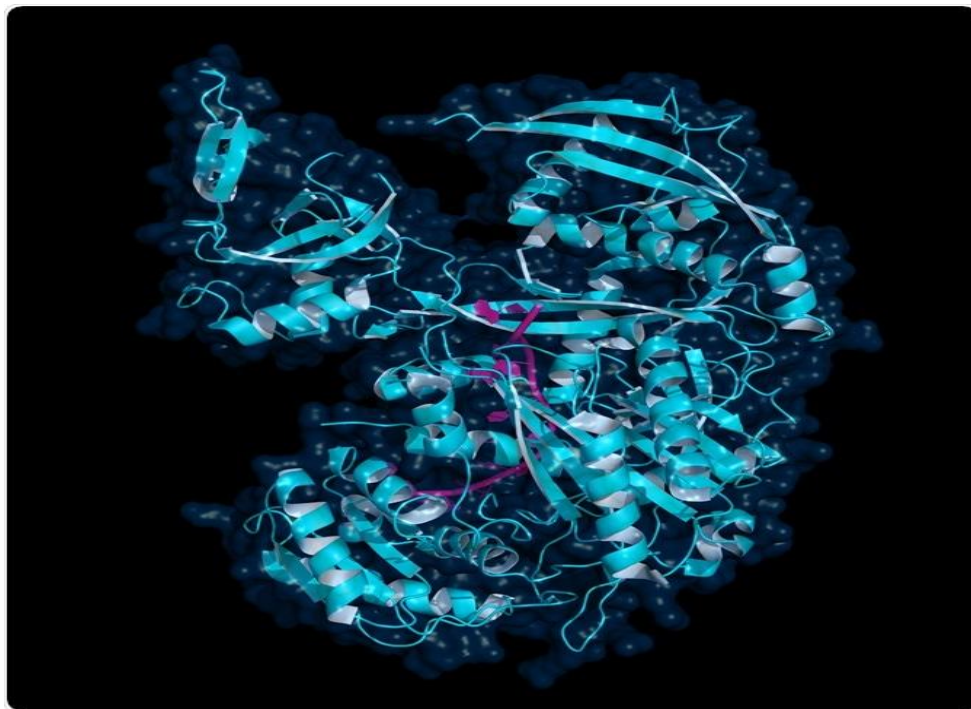




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΚΑΔΗΜΙΑ ΤΩΝ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»



«Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης των Αργοναυτών στην κυτταρική δομή και λειτουργία»



Ακτύπη Ανδριάνα, Βιολόγος

Επιστημονική Υπεύθυνη:

Έμα Ανασταδιάδου, Ερευνήτρια του τομέα Γενετικής, Ακαδημία Αθηνών

Επιβλέπων Καθηγητής:

Δ.Ι. Στραβοπόδης, Αναπληρώτης Καθηγητής του Τμήματος Βιολογίας

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Ι.Σ. Παπασιδέρη, Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας

Π. Κόλλια, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας

Δ.Ι. Στραβοπόδης, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Βιολογίας

Αθήνα 2019

Πρόλογος- Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο τμήμα βασικής έρευνας, του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών ερευνών της ακαδημίας Αθηνών (Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α), στο εργαστήριο γενετικής, με επικεφαλής την Δρ. Αναστασιάδου Ευανθία.

Στο εγχείρημα αυτό δεν υπήρξα μόνη μου και γι αυτό το λόγο θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς, όλους τους ανθρώπους που συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα σε αυτό.

Πρώτα από όλα, νιώθω την ανάγκη να εκφράσω ένα τεράστιο ευχαριστώ, στη Δρ. Αναστασιάδου Ευανθία, για την εμπιστοσύνη της να με εντάξει στην ομάδα της, καθώς και για την ανάθεση ενδιαφέροντων ερευνητικών αντικειμένων. Αποτελεί για μένα όχι μόνο πρότυπο σπουδαίας ερευνήτριας αλλά και γυναίκας. Ήταν δίπλα μου σε όλες τις δύσκολες στιγμές και με το χαμόγελο και την ηρεμία που τη χαρακτηρίζει, με δίδασκε να πηγαίνω πάντα ένα βήμα μπροστά. Χάρης την προσωπικότητα της και την αγάπη της για την έρευνα, η αγάπη μου για τον κόσμο της βιολογίας έγινε ακόμα μεγαλύτερη.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στον Αναπληρωτή καθηγητή Στραβοπόδη Δημήτριο, ο οποίος με τίμησε δίνοντας μου την ευκαιρία να εργαστώ πάνω στο συγκεκριμένο ερευνητικό θέμα δίνοντας μου απόλυτη ελευθερία όσον αφορά την πειραματική κατεύθυνση. Η αγάπη και η προσήλωση του για την έρευνα αποτελεί για εμένα φωτεινό παράδειγμα. Καθόλη τη διάρκεια της φοίτησης μου ήταν πάντα πρόθυμος να αφουγκραστεί και να επιλύσει κάθε προβληματισμό μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, Καθηγήτρια Ισιδώρα Παπασιδέρη και Καθηγήτρια Κόλλια Παναγούλα, για την οργάνωση του μεταπτυχιακού προγράμματος μέσα απο το οποίο είχα την ευκαιρία να έρθω σε επαφή με μια ευρεία γκάμα ερευνητικών αντικειμένων και σπουδαίους ερευνητές.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω, επίσης, σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου: Γεωργίου Στυλιανή , Πανταζοπούλου Βασιλική, Φιλίππα Βίκυ, Δελλής Αναστάσιος, Βασίλης Πιέρρος, Θεοτόκη Ελένη, Διαμάντη Χριστίνα, Λιανοπούλου Εριφύλη, Καλαβρός Νικόλας, Δημάκου Δέσποινα, Γιαννακοπούλου Σταυρούλα για όλα αυτά που με δίδασκαν καθώς επίσης και για όλες τις στιγμές που μοιραστήκαμε, όλο αυτό το διάστημα. Η ομάδα του εργαστηρίου αποτελεί για μένα τη δεύτερη μου οικογένεια.

Τέλος, εξίσου σημαντική ήταν η συμβολή της οικογένειάς μου, οι οποίοι με στήριξαν σε δύσκολες στιγμές άγχους και αγωνίας. Η αγάπη τους και η εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, υπήρξε για μένα το ισχυρότερο κίνητρο να μην εγκαταλείψω ποτέ τους στόχους μου και να προσπαθώ πάντα για το καλύτερο.

Περίληψη

Η οικογένεια των Αργοναυτών εμφανίζει υψηλό βαθμό συντηρητικότητας, με τα μέλη της να απαντώνται στα Αρχαία, στους Προκαρυωτικούς και Ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η συγκεκριμένη οικογένεια υποδιαιρείται σε τρεις υποοικογένειες, όπως αυτές κατάγραφονται παρακάτω: την **υποοικογένεια AGO**, η οποία περιλαμβάνει πρωτεΐνες όπως η AGO1 που ανακαλύφθηκε στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, την **υποοικογένεια PIWI** (P element induced wimpy testis), η οποία αποτελείται από πρωτεΐνες όπως η πρωτεΐνη piwi που βρέθηκε στον οργανισμό *Drosophila melanogaster* και τέλος, την πρόσφατη **υποοικογένεια Αργοναύτη 3** που περιλαμβάνει πρωτεΐνες όμοιες με εκείνες του οργανισμού *C. elegans*. Οι πρωτεΐνες Αργοναύτες έχουν χαρακτηριστική δίλοβη δομή. Ο ένας λοβός συγκροτείται από τις επικράτειες N-PAZ και ο άλλος από τις MID-PIWI, σχηματίζοντας στο κέντρο της πρωτεΐνης μία ειδική θέση πρόσδεσης μικρών μορίων RNA. Οι πρωτεΐνες της συγκεκριμένης οικογένειας φαίνεται να εμπλέκονται σε πολλές διαδικασίες του κυττάρου, όπως στη βιογένεση των μικρών RNA, microRNA, small-interference RNA και piwi-interacting RNA. Οι πρωτεΐνες Αργοναύτες απαντώνται κυρίως στο κυτταρόπλασμα (συνήθως στα σωματίδια P-bodies), αν και πρόσφατες μελέτες έχουν εντοπίσει τα συγκεκριμένα μόρια μέσα στο πυρήνα. Από την οικογένεια των αργοναυτών, ο Αργοναύτης 2 διαθέτει καταλυτική υπομονάδα (λόγω του ιδιαίτερου μοτίβου Asp597-Asp669-His807 που εμφανίζει στη δομή του) και εμπλέκεται στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση ως μέλος του συμπλόκου RISC με διάφορους τρόπους. Είτε καταστρέφοντας το προσδεδεμένο mRNA, είτε εμποδίζοντας την μετέπειτα μετάφραση του. Επίσης, φαίνεται ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εμπλέκεται σε πολλά σύνδρομα και ασθένειες, όπως για παράδειγμα σε διάφορους τύπους καρκίνου και στο σύνδρομο Εύθραστου X. Για τον σκοπό αυτό, στην παρούσα εργασία, μελετάται η επίδραση που έχει η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2 στον φαινότυπο των φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων NTHY. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2 πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικασίας της διαμόλυνσης κυττάρων με πλασμιδιακούς φορείς (AGO2-GFP πλασμίδιο και GFP πλασμίδιο). Η μέθοδος της κυτταρομετρίας ροής έδειξε ότι τα κύτταρα που εκφράζουν την χιμαιρική πρωτεΐνη Αργοναύτης 2-gfp είναι λιγότερα συγκριτικά με εκείνα που εκφράζουν μόνο το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας χρωστικής. Περαιτέρω ανάλυση

πραγματοποιήθηκε μέσω της δοκιμασίας MTT κατά την οποία παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Ago2 σε κύτταρα μειώνει τον αρχικό πληθυσμό των βιώσιμων κυττάρων. Επιπλέον, μελετήθηκε η μεταγραφική έκφραση διαφόρων γονιδίων ενδιαφέροντος σε κύτταρα τα οποία είχαν προσλάβει το πλασμίδιο της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2-gfp, μέσω της δοκιμασίας αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Ago2 φαίνεται να μην επηρεάζει την συνολική μεταγραφική έκφραση των γονιδίων ελέγχου LamA/C, GAPDH ή των μελών της οικογένειας των Αργοναυτών. Αντίθετα, η ενδογενής έκφραση του γονιδίου του Αργοναύτη 2 σε μεταγραφικό επίπεδο στον κυτταρικό πληθυσμό που υπερεκφράζει την πρωτεΐνη Ago2, δείχνει να έχει πτωτική τάση συγκριτικά με την έκφραση που παρουσιάζεται στα κύτταρα που εκφράζουν μόνο την πράσινη φθορίζουσα χρωστική GFP. Επιπρόσθετα, μέσω της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (q-PCR) παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα που προσέλαβαν μόνο το γονίδιο της πράσινης χρωστικής GFP, εμφανίζουν μεγαλύτερο φθορισμό συγκριτικά με εκείνα που προσέλαβαν το πλασμίδιο του Αργοναύτη 2. Τέλος, η έκφραση των μελών της οικογένειας των αργοναυτών (AGO1, AGO2, AGO3, AGO4) φαίνεται ότι παρουσιάζει διαφορές στην μεταγραφική έκφραση ανάμεσα στους διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς που μελετήθηκαν.

Summary

The Argonaute protein family is well conserved among the species. It can be divided in three subfamilies: the **AGO protein subfamily** which involves proteins similar to AGO1 found at plant *Arabidopsis thaliana*, the **PIWI protein subfamily** (P element induced wimpy testis), which contains proteins that could be found in *Drosophila melanogaster* and the third **subfamily Argonaute 3**, which includes Ago proteins, as the ones found in *C. elegans*. The Argonautes family has a characteristic bilobal structure. One lobe consists of the N and PAZ domains and the other one the MID-PIWI domain. All together, they form a specific cleft in the centre of the Argonaute protein where small RNAs can be attached. Argonaute proteins are known because of their role in microRNAs, small-interference RNAs and piwi-interacting RNAs biogenesis. Most of them are located in the cytoplasm (in specific structures that are called P-bodies). However, recent studies proved that Argonaute can be also found inside the nucleus. Protein Argonaute 2 (Ago2) belongs to the AGO subfamily. It is one of the members in mammals that has catalytic activity (because of the special motif Asp597-Asp669-His807 in its structure) and plays an important role in post transcription regulation as being a part of RISC complex by multiple ways. Argonaute 2 has the ability to degradate mRNAs which are attached on the RISC complex, or to inhibit their translation. Furthermore, Argonaute 2 protein also seems to implicate in various deceases in human, including various cancer types (such as colon cancer and ovarian cancer) and syndrome X. However, little is known about the implication of Ago2 over-expression in the cell phenotype. In this study, using transfected normal thyroid cell line NTHY with plasmid vectors (Ago2-gfp plasmid and gfp plasmid), it is shown that over-expression of the Ago2 protein affects the number of living cells, in comparison with other cell populations of the Ago2 with normal expression. With flow cytometry was shown that Ago2-gfp positive cells were less in number than the cells that expressed only the gene of the green fluorescent, gfp. To further test this observation, MTT analysis was performed and the results were in agreement with the ones emerged from flow cytometry. It was statistically significant that the cells which expressed the hybrid Ago2 -gfp protein, were less than the cells that expressed just the gfp protein. It was also observed that over-expression of the Ago2 protein does not affect the expression of housekeeping genes, such as Lamin or GAPDH, or the expression of the family protein members (AGO1, AGO2, AGO3, AGO4) on the

transcription level. Though it is important to point out that the amount of endogenous Ago2 in the transfected cells with plasmid Ago2-gfp, it seems to be less expressed in contrast with the other cell populations. To further investigate this result, quantitative polymerase chain reaction (q-PCR) was performed. It was obvious that the cells which expressed only the GFP protein, express higher levels of GFP transcripts than the cells which were treated with the AGO2-GFP plasmid. Finally, it should be mentioned that, in this experimental procedure, the expression of the endogenous Ago2 is differentiated among the cell populations used in this study.

Περιεχόμενα

Πρόλογος- Ευχαριστίες	2
Περίληψη.....	3
Summary	5
1.Εισαγωγή	9
1.1 Οικογένεια των Αργοναυτών	10
1.2 Δομή των Αργοναυτών.....	11
1.3 Λειτουργία των Αργοναυτών	14
1.3.1 Ο ρόλος των Αργοναυτών στην βιογένεση των miRNAs και στην σίγηση των mRNA.	14
1.3.2 Ο ρόλος των Αργοναυτών στην βιογένεση των μικρών μορίων RNA, siRNAs και στην εξαχρείωση των mRNA.	17
1.3.3 Ο ρόλος των Αργοναυτών στην βιογένεση των μικρών μορίων RNA, piRNAs και στην καταστολή των τρανσποζονίων.	18
1.4 Τοπολογία Αργοναυτών	20
1.5 Οι πρωτεΐνες Αργοναύτες και η εμπλοκή τους σε ασθένειες.....	21
1.6. Αργοναύτης 2	23
1.7. Δομή της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2.....	23
1.8. Λειτουργίες πρωτεΐνης Αργοναύτη 2	26
1.9 Η πρωτεΐνη Αργοναύτης 2 και παθολογικές καταστάσεις	29
2.Υλικά και μέθοδοι	31
2.1. Βακτηριακές καλλιέργειες.....	32
2.1.1. Βακτηριακή καλλιέργεια E.coli σε τρυβλίο	32
2.1.2 Υγρή βακτηριακή καλλιέργεια E.coli.....	32
2.1.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από υγρή καλλιέργεια μικρής κλίμακας.	32
2.1.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας.....	33
2.1.5 Πέψεις πλασμιδιακού DNA με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων.	34
2.2. Κυτταροκαλλιέργειες	35
2.2.1. Διατήρηση και ανακαλλιέργεια κυττάρων	35
2.2.2. Φύλαξη κυττάρων-Κατάψυξη και απόψυξη.....	35
2.3 Διαμόλυνση κυτταρικού πληθυσμού με πλασμιδιακό DNA.....	36
2.4 Κυτταρομετρία ροής.....	37
2.5 Μικροσκοπία Φθορισμού.....	38

2.6 Απομόνωση RNA από κυτταρικό εκχύλισμα.....	39
2.7 <i>In vitro</i> αντίστροφη μεταγραφή - δημιουργία cDNA από RNA.....	40
2.7.1 Εξάλειψη γενωμικού DNA.....	41
2.7.2 Αντίστροφη μεταγραφή.....	41
2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	43
2.8.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	43
2.8.2 Q RT-PCR (Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου)	45
2.9 Δοκιμασία MTT	47
3.Αποτελέσματα.....	48
3.1 Μικρότερος πληθυσμός φθορίζοντων κυττάρων με συνέκφραση της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2 συγκριτικά με τους κυτταρικούς πληθυσμούς ελέγχου.	49
3.2. Η υπερέκφραση του Αργοναύτη στα φυσιολογικά θυρεοειδικά κύτταρα συνεπάγεται μειωμένο αριθμό βιώσιμων κυττάρων.	56
3.3 Η υπερέκφραση του Αργοναύτη 2 δεν επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που εκφράζονται σταθερά στον κυτταρικό πληθυσμό των φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων	63
3.4. Η υπερέκφραση του Αργοναύτη 2 δεν επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων των υπόλοιπων αργοναυτών στον κυτταρικό πληθυσμό των φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων NTHY.	65
3.5. Η υπερέκφραση του Αργοναύτη 2 φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση της ενδογενούς πρωτεΐνης Αργοναύτη 2 στον κυτταρικό πληθυσμό των φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων.	66
3.5 Εντονότερο φθορισμό εμφανίζουν τα κύτταρα που δεν υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Αργοναύτη 2.....	67
3.6 Η μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου Ago2-gfp επιτυγχάνεται στο μέγιστο στις 48 ώρες μετά την διαμόλυνση των κυτταρικών πληθυσμών NTHY.	69
3.7 Η μεταγραφική έκφραση των υπόλοιπων μελών της οικογένειας φαίνεται να είναι ποσοτικά μεγαλύτερη στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Ago2.....	71
4.Συζήτηση	73
5.Βιβλιογραφία	78
5.1 Βιβλιογραφικές αναφορές	79

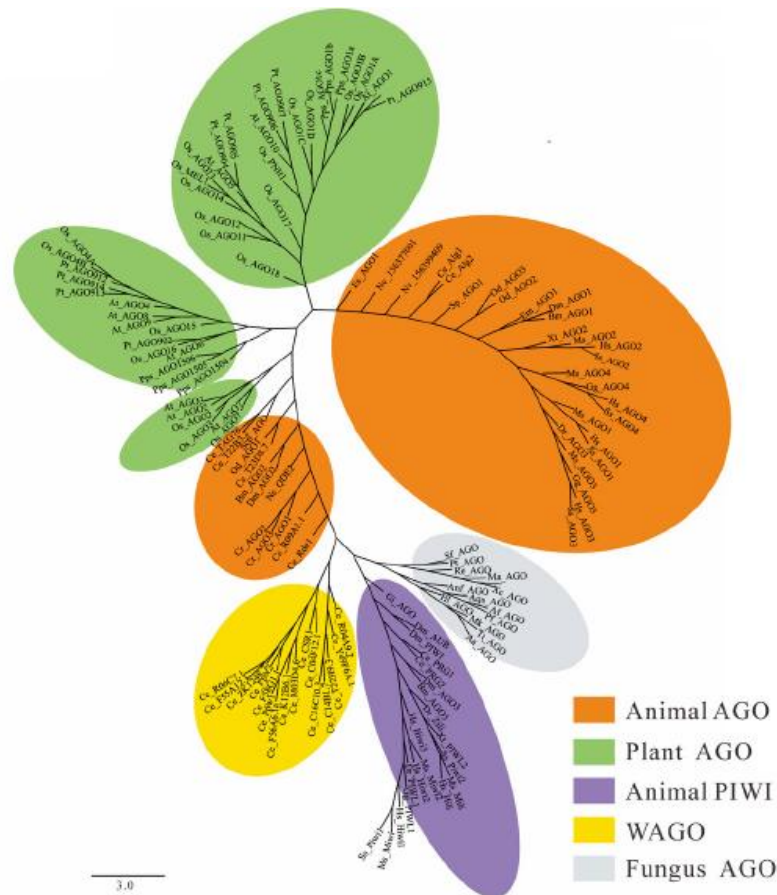
1.Εισαγωγή

1.1 Οικογένεια των Αργοναυτών

Η οικογένεια των Αργοναυτών αποτελείται από επτά μέλη πρωτεϊνών. Η πρώτη αναφορά στις συγκεκριμένες πρωτεΐνες έγινε την δεκαετία του ενενήντα, όπου μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης Αργοναύτης 1, τροποποίησαν την μορφολογία του φυτού *Arapidopsis thaliana*. Η ονομασία της οικογένειας προήλθε από την συγκεκριμένη μελέτη, καθώς η μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης, τροποποιεί τη δομή του φυτού με τέτοιο τρόπο ώστε να θυμίζει το καλαμάρι *Argonauta* (1).

Τα μέλη της οικογένειας των Αργοναυτών μπορούν να διαιρεθούν σε τέσσερις μεγαλύτερες κατηγορίες. Στην μεγάλη **υποοικογένεια των Αργοναυτών**, η οποία περιλαμβάνει πρωτεΐνες όπως την AGO1 που περιγράφηκε στο φυτό *A. thaliana*, στην **υποοικογένεια των πρωτεϊνών PIWI** (P element induced wimpy testis), οι οποίες μοιάζουν με την πρωτεΐνη PIWI που συναντάται στην μύγα *D. melanogaster* και στην μικρότερη **υποοικογένεια των Αργοναυτών 3**, όπου ανακαλύφθηκε σχετικά πρόσφατα στον οργανισμό *C. Elegans* και για την οποία δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες μέχρι σήμερα. Οι πρωτεΐνες της κλάσης AGO εκφράζονται στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους και συμμετέχουν κυρίως στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση, ενώ οι πρωτεΐνες της δεύτερης υπο-οικογένειας PIWI εκφράζονται στα κύτταρα της γαμετικής σειράς και εμποδίζουν την έκφραση των τρανσποζονίων (2,3).

Οι πρωτεΐνες AGO είναι αρκετά συντηρημένες εξελικτικά, με τις πρώτες δύο υποοικογένειες να συναντώνται σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς και στα Αρχαία. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι το 12% της αλληλουχίας των Αργοναυτών είναι ίδιο ανεξάρτητα από τον οργανισμό από τον οποίο απομονώθηκε. Παρόλα αυτά, οι πρωτεΐνες Αργοναύτες εμφανίζουν διαφοροποιήσεις στην δομή και στον αριθμό των γονιδίων των Αργοναυτών ανάλογα με το είδος του οργανισμού που απαντώνται (4).



Εικόνα 1: Φυλογενετικό δέντρο πρωτεϊνικής οικογένειας Αργοναυτών. Απεικονίζονται όλες οι υποοικογένειες των Αργοναυτών στους ευκαριωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς και στα Αρχαία. Οι πρωτεΐνες AGO απαντώνται στα ζώα (πορτοκαλί χρώμα), στα φυτά (πράσινο χρώμα) και στους μύκητες (γκρι χρώμα). Οι πρωτεΐνες PIWI υπάρχουν στα ζώα (μωβ χρώμα) και οι πρωτεΐνες WAGO (worm-specific clade proteins) που ανακαλύφθηκαν στον οργανισμό *C. elegans* (κίτρινο χρώμα). (4).

1.2 Δομή των Αργοναυτών

Η δομή των Αργοναυτών αρχικά μελετήθηκε στα Αρχαία, στο είδος *Pyrococcus furiosus* και αφορούσε μεμονομένες περιοχές της πρωτεΐνης (5). Σήμερα είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες Αργοναυτές, αποτελούνται από τέσσερις διαφορετικές επικράτειες (αμινοτελικό άκρο N, PAZ, MID και PIWI) και δύο περιοχές-συνδέτες (L1 και L2 περιοχή σύνδεσης). Οι τέσσερις επικράτειες αλληλεπιδρούν με τέτοιο τρόπο ώστε το τελικό μόριο της πρωτεΐνης να έχει τη χαρακτηριστική δίλοβη μορφή στο χώρο. Μελέτες απέδειξαν ότι οι πρώτες δύο επικράτειες, το αμινοτελικό άκρο N και η επικράτεια PAZ συγκροτούν τον ένα λοβό, ενώ οι άλλες δύο περιοχές, MID και PIWI

αποτελούν τον άλλο λοβό. Ο σχηματισμός αυτός επιτρέπει την δημιουργία σχισμής, στην οποία είναι δυνατόν να προσδεθούν μόρια RNA (6).

Αμινοτελικό άκρο N

Η περιοχή αμινοτελικό άκρο N είναι δυνατόν να διαιρεθεί σε τρεις επιπλέον περιοχές: την αμινοτελική ουρά, την κύρια περιοχή και την περιοχή 1785 που μέχρι πρότινος θεωρείτο ότι ήταν ο συνδέτης 1. Η επικράτεια N είναι σημαντική για το μόριο του Αργοναύτη, καθώς συμμετέχει στο φόρτωμα και στο ξετύλιγμα της δίκλωνης αλυσίδας των μικρών μορίων RNA. Επιπλέον, αποτρέπει τη δημιουργία α-έλικας εφόσον η σύνδεση του microRNA με το mRNA-στόχο είναι πλήρης και συμβάλλει στην ανακύκλωση της πρωτεΐνης Αργοναύτη μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας (7).

PAZ τομέας

Η επικράτεια PAZ συναντάται σε δύο πρωτεϊνικά μόρια, στις πρωτεΐνες Αργοναύτες και στο ένζυμο DICER. Και οι δύο πρωτεΐνες εμπλέκονται στην σίγαση των μορίων RNA. Η χαρακτηριστική δομή της συγκριμένης περιοχής της δίνει την δυνατότητα να προσδένει νουκλεοτίδια ή ολιγοσακχαρίτες. Έτσι στις πρωτεΐνες Αργοναύτες, λειτουργεί ως θέση πρόσδεσης (χαμηλής συνάφειας) του 3' άκρου των μικρών μορίων RNA. Η επικράτεια PAZ φαίνεται να είναι καθόλη τη διάρκεια ζωής της πρωτεΐνης η πιο εύκολα τροποποιήσιμη και εμφανίζει προτίμηση στην καθήλωση ριβονουκλεοτιδίων έναντι δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (8).

MID τομέας

Λόγω της ιδιαίτερης αναδίπλωσης του MID τομέα στο χώρο (Rosemann like fold) είναι δυνατόν η συγκεκριμένη πρωτεϊνική περιοχή να συγκρατεί μόρια RNA στο 5' άκρο τους. Μαζί με την PIWI επικράτεια, ο MID τομέας, είναι από τις πιο καλά συντηρημένες πρωτεϊνικές περιοχές. Επιπλέον, η συγκεκριμένη περιοχή του μορίου παρουσιάζει μεγαλύτερη συνάφεια πρόσδεσης όσον αφορά τα miRNA μόρια συγκριτικά με την περιοχή PAZ. Στην πρωτεΐνη Αργοναύτης, η περιοχή MID είναι εκείνη που επιλέγει τα μόρια που θα προσδεθούν σε αυτήν. Πιο συγκεκριμένα, μόρια microRNA που έχουν στο 5' άκρο τους ουριδίνη τείνουν να συγκροτούνται από την πρωτεΐνη Αργοναύτης 1, ενώ εκείνα που έχουν αδενίνη προσδένονται καλύτερα από την πρωτεΐνη Αργοναύτης 2 (9,10).

PIWI τομέας

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συγκεκριμένη περιοχή εξαιτίας των τριών κατάλοιπων Asp-Asp-His που διαθέτει, δημιουργώντας παρόμοιο μοτίβο με αυτό που έχουν τα ένζυμα ενδονουκλεάσες RNA-H. Η επικράτεια PIWI αποτελεί την καταλυτική περιοχή της πρωτεΐνης Αργοναύτης καθώς είναι αυτή η οποία τέμνει τα mRNAs με βάση το miRNA που είναι προσδεδεμένο σε αυτά συμπληρωματικά. Αυτή την ιδιότητα βέβαια την έχουν συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας των Αργοναυτών, όπως για παράδειγμα η πρωτεΐνη Αργοναύτης 2 στα θηλαστικά. Επιπλέον, στην PIWI επικράτεια μπορούν να προσδεθούν και πρωτεΐνες όπως η GW182 (11,12).

L1 συνδέτης

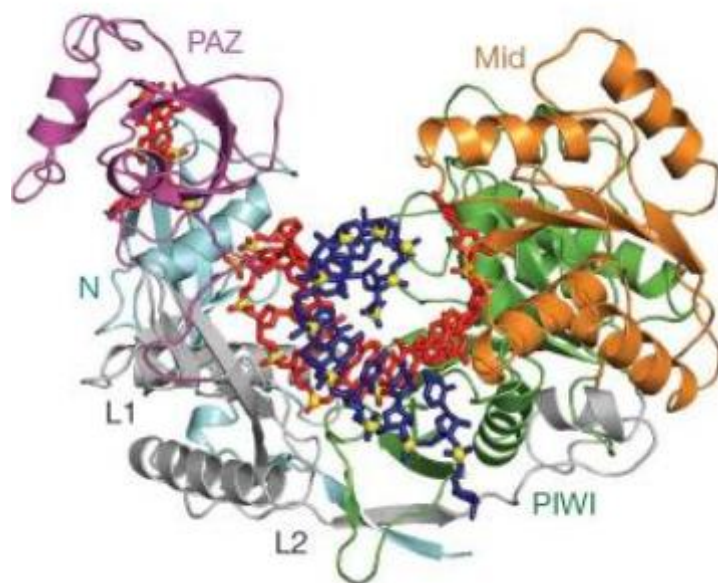
Η λειτουργικότητα της περιοχής L1 εξαφανίζεται όταν καταφθάσει το mRNA-στόχος στην πρωτεΐνη και με αυτό τον τρόπο δίνεται το απαραίτητο σήμα για την πρόσδεση του συγκεκριμένου ριβονουκλεϊκού μορίου στον Αργοναύτη (13).

L2 συνδέτης

Η περιοχή αυτή συνδέει την PAZ με την MID επικράτεια προσδίδοντας στο μόριο του Αργοναύτη μεγαλύτερη σταθερότητα. Επιπλέον η συγκεκριμένη περιοχή έχει τη δυνατότητα μέσω των θετικά φορτισμένων καταλοίπων της, να προσδένεται τόσο σε μικρά μόρια RNA και mRNA όσο και να αλληλεπιδρά με περιοχές των άλλων μελών της οικογένειας των Αργοναυτών (7).



Εικόνα 2: Δομή της πρωτεΐνης Αργοναύτης. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτοταγής δομής της πρωτεΐνης Αργοναύτης στην οποία διακρίνονται οι τέσσερις βασικές επικράτειες (N, PAZ, MID, PIWI) και οι δύο περιοχές συνδέτες (L1, L2) (14).



Εικόνα 3: Κρυσταλλική απεικόνιση της δομής της πρωτεΐνης Αργοναύτης στο είδος *T. thermophilus* (15).

1.3 Λειτουργία των Αργοναυτών

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας των Αργοναυτών φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση των mRNA μέσω της αλληλεπίδρασης με τα μικρά μόρια RNA. Υπάρχουν διάφοροι τύποι μη κωδικών μορίων RNA, συμπεριλαμβανομένων των small interfering RNAs (**siRNA**), τα microRNAs (**miRNA**) και τα piwi-interacting RNAs (**piRNA**).

1.3.1 Ο ρόλος των Αργοναυτών στην βιογένεση των miRNAs και στην σίγηση των mRNA.

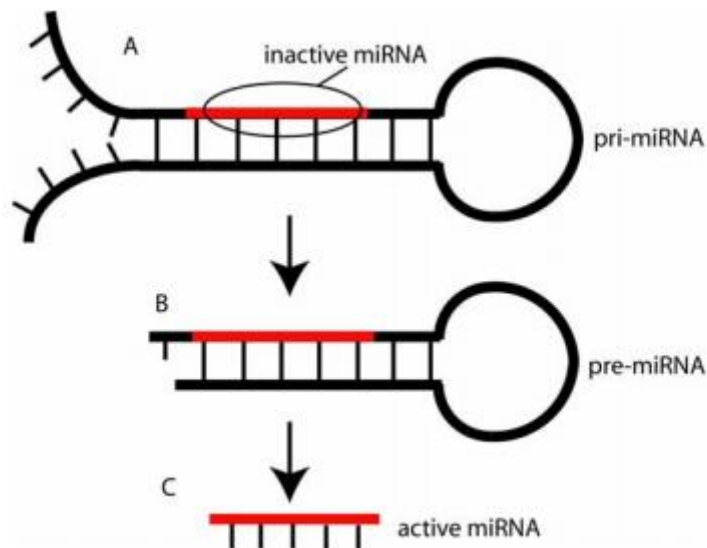
Τα μικρά μόρια RNA (microRNAs ή miRNAs), ανακαλύφθηκαν στις αρχές της δεκαετίας του ενενήντα, σε μελέτες που έγιναν στον οργανισμό *C. elegans*, στον οποίο συγκεκριμένο γονίδιο παράγει μη κωδικοποιήσιμο προϊόν μήκους 22 νουκλεοτιδίων (16). Σήμερα, φαίνεται να δημιουργούνται στον πυρήνα μέσα από τρεις διαφορετικές διαδικασίες. Τα περισσότερα παράγονται κανονικά μέσω του ενζύμου πολυμεράση II (polymerase II) ή πολυμεράση III (polymerase III) (17,18)

ενώ περίπου το ένα τρίτο του συνόλου τους δημιουργούνται από εσώνια που απαντώνται εσωτερικά των γονιδίων και ονομάζονται **mirtons** (19,20). Πρόσφατες ανακαλύψεις υποστηρίζουν ότι τα microRNAs είναι δυνατόν να παραχθούν και από μικρά μόρια small nucleolar RNAs , snoRNAs, ωστόσο ο συγκεκριμένος μηχανισμός δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως (21).

Σύμφωνα με την πρώτη εκδοχή, τα μόρια microRNA παράγονται από αρχικά μόρια, με χαρακτηριστική δομή (μία φουρκέτα με δύο ή τρεις δίκλωνες σπείρες) τα οποία ονομάζονται πρωταρχικά microRNAs, (**primary microRNAs, pri-miRNAs**). Η πρώτη επεξεργασία που υφίστανται εντοπίζεται στον πυρήνα, από το σύμπλοκο ενζύμων DROSHA στο οποίο συμμετέχουν τουλάχιστον 20 πρωτεΐνες με βασικότερες την DROSHA (πολυμεράση τύπου III) και την DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8). Η πρωτεΐνη DGCR8 διασφαλίζει την λειτουργία της DROSHA. Το σύμπλοκο DROSHA δίνει γένεση στο μικρότερου μεγέθους μόριο 70-100 νουκλεοτιδίων, το πρόδρομο microRNA (**precursor microRNA, pre-miRNA**) (**Εικόνα 4**) (22,23) .

Στη συνέχεια το microRNA ως δίκλωνο μόριο, μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια της πρωτεΐνης εξπορτίνης (**EXPORTIN 5, EXP5**) (24). Εκεί, είτε φορτώνεται απευθείας στον Αργοναύτη ως μονόκλωνη αλυσίδα (το μοντέλο αυτό φαίνεται να έχει εγκαταληφθεί τα τελευταία χρόνια), είτε υφίσταται επιπλέον επεξεργασία από το ένζυμο **DICER** το οποίο θα δώσει το τελικό δίκλωνο μόριο, ελεύθερο δευτεροταγών δομών.

Το συγκεκριμένο μόριο αποτελείται από την αλυσίδα οδηγό miRNA (**guide strand miRNA**) και την αλυσίδα επιβάτη miRNA*, (**passenger strand, miRNA***). Η αλυσίδα επιβάτης, miRNA*, αποικοδομείται στο κυτταρόπλασμα και μόνο η αλυσίδα οδηγός miRNA φορτώνεται τελικά στο σύμπλοκο RISC, (RNA-induced silencing complex), στο οποίο συμμετέχει η πρωτεΐνη Αργοναύτης. Μέσω της αλυσίδας οδηγού, το σύμπλοκο RISC είναι δυνατόν να εντοπίσει το μόριο-στόχο mRNA, καθώς το τελευταίο εμφανίζει συμπληρωματικές περιοχές με την αλυσίδα οδηγό. Μελέτες έχουν δείξει ότι η συμπληρωματικότητα εμφανίζεται στην 3'αμετάφραστη περιοχή του mRNA. Το σύμπλοκο RISC παρεμβαίνει στην μετάφραση του προσδεόμενου mRNA πιθανότατα αποαδενυλιώνοντας την polyA ουρά του μετάγραφου (**Εικόνα 6b**) (25,26).



Εικόνα 4: Αναπαράσταση της δομής των μορίων microRNAs. A. Η δομή του πρωταρχικού μορίου microRNA. B. Η δομή του πρόδρομου μορίου microRNA. C. Η δομή του τελικού ώριμου μορίου microRNA. Με κόκκινο απεικονίζεται η περιοχή του μορίου microRNA που θα αποτελέσει το τελικό ώριμο microRNA (27).

1.3.2 Ο ρόλος των Αργοναυτών στην βιογένεση των μικρών μορίων RNA, siRNAs και στην εξαχρείωση των mRNA.

Οι Αργοναύτες συμμετέχουν στη βιογένεση των μορίων short interference RNA, siRNAs. Η διαδικασία εμφανίζει ομοιότητες με εκείνη της βιογένεσης των μικρών μορίων microRNA. Όμως σε αυτήν τη περίπτωση, δεν συμμετέχει το ένζυμο DROSHA και το κύριο σύμπλοκο ονομάζεται si-containing RISC (siRISC). Το αρχικό μόριο είναι δίκλωνο, ποικίλου μεγέθους, το οποίο στη συνέχεια θα τροποποιηθεί από το ένζυμο Dicer. Έπειτα μόνο η αλυσίδα-οδηγός (guide strand) θα φορτωθεί στο σύμπλοκο siRISC. Το συγκεκριμένο σύμπλοκο αποτελείται από την πρωτεΐνη Αργοναύτη, το ένζυμο DICER και την πρωτεΐνη TRBP (Trans-Activation Responsive RNA-Binding Protein) που έχει τη δυνατότητα να προσδένει δίκλιωνα μόρια RNA. Η αλυσίδα οδηγός και σε αυτή την περίπτωση, θα σηματοδοτήσει το μόριο RNA που πρόκειται να κοπεί καθώς ενώνεται πλήρως με αυτό, συμπληρωματικά. Η άλλη αλυσίδα (passenger strand/ non guide strand) αποικοδομείται στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 5, 6a), (28,29).



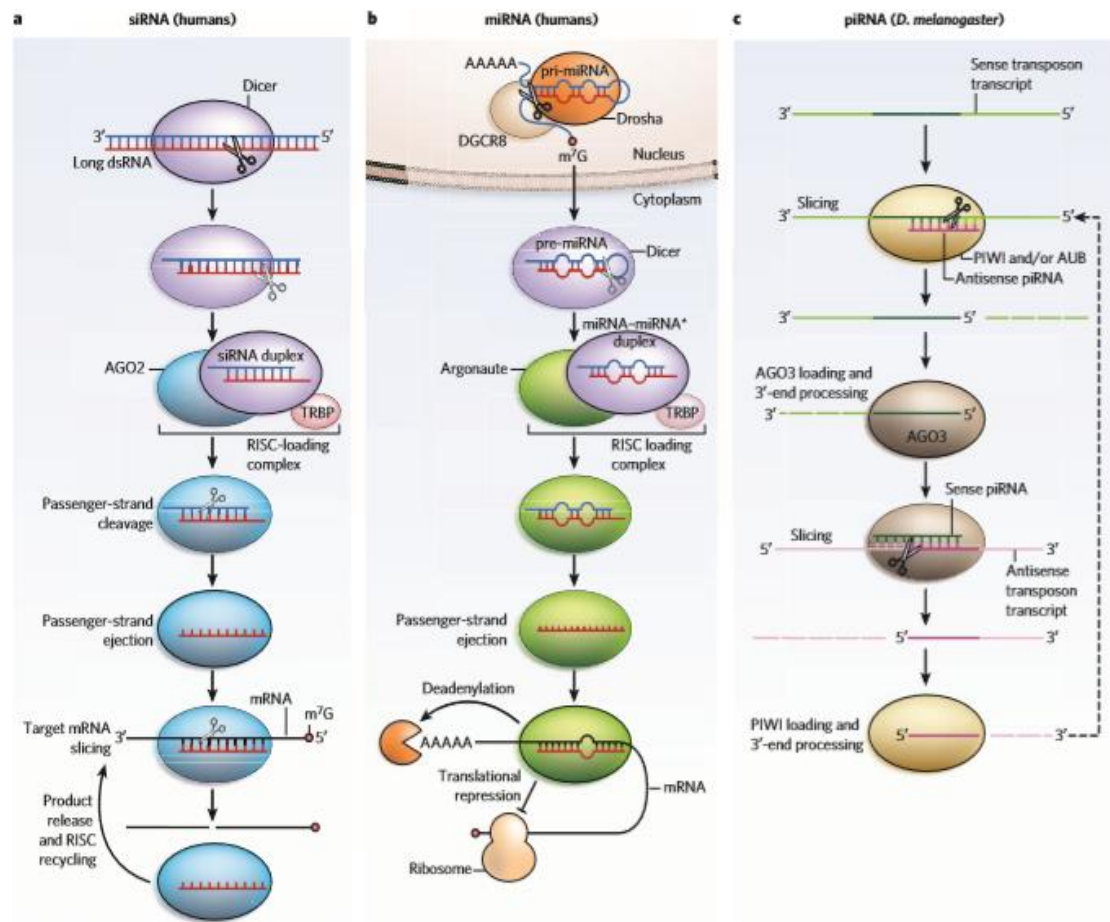
Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του small interference RNA. Διακρίνονται τα 2 νουκλεοτίδια στο 5' άκρο, τα 3 νουκλεοτίδια στο 3' άκρο και οι υδροξυλομάδες στο 3' άκρο (30).

1.3.3 Ο ρόλος των Αργοναυτών στην βιογένεση των μικρών μορίων RNA, piRNAs και στην καταστολή των τρανσποζονίων.

Τα μικρά Piwi-interacting RNAs (**piwi-RNAs**) αποτελούνται από μονόκλωνες αλυσίδες 24 έως 31 νουκλεοτιδίων και ο ρόλος τους σχετίζεται με την καταστολή της έκφρασης των τρανσποζονίων, όπως στη μύγα *D. melanogaster*. Τα πρωταρχικά μόρια piwi-RNAs είναι μονόκλωνα και γι' αυτό το λόγο δεν συμμετέχει το ένζυμο DICER σε αυτήν τη διαδικασία. Η παραγωγή αυτών των μορίων γίνεται στον πυρήνα από το ένζυμο Zucchini (ένζυμο υπεύθυνο για τη δημιουργία δύο ελεύθερων νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο), ενώ η ωρίμανση και ο πολλαπλασιασμός τους γίνεται στο κυτταρόπλασμα από έναν ιδιαίτερο επαναλαμβανόμενο μηχανισμό που δεν είναι πλήρως κατανοητός ακόμα (ping pong loop). Συνήθως τα μικρά αυτά μόρια παράγονται και από τις δύο αλυσίδες (κωδική και μη κωδική αλυσίδα) των τρανσποζονίων. Τα piwi-RNAs που συντίθενται από την μη κωδική αλυσίδα λέγονται μη κωδικά piwi-RNAs και εκείνα που παράγονται από την κωδική αλυσίδα κωδικά piwi-RNAs.

Σε αυτήν τη διαδικασία σημαντικό ρόλο παίζουν οι πρωτεΐνες του κλάδου PIWI, της πρωτεϊνικής οικογένειας των Αργοναυτών. Η PIWI πρωτεΐνη βρίσκεται στον πυρήνα, ενώ η Aubergine (AUB) και AGO3 πρωτεΐνες δρουν στο κυτταρόπλασμα.

Τα κωδικά piwi-RNAs θα προσδεθούν στην πρωτεΐνη AGO3 με σκοπό να οδηγήσουν την πρωτεΐνη στην συμπληρωματική μη κωδική αλυσίδα των τρανσποζονίων. Εκεί η πρωτεΐνη AGO3 θα κόψει σε κομμάτια την μη κωδική αλυσίδα των τρανσποζονίων. Στη συνέχεια, από αυτά τα κομμάτια θα δημιουργηθούν τα μη κωδικά piwi-RNAs τα οποία θα προσδεθούν με τις πρωτεΐνες PIWI/AUB οι οποίες θα δημιουργήσουν τομές στην κωδική αλυσίδα των τρανσποζονίων (**Εικόνα 6c**) (31).



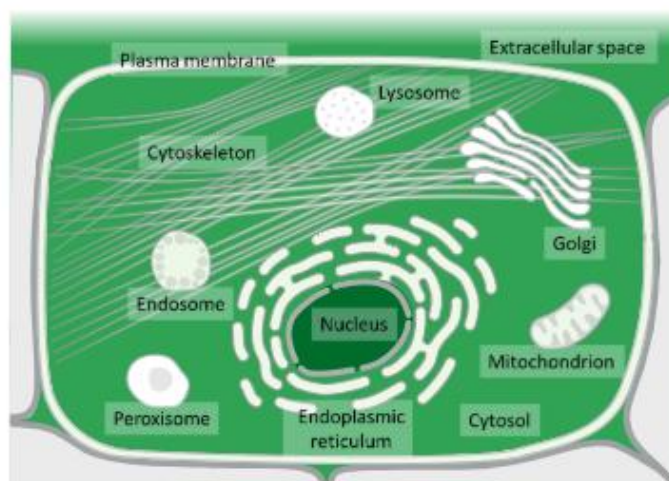
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών βιογένεσης και δράσης των μικρών RNAs. a. Βιογένεση και ρόλος των small interference si-RNAs. b. Βιογένεση και ρόλος των microRNAs, miRNAs. c. Βιογένεση και ρόλος των piwi-interacting RNAs, pi-RNAs (32).

1.4 Τοπολογία Αργοναυτών

Οι πρωτεΐνες Αργοναύτες, όπως έχει περιγραφεί μέχρι τώρα, ως μέλη του συμπλόκου RISC, βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Αρχικά επικρατούσε η απόψη ότι οι Αργοναύτες εντοπίζονται μόνο σε συγκεκριμένες περιοχές του κυττάρου, τα σωματίδια P (P-bodies). Ωστόσο αυτή η πρόταση εγκαταλήφθηκε καθώς, όπως περιγράφηκε και παραπάνω, παρόλο που στην *D. melanogaster* δεν υπάρχουν σωματίδια P (P-bodies) η διαδικασία πραγματοποιείται κανονικά. (33).

Επιπλέον μελέτες αποδεικνύουν την πυρηνική υπόσταση των Αργοναυτών. Πιο συγκεκριμένα, πολλές επικράτειες της πρωτεϊνικής οικογένειας των Αργοναυτών, έχουν βρεθεί να αλληλεπιδρούν με το γενωμικό DNA, κυρίως στις περιοχές που ξεκινάει η μεταγραφή. (34).

Δεδομένα που προέρχονται από πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν αυτήν την υπόθεση, καθώς έχει δειχθεί ότι η πρωτεΐνη GW182 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη του Αργοναύτη σχηματίζοντας τα σωματίδια GW (GW-bodies), τα οποία εμφανίζουν ομοιότητες με τα σωματίδια P. Αυτά τα σωματίδια μεταφέρουν την πρωτεΐνη Αργοναύτη 2 μέσα στον πυρήνα. Ακόμη, πολλά μικρά RNAs που προσδένονται στις συγκεκριμένες πρωτεΐνες, έχουν εντοπιστεί στον πυρήνα, οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη Αργοναύτης είναι δυνατόν να βρίσκεται μέσα στον πυρήνα. Τέλος, πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι μέλη της οικογένειας των Αργοναυτών εντοπίζονται και σε δομές όπως τα εξωσώματα (35).



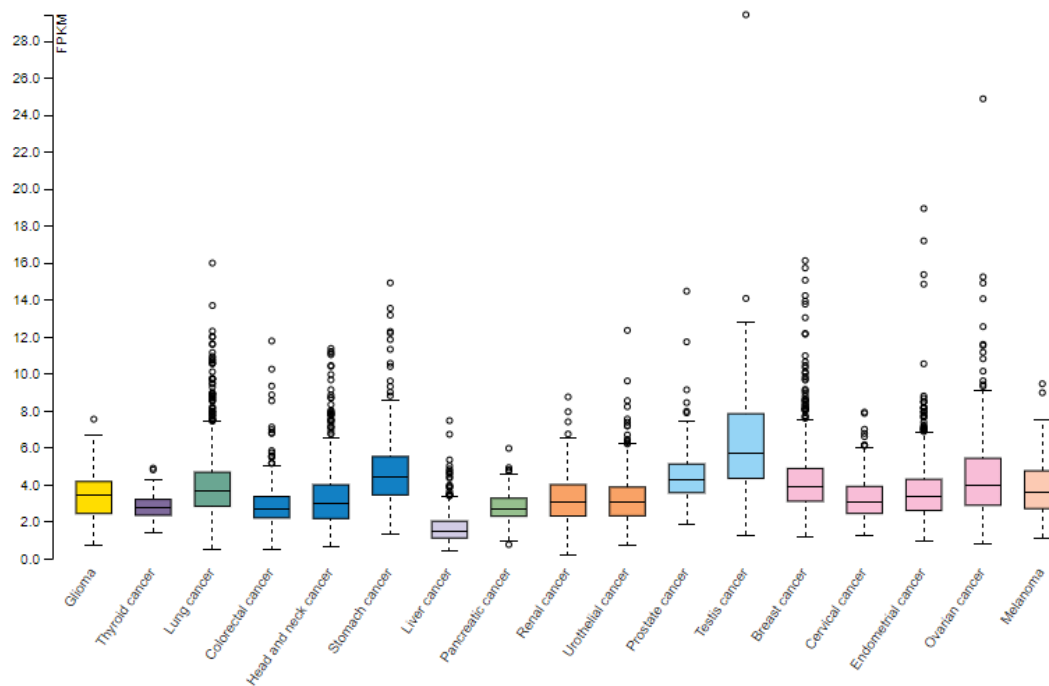
Εικόνα 7: Πιθανές θέσεις της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2 μέσα στο κύτταρο. Με πράσινο απεικονίζεται η εύρεση της πρωτεΐνης στα συγκεκριμένα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Με λευκό αναπαρίστανται οι περιοχές στις οποίες η πιθανότητα απάντησης της πρωτεΐνης είναι μικρή (36).

1.5 Οι πρωτεΐνες Αργοναύτες και η εμπλοκή τους σε ασθένειες

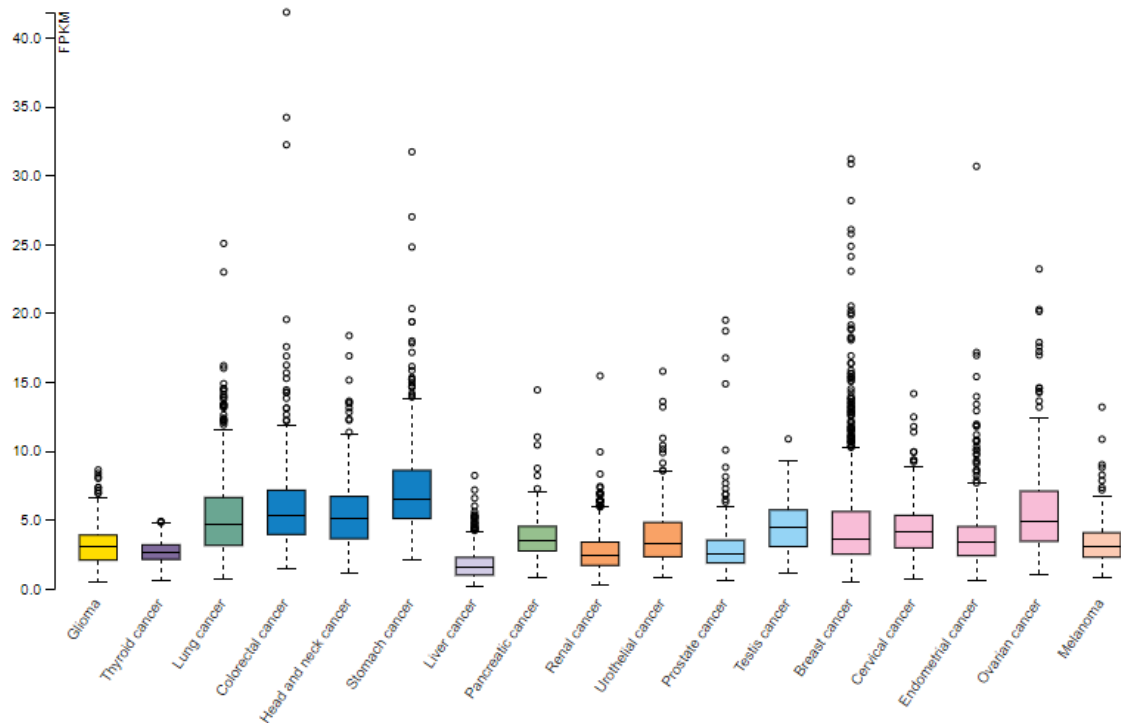
Οι πρωτεΐνες Αργοναύτες ως οι κύριοι ρυθμιστές της διαδικασίας της RNA σίγησης φαίνεται να εμπλέκονται σε πληθώρα διαταραχών της υγείας όπως π.χ. νεοπλασίες (37), σύνδρομο Εύθραστου X (38) και επιπλοκές του ανοσοποιητικού συστήματος (39).

Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί η χρήση των πρωτεϊνικών μορίων Αργοναύτες στην αντιμετώπιση των ιών. Είναι γνωστό ότι πολλοί ιοί έχουν ως γενετικό υλικό RNA. Ως εκ τούτου, μέσω του συμπλόκου RISC και τη δράση μορίων microRNA (συμπληρωματικών ως προς το RNA των ιών) καθίσταται δυνατή η αποσιώπηση του ιικού γονιδιώματος και η επιτυχής καταστολή του ιού στον οργανισμό. Μελέτες στο φυτό *Arabidopsis thaliana* έχουν αποδείξει ότι αυτό είναι δυνατόν να συμβεί, με τη συμμετοχή δύο μελών, των πρωτεϊνών AGO1 και AGO2 (40).

Στον άνθρωπο, είναι αναμενόμενο, οι περισσότερες παθολογίες να συνδέονται με ένα μόνο συγκεκριμένο μέλος της υποοικογένειας AGO, την πρωτεΐνη Αργοναύτης 2, καθώς είναι ένα από τα βασικά στοιχεία του συμπλόκου RISC και ανήκει στις πρωτεΐνες με καταλυτική ικανότητα.



Εικόνα 8: Διαγραμματική απεικόνιση των καρκινικών τύπων στους οποίους φαίνεται να εμπλέκεται το μετάγραφο του γονιδίου Αργοναύτης 1. Τα δεδομένα βασίζονται στην ανάλυση TCGA (41).



Εικόνα 9: Διαγραμματική απεικόνιση των καρκινικών τύπων στους οποίους φαίνεται να εμπλέκεται το μετάγραφο του γονιδίου Αργοναύτης 2. Τα δεδομένα βασίζονται στην ανάλυση TCGA (42).

1.6. Αργοναύτης 2

Ο Αργοναύτης 2 ή αλλιώς Eukaryotic translation initiation factor 2C2 (EIF2C2) είναι το μοναδικό μέλος στα θηλαστικά, που μέχρι πρόσφατα, φαινόταν να εμφανίζει καταλυτική ιδιότητα, εξαιτίας μίας συγκεκριμένης περιοχής στο μόριο του που αποτελείται από το μοτίβο Asp597-Asp669-His807. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην γονιδιακή σίγαση, ως μέλος μέσω του συμπλέγματος RISC όσο και στην καταστολή της διαδικασίας της μετάφρασης.

Το γονίδιο που παράγει τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη στον άνθρωπο, εδράζεται στον μεγάλο βραχίονα του όγδοου χρωμοσώματος (**Εικόνα 10**), σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας (AGO1, AGO3, AGO4) τα οποία βρίσκονται στο πρώτο χρωμόσωμα. Η παραγόμενη πρωτεΐνη αποτελείται από 859 αμινοξέα (Μοριακό Βάρος πρωτεΐνης ισούται με 97.208Da) και εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, αν και τα τελευταία χρόνια υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για την παρουσία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στον πυρήνα και στον εξωκυττάριο χώρο (36).



Εικόνα 10: Απεικόνιση γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Αργοναύτης 2, Ago2, στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 8 (36).

1.7. Δομή της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2

Ως μέλος της ευρύτερης οικογένειας των Αργοναυτών, η πρωτεΐνη EIF2C2 εμφανίζει σχεδόν την ίδια μορφολογία με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της οικογένειας. Πιο συγκεκριμένα, αποτελείται από δύο λοβούς που σχηματίζουν μια αύλακα. Ο πρώτος λοβός συγκροτείται από τις επικράτειες N-PAZ τομείς, ενώ ο δεύτερος από τις επικράτειες MID-PIWI που συνδέονται μεταξύ τους μέσω περιοχών σύνδεσης (L1, L2).

Η δομή που κατέχει στο χώρο η ανθρώπινη πρωτεΐνη Ago2, ομοιάζει σε μεγάλο βαθμό με την δομή που έχει μελετηθεί στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, εμφανίζοντας όμως κάποιες σημαντικές διαφορές. Οι επικράτειες στην ανθρώπινη πρωτεΐνη Αργοναύτης 2 δεν στοιχίζονται με τον ίδιο τρόπο, όπως γίνεται στην αντίστοιχη πρωτεΐνη των προκαρυωτικών. Πιο αναλυτικά, στον άνθρωπο η πρωτεΐνη EIF2C2, στην κύρια περιοχή πρόσδεσης των μικρών μορίων RNA φαίνεται να σχηματίζει επιπλέον δευτεροταγείς δομές και θηλιές, χαρακτηριστικό που την καθιστά ικανή να αναγνωρίζει αλληλουχίες στόχους και να στρατολογεί τις διάφορες πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά. Πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν από κρυσταλλογραφία, επέδειξαν ότι στον λοβό MID/PAZ/L1/L2 μπορούν να προσδεθούν μικρά ριβονουκλεϊκά οξέα όπως ακριβώς προσδένονται μόρια DNA στην βακτηριακή πρωτεΐνη Αργοναύτη (43).

Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά οι επικράτειες της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2.

N επικράτεια

Στην ανθρώπινη πρωτεΐνη Αργοναύτης 2 η συγκεκριμένη επικράτεια συμμετέχει στο ξετύλιγμα των μικρών ριβονουκλεϊκών μορίων, χωρίς όμως να εμπλέκεται στην πρόσδεση των μορίων αυτών στην πρωτεΐνη ή στην τελική τομή των μορίων mRNA. Επιπλέον, μεταλλαγμένες μορφές της συγκεκριμένης περιοχής, έδειξαν ότι επηρεάζουν την καταστροφή της αλυσίδας επιβάτη (passenger strand) (44).

PAZ

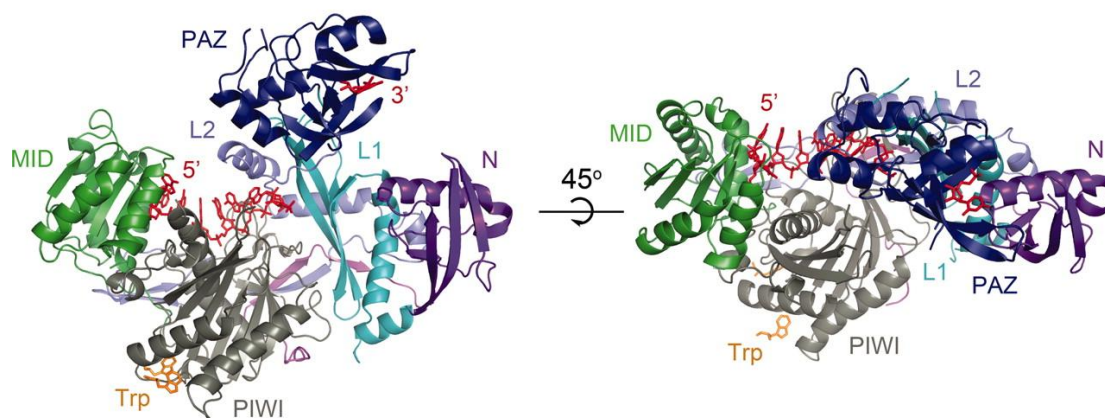
Η συγκεκριμένη περιοχή απαντάται στην πρωτεΐνη AGO2 και το ένζυμο DICER. Η χαρακτηριστική δομή της, επιτρέπει στο μόριο του Αργοναύτη 2 να δημιουργήσει μια ιδιαίτερη περιοχή στην οποία είναι δυνατή η πρόσδεση μικρών μορίων RNA μέσω των τελευταίων δύο νουκλεοτιδίων που βρίσκονται στο 3-άκρο τους. Μελέτες που αφορούν στην πρωτεΐνη AGO2 του είδους *D. melanogaster* αποδεικνύουν πως οποιαδήποτε διαταραχή στη συγκεκριμένη περιοχή, οδηγεί σε μη ορθό σχηματισμό του συμπλόκου RISC με αποτέλεσμα να μην πραγματοποιείται η γονιδιακή σίγαση (45).

MID

Όπως συμβαίνει και στα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, έτσι και στην πρωτεΐνη Αργοναύτης 2, η συγκεκριμένη περιοχή είναι απαραίτητη για την αγκυροβόληση των μορίων mRNA μέσω του 5' άκρου της καλύπτρας τους. Μέσα στην επικράτεια MID υπάρχει μια υποπεριοχή MC η οποία ομοιάζει πολύ με την περιοχή πρόσδεσης του παράγοντα έναρξης μετάφρασης eIF4E, η οποία έχει την ίδια λειτουργία (δηλαδή συγκροτεί mRNA από το 5' άκρο τους). Η συγκρότηση των μορίων mRNA διασφαλίζεται μέσω των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται στην περιοχή (46).

PIWI

Η επικράτεια PIWI στο μόριο του Αργοναύτη 2 εμφανίζει πολλές λειτουργίες. Η κύρια λειτουργία είναι η ενδονουκλεολυτική δράση, παρόμοια με εκείνη των RNA-H ενζύμων, κόβοντας τα μόρια mRNA που έχουν προσδεθεί πάνω στο σύμπλοκο RISC. Επιπλέον, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε τρυπτοφάνη, είναι δυνατή η πρόσδεση της πρωτεΐνης GW182 αλλά και η επιπρόσθετη σταθεροποίηση του λοβού MID/PIWI (32).



Εικόνα 11: Δομή της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2 στην οποία είναι προσδεμένο το RNA. Αριστερά απεικονίζεται η πρόσοψη της πρωτεΐνης και δεξιά η κάτοψη. Διακρίνονται οι υπομονάδες N (μώβ χρώμα), MID (πράσινο χρώμα), PIWI (γκρί χρώμα), PAZ (μπλέ χρώμα) και οι περιοχές συνδέτες L1 (γαλάζιο χρώμα) και L2 (μωβ). Με κόκκινο χρώμα αναπαριστάται η οδηγός αλυσίδα του RNA. (43)

1.8. Λειτουργίες πρωτεΐνης Αργοναύτη 2

Μία από τις πιο γνωστές λειτουργίες της πρωτεΐνης AGO2 είναι η αποσιώπηση γονιδίων μέσω του μηχανισμού παρέμβασης σε μόρια RNA (RNA interference, RNAi). Η δράση της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2 στην μεταγραφική και μετα-μεταγραφική τροποποίηση είναι γνωστή τα τελευταία χρόνια, κυρίως μέσω της συμμετοχής της πρωτεΐνης στο συμπλοκο RISC και ως εκ τούτου την αποικοδόμηση μορίων mRNA, όπως περιγράφηκε αναλυτικότερα παραπάνω (Παράγραφος 1.3). Ωστόσο υπάρχουν διάφοροι τρόποι με τους οποίους το μόριο Αργοναύτης 2 παρεμβαίνει στην έκφραση των γονιδίων.

Η οδός που θα ακολουθήσει κάθε φορά για την αποσιώπηση της γενετικής πληροφορίας ενός μετάγραφου, σχετίζεται με την συμπληρωματικότητα που εμφανίζεται ανάμεσα στα μικρά μόρια RNA (microRNA/siRNA) και το mRNA (47).

Μετα-μεταγραφική ρύθμιση

Στην περίπτωση που η συμπληρωματικότητα ανάμεσα στα μόρια miRNA/siRNA και mRNA είναι πλήρης τότε η πρωτεΐνη AGO2, μέσω του τομέα PIWI κόβει το μόριο στόχος και έτσι καταστρέφεται το mRNA (48), (49).

Στην περίπτωση όπου η συμπληρωματικότητα είναι ατελής τότε η μη έκφραση της πληροφορίας επιτυγχάνεται μέσω αναστολής της διαδικασίας της μετάφρασης με διάφορους τρόπους. Η πρωτεΐνη Αργοναύτης 2 ανταγωνίζεται τη θέση πρόσδεσης του παράγοντα έναρξης eIF4E, στο 5' άκρο του mRNA και κατά συνέπεια εμποδίζεται με αυτόν τον τρόπο η έναρξη της διαδικασίας της μετάφρασης. Εναλλακτικά, είναι δυνατόν να παρέμβει στο σχηματισμό του ριβοσώματος στρατολογώντας τον παράγοντα eIF6 (**Εικόνα 12**) (48,49).

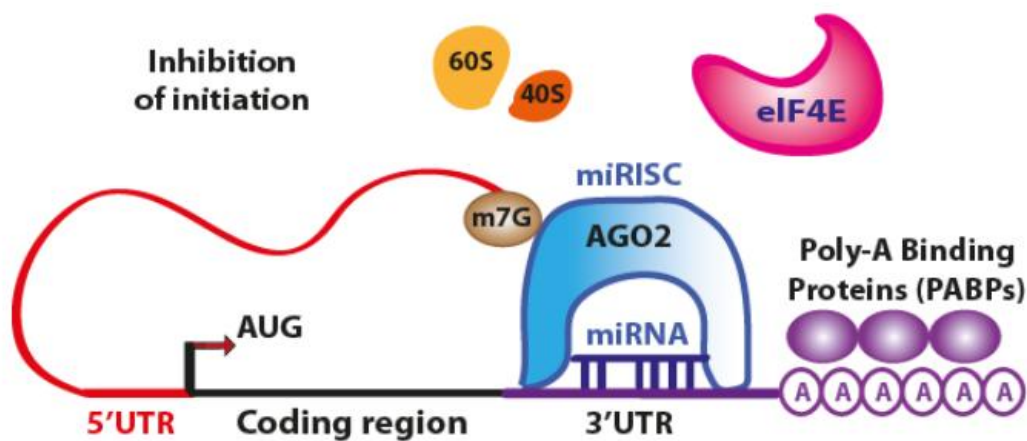
Επιπλέον, πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι το πρωτεϊνικό μόριο Αργοναύτης 2, έχει τη δυνατότητα απο-αδενυλίωσης των mRNA, μέσω της σύνδεσης του με τις πρωτεΐνες GW182 ή με άλλα μέλη της οικογένειας των Αργοναυτών αποτρέποντας έτσι την επιμήκυνση της μετάφρασης (**Εικόνα 13**) (48), (49).

Εντοπισμός του μορίου σε περιοχές ετεροχρωματίνης

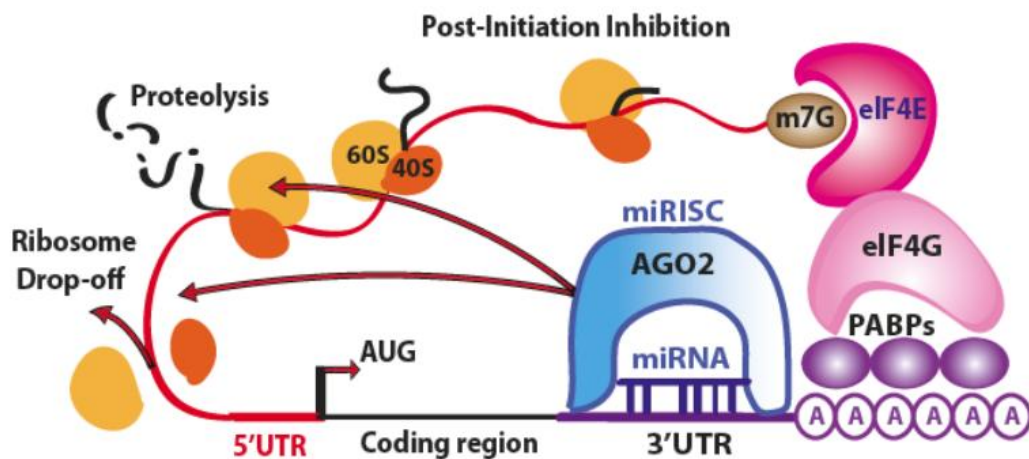
Στο σημείο αυτό να αναφέρουμε πως υπάρχουν μελέτες που δείχνουν τη δράση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης και στις ετεροχρωματικές περιοχές καθώς φάνηκε ότι συνεντοπίζεται με τα μόρια CTCF/CP190 ρυθμίζοντας την δράση διαφόρων γονιδίων (50).

Άλλοι μηχανισμοί

Η πρωτεΐνη Αργοναύτης 2 σε ειδικές περιπτώσεις φαίνεται ότι αυξορρυθμίζει συγκεκριμένα γονίδια χρησιμοποιώντας και σε αυτή την περίπτωση τα μικρά μόρια microRNAs. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η πρόσδεση του μορίου του Αργοναύτη 2 στις ειδικές περιοχές στο 3'UTR άκρο του mRNA του παράγοντα TNF (47).



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση αναστολή της μετάφρασης. Η πρωτεΐνη Αργοναύτης 2 (AGO2) καταλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης και έτσι αποτρέπεται η συγκρότηση του ριβοσώματος και κατ'επέκταση η έναρξη της μετάφρασης (49).



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση αναστολή της μετάφρασης. Η πρωτεΐνη Αργοναύτης 2 (AGO2) αλληλεπιδρά με τα πρωτεϊνικά μόρια GW182 και έτσι αποτρέπεται η συγκρότηση του ριβοσώματος και κατ'επέκταση η επιμήκυνση της μετάφρασης (49).

1.9 Η πρωτεΐνη Αργοναύτης 2 και παθολογικές καταστάσεις

Η πρωτεΐνη Αργοναύτης 2 ως μέλος του συμπλόκου RISC είναι από τα κύρια μόρια που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων μέσω της μετα-μεταγραφικής σίγασης των μορίων mRNA. Μέσω της συγκεκριμένης ιδιότητας είναι αυτονόητο ότι μπορούν να λειτουργήσουν ως μόρια ρυθμιστές στην ογκογένεση. Υποθετικά, μέσω της πρωτεΐνης AGO2 είναι δυνατόν να αποτραπεί η έκφραση ογκογονιδίων.

Ως εκ τούτου, η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης μπορεί να επηρεάσει την τύχη του κυττάρου.

Τα τελευταία χρόνια, επιστήμονες έχουν μελετήσει την υπερέκφραση ή την υποέκφραση της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2. Αλλαγές στην έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης φαίνεται να σχετίζονται με διάφορες διαταραχές της υγείας, όπως καρκίνο, το σύνδρομο Ευθραυστου Χ και την υπογονιμότητα.

Ενδεικτικά, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2 συνδέεται με την εμφάνιση καρκίνου στην ουροδόχο κύστη (51), το παχύ έντερο (52) και στις ωοθήκες (53). Σε πολλούς από αυτούς τους καρκινικούς τύπους έχειδειχθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης σχετίζονται άμεσα με την ανάπτυξη του όγκου και την επιβίωση των ασθενών. Παρόλα αυτά, υπάρχουν καρκινικοί τύποι όπως το μελάνωμα στο οποίο ο Αργοναύτης 2 έχει μειωμένη έκφραση πρωτεϊνικά, αλλά όχι και μεταγραφικά (54).

Από τα παραπάνω δεδομένα είναι εμφανές ότι η έκφραση της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2 δεν εμφανίζει ένα συγκεκριμένο μοτίβο πρωτεϊνικής έκφρασης που να συνδέεται με την ογκογένεση.

Carcinomas	Total Cases	AGO2 Expression	
		Positive Cases	Negative Cases
Colon Carcinoma	75	74 (98.67%)	1 (1.33%)
Urothelial Carcinoma of Bladder	106	96 (90.57)	10 (9.43%)
Ovarian Carcinoma	103	103 (100%)	0 (0%)
Colorectal Carcinoma	76	43 (56.6%)	33 (43.4%)
Smooth Muscle Carcinoma of Soft Tissues	110	107 (97.3)	3 (2.7%)
Prostate Carcinoma	107	61 (57%)	46 (43%)
Esophageal Carcinoma	58	34 (58.4%)	24 (41.6%)
Gliomas	129	129 (100%)	0 (0%)
Myeloma	53	53 (100%)	0 (0%)
Hepatocellular Carcinoma	152	105 (69.07%)	47 (30.93%)

Εικόνα 14: Καρκινικοί τύποι στους οποίους η πρωτεΐνης Αργοναύτης 2 είναι υπερεκφρασμένη (55).

Έτσι, μέχρι και σήμερα δεν είναι σαφής η επίδραση της υπερ-έκφρασης της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2 στα κύτταρα.

Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην μελέτη της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, μελετάται η επίδραση της υπερέκφρασης του Αργοναύτη 2 σε φυσιολογικά θυρεοειδικά κύτταρα NTHY μέσω των μεθόδων της κυτταρομετρίας ροής και δοκιμασίας MTT. Επιπλέον, διερευνάται η έκφραση των υπόλοιπων πρωτεϊνών που ανήκουν στην ίδια οικογένεια με τον Αργοναύτη 2 σε μεταγραφικό επίπεδο.

2.Υλικά και μέθοδοι

2.1. Βακτηριακές καλλιέργειες

2.1.1. Βακτηριακή καλλιέργεια E.coli σε τρυβλίο

1. Σε bacterial plates (10cm, company), προστίθεται 8ml LB agar το οποίο περιέχει 8μl αντιβιοτικό canamycin. Τα τρυβλία αφήνονται να σε συνθήκες δωματίου έως ότου πολυμεριστεί και στεροποιηθεί το αгар.
2. Σε κάθε τρυβλίο εμβολιάζονται 200λ από έναν κλώνο καλλιέργειας E. Coli στην οποία υπάρχει το πλασμίδιο της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2.
3. Η καλλιέργεια απλώνεται πάνω στο θρεπτικό υλικό με ειδική σπάτουλα.
4. Επώαση των τρυβλίων στους 37° C για τουλάχιστον 16 ώρες.

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε άσηπτες συνθήκες, κοντά σε λίκνο Bunsen και όλα τα υλικά είναι αποστειρωμένα.

2.1.2 Υγρή βακτηριακή καλλιέργεια E.coli

Μικρής κλίμακας βακτηριακή καλλιέργεια

1. Απομακρυσμένες βακτηριακές αποικίες που έχουν μεγαλώσει σε θρεπτικό υλικό άγαρ, εμβολιάζονται σε 4ml θρεπτικού υλικού LB Broth με 4λ αντιβιοτικό canamycin.
2. Επώαση των βακτηριακών καλλιιεργειών για 8 ώρες, στους 37° C με ταυτόχρονη ανάδευση των καλλιιεργειών.

Μεγάλης κλίμακας βακτηριακή καλλιέργεια

1. 2ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας εμβολιάζεται σε 250ml θρεπτικό υλικό και 200λ καναμυκίνη.
2. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37° C για τουλάχιστον 16 ώρες.

2.1.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από υγρή καλλιέργεια μικρής κλίμακας.

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από υγρή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της Monarch Plasmid mini prep Kit, BIoIab.

1. 2ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας φυγοκεντρούνται στις 13.000 στροφές για 30 δευτερόλεπτα.
2. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 200λ B1 διαλύματος (Plasmid Resuspension Buffer).
3. Λύση των κυττάρων με προσθήκη 200λ B2 Plasmid Lysis buffer.
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.
5. Ουδετεροποίηση του διαλύματος με προσθήκη 400λ Plasmid Neutralization Buffer B3.
6. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
7. Φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 5 λεπτά.
8. Μεταφορά του υπερκείμενου σε κολώνα και φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για ένα λεπτό.
9. Προσθήκη 200λ Plasmid wash buffer 1
10. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
11. Φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 1 λεπτό.
12. Τοποθέτηση της κολώνας σε νέο σωληνάριο και προσθήκη 30λ Elution Buffer και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.
13. Φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 1 λεπτό.

2.1.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας έγινε με το kit Qiagen, Nucleobond Xtra midi kit.

1. Αναδιάλυση του pellet σε 4ml P1 και προσθήκη 10λ RNase A.
2. Προσθήκη 4ml P2 και αναστοφή των σωληναρίων 5-6 φορές. Στο σημείο αυτό γίνεται κατακρήμνιση του γενωμικού DNA.
3. Επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Πρόσθήκη 4ml P3 και αναστροφή των σωληναρίων 4-6 φορές.
5. Επώαση για 15 λεπτά στο πάγο. Εμφανίζεται λευκό ίζημα το οποίο αποτελείται από το γενωμικό DNA, τις πρωτεΐνες και κυτταρικά θραύσματα.
6. Τα σωληνάρια φυγοκεντρούνται στις 5.000rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C.

7. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο και φυγοκέντρηση του στις 5.000 rpm για 20 λεπτά.
8. Προσθήκη 4ml διαλύματος QBT στη στήλη, με στόχο τον καθαρισμό του φίλτρου της στήλης.
9. Μεταφορά του υπερκείμενου στη στήλη.
10. Προσθήκη 10ml διαλύματος QC.
11. Μεταφορά της στήλης σε νέο φιαλίδιο και προσθήκη 5ml QF. Στο σημείο αυτό απελευθερώνεται το πλασμιδιακό DNA από τη στήλη.
12. Προσθήκη 3,5ml ισοπροπανόλης και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 30 λεπτά στις 5.000rpm στους 4° C.
13. Απομάκρυνση υπερκείμενου και αναδιάλυση του ιζήματος σε 500 ml 70% αιθανόλη.
14. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 5.000 rpm .
15. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
16. Αναδιάλυση του ιζήματος, δηλαδή του πλασμιδιακού DNA με 16μl αποστειρωμένο νερό.

2.1.5 Πέψεις πλασμιδιακού DNA με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων.

Με τη βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων, ελέγχεται το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από τις βακτηριακές καλλιέργειες. Σε αυτή την δοκιμασία εξακριβώνεται ότι έχει απομονωθεί το επιθυμητό πλασμίδιο. Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ανακτήθηκαν από την βάση δεδομένων της Addgene. Η πέψη των πλασμιδίων έγινε σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο.

Αντιδραστήρια	Όγκος/Ποσότητα
DNA	1μl
Περιοριστικό ένζυμο	0,5 μl
Buffer ενζύμου	2 μl
BSA	0,2 μl/0 μl
H₂O	16,3 /16,5

Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε φιαλίδιο το οποίο περιείχε το πλασμιδιακό DNA απουσία περιοριστικού ενζύμου.

2.2. Κυτταροκαλλιέργειες

2.2.1. Διατήρηση και ανακαλλιέργεια κυττάρων

Η καλλιέργεια κυττάρων πραγματοποιήθηκε κάτω από αυστηρές ελεγχόμενες συνθήκες μέσα σε ειδικό επωαστικό κλίβανο στον οποίο διατηρείται σταθερή θερμοκρασία 37°C, η ατμόσφαιρα περιέχει 5% CO₂ και η σχετική υγρασία προσμετράτε στο 95%. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των κυττάρων είναι RPMI για τις θυρεοειδικές σειρές και DMEM για τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές (αραιωμένα σε 1x από 10x stock). Προστέθηκε επιπλέον 10% διάλυμα ορού εμβρύου βοός (FBS), 1% διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης και ένα 1% διάλυμα L-γλουταμίνης.

Το διάλυμα FBS απενεργοποιείται με την επώαση του σε θερμοκρασία 65°C, για 30λεπτά. Η παρασκευή του υλικού καλλιέργειας, καθώς και οι χειρισμοί των κυττάρων γίνονται σε συνθήκες αποστείρωσης μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής. Όλες οι φλάσκες καλλιέργειας φυλάσσονται μέσα σε επωαστικούς κλίβανους.

Η ανακαλλιέργεια των κυτταρικών σειρών απαιτεί επώαση με θρυψίνη ως εξής:

- Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας
- Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml 1x PBS, ώστε να απομακρυνθούν όλα τα ίχνη του ορού, που περιέχουν αναστολείς θρυψίνης.
- Προσθήκη θρυψίνης στη φλάσκα των 25 ή 75cm² και ομοιόμορφη κατανομή της σε όλη την επιφάνεια.
- Επώαση του τρυβλίου σε θερμοκρασία δωματίου για 2min
- Προσθήκη ποσότητας πλήρους θρεπτικού υλικού 1x RPMI και μεταφορά του εναιωρήματος σε νέες φλάσκες, για να διασπαστούν πλήρως τα κυτταρικά συσσωματώματα, το εναιώρημα αναδεύεται εντός της φλάσκας με πιπέττα.

2.2.2. Φύλαξη κυττάρων-Κατάψυξη και απόψυξη

Η αποθήκευση των κυτταρικών σειρών πραγματοποιείται με κατάψυξη των κυττάρων σε ειδικά πλαστικά φιαλίδια (Nalgene Labware, Thermo Fiscer Scientific) και ακόλουθη μεταφορά τους σε καταψύκτες θερμοκρασίες -80°C. Η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται παρακάτω:

- Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας, η οποία έχει φτάσει την απαιτούμενη πυκνότητα κυττάρων (80%).
- Προσθήκη ποσότητας διαλύματος θρυψίνη και επώαση για λίγα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη ποσότητας πλήρους θρεπτικού και μεταφορά σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου falcon (15ml)
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1200rpm (στροφές/λεπτό), σε θερμοκρασία 10°C, για 15min.
- Επαναιώρηση των κυττάρων σε όγκο 1ml θρεπτικού μέσου κατάψυξης

Η χημική σύσταση του θρεπτικού υλικού κατάψυξης είναι 10% διάλυμα DMSO και 90%FBS.

Μετά την επαναιώρηση των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο κατάψυξης, μεταφέρονται σε ειδικό πλαστικό φιαλίδιο και από εκεί ακολουθεί ή διαδικασία ψύξης τους, με ρυθμό ελάττωσης της θερμοκρασίας -1οc ανά λεπτό, ως τη θερμοκρασία -80οc. Ο συγκεκριμένος ρυθμός ψύξης επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ειδικού δοχείου πολυαιθυλενίου το οποίο περιέχει διάλυμα ισοπροπανόλης. Τα κύτταρα παραμένουν μέσα στο συγκεκριμένο δοχείο για τουλάχιστον 24h εντός κατάψυξης -80οC. Τέλος αποθηκεύονται σε καταψύκτη στους -80οC.

Η διαδικασία της απόψυξης πραγματοποιείται ως εξής:

Άμεση απόψυξη κυττάρων με ολιγολεπτη επώαση στους 37οC.

Αμέσως μετά την ολοκλήρωση απόψυξης τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωλήνα τύπου falcon 15ml και προστίθεται ποσότητα φρεσκου πλήρους θρεπτικού υλικού.

2.3 Διαμόλυνση κυτταρικού πληθυσμού με πλασμιδιακό DNA.

1. Πλήρης αφαίρεση θρεπτικού υλικού.
2. Πλύσιμο κυττάρων με 7ml PBS
3. Προσθήκη 400 μl θρεπτικού υλικού RPMI, στο οποίο δεν έχει προστεθεί ορός.
4. Επώαση των κυττάρων τουλάχιστον 20λεπτά σε θερμοκρασία 37° C.

5. Στο διάστημα αυτό, ετοιμάζεται το διάλυμα διαμόλυνσης που θα μοιραστεί αργότερα στον κυτταρικό πληθυσμό. Για κάθε συνθήκη διαμόλυνσης υπάρχουν δύο διαλύματα Α και Β.

Το Α διάλυμα περιέχει το εκάστοτε πλασμιδιακό DNA με θρεπτικό υλικό RPMI χωρίς ορό, ενώ στο Β διάλυμα προστίθενται τα λιποσώματα με θρεπτικό υλικό RPMI χωρίς ορό.

Ο συνολικός όγκος κάθε διαλύματος Α και Β είναι 25μl και η ποσότητα του πλασμιδιακού DNA είναι 1μg ανά πηγαδάκι ή 10μg για διαμόλυνση κυτταρικού πληθυσμού σε τριβλύο 10cm.

Η ποσότητα των λιποσωμάτων είναι 1,5μl.

6. Το διάλυμα διαμόλυνσης Α προστίθεται στο διάλυμα Β.
7. Επώση του διαλύματος διαμόλυνσης για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Προσθήκη 100λ του διαλύματος διαμόλυνσης σε κάθε πηγαδάκι ή 2ml σε κάθε τρυβλίο κυττάρων και συμπλήρωση με θρεπτικό υλικό RPMI απουσία ορού έως ότου ο τελικό όγκος να είναι 500μl και 7 ml αντίστοιχα.
9. Οι κυτταρικοί πληθυσμοί επωάζονται στους 37° C για 6 ώρες και στη συνέχεια γίνεται αλλαγή του θρεπτικού υλικού με προσθήκη 7 ml RPMI θρεπτικού υλικού στο οποίο περιέχεται ορός.

2.4 Κυτταρομετρία ροής

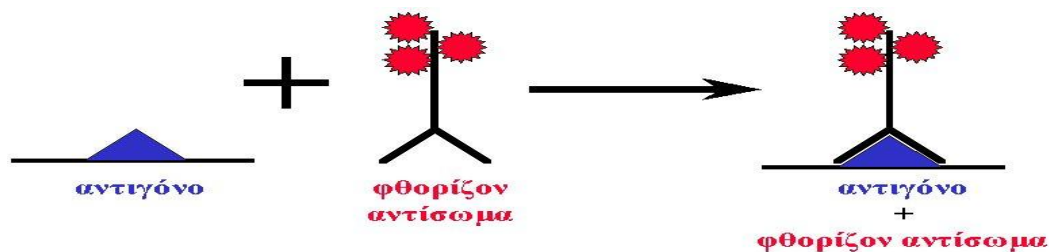
1. Στα τρυβλία με τους κυτταρικούς πληθυσμούς αφαιρείται το θρεπτικό υλικό.
2. Πλύσιμο των κυττάρων με διάλυμα PBS.
3. Προσθήκη ποσότητας διαλύματος θρυψίνης και συλλογή τους με την προσθήκη θρεπτικού υλικού RPMI.
4. Φυγοκέντρηση των κυτταρικών πληθυσμών στις 1100 rpm για 10 λεπτά.
5. Αφαίρεση υπερκείμενου και αναδιάλυση ιζήματος, το οποίο περιέχει τα κύτταρα σε διάλυμα PBS.
6. Μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού με τη μέθοδο Neubauer.
7. Φυγοκέντρηση των κυτταρικών πληθυσμών στις 1100 rpm για 10 λεπτά.
8. Απομάκρυνση υπερκείμενου και αναδιάλυση των κυττάρων σε διάλυμα συλλογής (sorting buffer) το οποίο περιέχει PBS, 25mM HEPES, 2% ορό FBS και 0,5mM EDTA.

9. Στη συνέχεια τα φιαλίδια με τους κυτταρικούς πληθυσμούς διέρχονται από το κυτταρόμετρο.

2.5 Μικροσκοπία Φθορισμού

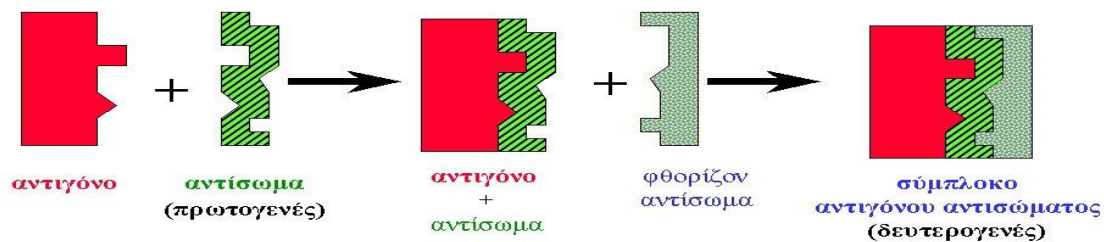
Σε ένα μικροσκόπιο φθορισμού υπεριώδης ακτινοβολία παραγόμενη από λυχνία Hg ή Xe περνά από φίλτρο εκπομπής για επιλογή συγκεκριμένου φάσματος. Μετά τη διέλευση από το συγκεντρωτικό φακό επιδρά στο παρασκεύασμα και σχηματίζει είδωλο στο πίσω εστιακό επίπεδο του αντικειμενικού φακού. Ένα φίλτρο αποκοπής επιτρέπει μόνο στο ορατό φάσμα να περάσει κι έτσι διαπιστώνεται η παρουσία στο παρασκεύασμα μορίων με ενδογενή φθορισμό ή μετά από προσθήκη εξωγενών ουσιών.

Ο φθορισμός είναι ένα χαρακτηριστικό φαινόμενο πολλών μορίων. Για να εκδηλωθεί πρέπει το μόριο να φωτισθεί με ακτινοβολία μικρού μήκους κύματος, όπως είναι η υπεριώδης. Τότε το μόριο διεγείρεται και αποδίδει μέρος της ενέργειας που παίρνει με μεγαλύτερο μήκος κύματος που συνήθως εμπίπτει στην ορατή περιοχή του φάσματος. Εκτός του αυτοφθορισμού που υπάρχει σε πολλά βιολογικά συστήματα, υφίσταται και ο ετεροφθορισμός- δηλαδή η εντόπιση εξωγενών ουσιών που φθορίζουν. Μέσω του ετεροφθορισμού ανιχνεύονται βιομόρια που σημαίνονται με φθορίζοντα μόρια. Στο πλαίσιο αυτό έχει αναπτυχθεί ο ανοσοφθορισμός κατά τον οποίο χρησιμοποιείται φθορίζον αντίσωμα (άμεσα ή έμμεσα) ώστε να εντοπιστεί το αντίστοιχο αντιγόνο. Η τεχνική αυτή τα τελευταία χρόνια έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στις βιοϊατρικές επιστήμες κυρίως για διαγνωστικούς σκοπούς, λόγω της δημιουργίας καθαρών και μονοκλωνικών αντισωμάτων.



Εικόνα 15: Σύνδεση αντιγόνου με φθορίζον αντίσωμα.

Μια παραλλαγή της μεθόδου του ανοσοφθορισμού, είναι και η τεχνική sandwich όπου το φθοριόχρωμα είναι ήδη συνδεδεμένο με ένα δευτερογενές αντίσωμα το οποίο στη συνέχεια προσκολλάται στο σύμπλοκο αντιγόνο / πρωτογενές αντίσωμα.



Εικόνα 16: Σύνδεση αντιγόνου με το αντίσωμα και στη συνέχεια με φθορίζον αντίσωμα (τεχνική sandwich).

Μερικά από τα πλεονεκτήματα της παρατήρησης με μικροσκόπιο φθορισμού είναι η αυξημένη ευαισθησία, με αποτέλεσμα τη προστασία του παρασκευάσματος από τεχνητές αλλοιώσεις γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό σε ανοσοβιολογικές τεχνικές όπου οι διάφορες χημικές ουσίες μπορεί να επηρεάσουν την αντιγονικότητα του αντιορού, η υψηλή εξειδίκευση, που καθιστά την τεχνική πολύ αξιόπιστη, η αυξημένη ταχύτητα και ευκολία.

2.6 Απομόνωση RNA από κυτταρικό εκχύλισμα

Η απομόνωση του RNA από κύτταρα έγινε με τη χρήση του TRIZOL (peqGOLD TriFast, peqlab, Erlangen, Γερμανία). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι αυτό που παρέχεται από την εταιρεία μαζί με το προϊόν. Η απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα πραγματοποιήθηκε με βάση την παρακάτω διαδικασία:

1. Κύτταρα ($\sim 0,8 \times 10^6$) ενοφθαλμίζονται σε αποστειρωμένες φλάσκες 25 cm² και επωάζονται στους 37°C και 5% CO₂. Αφού αποκτήσουν >90% πληρότητα, συλλέγονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου erppendorf, και στο κυτταρικό ίζημα που προκύπτει προστίθεται 1ml αντιδραστηρίου Trizol. Ακολουθεί καλή ομογενοποίηση με τη βοήθεια πιπέττας και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
2. Στη συνέχεια, προστίθεται σε κάθε δείγμα όγκος (0,2 ml) διαλύματος χλωροφορμίου (100%, Sigma-Aldrich, Γερμανία). Αποτέλεσμα αυτού είναι στο διάλυμα να δημιουργούνται τρεις φάσεις, με τις πρωτεΐνες να εντοπίζονται στην μεσόφαση και το RNA στην ανώτερη, διαυγή φάση. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση για 20 sec (με αναδευτήρα vortex ή με το χέρι) και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 12500 rpm, στους 4°C,

για 15 min και το υπερκείμενο διάλυμα (450-500 μ l) μεταφέρεται σε νέο , αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erppendorf.

4. Σε κάθε δείγμα προστίθεται όγκος (0,5 ml) διαλύματος ισοπροπανόλης (100%, # 33539, Sigma-Aldrich, Γερμανία), το οποίο πραγματοποιεί την κατακρήμνιση του RNA. Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου , για μισή ώρα.

5. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 12500 rpm, σε θερμοκρασία 4°C για 35 λεπτά.

6. Ακολούθως γίνεται προσεκτική απομάκρυνση του συνόλου του υπερκείμενου διαλύματος και στο εναπομείναν ίζημα (RNA) προστίθεται όγκος (750 μ l) διαλύματος αιθανόλης (75%, #32221, Sigma-Aldrich, Γερμανία). Ανάδευση με αναστροφή του σωληναρίου δυο φορές.

7. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13000 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

8. Απομακρύνεται το υπερκείμενο διάλυμα και το δείγμα αφήνεται στον αέρα για να στεγνώσει, επί 10 λεπτά περίπου. Στη συνέχεια, προστίθεται όγκος (11-31 μ l) υπερ-καθαρού νερού (DEPC treated H₂O, RNase free) και ακολουθεί προσεκτική επαναιώρηση του RNA με τη βοήθεια Thermomixer (Thermomixer comfort, Erppendorf, Γερμανία) στους 30° C για 15 λεπτά, ώστε να διαλυτοποιηθεί πλήρως το RNA.

9. Ακολουθεί προσδιορισμός της ποιότητας και συγκέντρωσης του RNA με τη βοήθεια Nanodrop (Nanodrop 2000c, UV-Vis Spectrophotometer, Thermoscientific, Η.Π.Α). Η αποθήκευση των δειγμάτων γίνεται σε θερμοκρασία -80°C.

2.7 *In vitro* αντίστροφη μεταγραφή - δημιουργία cDNA από RNA

Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε το kit QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen (QuantiTect Reverse Transcription Kit, 205311, Qiagen, Γερμανία). Η διαδικασία της ανάστροφης μεταγραφής για τη δημιουργία cDNA περιλαμβάνει δύο βήματα: την εξάλλειψη του γενωμικού DNA και την ανάστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA. Βέβαια η ακρίβεια των αποτελεσμάτων της RT-PCR πραγματικού χρόνου εξαρτάται και από το σχεδιασμό των εκκινητών όπου μπορεί να περιορίσει την ανίχνευση γενωμικού DNA (intron spanning primers).

2.7.1 Εξάλειψη γενωμικού DNA

Αφού ξεπαγώσει το RNA στον πάγο και το gDNA Wipeout Buffer, Quantiscript, τα Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer, RT Primer Mix, και το RNase-free νερό σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πραγματοποιείται η αντίδραση εξάλειψης του γενωμικού DNA σύμφωνα με τον **Πίνακα 1**, ακόλουθα.

Αντιδραστήρια	Όγκος/αντίδραση	Προτεινόμενος όγκος/αντίδραση
gDNA Wipeout Buffer, 7x	2 μl	2μl (1x)
Μήτρα RNA (1μg/μl)	0,5 μl	Μεταβλητή ποσότητα ως 1μg
Νερό χωρίς RNase	11,5 μl	Μεταβλητός όγκος
Τελικός όγκος αντίδρασης	14 μl	14μl

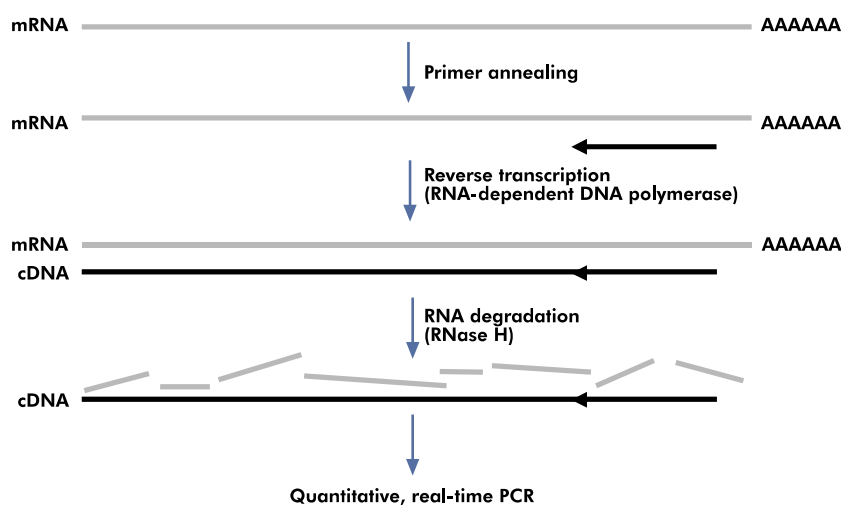
Πίνακας 1: Συστατικά αντίδρασης εξάλειψης γενωμικού DNA.

Επώαση στους 42°C για 2 λεπτά κι άμεση επιστροφή στον πάγο. Το καθαρό RNA δείγμα μετά τη διαδικασία εξάλειψης του γενωμικού DNA επωάζεται για 2 λεπτά στους 42°C και το RNA δείγμα χρησιμοποιείται απευθείας μετά στην αντίδραση της ανάστροφης μεταγραφής.

2.7.2 Αντίστροφη μεταγραφή

Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιείται στον πάγο, σύμφωνα με τον πίνακα. Το μείγμα της αντίστροφης μεταγραφής περιέχει όλα τα συστατικά που απαιτούνται για τη σύνθεση του cDNA, εκτός από το RNA. Όλη η αντίδραση πραγματοποιείται στους 42°C και για την απενεργοποίησή της η αυξάνεται η θερμοκρασία στους 95°C. Η δράση των ενζύμων RNA εξαρτώμενης πολυμεράσης και RNase H, κατά την αντίδραση της ανάστροφης μεταγραφής φαίνεται στην

εικόνα 17 που ακολουθεί.



Εικόνα 17: Σύνθεση cDNA, ενζυματική δράση κατά την αντίδραση της ανάστροφης μεταγραφής.

Αντιδραστήρια	Όγκος/αντίδραση
Master mix αντίστροφης μεταγραφής -Quantiscript Reverse Transcriptase	
Quantiscript RT Buffer, 5x	4 µl (1x)
RT Primer Mix	1 µl
Μήτρα RNA: Προϊόν αντίδρασης εξάλλειψης γενωμικού RNA	14 µl
RT transcriptase	1µl
Συνολικός όγκος αντίδρασης	20 µl

Πίνακας 2: Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.

Το προϊόν της εξάλλειψης DNA από το προηγούμενο βήμα (14 µl) προστίθεται στο μείγμα της αντίστροφης μεταγραφής (master mix) (**Πίνακας 2**), το οποίο παρασκευάζεται για το σύνολο των αντιδράσεων σύμφωνα με τον Πίνακα. Το μίγμα αναδεύεται και τοποθετείται στον πάγο. Ακολουθεί επώαση για 40 λεπτά στους 42° C και για 3 λεπτά στους 95° C, στο υδατόλουτρο.

Η τελευταία επώαση απενεργοποιεί την αντίστροφη μεταγραφάση. Τα προϊόντα της αντίστροφης μεταγραφής φυλάσσονται για μελλοντική χρήση στους -20° C.

2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

2.8.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), επιτυγχάνεται ο πολλαπλασιασμός συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA (πρότυπη αλληλουχία), που καθορίζεται από ειδικούς για την κάθε περιοχή ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινήτες. Η μέθοδος στηρίζεται στην επανάληψη ενός κύκλου τριών βημάτων, που περιλαμβάνει αρχικά την αποδιάταξη των μορίων του DNA κάτω από συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (95°C), στη συνέχεια την υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων με τις μονόκλωνες αλυσίδες DNA σε θερμοκρασία που καθορίζεται από τα χαρακτηριστικά των υποκινητών και τέλος την αντίδραση της επιμήκυνσης κατά την οποία δρά η DNA πολυμεράση και συνήθως απαιτεί θερμοκρασία περίπου 70-72° C.

Στην ημιποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρησιμοποιείται DNA καλούπι από αυτό που προέκυψε από την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής. Συγκρίνοντας τις σχετικές ποιότητες των προϊόντων της PCR, αποκτούμε ένα δείκτη της μεταγραφικής ενεργότητας των συγκεκριμένων γενετικών τόπων. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας το γονίδιο της αφυδρογονάσης της φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH), η ακτίνη ή η 18s υπομονάδα του ριβοσώματος των οποίων η μεταγραφική ενεργότητα παραμένει σταθερή.

Οι επιμέρους συγκεντρώσεις των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης παρουσιάζονται παρακάτω στον **Πίνακα 3**. Τα επιμέρους συστατικά προστίθενται σε ειδικό δοκιμαστικό σωλήνα τύπου eppendorf (0,2 ml), όπου πραγματοποιείται ήπια ανάδενσή τους με τη βοήθεια πιπέττας τύπου Gilson. Το διάλυμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs είναι από την εταιρεία Biorad (#10297-018, Invitrogen, Γερμανία) και η πολυμεράση και το ρυθμιστικό διάλυμα από την εταιρεία New England Biolabs. (KapaTaq polymerase, KK1022, Kapa

Biosystems Inc., H.P.A.).

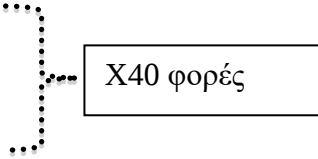
Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 3% ώστε να γίνει η ταυτοποίηση του μοριακού βάρους του παραγόμενου προϊόντος, καθώς και να προσδιοριστεί ημιοποσοτικά η μεταγραφική ενεργότητα των γενετικών τόπων που ενισχύθηκαν.

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση	Ποσότητα
cDNA	100ng	1μl
Ρυθμιστικό διάλυμα	10x	2,5μl
Εκκινητής πρόσθιος	10pmol	1μl
Εκκινητής ανάστροφος	10pmol	1μl
Διάλυμα τριφωσφορικών δεσοξυνουκλεοτιδίων (dNTP's)	2,5mM	0,5μl
KapaTaq DNA polymerase	5U/μl	0,1μl
H2O	-	18,9μl

Πίνακας 3: Επιμέρους ποσότητες των συστατικών που απαιτούνται για μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Το DNA που χρησιμοποιείται ως πρότυπη αλληλουχία προέρχεται από αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (cDNA). Όλα τα επιμέρους συστατικά προστίθενται σε παγωμένο (4°C) αποστειρωμένο σωλήνα τύπου eppendorf (0,2 ml).

Ένα τυπικό παράδειγμα του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε για τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων γενετικών τόπων χρησιμοποιώντας το cDNA ως καλούπι παρατίθεται στον **πίνακα 4**.

Θερμοκρασιακό Πρωτόκολλο

Αποδιάταξη DNA	95° C για 15 sec	
Πρόσδεση εκκινητών και επιμήκυνση	60° C για 1 min	
Παύση αντίδρασης	15° C for ever	

Πίνακας 4: Τυπικό παράδειγμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Απεικονίζονται τα επιμέρους στάδια της μεθόδου , οι θερμοκρασίες που εφαρμόζονται, καθώς και το χρονικό διάστημα που διαρκεί κάθε στάδιο . *Ta: θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών , η οποία εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης (Tm) αυτών. Συνήθως ισχύει $Ta = Tm - 4^{\circ} C$. Οι ιδιότητες του χρησιμοποιούμενου ενζύμου και των εκκινητών , μας επιτρέπουν η θερμοκρασία πρόσδεσης και επιμήκυνσης να συμπίπτουν . Ο χρόνος που απαιτείται για την επέκταση των εκκινητών , εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος. Δεδομένου ότι στην προκειμένη περίπτωση το μέγεθος του προϊόντος της PCR δεν ξεπερνά τις 300bp ο χρόνος επιμήκυνσης που θέτουμε είναι 60 sec.

2.8.2 Q RT-PCR (Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου)

Στη μοριακή βιολογία , η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο , που ονομάζεται επίσης ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real time qPCR), είναι μια εργαστηριακή τεχνική που βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης , η οποία χρησιμοποιείται για να ενισχύσει και ταυτόχρονα να ποσοτικοποιήσει ένα στοχευμένο μόριο DNA. Η ποσότητα μπορεί να είναι είτε ένας απόλυτος αριθμός των αντιγράφων ή μια σχετική ποσότητα , όταν συγκρίνεται με κάποια γονίδια ομαλοποίησης, όπως τα γονίδια αναφοράς.

Βασικό χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι ότι το ενισχυμένο DNA ανιχνεύεται καθώς η αντίδραση εξελίσσεται σε πραγματικό χρόνο , ενώ στην κλασσική PCR το προϊόν της αντίδρασης ανιχνεύεται στο τέλος . Για την ανίχνευση των προϊόντων PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιούνται φθορίζουσες χρωστικές που παρεμβάλλονται στο δίκλωνο DNA ή μια μεγάλη ποικιλία σημασμένων ανιχνευτών (probes).

Η ποσοτική PCR εκτελείται σε έναν θερμικό κυκλοποιητή , με την ικανότητα να ρίχνει μια δέσμη φωτός σε κάθε δείγμα , με συγκεκριμένο μήκος κύματος , και να ανιχνεύει το φθορισμό που εκπέμπεται από το διεγερμένο φθοριόχρωμα . Η μέθοδος της PCR γενικά αποτελείται από μια σειρά αλλαγών θερμοκρασίας που επαναλαμβάνονται 25-40 φορές.

Αυτοί οι κύκλοι αποτελούνται συνήθως από τρία στάδια:

Το πρώτο , σε περίπου $95^{\circ}C$, επιτρέπει το διαχωρισμό της διπλής έλικας του νουκλεϊκού οξέος.

Το δεύτερο στάδιο σε μια θερμοκρασία περίπου 50-60 °C, επιτρέπει την ευθυγράμμιση των εκκινητών με τη μήτρα του DNA.

Το τρίτο στάδιο σε θερμοκρασία περίπου 68-72 °C, διευκολύνει τον πολυμερισμό που διεξάγεται από την DNA πολυμεράση. Στην ποσοτική PCR όμως, λόγω του μικρού μεγέθους θραυσμάτων το τελευταίο βήμα συνήθως παραλείπεται, καθώς το ένζυμο είναι ικανό ν' αυξάνει τον αριθμό τους κατά τη διάρκεια της μεταβολής μεταξύ του σταδίου ευθυγράμμισης και του σταδίου διαχωρισμού. Επιπλέον, ορισμένοι θερμοκυκλοποιητές προσθέτουν άλλη μία θερμοκρασιακή φάση που διαρκεί μόνο μερικά δευτερόλεπτα για κάθε κύκλο, με μία θερμοκρασία για παράδειγμα 80°C, προκειμένου να μειωθεί ο θόρυβος που προκαλείται από την παρουσία διμερών εκκινητών, όταν χρησιμοποιείται μια μη-ειδική χρωστική.

Η QPCR επιτρέπει την ταυτοποίηση ειδικών, ενισχυμένων θραυσμάτων DNA χρησιμοποιώντας την ανάλυση της θερμοκρασίας τήξης τους (που ονομάζεται «Tm value», από τη θερμοκρασία τήξης).

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται στη μελέτη αυτή είναι real time RT-QPCR με SYBR Green που είναι μια φθορίζουσα χρωστική που προσδένεται στο δίκλωνο DNA (μη ειδικά) και βοηθά την ανίχνευση. Ο φθορισμός ανιχνεύεται και μετράται από το μηχανήμα της PCR πραγματικού χρόνου, και η γεωμετρική του αύξηση που αντιστοιχεί στην εκθετική αύξηση του προϊόντος, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του κύκλου ποσοτικοποίησης (Cq) σε κάθε αντίδραση. Στην PCR πραγματικού χρόνου, σε αντίθεση με τη συμβατική PCR, επιτρέπεται η ποσοτικοποίηση του επιθυμητού προϊόντος σε οποιοδήποτε σημείο της διαδικασίας ενισχύσεως με τη μέτρηση του φθορισμού (στην πραγματικότητα, η μέτρηση γίνεται πάνω από το επίπεδο ενός δεδομένου ορίου «threshold»). Μια κοινώς χρησιμοποιούμενη μέθοδος ποσοτικοποίησης του DNA με PCR πραγματικού χρόνου βασίζεται στη σχεδίαση του φθορισμού έναντι του αριθμού των κύκλων σε λογαριθμική κλίμακα. Το «threshold» για την ανίχνευση του DNA με βάση το φθορισμό βρίσκεται ελαφρώς πάνω από το υπόβαθρο (background). Ο αριθμός των κύκλων κατά τον οποίο ο φθορισμός υπερβαίνει το «threshold», καλείται «threshold cycle» (Ct).

2.9 Δοκιμασία MTT

1. Αφαίρεση θρεπτικού υλικού και πλύσιμο των κυττάρων με διάλυμα PBS.
2. Προσθήκη 100μl διαλύματος MTT.
3. Επώαση των κυττάρων για τουλάχιστον 3 ώρες στους 37° C. Σε αυτό το σημείο εμφανίζονται οι κρύσταλλοι φορμαζάνης.
4. Αφαίρεση διαλύματος MTT και διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζάνης με διάλυμα DMSO.
5. Μέτρηση της απορρόφησης σε φωτόμετρο στα 570nm.

3.Αποτελέσματα

3.1 Μικρότερος πληθυσμός φθορίζοντων κυττάρων με συνέκφραση της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2 συγκριτικά με τους κυτταρικούς πληθυσμούς ελέγχου.

Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2 σε ανθρώπινα φυσιολογικά κύτταρα πραγματοποιήθηκε με πλασμιδιακό φορέα, στον οποίο το γονίδιο της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, είναι συζευγμένο με το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας χρωστικής E-GFP (Enhanced Green Fluorescent Protein). Στην παρούσα εργασία ο συγκεκριμένος φορέας θα αναφέρεται ως **πλασμίδιο Ago2**. Η επιλογή του πλασμιδιακού φορέα δεν ήταν τυχαία. Τα κύτταρα τα οποία είχαν προσλάβει το πλασμίδιο, εκφράζουν την πράσινη χρωστική και έτσι καθίσταται δυνατή η παρατήρηση τους σε μικροσκόπιο φθορισμού.

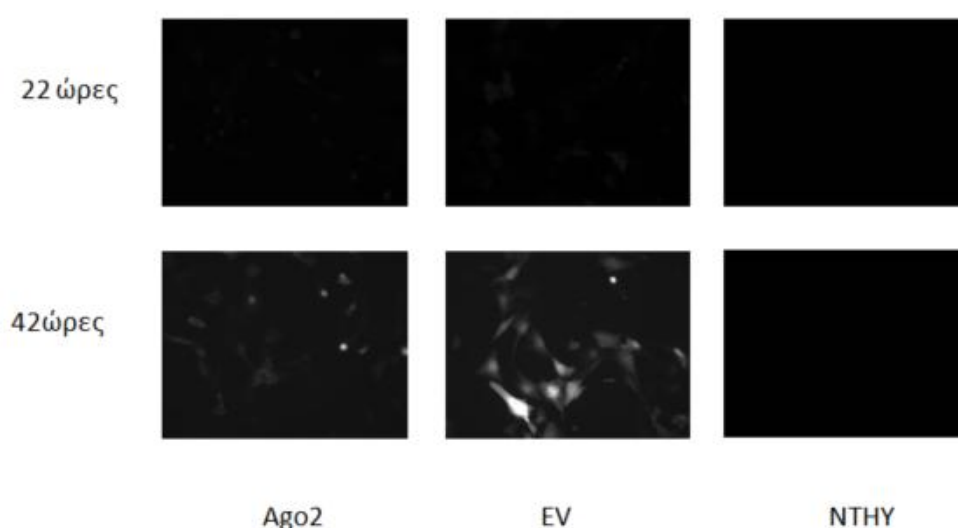
Επίσης, για τον έλεγχο της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακός φορέας, στον οποίο υπάρχει μόνο το γονίδιο της πράσινης χρωστικής E-GFP και στο εξής θα αναφέρεται ως **κενό πλασμίδιο (empty vector, EV)**. Με τη χρήση του κενού πλασμιδίου είναι δυνατή η παρατήρηση των κυττάρων που προσέλαβαν το συγκεκριμένο πλασμίδιο, εφόσον θα εκφράζουν το γονίδιο της πράσινης χρωστικής. Κατά συνέπεια ελέγχεται αν η οποιαδήποτε αλλαγή στον φαινότυπο των κυττάρων με το πλασμίδιο Ago2 οφείλεται στην διαδικασία εισαγωγής του πλασμιδίου ή συγκεκριμένα στην υπερέκφραση της πρωτεΐνης του Αργοναύτη 2.

Στην πειραματική διαδικασία της διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν λιποσώματα, ως φορείς νουκλεικών οξέων. Τα λιποσώματα είναι μικρά σφαιρικά σωματίδια με μεμβράνες λιπιδικής φύσεως. Στις πειραματικές διεργασίες χρησιμοποιούνται εξαιτίας της ικανότητας τους να συντήκονται με τις μεμβράνες των κυττάρων και να εισάγουν στο κύτταρο οτιδήποτε βρίσκεται στο εσωτερικό τους. Κατά τη διαμόλυνση των θυρεοειδικών φυσιολογικών κυττάρων NTHY, έγινε η χρήση λιποσωμάτων με σκοπό να διασφαλιστεί η εισαγωγή του πλασμιδιακού DNA. Σε περιπτώσεις που κρίθηκε αναγκαίο, χρησιμοποιήθηκε ως επιπλέον μάρτυρας έλεγχου της πειραματικής διαδικασίας (Lipo control). Πιο συγκεκριμένα, σε πληθυσμό κυττάρων NTHY, προστέθηκαν μόνο τα λιποσώματα εκείνα στα οποία δεν υπήρχε πλασμιδιακός φορέας. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η ακρίβεια των αποτελεσμάτων, δηλαδή

οποιαδήποτε παρατήρηση οφείλεται αποκλειστικά στην υπερέκφραση της πρωτεΐνης και όχι στην επεξεργασία των κυττάρων με λιποσώματα.

Επιπλέον, σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες, ως κύτταρα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν «φυσιολογικά» θυρεοειδικά κύτταρα (NTHY κυτταρική σειρά) τα οποία δεν διαμολύνθηκαν με κάποιο από τα παραπάνω πλασμίδια. Με αυτό τον τρόπο, είναι δυνατή η σύγκριση των κυττάρων που εκφράζουν φυσιολογικά την πρωτεΐνη Ago2 με εκείνα που την υπερεκφράζουν.

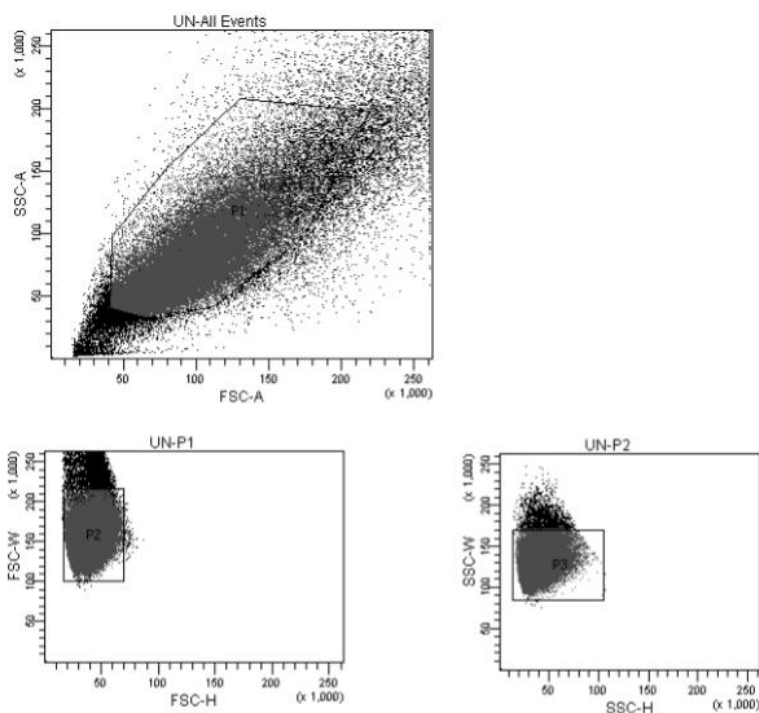
Οι κυτταρικοί πληθυσμοί παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού, με σκοπό την παρατήρηση των κυττάρων που έχουν προσλάβει τον πλασμιδιακό φορέα. Στην εικόνα (**Εικόνα 18**), απεικονίζονται αντιπροσωπευτικές περιοχές κυττάρων, στις οποίες διακρίνονται τα κύτταρα που έχουν προσλάβει το πλασμιδιακό DNA (φθορίζοντα κύτταρα). Ο φθορισμός στις 24 ώρες φαίνεται να είναι χαμηλότερος. Αυτό συμβαίνει καθώς το κύτταρο χρειάζεται χρόνο από τη στιγμή που θα προσλάβει το πλασμιδιακό DNA μέχρι τη στιγμή που θα πραγματοποιηθεί η διαδικασία της μεταγραφής και της μετάφρασης. Τα κύτταρα στα οποία δεν εισήχθει κάποιο πλασμίδιο δεν εμφανίζουν φθορισμό.



Εικόνα 18: Παρατήρηση φυσιολογικών θυρεοειδών κυττάρων NTHY σε μικροσκόπιο φθορισμού, 24 και 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση με πλασμιδιακό φορέα. Στην πρώτη στήλη απεικονίζονται τα κύτταρα που προσέλαβαν το πλασμίδιο του Αργοναύτη 2 (Ago2), στη δεύτερη στήλη τα κύτταρα που εκφράζουν μόνο την πράσινη χρωστική (EV) και στην τρίτη στήλη μη τροποποιησιμα κύτταρα (NTHY).

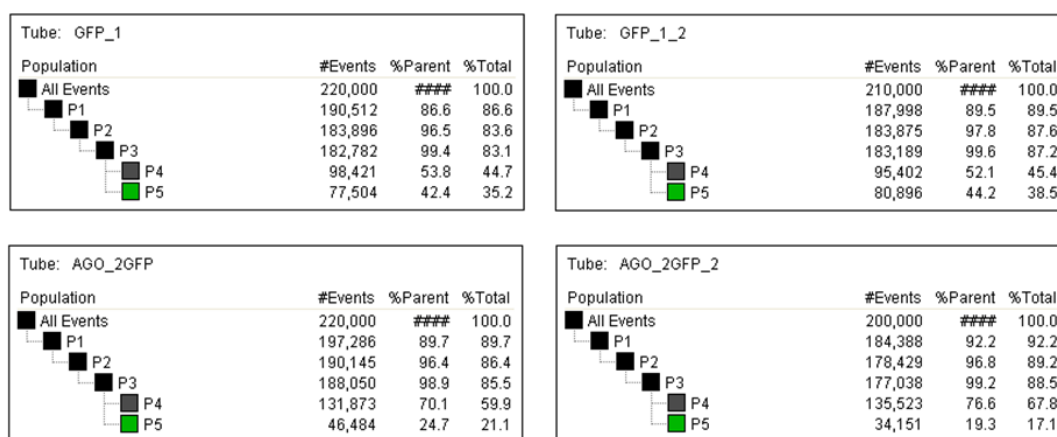
Για τον ακριβή προσδιορισμό του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων και στις δύο περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της κυτταρομετρίας ροής στις ίδιες χρονικές στιγμές (24 και 48 ώρες). Για την κάθε συνθήκη χρησιμοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα (duplicates), για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

Αρχικά κατά την πειραματική διαδικασία της κυτταρομετρίας ροής μετρήθηκαν τα κύτταρα NTHY που λειτουργούν ως αρνητικός μάρτυρας φθορισμού (NTHY control). Πιο συγκεκριμένα, με βάση αυτά τα κύτταρα λαμβάνεται η εικόνα των κυττάρων που θα πρέπει να καταμετρηθούν και στους υπόλοιπους κυτταρικούς πληθυσμούς. Δηλαδή σε αυτό το στάδιο, διακρίνονται τα αποπτωτικά και τα κυτταρικά υπολείμματα, από τα ζωντανά κύτταρα και έτσι λαμβάνονται τα όρια για τη μέτρηση ενός συγκεκριμένου πληθυσμού (πληθυσμός P3). Στις υπόλοιπες συνθήκες τα κύτταρα του συγκεκριμένου πληθυσμού θα ελεγχθούν για το αν εμφανίζουν φθορισμό (GFP positive), (πληθυσμός P5) ή όχι (πληθυσμός P4) (**Εικόνα 19**).

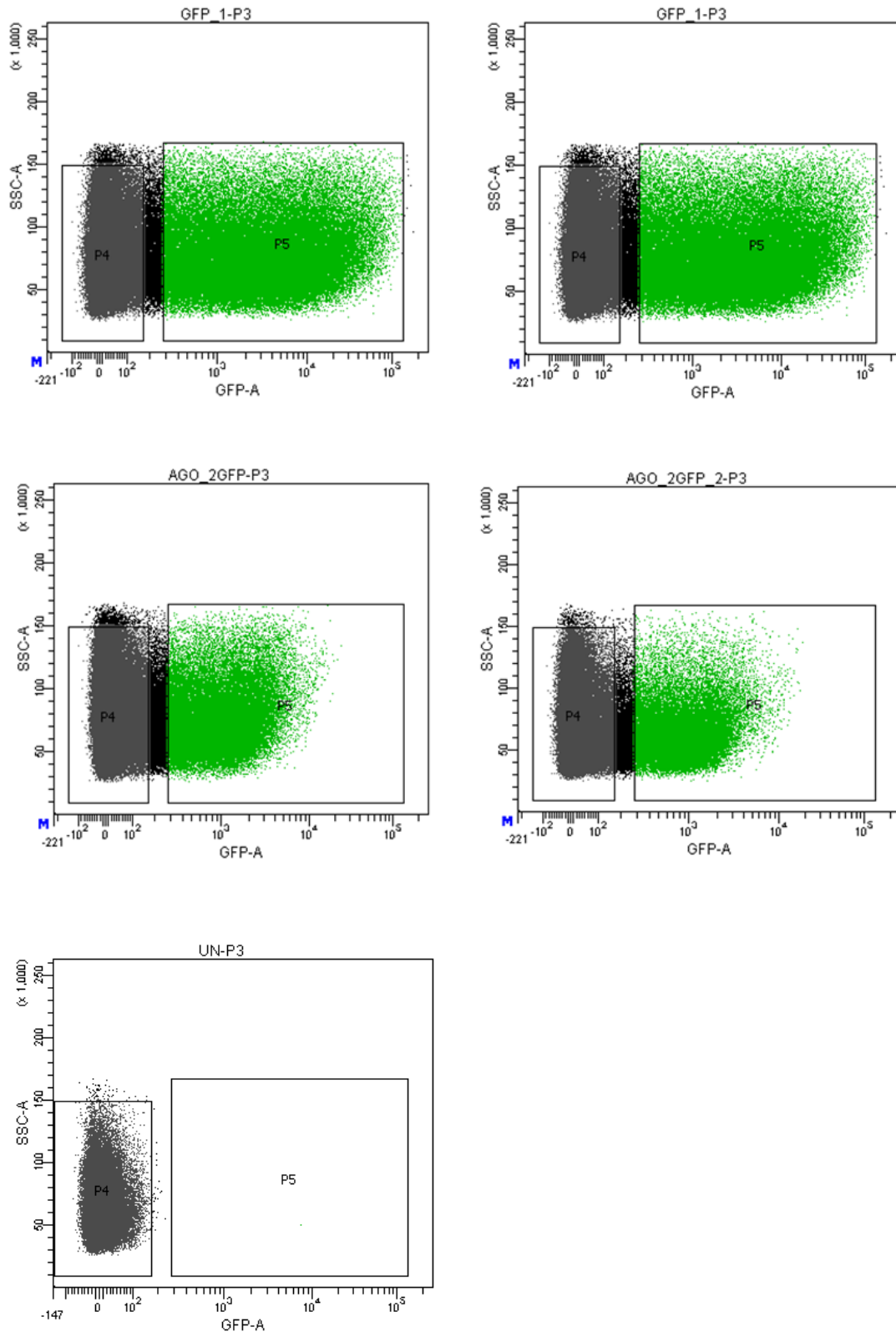


Εικόνα 19: Καθορισμός κυτταρικών πληθυσμών που πρόκειται να καταμετρηθούν κατά την κυτταρομετρία ροής. Ο πληθυσμός P3 είναι τελικά αυτός που θα ελεγχθεί για την έκφραση της πρωτεΐνης E-GFP.

Τα αποτελέσματα από την κυτταρομετρία ροής εμφανίζονται στις παρακάτω εικόνες. (Εικόνα 20, 21). Οι αρχικοί πληθυσμοί σε κάθε ανεξάρτητο βιολογικό πείραμα είναι σχεδόν ίδιοι έτσι ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση των τελικών αποτελεσμάτων. Είναι εμφανές ότι 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων με τους πλασμιδιακούς φορείς, μεγαλύτερο πληθυσμό κυττάρων εμφανίζουν τα κύτταρα που έχουν προσλάβει το κενό πλασμίδιο. Αντίθετα, τα κύτταρα στα οποία υπερεκφράζεται η πρωτεΐνη Αργοναύτης 2, είναι σχεδόν τα μισά. Με αυτό τον τρόπο αποδεικνύεται ότι η υπερέκφραση του Αργοναύτη μπορεί να έχει θανατηφόρο αποτέλεσμα στα φυσιολογικά κύτταρα του θυρεοειδούς, στις πρώτες 24 ώρες.



Εικόνα 20: Αριθμητικά αποτελέσματα κυτταρικών πληθυσμών όπως αυτά αποτυπώθηκαν κατά την δοκιμασία της κυτταρομετρίας ροής. Αναγράφεται ο αρχικός πληθυσμός των κυττάρων (all events), ο τελικός πληθυσμός των βιώσιμων κυττάρων (P3), ο πληθυσμός των κυττάρων χωρίς φοροισμό (P4) και ο πληθυσμός των κυττάρων με φοροισμό (P5). Στην πάνω σειρά απεικονίζονται τα αποτελέσματα για τον κυτταρικό πληθυσμό που προσέλαβε το κενό πλασμίδιο (GFP) ενώ στη κάτω σειρά, εμφανίζονται τα αποτελέσματα των κυττάρων που εκφράζουν το πλασμίδιο της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2 (AGO2).

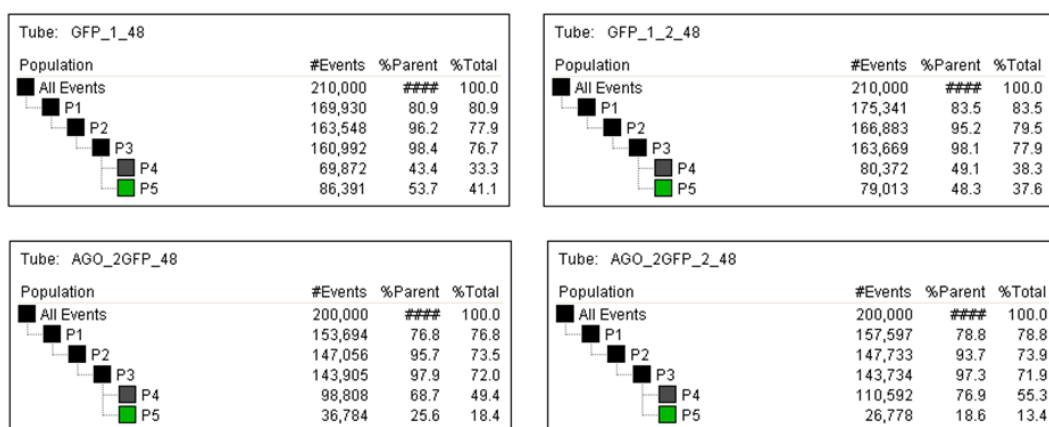


Εικόνα 21: Διαγράμματα κυτταρομετρία ροής 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση φυσιολογικών θυρεοειδών κυττάρων NTHY, με πλασμιδιακούς φορείς. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται ο πληθυσμός των φθορίζοντων κυττάρων (P5) ενώ με μαύρο χρώμα τα ζωντανά κύτταρα χωρίς φθορισμό (P4). Πρώτη σειρά διαγραμμάτων, φαίνεται ο πληθυσμός των κυττάρων που έχουν προσλάβει το κενό πλασμίδιο, EV. Στην δεύτερη σειρά διαγραμμάτων απεικονίζεται ο αριθμός των κυττάρων που προσέλαβαν το

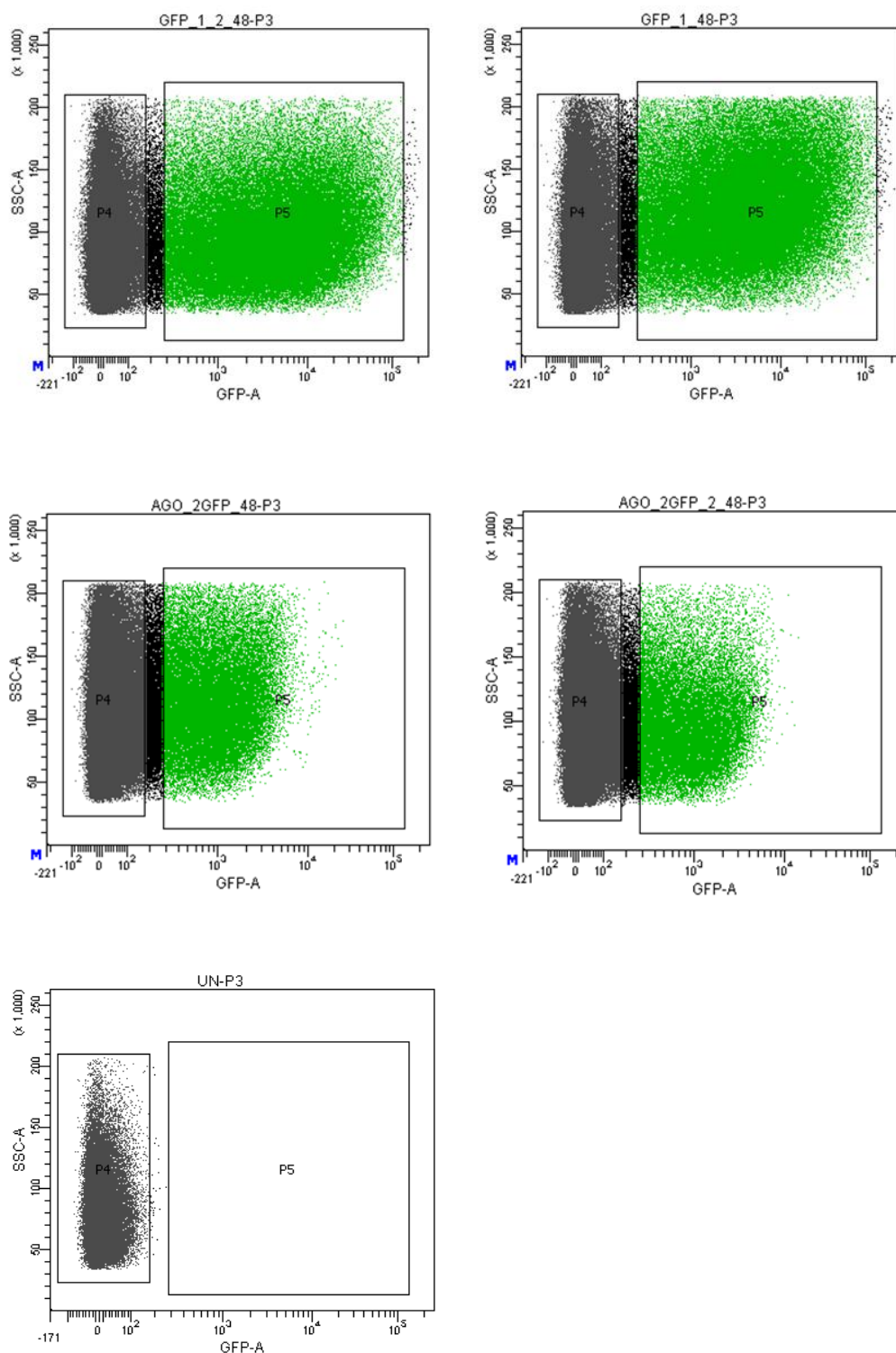
πλασμίδιο Ago2. Στην τρίτη σειρά διαγραμμάτων απεικονίζονται μη φθορίζοντα κύτταρα NTHY (αρνητικός μάρτυρας).

Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρείται σε ακόμη μεγαλύτερο βαθμό στις 48 ώρες, όπως φαίνεται στην εικόνα (Εικόνα 22, 23). Ο πληθυσμός των κυττάρων που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο με την πρωτεΐνη Αργοναύτη 2 είναι ακόμα μικρότερος συγκριτικά με εκείνα που προσέλεβαν τον κενό πλασμιδιακό φορέα.

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται έντονη διαφορά όχι μόνο ανάμεσα στις δύο συνθήκες πληθυσμού κυττάρων αλλά και στις δύο χρονικές στιγμές.



Εικόνα 22: Αριθμητικά αποτελέσματα κυτταρικών πληθυσμών όπως αυτά αποτυπώθηκαν κατά την επεξεργασία της δοκιμασίας κυτταρομετρίας ροής. Αναγράφεται ο αρχικός πληθυσμός των κυττάρων (all events), ο τελικός πληθυσμός των βιώσιμων κυττάρων (P4) και ο πληθυσμός των κυττάρων με φθορισμό (P5). Στην πάνω σειρά απεικονίζονται τα αποτελέσματα για τον κυτταρικό πληθυσμό που προσέλαβε το κενό πλασμίδιο ενώ στην κάτω σειρά, εμφανίζονται τα αποτελέσματα των κυττάρων που εκφράζουν το πλασμίδιο του Αργοναύτη.

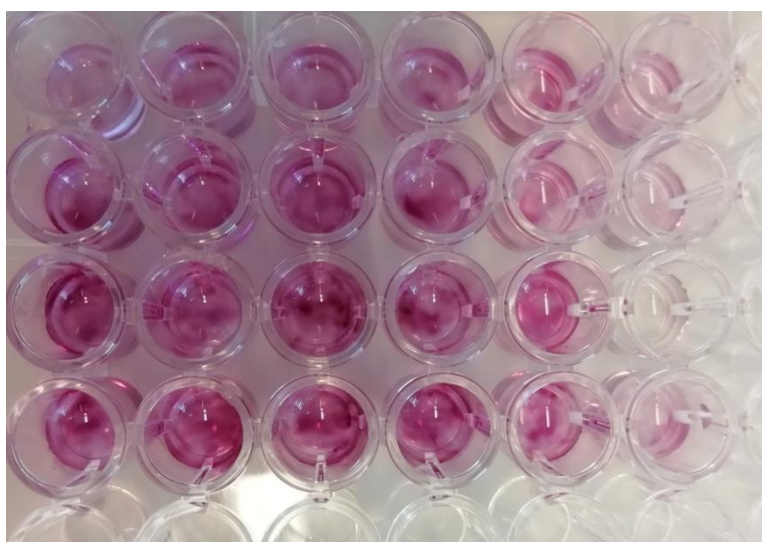


Εικόνα 23: Διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων NTHY με πλασμιδιακούς φορείς. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται ο πληθυσμός των φθορίζοντων κυττάρων ενώ με μαύρο χρώμα τα κύτταρα χωρίς φθορισμό. Στην πρώτη σειρά διαγραμμάτων, φαίνεται ο πληθυσμός των κυττάρων που έχουν προσλάβει το κενό πλασμίδιο (EV). Στην δεύτερη σειρά διαγραμμάτων απεικονίζεται ο αριθμός των κυττάρων που προσέλαβαν το πλασμίδιο Ago2. Στην τρίτη σειρά μη φθορίζοντα κύτταρα NTHY.

3.2. Η υπερέκφραση του Αργοναύτη στα φυσιολογικά θυρεοειδικά κύτταρα συνεπάγεται μειωμένο αριθμό βιώσιμων κυττάρων.

Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής, διεξάχθηκε η πειραματική διαδικασία MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Με τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία δίνεται η εικόνα των μεταβολικά ενεργών κυττάρων και κατά συνέπεια, κάτω υπό ορισμένες πειραματικές συνθήκες, αντανακλάται ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων σε έναν κυτταρικό πληθυσμό. Αυτό συμβαίνει καθώς τα ένζυμα NADPH oxidoreductases έχουν την δυνατότητα να μετατρέπουν τη χρωστική MTT με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζονται οι αδιάλυτοι κρυστάλλοι φορμαζάνης, οι οποίοι δίνουν το χαρακτηριστικό μωβ χρώμα (Εικόνα 24).

Ανθρώπινα φυσιολογικά θυρεοειδικά κύτταρα NTHY, διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο Ago2. Για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων η διαδικασία πραγματοποιήθηκε και σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν με κενό πλασμίδιο που εκφράζει μόνο την πράσινη χρωστική E-GFP και σε διαμολυμένα κύτταρα στα οποία όμως προστέθηκαν λιποσώματα (Lipo control), διασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο ότι τα αποτελέσματα οφείλονται αποκλειστικά στην επίδραση της πρωτεΐνης Αργοναύτη 2.

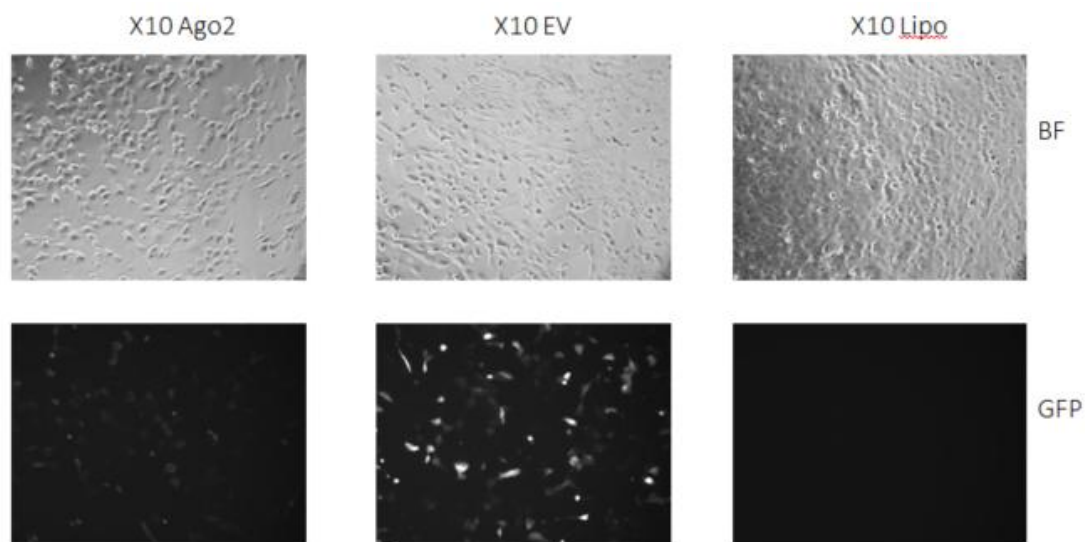


Εικόνα 24: Σχηματισμός κρυστάλλων φορμαζάνης κατά τη πειραματική διαδικασία MTT.

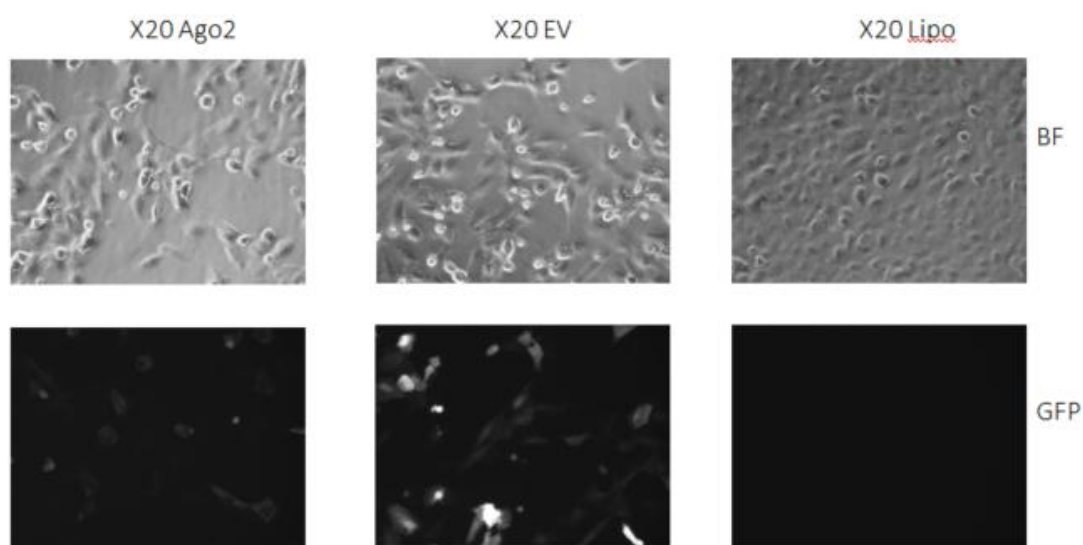
Οι παραπάνω κυτταρικοί πληθυσμοί παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού 24, 48 και 72 ώρες μετά την διαμόλυνση τους, ελάχιστα πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας MTT, με στόχο την παρατήρηση των κυττάρων στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές. Η παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο αποσκοπεί στην εκπλήρωση δύο βασικών στόχων. Αρχικά, για την παρατήρηση των κυτταρικών πληθυσμών προτού προστεθεί σε αυτά η χρωστική MTT. Στο σημείο αυτό να επισημάνουμε πως ο αριθμός τους θα πρέπει να είναι παρόμοιος, για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα. Εν συνεχεία, μπορεί να παρατηρηθεί πόσα κύτταρα από τον αρχικό πληθυσμό εκφράζουν την πράσινη χρωστική E-GFP. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της παρατήρησης των κυττάρων στο ορατό φως (Brightfield, BF) κατά τον οποίο διακρίνονται όλα τα κύτταρα, ενώ στο ίδιο ακριβώς πεδίο η παρατήρηση γίνεται με laser στο οποίο διακρίνονται μόνο τα φθορίζοντα κύτταρα.

Κατά τη δοκιμασία MTT κρίθηκε σκόπιμο να ληφθεί μέτρηση 72 ώρες μετά την διαμόλυνση των κυττάρων, καθώς το κύτταρο χρειάζεται περισσότερο χρόνο από τη στιγμή που θα προσλάβει το πλασμιδιακό DNA μέχρι την χρονική στιγμή έκφρασης του προσληφθέντος γονιδίου. Επιπρόσθετα, οι πειραματικές συνθήκες είναι με τέτοιο τρόπο σχεδιασμένες ώστε μέσω της δοκιμασίας MTT να αντικατοπτρίζεται ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων, και για αυτό κρίνεται αναγκαίο να αυξήσουμε το χρονικό όριο έτσι ώστε να παρατηρηθεί η δράση της εκφρασμένης πλέον υβριδικής πρωτεΐνης Αργοναύτης 2-GFP.

Στις 24 ώρες, (**Εικόνα 25, 26**), υπάρχουν πολλά κύτταρα τα οποία φθορίζουν και στις δύο συνθήκες. Τα κύτταρα στα οποία εισήχθη το κενό πλασμίδιο (EV), που εκφράζει μόνο το γονίδιο GFP αλλά όχι τον Αργοναύτη, παρουσιάζουν εντονότερο φθορισμό.



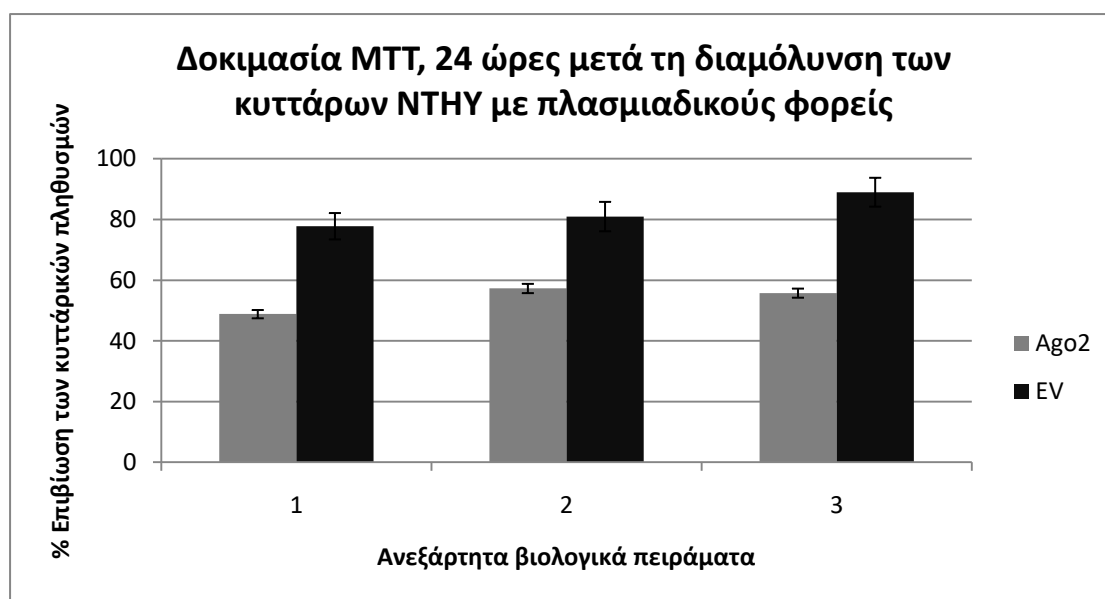
Εικόνα 25: Παρατήρηση φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού, 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση τους με πλασμιδιακό φορέα Ago2 (1^η στήλη, αριστερά) και κενό πλασμιδιακό φορέα (δεύτερη στήλη). Στην τρίτη στήλη παρουσιάζονται τα φυσιολογικά θυρεοειδικά κύτταρα στα οποία δεν διαμολύνθηκαν με κάποιο πλασμίδιο. Πάνω σειρά, εικόνα μικροσκοπίου με ορατό φως (Brightfield, BF), κάτω σειρά εικόνες μικροσκοπίου με φθορισμό (GFP). Με λευκά απεικονίζονται τα κύτταρα τα οποία φθορίζουν. Μεγένθυση 10X.



Εικόνα 26: Παρατήρηση φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων σε μικροσκόπιο φθορισμού, 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση τους με πλασμιδιακό φορέα Ago2 (1^η στήλη, αριστερά) και κενό πλασμιδιακό φορέα (δεύτερη στήλη). Μεγένθυση 20X.

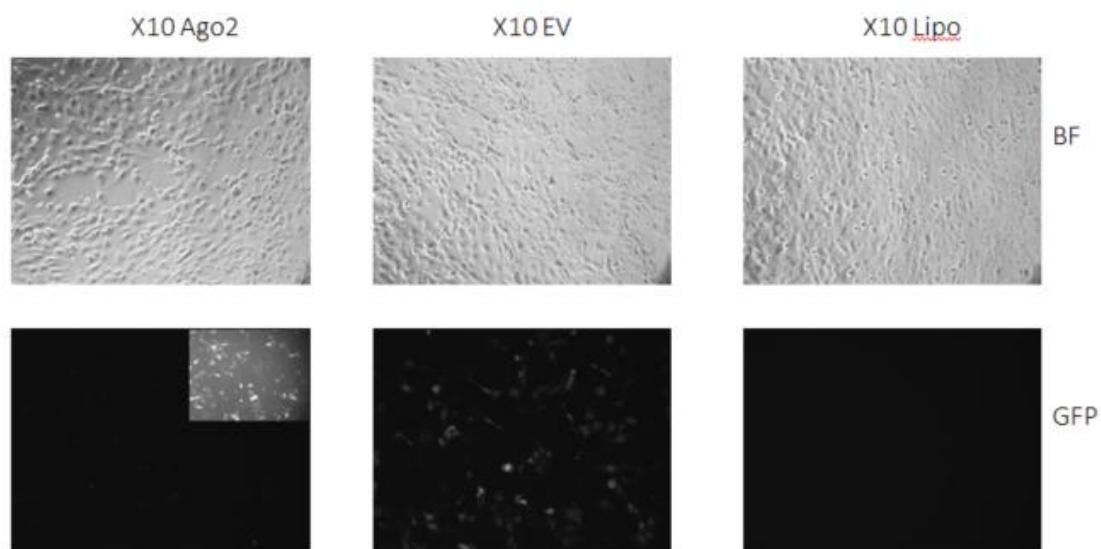
Τα αποτελέσματα από την δοκιμασία MTT συμφωνούν με εκείνα από την δοκιμασία της κυτταρομετρίας ροής. Όπως παρουσιάζεται και στο διάγραμμα (**Διάγραμμα 1**), ενώ ο αρχικός πληθυσμός των κυττάρων (πριν τη διαμόλυνση) ήταν ο ίδιος σε όλες

τις περιπτώσεις, τα κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη Αργοναύτης 2 φαίνεται να είναι μικρότερα σε αριθμό, συγκριτικά με εκείνα που προσέλαβαν το πλασμίδιο που εκφράζει μόνο την πράσινη χρωστική. Ωστόσο η διαφορά σε αυτό το χρονικό σημείο φαίνεται να είναι της τάξεως του 30%. (Όλες οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές ($p < 0,01$) ύστερα από ανάλυση των δεδομένων με τη δοκιμασία t test).

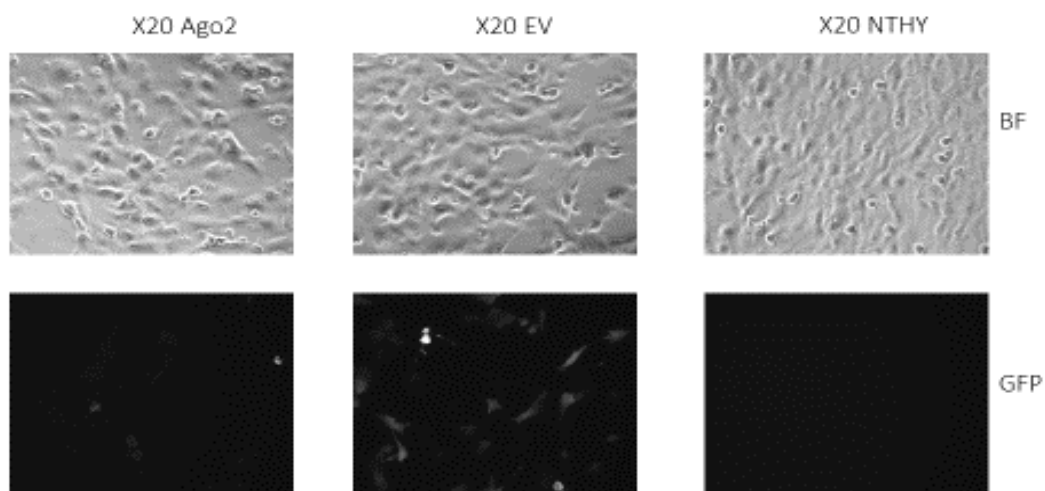


Διάγραμμα 1: Διαγραμματική επεικόνιση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας MTT, 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση τους. Με γκρι χρώμα παρουσιάζεται η επιβίωση των φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων NTHY στα οποία έγινε υπερέκφραση της πρωτεΐνης αργοναύτης 2 (Ago2). Με μαύρο χρώμα παρουσιάζεται η επιβίωση των κυττάρων NTHY τα οποία διαμολύνθηκαν με το κενό πλασμίδιο (EV).

Στις 48 ώρες, τα αποτελέσματα από το μικροσκόπιο φθορισμού αποδεικνύουν ότι ο φθορισμός στα κύτταρα τα οποία εκφράζουν την πρωτεΐνη Αργοναύτης 2 είναι πολύ χαμηλός. Σε αυτό το διάστημα αναμένεται ότι το κύτταρο θα έχει την δυνατότητα να εκφράσει την χημειρική πρωτεΐνη Ago2-GFP. Ως εκ τούτου και με βάση αυτό το δεδομένο, εφόσον υπάρχει φθορισμός (άρα και έκφραση της πρωτεΐνης), που όμως είναι αρκετά χαμηλός, υπάρχει η πιθανότητα μόνο τα κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη Αργοναύτης 2 σε χαμηλά επίπεδα να είναι εκείνα που επιβιώνουν. Θα μπορούσε, δηλαδή, να λειτουργήσει ως ένας μηχανισμός άμυνας του κυττάρου για να ξεφύγει από την τοξική επίδραση του μορίου Αργοναύτης 2 (**Εικόνα 27, 28**). Αντίθετα, πληθυσμός των κυττάρων στα οποία προστέθηκαν τα λιποσώματα χωρίς τα πλασμίδια δεν εμφανίζουν κανέναν φθορισμό, όπως ήταν αναμενόμενο.



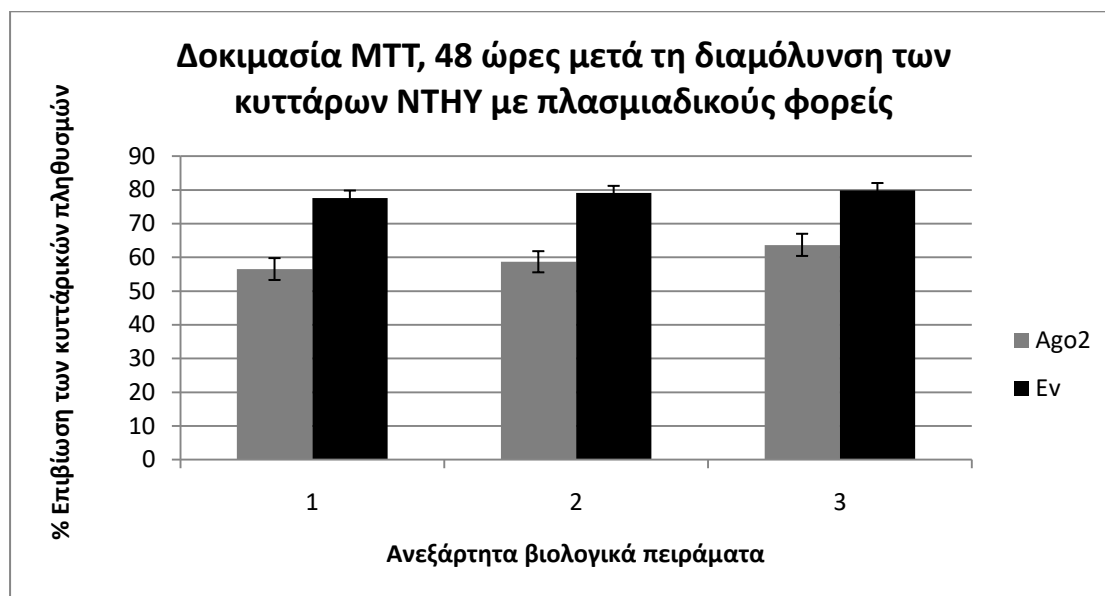
Εικόνα 27: Παρατήρηση φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων NTHY σε μικροσκόπιο φθορισμού, 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση τους με πλασμιδιακό φορέα Ago2 (1^η στήλη, αριστερά) και κενό πλασμιδιακό φορέα (δεύτερη στήλη). Στην τρίτη στήλη παρουσιάζονται τα θυρεοειδικά κύτταρα στα οποία δεν διαμολύνθηκαν με κάποιο πλασμίδιο (Lipo). Στην πάνω σειρά, παρουσιάζονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί σε ορατό φως (BF), ενώ στην κάτω σειρά με φθορισμό (GFP). Με λευκά απεικονίζονται τα κύτταρα τα οποία φθορίζουν. Μεγένθυση 10X.



Εικόνα 28: Παρατήρηση φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων NTHY σε μικροσκόπιο φθορισμού, 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση τους με πλασμιδιακό φορέα Ago2 (1^η στήλη, αριστερά) και κενό πλασμιδιακό φορέα EV(δεύτερη στήλη). Μεγένθυση 20X.

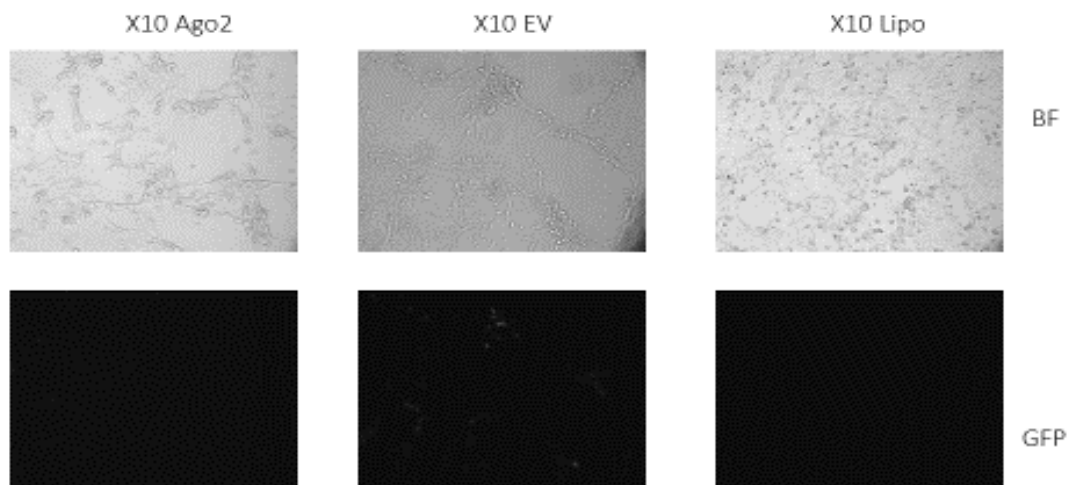
Τα αριθμητικά αποτελέσματα των κυττάρων, 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση, αποδεικνύουν ότι ο αριθμός των μεταβολικά ενεργών κυττάρων στον πληθυσμό που εκφράζουν το πλασμίδιο με το γονίδιο της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2 είναι λιγότερα σε

σύγκριση με εκείνα που διαμολύνθηκαν με τον κενό πλασμιδιακό φορέα (**Διάγραμμα 2**). (Όλες οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές ($p < 0,01$) ύστερα από ανάλυση των δεδομένων με τη δοκιμασία t test).

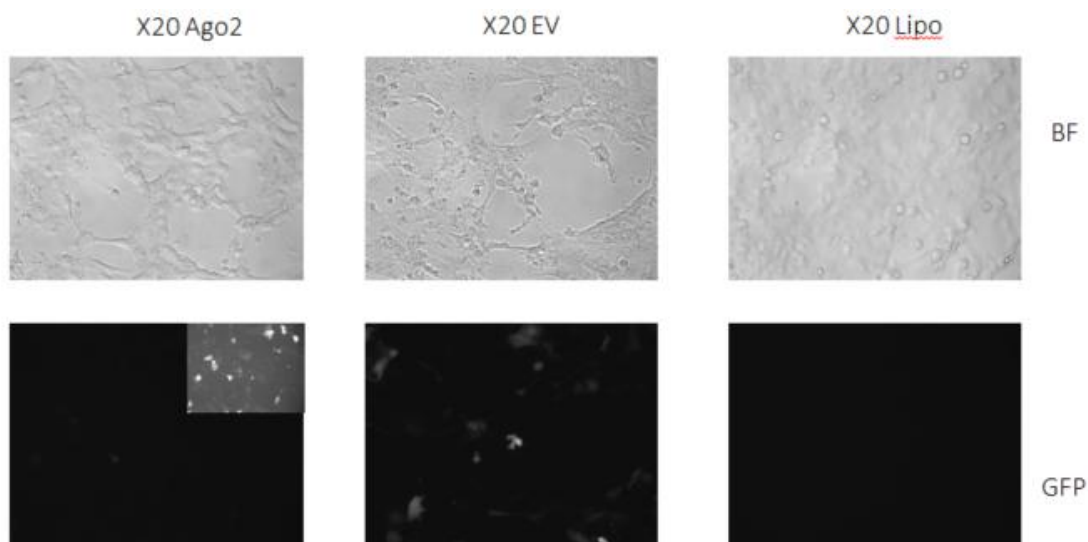


Διάγραμμα 2: Διαγραμματική επεικόνιση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας MTT, 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση τους. Με γκρι χρώμα παρουσιάζεται η επιβίωση των φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων NTHY στα οποία έγινε υπερέκφραση της πρωτεΐνης αργοναύτης 2 (Ago2). Με μαύρο χρώμα παρουσιάζεται η επιβίωση των κυττάρων NTHY τα οποία διαμολύνθηκαν με το κενό πλασμίδιο (EV).

Στις 72 ώρες, όπως φαίνονται και από τις εικόνες φθορισμού (**Εικόνα 29**), στα κύτταρα της πρώτης συνθήκης (υπερέκφραση της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2) φαίνεται σαν να απουσιάζει ο φθορισμός. Ωστόσο, με αύξηση της αντίθεσης (contrast) της εικόνας, φαίνεται ότι υπάρχουν ακόμα κύτταρα τα οποία έχουν το συγκεκριμένο πλασμίδιο. Αντίθετα, κύτταρα τα οποία έχουν διαμολυνθεί με το κενό πλασμίδιο εμφανίζουν έντονο φθορισμό. Ο φθορισμός και στις 72 ώρες εξακολουθεί να είναι εντονότερος στον κυτταρικό πληθυσμό που προσέλεβαν το κενό πλασμιδιακό φορέα (**Εικόνα 30**).



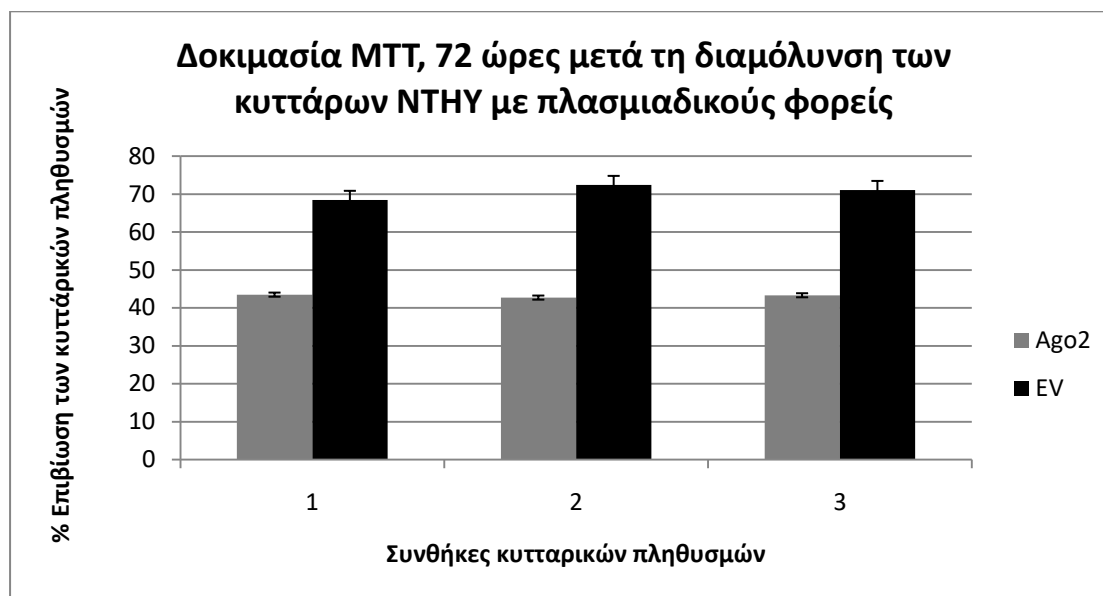
Εικόνα 29: Παρατήρηση φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων NTHY σε μικροσκόπιο φθορισμού, 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση τους με πλασμιδιακό φορέα Ago2 (1^η στήλη, αριστερά) και κενό πλασμιδιακό φορέα EV (δεύτερη στήλη). Στην τρίτη στήλη παρουσιάζονται τα θυρεοειδικά κύτταρα στα οποία δεν διαμολύνθηκαν με κάποιο πλασμίδιο (Lipo). Στην πάνω σειρά, παρουσιάζονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί σε ορατό φως (BF), ενώ στην κάτω σειρά με φθορισμό (GFP). Με λευκά απεικονίζονται τα κύτταρα τα οποία φθορίζουν. Μεγένθυση 10X.



Εικόνα 30: Παρατήρηση φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων NTHY σε μικροσκόπιο φθορισμού, 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση τους με πλασμιδιακό φορέα Ago2 (1^η στήλη, αριστερά) και κενό πλασμιδιακό φορέα (δεύτερη στήλη). Μεγένθυση 20X.

Στις 72 ώρες τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την δοκιμασία του MTT, δείχνουν ότι τα κύτταρα στα οποία προστέθηκε το πλασμίδιο του Αργοναύτη 2 εμφανίζουν

μικρότερο αριθμό συγκριτικά με τους άλλους πληθυσμούς. Η διαφορά αυτή είναι λίγο λιγότερη από το διπλάσιο (**Διάγραμμα 3**). (Όλες οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές ($p < 0,01$) ύστερα από ανάλυση των δεδομένων με τη δοκιμασία t test).



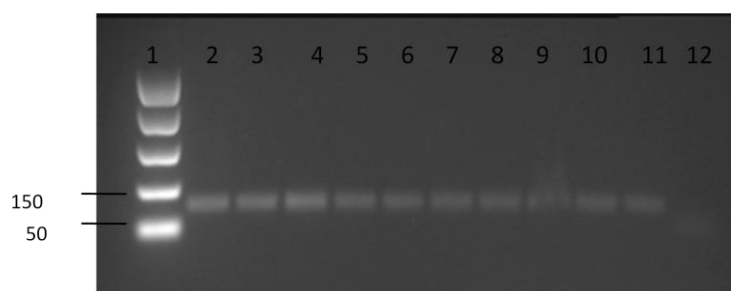
Διάγραμμα 3: Διαγραμματική επεικόνιση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας MTT, 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση τους. Με γκρι χρώμα παρουσιάζεται η επιβίωση των φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων NTHY στα οποία έγινε υπερέκφραση της πρωτεΐνης αργοναύτης 2 (Ago2). Με μαύρο χρώμα παρουσιάζεται η επιβίωση των κυττάρων NTHY τα οποία διαμολύνθηκαν με το κενό πλασμίδιο (EV).

3.3 Η υπερέκφραση του Αργοναύτη 2 δεν επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που εκφράζονται σταθερά στον κυτταρικό πληθυσμό των φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων .

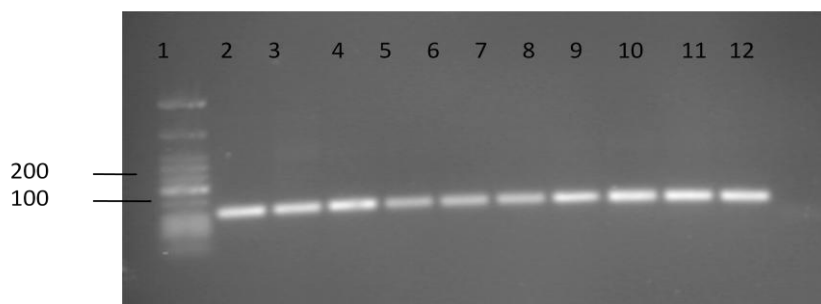
Σε φυσιολογικά θυρεοειδικά κύτταρα, δημιουργήθηκαν τρεις διαφορετικοί πληθυσμοί κυττάρων. Ο πρώτος πληθυσμός έχει προσλάβει το πλασμίδιο με το γονίδιο της πρωτεΐνης Αργοναύτη 2, στον δεύτερο πληθυσμό είχε προστεθεί το κενό πλασμίδιο ενώ ο τρίτος πληθυσμός δεν είχε τροποποιηθεί. Από αυτά τα κύτταρα μέσω της διαδικασίας της κυτταρομετρίας ροής, συλλέχθηκαν μόνο εκείνα τα οποία φθορίζουν, δηλαδή εκείνα τα οποία είχαν προσλάβει είτε το πλασμίδιο με το γονίδιο του Αργοναύτη 2 είτε το κενό πλασμίδιο. Στη συνέχεια, σε αυτούς τους κυτταρικούς

πληθυσμούς απομονώθηκε το ώριμο mRNA, με σκοπό την κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης και την μελέτη έκφρασης γονιδίων ενδιαφέροντος.

Τα πρώτα γονίδια τα οποία ελέγχθηκαν στους παραπάνω πληθυσμούς ήταν το γονίδιο GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) και το γονίδιο της Λαμίνης (LamA/C). Το γονίδιο GAPDH εμπλέκεται στον μεταβολισμό του κυττάρου, ενώ το γονίδιο της Λαμίνης συμμετέχει στην δημιουργία του κυτταροσκελετού. Η σημαντικότητα σωστής λειτουργίας των δύο παραπάνω γονιδίων στο κύτταρο, ήταν και ο λόγος που επιλέχθηκαν για τη μελέτη έκφρασης τους στους παραπάνω κυτταρικούς πληθυσμούς. Όπως φαίνεται και στις εικόνες (**Εικόνα 31** και **32**), η έκφραση και των δύο γονιδίων παραμένει σταθερή και στις τρεις διαφορετικές συνθήκες. Επομένως, η υπερέκφραση του Αργοναύτη 2 δεν φαίνεται να αλλοιώνει την έκφραση των παραπάνω γονιδίων. Επιπρόσθετα, η έκφραση είναι η ίδια και μετά την παρέλευση των 24 ωρών.



Εικόνα 31: Απεικόνιση μεταγραφικής έκφρασης του γονιδίου GAPDH, σε κυτταρικούς πληθυσμούς φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων NTHY. 1: Μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών. 2,3: NTHYAgo2, 4,5: NTHYEV, 6: NTHY, 7,8: NTHYAgo2, 9,10: NTHYEV, 11: NTHY, 12: αρνητικό δείγμα ελέγχου. Τα δείγματα 1-6 συλλέχθηκαν 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση και τα δείγματα 7-11 48 ώρες μετά.



Εικόνα 32: Απεικόνιση μεταγραφικής έκφρασης του γονιδίου Λαμίνης, σε κυτταρικούς πληθυσμούς φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων NTHY. 1: Μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών. 2,3:

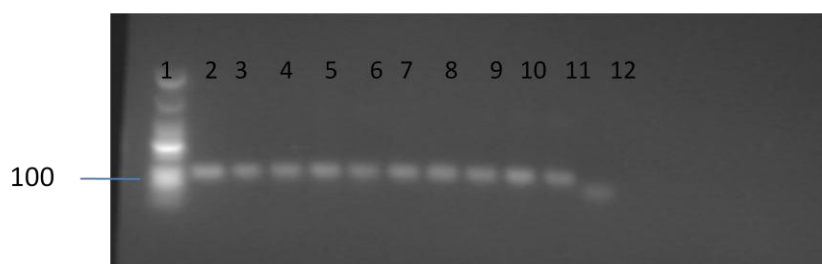
NTHYAgo2, 4,5: NTHYEV, 6:NTHY, 7,8:NTHYAgo2, 9,10: NTHYEV, 11:NTHY, 12: αρνητικό δείγμα ελέγχου. Τα δείγματα 1-6 συλλέχθηκαν 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση και τα δείγματα 7-11 48 ώρες μετά.

3.4. Η υπερέκφραση του Αργοναύτη 2 δεν επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων των υπόλοιπων αργοναυτών στον κυτταρικό πληθυσμό των φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων NTHY.

Η πρωτεΐνη Αργοναύτης 2 ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των πρωτεϊνών Αργοναυτών και συγκεκριμένα στην υποοικογένεια AGO. Στη συγκεκριμένη υποοικογένεια ανήκουν οι πρωτεΐνες AGO1, AGO2, AGO3 και AGO4. Επομένως θα πρέπει να μελετηθεί η επίδραση της εισαγωγής γονιδίου Ago2, στην έκφραση των υπόλοιπων μορίων της οικογένειας.

Όπως είναι γνωστό, οι πρωτεΐνες που ανήκουν στον κλάδο AGO εμφανίζουν αυξημένη νουκλεοτιδική ομοιότητα. Έτσι είναι δυνατή η σχεδίαση εκκινητών (primers) οι οποίοι μέσω της πειραματικής διαδικασίας της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, ενισχύουν το γονίδιο όλων των μελών του κλάδου AGO. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι συγκεκριμένοι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να ενισχύουν το χιμαιρικό γονίδιο Ago2/gfp.

Από την εικόνα (**Εικόνα 33**), φαίνεται ότι η συνολική ενδογενής έκφραση των μελών της οικογένειας των αργοναυτών, παραμένει η ίδια τόσο ανάμεσα στους τρεις διαφορετικούς πληθυσμούς, όσο και ανάμεσα στα δύο χρονικά σημεία αναφοράς. Άρα κατά πάσα πιθανότητα, μειώνεται η μεταγραφική έκφραση κάποιου άλλου μέλους με την υπερέκφραση του γονιδίου Αργοναύτης 2.



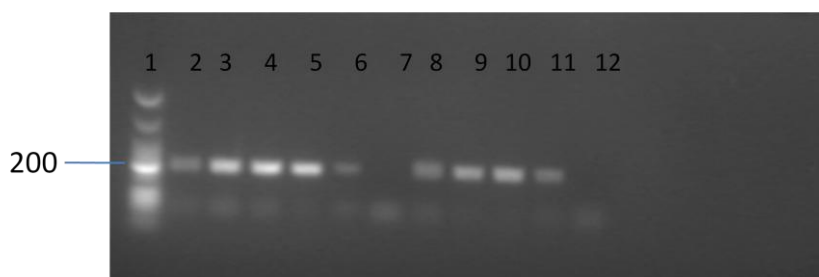
Εικόνα 33: Απεικόνιση μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων των αργοναυτών, σε κυτταρικούς πληθυσμούς φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων NTHY.1:Μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών. 2,3: NTHYAgo2, 4,5: NTHYEV, 6:NTHY, 7,8:NTHYAgo2, 9,10: NTHYEV, 11:NTHY, 12: αρνητικό

δείγμα ελέγχου. Τα δείγματα 1-6 συλλέχθηκαν 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση και τα δείγματα 7-11 48 ώρες μετά.

3.5. Η υπερέκφραση του Αργοναύτη 2 φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση της ενδογενούς πρωτεΐνης Αργοναύτη 2 στον κυτταρικό πληθυσμό των φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων.

Εφόσον από τα προηγούμενα αποτελέσματα φαίνεται ότι η υπερέκφραση του Αργοναύτη 2 δεν επηρεάζει την έκφραση των υπόλοιπων μελών της οικογένειας AGO, θα πρέπει να μελετηθεί η έκφραση του ενδογενούς Αργοναύτη 2 που παράγεται φυσιολογικά από το κύτταρο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι υβριδοποιούνται με την περιοχή 3'UTR του γονιδίου Αργοναύτη 2 και άρα δεν είναι δυνατόν να ενισχύουν και το χμαιοικό γονίδιο Ago2-gfp το οποίο εισάγεται με το πλασμίδιο.

Παρατηρείται ότι στους κυτταρικούς πληθυσμούς που χορηγήθηκε το πλασμίδιο του Αργοναύτη 2, παρουσιάζει την ίδια εικόνα με τους άλλους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς, συμπεραίνοντας έτσι ότι η ενδογενής πρωτεΐνη του συγκεκριμένου μέλους της οικογένειας των Αργοναυτών συνεχίζει να εκφράζεται (**Εικόνα 34**) και εμφανίζει πτωτική τάση. Ωστόσο επειδή η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία είναι ημιποσοτική, για την επαλήθευση του ισχυρισμού θα πρέπει να διεξαχθεί ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (quantitative PCR, q-PCR).



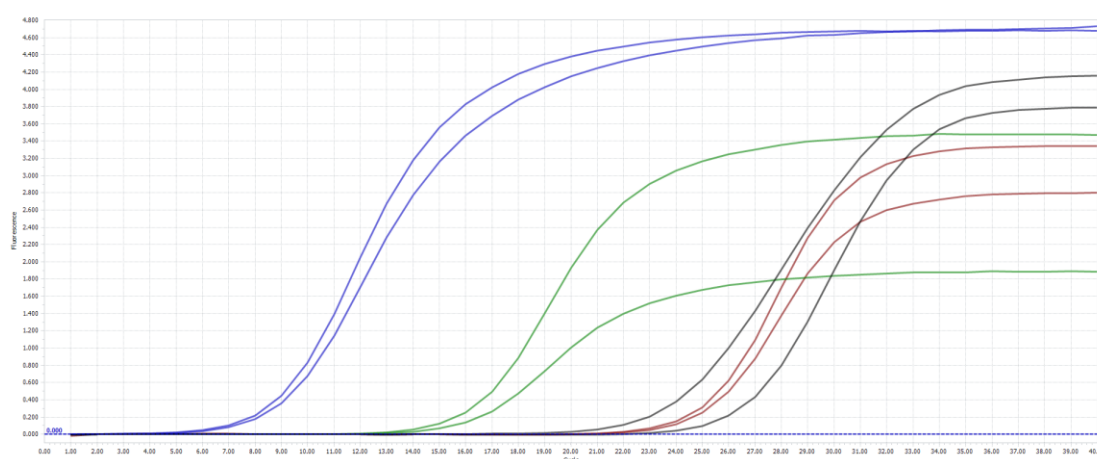
Εικόνα 34: Απεικόνιση μεταγραφικής έκφρασης της ενδογενής έκφρασης του γονιδίου Αργοναύτη 2, σε κυτταρικούς πληθυσμούς φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων NTHY.1:Μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών. 2,3: NTHYAgo2, 4,5: NTHYEV, 6:NTHY, 7: αρνητικό δείγμα ελέγχου, 8:NTHYAgo2, 9,10: NTHYEV, 11:NTHY, 12: αρνητικό δείγμα ελέγχου. Τα δείγματα 2-6 συλλέχθηκαν 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση και τα δείγματα 7-11 48 ώρες μετά.

3.5 Εντονότερο φθορισμό εμφανίζουν τα κύτταρα που δεν υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Αργοναύτη 2.

Με βάση τα αποτελέσματα της μικροσκοπίας φθορισμού, παρατηρήθηκαν αλλαγές στην ένταση του φθορισμού τόσο ανάμεσα στα δύο χρονικά σημεία αναφοράς όσο και ανάμεσα στους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς. Για το σκοπό αυτό, για την καλύτερη κατανόηση και ποσοτικό προσδιορισμό των παραπάνω αποτελεσμάτων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης q-PCR, η έκφραση της πράσινης χρωστικής E-GFP στους τρεις κυτταρικούς πληθυσμούς.

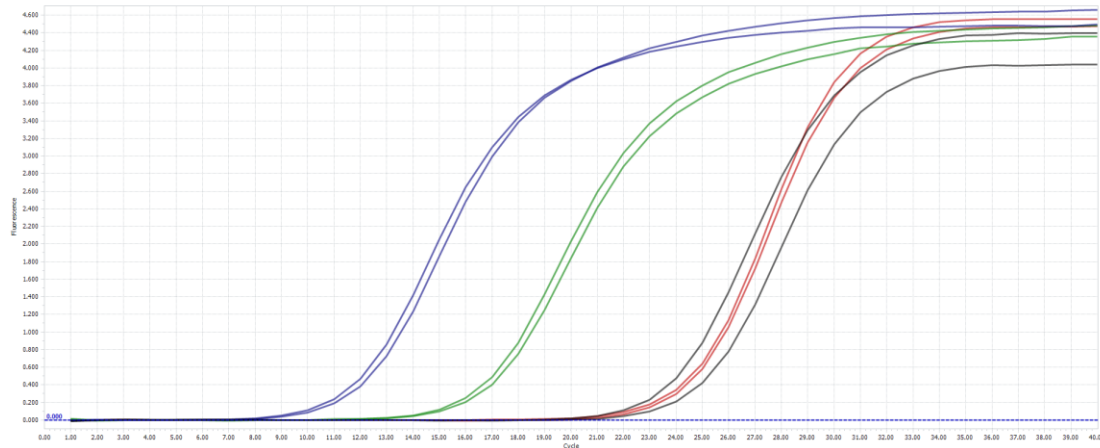
Από το διάγραμμα, φαίνεται ότι η έκφραση του E-GFP γονιδίου στα θυρεοειδικά κύτταρα στα οποία εισήχθη το κενό πλασμίδιο είναι πολύ μεγαλύτερη συγκριτικά με τον κυτταρικό πληθυσμό με το πλασμίδιο του Αργοναύτη 2, όπως ακριβώς παρατηρήθηκε σε όλες τις εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού.

Επιπλέον παρατηρείται ότι μεγαλύτερο φθορισμό εμφανίζουν το πρώτο 24ωρο τα κύτταρα με το κενό πλασμίδιο ενώ ο εντονότερος φθορισμός στα κύτταρα με το πλασμίδιο του αργοναύτη πραγματοποιείται στις 48 ώρες, το οποίο συμφωνεί με τα αποτελέσματα του μικροσκοπίου της κυτταρομετρίας φθορισμού (παράγραφος 3.1.). Φυσικά, όπως ήταν αναμενόμενο τα κύτταρα στα οποία δεν έγινε διαμόλυνση με κάποιο από τα δύο πλασμίδια, δεν εκφράζουν καθόλου την πράσινη χρωστική.

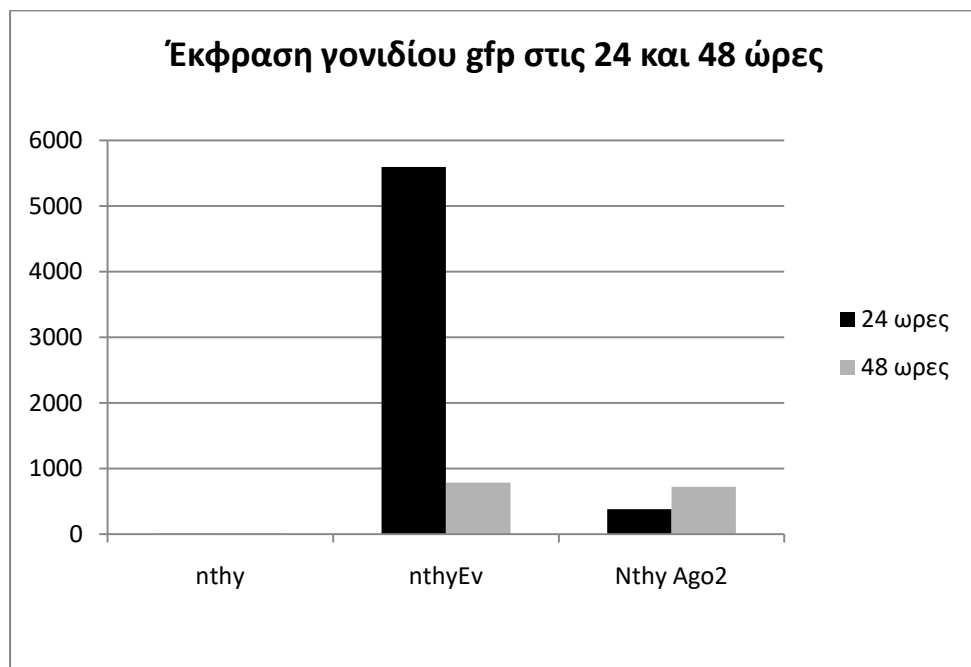


Εικόνα 35: Μεταγραφική έκφραση του γονιδίου E-GFP στους διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς, 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων. Με μπλέ απεικονίζεται η έκφραση στα κύτταρα που προσέλαβαν το κενό πλασμίδιο (EV), με πράσινο η έκφραση του GFP σε κύτταρα με το πλασμίδιο του

Αργοναύτη 2 και με μαύρο η έκφραση των κυττάρων NTHY. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται ο αρνητικός μάρτυρας.



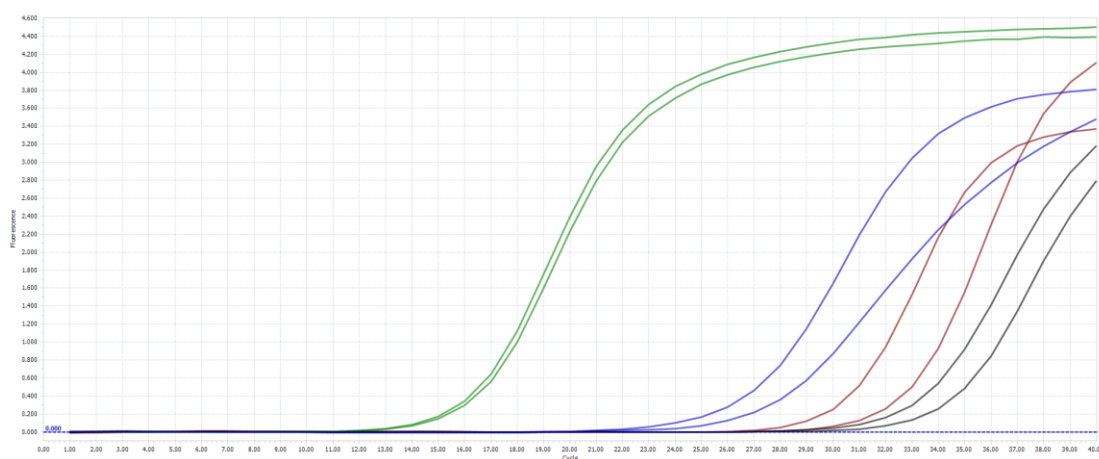
Εικόνα 36: Μεταγραφική έκφραση του γονιδίου E-GFP στους διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς, 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων. Με μπλέ απεικονίζεται η έκφραση στα κύτταρα που προσέλαβαν το κενό πλασμίδιο (EV), με πράσινο η έκφραση του GFP σε κύτταρα με το πλασμίδιο του Αργοναύτη 2 και με μαύρο η έκφραση των κυττάρων NTHY. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται ο αρνητικός μάρτυρας.



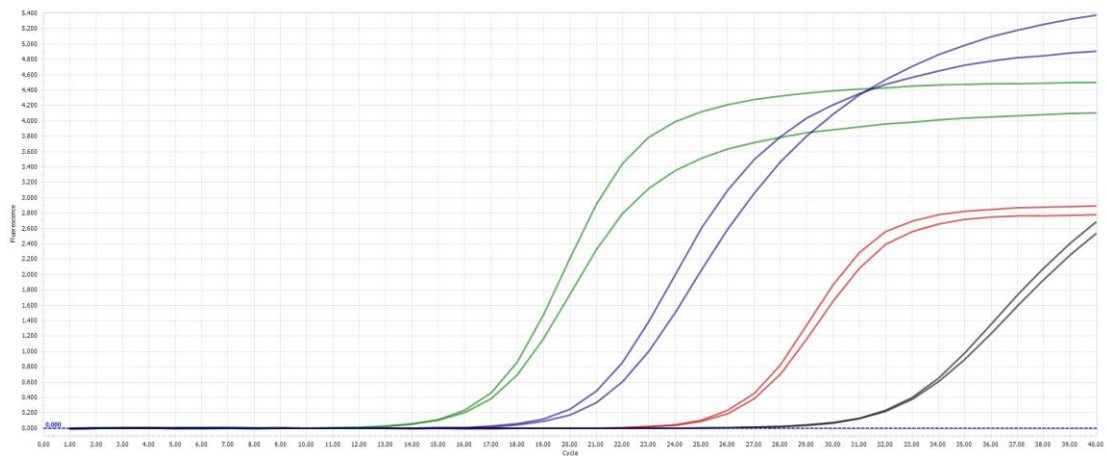
Διάγραμμα 4: Έκφραση του γονιδίου gfp στις 24 και 48 ώρες

3.6 Η μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου Ago2-gfp επιτυγχάνεται στο μέγιστο στις 48 ώρες μετά την διαμόλυνση των κυτταρικών πληθυσμών NTHY.

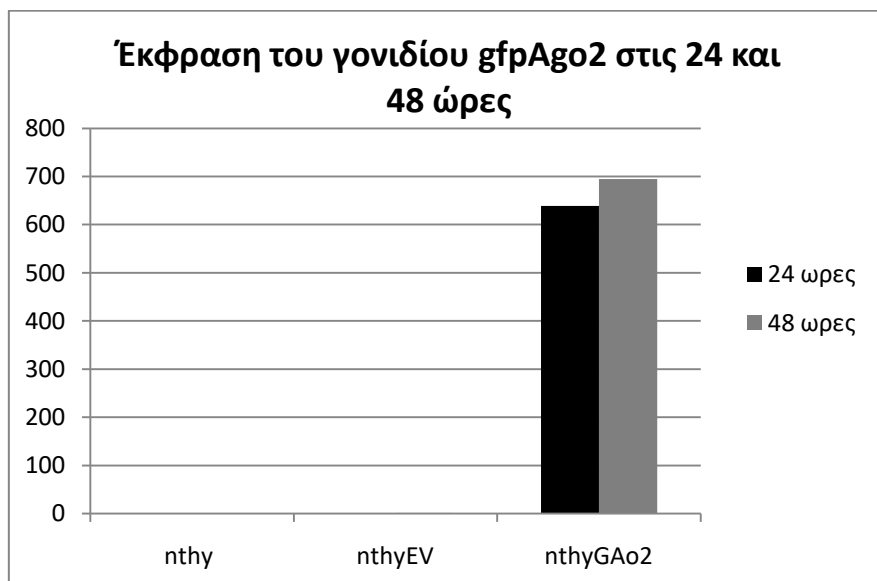
Όπως ήταν αναμενόμενο, σε φυσιολογικά θυρεοειδικά κύτταρα χωρίς πλασμιδιακό φορέα και σε ίδια κύτταρα τα οποία τροποποιήθηκαν με την εισαγωγή του κενού πλασμιδίου δεν υπάρχει έκφραση του γονιδίου gfp-Ago. Αντίθετα, υπάρχει μεγάλη έκφραση του στα θυρεοειδικά κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη Αργοναύτης 2. Επιπλέον απο το διάγραμμα φαίνεται οτι υπάρχει παρόμοια μεταγραφική δραστηριότητα στις 24 και στις 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση.



Εικόνα 37: Μεταγραφική έκφραση του χημειοειδικού γονιδίου Ago2-GFP στους διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων. Με μπλέ απεικονίζεται η έκφραση στα κύτταρα που προσέλαβαν το κενό πλασμίδιο (EV), με πράσινο η έκφραση του GFP σε κύτταρα με το πλασμίδιο του Αργοναύτη 2 και με μαύρο η έκφραση των κυττάρων NTHY. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται ο αρνητικός μάρτυρας.



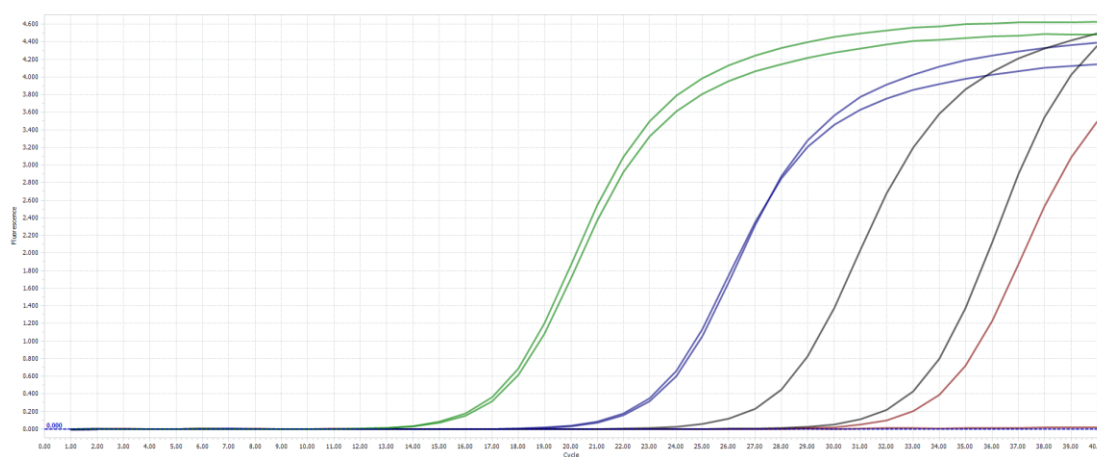
Εικόνα 38: Μεταγραφική έκφραση του χημαιρικού γονιδίου Ago2-GFP στους διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς 48 ώρες μετά την διαμόλυνση των κυττάρων. Με μπλέ απεικονίζεται η έκφραση στα κύτταρα που προσέλαβαν το κενό πλασμίδιο (EV), με πράσινο η έκφραση του GFP σε κύτταρα με το πλασμίδιο του Αργοναύτη 2 και με μαύρο η έκφραση των κυττάρων NTHY. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται ο αρνητικός μάρτυρας.



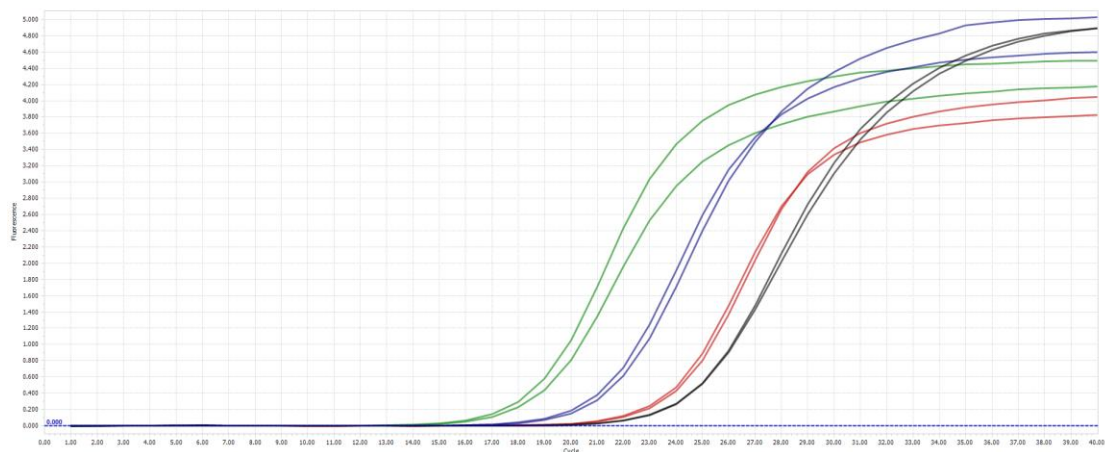
Διάγραμμα 5: Έκφραση του γονιδίου Ago2gfp στις 24 και 48 ώρες

3.7 Η μεταγραφική έκφραση των υπόλοιπων μελών της οικογένειας φαίνεται να είναι ποσοτικά μεγαλύτερη στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Ago2.

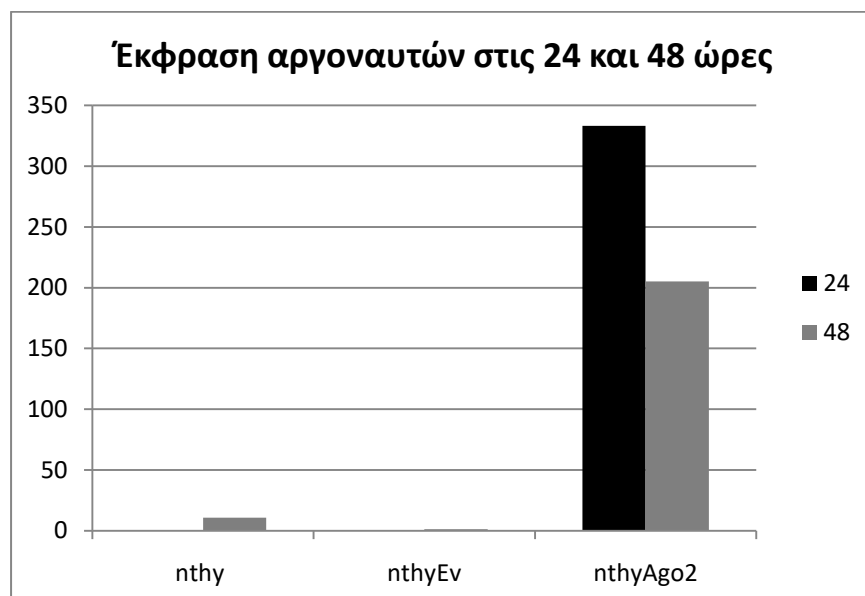
Η υπερέκφραση του αργοναύτη 2 φαίνεται να μην επηρεάζει την μεταγραφική έκφραση των υπόλοιπων μελών της ίδιας οικογένειας. Κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων Αργοναυτών παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα που προσέλεβαν το κενό πλασμίδιο έχουν μικρότερη έκφραση των υπόλοιπων πρωτεϊνικών μελών της οικογένειας των Αργοναυτών. Ενώ κύτταρα τα οποία προσέλεβαν το πλασμίδιο του Αργοναύτη 2, ή εκείνα τα οποία δεν τροποποιήθηκαν καθόλου εκφράζουν σε μεγαλύτερο βαθμό τα συγκεκριμένα γονίδια, με τα πρώτα να εμφανίζουν την μεγαλύτερη έκφραση. Επίσης, ενώ τα κύτταρα τα οποία δεν τροποποιήθηκαν με πλασμίδιο εμφανίζουν αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα των μελών του κλάδου Ago μέσα στο πρώτο εικοσιτετράωρο, ενώ το αντίθετο συμβαίνει σε εκείνα που προσελαβαν το πλασμίδιο του Αργοναύτη 2. Τα κύτταρα με το κενό πλασμίδιο δεν εμφανίζουν διαφορά στην έκφραση του mRNA των αργοναυτών ανάμεσα στα δύο χρονικά σημεία.



Εικόνα 39: Μεταγραφική έκφραση των γονιδίων της οικογένειας των Αργοναυτών, στους διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων. Με μπλέ απεικονίζεται η έκφραση στα κύτταρα που προσέλαβαν το κενό πλασμίδιο (EV), με πράσινο η έκφραση του GFP σε κύτταρα με το πλασμίδιο του Αργοναύτη 2 και με μαύρο η έκφραση των κυττάρων NTHY. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται ο αρνητικός μάρτυρας.



Εικόνα 40: Μεταγραφική έκφραση των γονιδίων των Αργοναυτών στους διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων. Με μπλέ απεικονίζεται η έκφραση στα κύτταρα που προσέλαβαν το κενό πλασμίδιο (EV), με πράσινο η έκφραση του GFP σε κύτταρα με το πλασμίδιο του Αργοναυτή 2 και με μαύρο η έκφραση των κυττάρων NTHY. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται ο αρνητικός μάρτυρας.



Διάγραμμα 6: Έκφραση των γονιδίων των Αργοναυτών στις 24 και 48 ώρες.

4.Συζήτηση

Η οικογένεια των Αργοναυτών διαιρείται σε τρεις υποοικογένειες, την **υποοικογένεια AGO**, την **υποοικογένεια PIWI** (P element induced wimpy testis), και την πρόσφατη **υποοικογένεια Αργοναύτη 3**. Οι πρωτεΐνες Αργοναύτες εμφανίζουν υψηλή νουκλεοτιδική ομοιότητα και όλα τα μέλη τους έχουν χαρακτηριστική δίλοβη δομή. Ο ένας λοβός συγκροτείται από τις επικράτειες N-PAZ και ο άλλος από τις MID-PIWI. Οι πρωτεΐνες της συγκεκριμένης οικογένειας φαίνεται να εμπλέκονται σε πολλές διαδικασίες του κυττάρου, λόγω της ύπαρξης μίας ειδικής περιοχής στο μόριο τους, η οποία αποτελεί θέση πρόσδεσης μικρών μορίων RNAs. Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει τον καθοριστικό ρόλο των πρωτεϊνών Αργοναυτών στην βιογένεση των microRNAs, small interference RNAs και piwi-interacting RNAs. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες Αργοναύτες συμμετέχουν στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων, προσδένοντας μόρια mRNA, με σκοπό την καταστροφή τους ή την αναστολή της μετάφρασής τους. Πλέον είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες Αργοναύτες έχουν την δυνατότητα να καταστείλουν την έκφραση γονιδίων και ως εκ τούτου, είναι δυνατόν να επηρεάσουν την μετέπειτα πορεία του κυττάρου ή ολόκληρου του οργανισμού. Δεν είναι τυχαίο ότι πολλές διαταραχές της υγείας (νεοπλασίες, διαταραχές ανοσοποιητικού) συνδέονται άμεσα με τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες.

Από την οικογένεια των αργοναυτών, η πρωτεΐνη Αργοναύτης 2, στα θηλαστικά, διαθέτει καταλυτική υπομονάδα εξαιτίας του ιδιαίτερου μοτίβου Asp597-Asp669-His807 που εμφανίζει στη δομή της. Επιπλέον, ως μέλος του συμπλόκου RISC, εμπλέκεται άμεσα στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση αρκετών γονιδίων. Σε πολλούς κυτταρικούς τύπους έχει αποδειχθεί ότι διαταραχές στην έκφραση της πρωτεΐνης του Αργοναύτη 2 μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση νεοπλασίας. Υπάρχουν πολλοί κυτταρικοί τύποι στους οποίους η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι υπερεκφρασμένη, όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου, της οροδόχου κύστης ή των ωοθηκών. Υπάρχουν όμως άλλοι τύποι κυττάρων στους οποίους η συγκεκριμένη πρωτεΐνη έχει χαμηλά επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης, όπως συμβαίνει στο μελάνωμα. Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι δεν διακρίνεται κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο στην έκφραση του Αργοναύτη 2 και τις διαταραχές στην υγεία.

Στόχος της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη της επίδρασης που έχει η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2 στον φαινότυπο των φυσιολογικών κυττάρων. Για τον σκοπό αυτό, υπερέκφραση της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2 πραγματοποιήθηκε μέσω διαμόλυνσης φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων NTHY

με πλασμιδιακό φορέα έκφρασης AGO2-GFP ή GFP. Αρχικά, μέσω της μικροσκοπίας φθορισμού, φάνηκε ότι τα κύτταρα εκφράζουν περισσότερο την χημεική πρωτεΐνη 48 ώρες μετά την διαμόλυνση των κυττάρων NTHY και ότι λιγότερα κύτταρα φθορίζουν μετά από μεταμόλυνση με το πλασμίδιο AGO2-GFP συγκριτικά με το αντίστοιχο GFP. Με τη βοήθεια της πειραματικής διαδικασίας κυτταρομετρία ροής επιβεβαιώθηκε ότι ο αριθμός των κυττάρων που εκφράζουν την υβριδική πρωτεΐνη Αργοναύτης 2-GFP είναι μικρότερος συγκριτικά με το πλήθος των κυττάρων στα οποία προστέθηκε ο πλασμιδιακός φορέας GFP. Από την κυτταρομετρία ροής απομονώθηκαν και συλλέχθηκαν τα κύτταρα τα οποία εμφάνιζαν φθορισμό και άρα είναι εκείνα τα οποία εκφράζουν τις πρωτεΐνες Ago2-GFP και GFP, αντίστοιχα.

Στους συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς μελετήθηκε η μεταγραφική έκφραση γονιδίων ενδιαφέροντος, μέσω της δοκιμασίας αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Ago2 φαίνεται να μην επηρεάζει την συνολική μεταγραφική έκφραση των γονιδίων ελέγχου **LamA/C** και **GAPDH**, γονίδια τα οποία είναι σημαντικά για τη λειτουργία του κυττάρου.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία με στόχο τη μελέτη μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων των **υπόλοιπων μελών** της υποοικογένειας του Αργοναύτη 2. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι πιθανότατα υπάρχει μηχανισμός ο οποίος μειώνει την ενδογενή έκφραση των μετάγραφων των υπόλοιπων μελών της υποοικογένειας AGO. Το γεγονός αυτό μπορεί να λειτουργεί ως μηχανισμός άμυνας του κυττάρου, έτσι ώστε να διαφύγει την τοξική δράση της υπέρμετρης έκφρασης του Αργοναύτη 2. Η συγκεκριμένη παρατήρηση ενισχύεται και από το γεγονός ότι η **ενδογενή** μεταγραφική έκφραση του **Αργοναύτη 2** εμφανίζει πτωτική τάση στα κύτταρα που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο του Αργοναύτη 2. Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι η παραπάνω μέθοδος είναι ημιποσοτική και γι αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε περαιτέρω διερεύνηση μέσω της μεθοδολογίας q-PCR.

Ένα από τα πρώτα γονίδια τα οποία ελέγχθηκαν ποσοτικά είναι το γονίδιο της πράσινης χρωστικής **GFP**. Όπως ήταν αναμενόμενο, παραγωγή μετάγραφων παρατηρήθηκε μόνο στους κυτταρικούς πληθυσμούς NTHY-EV και NTHY-Ago2. Επιπλέον, η μεταγραφική έκφραση του γονιδίου GFP είναι μεγαλύτερη στον

κυτταρικό πληθυσμό που προσέλαβε το κενό πλασμίδιο συγκριτικά με τους άλλους δύο πληθυσμούς. Εν συνεχεία, μελετήθηκε η έκφραση του υβριδικού μετάγραφου **Ago2-GFP**. Μόνο τα κύτταρα που προσέλαβαν το πλασμίδιο του Αργοναύτη 2 εκφράζουν το συγκεκριμένο μετάγραφο του οποίου η έκφραση, ανάμεσα στα δύο εικοσιτετράωρα, είναι παρόμοια.

Ακόμα, από τη μελέτη έκφρασης των μετάγραφων των υπόλοιπων μελών της οικογένειας του Αργοναύτη 2, έδειξαν ότι υπάρχει διαφοροποίηση ανάμεσα στους κυτταρικούς πληθυσμούς. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει ελάχιστη παραγωγή μεταγράφων στα κύτταρα που δεν μεταμολύνθηκαν με κάποιο πλασμίδιο και σε εκείνα που μεταμολύνθηκαν με το κενό πλασμίδιο, ενώ στα κύτταρα που προσέλαβαν τον Αργοναύτη 2, η έκφραση των συγκεκριμένων μετάγραφων είναι μεγαλύτερη. Αυτό συμβαίνει καθώς ενισχύεται και το γονίδιο του πλασμιδίου. Ωστόσο παρατηρείται μείωση των μετάγραφων κατά το δεύτερο εικοσιτετράωρο, πιθανότατα για να καταφέρει να ανταπεξέλθει το κύτταρο στην τεράστια παραγωγή των μεταγράφων του Αργοναύτη 2.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η υπερέκφραση του Αργοναύτη 2, προκαλεί δυσάρεστες συνέπειες στο κύτταρο, το οποίο για να καταφέρει να ξεφύγει από αυτές, μειώνει την έκφραση των υπόλοιπων μελών. Η τοξική δράση του μορίου Ago2 επιβεβαιώθηκε με την πειραματική διαδικασία MTT, καθώς ο πληθυσμός των κυττάρων που διαμολύνθηκαν με το κενό πλασμίδιο είναι μεγαλύτερος συγκριτικά με τα κύτταρα που προσέλαβαν το πλασμίδιο του Αργοναύτη 2. Επίσης, μεγαλύτερη διαφορά ανάμεσα στους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς εμφανίζεται στις 72 ώρες.

Ωστόσο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περαιτέρω διερεύνηση της συγκεκριμένης τοξικής δράσης του Αργοναύτη μέσω της δοκιμασίας κυτταρομετρίας ροής και τη συλλογή των κυττάρων με σκοπό την μετέπειτα αλληλούχιση. Έτσι είναι δυνατή η εύρεση όλων των πιθανών μορίων ή πιθανών μηχανισμών που εμπλέκονται με το συγκεκριμένο μόριο. Επιπλέον, θα πρέπει να αποσαφηνιστεί αν η τοξική δράση που προκαλείται, οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση ή νέκρωση. Επίσης, είναι δυνατή η παρατήρηση των κυτταρικών πληθυσμών που περιγράφηκαν στην παρούσα εργασία με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού, έτσι ώστε να αποσαφηνιστεί η δράση της πρωτεΐνης Αργοναύτης 2 στην κυτταρική δομή. Τέλος, θα μπορούσε να μελετηθεί η

επίδραση της υποέκφρασης ή σίγαση του συγκεκριμένου γονιδίου αλλά και των υπόλοιπων μελών της οικογένειας.

5.Βιβλιογραφία

5.1 Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Bohmert, K. (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *The EMBO Journal*, 17(1), pp.170-180.
2. Carmell, M. (2002). The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes & Development*, 16(21), pp.2733-2742.
3. Yigit, E., Batista, P., Bei, Y., Pang, K., Chen, C., Tolia, N., Joshua-Tor, L., Mitani, S., Simard, M. and Mello, C. (2006). Analysis of the C. elegans Argonaute Family Reveals that Distinct Argonautes Act Sequentially during RNAi. *Cell*, 127(4), pp.747-757.
4. Wei, K., Wu, L., Chen, Y., Lin, Y., Wang, Y., Liu, X. and Xie, D. (2019). Argonaute protein as a linker to command center of physiological processes. [online] Cjcr.amegroups.com. Available at: <http://cjcr.amegroups.com/article/view/2535/3451>.
5. Song, J. (2004). Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity. *Science*, 305(5689), pp.1434-1437.
6. Sasaki, H. and Tomari, Y. (2012). The true core of RNA silencing revealed. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(7), pp.657-660.
7. Poulsen, C., Vaucheret, H. and Brodersen, P. (2013). Lessons on RNA Silencing Mechanisms in Plants from Eukaryotic Argonaute Structures. *The Plant Cell*, 25(1), pp.22-37.
8. SONG, J. and JOSHUA-TOR, L. (2006). Argonaute and RNA — getting into the groove. *Current Opinion in Structural Biology*, 16(1), pp.5-11.
9. Boland, A., Tritschler, F., Heimstädt, S., Izaurralde, E. and Weichenrieder, O. (2010). Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein. *EMBO reports*, 11(7), pp.522-527.
10. Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G. and Qi, Y. (2008). Sorting of Small RNAs into Arabidopsis Argonaute Complexes Is Directed by the 5' Terminal Nucleotide. *Cell*, 133(1), pp.116-127.

11. Cerutti, L., Mian, N. and Bateman, A. (2000). Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(10), pp.481-482.
12. Liu, J. (2004). Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *Science*, 305(5689), pp.1437-1441.
13. Swarts, D., Makarova, K., Wang, Y., Nakanishi, K., Ketting, R., Koonin, E., Patel, D. and van der Oost, J. (2014). The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(9), pp.743-753.
14. Mcmanuslab.ucsf.edu. (2019). *Piwi-Interacting RNA | McManus Lab*. [online] Available at: <https://mcmanuslab.ucsf.edu/node/266>.
15. Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Tuschl, T. and Patel, D. (2008). Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature*, 456(7224), pp.921-926.
16. Lee, R., Feinbaum, R. and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), pp.843-854.
17. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K., Lee, S., Baek, S. and Kim, V. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20), pp.4051-4060.
18. CAI, X. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10(12), pp.1957-1966.
19. Dudzic, E., Miah, S., Choudhry, H., Owen, H., Blizard, S., Glover, M., Hamdy, F. and Catto, J. (2010). Hypermethylation of CpG Islands and Shores around Specific MicroRNAs and Mirtrons Is Associated with the Phenotype and Presence of Bladder Cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(6), pp.1287-1296.
20. Westholm, J. and Lai, E. (2011). Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie*, 93(11), pp.1897-1904.
21. Ender, C., Krek, A., Friedländer, M., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N. and Meister, G. (2008). A Human snoRNA with MicroRNA-Like Functions. *Molecular Cell*, 32(4), pp.519-528.
22. Han, J. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development*, 18(24), pp.3016-3027.

23. Guo, F. (2012). Drosha and DGCR8 in MicroRNA Biogenesis. *Eukaryotic RNases and their Partners in RNA Degradation and Biogenesis, Part B*, pp.101-121.
24. Wu, K., He, J., Pu, W. and Peng, Y. (2018). The Role of Exportin-5 in MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 16(2), pp.120-126.
25. Kawamata, T. and Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(7), pp.368-376.
26. Bartel, D. (2004). MicroRNAs. *Cell*, 116(2), pp.281-297.
27. Pathak, K. and Gogoi, B. (2016). RNA interference (RNAi): Application in crop improvement: A review. *Agricultural Reviews*, 37(3).
28. Reactome.org. (2019). *Reactome | Small interfering RNA (siRNA) biogenesis*. [online] Available at: <https://reactome.org/content/detail/R-HSA-426486>.
29. Tomari, Y. (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes & Development*, 19(5), pp.517-529.
30. Abcam.com. (2019). *RNA interference overview | Abcam*. [online] Available at: <https://www.abcam.com/pathways/rna-interference---a-comprehensive-overview> [Accessed 24 Sep. 2019].
31. Yamanaka, S., Siomi, M. and Siomi, H. (2014). piRNA clusters and open chromatin structure. *Mobile DNA*, 5(1), p.22.
32. Jinek, M. and Doudna, J. (2008). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 457(7228), pp.405-412.
33. Jakymiw, A., Pauley, K., Li, S., Ikeda, K., Lian, S., Eystathiou, T., Satoh, M., Fritzler, M. and Chan, E. (2007). The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing. *Journal of Cell Science*, 120(9), pp.1702-1702.
34. Muetze, J., Ohrt, T., Staroske, W., Crell, K. and Schwille, P. (2009). Nuclear RISC Originates from Cytoplasmic Loaded RISC in Human Cells. *Biophysical Journal*, 96(3), p.63a.
35. Kian, R., Moradi, S. and Ghorbian, S. (2018). ROLE OF COMPONENTS OF microRNA MACHINERY IN CARCINOGENESIS. *Experimental Oncology*, 40(1), pp.2-9.
36. Database, G. (2019). *AGO2 Gene - GeneCards | AGO2 Protein | AGO2 Antibody*. [online] Genecards.org. Available at: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AGO2>.

37. Wei Li, H. (2019). *Evaluation of Argonaute protein as a predictive marker for human clear cell renal cell carcinoma*. [online] PubMed Central (PMC). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3657361/>
38. Jin, P., Zarnescu, D., Ceman, S., Nakamoto, M., Mowrey, J., Jongens, T., Nelson, D., Moses, K. and Warren, S. (2004). Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nature Neuroscience*, 7(2), pp.113-117.
39. Jakymiw, A., Ikeda, K., Fritzler, M., Reeves, W., Satoh, M. and Chan, E. (2006). *Arthritis Research & Therapy*, 8(4), p.R87.
40. Harvey, J., Lewsey, M., Patel, K., Westwood, J., Heimstädt, S., Carr, J. and Baulcombe, D. (2011). An Antiviral Defense Role of AGO2 in Plants. *PLoS ONE*, 6(1), p.e14639.
41. Proteinatlas.org. (2019). *Expression of AGO1 in cancer - Summary - The Human Protein Atlas*. [online] Available at: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000092847-AGO1/pathology>.
42. Proteinatlas.org. (2019). *Expression of AGO2 in cancer - Summary - The Human Protein Atlas*. [online] Available at: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000123908-AGO2/pathology>
43. Schirle, N. and MacRae, I. (2012). The Crystal Structure of Human Argonaute2. *Science*, 336(6084), pp.1037-1040.
44. Kwak, P. and Tomari, Y. (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(2), pp.145-151.
45. Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. and Sattler, M. (2003). Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*, 426(6965), pp.465-469.
46. Frank, F., Fabian, M., Stepinski, J., Jemielity, J., Darzynkiewicz, E., Sonenberg, N. and Nagar, B. (2011). Structural analysis of 5'-mRNA-cap interactions with the human AGO2 MID domain. *EMBO reports*, 12(5), pp.415-420.
47. Bioinformatics, C. (2019). [online] Nextprot.org. Available at: https://www.nextprot.org/entry/NX_Q9UKV8/.
48. Stefani, G. and Slack, F. (2008). Small non-coding RNAs in animal development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), pp.219-230.

49. Sacco, L. and Masotti, A. (2012). Recent Insights and Novel Bioinformatics Tools to Understand the Role of MicroRNAs Binding to 5' Untranslated Region. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), pp.480-495.
50. Moshkovich, N., Nisha, P., Boyle, P., Thompson, B., Dale, R. and Lei, E. (2011). RNAi-independent role for Argonaute2 in CTCF/CP190 chromatin insulator function. *Genes & Development*, 25(16), pp.1686-1701.
51. Zhang, Z., Zhang, G., Kong, C., Bi, J., Gong, D., Yu, X., Shi, D., Zhan, B. and Ye, P. (2015). EIF2C, Dicer, and Drosha are up-regulated along tumor progression and associated with poor prognosis in bladder carcinoma. *Tumor Biology*, 36(7), pp.5071-5079.
52. Li, L., Yu, C., Gao, H. and Li, Y. (2010). Argonaute proteins: potential biomarkers for human colon cancer. *BMC Cancer*, 10(1).
53. Vaksman, O., Hetland, T., Trope', C., Reich, R. and Davidson, B. (2012). Argonaute, Dicer, and Drosha are up-regulated along tumor progression in serous ovarian carcinoma. *Human Pathology*, 43(11), pp.2062-2069.
54. Völler, D., Reinders, J., Meister, G. and Bosserhoff, A. (2013). Strong reduction of AGO2 expression in melanoma and cellular consequences. *British Journal of Cancer*, 109(12), pp.3116-3124.
55. Ye, Z., Jin, H. and Qian, Q. (2015). Argonaute 2: A Novel Rising Star in Cancer Research. *Journal of Cancer*, 6(9), pp.877-882.