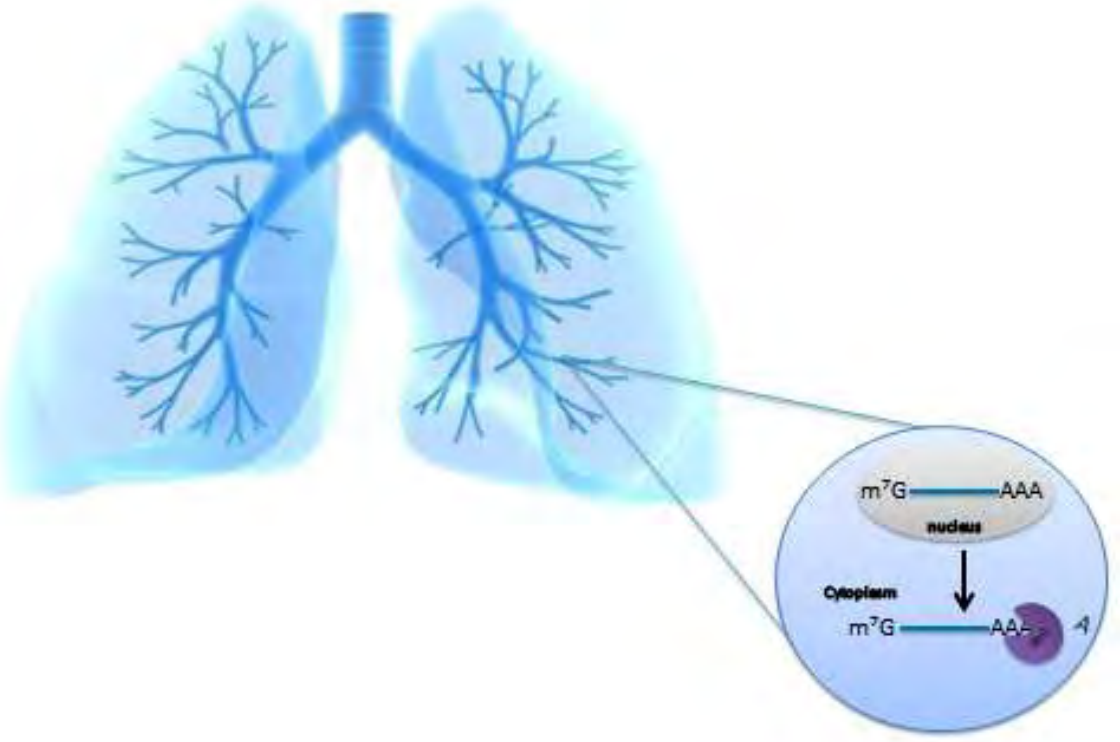
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΗ ΕΙΡΗΝΗ

ΕΝΖΥΜΑ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ RNA ΩΣ ΝΕΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ



ΛΑΡΙΣΑ 2012

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

ΕΝΖΥΜΑ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ RNA ΩΣ ΝΕΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

- Μπαλατσός Νικόλαος, Λέκτορας Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Υπεύθυνος διπλωματικής εργασίας).
- Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μπαλατσό Νικόλαο για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την παρούσα εργασία καθώς επίσης και για τις γνώσεις και τις εμπειρίες που μου μετέδωσε και το χρόνο που διέθεσε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Λεωνίδα Δημήτριο και την κ. Ζιφα Αιμιλία που αποτελούν μέλη της τριμελής επιτροπής για τη συμβολή τους στη διεξαγωγή της διπλωματικής.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Καθηγητή Κωνσταντίνο Ι. Γουργουλιάνη και τη Δρ. Θεοδώρα Κερενίδη από την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για την παραχώρηση των δειγμάτων από καρκίνο του πνεύμονα και την στήριξή τους σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα Π. Μαραγκοζίδη για τη αμέριστη βοήθεια του, τη σημαντική συμβολή του στη διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς και για την άψογη συνεργασία μας.

Τέλος ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 6

ABSTRACT 7

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Καρκίνος του πνεύμονα

1.1Εισαγωγή 8

1.2 Ταξινόμηση του καρκίνου του πνεύμονα 8

1.3 Σταδιοποίηση 12

1.4 Αιτιοπαθογένεια 13

1.5 Μοριακή βιολογία του καρκίνου του πνεύμονα 14

1.6 Διάγνωση, πρόγνωση του καρκίνου του πνεύμονα 16

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

RNA

2.1 Εισαγωγή 18

2.2 Ωρίμανση mRNA 18

2.3 Αποικοδόμηση mRNA 20

2.4 Αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNA 23

2.5 Παράγοντες που ρυθμίζουν την αποικοδόμηση του mRNA 26

2.6 Αποαδενυλάσες 27

2.7 Σύμπλοκα αποαδενυλασών 29

2.8 Βιολογικές λειτουργίες 32

2.9 Ρύθμιση αποαδενυλίωσης mRNA 33

2.10 Ριβονουκλεάσες και καρκίνος 35

Σκοπός 38

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Υλικά

3.1.1 Χημικά 39

3.1.2 Kit 40

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

3.1.3 Διαλύματα 40

3.1.4 Θρεπτικά μέσα 40

3.1.5 Βακτηριακά στελέχη 41

3.1.6 Πλασμιδιακοί φορείς 41

3.1.7 Κυτταρική σειρά 41

3.1.8 Δείγματα 41

3.1.9 Short-Hairpin RNAs (shRNAs) 42

3.1.10 Εκκινητές 44

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Ηλεκτροδιάτρηση δεκτικών κυττάρων DH5a (E.coli) με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 (puro-amp) 47

3.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation) 48

3.2.3 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με X-fect 49

3.2.4 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών 50

3.2.5 Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου δύο βημάτων (RT-qPCR) 52

3.2.6 cDNA Μικροσυστοιχίες (Microarrays) 55

4. Αποτελέσματα

4.1 Επίπεδα έκφρασης mRNA αποαδενυλασών σε ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα με quantitive Real Time PCR (qRT-PCR) 57

4.2 Επίπεδα έκφρασης mRNA αποαδενυλασών σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα με quantitive Real Time PCR (qRT-PCR) 58

4.3 cDNA Μικροσυστοιχίες 59

5.Συζήτηση 64

Συμπεράσματα 68

Βιβλιογραφία 69

Παράρτημα 78

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs παρέχει στα ευκαρυωτικά κύτταρα ένα μηχανισμό ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης. Μέσω αυτής ρυθμίζεται η σταθερή και ακριβής μετάφραση και αποικοδόμησή τους, και κατ' επέκταση η ποιότητα και η ποσότητα των πρωτεϊνών που συνθέτονται. Στις νεοπλασίες, η απορρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη παραγωγή ογκογόνων και/ή μειωμένη παραγωγή ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών. Έτσι, η μελέτη των παραγόντων που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των mRNAs είναι σημαντική για την κατανόησή του ρόλου τους στον καρκίνο. Το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs είναι η βράχυνση των πολυ(Α) ουρών τους από μια οικογένεια ενζύμων, τις αποαδενυλάσες. Τουλάχιστον εννέα αποδενυλάσες έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο. Στην παρούσα εργασία ερευνάται η διαφοροποίηση της έκφρασης των αποαδενυλασών σε καρκινικούς ιστούς πνεύμονα, σε σχέση με παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Για να κατανοήσουμε το ρόλο των αποαδενλασών στον καρκίνο του πνεύμονα σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης αποσιωπήθηκε η έκφραση των αποαδενυλασών CNOT6, CNOT6L και CNOT7 σε κύτταρα προέλευσης καρκίνου του πνεύμονα (squamous cell carcinoma) και αναλύθηκε η επίδραση της διεργασίας στην έκφραση του συνόλου του γονιδιώματος. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως η έκφραση των αποαδενυλασών αλλάζει στον καρκίνο του πνεύμονα. Ενώ μέσω των πειραμάτων DNA μικροσυστοιχιών, προσδιορίστηκαν μεταβολές στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης, αποκαλύπτοντας νέες σχέσεις μεταξύ κυτταρικών μονοπατιών. Οι παρατηρήσεις μας, σε συνδυασμό με την τεκμηριωμένη αλλαγή έκφρασης ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών παραγόντων, θα μπορούσαν να δώσουν νέα προοπτική στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών του καρκίνου μέσω των μηχανισμών αποικοδόμησης των mRNAs, αναδεικνύοντας τους παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτούς ως υποσχόμενο στόχο θεραπείας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

ABSTRACT

The regulation of mRNAs stability in eukaryotic cells provides a mechanism for control of gene expression. Through this, stable and accurate translation and degradation of mRNAs is regulated, reflected to the quality and quantity of the newly synthesized proteins. In cancer, deregulation of mRNAs stability can lead to increased production of oncogene products and/or decrease of tumor suppressor protein levels. Thus, the study of factors involved in mRNA degradation is important for understanding their role in cancer. The first and rate-limiting step of mRNA degradation is the shortening of their poly(A) tail catalyzed by deadenylases. At least 9 deadenylases have been recognized in humans, yet it is not clear the advantage to have so many poly(A)-degrading enzymes. We study the expression of deadenylases in lung cancer tissues, compared to adjacent normal tissues. To understand their diversity in lung cancer we silence the expression of CNOT6, CNOT6L and CNOT7 in human NCI-H520 cells and study the impact on gene expression using microarrays. The analysis showed that the expression of deadenylases alters significantly in lung cancer compared to controls. Moreover, gene expression analysis via DNA microarrays experiments, revealed new relations between cellular pathways. Our observations, combined with the documented changes in expression of oncogenes or tumor suppressors could provide new perspective on our understanding of the molecular mechanisms in cancer through the mechanisms of mRNA degradation, revealing the factors involved as promising candidated targets for therapy.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Καρκίνος του πνεύμονα

1.1 Εισαγωγή

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ο πιο κοινός και θανατηφόρος καρκίνος παγκοσμίως. Αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου καρκίνου στους άνδρες και την τρίτη στις γυναίκες (μετά τον καρκίνο του μαστού και τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας). Κάθε χρόνο διαγιγνώσκονται περισσότερα από 1,2 εκατομμύρια νέα περιστατικά καρκίνου του πνεύμονα (Stewart και Kleihues, 2003). Τα άτομα που προσβάλλονται έχουν δυσμενή πρόγνωση και μόνο το 14% έχει προσδόκιμο επιβίωσης πέντε χρόνια στις Η.Π.Α., ενώ το ποσοστό στην Ευρώπη κυμαίνεται στο 10% και στις αναπτυσσόμενες χώρες ανέρχεται στο 8,9% (Parkin *και συν.,* 2005). Στην Ελλάδα ο καρκίνος του πνεύμονα είναι υπεύθυνος για το 30% των θανάτων από κακοήθη νεοπλάσματα στους άνδρες αλλά μόνο για το 10% στις γυναίκες. Η θνησιμότητα από καρκίνο του πνεύμονα παρουσιάζει συνεχή αυξητική πορεία, ανάλογη με την πορεία της θνησιμότητας από άλλα κακοήθη νεοπλάσματα και δεν εμφανίζει την πτωτική τάση που παρουσιάζεται στον ανδρικό πληθυσμό σε άλλες χώρες (World.Health Organization).

1.2 Ταξινόμηση του καρκίνου του πνεύμονα

Σύμφωνα με την ιστοπαθολογική ταξινόμηση (WHO, 1997), ο καρκίνος του πνεύμονα ταξινομείται βάσει των βιολογικών και κλινικών του χαρακτηριστικών σε δύο τύπους.

Οι δύο αυτοί τύποι είναι ο μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα (Small Cell Lung Cancer, SCLC), και ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα (Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC). Ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις όπου ο καρκίνος του πνεύμονα εμφανίζει χαρακτηριστικά τόσο του SCLC όσο και του NSCLC, και ονομάζεται

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

«Συνδυασμένος μικροκυτταρικός/μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα». (Sekido *και συν.*, 1998).

1. **<u>Μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (NSCLC) 70-75%</u>**

   Καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο (επιδερμοειδές) 25-30%

   Αδενοκαρκίνωμα (30-35%)

   Καρκίνωμα από μεγάλα κύτταρα (10-15%)

2. **<u>Μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (SCLC) 20-25%</u>**

3. **<u>Συνδυασμένοι τύποι (5-10%)</u>**

   Συνηθέστερα

   Μικτό καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο και αδενοκαρκίνωμα

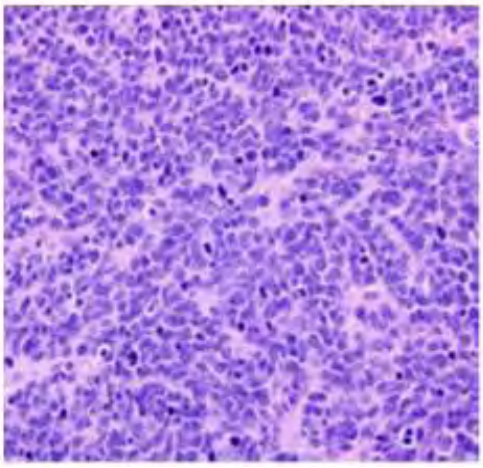
   Μικτό καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο και SCLC

Πίνακας 1: Ιστολογικής ταξινόμησης και επίπτωσης κατά προσέγγιση (Robbins *και συν.*, 2002).

- *Μικροκυταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC)*

Ο ΜΚΠ αποτελεί περίπου 20%-25% όλων των περιπτώσεων του καρκίνου του πνεύμονα. Ο ΜΚΠ είναι η πιο επιθετική μορφή καρκίνου του πνεύμονα. Τα μικροκυτταρικά καρκινώματα εμφανίζονται γενικά ως ωχρές, φαιές μάζες με κεντρική εντόπιση, οι οποίες επεκτείνονται στο πνευμονικό παρέγχυμα και προσβάλλουν πρώιμα τους πυλαίους και τους μεσωθωρακικούς λεμφαδένες. Παρότι τα καρκινικά κύτταρα είναι μικρά, διπλασιάζονται γρήγορα, αναπτύσσονται επίσης πολύ γρήγορα και δημιουργούν μεγάλους όγκους. Οι όγκοι αυτοί συνήθως εξαπλώνονται γρήγορα σε άλλα όργανα του σώματος, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου, του ήπατος καθώς επίσης και στα οστά. Τα καρκινώματα αυτά αποτελούνται από κύτταρα με στρογγυλό έως και ατρακτοειδές σχήμα, ελάχιστο κυτταρόπλασμα και λεπτοκοκκώδη χρωματίνη. Κύρια αιτία της εμφάνισης του μικροκυτταρικού καρκίνου είναι το κάπνισμα (Elias, 1997˙ Robbins *και συν.*, 2002).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94



Εικόνα 1.1: Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Travis, 2011).

- *Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC)*

Ο ΜΜΚΠ είναι η πιο συνηθισμένη μορφή καρκίνου του πνεύμονα και ευθύνεται για περίπου 80% του συνόλου των περιστατικών. Από αυτούς ήδη το 80% παρουσιάζει διάσπαρτη ή τοπικά προχωρημένη νόσο (Park και Altorki, 2002). Ο τύπος αυτός περιλαμβάνει τρεις ιστολογικούς τύπους, τον πλακώδη, το αδενοκαρκίνωμα και τον μεγαλοκυτταρικό.

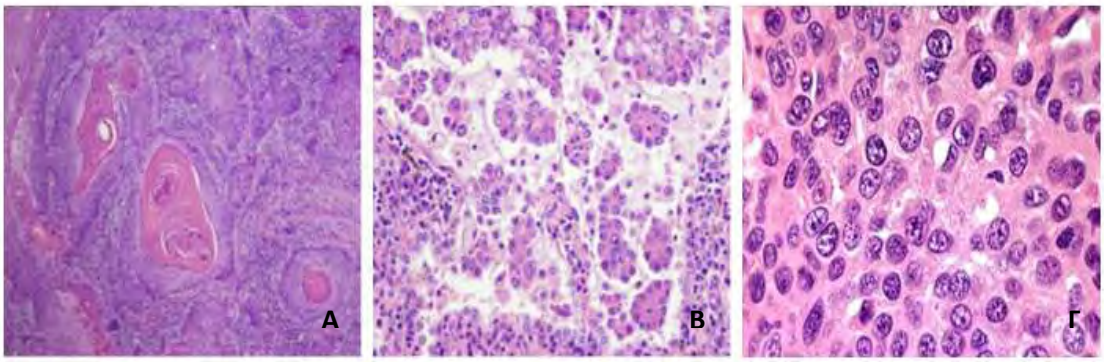
Καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο ή επιδερμοειδής καρκίνος (squamous cell carcinoma): είναι ο συχνότερος βρογχογενής καρκίνος και αποτελεί το 30% όλων των περιπτώσεων του καρκίνου του πνεύμονα Τα καρκινώματα από πλακώδες επιθήλιο είναι συχνότερα στους άντρες από ότι στις γυναίκες. Εμφανίζουν την τάση να αναπτύσσονται κεντρικά, στους κύριους βρόγχους και να διασπείρονται στους επιχώριους πηλαίους, λεμφαδένες ενώ εξωθωρακική γενικευμένη διασπορά συμβαίνει αργότερα συγκριτικά με τους άλλους ιστολογικούς τύπους. Ιστολογικά οι όγκοι αυτοί κυμαίνονται από καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα από πλακώδες επιθήλιο που εμφανίζουν πέρλες κερατίνης και μεσοκυττάριες γέφυρες μέχρι πτωχά διαφοροποιημένα καρκινώματα με ελάχιστα υπολειμματικά χαρακτηριστικά πλακώδων κυττάρων.

Αδενοκαρκίνωμα: είναι η πιο διαδεδομένη μορφή καρκίνου του πνεύμονα καθώς ευθύνεται για το 40% όλων των περιπτώσεων. Τα αδενοκαρκινώματα μπορούν να εμφανιστούν ως κεντρικές βλάβες όπως ο ιστολογικός τύπος από πλακώδη κύτταρα, αλλά συνήθως εντοπίζονται περιφερικότερα. Οι όγκοι αυτοί αναπτύσσονται αργά και σχηματίζουν μικρότερες μάζες συγκριτικά με τους άλλους ιστολογικούς τύπους

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

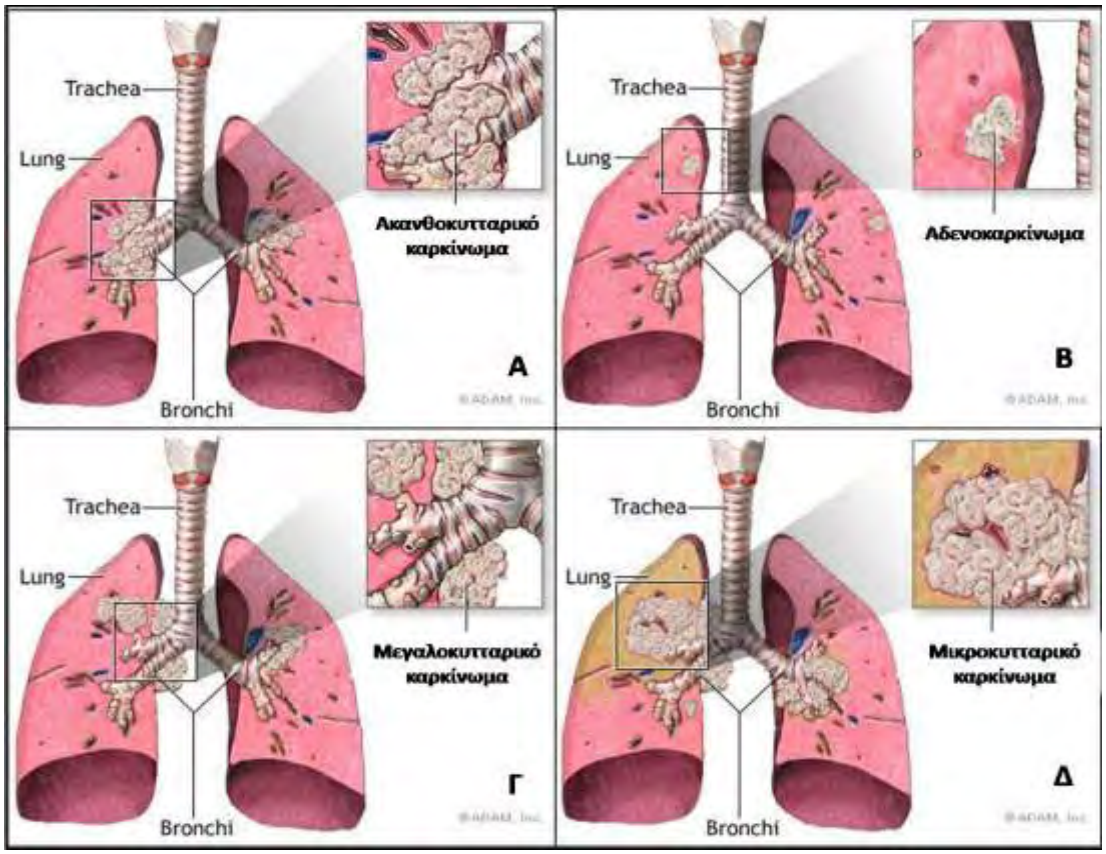
αλλά τείνουν να μεθίστανται ευρέως σε πρώιμο στάδιο. Ιστολογικά, επεξεργάζονται ποικίλη μορφολογία όπως κυψελίδωδη (σχηματίζει αδένες), θηλώδη και συμπαγή.

Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (large cell carcinoma): αποτελεί το 10% των καρκίνων του πνεύμονα και αναπτύσσεται συχνά στην περιφέρεια του πνεύμονα. Τα καρκινώματα από μεγάλα κύτταρα αποτελούν μια ομάδα νεοπλασμάτων που στερούνται κυτταρικής διαφοροποίησης και προφανώς αντιπροσωπεύουν είτε καρκινώματα από πλακώδες επιθήλιο είτε αδενοκαρκινώματα τα οποία είναι τόσο αδιαφοροποίητα ώστε δεν επιτρέπεται η περεταίρω ταυτοποίησή τους. Τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι μεγάλα, συνήθως αναπλαστικά και έχουν μεγάλους φυσαλιδώδεις πυρήνες με έντονα πυρήνια. Περιστασιακά οι όγκοι περιλαμβάνουν ένα επικρατούν στοιχείο γιγάντιων κυττάρων, πολλά από τα οποία είναι πολυπύρηνα, γιγαντοκυτταρικό καρκίνωμα, ενώ άλλοι αποτελούνται από ατρακτοειδή κύτταρα, ατρακτοκυτταρικό καρκίνωμα. Μερικοί όγκοι συνιστούν μείγμα και των δυο γιγαντοκυτταρικό και ατρακτοκυτταρικό καρκίνωμα. Τα καρκινώματα από μεγάλα κύτταρα έχουν κακή πρόγνωση λόγω της τάσης τους να διασπείρονται σε απομακρυσμένες περιοχές πρώιμα κατά την πορεία τους.



Εικόνα 1.2 :Οι τρείς τύποι του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Α) Πλακώδες καρκίνωμα. Β) Αδενοκαρκίνωμα. Γ) Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (Travis, 2011).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94



Εικόνα 1.3: Οι τέσσερεις τύποι καρκινικών κυττάρων στον πνεύμονα και οι περιοχές του πνεύμονα που εμφανίζονται (ADAM.Inc).

1.3 Σταδιοποίηση

Με βάση το μέγεθος του όγκου, την ανίχνευση καρκινικών κυττάρων στους λεμφαδένες καθώς και την ανεύρεση μετάστασής τους σε άλλα όργανα, οι καρκινικοί αυτοί τύποι ταξινομούνται σε τέσσερα στάδια (στάδιο I-IV).

Σταδίου I: Το μέγεθος των όγκων δε ξεπερνά τα 3cm και δεν διηθούν τους λεμφαδένες ή τους κύριους βρόγχους.

Σταδίου II: Οι όγκοι έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από 3cm, περιλαμβάνουν τους κύριους βρόγχους ή διηθούν τον περισπλάχνιο υπεζωκότα.

Σταδίου III: Οι όγκοι έχουν οποιοδήποτε μέγεθος, διηθούν το θωρακικό τοίχωμα, το διάφραγμα, το μεσοπνευμόνιο υπεζωκότα, το περίτονο περικάρδιο και τους λεμφαδένες.

Σταδίου IV: Οι όγκοι παρουσιάζουν μεταστάσεις σε άλλα όργανα (Shields, 2001).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

1.4 Αιτιοπαθογένεια

Το κάπνισμα και σε πολύ μικρότερο βαθμό άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες ευθύνονται για τις γενετικές μεταβολές που προκαλούν καρκίνο του πνεύμονα. Στατιστικά, περίπου το 90% των καρκίνων του πνεύμονα εμφανίζονται σε ενεργούς καπνιστές ή σε αυτούς που σταμάτησαν το κάπνισμα πρόσφατα. Το παθητικό κάπνισμα αυξάνει επίσης τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα περίπου δυο φορές σε σχέση με τους μη καπνιστές. Μεταξύ των ιστολογικών τύπων του καρκίνου του πνεύμονα, τα μικροκυτταρικά καρκινώματα και τα καρκινώματα από το πλακώδες επιθήλιο παρουσιάζουν την ισχυρότερη σχέση με έκθεση στο καπνό.

Άλλοι παράγοντες κινδύνου που ενέχονται στον καρκίνο του πνεύμονα είναι η έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους, η έκθεση σε χημικές ουσίες όπως στον αμίαντο, αρσενικό, χρώμιο, νίκελιο και βινυλοχλωρίδιο και υπερίτη (Williams και Sandler, 2001).

Εκτός από το κάπνισμα και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, γενετικοί παράγοντες ρυθμίζουν τη μεταλλοξιογόνο δράση των καρκινογόνων ουσιών. Οι πολυμορφισμοί των ογκοκατασταλτικών γονιδίων καθώς και οι αλληλικές παραλλαγές των γονιδίων που εμπλέκονται στην αποτοξίνωση, εμπλέκονται στο καρκίνο του πνεύμονα (Dialyna *και συν*., 2003). Για παράδειγμα πολλές χημικές ουσίες (προκαρκινικά) απαιτούν την ενεργοποίηση του ενζυμικού συστήματος P-450 για την μετατροπή τους σε καρκινικά. Ακόμη, προϋπάρχουσες μη-κακοήθεις πνευμονικές νόσοι, όπως χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση και φυματίωση, σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα καρκίνου πνεύμονα (Robbins *και συν*., 2002).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

1.5 Μοριακή βιολογία του καρκίνου του πνεύμονα

Η ανάπτυξη και η εξέλιξη του καρκίνου του πνεύμονα είναι μια πολυπαραγοντική διεργασία που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση πολλών γενετικών, μοριακών και επιγενετικών αλλαγών (Sekido *και συν.*, 2003). Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από:

- αυτο-επάρκεια σε αυξητικά σήματα, λόγω μεταλλάξεων σε πρωτοογκογονίδια,
- απώλεια ευαισθησίας σε αντι-αυξητικά σήματα, λόγω μεταλλάξεων σε ογκοκατασταλτικά γονίδια
- αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση)
- απεριόριστη δυνατότητα αντιγραφής, εξαιτίας της δράσης της τελομεράσης
- διατήρηση της αγγειογένεσης
- προσβολή του ιστού και μετάσταση (Panov, 2005).

Γενετικές και μοριακές ανωμαλίες

Στο καρκίνο του πνεύμονα παρατηρείται είτε υπερέκφραση ογκογονιδίων είτε απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, δημιουργώντας έτσι αλλοιώσεις σε γονίδια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη. Επιπλέον εμφανίζονται χρωμοσωμιακές ανωμαλίες (ανευπλοειδία) που συνοδεύονται από απώλεια ή περίσσεια αλλήλων και δομικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες (Sekido *και συν.,* 2003). Επίσης, εμφανίζεται συχνά μικροδορυφορική αστάθεια που αφορά σε λίγους επιτόπους και εκδηλώνεται με μεταθέσεις μεμονωμένων ταινιών αλλήλων σε σύγκριση με το φυσιολογικό DNA του ιδίου ασθενή. Η συνολική εμφάνιση μικροδορυφορικών μετατροπών σε μεμονωμένους επιτόπους εμφανίζεται στο 35% των μικροκυτταρικών και στο 22% των μη-μικροκυτταρικών καρκίνων του πνεύμονα (Sekido *και συν*., 1998).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

Γονίδιο	Τροποποιήσεις	Συχνότητα %	
		SCLC	NSCLC
FHIT	Έλλειψη/Μετάλλαξη	~80	~40
Ras	Μετάλλαξη	<1	~20
ERB1/EGFR	Υπερέκφραση	-	~60
ERB2/HER2/NEU	Υπερέκφραση	-	~20
Myc	Υπερέκφραση	15-30	5-10
BCL-2	Υπερέκφραση	75-95	10-35
p16ink4a	Απενεργοποίηση (Έλλειψη/Μετάλλαξη/Υπερμεθυλίωση)	0-10	~70
Rb	Απενεργοποίηση (Έλλειψη/Μετάλλαξη)	~90	~15-30
p53	Απενεργοποίηση (Έλλειψη/Μετάλλαξη	80-90	~50

Πίνακας 2: Συχνές κυτταρογενετικές αλλαγές σε καρκίνο πνεύμονα (Mitsuuchi και Testa, 2002).

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

Πίνακας 3: Συχνές μοριακές γενετικές αλλαγές στο καρκίνο του πνεύμονα (Mitsuuchi και Testa, 2002).

Επιγενετικές αλλαγές

Οι επιγενετικοί αλλαγές είναι κληρονομήσιμες και δεν αφορούν αλλαγές στην αλληλουχία του DNA. Οι κυριότερες επιγενετικές τροποποιήσεις, είναι η παρεκκλίνουσα μεθυλίωση του DNA (υπομεθυλίωση και υπερμεθυλίωση των κυτοσινών σε συγκεκριμένες θέσεις), η μετα-μεταφραστική τροποποίηση των ιστονών (ακετυλίωση, φωσφορυλίωση και μεθυλίωση) και η επαγωγή γονιδιακής καταστολής από τη μεσολάβηση ποικίλων μορφών RNA, αντινοηματικά μετάγραφα, μη κωδικό RNA ή RNAi (Bowman *και συν.*, 2006).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

1.6 Διάγνωση, πρόγνωση του καρκίνου του πνεύμονα

Σημαντικό εργαλείο για την ανίχνευση του καρκίνου του πνεύμονα, την πρόγνωση και την πρόβλεψη είναι οι καρκινικοί δείκτες. Πρόκειται για βιομόρια που ανιχνεύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα, στα ούρα, στους ιστούς, στο εγκεφαλονωτιαίο, ασκητικό, πλευριτικό υγρό. Δίνουν πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη, τη φύση, το μέγεθος, την υποτροπή ή την μεταστατική εξάπλωση μιας κακοήθους διεργασίας στον οργανισμό. Ωστόσο αυξημένες τιμές τους εμφανίζονται και σε ορισμένες μη καρκινικές παθολογικές καταστάσεις.

Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται συνήθως στην διάγνωση, την πρόγνωση και στην παρακολούθηση ασθενών με SCLC είναι το Pro-GRP και η ειδική νευρωνική ενολάση (NSE).

Αν και είναι δύσκολο να προσδιορίσουμε τα επίπεδα του GRP στον ορό εξαιτίας της αστάθειας του στο αίμα, χρησιμοποιείται ως ειδικός δείκτης για το SCLC το Pro-GRP που είναι σταθερό στο αίμα. Το Pro-GRP παίζει σημαντικό ρόλο στην διάγνωση των ασθενών με SCLC με ευαισθησία 65-80% και ειδικότητα 93-96% (Lamy *και συν.*, 2000˙ Shibayama *και συν.*, 2001). Τέλος, τα επίπεδα του Pro-GRP στον ορό παίζουν ρόλο στην παρακολούθηση της θεραπείας, στην ανίχνευση της υποτροπής και στην πορεία της νόσου των ασθενών (Miyake *και συν*., 1994˙ Sunaga *και συν.*, 1999˙ Niho *και συν*., 2000).

Η NSE χρησιμοποιείται επίσης στη διάγνωση ειδικότερα σε συνδυασμό με τους δείκτες TPS και CEA. Η NSE παρουσιάζει διαγνωστική ευαισθησία 76% (Kushlinsky *και συν,*. 1996). Η NSE εμφανίζεται επίσης να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης επιβίωσης. Μελέτες έδειξαν ότι η NSE είναι πιο χρήσιμη στην παρακολούθηση των ασθενών με SCLC που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία (Carney *και συν.*, 1982˙ Abbasciano *και συν.*, 1999). Μέτρηση των επιπέδων της 21 μέρες μετά τη χημειοθεραπεία έδειξε ότι είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας σε αυτούς τους ασθενείς (Jin *και συν*., 2001).

Τα επίπεδα του Pro-GRP αυξάνονται κατά μέσο όρο 35 μέρες πριν την κλινική ένδειξη ύπαρξης υποτροπής ενώ τα επίπεδα του NSE αυξάνονται 20 μέρες μετά την ανίχνευση υποτροπής (Okusaka *και συν*., 1997).

Οι καρκινικοί δείκτες χρησιμοποιούνται στο NSCLC ως προγνωστικοί δείκτες της έκτασης της νόσου προεγχειρητικά σε ασθενείς με εντοπισμένη νόσο, στην λήψη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

απόφασης για την εφαρμογή χημειοθεραπείας, στην παρακολούθηση ανταπόκρισης στη θεραπεία καθώς επίσης και στην μετεγχειρητική παρακολούθηση ασθενών

Το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (CEA), θεωρείται προγνωστικός δείκτης στον χειρουργήσιμο NSCLC, με οριακή τιμή 2,5 ng/ml. Αυξημένες τιμές φανερώνουν φτωχή πρόγνωση (Rubins *και συν*., 1998). Ενώ κάποιες άλλες έρευνες θεωρούν ότι ο προσδιορισμός του δεν έχει την απαιτούμενη ειδικότητα και ευαισθησία στην διερεύνηση του NSCLC (Dent *και συν*., 1978).

Το CA 125, φαίνεται να είναι ένας άλλος ανεξάρτητος προεγχειρητικός προγνωστικός δείκτης επιβίωσης, ελεύθερης νόσου, με οριακή τιμή 15U/ml. Όταν τα επίπεδα του δείκτη υπερβούν αυτήν την τιμή παρουσιάζεται αυξημένος κίνδυνος υποτροπών (Diez *και συν.,* 1994˙ Diez *και συν.,* 1995).

Επίσης ο CYFRA 21-1 (τμήμα της κυτοκερατίνης 19)έχει υψηλή προγνωστική αξία στον NSCLC με οριακή τιμή 3,3 ng/ml και διαγνωστική ευαισθησία 72% (Kushlinsky *και συν.,* 1996˙ Stieber *και συν*., 1999). Σε μελέτη 67 ατόμων με NSCLC, υψηλότερα επίπεδα CYFRA 21-1 από 3,6 ng/ml στον ορό βρέθηκε να σχετίζονται με φτωχή πρόγνωση και για την ολική επιβίωση και για την επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου σε ασθενείς με χειρουργήσιμο καρκίνο. Ο CYFRA 21-1 μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στην αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της χημειοθεραπείας (Van der Gaast *και συν.,* 1994˙ Ebert και Muley, 1999). Τέλος, κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι η μεταβολή του CYFRA κατά 10% έχει προγνωστική αξία στον προσδιορισμό των υποτροπών, με ευαισθησία 60% και ειδικότητα 100% ενώ κάποιες άλλες μελέτες αξιολογούν την μεταβολή του CYFRA κατά 30% ((Hamzaoui *και συν.,* 1997˙ Ebert και Muley, 1999).

Το SCC-Ag (squamous cell carcinoma antigen) μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως καρκινικός δείκτης στο NSCLC με οριακή τιμή 2,5 ng/ml (Body *και συν.,* 1986˙ Mino *και συν,* 1988). Αύξηση του αντιγόνου προεγχειρητικά συνοδεύεται από φτωχή πρόγνωση (Niklinski *και συν.,* 1992[a.b]). Το σύμπλοκο μεταλλοπρωτεϊνών μπορεί να είναι εξίσου χρήσιμο στην κλινική έρευνα για ασθενείς με NSCLC. Η υπερέκφραση του MMP2 φανερώνει φτωχή πρόγνωση σε πρώιμο στάδιο NSCLC (Passlick *και συν.,* 2000). Η MMP9 είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης σε ασθενείς με χειρουργήσιμο καρκίνο (Sienel *και συν*., 2003).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

RNA

2.1 Εισαγωγή

Η απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου. Είναι απαραίτητος, λοιπόν ο μετα-μεταγραφικός μηχανισμός για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Τα μετα-μεταγραφικά γεγονότα περιλαμβάνουν τη επεξεργασία του mRNA, την εξαγωγή του mRNA από το πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, τον εντοπισμό του mRNA, τη σταθερότητα του mRNA και τη μεταφραστική ρύθμιση. Ο ρυθμός σύνθεσης του mRNA καθώς επίσης και ο ρυθμός αποικοδόμησής του επηρεάζει σημαντικά τη σταθερότητά του (Audic και Hartley, 2004).

2.2 Ωρίμανση mRNA

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα για να εξαχθεί το mRNA από το πυρήνα υφίσταται μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις ώστε το πρώιμο μετάγραφο να μετατραπεί σε ώριμο mRNA και να είναι λειτουργικό. Οι τροποποιήσεις αυτές είναι η προσθήκη της 5' καλύπτρας (capping), το μάτισμα (splicing) και η προσθήκη poly(A) ουράς στο 3' άκρο (πολυαδενυλίωση).

Η τροποποίηση του 5' άκρου του mRNA έγκειται στη προσθήκη μιας γουανίνης που είναι μεθυλιωμένη στη θέση 7, από τη 7-μεθυλο-τρανσφεράση της γουανίνης. Η γουανίνη ενώνεται μέσω μιας πυροφωσφορικής γέφυρας με το 5’ άκρο του τελικού νουκλεοτιδίου του mRNA και έτσι δημιουργείται ένας 5'-5' τριφωσφορικός δεσμός. Στην προσθήκη αυτή συμμετέχουν τρία ένζυμα, μία φωσφατάση, μία γουανυλοτρανσφεράση, και μία μεθυλάση. Εκτός από τη μεθυλίωση στο N-7 της γουανίνης συμβαίνουν και άλλες δυο μεθυλιώσεις στις δυο προηγούμενες ριβόζες. Έτσι διακρίνονται τρία είδη καλύμματος ανάλογα με το πλήθος μεθυλιώσεων που φέρουν: κάλυμμα 0, όταν δεν υπάρχει επιπρόσθετη μεθυλίωση, κάλυμμα 1 όταν το

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

πρώτο σάκχαρο της ριβόζης είναι καθοδικά μεθυλιωμένο, κάλυμμα 2 όταν και τα δύο σάκχαρα της ριβόζης είναι καθοδικά μεθυλιωμένα. Οι μεθυλιώσεις αυτές σταθεροποιούν το mRNA και το προστατεύουν από την αποικοδόμηση από τις 5'-νουκλεάσες και τις φωσφατάσες. Επιπλέον, η καλύπτρα βοηθά στην αποκοπή και στην απομάκρυνση των ιντρονίων και στην αύξηση της μεταμεταφραστικής ικανότητας του mRNA από τη μεταμεταφραστική μηχανή του κυττάρου (Μαρμαράς και Λαμπροπούλου, 2005).

Το δεύτερο μετα-μεταγραφικό γεγονός που υφίσταται το πρώιμο mRNA είναι το μάτισμα. Το μάτισμα επιτυγχάνει την αφαίρεση ιντρονίων και τη συρραφή εξονίων ώστε να δημιουργηθεί το ώριμο mRNA. Κατά το μάτισμα είναι απαραίτητη η συνεργασία αρκετών μικρών μορίων RNA και πρωτεϊνών που σχηματίζουν ένα μεγάλο σύμπλοκο, το σωμάτιο ματίσματος (spliceosomes).Η συγκρότηση αυτών των σωματίων γίνεται στα όρια εξονίων-ιντρονίων χάρη σε φυλογενετικά συντηρημένες cis-αλληλουχίες. Τα σωμάτια ματίσματος απαρτίζονται από μικρά πυρηνικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (snRNPs) U1, U2, U4/6 και U5 και άλλες ειδικές πρωτεΐνες, όπως οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες του ματίσματος. Η πολυπλοκότητα του ματίσματος αυξάνει σημαντικά από το ζυμομύκητα στα θηλαστικά (Lewin, 2004).

Το τελευταίο στάδιο στην μετα-μεταγραφική επεξεργασία του mRNA είναι η πολυαδενυλίωση του. Το πρώιμο μετάγραφο υφίσταται μία ενδονουκλεολυτική απομάκρυνση από το σημείο μεταγραφής του και στο 3' άκρο του προστίθεται 250-300 νουκλεοτίδια αδενοσίνης, poly (A) ουρά. Η πολυαδενυλίωση καταλύεται από μια poly (A) πολυμεράση. Η RNA πολυμεράση ΙΙ όταν φτάσει στο τέλος του γονιδίου δεν σταματά τη μεταγραφή αλλά τη συνεχίζει τουλάχιστον για 1500 ακόμη νουκλεοτίδια. Πριν το τέλος της αλληλουχίας που κωδικοποιεί την πολυπεπτιδική αλυσίδα μεταγράφεται η αλληλουχία AAUAAA. Η αλληλουχία AAUAAA αποτελεί σήμα για την προσθήκη της poly (A) ουράς και βρίσκεται 10-30 περίπου νουκλεοτίδια ανοδικά της τελικής θέσης της πολυαδενυλίωσης στα ευκαρυωτικά γονίδια. Το σήμα αυτό αναγνωρίζεται από ένα ειδικό πρωτεϊνικό παράγοντα CPSF. Στο σημείο αυτό προσδένονται και άλλοι πρωτεϊνικοί παράγοντες.

Ο ρόλος της poly (A) ουράς δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι ενισχύει την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης και τη σταθερότητα του mRNA . Το mRNA που δεν έχει poly (A) ουράς μπορεί να μεταφέρεται έξω από τον πυρήνα ωστόσο ένα μόριο mRNA, που δεν έχει poly (A) ουρά συνήθως είναι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

λιγότερο αποτελεσματικό ως εκμαγείο για σύνθεση πρωτεϊνών από αυτό που έχει poly (A) ουρά. Μερικά μόρια mRNA αποθηκεύονται με μια μη αδενυλιωμένη μορφή και αποκτούν την poly (A) ουρά μόνο όταν επίκειται μετάφραση. Η σταθεροποίηση του mRNA οφείλεται στη πρόσδεση της poly (A) προσδενόμενης πρωτεΐνης (poly(A)-binding protein), PABP. Η PABP προστατεύει την poly (A) ουρά από τις νουκλεάσες και αυξάνει την ευαισθησία του σε μια ειδική poly A ριβονουκλεάση (Μαρμαράς και Λαμπροπούλου, 2005˙ Stryer *και συν.*, 2002).

2.3 Αποικοδόμηση mRNA

Η αποικοδόμηση mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η αποικοδόμηση του mRNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα συμβαίνει μέσω διαφόρων οδών οι οποίες διαφοροποιούνται ανάλογα με το αν η αποικοδόμηση του «σώματος» του mRNA συμβαίνει με κατεύθυνση 5'→3' ή 3'→5'και αν η αποαδενυλίωση προηγείται ή όχι της αποικοδόμησης αυτής (Beelman και Parker, 1995).

Α. *Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από αποαδενυλίωση*

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η πλειοψηφία των mRNAs αποικοδομείται μέσω ενός μονοπατιού, το οποίο ξεκινά με τη αφαίρεση της poly (A) ουράς, γνωστό ως μονοπάτι αποικοδόμησης εξαρτώμενο από αποαδενυλίωση (Εικόνα 2.1Α). Η αντίδραση καταλύεται από μαγνήσιο-εξαρτώμενες εξωριβονουκλεάσες, τις αποαδενυλάσες. Αφού πραγματοποιηθεί η αποαδενυλίωση, δύο μηχανισμοί μπορούν να οδηγήσουν στην αποικοδόμηση του mRNA: είτε αφαίρεση της 5' καλύπτρας και αποικοδόμηση με κατεύθυνση 5'→3', είτε αποικοδόμηση 3'→5'. Στο πρώτο μονοπάτι, το σύμπλεγμα πρωτεϊνών Lsm 1-7 αλληλεπιδρά με το 3' άκρο του μεταγράφου επάγοντας την αφαίρεση της καλύπτρας μέσω του συμπλόκου DCP1-DCP2, εκθέτοντας έτσι το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την XRN1 εξωριβονουκλεάση. Εναλλακτικά, το αποαδενυλιωμένο mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'→5' από το εξώσωμα. (Garneau *και συν.*, 2007). Πρόκειται για ένα σύπμλοκο 10-

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

12 υπομονάδων που αποτελείται από 6 πρωτεΐνες με σημαντική ομολογία 3'→5' φωσφορυλιτικών εξωρινοβουκλεασών, αρκετές πρωτεΐνες με ομολογία 3'→5' υδρολυτικών εξωνουκλεασων και Rna ελικάσες (Houseley *και συν.,* 2006). Κάθε μία από τις καταλυτικές υπομονάδες του εξωσώματος έχει μια PH περιοχή RNase η οποία ενδέχεται να συμβάλλει στην καταλυτική δραση. Ωστόσο, παραμένει ασαφές αν όλοι οι υπομονάδες είναι καταλυτικά ενεργές ή αν κάποιες από αυτές παίζουν ρόλο στην αναγνώριση και την τοποθέτηση του υποστρώματος. Το εξώσωμα εκτός από την κυτταροπλασματική διάσπαση του mRNA συμμετέχει στην 3' επεξεργασία των μη-κωδικοποιούμενα (noncoding) mRNA στο πυρήνα. Μετά την 3'→5' αποικοδόμηση, τα ολιγομερή της 5' καλύπτρα που έχουν απομείνει μεταβολίζονται από το ένζυμο DcpS (Liu *και συν.,* 2002). Τα δύο αυτά μονοπάτια δεν είναι απαραίτητα ανεξάρτητα. Στο S. cerevisiae αποσιωπώντας συστατικά του 3'→5' ή 5'→3' μονοπατιού παρατηρήθηκε ότι το μεταγραφόσωμα επηρεάζεται ελάχιστα, γεγονός που υποδηλώνει πλεονασμό των μηχανισμών αποικοδόμησης (He *και συν.,* 2003˙ Houalla *και συν.,* 2006).

Β. *Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αφαίρεση της καλύπτρας*

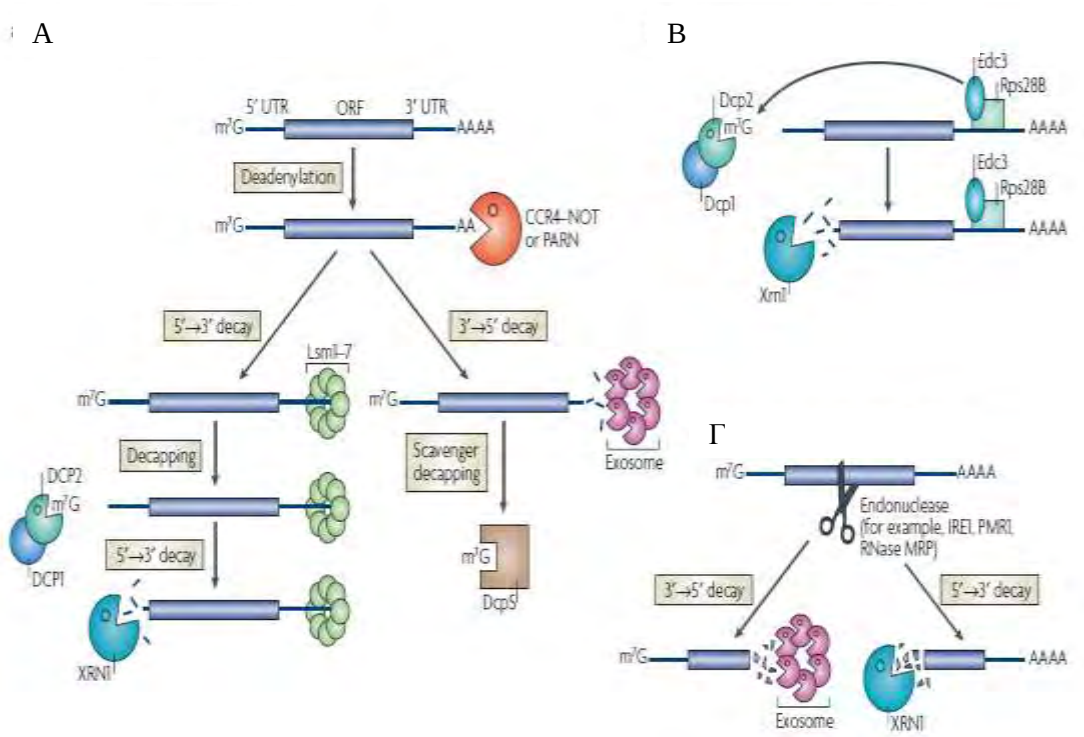
Δύο μη συνδεδεμένα μετάγραφα RPS28B και EDC1 παρακάμπτουν την αποαδενυλίωση, προκαλώντας άμεσα την αφαίρεση της καλύπτρας (Εικόνα 2.1Β). Η Rps28B του S. cerevisiae οδηγεί στην αποικοδόμηση μέσω ενός αυτορυθμιστικού μηχανισμού. Η πρωτεΐνη Rps28B προσδένεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή του δικού της mRNA και στρατολογεί την Edc3, έναν ενισχυτή αφαίρεσης της καλύπτρας. Αυτό προφανώς επιφέρει σύνδεση και άλλων παραγόντων αφαίρεσης της καλύπτρας και επιτρέπει την αποικοδόμηση που είναι ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση (Cheadle *και συν.,* 2005). Το EDC1 mRNA του S. cerevisiae, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Edc1 που ρυθμίζει την αφαίρεση της καλύπτρας, επίσης αποικοδομείται μέσω μονοπατιών ανεξάρτητων της αποαδενυλίωσης. Συγκεκριμένα, η αποαδενυλίωση φαίνεται να προλαμβάνεται από την αλληλεπίδραση της poly(A) ουράς και την περιοχή poly (U) στο 3' UTR. Αυτό το ενδομοριακό ζευγάρωμα βάσεων εμποδίζει την πρόσβαση των αποαδενυλασών. Ωστόσο η αφαίρεση του EDC1 mRNA απαιτεί την παρουσία υπομονάδων του συμπλόκου CCR4–NOT

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

γεγονός που φανερώνει μια ενδιαφέρουσα συσχέτιση μεταξύ της αποαδενυλίωσης και της αφαίρεσης της καλύπτρας (Muhlrad και Parker 2005).

Γ. *Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση*

Αποικοδόμηση του mRNA μπορεί να συμβεί και μέσω ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης, όπου παράγονται δύο τμήματα με απροστάτευτα άκρα (Εικόνα 2.1Γ). Πρόσφατα έχουν χαρακτηριστεί διάφορες ενδονουκλεάσες που στοχεύουν το mRNA όπως οι PMR1, IRE1 καθώς επίσης το ένζυμο επεξεργασίας του ριβοσωμικού RNA, RNase MRP, το οποίο φαίνεται να επιτελεί επιπρόσθετο ρόλο αφού επιτίθεται και σε συγκεκριμένα μόρια mRNA. Τα τμήματα που προκύπτουν από τη διάσπαση, αποκοδομούνται από το XRN1 και το εξώσωμα. Επιπλέον ενδονουκλεάσες που δεν έχουν ταυτοποιηθεί έχουν εμπλακεί στην αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNAs (He *και συν.*, 2003˙ Houalla *και συν.*, 2006). Τα siRNAs επίσης προκαλούν την αποικοδόμηση μέσω ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης με τη μεσολάβηση των Argonaute protein-2 (Ago2) (Liu *και συν.*, 2004˙ Song *και συν.*,2004).



Εικόνα 2.1: Μηχανισμοί αποικοδόμησης.Α) Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από αποαδενυλίωση. Β) Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αφαίρεση της καλύπτρας. Γ) Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση (Garneau *και συν.*, 2007).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

Η αποικοδόμηση των mRNA λαμβάνει χώρα σε κυτταροπλασματικές κοκκώδεις δομές, στα P bobies όπου βρίσκονται παράγοντες που εμπλέκονται στην έναρξη της μετάφρασης, στην αποαδενυλίωση, στην αφαίρεση της καλύπτρας, στην 5'→3' εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, στην ανερμηνεύσιμα διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (nonsense-mediated decay) και στην microRNA (miRNA) διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση. Τα P bodies στρατολογούνται όταν υπάρχουν πολλά μόρια RNA τα οποία αποικοδομούνται μέσω του συστήματος 5'→3' αποικοδόμησης ή όταν η αποικοδόμηση των mRNAs παρεμποδίζεται εξαιτίας μεταλλάξεων στους παράγοντες αφαίρεσης της καλύπτρας ή στην εξωνουκλεάση XRN1. Αντίθετα τα P bodies μειώνονται σε αριθμό και μέγεθος ή εξαφανίζονται όταν μειώνεται ο αριθμός των μορίων mRNA προς αποικοδόμηση καθώς και όταν παρεμποδίζεται η μεταγραφή, η μετάφραση ή η επικοινωνία (communication) μεταξύ της μετάφρασης και των μηχανισμών αποικοδόμησης του mRNA. Επίσης η μείωση των P bodies μπορεί να οφείλεται και σε μεταλλάξεις παράγοντων που εμπλέκονται στα αρχικά στάδια της αποικοδόμησης όπως το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CCR4-NOT και το σύμπλοκο Lsm (Garneau *και συν.*, 2007˙ Parker και Song 2004).

2.4 Αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNA

Κατά την παραγωγή ενός ώριμου mRNA μεταγράφου ενδέχεται η εισαγωγή λάθους. Για την διαφύλαξη της πιστότητας της μετάφρασης, το κύτταρο διαθέτει μηχανισμούς ώστε να εντοπίζει τα ελαττωματικά μετάγραφα και να τα αποικοδομεί, προστατεύοντας το από τις τοξικές πρωτεΐνες. Ο έλεγχος της ωρίμανσης του mRNA γίνεται στον πυρήνα, ενώ υπάρχουν τρεις οι οδοί που εξαρτώνται από τη μετάφραση και ανιχνεύουν ελαττωματικά ριβονουκλεϊνικά σύμπλοκα στο κυτταρόπλασμα (Garneau *και συν.*, 2007).

Α. *Μη-νοηματικά (ανερμηνεύσημα) διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (Nonsense-mediated decay*)

Στο μονοπάτι αυτό τα mRNA που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται. Η πρόωρη αλληλουχία τερματισμού μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις, μετατοπίσεις του αναγνωστικού πλαισίου, αναποτελεσματική επεξεργασία, στην ελαττωματική έναρξη της μετάφρασης και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

εκτενή 3΄ αμετάφραστη περιοχή. Η αποικοδόμηση αυτών των μεταγράφων συμβαίνει είτε μετά από αφαίρεση του καλύμματος σε μία διαδικασία η οποία είναι ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση, είτε από επιτάχυνση της αποαδενυλίωσης και της 3'→5' αποικοδόμησης από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα .Το μονοπάτι αυτό έχει βρεθεί σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και τα κυριότερα συστατικά του NMD συμπλόκου UPF1, UPF2 και UPF3, είναι διατηρημένα (Conti και Izaurralde, 2005).

Μετά την ωρίμανση του mRNA στον πυρήνα, το σύμπλοκο σύνδεσης εξωνίων (EJC), το οποίο περιέχει UPF3, συνδέεται με το μεταγράφο και το προκύπτον mRNA εξάγεται στο κυτταρόπλασμα. Στο κυτταρόπλασμα, μια δεύτερη πρωτεΐνη NMD, η UPF2, συνδέεται με τη UPF3. Κατά τη μετάφραση όταν το ριβόσωμα συναντήσει το πρόωρο κωδικόνιο λήξης (PTC), σταματά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σύμπλοκο SURF (που περιλαμβάνει SMG1, UPF1 και πεπτιδικούς-παράγοντες απελευθέρωσης eRF1 και eRF3) να προσδεθεί στο ριβόσωμα. Η UPF1 προσδένεται στη UPF2, συνδέοντας το EJC στην PTC. Η φωσφορυλίωση της UPF1 από τη SMG1 οδηγεί στην αποσύνδεση του eRF1 και eRF3 και στη δέσμευση των πρωτεϊνών του SMG7 προσαρμογέα. Έτσι το mRNA αποικοδομείται (εικόνα 2.2Α) (Kashima *και συν.*, 2006).

Β. *Αποικοδόμηση μη-τερματισμού (Non-stop decay)*

Η διαδικασία αυτή στοχεύει ομοίως σε mRNA τα οποία δεν έχουν κωδικόνιο τερματισμού, έτσι αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα. Τέτοια μετάγραφα μπορούν να προκύψουν από διάσπαση, από την απουσία αλληλουχίας τερματισμού μέσα στην κωδικοποιούμενη περιοχή καθώς επίσης και από πρόωρη πολυαδενυλίωση κατά την μεταγραφή. Στο μονοπάτι αυτό το ριβόσωμα διέρχεται από την poly (A) ουρά εκτοπίζοντας την PABP, και ακινητοποιείται στο 3' άκρο του mRNA. Στη ζύμη και στα θηλαστικά, ο Ski7, ένας πρωτεϊνικός προσαρμογέας που μιμείται μοριακά το tRNA, προσδένεται στην Α περιοχή του ακινητοποιημένου ριβοσώματος για να αποδεσμεύσει το μετάγραφο και να στρατολογήσει το εξώσωμα που το αποικοδομεί (Van Hoof A. *και συν.*, 2002˙ Frischmeyer *και συν.*, 2002).

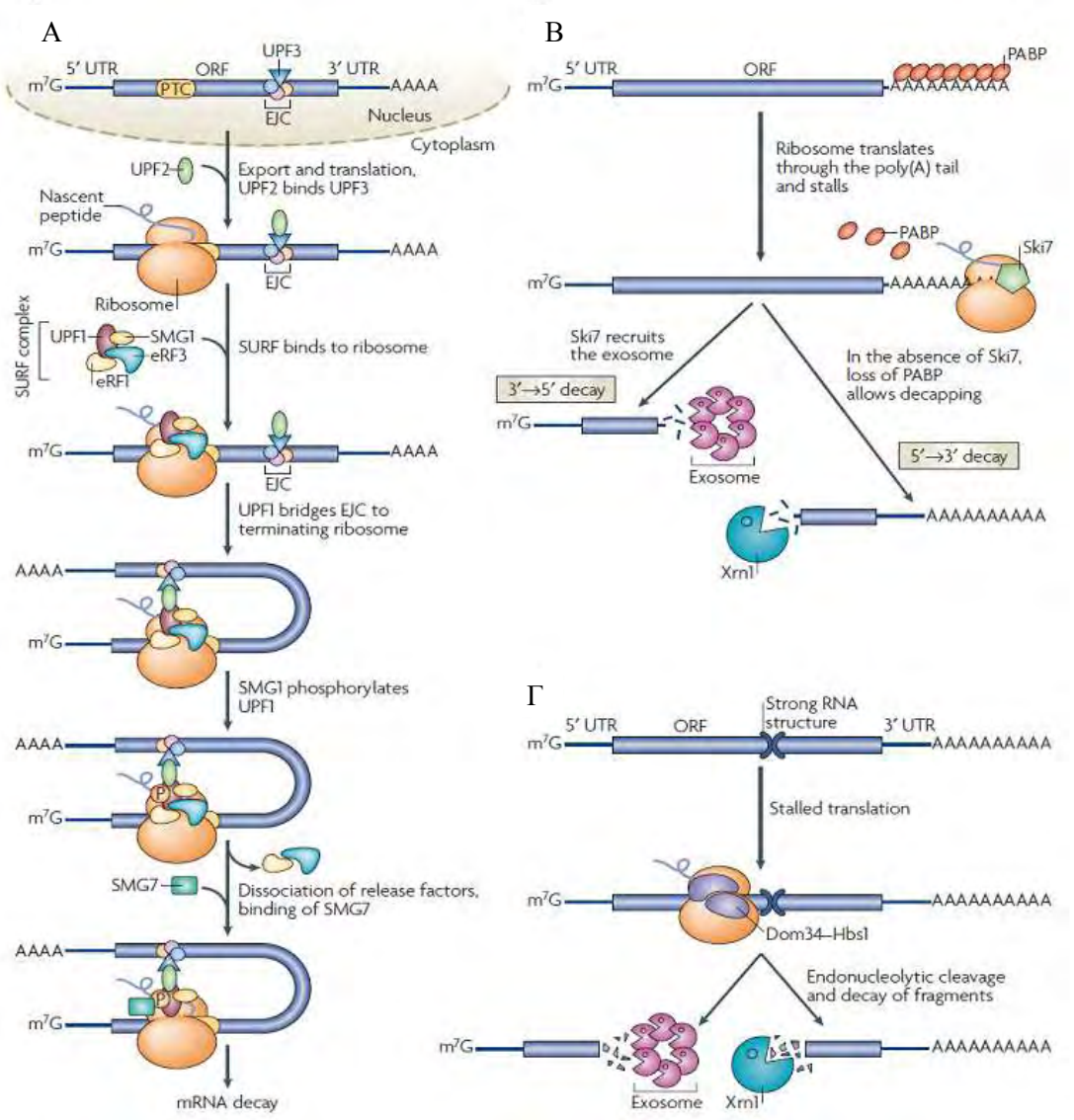
Ένα άλλο μονοπάτι που έχει περιγραφεί στο S. cerevisiae, απουσία του Ski7, είναι ότι η μετατόπιση της PABP από το ριβόσωμα καθιστά το mRNA ευπαθή στην

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

αφαίρεση της καλύπτρας και στην αποικοδόμηση 5΄→3΄ από την 5΄→3΄ εξωριβονουκλεάση Xrn1 (εικόνα 2.2Β) (Inada και Aiba, 2005).

Γ. *No-go αποικοδόμηση (No-go decay)*

Ο μηχανισμός αυτός ανακαλύφθηκε πρόσφατα στον ζυμομύκητα. Το ριβόσωμα ακινητοποιείται στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης λόγω σχηματισμού ειδικής δευτεροταγούς δομής στο ελαττωματικό mRNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να πυροδοτείται η διαμεσολαβούμενη από ενδονουκλεάσες αποικοδόμηση του mRNA και η απελευθέρωση του ριβοσώματος (εικόνα 2.1Γ) (Doma και Parker, 2006).



Εικόνα 2.2: Μονοπάτια αποικοδόμησης ελαττωματικών mRNAs: Α) Nonsense-mediated decay. Β) Non-stop decay. Γ) No-go decay (Garneau *και συν.*, 2007)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

2.5 Παράγοντες που ρυθμίζουν την αποικοδόμηση του mRNA

Microarrays αναλύσεις αποκάλυψαν ότι το 40-50% των αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης σε απάντηση στα κυτταρικά μηνύματα εμφανίζεται στο επίπεδο σταθερότητας του mRNA. Οι αλλαγές αυτές συνήθως προκαλούνται από αλλαγές στη σύνθεση των mRNPs που είτε αναστέλλουν ή διεγείρουν την αποικοδόμηση. Βρέθηκε ότι οι καθοριστές της σταθερότητας των mRNAs βρίσκονται κυρίως στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) όπου τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα προστατεύονται από τη διάσχιση των ριβοσωμάτων κατά μήκος των mRNAs, αλλά και στην 5' UTR και στην κωδική περιοχή (Garneau *και συν.*, 2007*)*. Τα πιο καλά μελετημένα στοιχεία σταθερότητας των mRNAs, είναι οι αλληλουχίες που περιέχουν βάσεις A και U σε διάφορα μοτίβα (AU-rich elements, ARE). Οι αλληλουχίες αυτές βρίσκονται στην 3' UTR περιοχή πολλών μεταγράφων που κωδικοποιούν κυτοκίνες, πρωτοογκογονίδια και μεταγραφικούς παράγοντες. Το πιο απλό μοτίβο ενός στοιχείου ARE συνίσταται στο πεντανουκλεοτίδιο AUUUA, ενώ η αποσταθεροποίηση που προκαλείται από τα στοιχεία αυτά είναι αποτέλεσμα οργάνωσης των διαφόρων μοτίβων (πεντανουκλεοτίδια AUUUA, εννιαμερή UUAUUUUA (U/A)(U/A), κ.α.) σε δευτεροταγείς ή τριτοταγείς δομές. Ανάλογα με το μοτίβο του στοιχείου ARE και την αντίστοιχη κινητική της αποικοδόμησης του μορίου mRNA που το περιέχει, χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

Τα ARE τύπου I που αποτελούνται από 1-3 επαναλήψεις του μοτίβου AUUUA και απαντώνται συνήθως στα mRNA των «γονιδίων πρώιμης απόκρισης» (early-responsegenes) που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες π.χ. c-fos.

Τα ARE τύπου II που αποτελούνται από περισσότερα μοτίβα AUUUA (5-6 αντίγραφα) και βρίσκονται συνήθως σε γονίδια κυτοκινών, π.χ. GM-CSF, TNF-α, IL-3.

Τα ARE τύπου III, τα οποία δεν περιέχουν το μοτίβο AUUUA, αλλά επαναλήψεις U (U-stretches), π.χ ο μεταγραφικός παράγοντας c-jun.

Στα στοιχεία ARE τύπου I και τύπου III η αποικοδόμηση πραγματοποιείται σε δυο στάδια– στο πρώτο στάδιο συμβαίνει η αποαδενυλίωση όπου η νουκλεοτιδική αλληλουχία του mRNA δεν μεταβάλλεται, και στο δεύτερο στάδιο τα μόρια mRNA αποικοδομούνται ταχύτατα και έχουν πλέον μια πολύ μικρή poly (A)ουρά (30-60

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

βάσεις αδενοσίνης). Η κινητική της αποδόμησης στις περιπτώσεις των ARE τύπου ΙΙ, διαφέρει στο ότι η αποαδενυλίωση και η αποικοδόμηση του μορίου mRNA συμβαίνουν ταυτόχρονα (Xu *και συν.,* 1997).

Οι πρωτεΐνες που συνδέονται με τα στοιχεία ARE μπορεί να είναι είτε ειδικές όπως παράγοντες AUBFs (AU-rich binding factors, AUBFs), είτε να ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών hnRNP. Αρκετοί τέτοιοι παράγοντες έχουν ταυτοποιηθεί όπως : AUF1, TTP, KSRP , RHAU, TIAR. Οι παράγοντες αυτοί αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με παράγοντες που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση mRNA όπως οι αποαδενυλάσες (PARN, CCR4-NOT), τα DCP1-2 και το εξώσωμα.. Αναλυτικότερα το AUF1 αλληλεπιδρά με το εξώσωμα, το KSRP και το RHAU προσδένονται στην αποαδενυλάση PARN και στο εξώσωμα, με αποτέλεσμα αυτό να οδηγεί σε αυξημένη διάσπαση του mRNA-στόχου (Garneau *και συν.,* 2007).

2.6 Αποαδενυλάσες

Πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs είναι η βράχυνση της poly (A) ουράς, αποαδευνλίωση, από μια οικογένεια ενζύμων τις αποαδενυλάσες. Πρόκειται για μαγνησο-εξαρτώμενες εξωριβονουκλεάσες, οι οποίες υδρολύουν το mRNA με 3'→5' κατεύθυνση, απελευθερώνοντας 5' – AMP. Η poly (A) ουρά αποτελεί κύριο υπόστρωμα αυτών των ενζύμων. Οι αποαδενυλάσες ταξινομούνται σε δυο μεγάλες υπερ-οικογένειες βάση της παρουσίας συγκεκριμένων συντηρημένων καταλοίπων στο καταλυτικό τους κέντρο την DEDD ή την exonuclease–endonuclease–phosphatase (EEP) υπέρ-οικογένεια. Οι DEDD νουκλεάσες ονομάστηκαν έτσι εξαιτίας των συντηρημένων καταλυτικών αμινοξικών καταλοίπων Asp και Glu τα οποία είναι διάσπαρτα σε τρία μοτίβα εξωνουκλεάσης που δεσμεύουν ιόντα μαγνησίου . Μέλη της ομάδας αυτής είναι οι οικογένειες της POP2 (CAF1), η poly(A) εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), η CAF1Z, και η PAN2. Τα ένζυμα της ομάδας EEP έχουν συντηρημένα κατάλοιπα Asp και His στην περιοχή με δράση νουκλεάσης. Μέλη της ομάδας αυτής είναι η CCR4, η Nocturinin, η ANGEL και η 2' phosphodiesterase (2′PDE). Πιθανόν να υπάρχουν και άλλες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

νουκλεάσες εκτός των υπέρ-οικογενειών DEDD και EEP ωστόσο δεν έχει ταυτοποιηθεί καμία ακόμη (Dlakic, 2000).

Οι ποικιλία των αποαδενυλασών μεταβάλλεται μεταξύ των ειδών. Μέλη των οικογενειών POP2, CCR4, PAN2 και ANGEL εντοπίζονται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ενώ άλλες αποαδενυλάσες είναι λιγότερο συντηρημένες. Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον εννέα αποαεδνυλάσες (Goldstrohm και Wickens, 2008).

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

Πίνακας 1: Ποικιλομορφία των αποαδενυλασών SC: S.cerevisiae, CE: C. elegans, DM: D.melanogaster, XL: X.laevis, MM: M. musculus, HS: H.sapiens (+): είναι παρούσα στον οργανισμό (-): δεν είναι παρούσα στον οργανισμό (Goldstrohm και Wickens, 2008).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

2.7 Σύμπλοκα αποαδενυλασών

Οι αποαδενυλάσες συνήθως σχηματίζουν σύμπλοκα ενώ άλλες ομοδιμερή ή ετεροδημερή όπως το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο CCR4-NOT, το ετεροδιμερές PAN2-PAN3 κα το ομοδιμερές της PARN (Piao *και συν.*, 2010). Ο ετεροδιμερισμός αυξάνει σημαντικά το ρεπερτόριο των συμπλόκων των αποαδενυλασών. Διάφορα ετεροδιμερή μπορεί να έχουν διαφορετική ενζυμική ή ρυθμιστική ικανότητα. Για παράδειγμα η CNOT8 που ανήκει στην οικογένεια της POP2, έχει την ικανότητα να προσδένεται στην PUF ρυθμιστική πρωτεΐνη περισσότερο από ότι προσδένεται η CNOT7, που επίσης ανήκει στην οικογένεια POP2 (Goldstrohm *και συν.*, 2006). Τα σύμπλοκα των αποαδενυλασών πέρα της συμμετοχής τους στην αποικοδόμηση το mRNA προσθέτουν σε επίπεδο οργάνωσης επιπλέον λειτουργίες και ρυθμιστική δυνατότητα.

Το πολύπρωτεϊνικό σύμπλοκο CCR4 -NOT είναι συντηρημένο από τη ζύμη εως τον άνθρωπο. Αρχικά χαρακτηρίστηκε στον S. Cerevisiae ως μεταγραφικό σύμπλοκο ρυθμιζόμενο από γλυκόζη, το οποίο καταστέλλει την RNA πολυμεράση II και αποτελεί το κύριο σύμπλοκο αποαδενυλίωσης (Garneau *και συν.*, 2007). Στη ζύμη το σύμπλοκο αποτελείται από από την Pop2/Caf1, Ccr4, Not1-5, Caf 40, Caf 130 (Chen *και συν.*, 2001). Στον άνθρωπο το σύμπλοκο αποτελείται από τις καταλυτικές υπομονάδες CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 και τις μη καταλυτικές υπομονάδες CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT9 και CNOT10. Η υπομονάδα CNOT1 λειτουργεί σαν «σκαλωσιά», αφού σε αυτή προσδένονται οι υπόλοιπες CNOT υπομονάδες (Bartlam και Yamamoto 2010). Μέλη της οικογένειας BTG/TOB μπορεί να συμβάλλουν στη στρατολόγηση του συμπλόκου. Τόσο η TOB και η BTG2 αλληλεπιδρούν με τις υπομονάδες Caf1a(CNOT7)/Caf1b (CNOT8) και ενισχύεται η αποαδενυλίωση. Οι πρωτεΐνες TOB προάγουν την αποαδενυλίωση στρατολογόντας το σύμπλοκο CAF1-CCR4 στο τέλος 3' άκρου του mRNA με ταυτόχρονη πρόσδεση της CAF1 και της PABP. Ωστόσο, ο ακριβής μοριακός μηχανισμός προώθησης της αποαδενυλίωσης μέσω των TOB παραμένει ασαφής (Ezzeddine *και συν.*, 2012). Ωστόσο παλαιότερες μελέτες δείχνουν ότι η Pabp1 αναστέλλει την ενεργότητα της Ccr4p (Tucker *και συν.*, 2002). Οι PUF πρωτεΐνες που στοχεύουν ειδικά στην 3' αμετάφραστη περιοχή των RNAs μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη στρατολόγηση του συμπλόκου CCR4-NOT, όπως συμβαίνει με τη COX17 (Olivas και Parker, 2000).

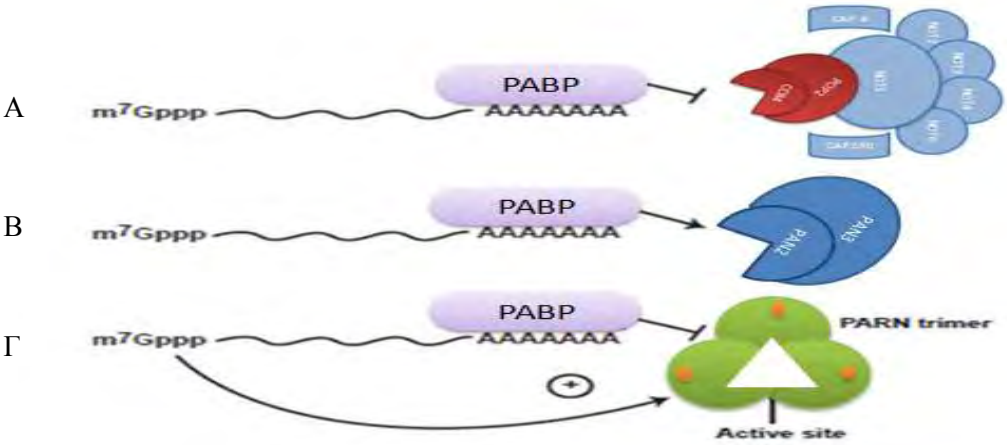
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

Πρόσφατες μελέτες στη Drosophila και σε κύτταρα θηλαστικών έχουν δείξει ότι η καταστολή γονιδίου μεσολαβούμενη από microRNA σχετίζεται με την αποαδενυλίωση και αποικοδομήση του mRNA και ότι συστατικά του μηχανισμού micro RNAs αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο CCR4-NOT (Fabian *και συν.*, 2009). Επιπλέον η δραστικότητα του συμπλόκου μπορεί να ρυθμίζεται μετά την στρατολόγησή του στο mRNA (Morozov *και συν.,* 2010).

Ένα άλλο σύμπλοκο αποαδευναλάσων που έχει ταυτοποιηθεί στη ζύμη και στα θηλαστικά είναι η PAN. Η PAN είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από τη καταλυτική PAN2 και τη ρυθμιστική PAN3 υπομονάδες Η αποαδενυλάση PAN2 προσδένεται στην PAN3 η οποία με την σειρά της αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη PABP. Η PABP ρυθμίζει την δράση του συμπλόκου προσελκύοντας το στην poly(A) ουρά, η οποία με την σειρά της αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη PABP (Uchida *και συν.*, 2004). Στις ζύμες και πιθανόν και σε άλλα ευκαρυωτικά κύτταρα, η PAN συμμετέχει στο πρώιμο στάδιο του μεταβολισμού του mRNA όπου η poly (A) ουρά μειώνεται κατά 55-75 νουκλεοτίδια, ανάλογα με τα mRNAs διαφόρων ειδών (Brown και Sachs, 1998). Στο S. cerevisiae το σύμπλοκο PAN2–PAN3 ενέχεται στην βράχυνση της poly (A) ουράς μήκους 60-80 νουκλεοτίδιων (Brown *και συν.*, 1996). Σε κύτταρα θηλαστικών, η PAN2 αφαιρεί την μισή ουρά, οπότε μέλη της POP2 και CCR4 αποικοδομούν την υπόλοιπη. Στα θηλαστικά, το σύμπλοκο PAN2-PAN3 πραγματοποιεί μια αρχική βράχυνση της poly (A) ουράς του μεταγράφου της β-γλοβίνης από το συνήθης μήκος 200 νουκλεοτιδίων σε 80 νουκλεοτίδια. Η αποαδενυλίωση σε αυτό το σημείο συνεχίζεται από ένα άλλο σύμπλοκο, το CCR4-NOT (Yamashita *και συν.*, 2005).

Η PARN έχει την κύρια ενεργότητα αποαδενυλάσης στα θηλαστικά σε συστήματα in vitro αποικοδόμησης mRNA. Ο ομοδιμερισμός της είναι απαραίτητος για την ενεργότητά της (Wu *και συν.*, 2005). Η δράση της ενισχύεται από την παρουσία της 5' καλύπτρας ενώ αναστέλλεται από προσδετώμενες πρωτεΐνες στη καλύπτρα (Gao *και συν*., 2000). Στα ωοκύτταρα του Xenopus laevis φαίνεται ότι η PARN εμπλέκεται στη αποαδενυλίωση των μητρικών mRNAs κατά την ωρίμανση καθώς επίσης είναι η κύρια αποαδενυλάση σε κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα που προέρχονται από διάφορες κυτταρικές σειρές (Korner *και συν.*, 1998˙ Opyrchal *και συν.*, 2005).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94



Εικόνα 2.3 : Σύμπλοκα ευκαρυωτικών αποαδενυλασών. Α) Το σύμπλοκο CC4R-POP2-NOT αναστέλλεται από την PABP και δεν αλληλεπιδρά με την 5' καλύπτρα. Β) Το σύμπλοκο PAN2-PAN3 ενεργοποείται από τη PABP και αλληλεπιδρά με την 5' καλύπτρα. Γ) Η PARN αναστέλλεται από τη PABP και ενεργοποιείται από την 5' καλύπτρα (Parker και Song, 2004).

Η ανθρώπινη ANGEL έχει βρεθεί να σχετίζεται με σύμπλοκα αποαδενυλίωσης και να διατηρεί τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου, ενώ η Ngl2, μια ορθόλογη της ANGEL στον μύκητα, είναι μία εξωνουκλεάση ((Wagner *και συν*., 2007˙ Faber *και συν.*, 2002). Η ανθρώπινη 2′PDE μπορεί να διασπά το poly(A) όταν το 5΄φωσφορικό κάθε αδενοσίνης είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με το 2' ή 3' υδροξύλιο. Πρόσφατα βρέθηκε ότι ο μοναδικός βιολογικός ρόλος της 2′PDE είναι η αποικοδόμηση του 2'-5' oligo(A) (Kubota *και συν,.* 2004).

Τα σύμπλοκα των αποαδενυλασών εκτός από τα ένζυμα αποαδενυλίωσης, έχουν παράγοντες που καταστέλλουν τη μετάφραση και ενισχύουν την αποικοδόμηση του mRNA. Η πολυλειτουργικότητα αυτή παρέχει ευκαιρίες για πολυάριθμα σημεία ρύθμισης της αποαδενυλίωσης, της μετάφρασης και της αποικοδόμησης των mRNAs, είτε ξεχωριστά είτε συντονισμένα (Goldstrohm και Wickens, 2008).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

2.8 Βιολογικές λειτουργίες

Οι αποαδενυλάσες έχουν διάφορες βιολογικές λειτουργίες. Κάποιες από αυτές είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των οργανισμών, ενώ μεταλλάξεις άλλων αποαδενυλασών παρουσιάζουν μια ποικιλία φαινοτύπων. Αρκετές αποαδενυλάσες συμμετέχουν στην εμβρυογένεση, στον κυτταρικό κύκλο, στην ανάπτυξη, στη γονιμότητα, στη μεταβολική ομοιόσταση. Για παράδειγμα η PARN της A. Thaliana και του X. laevis, η CCR4 της D.melanogaster και η CCF1 του C. elegans είναι απαραίτητες για την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη (Chiba *και συν.,* 2004˙ Korner *και συν.,* 1998˙ Morris *και συν.,* 2005˙ Molin *και συν.,* 2005). Στα θηλαστικά, υπερέκφραση της CNOT7 ή της CAF1Z ή αποσιώπηση της CNOT6L εμποδίζει την κυτταρική αύξηση (Morita *και συν.,* 2007˙ Bogdan *και συν.,* 1998). Οι μη καταλυτικές υπομονάδες του συμπλόκου CCR4-NOT, η CNOT1 και η CNOT3 είναι απαραίτητές για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά δεν συμβάλλουν στην κυτταρική επιβίωση. Επίσης οι υπομονάδες Ccr4a (CNOT6) και Ccr4b (CNOT6) του συμπλόκου CCR4-NOT αναστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο και τη γήρανση (Mittal *και συν.,* 2011). Επιπλέον depletions είτε της υπομονάδας CNOT1 είτε της CNOT2 επάγουν κυτταρικό θάνατο μέσω του ERstress (Ito *και συν.,* 2011 [a,b]).

οικογένεια	Βιολογικές λειτουργίες
DEED νουκλεάσες	
POP2	Καταστροφή DNA Κυτταρικό κύκλο (Sc)
	Ανάπτυξη Γονιμότητα (Ce)
	Κυτταρική μάζα Ρύθμιση miRNA (Dm)
	Σπερματογένεση Οστική μάζα (Mm)
	ND
CAF1Z	ND
PARN	Ωοκύτωση Ωρίμανση (Xl)
	NMD (Hs)
PAN2	Βράχυνση poly (A) Replication stress (Sc)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

EEP νουκλεάσες	
CCR4	Καταστροφή DNA Κυτταρικό κύκλο Replication stress (Sc)
	Ωογένεση (Dm)
	NMD (Mm)
	Κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Mm)
Nocturnin	Κιρκάδιος ρυθμός (Xl, Mm)
	Ομοιόσταση (Mm)
Angel	Επεξεργασία του 5,8S rRNA Πηγή άνθρακα (Sc)
2' PDE	Αποικοδόμηση του 2΄-5΄ oligo(A) από ιντερφερόνη (Hs)

Πίνακας 2: Ταξινόμηση αποαδενυλασών (Goldstrohm και Wickens, 2008).

Εξαιτίας της ικανότητας των αποαδενυλασών να στοχεύουν σε διακριτές ομάδες mRNA ώστε να ελέγχεται κάθε ομάδα από την δράση ενός ενζύμου καθώς επίσης και να δρουν στο ίδιο mRNA με διακριτές αλλά αλληλοεπικαλυπτόμενες δράσεις, δικαιολογείται η μεγάλη ποικιλότητα και ποικιλομορφία τους. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για να ταυτοποιηθούν όλες οι δραστικές αποαδενυλάσες και να διευκρινιστεί ο βιολογικός τους ρόλος (Goldstrohm και Wickens, 2008).

2.9 Ρύθμιση αποαδενυλίωσης mRNA

Η ρύθμιση της δραστικότητας των αποαδενυλασών είναι απαραίτητη, καθώς η ανεξέλεγκτη αποαδενυλίωση θα οδηγούσε στο θάνατο του κυττάρου.

Τα σταθερά και ενεργά μετάγραφα mRNA θα πρέπει να προστατευτούν από την αποαδενυλίωση ενώ τα ασταθή ή ελαττωματικά mRNA θα πρέπει να αποαδενυλιώνονται ή να αποικοδομούνται. Ο ρυθμός αποαδενυλίωσης ποικίλει στα διάφορα υποστρώματα mRNA για αυτό οι αποαδενυλάσεις ρυθμίζονται τόσο σε γενικό όσο και σε ειδικό επίπεδο (Goldstrohm και Wickens, 2008).

Η έκφραση των αποαδενυλασών και των ρυθμιστών τους υπαγορεύουν το χρόνο και το τόπο που θα συμβεί η ρύθμιση της αποαδενυλίωσης. Για παράδειγμα η έκφραση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

της Nocturnin είναι ρυθμική, ενδεχομένως ελέγχεται από τον κιρκάδιο ρυθμό. Άλλες αποαδενυλάσες όπως μέλη της οικογένειας POP2 και CCR4 είναι σταθερά και εκφράζονται ιδιοσυστατικά. Η αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας αποτελεί έναν άλλο τρόπο γενικού ελέγχου της αποαδευνυλίωσης. Σε συνθήκες στρες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, τα οξειδωτικά, η οσμωτική πίεση ή το θερμικό στρες, η έλλειψη γλυκόζης, η αποαδενυλίωση αναστέλλεται˙ ο μοριακός μηχανισμός που ρυθμίζει αυτή την αναστολή δεν είναι ακόμα γνωστός (Goldstrohm και Wickens, 2008).

Η αποαδενυλίωση επηρεάζεται επίσης από δύο μορφές χωρικού ελέγχου από τον πυρηνο-κυτταροπλασματικό διαχωρισμό των αποαδενυλασών και τον εντοπισμό τους στα P-bodies. Αρκετές αποαδενυλάσες μετακινούνται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Αλλαγές στη διαμερισματοποιησή τους μπορούν να επιφέρουν δραματικές συνέπειες, για παράδειγμα στα αμφίβια, η αποσύνθεση του πυρήνα κατά την μείωση απελευθερώνει την PARN στο κυτταρόπλασμα όπου και αποαδενυλιώνει μητρικά mRNAs (Goldstrohm και Wickens, 2008).

Ορισμένες αποαδενυλάσες έχουν εντοπιστεί σε ενδοκυτταρικά κοκκία. Τα κοκκία αυτά όπως τα γαμετοκύτταρα, τα νευρωνικά κοκκία και τα P-bodies περιέχουν mRNA μόρια σε καταστολή τα οποία μπορούν να ενεργοποιηθούν (Eulalio *και συν.*, 2007). Ενδεχομένως, ο συνεντοπισμός αποαδενυλασών και των υποστρωμάτων τους μπορεί να αυξήσει την κινητική της αποαδενυλίωσης. Η αποαδενυλίωση δεν περιορίζεται στα κοκκία γιατί οι ίδιες αποαδενυλάσες έχουν βρεθεί σε όλο το κυτταρόπλασμα.

Τα χαρακτηριστικά των mRNAs στόχων μπορούν επίσης να επηρεάσουν την αποαδενυλίωση. Η 5' cap μπορούν να επηρεάσει την αποαδενυλίωση διεγείροντας την ενεργότητα της PARN, ενώ δεν έχει επίδραση στην δράση άλλων αποαδενυλασών. Αυτή η μοναδική ιδιότητα μεσολαβείται από την άμεση αλληλεπίδραση της PARN με την 5 'cap του mRNA (Garneau *και συν.*, 2007). Σε ορισμένα mRNAs, η poly (A) ουρά μπορεί να προστατεύεται από τις αποαδενυλάσες μέσω ζευγαρώματος βάσεων. Για παράδειγμα η πλούσια σε ουριδίνη περιοχή στο πυρηνικό RNA της PAN στο σάρκωμα Kaposi, προκαλούμενο από τον ερπητοϊό, αποτρέπει την αποαδενυλίωση του με ζευγάρωμα βάσεων με την poly(A) ουρά (Conrad *και συν.*, 2007). Η πλούσια σε ουριδίνη περιοχή του mRNA Edc1 του S. cerevisiae μπορεί να λειτουργήσει παρομοίως (Muhlard και Parker, 2005).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

Επιπλέον η ρύθμιση ειδικών mRNAs εξαρτάται από συγκεκριμένες αλληλουχίες που εντοπίζονται στο 3' UTR και ενισχύουν την αποαδενυλίωση. Διάφοροι παράγοντες δεσμεύονται στις αλληλουχίες αυτές και στρατολογούν τις αποαδευλάσες. Παράγοντες όπως οι CUG-BP, PUF και CPEB, αλληλεπιδρούν άμεσα με τις αποαδενυλάσες και τις στρατολογούν στο mRNA (Goldstrohm και Wickens, 2008).

Η συνδυαστική δράση των ρυθμιστών επεκτείνει την πολυπλοκότητα των διαδικασιών αποαδενυλίωσης. Πολλαπλοί καταστολείς, είτε πρωτεΐνες είτε miRNAs, μπορούν να προσδένονται στο ίδιο mRNA 3′ UTR και σύμπλοκα να προσδένονται στο 3′-UTR μέσω διαφορετικών υπομονάδων. Επίσης η αποαδενυλίωση μπορεί να ελέγχεται με τροποποίηση της πρόσδεσης του ρυθμιστή με ένα mRNA ή την αποαδενυλάση ή με την αλληλεπίδραση ρυθμιστή-αποαδενυλάσης (Goldstrohm και Wickens, 2008).

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την αποαδενυλίωση είναι η PABP. Το υπόστρωμα των αποαδενυλασών, η poly (A) ουρά του mRNA, επικαλύπτεται με μόρια PABP που εμποδίζουν την πρόσβαση των αποαδενυλασών (Gorgoni και Gray, 2004). Η PABP του ζυμομύκητα αναστέλλει την δραστικότητα της απομονωμένης Ccr4 ενώ στα θηλαστικά αναστέλλει την PARN (Tucker *και συν*., 2002˙ Korner και Wahlel, 1997). Αντίθετα η ρυθμιζόμενη αποδέσμευση της PABP από την poly (A) ουρά ή η αλληλεπίδραση της PABP με μία αποαδενυλάση μπορεί να επάγει την αποαδενυλίωση. Η PABP μπορεί να ενεργοποιήσει την αποαδενυλίωση στρατολογώντας το σύμπλοκο PAN2–PAN3 στο mRNA στόχο. Στα θηλαστικά η PABP μπορεί να στρατολογήσει το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CCR4-CAF1-NOT, μέσω αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες TOB (Ezzedine *και συν.*,2007).

2.10 Ριβονουκλεάσες και καρκίνος

Η απορρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs μπορεί να οδηγήσει σε νεοπλασίες. Η μειωμένη αποικοδόμηση ογκογονιδίων mRNAs λόγω της αυξημένης δραστικότητας των σταθεροποιητικών πρωτεϊνών που συνδέονται με το mRNA ή της μειωμένης δραστικότητας των αποσταθεροποιητικών παραγόντων (destabilizer RBP) και των miRNAs που αναστέλλουν τη μετάφραση μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

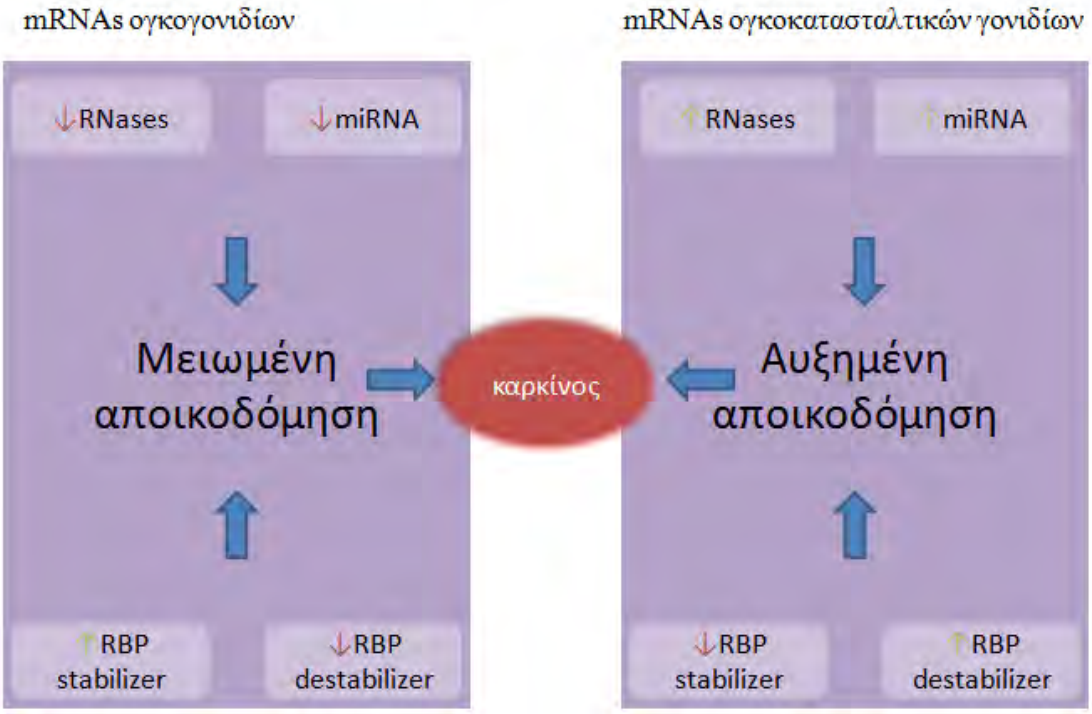
καρκίνου. Από την άλλη, η αυξημένη αποικοδόμηση των ογκοκατασταλτικών mRNAs λόγω αυξημένης δραστικότητας ριβονουκλεασών ή των miRNAs μπορεί επίσης να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου (εικόνα 4) (Kim και Lee, 2009).

Η αποαδενυλάση CCR4b του συμπλόκου CCR4–NOT επάγει την αύξηση των ινοβλαστών σε κυτταρικές σειρές ως πρώτο-ογκογονίδιο. Σε φυσιολογικές συνθήκες το ένζυμο αυτό ρυθμίζει τα επίπεδα του p27Kip1 mRNA, ενός ογκοκατασταλτικού που αναστέλλει κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες και προάγει τον κυτταρικό θάνατο. Σε κύτταρα όπου λείπει η CCR4b, τα επίπεδα του p27Kip1 αυξάνονται και αναστέλλεται η ανάπτυξη των κυττάρων. Ωστόσο δεν υπάρχει καμία μελέτη με αλλαγή των επιπέδων της CCR4b σε όγκους, ενώ δεν υπάρχουν μελέτες που να σχετίζουν μία πλεονάζουσα δράση του ενζύμου με τα επίπεδα ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε καρκινικές σειρές (Mortia *και συν.*, 2007).

Η CCR4d (ANGEL) ρυθμίζει την έκφραση του p21 μέσω του p53-ανεξάρτητου μονοπατιού. Η θετική ρύθμιση της p21 από τη Ccr4d και αναστολή της ανάπτυξης από την επίδραση της Ccr4d υποδηλώνουν ότι ενδεχομένως η Ccr4d να εμπλέκεται στην καρκινογένεση. Η Ccr4d υποεκφράζεται σε καρκίνους που προέρχονται από διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των νεφρών, της ουροδόχου κύστης, του αιδοίου, του προστάτη, θυρεοειδούς, δέρμα, λεπτό έντερο, και το πάγκρεας (Yi *και συν.*, 2012).

Η αποαδενυλιωτική ενεργότητα της PARN σε συνδυασμό με τις αποσταθεροποιητικές δράσεις των RBPs, μπορεί ενδεχομένως να ενεργήσει ως ογκοκαταστολέας, προκαλώντας αποικοδόμηση των mRNAs που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες όπως τον IL-8 και τον VEGF. Υπερέκφραση του αποσταθεροποιητικού παράγοντα TTP σε κακοήθη γλοιοκύτταρα, οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του RNA της IL-8 και του VEGF (Lai *και συν.*, 2003˙ Suswam *και συν.*, 2008). Μεταλλάξεις του TTP στα μεταστατικά γλοιοκύτταρα εμποδίζουν τη στρατολόγηση της PARN. Επίσης η PARN και το σύμπλοκο εξωσώματος στρατολογούνται από τις KSRP και DHAU με αποτέλεσμα να αποσταθεροποιούνται τα επίπεδα του c-jun και της uPA, τα οποία αυξάνονται στον καρκίνο (Tran *και συν.*, 2003). Η CUG-BP προσδένεται σε υποστρώματα mRNA και στρατολογεί τη PARN με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση των mRNAs των c-fos και TNF-alpha (Moraes *και συν.*, 2006).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94



Εικόνα 2.4: Μετά-μεταφραφικός έλεγχος στο καρκίνο. Οι δυσλειτουργικοί trans-acting παραγόντες στον μεταβολισμό του mRNA οδηγούν σε καρκινογένεση (Kim and Lee, 2009).

Πρόσφατα από το εργαστήριό μας ανακοινώνθηκε πως τα επίπεδα έκφρασης ορισμένων αποαδενυλασών, όπως της PARN και CNOT7, αλλάζουν την έκφρασή τους σε οξείες λευχαιμίες, τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και πρωτεΐνης. Προτάθηκε επίσης πως θα μπορούσε να διερευνηθεί η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν τα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων αυτών ως πιθανοί βιοδείκτες στο μέλλον (Maragozidis et al. 2012; Balatsos et al 2011).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

Σκοπός

Με βάση τις πρόσφατες παρατηρήσεις του εργαστηρίου μας στην έκφραση των αποαδενυλασών στις λευχαιμίες, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της βιολογικής σημασίας των αποαδενυλασών στο καρκίνο του πνεύμονα. Στόχος είναι να εξεταστεί αν οι αλλαγές στην έκφραση των ενζύμων αυτών αφορούν ένα γενικότερο φαινόμενο στον καρκίνο.

Για την προσέγγιση του σκοπού της εργασίας, επιχειρήθηκε η ανάλυση των επιπέδων mRNAs των αποαδενυλασών σε δείγματα ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο και πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα. Παράλληλα, αποσιωπήθηκε η έκφραση επιλεγμένων αποαδενυλασών σε καλλιέργειες κυττάρων από καρκίνο του πνεύμονα και εξετάστηκε η επίδρασή της στη γονιδιακή έκφραση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Υλικά

3.1.1 Χημικά

Antibiotic-Antimycotic	BIOSERA
Αγαρόζη	BIO-RAD
Αιθανόλη	MERCH
Αμπικιλλίνη	SIGMA
Bromophenol Blue	RESEARCH ORGANICS
β-μερκαπτοαιθανόλη	RIEDEL-DE HAEN
GelRed Nuclein Acid Stain	BIOTIUM
Γλυκερόλη	SDS
D(+) Γλυκόζη	PANREAC
Dimethyl sulfoxide DMSO	SIGMA
RPMI 1640	SIGMA
DNA KB marker	GEN SCRIPT
DNA marker 100 bp	INVITROGEN
Fetal Bovine Serum FBS	GIBCO
Ισοπροπανόλη	SCHARLAU
LB Agar	SCHARLAU
LB Broth	SCHARLAU
NaOH	MERCK
Οξικό οξύ	MERCK
Phosphate buffered saline PBS Tablets	CALBIOCHEM
Protease Inhibitors	ROCHE
Puromycin	SIGMA
Tris base	MERCK
Trypan blue solution 0,4%	SIGMA
Trypsin-EDTA 5% 10x	GIBCO

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

3.1.2 Kit

KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kit - Master Mix (2X) Universal	KAPA BIOSYSTEMS
NucleoSpin Plasmid QuickPure	MACHEREY NAGEL
PrimeScript™ 1st strand cDNA synthesis	TAKARA BIO
Total RNA Isolation kit Nucleospin	MACHEREY NAGEL
Xfect Transfection Reagent	CLONTECH

3.1.3 Διαλύματα

Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

• TAE (50x) Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης : Tris base 24,2% v/w , Οξικό οξύ 5,71% w/w , EDTA 0,05M , pH 8,6.

• Loading buffer (6x) Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων Bromophenol Blue 0,09%, Xylene Cyanol 0,09%, Γλυκερόλη 60%, EDTA 60mM.

3.1.4 Θρεπτικά μέσα

Θρεπτικά υλικά για την καλλιέργεια βακτηρίων

• Υγρό θρεπτικό μέσο (LB Broth) 0,5% v/w yeast extract, 1% v/w tryptone, 0,5% v/w NaCl, pH 7,2.

• Στερεό θρεπτικό μέσο (LB Agar) 0,5% v/w yeast extract, 1% v/w tryptone, 0,5% v/w NaCl, 1,5% agar, pH 7,2.

• SOC (υγρό θρεπτικό μέσο για μετασχηματισμό βακτηρίων) 0,5% v/w yeast extract, 1% v/w tryptone, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl,10 mM MgCl2, 10 mM MgSO4, 20mM glucose.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

Για την καλλιέργεια ανθρώπινων κυτταρικών σειρών

• Πλήρης θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιεργειών RPMI 1640 w/ 25 mM HEPES και όξινο ανθρακικό νάτριο, L- glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS), Antibiotic-Antimycoti (10000 units penicillin and 10000 μg streptomycin per ml).

• Διάλυμα ψύξης: 20% FBS, 10% DMSO, RPMI 1640.

3.1.5 Βακτηριακά στελέχη

DH5α (γονότυπος: F-φ80lacZΔM15 Δ(lacZY A-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 rela1 λ-).

3.1.6 Πλασμιδιακοί φορείς

Plko.1-puro: Ο φορέας pLKO.1-puro περιέχει γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλλίνη και την πουρομυκίνη για δυνατότητα επιλογής βακτηριακών και ευκαρυωτικών κυττάρων αντιστοίχως, που έλαβαν επιτυχώς το πλασμίδιο.

3.1.7 Κυτταρική σειρά

NCI-H 520: Ανθρώπινη καρκινική σειρά προερχόμενη από ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα. Συντήρηση κυττάρων σε θρεπτικό μέσο, RPMI 1640, w/L-glutamine, εμπλουτισμένο με 10 % FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic και επώαση στους 37˚C, σε 5 % CO_2.

3.1.8 Δείγματα

Πραγματοποιήθηκε λήψη παθολογικού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού με βρογχοσκόπηση από ασθενείς με μικροκυτταρικό και πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

	SCLC	SCC
Αριθμός δειγμάτων	10	22
Φύλο	Άνδρες	Άνδρες
Μ.Ο ηλικίας	64,3 (±6,9)	65,8 (±6,9)
Ιστορικό	Καπνιστές	Καπνιστές

Πίνακας 1: Αριθμός και προέλευση δειγμάτων.

3.1.9 Short-Hairpin RNAs (shRNAs)

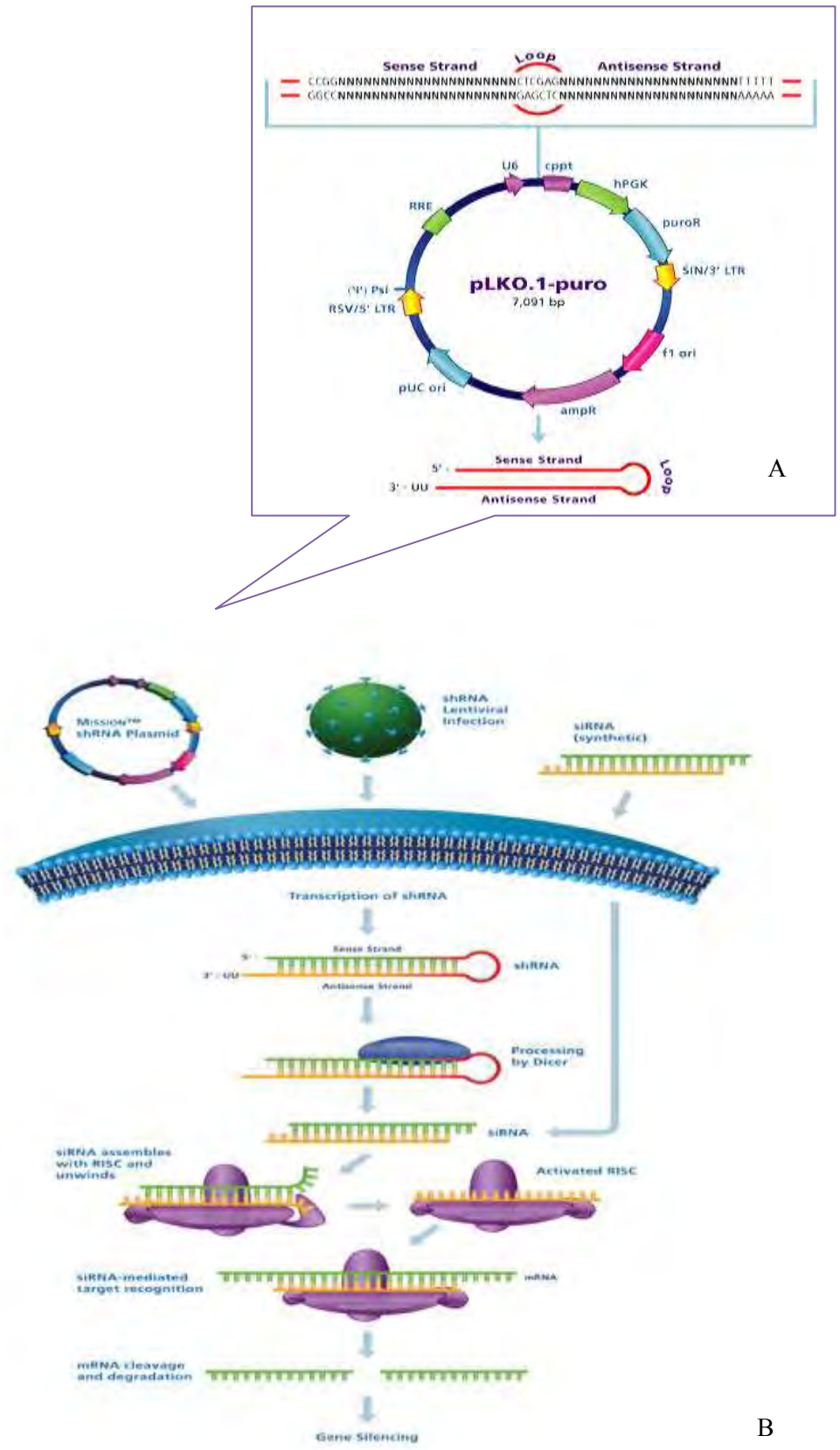
Για την αποσιώπηση της κάθε αποαδενυλάσης χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά shRNAs από τη Sigma, κλωνοποιημένα στο πλασμιδιακό φορέα pLKO.1-puro. Τα shRNAs και τα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου φορέα παρέχουν ένα ισχυρό μοριακό εργαλείο μακροπρόθεσμης, σταθερής αποσιώπησης του επιθυμητού γονιδίου, μέσω του συστήματος του RNAi καθώς και τη δυνατότητα αναγέννησης του πλασμιδίου μετά το μετασχηματισμό βακτηρίων με αυτό.

Ο μηχανισμός δράσης των shRNAs έγκειται στην in vivo μεταγραφή της κλωνοποιημένης στο φορέα αλληλουχίας του shRNA ενδοκυτταρικά και στην παραγωγή μικρών δίκλωνων μορίων RNA που φέρουν μια δευτεροταγή δομή φουρκέτας. Στη συνέχεια αυτά τα δίκλωνα μόρια επεξεργάζονται από τη Dicer και παράγουν μια ομάδα από siRNAs ειδικά για το ένα mRNA-στόχο.

Τα siRNAs αυτά στρατολογούνται στο σύμπλοκο RISC, που περιέχει τη νουκλεάση Argonaute καθώς και πληθώρα άλλων κυτταρικών παραγόντων. Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο siRISC, στο οποίο περιέχεται πλέον μόνο ο ένας κλώνος του siRNA μορίου, ο κλώνος οδηγός, καθοδηγείται στο στόχο mRNA και τον πέπτει.

Εκτός από τα τρία ειδικά και εξειδικευμένα shRNAs, έναντι του mRNA της κάθε αποαδενυλάσης, σχεδιάστηκε, μία ακόμη αλληλουχία shRNA, η οποία δεν στοχεύει κανένα γονίδιο εντός του κυττάρου και χρησιμοποιείται ως αρνητικό control (Non target shRNA control vector). Η αλληλουχία αυτή περιέχει τέσσερις αναντιστοιχίες ζευγών βάσεων, για κάθε γνωστό ανθρώπινο γονίδιο. Αυτό μας επιτρέπει να εξετάσουμε την επίδραση της διαμόλυνσης του κυττάρου με ένα shRNA, στη γονιδιακή έκφραση και να ερμηνεύσουμε συγκριτικά την επίδραση της αποσιώπησης που επιτυγχάνεται με τη χρήση των ειδικών shRNAs.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94



Εικόνα 1: Α. Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pLKO.1- puro. Β. Μηχανισμός αποσιώπησης μέσω πλασμιδιακών φορέων που μεταγράφουν shRNAs (Sigma).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

Αλληλουχία θηλιάς (5′→3)	Αλληλουχία των 3 shRNAs
shRNAs έναντι της CNOT6	
CTCGAG	CCGGGCTTTGCATTTGAGTGACAATCTCGAGATTGTCACTCAAATGCAAAGCTTTTTG
CTCGAG	CCGGCCAGGATATATTGAACCTTTACTCGAGTAAAGGTTCAATATATCCTGGTTTTTG
CTCGAG	CCGGGCAACCTCAAATCCAGTGTTTCTCGAGAAACACTGGATTTGAGGTTGCTTTTTG
shRNAs έναντι της CNOT6L	
CTCGAG	CCGGCCGGTACAAGCAGACTCTATACTCGAGTATAGAGTCTGCTTGTACCGGTTTTTG
CTCGAG	CCGGCCAAGAGGTGGACCACTATTTCTCGAGAAATAGTGGTCCACCTCTTGGTTTTTG
CTCGAG	CCGGTTTAATCACAGGAGTCTATTTCTCGAGAAATAGACTCCTGTGATTAAATTTTTG
shRNAs έναντι της CNOT7	
CTCGAG	CCGGGCTACTAACAACATCTGGTATCTCGAGATACCAGATGTTGTTAGTAGCTTTTT
CTCGAG	CCGGGCTGACTATCAATACCAACTACTCGAGTAGTTGGTATTGATAGTCAGCTTTTT
CTCGAG	CCGGCGGTGTAATGTAGACTTGTTACTCGAGTAACAAGTCTACATTACACCGTTTTT

Πίνακας 2: : Χαρακτηριστικά των σχεδιασμένων shRNAs έναντι των αποαδευναλασών. Με πράσινα και μπλε γράμματα παρουσιάζονται το 5’ και 3’ άκρο αντίστοιχα, ενώ με κόκκινα η αλληλουχία της φουρκέτας. Εκατέρωθεν αυτής, με μαύρα γράμματα η κωδική και μη κωδική αλληλουχία.

3.1.10 Εκκινητές

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης της των αποαδενυλασών καθώς και των υπόλοιπων παραγόντων που εξετάστηκαν χρησιμοποιήθηκων οι εκκινητές που παρουσιάζονται στον Πίνακα . Ο κάθε εκκινητής ελέγχθηκε ως προς την εξειδίκευση του για το αντίστοιχο cDNA-στόχο, με το πρόγραμμα Blastn.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

Παράγοντας	Βιολογική λειτουργία	Primers (5'→3') Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
ANGEL1	Ανήκει στην EEP υπεροικογένεια αποαδενυλασών. Υπάρχει σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Goldstrohm A. and Wickens M., 2008)	Fwd AGCATAGCACCTGAGCCTGT Rev GGTCCTGAGCCAGGATGTTA 220bp
ANGEL2	Ανήκει στην EEP υπεροικογένεια αποαδενυλασών. Υπάρχει σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Goldstrohm A. and Wickens M., 2008)	Fwd GTGTTGCCCACCAGAAAGAT Rev GGGGCCAAATTGGAATAGAT 195bp
PARN	Ανήκει στην DEDD υπεροικογένεια αποαδενυλασών (Goldstrohm A. και Wickens M., 2008)	Fwd GACCCCTCCCAGAAAGCTAC Rev GGGGCACTTTGTCTCAACAT 236bp
PARNL (PNLDC1 poly(A)-specific ribonuclease (PARN)-like domain containing 1)	Ανήκει στην DEDD υπεροικογένεια αποαδενυλασών (Goldstrohm A. and Wickens M., 2008	Fwd GACCCCTCCCAGAAAGCTAC Rev GGGGCACTTTGTCTCAACAT 236bp
CNOT6 (CCR4-NOT transcription complex, subunit 6)	Αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (Lau *και συν.,* 2009)	Fwd AGCTGTCATGGGAAGAATGG Rev GGGCAGCCACTGATGTTATT 221bp
CNOT6L (CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like)	Αποτελεί μεταβλητή υπομονάδα του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (Lau *και συν.,* 2009)	Fwd CGGCTCTTCCAGCTACAAAC Rev GGAAGCTGCTCTGGATGAAC 143bp
CNOT7	Ανήκει στην DEDD υπεροικογένεια (Goldstrohm A. και Wickens M., 2008)	Fwd GTCCTCTGTGAAGGGGTCAA Rev GACTGCTTGTTGGCTTCTC 419bp
CNOT8 (CCR4-NOT transcription complex, subunit 8)	Αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (Lau *και συν.,* 2009)	Fwd GGATTTGCAGAGGATTGGAA Rev TCACTGCTGCATGTTGTTGA 232bp

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

NOCTURNIN **(CCR4 carbon catabolite repression 4-like)**	Αποαδενυλάση κατηγορίας EEP, εξαρτώμενη από δισθενή κατιόντα Mg2+. Υπόκειται σε κιρκάδιο έλεγχο (Goldstrohm A. και Wickens M., 2008)	Fwd GCCAAGACACTGAACAGCAG Rev GGCAATCTGTCCTCAGATCC 175bp
PAN2	Ανήκει στην υπεροικογένεια DEDD αποαδενυλασών. Αποικοδομεί το μισό μήκος της πολύ(Α) ουράς μέσα στον πυρήνα, ενώ το υπόλοιπο μέρος αποικοδομείται από τις αποαδενυλάσες CAF1 και CCR4 στο κυτταρόπλασμα (Goldstrohm A. και Wickens M., 2008)	Fwd CTCATCGGGGGACTCTGTTA Rev CCAGGCCTGTGTATTCTGGT 205bp
b-actin	Η β- ακτίνη είναι μία από τις 6 διαφορετικές ισομορφές ακτίνης που έχουν ταυτοποιηθεί στους ανθρώπους. Είναι μία από τις δύο ακτίνες του κυτταροσκελετού, που δεν βρίσκονται στους μύες. Είναι υψηλά διατηρημένη πρωτεΐνη και εμπλέκεται στην κινητικότητα, τη δομή και την ακεραιότητα του κυττάρου. Τα επίπεδά της παραμένουν σταθερά και χρησιμοποιείται έτσι, σαν control, μεταξύ άλλων, όσων αφορά την ακεραιότητα των κυττάρων, την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και σε τεχνικές όπως Western Blotting (“Entrez Gene: ACTB actin, beta”)	Fwd GGACTTCGAGCAAGAGATGG Rev AGCACTGTGTTGGCGTACAG 234 bp
18S rRNA	Μέλος του ριβοσωμικού RNA. Αποτελεί συστατικό της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας 40S. Εϊναι το ευκαρυωτικό πυρηνικό ομόλογο του 16S rRNA των προκαρυωτών και των μιτοχονδρίων. Είναι ένα από τα βασικά συστατικά όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων. Δεν έχει πολυ(Α) ουρά, καθώς δεν μεταφράζεται και θεωρείται ως housekeeping gene, γιατί τα επίπεδά του εντός του κυττάρου παραμένουν σταθερά (Lewin, GENES VIII)	Fwd AGAAGGCTGGGGCTCATTTG Rev AGGGGCCATCCACAGTCTTC 253 bp

Πίνακας 3: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη REAL TIME PCR.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Ηλεκτροδιάτρηση δεκτικών κυττάρων DH5a (E.coli) με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 (puro-amp)

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

3.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

Βακτηριακά κύτταρα DH5a (συνήθως από stock γλυκερόλης) ενοφθαλμίζονται σε 5ml LB broth που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί επώαση των καλλιεργειών για 12-14h στους 37^{o}C υπό ανάδευση (210 rpm). Η ακόλουθη διαδικασία πραγματοποιείται με βάση το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από κύτταρα E. coli, NucleoSpin Plasmid QuickPure:

Καλλιέργεια και συλλογή των βακτηριακών κυττάρων:

Μεταφέρονται 1,5ml από την καλλιέργεια E. coli που αναπτύχθηκε σε ένα σωλήνα και φυγοκεντρούνται για 1min στις 14000 x g. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται αυτό το βήμα.

Λύση των κυττάρων:

Προστίθενται 250μl buffer A1 και επαναδιαλύεται το ίζημα με τη βοήθεια πιπέτας και έντονη ανάδευση στο vortex. Ακολουθεί προσθήκη 250μl buffer A2 και ανάμειξη αναποδογυρίζοντας ήπια μερικές φορές χωρίς τη χρήση του vortex. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά. Ακολούθως προστίθενται 300μl buffer A3 και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση αναποδογυρίζοντας μερικές φορές (6-8) αποφεύγοντας τη χρήση του vortex. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 11000 x g σε θερμοκρασία δωματίου.

Δέσμευση του DNA:

Τοποθετείται η στήλη NucleoSpin Plasmid QuickPure σε ένα συλλεκτικό σωλήνα (collecting tube) των 2ml στην οποία φορτώνεται το υπερκείμενο που έχει προκύψει από τη φυγοκέντρηση του προηγούμενου βήματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 x g και απομάκρυνση του εκλούσματος.

Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης:

Επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα και προστίθενται 450μl buffer AQ (με αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 11000 x g όπου και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

επιτυγχάνεται ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης. Τέλος, πραγματοποιείται απομάκρυνση του εκλούσματος και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα.

Έκλουση του DNA:

Τοποθετείται η στήλη σε νέο σωλήνα και προστίθενται 50μl buffer AE. Στη συνέχεια, επωάζεται το δείγμα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 x g.

3.2.3 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με X-fect

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

1. Αρχικά μια μέρα πριν τη διαμόλυνση σε κάθε T25 flask τοποθετούμε κύτταρα σε πληρότητα 40-50%.
2. Για κάθε flask ετοιμάζονται δύο διαλύματα:

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

3. Ανακινούμε καλά το κάθε tube.
4. Για την παρασκευή του διάλυμα διαμόλυνσης (transfection mix) αναμιγνύουμε το tube 1 με το tube 2 και ανακινούμε για 10 sec.
5. Τα αφήνουμε να επωαστούν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου
6. Παράλληλα απομακρύνουμε από κάθε flask το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και ξεπλένουμε τα κύτταρα με κρύο και αποστειρωμένο PBS 1X δύο φορές. Πριν την προσθήκη του transfection mix προσθέτουμε 2ml θρεπτικού υλικού χωρίς αντιβιοτικά-αντιμυκοτικά και χωρίς ορό (FBS) σε κάθε flask .

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

7. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης του transfection mix, μοιράζουμε 400 μl στα κύτταρα που προορίζονται για διαμόλυνση και αφήνουμε τη flask να επωαστεί στους 37^{o}C.
8. Μετά από 12h απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από τα διαμολυσμένα κύτταρα και το αντικαθιστούμε με RPMI 1640 10% FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic το οποίο περιέχει επιπλέον και το αντιβιοτικό επιλογής (στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πουρομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 1-10μg/ml θρεπτικού υλικού. Πραγματοποιήσαμε τέστ ανθεκτικότητας των NCI-H520 στην πουρομυκίνη και η βέλτιστη συγκέντρωση, στην οποία απεβίωσε το 100% των κυττάρων που δεν φέρουν πλασμίδιο ανθεκτικότητας σε 48h μετά την αρχική έκθεση, είναι 5μg/ml).
9. Μετά από 72h συλλέγουμε τα κύτταρα.

3.2.4 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών

Για την απομόνωση ολικού RNA από τα επεξεργασμένα με shRNAs κύτταρα που συλλέχθηκαν με το πρωτόκολλο της παραγράφου 3.2.4, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό Total RNA Isolation kit Nucleopsin RNAII της Macherey Nagel. Η διαδικασία απομόνωσης είναι βασισμένη στην μέθοδο των Chomczynski και Sacchi στην οποία χρησιμοποιείται στο αρχικό στάδιο της ομογενοποίησης ιστού και εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων σε όξινο φαινολικό διάλυμα θειοκυανικής γουανιδίνης. Αρχικά περίπου 30 mg από κάθε δείγμα ομογενοποιούνται με την προσθήκη 350 μL διαλύματος RA1 παρουσία 3.5 μL β-μερκαπτοαιθανόλης. Το ομογενοποίημα τοποθετείται σε ειδικές στήλες οι οποίες επιτρέπουν το φιλτράρισμα του δείγματος μετά από φυγοκέντρηση στις 11000 x g για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διηθημένο μίγμα μεταφέρεται σε νέους αποστειρωμένους σωλήνες eppendorf, στο οποίο προστίθενται 0.350 ml αιθανόλης 70%. Ακολουθεί δέσμευση του ολικού RNA σε μικρές στήλες χρωματογραφίας και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8000 x g για 30 sec σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απομάκρυνση τυχόν αλάτων με ειδικό διάλυμα (Membrane Desalting Buffer, MDB) και επώαση του δείγματος παρουσία

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

DNAασης I , για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το βήμα αυτό εξασφαλίζει την ελάχιστη δυνατή επιμόλυνση του δείγματός μας με γονιδιωματικό DNA, γεγονός το οποίο θα επηρέαζε την τελική ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR. Ακολουθούν σταδιακές φυγοκεντρήσεις του δείγματος, κατά τις οποίες απομακρύνονται τα παραπροϊόντα της πέψης με την DNAάση I.

Τέλος, ακολουθεί έκλουση του ολικού RNA του δείγματος με H_2O ελεύθερο ριβονουκλεασών (RNase-free ή DEPC-treated water). Κάθε δείγμα RNA που απομονώνεται ελέγχεται για τυχαία υδρόλυση μετά από ανάλυση τόσο σε πηκτή αγαρόζης 0,8% όσο και σε πηκτή αγαρόζης 1,2% παρουσία φορμαλδεΰδης και φυλάσσεται στους -80°C.

1	Supply sample		Use up to 5 x 10^6 cultured cells or 5 mg tissue samples
2	Lyse and homogenize cells		100 µl RA1 2 µl TCEP Mix
3	Add Carrier RNA		5 µl Carrier RNA working solution Mix
4	Filtrate lysate *(optional)*		11,000 x *g* 30 s
5	Adjust RNA binding condition		100 µl 70% ethanol Mix
6	Bind RNA		Load lysate 11,000 x *g* 30 s
7	Desalt silica membrane		100 µl MDB 11,000 x *g* 30 s
8	Digest DNA		25 µl DNase reaction mixture RT 15 min
9	Wash and dry silica membrane		1st wash 100 µl RA2 RT, 2 min 11,000 x *g*, 30 s 2nd wash 400 µl RA3 11,000 x *g*, 2 min 3rd wash 200 µl RA3 11,000 x *g*, 2 min
10	Elute highly pure RNA		10 µl RNase-free H_2O 11,000 x *g* 30 s

Εικόνα 3.1: Συνοπτική παρουσίαση του πρωτοκόλλου απομόνωσης ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

3.2.5 Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου δύο βημάτων (RT-qPCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού γονιδιακής έκφρασης. Είναι μία ιδιαίτερα 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 στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα ή σε δύο βήματα (two-steps) όπου η αντίστροφη μεταγραφή και η ενίσχυση του παραγόμενου cDNA πραγματοποιούνται σε διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Η one step Real time PCR θεωρείται ότι μειώνει την πειραματική απόκλιση γιατί οι ενζυμικές αντιδράσεις συμβαίνουν στο ίδιο σωληνάκι. Ωστόσο αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί ως μήτρα το RNA, το οποίο είναι επιρρεπές σε αποικοδόμηση. Για το λόγο αυτό εφαρμόσαμε τη δεύτερη μέθοδο, Real-time PCR δύο βημάτων, ή αλλιώς RT-qPCR.

<u>1^{ο} Βήμα: Σύνθεση του cDNA κλώνου</u>

Για τη μετατροπή του ολικού RNA σε cDNA που η χρησιμοποιήθηκε προκειμένου στη συνέχεια να πολλαπλασιαστεί σε απλή PCR χρησιμοποίηθηκε το Prime 1st Strand Cdna Synthesis Kit της εταιρίας Takara. Η αντίστροφη μεταγραφάση που χρησιμοποιήθηκε απομονώνεται από τον Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) και μπορεί να συνθέσει cDNA μήκους μέχρι και 12000 βάσεων.

1. Ετοιμάζουμε σε ένα μικρό eppendorf τα εξής:

Αντιδραστήρια	Όγκος
Oligo dT Primer (50 μM)*	1.0 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	1.0 μl
Template RNA	(Ολικό RNA : < 5 μg*, πολυ(A)$^{+}$ RNA : < 1 μg**)
RNase free dH_2O	μέχρι 10 μl

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

*Σε περίπτωση που θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε ειδικούς εκκινητές για κάποιο γονίδιο, όπως παραδείγματος χάριν το 18S rRNA που δεν έχει πολυ(Α) ουρά, η τελική συγκέντρωση του εκκινητή πρέπει να είναι 2pmol.
**Στην παρούσα εργασία η μήτρα RNA που χρησιμοποιούμε έχει συγκέντρωση 400ng/rxn.

2. Το μίγμα θερμαίνεται στους 65ο C για 5 min ώστε να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA και να γίνει η πρόσδεση των εκκινητών στο στόχο και στη συνέχεια τοποθετείται κατευθείαν στον πάγο
3. Στη συνέχεια προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια, μέχρι τον τελικό όγκο που είναι 20 μl.

Αντιδραστήρια	Όγκος
Template RNA Primer Mixture	μέχρι 10.0μl
5 X PrimeScript™ Buffer	4 μl (1X)
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0.5 μl (20 units)
PrimeScript™ RTase (200 U/μl)	1.0 μl (200 units)
RNase free dH_2O	μέχρι 20.0 μl

2ο Βήμα: Real Time PCR

Κατά την Real Time PCR, πραγματοποιείται η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος καθ'όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης και καταγραφής της αύθξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Ευρέως χρησιμοποιούμενη ουσία αποτελεί η SYBR green1 η οποία διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497nm και εκπέμπει στα 520 nm. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της SYBR green είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών , για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας – στόχο, ενώ σημαντικό μειονέκτημά της είναι ότι προσδένεται σε όλα τα δίκλωνα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης., στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύπτουν. Ωστόσο ο σωστός σχεδιασμός ειδικών εκκινητών καθώς και η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, μπορούν να συμβάλλουν στην αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών. Η ένταση φθορισμού μετράται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μία καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει την παρακολούθηση ολόκληρης της διαδικασίας της αντίδρασης από τον ερευνητή. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase) , σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την αντίδραση συστατικά βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Στη συνέχεια επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία ορισμένα από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται , σταδιακά και αναστολείς της αντίδρασης, Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητά της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau).

Στη συγκεκριμένη εργασία η μελέτη των επιπέδων έκφρασης αποαδενυλασών και καρκινικών παραγόντων πραγματοποιήθηκε με την ποσοτική PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ″KAPA^{TM} SYBR® FAST qPCR Kit – Master Mix (2X) Universal″. Στις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ως χρωστική αναφοράς η ROX και ως εσωτερικό control για την κανονικοποίηση του σήματος των ειδικών προϊόντων, το ιδιοσυστατικό γονίδιο της β-ακτίνης και του 18S rRNA. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε cDNA, από ολικό RNA απομονωμένο από τα εξεταζόμενα δείγματα. Οι ποσότητες των επιμέρους αντιδραστηρίων των αντιδράσεων και οι συνθήκες αυτών παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 4 και 5).

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

Πίνακας 4: Συστατικά αντίδρασης qPCR.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

qPCR steps	Cycling conditions	
Denaturation (Hot Start)	95°C, 3min	(1 cycle)
Amplification	95°C, 3sec 60°C, 30sec 72°C, 11sec	(40 cycles)
Dissociation	95°C, 1min 55°C, 30sec 95°C, 30sec	(1 cycle)
	25°C, 3min	(1 cycle)

Πίνακας 5: Συνθήκες αντίδρασης qPCR για την ενίσχυση των επιλεγμένων παραγόντων

3.2.6 cDNA Μικροσυστοιχίες (Microarrays)

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

1. Κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 που φέρει μία αλληλουχίες shRNA έναντι των αποαδενυλασών CNOT6, CNOT6L και CNOT7.
2. Κύτταρα αγρίου τύπου (MW).
3. Κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 που δεν φέρει κάποια αλληλουχία shRNA (MV).
4. Κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 που φέρει μία αλληλουχία shRNA η οποία δεν στοχεύει κανένα mRNA εντός του κυττάρου (MSH).

Τα δείγματα 2, 3 και 4 χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (control). Τα δείγματα RNA στα οποία έγινε ανάλυση του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης, υβριδίστηκαν σε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

μικροσυστοιχία ολιγονουκλεοτιδίων-Whole Human Genome Agilent 4X44K oligonucleotide Microarray (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA). Η απομόνωση, ο καθαρισμός, η ενίσχυση, η σήμανση και ο υβριδισμός στην πλατφόρμα (Agilent 44K Human Whole Genome microarrays) των δειγμάτων RNA, καθώς και η σάρωση των αρχείων εικόνας, πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η κανονικοποίηση των δεδομένων έγινε μέσω του προγράμματος Feature Extraction (v. 10.7.3.1).

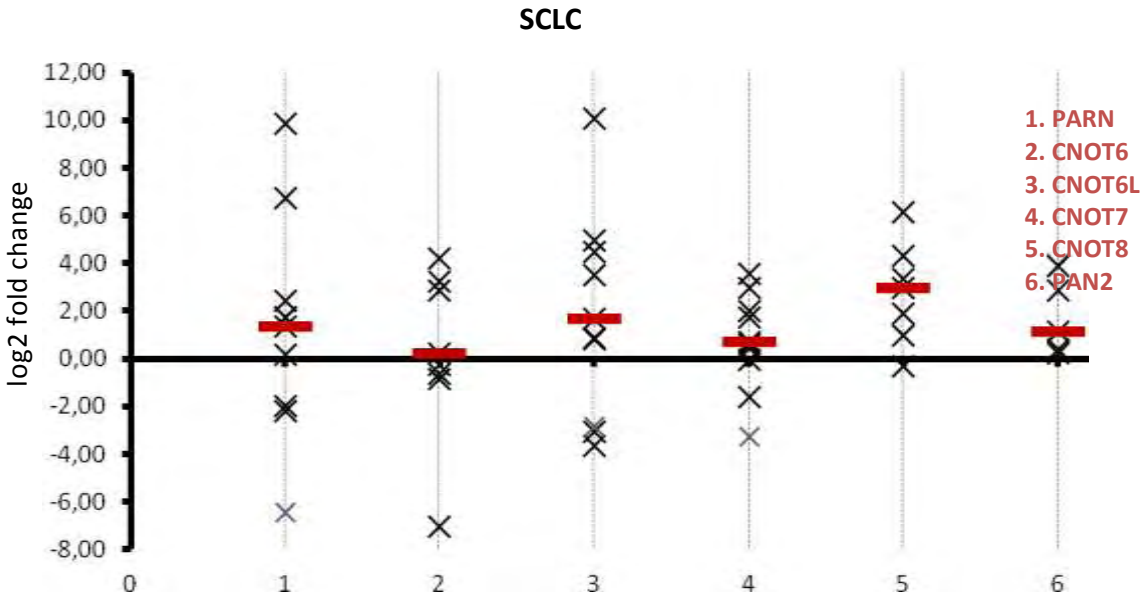
Βιοπληροφορική: Έγινε ανάλυση της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης (fold-change analysis), προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα γονίδια τα οποία εκφράζονται διαφορικά στις δύο ομάδες σύγκρισης (κάθε δείγμα συγκρίθηκε με τα mock κύτταρα (MS), έτσι ώστε να αποκλείονται οι μεταβολές που οφείλονται στην επαγωγή του μηχανισμού RNAi). Μόνο τα γονίδια που παρουσιάζουν τιμές >2-fold change, θεωρούνται ότι μεταβάλλονται σημαντικά. Η βάση δεδομένων GSEA (Gene Set Enrichment Analysis), χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση λειτουργικών ομάδων γονιδίων. Οι επιλεγμένες ομάδες συγκρίθηκαν με ομάδες γονιδίων που συμμετέχουν σε κυτταρικά μονοπάτια τα οποία είναι καταχωρημένα στις βάσεις: BioCarta, KEGG και REACTOME.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

4. Αποτελέσματα

4.1 Επίπεδα έκφρασης mRNA αποαδενυλασών σε ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα με quantitive Real Time PCR (qRT-PCR)

Πραγματοποιήθηκε λήψη παθολογικού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού με βρογχοσκόπηση από ασθενείς με μικορκυτταρικό του πνεύμονα. Μελετήθηκαν 10 δείγματα και μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των αποαδευναλασών με qRT-PCR. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται δείγμα από μη παθολογικό ιστό του ιδίου ασθενούς. Αύξηση των επιπέδων έκφρασης παρατηρήθηκε στις αποαδενυλάσες PARN, CNOT6L, CNOT7, CNOT8, PAN2.



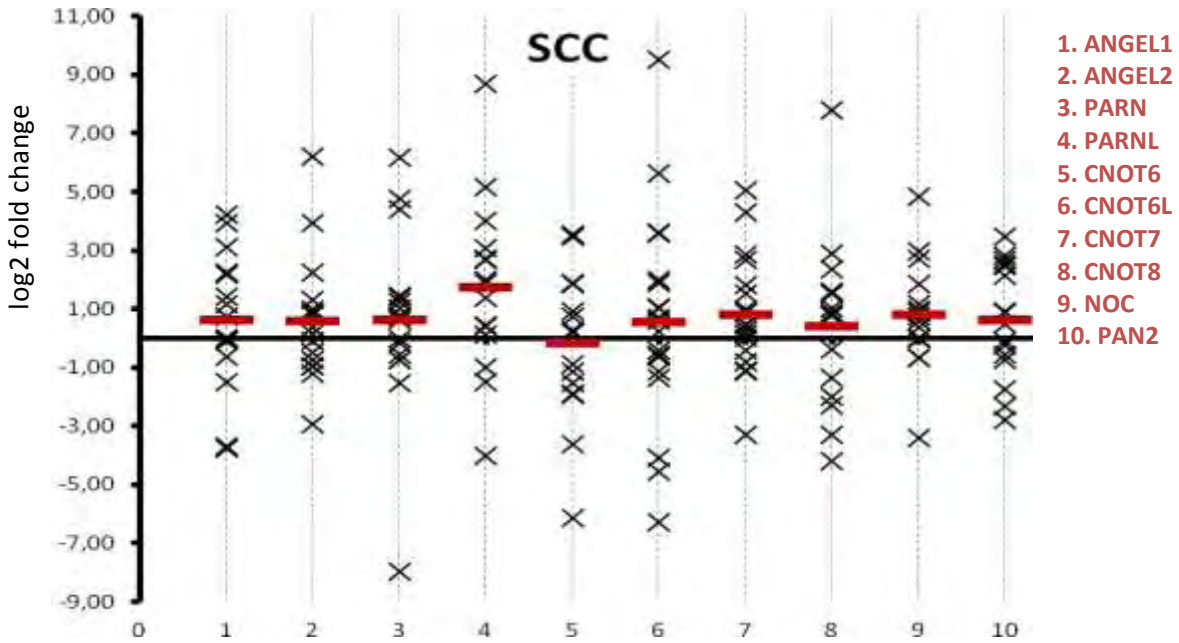
DeAs	PARN	CNOT6	CNOT6L	CNOT7	CNOT8	PAN2
Average	1,32	0,21	1,68	0,70	2,94	1,16

Εικόνα 4.1: Επίπεδα έκφρασης αποαδενυλασών και ο μέσος όρος έκφρασης (—) σε δείγματα από 11ασθενείς με SCLC. Τα σημεία που εμφανίζονται αντιστοιχούν στη έκφραση αποαδενυλασών στον παθολογικό ιστό σε σχέση με την αντίστοιχη επί του φυσιολογικού ιστού (log2fold change).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

4.2 Επίπεδα έκφρασης mRNA αποαδενυλασών σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα με quantitive Real Time PCR (qRT-PCR)

Πραγματοποιήθηκε λήψη παθολογικού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού με βρογχοσκόπηση από ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα. Μελετήθηκαν 22 δείγματα και μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των αποαδευναλασών με qRT-PCR. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται δείγμα από μη παθολογικό ιστό του ιδίου ασθενούς. Η ανάλυση έδειξε πως η έκφραση των αποαδενυλασών αλλάζει σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες. Ειδικότερα, οι περισσότερες αποαδενυλάσες έδειξαν διαφοροποίηση στην έκφρασή τους σε σύγκριση με τους μάρτυρες, όπως η αύξηση των ANGEL1, ANGEL2, PARN, CNOT7 και CNOT8 και μείωση της CNOT6L. όπως η αύξηση των ANGEL1, ANGEL2, PARN, PARNL και CNOT7 και μείωση της CNOT6L. Ενώ τα επίπεδα έκφρασης της CNOT6 και δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφοροποίηση.



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

DeAs	ANGEL1	ANGEL2	PARN	PARNL	CNOT6	CNOT6L	CNOT7	CNOT8	NOC	PAN2
Average	0,62	0,59	0,64	1,74	-0,16	0,57	0,81	0,41	0,82	0,61

Εικόνα 4.2: Επίπεδα έκφρασης αποαδενυλασών και ο μέσος όρος έκφρασης (—) σε δείγματα από 22 ασθενείς με SCC. Τα σημεία που εμφανίζονται αντιστοιχούν στην έκφραση των αποαδενυλασών στον παθολογικό ιστό σε σχέση με την αντίστοιχη επί του φυσιολογικού ιστού (fold change).

4.3 cDNA Μικροσυστοιχίες

Για να εξετάσουμε την επίδραση της αποσιώπησης στο γονιδίωμα και πιθανά μονοπάτια που επηρεάζονται από τις αποαδενυλάσες πραγματοποιήσαμε ανάλυση μικροσυστοιχιών. Παρουσιάζεται η ανάλυση των δεδομένων για τρεις από αυτές, τις CNOT6, CNOT6L και CNOT7, που έδειξε ότι η αποσιώπηση της CNOT6 οδήγησε σε μεταβολές των επιπέδων 1117γονιδίων (διαφορική έκφραση >2-fold συγκριτικά με τα MS, $p<0,05$), εκ των οποίων τα 112 δείχνουν μείωση και τα 1005 αύξηση. Ως αποτέλεσμα της αποσιώπησης της CNOT6L μειώνονται σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης 185 γονιδίων και αυξάνονται 646 γονιδίων. Στην αποσιώπηση της CNOT7 μειώθηκαν τα επίπεδα έκφρασης 213 ενώ αυξήθηκαν 680. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα κυτταρικά μονοπάτια που φαίνεται να επηρεάζονται είτε θετικά (up-regulated), είτε αρνητικά (down-regulated).

MV vs MSH

Όνομα μονοπατιού	Μέγεθος	NOM p-val	FDR q-val
ACE2PATHWAY	12	0,002484472	0,23531255

A. Θετικά σχετιζόμενα μονοπάτια

Όνομα μονοπατιού	Μέγεθος	NOM p-val	FDR q-val
CALCINEURINPATHWAY	18	0	0,08046725

B. Αρνητικά σχετιζόμενα μονοπάτια

Πίνακας 1:Α. Θετικά σχετιζόμενα μονοπάτια Β. Αρνητικά σχετιζόμενα μονοπάτια

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

Στην πρώτη καταγράφονται τα μονοπάτια που απορρυθμίζονται στα MV δείγματα συγκρινόμενα με τα MSH. Στις επόμενες στήλες αναφέρεται το μέγεθος (ο αριθμός των γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι), η p value (στατιστική παράμετρος/ τιμές < 0.05 υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα) και η FDR value (false discovery rate, στατιστική μέθοδος/ τιμές <0.25 υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα).

T-CNOT6 vs MSH

Όνομα μονοπατιού	Μέγεθος	NOM p-val	FDR q-val
NEUTROPHIL PATHWAY	8	0	0,042454444
DC PATHWAY	20	0	0,040114745
HSA00591 LINOLEIC ACID METABOLISM	31	0	0,03396627
MONOCYTE PATHWAY	11	0	0,03835693
LYMPHOCYTE PATHWAY	9	0	0,04242203
GAMMA HEXACHLOROCYCLOHEXANE DEGRADATION	27	0,0037546933	0,13010617
COMP PATHWAY	15	0,005524862	0,11827622
CYTOKINE PATHWAY	19	0,009536785	0,17123464
HSA04640 HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE	87	0,0010976949	0,16245124
BENZOATE DEGRADATION VIA COA LIGATION	9	0,010510511	0,16180834
TRYPTOPHAN METABOLISM	50	0,002361275	0,1684694
HSA04610 COMPLEMENT AND COAGULATIN CASCADES	68	0,0033259424	0,15924191
PEPTIDE GPCRS	66	0,0011185682	0,14943996
COMPLEMENT ACTIVATION CLASSICAL	12	0,004237288	0,15484977
LAIR PATHWAY	16	0,009497965	0,14649454
HSA00940 PHENYLPROPANOID BIOSYNTHESIS	7	0,0060790274	0,13939546

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

HSA03010 RIBOSOME	67	0,0056433408	0,14099811
HSA04940 TYPE I DIABETES MELLITUS	44	0,010869565	0,15609321
STRIATED MUSCLE CONTRACTION	33	0,006142506	0,15259273
BL YMPHOCYTE PATHWAY	10	0,017291067	0,15939562
FATTY ACID BIOSYNTHESIS PATH 2	8	0,022865854	0,16498205
GPCRDB CLASS A RHODOPSIN LIKE	163	0,0010362695	0,16381371
CLASSIC PATHWAY	12	0,014450867	0,16307901
IL5 PATHWAY	10	0,019746121	0,16217913
INFLAM PATHWAY	28	0,015228426	0,17971636
C21 STEROID HORMONE METABOLISM	10	0,024096385	0,18495302
NKT PATHWAY	28	0,024875622	0,21875691
GLUCOCORTICOID MINERALOCORTIC OID METABOLISM	7	0,039694656	0,22735533

Θετικά σχετιζόμενα μονοπάτια

Πίνακας 2: Στην πρώτη καταγράφονται τα μονοπάτια που απορρυθμίζονται στα TCNOT6 δείγματα συγκρινόμενα με τα MSH. Στις επόμενες στήλες αναφέρεται το μέγεθος, η p value 0.05 και η FDR value.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

TCNOT6-L vs MSH

Όνομα μονοπατιού	Μέγεθος	NOM p-val	FDR q-val
STRIATED MUSCLE CONTRACTION	33	0	0,049484037
DC PATHWAY	20	0	0,07849256
HSP27 PATHWAY	15	0	0,11089081

Θετικά σχετιζόμενα μονοπάτια

Πίνακας 3: Στην πρώτη και δεύτερη στήλη καταγράφονται τα μονοπάτια που απορρυθμίζονται και τα χαρακτηριστικά τους στα CNOT6L δείγματα συγκρινόμενα με τα MSH. Στις επόμενες στήλες αναφέρεται το μέγεθος, η p value και η FDR value.

TCNOT7 vs MSH

Όνομα μονοπατιού	Μέγεθος	NOM p-val	FDR q-val
STRIATED MUSCLE CONTRACTION	33	0	0,10950794
HSA04640 HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE	87	0	0,16339089
DC PATHWAY	20	0,0017793594	0,13182579

Θετικά σχετιζόμενα μονοπάτια

Πίνακας 4: Στην πρώτη και δεύτερη στήλη καταγράφονται τα μονοπάτια που απορρυθμίζονται και τα χαρακτηριστικά τους στα CNOT7 δείγματα συγκρινόμενα με τα MSH. Στις επόμενες στήλες αναφέρεται το μέγεθος, η p value και η FDR value.

Οι αποαδενυλάσες αυτές φαίνεται πως εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης κρίσιμων μονοπατιών και αρκετών γονιδίων συ μεταξύ συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής ανάπτυξης, της ανοσολογικής απόκρισης, της μυϊκής σύσπασης, της πρωτεϊνοσύνθεσης (Παράρτημα). Αρκετά μονοπάτια επηρεάζονται τουλάχιστον από

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

δυο αποαδενυλάσες, γεγονός που υπαινίσσεται αλληλεπικαλυπτόμενους ρόλους (Εικόνα 4.3).

Positively correlated pathways/ genes

SILENCED DeA	CNOT6			CNOT6L		CNOT7			
PATHWAY	STRIATED MUSCLE CONTRACTION	DC PATHWAY	HSA04640 HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE	STRIATED MUSCLE CONTRACTION	DC PATHWAY	STRIATED MUSCLE CONTRACTION	DC PATHWAY	HSA04640 HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE	
Gene number	14	12	51	15	14	16	12	30	OVERLAP
CNOT6				13	10	33	10	28	
CNOT6L	13	10				14	12		
CNOT7	13	10	28	14	12				
OVERLAP (total)	51			26		71			

Εικόνα 4.3: Κοινά μονοπάτια που απορυθμίζονται από τις αποαδενυλάσες CNOT6, CNOT6L και CNOT7. Οι αριθμοί δηλώνουν το σύνολο των απορρυθμισμένων γονιδίων και την αλληλοεπικάλυψη τους.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

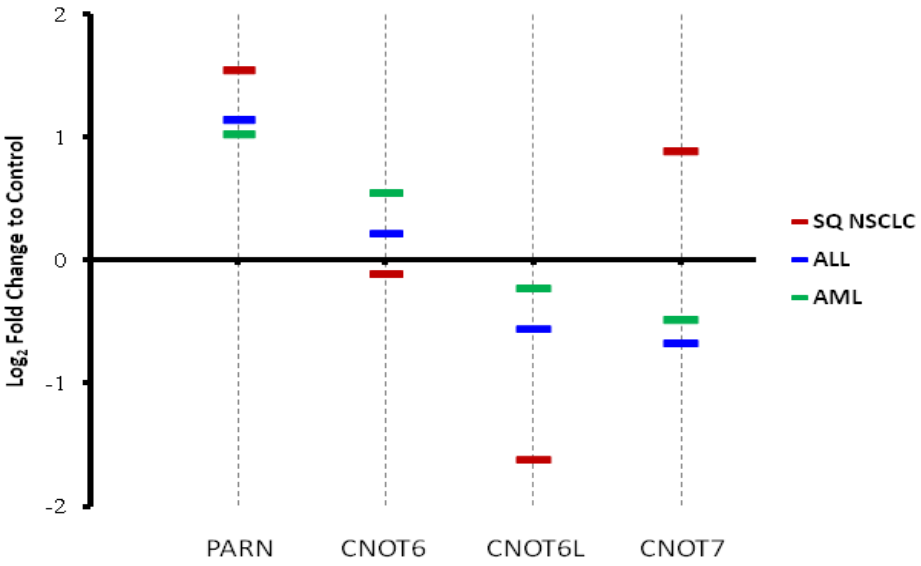
5. Συζήτηση

Προηγούμενες μελέτες που από το εργαστήριό μας σε δείγματα ασθενών με λευχαιμίες και έδειξαν ότι η έκφραση αποαδενυλασών, όπως η PARN και η CNOT7, μεταβάλλεται μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων, υπαινίσσοντας πως τα ένζυμα αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως σημπληρωματικοί βιοδείκτες και πιθανόν ως χρήσιμα εργαλεία μελέτης της προόδου της θεραπείας (Maragozidis *και συν*., 2012). Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις επεκτείναμε τη μελέτη μας στον καρκίνο του πνεύμονα, ώστε να εξετάσουμε αν οι προηγούμενες παρατηρήσεις σχετικά με τη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των αποαδενυλασών αποτελούν ένα γενικότερο φαινόμενο στον καρκίνο. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε με τη μέθοδο της Real Time PCR, τα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT6L, CNOT7, CNOT8 και PAN2 σε παθολογικά και φυσιολογικά δείγματα ασθενών με Μικροκυτταρικό (SCLC) και των ANGEL1, ANGEL2, PARN, PARNL, CNOT6, CNOT6L, CNOT7, CNOT8, NOC, PAN2 σε πλακώδη καρκίνο (SCC) του πνεύμονα. Στις εικόνες 4.1 και 4.2 απεικονίζονται συγκριτικά οι μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών ανάμεσα στους δύο τύπους καρκίνου του πνεύμονα. Η PARN παρουσιάζει αυξημένη έκφραση εως και 2 φορές στα παθολογικά δείγματα ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο ενώ η έκφρασή αυξάνεται ασθενώς στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα. Επίσης τα επίπεδα έκφρασης των CNOT6 και PAN2 διαφοροποιούνται σημαντικά ανάμεσα στους δύο τύπους καρκίνου, εμφανίζοντας αύξηση στο Μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και μείωση στο Πλακώδες καρκίνωμα. Η CNOT6L παρουσιάζει σχετικά υψηλή έκφραση στους δύο τύπους καρκίνου, ενώ η CNOT7 εκφράζεται ασθενώς τόσο στο μικροκυτταρικό όσο και στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Τέλος η CNOT8 εμφανίζει ήπια αύξηση στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ενώ δεν εκφράζεται καθόλου στο πλακώδες καρκίνωμα

Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν τις παρατηρήσεις από προηγούμενή μας εργασία, όπου δείχνεται πως αρκετές αποαδενυλάσες μεταβάλλουν την έκφρασή τους σε οξείες λευχαιμίες (Maragozidis et al., 2012). Η σύγκριση των αλλαγών μεταξύ των δύο ειδών καρκίνου (λευχαιμιών και πνεύμονα) αποκαλύπτει ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις (Εικόνα 5.1) Τα επίπεδα των PARN και CNOT6L μεταβάλλονται με τον ίδιο τρόπο στα δύο είδη· η PARN αυξάνεται ενώ η CNOT6L μειώνεται.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

Αντίθετα, η CNOT7 ενώ αυξάνεται στον καρκίνο του πνεύμονα, μειώνεται στις οξείες λευχαιμίες. Ανάλογα παρατηρούνται και για την CNOT6L, αλλά αντίστροφα στα είδη καρκίνων και σε λιγότερη ένταση σε σχέση με την CNOT7. Οι παρατηρήσεις αυτές μπορεί να σημαίνουν πως συγκεκριμένες αποαδενυλάσες ελέγχουν συγκεκριμένα μονοπάτια ή κυτταρικές διεργασίες. Πρέπει να σημειώσουμε πρόσφατες μελέτες που δείχνουν πως σε κύτταρα προέλευσης από καρκίνο του μαστού οι CNOT6 και CNOT6L συμμετέχουν σε διεργασίες γήρανσης και κυτταρικού θανάτου (Mittal *και συν*., 2011), οι CNOT7 και CNOT8 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Aslam *και συν.,* 2009). Επίσης δείχθηκε πως η PARN ελέγχει συγκεκριμένη ομάδα γονιδίων που εμπλέκονται στην κινητικότητα κυττάρων μυοβλαστών ποντικών (Lee *και συν.,* 2012). Έαν οι αποαδενυλάσες ελέγχουν συγκεκριμένα μονοπάτια, μια άλλη ενδιαφέρουσα προοπτική είναι πως μπορεί οι αποαδενυλάσες να λειτουργούν αλληλοεπικαλυπτόμενα· σε περίπτωση που τα επίπεδα μιας μειώνονται (π.χ. CNOT6L) να την αντικαθιστά μια άλλη (CNOT7) ώστε να εξασφαλίζεται η αποικοδόμηση των mRNAs των παραγόντων που δεν θα γινόταν αν έλειπε η μία από αυτές (η CNOT6L στο εν λόγω παράδειγμα). Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται και έχουν δρομολογηθεί για να προσεγγισθούν αυτά τα ερωτήματα.



Εικόνα 5.1. Σύγκριση αποτελεσμάτων στα επίπεδα έκφρασης αποαδενυλασών σε ασθενείς με SCC (πλακώδες) και σε ασθενείς με Λευχαιμίες (ALL – Οξεία Λεμφοκυτταρική, AML – Οξεία Μυελογενής).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

Με βάση αυτές τις προηγούμενες παρατηρήσεις επιχειρήσαμε να κατανοήσουμε το ρόλο των αποαδενλασών στον καρκίνο του πνεύμονα σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης. Για το σκοπό αυτό αποσιωπήθηκε η έκφραση των CNOT6, CNOT6L και CNOT7 σε κύτταρα προέλευσης καρκίνου του πνεύμονα (squamous cell carcinoma), ώστε να προσεγγίζει το είδος των κλινικών δειγμάτων που αναλύσαμε παραπάνω, και αναλύθηκε η επίδραση της διεργασίας στην έκφραση του συνόλου του γονιδιώματος. Όπως φαίνεται εκτενώς στα αποτελέσματα, οι αποαδενυλάσες αυτές φαίνεται πως εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης κρίσιμων μονοπατιών και αρκετών γονιδίων (Πίνακας 1). Φαίνεται πως εμπλέκονται, μεταξύ άλλων, στη ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης, αιμοποίησης και μυϊκής σύσπασης. Αν και το τελευταίο είναι μάλλον αντιφατικό για ένα καρκινικό κύτταρο, εντούτοις μπορεί να σημαίνει πως το ένζυμο εμπλέκεται σε μηχανισμούς κυτταρικής κινητικότητας, που είναι κρίσιμη διεργασία για ένα καρκινικό κύτταρο. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι πως παράγοντες αιμοποίησης φαίνεται να ελέγχονται από κοινού από τις CNOT6 και CNOT7 (Εικόνα 4.3), γεγονός που θα μπορούσε ενισχύει την προηγούμενη υπόθεση της αλληλοεπικαλυπτόμενης δράσης των ενζύμων ως ένας μηχανισμός ρύθμισης για τον έλεγχο της λειτουργίας των μονοπατιών.

CNOT6			
NEUTROPHIL PATHWAY	Ανοσολογική απόκριση	TRYPTOPHAN METABOLISM	Μεταβολισμός τρυπτοφάνης
DC PATHWAY	Ανοσολογική απόκριση	HSA04610 COMPLEMENT AND COAGULATION CASCADES	Ανοσολογική απόκριση
HSA00591 LINOLEIC ACID METABOLISM	Μεταβολισμός του λινολεϊκού οξέος	PEPTIDE GPCRS	Σηματοδικά μονοπάτια
MONOCYTE PATHWAY	Ανοσολογική απόκριση	COMPLEMENT ACTIVATION CLASSICAL	Ανοσολογική απόκριση
LYMPHOCYTE PATHWAY	Ανοσολογική απόκριση	LAIR PATHWAY	Ανοσολογική απόκριση
GAMMA HEXACHLOROCYCLOHEXANE DEGRADATION	Μεταβολισμός	HSA00940 PHENYLPROPANOID BIOSYNTHESIS	Βιοσύνθεση φαινυλοπροπανοειδών
COMP PATHWAY	Ανοσολογική απόκριση	HSA03010 RIBOSOME	Γονίδια που εμπλέκονται στη ριβοσωμική λειτουργία
CYTOKINE PATHWAY	Ανοσολογική απόκριση	HSA04940 TYPE I DIABETES MELLITUS	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου Ι
HSA04640 HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE	Αιμοποίηση	STRIATED MUSCLE CONTRACTION	Μυϊκή σύσπαση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

BENZOATE DEGRADATION VIA COA LIGATION	Αποικοδόμηση βενζοϊκού οξέος μέσω σύνδεσης του CoA	B LYMPHOCYTE PATHWAY	Ανοσολογική απόκριση
CNOT6L		**CNOT7**	
STRIATED MUSCLE CONTRACTION	Μυϊκή σύσπαση	STRIATED MUSCLE CONTRACTION	Μυϊκή σύσπαση
DC PATHWAY	Ανοσολογική απόκριση	DC PATHWAY	Ανοσολογική απόκριση
HSP27PATHWAY	Προστασία από την απόπτωση	HSA04640 HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE	Αιμοποίηση

Πίνακας 1: Τα θετικά σχετιζόμενα μονοπάτια και τα χαρακτηριστικά τους στα οποία εμπλέκονται οι αποαδενυλάσες CNOT6,CNOT6L και CNOT7.

Τα αποτελέσματα της εργασίας ανοίγουν νέες προοπτικές στο ρόλο των αποαδνευλασών στον καρκίνο του πνεύμονα και των ασθενειών αυτών γενικότερα. Για την καλύτερη κατανόηση του ρόλου τους στο σύνολό του απαιτείται η επέκταση της μελέτης και στις υπόλοιπες αποαδενυλάσες καθώς και παραγόντων που εμπλέκονται στη ρύθμιση τόσο των μονοπατιών, όσο και της γονιδιακής έκφρασης γενικότερα. Σε αυτή την τελευταία κατεύθυνση η μελέτη των στο επίπεδο των micoRNAs σε σχέση με την αποαδενυλίωση αναμένεται να είναι ιδιαίτερα αποκαλυπτικός.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν πως η έκφραση των αποαδενυλασών αλλάζουν στον καρκίνο του πνεύμονα. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι σημαντικές γιατί μπορεί να σχετίζονται άμεσα με τις αλλαγές που κάναμε στην έκφραση άλλων κρίσιμων παραγόντων, όπως ογκογονιδίων και βιοδεικτών στον καρκίνο του πνεύμονα. Σε συνδυασμό με προηγούμενες παρατηρήσεις του εργαστηρίου που είναι υπό κρίση για δημοσίευση, υποστηρίζουν την ιδέα ότι οι αποαδενυλάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου. Θα μπορούσαν λοιπόν τα ένζυμα αυτά να εξετασθούν περεταίρω για να χρησιμοποιηθούν ως βοηθητικοί βιοδείκτες, ή ακόμη και για την παρακολούθηση της εξέλιξες των θεραπευτικών σχημάτων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

Βιβλιογραφία

1. Abbasciano V., Sartori S., Trevisani L., Nielsen I., Ferrazzi E., Bononi A., Toso S., Crepaldi G., Bianchi M. , Gilli G., Zavagli G., (1999), Neuron-specific enolase, thymidine kinase, and tissue polypeptide-specific antigen in diagnosis and response to chemotherapy of small-cell lung cancer, *Cancer Detect. Prev.*, 23(4):309-15.
2. Audic Y. and Hartley R., (2004), Post-transcriptional regulation in cancer, *Biology of the Cell*, 96; 479–498.
3. Aslam A., Mittal S., Koch F., Andrau J. and Winkler G.S., (2009), The Ccr4–Not Deadenylase Subunits CNOT7 and CNOT8 Have Overlapping Roles and Modulate Cell Proliferation, *Molecular Biology of the Cell*,20: 3840–3850.
4. Bartlam M. and Yamamoto T., (2010), The structural basis for deadenylation by the CCR4-NOT complex, *Protein Cell*, 1(5): 443–452.
5. Beelman C.A. and Paker R., (1995), Degradation of mRNA in eukaryotes, *Cell*, 8: 179–183.
6. Body J.J., Sculier J.P., Raymakers N., (1986), Evaluation of SCC Antigen as a new marker for lung cancer, *Cancer*, 65:1552-155.
7. Bogdan J.A., Adams-Burton C., Pedicord D.L., Sukovich D.A., Benfield P.A., Corjay M.H., Stoltenborg J.K., Dicker I.B., (1998), Human carbon catabolite repressor protein (CCR4)-associative factor 1: cloning, expression and characterization of its interaction with the B-cell translocation protein BTG-1, *Biochem. J.*, 336; 471-481.
8. Bowman R., Yang I., Semmler A. and Fong K., (2006), Epigenetics of lung cancer, *Respirology*, 11; 355–365.
9. Brown C.E. and Sachs A.B., (1998), Poly(A)Tail Length Control in Saccharomyces cerevisiae Occurs by Message-Specific Deadenylation, *Mol Cell Biol.*, 18(11): 6548–6559.
10. Brown, C.E., Tarun, S.Z., Boeck, R. and Sachs A.B., (1996), PAN3 encodes a subunit of the Pab1p-dependent poly(A) nuclease in Saccharomyces cerevisiae, *Mol. Cell Biol.*, 16;5744–5753.
11. Carney D.N., Marangos P.J., Ihde D.C., Bunn P.A. Jr, Cohen M.H., Minna J.D., Gazdar A.F., (1982), Serum neuron-specific enolase: a marker for disease extent and response to therapy of small-cell lung cancer, *Lancet*, 13;1(8272):583-5.
12. Cheadle C., Fan J., Cho-Chung Y.S., Werner T., Ray J., Do L., Gorospe M., Becker K.G., (2005), Control of gene expression during T cell activation: alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability, *BMC Genomics*, 6: 75.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

13. Chiba Y., Johnson M.A., Lidder P., Vogel J.T., Van Erp H., Green P.J., (2004), AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in Arabidopsis, *Gene*, 328;95–102 .
14. Chen J., Rappsilber J., Chiang Y.C., Russell P., Mann M., Denis C.L., (2001), Purification and characterization of the 1.0 MDa CCR4-NOT complex identifies two novel components of the complex, *J. Mol. Biol*., 314: 683–694.
15. Conrad N.K., Shu M.D., Uyhazi K.E., Steitz J.A., (2007), Mutational analysis of a viral RNAelement that counteracts rapid RNA decay by interaction with the polyadenylate tail, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104: 10412–10417.
16. Conti E. and Izaurralde E., (2005), Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17; 316–325.
17. Dent P.B., McCulloch P.B., Wesley-James O., MacLaren R., Muirhead W., Dunnett C.W., (1978), Measurments of CEA in patients with bronchogenic carcinoma, *Cancer*, 42:1484-1491.
18. Dialyna I.A., Miyakis S., Georgatou N., Spandidos D.A., (2003), Genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer risk, *Oncol. Rep.*, 10(6):1829-35.
19. Diez M., Torres A., Pollan M., Gomez A. Ortega D., Maestro M.L., Granell J., Balibrea J.L., (1994), Prognostic significance of serum CA125 antigen assay in patients with non-small cell lung cancer, *Cancer*, 73:1358-1376.
20. Diez M., Gomez A., Hernando F., Ortega M.D., Maestro M.L., Torres A., Mugüerza J.M., Gutierrez A., Granell J., Balibrea J.L., (1995), Serum CEA, CA125, and SCC antigens and tumor recurrence in resectable non-small cell lung cancer, *Int. J. Biol. Markers*, 10:5-10.
21. Dlakic M., (2000), Functionally unrelated signalling proteins contain a fold similar to Mg2+-dependent endonucleases. *Trends Biochem. Sci.*, 25: 272–273.
22. Doma M.K. and Parker R., (2006), Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation, *Nature*, 440; 561–564.
23. Ebert W. and Muley T., (1999), CYFRA 21-1 in the follow-up of inoperable non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy, *Anticancer Re.s*, 19(4A):2669-72.
24. Elias, (1997), Small cell lung cancer: State of the art in 1996, *Chest* ,**112**:251S-258S.
25. Eulalio A., Behm-Ansmant I. and Izaurralde E., (2007), P bodies: at the crossroads of posttranscriptional pathways, *Mol. Biol. Cell*, 8: 9–22.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

26. Ezzeddine N, Chen CY, Shyu AB, (2012), Evidence providing new insights into TOB-promoted deadenylation and supporting a link between TOB's deadenylation-enhancing and anti-proliferative activities, *Mol. Cell Biol.*, 32(6):1089-98.
27. Ezzeddine N., Chang T.C., Zhu W., Yamashita A., Chen C.Y., Zhong Z., Yamashita Y., Zheng D., Shyu A.B., (2007), Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation, *Mol. Cell Biol.*, 27(22):7791-801.
28. Faber A. W., Van Dijk M., Raue H. A. and Vos J.C., (2002), Ngl2p is a Ccr4p-like RNA nuclease essential for the final step in 3'-end processing of 5.8S rRNA in Saccharomyces cerevisiae, *RNA*, 8: 1095–1101.
29. Fabian M.R., Mathonnet G., Sundermeier T., Mathys H., Zipprich J.T., Svitkin Y.V., Rivas F., Jinek M., Wohlschlegel J., Doudna J.A. Chen C.Y., Shyu A.B., Yates J.R. 3rd,Hannon G.J., Filipowicz W., Duchaine T.F., Sonenberg N., (2009), Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation, *Mol. Cell*, 35: 868–880.
30. Frischmeyer P.A., Van Hoof A., O'Donnell K., Guerrerio A.L., Parker R. and Dietz H.C., (2002), An mRNAsurveillancemechanism that eliminates transcripts lacking termination codons, *Science*, 295: 2258–2261.
31. Gao M., Fritz, D. T., Ford, L. P. and Wilusz, J., (2000), Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5′ cap influences mRNA deadenylation rates *in vitro*. *Mol Cell*, 5; 479–488.
32. Garneau N. L., Wilusz J. and Wilusz C. J., (2007), The highways and byways of mRNA decay, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 8: 113–126.
33. Goldstrohm A.C. and Wickens M., (2008), Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9: 337–344.
34. Goldstrohm A.C., Hook B.A., Seay D.J. andWickens, M., (2006), PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs, *Nature Struct. Mol. Biol.*, 13: 533–539.
35. Gorgoni B. and Gray N.K., (2004), The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: A developmental perspective, *Brief Funct. Genomic Proteomic*. Aug;3(2):125-41.
36. Hamzaoui A., Thomas P., Castelnau O., Roux N., Roux F., Kleisbauer JP., (1997), Usefulness of longitudinal evaluation of Cyfra 21-1 variations in advanced lung cancer monitoring, *Lung Cancer*, 16(2-3):191-202.
37. He F., Li X., Spatrick P., Casillo R., Dong S., Jacobson A., (2003), Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5′ to 3′ mRNA decay pathways in yeast, *Mol. Cell.*, 6: 1439–1452.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

38. Houalla R., Devaux F., Fatica A., Kufel J., Barrass D., Torchet C., Tollervey D., (2006), Microarray detection of novel nuclear RNA substrates for the exosome, *Yeast*, 6:439–454.
39. Houseley J., LaCava J. and Tollervey D., (2006), RNA-quality control by the exosome. Nature Rev. Mol. Cell Biol., 7;529–539.
40. Inada T. and Aiba H., (2005), Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3′-UTR is repressed after initiation in yeast. *EMBO J,* 24; 1584–1595.
41. [a] Ito K, Takahashi A, Morita M, Suzuki T, Yamamoto T., (2011), The role of the CNOT1 subunit of the CCR4-NOT complex in mRNA de adenylation and cell viability, *Protein Cell.*, 2(9):755-63.
42. [b]Ito K, Inoue T, Yokoyama K, Morita M, Suzuki T, Yamamoto T. (2011) ,CNOT2 depletion disrupts and inhibits the CCR4–NOTdeadenylase complex and induces apoptotic cell death, *Genes to Cells*, 16 (4): 368–379.
43. Jin B., Zhao L., Zhou C., (2001) The prognostic value of serum neuron specific enolase detection in small cell lung cancer, *Honghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*., 24(12):722-4.
44. Kashima I., Yamashita A. , Izumi N., Kataoka N. , Morishita R. , Hoshino S. , Ohno M. , Dreyfuss G. , and Ohno S., *(*2006), Binding of a novel SMG-1–Upf1– eRF1–eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and non sense mediated mRNA decay, *Genes Dev.*, 20;355–367.
45. Kim W.C. and Lee C.H., (2009), The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer, *Bioch. et Bioph. Acta*, 99-113.
46. Körner CG, Wormington M, Muckenthaler M, Schneider S, Dehlin E, Wahle E., (1998), The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of Xenopus oocytes, *EMBO J.*, 15;17(18):5427-37.
47. Körner C.G. and Wahle E., (1997), Poly(A) Tail Shortening by a Mammalian Poly(A)-specific 3′-Exoribonuclease, *J. Biol. Chem.*, 272;10448-10456.
48. Kubota K, Nakahara K, Ohtsuka T, Yoshida S, Kawaguchi J, Fujita Y, Ozeki Y, Hara A, Yoshimura C,Furukawa H, Haruyama H, Ichikawa K, Yamashita M, Matsuoka T, Iijima Y., (2004) Identification of 2′-phosphodiesterase, which plays a role in the 2–5A system regulated by interferon, *J.* B*iol. Chem*, 279;37832–37841.
49. Kushlinsky NE, Lyubimova NY, Lemeshko AO, (1996), Serum CYFRA 21-1 and Neuron Specific Enolase as markers of lung cancer. In 2nd international congress on lung cancer, Crete. Eds Monduzzi, Bologna (ITA).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

50. Lai W.S., Kennington E.A., Blackshear P.J., (2003), Tristetraprolin and Its Family Members Can Promote the Cell-Free Deadenylation of AU-Rich Element-Containing mRNAs by Poly(A) Ribonuclease, *Mol. Cell Biol.*, 23(11): 3798–3812.
51. Lamy PJ, Grenier J, Kramar A, Pujol JL., (2000), Pro-gastrin-releasing peptide, neuron specific enolase and chromogranin A as serum markers of small cell lung cancer, *Lung Cancer*, 29(3):197-203.
52. Lee J.E., Lee J.Y., Trembly J, Wilusz J., Tian B., Wilusz C.J.,(2012) The PARN Deadenylase Targets a Discrete Set of mRNAs for Decay and Regulates Cell Motility in Mouse Myoblasts, *PLOS Gentics*, 8: e1002901.
53. Lewin B., (2004), Genes VIII, *Pearson Education*, ch:24.
54. Liu, H., Rodgers, N. D., Jiao, X. and Kiledjian, M., (2002), The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is amember of the HIT family of pyrophosphatases, *EMBO J*, 21;4699–4708.
55. Liu J., Carmell MA., Rivas FV., Marsden C.G., Thomson J.M., Song J.J., Hammond S.M.,Joshua-Tor L. and Hannon G.J., (2004), Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi, *Science*,305: 1437–1441.
56. Maragozidis P., Karangeli M., Labrou M., Dimopoulo G., Papaspyrou K., Salataj E., Pournaras S., Matsouka K., Gourgoulianis K., Balatsos N., (2012), Alrerations of Deadenylases Expression in Acute Leukemias: Evidence for Poly (A)-specific Ribonuclease as a Potential Biomarker, *Acta Haematol.*, 128:39–46.
57. Μαρμαράς Β., Μαρμαρά- Λαμπροπούλου Μ., (2005), Βιολογία κυττάρου: Μοριακή προσέγγιση, Εκδόσεις Typorama, κεφ 6.
58. Mitsuuchi Y. and Testa J., (2002), Cytogenetics and Molecular Genetics of Lung Cancer, *American Journal of Medical Genetics (Semin. Med. Genet.)*, 115:183–188 .
59. Mino N., Iio A., Hamamoto K., (1988), Availability of tumor antigen 4 as a marker of squamous cell carcinoma of the lung and other organs, *Cancer* , 62:730-734.
60. Mittal S., Aslam A., Doidge R, Medica R., and Winkler G.S., (2011), The Ccr4a (CNOT6) and Ccr4b (CNOT6L) deadenylase subunits of the human Ccr4–Not complex contribute to the prevention of cell death and senescence, *Mol. Biol. Cell*, 22: 748.
61. Miyake Y., Kodama T., Yamaguchi K., (1994), Pro-gastrin-releasing peptide (31-98) is a specific tumor marker in patients with small cell lung carcinoma, *Cancer Res*, Apr 15;54(8):2136-40.
62. Molin, L. and Puisieux, A., (2005), C. elegans homologue of the Caf1 gene, which encodes a subunit of the CCR4–NOT complex, is essential for embryonic and larval development and for meiotic progression, *Gene*, 358; 73–81 .

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

63. Moraes K.C., Wilusz C.J., Wilusz J., (2006), CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylasem, *RNA*, 12(6):1084-91.
64. Morita M., Suzuki T., Nakamura T., Yokoyama K., Miyasaka T., Yamamoto T., (2007), Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers elevation of the p27Kip1 mRNA level and impairs cell growth, *Mol. Cell Biol.*, 27; 4980–4990.
65. Morozov I.Y., Jones M.G., Spiller D.G., Rigden D.J., Dattenbock C., Novotny R., Strauss J., Caddick M.X., *(*2010), Distinct roles for Caf1, Ccr4, Edc3 and CutA in the co-ordination of transcript deadenylation, decapping and P-body formation in *Aspergillus nidulans*, *Mol. Microbiol.*, 76:503–516.
66. Morris J.Z., Hong A., Lilly M.A. and Lehmann R., (2005), Twin a CCR4 homolog, regulates cyclin poly(A) tail length to permit Drosophila oogenesis. Development, 132; 1165–1174.
67. Muhlrad D. and Parker R., (2005), The yeast EDC1 mRNA undergoes deadenylation-independent decapping stimulated by Not2p, Not4p, and Not5p, *EMBO J.*, 24: 1033–1045.
68. Niho S., Nishiwaki Y., Goto K., Ohmatsu H., Matsumoto T., Hojo F., Ohe Y., Kakinuma R., Kodama T., (2000), Significance of serum pro-gastrin-releasing peptide as a predictor of relapse of small cell lung cancer: comparative evaluation with neuron-specific enolase and carcinoembryonic antigen. *Lung Cancer*, 27(3):159-67.
69. [a]Niklinski J., Furman M., Laudanski J., Kozlowski M., (1992), Prognostic value of pretreatment CEA, SCC-Ag, and CA 19-9 levels in sera of patients with non-small cell lung cancer, *Eur. J. Cancer Prev.*, 1:401-406.
70. [b]Niklinski J., Furman M., Laudanski J., Kozlowski M., (1992), Evaluation of squamous cell carcinoma antigen (SCC-Ag) in the diagnosis and follow up of patients with non-small cell lung carcinoma, *Neoplasma*, 39:279-282.
71. Okusaka T., Eguchi K., Kasai T., Kurata T., Yamamoto N., Ohe Y., Tamura T., Shinkai T., Saijo N., (1997), Serum levels of pro-gastrin-releasing peptide for follow-up of patients with small cell lung cancer, *Clin. Cancer Res.*, 3(1):123-7.
72. Olivas W. and Parker R., (2000), The Puf3 protein is a transcript-specific regulator of mRNA degradation in yeast, *EMBO J.*, 19(23): 6602–6611.
73. Opyrchal, M., Anderson, J. R., Sokoloski, K. J., Wilusz, C. J. and Wilusz, J. A, (2005), A cell-free mRNA stability assay reveals conservation of the enzymes and mechanisms of mRNA decay between mosquito and mammalian cell lines. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35;1321–1334.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

74. Panov Sasho Z., (2005), Molecular biology of the lung cancer, *Radiol. Oncol.*, 39(3): 197-210.
75. Park and Altorki, (2002), Diagnosis and management of early lung cancer, *Surg. Clin. North Am*., 82(3):457-76.
76. Parker R. and Song H., (2004), The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11(2):121-7.
77. Parkin, D.M., Bray F., Ferlay J. and Pisani, P., (2005), Global cancer statistics, *CA Cancer J Clin*, 74-108.
78. Pass H.I., MD, Mitchel J.B., Johnson D.H., Turrisi A.T. and Minna J.D., (2000), Lung cancer: principles and practice, 2nd edition, Williams and Wilkins or Shields, pp 1,408.
79. Passlick B., Sienel W., Seen-Hibler R., Wöckel W., Thetter O., Mutschler W., Pantel K., (2000), Overexpression of matrix metalloproteinase 2 predicts unfavorable outcome in early-stage non-small cell lung cancer, *Clin Cancer Res.*, 6(10):3944-8.
80. Piao Zhang X., Wu L., Belasco J.G., (2010), CCR4-NOT Deadenylates mRNA Associated with RNA-Induced Silencing Complexes in Human Cells, *Mol. Cell Biol.*, 30;1486-1494.
81. Robbins S.L., Kumar V., Cotran R.S., (2002), Robbins Basic Pathology, 7th Edition, *W.B. Saunders Company*, ch:13.
82. Rubins JB, Dunitz J., Rubins HB, Maddaus MA, Niewoehner DE., (1998), Serum carcinoembryonic antigen as an adjunct to preoperative staging of lung cancer, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 116:412-416.
83. Sekido Y., Fong K.M. and Minna, J.D, (2003), Molecular Genetics of Lung Cancer, *Annual Review of Medicine*, 54: 73-87.
84. Sekido Y., Fong K.M. and Minna, J.D., (1998) ,Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer, *Biochim. Biophys. Acta*, 19;1378(1):F21-59.
85. Sienel W., Hellers .J, Morresi-Hauf A., Lichtinghagen R., Mutschler W., Jochum M., Klein C., Passlick B., Pantel K., (2003), Prognostic impact of matrix metalloproteinase-9 in operable non-small cell lung cancer, *Int. J Cancer*, 20;103(5):647-51.
86. Shibayama T., Ueoka H., Nishii K., Kiura K., Tabata M., Miyatake K., Kitajima T., Harada M., (2001), Complementary roles of pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP) and neuron specific enolase (NSE) in diagnosis and prognosis of small-cell lung cancer (SCLC), *Lung Cancer*, 32(1):61-9.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

87. Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J. and Joshua-Tor L., (2004), Crystal structure of Argonaute and itsimplications for RISC slicer activity, *Science*, 305: 1434–1437.
88. Stewart and Kleihues, (2003), World Cancer Report, *IARC Press*, 183-87.
89. Stieber P., Zimmermann A., Reinmiedl J., Muller C., Hoffmann H., Dienemann H., (1999), CYFRA 21-1 in the early diagnosis of recurrent disease in non-small cell lung carcinomas (NSCLC), *Anticancer Res*, 19:2665-2668.
90. Stryer L., Berg J.M, Tymoczko JL, (2002), Biochemistry (5th ed.), *WH Freeman and Company*, pp: 118–19, 781–808.
91. Sunaga N., Tsuchiya S., Minato K., Watanabe S., Fueki N., Hoshino H., Makimoto T., Ishihara S., Saito R., Mori M., (1999), Serum pro-gastrin-releasing peptide is a useful marker for treatment monitoring and survival in small-cell lung cancer. *Oncology*, 57(2):143-8.
92. Suswam E., Li Y., Zhang X., Gillespie G.Y., Li X., Shacka J.J., Lu L., Zheng L., King P.H., (2008), Tristetraprolin down-regulates interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in malignant glioma cells, *Cancer Res.*, 68(3):674-82.
93. Travis, (2011), Classification of Lung Cancer, *Seminars in Roentgenology*, 46;3(7): 178-186.
94. Tucker M., Staples R.R., Valencia-Sanchez M.A., Muhlrad D., Parker R., (2002), Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae, EMBO J*., 21; 1427–1436.
95. Uchida N., Hoshino S., Katada T., (2004), Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein, *J Biol Chem*, 279:1383–1391.
96. Van der Gaast A., Schoenmakers C.H., Kok T.C., Blijenberg B.G., Cornillie F., Splinter T.A. , (1994), Evaluation of a new tumour marker in patients with non-small-cell lung cancer: CYFRA 21.1.Br., *J Cancer*, 69(3):525-8.
97. Van Hoof A., Frischmeyer P.A., Dietz H.C. and Parker R., (2002), Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon, *Science*, 295: 2262–2264.
98. Wagner E., Clement S.L. and Lykke-Andersen J, (2007), An unconventional human CCR4–CAF1 deadenylase complex in nuclear cajal bodies, *Mol. Cell Biol*, 27: 1686–1695.
99. Williams and Sandler, (2001), The epidemiology of lung cancer, Cancer Treat Res, 105: 31-52.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

100. Wu M, Reutter M, Lilie H, Liu Y, Wahle E and Song H, (2005), Structural insight into poly (A) binding and catalytic mechanism of human PARN, *EMBO J*, 24(23): 4082–4093.
101. Xu N., Chen C. and Shyu A., (1997), Modulation of the Fate of Cytoplasmic mRNA by AU-Rich Elements: Key Sequence Features Controlling mRNA Deadenylation and Decay, *Molecular and Cellular Biology*, 4611–4621.
102. Yamashita A., Chang T.C., Yamashita Y., Zhu W., Zhong Z., Chen C.Y., Shyu A.B., (2005), Concerted action of poly(A)nucleases and decapping enzyme in mammalianmRNA turnover. Nature Struct. Mol. Biol., 12;1054–1063.
103. Yi X., Hong M., Gui B., Chen Z., Li L., Xie G., Liang J., Wang X., Shang Y., (2012) RNA Processing and Modification Protein, Carbon Catabolite Repression 4 (Ccr4), Arrests the Cell Cycle throughp21 dependent and p53-independent Pathway, *J. Biol. Chem.*, 15;287(25):21045-57.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

NEUTROPHIL PATHWAY	
PECAM1	platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)
SELE	selectin E (endothelial adhesion molecule 1)
SELL	selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)
ITGAL	integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)
ITGAM	integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor
DCPATHWAY	
IL4	interleukin 4
ITGAX	integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)
CD7	CD7 molecule
IL12B	interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)
IL5	interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)
TLR9	toll-like receptor 9
IL13	interleukin 13
CD33	CD33 molecule
IFNB1	interferon, beta 1, fibroblast
CD2	CD2 molecule
IFNG	interferon, gamma
IL10	interleukin 10
HSA00591 LINOLEIC ACID METABOLISM	
PLA2G12B	phospholipase A2, group XIIB
PLA2G5	phospholipase A2, group V
RDH12	retinol dehydrogenase 12 (all-trans/9-cis/11-cis)
CYP3A5	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5
CYP2C9	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9
PLA2G2F	phospholipase A2, group IIF
CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4
CYP3A7	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 7
CYP1A2	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2
CYP2C18	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18
PLA2G1B	phospholipase A2, group IB (pancreas)
CYP2C19	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19
CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1
PLA2G2E	phospholipase A2, group IIE
MONOCYTE PATHWAY	
PECAM1	platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

SELE	selectin E (endothelial adhesion molecule 1)
SELL	selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)
ITGAL	integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)
ITGAM	integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor
LYMPHOCYTE PATHWAY	
PECAM1	platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)
SELE	selectin E (endothelial adhesion molecule 1)
SELL	selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)
ITGAL	integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor
GAMMA HEXACHLOROCYCLOHEXANE DEGRADATION	
CYP3A5	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5
ACP5	acid phosphatase 5, tartrate resistant
CYP4F8	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 8
CYP2C9	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9
CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4
CYP3A7	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 7
CYP1A2	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2
CYP2C18	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18
CYP2C19	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19
CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1
CYP2F1	cytochrome P450, family 2, subfamily F, polypeptide 1
CYP2B6	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6
CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
PON1	paraoxonase 1
COMP PATHWAY	
C1QB	complement component 1, q subcomponent, B chain
MBL2	mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble (opsonic defect)
C8A	complement component 8, alpha polypeptide
C1S	complement component 1, s subcomponent
C6	complement component 6
C7	complement component 7
C4B	complement component 4B (Childo blood group)
C2	complement component 2
CYTOKINE PATHWAY	
IL4	interleukin 4
TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
IL1A	interleukin 1, alpha

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

IL12B	interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)
IL5	interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)
IL13	interleukin 13
IFNB1	interferon, beta 1, fibroblast
IFNG	interferon, gamma
IL10	interleukin 10
LTA	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)
HSA04640 HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE	
IL4	interleukin 4
ITGB3	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)
DNTT	deoxynucleotidyltransferase, terminal
CD7	CD7 molecule
CD1A	CD1a molecule
IL5RA	interleukin 5 receptor, alpha
TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
CR1	complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group)
IL1A	interleukin 1, alpha
CD19	CD19 molecule
ITGAM	integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)
FLT3	fms-related tyrosine kinase 3
CSF3	colony stimulating factor 3 (granulocyte)
HLA-DRB5	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5
GP9	glycoprotein IX (platelet)
CD3E	CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)
MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
CD1D	CD1d molecule
GP5	glycoprotein V (platelet)
CD38	CD38 molecule
IL5	interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)
IL1B	interleukin 1, beta
CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog
CD14	CD14 molecule
GP1BA	glycoprotein Ib (platelet), alpha polypeptide
CD33	CD33 molecule
CD2	CD2 molecule
HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)
FCER2	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)
CD1E	CD1e molecule
HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha
CD8B	CD8b molecule

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

CD1C	CD1c molecule
CD3G	CD3g molecule, gamma (CD3-TCR complex)
THPO	thrombopoietin (myeloproliferative leukemia virus oncogene ligand, megakaryocyte growth and development factor)
CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
ITGA4	integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)
ITGA2B	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)
ITGA1	integrin, alpha 1
IL9R	interleukin 9 receptor
CD1B	CD1b molecule
IL3	interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)
CD37	CD37 molecule
HLA-DRB3	major histocompatibility complex, class II, DR beta 3
ANPEP	alanyl (membrane) aminopeptidase (aminopeptidase N, aminopeptidase M, microsomal aminopeptidase, CD13, p150)
CD34	CD34 molecule
IL3RA	interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)
CD8A	CD8a molecule
IL1R2	interleukin 1 receptor, type II
HLA-DRB1	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1
BENZOATE DEGRADATION VIA COA LIGATION	
SDS	serine dehydratase
ACYP2	acylphosphatase 2, muscle type
EHHADH	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase
TRYPTOPHAN METABOLISM	
SDS	serine dehydratase
ASMT	acetylserotonin O-methyltransferase
TPH1	tryptophan hydroxylase 1 (tryptophan 5-monooxygenase)
CYP3A5	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5
CYP4F8	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 8
CYP2C9	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9
CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4
CYP3A7	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 7
CYP1A2	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2
CYP2C18	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18
EHHADH	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase
CYP2C19	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19
CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1
CYP2F1	cytochrome P450, family 2, subfamily F, polypeptide 1
ALDH1A2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

HSA04610 COMPLEMENT AND COAGULATION CASCADES	
KNG1	kininogen 1
F13B	coagulation factor XIII, B polypeptide
C1QB	complement component 1, q subcomponent, B chain
CR1	complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group)
SERPIND1	serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1
F10	coagulation factor X
C1QC	complement component 1, q subcomponent, C chain
MBL2	mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble (opsonic defect)
C8A	complement component 8, alpha polypeptide
F11	coagulation factor XI (plasma thromboplastin antecedent)
C4BPA	complement component 4 binding protein, alpha
PLAU	plasminogen activator, urokinase
C3AR1	complement component 3a receptor 1
F2	coagulation factor II (thrombin)
KLKB1	kallikrein B, plasma (Fletcher factor) 1
C1S	complement component 1, s subcomponent
C6	complement component 6
SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
F8	coagulation factor VIII, procoagulant component (hemophilia A)
C7	complement component 7
PLAT	plasminogen activator, tissue
C8B	complement component 8, beta polypeptide
SERPINA1	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1
CFB	complement factor B
SERPINA5	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 5
C4B	complement component 4B (Childo blood group)
C5AR1	complement component 5a receptor 1
PLG	Plasminogen
PEPTIDE GPCRS	
GNRHR	gonadotropin-releasing hormone receptor
CCR4	chemokine (C-C motif) receptor 4
MC4R	melanocortin 4 receptor
SSTR4	somatostatin receptor 4
BRS3	bombesin-like receptor 3
EDNRB	endothelin receptor type B
CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7
C3AR1	complement component 3a receptor 1
TACR3	tachykinin receptor 3
PPYR1	pancreatic polypeptide receptor 1

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

EDNRA	endothelin receptor type A
NTSR1	neurotensin receptor 1 (high affinity)
CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
SSTR3	somatostatin receptor 3
NPY5R	neuropeptide Y receptor Y5
NTSR2	neurotensin receptor 2
OPRM1	opioid receptor, mu 1
GALR1	galanin receptor 1
AVPR1B	arginine vasopressin receptor 1B
TRHR	thyrotropin-releasing hormone receptor
FPR1	formyl peptide receptor 1
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
TACR1	tachykinin receptor 1
CXCR3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3
CXCR6	chemokine (C-X-C motif) receptor 6
NPY6R	neuropeptide Y receptor Y6 (pseudogene)
AVPR2	arginine vasopressin receptor 2 (nephrogenic diabetes insipidus)
MC3R	melanocortin 3 receptor
CCKAR	cholecystokinin A receptor
OXTR	oxytocin receptor
AVPR1A	arginine vasopressin receptor 1A
SSTR1	somatostatin receptor 1
CCR6	chemokine (C-C motif) receptor 6
FSHR	follicle stimulating hormone receptor
OPRL1	opiate receptor-like 1
GHSR	growth hormone secretagogue receptor
BDKRB1	bradykinin receptor B1
MC2R	melanocortin 2 receptor (adrenocorticotropic hormone)
MC5R	melanocortin 5 receptor
GRPR	gastrin-releasing peptide receptor
COMPLEMENT ACTIVATION CLASSICAL	
C1QB	complement component 1, q subcomponent, B chain
C8A	complement component 8, alpha polypeptide
C1S	complement component 1, s subcomponent
C6	complement component 6
C7	complement component 7
C8B	complement component 8, beta polypeptide
C2	complement component 2
LAIR PATHWAY	
TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
IL1A	interleukin 1, alpha
ITGAL	integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

	receptor
C6	complement component 6
C7	complement component 7
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)
SELP	selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)
ITGA4	integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)
HSA00940 PHENYLPROPANOID BIOSYNTHESIS	
MPO	Myeloperoxidase
EPX	eosinophil peroxidase
GBA3	glucosidase, beta, acid 3 (cytosolic)
LPO	Lactoperoxidase
HSA03010 RIBOSOME	
RPS4Y1	ribosomal protein S4, Y-linked 1
RPS13	ribosomal protein S13
RPL41	ribosomal protein L41
RPS12	ribosomal protein S12
RPL35A	ribosomal protein L35a
RPS8	ribosomal protein S8
RPL11	ribosomal protein L11
RPL26	ribosomal protein L26
RPS24	ribosomal protein S24
RPL38	ribosomal protein L38
RPS5	ribosomal protein S5
RPL27	ribosomal protein L27
RPL19	ribosomal protein L19
RPL35	ribosomal protein L35
FAU	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived); ribosomal protein S30
RPS21	ribosomal protein S21
RPL30	ribosomal protein L30
RPL22L1	ribosomal protein L22-like 1
RPL6	ribosomal protein L6
RPL32	ribosomal protein L32
RPS20	ribosomal protein S20
RPS28	ribosomal protein S28
RPL18	ribosomal protein L18
RPL37A	ribosomal protein L37a
RPS3A	ribosomal protein S3A
RPS16	ribosomal protein S16
RPS9	ribosomal protein S9
RPS7	ribosomal protein S7
RPS25	ribosomal protein S25
RPL12	ribosomal protein L12

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

RPS27	ribosomal protein S27 (metallopanstimulin 1)
RPL18A	ribosomal protein L18a
RPS3	ribosomal protein S3
RPS10	ribosomal protein S10
RPL36A	ribosomal protein L36a
RPS18	ribosomal protein S18
RPL36AL	ribosomal protein L36a-like
RPS11	ribosomal protein S11
RPL9	ribosomal protein L9
RPL24	ribosomal protein L24
RPL8	ribosomal protein L8
HSA04940 TYPE I DIABETES MELLITUS	
CD80	CD80 molecule
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
IL1A	interleukin 1, alpha
HLA-DRB5	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5
HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1
PTPRN	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N
IL12B	interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)
IL1B	interleukin 1, beta
CD86	CD86 molecule
HLA-DMA	major histocompatibility complex, class II, DM alpha
HLA-DOB	major histocompatibility complex, class II, DO beta
HLA-DMB	major histocompatibility complex, class II, DM beta
IFNG	interferon, gamma
HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4
GZMB	granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)
LTA	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
HLA-DQB2	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 2
PRF1	perforin 1 (pore forming protein)
HLA-DOA	major histocompatibility complex, class II, DO alpha
INS	Insulin
HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha
HLA-DQA1	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1
HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1
STRIATED MUSCLE CONTRACTION	
MYBPC3	myosin binding protein C, cardiac
MYL2	myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow
MYL3	myosin, light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow
MYBPC2	myosin binding protein C, fast type
TNNI2	troponin I type 2 (skeletal, fast)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

MYL1	myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast
MYH3	myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic
MYH6	myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha (cardiomyopathy, hypertrophic 1)
NEB	Nebulin
ACTN2	actinin, alpha 2
TNNI3	troponin I type 3 (cardiac)
TNNT1	troponin T type 1 (skeletal, slow)
MYL9	myosin, light chain 9, regulatory
ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
B LYMPHOCYTE PATHWAY	
CD80	CD80 molecule
CR1	complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group)
ITGAL	integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor
FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)
HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha

Πίνακας 1 : CNOT6 vs MSH - Απορρυθμισμένα γονίδια στο κάθε μονοπάτι

STRIATED MUSCLE CONTRACTION	
MYH8	myosin, heavy chain 8, skeletal muscle, perinatal
MYL1	myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast
MYBPC3	myosin binding protein C, cardiac
TNNI2	troponin I type 2 (skeletal, fast)
MYL2	myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow
TNNT1	troponin T type 1 (skeletal, slow)
ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
MYBPC2	myosin binding protein C, fast type
TCAP	titin-cap (telethonin)
MYH3	myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic
MYL9	myosin, light chain 9, regulatory
MYH6	myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha (cardiomyopathy, hypertrophic 1)
MYL3	myosin, light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow
TNNI3	troponin I type 3 (cardiac)
NEB	nebulin
DC PATHWAY	
IL4	interleukin 4
CD7	CD7 molecule

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

CD33	CD33 molecule
IL12B	interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)
CD5	CD5 molecule
ITGAX	integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)
IL13	interleukin 13
TLR7	toll-like receptor 7
IL5	interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)
IL3	interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)
TLR9	toll-like receptor 9
IL10	interleukin 10
CD2	CD2 molecule
CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
HSP27 PATHWAY	
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
ACTA1	actin, alpha 1, skeletal muscle
IL1A	interleukin 1, alpha
TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)

Πίνακας 2: CNOT6L vs MSH - Απορρυθμισμένα γονίδια στο κάθε μονοπάτι.

STRIATED MUSCLE CONTRACTION	
MYBPC3	myosin binding protein C, cardiac
MYL1	myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast
MYL2	myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow
MYBPC2	myosin binding protein C, fast type
TNNI2	troponin I type 2 (skeletal, fast)
MYL3	myosin, light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow
TNNT1	troponin T type 1 (skeletal, slow)
MYH3	myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic
NEB	Nebulin
ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
TCAP	titin-cap (telethonin)
MYH8	myosin, heavy chain 8, skeletal muscle, perinatal
TNNI3	troponin I type 3 (cardiac)
ACTN2	actinin, alpha 2
MYH6	myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha (cardiomyopathy, hypertrophic 1)
TPM1	tropomyosin 1 (alpha)
HSA04640 HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE	
IL4	interleukin 4

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94

GP9	glycoprotein IX (platelet)
CD7	CD7 molecule
CD1D	CD1d molecule
HLA-DRB5	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5
GP5	glycoprotein V (platelet)
CD1B	CD1b molecule
ITGAM	integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)
FLT3	fms-related tyrosine kinase 3
IL5RA	interleukin 5 receptor, alpha
CD33	CD33 molecule
IL1A	interleukin 1, alpha
MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
IL3	interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)
CD19	CD19 molecule
CD14	CD14 molecule
HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha
CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
CD3E	CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)
CD1A	CD1a molecule
CR1	complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group)
ITGB3	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)
ITGA5	integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)
DNTT	deoxynucleotidyltransferase, terminal
CD2	CD2 molecule
CD38	CD38 molecule
IL5	interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)
CD5	CD5 molecule
FCER2	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)
DC PATHWAY	
IL4	interleukin 4
CD7	CD7 molecule
CD33	CD33 molecule
IL12B	interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)
IL3	interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)
ITGAX	integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)
IL13	interleukin 13
TLR9	toll-like receptor 9
CD2	CD2 molecule
IL5	interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)
CD5	CD5 molecule
IL10	interleukin 10

Πίνακας 3: CNOT7 vs MSH - Απορρυθμισμένα γονίδια στο κάθε μονοπάτι.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 05:14:59 EEST - 18.221.156.94