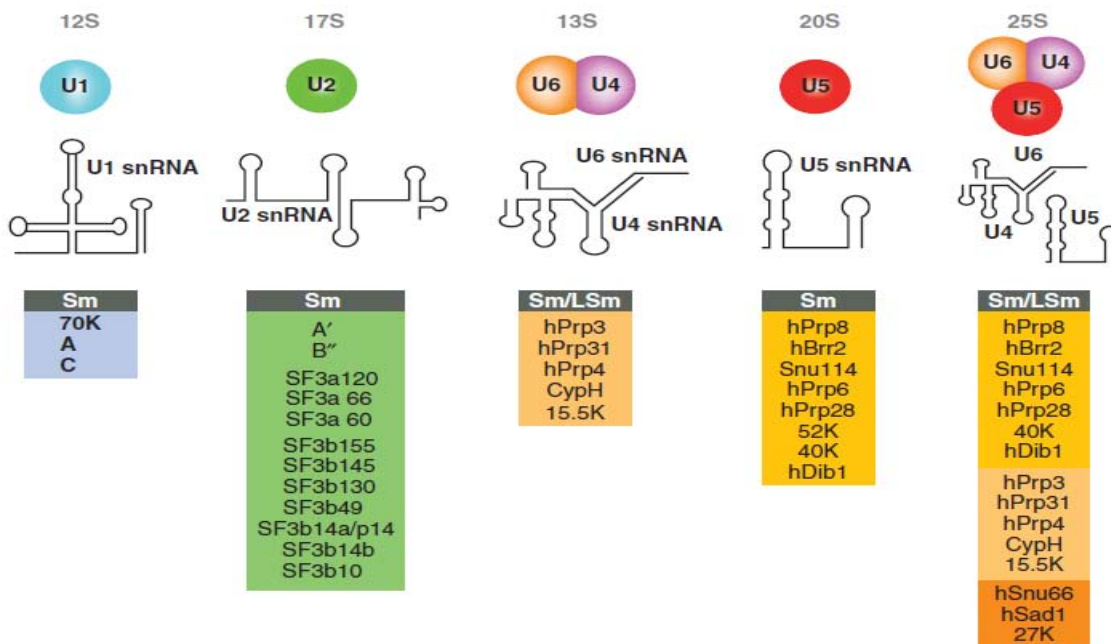
1.1.3 Η δομή του spliceosome και ο βιοχημικός μηχανισμός του ματίσματος

Το εναλλακτικό αλλά και το ιδιοσυστατικό μάτισμα καταλύεται από το σωμάτιο συναρμογής, που επίσης λέγεται και ματισματόσωμα (spliceosome). Το ματισματόσωμα είναι ένα γιγάντιο ριβοπρωτεϊνικό σύμπλοκο με μοριακό βάρος περίπου 3 megaDalton (MDa), η μόνη μοριακή μηχανή συγκρίσιμου μεγέθους και πολυπλοκότητας είναι το ριβόσωμα (3.2 MDa). Οι πολυκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν δύο είδη ματισματοσωμάτων ένα κύριο, το U2 εξαρτώμενο και ένα

δευτερεύον το U12. Τα δύο αυτά ματισματοσώματα έχουν εκτενείς δομικές και λειτουργικές διαφορές, επίσης το U12 είναι εξειδικευμένο στην καταλύση της αφαίρεσης ενός μικρού υποσυνόλου των ιντρονίων τα οποία αποτελούν μόλις το 0.25% του συνόλου [28].

Το ανθρώπινο U2 εξαρτώμενο ματισματοσώμα έχει δυναμική διαμόρφωση και πρωτεϊνική σύσταση καμία από τις δύο δεν είναι απόλυτα γνωστές. Έχει πολλαπλές ενζυματικές δραστηριότητες κινάσης, ATPάσης, GTPάσης, RNA ελικάσης και cis-trans πρόλυλ-ισομεράσης (cis-trans polyI isomerase) [156]. Δομικά το ματισματοσώμα οργανώνεται σε υπομονάδες που ενώνονται και συγκροτούνται πάνω στις θέσεις ματίσματος, αυτές οι αλληλεπιδράσεις υποβοηθούνται από μια πληθώρα παραγόντων που έχουν παροδική δράση. Οι υπομονάδες αυτές είναι οι εξής: τα U1, U2, U4/U6 και U5 ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (snRNPs) και το εξ' ολοκλήρου πρωτεϊνικό σύμπλοκο PRP19. Τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα παίρνουν το όνομά τους από το snRNA που περιέχουν. Κάθε snRNP περιέχει μια σειρά από αμετάβλητους παράγοντες που δομούν τον πυρήνα του, οι οποίοι είναι οι Sm και Lsm ring proteins καθώς επίσης και 3 με 15 πρωτεΐνες που είναι αμετάβλητες και ειδικές για κάθε snRNP [157].

Οι πιο σημαντικές αλληλεπιδράσεις για τη συγκρότηση του ματισματοσώματος και την κατάλυση της αντίδρασης του ματίσματος γίνονται μεταξύ των snRNAs και μεταξύ snRNAs και ιντρονικών αλληλουχιών [152].



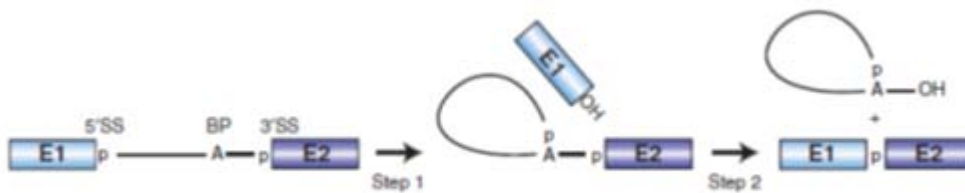
Εικόνα 1. Πρωτεϊνική σύνθεση και δευτεροταγής δομή των κύριων ανθρώπινων snRNPs (Cindy L. Will and Reinhard Lührmann, 2010)

Σε κάθε ιντρόνιο υπάρχουν οι 4 συντηρημένες κύριες cis αλληλουχίες του ματίσματος [30]. Αυτές είναι: η 5' θέση ματίσματος (5' splice site), η 3' θέση (3' splice site), η περιοχή διακλάδωσης (branch site) και η έκταση πυριμιδινών (polyuridylic tract). Οι αλληλουχίες αυτές αναγνωρίζονται από συγκεκριμένες ριβονουκλεοπρωτεϊνικές υπομονάδες του ματισματοσώματος κατά το μάτισμα έτσι ώστε να γίνει η αναγνώριση και αποκοπή του ιντρονίου [31].



Εικόνα 2. Οι κύριες cis αλληλουχίες του ματίσματος (Cindy L. Will and Reinhard Lührmann 2010)

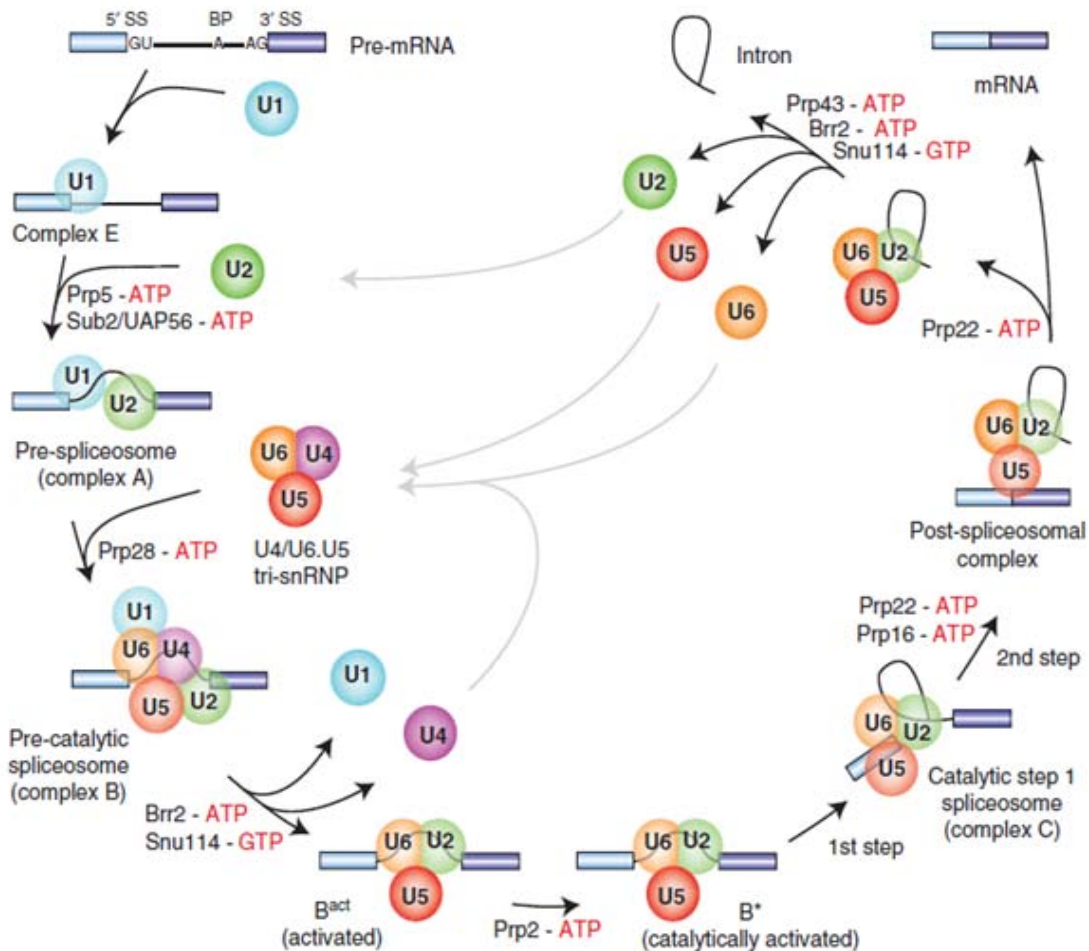
Το ματισματοσώμα απομακρύνει τα ιντρόνια με δύο διαδοχικές αντιδράσεις trans εστεροποίησης. Αρχικά η 2' υδροξύ (-OH) ομάδα μίας συγκεκριμένης αδενosίνης της περιοχής διακλάδωσης πραγματοποιεί πυρηνόφιλη προσβολή στη 5' θέση του ματίσματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποκοπή από αυτή τη θέση και την ένωση του 5' άκρου του ιντρονίου στην περιοχή διακλάδωσης, σχηματίζοντας μια θηλιά. Στη συνέχεια η 3' υδροξύ ομάδα της 5'θέσης του εξονίου επιτίθεται στην 3' θέση ματίσματος που έχει ως αποτέλεσμα την αποκοπή του ιντρονίου και τη σύνδεση των δύο γειτονικών εξονίων [31].



Εικόνα 3. Η αφαίρεση του ιντρονίου μέσω δύο αντιδράσεων trans εστεροποίησης (Cindy L. Will and Reinhard Lührmann, 2010)

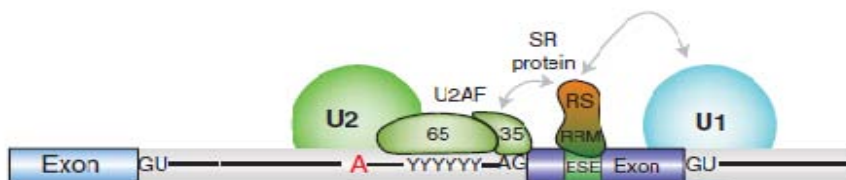
Για να γίνει η κατάλυση της απομάκρυνσης του ιντρονίου το ματισματοσώμα πρέπει να συγκροτηθεί πάνω στο ιντρόνιο. Η συγκρότηση του ματισματοσώματος πάνω στα κύρια cis στοιχεία ματίσματος του ιντρονίου γίνεται από μέσω της αλληλεπίδρασης μεταξύ των snRNPs και πολλών ακόμα παραγόντων ματίσματος. Στην περίπτωση που το μήκος του ιντρονίου δεν υπερβίνει τα 200-250 ζεύγη βάσεων, το ματισματοσώμα αρχικά συγκροτείται πάνω στο ιντρόνιο σε μία διαδικασία που ονομάζεται «αναγνώριση ιντρονίου» [32]. Αρχικά το U1 ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο προσδένεται στην 5'θέση ματίσματος του ιντρονίου, άλλοι παράγοντες όπως ο SF1/mBBP και ο U2AF προσδένονται στη περιοχή διακλάδωσης και στην έκταση πυριμιδινών αντίστοιχα. Στο επόμενο βήμα

το U2 snRNP συνδέεται στην περιοχή διακλάδωσης σχηματίζοντας το σύμπλοκο ματίσματος A. Στη συνέχεια συναρμολογείτε το U4/U6.U5 tri-snRNP σύμπλοκο από τα συστατικά του και προσδένεται στο σύμπλοκο A δημιουργώντας το προκαταλυτικό σύμπλοκο B. Σημαντικές αναδιατάξεις των αλληλεπιδράσεων RNA-RNA και RNA – πρωτεϊνών οδηγούν στην αποσταθεροποίηση των U1 και U4 snRNPs δημιουργώντας το ενεργοποιημένο ματισματόσωμα. Η καταλυτική ενεργοποίηση από τη DEAH-box RNA ελικάση Prp2 παράγει το B* σύμπλοκο το οποίο καταλύει το πρώτο από τα δύο χημικά στάδια του ματίσματος. Μετά το τέλος της παραπάνω αντίδρασης αλλάζει η δομή του συμπλόκου B* και έτσι προκαλείται η δημιουργία του συμπλόκου C το οποίο καταλύει το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης του ματίσματος. Το ματισματόσωμα τελικά αποσυνδέεται και αποσυναρμολογείται έτσι ώστε τα snRNPs να μπορούν να λάβουν μέρος σε άλλες αντιδράσεις ματίσματος [32].



Εικόνα 4. Ο μηχανισμός του ματίσματος όταν το ιντρόν είναι μικρότερο από 250 bp (Cindy L. Will and Reinhard Lührmann 2010)

Όταν ένα ιντρόνιο είναι μεγαλύτερο από 250 ζεύγη βάσεων τα σύμπλοκα του ματίσματος συγκροτούνται αρχικά γύρω από το εξόνιο καθοδικά του ιντρονίου και στη συνέχεια μεταφέρονται στο ιντρόνιο, η διαδικασία αυτή ονομάζεται «αναγνώριση εξονίου» [32.158]. Κατά τη διαδικασία αυτή το U1 snRNP συνδέεται προσδένεται στην 5' θέση ματίσματος καθοδικά του εξονίου το οποίο προκαλεί τη σύνδεση του U2AF στην έκταση πυριμιδών και στην 3' θέση ματίσματος ανωδικά του εξονίου. Αυτοί οι παράγοντες στη συνέχεια στρατολογούν το U2 snRNP στη θέση διακλάδωσης ανωδικά του εξονίου. Εντός του εξονίου ένα δευτερεύον cis ρυθμιστικό στοιχείο ο εξονικός ενισχυτής του ματίσματος (Exonic Splice Enhancer) στρατολογεί πρότεινες της οικογένειας SR που αλληλεπιδρούν και σταθεροποιούν την σύνδεση όλων των παραγόντων ματίσματος γύρω από το εξόνιο [159]. Οι βιοχημικές αντιδράσεις που μετατρέπουν το σύμπλοκο αναγνώρισης εξονίου σε σύμπλοκο αναγνώρισης ιντρονίου δεν είναι γνωστές.

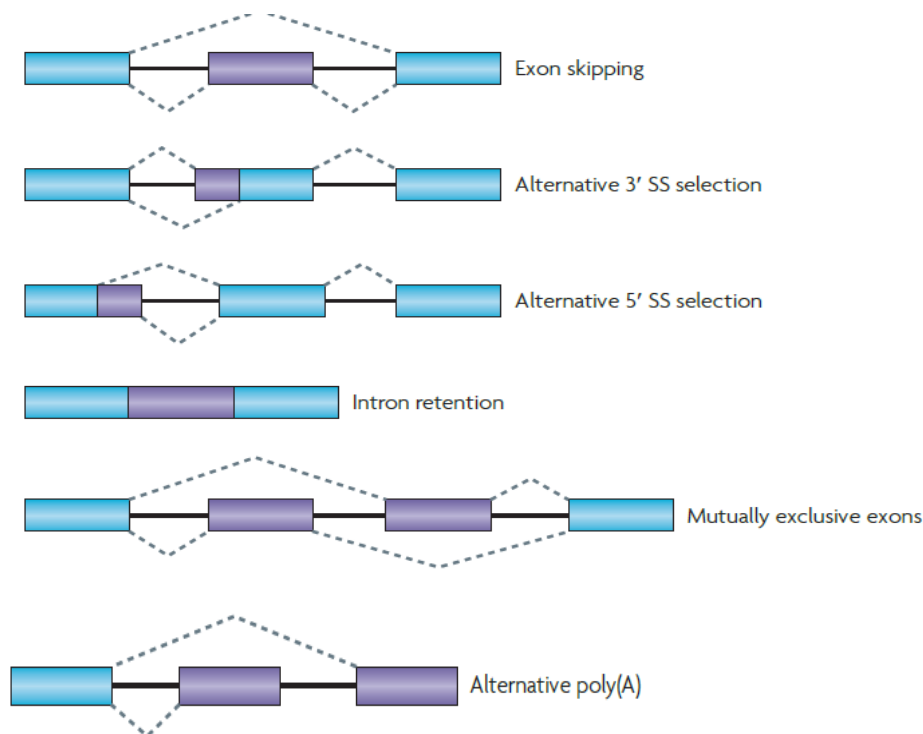


Εικόνα 5. Ο σχηματισμός του συμπλόκου αναγνώρισης εξονίου. (Cindy L. Will and Reinhard Lührmann 2010)

1.1.4 Οι κατηγορίες του εναλλακτικού ματίσματος

Υπάρχουν έξι διαφορετικές κατηγορίες εναλλακτικού ματίσματος (εικόνα 6). Η πιο κοινή κατηγορία στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι η παράλειψη εξονίου (**a**) που αποτελεί το 40% των συμβάντων εναλλακτικού ματίσματος αυτών τους οργανισμούς [33]. Σε αυτή την περίπτωση το εναλλακτικό εξόνιο μαζί με τα γειτονικά ιντρόνια αναγνωρίζονται ως ένα ενιαίο ιντρόνιο και αποκόπτονται από το πρώιμο mRNA. Οι δύο επόμενες κατηγορίες εναλλακτικού ματίσματος είναι η χρήση εναλλακτικής 3' (**b**) και 5' (**c**) θέσης ματίσματος. Σε αυτές τις περιπτώσεις, αναγνωρίζονται εναλλακτικές 3' και 5' θέσεις ματίσματος με αποτέλεσμα στο ώριμο μετάγραφο να συμπεριλαμβάνονται εναλλακτικές 3' και 5' περιοχές σε ένα εξόνιο. Αυτές οι δύο κατηγορίες απαρτίζουν το 18.4% και 7.9% αντίστοιχα από το σύνολο των εναλλακτικών μεταγράφων των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Ο τέταρτος τύπος εναλλακτικού ματίσματος είναι η κατακράτηση ιντρονίου (intron retention) (**d**), σε αυτό τον τύπο ένα ιντρόνιο (συνήθως μικρού μήκους) αναγνωρίζεται σαν εξόνιο και παραμένει στο ώριμο μετάγραφο. Αυτός ο τύπος είναι σπάνιος στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς μιας και αποτελεί

μόνο το 5% του συνόλου των εναλλακτικών μεταγράφων αντίθετα, στα φυτά στους μύκητες και στα πρωτόζωα είναι ο πιο συνηθισμένος τύπος [34]. Οι δύο πιο σπάνιοι τύποι εναλλακτικών μεταγράφων είναι τα αμοιβαία αποκλειστικά εξόνια (e) (mutually exclusive exons) και οι εναλλακτικές θέσεις πολυαδενυλίωσης (f). Στα αμοιβαία αποκλειστικά εξόνια, δύο ή περισσότερα γειτονικά εξόνια αναγνωρίζονται ως μια μονάδα που μπορεί να συμπεριληφθεί ή να αφαιρεθεί από το ώριμο μετάγραφο [34].



Εικόνα 6. Οι 6 κατηγορίες εναλλακτικού ματίσματος (Hadas Keren, Galit Lev-Maor and Gil Ast, 2010)

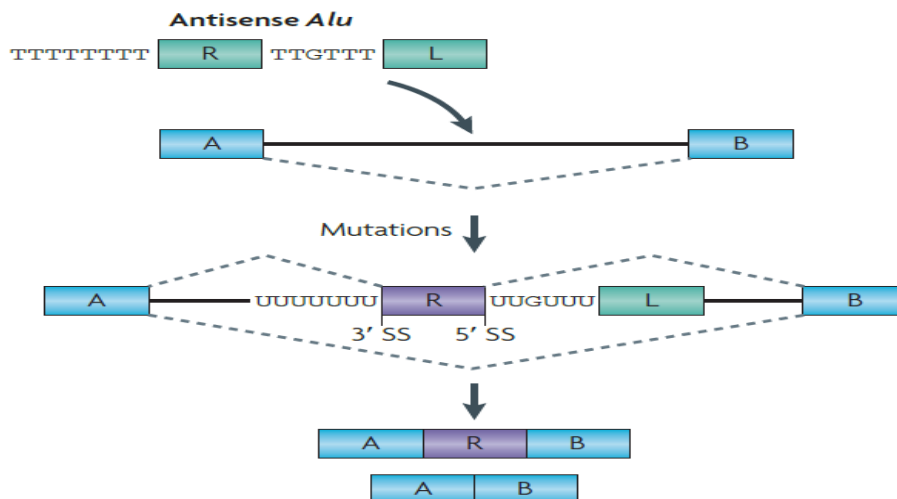
1.1.5 Η εξέλιξη του μηχανισμού του εναλλακτικού ματίσματος και των εναλλακτικών εξονίων

Ο μηχανισμός του εναλλακτικού ματίσματος πιθανότατα δημιουργήθηκε στον κοινό πρόγονο των ευκαρυωτών. Το γονιδίωμα του αποτελούταν από πολυιντρονικά γονίδια τα οποία συσσωρεύσαν μεταλλάξεις στις θέσεις ματίσματος και με αυτόν τον τρόπο πιστεύεται πως δημιουργήθηκε το εναλλακτικό μάτισμα [21]. Πρόσφατη εξελικτική μελέτη προσπάθησε να ανοικοδομήσει την εξελικτική πορεία των θέσεων του ματίσματος στους πρώιμους ευκαρυώτες και βρήκε ότι οι 5' θέσεις ήταν εκφυλισμένες και όχι συντηρημένες [22,23]. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το εναλλακτικό μάτισμα είναι πράγματι μια πολύ παλιά διαδικασία. Άλλα ευρήματα που υποστηρίζουν την παραπάνω θεωρία είναι ότι όλοι οι κατώτεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί που εξετάστηκαν έχουν περίπλοκα σωματίδια συναρμογής [24,25,26]. Ακόμα βρέθηκαν λειτουργικά μονοπάτια μη νοηματικής διαμεσολαβούμενης

αποδόμησης (nonsense mediated decay) σε ζώα, μύκητες, φυτά και chromalveolata. Η παραπάνω ανακάλυψη έδειξε για ότι ο μηχανισμός NMD χρειάζεται την καταστροφή μεταγράφων που έχουν προκύψει από λάθη του ματίσματος. Επίσης έχει βρεθεί ότι η αφθονία εναλλακτικών μεταγράφων που κωδικοποιούν τα γονιδιώματα των ευκαρυωτών είναι ανάλογη με την πολυπλοκότητά τους [27].

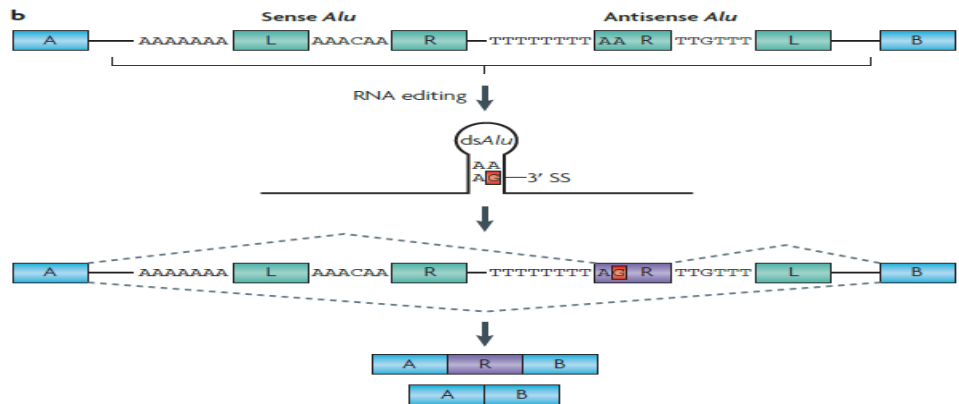
Τα εναλλακτικά εξόνια μπορούν να προκύψουν με τρεις τρόπους την **εξονοποίηση**, την **ανακατανομή εξονίων** και τη **μετάπτωση εξονίων** [164].

Η **εξονοποίηση** (exonisation) είναι η διαδικασία στην οποία προκύπτει η δημιουργία ενός de novo εναλλακτικού εξονίου μέσα σε ένα γονίδιο μετά από την ένθεση ενός μεταθετού στοιχείου, συνήθως Alu [162]. Τα μεταθετά στοιχεία Alu ανήκουν στην οικογένεια των βραχέων διάσπαρτων στοιχείων (Short interspersed elements SINEs) έχουν μέγεθος περίπου 300 ζεύγη βάσεων και περιέχουν δύο παρόμοια μονομερή τμήματα το δεξί και αριστερό βραχίονα. Οι δύο αυτοί βραχίονες ενώνονται μέσω μίας αλληλουχίας που είναι πλούσια σε αδενίνες, επίσης ο δεξιός βραχίονας ενώνεται με μία αλληλουχία που μοιάζει με πολυ(A) ουρά. Σε έναν από τους δύο μηχανισμούς το Alu εντίθεται με ρετρομετάθεση μέσα σε ένα ιντρόνιο με αντινοηματικό προσανατολισμό (antisense orientation). Τα στοιχεία Alu σε αυτή τη διαμόρφωση έχουν πολλαπλές θέσεις που μοιάζουν με τις 3' και 5' θέσεις ματίσματος συσώρευση μεταλλάξεων σε αυτές τις θέσεις μπορεί να τις μετατρέψει σε λειτουργικές. Στο 85% των περιπτώσεων εξονοποίησης που έχουν παρατηρηθεί το καινούριο εξόνιο προκύπτει από τον δεξιό βραχίονα. Αυτό συμβαίνει γιατί η αλληλουχία που μοιάζει με πολυ(A) ουρά εντίθεται σαν πολύ-T και έτσι δημιουργεί μία έκταση πυριμιδινών (polyuracil tract), ένα θετικό ρυθμιστικό στοιχείο του ματίσματος. Αυτό το στοιχείο βοηθά την αναγνώριση από το σωματίο συναρμογής των 3' και 5' θέσεων ματίσματος στα άκρα του δεξιού βραχίονα. [160]



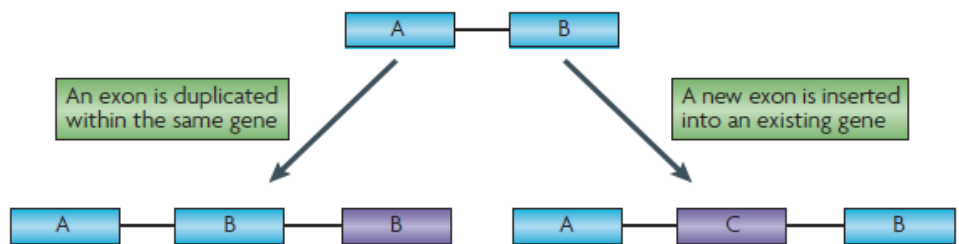
Εικόνα 7. Εξονοποίηση μέσω ένθεσης μεταθετού στοιχείου με αντινοηματικό προσανατολισμο και συσώρευσης μεταλλάξεων (Hadas Keren, Galit Lev-Maor and Gil Ast, 2010)

Ένας άλλος μηχανισμός εξονιοποίησης περιλαμβάνει την ένθεση δύο στοιχείων Alu σε κοντινή απόσταση με αντίθετο προσανατολισμό μέσα σε ένα ιντρόνιο. Κατά τη μεταγραφή δημιουργείται μία φουρκέτα που αναγνωρίζεται από το ένζυμο τροποποίησης RNA ADAR. Το ADAR στη συνέχεια μπορεί να μετατρέψει νουκλεοτίδια Αδενίνης προς ινοσίνη. Η ινοσίνη αναγνωρίζεται από τους κυταρικούς μηχανισμούς ως γουανίνη. Έτσι μπορεί να παραχθεί μία λειτουργική 3' θέση ματίσματος AG [160,161].



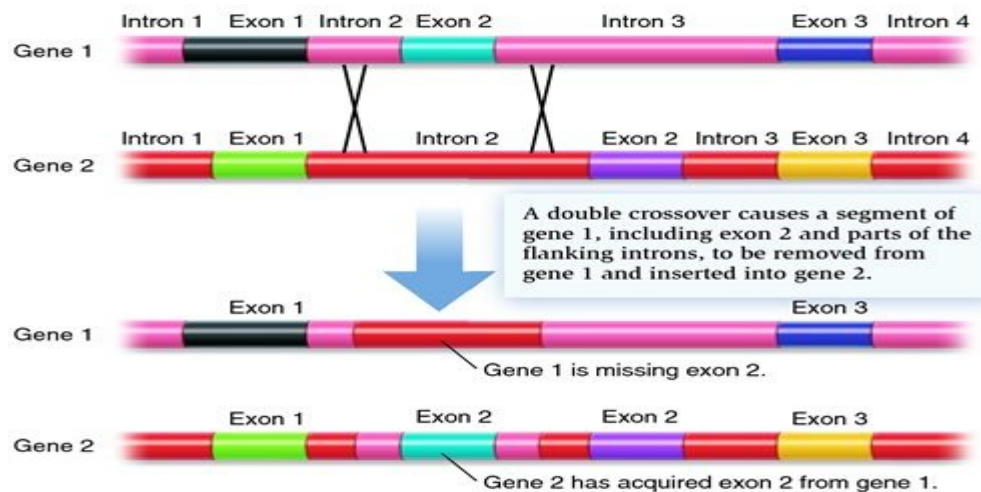
Εικόνα 8. Εξονιοποίηση μέσω ένθεσης δύο μεταθετών στοιχείων με αντίθετο προσανατολισμο. (Hadas Keren, Galit Lev-Maor and Gil Ast, 2010)

Η **ανακατανομή εξονίων** είναι η διεργασία στην οποία ένα εξόνιο εισάγεται ή διπλασιάζεται μέσα σε ένα γονίδιο με ιντρονικό ανασυνδυασμό [163].



Εικόνα 9. Ανακατανομή εξονίων (Hadas Keren, Galit Lev-Maor and Gil Ast, 2010)

Ο ιντρονικός ανασυνδυασμός (intronic recombination) είναι ο μη ομόλογος ανασυνδυασμός που συμβαίνει μεταξύ δύο γονιδίων σε δύο θέσεις ιντρονίων εκατέρωθεν ενός εξωνίου. Αν ο ιντρονικός ανασυνδυασμός γίνει μεταξύ δύο διαφορετικών γονιδίων, τότε προκύπτει η εισαγωγή ενός εξωνίου από το άλλο γονίδιο. Αν γίνει μεταξύ μεταξύ δύο αλληλομόρφων γονιδίων τότε έχουμε το διπλασιασμό ενός εξωνίου [163].



Εικόνα 10. Ιντρονικός μη ομόλογος ανασυνδυασμός (Biology forums gallery)

Τα εξόνια που εισάγονται με αυτό τον τρόπο θα υπόκεινται είτε σε εναλλακτικό είτε σε ιδιόσυστατο μάτισμα, ανάλογα με το προφίλ ματίσματος που είχαν πριν την ένθεση.[163]

Μετάπτωση ιδιόσυστατικών μεταγραφών σε εναλλακτικά.

Υπάρχουν δύο μηχανισμοί που μπορεί να αλλάξουν το προφίλ ματίσματος ενός εξονίου, η συσσώρευση μεταλλάξεων και η δημιουργία καινούριων δευτεροταγών δομών δευτεροταγών δομών στο RNA.

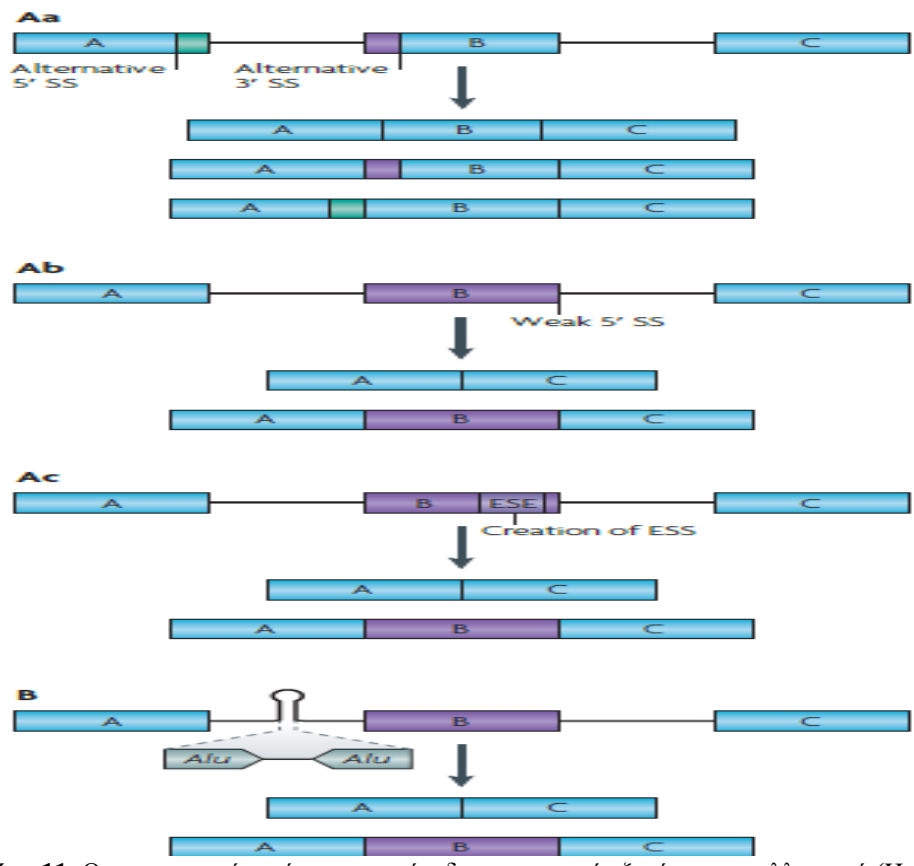
Aα) Μεταλλάξεις μπορεί να οδηγήσουν στην δημιουργία εναλλακτικών 5' ή 3' θέσεων ματίσματος[165].

Ab) Συσσώρευση μεταλλάξεων μπορεί να αποδυναμώσουν μία 5' θέση ματίσματος ενός εξονίου μετατρέποντάς το σε εναλλακτικό [165].

Ac)Μεταλλάξεις μπορεί να αδρανοποιήσουν κάποιο θετικό cis ρυθμιστικό στοιχείο του ματίσματος ή να δημιουργήσουν κάποιο αρνητικό [166,167].

B) Αν γίνει ένθεση δύο στοιχείων Alu σε αντίθετο προσανατολισμό μέσα σε ένα ιντρόνιο, μπορεί να προκαλέσει την μετατροπή του καθοδικού εξονίου σε εναλλακτικό.

Αυτό γίνεται γιατί στην περιοχή που έχει γίνει η διπλή ένθεση εμφανίζεται μια δομή φουρκέτας στο pre-mRNA κατά τη μεταγραφή, σε αυτό το σημείο η μεταγραφή καθυστερεί και δίνει περισσότερη ώρα σε θετικούς trans ρυθμιστικούς παράγοντες του ματίσματος να προσδεθούν [168].



Εικόνα 11. Οι μηχανισμοί μετάπτωσης ενός ιδιουσυστατικού εξονίου σε εναλλακτικό (Hadas Keren, Galit Lev-Maor and Gil Ast, 2010)

1.1.6 Ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος

Η ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία μιας και περιλαμβάνει πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς ρύθμισης. Ο απώτερος στόχος της μελέτης της ρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος, είναι η εξιχνίαση του κώδικα του ματίσματος που θα μπορεί να προβλέπει το αποτέλεσμα του εναλλακτικού ματίσματος επεξεργάζοντας τα δεδομένα των ρυθμιστικών στοιχείων. Το κυτταρικό πρόγραμμα της ρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος μπορούμε να πούμε ότι έχει ως στόχο την επιλογή της έκφρασης των σωστών εναλλακτικών μεταγράφων σύμφωνα με τις ανάγκες του κυττάρου και κατ' επέκταση του οργανισμού. Για να επιτύχει αυτό το στόχο πρέπει να έχει την ικανότητα να ανταποκριθεί σωστά σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος, να αναγνωρίσει με ακρίβεια νουκλεοτιδίου τα όρια ιντρονίων και εξονίων και τέλος να δημιουργήσει τις σωστές αλληλεπιδράσεις μεταξύ cis και trans ρυθμιστικών στοιχείων τα οποία στη συνέχεια θα προσελκύσουν στοιχεία του ματισματοσώματος στις σωστές θέσεις ώστε να εκφραστούν τα σωστά εναλλακτικά μετάγραφα.

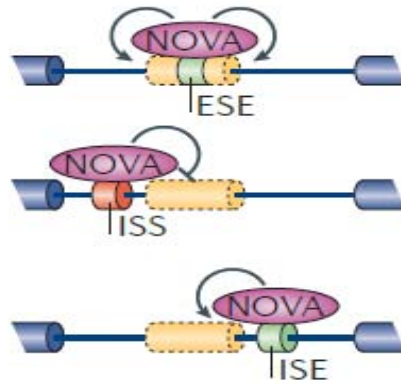
Τα εξόνια μπορούν να καταναμηθούν σε δύο κατηγορίες ως προς το εναλλακτικό μάτισμα, τα ιδιουσυστατικά εξόνια που περιλαμβάνονται σε όλα τα μετάγραφα ενός συγκεκριμένου γονιδίου και τα

εναλλακτικά που περιλαμβάνονται μόνο σε συγκεκριμένα (ή συγκεκριμένο) εναλλακτικά μετάγραφα ενός γονιδίου. Το γνώρισμα που διακρίνει αυτές τις κατηγορίες εξονίων είναι η “δύναμη” των κύριων cis θέσεων του ματίσματος πάνω στις οποίες προσδένονται τα κύρια δομικά στοιχεία του ματισματοσώματος. Ως “δύναμη” χαρακτηρίζουμε την απόκλιση που έχουν αυτές οι αλληλουχίες από τις αντίστοιχες βέλτιστες, οι οποίες μπορούν να στρατολογήσουν τα συστατικά του ματισματοσώματος με τη μέγιστη απόδοση. Κατά κανόνα τα ιδιοσυστατικά εξόνια έχουν πολύ πιο δυνατές κύριες cis θέσεις σε σχέση με τα εναλλακτικά [166]. Έτσι λοιπόν για να αναγνωριστούν αυτές οι λιγότερο δυνατές θέσεις ματίσματος οι οποίες ορίζουν τα όρια των εναλλακτικών εξονίων είναι προφανές ότι χρειάζεται η βοήθεια και άλλων δευτερευόντων θετικών cis στοιχείων τα οποία έχουν και ρυθμιστική δράση. Τα θετικά cis στοιχεία θα βοηθήσουν στη προσέλκυση και συναρμολόγηση του ματισματοσώματος, ωστόσο χρειάζονται και αρνητικά που θα βοηθήσουν στην λεπτή και ακριβή ρύθμιση. Η ρυθμιστική δράση αυτών των cis στοιχείων του ματίσματος (cis Splicing Regulatory Elements, SRE) διεκπεραιώνεται μέσω των trans ρυθμιστικών παραγόντων που προσδένονται πάνω τους στο πρώτο μετάγραφο [60,61]. Αυτοί οι trans παράγοντες με τη σειρά τους μπορεί να έχουν θετική ή αρνητική δράση ως προς την συναρμολόγηση του ματισματοσώματος [62]. Υπάρχει μια ποικιλία μοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ trans παραγόντων και SREs. Η συμπερίληψη του εναλλακτικού εξονίου κρίνεται από την δράση θετικών και αρνητικών παραγόντων αλλά και από τη τελική σύσταση και ενεργότητα του τελικού συμπλόκου παραγόντων. Η πρόσδεση συγκεκριμένων trans παραγόντων πάνω σε συγκεκριμένα cis στοιχεία είναι αποτέλεσμα μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Με αυτό τον τρόπο η πρόσδεση μιας σειράς trans παραγόντων πάνω στα SRE καθορίζει το εναλλακτικό μάτισμα ως απόκριση στις μεταβαλλόμενες συνθήκες του κυττάρου και του οργανισμού. Επίσης αξίζει να αναφέρουμε ότι ακόμα και τα ιδιοσυστατικά εξόνια βρίσκονται υπό την επιρροή SREs έτσι ώστε να διευκολύνεται η αναγνώρισή τους από το ματισματοσώμα μιας και υπάρχουν αρκετά “ψευδοεξόνια” στο γονιδίωμα δηλαδή περιοχές που περιβάλλονται από αλληλουχίες που προσομοιάζουν 3’ και 5’ θέσεις ματίσματος αλλά δεν αποτελούν εξόνια [58,59].

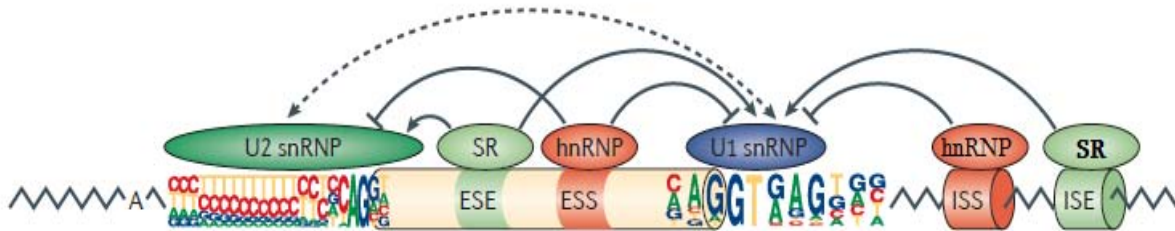
Οι παράγοντες της ρύθμισης και η δράση τους

Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες SREs οι εξονικοί ενισχυτές του ματίσματος, οι εξονικοί αποσιωπητές του ματίσματος, οι ιντρονικοί ενισχυτές του ματίσματος και οι ιντρονικοί αποσιωπητές του ματίσματος (exonic splicing enhancer ESE, exonic splicing silencer ESS, intronic splicing enhancer ISE, intronic splicing silencer ISS). Οι trans παράγοντες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τις πρωτεΐνες της οικογένειας SR, τους παράγοντες ετερογενών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων (heterogenous nuclear ribonucleoproteins hnRNP) [63] και τους ιστοειδικούς παράγοντες του ματίσματος όπως οι οικογένειες πρωτεϊνών NOVA [64] και FOX [65]. Οι ESE και οι ISE είναι θετικά SREs στα οποία προσδένονται οι SR πρωτεΐνες που κυρίως είναι θετικοί trans ρυθμιστικοί παράγοντες του ματίσματος και έτσι προάγουν την αναγνώριση του εξονίου. Οι ESE βρίσκονται μέσα σε εξόνια [66] ενώ οι ISE στα άμεσα γειτονικά ιντρόνια. Αντίστοιχα οι ESS και ISS είναι αρνητικά SREs στα οποία

προσδένονται οι αρνητικοί ρυθμιστές hnRNPs και έτσι αναστέλλουν την αναγνώριση του εξονίου, ομοίως οι ESS βρίσκονται μέσα εξόνια ενώ οι ISS σε ιντρόνια [67]. Οι ιστοειδικοί παράγοντες του ματίσματος συνήθως μπορούν να προσδένονται σε πολλά ή όλα τα SREs και να έχουν θετική ή αρνητική δράση. Για παράδειγμα ο NOVA μπορεί να προσδεθεί σε ESE, ISS και ISE[68].



Εικόνα 12. Οι ιστοειδικοί παράγοντες ματίσματος όπως αυτοί της οικογένειας NOVA μπορούν να προσδεθούν σε διαφορετικά είδη SRE και να έχουν πλειοτροπική δράση (G. Matera, Z.Wang, 2014)



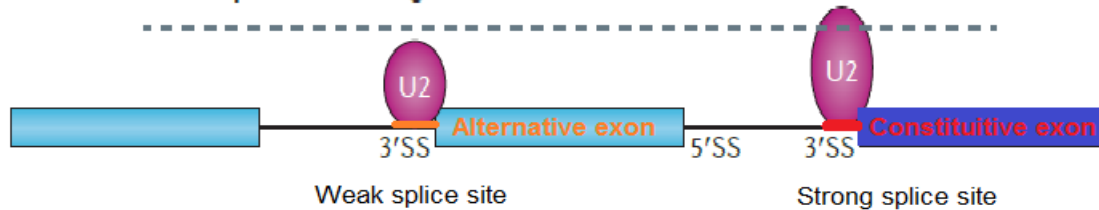
Εικόνα 13. Μια εποπτική απεικόνιση των κύριων ρυθμιστικών στοιχείων και παραγόντων που ελέγχουν το εναλλακτικό μάτισμα. (G. Matera, Z.Wang, 2014)

Οι τέσσερις βασικοί κανόνες της ρύθμισης

Έχει βρεθεί ότι οι αλληλεπιδράσεις cis στοιχείων και trans παραγόντων ακολουθούν τέσσερις βασικούς κανόνες [171]. Όπως προαναφέρθηκε και παραπάνω τα κύρια cis στοιχεία του ματίσματος, δηλαδή οι 3' και 5' θέσεις του ματίσματος είναι πολύ πιο δυνατές όταν ορίζουν ιδιοσυστατικά εξόνια παρά όταν ορίζουν εναλλακτικά. Έτσι οι θέσεις ματίσματος των ιδιοσυστατικών εξονίων είναι πολύ πιο αποδοτικές στη στρατολόγηση στοιχείων του ματισματοσώματος (όπως το U2 snRNP στην 3' θέση ματίσματος.) Επίσης κατά κανόνα οι θέσεις ματίσματος των εναλλακτικών εξονίων είναι πολύ πιο συντηρημένες σε σχέση με των ιδιοσυστατικών. Πιστεύεται πως η σχετική δύναμη αυτών των θέσεων παίζει σημαντικότερο ρόλο στη ρύθμιση μιας και η χαμηλή δραστηριότητα αυτών των θέσεων

αντισταθμίζεται με τη δραστηριότητα των ρυθμιστικών στοιχείων, αυτή η ισορροπία μάλλον είναι θεμελιώδους σημασίας για τη σωστή ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος. [69].

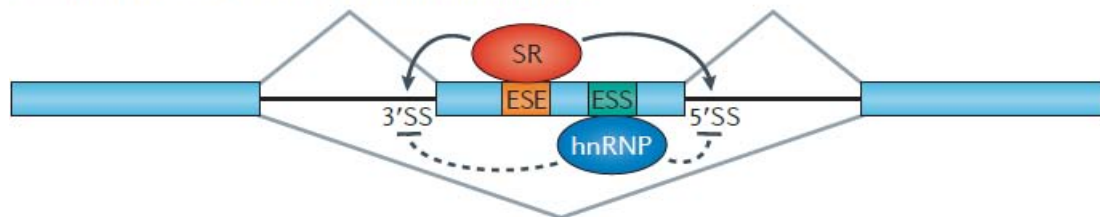
a Threshold for splice site recognition



Εικόνα 14. Κανόνας 1. Οι δυνατές 5΄ και 3΄ θέσεις ματίσματος συνήθως αντιστοιχούν σε ιδιосуστατικά εξόνια ενώ οι αδύναμες σε εναλλακτικά (Xiang-Dong Fu and Manuel Ares Jr, 2014)

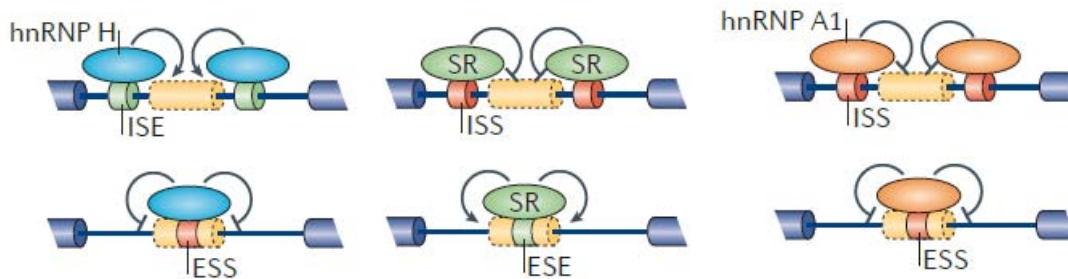
Γενικά μπορούμε να πούμε ότι οι SR πρωτεΐνες προσδένονται στα θετικά ρυθμιστικά SRE τα ESE και τα ISE έτσι προάγουν την αναγνώριση των θέσεων ματίσματος του εναλλακτικού εξονίου, ενώ τα hnRNPs προσδένονται σε αρνητικά SRE τα ESS και ISS προβάλλοντας τα αντίθετα αποτελέσματα.

b Opposite effects of SR proteins and hnRNPs



Εικόνα 15. Κανόνας 2. Οι παράγοντες SR προσδένονται στα ESE και επάγουν την αναγνώριση της εναλλακτικής θέσης, το αντίθετο αποτέλεσμα έχουν οι hnRNP όταν προσδένονται στα ESS (Xiang-Dong Fu and Manuel Ares Jr, 2014)

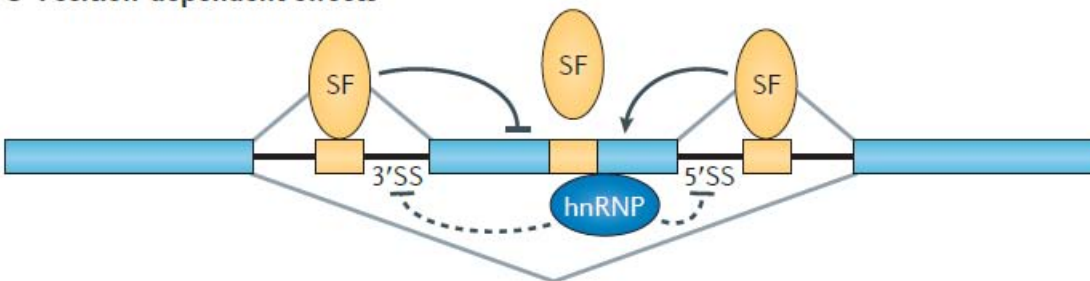
Ο παραπάνω κανόνας δεν είναι απόλυτα ακριβής, στην πραγματικότητα οι δύο μεγάλες οικογένειες trans παραγόντων έχουν ρυθμιστική δράση ανάλογα με το είδος SRE στο οποίο προσδένονται αλλά και μπορούν να αλληλεπιδράσουν με περισσότερα είδη SREs σε σχέση με αυτά που προβλέπει ο γενικός κανόνας. Ορισμένα hnRNPs έχουν τη δυνατότητα να επάγουν (hnRNP H) ή να αναστέλλουν (hnRNP A1) την αναγνώριση του εξονίου όταν προσδένονται σε ιντρονικές ρυθμιστικές cis θέσεις (ISS, ISE) ενώ πάντα την αναστέλλουν όταν προσδένονται σε εξονικές (ESS) [70,71,72,73]. Ομοίως οι SR όταν προσδένονται σε εξονικά SREs (ESE) πάντα έχουν θετική δράση ενώ όταν προσδένονται σε ιντρονικά SREs (ISS) έχουν αρνητική [74,75,76].



Εικόνα 16. Μερικοί παράγοντες μπορούν να προσδεθούν σε μη αντίστοιχα SRE και έτσι να έχουν αντίστροφη ρυθμιστική δράση (G. Matera, Z.Wang, 2014)

Πολλοί ιστοειδικοί παράγοντες έχουν διαφορετική ρυθμιστική δράση ανάλογα με τη θέση του SRE στο οποίο θα προσδεθούν σε σχέση με το εναλλακτικό εξόνιο. Για παράδειγμα οι NOVA όταν προσδέονται καθοδικά του εξονίου έχει ή θετική δράση, ενώ όταν προσδέονται ανοδικά έχει αρνητική [77]. Ο μηχανισμός αυτής της δράσης δεν είναι γνωστός.

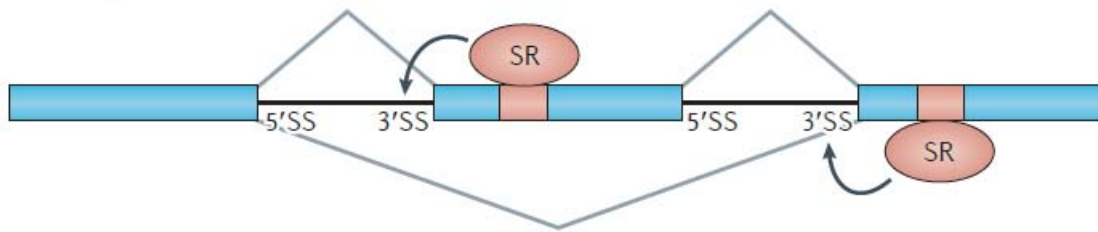
c Position-dependent effects



Εικόνα 17.Κανόνας 3. Μερικοί παράγοντες έχουν διαφορετική δράση ανάλογα με τη θέση πρόσδεσής τους σε σχέση με την εναλλακτική θέση ματίσματος που ρυθμίζουν (Xiang-Dong Fu and Manuel Ares Jr, 2014)

Ο πιο σημαντικός κανόνας που ισχύει σχεδόν πάντα, είναι ότι η αναγνώριση και η επιλογή των 3' και 5' θέσεων ματίσματος των εναλλακτικών εξονίων ποτέ δεν είναι ένα μεμονωμένο γεγονός που εξαρτάται μόνο από τα εγγενή ρυθμιστικά στοιχεία του κάθε εναλλακτικού εξονίου. Η επιλογή των εναλλακτικών θέσεων ματίσματος γίνεται σε ένα πλαίσιο ανταγωνισμού μεταξύ των αντίστοιχων θέσεων ματίσματος των γειτονικών εξονίων. Οι εναλλακτικές 3' θέσεις ανταγωνίζονται μεταξύ τους για τις 5' και αντίστροφα. Οι παράγοντες που θα κρίνουν την θέση ματίσματος "νικητή" σε αυτή την άμιλλα είναι η εγγενής «δύναμη» της θέσης ματίσματος (δηλαδή το πόσο αποκλίνει από τη βέλτιστη) και η συνολική ισχύ των θετικών ρυθμιστικών παραγόντων που θα συγκεντρωθούν σε σχέση με τα αρνητικά. Ο έλεγχος αυτής της δυναμικής ισορροπίας μεταξύ "αντίπαλων" γειτονικών θέσεων ματίσματος πιστεύεται ότι συντελεί την βαθύτερη λογική της ρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος [78,79].

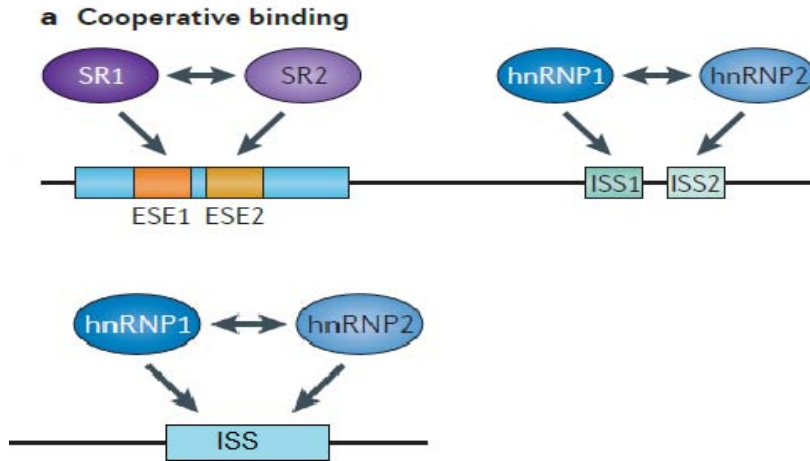
d Competition between splice sites



Εικόνα 18.Κανόνας 4. Η ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος συνίσταται από τον ανταγωνισμό μεταξύ δύο αντίστοιχων γειτονικών θέσεων ματίσματος (Xiang-Dong Fu and Manuel Ares Jr, 2014)

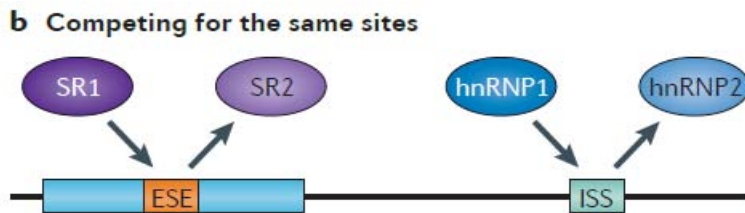
1.1.7 Συνδυαστική ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος

Πολλοί trans ρυθμιστικοί παράγοντες έχει δειχθεί ότι αλληλοεπιδρούν με ποικίλους τρόπους μεταξύ τους αλλά και με μια μεγάλη ποικιλία ρυθμιστικών μορίων που συμμετέχουν στο δίκτυο μεταγωγής σήματος [80]. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ trans ρυθμιστικών παραγόντων μπορεί να 'ναι συναγωνιστικές ή ανταγωνιστικές ως προς την πρόσδεση τους για τα ίδια [81] ή γειτονικά SRE [82]. Μελέτες έχουν δείξει ότι δυο θετικοί ρυθμιστικοί παράγοντες της οικογένειας T-STAR οι ASD-2 και SUP-12 αλληλεπιδρούν συνεργαστικά για την πρόσδεσή τους σε δύο γειτονικά ESE του γονιδίου unc-60 ώστε να ρυθμίσουν το μάτισμα στο μυ. Οι παραπάνω παράγοντες έχουν από μόνοι τους μικρή συγγένεια για σύνδεση στα αντίστοιχα SRE τους και περιορισμένη ικανότητα προσέλκυσης του ματισματοσώματος. Έτσι η πρόσδεση του ενός προάγει την πρόσδεση του άλλου που έχει ως αποτέλεσμα την ενισχυμένη θετική ρύθμιση της αναγνώρισης του εναλλακτικού εξονίου από το ματισματοσώμα [82]. Επίσης έχουν παρατηρηθεί αντίστοιχα φαινόμενα συναγωνιστικής αρνητικής ρύθμισης μεταξύ hnRNP που προσδέονται σε γειτονικά SRE [83].



Εικόνα 19. Συναγωνιστική πρόσδεση παραγόντων σε αντίστοιχα γειτονικά SRE (Xiang-Dong Fu and Manuel Ares Jr, 2014)

Αν διαφορετικοί ρυθμιστικοί παράγοντες είναι ειδικοί για το ίδιο SRE τότε μπορεί να συναγωνιστούν ή να ανταγωνιστούν για την πρόσδεση πάνω του, κάτω από διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες [86]. Αυτό το φαινόμενο έχει παρατηρηθεί σε SR [84] και hnRNP [85] παράγοντες.



Εικόνα 20. Ανταγωνισμός παραγόντων της ίδιας οικογένειας για την πρόσδεση στα SRE (Xiang-Dong Fu and Manuel Ares Jr, 2014)

Ρύθμιση in trans από το δίκτυο μεταγωγής σήματος

Ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά σήματα ρυθμίζουν το κυτταρικό πρόγραμμα εναλλακτικού ματίσματος μεταβάλλοντας το πρότυπο ομοιοπολικών τροποποιήσεων των trans ρυθμιστικών παραγόντων [88,89,90]. Έτσι ρυθμίζονται οι αλληλεπιδράσεις τους με άλλες πρωτεΐνες και RNAs που τελικά έχει ως αποτέλεσμα την ρύθμιση της έκφρασης συγκεκριμένων εναλλακτικών μεταγράφων. Έχει βρεθεί ότι οι SR πρωτεΐνες, οι hnRNP και πολλοί άλλοι παράγοντες που εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στη ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος πηγαίνουν μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος [87]. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να έρθουν σε επαφή με τα συστατικά του δικτύου μεταγωγής σήματος. Οι SR πρωτεΐνες ρυθμίζονται από τουλάχιστον τέσσερις οικογένειες κινασών τις SRPK, CLK, την

Topoisomerase 1 και Akt [91,92,93]. Οι SR μπορούν να φωσφορυλιωθούν σε πολλές διαφορετικές θέσεις, το πρότυπο φωσφορυλίωσής τους έχει σημαντικότερο ρυθμιστικό ρόλο επηρεάζοντας ειδικά το προφίλ εναλλακτικού ματίσματος [98]. Οι hnRNP εκτός από φωσφορυλίωση μπορούν να ρυθμιστούν με μια μεγαλύτερη ποικιλία τροποποιήσεων σε σχέση με τις SR δηλαδή με σουμυλίωση, μεθυλίωση και ακετυλίωση [94,95,96,97] επίσης πιστεύεται ότι η ρύθμιση των hnRNP είναι πολύ πιο πολύπλοκη. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δικτύων μεταγωγής σήματος των SR και των hnRNP αντίστοιχα είναι ελάχιστα γνωστές.

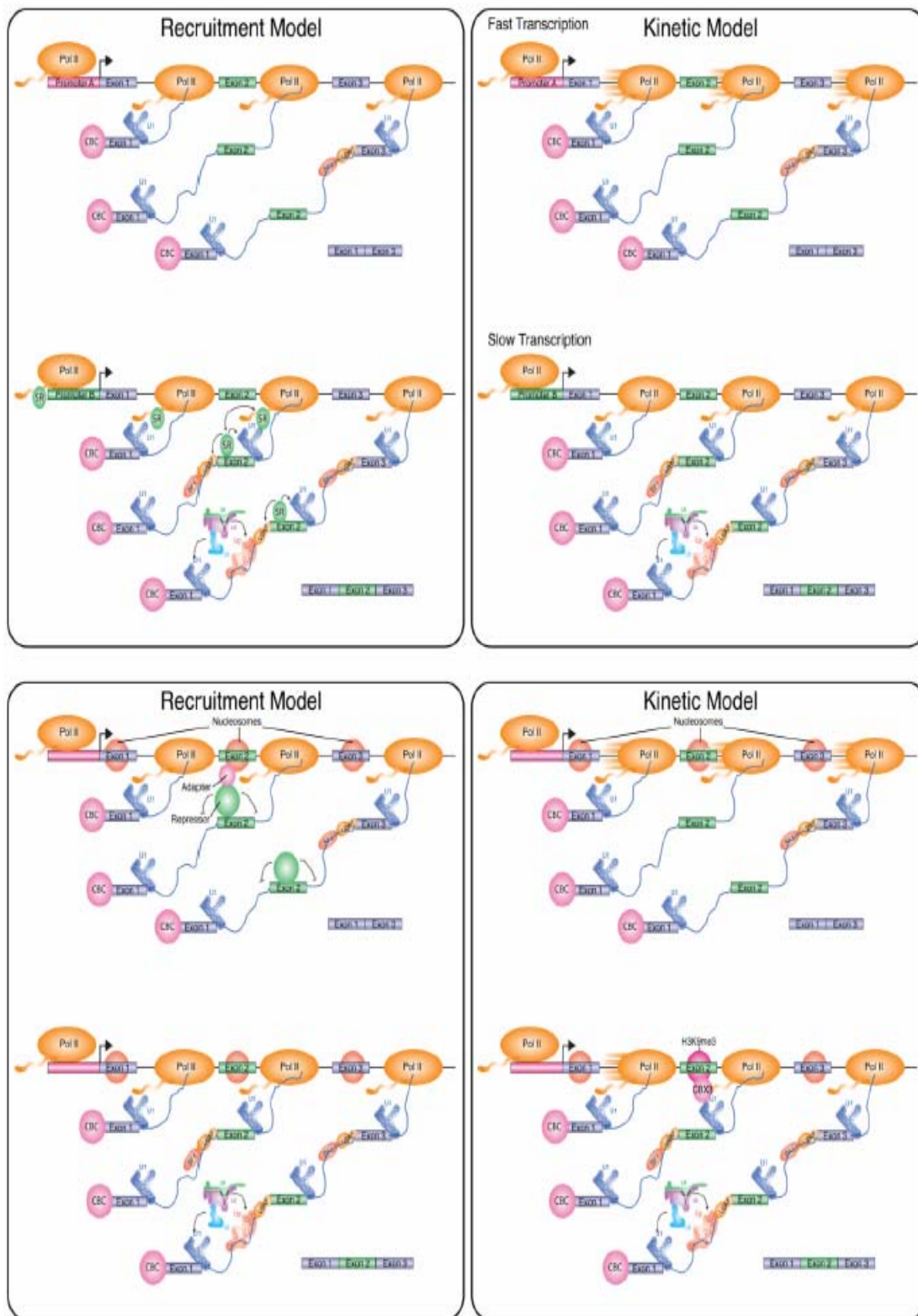
1.1.8 Ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος μέσω μηχανισμών της μεταγραφής

Η μεταγραφή είναι το πρώτο και σίγουρα το πιο κρίσιμο στάδιο της γονιδιακής έκφρασης. Έχει διατυπωθεί μια εξαιρετική θεωρία από το Scherger πρόσφατα που υποστηρίζει ότι η μοίρα κάθε μορίου mRNA καθορίζεται κατά τη διάρκεια της μεταγραφής του. Αυτό γίνεται κυρίως μέσω παραγόντων που εντυπώνονται πάνω στο mRNA κατά τη διάρκεια της μεταγραφής. Αυτοί οι παράγοντες καθορίζουν όλα τα στάδια της ζωής του, και ρυθμίζουν όλες τις αλληλεπιδράσεις του. Επηρεάζουν την επιλογή των εναλλακτικών μεταγράφων που θα εκφραστούν μέσω εναλλακτικού ματίσματος, τον κυτταρικό εντοπισμό, την αποδοτικότητα της μετάφρασης αλλά και το μεταβολισμό και την τελική αποικοδόμησή του [99].

Έχει βρεθεί ότι στο mRNA, το μάτισμα των περισσότερων ιντρονίων και όλων των ιδιόσυστατων ιντρονίων γίνεται κατά τη διάρκεια της μεταγραφής, επίσης όλα τα ιντρόνια που αφαιρούνται μετά τη μεταγραφή είναι εναλλακτικά [100,101,102,103,104]. Επίσης βρέθηκε σε μια έρευνα ότι η πλειονότητα των πρώιμων μεταγράφων παραμένουν συνδεδεμένα με τη χρωματίνη μέχρι να ολοκληρωθεί το μάτισμα και η πολυαδενυλίωση η οποία ολοκληρώνεται πιο πριν από το μάτισμα [101]. Με αυτά τα αποτελέσματα καταλαβαίνουμε ότι οι μηχανισμοί της μεταγραφής και του ματίσματος είναι χρονικά και τοπικά συνδεδεμένα. Μια άλλη πρόσφατη μελέτη έχει δείξει ότι trans παράγοντες ρύθμισης του ματίσματος προσδένονται στην καρβοξυτελική υπομονάδα της RNA πολυμεράσης 2 [105,106]. Από μια άλλη έρευνα βρέθηκε προσδέεται ο παράγοντας hnRNP L σε υποκινητές μέσω του συμπλόκου Mediator [111]. Αυτό το σύμπλοκο γεφυρώνει τους μεταγραφικούς παράγοντες που έχουν προσδεθεί στον υποκινητή με την RNA πολυμεράση 2. Ακόμα βρέθηκε ότι ένα συγκεκριμένο είδος ιστονικής τροποποίησης (H2A Bbd) προσελκύει συστατικά του ματισματοσώματος [107] και ότι ένα άλλο είδος (H3k36me3) το οποίο είναι συγκεντρωμένο σε θέσεις εξονίων στρατολογεί παράγοντες SR (αρχικά προσδέεται ο Psip1/Ledgf και πάνω του ο SRSF1) [108]. Τα τελευταία πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι κύρια συστατικά του μηχανισμού της μεταγραφής λειτουργικά και ρυθμιστικά είναι φυσικά συνδεδεμένα με αντίστοιχα συστατικά του ματίσματος. Επίσης βρέθηκε ότι επηρεάζοντας τον ρυθμό σύνθεσης του mRNA με

τροποποιητές της RNA πολυμεράση 2 επηρεάζεται το πρότυπο εναλλακτικού ματίσματος των γονιδίων που μεταγράφονται. Επίσης από την ίδια μελέτη βρέθηκε ότι πολλοί άλλοι φυσικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη ταχύτητα της μεταγραφής επηρεάζουν ομοιοτρόπως και το προφίλ εναλλακτικού ματίσματος, τέτοιοι είναι: η ποσότητα και ο τύπος επιγενετικών στοιχείων και τροποποιήσεων πάνω στα εναλλακτικά εξόνια, η αλληλουχία των εναλλακτικών περιοχών (μιας και οι περιοχές με μεγάλο συχνότητα αδενίνης και θυμίνης μεταγράφονται αργά), η πρόσδεση πρωτεϊνών στο mRNA κατά τη διάρκεια της σύνδεσής του και άλλα. [110]. Αυτά και πολλά άλλα αποτελέσματα ερευνών δείχνουν κατ' αρχήν ότι η μεταγραφή και το μάτισμα είναι δύο πολύ βαθιά συνδεδεμένες διαδικασίες.

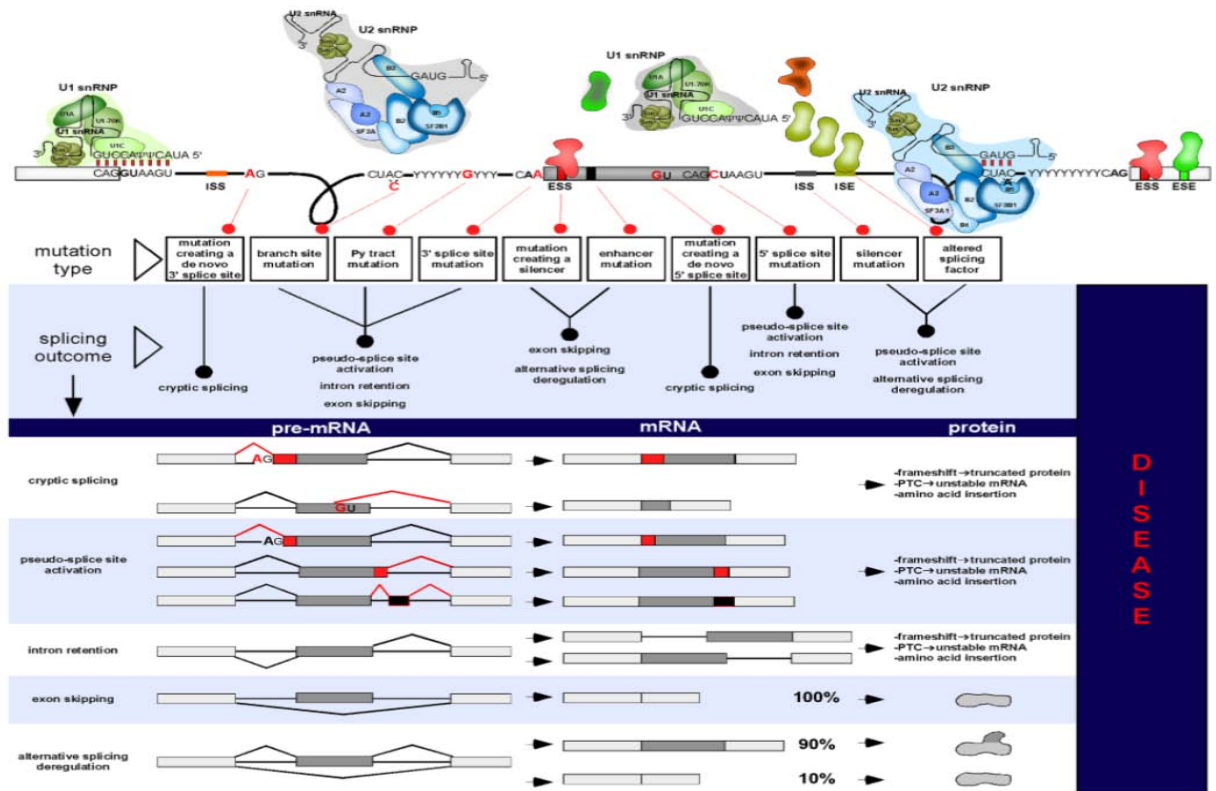
Έχουν δομηθεί δύο μοντέλα ρύθμισης που συμπεριλαμβάνουν την γνώση που αποκτήθηκε από τα αποτελέσματα των παραπάνω πειράματων, τα μοντέλα αυτά δεν είναι αποκλειστικά, δηλαδή για διαφορετικά γονίδια μπορεί να ισχύει το ένα το άλλο ή και τα δυο. Το μοντέλο της στρατολόγησης μοιάζει πολύ με τη θεωρία του Scherrer, δηλαδή παράγοντες του ματίσματος που έχουν στρατολογηθεί σε διάφορα γενετικά στοιχεία όπως οι υποκινητές και τα cis ρυθμιστικά στοιχεία της μεταγραφής (αναγνωρίζοντας συγκεκριμένη αλληλουχία, επιγενετικές τροποποιήσεις, ή άλλους παράγοντες που έχουν προσδεθεί στο DNA) μετατοπίζονται από την RNA pol2 και εντυπώνονται στα αντίστοιχα SRE του συντιθέμενου mRNA όπου μπορούν να ολοκληρώσουν το ρυθμιστικό τους ρόλο. Το κινητικό μοντέλο βασίζεται στο γεγονός ότι οι εναλλακτικές θέσεις ματίσματος είναι λιγότερο ισχυρές σε σχέση με τις ιδιοσυστατικές και ότι για να τις ανταγωνιστούν χρειάζεται η δράση των ρυθμιστικών trans παραγόντων. Θεωρεί ότι αν η μεταγραφή γίνεται γρήγορα οι παράγοντες αυτοί δεν έχουν χρόνο για να προσδεθούν πάνω στο mRNA ώστε να βοηθήσουν στην αναγνώριση των εναλλακτικών περιοχών. Πάνω σε αυτή τη λογική όλοι οι ρυθμιστικοί παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό της μεταγραφής επηρεάζουν το εναλλακτικό μάτισμα. Για παράδειγμα αν σε ένα γονίδιο έχουν συσσωρευθεί συγκεκριμένες επιγενετικές τροποποιήσεις πάνω στους γενετικούς τόπους που κωδικοποιούν για εναλλακτικές θέσεις, η πολυμεράση θα μειώσει ταχύτητα όταν θα μεταγράψει αυτό το μέρος του γονιδίου και θα υπάρξει χρόνος για τους trans παράγοντες να προσδεθούν ώστε να τελέσουν τη ρυθμιστική τους δράση.



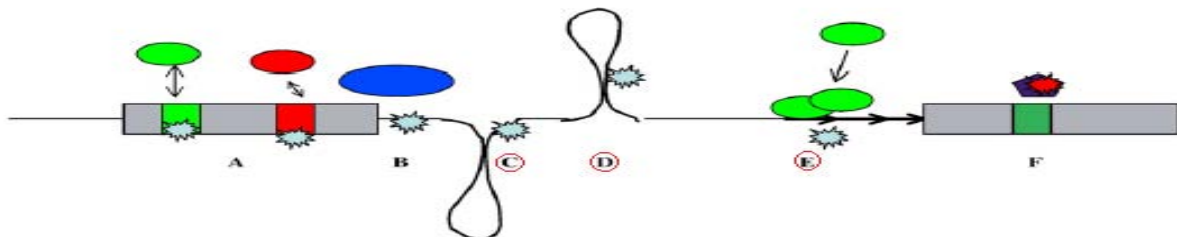
Εικόνα 21. Τα δύο μοντέλα ρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος μέσω της μεταγραφής (Ulrich Braunschweig1., Serge Gueroussou, Alex Plocik, Brenton R. Graveley, Benjamin J. Blencowe, 2013)

1.1.9 Μοριακή βάση γενετικών ασθενειών που οφείλονται σε λάθη στο εναλλακτικό μάτισμα

Το ένα τρίτο όλων των γνωστών γενετικών ασθενειών οφείλεται σε μεταλλάξεις που διαταράσσουν το φυσιολογικό πρότυπο ματίσματος [50,51]. Οι αλλαγές στο προφίλ εναλλακτικού ματίσματος μπορεί να είναι η αιτία ή το αποτέλεσμα μιας γενετικής ασθένειας. Η αλλαγή του προφίλ εναλλακτικού ματίσματος μπορεί να γίνει με ποικίλους έμμεσους τρόπους, και σε αυτές τις περιπτώσεις ο φαινότυπος συνήθως δεν είναι αποτέλεσμα μόνο της αλλαγής στο εναλλακτικό μάτισμα. Κατά κανόνα η μοριακή βάση αυτών των γενετικών ασθενειών είναι η συσσώρευση μεταλλάξεων στις cis περιοχές του ματίσματος με τις οποίες αλληλοεπιδρά το ματισματοσώμα ή οι trans ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Στις εικόνες 22,23 απεικονίζονται οι κύριες κατηγορίες μεταλλάξεων που προκαλούν αλλαγές στο εναλλακτικό μάτισμα ενός γονιδίου. Συσσώρευση μεταλλάξεων στις κύριες cis θέσεις του ματίσματος με τις οποίες αλληλεπιδρά το ματισματοσώμα δηλαδή στις 3' και 5' θέσεις του ματίσματος, την έκταση πυριμιδινών και τη θέση διακλάδωσης μπορεί να καταστείλουν τις αλληλεπιδράσεις με το ματισματοσώμα. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την παράλειψη του εξονίου ανωδικά ή καθοδικά από το σημείο της μετάλλαξης ή την κατακράτηση του ιντρονίου. Σε αρκετές περιπτώσεις αν καταστραφεί ολοσχερώς μια 3' ή 5' θέση του ματίσματος μπορεί να ενεργοποιηθεί μια κοντινή, «ψευδή θέση ματίσματος» (pseudo splice site) η οποία φυσιολογικά θα ήταν αδρανής, αυτό έχει ως αποτέλεσμα την προσθήκη μιας ιντρονικής περιοχής στο ώριμο μετάγραφο. Σχεδόν πάντα η παραπάνω αλλαγή καταστρέφει το πλαίσιο ανάγνωσης [52]. Μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας μέσα στο ιντρόνιο μπορεί να δημιουργήσουν «κρυπτικές» (cryptic splice site) 3' και 5' θέσεις ματίσματος που μπορεί να ανταγωνίζονται τις φυσιολογικές, αυτό σχεδόν πάντα δημιουργεί μη λειτουργικά εναλλακτικά μετάγραφα. Οι μεταλλάξεις μέσα στο εξόνιο ακόμα και αν αποτελούν σιωπηλές μεταλλάξεις, αν βρίσκονται σε εξονικές cis ρυθμιστικές περιοχές του ματίσματος δηλαδή σε εξονικούς ενισχυτές του ματίσματος (Exonic Splice Enhancer) και σε εξονικούς αποσιωπητές του ματίσματος (Exonic Splice Silencer) μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές των αλληλεπιδράσεων μεταξύ cis και trans εξονικών ρυθμιστικών στοιχείων. Αυτό μπορεί να φέρει αλλαγές στην αναγνώριση του εξονίου, με αποτέλεσμα στην πιο ακραία περίπτωση το ματισματοσώμα να μην αναγνωρίζει το εξόνιο πια και έτσι πάντα να παραλείπεται ή απλά να μειωθεί το ποσοστό συμπερίληψης του εξονίου. Με την ίδια λογική συσσώρευση μεταλλάξεων σε ιντρονικές cis ρυθμιστικές περιοχές του ματίσματος δηλαδή σε ιντρονικούς ενισχυτές του ματίσματος (Intronic Splice Enhancer) και σε ιντρονικούς αποσιωπητές του ματίσματος (Intronic Splice Silencer) μπορεί να φέρει αλλαγές στην αναγνώριση του ιντρονίου. Αυτό στη χειρότερη περίπτωση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την συμπερίληψή του στο ώριμο mRNA ή εναλλακτικά να επηρεαστούν τα ποσοστά έκφρασης των εναλλακτικών μεταγράφων.



Εικόνα 22. Η Συσώρευση μεταλλάξεων σε cis ρυθμιστικά στοιχεία του ματίσματος είναι η αιτία πολλών γενετικών ασθενειών (Havens , Duelli, Hastings, 2013).



Εικόνα 23. Η Συσώρευση μεταλλάξεων σε cis ρυθμιστικά στοιχεία του ματίσματος είναι η αιτία πολλών γενετικών ασθενειών (Havens , Duelli, Hastings, 2013).

Οι μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα την εισαγωγή ή την καταστροφή δευτεροταγών δομών φουρκέτας ιντρονικών περιοχών του πρώιμου mRNA μπορούν επίσης να προκαλέσουν ασθένεια. Αν γίνει ένθεση δύο στοιχείων Alu σε αντίθετο προσανατολισμό μέσα σε ένα ιντρόνιο έχουμε την εισαγωγή μιας δευτεροταγούς δομής φουρκέτας στο πρώιμο mRNA (Εικόνα 23, C). Συσώρευση μεταλλάξεων σε μια ιντρονική περιοχή που δημιουργεί δευτεροταγείς δομές, μπορεί να τις καταστρέψει, αυτό ίσως να έχει ως αποτέλεσμα την μη αναγνώριση του εξονίου που βρίσκεται καθοδικά και έτσι τελικά να παραληφθεί από το ώριμο μετάγραφο (Εικόνα 23, D). Τέλος η επέκταση επαναλήψεων που βρίσκονται μέσα σε ιντρόνια μπορεί να απομακρύνει άλλα cis ρυθμιστικά στοιχεία του ματίσματος με επακόλουθο οι trans ρυθμιστικές

πρωτεΐνες που δεσμεύονται σε αυτά να μην μπορούν να αλληλοεπιδράσουν μεταξύ τους για να εκτελέσουν τη ρυθμιστική λειτουργία τους. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του προφίλ εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου (Εικόνα 23, Ε) [173].

1.1.10 Ο ρόλος του εναλλακτικού ματίσματος στον καρκίνο

Τις περισσότερες φορές οι αλλαγές στο εναλλακτικό μάτισμα δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης, αλλά έχει δείχθει ότι έχουν μεγάλη επίδραση στα μετέπειτα στάδια της καρκινογένεσης όπως στη μετάσταση [35]. Κατά την πρόοδο του καρκίνου όλο και περισσότερα γονίδια αλλάζουν το πρότυπο εναλλακτικού ματίσματος με αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα σταδιακά να αποκτούν τα οκτώ χαρακτηριστικά που περιέγραψαν οι Hanahan and Weinberg [174] κατά την πρόοδο του καρκίνου. Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι τα εξής: η αντίσταση των καρκινικών κυττάρων σε σήματα καταστολής της κυτταρικής αύξησης, η ικανότητα να διατηρούν την ενδοκυτταρική σηματοδότηση πολλαπλασιασμού, η αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο, η απόκτηση της ιδιότητας να μεθίστανται και να εισβάλλουν σε απομαρυσμένους ιστούς, η δυνατότητα να επάγουν την αγγειογένεση, η δυνατότητα να επαναπρογραμματίζουν το μεταβολισμό ενέργειας, να είναι αθάνατα όσες φορές και αν διαιρεθούν και να έχουν τη δυνατότητα να διαφεύγουν του ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος.

Ένα κρίσιμο χαρακτηριστικό της καρκινογένεσης είναι η δυνατότητα των καρκινικών κυττάρων να πολλαπλασιάζονται ακόμα και με την απουσία εξωκυτταρικών αυξητικών παραγόντων. Το μονοπάτι Ras/MAPK είναι ιδιόσυστατα ενεργό στο 25% των ανθρώπινων όγκων συνήθως ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων στο γονίδιο Ras [37]. Ένας άλλος μηχανισμός που μπορεί να προκαλέσει αυτό το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή ενός βρόγχου θετικής επανατροφοδότησης που προάγει τη δραστηριότητα των Ras και MAPK κινασών. Το CD44 είναι ένα από τα γονίδια που ρυθμίζουν το μονοπάτι μεταγωγής σήματος Ras/MAPK [38], μέσω της δυνατότητάς του να κωδικοποιεί για πολλά εναλλακτικά μετάγραφα που περιέχουν μια σειρά από εναλλακτικά εξόνια. Όταν περιλαμβάνονται εναλλακτικά εξόνια τότε παράγονται οι ισομορφές CD44v ενώ όταν δεν περιλαμβάνονται η CD44s.. Με την πρόσδεση αυξητικών παραγόντων ενεργοποιείται το μονοπάτι Ras/MAPK που επάγει το εναλλακτικό μάτισμα του CD44 παράγοντας ένα εναλλακτικό μετάγραφο που περιέχει το εναλλακτικό εξόνιο 6, αυτή η ισομορφή ονομάζεται CD44v6 [175]. Το CD44v6 αυξάνει τη δράση ορισμένων RTKs (receptor tyrosine kinases) όπως της Met και του EGFR οι οποίες προωθούν τη σηματοδότηση Ras/MAPK. Οι Ras/MAPK φωσφορυλιώνουν τους παράγοντες ματίσματος Sam68 και SRm160 οι οποίοι επάγουν το συγκεκριμένο προφίλ εναλλακτικού ματίσματος του CD44 [176]. Αυτός ο μηχανισμός συνιστά ένα βρόγχο θετικής ανατροφοδότησης που διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Τα καρκινικά κύτταρα επίσης πρέπει να βρουν τρόπους για να ξεπεράσουν ή να εξαλείψουν μηχανισμούς που ρυθμίζουν αρνητικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως το μονοπάτι του p53. Το γονίδιο p53 εκφράζει μια ποικιλία εναλλακτικών μεταγράφων μέσω της χρήσης εναλλακτικού υποκινητή και μέσω εναλλακτικού ματίσματος. Υπάρχουν τρεις ισομορφές p53 η p53α,β και γ που έχουν διαφορετικές καρβοξυτελικές περιοχές και προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα. Η p53β όταν υπερεκφράζεται επάγει κυτταρική γήρανση [39,40]. Η παραγωγή αυτής της ισομορφής αναστέλλεται από τον παράγοντα ματίσματος SRSF3, [39] αυτός ο παράγοντας υπερεκφράζεται σε πολλά είδη καρκίνου καταστέλλοντας με αυτό τον τρόπο την κυτταρική γήρανση. Ο μηχανισμός δράσης του SRSF3 δεν είναι πλήρως κατανοητός, πιστεύεται ότι προσδένεται στο εξόνιο 19 και με αυτόν τον τρόπο αποτρέπει την συμπερίληψή του στο ώριμο μετάγραφο [41,41].

Η απόπτωση είναι μια διεργασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που παίζει πολύ σημαντικό ρόλο ως φυσικό εμπόδιο στην εξάπλωση του καρκίνου. Ωστόσο καθώς τα καρκινικά κύτταρα συσσωρεύουν μεταλλάξεις απευαισθητοποιούνται από αποπτωτικά σήματα, οδηγώντας σε επιθετικές κακοήθειες και αντίσταση στη χημιοθεραπεία [43,44] Η αλλαγή του εναλλακτικού ματίσματος γονιδίων που ελέγχουν την απόπτωση είναι μια αποτελεσματική στρατηγική των καρκινικών κυττάρων για την αποφυγή της. Ο υποδοχέας θανάτου FAS είναι ένας κύριος ρυθμιστής της απόπτωσης ο οποίος όταν δέχεται το εξωκυττάριο σήμα από τον προσδέτη του τον FasL (FAS ligand) πυροδοτεί το αποπτωτικό μονοπάτι. Τελικά με τη συμβολή και άλλων προαποπτωτικών σημάτων το κύτταρο φτάνει στην απόπτωση. Ένας από τους τελικούς τελεστές της απόπτωσης είναι η κασπάση 9 (Caspase-9), η ενεργοποίηση της προκαλεί ένα καταρράκτη πρωτεόλυσης που τελικά καταστρέφει το κύτταρο. Η ρύθμιση της δράσης της κασπάσης 9 αλλά και του FAS ρυθμίζονται με το εναλλακτικό μάτισμα, εναλλακτικές ισομορφές αυτών των δύο πρωτεϊνών έχουν αντίθετη ρυθμιστική δράση προαποπτωτική ή αντιαποπτωτική [45,46]. Τα καρκινικά κύτταρα αλλάζουν το προφίλ εναλλακτικού ματίσματος αυτών των γονιδίων έτσι ώστε να εκφράζονται μόνο οι αντιαποπτωτικές ισομορφές.

Στην περίπτωση του FAS η συμπερίληψη του εναλλακτικού εξονίου 6 έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μίας ισομορφής που συνδέεται στη μεμβράνη και έχει προαποπτωτική δράση. Στην αντίθετη περίπτωση το εναλλακτικό μετάγραφο που δεν περιέχει το εξόνιο 6 μεταφράζεται σε μια διαλυτή ισομορφή της πρωτεΐνης που έχει αντιαποπτωτική δράση, αυτή η ισομορφή υπερεκφράζεται σε πολλά είδη κακοηθειών σε αντίθεση με την πρώτη. [47,48]. Ο μηχανισμός της ρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος του FAS περιγράφεται παρακάτω. Οι παράγοντες ματίσματος TIA-1 και TIAR (T-cell intracellular antigen 1, TIA-1 related) προωθούν την αναγνώριση και συμπερίληψη του εξονίου 6. Οι παράγοντες TIA-1 και TIAR βοηθούν την αναγνώριση της εναλλακτικής 3' θέσης ματίσματος από τους U2AF (U2 auxiliary splicing factor) και U1 snRNP με αποτέλεσμα την παραγωγή του προαποπτωτικού εναλλακτικού μεταγράφου της FAS [49]. Το αντίθετο αποτέλεσμα έχει η πρόσδεση του παράγοντα PTB

(polypyrimidine tract binding protein) σε έναν εξονικό αποσιωπητή του ματίσματος που βρίσκεται μέσα στο εξόνιο 6 (Exonic splice silencer). Η παραπάνω αλληλεπίδραση παραμποδίζει την πρόσδεση των U2AF και U1 snRNP στην εναλλακτική 3' θέση ματίσματος με αποτέλεσμα την μη αναγνώρησή της και μη συμπερίληψη του εξονίου 6 [49]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το ίδιο αποτέλεσμα στην παρεμπόδιση της δράσης του TIAR έχουν οι HUR, hnRNP1/C2 και RBM5.

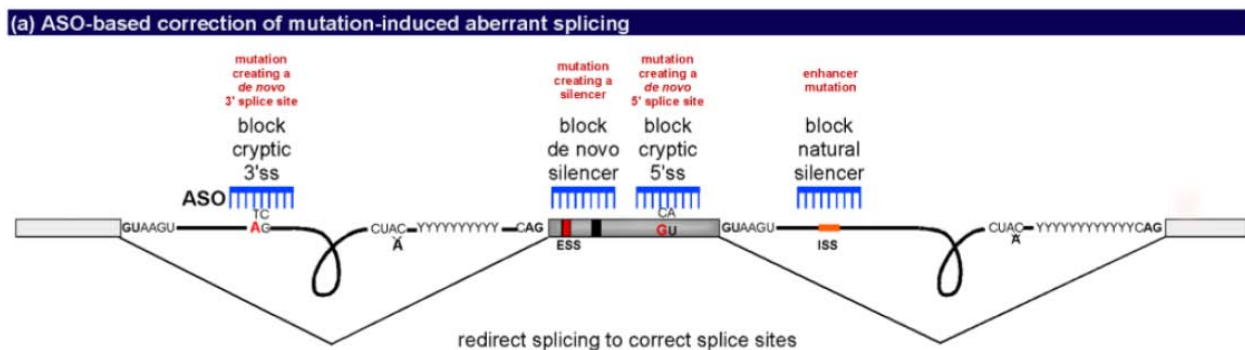
1.1.11 Στόχευση του ματίσματος ως θεραπεία γενετικών ασθενειών

Η στόχευση του ματίσματος για την επιδιόρθωση των επιπτώσεων μεταλλάξεων που προκαλούν γενετικές ασθένειες είναι μια καινούρια και πολλά υποσχόμενη προσέγγιση. Το μάτισμα είναι ένας πολύ καλός στόχος για παρέμβαση μιας και είναι ένα από τα πρώτα στάδια στη γραμμή της γονιδιακής έκφρασης και έχει το μεγάλο πλεονέκτημα ότι τεχνικές που τροποποιούν το μάτισμα δεν τροποποιούν το γενετικό υλικό. Οι άλλες δύο προσεγγίσεις, η γονιδιακή θεραπεία, η εισαγωγή και στοχευμένη διαφοροποίηση βλαστοκυττάρων περιλαμβάνουν πολύ μεγαλύτερα ρίσκα. Επίσης σε σχέση με τις προηγούμενες στρατηγικές μπορεί να επιδιορθώσει ευρύτερη γκάμα μεταλλάξεων και η χορήγηση, μεταφορά και διανομή των θεραπευτικών ουσιών συνήθως είναι πιο εύκολη. Το μάτισμα μπορεί να χειραγωγηθεί από μια σειρά από μοριακά εργαλεία. Αυτά είναι τα αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια, τα τροποποιημένα U1 snRNAs, το χειρισμό του trans-ματίσματος και διάφορα θεραπευτικά μικρά μόρια.

Τα αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (Antisense Oligonucleotides) που είναι επίσης γνωστά ως ASO, είναι μικρές αλληλουχίες 15-25 βάσεων που σχεδιάζονται έτσι ώστε να είναι αντίστροφα συμπληρωματικές με μία συγκεκριμένη αλληλουχία ενός πρώιμου μεταγράφου. Τα ASO δρουν σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με την αλληλουχία στόχο [53]. Με αυτό τον τρόπο παρεμποδίζουν στερικώς την πρόσδεση παραγόντων του ματίσματος όπως του ματισματοσώματος ή trans ρυθμιστικών παραγόντων. Επίσης μπορούν να στοχεύουν πάνω σε ιντρονικές δευτεροταγείς δομές φουρκέτας ώστε να τις σταθεροποιήσουν [54]. Η θεραπευτική χρήση των ASO έχει μερικά πολύ σημαντικά προτερήματα σε σχέση με τις άλλες μεθόδους τροποποίησης του ματίσματος. Έχουν τη μέγιστη ειδικότητα επιτρέποντάς τα να στοχεύουν συγκεκριμένα μόρια RNA. Είναι πάρα πολύ σταθερά γιατί δεν αποικοδομούνται από την ριβονουκλεάση H [53] έχει βρεθεί ότι από μόνα τους έχουν χρόνο ημιζωής μέσα στο ανθρώπινο πλάσμα περίπου 15 μέρες [53]. Επίσης είναι πολύ εύκολο να χορηγηθούν, αλλά και λόγω της εξαιρετικής ειδικότητάς τους έχουν αμελητέα τοξικότητα.

Η χρήση ASO είναι η καλύτερη στρατηγική για την αντιμετώπιση αλλαγών στο μάτισμα που προέρχονται από την δημιουργία de novo cis θέσεων. Δηλαδή 3' και 5' κρυπτικών θέσεων ματίσματος, αλλά και cis ρυθμιστικών αλληλουχιών του εναλλακτικού ματίσματος όπως οι εξονικοί και ιντρονικοί ενισχυτές και αποσιωπητές (ESS, ESE, ISE, ISS). Αυτές οι θέσεις δημιουργούνται μέσω συσσώρευσης μεταλλάξεων κέρδους λειτουργίας. Για αυτό το σκοπό το ASO σχεδιάζεται ώστε να είναι

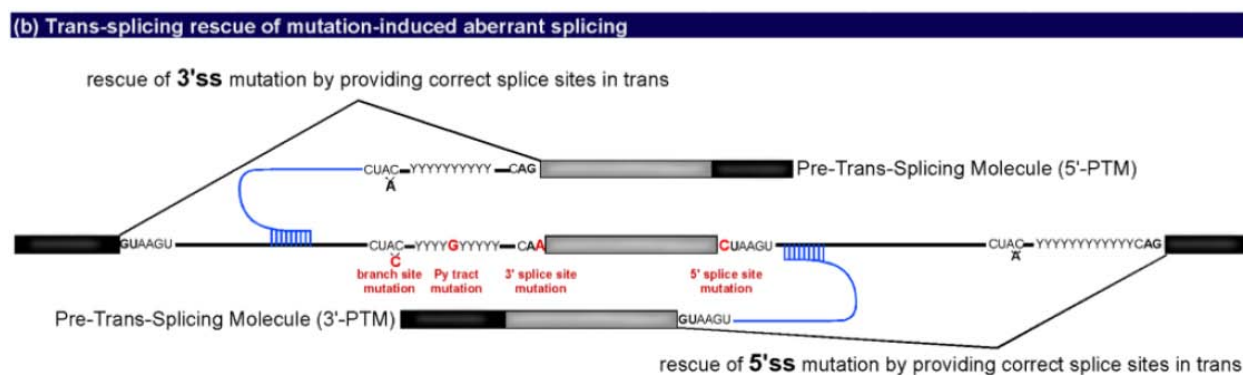
συμπληρωματικό στο πρώιμο RNA σε αυτές τις θέσεις. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η παρεμπόδιση της πρόσδεσης του ματίσματος στις κρυπτικές θέσεις και οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες του ματίσματος στα νεοσυντιθέντα cis ρυθμιστικά στοιχεία. Επίσης τα ASO μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εξαλείψουν την έκφραση ενός γονιδίου του οποίου η υπερέκφραση παίζει βασικό ρόλο στην παθολογία μιας νόσου. Για αυτό το σκοπό σχεδιάζονται μια σειρά από ASO συμπληρωματικά προς τις 3΄ και 5΄ θέσεις του ματίσματος όλων των ιντρονίων ενός γονιδίου. Έτσι καταστέλλεται η αφαίρεση των ιντρονίων και κατά συνέπεια η παραγωγή του ώριμου μεταγράφου, τα παραγόμενα mRNA καταστρέφονται από μηχανισμούς αποικοδόμησης μη νοηματικών μεταγράφων (Nonsense Mediated Decay). Αυτή η στρατηγική έχει χρησιμοποιηθεί με εξαιρετικά αποτελέσματα για την καταπολέμηση της υπερέκφρασης ογκογονιδίων σε διάφορα είδη καρκίνου. [55,56]



Εικόνα 25. Τα ASO προσδένονται στις συμπληρωματικές θέσεις του pre-mRNA που συνιστούν SRE και αναστέλλουν τη δράση τους (Havens, Duelli, Hastings, 2013).

Ο χειρισμός του trans ματίσματος (trans-splicing) για θεραπευτική χρήση επιδιόρθωσης λαθών του ματίσματος είναι μια καινούρια τεχνική που βρίσκεται σε πειραματικό στάδιο. Η μεθοδολογία της αντικατάστασης μέσω trans ματίσματος επίσης γνωστή και ως Splicosomal-Mediated RNA trans-splicing (SMaRT) έχει ως στόχο την αντικατάσταση ολόκληρης της αλληλουχίας ενός μεταγράφου καθοδικά μιας συγκεκριμένης 3΄ θέσεις ματίσματος ή ανοδικά μιας 5΄. Με αυτή τη τεχνική μεταφέρεται στο κύτταρο μέσω ιικού φορέα ένα πλασμίδιο που εκφράζει ένα μόριο RNA που λέγεται pre-trans-splicing molecule (PTM). Το PTM αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές που η κάθε μια έχει διαφορετική λειτουργία. Η περιοχή ASO βρίσκεται στο 5΄ άκρο του μορίου και η λειτουργία της είναι η στόχευση του PTM σε μία συγκεκριμένη περιοχή ενός πρώιμου mRNA. Το ASO σχεδιάζεται έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικό σε μία ιντρονική περιοχή του πρώιμου mRNA ανοδικά της 3΄ ή καθοδικά της 5΄ θέσης. Στο κέντρο του μορίου υπάρχει μία συνθετική θέση ματίσματος η οποία χρησιμοποιείται για τη σύνδεση μέσω trans ματίσματος του πρώιμου mRNA στόχου και του PTM. Καθοδικά αυτής της περιοχής βρίσκεται η θεραπευτική αλληλουχία τελεστής που τελικά θα ενσωματωθεί στο πρώιμο mRNA στόχο. Ο μηχανισμός δράσης της τεχνικής SMaRT για την διόρθωση μιας μετάλλαξης σε μία 3΄ θέση ματίσματος είναι ο εξής: αφού εκφραστεί το PTM η περιοχή ASO προσδένεται ανοδικά της θέσης που έχει γίνει η

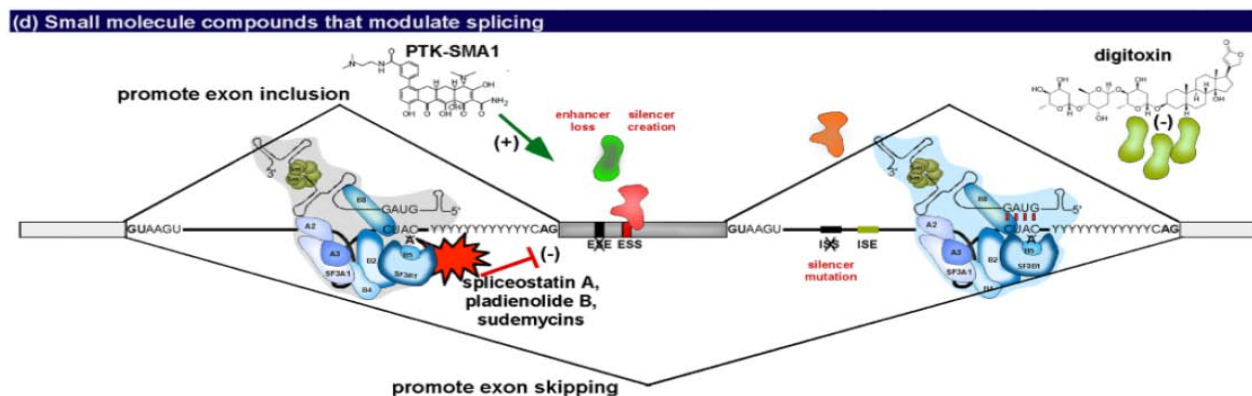
μετάλλαξη, στη συνέχεια το ματισματόσωμα αναγνωρίζει την συνθετική 3' θέση ματίσματος και έτσι καταλύει την αντίδραση ματίσματος, ενώνοντας την αλληλουχία τελεστή με το εξόνιο ανοδικά της φυσιολογική 5'θέσης ματίσματος του mRNA, αντικαθιστώντας με αυτό τον τρόπο την περιοχή του mRNA καθοδικά της 5'θέσης ματίσματος όπως φαίνεται στην εικόνα παρακάτω. Ανάλογος είναι και ο μηχανισμός για τη διόρθωση μετάλλαξης σε 5' θέση ματίσματος. Η τεχνική αυτή είναι η μόνη που μπορεί να διορθώσει μεταλλάξεις που απενεργοποιούν την 3' θέση ματίσματος, επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διορθώσει τις επιπτώσεις μεταλλάξεων που έχουν συσσωρευθεί μέσα σε ένα εξόνιο. Η τεχνική SMaRT χρησιμοποιεί ικούς φορείς για τη μεταφορά του PTM, οπότε κληρονομεί και όλες τις επιπλοκές που συνδέονται με αυτή τη μέθοδο μεταφοράς. Δύο πολύ σημαντικά θετικά στοιχεία αυτής της μεθόδου σε σχέση με τη μεταφορά ολόκληρου του γονιδίου είναι ότι μπορεί να διορθώσει και μεταλλάξεις αρνητικού κέρδους λειτουργίας, αλλά και ότι δεν επηρεάζει τη ρύθμιση της έναρξης της μεταγραφής [57].



Εικόνα 26. Με το χειρισμό του Trans ματίσματος μπορεί να αντικατασταθεί η αλληλουχία ολόκληρου του μεταγράφου καθοδικά μιας 3'θέσης ματίσματος, ή ανοδικά μιας 5' (Havens, Duelli, Hastings, 2013).

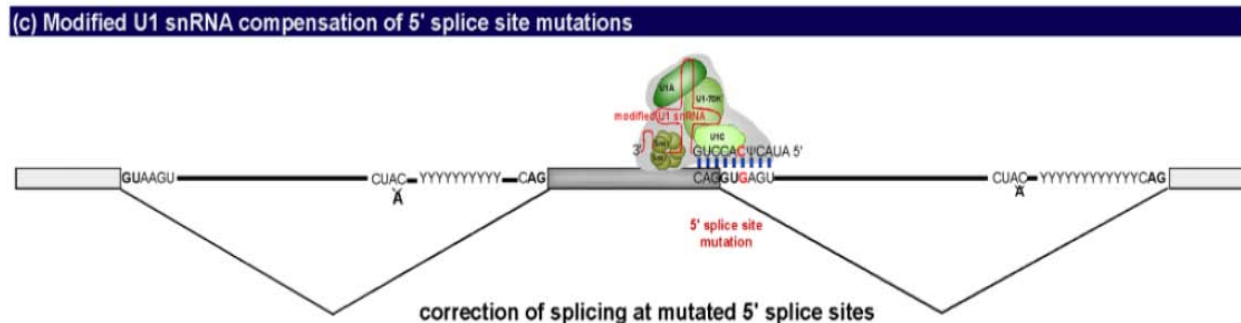
Έχουν βρεθεί πολλά μικρά μόρια που μπορούν να επηρεάσουν το μάτισμα, η δράση αυτών των μορίων έχει βρεθεί με μεθόδους διαλογής υψηλής απόδοσης (high throughput screening) [177]. Τις περισσότερες φορές δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός δράσης τους και πιστεύεται ότι πολλά από αυτά δρουν έμμεσα επηρεάζοντας κάποιο ή κάποια συστατικά των μονοπατιών μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν το εναλλακτικό μάτισμα[178]. Μάλλον για τον παραπάνω λόγο τα μικρά μόρια δεν είναι ειδικά για τον αιτιολογικό παράγοντα της ασθένειας και έτσι συνήθως προκαλούν παράπλευρα αποτελέσματα. Η πλειοψηφία αυτών των φαρμάκων έχουν είδη εγκριθεί για την κλινική πράξη για άλλες ασθένειες[179]. Η χρήση αυτών των μορίων είναι η καλύτερη στρατηγική για την καταπολέμηση ασθενειών που οφείλονται στην απορρύθμιση της έκφρασης εναλλακτικών μεταγράφων. Η συγκεκριμένη αιτιολογία πολλές φορές δεν οφείλεται σε μετάλλαξη μέσα στα γονίδια που επηρεάζονται αλλά σε πολλούς διαφορετικούς trans

ρυθμιστικούς παράγοντες. Η διάγνωση και η θεραπεία τέτοιων ασθενειών είναι εξαιρετικά δύσκολη και δυστυχώς η στρατηγική αντιμετώπισης περιλαμβάνει μια σειρά από δοκιμές διαφορετικών συνδυασμών μικρών μορίων.



Εικόνα 27. Πολλά μικρά θεραπευτικά μόρια επηρεάζουν το μάτισμα με ποικίλους άγνωστους μηχανισμούς. (Havens, Duelli, Hastings, 2013).

Η εισαγωγή τροποποιημένου U1 snRNA είναι μια πολύ καλή μέθοδος για την θεραπεία ασθενειών που οφείλονται στην καταστολή του ματίσματος ενός γονιδίου λόγω συσσώρευσης απενεργοποιητικών μεταλλάξεων σε 5' θέσεις ματίσματος. Τα τροποποιημένα U1 snRNAs σχεδιάζονται έτσι ώστε το μέρος του που χρειάζεται για την αναγνώριση της 5' θέσης να είναι συμπληρωματικά με τη μεταλλαγμένη. Έτσι τα τροποποιημένα U1 snRNAs εισάγονται με ικούς φορείς και αντικαθιστούν τα φυσιολογικά U1 snRNAs κατά τη συγκρότηση του ματισματοσώματος στην θέση ματίσματος που περιλαμβάνει τη χαλασμένη 5' θέση και με αυτόν τον τρόπο αποκαθιστούν την αναγνώριση της και κατά συνέπεια και το μάτισμα [180].



Εικόνα 28. Τα τροποποιημένα U1 snRNA είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να αναγνωρίζουν θέσεις ματίσματος που έχουν συσσωρεύσει μεταλλάξεις (Havens, Duelli, Hastings, 2013).

1.2 Οι 5'-μη μεταφραζόμενες περιοχές του mRNA

Στο 5' άκρο κάθε πυρηνικά μεταγραφόμενου mRNA υπάρχουν οι 5'μη μεταφραζόμενες περιοχές (5' untranslated regions, 5' UTR). Το μέσο μήκος των 5' UTR είναι 100 με 220 νουκλεοτίδια [112]. Οι 5' UTR περιλαμβάνουν cis στοιχεία που συμμετέχουν στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και την αναγνώριση του mRNA από το ριβόσωμα. Τα cis στοιχεία των 5' UTR παίζουν κυρίως ρόλο στην ρύθμιση της απόδοσης της μετάφρασης του mRNA σε πρωτεΐνη. Επίσης, ρυθμίζουν την έξοδο του από τον πυρήνα, τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό, και τον χρόνο ημιζωής του στο κυτταρόπλασμα. Αυτό το είδος ρύθμισης έχει ως στόχο την ταχύτερη απόκριση του κυττάρου σε αλλαγές, είναι πολύ πιο γρήγορο το να υπάρχουν έτοιμα και ανενεργά τα mRNA μέχρι να χρειαστεί η ολοκλήρωση της έκφρασής τους, παρά για κάθε αλλαγή να χρειάζεται να ξεκινήσει από την αρχή η γραμμή γονιδιακής έκφρασης. Αυτά cis στοιχεία είναι: η 5'καλύπτρα, οι δευτεροταγής δομές φουρκέτας, οι θέσεις πρόσδεσης ρυθμιστικών trans παραγόντων, τα ανοδικά πλαίσια ανάγνωσης, τα ανοδικά κωδικόνια έναρξης και οι εσωτερικές θέσεις εισόδου του ριβοσώματος.

Κάθε mRNA έχει πάντα μόνο μία 5'καλύπτρα κατά τα άλλα μπορεί να έχει μια ποικιλία από τα υπόλοιπα cis στοιχεία. Ο κύριος ρόλος της 5' καλύπτρας είναι να διευκολύνει την πρόσδεση του mRNA στο ριβόσωμα. Αυτό επιτυγχάνεται εν μέρει μέσω των παραγόντων έναρξης της μετάφρασης οι οποίοι προσδένονται στην καλύπτρα και στρατολογούν τη μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος [113]. Άλλοι ρόλοι της 5'καλύπτρας είναι να προστατεύουν το mRNA από 5'→3' εξωνουκλεολυτική διάσπαση, αλλά και να επάγουν την πολυαδενυλίωση το μάτισμα και την εξαγωγή του mRNA από τον πυρήνα [114,115].

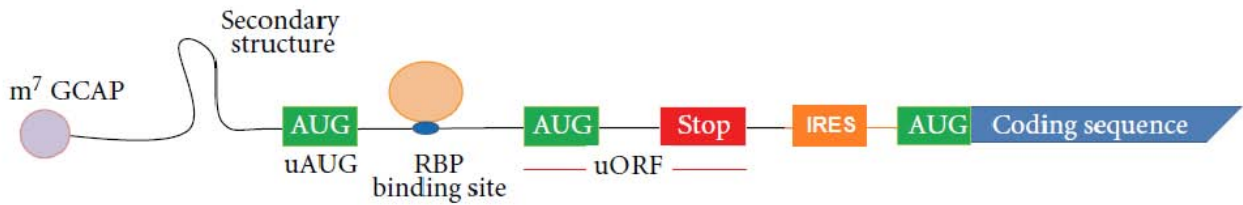
Οι δευτεροταγής δομές φουρκέτας έχουν ως μοναδικό ρόλο την αρνητική ρύθμιση της μετάφρασης και βρίσκονται συνήθως σε μετάγραφα γονιδίων που κωδικοποιούν πολύ σημαντικές (και επικίνδυνες αν υπερεκφραστούν) ρυθμιστικές πρωτεΐνες όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες και τα πρωτοοογονίδια. Η έκταση, η περιεκτικότητα σε γουανίνες και κυτοσίνες και η απόσταση από την 5'καλύπτρα είναι παράγοντες που καθορίζουν τη σταθερότητα αυτών των δομών [116,117,118]. Αυτές οι δομές στελέχους-θηλιάς πολλές φορές αποτελούν θέση πρόσδεσης επιπρόσθετων trans αρνητικών ρυθμιστικών παραγόντων [119].

Οι θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνικών trans παραγόντων και αυτές ρυθμίζουν την μετάφραση του mRNA βοηθώντας ή παρεμποδίζοντας την αναγνώρισή του από το ριβόσωμα [120]. Σε αυτές μπορούν να προσδεθούν συγκεκριμένοι για κάθε θέση θετικοί ή αρνητικοί ρυθμιστικοί παράγοντες. Ένα απλό παράδειγμα τέτοιου είδους ρύθμισης είναι η καταστολή της μετάφρασης μεταγράφων που εκφράζουν ένζυμα που παίζουν ρόλο στο μεταβολισμό του σιδήρου από τα IRP1 και IRP2. Όταν η συγκέντρωση ιόντων σιδήρου είναι χαμηλή τα IRP1 και IRP2 προσδένονται στο αντίστοιχο cis στοιχείο IRE (iron

response element) έτσι μπλοκάρεται στερικά η αναγνώριση της 5'καλύπτρας από το ριβόσωμα ή διακόπτεται η σάρωση του ριβοσώματος πριν φτάσει στο κωδικόνιο έναρξης ανάλογα με την απόσταση του IRE από την καλύπτρα. Όταν αυξηθεί η συγκέντρωση σιδήρου τότε είναι συνετό πια για το κύτταρο να παράγει αυτές τις πρωτεΐνες και έτσι ο σίδηρος προσδένεται στα IRP1&2 και μειώνει δραστικά την συγγενειά τους για το IRE, έτσι τα mRNA αυτά είναι ελευθέρω πια να εκφραστούν[181].

Τα ανοδικά πλαίσια ανάγνωσης και τα ανοδικά κωδικόνια έναρξης (upstream reading frame uORF, upstream start codon uAUG) όπως υπαινίσσεται το όνομά τους είναι ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης και κωδικόνια έναρξης που βρίσκονται ανοδικά του κυρίου πλαισίου ανάγνωσης του μεταγράφου. Τα uORF όπως και τα κανονικά πλαίσια ορίζονται από ένα κωδικόνιο έναρξης και ένα λήξης αλλά μπορούν και να μεταφραστούν. Η διαφορά τους προφανώς είναι ότι τα κύρια πλαίσια ανάγνωσης έχουν λειτουργικό σε αντίθεση με τα uORF που έχουν καθαρά ρυθμιστικό ρόλο. Τα uORF θεωρείται ότι έχουν σχεδόν πάντα αρνητική ρυθμιστική δράση [122] αν και έχουν βρεθεί ελάχιστες εξαιρέσεις [123,124]. Ο πιο αποδεκτός μηχανισμός δράσης των uAUG είναι ότι μάλλον δρουν σε δολώματα για το ριβόσωμα. Η μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος προσδένεται στην καλύπτρα και μετακινείται 5'προς 3'μέχρι να βρει κωδικόνιο έναρξης, με αυτό τον τρόπο το uAUG αναγνωρίζεται πρώτο και ανταγωνίζεται το κωδικόνιο έναρξης που βρίσκεται καθοδικά. Τα uORF δρουν με παρόμοιο τρόπο μιας και αυτά έχουν κωδικόνιο έναρξης, η διαφορά με τα uAUG ως αναφορά το μηχανισμό ρύθμισης είναι ότι μεταφράζονται και τα πεπτίδια που παράγονται σταματούν το ριβόσωμα στο τέλος του uORF αναγκάζοντάς το να αποδεσμευτεί [125].

Οι εσωτερικές θέσεις εισόδου του ριβοσώματος (Internal Ribosome Entry Sites, IRES) είναι cis στοιχεία που βρίσκονται συνήθως κοντά στο κωδικόνιο έναρξης και μπορούν να προσελκύσουν το ριβόσωμα κατευθείαν στη θέση τους παρακάμπτοντας την 5' καλύπτρα. Αυτά τα στοιχεία αρχικά ανακαλυφθήκαν στα μετάγραφα των πολιοιών [126] και σε μια μετέπειτα μελέτη επίσης βρέθηκε ότι τα ιικά μετάγραφα που περιείχαν IRES μπορούσαν να προσελκύσουν τα κυτταρικά ριβοσώματα πολύ πιο αποτελεσματικά σε σχέση με τα κυτταρικά μετάγραφα [127]. Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι περίπου το 10%-15% των ευκαριωτικών mRNAs περιέχουν λειτουργικά IRES και με αυτό τον τρόπο μπορούν να μεταφραστούν ανεξάρτητα από την καλύπτρα. Η συγκεκριμένη μελέτη επίσης έδειξε ότι ο πιο πιθανός ρόλος των κυτταρικών μεταγράφων που περιέχουν IRES είναι να δίνουν την ικανότητα να μεταφράζονται φυσιολογικά κάτω από καταστάσεις stress [128]. Επίσης έχει βρεθεί ότι τα ιικά IRES σχηματίζουν συγκεκριμένες δευτεροταγής δομές οι οποίες είναι απαραίτητες για τη λειτουργία τους [129]. Τέλος δύο πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι όπως και τα περισσότερα cis στοιχεία για να δράσουν είναι απαραίτητη η πρόσδεση trans παραγόντων [130,131]



Εικόνα 29. Οι 6 γνωστές κατηγορίες cis ρυθμιστικών στοιχείων που βρίσκονται στις 5' μη μεταφραζόμενες περιοχές. (Araujo et. al. 2012)

1.3 Η ρυθμιστική δράση των εναλλακτικών 5' αμετάφραστων περιοχών

Το 12% των ανώτερων ευκαρυωτικών γονιδίων εκφράζουν εναλλακτικά 5' UTR μέσω εναλλακτικού ματίσματος [134] και το 10%-18% μέσω εναλλακτικών υποκινιτών, η πλειονότητα αυτών των γονιδίων εκφράζει ρυθμιστικές πρωτεΐνες [132,133]. Ο ευκαρυωτικός οργανισμός μπορεί να εκφράζει κάτω από διαφορετικές συνθήκες μετάγραφα που έχουν εναλλακτικά 5' UTR, με αυτό τον τρόπο μπορεί να ελέγξει λεπτομερώς την απόδοση αλλά και τις συνθήκες κάτω από τις οποίες θα μεταφραστεί το μετάγραφο ως απόκριση σε αυτές, αυτές οι δύο μεταβλητές καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τις αλληλεπιδράσεις cis στοιχείων στα UTR και trans παραγόντων. Πιστεύεται ότι η στρατηγική του κυττάρου είναι να είναι πάντα προετοιμασμένο για τις πιθανές αλλαγές που μπορεί να συμβούν. Με αυτή τη λογική το κύτταρο μπορεί να εκφράσει μια σειρά από εναλλακτικά μετάγραφα με διαφορετικά 5' UTR (και/ή 3') ώστε να καλύπτει πολλές πιθανότητες αλλαγής ώστε να αποκριθεί γρήγορα και αποτελεσματικά στην αλλαγή. Συγκεκριμένα μετάγραφα μεταφράζονται κάτω από συγκεκριμένες κυτταρικές συνθήκες μέσω των trans παραγόντων που ενεργοποιούνται ως απόκριση σε αυτές. Αυτοί οι παράγοντες προσδένονται στα αντίστοιχα cis στοιχεία συγκεκριμένων εναλλακτικών UTR προωθώντας αλλά και παράλληλα ρυθμίζοντας την απόδοση της μετάφρασής τους. Τα μετάγραφα που δεν θα στρατολογήσουν τους αντίστοιχους trans δεν θα μεταφραστούν και θα παραμείνουν αδρανή στο κυτταρόπλασμα μέχρι να αλλάξουν η συνθήκες κάτω από τις οποίες χρειάζεται η έκφρασή τους ή θα αποικοδομηθούν [182]. Αν διαταραχθεί η λεπτή ποιοτική ή η ποσοτική ισορροπία έκφρασης εναλλακτικών μεταγράφων είδαμε παραπάνω ότι τα αποτελέσματα μπορεί να είναι καταστροφικά για το κύτταρο ή και για τον οργανισμό τα μετάγραφα με εναλλακτικά 5' UTR δεν αποτελούν εξαίρεση. Ένα καλό παράδειγμα είναι η απορρύθμιση της έκφρασης δύο εναλλακτικών μεταγράφων του ογκοκατασταλτικού γονιδίου BRCA1 στον καρκίνο του μαστού. Τα δύο αυτά εναλλακτικά μετάγραφα εκφράζονται από εναλλακτικό υποκινιτή και διαφέρουν στο 5' UTR τους, το ένα έχει εκτεταμένο 5' UTR το άλλο έχει πολύ μικρότερο. Το μακρύ μετάγραφο περιέχει στο UTR του μια σειρά από ισχυρά αρνητικά

cis στοιχεία (uAUGs) ενώ το βραχύ έχει πολύ λιγότερα. Στον καρκίνο του μαστού συνήθως εκφράζεται μόνο το μακρύ μετάγραφο το οποίο μεταφράζεται ελάχιστα και έτσι αδυνατεί να αναστείλει την κυτταρική διαίρεση [135].

1.4 Η αποαδενυλάση PARN

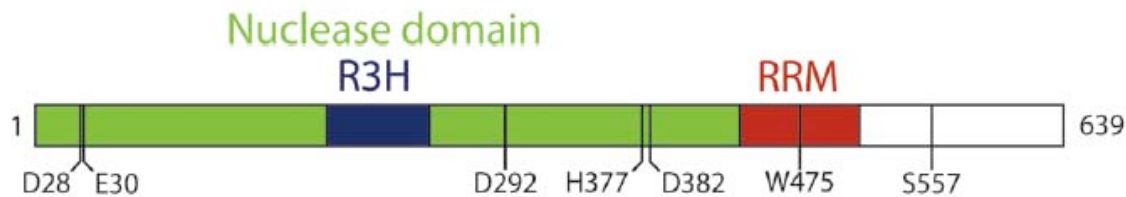
Η PARN είναι μια 3'-5' αποαδενυλάση, δηλαδή μια ριβονουκλεάση που η ενζυμική της δράση είναι η αποικοδόμηση πολυ(A) ουρών μεταγράφων με κατεύθυνση 3' προς 5'. Για να πραγματοποιήσει τη δράση της χρειάζεται να αναγνωρίσει και να προσδεθεί στην 3' πολυ(A) ουρά και στην 5' καλύπτρα [137] και χρειάζεται να υπάρχει μία ελεύθερη 3' υδροξυομάδα στο RNA-στόχο [136]. Αξίζει να αναφέρουμε ότι η PARN είναι η μόνη αποαδενυλάση που είναι γνωστό ότι προσδέεται άμεσα στην πολυ(A) ουρά και στην 5' καλύπτρα. Η PARN χρειάζεται να ομοδιμεριστεί για να είναι δραστική δηλαδή δύο πρωτείνες PARN χρειάζεται να συνδεθούν με δισουλφιδικούς δεσμούς [136].

Υπάρχουν δύο γνωστές λειτουργικές ισομορφές της PARN μια μεγάλη μήκους 639 αμινοξέων και μοριακού βάρους 74 kilodalton [138,140] και μια 54kd, η βραχύτερη πιστεύεται ότι προκύπτει από την πρωτεόλυση της ισομορφής πλήρους μήκους [140], αυτές οι δύο ισομορφές επίσης έχει βρεθεί ότι έχουν διαφορετικό κυτταρικό εντοπισμό η 74 μεταφέρεται στον πυρήνα ενώ η 54 παραμένει στο κυτταρόπλασμα [140].

Η PARN ανήκει στην οικογένεια νουκλεασών DEDD και πιο συγκεκριμένα στην υποοικογένεια DEDDh. Οι DEDD ριβονουκλεάσες συμπεριλαμβάνουν DNAσες και RNAσες που το καταλυτικό τους κέντρο ορίζεται από τέσσερα οξεία αμινοξέα που είναι καταναμημένα μεταξύ των τριών χαρακτηριστικών μοτίβων Exo1-3 [141]. Μεταξύ αυτών των τεσσάρων αμινοξέων στην τριτοταγή δομή του ενζύμου δεσμεύονται δύο δισθενή ιόντα Mg που είναι απαραίτητα για την καταλυτική δράση. Αυτά τα τέσσερα συντηρημένα αμινοξέα που χαρακτηρίζουν την οικογένεια ενζύμων DEDD περιλαμβάνουν τρία ασπαρτικά οξεία (D) και ένα γλουταμινικό (E). Η οικογένεια DEDD χωρίζεται σε δύο υποοικογένειες τη DEDDy DEDDh ανάλογα με το πέμπτο συντηρημένο αμινοξύ, το οποίο είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση ενός μορίου νερού ή υδροξειδίου κατά την υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δύο νουκλεοτιδίων [142]. Αυτό το αμινοξύ μπορεί να είναι τυροσίνη (y) ή ιστιδίνη (h), η ιστιδίνη 337 (His337) πιστεύεται ότι τελειώνει τον παραπάνω ρόλο [136].

Η αλληλουχία της PARN χωρίζεται σε τρεις περιοχές (επικράτειες, domains), την περιοχή νουκλεάσης (1-177) και (246- 391) και δύο περιοχές με RNA-συνδεόμενες ιδιότητες την R3H (178-245) και RRM (437-510). Η περιοχή νουκλεάσης περιέχει τα τέσσερα καταλυτικά αμινοξέα (Asp28, Glu30,

Asp 292, Asp 382 και παίζει σημαντικότατο ρόλο στη δομή του ενεργού κέντρου[136]. Η περιοχή R3H έχει βρεθεί ότι παίζει ρόλο στην πρόσδεση του ενζύμου με το υπόστρωμά του την πολυ(A) [136] ουρά ενώ η RRM έχει διπλό ρόλο μιας και απαιτείται για την πρόσδεση στην 5'καλύπτρα αλλά και για την πρόσδεση στην πολυ(A) ουρά [143]. Επίσης έχει προταθεί η RRM επικράτεια να σταθεροποιεί την συνολική τρισδιάστατη δομή της PARN [144].



Εικόνα 30. Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών (domains) της ανθρώπινης αποαδενυλάσης PARN (639 αα), όπου με πράσινο χρώμα αναπαρίσταται η περιοχή ριβονουκλεάσης, με μπλε η περιοχή R3H, με κόκκινο η περιοχή RRM, και με λευκό η μη συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή. Αναπαρίστανται επίσης και τα λειτουργικώς σημαντικότερα αμινοξέα της πρωτεΐνης (Virtanen et al., 2013)

Η PARN συμμετέχει σε μια σειρά κυτταρικών αποκρίσεων. Για παράδειγμα, έχει δείχθει ότι η PARN εμπλέκεται σε κυτταρική απόκριση στο στρες [145], στην αποικοδόμηση των πολλαπλά ματισμένων HIV-1 mRNAs κατά τη μόλυνση από HIV-1 [146]. Επίσης, έχει προταθεί ως ένας πιθανός δείκτης της καρκινικής ανάπτυξης [147].

Η ρύθμιση της στόχευσης και της δραστικότητας της PARN φαίνεται να επιτελείται από cis-δραστικά στοιχεία, όπως είναι τα στοιχεία AU και GU [148]. Στα στοιχεία αυτά, προσδένονται διάφοροι trans RNA-συνδεδόμενοι παράγοντες, οι οποίοι στρατολογούν, ενισχύουν ή αναστέλλουν την PARN[148]. Πολλά mRNAs που περιέχουν συγκεκριμένα cis στοιχεία όπως τα ARE (πλούσια σε AU κατάλοιπα), αποτελούν πρωτο-ογκογονίδια (π.χ. c-myc, c-fos και c-jun), κυτταροκίνες (π.χ. TNFα), χυμοκίνες, αυξητικοί παράγοντες και ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου [153]. Τα εν λόγω mRNAs, ρυθμίζονται από τις ARE-συνδεδόμενες πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν εμπλακεί σε διεργασίες δρώντας ως ενεργοποιητές ή πρωτεΐνες στρατολόγησης της PARN. Επίσης η PARN εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα αλλά μπορεί και να μετακινείται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος [149,150] στον πυρήνα, βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στα nucleoli and Cajal bodies [151] αλλά συμμετέχει επίσης και στην επεξεργασία μη-κωδικών μορίων RNA, όπως είναι τα μικρά nucleolar RNAs (snoRNAs) και τα μικρά Cajal body RNAs (scaRNAs) [151]. Τα snoRNAs και τα scaRNAs είναι κρίσιμα για την τροποποίηση μη-κωδικών μορίων, όπως είναι τα ριβοσωμικά rRNAs και τα μικρά U πυρηνικά snRNAs του spliceosome[152].

1.5 Η ρυθμιστική δράση των miRNAs

Εκτός από την καλά τεκμηριωμένη και επαρκώς ερευνημένη αρνητική μετα-μεταγραφική ρυθμιστική δράση που εξασκούν τα miRNAs πάνω στα mRNAs στοχεύοντας πάνω στην 3' UTR των τελευταίων, πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι τα miRNAs έχουν και θετική ρυθμιστική ικανότητα αλλά και ότι μπορούν να στοχεύσουν στην 5' UTR [154] αλλά και στην κωδική περιοχή των mRNA [155].

Όλες οι γνωστές ρυθμιστικές δράσεις των miRNAs διεκπεραιώνονται με τη βοήθεια RNA συνδεδεμένων πρωτεϊνών. Τα miRNAs δημιουργούν ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα με αυτές τις πρωτεΐνες, τα οποία στη συνέχεια στοχεύονται σε συγκεκριμένα cis ρυθμιστικά στοιχεία των ώριμων mRNAs. Η στόχευση αυτών των miRNPs γίνεται αποκλειστικά από το miRNA το οποίο δημιουργεί δεσμούς Watson-Crick με συγκεκριμένα cis ρυθμιστικά στοιχεία των ώριμων mRNAs τα οποία είναι συμπληρωματικά συνήθως με μια περιοχή στο 5' άκρο του miRNA, γνωστή ως περιοχή seed (seed region). Το αποτέλεσμα της πρόσδεσης του miRNP στο mRNA στόχο εξαρτάται κυρίως από την πρωτεϊνική σύστασή του, την θέση και τον τύπο cis ρυθμιστικού στοιχείου που θα προσδεθεί και από βαθμό συμπληρωματικότητας της 5' περιοχής seed με το cis ρυθμιστικό στοιχείο. Μέχρι στιγμής τα γνωστά πιθανά αποτελέσματα πρόσδεσης των miRNP στα mRNA στόχο είναι: η άμεση τμήση και αποικοδόμηση του mRNA, η καταστολή ή ενεργοποίηση της μετάφρασής του και η αποαδενυλίωσή του μέσω στρατολόγησης αποαδενυλασών.

Όταν η 5' περιοχή seed του miRNA είναι πλήρως συμπληρωματική με την περιοχή πρόσδεσής του στο mRNA στόχο τότε το miRNP miRISC καταλύει την ενδονουκλεολυτική κοπή του. Το miRISC αποτελείται από μία AGO πρωτεΐνη και την GW1826 που αλληλεπιδρά με την AGO [183]. Οι AGO πρωτεΐνες περιέχουν τρεις επικράτειες, τις PAZ, MID και PIWI7. Η PAZ προσδένει το 3' άκρο του miRNA. Η διεπιφάνεια μεταξύ MID-PIWI παρέχει την σχισμή πρόσδεσης της 5' περιοχή seeds (Boland et al. 2011). Η επικράτεια PIWI καταλύει την ενδονουκλεολυτική διάσπαση του mRNA-στόχου, δρώντας εξειδικευμένα σε θέση που απέχει 10 νουκλεοτίδια από το 5' άκρο του miRNA, αφήνοντας το miRNA άθικτο για άλλον έναν γύρο διάσπασης.

Τα miRNAs μπορούν να αναστείλουν τη μετάφραση των mRNA-στόχων, Η καταστολή της μετάφρασης από τα miRNAs μπορεί να λάβει χώρα κατά την φάση της έναρξης [184], ή κατά τη διάρκεια των επόμενων σταδίων της μετάφρασης.

Τέτοιοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την αναστολή της μετάφρασης μπλοκάροντας διεργασίες που εξαρτώνται από την καλύπτρα, όπως η προσέλκυση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας στην 5' καλύπτρα, ή η αναστολή της πρόσδεσης του παράγοντες έναρξης (eIFs) με την καλύπτρα. Το let-7 καταστέλλει έμμεσα την μετάφραση στοχεύοντας το miRISC στο mRNAs και πυροδοτώντας έτσι την αποαδενυλίωση. Με αυτό τον τρόπο αναστέλλεται η αλληλεπίδραση μεταξύ της 5' καλύπτρας και της πολυ(A) ουράς [194]. Επίσης δείχθηκε ότι το σύμπλοκο miRISC μπορεί να εμποδίσει τη λειτουργία του παράγοντα

έναρξης eIF4E, ή να παρεμβάλλεται σε προγενέστερο βήμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ των eIF4E - eIF4G κατά την έναρξη της μετάφρασης [185].

Η σύνδεση ανάμεσα στο miRISC σύμπλοκο και την αποαδενυλίωση διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη GW182, η οποία λειτουργεί ως: α) πλατφόρμα που στρατολογεί αποαδενυλάσες ένας συνενεργοποιητής αποαδενυλάσης, καθώς αλληλεπιδρά ανεξάρτητα με τα σύμπλοκα αποαδενυλίωσης PAN2-PAN3 (PAN) και CCR4-NOT προωθώντας σταδιακή αφαίρεση των πολυ(A) ουρών των mRNA-στόχων [186].

Μετά την ανακάλυψη των microRNA και siRNA, ο μείζων ρόλος τους στην αρνητική μεταγραφική ρύθμιση και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται σύντομα έγιναν προφανής. Από την άλλη πλευρά η θετική ρύθμιση από microRNAs είναι ένα σχετικά καινούριο και λιγότερο ερευνημένο πεδίο. Η πρώτη έρευνα που έδειξε την θετική ρυθμιστική ικανότητα των microRNA έγινε πάνω στον ιό της ηπατίτιδας γ όπου βρέθηκε ότι η έκφραση του κυτταρικού miR-122¹ έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του ιικού γονιδιώματος [187,188]. Αυτό το ενδιαφέρον αποτέλεσμα έστρεψε αρκετούς ερευνητές στην προσπάθεια για την ανακάλυψη και την διερεύνηση της άμεσης και έμμεσης θετικής ρυθμιστικής δράσης των microRNA. Αυτές οι έρευνες σύντομα στεφθήκαν από επιτυχία και έδειξαν ότι τα microRNA άμεσα μπορούν να επάγουν τη μετάφραση συγκεκριμένων mRNA κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες.

Πιο συγκεκριμένα δείχθηκε ότι σε κύτταρα που βρίσκονται στην G0 φάση του κυτταρικού κύκλου, ορισμένα microRNPs που περιέχουν AGO2 μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μετάφραση συγκεκριμένων συνθετικών μεταγράφων δεικτών που περιλαμβάνουν UTRs που περιέχουν συγκεκριμένα cis ρυθμιστικά στοιχεία ενωμένα με το πλαίσιο ανάγνωσης του GFP [189,190]. Επόμενες μελέτες πάνω σε ένα συγκεκριμένο είδος cis ρυθμιστικού στοιχείου στην 5' UTR φυσιολογικών mRNAs έδειξαν ότι μια σειρά από microRNA μπορούν να προσδεθούν στην 5' τερματική επικράτεια πυριμιδινών (5' terminal oligopyrimidine tract 5' TOP) και να επάγουν τη μετάφραση αυτών των mRNA, π.χ. βρέθηκε ότι το miR-145 προσδένεται και επάγει την μετάφραση του mRNA της μυοκαρδίνης [191]. Έτσι εδραιώθηκε η ύπαρξη αυτής της καινούριας δράσης των microRNAs και ως επί το πλείστο οι επόμενες μελέτες που ακολούθησαν εξέταζαν το μηχανισμό αυτού του καινούριου θετικού τρόπου ρύθμισης.

Έτσι βρέθηκε ότι τα microRNPs που συμμετέχουν στη θετική ρύθμιση περιλαμβάνουν διαφορετικές πρωτεΐνες από τα microRNPs που είναι αποδεδειγμένο ότι έχουν αρνητική δράση. Η πιο μεγάλη διαφορά στην πρωτεϊνική σύσταση αυτών των δύο τάξεων microRNPs είναι ότι ποτέ τα θετικά microRNPs ποτέ δεν περιλαμβάνουν την GW182 [189,190] υπογραμμίζοντας τον θεμελιώδη ρόλο που κατέχει αυτή η πρωτεΐνη στην μεταφραστική αποσιώπηση. Επίσης έχει βρεθεί και το αντίστροφο, δηλαδή

¹ Γενικά, τα microRNAs αναφέρονται ως miRNAs. Ως miR χαρακτηρίζεται το microRNA του οποίου η ύπαρξη έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά, ως miR αναφέρονται οι πρόδρομες μορφές του, pre-miRNA και pri-miRNA, ενώ ως MIR αναφέρεται το γονίδιο που το κωδικοποιεί. Το πρόθεμα miR (ή mir) ακολουθείται από μια παύλα και έναν αριθμό, π.χ. miR-122.

ότι τα θετικά microRNPs συνήθως περιέχουν πρωτεΐνες που δεν απαντώνται στα αρνητικά όπως η FXR1 (Fragile X mental retardation protein 1) τέτοιες πρωτεΐνες θεωρείται ότι έχουν δράση θετικού τελεστή. Επίσης τα θετικά microRNPs έχει βρεθεί ότι μπορούν να περιέχουν συγκεκριμένες ισομορφές της πρωτεΐνης AGO δηλαδή τις AGO2, xLAGO και dAGO2, ενώ τα microRNPs με αρνητική ρυθμιστική δράση μπορούν να τις χρησιμοποιήσουν όλες. [189,190]. Τέλος το πιο χαρακτηριστικό και το πιο ενδιαφέρον γνώρισμα της θετικής ρύθμισης είναι ότι τα mRNA στόχοι τις περισσότερες βρίσκονται υπό την αρνητική ρύθμιση σχετικά σπάνιων τύπων και συνδυασμών Cis ρυθμιστικών στοιχείων όπως τα IRES και 5' TOP επίσης έχουν βρεθεί στόχοι που να μην έχουν πολυ(A) ουρά. Αρκετά από αυτά τα mRNA εκφράζονται αποκλειστικά σε πολύ συγκεκριμένες συνθήκες όπως στη G0 σε κατάσταση stress, ή στα γαμετικά κύτταρα. Αυτά τα αποτελέσματα καθιστούν προφανές ότι η θετική ρύθμιση της μετάφρασης από microRNPs συμβαίνει μόνο σε πολύ συγκεκριμένες καταστάσεις σε αντίθεση με την αρνητική ρύθμιση που είναι πολύ πιο διαδεδομένη[185,189,190]

Ένα εξαιρετικό παράδειγμα της θετικής ρύθμισης της μετάφρασης από microRNP συμβαίνει στον εγκέφαλο και στα p19 κύτταρα. Το miR-346 στοχεύει πάνω στο εναλλακτικό 5' UTR ενός εναλλακτικού μεταγράφου του RIP140. Σε αυτό το microRNP όταν έγινε αποσιώπιση της AGO2 δεν επηρεάστηκε η επαγωγή της μετάφρασης γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη επικαλυπτόμενης δράσης των θετικών microRNP [192]. Ένα άλλο παράδειγμα αφορά τα mRNA πρωτεϊνών του ριβοσώματος. Αυτά τα mRNA στις 5' αμετάφραστες περιοχές τους έχουν 5' τερματικές ολιγοπυριμιδινικές αλληλουχίες (5'TOP) αυτές είναι πολύ αποτελεσματικές στο να αναστέλλουν τη μετάφρασή τους μιας και δημιουργούν σταθερότατες δευτεροταγείς δομές που αναστέλλουν την έναρξη της μετάφρασης. Όταν εκφράζεται το miR-10a προσδένεται αμέσως καθοδικά από τέτοιες δομές και εξουδετερώνει την κατασταλτική τους δράση αποσταθεροποιώντας την δευτεροταγή τους δομή, με αυτό τον τρόπο διεγείρει τη μετάφρασή τους [191].

1.6 Σκοπός εργασίας

Σκοπός της εργασίας είναι να συμβάλει στην αναζήτηση εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου της PARN. Εφόσον εντοπιστούν τέτοια μετάγραφα να επιχειρηθεί μια πρώτη προσπάθεια κατανόησης της ρύθμισης της έκφρασης των. Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας έγινε βιοπληροφορική ανάλυση με EST έτσι ώστε να αναγνωριστούν οι πιθανές θέσεις εναλλακτικού ματίσματος της PARN, σχεδιάστηκαν εκκινητές PCR που ελέγχουν την ύπαρξη αυτών των μεταγράφων σε δείγματα cDNA και πραγματοποιήθηκε σάρωση με αυτά τα ζεύγη εκκινητών σε δείγματα cDNA που απομονώθηκαν από 9 διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Αφού πραγματοποιηθεί η αναγνώριση της έκφρασης των εναλλακτικών μεταγράφων στη συνέχεια θα ελεγχθούν οι κυτταρικές συνθήκες και η πιθανή εμπλοκή των miRNA που πιθανώς θα επηρεάζουν το προφίλ έκφρασής τους.

2 Υλικά – Μέθοδοι

2.1 Κυτταρικές σειρές

M14K	Καρκινική σειρά κακοήθους πλευριτικού μεσοθηλιώματος
MCF7	Σειρά αδenoκαρκινώματος του μαστού
HELA	Καρκινική σειρά τραχήλου της μήτρας
NCI-H520	Πλακώδη κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα
MDA	Κύτταρα καρκίνου του μαστού που έχουν συλλεχθεί από μετάσταση στον υπεζωκότα
HEK	Μη καρκινικά κύτταρα εμβρυικού νεφρικού ιστού
EA.hy926	Καρκινική σειρά που έχουν προέλθει από τη σύντηξη κυττάρων ομφάλιου λώρου με A549 κυττάρων του καρκίνου του πνεύμονα
HEPG2	Κυτταρική σειρά του καρκίνου του ήπατος
MET5A	Καρκινική σειρά που έχει προέλθει από την εισαγωγή και υπερεκφραση του πρώιμου αντιγόνου του ιού sv40 σε φυσιολογικά μεσοθηλιακά κύτταρα

2.2 Απομόνωση ολικού RNA με το πρωτόκολλο Tri Reagent της Sigma Aldrich.

Για το παρακάτω πρωτόκολλο χρειάζεται να αποστειρωθεί το περιβάλλον που θα γίνει το πείραμα και τα εργαλεία, τον πάγκο και τις πιπέτες τις αποστειρώνω με αιθανόλη και χρησιμοποιώ φρέσκα αποστειρωμένα tips.

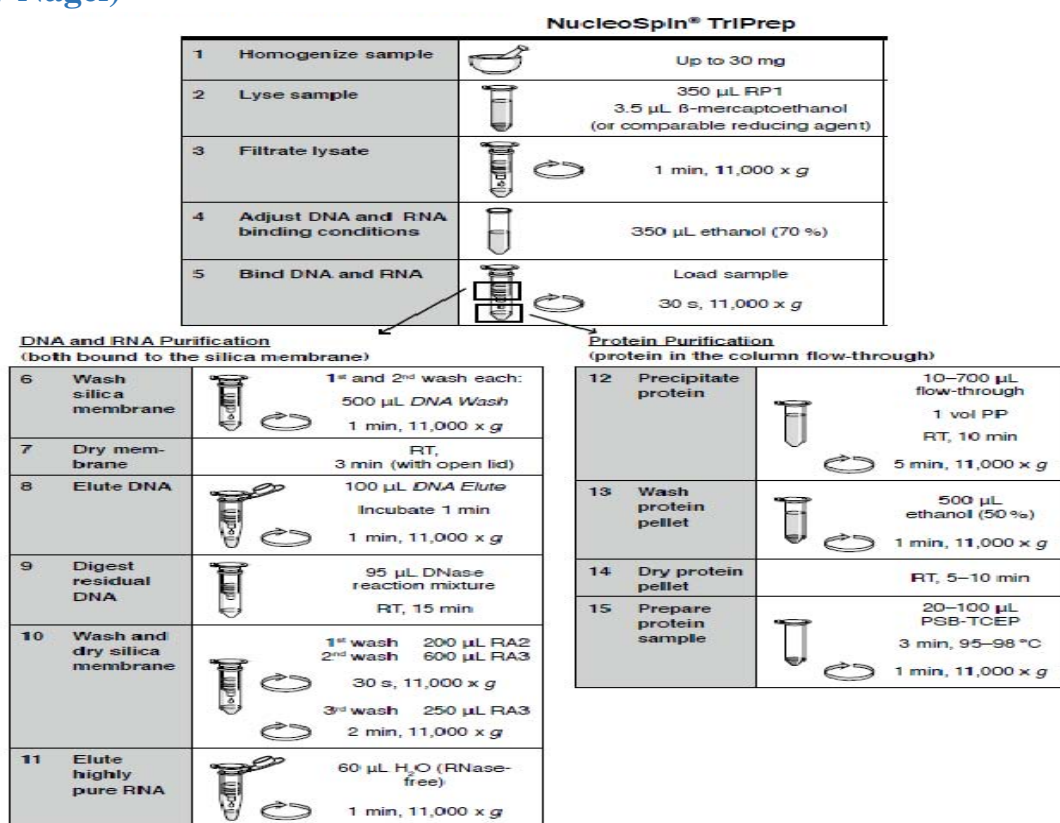
1. Φυγοκεντρούμε το δείγμα καρκινικών κυττάρων στα 3000g για τρία λεπτά σε θερμοκρασία 4 C τα κύτταρα καθιζάνουν στο πάτο του tube, απορρίπτουμε το υπερκείμενο.
2. Προσθέτουμε 1 όγκο αντιδραστηρίου TRI (1 όγκος = 1ml) και πιπετάρω για να λυθούν ήπια τα κύτταρα
3. Προσθέτουμε 0.1 όγκους 1-βρωμο-3χλωροπροπάνιο το οποίο δεσμεύεται στα νουκλεϊκά οξέα και κάνουμε Vortex για 15 δευτερόλεπτα.
4. Επιάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά για να προσδεθεί το 1-βρωμο-3χλωροπροπάνιο στο RNA. Με τον τρόπο αυτό γίνεται διαχωρισμός των φάσεων, κατά τον οποίο το ολικό RNA μεταπίπτει στην υδατική φάση, ενώ οι πρωτεΐνες στην οργανική.
5. Φυγοκεντρούμε στα 12000g για 15 λεπτά στους 4 C.
6. Τα νουκλεϊκά οξέα διαχωρίζονται από τις πρωτεΐνες και εμφανίζονται στην υδατική φάση την οποία μεταφέρουμε σε άλλο tube.
7. Προσθέτουμε 0.5 όγκους 2-προπανόλης η οποία μειώνει τη διαλυτότητα του RNA στο νερό και αναδεύουμε καλά με την πιπέτα.
8. Επιάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου 10 λεπτά.
9. Φυγοκεντρούμε στα 10000 g για 10 λεπτά στους 4 C για να καθιζάνει το RNA
10. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο προσεκτικά.
11. Προσθέτουμε 2 όγκους αιθανόλη 75% η αιθανόλη.
12. Επιάζουμε στους -20 C για 20 λεπτά ώστε να μειωθεί περαιτέρω η διαλυτότητα του RNA στο νερό και μετά αναδεύουμε το RNA με vortex .
13. Φυγοκεντρούμε στα 12000 g για 5 λεπτά στους 4 C για να καθιζάνει το RNA σαν ίζημα.
14. Με εξαιρετική προσοχή αφαιρούμε το υπερκείμενο.

15. Στεγνώνουμε το ίζημα αφήνοντας ανοιχτό το tube μέσα στο Hood αφού πρώτα το έχουμε αποστειρώσει με UV, προσέχουμε ώστε να μην στεγνώσει εντελώς γιατί μετά θα είναι πολύ δύσκολο να το επαναδιαλύσουμε.
16. Επιάζουμε το ίζημα στο heat block για 2 λεπτά στους 55 C.
17. Επαναδιαλύουμε το RNA σε ενέσιμο νερό και το αποθηκεύουμε στους -80 όπου μπορεί να διατηρηθεί για περίπου 6 μήνες.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- TRI Buffer
- 1-βρωμο-3-χλωροπροπάνιο (Merck)
- Αιθανόλη (Sigma)
- 2-προπανόλη (Merck)

2.3 Απομόνωση ολικού RNA και πρωτεϊνών με kit (nucleospin Triprep, Macherey Nagel)



Εικόνα 31. Γενικό σχήμα απομόνωσης και διαχωρισμού, DNA, RNA και πρωτεϊνών (Triprep, Macherey-Nagel)

1. Φυγοκεντρούμε το δείγμα καρκινικών κυττάρων στα 3000g για τρία λεπτα σε θερμοκρασία 4°C τα κύτταρα καθιζάνουν στο πάτο του tube, απορρίπτουμε το υπερκείμενο.
2. Προσθέτουμε 350µl αντιδραστήριου RP1 και 3.5µl β-μερκαπτοαιθανόλης, το RP1 λύει τα κύτταρα μέσω ωσμωτικού shock και η βμερκαπτοαιθανόλη μετουσιώνει τις πρωτεΐνες καταστρέφοντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς.

3. Μεταφέρουμε το διάλυμα στο φίλτρο που έχει τοποθετηθεί μέσα σε ένα tube και φυγοκεντρούμε στα 11000g για 1 λεπτό στους 4 C. Με αυτό τον τρόπο τα κυτταρικά υπολείμματα παραμένουν στο φίλτρο ενώ οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα το διαπερνούν και καταλήγουν μέσα στο tube.
4. Απορρίπτουμε το φίλτρο και προσθέτω 350μl αιθανόλης ώστε να εξισορροπηθεί το διάλυμα με τη στήλη που θα χρησιμοποιήσουμε στη συνέχεια.
5. Μεταφέρουμε το διάλυμα στη στήλη και φυγοκεντρούμε στα 11000g για 30 δευτερόλεπτα στους 4 C τα νουκλεϊκά οξέα δεσμεύονται στη στήλη ενώ οι πρωτεΐνες τη διαπερνούν και καταλήγουν στο tube, το οποίο αποθηκεύουμε στους 4 C και συνεχίζουμε με τον καθαρισμό τους αφού ολοκληρωθεί η απομόνωση και ο καθαρισμός του RNA .
6. Προσθέτουμε στη στήλη 500μl αντιδραστήριο DNA wash και φυγοκεντρούμε στα 11000g για 1 λεπτό στους 4 C, στη συνέχεια επαναλαμβάνουμε αυτό το βήμα μια ακόμα φορά. Το DNA wash απομακρύνει τα χροστροπικά άλατα από τη στήλη.
7. Στεγνώνουμε τη στήλη αφήνοντας ανοιχτό το καπάκι του tube για 3 λεπτά μέσα στο hood (αφού το έχω αποστειρώσει πρώτα)
8. Προσθέτουμε 100 μl αντιδραστηρίου DNA elute στη στήλη και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στα 11000g στους 4 C, έτσι το DNA προσδένεται στα συστατικά του αντιδραστηρίου και εκλύεται από τη στήλη στο tube, τώρα στη στήλη παραμένει μόνο το RNA και ελάχιστο DNA .
9. Προσθέτουμε 10 μl rDNase και 90 μl rDNase Reaction buffer και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά, σε αυτό το βήμα προσπαθούμε να εξαλείψουμε το DNA που έχει παραμείνει στη στήλη.
10. Προσθέτουμε 200 μl αντιδραστηρίου RA2 και φυγοκεντρούμε στα 11000g για 30 δευτερόλεπτα στους 4 C στη συνέχεια προσθέτουμε 600 μl αντιδραστηρίου RA3 και φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες τέλος προσθέτουμε 250 μl RA3 και φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στα 11000g στους 4 C. Οι δεοξυριβονουκλεάσες μπορούν να υδρολύσουν και να καταστρέψουν το RNA αν παραμείνουν π ολύ ώρα οπότε σε αυτό το βήμα προσπαθούμε να απενεργοποιήσουμε την δεοξυριβονουκλεάση που έχει παραμείνει στη στήλη με το RA2 και στη συνέχεια να την απομακρύνουμε με το RA3.
11. Προσθέτουμε 60μl υπερκάθαρο νερό που δεν περιέχει ριβονουκλεάσες και φυγοκεντρώ για 1 λεπτό στα 11000g στους 4 C. Το RNA εκλύεται από τη στήλη
12. Για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών μεταφέρουμε 100 μl σε καινούριο tube και προσθέτουμε ένα όγκο αντιδραστηρίου Protein Precipitator στη συνέχεια επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου και μετά φυγοκεντρούμε στα 11000g για 5 λεπτά.
13. Οι πρωτεΐνες κατακρημνίζονται και δημιουργούν ένα ορατό ίζημα, αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο, προσθέτουμε 500μl 50% αιθανόλης και φυγοκεντρούμε στα 11000 g. Με αυτό τον τρόπο γίνεται η πλύση του ιζήματος από προσμίξεις.
14. Αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο και αφήνουμε να στεγνώσει το ίζημα επωάζοντας σε θερμοκρασία δωματίου με ανοιχτό το καπάκι του tube.
15. Προσθέτουμε 100μl PSB-TCEP και επωάζουμε στο Heat block στους 95 °C για 3 λεπτά. Σε αυτό το στάδιο οι πρωτεΐνες γίνονται διαλυτές και μετουσιώνονται. Τέλος φυγοκεντρούμε στα 11000g για 1 λεπτό και αποθηκεύουμε το υπερκείμενο στους -20 °C, το ίζημα περιέχει αδιάλυτες πρωτεΐνες.

Υλικά

Lysis Buffer RP1
Buffer DNA Wash
Buffer DNA Elute
Wash Buffer RA2
Wash Buffer RA3
RNase-free H₂O
rDNase
RNase-free water
NucleoSpin® Filters
NucleoSpin® TriPrep Columns
Collection Tubes
β-μερκαπτοαιθανόλη (Merck)
PSB-TCEP
Protein Precipitator

2.3.1 Επιπρόσθετη πέψη με δεοξυριβονουκλεάση και καθαρισμός με Sodium Acetate Precipitation of Small Nucleic Acids της Life technologies

Επειδή ένα ζεύγος εκκινητών RTqPCR στοχεύει εντός ενός εξονίου η παραμικρή ποσότητα γενωμικού DNA που θα παραμείνει μπορεί να μας επηρεάσει τα αποτελέσματα της RTqPCR, οπότε αποφασίσαμε να επιάσουμε μία ακόμη φορά με δεοξυριβονουκλεάση rDNase ώστε να είμαστε σίγουροι ότι το γενωμικό DNA έχει καταστραφεί ολοσχερώς σύμφωνα με της οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια επαναλάβαμε τον καθαρισμό με διαφορετικό πρωτόκολλο ώστε να απαλλαγούμε από τη rDNase και τα συστατικά του Reaction Buffer .

1. Προσθέτουμε 6μl Reaction Buffer 0.6 μl rDNase στα 60μl διαλύματος RNA που απομονώσαμε με την παραπάνω διαδικασία.
2. Επιάζουμε για 10 λεπτά στους 37 °C στο heat block ώστε να δράσει η δεοξυριβονουκλεάση.
3. Προσθέτουμε 0.1 όγκους 3M οξικού νατρίου και ανακάτεβουμε καλά. Το αιθανικό νάτριο προσδένεται στο RNA και μειώνει τη διαλυτότητά του στο νερό.
4. Προσθέτουμε 4 όγκους 100% αιθανόλης για να σχηματιστεί υδρόφοβο περιβάλλον στο διάλυμα.
5. Επιάζουμε στους -20 °C για 12 ώρες.
6. Φυγοκεντρούμε στα 13200g για 30 λεπτά στους 4 °C ώστε να κατακρημνιστεί το RNA ως ίζημα.
7. Με μεγάλη προσοχή αφαιρούμε το υπερκείμενο.
8. Προσθέτουμε 100μl 70% παγωμένης αιθανόλης που είχα αποθηκεύσει στους -80°C και ανακάτεβουμε ήπια. Σε αυτό το στάδιο αποτελεί μία τελευταία πλύση του ιζήματος RNA.
9. Φυγοκεντρούμε στα 13200 g για 10 λεπτά στους 4 °C
10. Με μεγάλη προσοχή αφαιρούμε το υπερκείμενο.
11. Αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει μέσα στο hood με ανοιχτό το tube
12. Τέλος επαναδιαλύουμε το RNA σε 40μl ενέσιμου νερού.

Υλικά

Οξικό νατρίο (Merck)

Αιθανόλη (Merck)

Φωτομετρήσαμε τα δειγμάτων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης RNA με το φωτόμετρο BioPhotometer plus

2.4 Παραγωγή cDNA με 1st strand cDNA kit (TAKARA)

1. Αρχικά παρασκευάζουμε το πρώτο μείγμα της αντίδρασης 1 (mix 1)

Oligo dT primer	1μl
Δείγμα ολικού RNA	Προσθέτουμε ποσότητα ανάλογα με τη συγκέντρωση του RNA δείγματος
dNTP mix	1μl
V τελικό	10 μl

Cell line	V δείγματος RNA, μl
NCI-H520	8
MCF7	3
MET5A	8
HEPG2	5
EA.HY926	8
M14K	3
HEK	5
HELA	8
MDA	8

2. Επωάζουμε για 5 λεπτά στους 65 C στο μηχάνημα της PCR για να προσδεθεί ο Oligo dT primer στις πολυ(A) ουρές των mRNA.
3. Δημιουργούμε το δεύτερο μείγμα αντίδρασης

Mix 1	10 μl
5x buffer	4 μl
RNAse inhibitor	0.5 μl
Prime script reverse polymerase	1 μl
RNAse free H2O	14.5 μl

4. Επωάζουμε στους 42 °C για μία ώρα ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφή.

Επωάζουμε στους 95 °C για 5 λεπτά για να απενεργοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφάση.

2.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική της PCR χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ενισχυθούν τμήματα του cDNA που αντιστοιχούν σε περιοχές που πιθανώς ματίζονται εναλλακτικά. Με τη PCR μπορεί να ενισχυθεί ένα συγκεκριμένο τμήμα που μας ενδιαφέρει σε μεγάλες ποσότητες με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών, οι οποίοι υβριδοποιούνται εκατέρωθεν του τμήματος cDNA στόχου. Οι υβριδοποιημένοι εκκινητές λειτουργούν ως πρωταρχικά τμήματα για τη δράση της DNA πολυμεράσης και έτσι για κάθε αλυσίδα δημιουργείται ένας συμπληρωματικός κλώνος DNA μέσω διαδοχικής προσθήκης δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs).

2.5.1 Στάδια της PCR

Η τεχνική της PCR βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο τριών σταδίων που περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.

1. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η μετουσίωση του DNA στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Η μετουσίωση του DNA επιτυγχάνεται συνήθως σε θερμοκρασία 94-95 °C για 30 δευτερόλεπτα περίπου.
2. Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται ο υβριδισμός των κατάλληλων ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών με την αλληλουχία στόχο. Ο υβριδισμός επιτυγχάνεται ανάλογα με τη σύνθεση των βάσεων A/T, G/C των εκκινητών σε θερμοκρασία 50-65 °C επί 20 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό.
3. Το τρίτο στάδιο περιλαμβάνει την προσθήκη συμπληρωματικών βάσεων δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητή από την Taq DNA πολυμεράση και συνεπώς την επέκταση της αλυσίδας του DNA. Η επέκταση των εκκινητών επιτυγχάνεται στους 72-74 °C επί 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό ανάλογα με το μέγεθος του προϊόντος PCR και της ποιότητας της Taq DNA πολυμεράσης.

Πριν από τον πρώτο κύκλο, το DNA συχνά αποδιατάσσεται για 5 λεπτά ώστε να διασφαλιστεί ότι θα είναι μονόκλωνο ώστε να μπορεί να υβριδιστεί με τους μονόκλωνους εκκινητές. Επίσης, μετά το τέλος των κύκλων εφαρμόζεται ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης για άλλα 5 λεπτά για να διασφαλιστεί ότι το DNA έχει αντιγραφεί επιτυχώς σε όλο το μήκος του.

Μια εκτέλεση των τριών αυτών σταδίων, αποτελεί 1 κύκλο της αντίδρασης PCR. Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας ανάμεσα σε κάθε κύκλο επιτυγχάνονται με αυτοματοποιημένες συσκευές, τους θερμοκυκλοποιητές, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να ανεβοκατεβάζουν τη θερμοκρασία μεταξύ των τριών προαναφερομένων θερμοκρασιών. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης συνήθως

πραγματοποιείται επί 25-40 κύκλους, οπότε το τμήμα του DNA στόχου πολλαπλασιάζεται 2^n φορές (όπου n ο αριθμός των κύκλων).

2.5.2 Αντιδραστήρια και συνθήκες της PCR

Η αντίδραση PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται: DNA στόχος, εκκινητές, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, ένζυμο Taq DNA πολυμεράση και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα pH \approx 8.2 που περιέχει ιόντα Mg^{++} απαραίτητα για την ενζυμική δράση της πολυμεράσης.

Δείγμα DNA

Σε όλες τις αντιδράσεις PCR ως δείγμα χρησιμοποιείται cDNA που έχει παραχθεί από την αντίστροφη μεταγραφή ολικού RNA.

Εκκινητές (primers)

Η επιλογή των εκκινητικών μορίων είναι θεμελιώδους σημασίας για την επιτυχία της τεχνικής PCR. Τα εκκινητικά μόρια, καλό είναι να έχουν παραπλήσιο αριθμό βάσεων G/C και A/T. Είναι εξαιρετικά σημαντικό να έχουν παραπλήσια ή ακόμα καλύτερα την ίδια θερμοκρασία τήξεως (T_m) (± 1 °C), να μην παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή 5' άκρο τους, ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών και η απόστασή τους να είναι μεγαλύτερη των 100 βάσεων. Επίσης θα πρέπει να αποφεύγεται η ενδοσυμπληρωματικότητα των εκκινητών. Ένα επιθυμητό T_m θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 57-65 °C. Η ειδικότητα της αντίδρασης οφείλεται κατά μεγάλο ποσοστό στη θερμοκρασία υβριδισμού (T_a) των εκκινητικών μορίων. Συνήθως η θερμοκρασία υβριδισμού T_a , επιλέγεται να είναι κατά 3-5 °C μικρότερη του T_m των εκκινητών.

Τριφωσφορικά δεοξυνοουκλεοτίδια (dNTPs)

Στην αντίδραση PCR οι συγκεντρώσεις των dNTPs κυμαίνονται μεταξύ 50-200 μ M. Υψηλότερες συγκεντρώσεις dNTPs μπορεί να προκαλέσουν την παραγωγή παραπροϊόντων από την πολυμεράση και πρέπει ν' αποφεύγονται. Τα dNTPs δεσμεύουν τα ιόντα Mg^{2+} και συνεπώς το ποσό των dNTPs προσδιορίζει και το ελεύθερο ποσό διαθέσιμου Mg^{2+} .

DNA πολυμεράση

Το ένζυμο Taq DNA είναι μια ανθεκτική στη θερμοκρασία DNA πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq). Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ενζυμική

δράση της Taq πολυμεράσης είναι οι 72° C, αλλά είναι αρκετά σταθερή ακόμα και στους 94° C. Η Taq πολυμεράση προστίθεται μόνο μία φορά αμέσως πριν την αρχή της αντίδρασης και παραμένει ενεργή για 40-45 κύκλους, καθιστώντας δυνατή την αυτοματοποίηση της PCR με την χρήση των θερμικών κυκλοποιητών.

Ρυθμιστικό διάλυμα PCR που περιέχει MgCl₂

Συνήθως ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται Tris-Cl τυπικά σε συγκέντρωση ~10 mM, προκειμένου το pH να διατηρείται μεταξύ 8,3 και 8,5 σε θερμοκρασία δωματίου. Στη θερμοκρασία των 72° C στην οποία επιτελείται ο πολυμερισμός, το pH πέφτει κατά μια περίπου μονάδα φθάνοντας στο ~7,2 που είναι η κατάλληλη τιμή για τη δράση των περισσότερων θερμοσταθερών DNA πολυμερασών. Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα περιέχει και 1,5 mM ιόντων Mg²⁺. Η συγκέντρωση ιόντων Mg²⁺ έχει μεγάλη επίδραση στην ειδικότητα και στη ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR. Οι συγκεντρώσεις των 1,5 mM είναι συνήθως βέλτιστες, αλλά σε μερικές περιπτώσεις διαφορετικές συγκεντρώσεις Mg²⁺ μπορεί να αποδειχθούν απαραίτητες. Γενικά, η περίσσεια Mg²⁺ έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση μη ειδικού προϊόντος, ενώ η έλλειψη Mg²⁺ μειώνει την ποσότητα του προϊόντος.

Για την εκτέλεση της PCR, το cDNA κάθε δείγματος προστίθεται σε ειδικό σωλήνα (tube) για την PCR και έπειτα προστίθενται οι αντίστοιχοι ευκινητές, ρυθμιστικό διάλυμα, dNTPs, ενέσιμο νερό και στο τέλος προστίθεται η πολυμεράση. Εναλλακτικά αν χρειάζεται να αναλύσουμε πολλά δείγματα παρασκευάζεται το μίγμα της αντίδρασης (master mix) που περιέχει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια αφού προηγηθεί σύντομη φυγοκέντρηση, το μίγμα μοιράζεται ισόποσα στους σωλήνες PCR που περιέχουν το DNA και ακολουθεί περιστροφή (spin) στη φυγόκεντρο για 4 δευτερόλεπτα περίπου. Τέλος, τα σωληνάκια τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή και ενεργοποιείται το κατάλληλο πρόγραμμα.

Υλικά PCR

Εκκινητές: Eurofins Genomics

Πολυμεράση: KAPA TAQ PCR kit

DNTPs: Takara

Buffer A: KAPA TAQ PCR kit

Κυκλοποιητής: Eppendorf master cycler

Τα αντιδραστήρια οι ποσότητες και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τις PCR με όλα τα ζεύγη εκκινητών (F1R,F2R) φαίνονται παρακάτω:

10mM μείγμα dNTP (το κάθε ένα)	0,5 μl
H ₂ O	18,4 μl
Kapa Taq DNA pol 5u/μl	0.1 μl
10X Buffer A	2.5 μl
10 μM πρόσθιος εκκινητής	1 μl
10μM ανάστροφος εκκινητής	1 μl
cDNA	1.5μl
Τελικός όγκος	25μl

Στάδιο της PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος	40 κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 λεπτά	
Αποδιάταξη	95 °C	30 δευτερόλεπτα	
Υβριδοποίηση εκκινητών	55 °C	30 δευτερόλεπτα	
Επιμήκυνση	72 °C	30 δευτερόλεπτα	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	5 λεπτά	
-	4 °C	-	

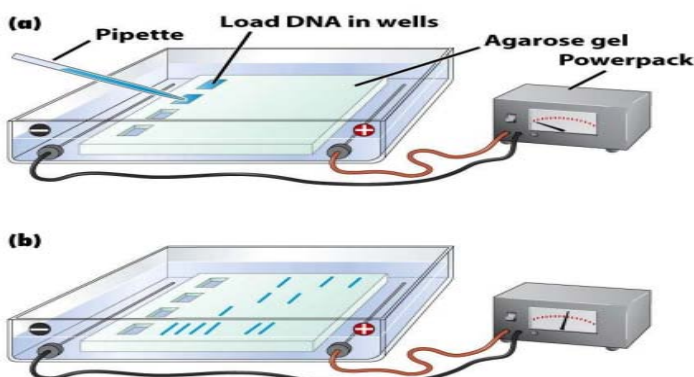
2.6 Ανάλυση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο έλεγχος για την ύπαρξη εναλλακτικών μεταγράφων μετά την ενίσχυση του cDNA με PCR έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης. Η τεχνική αυτή, επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων δίκλωνου DNA σε ουδέτερο pH. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου. Έτσι, το DNA που φέρει αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών του ομάδων, τοποθετείται στην κάθοδο(-) και κινείται προς την άνοδο(+). Πολλοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό μετανάστευσης του DNA. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου, το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος (δηλαδή η συγκέντρωση της αγαρόζης) και το σημαντικότερο, το μέγεθος των μορίων του DNA. Τα μικρότερα μόρια εμποδίζονται λιγότερο από τους πόρους του πηκτώματος σε σχέση με τα μεγαλύτερα και ως εκ τούτου κινούνται ταχύτερα. Σχηματίζονται συνεπώς στο πήκτωμα ζώνες από τα μόρια διαφορετικού μεγέθους οι οποίες μπορούν να ανιχνευθούν με χρήση υπεριώδους φωτός.

Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης που, σε κατάλληλες συνθήκες, δημιουργεί ένα πορώδες πήκτωμα με πόρους διαμέτρου από 100 έως 300 nm. Η ηλεκτροφόρηση για την ανίχνευση προϊόντων της PCR που αντιστοιχούν σε εναλλακτικά μετάγραφα έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 12%. Για την

παρασκευή του πήκτωματος αγαρόζης 1%, σε μια κωνική φιάλη προστίθενται 100 ml διαλύματος TAE 1x και 1gr αγαρόζης και το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων, μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Αφού κρυώσει λίγο προστίθενται 6 ml midori green το οποίο δρα παρόμοια με το βρωμιούχο αιθίδιο, δηλαδή προσδένεται στο DNA και επέμπει στα 540nm όταν φωτιστεί από το UV. Έπειτα, το πήκτωμα τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου. Στο σημείο αυτό, στο πήκτωμα βυθίζεται μια ειδική «χτένα» που δημιουργεί τις υποδοχές των δειγμάτων. Μόλις στερεοποιηθεί το πήκτωμα απομακρύνεται η «χτένα» και η συσκευή ηλεκτροφόρησης συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x.

Σε κάθε θέση του πήκτωματος τοποθετούνται 19 μl DNA και 5 μl χρωστικής (loading buffer 6x) και η συσκευή ηλεκτροφόρησης ορίζεται σε τάση γύρω στα 90 V. Τέλος, το πήκτωμα μεταφέρεται σε συσκευή UV με σκοπό την παρατήρηση του DNA λόγω της ύπαρξης του midori green.



Εικόνα 32. Ανάλυση δειγμάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι τα εξής:

TAE (Tris-acetate-EDTA): Ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για το διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων όπως DNA και RNA. Για την παρασκευή διαλύματος TAE 50x, διαλύονται 121 gr Tris base, 28,5 ml ακετοξικό οξύ και 50 ml EDTA (0,5M) σε 500ml ddH₂O. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται TAE 1x, επομένως γίνεται αρραίωση του διαλύματος TAE 50x σε ddH₂O.

Loading buffer 6x: Χρησιμοποιείται για να καταστήσει τα δείγματα πυκνότερα από το ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να καθιζάνουν στις θέσεις υποδοχής του πήκτωματος, ενώ περιέχει και χρωστική για την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Για την παρασκευή του αναμειγνύεται 1 ml μπλε της βρωμοφαινόλης 1% w/v με 1 ml διαλύματος TBE 10x και 5 ml γλυκερόλη 100% και συμπληρώνεται με

ddH₂O σε τελικό όγκο 10 ml. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση loading buffer 1x.

Υλικά - Αντιδραστήρια

- **TAE 50x:** Tris base 24,2% v/w, ακετοξικό οξύ 5,71% w/w, EDTA 0,05M, pH 8,6
- **Loading buffer 6x:** Bromophenol Blue 0,09%, Xylene Cyanol 0,09%, Γλυκερόλη 60%, EDTA 60mM
- Αγαρόζη (Sigma)
- DNA μοριακός μάρτυρας 1000 bp (Thermo Scientific)
- Midori Green DNA stain (Nippon Genetics)
- Bromophenol blue (Research Organics)
- Xylene Cyanol (Merck)
- Γλυκερόλη (Panreac)
- EDTA (Merck)
- Tris (Merck)
- Ακετοξικό οξύ (Merck)

Για τον προσδιορισμό των προϊόντων PCR/rtPCR χρησιμοποιήθηκε ένα πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1-2% στα 90V, σε κάθε θέση δείγματος προστέθηκαν 19μl προϊόντος PCR και 5 μl Loading Buffer 6x επίσης σε ξεχωριστή θέση εισήγαμε 1kb DNA μοριακού μάρτυρα.

2.7 Αποκοπή και καθαρισμός μάντας Gel αγαρόζης kit PCR cleanup Gel extraction Macherey-Nagel

Ο σκοπός αυτής της μεθόδου είναι ο καθαρισμός και η απομόνωση των προϊόντων PCR από πηκτή αγαρόζης που προέρχονται από εναλλακτικά μετάγραφα ώστε στη συνέχεια να αλληλουχηθούν.

1. Αποκόπτουμε με νυστέρι τα κομμάτια αγαρόζης που περιέχουν τα διακριτά προϊόντα PCR που αντιστοιχούν σε εναλλακτικά μετάγραφα κάτω από υπεριώδες φως, προσέχω ώστε να μην συμπεριλάβω στα κομμάτια μάντες από άλλα προϊόντα .
2. Τα τοποθετούμε σε ξεχωριστά tubes και τα ζυγίζω, αφαιρώ το βάρος κάθε tube από το συνολικό βάρος.
3. Προσθέτουμε 200μl αντιδραστηρίου NTI buffer για κάθε 100mg κομματιού αγαρόζης σε κάθε tube. Αυτή η αναλογία ισχύει για σχετικά αραιές πηκτές (1-1,5%), για πηκτές που έχουν παραπάνω από 2% περιεκτικότητα σε αγαρόζη χρησιμοποιώ διπλάσια ποσότητα NTI. Το NTI περιέχει χαιτροπικά που προσδένονται στο DNA.
4. Επιάζουμε τα tubes για 10 λεπτά στο heat block στους 55 C και τα αναδεύω με vortex κάθε 2 λεπτά για 10 δευτερόλεπτα μετά ελέγγω αν η πηκτή έχει διαλυθεί εντελώς .

5. Μεταφέρουμε τα δείγματα στις στήλες τις οποίες έχω τοποθετήσει μέσα σε καινούρια tube και φυγοκεντρώ στα 11000g για 30 δευτερόλεπτα, απορρίπτω τα μείγματα που έχουν διαπεράσει τις στήλες. Σε αυτό το στάδιο το συμπλοκοποιημένο με χαοτροπικά άλατα DNA προσδένεται και παραμένει στην στήλη ενώ τα συστατικά της πηκτής τη διαπερνούν.
6. Προσθέτουμε στις στήλες 700μl αντιδραστηρίου NT3 buffer και φυγοκεντρώ στα 11000g για 30 δευτερόλεπτα μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης απορρίπτω τα μείγματα που έχει διαπεράσει τις στήλες. Το NT3 buffer περιέχει αιθανόλη και διερχόμενο από τη στήλη προσδένεται σε συστατικά της πηκτής που παρέμειναν προσδεμένα στην στήλη και τα κατακρμνίζει.
7. Φυγοκεντρούμε στα 10000 g για 1 λεπτό ώστε να αφαιρεθεί το υπόλοιπο NT3 που έχει παραμείνει στις στήλες.
8. Απορρίπτουμε τα προηγούμενα tube και μεταφέρουμε τις στήλες σε νέα. Προσθέτουμε στη στήλη 30 μl αντιδραστηρίου NE buffer στις στήλες και επιάζω σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Σε αυτό το στάδιο τα συστατικά του NE buffer αντιδρούν με τα χαοτροπικά άλατα που συγκρατούν το DNA στη στήλη.
9. Φυγοκεντρούμε στα 11000 g για 1 λεπτό ώστε το DNA να διαπεράσει τη στήλη και να συλλεχθεί στο Tube. Το δείγμα DNA αποθηκεύθηκε σε θερμοκρασία -20C μέχρι να σταλθεί για αλληλούχιση.

Η αλληλούχιση κατά Sanger έγινε στο CEMIA (cellular and immunological applications) που βρίσκεται στη Νεάπολη νομού Θεσσαλίας

2.8 Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Η Real Time PCR είναι μία από τις πιο απλές και διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού γονιδιακής έκφρασης. Είναι μία ιδιαίτερα ευαίσθητη και εξειδικευμένη τεχνική καθώς μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και ένα αντίγραφο ενός μεταγράφου ή ακόμα να ανιχνεύσει διαφορετικής έντασης έκφραση μεταξύ δύο δειγμάτων σε ποσοστό έως και 23%. Μπορεί να διεξαχθεί σε ένα βήμα (one step reaction), όπου η όλη διαδικασία από τη σύνθεση του cDNA μέχρι την αντίδραση πολυμεράσης συμβαίνει στο ίδιο tube ή σε δύο βήματα (two-steps) όπου η αντίστροφη μεταγραφή και η ενίσχυση του παραγόμενου cDNA πραγματοποιούνται σε διαφορετικά βήματα. Η one step Real time PCR θεωρείται ότι μειώνει την πειραματική απόκλιση γιατί οι ενζυμικές αντιδράσεις συμβαίνουν στο ίδιο tube. Ωστόσο αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί μία αρχική RNA μήτρα η οποία είναι επιρρεπής σε αποικοδόμηση.

Η Real Time PCR επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου σε όλη τη διάρκεια της PCR. Ύστερα από μια αρχική φάση στην οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα, ακολουθεί μία εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα του

προϊόντος σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Αν υπάρχουν περισσότερα μόρια-στόχοι αρχικά στο tube, θα χρειαστούν και λιγότεροι κύκλοι για να ξεκινήσει η εκθετική φάση. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την έλευση της εκθετικής φάσης σε διαφορετικές αντιδράσεις, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα στις αντιδράσεις.

Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό του προϊόντος της PCR που υπάρχει στο τέλος κάθε κύκλου, αλλά όλες βασίζονται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας ετικέτας (tag), η οποία συνδέεται σε κάθε μόριο που συντίθεται. Οι πρώτες ετικέτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το βρωμιούχο αιθίδιο και το SYBR Green I. Και τα δύο εισχωρούν στις αύλακες του δίκλωνου DNA. Για την ποσοτικοποίηση του miR-1207 αλλά και των επιπέδων των εναλλακτικών μεταγράφων της PARN, εφαρμόστηκε συγκριτική ποσοτική Real Time PCR (Comparative qRT-PCR) με τη μέθοδο $\Delta\Delta C_t$, με την οποία η κανονικοποίηση γίνεται μέσω τη σύγκρισης του ρυθμού ενίσχυσης των αντίστοιχων δειγμάτων με το ρυθμό ενίσχυσης γονιδίων αναφοράς των οποίων τα επίπεδα έκφρασης παραμένουν σταθερά. Με την παραπάνω μέθοδο, τα επίπεδα των miRNAs καθορίστηκαν συγκριτικά με τα επίπεδα του U6 snRNA ενώ τα επίπεδα των εναλλακτικών μεταγράφων της PARN συγκριτικά με τα επίπεδα της β -ακτίνης. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων των δύο εναλλακτικών μεταγράφων της PARN σε κύτταρα M14k που επώαστηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού (0.5% FBS για μία μέρα) σε σχέση με κανονικές συνθήκες επώασης (10% FBS) έγιναν σε μια αντίδραση qRT-PCR. Ενώ η ποσοτικοποίηση των επιπέδων miR-1207 στην ίδια κυτταρική σειρά κάτω από τις παραπάνω συνθήκες (0.5% FBS- 10% FBS) έγινε σε ξεχωριστή αντίδραση qRT-PCR όπου οι συνθήκες θερμοκικού προφίλ και οι ποσότητες των επιμέρους αντιδραστηρίων ήταν διαφορετικές. Τα δεδομένα αυτά φαίνονται παρακάτω.

K-SYBR mix	10 μ l
MiR-1207 5' primer 10 μ M	0.2 μ l
mRQ 3' primer (10 μ M)	0,2 μ l
Rox dye low	0.4 μ l
ddH ₂ O	8.2 μ l
cDNA	1 μ l
Total Volume	20 μ l

K-SYBR mix	10 μ l
Foward primer	0,2 μ l
Reverse primer	0.2 μ l
ROX (low)	0.4 μ l
ddH ₂ O	8.2 μ l
cDNA	1 μ l
Total volume	20 μ l

To K-SYBR mix είναι ένα μίγμα Taq DNA πολυμεράσης, dNTPs, ιόντων Mg²⁺, και χρωστικής παρακολούθησης SYBR Green, **miRNA-specific 5' primer** ο 5' εκκινήτης, ειδικός για το miRNA, **mRQ 3' primer** αποτελεί τον 3'-oligo-dT εκκινήτη, ο οποίος είναι συμπληρωματικός με την περιοχή του cDNA

που αντιστοιχεί στην πολυ(A) ουρά. **ROX dye** είναι χρωστική αναφοράς, η οποία μειώνει το θόρυβο του μηχανήματος (θερμοκυκλοποιητή).

Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα, οι αντιδράσεις για την ποσοτικοποίηση όλων των μεταγράφων έγιναν σε triplicates. Για κάθε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών, στην αντίδραση συμπεριλήφθηκε ως αρνητικό control, NTC αντίδραση που στερούνταν δείγματος cDNA (No Template Control). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, παρατίθενται παρακάτω.

Εκκινητές	Αλληλουχία
PARN forward (F1)	GGC TGC CTC AGC TAC TGC
PARN general reverse (R2)	ATG CAG AGA CTG AAG GTC CAT C
PARN Kts specific reverse (R3)	GAG TGG CCG GAA CCT TGG
B-actin forward	GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG
B-actin reverse	AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG
U6 snRNA forward	GGA ATG ACA CAG TGA AGA TTG G
U6 snRNA reverse	TTT CCT GTC ATC CTT GCA CA

Ζεύγος εκκινητών	Μήκος προϊόντων	
F1R2	230 (Kts)	
F1R3	100 (Kts)	145(Ts2)
B-actin	243	
U6 snRNA	51	

Το θερμικό προφίλ του κυκλοποιητή της αντίδρασης PCR για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των εναλλακτικών μεταγράφων της PARN σε σχέση με τη β-ακτίνη:

Τύπος Αντίδρασης	Συνθήκες
Αρχική αποδιάταξη	95 °C, 3 min
Ενίσχυση (x35 cycles)	95 °C, 3sec
	60 °C, 30sec
	72 °C 11sec
Αποδιάταξη	95 °C, 60sec
	55 °C, 30sec
	95 °C, 30sec

Το θερμικό προφίλ του κυκλοποιητή της αντίδρασης PCR για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του MiR-1207 σε σχέση με το U6-snRNA.

Τύπος Αντίδρασης	Συνθήκες
Αρχική αποδιάταξη	95 °C, 10sec
Ενίσχυση (x35 cycles)	95 °C, 5sec
	60 °C, 20sec
	95 °C, 60sec
Αποδιάταξη	55 °C, 30sec
	95 °C, 30sec

Η ανάλυση των δεδομένων μετά την ενίσχυση των δειγμάτων έγινε με το πρόγραμμα MxPro.

2.9 Βιοπληροφορική πρόβλεψη πιθανών στόχων miRNA με το πρόγραμμα PITA.

Το PITA κάνει την πρόβλεψη βάσει της προσβασιμότητας του mRNA-στόχου από το miRNA, κάτι που καθορίζεται κυρίως από τη δευτεροταγή δομή του mRNA. Η ελεύθερη ενέργεια που έχει το διμερές miRNA-mRNA, αφού έχει ανοίξει η δευτεροταγής δομή του τελευταίου, και έχουν ζευγαρώσει βάσει συμπληρωματικότητας, ονομάζεται ddG, η οποία όσο πιο αρνητική είναι, τόσο πιο υψηλή είναι η συγγένεια του miRNA με το mRNA-στόχο.

Για να γίνει η πρόβλεψη, ανακτήθηκε η 5'-UTR περιοχή του γνωστού μεταγράφου της PARN, η προβλεπόμενη 5'-UTR του εναλλακτικού μεταγράφου σε FASTA format, η οποία εισήχθη στη συνέχεια στο PITA προς σάρωση. Από τη λίστα που προέκυψε από το PITA, λήφθηκαν υπόψη για περαιτέρω σύγκριση μόνο τα miRNAs για τα οποία η ελεύθερη ενέργεια είχε αρνητική τιμή (όριο αποκοπής το 0). Ενώ σαν παράμετροι-φίλτρα ορίστηκαν τα εξής:

Τουλάχιστον ένα εξαμερές (6mer) στην 5'-περιοχή του miRNA να έχει συμπληρωματικότητα με τα 5'-UTR του mRNA. Η συμπληρωματικότητα να είναι (6:1:1), δηλαδή να επιτρέπεται ένα αταίριαστο ζεύγος, και μια G:U ταλάντευση στην περιοχή 5' του miRNA.

Η βιοπληροφορική πρόβλεψη της περιοχής του εναλλακτικού μεταγράφου που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη έγινε με το πρόγραμμα expasy translation tool.

2.10 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτική πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη PVDF και Ανοσοανίχνευση

SDS-PAGE

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών των υπό ανάλυση δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου δύο φάσεων (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Η μία φάση του πηκτώματος αποτελεί το Stacking gel (5%), στην οποία έγινε φόρτωση των δειγμάτων των πρωτεϊνών και το «πακετάρισμά» τους στο ίδιο ύψος προκειμένου όλες οι διαδρομές να τρέξουν σύγχρονα. Τη δεύτερη φάση αποτελεί το πήκτωμα διαχωρισμού ή separating gel (8%), όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, κάτω από εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου.

Η παρασκευή του διφασικού πηκτώματος έγινε σύμφωνα με τα συστατικά των παρακάτω πινάκων

Συστατικά πηκτώματος διαχωρισμού	ml
H ₂ O	2,3
30% acrylamide mix	1,3
1.5M Tris (Ph 8.8)	1,3
10% SDS	0,05
10% APS (ammonium persulfate)	0,05
TEMED	0,003

Συστατικά πηκτώματος stacking	ml
H ₂ O	2,1
30% acrylamide mix	0,5
1 M Tris (Ph 8.8)	0,38
10% SDS	0,03
10% APS (ammonium persulfate)	0,03
TEMED	0,003

Ηλεκτρομεταφορά

Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF (ή νιτροκυτταρίνης) είναι γνωστή ως Western blotting. Βασίζεται στο γεγονός ότι τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-SDS που είναι αρνητικά φορτισμένα, μετακινούνται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου προς την άνοδο, εξέρχονται από την πηκτή και καθιλώνονται στη μεμβράνη λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η μεμβράνη και η πηκτή μεταφέρονται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (*Transfer buffer*). Στην περίπτωση της PVDF μεμβράνης προηγείται ένα στάδιο εμβαπτίσεως της μεμβράνης σε 100% μεθανόλη πριν βυθιστεί στο διάλυμα μεταφοράς.

Η τοποθέτησή του gel και της μεμβράνης στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (χρησιμοποιήθηκε Semidry Transfer System) γίνεται ανάμεσα σε τρία ζεύγη από χαρτιά Whatman με τη μεμβράνη προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και την πηκτή στον αρνητικό. Η επαφή μεταξύ της πηκτής και της μεμβράνης πρέπει να είναι άμεση χωρίς την παρεμβολή φυσαλίδων που παρεμποδίζουν τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η μεταφορά των πρωτεϊνών στην συγκεκριμένη εργασία έγινε κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 270 mA για 50 min, χρόνος που μπορεί όμως να διαφέρει ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που πρόκειται να μεταφερθούν .

Ανοσοανίχνευση

Η ανοσοανίχνευση είναι μια τεχνική που επιτρέπει τον εντοπισμό μιας καθηλωμένης σε μεμβράνη πρωτεΐνης με τη βοήθεια αντισώματος. Η τεχνική βασίζεται στο γεγονός ότι όταν η καθηλωμένη πρωτεΐνη-αντιγόνο αλληλεπιδράσει με το αντίσωμα, μπορεί να ανιχνευτεί με τη βοήθεια ενός δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο.

Αρχικά η μεμβράνη PVDF μετά την ηλεκτρομεταφορά εμβαπτίζεται υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα σε blocking buffer ώστε να κορεστεί η μεμβράνη από την καζεΐνη του γάλακτος και να αποφευχθούν οι μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα το ειδικό για την επιθυμητή πρωτεΐνη (στην προκειμένη περίπτωση ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε rabbit anti-PARN με αραίωση 1:500 σε blocking buffer). Κατόπιν η μεμβράνη επώαζεται με το πρώτο αντίσωμα υπό συνεχή ανακίνηση overnight στους 4°C. Ακολουθούν 5 πλύσεις της μεμβράνης με PBS-T 15 για min η κάθε μία υπό ανάδευση, και στη συνέχεια επώαση της μεμβράνης επίσης υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία του δεύτερου αντισώματος (φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένη υποοξειδάση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Ως δεύτερο αντίσωμα στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε goat anti-rabbit IgG-HRP αραιωμένο 1:10000. Της διαδικασίας εμφάνισης του σήματος προηγούνται πέντε πλύσεις της μεμβράνης με PBS-T για 15min. Η ανίχνευση ειδικού σήματος στη συνέχεια οφείλεται στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας, καθώς το δεύτερο αντίσωμα που είναι ειδικό έναντι rabbit IgG ανοσοσφαιρινών, μετά την προσθήκη κατάλληλου αντιδραστηρίου δίνει προϊόν που παράγει έντονο φως (συγκεκριμένα ως αποτέλεσμα οξείδωσης της λουμινόλης από την υπεροξειδάση), το οποίο μπορεί να αποτυπωθεί σε φωτογραφικό φιλμ με τη μορφή σκοτεινής ζώνης. Η εμφάνιση γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο του συστήματος ανοσοανίχνευσης ECL ή ECL Plus της Amersham.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- Running buffer 10x: 25mM Tris, 192mM Glycine, SDS 0,1%, 500 ml dH₂O
- Transfer buffer 1x: 10% running buffer 10x, 10% Methanol (100%), dH₂O
- Blocking buffer: 0,1% Tween, 5% γάλα, PBS 1x
- Washing buffer (PBS-T): 0,1% Tween, PBS 1x
- Protein Loading Buffer 4x: 1M Tris pH 6.8, 10% glycerol, 10% SDS, 5% β -μερκαπτοαιθανόλη, 1% bromophenol blue

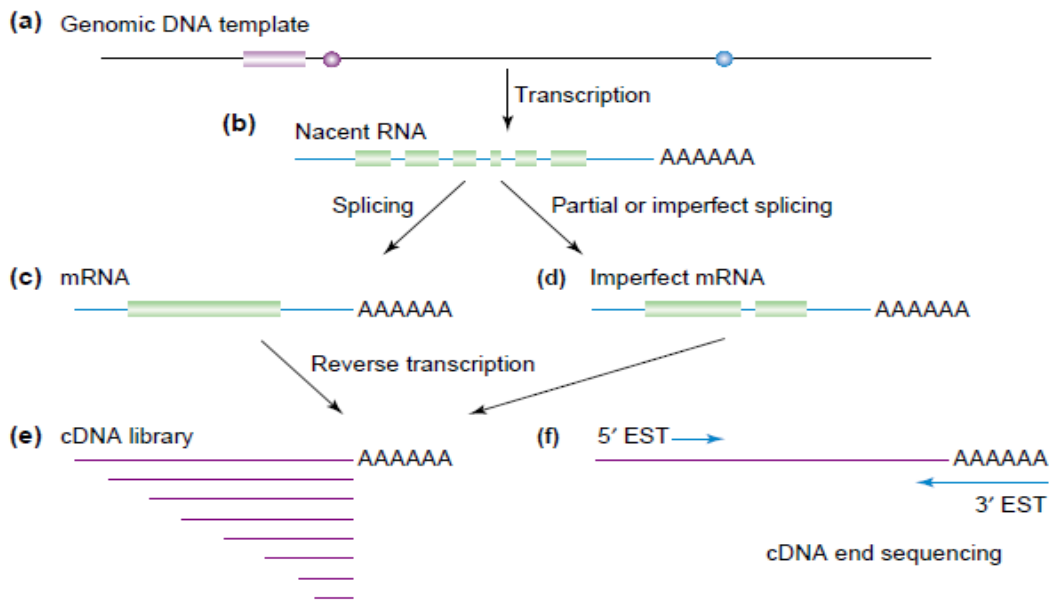
- Acryl-bisacrylamide mix (Merck)
- Tris (Merck)
- SDS (Merck)
- APS (Merck)
- TEMED (Life Invitrogen)
- Glycerol (Merck)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Merck)

- Glycine (Merck)
- Bromophenol blue (Rasearch Organics)
- Methanol (Merck)
- Tween (EuroClone)
- Γάλα σε σκόνη
- Rabbit anti-PARN serum (A.Virtanen)
- Goat anti-rabbit IgG-HRP (Chemicon)
- ECL Plus (Amersham)
- Protein ladder (Nippon Genetics)

3 Αποτελέσματα

3.1 Σχεδιασμός εκκινήτων

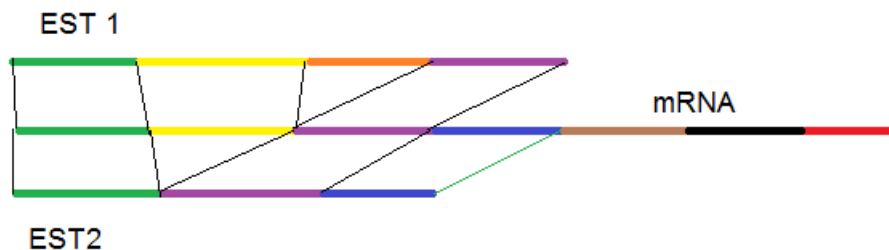
Ο σχεδιασμός των εκκινήτων έγινε έτσι ώστε να ενισχυθούν cDNA της PARN που αντιστοιχούν σε εναλλακτικά μετάγραφα λόγω εναλλακτικού ματίσματος. Οι εκκινήτες σχεδιαστήκαν εκατέρωθεν εναλλακτικών περιοχών που έχει βρεθεί ότι υπάρχουν από τη μελέτη των ESTs (expressed sequence tags) που αντιστοιχούν στη PARN αλλά και από ένα πρόσφατο μεγάλο projects ολικής αλληλούχισης cDNA βιβλιοθηκών με στόχο την ανακάλυψη εναλλακτικών μεταγράφων.



Εικόνα 33. Η μέθοδος παραγωγής των ESTs.

Τα ESTs είναι αλληλουχίες μήκους 300-700 βάσεων που προέρχονται από την αλληλούχιση των άκρων των ενθεμάτων cDNA βιβλιοθηκών. Οι cDNA βιβλιοθήκες δομούνται κλωνοποιώντας τα cDNA που έχουν παραχθεί από την αντίστροφη μεταγραφή όλων των mRNA ενός συγκεκριμένου είδους κυττάρων οπότε θεωρητικά περιέχουν την πλειοψηφία της πληροφορίας που εκφράζεται σε ένα συγκεκριμένο τύπο κυττάρων κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Επειδή ακόμα και σήμερα η αλληλούχιση ολόκληρης της βιβλιοθήκης και η βιοπληροφορική επεξεργασία της είναι μια εξαιρετικά δύσκολη, χρονοβόρα και πολυδάπανη διεργασία μπορούν να αλληλουχηθούν μόνο τα άκρα του κάθε ενθέματος και έτσι να παραχθούν τα ESTs. Οπότε η γνώση της αλληλουχίας των ESTs που έχουν παραχθεί από μια συγκεκριμένη cDNA βιβλιοθήκη μας δίνει ένα στιγμιότυπο της γονιδιακής έκφρασης μιας κυτταρικής σειράς κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες σε αντίθεση με την πλήρη εικόνα που θα μας δώσει ένα πλήρες project αλληλούχισης. Τα άκρα του κάθε ενθέματος αλληλουχούνται μόνο μία φορά προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση, συνήθως 3' προς 5' έτσι η πιστότητά

της αλληλουχίας τους είναι περιορισμένη. Αυτή η κατεύθυνση συνήθως επιλέγεται γιατί μπορούμε ευκολά να εισάγουμε προσαρμογείς που να προσδένονται πάνω στην αντίστοιχη περιοχή της πολυ(Α) ουράς στο cDNA έτσι αυτή η δίκλωνη περιοχή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν εκμαγείο για την έναρξη της αλληλούχισης. Τα ESTs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση θέσεων εναλλακτικού ματίσματος. Η λογική είναι ότι προσπαθούμε να βρούμε ESTs που δεν στοιχίζονται σε όλο τους το μήκος με την αλληλουχία του γνωστού μεταγράφου αλλά στοιχίζονται με μεγάλο score στα άκρα του. Για παράδειγμα αν βρούμε ένα EST όπως το "EST2" στην εικόνα 32 που περιέχει το πρώτο εξόνιο (πράσινο) ή μέρος του, επίσης περιέχει το τρίτο (ιώδες) αλλά όχι το δεύτερο (κίτρινο) καταλαβαίνουμε ότι αυτό το EST αντιπροσωπεύει ένα εναλλακτικό μετάγραφο που δεν περιέχει το δεύτερο εξόνιο. Αναλόγως αν βρούμε ένα EST όπως το "EST1" που περιέχει μια αλληλουχία που δεν στοιχίζεται με την αλληλουχία του mRNA τότε καταλαβαίνουμε πως το "EST1" αντιστοιχεί σε ένα εναλλακτικό μετάγραφο που περιέχει ένα εναλλακτικό εξόνιο.



Εικόνα 34. Πρόβλεψη εναλλακτικών θέσεων ματίσματος χρησιμοποιώντας ESTs

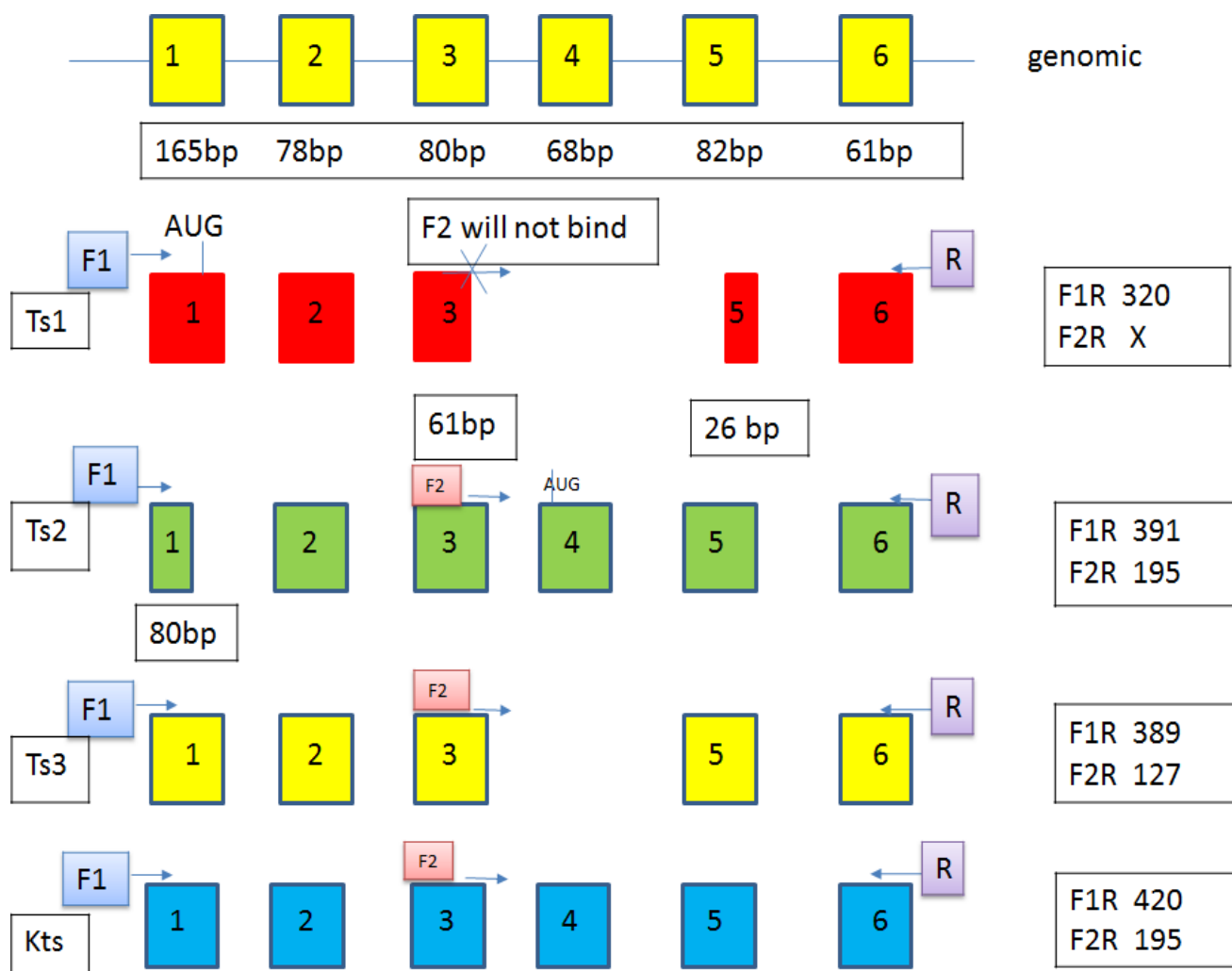
Η διαδικασία για αυτή τη βιοπληροφορική ανάλυση είναι η εξής:

- Αρχικά επιλέγουμε και αντιγράφουμε από το NCBI την αλληλουχία του mRNA της PARN.
- Κάνουμε ομοπαράθεση με τον πρόγραμμα BLASTn την αλληλουχία αυτή με όλα τα ανθρώπινα EST που έχουν καταχωρηθεί στην βάση δεδομένων dbEST
- Επιλέγουμε και αντιγράφουμε την αλληλουχία όλων των EST που έχουν το προφίλ ομοπαράθεσης που περιγράφηκε παραπάνω.
- Κάνουμε ομοπαράθεση κάθε ένα από τα EST με την γενομική αλληλουχία του γονιδίου της PARN.
- Παρατηρούμε αν η αλληλουχία του EST ταιριάζει στα εσωτερικά εξόνια του γονιδίου σε όλο του το μήκος και αν ταιριάζει μέρος του EST με κάποια ιντρονική αλληλουχία.
- Αν δεν στοιχίζεται σε όλο το μήκος κάποιου εσωτερικού εξονίου ή αν στοιχίζεται με κάποια ιντρονική αλληλουχία με επαρκές score τότε αυτό το EST μαρτυρά την ύπαρξη εναλλακτικού μεταγράφου που τουλάχιστον έχει τις ίδιες διαφορές που έχει το συγκεκριμένο EST με το συγκεκριμένο mRNA.

Με αυτή την ανάλυση βρήκαμε ότι το εξόνιο 4 της PARN ίσως είναι εναλλακτικό, επίσης βρήκαμε πιθανές θέσεις εναλλακτικού ματίσματος στα εξόνια 1, 3 και 5. Με αυτά τα δεδομένα σχεδιάστηκαν οι εκκινητές F1,F2,R με τη βοήθεια του προγράμματος Primer 3. Οι F1 και R περικλείουν ολόκληρη την πιθανή εναλλακτική περιοχή ενώ ο F2 έχει σχεδιαστεί ώστε να είναι συμπληρωματικός με την πιθανή εναλλακτική περιοχή του εξονίου 3. Τα ESTs που μαρτυρούν την ύπαρξη εναλλακτικής θέσης

ματίσματος στο εξόνιο 1 είναι τα: **BI911937, BM461431, DC395851, DC298332**. Τα ESTs που μας δείχνουν ότι το εξόνιο 4 είναι εναλλακτικό είναι τα: **DA371234, AL524121, DB135967, AL713474, DA701131**. Τέλος τα ESTs που μας δείχνουν την πιθανή ύπαρξη δύο εναλλακτικών θέσεων ματίσματος εντός των εξονίων 3 και 5 είναι τα: **DC393890 BM546879**.

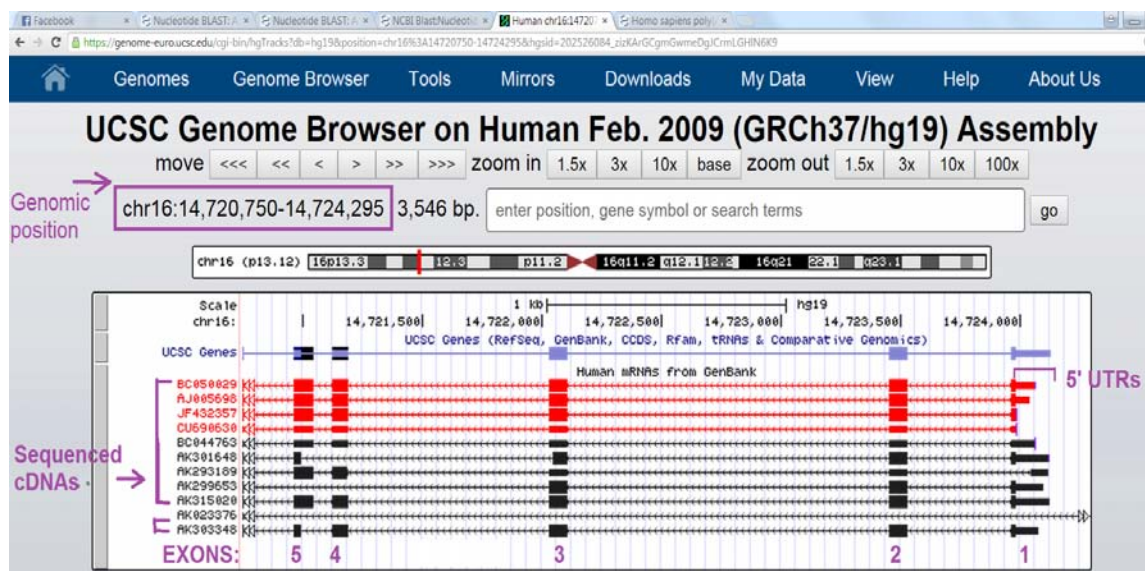
Με τα παραπάνω δεδομένα θεωρήσαμε την ύπαρξη τριών εναλλακτικών μεταγράφων τα Transcript 1,2 και 3 (Ts1,Ts2,Ts3) πέρα από το γνωστό μετάγραφο Kts (Known transcript). Επίσης βρέθηκε ότι στο υποθετικό ts2 χάνεται το κωδικόνιο έναρξης οπότε πιθανώς η μετάφραση να αρχίζει από ένα καθοδικό ATG που βρίσκεται στο εξόνιο 4 μιας και το συγκεκριμένο διατηρεί το πλαίσιο ανάγνωσης μέχρι το τέλος του μεταγράφου.



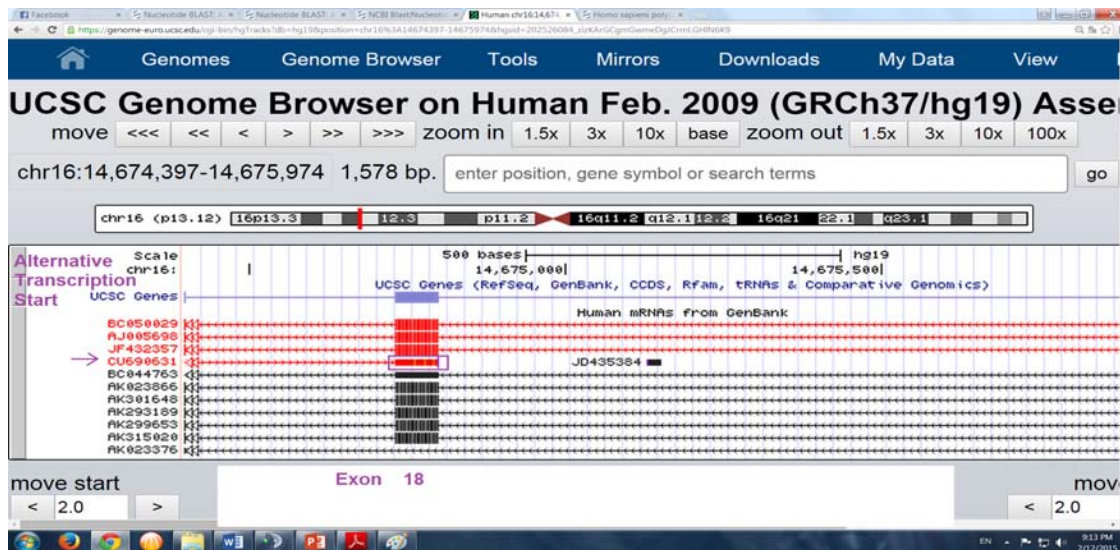
Εικόνα 35. Οι εκκινήτες F1, F2 και R σχεδιάστηκαν για την αναζήτηση τριών εναλλακτικών μεταγράφων. Τα χρωματιστά πλαίσια (κόκκινο, πράσινο, κίτρινο, κυανό) υποδηλώνουν εξόνια, και οι αριθμοί στα πλαίσια την αύξουσα σειρά τους.

Εκκινητής	Αλληλουχία	TM
F1	GGC TGC CTC AGC TAC TGC	61
F2	GAA GAG AGG TAT CAG AAG CTT	57.5
R	GCT AGA AAG TCA ATG CTG GA	57

Μια άλλη ανεξάρτητη πηγή δεδομένων είναι τα cDNAs που έχουν αλληλουχηθεί πλήρως και έχουν κατατεθεί στο Genbank. Σημαντικό μέρος αυτών προέρχεται από το project **Identification and Functional Analyses of 11 769 Full-length Human cDNAs Focused on Alternative Splicing** AI Wakamatsu et al 2009 [195]. Σε αυτή την έρευνα δημιουργήθηκε μια πλούσια βιβλιοθήκη cDNA και από αυτά αλληλουχήθηκαν πλήρως 55000 διαφορετικά μόρια. Βρέθηκαν 11769 cDNA που φαίνεται ότι αντιστοιχούν σε εναλλακτικά μετάγραφα, 7 των οποίων δείχθηκε ότι εκφράζονται από το γονίδιο της PARN. Έξι από αυτά πιστεύεται ότι οφείλονται σε εναλλακτικό μάτισμα και ένα στη χρήση εναλλακτικού υποκινητή. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας ενσωματώθηκαν στο ENCODE project και μπορούν να εξεταστούν μέσω του **ucsc genome browser**.



Εικόνα 36. Μια σειρά από projects αλληλούχισης έδειξαν ότι το γονίδιο της PARN δύναται να εκφράζει πολλά εναλλακτικά μετάγραφα τα οποία εμφανίζουν ιδιαίτερη ποικιλία στις 5' UTR.



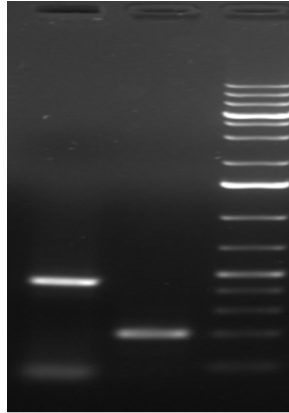
Εικόνα 37. Το μετάγραφο CU690631 ξεκινά από το εξόνιο 18 υποδεικνύοντας την ύπαρξη εναλλακτικού υποκινητή.

Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν εν μέρει με τις παραπάνω προβλέψεις που κάναμε μιας και το AK301648, AK293189, ταυτίζονται με το προφίλ των Ts1 και Ts2 αντίστοιχα. Επίσης βλέπουμε πως στο πρώτο εξόνιο η περιοχή που κωδικοποιεί την 5'αμετάφραστη περιοχή ίσως να έχει πολλαπλές εναλλακτικές θέσεις ματίσματος. Τέλος βλέπουμε ότι σύμφωνα με το CU690631 ίσως η PARN έχει εναλλακτικό καθοδικό υποκινητή.

3.2 Αναζήτηση εναλλακτικών μεταγράφων σε 9 κυτταρικές σειρές

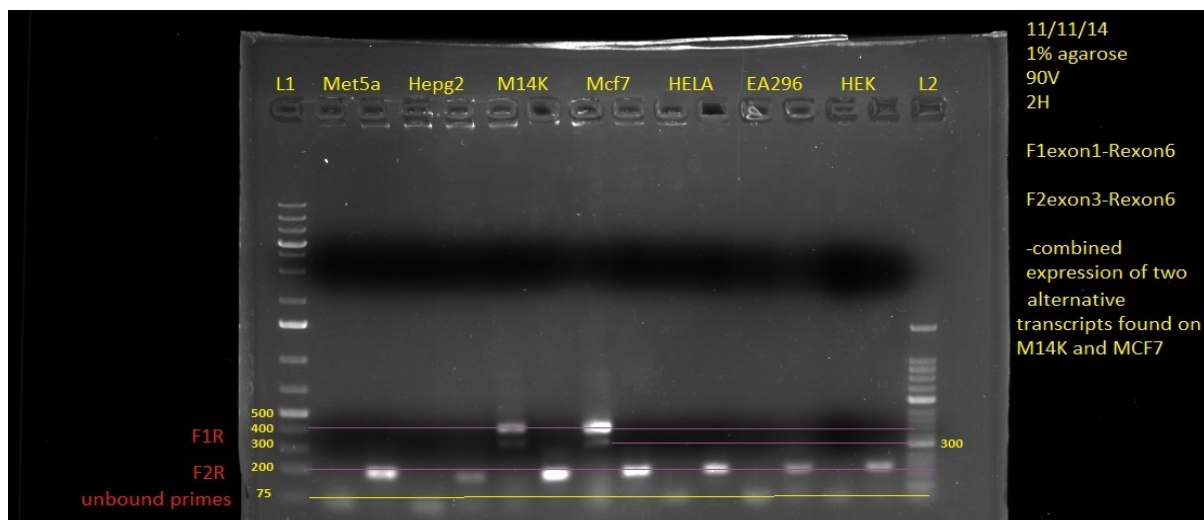
Συλλέχθηκαν κύτταρα NCI-H520 πλακώδους καρκίνου του πνεύμονα, στη συνέχεια έγινε απομόνωση του ολικού RNA με το πρωτόκολλο Tri Reagent της Sigma Aldrich και φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης, έπειτα με το 1st strand cDNA kit της Takara έγινε η σύνθεση του cDNA. Στη συνέχεια έγινε PCR με τα ζεύγη εκκινητών F1R F2R. Τέλος τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% υπό τάση 90 Volt.

Στην εικόνα 38 από τα αριστερά προς τα δεξιά βλέπουμε τις διαδρομές των προϊόντων του ζεύγους F1R, F2R και το μοριακό μάρτυρα DNA. Το προϊόν F1R έχει μέγεθος περίπου 420 ζευγών βάσεων, ενώ το F2R 200. Επίσης στη διαδρομή F1R παρατηρούμε την ύπαρξη διμερών εκκινητών. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως στα NCI-H520 εκφράζεται μόνο το γνωστό μετάγραφο της PARN (με μήκους εξωνίου 1 165bp) μιας και συμφωνεί με το αντίστοιχο προβλεπόμενο μέγεθος προϊόντων.



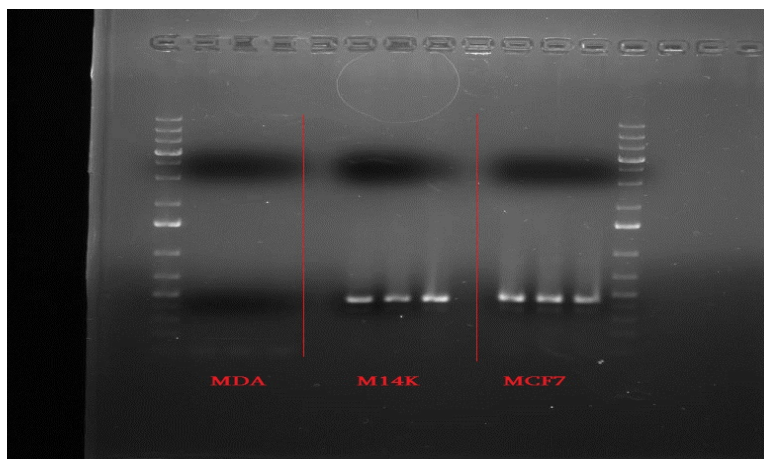
Εικόνα 38 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με ζεύγη F1R,F2R σε cDNA κυττάρων NCI-H520, (F1R,F2R, Ladder από αριστερά προς τα δεξιά)

Το επόμενο βήμα ήταν να επαναληφθεί το παραπάνω πείραμα με τις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές MCF7, MET5A, HEPG2, EA.hy926, M14K, HEK, HeLa με μόνη διαφορά ότι για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε το kit Nucleospin Triprep της Macherey Nagel. Στην Εικόνα 39 παρατηρούμε ότι το ζεύγος εκκινητών F1R δεν λειτούργησε στο cDNA των κυττάρων met5a, Hepg2, HELA, EA296 και HEK αλλά έδωσε δύο προϊόντα μεγέθους περίπου 400 και 320 ζευγών βάσεων στο cDNA των κυττάρων Mcf7 και M14K, επίσης το ζεύγος F2R έδωσε ένα προϊόν 200 ζευγών βάσεων σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Αυτά τα μεγέθη προϊόντων ταιριάζουν με τα προβλεπόμενα μεγέθη των TS2 και του γνωστού mRNA της PARN.



Εικόνα 39. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με ζεύγη F1R,F2R σε cDNA επτά κυτταρικών σειρών.

Στη συνέχεια έγινε επανάληψη της PCR με το ζεύγος εκκινητών F1R στα cDNA των M14K, MCF7 και MDA. Η κυτταρική σειρά MDA δεν είχε ελεγχθεί για την έκφραση εναλλακτικών μεταγράφων. Επίσης έγινε PCR στα cDNA των M14K, MCF7 για να παραχθεί αρκετή ποσότητα DNA ώστε εν τέλει να σταλθούν για αλληλούχηση. Έτσι μετά την ολοκλήρωση της PCR έγινε ηλεκτροφόρηση στις ίδιες συνθήκες. Τέλος έγινε αποκοπή των ζωνών ενδιαφέροντος και απομόνωση του DNA με το kit PCR cleanup Gel extraction της Macherey-Nagel.



Εικόνα 40. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε cDNA κυττάρων MDA, MCF7 και M14K.

Βλέπουμε πως το ζεύγος εκκινητών F1R δεν λειτούργησε στο cDNA των κυττάρων MDA και ότι το cDNA που αντιστοιχεί στο εναλλακτικό μετάγραφο μεγάλου μήκους ενισχύθηκε πολύ περισσότερο σε σχέση με το βραχύτερο στα MCF7 και M14K. Στη συνέχεια έγινε αποκοπή όλων των ξεχωριστών ζωνών της πηκτής με νυστέρι και τοποθετήθηκαν σε τέσσερα ξεχωριστά tubes ένα για κάθε διαφορετική κυτταρική σειρά και προϊόν (MCF7 long, MCF7 short, M14k long, M14k short). Αφού ολοκληρώθηκε η απομόνωση του DNA προϊόντος από όλες τις ζώνες, επαναλάβαμε την PCR με εκκινητές F1R στα δύο δείγματα DNA των βραχέων προϊόντων (MCF7 short, M14k short) με αυτό τον τρόπο εξασφαλίσαμε ότι η συγκέντρωση DNA των βραχέων προϊόντων θα επαρκήσει για να γίνει επιτυχώς η αλληλούχησή τους.

3.3 Αλληλούχιση των προϊόντων PCR και βιοπληροφορική επαιξεργασία

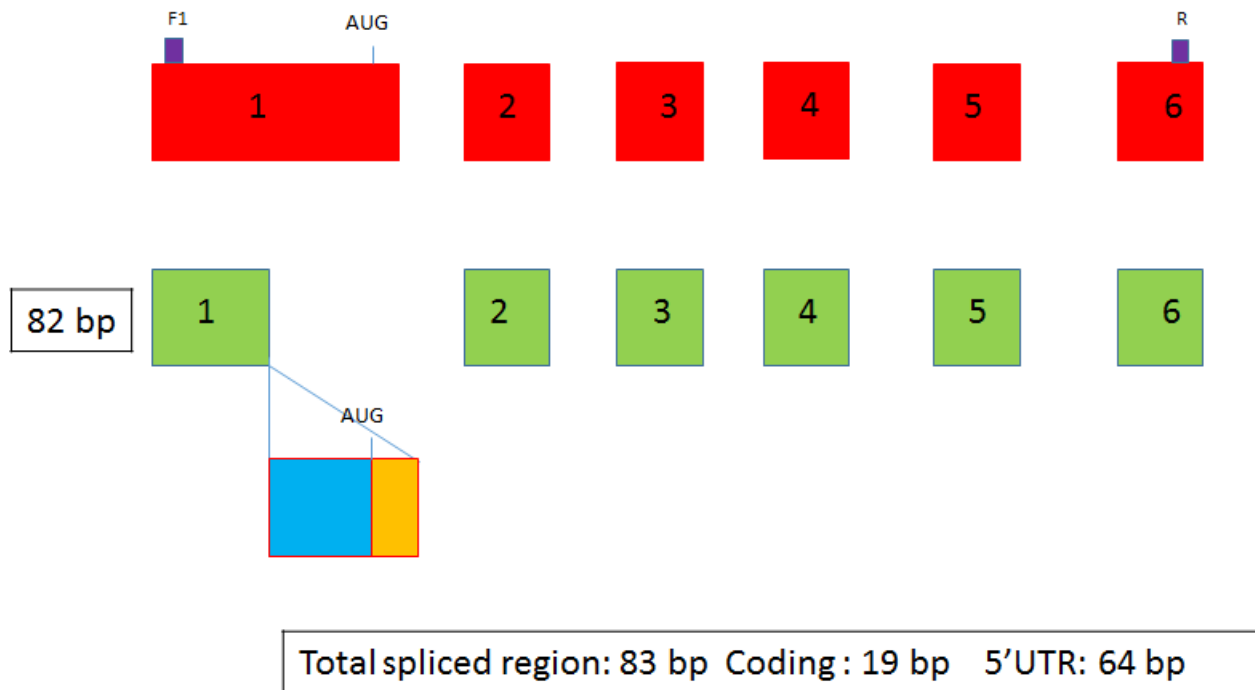
Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης επιβεβαίωσαν τις προβλέψεις μας και έδειξαν ότι το προϊόν μεγάλου μήκους αντιστοιχεί στο γνωστό μετάγραφο της PARN και το προϊόν μικρότερου μήκους σε ένα εναλλακτικό μετάγραφο. Βρέθηκε ότι η διαφορά μεταξύ των δύο προϊόντων έγκειται στην έλλειψη 83 ζευγών βάσεων από το βραχύ προϊόν σε σχέση με το μεγαλύτερο. Η διαφορά αυτή εντοπίζεται στο εξόνιο 1 το οποίο στο γνωστό μετάγραφο κωδικοποιεί στο μεγαλύτερό του μήκος για την 5' αμετάφραστη περιοχή αλλά περιέχει και μια μικρή περιοχή που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη. Η εναλλακτική περιοχή περιλαμβάνει 64 ζεύγη βάσεων που αντιστοιχούν σε 5' UTR και 19 ζεύγη βάσεων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνη συμπεριλαμβανομένου του κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης. Παρακάτω φαίνεται η πλήρης αλληλουχία του πρώτου εξονίου της PARN, όλες οι χρωματιστές αλληλουχίες συντελούν την εναλλακτική περιοχή, από τις οποίες οι γαλάζιες αποτελούν 5' UTR και οι μώβ κωδικοποιούν για πρωτεΐνη.

Με τη χρήση του προγράμματος ExPASy translate tool βρήκαμε ότι στο βραχύ μετάγραφο το επόμενο κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης το οποίο διατηρεί το πλαίσιο ανάγνωσης βρίσκεται στο εξόνιο τέσσερα. Θεωρώντας ότι η μόνη διαφορά μεταξύ των δύο μεταγράφων είναι αυτή που βρήκαμε στο εξόνιο 1 προσπαθήσαμε να προβλέψουμε τις αλλαγές που θα έχουν οι δύο αντίστοιχες πρωτεϊνικές ισομορφές της PARN. Με την μεταφορά του κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης στο εξόνιο τέσσερα,

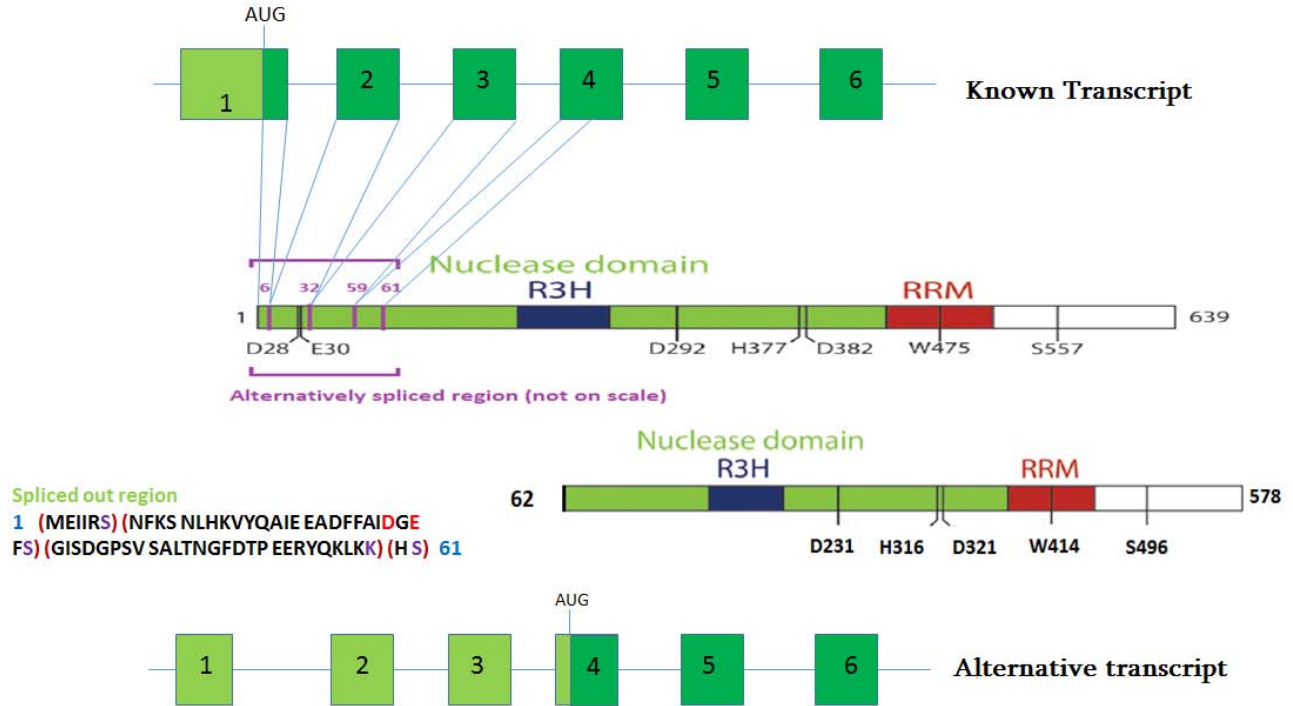
όλες οι ανοδικές περιοχές μετατρέπονται σε 5' UTR ,αυτό από ότι φαίνεται θα έχει ως αποτέλεσμα οι δύο ισομορφές να διαφέρουν κατά 61 αμινοξέα στο N-τελικό άκρο της PARN. Αυτά τα 61 αμινοξέα είναι μέρος της καταλυτικής περιοχής της PARN και μάλιστα περιλαμβάνουν δύο από τα καταλυτικά αμινοξέα του ενεργου κέντρου του ενζύμου, τα Asp28 και Glu30.

A 1 agggcgcgcg tgtttccgga agtcgcggcc ggcgtcaccg ctgcggtgc etcagctact
 61 gccgcagtgc ccgcggaatt cg**gcgagtag aaccgtgag gcgggcgcg gcccgggtg**
 121 **ggccaaggtt ccgccaacte tgcagatcg agataatcag gagca**

B



Εικόνα 41. A. αλληλουχία του πρώτου εξονίου της PARN. Ο ι χρωματιστές αλληλουχίες συντελούν την εναλλακτική περιοχή. Γαλάζιο: 5' UTR· μώβ: περιοχή που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη. **B.** Σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων αλληλούχισης προϊόντων PCR που αντιστοιχούν σε εναλλακτικά μετάγραφα . Κάθε τετράγωνο αναπαριστά ένα εξώνιο και η αριθμησή τους αντιστοιχεί στα εξώνια του γονιδίου της PARN. Το γνωστό μακρύ μετάγραφο φαίνεται με κόκκινο και το εναλλακτικό TS2 με πράσινο. Με πορτοκαλί και γαλάζιο φαίνεται η περιοχή που λείπει από το TS2 μετάγραφο, η πορτοκαλί περιοχή στο γνωστό μετάγραφο αντιστοιχεί σε μέρος της 5' UTR ενώ η πορτοκαλί σε περιοχή που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη. Έτσι φαίνεται πως από το πρώτο εξώνιο του Ts2 εναλλακτικού μεταγράφου λείπει μία εναλλακτική περιοχή μήκους 83 ζευγών βάσεων και παραμένει μία περιοχή 82.



Εικόνα 42. Σχηματική αποικόνιση της προβλεπόμενης πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης που ίσως εκφράζει το TS2 εναλλακτικό μετάγραφο (alternative transcript). Known transcript: μετάγραφο PARN αγρίου τύπου.

Το προβλεπόμενο μοριακό βάρος της εναλλακτικής ισομορφής της PARN υπολογίζεται σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα:

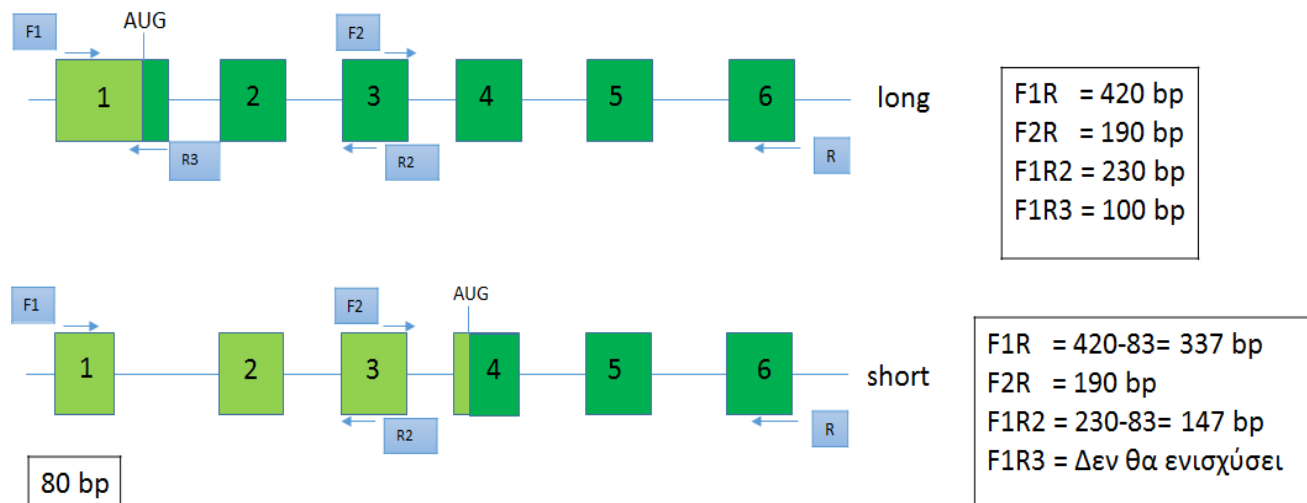
639 αμινοξέα η γνωστή ισομορφή της PARN	74KD
639-61=578 αμινοξέα, προβλεπόμενο μήκος εναλλακτικής ισομορφής	67 KD

Με τη χρήση του προγράμματος PITA προβλέφθηκε ότι η 5' περιοχή seed του miR-1207 μπορεί να προσδεθεί στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γνωστού μεταγράφου και όχι του εναλλακτικού. Σύμφωνα με το πρόγραμμα, 7 θέσεις της περιοχής seed του είναι συμπληρωματικές με το 5' UTR, σε μία θέση υπάρχει αταίριαστο ζεύγος και σε μία ακόμα δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου μέσω γουανίνης και ουρακίλης η ελεύθερη ενέργεια Gibbs αυτής της πρόσδεσης υπολογίστηκε ότι είναι -13,03 J.

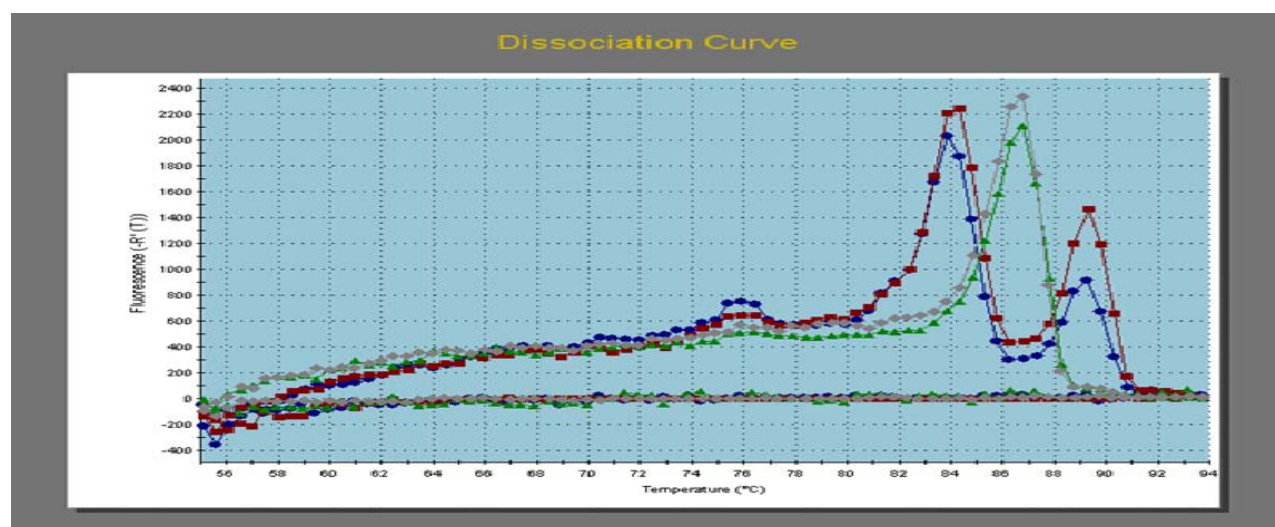
3.4 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων της PARN σε συνθήκες στέρησης ορού

Στη συνέχεια αποφασίσαμε να εξετάσουμε τα επίπεδα έκφρασης των εναλλακτικών μεταγράφων στα M14K κύτταρα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες επώασης και σε συνθήκες στέρησης ορού. Για αυτό το σκοπό έγινε RTq-PCR με τα ζεύγη εκκινητών F1R2, F1R3 σε cDNA M14K κυττάρων που

επώστηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες (10% FBS) και σε σε cDNA M14K κυττάρων που επώστηκαν σε μειωμένο θρεπτικό υλικό (0.5% FBS) για 1 ημέρα.



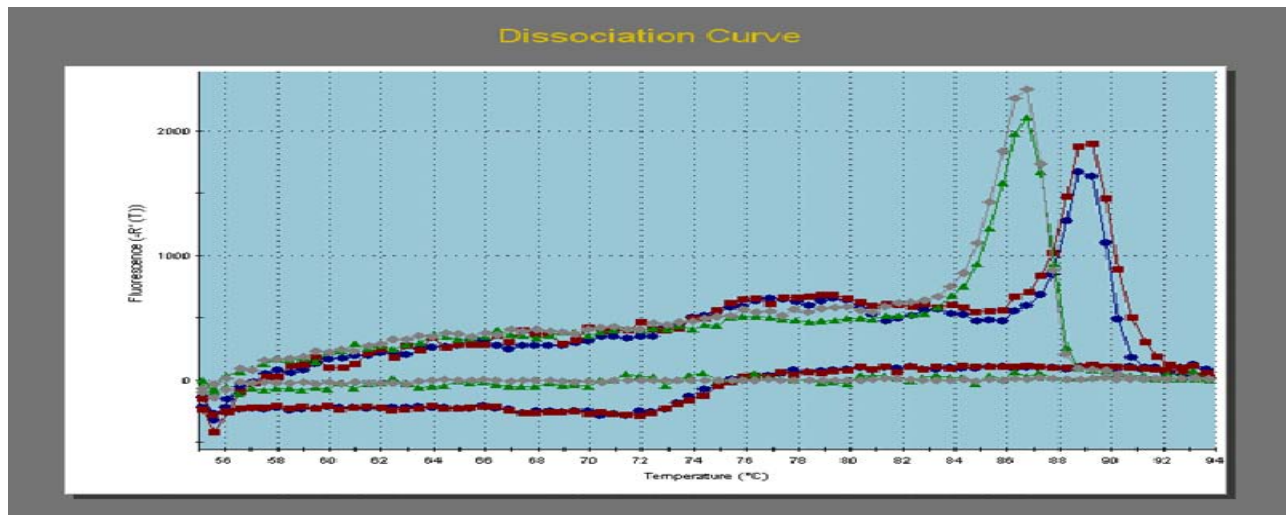
Εικόνα 43. Οι εκκινητές R2, R3 σχεδιάστηκαν έτσι ώστε το ζεύγος F1R2 να μπορεί να ενισχύσει και τα δύο εναλλακτικά μετάγραφα ενώ το F1R3 μόνο το γνωστό.



Εικόνα 44. Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού της RTq-PCR με το ζεύγος εκκινητών F1R2 και το ζεύγος που ενισχύει τη β-ακτίνη.

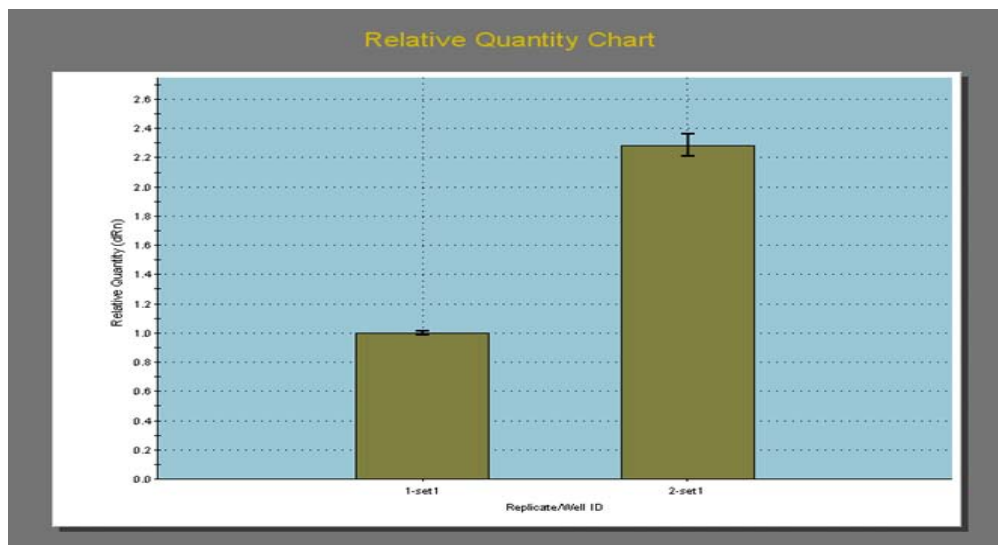
Με κόκκινο φαίνονται τα επίπεδα φθορισμού των προϊόντων 0.5% FBS με, μπλέ των 10% FBS και με πράσινο και γκρί της β-ακτίνης. Στους 84 βαθμούς Κελσίου βλέπουμε την καμπύλη φθορισμού του προϊόντος που προέρχεται από το βραχύ εναλλακτικό μετάγραφο ενώ στους 89°C βλέπουμε την καμπύλη του γνωστού μεταγράφου. Στους 87 °C βλέπουμε την καμπύλη της β- ακτίνης. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 80 °C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε

θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 82 °C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR. Από τα διαγράμματα διάστασης σήματος φθορισμού καταλαβαίνουμε ότι όλα τα προϊόντα ήταν ειδικά μιας και οι καμπύλες εμφανίζονται σε υψηλές θερμοκρασίες και είναι πολύ απότομες.

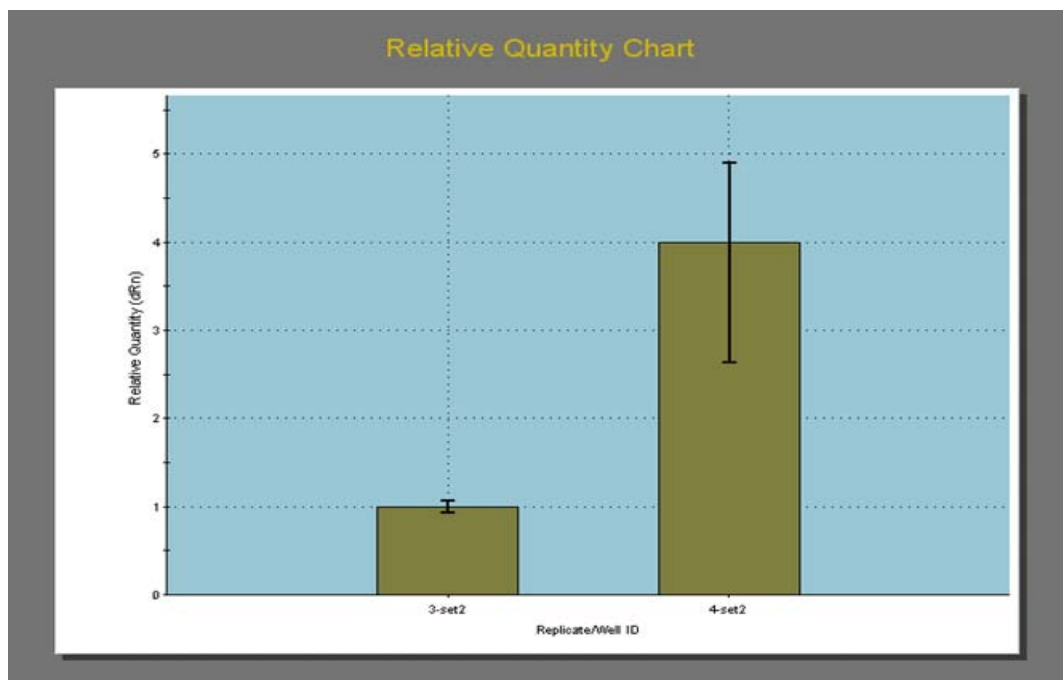


Εικόνα 45. Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού της RTq-PCR με το ζεύγος εκκινήτων FIR3 και το ζεύγος που ενισχύει τη β-ακτίνη.

Η καμπύλη φθορισμού στους 89 °C προέρχεται από το προϊόν αποκλειστικά και μόνο του γνωστού μεταγράφου. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 82 °C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 84 °C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.



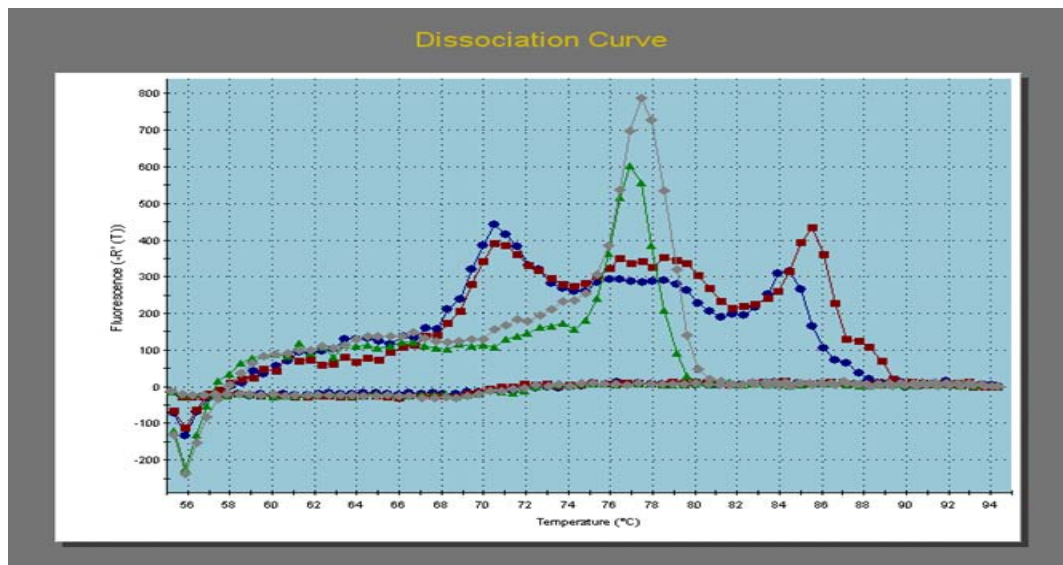
Εικόνα 46. Η συνολική έκφραση των δύο μεταγράφων της PARN διπλασιάζεται σε κατάσταση σε κατάσταση στέρησης ορού (το ζεύγος εκκινήτων FIR2 ενισχύει και τα δύο cDNA προϊόντα των μεταγράφων).



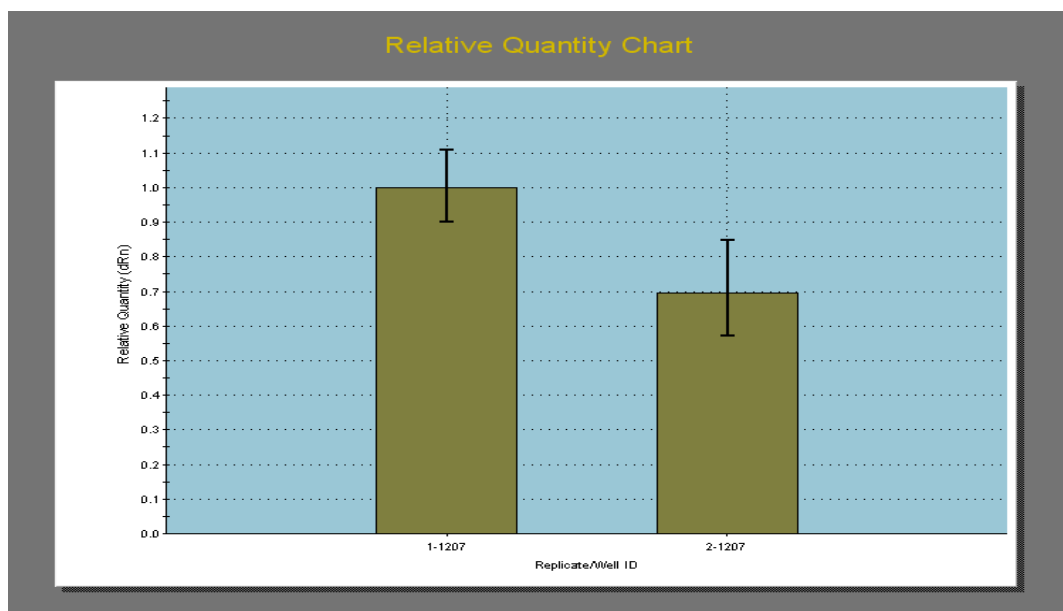
Εικόνα 47. Η έκφραση του γνωστού μεταγράφου τετραπλασιάζεται σε κατάσταση στέρησης ορού (το ζεύγος εκκινητών F1R3 ενισχύει μόνο το γνωστό μετάγραφο).

3.5 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης του miR-1207 σε συνθήκες στέρησης ορού

Στη συνέχεια μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης του miR-1207 κάτω από φυσιολογικές συνθήκες επώασης (10% FBS) και σε κατάσταση στέρησης ορού (0.5% FBS) σε κύτταρα M14K. Πιο κάτω φαίνεται το διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού, με κόκκινο φαίνονται τα επίπεδα φθορισμού του miR-1207 στα κύτταρα που επώαστηκαν με 10% FBS ενώ με μπλε με 0.5% FBS, με πράσινο και γκρι τα U6 στις αντίστοιχες συνθήκες. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 74 °C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 76 °C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR



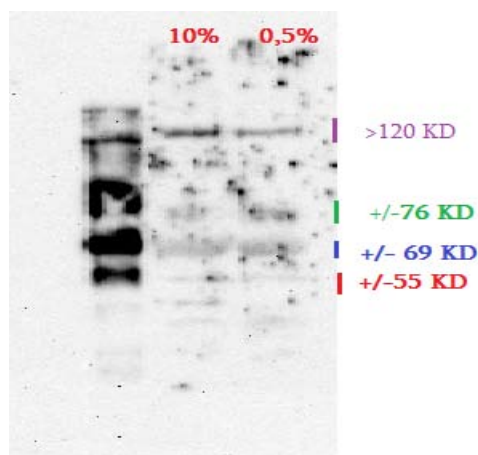
Εικόνα 48. Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού της RTq-PCR με το ζεύγος εκκινήτων που ενισχύουν το miR-1207 και το U6 snRNA.



Εικόνα 49. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του miR-1207 σε φυσιολογικές συνθήκες επώασης (αριστερό ραβδόγραμμα) και σε συνθήκες στέρησης ορού (δεξί ραβδόγραμμα). Παρατηρούμε ότι τα επίπεδα έκφρασης του miR-1207 μειώνονται κατά 30% σε συνθήκες έλλειψης ορού.

3.6 Ανοσοαποτύπωση αντι-PARN σε δείγματα πρωτεϊνών M14k κυττάρων σε κανονικές συνθήκες, και σε στέρησης ορού

Τέλος κάναμε στύπωμα Western σε αποδιατακτικές συνθήκες με αντι-PARN πολυκλωνικά αντισώματα σε ολικό κυτταρικό εκχύλισμα πρωτεϊνών που είχαν απομονωθεί από M14k κύτταρα που είχαν επωαστεί σε κανονικές συνθήκες, και σε συνθήκες στέρησης ορού. Παρατηρούμε και στα δύο δείγματα την ύπαρξη δύο ζωνών με μεγέθη περίπου 76 και 69 Kd οι τελευταίες θα μπορούσαν να αντιστοιχούν στα πρωτεϊνικά προϊόντα του Ts2 εναλλακτικού μεταγράφου. Επίσης παρατηρούμε την ύπαρξη μιας ζώνης με μέγεθος μεγαλύτερο των 120 Kd και μία πολύ αχνή ζώνη περίπου στα 55 Kd. Στο δείγμα που αντιστοιχεί στα κύτταρα που επώαστηκαν σε μειωμένο θρεπτικό υλικό επίσης βλέπουμε ότι η ζώνη των 76 Kd είναι αρκετά πιο έντονη σε σχέση με την αντίστοιχη του άλλου δείγματος.



Εικόνα 50. Ανοσοαποτύπωση κατά Western με πολυκλωνικά αντισώματα αντι-PARN σε κυτταρικά λύματα που απομονώθηκαν από κύτταρα M14K που επώαστηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες (αριστερά) και σε στέρηση ορού (δεξιά).

4. Συζήτηση αποτελεσμάτων

Την τελευταία δεκαετία έχει γίνει σημαντική πρόοδος στον τομέα της γενομικής κυρίως λόγω της ωρίμανσης των τεχνολογιών της αλληλούχισης και των μικροσυστοιχιών αλλά και λόγω της ανάπτυξης χρήσιμων προγραμμάτων βιοπληροφορικής για την επεξεργασία του όγκου δεδομένων που παράγουν οι παραπάνω τεχνικές. Ένας από τους πολλούς καρπούς που μας πρόσφεραν οι έρευνες που έγιναν χρησιμοποιώντας την παραπάνω τεχνολογία, είναι η ανάδειξη της σημασίας του μηχανισμού του εναλλακτικού ματίσματος. Είναι σαφές πως το εναλλακτικό μάτισμα είναι ο κύριος μηχανισμός δημιουργίας πολυπλοκότητας στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ότι είναι ένα σημαντικότερο βήμα της γονιδιακής έκφρασης, αλλά και ότι ίσως είναι καιρός να αναθεωρηθεί ο ορισμός του γονιδίου, μιας και έχουν βρεθεί εναλλακτικά μετάγραφα που μεταφράζονται σε πρωτεΐνες που έχουν εντελώς διαφορετική τριτοταγή δομή, δράση, λειτουργία και ρύθμιση σε σχέση με τα υπόλοιπα μετάγραφα που μπορεί να κωδικοποιεί ένα γονίδιο. Η απορρύθμιση μέσω μιας ποικιλίας κωδικών και μη κωδικών μεταλλάξεων σε cis στοιχεία και trans ρυθμιστικούς παράγοντες επίσης έχει δείχθει ότι αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα για πολλές γενετικές ασθένειες και ότι παίζει σημαντικότερο ρόλο στα μετέπειτα στάδια της καρκινογένεσης. Ο τομέας της πρωτεομικής για πολλούς λόγους δεν έχει ακολουθήσει τους ταχείς ρυθμούς ανάπτυξης της γενομικής. Αυτό συμβαίνει κυρίως επειδή η δομή είναι εξ ίσου αν όχι πιο σημαντική από την αλληλουχία σε αυτόν τον τομέα, προσθέτοντας δισανάλογο βάθος στην έρευνα των πρωτεϊνών σε σχέση με των γονιδίων και των μεταγράφων, αλλά και επειδή οι τεχνικές της πρωτεομικής δεν καταφέρνουν μέχρι στιγμής να δίνουν τα μαζικά αποτελέσματα που δίνουν οι high throughput τεχνικές της γενομικής. Έτσι πολλά αποτελέσματα που έχει δώσει η γενομική, που υποδεικνύουν άμεσα ή υπονοούν την ύπαρξη εναλλακτικών μεταγράφων δεν έχει μετατραπεί ακόμα σε γνώση δομής λειτουργίας και ρύθμισης των αντίστοιχων πρωτεϊνικών προϊόντων για τον απλό λόγο ότι αυτό το είδος έρευνας χρειάζεται δισανάλογα περισσότερο χρόνο και κόπο. Η παρούσα εργασία φιλοδοξεί να είναι ένα πρώτο βήμα για την αξιοποίηση της γνώσης της ύπαρξης και της ρύθμισης των εναλλακτικών μεταγράφων της PARN, ώστε σε μελλοντικές εργασίες να αποκτηθεί γνώση πάνω στη λειτουργία αυτών των νέων πρωτεϊνών. Σε αυτή την εργασία βρήκαμε ότι στις κυτταρικές σειρές M14K και Mcf7 συνεκφράζονται δύο μετάγραφα της PARN, ένα εκ των οποίων ήταν άγνωστο. Στη συνέχεια ελέγχθηκε το πρότυπο έκφρασης των μεταγράφων και του miR-1207 σε M14K κύτταρα σε κατάσταση στέρησης ορού. Παρατηρήσαμε ότι σε κατάσταση στέρησης ορού το συνολικό επίπεδο έκφρασης των μεταγράφων διπλασιάζεται, η έκφραση του γνωστού μεταγράφου τετραπλασιάζεται και του Ts2 υποδιπλασιάζεται ενώ η έκφραση του miR-1207 μειώνεται κατά 30%. Τέλος έγινε ανοσοαποτύπωση της PARN σε δείγματα κυτταρικών λυμάτων πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από M14K κύτταρα τα οποία επώαστηκαν στις συνθήκες που περιγράφονται παραπάνω. Από το τελευταίο πείραμα μπορέσαμε να παρατηρήσουμε την πρωτεΐνη της PARN, αλλά μάλλον λόγω του ότι η πρωτεολυμένη ισομορφή της και το προβλεπόμενο

πρωτεϊνικό προϊόν του εναλλακτικού μεταγράφου έχουν σχετικά παραπλήσιες μοριακές μάζες δεν μπορέσαμε να λάβουμε καθαρή ζώνη, ώστε να αποφανθούμε με ασφάλεια ότι προέρχεται από το εναλλακτικό μετάγραφο.

Έγινε σάρωση με PCR σε cDNA εννέα διαφορετικών κυτταρικών σειρών ώστε να εξεταστεί η έκφραση εναλλακτικών μεταγράφων (εικόνες 38-40). Τα κύτταρα NCI εκφράζουν το γνωστό μετάγραφο της PARN μιας και τα μήκη των προϊόντων F1R, F2R ταιριάζουν με τα αντίστοιχα προβλεπόμενα μήκη του γνωστού μεταγράφου (εικόνα 38). Το ζεύγος εκκινητών F2R έδωσε προϊόν σε όλα τα δείγματα, ενώ το F1R μόνο στα M14K και MCF7 στα οποία έδωσε διπλή ζώνη (εικόνα 39). Το γεγονός ότι το ζεύγος εκκινητών F2R λειτούργησε σε όλα τα δείγματα σημαίνει ότι το γονίδιο PARN εκφράζεται σε όλες τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν. Το ζεύγος εκκινητών F1R είναι πιθανό ότι δεν παρήγαγε προϊόν στις περισσότερες αντιδράσεις PCR, διότι ο εκκινητής F1 σχεδιάστηκε εντός της 5' UTR που όπως φαίνεται και από την εικόνα 36 (που παραθέτει τα αποτελέσματα του [195]) αποτελεί εναλλακτική περιοχή. Το διπλό προϊόν του ζεύγους F1R στα cDNA που προέρχονται από τα κύτταρα M14K και MCF7 είναι μια σαφής ένδειξη της συνέκφρασης δύο μεταγράφων. Το μήκος των προϊόντων αυτών ταυτίζεται με τα προβλεπόμενα για το γνωστό μετάγραφο και το εναλλακτικό μετάγραφο Ts2. Στην εικόνα 40 φαίνεται ότι στο cDNA των κυττάρων MDA δεν λειτούργησε το ζεύγος F1R. Έτσι λοιπόν από το πείραμα σάρωσης μπορούν να εξαχθούν δύο συμπεράσματα, ότι τα M14K και MCF7 συνεκφράζουν 2 μετάγραφα, και το ότι στις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές εκτός της NCI εκφράζονται άλλα άγνωστα εναλλακτικά μετάγραφα που έχουν τουλάχιστον διαφορετικό 5' UTR σε σχέση με το γνωστό μετάγραφο.

Η αλληλούχιση των δύο προϊόντων των σειρών M14K και MCF7 έδειξε ότι τα αντίστοιχα αγρίου τύπου και τα βραχεία εναλλακτικά μετάγραφα των δύο σειρών είναι τα ίδια αλλά και ότι στο βραχύ μετάγραφο λείπει ένα κομμάτι 83 ζευγών βάσεων από την περιοχή του πρώτου εξονίου 19 εκ των οποίων κωδικοποιούν για αμινοξέα, ενώ τα υπόλοιπα είναι μέρος του 5' UTR. Έτσι, είναι πιθανό ότι η μετάφραση του εναλλακτικού μεταγράφου ξεκινά από το εξόνιο 4 διατηρώντας το ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης χάνοντας έτσι 61 αμινοξέα από το αμινοτελικό άκρο συμπεριλαμβανομένων 2 καταλυτικών αμινοξέων (Asp28 και Glu30) όπως φαίνεται στις εικόνες 41 και 42. Αυτό μπορεί να σημαίνει πως το συγκεκριμένο εναλλακτικό μετάγραφο αποτελεί εξαίρεση στον κανόνα που ορίζει ότι η πλειοψηφία των εναλλακτικών μεταγράφων περιλαμβάνουν ήπιες αλλαγές σε εξωτερικές θέσεις της πρωτεΐνης [15,16] και έτσι θα μπορούσε η νέα πρωτεΐνη να έχει νέα δομή και δράση μιας και οι αλλαγές περιλαμβάνουν πολύ σημαντικές θέσεις όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία [20]. Παρόλα αυτά, απαιτείται σε βάθος μελέτη για να αποσαφηνισθούν αυτά τα ερωτήματα.

Σε συνθήκες στέρησης ορού υπολογίστηκε πως η έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου TS2 μειώνεται κατά περίπου δύο φορές, μιας και σε αυτές τις συνθήκες τετραπλασιάζεται η έκφραση του γνωστού μακρού μεταγράφου και διπλασιάζεται η έκφραση και των δύο (εικόνες 46, 47). Δεν εξετάστηκε

αν η αλλαγή αυτή είναι τελικού σημείου ή αν συνεχίσει η επώαση στις συγκεκριμένες συνθήκες stress η έκφραση του TS2 θα μηδενιστεί. Στην πρώτη περίπτωση, η πρωτεΐνη που παράγει το εναλλακτικό μετάγραφο θα χρειαζόταν σε αυτή τη συγκεκριμένη αναλογία, ενώ στη δεύτερη περίπτωση η έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου δεν θα ήταν ωφέλιμη για το κύτταρο στη συγκεκριμένη κατάσταση, οπότε το κύτταρο προσπαθεί να την εξαλείψει. Πιθανώς η έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου TS2 έχει χρησιμότητα σε κατάσταση ηρεμίας ενώ ο ρόλος της σε κατάσταση stress είναι άγνωστη. Σε αυτή την κατεύθυνση, έχειδειχθεί ότι η PARN απαντά σε διμερή και πιθανώς σε ολιγομερείς δομές, η συγκρότηση αυτών των δομών σχετίζεται με τη δραστηριότητά της [148]. Θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστεί αν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των δύο μεταγράφων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ετεροδιμερών αλλά και ομοδιμερών μεταξύ δύο πρωτεϊνών που προέρχονται από το εναλλακτικό μετάγραφο ίσως και η πιθανή αναλογία αυτών των δομών να έχουν διαφορετική ρυθμιστική δράση και να δημιουργούνται ως απόκριση σε συγκεκριμένες κυτταρικές συνθήκες. Σε κάθε περίπτωση, οι παραπάνω σκέψεις αφορούν σε ανοικτά ερωτήματα μελλοντικής έρευνας.

Εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης ενός microRNA, του miR-1207, για το οποίο προκαταρκτικές μελέτες του εργαστηρίου έδειξαν πως επηρεάζει αρνητικά τα επίπεδα της PARN. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης του miR-1207 μειώνονται κατά 30% σε κατάσταση έλλειψης ορού σε σχέση με τα επίπεδα του σε κύτταρα που επώαστηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες (εικόνα 49). Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με τις προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, οι οποίες είχαν δείξει ότι το miR-1207 στοχεύει το μετάγραφο της PARN ρυθμίζοντας αρνητικά τα επίπεδα της πρωτεΐνης και του γνωστού μεταγράφου της. Έτσι σε κατάσταση έλλειψης ορού η αύξηση της έκφρασης του γνωστού μεταγράφου ίσως να οφείλεται εν μέρει στη μείωση των επιπέδων του miR-1207.

Στο πείραμα ανοσοαποτύπωσης κατά Western (εικόνα 50) η ζώνη 76 kDa πιθανότατα αντιστοιχεί στην πυρηνική μορφή της γνωστής PARN μιας και η μοριακή μάζα της έχει υπολογιστεί σε 74kDa [138,140]. Το αποτέλεσμα ότι η ζώνη 76 kDa που αντιστοιχεί στο δείγμα που επώαστηκε σε 0.5%FBS είναι πολύ πιο έντονη σε σχέση με την αντίστοιχη ζώνη του δείγματος που επώαστηκε σε 10% FBS έρχεται σε συμφωνία με το αποτέλεσμα του πειράματος ελέγχου των επιπέδων έκφρασης των mRNA με RTq-PCR. Η ζώνη στην περιοχή των 69 kDa θα μπορούσε να αντιστοιχεί στο πρωτεϊνικό προϊόν του εναλλακτικού μεταγράφου με προβλεπόμενη μάζα 67 kDa. Δεν πρέπει όμως να αγνοηθούν και οι γνωστές κυτταροπλασματικές πρωτεολυμένες μορφές της PARN που πιθανόν να υπάρχουν (για παράδειγμα έχουν αναφερθεί οι 54 kDa μορφή σε κύτταρα HeLa [193], και 62 kDa σε Xenopus[139]). Επίσης η αμυδρή ζώνη που εμφανίζεται περίπου στα 55 kDa θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει μια πρωτεολυμένη μορφή της PARN προερχόμενη ίσως από την πρωτεολυτική πέψη του εναλλακτικού μεταγράφου Ts2. Παρατηρείται επίσης μία ζώνη που έχει μοριακή μάζα μεγαλύτερη από 120 kDa. Με δεδομένο πως η ηλεκτροφόρηση SDS PAGE γίνεται σε αποδιατακτικές συνθήκες, περιορίζεται η

πιθανότητα διμερισμού. Παρόλα αυτά, κατά την απομόνωση πρωτεϊνών η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε πρωτεΐνη ήταν εξαιρετικά υψηλή και είναι πιθανό να αποκαταστήθηκαν οι δισουλφιδικοί δεσμοί, να σχηματίστηκαν συσσωματώματα ή να παρουσίασαν εσφαλμένη αναδίπλωση που να επέμειναν παρόλο τις αποδιατακτικές συνθήκες, παρόμοια ευρήματα έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία [196].

Προοπτικές

Η παρούσα μελέτη αναδεικνύει πολλά ενδιαφέροντα ερωτήματα. Μια πρώτη μελέτη θα μπορούσε να αφορά στην αναζήτηση πιθανών εναλλακτικών 5' UTR· θα μπορούσε να γίνει ανάλυση 5' RACE σε συνδυασμό με κατάλληλους εκκινητές ώστε να ενισχυθούν οι διαφορές στα μεγέθη των πιθανών εναλλακτικών 5' περιοχών. Για να εξετασθεί εάν η αλλαγή στο προφίλ έκφρασης των μεταγράφων είναι τελικού σημείου ή αποτελεί μεταβατικό στάδιο της έκφρασης, θα μπορούσαν να τροποποιηθούν οι πειραματικές συνθήκες, ώστε να αναλυθούν τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων σε συνθήκες στρες και σε μεγαλύτερους χρόνους επώασης. Εξίσου σημαντικό είναι να αναζητηθεί το προϊόν του εναλλακτικού μεταγράφου και η διάκρισή του από άλλες πιθανές πρωτολυμένες μορφές. Σε αυτή την κατεύθυνση θα βοηθήσουν πειράματα διαχωρισμού πυρήνα – κυτταροπλάσματος σε κατάλληλες συνθήκες και με χρήση κατάλληλων αναστολέων πρωτεασών. Εάν ταυτοποιηθεί η ύπαρξη πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το εναλλακτικό μετάγραφο, είναι απαραίτητη η διερεύνηση της δραστηριότητας του· κλωνοποίησή του μεταγράφου σε κατάλληλο φορέα έκφρασης και ακολούθως μελέτες ενζυμικής δραστηριότητας θα συμβάλλουν στη προσέγγιση του ερωτήματος αυτού. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα έχει η αναζήτηση παραγόντων που προσδένονται στην περιοχή που διαφοροποιεί τα μετάγραφα. Για το σκοπό αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν εργαλεία βιοπληροφορικής για να αναζητήσουν miRNAs με πιθανότητα πρόσδεσης στην περιοχή αυτή, ή πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε συνδυασμό με εργαλεία πρωτεομικής.

5. Βιβλιογραφία

1. T Kozasa, H Itoh, T Tsukamoto, and Y Kaziro Isolation and characterization of the human Gs alpha gene 1988.
2. Wang, E. T. *et al.* Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 2008, 456, 470–476
3. Baek, D. *et al.* Characterization and predictive discovery of evolutionarily conserved mammalian alternative promoters. *Genome Res.* 2007, 17, 145–155
4. Sun, H. *et al.* MPromDb: an integrated resource for annotation and visualization of mammalian gene promoters and ChIP-chip experimental data. *Nucleic Acids Res.* 2006, 34, D98–D103
5. Takeda, J. *et al.* H-DBAS: alternative splicing database of completely sequenced and manually annotated full-length cDNAs based on H-Invitational. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35, D104–D109
6. Kimura, K. *et al.* Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res.* 2006, 16, 55–65
7. Cooper, S.J. *et al.* Comprehensive analysis of transcriptional promoter structure and function in 1% of the human genome. *Genome Res.* 2006, 16, 1–10
8. Calfon M¹, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D.
IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature.* 2002 Jan 3;415(6867):92-6.
9. Sharpless NE INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res.* 2005
10. Fabian, M. R., Sonenberg, N. & Filipowicz, W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 2010, 79, 351–379.
11. Andreassi, C. & Riccio, A. To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends. *Trends Cell Biol.* 2009, 19, 465–474
12. Pan, Q., Shai, O., Lee, L. J., Frey, B. J. & Blencowe, B. J. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature Genet.* 2008, 40, 1413–1415.
13. Wang, E. T. *et al.* Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 2008, 456, 470–476
14. Singh RK, Cooper TA. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *TrendsMol Med* 2012; 18:472–82.
15. Wang, P., Yan, B., Guo, J.T., Hicks, C., Xu, Y. Structural genomics analysis of 2175 alternative splicing and application to isoform structure modeling. *Proc. Natl. Acad. 2176 Sci. U. S. A.* 2005, 102, 18920–18925.

16. Romero, P.R., et al. Alternative splicing in concert with protein intrinsic disorder 1854 enables increased functional diversity in multicellular organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006, 103, 8390–8395.
17. Han, G.S., Carman, G.M. Characterization of the human LPIN1-encoded 1274 phosphatidate phosphatase isoforms. *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 14628–14638.
18. Andolfo, I., et al. Regulation of divalent metal transporter 1 (DMT1) non-IRE isoform by the microRNA Let-7d in erythroid cells. *Haematologica* 2010, 95, 1244–1252
19. Vernes, S.C., Fisher, S.E., Unravelling neurogenetic networks implicated in 2139 developmental language disorders. *Biochem. Soc. Trans.* 2009, 7, 1263–1269.
20. Ghosh, M., Loper, R., Gelb, M.H., Leslie, C.C., Identification of the expressed form of human cytosolic phospholipase A2beta (cPLA2beta): cPLA2beta3 is a novel variant localized to mitochondria and early endosomes. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 16615–16624.
21. Ast, G. How did alternative splicing evolve? *Nature Rev. Genet.* 2004, 5, 773–782
22. Schwartz, S. H. *et al.* Large-scale comparative analysis of splicing signals and their corresponding splicing factors in eukaryotes. *Genome Res.* 2008, 18, 88–103
23. Irimia, M., Rukov, J. L., Penny, D. & Roy, S. W. Functional and evolutionary analysis of alternatively spliced genes is consistent with an early eukaryotic origin of alternative splicing. *BMC Evol. Biol.* 2007, 7, 188
24. Fedorov, A., Merican, A. F. & Gilbert, W. Large-scale comparison of intron positions among animal, plant, and fungal genes. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2002
25. Roy, S. W. & Irimia, M. Splicing in the eukaryotic ancestor: form, function and dysfunction. *Trends Ecol.Evol.* 2009, 24, 447–455
26. Rogozin, I. B., Wolf, Y. I., Sorokin, A. V., Mirkin, B. G. & Koonin, E. V. Remarkable interkingdom conservation of intron positions and massive, lineage-specific intron loss and gain in eukaryotic evolution. *Curr. Biol.* 2003, 13, 1512–1517
27. Artamonova, I. I. & Gelfand, M. S. Comparative genomics and evolution of alternative splicing: the pessimists' science. *Chem. Rev.* 2007, 107, 3407–3430
28. Abhijit A. Patel¹ & Joan A. Steitz Splicing double: insights from the second spliceosome (December 2003)
29. Jurica MS1, Moore MJ. Capturing splicing complexes to study structure and mechanism. *Methods*, 2002 Nov;28(3):336-45.

30. Burge CB, Tuschl T, Sharp PA. Splicing of Precursors to mRNAs by the Spliceosomes. In *The RNAworld* Second edition (ed. R.F. Gesteland et al.), Cold Spring Harbor Laboratory Press 1999, pp. 525–560.
31. Moore MJ, Query CC, Sharp PA. 1993. Splicing of precursors to mRNA by the spliceosome. In *RNAWorld* (ed. R.F. Gesteland, J.F. Atkins), Cold Spring Harbor Laboratory Press 1993, pp. 303–357.
32. Fox-Walsh KL, Dou Y, Lam BJ, Hung SP, Baldi PF, Hertel KJ. The architecture of pre-mRNAs affects mechanisms of splice-site pairing. *Proc Natl Acad Sci* 2005, 102: 16176–16181.
33. Alekseyenko, A. V., Kim, N. & Lee, C. J. Global analysis of exon creation versus loss and the role of alternative splicing in 17 vertebrate genomes. *RNA* 2007, 13, 661–670
34. Kim, E., Goren, A. & Ast, G. Alternative splicing: current perspectives. *Bioessays* 2008, 30, 38–47
35. Hagen RM, Lodomery MR. Role of splice variants in the metastatic progression of prostate cancer. *Biochem Soc Trans* 2012;40:870–4.
36. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144:646–674.
37. Medema RH, de Vries-Smits AM, van der Zon GC, Maassen JA, Bos JL. Ras activation by insulin and epidermal growth factor through enhanced exchange of guanine nucleotides on p21ras. *Mol Cell Biol* 1993, 13:155–162
38. Cheng C, Yaffe MB, Sharp PA. A positive feedback loop couples Ras activation and CD44 alternative splicing. *Genes Dev* 2006, 20:1715–1720.
39. Tang Y, Horikawa I, Ajiro M, Robles AI, Fujita K, Mondal AM, Stauffer JK, Zheng ZM, Harris CC. Downregulation of splicing factor SRSF3 induces p53 β , an alternatively spliced isoform of p53 that promotes cellular senescence. *Oncogene* (Epub ahead of print; July 9, 2012).
40. Fujita K, Mondal AM, Horikawa I, Nguyen GH, Kumamoto K, Sohn JJ, Bowman ED, Mathe EA, Schetter AJ, Pine SR, et al. p53 isoforms δ 133p53 and p53 β are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nat Cell Biol* 2009, 11:1135–1142.
41. Jia R, Li C, McCoy JP, Deng CX, Zheng ZM. SRp20 is a proto-oncogene critical for cell proliferation and tumor induction and maintenance. *Int J Biol Sci* 2010, 6:806–826.
42. He X, Arslan AD, Pool MD, Ho TT, Darcy KM, Coon JS, Beck WT. Knockdown of splicing factor SRp20 causes apoptosis in ovarian cancer cells and its expression is associated with malignancy of epithelial ovarian cancer. *Oncogene* 2011, 30:356–365
43. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004, 432:307–315.

44. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007, 26:1324–1337.
45. Shultz JC, Chalfant CE. Caspase 9b: a new target for therapy in non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2011, 11:499–502.
46. Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 2005, 19:1–13.
47. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994, 263:1759–1762.
48. Cascino I, Fiucci G, Papoff G, Ruberti G. Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J Immunol* 1995, 154:2706–2713.
49. Izquierdo JM, Majos N, Bonnal S, Martinez C, Castelo R, Guigo R, Bilbao D, Valcarcel J. Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. *Mol Cell* 2005, 19:475–484
50. Lim KH, Ferraris L, Filloux ME, Raphael BJ, Fairbrother WG. Using positional distribution to identify splicing elements and predict pre-mRNA processing defects in human genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108:11093–11098.
51. Sterne-Weiler T, Howard J, Mort M, Cooper DN, Sanford JR. Loss of exon identity is a common mechanism of human inherited disease. *Genome research*. 2011; 21:1563–1571.
52. Roca X, Sachidanandam R, Krainer AR. Intrinsic differences between authentic and cryptic 5' splice sites. *Nucleic acids research*. 2003; 31:6321–6333.
53. Bennett CF, Swayze EE. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 2010
54. Peacey E, Rodriguez L, Liu Y, Wolfe MS. Targeting a pre-mRNA structure with bipartite antisense molecules modulates tau alternative splicing. *Nucleic acids research*. 2012; 40:9836–9849.
55. Zammarchi F, de Stanchina E, Bournazou E, Supakorndej T, Martires K, Riedel E, Corben AD, Bromberg JF, Cartegni L. Antitumorigenic potential of STAT3 alternative splicing modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011; 108:17779–17784.
56. Lefave CV, Squatrito M, Vorlova S, Rocco GL, Brennan CW, Holland EC, Pan YX, Cartegni L. Splicing factor hnRNPH drives an oncogenic splicing switch in gliomas. *The EMBO journal*, 2011; 30:4084–4097.

57. Wally V, Murauer EM, Bauer JW. Spliceosome-mediated trans-splicing: the therapeutic cut and paste. *The Journal of investigative dermatology*, 2012; 132:1959–1966.
58. Wang, Z. *et al.* Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers. *Cell* 2004, 119, 831–845
59. Zhang, X. H. & Chasin, L. A. Computational definition of sequence motifs governing constitutive exon splicing. *Genes Dev.* 2004, 18, 1241–1250
60. Jurica, M. S. & Moore, M. J. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol. Cell* 2003, 12, 5–14
61. Bessonov, S., Anokhina, M., Will, C. L., Urlaub, H. & Luhrmann, R. Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature* 2008, 452, 846–850
62. Hegele, A. *et al.* Dynamic protein–protein interaction wiring of the human spliceosome. *Mol. Cell* 2012, 45, 567–580
63. Busch, A. & Hertel, K. J. Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2012, 3, 1–12
64. Jelen, N., Ule, J., Zivin, M. & Darnell, R. B. Evolution of Nova-dependent splicing regulation in the brain. *PLoS Genet.* 2007, 3, 1838–1847
65. Lee, J. A., Tang, Z. Z. & Black, D. L. An inducible change in Fox-1/A2BP1 splicing modulates the alternative splicing of downstream neuronal target exons. *Genes Dev.* 2009, 23, 2284–2293
66. Graveley, B. R. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 6, 1197–1211 (2000)
67. Smith, C. W. & Valcarcel, J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* 2000, 25, 381–388
68. Ule, J. *et al.* An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation. *Nature* 2006, 444, 580–586
69. Sugnet, C. W., Kent, W. J., Ares, M. Jr & Haussler, D. Transcriptome and genome conservation of alternative splicing events in humans and mice. *Pac. Symp. Biocomput.* 2004, 66–77
70. Melton, A. A., Jackson, J., Wang, J. & Lynch, K. W. Combinatorial control of signal-induced exon repression by hnRNP L and PSF. *Mol. Cell. Biol.* 2007, 27, 6972–6984
71. Rothrock, C. R., House, A. E. & Lynch, K. W. hnRNP L represses exon splicing via a regulated exonic splicing silencer. *EMBO J.* 2005, 24, 2792–2802
72. Hui, J. *et al.* Intronic CA-repeat and CA-rich elements: a new class of regulators of mammalian alternative splicing. *EMBO J.* 2005, 24, 1988–1998
73. Hui, J., Stangl, K., Lane, W. S. & Bindereif, A. hnRNP L stimulates splicing of the *eNOS* gene by binding to variable-length CA repeats. *Nature Struct. Biol.* 2003, 10, 33–37

74. Havlioglu, N. *et al.* An intronic signal for alternative splicing in the human genome. *PLoS ONE* 2, e1246 2007
75. Buratti, E., Stuani, C., De Prato, G. & Baralle, F. E. SR protein-mediated inhibition of *CFTR* exon 9 inclusion: molecular characterization of the intronic splicing silencer. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35, 4359–4368
76. Jiang, Z. H., Zhang, W. J., Rao, Y. & Wu, J. Y. Regulation of *Ich-1* pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1998, 95, 9155–9160
77. Licatalosi, D. D. *et al.* HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing. *Nature* 2008, 456, 464–469
78. Han, H. *et al.* MBNL proteins repress ES-cell-specific alternative splicing and reprogramming. *Nature* 2013, 498, 241–245
79. Han, J. *et al.* SR proteins induce alternative exon skipping through their activities on the flanking constitutive exons. *Mol. Cell. Biol.* 2011, 31, 793–802
80. Chen, M. & Manley, J. L. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2009, 10, 741–754
81. Zhu, J. & Krainer, A. R. Pre-mRNA splicing in the absence of an SR protein RS domain. *Genes Dev.* 2000, 14, 3166–3178
82. Ohno, G. *et al.* Muscle-specific splicing factors ASD-2 and SUP-12 cooperatively switch alternative pre-mRNA processing patterns of the *ADF/cofilin* gene in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 2012, 8, e1002991
83. Crawford, J. B. & Patton, J. G. Activation of α -tropomyosin exon 2 is regulated by the SR protein 9G8 and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins H and F. *Mol. Cell. Biol.* 2006, 26, 8791–802
84. Pandit, S. *et al.* Genome-wide analysis reveals SR protein cooperation and competition in regulated splicing. *Mol. Cell* 2013, 50, 223–235
85. Zarnack, K. *et al.* Direct competition between hnRNP C and U2AF65 protects the transcriptome from the exonization of Alu elements. *Cell* 2013, 152, 453–466
86. Modafferi, E. F. & Black, D. L. Combinatorial control of a neuron-specific exon. *RNA* 1999, 5, 687–706

87. Piñol-Roma S1, Dreyfuss G. (1992) Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm.
88. Weg-Remers S1, Ponta H, Herrlich P, König H. (2001) Regulation of alternative pre-mRNA splicing by the ERK MAP-kinase pathway.
89. Stoss O1, Olbrich M, Hartmann AM, König H, Memmott J, Andreadis A, Stamm S. (2000) The STAR/GSG family protein rSLM-2 regulates the selection of alternative splice sites.
90. Xiao SH1, Manley JL (1998) Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2.
91. Ngo JC1, Chakrabarti S, Ding JH, Velazquez-Dones A, Nolen B, Aubol BE, Adams JA, Fu XD, Ghosh G. (2005) Interplay between SRPK and Clk/Sty kinases in phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 is regulated by a docking motif in ASF/SF2.
92. Rossi F1, Labourier E, Forné T, Divita G, Derancourt J, Riou JF, Antoine E, Cathala G, Brunel C, Tazi J (1996) Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I
93. Jiang K1, Patel NA, Watson JE, Apostolatos H, Kleiman E, Hanson O, Hagiwara M, Cooper DR (2009). Akt2 regulation of Cdc2-like kinases (Clk/Sty), serine/arginine-rich (SR) protein phosphorylation, and insulin-induced alternative splicing of PKCbetaII messenger ribonucleic acid
94. Krecic AM1, Swanson MS (1999). hnRNP complexes: composition, structure, and function.
95. SVassileva MT1, Matunis MJ (2004). UMO modification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins.
96. Kim SC1, Sprung R, Chen Y, Xu Y, Ball H, Pei J, Cheng T, Kho Y, Xiao H, Xiao L, Grishin NV, White M, Yang XJ, Zhao Y (2006). Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey.
97. Bedford MT1, Richard S (2005) Arginine methylation an emerging regulator of protein function.
98. SBlaustein M1, Pelisch F, Srebrow A (2007) Signals, pathways and splicing regulation.
99. Scherrer K1. Regulation of gene expression and the transcription factor cycle hypothesis.
100. Ameer A, Zaghlool A, Halvardson J, Wetterbom A, Gyllensten U, Cavelier L, Feuk L. Total RNA sequencing reveals nascent transcription and widespread co-transcriptional splicing in the human brain. *Nat Struct Mol Biol.* 2011; 18:1435–1440.
101. Bhatt DM, Pandya-Jones A, Tong AJ, Barozzi I, Lissner MM, Natoli G, Black DL, Smale ST. Transcript dynamics of proinflammatory genes revealed by sequence analysis of subcellular RNA fractions. *Cell* 2012; 150:279–290.

102. Khodor YL, Menet JS, Tolan M, Rosbash M. Cotranscriptional splicing efficiency differs dramatically between *Drosophila* and mouse. *RNA* 2012; 18:2174–2186.
103. Khodor YL, Rodriguez J, Abruzzi KC, Tang CHA, Marr MT 2nd, Rosbash M. Nascent-seq indicates widespread cotranscriptional pre-mRNA splicing in *Drosophila*. *Genes Dev.* 2011; 25:2502–2512.
104. Tilgner H, Knowles DG, Johnson R, Davis CA, Chakraborty S, Djebali S, Curado J, Snyder M, Gingeras TR, Guigo R. Deep sequencing of subcellular RNA fractions shows splicing to be predominantly co-transcriptional in the human genome but inefficient for lncRNAs. *Genome Research.* 2012; 22:1616–1625.
105. David CJ, Manley JL. The RNA polymerase C-terminal domain: a new role in spliceosome assembly. *Transcription.* 2011; 2:221–225.
106. Hsin JP, Manley JL. The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev.* 2012; 26:2119–2137.
107. Tolstorukov MY, Goldman Ja, Gilbert C, Ogryzko V, Kingston RE, Park PJ. Histone variant H2A.Bbd is associated with active transcription and mRNA processing in human cells. *Mol Cell.* 2012; 47:596–607.
108. Pradeepa MM, Sutherland HG, Ule J, Grimes GR, Bickmore WA. Psip1/Ledgf p52 binds methylated histone H3K36 and splicing factors and contributes to the regulation of alternative splicing. *PLoS Genet.* 2012; 8:e1002717.
110. Luco RF, Allo M, Schor IE, Kornbliht AR, Misteli T. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* 2011; 144:16–26.
111. Huang Y, Li W, Yao X, Lin QJ, Yin JW, Liang Y, Heiner M, Tian B, Hui J, Wang G. Mediator complex regulates alternative mRNA processing via the MED23 subunit. *Mol Cell.* 2012; 45:459–469.
112. G. Pesole, F. Mignone, C. Gissi, G. Grillo, F. Licciulli, and S. Liuni, “Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions,” *Gene*, vol. 276, no. 1-2, pp. 73–81, 2001.
113. Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 2009, 136:731–745.
114. Gu M, Lima CD. Processing the message: structural insights into capping and decapping mRNA. *Curr Opin Struct Biol* 2005, 15:99–106.
115. Lewis JD, Izaurralde E. The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. *Eur J Biochem* 1997, 247:461–469.
116. R. V. Davuluri, Y. Suzuki, S. Sugano, and M. Q. Zhang, “CART classification of human 5' UTR sequences,” *Genome Research*, vol. 10, no. 11, pp. 1807–1816, 2000.

117. J. R. Babendure, J. L. Babendure, J. H. Ding, and R. Y. Tsien, “Control of mammalian translation by mRNA structure near caps,” *RNA*, vol. 12, no. 5, pp. 851–861, 2006.
118. B. M. Pickering and A. E. Willis, “The implications of structured 5′ untranslated regions on translation and disease,” *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 16, no. 1, pp. 39–47, 2005.
119. D. J. Fraser, A. O. Phillips, X. Zhang et al., “Y-box protein-1 controls transforming growth factor- β 1 translation in proximal tubular cells,” *Kidney International*, vol. 73, no. 6, pp. 724–732, 2008.
120. I. Abaza and F. Gebauer, “Functional domains of Drosophila UNR in translational control,” *RNA*, vol. 14, no. 3, pp. 482–490, 2008.
121. D. L. Zhang, R. M. Hughes, H. Ollivierre-Wilson, M. C. Ghosh, and T. A. Rouault, “A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression,” *Cell Metabolism*, vol. 9, no. 5, pp. 461–473, 2009.
122. C. Vogel, R. de Sousa Abreu, D. J. Ko et al., “Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line,” *Molecular Systems Biology*, vol. 6, article 400, 2010.
123. Kozak, M. An analysis of 5′-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.*, 1987, 15(20), 8125-8148.
124. Hinnebusch, A. G. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2005, 59, 407-450.
125. M. Oyama, C. Itagaki, H. Hata et al., “Analysis of small human proteins reveals the translation of upstream open reading frames of mRNAs,” *Genome Research*, vol. 14, no. 10, pp. 2048–2052, 2004
126. Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 1988; 334:320–325.
127. Jang SK, Wimmer E. Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein. *Genes Dev.* 1990; 9:1560–1572.
128. Spriggs KA, Bushell M, Mitchell SA, Willis AE. Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-trans-acting factors. *Cell Death Differ.* 2005; 12:585–591.
129. Lukavsky PJ. Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res.* 2009; 139:166–171.
130. Lewis SM, Holcik M. For IRES trans-acting factors, it is all about location. *Oncogene.* 2008; 27:1033–1035.
131. Komar AA, Hatzoglou M. Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle.* 2011; 10:229–240.

132. Zhang, T. et al. (2004) Multiple variable first exons: a mechanism for cell- and tissue-specific gene regulation. *Genome Res.* 14, 79–89
133. Trinklein, N.D. et al. (2003) Identification and functional analysis of human transcriptional promoters. *Genome Res.* 13, 308–312
134. Nagasaki, H. et al. Species-specific variation of alternative splicing and transcriptional initiation in six eukaryotes. *Gene* (in press)
135. K. Sobczak and W. J. Krzyzosiak, “Structural determinants of BRCA1 translational regulation,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 19, pp. 17349–17358, 2002.
136. Wu M, Reuter M, Lilie H, et al. Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *Embo J* 2005, 24:4082–93.
137. Dehlin E, Wormington M, Körner CG, Wahle E. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *Embo J* 2000, 19:1079–86
138. Körner CG¹, Wahle E (1997) Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease.
139. Copeland PR1, Wormington M. *RNA* (2001) The mechanism and regulation of deadenylation: identification and characterization of *Xenopus* PARN.
140. Dehlin E1, Wormington M, Körner CG, Wahle E. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.* 2000 Mar 1;19(5):1079-86.
141. Zuo Y1, Deutscher MP. Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res.* 2001, Mar 1;29(5):1017-26.
142. Beese LS1, Steitz TA. Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *EMBO J.* 1991, Jan;10(1):25-33.
143. Nilsson P, Henriksson N, Niedzwiecka A, et al. A multifunctional RNA recognition motif in poly(A)-specific ribonuclease with cap and poly(A) binding properties. *J Biol Chem* 2007, 282:32902–11.
144. Zhang A, Liu WF, Yan YB. Role of the RRM domain in the activity, structure and stability of poly(A)-specific ribonuclease. *Arch Biochem Biophys* 2007, 461:255–62.
145. Reinhardt HC, Hsaskamp P, Schmedding I, et al. DNA damage activates a spatially distinct late cytoplasmic cell-cycle checkpoint network controlled by MK2-mediated RNA stabilization. *Mol Cell* 1010, 40:34–49

146. Zhu, S., H. Wu, F. Wu, D. Nie, S. Sheng and Y.Y. Mo. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res.* 2008, 18: 350-359
147. Maragozidis P, Karangeli M, Labrou M, et al. Alterations of deadenylase expression in acute leukemias: evidence for poly(a)-specific ribonuclease as a potential biomarker. *Acta Haematol* 2012, 128:39–46.
148. Balatsos NA, Maragozidis P, Anastasakis D, Stathopoulos C. Modulation of poly(A)-specific ribonuclease (PARN): current knowledge and perspectives. *Curr Med Chem* 2012, 19:4838–49.
149. Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, et al. Towards a knowledgebased human protein atlas. *Nat Biotechnol* 2010, 28:1248–50
150. Yamashita A, Chang TC, Yamashita Y, Zhu W, Zhong Z, Chen CY, Shyu AB Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 2005, 12, 1054–1063.
151. Berndt H, Harnisch C, Rammelt C, et al. Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA* 2012, 18:958–72
152. Matera, AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8:209–20
153. Schoenberg DR, Maquat LE. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* 2012, 13:246–59
154. Honglei Zhou and Isidore Rigoutsos. MiR-103a-3p targets the 5' UTR of GPRC5A in pancreatic cells. Computational Medicine Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107
155. Martin Reczko^{1,2}, Manolis Maragkakis^{1,3}, Panagiotis Alexiou^{1,4}, Ivo Grosse³ and Artemis G. Hatzigeorgiou Functional microRNA targets in protein coding sequences ^{1,5} 2012
156. Blencowe J, Gravely .R 2007 Alternative splicing in the post genomic era.
157. Will CL, Lu¨hrmann R. Spliceosome structure and function. In *The RNA world*, 3rd ed. (ed. R.F. Gesteland et al.), *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.* 2006, pp. 369–400.
158. Berget SM. Exon recognition in vertebrate splicing. *Mol Cell Biol* 1995, 270: 2411–2414.
159. Reed R. Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol* 2000,12: 340–345
160. Krull, M., Brosius, J. & Schmitz, J. *Alu*-SINE exonization: *en route* to protein-coding function. *Mol. Biol. Evol.* 2005, 22, 1702–1711
161. Singer, S. S., Mannel, D. N., Hehlhans, T., Brosius, J. & Schmitz, J. From 'junk' to gene: curriculum vitae of a primate receptor isoform gene. *J. Mol. Biol.* 2004, 341, 883–886
162. Parma, J., Christophe, D., Pohl, V. & Vassart, G. Structural organization of the 5' region of the thyroglobulin gene. Evidence for intron loss and 'exonization' during evolution. *J. Mol. Biol.* 196, 769–779 (1987).

163. Kondrashov, F. A. & Koonin, E. V. (2001) Origin of alternative splicing by tandem exon duplication. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2661–2669.
164. Hadas Keren, Galit Lev-Maor and Gil Ast (2010) Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function
165. Ast, G. (2004) How did alternative splicing evolve? *Nature Rev. Genet.* 5, 773–782
166. Koren, E., Lev-Maor, G. & Ast, G. (2007) The emergence of alternative 3' and 5' splice site exons from constitutive exons. *PLoS Comput. Biol.* 3, e95
167. Lev-Maor, G. *et al.* (2007) The 'alternative' choice of constitutive exons throughout evolution. *PLoS Genet.* 3, e203
168. Lev-Maor, G. *et al.* (2008) Intronic *Alus* influence alternative splicing. *PLoS Genet.* 4, e1000204
169. Alberto R. Kornblihtt, Ignacio E. Schor, Mariano Alló, Gwendal Dujardin, Ezequiel Petrillo and Manuel J. Muñoz (2013) Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation
170. A. Gregory Matera and Zefeng Wang (2014) A day in the life of the spliceosome
171. Xiang-Dong Fu1 and Manuel Ares Jr2 (2014) Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins
172. Ulrich Braunschweig1, Serge Gueroussov, Alex Plocik, Brenton R. Graveley, and Benjamin J. Blencowe (2013) Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways
173. Mallory A. Havens, Dominik M. Duelli, and Michelle L. Hastings (2013) Targeting RNA Splicing for Disease Therapy
174. Hanahan D1, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000
175. Cheng C, Yaffe MB, Sharp PA. A positive feedback loop couples Ras activation and CD44 alternative splicing. *Genes Dev* 2006, 20:1715–1720.
176. Weg-Remers S, Ponta H, Herrlich P, König H. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by the ERK MAP-kinase pathway. *EMBO J* 2001, 20:4194–4203.
177. Arslan AD, He X, Wang M, Rumschlag-Booms E, Rong L, Beck WT. A High-Throughput Assay to Identify Small-Molecule Modulators of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Journal of biomolecular screening*, 2012
178. Stoilov P, Lin CH, Damoiseaux R, Nikolic J, Black DL. A high-throughput screening strategy identifies cardiotonic steroids as alternative splicing modulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008; 105:11218–11223.

179. Warf MB, Nakamori M, Matthys CM, Thornton CA, Berglund JA. Pentamidine reverses the splicing defects associated with myotonic dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106:18551–18556.
180. Schmid F, Hiller T, Korner G, Glaus E, Berger W, Neidhardt J. A gene therapeutic approach to correct splice defects with modified U1 and U6 snRNPs. *Human gene therapy*, 2012
181. D. J. Goss and E. C. Theil, “Iron responsive mRNAs: a family of Fe²⁺ sensitive riboregulators,” *Accounts of Chemical Research*, vol. 44, no. 12, pp. 1320–1328, 2011
182. Patricia R. Araujo, Kihoon Yoon, Daijin Ko, Andrew D. Smith, Mei Qiao, Uthra Suresh, Suzanne C. Burns, and Luiz O. F. Penalva *Before It Gets Started: Regulating Translation at the 5 UTR* 2012
183. Yang, W., T.P. Chendrimada, Q. Wang, M. Higuchi, P.H. Seeburg, R. Shiekhattar and K. Nishikura. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006, 13: 13-21.
184. Pillai, R.S., S.N. Bhattacharyya, C.G. Artus, T. Zoller, N. Cougot, E. Basyuk, E. Bertrand and W. Filipowicz. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 2005, 309: 1573-1576.
185. Tomari, Y. and P.D. Zamore. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 2005, 19: 517-529.
186. Yang, J.S. and E.C. Lai. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol. Cell* 2011, 43: 892-903
187. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005, 309:1577–1581
188. Jopling CL, Schutz S, Sarnow P. Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe* 2008, 4:77–85
189. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007, 318:1931–1934
190. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle* 2008, 7:1545–1549
191. Orom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 2008, 30:460–471
192. Tsai NP, Lin YL, Wei LN. MicroRNA mir-346 targets the 5' UTR-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression. *Biochem J* 2009, 424:411–418
193. Virtanen Anders, Niklas Henriksson, Per Nilsson, and Mikael Nissbeck Poly(A)-specific ribonuclease (PARN): An allosterically regulated, processive and mRNA cap-interacting deadenylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013; 48(2): 192–209

194. Yuan, Y.R., Y. Pei, J.B. Ma, V. Kuryavyi, M. Zhadina, G. Meister, H.Y. Chen, Z. Dauter, T. Tuschl and D.J. Patel. Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol. Cell* 2005, 19: 405-419.
195. AI Wakamatsu et al. (2009) Identification and Functional Analyses of 11 769 Full-length Human cDNAs Focused on Alternative Splicing.
- 196 Karch CM and Borchelt DR “A Limited Role for Disulfide Cross-linking in the Aggregation of Mutant SOD1 Linked to Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis” *J Biol Chem.* 2008 May 16; 283(20): 13528–13537