



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ
ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ

ΙΔΡΥΜΑ
ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ
ΑΘΗΝΩΝ



Ο Ρόλος των Νευρωνικών microRNAs στην Ομοιόσταση του Ασβεστίου

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
“ΜΟΡΙΑΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ”

Διπλωματική Εργασία

ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΥΣ ΧΡΥΣΑΝΘΗ -20120666-

Σεπτέμβριος 2015



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ
ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ

ΙΔΡΥΜΑ
ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ
ΑΘΗΝΩΝ



Ο Ρόλος των Νευρωνικών microRNAs στην Ομοιόσταση του Ασβεστίου

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
“ΜΟΡΙΑΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ”

Διπλωματική Εργασία
Χαραλάμπους Χρυσάνθη -20120666-

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Επιβλέπουσα: Παπαζαφείρη Παναγιώτα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Φυσιολογίας Ζώων, τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μέλος/Συνεπιβλέπων: Δοξάκης Επαμεινώνδας, Ερευνητής Δ', τομέας
Βασικής Έρευνας Ι, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας
Αθηνών

Μέλος: Γκάγκος Σαράντης, Ερευνητής Β', τομέας Βασικής Έρευνας ΙΙ,
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Τόπος Διεξαγωγής Έρευνας:

Εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Νευροβιολογίας, τομέας Βασικής
Έρευνας Ι, ΙΙΒΕΑΑ

Εργαστήριο Ζωολογίας, τομέας Θαλάσσιας Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Σεπτέμβριος 2015

Στην οικογένειά μου...

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στη δημιουργική προσπάθεια του ανθρώπου, στο χώρο της ύλης και του πνεύματος, σπουδαίο ρόλο κατείχε και κατέχει η έρευνα. Όμως, έρευνα δε νοείται δίχως συνεργασία. Προϊόν αυτής της έρευνας-συνεργασίας, είναι η παρούσα διπλωματική εργασία, με θέμα «Ο Ρόλος των Νευρωνικών microRNAs στην ομοιόσταση του Ασβεστίου», που εκπονήθηκε στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΒΕΑΑ), σε συνεργασία με το τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ). Επιβλέπουσα της Τριμελούς Επιτροπής ορίστηκε η κα. Παπαζαγείρη Παναγιώτα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ζώων, του τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ. Με την ξεχωριστή παρουσία της και την εύστοχη καθοδήγησή της, μας βοήθησε ενεργά στην πορεία των πειραμάτων. Μέλη της Επιτροπής ορίστηκαν ο κ. Δοξάκης Επαμεινώνδας, Ερευνητής Δ΄ του εργαστηρίου Μοριακής και Κυτταρικής Νευροβιολογίας του κέντρου Βασικής Έρευνας Ι του ΙΒΕΑΑ, όπου πραγματοποιήθηκε το μεγαλύτερο μέρος των πειραμάτων, και ο κ. Γκάγκος Σαράντης, Ερευνητής Β΄ του εργαστηρίου Γενετικής και Γονιδιακής Θεραπείας, του Κέντρου Βασικής Έρευνας ΙΙ του ΙΒΕΑΑ. Είχα την τιμή να συνεργαστώ με την Επιτροπή και να δεχθώ την εύστοχη καθοδήγησή τους, πράγμα που δεν μου αφήνει περιθώρια από το να τους ευχαριστήσω θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσαν, ώστε να γνωρίσω μια πτυχή του τομέα της έρευνας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ντέντο Σκαρλάτο, Επίκουρο Καθηγητή Ζωολογίας του τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ, καθώς και τον Ζαχαριάδη Μιχάλη, Μεταδιδακτορικό Ερευνητή, για την πολύτιμη βοήθειά τους και την συνεργασία τους για την εκπόνηση μιας σειράς πειραμάτων στο εργαστήριό τους.

Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου την υποψήφια διδάκτορα Πάσχου Μαρία και την Παντελέλη Έφη, για την αμέριστη βοήθειά τους και την συνεργασία που είχαμε στο παρόν θέμα έρευνας. Επιπλέον, ευχαριστώ την Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Φραγκούλη Αποστολία, και τις υποψήφιες διδάκτορες Γουρδομιχάλη Όλγα και Κουκουράκη Πελαγία, που με τις φιλικές τους προθέσεις με εμπιστεύτηκαν και με στήριξαν στην προσπάθειά μου.

Κλείνοντας, θέλω να ευχαριστήσω από καρδιάς την οικογένειά μου, που μου δίνει τη δύναμη και τη δυνατότητα, να κάνω τα όνειρά μου πραγματικότητα, καθώς και τους φίλους μου, που αποτελούν πηγή έμπνευσης και αισιοδοξίας στη ζωή μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1 Χημικό στοιχείο Ασβεστίου	11
<i>1.1.1 Ομοιόσταση Ασβεστίου</i>	12
<i>1.1.2 Κινητικότητα ιόντων Ca^{2+}</i>	13
<u>1.1.2.1 Κυτταροπλασματική μεμβράνη</u>	13
<u>1.1.2.2 Ενδοπλασματικό Δίκτυο</u>	15
<u>1.1.2.3 Ασβέστιο-εξαρτώμενες Πρωτεΐνες</u>	17
<i>1.1.3 Ασβέστιο και Κυτταρικές Λειτουργίες</i>	18
<i>1.1.4 Το Ασβέστιο στο Νευρικό Σύστημα</i>	22
<i>1.1.5 Ασθένειες και Διαταραχές της Ομοιόστασης του Ασβεστίου</i>	23
1.2 microRNAs	26
<i>1.2.1 Βιογένεση των microRNAs</i>	27
<u>1.2.1.1 Πυρήνας</u>	27
<u>1.2.1.2 Κυτταρόπλασμα</u>	29
<i>1.2.2 Τρόπος δράσης των microRNAs</i>	30
<i>1.2.3 microRNAs και Κυτταρικές Λειτουργίες</i>	34
<u>1.2.3.1 Τα microRNAs στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των οργανισμών</u>	34
<u>1.2.3.2 Τα microRNAs στο Νευρικό Σύστημα</u>	35
1.3 Σκοπός	36
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση	37
2.2 Πειραματικό υλικό	37
<i>2.2.1 Κυτταρικές σειρές</i>	37
<i>2.2.2 Φορείς κλωνοποίησης</i>	38
2.3 Κατασκευή των φορέων κλωνοποίησης	44
<i>2.3.1 Κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα ψ-CHECKTM2-3'-UTR των γονιδίων <i>Ryr-1</i>, <i>Ryr-2</i>, <i>Ryr-3</i>, <i>Ip_{3r}-1</i>, <i>Ip_{3r}-2</i> και <i>Ip_{3r}-3</i></i>	44
<u>2.3.1.1 Απομόνωση του τμήματος DNA των 3'-UTRs των γονιδίων <i>Ryr-1</i>, <i>Ryr-2</i>, <i>Ryr-3</i>, <i>Ip_{3r}-1</i>, <i>Ip_{3r}-2</i> και <i>Ip_{3r}-3</i></u>	44

<u>2.3.1.2 Πέψη του προϊόντος PCR με περιοριστικά ένζυμα</u>	45
<u>2.3.1.3 Οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης</u>	45
<u>2.3.1.4 Καθαρισμός προϊόντος PCR</u>	46
<u>2.3.1.5 Εισαγωγή των 3'-UTRs στον πλασμιδιακό φορέα psi-CHECKTM2</u>	46
<i>2.3.2 Κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα</i>	
<i>pcDNATM6.2-GW/DsRed-Express-miR</i>	47
<u>2.3.2.1 Απομόνωση του τμήματος DNA του γονιδίου DsRed-Express</u>	47
<u>2.3.2.2 Απομάκρυνση του τμήματος DNA του γονιδίου EmGFP από τον πλασμιδιακό φορέα pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR</u>	47
<u>2.3.2.3 Εισαγωγή του τμήματος DNA του γονιδίου DsRed-Express στον πλασμιδιακό φορέα pcDNATM6.2-GW/miR</u>	48
2.4 Κλωνοποίηση	49
<i>2.4.1 Παραγωγή δεκτικών κυττάρων για την εισαγωγή πλασμιδίων</i>	49
<i>2.4.2 Μετασχηματισμός κυττάρων</i>	50
<i>2.4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε αποικία (Colony PCR)</i>	50
<i>2.4.4 Καλλιέργεια βακτηρίων</i>	50
<i>2.4.5 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακών φορέων (miniprep)</i>	51
<i>2.4.6 Μεσαίας κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακών φορέων (midiprep)</i>	51
2.5 Διαμόλυνση	52
<i>2.5.1 Διαμόλυνση των κυττάρων HEK-293 με τους φορείς psi-CHECKTM2 και pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR</i>	53
<i>2.5.2 Διαμόλυνση των κυττάρων SK-N-SH και HEK-293 με τους φορείς pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR ή pcDNATM6.2-GW/DsRed-Express-miR</i>	53
2.6 Ανάλυση με τη μέθοδο της Λουσιφεράσης	54
2.7 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)	55
<i>2.7.1 Απομόνωση RNA</i>	55
<i>2.7.2 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT)</i>	56
<i>2.7.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)</i>	57
<i>2.7.4 Κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου</i>	57
2.8 Μέτρηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου με τη μέθοδο της Aequorin	58
2.9 Μέτρηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου με τη μέθοδο της απεικόνισης ιόντων ασβεστίου (Calcium Imaging)	60

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	62
3.1 Οι 3'-UTRs των <i>Ryrs</i> και <i>Ip3rs</i> mRNAs αποτελούν στόχο για microRNAs	62
3.2 Μελέτη της έκφρασης των ενδογενών επιπέδων <i>Ryr-1</i>, <i>Ryr-2</i>, <i>Ryr-3</i> και <i>Ip3r-3</i> mRNAs σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές	66
3.3 Η επιρροή των miRs στη συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} του κυτταροπλάσματος	68
3.3.1 Μέθοδος <i>Aequorin</i>	68
3.3.2 Μέθοδος Απεικόνισης Ιόντων Ασβεστίου (<i>Calcium Imaging</i>)	72
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	80
4.1 Συμπεράσματα	80
4.2 Μελλοντικοί στόχοι	83
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	85

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ασβέστιο (Calcium, Ca^{2+}) αποτελεί το 5^ο σε αφθονία στοιχείο της μάζας του φλοιού της Γης. Στα κύτταρα των οργανισμών παρατηρείται μεγάλη διακύμανση στις συγκεντρώσεις των ιόντων Ca^{2+} , η κινητικότητα των οποίων καθοδηγείται είτε από τις ενδοκυττάρια αποθήκες Ca^{2+} , όπως είναι το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια, είτε από τον εξωκυττάριο χώρο. Η μετακίνηση των ιόντων Ca^{2+} στο κύτταρο γίνεται μέσω διαμεμβρανικών διαύλων και αντλιών, τόσο της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, όσο και της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου, αλλά και μέσω ασβεστιο-εξαρτώμενων πρωτεϊνών. Η παρουσία των ιόντων Ca^{2+} κρίνεται απαραίτητη κατά την γονιμοποίηση, την περίοδο ανάπτυξης στην παιδική και εφηβική ηλικία, αλλά είναι επίσης σημαντική σε όλη τη διάρκεια της ζωής μας για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού.

Τα microRNAs (ή miRs) είναι μικρά μονόκλωνα ριβονουκλεϊκά οξέα, περίπου 22 νουκλεοτιδίων, και εντοπίζονται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Κωδικοποιούνται από γονίδια ή εσόνια γονιδίων, αλλά σε αντίθεση με τα περισσότερα γονίδια, δεν μεταφράζονται περαιτέρω σε πρωτεΐνες. Αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, συμμετέχοντας σε ποικίλες βιολογικές διαδικασίες, όπως η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και ο κυτταρικός κύκλος. Είναι γνωστό πλέον, ότι τουλάχιστον το 1/3 των ανθρωπίνων γονιδίων πιθανώς να ρυθμίζονται από miRs και κάθε miR μπορεί να δρα μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα miRs, αλληλεπιδρώντας με περισσότερα του ενός mRNAs. Επιπλέον, εμπλέκονται στην παθογένεια πολλών ασθενειών, όπως είναι οι διαταραχές του νευρικού συστήματος και ο καρκίνος.

Η παρούσα εργασία στοχεύει στον προσδιορισμό miRs, που ενδεχομένως επηρεάζουν την ομοιοστάση των ιόντων Ca^{2+} στο εσωτερικό των κυττάρων. Αρχικά, βιοπληροφορική ανάλυση έδειξε ότι τρία νευρωνικά miRs, τα miR-96, miR-124 και miR-153, προσδένονται στις 3'-UTRs των *Ryrs* και *Ip3rs* mRNAs των διαύλων Ca^{2+} του ενδοπλασματικού δικτύου. Πειράματα λουσιφεράσης, που ακολούθησαν, επιβεβαίωσαν την πρόσδεση των miR-124 και miR-153, όσον αφορά τα mRNAs των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3* και *Ip3r-3*. Κατόπιν, ακολούθησε προσδιορισμός των επιπτώσεων που μπορεί να έχει η δράση των miR-124 και miR-153 στη λειτουργία αυτών των διαύλων Ca^{2+} (IP₃Rs, RYRs) και κατ' επέκταση στην ομοιοστάση του Ca^{2+} στο εσωτερικό του κυττάρου. Συγκεκριμένα, με τις τεχνικές ανάλυσης της ακουαρίνης

και της απεικόνισης ιόντων Ca^{2+} μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα κυττάρων νευροβλαστώματος SK-N-SH, που είχαν διαμολυνθεί με miR-124 και miR-153. Χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους αγωνιστές και ανταγωνιστές βρέθηκε ότι τα miR-124 και miR-153 προκαλούν μειωμένη εκροή ιόντων Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό δίκτυο προς το κυτταρόπλασμα, ως αποτέλεσμα της δέσμευσής τους στους διαύλους IP_3Rs και $RYRs$. Από τα δεδομένα αυτής της διπλωματικής εργασίας αποκαλύπτεται ένας νέος μηχανισμός ρύθμισης της ομοιόστασης Ca^{2+} στα νευρικά κύτταρα, που μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση του μηχανισμού παθογένειας διαφόρων ασθενειών, στις οποίες παρατηρείται διατάραξη στα επίπεδα Ca^{2+} .

ABSTRACT

Calcium is the 5th most abundant element in the earth's crust. In mammals there is a great variation in body Ca^{2+} ions levels, whose availability is generally regulated either by intracellular calcium stores, such as the endoplasmic reticulum and mitochondria, or the extracellular space. The movement of ions inside the cell is largely mediated by transmembrane channels and pumps, located in the cytoplasmic membrane and membranes of the endoplasmic reticulum, as well as Ca^{2+} binding proteins. The presence of Ca^{2+} ions is necessary for fertilization, growth during childhood and proper functioning of the body during adulthood.

MicroRNAs (or miRs) are a class of highly conserved small non coding RNA molecules, about 22 nucleotides in length, so far identified in only eukaryotes. They are transcribed from genes or introns of genes, but unlike most genes, they are not further translated into proteins. They are important regulators of gene expression participating in diverse biological processes during development, differentiation and cell cycle. It is known that at least one third of human genes regulated by miRs, and each miR interact with several mRNAs alone or in combination with other miRs. Moreover, miRs are involved in pathogenesis of many diseases, such as disorders of nervous system and cancer.

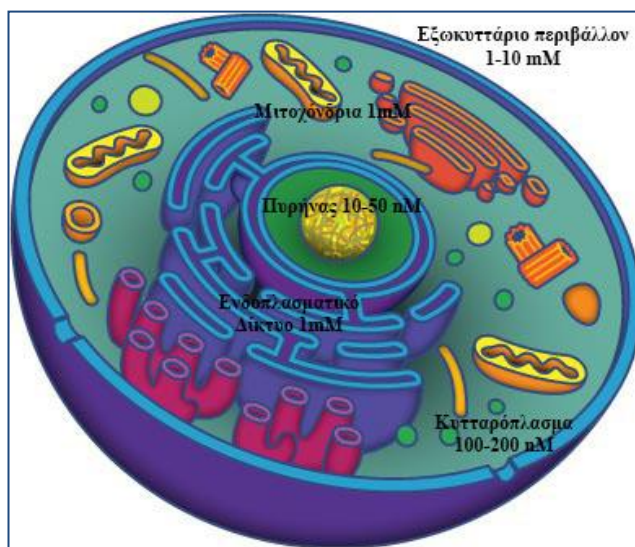
The present study aims at identifying miRs, which maybe affect the intracellular homeostasis of Ca^{2+} ions. Bioinformatic data suggest that three neuronal microRNAs, miR-96, miR-124 and miR-153, interact with 3'-UTRs of *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3* and *Ip3r-3* mRNAs of endoplasmic reticulum calcium channels. The binding of miR-124 and miR-153 is confirmed by luciferase assays. Following experiments tried to identify the effects of miR-124 and miR-153 in the operation of specific calcium channels (IP3Rs, RYRs). In particular, Ca^{2+} ions levels of cytosol were studied in transfected neuroblastoma cells SK-N-SH with miR-124 and miR-153, by Aequorin and calcium imaging analysis. It was found that miR-124 and miR-153 cause decreased efflux of Ca^{2+} ions from endoplasmic reticulum to cutosol, using specific agonists and antagonists, as a result of their binding to RYRs and IP₃Rs channels. Data of this study revealed a novel regulatory mechanism of Ca^{2+} homeostasis in neuronal cells, enabling us to better understand calcium dyshomeostasis, which is presented in several diseases, such as neurodegenerative disorders.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Χημικό στοιχείο Ασβεστίου

Το χημικό στοιχείο Ασβέστιο (Calcium) είναι ένα δισθενές μέταλλο με ατομικό αριθμό 20 και ατομικό βάρος 40,078. Η θερμοκρασία τήξης είναι 839°C και η θερμοκρασία βρασμού ορίζεται στους 1484,4°C. Το ασβέστιο ανήκει στην ομάδα των “Αλκαλικών Γαιών” του Περιοδικού Πίνακα και αποτελεί το 5^ο σε αφθονία στοιχείο της μάζας του φλοιού της Γης. Στα φυτά το ασβέστιο βρίσκεται ενωμένο στα τοιχώματα των κυττάρων ως πηκτινικό ασβέστιο, ενώ στον άνθρωπο και τα ζώα υπάρχει σε μεγάλες ποσότητες στα δόντια και τα οστά υπό τη μορφή του υδροξυαπατίτη ($3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{Ca}(\text{OH})_2$), και μόλις το 1% της συνολικής περιεκτικότητας σε ασβέστιο εντοπίζεται στον εξωκυττάριο χώρο (Beto, 2015; McKenna et al, 2010). Στο εσωτερικό των κυττάρων μια πολύ μικρή ποσότητα ασβεστίου εντοπίζεται με τη μορφή ελεύθερων ιόντων (Ca^{2+}), ενώ σχεδόν όλη η υπόλοιπη ποσότητα αυτού βρίσκεται στις μεμβράνες των οργανιδίων των κυττάρων. Η παρουσία του ασβεστίου στις διάφορες μεμβράνες επηρεάζει σημαντικά τη διαπερατότητά τους σε διάφορα ιόντα.

Τα ιόντα Ca^{2+} λειτουργούν ως δεύτερο μήνυμα (second messenger) σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών αποκρίσεων, τόσο στην περίπτωση που το πρώτο μήνυμα είναι χημικής φύσεως, όσο και όταν είναι ηλεκτρικής φύσεως (Cerella et al, 2010). Η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου μέσα στα κύτταρα είναι κατά περίπου 10-100 φορές μικρότερη απ’ ότι είναι στον εξωκυττάριο χώρο, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια διαφορά δυναμικού, που επηρεάζει σημαντικά τη διαπερατότητα των μεμβρανών (Εικόνα 1). Η συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα διατηρείται εξαιρετικά χαμηλή, περίπου 100-200 nM, λόγω της δράσης ειδικών συστημάτων ενεργούς μεταφοράς που

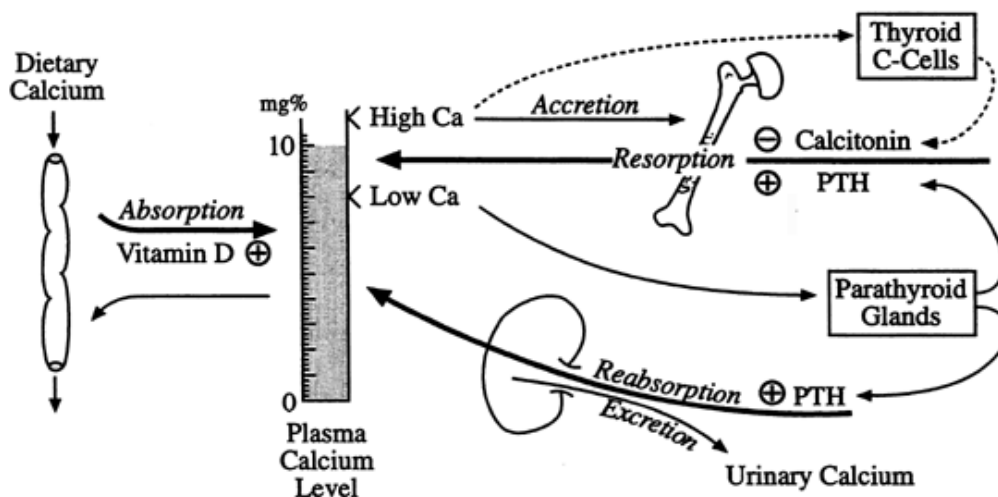


Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση συγκεντρώσεων ιόντων ασβεστίου εντός και εκτός ενός ευκαρυωτικού κυττάρου.

διαθέτουν τόσο η κυτταρική μεμβράνη, όσο και οι μεμβράνες άλλων κυτταρικών οργανιδίων. Κατά συνέπεια, υπάρχει μια μεγάλη ηλεκτροχημική κλίση, που ευνοεί τη διάχυση του ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα μέσω των διαύλων ασβεστίου της κυτταρικής μεμβράνης ή της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ). Η σταθερή αυτή κατάσταση μπορεί να αλλάξει και η κυτταροπλασματική συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} να μεταβληθεί, αν επηρεαστεί η λειτουργία των συστημάτων μεταφοράς ή/και των ιοντικών διαύλων από κάποιο ερέθισμα.

1.1.1 Ομοιόσταση Ασβεστίου

Το εσωτερικό περιβάλλον κάθε πολυκύτταρου οργανισμού αποτελείται από ένα εξωκυττάριο υγρό, που περιέχει τα κύτταρα. Με τον όρο “Ομοιόσταση” ορίζεται η ικανότητα διατήρησης ενός σχετικά σταθερού εσωτερικού περιβάλλοντος, που επιτελείται από συστήματα ομοιοστατικού ελέγχου. Κάθε κύτταρο επιτελεί τις βασικές κυτταρικές λειτουργίες που χρειάζεται για να διατηρήσει την ακεραιότητά του, αλλά και ορισμένες εξειδικευμένες λειτουργίες, με τις οποίες συμβάλλει στη διατήρηση της ομοιόστασης του συνόλου του οργανισμού. Για παράδειγμα, η διατήρηση των σχετικά σταθερών συγκεντρώσεων αλάτων, ιόντων και σακχάρων στο εσωτερικό του οργανισμού και η σχετικά σταθερή θερμοκρασία κάθε οργανισμού, όπως είναι οι 36,6-37 °C στον άνθρωπο, αποτελούν συστήματα ομοιοστατικού ελέγχου (Benzinger, 1969). Η ομοιόσταση διατηρείται σταθερή με τον συνεχή ανεφοδιασμό χρήσιμων ουσιών στα κύτταρα και τη συνεχή απομάκρυνση άχρηστων και επιβλαβών ουσιών. Αυτό επιτυγχάνεται με την κυκλοφορία του αίματος και άλλων συστημάτων. Στα θηλαστικά, παρατηρείται μια μεγάλη διακύμανση στις συγκεντρώσεις των ιόντων Ca^{2+} , που εντοπίζονται στα σωματικά υγρά, τον εξωκυττάριο χώρο και το εσωτερικό των κυττάρων. Στον άνθρωπο η συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} στο πλάσμα του αίματος είναι 2,1-2,6 mM (Mundy & Guise, 1999). Αυτή η συγκέντρωση ρυθμίζεται από τρεις ορμόνες: την παραθυροειδή ορμόνη (parathyroid hormone, PTH), την καλσιτονίνη και την ενεργή μορφή της βιταμίνης D (1,25-OH vitamin D3, calcitriol). Για την ρύθμιση της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} στο πλάσμα απαιτείται η λειτουργία των νεφρών, των οστών και του γαστρεντερικού σωλήνα (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} στο πλάσμα του αίματος με τη συμμετοχή των νεφρών, των οστών και του γαστρεντερικού σωλήνα (http://chemistry.gravitywaves.com/CHE452/20_Calcium%20Homeostasis16.htm).

Πέρα από τον ορμονικό έλεγχο της ομοιόστασης του ασβεστίου, υπάρχει μια σειρά από υποδοχείς, διαύλους και ασβεστιο-εξαρτώμενες πρωτεΐνες στο εσωτερικό των κυττάρων που ρυθμίζουν τις συγκεντρώσεις των ιόντων Ca^{2+} στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα. Η ρύθμιση στο εσωτερικό του κυττάρου είναι απαραίτητη, καθώς η συμμετοχή των ιόντων σε διάφορες σηματοδοτικές οδούς επιφέρει αυξομειώσεις των διαφόρων συγκεντρώσεών του. Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικότερα οι διάφορες πρωτεΐνες και διαύλοι.

1.1.2 Κινητικότητα ιόντων Ca^{2+}

Η κινητικότητα των ιόντων Ca^{2+} καθοδηγείται είτε από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες ασβεστίου, όπως είναι το ΕΔ και τα μιτοχόνδρια, είτε από τον εξωκυττάριο χώρο. Επιπλέον, υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών, που διαθέτουν ειδικές θέσεις δέσμευσης των ιόντων Ca^{2+} , όπως είναι η παρβαλβουμίνη, η εξαρτώμενη από το σύμπλοκο ασβεστίου-καλμοδουλίνης πρωτεϊνική κινάση II (Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase II, CaMKII) κ.α.

1.1.2.1 Κυτταροπλασματική Μembrάνη

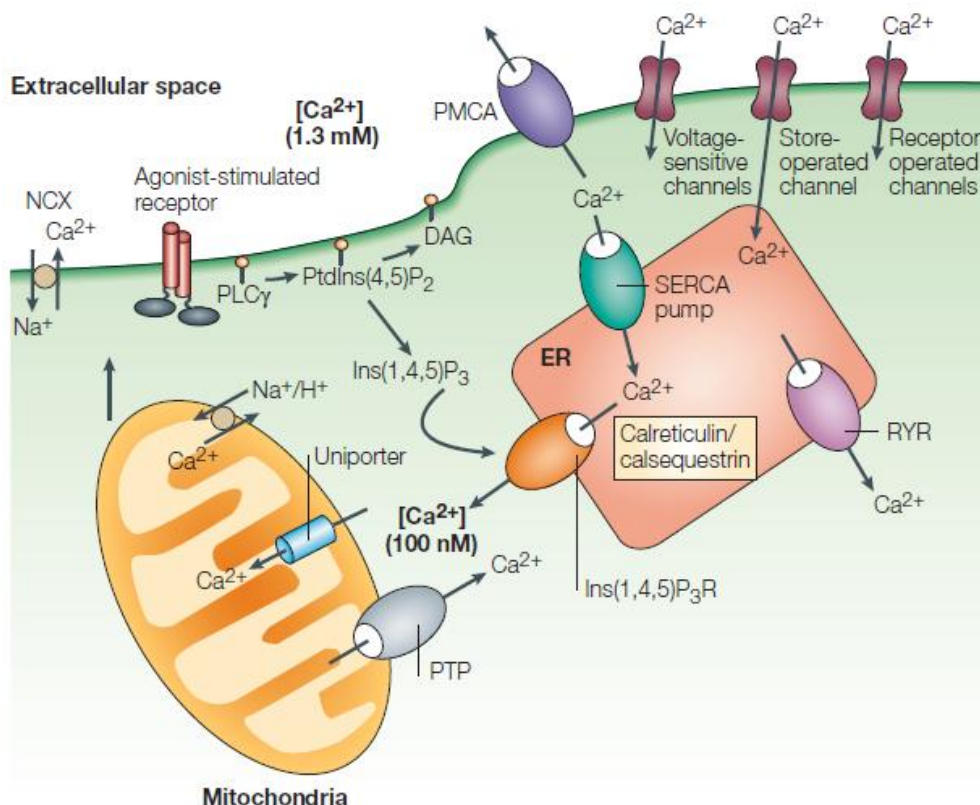
Η είσοδος των ιόντων Ca^{2+} στο κύτταρο από τον εξωκυττάριο χώρο γίνεται μέσω της ενεργοποίησης διαφόρων διαμεμβρανικών διαύλων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, ως απόκριση σε κάποιο ερέθισμα, όπως είναι η

εκπόλωση της πλασματικής μεμβράνης, διάφοροι αγωνιστές, ενδοκυττάρια σήματα, εκκένωση των ενδοκυττάρων αποθηκών ασβεστίου κά. Οι πιο γνωστοί διάλυοι της κυτταροπλασματικής μεμβράνης είναι οι τασεοελεγχόμενοι διάλυοι (Voltage-Operated Channels, VOCs), οι οποίοι εντοπίζονται στα διεγέρσιμα κύτταρα και αποσκοπούν στην ταχεία είσοδο των ιόντων Ca^{2+} στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι VOCs ανοίγουν όταν δεχτούν κάποιο ηλεκτρικό ερέθισμα, όπως είναι η εκπόλωση της πλασματικής μεμβράνης (Εικόνα 3) (Atlas, 2010). Η παρουσία τους κρίνεται απαραίτητη κατά την μυϊκή σύσπαση και την εξωκυττάρωση στη συναπτική διαβίβαση. Υπάρχουν διάφορων ειδών τασεοελεγχόμενοι διάλυοι ανάλογα με τη χρησιμότητά τους. Για παράδειγμα, στις συναπτικές απολήξεις εντοπίζονται οι P/Q-, N-, και R-τύποι, οι οποίοι συμμετέχουν ενεργά στη σύντηξη των συναπτικών κυστιδίων με την κυτταροπλασματική μεμβράνη, ώστε να απελευθερωθεί ο εκάστοτε νευροδιαβιβαστής (Zhong et al, 1999; Tobi et al, 1998; Bezprozvanny et al, 1995).

Επιπλέον, στην πλασματική μεμβράνη συναντάμε τους υποδοχείς-διαύλους (Receptor-Operated Channels, ROCs), μέσω των οποίων εισάγονται ιόντα Ca^{2+} από τον εξωκυττάριο χώρο προς το εσωτερικό του κυττάρου, ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα (Εικόνα 3). Τέτοιοι διάλυοι είναι οι γλουταματεργικοί NMDA (N-methyl-D-aspartate) υποδοχείς (NMDARs) του νευρικού συστήματος, οι οποίοι ενεργοποιούνται από την δέσμευσή τους με το γλουταμικό (Glutamate) (Dingledine et al, 1999). Ακόμα, κυρίαρχο ρόλο κατέχουν και οι διάλυοι ιόντων Ca^{2+} που ενεργοποιούνται από την εκκένωση των ενδοκυττάρων αποθηκών ασβεστίου (Store-Operated Channels, SOCs) (Parekh & Putney, 2005). Σ' αυτήν τη περίπτωση, η ποσότητα των ιόντων Ca^{2+} που βρίσκεται στις ενδοκυττάρια αποθήκες, όπως το ενδοπλασματικό και το σαρκοπλασματικό δίκτυο, ελέγχει την εισροή ιόντων Ca^{2+} στο εσωτερικό μη διεγέρσιμων κυττάρων. Τέλος, στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) συναντάμε τους TRPC διαύλους (Transient Receptor Potential Channels), που ρυθμίζονται από την τριφωσφορική ινοσιτόλη ($Ins(1,4,5)_3P$, IP_3) και την διακυλογλυκερόλη (DAG), όπως και διαύλους που είναι απευθείας συνδεδεμένοι με IP_3 (Li et al, 1999; Satoh et al, 1991).

Σημαντική κρίνεται και η παρουσία αντλιών ιόντων Ca^{2+} με δράση ΑΤΡάσης (Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase, PMCA) στην κυτταρική μεμβράνη (Εικόνα 3). Αυτές οι αντλίες φωσφορυλιώνονται και αποφωσφορυλιώνονται κατά τη διάρκεια του κύκλου της άντλησης. Ο ρόλος τους είναι να απομακρύνουν ιόντα Ca^{2+} από το κυτταρόπλασμα, και αποτελούν τμήμα των ομοιοστατικών μηχανισμών ελέγχου των

ενδοκυττάρων συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{2+} . Κάθε φορά που υδρολύεται ένα μόριο ATP, ένα ιόν Ca^{2+} απομακρύνεται από το κυτταρόπλασμα προς το εξωκυττάριο περιβάλλον. Όπως και η PMCA, έτσι και ο ανταλλάκτης $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, NCX) έχουν χαμηλότερο ρυθμό μεταφοράς ιόντων Ca^{2+} , σε σύγκριση με τους διαύλους, αλλά έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για το ιόν αυτό. Η αντλία PMCA έχει ανιχνευτεί με 4 ισομορφές, και οι ισομορφές 2 και 3 εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στον εγκέφαλο (Brini & Carafoli, 2009; Di Leva et al, 2008).



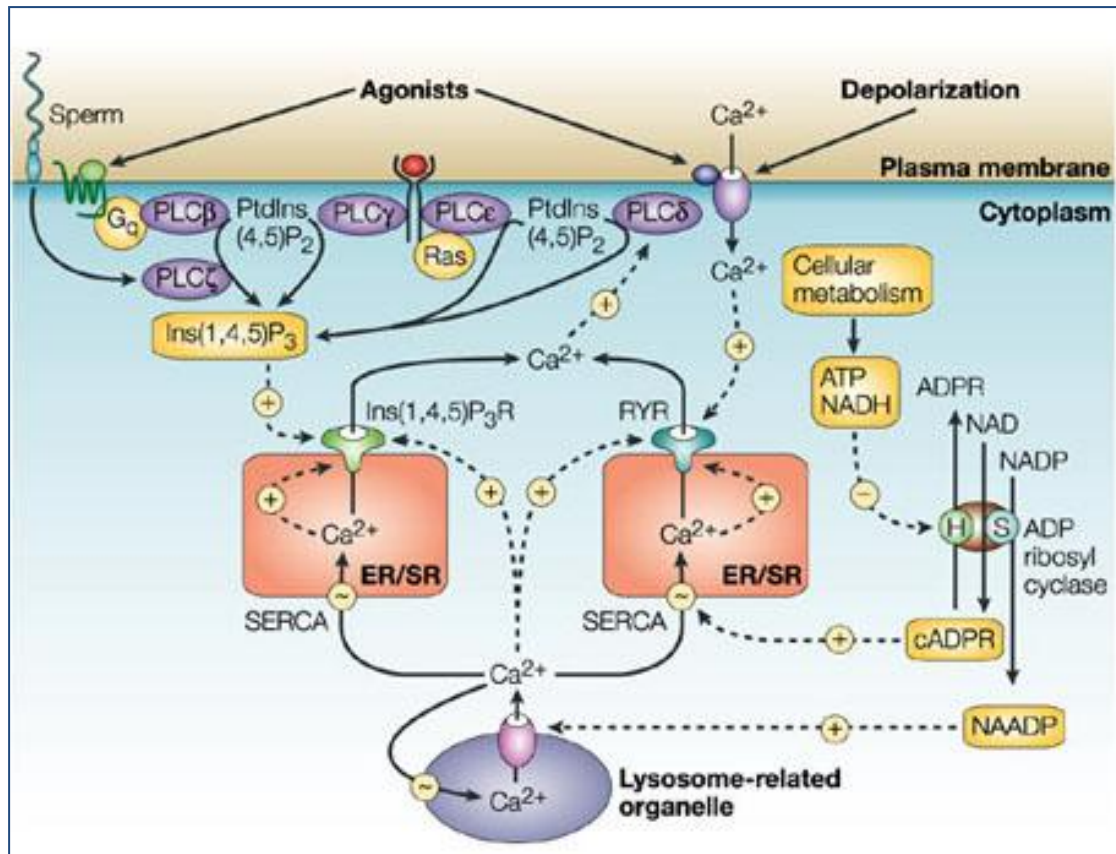
Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της κινητικότητας των ιόντων Ca^{2+} σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο (Orrenius et al, 2003).

1.1.2.2 Ενδοπλασματικό Δίκτυο

Με την επίδραση ενός εξωτερικού ερεθίσματος η συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου αυξάνεται 3-5 φορές, καθώς αυτά μπορεί είτε να εισρέουν από τον εξωκυττάριο χώρο στο κυτταρόπλασμα, είτε να απελευθερώνονται από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες ασβεστίου. Μετά την πάροδο του ερεθίσματος, το ΕΔ προσλαμβάνει την περίσσεια των ιόντων και αποκαθιστά τα επίπεδα των ιόντων Ca^{2+} του κυτταροπλάσματος στο φυσιολογικό (Borge et al, 2002).

Δύο κυρίαρχοι τύποι διαύλων ασβεστίου εντοπίζονται στην μεμβράνη του ΕΔ, απελευθερώνοντας μεγάλες ποσότητες ιόντων Ca^{2+} από το εσωτερικό του ΕΔ προς το κυτταρόπλασμα, και υπάρχουν σε αφθονία κυρίως στα μυϊκά, καρδιακά και νευρικά κύτταρα (Εικόνα 3) (Islam et al, 1992). Πρώτον, οι IP_3 υποδοχείς (IP_3Rs) ενεργοποιούνται μέσω της δέσμευσής τους με IP_3 . Πολλά εξωγενή ερεθίσματα, μέσω της φωσφολιπάσης C (Phospholipase C, PLC) οδηγούν στην παραγωγή IP_3 , με σκοπό την απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+} από το ΕΔ στο κυτταρόπλασμα και την τελική απόκριση του κυττάρου (Εικόνες 3, 4). Έχουν προσδιοριστεί τρεις ισομορφές των υποδοχέων ($\text{IP}_3\text{R 1,2,3}$), ενώ τα γονίδιά τους στον άνθρωπο εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 3, 12 και 6, αντίστοιχα, και το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που προκύπτουν υπολογίζεται περίπου στα 300 kDa. Στο νευρικό σύστημα, ο $\text{IP}_3\text{R1}$ είναι σε αφθονία στους νευρώνες Purkinje της παρεγκεφαλίδας, ο $\text{IP}_3\text{R2}$ εκφράζεται ευρέως στα κύτταρα γλοίας, ενώ ο $\text{IP}_3\text{R3}$ εντοπίζεται κυρίως σε νευρικά κύτταρα και με ελάχιστες εξαιρέσεις σε κύτταρα γλοίας (Sharp et al, 1999).

Δεύτερον, οι υποδοχείς Ρυανοδίνης (Ryanodine Receptors, RYRs), που πήραν το όνομά τους λόγω της απόκρισής τους σε ένα φυτικό αλκαλοειδές, τη ρυανοδίνη, δρουν όπως και οι IP_3Rs , μεταφέροντας ιόντα Ca^{2+} από το ΕΔ στο κυτταρόπλασμα (Εικόνες 3, 4). Έχουν προσδιοριστεί τρεις ισομορφές των υποδοχέων (RYR 1,2,3), ενώ τα ανθρώπινα γονίδια εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 19, 1 και 15, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι αρκετά μεγαλύτεροι διάυλοι, καθώς η κάθε υπομονάδα έχει μοριακό βάρος περίπου 550 kDa. Ο υποδοχέας RYR1 εκφράζεται κυρίως στους σκελετικούς μύες, ο RYR2 στα κύτταρα του μυοκαρδίου, ενώ ο RYR3 κατά κύριο λόγο εντοπίζεται στον εγκέφαλο (Lanner et al, 2010). Ιδιαίτερο γνώρισμα αυτών των διαύλων είναι η ενεργοποίησή τους από τις ίδιες τις μεταβολές των ιόντων Ca^{2+} , που οδηγούν σε ταχύτατη έξοδο των ιόντων από τις αποθήκες ασβεστίου. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως “Calcium Induced Calcium Release – CICR”, δηλαδή απελευθέρωση ασβεστίου παραγόμενη από το ασβέστιο (Fabiato, 1985).



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση των μηνυμάτων και των ρυθμιστών για την κινητικότητα των ιόντων Ca^{2+} στο εσωτερικό του κυττάρου (Berridge et al, 2003).

Η σαρκοενδοπλασματική Ca^{2+} ATPάση (Sarcoendoplasmic Ca^{2+} ATPase, SERCA) είναι η κύρια αντλία που εισάγει περίσσεια ιόντων Ca^{2+} από το κυτταρόπλασμα στο εσωτερικό του ΕΔ (Εικόνες 3, 4). Η αντλία είναι Ρ-τύπου και για κάθε ένα μόριο ATP που υδρολύεται 2 ιόντα Ca^{2+} εισέρχονται στο εσωτερικό του ΕΔ (Periasamy & Kalyanasundaram, 2007). Έχουν ταυτοποιηθεί τρία γονίδια που κωδικοποιούν για περισσότερες από 10 ισομορφές της αντλίας SERCA. Ο πολυμορφισμός αυτός οφείλεται σε διαφορετική γονιδιακή έκφραση ανάλογα με τον ιστό. Γενικότερα, η SERCA1 εντοπίζεται στους σκελετικούς μύες, η SERCA2 κυρίως στα καρδιακά κύτταρα, ενώ η SERCA3 εκφράζεται ευρέως σε πολλούς ιστούς και κύτταρα.

1.1.2.3 Ασβέστιο-εξαρτώμενες Πρωτεΐνες

Υπάρχει μια μεγάλη πληθώρα πρωτεϊνών που διαθέτουν θέσεις πρόσδεσης για τα ιόντα Ca^{2+} και συμμετέχουν σε ποικίλες διεργασίες μέσα στο κύτταρο. Η CaMKII αποτελεί μια από τις σημαντικότερες κινάσες, η οποία απαντάται στους περισσότερους ιστούς των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του νευρικού

συστήματος, όπου και εντοπίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου (πχ. ιππόκαμπος) η πρωτεΐνη αυτή πλησιάζει ή και ξεπερνά το 2% της συνολικής ποσότητας των πρωτεϊνών (Erondu & Kennedy, 1985; Bennett et al, 1983). Το ένζυμο αυτό, μόλις συνδεθεί με ιόντα Ca^{2+} , αλλάζει τη στερεοδιαμόρφωσή του και καταλύει τη φωσφορυλίωση ενός μεγάλου αριθμού υποστρωμάτων, γεγονός που επισημαίνει το ρόλο του στη ρύθμιση πολλαπλών και πολύπλοκων ενδοκυτταρικών λειτουργιών και διεργασιών, όπως είναι η συναπτική πλαστικότητα και η μνήμη και μάθηση (Yamauchi, 2005; Colbran & Brown, 2004; Griffith, 2004; Fink & Meyer, 2002). Στα θηλαστικά έχουν εντοπιστεί 4 γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες τύπου CaMKII: α , β , γ και δ . Μια σειρά από ισομορφές που προκύπτει με εναλλακτική συρραφή (Alternative Splicing) κάθε γονιδίου CaMKII (Tobimatsu & Fujisawa, 1989; Tobimatsu et al, 1988; Bennett & Kennedy, 1987; Lin et al, 1987). Οι α και β μορφές εκφράζονται κατά κύριο λόγο στο νευρικό σύστημα και ειδικότερα στον εγκέφαλο (Kennedy et al, 1990; Erondu & Kennedy, 1985).

1.1.3 Ασβέστιο και Κυτταρικές Λειτουργίες

Η παρουσία των ιόντων Ca^{2+} κρίνεται απαραίτητη κατά την γονιμοποίηση, την περίοδο ανάπτυξης στην παιδική και εφηβική ηλικία, αλλά είναι επίσης σημαντική σε όλη τη διάρκεια της ζωής για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού. Οι σημαντικότερες διεργασίες που συμμετέχουν τα ιόντα Ca^{2+} είναι:

1. Γονιμοποίηση: κατά την γονιμοποίηση, τα ώαρια των θηλαστικών παράγουν έντονα σήματα/κύματα (Spikes) ιόντων Ca^{2+} , τα οποία διατηρούνται για 2 ώρες περίπου, ώστε να ξεκινήσει η ανάπτυξη. Κάθε κύμα που σαρώνει το ζυγωτό, οδηγείται από την απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+} από τους υποδοχείς IP_3Rs (Εικόνα 4) (Miyazaki et al, 1993). Οι υποδοχείς ενεργοποιούνται συνεχώς από τις αυξημένες ποσότητες της IP_3 , που παράγονται από την φωσφολιπάση C, η οποία μεταφέρεται στο ζυγωτό μέσω του σπέρματος (Jones et al, 2000). Στη συνέχεια, τα ιόντα Ca^{2+} ενεργοποιούν την CaMKII και μετά από έναν καταρράκτη φωσφορυλίσεων ενεργοποιείται η Κυκλίνη B, ώστε να ολοκληρωθεί η διαδικασία της μείωσης. Στο τέλος οι πυρήνες των γαμετών συντήκονται και ξεκινούν οι διαδοχικές μιτώσεις.

2. Σχηματισμός Εμβρυϊκού Προτύπου: κατά την ανάπτυξη του εμβρύου, το ζυγωτό πολλαπλασιάζεται ταχέως για να παράγει μεγάλες ομάδες κυττάρων. Η σηματοδότηση μέσω ιόντων Ca^{2+} ελέγχει ειδικές διαδικασίες, υπεύθυνες για τον σχηματισμό προτύπου και την κυτταρική διαφοροποίηση. Τόσο η IP_3 , όσο και τα ιόντα Ca^{2+} συμμετέχουν στον σχηματισμό του ραχιοκοιλιακού άξονα (Dorsoventral Axis), με τα IP_3 /ιόντα Ca^{2+} να εντοπίζονται σε μεγάλες ποσότητες στην κοιλιακή περιοχή, και κλιμακωτά να μειώνονται προς την ράχη (Creton et al, 2000; Gilland et al, 1999; Kume et al, 1997; Reinhard et al, 1995; Maslanski et al, 1992). Συνεπώς, η δράση της CaMKII εμφανίζεται ιδιαίτερα αυξημένη στην κοιλιακή περιοχή (Kuhl et al, 2000). Έτσι, ο ραχιοκοιλιακός άξονας προσδιορίζεται από μια διαβαθμισμένη κλίση της σηματοδότησης των ιόντων Ca^{2+} .
3. Κυτταρική Διαφοροποίηση: κατά την ανάπτυξη, τα ιόντα Ca^{2+} συμμετέχουν στην επαγόμενη διαφοροποίηση των επιμέρους κυττάρων. Στα νευρικά και τα μυϊκά κύτταρα οι σύντομες επαναλαμβανόμενες αυξήσεις των ιόντων Ca^{2+} επάγουν την κυτταρική διαφοροποίηση (Buonanno & Fields, 1999). Στον οργανισμό *Xenopus laevis* τα μυοκύτταρα διαφοροποιούνται σε σωμίτες, λόγω της παρουσίας σύντομων αυξήσεων των ιόντων Ca^{2+} που απελευθερώνονται από τους διαύλους RYRs, κατά την διάρκεια ενός σύντομου αναπτυξιακού χρονικού πλαισίου (Ferrari et al, 1998). Επιπρόσθετα, τα ιόντα Ca^{2+} ρυθμίζουν την έκφραση ειδικών νευροδιαβιβαστών και διαύλων, κατά την ανάπτυξη των νευρώνων (Carey & Matsumoto, 1999; Gu & Spitzer, 1997).
4. Κυτταρικός Πολλαπλασιασμός: τα διαφοροποιημένα κύτταρα συνήθως σταματούν να πολλαπλασιάζονται. Ωστόσο, ορισμένα κύτταρα διατηρούν τη δυνατότητα να εισέλθουν στον κυτταρικό κύκλο, όταν αποκρίνονται στην παρουσία αυξητικών παραγόντων. Τα ιόντα Ca^{2+} αποτελούν έναν από τους κύριους ρυθμιστές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, καθώς προσδένονται σε ασβεστιο-εξαρτώμενες πρωτεΐνες και δρουν σε συνδυασμό με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως αυτά που ρυθμίζονται από τις κινάσες MAPK και την κινάση IP_3K (Berridge, 1995; Lu & Means, 1993). Για παράδειγμα, τα ιόντα Ca^{2+} συμμετέχουν στην απόκριση των

λεμφοκυττάρων σε κάποιο αντιγόνο. Όταν το τελευταίο προσδένεται στους υποδοχείς των T-κυττάρων (TCR), ακολουθεί μια σειρά από σηματοδοτικά γεγονότα (Monks et al, 1998). Μεταξύ αυτών, η φωσφολιπάση Cγ1 (PLCγ1) προάγει την παραγωγή DAG και IP₃ για τουλάχιστον 2 ώρες, ώστε να ενεργοποιηθούν οι διαδικασίες πολλαπλασιασμού.

5. Γονιδιακή Έκφραση: η κύρια λειτουργία των ιόντων Ca²⁺ στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι η ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, που βρίσκονται είτε στο κυτταρόπλασμα (Nuclear Factor of Activated T-cells (NF-AT), Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B Cells (NF-κB)), είτε στο εσωτερικό του πυρήνα (cAMP Response Element-Binding protein, (CREB)). Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-AT εντοπίζεται φωσφορυλιωμένος σε ανενεργή μορφή στο κυτταρόπλασμα. Τα ιόντα Ca²⁺ προσδένονται σε μια φωσφατάση, η οποία με τη σειρά της αποφωσφορυλιώνει τον NF-AT, ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα και συμμετέχει στην ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων (Crabtree, 1999). Επειδή η διαδικασία είναι χρονοβόρα, η σηματοδότηση των ιόντων Ca²⁺ είναι ιδιαίτερα παρατεταμένη. Οι κινάσες CaMKII και CaMKIV φωσφορυλιώνουν τον μεταγραφικό παράγοντα CREB στο εσωτερικό του πυρήνα, ως απόκριση στη σηματοδότηση των ιόντων Ca²⁺. Επιπλέον, τα ιόντα Ca²⁺ στον πυρήνα ενεργοποιούν τον βοηθητικό παράγοντα του CREB (co-activator CREB-binding protein, CBP), για την ενίσχυση της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα (Hardingham et al, 1999; Chawla et al, 1998).
6. Μυϊκή Σύσπαση και Χάλαση: η λειτουργία τόσο των περιφερικών μυών, όσο και των μυϊκών κυττάρων της καρδιάς είναι στενά συνδεδεμένη με την παρουσία των ιόντων Ca²⁺. Με τη δημιουργία ενός δυναμικού ενεργείας στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου, το σήμα μεταφέρεται στο σαρκοπλασματικό δίκτυο, από το οποίο απελευθερώνεται μεγάλη ποσότητα ιόντων Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα. Τα ιόντα Ca²⁺ αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες τροπομυοσίνη και τροπονίνη, οι οποίες συνδέονται με τα ινίδια ακτίνης, με αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης αυτών των πρωτεϊνών και την έναρξη της σύσπασης (Spudich & Watt, 1971). Η αυξημένη ποσότητα των ιόντων Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα μειώνεται μόλις

διακοπεί το εξωκυττάριο σήμα, τα ιόντα αντλούνται ταχέως πίσω στο σαρκοπλασματικό δίκτυο, οι πρωτεΐνες επανέρχονται στην αρχική τους θέση και επιτυγχάνεται η χάλαση του μυός. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα μιτοχόνδρια συνδέονται στενά με την απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο, χωρίς να επηρεάζουν άμεσα τη λειτουργία των διαύλων RYRs (Franzini-Arnstrong, 2007).

7. Μεταβίβαση Νευρικού Ερεθίσματος: τα ιόντα Ca^{2+} θεωρούνται απαραίτητα για τη μεταβίβαση του νευρικού ερεθίσματος, επηρεάζοντας τη διαπερατότητα των μεμβρανών των νευρικών κυττάρων και την ενεργοποίηση, καθώς και την απελευθέρωση σημαντικών νευροδιαβιβαστών, όπως η ακετυλοχολίνη, σεροτονίνη και νορεπινεφρίνη (Mermelstein et al, 2000). Περισσότερα για τον ρόλο των ιόντων Ca^{2+} στο νευρικό σύστημα αναφέρονται παρακάτω.
8. Μεταβολισμός: μέσω της καθημερινής διατροφής ο οργανισμός προσλαμβάνει ασβέστιο από διάφορα τρόφιμα. Μια ποσότητα ιόντων Ca^{2+} βρίσκεται στο πλάσμα του αίματος και διανέμεται σε όλο τον οργανισμό. Η βιταμίνη D, η παραθυρεοειδής ορμόνη και η καλσιτονίνη είναι υπεύθυνες για την απορρόφηση του ασβεστίου από το έντερο, την καθήλωση του ασβεστίου στα οστά και την αποβολή του από τα ούρα (Bawden et al, 1983).
9. Απόπτωση: τα ιόντα Ca^{2+} ρυθμίζουν την έκφραση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην διαδικασία της απόπτωσης, όπως το σύστημα Fas. Ως απόκριση σε εξωγενείς και ενδογενείς παθολογικούς παράγοντες τα ιόντα Ca^{2+} επάγουν την απόπτωση, που εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των μιτοχονδρίων και του ΕΔ (Kass & Orrenius, 1999). Όταν τα μιτοχόνδρια είναι υπερφορτωμένα με ιόντα Ca^{2+} , τότε απελευθερώνουν το κυτόχρωμα c, και σταδιακά με την διαδοχική ενεργοποίηση των κασπασών τα κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση και κατακερματισμό του DNA (Shimizu et al, 1999).

1.1.4 Το Ασβέστιο στο Νευρικό Σύστημα

Τα ιόντα Ca^{2+} κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην ρύθμιση της λειτουργίας των κυττάρων του νευρικού συστήματος. Σε διαφορετικές περιοχές των νευρώνων επιτελούνται αρκετές ασβέστιο-εξαρτώμενες διαδικασίες μέσω μιας μεγάλης ποικιλίας διαύλων ιόντων Ca^{2+} . Αναφέρθηκε παραπάνω, ότι τα ιόντα Ca^{2+} ρυθμίζουν την έκφραση ειδικών νευροδιαβιβαστών και διαύλων, κατά την ανάπτυξη των νευρώνων, συμβάλλοντας έτσι στον σχηματισμό των συνάψεων (Carey & Matsumoto, 1999; Gu & Spitzer, 1997). Κατά την εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, τασεοελεγχόμενοι διάυλοι (τύπου-N και -P/Q), που βρίσκονται στις συναπτικές απολήξεις, αντιλαμβάνονται το ερέθισμα και προκαλούν τοπική αύξηση των ιόντων Ca^{2+} , με σκοπό την εξωκυττάρωση και την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή. Στο κυτταρικό σώμα και τους δενδρίτες, τασεοελεγχόμενοι διάυλοι τύπου-L αντιλαμβάνονται εξίσου την εκπόλωση της μεμβράνης και προάγουν την είσοδο ιόντων Ca^{2+} με τελικό σκοπό την γονιδιακή έκφραση. Η σηματοδότηση σ' αυτό το στάδιο διαμεσολαβείται από cAMP, και την ενεργοποίηση μιας σειράς κινασών, όπως MAPK, CaMKII κ.α. Τα ιόντα Ca^{2+} συμμετέχουν στις διαδικασίες μνήμης και μάθησης, καθώς εισέρχονται στο νευρώνα μέσω των VOCs και ROCs, όπως οι υποδοχείς NMDA (N-methyl-D-aspartate) και εξέρχονται από το ΕΔ μέσω των διαύλων IP_3Rs και RYRs (Berridge, 1998). Το γλουταμικό ως νευροδιαβιβαστής προσδένεται στους μετασυναπτικούς NMDA υποδοχείς, προκαλώντας την είσοδο ιόντων Ca^{2+} στο νευρώνα, ή στους μεταβολοτροπικούς υποδοχείς mGluR1, προκαλώντας την παραγωγή IP_3 και την μετανάστευση των ιόντων Ca^{2+} από το ΕΔ στο κυτταρόπλασμα. Σε νευρώνες ιπποκάμπου η ηλεκτρική διέγερση έχει ως αποτέλεσμα την είσοδο των ιόντων Ca^{2+} μέσω VOCs, και παράλληλα με τη δράση του γλουταμικού παράγεται μια συνεργιστική απελευθέρωση των ιόντων Ca^{2+} από το ΕΔ (Nakamura et al, 1999). Αυτά τα γεγονότα εντοπίζονται στις συναπτικές απολήξεις και οδηγούν στην μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση (Long-Term Potentiation, LTP) και την μακροπρόθεσμη καταστολή (Long-Term Depression, LTD), διαδικασίες που είναι υπεύθυνες για τη μνήμη και τη μάθηση. Επιπλέον, κατά την ανάπτυξη των νευρώνων, τα ιόντα Ca^{2+} φαίνεται να συμμετέχουν στην ανάπτυξη των αξόνων, και κατ' επέκταση στον σχηματισμό νευρωνικών δικτύων (Gomez & Spitzer, 1999; Wong, 1999).

1.1.5 Ασθένειες και Διαταραχές της Ομοιόστασης του Ασβεστίου

Παθογένειες των σκελετικών μυών που σχετίζονται άμεσα με την διαταραχή της ομοιόστασης των ιόντων Ca^{2+} είναι η κακοήθης υπερθερμία (Malignant Hyperthermia, MH), η νόσος του κεντρικού πυρήνα (Central Core Disease, CCD) και η νόσος του Brody (Brody's Disease, BD), ενώ έμμεσα είναι η μυϊκή δυστροφία Duchenne (Duchenne Muscular Dystrophy). Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια ενός επεισοδίου MH, ιόντα Ca^{2+} εξέρχονται από το σαρκοπλασματικό δίκτυο ανεξέλεγκτα, λόγω της χορήγησης αναισθητικών φαρμάκων (Rosenberg et al, 2007). Η νόσος CCD είναι μια συγγενής μυοπάθεια, χαρακτηρίζεται από αδυναμία των μυών των κάτω άκρων και προκαλείται από μεταλλάξεις του γονιδίου *Ryr-1* (Durham et al, 2007). Η νόσος BD είναι μια σπάνια μυοπάθεια, που προκαλείται από μεταλλάξεις μιας ισομορφής της αντλίας SERCA, και χαρακτηρίζεται από μυϊκή δυσκαμψία (Benders et al, 1994). Η νόσος Duchenne χαρακτηρίζεται από προοδευτική μυϊκή αδυναμία και επακόλουθη μυϊκή εκφύλιση. Αίτια της νόσου αποτελούν οι μεταλλάξεις της δυστροφίνης, μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης που ενώνει την ενδοκυττάρια ακτίνη με τον εξωκυττάριο χώρο (McNeil & Steinhead, 2003). Συνέπεια αυτών είναι η αυξημένη είσοδος ιόντων Ca^{2+} στα μυοκύτταρα και η διαταραχή της ομοιόστασης του ασβεστίου (Allen et al, 2010).

Ορισμένες παθήσεις της καρδιάς οφείλονται σε μεταλλάξεις γονιδίων που κωδικοποιούν για ασβέστιο-εξαρτώμενες πρωτεΐνες, απαραίτητες για την συστολή των κυττάρων (Morimoto, 2008). Τέτοιες παθήσεις είναι η υπερτροφική καρδιομυοπάθεια (Hypertrophic Cardiomyopathy, HCM), η διατακτική καρδιομυοπάθεια (Dilated Cardiomyopathy, DCM) και η περιοριστική καρδιομυοπάθεια (Restricted Cardiomyopathy, RCM). Επίσης, στην αρρυθμογενή δυσπλασία της δεξιάς κοιλίας (Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia, ARVD) παρατηρούνται ελαττωματικοί RYR2 υποδοχείς, με συνέπεια την διαταραχή της ομοιόστασης των ιόντων Ca^{2+} (Tiso et al, 2001).

Διάφορα είδη καρκίνου έχουν συσχετιστεί με διαταραχές της ομοιόστασης του ασβεστίου στα κύτταρα. Η φωσφολιπάση C αναφέρεται ως το ένζυμο που επάγει τη σηματοδότηση για την κακοήθεια, και η υπερέκφρασή του προωθεί τον μετασχηματισμό και την ογκογένεση (Yang et al, 1998; Smith et al, 1998). Πολλά φάρμακα έχουν σχεδιαστεί, ώστε να παρεμποδίσουν την είσοδο των ιόντων Ca^{2+} και

να επιβραδύνουν την ανάπτυξη ορισμένων όγκων (Haverstick et al, 2000; Nie et al, 1996; Benzaquen et al, 1995).

Σχετικά με τις διαταραχές του νευρικού συστήματος, στις οποίες εμπλέκονται τα ιόντα Ca^{2+} , συναντάμε την αταξία (Ataxia) και μια σειρά από νευροεκφυλιστικές νόσους. Η αταξία είναι μια νευρολογική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από έλλειψη συντονισμού των κινήσεων βούλησης. Κάποιες μορφές της αταξίας σχετίζονται με μεταλλάξεις πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την ομοιόσταση των ιόντων Ca^{2+} , καθώς και με μερική διαγραφή του γονιδίου *Ip3r-1* (Storey & Gardner, 2012; Matilla-Duenas et al, 2010; Storey et al, 2001). Η διαταραχή της ομοιόστασης των ιόντων Ca^{2+} συναντάται και στις νευροεκφυλιστικές νόσους του Πάρκινσον, Αλτσχάιμερ, Χάντιγκτον και πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS) (Cali et al, 2012). Όλες οι παραπάνω νόσοι χαρακτηρίζονται από απώλεια νευρώνων και, με εξαίρεση τη νόσο ALS, παρατηρείται παράλληλη εναπόθεση μη φυσιολογικών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Η νόσος Πάρκινσον χαρακτηρίζεται από απώλεια νευρώνων της μέλαινας ουσίας, ενώ παράλληλα παρατηρούνται μεταλλάξεις κάποιων πρωτεϊνών που επηρεάζουν την ομοιόσταση των ιόντων Ca^{2+} , όπως είναι η PINK-1, DJ-1 και η α -συνουκλεΐνη (Melachroinou et al, 2013; Cookson, 2012; Heeman et al, 2011; Guzman et al, 2010; Gandhi et al, 2009). Η νόσος Αλτσχάιμερ είναι η πιο κοινή μορφή αμνησίας και χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση “πλακών” του β -αμυλοειδούς (A β) στην εξωκυττάρια περιοχή του εγκεφαλικού φλοιού. Επίσης, παρατηρείται διαταραχή της ομοιόστασης των ιόντων Ca^{2+} , καθώς τα ενδοκυττάρια αποθέματα ιόντων Ca^{2+} αυξάνονται, λόγω, μεταξύ των άλλων, της ενεργοποίησης διαφόρων ενζύμων, της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης TAU, της παραγωγής A β και της αυξημένης έκφρασης του διαύλου RYR3 (Supnet et al, 2006; Wojda et al, 2005). Ακόμη, μεταλλαγμένες μορφές των πρεσηνιλινών (PS1, PS2) επηρεάζουν τη δράση των διαύλων IP₃Rs και RYRs, με συνέπεια τη διαφορετική απελευθέρωση Ca^{2+} από το ΕΔ (Chan et al, 2000). Η νόσος Χάντιγκτον χαρακτηρίζεται από την απώλεια νευρώνων στο ραβδωτό σώμα και οφείλεται στη μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης χάντιγκτίνης (huntingtin, Htt). Αυτή η πρωτεΐνη επηρεάζει τις διαδικασίες μεταγωγής σήματος που συμμετέχουν τα ιόντα Ca^{2+} , καθώς και τον διάυλο IP₃R, που ρυθμίζει την έξοδο των ιόντων Ca^{2+} από το ΕΔ (Giacomello et al, 2013; Cali et al, 2012). Τέλος, η νόσος ALS χαρακτηρίζεται από απώλεια κινητικών νευρώνων στον κινητικό φλοιό και την σπονδυλική στήλη, και

παρατηρείται μια ανισορροπία της ομοιόστασης των ιόντων Ca^{2+} , λόγω μετάλλαξης της πρωτεΐνης SOD1 (Cali et al, 2012; Duffy et al, 2011).

1.2. microRNAs

Τα microRNAs (ή miRs) είναι μικρά μονόκλινα ριβονουκλεϊκά οξέα, που αποτελούνται, κατά μέσο όρο, από 22 νουκλεοτίδια, εντοπίζονται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και είναι υψηλά συντηρημένα μεταξύ των διαφόρων ειδών (Doxakis, 2013). Κωδικοποιούνται από γονίδια ή εσώνια γονιδίων, αλλά σε αντίθεση με τα περισσότερα γονίδια, δεν μεταφράζονται περαιτέρω σε πρωτεΐνες. Αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, συμμετέχοντας σε ποικίλες βιολογικές διαδικασίες, όπως η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και ο κυτταρικός κύκλος (Bushati & Cohen, 2007). Παράλληλα έχειδειχθεί ότι εμπλέκονται στην παθογένεια ασθενειών, όπως είναι οι διαταραχές του νευρικού συστήματος και ο καρκίνος. Πιο συγκεκριμένα, συμμετέχουν στη μεταγραφική ρύθμιση πολλών γονιδίων, καθώς δεσμεύονται συμπληρωματικά σε πολλές περιοχές κυρίως των 3'-μη μεταφρασμένων περιοχών (3'-untranslated region, 3'-UTR) mRNA-στόχων, προκαλώντας την αποσταθεροποίησή τους και την καταστολή της μετάφρασης (Doxakis, 2013). Έχει προσδιοριστεί ότι στο ανθρώπινο γονιδίωμα πάνω από 1800 γονίδια κωδικοποιούν για miRs, τα οποία εντοπίζονται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους (Kozomara, 2011). Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι τουλάχιστον το 1/3 των ανθρώπινων γονιδίων πιθανώς να ρυθμίζονται από miRs και κάθε miR μπορεί να δρα μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα miRs, αλληλεπιδρώντας με περισσότερα του ενός mRNAs (Griffiths-Jones, 2005).

Το πρώτο miR ανακαλύφθηκε στις αρχές του 1990 στον κυανοραβδίτη, *Caenorhabditis elegans*, κατά τη διάρκεια μελέτης του γονιδίου *lin-14*, το οποίο συμμετέχει στην ανάπτυξη του *C. elegans* (Lee et al, 1993). Παρατηρήθηκε ότι το γονίδιο *lin-4*, το οποίο συμμετέχει επίσης στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του οργανισμού, δεν κωδικοποιεί για κάποια πρωτεΐνη, αλλά παράγει δύο μικρά μόρια RNA, μεγέθους 61 και 22 νουκλεοτιδίων. Το μικρότερο μόριο RNA είναι μερικώς συμπληρωματικό με πολλές περιοχές της αλληλουχίας 3'-UTR του mRNA του γονιδίου *lin-14* και είναι υπεύθυνο για την καταστολή της έκφρασης του *lin-14* (Wightman et al, 1993; Ferguson, 1987; Horvitz & Sulston, 1980). Το 2000 ανακαλύφθηκε ένα δεύτερο miR, το *let-7*, το οποίο συμμετέχει σε μεταγενέστερο από τη λάρβα αναπτυξιακό στάδιο του *Caenorhabditis elegans* και κωδικοποιεί για ένα RNA 21 νουκλεοτιδίων. Αυτό το miR είναι συμπληρωματικό σε διάφορες περιοχές των 3'-UTRs αρκετών γονιδίων, όπως *lin-41*, *lin-14*, *lin-28*, *lin-42* και *daf-12*, τα

οποία συμμετέχουν στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του οργανισμού, καταστέλλοντας τη έκφρασή τους (Reinhardter et al, 2000; Pasquinelli et al, 2000). Το *let-7* εντοπίστηκε και σε άλλους οργανισμούς, όπως ο άνθρωπος και η φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster*, υποδηλώνοντας ότι είναι υψηλά συντηρημένο μεταξύ των διαφόρων ειδών. Από τις αρχές του 1990 έως και σήμερα έχουν αναγνωριστεί εκατοντάδες γονίδια που κωδικοποιούν για miRs, τα οποία αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια γονιδιακών ρυθμιστών, συντηρημένων σε πολλούς οργανισμούς.

1.2.1 Βιογένεση των *microRNAs*

Τα μισά miRs εντοπίζονται σε εσώνια ή εξώνια άλλων γονιδίων, μερικά από τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και άλλα όχι (Rodriguez, 2004; Lau et al, 2001). Τα περισσότερα miRs μεταγράφονται παράλληλα με τα γονίδια, στα οποία εδράζονται, και χρησιμοποιούν τους ίδιους υποκινητές και τον ίδιο μεταγραφικό μηχανισμό (Kim YK & Kim YN, 2007; Baskerville & Bartel, 2005). Άλλα miRs εντοπίζονται σε εσώνια γονιδίων, συνιστούν ξεχωριστές μεταγραφικές μονάδες και έχουν ξεχωριστό υποκινητή. Στα θηλαστικά, ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων που κωδικοποιούν για miRs σχηματίζουν συστάδες γονιδίων (clusters) και μεταγράφονται ως πολυσιτρονικές μονάδες, με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη έκφραση πολλών miRs (Megraw et al, 2007; Alturia Y et al, 2005). Η βιογένεση των miRs πραγματοποιείται σε δύο διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα, τον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, και ως εκ τούτου, συμμετέχουν πολλά ένζυμα στη διαδικασία ωρίμανσης.

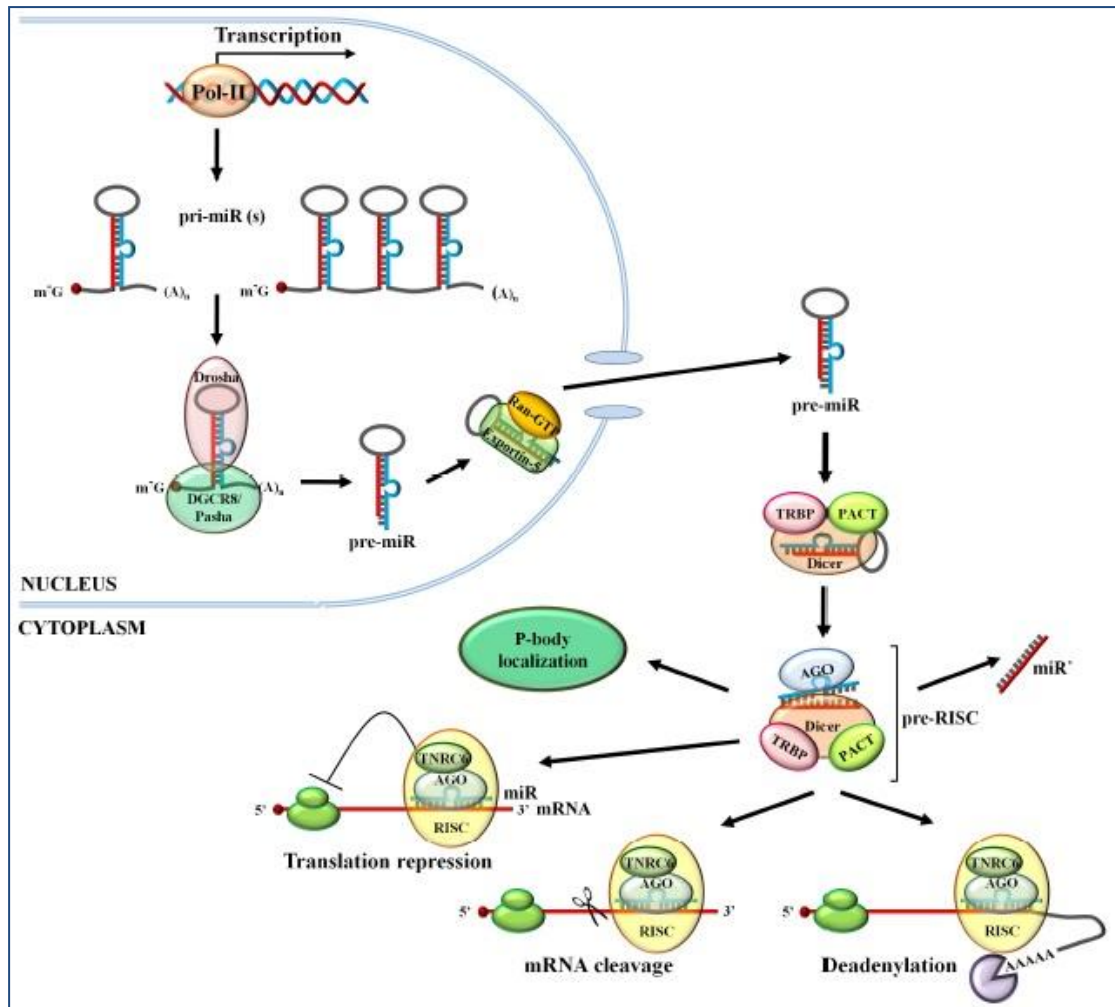
1.2.1.1 Πυρήνας

Τα περισσότερα γονίδια που κωδικοποιούν για miRs, μεταγράφονται στον πυρήνα του κυττάρου από την RNA πολυμεράση II, ενώ μια μικρή ομάδα γονιδίων μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση III (Εικόνα 5) (Faller & Guo, 2008; Lee et al, 2004). Αρχικά, τα μετάγραφα που προκύπτουν καλούνται πρωταρχικά miRs (primary miRs ή pri-miRs), και είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος σε σχέση με τα ώριμα miRs (Bushati & Cohen, 2007). Τα pri-miRs υπόκεινται σε μετα-μεταγραφική επεξεργασία μέσα στον πυρήνα, κατά την οποία το 5' άκρο τους επεξεργάζεται και καλύπτεται από κατάλοιπα 7-μεθυλ-γουανίνης, σχηματίζοντας την 5' καλύπτρα (5'-CAP) και στο 3' άκρο προστίθενται επαναλαμβανόμενα κατάλοιπα αδενίνης για να σχηματιστεί η poly(A) ουρά (Cai et al, 2004). Μετά το πέρας της μεταγραφής, κάθε

pri-miR αναδιπλώνεται στο κέντρο του μορίου, έτσι ώστε να σχηματιστεί μια δίκλωνη περιοχή σε σχήμα φουρκέτας, με μέγεθος 60-80 νουκλεοτίδια (Chang & Mendell, 2007). Η αλληλουχία του ώριμου miR εντοπίζεται στο εσωτερικό αυτής της δομής και στα 5' και 3' άκρα υπάρχουν μονόκλινα τμήματα (Kim, 2005).

Η επεξεργασία των pri-miRs συνεχίζεται στον πυρήνα από ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο ονομάζεται «σύμπλεγμα μικρο-επεξεργασίας» (Microprocessor Complex). Οι κύριοι παράγοντες αυτού του συμπλέγματος είναι η ενδονουκλεάση Drossha και ο συμπαράγοντας DGCR8 (Di George Syndrome Critical Region 8 ή Pasha) (Gregory et al, 2006; Denli et al, 2004; Han et al, 2004). Στη δομή της Drossha (ριβονουκλεάση τύπου III, RNase III) διακρίνεται μια περιοχή dsRBD (double-stranded RNA-Binding Domain) με ικανότητα δέσμευσης σε δίκλινα μόρια RNA, ενώ ο συμπαράγοντας DGCR8 έχει την ικανότητα να δεσμεύεται και σε μονόκλινα τμήματα, βοηθώντας έτσι τη δράση της Drossha (Εικόνα 5) (Han, 2006; Filipov, 2000). Στο σύμπλεγμα Microprocessor υπάρχουν κι άλλοι συμπαράγοντες, όπως οι RNA ελικάσες, καθώς και πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (Ribonucleoproteins, RNPs), οι οποίες απαιτούνται για τη ρύθμιση της ειδικότητας και της ενεργότητας της πρωτεΐνης Drossha (Gregory et al, 2004).

Αρχικά, ο συμπαράγοντας DGCR8 δεσμεύεται μεταξύ των δίκλωνων τμημάτων της βάσης της φουρκέτας και των μονόκλωνων τμημάτων στα άκρα του pri-miR (Han et al, 2006). Στη συνέχεια, η ριβονουκλεάση Drossha αλληλεπιδρά με τον συμπαράγοντα DGCR8 και αποκόπτει ασύμμετρα τα δύο άκρα της φουρκέτας, σε απόσταση 11 νουκλεοτιδίων από τη βάση της. Έχει διαπιστωθεί ότι, η μεταγραφή και η επεξεργασία του pri-miR πιθανώς πραγματοποιούνται ταυτόχρονα και έτσι το pri-miR μετατρέπεται στο πρόδρομο miR (precursor miR ή pre-miR) (Morlando et al, 2008). Το pre-miR είναι ένα δίκλινο μόριο σε σχήμα φουρκέτας, που το απαρτίζουν 60-80 νουκλεοτίδια. Το 5' άκρο του pre-miR είναι φωσφορυλιωμένο, ενώ στο 3' άκρο προεξέχουν δύο νουκλεοτίδια, σχηματίζοντας μια μονόκλινη περιοχή (3' overhang) (Basyuk et al, 2003). Αυτά τα νουκλεοτίδια αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη εξαπορτίνη 5 (Exportin 5, Exp-5), η οποία βρίσκεται στην πυρηνική μεμβράνη και έχει δράση RAN-GTP (Ras-Related Nuclear Protein-GTP). Η Exp-5 καταλύει την μεταφορά του pre-miR από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, υδrolύοντας ένα μόριο GTP (Εικόνα 5) (Bohnsack et al, 2004; Lund et al, 2004).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της βιογένεσης των miRs. Η βιογένεση των miRs ξεκινά με τη μεταγραφή τους στο εσωτερικό του πυρήνα. Κατόπιν τα pre-miRs εξάγονται στο κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια της εξπορτίνης 5 για περαιτέρω επεξεργασία (Doxakis, 2013).

1.2.1.2 Κυτταρόπλασμα

Το ένα άκρο του pre-miR έχει ήδη οριοθετηθεί στον πυρήνα του κυττάρου από το ένζυμο Drosha, ενώ το άλλο άκρο θα οριοθετηθεί στο κυτταρόπλασμα από το ένζυμο Dicer, το οποίο διαθέτει αρκετές λειτουργικές περιοχές (Lee et al, 2003). Από τις σημαντικότερες ενεργότητες είναι αυτή της ριβονουκλεάσης τύπου III (RNase III-like Domains ή RIII), με δύο επικράτειες RIIIA και RIIIB, καθώς και οι περιοχές PAZ (Piwi Argonaute Zwiller) και dsRBD (Garofalo & Croce, 2011). Δύο βοηθητικές πρωτεΐνες, η TRBP (Transactivating Response RNA-Binding Protein) και η PACT (Protein Activator of Protein Kinase R), σταθεροποιούν την Dicer πάνω στο pre-miR (Εικόνα 5) (Lee et al, 2006; Chendrimada et al, 2005). Έτσι, η Dicer, μέσω των περιοχών PAZ και RIIIA/B, αναγνωρίζει τα δύο προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του pre-miR και αποκόπτει τη θηλιά από το υπόλοιπο μόριο, δίνοντας ένα

ευθύγραμμο δίκλωνο μόριο RNA (miR duplex), μεγέθους περίπου 22 νουκλεοτιδίων, με φωσφορυλιωμένο το 5' άκρο και δύο προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο (Ji X, 2008; Lund et al, 2006; Zhang et al, 2004). Κατόπιν, μια ελικάση διαχωρίζει το miR duplex σε δύο αλυσίδες, τις miR και miR*, εκ των οποίων μόνο η μία θα αποτελέσει το ώριμο miR (Salzman et al, 2007).

Η αλυσίδα miR, που καλείται και “αλυσίδα οδηγός”, ενσωματώνεται στο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο miRISC (miR-Induced Silencing Complex), με τη βοήθεια του οποίου επιτυγχάνεται η καταστολή της έκφρασης των mRNA-στόχων, ενώ η αλυσίδα miR*, η οποία καλείται “αλυσίδα επιβάτης”, αποικοδομείται τις περισσότερες φορές στο κυτταρόπλασμα (Zhang et al, 2007; Khvorova et al, 2003; Schwarz et al, 2003; Schwarz & Zamore, 2002).

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Argonautes (AGO-1, AGO-2, AGO-3 και AGO-4) αποτελούν το ενεργό κέντρο του συμπλόκου miRISC (Filipowicz, 2005). Στις πρωτεΐνες AGO έχουν προσδιοριστεί δύο καταλυτικές επικράτειες, η PAZ, η οποία προσδέεται στα δύο προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του miR duplex, και η PIWI (P-element Induced Wimpy Testis Domain), που έχει την ικανότητα αποικοδόμησης μορίων mRNA (Tang, 2005; Song et al, 2004). Οι πρωτεΐνες AGO αναγνωρίζουν και δεσμεύουν το miR duplex, αλλά μόνο η AGO-2 έχει ενεργότητα ενδονουκλεάσης, και πιθανότατα να αποικοδομεί την αλυσίδα miR* και ενσωματώνει το ώριμο miR στο σύμπλοκο miRISC (Εικόνα 5) (Rand et al, 2005; Liu et al, 2004; Meister et al, 2004). Παρόλα αυτά, έχει δειχθεί ότι, μερικές αλυσίδες miR* προσδέονται στις AGO-1 και AGO-2 χωρίς να αποικοδομούνται μέσα στο σύμπλοκο miRISC και έτσι είναι λειτουργικές και οι δύο αλυσίδες του miR duplex (Okamura et al, 2009). Τέλος, το ώριμο miR, μαζί με το σύμπλοκο miRISC, εντοπίζει τα mRNA-στόχους, δεσμεύεται στις συμπληρωματικές βάσεις και καταστέλλει την έκφρασή τους (Bushati & Cohen, 2007).

1.2.2 Τρόπος δράσης των microRNAs

Τα περισσότερα miRs αναγνωρίζουν συμπληρωματικές βάσεις στις 3'-UTRs των mRNA-στόχων, καταστέλλοντας έτσι την γονιδιακή έκφραση, ενώ ορισμένα δεσμεύονται στην κωδική περιοχή και ακόμα λιγότερα στις 5'-UTRs (Gu et al, 2009; Easow et al, 2007; Grimson et al, 2007). Στο 5' άκρο των miRs, δηλαδή στα πρώτα 2-8 νουκλεοτίδια, υπάρχει μια αλληλουχία 7-8 νουκλεοτιδίων, η οποία ονομάζεται

«αλληλουχία seed» (seed sequence ή seed region), και αλληλεπιδρά ισχυρά, με τέλεια συμπληρωματικότητα, με τη 3'-UTR των mRNA-στόχων (Bartel, 2009). Οι αλληλουχίες seed είναι υψηλά συντηρημένες μεταξύ των οργανισμών, μέσω αυτών γίνεται η επιλογή των mRNA-στόχων από τα miRs και αποτελούν χρήσιμο εργαλείο στον τομέα της βιοπληροφορικής για την πρόβλεψη στόχων των miRs (Maziere & Enright, 2007; Lewis et al, 2003). Το 3' άκρο του miR πραγματοποιεί ατελή συμπληρωματικότητα με τα νουκλεοτίδια της 3'-UTR του mRNA-στόχου και η αλληλεπίδραση είναι ασθενής (Brennecke et al., 2005).

Κατά κύριο λόγο, τα miRs έχουν αρνητική ρύθμιση στη γονιδιακή έκφραση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, είτε αποικοδομώντας τα mRNA-στόχους τους, ή/και καταστέλλοντας την μετάφρασή τους (Doxakis, 2013; Chekulaeva & Filipowicz, 2009; Eulalio et al, 2008; Filipowicz et al, 2008). Βέβαια έχει βρεθεί ότι, τα miRs μπορούν να επάγουν την μετάφραση κάποιων mRNAs (Orom et al, 2008; Vasudevan et al, 2007). Ο τρόπος με τον οποίο θα δράσουν τα miRs, εξαρτάται από τον βαθμό συμπληρωματικότητας μεταξύ του miR και της 3'-UTR του mRNA-στόχου. Αν υπάρχει τέλεια ή σχεδόν τέλεια συμπληρωματικότητα προκαλείται διάσπαση ή αποικοδόμηση του mRNA-στόχου από τις ριβονουκλεάσες του συμπλόκου miRISC (Zeng et al, 2003; Hutvagner & Zamore, 2002; Rhoades et al, 2002). Όμως συνήθως παρατηρείται ατελή συμπληρωματικότητα ανάμεσα στο miR και τη 3'-UTR του mRNA-στόχου (Pillai et al, 2007). Σ' αυτή τη περίπτωση, κύριο ρόλο κατέχουν οι ριβονουκλεάσες του συμπλόκου miRISC, καταστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση, και επιπλέον οδηγούν το mRNA-στόχο σε περαιτέρω επεξεργασία, προκαλώντας την αποσταθεροποίηση και την πιθανή αποικοδόμησή τους (Fabian et al, 2010; Saxena et al, 2003). Οι τρόποι δράσης είναι:

1. Αποικοδόμηση των mRNA-στόχων: Η αποικοδόμηση των mRNA-στόχων από τα miRs συμβαίνει κυρίως στα φυτά (Nilsen, 2007). Οι πρωτεΐνες AGO του συμπλόκου miRISC βοηθούν στην αναγνώριση των mRNA-στόχων από τα miRs, αλλά μόνο η AGO-2 έχει ενεργότητα ενδονουκλεάσης και μπορεί και διασπά το mRNA-στόχο (Landthaler et al, 2008; Tang, 2005; Hutvagner & Zamore, 2002). Από τη διάσπαση προκύπτουν δύο τμήματα των mRNA-στόχων. Τα τμήματα που έχουν το 5' άκρο αποικοδομούνται στο εξώσωμα με κατεύθυνση 3' προς 5', ενώ τα τμήματα που έχουν το 3' άκρο αποικοδομούνται στο κυτταρόπλασμα ή

στον πυρήνα από μια 5' προς 3' εξωνουκλεάση (Gy et al, 2007; Houseley et al, 2006; Souret et al, 2004).

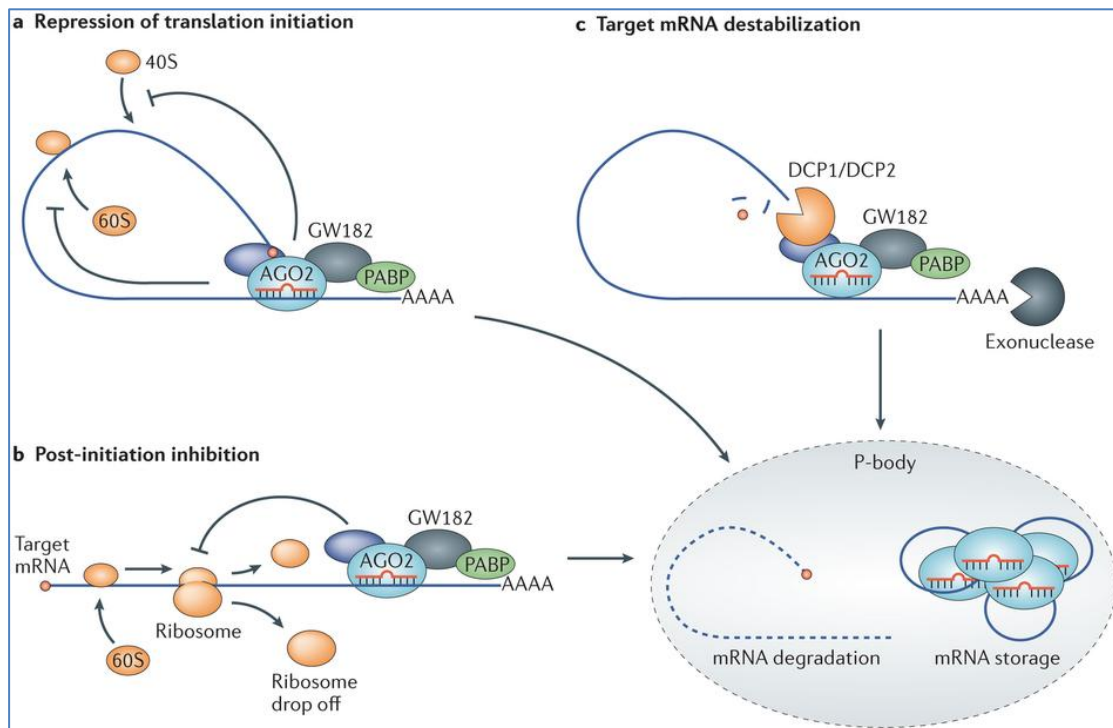
2. Καταστολή της μετάφρασης των mRNA-στόχων: Η καταστολή της μετάφρασης, η οποία γίνεται μέσω του συμπλόκου miRISC, συμβαίνει είτε στην έναρξη είτε στην επιμήκυνση της πρωτεϊνοσύνθεσης (Filipowicz et al, 2008). Η πρωτεΐνη AGO-2 έχει την ικανότητα να δεσμεύεται απευθείας στην 5'- καλύπτρα των mRNA-στόχων, παρεμποδίζοντας τη δέσμευση του παράγοντα έναρξης eIF4E (eukaryotic Translation Factor 4E), ενώ η πρωτεΐνη TNRC6 (γνωστή και ως GW182) αλληλεπιδρά με την PABP (Poly(A) Binding Protein) στο 3' άκρο, παρεμποδίζοντας τη δέσμευση του παράγοντα έναρξης eIF4G και καταστέλλοντας έτσι την έναρξη της μετάφρασης (Εικόνες 5 και 6) (Fabian et al, 2010; Fabian et al, 2009; Kiriakidou et al, 2007). Εναλλακτικά, κατά την έναρξη της μετάφρασης, τα miRs ενισχύουν τη δράση του παράγοντα έναρξης eIF6 (eukaryotic Translation Initiation Factor 6), ο οποίος προσδένεται στη ριβοσωμική μονάδα 60S και εμποδίζει τη σύνδεσή της με τη ριβοσωμική μονάδα 40S, για να σχηματιστεί το ριβόσωμα 80S στην 5'- καλύπτρα των mRNAs (Chendrimata et al, 2007; Basu et al, 2001).

Μελέτες έχουν δείξει ότι, τα miRs μπορούν να καταστείλουν την επιμήκυνση της πρωτεϊνοσύνθεσης, καθώς αυτά προσδένονται στα πολυσώματα μέσω των πρωτεϊνών AGO, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των ριβοσωμάτων από το mRNA-στόχο και την πρόωρη λήξη της μετάφρασης στο στάδιο της επιμήκυνσης (Petersen et al, 2006; Seggerson et al, 2002; Olsen & Ambros, 1999).

3. Απαδενυλίωση και αποικοδόμηση των mRNA-στόχων: Έχει δειχθεί ότι η καταστολή της έκφρασης ορισμένων mRNAs επιτυγχάνεται και μέσω της αποσταθεροποίησης και αποικοδόμησής τους μέσα στα σωματίδια P από τις πρωτεΐνες του συμπλόκου miRISC (Wu et al, 2006; Bagga et al, 2005). Τα σωματίδια P αποτελούν δομές πλούσιες σε ένζυμα που σχετίζονται με την αποθήκευση, την αποικοδόμηση και την καταστολή της μετάφρασης των mRNAs (Εικόνες 5 και 6) (Eulalio et al, 2007; Parker & Sheth, 2007). Η αποσταθεροποίηση γίνεται μέσω απαδενυλίωσης, δηλαδή αφαίρεσης της poly(A) ουράς από το 3' άκρο, κατά την οποία συμμετέχουν οι πρωτεΐνες

TNRC6 και AGO του σύμπλοκου miRISC (Fabian et al, 2009; Yamashita et al, 2005).

4. Ρύθμιση της δράσης των miRs: Οι πρωτεΐνες RBPs (RNA-Binding Proteins), οι οποίες έχουν την ικανότητα να προσδένονται στις 3'-UTRs των mRNAs και να ρυθμίζουν την μετάφρασή τους, φαίνεται να ανταγωνίζονται την δράση των miRs (Fabian et al, 2010). Πιθανώς, αυτές οι πρωτεΐνες κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες προσδένονται στο mRNA-στόχο και παρεμποδίζουν την πρόσδεση του εκάστοτε miR (Bhattacharyya et al, 2006). Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη HuR, μία από τις πρωτεΐνες της οικογένειας πρωτεϊνών ELAV (Embryonic Lethal Abnormal Vision), κάτω από συνθήκες στρες δεσμεύεται στη 3'-UTR του *cat-1* mRNA, παρεμποδίζοντας την πρόσδεση του miR-122, οδηγώντας στην απελευθέρωση και την μετάφραση του mRNA από τα σωματίδια P (Hinman & Lou, 2008; Chang et al, 2007; Bhattacharyya et al, 2006).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου δράσης των miRs. Διακρίνονται η καταστολή των mRNA-στόχων κατά την έναρξη και την επιμήκυνση της μετάφρασής τους, καθώς και η αποσταθεροποίηση των mRNA-στόχων. Τέλος, στην εικόνα παρατηρείται και η περιοχή των “σωματιδίων P”, όπου πραγματοποιείται η αποικοδόμηση και η φύλαξη των mRNA-στόχων (Li & Rana, 2014).

1.2.3 *microRNAs* και Κυτταρικές Λειτουργίες

Τα miRs κατέχουν κυρίαρχο ρόλο σε αρκετές φυσιολογικές, αναπτυξιακές και παθολογικές διεργασίες, καθώς περίπου το 1/3 των γονιδίων των θηλαστικών καταστέλλονται από miRs. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι τα miRs συμμετέχουν στην διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων, την ανάπτυξη και διαφοροποίηση του αιμοποιητικού, καρδιαγγειακού, σκελετικού και νευρικού συστήματος, την έκκριση της ινσουλίνης, το μεταβολισμό της χοληστερόλης και την ανοσολογική απόκριση (Williams, 2008). Έχουν παρατηρηθεί αρκετά miRs, τα οποία εμπλέκονται στην παθογένεια ασθενειών, όπως είναι το σύνδρομο του ευθραύστου X, το σύνδρομο Di George, σε διαταραχές καρδιαγγειακού, ανοσοποιητικού και νευρικού συστήματος, καθώς και στον καρκίνο (Zhang et al, 2007). Τελευταία νέα της επιστημονικής κοινότητας προσδιορίζουν την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών προσκόλλησης με miRs σε υγιή κύτταρα, με στόχο τον περιορισμό του πολλαπλασιασμού τους (Kourtidis et al, 2015). Ενδεικτικά θα γίνει αναφορά στην ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των οργανισμών, καθώς και στο ρόλο των miRs στο νευρικό σύστημα.

1.2.3.1 Τα *microRNAs* στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των οργανισμών

Η πλειοψηφία των miRs εκφράζεται σε συγκεκριμένα στάδια της διαφοροποίησης των οργανισμών ή σε συγκεκριμένους ιστούς και καθένα απ' αυτά έχει την ικανότητα να συμμετάσχει σε διαφορετικές βιολογικές διεργασίες (Wienholds & Plasterk, 2005). Τα πρώτα miRs που ανακαλύφθηκαν, lin-4 και let-7, συμμετέχουν στην διαφοροποίηση και την ανάπτυξη της προνύμφης του *C. elegans* (Lee et al, 2003; Wightman et al, 1993). Αργότερα, ταυτοποιήθηκαν περισσότερα miRs, τα οποία εμπλέκονται στη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη διάφορων οργανισμών, όπως τα let-60, lsy-6, miR-48, miR-84 και miR-241 στον *C. elegans*, τα miR-1, miR-2, miR-7, miR-9, miR-14, miR-31, miR-100, miR-125 και miR-310 στη φρουτόμυγα *D. melanogaster*, και τα miR-1, miR-10, miR-143, miR-124, miR-181, miR-196 και miR-430 στα θηλαστικά (Williams, 2008). Ένα παράδειγμα ιστοειδικής έκφρασης αποτελούν τα miR-1 και miR-124, όπου το miR-1 εντοπίζεται στους καρδιακούς και σκελετικούς μύες, ενώ το miR-124 εκφράζεται στον εγκέφαλο (Bushati & Cohen, 2007). Επιπλέον, υπάρχουν miRs, τα οποία εκφράζονται αποκλειστικά στα εμβρυικά βλαστοκύτταρα και συμμετέχουν στον καθορισμό της

τελικής τύχης των κυττάρων στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης (Houbaviy et al, 2003).

1.2.3.2 Τα microRNAs στο Νευρικό Σύστημα

Τα miRs αποτελούν έναν νέο παράγοντα ρύθμισης του Νευρικού Συστήματος (ΝΣ). Όπως και άλλοι ιστοί, έτσι το ΝΣ και οι νευρικές κυτταρικές σειρές εκφράζουν κάποια ιστο-ειδικά miRs, όπου η έκφρασή τους είναι ιδιαίτερα αυξημένη ή μοναδική σ' αυτά τα κύτταρα. Τα miRs που έχουν προσδιοριστεί, μεταξύ άλλων, είναι τα miR-9, miR-124, miR-125, miR-128, miR-129 (Bak et al, 2008; Landgraf et al, 2007; Baskerville & Bartel, 2005; Nelson, 2004; Lagos-Quintana, 2002). Ο αριθμός των γονιδίων που κωδικοποιούν για miRs στο ΝΣ φαίνεται να είναι αρκετά μεγαλύτερος από άλλα όργανα, πιθανόν λόγω του βαθμού διαφοροποίησης και υψηλότερης γονιδιακής έκφρασης που διαθέτει το ΝΣ. Συγκεκριμένα, τα miR-9, miR-124 και miR-125 συμμετέχουν ενεργά στη διαφοροποίηση των κυττάρων του ΝΣ (Hohjoh & Fukushima, 2007; Krichevsky et al, 2006; Smirnova et al, 2005; Sempere et al, 2004). Ιδιαίτερα μεγάλη είναι η έκφραση του miR-124 κατά την έκφυση νευριτών και την μεταγραφή πολλών ειδικών νευρωνικών γονιδίων (Yu et al, 2008; Conaco et al, 2006). Σε καταστάσεις νευρολογικών διαταραχών, η έκφραση των miRs αλλάζει. Στο γλοιοβλάστωμα παρατηρείται αυξημένη έκφραση των miR-7, miR-124 και miR-137 (Lukiw et al, 2009; Silber et al, 2008; Chan et al, 2005; Ciafre et al, 2005). Η έκφραση του miR-133b στο μεσεγκέφαλο ασθενών με νόσο Πάρκινσον είναι ιδιαίτερα μειωμένη, ενώ παράλληλα τα miR-7 και miR-153 φαίνεται να ρυθμίζουν την έκφραση της πρωτεΐνης α-συνουκλείνη, η οποία εμπλέκεται στη νόσο Πάρκινσον (Doxakis, 2010; Junn et al, 2009). Σε ασθενείς με νόσο Αλτσχάιμερ παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης του miR-146a στον εγκέφαλο (Lukiw et al, 2008). Αντίθετα, σε ασθενείς με νόσο Αλτσχάιμερ τα επίπεδα έκφρασης των miR-29, miR-107 και miR-153 ήταν ιδιαίτερα μειωμένα (Long et al, 2012; Herbert et al, 2008; Wang et al, 2008; Liang et al, 2007). Τέλος, αναφέρεται ότι σε ασθενείς με νόσο Χάντιγκτον αλλάζουν τα επίπεδα έκφρασης των miRs, όπως για παράδειγμα ότι μειώνεται η έκφραση του miR-132 (Johnson et al, 2008).

1.3 Σκοπός

Το ασβέστιο εντοπίζεται στα φυτά και τα θηλαστικά, είτε ενωμένο με άλλες ουσίες, όπως ο υδροξυαπατίτης, ή ως ελεύθερο δισθενές ιόν (Ca^{2+}). Στα θηλαστικά, παρατηρείται μεγάλη διακύμανση στις συγκεντρώσεις των ιόντων ασβεστίου, που εντοπίζονται στα σωματικά υγρά, τον εξωκυττάριο χώρο και το εσωτερικό των κυττάρων, και παραμένουν σχετικά σταθερές. Τα ιόντα Ca^{2+} δρουν ως δεύτερο μήνυμα σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών αποκρίσεων, τόσο στην περίπτωση που το πρώτο μήνυμα είναι χημικής φύσεως, όσο και όταν είναι ηλεκτρικής φύσεως. Η κινητικότητα των ιόντων Ca^{2+} καθοδηγείται είτε από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες ασβεστίου, όπως είναι το ΕΔ και τα μιτοχόνδρια, είτε από τον εξωκυττάριο χώρο. Η συμμετοχή των ιόντων Ca^{2+} κρίνεται απαραίτητη σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η γονιμοποίηση, η περίοδος ανάπτυξης στην παιδική και εφηβική ηλικία, η μεταβίβαση του νευρικού σήματος, η μιϊκή σύσπαση και χάλαση κ.α. Επιπλέον, διαταραχές της ομοιόστασης του ασβεστίου σχετίζονται με πληθώρα ασθενειών, όπως μυϊκές, καρδιαγγειακές και παθήσεις του νευρικού συστήματος.

Τα miRs είναι μικρά μονόκλωνα ριβονουκλεϊκά οξέα, περίπου 22 νουκλεοτιδίων, εντοπίζονται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και είναι υψηλά συντηρημένα μεταξύ των διαφόρων ειδών. Κωδικοποιούνται από γονίδια ή εσώνια γονιδίων, αλλά δε μεταφράζονται περαιτέρω σε πρωτεΐνες. Αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, καθώς δεσμεύονται συμπληρωματικά στις 3'-UTRs των mRNA-στόχων, προκαλώντας την αποσταθεροποίησή τους και την καταστολή της μετάφρασης. Τα miRs συμμετέχουν σε ποικίλες βιολογικές διαδικασίες, όπως η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και ο κυτταρικός κύκλος. Επιπλέον, τα miRs έχει δειχθεί ότι εμπλέκονται στην παθογένεια ασθενειών, όπως είναι οι διαταραχές του νευρικού συστήματος και ο καρκίνος.

Συνεκτιμώντας τα παραπάνω, η παρούσα εργασία στοχεύει στον προσδιορισμό συγκεκριμένων νευρωνικών miRs που ενδεχομένως αλληλεπιδρούν με τις 3'-UTRs των *Ip3rs* και *Ryrs* mRNAs και ρυθμίζουν την έκφρασή τους. Η μελέτη του τρόπου δράσης αυτών των miRs στην λειτουργία των διαύλων ασβεστίου θα συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση του μηχανισμού ρύθμισης της εκροής ιόντων Ca^{2+} από το ΕΔ προς το κυτταρόπλασμα και κατ' επέκταση στον περιορισμό της διαταραχής της ομοιόστασης του ασβεστίου, που παρουσιάζεται σε διάφορες ασθένειες.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση με τις προβλέψεις των βάσεων δεδομένων TargetScan και miRanda, προκειμένου να εντοπιστούν πιθανές θέσεις πρόσδεσης στις 3'-UTRs των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip3r-1*, *Ip3r-2* και *Ip3r-3* mRNAs, οι οποίες αποτελούν στόχους συγκεκριμένων miRs (Friedman et al 2009, Grimson et al 2007, John et al 2004). Οι βάσεις δεδομένων, που χρησιμοποιήθηκαν, αναζητούν αλληλουχίες 7 ή 8 νουκλεοτιδίων πάνω σε κάθε mRNA, που είναι υψηλά συντηρημένες ανάμεσα στα διάφορα είδη οργανισμών και συμπληρωματικές με τις αλληλουχίες seed συγκεκριμένων miRs.

2.2 Πειραματικό υλικό

2.2.1 Κυτταρικές σειρές

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές εμπορικές κυτταρικές σειρές, οι οποίες είναι:

1. HEK-293 (Human Embryonic Kidney 293): Τα κύτταρα αυτής της σειράς έχουν προέλθει από τον μετασχηματισμό ανθρώπινων εμβρυικών κυττάρων νεφρού.
2. HeLa (Human Cervical Cancer): Τα κύτταρα της συγκεκριμένης σειράς προήλθαν από την ασθενή Henrietta Lacks, η οποία έπασχε από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.
3. SH-SY5Y (Human neuroblastoma): Τα κύτταρα αυτά είναι μετασχηματισμένα ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος, τα οποία απομονώθηκαν από ένα κοριτσάκι 4 ετών.
4. SK-N-SH (Human Neuroblastoma): Τα συγκεκριμένα κύτταρα προήλθαν από ανθρώπινα μεταστατικά κύτταρα μυελού των οστών, τα οποία απομονώθηκαν από ένα καυκάσιο κοριτσάκι 4 ετών.

Όλες οι κυτταρικές σειρές διατηρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM, το οποίο περιείχε επιπλέον 10 % εμβρυϊκό όρο μοσχαριού (Fetal Bovine Serum, FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα συντηρήθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 60 mm, σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C και σε

ατμόσφαιρα 5 % CO₂. Όταν η πυκνότητα ήταν περίπου 80-90%, τα κύτταρα μεταφέρονταν σε νέο τρυβλίο με φρέσκο θρεπτικό μέσο, σε αραιώση 1:6, περίπου κάθε 3 ημέρες.

Αρχικά, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο από το τρυβλίο με τα κύτταρα και έγινε μια πλύση με DPBS. Για την αποκόλληση των κυττάρων έγινε προσθήκη διαλύματος 0,05 % τρυψίνης/EDTA και έγινε επώαση στους 37 °C για 5 λεπτά. Το διάλυμα τρυψίνης/EDTA απενεργοποιήθηκε με την προσθήκη θρεπτικού μέσου DMEM/FBS 10%. Κατόπιν, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 1000 rpm για 5 λεπτά και το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε με DMEM/FBS 10%. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε νέο τρυβλίο με φρέσκο θρεπτικό μέσο DMEM/FBS 10% και επώαστηκαν στους 37 °C για περίπου 3 ημέρες, μέχρι την επόμενη ανακαλλιέργεια.

Όλες οι κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription, RT) και την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Επιπλέον, η κυτταρική σειρά HEK-293 χρησιμοποιήθηκε για την διαμόλυνση και ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης. Η κυτταρική σειρά SK-N-SH χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου με τις μεθόδους της ακουαρίνης (Aequorin) και της απεικόνισης των ιόντων ασβεστίου (calcium imaging) με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής Fluo-4.

2.2.2 Φορείς κλωνοποίησης

Για την κλωνοποίηση των τμημάτων DNA, που κωδικοποιούν τα τμήματα RNA της 3'-UTR των γονιδίων *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip_{3r}-1*, *Ip_{3r}-2* και *Ip_{3r}-3*, του miR-124, του miR-153, του miR-124/153, καθώς και της φωτοπρωτεΐνης Aequorin, χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι φορείς κλωνοποίησης:

1. psi-CHECKTM2 (Promega)

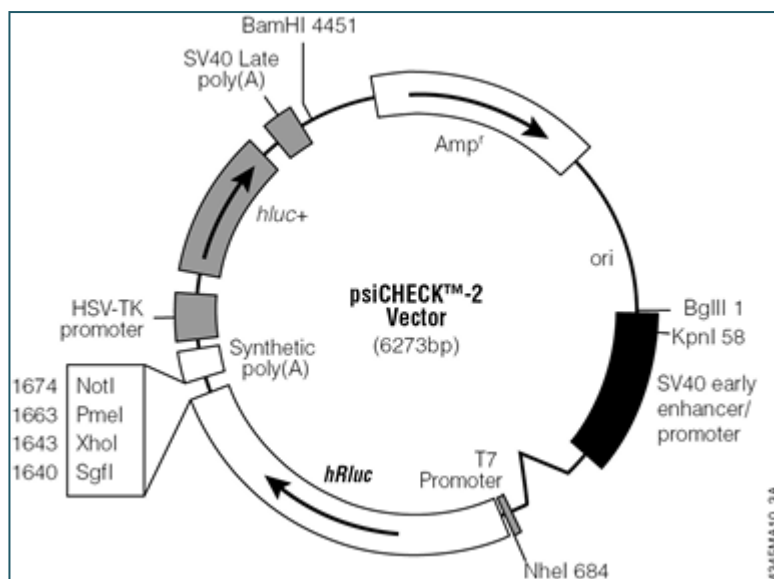
Οι αλληλουχίες, που κωδικοποιούν τις 3'-UTR των γονιδίων *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip_{3r}-1*, *Ip_{3r}-2* και *Ip_{3r}-3*, τοποθετήθηκε καθοδικά της 3'-UTR της λουσιφεράσης Renilla. Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας χρησιμοποιήθηκε για την διαμόλυνση των κυττάρων HEK-293 κατά τη μέθοδο της λουσιφεράσης. Ο φορέας psi-CHECKTM2, μεταξύ των άλλων, διαθέτει:

- i) Τις κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων της λουσιφεράσης Renilla (Synthetic Renilla luciferase gene, hRluc) και της λουσιφεράσης Firefly

(Synthetic Firefly luciferase gene, hluc+), που είναι κατασκευασμένες, ώστε να εκφράζονται σε κύτταρα θηλαστικών. Η έκφραση της Renilla χρησιμεύει για τη μέτρηση της έκφρασης των 3'-UTRs των γονιδίων *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip3r-1*, *Ip3r-2* και *Ip3r-3*, ενώ η Firefly αποτελεί εσωτερικό μάρτυρα για την κανονικοποίηση του σήματος της Renilla,

- ii) Ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, απαραίτητο για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών *E. Coli* που φέρουν το σωστό φορέα,
- iii) Τον υποκινητή του γονιδίου T7, ανοδικά του γονιδίου Renilla, που χρησιμοποιείται για την μεταγραφή της από την T7 RNA πολυμεράση,
- iv) Τις αλληλουχίες SV40 Synthetic poly (A) και SV40 Late poly (A), καθοδικά των γονιδίων *Renilla* και *Firefly*, αντίστοιχα, οι οποίες παρέχουν το σήμα για πολυαδενιλίωση των μεταγράφων και ενισχύουν την σταθερότητα αυτών και την αποτελεσματικότητα της μεταγραφής τους.

Η εισαγωγή του προϊόντος της PCR καθοδικά της 3'-UTR του γονιδίου της Renilla μέσα στον πλασμιδιακό φορέα psi-CHECKTM2 πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων XhoI και NotI (Εικόνα 7). Έπειτα πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli* DH5A με τον τροποποιημένο φορέα psi-CHECKTM2, για επιλογή και απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων που έφεραν το σωστό ένθεμα (*Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip3r-1*, *Ip3r-2* και *Ip3r-3* 3'-UTRs). Τέλος, οι φορείς, οι οποίοι έφεραν τις 3'-UTRs, χρησιμοποιήθηκαν για την διαμόλυνση των κυττάρων HEK-293 κατά την ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης.



Εικόνα 7: Σχηματικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα psi-CHECK™2.

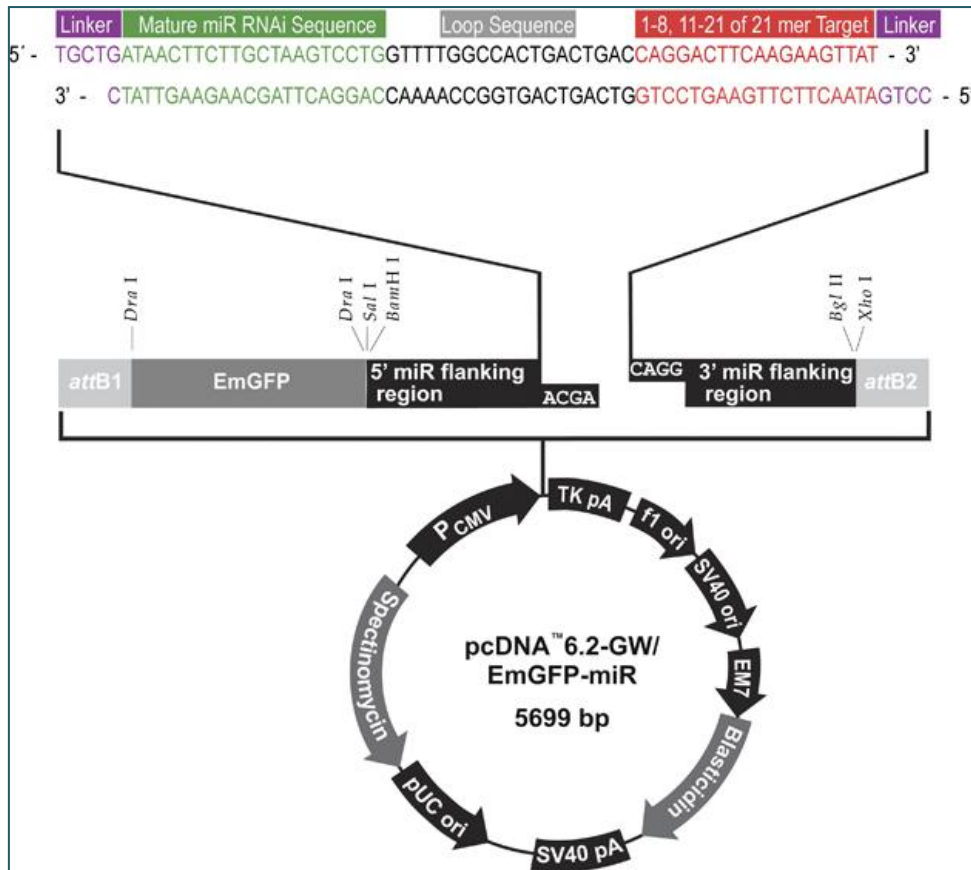
2. pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR (Invitrogen)

Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία αντιπροσωπεύουν την πρωταρχική μορφή των miRs (pri-miRs) και κωδικοποιούν τα ώριμα miRs. Ο φορέας pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR, μεταξύ των άλλων, διαθέτει:

- i) Τον υποκινητή του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (Cytomegalovirus, CMV), ο οποίος αναγνωρίζεται από την RNA πολυμεράση II και παρέχει ισχυρή και επιλεκτική έκφραση των miRs και των γονιδίων αναφοράς (EmGFP),
- ii) Την κωδική αλληλουχία του γονιδίου της Emerald Πράσινης Φθορίζουσας Πρωτεΐνης (Emerald Green Fluorescent Protein, EmGFP), η οποία επιτρέπει τον οπτικό προσδιορισμό των διαμολυσμένων κυττάρων, με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού,
- iii) Μια περιοχή κλωνοποίησης, που περιλαμβάνει μία 5' και μία 3' προεξοχή (5', 3' miR flanking regions), και είναι απαραίτητη για την προσανατολισμένη κλωνοποίηση του δίκλωνου πρόδρομου ολιγονουκλεοτιδίου, που κωδικοποιεί για κάθε miR,
- iv) Μία αλληλουχία σήματος πολυαδενυλίωσης της θυμιδικής κινάσης (Thymidine Kinase Poly (A), TKpA) του ερπητοϊού (Herpes Simplex Virus, HSV), απαραίτητη για την λήξη της μεταγραφής και την πολυαδενυλίωση του μεταγράφου,

- ν) Δύο γονίδια ανθεκτικότητας στην στρεπτομυκίνη και στην βλαστισιδίνη, απαραίτητα για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών *E. coli* και των ευκαρυωτικών κυττάρων που φέρουν τον σωστό πλασμιδιακό φορέα, αντίστοιχα.

Τα πρόδρομα δίκλινα ολιγονουκλεοτίδια των miRs κατασκευάστηκαν, χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές, και εισήχθησαν στο 3'-UTR του γονιδίου EmGFP μέσα στον φορέα pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR, αφού προηγήθηκε πέψη τους με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli* με τους τροποποιημένους φορείς pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR, για επιλογή και απομόνωση των φορέων που έφεραν τα εκάστοτε miRs. Ο φορέας, που έφερε ταυτόχρονα δύο pri-miRs (pri-miR-124/153) κατασκευάστηκε με εισαγωγή της αλληλουχίας του pri-miR-153 μετά την αλληλουχία του pri-miR-124 μέσα στη 3'-UTR του γονιδίου EmGFP (Εικόνα 8). Οι φορείς, οι οποίοι έφεραν τα pri-miRs χρησιμοποιήθηκαν για την διαμόλυνση των κυττάρων HEK-293 και SK-N-SH, την ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης, την PCR, και για την μέτρηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου με τη μέθοδο της Aequorin.



Εικόνα 8: Σχηματικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR.

3. pcDNA™6.2-GW/DsRed-Express-miR

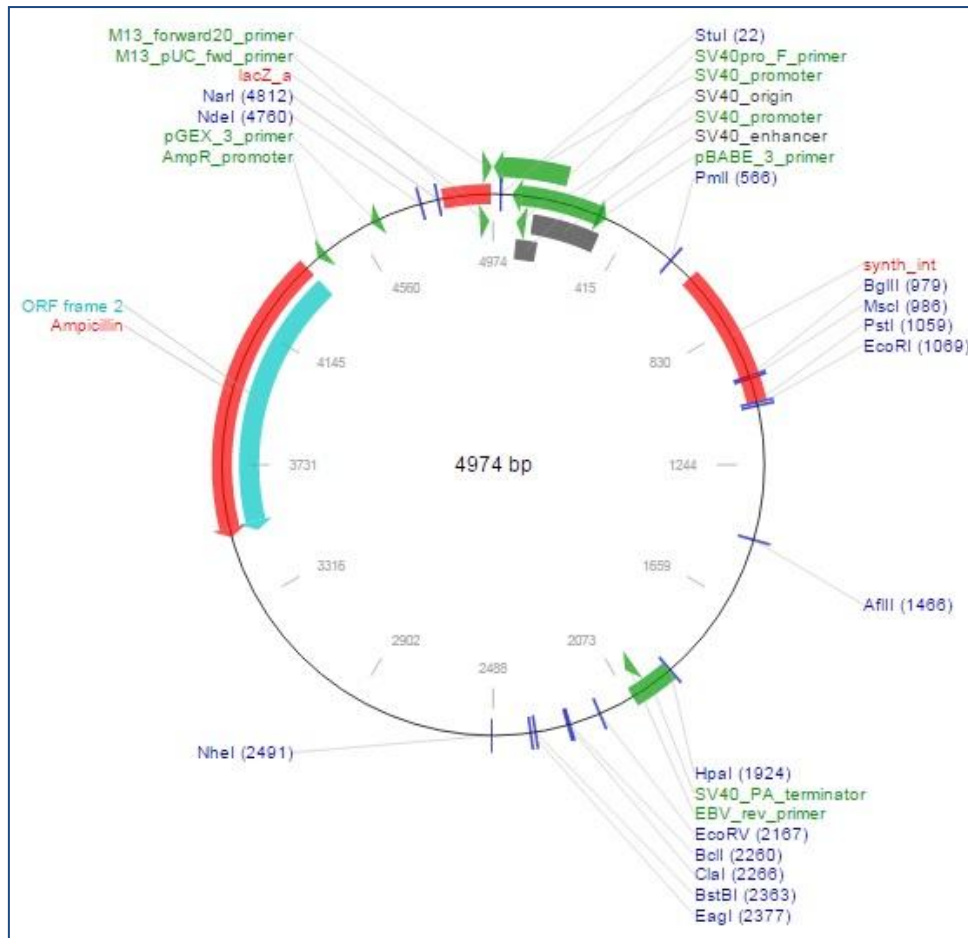
Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA™6.2-GW/DsRed-Express-miR κατασκευάστηκε με την απομάκρυνση του γονιδίου EmGFP από τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR, με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα, και την ένταξη του γονιδίου DsRed-Express από τον πλασμιδιακό φορέα pCMV-DsRed-Express (632416, Clontech). Τα πρόδρομα δίκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια των miRs εντοπίζονται στη 3'-UTR του γονιδίου DsRed-Express μέσα στον φορέα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μετασηματισμός βακτηρίων *E. coli* με τους τροποποιημένους φορείς pcDNA™6.2-GW/DsRed-Express-miR, για επιλογή και απομόνωση των φορέων που έφεραν τα εκάστοτε miRs. Οι φορείς, οι οποίοι έφεραν τα pri-miRs χρησιμοποιήθηκαν για την διαμόλυνση των κυττάρων SK-N-SH και την μέτρηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου με τη μέθοδο της απεικόνισης ιόντων ασβεστίου (Calcium Imaging).

4. cytAEQ/pMT2

Ο πλασμιδιακός φορέας cytAEQ/pMT2 (cytAEQ) χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση της φωτοπρωτεΐνης ακουαρίνης (Aroaequorin) και την παραμονή της στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 9). Ο παρόν φορέας κλωνοποίησης μεταξύ άλλων διαθέτει:

- i) Τον υποκινητή από τον ιό SV40 (*Simian virus 40*), ο οποίος αναγνωρίζεται από την RNA πολυμεράση II, και ελέγχει την έκφραση του γονιδίου της Aroaequorin,
- ii) Μία αλληλουχία σήματος πολυαδενυλίωσης του ιού SV40 (SV40 terminator), απαραίτητη για την λήξη της μεταγραφής και την πολυαδενυλίωση του μεταγράφου,
- iii) Ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη, απαραίτητο για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών *E. Coli* που φέρουν τον σωστό φορέα.

Η εισαγωγή του ενθέματος της Aroaequorin, ως προϊόν PCR, έγινε με τη βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων PstI και EcoRI (Εικόνα 9). Έπειτα πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli* DH5A με τον τροποποιημένο φορέα, για επιλογή και απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων που έφεραν το ένθεμα της Aroaequorin. Ο φορέας cytAEQ χρησιμοποιήθηκε για την διαμόλυνση των κυττάρων SK-N-SH, μαζί με τους φορείς pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR, οι οποίοι κωδικοποιούν τα miRs, προκειμένου να προσδιοριστεί η ενδοκυττάρια συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου. Το παραπάνω πλασμίδιο είναι ευγενική παραχώρηση του εργαστηρίου του κ. Javier Alvarez, από το τμήμα Βιοχημείας και Φυσιολογίας, του Ινστιτούτου Βιολογίας και Μοριακής Γενετικής (Institute of Biology and Molecular Genetics, IBMG) της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Valladolid της Ισπανίας (Brini et al 1995).



Εικόνα 9: Σχηματικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pMT2.

2.3 Κατασκευή Φορέων Κλωνοποίησης

2.3.1 Κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα *psi-CHECKTM* 2'-3'-UTR των γονιδίων *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip_{3r}-1*, *Ip_{3r}-2* και *Ip_{3r}-3*

2.3.1.1 Απομόνωση του τμήματος DNA 3'-UTR των γονιδίων *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip_{3r}-1*, *Ip_{3r}-2* και *Ip_{3r}-3*

Οι αλληλουχίες των 3'-UTRs των γονιδίων *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip_{3r}-1*, *Ip_{3r}-2* και *Ip_{3r}-3* απομονώθηκαν από ολικό DNA γλοιοβλαστώματος με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Για την PCR σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές, όπου στις άκρες έχουν ειδικές αλληλουχίες αναγνώρισης από τα περιοριστικά ένζυμα *XhoI* και *NotI*, και το ένζυμο της DNA πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η *One Taq* (NEB). Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρειάστηκαν 100 ng DNA ανθρώπινου γλοιοβλαστώματος, τα οποία αναμείχθηκαν με 1X *One Taq* Standart Buffer, 0,2 mM dNTPs, 0,2 pmoles από κάθε εκκινητή και 1,25 Units *One Taq* σε τελικό όγκο 50 μl. Ο πολλαπλασιασμός

των 3'-UTRs των γονιδίων *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip3r-1*, *Ip3r-2* και *Ip3r-3* πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή και το μίγμα αρχικά επωάστηκε στους 94 °C για 2 λεπτά, έπειτα στους 94 °C για 20 δευτερόλεπτα, μετά στους 50 °C για 40 δευτερόλεπτα, και κατόπιν η επέκταση του τμήματος DNA έγινε στους 68 °C για 3 λεπτά. Το πρόγραμμα αυτό επαναλήφθηκε για 40 κύκλους. Στο τέλος, το μίγμα επωάστηκε στους 68 °C για ακόμα 10 λεπτά και πραγματοποιήθηκαν πέψεις με περιοριστικά ένζυμα, έτσι ώστε να είναι δυνατή η σύνδεσή τους με τον εκάστοτε πλασμιδιακό φορέα.

2.3.1.2 Πέψη του προϊόντος PCR με περιοριστικά ένζυμα

Τα κλωνοποιημένα τμήματα DNA υποβλήθηκαν σε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και NotI-HF (NEB). 35 μl από το προϊόν της PCR αναμείχθηκαν με 1X Buffer 4 NEB, 1X BSA και 1,6 units από το κάθε ένζυμο σε τελικό όγκο 50 μl. Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 37 °C για 3 ½ ώρες. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και απομονώθηκαν με τη βοήθεια του QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (Qiagen), όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.3.1.3 Οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την διαδικασία πολλαπλασιασμού των 3'-UTRs των γονιδίων *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip3r-1*, *Ip3r-2* και *Ip3r-3*, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 1,5 % πήκτωμα αγαρόζης. Τα μεγέθη των διαφόρων ενθεμάτων ποικίλουν: *Ryr-1* (120 bp), *Ryr-2* (1330 bp), *Ryr-3* (750 bp), *Ip3r-1* (1600 bp), *Ip3r-2* (3290 bp) και *Ip3r-3* (690 bp). Για την παρασκευή του πηκτώματος 0,75 g αγαρόζης διαλύθηκαν σε 50 ml 1X TBE με τη βοήθεια θερμότητας. Μετά το βρασμό, το μίγμα αφέθηκε για μερικά λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα προστέθηκαν 5 μl βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml), ακολούθησε ελαφριά ανακίνηση και το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδικό καλούπι. Έπειτα, τοποθετήθηκε ειδικό χτενάκι για τη διαμόρφωση των πηγαδιών, όπου θα προστεθούν τα δείγματα. Το πήκτωμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, μέχρι να στερεοποιηθεί. Κατόπιν, αφαιρέθηκε το χτενάκι και η συσκευή γέμισε με 0,5X TBE, μέχρι να καλυφθεί το πήκτωμα. Στα δείγματα προστέθηκε 1X χρωστικής για DNA και φορτώθηκε όλη η ποσότητα στα πηγαδάκια. Στο πρώτο πηγάδι του πηκτώματος φορτώθηκαν 3 μl 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas), που αποτελείται από μίγμα DNA γνωστών μοριακών βαρών και χρησιμοποιήθηκε για την

ταυτοποίηση των τμημάτων DNA. Η συσκευή συνδέθηκε με το τροφοδοτικό και η τάση του ρεύματος που εφαρμόστηκε ήταν 110 Volts. Μετά τον διαχωρισμό των δειγμάτων, η ηλεκτροφόρηση σταμάτησε και το πήκτωμα φωτογραφήθηκε, κάτω από λάμπα UV, με το Dolphin Gel Documentation System.

2.3.1.4 Καθαρισμός προϊόντος PCR

Ο καθαρισμός έγινε με τη βοήθεια του QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (Qiagen) ύστερα από ηλεκτροφόρηση του δείγματος. Με ένα χειρουργικό νυστέρι απομονώθηκε το κομμάτι του πηκτώματος που περιείχε το επιθυμητό τμήμα DNA και τοποθετήθηκε σε φυαλίδιο erpendorf. Το κομμάτι του πηκτώματος ζυγίστηκε και προστέθηκε ποσότητα QG Buffer ίση με 3 φορές του βάρους του κομματιού. Το δείγμα επώαστηκε στους 50 °C για 10 λεπτά, μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη, αναδεύοντας κάθε 2-3 λεπτά σε vortex. Κατόπιν, το δείγμα τοποθετήθηκε σε ειδική στήλη με φίλτρο και φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 rpm για 1 λεπτό. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε πλύση της στήλης με 0,5 ml PE Buffer και δύο φυγοκεντρήσεις στις 13.000 rpm για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθεί όλη η περίσσια ποσότητα της αιθανόλης. Η στήλη τοποθετήθηκε σε καθαρό φυαλίδιο erpendorf και προστέθηκαν 35 μl EB Buffer, το οποίο είχε θερμανθεί στους 65 °C. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μία τελευταία φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 1 λεπτό, ώστε να εκλουστεί το τμήμα DNA, το οποίο στη συνέχεια φωτομετρήθηκε.

2.3.1.5 Εισαγωγή των 3'-UTRs στον πλασμιδιακό φορέα psi-CHECK^{TM2}

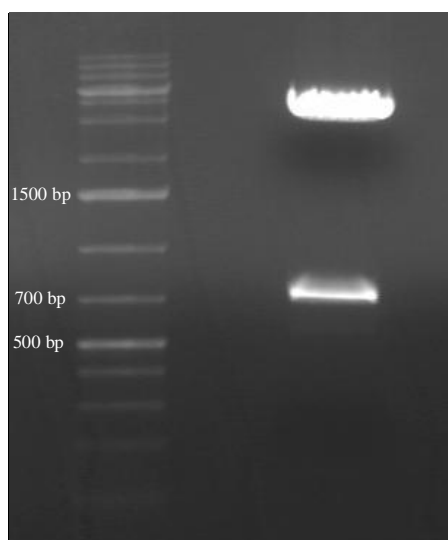
Για την εισαγωγή των αλληλουχιών 3'-UTRs των γονιδίων *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip3r-1*, *Ip3r-2* και *Ip3r-3* στον πλασμιδιακό φορέα psi-CHECK^{TM2}, υπολογίστηκαν *in silico* οι απαιτούμενες ποσότητες για την πραγματοποίηση της σύνδεσης. Έτσι, ήταν εφικτό να αναμειχθούν οι αλληλουχίες 3'-UTRs των γονιδίων *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip3r-1*, *Ip3r-2* και *Ip3r-3*, η κάθε μια ξεχωριστά, μαζί με την απαραίτητη ποσότητα του πλασμιδιακού φορέα, ο οποίος είχε κοπεί με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα με τα οποία είχε γίνει και η πέψη στα ενθέματα. Τα μίγματα συμπληρώθηκαν με 1X Ligase Buffer και 1μl DNA λιγάσης (Takara), η οποία έχει τη δυνατότητα να καταλύει τη σύνδεση τμημάτων DNA. Ο τελικός όγκος του μίγματος ήταν 10 μl και η αντίδραση έγινε στους 16 °C όλη τη νύχτα. Έπειτα ακολούθησε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με τα 5 μl του μίγματος, έγινε έλεγχος των αποικιών με Colony PCR,

καλλιέργεια των αποικιών που έφεραν το σωστό πλασμίδιο και απομόνωση του πλασμιδίου.

2.3.2 Κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα *pcDNATM6.2-GW/DsRed-Express-miR*

2.3.2.1 Απομόνωση του τμήματος DNA του γονιδίου DsRed-Express

Για την απομόνωση του τμήματος DNA του γονιδίου DsRed-Express από τον πλασμιδιακό φορέα pCMV-DsRed-Express (632416, Clontech) πραγματοποιήθηκε πέψη με περιοριστικά ένζυμα. 3 μg του πλασμιδίου αναμείχθηκαν με 1X CutSmart NEB Buffer και 2 units από κάθε περιοριστικό ένζυμο, NheI-HF και NotI-HF, σε τελικό όγκο 50 μl. Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 37 °C για 3 ½ ώρες. Κατόπιν, όλη η ποσότητα του δείγματος αναμείχθηκε με 1X T4 DNAPol Buffer, 100 μM dNTPs και 2 units T4 DNA πολυμεράση NEB σε τελικό όγκο 30 μl. Η αντίδραση έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Τέλος, το δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα 1% αγαρόζης και απομονώθηκε με τη βοήθεια του QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (Qiagen), όπως περιγράφεται παραπάνω, και φωτομετρήθηκε (Εικόνα 10).

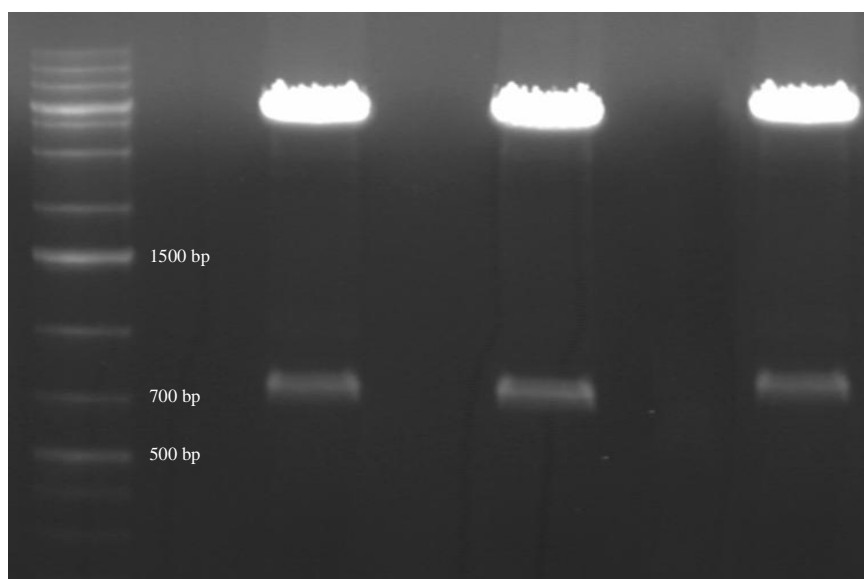


Εικόνα 10: Οριζόντια ηλεκτροφόρηση του τμήματος DNA του γονιδίου DsRed-Express από τον πλασμιδιακό φορέα pCMV-DsRed-Express. Το τμήμα DNA του γονιδίου DsRed-Express υπολογίζεται περίπου στα 715 bp, όπως εμφανίστηκε στην ηλεκτροφόρηση.

2.3.2.2 Απομάκρυνση του τμήματος DNA του γονιδίου EmGFP από τον πλασμιδιακό φορέα *pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR*

Για την απομάκρυνση του τμήματος DNA του γονιδίου EmGFP από τον πλασμιδιακό φορέα *pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR* πραγματοποιήθηκε πέψη με το

περιοριστικό ένζυμο DraI (Takara). Ποσότητα 2 μg από κάθε πλασμίδιο pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR, που κωδικοποιεί τα ώριμα miRs, αναμειχθηκε με 1X DraI Buffer (Takara) και 1,5 units DraI σε τελικό όγκο 20 μl . Τα δείγματα επωάστηκαν στους 37 °C για 3 ½ ώρες. Στη συνέχεια, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν και απομονώθηκαν τα γραμμικά πλέον πλασμίδια με τη χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (Qiagen), όπως περιγράφεται παραπάνω. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε αποφωσφορυλίωση των γραμμικών πλασμιδίων με τη χρήση του ενζύμου αλκαλικής φωσφατάσης (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, CIAP) (Fermentas), ώστε να αφαιρεθούν οι φωσφορικές ομάδες από τα 5' άκρα τους και να εμποδιστεί η επανακυκλοποίησή τους. Αρκετή ποσότητα των δειγμάτων αναμειχθηκε με 1X CIAP Buffer και 2 units ενζύμου CIAP σε τελικό όγκο 50 μl . Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 37 °C για ½ ώρα. Τα δείγματα καθαρίστηκαν από την παρουσία του ενζύμου με τη χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (Qiagen), χωρίς να προηγηθεί ηλεκτροφόρηση, και φωτομετρήθηκαν (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Οριζόντια ηλεκτροφόρηση του τμήματος DNA του γονιδίου EmGFP από τους πλασμιδιακούς φορείς pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR, περιείχαν τα miR-124, miR-124/153 και miR-153, από τα αριστερά προς τα δεξιά. Το τμήμα DNA του γονιδίου EmGFP υπολογίζεται περίπου στα 710 bp.

2.3.2.3 Εισαγωγή του γονιδίου DsRed-Express στον πλασμιδιακό φορέα pcDNATM6.2-GW/miR

Για την κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα pcDNATM6.2-GW/DsRed-Express-miR πραγματοποιήθηκε εισαγωγή του τμήματος DNA του γονιδίου DsRed-Express στους γραμμικούς πλασμιδιακούς φορείς pcDNATM6.2-GW/miR, αφού

πρώτα υπολογίστηκαν *in silico* οι απαιτούμενες ποσότητες για την πραγματοποίηση της σύνδεσης. Έτσι, σε κάθε 150 ng γραμμικού πλασμιδιακού φορέα προστέθηκαν περίπου 72 ng ενθέματος του γονιδίου DsRed-Express. Το μίγμα συμπληρώθηκε με 1X Ligase Buffer και 20 units λιγάσης (Takara), η οποία έχει τη δυνατότητα να καταλύει τη σύνδεση τμημάτων DNA. Ο τελικός όγκος του μίγματος ήταν 10 μl και η αντίδραση έγινε στους 16 °C όλη τη νύχτα. Έπειτα ακολούθησε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με τα 5 μl του μίγματος, καλλιέργεια των αποικιών που έφεραν το σωστό πλασμίδιο και απομόνωση του πλασμιδίου.

2.4 Κλωνοποίηση Πλασμιδιακών Φορέων

Για την αποθήκευση των πλασμιδιακών φορέων και για τα πειράματα κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε η βακτηριακή κυτταρική σειρά *Escherichia coli* DH5a.

2.4.1 Παραγωγή δεκτικών κυττάρων για την εισαγωγή πλασμιδίων

Αρχικά, έγινε επίστρωση κυττάρων *E. coli* DH5a σε τρυβλίο διαμέτρου 10 cm με θρεπτικό υλικό άγαρ, χωρίς τη παρουσία αντιβιοτικού, και επώαση αυτών σε θερμοκρασία 37°C για όλη τη νύχτα. Τη δεύτερη μέρα, έγινε επιμόλυνση σε falcon με 6 ml θρεπτικού υλικού και επώαστηκε σε αναδευτήρα στους 20-22°C και 220-250 rpm για 6-8 ώρες. Το βράδυ της δεύτερης ημέρας έγινε επιμόλυνση με 1 ml από το falcon σε μια κωνική φιάλη με 100 ml θρεπτικού υλικού και 10 mM MgCl₂ και επώαστηκε στους 20-22°C και τουλάχιστον 220 rpm για όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα έγινε συχνή λήψη ~ 500 μl του δείγματος και φωτομετρήθηκε. Όταν η απορρόφηση του δείγματος έφτασε OD_{595nm} = 0.4-0.6, η φιάλη τοποθετήθηκε σε δωμάτιο θερμοκρασίας 4°C. Όλες οι διαδικασίες και τα διαλύματα από αυτό το σημείο κι έπειτα έπρεπε να βρίσκονται σε θερμοκρασία 4°C. Ακολούθως, έγινε διαχωρισμός της υγρής καλλιέργειας σε 2 falcon των 50ml και φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 10 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου έγινε επαναιώρηση των κυττάρων κάθε σωληναρίου σε 10 ml διαλύματος TB (10 mM HEPES, 15 mM CaCl₂, 55 mM MnCl₂, 250 mM KCl), συνένωση των δύο εναιωρημάτων κυττάρων και ψύξη για 10 λεπτά στον πάγο. Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 10 λεπτά και πάλι απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Ακολούθησε αναδιασπορά των κυττάρων σε 4 ml διαλύματος TB, εκ των οποίων τα 280 μl ήταν DMSO. Τέλος, μοιράστηκαν 60 μl από το αιώρημα των κυττάρων σε

κάθε erpendorf tube, ψύχθηκαν αμέσως με τη χρήση υγρού αζώτου και αποθηκεύτηκαν στους -80°C .

2.4.2 Μετασχηματισμός κυττάρων

Αρχικά, τοποθετήθηκε το erpendorf με το αιώρημα των κυττάρων, που είναι δεκτικά σε πλασμίδια, από τους -80°C σε πάγο, ώστε η απόψυξη των κυττάρων να γίνει με ομαλό τρόπο. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη του πλασμιδίου, τόση ώστε να μη ξεπερνά το 1/10 του όγκου των κυττάρων που βρίσκονται στο erpendorf, και επώαση στον πάγο για 15-20 λεπτά. Κατά τη διάρκεια αυτών των λεπτών, ανά ~4 λεπτά γινόταν μια ήπια ανακίνηση. Ακολούθως, έγινε επώαση για 40 δευτερόλεπτα στους 42°C και αμέσως μετά επώαστηκαν για 2-5 λεπτά και πάλι στον πάγο. Έπειτα έγινε προσθήκη 900 μl θρεπτικού υλικού στα κύτταρα και επώασή τους στους 37°C για 1 ώρα, προκειμένου να εκφραστεί το γονίδιο ανθεκτικότητας για το εκάστοτε αντιβιοτικό. Μετά το πέρας της 1 ώρας πραγματοποιήθηκε καθίζηση των κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 λεπτά, αφαίρεση της μισής ποσότητας του υπερκειμένου και αναδιασπορά των κυττάρων με την υπόλοιπη ποσότητα του υπερκειμένου. Το τελευταίο στάδιο του μετασχηματισμού των κυττάρων περιλαμβάνει την επιμόλυνση τρυβλίων διαμέτρου 10 cm με θρεπτικό υλικό LB άγαρ (Sigma Aldrich) που περιείχαν αντιβιοτικό για την επιλογή των κατάλληλων αποικιών των βακτηρίων, οι οποίες αναπτύχθηκαν στους 37°C μέσα σε 12-16 ώρες.

2.4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε αποικία (Colony PCR)

Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη PCR είναι το ίδιο με αυτό που έγινε η απομόνωση της εκάστοτε αλληλουχίας DNA, με τη διαφορά ότι ως υπόστρωμα της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν διάφορες αποικίες βακτηρίων και όχι το ολικό DNA του γλοιοβλαστώματος. Μ' αυτό τον τρόπο, όσες αποικίες έδωσαν κατά την ηλεκτροφόρηση το επιθυμητό τμήμα DNA στο κατάλληλο μέγεθος ήταν και αυτές που επιλέχθηκαν για την περαιτέρω καλλιέργειά τους με το σωστό πλασμίδιο.

2.4.4 Καλλιέργεια βακτηρίων

Για την καλλιέργεια βακτηρίων που φέρουν το σωστό πλασμιδιακό φορέα, έγινε λήψη μιας διακριτής αποικίας από την στερεή καλλιέργεια και ακολούθησε επιμόλυνση μικρής φιάλης καλλιέργειας με 6 ml θρεπτικό υλικό LB broth (Sigma

Aldrich), παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού. Στη συνέχεια η υγρή καλλιέργεια επωάστηκε σε αναδευτήρα στους 37 °C για 12-16 ώρες.

2.4.5 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακών φορέων (*miniprep*)

Η απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων psi-CHECKTM2-3'-UTR των γονιδίων *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip3r-1*, *Ip3r-2* και *Ip3r-3* και pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR έγινε με τη χρήση του GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich). Αρχικά, από τα 5,5 ml υγρής καλλιέργειας έγινε συλλογή των βακτηρίων μετά από διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στις 13.000 rpm για 1 λεπτό. Έγινε επαναδιάλυση των κυττάρων με 200 µl Resuspension Solution και λύση αυτών με την προσθήκη 200 µl Lysis Solution. Τα βακτήρια παρέμειναν με τα παραπάνω διαλύματα για 5 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν ακόμη 350 µl Neutralization Solution, ώστε να σταματήσει η λύση των κυττάρων. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 rpm για 10 λεπτά. Έγινε προετοιμασία της στήλης με το φίλτρο, το οποίο συγκρατεί τους πλασμιδιακούς φορείς, με την προσθήκη 500 µl Column Preparation Solution, τοποθετήθηκε μέσα σε eppendorf και φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 rpm για 1 λεπτό. Μετά την απομάκρυνση του διαλύματος, μεταφέρθηκε το καθαρό μίγμα από τη φυγοκέντρηση των λυμένων κυττάρων στη στήλη με το φίλτρο. Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στις 13.000 rpm του 1 λεπτού, ώστε να περάσει όλη η ποσότητα των λυμένων κυττάρων από το φίλτρο. Ακολούθως, προστέθηκαν 500 µl Optional Wash Solution στη στήλη, έγινε φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 λεπτό και αφαιρέθηκε το διάλυμα. Έγινε προσθήκη 750 µl Wash Solution και δύο φυγοκεντρήσεις στις 13.000 rpm για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα της αιθανόλης, η οποία περιέχεται στο τελευταίο διάλυμα. Τέλος, η στήλη με το φίλτρο μεταφέρθηκε σε καθαρό φιαλίδιο eppendorf, προστέθηκαν 80 µl Elution Solution, το οποίο είχε ζεσταθεί στους 65 °C, έγινε φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 λεπτό και το διαλυμένο πλασμίδιο φωτομετρήθηκε.

2.4.6 Μεσαίας κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακών φορέων (*midiprep*)

Η απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων pcDNATM6.2-GW/DsRed-Express-miR, που κωδικοποιούν τα ώριμα miRs, έγινε με τη χρήση του Purelink HiPure Plasmid Filter Purification (Invitrogen). Αρχικά, από τα 50 ml υγρής καλλιέργειας έγινε συλλογή των βακτηρίων με φυγοκέντρηση στα 4000g για 10 λεπτά και στη

συνέχεια απόρριψη του υπερκείμενου. Κατόπιν, προστέθηκαν 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος επαναιώρησης (Resuspension Buffer R3) με RNase A στο ίζημα που προέκυψε από την προηγούμενη διαδικασία και έγινε επαναιώρηση αυτού μέχρι ομογενοποίησης. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (Lysis Buffer, L7), έγινε ήπια ανάμειξη με αναστροφή 5 φορές, και το μείγμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος κατακρήμνισης (Precipitation Buffer, N3) και το μείγμα αναδεύτηκε με αναστροφή μέχρι ομογενοποίησης. Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 15000g. Έγινε προετοιμασία της στήλης με το φίλτρο με την προσθήκη 15 ml Equilibration Buffer (EQ1). Μετά τη φυγοκέντρωση το υπερκείμενο που προέκυψε τοποθετήθηκε στην ενυδατωμένη στήλη και το διάλυμα αφέθηκε μέχρι να διέλθει πλήρως από τη στήλη με την επίδραση της βαρύτητας. Μετά τη διέλευση του διαλύματος από τη στήλη ακολούθησαν δυο ξεπλύματα αυτής με 20 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer, W8) στη κάθε πλύση, και αφέθηκαν ώστε να διέλθει το διάλυμα από τη στήλη. Αργότερα, τοποθετήθηκε κάτω από τη στήλη νέος αποστειρωμένος σωλήνας των 15 ml (Falcon), προστέθηκαν 5 ml ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (Elution Buffer, E4) στη στήλη και το διάλυμα αφέθηκε να διέλθει από τη στήλη με την επίδραση της βαρύτητας. Στο falcon προστέθηκαν 3,5 ml ισοπροπανόλης και το μείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 12000g για 30 λεπτά στους 4 °C. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε με 3 ml αιθανόλης 70%. Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 12000g για 5 λεπτά στους 4 °C, το υπερκείμενο απορρίφτηκε και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει για να απομακρυνθεί όλη η αιθανόλη. Τέλος, το ίζημα επαναιωρήθηκε με 150 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE, το διάλυμα μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο φιαλίδιο erpendorf και το διαλυμένο πλασμίδιο φωτομετρήθηκε.

2.5 Διαμόλυνση Κυττάρων

Με τον όρο διαμόλυνση εννοούμε την εισαγωγή ξένων νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) σε κύτταρα θηλαστικών. Στην παρούσα μελέτη η διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των λιπιδίων σε κύτταρα HEK-293 και SK-N-SH. Ως λιπίδιο χρησιμοποιήθηκε η λιποφεκταμίνη (Lipofectamine 2000, LP-2000

Invitrogen), το οποίο αποτελεί κατιοντικό μόριο και παρέχει υψηλά επίπεδα διαμόλυνσης, χωρίς να προκαλεί μεγάλη καταπόνηση των κυττάρων.

2.5.1 Διαμόλυνση των κυττάρων HEK-293 με τους φορείς *psi-CHECKTM2* και *pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR*

Η διαμόλυνση των κυττάρων HEK-293 για ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης έγινε μία ημέρα μετά την επίστρωση των κυττάρων σε πιάτο 48 οπών και την επώασή τους στους 37 °C σε θρεπτικό μέσο DMEM/FBS 10%. Αρχικά, αναμίχθηκαν 30 μl διαλύματος OPTIMEM με 0,2 μg/μl *psi-CHECKTM2*- 3'-UTR των γονιδίων *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip3r-1*, *Ip3r-2* και *Ip3r-3*, και 0,8 μg/μl *pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR*, ανά συνθήκη. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν 30 μl OPTIMEM, που περιείχαν 1 μl LP-2000 και τα δείγματα επώαστηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση, το περιεχόμενο κάθε δείγματος μεταφέρθηκε στο πιάτο 48 οπών, όπου αναπτύσσονταν τα κύτταρα HEK-293 σε θρεπτικό 10% DMEM/FBS. Το πιάτο τοποθετήθηκε σε επωαστικό κλίβανο, θερμοκρασίας 37 °C και ατμόσφαιρας 5% CO₂ για 48 ώρες, μέχρι την συλλογή των κυττάρων για ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης.

2.5.2 Διαμόλυνση των κυττάρων SK-N-SH και HEK-293 με τους φορείς *pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR* ή *pcDNATM6.2-GW/DsRed-Express-miR*

Η διαμόλυνση των κυττάρων SK-N-SH και HEK-293, για την μέτρηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου με τη μέθοδο της Aequorin και της απεικόνισης ιόντων ασβεστίου (Calcium Imaging), έγινε την ίδια μέρα με την ανακαλλιέργειά τους.

- 1) Διαμόλυνση που προορίζεται για μέτρηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου με τη μέθοδο της Aequorin: Αρχικά αναμίχθηκαν 20 μl διαλύματος OPTIMEM με 0,8 μl LP2000, ανά συνθήκη, και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της παραπάνω επώασης επιπλέον 20 μl διαλύματος OPTIMEM αναμίχθηκαν με 0,2 μg του πλασμιδιακού φορέα cytAEQ και 0,4 μg των πλασμιδιακών φορέων *pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR*, ανά συνθήκη. Στη συνέχεια, έγινε μεταφορά του OPTIMEM που περιείχε τη LP2000, στο διάλυμα του κάθε φορέα και ακολούθησε επώαση για 20

λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, προστέθηκαν 25 μl από το διάλυμα των κυττάρων SK-N-SH της ανακαλλιέργειας (300 μl διάλυμα κυττάρων/ DMEM/FBS 10% από 60 mm τριβλίο) και μετά από μία επώαση 15 λεπτών το περιεχόμενο του κάθε δείγματος μεταφέρθηκε σε πιάτο 24 οπών που περιείχε 500 μl θρεπτικού υλικού DMEM/FBS 10%. Το πιάτο τοποθετήθηκε τέλος σε επωαστικό κλίβανο, θερμοκρασίας 37 °C και ατμόσφαιρας 5% CO₂ για 48 ώρες, μέχρι τη χρήση των κυττάρων και την περαιτέρω ανάλυση.

- 2) Διαμόλυνση που προορίζεται για μέτρηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου με τη μέθοδο της απεικόνισης ιόντων ασβεστίου (Calcium Imaging): Αρχικά αναμίχθηκαν 40 μl διαλύματος OPTIMEM με 3 μl LP2000, ανά συνθήκη, και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της παραπάνω επώασης ακόμη 40 μl διαλύματος OPTIMEM αναμίχθηκαν με 2,25 μg των πλασμιδιακών φορέων pcDNATM6.2-GW/DsRed-Express-miR, ανά συνθήκη. Στη συνέχεια, έγινε μεταφορά του OPTIMEM που περιείχε τη LP2000, στο διάλυμα του κάθε φορέα και ακολούθησε επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, προστέθηκαν 50 μl από το διάλυμα των κυττάρων SK-N-SH ή HEK-293 της ανακαλλιέργειας (360 μl διάλυμα κυττάρων/ DMEM/FBS 10% από 60 mm τριβλίο) και μετά από μία επώαση 15 λεπτών το περιεχόμενο του κάθε δείγματος μεταφέρθηκε σε πιάτο 6 οπών που περιείχε 2 ml θρεπτικού υλικού DMEM/FBS 10% και αποστειρωμένες καλυπτρίδες, οι οποίες νωρίτερα είχαν επωαστεί για 1 ώρα με διάλυμα πολυλυσίνης. Το πιάτο τοποθετήθηκε τέλος σε επωαστικό κλίβανο, θερμοκρασίας 37 °C και ατμόσφαιρας 5% CO₂ για 48 ώρες, μέχρι τη χρήση των κυττάρων και την περαιτέρω ανάλυση.

2.6 Ανάλυση με τη μέθοδο της Λουσιφεράσης

Η ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης των διαμολυσμένων κυττάρων HEK-293 με τους φορείς psi-CHECKTM2- 3'-UTR των γονιδίων *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip3r-1*, *Ip3r-2* και *Ip3r-3* και pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR, πραγματοποιήθηκε 48 ώρες μετά την διαμόλυνσή τους, με τη χρήση του Dual-Luciferase Reporter Kit (Promega). Αρχικά, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο DMEM/FBS 10% από το πιάτο και

έγινε μία πλύση με DPBS. Στη συνέχεια, προστέθηκε σε κάθε οπή 120 µl Lysis Buffer 1X, αραιωμένο με ultra pure H₂O, για διάλυση των κυττάρων, και 70 µl από τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε ειδικούς σωλήνες. Ακολούθησε προσθήκη σε κάθε σωλήνα 50 µl αντιδραστηρίου Dual-Glo Luciferase και τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 λεπτά σε σκιερό μέρος, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 10 λεπτών μετρήθηκε η έκφραση της λουσιφεράσης Firefly με τη βοήθεια λουμινόμετρου Lumat LB9507. Έπειτα σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 50 µl αντιδραστηρίου Dual-Stop & Glo 1:50 Stop & Glo Substrate. Έγινε επώαση των κυττάρων για 10 λεπτά σε σκιερό μέρος, σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε μέτρηση της έκφρασης της λουσιφεράσης Renilla στο λουμινόμετρο. Οι τιμές από την έκφραση της λουσιφεράσης Firefly χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση των τιμών από την έκφραση της λουσιφεράσης Renilla. Η μείωση της ενεργότητας της Renilla, λόγω της πρόσδεσης των miRs στις 3'-UTRs των γονιδίων *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip3r-1*, *Ip3r-2* και *Ip3r-3*, υπολογίστηκε από το λόγο των τιμών της έκφρασης της Renilla προς τις τιμές της έκφρασης της Firefly.

2.7 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)

Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip3r-1*, *Ip3r-2* και *Ip3r-3* mRNA και των miRs σε κύτταρα HEK-293, HeLa, SK-N-SH και SHSY-5Y διαμολυσμένα με φορείς που έφεραν το εκάστοτε miR. Αρχικά, έγινε απομόνωση του RNA από κάθε ιστό, το οποίο, στη συνέχεια, μετατράπηκε με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT) σε cDNA και ενισχύθηκε με PCR.

2.7.1 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA από κάθε κυτταρική σειρά πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του RNazol®RT (MRC) και η κατακρύμνηση έγινε με ισοπροπανόλη. Πρώτα απ' όλα, απομακρύνθηκε το θρεπτικό μέσο από το πιάτο 24 οπών με τα κύτταρα και έγινε μία πλύση με DPBS. Εν συνεχεία, σε κάθε οπή του πιάτου προστέθηκαν 300 µl RNazol (γαλάζιο χρώμα), ώστε να προκληθεί διάλυση των κυττάρων, και τα ομογενοποιημένα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια τύπου eppendorf.

Επιπλέον, έγινε προσθήκη 1 μl Precipitation Carrier και 100 μl νερού, τα μίγματα αναδεύτηκαν καλά (vortex) για 15 sec και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4 °C, 13.000 rpm για 15 λεπτά και έγινε μεταφορά της ανώτερης υδατικής φάσης (διάφανη), η οποία περιέχει το RNA, σε νέα φιαλίδια. Στην υδατική φάση έγινε προσθήκη 1,5 μl BAN (5% του όγκου RNazol), τα μίγματα αναδεύτηκαν καλά (vortex) για 15 sec και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 3-5 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4 °C, 13.000 rpm για 15 λεπτά και έγινε μεταφορά της ανώτερης υδατικής φάσης (διάφανη), σε νέα φιαλίδια. Στην υδατική φάση έγινε προσθήκη ίσης ποσότητας (1 όγκου) ισοπροπανόλης, ακολούθησε ελαφριά ανάδευση και τα μίγματα επώστηκαν στους -20 °C για 20 λεπτά. Κατόπιν ακολούθησε φυγοκέντρηση στους 4 °C, 13.000 rpm για 20 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και έγινε μία πλύση του ιζήματος με 400 μl 75% αιθανόλη και φυγοκέντρηση στους 4 °C, 13.000 rpm για 10 λεπτά. Τα δείγματα παρέμειναν με ανοιχτό το καπάκι για μερικά λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη, και έπειτα πραγματοποιήθηκε διαλυτοποίηση του ιζήματος με 45 μl DEPC (Diethylpyrocarbonate) H₂O, ελεύθερο από RNάσες. Έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων από την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm με τη χρήση φωτόμετρου. Τέλος, το RNA από κάθε δείγμα φυλάχτηκε στους -80 °C, μέχρι την χρήση του.

2.7.2 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT)

Αρχικά, 0,4-0,6 μg RNA αναμείχθηκαν με 50 pmoles τυχαίων εξαμερών εκκινητών (Random Hexamers, RH) και 1 μl από 10 mM μίγματος νουκλεοτιδίων (Deoxynucleoside Triphosphate, dNTPs) σε τελικό όγκο 10 μl. Τα δείγματα επώστηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή στους 67 °C για 5 λεπτά και αμέσως μετά τοποθετήθηκαν σε πάγο. Ακολούθησε, σε κάθε δείγμα, προσθήκη 4 μl 5X First Strand Buffer, 2 μl διθειοθρεϊτόλης (Dithiothreitol, DTT) και 0,6 μl ενζύμου M-MLV RT (Invitrogen), το οποίο καταλύει την αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA στους 37 °C. Στα δείγματα προστέθηκε DEPC H₂O, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 18,9 μl. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε και ένας μάρτυρας ελέγχου, ο οποίος περιείχε RNA και όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια, εκτός από το ένζυμο. Τα δείγματα επώστηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή σε θερμοκρασία 25 °C

για 10 λεπτά, 37 °C για 40 λεπτά. Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 0,5 μl από ranmiR, ειδικά σχεδιασμένος εκκινητής για να προσδένεται μόνο σε miRs, 0,4 μl από 10 mM ATPs και 0,2 μl Poly(A) Polymerase (NEB), ώστε να τοποθετηθούν νουκλεοτίδια αδερίνης, και ο τελικός όγκος της αντίδρασης να φτάσει τα 20 μl. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 37 °C για άλλα 30 λεπτά, μετά στους 70 °C για 15 λεπτά και τέλος στους 4 °C για 5 λεπτά, οπότε και αφαιρέθηκαν από τη συσκευή και αραιώθηκαν με 40 μl ultra pure H₂O. Τέλος, τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -20 °C μέχρι τη χρήση τους.

2.7.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρειάστηκαν 2 μl cDNA, τα οποία αναμείχθηκαν με 1X KaraTaq Buffer, 1,5-1,8 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,15 pmoles από κάθε εκκινητή και 1,25 Units θερμοανθεκτικού ενζύμου KaraTaq, που καταλύει την επέκταση των cDNAs σε θερμοκρασία 72 °C. Σε όλα τα δείγματα προστέθηκε ultra pure H₂O, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να γίνει 10 μl. Για την επέκταση των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip3r-1*, *Ip3r-2*, *Ip3r-3*, *miRs* και *Gapdh* cDNAs στους διάφορους τύπους των κυτταρικών σειρών, χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινοι εμπρόσθιοι και αντίστροφοι εκκινητές. Η επέκταση των cDNAs πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή και κάθε κύκλος περιελάμβανε 95 °C για 18 δευτερόλεπτα, 55-57 °C για 18 δευτερόλεπτα και 72 °C για 18 δευτερόλεπτα. Μετά την ολοκλήρωση των κύκλων, ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στους 72 °C για 10 λεπτά και στους 4 °C, οπότε και αφαιρέθηκαν από τον θερμικό κυκλοποιητή και τοποθετήθηκαν στο ψυγείο μέχρι την χρήση τους.

2.7.4 Κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

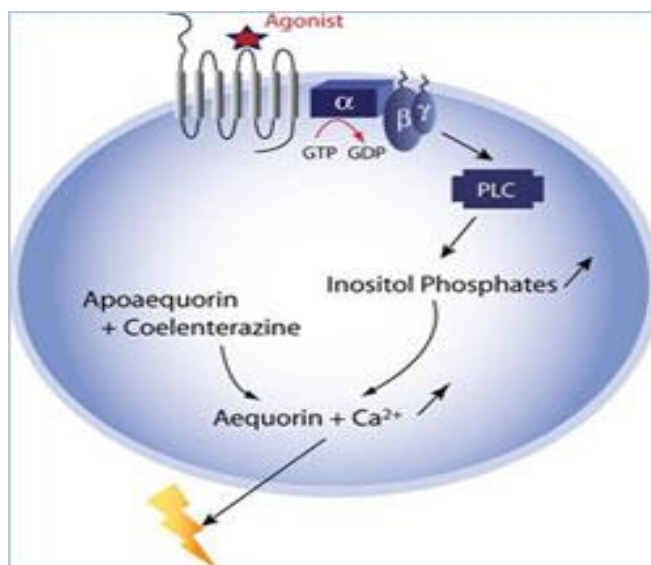
Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας επέκτασης των cDNAs μέσω PCR, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 8% πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, σε ειδική κάθετη συσκευή. Το πήκτωμα παρασκευάστηκε από 8% διάλυμα πολυακρυλαμίδης, το οποίο περιείχε 66 ml 30% πολυακρυλαμίδης, 100 ml 2,5X TBE (Tris Borate EDTA) και 84 ml ultra pure H₂O. Στο διάλυμα πολυακρυλαμίδης προστέθηκαν 100 μl 20% APS (Ammonium Persulfate), διαλυμένο σε ultra pure H₂O, και 35 μl TEMED (Tetramethylethylenediamine). Κατόπιν, το διάλυμα τοποθετήθηκε με τη βοήθεια σύριγγας ανάμεσα στα δύο μεγάλα τζάμια της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Στην

πάνω πλευρά του πήκτωματος τοποθετήθηκε ειδικό χτενάκι για τη διαμόρφωση των 20 θέσεων, όπου θα προστεθούν τα δείγματα. Το πήκτωμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά, μέχρι να πολυμεριστεί η πολυακρυλαμίδη. Έπειτα, αφαιρέθηκε το χτενάκι από το πήκτωμα, τα τζάμια ξεπλύθηκαν με άφθονο νερό, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πήκτωματος, και τοποθετήθηκαν κατακόρυφα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Η πάνω και κάτω λεκάνη της συσκευής συμπληρώθηκε με 0,5X TBE. Στα δείγματα προστέθηκαν 2 μl χρωστικής για DNA και 10 μl από κάθε δείγμα φορτώθηκαν σε κάθε πηγάδι του πήκτωματος. Στο πρώτο πηγάδι του πήκτωματος φορτώθηκαν 2 μl Low Molecular DNA Ladder, που αποτελείται από μίγμα DNA γνωστών μοριακών βαρών και χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των cDNAs. Η συσκευή ρυθμίστηκε με το τροφοδοτικό και η τάση του ρεύματος που εφαρμόστηκε ήταν 270 Volts. Αφού διαχωρίστηκαν καλά τα δείγματα, η ηλεκτροφόρηση σταμάτησε, τα τζάμια απομακρύνθηκαν από τη συσκευή και το πήκτωμα αφαιρέθηκε από τα τζάμια. Το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε νέο τζάμι και από πάνω προστέθηκε διάλυμα χρωστικής, το οποίο περιείχε 25 ml 1X TBE, 25 ml ultra pure H₂O και 2 μl χρωστικής SYBR Green. Το πήκτωμα επώαστηκε με τη χρωστική για 20 λεπτά σε σκιερό μέρος και στη συνέχεια ξεπλύθηκε με νερό και τοποθετήθηκε κάτω από λάμπα UV σε ειδική συσκευή. Το πήκτωμα φωτογραφήθηκε με το Dolphin Gel Documentation System και οι φωτογραφίες αναλύθηκαν με το πρόγραμμα ImageJ και επεξεργάστηκαν με το Adobe Photoshop CS5.

2.8 Μέτρηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου με τη μέθοδο της Aequorin

Η μέτρηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου με τη μέθοδο της Aequorin πραγματοποιήθηκε σε διαμολυσμένα κύτταρα 48 ώρες μετά τη διαμόλυνσή τους (Brini et al 1995). Αρχικά, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με την προσθήκη διαλύματος 0,05 % τρυψίνης/EDTA και επώασή τους στους 37 °C για 5 λεπτά, φυγοκεντρήθηκαν και επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 1ml διαλύματος 2% DMEM/FBS και 5 μM Coel (coelenterazine), για την ενεργοποίηση της Apoaequorin σε Aequorin. Τα εναιωρήματα κυττάρων αφέθηκαν για 2 ½ ώρες σε σκοτεινό μέρος χωρίς ανάδευση και μετά φυγοκεντρήθηκαν στις 1000 rpm για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα της κάθε συνθήκης επαναδιαλυτοποιήθηκε με 300 μl διαλύματος Krebs-Ringer modified

Buffer (KRB). 2 x 120.000 κύτταρα ανά συνθήκη τοποθετήθηκαν σε λευκό πιάτο 96 οπών σε τελικό όγκο 60 μ l. Τα κύτταρα αφήθηκαν για 10 λεπτά να ηρεμίσουν και κατόπιν το πιάτο τοποθετήθηκε σε ειδική θέση του μηχανήματος MicroLumatPlus LB 96V Berthold. Αυτόματα και σε διάστημα 0,5 sec γινόταν έγχυση κάπου αγωνιστή σε κάθε συνθήκη και το φως, μήκους κύματος $\lambda=469$ nm, που εξέπεμπε από την πρόσδεση των ιόντων ασβεστίου με την φωτοπρωτεΐνη Aequorin ανιχνευόταν από το μηχανήμα και αναλυόταν από το ειδικό πρόγραμμα (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου δράσης της φωτοπρωτεΐνης Aequorin.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον ερεθισμό των κυττάρων και την κινητικότητα των ιόντων ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου είναι:

- 1) Αγωνιστές: 1 μ M Ionomycin (ιονοφόρο ιόντων ασβεστίου), 60mM Caffeine (υποδοχέας RYR), 1 μ M Ryanodine (υποδοχέας RYR), 3,3mM CaCl₂
- 2) Ανταγωνιστής: 25 μ M Dandrolene (υποδοχέας RYR), όπου τα κύτταρα επωάζονταν για 10-15 λεπτά με τον ανταγωνιστή πριν προκληθεί ο ερεθισμός των κυττάρων από τον αγωνιστή, 1 μ M Thapsigargin (αντλία SERCA),

ενώ στο τέλος γινόταν λύση των κυττάρων με το διάλυμα Lysis (1% Triton X-100 σε KRB) και μέτρηση των φωτονίων, προκειμένου να προσδιοριστεί η περίσσεια ποσότητα της Aequorin στο εσωτερικό των κυττάρων. Η σύσταση του διαλύματος KRB είναι 125mM NaCl, 5mM KCl, 1mM Na₃PO₄, 20mM HEPES, 5,5mM γλυκόζη, σε pH 7.4, το οποίο αποστειρώθηκε με τη χρήση φίλτρου. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου έγινε με τον τύπο:

$$[Ca^{2+}]_{\text{cyt}} (M) = \frac{\text{ratio} + (\text{ratio} \cdot K_{TR}) - 1}{K_R - (\text{ratio} \cdot K_R)},$$

όπου:

$K_R = 7,23 \cdot 10^6 M^{-1}$ (σταθερά), $K_{TR} = 120$ (σταθερά),

Ratio = $(L/L_{\text{max}})^{1/n}$, όπου L ορίζεται η μέτρηση του φωτός κάθε στιγμή, ενώ η τιμή L_{max} δεν είναι σταθερή και υπολογίζεται κάθε φορά από την συνολική εκπομπή φωτός του πειράματος, μειωμένη κατά την εκπομπή φωτός από εκείνη τη στιγμή και πριν, και $n=2,99$ (σταθερά), ο αριθμός θέσεων πρόσδεση των ιόντων ασβεστίου (Brini et al 1995).

2.9 Μέτρηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου με τη μέθοδο της απεικόνισης ιόντων ασβεστίου (Calcium Imaging)

Η μέτρηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου με τη μέθοδο της απεικόνισης ιόντων ασβεστίου (Calcium Imaging) πραγματοποιήθηκε σε διαμολυσμένα κύτταρα 48 ώρες μετά τη διαμόλυνσή της. Αρχικά, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο DMEM/FBS 10% από της επιστρωμένες καλυπτρίδες με κύτταρα, οι καλυπτρίδες μεταφέρθηκαν σε τριβλία των 30mm, ανά συνθήκη, και έγινε μία πλύση αυτών με το διάλυμα HBS Full. Κατόπιν, οι καλυπτρίδες επώαστηκαν με 2μM fluo-4 (φθορίζουσα χρωστική, F14201, Life Technologies) και 0,2mM DTPA (diethylenetriaminepentaacetate) σε τελικό όγκο 1ml για 1 ώρα σε θερμοκρασία 22°C, σε χαμηλή ανάδευση και σκοτεινό μέρος. Μετά το πέρας της 1 ώρας, έγινε πλύση των καλυπτρίδων με 1ml HBS Full και επώαση αυτών με 1ml HBS Full για ακόμα 1 ώρα σε θερμοκρασία 22°C, σε χαμηλή ανάδευση και σκοτεινό μέρος. Μετά το πέρας της επώασης, οι καλυπτρίδες επώαστηκαν για 5 λεπτά με 1ml HBS w/o CaCl₂, ώστε να απομακρυνθεί όλη η περίσσεια ποσότητα εξωκυττάριας συγκέντρωση ασβεστίου, κατόπιν τοποθετήθηκαν σε ειδικές θήκες, προστέθηκαν 450μl HBS w/o CaCl₂ και παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού (Axio, Zeiss). Με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος ZEN (software ZEN) μετρήθηκε η αλλαγή της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου σε διαμολυσμένα και μη κύτταρα, που βρίσκονται σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο, με την προσθήκη 50μl αγωνιστή (πχ. καφεΐνη (Appllichem) τελικής συγκέντρωσης 30mM), ή ρυανοδίνη (τελική συγκέντρωση 1μM), ή καρβαχόλη (τελική συγκέντρωση 1μM), σε πραγματικό χρόνο. Επιπλέον, έγινε χρήση thapsargin (τελ. Συγκ. 1μM) και 100mM CaCl₂. Συγκεκριμένα, ανιχνεύτηκε η αλλαγή της έντασης του φθορισμού περίπου στα 488

nm, όπου εκπέμπει η φθορίζουσα χρωστική όταν δεσμεύεται με ιόντα ασβεστίου. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων με την προσθήκη Triton X-100 1% τελικής συγκέντρωσης, για τον υπολογισμό του F_{max} , και στο τέλος προσθήκη 0,5 ml συγκέντρωσης 50 mM EGTA, για τον υπολογισμό του F_{min} . Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του ασβεστίου έγινε με τον τύπο:

$$[Ca^{2+}]_{cyt} \text{ (nM)} = 345 \cdot \frac{F_n - F_{min}}{F_{max} - F_n},$$

όπου:

F_n : ορίζεται ως η ένταση φθορισμού σε ενδιάμεσα επίπεδα ιόντων ασβεστίου,

F_{min} : ορίζεται ως η ελάχιστη ένταση φθορισμού, απουσία ιόντων ασβεστίου,

F_{max} : ορίζεται ως η μέγιστη ένταση φθορισμού, με μέγιστη παρουσία ιόντων ασβεστίου.

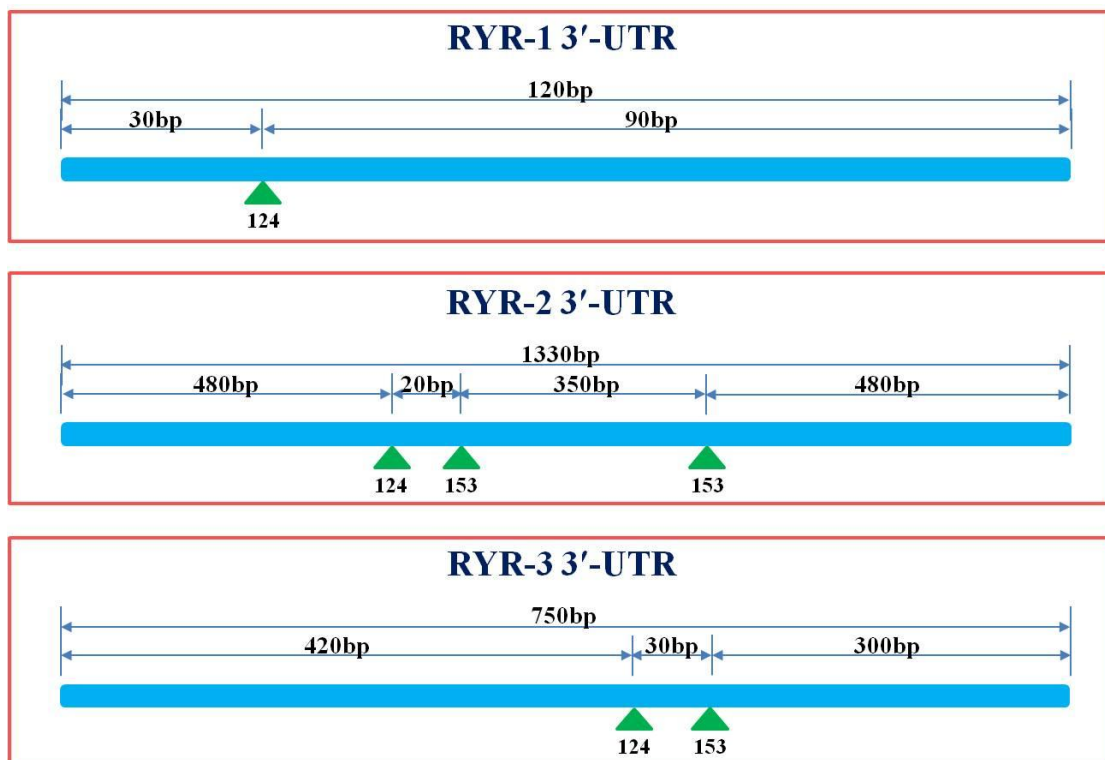
Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- 1) Διάλυμα HBS Full: 135mM NaCl, 5.9mM KCl, 1.2mM MgCl₂, 1.5mM CaCl₂, 11.6mM Hepes και 11.5mM Glucose, pH 7,3
- 2) Διάλυμα HBS w/o Ca²⁺: 135mM NaCl, 5.9mM KCl, 1.2mM MgCl₂, 0,1mM EGTA, 11.6mM Hepes και 11.5mM Glucose.

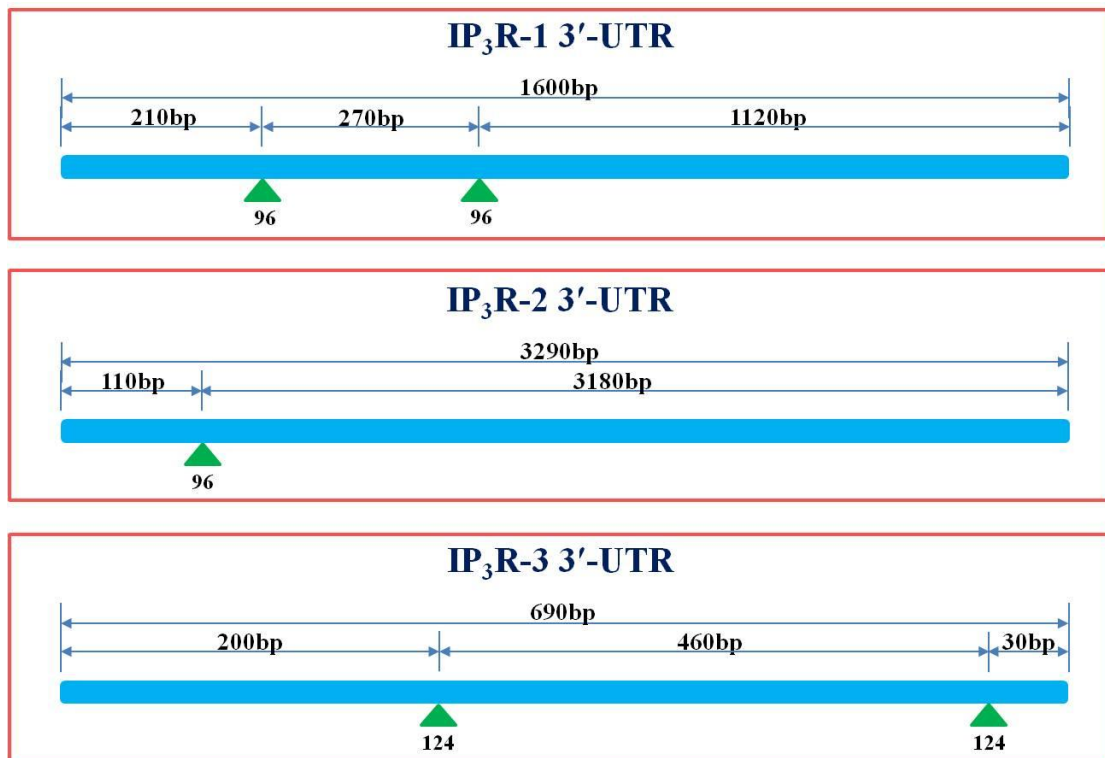
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Οι 3'-UTRs των *Ryrs* και *Ip₃rs* mRNAs αποτελούν στόχο για microRNAs

Στη παρούσα μελέτη επιχειρήσαμε να απαντήσουμε στο ερώτημα κατά πόσο κάποια miRs επηρεάζουν την ομοιόσταση των ιόντων Ca^{2+} στο εσωτερικό των κυττάρων. Η μελέτη εστιάστηκε στη δράση των νευρωνικών miRs και πως αυτά μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση και τη λειτουργία των διαύλων ασβεστίου που εντοπίζονται στο ΕΔ (IP₃Rs, RYRs), και κατ' επέκταση την ομοιόσταση του ασβεστίου στα κύτταρα. Η συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων αναζήτησης από τις δύο βάσεις δεδομένων, TargetScan και miRanda, έδειξε ότι οι 3'-UTRs των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip₃r-1*, *Ip₃r-2* και *Ip₃r-3* mRNA των διαύλων ασβεστίου αποτελούν στόχο για miRs. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι το miR-124 αλληλεπιδρά ισχυρά με τις 3'-UTRs των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3* και *Ip₃r-3* mRNAs, το miR-96 με τις 3'-UTRs των *Ip₃r-1* και *Ip₃r-2* mRNAs, ενώ το miR-153 με τις 3'-UTRs των *Ryr-2* και *Ryr-3* mRNAs (Εικόνες 13, 14).



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση των θέσεων σύνδεσης των miRs στις 3'-UTRs των *Ryr-1*, *Ryr-2* και *Ryr-3* mRNAs. Με τα τρίγωνα υποδεικνύονται οι θέσεις πρόσδεσης των miRs στα mRNAs.

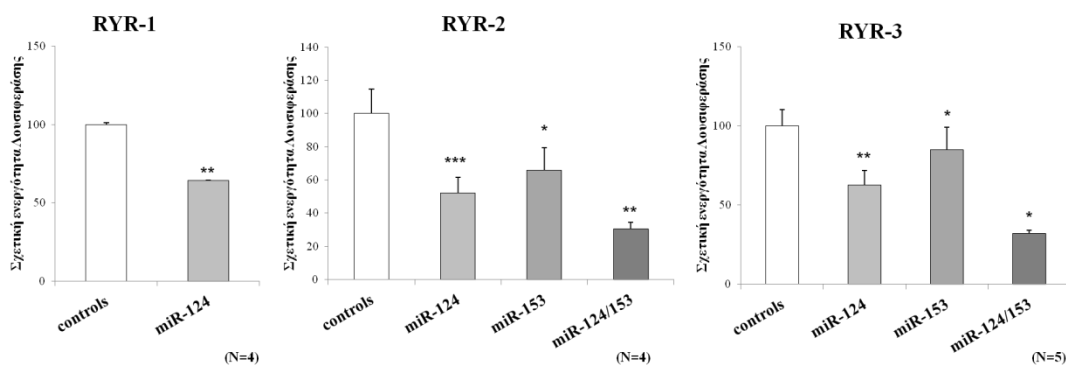


Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση των θέσεων σύνδεσης των miRs στις 3'-UTRs των *Ip3r-1*, *Ip3r-2* και *Ip3r-3* mRNAs. Με τα τρίγωνα υποδεικνύονται οι θέσεις πρόσδεσης των miRs στα mRNAs.

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι βιοπληροφορικές προβλέψεις για την πρόσδεση των miRs στα mRNAs, κατασκευάστηκαν ειδικοί φορείς κλωνοποίησης psi-CHECKTM2, οι οποίοι περιείχαν τις 3'-UTRs των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip3r-1*, *Ip3r-2* και *Ip3r-3* mRNAs καθοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης Renilla. Το γονίδιο της λουσιφεράσης Firefly αποτελεί τον εσωτερικό μάρτυρα για την κανονικοποίηση του σήματος της λουσιφεράσης Renilla. Οι παραπάνω φορείς, μαζί με τους φορείς pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR, οι οποίοι κωδικοποιούν για τα miR-96, miR-124, miR-153 και το συνδυασμό των miR-124/153, χρησιμοποιήθηκαν για την διαμόλυνση κυττάρων HEK-293. Ως μάρτυρες ελέγχου (controls) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HEK-293 διαμολυσμένα με φορείς που περιείχαν ανακατεμένες αλληλουχίες γνωστών miRs.

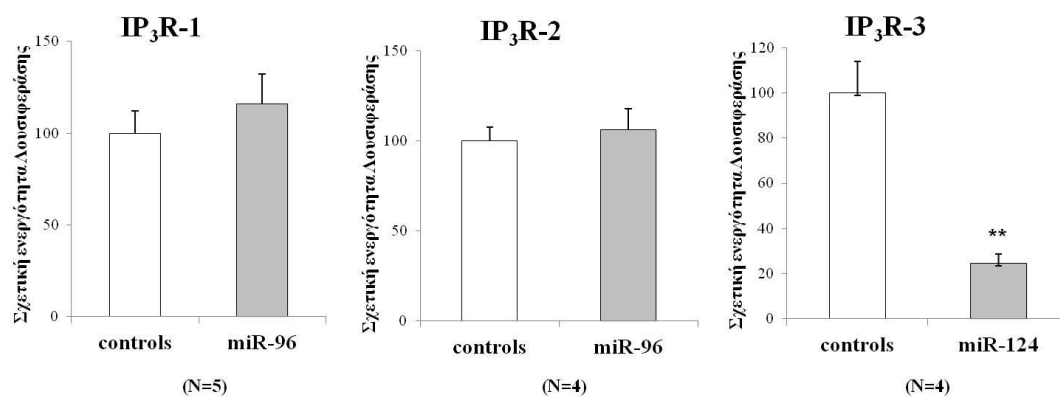
Η ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν, αποκάλυψε ότι το miR-124 προκαλεί σημαντική μείωση, από 35% έως και 75%, στην ενεργότητα της λουσιφεράσης Renilla, όταν καθοδικά από το γονίδιο της Renilla εντοπίζονται οι 3'-UTRs των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3* και *Ip3r-3* mRNAs, σε σχέση με τους μάρτυρες ελέγχου (ανακατεμένες αλληλουχίες miR, scramble miR) (Εικόνες 15 και 16,

Πίνακας 1). Επιπρόσθετα, η ενεργότητα της Renilla καθοδικά της οποίας υπήρχαν οι 3'-UTRs των *Ryr-2* και *Ryr-3* mRNAs μειώθηκε κατά 34% και 15%, αντίστοιχα, λόγω της παρουσίας του miR-153 (Εικόνα 15, Πίνακας 1). Αντίθετα, το miR-96 δεν φάνηκε να επηρεάζει την ενεργότητα του γονιδίου της λουσιφεράσης, όταν καθοδικά του υπήρχαν οι 3'-UTRs των *Ip3r-1* και *Ip3r-2* mRNAs (Εικόνα 16, Πίνακας 1).



Εικόνα 15: Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού της σχετικής ενεργότητας της λουσιφεράσης Renilla. Κατασκευάστηκαν φορείς κλωνοποίησης psi-CHECKTM2, οι οποίοι περιείχαν τις 3'-UTRs των *Ryr-1*, *Ryr-2* και *Ryr-3* mRNAs καθοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης Renilla. Το γονίδιο της λουσιφεράσης Firefly αποτελεί τον εσωτερικό μάρτυρα για την κανονικοποίηση του σήματος της λουσιφεράσης Renilla. Οι παραπάνω φορείς, μαζί με τους φορείς pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR, οι οποίοι κωδικοποιούν για τα miR-124 και miR-153 και το συνδυασμό των miR-124/153, χρησιμοποιήθηκαν για την διαμόλυνση κυττάρων HEK-293. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Η ταυτόχρονη υπερέκφραση των miR-124 και miR-153 σε κύτταρα HEK-293, που έφεραν τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τις 3'-UTRs των *Ryr-2* και *Ryr-3* mRNAs, προκάλεσε μεγαλύτερη από 60% μείωση στην ενεργότητα της Renilla, σε σχέση με τους μάρτυρες ελέγχου, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα miRs δρουν συνεργιστικά για την καταστολή της έκφρασης των mRNAs (Εικόνα 15, Πίνακας 1).



Εικόνα 16: Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού της σχετικής ενεργότητας της λουσιφεράσης Renilla. Κατασκευάστηκαν φορείς κλωνοποίησης psi-CHECKTM2, οι οποίοι περιείχαν τις 3'-UTRs των *Ip3r-1*, *Ip3r-2* και *Ip3r-3* mRNAs καθοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης Renilla. Το γονίδιο της λουσιφεράσης Firefly αποτελεί τον εσωτερικό μάρτυρα για την κανονικοποίηση του σήματος της λουσιφεράσης Renilla. Οι παραπάνω φορείς, μαζί με τους φορείς pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR, οι οποίοι κωδικοποιούν για τα miR-96 και miR-124, χρησιμοποιήθηκαν για την διαμόλυνση κυττάρων HEK-293** $P \leq 0.01$.

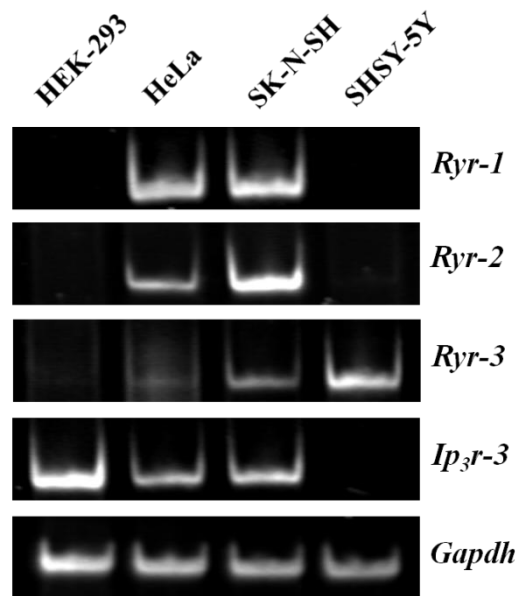
Η μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης Renilla χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των miRs στις 3'-UTRs των συγκεκριμένων mRNAs. Οι μειώσεις που παρατηρούνται στην ενεργότητα της Renilla αντικατοπτρίζουν μειώσεις στην έκφραση αυτών των mRNAs. Διαπιστώθηκε ότι τα miR-124 και miR-153 δεσμεύονται ισχυρά στις 3'-UTRs των αντίστοιχων mRNAs των *Ryrs* και *Ip3rs* και επηρεάζουν την έκφρασή τους. Επομένως, προέκυψε το ερώτημα αν η παρουσία των miRs, και της αλληλεπίδρασής τους με τις 3'-UTRs των mRNAs των διαύλων ασβεστίου, προκαλεί κάποια αντίστοιχη επίπτωση στην έκφραση των πρωτεϊνών RYR-1, RYR-2, RYR-3 και IP₃R-3, και κατ' επέκταση αν προκαλείται κάποια αλλαγή στην έξοδο των ιόντων Ca²⁺ από το ΕΔ προς το κυτταρόπλασμα. Για πρακτικούς λόγους, στα επόμενα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν έγινε χρήση μόνο των miR-124, miR-153 και miR-124/153.

Σχετική Ενεργότητα Λουσιφεράσης Renilla (%)					
3'-UTRs	controls	miR-96	miR-124	miR-153	miR-124/153
RYR-1	100	-	64,1	-	-
RYR-2	100	-	52,3	65,9	30,6
RYR-3	100	-	62,7	84,9	32,2
IP ₃ R-1	100	115,8	-	-	-
IP ₃ R-2	100	106,1	-	-	-
IP ₃ R-3	100	-	24,6	-	-

Πίνακας 1: Συγκεντρωτικός πίνακας των ποσοστιαίων μονάδων της σχετικής ενεργότητας της λουσιφεράσης Renilla, όταν καθοδικά αυτής βρίσκονται οι 3'-UTRs των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip3r-1*, *Ip3r-2* και *Ip3r-3* mRNAs, και έπειτα από την επίδραση των miRs.

3.2 Μελέτη της έκφρασης των ενδογενών επιπέδων *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3* και *Ip3r-3* mRNAs σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε μελέτη των προτύπων έκφρασης των 3'-UTRs των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3* και *Ip3r-3* mRNAs σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, προκειμένου να γίνει επιλογή της κατάλληλης σειράς που θα χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των ιόντων Ca²⁺. Για την ανάλυση των προτύπων έκφρασης των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3* και *Ip3r-3* mRNAs, έγινε απομόνωση RNA από τις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές HEK-293, HeLa, SK-N-SH και SHSY-5Y. Τα RNAs, που απομονώθηκαν, αναλύθηκαν με RT-PCR και PCR, χρησιμοποιώντας αντίστροφους εκκινητές για τα *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3* και *Ip3r-3* mRNAs. Το mRNA του γονιδίου *Gapdh* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς, για την κανονικοποίηση των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3* και *Ip3r-3* mRNAs στα διαφορετικά δείγματα.



Εικόνα 17: Απεικόνιση της έκφρασης των ενδογενών επιπέδων έκφρασης των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3* και *Ip3r-3* mRNAs σε τέσσερις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Το γονίδιο *Gapdh* mRNA χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς, για την κανονικοποίηση των επιπέδων της έκφρασης των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3* και *Ip3r-3* mRNAs στα διαφορετικά δείγματα.

Παρατηρήθηκε ότι η έκφραση των *Ryr-1*, *Ryr-2* και *Ryr-3* mRNAs είναι ανιχνεύσιμη κυρίως στις κυτταρικές σειρές HeLa και SK-N-SH, ενώ το *Ryr-3* mRNA εκφράζεται και στα κύτταρα νευροβλαστώματος SHSY-5Y (Εικόνα 17). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε κάποια έκφραση αυτών των mRNAs στα κύτταρα HEK-293. Από την άλλη, η έκφραση του *Ip3r-3* mRNA είναι ιδιαίτερα υψηλή στα κύτταρα HEK-293, καθώς επίσης ανιχνεύεται και στα κύτταρα HeLa και SK-N-SH, αλλά όχι στα κύτταρα SHSY-5Y (Εικόνα 17).

Έπειτα από αυτή την παρατήρηση, και θέλοντας να μελετήσουμε την πιθανή επιρροή που μπορεί να έχουν τα miRs στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου σε νευρικά κύτταρα, επιλέξαμε την ανθρώπινη κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος SK-N-SH για τη συνέχιση των πειραμάτων. Επιπλέον, στα κύτταρα SK-N-SH εκφράζονται ενδογενώς όλα τα mRNAs των διαύλων (*Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3* και *Ip3r-3* mRNAs) και πιθανή επιρροή των miRs θα είναι λογικά ανιχνεύσιμη. Τέλος, μια σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα της σειράς HEK-293, τα οποία εκφράζουν μόνο τους διαύλους IP₃Rs, και όχι τους διαύλους RYRs, προκειμένου να διαπιστωθεί πιθανή επιρροή των miRs στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου, μέσω των διαύλων IP₃Rs.

3.3 Η επιρροή των miRs στη συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} του κυτταροπλάσματος

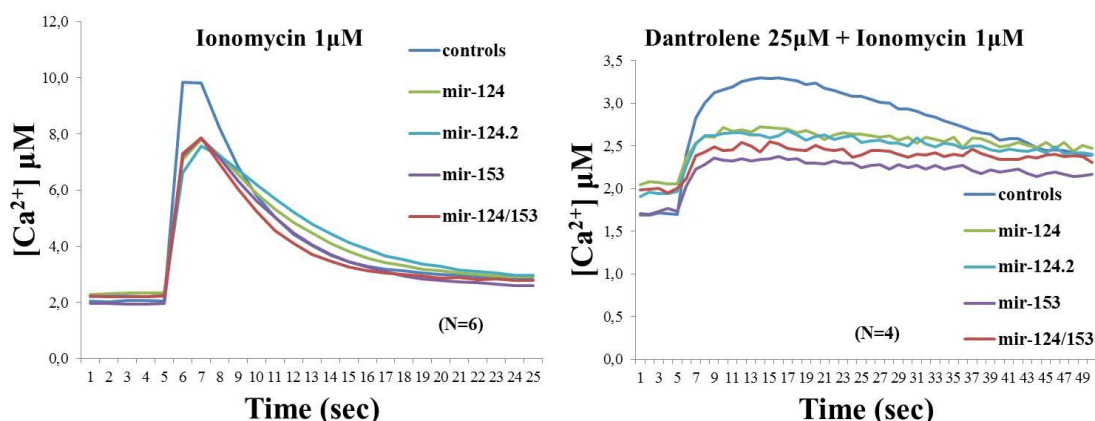
3.3.1 Μέθοδος Aequorin

Προκειμένου να μελετηθεί η πιθανή επίδραση των miR-124, miR-153 και miR-124/153 στην ομοιόσταση του ασβεστίου, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τους διαύλους του ΕΔ, RYRs και IP_3Rs , επιλέχθηκε η μέτρηση των συγκεντρώσεων του ασβεστίου με την μέθοδο της Aequorin (Brini et al 1995). Η Aequorin είναι μια φωτοπρωτεΐνη με μέγεθος 22 kDa, που ενεργοποιείται από τη δέσμευση ιόντων Ca^{2+} , καθώς διαθέτει τρεις θέσεις πρόσδεσης ιόντων. Η πρόσδεση των ιόντων στην πρωτεΐνη έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός σε μήκος κύματος 469nm. Η μέθοδος της ακουαρίνης χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης ιόντων Ca^{2+} , ενώ υπάρχει δυνατότητα επιλογής του κυτταρικού διαμερίσματος στο οποίο πραγματοποιείται η μέτρηση. Η Aequorin που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία εισήχθη με τη χρήση πλασμιδιακού φορέα, ο οποίος είναι τροποποιημένος κατάλληλα, ώστε η ακουαρίνη να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα SK-N-SH, τα οποία διαμολύνθηκαν με τον φορέα cytAEQ και τους φορείς pcDNA6.2-GW/EmGFP, που περιείχαν τα miR-124, miR-153 και miR-124/153. Τα κύτταρα που προορίζονται για μέτρηση συγκέντρωσης ασβεστίου βρίσκονται σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο (Calcium-free environment). Οι χημικές ουσίες καφεΐνη (60mM) και ρυανοδίνη (1 μ M), οι οποίες επάγουν την ενεργοποίηση των διαύλων ασβεστίου RYRs, χρησιμοποιήθηκαν ως αγωνιστές αυτών των διαύλων, ενώ η ιονομυκίνη (1 μ M), ως ιονοφόρο των ιόντων Ca^{2+} , προκαλεί την έξοδο ιόντων Ca^{2+} από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες και χρησιμοποιήθηκε ως γενικός αγωνιστής των διαύλων RYRs και IP_3Rs . Αντίθετα, η dantrolene (25 μ M) δρα ως ανταγωνιστής των διαύλων RYRs. Τέλος, η thapsigargin (1 μ M) προκαλεί την εκκένωση του ΕΔ από ιόντα Ca^{2+} , καθώς δρα ως αναστολέας της αντλίας SERCA, και χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση, τόσο του ενδοκυττάριου ασβεστίου, όσο και του ασβεστίου που εισρέει από το εξωκυττάριο περιβάλλον στο κυτταρόπλασμα.

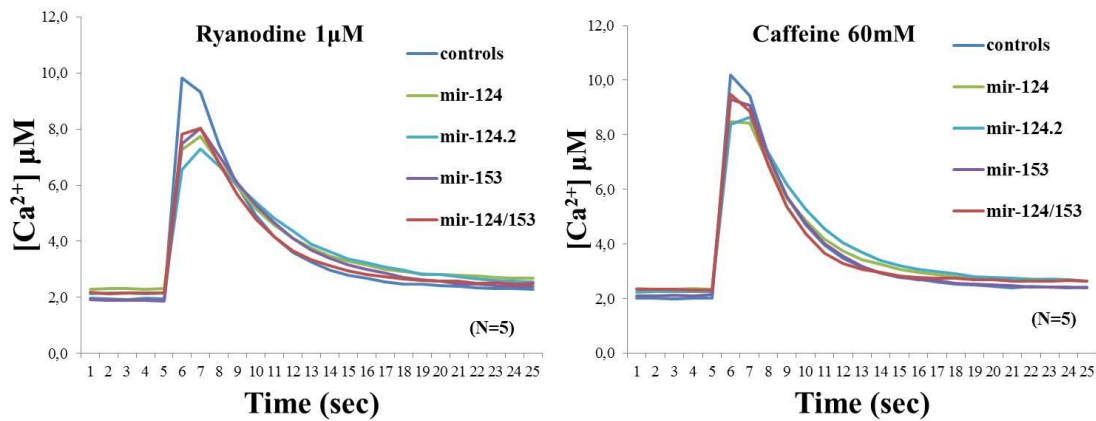
Με τη χρήση της ιονομυκίνης, η έξοδος του ασβεστίου από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα παρουσιάστηκε μειωμένη στις περιπτώσεις όπου υπερεκφράζονταν τόσο τα miR-124 και miR-153 μόνα τους, όσο και τα δύο ταυτόχρονα, σε σχέση με τους μάρτυρες ελέγχου (Εικόνα 18, Πίνακας 2). Η

αναστολή των διαύλων RYRs μέσω της dantrolene προκάλεσε μείωση στην συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, η οποία παρουσιάζεται ακόμα μεγαλύτερη παρουσία των miRs (Εικόνα 18, Πίνακας 2). Η παραπάνω παρατήρηση μπορεί πιθανόν να οφείλεται στη μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης IP_3R-3 , λόγω της δράσης του miR-124. Η κινητικότητα των ιόντων Ca^{2+} στη συγκεκριμένη περίπτωση προκλήθηκε με τη παρουσία της ιονομυκίνης.



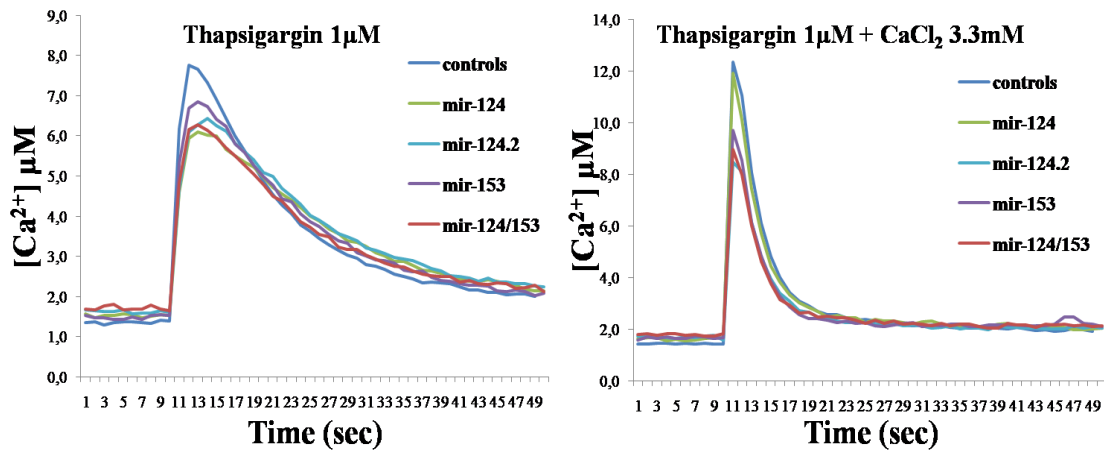
Εικόνα 18: Απεικόνιση των συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων SK-N-SH με τη μέθοδο της Aequorin. Οι γραφικές παραστάσεις δείχνουν την απόκριση των διαμολυσμένων κυττάρων, ανά συνθήκη, σε εξωγενή ερεθίσματα, της ιονομυκίνης 1 μM και της dantrolene 25 μM . Κύτταρα SK-N-SH διαμολύνθηκαν με τον φορέα cytAEQ και τους φορείς pcDNA6.2-GW/EmGFP, που περιείχαν τα miR-124, miR-153 και miR-124/153. Τα κύτταρα που προορίζονται για μέτρηση συγκέντρωσης ασβεστίου βρίσκονται σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο.

Η καφεΐνη και η ρυανοδίνη, ως αγωνιστές των διαύλων RYRs, προκαλούν την μετακίνηση των ιόντων ασβεστίου από το ΕΔ προς το κυτταρόπλασμα, μέσω των διαύλων RYRs. Στις περιπτώσεις υπερέκφρασης τόσο των miR-124 και miR-153, όσο και του συνδυασμού αυτών, η έξοδος των ιόντων Ca^{2+} από το ΕΔ, που προκλήθηκε από την παρουσία της ρυανοδίνης, παρουσιάστηκε μειωμένη κατά 15-20% σε σύγκριση με αυτή των μαρτύρων ελέγχου, όπως αυτό γίνεται φανερό από την Εικόνα 19 και τον Πίνακα 2. Επιπλέον, στην περίπτωση της υπερέκφρασης κυρίως του miR-124 στα κύτταρα SK-N-SH, η έξοδος των ιόντων Ca^{2+} από το ΕΔ, λόγω της παρουσίας της καφεΐνης, μειώθηκε περίπου κατά 17%, σε σύγκριση με τους μάρτυρες ελέγχου (Εικόνα 19, Πίνακας 2). Αντίθετα, στην περίπτωση υπερέκφρασης των miR-153 και miR-124/153, παρουσία της καφεΐνης, η έξοδος των ιόντων Ca^{2+} από το ΕΔ διέφερε οριακά από αυτή των μαρτύρων ελέγχου (Εικόνα 19, Πίνακας 2).



Εικόνα 19: Απεικόνιση των συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων SK-N-SH με τη μέθοδο της Aequorin. Οι γραφικές παραστάσεις δείχνουν την απόκριση των διαμολυσμένων κυττάρων, ανά συνθήκη, σε εξωγενή ερεθίσματα, της καφεΐνης 60 mM και της ρυανοδίνης 1 μM . Κύτταρα SK-N-SH διαμολύνθηκαν με τον φορέα cytAEQ και τους φορείς pcDNA6.2-GW/EmGFP, που περιείχαν τα miR-124, miR-153 και miR-124/153. Τα κύτταρα που προορίζονται για μέτρηση συγκέντρωσης ασβεστίου βρίσκονται σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο.

Στην περίπτωση της χρήσης της thapsigargin, που προκαλεί την εκκένωση του ΕΔ από τα ιόντα Ca^{2+} σε περιβάλλον ελεύθερο από ασβέστιο, η υπερέκφραση των miR-124 και miR-153, αλλά και του συνδυασμού miR-124/153, οδήγησε σε μειωμένη έξοδο ασβεστίου από το ΕΔ, κατά 10-20%, σε σχέση με τους μάρτυρες ελέγχου (Εικόνα 20, Πίνακας 2). Σ' αυτό το σημείο οφείλουμε να αναφέρουμε ότι λόγω της διαφοράς των συγκεντρώσεων των ιόντων Ca^{2+} , ανά συνθήκη, στο κυτταρόπλασμα, η οποία προκαλείται από την εκκένωση του ΕΔ παρουσία thapsigargin, είναι πιθανό τα miRs να επηρεάζουν και την συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} στο εσωτερικό του ΕΔ. Τέλος, δείχτηκε ότι, κατά την επώαση των κυττάρων με thapsigargin και επακόλουθη έγχυσή τους με περίσσεια ασβεστίου (3,3 mM CaCl_2), η δράση των miR-124 και miR-153 προκάλεσε μείωση σχεδόν 30% στην είσοδο του ασβεστίου από τον εξωκυττάριο χώρο στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 20, Πίνακας 2).



Εικόνα 20: Απεικόνιση των συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων SK-N-SH με τη μέθοδο της Aeurogrip. Οι γραφικές παραστάσεις δείχνουν την απόκριση των διαμολυσμένων κυττάρων, ανά συνθήκη, σε εξωγενή ερεθίσματα, της thapsigargin $1\mu M$ και του $3,3\text{ mM } CaCl_2$. Κύτταρα SK-N-SH διαμολύνθηκαν με τον φορέα cytAEQ και τους φορείς pcDNA6.2-GW/EmGFP, που περιείχαν τα miR-124, miR-153 και miR-124/153. Τα κύτταρα που προορίζονται για μέτρηση συγκέντρωσης ασβεστίου βρίσκονται σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο.

Στο πείραμα όπου τα κύτταρα επώαστηκαν αρχικά με thapsigargin και έπειτα με $CaCl_2$, η συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα αυξήθηκε παροδικά, για περίπου 4-5 δευτερόλεπτα, λόγω της εισόδου ιόντων Ca^{2+} από τον εξωκυττάριο χώρο στο κυτταρόπλασμα, και έπειτα επανήλθε απότομα στα φυσιολογικά επίπεδα. Συνήθως, σε τέτοιες περιπτώσεις τα διαγράμματα καμπυλών των συγκεντρώσεων των ιόντων Ca^{2+} παρουσιάζουν μια συνεχής ανακύκλωση των ιόντων Ca^{2+} από το εξωτερικό προς το εσωτερικό των κυττάρων, δηλαδή μια κορυφή και μια συνεχής γραμμή σε υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων Ca^{2+} , χωρίς να επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Ενώ η παραπάνω μέθοδος της Aeurogrip μας έδωσε κάποιες πρώτες ενδείξεις ότι τα miR-124 και miR-153 πιθανόν να συμμετέχουν στους μηχανισμούς ρύθμισης της ομοιόστασης του ασβεστίου, κρίθηκε απαραίτητη η χρήση και δεύτερης μεθόδου για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα.

Μέγιστες συγκεντρώσεις ιόντων Ca ²⁺ (%)					
Αγωνιστές/Ανταγωνιστές	controls	miR-124	miR-124.2	miR-153	miR-124/153
Ionomycin 1μM	100,00	79,53	77,09	80,14	79,94
Caffeine 60mM	100,00	83,19	82,17	90,99	92,89
Ryanodine 1μM	100,00	83,19	78,24	86,20	86,25
Dantrolene 25μM + Ionomycin 1μM	100,00	82,56	78,98	71,43	77,53
Thapsigargin 1μM	100,00	79,49	82,05	89,50	81,96
Thapsigargin 1μM + CaCl ₂ 3,3mM	100,00	96,56	68,77	78,59	72,71

Πίνακας 2: Συγκεντρωτικός πίνακας των ποσοστιαίων μονάδων των μέγιστων συγκεντρώσεων των ιόντων Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων SK-N-SH, όπως αυτές παρουσιάζονται στις Εικόνες 18, 19 και 20.

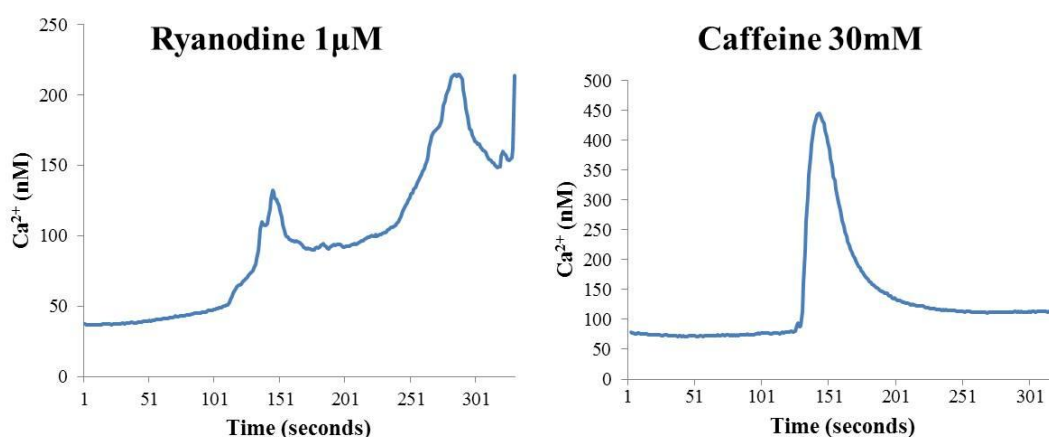
Συγκεντρωτικά, τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα miR-124 και miR-153 επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις των ιόντων Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα, τουλάχιστον μέσω των διαύλων του ΕΔ, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα miRs αυτά συμμετέχουν ποικιλοτρόπως στους μηχανισμούς ρύθμισης της ομοιόστασης του ασβεστίου.

3.3.2 Μέθοδος Απεικόνισης Ιόντων Ασβεστίου (Calcium Imaging)

Η αλλαγή στη συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων μπορεί να ανιχνευθεί με τη χρήση φθορίζουσών ουσιών που δεσμεύουν τα ιόντα Ca²⁺, όπως είναι η fluo-4 (Invitrogen). Οι ουσίες αυτές έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να καθίσταται δυνατή η μέτρηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων Ca²⁺ σε ζωντανά κύτταρα, και έχουν συγγένεια για τα ιόντα Ca²⁺ σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των ιόντων Ca²⁺ σε κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας. Κατά την πρόσδεση των ιόντων Ca²⁺ στη φθορίζουσα χρωστική fluo-4 εκπέμπεται φως στα 488 nm, το οποίο γίνεται αντιληπτό από ειδικό ανιχνευτή, μέσω του ανάστροφου μικροσκοπίου φθορισμού.

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την ορθότητα της νέας μεθόδου, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων σε μη διαμολυσμένα κύτταρα νευροβλαστώματος SK-N-SH. Τα κύτταρα που προορίζονταν για μέτρηση συγκέντρωσης ιόντων Ca²⁺ βρίσκονταν σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο και

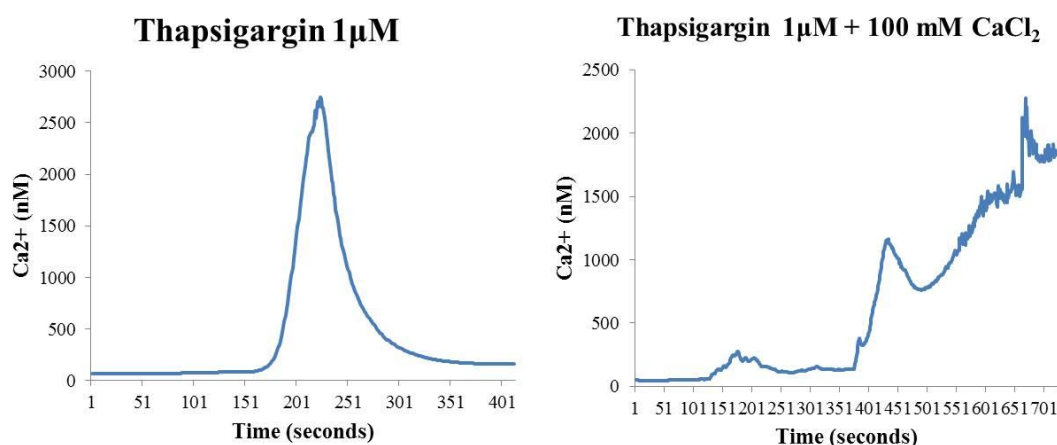
επωάστηκαν με τη χρωστική fluo-4 για 1 ώρα στους 22°C. Αρχικά, η επίδραση της καφεΐνης και της ρυανοδίνης προκάλεσαν την φυσιολογική και αναμενόμενη αντίδραση των κυττάρων SK-N-SH, όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 21. Ειδικότερα, η επίδραση της ρυανοδίνης προκάλεσε συνεχείς διακυμάνσεις/ταλαντώσεις στη συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} (Calcium Oscillations). Αυτό το φαινόμενο πιθανώς οφείλεται στην παρουσία των διαύλων RYRs στα κύτταρα SK-N-SH, καθώς είναι γνωστό ότι κατά τη διέγερση αυτών των διαύλων από τα ίδια τα ιόντα Ca^{2+} παρατηρούνται διακυμάνσεις στη συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα (McDonough et al, 2000).



Εικόνα 21: Απεικόνιση των συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων SK-N-SH με τη μέθοδο απεικόνισης των ιόντων ασβεστίου (Calcium Imaging). Οι γραφικές παραστάσεις δείχνουν την απόκριση μη διαμολυσμένων κυττάρων σε εξωγενή ερεθίσματα, της ρυανοδίνης 1μM και καφεΐνης 30mM. Τα κύτταρα που προορίζονται για μέτρηση συγκέντρωσης ασβεστίου βρίσκονται σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο και επωάζονται με τη χρωστική fluo-4 για 1 ώρα στους 22°C.

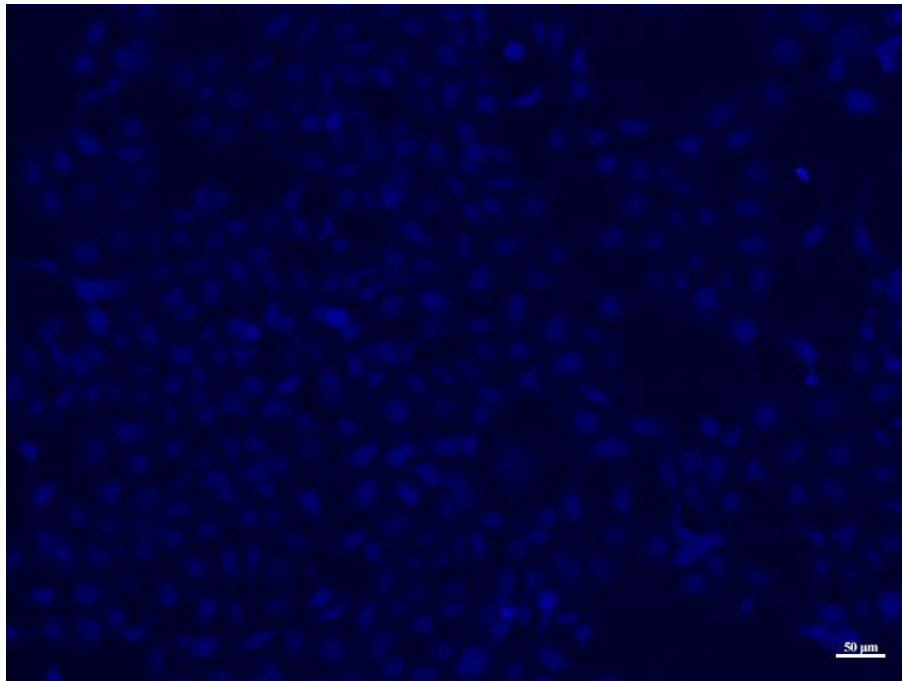
Στη συνέχεια, κύτταρα SK-N-SH, χωρίς να διαμολυνθούν, επωάστηκαν με 1μM thapsigargin και έπειτα με 100mM $CaCl_2$. Τα κύτταρα και πάλι βρίσκονταν σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο και επωάστηκαν με τη χρωστική fluo-4 για κατάλληλο χρονικό διάστημα. Στο διάγραμμα της καμπύλης της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} , έπειτα από διέγερση των κυττάρων μόνο με thapsigargin, παρατηρείται μια μεγάλη εκκένωση του ΕΔ από ιόντα Ca^{2+} (Εικόνα 22). Έπειτα, τα κύτταρα επωάστηκαν με thapsigargin, και κατόπιν διεγέρθηκαν με $CaCl_2$. Όπως διακρίνεται και στο δεξί μέρος της Εικόνας 22, παρουσιάζεται μια παροδική αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, και κατόπιν μια συνεχής αυξανόμενη γραμμή σε υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων Ca^{2+} , χωρίς να επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα στο

άμεσο χρονικό διάστημα. Έτσι, παρατηρήθηκε μια αναμενόμενη φυσιολογική ανακύκλωση των ιόντων Ca^{2+} από το εξωτερικό προς το εσωτερικό των κυττάρων, που μας εγκυιάται την ορθότητα της μεθόδου και μας έδωσε το πράσινο φως για την συνέχιση του πειράματος με τη διαμόλυνση των κυττάρων και τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} , έπειτα από τη δράση της καφεΐνης.

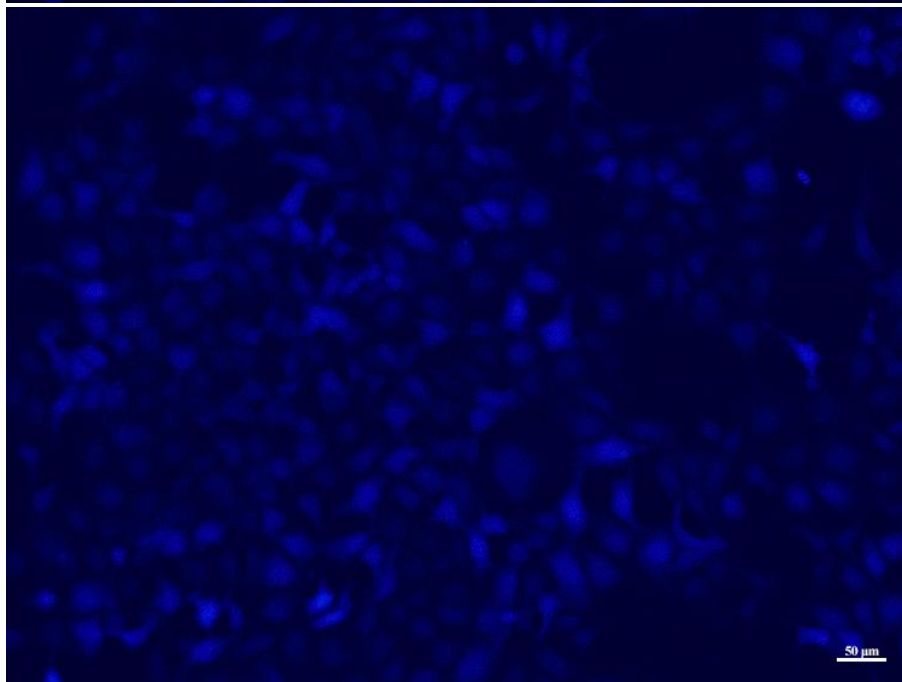


Εικόνα 22: Απεικόνιση των συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων SK-N-SH με τη μέθοδο απεικόνισης των ιόντων ασβεστίου (Calcium Imaging). Οι γραφικές παραστάσεις δείχνουν την απόκριση μη διαμολυσμένων κυττάρων σε εξωγενή ερεθίσματα, της thapsigargin $1\mu\text{M}$ και 100mM CaCl_2 . Τα κύτταρα που προορίζονται για μέτρηση συγκέντρωσης ασβεστίου βρίσκονται σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο και επωάζονται με τη χρωστική fluo-4 για 1 ώρα στους 22°C .

Οι επόμενες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα SK-N-SH, τα οποία διαμολύνθηκαν με τους φορείς pcDNA6.2-GW/DsRed-Express-miR, που περιείχαν τα miR-124, miR-153 και miR-124/153. Τα κύτταρα που προορίζονταν για μέτρηση συγκέντρωσης ιόντων Ca^{2+} βρίσκονταν σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο και επωάστηκαν με τη χρωστική fluo-4 για κατάλληλο χρονικό διάστημα. Η διέγερση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της καφεΐνης η οποία ενεργοποιεί τους διαύλους RYRs. Στην Εικόνα 23 παρατηρούμε τα διαμολυσμένα κύτταρα SK-N-SH σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού, σε κατάσταση ηρεμίας πριν την επίδραση της καφεΐνης, καθώς και κατά τη στιγμή της μέγιστης διέγερσης των κυττάρων από την καφεΐνη.



Κατάσταση
ηρεμίας των
κυττάρων
SK-N-SH

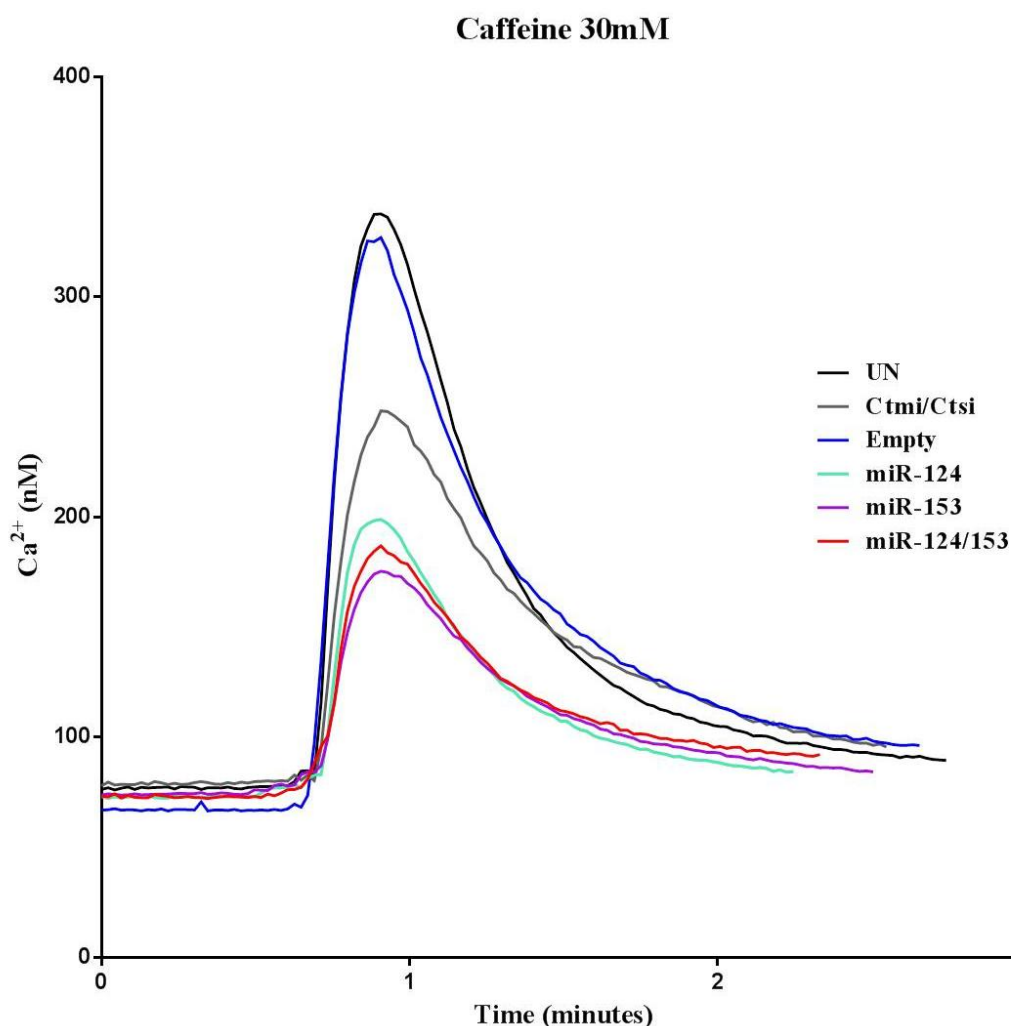


Κατάσταση
διέγερσης
των κυττάρων
SK-N-SH

Εικόνα 23: Απεικόνιση των διαμολυσμένων κυττάρων SK-N-SH σε μικροσκόπιο φθορισμού. Οι παρούσες εικόνες προέρχονται από κύτταρα SK-N-SH, που διαμολύνθηκαν με τον φορέα pcDNA6.2-GW/DsRed-Express-miR, που περιείχε το miR-153. Η μπάρα στο κάτω δεξί μέρος της κάθε εικόνας ορίζεται στα 50 μm.

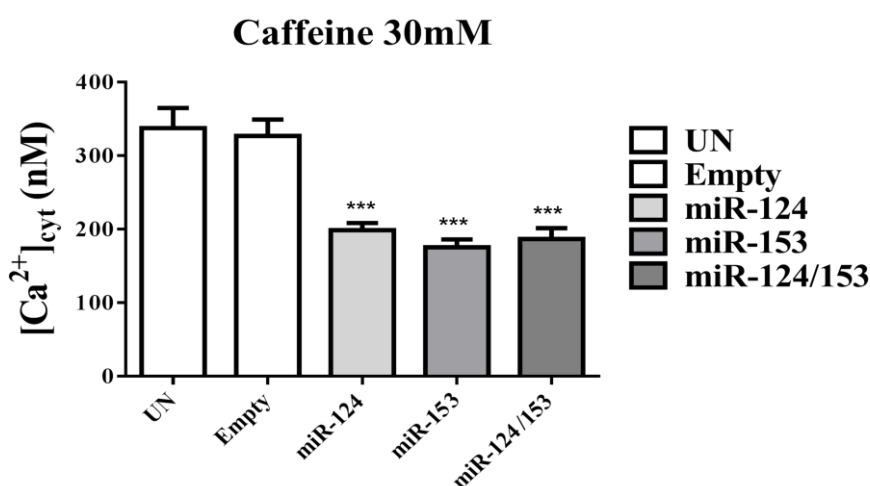
Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα. Από το διάγραμμα καμπύλης ασβεστίου της Εικόνας 24, φαίνεται ότι με τη χρήση της καφεΐνης, η προκαλούμενη έξοδος ιόντων Ca^{2+} από τους διαύλους RYRs του ΕΔ στο κυτταρόπλασμα παρουσιάστηκε μειωμένη, όταν υπερεκφράζονταν τα miR-124 και miR-153, τόσο μόνα τους, όσο και τα δύο

μαζί, σε σύγκριση με τον μάρτυρα ελέγχου “empty”. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, όπου είχαν υπερεκφραστεί τα miRs, εμφανίζεται σχεδόν 100nM μικρότερη, σε σύγκριση με αυτή του μάρτυρα ελέγχου “empty”. Επιλέξαμε ως μάρτυρα ελέγχου τη συνθήκη “empty”, διότι η απόκριση αυτών των κυττάρων είναι παρόμοια με αυτή των κυττάρων που δεν διαμολύνθηκαν. Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνουν τις ενδείξεις που είχαν σχηματιστεί με την μέθοδο της Aequorin, δηλαδή ότι τα miR-124 και miR-153 αλληλεπιδρώντας με τους διαύλους RYRs συμμετέχουν στους μηχανισμούς ρύθμισης της ομοιόστασης του ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου.



Εικόνα 24: Απεικόνιση της συγκέντρωσης ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων SK-N-SH με τη μέθοδο απεικόνισης των ιόντων ασβεστίου (Calcium Imaging). Η γραφική παράσταση δείχνει την απόκριση των διαμολυσμένων και μη κυττάρων, ανά συνθήκη, μετά την επίδραση της καφεΐνης, με τελική συγκέντρωση 30mM. Κύτταρα SK-N-SH διαμολύνθηκαν με τους φορείς pcDNA6.2-GW/DsRed-Express-miR, που περιείχαν τα miR-124, miR-153 και miR-124/153. Τα κύτταρα που προορίζονται για μέτρηση συγκέντρωσης ασβεστίου βρίσκονται σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο και επωάζονται με τη χρωστική fluo-4 για 1 ώρα στους 22 °C.

Οι ανάλογες διαφορές στις συγκεντρώσεις των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων SK-N-SH παρουσιάζονται και στα ραβδόγραμμα των Εικόνων 25 και 26. Είναι φανερό από το ραβδόγραμμα της Εικόνας 25, ότι οι διαφορές στις συγκεντρώσεις των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων SK-N-SH, όπως αυτές εμφανίζονται σύμφωνα με τη καμπύλη του ασβεστίου της Εικόνας 24, παρουσιάζονται ιδιαίτερα μεγάλες και στατιστικά σημαντικές, όταν χρησιμοποιείται ως μάρτυρας ελέγχου η συνθήκη “empty”. Οι συγκεντρώσεις των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, όπου είχαν υπερεκφραστεί τα miR-124 και miR-153, τόσο μόνα τους, όσο και ο συνδυασμός αυτών, εμφανίζονται σχεδόν 100nM μικρότερες, σε σύγκριση με αυτή του μάρτυρα ελέγχου “empty”.

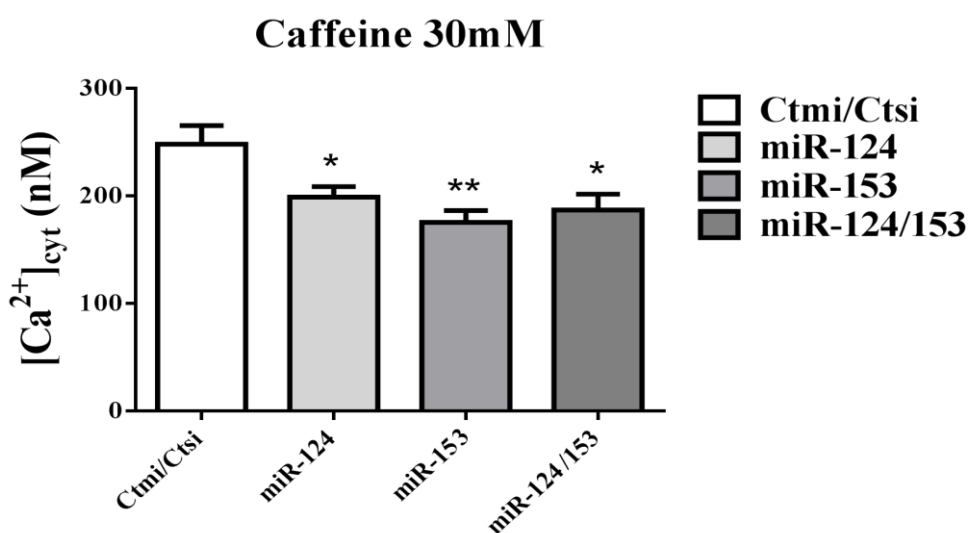


Εικόνα 25: Απεικόνιση των μέγιστων συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{2+} του κυτταροπλάσματος σε μορφή ραβδόγραμματος, έπειτα από την επίδραση της καφεΐνης, με τελική συγκέντρωση 30mM, με τη μέθοδο Calcium Imaging. Κύτταρα SK-N-SH διαμολύνθηκαν με τους φορείς pcDNA6.2-GW/DsRed-Express-miR, που περιείχαν τα miR-124, miR-153 και miR-124/153, και τον μάρτυρα ελέγχου “empty”. Τα κύτταρα βρίσκονται σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο και επωάζονται με τη χρωστική fluo-4 για 1 ώρα στους 22°C. *** $P \leq 0.001$.

Στο ραβδόγραμμα της Εικόνας 26 οι διαφορές στις συγκεντρώσεις των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων SK-N-SH, όπως αυτές εμφανίζονται σύμφωνα με τη καμπύλη του ασβεστίου της Εικόνας 24, είναι επίσης ιδιαίτερα μεγάλες και στατιστικά σημαντικές, όταν χρησιμοποιείται ως μάρτυρας ελέγχου η συνθήκη “Ctmi/Ctsi”. Οι συγκεντρώσεις των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, όπου είχαν υπερεκφραστεί τα miR-124 και miR-153, τόσο μόνα τους, όσο και ο συνδυασμός αυτών, εμφανίζονται σχεδόν 50 nM μικρότερες, σε σύγκριση με αυτή του μάρτυρα ελέγχου “Ctmi/Ctsi”. Ο μάρτυρας ελέγχου “Ctmi/Ctsi” περιέχει

ανακατεμένες αλληλουχίες DNA, οι οποίες όμως δεν κωδικοποιούν τίποτα (scramble).

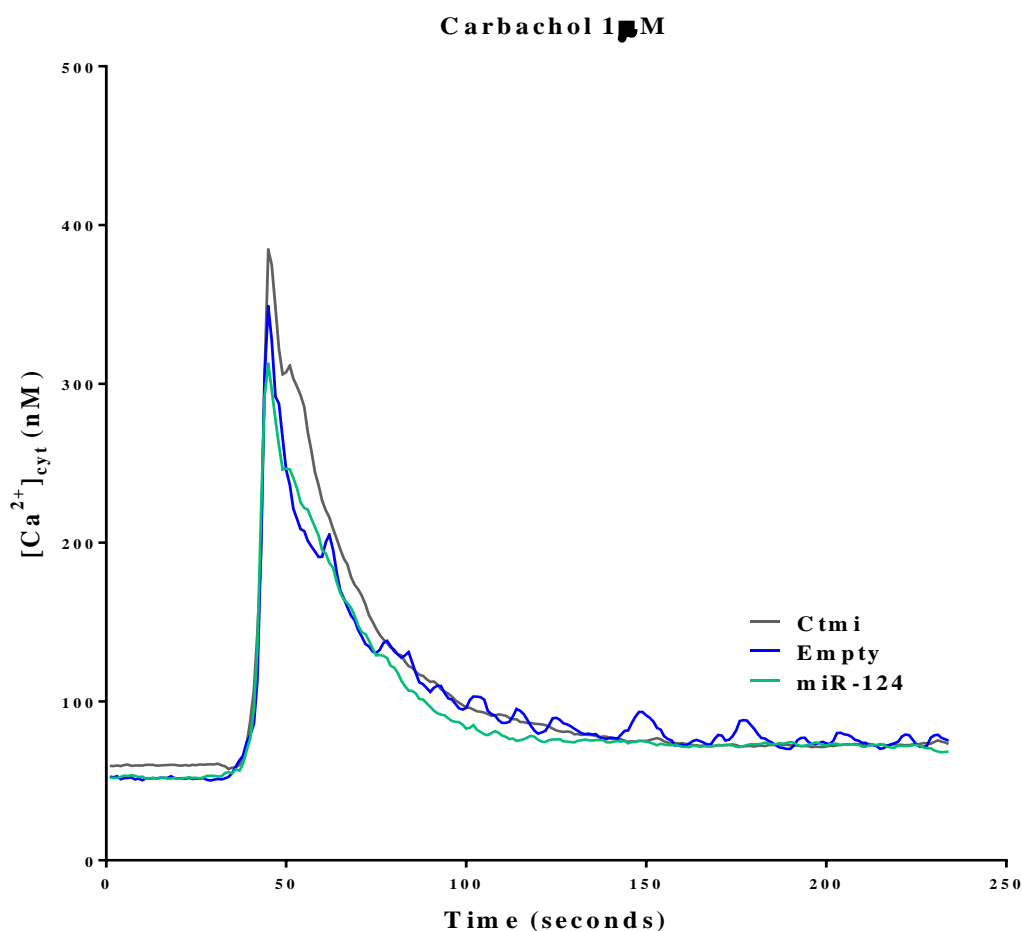
Με όποιον μάρτυρα ελέγχου κι αν συγκρίνουμε τις συγκεντρώσεις των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων SK-N-SH, που προκύπτουν από την επιρροή των miRs, φαίνεται ξεκάθαρα η μείωση της συγκέντρωσης των ιόντων στο κυτταρόπλασμα. Έτσι, προκύπτει ότι τα miRs πιθανόν, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τους διαύλους ασβεστίου του ΕΔ, προκαλούν μείωση στη συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, συμβάλλοντας έτσι στο μηχανισμό ρύθμισης της ομοιόστασης του ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου.



Εικόνα 26: Απεικόνιση των μέγιστων συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{2+} του κυτταροπλάσματος σε μορφή ραβδογράμματος, έπειτα από την επίδραση της καφεΐνης 30mM, με τη μέθοδο Calcium Imaging. Κύτταρα SK-N-SH διαμολύνθηκαν με τους φορείς pcDNA6.2-GW/DsRed-Express-miR, που περιείχαν τα miR-124, miR-153 και miR-124/153, και τον μάρτυρα ελέγχου “Ctmi/Ctsi”. Τα κύτταρα βρίσκονται σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο και επωάζονται με τη χρωστική fluo-4 για 1 ώρα στους 22°C. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

Συμπληρωματικά, προχωρήσαμε σε διαμόλυνση των κυττάρων HEK-293, που δεν εκφράζουν τους διαύλους RYRs, αλλά μόνο τους διαύλους IP_3Rs , με τον φορέα pcDNA6.2-GW/DsRed-Express-miR, που περιείχε το miR-124, και μέτρηση της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} , με τη μέθοδο Calcium Imaging. Η διέγερση των κυττάρων έγινε με τη χρήση καρβαχόλης σε τελική συγκέντρωση 1 μM (carbachol). Η καρβαχόλη επάγει την παραγωγή του IP_3 στο εσωτερικό των κυττάρων, και οδηγεί στην ενεργοποίηση των διαύλων IP_3Rs . Από το γράφημα που παρουσιάζεται στην Εικόνα 27, φαίνεται πως η απόκριση των κυττάρων και στις τρεις συνθήκες είναι

παρόμοια, χωρίς ,δηλαδή, το miR-124 να επηρεάζει σημαντικά τις συγκεντρώσεις των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, σε σύγκριση με τους μάρτυρες ελέγχου. Αυτό το πείραμα μας δείχνει ότι πιθανόν το miR-124 να μην επηρεάζει τη λειτουργία των διαύλων IP_3Rs στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HEK-293, καθώς δεν παρατηρείται αλλαγή στην συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} κατά την υπερέκφραση του miR-124. Έτσι, επιβεβαιώνεται η ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου από τα miR-124 και miR-153, λόγω της πιθανής αλληλεπίδρασής τους τουλάχιστον με τα *Ryr-1*, *Ryr-2* και *Ryr-3* mRNAs.



Εικόνα 27: Απεικόνιση των συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων HEK-293 με τη μέθοδο απεικόνισης των ιόντων ασβεστίου (Calcium Imaging). Η γραφική παράσταση δείχνει την απόκριση των διαμολυσμένων κυττάρων, ανά συνθήκη, έπειτα από την επίδραση carbachol, με τελική συγκέντρωση 1 μ M. Κύτταρα HEK-293 διαμολύνθηκαν με τους φορείς pcDNA6.2-GW/DsRed-Express-miR, που περιείχαν το miR-124 και τους μάρτυρες ελέγχου “Ctmi” και “empty”. Τα κύτταρα που προορίζονται για μέτρηση συγκέντρωσης ασβεστίου βρίσκονται σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο και επωάζονται με τη χρωστική fluo-4 για 1 ώρα στους 22°C.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Συμπεράσματα

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η μελέτη της πιθανής δράσης των miRs στη ρύθμιση της ομοιόστασης των συγκεντρώσεων των ιόντων Ca^{2+} στο εσωτερικό των κυττάρων. Στη παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε η συμμετοχή δύο νευρωνικών miRs στον έλεγχο της εξόδου των ιόντων Ca^{2+} από το ΕΔ προς το κυτταρόπλασμα σε κύτταρα νευροβλαστώματος.

Αρχικά, βιοπληροφορικές προσεγγίσεις φανέρωσαν την πιθανή αλληλεπίδραση των miR-96, miR-124 και miR-153 με τις 3'-UTRs περιοχές των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip3r-1*, *Ip3r-2* και *Ip3r-3* mRNAs (Εικόνες 13 και 14). Πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση λουσιφεράσης, που έφερε στο 3' άκρο της τις 3'-UTRs των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3*, *Ip3r-1*, *Ip3r-2* και *Ip3r-3* mRNAs με ταυτόχρονη υπερέκφραση των miR-96, miR-124 και miR-153, τόσο μόνα τους, όσο και ο συνδυασμός των δύο, σε κύτταρα της σειράς HEK-293. Τα αποτελέσματα της μεθόδου της λουσιφεράσης επιβεβαίωσαν την αλληλεπίδραση των miR-124 και miR-153 με τις 3'-UTRs περιοχές των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3* και *Ip3r-3* mRNAs (Εικόνες 15 και 16). Επομένως, προέκυψε το ερώτημα αν η παρουσία των miRs προκαλεί κάποια λειτουργική επίπτωση στους διαύλους του ΕΔ, με αποτέλεσμα την διαταραχή της εξόδου των ιόντων Ca^{2+} από το ΕΔ προς το κυτταρόπλασμα. Για να δώσουμε την απάντηση σ' αυτό το ερώτημα, μελετήσαμε το πρότυπο έκφρασης των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3* και *Ip3r-3* mRNAs σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, και επιλέξαμε τα κύτταρα νευροβλαστώματος SK-N-SH, τα οποία εκφράζουν όλα τα παραπάνω mRNAs, για τη συνέχιση της πειραματικής προσέγγισης (Εικόνα 17).

Για το αν επηρεάζεται η λειτουργία των διαύλων του ΕΔ από την παρουσία των miRs, επιχειρήσαμε να υπολογίσουμε τις συγκεντρώσεις των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, καθώς ιόντα Ca^{2+} εξέρχονται από το ΕΔ προς αυτό, με τη μέθοδο της Aequoerin, μιας φωτοπρωτεΐνης που διαθέτει θέσεις πρόσδεσης για ιόντα Ca^{2+} . Αρχικά, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα SK-N-SH, τα οποία διαμολύνθηκαν με τον φορέα cytAEQ και τα miR-124, miR-153 και miR-124/153. Οι χημικές ουσίες καφεΐνη και ρυανοδίνη, οι οποίες επάγουν την ενεργοποίηση των διαύλων ασβεστίου RYRs, χρησιμοποιήθηκαν ως αγωνιστές αυτών των διαύλων, ενώ η ιονομυκίνη προκάλεσε την έξοδο ασβεστίου ως γενικός αγωνιστής (Εικόνες 18 και

19). Από την άλλη, η dantrolene δρα ως ανταγωνιστής των διαύλων RYRs (Εικόνα 18). Τέλος, η thapsigargin, προκαλώντας την εκκένωση του ΕΔ από ιόντα Ca^{2+} , χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση, τόσο των ενδοκυττάρων ιόντων Ca^{2+} , όσο και των ιόντων που εισέρχεται από το εξωκυττάριο περιβάλλον στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 20). Τα πειραματικά αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι τα miR-124 και miR-153 μειώνουν τις συγκεντρώσεις των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα miRs αυτά συμμετέχουν στους μηχανισμούς ρύθμισης της ομοιόστασης του ασβεστίου.

Η αλλαγή στη συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} ανιχνεύθηκε και με τη χρήση της φθορίζουσας ουσίας fluo-4, η οποία επίσης δεσμεύει τα ιόντα Ca^{2+} , μέσω της οποίας καθίσταται δυνατή η μέτρηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων Ca^{2+} σε ζωντανά κύτταρα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα SK-N-SH, τα οποία διαμολύνθηκαν με τα miR-124, miR-153 και miR-124/153. Με τη χρήση της καφεΐνης, η προκαλούμενη έξοδος ιόντων Ca^{2+} από τους διαύλους RYRs του ΕΔ στο κυτταρόπλασμα παρουσιάστηκε μειωμένη στις περιπτώσεις όπου υπερεκφράζονταν τα miR-124 και miR-153, σε σύγκριση με τον μάρτυρα ελέγχου “empty” (Εικόνα 24).

Συμπληρωματικά, προχωρήσαμε σε διαμόλυνση των κυττάρων HEK-293 με το miR-124, και μέτρηση της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} , με τη μέθοδο Calcium Imaging. Η απόκριση των κυττάρων και στις τρεις συνθήκες, με τη χρήση της καρβαχόλης, εμφανίζεται παρόμοια, χωρίς, δηλαδή, το miR-124 να επηρεάζει τις συγκεντρώσεις των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, σε σύγκριση με τους μάρτυρες ελέγχου (Εικόνα 27). Αυτό το πείραμα μας δείχνει ότι πιθανόν το miR-124 να μην επηρεάζει τη λειτουργία των διαύλων IP_3Rs στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HEK-293. Έτσι, επιβεβαιώνεται η ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου από τα miR-124 και miR-153, λόγω της πιθανής αλληλεπίδρασής τους τουλάχιστον με τα *Ryr-1*, *Ryr-2* και *Ryr-3* mRNAs.

Βάση αυτής της μελέτης αποτέλεσαν βιβλιογραφικά δεδομένα που συσχετίζουν τη νόσο Αλτσχάιμερ με διαταραχές της ομοιόστασης του ασβεστίου και τη διαφορική έκφραση κάποιων miRs, όπως τα miR-9, miR-29, miR-107, miR-124, miR153 και miR-181 (Femminella et al, 2015; Berridge, 2010). Η νόσος Αλτσχάιμερ είναι μια νευροεκφυλιστική νόσος, αποτελεί την πιο κοινή μορφή αμνησίας, και χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση “πλακών” του β-αμυλοειδούς (Aβ) στην εξωκυττάρια περιοχή του φλοιού των εγκεφάλων (Mattson, 2004). Κύριο συστατικό αυτών των πλακών είναι το πεπτίδιο Aβ42, που προκύπτει από την πρωτεόλυση της

πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP) με τη δράση της γ-σεκρετάσης (Nogalska et al, 2012; Kumar-Singh et al, 2006). Επίσης, παρατηρείται διαταραχή της ομοιόστασης των ιόντων Ca^{2+} στον εγκέφαλο, καθώς τα ενδοκυττάρια αποθέματα ιόντων Ca^{2+} αυξάνονται, λόγω της ενεργοποίησης πολλών ενζύμων και της παρουσίας μεταλλαγμένων μορφών των πρεσενιλινών (PS1, PS2) (Nixon et al, 1994). Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η μεταλλαγμένη μορφή της PS1 αυξάνει την έκφραση των διαύλων RYRs, με αποτέλεσμα την αυξημένη εκροή ιόντων Ca^{2+} από το ΕΔ προς το κυτταρόπλασμα, καθώς επίσης εμπλέκεται και στον αυξημένο κυτταρικό θάνατο που παρατηρείται, λόγω του πεπτιδίου Αβ (Chan et al, 2000; Guo et al, 1996). Επιπλέον, με την αύξηση των ενδοκυττάρια αποθεμάτων ιόντων Ca^{2+} προκαλείται υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau, καθώς και επαγωγή της παραγωγής Αβ42, με αποτέλεσμα και την αύξηση της έκφρασης του διαύλου RYR-3 (Wojda et al, 2008; Supnet et al, 2006; Mattson et al, 1991).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η νευροτοξικότητα του πεπτιδίου Αβ42 μπορεί να αναστέλλεται, όταν τα κύτταρα επωάζονται α) σε διαλύματα από τα οποία απουσιάζει το ασβέστιο, β) παρουσία αναστολέων διαύλων ασβεστίου του ΕΔ, γ) παρουσία αναστολέων τάσσο-ελεγχόμενων διαύλων ασβεστίου και δ) με αντι-οξειδωτικά, που περιορίζουν την αύξηση στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} που επάγεται από το Αβ (Yagami et al, 2003; Pappolla et al, 1997; Mark et al, 1995). Επιπλέον, μελέτες υποστηρίζουν πως μια θεραπευτική προσέγγιση για τη νόσο Αλτσχάμερ είναι η μερική παρεμπόδιση της λειτουργίας των διαύλων του ΕΔ (Oulès et al, 2012; Anekonda & Quinn, 2011). Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι φαρμακολογική ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου πιθανόν μπορεί να έχει θεραπευτική αξία για τους ασθενείς με νόσο AD.

Είναι πλέον σαφές, πως στη νόσο Αλτσχάμερ παρατηρείται διαφορική έκφραση διαφόρων miRs. Αξίζει να σημειωθεί ότι το miR-124 εκφράζεται ιδιαίτερα στο νευρικό σύστημα. Καταστολή ή μείωση της έκφρασης του miR-124 αυξάνει την έκφραση του ενζύμου β-σεκρετάση (Beta-secretase 1, BACE1), κάτι που οδηγεί στην παραγωγή του Αβ πεπτιδίου, και άρα το φαινότυπο της νόσου Αλτσχάμερ (Fang et al, 2012). Επιπλέον, σε ασθενείς με νόσο Αλτσχάμερ παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του miR-153, ενώ σε φυσιολογικές καταστάσεις στόχος του miR-153 είναι η μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης APP (Long et al, 2012).

Κατά καιρούς, έχουν δημοσιευθεί αρκετές μελέτες που υποστηρίζουν πως θεραπευτικός στόχος για τη νόσο Αλτσχάμερ αποτελεί η επαναφορά της

ομοιόστασης του ασβεστίου στα κύτταρα. Πολλές μελέτες εστιάστηκαν στη καταστολή διαφόρων διαύλων και αντλιών του ασβεστίου, θεωρώντας ότι έτσι θα ρυθμίζεται άμεσα η ομοιόσταση του ασβεστίου (Anekonda and Quinn, 2011). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στη νόσο Αλτσχάιμερ παρατηρείται αυξημένη έκφραση του διαύλου RYR-3, κάτι που οδηγεί σε αυξημένη εκροή ιόντων Ca^{2+} από το ΕΔ προς το κυτταρόπλασμα. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι, εμποδίζοντας τη δράση των διαύλων RYRs, ρυθμίζεται και η αυξημένη εκροή των ιόντων Ca^{2+} από το ΕΔ, που χαρακτηρίζεται και τοξική για τα κύτταρα (Oules et al, 2012). Έτσι, οι δίαυλοι RYRs πιθανόν να αποτελούν έναν στόχο για την ανάπτυξη θεραπειών για τη νόσο Αλτσχάιμερ.

Με γνώμονα αυτές τις προσεγγίσεις, υποθέσαμε ότι η πιθανή δράση των miRs σε αυτούς τους διαύλους μπορεί να συμβάλει στη ρύθμιση της παραγωγής των διαύλων ασβεστίου του ΕΔ, και κατ' επέκταση στους μηχανισμούς ομοιόστασης του ασβεστίου. Οι παραπάνω μελέτες επιβεβαιώνουν τα πειραματικά μας αποτελέσματα, ότι τα miR-124 και miR-153 συμμετέχουν στους μηχανισμούς ρύθμισης της ομοιόστασης του ασβεστίου, τουλάχιστον μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τα *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3* και *Ip3r-3* mRNAs. Ελπίζουμε πως τα παραπάνω ευρήματα θα βοηθήσουν στην περαιτέρω κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης της ομοιόστασης του ασβεστίου, καθώς και στη βελτίωση πιθανών διαταραχών της ομοιόστασης, που παρατηρούνται σε διάφορες ασθένειες.

4.2 Μελλοντικοί στόχοι

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η συνεισφορά της στοχευμένης δράσης δύο miRs στην ρύθμιση διαύλων ασβεστίου και κατ' επέκταση στην ομοιόσταση του ασβεστίου. Κρίνεται απαραίτητο να γίνουν κι άλλα συμπληρωματικά πειράματα για την επιβεβαίωση αυτού του αποτελέσματος.

Ένα από αυτά είναι η επιβεβαίωση της δράσης των miR-124 και miR-153 στις 3'-UTRs των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3* και *Ip3r-3* mRNAs, τα οποία θα φέρουν σημειακές μεταλλάξεις στα σημεία που προσδένονται τα miRs, με τη μέθοδο της λουσιφεράσης. Έχουν πραγματοποιηθεί ήδη κάποια από αυτά τα πειράματα, με ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Επιπλέον, έχει αρχίσει η μελέτη των ενδογενών επιπέδων έκφρασης των *Ryr-1*, *Ryr-2*, *Ryr-3* και *Ip3r-3* mRNAs, έπειτα από την υπερέκφραση των miR-124 και miR-153.

Προκειμένου να μελετηθούν οι επιπτώσεις αυτών των miRs στα ενδογενή πρωτεϊνικά επίπεδα των διαύλων ασβεστίου, θα ακολουθήσει ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα κατά Western σε κύτταρα SK-N-SH, που πρώτα θα έχουν διαμολυνθεί με τα miR-124 και miR-153. Πρώτες ενδείξεις δείχνουν ότι η υπερέκφραση του miR-124 στα κύτταρα αυτά προκαλεί μικρή μείωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης IP₃R-3. Σ' αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι ο εντοπισμός των ενδογενών επιπέδων των πρωτεϊνών RYRs είναι ιδιαίτερα δύσκολος, κυρίως λόγω του μεγάλου μεγέθους των πρωτεϊνών (500-550kDa). Παρ' όλα αυτά έχουν γίνει κάποιες πρώτες προσπάθειες για την ανίχνευση αυτών των πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωμα κατά Western έπειτα από ανοσοκατακρήμνιση των πρωτεϊνών RYRs, τόσο σε εκχύλισμα από εγκέφαλο νεογέννητων ποντικών CD-1 ηλικίας 8 ημερών, όσο και σε κύτταρα SK-N-SH.

Τέλος, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά για τη ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου από miRs. Εφόσον στο μέλλον ολοκληρωθούν οι παραπάνω πειραματικές προσεγγίσεις, για τη μελέτη της έκφρασης των διαύλων ασβεστίου σε επίπεδο mRNAs και πρωτεϊνών σε μη παθολογικές καταστάσεις, αξίζει να εξεταστεί εάν τα miR-124 και miR-153 διαθέτουν νευροπροστατευτικές ιδιότητες. Έτσι, κρίνεται απαραίτητη η μελέτη της δράσης των miRs σε μοντέλα παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι η παρουσία Αβ πεπτιδίων σε καλλιέργειες κυττάρων. Ακόμη, θα έχει ενδιαφέρον η μελέτη της υπερέκφρασης των miR-124 και miR-153 σε ζωικό μοντέλο με χαρακτηριστικά της νόσου Άλτσχάιμερ, για τον προσδιορισμό τυχόν νευροπροστατευτικών ιδιοτήτων που μπορεί να έχουν τα συγκεκριμένα miRs.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- Allen, D. G., et al. (2010). "Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy." Can J Physiol Pharmacol **88**(2): 83-91.
- Altuvia, Y., et al. (2005). "Clustering and conservation patterns of human microRNAs." Nucleic Acids Res **33**(8): 2697-2706.
- Anekonda, T. S. and J. F. Quinn (2011). "Calcium channel blocking as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease: the case for isradipine." Biochim Biophys Acta **1812**(12): 1584-1590.
- Atlas, D. (2010). "Signaling role of the voltage-gated calcium channel as the molecular on/off-switch of secretion." Cell Signal **22**(11): 1597-1603.
- Bagga, S., et al. (2005). "Regulation by let-7 and lin-4 miRs results in target mRNA degradation." Cell **122**(4): 553-563.
- Bak, M., et al. (2008). "MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system." RNA **14**(3): 432-444.
- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." Cell **136**(2): 215-233.
- Baskerville, S. and D. P. Bartel (2005). "Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRs and host genes." RNA **11**(3): 241-247.
- Basu, U., et al. (2001). "The *Saccharomyces cerevisiae* TIF6 gene encoding translation initiation factor 6 is required for 60S ribosomal subunit biogenesis." Mol Cell Biol **21**(5): 1453-1462.
- Basyuk, E., et al. (2003). "Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products." Nucleic Acids Res **31**(22): 6593-6597.
- Bawden, J. W., et al. (1983). "The effects of parathyroid hormone, calcitonin, and vitamin D metabolites on calcium transport in the secretory rat enamel organ." J Dent Res **62**(9): 952-955.
- Benders, A. A., et al. (1994). "Ca²⁺ homeostasis in Brody's disease. A study in skeletal muscle and cultured muscle cells and the effects of dantrolene and verapamil." J Clin Invest **94**(2): 741-748.
- Bennett, M. K., et al. (1983). "Purification and characterization of a calmodulin-dependent protein kinase that is highly concentrated in brain." J Biol Chem **258**(20): 12735-12744.
- Bennett, M. K. and M. B. Kennedy (1987). "Deduced primary structure of the beta subunit of brain type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase determined by molecular cloning." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(7): 1794-1798.
- Benzaquen, L. R., et al. (1995). "Clotrimazole inhibits cell proliferation in vitro and in vivo." Nat Med **1**(6): 534-540.
- Benzinger, T. H. (1969). "Heat regulation: homeostasis of central temperature in man." Physiol Rev **49**(4): 671-759.
- Berridge, M. J. (1995). "Calcium signalling and cell proliferation." Bioessays **17**(6): 491-500.
- Berridge, M. J. (1998). "Neuronal calcium signaling." Neuron **21**(1): 13-26.
- Berridge, M. J. (2010). "Calcium hypothesis of Alzheimer's disease." Pflugers Arch **459**(3): 441-449.
- Berridge, M. J., et al. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 517-529.
- Beto, J. A. (2015). "The role of calcium in human aging." Clin Nutr Res **4**(1): 1-8.

- Bezprozvanny, I., et al. (1995). "Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels." Nature **378**(6557): 623-626.
- Bhattacharyya, S. N., et al. (2006). "Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress." Cell **125**(6): 1111-1124.
- Bohnsack, M. T., et al. (2004). "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRs." RNA **10**(2): 185-191.
- Borge, P. D., et al. (2002). "Insulin receptor signaling and sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase in beta-cells." Diabetes **51 Suppl 3**: S427-433.
- Brennecke, J., et al. (2005). "Principles of microRNA-target recognition." PLoS Biol **3**(3): e85.
- Brini, M. and E. Carafoli (2009). "Calcium pumps in health and disease." Physiol Rev **89**(4): 1341-1378.
- Brini, M., et al. (1995). "Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_c). A critical evaluation." J Biol Chem **270**(17): 9896-9903.
- Buonanno, A. and R. D. Fields (1999). "Gene regulation by patterned electrical activity during neural and skeletal muscle development." Curr Opin Neurobiol **9**(1): 110-120.
- Bushati, N. and S. M. Cohen (2007). "microRNA functions." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 175-205.
- Cai, X., et al. (2004). "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs." RNA **10**(12): 1957-1966.
- Cali, T., et al. (2012). "Mitochondrial Ca(2+) and neurodegeneration." Cell Calcium **52**(1): 73-85.
- Carey, M. B. and S. G. Matsumoto (1999). "Spontaneous calcium transients are required for neuronal differentiation of murine neural crest." Dev Biol **215**(2): 298-313.
- Cerella, C., et al. (2010). "The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival." Int J Cell Biol **2010**: 546163.
- Chan, J. A., et al. (2005). "MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells." Cancer Res **65**(14): 6029-6033.
- Chan, S. L., et al. (2000). "Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons." J Biol Chem **275**(24): 18195-18200.
- Chang, T. C. and J. T. Mendell (2007). "microRNAs in vertebrate physiology and human disease." Annu Rev Genomics Hum Genet **8**: 215-239.
- Chawla, S., et al. (1998). "CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV." Science **281**(5382): 1505-1509.
- Chekulaeva, M. and W. Filipowicz (2009). "Mechanisms of miR-mediated post-transcriptional regulation in animal cells." Curr Opin Cell Biol **21**(3): 452-460.
- Chendrimada, T. P., et al. (2007). "MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6." Nature **447**(7146): 823-828.
- Chendrimada, T. P., et al. (2005). "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." Nature **436**(7051): 740-744.
- Ciafre, S. A., et al. (2005). "Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma." Biochem Biophys Res Commun **334**(4): 1351-1358.

- Colbran, R. J. and A. M. Brown (2004). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptic plasticity." Curr Opin Neurobiol **14**(3): 318-327.
- Conaco, C., et al. (2006). "Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(7): 2422-2427.
- Cookson, M. R. (2012). "Parkinsonism due to mutations in PINK1, parkin, and DJ-1 and oxidative stress and mitochondrial pathways." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(9): a009415.
- Crabtree, G. R. (1999). "Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT." Cell **96**(5): 611-614.
- Creton, R., et al. (2000). "Presence and roles of calcium gradients along the dorsal-ventral axis in *Drosophila* embryos." Dev Biol **217**(2): 375-385.
- Denli, A. M., et al. (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." Nature **432**(7014): 231-235.
- Di Leva, F., et al. (2008). "The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation." Arch Biochem Biophys **476**(1): 65-74.
- Dingledine, R., et al. (1999). "The glutamate receptor ion channels." Pharmacol Rev **51**(1): 7-61.
- Doxakis, E. (2013). "Principles of miR-target regulation in metazoan models." Int J Mol Sci **14**(8): 16280-16302.
- Duffy, L. M., et al. (2011). "Review: The role of mitochondria in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis." Neuropathol Appl Neurobiol **37**(4): 336-352.
- Durham, W. J., et al. (2007). "Diseases associated with altered ryanodine receptor activity." Subcell Biochem **45**: 273-321.
- Easow, G., et al. (2007). "Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification." RNA **13**(8): 1198-1204.
- Erondu, N. E. and M. B. Kennedy (1985). "Regional distribution of type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in rat brain." J Neurosci **5**(12): 3270-3277.
- Eulalio, A., et al. (2007). "P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(1): 9-22.
- Eulalio, A., et al. (2008). "Getting to the root of miR-mediated gene silencing." Cell **132**(1): 9-14.
- Fabian, M. R., et al. (2009). "Mammalian miR RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation." Mol Cell **35**(6): 868-880.
- Fabian, M. R., et al. (2010). "Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs." Annu Rev Biochem **79**: 351-379.
- Fabiato, A. (1985). "Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell." J Gen Physiol **85**(2): 247-289.
- Faller, M. and F. Guo (2008). "MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat." Biochim Biophys Acta **1779**(11): 663-667.
- Fang, M., et al. (2012). "The miR-124 regulates the expression of BACE1/beta-secretase correlated with cell death in Alzheimer's disease." Toxicol Lett **209**(1): 94-105.

- Femminella, G. D., et al. (2015). "The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease." Front Physiol **6**: 40.
- Ferguson, E. L., et al. (1987). "A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*." Nature **326**(6110): 259-267.
- Ferrari, M. B., et al. (1998). "A calcium signaling cascade essential for myosin thick filament assembly in *Xenopus* myocytes." J Cell Biol **141**(6): 1349-1356.
- Filipowicz, W. (2005). "RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine." Cell **122**(1): 17-20.
- Filipowicz, W., et al. (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" Nat Rev Genet **9**(2): 102-114.
- Filippov, V., et al. (2000). "A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes." Gene **245**(1): 213-221.
- Fink, C. C. and T. Meyer (2002). "Molecular mechanisms of CaMKII activation in neuronal plasticity." Curr Opin Neurobiol **12**(3): 293-299.
- Franzini-Armstrong, C. (2007). "ER-mitochondria communication. How privileged?" Physiology (Bethesda) **22**: 261-268.
- Friedman, R. C., et al. (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." Genome Res **19**(1): 92-105.
- Gandhi, S., et al. (2009). "PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death." Mol Cell **33**(5): 627-638.
- Garofalo, M. and C. M. Croce (2011). "microRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer." Annu Rev Pharmacol Toxicol **51**: 25-43.
- Giacomello, M., et al. (2013). "Neuronal Ca(2+) dyshomeostasis in Huntington disease." Prion **7**(1): 76-84.
- Gilland, E., et al. (1999). "Imaging of multicellular large-scale rhythmic calcium waves during zebrafish gastrulation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(1): 157-161.
- Gomez, T. M. and N. C. Spitzer (1999). "In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients." Nature **397**(6717): 350-355.
- Gregory, R. I., et al. (2006). "MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex." Methods Mol Biol **342**: 33-47.
- Griffith, L. C. (2004). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: an unforgettable kinase." J Neurosci **24**(39): 8391-8393.
- Griffiths-Jones, S. (2005). "Annotating non-coding RNAs with Rfam." Curr Protoc Bioinformatics **Chapter 12**: Unit 12 15.
- Grimson, A., et al. (2007). "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing." Mol Cell **27**(1): 91-105.
- Grimson, A., et al. (2007). "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing." Mol Cell **27**(1): 91-105.
- Gu, S., et al. (2009). "Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs." Nat Struct Mol Biol **16**(2): 144-150.

- Gu, X. and N. C. Spitzer (1997). "Breaking the code: regulation of neuronal differentiation by spontaneous calcium transients." Dev Neurosci **19**(1): 33-41.
- Guo, Q., et al. (1996). "Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid beta-peptide." Neuroreport **8**(1): 379-383.
- Guzman, J. N., et al. (2010). "Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1." Nature **468**(7324): 696-700.
- Gy, I., et al. (2007). "Arabidopsis FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors." Plant Cell **19**(11): 3451-3461.
- Han, J., et al. (2004). "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing." Genes Dev **18**(24): 3016-3027.
- Han, J., et al. (2006). "Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex." Cell **125**(5): 887-901.
- Hardingham, G. E., et al. (1999). "Control of recruitment and transcription-activating function of CBP determines gene regulation by NMDA receptors and L-type calcium channels." Neuron **22**(4): 789-798.
- Haverstick, D. M., et al. (2000). "Inhibition of human prostate cancer proliferation in vitro and in a mouse model by a compound synthesized to block Ca²⁺ entry." Cancer Res **60**(4): 1002-1008.
- Hebert, S. S., et al. (2008). "Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(17): 6415-6420.
- Heeman, B., et al. (2011). "Depletion of PINK1 affects mitochondrial metabolism, calcium homeostasis and energy maintenance." J Cell Sci **124**(Pt 7): 1115-1125.
- Hinman, M. N. and H. Lou (2008). "Diverse molecular functions of Hu proteins." Cell Mol Life Sci **65**(20): 3168-3181.
- Hohjoh, H. and T. Fukushima (2007). "Marked change in microRNA expression during neuronal differentiation of human teratocarcinoma NTera2D1 and mouse embryonal carcinoma P19 cells." Biochem Biophys Res Commun **362**(2): 360-367.
- Horvitz, H. R. and J. E. Sulston (1980). "Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*." Genetics **96**(2): 435-454.
- Houbaviy, H. B., et al. (2003). "Embryonic stem cell-specific MicroRNAs." Dev Cell **5**(2): 351-358.
- Houseley, J., et al. (2006). "RNA-quality control by the exosome." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(7): 529-539.
- Hutvagner, G. and P. D. Zamore (2002). "A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex." Science **297**(5589): 2056-2060.
- Islam, M. S., et al. (1992). "Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in insulin-secreting cells." FEBS Lett **296**(3): 287-291.
- Ji, X. (2008). "The mechanism of RNase III action: how dicer dices." Curr Top Microbiol Immunol **320**: 99-116.
- John, B., et al. (2004). "Human MicroRNA targets." PLoS Biol **2**(11): e363.
- Johnson, R., et al. (2008). "A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease." Neurobiol Dis **29**(3): 438-445.

- Jones, K. T., et al. (2000). "Different Ca²⁺-releasing abilities of sperm extracts compared with tissue extracts and phospholipase C isoforms in sea urchin egg homogenate and mouse eggs." Biochem J **346 Pt 3**: 743-749.
- Junn, E., et al. (2009). "Repression of alpha-synuclein expression and toxicity by microRNA-7." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(31): 13052-13057.
- Kass, G. E. and S. Orrenius (1999). "Calcium signaling and cytotoxicity." Environ Health Perspect **107 Suppl 1**: 25-35.
- Kennedy, M. B., et al. (1990). "Structure and regulation of type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase in central nervous system neurons." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **55**: 101-110.
- Khvorova, A., et al. (2003). "Functional siRNAs and miRs exhibit strand bias." Cell **115**(2): 209-216.
- Kim, V. N. (2005). "MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(5): 376-385.
- Kim, Y. K. and V. N. Kim (2007). "Processing of intronic microRNAs." EMBO J **26**(3): 775-783.
- Kiriakidou, M., et al. (2007). "An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation." Cell **129**(6): 1141-1151.
- Kourtidis, A., et al. (2015). "Distinct E-cadherin-based complexes regulate cell behaviour through miRNA processing or Src and p120 catenin activity." Nat Cell Biol **17**(9): 1145-1157.
- Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones (2011). "miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D152-157.
- Krichevsky, A. M., et al. (2006). "Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis." Stem Cells **24**(4): 857-864.
- Kuhl, M., et al. (2000). "Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in Xenopus." J Biol Chem **275**(17): 12701-12711.
- Kumar-Singh, S., et al. (2006). "Mean age-of-onset of familial alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Abeta42 and decreased Abeta40." Hum Mutat **27**(7): 686-695.
- Kume, S., et al. (1997). "Developmental expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and localization of inositol 1,4,5-trisphosphate during early embryogenesis in Xenopus laevis." Mech Dev **66**(1-2): 157-168.
- Lagos-Quintana, M., et al. (2002). "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse." Curr Biol **12**(9): 735-739.
- Landgraf, P., et al. (2007). "A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing." Cell **129**(7): 1401-1414.
- Landthaler, M., et al. (2008). "Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs." RNA **14**(12): 2580-2596.
- Lanner, J. T., et al. (2010). "Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(11): a003996.
- Lau, N. C., et al. (2001). "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans." Science **294**(5543): 858-862.
- Lee, J. I., et al. (2003). "The Caenorhabditis elegans homologue of Down syndrome critical region 1, RCN-1, inhibits multiple functions of the phosphatase calcineurin." J Mol Biol **328**(1): 147-156.

- Lee, R. C., et al. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-854.
- Lee, Y., et al. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-419.
- Lee, Y., et al. (2006). "The role of PACT in the RNA silencing pathway." EMBO J **25**(3): 522-532.
- Lee, Y., et al. (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." EMBO J **23**(20): 4051-4060.
- Lewis, B. P., et al. (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." Cell **115**(7): 787-798.
- Li, H. S., et al. (1999). "Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF." Neuron **24**(1): 261-273.
- Li, Z. and T. M. Rana (2014). "Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges." Nat Rev Drug Discov **13**(8): 622-638.
- Liang, Y., et al. (2007). "Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues." BMC Genomics **8**: 166.
- Lin, C. R., et al. (1987). "Molecular cloning of a brain-specific calcium/calmodulin-dependent protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(16): 5962-5966.
- Liu, J., et al. (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." Science **305**(5689): 1437-1441.
- Long, J. M., et al. (2012). "MicroRNA-153 physiologically inhibits expression of amyloid-beta precursor protein in cultured human fetal brain cells and is dysregulated in a subset of Alzheimer disease patients." J Biol Chem **287**(37): 31298-31310.
- Lu, K. P. and A. R. Means (1993). "Regulation of the cell cycle by calcium and calmodulin." Endocr Rev **14**(1): 40-58.
- Lukiw, W. J., et al. (2009). "Up-regulation of micro-RNA-221 (miR-221; chr Xp11.3) and caspase-3 accompanies down-regulation of the survivin-1 homolog BIRC1 (NAIP) in glioblastoma multiforme (GBM)." J Neurooncol **91**(1): 27-32.
- Lukiw, W. J., et al. (2008). "An NF-kappaB-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells." J Biol Chem **283**(46): 31315-31322.
- Lund, E. and J. E. Dahlberg (2006). "Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **71**: 59-66.
- Lund, E., et al. (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." Science **303**(5654): 95-98.
- Mark, R. J., et al. (1995). "Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death." J Neurosci **15**(9): 6239-6249.
- Maslanski, J. A., et al. (1992). "Lithium-sensitive production of inositol phosphates during amphibian embryonic mesoderm induction." Science **256**(5054): 243-245.
- Matilla-Duenas, A., et al. (2010). "Cellular and molecular pathways triggering neurodegeneration in the spinocerebellar ataxias." Cerebellum **9**(2): 148-166.
- Mattson, M. P. (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease." Nature **430**(7000): 631-639.

- Mattson, M. P., et al. (1991). "Effects of elevated intracellular calcium levels on the cytoskeleton and tau in cultured human cortical neurons." Mol Chem Neuropathol **15**(2): 117-142.
- Maziere, P. and A. J. Enright (2007). "Prediction of microRNA targets." Drug Discov Today **12**(11-12): 452-458.
- McDonough, S. I., et al. (2000). "Origin sites of calcium release and calcium oscillations in frog sympathetic neurons." J Neurosci **20**(24): 9059-9070.
- McKenna, B. A., et al. (2010). "Effects of Ca, Cu, Al and La on pectin gel strength: implications for plant cell walls." Carbohydr Res **345**(9): 1174-1179.
- McNeil, P. L. and R. A. Steinhardt (2003). "Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 697-731.
- Megraw, M., et al. (2007). "miRGen: a database for the study of animal microRNA genomic organization and function." Nucleic Acids Res **35**(Database issue): D149-155.
- Meister, G., et al. (2004). "Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing." RNA **10**(3): 544-550.
- Melachroinou, K., et al. (2013). "Deregulation of calcium homeostasis mediates secreted alpha-synuclein-induced neurotoxicity." Neurobiol Aging **34**(12): 2853-2865.
- Mermelstein, P. G., et al. (2000). "Critical dependence of cAMP response element-binding protein phosphorylation on L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs in preference to action potentials." J Neurosci **20**(1): 266-273.
- Miyazaki, S., et al. (1993). "Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ release channel in Ca²⁺ waves and Ca²⁺ oscillations at fertilization of mammalian eggs." Dev Biol **158**(1): 62-78.
- Monks, C. R., et al. (1998). "Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells." Nature **395**(6697): 82-86.
- Morimoto, S. (2008). "Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies." Cardiovasc Res **77**(4): 659-666.
- Morlando, M., et al. (2008). "Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally." Nat Struct Mol Biol **15**(9): 902-909.
- Mundy, G. R. and T. A. Guise (1999). "Hormonal control of calcium homeostasis." Clin Chem **45**(8 Pt 2): 1347-1352.
- Nakamura, T., et al. (1999). "Synergistic release of Ca²⁺ from IP₃-sensitive stores evoked by synaptic activation of mGluRs paired with backpropagating action potentials." Neuron **24**(3): 727-737.
- Nelson, P. T., et al. (2004). "miRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line." RNA **10**(3): 387-394.
- Nie, L., et al. (1996). "Blockade of DNA synthesis induced by platelet-derived growth factor by tranilast, an inhibitor of calcium entry, in vascular smooth muscle cells." Mol Pharmacol **50**(4): 763-769.
- Nilsen, T. W. (2007). "Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells." Trends Genet **23**(5): 243-249.
- Nixon, R. A., et al. (1994). "Calcium-activated neutral proteinase (calpain) system in aging and Alzheimer's disease." Ann N Y Acad Sci **747**: 77-91.

- Nogalska, A., et al. (2012). "Activation of the gamma-secretase complex and presence of gamma-secretase-activating protein may contribute to Abeta42 production in sporadic inclusion-body myositis muscle fibers." Neurobiol Dis **48**(1): 141-149.
- Okamura, K., et al. (2009). "Distinct mechanisms for microRNA strand selection by Drosophila Argonautes." Mol Cell **36**(3): 431-444.
- Olsen, P. H. and V. Ambros (1999). "The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation." Dev Biol **216**(2): 671-680.
- Orom, U. A., et al. (2008). "MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation." Mol Cell **30**(4): 460-471.
- Orrenius, S., et al. (2003). "Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 552-565.
- Oules, B., et al. (2012). "Ryanodine receptor blockade reduces amyloid-beta load and memory impairments in Tg2576 mouse model of Alzheimer disease." J Neurosci **32**(34): 11820-11834.
- Pappolla, M. A., et al. (1997). "Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide." J Neurosci **17**(5): 1683-1690.
- Parekh, A. B. and J. W. Putney, Jr. (2005). "Store-operated calcium channels." Physiol Rev **85**(2): 757-810.
- Parker, R. and U. Sheth (2007). "P bodies and the control of mRNA translation and degradation." Mol Cell **25**(5): 635-646.
- Pasquinelli, A. E., et al. (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." Nature **408**(6808): 86-89.
- Periasamy, M. and A. Kalyanasundaram (2007). "SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease." Muscle Nerve **35**(4): 430-442.
- Petersen, C. P., et al. (2006). "Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells." Mol Cell **21**(4): 533-542.
- Pillai, R. S., et al. (2007). "Repression of protein synthesis by miRs: how many mechanisms?" Trends Cell Biol **17**(3): 118-126.
- Rand, T. A., et al. (2005). "Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation." Cell **123**(4): 621-629.
- Reinhard, E., et al. (1995). "Localized calcium signals in early zebrafish development." Dev Biol **170**(1): 50-61.
- Reinhart, B. J., et al. (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." Nature **403**(6772): 901-906.
- Rhoades, M. W., et al. (2002). "Prediction of plant microRNA targets." Cell **110**(4): 513-520.
- Rodriguez, A., et al. (2004). "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units." Genome Res **14**(10A): 1902-1910.
- Rosenberg, H., et al. (2007). "Malignant hyperthermia." Orphanet J Rare Dis **2**: 21.
- Salzman, D. W., et al. (2007). "P68 RNA helicase unwinds the human let-7 microRNA precursor duplex and is required for let-7-directed silencing of gene expression." J Biol Chem **282**(45): 32773-32779.

- Satoh, M., et al. (1991). "Inositol 1,4,5-trisphosphate activates Ca²⁺ channels in the plasma membranes of rat brain nerve terminals." Adv Exp Med Biol **287**: 97-110.
- Saxena, S., et al. (2003). "Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells." J Biol Chem **278**(45): 44312-44319.
- Schwarz, D. S., et al. (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." Cell **115**(2): 199-208.
- Schwarz, D. S. and P. D. Zamore (2002). "Why do miRs live in the miRNP?" Genes Dev **16**(9): 1025-1031.
- Seggeron, K., et al. (2002). "Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation." Dev Biol **243**(2): 215-225.
- Sempere, L. F., et al. (2004). "Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation." Genome Biol **5**(3): R13.
- Sharp, A. H., et al. (1999). "Differential cellular expression of isoforms of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in neurons and glia in brain." J Comp Neurol **406**(2): 207-220.
- Shimizu, S., et al. (1999). "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC." Nature **399**(6735): 483-487.
- Silber, J., et al. (2008). "miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells." BMC Med **6**: 14.
- SmiRnova, L., et al. (2005). "Regulation of miR expression during neural cell specification." Eur J Neurosci **21**(6): 1469-1477.
- Smith, M. R., et al. (1998). "Overexpression of phosphoinositide-specific phospholipase Cgamma in NIH 3T3 cells promotes transformation and tumorigenicity." Carcinogenesis **19**(1): 177-185.
- Song, J. J., et al. (2004). "Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity." Science **305**(5689): 1434-1437.
- Souret, F. F., et al. (2004). "AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miR targets." Mol Cell **15**(2): 173-183.
- Spudich, J. A. and S. Watt (1971). "The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin." J Biol Chem **246**(15): 4866-4871.
- Storey, E. and R. J. Gardner (2012). "Spinocerebellar ataxia type 15." Handb Clin Neurol **103**: 561-565.
- Storey, E., et al. (2001). "A new autosomal dominant pure cerebellar ataxia." Neurology **57**(10): 1913-1915.
- Supnet, C., et al. (2006). "Amyloid-beta-(1-42) increases ryanodine receptor-3 expression and function in neurons of TgCRND8 mice." J Biol Chem **281**(50): 38440-38447.
- Tang, G. (2005). "siRNA and miR: an insight into RISCs." Trends Biochem Sci **30**(2): 106-114.
- Tiso, N., et al. (2001). "Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2)." Hum Mol Genet **10**(3): 189-194.

- Tobi, D., et al. (1998). "N-type voltage-sensitive calcium channel interacts with syntaxin, synaptotagmin and SNAP-25 in a multiprotein complex." Receptors Channels **6**(2): 89-98.
- Tobimatsu, T. and H. Fujisawa (1989). "Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs." J Biol Chem **264**(30): 17907-17912.
- Tobimatsu, T., et al. (1988). "Molecular cloning of the cDNA encoding the third polypeptide (gamma) of brain calmodulin-dependent protein kinase II." J Biol Chem **263**(31): 16082-16086.
- Vasudevan, S., et al. (2007). "Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation." Science **318**(5858): 1931-1934.
- Wang, W. X., et al. (2008). "The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1." J Neurosci **28**(5): 1213-1223.
- Wienholds, E. and R. H. Plasterk (2005). "MicroRNA function in animal development." FEBS Lett **579**(26): 5911-5922.
- Wightman, B., et al. (1993). "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*." Cell **75**(5): 855-862.
- Williams, A. E. (2008). "Functional aspects of animal microRNAs." Cell Mol Life Sci **65**(4): 545-562.
- Wojda, U., et al. (2008). "Calcium ions in neuronal degeneration." IUBMB Life **60**(9): 575-590.
- Wong, R. O. (1999). "Retinal waves and visual system development." Annu Rev Neurosci **22**: 29-47.
- Wu, L., et al. (2006). "MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(11): 4034-4039.
- Yagami, T., et al. (2003). "Novel binding sites of 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in plasma membranes from primary rat cortical neurons." Exp Cell Res **291**(1): 212-227.
- Yamashita, A., et al. (2005). "Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover." Nat Struct Mol Biol **12**(12): 1054-1063.
- Yamauchi, T. (2005). "Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II--discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory." Biol Pharm Bull **28**(8): 1342-1354.
- Yang, H., et al. (1998). "Phospholipase C (EC 3.1.4.11): a malignancy linked signal transduction enzyme." Anticancer Res **18**(3A): 1399-1404.
- Yu, J. Y., et al. (2008). "MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation." Exp Cell Res **314**(14): 2618-2633.
- Zeng, Y., et al. (2003). "MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 9779-9784.
- Zhang, H., et al. (2004). "Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III." Cell **118**(1): 57-68.
- Zhang, Y., et al. (2007). "[Potential role of microRNAs in human diseases and the exploration on design of small molecule agents]." Yao Xue Xue Bao **42**(11): 1115-1121.
- Zhong, H., et al. (1999). "Reciprocal regulation of P/Q-type Ca²⁺ channels by SNAP-25, syntaxin and synaptotagmin." Nat Neurosci **2**(11): 939-941.

