



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

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ mRNA ΤΗΣ
ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΗΣ 3 ΑΠΟ microRNAs ΜΟΡΙΑ**

ΔΡΑΓΟΛΙΑ ΜΕΛΙΝΑ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2018



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

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ mRNA ΤΗΣ
ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΗΣ 3 ΑΠΟ microRNAs ΜΟΡΙΑ**

ΔΡΑΓΟΛΙΑ ΜΕΛΙΝΑ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2018



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ mRNA ΤΗΣ
ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΗΣ 3 ΑΠΟ microRNAs ΜΟΡΙΑ**

ΔΡΑΓΟΛΙΑ ΜΕΛΙΝΑ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Σίδερης Διαμάντης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **Σίδερης Διαμάντης**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
- **Σκορίλας Ανδρέας**, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
- **Βασιλακοπούλου Διδώ**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης με τίτλο ‘‘Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική’’, κατά τη χρονική περίοδο 2015-2018, όπου το πειραματικό μέρος αυτής διεξήχθη στην ερευνητική μονάδα του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Διαμάντη Σίδηρη, στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου, κ. Διαμάντη Σίδηρη, για την ανάθεση της εν λόγω εργασίας, την επιστημονική του καθοδήγηση, καθώς και την μεγάλη προθυμία του να επιλύει οποιουσδήποτε προβληματισμούς μου προέκυπταν καθ’όλη τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών.

Ακολούθως, θα ήθελα να εκφράσω της ευχαριστίες μου στους καθηγητές, κ. Ανδρέα Σκορίλα και κα. Διδώ Βασιλακοπούλου, για την συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή μου και την αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.

Φυσικά, δεν θα μπορούσα να παραλείψω ένα μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη της ερευνητικής μου μονάδας, την υποψήφια διδάκτορα Αθηνά Κλάδη που μου παρείχε τις απαραίτητες κατευθυντήριες γραμμές για την περάτωση των πειραμάτων, καθώς και την υποψήφια διδάκτορα Ιωάννα Κοκκινοπούλου για την πολύτιμη βοήθεια της. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις συναδέλφους μου στο εργαστήριο, Νεκταρία Νταουλά, Χριστίνα Πετροπούλου και Αγγελική Μείντάνη, όπως και την προπτυχιακή φοιτήτρια Αγγελική Μπαλούρη, για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που επικράτησε και την βοήθεια τους.

Εδώ, οφείλω ένα ευχαριστώ και στα μέλη της ερευνητικής ομάδας του κ. Ανδρέα Σκορίλα, τους υποψήφιους διδάκτορες Μάριο Διαμαντόπουλο, Παναγιώτη Αδαμόπουλο και Παναγιώτη Τσιακανίκα, που πολλές φορές χρειάστηκε να με βοηθήσουν σε θέματα τεχνικής φύσεως. Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα τους συμφοιτητές μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα, Ευαγγελία Πετράκη, Χριστίνα Ντάλλα, Κωνσταντίνα Παντιώρα, Κωνσταντίνο Κομιανό και Γιώργο Ράπτη, για την ευχάριστη και χαρούμενη παρέα τους και τις ώρες που περνούσαμε μαζί σε καθημερινή βάση, καθώς και την Βασιλική Γιογλή, για την παρέα της και τις ατέλειωτες ώρες συζητήσεων.

Ωστόσο, πάνω απ' όλους χρωστάω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, τους γονείς μου Ανέστη και Κατερίνα και την αδερφή μου Αρίστη, για την αγάπη τους, τη στήριξη τους και όλα όσα μου έχουν προσφέρει μέχρι στιγμής στη ζωή μου. Τέλος, νιώθω καθημερινά ευγνώμων και για τις αδερφικές μου φίλες, Χριστίνα, Μαρία και Δέσποινα, που είναι πάντοτε πρόθυμες να με ακούσουν και να με στηρίξουν σε ό,τι τις χρειαστώ.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ac-pre-miRNA	Ago2-clived pre-miRNA
Ago-2	Argonaute 2
ALU	Arthrobacter Luteus Element
AMP	Adenosine Monophosphate
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
ARE	AU-rich Element
ATP	Adenosine-5'-Triphosphate
B-gal	Beta-galactosidase
bp	Base pairs
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	Complementary DNA
CDS	Coding Sequence
CMV	Cytomegalovirus
C19orf48	Chromosome 19 Open Reading Frame 48
Ct	Threshold Cycle
CTU1	Cytosolic Thiouridylase Subunit 1
DEAE	Diethylaminoethanol
DFS	Disease-free Survival
DGCR8	DiGeorge syndrome Critical Region gene 8
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates
DTT	Dithiothreitol
dUTPs	Deoxyuridine Triphosphates
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
eRNA	Enhancer-derived RNA
FBS	Fetal Bovine Serum

GFP	Green Fluorescent Protein
GPCRs	G Protein–Coupled Receptors
GTP	Guanosine-5′-triphosphate
HEK293	Human Embryonic Kidney cells 293
HOTAIR	HOX transcript antisense RNA
IGFs	Insulin-like Growth factors
IGFBPs	Insulin-like Growth Factor-Binding Proteins
IGFR	Insulin-like Growth Factor Receptor
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
kb	Kilobases
KLK	Kallikrein-related Peptidase
KLKP1	Kallikrein Pseudogene 1
LB	Lysogeny Broth
lncRNAs	Long non-coding RNAs
MCS	Multiple Cloning Site
MER8	Medium Reiterated Frequency Repeat 8
miRISC	miRNA-induced Silencing Complex
miRNAs	MicroRNAs
MIRs	Mammalian-wide Interspersed Repeats
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MMPs	Matrix Metalloproteinases
mRNA	Messenger RNA
MSR1	Minisatellite Repeat Element 1
ncRNAs	Non-coding RNAs
NGS	Next Generation Sequencing
OGT	O-GlcNAc Transferase
ORF	Open Reading Frame
Ori	Origin of replication
PACT	Protein Kinase R-activating Protein
PAP	Polyadenylate Polymerase
PAR	Proteinase-Activated Receptor

PARs/PATs	Promoter-associated RNAs/ Promoter-associated Transcripts
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEI	Polyethylenimine
piRNA	Piwi-interacting RNA
P _{lac}	Lactose Operon Promoter
pre-miRNAs	Precursor miRNAs
pri-miRNAs	Primary miRNAs
PSA	Prostate Specific Antigen
PTHrP	Parathyroid Hormone-related Protein
qRT-PCR	Quantitative Real-time PCR
RAN	RAs-related Nuclear protein
RasiRNA	Repeat-associated small interfering RNA
RLC	RISC-Loading Complex
ROS	Reactive Oxygen Species
RQ	Relative Quantification
rRNA	Ribosomal RNA
RSS	RNA Storage Solution
RT	Reverse Transcription
Siglec-9	Sialic acid binding Ig-like lectin 9
SINEs	Short Interspersed Nuclear Elements
siRNA	Small interfering RNA
SNORD88	Small Nucleolar RNA, C/D box 88
snRNA	Small nuclear RNA
snoRNA	Small nucleolar RNAs
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite Repression
SPS	Seed-pairing Stability
SV-40	Simian Vacuolating Virus 40
Ta	Annealing Temperature
TA	Target site Abundance
TERC/TR	Telomerase RNA Component/ Telomere RNA

TGFβ	Transforming Growth Factor beta
Tigger2	Tc1/mariner-like Transposable Element 2
Tm	Melting Temperature
TRBP	Transactivating Response RNA binding Protein
tRNA	Transfer RNA
TUs	Transcription Units
uPA	Urokinase-type Plasminogen Activator
uPAR	Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor
UTRs	Untranslated Regions
Xist	X inactive-specific transcript
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. ΟΙ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΕΣ	1
1.1.1. Η οικογένεια των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών	3
1.1.1.1. Ο γενετικός τύπος των ιστικών καλλικρεϊνών	3
1.1.1.2. Η δομή των γονιδίων των ιστικών καλλικρεϊνών	5
1.1.1.3. Η πρωτεϊνική δομή των ιστικών καλλικρεϊνών	6
1.2. Η ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ	7
1.3. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	9
1.3.1. Η ιστική καλλικρεΐνη 3 (KLK3) ως καρκινικός βιοδείκτης	11
1.4. ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA (ncRNAs)	12
1.4.1. MicroRNAs (miRNAs)	14
1.4.1.1. Η γονιδιακή οργάνωση των miRNAs	14
1.4.1.2. Η βιογένεση των miRNAs	15
1.4.1.3. Ο μηχανισμός δράσης των miRNAs	17
1.5. MicroRNAs ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΕΣ	20
1.6. ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ microRNAs	21
1.7. ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΤΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΤΩΝ microRNAs	23
1.7.1. Εργαστηριακές μέθοδοι επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων πρόβλεψης	29
1.8. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
2.1. ΥΛΙΚΑ	31
2.1.1. Θρεπτικά μέσα - Διαλύματα	31
2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	33
2.2.1. Κυτταρικές καλλιέργειες	33
2.2.1.1. Απόψυξη των κυττάρων	33
2.2.1.2. Ανακαλλιέργεια των κυττάρων	34
2.2.1.3. Κρυοσυντήρηση των κυττάρων	35
2.2.2. Μοριακή κλωνοποίηση	35
2.2.2.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	36
2.2.2.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αгарόζης	40
2.2.2.3. Αντίδραση σύνδεσης των τμημάτων DNA με τον πλασμιδιακό φορέα pCR™ II-TOPO® (TA cloning)	41
2.2.2.4. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	44

2.2.2.5. Υγρές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων	45
2.2.2.6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα	45
2.2.2.7. Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού	47
2.2.2.8. Εκχύλιση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	49
2.2.3. Υποκλωνοποίηση των τμημάτων DNA στον πλασμιδιακό φορέα pMIR-REPORT™ Luciferase	50
2.2.3.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA για πειράματα διαμόλυνσης.....	52
2.2.4. Διαμόλυνση των κυττάρων με το πλασμιδιακό DNA.....	54
2.2.5. Εκχύλιση ολικού RNA από τα κύτταρα.....	56
2.2.6. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT).....	58
2.2.7. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qRT-PCR).....	60
2.2.8. Δοκιμές γονιδίων αναφοράς (Reporter Gene Assays).....	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	65
3.1. ΕΥΡΕΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ miRNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΛΓΟΡΙΘΜΩΝ	65
3.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ 3'-UTR ΤΟΥ KLK3 ΣΤΟΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pMIR-REPORT™ Luciferase	67
3.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ miR-936 ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΝΕΦΡΟΥ (HEK 293T)	70
3.4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ miR-423-5p ΣΤΗΝ 3'-UTR ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ OGT	72
3.5. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ miR-936 ΣΤΗΝ 3'-UTR ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ KLK3.....	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	79
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	83

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΟΙ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΕΣ

Ο όρος ‘καλλικρεΐνη’ χρησιμοποιήθηκε, αρχικά, από τους Kraut, Frey και Werle κατά τη δεκαετία του 1930, για την περιγραφή μιας ουσίας με υποτασιογόνο δράση, η οποία ανιχνεύθηκε σε μεγάλη συγκέντρωση στο πάγκρεας (στην αρχαία ελληνική καλείται καλλίκρεας) [1,2]. Η ουσία αυτή χαρακτηρίστηκε ως ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που εμπλέκεται στο σύστημα καλλικρεϊνών-κινινών (kallikrein-kinin system) μέσω απελευθέρωσης ενός βιοδραστικού πεπτιδίου (κινίνη) από ένα ενδογενές υπόστρωμα (κινινογόνο) [3]. Στον άνθρωπο, αυτό το ένζυμο είναι γνωστό ως παγκρεατική/νεφρική καλλικρεΐνη ή KLK1 και επιδρά σε ένα χαμηλού μοριακού βάρους ηπατικό κινινογόνο προκειμένου να απελευθερωθεί λυσυλβραδυκινίνη (ονομάζεται και καλλιδίνη). Η λυσυλβραδυκινίνη εμπλέκεται στον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης, της φλεγμονής, της ηλεκτρολυτικής ισορροπίας και άλλων φυσιολογικών διαδικασιών [4,5]. Επιπλέον, η KLK1 έχει τη δυνατότητα επεξεργασίας διαφόρων υποστρωμάτων, όπως αυξητικών παραγόντων, ορμονών και εξωκυττάρων μορίων [3].

Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1990, οι ερευνητές πίστευαν ότι ο γενετικός τύπος των ανθρώπινων καλλικρεϊνών αποτελούνταν από τρία μόνο γονίδια: το γονίδιο *KLK1* που κωδικοποιεί για την παγκρεατική/νεφρική καλλικρεΐνη, το γονίδιο *KLK2* που κωδικοποιεί για την ανθρώπινη αδενική καλλικρεΐνη και το γονίδιο *KLK3* που κωδικοποιεί για το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA) [6]. Τα τρία αυτά γονίδια χαρακτηρίστηκαν ως ‘κλασσικές’ καλλικρεΐνες και εδράζουν στη χρωμοσωμική περιοχή 19q13.4. Ωστόσο, κατά την χρονική περίοδο από το 1994-2001 με τη βοήθεια του Προγράμματος Προσδιορισμού του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (Human Genome Project, HGP) έλαβαν χώρα η κλωνοποίηση και χαρτογράφηση νέων γονιδίων που εντοπίζονται σε αυτήν την χρωμοσωμική περιοχή και παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με τις τρεις ‘κλασσικές’ καλλικρεΐνες, με αποτέλεσμα την επέκταση της οικογένειας των ανθρώπινων καλλικρεϊνών στα 15 μέλη, συνολικά [7-10]. Σύμφωνα με την επίσημη ονοματολογία που δημοσιεύθηκε το 2006, όλα τα μέλη του συγκεκριμένου γενετικού τύπου, εκτός της *KLK1*, θα αναφέρονται ως πεπτιδάσες που σχετίζονται με την καλλικρεΐνη (kallikrein-related

peptidases), εννοώντας την KLK1 και το όνομα του αντίστοιχου γονιδίου τους θα συμβολίζεται ως *KLK* [11].

Τα ένζυμα των καλλικρεϊνών διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες: την καλλικρεΐνη του πλάσματος και τις ιστικές καλλικρεΐνες (**Πίνακας 1.1**). Αυτές οι δύο κατηγορίες διαφέρουν σημαντικά ως προς το μοριακό τους βάρος, τη γονιδιακή και πρωτεϊνική δομή, τα ανοσολογικά χαρακτηριστικά και την εξειδίκευση του υποστρώματος.

Η καλλικρεΐνη του πλάσματος ή παράγοντας Fletcher κωδικοποιείται από ένα γονίδιο (*KLKB1*) που εδράζεται στο χρωμόσωμα 4 (4q35) και αποτελείται από 15 εξώνια. Το μοριακό βάρος της *KLKB1* κυμαίνεται στα 85-88 kDa και μοιάζει δομικά με τον παράγοντα πήξης XI. Η καλλικρεΐνη του πλάσματος εκφράζεται αποκλειστικά στα ηπατικά κύτταρα και εκκρίνεται από το ήπαρ στην κυκλοφορία του αίματος, όπου συμμετέχει στην διαδικασία της πήξης του αίματος και της ινωδόλυσης, καθώς και στη ρύθμιση της αγγειοσύσπασης και της φλεγμονώδους αντίδρασης μέσω της απελευθέρωσης βραδυκινίνης από υψηλού μοριακού βάρους ηπατικό κινινογόνο [3,12,13].

Πίνακας 1.1. Ονομασίες των γονιδίων των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών [19].

Επίσημη ονομασία γονιδίου/ πρωτεΐνης	Άλλες ονομασίες
<i>KLK1</i> / hK1	Tissue/ pancreatic/ renal/ urinary kallikrein, hPRK
<i>KLK2</i> / hK2	Human glandular kallikrein 1, hGK-1
<i>KLK3</i> / hK3	Prostate-specific antigen, PSA, APS
<i>KLK4</i> / hK4	Protease, <i>KLK-L1</i> , EMSP1, PRSS17, ARM1
<i>KLK5</i> / hK5	<i>KLK-L2</i> , HSCTE
<i>KLK6</i> / hK6	Zyme, Protease M, Neurosin, PRSS9
<i>KLK7</i> / hK7	HSCCE, PRSS6
<i>KLK8</i> / hK8	Neuropsin, Ovasin, <i>TADG-14</i> , PRSS19, HNP
<i>KLK9</i> / hK9	<i>KLK-L3</i>
<i>KLK10</i> / hK10	<i>NES1</i> , PRSSL1
<i>KLK11</i> / hK11	TLSP/Hippostasin, PRSS20
<i>KLK12</i> / hK12	<i>KLK-L5</i>
<i>KLK13</i> / hK13	<i>KLK-L4</i>
<i>KLK14</i> / hK14	<i>KLK-L6</i>
<i>KLK15</i> / hK15	Prostinogen, HSRNASPH

Οι ιστικές καλλικρεΐνες αποτελούν μια ευρεία ομάδα ενζύμων, η οποία θα αναλυθεί εκτενέστερα παρακάτω. Τα μέλη της ομάδας αυτής εμφανίζουν σημαντικές ομοιότητες τόσο σε επίπεδο γονιδίου όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Στον παραπάνω **Πίνακα 1.1** παρουσιάζονται οι διάφορες ονομασίες με τις οποίες αναφέρονται τα γονίδια της οικογένειας των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών.

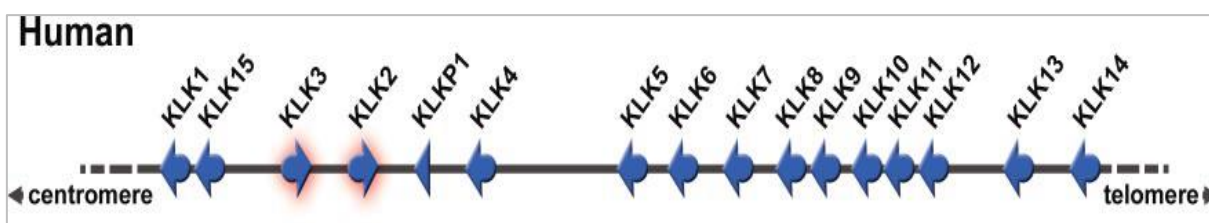
1.1.1. Η οικογένεια των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών

Τα γονίδια της οικογένειας των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών κωδικοποιούν για πρωτεάσες σερίνης, μοριακού βάρους 25-30 kDa, που εντοπίζονται σε διάφορους ιστούς και βιολογικά υγρά. Οι ιστικές καλλικρεΐνες, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, παρουσιάζουν σημαντική ομολογία τόσο σε γονιδιακό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο και μάλιστα σε ποσοστό 30-50%, ενώ ο βαθμός ομοιότητας ανάμεσα στις τρεις “κλασσικές” καλλικρεΐνες (KLK1, KLK2, KLK3) ανέρχεται στο 73-84% για την νουκλεοτιδική και στο 61-77% για την αμινοξική αλληλουχία [14].

1.1.1.1. Ο γενετικός τύπος των ιστικών καλλικρεϊνών

Ο γενετικός τύπος των ανθρώπινων καλλικρεϊνών εντοπίζεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 19 (19q13.4) αποτελούμενος από 15 γονίδια, ενώ μεταξύ των γονιδίων *KLK2* και *KLK4* έχει ταυτοποιηθεί η ύπαρξη ενός ψευδογονιδίου (*ΨKLK1/KLKP1*) [15]. Στην **Εικόνα 1.1** απεικονίζεται ο εν λόγω γενετικός τύπος. Σε αυτόν, όλα τα γονίδια είναι διευθετημένα διαδοχικά το ένα δίπλα στο άλλο χωρίς την παρεμβολή άλλων γονιδίων ανάμεσά τους, καταλαμβάνοντας μια έκταση περίπου 300 kb. Οι τρεις “κλασσικές” καλλικρεΐνες και το γονίδιο *KLK15* γειτνιάζουν σε μια περιοχή μήκους 60 kb, ενώ τα υπόλοιπα γονίδια (*KLK4-KLK14*) μαζί με το *KLKP1* εδράζουν τελομερικά του *KLK2*. Επίσης, ο γενετικός τύπος πλαισιώνεται από γονίδια που διαφέρουν δομικά και λειτουργικά από τις ανθρώπινες καλλικρεΐνες και για το λόγο αυτό δεν παρουσιάζονται στην Εικόνα. Συγκεκριμένα, κεντρομερικά του *KLK1* υπάρχουν διάφορα γονίδια που μεταγράφονται σε μικρά πυρηνισκικά RNAs (SNORD88A, SNORD88B και SNORD88C)

και το γονίδιο C19orf48 (αντιγόνο ελάσσονος ιστοσυμβατότητας), ενώ τελομερικά του τελευταίου γονιδίου εντοπίζονται το γονίδιο CTU1 που κωδικοποιεί για την υπομονάδα 1 της κυτοσολικής θειουριδυλάσης και το γονίδιο Siglec-9 που ανήκει στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών, οι οποίες κωδικοποιούν για διαμεμβρανικούς υποδοχείς λεκτίνης που δεσμεύουν σιαλικό οξύ. Η κατεύθυνση της μεταγραφής όλων των *KLK* γονιδίων είναι από το τελομερές προς το κεντρομερές, εκτός των *KLK3* και *KLK2* που ακολουθούν αντίθετη κατεύθυνση [16,17].

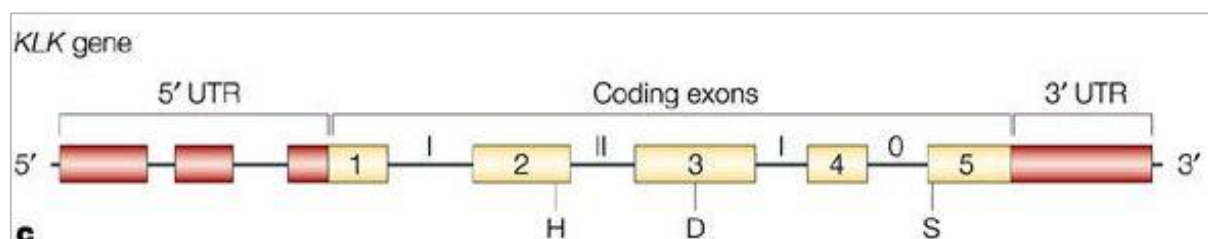


Εικόνα 1.1. Ο γενετικός τόπος των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών. Τα βέλη υποδηλώνουν την κατεύθυνση της μεταγραφής από το τελομερές προς το κεντρομερές, ενώ με κόκκινη σκίαση φαίνονται τα γονίδια *KLK3* και *KLK2* που έχουν αντίθετη κατεύθυνση [16] .

Σε γενικές γραμμές, έχει παρατηρηθεί ότι στο χρωμόσωμα 19 υπάρχει μια πληθώρα επαναλαμβανόμενων στοιχείων. Εδώ, στο γενετικό τόπο των ανθρώπινων καλλικρεϊνών οι αλληλουχίες αυτές φτάνουν περίπου το 52%, ενώ οι περιοχές που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες ανέρχονται σε μόλις 4,3%. Τα πλέον συνήθη επαναλαμβανόμενα στοιχεία που εντοπίζονται σε αυτόν τον γενετικό τόπο είναι τα μικρά διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία (Short Interspersed Nuclear Elements, SINEs), όπως τα μεταθετά στοιχεία ALU και οι διάσπαρτες επαναλήψεις των θηλαστικών (Mammalian-wide Interspersed Repeats, MIRs). Άλλα στοιχεία που, επίσης, έχουν ταυτοποιηθεί είναι τα Tigger2, MER8 και MSR1. Από αυτά, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η MSR1 (μικροδορυφορική αλληλουχία), καθώς ο αριθμός των επαναλήψεων της MSR1 στην 3'-UTR των *KLK4* και *KLK14* διαφέρει μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού από μαστό και προστάτη [16,18].

1.1.1.2. Η δομή των γονιδίων των ιστικών καλλικρεϊνών

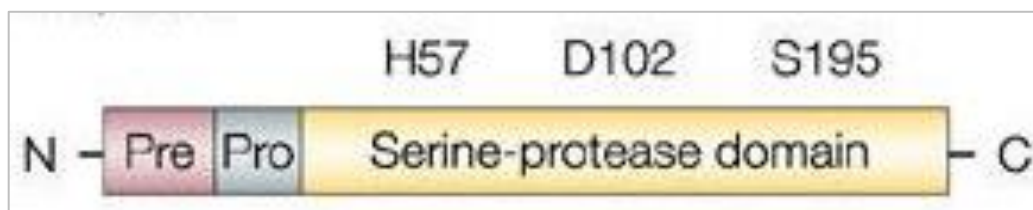
Όλα τα γονίδια των ανθρώπινων καλλικρεϊνών εμφανίζουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά (Εικόνα 1.2). Συγκεκριμένα, το μέγεθος των γονιδίων κυμαίνεται από 4 έως 10 kb ανάλογα με τα εκατόστε μεγέθη των εσώνίων που διαθέτουν. Πέραν αυτού, όλα τα γονίδια αποτελούνται από 5 κωδικά εξώνια, όπου το πρώτο εξώνιο περιλαμβάνει μέρος της 5' αμετάφραστης περιοχής (5'-UTR) και το κωδικόνιο έναρξης, ενώ το τελευταίο περιέχει το κωδικόνιο λήξης και ολόκληρη την 3' αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR). Ανάμεσα στα εξώνια παρεμβάλλονται και 4 εσώνια, των οποίων οι θέσεις σε σχέση με τα κωδικόνια των εξωνίων στα γονίδια των καλλικρεϊνών είναι συντηρημένες (I, II, I, 0). Τα *KLK* γονίδια, με εξαίρεση αυτά των "κλασσικών" καλλικρεϊνών, περιέχουν ένα ή δύο μη κωδικά εξώνια εντός της 5'-UTR. Επιπλέον, η 3'-UTR, που εντοπίζεται μετά το κωδικόνιο λήξης, διαφέρει σε μέγεθος μεταξύ των γονιδίων, με αποτέλεσμα την παραγωγή περισσότερων του ενός mRNA μεταγράφων ανά γονίδιο που, όμως, κωδικοποιούν για την ίδια πρωτεΐνη. Οι διαφορές στις 5'- και 3'-UTRs επιδρούν στη σταθερότητα των mRNA μεταγράφων και στην αποτελεσματικότητα της μετάφρασής τους, καθώς και στην ευαισθησία τους απέναντι στη δράση των microRNAs μορίων. Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι καλλικρεΐνες ως ένζυμα περιέχουν μια καταλυτική τριάδα ιστιδίνης-ασπαραγινικού οξέος-σερίνης (H-D-S). Οι θέσεις των κωδικονίων αυτών των αμινοξέων εμφανίζουν συντηρητικότητα μεταξύ των γονιδίων. Συγκεκριμένα, το κωδικόνιο της ιστιδίνης (H) εντοπίζεται πάντοτε στο τέλος του δεύτερου κωδικού εξωνίου, του ασπαραγινικού οξέος (D) στη μέση του τρίτου και αυτό της σερίνης (S) στην αρχή του πέμπτου [14,16,18,19].



Εικόνα 1.2. Η κοινή δομή των γονιδίων των ανθρώπινων καλλικρεϊνών. Τα κίτρινα κουτιά υποδηλώνουν τα 5 κωδικά εξώνια, ενώ τα κόκκινα τα μη κωδικά εξώνια που εντοπίζονται εντός των 5'- και 3'-UTRs [14].

1.1.1.3. Η πρωτεϊνική δομή των ιστικών καλλικρεϊνών

Οι δομικές ομοιότητες των ανθρώπινων καλλικρεϊνών επεκτείνονται και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Έτσι, κάθε πρωτεΐνη της οικογένειας αυτής αποτελεί μια πρωτεάση σερίνης μονής πολυπεπτιδικής αλυσίδας, η οποία περιλαμβάνει ένα πεπτιδίο σηματοδότησης (predomain) μήκους 16-33 αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο της, το οποίο κατευθύνει την πρωτεΐνη στο ενδοπλασματικό δίκτυο για έκκριση, ακολουθούμενο από ένα προπεπτιδίο (prodomain) μήκους 4-9 αμινοξέων (για την KLK5 το μήκος είναι 3-37 αμινοξέα) και την περιοχή του ώριμου ενζύμου με την συντηρημένη καταλυτική τριάδα ιστιδίνης-ασπαραγινικού οξέος-σερίνης (H57-D102-S195) και μήκος 227-252 αμινοξέα [14,19] (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3. Η κοινή πρωτεϊνική δομή των ανθρώπινων καλλικρεϊνών [14].

Αρχικά, όλες οι καλλικρεΐνες συντίθενται ως ανενεργά προ-προένζυμα που κατευθύνονται προς το εκκριτικό μονοπάτι, τα οποία μετατρέπονται στη μορφή των προενζύμων (ζυμογόνων), μοριακού βάρους 24-29 kDa, μετά από σχάση του πεπτιδίου σηματοδότησης από το αμινοτελικό τους άκρο. Τα προένζυμα αυτά εξακολουθούν να παραμένουν σε ανενεργή κατάσταση και μετά την έκκριση. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η πλήρης ενεργοποίηση του ενζύμου, ακολουθεί η απομάκρυνση του προπεπτιδίου μέσω περιορισμένης πρωτεόλυσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια αλλαγή στη διαμόρφωση της θέσης πρόσδεσης του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Μέσω της διαμόρφωσης αυτής, τα ένζυμα των καλλικρεϊνών είναι, πλέον, ελεύθερα να δεσμεύσουν το κατάλληλο υπόστρωμα και να ασκήσουν την καταλυτική τους δράση. Στις περισσότερες καλλικρεΐνες, η αποκοπή του προπεπτιδίου επιτυγχάνεται από πεπτιδάσες με

ενεργότητα όμοια με της θρυψίνης, όπως αποδεικνύεται από την παρουσία καταλοίπων αργινίνης (Arg₁₆) ή λυσίνης (Lys₁₆) στο καρβοξυτελικό άκρο του προπεπτιδίου αυτού. Λόγω του γεγονότος ότι η πλειονότητα των ανθρώπινων καλλικρεϊνών διαθέτει ενεργότητα ανάλογη της θρυψίνης, όπως θα αναλυθεί και παρακάτω, θεωρείται πιθανό ότι μπορούν να αυτοενεργοποιούνται ή να ενεργοποιούν άλλες [20-22]. Εξάίρεση αποτελεί η KLK4, η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί και από άλλα ένζυμα όπως τη μεταλλοπρωτεάση-20 (MMP-20) και μια πρωτεάση κυστεΐνης, την διπεπτιδυλ-πεπτιδάση I λόγω ενός καταλοίπου γλουταμίνης που διαθέτει [23].

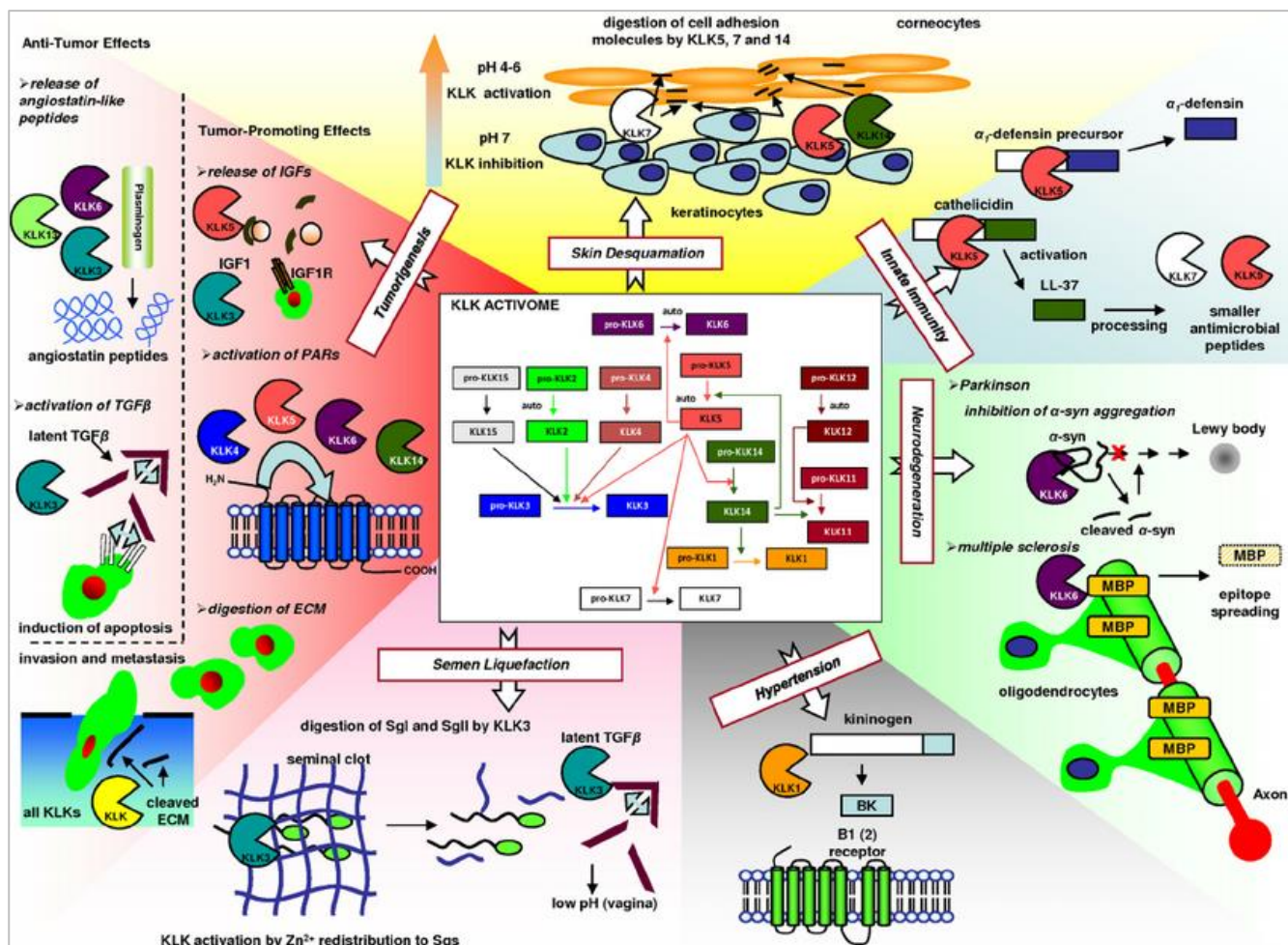
1.2. Η ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ

Οι ανθρώπινες καλλικρεΐνες, όπως έχει ήδη ειπωθεί, ανήκουν στην ομάδα των πρωτεασών σερίνης. Γενικά, οι πρωτεάσες ή πεπτιδάσες αποτελούν ομάδα ενζύμων που υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς. Η δράση των πρωτεασών είναι πάντοτε μια μη αντιστρεπτή διαδικασία και σχετίζεται είτε με μη ειδική αποδόμηση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, όπως στην περίπτωση της απόπτωσης, είτε με ειδική πρωτεόλυση συγκεκριμένων πρωτεϊνών με στόχο μια λειτουργική αλλαγή, όπως συμβαίνει κατά την ενεργοποίηση μιας προ-ορμόνης. Η διάκριση των πρωτεασών πραγματοποιείται βάσει τριών κριτηρίων που είναι η θέση πάνω στο υπόστρωμα όπου εντοπίζεται ο πεπτιδικός δεσμός που πρόκειται να υδρολυθεί (εσωτερικά ή στο άκρο), ο καταλυτικός μηχανισμός και οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των πρωτεασών, όπως υποδεικνύονται από τα δομικά χαρακτηριστικά τους. Σύμφωνα, λοιπόν, με το πρώτο κριτήριο, οι πρωτεάσες χωρίζονται σε ενδο- και εξωπεπτιδάσες, ενώ με βάση το δεύτερο κριτήριο οι ενδοπεπτιδάσες διακρίνονται στις υποκατηγορίες των πρωτεασών σερίνης, κυστεΐνης, θρεονίνης, ασπαραγινικού οξέος και των μεταλλοπρωτεασών (MMPs). Όσον αφορά στο τρίτο κριτήριο, οι πρωτεάσες κάθε καταλυτικής τάξης κατηγοριοποιούνται σε εξελικτικές ομάδες “clans” που περιλαμβάνουν πολλές οικογένειες με σημαντικές ομοιότητες αλληλουχίας [19].

Οι πρωτεάσες σερίνης ή ενδοπεπτιδάσες σερίνης δρουν μέσω ενός καταλοίπου σερίνης στο ενεργό κέντρο τους, του οποίου η υδροξυλομάδα ενεργεί ως πυρηνόφιλο μόριο που στοχεύει τον πεπτιδικό δεσμό. Επιπλέον, είναι οργανωμένες σε 16 εξελικτικές ομάδες [24], όπου καθεμία αποτελείται από επιμέρους οικογένειες. Περίπου το 80% των πλέον γνωστών πρωτεασών σερίνης ανήκουν στην οικογένεια S1 της ομάδας PA (PA clan) που απαρτίζεται από ένζυμα με ενεργότητα όμοια με τη θρυψίνη ή τη χυμοθρυψίνη. Σε γενικές γραμμές, τα ένζυμα που εμφανίζουν ενεργότητα όμοια της θρυψίνης διασπούν πεπτιδικούς δεσμούς εκεί όπου υπάρχουν θετικά φορτισμένα αμινοξέα αργινίνης ή λυσίνης, ενώ αυτά με ενεργότητα όμοια της χυμοθρυψίνης δρουν εκεί όπου εντοπίζονται υδροφοβικά κατάλοιπα τυροσίνης, τρυπτοφάνης ή φαινυλαλανίνης. Οι ανθρώπινες ιστικές καλικρεΐνες αποτελούν μέλη της S1 οικογένειας και συγκεκριμένα, οι KLK2, KLK4, KLK5, KLK6, KLK8, KLK10, KLK12, KLK13 και KLK15 έχουν ενεργότητα όμοια της θρυψίνης, ενώ οι KLK3, KLK7 και KLK9 ανάλογη της χυμοθρυψίνης. Ενδιαφέρον προκαλούν οι KLK1, KLK11 και KLK14 που φέρουν διττή ενεργότητα [25].

Οι καλικρεΐνες ανιχνεύονται σε διάφορους ιστούς και βιολογικά υγρά, όπου ασκούν την πρωτεολυτική τους δράση είτε ανεξάρτητα είτε ως μέρος πρωτεολυτικών καταρρακτών που αποτελούνται από πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Στην **Εικόνα 1.4** παρουσιάζονται λεπτομερώς οι ρόλοι που διαδραματίζουν οι ανθρώπινες καλικρεΐνες τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις στον οργανισμό. Όπως φαίνεται, εμπλέκονται στις διαδικασίες της φυσικής ανοσίας (KLK5, KLK7), της ρύθμισης της αρτηριακής πίεσης (KLK1), της φυσικής απολέπισης του δέρματος (KLK5, KLK7, KLK4), της υγροποίησης του σπέρματος (KLK3), της μυελίνωσης και συναπτογένεσης στο ΚΝΣ (KLK6), καθώς και σε περιπτώσεις ογκοκαταστολής αλλά και καρκινογένεσης, όπως θα αναλυθεί και παρακάτω [26].

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η ρύθμιση της ενζυμικής ενεργότητας των ανθρώπινων ιστικών καλικρεϊνών είναι ιδιαίτερα κρίσιμη κυρίως λόγω της μη αντιστρεπτής φύσης της πρωτεολυτικής τους δράσης και για το λόγο αυτό ελέγχεται με διάφορους τρόπους. Ανάμεσα σε αυτούς περιλαμβάνονται η ενεργοποίηση των προενζύμων (ζυμογόνων), ο σχηματισμός συμπλόκων με ενδογενείς αναστολείς, η απενεργοποίηση μέσω αυτοαποδόμησής τους και η αλλοστερική ρύθμιση [14,17,26].



Εικόνα 1.4. Τα μονοπάτια εμπλοκής των ανθρώπινων καλλικρεϊνών σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις του οργανισμού [26].

1.3. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΚΑΛΙΚΡΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Οι ρόλοι των καλλικρεϊνών στον ανθρώπινο οργανισμό αφορούν τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Πιο συγκεκριμένα, η μη ελεγχόμενη ρύθμιση της πρωτεολυτικής ενεργότητάς τους συνδέεται στενά με παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι ο καρκίνος. Επίσης, η απορρύθμιση της έκφρασης των καλλικρεϊνών τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο φαίνεται ότι σχετίζεται με τα κλινικά χαρακτηριστικά και την πρόγνωση των ασθενών σε διάφορους καρκινικούς τύπους.

Δεδομένα που προκύπτουν από επιστημονικές μελέτες δείχνουν ότι οι καλλικρεΐνες ενέχονται στην ρύθμιση της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων μέσω της τροποποίησης των αυξητικών παραγόντων τύπου ινσουλίνης (IGFs), καθώς και της πρωτεολυτικής διάσπασης των πρωτεϊνών που τους δεσμεύουν (IGF-binding proteins, IGFBPs). Κάτι τέτοιο έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία σχηματισμού του συμπλόκου IGF-IGFBPs, επιτρέποντας, έτσι, την πρόσδεση του IGF στον υποδοχέα IGFR-1 και την ενεργοποίησή του. Απόρροια αυτής της διαδικασίας είναι η επαγωγή μονοπατιών σηματοδότησης που ρυθμίζουν την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλουν την απόπτωση. Επιπρόσθετα, οι ανθρώπινες καλλικρεΐνες μπορούν να αποτελέσουν μόρια σηματοδότησης μεμβρανικών υποδοχέων, όπως είναι οι υποδοχείς PAR που ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων που συζεύγνυνται με G πρωτεΐνες (GPCRs). Οι εν λόγω υποδοχείς εμπλέκονται, επίσης, σε μοριακά μονοπάτια που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Πέρα από την ανάπτυξη του όγκου, οι καλλικρεΐνες φαίνεται να συμβάλλουν άμεσα ή έμμεσα στις διαδικασίες της αγγειογένεσης, της διήθησης και της μετάστασης μέσω αποδόμησης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM), η οποία αποτελεί τον φυσικό φραγμό που τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να υπερκεράσουν για να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος. Σε αυτή την περίπτωση, ο ρόλος τους σχετίζεται είτε με άμεση υδρόλυση εξωκυττάριας πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, όπως είναι η φιμπρονεκτίνη, η λαμινίνη και το κολλαγόνο είτε με έμμεση συμμετοχή τους σε πρωτεολυτικά μονοπάτια όπου επιδρούν κι άλλες πρωτάσες, όπως συμβαίνει στην ενεργοποίηση των μονοπατιών καλλικρεΐνης-κινίνης και uPA/uPAR/MMPs.

Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι ανθρώπινες καλλικρεΐνες δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη του όγκου και την αγγειογένεση. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η KLK3 που εμπλέκεται στην αποδόμηση των πρωτεϊνών που δεσμεύουν τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού (TGFβ), με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του, οδηγώντας στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, αρκετές καλλικρεΐνες, όπως είναι οι KLK3, KLK5, KLK6 και KLK13 φέρονται να αποτρέπουν την διαδικασία της αγγειογένεσης μέσω απελευθέρωσης από το πλασμινογόνο συστατικών που μοιάζουν με την αγγειοστατίνη [14,26-28].

1.3.1. Η ιστική καλλικρεΐνη 3 (KLK3) ως καρκινικός βιοδείκτης

Το γονίδιο *KLK3* κωδικοποιεί για το ευρέως γνωστό ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA), το οποίο εκφράζεται κυρίως στον αδένα του προστάτη και αποτελεί τον καλύτερα αποδεκτό και χρησιμοποιούμενο δείκτη για τη διάγνωση, την παρακολούθηση και την πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη. Το PSA, όπως και η *KLK2*, συμμετέχουν στην διαδικασία υγροποίησης του σπέρματος μέσω αποδόμησης των σεμινογελινών I και II, της φιμπρονεκτίνης και της λαμινίνης στον φυσιολογικό ιστό του προστάτη. Ωστόσο, με την ενεργοποίηση και την πρωτεολυτική διάσπαση ενός ευρέος φάσματος υποστρωμάτων μπορούν να επάγουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων στον προστάτη και να προάγουν την μετάσταση. Τέτοιου είδους υπόστρωμα είναι το πεπτίδιο που σχετίζεται με την παραθορμόνη (PTHrP), το οποίο αποτελεί έναν αυξητικό παράγοντα που αυξάνει τον ρυθμό ανάπτυξης των προστατικών καρκινικών κυττάρων *in vivo* και επίσης, φαίνεται να έχει κάποιο ρόλο στις οστικές μεταστάσεις του καρκίνου του προστάτη. Άλλα υποστρώματα που διασπώνται είναι οι πρωτεΐνες IGFBP3 και IGFBP4, με αποτέλεσμα την αδυναμία δέσμευσης από αυτές του παράγοντα IGF, ο οποίος ενεργοποιεί τον υποδοχέα IGFR και επάγεται ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός, καθώς και ο λανθάνων TGFβ που όταν απελευθερώνεται προάγει την μετάβαση από το επιθήλιο στο μεσέγχυμα (EMT). Εκτός από την πρωτεολυτική της ενεργότητα, η *KLK3* μπορεί να δεσμεύεται σε έναν υποδοχέα της επιφάνειας των κυττάρων, διεγείροντας την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) που προκαλούν μεταλλάξεις στο DNA. Με αυτό τον τρόπο, η *KLK3* συμβάλλει έμμεσα στην καρκινογένεση του προστάτη [29].

Η έκφραση του γονιδίου *KLK3* έχει, επίσης, ανιχνευθεί και σε περιπτώσεις ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου του μαστού και μάλιστα, έχουν παρατηρηθεί μειωμένα επίπεδα έκφρασής του στον καρκινικό συγκριτικά με τον φυσιολογικό ή υπερπλαστικό ιστό του μαστού. Γυναίκες με PSA-θετικούς όγκους χαρακτηρίζονται, συνήθως, από μεγαλύτερη πιθανότητα για μακρά επιβίωση ελεύθερης νόσου (DFS) με μικρότερο κίνδυνο υποτροπής. Σύμφωνα, λοιπόν, με τα ευρήματα αυτά, το PSA μπορεί να θεωρηθεί χρήσιμος προγνωστικός δείκτης για τον καρκίνο του μαστού και η μειωμένη έκφραση του σχετίζεται με πιο επιθετική μορφή της νόσου και λιγότερο καλά διαφοροποιημένους όγκους [29,30].

1.4. ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA (ncRNAs)

Μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος προσδιορισμού του ανθρώπινου γονιδιώματος (HGP), ιδιαίτερο ενδιαφέρον στους ερευνητές προκάλεσε η ανακάλυψη ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από περίπου 20.000 γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, αντιπροσωπεύοντας μόλις το 1,5% του συνόλου του γονιδιώματος [31]. Ένα μεγάλο μέρος του υπόλοιπου τμήματος του γονιδιώματος θεωρήθηκε ως άχρηστο γενετικό υλικό ('junk' DNA). Ωστόσο, δεδομένα αναλύσεων που προέκυψαν από διεθνή προγράμματα, όπως είναι το ENCODE project (Encyclopedia of DNA Elements), υπέδειξαν ότι περισσότερο από το 80% του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι μεταγραφικά ενεργό και συμμετέχει σε βιοχημικές δραστηριότητες που μπορεί να είναι λειτουργικά σημαντικές [32]. Έτσι, πέρα από την ανακάλυψη εδώ και πέντε δεκαετίες των κλασσικών μη κωδικών μορίων RNA (ncRNAs), όπως είναι το μεταφορικό (tRNA) και ριβοσωμικό RNA (rRNA) που εμπλέκονται στη μετάφραση του mRNA, το μικρό πυρηνικό RNA (snRNA) που συμμετέχει στο μάτισμα, καθώς και το μικρό πυρηνισκικό RNA (snoRNA) που εμπλέκεται στην τροποποίηση των RNA μορίων, ήρθαν στο φως κι άλλα μη κωδικά μόρια RNA με σημαντικές βιολογικές λειτουργίες.

Τα μη κωδικά μόρια RNA χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τα housekeeping ncRNAs και τα ρυθμιστικά ncRNAs (regulatory ncRNAs) (**Εικόνα 1.5**). Η πρώτη κατηγορία αποτελείται από τα tRNA, rRNA, snRNA και snoRNA, τα οποία εντοπίζονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και επιτελούν σημαντικές λειτουργίες στον οργανισμό, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Στην κατηγορία αυτή εμπίπτει και το TR (Telomere RNA ή Telomerase RNA Component, TERC), που εμπλέκεται στην διατήρηση των τελομερών άκρων και υφίσταται απορρύθμιση στα καρκινικά κύτταρα. Όσον αφορά στην κατηγορία των ρυθμιστικών ncRNAs, αυτή μπορεί να υποκατηγοριοποιηθεί στα μεγάλα ncRNAs (lncRNAs) που απαρτίζονται από μόρια RNA μήκους μεγαλύτερο από 200 νουκλεοτίδια και στα μικρά ncRNAs (small ncRNAs) με μήκος μικρότερο από 200 νουκλεοτίδια, όπως είναι τα miRNA, siRNA, rasiRNA, piRNA και PATs (καλούνται και PARs). Τα eRNAs (enhancer-derived RNAs) μπορούν να ανήκουν και στις δύο υποκατηγορίες, καθώς το μέγεθός τους κυμαίνεται στα 50-2000 νουκλεοτίδια [33,34].

Τα lncRNAs μοιάζουν δομικά με τα mRNA μετάγραφα, καθώς διαθέτουν 5' κάλυμμα, poly(A) ουρά και υφίστανται ρύθμιση από τους καθιερωμένους μεταγραφικούς παράγοντες [34]. Παρόλα αυτά, τα επίπεδα έκφρασης τους φαίνεται να είναι χαμηλότερα συγκριτικά με τα μετάγραφα που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Οι λειτουργίες των lncRNAs σχετίζονται με επιγενετικές (*HOTAIR*, *Xist*), μεταγραφικές και μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις. Επιπλέον, η απορρύθμιση της έκφρασης πολλών lncRNAs συνδέεται στενά με την εκδήλωση ασθενειών, όπως είναι ο καρκίνος [35].

Από την υποκατηγορία των μικρών ncRNAs, τα πιο ευρέως μελετημένα, την τελευταία δεκαετία, είναι τα miRNA, siRNA και piRNA, τα οποία συνδέονται με μονοπάτια που οδηγούν στην σίγηση συγκεκριμένων γονιδίων και στην προστασία του κυττάρου από ιούς και μεταθετά στοιχεία (τρανσποζόνια). Στην παρούσα εργασία, το ενδιαφέρον εστιάζεται στα miRNAs μόρια, των οποίων η βιογένεση και ο μηχανισμός δράσης θα περιγραφούν εκτενέστερα παρακάτω.

Housekeeping ncRNAs		
Abbreviation	Full name	Function
rRNA	Ribosomal RNA	Translational machinery
tRNA	Transfer RNA	Amino acid carriers
snRNA	Small nuclear RNA	RNA processing
snoRNA	Small nucleolar RNA	RNA modifications
TR	Telomere RNA	Chromosome end synthesis
Regulatory ncRNAs		
Abbreviation	Full name	Function
miRNA	MicroRNAs	RNA stability and translation control
endo-siRNA	Endogenous siRNA	RNA degradation
rasiRNA	Repeat-derived RNA	Transcriptional control
piRNA	Piwi-associated RNA	Silencing transposon and mRNA decay
eRNA	Enhancer-derived RNA	Regulation of gene expression
PATs	Promoter-associated RNA	Transcription initiation and pause release
lncRNA	Long non-coding RNA	Imprinting, epigenetics, nuclear structure

Εικόνα 1.5. Οι κατηγορίες των ncRNAs και οι λειτουργίες που επιτελεί καθένα από αυτά στον οργανισμό [34].

1.4.1. MicroRNAs (miRNAs)

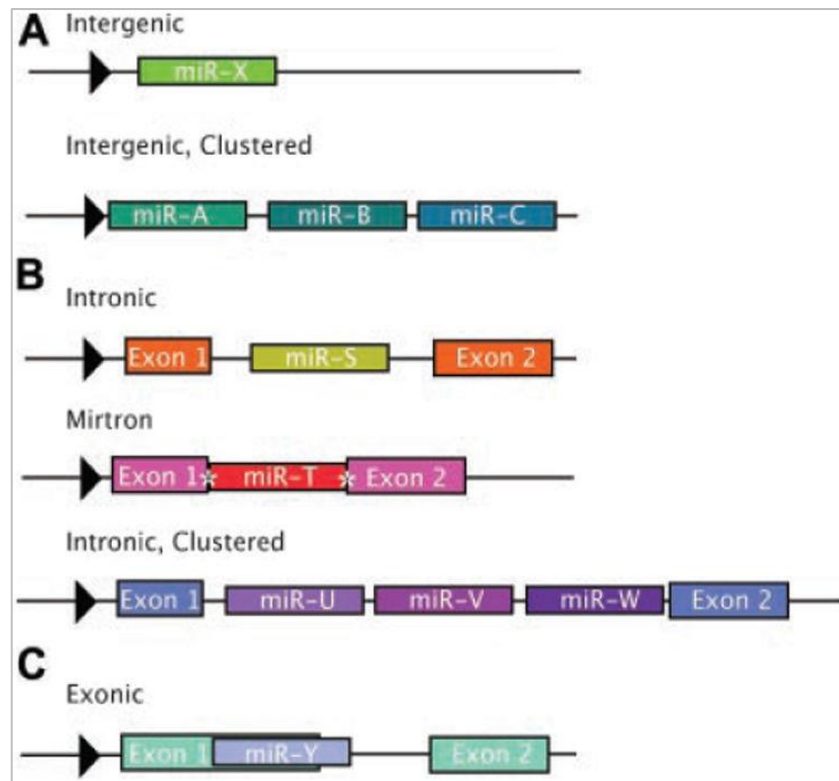
Η ανακάλυψη του δύο πρώτων miRNAs, *lin-4* και *let-7*, πραγματοποιήθηκε κατά τη δεκαετία του 1990, όπου χαρακτηρίστηκαν ως μόρια που ρυθμίζουν την ανάπτυξη στον νηματώδη σκώληκα (*C. elegans*) μέσω μετα-μεταγραφικής σίγησης γονιδίων [36,37]. Σήμερα, ο αριθμός των ώριμων miRNA μορίων που εντοπίζονται στο ανθρώπινο γονιδίωμα ξεπερνά τα 1000 [38], συνιστώντας περίπου το 1-2% του συνόλου των εκφραζόμενων ανθρώπινων γονιδίων και καθιστώντας, έτσι, τα εν λόγω μόρια ως μια από τις μεγαλύτερες τάξεις γονιδιακών ρυθμιστών.

Σε γενικές γραμμές, τα miRNAs αποτελούν ενδογενή, εξελικτικά συντηρημένα, μονόκλωνα μόρια RNA με μήκος που κυμαίνεται στα 19-24 νουκλεοτίδια. Τα μόρια αυτά δεν κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και εμπλέκονται στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο είτε αναστέλλοντας τη μετάφραση είτε επάγοντας την αποδόμηση συγκεκριμένων mRNA μεταγράφων. Συγκεκριμένα, εκτιμάται ότι ελέγχουν τη δραστηριότητα περίπου του 60% των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Επιπλέον, έχει αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους σε πληθώρα βιολογικών διαδικασιών, όπως είναι η ανάπτυξη, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση και ο κυτταρικός θάνατος [39].

1.4.1.1. Η γονιδιακή οργάνωση των miRNAs

Στον άνθρωπο, τα γονίδια των miRNAs είναι κατανεμημένα σε όλα τα χρωμοσώματα, με εξαίρεση το φυλετικό Y χρωμόσωμα. Στην **Εικόνα 1.6** που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι διάφορες θέσεις των γονιδίων αυτών πάνω στο γονιδίωμα. Περίπου το 50% των γνωστών miRNA μορίων εντοπίζονται ομαδοποιημένα σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους, σχηματίζοντας αλληλουχίες μεγάλου μήκους (clusters) που επιτρέπουν την μεταγραφή τους ως πολυκιστρονικά πρωτογενή μετάγραφα. Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις όπου ορισμένα miRNAs διαθέτουν τον δικό τους υποκινητή και μεταγράφονται αυτόνομα. Ως επί το πλείστον, τα γονίδια των ανθρώπινων miRNAs ανιχνεύονται σε εσώνια μεταγραφικών μονάδων (Transcription Units, TUs) κωδικών ή μη κωδικών μεταγράφων, ενώ, σπανιότερα, βρίσκονται σε περιοχές εξωνίων μη κωδικών μεταγράφων [40-43]. Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί και η περίπτωση των μεικτών

miRNA γονιδίων, τα οποία εμφανίζονται είτε σε εξώνια είτε σε εσώνια ανάλογα με το πρότυπο του εναλλακτικού ματίσματος του μεταγράφου [41].



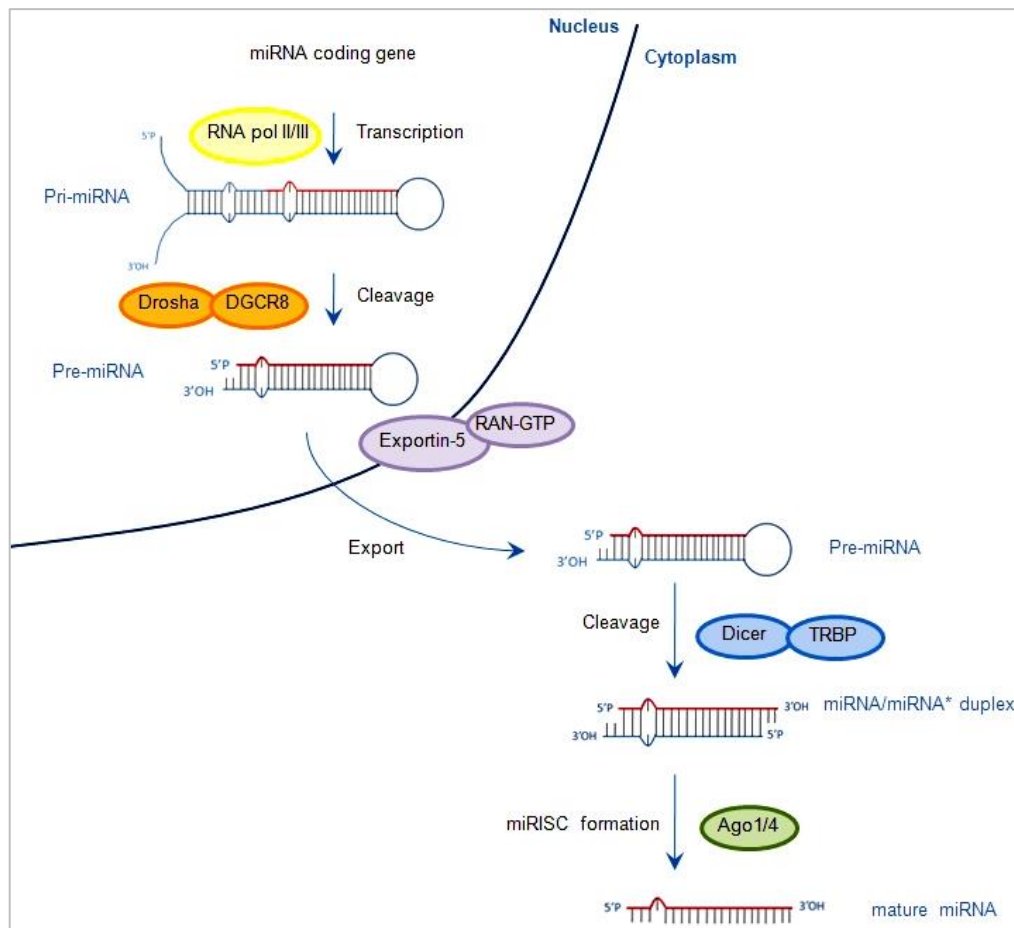
Εικόνα 1.6. Η γενωμική οργάνωση των γονιδίων των miRNAs [41].

1.4.1.2. Η βιογένεση των miRNAs

Η βιογένεση των miRNA μορίων αποτελεί μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 1.7**. Αρχής γενομένης από τον πυρήνα του κυττάρου, τα γονίδια των miRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II (RNA Pol II) ή την συρραφή ενός ιντρονίου σε πρωτογενή miRNA μετάγραφο (pri-miRNAs). Εδώ, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η μεταγραφή μπορεί να πραγματοποιηθεί και από την RNA πολυμεράση III (RNA Pol III), η οποία, γενικά, συνθέτει μικρά μη κωδικά μόρια RNA που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της ανάπτυξης [40,43]. Τα pri-miRNAs έχουν μήκος αρκετών κιλοβάσεων, σχηματίζουν δομή φουρκέτας και εμφανίζουν κάλυμμα στη

γουανιδίνη του 5'-άκρου, καθώς και poly(A) ουρά στο 3'-άκρο τους. Εν συνεχεία, τα πρωτογενή αυτά μετάγραφα υφίστανται διάσπαση από ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο (γνωστό ως σύμπλοκο μικροεπεξεργαστή), το οποίο απαρτίζεται από δύο πρωτεΐνες, την RNάση Drosha που συνδέεται με τον συμπαράγοντα DGCR8 (DiGeorge syndrome Critical Region gene 8). Η DGCR8 είναι αυτή που κατευθύνει και σταθεροποιεί τη δράση της Drosha, η οποία, με τη σειρά της, κόβει τα pri-miRNAs σε απόσταση περίπου 11 ζευγών βάσεων από τη διασταύρωση των μονόκλωνων αλυσίδων με το στέλεχος-βρόγχο, οδηγώντας στη δημιουργία των πρόδρομων miRNAs (pre-miRNAs), μήκους περίπου 60-70 νουκλεοτιδίων. Αυτά τα πρόδρομα μόρια εμφανίζουν δομή φουρκέτας, ενώ στο 3'-άκρο τους διακρίνεται η ύπαρξη δύο αζευγάρωτων νουκλεοτιδίων. Στο σημείο αυτό, τα pre-miRNAs μεταφέρονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα μέσω της εξπορτίνης-5 (Exportin-5) με μια εξαρτώμενη από GTP διαδικασία (RAN-GTP).

Αφού τα pre-miRNAs εξέλθουν στο κυτταρόπλασμα, λαμβάνει χώρα η επεξεργασία τους από μια δεύτερη RNάση III, τη Dicer, που σχηματίζει σύμπλοκο με πρωτεΐνες πρόσδεσης στο δίκλωνο RNA, όπως είναι οι TRBP (Transactivating Response RNA binding Protein), PACT (Protein Kinase R-activating Protein) και Ago (Ago 1-4). Το σύμπλοκο αυτό είναι γνωστό ως RLC (RISC-Loading Complex), δεσμεύεται στα pre-miRNAs, κόβει τη θηλιά της φουρκέτας και συμβάλλει στη συγκρότηση του συμπλόκου miRISC (miRNA-induced Silencing Complex). Εδώ, θα πρέπει να ειπωθεί ότι σύμφωνα με ένα δεύτερο μοντέλο, πριν τη δράση της Dicer προηγείται η διάσπαση από την Ago-2, επιτρέποντας την παραγωγή ενός νέου pre-miRNA που καλείται ac-pre-miRNA (Ago2-clived pre-miRNA). Κάτι τέτοιο πιθανόν να συμβαίνει προς διευκόλυνση της μετέπειτα δράσης της Dicer. Μετά την διάσπαση από την Dicer, τα δίκλωνα μόρια (miRNA:miRNA*) που προκύπτουν, μήκους περίπου 22 νουκλεοτιδίων, αποτελούνται από την αλυσίδα οδηγό (ώριμο miRNA) και την αλυσίδα συνοδό (miRNA*). Με τον διαχωρισμό των δύο αυτών αλυσίδων, η αλυσίδα οδηγός (έχει το λιγότερο θερμοδυναμικά σταθερό 5'-άκρο) είναι αυτή που ενσωματώνεται στο καταλυτικό σύμπλοκο miRISC και το κατευθύνει στο mRNA-στόχο, ενώ η αλυσίδα συνοδός απελευθερώνεται και αποικοδομείται [40,42-44].



Εικόνα 1.7. Η βιογένεση των miRNA μορίων [43].

1.4.1.3. Ο μηχανισμός δράσης των miRNAs

Το σύμπλοκο miRISC αποτελεί την κυτταροπλασματική μηχανή εκδήλωσης της ρυθμιστικής δράσης των ώριμων miRNA μορίων. Πιο συγκεκριμένα, μετά την ενσωμάτωση της αλυσίδας οδηγού (ώριμο miRNA) στο σύμπλοκο αυτό, η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου-στόχου μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο μετα-μεταγραφικούς τρόπους ανάλογα με τον βαθμό συμπληρωματικότητας μεταξύ miRNA και mRNA. Όταν εμφανίζεται τέλεια συμπληρωματικότητα στην αλληλεπίδραση miRNA:mRNA, τότε επάγεται η διάσπαση του mRNA, μέσω της ενδονουκλεολυτικής δράσης της πρωτεΐνης Ago-2, με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του εν λόγω μορίου. Αντιθέτως, στην περίπτωση που υπάρχει ατελής συμπληρωματικότητα και κεντρική μη αντιστοιχία βάσεων, όπως συμβαίνει σε όλες σχεδόν τις αλληλεπιδράσεις miRNA:mRNA στα ζώα, το

Ως επί το πλείστον, το ενεργοποιημένο σύμπλοκο miRISC δεσμεύεται στην 3'-UTR του mRNA-στόχου μέσω συμπληρωματικότητας των βάσεων κατά Watson-Crick σε απόσταση μεγαλύτερη από 15 νουκλεοτίδια από το κωδικόνιο λήξης. Παρόλα αυτά, έχει αποδειχθεί ότι μερικά miRNAs μπορούν να καταστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση, αλληλεπιδρώντας με την κωδική περιοχή ή την 5'-UTR του mRNA-στόχου. Η υβριδοποίηση των δύο μορίων καθίσταται πλήρως συμπληρωματική στην περιοχή που βρίσκεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων 2 και 8 στο 5'-άκρο του miRNA, η οποία ονομάζεται seed περιοχή. Ωστόσο, η εμφάνιση συμπληρωματικότητας και με άλλες αλληλουχίες του miRNA που εντοπίζονται στο κέντρο ή στο 3'-άκρο, όπως απεικονίζεται στο σχήμα της **Εικόνας 1.8**, συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης miRNA:mRNA. Για παράδειγμα, μια κεντρική διόγκωση, όπου παρατηρείται μερική συμπληρωματικότητα στο 3'-άκρο του miRNA, φαίνεται ότι εμποδίζει την διάσπαση από την πρωτεΐνη Ago-2. Επιπλέον, η ύπαρξη απόλυτης συμπληρωματικότητας μεταξύ των νουκλεοτιδίων 13-16 στο 3'-άκρο του miRNA, είναι απαραίτητη για την καλύτερη σταθεροποίηση του συμπλόκου miRNA:mRNA. Τέλος, η παρουσία ενός καταλοίπου αδερίνης (A) στη θέση 1 και μιας αδερίνης (A) ή ουρακίλης (U) στη θέση 9 της αλληλουχίας του mRNA αυξάνουν την αποτελεσματικότητα της δράσης του miRNA [43].



Εδώ, αξίζει να σημειωθεί ότι τα παραπάνω χαρακτηριστικά που αφορούν στο σχηματισμό του υβριδίου miRNA:mRNA έχουν χρησιμοποιηθεί για τον ορισμό αλγορίθμων βιοπληροφορικής που προβλέπουν πιθανούς στόχους των miRNA μορίων, καθώς ένα miRNA μπορεί να στοχεύει πολλά και διαφορετικά mRNA μόρια, αλλά και ένα mRNA μόριο μπορεί να αναγνωρίζεται από περισσότερα του ενός miRNAs. Οι αλγόριθμοι αυτοί, όπως και τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που λαμβάνει υπόψη ο καθένας, θα αναλυθούν εκτενέστερα παρακάτω.

Πέρα από την αρνητική ρυθμιστική δράση στη γονιδιακή έκφραση που ασκούν τα περισσότερα miRNA μόρια, υπάρχουν και ορισμένα που μπορούν να συμβάλλουν στην αύξηση της έκφρασης μεταγράφων και πρωτεϊνών σε ειδικούς κυτταρικούς τύπους και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Μια τέτοια περίπτωση είναι η αλληλεπίδραση των miRNAs με πρωτεΐνες-καταστολείς του καταλυτικού συμπλόκου miRISC, με αποτέλεσμα την έμμεση επαγωγή της μετάφρασης του mRNA-στόχου. Επίσης, δεδομένα από επιστημονικές μελέτες υποδεικνύουν την εμπλοκή των miRNA μορίων στην απώλεια της φάσης G₀ και την αδυναμία διακοπής του κυτταρικού κύκλου, ενεργοποιώντας, έτσι, την καταστολή του γονιδίου-στόχου. Τέλος, η επαγόμενη από miRNA μόρια αύξηση της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να επιτευχθεί και μέσω στρατολόγησης πρωτεϊνών που είναι πλούσιες σε AU (ARE) στην περιοχή του mRNA που στοχεύεται [46].

Όπως έχει ήδη ειπωθεί, τα μόρια των miRNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές διαδικασίες του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων της ανάπτυξης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής διαφοροποίησης και του κυτταρικού θανάτου. Λόγω αυτών των λειτουργιών τους, οι οποίες είναι απαραίτητες σε κάθε εξειδικευμένο ιστό, η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs σχετίζεται με περιπτώσεις καρκινογένεσης. Η μειωμένη έκφραση κάποιων miRNA μορίων που εμφανίζουν ογκοκατασταλτικό ρόλο στα φυσιολογικά κύτταρα, μπορεί να προάγει τον σχηματισμό του όγκου μέσω αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού και δημιουργίας μετάστασης και αγγειογένεσης. Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση ορισμένων miRNAs που δρουν ως ογκογονίδια, έχει και πάλι ως συνέπεια την ανάπτυξη του όγκου. Έτσι, προκύπτει ένα νέο πεδίο έρευνας, τα ογκογόνα miRNAs (oncomiRs) που χρησιμεύουν ως προγνωστικοί και προβλεπτικοί δείκτες σε πολλούς καρκινικούς τύπους [47].

1.5. MicroRNAs ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΕΣ

Ανάμεσα στους γονιδιακούς στόχους των miRNA μορίων συγκαταλέγονται και τα γονίδια των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών που εδράζουν στη χρωμοσωμική περιοχή 19q13.4 και κωδικοποιούν για πρωτεάσες σερίνης. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι, στον καρκίνο του προστάτη, τα μόρια αυτά συμβάλλουν στη ρύθμιση της έκφρασης των *KLK* γονιδίων, με αποτέλεσμα ο άξονας αλληλεπίδρασης μεταξύ miRNAs και *KLKs* να αποτελεί ένα σημαντικό στοιχείο στην παθογένεια του καρκίνου και τις θεραπευτικές προσεγγίσεις [48]. Η υψηλή ομολογία που εμφανίζεται στην αλληλουχία των mRNAs της οικογένειας των καλλικρεϊνών, η οποία αντικατοπτρίζεται και στην 3'-UTR των μεταγράφων αυτών, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ένα μόριο miRNA μπορεί να ελέγχει τα επίπεδα έκφρασης πολλών καλλικρεϊνών, ταυτόχρονα. Σύμφωνα με δεδομένα επιστημονικών μελετών, οι *KLK5*, *KLK10* και *KLK13* αποτελούν τους πιο καλά αναγνωρισμένους στόχους των γνωστών miRNAs, ενώ υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με τα miRNAs που, πιθανόν, στοχεύουν τα μέταγραφα των *KLK1*, *KLK3*, *KLK8* και *KLK12*. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι οι *KLK2*, *KLK4*, *KLK5* και *KLK10* διαθέτουν πολλαπλές θέσεις αλληλεπίδρασης με miRNA μόρια στις 3'-UTRs των mRNA μεταγράφων τους [17,49].

Εδώ, θα πρέπει να αναφερθεί ότι σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ των mRNAs των καλλικρεϊνών και των miRNA μορίων μπορεί, σε μερικές περιπτώσεις, να έχει αμφίδρομα αποτελέσματα, ήτοι την επαγόμενη από τις *KLKs* μειωμένη έκφραση των miRNAs. Πιο συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι η διαμόλυνση καρκινικών κυτταρικών σειρών μαστού με το γονίδιο της *KLK5*, όπου φυσιολογικά δεν εκφράζεται, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση στη ρύθμιση πολλών miRNAs, τα οποία συμμετέχουν σε μονοπάτια που σχετίζονται με την αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM). Έτσι, καθίσταται σαφές ότι οι ανθρώπινες καλλικρεΐνες μπορούν να επιδρούν στην εξωκυττάρια μήτρα άμεσα μέσω της πρωτεολυτικής τους δράσης, αλλά και έμμεσα διαμέσου μονοπατιών που ελέγχονται από miRNA μόρια [50,51].

1.6. ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ *microRNAs*

Τα τελευταία χρόνια, οι μεθοδολογίες που έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση των *miRNA* μορίων υφίστανται συνεχή βελτίωση. Σε αυτό το πεδίο, ιδιαίτερη είναι η συμβολή της βιοπληροφορικής, όπου διάφοροι εξειδικευμένοι επιστήμονες αναπτύσσοντας διαφορετικά προγράμματα και προσεγγίσεις κατάφεραν να προτείνουν έναν μεγάλο αριθμό *miRNA* μορίων, τα οποία δύναται να ανιχνευτούν *in vivo*. Με τη ραγδαία ανάπτυξη στον τομέα της αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) και άλλων τεχνικών υψηλής απόδοσης (high-throughput), ο αριθμός των επιβεβαιωμένων *miRNAs* έχει αυξηθεί σημαντικά. Ως επακόλουθο αυτής της συνεχούς ανακάλυψης και συσσώρευσης νέων μορίων ήταν η ανάγκη δημιουργίας βάσεων δεδομένων που να αποθηκεύουν το σύνολο των ταυτοποιημένων *miRNAs*. Παράλληλα, έχουν αναπτυχθεί και αλγόριθμοι πρόβλεψης περιοχών στόχων όπου τα *miRNAs* έχουν προτίμηση, καθώς και βάσεις δεδομένων που καταγράφουν όλες τις πειραματικά επιβεβαιωμένες συσχετίσεις μεταξύ *miRNAs* και ασθενειών.

Η σημαντικότερη και πιο εξειδικευμένη βάση δεδομένων, όσον αφορά στην ανεύρεση των ταυτοποιημένων *miRNA* αλληλουχιών, είναι η **miRBase** (<http://www.mirbase.org/>) που δημιουργήθηκε το 2002. Στη συγκεκριμένη βάση, πέραν των πληροφοριών που παρέχονται σχετικά με τις αλληλουχίες των ώριμων *miRNAs* και της τυπικής δομής φουρκέτας των πρόδρομων μορίων τους (*pre-miRNAs*), αναφέρονται, επίσης, και οι πειραματικές μέθοδοι που πραγματοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση της έκφρασης του εκάστοτε *miRNA* μορίου. Επιπρόσθετα, στην *miRBase* υπάρχουν καταχωρημένοι οι αποδεδειγμένοι και προβλεπόμενοι στόχοι για το κάθε *miRNA*. Προκειμένου να γίνει αποδεκτή η υποβολή ενός νεοανακαλυφθέντος *miRNA* στην εν λόγω βάση, θα πρέπει προηγουμένως να έχει αποδειχθεί πειραματικά η έκφραση του και η ερευνητική αυτή εργασία να έχει γίνει δεκτή για δημοσίευση σε επιστημονικό περιοδικό. Στη συνέχεια, δίνεται η επίσημη ονομασία, βάσει των κανόνων που θα αναλυθούν παρακάτω, προς χρήση στην τελική μορφή της δημοσίευσης. Η πρώτη έκδοση του *miRBase* περιελάμβανε στοιχεία μόνο για 218 *miRNAs* από πέντε διαφορετικά είδη. Ωστόσο, σήμερα ο αριθμός αυτός έχει επεκταθεί στις 35.000 *miRNA* αλληλουχίες από περίπου 223 είδη, συνολικά [38,52].

Για την αποφυγή ενδεχομένου επικάλυψης στην ονομασία των διακριτών miRNAs, η βάση δεδομένων miRBase έχει θεσπίσει συγκεκριμένους κανόνες ονοματολογίας. Συγκεκριμένα, τα ώριμα miRNAs ονομάζονται με το πρόθεμα miR ακολουθούμενο από έναν αριθμό, υποδηλώνοντας τη σειρά ανακάλυψης. Όσον αφορά στο όνομα των πρόδρομων μορίων, αυτά αναφέρονται με το πρόθεμα mir σε μορφή italics (π.χ. *mir-14*). Ο οργανισμός από τον οποίο έχει απομονωθεί το miRNA συμβολίζεται με την προσθήκη τριών γραμμάτων πριν από το όνομα του (π.χ. hsa-miR-194 για τον άνθρωπο). Επίσης, η διάκριση μεταξύ των μορίων που προέρχονται από ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς πραγματοποιείται με την απουσία παύλας μετά του προθέματος στην περίπτωση των φυτών (π.χ. miR172). Επιπλέον, όταν κάποια miRNA μόρια είναι σχεδόν ίδια και διαφέρουν κατά 1-2 νουκλεοτίδια, τότε χρησιμοποιείται ο ίδιος αριθμός με την προσθήκη ενός επιπλέον γράμματος στην κατάληξη (π.χ. tae-miR172a και tae-miR172b). Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί η περίπτωση όπου ένα ώριμο miRNA προέρχεται είτε από το 3'-άκρο είτε από το 5'-άκρο του πρόδρομου μορίου και τότε προσδίδεται ο κύριος αριθμός και ακολούθως, ένα επίθεμα που υποδεικνύει την αλυσίδα προέλευσης (π.χ. miR172-3p και miR172-5p) [53].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει και η βάση δεδομένων **DIANA-TarBase** (<http://www.microma.gr/tarbase>) που αναπτύχθηκε το 2006. Η συγκεκριμένη ήταν η πρώτη διαθέσιμη βάση με τους πειραματικά επιβεβαιωμένους στόχους των miRNAs σε πολλά διαφορετικά είδη. Σε γενικές γραμμές, για κάθε περίπτωση αλληλουχίας-στόχου (κυρίως στην 3'-UTR του mRNA) περιγράφονται το miRNA με το οποίο αλληλεπιδρά, το γονίδιο στο οποίο εντοπίζεται, η φύση των πειραμάτων που διεξήχθησαν, ο βαθμός ικανότητας της αλληλουχίας να επάγει καταστολή της μετάφρασης ή αποικοδόμηση του mRNA, καθώς και η πρότυπη ερευνητική εργασία μελέτης αυτής της αλληλεπίδρασης. Πέραν αυτών, η βάση αυτή συνδέεται διαδικτυακά και με άλλες χρήσιμες βάσεις δεδομένων, όπως είναι οι Ensembl, Hugo, UCSC και SwissProt [54].

Τέλος, όσον αφορά στις βάσεις δεδομένων που διαθέτουν πληροφορίες για την εμπλοκή συγκεκριμένων miRNAs σε παθολογικές καταστάσεις, μια από αυτές είναι η **miR2Disease** (<http://www.mir2disease.org/>) που δημιουργήθηκε το 2008. Κάθε καταχώρηση στην προκειμένη βάση συνοδεύεται από λεπτομέρειες σχετικά με την ταυτότητα του miRNA, το όνομα της νόσου στην οποία εμπλέκεται, όπως και μια σύντομη περιγραφή αυτής της συσχέτισης, τα πρότυπα έκφρασης των miRNAs κατά το στάδιο της

νόσου και η μέθοδος ανίχνευσης αυτών. Επιπρόσθετα, αναφέρονται και οι πειραματικά αποδεδειγμένοι στόχοι των εκάστοτε miRNAs και η βιβλιογραφική τους αναφορά [55].

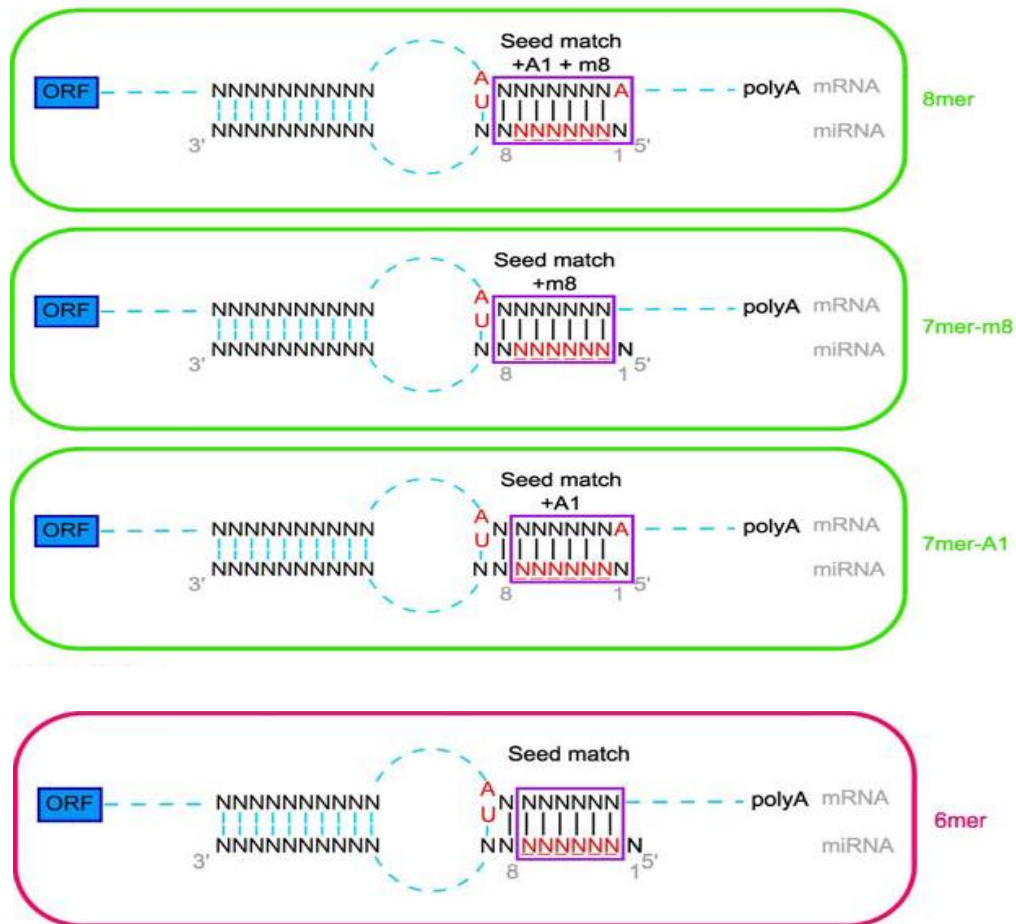
1.7. ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΤΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΤΩΝ microRNAs

Μια σημαντική πτυχή στον τομέα της βιολογίας των miRNA μορίων αποτελεί η ταυτοποίηση των στόχων τους. Πρόσφατα, ο τεράστιος αριθμός τέτοιων πιθανών αλληλουχιών στόχευσης για κάθε miRNA, καθώς και η δυσκολία επικύρωσης τους σε εργαστηριακή κλίμακα μέσω της πειραματικής μεθόδου που θεωρείται ιδιαίτερα δαπανηρή και χρονοβόρα, οδήγησαν στη δημιουργία αρκετών λογισμικών προγραμμάτων πρόβλεψης των στόχων των miRNA μορίων. Απόρροια της χρήσης αυτών των προγραμμάτων είναι η μετέπειτα διευκόλυνση της πειραματικής διαδικασίας επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων πρόβλεψης μέσω καλύτερης διαλογής ανάμεσα στα υποψήφια μόρια που πρόκειται να εξεταστούν.

Γενικά, οι παράμετροι και τα χαρακτηριστικά που λαμβάνει υπόψη ο κάθε αναπτυσσόμενος αλγόριθμος πρόβλεψης είναι κοινά και παρατίθενται παρακάτω:

i. Βαθμός συμπληρωματικότητας στη seed περιοχή (Seed match)

Τα περισσότερα υπολογιστικά συστήματα αρκούνται στον έλεγχο της συμπληρωματικότητας στις 3'-UTRs των εκάστοτε γονιδίων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στο 5'-άκρο του miRNA εντοπίζεται μια περιοχή (2-8 νουκλεοτιδίων), όπου πραγματοποιείται η τέλεια υβριδοποίηση με το mRNA-στόχο. Όσο μεγαλύτερη είναι η συμπληρωματικότητα μεταξύ αυτών των νουκλεοτιδίων τόσο υψηλότερη βελτίωση υφίσταται η απόδοση των προγραμμάτων πρόβλεψης. Οι συνηθέστεροι τύποι αντιστοιχίας με το μόριο-στόχο στη seed περιοχή είναι οι 6mer (πλήρης αντιστοιχία μεταξύ 6 νουκλεοτιδίων της περιοχής), 7mer-m8 (πλήρης αντιστοιχία στο τμήμα που απαρτίζεται από τα νουκλεοτίδια 2-8), 7mer-A1 (πλήρης αντιστοιχία μεταξύ των νουκλεοτιδίων 2 και 7 σε συνδυασμό με την παρουσία ενός καταλοίπου αδεΐνης (A) στη θέση 1) και 8mer (πλήρης συμπληρωματικότητα μεταξύ 8 νουκλεοτιδίων της περιοχής) (Εικόνα 1.9) [43, 56-58].



Εικόνα 1.9. Οι συνήθεις τύποι πλήρους αντιστοιχίας με το mRNA-στόχο στη seed περιοχή του miRNA (seed match) [43].

ii. Συντηρητικότητα της θέσης στόχευσης (Conservation)

Η διατήρηση της θέσης πρόσδεσης στην αλληλουχία του στόχου μεταξύ των εξελικτικά συγγενικών ειδών, που αποδεικνύει την βιολογική λειτουργικότητα της εν λόγω θέσης, θεωρείται μια βασική αρχή στη θέσπιση των κανόνων των αλγορίθμων πρόβλεψης. Πιο συγκεκριμένα, πολλοί από τους αλγόριθμους αυτούς αναγνωρίζουν τις ορθόλογες 3'-UTR αλληλουχίες και εν συνεχεία, εξετάζουν αν η εκάστοτε αλληλουχία-στόχος είναι συντηρημένη και σε άλλα συγγενικά είδη. Η χρήση της παραμέτρου των συντηρημένων περιοχών στόχευσης μπορεί να μειώσει σημαντικά τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα (false-positive rate) των προγραμμάτων πρόβλεψης [56-58].

iii. Θερμοδυναμική

Ένα άλλο χαρακτηριστικό που συνυπολογίζεται για την αναγνώριση των προβλεπόμενων στόχων είναι η θερμοδυναμική σταθερότητα της αλληλεπίδρασης miRNA:mRNA μέσω αξιολόγησης της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG). Πρόκειται για την ενέργεια που εκλύεται όταν σχηματίζεται το σύμπλοκο του miRNA με το στόχο. Συγκεκριμένα, οι αρνητικές τιμές της ΔG υποδηλώνουν θερμοδυναμικά πιο σταθερές αλληλεπιδράσεις, με αποτέλεσμα η πρόσδεση του miRNA μορίου στην αλληλουχία του στόχου να είναι ισχυρότερη. Ωστόσο, το κριτήριο αυτό δεν εξασφαλίζει την ορθότητα της πρόβλεψης, αφού ο αριθμός των επιβεβαιωμένων διπόλων miRNA:mRNA είναι αρκετά περιορισμένος [58].

iv. Προσβασιμότητα της θέσης (Site accessibility)

Η δευτεροταγής δομή του mRNA θεωρείται καθοριστική για την στόχευση από το miRNA. Για την επιτυχή αλληλεπίδραση του miRNA με το στόχο απαιτείται η περιοχή πρόσδεσης να είναι ανοιχτή (απουσία αλληλεπιδράσεων με άλλες περιοχές εντός του mRNA μορίου) προκειμένου να ξεκινήσει η αντίδραση του υβριδισμού. Με την επίτευξη της υβριδοποίησης, το καταλυτικό σύμπλοκο miRISC προκαλεί διάσπαση της δευτεροταγούς δομής στη συγκεκριμένη περιοχή προς επιμήκυνση του υβριδισμού. Η διαδικασία αυτή επιφέρει ένα ενεργειακό κόστος, το οποίο μπορεί να προσμετρηθεί. Επιπλέον, η προσβασιμότητα της θέσης πρόσδεσης μπορεί να εκτιμηθεί και μέσω εντοπισμού των ζευγών A:U που την πλαισιώνουν [56-58].

v. Προφίλ έκφρασης (Expression profile)

Ένα miRNA μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση πολλών διαφορετικών γονιδίων, με αποτέλεσμα τα προφίλ έκφρασης των mRNAs να διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης του miRNA. Γενικά, μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του miRNA και των προβλεπόμενων στόχων του είναι πιθανόν να υποδηλώνει την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ αυτού και του αντίστοιχου μορίου-στόχου. Παρόλα αυτά, μια περαιτέρω ανάλυση σε πρωτεϊνικό επίπεδο μπορεί να οδηγήσει στον αποκλεισμό δυνητικών στόχων [56].

Τα προαναφερθέντα κριτήρια, στο σύνολο τους ή κατ'επιλογή, αποτέλεσαν τη βάση για την ανάπτυξη αλγορίθμων πρόβλεψης των στόχων των γνωστών καταχωρημένων miRNA μορίων (Πίνακας 1.2). Η διαδικτυακή πρόσβαση σε αυτούς είναι ως επί το πλείστον ελεύθερη.

Ο αλγόριθμος **TargetScan** αναπτύχθηκε το 2003 και θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους για την πρόβλεψη των στόχων των miRNAs στα σπονδυλωτά. Ο αλγόριθμος αυτός ανιχνεύει, κυρίως, στόχους σε ανθρώπινες 3'-UTR αλληλουχίες και τις ορθόλογες τους, αλλά παρέχει και τη δυνατότητα πρόβλεψης σε κωδικές περιοχές (ORF). Επιπλέον, μέσω του συγκεκριμένου προγράμματος δύναται να εντοπιστούν πιθανές αλληλεπιδράσεις ακόμα και για μη εξελικτικά συντηρημένα miRNA μόρια. Στην τελευταία έκδοση του (TargetScan Release 7.1), η ταξινόμηση των στόχων πραγματοποιείται, πλέον, με βάση τα context++ scores και την πιθανότητα συντηρητικότητας της θέσης στόχευσης (P_{ct}). Τα context scores επιφέρουν αύξηση της ειδικότητας του συγκεκριμένου αλγόριθμου και αποτελούν τον συνυπολογισμό πολλών παραμέτρων. Ανάμεσα σε αυτές, συγκαταλέγονται: **α)** ο βαθμός συμπληρωματικότητας στη seed περιοχή που εξαρτάται από το είδος αντιστοίχισης με το μόριο-στόχο (7mer-m8, 7mer-A1, 8mer), **β)** η ύπαρξη συμπληρωματικότητας miRNA-mRNA εκτός της seed περιοχής (supplementary pairing), **γ)** η περιεκτικότητα σε AU εκατέρωθεν της προβλεπόμενης θέσης στόχευσης, **δ)** η απόσταση της θέσης από το κοντινότερο άκρο της 3'-UTR του γονιδίου-στόχου (minimum distance), **ε)** η σταθερότητα του συμπλόκου miRNA:mRNA ανάλογα με το πλήθος των ζευγών AU στη seed περιοχή (seed-pairing stability, SPS) και **στ)** η αφθονία των αλληλουχιών στόχευσης μιας miRNA οικογένειας σε διαφορετικές 3'-UTRs (target site abundance, TA). Σε γενικές γραμμές, αρνητικότερες τιμές των context scores, υποδεικνύουν ευνοϊκότερη θέση στόχευσης. Τέλος, όσον αφορά στην πιθανότητα P_{ct} , η τιμή της καθορίζει την αναγνώριση πιο αποτελεσματικών στόχων με μεγαλύτερη πιθανότητα εντοπισμού τους στα ζώα (κατανομή των προβλεπόμενων στόχων με φθίνουσα P_{ct}) [59].

Ένας ακόμα εύχρηστος αλγόριθμος που σχεδιάστηκε το 2009 για να προβλεφθούν νέοι miRNA στόχοι στον άνθρωπο είναι ο **DIANA-microT**. Αυτό το πρόγραμμα διαθέτει *in silico* προβλέψεις για τέσσερα είδη (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* και *Caenorhabditis elegans*) και υποστηρίζει το miRBase 18 και την Ensembl 69. Την παρούσα στιγμή, ο αλγόριθμος αυτός (DIANA-microT-CDS) είναι από τους λίγους που επιτρέπουν την αναζήτηση στόχευσης από miRNA μόρια τόσο στην 3'

UTR όσο και στην κωδική περιοχή (CDS) του γονιδίου-στόχου. Αυτό θεωρείται ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς ο έλεγχος και σε κωδικές αλληλουχίες αυξάνει την ευαισθησία του συστήματος σε κάθε επίπεδο ειδικότητας, συγκριτικά με λογισμικά που εξετάζουν μόνο την 3'-UTR. Οι παράμετροι που λαμβάνει υπόψη για την πρόβλεψη των δυνητικών στόχων είναι: **α)** η συμπληρωματικότητα στη seed περιοχή (seed match), **β)** ο εντοπισμός συμπληρωματικότητας στο 5'-άκρο του mRNA στην περίπτωση μειωμένου υβριδισμού στη seed αλληλουχία, **γ)** η διαπιστωμένη συντηρητικότητα της θέσης πρόσδεσης στην αλληλουχία-στόχο και η δομική πρόσβαση της, **δ)** η τιμή της ΔG σχηματισμού του συμπλόκου miRNA:mRNA, καθώς και **ε)** η δημιουργία προεξοχών που προκύπτουν λόγω μερικής συμπληρωματικότητας πάνω στο σχηματιζόμενο δίπολο. Ο διακομιστής του εν λόγω προγράμματος χρησιμοποιεί ως προκαθορισμένο όριο (threshold) την τιμή 0,7 που παρέχει κατά μέσο όρο 350 στόχους για κάθε miRNA μόριο [60,61].

Ένας επίσης πολυχρησιμοποιημένος αλγόριθμος, ο **miRanda**, δημιουργήθηκε το 2003 για την πρόβλεψη miRNA στόχων στη *Drosophila melanogaster*. Ωστόσο, στη συνέχεια, η αναζήτηση του επεκτάθηκε στον άνθρωπο και τα θηλαστικά. Ο συγκεκριμένος αλγόριθμος βασίζεται στον συνυπολογισμό χαρακτηριστικών τόσο του συμπλόκου miRNA:mRNA (συμπληρωματικότητα στη seed περιοχή και στο 3'-άκρο του miRNA μορίου), όσο και της αλληλουχίας στόχευσης (σύσταση σε AU, προσβασιμότητα στη δευτεροταγή δομή του mRNA). Επιπλέον, αξιολογεί την ενέργεια σχηματισμού του διπόλου, όπως και την εξελικτική συντηρητικότητα ολόκληρης της θέσης του στόχου. Πρόσφατα, πραγματοποιήθηκε μια σημαντική βελτίωση αυτού του λογισμικού με τη δημιουργία του αλγόριθμου mirSVR, ο οποίος αναλαμβάνει την ταξινόμηση των προβλεπόμενων αλληλεπιδράσεων που προέρχονται από τον αλγόριθμο miRanda μέσω της ανάθεσης ενός σκορ ($\leq -0,1$). Δηλαδή, συσχετίζεται γραμμικά με τα επίπεδα μειωμένης έκφρασης των γονιδίων-στόχων. Ένα από τα κυριότερα πλεονεκτήματα του mirSVR είναι η δυνατότητα ανίχνευσης αλληλουχιών-στόχων που εμφανίζουν μερική συμπληρωματικότητα με τη seed περιοχή και δεν είναι συντηρημένες [58,62].

Ο τελευταίος από τους πλέον αξιόπιστους αλγόριθμους πρόβλεψης είναι ο **miRDB**. Ο αλγόριθμος αυτός αναπτύχθηκε το 2008 και ανιχνεύει προβλεπόμενους miRNA στόχους σε πέντε είδη (άνθρωπος, ποντίκι, αρουραίος, σκύλος, κοτόπουλο). Για την διεξαγωγή της αναζήτησης περιοχών στόχευσης στις 3'-UTR αλληλουχίες των εκάστοτε μεταγράφων, λειτουργεί συνδυαστικά με τον αλγόριθμο MirTarget, ο οποίος βασίζεται στη συλλογή δεδομένων από πειράματα μικροσυστοιχιών και εμφανίζει την πρωτοτυπία ανακάλυψης

αλληλουχιών-στόχων μειωμένης συντηρητικότητας μεταξύ των ειδών. Ανάμεσα στα χαρακτηριστικά που συνεκτιμώνται για την πρόβλεψη των στόχων περιλαμβάνονται η συμπληρωματικότητα στη seed περιοχή, η συντηρητικότητα της θέσης στόχευσης (όπου υπάρχει) και η δευτεροταγής δομή του mRNA μορίου, περικλείοντας το ενεργειακό κόστος της αλληλεπίδρασης miRNA:mRNA και την προσβασιμότητα της περιοχής που στοχεύεται. Πέραν της υπολογιστικής ανάλυσης, ο αλγόριθμος miRDB δίνει εξέχουσα σημασία στις διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές που σχετίζονται με τα πειράματα ταυτοποίησης των στόχων. Στην τελευταία έκδοση του, παρέχεται η δυνατότητα στους χρήστες του προγράμματος να παραθέσουν προς έλεγχο τη δική τους επιθυμητή αλληλουχία για εξατομικευμένη πρόβλεψη στόχων [58,63].

Ένας εξίσου αναπτυσσόμενος αλγόριθμος που, όμως, χρησιμεύει ως συμπληρωματικό μέσο αξιολόγησης των προβλεπόμενων αλληλεπιδράσεων είναι ο **RNA22**, ο οποίος σχεδιάστηκε το 2006. Η λειτουργία του στηρίζεται στην σάρωση της αλληλουχίας-στόχου προς εντοπισμό στατιστικά σημαντικών προτύπων στόχευσης των γνωστών ώριμων miRNA μορίων και εν συνεχεία, εκτίμηση της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας κατά το σχηματισμό ζεύγους μεταξύ των προτύπων και των υποψήφιων miRNAs [57,58]. Παρεμφερής είναι και η χρησιμότητα των αλγορίθμων **RNAhybrid** και **PITA** που αναπτύχθηκαν το 2006 και 2007, αντίστοιχα. Όσον αφορά στον πρώτο, ο σκοπός του έγκειται στην αναζήτηση των βέλτιστων ενεργητικά θέσεων πρόσδεσης των miRNA μορίων πάνω σε μια mRNA αλληλουχία. Αντιθέτως, με το πρόγραμμα PITA υπολογίζεται η διαφορά μεταξύ της ενέργειας που κερδίζεται από τη δημιουργία του διπόλου miRNA:mRNA και της αποδιάταξης της δευτεροταγούς δομής του μεταγράφου στην περιοχή στόχευσης, με αποτέλεσμα την αξιολόγηση της προσβασιμότητας της εν λόγω περιοχής [58].

Τέλος, αξίζει να αναφερθούν δύο επιπρόσθετα υπολογιστικά συστήματα πρόβλεψης των miRNA στόχων, τα οποία ενσωματώνουν αποτελέσματα που έχουν προκύψει από άλλους αλγόριθμους. Επιπλέον, και στα δύο μπορεί να πραγματοποιηθεί αναζήτηση και για πειραματικά επιβεβαιωμένους στόχους (validated targets), όπως αυτοί αναφέρονται σε βιβλιογραφικά δεδομένα. Το πρώτο από αυτά είναι το πρόγραμμα **miRecords** που δημιουργήθηκε το 2009 και περιλαμβάνει αποτελέσματα από 11 διαφορετικούς καθιερωμένους αλγόριθμους [64]. Από την άλλη, το σύστημα **miRWalk** αναπτύχθηκε το 2011 και παρέχει πληροφορίες για τον άνθρωπο, το ποντίκι και τον αρουραίο. Ο συγκεκριμένος αλγόριθμος, πέρα από την προσπάθεια να εντοπίσει συμπληρωματικές seed

ακολουθίες (βάσει συμπληρωματικότητας Watson-Crick) κατά μήκος της αλληλουχίας ενός γονιδίου, διαθέτει στοιχεία από άλλους 8 αναγνωρισμένους αλγόριθμους πρόβλεψης [65].

Πίνακας 1.2. Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι αλγόριθμοι πρόβλεψης των miRNA στόχων και οι αντίστοιχες ηλεκτρονικές τους διευθύνσεις.

Αλγόριθμος	Ηλεκτρονική διεύθυνση
TargetScan	http://www.targetscan.org/vert_71/
DIANA-microT	http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index
miRanda	http://www.microna.org/
miRDB	http://www.mirdb.org/
RNA22	https://cm.jefferson.edu/rna22/
RNAhybrid	https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid
miRecords	http://c1.accurascience.com/miRecords/
miRWalk	http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/

1.7.1. Εργαστηριακές μέθοδοι επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων πρόβλεψης

Τα υπολογιστικά προγράμματα πρόβλεψης αποτελούν το πρώτο μέσο για τον εντοπισμό των miRNA στόχων, τα οποία κατά βάση στηρίζονται στην αξιολόγηση της συντηρημένης συμπληρωματικότητας μεταξύ των miRNA μορίων και των δυνητικών γονιδίων στόχευσης. Ωστόσο, αυτή η παράμετρος δεν μπορεί να θεωρηθεί ως ο απόλυτος δείκτης για την εξαγωγή σαφών συμπερασμάτων σχετικά με τα αποτελέσματα πρόβλεψης. Για το λόγο αυτό, η πειραματική επιβεβαίωση αυτών των αποτελεσμάτων καθίσταται απαραίτητη για την αποσαφήνιση της ακριβούς λειτουργικότητας των εκάστοτε υποψήφιων miRNAs. Πολλές τέτοιες εργαστηριακές μέθοδοι έχουν παρουσιαστεί στη βιβλιογραφία και οι πλέον εφαρμοζόμενες αφορούν σε μετρήσεις τόσο σε επίπεδο mRNA

(ή γονιδίου) όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης. Στην πρώτη περίπτωση περιλαμβάνονται η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR), που είναι μια γρήγορη και σχετικά φθηνή τεχνική ποσοτικοποίησης των μεταβολών της γονιδιακής έκφρασης, καθώς και η μεταφορά κατά Northern (Northern blotting), η οποία, αν και χρονοβόρα, θεωρείται ιδιαίτερα χρήσιμη κυρίως σε περιπτώσεις όπου εκφράζονται διαφορετικές ισομορφές του στόχου. Όσον αφορά στις μετρήσεις σε πρωτεϊνικό επίπεδο, οι πλέον χρησιμοποιούμενες είναι η μεταφορά κατά Western (Western blotting), η μέθοδος ELISA και αυτή της ανοσοϊστοχημείας. Τέλος, η δοκιμή γονιδίου αναφοράς (Reporter Gene Assay) θεωρείται ευρείας χρήσης παγκοσμίως για την επιβεβαίωση της άμεσης ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης από ένα miRNA μόριο, κατά την οποία η 3'-UTR του μεταγράφου ενδιαφέροντος κλωνοποιείται σε ένα πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο της λουσιφεράσης (γονίδιο αναφοράς). Η ακόλουθη διαμόλυνση των κυττάρων (που εκφράζουν το υποψήφιο miRNA) με τον εν λόγω φορέα συμβάλλει στην εκτίμηση της ύπαρξης αλληλεπίδρασης μεταξύ miRNA και στόχου μέσω αξιολόγησης των μεταβολών στην ενζυμική δραστηριότητα της λουσιφεράσης [66].

1.8. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν, αρχικά, η ανεύρεση του υποψήφιου προς μελέτη miRNA μορίου που προβλέπεται ότι στοχεύει το γονίδιο *KLK3* μέσω πραγματοποίησης έρευνας στους πλέον χρησιμοποιούμενους αλγόριθμους πρόβλεψης που αναφέρθηκαν παραπάνω. Κατόπιν, έλαβε χώρα η διαδικασία πειραματικής επιβεβαίωσης της εν λόγω αλληλεπίδρασης με εφαρμογή της εργαστηριακής δοκιμής γονιδίου αναφοράς (Reporter Gene Assay), προκειμένου να εξαχθούν ακριβή συμπεράσματα σχετικά με την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της *KLK3* από το συγκεκριμένο miRNA μόριο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΛΙΚΑ

2.1.1. Θρεπτικά μέσα - Διαλύματα

➤ Θρεπτικό υλικό ανάπτυξης HEK293T κυττάρων (ATCC:CRL-3216)

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) υψηλής γλυκόζης (4.500 mg/L) με L-Glutamine Sodium Pyruvate και κόκκινο της φαινόλης
- 10 % v/v εμβρυϊκός ορός βοοειδούς (Fetal Bovine Serum, FBS)
- 1 % v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη

➤ Διάλυμα διαχωρισμού κυττάρων

- 0,5 % w/v θρυψίνη
- 0,2 % w/v αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA)
- 10x ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate buffered saline, PBS, pH=7,4)

➤ Διάλυμα ψύξης κυττάρων

- 90 % v/v θρεπτικό υλικό ανάπτυξης HEK293T κυττάρων
- 10 % v/v διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl sulfoxide, DMSO)

➤ Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων (LB υγρής φάσης, pH= 7,5)

- 1% w/v NaCl
- 0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης
- 1% w/v τρυπτόνη

➤ Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων (LB στερεής φάσης)

- 1% w/v NaCl
- 0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης
- 1% w/v τρυπτόνη
- 1,5 % w/v άγαρ
- 0,064 mg/ml X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside)
- 0,2 M IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)
- 50 μg/ml καναμυκίνη (αντιβιοτικό)
- 100 μg/ml αμπικιλίνη/καρβενικιλίνη (αντιβιοτικό)

➤ Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης DH5α κυττάρων (SOC, pH=7)

- 0,05% w/v NaCl
- 0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης
- 2% w/v τρυπτόνη
- 2,5 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄
- 20 mM γλυκόζη

➤ Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (TBE)

- 89 mM Tris-HCl, pH=8,3
- 89 mM βορικό οξύ
- 2 mM EDTA

➤ Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης

- 1% ή 1,5% w/v αγαρόζη
- 0,03 % v/v βρωμιούχο αιθίδιο
- 1x TBE

➤ Διάλυμα αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής (RT-Buffer)

- 50 mM Tris-HCl, pH=8,3
- 3 mM MgCl₂
- 75 mM KCl
- 10 mM διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol, DTT)

➤ Διάλυμα αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου (MasterMix)

- 2x SYBR Green 1 Dye
- AmpliTaq Gold® DNA πολυμεράση
- dNTPs με dUTP
- Passive Reference 1 (ROX)
- βελτιστοποιημένα συστατικά του ρυθμιστικού διαλύματος (περιλαμβάνει MgCl₂)

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Κυτταρικές καλλιέργειες

Στην παρούσα μελέτη, καλλιεργήθηκε και χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη καρκινική σειρά νεφρού HEK293T. Τα κύτταρα αυτά δημιουργήθηκαν μετά από μετασχηματισμό ανθρώπινων εμβρυϊκών κυττάρων νεφρού (HEK) με το SV40 Large T-αντιγόνο, το οποίο επιτρέπει την αντιγραφή των πλασμιδίων που φέρουν SV-40, με αποτέλεσμα να ενισχύονται τα πλασμίδια και να επιμηκύνεται ο χρόνος έκφρασης του επιθυμητού γονιδίου. Για το λόγο αυτό, τα συγκεκριμένα κύτταρα χρησιμοποιούνται ευρέως σε πειράματα διαμόλυνσης στον τομέα της έρευνας [67,68].

2.2.1.1. Απόψυξη των κυττάρων

Η διαδικασία της απόψυξης των κυττάρων από το υγρό άζωτο (-175°C) ή από τους -80°C θα πρέπει να γίνεται υπό αυστηρά ασηπτικές συνθήκες μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar Flow Hood) και με γρήγορους ρυθμούς προς αποφυγή τοξικότητας των

κυττάρων λόγω υπερέκθεσής τους στον κρυοπροστατευτικό παράγοντα DMSO. Αρχικά, αποψύχεται το cryovial των κυττάρων μέσω της τριβής και στη συνέχεια, το διάλυμα μεταφέρεται σε ένα falcon των 15 ml, το οποίο περιέχει 3 ml FBS. Ακολούθως, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στις 1450 rpm για 2 λεπτά στους 25°C προς σχηματισμό ιζήματος των κυττάρων και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Εν συνεχεία, το ίζημα διαλυτοποιείται σε 2 ml θρεπτικού υλικού ανάπτυξης και μεταφέρεται σε φλάσκα καλλιέργειας 75 cm², η οποία περιέχει ποσότητα θρεπτικού, ώστε ο τελικός όγκος θρεπτικού και κυττάρων στη φλάσκα να είναι 10 ml. Επιπλέον, προστίθεται στη φλάσκα 1 ml FBS. Τέλος, η φλάσκα καλλιέργειας τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο με σταθερές συνθήκες (37°C, 5% CO₂).

2.2.1.2. Ανακαλλιέργεια των κυττάρων

Η διαδικασία αυτή συμβαίνει, επίσης, σε αυστηρά ασηπτικές συνθήκες. Προκειμένου να γίνει η ανακαλλιέργεια των κυττάρων, αρχικά ελέγχονται σε ανάστροφο μικροσκόπιο η πυκνότητα (τα κύτταρα θα πρέπει να καλύπτουν το 90-95% της επιφάνειας της φλάσκας) και η μορφολογία τους. Κατόπιν, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας από τη φλάσκα και πραγματοποιείται έκπλυση της με 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1x PBS προς απομάκρυνση μικροποσοτήτων θρεπτικού υλικού που θα μπορούσαν, στη συνέχεια, να αναστείλουν τη δράση της θρυψίνης. Στη συνέχεια, προστίθενται 2 ml του διαλύματος θρυψίνης και ακολουθεί επώαση των κυττάρων στον επωαστικό κλίβανο για 5-10 λεπτά προκειμένου να αποκολληθούν και να διαχωριστούν μεταξύ τους τα κύτταρα (παρατήρηση στο μικροσκόπιο). Έπειτα, προστίθενται 5ml θρεπτικού υλικού ανάπτυξης για απενεργοποίηση της δράσης της θρυψίνης και με τη βοήθεια σιφωνιών ξεπλένονται τα τοιχώματα της φλάσκας. Το εναιώρημα των κυττάρων συλλέγεται, μεταφέρεται σε falcon των 15 ml και φυγοκεντρείται στις 1450 rpm για 2 λεπτά προς σχηματισμό ιζήματος. Ακολούθως, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού υλικού για αναλογία ανακαλλιέργειας 1/3-1/6. Τέλος, η κατάλληλη ποσότητα του κυτταρικού εναιωρήματος μεταφέρεται σε νέα φλάσκα που περιέχει φρέσκο θρεπτικό υλικό, ώστε και πάλι ο τελικός όγκος να είναι 10 ml και τα κύτταρα τοποθετούνται για επώαση στον κλίβανο.

2.2.1.3. Κρυοσυντήρηση των κυττάρων

Οι κυτταρικές σειρές μπορούν να διατηρηθούν για τακτά χρονικά διαστήματα στους -80°C , ενώ για μεγαλύτερο διάστημα απαιτείται η συντήρησή τους σε υγρό άζωτο (-175°C). Για να επιτευχθεί η σωστή κρυοσυντήρηση των κυττάρων, θα πρέπει, αρχικά, αυτά να βρίσκονται σε καλή μεταβολική κατάσταση. Για το λόγο αυτό, η διαδικασία λαμβάνει χώρα όταν τα κύτταρα εμφανίζουν εκθετική φάση ανάπτυξης. Η διατήρησή τους πραγματοποιείται παρουσία κρυοπροστατευτικών μέσων, όπως είναι το DMSO και η γλυκερόλη, προς αποφυγή σχηματισμού κρυστάλλων νερού που αφυδατώνουν και καταστρέφουν τα κύτταρα. Συγκεκριμένα, ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως και στην ανακαλλιέργεια μέχρι το στάδιο της φυγοκέντρωσης. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το ίζημα των κυττάρων διαλυτοποιείται σε 1ml διαλύματος ψύξης (θρεπτικό υλικό + 10 % DMSO) και το διάλυμα μεταφέρεται σε cryovial, το οποίο τοποθετείται άμεσα στους -80°C για χρονικό διάστημα 24 ωρών και στη συνέχεια σε υγρό άζωτο για μακροχρόνια συντήρηση.

2.2.2. Μοριακή κλωνοποίηση

Η μέθοδος της μοριακής κλωνοποίησης αποτελεί μια διαδικασία πολλών σταδίων με σκοπό την δημιουργία μορίων ανασυνδυασμένου DNA και την ακόλουθη αντιγραφή τους μέσα σε έναν οργανισμό-ξενιστή [69]. Με τον τρόπο αυτό, δημιουργούνται κυτταρικοί κλώνοι που φέρουν πανομοιότυπα DNA μόρια. Γενικά, στη μοριακή κλωνοποίηση χρησιμοποιούνται αλληλουχίες DNA από δύο διαφορετικούς οργανισμούς, του οργανισμού-δότη του DNA που υφίσταται κλωνοποίηση και του οργανισμού που λειτουργεί ως ξενιστής για την αντιγραφή του ανασυνδυασμένου DNA. Η μέθοδος της μοριακής κλωνοποίησης χρησιμοποιείται ευρέως στους τομείς της σύγχρονης βιολογίας και της ιατρικής [70]. Στην παρούσα μελέτη, διεξήχθησαν δύο ξεχωριστές διαδικασίες μοριακής κλωνοποίησης με στόχο τη δημιουργία και απομόνωση αφενός του πλασμιδίου που φέρει την 3'-UTR του γονιδίου *KLK3* και αφετέρου του πλασμιδίου που φέρει την 3'-UTR του γονιδίου *OGT*.

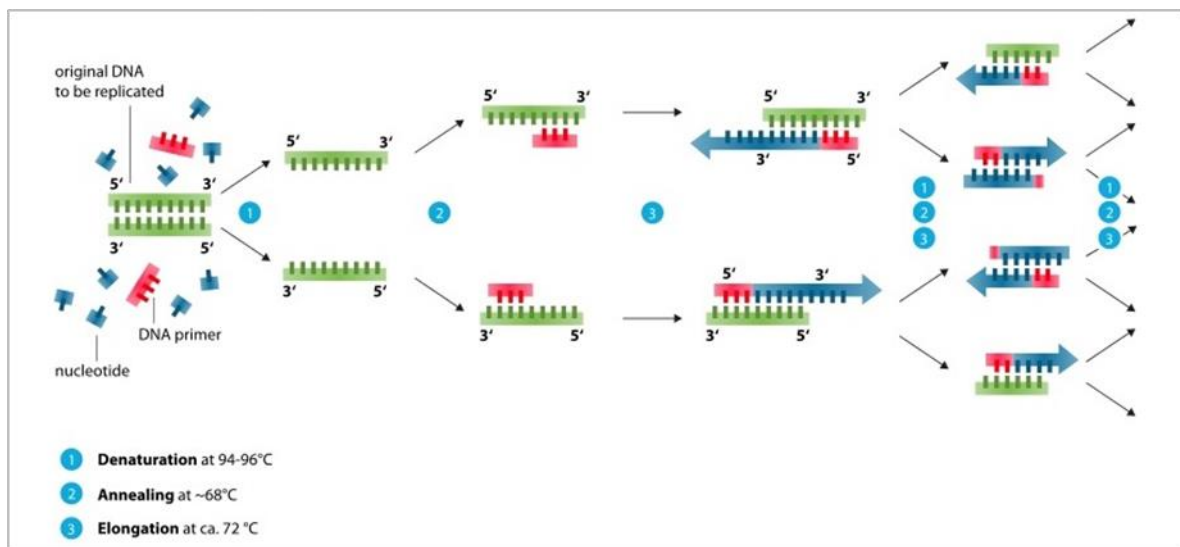
2.2.2.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από τον Kary Mullis το 1983, ο οποίος 10 χρόνια μετά βραβεύτηκε με το Νόμπελ Χημείας για την συμβολή του στον τομέα της έρευνας. Η μέθοδος της PCR είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική στη μοριακή βιολογία, καθώς αποτελεί έναν εύκολο, φθηνό και αξιόπιστο τρόπο *in vitro* ενίσχυσης, κατά δισεκατομμύρια φορές, συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA που μπορεί να υφίστανται ακόμα και σε μικρή συγκέντρωση σε ένα δείγμα. Με τον σχεδιασμό των κατάλληλων συνθετικών DNA εκκινητών ολιγονουκλεοτιδίων, όπου ο καθένας είναι συμπληρωματικός ως προς τη μια από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA, επιτυγχάνεται και ο καθορισμός των άκρων του DNA τμήματος που πρόκειται να ενισχυθεί [71]. Επιπλέον, η επιμήκυνση των νέων αλυσίδων πραγματοποιείται από την θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση (προερχόμενη από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*) που αντέχει σε θερμοκρασίες μέχρι 95°C.

Τα στάδια της μεθόδου, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά με θερμικές αλλαγές που καλούνται κύκλοι της αντίδρασης, απεικονίζονται στην **Εικόνα 2.1** και αναλύονται παρακάτω [72]:

- i. Αποδιάταξη: Διαχωρισμός των δύο αλυσίδων του δίκλωνου DNA δείγματος με σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων σε θερμοκρασία 95°C για 1-2 λεπτά. Έτσι, προκύπτει μονόκλωνο DNA.
- ii. Υβριδοποίηση των εκκινητών: Σε αυτό το στάδιο, παρατηρείται σημαντική μείωση της θερμοκρασίας στους 50-65°C για 20-40 δευτερόλεπτα, επιτρέποντας την υβριδοποίηση των εκκινητών με την επιθυμητή αλληλουχία. Αυτό το στάδιο είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς η θερμοκρασία υβριδοποίησης που εξαρτάται από το σημείο τήξης (T_m) του κάθε εκκινητή, θα επηρεάσει την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου.
- iii. Επιμήκυνση: Αύξηση της θερμοκρασίας στους 72°C που αποτελεί τη βέλτιστη θερμοκρασία για να δράσει το ένζυμο της Taq DNA πολυμεράσης. Εδώ, η DNA πολυμεράση επιμηκώνει τα άκρα των εκκινητών, εισάγοντας dNTPs με κατεύθυνση 5'→3', με αποτέλεσμα τη σύνθεση μιας νέας αλυσίδας που είναι συμπληρωματική ως προς την αλληλουχία του εκμαγείου. Η χρονική διάρκεια του εν λόγω σταδίου εξαρτάται από την ενεργότητα της πολυμεράσης που χρησιμοποιείται, καθώς και από το εκάστοτε μήκος της αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί.

Τα παραπάνω στάδια καθιστούν έναν πλήρη κύκλο της PCR αντίδρασης. Ωστόσο, για την αποτελεσματική ενίσχυση των DNA αλληλουχιών απαιτούνται 25-35 επαναλαμβανόμενοι κύκλοι. Εδώ, οι PCR αντιδράσεις περιελάμβαναν ένα αρχικό στάδιο θερμικής ενεργοποίησης της πολυμεράσης για 2 λεπτά στους 95°C και ακολούθως, το στάδιο αποδιάταξης για 1 λεπτό στους 95°C, το στάδιο υβριδοποίησης των εκκινητών για 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία που εξαρτάται από το T_m των εκκινητών (48°C για το γονίδιο *KLK3* και 59°C για το γονίδιο *OGT*) και το στάδιο επιμήκυνσης των αλυσίδων για 1 λεπτό στους 72°C που επαναλήφθηκαν κυκλικά 30 φορές (30 κύκλοι). Τέλος, ακολούθησαν ένα στάδιο τελικής επιμήκυνσης για 5 λεπτά στους 72°C, καθώς και ένα στάδιο τελικής αναμονής στους 4°C για βραχυπρόθεσμη συντήρηση των προϊόντων της αντίδρασης.



Εικόνα 2.1. Τα στάδια ενός πλήρους κύκλου της PCR αντίδρασης [72].

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR τελικού όγκου 50 μ l στον θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf). Στον **Πίνακα 2.1.** που ακολουθεί, φαίνονται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν. Το PCR kit ήταν της εταιρείας Kara Biosystems και αποτελούνταν από την Taq DNA πολυμεράση, το ρυθμιστικό διάλυμα της (Kara Taq Reaction Buffer) και το διάλυμα με τα κατιόντα Mg^{2+} ($MgCl_2$) για

τη επιτυχή δράση της πολυμεράσης. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια όλων των βάσεων (dNTPs) που αποτελούν τους θεμέλιους λίθους για την παραγωγή των νέων DNA αλυσίδων, καθώς και το κατάλληλο ζεύγος εκκινητών που είναι ειδικοί για την αλληλουχία-στόχο. Για την διαδικασία κλωνοποίησης της 3'-UTR του γονιδίου *KLK3*, ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε δείγμα cDNA ασθενούς με καρκίνο του προστάτη που εκφράζει το *KLK3*, ενώ κατά την αντίστοιχη διαδικασία για το γονίδιο *OGT* χρησιμοποιήθηκε δείγμα γενωμικού DNA ποντικού (*Mus Musculus*).

Πίνακας 2.1. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR αντίδραση.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση τελικού όγκου 50μl
▪ 5x Kapa Taq Reaction Buffer (Mg free)	10μl
▪ MgCl ₂ (25mM)	3μl
▪ dNTPs (10mM)	1μl
▪ Πρόσθιος εκκινητής (F) (10 pM)	1μl
▪ Ανάστροφος εκκινητής (R) (10 pM)	1μl
▪ Kapa Taq DNA πολυμεράση (5u/μl)	0,5μl
▪ Δείγμα-εκμαγείο	2μl
▪ dH ₂ O	31,5μl

Όσον αφορά στο σχεδιασμό των εκκινητών, το μήκος του κάθε ολιγονουκλεοτιδίου θα πρέπει να κυμαίνεται στα 18-22 bp, προκειμένου αφενός να επιτυγχάνεται η κατάλληλη εξειδίκευση και αφετέρου να είναι εφικτή η υβριδοποίηση με το υπόστρωμα κατά το στάδιο της αποδιάταξης. Επιπλέον, η θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_a) εκκινητή-υποστρώματος εξαρτάται από το σημείο τήξης (T_m) του κάθε εκκινητή. Ως σημείο τήξης (T_m) ορίζεται η θερμοκρασία όπου το 50% του DNA είναι αποδιαταγμένο και υπολογίζεται από τον τύπο: $T_m = 4x(G+C) + 2x(A+T)$. Έτσι, μετά τον υπολογισμό του T_m , η κατάλληλη θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_a) προκύπτει από τον τύπο: $T_a = T_m$ έως ($T_m - 5^\circ\text{C}$). Επιπρόσθετα, η επί τις εκατό περιεκτικότητα των ολιγονουκλεοτιδίων σε GC θα πρέπει να είναι 40-60% και να μην φέρουν περισσότερα από 3 C ή G νουκλεοτίδια ($\leq 3G's-C's$) στις 5 τελευταίες βάσεις του 3'-άκρου τους προς αποφυγή σχηματισμού δεσμών με μη ειδικές περιοχές [73].

Στην παρούσα εργασία, οι εκκινητές για την 3'-UTR του *KLK3* υβριδοποιούνται σε κοινή περιοχή των τριών mRNA μεταγράφων του γονιδίου: *KLK3* mRNA μετάγραφο 1 (GenBank NM_001648.2), *KLK3* mRNA μετάγραφο 3 (GenBank NM_001030047.1) και *KLK3* mRNA μετάγραφο 4 (GenBank NM_001030048.1). Αντιθέτως, οι εκκινητές για την 3'-UTR του *OGT* υβριδοποιούνται στο μοναδικό mRNA μετάγραφο στον ποντικό *Mus Musculus* (GenBank NM_139144.4). Τα ολιγονουκλεοτίδια των εκκινητών σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του αλγόριθμου Primer-BLAST και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.2.**, ο οποίος περιλαμβάνει και κάποια χαρακτηριστικά αυτών. Εδώ, θα πρέπει να αναφερθεί ότι παρόλο που στις αλληλουχίες των εκκινητών έχουν συμπεριληφθεί και οι αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών HindIII (5'-AAGCTT-3') και SacI (5'-GAGCTC-3') που θα χρησιμεύσουν στο στάδιο της υποκλωνοποίησης, εντούτοις δεν έχουν συνοπολογιστεί για τον καθορισμό των Tm και Ta στις παρούσες PCR αντιδράσεις.

Πίνακας 2.2. Οι αλληλουχίες και τα χαρακτηριστικά των εκκινητών που σχεδιάστηκαν για τις 3'-UTRs των γονιδίων *KLK3* και *OGT*.

Ονομασία εκκινητή	Αλληλουχία	Μήκος (nt)	Tm (°C)
KLK3F-UTR	5'-C AAGCTT CCTTGGAATGACCAGG -3'	17	51,67
KLK3R-UTR	5'-C GAGCTC CAGCTCTTTATTTCTGTGAG-3'	20	51,62
F-OGT	5'-C AAGCTT GCTTTCAGACATCCCAGGGT-3'	20	59,9
R-OGT	5'-C GAGCTC TTCCCTACCAAGGCCGAATC-3'	20	61,97

^a Σε μαύρο πλαίσιο φαίνονται οι αλληλουχίες των περιοριστικών ενζύμων HindIII και Sac I που χρησιμεύουν στο στάδιο της υποκλωνοποίησης και δεν έχουν συνοπολογιστεί στο μήκος και τον καθορισμό του Tm του κάθε εκκινητή για την αντίδραση της PCR.

2.2.2.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια εργαστηριακή τεχνική, όπου φορτισμένα μόρια (DNA, RNA και πρωτεΐνες) κινούνται προς τον αντίθετο από το φορτίο τους πόλο, όταν βρίσκονται σε υδάτινα διαλύματα και υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, τα μόρια εμφανίζουν διαφορετικές ταχύτητες κινητικότητας εντός του ηλεκτρικού πεδίου λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών τους. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των φορτισμένων σωματιδίων εξαρτάται κυρίως από το μοριακό βάρος, το καθαρό φορτίο, το σχήμα τους και την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου. Άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την ταχύτητα κίνησης των σωματιδίων είναι το pH και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος, η θερμοκρασία, καθώς και η φύση του υλικού μέσα στο οποίο λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση.

Για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση, την απομόνωση και τον καθαρισμό των νουκλεϊκών οξέων, ως μέσο ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται το πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι ένας ουδέτερος, καθαρός πολυσακχαρίτης, ο οποίος δημιουργεί πόρους κατά το σχηματισμό του πηκτώματος, επιτρέποντας, έτσι, την ελεύθερη μετακίνηση των βιομακρομορίων. Η διάμετρος των πόρων και ο μοριακός ηθμός εξαρτώνται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Συγκεκριμένα, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις εξασφαλίζεται μικρότερο μέγεθος πόρων. Σε γενικές γραμμές, η συγκέντρωση της αγαρόζης κυμαίνεται συνήθως από 0,7% έως 2% w/v. Το μήκος των τμημάτων DNA/RNA που μπορούν να διαχωριστούν με την εν λόγω μέθοδο ανέρχεται στα 100 bp έως 25 kb. Τα μεγαλομοριακά τμήματα διαχωρίζονται αποτελεσματικά σε αραιές συγκεντρώσεις αγαρόζης, ενώ τα μικρότερα τμήματα σε πιο μεγάλες συγκεντρώσεις [74].

Τα βήματα της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης παρατίθενται παρακάτω:

- i. Αρχικά, παρασκευάζεται το πήκτωμα αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης για το μέγεθος του DNA/RNA που πρόκειται να ταυτοποιηθεί/διαχωριστεί. Εδώ, τα προϊόντα των δύο PCR αντιδράσεων ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% w/v, που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια φθορίζουσα χρωστική, η οποία έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται στις βάσεις του DNA και να απορροφά στο υπεριώδες

μήκος κύματος (UV), καθιστώντας, έτσι, τα νουκλεϊκά οξέα ορατά όταν εκτεθούν σε υπεριώδη ακτινοβολία.

- ii. Στη συνέχεια, σε 15 μl του προς ανάλυση δείγματος (PCR προϊόν) προστίθενται 3 μl διαλύματος φόρτωσης (Gel Loading Dye, Blue 6x) και το δείγμα τοποθετείται σε θέση υποδοχής του πηκτώματος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε σταθερή ένταση ρεύματος 100 mA για περίπου 45 λεπτά. Παράλληλα με το δείγμα, ηλεκτροφορούνται και πρότυπα μοριακών βαρών (Low Molecular Weight DNA ladder για την 3'-UTR του *KLK3* και 100 bp DNA ladder για την 3'-UTR του *OGT*) προκειμένου να προσδιοριστεί το κατάλληλο μέγεθος του κάθε προϊόντος.
- iii. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρεται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας και φωτογραφίζεται με σύστημα κάμερας.

2.2.2.3. Αντίδραση σύνδεσης των τμημάτων DNA με τον πλασμιδιακό φορέα pCR™II-TOPO® (TA cloning)

Η διαδικασία TA cloning είναι η πιο δημοφιλής μέθοδος κλωνοποίησης PCR προϊόντων που έχουν ενισχυθεί μέσω της δράσης του ενζύμου Taq DNA πολυμεράση. Ένα από τα χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης πολυμεράσης είναι η έλλειψη ενζυμικής ενεργότητας εξωνουκλεάσης με κατεύθυνση 3'→5', με αποτέλεσμα την ύπαρξη ενός αζευγάρωτου νουκλεοτιδίου αδενίνης (A) στο 3'-άκρο του PCR προϊόντος. Το εν λόγω προϊόν δύναται να κλωνοποιηθεί σε έναν γραμμικό φορέα έκφρασης, ο οποίος διαθέτει ένα συμπληρωματικό μη ζευγαρωμένο νουκλεοτίδιο θυμίνης (T) στο 3'-άκρο του (T-vector). Με τον τρόπο αυτό, πραγματοποιείται υβριδοποίηση των δύο συμπληρωματικών νουκλεοτιδίων και εν συνεχεία, ένωση του PCR προϊόντος με τον φορέα μέσω σχηματισμού φωσφοδιεστερικών δεσμών από τη δράση του ενζύμου DNA λιγάση, οδηγώντας στη δημιουργία του ανασυνδυασμένου DNA [75].

Στην παρούσα μελέτη, έλαβαν χώρα αντιδράσεις TA cloning τελικού όγκου 10μl, όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 2.3.** που ακολουθεί, οι οποίες επωάστηκαν στους 14°C για 12-16 ώρες. Το TA cloning kit ήταν της εταιρείας Invitrogen και περιελάμβανε την T4 DNA λιγάση που παράγεται από τον βακτηριοφάγο T4, το ρυθμιστικό της διάλυμα (10x

T4 DNA Ligase Buffer) που περιέχει ATP για την επιτυχή δράση της λιγάσης, καθώς και τον γραμμικό πλασμιδιακό φορέα pCRTMII-TOPO[®] (4.0 kb).

Πίνακας 2.3. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση TA cloning.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση τελικού όγκου 10μl
▪ 10x T4 DNA Ligase Buffer	1μl
▪ pCR TM II-TOPO [®] φορέας (25ng/μl)	1μl
▪ T4 DNA λιγάση (5u/μl)	1μl
▪ Προϊόν PCR	0,5μl
▪ dH ₂ O	6,5μl

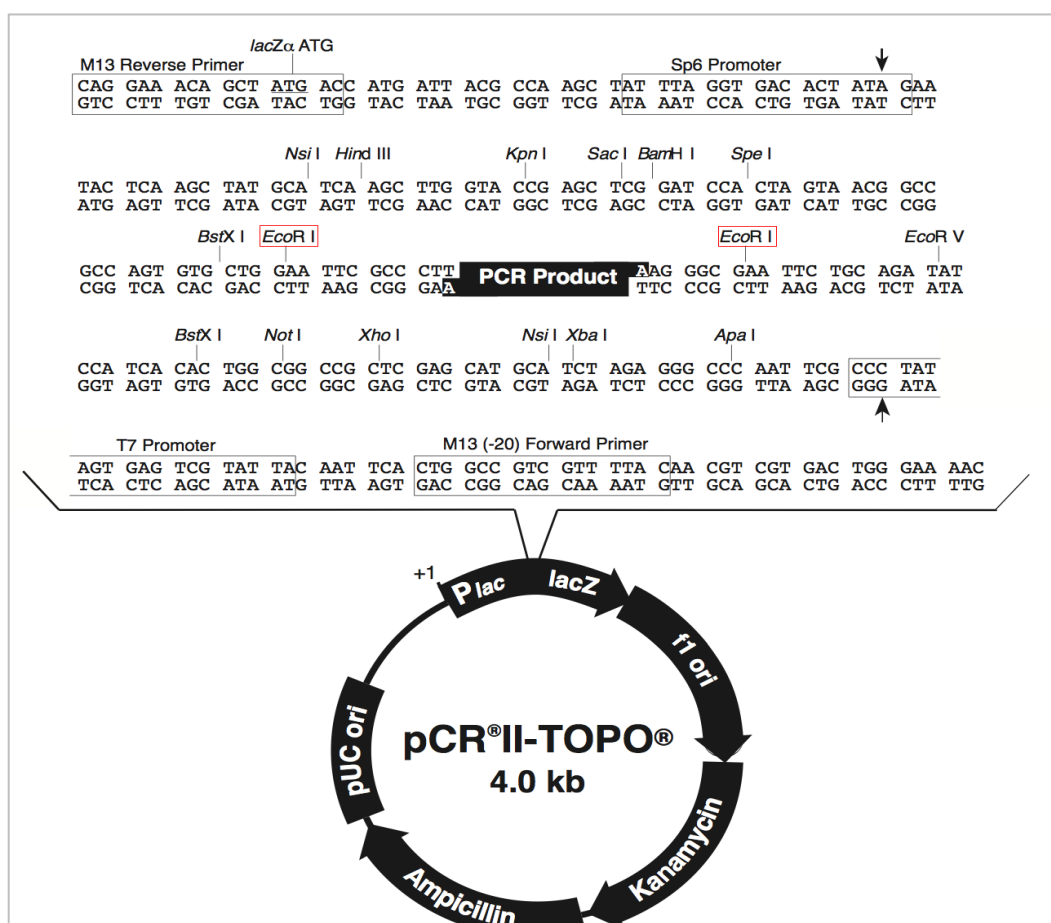
^a Η ποσότητα του ένζυμου της λιγάσης που χρησιμοποιείται στην αντίδραση σύνδεσης δεν θα πρέπει να ξεπερνάει το 10% του τελικού όγκου αυτής.

Όσον αφορά στον φορέα κλωνοποίησης, όπως συμβαίνει και εν προκειμένω με το πλασμίδιο pCRTMII-TOPO[®] (**Εικόνα 2.2**), θα πρέπει να διαθέτει τα χαρακτηριστικά που αναλύονται παρακάτω [76]:

- Δικό του σημείο έναρξης της αντιγραφής (origin of replication, ori), προκειμένου να είναι εφικτή η εν μέρει αυτόνομη αντιγραφή του ανασυνδυασμένου DNA μέσα στον οργανισμό-ξενιστή.
- Γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό, επιτρέποντας την επιβίωση μόνο των επιθυμητών κυτταρικών κλώνων που έχουν δεχτεί τον πλασμίδιο, κατά το στάδιο του μετασχηματισμού. Εδώ, ο φορέας διαθέτει γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (Ampicillin) και την καναμυκίνη (Kanamycin).
- Ισχυρό υποκινητή, ο οποίος θα προάγει την μεταγραφή του διαγονιδίου, καθώς και των υπόλοιπων γονιδίων του φορέα. Εδώ, ο πλασμιδιακός φορέας pCRTMII-TOPO[®] περιέχει τον υποκινητή lac (P_{lac}) και το γονίδιο lacZ (κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοσιδάση), το οποίο χρησιμεύει ως γονίδιο αναφοράς, στη διαδικασία του μετασχηματισμού, για την ταυτοποίηση των πλασμιδίων που φέρουν το επιθυμητό τμήμα DNA. Η μεταγραφή του γονιδίου lacZ πραγματοποιείται μόνο παρουσία λακτόζης ή του μεταγραφικού παράγοντα IPTG.

- iv. Έναν πολυσύνδεσμο MCS (Multiple Cloning Site) που αποτελείται από πολλαπλές θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων, καθιστώντας δυνατή την εισαγωγή εξωγενούς DNA στον φορέα, αλλά και τη μετέπειτα υποκλωνοποίηση αυτού του τμήματος DNA σε ένα διαφορετικό φορέα έκφρασης. Στην **Εικόνα 2.2** παρατηρείται ότι η θέση εισαγωγής του PCR προϊόντος εντοπίζεται ανάμεσα σε αλληλουχίες αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *EcoRI*.

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι ορισμένοι φορείς κλωνοποίησης, όπως και ο *pCRTMII-TOPO[®]*, φέρουν το ένζυμο της τοποϊσομεράσης I που κόβει και επανενώνει DNA τμήματα, με αποτέλεσμα να μην απαιτείται η πέψη του φορέα και του εξωγενούς τμήματος DNA από περιοριστικά ένζυμα και έτσι, να επιταχύνεται η διαδικασία της κλωνοποίησης.



Εικόνα 2.2. Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pCRTMII-TOPO[®] (4.0 kb).

2.2.2.4. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Η μέθοδος του μετασχηματισμού ανακαλύφθηκε από τον Frederick Griffith το 1928, ο οποίος απέδειξε ότι χαρακτηριστικά που κληρονομούνται μπορούν να μεταφερθούν από ένα βακτηριακό στέλεχος σε άλλο. Ως βακτηριακός μετασχηματισμός καλείται ο μηχανισμός κατά τον οποίο το βακτήριο δέχεται τμήματα εξωγενούς DNA (π.χ. πλασμίδια) και τα ενσωματώνει στο χρωμόσωμά του με γενετικό ανασυνδυασμό. Ωστόσο, *in vivo* λίγα βακτήρια είναι ικανά πρόσληψης “ξένου” DNA και για το λόγο αυτό, σε εργαστηριακή κλίμακα τα βακτηριακά κύτταρα μπορούν να υποστούν χημική τροποποίηση, κυρίως μέσω επώασης τους σε διάλυμα που περιέχει δισθενή κατιόντα (CaCl_2), προκειμένου να δημιουργηθούν οπές στην κυτταρική τους μεμβράνη και να καταστούν δεκτικά (competent) [77]. Τα κύτταρα DH5a είναι χημικά επεξεργασμένα (δεκτικά) στελέχη, προερχόμενα από το βακτήριο *Escherichia coli*, και αποτελούν τα πλέον χρησιμοποιούμενα και αποδοτικά κύτταρα σε πειράματα βακτηριακού μετασχηματισμού [78].

Η διαδικασία του μετασχηματισμού λαμβάνει χώρα σε ασηπτικές συνθήκες κοντά σε λύχνο. Αρχικά, το προϊόν της αντίδρασης TA cloning επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Παράλληλα, το θρεπτικό μέσο (SOC) των DH5a κυττάρων αποψύχεται στους 37°C που αποτελεί την ιδανική θερμοκρασία για την ανάπτυξη των κυττάρων. Ακολούθως, σε 100 μl των δεκτικών κυττάρων προστίθενται 5 μl του TA cloning προϊόντος και το δείγμα τοποθετείται σε πάγο για 30 λεπτά, αφού προηγηθεί ήπια ανάδευση (χωρίς την χρήση πιπέτας). Εν συνεχεία, ακολουθεί επώαση του δείγματος στους 42°C για ακριβώς 45 δευτερόλεπτα. Στο σημείο αυτό, τα κύτταρα υφίστανται θερμικό σοκ (heat shock) και τα πλασμίδια μπορούν να εισέλθουν σε αυτά. Κατόπιν, το δείγμα μεταφέρεται ακαριαία στον πάγο για ακριβώς 2 λεπτά. Έπειτα, προστίθενται σε αυτό 450 μl του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης SOC και επέρχεται επώαση υπό ανάδευση (shaking incubator) στους 37°C για περίπου 1 ώρα. Τέλος, το μίγμα των κυττάρων επιστρέφεται στην επιφάνεια 2-3 τρυβλίων που περιέχουν LB άγαρ, καθώς και κατάλληλες ποσότητες X-gal, IPTG και καναμυκίνης και τα τρυβλία τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C για 16-18 ώρες προς σχηματισμό κυτταρικών κλώνων (αποικιών) που φέρουν πανομοιότυπα DNA μόρια.

Εδώ, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η X-gal είναι μια χρωμογόνο ουσία που χρησιμεύει στη μοριακή κλωνοποίηση για την ανίχνευση της έκφρασης του ενζύμου β-

γαλακτοσιδάση σε ένα κύτταρο μέσω διαλογής μπλε/άσπρων αποικιών. Οι μπλε αποικίες υποδηλώνουν επιτυχώς μετασχηματισμένα βακτήρια με το πλασμίδιο που, όμως, δεν φέρει το επιθυμητό DNA, ενώ οι άσπρες επιτυχώς μετασχηματισμένα βακτήρια με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Επιπλέον, όπως έχει ειπωθεί και παραπάνω, ο μεταγραφικός παράγοντας IPTG επάγει την έκφραση του γονιδίου lacZ που λειτουργεί ως γονίδιο αναφοράς και η παρουσία του αντιβιοτικού (καναμυκίνη) επιτρέπει την επιβίωση μόνο των κυτταρικών κλώνων που έχουν δεχτεί το πλασμίδιο.

2.2.2.5. Υγρές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων

Η διαδικασία αυτή συμβαίνει, επίσης, σε ασηπτικές συνθήκες κοντά σε λύχνο. Για τη δημιουργία υγρών βακτηριακών καλλιεργειών πραγματοποιείται συλλογή κατάλληλου αριθμού μεμονωμένων άσπρων αποικιών (μετασχηματισμένα βακτήρια με το πλασμίδιο που φέρει το επιθυμητό τμήμα DNA) από τα τρυβλία και ενοφθαλμισμός καθεμιάς από αυτές σε falcon των 50 ml που περιέχει 3 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB μαζί με το αντιβιοτικό καναμυκίνη. Στη συνέχεια, οι καλλιέργειες επωάζονται υπό ανάδευση στους 37°C για αυστηρά 16-18 ώρες.

2.2.2.6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία της απομόνωσης ήταν της εταιρείας Macherey-Nagel (NucleoSpin® Plasmid). Κάθε υγρή βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρεται σε erpendorf tube των 2 ml και φυγοκεντρείται στις 13.400 rpm για 2 λεπτά προς σχηματισμό ιζήματος κυττάρων. Ακολούθως, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 250 µl του διαλύματος A1 (Resuspension Buffer A1) με ήπια ανάδευση έως ότου να μην υφίστανται συσσωματώματα κυττάρων σε αυτό. Έπειτα, ακολουθεί προσθήκη 250 µl του διαλύματος A2 (Lysis Buffer A2), ελαφριά ανάδευση 6-8 φορές (πάνω-κάτω) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 λεπτά προς ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών και λύση των κυττάρων. Εν συνεχεία, προστίθενται 300 µl του

διαλύματος A3 (Neutralization Buffer A3), το μίγμα αναδεύεται 6-8 φορές ακόμα και φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Παράλληλα, η ειδική κολώνα (NucleoSpin® Plasmid Column) που παρέχεται από την εταιρεία, εξισορροπείται σε ένα collection tube των 2 ml. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το καθαρό υπερκείμενο αφήνεται να περάσει διαμέσου της κολώνας προκειμένου το πλασμιδιακό DNA να δεσμευτεί σε αυτήν. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στις 13.400 rpm για 1 λεπτό, απορρίπτεται το υπερκείμενο και η κολώνα ξεπλένεται με 500 μl του διαλύματος AW (Wash Buffer AW), το οποίο έχει προθερμανθεί στους 50°C. Ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρωση για 1 λεπτό και απορρίπτεται ξανά το υπερκείμενο. Το βήμα έκπλυσης της κολώνας επαναλαμβάνεται με προσθήκη 600 μl του διαλύματος A4 (Wash Buffer A4), όπου περιέχεται ποσότητα αιθανόλης. Στο σημείο αυτό, η κολώνα φυγοκεντρείται ξανά για 1 λεπτό προς απομάκρυνση μικροποσοτήτων αιθανόλης που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την καθαρότητα του απομονωμένου DNA. Τέλος, η κολώνα τοποθετείται σε νέο eppendorf tube του 1,5 ml και προστίθενται ακριβώς στο κέντρο της 100 μl του διαλύματος AE (Elution Buffer AE, 5 mM Tris/HCl, pH 8.5) προς έκλουση του πλασμιδιακού DNA από την κολώνα, αφού προηγηθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό.

Η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA υπολογίζεται με τη χρήση φασματοφωτόμετρου που βασίζεται στην ιδιότητα των νουκλεϊκών οξέων να απορροφούν στο υπεριώδες φάσμα φωτός με μέγιστο απορρόφησης στα 260 nm. Εδώ, η φωτομέτρηση των απομονωμένων πλασμιδιακών DNAs έγινε με μόλις 1 μl του κάθε δείγματος στο νανοφωτόμετρο Biospec-nano της εταιρείας Biotech. Ωστόσο, την ιδιότητα απορρόφησης διαθέτουν και οι πρωτεΐνες με μέγιστο στα 280 nm. Έτσι, είναι εφικτή η εκτίμηση της καθαρότητας του απομονωμένου DNA μέσω υπολογισμού του λόγου των απορροφήσεων στα 260 nm και 280 nm, σύμφωνα με τον τύπο $\lambda = A_{260}/A_{280}$. Οι λόγοι που κυμαίνονται από 1,8-2 θεωρούνται αποδεκτοί και υποδεικνύουν την καθαρότητα του δείγματος.

2.2.2.7. Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού

Η ανακάλυψη και περιγραφή του συστήματος των περιοριστικών ενδονουκλεασών πραγματοποιήθηκε από τον Werner Aber το 1965, ο οποίος 13 χρόνια μετά βραβεύτηκε με το Νόμπελ Φυσιολογίας για την συμβολή του στον τομέα της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αποτελούν ένζυμα βακτηριακής προέλευσης που έχουν τη δυνατότητα να διασπούν το δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένες θέσεις, αφού αναγνωρίσουν μικρού μεγέθους χαρακτηριστικές αλληλουχίες πάνω στις δύο αλυσίδες. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης είναι συμμετρικές και παλίνδρομες και το μέγεθός τους κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 4 και 8 νουκλεοτιδίων. Τα περιοριστικά αυτά ένζυμα διακρίνονται σε τέσσερις τύπους (I-IV), οι οποίοι διαφέρουν ως προς τη δομή, τη θέση αναγνώρισης και την εξειδίκευση. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες τύπου II θεωρούνται οι πλέον χρήσιμες στον κλάδο της γενετικής μηχανικής, καθώς κόβουν το DNA εντός της αλληλουχίας αναγνώρισης [79]. Εδώ, χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI (5'-GAATTC-3'), HindIII (5'-AAGCTT-3') και SacI (5'-GAGCTC-3') που ανήκουν στην εν λόγω κατηγορία και οδηγούν στο σχηματισμό προεξεχόντων άκρων (sticky ends). Τα ένζυμα αυτά, όπως και τα ρυθμιστικά τους διαλύματα (10x EcoRI Reaction Buffer, 10x CutSmart® Buffer) και ο ορός αλβουμίνης βοοειδούς (100x Purified BSA), που χρησιμεύει στην σταθεροποίηση και προστασία του περιοριστικού ενζύμου κατά την αντίδραση της πέψης, ήταν της εταιρείας New England Biolabs.

Στην παρούσα εργασία, μετά τη συλλογή των αποικιών και την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από την καθεμία, κρίθηκε απαραίτητη η ταυτοποίηση αυτών που έχουν δεχτεί το πλασμίδιο με το επιθυμητό τμήμα, το οποίο, όπως έχει ήδη αναφερθεί, εντοπίζεται ανάμεσα σε αλληλουχίες αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI πάνω στον πλασμιδιακό φορέα pCR™II-TOPO®. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις πέψης με το συγκεκριμένο ένζυμο τελικού όγκου 15 μl, όπως παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.4** που ακολουθεί, οι οποίες επώαστηκαν στους 37°C για 1,5 ώρα. Τα προϊόντα των αντιδράσεων αυτών μαζί με τα αντίστοιχα πρότυπα μοριακών βαρών ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης ανάλογα με το μέγεθος του DNA που ταυτοποιήθηκε. Για την 3'-UTR του *KLK3*, μεγέθους περίπου 590 bp, το πήκτωμα αγαρόζης ήταν συγκέντρωσης 1% w/v, ενώ για την 3'-UTR του *OGT*, μεγέθους περίπου 474 bp, ήταν 1,5% w/v.

Πίνακας 2.4. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση τελικού όγκου 15 μ l
▪ 10x EcoRI Reaction Buffer	1,5 μ l
▪ 100x Purified BSA (10mg/ml)	0,5 μ l
▪ EcoRI (20,000u/ml)	1 μ l
▪ Δείγμα πλασμιδιακού DNA	V που αντιστοιχεί σε 500ng DNA
▪ dH ₂ O	12-V _{DNA} μ l

Αφού πραγματοποιήθηκε η επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης του επιθυμητού τμήματος DNA στον φορέα, ακολούθησαν αντιδράσεις πέψης τόσο του πλασμιδιακού DNA όσο και του φορέα pMIR-REPORT™ Luciferase (6740 bp), όπου θα γίνει η τελική υποκλωνοποίηση, με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες HindIII και SacI. Ο λόγος που επιλέχθηκαν τα συγκεκριμένα ένζυμα είναι διότι αφενός μπορούν να αποκόψουν το τμήμα DNA από τον φορέα pCR™II-TOPO®, καθώς το PCR προϊόν φέρει στο 5'-άκρο του τις αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τα εν λόγω ένζυμα (είχαν συμπεριληφθεί στις αλληλουχίες των εκκινητών), και αφετέρου το πλασμίδιο pMIR-REPORT™ Luciferase διαθέτει θέσεις αναγνώρισης των HindIII και SacI μέσα στον πολυσύνδεσμο MCS, όπως υποδηλώνεται από τον χάρτη του που θα αναλυθεί παρακάτω, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η μετατροπή του σε γραμμικό φορέα έκφρασης και η εισαγωγή του DNA σε αυτόν. Εδώ, οι αντιδράσεις πέψης ήταν τελικού όγκου 40 μ l, όπως δείχνει και ο **Πίνακας 2.5**, που επωάστηκαν στους 37°C για τουλάχιστον 3 ώρες. Στη συνέχεια, τα προϊόντα αυτών ηλεκτροφορήθηκαν σε ανάλογες συνθήκες όπως και παραπάνω για να ακολουθήσει η διαδικασία εκχύλισης των DNAs από το πήκτωμα της αгарόζης και να γίνει η αντίδραση της ένωσης.

Πίνακας 2.5. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις πέψης του πλασμιδιακού DNA και του πλασμιδίου pMIR-REPORT™ Luciferase με τις ενδονουκλεάσες HindIII και SacI.

Αντιδραστήρια	Αντιδράσεις τελικού όγκου 40 μ l
10x CutSmart® Buffer - HindIII (20,000u/ml) - SacI (20,000u/ml) - Δείγμα πλασμιδιακού DNA - dH₂O	4μl 1,5μl 1,5μl V που αντιστοιχεί σε 1,5-2,5μg DNA 33-V_{DNA} μl
10x CutSmart® Buffer - HindIII (20,000u/ml) - SacI (20,000u/ml) - Πλασμίδιο pMIR-REPORT™ Luciferase - dH₂O	4μl 1,5μl 1,5μl V που αντιστοιχεί σε 700ng DNA 33-V_{DNA} μl

2.2.2.8. Εκχύλιση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Τα τμήματα DNA που διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μπορούν να ανακτηθούν και να χρησιμοποιηθούν για την υποκλωνοποίηση του DNA ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα pMIR-REPORT™ Luciferase μέσω εκχύλισης τους από το πήκτωμα. Το πρωτόκολλο και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία της εκχύλισης ήταν της εταιρείας Macherey-Nagel (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up). Αρχικά, γίνεται απομόνωση των ζωνών του DNA για την 3'-UTR και τον φορέα pMIR-REPORT™ Luciferase από το πήκτωμα με τη βοήθεια καθαρού ξυραφιού. Στη συνέχεια, τα κομμάτια αυτά τοποθετούνται στο ίδιο eppendorf tube και προσδιορίζεται το βάρος τους με ζυγό. Ακολούθως, προστίθεται σε αυτό κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος NT1 (Binding Buffer NT1/ 300 μ l διαλύματος ανά 100mg πηκτώματος) και επωάζεται στους 50°C για περίπου 7 λεπτά, όπου αναδεύεται (vortex) ανά τακτά χρονικά διαστήματα έως ότου το πήκτωμα λιώσει εντελώς. Παράλληλα, η ειδική κολώνα της εταιρείας (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up) τοποθετείται σε ένα collection tube των 2 ml, όπου προστίθεται το δείγμα για να περάσει διαμέσου της κολώνας και να δεσμευτεί το DNA σε αυτήν. Κατόπιν, ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.400 rpm για 1 λεπτό, απόρριψη του

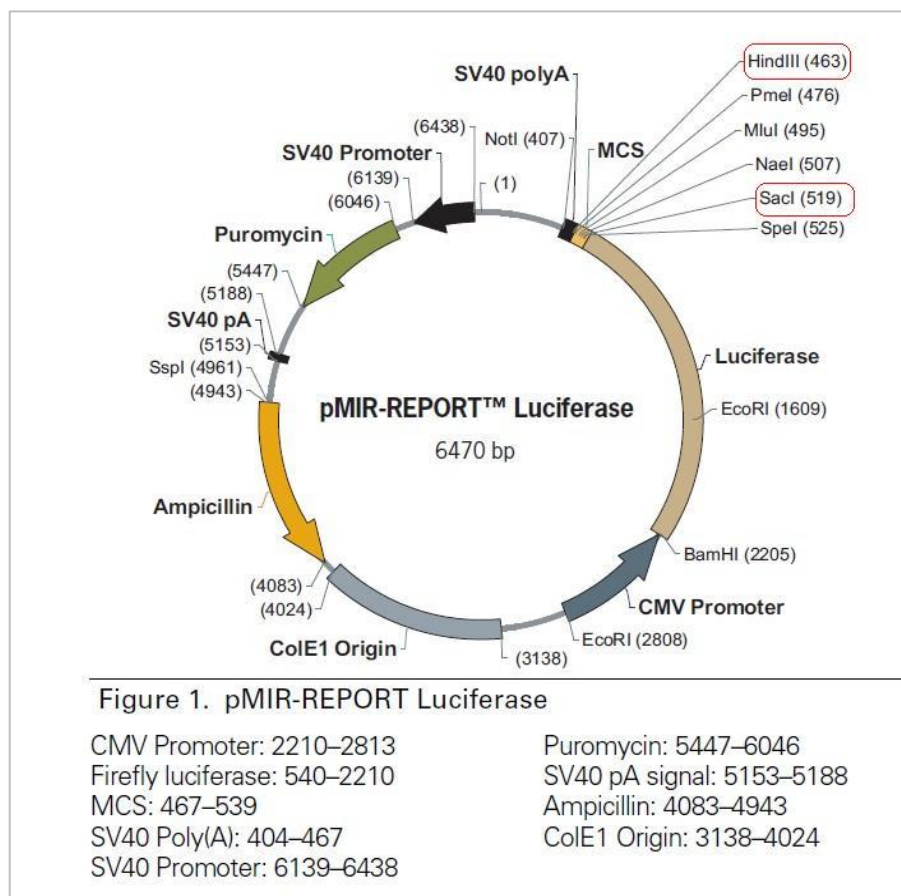
υπερκειμένου και δύο φορές έκπλυση της κολώνας με 700 µl του διαλύματος NT3 (Wash Buffer NT3) που περιέχει αιθανόλη. Έπειτα, το δείγμα φυγοκεντρείται διαδοχικά δύο φορές για 1 λεπτό προς απομάκρυνση των ποσοτήτων αιθανόλης που, ενδεχομένως, έχουν απομείνει σε αυτό και η κολώνα μεταφέρεται σε νέο eppendorf tube του 1,5 ml. Ακριβώς στο κέντρο αυτής γίνεται προσθήκη 20 µl του διαλύματος NE (Elution Buffer NE, 5 mM Tris/HCl, pH 8.5) προς έκλυση του DNA από την κολώνα, αφού προηγηθεί επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό. Τέλος, η συγκέντρωση του εκχυλισθέντος DNA μετράται με τη χρήση φασματοφωτόμετρου.

2.2.3. Υποκλωνοποίηση των τμημάτων DNA στον πλασμιδιακό φορέα pMIR-REPORT™ Luciferase

Η τεχνική της υποκλωνοποίησης αποτελεί μια διαδικασία, στον τομέα της μοριακής βιολογίας, κατά την οποία μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA που έχει εισαχθεί σε ένα αρχικό πλασμίδιο είναι δυνατόν να μεταφερθεί και να κλωνοποιηθεί εκ νέου σε έναν διαφορετικό επιθυμητό φορέα έκφρασης. Για τη διεξαγωγή αυτής της διαδικασίας, απαιτείται, αρχικά, αποκοπή του ενθέματος από τον αρχικό πλασμιδιακό φορέα με τη χρήση ενζύμων περιορισμού, καθώς και επερχόμενος καθαρισμός του εν λόγω τμήματος από τυχόν προσμίξεις με τη μέθοδο της εκχύλισης από πήκτωμα αγαρόζης. Παράλληλα, η ίδια πορεία ακολουθείται και για τον τελικό φορέα, ο οποίος υφίσταται πέψη με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, εφόσον τόσο αυτός όσο και το ένθεμα διαθέτουν κοινές θέσεις αναγνώρισης από τα συγκεκριμένα ένζυμα. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται η δημιουργία συμπληρωματικών προεξεχόντων άκρων (sticky ends) που θα διευκολύνουν την μετέπειτα διαδικασία σύνδεσης. Εν συνεχεία, πραγματοποιείται ένωση του τμήματος DNA με τον επιθυμητό φορέα μέσω της δράσης του ενζύμου DNA λιγάση. Η αναλογία ενθέματος:τελικού φορέα που, συνήθως, προτιμάται για την διαδικασία της ένωσης είναι 3:1 [80].

Στην παρούσα μελέτη, ως τελικός επιθυμητός φορέας έκφρασης επιλέχθηκε το πλασμίδιο pMIR-REPORT™ Luciferase (6470 bp) της εταιρείας Applied Biosystems. Σε γενικές γραμμές, οι πλασμιδιακοί φορείς αυτής της κατηγορίας (pMIR-REPORT™ miRNA Expression Reporter Vectors) χρησιμοποιούνται ευρέως για πειράματα κλωνοποίησης

προβλεπόμενων γονιδιακών στόχων των miRNA μορίων. Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας pMIR-REPORT™ Luciferase, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 2.3**, εμφανίζει όλα εκείνα τα χαρακτηριστικά που θα πρέπει να διαθέτει ένας κοινός φορέας κλωνοποίησης, όπως δικό του σημείο έναρξης της αντιγραφής (ColE1 Origin), γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (Ampicillin, Puromycin) και έναν πολυσύνδεσμο MCS με πολλαπλές θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων, όπου εισάγεται το DNA. Επιπλέον, το πλασμίδιο αυτό διαθέτει ισχυρό υποκινητή SV40 που θα επιτρέψει, αργότερα, την ενίσχυση του σε πειράματα διαμόλυνσης σε HEK293T κύτταρα. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι μέσω του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης (Luciferase) που φέρει, το οποίο υπόκειται στον έλεγχο του CMV υποκινητή, καθίσταται εφικτή η αξιολόγηση της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης από τα miRNAs, όπως θα αναλυθεί παρακάτω, καθώς το ένζυμο της λουσιφεράσης μπορεί να αντιδράσει με κατάλληλο υπόστρωμα, οδηγώντας στην εκπομπή φωτός.



Εικόνα 2.3. Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pMIR-REPORT™ Luciferase (6470 bp).

Έτσι, αφού προηγήθηκε η εκχύλιση των DNAs του ενθέματος και του pMIR-REPORT™ Luciferase από το πήκτωμα, τα οποία αναμίχθηκαν σε αναλογία περίπου 3:1, όπως υποδεικνύεται από τον **Πίνακα 2.5**, ακολούθησε η αντίδραση ένωσης τους από την T4 DNA λιγάση τελικού όγκου 10 µl, σύμφωνα με τον **Πίνακα 2.6**, που επωάστηκε και πάλι στους 14°C για 12-16 ώρες. Στη συνέχεια, διεξήχθησαν όλα τα ανωτέρω στάδια (μετασχηματισμός σε DH5a κύτταρα, υγρές βακτηριακές καλλιέργειες, απομόνωση πλασμιδιακού DNA, πέψη με τα ένζυμα HindIII και SacI) προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της υποκλωνοποίησης του DNA για την 3'-UTR στο πλασμίδιο pMIR-REPORT™ Luciferase. Εδώ, η επίστρωση των κυττάρων, κατά τη διαδικασία του μετασχηματισμού, έγινε σε τρυβλία που περιείχαν LB άγαρ και αμπικιλίνη ή καρβενικιλίνη και ακολούθησε συλλογή των μεμονωμένων άσπρων αποικιών που αναπτύχθηκαν.

Πίνακας 2.6. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία σύνδεσης του DNA ενθέματος με τον πλασμιδιακό φορέα pMIR-REPORT™ Luciferase.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση τελικού όγκου 10 µl
▪ 10x T4 DNA Ligase Buffer ▪ T4 DNA λιγάση (5u/µl) ▪ Καθαρό DNA ενθέματος-φορέα ▪ dH₂O	1µl 1µl 8µl -

2.2.3.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA για πειράματα διαμόλυνσης

Από τις αποικίες που ταυτοποιήθηκαν ότι έχουν δεχτεί το πλασμίδιο με το ένθεμα, επιλέγεται αυτή με την μεγαλύτερη συγκέντρωση πλασμιδιακού DNA και ενοφθαλμίζεται σε falcon των 50 ml που περιέχει 15 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB μαζί με το αντιβιοτικό αμπικιλίνη ή καρβενικιλίνη. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια επωάζεται υπό ανάδευση στους 37°C για αυστηρά 16-18 ώρες. Το πρωτόκολλο και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

για τη διαδικασία της απομόνωσης ήταν της εταιρείας Macherey-Nagel (NucleoSpin® Plasmid Transfection-grade). Η υγρή βακτηριακή καλλιέργεια των 15 ml μεταφέρεται σε 4 eppendorf tubes των 2 ml που υφίστανται φυγοκέντρωση στις 13.400 rpm για 2 λεπτά προς σχηματισμό ιζήματος κυττάρων (τα 3 από αυτά αποθηκεύονται για ενδεχόμενη μελλοντική χρήση στους -20°C). Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου, το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 250 µl του διαλύματος A1 (Resuspension Buffer A1) με ήπια ανάδευση μέχρι να μην υπάρχουν συσσωματώματα κυττάρων σε αυτό και ακολουθεί προσθήκη 250 µl του διαλύματος A2 (Lysis Buffer A2) με ελαφριά ανάδευση 6-8 φορές (πάνω-κάτω). Εν συνεχεία, προστίθενται 300 µl του διαλύματος A3 (Neutralization Buffer A3) και το μίγμα αναδεύεται έως ότου εξαφανιστεί το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Έπειτα, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στις 13.400 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προς καθαρισμό του προϊόντος λύσης. Παράλληλα, η κολώνα (NucleoSpin® Plasmid TG Column) της εταιρείας, εξισορροπείται σε collection tube των 2 ml. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το καθαρό υπερκείμενο αφήνεται να περάσει διαμέσου της κολώνας προκειμένου το πλασμιδιακό DNA να δεσμευτεί σε αυτήν. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 1 λεπτό, απορρίπτεται το υπερκείμενο και η κολώνα ξεπλένεται διαδοχικά δύο φορές με 700 µl του διαλύματος ERB (Wash Buffer ERB) και 650 µl του διαλύματος AQ (Wash Buffer AQ, περιέχει αιθανόλη). Μετά από κάθε έκπλυση, ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 λεπτό και απόρριψη του υπερκείμενου. Στο σημείο αυτό, η κολώνα φυγοκεντρείται ξανά για 1 λεπτό προς απομάκρυνση των μικροποσοτήτων αιθανόλης. Τέλος, η κολώνα τοποθετείται σε νέο eppendorf tube του 1,5 ml και προστίθενται στο κέντρο της 100 µl του διαλύματος AE (Elution Buffer AE, 5 mM Tris/HCl, pH 8.5) προς έκλυση του πλασμιδιακού DNA από την κολώνα, αφού προηγηθεί επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό. Η συγκέντρωση του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA υπολογίζεται, και πάλι, με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στα πρωτόκολλα των πειραμάτων διαμόλυνσης.

2.2.4. Διαμόλυνση των κυττάρων με το πλασμιδιακό DNA

Η μέθοδος της διαμόλυνσης αφορά στην εισαγωγή εξωγενούς DNA στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Κατά τη διαδικασία αυτή, το “ξένο” γενετικό υλικό μπορεί να ενσωματωθεί μόνιμα ή παροδικά στο γονιδίωμα των κυττάρων. Σε γενικές γραμμές, οι τρόποι που έχουν αναπτυχθεί για τη γονιδιακή μεταφορά διακρίνονται σε φυσικούς και χημικούς (χημικές ουσίες, ιικά σωματίδια). Στους φυσικούς τρόπους ανήκουν η ηλεκτροδιάτρηση, η μικροένεση, ο βομβαρδισμός με μικροσφαιρίδια που περιέχουν το διαγονίδιο (gene gun), η υδροστατική πίεση και η χρήση υπερήχων. Αντιθέτως, στους χημικούς τρόπους συγκαταλέγονται αυτοί, όπου διάφορα χημικά υλικά ή σωματίδια ιών λειτουργούν ως “οχήματα” για τη μεταφορά του εξωγενούς γενετικού υλικού. Τέτοιες χημικές ουσίες μπορεί να είναι λιποσώματα (lipofection), κατιονικά μη λιπιδικά πολυμερή, όπως DEAE-δεξτράνη ή πολυαιθανολαμίνη (PEI), κυκλοδεξτρίνη και νανοσωματίδια [81].

Στην παρούσα εργασία, για τη διεξαγωγή των πειραμάτων διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε το jetPRIME[®] Transfection kit της εταιρείας Polyplus. Το αντιδραστήριο του εν λόγω kit, jetPRIME[®] Reagent, αποτελείται από κατιονικά μη λιπιδικά πολυμερή (θετικά φορτισμένα), τα οποία σχηματίζουν σύμπλοκο με το αρνητικά φορτισμένο νουλεϊκό οξύ. Τα σύμπλοκα αυτά αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη και επιτρέπουν την είσοδο του DNA στον πυρήνα του κυττάρου μέσω ενδοκύττωσης. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας, αρχικά, πραγματοποιείται καταμέτρηση των κυττάρων (με τη βοήθεια της πλάκας Neubauer) και επίστρωση του απαιτούμενου αριθμού αυτών σε πιάτο 24 φρεατίων ($5,5 \times 10^4$ κύτταρα σε 1 ml θρεπτικού μέσου για κάθε φρεάτιο). Ακολουθεί επώαση τους σε επωαστικό κλίβανο (37°C, 5% CO₂) για 24 ώρες. Κατά το στάδιο της διαμόλυνσης, τα κύτταρα θα πρέπει να καλύπτουν το 60-80% της επιφάνειας του φρεατίου. Εν συνεχεία, η επιθυμητή συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA αναμειγνύεται σε 50 µl του ρυθμιστικού διαλύματος jetPRIME[®] Buffer μέσω ανάδευσης (vortex) για 10 δευτερόλεπτα και κατόπιν spin down. Έπειτα, στο μίγμα αυτό προστίθεται κατάλληλη ποσότητα του αντιδραστηρίου jetPRIME[®] Reagent (για αναλογία πλασμιδιακού DNA:αντιδραστηρίου 1:2) και επέρχεται εκ νέου ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα, spin down και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα σύμπλοκα DNA-πολυμερών που έχουν σχηματιστεί, μπορούν να παραμείνουν σταθερά για 6 ώρες. Στη συνέχεια, το τελικό μίγμα προστίθεται σε κάθε φρεάτιο υπό ροή σταγόνας. Το

θρεπτικό μέσο αντικαθίσταται μετά από 6 ώρες και τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο για 36 ώρες. Εδώ, για τον έλεγχο της έκφρασης του πλασμιδίου miR-936 (Origene) στα HEK293T κύτταρα, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 250ng, 500ng, 750ng και 1μg. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ο αρνητικός μάρτυρας για το miR-936, 1μg του πλασμιδίου miR-423-5p (αποτελείται από τον ίδιο φορέα έκφρασης pCMV-MIR με το miR-936), καθώς και κύτταρα τα οποία δε διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο.

Ως συνδιαμόλυνση (co-transfection) ορίζεται η ταυτόχρονη διαμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων με δύο διαφορετικά μόρια νουλεϊκών οξέων (π.χ. πλασμιδιακό DNA και miRNA). Κατά τη διαδικασία αυτή, κρίνεται απαραίτητη η διατήρηση της ίδιας ποσότητας συνολικού DNA σε κάθε δείγμα. Ωστόσο, η αναλογία κάθε πλασμιδίου, που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί, χρήζει περαιτέρω βελτιστοποίησης για να επιτευχθούν τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα. Επιπλέον, θεωρείται εξίσου σημαντική η ανάμειξη των απαιτούμενων πλασμιδιακών DNAs πριν από την προσθήκη του αντιδραστηρίου διαμόλυνσης [82]

Στην προκειμένη μελέτη, για να εντοπιστούν η βέλτιστη αναλογία του κάθε πλασμιδίου, καθώς και οι κατάλληλες συνθήκες για τα πειράματα συνδιαμόλυνσης, έλαβε χώρα βιβλιογραφική ανασκόπηση προς αναζήτηση μιας επιβεβαιωμένης μελέτης που έχει ακολουθήσει την ίδια πειραματική διαδικασία. Έτσι, επιλέχθηκε η εργαστηριακή διεκπεραίωση μιας μελέτης, όπου το γονίδιο *OGT* στοχεύεται από το miR-423-5p, το οποίο αποτελείται από τον ίδιο πλασμιδιακό φορέα με το miR-936. [83]. Κι εδώ, διεξήχθη η ίδια πορεία της μεθόδου διαμόλυνσης με τη χρήση των ίδιων αντιδραστηρίων. Παρόλα αυτά, υπήρξαν ελάχιστες διαφοροποιήσεις όσον αφορά στον αρχικό αριθμό των κυττάρων και σε κάποιους τεχνικούς χειρισμούς. Συγκεκριμένα, η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων ανήλθε στα $6,5 \times 10^4$ κύτταρα σε 500μl θρεπτικού μέσου για κάθε φρεάτιο και κρίθηκε απαραίτητη η έντονη ανάδευση των κυττάρων σε ειδική πλατφόρμα για 1-2 λεπτά μετά την προσθήκη του τελικού μίγματος διαμόλυνσης. Οι συγκεντρώσεις των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στο τελικό πείραμα συνδιαμόλυνσης για τον έλεγχο πιθανής στόχευσης του miR-936 στην 3'-UTR του γονιδίου *KLK3*, όπως προέκυψαν από την εργαστηριακή εκτέλεση της επιβεβαιωμένης μελέτης, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.7**. Αξίζει να σημειωθεί ότι το πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοσιδάση (pMIR-REPORT™ β-gal Control, Applied Biosystems) χρησιμεύει για κανονικοποίηση των τιμών κατά το μετέπειτα στάδιο ελέγχου της ενζυμικής ενεργότητας της λουσιφεράσης.

Πίνακας 2.7. Οι τελικές συγκεντρώσεις των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία συνδιαμόλυνσης των HEK293T κυττάρων για έλεγχο πιθανής στόχευσης του *KLK3* από το miR-936.

Δείγμα	3'-UTR <i>KLK3</i>	β -gal	miR-936	miR-423-5p	
Control	50ng	10ng	-	400ng	460ng
1	50ng	10ng	50ng	350ng	460ng
2	50ng	10ng	100ng	300ng	460ng
3	50ng	10ng	200ng	200ng	460ng
4	50ng	10ng	400ng	-	460ng
Cells	-	-	-	-	-

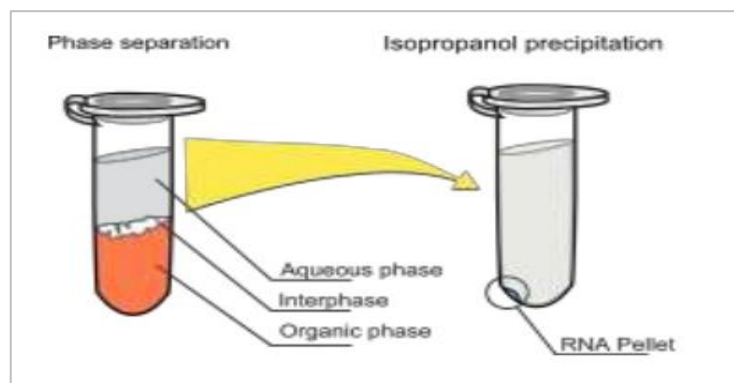
2.2.5. Εκχύλιση ολικού RNA από τα κύτταρα

Η μέθοδος εκχύλισης του RNA αποτελεί μια περίπλοκη διαδικασία κυρίως λόγω της ιδιαίτερης ευαισθησίας του μορίου αυτού σε φαινόμενα αποικοδόμησης από ριβονουκλεάσες (RNάσες), προερχόμενες είτε από το ίδιο το κύτταρο είτε από το περιβάλλον της εκχύλισης. Για το λόγο αυτό, απαιτείται προσοχή κατά την πειραματική πορεία της μεθόδου και τα υλικά χρήσης θα πρέπει να είναι αποστειρωμένα και απαλλαγμένα από RNάσες. Το πιο δημοφιλές πρωτόκολλο της διαδικασίας εκχύλισης είναι αυτό που δημοσιεύτηκε το 1987 από τον Piotr Chomczynski και την Nicoletta Sacchi, σύμφωνα με το οποίο το όξινο διάλυμα ισοθειοκυανικής γουανίνης, φαινόλης και χλωροφορμίου προκαλεί τη λύση των κυττάρων και την αποδιάταξη των ανώτερων πρωτεϊνικών δομών, καθώς και το διαχωρισμό του rRNA από τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες [84]. Εδώ, το όξινο αυτό διάλυμα ήταν της εταιρείας Sigma-Aldrich (TRI Reagent).

Στην παρούσα μελέτη, στο πείραμα για τον έλεγχο της έκφρασης του miR-936 στα HEK293T κύτταρα, αρχικά, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο από κάθε φρεάτιο και εν συνεχεία, προστέθηκε 1 ml του διαλύματος TRI Reagent με παρατεταμένη ανάδευση προκειμένου να προκληθεί ρήξη των κυτταροπλασματικών μεμβρανών και απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου. Έπειτα, το μίγμα μεταφέρεται σε eppendorf tube των 2 ml και επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, προστίθενται σε αυτό 200 μ l χλωροφορμίου με έντονη ανάδευση για περίπου 15 δευτερόλεπτα, επώαση για 10

λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση στις 12.000 g για 15 λεπτά στους 4°C. Στο σημείο αυτό, δημιουργούνται τρεις φάσεις (**Εικόνα 2.4**): η κατώτερη (οργανική) που περιέχει τις πρωτεΐνες, η ενδιάμεση που αποτελεί το DNA και η ανώτερη (υδατική), στην οποία περιέχεται το RNA που πρόκειται να απομονωθεί. Κατόπιν, πραγματοποιείται συλλογή της υδατικής φάσης και τοποθέτησή της σε νέο eppendorf tube των 2 ml. Στη συνέχεια, προστίθενται σε αυτήν 500 μl ισοπροπανόλης με ήπια ανάδευση και ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση για 8 λεπτά. Η ισοπροπανόλη είναι μια υδρόφοβη ουσία που βοηθάει στην κατακρήμνιση του RNA (**Εικόνα 2.4**). Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, απορρίπτεται το υπερκείμενο με χρήση αποστειρωμένης σύριγγας, προστίθεται στο ίζημα 1 ml 75% v/v αιθανόλης με ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 λεπτά. Τέλος, γίνεται αφαίρεση του υπερκειμένου με τη σύριγγα, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει από τυχόν μικροποσότητες αιθανόλης και επαναδιαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος RSS (RNA Storage Solution, 1mM κιτρικό νάτριο, pH 6.4). Το συγκεκριμένο διάλυμα ελαχιστοποιεί την υδρόλυση των βάσεων του RNA μέσω του κιτρικού νατρίου που περιέχει, το οποίο δρα ως χηλικός παράγοντας δεσμεύοντας δισθενή κατιόντα. Το απομονωμένο ολικό RNA φυλάσσεται στους -80°C ή ακολουθεί η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής.

Η συγκέντρωση του ολικού RNA, καθώς και η καθαρότητα του μπορούν να εκτιμηθούν με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Εδώ, τιμές των λόγων μικρότερες από 1,8 υποδηλώνουν υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 2 αντιστοιχούν στην παρουσία ποσότητας DNA σε υψηλά επίπεδα.



Εικόνα 2.4. Διαχωρισμός φάσεων (αριστερά) και κατακρήμνιση του RNA με ισοπροπανόλη (δεξιά) κατά τη διαδικασία εκχύλισης του από τα κύτταρα [84].

2.2.6. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT)

Η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription, RT) αποτελεί τη διαδικασία σύνθεσης μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA), έχοντας ως εκμαγείο ένα μόριο RNA. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από ένα ένζυμο που ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση, το οποίο ανακαλύφθηκε, ταυτόχρονα και ανεξάρτητα, κατά τη δεκαετία του 1970 από τους Howard Temin και David Baltimore. Το συγκεκριμένο ένζυμο είναι ιικής προέλευσης και μετατρέπει το γενετικό υλικό του ιού από τη μορφή του μονόκλωνου RNA σε δίκλωνο DNA (RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση), έτσι ώστε να μπορεί να ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό των κυττάρων-ξενιστών. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης συνίσταται η χρήση ολικού RNA, όπου υβριδοποιείται ο κατάλληλος εκκινητής και στη συνέχεια, το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης προσθέτει τα συμπληρωματικά dNTPs με κατεύθυνση 5'→3', προκειμένου να συντεθεί η πρώτη αλυσίδα του cDNA (first-strand cDNA). Οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες μεταγραφάσες προέρχονται από τους ιούς AMV (Avian Myeloblastosis Virus transcriptase) και MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus transcriptase). Για τη σύνθεση του cDNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν τρία είδη εκκινητών: τα ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμίνης (oligo-dT), τα τυχαία εξαμερή (random hexamers) και εκκινητές ειδικοί για το γονίδιο-στόχο (gene-specific primers) [85].

Στην παρούσα μελέτη, πριν από το στάδιο της RT έλαβε χώρα αντίδραση πολυαδενυλίωσης του ολικού RNA, καθώς τα miRNAs δεν διαθέτουν poly(A) ουρά, η οποία καθίσταται απαραίτητη για την πρόσδεση των εκκινητών κατά τη διαδικασία της RT. Η αντίδραση, τελικού όγκου 10 μl (**Πίνακας 2.8**), πραγματοποιήθηκε στο θερμικό κυκλοποιητή στους 37°C για 60 λεπτά και στους 65°C για 10 λεπτά. Σε αυτήν, το ένζυμο poly(A) πολυμεράση (PAP), προερχόμενο από το βακτήριο *E.Coli*, καταλύει την προσθήκη μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) στο 3'-ακρο του RNA, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), χωρίς να απαιτεί την παρουσία κάποιου μορίου εκκινητή.

Μετά το στάδιο της πολυαδενυλίωσης, ακολούθησε η αντίδραση της RT των πολυαδενυλιωμένων RNA μορίων. Έτσι, διεξήχθησαν δύο στάδια, συνολικού τελικού όγκου 20 μl, όπως δείχνει ο **Πίνακας 2.9**. Κατά το πρώτο στάδιο, το RNA υφίσταται

αποδιάταξη στους 70°C για 5 λεπτά και ο τροποποιημένος poly(T) εκκινητής προσδένεται στην 3'-poly(A) ουρά του. Η αλληλουχία του εν λόγω εκκινητή είναι:

5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGTTTTTTTTTTTTTVN-3'

, όπου V ορίζεται ως η βάση που μπορεί να υβριδοποιηθεί με όλες τις βάσεις εκτός A και N ορίζεται ως η βάση που μπορεί να υβριδοποιηθεί με όλες τις βάσεις. Στο δεύτερο στάδιο (37°C για 55 λεπτά και 70°C για 15'), συμβαίνει η σύνθεση του cDNA και η ακόλουθη αποδιάταξη του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης MMLV (Invitrogen). Το cDNA που προκύπτει μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω πειράματα απλής ή ποσοτικής PCR. Εδώ, θα πρέπει να σημειωθεί ότι με την παρουσία του αναστολέα των RNAσών (Invitrogen) επιτυγχάνεται η αποτροπή της αποικοδόμησης του RNA από ριβονουκλεάσες.

Πίνακας 2.8. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση πολυαδενυλίωσης του ολικού RNA.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση τελικού όγκου 10 μ l
▪ PAP Buffer	1 μ l
▪ ATP	0,8 μ l
▪ PAP πολυμεράση	0,2 μ l
▪ Δείγμα ολικού RNA	V που αντιστοιχεί σε 1 μ g RNA
▪ dH ₂ O	8-V _{RNA} μ l

Πίνακας 2.9. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τα δύο στάδια της RT αντίδρασης.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση τελικού όγκου 20 μ l
<u>1^ο Στάδιο</u>	
▪ Poly(T) εκκινητής (0,25 μ M)	0,5 μ l
▪ Προϊόν πολυαδενυλίωσης	10 μ l
▪ dH ₂ O	2 μ l
<u>2^ο Στάδιο</u>	
▪ RT-Buffer	6 μ l
▪ dNTPs	1 μ l
▪ Αναστολέας RNAσών (40u/ μ l)	0,25 μ l
▪ MMLV μεταγραφάση (200u/ μ l)	0,25 μ l
▪ Προϊόν 1 ^{ου} σταδίου	12,5 μ l

2.2.7. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qRT-PCR)

Η μέθοδος της ποσοτικής PCR πρωτοεμφανίστηκε το 1993 από τον Russell Higuchi και αποτελεί μια ευαίσθητη και αξιόπιστη παραλλαγή της συμβατικής PCR με δυνατότητα ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων. Η διαδικασία αυτή βασίζεται στη χρήση φθορίζοντων ιχνηθετών, οι οποίοι δεσμεύονται στα δίκλωνα προϊόντα που παράγονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και εκπέμπουν σήμα φθορισμού. Αυτό το σήμα μπορεί να καταγραφεί και να αξιολογηθεί από ειδικούς θερμικούς κυκλοποιητές, όπου λαμβάνει χώρα η ποσοτική PCR. Σε αντίθεση με την απλή PCR, εδώ τα δεδομένα συλλέγονται όταν η αντίδραση είναι ακόμη στη φάση της εκθετικής αύξησης. Η σημαντικότερη αριθμητική παράμετρος για την ποσοτικοποίηση και την ανάλυση των αποτελεσμάτων της qRT-PCR είναι η τιμή C_t (threshold cycle, κύκλος κατωφλίου), που υπολογίζεται αυτόματα από το μηχάνημα και αντιστοιχεί στον κύκλο της αντίδρασης, κατά τον οποίο το σήμα του εκπεμπόμενου φθορισμού των προϊόντων ξεπερνά το βασικό επίπεδο και φτάνει σε ένα συγκεκριμένο ουδό (κατώφλι) καταγραφής.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίζεται στο γεγονός ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων DNA ή cDNA στο αρχικό δείγμα, τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων πολλαπλασιασμού που χρειάζονται για να παραχθεί ικανός αριθμός προϊόντων, ώστε ο φθορισμός του δείγματος να ξεπεράσει το επίπεδο ανίχνευσης. Οι τρόποι ποσοτικής ανάλυσης των δεδομένων της qRT-PCR διακρίνονται στην απόλυτη και σχετική ποσοτικοποίηση. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται βάσει μια πρότυπης καμπύλης, η οποία δημιουργείται από δείγματα με γνωστή συγκέντρωση. Το κύριο μειονέκτημα του τρόπου αυτού είναι η ανάγκη της ύπαρξης μιας ανεξάρτητης αξιόπιστης πρότυπης καμπύλης για κάθε γονίδιο που μελετάται. Αντιθέτως, στη σχετική ποσοτικοποίηση, συγκρίνονται τα C_t του γονιδίου-στόχου και του γονιδίου αναφοράς ανάμεσα σε δύο δείγματα. Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιούνται, συνήθως, τα housekeeping genes, τα οποία εμφανίζουν σταθερή έκφραση σε όλα τα δείγματα. Το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο μοντέλο που υποδηλώνει τη μορφή σχετικής ποσοτικοποίησης είναι αυτό που δίνεται από τον τύπο: $RQ = 2^{-[\Delta C_t \text{ δείγματος} - \Delta C_t \text{ γονιδίου αναφοράς}]}$, $RQ = 2^{-[\Delta \Delta C_t]}$.

Όσον αφορά, στις φθορίζουσες χρωστικές, αυτές χωρίζονται σε μη ειδικές και ειδικές. Οι μη ειδικές χρωστικές (π.χ. SYBR Green I) εμφανίζουν ελάχιστο ή μηδενικό φθορισμό όταν είναι ελεύθερες στο διάλυμα και φθορίζουν όταν ενσωματώνονται στη μικρή αύλακα των δίκλωνων μορίων DNA. Από την άλλη, οι ειδικές (π.χ. ιχνηθέτες τύπου Taqman) δεν είναι ελεύθερες στο διάλυμα και υβριδοποιούνται στο γονίδιο-στόχο ανάμεσα στους δύο εκκινητές [86,87].

Στην παρούσα εργασία, για τον ποσοτικό έλεγχο της έκφρασης του πλασμιδίου miR-936, έλαβε χώρα ποσοτική PCR αντίδραση τελικού όγκου 10 µl ανά δείγμα (**Πίνακας 2.10**) στο μηχάνημα 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) με το σύστημα ανίχνευσης SYBR Green I, ενώ εφαρμόστηκε η μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης $RQ = 2^{-[\Delta\Delta Ct]}$. Εδώ, ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το RNU48 που αποτελεί ένα snoRNA housekeeping gene. Τα ολιγονουκλεοτίδια των εκκινητών που σχεδιάστηκαν για το miR-936 και το snoRNA RNU48, καθώς και τα χαρακτηριστικά αυτών, απεικονίζονται στον **Πίνακα 2.11**.

Η ποσοτική PCR αντίδραση περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο ενεργοποίησης της πολυμεράσης για 2 λεπτά στους 95°C και ακολούθως, το στάδιο αποδιάταξης για 3 δευτερόλεπτα στους 95°C και το στάδιο της υβριδοποίησης και του πολυμερισμού για 30 δευτερόλεπτα στους 60°C που επαναλήφθηκαν κυκλικά 40 φορές (40 κύκλοι). Στο τέλος, ακολούθησε ο προσδιορισμός της θερμοκρασίας τήξης των προϊόντων (95°C/15 δευτερόλεπτα, 60 °C/1 λεπτό, 95 °C /15 δευτερόλεπτα και 60 °C /15 δευτερόλεπτα).

Πίνακας 2.10. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν ανά δείγμα για την qRT-PCR αντίδραση.

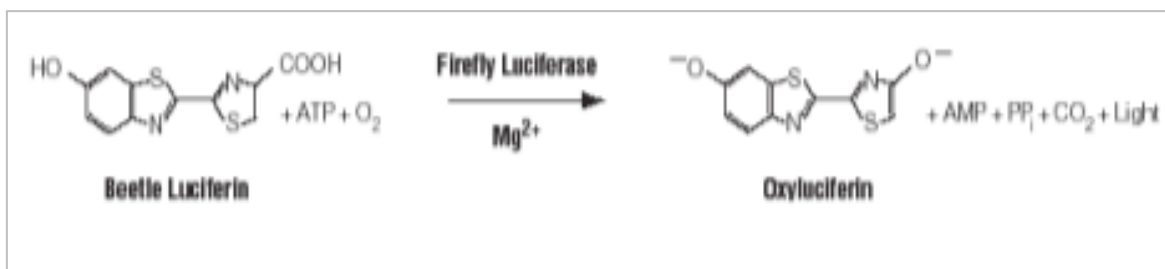
Αντιδραστήρια	Αντίδραση τελικού όγκου 10 µl
▪ MasterMix	5,2µl
▪ Πρόσθιος εκκινητής (F) (200nM)	1µl
▪ Ανάστροφος εκκινητής (PAP-R) (200nM)	1µl
▪ Δείγμα cDNA (0,2 ng/µl)	1µl
▪ dH ₂ O	1,8µl

Πίνακας 2.11. Οι αλληλουχίες και τα χαρακτηριστικά των εκκινητών για τον ποσοτικό έλεγχο της έκφρασης του miR-936 με τη μέθοδο της qRT-PCR.

Ονομασία εκκινητή	Αλληλουχία	Μήκος (nt)	Tm (°C)
miR-936 (F)	5'-ACAGTAGAGGGAGGAATCGCAG-3'	22	62,1
PAP-R	5'- GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3'	22	57,9
RNU48 (F)	5'- TGATGATGACCCCAGGTAACCTCT-3'	23	60,57
PAP-R	5'- GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3'	22	57,9

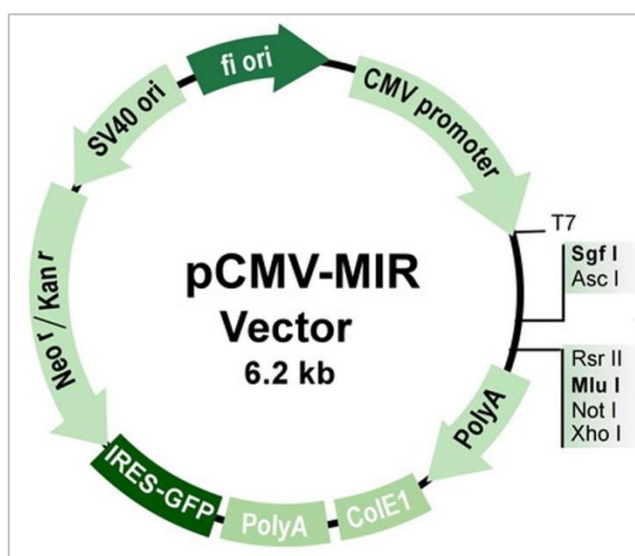
2.2.8. Δοκιμές γονιδίων αναφοράς (Reporter Gene Assays)

Τα γονίδια αναφοράς αποτελούν αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν και να ποσοτικοποιηθούν. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται ευρέως σε πειράματα διαμόλυνσης, στον τομέα της μοριακής βιολογίας, καθώς είναι δυνατόν να λειτουργήσουν ως μάρτυρες τόσο για την παρακολούθηση της επιτυχούς εισαγωγής του εξωγενούς γενετικού υλικού στα κύτταρα όσο και για τη μελέτη της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, όπως και την βελτιστοποίηση της αποτελεσματικότητας των πειραμάτων διαμόλυνσης. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα γονίδια αναφοράς σε διαδικασίες διαμόλυνσης είναι αυτά που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες GFP και λουσιφεράση (Luciferase). Η GFP αποτελεί μια φθορίζουσα πρωτεΐνη, η οποία εκπέμπει πράσινο φως κατά την έκθεση της σε UV ακτινοβολία, με αποτέλεσμα τα κύτταρα που την εκφράζουν να φθορίζουν όταν βρίσκονται σε αντίστοιχες συνθήκες. Από την άλλη, η λουσιφεράση είναι ένα ένζυμο που καταλύει την οξειδωτική φωσφορυλίωση της λουσιφερίνης, παρουσία ATP και Mg^{+2} , εκπέμποντας φωτόνια, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 2.5** [88].



Εικόνα 2.5. Η αντίδραση οξείδωσης της λουσιφερίνης από το ένζυμο της λουσιφεράσης[88].

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε γονίδιο αναφοράς για τον ποιοτικό έλεγχο της έκφρασης του πλασμιδίου miR-936 στα HEK293T κύτταρα. Ο πλασμιδιακός φορέας του miR-936 (pCMV-MIR 6.2kb, Origene), εκτός των άλλων φέρει το γονίδιο IRES-tGFP που υπόκειται στον έλεγχο του υποκινητή CMV και κωδικοποιεί για την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (**Εικόνα 2.6**). Εδώ, μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων με το miR-936 και με το πέρασ 24 ωρών, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο από κάθε φρεάτιο του ειδικού πιάτου φθορισμού 24 θέσεων (24-well fluorescent microplate), προστέθηκαν 500μl 1x PBS ανά φρεάτιο για ελαχιστοποίηση του σήματος υποβάθρου λόγω του έγχρωμου θρεπτικού μέσου και ακολούθησε μέτρηση της έντασης του φθορισμού στα δείγματα των κυττάρων με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού (Confocal Microscopy).



Εικόνα 2.6. Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pCMV-MIR (6.2 kb).

Επιπλέον, η 3'-UTR του γονιδίου *KLK3* έχει κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pMIR-REPORT™ Luciferase, ο οποίος φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο της λουσιφεράσης (Luciferase) και λειτουργεί ως γονίδιο αναφοράς. Έτσι, καθίσταται εφικτή η αξιολόγηση των μεταβολών στην ενζυμική δραστηριότητα της λουσιφεράσης, σε δείγματα κυττάρων που εκφράζουν το miR-936, μέσω μέτρησης της έντασης του φωτός που παράγεται (χημειοφωταύγεια) με τη βοήθεια ενός λουμινόμετρου.

Στην προκειμένη περίπτωση, μετά τη συνδιαμόλυνση των κυττάρων με τα πλασμίδια, ακολούθησε απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από κάθε φρεάτιο και έκπλυση με 1x PBS. Το Luciferase assay system kit ήταν της εταιρείας Promega και περιελάμβανε το διάλυμα λύσης των κυττάρων (Reporter Lysis 5x Buffer) και τα διαλύματα της λουσιφερίνης (Luciferase Assay Reagent) και της β-γαλακτοσιδάσης (Beta-Glo® Assay Reagent). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας, τα κύτταρα κάθε δείγματος λύνονται με την προσθήκη 300μl του διαλύματος λύσης (αραίωση 1/5 του Reporter Lysis 5x Buffer) και επέρχεται άμεσο πάγωμα αυτών στους -80°C για τουλάχιστον 24 ώρες. Στη συνέχεια, το δείγμα αποψύχεται με παράλληλη έντονη ανάδευση σε ειδική πλατφόρμα (προς ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών και απελευθέρωση του κυτταρικού εκχυλίσματος) και μεταφέρεται σε eppendorf tube των 0,5ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000g για 15 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο tube. Έπειτα, ακριβώς τη στιγμή πριν από τη μέτρηση, 20μl από το υπερκείμενο των κυττάρων αναμιγνύονται με 100μl του διαλύματος της λουσιφερίνης (φωτοεαυαίσθητο) και τοποθετούνται σε ειδικό πιάτο 96 θέσεων προς μέτρηση της έντασης της χημειοφωταύγειας σε ειδικό λουμινόμετρο (Tecan infinite 200). Επιπλέον, 100μl από το ίδιο υπερκείμενο αναμιγνύονται με 100μl του διαλύματος της β-γαλακτοσιδάσης και επέρχεται επώαση του μίγματος για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εν συνεχεία, γίνεται μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας αυτής στις ίδιες συνθήκες προς κανονικοποίηση των τιμών από σφάλματα κατά τη διαμόλυνση. Τελικά, με τον υπολογισμό του λόγου της ενεργότητας της λουσιφεράσης προς την ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης (Luciferase/β-gal) που προκύπτει, μπορούν να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα σχετικά με την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από το miR-936.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΕΥΡΕΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ miRNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΛΓΟΡΙΘΜΩΝ

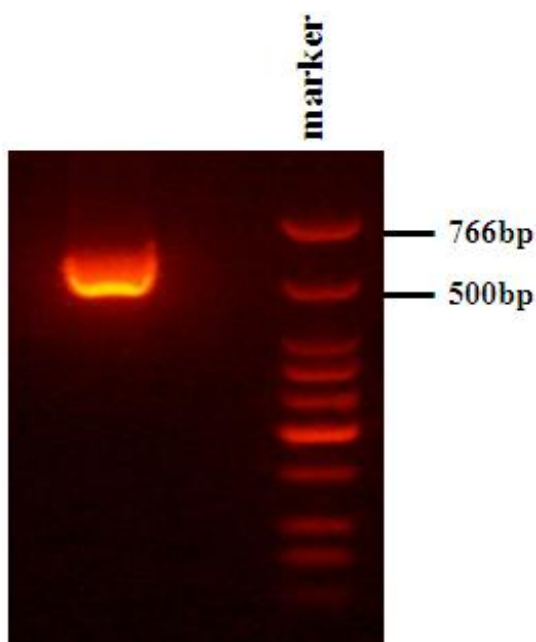
Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε έρευνα με τη χρήση των πλέον χρησιμοποιούμενων αλγόριθμων πρόβλεψης για την εύρεση του υποψήφιου προς επιβεβαίωση miRNA που στοχεύει το γονίδιο *KLK3*. Ο παρακάτω συγκεντρωτικός πίνακας (Πίνακας 3.1) συνοψίζει τα προβλεπόμενα miRNA μόρια που στοχεύουν το γονίδιο *KLK3*, όπως προέκυψαν μετά την έρευνα. Στον Πίνακα αυτό, με κόκκινο χρώμα διακρίνονται οι περισσότεροι αξιόπιστοι αλγόριθμοι, συγκριτικά με τα υπόλοιπα υπολογιστικά συστήματα, ενώ με γκρι σκίαση υποδηλώνεται το miRNA που τελικά επιλέχθηκε να μελετηθεί πειραματικά στην παρούσα εργασία. Παρόλο που υπάρχουν κι άλλα miRNAs, όπως φαίνεται, τα οποία προτείνονται από την πλειοψηφία των αλγορίθμων, ο λόγος που τελικά επιλέχθηκε το miR-936 είναι η υψηλότερη κατάταξη του στους σημαντικότερους από αυτούς (κόκκινο χρώμα), σύμφωνα με τα εκάστοτε χαρακτηριστικά που προσδιορίζει και λαμβάνει υπόψη ο καθένας, όπως αναλύθηκαν στο Υποκεφάλαιο 1.7.

Πίνακας 3.1. Συγκεντρωτικός πίνακας με τα προβλεπόμενα miRNA μόρια που στοχεύουν το γονίδιο *KLK3*

miRNA	Target Scan	DIANA-MicroT	miRDB	miRanda	miRWalk	miRecords	RNA 22	RNA hybrid	PITA
miR-1231	+	+		+	+	+	+	+	+
miR-632	+	+		+	+	+	+	+	+
miR-296-3p	+	+		+	+	+	+	+	+
miR-936	+		+	+		+		+	+
miR-6736-3p	+	+					+		
miR-6729-3p	+	+					+		
miR-8080	+		+				+		
miR-6825-5p	+		+				+		
miR-4765	+	+					+		
miR-4673	+	+					+		

3.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ 3'-UTR ΤΟΥ KLK3 ΣΤΟΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pMIR-REPORT™ Luciferase

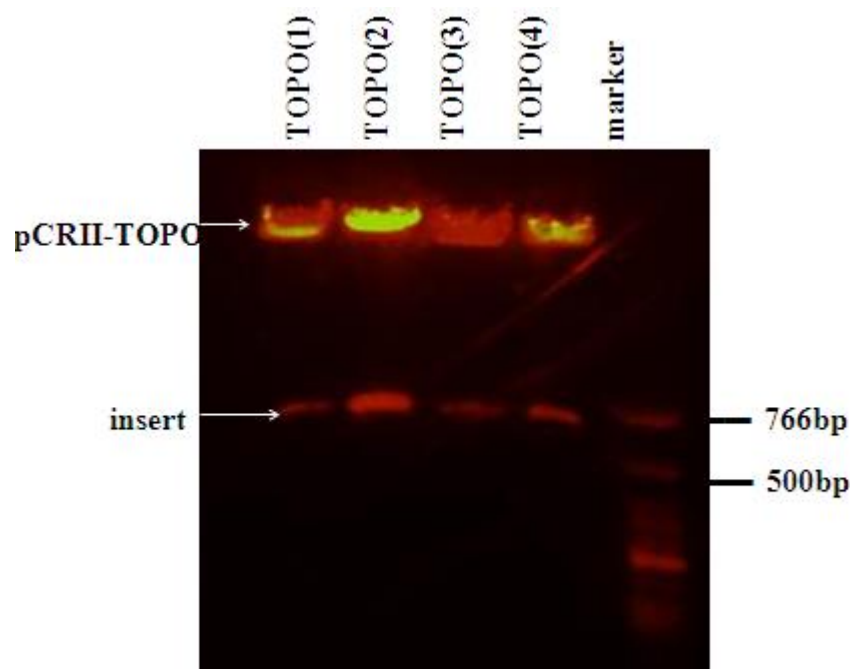
Δείγμα cDNA ασθενούς με καρκίνο του προστάτη που εκφράζει το γονίδιο *KLK3* χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση της 3'-UTR αλληλουχίας του γονιδίου αυτού. Πραγματοποιώντας μια αντίδραση PCR υπό κατάλληλες συνθήκες (Εδάφιο 2.2.2.1) και με τη χρήση των εκκινητών που σχεδιάστηκαν, απομονώθηκε τελικά το επιθυμητό τμήμα της 3'-UTR, μεγέθους περίπου 590bp (Εικόνα 3.2). Το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% w/v και ο marker που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο low molecular weight (Low MW) DNA ladder.



Εικόνα 3.2. Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντος από δείγμα ασθενούς που εκφράζει το *KLK3*. Το μέγεθος του προϊόντος ανέρχεται στα 590bp.

Στη συνέχεια, ακολούθησε κλωνοποίηση της εν λόγω αλληλουχίας στον πλασμιδιακό φορέα pCR™II-TOPO® (4.0kb) και κατόπιν μετασχηματισμός σε βακτηριακά κύτταρα DH5a (στελέχη *E.Coli*) για την παραγωγή της σε μεγάλες ποσότητες. Το συγκεκριμένο πλασμίδιο διαθέτει στο 3'-άκρο του ένα συμπληρωματικό μη ζευγαρωμένο νουκλεοτίδιο θυμίνης (T) (T-vector), ώστε να γίνεται απευθείας ένωση του PCR προϊόντος

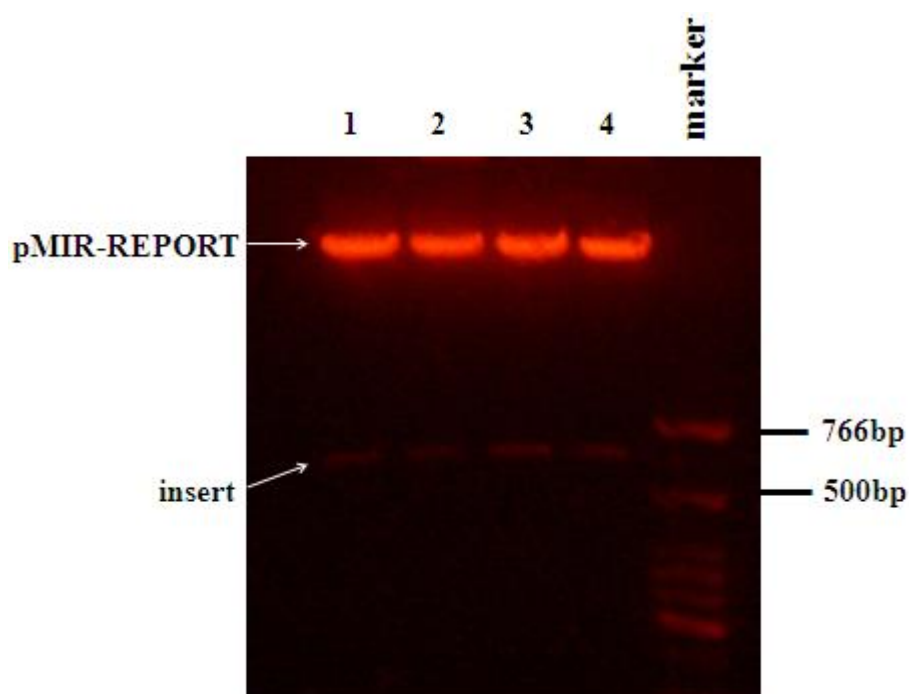
(φέρει ένα αζευγάρωτο νουκλεοτίδιο (A) στο 3'-άκρο) και χάρη στη δημιουργία ζεύγους μεταξύ αδερίνης (A) και θυμίνης (T) να αποφεύγεται ο σχηματισμός τυφλών άκρων (blunt ends) και έτσι τα μόρια να κλωνοποιούνται σε έναν σταθερό φορέα (TA Cloning, Εδάφιο 2.2.2.3). Επιπλέον, διαθέτει και θέσεις αναγνώρισης από την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI που πλαισιώνουν το PCR προϊόν και επιτρέπουν εύκολα την αποκοπή του. Η **Εικόνα 3.3** δείχνει την επιβεβαίωση της κλωνοποίησης της 3'-UTR του *KLK3* (insert) στον φορέα μετά από πέψη των δειγμάτων με το ένζυμο EcoRI και ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 3.3. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης με EcoRI σε πήκτωμα αгарόζης 1% w/v και marker τον Low MW ladder. Στο επάνω μέρος φαίνεται ο φορέας, ενώ πιο κάτω εντοπίζεται το τμήμα που εισήχθη σε αυτόν.

Για την ολοκλήρωση της διαδικασίας απαιτείται υποκλωνοποίηση της 3'-UTR στον τελικό πλασμιδιακό φορέα, τον pMIR-REPORT™ Luciferase (6.470bp). Ο χάρτης του πλασμιδίου αυτού, με τις πληροφορίες που δίνει σχετικά με το σημείο έναρξης της αντιγραφής, τα γονίδια επιλογής (ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά), το γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο της λουσιφεράσης, τους υποκινητές, τις θέσεις περιορισμού και τον πολυσύνδεσμο MCS, παρουσιάστηκε και αναλύθηκε εκτενέστερα στο Εδάφιο 2.2.3. Για την υποκλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε, αρχικά, πέψη τόσο του αρχικού πλασμιδίου

(pCRII-TOPO) που φέρει το insert όσο και του τελικού φορέα (pMIR-REPORT™ Luciferase) με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και SacI. Το πλασμίδιο pMIR-REPORT διαθέτει θέσεις αναγνώρισης από αυτά τα δύο ένζυμα στην περιοχή του πολυσυνδέσμου εκατέρωθεν της αλληλουχίας που θα εισαχθεί, οι οποίες περιλαμβάνονται επίσης και στα άκρα των εκκινήτων της 3'-UTR του *KLK3* που σχεδιάστηκαν. Εδώ, για την πέψη επιλέχθηκε το δεύτερο δείγμα (TOPO2) της **Εικόνας 3.3** λόγω μεγαλύτερης ποσότητας του πλασμιδιακού DNA σε αυτό, όπως προέκυψε τόσο από μέτρηση της συγκέντρωσης φασματοφωτομετρικά όσο και από την ηλεκτροφόρηση. Ακολούθως, ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v, αποκόπηκαν και εκχυλίστηκαν οι ζώνες τόσο του τελικού φορέα όσο και του insert από το πήκτωμα της αγαρόζης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο Εδάφιο 2.2.2.8. Στη συνέχεια, έγινε ένωση του νέου φορέα με το insert και μετασχηματισμός σε βακτηριακά κύτταρα DH5a. Στην **Εικόνα 3.4**, επιβεβαιώνεται η επιτυχής κλωνοποίηση της 3'-UTR του *KLK3* (insert) στον πλασμιδιακό φορέα pMIR-REPORT™ Luciferase με αποτέλεσμα τη δημιουργία του επιθυμητού πλασμιδίου για την μετέπειτα πορεία των πειραμάτων.

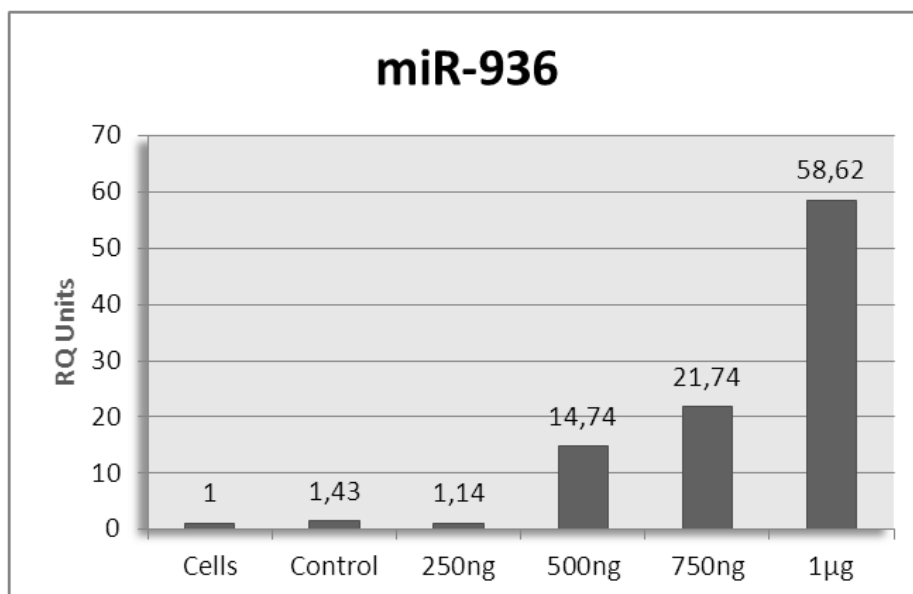


Εικόνα 3.4. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης με HindIII και SacI σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v και marker τον Low MW ladder. Στο επάνω μέρος φαίνεται ο φορέας, ενώ πιο κάτω εντοπίζεται το τμήμα που εισήχθη σε αυτόν.

3.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ miR-936 ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΝΕΦΡΟΥ (HEK 293T)

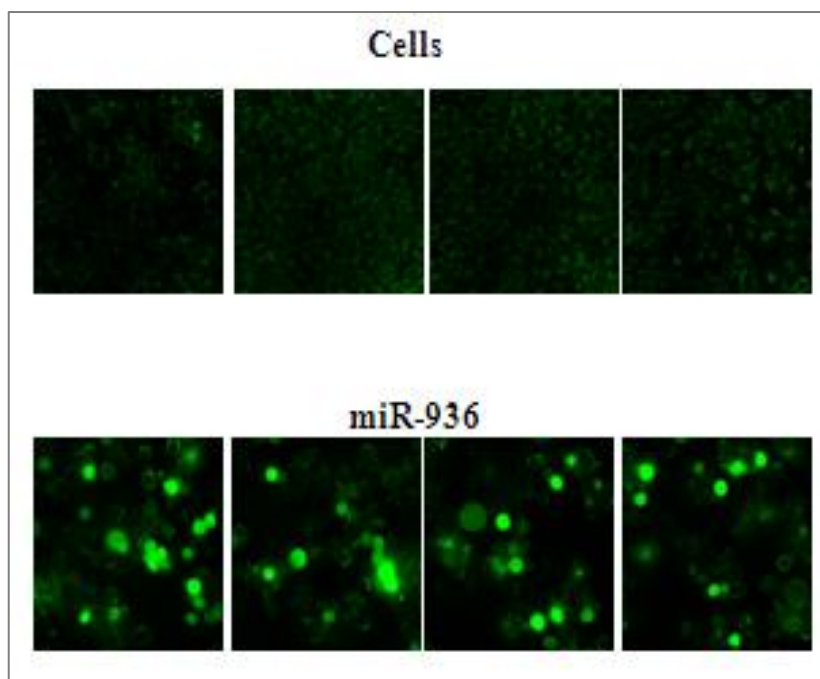
Η ανθρώπινη καρκινική σειρά νεφρού HEK293T (ATCC:CRL-3216) καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο και χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της έκφρασης του miR-936. Συγκεκριμένη συγκέντρωση κυττάρων HEK293 (5,5x10⁴cells/ml) εμφυτεύθηκαν σε 6 διαφορετικά φρεάτια ενός πιάτου 24 θέσεων και επώστηκαν για 24 ώρες σε σταθερές συνθήκες (37°C και 5% CO₂). Εν συνεχεία, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του πλασμιδίου miR-936 (250ng, 500ng, 750ng, 1μg), μία σε κάθε φρεάτιο, και επώστηκαν για 36 ώρες στις ίδιες σταθερές συνθήκες, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που παρουσιάστηκε στο Εδάφιο 2.2.4. Εδώ, ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο miR-423-5p, του οποίου ο φορέας είναι ίδιος με αυτόν του miR-936 (pCMV-MIR 6.2kb, Origene). Μετά τη διαμόλυνση, ακολούθησε συλλογή των κυττάρων για εκχύλιση και απομόνωση του ολικού RNA από αυτά (Εδάφιο 2.2.5) και έλαβε χώρα ποσοτικός προσδιορισμός του απομονωμένου RNA μέσω φωτομέτρησης στα 260nm και έλεγχος της καθαρότητας του βάσει του λόγου A₂₆₀/A₂₈₀.

Αφού διαπιστώθηκε η καλή ποιότητα του RNA, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (με στάδιο πολυαδενυλίωσης) για να προκύψει το τελικό cDNA και να ακολουθήσει η μέθοδος της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR). Για τον έλεγχο της απόδοσης της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς το RNU48 (snoRNA). Οι μονάδες σχετικής ποσοτικοποίησης (RQ, relative quantification units) κάθε μορίου που προέκυψαν από τα δείγματα συγκριτικά με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του πλασμιδίου σε κάθε δείγμα απεικονίζονται στο διάγραμμα της **Εικόνας 3.5**. Όπως συμπεραίνεται, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του πλασμιδίου miR-936 στα κύτταρα, αυξάνεται και η έκφραση του. Επιπλέον, παρατηρείται ότι τόσο το αρνητικό control όσο και το δείγμα που δεν διαμολύνθηκε με το πλασμίδιο (Cells) έχουν σχεδόν μηδενική έκφραση του miR-936 που σημαίνει ότι η διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε επιτυχώς. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι δεν υπήρχαν διακυμάνσεις όσον αφορά στην έκφραση του γονιδίου αναφοράς RNU48, επιβεβαιώνοντας την επιτυχία της αντίδρασης της qRT-PCR.



Εικόνα 3.5. Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής στην έκφραση του miR-936 αυξανόμενης της συγκέντρωσης του στα κύτταρα.

Στον χάρτη του πλασμιδιακού φορέα του miR-936 (pCMV-MIR), που παρουσιάστηκε στο Εδάφιο 2.2.8, εντοπίζεται το γονίδιο που κωδικοποιεί για την GFP πρωτεΐνη. Το συγκεκριμένο γονίδιο χρησιμοποιείται ευρέως στην κυτταρική και μοριακή βιολογία ως γονίδιο αναφοράς, καθώς η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί, εκπέμπει έντονο πράσινο φως όταν εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία. Στην παρούσα μελέτη, πέραν του ποσοτικού ελέγχου της έκφρασης του miR-936 με τη μέθοδο της qRT-PCR, πραγματοποιήθηκε και ποιοτικός έλεγχος της έκφρασης του με την μέθοδο του γονιδίου αναφοράς (Reporter Gene Assay) και μέτρηση της έντασης του εκπεμπόμενου φθορισμού. Εκμεταλλεύοντας την ύπαρξη του γονιδίου IRES-tGFP στον φορέα του miR-936, έγινε μέτρηση της έντασης του φθορισμού με τη χρήση κατάλληλου μικροσκοπίου. Στην **Εικόνα 3.6.** φαίνονται τα αποτελέσματα αυτής της μέτρησης τόσο στα κύτταρα που δεν διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο όσο και σε κύτταρα που δέχτηκαν το πλασμίδιο miR-936 (500ng). Όπως προκύπτει, στα κύτταρα που δεν είχαν το πλασμίδιο δεν παρατηρείται σήμα φθορισμού, αντιθέτως με αυτά που το δέχτηκαν, όπου το σήμα είναι αρκετά έντονο. Τα αποτελέσματα της μέτρησης του φθορισμού συγκλίνουν με αυτά της qRT-PCR, καταλήγοντας στο τελικό συμπέρασμα ότι το πλασμίδιο miR-936 εκφράζεται επιτυχώς στα HEK293T κύτταρα.



Εικόνα 3.6. Μέτρηση έντασης φθορισμού σε HEK293T κύτταρα μετά από διαμόλυνση με το πλασμίδιο miR-936.

3.4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ miR-423-5p ΣΤΗΝ 3'-UTR ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ OGT

Για την διεξαγωγή του τελικού πειραματικού σταδίου της παρούσας μελέτης που αφορά στον έλεγχο πιθανής στόχευσης του miR-936 στην 3'-UTR του *KLK3*, προέκυψε η ανάγκη για σταθεροποίηση των συνθηκών υπό τις οποίες θα εκτελεστούν τόσο η μέθοδος της συνδιαμόλυνσης με τα πλασμίδια (co-transfection) όσο και η μέτρηση της χημειοφωταύγειας κατά τη δοκιμή του γονιδίου αναφοράς (Luciferase Assay System). Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική ανασκόπηση προς αναζήτηση μιας επιβεβαιωμένης μελέτης, όπου ένα από τα δύο miRNAs που διατίθενται (miR-936, miR-423-5p), στοχεύει την 3'-UTR του mRNA ενός γνωστού γονιδίου. Λόγω έλλειψης βιβλιογραφικών αναφορών για το miR-936, επιλέχθηκε μια μελέτη που αναφερόταν στο miR-423-5p, καθώς αποτελείται από τον ίδιο φορέα με το miR-936 και στην οποία ακολουθούνταν παρόμοια πειραματική διαδικασία με την παρούσα εργασία. Σύμφωνα, λοιπόν, με τη συγκεκριμένη μελέτη, το miR-423-5p στοχεύει το γονίδιο *OGT* (O-GlcNAc

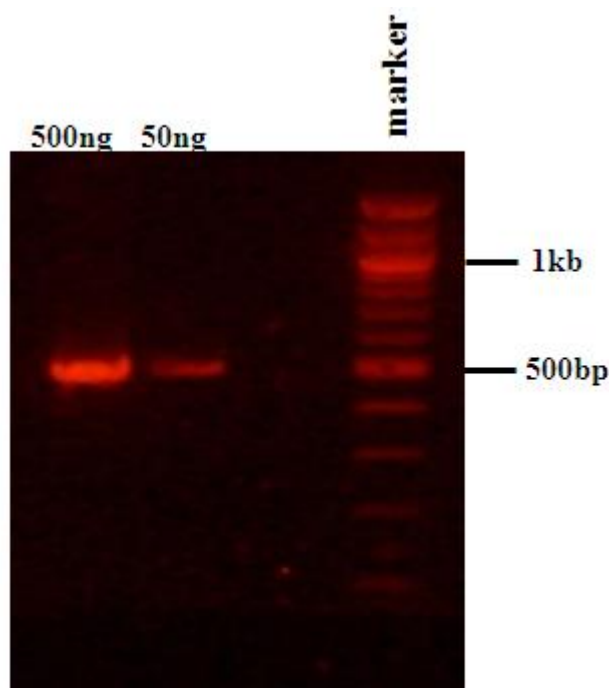
transferase, *Mus Musculus*) [83]. Έτσι, αυτό που απέμενε ήταν η εργαστηριακή εκτέλεση της εν λόγω μελέτης, ώστε να εξακριβωθούν οι κατάλληλες πειραματικές συνθήκες.

Αρχικά, όπως συνέβη και στο Υποκεφάλαιο 3.1, μέσω της βάσης δεδομένων GenBank εντοπίστηκε η 3'-UTR του γονιδίου *OGT* (*Mus Musculus*) και έπειτα η αλληλουχία πάνω στην 3'-UTR που εμφανίζει πλήρη συμπληρωματικότητα με την seed περιοχή στο 5'-άκρο του miR-423-5p. Η **Εικόνα 3.7** δείχνει το μέγεθος της 3'-UTR που θα κλωνοποιηθεί (474bp) με υπογραμμισμένη την αλληλουχία στόχο του miR-423-5p, καθώς και τις θέσεις όπου σχεδιάστηκαν οι εκκινητές. Η αλληλουχία των εκκινητών αναφέρεται στο Εδάφιο 2.2.2.1.

Forward Primer	
5' -	gctt tcagacatcc caggggtgttt ctctcgaaca tgccatctgg tgccaaatga aaattccttag gagtgaatat taatcatgaa ggtcacagtt gtggtactgt tattgataat aatatagggt ttttttctgc ctaagtttta cctgtttcac cagtgtttca gcccttgact gccccctccta tgctgcttcc aaaagtaata gtgtgataag atttttacct tcctttctaa agtttgTTTT ttttttaaag tgagtcctgt tcttccatt tctttcagca gaaatgaaat cccaggtaag tatataagta ttcaaatggt tggtagtaa attacagtgc tctccagtac cttaaatggt gttcaccgct ctgaagaagc atctctatac aggcagttat tttattttta gactgtgtta gaatgtctgg acttagcttc aaactctatg gattcggcct tggtagggaa-3'
Reverse Primer	

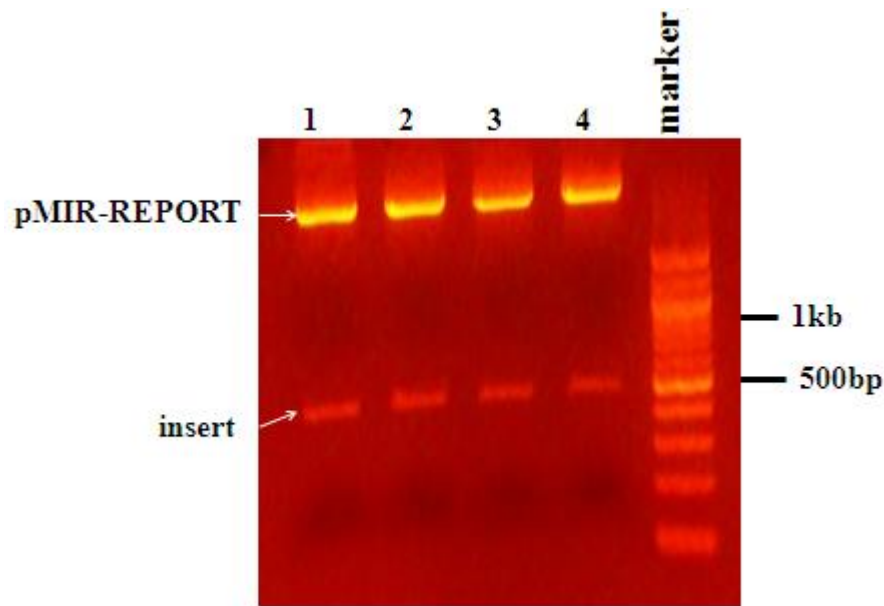
Εικόνα 3.7. Η 3'-UTR του γονιδίου *OGT* (*Mus Musculus*) που πρόκειται να κλωνοποιηθεί (474bp). Με γκρι σκίαση φαίνεται η αλληλουχία στόχος του miR-423-5p, ενώ με μαύρο πλαίσιο οι θέσεις όπου σχεδιάστηκαν ο πρόσθιος(forward primer) και ανάστροφος εκκινητής (reverse primer).

Ακολούθως, όπως και στο Υποκεφάλαιο 3.2, πραγματοποιήθηκε απομόνωση της 3'-UTR αλληλουχίας και κλωνοποίηση της στον πλασμιδιακό φορέα pMIR-REPORT™ Luciferase. Για την απομόνωση, έλαβε χώρα αντίδραση PCR σε δείγμα γενωμικού DNA ποντικού (*Mus Musculus*) με τη χρήση των εκκινητών που σχεδιάστηκαν και στη συνέχεια, το προϊόν ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% w/v και marker των 100bp DNA ladder. Η εν λόγω ηλεκτροφόρηση απεικονίζεται στην **Εικόνα 3.8**, όπου φαίνεται το προϊόν μεγέθους περίπου 474bp που πρόκειται να κλωνοποιηθεί.



Εικόνα 3.8. Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντος από δείγμα γενομικού DNA ποντικού (*Mus Musculus*). Το μέγεθος του προϊόντος ανέρχεται στα 474bp.

Αφού απομονώθηκε η αλληλουχία της 3'-UTR του *OGT*, ακολούθησε ένωση της με τον πλασμιδιακό φορέα pCRTMII-TOPO[®] και μετασχηματισμός στα βακτηριακά στελέχη DH5a. Η κλωνοποίηση αυτή επιβεβαιώθηκε με πέψη των δειγμάτων με το ένζυμο EcoRI και ηλεκτροφόρηση (1,5% w/v αγαρόζη, 100bp DNA ladder). Η διαδικασία ολοκληρώθηκε, και εδώ, με υποκλωνοποίηση της 3'-UTR στον τελικό φορέα pMIR-REPORTTM Luciferase με την ίδια πορεία όπως περιγράφηκε στο Υποκεφάλαιο 3.2. Στην παρακάτω **Εικόνα 3.9**, φαίνεται η επιτυχής δημιουργία του πλασμιδίου που αποτελείται από την 3'-UTR του *OGT* (insert) και φορέα τον pMIR-REPORTTM Luciferase.



Εικόνα 3.9 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης με *HindIII* και *SacI* σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% w/v και marker τον 100bp ladder. Στο επάνω μέρος φαίνεται ο φορέας, ενώ πιο κάτω εντοπίζεται το τμήμα που εισήχθη σε αυτόν.

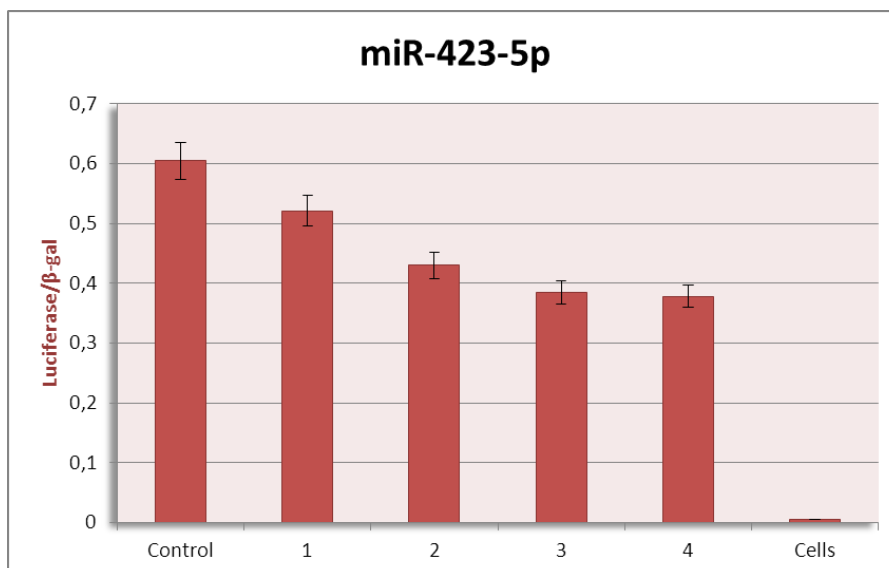
Για τον έλεγχο της στόχευσης του miR-423-5p στην 3'-UTR του *OGT*, ακολούθησε η μέθοδος της συνδιαμόλυνσης των κυττάρων HEK 293T με τα πλασμίδια. Συγκεκριμένη συγκέντρωση κυττάρων ($6,5 \times 10^4$ cells/500μl) εμφυτεύθηκαν σε 6 διαφορετικά φρεάτια ενός πιάτου 24 θέσεων και επωάστηκαν για 24 ώρες σε σταθερές συνθήκες (37 °C και 5% CO₂). Στη συνέχεια, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν ταυτόχρονα με συγκεντρώσεις των πλασμιδίων που έφεραν την 3'-UTR *OGT*, την β-gal, το miR-423-5p και το miR-936, όπως παρατίθενται στον **Πίνακα 3.2.**, και επωάστηκαν για 36 ώρες στις ίδιες σταθερές συνθήκες. Στον Πίνακα αυτό, μέσα σε έντονο μαύρο πλαίσιο φαίνονται οι διαφορετικές συγκεντρώσεις του miR-423-5p που εξετάζεται εδώ, οι οποίες εξισορροπούνται με διαφορετικές συγκεντρώσεις του miR-936 (χρησιμεύει ως αρνητικό control), με αποτέλεσμα κάθε δείγμα να αποτελείται από ίση ποσότητα συνολικού DNA (460ng). Το πρωτόκολλο της συνδιαμόλυνσης των κυττάρων που αναφέρει την αναλογία των αντιδραστηρίων και ολόκληρη την μεθοδολογία, παρουσιάστηκε στο Εδάφιο 2.2.4.

Πίνακας 3.2. Οι συγκεντρώσεις των πλασμιδίων κάθε δείγματος κατά την εκτέλεση της συνδιαμόλυνσης σε HEK293T κύτταρα.

Δείγμα	3'-UTR OGT	β-gal	miR-423-5p	miR-936	
Control	50ng	10ng	-	400ng	460ng
1	50ng	10ng	50ng	350ng	460ng
2	50ng	10ng	100ng	300ng	460ng
3	50ng	10ng	200ng	200ng	460ng
4	50ng	10ng	400ng	-	460ng
Cells	-	-	-	-	-

Αφού διεκπεραιώθηκε η ταυτόχρονη διαμόλυνση με τα πλασμίδια, απέμενε η μέτρηση της χημειοφωταύγειας σε ειδικό λουμινόμετρο (Tecan infinite 200), προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την ενεργότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης. Το ένζυμο αυτό καταλύει την αντίδραση οξείδωσης της λουσιφερίνης παρουσία ATP και Mg²⁺, εκπέμποντας φωτόνια. Η λουσιφερίνη απαντάται στο αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για την μέτρηση της χημειοφωταύγειας (Luciferase Assay System, Εδάφιο 2.2.8).

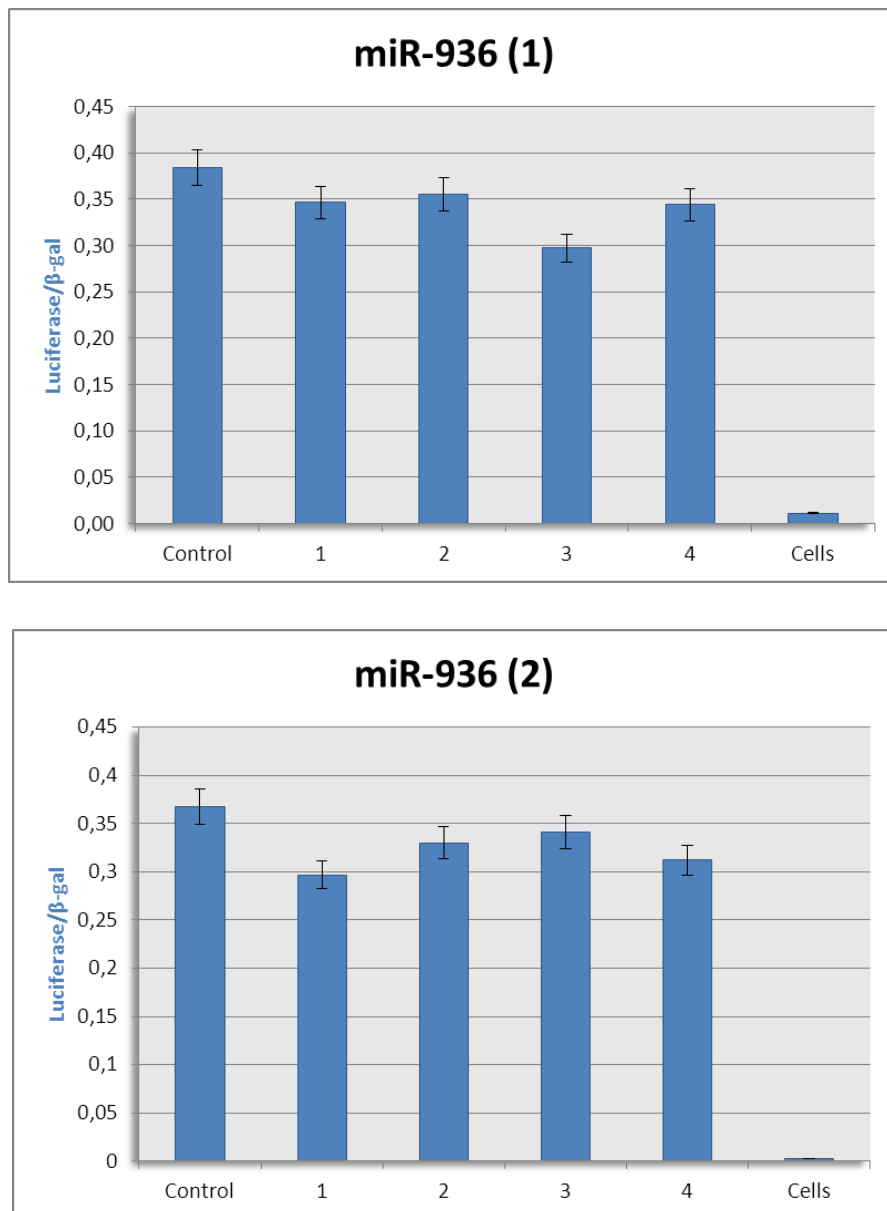
Το διάγραμμα της **Εικόνας 3.10** που ακολουθεί, δείχνει τον λόγο Luciferase/β-gal, συναρτήσει των διαφορετικών συγκεντρώσεων του πλασμιδίου miR-423-5p που προστέθηκαν σε κάθε δείγμα. Πιο συγκεκριμένα, απεικονίζεται η σχετική ενεργότητα του ενζύμου, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του πλασμιδίου miR-423-5p στα κύτταρα βάσει του **Πίνακα 3.2**. Εδώ, αξίζει να σημειωθεί ότι το ένζυμο της β-γαλακτοσιδάσης (β-gal) χρησιμεύει για κανονικοποίηση των τιμών από τυχόν σφάλματα κατά τη διαμόλυνση και γι' αυτό προκύπτει ο λόγος ενεργότητας λουσιφεράσης προς ενεργότητας β-gal. Σύμφωνα, λοιπόν, με το διάγραμμα παρατηρείται μείωση της ενεργότητας του ενζύμου της λουσιφεράσης στα δείγματα αναλογικά με την συγκέντρωση του πλασμιδίου miR-423-5p σε αυτά. Δηλαδή, αυξανόμενης της ποσότητας του πλασμιδίου, η μείωση είναι μεγαλύτερη. Επιπλέον, στο δείγμα με το αρνητικό control (miR-936), η ενεργότητα παραμένει σχεδόν ανέπαφη. Τα παραπάνω, συγκλίνουν με την μελέτη του 2015 ότι το γονίδιο OGT αποτελεί στόχο του miR-423-5p.



Εικόνα 3.10. Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής στην ενεργότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης αυξανόμενης της συγκέντρωσης του miR-423-5p στα κύτταρα

3.5. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ miR-936 ΣΤΗΝ 3'-UTR ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ KLK3

Το τελικό στάδιο, που αποτελεί και σκοπό της παρούσας μελέτης, αφορά στον έλεγχο πιθανής στόχευσης του miR-936 πάνω στην 3'-UTR του γονιδίου *KLK3*. Αφού, λοιπόν, εξακριβώθηκαν οι κατάλληλες πειραματικές συνθήκες μέσω του πειράματος που περιγράφηκε στο Υποκεφάλαιο 3.4, ακολούθησε εφαρμογή των ίδιων ακριβώς συνθηκών και στην προκειμένη περίπτωση. Τα πλασμίδια για το co-transfection που χρησιμοποιήθηκαν εδώ, ήταν αυτά που έφεραν την 3'-UTR *KLK3*, την β-gal, το miR-936 και το miR-423-5p ως αρνητικό control, σε ίδιες συγκεντρώσεις με αυτές του Πίνακα 3.2. Για την εξάλειψη λαθών που μπορεί να οφείλονται σε τεχνικά σφάλματα, πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα διαδοχικά πειράματα με τις ίδιες ακριβώς συνθήκες, των οποίων τα αποτελέσματα από τη μέτρηση της χημειοφωταύγειας απεικονίζονται στα παρακάτω διαγράμματα της **Εικόνας 3.11**. Όπως παρατηρείται και στα δύο διαγράμματα υπάρχουν διακυμάνσεις σε επίπεδο αυξομειώσεων στην ενεργότητα της λουσιφεράσης, καθώς αυξάνεται η ποσότητα του πλασμιδίου miR-936 στα κύτταρα, ακόμα και μετά από κανονικοποίηση των τιμών με την ενεργότητα της β-gal. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανότατα το γονίδιο *KLK3* δεν αποτελεί στόχο του miR-936, όπως είχε προβλεφθεί με τη χρήση των αλγορίθμων του Υποκεφαλαίου 3.1.



Εικόνα 3.11. Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής στην ενεργότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης αυξανόμενης της συγκέντρωσης του miR-936 στα κύτταρα σε δύο ανεξάρτητα διαδοχικά πειράματα ίδιων συνθηκών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ένζυμα των ανθρώπινων καλλικρεϊνών κατηγοριοποιούνται σε δύο ομάδες, οι οποίες εμφανίζουν σημαντικές διαφορές τόσο δομικά όσο και λειτουργικά: την καλλικρεΐνη του πλάσματος (KLKB1) και τις ιστικές καλλικρεΐνες. Η δεύτερη ομάδα είναι και αυτή που παρουσιάζει το μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον, καθώς απαρτίζεται από 15 γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεάσες σερίνης και μοιράζονται κοινά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά με υψηλό βαθμό ομολογίας [14]. Οι λειτουργίες που επιτελούν τα μέλη της εν λόγω οικογένειας ενζύμων στον ανθρώπινο οργανισμό σχετίζονται τόσο με φυσιολογικές όσο και με παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι ο καρκίνος [26]. Για το λόγο αυτό, τα μόρια των καλλικρεϊνών έχουν αποτελέσει, κατά καιρούς, αντικείμενο μελέτης όσον αφορά στην επίδραση της γονιδιακής τους έκφρασης από μικρά μη κωδικά μόρια RNA (miRNAs) [48].

Η ανακάλυψη των μη κωδικών μορίων RNA (ncRNAs) επέφερε μια ραγδαία αλλαγή στην άποψη που υποστηριζόταν μέχρι πρότινος σχετικά με το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης. Μεταξύ αυτών, τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA (miRNAs) έχουν μελετηθεί εκτενώς λόγω του ρόλου που διαδραματίζουν σε περιπτώσεις σίγησης συγκεκριμένων γονιδίων. Τα miRNAs είναι γνωστό ότι αποτελούν μικρά ρυθμιστικά RNAs, μήκους περίπου 19-24 νουκλεοτιδίων, τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση μιας πληθώρας γονιδίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο [39]. Η ωρίμανση των μορίων αυτών ολοκληρώνεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων με τη συμμετοχή πολλών πρωτεϊνικών παραγόντων, ενώ η ρυθμιστική τους δράση εκδηλώνεται μέσω ενός καταλυτικού συμπλόκου, ονόματι miRISC. Όπως έχει γίνει ευρέως γνωστό, τα miRNAs ασκούν την καταλυτική τους δράση, αλληλεπιδρώντας με την 3'-UTR των μεταγράφων των εκάστοτε γονιδίων στόχευσης [43].

Σύμφωνα με δεδομένα επιστημονικών μελετών, υπάρχουν ελάχιστες αναφορές σε μόρια miRNA που επιδρούν στο γονίδιο της *KLK3*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA), που εκφράζεται κυρίως στον προστατικό αδένα και χρησιμοποιείται ευρύτατα ως διαγνωστικός και προγνωστικός δείκτης στη νόσου του καρκίνου του προστάτη. Προς αυτή την κατεύθυνση εστιάστηκε το ενδιαφέρον της παρούσας μελέτης, με σκοπό τον εντοπισμό υποψήφιων miRNAs που αλληλεπιδρούν με το γονίδιο *KLK3*, προκαλώντας την μετα-μεταγραφική του αποσιώπηση.

Ξεκινώντας, λοιπόν, την πορεία της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση των προβλεπόμενων υποψήφιων μορίων miRNA που στοχεύουν το γονίδιο της *KLK3* με μεθόδους βιοπληροφορικής. Τα τελευταία χρόνια, ο τομέας αυτός έχει συμβάλλει σε μέγιστο βαθμό στην προσπάθεια ταυτοποίησης γονιδιακών στόχων από τα ήδη υπάρχοντα γνωστά miRNAs. Τα υπολογιστικά προγράμματα (αλγόριθμοι) που έχουν αναπτυχθεί, αξιολογώντας συγκεκριμένες παραμέτρους που αφορούν κυρίως στο ποσοστό συμπληρωματικότητας μεταξύ των miRNAs και των γονιδίων στόχευσης, προσφέρουν σημαντική βοήθεια στη μετέπειτα διαδικασία πειραματικής επιβεβαίωσης των στόχων [58]. Στην παρούσα μελέτη, μετά από ενδελεχή έρευνα στους ευρέως χρησιμοποιούμενους αλγόριθμους πρόβλεψης των miRNA στόχων, επιλέχθηκε ως υποψήφιο προς μελέτη μόριο το miR-936, καθότι κατατάσσεται σε υψηλότερη κλίμακα στους πιο αξιόπιστους από αυτούς (αρνητικότερο context++ score στο TargetScan και υψηλότερη βαθμολογία στους DIANA-microT, miRanda και miRDB).

Εφόσον εντοπίστηκε το miRNA που πρόκειται να μελετηθεί, ακολούθησε η προσπάθεια πειραματικής επιβεβαίωσης αυτής της πρόβλεψης. Ανάμεσα στις εργαστηριακές μεθόδους που εφαρμόζονται για τέτοια πειράματα ταυτοποίησης ανήκει η δοκιμή γονιδίου αναφοράς (Reporter Gene Assay), όπου η 3'-UTR του γονιδίου ενδιαφέροντος κλωνοποιείται σε ειδικό φορέα που διαθέτει το γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο της λουσιφεράσης. Η ενεργότητα του ενζύμου αυτού μπορεί εύκολα να ανιχνευθεί και να ποσοτικοποιηθεί, καθώς συνοδεύεται από την εκπομπή φωτός [66]. Έτσι, διεξήχθησαν διαδικασίες μοριακής κλωνοποίησης προκειμένου να δημιουργηθεί και να απομονωθεί το πλασμίδιο που θα φέρει την 3'-UTR του *KLK3* γονιδίου με σύστημα ανίχνευσης το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης.

Παράλληλα, κατέστη αναγκαία η επικύρωση της έκφρασης του miR-936 στα HEK293T κύτταρα που θεωρούνται τα καλύτερα και πιο αξιόπιστα για πειράματα διαμόλυνσης με εξωγενές γενετικό υλικό. Έτσι, αφού στα κύτταρα εισήχθησαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις του πλασμιδίου που φέρει το miR-936, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος της έκφρασης του με τις μεθόδους της qRT-PCR και της δοκιμής γονιδίου αναφοράς, αντίστοιχα. Κατά τον ποσοτικό έλεγχο και μετά από εφαρμογή της σχετικής ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων, προέκυψαν οι μονάδες RQ (RQ Units), οι οποίες κυμάνθηκαν μεταξύ RQ=1,14 για τη μικρότερη συγκέντρωση του πλασμιδίου (250ng) έως RQ=58,62 για τη μέγιστη συγκέντρωση (1μg). Επιπλέον, οι αντίστοιχες μονάδες για τα δείγματα των αρνητικών μαρτύρων (miR-423-5p και κύτταρα

με απουσία διαμόλυνσης) ήταν $RQ=1$ έως 1,43. Η επιτυχής διεξαγωγή του ποσοτικού ελέγχου επιβεβαιώθηκε μέσω της απουσίας διακυμάνσεων στις τιμές των γονιδίου αναφοράς RNU48. Από την άλλη, στην ποιοτική ανάλυση, εκτιμήθηκε η ένταση του φθορισμού στα ίδια κύτταρα, καθότι ο πλασμιδιακός φορέας του miR-936 φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί για την GFP πρωτεΐνη, επιτρέποντας την ανίχνευση της. Εδώ, τα αποτελέσματα έδειξαν απουσία εκπεμπόμενου σήματος στο δείγμα των μη διαμολυσμένων κυττάρων, σε αντίθεση με το δείγμα που δέχτηκε 500ng του πλασμιδίου, το οποίο παρουσίαζε έντονο σήμα φθορισμού μετά από αξιολόγηση σε κατάλληλο μικροσκόπιο. Και στις δύο περιπτώσεις ελέγχου, τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα επιτυχούς έκφρασης του miR-936 στα κύτταρα.

Προχωρώντας την πειραματική πορεία και για τη διεκπεραίωση του τελικού πειράματος της συγκεκριμένης μελέτης με μεγάλη αποδοτικότητα, κρίθηκε απαραίτητος ο εντοπισμός των βέλτιστων συνθηκών για την εκτέλεση του. Προς αυτό, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση σε βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με πειραματικά επιβεβαιωμένες αναφορές, όπου συγκεκριμένα γονίδια υφίστανται ρύθμιση από το miR-936. Η έλλειψη τέτοιων αναφορών για το miR-936, έστρεψε την αναζήτηση στους επιβεβαιωμένους στόχους του miR-423-5p, καθώς αποτελείται από τον ίδιο πλασμιδιακό φορέα με το miR-936 και για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε ως ο αρνητικός του μάρτυρας σε όλα τα πειράματα συνδιαμόλυνσης. Με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, προέκυψε ότι το miR-423-5p έχει ταυτοποιηθεί ότι επιδρά στη σίγηση ενός γονιδίου στο ποντίκι (*Mus Musculus*) που ονομάζεται *OGT*. Τα miRNAs είναι εξελικτικά συντηρημένα μόρια μεταξύ συγγενικών ειδών [39].

Η εκτέλεση του ήδη επιβεβαιωμένου πειράματος σε εργαστηριακή κλίμακα βοήθησε στη βελτιστοποίηση των συνθηκών για το τελικό πείραμα. Η διαδικασία ήταν η ίδια, με δημιουργία και απομόνωση του πλασμιδίου που φέρει την 3'-UTR του γονιδίου *OGT* και το γονίδιο της λουσιφεράσης, εφαρμόζοντας τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης. Ακολούθως, τα HEK293T κύτταρα αποδείχθηκε ότι εκφράζουν επιτυχώς το miR-423-5p. Κατ'αυτό τον τρόπο, ακολούθησε συνδιαμόλυνση των κυττάρων αυτών με σταθερή συγκέντρωση του πλασμιδίου με το ένθεμα της 3'-UTR του *OGT* και αυξανόμενες συγκεντρώσεις του miR-423-5p σε κάθε δείγμα. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια του αρνητικού μάρτυρα (miR-936) και της β-γαλακτοσιδάσης (β-gal), που χρησιμεύει στην εξομάλυνση των διακυμάνσεων των τιμών από τυχόν τεχνικά σφάλματα κατά τα πειράματα διαμόλυνσης. Η χρήση του αρνητικού μάρτυρα αποσκοπούσε, επίσης,

στην διατήρηση της ίδιας ποσότητας του συνολικού πλασμιδιακού DNA σε όλα τα δείγματα, όπως είθισται να συμβαίνει σε πειράματα συνδιαμόλυνσης [82].

Αφού, λοιπόν, έλαβε χώρα η ταυτόχρονη διαμόλυνση των κυττάρων με τα πλασμίδια, απέμενε η μέτρηση της μεταβολής στην ενζυμική ενεργότητα της λουσιφεράσης. Η μέτρηση έγινε σε ειδικό λουμινόμετρο τόσο για την λουσιφεράση όσο και για τη β-γαλακτοσιδάση, προκειμένου να προκύψει ο λόγος της ενεργότητας των δύο ενζύμων (Luciferase/β-gal). Οι τιμές των λόγων κυμάνθηκαν από Luciferase/β-gal=0,521 για την μικρότερη συγκέντρωση του miR-423-5p (50ng) έως Luciferase/β-gal=0,378 για τη μέγιστη συγκέντρωση (400ng), ενώ στο δείγμα του αρνητικού μάρτυρα η τιμή ήταν η μέγιστη Luciferase/β-gal=0,604. Τα αποτελέσματα αυτά, συγκλίνουν με την επιβεβαιωμένη μελέτη περί στόχευσης του γονιδίου *OGT* από το miR-423-5p, καθώς αυξανόμενης της ποσότητας του miR-423-5p στα κύτταρα, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση στην ενζυμική ενεργότητα της λουσιφεράσης, η οποία παρέμεινε ανέπαφη στο δείγμα με τον αρνητικό μάρτυρα.

Τέλος, οι ίδιες σταθερές συνθήκες με το επιβεβαιωτικό πείραμα εφαρμόστηκαν και για την ανίχνευση της πιθανότητας αλληλεπίδρασης του miR-936 με την 3'-UTR του γονιδίου *KLK3*, που είναι και ο απώτερος σκοπός της παρούσας μελέτης. Για ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων στον τεχνικό χειρισμό, πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα διαδοχικά πειράματα υπό τις ίδιες συνθήκες. Οι τιμές των λόγων Luciferase/β-gal που προέκυψαν, μετά τα πειράματα συνδιαμόλυνσης, έδειξαν σημαντικές αυξομειώσεις μεταξύ των δειγμάτων, αφού οι λόγοι κυμάνθηκαν από Luciferase/β-gal=0,297-0,347 για την μικρότερη συγκέντρωση του miR-936 (50ng) έως Luciferase/β-gal=0,312-0,344 για τη μέγιστη συγκέντρωση (400ng), ενώ στο δείγμα του αρνητικού μάρτυρα (miR-423-5p) η τιμή ήταν Luciferase/β-gal=0,368-0,384.

Συνοψίζοντας, λοιπόν, το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι δεν υφίσταται ισχυρή αλληλεπίδραση του miR-936 με την 3'-UTR του mRNA της *KLK3*, πράγμα που υποδηλώνει ότι το γονίδιο *KLK3* δεν αποτελεί δυνητικό στόχο του συγκεκριμένου miRNA μορίου, όπως είχε προβλεφθεί από τους αντίστοιχους αλγόριθμους. Ωστόσο, μια περαιτέρω ανάλυση της εν λόγω αλληλεπίδρασης ενδεχομένως και με άλλες εργαστηριακές μεθόδους θα μπορούσε να βοηθήσει στην εξαγωγή ακριβέστερων και πιο σαφών συμπερασμάτων προς αυτό το πεδίο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kraut, H., Frey, E.K. and Werle, E., 1930, Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse. Hoppeseylers Z Physiol Chem., **189**, 97–106.
2. Werle, E., 1934, Zur Kenntnis des haushalts des Kallikreins. Biochem Z., **269**, 415–434.
3. Bhoola, K.D., Figueroa, C.D. and Worthy, K., 1992, Bioregulation of kinins:kallikreins, kininogens, and kininases. Pharmacol Rev, **44**, 1–80.
4. Clements, J.A., in The Kinin System , ed Farmer, S.G., 1st ed., Academic Press, San Diego, CA , 1997, ch. 5, pp. 71–97.
5. Margolius, H.S., 1998, Kallikreins, kinins and cardiovascular diseases:a short review. Biol Res, **31** (3), 135–141.
6. Riegman, P.H., Vlietstra, R.J., Suurmeijer, L., Cleutjens, C.B. and Trapman, J., 1992, Characterization of the human kallikrein locus. Genomics, **14** (1), 6–11.
7. Yousef, G.M., Luo, L.Y. and Diamandis, E.P., 1999, Identification of novel human kallikrein-like genes on chromosome 19q13.3-q13.4. Anticancer Res, **19** (4B), 2843–52.
8. Gan, L., Lee, I., Smith, R., Argonza-Barrett, R., Lei, H., McCuaig, J., Moss, P., Paeper, B. and Wang, K., 2000, Sequencing and expression analysis of the serine protease gene cluster located in chromosome 19q13 region. Gene, **257** (1), 119–130
9. Harvey, T.J., Hooper, J.D., Myers, S.A., Stephenson, S.A., Ashworth, L.K. and Clements, J.A., 2000, Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (KLK) locus on proximal 19q13.4. J Biol Chem, **275** (48), 37397–406.
10. Yousef, G.M., Chang, A., Scorilas, A. and Diamandis, E.P., 2000, Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3-q13.4. Biochem Biophys Res Commun, **276** (1), 125–133
11. Lundwall, A. et al., 2006, A comprehensive nomenclature for serine proteases with homology to tissue kallikreins. Biol.Chem., **387** (6), 637–641.
12. Asakai, R., Davie, E.W. and Chung, D.W., 1987, Organization of the gene for human Factor XI. Biochemistry, **26** (23), 7221–8.
13. Sainz, I.M., Pixley, R.A. and Colman, R.W., 2007, Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. Thromb Haemost, **98** (1), 77–83.

14. Borgoño, C.A. and Diamandis, E.P., 2004, The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer.*, **4** (11), 876–890.
15. Yousef, G.M., Borgoño, C.A., Michael, I.P. and Diamandis, E.P., 2004, Cloning of a kallikrein pseudogene. *Clin Biochem*, **37**(11), 961-967.
16. Lawrence, M.G., Lai, J. and Clements, J.A., 2010, Kallikreins on steroids: structure, function, and hormonal regulation of prostate-specific antigen and the extended kallikrein locus. *Endocr Rev.*, **31** (4), 407-446.
17. Kontos, C.K. and Scorilas, A., 2012, Kallikrein-related peptidases (KLKs): a gene family of novel cancer biomarkers. *Clin Chem Lab Med.*, **50** (11), 1877-91.
18. Diamandis, E.P. and Yousef, G.M., 2002, Human tissue kallikreins: A family of new cancer biomarkers. *Clin Chem.*, **48** (8), 1198-205.
19. Borgoño, C.A., Michael, I.P., and Diamandis, E.P., 2004, Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Mol Cancer Res.*, **2** (5), 257-280.
20. Yoon, H., Laxmikanthan, G., Lee, J., Blaber, S.I., Rodriguez, A., Kogot, J.M., Scarisbrick, I.A. and Blaber, M., 2007, Activation profiles and regulatory cascades of the human kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem.*, **282** (44), 31852–64.
21. Emami, N. and Diamandis, E.P., 2007, Human tissue kallikreins: A road under construction. *Clin Chim Acta.*, **381** (1), 78-84.
22. Lundwall, A. and Brattsand, M., 2008, Kallikrein-related peptidases. *Cell Mol Life Sci.*, **65** (13), 2019-38.
23. Tye, C.E, Pham, C.T., Simmer, J.P. and Bartlett, J.D., 2009, DPPI may activate KLK4 during enamel formation. *J Dent Res*, **88** (4), 323– 327.
24. *MEROPS - The Peptidase database*. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/merops/>.
25. Kalinska, M., Meyer-Hoffert, U., Kantyka, T. and Potempa, J., 2016, Kallikreins - The melting pot of activity and function. *Biochimie.*, **122**, 270-282.
26. Sotiropoulou, G., Pampalakis, G. and Diamandis, E.P., 2009, Functional roles of human kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem.*, **284** (48), 32989-94.
27. Avgeris, M., Mavridis, K. and Scorilas, A., 2012, Kallikrein-related peptidases in prostate, breast, and ovarian cancers: from pathobiology to clinical relevance. *Biol Chem.*, **393** (5), 301-317.
28. Filippou, P.S., Karagiannis, G.S., Musrap, N. and Diamandis, E.P., 2016, Kallikrein-related peptidases (KLKs) and the hallmarks of cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci.*, **53** (4), 277-291.

29. Mavridis, K. and Scorilas, A., 2010, Prognostic value and biological role of the kallikrein-related peptidases in human malignancies. *Future Oncol.*, **6** (2), 269-285.
30. Diamandis, E.P., Yousef, G.M., Luo, L.Y., Magklara, A. and Obiezu, C.V., 2000, The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis. *Trends Endocrinol Metab.*, **11** (2), 54-60.
31. Lander, E.S., 2011, Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature.*, **470** (7333), 187–197.
32. ENCODE Project Consortium., 2012, An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.*, **489** (7414), 57–74.
33. Pauli, A., Rinn, J.L. and Schier, A.F., 2011, Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. *Nat Rev Genet.*, **12** (2), 136-149.
34. Fu, X.D., 2014, Non-coding RNA: a new frontier in regulatory biology. *Natl Sci Rev.*, **1** (2), 190–204.
35. Mercer, T.R., Dinger, M.E. and Mattick, J.S., 2009, Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet.*, **10** (3), 155-159.
36. Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V., 1993, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75** (5), 843–854.
37. Pasquinelli, A. E., 2000, Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*, **408** (6808), 86–89.
38. Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S., 2011, miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data, *Nucleic Acids Res.*, **39** (Database issue), D152-157.
39. Hrdlickova, B., de Almeida, R.C., Borek, Z. and Withoff, S., 2014, Genetic variation in the non-coding genome: Involvement of micro-RNAs and long non-coding RNAs in disease. *Biochim Biophys Acta.*, **1842** (10), 1910-22.
40. Macfarlane, L.A. and Murphy, P.R., 2010, MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics.*, **11** (7), 537-561.
41. Olena, A.F. and Patton, J.G., 2010, Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol.*, **222** (3), 540-545.
42. Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T. and Kim, Y.Y., 2010, MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta.*, **1803** (11), 1231-43.

43. Lages, E., Ipas, H., Guttin, A., Nesr, H., Berger, F. and Issartel, J.P., 2012, MicroRNAs: molecular features and role in cancer. *Front Biosci.*, **17**, 2508-40.
44. Melo, C.A. and Melo, S.A., in *Non-coding RNAs and Cancer*, ed Fabbri, M., Springer, New York, 2014, ch. 2, pp. 5-24.
45. Gurtan, A.M. and Sharp, P.A., 2013, The role of miRNAs in regulating gene expression networks. *J Mol Biol.*, **425** (19), 3582-600.
46. Valinezhad Orang, A., Safaralizadeh, R. and Kazemzadeh-Bavili, M., 2014, Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int J Genomics.*, **2014**, 970607.
47. Cheng, C.J. and Slack, F.J., 2012, The duality of oncomiR addiction in the maintenance and treatment of cancer. *Cancer J.*, **18** (3), 232-237.
48. Samaan, S., Lichner, Z., Ding, Q., Saleh, C., Samuel, J., Streutker, C. and Yousef, G.M., 2014, Kallikreins are involved in an miRNA network that contributes to prostate cancer progression. *Biol Chem.*, **395** (9), 991-1001.
49. White, N.M., Youssef, Y.M., Fendler, A., Stephan, C., Jung, K. and Yousef, G.M., 2012, The miRNA-kallikrein axis of interaction: a new dimension in the pathogenesis of prostate cancer. *Biol Chem.*, **393** (5), 379-389.
50. Sidiropoulos, K.G., White, N.M., Bui, A., Ding, Q., Boulos, P., Pampalakis, G., Khella, H., Samuel, J.N., Sotiropoulou, G. and Yousef, G.M., 2014, Kallikrein-related peptidase 5 induces miRNA-mediated anti-oncogenic pathways in breast cancer. *Oncoscience.*, **1** (11), 709-724.
51. Pasic, M.D., Sotiropoulou, G. and Yousef, G.M., 2015, The miRNA-Kallikrein interactions: adding a new dimension. *Cell Cycle.*, **14** (5), 691-692.
52. Kozomara, A and Griffiths-Jones, S., 2014, MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*, **42** (Database issue), D68-73.
53. Budak, H., Bulut, R., Kantar, M. and Alptekin, B., 2016, MicroRNA nomenclature and the need for a revised naming prescription. *Brief Funct Genomics.*, **15** (1), 65-71.
54. Vlachos, I.S. et al., 2015, DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Res.*, **43** (Database issue), D153-9.
55. Jiang, Q., Wang, Y., Hao, Y., Juan, L., Teng, M., Zhang, X., Li, M., Wang, G. and Liu, Y., 2009, miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res.*, **37** (Database issue), D98-104.

56. Saito, T. and Saetrom, P., 2010, MicroRNAs--targeting and target prediction. *N Biotechnol.*, **27** (3), 243-249.
57. Witkos, T.M., Koscianska, E. and Krzyzosiak, W.J, 2011, Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Curr Mol Med.*, **11** (2), 93-109.
58. Peterson, S.M., Thompson, J.A., Ufkin, M.L., Sathyanarayana, P., Liaw, L. and Congdon, C.B., 2014, Common features of microRNA target prediction tools. *Front Genet.*, **5** :23.
59. Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.W., Bartel, D.P., 2015, Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife.*, **4**.
60. Vlachos, I.S., Kostoulas, N., Vergoulis, T., Georgakilas, G., Reczko, M., Maragkakis, M., Paraskevopoulou, M.D., Prionidis, K., Dalamagas, T. and Hatzigeorgiou, A.G., 2012, DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res.*, **40**(Web Server issue):W498-504.
61. Paraskevopoulou, M.D., Georgakilas, G., Kostoulas, N., Vlachos, I.S., Vergoulis, T., Reczko, M., Filippidis, C., Dalamagas, T. and Hatzigeorgiou, A.G., 2013, DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Res.*, **41** (Web Server issue):W169-173.
62. Betel D., Koppal, A., Agius, P., Sander, C. and Leslie, C., 2010, Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol.*, **11** (8):R90.
63. Wong, N. and Wang, X., 2015, miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res.*, **43** (Database issue):D146-152.
64. Xiao, F., Zuo, Z., Cai, G., Kang, S., Gao, X. and Li, T., 2009, miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.*, **37** (Database issue):D105-110.
65. Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P. and Gretz, N., 2011, miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform.*, **44** (5):839-847.
66. Martinez-Sanchez, A. and Murphy, C.L., 2013, MicroRNA Target Identification-Experimental Approaches. *Biology (Basel)*, **2** (1), 189-205.
67. *HEK293 cells*. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/HEK_293_cells.
68. *HEK293T* (ATCC® CRL-3216™). Available from: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-3216>.

69. Watson, J.D., in Recombinant DNA: genes and genomes: a short course, ed Freeman, W.H., 3rd ed., Academic Press, San Francisco , 2007, ISBN 0-7167-2866-4.
70. Patten, C.L., Glick, B.R. and Pasternak, J., in Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA., 2009, Washington, D.C: ASM Press. ISBN 978-1-55581-498-4.
71. Bartlett, J.M. and Stirling, D., 2003, A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.*, **226**, 3-6.
72. *Polymerase Chain Reaction.* Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction.
73. *PCR Primer Design Guidelines.* Available from: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html.
74. Westermeier, R., in Electrophoresis in Practice: Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations., 2016, 5th ed. Weinheim, New York : Wiley-VCH, c2001.
75. *TA Cloning Technology.* Available from: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/TA_Cloning.html.
76. *Vector (molecular biology).* Available from: [https://en.wikipedia.org/wiki/Vector_\(molecular_biology\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Vector_(molecular_biology)).
77. Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P. and Claverys, J.P., 2014, Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews. Microbiology.*, **12** (3), 181–96.
78. *Strain - DH5α.* Available from: <https://cgsc2.biology.yale.edu/Strain.php?ID=43509>.
79. *Restriction Enzyme.* Available from: <https://www.britannica.com/science/restriction-enzyme>.
80. *Classic Subcloning.* Available from: https://www.promega.com/-/media/files/resources/product-guides/subcloning-notebook/classic_subcloning.
81. *Transfection Methods Overview.* Available from: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10-0826_transfection_tutorial_interactive.
82. *Co-transfection Protocol for Multiple Plasmid DNAs.* Available from: <https://www.mirusbio.com/tech-resources/tips/co-transfection-protocol-for-multiple-plasmid-dnas>.
83. Luo, P., He, T., Jiang, R. and Li, G., 2015, MicroRNA-423-5p targets O-GlcNAc transferase to induce apoptosis in cardiomyocytes. *Mol Med Rep.*, **12** (1), 1163-68.

84. *Acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Available from:
https://en.wikipedia.org/wiki/Acid_guanidinium_thiocyanate-phenol-chloroform_extraction.
85. *Reverse Transcription Basics*. Available from:
<https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-basics.html>.
86. *Real-Time PCR (qPCR) Basics*. Available from:
<https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics.html>.
87. Δ. Παλαιολόγου, Ε.Κ.κ.Γ.Π. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Available from:
https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/647/1/02_chapter_07.pdf.
88. *Bioluminescent Reporter Gene Assays*. Available from:
<https://www.promega.com/~media/files/resources/paguide/letter/chap8.pdf?la=en>.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πειραματική επιβεβαίωση της στόχευσης του mRNA της Καλλικρεΐνης 3 από microRNAs μόρια

Τα γονίδια των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών κωδικοποιούν για πρωτεάσες σερίνης και εντοπίζονται σε πολλούς ιστούς και βιολογικά υγρά. Ο γενετικός τους τόπος (19q13.4) αποτελείται από 15 μέλη, τα οποία χαρακτηρίζονται από σημαντική ομοιότητα στη δομή και τη λειτουργία τους. Η εμπλοκή τους σε παθολογικές καταστάσεις του ανθρώπινου οργανισμού, έχει στρέψει το ερευνητικό ενδιαφέρον στον εντοπισμό miRNA μορίων που λειτουργούν ως ρυθμιστές της έκφρασης των γονιδίων των καλλικρεϊνών.

Τα miRNAs ανήκουν στην κατηγορία των ρυθμιστικών μη κωδικών μορίων RNA και το μέγεθός τους είναι περίπου 19-24 νουκλεοτίδια. Ο ρόλος αυτών των μικρών μη κωδικών μορίων RNA σχετίζεται με τη μετα-μεταγραφική σίγηση διαφόρων γονιδίων, καθώς δρουν είτε αποικοδομώντας τα mRNA μετάγραφα είτε καταστέλλοντας την μετάφρασή τους. Συγκεκριμένα, η καταλυτική τους δράση πραγματοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης με την 3'-UTR των διαφόρων μεταγράφων.

Η παρούσα εργασία είχε ως σκοπό την εύρεση υποψήφιων miRNA μορίων που επιδρούν στο γονίδιο της KLK3, καθώς υπάρχουν ελάχιστα βιβλιογραφικά δεδομένα που να υποδεικνύουν τη στόχευση του mRNA της KLK3 από τους συγκεκριμένους γονιδιακούς ρυθμιστές. Σε αυτό, βοήθησε το πεδίο της βιοπληροφορικής μέσω αναζήτησης σε κατάλληλους αλγόριθμους πρόβλεψης των miRNA στόχων. Το miR-936 ήταν αυτό που παρουσίαζε την υψηλότερη κατάταξη ως υποψήφιο μόριο που στοχεύει το γονίδιο *KLK3*. Ακολούθως, εφαρμόστηκε η πειραματική επιβεβαίωση αυτής της προβλεπόμενης αλληλεπίδρασης του miR-936 με την 3'-UTR του μεταγράφου της *KLK3* με τη μέθοδο δοκιμής του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης. Η εργαστηριακή διαδικασία περιελάμβανε την κλωνοποίηση της 3'-UTR του *KLK3* στον πλασμίδιο pMIR-REPORTTM Luciferase, που φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο της λουσιφεράσης, τον ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο της έκφρασης του πλασμιδίου του miR-936 στα HEK293T κύτταρα και τέλος, τη συνδιαμόλυνση των κυττάρων αυτών με τα πλασμίδια προς εξέταση της πιθανότητας αλληλεπίδρασης μεταξύ του miR-936 και του mRNA της *KLK3* μέσω μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας της λουσιφεράσης. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε εργαστηριακή εκτέλεση μιας επιβεβαιωμένης μέλετης, όπου

το miR-423-5p έχει αποδειχθεί ότι στοχεύει το γονίδιο *OGT* (*Mus Musculus*), προκειμένου να οριστούν οι κατάλληλες συνθήκες για την διεξαγωγή του τελικού πειραματικού σταδίου της παρούσας εργασίας. Το miR-423-5p διαθέτει τον ίδιο πλασμιδιακό φορέα με το miR-936 και χρησιμοποιήθηκε ως ο αρνητικός του μάρτυρας στα πειράματα συνδιαμόλυνσης.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, μετά από εκτέλεση του τελικού σταδίου της παρούσας εργασίας, εφαρμόζοντας τις ίδιες πειραματικές συνθήκες με την επιβεβαιωμένη μελέτη, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το υποψήφιο miR-936 πιθανόν να μην επιδρά στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της *KLK3*. Παρόλα αυτά, μια περαιτέρω ανάλυση θα μπορούσε να συμβάλει στην εξαγωγή ακριβέστερων συμπερασμάτων.

ABSTRACT

Experimental validation of microRNAs-mediated targeting on mRNA of Kallikrein 3

The human tissue kallikrein genes encode for serine proteases and are found in many tissues and biological fluids. The human kallikrein locus, on chromosome 19q13.4, consists of 15 members, which are characterized by significant similarity in their structure and function. Their involvement in many human pathological processes has turned the scientific interest in identifying miRNAs which could regulate the expression of kallikrein genes.

MiRNAs are short regulatory non-coding RNA molecules of approximately 19-24 nucleotides long. These molecules are involved in post-transcriptional silencing of various genes, as they can either degrade the mRNA transcripts or suppress their translation. In particular, the main interaction between miRNAs and target messenger RNAs occurs at the 3'-Untranslated Region (3'-UTR) of the mRNA.

The aim of this study was to find the candidate miRNAs which target the *KLK3* gene, as this gene is not strongly predicted to interact with known miRNAs according to literature references. Computational prediction of miRNA targets is really helpful in identifying miRNA: mRNA interactions. In this study, miR-936 was the most predictable molecule that targets the gene of interest. Subsequently, validation of this predicted interaction was applied via the luciferase gene assay. The experimental procedure involved the cloning of the 3'-UTR of *KLK3* in pMIR-REPORT[™] Luciferase plasmid, which includes the reporter luciferase gene, qualitative and quantitative control of miR-936 expression in HEK293T cells and finally, co-transfection with the plasmids in order to measure the activity of luciferase enzyme and evaluate the interaction between miR-936 and the mRNA of *KLK3*. In addition, a confirmed study, in which miR-423-5p has been shown to target the *OGT* gene (*Mus Musculus*), was carried out *in vitro* in order to determine the appropriate experimental conditions for conducting the final step of current study. The plasmid vector of miR-423-5p is the same as miR-936 and thus, it was used as the negative control of miR-936 in co-transfection experiments.

According to the results, after the conduction of the final step under the appropriate conditions, the main conclusion is that miR-936 may not regulate the expression of *KLK3* gene. However, a further investigation of this interaction could confirm or not this conclusion.