



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΝΕΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΗΣ RNase
κ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ**

ΠΕΤΡΟΠΟΥΛΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2017



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΝΕΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΗΣ RNase
κ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ**

ΠΕΤΡΟΠΟΥΛΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2017



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΑΘΗΓΗΤΗ Δ.ΣΙΔΕΡΗ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΝΕΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΗΣ RNase
κ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ**

ΠΕΤΡΟΠΟΥΛΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: κ. ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ ΣΙΔΕΡΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **ΣΙΔΕΡΗΣ ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ**, Αναπληρωτής Καθηγητής
- **ΣΚΟΡΙΛΑΣ ΑΝΔΡΕΑΣ**, Καθηγητής
- **ΓΟΥΡΓΙΩΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**, Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2016

Στην αγαπημένη κ. Ευσταθία

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης με τίτλο <<Κλινική Χημεία-Μοριακή Διαγνωστική>> τα ακαδημαϊκά έτη 2014-2017. Το πειραματικό μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο βιοχημείας και μοριακής βιολογίας του αναπληρωτή καθηγητή Διαμάντη Σίδερη, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη του προς το πρόσωπό μου για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την επιστημονική καθοδήγηση καθόλη την διάρκεια της διπλωματικής εργασίας, τις συμβουλές, τη στήριξη και την πολύτιμη βοήθεια του.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές Ανδρέα Σκορίλα και Δημήτριο Γουργιώτη, που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στη τριμελή εξεταστική μου επιτροπή και να αξιολογήσουν την παρούσα εργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της ερευνητικής μου ομάδας, την υποψήφια διδάκτορα Ιωάννα Κοκκινοπούλου για την πολύτιμη βοήθεια της, τις συναδέλφους Μαριαλένα Παπαγρηγορίου, Μελίνα Δραγκόλια και την προπτυχιακή φοιτήτρια Αγγελική Μπαλούρη για την συνεργασία και την βοήθεια τους.

Πίνακας περιεχομένων

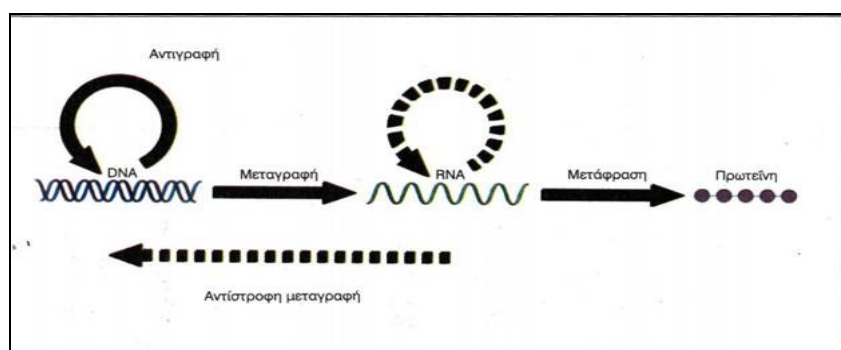
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1.1.Ο κόσμος του RNA.....	4
1.2.Δομή και λειτουργία ριβονουκλεασών.....	9
1.2.1.Κατηγορίες ριβονουκλεασών.....	16
1.2.2. Η πρωτεϊνική οικογένεια ριβονουκλεασών κ (RNase κ).....	20
1.3. Εναλλακτική συρραφή.....	24
1.3.1. Εισαγωγή ματίσματος.....	24
1.3.2. Εναλλακτικό μάτισμα.....	27
1.4. Αλληλούχιση.....	29
1.4.1. Next Generation Sequencing και RNase κ.....	36
1.5. Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας.....	40
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	41
2.1. Υλικά.....	42
2.1.1 Χημικές Ουσίες.....	42
2.1.2. Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.....	43
2.1.3. Θρεπτικά Υλικά.....	44
2.1.4. Διαλύματα.....	45
2.1.5. Ολιγονουκλεοτίδια- εκκινητές.....	45
2.2.Μέθοδοι.....	46
2.2.1.Κυτταροκαλλιέργειες.....	46
2.2.1.1.Απόψυξη κυττάρων.....	46
2.2.1.2. Ανακαλλιέργεια κυττάρων.....	47
2.2.1.3.Κατάψυξη κυττάρων.....	48
2.2.2. Απομόνωση ολικού RNA.....	48
2.2.2.1. Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα.....	48
2.2.2.2.Ποσοτικός προσδιορισμός ολικού RNA.....	50

2.2.2.3.Ποιοτικός έλεγχος του ολικού RNA.....	51
2.2.3.Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	52
2.2.3.1.Αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR).....	56
2.2.3.2.PCR.....	60
2.2.3.3.Ανάλυση των cDNA των διαφόρων μεταγράφων σε πήκτωμα αγαρόζης.....	67
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	71
3.2.Εντοπισμός νέων μεταγράφων της RNase κ σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.....	74
3.3.Συγκριτική παρουσίαση προτύπων έκφρασης των νέων μεταγράφων της RNase κ σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.....	85
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	87
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	92

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.Ο κόσμος του RNA

Το RNA, μαζί με τις πρωτεΐνες και το DNA, είναι πλέον γνωστό πως αποτελεί ένα από τα τρία απαραίτητα μακρομόρια της ζωής. Η ανακάλυψη της διπλής έλικας του DNA από τους Watson και Crick (Nobel 1962) οδήγησε στην διατύπωση του κεντρικού δόγματος βιολογίας, σύμφωνα με την οποία το DNA είναι το μόριο που παρέχει την γενετική πληροφορία, η οποία ρέει από το DNA στο RNA, το οποίο συμμετέχει στην αποκωδικοποίηση της πληροφορίας και οδηγεί στην πρωτεϊνσύνθεση. Όμως, δεν ήταν μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1960 όπου αρκετοί επιστήμονες πρότειναν πως πρέπει να υπάρχει ένα πρωταρχικό αρχέγονο μόριο που να περιέχει την γενετική πληροφορία και να είναι καταλυτικά δραστικό και ότι αυτό το μόριο δεν είναι ούτε το DNA ούτε οι πρωτεΐνες. Έτσι, δημιουργήθηκε η <<θεωρία του RNA κόσμου>>, η οποία προτάθηκε αρχικά από τους Woese (1967), Crick (1968) και Orgel (1968) και υποστήριζε πως το πρωταρχικό μόριο της ζωής είναι το RNA. Η θεωρία αυτή προϋποθέτει δύο βασικές ιδιότητες, α) το RNA να έχει την ικανότητα αυτό-αντιγραφής και β) να μπορεί να καταλύει αντιδράσεις σημαντικές για την πρωτεϊνσύνθεση για τις οποίες όμως δεν υπήρχαν ακόμα αποδείξεις ότι το RNA τις διαθέτει. Η ανακάλυψη των ριβοενζύμων και των ρετροϊών από τους Kruger, Guerier-Takada και Cech και Altman, που τους απέφερε το Nobel Χημείας το 1989, επανέφερε την θεωρία του RNA κόσμου στο προσκήνιο και επαναδιατύπωσε το κεντρικό δόγμα βιολογίας στην σημερινή μορφή που πλέον γνωρίζουμε, όπως απεικονίζεται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1: Κεντρικό Δόγμα Βιολογίας.

Το RNA μόριο είναι πλέον γνωστό πως διαθέτει καταλυτικές ιδιότητες και έχει την ικανότητα να αντιγράφει τον εαυτό του, χαρακτηριστικά που ενισχύουν την άποψη ότι προϋπήρχε ένας πρώιμος RNA κόσμος, πριν τον κόσμο του DNA και των πρωτεϊνών. Αυτός ο αρχέγονος RNA κόσμος ήταν τελείως διαφορετικός από τον σύγχρονο που γνωρίζουμε εμείς. Το πρώτο βιολογικό σύστημα θεωρείται πως προέκυψε από μια αρχέγονη δεξαμενή πρώιμων RNA μορίων (primordial pool), όπου υπήρχε ένα μόριο RNA ικανό να αυτό-αντιγράφεται[1]. Το προβιοτικό περιβάλλον αυτής της δεξαμενής περιείχε οργανικά μόρια, όπως υδροξυ-οξέα, αμινοξέα, λιπαρά οξέα, πουρίνες, πυριμιδίνες και σάκχαρα, τα οποία μπόρεσαν να συνδυαστούν και να σχηματίσουν πολυμερή τυχαίας αλληλουχίας και στερεοχημείας. Τα μεγάλα παραγόμενα RNA μόρια υφίστανται αναπόφευκτα λάθη, τα οποία προσδίδουν μεγάλη ποικιλομορφία, χωρίς να χάνεται η λειτουργικότητα. Αυτός ο γενετικός μηχανισμός αντιγραφής-ποικιλομορφίας μέσω της Δαρβίνειας εξελικτικής πίεσης οδήγησε σε RNA μόρια που θα επιλέγονταν ανάλογα την ικανότητα τους να αυτό-αντιγράφονται και την καταλυτική τους δυνατότητα[2]. Η δυσκολία της χημικής σύνθεσης και της σταθερότητας του RNA υπό τις προβιοτικές συνθήκες αποτελούν στοιχεία έντονης κριτικής της θεωρίας του RNA κόσμου, παρόλα αυτά η συνεχής ανακάλυψη ποικίλων καταλυτικών RNA μορίων στην φύση ενισχύει την άποψη πως ο RNA κόσμος όχι απλά προϋπήρχε αλλά κατάλοιπα αυτού συνεχίζουν να εμφανίζονται στα σύγχρονα βιολογικά συστήματα[3].

Πρόσφατη έρευνα δείχνει την δημιουργία ενός χημικού συστήματος όπου η Δαρβίνεια εξέλιξη είναι παρούσα. Ειδικότερα, κατασκευάστηκε ένα καταλυτικό σύστημα τα οποίο περιέχει δύο RNA ένζυμα ικανά να καταλύουν το καθένα την σύνθεση του άλλου, με την παρουσία μόνο τεσσάρων βασικών νουκλεοτιδίων. Αυτό το ενζυμικό RNA σύστημα διασταυρούμενης αντιγραφής έχει την ικανότητα παραγωγής RNA μορίων υπό συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας. Τα στοιχεία αυτής της έρευνας αποτελούν το πρώτο παράδειγμα εξελικτικής προσαρμογής και εφαρμογής του πρώιμου RNA κόσμου σε μοριακό γενετικό σύστημα[4]. Επίσης, στοιχεία που εμφανίζονται στα σύγχρονα βιολογικά συστήματα θα μπορούσαμε να τα χαρακτηρίσουμε ως κατάλοιπα αυτού του αρχέγονου κόσμου RNA. Αρχικά γνωρίζουμε βάση της βιοχημείας πως η σύνθεση των ριβονουκλεοτιδίων προηγείται αυτής των δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Επιπρόσθετα, πραγματοποιείται η σύνθεση της

ουρακίλης και ακολουθεί η μεθυλίωση τα για την παραγωγή της θυμίνης. Τέλος, είναι γνωστό ότι η έναρξη αντιγραφής του DNA προαπαιτεί την σύνθεση RNA εκκινητών, που βέβαια στη συνέχεια αποσυντίθενται και αντικαθίσταται από DNA. Τέτοιες ενδείξεις και ολοένα νέες ανακαλύψεις θέτουν ακόμα πιο σταθερές βάσεις στην θεωρία του RNA κόσμου.

Πέρα από τον αρχέγονο αυτό κόσμο του RNA, πλέον γνωρίζουμε έναν σύγχρονο κόσμο που περιλαμβάνει τα γνωστά μόρια RNA που συναντάμε στα σημερινά βιολογικά συστήματα και συμμετέχουν σε μια πληθώρα κυτταρικών διεργασιών από την πρωτεϊνοσύνθεση μέχρι την γονιδιακή ρύθμιση, την κατάλυση βιοχημικών αντιδράσεων αλλά εντοπίζονται ακόμα και στην προσπάθεια προστασίας των οργανισμών από παράγοντες μόλυνσης[5]. Τα RNA μόρια εξελίχθηκαν από τους προγόνους τους και η επιστημονική κοινότητα ανακαλύπτει καινούργιες κατηγορίες RNA μορίων, τα οποία παίρνουν μέρος και κατέχουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο σε ποικίλες διαδικασίες. Ακολουθεί μια εκτενέστερη περιγραφή των μορίων που απαρτίζουν τον σύγχρονο RNA κόσμο.

Βασικά RNA μόρια

Τα τρία βασικά RNA μόρια που συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση αποτελούν την πλειοψηφία των RNA μορίων που συναντάμε στους ζώντες οργανισμούς. Το ριβοσωμικό RNA (ribosomal RNA, rRNA), το αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA, mRNA) και το μεταφορικό RNA (transfer RNA, tRNA) είναι γνωστά για τον κεντρικό ρόλο που κατέχουν στην ομαλή διεξαγωγή της διαδικασίας της πρωτεϊνοσύνθεσης. Το rRNA συντίθεται στον πυρηνίσκο και συγκροτεί το ριβόσωμα μαζί με άλλες πρωτεϊνικές υπομονάδες. Το mRNA αποτελεί το ενδιάμεσο μόριο που φέρει την γενετική πληροφορία και είναι υπεύθυνο για την μεταφορά αυτής από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου εντοπίζονται τα ριβοσώματα. Το tRNA είναι απαραίτητο για την σωστή μετάφραση του γενετικού κώδικα, αφού είναι αυτό που φέρει το ενεργοποιημένο αμινοξύ που κάθε φορά πρέπει να ενσωματωθεί στην σωστή θέση της νεοσυντιθέμενης πεπτιδικής αλυσίδας. Το μεταφορικό RNA για κάθε τριπλέτα βάσεων του αντικωδικονίου, φέρει και το αντίστοιχο αμινοξύ στο 3' άκρο του και το μεταφέρει στο ριβόσωμα, όπου διεξάγεται η σύνθεση των πρωτεϊνών.

Μη κωδικοποιούν RNA (non-coding RNA, ncRNA)

Η επιστημονική κοινότητα θεωρούσε μέχρι πρόσφατα ένα μεγάλο κομμάτι του γονιδιώματος ως άχρηστο γενετικό υλικό (junk DNA), καθώς δεν είχαν εντοπίσει ακόμα κάποια λειτουργική ιδιότητα και δεν γνώριζαν την χρησιμότητα του. Η ανακάλυψη όμως των microRNAs και του παρεμβαλλόμενου RNA (RNAi) έδωσε στους επιστήμονες μια νέα οπτική του γονιδιώματος και δημιουργήθηκε μια νέα κατηγορία, τα μη κωδικοποιούντα RNA μόρια (noncoding RNA), καθώς δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες[6]. Τα ncRNAs έχουν ποικίλες λειτουργίες και συμμετέχουν στην ρύθμιση της μεταγραφής, την αντιγραφή των χρωμοσωμάτων, την τροποποίηση του RNA, την μετάφραση και σταθερότητα του mRNA, και ακόμα και την αποικοδόμηση και την χωροθέτηση πρωτεϊνών, ενώ συνεχώς έρχονται στο προσκήνιο περισσότερες και διαφορετικές ιδιότητες.

Τα microRNAs είναι μικρά μη-κωδικοποιούντα RNA ενδογενή μόρια, με μέγεθος 18-25 νουκλεοτιδίων. Τα πρόδρομα μόρια μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II και σχηματίζουν χαρακτηριστικές δομές φουρκέτας. Αυτές οι δομές αναγνωρίζονται από τα ένζυμα Dorsha και Dicer[7]. Υπάρχει ένα εναλλακτικό μονοπάτι στην βιοσύνθεση τους μέσω κάποιων ρυθμιστικών RNAs που ονομάζονται miRtrons, τα οποία σχηματίζουν pre-miRNA χρησιμοποιώντας τον μηχανισμό του ματίσματος[8]. Τα miRNAs θεωρείται ότι μπορούν να δρουν μέσω στόχευσης συμπληρωματικών περιοχών των mRNA στόχων, καταστέλλοντας έτσι την μετάφραση τους. Επίσης, δρουν προσδεδεμένα με τις πρωτεΐνες της οικογένειας Argonaute (Ago) δημιουργώντας έτσι το σύμπλοκο RISC (RNA Interference Silencing Complex), το οποίο προκαλεί ειδική θραύση των mRNA στόχων[9]. Από την ανακάλυψη τους μέχρι σήμερα, έχουν μελετηθεί εκτενώς για τον ρυθμιστικό τους ρόλο σε πολλές βιολογικές διαδικασίες αλλά και για την συμμετοχή τους σε παθολογικές καταστάσεις. Τελευταίες επιστημονικές μελέτες δείχνουν την συμμετοχή τους σε διάφορες μορφές καρκίνου ενώ υπάρχουν ενδείξεις για την προγνωστική τους ικανότητα και ίσως αποτελέσουν αξιόπιστους βιολογικούς δείκτες τόσο στην πρόγνωση όσο και την ταξινόμηση συγκεκριμένων μορφών καρκίνου, π.χ. καρκίνο μαστού[10].

Τα μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA (small interference RNAs, siRNAs) εντοπίζονται στα φυτά, στα ζώα, στους μύκητες και συμμετέχουν στην γονιδιακή ρύθμιση ενώ επιπλέον στα φυτά και στα ζώα λαμβάνουν μέρος και στην αντιμετώπιση ιών. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν την συμμετοχή τους στη σταθερότητα του γονιδιώματος και την οργάνωση της χρωματίνης[11]. Τα siRNAs μπορούν να διακριθούν ανάλογα με τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην βιογένεσή τους, ανάλογα με το μέγεθος τους, ανάλογα με την μορφή της γονιδιακής ρύθμισης αλλά και με τους παράγοντες(εξωγενείς ή ενδογενείς) που πυροδοτούν το σχηματισμό τους[12]. Η έρευνα αυτών των RNA μορίων είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα, ενώ ο μηχανισμός της αποσιώπησης της γονιδιακής έκφρασης και η εφαρμογή του ως θεραπευτική προσέγγιση σε μια πληθώρα ασθενειών είναι αντικείμενο των σύγχρονων επιστημονικών μελετών.

Στη κατηγορία των noncoding RNAs ανήκουν και τα piwi-interacting RNAs (piRNAs), τα οποία ανακαλύφθηκαν πρόσφατα και το όνομα τους οφείλεται στην πρόσδεσή τους στις Piwi πρωτεΐνες, που ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών Ago[13]. Τέσσερις ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες εντόπισαν αυτά τα μικρά RNA μόρια στους όρχεις ποντικών και φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην σπερματογένεση. Ακόμα δεν είναι ξεκάθαρη η πορεία της βιογένεσής τους, αλλά φαίνεται να διαχωρίζεται από αυτή των micro- και siRNAs. Σύγχρονες μελέτες φαίνεται να εστιάζουν στην κατανόηση των μηχανισμών δράσης τους, όπου μέσα από τα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους θα δοθούν απαντήσεις για αυτή την ενδιαφέρουσα ομάδα μη κωδικοποιούντων RNA μορίων[14].

Μια ακόμα μεγάλη κατηγορία είναι τα μεγάλα μη κωδικοποιούντα RNA μόρια (long non coding RNAs, lncRNAs) με μέγεθος >200 kb τα οποία συνδέονται έντονα με γενετική αστάθεια και επιγενετικές αλλαγές [15] ενώ πρόσφατες μελέτες συγκλίνουν στην εμπλοκή τους στον καρκίνο[16]. Μελλοντικοί στόχοι των ερευνητικών ομάδων είναι να αξιοποιήσουν τα μοτίβα αλλαγής της έκφρασης αυτής της ομάδας RNA μορίων σε διάφορες μορφές καρκίνου αλλά και σε άλλες ασθένειες ώστε να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί και βιολογικοί δείκτες.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν και οι <<ριβο-διακόπτες>> ή <<RNA-διακόπτης>>, μια ομάδα μη κωδικοποιούντων RNA μορίων με συγκεκριμένη δομή που προσδένουν μεταβολίτες και ασκούν έλεγχο στην γονιδιακή έκφραση[17]. Ένας

RNA-διακόπτης είναι ένα απταμερές και αποτελεί ένα *cis* ρυθμιστικό στοιχείο, το οποίο δεσμεύοντας το μόριο στόχο προκαλεί τέτοιες δομικές αλλαγές στο mRNA που το περιέχει, ώστε να επηρεάζει την έκφραση του. Συνεχώς ανακαλύπτονται καινούργιες κατηγορίες <<RNA-διακοπών>>, που φαίνονται να ανταποκρίνονται επιλεκτικά σε μεταβολίτες όπως είναι συνένζυμα, νουκλεοτιδικές βάσεις, αμινοξέα και άλλα μικρά μόρια προσδέτες. Μελέτες δείχνουν την μελλοντική τους χρήση ως μια καινούργια ομάδα αντιβιοτικών που θα μπορούσε να απορρυθμίζει σημαντικά μονοπάτια στα βακτήρια[18].

1.2.Δομή και λειτουργία ριβονουκλεασών

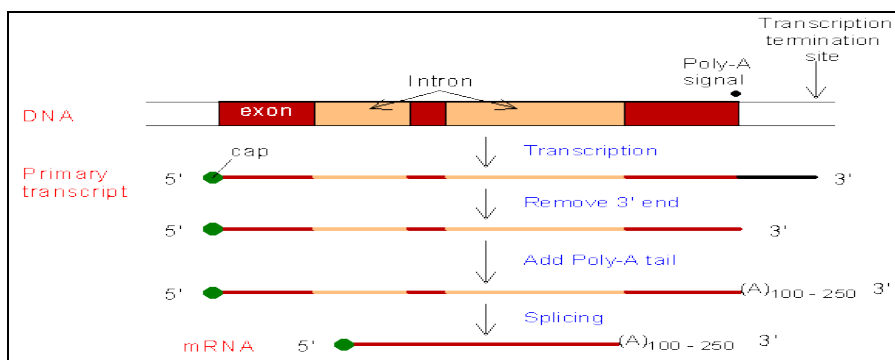
Εξαιτίας του καταλυτικού αυτού ρόλου του RNA και των μορίων που αυτό περιλαμβάνει, μια τέλεια ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης και της αποικοδόμησης των RNA μορίων μέσα στο κύτταρο πρέπει να διατηρείται. Ο μεταγραφικός έλεγχος παρέχει ένα τρόπο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης αλλά και η μετα-μεταφραστική ρύθμιση, μέσω της αποικοδόμησης εκείνων των μορίων RNA που δεν είναι λειτουργικά χρήσιμα για το κύτταρο, είναι επίσης κέραιας σημασίας. Η αποικοδόμηση περιλαμβάνει μια πληθώρα σύνθετων και αλληλοσύνδετων μονοπατιών που όλα καταλήγουν στον συνήθη και επικρατέστερο τρόπο αποικοδόμησης, την επιστράτευση των ριβονουκλεασών.

Οι ριβονουκλεάσες, ή αλλιώς RNases, αποτελούν ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση RNA μορίων σε μικρότερα συστατικά διασπώντας φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Πρόκειται για ένζυμα ευρέος φάσματος που καταλύουν όπως αναφέραμε την αποικοδόμηση πολυμερικού RNA και συμμετέχουν σε μεγάλης κλίμακας βιολογικές διεργασίες τόσο σε ενδοκυτταρικό όσο και σε εξωκυτταρικό επίπεδο [19]. Πρώτη ανακαλύφθηκε η βόεια παγκρεατική ριβονουκλεάση (RNase A) η οποία ήταν το πρώτο ένζυμο και η τρίτη πρωτεΐνη που αλληλουχήθηκε, ενώ κρυσταλλογραφήθηκε πενήντα χρόνια πριν. Η RNase A είναι μια ενδονουκλεάση που καταλύει τον πολυμερισμό μονόκλωνων mRNA, σπάζοντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ γειτονικών ριβονουκλεοτιδίων, που είναι

συνδεδεμένα κυρίως με πυριμιδίνες. Πρόκειται για μια πολύ μικρή πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 13.686 Da, ενώ η πολυπεπτιδική της αλυσίδα αποτελείται από 124 κατάλοιπα, τα περισσότερα από τα οποία είναι βασικά. Η εκτενής μελέτη της οδήγησε στο να αποτελεί πλέον μια από τις καλύτερα χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες με δεδομένα που συνέβαλλαν στη κατανόηση της δομής, λειτουργίας και σταθερότητας των πρωτεϊνών αυτών [20].

Η βιολογική λειτουργία των ριβονουκλεασών δεν αφορά αποκλειστικά την αποικοδόμηση μορίων RNA. Πιο ορθά, αφορά τον μεταβολισμό τους. Ειδικότερα, οι τρόποι μεταβολισμού του RNA, στους οποίους καθίσταται απαραίτητη η συμμετοχή των ενζύμων αυτών διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες [21]:

A) RNA Τροποποίηση(RNA processing): Η RNA τροποποίηση είναι η διαδικασία η οποία οδηγεί τα πρόδρομα μόρια RNA στις ώριμες μορφές τους. Το ευκαρυωτικό mRNA τροποποιείται κατά την διάρκεια ή μετά το πέρας της μεταγραφής του. Τα πρόδρομα μόρια αποκτούν καλύμματα στο 5' άκρο τους. Η μεταγραφή συνήθως αρχίζει με A ή G, εντούτοις το 5' τριφωσφορικό άκρο της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας του RNA σχεδόν αμέσως τροποποιείται. Ακόμα, στο 3' άκρο των περισσοτέρων πρόδρομων μορίων mRNA προστίθεται μια πολυαδενυλική ουρά μετά την διάσπασή τους από μια ενδονουκλεάση. Ειδικότερα, η προσθήκη της 3' πολύ(A) ουράς πραγματοποιείται από ένα σύμπλοκο ενώσεων, που για την τελική σωστή δομή της απαιτείται μια ενδονουκλεάση. Πέρα από αυτές τις διαδικασίες της τροποποίηση των 5'-3' άκρων, η τροποποίηση του RNA αφορά και την αφαίρεση των ιντρονίων και τον διαχωρισμό του RNA από πολυκιστρονικά μετάγραφα. Παρακάτω παρατίθεται μια ενδεικτική εικόνα για τις τροποποιήσεις που υπόκειται το RNA με την προσθήκη της 5' καλύπτρας, της 3' πολύ(A) ουράς και την απομάκρυνση των ιντρονίων.



Εικόνα 2: Τροποποίηση RNA με προσθήκη 5' καλύπτρας, 3' πολύ(A) ουράς και αφαίρεση ιντρονίων.

Β) Αναστροφή RNA (Turnover RNA): Τέτοιες αντιδράσεις αλλάζουν διαμόρφωση στα μόρια RNA αλλά στη συνέχεια επανέρχονται στην αρχική τους μορφή ή σχεδόν στην ίδια μορφή[22]. Τέτοιες αντιδράσεις σχετίζονται με την διαμόρφωση της poly-A ουράς, με αποκοπή και επανένωση του tRNA αντικωδικονίου κ.ά.

Γ) Αποικοδόμηση RNA: Οι αντιδράσεις αποικοδόμησης εξαλείφουν μόρια RNA από τα κύτταρα ή παράγουν θρεπτικά που απαιτούνται κάτω από ορισμένες φυσιολογικές συνθήκες στο κύτταρο. Ποικίλες μορφές RNA μορίων υπόκεινται σε αποικοδόμηση, με την κυριότερη να είναι αυτή των μορίων mRNA καθώς και των τμημάτων των εσωνίων που προκύπτουν από την τροποποίηση. Η αποικοδόμηση είναι μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία, η οποία μπορεί να ακολουθεί ποικίλα μονοπάτια.

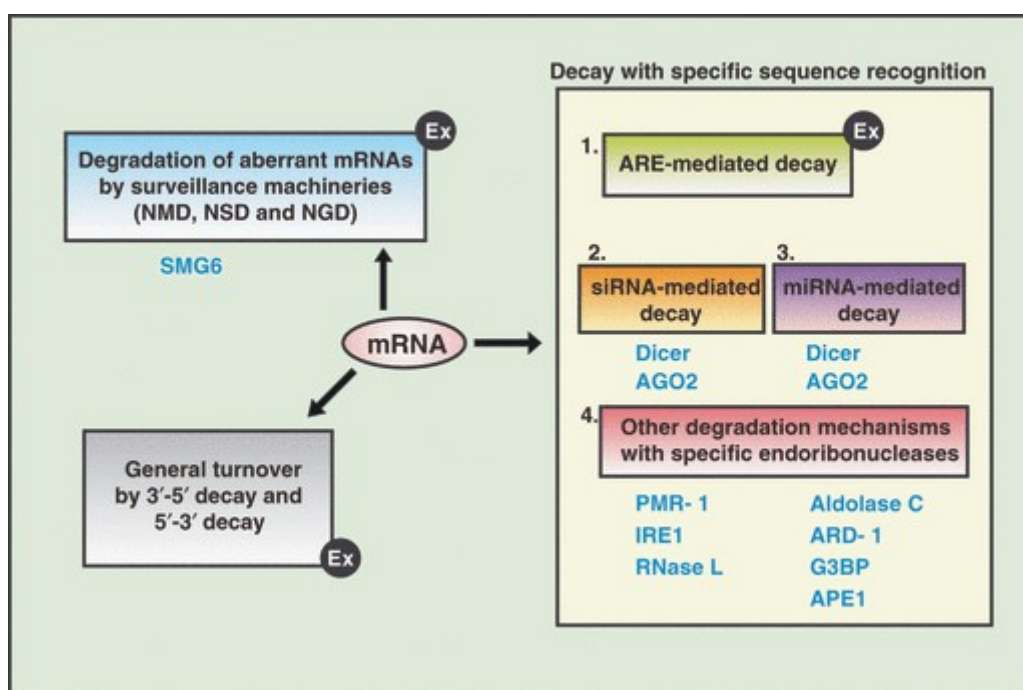
Δυσλειτουργικά μόρια mRNA που περιλαμβάνουν ανερμηνεύσιμα κωδικόνια υποβάλλονται στα μονοπάτια αποικοδόμησης NMD (Nonsense mediated mRNA decay). Η εισαγωγή μιας ανερμηνεύσιμης μετάλλαξης συχνά οδηγεί σε αυξημένη αποικοδόμηση του mRNA [23]. Η εξάρτηση της αποικοδόμησης από ένα κωδικόνιο τερματισμού αποδεικνύει ότι η αποικοδόμηση πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα. Αυτός ο μηχανισμός επιλεκτικής αποικοδόμησης των μορίων RNA που φέρουν ανερμηνεύσιμα κωδικόνια πιθανόν να αντιπροσωπεύει ένα σύστημα ποιοτικού ελέγχου ή επιτήρησης που απομακρύνει τα μη λειτουργικά mRNA. Παρομοίως σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως NSD (Non-stop decay), τα mRNA στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και

αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'-5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα.

Η απαρχή της αποικοδόμησης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς αρχίζει με την αποαδενυλίωση του 3' άκρου του mRNA[24]. Το καταλυτικό ένζυμο για αυτή την διεργασία στα Σπονδυλωτά είναι η εξωνουκλεάση PARN. Η δράση του ενζύμου είναι συνεχής από την στιγμή που αρχίζει να αποικοδομεί ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα mRNA, συνεχίζει να το τεμαχίζει βάση βάση έως το τέλος. Η αποαδενυλίωση της 3' ουράς πυροδοτεί την αφαίρεση της καλύπτρας από το 5' άκρο του mRNA από ένα ειδικό ένζυμο την PABP. Η παρουσία της στην πολύ(A) ουρά εμποδίζει το ένζυμο που αφαιρεί την καλύπτρα να προσδεθεί στο 5' άκρο. Η αντίδραση αφαίρεση της καλύπτρας συμβαίνει με αποκοπή 1-2 βάσεων από το 5' άκρο[25]. Τα δύο άκρα του mRNA συγκρατούνται μεταξύ τους από τους παράγοντες που εμπλέκονται στην πρωτεϊνοσύνθεση. Έτσι, κάθε άκρο επηρεάζει γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στο άλλο άκρο. Η επίδραση της PABP στην αφαίρεση της καλύπτρας επιτρέπει στο 3' άκρο να επηρεάσει την σταθεροποίηση του 5' άκρου. Επίσης, υπάρχει μια σχέση ανάμεσα στη δομή του 5' άκρου και στην αποικοδόμηση του 3' άκρου. Η αποαδενυλίωση προσδέεται άμεσα στην καλύπτρα. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη προκειμένου να προσβάλλει εξωνουκλεολυτικά την αλληλουχία της πολύ(A). Η αφαίρεση της καλύπτρας πυροδοτεί το 5'-3' μονοπάτι αποικοδόμησης, κατά το οποίο η 5'-3' εξωνουκλεάση XRN1 αποικοδομεί το 5' άκρο με μεγάλη ταχύτητα.

Το κύτταρο έχει επιπρόσθετους μηχανισμούς από αυτά τα μονοπάτια για τον έλεγχο της σταθερότητας κάποιων μεταγράφων του mRNA και αφορούν την προσθήκη συγκεκριμένων αλληλουχιών όπως Au στοιχεία (ARE) που εντοπίζονται στην 3'-UTR πολλών μεταγράφων mRNA και την κωδική περιοχή των c-myc mRNA. Η διάσπαση του mRNA μπορεί να προωθηθεί και από RNAi (RNA interference) μέσω των siRNA και miRNA και άλλους μηχανισμούς που συμπεριλαμβάνουν συγκεκριμένες ενδοριβονουκλεάσες [26]. Τέλος, το αποαδενυλιωμένο mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί από την 3'-5' ενεργότητα εξωνουκλεάσης του εξωσώματος, που αποτελεί ένα σύμπλοκο με περισσότερες από 9 ριβονουκλεάσες, παρόν σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα και με συμμετοχή σε πολλά μονοπάτια αποικοδόμησης. Το εξώσωμα εμπλέκεται και στην επεξεργασία πρόδρομων μορίων

rRNA. Η συσσωμάτωση των εξωνουκλεασών στο σύμπλοκο του εξωσώματος μπορεί να καθιστά εφικτό τον συντονισμένο έλεγχο των 3'-5' εξωνουκλεολυτικών δραστηριοτήτων. Το εξώσωμα μπορεί επίσης να αποικοδομήσει τμήματα mRNA που απελευθερώθηκαν με ενδονουκλεολυτική δράση. Ως πρόσφατα, η δράση του εξωσώματος θεωρούταν αποκλειστικά υπόστρωμα 3'-5' εξωριβονουκλεασών, μέχρι τελευταία που ένα συστατικό του συμπλόκου του εξωσώματος βρέθηκε να ασκεί 5'-3' ενδοριβονουκλεοτική δράση[27]. Η αποικοδόμηση του mRNA, επομένως, αποτελεί μια σύνθετη διαδικασία που αποτελεί μια συνισταμένη όλων των προαναφερθέντων στοιχείων και συνοψίζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 3:Εναλλακτικά μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA.

Ένα εύλογο ερώτημα που προκύπτει είναι ο μηχανισμός της αναγνώρισης του υποστρώματος των ριβονουκλεασών. Δηλαδή ο τρόπος που τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν και ξεχωρίζουν τα μόρια RNA που πρέπει να αποικοδομηθούν από αυτά που είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση του κυττάρου. Τα κύτταρα τα ίδια έχουν αναπτύξει μηχανισμούς προστασίας των σημαντικών RNA μορίων τους έναντι στην ανεξέλεγκτη δράση των RNAsων, ούτως ώστε να υπάρχει σαφής διαχωρισμός στο υπόστρωμα δράσης τους [28]. Καταρχάς, πολλά μόρια RNA βρίσκονται μέσα στο κύτταρο με μορφή ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων,

όπως για παράδειγμα στο ριβόσωμα. Οι πρωτεΐνες που περιβάλλουν το rRNA προσφέρουν συν τοις άλλοις και μια προστασία έναντι σε νουκλεολυτικά ένζυμα. Η συμπαγής τριτοταγή δομή των tRNA είναι ικανή να καθιστά τα μόρια αυτά ανθεκτικά σε μη εξειδικευμένες ριβονουκλεάσες, αλλά να αποτελεί και στοιχείο αναγνώρισης για τα <<processing>> ένζυμα. Είναι επίσης γνωστό ότι η ομοιοπολική τροποποίηση των άκρων των μορίων των mRNA με την προσθήκη της καλύπτρας στο 5' άκρο και της πολύ(A) ουράς στο 3' άκρο εξασφαλίζει και μια σταθερότητα απέναντι στις εξωνουκλεάσες. Βεβαίως, ένα τυχαίο mRNA δεν κινδυνεύει να αποικοδομηθεί από τα ένζυμα αυτά, καθώς οι εξειδικευμένες ριβονουκλεάσες αναγνωρίζουν μόνο συγκεκριμένα υποστρώματα.

Η διασφάλιση της ακεραιότητας των RNA μορίων εξασφαλίζεται και με άλλους τρόπους. Ένας από αυτούς είναι η διαμερισματοποίηση αποικοδομητικών ενζύμων, όπως στην περίπτωση της RNase I στο βακτήριο *E.coli*, που είναι γνωστό ότι εντοπίζεται στον περιπλασματικό χώρο και δεν έρχεται σε επαφή με το RNA του κυττάρου χωρίς λόγο. Επίσης, στο κυτταρόπλασμα πολλών ευκαρυωτικών κυττάρων συναντούνται πρωτεϊνικοί αναστολείς των ριβονουκλεασών, όπως είναι η πρωτεΐνη αναστολέας ριβονουκλεασών (ribonuclease inhibitor, RI)- η οποία προσδένεται με ορισμένες ριβονουκλεάσες με τη μέγιστη χημική συγγένεια σε σύγκριση με άλλες πρωτεΐνες, εμποδίζοντας τη δράση τους. Τέτοιες πρωτεΐνες αναστολείς έχουν απομονωθεί μέχρι τώρα από ανθρώπινο πλακούντα, από εγκέφαλο χοίρου, αλλά και από πολλές άλλες πηγές κυρίως θηλαστικών [29].

Μερικές φορές, το βλαπτικό αποτέλεσμα από την μη επιθυμητή δράση των ριβονουκλεασών μπορεί να περιοριστεί από μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η παρατήρηση επιδιόρθωσης από την tRNA νουκλεοτιδυλ-τρανσφεράση του 3' άκρου του tRNA, όταν αυτό έχει καταστραφεί από εξωνουκλεάσες[30]. Σημειώνεται τέλος, ότι η ριβονουκλεάση από πλάσμα σπέρματος ταύρου, ένζυμο εξωκυττάριο, ρυθμίζεται αλλοστερικά από το υπόστρωμα και τα προϊόντα υδρόλυσης. Δεν αποκλείεται τέτοιοι μηχανισμοί να λειτουργούν μέσα στο κύτταρο. Επομένως, δημιουργείται ένα εξαιρετικά ευαίσθητο κύκλωμα όπου οι ριβονουκλεάσες αναγνωρίζουν εξειδικευμένα υποστρώματα και δρουν σε αυτά δίχως να επηρεάζουν αρνητικά τα λειτουργικά RNA μόρια.

Οι ριβονουκλεάσες αποτελούν, επομένως, ένα βασικό συστατικό στην ρύθμιση του μεταβολισμού των μορίων RNA μέσα στον οργανισμό, για την ομαλή γονιδιακή ρύθμιση και έκφραση. Ωστόσο, μελέτες τα τελευταία χρόνια που έχουν αποκαλύψει την σημαντικότητα του μετα-μεταγραφικού μηχανισμού στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης ειδικά στο πεδίο της αποικοδόμησης του mRNA, έχουν δείξει ένα σημαντικό σύνδεσμο μεταξύ καρκινογένεσης και δυσλειτουργικών παραγόντων στον μεταβολισμό του mRNA, με τις ριβονουκλεάσες να κατέχουν σημαντικό ρόλο σε αυτό.

Ειδικότερα, οι διαδικασίες που αναφέρονται στην σταθερότητα του mRNA, στην μεταγραφική καταστολή και στην αποικοδόμηση μεταγράφων συνδέονται πολύπλοκα μεταξύ τους και μπορούν να επηρεαστούν από διάφορα cis-acting στοιχεία όπως η πολύ(A) ουρά, τα στοιχεία ARES (αλληλουχίες πλούσιες σε AU) και από trans-acting παράγοντες όπως τα μη κωδικοποιούντα RNAs(ncRNAs), RBPs (οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το RNA), οι ριβονουκλεάσες[31]. Ορισμένα μέλη ριβονουκλεοπρωτεϊνών που συνδέονται με έναν σημαντικό αριθμό μεταγράφων ενοχοποιούνται ως ογκογονίδια ή καταστολείς ογκογονιδίων που μεσολαβούν στην αποικοδόμηση και στην σταθερότητα των μεταγράφων. Οι ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στην καρκινογένεση και έχουν σημαντική επίδραση στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Οι ριβονουκλεάσες μπορούν να δράσουν ως ογκοπρωτεΐνες ή καταστολείς όγκων δίνοντας μια άλλη στροφή στη ρύθμιση της αφθονίας του mRNA και στους ρυθμούς της μετάφρασης.

Διάφορες ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στον μηχανισμό αποαδενυλίωσης του mRNA όπως αναλύσαμε παραπάνω. Απουσία ρυθμιστικών μηχανισμών οι ριβονουκλεάσες έχουν μια προφανή επίδραση στην γονιδιακή έκφραση αφού μία και μόνο ενδονουκλεολυτική κοπή οδηγεί στην αδρανοποίηση του mRNA. Τα κύτταρα βέβαια διαθέτουν μηχανισμούς για την αποτροπή μιας τέτοιας ανώμαλης αποικοδόμησης του mRNA ρυθμίζοντας τις ριβονουκλεάσες. Για παράδειγμα έχει βρεθεί πως ορισμένες από αυτές ελέγχονται από κυτταρικά σήματα για την διασφάλιση των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο mRNA.

Η μειωμένη αποικοδόμηση ογκογόνων mRNA μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη καρκίνου. Αυτό γίνεται με την μείωση της δραστηριότητας των ριβονουκλεασών και των miRNAs που αναστέλλουν την μετάφραση ογκογόνων mRNAs. Παρόμοιες

επιδράσεις έχουν η αυξημένη δραστηριότητα των σταθεροποιητικών πρωτεϊνών που συνδέονται με το mRNA ή η μειωμένη δραστηριότητα των αποσταθεροποιητικών. Από την άλλη, αυξημένη αποικοδόμηση ογκοκατασταλτικών mRNAs μπορεί επίσης να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνων σε περίπτωση που έχουμε αυξημένη δραστηριότητα ριβονουκλεασών ή των miRNAs που αναστέλλουν την μετάφρασή τους. Σημαντικό ρόλο κατέχουν οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το mRNA.

1.2.1.Κατηγορίες ριβονουκλεασών

Προηγουμένως αναφερθήκαμε σε εξωνουκλεάσες και ενδονουκλεάσες που σχετίζονται με τα μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA. Ειδικότερα, οι ριβονουκλεάσες, ανάλογα τον τρόπο και τρόπο δράσης τους διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

A) Εξωριβονουκλεάσες : Οι εξωριβονουκλεάσες συμμετέχουν στις διαδικασίες της RNA τροποποίησης, αποικοδόμησης, παρεμβολής, μεταγραφής, διαμόρφωσης της κυτταρικής έκφρασης, άμυνας εναντίον των ιών και πολλές άλλες σημαντικές λειτουργίες που σχετίζονται με τον καταβολισμό του RNA [32]. Αυτά τα ένζυμα κατηγοριοποιούνται βάση της κατεύθυνσης δράσης τους σε 5'- εξωριβονουκλεάσες, οι οποίες καταλύουν την εκλεκτική απομάκρυνση νουκλεοτιδικών καταλοίπων από το 5' άκρο του μορίου RNA και σε 3'-εξωριβονουκλεάσες, οι οποίες καταλύουν την αποικοδόμηση από το 3' άκρο του μορίου RNA.

Αν και μέχρι σήμερα έχει ταυτοποιηθεί ένας σημαντικός αριθμός 3'-5' εξωριβονουκλεασών, με μόνο στο βακτήριο *Escherihia coli* να έχουν εντοπιστεί οκτώ από αυτές, λίγες 5'-3' είναι ακόμα γνωστές, με την πιο καλά μελετημένη εξ αυτών την Xrn1/Xrn2 οικογένεια [33]. Οι εξωριβονουκλεάσες κατηγοριοποιούνται σε έξι υπεροικογένειες, τις RNP, DEDD, RBN, PDX,RRP4 και την 5PX με όλες να φέρουν 3'-5' υδρολυτική ικανότητα εκτός της 5PX με 5'-3' υδρολυτική ικανότητα [34]. Ακόμα, πέρα την RBN υπεροικογένεια με τους αντιπροσώπους της που εντοπίζεται σε συγκεκριμένα βακτήρια, όλες οι υπόλοιπες εμφανίζονται σε όλους τους

ευκαρυωτικούς οργανισμούς ενώ στην υπεροικογένεια RNP εμφανίζονται αντιπρόσωποι και σε βακτήρια, στην DEDD υπεροικογένεια σε συγκεκριμένα βακτήρια ενώ στην RRP4 υπεροικογένεια στα περισσότερα αρχαία. Η υπεροικογένεια εξωριβονουκλεασών RDX είναι η μόνη η οποία εμφανίζεται σε όλα τα βασίλεια.

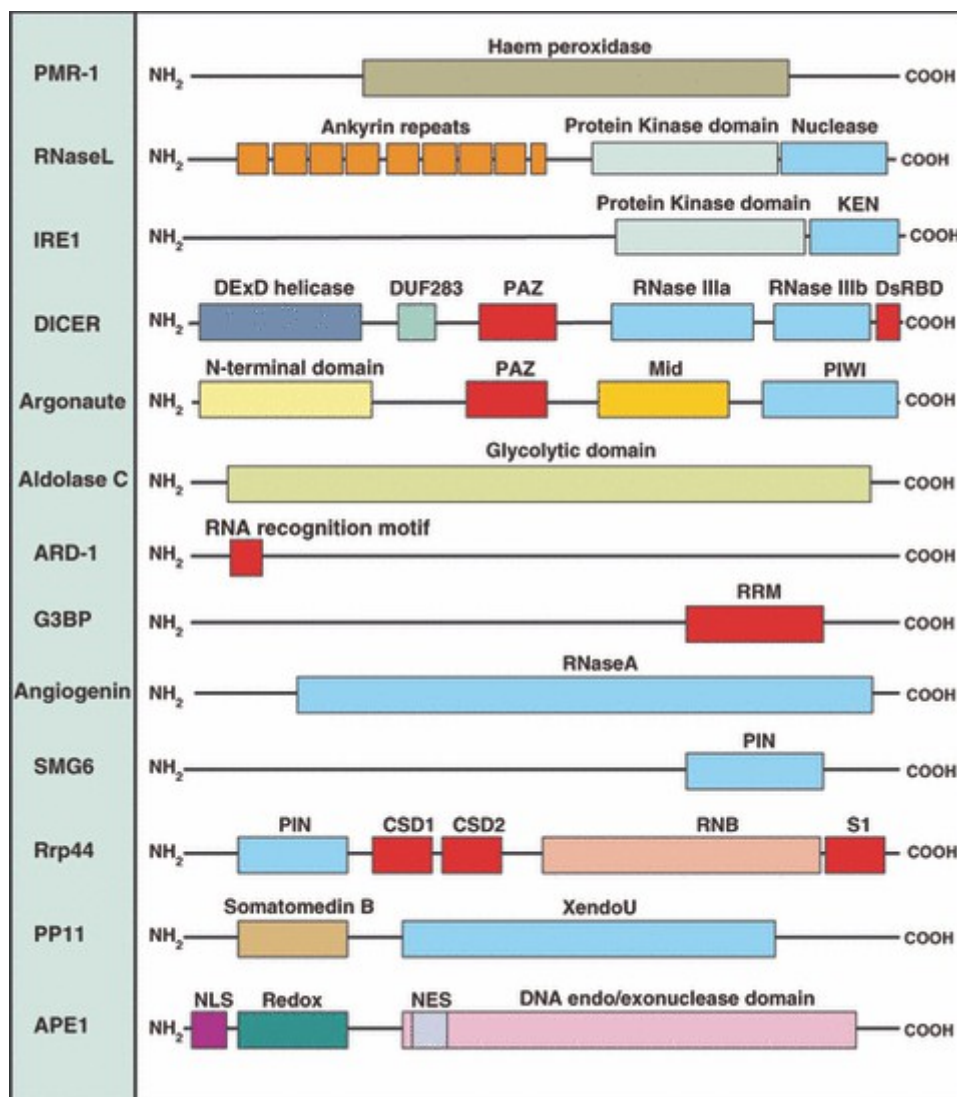
Β) Ενδοριβονουκλεάσες: Οι ενδοριβονουκλεάσες αποτελούν ένζυμα που διασπούν RNA μόρια σε εσωτερικές θέσεις. Παρουσιάζουν τεράστια ποικιλομορφία τόσο στην υποστρωματική τους εξειδίκευση όσο και στη δομή των υποστρωμάτων τους [35]. Γενικότερα, οι ενδοριβονουκλεάσες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: α) σε αυτές που δρουν αναγεννώντας προϊόντα που περιλαμβάνουν φωσφορικές ομάδες στο 3' άκρο και έχουν σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό 2'-3' κυκλικών ενδιάμεσων προϊόντων, χωρίς να απαιτούνται δισθενή κατιόντα για την δράση τους, και β) σε αυτές που φέρουν μεγάλη υποστρωματική εξειδίκευση και συμμετέχουν σε τροποποιητικές διεργασίες καθώς και στην ωρίμανση του RNA. Αυτή η κατηγορία συνήθως αναγεννούν προϊόντα με 3' υδροξυλικό άκρο ενώ η παρουσία δισθενών ιόντων είναι απαραίτητη για την καταλυτική διαδικασία.

Οι ενδοριβονουκλεάσες, με τις τελευταίες ανακαλύψεις, απέδειξαν τον σημαντικό τους ρόλο στον μεταβολισμό του και την αποικοδόμησή του mRNA [36]. Στην παρακάτω εικόνα παρατίθενται βασικοί αντιπρόσωποι ενδοριβονουκλεασών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο κύτταρο και θα αναφέρουμε επιγραμματικά τον βασικό ρόλο της καθεμίας.

- PMR-1 (Polysomal ribonuclease 1): Ανήκει στην οικογένεια των υπεροξειδασών και αν και δεν έχει ενεργότητα υπεροξειδάσης, ενεργοποιείται έπειτα από την επίδραση οιστρογόνων και είναι ικανή να αποσταθεροποιεί συγκεκριμένα mRNAs που κωδικοποιούν την σύνθεση πρωτεϊνών του ορού.
- RNase L: Η ριβονουκλεάση αυτή εμπλέκεται στην κυτταρική προστασία από την ιική εισβολή και η δράση της επάγεται από την παρουσία δίκλωνου RNA.

- IRE1: Εκφράζεται από το γονίδιο ERN1 (Endoplasmatic Reticilum to Nucleus signaling 1) και επάγει την σύνθεση πρωτεϊνών-συνοδών που βοηθούν την σωστή επαναφορά των πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου όταν αυτό καταπονείται.
- Dicer: Ανήκει στην οικογένεια της RNase III και εμπλέκεται στην βιογένεση των miRNAs και siRNAs για την μετα-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση.
- Argonaute (AGO2): Ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών Αργοναυτών και φέρει σημαντικό ρόλο στην ενδοριβονουκλεολυτική ενεργότητα του συμπλόκου RISC.
- Aldolase C: Κωδικοποιείται από το γονίδιο Aldoc στους ανθρώπους στο χρωμόσωμα 17 και είναι ένζυμο καταλυτικό για το τέταρτο στάδιο της γλυκόλυσης.
- ARD-1 (Activator of RNA decay): Αποτελεί μια ενδοριβονουκλεάση που έχει την ικανότητα να αντιστρέφει τα αποτελέσματα μεταλλαγών στο γονίδιο της RNase E στο βακτήριο της *Escherihia coli*.
- G3BP: Αν και σε αυτά τα ένζυμα απουσιάζουν αναγνωρίσιμοι τομείς νε ενεργότητα ριβονουκλεάσης, έχει αποδειχθεί μια ενδοριβονουκλεολυτική δράση της στην 3' αμετάφραστη περιοχή *in vitro*.
- Angiogenine: Ανήκει στην υπεροικογένεια των ριβονουκλεασών Α και, ενώ αρχικά μελετήθηκε για την αγγειογενετική της ικανότητα σε καρκινικά κύτταρα, πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως εμπλέκεται στην παραγωγή μικρών RNAs σε συνθήκες στρες, από την διάσπαση tRNAs κατά την καταστολή της μετάφρασης.
- SMG6: Φέρει έντονη ενδοριβονουκλεολυτική δράση, με κύριο ρόλο την αποικοδόμηση mRNAs που έχουν υποστεί πρόωρη μεταγραφή, λόγω της ύπαρξης πρόωρου κωδικονίου τερματισμού.
- Rrp44: Αποτελεί την καταλυτική μονάδα του ευκαρυωτικού συμπλόκου του εξωσώματος. Παλαιότερα, θεωρούταν πως διέθετε μόνο εξωριβονουκλεολυτική ενεργότητα ενώ σήμερα η ανακάλυψη της επικράτειας PIN δικαιολογεί την κατάταξη της στις ενδοριβονουκλεάσες.

- PP11 (Placental Protein 11): Από τις πιο πρόσφατα χαρακτηρισμένες ενδοριβονουκλεάσες, ανήκει σε μια πρωτεϊνική οικογένεια όπου τα μέλη της είναι XendoU, μια ενδοριβονουκλεάση στο *Xenopus laevis* που λαμβάνει μέρος σε διεργασίες που αφορούν την RNA τροποποίηση.
- APE1: Αποτελεί μια πρωτεΐνη με πολλές λειτουργίες με κυρίαρχο ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA με εκτομή βάσεων και με DNA απουρινική/απυριμιδινική ενδοριβονουκλεολυτική ενεργότητα.



Εικόνα 4: Χαρακτηριστικοί αντιπρόσωποι ενδοριβονουκλεασών.

1.2.2. Η πρωτεϊνική οικογένεια ριβονουκλεασών κ (RNase κ)

Η οικογένεια των ριβονουκλεασών κ αποτελεί μια πρόσφατα χαρακτηρισμένη οικογένεια ενδοριβονουκλεασών της οποίας ιδρυτικό μέλος είναι η Cc ριβονουκλεάση. Η Cc RNase αντιπροσωπεύεται από ένα μοναδικό ορθόλογο γονίδιο σε μιας μεγάλης κλίμακας ταξινόμησης των ζωικών ομάδων. Το ένζυμο αυτό απομονώθηκε το 1987 από προνύμφες 6 ημερών του εντόμου *Ceratitidis capitata* και αποτελείται από μια πολυλεπτιδική αλυσίδα 95 αμινοξέων που αποικοδομεί επιλεκτικά υποστρώματα poly(U) και poly(C) [37]. Το cDNA που κωδικοποιεί την σύνθεση του ενζύμου απομονώθηκε από δύο αλληλοεπικαλυπτόμενους κλώνους, αρχικά με την χρήση ανοσάρωσης του ενός κλώνου και ύστερα με την χρήση 5'-RACE PCR στο cDNA του άλλου κλώνου. Έπειτα διεξήχθη ανάλυση στη βάση δεδομένων με EST αλληλουχίες (Expressed Sequence Tags), όπου ανακτήθηκαν πολλές αλληλουχίες που εμφάνιζαν υψηλό ποσοστό ομοιότητας με την Cc RNase και προέρχονταν από 19 διαφορετικά είδη ζώων (θηλαστικά, αμφίβια, ψάρια, πουλιά, έντομα, νηματώδεις) [38].

Τα αποτελέσματα αυτά καθώς και ο υψηλός βαθμός συντηρητικότητας της πρώτης αλληλουχίας μεταξύ της Cc RNase και φαινομενικά ομόλογων σε άλλα είδη, υποδεικνύει μια συνεχόμενη και πιεστική εξελικτική επιλογή διατήρησης του ενζύμου αυτού, λόγω βασικής βιολογικής λειτουργίας. Έτσι σήμερα είναι γνωστό πως η οικογένεια εμφανίζει αντιπροσώπους σε όλα σχεδόν τα Μετάζωα, από τα Κνιδόζωα μέχρι τα θηλαστικά. Οι αντιπρόσωποι αυτοί αποτελούν, γενικά, πρωτεΐνες μήκους 95-105 αμινοξέων και δεν παρουσιάζουν ομοιότητες με άλλες ριβονουκλεάσες. Σε όλα τα διαθέσιμα γονιδιώματα που αναλύθηκαν ως προς την ριβονουκλεάση κ εντοπίζεται ένα μόνο γονίδιο που αποδεικνύει την ορθόλογη φύση της οικογένειας. Τα ορθόλογα γονίδια παρουσιάζουν ένα αυστηρό πρότυπο γονιδιακής οργάνωσης αποτελούμενο από τρία εξώνια που διακόπτονται από δύο εσώνια με συντηρημένα μήκη εξωνίων και θέσεις εσωνίων, εκτός από τα γονίδια των *Strongulocentrotus purpuratus*, *Nasonia vitripennis* και *Apis mellifera* όπου εντοπίζεται ένα μόνο εσώνιο, πιθανότατα από γεγονότα εξάλειψης γονιδίων [39].

Η ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ αποτελεί αντικείμενο μελέτης για το εργαστήριό μας τα τελευταία χρόνια, έπειτα από τον εντοπισμό και κλωνοποίηση του γονιδίου της από τους Economidou, Fragoulis και Sideris το 2007. Η ανάλυση στη βάση δεδομένων για την ανθρώπινη ομόλογη πρωτεΐνη της Cc RNase παρουσίασε μια πληθώρα αλληλουχιών EST, οι οποίοι προέρχονταν από διάφορα όργανα και ιστούς, γεγονός που υποδεικνύει μια ευρεία κατανομή της πρωτεΐνης στον ανθρώπινο οργανισμό [38]. Επιπρόσθετα, η έκφραση της προβλέπεται τόσο σε φυσιολογικούς ιστούς όσο και σε παθολογικούς, σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια, προτείνοντας το σημαντικό ρόλο του ενζύμου αυτού σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες (housekeeping).

Ο ανθρώπινος αντιπρόσωπος της RNase κ εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17 και συγκεκριμένα στη θέση 17p13.1, που αντιστοιχεί στην γονιδιακή τοποθεσία LOC440400 και διατηρεί το πρότυπο γονιδιακής οργάνωσης της οικογένειας αποτελούμενο από τρία εξώνια που διακόπτονται από δύο εσώνια μήκους 904 και 402 bp αντίστοιχα. Το πρώτο εξώνιο περιλαμβάνει 150 bp της 5' αμετάφραστης περιοχής και κωδικοποιεί τα πρώτα 65 αμινοξέα της ανθρώπινης πρωτεΐνης. Το δεύτερο εξώνιο έχει μήκος 77 bp και κωδικοποιεί τα επόμενα 26 αμινοξέα, ενώ το τρίτο εξώνιο αποτελείται από 387 bp, εκ των οποίων 139 bp κωδικοποιούν τα τελευταία 46 αμινοξέα. Τα τελευταία 245 νουκλεοτίδια ανήκουν στην 3' αμετάφραστη περιοχή [40]. Συγκριτικά με την ομόλογη πρωτεΐνη Cc RNase, η RNase κ στον άνθρωπο αποτελείται από 42 επιπλέον αμινοξέα, 137 το σύνολο και επιδεικνύει 40% ομοιότητα σε αμινοξικό επίπεδο με την Cc RNase. Και τα δύο ένζυμα υδρολύουν RNA στο ίδιο εύρος pH, είναι θερμοευαίσθητα και αναστέλλονται από ιόντα Zn. Όσον αφορά την νουκλεοτιδική τους ειδικότητα υδρολύουν και τα δύο UrU δεσμούς, με την Cc RNase να κόβει δεσμούς CpC πιο αποτελεσματικά συγκριτικά με την RNase κ.

Η ανθρώπινη RNase κ επιδεικνύει ενδοριβονουκλεολυτική δραστηριότητα in vitro κόβοντας ενζυμικά ApG και ApU φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, ενώ υδρολύει UrU δεσμούς με χαμηλότερους ρυθμούς. Επιπλέον, η οικογένεια της RNase κ περιλαμβάνει 3-5 κατάλοιπα κυστεινών, εκ των οποίων οι Cys6, Cys14 και Cys69 είναι απόλυτα συντηρημένες σε όλα τα είδη. Σχετικά με την δομή του ενζύμου, δεδομένα δείχνουν τα εξαιρετικά συντηρημένα κατάλοιπα Cys6 και Cys69 να

συμμετέχουν στον σχηματισμό ενός ενδομοριακού δισουλφιδικού δεσμού, απαραίτητο για την αναδίπλωση του μορίου στη λειτουργική του μορφή. Η απόλυτη συντηρητικότητα των καταλοίπων κυστεινών 6 και 69 υπαινίσσεται ότι ο δεσμός αυτός είναι πιθανότατα συντηρημένος σε όλους τους αντιπροσώπους της οικογένειας, αφού σχετίζεται με την ενεργότητα του ενζύμου [41].

Ανάλυση κατά Northern οδήγησε στον εντοπισμό ενός κύριου μεταγράφου της ανθρώπινης RNase κ μήκους 700 nt στους ιστούς που αναλύθηκαν (καρδιά, εγγέφαλος, πλακούντας, σκελετικός μυς, συκώτι, νεφρό, πάγκρεας, πνεύμονας), Βέβαια, η ανάλυση εμφάνισε και την ύπαρξη δύο επιπλέον mRNA μεταγράφων, λιγότερα συχνών, 3,1 και 5 kb, που ταυτοποιήθηκαν μόνο στον εγκεφαλο, τον πλακούντα και το πάγκρεας. Παράλληλα έχει βρεθεί και ένα τρίτο μετάγραφο μήκους 1,6 kb που έχει εντοπιστεί στα Β κύτταρα [38].

Μέχρι πρόσφατα, ήταν γνωστή μία μόνο mRNA ισομορφή, μήκους 811 βάσεων, η οποί κωδικοποιούσε για μία πρωτεΐνη, την ανθρώπινη RNase κ (κ01) με 137 αμινοξέα και ενδοριβονουκλεολυτική δράση. Ωστόσο, περαιτέρω πειράματα το 2014 από τους Karousis και Sideris έδειξαν ότι ένα εναλλακτικό μάτισμα παράγει ένα νέο μετάγραφο mRNA, το οποίο κωδικοποιεί την σύνθεση μιας πρωτεϊνικής ισομορφής 134 αμινοξέων, με κωδικόνιο έναρξης διαφορετικό από αυτό της RNase κ και επιπλέον την απουσία ενός τετρανουκλεοτιδίου GTTG από το εναλλακτικό μετάγραφο της RNase κ. Αυτό το μετάγραφο (κ02) εκφραζόταν σε όλες τις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν με το αμινοτελικό του άκρο να μην εμφανίζει καμία ομοιότητα με αυτό της RNase κ01 ή άλλες ανθρώπινες πρωτεΐνες, αλλά η περιοχή των αμινοξέων 63-134 να είναι ταυτόσημη με το μεγαλύτερο μέρος της RNase κ01. Αποτελεί προϊόν ενός μεταγράφου που υπέστη Δ4 εναλλακτική συρραφή και πρόκειται για μια υδρόφοβη πρωτεΐνη που εντοπίζεται κυτταροπλασματικά, γεγονός που υποστηρίζει την υπόθεση συμμετοχής της σε μακρομοριακά σύμπλοκα *in vivo* ή τον εντοπισμό της σε μεμβρανικές δομές όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο [42].

Η έκφραση της ριβονουκλεάσης κ τόσο σε φυσιολογικές όσο και παθολογικές καταστάσεις άνοιξε ένα πεδίο ερευνών για την συσχέτιση της με διάφορες ασθένειες. Η εμπλοκή γενικά των ριβονουκλεασών σε διάφορους τύπους καρκίνων και οι μηχανισμοί που μπορεί να προάγουν την εμπλοκή τους αναφέρθηκαν

παραπάνω. Ειδικότερα όμως, η υπερέκφραση της ή υποέκφραση της RNase κ σε διάφορους τύπους καρκίνου στον άνθρωπο, από δεδομένα που προέκυψαν με την χρήση μικροσυστοιχιών, όντως αποδεικνύουν την εμπλοκή της σε διάφορους τύπους καρκίνων. Μελέτη της έκφρασης της RNase κ σε καρκίνο των ωοθηκών και καρκίνο του μαστού ύστερα από την επίδραση του αντικαρκινικού φαρμάκου πακλιταξέλη (paclitaxel) όντως εντοπίστηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασής της. Με βάση τον τρόπο δράσης του συγκεκριμένου φαρμάκου-εκδηλώνει κυτταροτοξική δράση μέσω απόπτωσης- πολύ πιθανή είναι η εμπλοκή της σε μονοπάτια που σχετίζονται με την απόπτωση [43]. Αντίστοιχη μελέτη που υποστηρίζει αυτή την υπόθεση είναι ο υπολογισμός της έκφρασης της αναλογίας των δύο ισομορφών της RNase (RNase κ01/RNase κ02) σε καρκίνο του μαστού και ωοθηκών, ύστερα από επίδραση αντικαρκινικών φαρμάκων σε διαφορετικούς χρόνους. Τα δεδομένα έδειξαν και εκεί μια γενική αύξηση των επιπέδων έκφρασης των δύο ισομορφών [44].

Τέλος, δεδομένα που προσδίδουν μια άλλη ενεργότητα στην RNase κ, πέρα αυτής της ριβονουκλεολυτικής δράσης της, ήρθαν στο φώς και υποστηρίζουν πως η RNase κ αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για την επιμόλυνση κυττάρων από μορφές ιών ,όπως ο ιός του Δυτικού Νείλου, ο ιός της γρίπης, ο αδενοϊός, ο RVFW(Rift Valley Fever) και ο ιός του Δάγγειου. Βρέθηκε συγκεκριμένα ότι προωθεί τα πρώτα βήματα εισόδου του ιού στο κύτταρο και όχι στην προσκόλληση του ιού στα κύτταρα. Ακόμα, συμμετέχει στα μονοπάτια ενδοκύττωσης και συνδέεται στενά με την αντλία πρωτονίων V-ATPase, καθώς απαιτείται για την διατήρηση των διάφορων υπομονάδων και κατά συνέπεια τη διατήρηση της λειτουργίας της αντλίας [45, 46].

1.3. Εναλλακτική συρραφή

1.3.1. Εισαγωγή ματίσματος

Το μάτισμα (splicing) αποτελεί το στάδιο επεξεργασίας του πρωτογενούς μεταγράφου ενός γονιδίου, του λεγόμενου πρόδρομου mRNA, με απομάκρυνση των ιντρονίων και συνένωση των εξωνίων μεταξύ τους, ώστε να προκύψει ένα λειτουργικά ώριμο mRNA έτοιμο για μετάφραση. Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη. Ασυνεχή γονίδια συναντώνται σε όλες τις τάξεις των οργανισμών και αποτελούν την πλειοψηφία των γονιδίων στα ανώτερα ευκαρυωτικά γονιδιώματα [47]. Τα γονίδια εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια ως προς τον αριθμό και τα μήκη των εσωνίων που φέρουν, αλλά ένα τυπικό γονίδιο θηλαστικού έχει 7-8 εξώνια διασκορπισμένα σε έκταση -16 kb. Τα εξώνια είναι σχετικά μικρού μήκους (-100-200 kb), ενώ τα εσώνια σχετικά μεγαλύτερα (> 1kb). Η ασυμφωνία αυτή μεταξύ στην ασυνεχή οργάνωση του γονιδίου και στην συνεχή οργάνωση του mRNA οφείλεται ειδικά στο μάτισμα.

Ως θέσεις ματίσματος ορίζονται οι αλληλουχίες που βρίσκονται στα όρια εξωνίου- ιντρονίου, δηλαδή τις θέσεις αποκοπής και επανένωσης. Οι δύο θέσεις ματίσματος έχουν διαφορετική αλληλουχία και έτσι προσδιορίζουν την φορά του ιντρονίου[48]. Οι θέσεις αυτές, από τα αριστερά προς τα δεξιά κατά μήκος του ιντρονίου, ονομάζονται 5' θέση ματίσματος- μερικές φορές καλείται και αριστερή θέση ή θέση δότης- και 3' θέση ματίσματος- δεξιά θέση ή θέση δέκτης. Το μάτισμα εξαρτάται από την αναγνώριση των ζευγών θέσεων ματίσματος. Το θέμα είναι πως διασφαλίζεται ότι το μάτισμα θα γίνει ανάμεσα στα σωστά ζεύγη θέσεων ματίσματος εφόσον όλες οι 5' θέσεις είναι λειτουργικά ισοδύναμες και αντίστοιχα και όλες οι 3' θέσεις. Η αναγνώριση μιας θέσης ματίσματος εξαρτάται κυρίως από δύο παράγοντες: 1) την ισχύ της συναινετικής (*consensus*) αλληλουχίας που αντιστοιχεί στην περιοχή γύρω από την υποψήφια θέση ματίσματος (ισχύς ματίσματος) και 2) τις αλληλεπιδράσεις συγκεκριμένων αλληλουχιών του πρώιμου RNA με πληθώρα ρυθμιστικών παραγόντων όπως οι SR (serine arginine) πρωτεΐνες,

οι ετερογενείς οικογένειες πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (hnRNP) και οι παράγοντες snRNA που ρυθμίζουν την επιλογή των εξωνίων [49].

Το μάτισμα επιτυγχάνει την αφαίρεση των ιντρονίων και την συρραφή εξωνίων, έτσι ώστε να δημιουργηθεί ένα ώριμο λειτουργικό mRNA. Διακρίνονται τουλάχιστον τέσσερις τύποι αντιδράσεων, βάσει των απαιτήσεων τους *in vitro* και των ενδιάμεσων προϊόντων τους.

Το μάτισμα του πρόδρομου mRNA ακολουθεί κατά προτίμηση, αλλά όχι απαραίτητα, συγκεκριμένα μονοπάτια για την αφαίρεση πολλαπλών ιντρονίων. Αναγκαίο για το μάτισμα φαίνεται να είναι ορισμένες συντηρημένες αλληλουχίες ενώ το υπόλοιπο ιντρόνιο δεν είναι σημαντικό [50]. Οι απαραίτητες για το μάτισμα αλληλουχίες περιγράφεται από τον κανόνα GU-AG ο οποίος αναφέρεται στα νουκλεοτίδια που απαντώνται στα άκρα του ιντρονίου. Η αντίδραση στη 5' θέση ματίσματος οδηγεί στον σχηματισμό θηλειάς, όπου το άκρο GU ενώνεται με το ιντρόνιο σχηματίζοντας έναν 5'-2' φωσφοδιεστερικό δεσμό στο κατάλοιπο αδενίνης στην 6' θέση της διακλάδωσης. Στην συνέχεια, το 3'-OH άκρο του 5' εξωνίου προσβάλλει την 3' θέση του ματίσματος, έτσι ώστε να συνδεθούν τα εξώνια και να αποδεσμευτεί το ιντρόνιο με την μορφή θηλειάς. Και οι δύο αντιδράσεις είναι μετεστεροποιήσεις στις οποίες διατηρείται σταθερός ο αριθμός των δεσμών. Αρκετά στάδια της αντίδρασης απαιτούν υδρόλυση του ATP, πιθανώς για την προώθηση των αλλαγών της διαμόρφωσης του RNA και/ή των πρωτεϊνικών συστατικών. Ο σχηματισμός της θηλειάς ευθύνεται για την επιλογή της 3' θέσης ματίσματος.

Ο μηχανισμός του ματίσματος, για την αποκοπή και επανένωση των τμημάτων μεταξύ τους, απαιτεί την δημιουργία του σωματίου ματίσματος ή το συρραπτόσωμα ή σωματίο συρραφής (spliceosome) [51]. Το σωματίο ματίσματος αποτελεί ένα μεγάλο σύμπλοκο που συναρμολογεί τις συντηρημένες πρότυπες αλληλουχίες σε μια δομή η οποία διευκολύνει την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Σχηματίζεται συνήθως με την διαδικασία καθορισμού ιντρονίου, η οποία περιλαμβάνει την αναγνώριση της 5' θέσης ματίσματος. Αποτελούν μεγάλα σύμπλοκα που αποτελούνται από μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια με πρωτεϊνικά στοιχεία (snRNP) και μικρού μεγέθους RNA (snRNA), εκ των οποίων τα βασικά είναι τα U1, U2, U4/U6 και U5. Ένα εναλλακτικό μονοπάτι βασίζεται στον

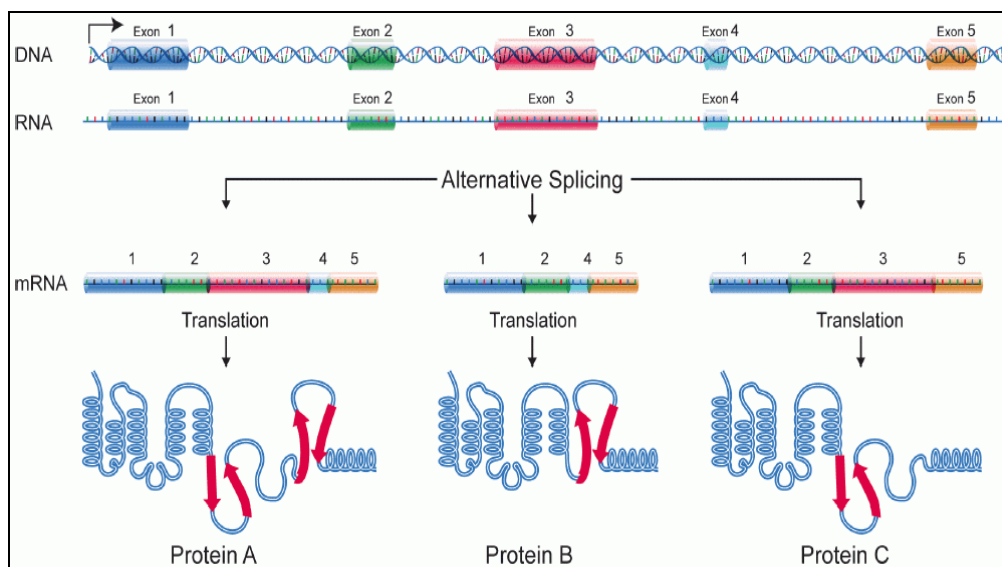
καθορισμό του εξωνίου, ο οποίος περιλαμβάνει την αρχική αναγνώριση της 5' θέσης ματίσματος τόσο του ιντρονίου που αποτελεί το υπόστρωμα όσο και του επόμενου ιντρονίου. Καθώς προστίθενται επιπλέον παράγοντες, το σωματίο ματίσματος διέρχεται στη φάση του συμπλόκου E (σύμπλοκο καθορισμού), που περιέχει το U1 snRNP και παράγοντες ματίσματος, στην φάση συμπλόκων A και B.

Το σωματίο ματίσματος περιέχει όπως αναφέραμε τα U1, U2,U4/U6 και U5 snRNP και κάποιους πρόσθετους παράγοντες ματίσματος [52]. Τα U1, U2 και U5 snRNP περιέχουν το καθένα ένα μόριο snRNP και αρκετές πρωτεΐνες. Το U4/U6 περιέχει 2 snRNP και αρκετές πρωτεΐνες και αυτό. Κάποιες πρωτεΐνες είναι κοινές σε όλα τα σωματίδια snRNP. Τα snRNP αναγνωρίζουν συντηρημένες αλληλουχίες. Το U1 σχηματίζει ζεύγη βάσεων με την 5' θέση ματίσματος και η πρόσδεση του αποτελεί το πρώτο βήμα για το μάτισμα, το U2 σχηματίζει ζεύγη βάσεων με την αλληλουχία διακλάδωσης, ενώ το U5 snRNP δρα στη 5' θέση ματίσματος. Όταν το U4 αποδεσμεύει το U6, το U6 σχηματίζει ζεύγη βάσεων με το U2, δημιουργώντας ενδεχομένως το καταλυτικό κέντρο του ματίσματος. Η σταθερότητα της αλληλεπίδρασης μεταξύ του U1 snRNA και της θέσης ματίσματος διασφαλίζεται από εξωγενείς παράγοντες που περιλαμβάνουν:

- Μέλη της οικογένειας των SR πρωτεϊνών και πιο συγκεκριμένα με την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης ASF/SF2 (γενικός παράγοντας ματίσματος της οικογένειας των πρωτεϊνών SR) με το U1 snRNP. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής συνδέουν επίσης τον παράγοντα U2AF με τον U1 snRNP.
- Μια ομάδα από συντηρημένες πρωτεΐνες δέσμησης του RNA που χαρακτηρίζεται από ένα τουλάχιστον μοτίβο αναγνώρισης RNA μορίων (RNA recognition motif, RRM) και μια περιοχή RSpλούσια σε σερίνη και αργινίνη που συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών. Τα μόρια snRNA μπορούν να δρουν καταλυτικά στο μάτισμα και σε άλλες αντιδράσεις κατά την επεξεργασία του RNA.

1.3.2. Εναλλακτικό μάτισμα

Το RNA ορισμένων γονιδίων, όμως, εκδηλώνει πρότυπα του λεγόμενου εναλλακτικού ματίσματος (alternative splicing), όπου ένα γονίδιο παράγει περισσότερες από μία αλληλουχίες mRNA. Ο μηχανισμός αυτός αποτελεί μέρος της γονιδιακής έκφρασης και σε αυτόν οφείλεται η ποικιλομορφία των γονιδιακών προϊόντων. Αποτέλεσε την απάντηση για τον μικρό αριθμό ανθρώπινων γονιδίων σε σχέση με τα προϊόντα τους, καθώς αποτελεί έναν εύκολο και έξυπνο τρόπο δημιουργίας μιας ποικιλίας πρωτεϊνών, οι οποίες είναι τροποποιήσεις ενός βασικού μοτίβου ανάλογα με το πρόγραμμα ανάπτυξης του κυττάρου, χωρίς να απαιτούνται νέα γονίδια για κάθε πρωτεΐνη [53]. Αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Dscam στα νευρικά κύτταρα της *Drosophila melanogaster*. Χάρη στην εναλλακτικό μάτισμα, από αυτό το γονίδιο και μόνο, παράγονται 38.016 διαφορετικά mRNA, δηλαδή τρεις φορές ο αριθμός των γονιδίων που φέρει το συγκεκριμένο είδος.



Εικόνα 5:Εναλλακτικό μάτισμα από το οποίο προκύπτουν τρία διαφορετικά μετάγραφα.

Εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να προκύψει με διαφορετικά πρότυπα επεξεργασίας [54]. Σε ορισμένες περιπτώσεις, το τελικό πρότυπο έκφρασης καθορίζεται από το πρωτογενές μετάγραφο, επειδή η χρήση διαφορετικών σημείων

έναρξης της μεταγραφής ή η δημιουργία εναλλακτικών 3' άκρων αλλάζει το πρότυπο του ματίσματος. Σε άλλες περιπτώσεις, ένα πρωτογενές μετάγραφο υπόκειται σε μάτισμα με τρόπους όπου τα εσωτερικά εξώνια υποκαθίστανται, προστίθενται ή αποκόπτονται. Το αποτέλεσμα, σε όλες τις περιπτώσεις, είναι η δημιουργία, από ένα και μόνο αρχικό μετάγραφο, πολλαπλών μεταγράφων και κατ' επέκταση διαφορετικών ισομορφών πρωτεϊνών, όπως απεικονίζεται στην εικόνα 5. Τα πολλαπλά προϊόντα μπορούν να παράγονται στο ίδιο κύτταρο ή η διαδικασία να ρυθμίζεται έτσι ώστε συγκεκριμένα πρότυπα ματίσματος να λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικούς κυτταρικούς ιστούς ή κάτω από συγκεκριμένες κυτταρικές συνθήκες.

Ο τρόπος ελέγχου του εναλλακτικού ματίσματος επιτυγχάνεται με τον παράγοντα ASF (Alternative Splicing Factor- παράγοντας εναλλακτικού ματίσματος). Ο παράγοντας αυτός αποτελεί μια πρωτεΐνη που προσδένεται στο RNA. Όταν ένα πρόδρομο mRNA διαθέτει περισσότερες από μία 5' θέσεις ματίσματος, οι οποίες προηγούνται μιας μοναδικής θέσης 3' θέσης ματίσματος, η υψηλή συγκέντρωση του ASF προωθεί την χρήση της 5' θέσης που είναι πιο κοντά στην 3' θέση, σε βάρος των υπολοίπων θέσεων [55]. Οι μοριακοί μηχανισμοί των παραγόντων που εμπλέκονται στην επιλογή των εναλλακτικών θέσεων ματίσματος δεν είναι ακόμα γνωστοί με ακρίβεια. Ωστόσο μπορεί να επηρεαστεί από πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην συναρμολόγηση του συμπλόκου του σώματος συρραφής, καθώς επίσης και από την καταστολή της χρήσης μιας θέσης.

Ανάλογα με την δομική τους σύσταση τα εναλλακτικά γεγονότα ματίσματος ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κύριες κατηγορίες :

- I. **Παράλειψη εξονίων (cassette exon):** Αναφέρονται σε γεγονότα όπου ένα εξόνιο που περιέχεται σε μία ισομορφή απουσιάζει εξολοκλήρου από μια άλλη. Όταν το εξόνιο κασέτας περιέχεται στο ιδιόσυστατο μετάγραφο και απουσιάζει από το εναλλακτικό ονομάζεται αποκλειόμενο (skipped), ενώ όταν απουσιάζει από το ιδιόσυστατο και περιέχεται στο εναλλακτικό ονομάζεται κρυφό (cryptic).
- II. **Διατήρηση ιντρονίου:** Τα γεγονότα αυτά παρατηρούνται όταν μεταξύ ενός ζεύγους ισομορφών ένα ιντρόνιο της μιας ισομορφής περιέχεται εξολοκλήρου στο ένα εξόνιο της άλλης ισομορφής.

- III. **Εναλλακτικά 5' σημεία ματίσματος:** Στις εναλλακτικές ισομορφές, τα όρια των εξονίων στην 5' περιοχή διαφοροποιούνται σε σχέση με το ιδιοσύστατο.
- IV. **Εναλλακτικά 3' σημεία ματίσματος:** Στις εναλλακτικές ισομορφές, διαφοροποιούνται τα όρια των εξονίων στην 3' περιοχή σε σχέση με το ιδιοσύστατο.

Πέρα από αυτές τις βασικές κατηγορίες, το εναλλακτικό μάτισμα διαθέτει και άλλους μηχανισμούς από τους οποίους προκύπτουν εναλλακτικές ισομορφές μεταγράφων [55], όπως τα αμοιβαία αποκλειόμενα εξόνια, όπου η εναλλακτική ισομορφή περιέχει ένα αποκλειόμενο εξόνιο που συνοδεύεται από ένα κρυφό εξόνιο καθώς και εναλλακτικές περιοχές προαγωγέων/πολυαδενυλίωσης, με τις διαφοροποιήσεις στις θέσεις του προαγωγέα ή της πολυαδενυλίωσης να οδηγεί σε εναλλακτικά αρχικά και τερματικά εξόνια αντίστοιχα. Τέλος, τα γεγονότα εναλλακτικού ματίσματος διακρίνονται σε απλά και σύνθετα, ανάλογα αν οι εναλλακτικές ισομορφές περιέχουν έναν ή περισσότερους τύπους εναλλακτικού ματίσματος.

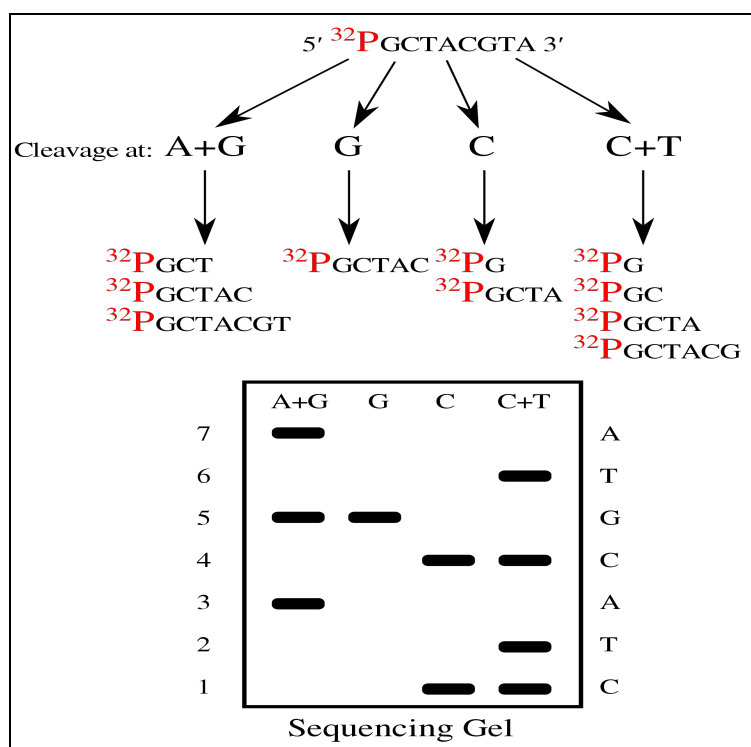
1.4. Αλληλούχιση

Η ανάγκη προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA καθίσταται επιτακτική, για την μελέτη, κατανόηση και αντιμετώπιση κλινικών παθογενών καταστάσεων ήδη από τα πρώτα βήματα εξέλιξης της Βιολογίας. Οι πρώτες επιτυχείς προσπάθειες, που απέδωσαν και βραβείο Nobel στους εφευρέτες τους, πραγματοποιήθηκαν στην δεκαετία του 1970-1980, με την ανακάλυψη δύο μεθόδων για τον προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης της DNA αλληλουχίας: α) η μέθοδος Maxam-Gilbert και β) η μέθοδος Sanger.

Η Maxam-Gilbert μέθοδος είναι ένας τρόπος αλληλούχισης που δημιουργήθηκε από τους Allan Maxam και Walter Gilbert το 1976-1977. Ονομάζεται και χημική μέθοδος, γιατί βασίζεται στην ειδική χημική τροποποίηση μίας ή δύο βάσεων του DNA και επακόλουθο σπάσιμο της αλυσίδας σε σημεία γειτονικά του

τροποποιημένου νουκλεοτιδίου [56]. Ειδικότερα, η διαδικασία ξεκινά με μια ομάδα δίκλωνων μορίων DNA επισημασμένα στο 5' άκρο που έχουν παραχθεί με τη βοήθεια της πολυνουκλεοτιδικής κινάσης. Στο πρώτο στάδιο οι κλώνοι της διπλής έλικας διαχωρίζονται και εκτίθενται σε ήπια κατεργασία με μια χημική ένωση που καταστρέφει μία από τις τέσσερις βάσεις στο DNA π.χ. την αδερίνη. Επειδή η κατεργασία είναι συνήθως ήπια, συνήθως μόνο μία αδερίνη καταστρέφεται σε κάθε μόριο τυχαία. Αυτό δίνει μια οικογένεια τμημάτων DNA διαφορετικού μήκους, που αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές περιοχές στις οποίες υπάρχει αδερίνη στο αρχικό μόριο DNA. Αυτά τα τμήματα διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα και ανιχνεύονται με αυτοραδιογραφία. Μόνο τα τμήματα που διαθέτουν μια 5'τελική ^{32}P φωσφορική ομάδα θα εμφανιστούν στο πήκτωμα και τα μεγέθη τους αποκαλύπτουν τις αποστάσεις από το επισημασμένο άκρο στις οποίες προκύπτουν οι αδερίνες. Για να προσδιοριστεί ολόκληρη η αλληλουχία, παρόμοιες διαδικασίες ακολουθούνται σε τέσσερα ξεχωριστά δείγματα του ίδιου επισημασμένου DNA μορίου, χρησιμοποιώντας χημικά αντιδραστήρια που κόβουν το DNA σε θυμίνη στο πρώτο δείγμα, σε κυτοσίνη στο δεύτερο, γουανίνη στο τρίτο και αδερίνη στο τέταρτο. Τα τμήματα αυτά διαχωρίζονται σε παράλληλες διαδρομές ενός πηκτώματος, δίνοντας ένα μοτίβο ραδιενεργών ζωνών DNA από το οποίο διαβάζεται η αλληλουχία του DNA, με ένα πρότυπο όπως απεικονίζεται στην εικόνα 6.

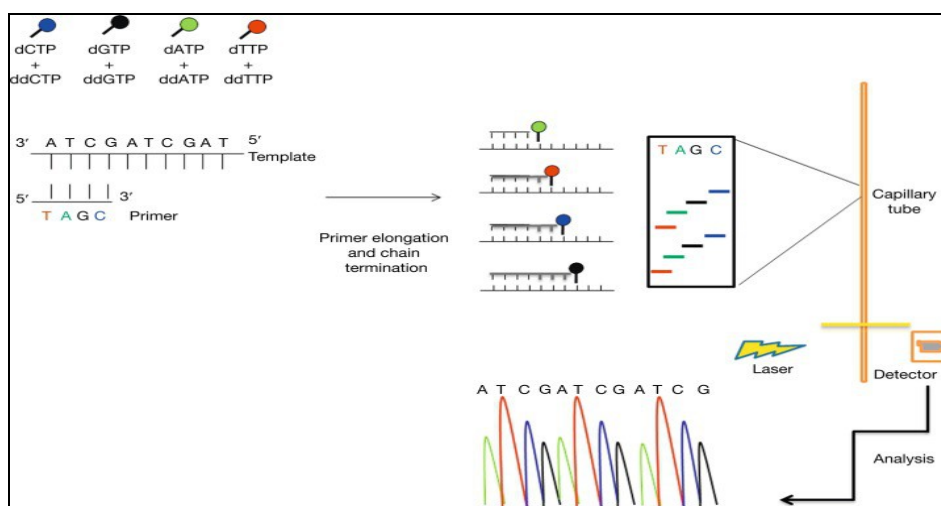
Αυτή η μέθοδος αλληλούχισης εκμεταλλεύεται μια καταλυτική διαδικασία δύο βημάτων που περιλαμβάνει την πιπεριδίνη και δύο χημικά που επιλεκτικά επιτίθενται σε πουρίνες και πυριμιδίνες. Οι πουρίνες θα αντιδράσουν με διμέθυλο-θειικό άλας και οι πυριμιδίνες με υδραζίνη, με τέτοιο τρόπο ώστε να διασπάσουν τον γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ του σακχάρου της ριβόζης και την βάση και να αντικαταστήσουν την βάση (βήμα 1). Η πιπεριδίνη στη συνέχεια καταλύει το σπάσιμο του φωσφοριεστερικού δεσμού εκεί που η βάση έχει αντικατασταθεί (βήμα 2). Επιπρόσθετα, η πιπεριδίνη και το διμέθυλο-θειικό άλας επιλεκτικά θα διασπάσουν νουκλεοτίδια γουανίνης ενώ πιπεριδίνη και διμέθυλο-θειικό άλας σε μυρμηκικό οξύ διασπούν νουκλεοτίδια γουανίνης και αδερίνης. Αντίστοιχα, υδραζίνη και πιπεριδίνη μαζί διασπούν νουκλεοτίδια θυμίνης και κυτοσίνης ενώ υδραζίνη και πιπεριδίνη σε 1,5M NaCl διασπούν μόνο νουκλεοτίδια κυτοσίνης.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου αλληλούχισης Maxam-Gilbert.

Την ίδια περίπου χρονική περίοδο με την ανάπτυξη της μεθόδου Maxam-Gilbert, ο Fred Sanger δημιουργούσε μια εναλλακτική μέθοδο. Αντί της χρήσης χημικής τροποποίησης, ο Sanger κατευθύνθηκε σε μια μέθοδο που περιλάμβανε την τρίτη μορφή του σακχάρου της ριβόζης. Όπως φαίνεται και στη παρακάτω φωτογραφία (εικόνα 7), η ριβόζη διαθέτει μια υδροξυλομάδα και στον 2' και στο 3' άνθρακα ενώ η δεοξυριβόζη διαθέτει μία μόνο στον 3' άνθρακα. Αυτό το γεγονός δεν επηρεάζει κατά την πολυνουκλεοτιδική σύνθεση *in vivo*, καθώς το ζευγάρωμα πραγματοποιείται διαμέσου του 3' άνθρακα και στο DNA και στο RNA. Υπάρχει και μια τρίτη μορφή ριβόζης, από την οποία απουσιάζουν υδροξυλομάδες και στη θέση 2' και στη θέση 3' του άνθρακα. Αυτή είναι η λεγόμενη διδεοξυριβόζη. Ο Sanger γνώριζε, λοιπόν, πως όταν ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο ενσωματωνόταν σε ένα πολυνουκλεοτίδιο *in vitro*, η αλυσίδα αμετάτρεπτα θα τερματιζόταν. Σε αυτό στηρίχθηκε για την δημιουργία ενός πρωτοκόλλου αλληλούχισης, βασιζόμενο στον τερματισμό αλυσίδας μέσω διδεοξυνουκλεοτιδίων.

Η ενζυμική αυτή μέθοδος ακολουθεί μια γενική διαδικασία όπου τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις γίνονται ταυτόχρονα και όλες περιέχουν έναν εκκινητή, ένα ένζυμο πολυμερισμού, ένα DNA-μήτρα και τα τέσσερα δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) αλλά κάθε μία περιέχει και ένα τροποποιημένο νουκλεοτίδιο, το οποίο σταματά την επέκταση της συμπληρωματικής αλυσίδας [57]. Το νουκλεοτίδιο αυτό είναι ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο, το οποίο μπορεί και ενσωματώνεται στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, όμως δεν μπορεί να σχηματίσει φωσφοδιεστερικό δεσμό με το επόμενο νουκλεοτίδιο, λόγω απουσίας του υδροξυλίου στην 3' θέση του άνθρακα. Συνεπώς, σε κάθε αντίδραση παράγεται ένα μίγμα θραυσμάτων που όλα τερματίζουν στο ίδιο τροποποιημένο νουκλεοτίδιο. Όταν τα προϊόντα αυτών των αντιδράσεων ηλεκτροφορηθούν στη σειρά, η ακολουθία με την οποία προστίθενται στον εκκινητή μπορεί να βρεθεί από τα αυξανόμενου μεγέθους διαδοχικά θραύσματα που προκύπτουν στις τέσσερις σειρές του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης. Η θέση των θραυσμάτων αυτών αποκαλύπτεται με την σήμανση τους (ραδιενεργή ή φθορίζουσα), πριν ή κατά την διάρκεια των αντιδράσεων επέκτασης.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση Sanger αλληλούχισης.

Η έλευση της Sanger αλληλούχισης έδωσε μια ώθηση στην αλληλούχιση του DNA σε γενικότερα πλαίσια και οδήγησε σε ταχύτατη προσπάθεια εύρεσης και ανάπτυξης μεθόδων αλληλούχισης, με ευκολότερη επεξεργασία δειγμάτων και αυτοματοποιημένα συστήματα αλληλούχισης. Πλέον, μιλάμε για την αυτοματοποιημένη αλληλούχιση στην Βιολογία με μεθόδους όπως Πυροαλληλούχιση (Pyrosequencing) και την Αλληλούχιση Νέας Γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS).

Η Πυροαλληλούχιση (Pyrosequencing) είναι μια τεχνική DNA αλληλούχισης που βασίζεται στον εντοπισμό εκλυόμενου πυροφωσφορικού (PPi) κατά την DNA σύνθεση. Αποτελεί την πρωτοποριακή δουλειά του Pal Nyren, PhD, ο οποίος πρώτος παρατήρησε το 1987 πως ο πολυμερισμός του DNA μπορεί να παρακολουθηθεί με την μέτρηση του παραγόμενου πυροφωσφορικού, που μπορεί να εντοπιστεί με την έκλυση φωτός [58]. Στη συνέχεια, ο Edward Hyman, PhD, συνέχισε πάνω στα ευρήματα που ήδη υπήρχαν για να δημιουργήσει την πυροαλληλούχιση ένα χρόνο μετά, αν και πήρε αρκετά χρόνια να γίνει ευρέως γνωστή και εύχρηστη. Η αντίδραση ξεκινά με την αντίδραση πολυμερισμού ενός νουκλειικού οξέος, στην οποία ανόργανο πυροφωσφορικό απελευθερώνεται ως αποτέλεσμα την νουκλεοτιδικής ενσωμάτωσης από την πολυμεράση. Αυτό το πυροφωσφορικό μετατρέπεται μετά σε ATP από μια ATP σουλφουρυλάση, το οποίο παρέχει ενέργεια στην λουσιφεράση να οξειδώσει την λουσιφερίνη και να παραχθεί φως. Επειδή το νουκλεοτίδιο που προστίθεται κάθε φορά είναι γνωστό, η ακολουθία του δείγματος μπορεί να καθοριστεί. Το νουκλειικό οξύ μπορεί να είναι είτε DNA είτε RNA, αν και επειδή η DNA πολυμεράση διαθέτει μεγαλύτερη καταλυτική δραστηριότητα από ότι η RNA πολυμεράση για περιορισμένη επέκταση νουκλεοτιδίων σε ορισμένες περιπτώσεις προτιμάται.

Πριν την πυροαλληλούχιση, το τμήμα ενδιαφέροντος για αλληλούχιση ενισχύεται με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας έναν ανάστροφο εκκινητή που είναι βιοτινυλιωμένος. Αυτό επιτρέπει την πλήρη ακινητοποίηση των προϊόντων PCR σε σφαιρίδια στρεπταβιδίνης, μέσω της ισχυρής γέφυρας βιοτίνης-στρεπταβιδίνης. Επειδή τα σφαιρίδια είναι μαγνητικά, μπορούν να ακινητοποιηθούν σε στερεή επιφάνεια με την επιβολή μαγνητικού πεδίου. Αυτό επιτρέπει τον καθαρισμό του δείγματος, αφού αποδιαταχθεί και εκπλυθεί. Η

αλυσίδα που βρίσκεται ακινητοποιημένη στο σφαιρίδιο αποτελεί το DNA-μήτρα για την αντίδραση της πυροαλληλούχισης.

Όπως κάθε τεχνική με εφαρμογή στην Βιολογία, έτσι και στη πυροαλληλούχιση από την πρωτογενή μορφή της εμφανίστηκαν ορισμένες βελτιώσεις. Σημαντική βελτίωση αποτέλεσε η εισαγωγή της απυράσης στην αντίδραση, δημιουργώντας ένα σύστημα τεσσάρων ενζύμων[59]. Η προσθήκη της απυράσης επέτρεψε στα νουκλεοτίδια να προστίθενται συνεχόμενα, χωρίς την ανάγκη ενδιάμεσου βήματος έκπλυσης [60]. Αυτό το ένζυμο διαθέτει ισχυρή καταλυτική δραστηριότητα και μια σχετικά μικρή ποσότητα του ενζύμου στην αντίδραση της πυροαλληλούχισης αποικοδομεί αποτελεσματικά τα διδεοξυνουκλεοτίδια που δεν ενσωματώνονται, ενώ σε σχέση με άλλα ένζυμα αποικοδόμησης, αναστέλλεται λιγότερο από τα προϊόντα της αποικοδόμησης. Επιπρόσθετα, η προσθήκη μιας πρωτεΐνης που δεσμεύεται σε μονής έλικας DNA δείγμα (ss-DNA binding protein) έχει απλοποιήσει τις ιδανικές συνθήκες για διάφορες παραμέτρους στην πυροαλληλούχιση. Αυτή η πρωτεΐνη έχει αποδειχθεί χρήσιμη για αλληλούχιση μεγάλων τμημάτων (long read sequencing) καθώς και για αλληλούχιση δύσκολων δειγμάτων αλλά και ευκολία στον σχεδιασμό των εκκινήτων.

Η αλληλούχιση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) αποτελεί από τα πιο πρόσφατα ευρήματα στην αλληλούχιση των γονιδιωμάτων [61]. Οι τεχνολογίες της άρχισαν να χρησιμοποιούνται μόλις το 2005. Χρησιμοποιούν μικροτεχνολογίες και νανοτεχνολογίες για μείωση του μεγέθους των δειγμάτων, του κόστους και την αύξηση των δειγμάτων που αναλύονται και για να επιτρέπει την εύρεση της σειράς παράλληλα. Οι τεχνολογίες των NGS έχουν κερδίσει έδαφος σε σχέση με τις παλιές μέσα σε πολύ σύντομο διάστημα και αυτό γιατί εμφανίζουν τα εξής πλεονεκτήματα:

- Μείωση του κόστους και αύξηση της απόδοσης της γονιδιωματικής αλληλουχίας λόγω λιγότερου χρόνου, ανθρώπινου δυναμικού και αντιδραστηρίων
- Μείωση χρόνου αντίδρασης λόγω του ότι η χημική αντίδραση και η εύρεση σήματος γίνονται σε ένα βήμα
- Ακριβές και έμπιστο λόγω εκτέλεσης πολλών επαναλήψεων
- Εντοπισμός αιτίας πολλών ασθενειών άγνωστης αιτιολογίας

- Προβολή χιλιάδων θέσεων στο γονιδίωμα για εύρεση των παθογόνων μεταλλάξεων
- Αλληλουχία βιολογικών δειγμάτων για τις γονιδιακές υπογραφές των νέων μολυσματικών παραγόντων
- Αύξηση της γνώσης γύρω από φαρμακογενετική, γενετική καρκίνου, την επιγενετική και των σύνθετων χαρακτηριστικών
- Αντικατάσταση συστοιχιών και αλληλουχιών Sanger σε κλινικές εφαρμογές, που ήδη χρησιμοποιούνται.

Βέβαια, κάποια μειονεκτήματα των NGS τεχνολογιών που υπάρχουν είναι:

- Απαιτείται μεγάλη ακρίβεια και καλύτεροι τρόποι για επιλογή των υποσυνόλων των γονιδιωμάτων που τυχαίνουν ενδιαφέροντος
- Απαιτούνται βελτιώσεις στη λειτουργικότητα, την ταχύτητα, την ευκολία χρήσης του λογισμικού ανάλυσης δεδομένων, την αποθήκευση δεδομένων και την ικανότητα μεταφοράς δεδομένων, αφού θα παράγονται εξαιρετικά μεγάλα σύνολα δεδομένων.

Σήμερα, υπάρχουν πολλές τεχνολογίες NGS αλληλούχισης, με τους τρεις κύριους τύπους να είναι [62]:

- **Με σύνθεση:** στην αλληλούχιση με σύνθεση, η NGS sequencing βρίσκει το κατάλληλο μέγεθος, συνδέεται στις σειρές του adaptor και ενισχύει το φθορίζον ή χημικό σήμα. Ειδικότερα, η βιβλιοθήκη με σταθερούς προσαρμογείς αποδιατάσσεται σε απλούς κλώνους και προστίθεται πάνω σε flow cells ,ακολουθούμενη από solid-phase bridge ενίσχυση στην οποία ο 5^{ος} και ο 3^{ος} μετασχηματιστές συνδέονται στο τέλος κάθε DNA template. Πριν δημιουργηθεί η ακολουθία, η βιβλιοθήκη συνδέεται σε μονούς κλώνους με την βοήθεια του ενζύμου της γραμμικοποίησης. Τέλος , το πρότυπο συμπληρώνεται με τέσσερα είδη νουκλεοτιδίων (ddATP,ddGTP,ddCTP,ddTTP) που περιέχουν διαφορετικά διασπώμενα φθορίζουσα χρωστικά και με μια αφαιρούμενη ομάδα αποκλεισμού.
- **Με σύνδεση:** Εδώ χρησιμοποιείται η ευαισθησία στην ανομοιότητα του DNA για την εύρεση της σειράς των νουκλεοτιδίων. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί ανιχνευτές ολιγονουκλεοτιδίων διαφόρων μεγεθών τα

οποία επισημαίνονται με ετικέτες φθορισμού ανάλογα με το νουκλεοτίδιο που αντιπροσωπεύουν. Τα μειονεκτήματα αυτού του τρόπου είναι ότι μπορεί να αντικατασταθούν λανθασμένες βάσεις γονιδιωμάτων και επίσης έχει ελλιπή αντιπροσώπευση AT και CG περιοχών.

- **Single-molecule:** Ο τρίτος αυτός τρόπος βρίσκει τη σειρά των DNA μορίων απευθείας χωρίς την χρήση ενίσχυσης. Έτσι έχει ως πλεονέκτημα το υψηλό throughput και λιγότερα λάθη.

Με τις σύγχρονες τεχνικές και τεχνολογικές καινοτομίες στον τομέα της Βιολογίας και της ανάλυσης του γονιδιώματος, βρισκόμαστε καθημερινά αντιμέτωποι με την ανακάλυψη όλο και περισσότερων στοιχείων για την βαθύτερη κατανόηση του ανθρώπινου γονιδιώματος καθώς και την συσχέτιση του με μηχανισμούς που εκδηλώνονται σε διάφορες ασθένειες.

1.4.1. Next Generation Sequencing και RNase κ

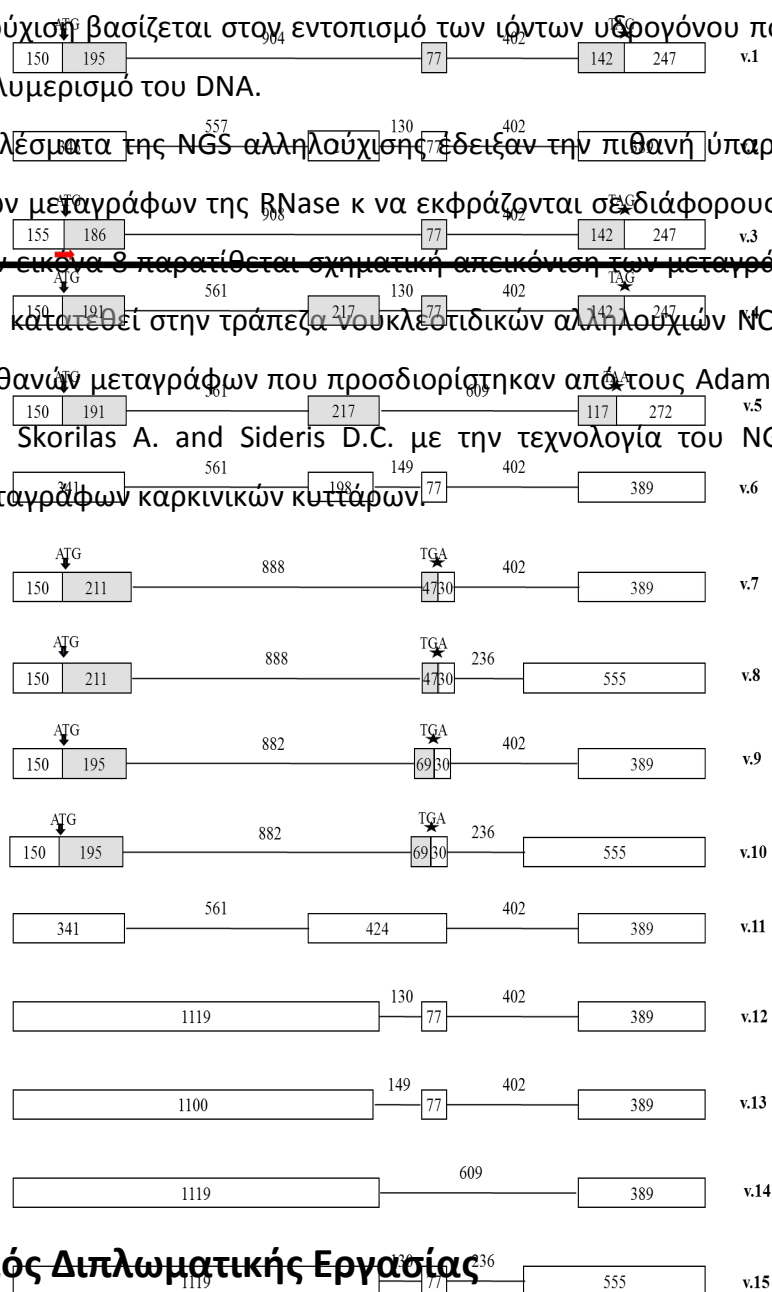
Προηγούμενες μελέτες σχετικά με την ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ (RNase κ) έδωσαν ισχυρές ενδείξεις σχετικά με την ύπαρξη και άλλων εναλλακτικών μεταγράφων, πέρα των ήδη γνωστών. Συγκεκριμένα, κατά την μελέτη και πιστοποίηση του εναλλακτικού μεταγράφου της RNase κ-02 από Karousis και Sideris προέκυψαν ορισμένα μετάγραφα μεγέθους 3,1 kb, 5 kb και 6 kb με έκφραση σε συγκεκριμένους ιστούς καρκινικών κυττάρων. Μια οργανωμένη προσπάθεια εύρεσης νέων μεταγράφων της RNase κ με τις σύγχρονες τεχνολογίες του NGS πραγματοποιήθηκε το 2014 από τους Adamopoulos,P.G., Kontos,C.K., Skorilas,A. και Sideris,D.C. με κύριο στόχο την εύρεση νέων εναλλακτικών μεταγράφων της ριβονουκλεάσης κ σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και αποσαφήνιση του ρόλου της σε τέτοιες παθογενείς καταστάσεις.

Σαν αρχικό βιολογικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν 56 καρκινικές κυτταρικές σειρές, προερχόμενες από 19 διαφορετικούς ιστούς του ανθρώπινου σώματος. Ειδικότερα,

αυτές οι κυτταρικές σειρές προερχόντουσαν από καρκινικούς ιστούς μαστού, ωοθηκών, μήτρας, τραχήλου, προστάτη, ουροδόχου κύστης, νεφρού, κόλον, στομαχιού, ήπατος, εγκεφάλου, πνεύμονα, μελανώματος, λεμφώματος, οξείας T κυτταρικής λευχαιμίας, λευχαιμίας, εμβρυικού νεφρού, παγκρέατος, και κεφαλιού και λαιμού. Οι αντιπρόσωπες κυτταρικές σειρές από κάθε ιστό αφορούσαν: κυτταρικές σειρές μαστού(MCF-7, SK-BR-3, BT-20, BT-474, OVCAR-3, MDA-MB-231, MDA-MB-435S, MDA-MB-468, T-47D, ZR-75-1, MCF-12A), κυτταρική σειρά στομάχου(AGS),κυτταρική σειρά μελανώματος(FM3), κυτταρικές σειρές ωοθηκών(SK-OV-3, ES-2, MDAH-2774,Ishikawa), κυτταρικές σειρές μήτρας(SK-UT-1BB), κυτταρικές σειρές τραχήλου της μήτρας(Siha, Hela), κυτταρικές σειρές προστάτη(DU145, LNCaP, PC3), κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης(T24, RT4), κυτταρικές σειρές νεφρού(ACHN, 786-O, Caki-1), κυτταρικές σειρές κόλον(HCT-116, RKO, HT-29, DLD-1, Caco-2, Sw-620, Colo-205), κυτταρικές σειρές εγκεφάλου(U-87MG, U251MG, D54,H4, SH-SY5Y), κυτταρικές σειρές λεμφώματος(Raji, Daudi, U937), κυτταρική σειρά πνεύμονα(A549), κυτταρικές σειρές λευχαιμίας(K562, HL-60, SUDHL), κυτταρικές σειρές οξείας T κυτταρικής λευχαιμίας(Jurkatt, Rec-1, Granta), κυτταρική σειρά παγκρέατος(1.2B4), κυτταρικές σειρές κεφαλιού και λαιμού(BB-49, CaL-33), κυτταρική σειρά εμβρυικού νεφρού(HEK-293), και κυτταρικές σειρές ήπατος(HepG2, Huh-7). Αφού καλλιεργήθηκαν και υπέστησαν απομόνωση RNA (RNA extraction), στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή για την σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας έναν oligo-dT-adaptor εκκινητή που υβριδοποιείται στην poly-A ουρά των mRNAs ενώ ταυτόχρονα προσθέτει μια ειδική αλληλουχία στο 5' άκρο κάθε cDNA. Ύστερα, έγινε μια πρώτη ενίσχυση των μεταγράφων, με 3' Rapid Amplification of cDNA Ends PCR (3'-RACE PCR), η οποία χρησιμοποιείται για την απόκτησης της πλήρους μήκους αλληλουχίας ενός RNA μεταγράφου. Στην 3' RACE-PCR χρησιμοποιήθηκε ένας forward εκκινητής ειδικός για το γονίδιο που στόχευε στην περιοχή του κωδικονίου έναρξης και ένας γενικός αντίστροφος εκκινητής (reverse), που υβριδοποιούνταν στην αλληλουχία του oligo-dT-adaptor. Επακόλουθα, πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη 3' RACE-PCR με διαφορετικούς εκκινητές, με αρχικό δείγμα τα καθαρισμένα προϊόντα της πρώτης αντίδρασης. Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν βιβλιοθήκες με την ενζυματική θραυσματοποίηση των προϊόντων της PCR, έγινε

καθαρισμός των τμημάτων και συνεχίστηκε με adaptor ligation και ποσοτικοποίηση της βιβλιοθήκης με PCR πραγματικού χρόνου, qPCR (Real time PCR). Αφού προετοιμάστηκαν τα δείγματα, τέλος έγινε η αλληλούχιση νέας γενιάς βασιζόμενη στη τεχνολογία της semi-conductor sequencing. Αυτή η μέθοδος ανήκει στους τρόπους αλληλούχισης με σύνθεση που αναφέρθηκε παραπάνω. Ειδικότερα εδώ η DNA αλληλούχιση βασίζεται στον εντοπισμό των ιόντων υδρογόνου που εκλύονται κατά τον πολυμερισμό του DNA.

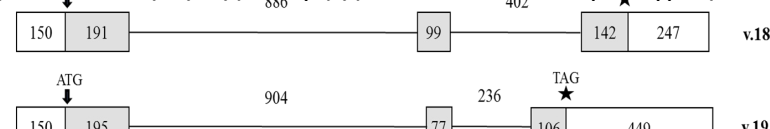
Τα αποτελέσματα της NGS αλληλούχισης έδειξαν την πιθανή ύπαρξη 17 ακόμα εναλλακτικών μεταγράφων της RNase κ να εκφράζονται σε διάφορους καρκινικούς τύπους. Στην εικόνα 8 παρατίθεται σχηματική απεικόνιση των μεταγράφων 1, 2 και 3 που έχουν καταταθεί στην τράπεζα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών NCBI καθώς και των νέων πιθανών μεταγράφων που προσδιορίστηκαν από τους Adamopoulos P.G., Kontos C.K., Skorilas A. and Sideris D.C. με την τεχνολογία του NGS μετά από ανάλυση μεταγράφων καρκινικών κυττάρων.



1.5. Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας

Σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση των νέων αυτών ισομορφών της RNase κ στους καρκινικούς αυτούς ιστούς με σκοπό:

- Την πιστοποίηση της ύπαρξης των νέων αυτών μεταγράφων



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση μεταγράφων της RNase κ 1,2 και 3 στην τράπεζα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών NCBI και νέων πιθανών μεταγράφων της από ανάλυση με τεχνολογία NGS.

- Τα πρότυπα έκφρασης αυτών σε διαφορετικούς καρκινικούς τύπους
- Την ημιποσοτική εκτίμηση στα ποσοστά έκφρασης αυτών
- Την πιθανότητα ύπαρξης σημαντικών διαφορών αυτών στα πρότυπα έκφρασης, ανάλογα τον ιστό έκφρασης και τον καρκινικό τύπο

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά

2.1.1 Χημικές Ουσίες

Αγαρόζη	Serva
Αιθανόλη	Sigma-Aldrich
Ammonium thiocyanate	Sigma-Aldrich
Boric acid	Applichem
Γλυκερόλη	Panreac Quimica Sau
Γλυκόζη	Sigma-Aldrich
Διμεθυλο-σουλφοξείδιο(DMSO)	Ferak
DMEM	Biosera
EDTA	Serva
Guanidine thiocyanate	Sigma-Aldrich
Ham's F12	Biosera
Ισοπροπανόλη	Merck
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Ferak
McCoy's	Biosera
NaCl	CARLO ERBA Reagents
NaOH	Panreac Quimica Sau
Όξινο Υωφοσφορικό Νάτριο (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	Ferak
Τρις-Υδροξυμέθυλο αμινομεθάνιο (Tris)	Duchefa Biochemic
RPMI	Biosera
Sodium Acetate	Mallinckroat
Trypsin	Biosera
Φαινόλη	Across Organics
Fetal Bovine Serum(FBS)	Biosera
Χλωροφόρμιο	Merck

2.1.2. Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

Για τις ανάγκες της παρούσας διπλωματικής εργασίας, καλλιεργήθηκαν οι εξής καρκινικές κυτταρικές σειρές:

Κυτταρικές σειρές	Ιστός
BT-20	αδενοκαρκίνωμα μαστού
HEK-293	κυτταρική σειρά από εμβρυικά νεφρού
FM3	μελάνωμα
AGS	γαστρικό αδενοκαρκίνωμα
DLD-1	αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου
DU145	προστατικό καρκίνωμα
U937	ιστοκυτταρικό λέμφωμα
MDAH-2774	αδενοκαρκίνωμα ωοθηκών
T24	καρκίνωμα ουροδόχου κύστης
1.2B4	κύτταρα παγκρεατικών νησίδων
HL60	οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία
Jurkatt	οξεία T κυτταρική λευχαιμία
SK-UT-1	καρκίνωμα μήτρας
SHSY5Y	νευροβλάστωμα
A549	καρκίνωμα πνεύμονα
Huh-7	ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα
Hela	καρκίνωμα τραχήλου της μήτρας
Caki-1	καρκίνωμα νεφρού

2.1.3. Θρεπτικά Υλικά

Θρεπτικά υλικά ανάπτυξης κυτταρικών σειρών

Η σύσταση των θρεπτικών υλικών είχε ως εξής:

Η παρασκευή όλων των θρεπτικών μέσων καλλιέργειας κυττάρων περιλάμβανε 10% FBS (Fetal Bovine Serum) και 1% Πενικιλίνη 10.000 U/mL / Στρεπτομυκίνη 10 mg/ml. Η βασική τους διαφοροποίηση ήταν το κύριο θρεπτικό μέσο που προστέθηκε κάθε φορά σε αναλογία 89% v/v ανάλογα τις απαιτήσεις της κάθε κυτταρικής σειράς, όπως απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα και αφορούσε τα θρεπτικά μέσα RPMI (Roswell Park Memorial Institute) / DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)/ McCoy's και Ham's F-12.

Θρεπτικό Μέσο	Κυτταρικές σειρές
RPMI	FM3
	AGS
	DLD-1
	DU145
	U937
	MDAH-2774
	1.2.B4
	HL-60
	Jurkatt
	SH-SY5Y
DMEM	Hela
	BT-20
	HEK-293
	SK-UT-1BB
McCoy's	Huh-7
	T24
	Caki-1
Ham's F12	A549

2.1.4. Διαλύματα

Ρυθμιστικό Διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline)

NaCl 0,8% w/v

KCl 0,024% w/v

K₂HPO₄ 0,02% w/v

Na₂HPO₄·2H₂O 0,18% w/v

Διάλυμα Tris/Boric/EDTA (TBE)

Tris-Ultrapure 89 mM

Boric acid 89 mM

EDTA 2Mm

Διάλυμα Trizol

Acid phenol 38% v/v

Guanidine thiocyanate 0,8 M

Ammonium thiocyanate 0,4 M

Sodium acetate 0,1 M pH 5.0

Glycerol 5 % v/v

2.1.5. Ολιγονουκλεοτίδια- εκκινητές

Η σύνθεση των μορίων εκκινητών πραγματοποιήθηκε από τις εταιρίες VBC-Genomics και Lab Supplies. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα μόρια εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διπλωματική.

Ονομασία	Νουκλεοτιδική αλληλουχία
F(ATG)	5'GATGGGATGGTTGAGGCCG3'
Ex1extF	5'GGTGCCTGAGAGGTGCTTGA3'
Ex2F	5'GAAGTGCCGGTTCTCCCTC3'
Ex2R	5'GAAGTGCCGGTTCTCCCTC3'
Ex2/3R	5'TGAGTCCGAATCCAATAATGCTC3'
Ex2/4R	5'CTGAGTCCGAATCCAGAATGGC3'
Ex2tr/3R	5'GCCCTGTTCCAGATAATGCTCG3'
Ex3/4R	5'AGATTTTGAGAATGGCCCCCAG3'
Ex3/ext4R	5'AAGATTTTGATCCACCTCTGCAA3'
Ex4newR	TGACACGGTGCAGGGAGTCT
Ex4R	5'ACGAGCAAGTCAGCTACAAC3'
FH	5'GCTTGACCTCGGCGAT3'

2.2.Μέθοδοι

2.2.1.Κυτταροκαλλιέργειες

2.2.1.1.Απόψυξη κυττάρων

Κατά την διαδικασία αυτή κύτταρα τα οποία έχουν παραμείνει κατεψυγμένα σε υγρό άζωτο (-175 °C) για μεγάλο χρονικό διάστημα, είναι δυνατόν να επανακαλλιεργηθούν. Η διαδικασία πραγματοποιείται υπο άσηπτες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής και όσο το δυνατόν ταχύτερα, προκειμένου τα κύτταρα να μην εκτεθούν στο DMSO, που αποτελεί κρυογόνο παράγοντα αλλά δρά τοξικά στα κύτταρα σε περίπτωση υπερέκθεσης. Τα βήματα που ακολουθούνται εν συντομία είναι τα εξής:

- Αφαιρείται το cryovial από το υγρό άζωτο και ξεπάγωμα των κυττάρων όσο το δυνατόν ταχύτερα με τριβή.
- Όταν το περιεχόμενο ξεπαγώσει τελείως, μεταφέρεται αργά και προσεκτικά σε αποστειρωμένο σωληνάκι τύπου falcon των 15 ml, το οποίο περιέχει 3 ml FBS (Fetal Bovine Serum).
- Φυγοκέντρηση του περιεχομένου σε 1440 rpm για 2 λεπτά στους 25 °C.
- Απόρριψη υπερκλειμένου και διαλυτοποίηση του ιζήματος με 2 ml θρεπτικού υλικού.

- v. Μεταφορά κυττάρων σε τρυβλίο διαμέτρου 100 mm και προστίθεται σε αυτό τόσο θρεπτικό ώστε να έχει τελικό όγκο 10 ml.
- vi. Μεταφορά κυττάρων σε κλίβανο επώασης σταθερών συνθηκών (37 °C, 5%CO₂).

2.2.1.2. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Η ανακαλλιέργεια κυττάρων πραγματοποιείται εφόσον τα κύτταρα έχουν καλύψει το 90-95% της επιφάνειας του τρυβλίου στο οποίο καλλιεργήθηκαν. Παρατηρούνται καθημερινά σε ανάστροφο μικροσκόπιο και υγιή κύτταρα θεωρούνται αυτά που είναι προσκολλημένα στο δάπεδο του τρυβλίου. Η πειραματική πορεία ανακαλλιέργειας που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

- i. Απόρριψη θρεπτικού μέσου και πλύση κυττάρων 2 φορές με 2 ml ισοτονικό διάλυμα 1x Phosphate Buffer Saline (PBS) για την απομάκρυνση ίχνων θρεπτικού υλικού που μπορεί να δράσουν ανασταλτικά στην θρυψίνη.
- ii. Προσθήκη 1 ml θρυψίνης 1x(Trypsin EDTA 1x) και επώαση των κυττάρων για 5 λεπτά στον κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C, για να ξεκολλήσουν από το υπόστρωμα.
- iii. Παρατήρηση κυττάρων και αν δεν έχουν αποκολληθεί ξαναμπαίνουν στον κλίβανο. Αν αποκολληθούν, προσθήκη θρεπτικού μέσου για την απενεργοποίηση της θρυψίνης.
- iv. Μεταφορά ελαιωρήματος σε 15 ml falcon και φυγοκέντρηση στις 1440 rpm για 2 λεπτά και στους 4 °C.
- v. Απόρριψη υπερκειμένου και ήπια επαναδιαλυτοποίηση του κυτταρικού ιζήματος με φρέσκο θρεπτικό υλικό. Ο όγκος του θρεπτικού υλικού που γίνεται η επαναδιαλυτοποίηση είναι πολλαπλάσιος του αριθμού της απαίωσης που θέλουμε να επιτύχουμε. Η αραίωση που πραγματοποιείται εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο, τον χρόνο διπλασιασμού των κυττάρων και κυμαίνεται από 1:3 έως 1:8.

- vi. Τέλος, μοιράζεται η κατάλληλη ποσότητα του εναιωρήματος σε νέα τρυβλία με φρέσκο θρεπτικό υλικό και τοποθέτηση στον κλίβανο.

2.2.1.3. Κατάψυξη κυττάρων

Η διατήρηση των ζωικών κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα είναι δυνατή με την διατήρησή τους σε υγρό άζωτο σε θερμοκρασίες μεταξύ -140°C και -175°C . Για τη επιτυχή συντήρησή τους είναι απαραίτητο να βρίσκονται σε καλή μεταβολική κατάσταση πριν τη κατάψυξη τους, για αυτό και πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα καλύπτουν το 90-95% του τρυβλίου. Επίσης, σε αντίθεση με την απόψυξη, η κατάψυξη είναι μια διαδικασία βαθμιαία, για την αποφυγή σχηματισμού κρυστάλλων νερού στο εσωτερικό τους και την σταδιακή αφυδάτωση τους. Για αυτό και καταψύχονται παρουσία DMSO ή γλυκερόλης. Τα βήματα που ακολουθούνται για την ψύξη των κυττάρων είναι ίδια με την διαδικασία της ανακαλλιέργειας μέχρι το σημείο της φυγοκέντρωσης. Στη συνέχεια το διάλυμα αναδιαλυτοποιείται σε 1 ml διαλύματος κατάψυξης, που αποτελείται από 900 μl FBS και 100 μl DMSO, και μεταφέρεται αργά και προσεκτικά σε ένα cryovial. Αυτό τοποθετείται για τουλάχιστον 24 ώρες στους -80°C και στη συνέχεια μεταφέρεται στο υγρό άζωτο -175°C .

2.2.2. Απομόνωση ολικού RNA

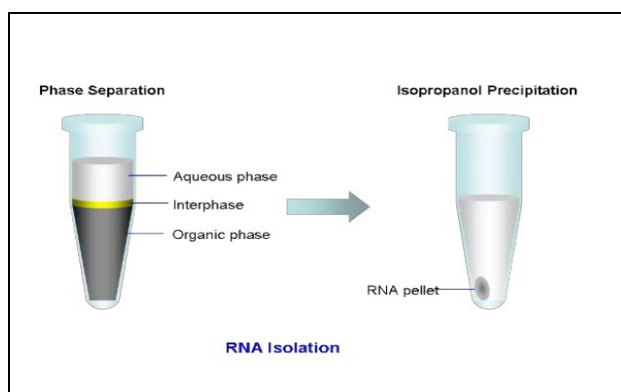
2.2.2.1. Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα

Για την απομόνωση ολικού RNA από τις κυτταρικές σειρές που καλλιεργήθηκαν χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Trizol, το οποίο αποτελεί βελτιωμένη έκδοση της μεθόδου απομόνωσης RNA ενός βήματος από τους Chomczynski και Sacchi. Το αντιδραστήριο Trizol είναι ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης, ισοθειοκυανικής γουανιδίνης και άλλων συστατικών που χρησιμοποιείται για την απομόνωση

RNA, DNA και πρωτεϊνών από κύτταρα και δείγματα ιστών ανθρώπων, ποντικού, φυτών, ζύμης και βακτηρίων [63]. Το χαρακτηριστικό του είναι ότι διατηρεί την ακεραιότητα του RNA χάρη στην αποτελεσματική αναστολή της δραστηριότητας των RNασών, ενώ παράλληλα προκαλεί την λύση των κυττάρων και την απελευθέρωση των κυτταρικών συστατικών κατά την ομογενοποίηση των δειγμάτων. Η μέθοδος απομόνωσης που πραγματοποιήθηκε είχε τα εξής βήματα:

- I. Πραγματοποιήθηκε όλη η διαδικασία ανακαλλιέργειας των κυττάρων μέχρι την φάση της φυγοκέντρωσης, όπου απομονώνεται το ίζημα που περιέχει τα κύτταρα.
- II. Προσθήκη 1 ml αντιδραστηρίου Trizol στο ίζημα των κυττάρων και αναδιαλυτοποίηση ιζήματος.
- III. Προσθήκη 200μl χλωροφορμίου και ήπια ανάδευση 10 φορές. Με την διαδικασία αυτή γίνεται η αποδιάταξη πρωτεϊνών που καθίστανται διαλυτές στην οργανική φάση ενώ το RNA γίνεται διαλυτό στην υδατική φάση. Παραμονή στον πάγο για 12 λεπτά, με ήπια ανάδευση στο ενδιάμεσο.
- IV. Φυγοκέντρωση για 15 λεπτά σε 13.000 rpm στους 4 °C. Το δείγμα έτσι διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις . Η υψηλότερη υδατική φάση περιέχει το RNA.
- V. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε αποστειρωμένο σωλήνα φυγοκέντρωσης και προσθήκη 500μl ισοπροπανόλης. Πραγματοποιείται ήπια ανάδευση 10 φορές και στη συνέχεια παραμονή στον πάγο για 10 λεπτά με ήπια ανάδευση στο ενδιάμεσο.
- VI. Φυγοκέντρωση για 15 λεπτά σε 13.000rpm στους 4 °C .
- VII. Μετά την φυγοκέντρωση αφαιρείται το υπερκείμενο προσεκτικά και παραμένει το RNA ως ίζημα (εικόνα 9).
- VIII. Προσθήκη 1 ml αιθανόλης 75% και φυγοκέντρωση για 20 λεπτά σε 13.000rpm στους 4 °C.
- IX. Αφαίρεση αιθανόλης υπο κενό και αφήνονται τα δείγματα ανοιχτά για 15 λεπτά περίπου για να εξατμιστούν τα οποιαδήποτε υπολείμματα αιθανόλης.

- Χ. Τέλος, αναδιαλυτοποίηση του ιζήματος RNA σε 20 μl dH₂O(RNase free) και φύλαξη του στους -80 °C.



Εικόνα 9: Διαχωρισμός φάσεων δείγματος κατά την απομόνωση RNA. Σχηματισμός ιζήματος RNA μετά την κατεργασία με διάλυμα ισοπροπανόλης.

2.2.2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικού RNA

Για το RNA που απομονώθηκε πραγματοποιήθηκε ο φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσής του. Η αρχή του φωτομετρικού προσδιορισμού της συγκέντρωσης DNA ή RNA σε υδατικά διαλύματα βασίζεται στο γεγονός ότι οι βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης απορροφούν ισχυρά στην υπεριώδη περιοχή του οπτικού φάσματος. Έτσι, τα διαλύματα νουκλεικών οξέων απορροφούν στο υπεριώδες με μέγιστο στα 260 nm. Μια μονάδα οπτικής απορρόφησης αντιστοιχεί σε 40 $\mu\text{g/ml}$ μονόκλωνου RNA. Επίσης, ο λόγος της απορρόφησης στα 260 και στα 280 nm (A_{260}/A_{280}) παρέχει μια εκτίμηση της καθαρότητας του RNA. Μια απομόνωση καθαρού RNA δίνει λόγο περίπου 1,8-2. Εάν υπάρχει μόλυνση του απομονωμένου RNA από πρωτεΐνες ή φαινόλη, τότε ο λόγος είναι μικρότερος του 1,8 ενώ εάν υπάρχουν προσμίξεις από γενωμικό DNA τότε ο λόγος είναι μεγαλύτερος του 2, παρεμποδίζοντας την ακριβή ποσοτικοποίηση του RNA.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του RNA εδώ, απαιτήθηκε μόλις 1 μl των δειγμάτων με την χρήση του BioSpec-nano. Πρόκειται για ένα φωτόμετρο μικρο-όγκων, με όρια ανίχνευσης μέχρι και 10 φορές καλύτερα συγκριτικά με τα υπόλοιπα του είδους του.

2.2.2.3. Ποιοτικός έλεγχος του ολικού RNA

Η πιστοποίηση της ποιότητας και της ακεραιότητας του RNA που απομονώθηκε πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που, σε κατάλληλες συνθήκες, δημιουργεί ένα πορώδες πήκτωμα. Προέρχεται από φύκη και τα πηκτώματά της φέρουν ευμεγέθεις πόρους κατάλληλους για διαχωρισμό μορίων DNA και RNA. Αυτή η διαχωριστική ικανότητα ενός πηκτώματος στηρίζεται στην διάμετρο των πόρων και ειδικότερα όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αγαρόζης σε ένα πήκτωμα, τόσο μικρότερη θα είναι η διάμετρος των πόρων [64]. Γενικότερα, η διαδικασία χωρίζεται σε τρία στάδια:

1. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης, κατάλληλης συγκέντρωσης για το μέγεθος DNA ή RNA που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε.
2. Τοποθέτηση δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής στο πήκτωμα και εφαρμογή της κατάλληλης ηλεκτρικής τάσης στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης. Αυτό συμβαίνει γιατί τα νουκλειακά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα λόγω των φωσφορικών ομάδων τους. Συνεπώς, μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο κινούνται προς τον θετικό πόλο, με ταχύτητα που εξαρτάται του μεγέθους και του σχήματος τους και διαχωρίζονται.
3. Άμεση παρατήρηση και φωτογράφιση του σε τράπεζα UV. Η παρατήρηση των νουκλειακών οξέων στα πηκτώματα αγαρόζης γίνεται με την βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), το οποίο προσδένεται στην μεγάλη αύλακα του DNA και απορροφά την υπεριώδη ακατινοβολία, καθιστώντας τα νουκλειακά οξέα ορατά σε μια τράπεζα υπεριώδους

ακτινοβολίας. Έτσι, παίρνουμε πληροφορίες για το μέγεθος του νουκλειικού οξέους που επιθυμούμε.

Ειδικότερα, στη περίπτωση ηλεκτροφόρησης ολικού RNA αναμένεται να παρατηρηθούν 4 ζώνες με σειρά από τη μεγαλύτερου προς τη μικρότερου μοριακού βάρους που αντιστοιχούν στα ακόλουθα RNA: 28s rRNA, 18s rRNA, 5,8s rRNA, tRNA. Το ριβοσωμικό RNA γενικά αποτελεί το 80% περίπου του ολικού RNA στα θηλαστικά σε αντίθεση με το mRNA που αποτελεί μόλις το 1-3% αυτού και είναι πιο δύσκολα ανιχνεύσιμο ακόμα και με τις πιο ευαίσθητες τεχνικές. Για αυτό το λόγο, η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί την πιο αξιόπιστη ως σήμερα μέθοδο ελέγχου της ακεραιότητας του ολικού RNA και το μοτίβο των ζωνών που προκύπτουν αντικατοπτρίζεται στην παρακάτω εικόνα, όπου ποσότητα ίση με 1 mg από κάθε δείγμα RNA ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα 1,5% αγαρόζης, το οποίο περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1x.

2.2.3. Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μία από τις πιο χρήσιμες και πολυχρησιμοποιούμενες μοριακές μεθόδους και αποτελεί μια επαναστατική μέθοδο στο χώρο της βιολογίας, που αναπτύχθηκε από τον Kary Mullis το 1983. Σε μια τέτοια αντίδραση, το μόριο που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα (DNA/RNA) πολλαπλασιάζεται δίνοντας πολλά από τα αρχικά αντίγραφα. Συγκεκριμένα, μια καθορισμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Η αλληλουχία του γονιδίου πρέπει να είναι σαφώς καθορισμένη για να είναι εφικτός ο σχεδιασμός και η χρήση ενός ζεύγους DNA ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές) -το καθένα συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του DNA-οι οποίοι κατευθύνουν την στοχευμένη σύνθεση DNA αντιγράφων [65]. Με αυτό τον τρόπο

εξασφαλίζεται ότι ο πολλαπλασιασμός συμβαίνει με επαναλαμβανόμενο τρόπο, ώστε το προϊόν της αντίδρασης κάθε κύκλου δραστηριότητας της αντίδρασης να προστίθεται ως πρότυπη μήτρα στο μείγμα στον επόμενο κύκλο, δημιουργώντας έτσι μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Η μέθοδος, επίσης, στηρίζεται στην δράση του ενζύμου Taq πολυμεράση-η οποία είναι ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες- που απομονώθηκε από μετασχηματισμένα βακτήρια *E.coli* με το αντίστοιχο γονίδιο του θερμοφιλού βακτηρίου *Thermus aquanticus*. Η δυνατότητα χρήσης υψηλών θερμοκρασιών γύρω στους 70 °C προσδίδει μεγαλύτερη ειδικότητα στη μέθοδο καθώς εξασφαλίζει πως οι εκκινητές δεν θα υβριδοποιούνται σε λάθος τμήματα πάνω στο γονιδίωμα, εξαλείφοντας τυχόν μη ειδικά προϊόντα.

Η μέθοδος πλέον είναι γρήγορη, αυτοματοποιημένη, και εφαρμόσιμη ακόμα και σε περιπτώσεις μικρής αρχικής ποσότητας του δείγματος, που απαιτείται αξιοπιστία όπως είναι σε πολλές περιπτώσεις ιατροδικαστικής φύσεως ή ακόμα και σε αρχαιολογικά ευρήματα. Επιπρόσθετα, έχει μετατραπεί σε ένα απαραίτητο εργαλείο μοριακής διαγνωστικής για διάγνωση κακοηθειών σε πρώιμα στάδια, για την ανίχνευση παθολογικών γονιδίων για την εύρεση της βέλτιστης θεραπευτικής αγωγής, για περιπτώσεις προγεννητικού ελέγχου αλλά φέρει και αναμφισβήτητη μεγάλη συμβολή και στο τομέα της μικροβιολογίας, με την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών και τη μέτρηση ιικού φορτίου.

Μια τυπική αντίδραση πολυμεράσης για την επιτυχή λειτουργία της χρειάζεται ποικίλα αντιδραστήρια και συστατικά. Συγκεκριμένα απαιτούνται:

- ❖ Το DNA δείγμα, που θα αποτελέσει την μήτρα για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδιώματος που επιθυμούμε να ενισχύσουμε
- ❖ Την θερμοφιλή Taq πολυμεράση που αναφέραμε με βέλτιστη θερμοκρασία απόδοσης 72 °C, για να παραμείνει ανέπαφη κατά την αντίδραση και τις υψηλές θερμοκρασίες, αλλά και για να πραγματοποιήσει την σύνθεση των νουκλεοτιδίων ειδικά
- ❖ Δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές, που ο ένας είναι συμπληρωματικός για το 3' άκρο κάθε αλυσίδας του DNA στόχου. Ο σχεδιασμός των εκκινητών λαμβάνει ορισμένες παραμέτρους υπόψη του ώστε να είναι επιτυχής η υβριδοποίηση τους στο γονίδιο στόχο. Συγκεκριμένα, το μέγεθος τους θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 18-22

νουκλεοτίδια, οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης τους να είναι παραπλήσιες, να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα(είτε μεταξύ τους είτε μεταξύ μορίων του ίδιου εκκινητή), η περιεκτικότητα τους σε G-C να κυμαίνεται σε ~50%, να είναι όσο το δυνατόν ειδικοί και τέλος να μη φέρουν περισσότερα από 3 C ή G νουκλεοτίδια στο 5' άκρο τους για να μην δημιουργούνται ισχυροί δεσμοί με μη ειδικές περιοχές του γονιδιώματος (πλούσιες σε G-C περιοχές)

- ❖ Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), που αποτελούν τους θεμέλιους λίθους για την κατασκευή των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων DNA
- ❖ Δισθενή κατιόντα μαγνησίου(Mg^{2+}), που αποτελούν μεταλλικό συμπράγοντα της πολυμεράσης και η συγκέντρωσή τους μπορεί να επηρεάσει την δράση της σημαντικά
- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης, που παρέχει το ιδανικό χημικό περιβάλλον με τις βέλτιστες συνθήκες για την δράση της πολυμεράσης
- ❖ Τέλος, μονοσθενή κατιόντα καλίου.

Η διαδικασία βασίζεται στη χρήση ενός θερμικού κυκλοποιητή, ο οποίος επαναλαμβάνει ορισμένες θερμικές αλλαγές, τους ονομαζόμενους κύκλους, με κάθε κύκλο να αποτελείται από 2-3 συγκεκριμένα θερμικά βήματα. Σε κάθε κύκλο, το δείγμα DNA που υπόκειται σε PCR υφίσταται συγκεκριμένες αλλαγές. Ειδικότερα, σε μια τυπική αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης περιέχονται τα εξής στάδια[66]:

- 1) Έναρξη (Initialiazation step): Αυτό το βήμα είναι απαραίτητο για πολυμεράσες που χρειάζονται θερμική ενεργοποίηση, κυμαίνεται στους 94-96 C και δεν διαρκεί πάνω από 2-8 λεπτά
- 2) Αποδιάταξη (Denaturation step): Αυτό το βήμα αποτελεί το πρώτο βήμα κάθε κύκλου και συνίσταται στην θέρμανση της αντίδρασης για 20-30'' στους 94-98 C. Προκαλεί την αποδιάταξη του δείγματος DNA, με σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου που κρατούν ισχυρά τις αλυσίδες ενωμένες, προκύπτοντας έτσι μονόκλωνα DNA τμήματα

- 3) Υβριδοποίηση των εκκινητών (Annealing step): Η θερμοκρασία της αντίδρασης μειώνεται για χρονικό διάστημα 20-40'' στους 50-65 °C για να επιτραπεί στους εκκινητές να υβριδοποιηθούν στα τμήματα του DNA που στοχεύουν. Αυτό το στάδιο απαιτεί χαμηλότερες θερμοκρασίες για την υβριδοποίηση, αλλά υψηλές αρκετά ώστε να πραγματοποιηθεί ειδικά. Αν οι θερμοκρασίες είναι πολύ χαμηλές, υπάρχει κίνδυνος μη ειδικής πρόσδεσης των εκκινητών, ενώ αν είναι πολύ υψηλές, ο εκκινητής μπορεί να μην προσδεθεί. Συνήθως, η θερμοκρασία υβριδοποίησης είναι 3-5 βαθμούς χαμηλότερα από το T_m του εκκινητή που σχεδιάστηκε. Σταθεροί δεσμοί DNA-DNA δημιουργούνται μόνο όταν η αλληλουχία ταιριάζει σχεδόν απόλυτα με την αλληλουχία του στόχου. Η πολυμεράση προσδένεται στο υβρίδιο εκκινητή-δείγμα και αρχίζει την σύνθεση. Το στάδιο αυτό της υβριδοποίησης θεωρείται το πιο κρίσιμο στα στάδια της PCR καθώς μια λάθος υβριδοποίηση μπορεί να δώσει ψευδώς αληθή ή αρνητικά αποτελέσματα.
- 4) Επιμήκυνση (Extension/elongation step): Η θερμοκρασία του συγκεκριμένου σταδίου καθορίζεται από ποια πολυμεράση χρησιμοποιείται. Όπως αναφέρθηκε, η Taq πολυμεράση φέρει βέλτιστη θερμοκρασία 75-80 °C και συνήθως μια θερμοκρασία 72 °C χρησιμοποιείται. Σε αυτό το στάδιο, η πολυμεράση συνθέτει μια νέα συμπληρωματική αλυσίδα με βάση το αρχικό υλικό μήτρα που έχει, προσθέτοντας τα dNTPs που είναι συμπληρωματικά κάθε φορά με προσανατολισμό 5'-3'. Η διάρκεια αυτού του βήματος ποικίλλει και εξαρτάται από την πολυμεράση που χρησιμοποιείται και την ενεργότητα της αλλά και από το μέγεθος του DNA τμήματος που θέλουμε να ενισχύσουμε.

Τα τρία αυτά στάδια καθιστούν ένα κύκλο της PCR. Πολλαπλοί απαιτούνται για την ενίσχυση του DNA-στόχου, που εξαρτώνται από το γονίδιο στόχο που διαθέτεις, τα ποσοστά έκφρασης αυτού και άλλους παράγοντες. Συνήθως, οι τυπικοί κύκλοι σε μια PCR αρχίζουν από ελάχιστους αλλά δεν ξεπερνούν τους 30-38.

Μετά το πέρας των κύκλων, λαμβάνουν χώρα ακόμα δύο βήματα:

- 5) Τελική επιμήκυνση (Final elongation): Μετά τον τελευταίο κύκλο της αντίδρασης, για την διασφάλιση πως δεν υπάρχουν μονόκλιωνα τμήματα DNA, η θερμοκρασία φτάνει τους 70-74 °C για 5-15 λεπτά
- 6) Τελική αναμονή(Final hold): αποθήκευση στους 4 °C για βραχυπρόθεσμη χρήση της αντίδρασης.

Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εφαρμόστηκαν η κλασική PCR (με υπόστρωμα DNA), η nested PCR και η αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR, με υπόστρωμα RNA). Οι δύο τελευταίες αποτελούν παραλλαγές της τυπικής PCR και αναλύονται παρακάτω.

2.2.3.1.Αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR)

Η αντίστροφη μεταγραφή αποτελεί μια αντίδραση κατά την οποία πραγματοποιείται η σύνθεση μιας συμπληρωματικής (complementary) αλυσίδας DNA (cDNA) έχοντας ως ένα εκμαγείο ένα μόριο RNA και χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό της έκφρασης του RNA σε κυτταρικούς ιστούς. Παλαιότερα, αυτός ο εντοπισμός πραγματοποιούνταν με την μέθοδο Northern blot, παρά τα μειονεκτήματα που έφερε. Δεν ήταν μέχρι το 1977 που ανακαλύφθηκε το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση από τους H.Temim και D.Baltimore και καθίσταται δυνατή η αντίστροφη μεταγραφή μέσω αυτής της τεχνικής. Το ένζυμο αυτό, το οποίο υπάρχει στην φύση και βρίσκεται στους RNA-ιούς (ρετροιούς), καταλύει την αντίδραση και μετατρέπει το γενετικό υλικό του ιού από την μορφή του μονόκλωνου RNA σε δίκλωνο DNA, έτσι ώστε να μπορεί να ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό των κυττάρων ξενιστών [67]. Η ανακάλυψη αυτού του ενζύμου διαμόρφωσε το κεντρικό δόγμα της βιολογίας στην σημερινή του μορφή και έδωσε σημαντική ώθηση στη μοριακή βιολογία και στην έρευνα, καθώς επέτρεψε τη μετατροπή των ευαίσθητων μορίων RNA σε σταθερά, συμπληρωματικά μόρια DNA, τα οποία μπορούν να υποστούν χειρισμούς και να μελετηθούν. Επίσης, έδωσε

δυνατότητες στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, ενώνοντας την αντίστροφη μεταγραφή με την κλασική ή ποσοτική PCR.

Στην αντίστροφη μεταγραφή, όπως αναφέραμε, το υπόστρωμα RNA που επιθυμούμε χρησιμοποιείται για την σύνθεση του cDNA με την βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση και στη συνέχεια το cDNA αυτό χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την διεκπεραίωση μιας αντίδρασης PCR [68]. Συγκεκριμένα, η αντίστροφη μεταγραφή μπορεί να γίνει με δύο τρόπους:

- RT-PCR ενός βήματος (one step RT-PCR): Σε αυτή την προσέγγιση, όλη η αντίδραση πραγματοποιείται σε ένα και μόνο σωληνάκι, από την σύνθεση του cDNA μέχρι την ενίσχυση του. Με αυτό τον τρόπο ελαχιστοποιούνται οι πειραματικές αποκλίσεις παρέχοντας σε όλα τα αντιδραστήρια το ίδιο χημικό περιβάλλον. Παρόλα αυτά, με αυτή τη μέθοδο το RNA καθίσταται ευάλωτο σε αποικοδόμηση καθώς και έχει αποδειχθεί πως είναι λιγότερο ακριβής σε σχέση με την άλλη πειραματική προσέγγιση.
- RT-PCR δύο βημάτων (two-step RT-PCR): Η διαφορά με την πρώτη έγκειται στο ότι η σύνθεση του cDNA και η περαιτέρω ενίσχυση πραγματοποιούνται σε ξεχωριστά σωληνάκια. Φέρει πλεονεκτήματα έναντι της πρώτης, όπως αναφέραμε αλλά το κύριο μειονέκτημα της είναι πως είναι πιο επιδεκτική σε μολύνσεις λόγω του πιο συχνού χειρισμού των δειγμάτων.

Η αντίδραση της σύνθεσης της πρώτης αλυσίδας του cDNA πραγματοποιείται στον θερμικό κυκλοποιητή και τα απαραίτητα αντιδραστήρια είναι η αντίστροφη μεταγραφάση, το αρχικό υλικό RNA, τα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) και οι κατάλληλοι εκκινητές. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν τέσσερα είδη εκκινητών:

1. Ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμίνης (Oligo-Ts): Οι εκκινητές αυτοί υβριδίζονται στην poly-A ουρά των mRNA και με την χρήση τους μπορούν να συντεθούν ακέραια τα μόρια mRNA. Η χρήση τους όμως δεν συνίσταται σε περιπτώσεις μεγάλων μορίων mRNA(>4Kb) καθώς το 5' άκρο τους δεν θα αντιπροσωπεύεται επαρκώς ή όταν τα μόρια του RNA στόχου δεν έχουν poly-A ουρά (RNA προκαρυωτικών οργανισμών).

2. Τυχαία εξανουκλεοτίδια (Random Hexamer, RH): Οι εκκινητές αυτοί απαρτίζονται από ένα μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων μήκους 6 βάσεων που έχουν τυχαία νουκλεοτιδική σύσταση. Θεωρείται ότι με την χρήση τους επιτυγχάνεται πληρέστερη κάλυψη όλων των μορίων RNA (ανεξαρτήτως της poly-A ουράς και σε όλο το μήκος τους). Στην πράξη είναι σύνηθες ο συνδυασμός των oligo-dTs και των RH.
3. Εκκινητές ειδικοί για το γονίδιο στόχο: Όταν το ζητούμενο είναι η αυξημένη ευαισθησία και ο έλεγχος ενός μόνο ή μικρού αριθμού γονιδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκκινητές ειδικοί για τα επιθυμητά γονίδια. Αποτελεί τον μοναδικό τύπο εκκινητή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην one step RT-PCR. Στην πράξη, είναι λίγο πιο δύσχρηστη μέθοδος καθώς απαιτείται προτύπωση των συνθηκών της αντίδρασης για κάθε εκκινητή.
4. Τέλος, τα anchored Oligo-(dT)N, που υβριδοποιούνται στην αρχή της poly-A ουράς και παράγουν DNA πλήρους μήκους.

Η σύνθεση του cDNA εκτελείται τυπικά στους 45-55 °C για χρονικό διάστημα από 15 λεπτά έως 1 ώρα, ανάλογα με το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση. Τα ευρέως χρησιμοποιούμενα ένζυμα για την αντίστροφη μεταγραφή είναι η μεταγραφάση του ιού του μυελοβλαστώματος των πτηνών, Avian Myeloblastosis Virus transcriptase (AMV), και η μεταγραφάση του ιού Moloney της λευχαιμίας των ποντικών, Moloney Murine Leukemia Virus transcriptase (M-MLV). Μετά το πέρας της αντίδρασης σχηματίζεται ένα δίκλωνο υβριδικό μόριο που περιέχει μια αλυσίδα RNA και μια αλυσίδα DNA. Στη συνέχεια, με θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία καταστρέφονται η αντίστροφη μεταγραφάση και η αλυσίδα του RNA. Το νεοσυντιθέμενο cDNA είναι συμπληρωματικό του αρχικού RNA και η ουρακίλη έχει αντικατασταθεί από την θυμίνη. Το cDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί έτσι ως αρχικό υλικό για την κλασική αντίδραση PCR.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο RT-PCR 2 βημάτων. Ως εκκινητής, επιλέχθηκαν τα oligo-dTs, που υβριδοποιούνται στην poly-A ουρά των mRNA ενώ χρησιμοποιήθηκε το kit της αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV Biolabs New England- μιας RNA -κατευθυνόμενης DNA πολυμεράσης που συνθέτει μια συμπληρωματική DNA αλυσίδα από έναν εκκινητή χρησιμοποιώντας

είτε RNA είτε μονόκλωνο DNA ως πρότυπο και δεν φέρει δράση 3'-5' εξωνουκλεάσης-, που περιείχε εκτός του ενζύμου, το ρυθμιστικό διάλυμα αυτού και την διθειοθριτόλη (DTT), απαραίτητο για την αντίδραση καθώς δρά σαν προστατευτικό που αποτρέπει την οξείδωση ομάδων θειόλης. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκε αναστολέας ριβονουκλεασών (RNase inhibitor), για την αποτροπή της αποικοδόμησης του RNA από ριβονουκλεάσες καθώς η πρωτεΐνη αυτά σχηματίζει ισχυρά σύμπλοκα με άλλες ριβονουκλεάσες, εμποδίζοντας την δράση τους. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν τα dNTPs για την σύνθεση των νέων νουκλεοτιδίων. Το πρωτόκολλο της αντίδρασης που ακολουθήθηκε είχε ως εξής:

Για τις 18 κυτταρικές σειρές που διαθέταμε RNA, προστέθηκαν για το καθένα σε ένα erppendorf τα ακόλουθα συστατικά με τις εξής αναλογίες,

- **1 µl RNA (1µg/µl)**
- **1 µl oligo-dTs**
- **1 µl dNTPs (10 mM each)**
- **10 µl dH₂O**

Τα δείγματα επωάστηκαν στους 65 °C για 5 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν απευθείας στον πάγο για 3 λεπτά. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε η υβριδοποίηση του εκκινητή με το RNA για να αρχίσει η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής στο επόμενο στάδιο.

Στα ίδια erppendorf προστέθηκαν στη συνέχεια,

- **4 µl 5x FS buffer**
- **2 µl DTT (0,1 M)**
- **0,5 RNase inhibitor (40u/µl)**
- **0,5 M-MLV (200u/µl)**

Τα δείγματα επωάστηκαν στους 37 °C για 52 λεπτά και στους 70 °C για 15 λεπτά, για την απενεργοποίηση του ενζύμου που αναφέραμε και παραπάνω. Το cDNA που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης παρακάτω.

2.2.3.2.PCR

Τα προϊόντα της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής και για τις 18 κυτταρικές σειρές στη συνέχεια υπεβλήθησαν σε συμβατική PCR για τον εντοπισμό της ύπαρξης των νέων μεταγράφων της RNase κ. Καθώς δεν ήταν δυνατή η μελέτη όλων των νέων μεταγράφων που προέκυψαν από τα πειράματα NGS, επικεντρωθήκαμε στην μελέτη των variant 2, variant 4, variant 5, variant 6, variant 12, variant 13, variant 14, variant 15, variant 16 και variant 17. Για την πιο αξιόπιστη μελέτη τους, σχεδιάστηκαν πρωτόκολλα που εξέταζαν αυτά τα variants ανά ζεύγη. Για όλα τα πρωτόκολλα χρησιμοποιήθηκε το ίδιο kit πολυμεράσης Kapa Taq Polymerase από την εταιρία Kapa Biosystems, που περιείχε τα ρυθμιστικά διαλύματα της πολυμεράσης C και D καθώς και διάλυμα $MgCl_2$ για την επιτυχή δράση της πολυμεράσης. Το πρώτο ρυθμιστικό διάλυμα αφορά την ευαισθησία της αντίδρασης ενώ το δεύτερο απευθύνεται σε μεγαλύτερα μεγέθη. Στα συγκεκριμένα πρωτόκολλα χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα D. Το μόνο που διαφοροποιούνταν σε κάθε πρωτόκολλο ήταν τα ζεύγη εκκινητών διαμορφωμένα έτσι ώστε να στοχεύουν σε συγκεκριμένα variants κάθε φορά. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν dNTPs καθώς και τα προϊόντα της αντίστροφης μεταγραφής ως αρχικό δείγμα.

Οι συνθήκες αντίδρασης ακολούθησαν ένα γενικό πρωτόκολλο με την διαφοροποίηση στο καθένα να έγκειται στο βήμα της υβριδοποίησης των εκκινητών καθώς και στον αριθμό των κύκλων, ανάλογα τα ποσοστά έκφρασης των ζευγών των variant που εξετάζαμε. Μια γενική εικόνα των βημάτων της αντίδρασης είχε ως εξής:

Βήμα 1^ο: 95 °C για 2 λεπτά

Βήμα 2: 95 °C για 1 λεπτό

Βήμα 3: Θερμοκρασία ανάλογα το T_m των εκκινητών για 30 δευτερόλεπτα

Βήμα 4: 72 °C για 1 λεπτό

Βήμα 5: x επαναλήψεις των βημάτων 2-4

Βήμα 6: 72 °C για 5 λεπτά

Βήμα 7: 4 °C

Για να εξασφαλιστεί η ομοιογένεια στα δείγματα και η αποφυγή στατιστικών λαθών φτιάχνεται μια δεξαμενή που περιέχει τα πάντα εκτός από το cDNA. Από εκεί κάθε φορά προστίθενται x μl σε κάθε erpendorf και τέλος το cDNA του κάθε δείγματος που έχει προκύψει από την αντίστροφη μεταγραφή σε ποσότητα (50-x). Το προϊόν της PCR είτε φυλλάχθηκε στους -20 °C για μακροπρόθεσμη χρήση είτε χρησιμοποιήθηκε απευθείας για την αντίδραση της nested PCR.

Η nested PCR αποτελεί μια παραλλαγή της κλασικής PCR με σκοπό την περαιτέρω ενίσχυση τμημάτων DNA τα οποία εκφράζονται σε περιορισμένη ποσότητα μέσα στα κύτταρα. Περιλαμβάνει ένα νέο ζεύγος εκκινητών, διαφορετικό του πρώτου που χρησιμοποιείται στην συμβατική PCR, που στοχεύει στην περαιτέρω ενίσχυση ενός στόχου που βρίσκεται στα προϊόντα της πρώτης PCR, για αυτό και οι εκκινητές αυτοί είναι σχεδιασμένοι εσωτερικότερα των πρώτων ζευγών. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η αύξηση της ειδικότητας και της ευαισθησίας της αντίδρασης, αποφεύγοντας ταυτόχρονα και μη ειδικά προϊόντα που μπορεί να προκύπτουν από τις πρώτες αντιδράσεις.

Για την ανίχνευση των επιθυμητών μεταγράφων, αφού πραγματοποιήθηκε η συμβατική PCR, τα προϊόντα της πρώτης αντίδρασης υπεβλήθησαν σε nested PCR. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση των κάθε variants ανά ζεύγη παρατίθεται στους παρακάτω πίνακες.

❖ **Ανίχνευση των variant 2 και variant 4**

Αντιδραστήρια	Αντίδραση τελικού όγκου 50μl
5x Kapa Taq (Mg free) Reaction Buffer	10 μl
MgCl ₂ (25 mM)	3 μl
dNTPs(10mM)	1 μl
Forward primer F(ATG) (10 μM)	1 μl
Reverse Primer Ex2/3R (10 μM)	1 μl
Kapa Taq Polymerase(5u/μl)	0,5 μl
template cDNA	2 μl
dH ₂ O	31,5 μl

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε για 23 κύκλους με θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών (annealing) τους 57°C.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση τελικού όγκου 50μl
5x Kapa Taq (Mg free) Reaction Buffer	10 μl
MgCl ₂ (25 mM)	3 μl
dNTPs(10 mM)	1 μl
Forward primer FH (10 μM)	1 μl
Reverse Primer Ex2R (10 μM)	1 μl
Kapa Taq Polymerase(5u/μl)	0,5 μl
template cDNA	0,5 μl
dH ₂ O	33 μl

Η αντίδραση της nested PCR πραγματοποιήθηκε για 30 κύκλους με θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών(annealing) τους 59°C.

❖ **Ανίχνευση των variant 5 και variant 14**

Αντιδραστήρια	Αντίδραση τελικού όγκου 50μl
---------------	---------------------------------

5x Kapa Taq (Mg free) Reaction	
Buffer	10 µl
MgCl₂(25 mM)	3 µl
dNTPs(10 mM)	1 µl
Forward primer F(ATG) (10 µM)	1 µl
Reverse Primer Ex4r (10 µM)	1 µl
Kapa Taq Polymerase(5u/µl)	0,5 µl
template cDNA	1 µl
dH₂O	32,5 µl

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε για 30 κύκλους με θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών (annealing) τους 59°C.

	Αντίδραση τελικού όγκου 50µl
Αντιδραστήρια	
5x Kapa Taq (Mg free) Reaction	
Buffer	10 µl
MgCl₂(25 mM)	3 µl
dNTPs(10 mM)	1 µl
Forward primer FH (10 µM)	1 µl
Reverse Primer Ex2/4R (10 µM)	1 µl
Kapa Taq Polymerase(5u/µl)	0,5 µl
template cDNA	1 µl
dH₂O	32,5 µl

Στη συγκεκριμένη αντίδραση, τα προϊόντα της πρώτης PCR υπέστησαν αραίωση της τάξης 1 στα 25 µl και αυτό το αραιωμένο προϊόν χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα για την αντίδραση. Η αντίδραση της nested PCR πραγματοποιήθηκε για 30 κύκλους με θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών(annealing) τους 60°C.

❖ *Ανίχνευση των variant 6 και variant 17*

	Αντίδραση τελικού όγκου 50µl
Αντιδραστήρια	
5x Kapa Taq (Mg free) Reaction	
Buffer	10 µl
MgCl₂(25 mM)	3 µl
dNTPs(10 mM)	1 µl

Forward primer F(ATG) (10 μ M)	1 μ l
Reverse Primer Ex2tr3R (10 μ M)	1 μ l
Kapa Taq Polymerase(5u/ μ l)	0,5 μ l
template cDNA	2 μ l
dH ₂ O	31,5 μ l

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε για 23 κύκλους με θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών (annealing) τους 59°C.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση τελικού όγκου 50 μ l
5x Kapa Taq (Mg free) Reaction Buffer	10 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	3 μ l
dNTPs(10 mM)	1 μ l
Forward primer FH (10 μ M)	1 μ l
Reverse Primer Ex2R (10 μ M)	1 μ l
Kapa Taq Polymerase(5u/ μ l)	0,5 μ l
template cDNA	2 μ l
dH ₂ O	31,5 μ l

Η αντίδραση της nested PCR πραγματοποιήθηκε για 30 κύκλους με θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών(annealing) τους 59°C.

❖ Ανίχνευση των *variant 12* και *variant 13*

Αντιδραστήρια	Αντίδραση τελικού όγκου 50 μ l
5x Kapa Taq (Mg free) Reaction Buffer	10 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	3 μ l
dNTPs(10 mM)	1 μ l
Forward primer Ex1extF (10 μ M)	1 μ l
Reverse Primer Ex4newR (10 μ M)	1 μ l
Kapa Taq Polymerase(5u/ μ l)	0,5 μ l
template cDNA	1,5 μ l
dH ₂ O	32 μ l

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε για 35 κύκλους με θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών (annealing) τους 60,5°C. Τα προϊόντα της αντίδρασης υπεβλήθησαν επεξεργασία με το kit Nucleo Spin Gel and PCR clean up της εταιρίας

Macherey-Nagel με σκοπό την απομάκρυνση των εκκινητών της πρώτης αντίδρασης.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση τελικού όγκου 50μl
5x Kapa Taq (Mg free) Reaction Buffer	10 μl
MgCl ₂ (25 mM)	3 μl
dNTPs(10 mM)	1 μl
Forward primer Ex2F (10 μM)	1 μl
Reverse Primer Ex3/4R (10 μM)	1 μl
Kapa Taq Polymerase(5u/μl)	0,5 μl
template cDNA	1,5 μl
dH ₂ O	32 μl

Η αντίδραση της nested PCR πραγματοποιήθηκε για 30 κύκλους με θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών(annealing) τους 58°C.

❖ **Ανίχνευση των variant 15 και variant 16**

Αντιδραστήρια	Αντίδραση τελικού όγκου 50μl
5x Kapa Taq (Mg free) Reaction Buffer	10 μl
MgCl ₂ (25 mM)	3 μl
dNTPs(10 mM)	1 μl
Forward primer Ex1extF (10 μM)	1 μl
Reverse Primer Ex4newR (10 μM)	1 μl
Kapa Taq Polymerase(5u/μl)	0,5 μl
template cDNA	1,5 μl
dH ₂ O	32 μl

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε για 35 κύκλους με θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών (annealing) τους 60,5°C. Τα προϊόντα της αντίδρασης υπεβλήθησαν επεξεργασία με το kit Nucleo Spin Gel and PCR clean up της εταιρίας Macherey-Nagel με σκοπό την απομάκρυνση των εκκινητών της πρώτης αντίδρασης.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση τελικού όγκου 50μl
5x Kapa Taq (Mg free) Reaction Buffer	10 μl

MgCl ₂ (25 mM)	3 μ l
dNTPs(10 mM)	1 μ l
Forward primer Ex2F (10 μ M)	1 μ l
Reverse Primer Ex3/ext4R (10 μ M)	1 μ l
Kapa Taq Polymerase(5u/ μ l)	0,5 μ l
template cDNA	1,5 μ l
dH ₂ O	32 μ l

Η αντίδραση της nested PCR πραγματοποιήθηκε για 30 κύκλους με θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών(annealing) τους 57°C .

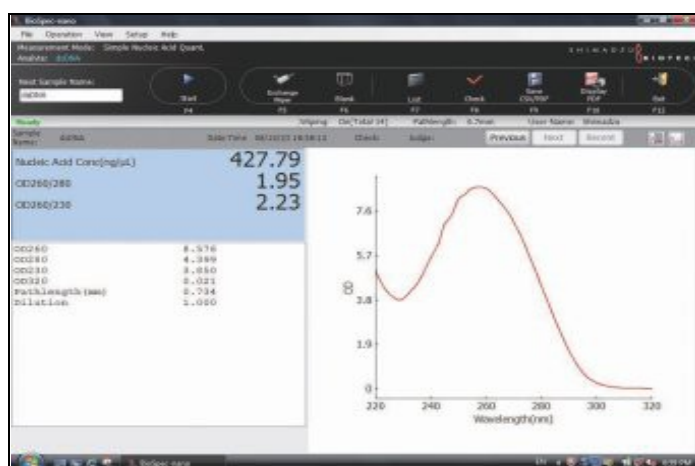
2.2.3.3.Ανάλυση των cDNA των διαφόρων μεταγράφων σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα προϊόντα των αντιδράσεων nested PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης για τον προσδιορισμό των επιθυμητών μεταγράφων. Η σύσταση των πηκτωμάτων αγαρόζης διαφοροποιούνταν ανάλογα το μέγεθος των προσδιοριζόμενων μεταγράφων. Η ηλεκτροφόρηση αγαρόζης πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (παράγραφος 2.1.4) με συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου στο πήκτωμα 10mg/ml. Η προετοιμασία των δειγμάτων πραγματοποιείται με την προσθήκη του κατάλληλου όγκου διαλύματος επιφόρτωσης DNA και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση υπό σταθερή ένταση ρεύματος 100 mA για τον κατάλληλο χρόνο, ανάλογα με το μέγεθος των υπό ανάλυση μορίων. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης τα μόρια DNA γίνονται ορατά με παρατήρηση του πηκτώματος σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

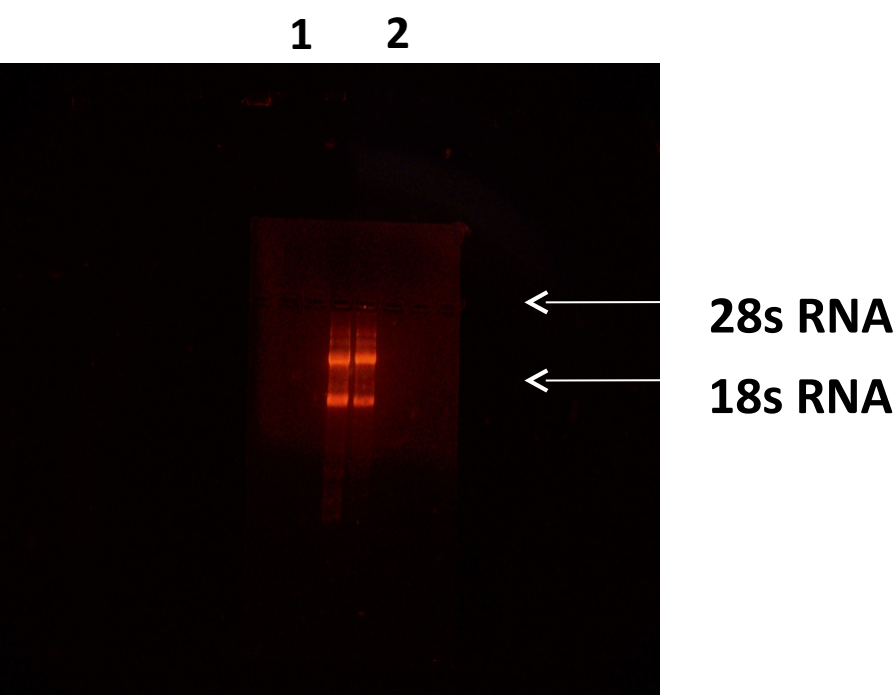
3.1.Απομόνωση ολικού RNA κυττάρων

Καρκινικές κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο όπως παρουσιάστηκε στο κεφάλαιο 2.2.1. και εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε πείραμα απομόνωσης RNA από τις κυτταρικές σειρές αυτές. Το πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.2.2.1 της παρούσας εργασίας. Μετά την απομόνωση ακολουθείται προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA μέσω της φωτομέτρησης στα 260 nm και έλεγχος της καθαρότητας του εξετάζοντας τον λόγο A_{260}/A_{280} . Ενδεικτικά, στην εικόνα 10 απεικονίζεται ένας φωτομετρικός προσδιορισμός συγκέντρωσης με την χρήση του Biospec-nano όπου παρουσιάζεται ο λόγος A_{260}/A_{280} να ισούται με 1,95, τιμή που κυμαίνεται στα αποδεκτά όρια απομόνωσης καθαρού RNA(1,8-2).



Εικόνα 10: Διαγραμματική απεικόνιση φωτομετρικού προσδιορισμού συγκέντρωσης RNA με Biospec nano όργανο, όπου φαίνονται οι μετρήσεις των λόγων καθαρότητας του δείγματος από τυχόν προσμίξεις DNA και πρωτεϊνών.

Επιπλέον, πραγματοποιείται ποιοτικός έλεγχος της απομόνωσης του RNA μέσω ηλεκτροφόρησης των RNA των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% w/v παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου, ώστε να διαπιστωθεί η ακεραιότητα του RNA. Στην εικόνα ηλεκτροφόρησης 11, εμφανίζονται ενδεικτικά 2 δείγματα RNA των κυτταρικών σειρών SH-SY5Y και MDAH-2774 στα οποία εμφανίζονται 2 κύριες ζώνες που αντιστοιχούν στα 28s rRNA και 18s rRNA. Η αναλογία και η ένταση του φθορισμού αποτελεί ένδειξη της καλής απομόνωσης, με την πρώτη ζώνη να είναι εμφανώς εντονότερη της δεύτερης, υποδηλώνοντας την περίπου διπλάσια συγκέντρωση της. Η ζώνη του 5,8s rRNA δεν είναι ορατή, ενώ απουσιάζουν ζώνες μικρότερου και μεγαλύτερου μοριακού βάρους, που θα υποδείκνυαν την αποικοδόμηση του RNA και την ύπαρξη γενωμικού DNA στο δείγμα, αντίστοιχα.



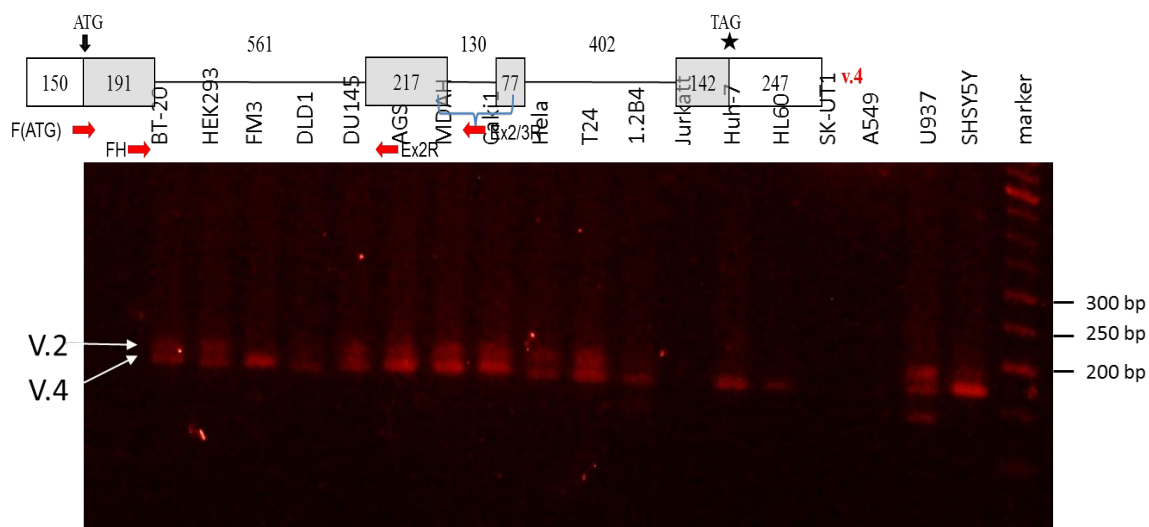
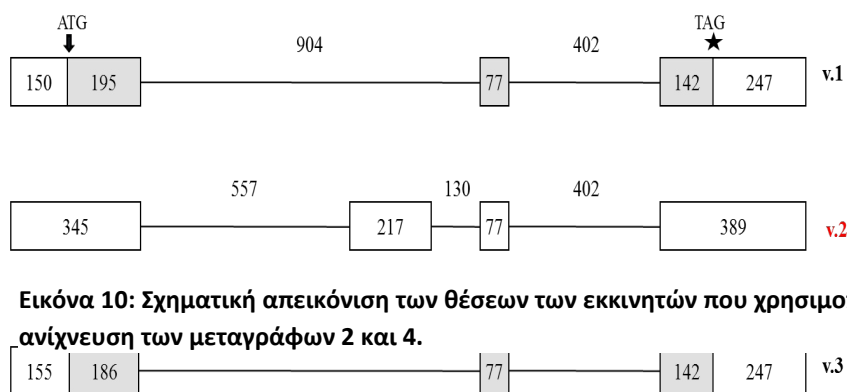
Εικόνα 11: Ενδεικτική ηλεκτροφόρηση RNA δειγμάτων. 1μg RNA που απομονώθηκε από SH-SY5Y (1) και από MDAH-2774 (2) κύτταρα ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5 % w/v .

3.2.Εντοπισμός νέων μεταγράφων της RNase κ σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

Τα δείγματα RNA που απομονώθηκαν από τις 18 κυτταρικές σειρές, αφού υπεβλήθησαν σε αντίστροφη μεταγραφή όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο 2.2.2., ενισχύθηκαν με συμβατική PCR και nested PCR προκειμένου να προσδιοριστεί η ύπαρξη νέων πιθανών μεταγράφων της RNase κ σε αυτά, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που περιγράφηκαν στα κεφάλαια 2.2.3.2 και 2.2.2.3. Έπειτα, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτώματα αγαρόζης διαφορετικής σύστασης κάθε φορά, ανάλογα το μέγεθος των μεταγράφων που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες, καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί στα ξεχωριστά πρωτόκολλα που σχεδιάστηκαν για τον εντοπισμό συγκεκριμένων variants κάθε φορά.

❖ Έκφραση των μεταγράφων 2 και 4 της RNase κ σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

Για τον προσδιορισμό των μεταγράφων 2 και 4, απομονώθηκε RNA από τις 18 κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν και ακολούθησε συμβατική και nested PCR. Τα αναμενόμενα μεγέθη κατά την ηλεκτροφόρηση τους ήταν για το μετάγραφο 2 170 bp και για το μετάγραφο 4 166 bp, μόλις δηλαδή 4 βάσεις διαφορά καθώς η μοναδική τους διαφοροποίηση ήταν η ύπαρξη ενός τετρανουκλεοτιδίου (GTTG) στο μετάγραφο 2, το οποίο απουσιάζει από το μετάγραφο 4. Στην εικόνα 12 παρουσιάζεται η αλληλουχία των τριών μεταγράφων που βρίσκονται καταχωρημένα στην τράπεζα νουκλεοτιδικής αλληλουχίας NCBI καθώς και η αλληλουχία του μεταγράφου 4, με επισημασμένα στο μετάγραφο 4 τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των δύο αυτών μεταγράφων στις 18 καρκινικές κυτταρικές σειρές.



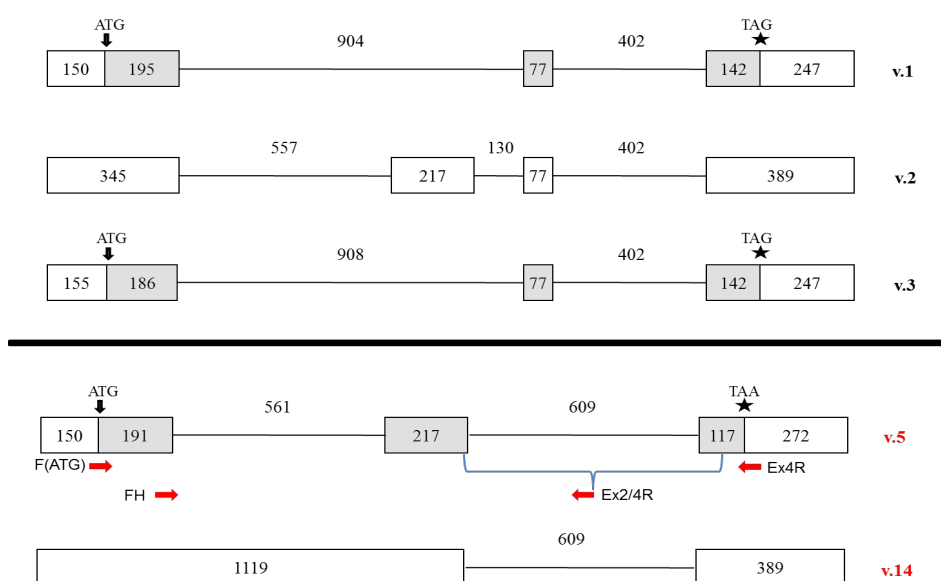
Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση DNA δειγμάτων. 10 μl των προϊόντων της nested PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% w/v για την ανίχνευση των μεταγράφων 2 και 4.

Στη συνέχεια τα προϊόντα της nested PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης για την ανίχνευση της έκφρασής τους. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρουσιάζονται στην εικόνα 13. Στις κυτταρικές σειρές που ελέγχθηκε η έκφραση των συγκεκριμένων variants εντοπίζεται μια ελαφρά διακύμανση ως προς τα πρότυπα έκφρασης. Όπως φαίνεται, παρουσιάζεται σχεδόν καθολική έκφραση του variant 4, με ελάχιστες κυτταρικές σειρές που δεν εντοπίζεται ενώ το variant 2 απουσιάζει από περισσότερες κυτταρικές σειρές. Ειδικότερα, το μετάγραφο 2 απουσιάζει από τις κυτταρικές σειρές FM3(μελάνωμα), DLD-1(αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου), SHSY5Y(νευροβλάστωμα), Huh-7(ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα), HL60(οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία), 1.2B4(κύτταρα παγκρεατικών νησίδων), SK-UT-1B(καρκίνωμα μήτρας),

A549(καρκίνωμα πνεύμονα) και Jurkatt (οξεία Τ κυτταρική λευχαιμία), ενώ από τα τρία τελευταία απουσιάζει και το μετάγραφο 4. Επιπρόσθετα, από μια ημιποσοτική εκτίμηση της έκφρασης αντικατοπτρίζεται ένα παρόμοιο μοτίβο και για τα 2 μεταγράφα χωρίς σημαντικές διαφορές ως προς τα ποσοστά έκφρασης.

❖ Έκφραση των μεταγράφων 5 και 14 της RNase κ σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

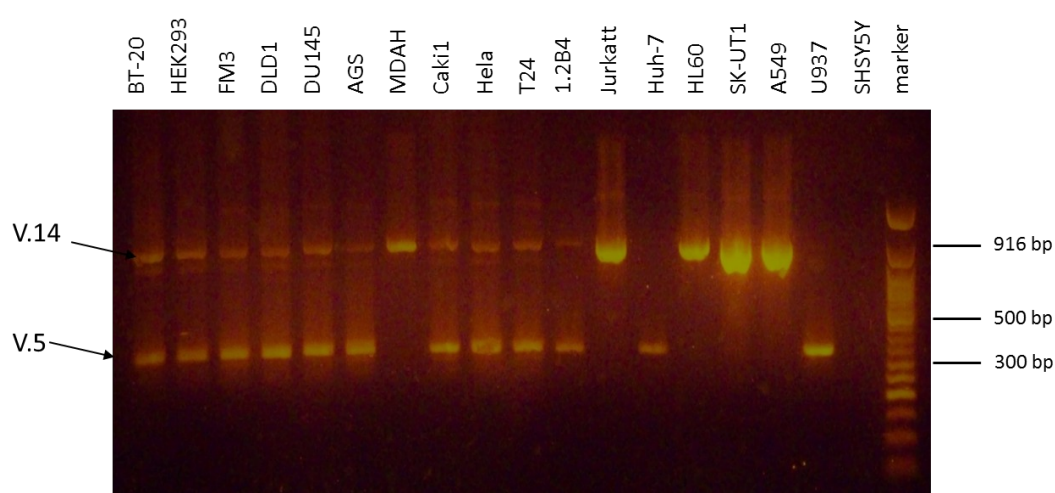
Τα μεταγράφα 5 και 14 μελετήθηκαν στο βιολογικό υλικό των 18 κυτταρικών σειρών και με τα πρωτόκολλα που σχεδιάστηκαν για την κλασική και nested PCR, κατά την ανίχνευση τους, αναμέναμε μεγέθη της τάξης των 332 bp για το μετάγραφο 5 και 893 bp για το μετάγραφο 14. Τα μεγέθη αυτά προκύπτουν από τα ζεύγη εκκινητών που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν κατά τις αντιδράσεις PCR, όπως επισημαίνονται στην εικόνα 14 στο μετάγραφο 5.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση των θέσεων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των μεταγράφων 5 και 14.

Σχετικά με την μελέτη των μεταγράφων 5 και 14, εδώ τα αποτελέσματα παρουσιάζουν μια ενδιαφέρουσα διακύμανση. Όπως φαίνεται και στην εικόνα ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων (εικόνα 15), το μετάγραφο 5 βλέπουμε να μην παρουσιάζει διαφορετικό πρότυπο ποσοτικής έκφρασης σε κάποια κυτταρική

σειρά και να απουσιάζει από τις κυτταρικές σειρές SHSY5Y, MDAH-2774(αδενοκαρκίνωμα ωοθηκών), Jurkatt, A549, SK-UT-1B και HL60. Το μετάγραφο 14 απουσιάζει μόνο από 3 κυτταρικές σειρές- SHSY5Y, Huh-7 και U937- ενώ ενδιαφέρον είναι ότι φέρει έντονη παρουσία σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Ειδικότερα, στις κυτταρικές σειρές Jurkatt (οξεία T κυτταρική λευχαιμία), HL60 (οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία), SK-UT-1B (καρκίνωμα μήτρας), A549 (καρκίνωμα πνεύμονα) βλέπουμε μια έντονη κυτταρική έκφραση, σε αισθητά διαφορετικά πρότυπα σε σχέση με τις άλλες κυτταρικές σειρές.

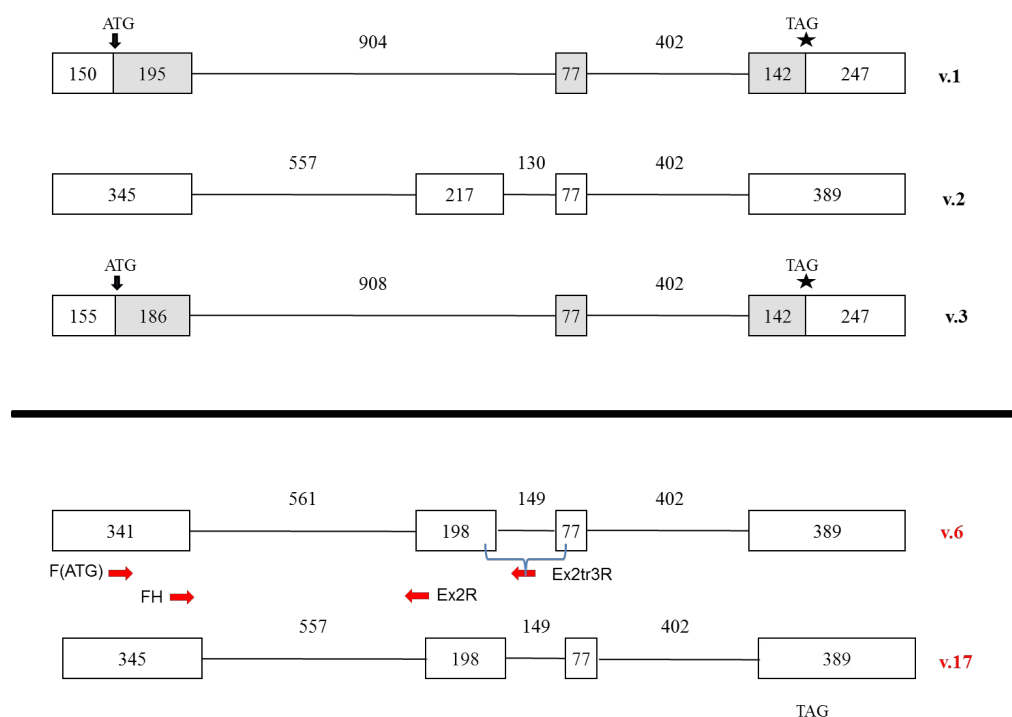


Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση DNA δειγμάτων. 10 μl των προϊόντων της nested PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% w/v για τον προσδιορισμό έκφρασης των variant 5 και 14.

❖ Έκφραση των μεταγράφων 6 και 17 της RNase κ σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

Με τα πρωτόκολλα που παρουσιάστηκαν αναλυτικά στις παραγράφους 2.2.3.1 και 2.2.3.2. μελετήθηκαν και τα μετάγραφα 6 και 17. Τα δύο αυτά μετάγραφα

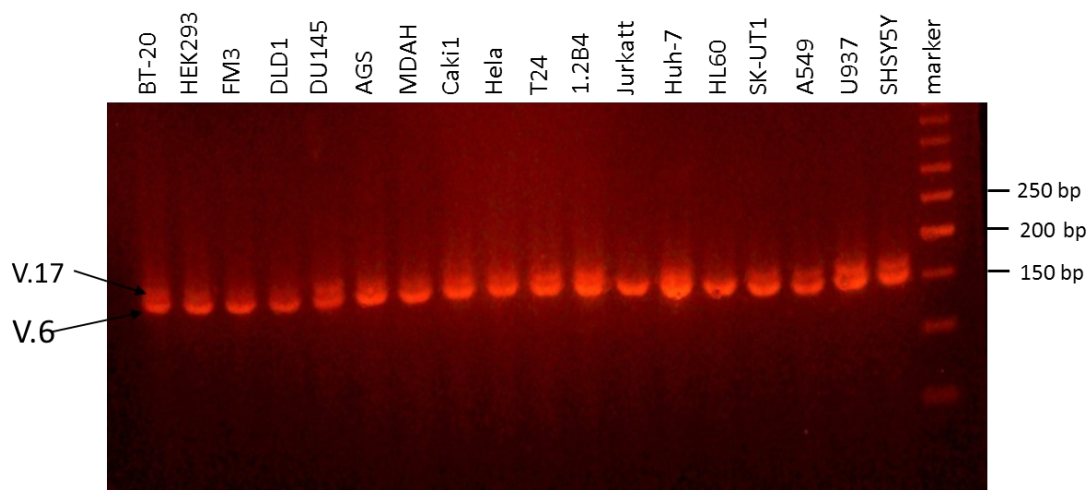
έφεραν σημαντικά ελάχιστες διαφορές μεταξύ τους, με ένα παρόμοιο πρότυπο των μεταγράφων 2 και 4, καθώς και μεταξύ των δύο αυτών η ειδοποιός διαφορά τους έγκειται στην ύπαρξη του τετρανουκλεοτιδίου GTTG στο μετάγραφο 17 και η απουσία του στο μετάγραφο 6. Τα αναμενόμενα μεγέθη κατά την ανίχνευση τους ήταν στα 166 bp για το μετάγραφο 6 και 170 bp για το μετάγραφο 17, σύμφωνα με τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν. Τα μεγέθη, όπως παρατηρούμε, συμπίπτουν με αυτά που προέκυπταν κατά τον προσδιορισμό των μεταγράφων 2 και 4 αλλά με την απουσία ενός τμήματος στο τελικό άκρο του εσωνίου 2, σύμφωνα με την αρίθμηση βασιζόμενη στο μετάγραφο 4 που απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα, καθίσταται εφικτή η ανίχνευση των δύο αυτών μεταγράφων. Τα ζεύγη εκκινητών των αντιδράσεων απεικονίζονται στο μετάγραφο 6, με τα εξωτερικά ζεύγη να αποτελούν τους εκκινητές της κλασικής PCR και τους εσωτερικότερους της nested PCR.



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση των θέσεων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των μεταγράφων 6 και 17.

Τα πρότυπα έκφρασης των μεταγράφων 6 και 17 παρουσιάζονται στην εικόνα 17, αφού ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης για την ανίχνευση τους. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παρουσίασαν μια καθολική έκφραση του

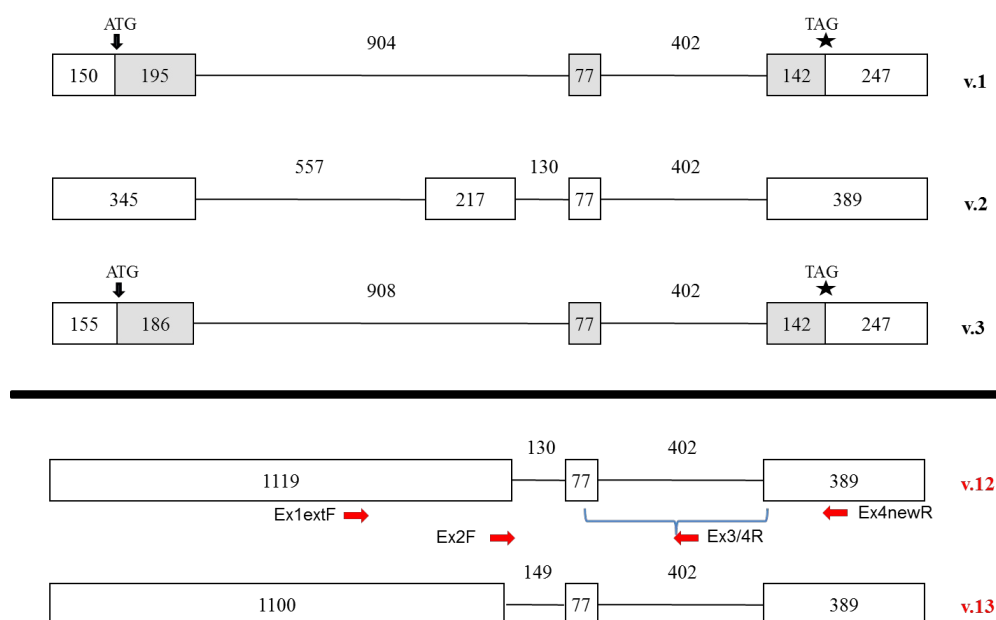
μεταγράφου 6 σε όλες τις κυτταρικές σειρές, ενώ το μετάγραφο 17 φαίνεται να απουσιάζει μόνο από τις κυτταρικές σειρές FM3, Jurkatt και HL60. Το αξιοσημείωτο σχετικά με τα 2 αυτά μετάργραφα είναι πως ο εντοπισμός του μεταγράφου 17 δεν παρουσιάζει κάποια διαφορά στα πρότυπα έκφρασης, σε αυτές τις κυτταρικές σειρές που βρίσκεται, ενώ το μετάγραφο 6 φέρει σημαντική διαφορά στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές HeLa (καρκίνωμα τραχήλου της μήτρας), T24(καρκίνωμα ουροδόχου κύστης), Caki-1(καρκίνωμα νεφρού), Huh7 (ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα), Jurkatt(οξεία T κυτταρική λευχαιμία), HL60(οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία), 1.2B4(κύτταρα παγκρεατικών νησίδων), U937(ιστοκυτταρικό λέμφωμα).



Εικόνα 15: Ηλεκτροφόρηση DNA δειγμάτων. 10 μl προϊόντων της nested PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% w/v για τον προσδιορισμό έκφρασης των variant 6 και 17.

❖ **Έκφραση των μεταγράφων 12 και 13 της RNase κ σε καρκινικές κυτταρικές σειρές**

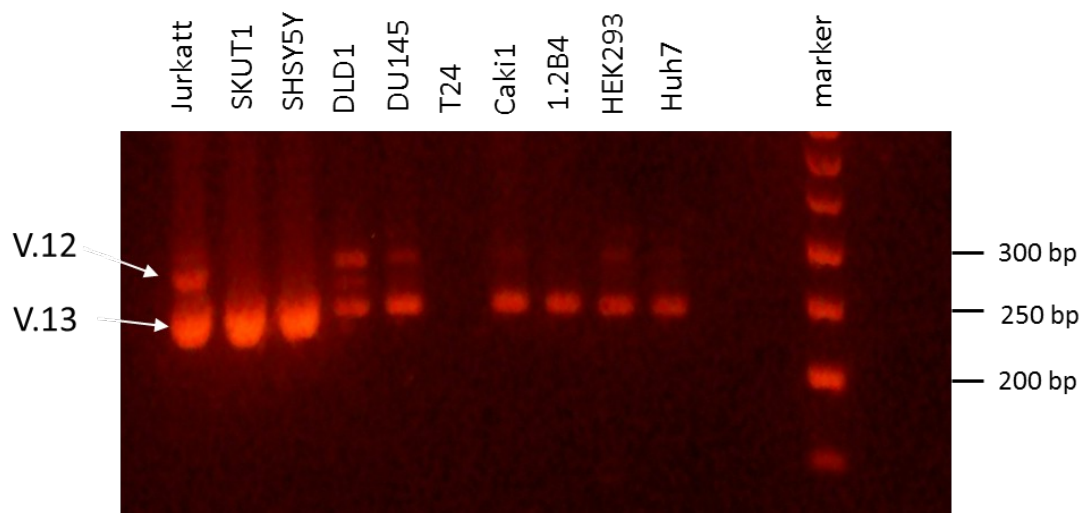
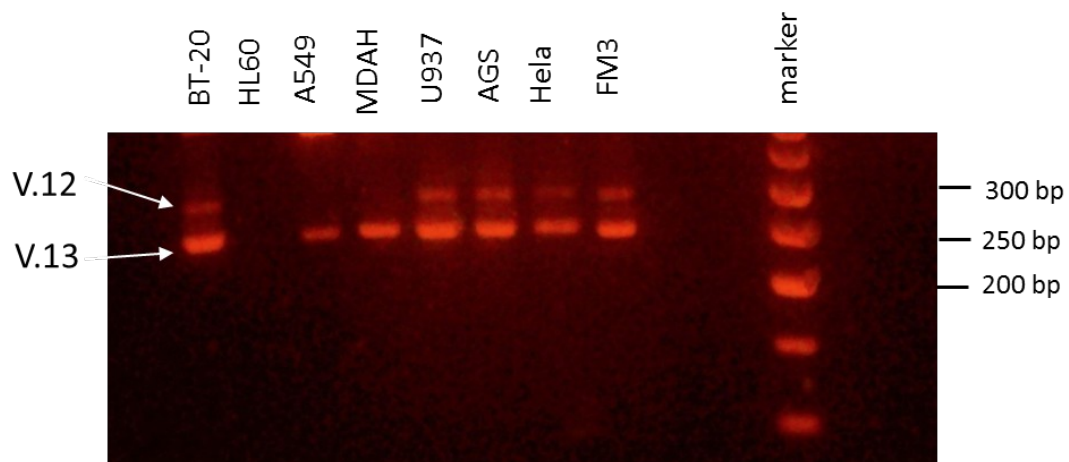
Η ύπαρξη των μεταγράφων 12 και 13 μελετήθηκε στις 18 κυτταρικές σειρές που καλλιεργήθηκαν, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που σχεδιάστηκαν και παρουσιάστηκαν στην ενότητα 2.2.3.2. Από τις θέσεις των εκκινήτων που παρουσιάζονται στην εικόνα 18, το μέγεθος του μεταγράφου 12 αναμενόταν στις 268 bp ενώ το μέγεθος του μεταγράφου 13 στις 249 bp. Τα εξωτερικά ζεύγη εκκινήτων αντιστοιχούν στην συμβατική αντίδραση PCR ενώ τα εσωτερικά απεικονίζουν τους εκκινήτες της nested PCR.



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση των θέσεων των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των μεταγράφων 12 και 13.

Τα μετάγραφα 12 και 13 που μελετήθηκαν συγκριτικά μεταξύ τους εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης και ως προς την εμφάνιση τους αλλά και ως προς την έντονη παρουσία τους. Συγκεκριμένα, το μετάγραφο 12 ελλείπει από τις μισές κυτταρικές σειρές- SHSY5Y, MDAH-2774, T24, Caki-1, Huh-7, 1.2B4, SK-UT-1B, A549 και HL60- ενώ το μετάγραφο 13 εμφανίζεται σε όλες πλην δύο, τις T24 και HL60.

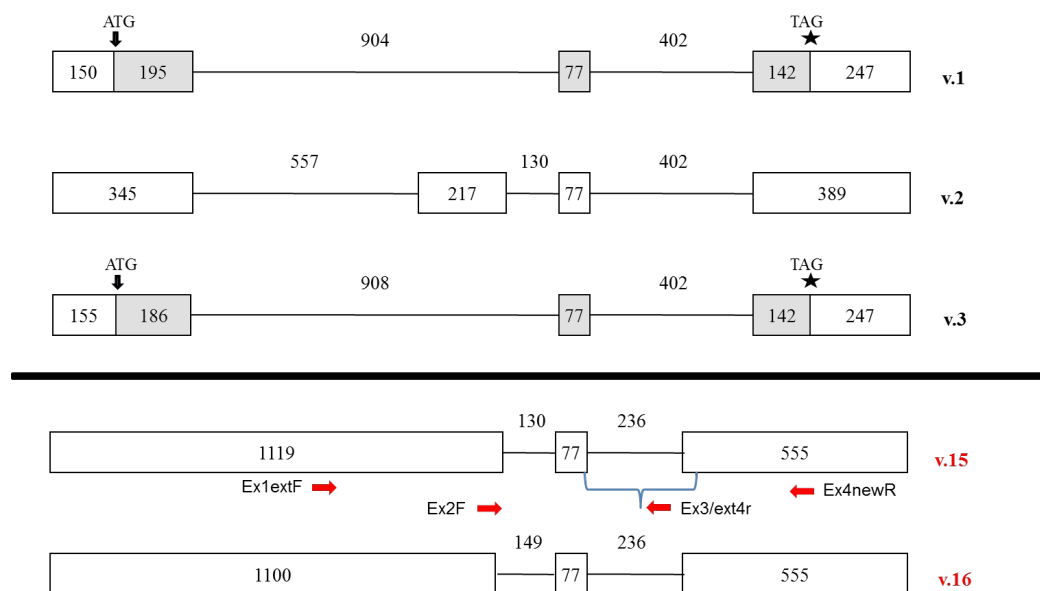
Ακόμα, το μετάγραφο 12 δεν παρουσιάζει κάποια σημαντική ποσοτική ένδειξη στα πρότυπα έκφρασης του, σε αντίθεση με το μετάγραφο 13 που όπως βλέπουμε στην εικόνα εμφανίζεται έντονα στις κυτταρικές σειρές SHSY5Y(νευροβλάστωμα), Jurkatt(οξεία Τ κυτταρική λευχαιμία) και SK-UT-1B(καρκίνωμα μήτρας). Στην παρακάτω εικόνα ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων της nested PCR για τα μετάγραφα 12 και 13 φαίνεται αυτή η έντονη διαφοροποίηση των τριών τελευταίων κυτταρικών σειρών ως προς την έκφραση του μεταγράφου 13.



Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση DNA δειγμάτων. 10 µl προϊόντων nested PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% w/v για τον προσδιορισμό έκφρασης των variant 12 και 13.

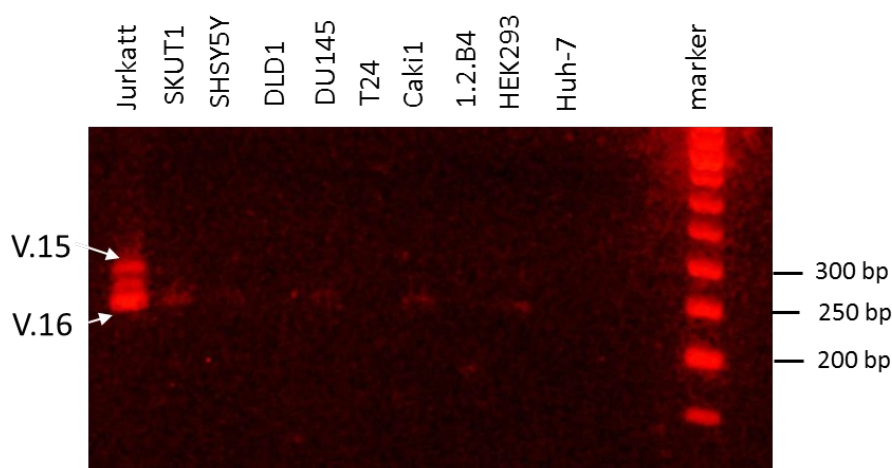
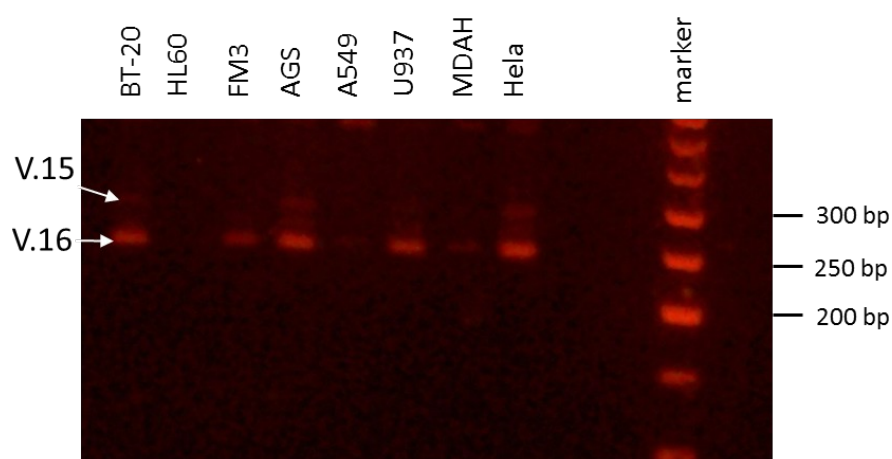
❖ **Έκφραση των μεταγράφων 15 και 16 της RNase κ σε καρκινικές κυτταρικές σειρές**

Με τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην κλασική και nested PCR για τον εντοπισμό των μεταγράφων 15 και 16, όπως παρουσιάζονται στην εικόνα 20, αναμέναμε μεγέθη της τάξης των 268 bp και 249 bp αντίστοιχα για το κάθε μετάγραφο. Το πρώτο ζεύγος εκκινητών της συμβατικής PCR είναι επισημασμένο στο μετάγραφο 15 ενώ το δεύτερο ζεύγος της nested PCR εμφανίζεται χαμηλότερα και εσωτερικότερα του πρώτου.



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση των θέσεων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των μεταγράφων 15 και 16.

Εν συνεχεία, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης για τον εντοπισμό τους στις καρκινικές κυτταρικές σειρές (εικόνα 21) και τα αποτελέσματα αυτών είναι ιδιαίτερα ενδιαφέροντα με τα μετάγραφα 15 και 16 να εμφανίζουν και αυτά αισθητές διαφορές μεταξύ τους. Μάλιστα, το μετάγραφο 15 από τις 18 κυτταρικές σειρές που ελέγχθηκαν παρουσίασε έκφραση μόνο σε τέσσερις κυτταρικές σειρές, τις BT-20 (αδενοκαρκίνωμα μαστού), Hela, AGS(γαστρικό αδενοκαρκίνωμα) και Jurkatt, στην τελευταία μάλιστα με ιδιαίτερα έντονη παρουσία. Αντιθέτως, το μετάγραφο 16 εμφάνισε συχνότερη έκφραση με απουσία στις κυτταρικές σειρές DLD-1, SHSY5Y, T24, Huh-7, 1.2B4 και HL60, χωρίς κάποια αξιοσημείωτη διακύμανση ως προς τα ποσοτικά πρότυπα έκφρασης.



Εικόνα 19: Ηλεκτροφόρηση DNA δειγμάτων.10 µl προϊόντων nested PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% w/v για τον προσδιορισμό έκφρασης των variant 15 και 16.

3.3.Συγκριτική παρουσίαση προτύπων έκφρασης των νέων μεταγράφων της RNase κ σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

Τα αποτελέσματα μελέτης των νέων αυτών μεταγράφων στις 18 συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές παρουσίαζαν μια ενδιαφέρουσα διακύμανση, τόσο ως προς την παρουσία τους σε διάφορους τύπους καρκίνων όσο και ως προς την ημιποσοτική τους έκφραση σε αυτούς. Ο παρακάτω συγκεντρωτικός πίνακας συνοψίζει την παρουσία των μεταγράφων και την ημιποσοτική τους εκτίμηση, με το σύμβολο (+) να υποδηλώνει την έκφραση τους ενώ η εμφάνιση περισσότερων του ενός συμβόλου να δηλώνει την έντονη έκφραση τους σε αυτές τις κυτταρικές σειρές.

Cell lines	V2	V4	V5	V6	V12	V13	V14	V15	V16	V17
BT-20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HEK-293	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
FM3	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
DLD-1	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
DU145	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Hela	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+
AGS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SHSY5Y	-	+	-	+	-	+++	-	-	-	+
MDAH-2774	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
T24	+	+	+	++	-	-	+	-	-	+
Caki-1	+	+	+	++	-	+	+	-	+	+
Huh-7	-	+	+	++	-	+	-	-	-	+
Jurkatt	-	-	-	++	+	+++	++	++	+	-
1.2.B4	-	+	+	++	-	+	+	-	-	+
SK-UT-1B	-	-	-	+	-	+++	+++	-	+	+
U937	+	+	+	++	+	+	-	-	+	+
A549	-	-	-	+	-	+	+++	-	+	+
HL60	-	+	-	+	-	-	++	-	-	-

Εικόνα 20:Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων έκφρασης των νέων μεταγράφων της RNase σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Παρατηρώντας τον παραπάνω πίνακα, βλέπουμε μια ποικιλομορφία ως προς την εμφάνιση και τα πρότυπα έκφρασης των νέων αυτών μεταγράφων της RNase kappa. Εντοπίζονται μετάγραφα όπου η έκφραση τους είναι σχεδόν καθολική και στις 18 κυτταρικές σειρές που ελέγχθηκαν, όπως τα variant 4 και 17, χωρίς να εμφανίζουν αξιοσημείωτη έκφραση σε αυτές ενώ ταυτόχρονα υπάρχουν μετάγραφα όπως το variant 15 που εμφανίζεται σε ελάχιστες από αυτές τις κυτταρικές σειρές και άλλα όπως το variant 13 που εντοπίζεται σε ορισμένες κυτταρικές σειρές με σημαντικά ποσοτικά ποσοστά έκφρασης. Αυτή η ετερογένεια, με περαιτέρω μελέτη, μπορεί να οδηγήσει σε αξιοσημείωτα αποτελέσματα τόσο για τα πρότυπα έκφρασης και την συχνότητα εμφάνισης τους σε διαφορετικούς τύπους καρκίνων όσο και για τα ποσοστά έκφρασης συγκεκριμένων μεταγράφων σε αυτούς.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το εναλλακτικό μάτισμα αποτελεί έναν κύριο μοριακό μηχανισμό για την επέκταση της λειτουργικής ποικιλότητας του ευκαρυωτικού πρωτεώματος και ταυτόχρονα την αιτία της πολυπλοκότητας των γονιδιωμάτων των θηλαστικών. Σύμφωνα με αυτήν την διαδικασία, από ένα και μόνο πρόδρομο μετάγραφο, αφού υποστεί εναλλακτική επεξεργασία, μπορούν να προκύψουν πολλά, ώριμα μεταγράφα που με την σειρά τους να οδηγήσουν σε ισομορφές πρωτεϊνών με διαφορετικές δομικές και λειτουργικές ιδιότητες. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε ποικίλες κυτταρικές και αναπτυξιακές διαδικασίες όπως είναι η κυτταρική ρύθμιση, η κυτταρική διέγερση, ο καθορισμός του φύλου, η απόπτωση και άλλες πολλές. Επομένως, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός πως οποιαδήποτε αποδιοργάνωση του εναλλακτικού ματίσματος μπορεί να οδηγήσει σε κληρονομικές και επίκτητες ανθρώπινες γενετικές διαταραχές [69]. Μελέτες τα τελευταία χρόνια έχουν υποδείξει πως μεταλλάξεις στις περιοχές συναρμογής των εσωνίων από τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι συχνά η αιτία που ένα εξώνιο παραλείπεται και περικόπτεται μια πρωτεΐνη ακριβώς όπως στις κλασικές ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις. Επίσης, πολλές μελέτες κατά την διάρκεια των τελευταίων 20 ετών σχετικά με τον καρκίνο και το εναλλακτικό μάτισμα αφορούν την παραγωγή εναλλακτικών μεταγράφων που δίνουν μεταλλαγμένες πρωτεΐνες, περιλαμβάνοντας παράγοντες της μεταγραφής, μετατροπείς σημάτων των κυττάρων αλλά και συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας.

Επομένως, το εναλλακτικό μάτισμα με τις πρωτεΐνες που παράγει μπορεί να προκαλέσει ή να προωθήσει την καρκινογένεση, κάτι που είναι γνωστό πολλά έτη τώρα. Πέρα αυτού του ρόλου του, δηλαδή την συμμετοχή του σε καρκινογενείς καταστάσεις, την σημερινή εποχή μελέτες γίνονται για την μετατροπή του σε ένα εργαλείο της Μοριακής Διαγνωστικής. Οι επιστήμονες επικεντρώνονται πλέον στην ανακάλυψη παρουσίας εναλλακτικών μεταγράφων σε επίπεδο mRNA σε διάφορους τύπους καρκίνου, μεταγράφα ειδικά για κάθε καρκίνο που θα μπορούσαν να αποτελέσουν υποψήφιους καρκινικούς δείκτες. Στο πλαίσιο αυτό, έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες που όντως πιστοποιούν την ύπαρξη συγκεκριμένων μεταγράφων τα οποία εκφράζονται ή υπερεκφράζονται μόνο κάτω από καρκινικές καταστάσεις. Ένα ενδεικτικό παράδειγμα αποτελεί το εναλλακτικό μάτισμα της διαμεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης CD44. Η πρωτεΐνη CD44 φυσιολογικά αποτελεί

ένα υποδοχέα που επιτελεί ποικίλες λειτουργίες στο κύτταρο, όπως η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, παρουσίαση χυμοκινών, μεταβίβαση σημάτων αύξησης, ενδοκυτταρική διάσπαση του υαλουρονικού οξέος, μεταβίβαση σημάτων που αφορούν την απόπτωση και γενικότερα είναι ιδιαίτερα σημαντική για την κυτταρική λειτουργία [70]. Το CD44 γονίδιο έχειδειχθεί πως ο ελάχιστος αριθμός εναλλακτικών μεταγράφων που παράγει είναι γύρω στα 20 μετάγραφα, τα οποία εμπλέκονται ισχυρά σε καρκινογενείς καταστάσεις. Ειδικότερα, στον καρκίνο του μαστού έχει αποδειχθεί πως, ενώ σε φυσιολογικές καταστάσεις ο μαστικός ιστός φέρει την CD44 μορφή (CD44E) και σε ελάχιστη ποσότητα άλλες εναλλακτικές μορφές του (CD44s), υπάρχει υπερέκφραση του CD44E και των άλλων μορφών του (CD44s) αλλά και ύπαρξη νέων μεταγράφων του CD44, που δεν εμφανίζονται σε φυσιολογικές καταστάσεις [71]. Η συσχέτισή του CD44 δεν αφορά μόνο τον καρκίνο του μαστού. Μελέτες έχουν συνδέσει την υπερέκφραση του μεταγράφου 6 του CD44 με γαστρικό καρκίνο τελικού σταδίου, τα μετάγραφα 7 και 9 υπεκφράζονται στον καρκίνο του προστάτη ενώ το μετάγραφο 5 του CD44 έχει βρεθεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταστατική συμπεριφορά του οστεοσαρκώματος. Η συχνότητα εμφάνισης και η ποσότητα εμφάνισης αυτών των μεταγράφων θα μπορούσε να αποτελέσει ένα διαγνωστικό εργαλείο για τον κάθε καρκινικό τύπο που επηρεάζει το καθένα, από την πρόωρη πρόγνωση έως και την παρακολούθηση της μετάστασης των καρκίνων. Παρ' όλα αυτά, λόγω πληθώρας δεδομένων που προέρχονται από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες και φέρουν αντικρουόμενα αποτελέσματα-πιθανότατα λόγω εφαρμογής διαφορετικών μεθοδολογιών- τα εναλλακτικά μετάγραφα του CD44 δεν έχουν εφαρμοστεί σαν καρκινικοί δείκτες, αν και αποτελούν το καλύτερο παράδειγμα συσχέτισης εναλλακτικών μεταγράφων και καρκίνου.

Άλλη μια οικογένεια πρωτεϊνών που συμβάλλει στην προσπάθεια αυτή είναι η οικογένεια των καλλικρεϊνών. Η καλλικρεΐνη 3 παράγεται και εκκρίνεται από τον προστάτη αλλά εντοπίζεται στον μαστικό ιστό, στο μαστικό γάλα και τον ορό των γυναικών [72]. Το Prostate-specific antigen (PSA) αποτελεί προϊόν της ανθρώπινης καλλικρεΐνης 3 και αποτελεί τον καλύτερο χαρακτηρισμένο καρκινικό δείκτη του προστάτη μέχρι σήμερα. Η καλλικρεΐνη 3 είναι μέλος μιας οικογένειας τουλάχιστον 15 γονιδίων, πολλά από τα οποία υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα και

συσχετίζονται με διάφορους τύπους καρκίνων[73]. Ειδικότερα, η καλλικρεΐνη 13 εκφράζεται σε φυσιολογικό και καρκινικό ιστό όρχεων. Παρ' όλα αυτά, εμφανίζει 5 εναλλακτικά μετάγραφα τα οποία εκφράζονται όλα μοναδικά στους όρχεις αλλά δεν εκφράζονται στον καρκίνο των όρχεων. Επιπρόσθετα, ένα εναλλακτικό μετάγραφο της καλλικρεΐνης 5 και ένα της καλλικρεΐνης 7 έχουν βρεθεί να υπερεκφράζονται σε καρκινώματα ωοθηκών, αλλά να απουσιάζουν πλήρως από το φυσιολογικό επιθήλιο των ωοθηκών[74]. Τέλος, η καλλικρεΐνη 11 φέρει 2 εναλλακτικές ισομορφές, γνωστές σαν τύπου προστάτη και τύπου εγκεφάλου ανάλογα την περιοχή της έκφρασης τους. Η χαμηλή έκφραση του τύπου προστάτη της καλλικρεΐνης 11 έχει συσχετιστεί με υψηλό στάδιο καρκίνου και την μετάσταση.

Τα παραδείγματα συσχέτισης εναλλακτικών μεταγράφων και καρκίνου είναι άφθονα και είναι πλέον πλήρως αποδεκτή η σχέση τους. Οι μελέτες σήμερα κινούνται σε ακόμα βαθύτερο επίπεδο σχετικά με αυτή την σχέση. Πλέον μιλάμε για cancer-specific alternative splicing, όπου το πρότυπο ματίσματος κάθε φορά δημιουργεί ένα μοτίβο για την έκφραση συγκεκριμένων μεταγράφων σε συγκεκριμένους καρκινικούς τύπους. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη φιβρονεκτίνη [75]. Φυσιολογικά είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό, στην κινητικότητα, στη μορφογένεση και στην προσκόλληση των κυττάρων. Είναι γνωστό πως φέρει 3 εξώνια που υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα. Το εξώνιο EDB διατηρείται επιλεκτικά στον καρκίνο του πνεύμονα[76] ενώ το εξώνιο EDA διατηρείται επιλεκτικά στον καρκίνο του ήπατος. Ακόμα, εμφανίζεται επιλεκτική απόκλιση του EDB εξωνίου στον καρκίνο του παχέος εντέρου[77]. Οι περιοχές EDB και EDA στους ανθρώπινους ενήλικες ιστούς αποκλείονται κανονικά, με εξαίρεση στον ιστό των ωοθηκών.

Μέσα σε αυτά τα πλαίσια, επομένως, κινηθήκαμε σε αυτή τη διπλωματική εργασία για την περαιτέρω διερεύνηση νέων πιθανών μεταγράφων της RNase κ που ελήφθησαν με την τεχνολογία του NGS. Σκοπός μας ήταν η πιστοποίηση της ύπαρξης των νέων αυτών μεταγράφων καθώς και η μελέτη της συχνότητας εμφάνισης και έκφρασης τους σε διάφορους τύπους καρκίνων. Για τον λόγο αυτό καλλιεργήθηκαν 18 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές που αντιστοιχούσαν σε 18 καρκινικούς ιστούς. Τα αποτελέσματα πράγματι πιστοποίησαν την ύπαρξη αυτών των μεταγράφων στους καρκινικούς ιστούς που ελέγχθηκαν, με μερικά από

αυτά να παρουσιάζουν ενδιαφέροντα πρότυπα έκφρασης και συχνότητας εμφάνισης. Ειδικότερα, τα μετάγραφα 2 και 4 παρουσίασαν μια σχεδόν καθολική έκφραση και στους 18 τύπους καρκίνων που αναλύθηκαν, χωρίς να εμφανίζουν κάποια διακύμανση ως προς τα ποσοστά έκφρασης τους. Σε αντίθεση, τα μετάγραφα 5 και 14 έφεραν μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα ποικιλομορφία και ως προς την εμφάνιση τους στους διάφορους καρκινικούς τύπους αλλά και ως προς τα ποσοστά έκφρασης. Το μετάγραφο 14 εμφάνισε έντονη παρουσία στις καρκινικές κυτταρικές σειρές Jurkatt(οξεία T κυτταρική λευχαιμία), HL-60(οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία), SK-UT-1B(καρκίνωμα μήτρας) και A549(καρκίνωμα πνεύμονα) ενώ ταυτόχρονα το μετάγραφο 5 απουσίαζε από όλες τις εν λόγω κυτταρικές σειρές. Ως προς τα μετάγραφα 6 και 17, η συχνότητα εμφάνισης ήταν παρόμοια καθώς το μετάγραφο 6 εμφανιζόταν σε όλες τις κυτταρικές σειρές ενώ το μετάγραφο 17 απουσίαζε μόνο από τις κυτταρικές σειρές FM3(μελάνωμα), Jurkatt και HL-60. Η ημιποσοτική εκτίμηση της έκφρασης αυτών των δύο μεταγράφων υποδήλωνε μια εντονότερη παρουσία του μεταγράφου 6 στις κυτταρικές σειρές Hela(καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας), T24(καρκίνωμα ουροδόχου κύστης), Caki-1(καρκίνωμα νεφρού), Huh-7(ηπατοκυτταρικός καρκίνος), Jurkatt, 1.2B4(καρκίνος παγκρεατικών νησίδων) και U937(ιστοκυτταρικό λέμφωμα), ενώ το μετάγραφο 17 παρουσίαζε μια ομοιόμορφη κατανομή έκφρασης σε όλους τους καρκινικούς τύπους. Η ανίχνευση των μεταγράφων 12 και 13, παρότι εμφάνιζε ένα ενδιαφέρον μοτίβο ως προς την συχνότητα παρουσίας μεταξύ αυτών των δύο, πιο έντονα διαφοροποιούνταν ως προς την έκφραση τους, με το μετάγραφο 13 να εντοπίζεται στις κυτταρικές σειρές SH-SY5Y(νευροβλάστωμα), Jurkatt και SK-UT-1 σε έντονη έκφραση, αισθητά πιο σημαντική από τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές. Τέλος, τα αποτελέσματα της διερεύνησης των μεταγράφων 15 και 16 έδειξαν έντονη διαφοροποίηση αυτών των δύο μεταγράφων μεταξύ τους ως προς την εμφάνιση τους καθώς το μετάγραφο 16 εμφανιζόταν σχεδόν σε όλες τις κυτταρικές σειρές, ενώ το μετάγραφο 15 απουσίαζε σχεδόν σε όλες τις κυτταρικές σειρές πλην των BT-20(αδενοκαρκίνωμα μαστού), Hela, AGS(γαστρικό αδενοκαρκίνωμα) και Jurkatt, μάλιστα στην τελευταία σε σχετικά αρκετή ποσότητα.

Τα αποτελέσματα αυτά, με την παρουσία ορισμένων εναλλακτικών μεταγράφων σε σημαντικές ποσότητες σε ορισμένους καρκινικούς τύπους, στοιχειοθετούν την

παραιτέρω μελέτη τους για την άμεση συσχέτιση τους με αυτούς τους καρκινικούς τύπους. Θα μπορούσαν να αποτελέσουν αντικείμενο μελέτης και έρευνας, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στο πεδίο της Μοριακής Διαγνωστικής, σαν καρκινικοί βιοδείκτες. Για τον σκοπό αυτό, καθίσταται αναγκαία η λεπτομερής ανάλυση του καθενός μεταγράφου που εντοπίζεται σε έναν συγκεκριμένο καρκινικό τύπο, η μελέτη των προτύπων έκφρασης αυτού στον αντίστοιχο φυσιολογικό ιστό και η συσχέτιση του με καρκινικές σειρές του ίδιου ιστού. Γενικότερα, μια μελλοντική διαλεύκανση του ρόλου αυτών των μεταγράφων θα μπορούσε να αποτελέσει μια πολλά υποσχόμενη εξακρίβωση της συμβολής τους σε διάφορους τύπους καρκινωμάτων με αντίκτυπο στην κλινική διαγνωστική.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gilbert W. and De Souza, 1999: Introns and the RNA world, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 221-232.
2. Joyce G.F., 2002, The antiquity of RNA-based evolution, *Nature*, 418(6894):214-21.
3. Doudna J.A., Rath V.L., 2002, Structure and Function of the eukaryotic ribosome: the next frontier, *Cell*, Vol.109(2):153-156.
4. Joyce G.F., Evolution in an RNA World, 2009, Cold Spring Harb Symp Quant Biol., 74: 17-23.
5. Atkins J.F., Gesteland R.F., Cech T., 2011, RNA worlds: from life's origins to diversity in gene regulation, Cold Spring Harbor Lab Press.
6. Lee C. Rosalind, Feinbaum L. Rihonda and Ambros Victor, 1993, The *C. elegans* Heterochronic Gene line-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to line-4, *Cell*, 843-854.
7. Lagos – Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tusch T., 2001, Identification of novel genes coding for small expressed RNAs, *Science*, 294(5543) :853-8.
8. Berezikov E., Chung W.J., Willis J., Cuppen E., Li E.C., 2007, Mammalian mirtron gene, *Mol Cell*, 328-336.
9. Valencia Sanchez, Lin J., Hannon G.J., Parker R., 2006, Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs, *Nat Lab Med*, 1:20(5), 515-24.
10. Iorio M.V. and Croce C.M., 2012, MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostic, monitoring and therapeutics, A comprehensive review, *EMBO Mol Med*, 4(3):143-59.
11. Kawamura K., 2012, Drawbacks of the ancient RNA-based life-like system under primitive earth conditions, *Biochimie*, 94(7):1441-50.
12. Ghildiyil M, Zamore PD., 2009, Small silencing RNAs: an expanding universe, *Nat Rev Genet* 10(2):94-108.
13. Grivna S.T., Beyret E., Wang Z., Lin H., 2006, A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells, *Genes Dev*, 20:1709-1714.
14. Siomi M.C., Sato K., Pezic D., Aravin A.A., 2011, PIWI-interacting small RNAs the vanguard of genome defense, *Nat Rev Mol Cel Biol*, 12:246-258.

15. Khalili A.M., Guttman M. et al., 2009, Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression, *Proc Nat Acad Sci USA*, 14:106(28)11667-72.
16. M. Mallardo, P. Poltronieri, 2008, Non-protein coding RNA biomarkers and differential expression in cancers: a review, *Journal of Experiments and Clinical Cancer Research*, 27:19.
17. Mandal M., Breaker R.P., 2004, Gene Regulation by riboswitches, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 451-463.
18. Blount K.F., Breaker RR., 2006, Riboswitches as antibacterial drug targets, *Nat Biotechnol*, 24(12):1558-64.
19. Nicholson A.W., 2006, Function, mechanisms and regulation of bacterial ribonucleases, *FEMS Microbiol Rev* 23:371-390.
20. Koczera Patrick, Lucas Martin, Gernot Marx and Tobias Schueholz, 2016, The ribonuclease A superfamily in humans: Canonical RNases as the Buttress of Innate Immunity, *Int J Mol Sci*, 17:1278.
21. Lomax Jo Ellen, 2014, Ribonucleases and Ribonuclease Inhibitors: Structure, Function and Evolution, 319.
22. Reznik K.B., Lykke –Anded J., 2010, Regulated and quality-control mRNA turnover pathways in eukaryotes, *Biochem Trans*, 38:1506-1511.
23. O.M.G. Stoecklin, 2013, “RNA decay mechanisms: Specificity through diversity”, *Biochem Biophys Acta*, 4:3.
24. Schweingruber C., Rufener SC, Zund D., Yamashita A., Mublemann O., 2013, Nonsense- mediated mRNA decay-mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells, *Biochim Biophys Acta* 612-623.
25. Mullen TE., Marzluff WF., 2008, Degradation of histone mRNA requires oligouridylation followed by decapping and simultaneous degradation of the mRNA both 5' to 3' and 3' to 5', *Genes Dev* 22:50-65.
26. Li M.W., Barnes T. and Lee C.H., 2010, Endoribonucleases- enzymes gaining spotlight in mRNA metabolism, *FEBS Journal* 277, 627-641.

27. Zuo Y.X. AND Deutscher M.P., 2011, Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution, *Nucleic Acids Research* 29(5), 1017-1026.
28. Blackburn P., Jaikhan B.L., 1979, *J Biol Chem* 254, 12488-12493.
29. Lomax Jo Ellen, 2014, *Ribonucleases and Ribonuclease Inhibitors: Structure, Function and Evolution*, 319.
30. Takahashi Y., Mase K., Suzuki Y., 1970, *J Neurochem* 17 1433-1440.
31. Houseley J., Tollervey D., 2009, The many pathways of RNA degradation, *Cell*, 136:763-776.
32. Yohong Zuo and Murray Deutscher, 2001, Exoribonucleases surepfamily: structural analysis and phylogenetic distribution, *Nuc Acids Res* 1017-1026.
33. Robinson R. Sophie, Antony W. Oliver, Timothy J. Chevassut and Sarah F. Newbury, 2015, The 3' to 5' exoribonuclease DIS3 from structure and mechanisms to biological Functions and Role in Human Disease, *Biomolecules*, 5(3)1515-1539.
34. Li M.W., Barnes t. and Lee C.H. (2010) Endoribonucleases- enzymes gaining spotlight in mRNA metabolism, *FEBS Journal* 277, 627-641.
35. Sorrentino S., 2011, The eight human canonical ribonucleases: Molecular diversity, catalytic properties and special biological actions of the enzyme proteins, *FEBS, Lett* 584:2194-2200.
36. Deutscher M.P., 1990, Ribonucleases , tRNA nucleitidyltransferase, and the 3' processing of tRNA *Prog Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 39, 209-240.
37. Sideris DC, Fragoulis EG., 1987, Purification and characterization of a ribonuclease specific for poly(U) and poly(C) from the larvae of *Ceratitis capitata*, *Eur J Biochem* 164:309-315.
38. Economopoulou MA.,Fragoulis EG., Sideris DC., 2007, Molecular cloning and characterization of the human RNase kappa, an ortholog of Cc RNase, *Nucleic Acids Res* 35:6389-6398.
39. Rampias TN., Sideris DC., Fragoulis EG., 2003, Cc RNase : The *Ceratitis capitata* ortholog of a novel highly conserved protein family in metazoas, *Nucleic Acids Res* 31:3092-3100.

40. Rampias TN., Fragoulis EG., Sideris DC., 2008, Genomic structure and expression analysis of the RNase kappa family ortholog gene in the insect *Ceratitis capitata*, FEBS J 275:6217-6227.
41. Kiritsi MN, Fragoulis EG, Sideris DC., 2012, Essential cysteine residues for human RNase κ catalytic activity, FEBS J 279:1318-1326.
42. Karousis ED. And Sideris DC., 2014, A Subtle Alternative Splicing Event Gives Rise to A Widely Expressed Human RNase κ isoform, PLoS One.
43. Gkratsou AS, Fragoulis EG, Sideris DC, 2013, The effect of cytostatic Drugs on the mRNA Expression levels of Ribonuclease κ in breast and ovarian cancer cell lines , Anticancer Agents Med Chem.
44. Περεντέ Γεωργία, 2016, Μελέτη της επίδρασης αντικαρκινικών φαρμάκων στα επίπεδα έκφρασης των ισομορφών της ανθρώπινης RNase κ , Διπλωματική Εργασία για την Απόκτηση του Τίτλου Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης.
45. Brent A. Hackett et al., 2015, RNASE K is required for internalization of diverse acid-dependent viruses, PNAS, Vol 112, 25:7797-7802.
46. Jill M. Perreira et al., 2015, RNASE K is a V-ATPase-Associated Factor required for endocytosis and the Replication of Rhinovirus, Influenza A Virus and Dengue Virus, Cell Reports, 12(5):850-63.
47. Stetefeld Jorg and Ruegg A. Markus, 2010, Structural and Functional diversity generated by alternative mRNA splicing, Bioch Sci, Vol.30, 9:515-521.
48. Matlin AJ., Clark F., Smith CW., 2005, Understanding alternative splicing towards a cellular code, Nat Rev Mol Cell Biol 6:386-398.
49. Αναστασιάδου Βαλεντίνη-Χριστίνα, 2010, Συσχέτιση επιγενετικών μηχανισμών και του εναλλακτικού ματίσματος σε γονιδιακές θέσεις που έχουν αναλυθεί από το Human Epigenome Project, Διπλωματική Εργασία για την απόκτηση Τίτλου Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης.
50. Lee Yeon and Rio C. Donald, 2005, Mechanisms and Regulation of alternative Pre-mRNA Splicing, Annu Rev Biochem,291-323.

51. Hoskins AA., Moore MJ., 2012, The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine, *Trends Biochem Sci* 37:179-188.
52. Eddo Kim, Amir Goren and Gill Ast, 2008, Alternative splicing: current perspectives, *Bioessays*, 30:38-47.
53. Chen Mo and Manley L. James, 2009, Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from the molecular and genomics approaches, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(11): 741-754.
54. Stamm S., Ben Aris S., Rafalska I., Tang Y., Zhang Z. et al., 2005, Function of alternative splicing , *Gene* 344:422-430.
55. Dou Y., Fox Walsh KL., Baldi PF., Hertel K., 2006, Genomic splice-site analysis reveals frequent alternative splicing close to the dominant splice site, *RNA* 12:2047-2056.
56. Allan M. Maxam and Walter Gilbert, 1977, A new method for sequencing DNA, *Biochemistry*.
57. Blazej G. Robert, Palani Kumaresan, Richard A. Mathies, 2006, Microfabricated bioprocessor for integrated nanoliter-scale Sanger DNA-sequencing, *Nat Rev Mol Cell Biol* 582-595.
58. Collen T. Harrington, BA; Elaine I. Lin, BA; Matthew T. Olson, MD; James R. Eshleman, MD; 2012, Fundamentals of Pyrosequencing, *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, Vol 137, 9: 1296-1303.
59. Ronaghi M., Uhlen M., Nyren P., 1998, A sequencing method based on real time pyrophosphate, *Science* 363-365.
60. Ronaghi M., 2001, Pyrosequencing Sheds Light On DNA Sequencing, *Genome Res* 11(1):3-11.
61. Frese S. Karren, Hugo A. Katusand and Meder Benjamin, 2013, Next Generation Sequencing from Understanding Biology to Personalised Medicine, *Biology*, 2(1):378-396.
62. Erwin L. et al., 2014, Ten years of next-generation sequencing technology, *Cell*, 418-426.
63. Chonczynski P. and N. Saacchi, 2006, The single- step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty years on, *Nat Protoc*, 1(2):581-585.

64. Alwine JC., Kemp DJ. and Stark GR., 1977, Method for detection of specific RNA in agarose gels by transfer to diazobenzylomethyl-paper and hybridization with DNA-probes, *Proc Nat Acad Sci USA*, 15:11677-82.
65. Barlett JM. And Stirling D., 2003, A short history of the polymerase chain reaction, *Methods Mol. Biol.* 226;3-6.
66. Carr AC. And Moore SD., 2012, Robust quantification of polymerase chain reaction using global fitting, *PLoS One*.
67. Farrell RE., 1998, RNA methodologies, 2nd ed, Academic Press, San Diego, California.
68. Degen Hans-Joachim, Deufel Anette, Eisel Doris et al., 2006, PCR Applicants Manual, Roche Diagnostics, 135-137.
69. Brinkman Brigitta, 2004, Splice variants as cancer biomarkers, *Clinical Biochemistry*,37(7):584-94.
70. Yi O., Tang L., 2011, Alternative spliced variants as biomarkers of colorectal cancer, *Curr Drug Vetab*,12(10):966-74.
71. Rhonda L. Brown, Layren M. Reinke, Marin S. Damerow et al., 2011, CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymatic transition and breast cancer progression, *The journal of Clinical Investigation*, 121(3):1064-1074.
72. Thoresent et al., 2008, Alternative splicing in Colon, Bladder, and Prostate Cancer Identified by Exon Array Analysis, *Molecular and Proteomics* 7:1214-1224.
73. Lisa Kurlender, Carla Borgono et al.,2005, A survey of alternative transcripts of human tissue kallikrein genes, *Biochem Biophys* 1-14.
74. Roscoe Klinck et al., 2008, Multiple alternative splicing markers for ovarian cancer, *Cancer Res* 68(3):657-63.
75. Khan ZA. Et al., 2005, ED-B fibronectin in non-small cell lung carcinomas, *Exp Lung Res*, 31:701-11.
76. Oyama F. et al., 1993, Coordinate oncodevelopment modulation of alternative splicing of fibronectin pre-messenger RNA at ED-A ED-B and CS1 regions in human liver tumours, *Cancer Res* 53 (9), 2005-2011.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Διερεύνηση της έκφρασης νέων μεταγράφων της RNase κ σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

Τα μόρια RNA που συναντάμε στα βιολογικά συστήματα είναι πλέον γνωστό ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε μια πληθώρα κυτταρικών διεργασιών, από το επίπεδο της πρωτεϊνοσύνθεσης μέχρι την γονιδιακή ρύθμιση. Η διατήρηση μιας τέλει ισορροπίας στην σύνθεση και αποικοδόμησή τους, επομένως, καθίστανται απαραίτητη, με τις ριβονουκλεάσες να αποτελούν τον επικρατέστερο τρόπο επιστράτευσης για αυτό τον σκοπό. Μια πρόσφατα χαρακτηρισμένη οικογένεια ριβονουκλεασών, η πρωτεϊνική οικογένεια της RNase κ έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης του εργαστηρίου μας τα τελευταία χρόνια. Η ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ μέχρι τώρα είναι γνωστό πως αντιπροσωπεύεται από 2 ισομορφές του γονιδίου της RNase κ σε επίπεδο mRNA. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με την τεχνολογία Next Generation Sequencing (NGS) ανέδειξαν 17 νέα πιθανά μετάγραφα του γονιδίου της RNase κ σε επίπεδο mRNA σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της έκφρασης των νέων αυτών πιθανών μεταγράφων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και η μελέτη των προτύπων έκφρασης τους. Η διερεύνηση επικεντρώθηκε στη ανίχνευση 10 εξ' αυτών των νέων πιθανών μεταγράφων ανά ζεύγη, των μεταγράφων 2 και 4, των μεταγράφων 5 και 14, των μεταγράφων 6 και 17, των μεταγράφων 12 και 13 και τέλος, των μεταγράφων 15 και 16. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιλάμβανε καλλιέργεια καρκινικών κυτταρικών σειρών από 18 διαφορετικούς ιστούς, απομόνωση ολικού RNA από τα κύτταρα, αντίστροφη μεταγραφή, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και nested PCR. Τελικώς, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης για τον εντοπισμό των νέων μεταγράφων. Τα αποτελέσματα πιστοποίησαν την ύπαρξη αυτών των μεταγράφων στις 18 κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, με ποικίλες διακυμάνσεις στη συχνότητα εμφάνισης τους καθώς και στα πρότυπα έκφρασης τους. Εντοπίστηκαν μετάγραφα όπως τα μετάγραφα 4 και 17 όπου η έκφραση τους ήταν σχεδόν καθολική, χωρίς αξιοσημείωτη έκφραση ενώ ταυτόχρονα υπήρξαν μετάγραφα όπως

το 15 που εμφανίζοταν σε ελάχιστες καρκινικές κυτταρικές σειρές και άλλα όπως το 13 που εντοπίστηκε σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές με σημαντικά ποσοστά έκφρασης. Ως εκ τούτου, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός πως η εμφάνιση εναλλακτικών μεταγράφων πρωτεϊνών σε διάφορους τύπους καρκίνου καθώς και η αυξημένη έκφρασή τους σε αυτούς έχουν αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο στο χώρο της Μοριακής Διαγνωστικής ως καρκινικοί δείκτες, τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να είναι ενδεικτικά για την περαιτέρω συσχέτιση συγκεκριμένων μεταγράφων της RNase κ με συγκεκριμένους καρκινικούς τύπους.

ABSTRACT

Research of the expression of new variants of RNase κ in cancer cell lines

RNA molecules in biology systems are well-known to play a significant role in a variety of cell functions, from protein synthesis to cell regulation. Therefore, the maintenance of a perfect balance between their synthesis and degradation is essential, with ribonucleases playing that part. A recently described family of ribonucleases, the RNase κ family, has been a subject of study for our laboratory for the past few years. The human RNase κ was till now represented by 2 isoforms of the RNase κ gene in mRNA level. Experiments conducted by Next Generation Sequencing (NGS) technology have shown 17 possible new variants of the RNase κ gene in cancer cell lines. The aim of this research project was the research of the expression of these new variants in cancer cell lines and the study of their expression patterns. We focused on 10 out of the 17 new variants, which were studied by pairs, variant 2 and 4, variant 5 and 14, variant 6 and 17, variant 12 and 13 and variant 15 and 16. The protocol which was followed included the culture of cancer cell lines derived from 18 different cancer tissues, RNA extraction, reverse transcription, polymerase chain reaction (PCR) and nested PCR. In order to detect the new variants, we conducted agarose gel electrophoresis. The results verified the existence of these new variants in these cancer cell lines, which were expressed in diverse manner. There were variants such as variant 4 and 17 which were expressed in almost all cell lines whereas they were variants like 15 which was absent in most of all cell lines and other like variant 13 which was expressed in a significant quantity in specific cancer cell lines. Therefore, taking into consideration that the expression of alternative variants of proteins in different cancer types and their levels of expression have been used in Molecular Diagnostics field as cancer biomarkers, these results can be further used for the correlation of specific RNase κ variants with specific cancer types.

