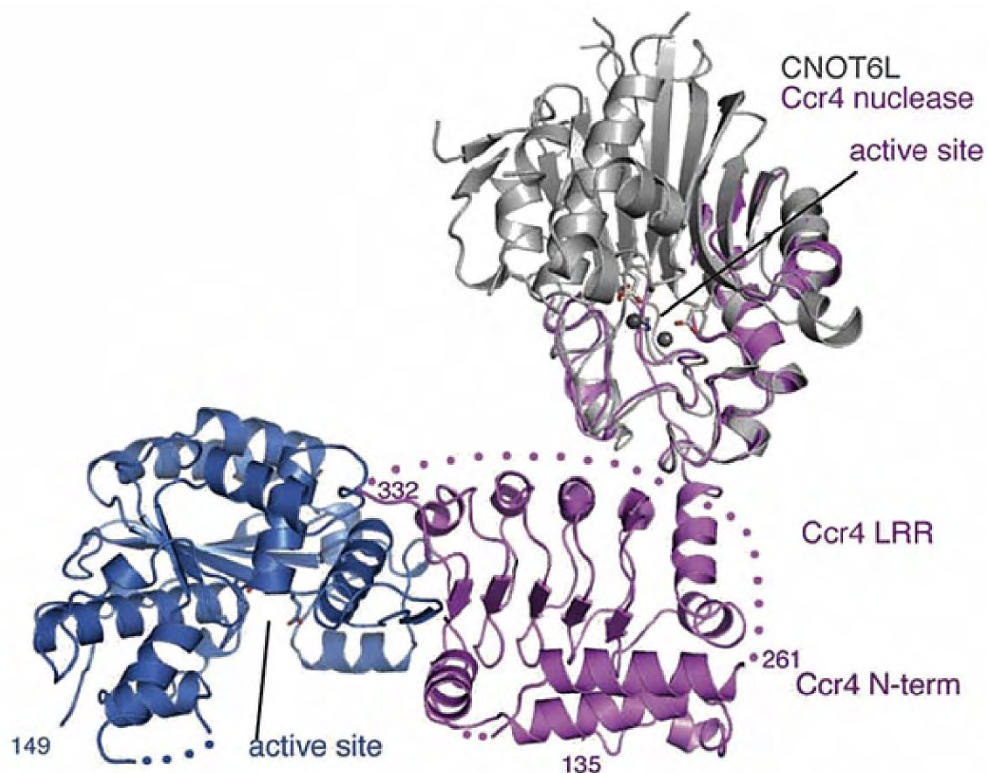




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Απομόνωση, κλωνοποίηση και βιολογικός χαρακτη- ρισμός της ανθρώπινης απαδενυλάσης ANGEL2



Τούλιος Αθανάσιος

2016

Απομόνωση, κλωνοποίηση και βιολογικός χαρακτηρισμός της αν-
θρώπινης απαδενυλάσης ANGEL2

Isolation, cloning and biological characterization of the human
deadenylase ANGEL2

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Σκαμνάκη Βασιλική: Λέκτορας Βιοχημείας- Μεταβολισμού. Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Εικόνα Εξωφύλλου

Η κρυσταλλογραφική δομή των απαδενυλασών γ CCR4 και γ CAF1. Στην εικόνα της δομής τέθηκε η δομή της νουκλεάσης του ανθρώπινου ορθόλογου γονιδίου της CCR4, της CNOT6L (PDB 3NGQ). Επίσης, σημαίνονται τα 5 LRR (leucine-rich-regions) μοτίβα και το N-τελικό άκρο της γ CCR4. Τέλος, παρουσιάζονται και η ενεργή περιοχή απαδενυλίωσης της γ CAF1 (PDB 4B8C).¹

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα πρόσωπα εκείνα, των οποίων η υποστήριξη και οι υποδείξεις αποτέλεσαν πολύτιμες κατά την εκπόνηση της παρούσης εργασίας. Θα ευχαριστήσω όλα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, και ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Ν. Μπαλατσό, για την ευκαιρία που μου έδωσε να βρίσκομαι στο εργαστήριο του, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και για την καθοδήγησή του όλο αυτό το διάστημα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω στον κύριο Δρ. Ζαρογιάννη, καθηγητή του τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η συμβολή του οποίου υπήρξε καθοριστικής σημασίας για την διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους της εργασίας αυτής. Τέλος, θα ήθελα να δώσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Α. Κυρίτση και τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μ. Λάμπρου.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT	7
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Το RNA.....	8
1.2. Το mRNA παράγεται με μεταγραφή.....	8
1.3. Ωρίμανση του mRNA.....	9
1.4. Το άκρο 5' του ευκαρυωτικού mRNA φέρει καλύπτρα.....	10
1.5. Η πολυ(A) ουρά στο άκρο 3'	11
1.6. Σταθερότητα του mRNA.....	11
1.7. Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA	15
1.8. Απαδενυλάσες	16
1.9. Το σύμπλοκο CCR4-NOT	19
Δομή του Συμπλόκου CCR4-NOT.....	19
Υποκυτταρικός Εντοπισμός	21
Ρόλος του CCR4-NOT στα Ευκαρυωτικά Κύτταρα	21
Οι απαδενυλάσες CCR4-CAF1	22
1.10. ANGEL2.....	24
2. Σκοπός της εργασίας	27
3. Υλικά και μέθοδοι.....	28
3.1. Υλικά.....	28
Χημικές Ουσίες	28
Ένζυμα.....	29
Kit	29

Βακτηριακά Στελέχη	29
Πλασμιδιακοί φορείς.....	30
Κυτταρική Σειρά	31
Εκκινητές.....	32
Διαλύματα.....	34
3.2. Υπολογιστικά προγράμματα	35
3.3. Μέθοδοι.....	36
Κλωνοποίηση των εναλλακτικών μεταγράφων ANGEL2.....	36
Παραγωγή πρωτεϊνών ANGEL2.....	52
4. Αποτελέσματα.....	58
4.1. Ανάλυση <i>in silico</i> της μεταγραφής και μετάφρασης του ANGEL2.....	58
Τα εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου ANGEL2	58
Πρωτεϊνικά προϊόντα του γονιδίου ANGEL2	62
4.2. Ανίχνευση της ANGEL2 σε ανθρώπινα κύτταρα	64
4.3. Δοκιμή έκφρασης των ANGEL2.....	66
5. Συζήτηση.....	69
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	72

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μεγάλα σύμπλοκα πρωτεϊνών είναι συνήθως οι τελεστές των κυτταρικών διεργασιών. Το περίπλοκο δίκτυο ομοιόστασης του κυττάρου διαιρείται σε πολυάριθμα διασυνδεδεμένα μονοπάτια, καθένα από τα οποία ελέγχεται από ένα σύνολο πρωτεϊνικών μηχανών. Ένας από αυτούς τους κύριους ρυθμιστές είναι το CCR4-NOT, το οποίο ρυθμίζει τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών.

Η απαδενυλίωση αποτελεί κρίσιμο στάδιο στην αποικοδόμηση των mRNAs. Σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς έχει ανιχνευτεί το σύμπλοκο CCR4-NOT και ο ρόλος του στην απαδενυλίωση. Ωστόσο, ο διπλασιασμός των γονιδίων και η απόκλιση μεταξύ τους έχουν επεκτείνει την οικογένεια των εμπλεκόμενων γονιδίων στα φυτά, στις μύγες, στα σκουλήκια και στα θηλαστικά. Η ανάπτυξη αυτή έχει εγείρει το ερώτημα, εάν τα νέα σε κάθε διαφορετικό οργανισμό γονίδια έχουν διατηρήσει τις κύριες και αρχικές λειτουργίες τους ή έχουν σχηματίσει νέες.

Το γονίδιο *ANGEL2* αποτελεί ένα από αυτά τα γονίδια. Το πρωτεϊνικό της προϊόν φέρει κοινές επικράτειες με την CCR4 πρωτεΐνη του πρωτεϊνικού συμπλόκου CCR4-NOT στον *Homo sapiens*, αποτελώντας ομόλογες πρωτεΐνες. Το γεγονός αυτό καταστεί την *ANGEL2* ως απαδενυλάση, την κύρια δηλαδή λειτουργία της CCR4, χωρίς όμως να υπάρχει σχετική αναφορά με τον ρόλο της στα ανθρώπινα κύτταρα.

Στην παρούσα εργασία γίνεται η πρώτη προσπάθεια αναγνώρισης του ενδοκυτταρικού ρόλου της πρωτεΐνης αυτής. Αποτελέσματα *in silico* μας δείχνουν την παρουσία τριών παραγόμενων από το γονίδιο αυτό πρωτεϊνών, το οποία φέρουν την κοινή επικράτεια EEP (Exonuclease-Endonuclease-Phosphatase, εξωνουκλεάσης-ενδονουκλεάσης-φωσφατάσης). Η ανίχνευσή τους και η κλωνοποίηση τους ανοίγουν το δρόμο προς τη μελέτη της λειτουργίας τους *in vitro*, δίνοντας νέες προοπτικές στην κατανόηση του ρόλου των απαδενυλασών.

ABSTRACT

Multisubunit protein complexes are usually the major operators of the cellular regulations. The complex cell homeostasis network is divided into numerous interconnected pathways, each of which is controlled by a set of protein engines. One of these main regulators is CCR4-NOT complex, a multisubunit protein complex which regulates protein all of the protein expression levels.

Deadenylation is a critical step in the degradation of mRNAs. In many eukaryotes the CCR4-NOT complex and its role in deadenylation have been detected. However, duplication of genes and deviation from one another have extended the family of genes involved in plants, flies, worms and mammals. This development raises the question of whether the new genes in each organism have retained their primary and original functions or have forms new ones.

The *ANGEL2* gene is one of these genes. Its protein product carries common domains with the CCR4 protein of the CCR4-NOT complex in *Homo sapiens*, constituting homologous proteins. This makes ANGEL2 a deadenylase, the primary function of CCR4, but there is no reference to its role in human cells.

In this paper an attempt is made to identify the intracellular role of ANGEL2. *In silico* results revealed the presence of three proteins produced by this gene, which carry the Exonuclease-Endonuclease-Phosphatase (EEP) domain. The detection and cloning of ANGEL2 consists the first step to study its function *in vitro*, and opens new prospectives to understand the role of deadenylases.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το RNA

Το RNA είναι ένα μόριο κεντρικής σημασίας για τη γονιδιακή έκφραση. Αρχικά, χαρακτηρίστηκε ως ένα ενδιάμεσο προϊόν της πρωτεϊνοσύνθεσης, όμως, από τότε έχουν ανακαλυφθεί πολλά RNA που έχουν δομικούς ή λειτουργικούς ρόλους σε όλα τα στάδια της γονιδιακής έκφρασης. Η εμπλοκή του RNA σε πολλές λειτουργίες που αφορούν τη γονιδιακή έκφραση υποστηρίζει τη γενική άποψη ότι ολόκληρη η διαδικασία μπορεί να εξελιχθεί σε ένα «κόσμο RNA», στον οποίο αρχικά τα RNA ήταν το ενεργό συστατικό του μηχανισμού διατήρησης και έκφρασης της γενετικής πληροφορίας. Αργότερα, οι πρωτεΐνες υποβοήθησαν ή ανέλαβαν αποκλειστικά αυτές τις λειτουργίες, γεγονός που έχει ως συνέπεια την αύξηση της προσαρμοστικότητας και πιθανό της αποτελεσματικότητας.

Τα κύτταρα περιέχουν διάφορα είδη RNA, τα κυριότερα εκ των οποίων παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη μετάφραση. Οι τρεις κύριες τάξεις RNA είναι το αγγελιαφόρο (messenger RNA, mRNA), το μεταφορικό (transfer RNA, tRNA) και το ριβοσωμικό (ribosomal RNA, rRNA). Άλλα μόρια RNA μπορούν και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση με το να προσδένονται σε συμπληρωματικές αλληλουχίες πάνω στο mRNA (microRNA, miRNA, και small interfering RNA, siRNA)¹⁰. Άλλα μικρά μόρια RNA εμπλέκονται στις διαδικασίες ωρίμανσης των mRNAs και των ριβοσωμάτων (small nuclear RNA, snRNA, και small nucleolar RNA, snoRNA, αντίστοιχα). Υπάρχουν και πολλά ακόμα μόρια RNA που εμπλέκονται σε διάφορες άλλες ρυθμιστικές λειτουργίες των κυττάρων ή ο ρόλος τους στα κύτταρα είναι άγνωστος, πχ circular RNA, circRNA¹¹.

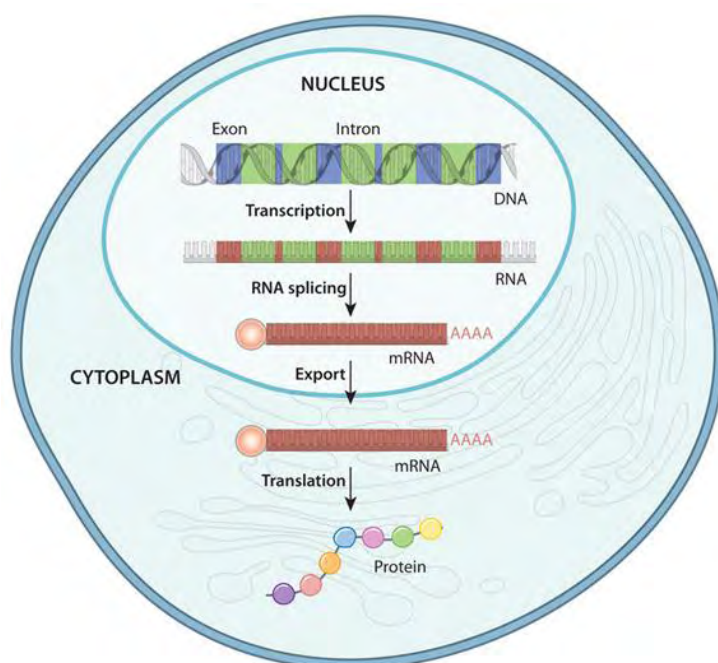
1.2. Το mRNA παράγεται με μεταγραφή

Το DNA αποθηκεύει τις γενετικές πληροφορίες σε μία σταθερή μορφή η οποία μπορεί εύκολα να αντιγραφεί. Ωστόσο, η έκφραση αυτών των γενετικών πληροφοριών προϋποθέτει τη ροή της από το DNA στο RNA στις πρωτεΐνες. Η σύνθεση

του RNA, ή μεταγραφή (transcription), είναι η διεργασία της μεταγραφής των πληροφοριών της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA σε πληροφορίες αλληλουχίας RNA.¹² Η μεταγραφή περιλαμβάνει τη σύνθεση μιας αλυσίδας RNA που αντιπροσωπεύει τον έναν κλώνο ενός τμήματος δίκλωνου DNA. Με τον όρο «αντιπροσωπεύει» εννοείται ότι το RNA είναι όμοιο σε αλληλουχία με τον έναν κλώνο του DNA, ο οποίος ονομάζεται κωδική αλυσίδα (coding strand). Επίσης, είναι συμπληρωματικό με τον άλλο κλώνο, που παρέχει την αλυσίδα-μήτρα (template-strand) για τη σύνθεσή του.¹⁰

1.3. Ωρίμανση του mRNA

Μετά τη σύνθεση του πρώιμου ευκαρυωτικού mRNA (pre-mRNA) ακολουθεί η ωρίμανση που δίνει το τελικό ώριμο mRNA. Το άκρο 5' του mRNA τροποποιείται, προστίθοντας σε αυτό μία καλύπτρα. Επιπλέον, το γονίδιο περιλαμβάνει επιπρόσθετες αλληλουχίες (ιντρόνια, introns) που παρεμβάλλονται στην κωδική περιοχή, διακόπτοντας την αλληλουχία που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη. Η ωρίμανση των διακοπτόμενων γονιδίων περιλαμβάνει την απομάκρυνση των ιντρονίων από το πρώιμο mRNA και τη συρραφή των εξονίων (exons), ώστε να προκύψει το ώριμο



Εικόνα 1 Σχηματική απεικόνιση των διαδικασιών ωρίμανσης και εξόδου του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα.⁴

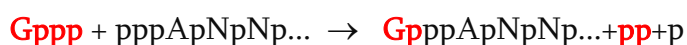
mRNA. Τέλος, το άκρο 3' τροποποιείται με την προσθήκη μίας αλληλουχίας περίπου 300 νουκλεοτιδίων αδενosίνης [πολυαδενυλικό οξύ ή πολυ(A) ουρά, poly(A) tail], μία διαδικασία που ονομάζεται πολυαδενυλίωση (polyadenylation). Η ολοκλήρωση όλων των παραπάνω τροποποιήσεων και επεξεργασίας θα επιτρέψει στο mRNA να εξέλθει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, προκειμένου να αναγνωριστεί από τα ριβosώματα και να μεταφραστεί.¹⁰

1.4. Το άκρο 5' του ευκαρυωτικού mRNA φέρει καλύπτρα.

Το 5' άκρο του mRNA τροποποιείται αμέσως μετά την εμφάνισή του, εξαιτίας της προσθήκης μιας καλύπτρας. Το 5' κάλυμμα σχηματίζεται με την προσθήκη μιας τριφωσφορικής γουανίνης στην πρώτη βάση του μεταγράφου, σχηματίζοντας ένα 5'-5' δεσμό, που είναι ένα τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο (συνήθως μία πουρίνη, αδενίνη ή γουανίνη). Η αρχική αλληλουχία του μεταγράφου μπορεί να αναπαρσταθεί ως:

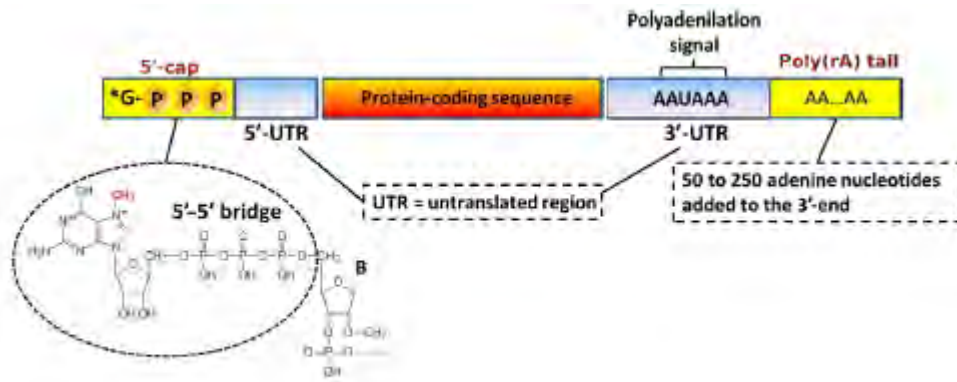


Η προσθήκη της γουανίνης στο άκρο καταλύεται από το πυρηνικό ένζυμο, γουανυλο-τρανσφεράση και συμβαίνει με αντίθετο προσανατολισμό (3'→5'). Η συνολική αντίδραση μπορεί να αναπαραχθεί ως μία συμπύκνωση μεταξύ της τριφωσφορικής γουανosίνης (GTP) και του αρχικού 5' τριφωσφορικού άκρου του RNA:



Η καλύπτρα αποτελεί υπόστρωμα για αρκετές αντιδράσεις μεθυλίωσης, με κάθε τύπο καλύπτρας να διακρίνεται από το πλήθος των μεθυλιώσεων που φέρουν. Η πρώτη μεθυλίωση γίνεται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και αποτελείται από την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στη θέση N7 της ακραίας γουανίνης. Μία καλύπτρα που έχει μόνο αυτή τη μεθυλομάδα ονομάζεται καλύπτρα 0 (cap 0). Το ένζυμο που ευθύνεται για αυτήν την τροποποίηση είναι η 7-μέθυλο-τρανσφεράση της γουανίνης (Εικόνα 2).

Η παρουσία της καλύπτρας είναι κρίσιμη για την αναγνώριση από το ριβosώμα και την προστασία από τις ριβονουκλεάσες.¹⁰



Εικόνα 2 Οι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις στο 5' (προσθήκη καλύπτρας) και στο 3' άκρο (σχηματισμός πολυ(A) ουράς) σε ένα μόριο mRNA.¹³

1.5. Η πολυ(A) ουρά στο άκρο 3'

Το 3' άκρο τροποποιείται με την προσθήκη μιας αλληλουχίας 250-300 νουκλεοτιδίων αδενοσίνης [πολυαδενυλικό οξύ ή πολύ(A) ουρά, poly(A) tail] αμέσως μετά την αποκοπή του μεταγράφου. Η διεργασία αυτή ονομάζεται διεργασία του 3' άκρου (3' end processing) ή πολυαδενυλίωση (polyadenylation) και καταλύεται από το ένζυμο πολύ(A)-πολυμεράση (polyadenylate polymerase).

Η πολύ(A) ουρά είναι από μόνη της μία εξαιρετικά δυναμική δομή (Εικόνα 2). Προστατεύει το άκρο 3' από τη δράση εξωνουκλεασών 3'→5' και συμμετέχει σε διεργασίες, όπως στην έξοδο του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Το μήκος της ποικίλλει σημαντικά κατά τη διάρκεια της ζωής ενός mRNA και σε απόκριση σε διαφορετικά φυσιολογικά ερεθίσματα. Η πολυαδενυλίωση μπορεί να επηρεάσει τόσο τη σταθερότητα του μηνύματος όσο και την έναρξη της μετάφρασης. Επιπλέον, η αποικοδόμηση των mRNAs που πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα ξεκινά με την αφαίρεση της πολυ(A) ουράς.¹⁴⁻¹⁷

1.6. Σταθερότητα του mRNA

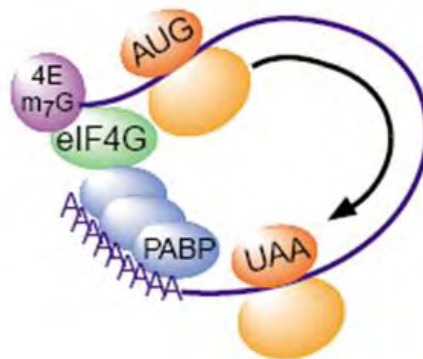
Η γονιδιακή έκφραση στα ευκαρυωτικά κύτταρα ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα, συμπεριλαμβανομένου της μεταγραφής, του ρυθμού αποικοδόμησης των mRNAs και της μετάφρασης. Η διαδικασία ρύθμισης του ρυθμού αποικοδόμησης

και της σταθερότητας των mRNAs αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τα επίπεδα των ενεργών μεταγράφων στα κύτταρα και μπορεί να ελεγχθεί κινητικά στα πολλαπλά επίπεδα.¹⁸

Η σταθερότητα ορισμένων mRNAs μπορεί να επηρεαστεί απευθείας από DNA υποκινητές και μεταγραφικούς παράγοντες, που είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή του μεταγράφου, και η οποία μπορεί να επιτευχθεί μέσω στρατολόγησης συγκεκριμένων ρυθμιστών της σταθερότητας του μεταγράφου. Επιπλέον, οι διαδικασίες με τις οποίες ελέγχεται, κυρίως, η σταθερότητα ή η αποικοδόμηση των mRNAs διενεργούνται από cis-δραστικά στοιχεία — όπως είναι η πολυ(A) ουρά, η 5'-καλύπτρα και τα στοιχεία ARE (AU-rich elements) — και από trans-δραστικούς παράγοντες, όπως είναι τα μη-κωδικά μόρια RNA (non-coding RNAs, ncRNAs), οι RNA-συνδεόμενες πρωτεΐνες (RNA-binding proteins, RBPs) και οι ριβονουκλεάσες.⁹

Τα cis-δραστικά στοιχεία της 5'-καλύπτρας και της πολυ(A) ουράς, φαίνεται ότι αποτελούν στοιχεία πρωταρχικής σημασίας για τη ρύθμιση του mRNA. Η σταθερή συγκέντρωση και αποτελεσματικότητα της μετάφρασης του mRNA εξαρτώνται τις τροποποιήσεις του μεταγράφου, δηλαδή την παρουσία της καλύπτρας και το μήκος της πολυ(A) ουράς, φανερώνοντας μία αλληλένδετη σχέση μεταξύ των διεργασιών αυτών. Η δομή της 5'-καλύπτρας αναγνωρίζεται από τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF-4E, καθιστώντας, έτσι, την αποτελεσματική στρατολόγηση του ριβοσώματος στο mRNA.¹⁹⁻²¹ (Εικόνα 3) Επιπλέον, η δομή αποκτά το mRNA στο χώρο, ύστερα από την πρόσδεση της καλύπτρας με το σύμπλοκο έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης και της πολυ(A) ουράς με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη πολυ(A)-συνδεόμενη πρωτεΐνη PABPC, είναι κυκλική, επιτρέποντας τη στρατολόγηση της 40S υπομονάδας του ριβοσώματος και τη συγκρότηση του πλήρους λειτουργικού 80S ριβοσώματος.²²⁻²⁴ Επίσης, η ρύθμιση της πολυ(A) ουράς στο κυτταρόπλασμα είναι στενά συνδεδεμένη με τον έλεγχο της μετάφρασης, καθώς μία πολυ(A) ουρά μεγάλου μήκους σχετίζεται με αποτελεσματική πρωτεϊνοσύνθεση. Επομένως, η παρουσία της καλύπτρας και της πολυ(A) ουράς εγείρει

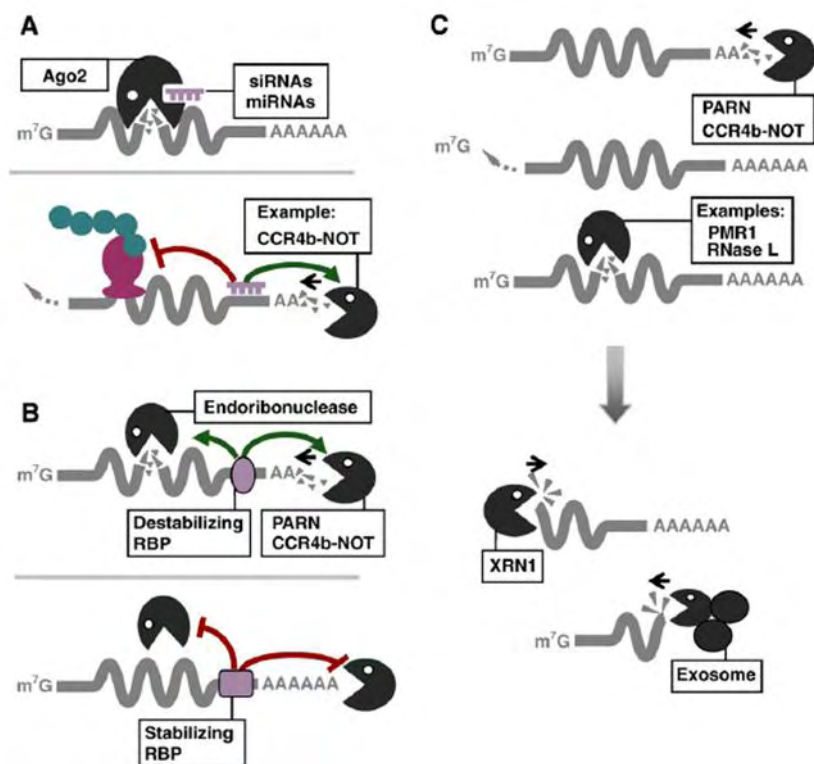
την έναρξη και την επανέναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης, καθορίζοντας την ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης.



Εικόνα 3 Η αλληλεπίδραση eIF4G και PABP κυκλοποιεί το mRNA φέρνοντας κοντά το άκρο 5' στο 3'

Η 5' καλύπτρα και η πολυ(A) ουρά αποτελούν σημαντικά στοιχεία αναγνώρισης από ρυθμιστικές και καταλυτικές πρωτεΐνες.²⁵⁻²⁷ Η υδρόλυση και των δύο αυτών δομών οδηγεί στην αποσταθεροποίηση των μορίων mRNA και την αποικοδόμησή τους, με την αφαίρεση της πολυ(A) ουράς, μέσω απαδενυλίωσης από ριβονουκλεάσες, να συνιστά το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμηση των μορίων mRNA.^{8, 28} Οι ριβονουκλεάσες τέμνουν μόρια RNA σε φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, προάγοντας την απαδενυλίωσή τους. Σε αυτές ανήκουν οι εξωριβονουκλεάσες, οι οποίες αποικοδομούν περαιτέρω τα απαδενυλιωμένα mRNAs από τα οποία έχει αφαιρεθεί η 5'-καλύπτρα τους, και οι ενδοριβονουκλεάσες, οι οποίες δεν προαπαιτούν την αφαίρεση της καλύπτρας ή την απαδενυλίωση προκειμένου να δράσουν, τέμνοντας στο εσωτερικό των μορίων και παράγοντας προϊόντα που αποικοδομούνται περαιτέρω από τις εξωριβονουκλεάσες με κατεύθυνση 5'→3' ή 3'→5' (Exosome complex).⁹ (Εικόνα 4C)

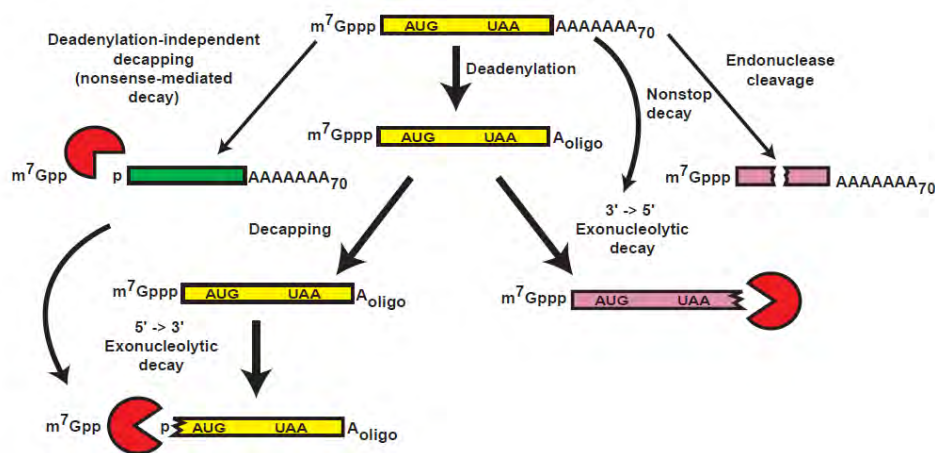
Άλλα trans-δραστικά στοιχεία αποτελούν οι RNA-συνδεόμενες πρωτεΐνες (RNA-binding proteins, RBPs) και τα μη-κωδικά μόρια RNA (ncRNAs). Οι RBPs επηρεάζουν δραματικά τη σταθερότητα των mRNAs, δρώντας στο χρόνο ημιζωής τους και ελέγχοντας το ρυθμό αποικοδόμησης συγκεκριμένων mRNAs ως απόκριση σε ερεθίσματα.²⁹⁻³¹ (Εικόνα 4B) Οι RBPs προσδένονται στις 3' αμετάφραστες περιοχές (3'-UTR), σε κωδικές περιοχές ή σε στοιχεία ARE των mRNAs και να προστατεύσουν τα μόρια από την αποικοδόμησή τους ή να εγείρουν την αποικοδόμηση, μέσω στρατολόγησης ενδοριβονουκλεασών και παραγόντων απαδενυλίωσης, γεγονότα που εξαρτώνται από τα mRNAs με τα οποία αλληλοεπιδρούν. Τα μη-κωδικά μόρια RNAs είναι μετάγραφα οποιουδήποτε μεγέθους που δε μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. (Εικόνα 4A) Η πρόσδεσή τους σε ένα μόριο mRNA μέσω συμπληρωματικότητας βάσεων προάγει την αναστολή της μετάφρασης του mRNA ή την αποικοδόμησή του, στρατολογώντας ριβονουκλεάσες.^{29, 32-37}



Εικόνα 4 Ρόλος των ριβονουκλεασών, των miRNAs και των RNA-συνδεόμενων πρωτεϊνών στη ρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs.⁹

1.7. Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA

Η αποικοδόμηση του ευκαρυωτικού mRNA παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και στον ποιοτικό έλεγχο της βιοσύνθεσης του mRNA.³⁸ Η απαδενυλίωση επηρεάζει με άμεσο τρόπο τον ρυθμό της αποικοδόμησης του mRNA και κατ' επέκταση τη συγκέντρωσή του σε συγκεκριμένα στάδια ή φυσιολογικές συνθήκες. Βασικός παράγοντας στις διαδικασίες της αποικοδόμησης αποτελεί το μήκος της πολυ(A) ουράς.



Εικόνα 5 Μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.⁸

Η αποικοδόμηση του mRNA συνήθως ξεκινά από την βράχυνση της πολυ(A) ουράς στο άκρο 3' του από τις απαδενυλάσες. Στη συνέχεια, στρατολογούνται ένζυμα, προκειμένου να αφαιρέσουν την 5'-καλύπτρα (όπως είναι το σύμπλοκο DCP1-DCP2) και ακολουθεί η πρόσδεση ριβονουκλεασών προς αποικοδόμηση του μορίου mRNA με προσανατολισμό 5'→3' ή 3'→5', ανάλογα με τη δράση τους. Η διαδικασία αυτή ορίζεται ως μονοπάτι αποικοδόμησης εξαρτώμενο από την απαδενυλίωση.³⁹⁻⁴⁴

Επίσης, υπάρχει και το μονοπάτι αποικοδόμησης ανεξάρτητο της απαδενυλίωσης στον *S. cerevisiae*, κατά το οποίο είναι απαραίτητη η στρατολόγηση της πρωτεϊνικής μηχανής απομάκρυνσης της καλύπτρας. Ωστόσο, η αποικοδόμηση ορισμένων mRNAs μπορεί να ξεκινήσει είτε με ενδονουκλεοτιδική διάσπαση από ενδοριβονουκλεάσες είτε με το μηχανισμό του RNAi.⁴⁵

1.8. Απαδενυλάσες

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, εκτός από τη δράση των ενδοριβονουκλεασών, η αποικοδόμηση των mRNAs στα κύτταρα των θηλαστικών, ξεκινά και με απαδενυλίωση⁸.

Ως απαδενυλάσες ορίζουμε τις εξωριβονουκλεάσες που αποικοδομούν την πολυ(A) ουρά των mRNAs με κατεύθυνση 3'-5' απελευθερώνοντας 5'-AMP. Οι απαδενυλάσες εκδηλώνουν μια σαφή προτίμηση για 3' - πολυ(A) ως υπόστρωμα, παρά το γεγονός πως σε ορισμένες περιπτώσεις έχει δειχτεί ότι αποικοδομούν λιγότερο αποτελεσματικά και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή^{7, 18, 46}.

Όλες οι γνωστές απαδενυλάσες είναι Mg^{2+} -εξαρτώμενα ένζυμα που μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες υπερ-οικογένειες με βάση την παρουσία συγκεκριμένων συντηρημένων καταλοίπων στο καταλυτικό τους κέντρο (Πίνακας 1). Η DEDD υπερ-οικογένεια έχει λάβει το όνομά της από τα καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu που βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ τριών μοτίβων εξωνουκλεάσης, τα οποία συντονίζονται από τα ιόντα Mg^{2+} . Μέλη αυτής της ομάδας αποτελούν η απαδενυλάση POP2 (γνωστή και ως CAF1), η CAF1Z, η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), καθώς και οι οικογένειες των PAN2 αποαδενυλασών. Από την άλλη μεριά η υπερ-οικογένεια των εξωνουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών (Exonuclease-Endonuclease-Phosphatase, EEP), περιλαμβάνει απαδενυλάσες που φέρουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στις δομικές περιοχές νουκλεάσης τους. Παραδείγματα EEP ενζύμων αποτελούν οι απαδενυλάσες CCR4, Nocturnin και Angel. Τα μέλη των οικογενειών POP2, CCR4, PAN2 και Angel είναι παρόντα σε όλους τους ευκαρυώτες, ενώ άλλες απαδενυλάσες είναι λιγότερο συντηρημένες⁷. Η εκτενής ποικιλότητα και η ποικιλομορφία των αποαδενυλασών υποδηλώνει πως πιθανότατα συγκεκριμένες απαδενυλάσες στοχεύουν συγκεκριμένα mRNAs ρυθμίζοντας τον έλεγχό τους στη δραστηριότητα ενός μόνο ενζύμου. Από την άλλη, διαφορετικές απαδενυλάσες μπορούν να δράσουν στο ίδιο mRNA με διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες λειτουργίες.

Οι απαδενυλάσες, εκτός από τον ρόλο που έχουν στη διαδικασία αποικοδόμησης των mRNAs, επιτελούν και αρκετούς εξειδικευμένους, ρυθμιστικούς, ρόλους. Κάποιες είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των οργανισμών. Άλλες, όπως είναι η

Πίνακας 1 Απαδενυλάσες από διαφορετικούς οργανισμούς έχουν ταξινομηθεί στις υπερικογένειες πρωτεϊνών DEDD και EEP με βάση της αμινικής αλληλουχίας της επικράτειας νουκλεάσης που περιέχουν.

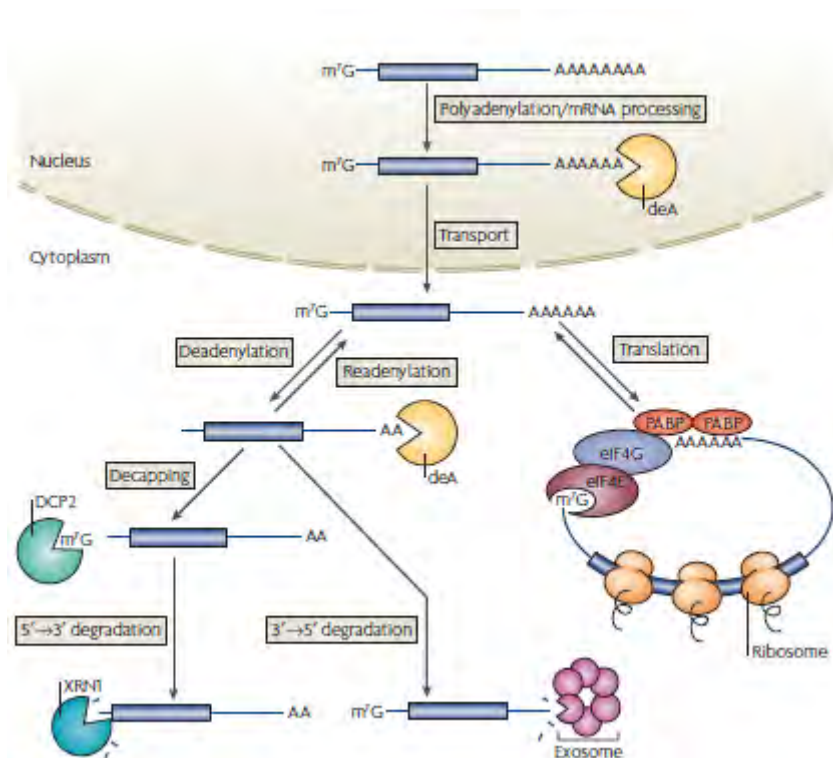
Family	Sc	Ce	Dm	Xl	Mm	Hs	Active	Notes	Protein domains	Local-ization
DEDD nucleases										
POP2	Pop2	CCF-1	POP2	CNOT8	CNOT8	CNOT8	Sc, Dm, Mm, Hs	Inhibited by PABP	DEDD	C, PB, Sh
				CNOT7	CNOT7	CNOT7	Hs		DEDD	
CAF1Z		CAF-1z		CAF1Z	CAF1Z	CAF1Z	Hs		DEDD, C3H ZnF, NLS	N, CB, Sh
PARN		PARN		PARN	PARN	PARN	Xl, Hs	Binds and stimulated by cap; inhibited by PABP and CBP80	DEDD, R3H, NBD, NLS	N, C, Sh
				PARNL	PARNL	PARNL	ND		DEDD	
PAN2	Pan2	PAN-2	PAN2	PAN2	PAN2	PAN2	Sc, Mm, Hs	Stimulated by PABP	DEDD, WD40, UCH	N, C, Sh
EEP nucleases										
CCR4	Ccr4	CCR-4	CCR4	CNOT6	CCR4	CNOT6	Sc, Dm, Mm, Hs	Inhibited by PABP	EEP, LRR	C, PB, Sh
				CNOT6L	CCR4L	CNOT6L	Mm, Hs		EEP, LRR	C, Sh
Nocturnin			NOC	Noc	NOC	NOC	Xl, Mm, Hs		EEP	C
ANGEL	Ng1	Angel	Angel	Angel1	ANGEL1	ANGEL1	ND		EEP	C, MA (Sc)
	Ng2			Angel2	ANGEL2	ANGEL2	Sc		EEP	C (Sc); N, CB, Sh (Hs)
	Ng3						ND		EEP	ND
2'PDE		2'PDE	2'PDE	2'PDE	2'PDE	2'PDE	Hs	Degrades 2'-5'A and 3'-5'A	EEP	ND

C3H ZnF: Cys-His δάκτυλος ψευδαργύρου, C: κυτταρόπλασμα, CB, σωμάτια Cajal, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Hs: *Homo sapiens*, LRR: επικράτεια πλούσια σε επαναλήψεις καταλοίπων λευκίνης, MA: σχετίζεται με το μιτοχόνδριο, Mm: *Mus musculus*, N: πυρήνας, ND: δεν έχει καθοριστεί, NBD: επικράτεια πρόσδεσης σε νουκλεοτίδια (σχετίζεται με το μοτίβο αναγνώρισης RNA), NLS: σήμα πυρηνικού εντοπισμού, PB: σωμάτια επεξεργασίας, R3H: μοτίβο καταλοίπων αργινίνης-ιστιδίνης, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Sh: πυρηνική-κυτταροπλασματική διακίνηση, UCH: υδρολάση ουβικουϊτίνης στο καρβοξυ-τελικό άκρο, Xl: *Xenopus laevis*.

PARN (*Xenopus laevis*) είναι σημαντικές κατά την πρώιμη ανάπτυξη, ενώ άλλες απαιτούνται για τη γονιμότητα και τη μεταβολική ομοίωση (CNOT7 και Nocturnin στα ποντίκια).

Η ρύθμιση της δραστηριότητας των αποαδενυλασών κρίνεται απαραίτητη, καθώς συνθήκες ανεξέλεγκτης αποαδενυλίωσης θα οδηγούσαν σε καταστροφή και θάνατο του κυττάρου. Σταθερά και μεταγραφικά ενεργά mRNAs πρέπει να προστατευθούν από την αποαδενυλίωση ενώ τα ασταθή και μη φυσιολογικά θα πρέπει να αποαδενυλιώνονται και να οδηγούνται στην αποικοδόμηση.

Οι αποαδενυλάσες συνήθως αποτελούν τμήμα συμπλόκων. Οι παρακαείμενες υπομονάδες, επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αποαδενυλασών. Για παράδειγμα, η PAN2 δεσμεύεται στην PAN3, που με τη σειρά της αλληλεπιδρά με την PABP. Η τελευταία στρατολογεί το σύμπλοκο PAN2-PAN3 στην πολυ(A) ουρά των mRNA-στόχων ⁴⁷. Άλλες αποαδενυλάσες σχηματίζουν ομοδιμερή και άλλες ετεροδιμερή.



Εικόνα 6 Μονοπάτια μετάφρασης και αποαδενυλίωσης ⁷.

Ο ετεροδιμερισμός αυξάνει σημαντικά το ρεπερτόριο των συμπλόκων των αποαδενυλασών που σχηματίζονται, καθώς διαφορετικά ετεροδιμερή έχουν και διαφο-

ρετικές ενζυμικές και ρυθμιστικές ιδιότητες. Η δυνατότητα για έλεγχο της απαδενυλίωσης καθίσταται τεράστια και ιδιαίτερα πολύπλοκη, λόγω της αλληλεπίδρασης των πολυάριθμων πιθανών συμπλόκων αποαδενυλασών με την τεράστια ποικιλία των ρυθμιστών τους και την αλληλεπίδραση των τελευταίων με μία εξίσου μεγάλη ποικιλία διαφορετικών ρυθμιστικών στοιχείων επί των 3'-UTR περιοχών των mRNA-στόχων ⁷.

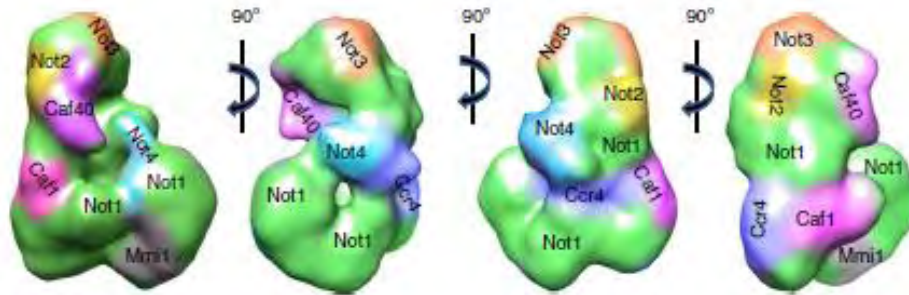
Τα σύμπλοκα αποαδενυλασών που στρατολογούνται από ειδικούς ρυθμιστές είναι πολυλειτουργικά καθώς περιέχουν, εκτός των ενζύμων απαδενυλίωσης, συστατικά που καταστέλλουν τη μετάφραση και συστατικά που ενισχύουν την αποικοδόμηση του mRNA. Η πολυλειτουργικότητα αυτή παρέχει ευκαιρίες για πολυάριθμα σημεία ρύθμισης της απαδενυλίωσης, της μετάφρασης και της αποικοδόμησης των mRNAs, είτε ξεχωριστά είτε συντονισμένα ⁷.

1.9. Το σύμπλοκο CCR4-NOT

Το σύμπλοκο CCR4 (Carbon Catabolite Repressed 4)-NOT (Negative on TATA-less) είναι ένα πολύ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο είναι συντηρημένο σε όλους τους ευκαρυώτες και συμβάλλει σε όλα τα στάδια του μεταβολισμού του RNA. Σταδιακά έχει προκύψει ως ένας σημαντικός ρυθμιστής της ομοιόστασης της γονιδιακής έκφρασης στους ευκαρυώτες ⁶.

Δομή του Συμπλόκου CCR4-NOT

Το σύμπλοκο έχει απομονωθεί από κύτταρα της ζύμης και έχει μοριακό βάρος 1,0 MDa ⁴⁸. Το ετεροπολυμερές αυτό σύμπλοκο έχει, επίσης, απομονωθεί με μικρότερο και με μεγαλύτερο μοριακό βάρος από κύτταρα διαφόρων ευκαρυωτών, ανιχνεύοντας σε αυτά όλες τις υπομονάδες του πυρήνα του συμπλόκου. Έτσι, δεν είναι γνωστό εάν οι υπομονάδες του συμπλόκου απομακρύνονται *in vitro* ή εάν άλλα σύμπλοκα αλληλοεπιδρούν με το σύμπλοκο CCR4-NOT *in vivo* ⁶.



Εικόνα 7 Ο χάρτης υπομονάδων του συμπλόκου CCR4-NOT στον *Schizosaccharomyces pombe*. Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι η υπομονάδα *Mmi1* ανιχνεύεται μόνο στον *S. pombe*².

Ο πυρήνας του συμπλόκου αποτελείται από 6 καλά συντηρημένες πρωτεΐνες-υπομονάδες: NOT1, NOT2, NOT5, CAF40, CCR4, CAF1⁴⁹. Η πρωτεΐνη NOT1 αποτελεί ένα αρθρωτό ικρίωμα στο οποίο συνδέονται όλες οι υπόλοιπες υπομονάδες⁵⁰. Ωστόσο, μεταξύ των ευκαρυωτών συναντώνται ορισμένες διαφορές. Η πρωτεΐνη NOT4, μία E3 λιγάση ουβικουιτίνης, είναι μία συντηρημένη πρωτεΐνη στους ευκαρυώτες, που όμως αποτελεί σταθερή υπομονάδα του συμπλόκου μόνο στον *Saccharomyces cerevisiae*⁵¹. Επιπλέον, στον *S. cerevisiae* απαντώνται, δύο γονίδια, τα *NOT3* και *NOT5*, τα οποία, πιθανώς να προέκυψαν ύστερα από διπλασιασμό, και πρωτεΐνες NOT3 και NOT5 εμφανίζουν μεταξύ τους 44% ομοιότητα στο αμινο-τελικό άκρο τους⁵². Ωστόσο, στο γονιδίωμα των *Homo sapiens* και *Drosophila melanogaster* υπάρχει ένα μόνο γονίδιο, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CNOT3 (στον *H. sapiens*, NOT5 στην *Dr. melanogaster*) και εμφανίζει ομολογία

Πίνακας 2 Οι ονομασίες των γονιδίων των υπομονάδων του συμπλόκου CCR4-NOT στους οργανισμούς *S. cerevisiae*, *Dr. melanogaster* και *H. sapiens*⁶.

Core Name	<i>Drosophila</i> Gene Name	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Gene Name	<i>Homo sapiens</i> Gene Name
Not1	<i>Not1</i>	<i>NOT1/CDC39</i>	<i>CNOT1</i>
Not2	<i>Regena (Rga)</i>	<i>NOT2/CDC36</i>	<i>CNOT2</i>
Not5	<i>Not3</i>	<i>NOT5</i>	<i>CNOT3</i>
Caf1	<i>Pop2</i>	<i>CAF1/POP2</i>	<i>Caf1a/CNOT7/CAF1 and Caf1b/CNOT8/POP2/CALIF</i>
Ccr4	<i>twin</i>	<i>CCR4</i>	<i>CCR4a/CNOT6C and CCR4b/CNOT6L</i>
Caf40	<i>Rcd1</i>	<i>CAF40</i>	<i>CNOT9/Rcd1/CAF40/RQCD1</i>
Not4	<i>Not4</i>	<i>NOT4/MOT2/SIG1</i>	<i>CNOT4</i>
Not10	<i>Not10</i>		<i>CNOT10</i>
Not11	<i>Not11</i>		<i>CNOT11/C2orf29</i>
Caf130		<i>CAF130</i>	
Not3		<i>NOT3</i>	
TAB182			<i>TAB182</i>

στο αμινο-τελικό άκρο της αντίστοιχης πρωτεΐνης του *S. cerevisiae*^{53,54}. Το μετάγραφο του γονιδίου αυτού υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα, παράγοντας μία μεγάλη ή μία μικρή πρωτεΐνη (CNOT3L ή CNOT3S, αντίστοιχα)⁵². Στον *H. sapiens*, φαίνεται να υπάρχουν ακόμα τρεις υπομονάδες στον πυρήνα του συμπλόκου CCR4-NOT: οι πρωτεΐνες CNOT10, CNOT11 και η TAB182. Οι δύο πρώτες εκφράζονται και στην *Dr. melanogaster*, ενώ η τελευταία μόνο στον *H. sapiens*⁵⁵⁻⁵⁷.

Υποκυτταρικός Εντοπισμός

Τα συστατικά του συμπλόκου έχουν εντοπιστεί τόσο στον πυρήνα, όσο και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων^{51, 58-60}. Στο κυτταρόπλασμα, οι υπομονάδες εντοπίζονται σε πολυσώματα (polysomes), όπου τα mRNAs μεταφράζονται σε πρωτεΐνες, καθώς και σε σωμάτια επεξεργασίας (processor bodies, P-bodies), στα οποία τα mRNAs έχουν υποστεί αναστολή της μετάφρασης, αφαίρεση της καλύπτρας ή/και έναρξη της αποικοδόμησής τους⁶¹⁻⁶³.

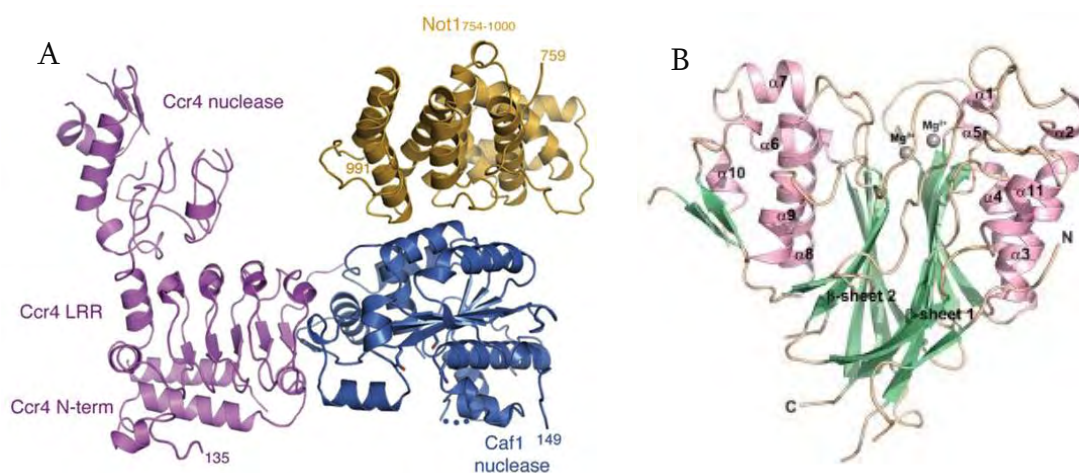
Ρόλος του CCR4-NOT στα Ευκαρυωτικά Κύτταρα

Το CCR4-NOT είναι ένα πολυλειτουργικό σύμπλοκο, κάθε υπομονάδα του οποίου εκτελεί ξεχωριστές λειτουργίες, με τέτοιο τρόπο, ώστε να συντονίζουν τα διαφορετικά στάδια της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Αρχικό βήμα είναι η σύνθεση του RNA. Το CCR4-NOT επάγει την αλλαγή της διαμόρφωσης της χρωματίνης, σημαντικό ρόλο στην οποία φαίνεται να έχουν οι υπομονάδες NOT4 και NOT5. Οι υπομονάδες αυτές συνεργάζονται με άλλα ένζυμα ή αναστέλλουν άλλα –μέσω ουβικουιτίνωσης– με απώτερο στόχο το σχηματισμό και τη διατήρηση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στις ιστόνες H3 και H4 των νουκλεοσωμάτων⁶⁴⁻⁶⁷. Επιπλέον, έχει δειχθεί, ότι το σύμπλοκο μπορεί να αποτελέσει τόσο αρνητικός, όσο και θετικός ρυθμιστής της μεταγραφής⁶⁸⁻⁷¹. Οι υπομονάδες του συμπλόκου –κυρίως οι NOT2 και NOT5– συνδέονται με μεταγραφικούς παράγοντες και ρυθμίζουν τη μεταγραφή στο στάδιο εκκίνησης και στο στάδιο επιμήκυνσης⁷²⁻⁷⁵. Η σύνδεση του συμπλόκου με άλλες πρωτεΐνες του πυρήνα επάγει τον έλεγχο

της ποιότητας των mRNAs και την έξοδό τους από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα ⁷⁶. Διάφορες έρευνες δηλώνουν, ακόμα, ότι το σύμπλοκο συμμετέχει στη διαδικασία της μετάφρασης, που είτε μέσω των λειτουργιών του –κυρίως ουβικουτινώση και απαδενυλίωση- είτε μέσω στρατολόγησης άλλων ενζύμων (πχ 4E-T, chaperones), εμπλέκεται στον έλεγχο των επιπέδων της μετάφρασης των mRNAs σε πρωτεΐνες ⁶.

Οι απαδενυλάσες CCR4-CAF1

Η μετάφραση και η αποσύνθεση των mRNAs είναι δύο στενά συνδεδεμένες διαδικασίες, ανταγωνιζόμενες η μία την άλλη. Το κύριο μονοπάτι αποσύνθεσης των mRNAs στους ευκαρυώτες περιλαμβάνει την αφαίρεση της καλύπτρας στο άκρο 5' και ακολουθεί εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση με προσανατολισμό 5' → 3'. Το αρχικό και περιορισμένου ρυθμού βήμα σε αυτό το μονοπάτι είναι η απαδενυλίωση, η οποία εκτελείται κυρίως από τις υπομονάδες CAF1 και CCR4 του συμπλόκου CCR4-NOT, και αποτελούν τις κύριες ευκαρυωτικές απαδενυλάσες ⁶.



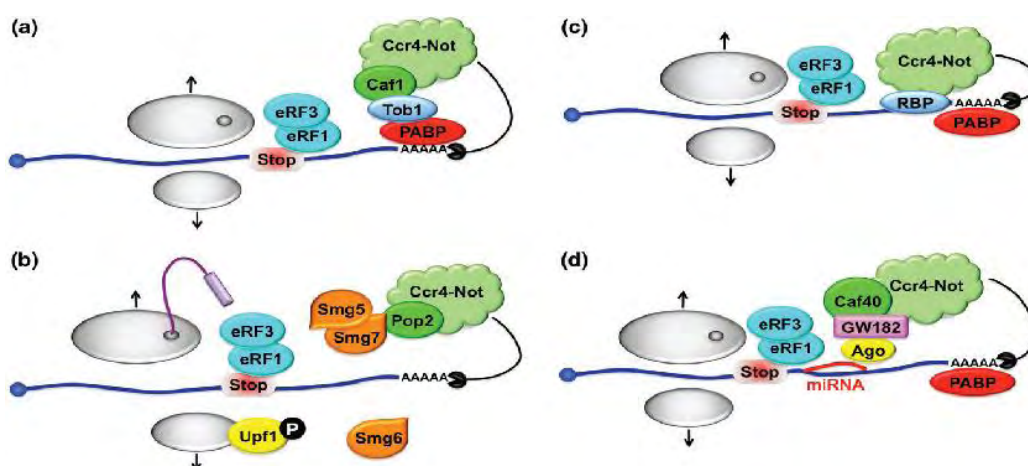
Εικόνα 8 (Α) Οι δομές των υπομονάδων CCR4 και CAF1 και η αλληλεπίδρασή τους με την NOT1 στον *S. cerevisiae*¹. (Β) Η δομή της καταλυτικής επικράτειας της ανθρώπινης CNOT6L (PDB 3NGO)³.

Η CAF1 υπομονάδα χαρακτηρίζεται από την παρουσία της πρωτεϊνικής επικράτειας ριβονουκλεάσης D (RNase D domain), η οποία ανήκει στην υπεροικογένεια πρωτεϊνών DEDD ^{7, 77-79}. Στα θηλαστικά εντοπίζονται δύο παράλογα γονίδια: *CNOT7* και *CONT8* (οι ονομασίες των γονιδίων αντιστοιχούν μόνο σε αυτές του

H. sapiens)⁷⁹. Η πρωτεΐνη CAF1 παρουσιάζει μία προτίμηση για πολυ(A) ως υπόστρωμα, αν και διάφορα μέλη της οικογένειας αυτής μπορούν να πέψουν μη-πολυ(A) αλληλουχίες με διαφορετικές αποδόσεις⁸⁰. Για τη λειτουργία του ενζύμου απαιτείται η παρουσία δύο ιόντων μαγνησίου (Mg^{2+})^{81,82}. Η CCR4 υπομονάδα χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο συντηρημένων επικρατειών: στο αμινο-τελικό άκρο περιέχεται μία επικράτεια πλούσια σε επαναλήψεις καταλοίπων λευκίνης (Leucine-Rich Region, LRR) και στο καρβοξυ-τελικό άκρο περιέχεται η επικράτεια ενδοριβονουκλεάσης –εξωριβονουκλεάσης –φωσφατάσης (Endoribonuclease –Exoribonuclease –Phosphatase, EEP). Η πρώτη παρέχει την επιφάνεια αλληλεπίδρασης της CCR4 με την CAF1, ενώ η δεύτερη σχετίζεται με τη ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα^{3,83}. Στα θηλαστικά εντοπίζονται δύο παράλογες υπομονάδες, τις CNOT6 και CNOT6-like (CNOT6L), οι οποίες συνδέονται στο σύμπλοκο, αλλά δεν μπορούν αν συνυπάρξουν μαζί στο ίδιο σύμπλοκο. Έχουν ισχυρή προτίμηση στο πολυ(A) ως υπόστρωμα και για τη λειτουργία τους απαιτούνται δύο ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}).

Ένα πιθανός μηχανισμός απαδενυλίωσης περιλαμβάνει το ετεροδιμερές σύμπλοκο απαδενυλίωσης PAN (PAN2/PAN3)⁸⁴. Με το τέλος της μετάφρασης στρατολογούνται στα κωδικόνια λήξης της μετάφρασης οι παράγοντες λήξης της μετάφρασης (translation termination factors), οι eRF1 και eRF3, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την στρατολόγηση του συμπλόκου PAN2/PAN3⁸⁵. Το σύμπλοκο αυτό φαίνεται να ξεκινά την αποικοδόμηση της πολυ(A) ουράς, αφήνοντας υπολειπόμενες αδενοσίνες στο άκρο 3' του mRNA^{86,87}. Το σύμπλοκο CCR4-NOT στρατολογείται στο mRNA από την οικογένεια πρωτεϊνών BTG/TOB, οι οποίες αλληλοεπιδρούν με τις πρωτεΐνες σύνδεσης στην πολυ(A) ουρά [Poly(A)-binding proteins, PABPs]⁸⁵. Επιπλέον, πολλές ειδικές πρωτεΐνες σύνδεσης στο RNA (RNA-binding proteins, RBPs) στρατολογούν το σύμπλοκο είτε μέσω της αλληλοεπίδρασή τους με την NOT1 υπομονάδα του συμπλόκου είτε αλληλοεπιδρώντας με τις πρωτεΐνες της οικογένειας BTG/TOB⁶.

Στην περίπτωση ύπαρξης λανθασμένου κωδικονίου λήξης στο μετάγραφο εκτελείται ανοηματικά-επαγόμενη mRNA αποσύνθεση (non-sense mediated mRNA decay, NMD). Η στρατολόγηση του συμπλόκου είναι αποτέλεσμα ενός μονοπατιού, που περιλαμβάνει τις SMG5, 6 και 7 πρωτεΐνες. Στο μηχανισμό αυτό φαίνεται να συμμετέχει στο σύμπλοκο μόνο η CNOT8 από τις παράλογες CAF1 πρωτεΐνες⁶. Ένας τελευταίος και καλά μελετημένος μηχανισμός απαδενυλίωσης του συμπλόκου αφορά την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης μέσω της δράσης των miRNAs. Στην περίπτωση αυτή, η AGO1 οδηγεί στην στρατολόγηση της πρωτεΐνης GW182, η οποία με τη σειρά της φέρνει κοντά στο mRNA απαδενυλάσες, συμπεριλαμβανομένου και του συμπλόκου CCR4-NOT⁶.



Εικόνα 9 (a) Το CCR4-NOT στρατολογείται μέσω αλληλοεπίδρασης της υπομονάδας CAF1 και Tob1, (b) Ο μηχανισμός της απαδενυλίωσης κατά την NMD, (c) Οι RBPs μπορούν να δεσμεύσουν το CCR4-NOT σύμπλοκο στοχεύοντας mRNA ύστερα από φυσιολογικό τερματισμό της μετάφρασης, (d) Ο μηχανισμός απαδενυλίωσης μέσω των miRNAs⁶.

1.10. ANGEL2

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα ανιχνεύονται πρωτεΐνες που φέρουν ομολογία με την πρωτεΐνη CCR4, αν και δε φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με το σύμπλοκο CCR4-NOT. Οι πρωτεΐνες αυτές στερούνται την επικράτεια LRR, ενώ περιλαμβάνουν στην αλληλουχία τους την επικράτεια EEP. Στον *S. cerevisiae*, οι πρωτεΐνες αυτές είναι οι NGL1, NGL2 και NGL3, ενώ στους ανώτερους ευκαρυώτες συναντώνται οι NOCTURNIN, ANGEL1, ANGEL2 και PDE12⁷⁹.

Οι ANGEL πρωτεΐνες (ANGEL1, ANGEL2) θεωρείται ότι δρουν ως απαδενυλάσες, λόγω ομοιότητας της αλληλουχίας τους με την οικογένεια πρωτεϊνών CCR4. Κύρια στοιχεία που υποστηρίζουν αυτή τη δράση τους προέρχονται από αναφορές που συνδέουν τις ANGEL με τις CAF1 πρωτεΐνες. Ωστόσο, δεν έχουν αναφερθεί αναλύσεις *in vitro* για τη δράση της ANGEL1 ως απαδενυλάση.⁸⁸

Η ANGEL2/CCR4D των ανώτερων ευκαρυωτών (*Dr. melanogaster* και *H. sapiens*) φέρει ομολογία με την NGL2⁷ στον οργανισμό *Saccharomyces cerevisiae*, η οποία εμπλέκεται στην ωρίμανση του άκρου 3' του 5,8S rRNA⁸⁹.

Σε αντίθεση με την NGL2, που έχει μόνο ένα μετάγραφο, το ανθρώπινο γονίδιο *ANGEL2* κωδικοποιεί τελικά πέντε διαφορετικά εναλλακτικά μετάγραφα, από τα οποία παράγονται τρεις πρωτεΐνες. Αν και δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα τόσο για τη λειτουργία της όσο και για τη δομή της, η ANGEL2/CCR4D ενδέχεται να εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο, επηρεάζοντας τα επίπεδα του αναστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cyclin-dependent kinases, CDKs), p21⁹⁰, μέσω ενός p35-ανεξάρτητου μηχανισμού. Ειδικότερα, η ANGEL2 αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, αλληλοεπιδρώντας με το *P21/CIP1* mRNA, το οποίο είναι ένας άμεσος μεσολαβητής αναστολής του κυτταρικού κύκλου κατά τη μετάβαση από τη φάση G1 στην S, και ρυθμίζει θετικά την έκφραση του *P21/CIP1* σταθεροποιώντας το mRNA.^{88, 90}

Η ANGEL2/CCR4D σχηματίζει σύμπλοκο με την πρωτεΐνη CAF1Z/TOE1 στον *H. sapiens*, που εκφράζεται από ένα παράλογο γονίδιο του CNOT7, ενώ είναι πιθανό να μην αλληλοεπιδρά με τις υπόλοιπες υπομονάδες του συμπλόκου CCR4-NOT. Το σύμπλοκο αυτό CAF1Z/ANGEL2 εντοπίζεται στον πυρήνα, και ειδικότερα στα σωματίδια Cajal (Cajal bodies), όπου λαμβάνουν χώρα οι διεργασίες σύνθεσης, ωρίμανσης και αποικοδόμησης των snRNAs και snoRNAs^{91, 92}, ενώ ενδέχεται, επίσης, να μετακινείται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα⁹³.

Καλύτερα χαρακτηριζόμενη για τη λειτουργία της είναι η πρωτεΐνη CAF1Z. Όπως και οι υπόλοιπες πρωτεΐνες CAF1 φέρει μία επικράτεια DEDD, ενώ η αλληλουχία της περιλαμβάνει επιπλέον το μοτίβο δακτύλου ψευδαργύρου (C₃H-type zinc

fenger) και μία επικράτεια σήματος πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS) ⁹³. Ωστόσο, πιστεύεται ότι φέρει περισσότερες ομοιότητες με την PARN απαδευνύλωση ⁹⁴. *In vitro*, η CAF1Z/TOE1 έχει δράση απαδευνύλωσης, ειδική για πολυ(A) υποστρώματα ⁹³. Πρόσφατα, έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται στην επεξεργασία και ωρίμανση των snRNAs (πιθανό στα σωμάτια Cajal) και ειδικότερα των U1, U2 και U5 snRNAs ⁹⁵. Παράλληλα, η CAF1Z/TOE1 αποτελεί στόχο του μεταγραφικού παράγοντα EGR1 (εξού και η ονομασία TOE1, Target of EGR1), συμμετέχοντας στον κυτταρικό κύκλο και επηρεάζοντας τα επίπεδα της p21 ^{96,97}.

2. Σκοπός της εργασίας

Η ANGEL2/CCR4D δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, εγείροντας πολλά ερωτήματα σχετικά με το ρόλο που διαδραματίζει στους ανώτερους ευκαρυώτες. Η παρούσα αυτή εργασία αποσκοπεί να συμβάλλει στην αποσαφήνιση του βιολογικού ρόλου των πρωτεϊνών που παράγονται από το γονίδιο *ANGEL2*.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1. Υλικά

Χημικές Ουσίες

Acrilamide	Sigma
Ethanol	Merck
APS (Ammonium Persulfate)	Sigma
β -mercaptoethanol	Riedel-de Haen
Bis-acrylamide	Sigma
Bromophenol Blue	Research Organics
Coomasie Brilliant Blue	Research Organics
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)	Merck
Glycerol	Panreac
Glycine	Applichem
Hydrogen Chloride (HCl)	Merck
Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyra- noside (IPTG)	Sigma
O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fischer Scientific
LB Broth	Scharlau
LB Agar	Scharlau
Methanol	Merck
Midori Green DNA stain	Nippon Genetics
2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)	Merck
Sodium Chloride (NaCl)	Panreac
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
Acetic Acid	Merck

Temed (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)	Research Organics
Tris Base	Merck
Tween 20	Euroclone
Xylene Cyanol	Merck

Ένζυμα

EcoRI	Takara
-------	--------

Kit

Nucleospin TriPrep Kit	Macherey-Nagel
Nucleospin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
Nucleospin Gel and PCR Clean-Up Kit	Macherey-Nagel
1 st Strand cDNA Synthesis Kit	Takara
KAPA Taq PCR Kit	Sigma
KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit	Sigma
In-Fusion HD Cloning Kit	Clontech

Βακτηριακά Στελέχη

- I. XL1-Blue: Γονότυπος: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lac^qZΔM15 Tn10(Tet^r)] Στέλεχος του βακτηρίου *Escherichia coli* που ενδείκνυται για την εισαγωγή και κλωνοποίηση πλασμιδιακών και λ φορέων
- II. Rosetta2: Γονότυπος: F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE2 (CamR) Αποτελούν παράγωγο στέλεχος των βακτηριακών στελεχών BL21 (*Escherichia coli*) και έχουν σχεδιαστεί για την ενίσχυση της έκφρασης των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών, οι οποίες περιέχουν κωδικόνια που σπανίως χρησιμοποιούνται από το βακτήριο *Escherichia coli*. Το στέλεχος Rosetta 2

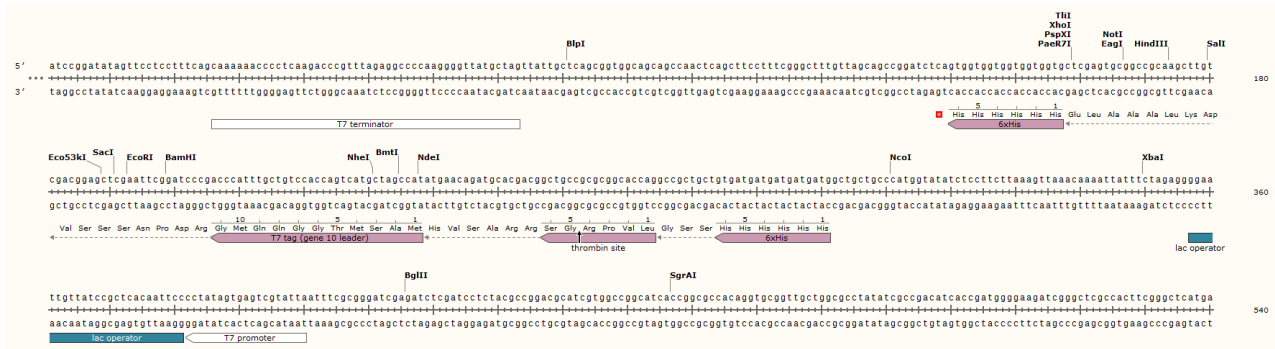
προβλέπει καθολική μετάφραση πρωτεϊνών παρέχοντας σπάνια για το βακτήριο *Escherichia coli* tRNAs.

Πλασμιδιακοί φορείς

pET33b(+): Πρόκειται για πλασμιδιακό φορέα μεγέθους που χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση και την έκφραση των γονιδίων μέσω της T7 RNAPol. Μετά τον προαγωγέα της T7 RNAPol υπάρχει ο πολυσυνδέτης (polylinker ή Multiple Cloning Site, MCS), ακολουθούμενος από τον επίτοπο 6 ιστιδίων (His-Tag) και τον επίτοπο T7 (T7-Tag).



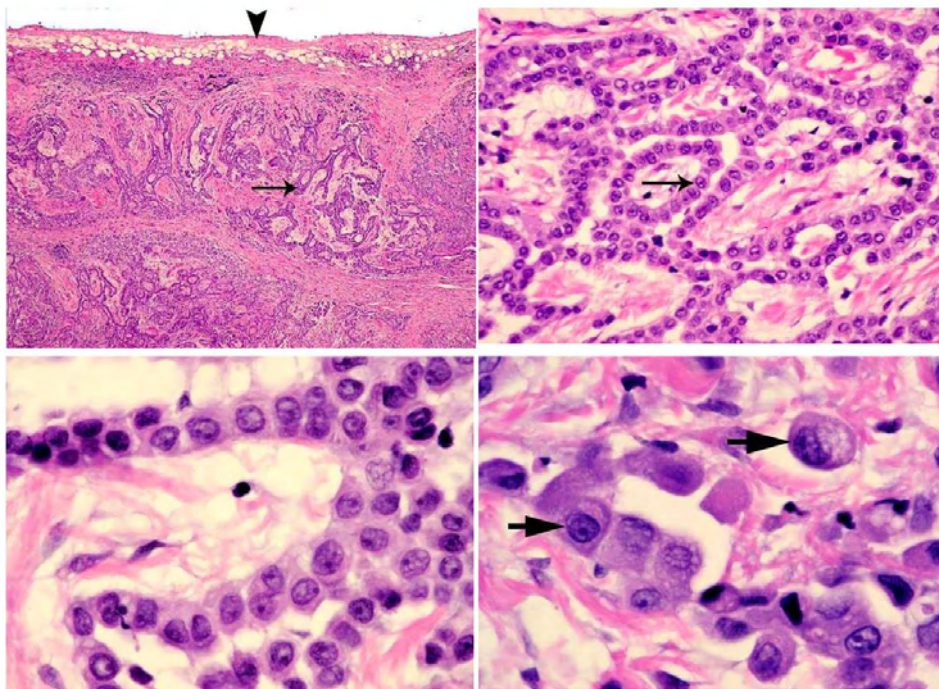
Εικόνα 10 Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pET33b(+)



Εικόνα 11 Η περιοχή του πολυσυνδέτη του πλασμιδιακού φορέα rET33b(+). Στην εικόνα εμφανίζονται, επίσης, οι θέσεις έ-
ναρξης και τερματισμού της μεταγραφής της T7 RNA πολυμεράσης και οι θέσεις των ετικετών.

Κυτταρική Σειρά

M14K: Πρόκειται για επιθηλιακά κύτταρα του κακοήθους μεσοθηλιώματος του υπεζωκότα (malignant pleural epithelioid mesothelioma) στον πνεύμονα. Το κκο-
ήθες μεσοθηλίωμα είναι ο κοινός τύπος καρκίνου στον υπεζωκότα, που προκα-
λείται στα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα και των περιτονιακών κοιλοτή-
των. Η έκθεση των ανθρώπων στον αμίαντο αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα
εμφάνισης αυτού του τύπου καρκίνου. Η συσχέτιση αυτή είναι πολύ υψηλή, σε
ποσοστό 80-100%.⁹⁸⁻¹⁰³ Η κυτταρική σειρά παραχωρήθηκε από τον Δρ. Ζαρο-
γιάννη (Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας).



Εικόνα 12 Ιστολογικές απεικονίσεις του κοκοήθους μεσοθηλιώματος του υπεζοκάτα. (Α) Στο σημείο που δείχνεται με το βέλος παρουσιάζεται ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων του μεσοθηλιώματος σε δίκτυα εσωτερικής σύνδεσης ιστών (inter-anastomosing cords) και εισβάλλουν στον ιστό του υπεζοκάτα. (Β) Το κακοήθες επιθηλιακό μεσοθηλιώμα παρουσιάζει τυπικές σωληνοειδείς/ψευδο-κυψελιδικές δομές που περικλείεται από ένα στρώμα κολλαγόνου. (Γ) Τα καρκινικά κύτταρα ευθυγραμμίζονται σε ένα μοτίβο τύπου έλικας (ribbon-like pattern) και παρουσιάζουν μεταβολές στο αμφιφιλικό κυτταρόπλασμα (amphophilic cytoplasm) και πυρηνική ατυπία. (Δ) Παρουσιάζεται η κυτταροπλασματική ποιότητα των καρκινικών κυττάρων και η μορφολογία τους. (www.pathpedia.com)

Εκκινητές

Για την ανίχνευση των κωδικών περιοχών των διαφορετικών μεταγράφων του γονιδίου *ANGEL2*, αλλά και για την ένθεση τους στον πλασμιδιακό φορέα, σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές για την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με τη βοήθεια των εργαλείων Primer3 και In-Fusion Cloning Primer Design. Ο κάθε εκκινητής ελέγχθηκε ως προς την εξειδίκευσή του με βάση του προγράμματος NCBI Primer-Blast.

Βασικά κριτήρια για τον σχεδιασμό των εκκινητών της PCR αποτελούν:

- Το μέγεθος των εκκινητών: Οι εκκινητές είναι συνήθως ολιγονουκλεοτίδια 18-30 βάσεων. Μικρότεροι εκκινητές οδηγούν σε μη ειδικό υβριδισμό, ενώ μεγαλύτεροι εκκινητές έχουν μεγαλύτερη ειδικότητα, αλλά αυξάνεται η πιθανότητα δημιουργία δευτερογενών δομών που μειώνουν την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού.
- Η αλληλουχία των εκκινητών: Οι εκκινητές πρέπει να έχουν απόλυτη συμπληρωματικότητα προς την αλληλουχία στόχο, αλλά ελάχιστη έως καθόλου συμπληρωματικότητα μεταξύ τους. Ο υβριδισμός μεταξύ των εκκινητών οδηγεί στο σχηματισμό διμερών εκκινητών (Primer dimers) που έχουν μέγεθος 30-50 βάσεων και μειώνουν την αποτελεσματικότητα της PCR, καθώς και του υβριδισμού στην αλληλουχία στόχο.
- Η θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών (T_m): Η T_m εξαρτάται από το μέγεθος της αλληλουχίας και τη σύσταση των βάσεων της αλληλουχίας. Υψηλό ποσοστό σε βάσεις γουανίνης και κυτοσίνης αυξάνει την T_m , καθώς οι βάσεις γουανίνη και κυτοσίνη ενώνονται με τις συμπληρωματικές του

στο δίκλωνο DNA με τρεις δεσμούς υδρογόνου, σε αντίθεση με τις βάσεις αδενίνη και τυροσίνη που ενώνονται με δύο δεσμούς υδρογόνου.

Για τον εντοπισμό των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *ANGEL2/CCR4D*, σχεδιάστηκαν εκκινητές οι οποίοι θα μπορέσουν να προσδεθούν στα άκρα 3' και στο 5' κάθε διαφορετικού μεταγράφου. Ωστόσο, στην περίπτωση αυτών των εναλλακτικών μεταγράφων, τυγχάνει και τα πέντε (5) διαφορετικά μετάγραφα να έχουν το ίδιο 3' άκρο. Το μετάγραφο 1 έχει ξεχωριστό 5' άκρο, τα μετάγραφα 2 και 3 έχουν ίδιο 5' άκρο, ενώ τα μετάγραφα 4 και 5 έχουν επίσης ξεχωριστό 5' άκρο. Έτσι, σχεδιάστηκαν τρεις διαφορετικοί εμπροσθοδρομικοί εκκινητές οι οποίοι στοχεύουν τα αντίστοιχα 5' άκρα των μεταγράφων και ένας μόνο αντίστροφος. Οι εκκινητές παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα 3.

Πίνακας 3 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, για την ενίσχυση των μεταγράφων ANGEL2

Εναλλακτικά Μετάγραφα <i>ANGEL2</i>	Είδος Εκκινητή	Εκκινητής	T _m (°C)	Μέγεθος Προϊόντος (bps)
1	Forward	ATGGAAGCCTGGCGCTGT	58,20	1634
2 & 3	Forward	ATGGAAGGTGTGATAAAGCGG	57,96	1256
4 & 5	Forward	GGATGTCCTATAATATACTTTCACAAGATT	57,80	1127
Κοινός Reversed Εκκινητής		GCTCAGAGCTCAAGTCTGAACT	60.03	

Για την ενίσχυση των άκρων των μεταγράφων, προκειμένου να εισαχθούν τα μετάγραφα στο πλασμίδιο pET33b(+), σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές που θα αποτελούνται από δύο τμήματα: το ένα θα αποτελεί μία αλληλουχία αλληλοεπικάλυψης με το ένθεμα, τόσο για το άκρο 5' (εμπροσθοδρομικός εκκινητής, forward primer) όσο και για το 3' (αντίστροφος εκκινητής, reverse primer), και το δεύτερο θα αποτελεί την αλληλουχία ενίσχυσης του επιθυμητού άκρου του μεταγράφου. Όπως και προηγουμένως, έτσι και για τη διαδικασία αυτή σχεδιάστηκαν 4 εκκινητές (3 εμπρόσθιοι εκκινητές και 1 οπίσθιος εκκινητής). Για την ενίσχυση άκρων των

μεταγράφων, με σκοπό την ενσωμάτωση των αντίστοιχων cDNA κλώνων –μεταγράφων του *ANGEL2* στον πλασμιδιακό φορέα, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα 4.

Πίνακας 4 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των άκρων των cDNA μεταγράφων του ANGEL2, για την ενσωμάτωσή τους στον πλασμιδιακό φορέα.

Εναλλακτικά Μετάγραφα <i>ANGEL2</i>	Είδος Εκκινητή	Εκκινητής	T _m (°C)
1	Forward	GTCGGGATCCGAATTATGGAAGCCTGGCGCTGT	73,20
2 & 3	Forward	GTCGGGATCCGAATTATGGAAGGTGTGATAAAGCG	70,60
4 & 5	Forward	GTCGGGATCCGAATTATGTCCTATAATACTTTTCAC	67,20
Κοινός Reversed Εκκινητής		GACGGAGCTCGAATTTTCAGAGCTCAAGTCTGAAC	70,70

Διαλύματα

- I. Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων
 - I. Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης (TAE 50×): Tris-base 24,2% w/v, Acetic acid 5,71% v/v, EDTA 0,05M 10% w/v, pH 8,6
 - II. Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων (6×) – Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων: Bromomethanol Blue 0,09% Xylene Cyanol 0,09%, Glycerol 60%, EDTA 60mM
- II. Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου
 - I. Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (Running Buffer)(10×): Tris-base 1,5%, Glycine 7,2% w/v, SDS 0,5%, pH 8,3
 - II. Αποθεματικά διαλύματα (stock) συστατικά του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης
 - Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 1,5, pH 8,8

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 1,0M, pH 6,8
- SDS 10% w/v
- Μίγμα ακρυλαμιδίου (ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο, 29:1) διαλυμένο σε ddH₂O 30% w/v
- Διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων (Loading Buffer): 1M Tris pH 6,8, Glycerol 10%, SDS 10%, β-mercaptoethanol 5%, Bromophenol Blue 1%

Ανάλογα με τη συσκευή και την περιεκτικότητα του ακρυλαμιδίου που θα χρειασθεί, απαιτείται η αναζήτηση των πινάκων για τον υπολογισμό της ορθής ποσότητας των αποθεματικών διαλυμάτων, συμπεριλαμβανομένων και των αντιδραστηρίων APS και TEMED, προκειμένου να συσταθεί σωστά το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

III. Διαλύματα για τη χρώση του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

- Διάλυμα χρώσης: Coomassie Brilliant Blue G250 0,1% w/v, ισοπροπανόλη 33%, Acetic acid 2%
- Διάλυμα αποχρωματισμού: Acetic acid 10%

III. Διαλύματα για τον έλεγχο υπερέκφρασης των πρωτεϊνών (Expression Test)

- I. Lysis Buffer (1): NaCl 0,1M, Phosphate Buffer 0,1M (pH 6,7)
- II. Lysis Buffer (2): NaCl 0,1M, MES 0,1M (pH 5,5)

3.2. Υπολογιστικά προγράμματα

Η πολλαπλή στοίχιση είναι μία διαδικασία με κεντρική σημασία στη σύγχρονη βιοπληροφορική. Η χρήση της πολλαπλής στοίχισης αναφέρεται στην ταυτόχρονη μελέτη μιας ομάδας σχετιζόμενων ακολουθιών (συνήθως πρωτεϊνών) και στην προσπάθεια εύρεσης των κοινών χαρακτηριστικών τους, στην περίπτωση μελέτης των φυλογενετικών σχέσεων των βιολογικών ακολουθιών και στην πρόγνωση της δομής των πρωτεϊνών.

Η πιο γνωστή ευριστική (heuristic) μέθοδος που χρησιμοποιείται στην πολλαπλή στοίχιση είναι η λεγόμενη Progressive Multiple Alignment Method (Προοδευτική

Πολλαπλή Στοίχιση). Κατά τη μέθοδο αυτή η στοίχιση των ακολουθιών γίνεται προοδευτικά, ξεκινώντας από δύο ακολουθίες (συνήθως αυτές με τη μεγαλύτερη ομοιότητα) και σταδιακά προστίθενται στην στοίχιση μία-μία οι υπόλοιπες ακολουθίες.

Ίσως το πιο γνωστό και περισσότερο χρησιμοποιημένο πρόγραμμα πολλαπλής στοίχισης, το CLUSTALW, ήταν το πρώτο που χρησιμοποίησε το προφίλ στοίχισης (Profile Alignment), δηλαδή υπολογίζει τη σχετική συνεισφορά όλων των ακολουθιών της κάθε στοίχισης, με προοδευτική πολλαπλή στοίχιση. Η ακρίβεια του CLUSTALW αυξάνεται κατά 6% με την επαναληπτική διαδικασία, κατά την οποία η προοδευτική πολλαπλή στοίχιση επαναλαμβάνεται, ώστε λάθη που είναι πιθανό να εισχωρήσουν σε αρχικά στάδια της στοίχισης, να μπορούν να αφαιρεθούν σε κάποιο μετέπειτα βήμα. Το MUSCLE είναι ένα σύγχρονο πρόγραμμα στοίχισης, το οποίο εργάζεται επαναληπτικά.

Για την οπτικοποίηση των πολλαπλών στοιχίσεων χρησιμοποιήθηκαν τα εργαλεία της βιοπληροφορικής Jalview, MEGA7 και SeaView.

3.3.Μέθοδοι

Κλωνοποίηση των εναλλακτικών μεταγράφων ANGEL2

Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών

Για την απομόνωση του ολικού RNA από τα κύτταρα M14K έγινε χρήση του Nucleospin TriPrep Kit.

1. Μετά τη συλλογή των κυττάρων ακολουθεί η λύση τους με την προσθήκη στο ίζημα αυτών (περίπου 30mg) 350μL διαλύματος RP1 και 3,5 μL β-mercaptoethanol.
2. Το λύμα φιλτράρεται μέσω μεταφοράς του σε ειδικές στήλες και φυγοκεντρείται στις 11000×g για 1' σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Για την προσαρμογή των συνθηκών δέσμευσης των DNA και RNA, το διηθημένο μίγμα μεταφέρεται σε νέους αποστειρωμένους σωλήνες erpendorf, στο οποίο προστίθενται 350μL ethanol 70%. Έπειτα, τα νουκλεϊκά οξέα δεσμεύονται σε μικρές στήλες χρωματογραφίας και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 8000×g για 30'' σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ οι πρωτεΐνες εκλύονται στους σωλήνες erpendorf.
4. Για το διαχωρισμό των νουκλεϊκών οξέων RNA και DNA και την έκλυση του DNA προηγούνται δύο πλύσεις της μεμβράνης χρωματογραφία με 500μL διαλύματος DNA Wash και φυγοκέντρωση στις 1000×g για 1' σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Έπειτα, προστίθεται 100μL διαλύματος DNA Elute και φυγοκεντρείται στις 11000×g για 1' σε θερμοκρασία δωματίου. Το RNA που παραμένει στη μεμβράνη χρωματογραφίας επώαζεται rDNAse Reaction mixture. Το βήμα αυτό εξασφαλίζει την ελάχιστη δυνατή επιμόλυνση του δείγματος με γονιδιωματικό DNA, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να επηρεάσει την τελική ανάλυση των δειγμάτων.
6. Ακολουθούν σταδιακές πλύσεις του δείγματος με ρυθμιστικό διάλυμα και διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, κατά τις οποίες απομακρύνονται τα υποπροϊόντα της πέψης με την rDNAse.
7. Τέλος, ακολουθεί έκλυση του ολικού RNA με H₂O ελεύθερο ριβονουκλεασών (RNAse free ή DEPC-treated water).
8. Το RNA φυλάσσεται στους -80°C.

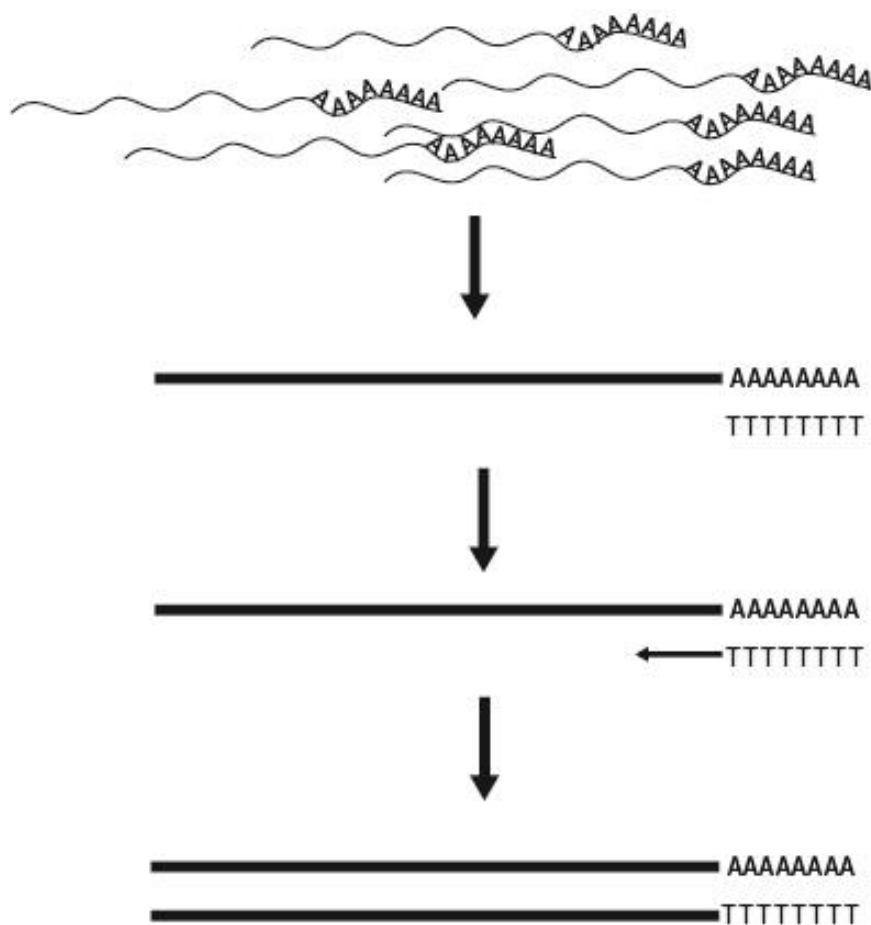
Αντίστροφη μεταγραφή – Σύνθεση πρώτης αλυσίδας cDNA

Αντίστροφη μεταγραφή, Reverse Transcription (RT), ονομάζεται η σύνθεση μιας συμπληρωματικής (complementary) αλυσίδας DNA (cDNA) έχοντας ως εκμαγείο ένα μόριο RNA. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφή (ή αντίστροφη τρανσκριπτάση), το οποίο στη φύση βρίσκεται σε RNA-ιούς (ρετροϊούς). Το ένζυμο μετατρέπει το γενετικό υλικό του ιού υπό τη μορφή

του μονόκλωνου RNA σε δίκλωνο DNA, έτσι ώστε να μπορεί να ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό των κυττάρων ξενιστών.

Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας ανάμεσα σε κάθε κύκλο επιτυγχάνονται με αυτοματοποιημένες συσκευές, τους θερμοκυκλοποιητές, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν την τιμή της θερμοκρασίας. Η αντίδραση σύνθεσης της πρώτης αλυσίδας του cDNA (First strand cDNA Synthesis) πραγματοποιείται στον θερμικό κυκλοποιητή και τα απαραίτητα αντιδραστήρια είναι η αντίστροφη μεταγραφάση, το αρχικό μόριο RNA, τα dNTPs και οι κατάλληλοι εκκινητές. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το 1st Strand cDNA Synthesis Kit.

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές oligo-d(T). Οι εκκινητές αυτοί είναι ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης που υβριδίζονται στην πολυ-A ουρά των mRNAs.



Εικόνα 13 Σχηματική απεικόνιση των βημάτων που πραγματοποιήθηκαν για το σχηματισμό της πρώτης αλυσίδας cDNA από ένα μίγμα μορίων RNA

Συνοπτικά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε:

1. Ετοιμάζουμε το μίγμα σε ένα μικρο-σωλήνα, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5 Το αρχικό μίγμα που προετοιμάζεται για την σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA. ¹ ο όγκος του ολικού RNA που προστίθεται, εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση των μορίων RNA, η οποία έχει υπολογισθεί μέσω φασματοφωτομετρίας.

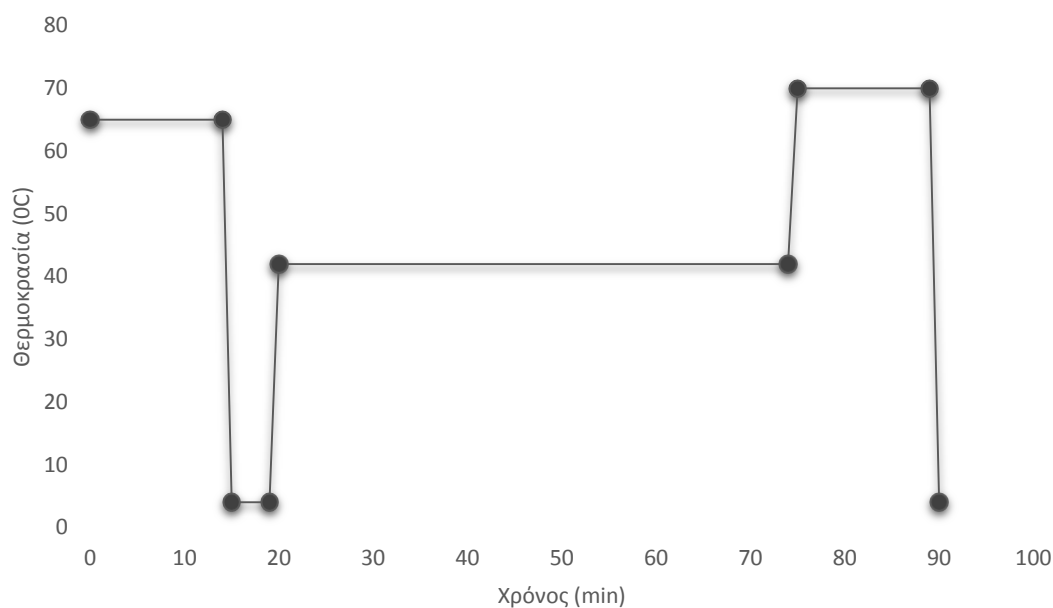
	(μL)
Oligo-d(T)	1,0
dNTPs	1,0
RNA	3,0 ¹
dH ₂ O	5,0
Σύνολο	10

2. Μεταφέρεται το δείγμα στον θερμοκυκλοποιητή για 5', ο οποίος έχει ήδη ρυθμιστεί στους 65°C.
3. Ετοιμάζεται το μίγμα αντίδρασης, το οποίο θα περιέχει το παραπάνω μίγμα και την αντίστροφη μεταγραφή του Kit.

	(μL)
Μίγμα	10,0
Buffer 5X	4,0
RNAse Inhibitor (40U/ μL)	0,5
RTase (200U/ μL)	1,0
RNAse free H ₂ O	4,5
Σύνολο	20,0

4. Μεταφέρεται το δείγμα στον θερμοκυκλοποιητή για 55', ο οποίος έχει ρυθμιστεί στους 42°C.
5. Η δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης σταματά με την αλλαγή της θερμοκρασίας του θερμοκυκλοποιητή στους 70°C για 15'.

6. Το δείγμα αποθηκεύεται στους -20°C .



Εικόνα 14 Διαγραμματική απεικόνιση του κύκλου θερμοκρασιών κατά τη σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του *cDNA*.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μία ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού *in vitro*. Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης PCR το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές, γεγονός που είναι απαραίτητο για μετέπειτα χειρισμούς.

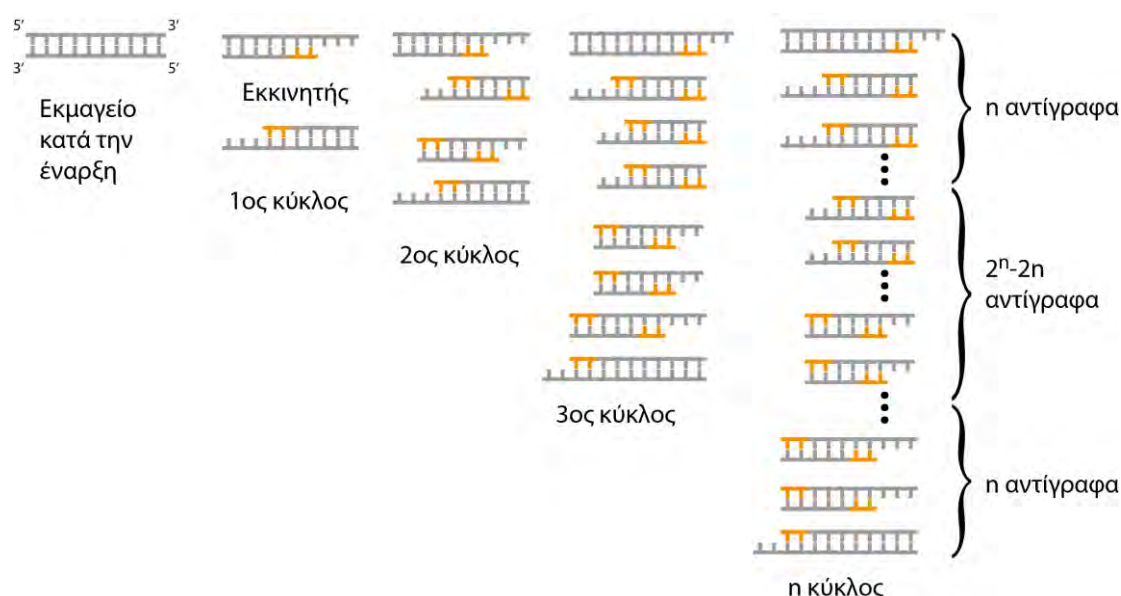
Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά:

- Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται (αποδιατάσσονται) με θέρμανση σε θερμοκρασία 95°C .
- Υβριδισμός εκκινήτων: Με μείωση της θερμοκρασίας, οι εκκινήτες υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες ως εκμαγείο DNA. Η τιμή της θερμοκρασίας αυτής εξαρτάται από τη θερμοκρασία αποδιάταξης των

εκκινητών (T_m) του κάθε εκκινητή, και πρέπει να είναι 5°C κάτω από την τιμή T_m .

- **Επιμήκυνση:** Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72°C , τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000 βάσεων ανά λεπτό.

Πριν από τον πρώτο κύκλο, το DNA συχνά αποδιατάσσεται για περίπου 5 λεπτά



Εικόνα 15 Η κινητική της αντίδρασης PCR. Η αύξηση των προϊόντων της PCR είναι εκθετική γιατί κάθε μόριο DNA που παράγεται μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα στον επόμενο κύκλο της PCR.

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

Βασικά συστατικά της PCR αποτελούν: 1. Η DNA πολυμεράση, 2. Οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές, 3. Το γενετικό υλικό, 4. Το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και Mg^{2+} και 5. Τα νουκλεοτίδια. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε και ένα επιπλέον αντιδραστήριο το διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl sulfoxide,

DMSO). Το DMSO αυξάνει την ευαισθησία και την ειδικότητα της PCR, αλληλοεπιδρώνοντας με το μονόκλωνο εκμαγείο μέσω δεσμούς υδρογόνου, αμέσως μετά την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων cDNA. Η ένωση αυτή διευκολύνει το διαχωρισμό των αλυσίδων νουκλεϊκών οξέων, μειώνοντας τη θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m) και αυξάνοντας την ειδικότητα της σύνδεσης των εκκινητών στο μονόκλωνο εκμαγείο.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷

Μία εκτέλεση των τριών αυτών σταδίων, αποτελεί 1 κύκλο της αντίδρασης PCR. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης συνήθως πραγματοποιείται επί 25-40 κύκλους, οπότε το τμήμα του DNA στόχου πολλαπλασιάζεται 2^n φορές (όπου n ο αριθμός των κύκλων). Η παραπάνω αντίδραση επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους (Εικόνα 15). Ο αριθμός των κύκλων ορίζεται από την κινητική της PCR. Η αύξηση των προϊόντων της PCR είναι εκθετική, γιατί κάθε μόριο DNA που παράγεται μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα στον επόμενο κύκλο. Η PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

- Εκθετική φάση: Μόλις έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας στόχου. Όλα τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε επάρκεια και η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική. Σε κάθε κύκλο διπλασιάζονται τα μόρια της αλληλουχίας στόχου.
- Γραμμική φάση: Παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου εξαιτίας της μείωσης της ποσότητας των αντιδραστηρίων.
- Φάση πλατώ: Δεν συντίθενται νέα μόρια DNA εξαιτίας της εξάντλησης ενός ή περισσότερων αντιδραστηρίων.

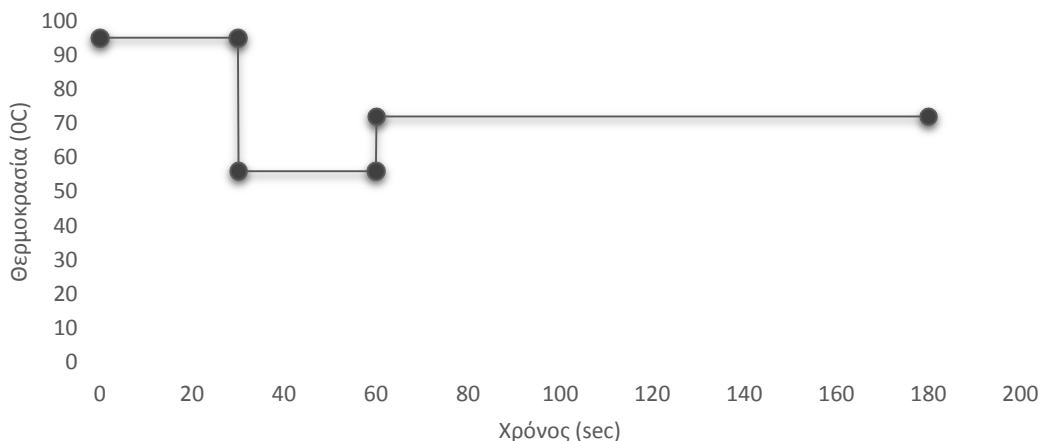
Για την κλασική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε το KAPA Taq PCR Kit. Στους παρακάτω πίνακες αναφέρονται η σύσταση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν και οι τιμές των θερμοκρασιών κατά τον ένα κύκλο της PCR που ρυθμίστηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή.

Πίνακας 6 Τα αντιδραστήρια και οι όγκοι αυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την απλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Αντιδραστήρια (KAPA Taq PCR Kit)	Όγκος (μL)
PCR Buffer 10X	2,50
dNTPs (10mM)	0,50
Forward Primer (10pmol/μL)	1,00
Reversed Primer (10pmol/μL)	1,00
Taq Polymerase	0,20
DMSO (5%)	1,25
ddH ₂ O	17,55
cDNA	1,00
Σύνολο	25

Πίνακας 7 Οι εναλλαγές των τιμών των θερμοκρασιών και ο χρόνος κάθε μιας για την ολοκλήρωση κάθε σταδίου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95	3 min	
Αποδιάταξη	95	30 sec	×35 κύκλους
Υβριδοποίηση εκκινητών	56	30 sec	
Επιμήκυνση	72	2 min	
Τελική επιμήκυνση	72	10 min	
-	4	-	



Εικόνα 16 Διαγραμματική απεικόνιση των τιμών των θερμοκρασιών συναρτήσει του χρόνου ενός κύκλου αντιδράσεων κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Απομόνωση τμημάτων DNA

Για το διαχωρισμό των τμημάτων DNA και τον προσδιορισμό του μεγέθους του καθενός μεταγράφου χρησιμοποιείται η μέθοδος ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Η πηκτή είναι σε συγκέντρωση 1,2%, η οποία παρασκευάζεται με την προσθήκη 0,48gr αγαρόζης, σε 40mL TAE Buffer 1X. Στη συνέχεια, θερμαίνεται το διάλυμα μέχρι να διαλυθεί όλη η ποσότητα της αγαρόζης και το διάλυμα γίνεται διαυγές σε φούρνο μικροκυμάτων. Λίγο πριν κρυώσει πλήρως το διάλυμα και πήξει πλήρως, ακολουθεί προσθήκη 1μL της χρωστικής Midori Green DNA stain, ήπια ανάδευση και το διάλυμα τοποθετείται σε στην ειδική θήκη της συσκευής ηλεκτροφόρησης, όπου και αφήνεται να πήξει. Προετοιμάζονται ο μάρτυρας μοριακού βάρους και τα δείγματα, στα οποία προστίθεται Loading Buffer 6X.

Η απομόνωση και ο καθορισμός των τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης (DNA extraction from agarose gels) έγινε βάσει του πρωτοκόλλου του Nucleospin Gel and PCR Clean-Up Kit.

1. Εξάγεται από την πηκτή αγαρόζης η ζώνη με το επιθυμητό τμήμα DNA με τη βοήθεια ειδικών εργαλείων απομόνωσης ζωνών (gel extraction tool). Τα κομμάτια πηκτώματος που προκύπτουν τοποθετούνται σε σωλήνες erpendorf.

2. Ζυγίζουμε έναν κενό σωλήνα erpendorf και έπειτα τους σωλήνες erpendorf που περιέχουν το αντίστοιχο κομμάτι πηκτώματος. Έτσι, υπολογίζεται το καθαρό βάρος της πηκτής κάθε σωλήνα.
3. Για κάθε 100mg πηκτώματος αγαρόζης (όταν αυτό έχει συγκέντρωση μικρότερη του 2%) σε κάθε erpendorf εισάγεται 200μL Buffer NT1 και επωάζουμε τα δείγματα στο heat block στους 50°C για 5-10'. Κατά το χρόνο αυτό, τα δείγματα αναδεύονται για 2-3' στο vortex.
4. Σε σωλήνες των 2mL που δίνονται από το kit τοποθετούνται στήλες δέσμευσης DNA, εισάγονται 700μL δείγματος και φυγοκεντρώνονται στις 1000 rcf για 30". Το έκλουσμα απομακρύνεται. Με τον τρόπο αυτό τα δείγματα DNA δεσμεύονται στις στήλες.
5. Ακολουθούν σταδιακές πλύσεις της στήλης. Σε κάθε στήλη εισάγεται 700μL Buffer NT3 και τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στις 11000 rcf για 30". Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο, καθώς έτσι επιτυγχάνεται η απομάκρυνση της αιθανόλης που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα, η οποία πιθανώς αναστείλει ακόλουθες αντιδράσεις.
6. Τοποθετούνται με ανοιχτά καπάκια τα δείγματα στο heat block στους 70°C για 2-5'. Μεταφέρονται οι στήλες σε νέους σωλήνες erpendorf. Ακολουθείται προσθήκη 10μL Buffer NE και αφήνονται για επώαση για 5'. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στις 1000 rcf για 1'.
7. Από τη φυγοκέντρωση διατηρείται το έκλουσμα στο σωλήνα erpendorf και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C.

Κλωνοποίηση μέσω επικάλυψης επεκτάσεων PCR (Overlap Extension PCR Cloning)

Για την κλωνοποίηση χρησιμοποιήθηκε το In-Fusion HD Cloning Kit, το οποίο βασίζεται στη μέθοδο επικάλυψης επεκτάσεων PCR (Overlap Extension PCR, OE-PCR).

Κατά την OE-PCR, μέσω PCR το επιθυμητό μετάγραφο αποκτά και στα δύο του άκρα προεκτάσεις, οι οποίες φέρουν ομολογία με συγκεκριμένες αλληλουχίες αζωτούχων βάσεων του πλασμιδιακού φορέα. Οι προεκτάσεις αυτές επιτρέπουν τις αλυσίδες των προϊόντων της PCR του μεταγράφου να λειτουργήσουν ως ζευγάρι υπερμεγεθών εκκινητών για τον φορέα. Εφόσον προηγηθεί αποδιάταξη και υβριδοποίηση των προεκτάσεων στο εκμαγείο, τα μετάγραφα ενσωματώνονται στο φορέα. Με τη βοήθεια της πολυμεράσης επιτρέπεται ο σχηματισμός του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου.¹⁰⁸

Αν και δεν είναι απαραίτητος ο σχηματισμός γραμμικού φορέα μέσω της OE-PCR, το In-Fusion HD Cloning Kit επιβάλλει το σχηματισμό του είτε μέσω χρήσης περιοριστικού ενζύμου είτε μέσω χρήσης PCR. Αυτό οφείλεται στο ένζυμο που περιέχεται στο kit, δηλαδή της DNA πολυμεράση του ιού της ευλογιάς (ροχνίους DNA polymerase), το οποίο έχει δράση 3'-5' εξωνουκλεάσης. Η λειτουργία του ενζύμου αυτού έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των βάσεων από την 3' αλυσίδα γραμμικών μορίων. Αυτό επιτρέπει την έκθεση των συμπληρωματικών υποστρωμάτων DNA, τα οποία μπορούν να υβριδιστούν μέσω συμπληρωματικότητας των βάσεων. Έτσι, προκύπτουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια που φέρουν μία υβριδική επικράτεια πλασιωμένη από ακριβή σημεία αλληλουχιών.

Το ροχνίους DNA polymerase έχει πολύ μικρή συγγένεια σε ενωμένα τμήματα DNA, γεγονός που επιτρέπει τη σταθερότητα των υποστρωμάτων DNA. Ο μετέπειτα μετασχηματισμός των ανασυνδυασμένων φορέων σε βακτηριακά στελέχη της *Escherichia coli* επιτρέπει την επιδιόρθωση εγκοπών μιας αλυσίδας.¹⁰⁹

Αρχικά, τα προϊόντα της κλασικής PCR (προηγούμενη υποενότητα) υποβλήθηκαν σε ακόμη μία PCR (overlap PCR), με τη χρήση των εκκινητών του πίνακα 4, όπου κάθε διαφορετικό εναλλακτικό μετάγραφο *ANGEL2*, που προκύπτει από την κλασική PCR, χρησιμοποιείται ως εκμαγείο DNA, σχηματίζοντας τις προεκτάσεις στα άκρα τους με τη χρήση των αντίστοιχων για κάθε μετάγραφο εκκινητών. Για αυτήν την PCR χρησιμοποιήθηκε το KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit. Στο μίγμα προστέθηκε, επίσης, DMSO 5%, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της

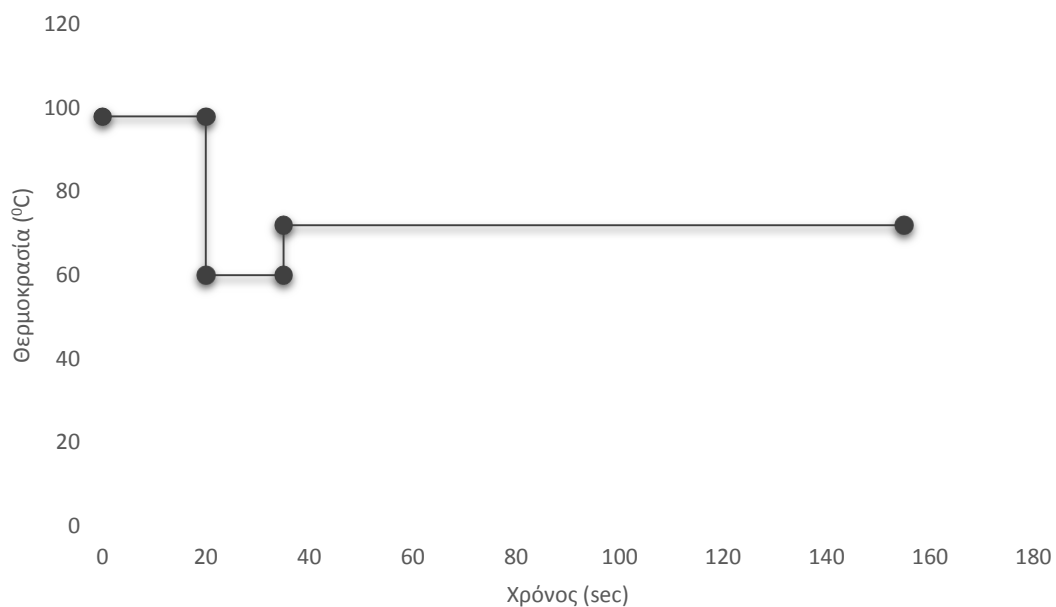
αντίδρασης. Έπειτα, τα μίγματα τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος έχει ρυθμιστεί στις συνθήκες που αναγράφονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 8 Τα αντιδραστήρια και οι όγκοι αυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μL)
KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)	25,0
Forward Primer (10μM)	1,5
Reversed Primer (10μM)	1,5
DMSO (5%)	2,5
Εκμαγείο DNA	1,5
dH ₂ O	18,0
Σύνολο	50,0

Πίνακας 9 Οι εναλλαγές των τιμών των θερμοκρασιών και ο χρόνος κάθε μιας για την ολοκλήρωση κάθε σταδίου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95	3 min	
Αποδιάταξη	98	20 sec	X35 κύκλους
Υβριδοποίηση εκκινητών	60	15 sec	
Επιμήκυνση	72	2 min	
Τελική επιμήκυνση	72	10 min	
-	4	-	



Εικόνα 17 Διαγραμματική απεικόνιση των τιμών των θερμοκρασιών συναρτήσει του χρόνου ενός κύκλου αντιδράσεων κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

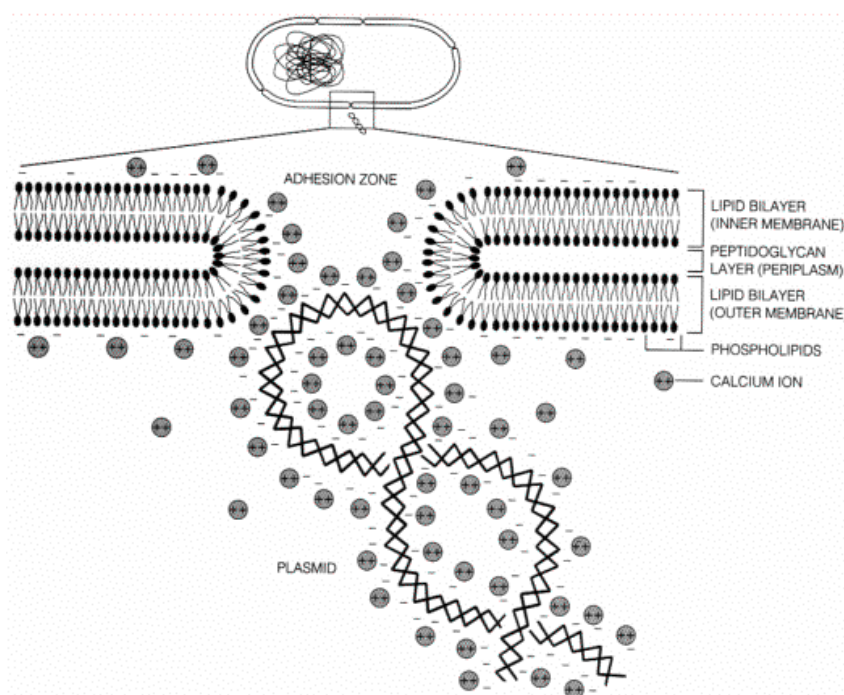
Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pET33b(+). Το πλασμιδιακό DNA επωάζεται με το ένζυμο περιορισμού EcoRI, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 10), και μεταφέρουμε το δείγμα στον θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος έχει ρυθμιστεί στους 37°C για 2 ώρες,

Πίνακας 10 Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της πέψης.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μL)
pET33b(+)	10
Buffer H (10X)	2
EcoRI	1,5
dH ₂ O	6,5
Σύνολο	20

Μετασηματισμός πλασμιδιακού DNA σε στελέχη *Escherichia coli* με Θερμικό σοκ

Τα βακτηριακά κύτταρα του στελέχους XL1-Blue, όπως και του στελέχους Rosetta2 που χρησιμοποιούνται για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης, καθίστανται επιδεκτικά στην ενσωμάτωση ξένου γενετικού υλικού με τη χρήση χλωριούχου ασβεστίου (calcium chloride, CaCl₂). Το χλωριούχο ασβέστιο στο κυτταρικό εναιώρημα επιτρέπει την πρόσδεση του πλασμιδιακού DNA στους λιποπολυσακχαρίτες (lipopolysaccharides, LPS), στην εξωτερική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης των θετικά φορτισμένων ιόντων του ασβεστίου με το αρνητικό φορτίο των νουκλεϊκών οξέων και το αρνητικό φορτίο των ομάδων λιποπολυσακχαριτών στο κυτταρόπλασμα των βακτηριακών κυττάρων (Εικόνα 18).



Εικόνα 18 Απεικόνιση της εισόδου του γενετικού υλικού διαμέσω της κυτταρικής μεμβράνης σε επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli* με τη χρήση χλωριούχου ασβεστίου.⁵

Για το μετασηματισμό επιδεκτικών κυττάρων XL1-Blue ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1. Σε 100μL επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων XL1-Blue προστίθενται 5μL του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και το μίγμα αφήνεται στον πάγο για 30'.

2. Ο σωλήνας erpendorf, που περιέχει τα επιδεικτικά κύτταρα και τα μόρια του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου μεταφέρονται στο Heat Block στους 42°C για 45'' ακριβώς.
3. Ο σωλήνας τοποθετείται πάλι στον πάγο για 2'.
4. Εισάγονται 900μL αποστειρωμένο LB Broth και τα βακτηριακά κύτταρα επωάζονται στον επωαστήρα στους 37°C και στις 210rpm για 1 ώρα.
5. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 3000rpm για 5' και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 100μL αποστειρωμένο LB Broth.
6. Σε επιστρωμένα τρυβλία Petri με LB άγαρ, παρουσία αντιβιοτικού καναμυκίνη (25μgr/ml), στο οποίο τα πλασμίδια φέρουν ανθεκτικότητα, επιστρώνονται τα μετασηματισμένα πλέον βακτήρια με τη χρήση γυάλινης Pasteur.
7. Τα τρυβλία μεταφέρονται στον κλίβανο στους 37°C για 12-14 ώρες,
8. Με το πέρας της ανάπτυξης, τα τρυβλία μπορούν να διατηρηθούν στους 4°C κλεισμένα περιμετρικά με Parafilm.

Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται υπό φλόγα.

Με ανάλογο τρόπο επιτεύχθηκε και ο μετασηματισμός των επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων Rosetta2.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA ακολουθείται η διαδικασία με βάση το πρωτόκολλο του NucleoSpin Plasmid Kit.

1. Σε νέο αποστειρωμένο falcon εισάγονται 10mL αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο LB Broth και αντιβιοτικό καναμυκίνη (50μgr/mL). Με τη βοήθεια ενός tip πιπέτας αποσπάται από το τρυβλίο μοναδιαία αποικία, απομακρυσμένη από τις υπόλοιπες συνωστισμένες αποικίες του τρυβλίου. Η θετική αυτή αποικία ενοφθαλμίζεται στο θρεπτικό μέσο. Η αποικία επωάζεται στον επωαστήρα στους 37°C και στις 210 rpm για 12-14 ώρες.

2. Μεταφέρονται 3mL καλλιέργειας XL1-Blue που αναπτύχθηκε στο falcon σε ένα σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνονται για 1' στις 11000xg. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται το βήμα. Στο ίζημα εντοπίζονται μόνο τα βακτηριακά κύτταρα.
3. Για τη λύση των κυττάρων, στο σωλήνα erpendorf προστίθενται 250μL Buffer A1, που το ίζημα επαναδιαλύεται με έντονη ανάδευση με vortex. Ακολουθεί προσθήκη 250μL Buffer A2 και ανάμειξη αναποδογυρίζοντας ήπια μερικές φορές χωρίς τη χρήση vortex. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 2 λεπτά. Ακολούθως, προστίθενται 300μL Buffer A3 και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση αναποδογυρίζοντας το μερικές φορές αποφεύγοντας τη χρήση του vortex. Το μίγμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 11000xg σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Τοποθετείται η στήλη σε ένα σωλήνα συλλογής (collection tube) των 2mL, στην οποία φορτώνεται το υπερκείμενο που έχει προκύψει από τη φυγοκέντρηση του προηγούμενου βήματος και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 11000xg για 1 λεπτό και απομάκρυνση του εκλούσματος. Με τον τρόπο αυτό δεσμεύεται το DNA στην στήλη.
5. Ακολουθεί πλύση της μεμβράνης της στήλης με την προσθήκη 600μL Buffer A4 και έπειτα φυγοκέντρηση στις 11000xg για 1 λεπτό.
6. Η στήλη επανατοποθετείται στο σωλήνα συλλογής, καθώς απομακρύνεται το έκλουσμα, και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 11000xg για 2 λεπτά, με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση του Buffer A4.
7. Για την έκλυση του DNA, προστίθεται 25μL Buffer AE (Elusion Buffer) και τοποθετείται για 2 λεπτά στο heat block στους 70°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 11000xg για 1 λεπτό.
8. Το εκλούμενο προϊόν περιέχει το πλασμιδιακό DNA και φυλάσσεται στους -20°C.

Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται υπό φλόγα.

Παραγωγή πρωτεϊνών ANGEL2

Δοκιμή έκφρασης

Η έκφραση και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών είναι χρονοβόρες διαδικασίες και αποτελούν σημαντικά εμπόδια στη μελέτη της πρωτεομικής. Οι πρωτεΐνες διαφέρουν στη σταθερότητα της δομής τους, στη διαλυτότητα και τοξικότητα του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται, με αποτέλεσμα σε διαφορετική συχνότητα οι πρωτεΐνες καταστρέφονται, σχηματίζονται σωμάτια έγκλεισης (inclusion bodies), είτε επάγουν τον κυτταρικό θάνατο, επηρεάζοντας την τιμή της διαλυτής πρωτεΐνης που μπορεί να ανακτηθεί από μία καλλιέργεια κυττάρων *Escherichia coli*. Κρίνεται αναγκαίος ο ταυτόχρονος έλεγχος των συνθηκών που θα μπορέσουν να βοηθήσουν στην έκφραση σημαντικής ποσότητας επιθυμητής πρωτεΐνης, όπως είναι το θρεπτικό μέσο, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση της ισοπροπυλικής β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδης (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG), κλπ.

Μετασχηματίζονται επιλεκτικά βακτηριακά κύτταρα στελέχους Rosetta2 της *Escherichia coli* με το επιθυμητό πλασμίδιο, όπως αναλύθηκε παραπάνω (βλ. [«Μετασχηματισμός πλασμδιακού DNA σε στελέχη *Escherichia coli* με Heat Shock»](#)). Σε 5mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth με αντιβιοτικό καναμυκίνη (50μL/mL) ενοφθαλμίζονται μετασχηματισμένα κύτταρα Rosetta2 και επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση (210rpm) για 16 ώρες. Σε γυάλινη κωνική φιάλη εισάγονται 80mL αποστειρωμένου LB Broth και καναμυκίνη. Στο θρεπτικό μέσο μεταφέρονται 800μL της O/N καλλιέργειας και το δείγμα επωάζεται στους 37°C υπό ανάδευση (210rpm). Στο βήμα αυτό, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm (OD₆₀₀), δηλαδή το η καλλιέργεια αναπτύσσεται μέχρις ότου το OD₆₀₀ έχει μία τιμή στο εύρος 05-06 A, τιμή που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Ως τυφλός μάρτυρας στον υπολογισμό της οπτικής απορρόφησης της καλλιέργειας χρησιμοποιείται το θρεπτικό μέσο με το αντιβιοτικό, στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους. Μόλις η οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας φέρει την επιθυμητή τιμή, η καλλιέργεια χωρίζεται σε 6 Falcon, από 10mL σε

κάθε ένα. Ο ορισμός του αριθμού των δοκιμαστικών σωλήνων που χρησιμοποιούνται καθορίζεται από τον αριθμό των συνθηκών που θα ελεγχθούν. Στη συγκεκριμένη δραστηριότητα, ελέγχθηκαν οι παράμετροι της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης IPTG. Το IPTG λειτουργεί ως επαγωγέας της έκφρασης του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης, της οποίας ο προαγωγέας στο πλασμίδιο pET33b(+) βρίσκεται μπροστά από τον πολυσυνδέτη (polylinker). Η έκφραση του γονιδίου αυτού στα κύτταρα του *Escherichia coli* αναστέλλεται από τον καταστολέα LacIQ. Το IPTG δεσμεύει και απομακρύνει τον καταστολέα από το DNA επιτρέποντας την έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης, η οποία με τη σειρά της θα αναγνωρίσει τον προαγωγέα της στο πλασμίδιο και θα μεταγράψει τα γονίδια που βρίσκονται μετά από αυτόν. Επομένως, τρεις δοκιμαστικοί σωλήνες Falcon θα ελεγχθούν στους 37°C για διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG (0mM, 0,5mM, 1mM), και αντίστοιχα οι άλλοι τρεις σωλήνες στους 18°C για τις ίδιες συγκεντρώσεις επαγωγέα, όπως φαίνεται στον πίνακα 11. Τα δείγματα που αναπτύσσονται στους 37°C μεταφέρονται στον επωαστήρα για 3 ώρες, ενώ στους 18°C για 16 ώρες. Και στις δύο περιπτώσεις θερμοκρασιών οι επωαστήρες λειτουργούν υπό ανάδευση. Τέλος, με το πέρας της επώασης, φυγοκεντρούνται οι καλλιέργειες στις 11000×g στους 4°C για 1 λεπτό και το ίζημα φυλάσσεται στους -20°C.

Πίνακας 11 Η ποσότητα υγρής καλλιέργειας που μεταφέρεται σε κάθε Falcon.

⊖ [IPTG]	0mM	0,5mM	1mM
37 °C	10mL	10mL	10mL
18 °C	10mL	10mL	10mL

Λύση βακτηριακών κυττάρων με χρήση υπερήχων

Το ίζημα των κυττάρων από τον έλεγχο έκφρασης των πρωτεϊνών ANGEL2 επωάζεται στον πάγο μέχρι να ξεπαγώσει. Αναδιαλύεται σε 1mL διαλύματος λύσης (lysis buffer). Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικά διαλύματα λύσης, σε διαφορετικούς χρόνους. Για την απομόνωση των πρωτεϊνών

και την διατήρησή τους σε ένα σταθερό περιβάλλον, τα συστατικά των διαλυμάτων λύσης καθορίστηκαν από το ισοηλεκτρικό σημείο (isoelectric point, pI) των πρωτεϊνών. Στο ένα λοιπόν διάλυμα λύσης προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffer) σε συγκέντρωση 0,1M και pH 6,7, ενώ στο άλλο MES σε συγκέντρωση 0,1M και pH 5,5, γνωρίζοντας ότι το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών κυμαίνεται στο 6,1. Με την προσθήκη του διαλύματος λύσης ακολουθεί ανάμειξη του μίγματος με χρήση vortex και επώαση στον πάγο για 30 λεπτά. Τα κύτταρα υφίστανται μηχανική λύση με τη χρήση υπερήχων. Η πλήρης λύση των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιείται σε συσκευή υπερήχων, η οποία είναι ρυθμισμένη στους 3 κύκλους παραγωγής υπερήχων εύρους 20-25% διάρκειας 60 δευτερολέπτων. Κατά τη διάρκεια λύσης με υπερήχους αυξάνεται κατά πολύ η θερμοκρασία του διαλύματος. Έτσι, οι κύκλοι διακόπτονται από μικρές παύσεις 21 δευτερολέπτων. Παράλληλα, καθ' όλη τη διάρκεια της μηχανικής λύσης, ο σωλήνας erpendorf βρίσκεται στον πάγο, ώστε να αποφευχθεί ανεπιθύμητη αύξηση της θερμοκρασίας του σωλήνα.

Το διάλυμα που προκύπτει από τη μηχανική λύση των βακτηριακών κυττάρων χωρίζεται σε ολικό διάλυμα (Total, T) και σε υπερκείμενο διάλυμα (Supernatant, S). Στο ολικό διάλυμα συναντώνται όλα τα προϊόντα, αλλά και τα παραπροϊόντα που προκύπτουν από την μηχανική λύση, διαλυτά και αδιάλυτα. Εφόσον διατηρήθηκαν 20μL Total, το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 11000rpm στους 8°C για 30 λεπτά και διατηρείται το υπερκείμενο. Το υπερκείμενο περιέχει το εκχύλισμα των διαλυτών πρωτεϊνών που περιέχονται στα βακτηριακά κύτταρα, ενώ το ίζημα μεμβράνες, βακτηριακά τοιχώματα, DNA και αδιάλυτα έγκλειστα σωματίδια.

Ανίχνευση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για το διαχωρισμό των πρωτεϊνικών μορίων βάσει του μοριακού τους βάρους. Το SDS (δωδεκυκλικό νάτριο) είναι μία επιφανειοδραστική ουσία, η οποία αποδιατάσει τις δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές των μορίων,

προσδίδοντας τες αρνητικό φορτίο, το οποίο συσχετίζεται με το μήκος της πολυπετιδικής αλυσίδας, επιτρέποντας τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους. Η κινητικότητα των μορίων στο πήκτωμα επηρεάζεται από την κατάσταση της πρωτεΐνης.

Το σύστημα του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιείται είναι ασυνεχές, αποτελούμενο από δύο πηκτώματα διαφορετικής πυκνότητας ακρυλαμίδης και pH, την πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (resolving gel). Η πηκτή επιστοιβάξης έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης (σταθερό ποσοστό 5%), επιτρέποντας τις πρωτεΐνες να μετακινούνται γρήγορα και να στοιβαχθούν σε μία στενή θέση, πριν εισέλθουν σε μία πηκτή μεγαλύτερης συγκέντρωσης πολυακρυλαμίδης, την πηκτή διαχωρισμού, όπου τα μόρια θα διαχωριστούν με βάση το μοριακό τους βάρος. Το ποσοστό της πολυακρυλαμίδης στην πηκτή διαχωρισμού σχετίζεται με το μοριακό βάρος της επιθυμητής πρωτεΐνης (Πίνακας 12).¹¹⁰ Για τον βέλτιστο διαχωρισμό των πρωτεϊνών με εύρος μοριακού βάρους 20 έως 90kDa το πήκτωμα διαχωρισμού πρέπει να είναι 10%, ενώ για εύρος 10 έως 20kDa η περιεκτικότητα πρέπει να είναι 16%.

Ο σχηματισμός της πηκτής πραγματοποιείται με την αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και του δις-ακρυλαμιδίου, σε θερμοκρασία δωματίου, παρουσία των παραγόντων υπερθειικό αμμώνιο (APS) και TEMED. Το TEMED είναι επιταχυντής, ο οποίος καταλύει την αντίδραση πολυμερισμού των ελεύθερων ριζών του θείου που σχηματίζονται από το APS.

Πίνακας 12 Οι όγκοι των συστατικών για την κατασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης.

Πηκτική διαχωρισμού (Resolving gel)

Διαλύματα	Όγκος συστατικών (mL) ανά όγκο πηκτής							
	5mL	10mL	15mL	20mL	25mL	30mL	40mL	50mL
10%								
H ₂ O	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30% Acrylamide	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
Mix								
1,5M Tris (pH 8,8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.015	0.016	0.02

Πηκτική επιστοίβαξης (Stacking gel)

Διαλύματα	Όγκος συστατικών (mL) ανά όγκο πηκτής							
	1mL	2mL	3mL	4mL	5mL	6mL	8mL	10mL
H ₂ O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% Acrylamide	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
Mix								
1,5M Tris (pH 6,8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10% APS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

Η κατασκευή όπου θα δημιουργηθεί η πηκτική του πολυακρυλαμιδίου είναι μία κάθετη διάταξη 2 τζαμιών διαστάσεων 7cm×9cm×1mm. Οι θέσεις υποδοχής των

δειγμάτων (πηγάδια) σχηματίζονται με την προσθήκη μιας ειδικής χτένας 15 θέσεων πριν την πήξη της πηκτής επιστοιβάξης. Μόλις το πήκτωμα είναι έτοιμο, τοποθετείται μαζί με το ικρίωμα της στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer 1×), το οποίο πρέπει να είναι σε επαφή με το πήκτωμα σε όλο το μήκος και πλάτος.

Τα δείγματα προετοιμάζονται σε κατάλληλη αναλογία με το ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων (sample buffer), τοποθετούνται στο heat block στους 95°C για 10 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών και «φορτώνονται» στα πηγάδια, μαζί με μάρτυρες μοριακών μεγεθών πρωτεϊνών. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται στο τροφοδοτικό, το οποίο διαβιβάζει ηλεκτρικό ρεύμα τάσης 120V στο κλειστό κύκλωμα της δεξαμενής της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Χρώση με Coomassie Brilliant Blue

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης διαχωρίζεται η πηκτή διαχωρισμού από την πηκτή επιστοιβάξης και η πηκτή διαχωρισμού μεταφέρεται στο διάλυμα χρώσης (staining solution) Coomassie Brilliant Blue. Το διάλυμα με την πηκτή θερμαίνεται ελαφρώς για 10 λεπτά και στη συνέχεια το πήκτωμα κατεργάζεται με διαδοχικές πλύσεις με το διάλυμα αποχρωματισμού, το οξικό οξύ, υπό ανάδευση μέχρι να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα της χρώσης και εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες στην πηκτή.

4. Αποτελέσματα

4.1. Ανάλυση *in silico* της μεταγραφής και μετάφρασης του *ANGEL2*

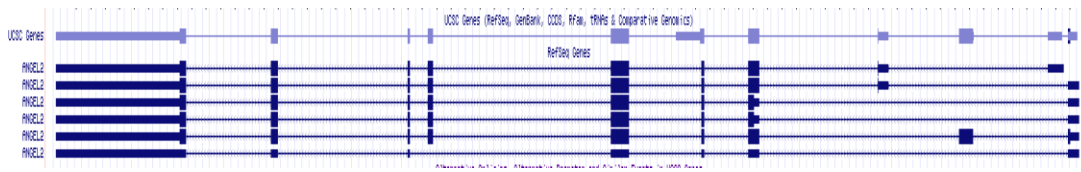
Τα εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου *ANGEL2*

Σύμφωνα με τις βάσεις δεδομένων GENE και NUCLEOTIDE του NCBI (National Center for Biotechnology Information, Εθνικό Κέντρο Πληροφοριών για τη Βιοτεχνολογία) έχουν εντοπιστεί έξι κύρια διαφορετικά εναλλακτικά μετάγραφα, τα οποία μεταγράφονται από το γονίδιο *ANGEL2*. Το γονίδιο *ANGEL2* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 (θέση 1q32.3) στο ανθρώπινο γενετικό υλικό (*Homo sapiens*). Για τον καλύτερο διαχωρισμό των μεταγράφων, κάθε μετάγραφο του *ANGEL2* συμβολίζεται και με έναν διαδοχικό φυσικό αριθμό, πέραν του ονόματος, ο οποίος βασίζεται σε αυτόν που δίνεται από τις βάσεις δεδομένων (Πίνακας 13). Από τα μετάγραφα αυτά, τα πέντε κωδικοποιούνται σε πρωτεΐνες, ενώ το έκτο μεταγράφεται σε ένα μη-κωδικό μόριο mRNA (lncRNA).

Πίνακας 13 Ονομασία των εναλλακτικών μεταγράφων *ANGEL2*. ΒΔ: Βάση δεδομένων

Κωδικός NCBI	ΟΝΟΜΑ ΑΛΛ/ΧΙΑΣ	ΜΕΓΕΘΟΣ
	ΒΑΣΕΙ ΒΔ	ΑΛΛ/ΧΙΑΣ (nts)
NM_144567	EN. MET. 1	4717
NM_001300753	EN. MET. 2	4642
NM_001300755	EN. MET. 3	4740
NM_001300757	EN. MET. 4	4395
NM_001300758	EN. MET. 5	4391
NR_125333	EN. MET. 6 (non-coding)	4264

Η περαιτέρω διερεύνηση των διαφορών μεταξύ των μεταγράφων του *ANGEL2* βασίστηκε στη βάση δεδομένων Genome Browser UCSC [genome-euro.ucsc.edu/Human Assembly: Feb:2009 (GRCh37/hg19)], ελέγχοντας στοιχεία



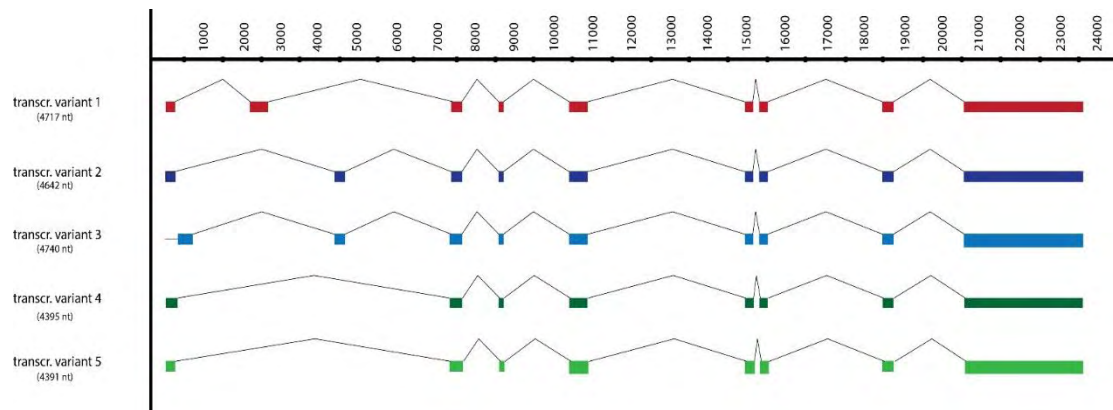
Εικόνα 19 Τα εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου *ANGEL2*, όπως φαίνονται στη βάση δεδομένων *Genome Browser UCSC*.

(tracks) που πιθανώς να δώσουν απαντήσεις στον τρόπο έκφρασης των εναλλακτικών μεταγράφων. Βασικά στοιχεία αποτελούν τα γονίδια UCSC και τα γονίδια RefSeq, βάσει των οποίων εξετάζονται οι θέσεις/περιοχές των ιντρονίων και των εξονίων, καθώς και ο προσανατολισμός της μεταγραφής. Το γονίδιο *ANGEL2*, όπως φαίνεται και στην εικόνα 19, μεταγράφεται από τα δεξιά προς τα αριστερά του γονιδίου, υποδεικνύοντας ότι στα αριστερά της γονιδιακής αλληλουχίας βρίσκεται το άκρο 3', ενώ το άκρο 5' εντοπίζεται στα δεξιά αυτής.

Για την καλύτερη παρουσίαση των γενομικών δεδομένων των εξονίων των διαφορετικών μεταγράφων, χρησιμοποιήθηκαν τα εργαλεία βιοπληροφορικής Jalview και Seaview, καθώς και το πρόγραμμα Adobe Illustrator. Από το σχεδιάγραμμα της εικόνας 20 γίνεται κατανοητό, ότι τα εξόνια όλων των μεταγράφων διαφέρουν στο άκρο 5' τους, ενώ φέρουν μεταξύ τους αρκετές συντηρημένες περιοχές εξονίων.

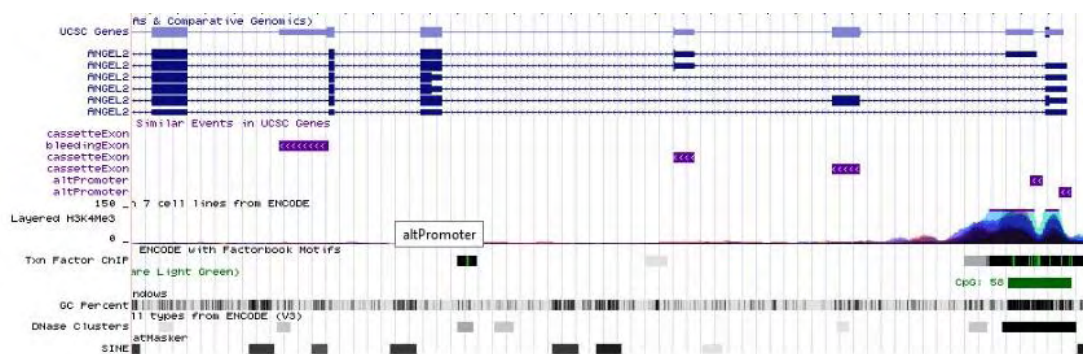
Στο άκρο 5' των μεταγράφων 1,2 και 3 του γονιδίου *ANGEL2* εμφανίζονται 2 διαφορετικά εναλλακτικά εξόνια, εκ των οποίων το ένα εντοπίζεται μόνο στο μετάγραφο 1, ενώ το δεύτερο στα μετάγραφα 2 και 3. Στα μετάγραφα 4 και 5 δεν παρατηρείται κάποιο εναλλακτικό εξόνιο. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν την παρουσία διαφορετικών εξονίων-κασετών (cassette exon), από τα οποία μόνο ένα από αυτά περιλαμβάνεται στο τελικό μόριο mRNA (mutually exclusive exons, αμοιβαίως αποκλειστικά εξόνια).¹¹¹ Τα μόρια mRNA 1, 2 και 3, επομένως, υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα, το οποίο ρυθμίζεται σε επίπεδο μεταγραφής.

Το πρώτο εξόνιο του μεταγράφου 3 παρατηρείται σε διαφορετική θέση από τα υπόλοιπα μετάγραφα. Στη βάση δεδομένων *Genome Browser UCSC* εισάγεται το στοιχείο UCSC Alt Events. Η προσθήκη αυτού του στοιχείου εμφανίζει τις παραμέτρους εναλλακτικού ματίσματος (alternative splicing), εναλλακτικού υποκινητή



Εικόνα 20 Σχηματική απεικόνιση των εναλλακτικών μεταγράφων ANGEL2. Στον οριζόντιο άξονα αναγράφονται τα μεγέθη των νουκλεοτιδικών αλυσίδων, ενώ στον κάθετο οι τίτλοι των διαφορετικών μεταγράφων και το μέγεθός τους. Κάθε ένα μετάγραφο συμβολίζεται με διαφορετικό χρώμα, ενώ σε κάθε μετάγραφο χρωματίζονται μόνο οι περιοχές των εξονίων. Οι περιοχές των ιντρονίων απεικονίζονται ως απλές γραμμές.

(alternative promoter) και παρόμοιων γεγονότων (similar events). Τα πρώτα εξόνια των μεταγράφων 1 και 3 ευθυγραμμίζονται με 2 μικρές περιοχές, που εμφανίστηκαν, έχοντας τον τίτλο «Alt Promoter». Για την ενίσχυση της παραπάνω υπόθεσης προστέθηκαν και τα στοιχεία “H3K4Me3”, “TnX FactorChIP”, CpG Islands” και “GC percent” (Εικόνα 21). Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν την ύπαρξη δύο διαφορετικών θέσεων έναρξης της μεταγραφής, που η έναρξη της μεταγραφής από τη μία θέση θα μπορέσει να δώσει κάποιο από τα εναλλακτικά μετάγραφα 1, 2, 4 και 5, ενώ η έναρξη από τη δεύτερη θέση έναρξης της μεταγραφής θα σχηματίσει μόνο το μετάγραφο 3.



Εικόνα 21 Σχηματική απεικόνιση των εναλλακτικών μεταγράφων ANGEL2, όπως φαίνονται στη βάση δεδομένων Genome Browser UCSC. Επιπλέον, παρουσιάζονται τα στοιχεία “CassetteExon”, “H3K4Me3”, “TnX Factor ChIP”, “GC Percent”, “DNase Clusters”, SINE”. Η αλληλουχία ξεκινά από τα δεξιά της εικόνας (3' άκρο). Στο 3' άκρο παρουσιάζεται υψηλό ποσοστό των μεθυιωμένων ιστονών, όπως και του ποσοστού του πλαισίου GC. Οι ίδιες περιοχές εμφανίζουν υπερευαισθησία σε DNAσες, γεγονός που υποδηλώνει τη θέση των υποκινιτών, καθώς σε αυτές εμφανίζονται και οι θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων.

Τα μετάγραφα 4 και 5 έχουν ακριβώς τον ίδιο αριθμό εξονίων, τα οποία στοιχίζονται και στις ίδιες θέσεις. Ωστόσο, το μέγεθος τους είναι διαφορετικό, με το μετάγραφο 4 να περιέχει 4 επιπλέον νουκλεοτίδια από το μετάγραφο 5. Ευθυγραμμίζοντας τα μετάγραφα 1, 4 και 5 (το μετάγραφο 1 χρησιμοποιείται ως πρότυπη αλληλουχία), παρατηρείται ότι τα 4 επιπλέον νουκλεοτίδια εντοπίζονται στο τέλος του πρώτου εξονίου του μεταγράφου 4 και ότι το πρώτο εξόνιο των μεταγράφων 1 και 5 είναι ίδιο (Εικόνα 22). Υποδεικνύεται, λοιπόν, η ύπαρξη ενός επιπλέον πρώτου εξονίου, κατά σειρά τρίτο, ανάμεσα στα εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου *ANGEL2*, το οποίο πιθανώς να είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος στο άκρο 5' της θέσης ματίσματος.

Πέραν των παραπάνω διαφορών, τα υπόλοιπα εξόνια έχουν ακριβώς την ίδια αλληλουχία και στοιχίζονται στις ίδιες θέσεις των εναλλακτικών μεταγράφων. Ενώνοντας (merging) τα εξόνια των εναλλακτικών μεταγράφων συμπεραίνεται ότι

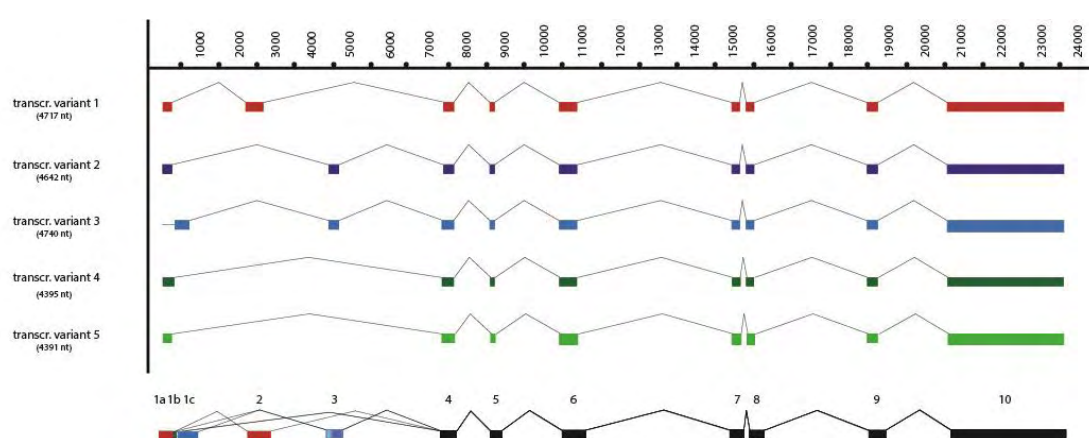


Εικόνα 22 Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του πρώτου εξονίου των εναλλακτικών μεταγράφων 1,4 και 5. Οι αζωτούχες βάσεις των νουκλεοτιδίων συμβολίζονται με διαφορετικό χρώμα για τον οπτικό διαχωρισμό τους. Παρατηρούνται τα 4 επιπλέον νουκλεοτίδια που υπάρχουν στο εναλλακτικό μετάγραφο 4. Το εξόνιο 2 που εμφανίζεται στην εικόνα ανήκει στο εναλλακτικό μετάγραφο 1 και όχι στα άλλα δύο.

ανιχνεύονται συνολικά 10 εξόνια, με το πρώτο εξόνιο να εμφανίζεται με τρεις διαφορετικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων: α) αλληλουχία 1a: η αλληλουχία του πρώτου εξονίου που εμφανίζεται στα μετάγραφα 1, 2 και 5, β) αλληλουχία 1b: η αλληλουχία του πρώτου εξονίου του μεταγράφου 3 και γ) αλληλουχία 1c: η αλληλουχία του πρώτου εξονίου του μεταγράφου 4 (Εικόνα 23).

Πίνακας 14 Συγκεντρωτικός πίνακας εξονίων που εμφανίζονται σε κάθε εναλλακτικό μετάγραφο ANGEL2.

Αριθμός εξονίου	1			2	3	4	5	6	7	8	9	10
	1a	1b	1c									
Εν. Μετάγραφο 1	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Εν. Μετάγραφο 2	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Εν. Μετάγραφο 3	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Εν. Μετάγραφο 4	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Εν. Μετάγραφο 5	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+



Εικόνα 23 Ένωση των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου ANGEL2. Είναι εμφανείς οι κασέτες-εξονίων και οι τρεις παραλλαγές του πρώτου εξονίου των μεταγράφων. Με μαύρο χρώμα συμβολίζονται οι συντηρημένες αλληλουχίες αυτών,

Πρωτεϊνικά προϊόντα του γονιδίου ANGEL2

Παρά την ύπαρξη πέντε εναλλακτικών μεταγράφων, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων GENE και PROTEIN του NCBI εντοπίζονται τρία διαφορετικά πρωτεϊνικά μόρια, γεγονός που παρουσιάζει μία αναντιστοιχία στον αριθμό των εναλλακτικών μεταγράφων και των πρωτεϊνών.

Για την παρουσίαση των δεδομένων των αμινικών αλληλουχιών των παραγόμενων από διαφορετικά mRNAs πεπτιδίων, χρησιμοποιήθηκαν το εργαλείο βιοπληροφορικής Seaview, για την πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών. Για το διαχωρισμό των πεπτιδίων αυτών, κάθε ένα συμβολίζεται με ένα διαδοχικό αριθμό, που βασίζεται στο ελληνικό σύστημα αρίθμησης (Α', Β', Γ'). (Εικόνες 24, 25) Από τις

παραπάνω βάσεις δεδομένων φαίνεται, ότι τα μετάγραφα 2 και 3 κωδικοποιούν την ίδια ακριβώς πρωτεΐνη, όπως και τα μετάγραφα 4 και 5 δίνουν το ίδιο ακριβώς πρωτεϊνικό προϊόν. Μόνο το μετάγραφο 1 κωδικοποιεί ξεχωριστό προϊόν από τα υπόλοιπα μετάγραφα.

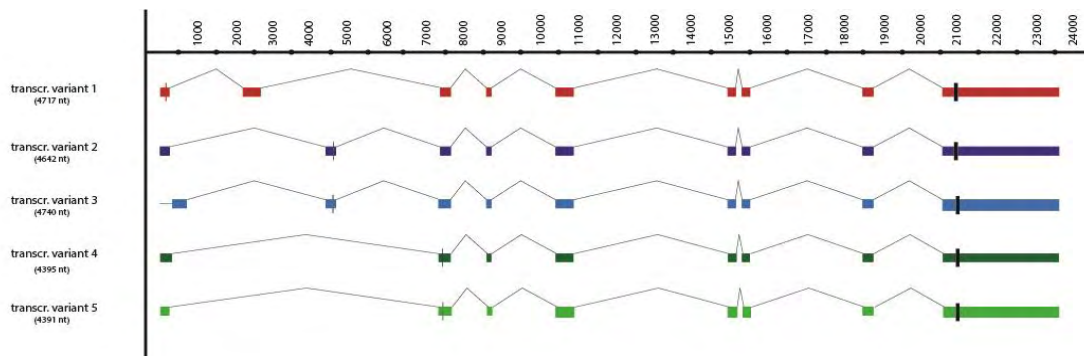
Πίνακας 15 Αναλυτικός πίνακας περιγραφής γνωρισμάτων των πρωτεϊνικών προϊόντων ANGEL2.

¹Οι θέσεις έναρξης και λήξης της μετάφρασης αναφέρονται στην αλληλουχία κάθε ξεχωριστού μεταγράφου και όχι του γονιδίου

²Οι τιμές του μοριακού βάρους και του ισοηλεκτρικού σημείου των διαφορετικών πρωτεϊνών προέχονται από το διαδικτυακό πρόγραμμα *ExPASy Molecular Calculator*

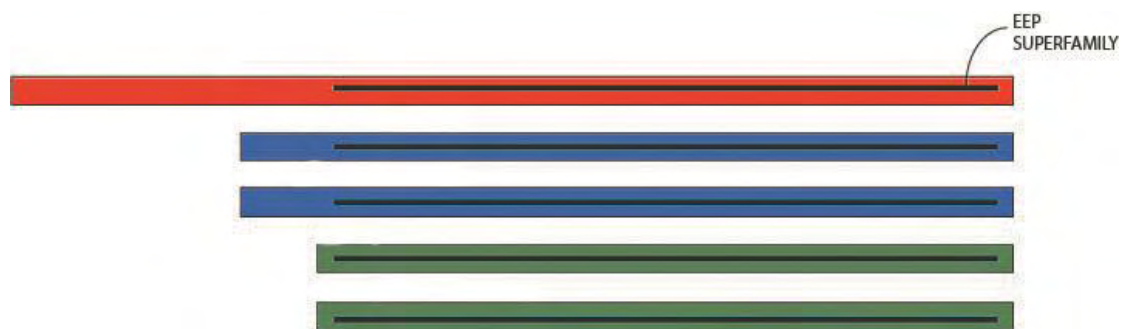
	Όνομα- σία Πρωτεΐ- νης	Θέση Έναρ- ξης ¹	Θέση Λήξης ¹	Μέγεθος Νουκλ/κη ς Αλληλ/χίας (nts)	Μέγεθος Πρωτεΐ- νης (αα)	Μο- ριακό Βάρος (kDa) ²	Ισοηλε- κτρικό σημείο (pI) ²
Εν. Μετ. 1	A'	205	1839	1635	545	62,339	8,00
Εν. Μετ. 2	B'	508	1764	1257	419	47,164	5,98
Εν. Μετ. 3	B'	606	1862	1257	419	47,164	5,98
Εν. Μετ. 4	Γ'	390	1517	1128	376	42,106	6,10
Εν. Μετ. 5	Γ'	386	1513	1128	376	42,106	6,10

Η παραγωγή του ίδιου πρωτεϊνικού προϊόντος είναι αποτέλεσμα ταύτισης των κωδικών περιοχών (CDS, Coding DNA Sequence) των δύο εναλλακτικών μεταγράφων και στις δύο διαφορετικές περιπτώσεις, παρά τις διαφορές τους στην νουκλεοτιδική τους αλληλουχία.



Εικόνα 24 Σχηματική απεικόνιση των εναλλακτικών μεταγράφων *ANGEL2* με τις αντίστοιχες θέσεις έναρξης και τερματισμού της μετάφρασης. Οι μικρές κάθετες προς τα εξόνια γραμμές αποτελούν τις θέσεις έναρξης της μετάφρασης (κωδικόνιο AUG), ενώ οι φαρδιές κάθετες γραμμές αποτελούν τα κωδικόνια λήξης της μετάφρασης (ένεκα κοινού τελικού εξονίου, το κωδικόνιο λήξης για όλα τα μεταγραφα είναι το UGA).

Η στοίχιση των αμινικών αλληλουχιών παρουσιάζει επιπλέον ομοιότητες και διαφορές στις μεταξύ τους αλληλουχίες. Όπως αναμένεται, η αλληλουχία μεταξύ των πρωτεϊνών Α' και Β' διαφέρει στο άκρο 5' τους, ενώ η αλληλουχία της πρωτεΐνης Γ' αποτελεί τμήμα των άλλων δύο πρωτεϊνών. Ωστόσο, ανεξάρτητα του μεγέθους

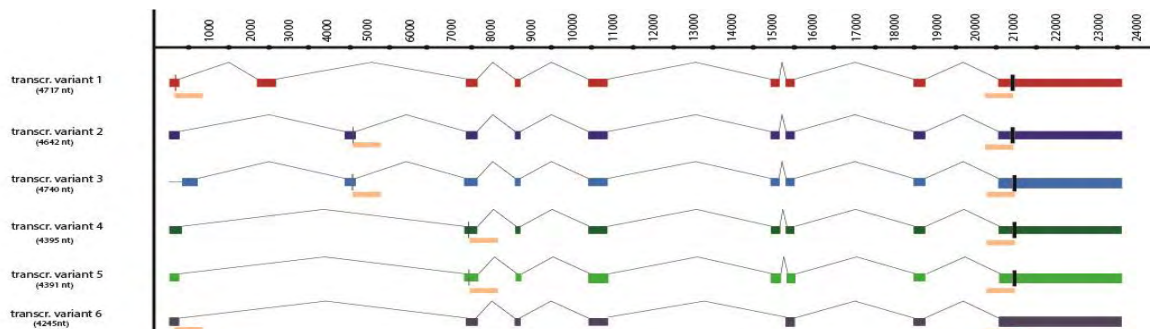


Εικόνα 25 Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών πρωτεϊνών *ANGEL2* (από πάνω προς κάτω είναι οι πρωτεΐνες Α', Β', Γ').

τους και οι τρεις πρωτεΐνες φέρουν την επικράτεια ενδο-εξω-ριβονουκλεάσης-φωσφατάσης (EEP).

4.2. Ανίχνευση της *ANGEL2* σε ανθρώπινα κύτταρα

Για την έκφραση του γονιδίου *ANGEL2* είναι απαραίτητη η μεταγραφή του. Έτσι, ελέγχθηκε η παραγωγή mRNAs των εναλλακτικών μεταγράφων *ANGEL2* σε ανθρώπινα κύτταρα. Η κυτταρική σειρά M14K που ελέγχθηκε, επιλέχθηκε τυχαία. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του ολικού RNA, σύνθεση πρώτης αλυσίδας cDNA και ενίσχυση των εναλλακτικών μεταγράφων με ειδικούς εκκινητές. Συγκεκριμένα για τα εναλλακτικά μετάγραφα 2 και 3 χρησιμοποιήθηκε μόνο ένα ζεύγος εκκινητών, όπως και για τα εναλλακτικά μετάγραφα 4 και 5 ένα μόνο ζεύγος (Εικόνα



Εικόνα 26 Σχηματική απεικόνιση των εναλλακτικών μεταγράφων *ANGEL2* με τις θέσεις ενίσχυσης των εκκινητών. Οι εκκινητές εμφανίζονται ως παράλληλες στα μετάγραφα γραμμές κάτω από αυτά. Επιπλέον, παρουσιάζονται και οι κωδικές περιοχές των μεταγράφων., όπου οι μικρές κάθετες προς τα εξόνια γραμμές αποτελούν τις θέσεις έναρξης της μετάφρασης (κωδικόνιο AUG), ενώ οι φαρδιές κάθετες γραμμές αποτελούν τα κωδικόνια λήξης της μετάφρασης (ένεκα κοινού τελικού εξονίου, το κωδικόνιο λήξης για όλα τα μετάγραφα είναι το UGA). Στο σχήμα αυτό, σε αντίθεση με τα άλλα, εμφανίζεται και η αλληλουχία του μη κωδικού mRNA εναλλακτικό μετάγραφο 6.

26). Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μετάγραφα που φέρουν κοινές κωδικές περιοχές μεταξύ τους, το μετάγραφο 1 έχει μοναδική αλληλουχία, έτσι ώστε και να είναι το μόνο μετάγραφο που θα έχει ξεχωριστούς εκκινητές. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον πρώτο πίνακα της ενότητας 3.1.

Από την εικόνα 27 είναι εμφανές ότι χρησιμοποιώντας τους εκκινητές του εναλλακτικού μεταγράφου 1 (διαδρομή 1) ανιχνεύεται το εναλλακτικό μετάγραφο 1 (1637bps), αλλά λαμβάνονται και πολλά παραπροϊόντα από την ενίσχυση αυτή. Ο εμπροσθοδρομικός εκκινητής του εναλλακτικού μεταγράφου 1 υβριδίζεται στο εξόνιο 1, το οποίο όμως είναι κοινό (ή σχεδόν ίδιο) για τα περισσότερα από τα εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου (εν. μετ. 1, 2, 4 και 5). Επιπλέον, η παρουσία μπάντας μεγέθους μικρότερου των χιλίων βάσεων μπορεί να θεωρηθεί ως ενισχυμένο παραπροϊόν του εναλλακτικού μεταγράφου 6, το οποίο φέρει επίσης κοινό με το πρώτο μετάγραφο εξόνιο 1.

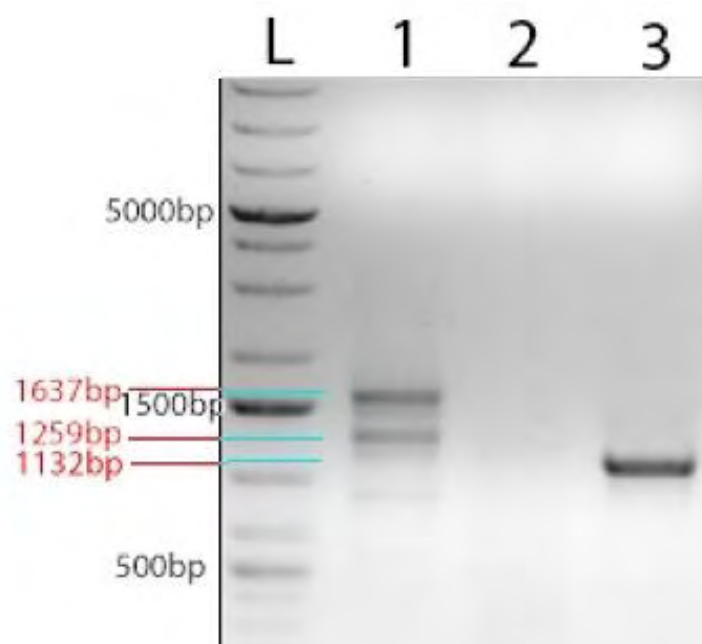
Η ενίσχυση των μεταγράφων 4 και 5 (θέση 3) είναι εμφανής (1132bps), καθόσον η κωδική τους περιοχή αποτελεί τμήμα της αλληλουχίας των εξονίων 4 έως 10, τμήμα δηλαδή όλων των μεταγράφων του γονιδίου, καθιστώντας ασαφή την πραγματική ύπαρξη τους ή το επίπεδο έκφρασής τους.

Αν και δεν είναι πολύ εμφανές (Εικόνα 27, Διαδρομή 2) το αποτέλεσμα ενίσχυσης των μεταγράφων 2 και 3 (1259 bps), τα εναλλακτικά μετάγραφα είναι παρόντα

στην κυτταρική σειρά M14K. Αντίθετα, τα μετάγραφα 4 και 5 (Εικόνα 27, Διαδρομή 3) φαίνεται ότι έχουν ενισχυθεί (1132bps).

4.3. Δοκιμή έκφρασης των *ANGEL2*

Ακολούθησε απομόνωση των μεταγράφων από το πήκτωμα και δεύτερη PCR

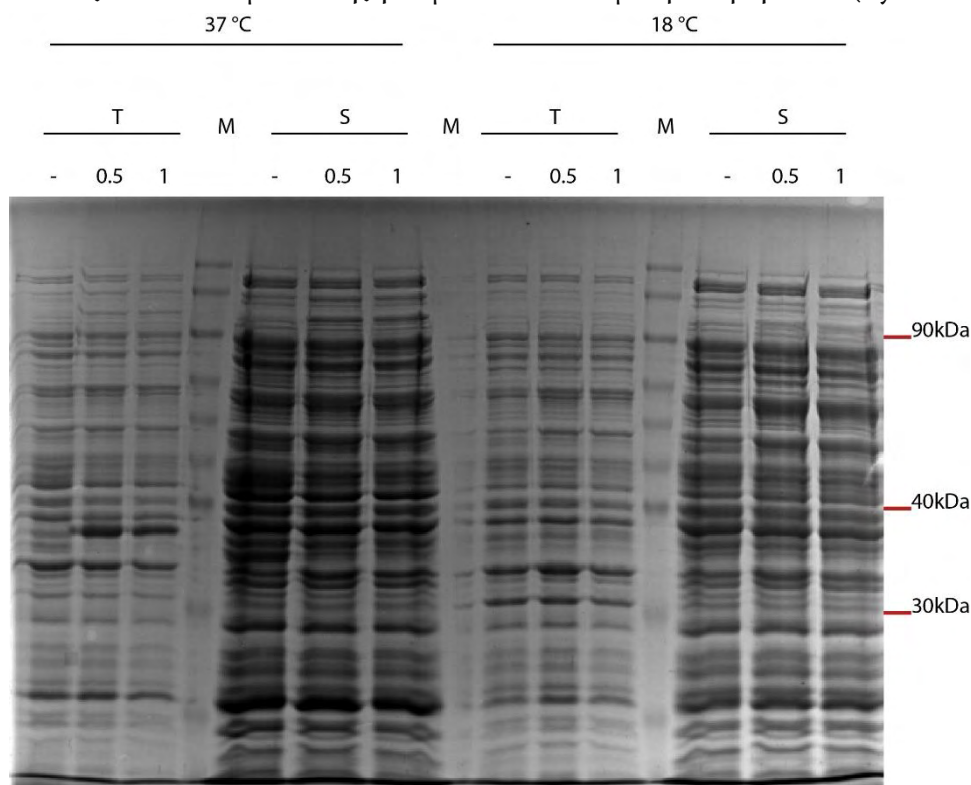


Εικόνα 27 Ανίχνευση εναλλακτικών μεταγράφων *angel2*. Αριστερά της εικόνα απεικονίζεται ο μάρτυρας μήκους βάσεων DNA. Και ακολουθούν οι θέσεις ενίσχυσης των μεταγράφων: Διαδρομή 1, εναλλακτικό μετάγραφο 1, Διαδρομή 2, μετάγραφο 2 και 3, Διαδρομή 3, εναλλακτικά μετάγραφα 4 και 5.

ενίσχυσης των άκρων των μεταγράφων (βλ. [«Κλωνοποίηση μέσω επικάλυψης επεκτάσεων PCR \(Overlap Extension PCR Cloning\)»](#)). Τα τρία ενισχυμένα στα άκρα προϊόντα, δηλαδή οι κωδικές περιοχές του εναλλακτικού μεταγράφου 1 (Προϊόν 1), των εναλλακτικών μεταγράφων 2 και 3 (Προϊόν 2) και των εναλλακτικών μεταγράφων 4 και 5 (Προϊόν 3), κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pET33b(+) και αλληλουχήθηκαν. Η αλληλούχιση επέτρεψε τον έλεγχο κλωνοποίησης των μεταγράφων στον πλασμιδιακό φορέα, μέσω ανάγνωσης των τελευταίων βάσεων του πλασμιδίου στη θέση κοπής του από την EcoRI και τις πρώτες αζωτούχες βάσεις της κλωνοποιημένης αλληλουχίας (με προσανατολισμό 5' → 3'). Η κλωνοποίηση ήταν επιτυχής μόνο για τα μετάγραφα 4 και 5. Η κωδική τους περιοχή αποτελεί τμήμα της αλληλουχίας των εξονίων 4 έως 10, τμήμα δηλαδή

όλων των μεταγράφων του γονιδίου, καθιστώντας ασαφή την πραγματική ύπαρξη τους ή το επίπεδο της έκφρασής τους.

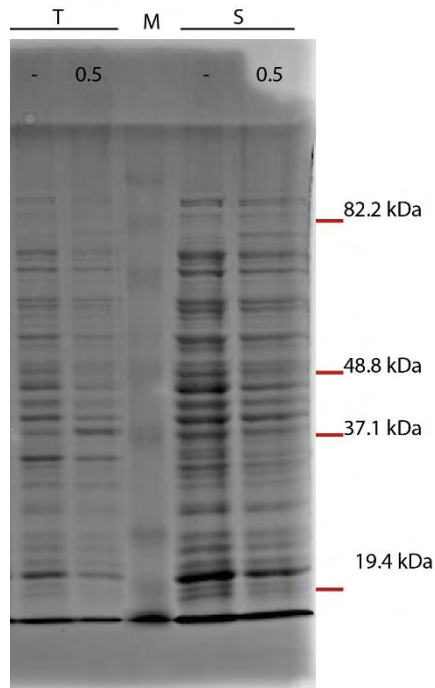
Έτσι, ελέγχθηκαν οι συνθήκες έκφρασης των κλωνοποιημένων γονιδίων και η παραγωγή των πρωτεϊνών μόνο για τη μικρότερη από τις τρεις πρωτεΐνες. Από τη δοκιμή παραγωγής των πρωτεϊνών στους 37°C και στους 18°C (Εικόνα 28), χρησιμοποιώντας στο διάλυμα λύσης ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Lysis Buffer



Εικόνα 28 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE για τη δοκιμή έκφρασης της ANGEL2 Γ'. Ελέγχονται οι συνθήκες θερμοκρασίας (37°C και 18°C) και συγκέντρωσης IPTG [χωρίς IPTG (-) και σε συγκεντρώσεις 0,5M και 1,0M]. Στους 37°C είναι εμφανής η έκφραση της πρωτεΐνης ύστερα από επαγωγή με IPTG, αλλά όχι στο διαλυτό διάλυμα πρωτεϊνών. T: ολικό διάλυμα (Total), S: υπερκείμενο διάλυμα (Supernatant), M: δείκτης μοριακού βάρους πρωτεϊνών (Marker).

1), συμπεραίνεται ότι η πρωτεΐνη παράγεται καλύτερα στους 37°C. Δεν εμφανίζεται στο διάλυμα των διαλυτών πρωτεϊνών, παρά μόνο στο ολικό διάλυμα.

Η διαδικασία δοκιμής έκφρασης επαναλαμβάνεται μόνο στους 37°C, χρησιμοποιώντας στο διάλυμα λύσης το αντιδραστήριο MES (Lysis Buffer 2), έχοντας, έτσι, ένα ρυθμιστικό διάλυμα με pH μικρότερο του ισοηλεκτρικού σημείου της πρωτεΐνης. Για ακόμη μία φορά, η πρωτεΐνη παράγεται, αλλά όχι στο διάλυμα των διαλυτών πρωτεϊνών (Εικόνα 29).



Εικόνα 29 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE για τη δοκιμή έκφρασης της ANGEL2 Γ'. Χρησιμοποιήθηκε στο διάλυμα λύσης το αντιδραστήριο MES. Η έκφραση της πρωτεΐνης είναι εμφανής στο ολικό διάλυμα, αλλά όχι στο διάλυμα διαλυτών πρωτεϊνών.

5. Συζήτηση

Η εξέλιξη του ζωικού βασιλείου βασίζεται σε μεταλλάξεις που υφίσταται το γονιδίωμά τους, οδηγώντας τόσο στην έκφραση αυξημένου αριθμού νέων πρωτεϊνών, όσο και στην αύξηση της πολυπλοκότητας τους, σχηματίζοντας νέες ρυθμιστικές λειτουργίες στα κύτταρα όπως και νέα μεταγωγικά μονοπάτια. Δημιουργούνται, έτσι, κύτταρα με ξεχωριστές λειτουργίες και ιδιότητες, χαρακτηρίζοντας την πολυπλοκότητα διαφορετικών οργανισμών. Οι περισσότερες πρωτεϊνικές επικράτειες φαίνεται ότι είναι κοινές σε όλο το ζωικό βασίλειο. Ωστόσο, υπάρχουν πολλά καινούρια αρχιτεκτονικά σχέδια πρωτεϊνών, στον άνθρωπο συγκεκριμένα, που ορίζονται ως καινοφανείς συνδυασμοί επικρατειών, αποκλίνοντας στον τρόπο λειτουργίας τους μέσα στο κύτταρο. Το ερώτημα που δημιουργείται είναι, εάν η λειτουργία τους διατηρείται κατά την εξέλιξη των οργανισμών ή αυτή διαφοροποιείται, αποκτώντας νέα λειτουργία, η οποία θα προσαρμόζεται στα νέα δίκτυα μονοπατιών λειτουργίας των κυττάρων.

Διάφορες μεταλλάξεις κατά την εξέλιξη των οργανισμών οδήγησαν στο σχηματισμό μίας νέας πρωτεΐνης, της ANGEL2, αποκτώντας έναν διαφορετικό λειτουργικό ρόλο στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, οι υπομονάδες του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου CCR4-NOT, οι CCR4 και CAF1 καταλύουν την απαδενυλίωση των mRNAs στο κυτταρόπλασμα, οδηγώντας στην αποσύνθεσή των μορίων αυτών. Ωστόσο, την ίδια λειτουργία δε φαίνεται αν έχουν και όλες οι ομόλογες προς τα μόρια αυτά πρωτεΐνες. Η ANGEL2/CCR4D φέρει ομόλογες επικράτειες με την CCR4. Στον ζυμομύκητα, *Saccharomyces cerevisiae*, η ορθόλογη πρωτεΐνη της ANGEL2, NGL2, εμπλέκεται στην επεξεργασία του 5,8S rRNA. Ωστόσο, στον άνθρωπο, σχηματίζοντας σύμπλοκο με την CAF1Z, φαίνεται να εμπλέκεται στην επεξεργασία των snRNAs και snoRNAs στα σωμάτια Cajal (Cajal bodies). Ο περιορισμένος αριθμός αυτός αναφορών δεν επιτρέπει τον προσδιορισμό της λειτουργίας της ίδιας της ANGEL2, κάνοντας αναγκαία τη μελέτη της.^{89, 93}

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης *in silico* είναι εμφανές ότι τα προϊόντα του γονιδίου *ANGEL2* υφίστανται πολλές τροποποιήσεις σε όλα τα στάδια έκφρασης των πρωτεϊνών. Κατά τη μεταγραφή του γονιδίου, διαφορετικοί μεταγραφικοί παράγοντες συνδέονται στον υποκινητή προκειμένου να συντεθεί ένα από τα πέντε διαφορετικά εναλλακτικά μετάγραφα, όπως επίσης, μπορεί να συμβεί και επιλογή διαφορετικού υποκινητή για το σκοπό αυτό (εναλλακτικό μετάγραφο 3). Μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό των ώριμων μορίων mRNAs. Τα εναλλακτικά μετάγραφα 1, 2 και 3 υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα, με την παρουσία δύο διαφορετικών εξονίων-κασετών (cassette exon), από τα οποία μόνο το ένα θα περιλαμβάνεται στο τελικό μόριο mRNA. Αντίθετα, τα εναλλακτικά μετάγραφα 4 και 5 δε φέρουν κανένα εξόνιο-κασέτα, αν και παρουσιάζουν μεταξύ τους διαφορές στο πρώτο εξόνιο τους. Οι παραπάνω τροποποιήσεις οδηγούν στο σχηματισμό διαφορετικών ώριμων μορίων mRNA, τα οποία θα διαφέρουν κύριες διαφορές στο άκρο 5' τους, διατηρώντας με τον τρόπο αυτό τη συντηρημένη πρωτεϊνική επικράτεια EEP στο άκρο 3'. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, παρόλο που μετάγραφα φέρουν κοινά πρώτα εξόνια, η μετάφρασή τους δεν ξεκινά από το ίδιο κωδικόνιο έναρξης. Η επιλογή αυτή των κυττάρων πιθανώς να οφείλεται στην ανάγκη διατήρησης της πρωτεϊνικής επικράτειας των παραγόμενων πρωτεϊνών, προκειμένου να δράσουν σε αυτά.

Πέρα από τα παραπάνω, τα αποτελέσματα της ανάλυσης *in silico* βοήθησαν στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων PCR, που εντοπίστηκαν επιτυχώς στην κυτταρική σειρά M14K. Οι θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών σε κοινές αλληλουχίες των mRNAs δεν αποτέλεσε σημαντικό πρόβλημα αναγνωρίζοντας το μέγεθος των ενισχυμένων από την PCR μεταγράφων. Είναι πιθανό, όμως, να αποτέλεσε ένα μικρό πρόβλημα στην απομόνωση αυτών για την κλωνοποίησή τους. Ένα ακόμη πρόβλημα στην κλωνοποίηση των εναλλακτικών μεταγράφων 2 και 3 αποτέλεσε ο μικρός αριθμός ενισχυμένων προϊόντων που προκύπτουν από την PCR.

Όπως ήταν αναμενόμενο τα μετάγραφα 4 και 5 κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pET33b(+). Προκειμένου να αναλυθεί η λειτουργία της πρωτεΐνης

ANGEL2Γ', έπρεπε να γίνουν γνωστές οι συνθήκες παραγωγής της πρωτεΐνης *in vitro*. Τα αποτελέσματα της δοκιμής έκφρασης δείχνουν ότι για την έκφραση της ANGEL2Γ' απαιτείται η θερμοκρασία των 37°C με ιδανική συγκέντρωση IPTG 0,5M. Το γεγονός, όμως, ότι η πρωτεΐνη φαίνεται στο ολικό διάλυμα συστατικών των βακτηρίων και όχι στο διαλυτό, μας οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται σε σωματίδια έγκλεισης (Inclusion bodies). Γενικότερα, θεωρείται πως, κατά την πρωτεϊνοσύνθεση ορισμένες πρωτεΐνες δεν αναδιπλώνονται σωστά προς την τριτοταγή τους δομή, αφήνοντας εκτεθειμένες υδροφοβικές περιοχές, με αποτέλεσμα την αλληλοεπίδραση με άλλες ίδιες ή παρόμοιες σε αυτές πρωτεΐνες και το σχηματισμό των τελικών συσσωματωμάτων.¹¹² Πιθανοί λόγοι σχηματισμού των σωματίων έγκλεισης αποτελούν το πλασμίδιο που χρησιμοποιείται (high-/low-copy) και κατ' επέκταση ο αριθμός αντιγράφων του γονιδίου-στόχου, τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών, το σύστημα του υποκινητή στο πλασμίδιο (ισχυρός ή ασθενής) και η συγκέντρωση του επαγωγέα. Ένα ακόμη αίτιο που έχει αναφερθεί είναι και η παρουσία chaperones στα βακτηριακά κύτταρα. Για την αποφυγή των σωματίων έγκλεισης και τη λήψη σωστά αναδιπλωμένης πρωτεΐνης θα πρέπει να ελεγχθούν πρώτα οι παραπάνω συνθήκες. Μία διαφορετική λύση προς απομόνωση διαλυτής πρωτεΐνης είναι η ανάκτησή της από τα σωματίια έγκλεισης, μέσω αποδιάταξης των συσσωματωμένων πρωτεϊνών και επαναδίπλωσής τους.¹¹³

Η παρούσα εργασία θέτει τα πρώτα βήματα στο χαρακτηρισμό του βιολογικού ρόλου της ANGEL2. Ο βιολογικός χαρακτηρισμός της στα ανθρώπινα κύτταρα πιθανώς να διευρύνει το ρόλο των απαδενυλασών στα ευκαρυωτικά κύτταρα και, σε σύνδεση με την CAF1Z, να φέρει στην επιφάνεια νέα ρυθμιστικά μονοπάτια, βλάβες των οποίων μπορεί να σχηματίσουν παθολογικούς φαινότυπους. Το κλειδί σε όλα αυτά αποτελεί ο βιοχημικός χαρακτηρισμός και η αποκάλυψη της δομής της πρωτεΐνης, καθώς είναι αυτή που θα επιτρέψει τη λειτουργία της μέσα στο κύτταρο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Basquin, J. et al. Architecture of the nuclease module of the yeast Ccr4-not complex: the Not1-Caf1-Ccr4 interaction. *Mol Cell* **48**, 207-18 (2012).
2. Ukleja, M. et al. The architecture of the Schizosaccharomyces pombe CCR4-NOT complex. *Nat Commun* **7**, 10433 (2016).
3. Wang, H. et al. Crystal structure of the human CNOT6L nuclease domain reveals strict poly(A) substrate specificity. *EMBO J* **29**, 2566-76 (2010).
4. Dyson, R.D. Essentials of cell biology (Allyn and Bacon, Boston, 1978).
5. Bloom, M.V., Freyer, G.A. & Micklos, D.A. Laboratory DNA science : an introduction to recombinant DNA techniques and methods of genome analysis (Benjamin/Cummings Pub. Co., Menlo Park, Calif., 1996).
6. Collart, M.A. The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **7**, 438-54 (2016).
7. Goldstrohm, A.C. & Wickens, M. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 337-44 (2008).
8. Parker, R. & Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 121-7 (2004).
9. Kim, W.C. & Lee, C.H. The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1796**, 99-113 (2009).
10. Lewin, B. Genes VIII (Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2004).
11. Enuka, Y. et al. Circular RNAs are long-lived and display only minimal early alterations in response to a growth factor. *Nucleic Acids Res* **44**, 1370-83 (2016).
12. Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L. Biochemistry (W.H. Freeman, New York, 2012).
13. Roviello, G.N. et al. Natural and artificial binders of polyriboadenylic acid and their effect on RNA structure. *Beilstein J Nanotechnol* **6**, 1338-47 (2015).
14. Wickens, M. In the beginning is the end: regulation of poly(A) addition and removal during early development. *Trends Biochem Sci* **15**, 320-4 (1990).
15. Schoenberg, D.R. & Maquat, L.E. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* **13**, 246-59 (2012).

16. Eckmann, C.R., Rammelt, C. & Wahle, E. Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**, 348-61 (2011).
17. Baudrimont, A. et al. Multiplexed gene control reveals rapid mRNA turnover. *Sci Adv* **3**, e1700006 (2017).
18. Yan, Y.B. Deadenylation: enzymes, regulation, and functional implications. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **5**, 421-43 (2014).
19. Hinnebusch, A.G. & Lorsch, J.R. The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4** (2012).
20. Marcotrigiano, J., Gingras, A.C., Sonenberg, N. & Burley, S.K. Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* **89**, 951-61 (1997).
21. Sonenberg, N. & Dever, T.E. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol* **13**, 56-63 (2003).
22. Amrani, N., Ghosh, S., Mangus, D.A. & Jacobson, A. Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature* **453**, 1276-80 (2008).
23. Tarun, S.Z., Jr. & Sachs, A.B. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J* **15**, 7168-77 (1996).
24. Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D. & Sachs, A.B. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* **2**, 135-40 (1998).
25. Wilusz, C.J., Wormington, M. & Peltz, S.W. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 237-46 (2001).
26. Shatkin, A.J. & Manley, J.L. The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat Struct Biol* **7**, 838-42 (2000).
27. Garneau, N.L., Wilusz, J. & Wilusz, C.J. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 113-26 (2007).
28. Meyer, S., Temme, C. & Wahle, E. Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **39**, 197-216 (2004).
29. Chou, C.F. et al. Tethering KSRP, a decay-promoting AU-rich element-binding protein, to mRNAs elicits mRNA decay. *Mol Cell Biol* **26**, 3695-706 (2006).
30. Paschoud, S. et al. Destabilization of interleukin-6 mRNA requires a putative RNA stem-loop structure, an AU-rich element, and the RNA-binding protein AUF1. *Mol Cell Biol* **26**, 8228-41 (2006).
31. Pulcrano, G. et al. PLAUF binding to the 3'UTR of the H3.3 histone transcript affects

- mRNA stability. *Gene* **406**, 124-33 (2007).
32. Ross, J. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* **59**, 423-50 (1995).
 33. Guo, X. & Hartley, R.S. HuR contributes to cyclin E1 deregulation in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* **66**, 7948-56 (2006).
 34. Gherzi, R. et al. A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol Cell* **14**, 571-83 (2004).
 35. Mazan-Mamczarz, K. & Gartenhaus, R.B. Post-transcriptional control of the MCT-1-associated protein DENR/DRP by RNA-binding protein AUF1. *Cancer Genomics Proteomics* **4**, 233-9 (2007).
 36. Sobue, S. et al. v-Src oncogene product increases sphingosine kinase 1 expression through mRNA stabilization: alteration of AU-rich element-binding proteins. *Oncogene* **27**, 6023-33 (2008).
 37. Quann, E.J., Khwaja, F. & Djakiew, D. The p38 MAPK pathway mediates aryl propionic acid induced messenger rna stability of p75 NTR in prostate cancer cells. *Cancer Res* **67**, 11402-10 (2007).
 38. van Hoof, A. & Parker, R. The exosome: a proteasome for RNA? *Cell* **99**, 347-50 (1999).
 39. Liu, H., Rodgers, N.D., Jiao, X. & Kiledjian, M. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J* **21**, 4699-708 (2002).
 40. Mitchell, P. & Tollervey, D. mRNA turnover. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 320-5 (2001).
 41. Anderson, J.S. & Parker, R.P. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J* **17**, 1497-506 (1998).
 42. Chen, C.Y. et al. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* **107**, 451-64 (2001).
 43. Wang, Z. & Kiledjian, M. Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* **107**, 751-62 (2001).
 44. Mukherjee, D. et al. The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J* **21**, 165-74 (2002).
 45. Dodson, R.E. & Shapiro, D.J. Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**, 129-64 (2002).
 46. Wu, M. et al. Structural basis of m(7)GpppG binding to poly(A)-specific ribonuclease. *Structure* **17**, 276-86 (2009).
 47. Hammet, A., Pike, B.L. & Heierhorst, J.

- Posttranscriptional regulation of the RAD5 DNA repair gene by the Dun1 kinase and the Pan2-Pan3 poly(A)-nuclease complex contributes to survival of replication blocks. *J Biol Chem* **277**, 22469-74 (2002).
48. Chen, J. et al. Purification and characterization of the 1.0 MDa CCR4-NOT complex identifies two novel components of the complex. *J Mol Biol* **314**, 683-94 (2001).
 49. Villanyi, Z. & Collart, M.A. Building on the Ccr4-Not architecture. *Bioessays* **38**, 997-1002 (2016).
 50. Boland, A. et al. Structure and assembly of the NOT module of the human CCR4-NOT complex. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 1289-97 (2013).
 51. Temme, C. et al. Subunits of the Drosophila CCR4-NOT complex and their roles in mRNA deadenylation. *RNA* **16**, 1356-70 (2010).
 52. Collart, M.A. & Panasenko, O.O. The Ccr4--not complex. *Gene* **492**, 42-53 (2012).
 53. Albert, T.K. et al. Isolation and characterization of human orthologs of yeast CCR4-NOT complex subunits. *Nucleic Acids Res* **28**, 809-17 (2000).
 54. Temme, C., Zaessinger, S., Meyer, S., Simonelig, M. & Wahle, E. A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in Drosophila. *EMBO J* **23**, 2862-71 (2004).
 55. Lau, N.C. et al. Human Ccr4-Not complexes contain variable deadenylase subunits. *Biochem J* **422**, 443-53 (2009).
 56. Bawankar, P., Loh, B., Wohlbold, L., Schmidt, S. & Izaurralde, E. NOT10 and C2orf29/NOT11 form a conserved module of the CCR4-NOT complex that docks onto the NOT1 N-terminal domain. *RNA Biol* **10**, 228-44 (2013).
 57. Mauxion, F., Preve, B. & Seraphin, B. C2ORF29/CNOT11 and CNOT10 form a new module of the CCR4-NOT complex. *RNA Biol* **10**, 267-76 (2013).
 58. Bogdan, J.A. et al. Human carbon catabolite repressor protein (CCR4)-associative factor 1: cloning, expression and characterization of its interaction with the B-cell translocation protein BTG1. *Biochem J* **336** (Pt 2), 471-81 (1998).
 59. Collart, M.A. & Struhl, K. CDC39, an essential nuclear protein that negatively regulates transcription and differentially affects the constitutive and inducible HIS3 promoters. *EMBO J* **12**, 177-86 (1993).
 60. Tucker, M. et al. The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **104**, 377-86 (2001).

61. Dimitrova, L.N., Kuroha, K., Tatematsu, T. & Inada, T. Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome. *J Biol Chem* **284**, 10343-52 (2009).
62. Panasenko, O.O. & Collart, M.A. Presence of Not5 and ubiquitinated Rps7A in polysome fractions depends upon the Not4 E3 ligase. *Mol Microbiol* **83**, 640-53 (2012).
63. Teixeira, D. & Parker, R. Analysis of P-body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **18**, 2274-87 (2007).
64. Larabee, R.N. et al. CCR4/NOT complex associates with the proteasome and regulates histone methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5836-41 (2007).
65. Mersman, D.P., Du, H.N., Fingerman, I.M., South, P.F. & Briggs, S.D. Polyubiquitination of the demethylase Jhd2 controls histone methylation and gene expression. *Genes Dev* **23**, 951-62 (2009).
66. Mulder, K.W., Brenkman, A.B., Inagaki, A., van den Broek, N.J. & Timmers, H.T. Regulation of histone H3K4 tri-methylation and PAF complex recruitment by the Ccr4-Not complex. *Nucleic Acids Res* **35**, 2428-39 (2007).
67. Peng, W., Togawa, C., Zhang, K. & Kurdistani, S.K. Regulators of cellular levels of histone acetylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **179**, 277-89 (2008).
68. Azzouz, N., Panasenko, O.O., Colau, G. & Collart, M.A. The CCR4-NOT complex physically and functionally interacts with TRAMP and the nuclear exosome. *PLoS One* **4**, e6760 (2009).
69. Cui, Y. et al. Genome wide expression analysis of the CCR4-NOT complex indicates that it consists of three modules with the NOT module controlling SAGA-responsive genes. *Mol Genet Genomics* **279**, 323-37 (2008).
70. Denis, C.L. & Chen, J. The CCR4-NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **73**, 221-50 (2003).
71. Liu, H.Y. et al. The NOT proteins are part of the CCR4 transcriptional complex and affect gene expression both positively and negatively. *EMBO J* **17**, 1096-106 (1998).
72. Deluen, C. et al. The Ccr4-not complex and yTAF1 (yTaf(II)130p/yTaf(II)145p) show physical and functional interactions. *Mol Cell Biol* **22**, 6735-49 (2002).
73. Gaillard, H. et al. Genome-wide analysis of factors affecting transcription elongation and DNA repair: a new role for PAF and Ccr4-not in transcription-coupled repair. *PLoS Genet* **5**, e1000364 (2009).
74. Lemaire, M. & Collart, M.A. The TATA-binding protein-

- associated factor yTafII19p functionally interacts with components of the global transcriptional regulator Ccr4-Not complex and physically interacts with the Not5 subunit. *J Biol Chem* **275**, 26925-34 (2000).
75. Sanders, S.L., Jennings, J., Canutescu, A., Link, A.J. & Weil, P.A. Proteomics of the eukaryotic transcription machinery: identification of proteins associated with components of yeast TFIID by multidimensional mass spectrometry. *Mol Cell Biol* **22**, 4723-38 (2002).
 76. Kerr, S.C. et al. The Ccr4-Not complex interacts with the mRNA export machinery. *PLoS One* **6**, e18302 (2011).
 77. Harnisch, C., Moritz, B., Rammelt, C., Temme, C. & Wahle, E. Activity and Function of Deadenylases. *Enzymes* **31**, 181-211 (2012).
 78. Wahle, E. & Winkler, G.S. RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-not and Pan2-Pan3 complexes. *Biochim Biophys Acta* **1829**, 561-70 (2013).
 79. Winkler, G.S. & Balacco, D.L. Heterogeneity and complexity within the nuclease module of the Ccr4-Not complex. *Front Genet* **4**, 296 (2013).
 80. Viswanathan, P., Ohn, T., Chiang, Y.C., Chen, J. & Denis, C.L. Mouse CAF1 can function as a processive deadenylase/3'-5'-exonuclease in vitro but in yeast the deadenylase function of CAF1 is not required for mRNA poly(A) removal. *J Biol Chem* **279**, 23988-95 (2004).
 81. Horiuchi, M. et al. Structural basis for the antiproliferative activity of the Tob-hCaf1 complex. *J Biol Chem* **284**, 13244-55 (2009).
 82. Thore, S., Mauxion, F., Seraphin, B. & Suck, D. X-ray structure and activity of the yeast Pop2 protein: a nuclease subunit of the mRNA deadenylase complex. *EMBO Rep* **4**, 1150-5 (2003).
 83. Chen, J., Chiang, Y.C. & Denis, C.L. CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *EMBO J* **21**, 1414-26 (2002).
 84. Yamashita, A. et al. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 1054-63 (2005).
 85. Funakoshi, Y. et al. Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes Dev* **21**, 3135-48 (2007).
 86. Brown, C.E., Tarun, S.Z., Jr., Boeck, R. & Sachs, A.B. PAN3 encodes a subunit of the Pab1p-dependent poly(A) nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**, 5744-53 (1996).
 87. Sachs, A.B. & Deardorff, J.A. Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A)

- ribonuclease in yeast. *Cell* **70**, 961-73 (1992).
88. Godwin, A.R., Kojima, S., Green, C.B. & Wilusz, J. Kiss your tail goodbye: the role of PARN, Nocturnin, and Angel deadenylases in mRNA biology. *Biochim Biophys Acta* **1829**, 571-9 (2013).
 89. Faber, A.W., Van Dijk, M., Raue, H.A. & Vos, J.C. 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**, 1095-101 (2002).
 90. Yi, X. et al. RNA processing and modification protein, carbon catabolite repression 4 (Ccr4), arrests the cell cycle through p21-dependent and p53-independent pathway. *J Biol Chem* **287**, 21045-57 (2012).
 91. Carmo-Fonseca, M., Pepperkok, R., Carvalho, M.T. & Lamond, A.I. Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies. *J Cell Biol* **117**, 1-14 (1992).
 92. Sawyer, I.A., Sturgill, D., Sung, M.H., Hager, G.L. & Dundr, M. Cajal body function in genome organization and transcriptome diversity. *Bioessays* **38**, 1197-1208 (2016).
 93. Wagner, E., Clement, S.L. & Lykke-Andersen, J. An unconventional human Ccr4-Caf1 deadenylase complex in nuclear cajal bodies. *Mol Cell Biol* **27**, 1686-95 (2007).
 94. Nousch, M., Techritz, N., Hampel, D., Millionigg, S. & Eckmann, C.R. The Ccr4-Not deadenylase complex constitutes the main poly(A) removal activity in *C. elegans*. *J Cell Sci* **126**, 4274-85 (2013).
 95. Lardelli, R.M. et al. Biallelic mutations in the 3' exonuclease TOE1 cause pontocerebellar hypoplasia and uncover a role in snRNA processing. *Nat Genet* (2017).
 96. De Belle, I., Wu, J.X., Sperandio, S., Mercola, D. & Adamson, E.D. In vivo cloning and characterization of a new growth suppressor protein TOE1 as a direct target gene of Egr1. *J Biol Chem* **278**, 14306-12 (2003).
 97. Sperandio, S., Tardito, S., Surzycki, A., Latterich, M. & de Belle, I. TOE1 interacts with p53 to modulate its transactivation potential. *FEBS Lett* **583**, 2165-70 (2009).
 98. Chaouche-Mazouni, S. et al. M14K and M38K malignant pleural mesothelioma cell lines preserve the same claudin-based phenotype in vivo. *In Vivo* **27**, 227-32 (2013).
 99. Klemperer, P. & Coleman, B.R. Primary neoplasms of the pleura. A report of five cases. *Am J Ind Med* **22**, 1-31 (1992).
 100. Klemperer, P. & Rabin, C.B. Primary Neoplasms of the Pleura. A Report of Five Cases. *Archives of Pathology* **11**, 27 (1931).
 101. Pelin-Enlund, K. et al. Asbestos-related malignant

- mesothelioma: growth, cytology, tumorigenicity and consistent chromosome findings in cell lines from five patients. *Carcinogenesis* **11**, 673-81 (1990).
102. Samson, M.K. et al. Randomized comparison of cyclophosphamide, imidazole carboxamide, and adriamycin versus cyclophosphamide and adriamycin in patients with advanced stage malignant mesothelioma: a Sarcoma Intergroup Study. *J Clin Oncol* **5**, 86-91 (1987).
 103. Wagner, J.C., Sleggs, C.A. & Marchand, P. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med* **17**, 260-71 (1960).
 104. Jensen, M.A., Fukushima, M. & Davis, R.W. DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. *PLoS One* **5**, e11024 (2010).
 105. Simonovic, A. et al. Dimethyl sulfoxide improves sensitivity and specificity of RT-PCR and qRT-PCR amplification of low-expressed transgenes. *Arch. Biol. Sci* **64**, 12 (2012).
 106. Varadaraj, K. & Skinner, D.M. Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene* **140**, 1-5 (1994).
 107. Winship, P.R. An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic Acids Res* **17**, 1266 (1989).
 108. Bryksin, A.V. & Matsumura, I. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques* **48**, 463-5 (2010).
 109. Zhu, B., Cai, G., Hall, E.O. & Freeman, G.J. In-fusion assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations. *Biotechniques* **43**, 354-9 (2007).
 110. Brunelle, J.L. & Green, R. One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods Enzymol* **541**, 151-9 (2014).
 111. Keren, H., Lev-Maor, G. & Ast, G. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat Rev Genet* **11**, 345-55 (2010).
 112. Burgess, R.R. Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods Enzymol* **463**, 259-82 (2009).
 113. Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A.K., Singh, S.M. & Panda, A.K. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact* **14**, 41 (2015).