

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διδακτορική Διατριβή

Μελέτη της έκφρασης της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ
και πιθανών ισομορφών της σε διάφορους ιστούς

Ευάγγελος Δ. Καρούσης
Βιολόγος



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ, ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Αθήνα 2014

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διδακτορική διατριβή

Θέμα:
**«Μελέτη της έκφρασης της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ και
πιθανών ισομορφών της σε διάφορους ιστούς»**

Ευάγγελος Δ. Καρούσης

Βιολόγος

Αθήνα 2014

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής υπό του Βιολογικού Τμήματος της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλεί αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα».

(Ν. 5343/1932, Άρθρο 202, Παρ. 2)

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Καθηγητής	Εμμανουήλ Φραγκούλης
Ερευνητής Α΄	Γεώργιος Παναγιώτου
Αναπληρωτής Καθηγητής	Διαμάντης Σίδερης (επιβλέπων)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγητής	Εμμανουήλ Φραγκούλης
Καθηγητής	Κωνσταντίνος Βοργιάς
Καθηγήτρια	Αικατερίνη Γαϊτανάκη
Ερευνητής Α΄	Γεώργιος Παναγιώτου
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια	Διδώ Βασιλακοπούλου
Αναπληρωτής Καθηγητής	Διαμάντης Σίδερης (επιβλέπων)
Επίκουρος Καθηγητής	Ιωάννης Τρουγκάκος



Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών κατά τη χρονική περίοδο Φεβρουάριος 2009-Μάιος 2014.

Για την ολοκλήρωσή της καθοριστικό ρόλο διαδραμάτισε ο Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Διαμάντης Σίδερης ο οποίος μου έκανε την τιμή να επιβλέψει την πορεία της και να μου δώσει την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί του. Μία προπτυχιακή διάλεξη στο δεύτερο έτος των σπουδών μου ήταν αρκετή για να με πείσει να ασχοληθώ ερευνητικά με το αντικείμενο της Βιοχημείας και μου γέννησε την επιθυμία να γίνω μέλος της ομάδας του. Είμαι ιδιαίτερα ευτυχής, όχι μόνο επειδή μου έδωσε αυτή την ευκαιρία αλλά κυρίως γιατί στάθηκε στο πλάι μου ως ιδανικός δάσκαλος, ερευνητής και φίλος όλα αυτά τα χρόνια μετατρέποντας τη διδακτορική μου διατριβή σε ένα πραγματικό ταξίδι ζωής που με έφερε πιο κοντά στις επαγγελματικές μου επιθυμίες. Η εμπειρία, οι συμβουλές, το ήθος αλλά ιδιαίτερα το μεράκι και το πάθος του για την έρευνα αποτέλεσαν για εμένα πολύτιμα εφόδια και πηγή έμπνευσης για κάθε βήμα που θα ακολουθήσει στην μετέπειτα πορεία μου. Τον ευχαριστώ θερμά γιατί αποτέλεσε για μένα υπόδειγμα επαγγελματισμού και εύχομαι μελλοντικά να τον κάνω περήφανο ως μαθητή του.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Καθηγητή Βιοχημείας Εμμανουήλ Φραγκούλη καθώς και τον Ερευνητή Α' Γεώργιο Παναγιώτου για τον χρόνο τους, την σημαντική καθοδήγηση τους και τις πολύτιμες συμβουλές τους κατά την διάρκεια της παρούσας διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στα μέλη του τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας και κυρίως στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Διδώ Βασιλακοπούλου και στην Αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Σόνια Τσιτλήλου για τις εύστοχες υποδείξεις τους και την ευχάριστη συνεργασία σε όλα τα επίπεδα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής που δέχτηκαν να αξιολογήσουν την παρούσα διατριβή.

Πέρα από την ερευνητική εμπειρία που αποκόμισα κατά την διάρκεια της διατριβής, στάθηκα ιδιαίτερα τυχερός να συνεργαστώ με μέλη της ερευνητικής ομάδας του τομέα που διευκόλυναν σημαντικά την καθημερινότητά μου και πολλοί από αυτούς είναι πλέον αγαπημένοι μου φίλοι. Πιο συγκεκριμένα, ένα ευχαριστώ από καρδιάς οφείλω στην Διδάκτορα και κουμπάρα μου πλέον, Μαριάννα Κυρίτση, στην Υποψήφια

Διδάκτορα Ασημίνα Γκράτσου και στον Υποψήφιο Διδάκτορα Σωτήρη Τσατσαρούνο. Μαριάννα, Ασημίνα και Σωτήρη η συνεργασία σας και κυρίως η φιλία σας ήταν ανέλπιστα δώρο. Μέσα από πειραματικές επιτυχίες, αποτυχίες, ταξίδια, βόλτες και ατελείωτες συζητήσεις γίνατε αναπόσπαστο κομμάτι της ζωής μου και σας διαβεβαιώνω ότι τα χρόνια που πέρασαν θα ήταν πολύ φτωχότερα χωρίς εσάς. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ από καρδιάς οφείλω στη βιολόγο Βάσια Δελίτσικου καθώς και στην υποψήφια Διδάκτορα Ιωάννα Κοκκινοπούλου για την φιλία, την άψογη συνεργασία μας και τις πολύτιμες στιγμές που περάσαμε και ελπίζω να συνεχίσουμε να περνάμε μαζί.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τους συναδέλφους, Διδάκτορες, Μεταπτυχιακούς και Προπτυχιακούς φοιτητές της ερευνητικής ομάδας του κ. Σίδηρη για την άψογη συνεργασία μας και συγκεκριμένα τους Μαριάντζελα Οικονομοπούλου, Βασίλη Βουρλούμη, Δέσποινα Βλοϊτού, Έλενα Σταθοπούλου, Κική Μάρκου, Βασιλική Τσιολίγκα, Έλσα Τάτση και Όλγα Ντουβροπούλου. Η συμβολή και η συνεργασία τους υπήρξε ανεκτίμητη.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω σε όλα τα μέλη του τομέα που συνυρπήξαμε μαζί τα τελευταία χρόνια. Ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στα μέλη της ομάδας της κας Βασιλακοπούλου και κυρίως στις διδάκτορες Αλίκη Βασιλείου, Ιωάννα Χαλατσά και Ιωάννα Κοκκίνου, στα μέλη της ομάδας του κυρίου Ροδάκη και κυρίως στην Ελένη Κυριακού, στα μέλη της ομάδας της κας Τσιτήλου και κυρίως στον Χάρη Αντύπα καθώς και στα μέλη της ομάδας του κου Σκορίλα και κυρίως στους Μαριάννα Χριστοδούλου, Κώστα Μαυρίδη και Δήμητρα Αλεξοπούλου για την πολύτιμη συνεργασία και την συμβολή τους σε όλα τα επίπεδα. Ευχαριστώ επίσης τον Δρ. Θανάση Βελέντζα για την πολύτιμη βοήθειά του στα πειράματα μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού καθώς και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ουρανία Τσιτσιλώνη για την παροχή κυτταρικού υλικού και για την συμπαράστασή της.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς οφείλω στην οικογένειά μου και κυρίως στους γονείς μου, Κυριακή και Δημήτρη για την ψυχολογική και υλική στήριξη. Η μητέρα μου, Κυριακή, διαδραμάτισε καταλυτικό ρόλο στην αναζήτηση της επαγγελματικής μου ταυτότητας και στάθηκε στο πλάι μου σαν αληθινή φίλη και πολύτιμη σύμμαχος καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου για το λόγο αυτό της αφιερώνω την παρούσα διδακτορική διατριβή. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στην ευρύτερη οικογένειά μου και στους φίλους μου η συμβολή των οποίων ήταν περισσότερο από πολύτιμη στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Πάνο, σε ευχαριστώ

από καρδιάς. Αθηνά, Μαρκέλλα, Μίνα, Φανή, Κική, Μάρθα και Κατερίνα σας είμαι
ευγνώμων για όλα.

Στη μητέρα μου, Κυριακή

Πίνακας περιεχομένων

	Σελ.
1. Εισαγωγή	
1.1 Δομή και λειτουργία των ριβονουκλεασών	3
1.1.1 Βασικά συντηρημένα χαρακτηριστικά των μονοπατιών αποικοδόμησης RNA	7
1.1.2 Συμπαράγοντες που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση RNA	8
ATP-εξαρτώμενες RNA ελικάσες	8
Πολυμεράσες	9
Πρωτεΐνες – Συνοδοί (Chaperones)	10
Μικρά RNAs	11
1.1.3 Μονοπάτια αποικοδόμησης ευκαρυωτικών RNAs	11
Κατηγορίες αντιδράσεων διάσπασης RNA	11
A. Ωρίμανση και διάσπαση RNA μορίων που συντίθενται από την RNA πολυμεράση I	12
B. Ωρίμανση και διάσπαση RNA μορίων που συντίθενται από την RNA πολυμεράση II	14
Μονοπάτια γενικής ρύθμισης των επιπέδων mRNA	16
Μονοπάτια ποιοτικού ελέγχου και απομάκρυνσης ελαττωματικών mRNA μορίων	19
NMD (Nonsense-mediated mRNA decay)	20
NSD (Non-stop decay) και NGD (No-Go decay)	26
Ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης miRNAs	26
Γ. Ωρίμανση και διάσπαση RNA μορίων που συντίθενται από την RNA πολυμεράση III	27
Δ. Ωρίμανση και διάσπαση RNA μορίων που συντίθενται από τις RNA πολυμεράσες IV και V	28
1.1.4 Κυτταροπλασματικά σωματίδια επεξεργασίας RNA (P bodies)	28
1.1.5 Βιολογικός ρόλος ειδικών ενδοριβονουκλεασών	29
A. PMR1	30
B. IRE1	30
Γ. RNase L	32
Δ. Η πρωτεΐνη AGO2	33
Ε. Οι αλδολάσες A και C	34
Στ. Η ριβονουκλεάση ARD-1	35
Z. Η οικογένεια G3BP	35
Η. Η Αγγειογενίνη	36
Θ. Η πρωτεΐνη SMG6	36
Ι. Η ριβονουκλεάση Rgp44	37
ΙΑ. Η πρωτεΐνη PP11	37
ΙΒ. Η πρωτεΐνη APE1	38
1.2 Η πρωτεϊνική οικογένεια της ριβονουκλεάσης κ	39
1.3 Η εναλλακτική συρραφή	45
1.3.1 Ο γενικός μηχανισμός απομάκρυνσης εσωνίων και συρραφής εξωνίων	45
1.3.2 Η εναλλακτική συρραφή ως πηγή ποικιλομορφίας	47
Μηχανισμός εναλλακτικής συρραφής	48

	Κύριοι τύποι εναλλακτικής συρραφής	49
1.3.3	Γενικά χαρακτηριστικά της εναλλακτικής συρραφής μικρής έκτασης	50
1.3.4	Μηχανισμός εναλλακτικής συρραφής μικρής έκτασης	51
1.3.5	Λειτουργικές συνέπειες γεγονότων εναλλακτικής συρραφής μικρής έκτασης	54
1.3.6	Εξελικτικές διαστάσεις της εναλλακτικής συρραφής μικρής έκτασης	56
1.4	Σκοπός της διδακτορικής διατριβής	58
2. Υλικά και Μέθοδοι		
2.1	Υλικά	61
2.1.1	Χημικές ουσίες	61
2.1.2	Αντισώματα	61
2.1.3	Κυτταρικά στελέχη	62
2.1.4	Θρεπτικά υλικά	64
2.1.5	Διαλύματα	66
2.1.6	Ολιγονουκλεοτίδια – Μόρια εκκινητές	66
2.1.7	Πλασμίδια, Φορείς κλωνοποίησης	67
2.2	Μέθοδοι	71
2.2.1	Ηλεκτροφορητικές τεχνικές	71
	2.2.1.1 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης	71
	2.2.1.2 Ηλεκτροφόρηση RNA σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης	72
	2.2.1.3 Ηλεκτροφόρηση ολιγονουκλεοτιδίων σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης - ουρίας	73
	2.2.1.4 SDS ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης	73
	2.2.1.5 SDS ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα παρουσία Tricine	75
2.2.2	Καλλιέργειες ανθρώπινων κυτταρικών σειρών	76
2.2.3	Δημιουργία και χημικός μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων	77
2.2.4	Απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων	78
	2.2.4.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	78
	2.2.4.2 Απομόνωση ολικού RNA από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές	79
	2.2.4.3 Απομόνωση poly(A)+RNA	80
	2.2.4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊνικών οξέων	81
2.2.5	Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και κλασμάτωσή τους βάσει υδροφοβικότητας	81
2.2.6	Ανάλυση κατά Northern	83
	2.2.6.1 Μεταφορά RNA σε μεμβράνη υβριδοποίησης υπό κενό	83
	2.2.6.2 Προετοιμασία ιχνηθέτη	84
	2.2.6.3 Υβριδοποίηση	85
	2.2.6.4 Αυτοραδιογραφία	86
2.2.7	Ανάλυση κατά Western	87
	2.2.7.1 Ημίστεγνη ανοσοσύπωση	87
	2.2.7.2 Ανοσοσύπωση κηλίδας (Dot Blot)	89
2.2.8	Ανοσοκυτταροχημεία και μικροσκοπία φθορισμού	89
2.2.9	Απομόνωση του cDNA της ανθρώπινης RNάσης κ-02	91
	Αντίστροφη μεταγραφή	91
	Σύνθεση βιοτινιλωμένου ιχνηθέτη και σύνδεση σε μαγνητικά σφαιρίδια	92

	Υβριδοποίηση	93
	Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση και εφαρμογή PCR	94
2.2.10	Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων mRNA της ανθρώπινης RNάσης κ	95
	Αντίστροφη μεταγραφή, πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση και εφαρμογή PCR	95
	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR)	96
2.2.11	Παρασκευή πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του αμινοτελικού άκρου της ανθρώπινης RNάσης κ-02	98
	Κλωνοποίηση αμινοτελικού άκρου και έκφραση στο σύστημα IMPACT-CN	98
	Χρωματογραφικός καθαρισμός του αμινοτελικού άκρου της RNάσης κ-02	100
	Ανοσοποίηση και καθαρισμός του πολυκλωνικού αντισώματος K02N	101
2.2.12	Ετερόλογη έκφραση της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 στο σύστημα του ζυμομύκητα <i>Pichia pastoris</i>	
	2.2.12.1 Ενσωμάτωση του cDNA της RNάσης κ-02 στον <i>P. Pastoris</i>	102
	Α. Γραμμικοποίηση του φορέα έκφρασης	103
	Β. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων ζυμομύκητα	103
	Γ. Μετασχηματισμός των κυττάρων του ζυμομύκητα με ηλεκτροδιάτρηση	104
	2.2.12.2 Επαγωγή της έκφρασης της ανθρώπινης RNάσης κ-02	104
	2.2.12.3 Χρωματογραφικός καθαρισμός της ανασυνδυασμένης RNάσης κ-02	105
2.2.13	Έλεγχος της ενζυμικής ενεργότητας της RNάσης κ-02	106
	2.2.13.1 Έλεγχος με ραδιενεργά σημασμένα υποστρώματα	106
	Σήμανση ολιγονουκλεοτιδίων με [γ - 32 P]	106
	Δοκιμασία ριβονουκλεολυτικής ενεργότητας (RNA assay)	107
	2.2.13.2 Με φθορίζοντα υποστρώματα	109
2.2.14	<i>In silico</i> ανάλυση αλληλουχιών	110
3. Αποτελέσματα		
3.1	Έκφραση της ανθρώπινης RNase κ σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές	113
	3.1.1 Δεδομένα από EST αλληλουχίες για την έκφραση πιθανών εναλλακτικών ισομορφών της ανθρώπινης RNάσης κ	113
	3.1.2 Ανάλυση κατά Northern της έκφρασης της ριβονουκλεάσης κ σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές	115
3.2	Κλωνοποίηση και μοριακός χαρακτηρισμός της εναλλακτικής ισομορφής RNάση κ-02	117
	3.2.1 Κλωνοποίηση του mRNA της ισομορφής RNάση κ-02	117
	3.2.2 Μοριακός χαρακτηρισμός του cDNA της ισομορφής RNase κ-02	119
3.3	Παραγωγή και καθαρισμός ενός ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της RNάσης κ-02	122
3.4	Ετερόλογη έκφραση και βιοχημικός χαρακτηρισμός της εναλλακτικής ισομορφής RNάση κ-02	126
	3.4.1 Ετερόλογη έκφραση της ανθρώπινης RNase κ-02 στο σύστημα του ζυμομύκητα <i>P.pastoris</i>	126
	3.4.2 Χρωματογραφικός καθαρισμός της ανθρώπινης RNάσης κ-02	128
	3.4.3 Ενζυμικός χαρακτηρισμός της ανθρώπινης RNase κ-02 και προσδιορισμός της εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα	130
	3.4.4 Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis (K_m) της RNάσης κ-02 και σύγκριση της	

	με την RNάση κ-01	135
3.5	Μελέτη της έκφρασης της ισομορφής RNάση κ-02 σε ανθρώπινες κυτταρικές Σειρές	
	3.5.1 Προσδιορισμός των σχετικών επιπέδων έκφρασης των mRNA ισομορφών RNase κ-01/RNase κ-02 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές	139
	3.5.2 Ανοσολογικός εντοπισμός της RNase κ-02 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές	143
	3.5.3 Υποκυτταρικός εντοπισμός της RNase κ-02 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές	145
4.	Συζήτηση	149
5.	Βιβλιογραφία	159
6.	Περίληψη	169
7.	Περίληψη στα Αγγλικά	177
8.	Δημοσίευση	183

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

APS	Ammonium persulphate Υπερθειικό αμμώνιο
AVLI	Το δεκαπενταπεπτίδιο: AVLIEDVVPFTEKDFE
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p-toluidine salt 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδυλ-φωσφορικό μετά της τολουϊδίνης άλας
BHQ1	Black hole quencher 1 Σκοτεινός αποσβέστης φθορισμού
Bis	N,N'-methylene-bis-acrylamide N,N'-μεθυλένο-δισ-ακρυλαμίδη
BMGY	Buffered glycerol complex medium Πλήρες ρυθμιστικό θρεπτικό υλικό με γλυκερόλη για την ανάπτυξη κυττάρων ζυμομύκητα
BMMY	Buffered methanol complex medium Πλήρες ρυθμιστικό θρεπτικό υλικό με μεθανόλη για την ανάπτυξη κυττάρων ζυμομύκητα
BSA	Bovine serum albumin Αλβουμίνη ορού βοός
cDNA	Complementary DNA Συμπληρωματικό DNA
Cc RNase	RNase κ of <i>Ceratitidis capitata</i> Ριβονουκλεάση κ του <i>Ceratitidis capitata</i>
dH ₂ O	Distilled water Απεσταγμένο νερό
DMF	Dimethylformamide Δι-μεθυλ-φορμαμίδιο
DMSO	Dimethylsulfoxid Διμεθυλο-σουλφοξειδίο
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates Μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων A,T,G,C.
DEPC	Diethylpyrocarbonate

	Διεθυλο-πυροανθρακικό
EDTA	Ethylenediamine-tetra-acetic acid Αιθυλενο-διαμινο- τετραοξικό οξύ
EtBr	Ethidium bromide Βρωμιούχο αιθίδιο
FAM	Fluorescein Φλουορεσκεΐνη
FRET	Fluorescence resonance energy transfer Ενεργειακή μεταφορά αντήχησης φθορισμού
IAA	Iodoacetamide Ιωδοακεταμίδιο
IPTG	Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside Ισοπροπυλ-β-D-θειογαλακτοπυρανοσίδη
LB	Lysogeny Broth Θρεπτικό διάλυμα καλλιέργειας βακτηρίων
Low salt LB	Low salt Lysogeny Broth Θρεπτικό διάλυμα καλλιέργειας βακτηρίων με χαμηλή συγκέντρωση άλατος
mRNA	Messenger RNA Αγγελιοφόρο RNA
NBT	nitro blue tetrazolium chloride 2H-(Tetrazolium,3,3'- (3,3'-dimethoxy (1,1'-biphenyl)- 4,4'-diyl) bis (4-nitrophenyl)-5- (phenyl-, dichloride) 2,2'-δι-νιτροφαινυλ-5,5'-διφαινυλ-3,3'-[3,3'-διμεθοξυ-4,4'-διφαινυλεν-χλωριούχο] τετραζόλιο
NEM	N-Ethylmaleimide N-εθυλμαλεϊμίδιο
Nonidet P-40	Non-ionic detergent 2-[2-[4-(2,4,4-trimethylpentanyl)phenoxy]ethoxy]ethanol Μη ιονικό απορρυπαντικό 2-[2-[4-(2,4,4-τριμεθυπεντανυλ)φαινοξυ]αιθοξυ]αιθανόλη
O.D.	Optical density Οπτική πυκνότητα

ORF	Open reading frame Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης
PCR	Polymerase chain reaction Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
pI	Isoelectric point Ισηλεκτρικό σημείο
RNase	Ribonuclease Ριβονουκλεάση
rpm	Rounds per minute Στροφές ανά λεπτό
rRNA	Ribosomal RNA Ριβοσωμικό RNA
SDS	Sodium dodecyl sulfate Θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο
snRNA	Small nuclear RNA Μικρό πυρηνικό RNA
snoRNA	Small nuclear RNA Μικρό πυρηνισκικό RNA
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite Repression Θρεπτικό διάλυμα μετασηματισμού δεκτικών βακτηριακών κυττάρων
shRNA	Short hairpin RNA Μικρό RNA με δομή φουρκέτας
T4 PNK	T4 Polynucleotide kinase Πολυνουκλεοτιδική κινάση του βακτηριοφάγου T4
TB	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-Βορικού οξέος που χρησιμοποιείται στην παραγωγή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων
TBE	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-Βορικού οξέος-EDTA ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης
TBS	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-NaCl που χρησιμοποιείται για την έκπλυση μεμβρανών ανοσοσύτωσης

TCA	Trichloroacetic acid Τριχλωροξικό οξύ
TE	Ρυθμιστικό διάλυμα γενικής χρήσης Tris- EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylene-diamine N, N, N',N' - τετραμεθυλαιθυλενο-διαμίνη
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane Τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθάνιο
Triton X-100	Non-ionic detergent iso-octylphenoxy polyethoxyethanol, Μη ιονικό απορρυπαντικό ισο-οκτυλοφαινοξυ-πολυαιθοξυ-αιθανόλη
tRNA	Transfer RNA Μεταφορικό RNA
UTR	Untranslated region Μη μεταφραζόμενη περιοχή
UV	Ultraviolet Υπεριώδες
v/v	Volume per volume Όγκος κατ' όγκο
w/v	Weight per volume Βάρος κατ' όγκο
YPD	Yeast extract peptone dextrose Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων ζυμομύκητα που περιέχει εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνη και δεξτρόζη
YPDS	Yeast extract peptone dextrose sorbitol Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων ζυμομύκητα που περιέχει εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνη, δεξτρόζη και σορβιτόλη
YNB	Yeast nitrogen base Διάλυμα που χρησιμοποιείται ως πηγή αζώτου κατά την καλλιέργεια κυττάρων ζυμομύκητα

1 | Εισαγωγή

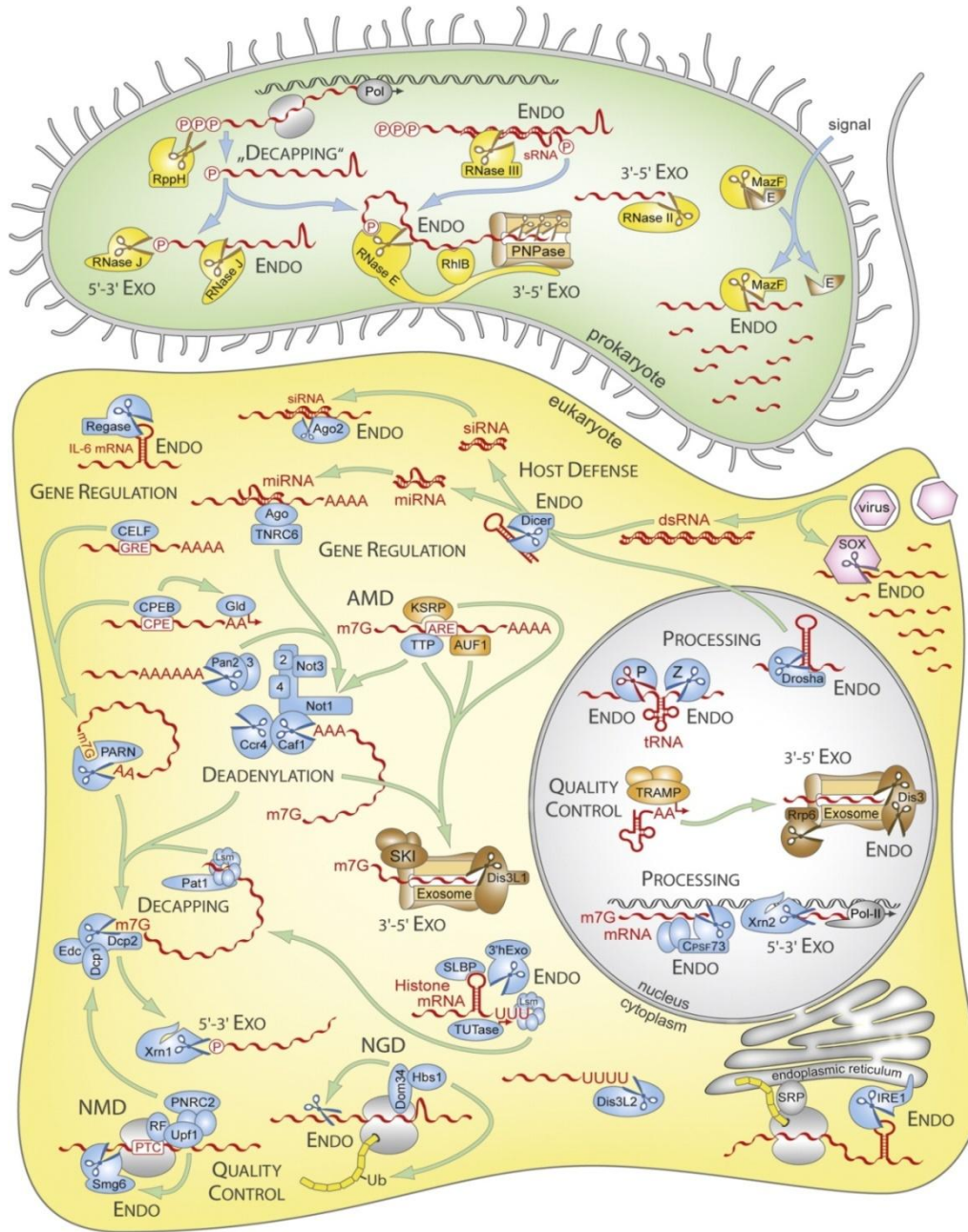
1.1 Δομή και λειτουργία των ριβονουκλεασών

Σε όλους τους οργανισμούς που έχουν μελετηθεί, ανεξάρτητα από το Βασίλειο στο οποίο ανήκουν, η αποικοδόμηση μορίων RNA είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την κυτταρική επιβίωση. Οι ριβονουκλεάσες είναι οι κύριοι καταλύτες του RNA καταβολισμού και συμμετέχουν σε ένα μεγάλο πλήθος διαφορετικών διεργασιών τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις.

Η αποικοδόμηση των ενδοκυττάρων RNAs καταλύεται από περισσότερες από 30 οικογένειες ριβονουκλεασών. Υπολογίζεται ότι ο συνολικός αριθμός ριβονουκλεασών είναι 24 στην *E.coli*, 25 στον *B. subtilis*, τουλάχιστον 34 στον *S.cerevisiae* και περισσότερες από 60 στον άνθρωπο (πίνακας 1). Οι αριθμοί αυτοί αντανακλούν την ποικιλία ενδοκυττάρων λειτουργιών στις οποίες εμπλέκονται οι ριβονουκλεάσες: ως παράγοντες ωρίμανσης μορίων RNA από πρόδρομα μόρια μεγαλύτερου μήκους, ως συστατικά συμπλεγμάτων ποιοτικού ελέγχου των RNA ώστε να αποικοδομούνται τα ελαττωματικά μόρια, ως μηχανισμοί προστασίας έναντι εισβολής ιικών RNA και μεταθετών στοιχείων, ως μόρια σηματοδότησης μονοπατιών μεταγωγής σήματος που ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση σε μεταμεταγραφικό επίπεδο αλλά και ως ένζυμα που αποικοδομούν το RNA της τροφής [1].

Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και οι εκκρινόμενες ριβονουκλεάσες που δρουν στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Η υπεροικογένεια εκκρινόμενων ριβονουκλεασών στα Σπονδυλόζωα περιλαμβάνει μικρές εκκρινόμενες πρωτεΐνες που ποικίλλουν ως προς τη δομή και ως προς τη λειτουργία [2]. Στους πρωτεϊνικούς αντιπροσώπους της υπεροικογένειας έχουν αποδοθεί πολλαπλοί βιολογικοί ρόλοι που περιλαμβάνουν την αγγειογένεση και την προστασία από παθογόνους παράγοντες [3]. Τα ομόλογα των θηλαστικών κατατάσσονται σε 8 οικογένειες που χαρακτηρίζονται ως «κανονικές» ριβονουκλεάσες [4] που παλιότερα ονομάζονταν και ριβονουκλεάσες «παγκρεατικού τύπου» λόγω της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A, της πρώτης που απομονώθηκε και μελετήθηκε. Ο καταλυτικός μηχανισμός της ριβονουκλεάσης A είχε προταθεί από τη δεκαετία του '60, πριν από την ανάλυση της τρισδιάστατης δομής της μερικά χρόνια αργότερα [5]. Σήμερα, η ριβονουκλεάση A θεωρείται το πληρέστερα μελετημένο ένζυμο και αποτελεί μοντέλο για την κατανόηση δέσμευσης και ενδοριβονουκλεολυτικής αποικοδόμησης πολυμερών υποστρωμάτων [6].

Στην επόμενη εικόνα απεικονίζονται οι κυριότερες διαδικασίες στις οποίες συμμετέχουν ριβονουκλεάσες σε ένα προκαρυωτικό και σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο.



Εικόνα 1.1: Ενδοκυτταρικά ένζυμα που αποικοδομούν RNA σε προκαρυωτικά (επάνω) και ευκαρυωτικά (κάτω) κύτταρα. Ένας μεγάλος αριθμός ριβονουκλεασών είναι απαραίτητος για την τροποποίηση των πρόδρομων μεταγράφων σε ώριμα RNAs, για τον ποιοτικό έλεγχο των RNAs, για την άμυνα έναντι εισβολής ξένου RNA και για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Ένας μικρός μόνο αριθμός ριβονουκλεασών από τις 30 διαφορετικές οικογένειες απεικονίζονται στο σχήμα. Τα ένζυμα αυτά δρουν ως ενδοριβονουκλεάσες (endo), και ως εξωριβονουκλεάσες (exo) με κατεύθυνση 5'→3' ή 3'→5'. Η δράση των ενδοριβονουκλεασών συνήθως απελευθερώνει υποστρώματα ευάλωτα στη δράση εξωριβονουκλεασών. AMD: αποικοδόμηση mRNAs μέσω αλληλουχιών ARE, NMD: Αποικοδόμηση mRNAs με πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού, NGD: Αποικοδόμηση mRNAs με ισχυρές δίκλωνες δομές. Το σχήμα είναι γενικευμένο καθώς δεν περιλαμβάνονται σε όλα τα κύτταρα τα ένζυμα που απεικονίζονται. Περισσότερες λεπτομέρειες περιλαμβάνονται στον πίνακα 1.1 [1].

Στον πίνακα που ακολουθεί συνοψίζονται οι ριβονουκλεάσες που έχουν χαρακτηριστεί στην *Escherichia coli*, στον *Saccharomyces cerevisiae* και στον *Homo sapiens* [1]. Κάθε γραμμή περιλαμβάνει ομόλογους αντιπροσώπους ενώ σε έγχρωμα πλαίσια αναγράφονται οι αντίστοιχες πρωτεϊνικές οικογένειες.

<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>
DEDD (3' Εξωνουκλεάση)			EEP (3' Εξωνουκλεάση, Ενδονουκλεάση)		
RNάση D/ <i>rmd</i>	Rrp6	RRP6		Ccr4	CCR4a/CNOT6
RNάση T/ <i>rnt</i>	Rex2	REXO1		Ng1	CCR4b/CNOT6L
Oligo-RNάση <i>lom</i>	Rex3	REXO1L1		Ng12	Nocturnin/CCRN4L
	Rex4	REXO2		Ng13	PDE12
	Rex1/Rnh70	REXO4			(ANGEL1) ²
	Pop2	CAF1a/CNOT7			(Ccr4d/ANGEL2) ²
	Pan2	CAF1b/CNOT8	Nudix Υδρολάση (5' Εξωνουκλεάση)		
		CAF1z	RppH/ <i>ygdP</i>	Dcp2	DCP2
		PAN2			NUDT16
		PARN	HIT Πυροφωσφατάση (5' Εξωνουκλεάση)		
		3' hExo/ERI1		Dcs1	DCPS
		ERI2		Dcs2	
		ERI3	XRN (5' Εξωνουκλεάση)		
		ISG20		Xrn1	XRN1
		ISG20L1/AEN		Rat1	XRN2
		ISG20L2	β-λακταμάση I/(5' Εξωνουκλεάση, Ενδονουκλεάση)		
		NEF-sp/LOC81691	RNάση Z (BN/ <i>rbn</i>)	RNάση Z/Trz1	RNάση Z1/ELAC1
RNάση II (3' Εξωνουκλεάση)				Cpsf73/Ysh1	RNάση Z2/ELAC2
RNάση II = B/ <i>rnb</i>	Rrp44/Dis3	DIS3		(Cpsf100/Ydh1) ¹	CPSF73
RNάση R/ <i>rnr</i>	Dss1	DIS3L			INTS9
	Ssd1	DIS3L2			CPSF3L/INTS11
PDX (3' Εξωνουκλεάση, φωσφορολυτική δράση)					(CPSF100) ¹
RNάση PH/ <i>rph</i>	(Rrp41) ¹	PNPάση/PNPT1	RNάση P (Ενδονουκλεάση)		
PNPάση/ <i>rnp</i>	(Rrp42) ¹	(Rrp41/EXOSC4) ¹	RNάση P ³ / <i>rnpB</i>	RNάση P ³ /RPR1	RNάση P ³ /RPPH1
	(Rrp43) ¹	(Rrp42/EXOSC7) ¹		RNάση MRP ³ /RPM1	RNάση MRP ³ /RMRP
	(Rrp45) ¹	(Rrp43/EXOSC8) ¹			(RNάση P RNA-like) ²
	(Rrp46) ¹	(Rrp45/EXOSC9) ¹			(RNάση MRN RNA-like) ²
	(Mtr3) ¹	(Rrp46/EXOSC5) ¹	RNase III (Ενδονουκλεάση, dsRNA)		
		(Mtr3/EXOSC6) ¹	RNάση III/ <i>rnc</i>	Rnt1	DROSHA, DICER1

<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>
RNάση H (Ενδονουκλεάση, RNA:DNA, dsRNA)			tRNA Ενδονουκλεάση (Ενδονουκλεάση)		
RNάση Hl/ <i>rnhA</i>	RNάση H1/ Rnh1	RNάση H1/ RNASEH1		Sen2	TSEN2
RNάση HII/ <i>rnhB</i>	RNάση H2/ Rnh201	RNάση H2A/ RNASEH2A		Sen34	TSEN34
(YghN/yhgN) ²		AGO2	RNάση τύπου Ire1 (Ενδονουκλεάση)		
RNάση T2 (Ενδονουκλεάση)				Ire1	Ire1/ERN1
RNάση I/ <i>rna</i>	Rny1	RNάση T2/ RNASET2			RNάση L/RNASEL
PIN (Ενδονουκλεάση)			DNA/RNA μη-ειδική ενδονουκλεάση (Ενδονουκλεάση)		
	Dis3 /Rrp44	DIS3		Nuc1	Ενδονουκλεάση G/ ENDOG
	Nob1	SMG6	PLD (Ενδονουκλεάση)		
		Regnase/ZC3H1 2A			Zucchini/PLD6
PemK (Ενδονουκλεάση)			Αpurinic–Αpyrimidinic (DNA-) Ενδονουκλεάση (Ενδονουκλεάση)		
MazF/ <i>mazF</i>					APE1/APEX1
ChpB/ <i>ChpB</i>			RNάση A (Ενδονουκλεάση)		
Plasmid-stabil (Ενδονουκλεάση)					RNASE1
RelE/ <i>relE</i>					RNASE2
YoeB/ <i>yoeB</i>					RNASE3
YafQ/ <i>yafQ</i>					RNASE4
RNάση LS (Ενδονουκλεάση)					RNASE5 = Angiogenin/ANG
RNάση LS/ <i>rnlA</i>					RNASE6
YhaV (Ενδονουκλεάση)					RNASE7
YhaV/ <i>yhaV</i>					RNASE8
Ferredoxin-like (Ενδονουκλεάση)					(RNASE9, 10, 12, 13) ¹
Cas2/ <i>ygbF</i>			Σωματίο συρραφής (Ενδονουκλεάση)		
RNάση E/G (DNάση I, Ενδονουκλεάση)				U2/U5/U6 snRNP ⁵	U2/U5/U6 snRNP ⁵
RNάση E/ <i>rne</i>			Calcineurin-like Φωσφοδιεστεράση (Ενδονουκλεάση)		
RNάση G/ <i>rng</i>			(Reg B) ⁴		

Πίνακας 1.1: Οι κυριότερες οικογένειες ενδοριβονουκλεασών. Σε κάθε γραμμή περιλαμβάνονται οι ομόλογες πρωτεΐνες στην *E.coli*, στον *S.cerevisiae* και στον άνθρωπο. Σε παρένθεση περιλαμβάνονται οι ενεργότητες που αποδίδονται στα μέλη της οικογένειας. **1:** Ανενεργό μόριο **2:** Αβέβαιη ενεργότητα **3:** Στους περισσότερους οργανισμούς η καταλυτική ενεργότητα της RNάσης P και της MRP αποδίδονται στο RNA συστατικό, ωστόσο η ανθρώπινη μιτοχονδριακή RNάση P έχει αποκλειστικά πρωτεϊνική σύσταση. **4:** Εκφράζεται από το βακτηριοφάγο T₄ **5:** Η καταλυτική ενεργότητα του σωματίου συρραφής αποδίδεται στα U2 και U6 snRNAs

Συνολικά, είναι σαφές ότι παρά την –φαινομενικά– μεγάλη πολυπλοκότητα των πληθυσμών RNA και συνεπώς των μονοπατιών αποικοδόμησής τους, υπάρχουν σημαντικές ομοιότητες στα βασικά χαρακτηριστικά της διάσπασης των RNA μορίων σε Βακτήρια, Αρχαία και ευκαρυωτικούς οργανισμούς, γεγονός που τονίζει ακόμη περισσότερο την ιδιαίτερη σημασία των διαδικασιών αυτών στην κυτταρική επιβίωση.

1.1.1 Βασικά συντηρημένα χαρακτηριστικά των μονοπατιών αποικοδόμησης RNA

Οι ριβονουκλεάσες είναι μια εξαιρετικά ετερογενής ομάδα ενζύμων με κοινό χαρακτηριστικό την αποικοδόμηση RNA. Ως προς την υποστρωματική τους εξειδίκευση μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες, τις **ενδοριβονουκλεάσες** που διασπών μόρια RNA σε εσωτερικές θέσεις, τις **5' εξωνουκλεάσες** και τις **3' εξωνουκλεάσες** που καταλύουν την αποικοδόμηση RNA από το 5' και 3' άκρο του μορίου αντίστοιχα [7].

Ίσως το πιο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των μηχανισμών RNA αποικοδόμησης είναι η *πολύ υψηλή αποδοτικότητά* τους. Σε ζυμομύκητες με μεταλλαγμένα ριβοσωμικά συστατικά και ως εκ τούτου αδυναμία σύνθεσης ριβοσωμάτων, τα pre-rRNAs αποικοδομούνται χωρίς καν να είναι δυνατή η *in vitro* ανίχνευση ενδιάμεσων προϊόντων [8]. Με άλλα λόγια, RNA μόρια μήκους χιλιάδων βάσεων απλά εξαφανίζονται σε μερικά δευτερόλεπτα παρά την τεράστια αφθονία τους.

Διάφορες θεωρίες έχουν προταθεί για να ερμηνεύσουν την εξελικτική καθιέρωση της εξαιρετικά υψηλής δραστηριότητας των μηχανισμών αποικοδόμησης RNA. Μια πιθανή εξήγηση λαμβάνει υπ' όψιν την ανάγκη άμεσης αποικοδόμησης μικρών μορίων RNA (όπως miRNAs, siRNAs και piRNAs) τα οποία πρόσφατα αποκαλύφθηκε ότι επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση (και όχι μόνο) μέσω μίας πληθώρας μηχανισμών. Συνεπώς, μια ισχυρή εξελικτική πίεση ασκείται με σκοπό την αποφυγή της τυχαίας συσσώρευσης λανθασμένων RNA μορίων που προέρχονται κυρίως από RNAs με υψηλά ενδογενή επίπεδα έκφρασης. Άλλες απόψεις προτείνουν ότι η συσσώρευση RNA μορίων μπορεί να εμποδίσει την αντιγραφή του DNA σχηματίζοντας RNA-DNA υβρίδια, ότι οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν RNA βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα συνεπώς τα RNA μόρια ανταγωνίζονται για τη δέσμευσή τους σε αυτές καθώς και την ανάπτυξη μηχανισμών ταχείας αποικοδόμησης με σκοπό την καταστολή έκφρασης ιικών μορίων RNA [9].

Τα περισσότερα γονιδιώματα οργανισμών κωδικοποιούν τη σύνθεση μεγάλου αριθμού ριβονουκλεασών, συχνά με επικαλυπτόμενες ενεργότητες, καθιστώντας έτσι τον *πλεονασμό*, την ύπαρξη δηλαδή της ίδιας ενεργότητας σε διαφορετικά ένζυμα, κοινό χαρακτηριστικό των μονοπατιών RNA αποικοδόμησης. Με ορισμένες σημαντικές εξαιρέσεις, η μετάλλαξη που οδηγεί σε απώλεια ενεργότητας μιας μόνο ριβονουκλεάσης συνήθως δεν οδηγεί σε σημαντική αποσταθεροποίηση των μηχανισμών αποικοδόμησης σε ευκαρυωτικά ή προκαρυωτικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι το ίδιο RNA μπορεί να αποτελεί ταυτόχρονα στόχο για περισσότερες ριβονουκλεάσες. Αυτό το χαρακτηριστικό αυξάνει σημαντικά την αποδοτικότητα και τη δυναμική των μονοπατιών αποικοδόμησης [9].

Πολλά από τα ένζυμα και τους συμπράγοντες που εμπλέκονται στην τροποποίηση και την αποικοδόμηση μορίων RNA εμφανίζουν *πολλαπλές λειτουργίες*. Ορισμένες ριβονουκλεάσες δηλαδή μπορούν είτε να διασπών μερικώς είτε πλήρως τα RNA-στόχους, εμφανίζοντας λεπτές δυνατότητες εξειδίκευσης ανάλογα με το υπόστρωμα στο οποίο δεσμεύονται. Έτσι, ορισμένα ένζυμα όπως η 5' εξωνουκλεάση Rat1 του ζυμομύκητα μπορούν να διασπών με ακρίβεια ορισμένα μόρια RNA δημιουργώντας καθορισμένα άκρα ενώ άλλα μόρια τα διασπών πλήρως. Έχουν μάλιστα τη δυνατότητα να επεξεργάζονται με διαφορετικό τρόπο τα ίδια RNA μόρια κάτω από διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες. Η πολλαπλή δραστηριότητα και η ειδικότητα που χαρακτηρίζει πολλές ριβονουκλεάσες έχει ιδιαίτερη σημασία στους μηχανισμούς εντοπισμού και αποικοδόμησης ελαττωματικών RNAs καθώς και συμπλόκων RNA – πρωτεϊνών. Αυτή η ειδικότητα συχνά επιτυγχάνεται από πρωτεϊνικούς ή άλλης φύσης *συμπράγοντες*, ορισμένοι από τους οποίους έχουν ταυτοποιηθεί και ο ρόλος τους στις διαδικασίες αποικοδόμησης έχει προσδιοριστεί [9].

1.1.2 Συμπράγοντες που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση RNA

ATP-εξαρτώμενες RNA ελικάσες

Πρόκειται για μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε όλα σχεδόν τα μονοπάτια επεξεργασίας και αποικοδόμησης RNA. Οι RNA ελικάσες μπορούν να κινηθούν κατά μήκος RNA μορίων δεσμεύοντας και υδρολύοντας ATP αποδιατάσσοντας δίκλωνες δομές ή απομακρύνοντας πρωτεϊνικά και RNA μόρια που έχουν δεσμευθεί στο RNA. Εναλλακτικά, μπορούν να λειτουργούν ως «σημάδια τοποθέτησης» παραμένοντας σε συγκεκριμένες θέσεις σηματοδοτώντας σημεία δράσης και επιστρατεύοντας μηχανισμούς

αποικοδόμησης στα σημεία αυτά [10]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ελικάσης είναι ο παράγοντας UPF1, ο σημαντικότερος ενεργοποιητής του μονοπατιού αποικοδόμησης ελαττωματικών μορίων mRNA μέσω του μηχανισμού NMD στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η φωσφορυλίωση της συγκεκριμένης ελικάσης πυροδοτεί την επαγωγή δράσης της ειδικής στα Μετάζωα ενδοριβονουκλεάσης SMG6 που καταλύει τη διάσπαση του ελαττωματικού mRNA [11-14].

Πολυμεράσες

Οι εξωνουκλεάσες δεν έχουν τη δυνατότητα να αποικοδομήσουν μόρια RNA κοντά σε σταθερές δίκλωνες δομές [15] και η μεσολάβηση πολυμερασών για να προσθέσουν μονόκλινα RNA μόρια που δρουν σαν «πλατφόρμες» για τη δράση των εξωνουκλεασών αποτελεί πιθανότατα μια στρατηγική που έχει υιοθετηθεί αρκετά νωρίς στην κυτταρική εξέλιξη. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το σύμπλοκο πολυαδενυλίωσης TRAMP δρα ως σημαντικός συμπαράγοντας για τη δράση του εξωσώματος στους ζυμομύκητες. Το σύμπλοκο *TRAMP* περιλαμβάνει μια poly(A) πολυμεράση, μία πρωτεΐνη δέσμησης RNA με δάκτυλα ψευδαργύρου και μία RNA ελικάση. Ο λειτουργικός ρόλος του συμπλόκου στον άνθρωπο δεν έχει αποσαφηνιστεί ωστόσο είναι αποδεκτό ότι το σύμπλοκο TRAMP-εξωσώματος συνιστά ένα δυναμικό σύστημα που είναι υπεύθυνο για την επιτήρηση πολλών RNAs και συμπλεγμάτων RNA – πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, η προσθήκη καταλοίπων αδερίνης σε *πυρηνικά* μόρια RNA αποτελεί σινιάλο αποικοδόμησης των αντίστοιχων μορίων, μηχανισμός αντίστοιχος με την προσθήκη ουβικιτίνης σε πρωτεΐνες που προορίζονται για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Αντιθέτως, όπως είναι γνωστό η πολυαδενυλίωση ώριμων μορίων mRNA προσδίδει κυτταροπλασματική σταθερότητα στα μηνύματα αυτά λόγω σύνδεσης πρωτεϊνών (PABP) στις αντίστοιχες αλληλουχίες [16].

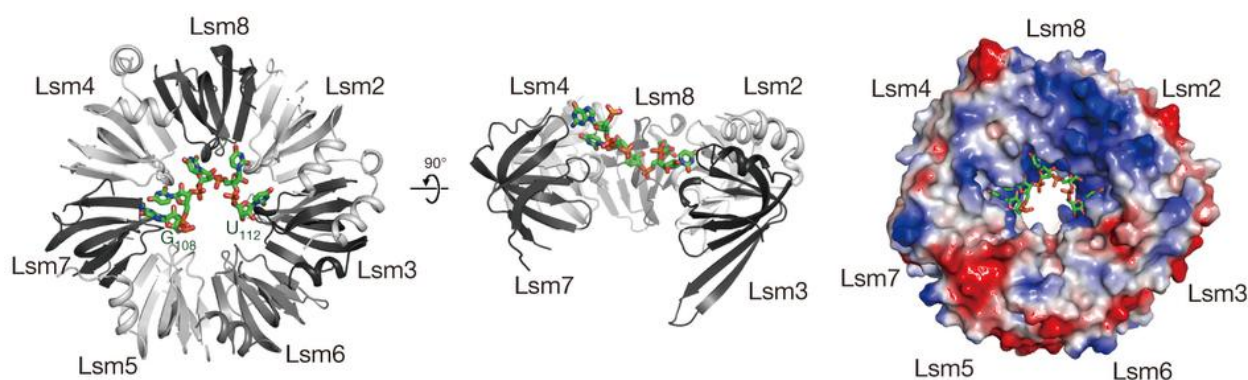
Ορισμένες 3' εξωνουκλεάσες, όπως η βακτηριακή πολυνουκλεοτιδική φωσφορυλάση (PNPάση) και το εξώσωμα στα Αρχαία εμφανίζουν και δράση RNA πολυμεράσης. Καταλύουν κυρίως την προσθήκη καταλοίπων αδερίνης, πιθανότατα επειδή η αδερίνη αποτελεί το πλέον διαθέσιμο νουκλεοτίδιο στο κυτταρικό περιβάλλον. Το γεγονός αυτό καθιστά πιθανή την θεωρία ότι τα αρχέγονα μονοπάτια αποικοδόμησης επάγονταν από την προσθήκη νουκλεοτιδικών καταλοίπων. Η poly(A) πολυμεράση του συμπλέγματος TRAMP προέκυψε αργότερα εξελικτικά ωστόσο η σχέση μεταξύ προσθήκης poly(A) και επαγωγής της αποικοδόμησης διατηρήθηκε μόνο στον ευκαρυωτικό πυρήνα

αφού, ως γνωστόν στο κυτταρόπλασμα η ύπαρξη της poly(A) ουράς σταθεροποιεί σημαντικά τα μόρια mRNA. Πράγματι, σε όλους σχεδόν τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς υπάρχουν poly(A) πολυμεράσες γεγονός που καθιστά πιθανό ότι η πολυαδενυλίωση των mRNAs αναπτύχθηκε αρχικά στο κυτταρόπλασμα πριν μεταφερθεί στον πυρήνα [17].

Στα ανθρώπινα κύτταρα η προσθήκη poly(U) ουρών επάγει επίσης την αποικοδόμηση των RNAs. Poly(U) πολυμεράσες έχουν βρεθεί σε αρκετούς οργανισμούς γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι πρόκειται επίσης για διαδεδομένο μονοπάτι αποικοδόμησης [18].

Πρωτεΐνες – Συνοδοί (Chaperones)

Τα συμπλέγματα Lsm1-7 και Lsm2-8 στους ευκαρυωτικούς και το σύμπλεγμα Hfq στα βακτήρια αποτελούν μέλη μιας ακόμη κατηγορίας συμπαραγόντων που βρίσκονται στους περισσότερους οργανισμούς που έχουν μελετηθεί [19]. Τα μόρια αυτά δρουν ως μοριακοί συνοδοί επάγοντας συγκεκριμένες RNA-RNA και RNA-πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις ρυθμίζοντας και την αποικοδόμηση πολλών RNAs. Για παράδειγμα, οι poly(U) ουρές επάγουν την αποικοδόμηση των mRNAs των ιστονών στον άνθρωπο στρατολογώντας το σύμπλεγμα Lsm1-7 που διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στα βασικά μονοπάτια mRNA αποικοδόμησης [18].



Εικόνα 1.2: Απεικόνιση της συνολικής δομής του ευκαρυωτικού συμπλέγματος Lsm 2-8 όπως δεσμεύεται στο 3' άκρο της αλληλουχίας του U6 snRNA. Μία κεντρική οπή του συμπλέγματος αλληλεπιδρά με πέντε νουκλεοτιδικά κατάλοιπα (αριστερά και μέσο). Το πεντανουκλεοτίδιο 5'-G₁₀₈UUUU₁₁₂-3' δεσμεύεται σε μία θετικά φορτισμένη επιφάνεια του δακτυλίου Lsm2-8 όπως φαίνεται στην ηλεκτροστατική απεικόνιση (δεξιά). Με μπλε απεικονίζονται θετικά φορτισμένες και με κόκκινο αρνητικά φορτισμένες περιοχές [20].

Μικρά RNAs

Ένας μεγάλος αριθμός μικρών ρυθμιστικών RNAs έχουν χαρακτηριστεί τόσο και προκαρυωτικά όσο και σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Τα βακτηριακά μικρά RNAs (sRNAs) δρουν ρυθμίζοντας τη μετάφραση συγκεκριμένων RNA-στόχων. Διαφορετικά sRNAs μπορούν να αλληλεπιδρούν λειτουργικά ενώ τα επίπεδά τους ρυθμίζονται μέσω poly(A)-επαγόμενης αποικοδόμησης RNA. Συνεπώς, τα βακτηριακά sRNAs εμφανίζουν λειτουργικές ομοιότητες με τα ενδογενή ευκαρυωτικά microRNAs (miRNAs) τα οποία επίσης δρουν ρυθμίζοντας στην έκφραση σε επίπεδο mRNA [21].

Πολλά βακτήρια επίσης κωδικοποιούν άλλα μικρά RNAs τα οποία μεταγράφονται από συγκεκριμένους γενετικούς τόπους CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) και χαρακτηρίζονται ως psiRNAs ή crRNAs. Οι γενετικοί τόποι CRISPR εμπεριέχουν πολλαπλές μικρές αλληλουχίες που ομοιάζουν με αλληλουχίες ιών και μεταγράφονται σε πρόδρομα pre-crRNA μόρια μεγάλου μήκους που υφίστανται επεξεργασία για να παράγουν τα ώριμα crRNAs/psiRNAs [22]. Αυτά τα μόρια συμμετέχουν στην άμυνα εναντίον των ιών επάγοντας την αποικοδόμηση ομόλογων ιικών RNAs μέσω ενδονουκλεολυτικής αποικοδόμησης. Η ιδιότητά τους αυτή έχει καταστήσει τα CRISPR εξαιρετικά δυναμικά εργαλεία στο πεδίο της γενετικής τροποποίησης. Η δράση τους ομοιάζει λειτουργικά σε μεγάλο βαθμό με τη δράση των ευκαρυωτικών siRNAs τα οποία κατευθύνουν τη στοχευμένη αποικοδόμηση μορίων RNAs μέσω στρατολόγησης του συμπλόκου RISC.

1.1.3 Μονοπάτια αποικοδόμησης ευκαρυωτικών RNAs

Κατηγορίες αντιδράσεων διάσπασης RNA

Η διάσπαση μορίων RNA πραγματοποιείται στα πλαίσια ενός μεγάλου αριθμού κυτταρικών λειτουργιών. Ωστόσο, όλες οι αντιδράσεις διάσπασης μορίων RNA υπάγονται σε μία από τις επόμενες γενικότερες κατηγορίες:

- **Τροποποίηση RNA (Processing):** Ουσιαστικά όλα τα μόρια RNA συντίθενται ως μεγαλύτερα πρόδρομα μόρια και πρέπει να υποστούν κατεργασία στο 3' και σε αρκετές περιπτώσεις και στο 5' άκρο τους υπό τη δράση νουκλεασών. Επιπλέον, οι αλληλουχίες που απομακρύνονται πρέπει να αποικοδομηθούν, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στα εσώνια των πρόδρομων μορίων mRNA. Τα μονοπάτια ωρίμανσης

αφορούν όλες τις ομάδες ευκαρυωτικών RNAs και η διάσπαση των προϊόντων που απομακρύνονται αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό των αντιδράσεων αποικοδόμησης που πραγματοποιούνται κάθε στιγμή.

- **Διάσπαση mRNAs και μικρών ρυθμιστικών (non coding) RNAs:** Η ρύθμιση της αποικοδόμησης των μορίων mRNAs αποτελεί έναν από τους κυριότερους μηχανισμούς ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης. Ομοίως, τα περισσότερα χαρακτηρισμένα μικρά ρυθμιστικά RNAs υφίστανται συνεχή αποικοδόμηση προκειμένου να επιτυγχάνεται η αυστηρή ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης των mRNA-στόχων.
- **Αντιδράσεις ποιοτικού ελέγχου:** Τα μονοπάτια επιτήρησης μορίων RNA φαίνεται να αναγνωρίζουν και να διασπούν όλες τις ομάδες ευκαρυωτικών RNAs και συμπλόκων RNA-πρωτεϊνών απομακρύνοντας τα ελαττωματικά προϊόντα. Η μελέτη των αντίστοιχων μηχανισμών είναι σημαντικά δυσκολότερη επειδή σπάνια υφίσταται *in vivo* συσσώρευση ελαττωματικών προϊόντων.

Τα ευκαρυωτικά RNA συντίθενται από τρεις διαφορετικές RNA πολυμεράσες. Τα προϊόντα που προκύπτουν από τη δράση τους διαφέρουν σημαντικά ωστόσο οι μηχανισμοί αποικοδόμησης που μπορούν να τα διασπάσουν είναι σε αρκετές περιπτώσεις κοινοί. Όντως, ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των μονοπατιών διάσπασης RNA είναι η καθολικότητα τους. Για παράδειγμα, μετάγραφα που προκύπτουν από τις RNA πολυμεράσες I, II και III μπορούν όλα να αποτελέσουν στόχους 3' εξωνουκλεολυτικής αποικοδόμησης από το εξώσωμα και το σύμπλεγμα TRAMP ή από την 5' εξωνουκλεάση Xrn2 στον άνθρωπο. Ο κύριος λόγος για τον οποίο πολλά από τα μονοπάτια αποικοδόμησης εμφανίζουν σημαντικές ομοιότητες για τους διάφορους τύπους RNA παρά τις δομικές τους διαφορές είναι ότι στο σύνολό τους αποτελούν στόχους του συμπλέγματος TRAMP/εξωσώματος ή της Xrn2 [9].

Ακολουθεί συνοπτική περιγραφή των ριβονουκλεολυτικών μονοπατιών ωρίμανσης και αποικοδόμησης των ευκαρυωτικών RNA βάσει του τρόπου βιογένεσής τους.

A. Ωρίμανση και διάσπαση RNA μορίων που συντίθενται από την RNA πολυμεράση I

Η RNA πολυμεράση I καταλύει τη σύνθεση ενός μοναδικού μεταγράφου, ενός πολυιστρονικού RNA υπεύθυνου για την παραγωγή τριών από τα τέσσερα ευκαρυωτικά ριβοσωμικά RNAs (rRNA). Τα ώριμα μόρια rRNAs προκύπτουν έπειτα από την

ενδοριβονουκλεολυτική και εξωριβονουκλεολυτική επεξεργασία του πρόδρομου μορίου όπου οι εσωτερικές και οι εξωτερικές περιοχές που μεταγράφονται αλλά απομακρύνονται (ETS και ITS) αποικοδομούνται ταχέως. Εξαιτίας του υψηλού ρυθμού βιοσύνθεσης ριβοσωμάτων (περίπου 2000 ανά λεπτό στις ζύμες), η αποικοδόμηση των pre-rRNAs πιθανότατα καταλαμβάνει ένα σημαντικό ποσοστό της ολικής RNA αποικοδόμησης.

Η επιτήρηση των ριβοσωμάτων κατά τη βιογένεσή τους είναι συνεχής στους ζυμομύκητες και τα ελαττωματικά προ-ριβοσώματα αποικοδομούνται άμεσα από το σύμπλεγμα TRAMP-εξωσώματος.

Κατά τη βιογένεση των ριβοσωμάτων εμπλέκεται ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων οι οποίοι πρέπει να απομακρυνθούν από το τελικό προϊόν που είναι το ώριμο ριβόσωμα. Σε αρκετές περιπτώσεις κάτι τέτοιο επιτυγχάνεται μέσω ειδικών ενζύμων όπως RNA ελικάσες, GTPάσες και AAA ATPάσες (ATPases Associated with diverse cellular activities) [23]. Ωστόσο, φαίνεται ότι σε άλλες περιπτώσεις η απομάκρυνση των ριβονουκλεοπρωτεϊνών επιτυγχάνεται μέσω αποικοδόμησης των ίδιων των RNA συστατικών. Για παράδειγμα, διάφοροι παράγοντες που εμπλέκονται στη σύνθεση του ριβοσώματος φαίνεται να αλληλεπιδρούν και ως εκ τούτου να απελευθερώνονται κατά την αποικοδόμηση της 5' ETS αλληλουχίας του pre-rRNA από το σύμπλεγμα TRAMP/εξωσώματος το οποίο επιτελεί ταυτόχρονα και ενδονουκλεολυτική διάσπαση. Τελικά, η ταχεία αποικοδόμηση που επιτελείται φαίνεται να ευνοεί σημαντικά την ανακύκλωση των αντίστοιχων συστατικών [24].

Οι ώριμες ριβοσωμικές υπομονάδες εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, είναι αρκετά σταθερές και ο ρυθμός αποικοδόμησής τους είναι σχεδόν μηδενικός. Ωστόσο, υπάρχουν δεδομένα για μηχανισμούς επιτήρησης και εκλεκτικής αποικοδόμησης ριβοσωμικών υπομονάδων που δεν συμμετέχουν στη συγκρότηση πολυσωμάτων μέσω διάσπασης rRNA τουλάχιστο στους ζυμομύκητες. Ο αντίστοιχος μηχανισμός δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί ωστόσο πιθανότητα ομοιάζει στο μονοπάτι “no-go decay” που ευθύνεται για τη διάσπαση mRNAs με ισχυρές άκαμπτες δομές που εμποδίζουν τη μετάφρασή τους από ριβοσώματα [25]. Επιπλέον, πρόσφατα δεδομένα προτείνουν ότι υπό συνθήκες αστίας τα ώριμα ριβοσώματα εγκολπώνονται σε κυστίδια και αποικοδομούνται μέσω «ριβοφαγίας» (ribophagy), μιας διαδικασίας που ομοιάζει σημαντικά με την αυτοφαγία άλλων κυτταροπλασματικών συστατικών. Επιπλέον, η επαγωγή συνθηκών stress μπορεί επίσης να προκαλέσει την αποικοδόμηση rRNA στους ζυμομύκητες, γεγονός που προκαλεί και μείωση στο ρυθμό μετάφρασης [25,26].

B. Ωρίμανση και διάσπαση RNA μορίων που συντίθενται από την RNA πολυμεράση II

Τα προϊόντα μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II περιλαμβάνουν πολλούς τύπους RNA μεταξύ των οποίων τα πρόδρομα mRNA (pre-mRNA) και τα πρόδρομα πολλών μικρών σταθερών RNAs μεταξύ των οποίων τα μικρά πυρηνικά RNAs (snRNAs) που συμμετέχουν στην ωρίμανση του πρόδρομου mRNA, μικρά πυρηνισκικά RNAs (snoRNAs) που συμμετέχουν στη σύνθεση των ριβοσωμάτων, τα miRNAs που ρυθμίζουν τη μετάφραση και τη σταθερότητα των mRNAs καθώς και άλλα μικρά ncRNA (non coding) μετάγραφα. Η μεταγραφή από την RNA πολυμεράση II συνοδεύεται από τη συμμεταγραφική προσθήκη ενός 5'-μεθυλογουανοσινικού παραγώγου (κάλυμμα) το οποίο προστατεύει το μετάγραφο από 5' εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση.

Κατά τις αντιδράσεις ωρίμανσης των ριβοσωμάτων και των mRNAs μπορούμε να διακρίνουμε σημαντικές ομοιότητες. Και στις δύο περιπτώσεις λαμβάνουν χώρα πολλαπλά γεγονότα επεξεργασίας που συνδέονται με τη δράση πολλών ATP εξαρτώμενων ελικάσων [27]. Η απομάκρυνση εσωνίων και η αποικοδόμησή τους συμβάλει σημαντικά στην ανανέωση της κυτταρικής δεξαμενής ριβονουκλεοτιδίων, ειδικά στα Μετάζωα όπου τα εσώνια συχνά υπερβαίνουν σε μήκος τις 100 κιλοβάσεις. Η αποικοδόμηση των εσωνίων απαιτεί μια εξειδικευμένη ενεργότητα διάσπασης 2'-5' φωσφοδιεστερικών δεσμών καθώς το προϊόν που προκύπτει από την ωρίμανση είναι κυκλικό, συνεπώς ανθεκτικό ως προς την εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση. Η γενική απουσία ενδοριβονουκλεολυτικής ενεργότητας από τον πυρήνα αποδεικνύεται από την αδυναμία διάσπασης των εσωνίων σε μεταλλαγμένα στελέχη ζυμομυκήτων που αδυνατούν να αποικοδομήσουν 2'-5' φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Συνεπώς, τα εσώνια που απομακρύνονται κατόπιν αποικοδομούνται μέσω εξωριβονουκλεολυτικών ενεργοτήτων.

Δεδομένου ότι τόσο η έναρξη όσο και ο ρυθμός της μεταγραφής ελέγχονται από περίπλοκους μηχανισμούς, είναι αντιληπτό ότι η ύπαρξη ακριβούς ρύθμισης των mRNA πληθυσμών ανά πάσα στιγμή είναι εξίσου σημαντική για τον αυστηρό έλεγχο του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης ανάλογα με τις κυτταρικές ανάγκες. Τα pre-mRNAs, σε αντίθεση με τα περισσότερα από τα υπόλοιπα προϊόντα μεταγραφής της RNA πολυμεράσης II υφίστανται διάσπαση σε συγκεκριμένη θέση στο 3' άκρο που συνοδεύεται από την προσθήκη μιας μεγάλης poly(A) ουράς από την poly(A) πολυμεράση PAP/Pap1. Σε αντίθεση με τις poly(A) ουρές που προστίθενται από το σύμπλεγμα TRAMP, στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν επάγεται η αποικοδόμηση, πιθανότατα επειδή συνοδεύεται από τη δέσμευση poly(A)

συνδεόμενων πρωτεϊνών (poly(A) binding proteins) PABP/Pab1. Ως αποτέλεσμα, το τελικό προϊόν mRNA φέρει στους ζυμομύκητες μία ουρά μήκους 70-90 καταλοίπων αδενίνης και περίπου 250 καταλοίπων στον άνθρωπο που καλύπτεται από PABP. Κατόπιν, το mRNA πακετάρεται για να μεταφερθεί στον πυρήνα σε μια διαδικασία που είναι στενά συνδεδεμένη με τη μεταγραφή. Ελαττωματική συγκρότηση mRNPs οδηγεί σε αποικοδόμηση του mRNA μέσω εξωσώματος [28].

Σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς, κοντά στα σημεία επιτυχούς συρραφής mRNA συγκροτείται ένα σύμπλοκο ωρίμανσης (Exon Junction Complex - EJC) η θέση του οποίου αξιολογείται από μονοπάτια επιτήρησης των mRNA μορίων στο κυτταρόπλασμα. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την ταχεία αποικοδόμηση μέσω ενός εξειδικευμένου μηχανισμού (Nonsense mediated decay - NMD) των mRNAs που δεν έχουν ωριμάσει σωστά και θα οδηγούσαν στη σύνθεση ελαττωματικών πρωτεϊνών.

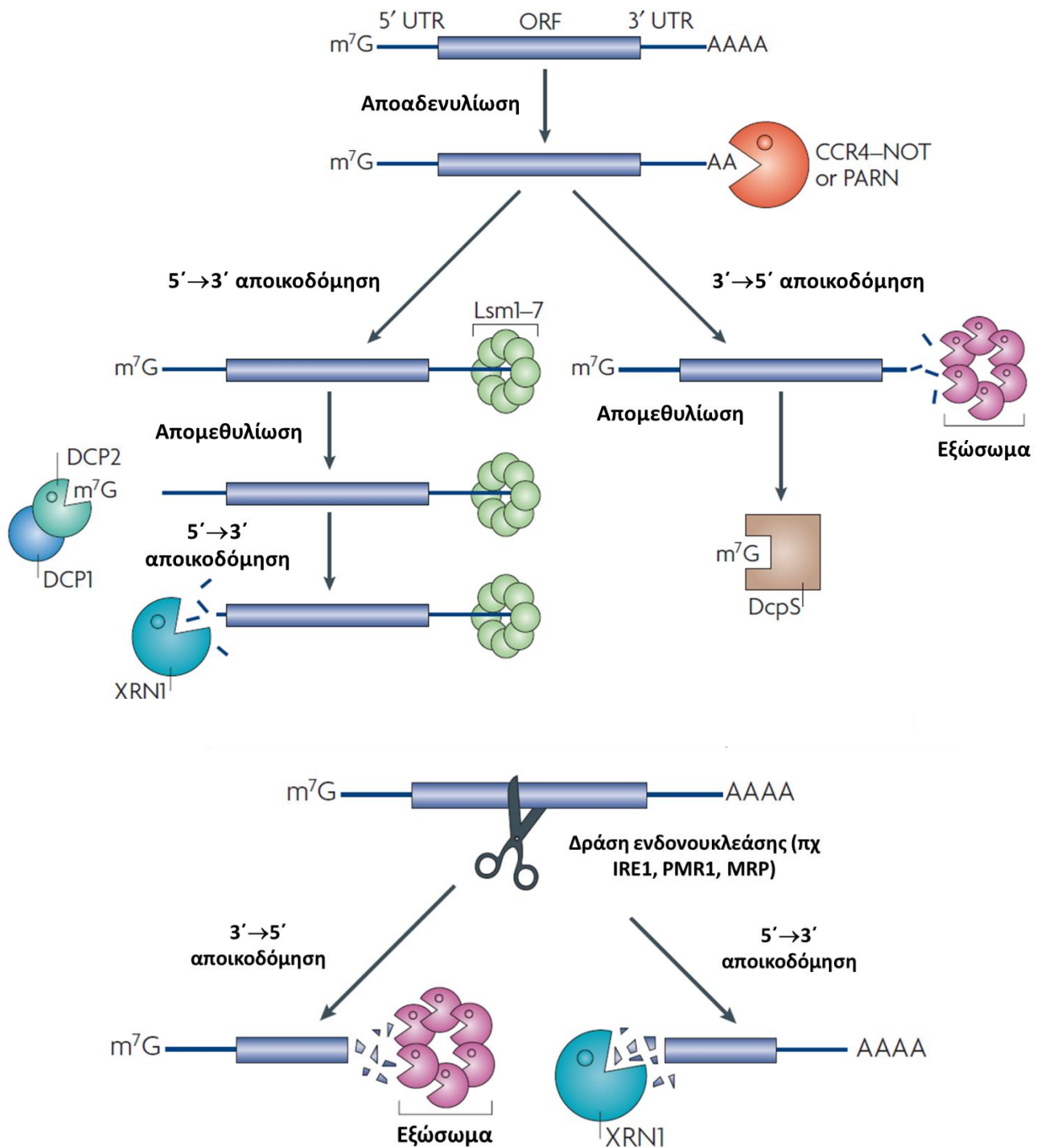
Όταν τα mRNAs μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα υφίστανται σταδιακή αποαδενυλίωση που ο ρυθμός της εξαρτάται από κάθε mRNA. Συνεπώς, ο χρόνος ημιζωής κάθε mRNA είναι συγκεκριμένος και καθορίζεται από την ίδια την αλληλουχία του mRNA μέσω αλληλουχιών σταθερότητας και αστάθειας. Τα καλύτερα χαρακτηρισμένα στοιχεία σταθερότητας / αστάθειας είναι τα AREs (AU-rich elements – αλληλουχίες πλούσιες σε AU). Σε αυτές τις αλληλουχίες συνδέονται πρωτεΐνες που είτε σταθεροποιούν είτε αποσταθεροποιούν τα αντίστοιχα mRNA συνήθως σε απόκριση εξωκυττάρων ερεθισμάτων [13].

Τα μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA στο κυτταρόπλασμα εξυπηρετούν είτε τη ρύθμιση της σταθερότητας (συνεπώς του χρόνου ημιζωής) συγκεκριμένων mRNAs στα πλαίσια της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης είτε στη διάσπαση και απομάκρυνση ελαττωματικών mRNAs η μετάφραση των οποίων θα οδηγούσε στη συσσώρευση πιθανά τοξικών πρωτεϊνικών προϊόντων. Τα κυτταροπλασματικά μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA περιλαμβάνουν πέντε τύπους ριβονουκλεολυτικών ενεργοτήτων η συνδυασμένη και αυστηρά ρυθμιζόμενη δράση των οποίων ποικίλλει ανάλογα με το mRNA υπόστρωμα και τις κυτταρικές συνθήκες. Οι ενεργότητες αυτές περιλαμβάνουν την απομεθυλίωση (decapping), την 5'→3' εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, την αποαδενυλίωση, την 3'→5' εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση και την ενδονουκλεολυτική διάσπαση. Η πρόσβαση των παραπάνω ενεργοτήτων επιτρέπεται στα mRNA στόχους μέσω ρυθμιστικών πρωτεϊνών καθώς και μέσω μικρών RNA μορίων που δεσμεύονται στα μόρια αυτά. Οι συγκεκριμένοι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν το ρυθμό της αποικοδόμησης επιτρέποντας ή

αποκλείοντας τη δέσμευση των ριβονουκλεασών στα mRNAs επηρεάζοντας την κυτταρική τοπολογία και τη μετάφραση των αντίστοιχων μορίων. Τα ίδια τα συστατικά των mRNPs μπορούν να καθορίσουν ποικιλοτρόπως την τύχη των mRNAs καθώς η σύνδεση ή η απομάκρυνση πρωτεϊνικών παραγόντων από αυτά σε απόκριση ερεθισμάτων, όπως το στάδιο του κυτταρικού κύκλου και η επαγωγή αλλαγών από εξωτερικούς παράγοντες, μπορούν να ρυθμίσουν την αφθονία, την κυτταρική τοπολογία και τη δραστηριότητα των συστατικών των mRNPs [29,30].

Μονοπάτια γενικής ρύθμισης των επιπέδων mRNA

Στα πλαίσια της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στο επίπεδο μετά τη μεταγραφή, τα περισσότερα ευκαρυωτικά mRNAs αποικοδομούνται από εξωνουκλεάσες που δρουν στα δύο άκρα του μορίου. Η αποικοδόμηση πραγματοποιείται με διάσπαση της poly(A) ουράς από το σύμπλεγμα PAN2 – PAN3 (PAB ριβονουκλεάσες), από ένα πολυενζυμικό σύμπλεγμα αποαδενυλίωσης που περιέχει ορισμένες υπομονάδες του συμπλόκου CCR4-NOT ή από την poly(A) αποαδενυλάση PARN. Η πρωτεϊνική σύσταση του mRNP καθορίζει ποια αποαδενυλάση θα στρατολογηθεί. Κατόπιν, πραγματοποιείται υδρόλυση του 5' καλύμματος από πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν επικράτειες Nudix και συγκεκριμένα την DCP2 (Decapping enzyme 2) ή NUDT16 (γνωστή και ως σύνδεσμος). Το υπόλοιπο σώμα του mRNA αποικοδομείται εξωνουκλεολυτικά υπό τη δράση της XRN1 (5'→3') ή από τη δράση των πρωτεϊνών RRP44 ή του συστατικού 10 (EXOSC10 ή PM/Scl-100) που αποτελούν συστατικά του εξωσώματος (3'→5'). Η εξωριβονουκλεολυτική αποικοδόμηση είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί και χωρίς απομεθυλίωση [31]. Οι παραπάνω μηχανισμοί συνοψίζονται στην εικόνα 1.3.



Εικόνα 1.3: Γενικοί μηχανισμοί αποικοδόμησης ευκαρυωτικών μορίων mRNA. Τα περισσότερα mRNAs υφίστανται αποικοδόμηση μέσω **αποαδενυλίωσης**. Η poly(A) ουρά απομακρύνεται υπό τη δράση αποαδενυλασών (CCR4-NOT ή PARN). Κατόπιν, δύο μηχανισμοί μπορούν να ενεργοποιηθούν: είτε απομεθυλίωση και επακόλουθη 5'→3' διάσπαση, είτε 3'→5' αποικοδόμηση. Κατά την απομεθυλίωση, το σύμπλοκο Lsm1-7 αλληλεπιδρά με το 3' άκρο του mRNA και επάγει την απομεθυλίωση από το σύμπλοκο DCP1-DCP2. Κατόπιν, το mRNA καθίσταται ευάλωτο στην 5'→3' αποικοδόμηση από την εξωριβονουκλεάση XRN1. Εναλλακτικά, το αποαδενυλιωμένο mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί στην κατεύθυνση 3'→5' από το εξώσωμα και το εναπομείναν κάλυμμα να διασπαστεί από το ένζυμο DcpS. Στην περίπτωση **ενδονουκλεολυτικής** αποικοδόμησης, το mRNA διασπάται σε εσωτερική θέση από τη δράση μιας ενδονουκλεάσης και προκύπτουν δύο θραύσματα με άκρα ευάλωτα στην αποικοδόμηση τα οποία διασπώνται κατόπιν εξωνουκλεολυτικά [32].

Για ορισμένα mRNAs η αποικοδόμηση ξεκινάει από τη δράση ενδονουκλεάσης και ακολουθεί εξωνουκλεολυτική διάσπαση. Η σταθερότητα κάθε μορίου mRNA, συνεπώς και ο χρόνος ημιζωής του στο κυτταρόπλασμα καθορίζεται από την νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Συγκεκριμένα, *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία έχουν την ικανότητα να σταθεροποιούν ή να αποσταθεροποιούν το μήνυμα επιστρατεύοντας την πρόσδεση συγκεκριμένων πρωτεϊνών που με τη σειρά τους επάγουν ή αναστέλλουν την αποικοδόμηση των mRNAs [13].

Οι αλληλουχίες πλούσιες σε AU (ARE – AU Rich Elements) αποτελούν τη μεγαλύτερη και περισσότερο μελετημένη ομάδα *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων. Οι κανονικές AREs γενικά περιλαμβάνουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα του πενταμερούς AUUUA που διακόπτονται από αλληλουχίες πλούσιες σε U. Τα κανονικά AREs εντοπίζονται στο 9% των mRNAs των θηλαστικών που κωδικοποιούν συνήθως τη σύνθεση ογκοπρωτεϊνών (πχ. c-FOS), αναπτυξιακών παραγόντων, κυτταροκινών (πχ. ιντερλευκίνες IL-1, IL-2, IL-3) μεταγραφικών παραγόντων και πρωτεϊνών μεταβολισμού του RNA [33]. Η αποικοδόμηση των mRNA-στόχων ξεκινάει με αποδενυλίωση της poly(A) ουράς και ακολουθεί εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση. Πρέπει να σημειωθεί ότι κάποια mRNAs με ένα ή περισσότερα AREs υφίστανται αποικοδόμηση ενώ άλλα παραμένουν σταθερά. Αυτό μπορεί να προκύπτει από τη δευτεροταγή δομή ή από το σύνολο των πρωτεϊνών που δεσμεύονται στο εκάστοτε mRNA καθώς και την πιθανή αλληλεπίδραση με ncRNAs. Επιπλέον, ορισμένες από τις πρωτεΐνες που προσδέονται σε AREs (ARE-BPs – ARE binding proteins) διαδραματίζουν και σταθεροποιητικό ρόλο.

Οι ARE-BPs μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως προς τη σταθεροποίηση ή την αποσταθεροποίηση του mRNA στόχου και ως προς τις πρωτεΐνες που στρατολογούν. Η δράση τους ρυθμίζεται από κινάσες, φωσφατάσες και σε μία τουλάχιστον περίπτωση από μια μεθυλοτρανσφεράση αργινίνης. Γενικά δρουν ως πολυμερή και μπορούν να φωσφορυλιωθούν σε συγκεκριμένες θέσεις από πολλές κινάσες ή σε πολλές διαφορετικές θέσεις από διαφορετικές κινάσες. ARE-συνδεδεμένες πρωτεΐνες που επάγουν αποσταθεροποίηση του mRNA στόχου είναι η TTP, οικογένεια πρωτεϊνών με δάκτυλους ψευδαργύρου, η KSRP (KH –type splicing regulatory protein) και η AUF1 (AU-rich-binding factor 1). Πρωτεΐνες με σταθεροποιητική δράση είναι η οικογένεια Hu (HuR, HuB, HuC και HuD) καθώς και η AUF1 υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Οι ARE-BPs μπορεί να έχουν ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης ή να εμφανίζουν ευρεία έκφραση όπως η HuR. Συχνά τροποποιούνται ως απόκριση σε εξωκυττάρια ερεθίσματα με σκοπό τη ρύθμιση των

επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων mRNAs. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι οι ίδιες οι ARE-BPs δεν έχουν ριβονουκλεολυτική ενεργότητα. Ενεργοποιούν την αποικοδόμηση mRNA επιστρατεύοντας τη δράση αποαδενυλασών, ενζύμων 5' απομεθυλίωσης και εξωνουκλεασών.

Υπάρχουν και άλλες cis-αλληλουχίες που συμβάλλουν στη σταθερότητα των mRNAs. Οι αλληλουχίες πλούσιες σε GU (GU Rich Elements – GREs) είτε επηρεάζουν την ωρίμανση των pre-mRNAs είτε επάγουν την αποικοδόμησή τους μέσω δέσμευσης των CELF πρωτεϊνών. Ένα γνωστό GU στοιχείο φέρει την αλληλουχία UGUUUUGUUUGU που αποτελεί θέση δέσμευσης της πρωτεΐνης GUGBP-1 (GUG-binding protein 1) η οποία είτε επάγει την αποαδενυλίωση του mRNA είτε καθοδηγεί το πρόδρομο mRNA σε μία οδό εναλλακτικής συρραφής. Τα GREs φαίνεται να αφθονούν σε mRNAs που κωδικοποιούν τη σύνθεση πρωτεϊνών σημαντικών για τη μεταγραφή, την απόπτωση, την ωρίμανση RNA, την κυτταρική διαίρεση και τη μεταγωγή σήματος [13,31-33].

Τα mRNAs που κωδικοποιούν τη σύνθεση ιστονών στα Μετάζωα αποτελούν ένα ιδιαίτερο παράδειγμα ρύθμισης των επιπέδων έκφρασης σε σχέση με τη φάση του κυτταρικού κύκλου. Η ημιζωή των mRNAs των ιστονών μειώνεται από 45-60 λεπτά κατά τη φάση S στα 10 λεπτά στο τέλος της φάσης S. Η μείωση αυτή έχει πολύ σημαντικό ρόλο στο συντονισμό των επιπέδων έκφρασής τους σε σχέση με τη διαίρεση του DNA. Τα μόρια αυτά αντί για poly(A) ουρά φέρουν στο 3' άκρο μια συντηρημένη περίπλοκη δευτεροταγή δομή (μίσχος – θηλιά) στην οποία προσδένεται η SLBP (Stem Loop Binding Protein) που εκφράζεται μόνο κατά την S φάση και είναι πολύ σημαντική για τη διαμόρφωση του 3' άκρου στον πυρήνα και για την αποδοτική μετάφραση του mRNA στο κυτταρόπλασμα. Μετά το πέρας της S φάσης του κυτταρικού κύκλου, όταν ολοκληρωθεί η μετάφραση του mRNA, η SLBP που είναι προσδεσμένη αναγνωρίζεται από τον παράγοντα του μονοπατιού αποικοδόμησης NMD UPF1 γεγονός που οδηγεί στη διάσπαση του mRNA. Η αποικοδόμηση επάγεται επίσης εξωριβονουκλεολυτικά λόγω ολιγοουριδυνίωσης στο 3' άκρο. Το μονοπάτι αυτό ελέγχεται μέσω φωσφορυλίωσης ενώ η SLBP οδηγείται σε αποικοδόμηση μέσω πρωτεασώματος μετά το τέλος της S φάσης [33].

Μονοπάτια ποιοτικού ελέγχου και απομάκρυνσης ελαττωματικών mRNA μορίων

Τα mRNAs υφίστανται ποιοτικό έλεγχο σε όλα σχεδόν τα στάδια της βιογένεσής τους, κατά τη μεταγραφή, την ωρίμανση, τη μεταφορά και τη συγκρότηση mRNP

σωματιδίων. Η δραστηριότητα των μηχανισμών ποιοτικού ελέγχου των mRNAs στηρίζεται σε έναν συνεχή ανταγωνισμό μεταξύ των πρωτεϊνικών παραγόντων που συμμετέχουν στους μηχανισμούς ελέγχου και εκείνων που δεσμεύονται για να επιτελέσουν φυσιολογικές λειτουργικές αντιδράσεις του mRNA. Καθώς ένα μόριο RNA διέρχεται από τα διάφορα στάδια ωρίμανσης, τα ελαττωματικά mRNAs είναι πιθανότερο να αναγνωριστούν από μηχανισμούς επιτήρησης και να οδηγηθούν σε μονοπάτια αποικοδόμησης [29,33].

Ο ποιοτικός έλεγχος ξεκινάει στον πυρήνα, αμέσως μετά την έναρξη της μεταγραφής. Μέσω ειδικών μηχανισμών, η ακεραιότητα του μεταγραφόμενου mRNA κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής του ελέγχεται και αν η κινητική αλληλεπίδρασής του με διάφορους λειτουργικούς πρωτεϊνικούς παράγοντες δεν ευνοείται θερμοδυναμικά επιτελείται εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση που επάγεται από την προσθήκη oligo(A) ουράς από το TRAMP σύμπλοκο πολυαδενυλίωσης. Ωστόσο, ορισμένα ελαττωματικά μόρια διαφεύγουν από τον μηχανισμό πυρηνικής επιτήρησης και μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα όπου δρα ένα σύνολο εξειδικευμένων μηχανισμών [9].

NMD: Ο μηχανισμός αποικοδόμησης mRNA με πρόωρο κωδικόνιο έναρξης
(*Nonsense-mediated mRNA decay*)

Τα mRNA με ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις που περιέχουν πρόωρα κωδικόνια λήξης (PTC – Premature Termination Codon) μπορεί να προκαλέσουν παθολογικό φαινότυπο. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στη σύνθεση πρωτεϊνών με μικρότερο μήκος που εμφανίζουν μειωμένη ή μηδενική λειτουργικότητα. Τα φαινόμενα αυτά μπορεί να έχουν καταστροφικό αντίκτυπο στην κυτταρική ομοιόσταση. Το 3-10% των κυτταρικών mRNAs περιέχουν PTC και μπορεί να προκύψουν λόγω μεταλλάξεων στο γενωμικό DNA, λαθών σε φαινόμενα ανασυνδυασμού, ή λαθών κατά τη μεταγραφή ή την ωρίμανση. Ένα μεγάλο ποσοστό mRNAs με PTC θεωρείται ότι προκύπτουν από φαινόμενα εναλλακτικής συρραφής και αποτελούν ενδογενή μηχανισμό ρύθμισης των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Τα mRNAs με PTC αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται από έναν μηχανισμό ποιοτικού ελέγχου που σχετίζεται με τη μετάφραση και ονομάζεται NMD [34,35].

Ο μηχανισμός NMD σχετίζεται με την πρωτεϊνοσύνθεση και δεδομένα δείχνουν ότι ένα ειδικό σύμπλεγμα πρωτεϊνών προσδένεται στο mRNA-στόχο καταρροϊκά του κωδικονίου έναρξης. Ο μηχανισμός NMD μέχρι πρόσφατα φαινόταν να αποικοδομεί

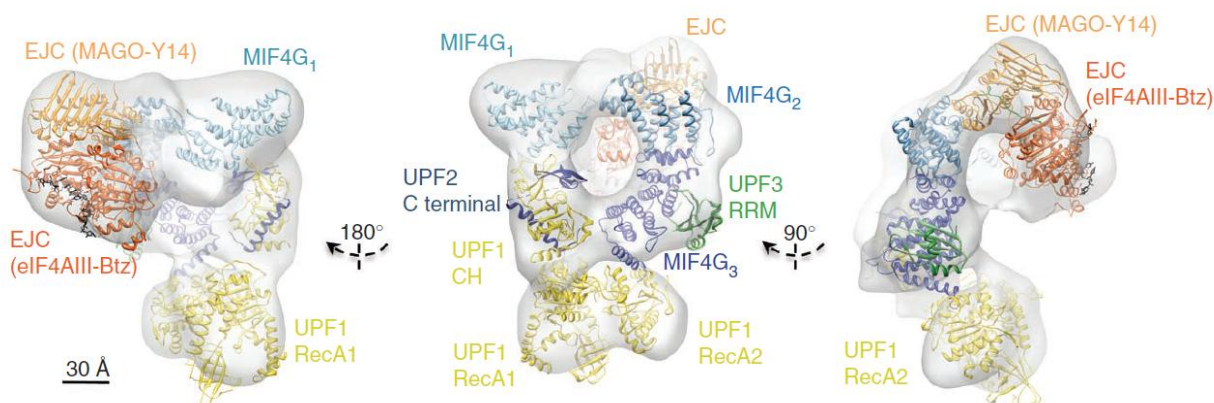
νεοσυντιθέμενα μόνο mRNAs κατά τη διάρκεια του «πρώτου κύκλου» μετάφρασης [36,37]. Σε αυτή την περίπτωση, στο 5' κάλυμμα βρίσκεται προσδεμένο το σύμπλοκο CBC (CBP80-CBP20) και στην poly(A) ουρά οι πρωτεΐνες PABPN1 και PABPC1 καθώς και το σύμπλοκο συρραφής (EJC) στα σημεία συρραφής των εξωνίων. Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι και τα ώριμα mRNAs που έχουν ολοκληρώσει έναν τουλάχιστον κύκλο μετάφρασης και φέρουν τις πρωτεΐνες eIF4E και PABPC1 αντίστοιχα ενώ απουσιάζουν τα σύμπλοκα EJC φαίνεται να αποικοδομούνται μέσω NMD και στα θηλαστικά [12].

Ένα ερώτημα που ανακύπτει είναι πώς ο μηχανισμός ξεχωρίζει τα πρόωρα κωδικόνια λήξης (PTC) από τα φυσιολογικά. Συνήθως, τα κωδικόνια λήξης εντοπίζονται φυσιολογικά στο τελευταίο εξώνιο, κοντά στην poly(A) ουρά όπου εντοπίζονται η PAPB (poly(A) binding protein) και άλλες πρωτεΐνες που προσδέονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR). Οι πρωτεΐνες αυτές φαίνεται να συμβάλλουν στην λήξη της μετάφρασης και να προστατεύουν το mRNA απ' την NMD αποικοδόμηση. Αντιθέτως, στα πρόωρα κωδικόνια λήξης το πρωτεϊνικό περιβάλλον διαφέρει δεδομένου ότι βρίσκονται σε μεγαλύτερη απόσταση από την αμετάφραστη περιοχή. Η διαφορά αυτή επιτρέπει σε πρωτεϊνικούς παράγοντες που σχετίζονται με το NMD να ενεργοποιηθούν και να επάγουν την αποικοδόμηση του μορίου. Το σύμπλοκο EJC (σύμπλοκο συρραφής Exon-Junction complex) το οποίο συγκροτείται στα σημεία συρραφής των εξωνίων μετά την ωρίμανση του mRNA και φυσιολογικά απομακρύνεται κατά τον πρώτο κύκλο μετάφρασης, επάγει σημαντικά το NMD στα κύτταρα θηλαστικών όταν βρίσκεται καταρροϊκά ενός πρόωρου κωδικονίου λήξης και λόγω πρόωρης ακινητοποίησης του ριβοσώματος αυτό το σύμπλοκο δεν απομακρύνεται [38].

Ένας από τους κύριους παράγοντες του NMD, ο UPF1, θεωρείται ότι είναι κρίσιμος για την επαγωγή της αποικοδόμησης. Ο UPF1 είναι μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη, απαραίτητη σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που φαίνεται να σχετίζεται, εκτός από την αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNA με ένα πλήθος άλλων λειτουργιών (διατήρηση των τελομερών, επιδιόρθωση DNA και άλλες). Πρόκειται για μία ελικάση που ανήκει στην υπερικογένεια SF1 και περιλαμβάνει δύο RecA επικράτειες και μία επικράτεια δέσμευσης ATP [39]. Είναι για μία πολύ συντηρημένη πρωτεΐνη σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και εκφράζεται σε αφθονία σε όλα τα κύτταρα.

Ο UPF1 βρίσκεται σε σύμπλοκο με την κινάση SMG1 η οποία καταστέλλεται από το ετεροδιμερές SMG8 και SMG9. Όταν ο UPF1 έρθει σε επαφή με τον παράγοντα UPF2, είτε

μέσω διάχυσης είτε έπειτα από γειτνίαση με ένα σύμπλοκο EJC, τότε η SMG1 κινάση φωσφορυλιώνει τον UPF1. Η στερεοδιαταξική αλλαγή του UPF1 επάγει τη δράση ελικάσης και ΑΤΡάσης ενώ στρατολογεί διάφορους παράγοντες που εμπλέκονται με την αποικοδόμηση του mRNA στόχου, μεταξύ των οποίων η ενδονουκλεάση SMG6 η δομή της οποίας περιγράφεται στην υποενότητα 1.1.5.Θ. Τα mRNA θραύσματα που προκύπτουν αποτελούν κατόπιν υπόστρωμα για τη δράση εξωνουκλεασών που ρυθμίζουν τα γενικά επίπεδα mRNA στο κύτταρο [40].



Εικόνα 1.4: Δομική απεικόνιση του συμπλέγματος UPF1-UPF2-UPF3-EJC. Απεικονίζονται οι τρεις όψεις του συμπλέγματος σε ατομική ανάλυση [41].

Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι ο UPF1, κατανέμεται σε όλο το μήκος των ώριμων μεταγράφων και απομακρύνεται κατά την επιμήκυνση της μετάφρασης από τα ριβοσώματα. Συνεπώς, στα μετάγραφα που έχουν υποστεί περισσότερους από έναν κύκλους μετάφρασης εντοπίζεται κυρίως στην 3' αμετάφραστη περιοχή όπου δεν έχει πρόσβαση το ριβόσωμα [39]. Με μία αφθονία 3×10^6 μορίων ανά κύτταρο και δεδομένου ότι κάθε κύτταρο έχει περίπου 3×10^5 μόρια mRNA, περίπου 10 μόρια UPF1 μπορούν να προσδένονται ανά μόριο mRNA, αριθμός συγκρίσιμος με τα 20 μόρια πρωτεΐνης που προσδένεται σε poly(A) (PABP) ανά mRNA [42]. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο UPF1 πιθανόν διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη συνολική ρύθμιση των χρόνων ημιζωής των μορίων mRNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα.

Όσο αφορά τον φυσιολογικό ρόλο του μονοπατιού NMD, έχει προταθεί η εμπλοκή του σε ένα σύνολο διαφορετικών μηχανισμών μεταξύ των οποίων η ρύθμιση της παραγωγής πρωτεϊνών που προσδένονται σε RNA, η ομοιόσταση θρεπτικών συστατικών καθώς και η προστασία από οξειδωτικό στρες. Ένας μεγάλος αριθμός φυσιολογικών κυτταρικών μεταγράφων αποτελούν στόχους NMD ή καταστέλλονται από κάποιο RNA που αποτελεί στόχο NMD καθιστώντας αρκετά πιθανή την εμπλοκή του NMD σε άλλες

κυτταρικές λειτουργίες εκτός από τον ποιοτικό έλεγχο των mRNAs. Το πρόσφατο εύρημα ότι οι NMD στόχοι αποτελούν την πρωτογενή πηγή αντιγονικών πεπτιδίων για το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας I (MHC I) που είναι υπεύθυνο για την αντιγονοπαρουσίαση ενδογενών πεπτιδίων σε T κύτταρα υπονοεί την πιθανή εμπλοκή του NMD στο μονοπάτι αυτό όχι μόνο στον άνθρωπο αλλά και στα υπόλοιπα Θηλαστικά [34].

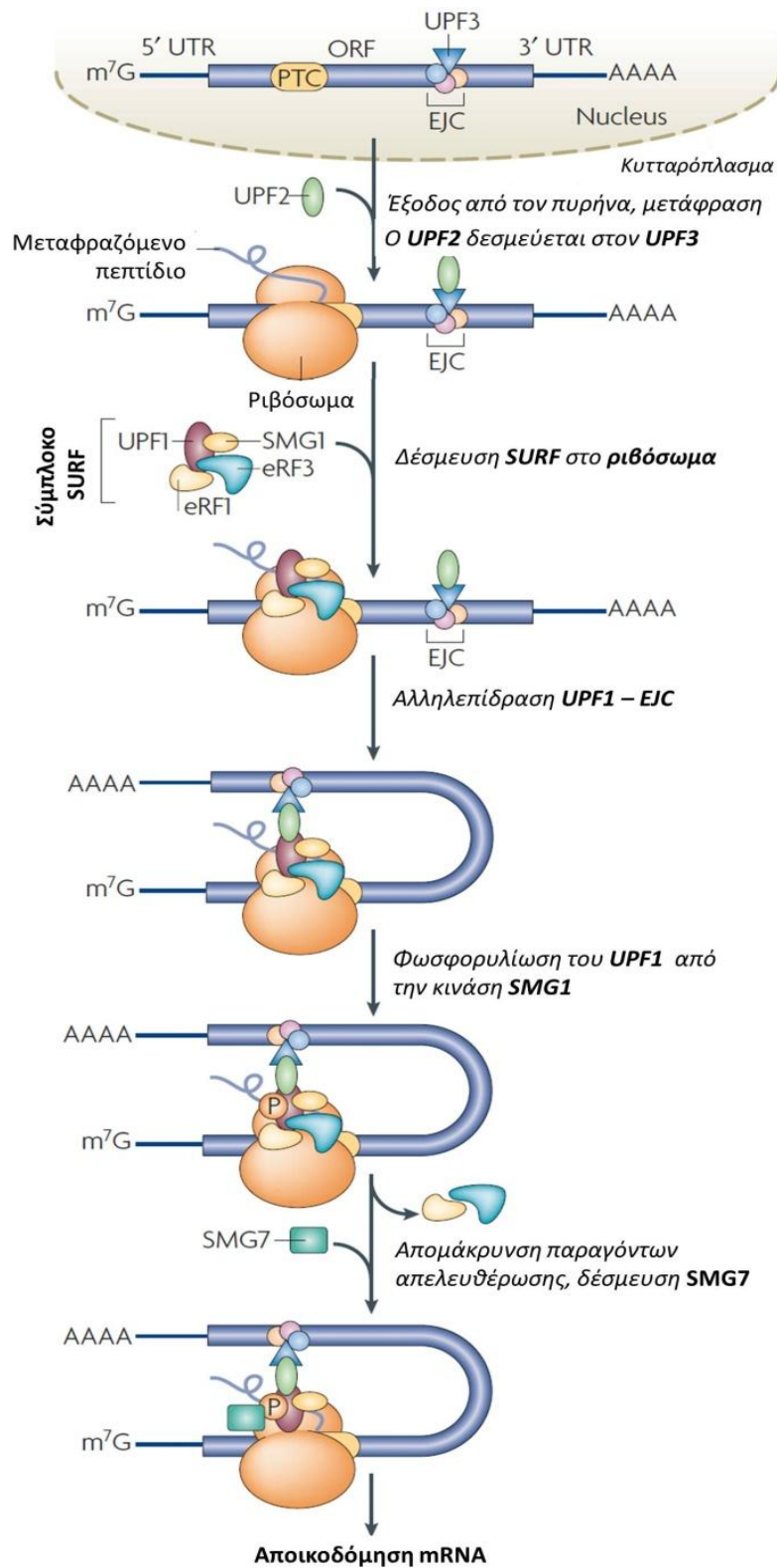
Σε μία πρόσφατη μελέτη αποκαλύφθηκε ο εξαιρετικά σημαντικός ρόλος του μονοπατιού, και ιδιαίτερα του παράγοντα UPF1 στον έλεγχο της κυτταρικής διαφοροποίησης των νευρικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι ο UPF1 καταστέλλει τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων σε νευρικά ενώ ταυτόχρονα ενεργοποιεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετάβαση από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου. Οι δράσεις αυτές εκδηλώνονται επάγοντας την εκλεκτική αποικοδόμηση mRNA μορίων που κωδικοποιούν αναστολείς της κυτταρικής διαίρεσης (p21, p27, p57, Erk3) και παράγοντες που επάγουν την νευρωνική διαφοροποίηση (Smad 7). Μάλιστα, μέσω της εκλεκτικής δράσης του UPF1 έναντι του SMAD7 αποκαλύφθηκε μια διασύνδεση του ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης με το μονοπάτι σηματοδότησης μέσω του TGF-β. Ο ίδιος ο UPF1 φαίνεται να ελέγχεται από το micro-RNA miR-128 το οποίο εκφράζεται σε αφθονία σε κύτταρα του νευρικού συστήματος, ένας ρυθμιστικός μηχανισμός που φαίνεται να είναι συντηρημένος στα Σπονδυλόζωα. Τα παραπάνω αποτελούν απόδειξη ότι το μονοπάτι NMD δεν αποτελεί πλέον μηχανισμό απομάκρυνσης μόνο ελαττωματικών μορίων αλλά έναν λεπτό μηχανισμό γονιδιακής ρύθμισης που έχει σημαντικές αναπτυξιακές συνέπειες [11].

Ο μηχανισμός NMD εμπλέκεται στη ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τη σύνθεση SR πρωτεϊνών (serine – arginine rich) καθώς και των hnRNPs πρωτεϊνών που αποτελούν τους κύριους παράγοντες ρύθμισης της ωρίμανσης. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και υπό τη δράση ειδικών παραγόντων ματίσματος ενσωματώνεται στο ώριμο μόριο RNA ένα επιπλέον εξώνιο το οποίο οδηγεί στην ενσωμάτωση ενός πρόωρου κωδικονίου έναρξης. Ως αποτέλεσμα, επάγεται ο μηχανισμός NMD έναντι των συγκεκριμένων μεταγράφων τα οποία αποικοδομούνται και ως εκ τούτου καταστέλλεται η έκφραση των αντίστοιχων SR και hnRNP πρωτεϊνών. Ο παραπάνω ομοιοστατικός μηχανισμός φαίνεται να είναι συντηρημένος αφού έχει εντοπιστεί σε απομακρυσμένους αντιπροσώπους όπως είναι ο *C. elegans* και η Δροσόφιλα [43].

Σε αρκετές περιπτώσεις έχει αναφερθεί η σύνθεση ρυθμιστικών μεταγράφων κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες από γενετικούς τόπους αναρροϊκά από γονίδια που σχετίζονται στον ενεργειακό μεταβολισμό και στην ομοιόσταση θρεπτικών συστατικών. Τα μετάγραφα αυτά αναστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση των γονιδίων καθώς κατά τη σύνθεσή τους απομακρύνουν μεταγραφικούς παράγοντες από τον υποκινητή του γονιδίου και δεν επιτρέπουν την επαναδέσμευσή τους. Τα συγκεκριμένα μετάγραφα αποικοδομούνται μέσω NMD συνεπώς τα επίπεδά τους ελέγχονται ώστε να αποφεύγεται η καταστολή των γονιδίων στόχων όταν αυτό δεν είναι απαραίτητο. Επιπλέον, η επαγωγή ασιτίας σε ευκαρυωτικά κύτταρα οδηγεί σε φωσφορυλίωση του eIF2A, γεγονός που πιθανώς καταστέλλει το μονοπάτι NMD [34].

Ο παράγοντας UPF1 επάγει τη σταθεροποίηση των mRNAs που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες και συμβάλλουν στην προστασία του κυττάρων από δραστικές ελεύθερες ρίζες και άλλες επιβλαβείς επιπτώσεις. Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι και σε συνθήκες υποξίας η φωσφορυλίωση του eIF2A επάγει την αναστολή του NMD. Δεδομένου ότι πολλά από τα μετάγραφα που οδηγούν στη σύνθεση πρωτεϊνών που επάγονται έπειτα από οξειδωτικό στρες οδηγούνται προς αποικοδόμηση από τον UPF1, καθίσταται πιθανό το σενάριο της επιλεκτικής σταθεροποίησης των NMD στόχων σε συνθήκες υποξίας με σκοπό τη γρήγορη επαναφορά του κυττάρου στις φυσιολογικές συνθήκες και τη διατήρηση της ομοιόστασής του [34].

Τέλος, η εξαιρετικά μεγάλη φυσιολογική σημασία του NMD διαφαίνεται στον καθοριστικό ρόλο του στην προστασία πολλών ετερόζυγων φορέων παθολογικών γονιδίων που κωδικοποιούν τη σύνθεση πρωτεϊνών με PTCs. Λόγω διάσπασης των ελαττωματικών mRNAs μέσω NMD αποφεύγεται η εκδήλωση συμπτωμάτων σε ετερόζυγους φορείς σε μια σειρά σοβαρών ασθενειών όπως είναι η β-θαλασσαιμία, η κυστική ίνωση, η μυϊκή δυστροφία Duchenne και άλλες [36].



Εικόνα 1.5: Γενικευμένος μηχανισμός ενεργοποίησης του ευκαρυωτικού μοριακού μονοπατιού NMD μέσω αλληλεπίδρασης του UPF1 με το σύμπλοκο συρραφής (EJC). **UTRs:** Αμετάφραστες περιοχές, **m⁷G:** κάλυμμα **ORF:** Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης **EJC:** σύμπλοκο συρραφής **PTC:** Πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού **AAAA:** poly(A) ουρά **P:** Φωσφορική ομάδα [32].

Μηχανισμοί αποικοδόμησης mRNA χωρίς κωδικόνια λήξης και με ισχυρές δίκλωνες δομές NSD (Non-stop decay) και NGD (No-Go decay)

Τα mRNAs που δεν φέρουν κωδικόνια λήξης αποτελούν επίσης στόχους αποικοδόμησης καθώς αυτά τα μόρια μπορεί να οδηγήσουν στη σύνθεση πρωτεϊνών με εκτεταμένο καρβοξυτελικό άκρο που μπορεί να έχουν καταστροφικές συνέπειες για το κύτταρο. Τα ριβοσώματα που μεταφράζουν την poly(A) ουρά κατόπιν ακινητοποιούνται στο 3' άκρο των mRNAs χωρίς κωδικόνιο λήξης. Τότε ο παράγοντας Ski7, ένα συστατικό του κυτταροπλασματικού εξωσώματος ομόλογου του eRF3 (ευκαρυωτικός παράγοντας απελευθέρωσης 3) αλληλεπιδρά με το ακινητοποιημένο ριβόσωμα και πυροδοτεί την άμεση αποικοδόμηση του μεταγράφου.

Ορισμένα ελαττωματικά mRNAs μπορεί να περιέχουν ισχυρές δίκλωνες δομές που εμποδίζουν τη μετάφραση και το σύμπλεγμα του ακινητοποιημένου ριβοσώματος στο mRNA αναγνωρίζεται από τον μηχανισμό NGD που απομακρύνει το ριβόσωμα και αποικοδομεί το μετάγραφο. Στις ζύμες, οι παράγοντες Dom34 και ο Hbs1 που ομοιάζουν με τους eRF1 και eRF3 αντίστοιχα επιτελούν τον μηχανισμό NGD επάγοντας αρχικά την ενδοριβονουκλεολυτική και κατόπιν την εξωριβονουκλεολυτική αποικοδόμηση του μεταγράφου [33].

Ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης miRNAs

Η RNA πολυμεράση II είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση αρκετών μικρών ρυθμιστικών μορίων RNA, μεταξύ των οποίων και τα miRNAs. Τα miRNAs αποτελούν τα προϊόντα ωρίμανσης πρόδρομων μορίων, των pri-miRNAs που μεταγράφονται είτε ως ανεξάρτητες μεταγραφικές μονάδες είτε αποτελούν εσώνια γονιδίων που κωδικοποιούν τη σύνθεση πρωτεϊνών. Τα miRNAs αλληλεπιδρούν με εξειδικευμένες πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των Αργοναυτών (Ago proteins) και συγκροτούν το σύμπλοκο RISC που κατευθύνεται βάσει συμπληρωματικότητας σε συγκεκριμένα mRNA στόχους τα οποία συνήθως αποικοδομούνται.

Τα miRNAs επιτελούν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο επίπεδο μετά τη μεταγραφή, συνεπώς η έκφρασή τους και τα επίπεδά τους ανά πάσα στιγμή είναι αυστηρά ελεγχόμενα. Έτσι, έχει βρεθεί ότι τα miRNAs αλλά και τα siRNAs αποικοδομούνται από την 3' εξωριβονουκλεάση Eri1 ενώ τροποποιήσεις στο 3'

άκρο όπως μεθυλίωση ή προσθήκη ριοβονουκλεοτιδίων (U ή A) επηρεάζουν τη σταθερότητα του μορίου – στόχου, σταθεροποιώντας ή αποσταθεροποιώντας το [9].

Γ. Ωρίμανση και διάσπαση RNA μορίων που συντίθενται από την RNA πολυμεράση III

Η RNA πολυμεράση III είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση αρκετών μικρών σταθερών RNAs, μεταξύ των οποίων τα tRNAs, το 5S rRNA, το U6 snRNA και το RNA συστατικό του SRP (Signal Recognition Particle – Σωματίδιο αναγνώρισης σινιάλου). Τα περισσότερα από αυτά τα μόρια υφίστανται απλούστερες διαδικασίες ωρίμανσης καθώς στο ώριμο μόριο το 5' άκρο προκύπτει από το σημείο έναρξης της μεταγραφής και το 3' άκρο προκύπτει από απλές αντιδράσεις διάσπασης. Εξαιρέση αποτελεί η ωρίμανση των tRNA μορίων τα οποία υφίστανται 5' διάσπαση από την RNase P και το 3'-CCA άκρο προστίθεται υπό τη δράση μιας ειδικής πολυμεράσης. Ελάχιστα δεδομένα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς επιτήρησης των μεταγράφων που προκύπτουν από τη δράση της RNA πολυμεράσης III σε σχέση με τα προϊόντα των υπολοίπων πολυμερασών. Ωστόσο, και αυτά τα μετάγραφα υφίστανται τους μηχανισμούς επιτήρησης των πυρηνικών μεταγράφων. Έπειτα από την προσθήκη poly(A) υπό τη δράση του TRAMP ακολουθεί αποικοδόμηση μέσω εξωσώματος, μια διαδικασία που φαίνεται να εφαρμόζεται τουλάχιστο στην περίπτωση των tRNAs, του 5S rRNA, του U6 snRNA και του RNA συστατικού του SRP.

Το καλύτερα μελετημένο υπόστρωμα του παραπάνω μηχανισμού αποτελεί το εναρκτήριο tRNA^{imet}, όμως το κυριότερο μονοπάτι επιτήρησης για τα περισσότερα από τα υπόλοιπα μη τροποποιημένα tRNAs φαίνεται να περιλαμβάνει τη δράση των 5' εξωνουκλεασών Rat1 και Xrn1. Η εμπλοκή των πυρηνικών ριβονουκλεασών στην αποικοδόμηση πρόδρομων tRNAs υπονοεί την πιθανή μεταφορά ελαττωματικών tRNAs στον πυρήνα και την επακόλουθη αποικοδόμησή τους. Πράγματι, τα μη φορτισμένα tRNAs στον ζυμομύκητα εισάγονται μέσω του μεταφορέα Mtr10/Kap111 σε ένα μοριακό μονοπάτι που πιθανότατα επιτρέπει και σε άλλα, ελαττωματικά μόρια tRNA να υποστούν ποιοτικό έλεγχο από μηχανισμούς που εντοπίζονται στον πυρήνα.

Έκπληξη προκαλεί το γεγονός ότι στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα τα tRNAs μπορούν να υποστούν διάσπαση στην θηλιά του αντικωδικονίου, ένα φαινόμενο που πιθανότατα βρίσκεται κάτω από ρυθμιστικό έλεγχο ως απόκριση σε οξειδωτικό στρες με σκοπό την καταστολή της μετάφρασης [9].

Δ. Ωρίμανση και διάσπαση RNA μορίων που συντίθενται από τις RNA πολυμεράσες IV και V

Στα φυτά, έχουν χαρακτηριστεί δύο επιπλέον RNA πολυμεράσες, IV και V (ή πυρηνικές RNA πολυμεράσες D και E) που φαίνεται να συμμετέχουν αποκλειστικά στην ωρίμανση των siRNA μορίων που συμμετέχουν στα μονοπάτια σίγασης της γονιδιακής έκφρασης. Συγκεκριμένα, η RNA πολυμεράση IV παράγει τα πρόδρομα μόρια siRNA ενώ η RNA πολυμεράση V παράγει μη κωδικά RNA μόρια (ncRNAs) που αποτελούν στόχους των siRNAs και φαίνεται να διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο.

Τα μονοπάτια ωρίμανσης των μορίων αυτών φαίνεται να ομοιάζουν εκείνα των μεταγράφων που παράγονται από την RNA πολυμεράση II ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις οι λεπτομέρειες των αντίστοιχων μοριακών μηχανισμών δεν έχουν αποκαλυφθεί [9].

1.1.4 Κυτταροπλασματικά σωμάτια επεξεργασίας RNA (P bodies)

Τα κυτταροπλασματικά σωμάτια επεξεργασίας RNA (γνωστά και ως P σωμάτια – processing bodies) περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 2002 στα πλαίσια μίας μελέτης επιτόπων-στόχων ενός αυτοάνοσου αντιορού [44]. Κατόπιν, πολλοί ερευνητές εστίαστηκαν στη μελέτη των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών αυτών σωματίων και στη συσχέτισή τους με την κυτταρική λειτουργία καθώς και την εμπλοκή τους σε αναπτυξιακά και παθολογικά φαινόμενα.

Τα σωμάτια P εμπλέκονται στη μετα-μεταγραφική επεξεργασία μορίων mRNA μέσω RNA σιώπησης (RNAi), 5'→3' εξωνουκλεολυτικής αποικοδόμησης, μεταφοράς mRNA και σταθεροποίησης συγκεκριμένων μεταγράφων. Θεωρείται ότι η σχετική κατανομή παραγόντων σιώπησης και αποικοδόμησης σε αυτές τις εντοπισμένες κυτταρικές περιοχές επιτυγχάνει την λεπτή ρύθμιση των αντίστοιχων μηχανισμών και προστατεύει από την λανθασμένη αποικοδόμηση λειτουργικών μεταγράφων. Αν και τα P σωμάτια έχουν μονοπωλήσει σχεδόν το ενδιαφέρον, κι άλλοι σχηματισμοί όπως τα κοκκία νευρωνικής μεταφοράς RNP (neuronal transport RNP granules), τα κοκκία κυτταρικής καταπόνησης (stress granules), τα σωμάτια – σπόγγοι (sponge bodies) και άλλα έχουν ανιχνευθεί να διαδραματίζουν παρόμοιους ρόλους, συνήθως σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους [45].

Μελέτες έδειξαν ότι παρά το γεγονός ότι αφθονούν στα σωματίδια αυτά πρωτεϊνικοί παράγοντες που εμπλέκονται με την αποικοδόμηση ελαττωματικών mRNA (SMG7, SMG5 και υπό συγκεκριμένες συνθήκες UPF1), η αδυναμία σύνθεσης των P bodies μέσω καταστολής της πρωτεΐνης Ge-1 σε κύτταρα HeLa δεν επηρεάζει τον μηχανισμό NMD. Συνεπώς, έχει προταθεί ότι τα σωματίδια P δεν είναι κυτταρικές δομές που στρατολογούν ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια που θα καταλήξουν σε αποικοδόμηση αλλά μάλλον ορατά συσσωματώματα mRNPs που σχηματίζονται ως απόκριση στην αυξημένη συγκέντρωση mRNAs που πρόκειται να αποικοδομηθούν [46].

1.1.5 Βιολογικός ρόλος ειδικών ενδοριβονουκλεασών

Όπως αναφέρθηκε, το κύριο μοντέλο που περιγράφει την αποικοδόμηση των mRNA στα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα έδινε ιδιαίτερη βαρύτητα στη δράση εξωνουκλεασών. Ωστόσο, στα πλαίσια των μονοπατιών αποικοδόμησης, οι περιπτώσεις εμπλοκής ενδοριβονουκλεασών σε καίρια σημεία αποικοδόμησης όπως η δράση του παράγοντα SMG6 στο μονοπάτι NMD αναδεικνύει το σημαντικό ρόλο των ενδονουκλεασών στον ενδοκυττάριο μεταβολισμό RNA. Η ανακάλυψη άλλων ενζύμων που διαθέτουν ενδοριβονουκλεολυτική ενεργότητα (PMR-1, IRE1, RNase L, αλδολάση C, ARD-1, G3BP και APE1) και ρυθμίζουν τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων mRNA-στόχων ενισχύει ακόμα περισσότερο τη σημασία των ενδοριβονουκλεασών στον μεταβολισμό του RNA.

Η ταυτοποίηση των ενδοριβονουκλεασών είναι σε αρκετές περιπτώσεις επίπονη κυρίως λόγω της δυσκολίας απομάκρυνσης προσμίξεων από ριβονουκλεάσες των συστημάτων έκφρασης που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των ανασυνδυασμένων ενζύμων. Η ενδονουκλεολυτική αποικοδόμηση έχει μελετηθεί περισσότερο στη γονιδιακή σιώπηση ως απόκριση στην καταπόνηση (stress) και στους μηχανισμούς άμυνας και όχι στους μηχανισμούς ρύθμισης των συνολικών επιπέδων mRNA. Ωστόσο, υπάρχουν και ισχυρές ενδείξεις ότι οι ενδοριβονουκλεάσες εμπλέκονται σε πολλούς μηχανισμούς φαινομενικά ανεξάρτητους με τον μεταβολισμό του RNA [47].

A. Ριβονουκλεάση σχετιζόμενη με τα πολυσώματα: PMR1 (Polysomal ribonuclease 1)

Η PMR1 απομονώθηκε από πολυσώματα ήπατος του *Xenopus*, ανήκει στην υπεροικογένεια των υπεροξειδασών και έχει μεγάλη ομολογία με την ανθρώπινη μυελοπεροξειδάση. Αν και η PMR1 δεν έχει ενεργότητα υπεροξειδάσης [48], ενεργοποιείται έπειτα από την επίδραση οιστρογόνων και είναι ικανή να αποσταθεροποιεί συγκεκριμένα mRNAs που κωδικοποιούν τη σύνθεση πρωτεϊνών του ορού, μεταξύ των οποίων της αλβουμίνης και της βιτελογενίνης μέσω ενδονουκλεολυτικής διάσπασής τους [48-50]. Η PMR1 εντοπίζεται σε λειτουργικές μονάδες που δεσμεύονται στα ριβοσώματα [49] και εντοπίζονται στα κυτταροπλασματικά σωματίδια καταπόνησης (stress granules) έπειτα από επίδραση με αρσενικό [51]. Η δράση της PMR1 (πολυσωμική ριβονουκλεάση 1) ελέγχεται μέσω φωσφορυλίωσης στο καρβοξυτελικό άκρο από την πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης SRC. Η τροποποίηση αυτή δημιουργεί μια θέση δέσμησης RNA στην SH2 επικράτεια του ενζύμου το οποίο δρα έναντι μεταφραζόμενων mRNPs [50]. Η PMR1 έχει βρεθεί επίσης να αλληλεπιδρά με ρυθμιστικές πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (MENA και VASP) επηρεάζοντας την κυτταρική κινητικότητα, πιθανότατα ως αποτέλεσμα τοπικής αποικοδόμησης mRNA μορίων. Επίσης, η έκφραση της πρωτεΐνης θερμικού σοκ Hsp90 είναι απαραίτητη για την λειτουργία του ενζύμου αφού σταθεροποιεί την PMR1 και δεν επιτρέπει την αποικοδόμησή της από το πρωτεάσωμα [52]. Σε κύτταρα θηλαστικών έχει δειχθεί ότι μια ριβονουκλεολυτική ενεργότητα αντίστοιχης της PMR1 είναι απαραίτητη για την αποικοδόμηση φυσιολογικών και παθολογικών mRNAs που κωδικοποιούν τη σύνθεση της β-σφαιρίνης [53,54]. Ωστόσο, η πρωτεΐνη στην οποία αποδίδεται η εν λόγω ενεργότητα δεν έχει ταυτοποιηθεί καθώς η αμινοξική αλληλουχία της PMR1 δεν εμφανίζει ομοιότητες με κάποια από τις γνωστές ανθρώπινες ριβονουκλεάσες που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση mRNA μορίων.

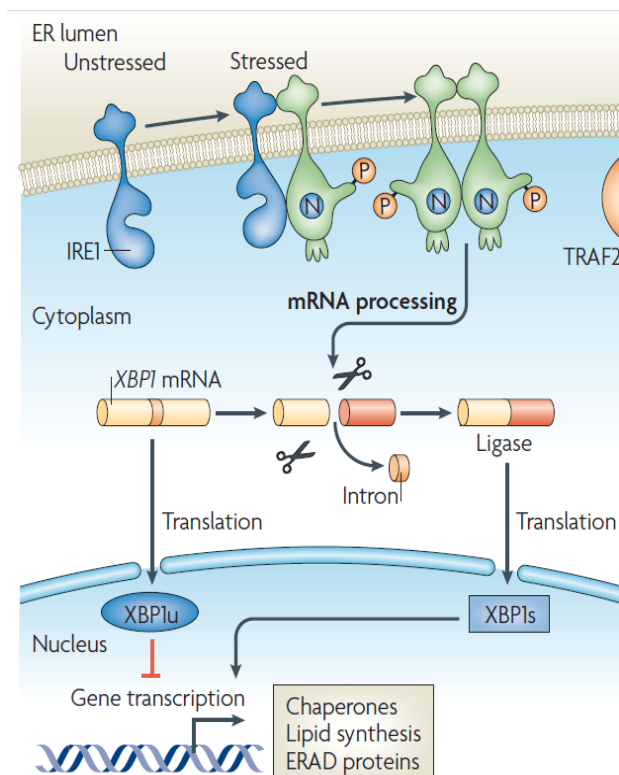
B. IRE1

Η IRE1 είναι προϊόν του γονιδίου *ERN1* (endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1) και αποτελεί μία από τις κύριες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην απόκριση καταπόνησης του ενδοπλασματικού δικτύου που συνοδεύεται από ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών στον αυλό του οργανιδίου (UPR – unfolded protein response). Στα θηλαστικά η IRE1 επάγει τη σύνθεση μοριακών συνοδών που υποβοηθούν την επαναπύκνωση των πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο [55] που συσσωρεύονται έπειτα από διάφορες αιτίες (διαταραχή ομοιόστασης ασβεστίου, μόλυνση από ιό, θερμικό σοκ, έλλειψη θρεπτικών συστατικών) [56].

Η IRE1 είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη και η ενεργοποίησή της κατά την καταπόνηση του ενδοπλασματικού δικτύου πραγματοποιείται μέσω μίας επικράτειας που παίζει ρόλο «αισθητήρα». Αυτή η περιοχή σε φυσιολογικές καταστάσεις καταλαμβάνεται από την πρωτεΐνη-συνοδό BiP (Immunoglobulin heavy chain-binding protein) που είναι προϊόν του γονιδίου HSPA5 (heat shock 70 kDa protein 5). Παρουσία πρωτεϊνών που έχουν αποπτωθωθεί, η BiP απελευθερώνεται από την IRE1, η IRE1 ολιγομερίζεται και ενεργοποιούνται οι επικράτειες που έχουν ριβονουκλεολυτική ενεργότητα και ενεργότητα κινάσης. Η ριβονουκλεολυτική ενεργότητα της IRE1 καταλύει την ωρίμανση του mRNA του γονιδίου XBP1 (X-box-binding protein 1) και η πρωτεΐνη XBP1 λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας για γονίδια-στόχους όπως πρωτεΐνες-συνοδοί, και ένζυμα που διευκολύνουν την πτύχωση [57]. Εκτός από την ωρίμανση του μεταγράφου του XBP1, η IRE1 εμπλέκεται και στην αποικοδόμηση άλλων mRNAs που συνθέτουν πρωτεΐνες που στοχεύονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και επιβαρύνουν την λειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου σε κατάσταση καταπόνησης [58]. Συνεπώς, η IRE1 έχει ιδιαίτερη σημασία για την απόκριση του ενδοπλασματικού δικτύου κατά την καταπόνησή του. Η IRE1 έχει φανεί να αποικοδομεί και άλλα mRNAs, μεταξύ των οποίων και του mRNA που κωδικοποιεί τη σύνθεσή της στα πλαίσια ενός μηχανισμού αυτορύθμισης της έκφρασής της. Μέσω απενεργοποίησης της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί τη σύνθεση της IRE1, φαίνεται η συγκεκριμένη πρωτεΐνη να σχετίζεται και με την ανάπτυξη των πλασματοκυττάρων [59]. Η κατανόηση του μοριακού μηχανισμού ενεργοποίησης της IRE1 ευνοήθηκε από τις πρόσφατες μελέτες σχετικά με τη δομή του ενζύμου [60,61].

Η αμινοξική στοίχιση της IRE1 με την RNase L έδειξε ότι και οι δύο πρωτεΐνες περιλαμβάνουν διακριτές επικράτειες κινάσης και ενδοριβονουκλεάσης (KEN domains) [61]. Η σημαντική ωστόσο διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι η IRE1 εμφανίζει ταυτόχρονα και υποχρεωτικά και τις δύο ενεργότητες. Όπως αναφέρθηκε, η IRE1 ενεργοποιείται κατά την καταπόνηση του ενδοπλασματικού δικτύου, διμερίζεται και τα διμερή αλληλοφωσφορυλιώνονται καθώς ενεργοποιείται η δράση κινάσης [60]. Η ενδοριβονουκλεολυτική ενεργότητα επάγεται έπειτα από δέσμευση νουκλεοτιδίου και από την αλληλοφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης. Παρά τις ομοιότητες με την RNase L, η δεύτερη δεν απαιτεί αυτοφωσφορυλίωση για τη δράση της. Από τα 458 κατάλοιπα που απαρτίζουν το ενεργό κέντρο της IRE1, δέκα σημαντικά κατάλοιπα τα οποία συναθροίζονται τοπικά ταυτοποιήθηκαν βάσει της έκθεσής τους στην επιφάνεια του μορίου και είναι απαραίτητα για τη ριβονουκλεολυτική ενεργότητα. Τα κατάλοιπα αυτά είναι υψηλά συντηρημένα [47]

και τέσσερα από αυτά (Y1043, R1056, N1057 και H1061) είναι συντηρημένα και στην RNase L και θεωρούνται κρίσιμα για τη ριβονουκλεολυτική ενεργότητα. Οι δομικές ομοιότητες της IRE1 με την ενδονουκλεάση που διασπά tRNAs υποδηλώνουν ότι τα δύο ένζυμα ίσως παρουσιάζουν όμοιους καταλυτικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν των σχηματισμό παρόμοιων ενδιάμεσων προϊόντων [62].



Εικόνα 1.6: Δράση της IRE1 στην καταπόνηση του ενδοπλασματικού δικτύου. Η IRE1 ολιγομερίζεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου έπειτα από την επαγωγή κυτταρικής καταπόνησης. Η αλληλοφωσφορυλίωση των διμερών αυξάνει τη συγγένεια της IRE1 για νουκλεοτίδια (N) τα οποία ενεργοποιούν αλλοστερικά την IRE1 και αποκαλύπτουν το ενεργό κέντρο της ενδοριβονουκλεολυτικής ενεργότητας. Η IRE1 κατόπιν διασπά το mRNA που κωδικοποιεί τη σύνθεση του mRNA της XBP1, τα δύο άκρα του mRNA επανασυνδέονται από μία λιγάση που δεν έχει ακόμη χαρακτηριστεί και ακολουθεί αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης της κωδικής αλληλουχίας (στην εικόνα παρουσιάζεται από κίτρινο σε κόκκινο μετά την απομάκρυνση του εσωνίου). Το ώριμο mRNA της XBP1 κωδικοποιεί τη σύνθεση ενός μεταγραφικού ενεργοποιητή παραγόντων που εμπλέκονται στην προστασία από την καταπόνηση ενδοπλασματικού δικτύου ενώ απουσία δράσης της IRE1 κωδικοποιεί τη σύνθεση της XBP1u, ενός αναστολέα της εκδήλωσης καταπόνησης του ενδοπλασματικού δικτύου (UPR) [63].

Γ. RNase L

Η RNase L εμπλέκεται στην κυτταρική προστασία από την ιική εισβολή και η δράση της επάγεται από την παρουσία δίκλωνων RNA μέσω του μονοπατιού 2-5A [64-67]. Στο μονοπάτι αυτό η RNase L ενεργοποιείται από το 2-5A που περιλαμβάνει μικρά ολιγονουκλεοτίδια ποικίλου μήκους που είναι τα προϊόντα δράσης των 2-5A συνθετασών. Τα γονίδια των 2-5A συνθετασών επάγονται παρουσία ιντερφερονών και παρουσία δίκλωνων RNAs μετατρέπουν το ATP σε 2-5A που κατόπιν δεσμεύεται και επάγει την ενεργοποίηση της RNase L.

Η RNase L αποικοδομεί μονόκλιωνα RNAs ως απόκριση στην ική μόλυνση αλλά εμπλέκεται και σε άλλους μηχανισμούς. Έχει βρεθεί να επηρεάζει τη διαφοροποίηση των

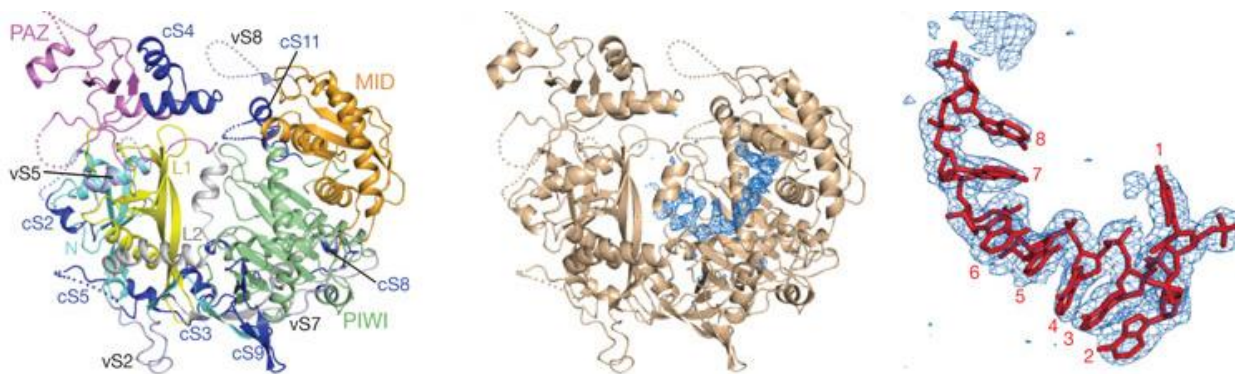
μυοβλαστών στα ποντίκια μέσω ρύθμισης του mRNA της MyoD, μιας σημαντικής ρυθμιστικής πρωτεΐνης για τη διαφοροποίηση των μυικών κυττάρων [68]. Η RNase L μπορεί να διαθέτει ογκοκατασταλτική δράση, γεγονός που καταδεικνύεται από την αποπτωτική της δράση [69]. Η καταστολή της RNase L σε ποντίκια κατέστειλε την απόπτωση στον θύμο και στο σπλήνα ενώ μεταλλάξεις του γονιδίου της RNase L σχετίζονται με την παθογένεση του καρκίνου του προστάτη [70].

Η RNase L διαθέτει μία αμινοτελική ρυθμιστική περιοχή που δεν είναι παρούσα στην IRE1 και αποτελείται από εννέα επαναλήψεις αγκυρίνης (R1-R9). Δομικές μελέτες της περιοχής αυτής έδειξαν ότι οι αλληλουχίες R2-R4 είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση του 2-5A ενώ οι R7-R9 συμμετέχουν στην εξασφάλιση της δομικής σταθερότητας του ενζύμου [71,72]. Το καρβοξυτελικό τμήμα της RNase L διαθέτει μια επικράτεια όμοια με επικράτεια κινάσης και μία επικράτεια νουκλεάσης, ομόλογες της IRE1. Ωστόσο, η RNase L δεν εμφανίζει δράση κινάσης αν και κατά την ενεργοποίησή της ομοδιμερίζεται όμοια με την IRE1 [73].

Δ. Η πρωτεΐνη AGO2

Η πρωτεΐνη AGO2 ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών Αργοναυτών και περιλαμβάνει τους αντιπροσώπους που πρόσφατα βρέθηκαν να συμμετέχουν στην ενδοριβονουκλεολυτική αποικοδόμηση στα πλαίσια του συμπλόκου RISC. Η δράση τους είναι απαραίτητη στην RNA σιώπηση (RNAi) τόσο των siRNAs όσο και των microRNAs [74], όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Στα πλαίσια της σιώπησης δίκλωνα RNA μόρια μήκους 21-23 νουκλεοτιδίων παράγονται από το ένζυμο Dicer και αλληλεπιδρούν με την AGO2 για να σχηματίσουν το σύμπλοκο RISC αναγνωρίζοντας την τρισδιάστατη διαμόρφωση του μικρού RNA [75].

Οι πρωτεΐνες Αργοναύτες φέρουν μία Mid αμινοτελική επικράτεια, την PAZ επικράτεια που είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του RNA και την PIWI επικράτεια που διαθέτει ριβονουκλεολυτική ενεργότητα και είναι δομικά όμοια με τις πρωτεΐνες της οικογένειας RNase H. Η PAZ επικράτεια έχει μία υδρόφοβη περιοχή που ευθύνεται για την αναγνώριση της μονόκλωνης 3' ουράς του δίκλωνου RNA [76,77]. Η αναγνώριση του υποστρώματος και η διάσπασή του από την AGO2 είναι εξαιρετικά ειδική και εξαρτάται από το βαθμό συμπληρωματικότητας μεταξύ της μίας αλυσίδας, της αλληλουχίας «οδηγού» του μικρού RNA και της αλληλουχίας του στόχου που περιβάλλει την θέση διάσπασης. Η θέση διάσπασης καθορίζεται βάσει του 5' άκρου της αλληλουχίας «οδηγού» [78].



Εικόνα 1.7: Δομική απεικόνιση της πρωτεΐνης AGO του *S. cerevisiae*. Αριστερά: χρωματίζονται οι κύριες δομικές επικρατείες της πρωτεΐνης. Μέσο: Τοποθέτηση ενός οκτανουκλεοτιδίου RNA υποστρώματος (με μπλε). Δεξιά: Τρισδιάστατη δομή του οκτανουκλεοτιδίου RNA [79].

Ε. Οι αλδολάσες A και C

Οι αλδολάσες είναι γλυκολυτικά ένζυμα που εμπλέκονται σε διάφορες μεταβολικές διαδικασίες. Η αλδολάσες A και C, ισοένζυμα που εκφράζονται στον εγκέφαλο και σε νευρικούς ιστούς, δεσμεύονται ειδικά στο mRNA που κωδικοποιεί τη σύνθεση ελαφρών νευροϊνιδίων (NF-L, Light-Neurofilaments) και ρυθμίζουν τη σταθερότητά τους [80]. Έχει προταθεί ότι και τα δύο ισοένζυμα εμφανίζουν δράση ενδοριβονουκλεάσης εντός συγκεκριμένων ριβονουκλεοπρωτεϊνικών σωματιδίων (mRNPs) ενώ είναι ικανά να διασπών τα μετάγραφα αυτά σε θέσεις UG. Η σταθερότητα των NF-L mRNAs φαίνεται να εξαρτάται από πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο poly(A) που προστατεύουν το μετάγραφο από τη δράση των αλδολασών [80]. Μελέτες έχουν δείξει ότι ένας νευροειδικός μηχανισμός, σε απόκριση σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα ενεργοποιείται για να επάγει τη ριβονουκλεολυτική ενεργότητα των ενζύμων και να διασπάσει τα NF-L μετάγραφα [80]. Η αλδολάση C εμφανίζει *in vitro* ριβονουκλεολυτική ενεργότητα που εξαρτάται από την παρουσία ψευδαργύρου [80].

Δεδομένης της έλλειψης επικρατειών που προβλέπεται να δεσμεύουν RNA στα ένζυμα αυτά, προκαλεί έκπληξη η εμπλοκή τους στη ρύθμιση της σταθερότητας των mRNA. Παραμένει άγνωστο κατά πόσο το ίδιο ενεργό κέντρο στην αλδολάση C συμμετέχει στη γλυκόλυση και στην αποικοδόμηση RNA. Κύτταρα που συνεκφράζουν τις αλδολάσες A και C σχηματίζουν ετεροτετραμερή που δεσμεύονται στο NF-L mRNA και εμφανίζουν διαφορετική δράση από τα ομοτετραμερή κυττάρων που εκφράζουν μόνο τη μία μορφή του ενζύμου. Ως εκ τούτου έχει προταθεί ότι η διαφορετική έκφραση μπορεί να εμπλέκει έναν μηχανισμό για την χρήση μιας δομικής διαφοροποίησης για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης σε συγκεκριμένους νευρώνες και ως απόκριση σε εξωγενή

ερεθίσματα [80]. Συνεπώς, οι αλδολάσες, εκτός από γλυκολυτικά ένζυμα πιθανότατα εκδηλώνουν και άλλους βιολογικούς ρόλους ως ριβονουκλεάσες ενώ φαίνεται να έχουν ικανότητα δέσμευσης στα ινίδια ακτίνης και σε μεταγραφικούς παράγοντες [81].

Στ. Η ριβονουκλεάση ARD-1

Η ριβονουκλεολυτική ενεργότητα της ARD-1 ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά χάρη στην ικανότητά της να αντικαθιστά την λειτουργία της σημαντικής για τα βακτήρια RNάσης E [82]. Βάσει της ομοιότητάς της με τη βακτηριακή ριβονουκλεάση E ως προς τη δέσμευση και την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, η ARD-1 θεωρείται ανάλογη της ριβονουκλεάσης E της *E.coli*, σημαντικό συστατικό για την mRNA αποικοδόμηση, στα Θηλαστικά [83]. Η ARD-1 αποτελεί το προϊόν εναλλακτικής ωρίμανσης του γονιδίου *NIPP-1* ή *PPP1R8* (protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 8). Λόγω της ομοιότητάς της στο αμινοτελικό άκρο και του υψηλά φορτισμένου καρβοξυτελικού άκρου, η ARD-1 ομοιάζει με άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη συρραφή του mRNA [84]. Ωστόσο ο ακριβής της βιολογικός ρόλος δεν έχει επιβεβαιωθεί.

Z. Η οικογένεια G3BP

Η οικογένεια G3BP (Ras-GAP SH3 domain binding protein) περιλαμβάνει τρία μέλη, τα G3BP1, G3BP2a και G3BP2b που εμφανίζουν και τα τρία *in vitro* ριβονουκλεολυτική ενεργότητα [85]. Οι G3BP πρωτεΐνες εμπλέκονται σε διάφορες διαδικασίες όπως ο μεταβολισμός RNA, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και η σηματοδότηση μέσω RAS συνεπώς είναι πολυλειτουργικές πρωτεΐνες. Φαίνεται να εντοπίζονται σε σωματίδια καταπόνησης (stress granules) στο κυτταρόπλασμα και θεωρείται ότι μετακινούνται στον πυρήνα μέσω φωσφορυλίωσης ενός καταλοίπου σερίνης που εντοπίζεται στην αμινοτελική περιοχή. Η τροποποίηση αυτή θεωρείται το σήμα που λειτουργεί σαν σινιάλο για την πυρηνική μεταφορά και την ενσωμάτωση των G3BP στα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά συμπλέγματα και τη διάσπαση mRNA – στόχων μέσω ενδονουκλεολυτικής αποικοδόμησης [86,87]. Η ριβονουκλεολυτική δράση των G3BP στηρίζεται και από το γεγονός ότι σε ινοβλάστες ποντικού όπου η θέση φωσφορυλίωσης έχει καταργηθεί, επιβραδύνεται η αποικοδόμηση του c-myc mRNA. Οι G3BP θεωρούνται σημαντικές καθώς απουσία τους προκαλεί σε αναπτυξιακή καθυστέρηση και νευρωνικό θάνατο στα ποντίκια [86]. Τα ευρήματα αυτά στηρίζουν την υπόθεση η ριβονουκλεολυτική ενεργότητα των G3BP μπορεί να είναι σημαντική για τη μετα-μεταγραφική ρύθμιση συγκεκριμένων mRNAs σε μεταβαλλόμενες αναπτυξιακές συνθήκες.

Η πρωτοταγής αλληλουχία των G3BP δείχνει ότι στο καρβοξυτελικό τμήμα εντοπίζονται δύο μοτίβα δέσμευσης RNA και μία περιοχή πλούσια σε αργινίνη και γλυκίνη (RGG box). Η G3BP δεσμεύεται σε ειδικές αλληλουχίες ACCCA(U/C)(A/C)(C/G)G(C/A)AG ενώ η ειδική αναγνώριση της θέσης διάσπασης επάγεται από την αλληλεπίδραση με το RNA-στόχο [87]. Όσο αναφορά τον καταλυτικό μηχανισμό του ενζύμου, η έλλειψη διακριτών επικρατειών ενδοριβονουκλεάσης δεν έχει επιτρέψει μέχρι σήμερα τη διαλεύκανση του τρόπου διάσπασης.

H. Η Αγγειογενίνη

Η αγγειογενίνη ανήκει στην υπεροικογένεια ριβονουκλεασών A και η αμινοξική της αλληλουχία εμφανίζει 33% ομοιότητα με την παγκρεατική ριβονουκλεάση A [88]. Λόγω του σχετικά μικρού μεγέθους της και της εκκρινόμενης φύσης της [89] (οι ριβονουκλεάσες της υπεροικογένειας A απελευθερώνονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον) μελετήθηκε αρχικά για την ιδιότητά της να επάγει την αγγειογένεση σε καρκινικούς ιστούς. Η εκκρινόμενη αγγειογενίνη έχει δειχθεί ότι ενσωματώνεται και μεταφέρεται στον πυρηνίσκο ενώ έχει δειχθεί ότι μπορεί να αποικοδομεί rRNAs και tRNAs *in vitro*. Πρόσφατα προτάθηκε ότι η αγγειογενίνη εμπλέκεται και στην παραγωγή μικρών RNAs έπειτα από καταπόνηση που προκύπτουν από τη διάσπαση tRNAs κατά την καταστολή της μετάφρασης [90].

Η αγγειογενίνη εμφανίζει μειωμένη ριβονουκλεολυτική ενεργότητα συγκριτικά με τη ριβονουκλεάση A παρόλο που περιλαμβάνει πολλά από τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στην κατάλυση. Η διαφορά οφείλεται στο γεγονός ότι ένα αμινοξικό κατάλοιπο (γλουταμίνη 117) δυσχεραίνει τη δέσμευση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο [91]. Ωστόσο, παρότι μειωμένη, η ριβονουκλεολυτική ενεργότητα φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αγγειογένεση και η αύξηση της ενεργότητάς της με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση επάγει επίσης το αγγειογενετικό της δυναμικό. Όμοια με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, δύο κατάλοιπα ιστιδίνης και ένα λυσίνης είναι σημαντικά για τη διάσπαση [91].

Θ. Η πρωτεΐνη SMG6

Η πρωτεΐνη SMG6 ονομάστηκε βάσει της ομόλογης της Smg-6 στον *Caenorhabditis elegans* και πρόσφατα χαρακτηρίστηκε ως ένα πολύ σημαντικό ένζυμο απαραίτητο για την αποικοδόμηση μορίων mRNA με πρόωρο κωδικόνιο λήξης (NMD). Η SMG6 είναι συντηρημένη στα Μετάζωα και διασπά ενδοκλουλεολυτικά τα ελαττωματικά mRNA μόρια κοντά στο σημείο πρόωρου τερματισμού της μετάφρασης [14]. Η SMG6 περιλαμβάνει μία

PilT αμινοτελική επικράτεια (PIN) που εμφανίζει *in vitro* ενδοριβονουκλεολυτική ενεργότητα [14]. Δομικές μελέτες έδειξαν ότι η στερεοδιαμόρφωση της επικράτειας PIN στην ανθρώπινη SMG6 έχει παρόμοια δομή με τις ριβονουκλεάσες H ενώ εντοπίζονται και τα τρία κρίσιμα για τη ριβονουκλεολυτική ενεργότητα αμινοξικά κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος. Τέλος, συγκριτικές μελέτες έδειξαν ότι η SMG6 είναι μία ενδονουκλεάση συντηρημένη σε όλα Μετάζωα.

I. Η ριβονουκλεάση Rrp44

Η Rrp44 (ονομάζεται και Dis3) είναι η καταλυτική υπομονάδα του ευκαρυωτικού εξωσώματος [92] που εμπλέκεται στην επεξεργασία πολλών RNA μεταξύ των οποίων και των mRNAs [93]. Στο κυτταρόπλασμα, το εξώσωμα είναι μέρος του μηχανισμού επιτήρησης των RNA μορίων και αποικοδομεί εξωνουκλεολυτικά φυσιολογικά και ελαττωματικά mRNAs. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε στο εξώσωμα του ζυμομύκητα η παρουσία της Dis3 ως υπομονάδα του κεντρικού πυρήνα του εξωσώματος να έχει ενδονουκλεολυτική δράση που αποδίδεται σε μία PIN επικράτεια [94]. Η Rrp44 στον άνθρωπο προβλέπεται να έχει μία PIN αμινοτελική επικράτεια, δύο επικράτειες ψυχρού σοκ (Cold-shock domains CSD), μία S1 επικράτεια που δεσμεύει RNA και μία καρβοξυτελική RNB επικράτεια με εξωριβονουκλεολυτική ενεργότητα. Στον ζυμομύκητα, η PIN επικράτεια αλλά όχι η RNB θεωρείται σημαντική για τη δράση του εξωσώματος [94]. Η ενδοριβονουκλεολυτική ενεργότητα του ενζύμου εξαρτάται από μεταλλικά ιόντα με τα ιόντα μαγνησίου να έχουν τη μεγαλύτερη επίδραση. Στον άνθρωπο, το ένζυμο δεν έχει βρεθεί αν εμπλέκεται στην *in vivo* αποικοδόμηση RNAs μέσω του εξωσώματος.

IA. Η πρωτεΐνη PP11

Η PP11 είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που αρχικά είχε προταθεί ότι αποτελεί πρωτεάση σερίνης [95]. Ωστόσο, αργότερα αποδείχτηκε ότι η PP11 δεν εμφανίζει πρωτεολυτικές ιδιότητες αλλά είναι μια ενδοριβονουκλεάση που εμφανίζει ομοιότητες με τη δομή της XendoU, μιας ριβονουκλεάσης στα αμφίβια που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση των μικρών πυρηνισκικών RNAs (snoRNAs), μιας τάξης ρυθμιστικών μορίων που εμπλέκονται στη βιογένεση των ριβοσωμάτων. Όμοια, η PP11 εμφανίζει ενδοριβονουκλεολυτική ενεργότητα που επάγεται παρουσία ιόντων μαγνησίου και αποδίδεται σε δύο συντηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης, ένα κατάλοιπο λυσίνης και δύο κατάλοιπα γλουταμινικού οξέος [96].

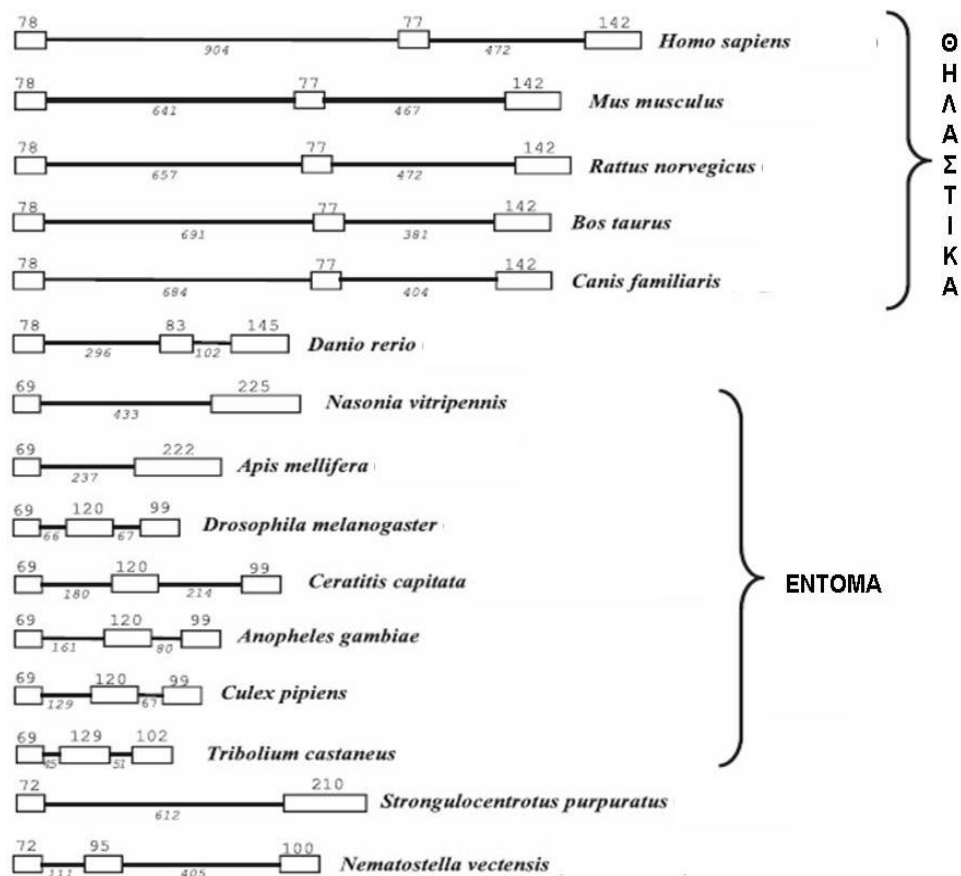
1B. Η πρωτεΐνη APE1

Η APE1 είναι μία απαραίτητη πολυλειτουργική πρωτεΐνη που εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες όπως είναι η DNA επιδιόρθωση [96,97], η ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων μέσω οξειδωτικού στρες και ο κυτταρικός θάνατος [98]. Έχει δράση DNA ενδονουκλεάσης, 3'→5' εξωνουκλεάσης, 3' φωσφοδιεστεράσης, 3' φωσφατάσης και ενεργότητα ριβονουκλεάσης. Η ενώ μπορεί να διασπάσει το mRNA του c-myc *in vitro*. Επίσης, σιώπηση της APE1 σε κύτταρα HeLa προκαλεί την αύξηση των επιπέδων του c-myc, ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός αποικοδόμησης παραμένει άγνωστος. Η πρωτεΐνη φέρει ένα σινιάλο πυρηνικού εντοπισμού στα 20 πρώτα αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου που ακολουθείται από μία REDOX και μία ενδονουκλεολυτική επικράτεια στο καρβοξυτελικό άκρο [99]. Η επικράτεια αυτή ομοιάζει με την επικράτεια της εξωνουκλεάσης III της *E.coli* και η δράση της επηρεάζεται από ιόντα μαγνησίου. Αν και το ένζυμο εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα, έχει βρεθεί ότι μπορεί να μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα ή και αντίστροφα ανάλογα με τις συνθήκες στρες [100,101]. Η APE1 φαίνεται να αφθονεί στα πολυσώματα, υπονοώντας την εμπλοκή της στη ρύθμιση των επιπέδων RNA. Επίσης βρέθηκε να αλληλεπιδρά με το ριβοσωμικό RNA και την NPM1, μια πυρηνική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση των ριβοσωμάτων [102] ωστόσο δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί η εμπλοκή της στον μεταβολισμό του RNA.

1.2 Η πρωτεϊνική οικογένεια της ριβονουκλεάσης κ

Η οικογένεια των ριβονουκλεασών κ είναι μία νέα πρωτεϊνική οικογένεια ενδοριβονουκλεασών, της οποίας ιδρυτικό μέλος είναι η Cc ριβονουκλεάση. Το ένζυμο αυτό απομονώθηκε το 1987 από προνύμφες 6 ημερών του εντόμου *Ceratitis capitata* [103]. Το cDNA που κωδικοποιεί τη σύνθεσή της απομονώθηκε μέσω ανοσοσάρωσης μιας cDNA βιβλιοθήκης από το ίδιο αναπτυξιακό στάδιο του εντόμου [104] και μέσω ανάλυσης EST ανακτήθηκαν πολλές αλληλουχίες που εμφάνιζαν υψηλά ποσοστά ομοιότητας με την Cc ριβονουκλεάση.

Οι αλληλουχίες αυτές προέρχονταν από ένα μεγάλο πλήθος ζωικών οργανισμών μεταξύ των οποίων και του ανθρώπου. Σήμερα είναι γνωστό ότι η οικογένεια των ριβονουκλεασών κ εμφανίζει αντιπροσώπους σε όλα σχεδόν τα Μετάζωα, από τα Κνιδόζωα μέχρι τα Θηλαστικά. Σε όλες τις περιπτώσεις φαίνεται να κωδικοποιούνται μικρές πρωτεΐνες μήκους 95-105 αμινοξέων που εμφανίζουν ιδιαίτερα αυξημένο βαθμό συντηρητικότητας και δεν εμφανίζουν σημαντικές ομοιότητες με άλλες μέχρι σήμερα γνωστές ριβονουκλεάσες. Το γεγονός ότι σε όλα τα διαθέσιμα γονιδιώματα εντοπίζεται ένα μόνο γονίδιο της ριβονουκλεάσης κ αποδεικνύει την ορθόλογη φύση της πρωτεϊνικής οικογένειας. Τα ορθόλογα γονίδια παρουσιάζουν αυστηρό πρότυπο γονιδιακής οργάνωσης αποτελούμενο από τρία εξώνια και δύο εσώνια με συντηρημένα μήκη των εξωνίων αλλά και θέσεις των εσωνίων. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.8, εξαίρεση στον παραπάνω κανόνα αποτελούν τα γονίδια των ειδών *Strongylocentrotus purpuratus*, *Nasonia vitripennis* και *Apis mellifera*, όπου εντοπίζεται ένα μόνο εσώνιο. Τα γονίδια των τριών αυτών ειδών πιθανολογείται ότι έχουν προκύψει από γεγονότα εξάλειψης εσωνίων [105].



Εικόνα 1.8: Το πρότυπο γονιδιακής οργάνωσης της οικογένειας των ριβονουκλεασών κ σε κάποια από τα διαθέσιμα γονιδιώματα μεταζώων. Με τετράγωνα συμβολίζονται τα εξώνια και με γραμμές τα εσώνια. Οι αριθμοί πάνω στα εξώνια και κάτω από τα εσώνια αντιστοιχούν στο μήκος τους σε ζεύγη βάσεων.

Η ευρεία παρουσία της οικογένειας των ριβονουκλεασών κ στο ζωικό βασίλειο, ο υψηλός βαθμός συντηρητικότητας των ομολόγων πρωτεϊνών και η αυστηρή οργάνωση των αντίστοιχων γονιδίων υποδεικνύουν μια ισχυρή εξελικτική πίεση για τη διατήρηση ενός ενζύμου με σημαντικό ρόλο για την κυτταρική λειτουργία.

Όσο αφορά την έκφραση των γονιδίων της οικογένειας, έχει προσδιοριστεί ότι στον *Ceratitis capitata* το γονίδιο της ριβονουκλεάσης κ εκφράζεται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και σε όλους τους ιστούς του ενήλικου εντόμου ενώ δύο εναλλακτικές ισομορφές μήκους 1,5 και 0,9 κιλοβάσεων εκφράζονται σε όλες τις περιπτώσεις. Τα μετάγραφα αυτά δεν διαφέρουν στην κωδική περιοχή αλλά το μεγαλύτερο μετάγραφο φέρει μία επέκταση 600 περίπου νουκλεοτιδίων στην 3' αμετάφραστη περιοχή που περιλαμβάνει μοτίβα αλληλουχιών που επάγουν την αποσταθεροποίηση των mRNA μορίων. Συνεπώς, η σύνθεση της εναλλακτικής ισομορφής ίσως να προσδίδει μία επιπλέον

διάσταση στους μηχανισμούς ρύθμισης της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου. Συγκριτική μελέτη των δύο μεταγράφων έδειξε ότι πιθανότατα η εναλλακτική ισομορφή προκύπτει μέσω εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης επί του πρωταρχικού mRNA [104].

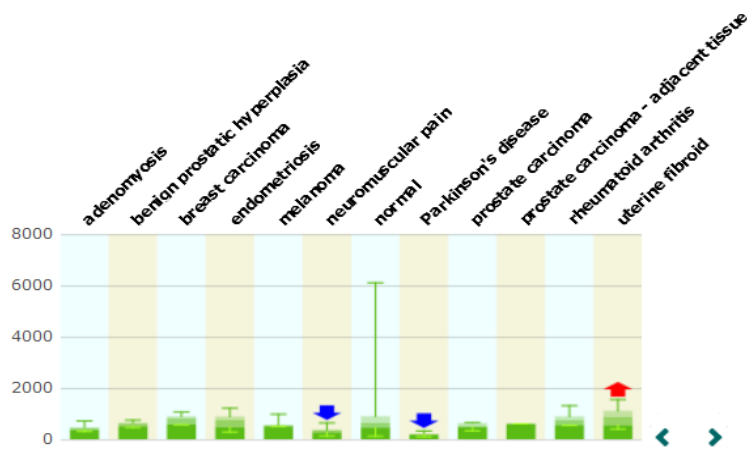
Ο ανθρώπινος αντιπρόσωπος της οικογένειας κωδικοποιείται από ένα μοναδικό γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 και διατηρεί επίσης το κλασσικό πρότυπο οργάνωσης των γονιδίων της οικογένειας. Δεδομένα από EST αλληλουχίες προβλέπουν την καθολική έκφραση του γονιδίου, ενώ η ανάλυση κατά Northern έχει επιβεβαιώσει την έκφραση σε πολλούς ανθρώπινους ιστούς [106]. Εδώ αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι μια πρόσφατη μελέτη ανάλυσης ευρείας κλίμακας (high-throughput) αποκάλυψε την αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών προχωρημένου σταδίου. Στη συγκεκριμένη μελέτη η αύξηση των επιπέδων έκφρασης της ριβονουκλεάσης κ συσχετίστηκε επιπλέον με κακή πρόγνωση της νόσου όπως εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Kaplan-Meier [107]. Μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι η έκφραση της RNάσης κ επηρεάζεται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστών και ωοθηκών από τη δράση αντικαρκινικών φαρμάκων [108].

Στα πλαίσια της ανάπτυξης αρκετών πλατφόρμων ανάλυσης μικροσυστοιχιών, ένα πλήθος πειραμάτων λαμβάνει χώρα τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε παθολογικά δείγματα με προέλευση, από κάθε κυτταρικό τύπο ανθρώπινων ιστών. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έναντι ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων-στόχων διατίθενται συνήθως ελεύθερα σε βάσεις δεδομένων, συνεπώς αρκετά δεδομένα σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ σε επίπεδο mRNA είναι διαθέσιμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι ένας μεγάλος αριθμός αλληλουχιών υβριδοποίησης για κάθε γονίδιο (probe sets) έχει εφαρμοστεί σε διάφορα πειράματα ανάλυσης μικροσυστοιχιών, γεγονός που καθιστά τα συγκεκριμένα δεδομένα αρκετά αξιόπιστα για τη διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης σε διάφορους κυτταρικούς τύπους.

Η ανάλυση δεδομένων για τα επίπεδα έκφρασης της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ από την πλατφόρμα μικροσυστοιχιών A-AFFY-44 (Gene expression atlas, EMBL) που περιλαμβάνει πειραματικά δεδομένα από την ανάλυση 677 ανθρώπινων, φυσιολογικών και παθολογικών ιστών δείχνουν την καθολική έκφραση της σε όλους τους ιστούς, όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 1.9.



Εικόνα 1.9: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης της ανθρώπινης RNάσης κ σε 103 φυσιολογικούς ιστούς όπως προέκυψε από την πλατφόρμα μικροσυστοιχιών A-AFFY-44 (EMBL).



Εικόνα 1.10: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης της ανθρώπινης RNάσης κ σε 10 παθολογικές καταστάσεις όπως προέκυψε από την πλατφόρμα μικροσυστοιχιών A-AFFY-44 (EMBL).

Σε όλα τα δείγματα που συμπεριλήφθηκαν στην εν λόγω μελέτη ανιχνεύθηκε η RNάση κ σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ενώ παρατηρούμε ένα μεγάλο εύρος διακύμανσης των επιπέδων έκφρασης μεταξύ διάφορων ιστών. Έτσι, mRNA που κωδικοποιούν τη σύνθεση της RNάσης κ φαίνεται να αφθονούν σε ιστούς υποθαλάμου,

φλοιού των επινεφριδίων και φλοιού του νεφρού ενώ σημαντικά μειωμένη έκφραση φαίνεται να παρατηρείται σε συγκεκριμένες ιστολογικές περιοχές του θαλάμου και σε ορισμένα παθολογικά δείγματα όπως είναι σε δείγματα νόσου Parkinson.

Η μελέτη του ανθρώπινου αντιπρόσωπου της οικογένειας επιτεύχθηκε μετά την απομόνωση του cDNA της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ από ιστό πλακούντα, την ετερόλογη έκφραση, καθαρισμό και βιοχημική μελέτη του ανασυνδυασμένου ενζύμου. Η μελέτη της ανασυνδυασμένης μορφής της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ έχει μέχρι σήμερα παρουσιάσει σημαντικά προβλήματα εξαιτίας της κυτταροτοξικότητας του μορίου, ένα χαρακτηριστικό κοινό σε πολλά ένζυμα με ριβονουκλεολυτική ενεργότητα. Παρόλα αυτά, σήμερα είναι γνωστό ότι η 98 αμινοξέων πρωτεΐνη εμφανίζει ενδοριβονουκλεολυτική ενεργότητα έναντι κυρίως των ApG και ApU φωσφοδιεστερικών δεσμών, ενώ έχουν αποσαφηνιστεί αρκετά σημεία που αφορούν τα βιοχημικά χαρακτηριστικά του ενζύμου [106].

Οι ριβονουκλεάσες της οικογένειας κ περιλαμβάνουν 3-5 κατάλοιπα κυστεϊνών, εκ των οποίων οι κυστεΐνες 6, 14 και 69 (αρίθμηση με βάση τον ανθρώπινο αντιπρόσωπο) είναι απόλυτα συντηρημένες. Σχετικά με τη δομή του ενζύμου, πρόσφατα δεδομένα δείχνουν τα εξαιρετικά συντηρημένα κατάλοιπα Cys6 και Cys69 (αρίθμηση με βάση τον ανθρώπινο αντιπρόσωπο) συμμετέχουν στο σχηματισμό ενός ενδομοριακού δισουλφιδικού δεσμού, απαραίτητου για την αναδίπλωση του μορίου στη λειτουργική του μορφή. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε έπειτα από μελέτη της επίδρασης αλκυλιωτικών και αναγωγικών παραγόντων στην ενεργότητα του ενζύμου, μελέτη της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης υπό αναγωγικές και μη συνθήκες καθώς και από πειράματα κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης. Η απόλυτη συντηρητικότητα των καταλοίπων Cys6 και Cys69 υπαινίσσεται ότι ο δεσμός αυτός είναι πιθανότατα συντηρημένος σε όλους τους αντιπροσώπους της οικογένειας [109].

Η ριβονουκλεάση κ αποτελεί μια από τις πολλές υπό μελέτη ριβονουκλεάσες των οποίων ο ρόλος παραμένει άγνωστος. Σύμφωνα με μία πρόσφατη μελέτη στον *C.elegans*, καταστολή της έκφρασης του γονιδίου εμπλέκεται με μειωμένη διάρκεια ζωής των στελεχών. Ωστόσο, ο μοριακός μηχανισμός που οδήγησε σε αυτό τον φαινότυπο δεν έχει αποσαφηνιστεί [110].

Η μελλοντική διερεύνηση των φυσικών υποστρωμάτων, της τοπολογίας και των αλληλεπιδράσεων της συντηρημένης αυτής ριβονουκλεάσης με άλλα μόρια είναι πολύ

πιθανό να οδηγήσει στη συσχέτιση της με κάποιο από τα ήδη γνωστά βιολογικά μονοπάτια που περιλαμβάνουν ριβονουκλεολυτικές ενεργότητες σε συγκεκριμένες ενδοκυτταρικές διεργασίες.

1.3 Εναλλακτική συρραφή mRNA

1.3.1 Ο γενικός μηχανισμός απομάκρυνσης εσωνίων και συρραφής εξωνίων

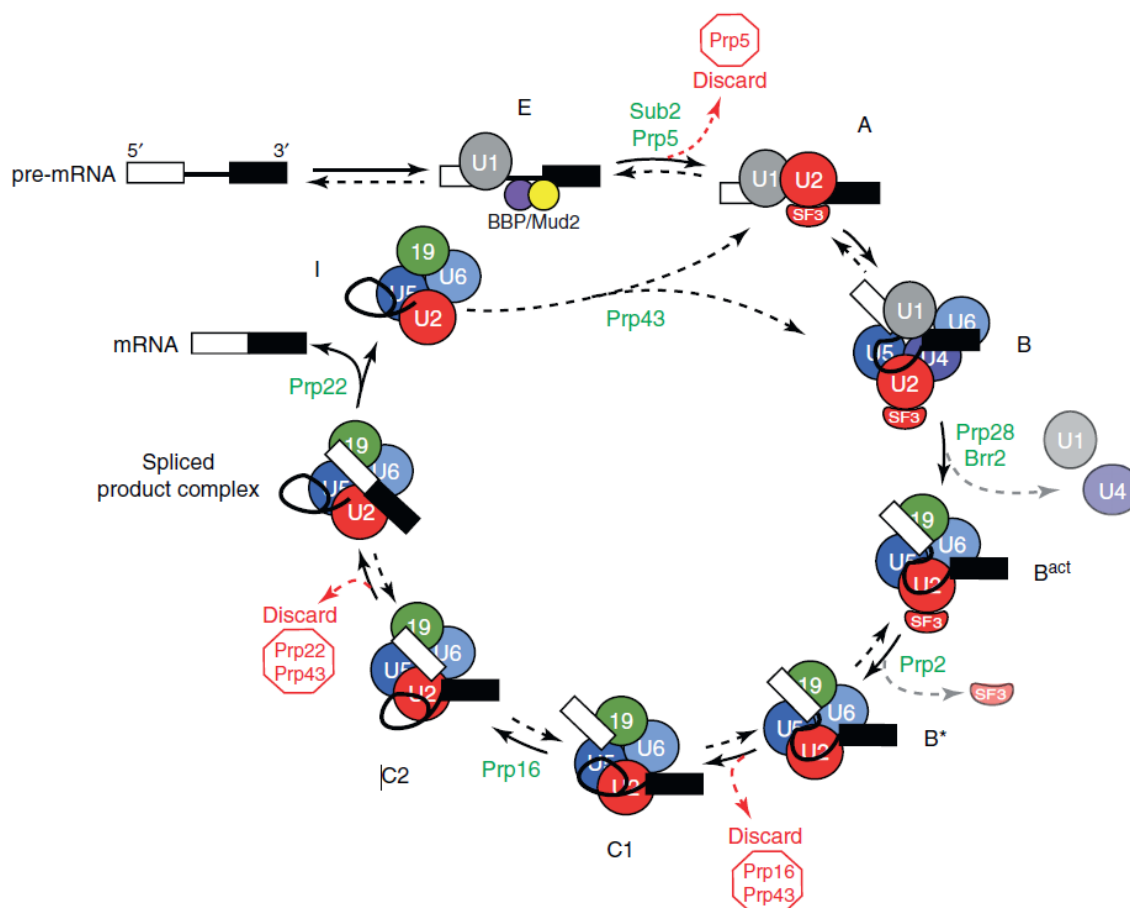
Η συντριπτική πλειοψηφία των γονιδίων των ανώτερων ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων περιλαμβάνει μη κωδικές, συνήθως μεγάλου μήκους αλληλουχίες, τα εσώνια, τα οποία απομακρύνονται για να επιτρέψουν στις κωδικές αλληλουχίες, τα εξώνια, να συρραφούν μεταξύ τους προκειμένου να οδηγήσουν στην παραγωγή λειτουργικών mRNAs. Ο όρος «συρραφή» (processing) χρησιμοποιείται καταχρηστικά για να περιγράψει τόσο τη διάσπαση και την απομάκρυνση εσωνίων όσο και τη σύνδεση των εξωνίων μεταξύ τους.

Η θέση και η αλληλουχία συγκεκριμένων *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων (νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του πρόδρομου RNA μορίου) συμβάλει ουσιαστικά στην οριοθέτηση των θέσεων συρραφής σε ένα τυπικό εσώνιο ανώτερου ευκαρυωτικού οργανισμού. Η απομάκρυνση των εσωνίων καταλύεται από το σωματίο συρραφής (spliceosome), ένα υπερμοριακό σύμπλεγμα που συνίσταται από τουλάχιστον 200 πρωτεΐνες και πέντε μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια (snRNPs), τα U1, U2, U4, U5 και U6.

Το σωματίο συρραφής ουσιαστικά συναρμολογείται σταδιακά επί του πρόδρομου μορίου mRNA, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 1.11. Τα μόρια pre-mRNAs ενσωματώνονται κατά τη διάρκεια της μεταγραφής στο σύμπλεγμα Η ταυτόχρονα με ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (hnRNPs). Κατά τη διαμόρφωση του συμπλέγματος Ε αναγνωρίζονται όλα τα ρυθμιστικά στοιχεία από αντίστοιχες πρωτεΐνες με υψηλή συγγένεια για τις αντίστοιχες περιοχές. Η πρωτεΐνη snRNP U1 αλληλεπιδρά με την 5' θέση ματίσματος, η SF1 (παράγοντας ματίσματος 1 – splicing factor 1) προσδένεται σε μία ειδική αλληλουχία στο 3' άκρο του εσωνίου (σημείο διακλάδωσης, branch point), ο παράγοντας U2AF (U2 υποβοηθητικός παράγοντας - U2 auxillary factor), ένα διμερές υπομονάδων μεγέθους 65 και 35 kDa προσδένεται σε μία περιοχή πλούσια σε πυριμιδίνες (polypyrimidine tract) και στην 3' θέση ματίσματος, ενώ οι SR πρωτεΐνες προσδένονται σε ESEs αλληλουχίες (αλληλουχίες – ενεργοποιητές ματίσματος -exon splicing enhancers) και αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες U2AF, U1 snRNP και τη θέση ματίσματος.

Το σύμπλοκο Ε ουσιαστικά στρατολογεί τη διαδικασία της ωρίμανσης, ωστόσο κινητικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η επανασύνδεση μεταξύ των θέσεων ματίσματος δεν πραγματοποιείται πριν τη στρατολόγηση του συμπλόκου Α. Από την άλλη, μελέτες

εναλλακτικού ματίσματος έδειξαν ότι η σύνδεση των άκρων μπορεί να συνοδεύεται από τη σύσταση του συμπλόκου B. Συνολικά, όλα τα σύμπλοκα E, A και B θεωρούνται πιθανά σημεία ρύθμισης της συρραφής. Η αντίδραση διάσπασης και συρραφής ουσιαστικά καταλύεται από το σύμπλοκο C και οδηγεί σε στερεοδιαταξικές αλλαγές του RNA μορίου [111].



Εικόνα 1.11: Σχηματική αναπαράσταση συναρμολόγησης και λειτουργίας του σωμάτιου συρραφής. Τα επιμέρους συμπλέγματα (E, A, B και άλλα) σημειώνονται σύμφωνα με την ονοματολογία που χρησιμοποιείται στον άνθρωπο. Η συναρμολόγηση ξεκινάει με πρόσδεση του U1 snRNP στο 5' άκρο του pre-mRNA και πρωτεϊνών (BBP και Mud2) στο σημείο διακλάδωσης (branch site) στο σύμπλοκο E (early complex). Σε μία ATP – εξαρτώμενη αντίδραση το U2 εκτοπίζει τους παράγοντες BBP/Mud2 και δεσμεύεται στο σημείο διακλάδωσης σχηματίζοντας στο σύμπλοκο A. Το B σύμπλοκο δημιουργείται με την προσθήκη των U4/U6.U5 tri-snRNP. Κατόπιν, για την ενεργοποίηση απαιτούνται περαιτέρω αναδιευθετήσεις: την αποχώρηση των U1 και U4 για να σχηματιστεί το B_{act} σύμπλοκο (γκρι βέλος), η προσθήκη του συμπλόκου Prp19 (19) και ο σχηματισμός της δομής με καταλυτική ενεργότητα από το pre-mRNA, τα U2 και U6 snRNAs σε συνδυασμό με την απομάκρυνση αρκετών πρωτεϊνών του U2 snRNP (SF3 σύμπλοκο) για το σχηματισμό του B* συμπλόκου. Το σύμπλοκο C1 σχηματίζεται μετά τη διάσπαση στο 5' άκρο. Για τη συρραφή των εξωνίων το σύμπλοκο συρραφής υφίσταται μία στερεοδιαταξική αλλαγή (σύμπλοκο C2) και μετά την ολοκλήρωση δύο χημικών σταδίων συρραφής το σύμπλοκο αποσυναρμολογείται και ανακυκλώνεται και τα συρραμμένα εξώνια απελευθερώνονται. Πολλά από τα στάδια του μονοπατιού επάγονται από την παρουσία DExD/H-box ATPασών (πράσινο) ορισμένες από τις οποίες εμπλέκονται στον έλεγχο και στην επαγωγή διαδικασιών απόρριψης (κόκκινο) που αποτρέπουν τελικά την ωρίμανση. Τα διπλά τόξα παρουσιάζουν στάδια που είναι αντιστρεπτά ενώ τα μονά τόξα μη αντιστρεπτές διαδικασίες [112].

1.3.2 Η εναλλακτική συρραφή ως πηγή ποικιλομορφίας

Η εναλλακτική συρραφή επιτρέπει την παραγωγή ώριμων μορίων RNA με διαφορετικές αλληλουχίες από ένα μόνο πρόδρομο μετάγραφο. Δεδομένα από αναλύσεις του ανθρώπινου μεταγραφώματος (ESTs, αναλύσεις μικροσυστοιχιών που εντοπίζουν γεγονότα ωρίμανσης και άλλες) έδειξαν ότι η εναλλακτική συρραφή αποτελεί αρκετά συχνό φαινόμενο στο ανθρώπινο γονιδίωμα που αφορά έως και το 90% των ανθρώπινων γονιδίων [113-115] ενώ για κάθε ανθρώπινο γονίδιο αντιστοιχούν κατά μέσο όρο 3,5 εναλλακτικές ισομορφές [116]. Η εναλλακτική συρραφή σε συνδυασμό με μηχανισμούς όπως η εναλλακτική έναρξη της μεταγραφής, η εναλλακτική πολυαδενυλίωση και η RNA επεξεργασία (RNA editing) μπορεί να δικαιολογήσει τη διαφορά μεταξύ του σχετικά μικρού αριθμού γονιδίων και του μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται σε ανώτερα ευκαρυωτικά γονιδιώματα [117].

Οι εναλλακτικές RNA ισομορφές μπορεί να έχουν διαφορετικούς βιολογικούς ρόλους κωδικοποιώντας πρωτεΐνες με διαφορετική λειτουργία [118], συνεπώς η ακριβής ρύθμιση της εναλλακτικής συρραφής είναι σημαντική για διάφορες βιολογικές διεργασίες. Για παράδειγμα, η ρυθμιστική πρωτεΐνη Nova συμμετέχει σε μηχανισμούς νευρο-ειδικής εναλλακτικής συρραφής γονιδίων που εμπλέκονται στην λειτουργία του νευρικού συστήματος [119]. Στη Δροσόφιλα, η εναλλακτική συρραφή στα προϊόντα του γονιδίου tra σηματοδοτεί την απαρχή ενός ρυθμιστικού μονοπατιού που οδηγεί στη φυλετική διαφοροποίηση του οργανισμού [120]. Επιπλέον, η εναλλακτική συρραφή λειτουργεί και ρυθμιστικά στο επίπεδο μετά τη μεταγραφή παράγοντας μετάγραφα-στόχους για μονοπάτια αποικοδόμησης (όπως το NMD που αναφέρθηκε νωρίτερα) [8,9]. Τέλος, αλλοιώσεις στους μηχανισμούς εναλλακτικής συρραφής έχουν συσχετισθεί με φαινόμενα καρκινογένεσης [121] και με άλλες παθολογικές καταστάσεις.

Όσο αναφορά τους τύπους γεγονότων εναλλακτικής συρραφής που έχουν αναφερθεί, στα Σπονδυλόζωα, η ενσωμάτωση ή παράλειψη ολόκληρων εξωνίων αποτελεί το πιο συχνό φαινόμενο [122] το οποίο έχει μελετηθεί επισταμένα ως προς την λειτουργία, την εξέλιξη και τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των αντίστοιχων εξωνίων. Ένας δεύτερος τύπος εναλλακτικής συρραφής που απαντά συχνά είναι η επιλογή δύο, ή περισσότερων σημείων εναλλακτικής συρραφής που στα ποντίκια και στον άνθρωπο αφορά το 25% των γεγονότων εναλλακτικής συρραφής [123] που απαντά εξίσου σε Σπονδυλόζωα, Ασπόνδυλα και φυτά [122].

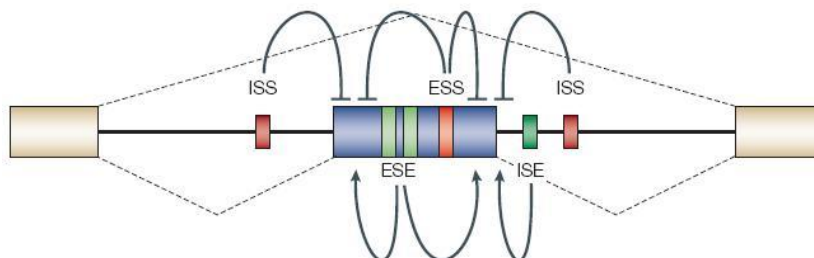
Ένα παράδειγμα που αποτυπώνει γλαφυρά την αύξηση του δυναμικού κωδικοποίησης χάρη σε μηχανισμούς εναλλακτικής συρραφής αφορά το γονίδιο *Dscam* γονίδιο στη *D.melanogaster*. Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί τη σύνθεση μιας πρωτεΐνης κυτταρικής επιφάνειας που εμπλέκεται στην καθοδήγηση του αναπτυσσόμενου νευράξονα κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου και οδηγεί στη σύνθεση 38.016 εναλλακτικών ισομορφών [113]. Μελέτες αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ισομορφών αυτών έδειξαν ότι υπάρχει έντονη προτίμηση για ομοφιλικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πανομοιότυπων ισομορφών. Η ικανότητα αυτή για διάκριση μεταξύ πανομοιότυπων και μη ισομορφών αποδεικνύεται ιδιαίτερα κρίσιμη για τη σωστή διαμόρφωση νευρωνικών κυκλωμάτων [124].

Μηχανισμός της εναλλακτικής συρραφής

Όπως συμβαίνει σε όλα τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης, έτσι και στην εναλλακτική συρραφή, η ρύθμιση περιλαμβάνει τόσο *cis* (αλληλουχίες στο πρόδρομο μόριο mRNA) όσο και *trans* στοιχεία (κυτταρικοί παράγοντες, RNA μόρια και πρωτεΐνες). Στις περισσότερες περιπτώσεις δεν είναι εύκολη η διάκριση των παραγόντων που εμπλέκονται σε γεγονότα «συμβατικής» από εκείνους που συμμετέχουν στην εναλλακτική συρραφή ενός δεδομένου πρόδρομου mRNA μορίου. Κάθε πιθανή θέση ματίσματος φέρει ένα «δυναμικό» διάσπασής της. Οι σχετικές δυνάμεις των θέσεων συρραφής καθορίζουν τη συχνότητα επιλογής ενός εξωνίου στα γεγονότα συρραφής, χωρίς ωστόσο δύο «ισχυρές» θέσεις συρραφής να εξασφαλίζουν με βεβαιότητα την ενσωμάτωση του εν λόγω εξωνίου στο ώριμο μετάγραφο. Το γεγονός αυτό είναι εμφανές στην περίπτωση των «ψευδοεξωνίων», αλληλουχιών που περιβάλλονται από θεωρητικά ισχυρές θέσεις συρραφής που ωστόσο δεν περιλαμβάνονται στο ώριμο μετάγραφο.

Στην περίπτωση της εναλλακτικής συρραφής, σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζουν υποβοηθητικά στοιχεία συρραφής που ποικίλλουν ως προς την αλληλουχία τους αλλά είναι σημαντικά στη διάκριση μεταξύ των ιδιοσυστατικών και των εναλλακτικών εξωνίων. Τα στοιχεία αυτά εμπίπτουν ανάλογα με την τοπολογία και το λειτουργικό τους ρόλο σε ενεργοποιητές και καταστολείς συρραφής εξωνίων (exon splicing enhancers και silencers ESEs και ESSs αντίστοιχα) καθώς και σε ενεργοποιητές και καταστολείς συρραφής εσωνίων (intron splicing enhancers και silencers ISEs και ISSs αντίστοιχα). Οι ενεργοποιητές μπορούν να ενεργοποιήσουν γειτονικές θέσεις συρραφής

και ανταγωνίζονται τους καταστολείς, ενώ οι καταστολείς μπορούν να καταστέλλουν θέσεις συρραφής εναντίον των ενεργοποιητών. Η ενσωμάτωση ή όχι εξωνίων καθορίζεται από την επίδραση των γειτονικών αλληλουχιών, και την παρουσία ή την απουσία συγκεκριμένων πρωτεϊνών που προσδένονται στο RNA που δρουν αντίστοιχα ως ενεργοποιητές ή ως καταστολείς όπως απεικονίζεται και στην εικόνα 1.12 που ακολουθεί.



Εικόνα 1.12: Ρυθμιστικές αλληλουχίες επάγουν ή καταστέλλουν την ενσωμάτωση αλληλουχιών στο τελικό προϊόν της συρραφής. ISS: Εσωτερικές αλληλουχίες καταστολής (internal sequences of silencing), ISE: Εσωτερικές αλληλουχίες επαγωγής (internal sequences of expression) ESE: Εξωτερικές αλληλουχίες επαγωγής (external sequences of expression) ESS: εξωτερικές αλληλουχίες καταστολής (external sequences of silencing) [111].

Κύριοι τύποι εναλλακτικής συρραφής

Η διαδικασία της εναλλακτικής συρραφής μπορεί να οδηγήσει στη σύνθεση μιας ποικιλίας ισομορφών μορίων mRNA αυξάνοντας έτσι την ετερογένεια των πληθυσμών που μπορούν να προκύψουν από ένα μόνο γονιδιακό προϊόν. Τα εξώνια – κασέτες είναι διακριτά εξώνια τα οποία μπορούν ανεξάρτητα να εμπεριέχονται ή όχι στο ώριμο μόριο mRNA όταν προκύπτουν τα αντίστοιχα γεγονότα εναλλακτικής συρραφής. Κατά το εναλλακτικό μάτισμα αμοιβαίου αποκλεισμού (mutually exclusive splicing) μόνο ένα από δύο εναλλακτικά εξώνια εμπεριέχεται κάθε φορά στο ώριμο μετάγραφο. Τέλος, Εναλλακτικές ισομορφές mRNA μπορεί να προκύψουν λόγω στρατολόγησης εναλλακτικών υποκινητών σε εσωτερικές θέσεις του γονιδίου ή λόγω εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης μηνυμάτων RNA. Στις περιπτώσεις όμως αυτές τα εναλλακτικά προϊόντα δεν προκύπτουν από μηχανισμούς ελέγχου στο επίπεδο της συρραφής [111].

1.3.3 Γενικά χαρακτηριστικά της εναλλακτικής συρραφής μικρής έκτασης

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι πολλά γεγονότα εναλλακτικής συρραφής πραγματοποιούνται με την χρήση εναλλακτικών σημείων συρραφής που βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους, δίνοντας mRNAs που διαφέρουν σε μερικά μόνο νουκλεοτίδια [2, 16-19]. Η εναλλακτική συρραφή αυτού του τύπου λέγεται «εναλλακτική συρραφή μικρής έκτασης» και στη διεθνή βιβλιογραφία αποδίδεται κυρίως με τον όρο "subtle alternative splicing".

Αν και η εναλλακτική συρραφή μικρής έκτασης παρατηρήθηκε πολύ σύντομα μετά την ανακάλυψη των εσωνίων, η συχνότητα του φαινομένου στα γονιδιώματα των οργανισμών εκτιμήθηκε μόλις πρόσφατα. *In silico* μελέτες EST αλληλουχιών έδειξαν ότι το 1/3 όλων των φαινομένων εναλλακτικής συρραφής αφορά ζεύγη που εντοπίζονται σε απόσταση 2-10 νουκλεοτιδίων μεταξύ τους [125]. Η εναλλακτική επιλογή 5' θέσης συρραφής εμφανίζεται δύο φορές πιο συχνά από την εναλλακτική επιλογή 3' θέσης [125-127]. Από όλα τα φαινόμενα εναλλακτικής επιλογής 3' θέσης τα Δ3 γεγονότα (η νουκλεοτιδική απόσταση μεταξύ δύο εναλλακτικών σημείων συρραφής συμβολίζεται με Δ) που ακολουθούν το μοτίβο NAGNAG (όπου N οποιοδήποτε ριβονουκλεοτίδιο) είναι τα πιο συχνά στα φυτά [127] και στα ζώα [124-126,128] με περισσότερες από 2000 αναφορές να αφορούν τον άνθρωπο [129]. Στην 5' θέση, τα Δ4 φαινόμενα είναι τα πιο συχνά [125,130,131] επειδή η αλληλουχία επιλογής εσωνίου GTRAGT (R=A,G) μπορεί να παράσχει ένα δεύτερο δινουκλεοτίδιο GT 4 νουκλεοτίδια αναροϊκά στο 40% των εσωνίων [131]. Η ακριβής ταυτοποίηση των γεγονότων εναλλακτικής συρραφής μικρής έκτασης από λάθη EST αλληλουχιών προϋποθέτει αυστηρή επιλογή έπειτα από στοιχίσεις γενωμικών αλληλουχιών με EST αλληλουχίες [128,132]. Η πειραματική επαλήθευση με χρήση RT-PCR έχει πραγματοποιηθεί σε 220 ταυτοποιημένες περιπτώσεις εναλλακτικής NAGNAG συρραφής [133] γεγονός που σημαίνει ότι αντίστοιχα φαινόμενα μπορούν γενικά να προβλεφθούν μέσω EST βάσεων δεδομένων.

Η συχνότητα εναλλακτικής συρραφής μειώνεται με την αύξηση της απόστασης μεταξύ των θέσεων συρραφής. Σε μικρές αποστάσεις, τα Δ4 και Δ5 γεγονότα είναι περισσότερα από τις περιπτώσεις Δ6 επιλογής αν και στις περισσότερες περιπτώσεις τα γεγονότα αυτά προκαλούν πλαισιοτροποποιητικές αλλαγές στα ώριμα mRNA μόρια και θεωρούνται στόχοι NMD μηχανισμών [125]. Η εναλλακτική συρραφή μικρής έκτασης συναντάται συχνά σε είδη όπου η εναλλακτική συρραφή αφθονεί και ιδιαίτερα στα Σπονδυλόζωα, στα Έντομα και στα φυτά [128,130,134]. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί ο *C.*

elegans όπου η NAGNAG εναλλακτική συρραφή θεωρείται πολύ σπάνια. Σε αυτή την περίπτωση, μία μόνο 5' θέση συρραφής επιλέγεται στα μοτίβα NAGNAG και μόνο 33 εναλλακτικές περιπτώσεις (που αφορούν ποσοστό μικρότερο του 1% των αντίστοιχων θέσεων) έχουν αναφερθεί [128,134]. Αυτό το γεγονός οφείλεται πιθανότατα στον μηχανισμό επιλογής 3' θέσης συρραφής, αφού στον *C. elegans* το διμερές του παράγοντα U2AF που συμμετέχει στην επιλογή του σημείου συρραφής δεσμεύεται αποκλειστικά στο μοτίβο UUUUCAG, και αποκλίσεις από αυτή την αλληλουχία δεν επιτρέπουν τη δέσμευση και εν συνεχεία την εναλλακτική διάσπαση, υπονοώντας ίσως έναν κρίσιμο ρόλο του παράγοντα U2AF στην εναλλακτική ωρίμανση μικρής έκτασης στις θέσεις NAGNAG [135]. Αντίθετα, Δ3 εναλλακτική συρραφή 5' θέσης παρατηρείται στον *C. elegans* σε συχνότητες αντίστοιχες άλλων ειδών [134].

Μία πρόσφατη βιοπληροφορική έρευνα μεγάλης κλίμακας εστιάστηκε στην ανάλυση EST δεδομένων από ανθρώπινους και από ιστούς ποντικού για τον εντοπισμό κοινών γεγονότων εναλλακτικής συρραφής μικρής έκτασης. Τα γεγονότα αυτά θεωρήθηκε ότι διατηρήθηκαν υπό την άσκηση εξελικτικής πίεσης και αξιολογήθηκαν ως προς το δυναμικό κωδικοποίησης πρωτεϊνικών ισομορφών. Η προσέγγιση αυτή οδήγησε στην περιγραφή 1849 ανθρώπινων και 733 μεταγράφων στο ποντίκι που χρησιμοποιούν εναλλακτικό κωδικόνιο έναρξης για την παραγωγή μιας τουλάχιστον εναλλακτικής πρωτεϊνικής ισομορφής. Μάλιστα, δεδομένα από ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας ταυτοποίησαν σε ορισμένες περιπτώσεις τη βιοσύνθεση αυτών των ισομορφών. Το γεγονός αυτό ανέδειξε για πρώτη φορά την ευρεία έκταση του φαινομένου εναλλακτικής συρραφής μικρής έκτασης, τόσο σε επίπεδο μεταγραφώματος, όσο και στο δυναμικό κωδικοποίησης νέων πρωτεϊνικών ισομορφών [136].

1.3.4 Μηχανισμός εναλλακτικής συρραφής μικρής έκτασης

Πειραματικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι οι ισομορφές mRNA που διαφέρουν μεταξύ τους σε μικρό αριθμό βάσεων οφείλονται σε εναλλακτική συρραφή περιορισμένης έκτασης. Η τροποποίηση μίας εκ των δύο θέσεων συρραφής σε επίπεδο DNA με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση [133,137,138] ή από την ύπαρξη πολυμορφισμών στις αντίστοιχες θέσεις [139-142] οδηγεί στην έλλειψη του αντίστοιχου εναλλακτικού μεταγράφου σε όλες τις περιπτώσεις που έχουν μελετηθεί. Το γεγονός αυτό αποκλείει την

πιθανότητα ενσωμάτωσης πολύ μικρών εξωνίων ή εναλλακτικών εξωνίων που ομοιάζουν πολύ μεταξύ τους να είναι κύρια αιτία γεγονότων εναλλακτικής συρραφής μικρής έκτασης.

Οι γειτονικές εναλλακτικές θέσεις συρραφής γενικά ομοιάζουν με φυσιολογικές θέσεις συρραφής ως προς την νουκλεοτιδική τους αλληλουχία. Συνεπώς και οι δύο θέσεις εξασφαλίζουν επαρκή συμπληρωματικότητα βάσεων του mRNA με το U1 μικρό πυρηνικό RNA (snRNA) και οι δύο θέσεις 5' αναγνώρισης φέρουν κυρίως YAG μοτίβα (όπου Y=C,T) που προτιμώνται από τον παράγοντα U2AF35 [125,134]. Για παράδειγμα, το 50% των 3' μοτίβων CAGCAG στον άνθρωπο αποτελούν θέσεις εναλλακτικής συρραφής [128]. Επιπλέον, πρακτικά και οι 16 πιθανοί συνδυασμοί NAGNAG μοτίβων επιτρέπουν την εναλλακτική συρραφή εκτός από αυτούς που φέρουν GAG θέσεις [128,139], γεγονός που συμφωνεί με την παρατήρηση ότι οι GAG αλληλουχίες δεν αποτελούν αποδοτικά σημεία συρραφής [143]. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι η δυνατότητα εναλλακτικής συρραφής σε αντίστοιχες θέσεις αποδίδεται σε ενδογενείς ιδιότητες του σωματίου συρραφής (spliceosome).

Από *in silico* αναλύσεις έχει γίνει γνωστό ότι η NAG αλληλουχία καθώς και οι αλληλουχίες που την περιβάλλουν είναι τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά που επιτρέπουν την επιλογή θέσεων εναλλακτικής συρραφής σε NAGNAG 3' θέσεις επιλογής [127]. Τα χαρακτηριστικά που προκύπτουν από τις γειτονικές αλληλουχίες όπως η ικανότητα δέσμευσης των αντίστοιχων πρωτεϊνικών παραγόντων επηρεάζουν την επιλογή θέσης συρραφής. Στην περίπτωση των NAGNAG θέσεων έχει προταθεί ότι ο λόγος των επιπέδων έκφρασης που προκύπτει μεταξύ των δύο ισομορφών εξαρτάται και από την νουκλεοτιδική αλληλουχία του εσωνίου μεταξύ του σημείου εκτομής και της θέσης συρραφής [139].

Η εναλλακτική συρραφή είναι μια λεπτά ρυθμιζόμενη διαδικασία που επιτρέπει την έκφραση ενός μεταγράφου σε συγκεκριμένους ιστούς ή αναπτυξιακά στάδια. Για παράδειγμα, η εναλλακτική συρραφή στο προϊόν του γονιδίου *tra* στη Δροσόφιλα ελέγχεται με τρόπο φυλο-ειδικό [120]. Πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι ο λόγος μεταξύ δύο εναλλακτικών μεταγράφων με μικρές διαφορές μπορεί να ποικίλλει μεταξύ διαφόρων ιστών [128], αναπτυξιακών σταδίων [144] ή σε απόκριση περιβαλλοντικών ερεθισμάτων [145]. Πρωτεϊνικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην ωρίμανση όπως οι SR (πρωτεΐνες πλούσιες σε σερίνη και αργινίνη) και οι hnRNPs ρυθμίζουν την εναλλακτική συρραφή [111] και φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στην εναλλακτική συρραφή μικρής έκτασης ευνοώντας την νουκλεοτιδική θέση διάσπασης. Αν και η μικρή απόσταση

μεταξύ των εναλλακτικών θέσεων διάσπασης δεν φαίνεται να επιτρέπει την ύπαρξη ρυθμιστικών αλληλουχιών ενδιάμεσα [146], οι αναρροϊκές και καταρροϊκές αλληλουχίες των θέσεων διάσπασης μπορεί να περιλαμβάνουν πιθανές θέσεις δέσμευσης ρυθμιστικών πρωτεϊνών, όπως έχει δειχθεί στην περίπτωση εναλλακτικών Δ3 θέσεων. Δεδομένου ότι η θέση διάσπασης του πρόδρομου mRNA στο 3' άκρο καθορίζεται στο δεύτερο βήμα της συρραφής, η συγκέντρωση των παραγόντων που εμπλέκονται στο βήμα αυτό μπορεί να επηρεάζει το λόγο έκφρασης εναλλακτικών ισομορφών, όπως έχει δειχθεί στην περίπτωση του hSlu7 [147]. Ωστόσο, οι λεπτομέρειες των αντίστοιχων μηχανισμών δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί. Σε άλλες, πειραματικά επιβεβαιωμένες περιπτώσεις η αναλογία των επιπέδων έκφρασης των εναλλακτικών μεταγράφων σε ιστούς, αναπτυξιακά στάδια, παθολογικές καταστάσεις ή ως απόκριση σε ερεθίσματα παραμένει σταθερός [137]. Για παράδειγμα, τα τέσσερα εναλλακτικά μεταγράφα του *ING4* (inhibitor of growth family 4) που προκύπτουν από Δ9 και Δ3 εναλλακτικές 5' θέσεις ματίσματος διατηρούν σταθερή αναλογία σε διάφορους ιστούς και κυτταρικές σειρές που δεν επηρεάζεται από την έλλειψη ορού, βλάβες στο DNA ή υπερέκφραση των παραγόντων SF2 και ASF [137]. Όμοια, η αναλογία των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου *WT1* (Wilms tumor 1) στο ποντίκι παραμένει σταθερή σε ιστούς, κυτταρικές σειρές και αναπτυξιακά στάδια [138].

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη διατήρηση σταθερής αναλογίας μεταξύ των εναλλακτικών μεταγράφων δεν έχουν διαλευκανθεί. Το μοντέλο ανταγωνισμού θέσεων συρραφής προτείνει ότι οι δύο πιθανές θέσεις 5' συρραφής ανταγωνίζονται για τηνδέσμευση του U1 snRNA και οι θέσεις 3' συρραφής για τη δέσμευση του U2AF35. Αν όντως οι παράγοντες αυτοί είναι κρίσιμοι για την εναλλακτική ωρίμανση μικρής έκτασης, μπορεί να αιτιολογηθεί η σταθερότητα των επιπέδων έκφρασης δεδομένου ότι εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια. Το παραπάνω μοντέλο στηρίζεται από το συμπέρασμα ότι η θέση συρραφής με τη μεγαλύτερη συγγένεια ως προς τους ρυθμιστικούς παράγοντες γενικά υπερισχύει [148].

Στις περιπτώσεις των NAGNAG θέσεων συρραφής, η επιλογή θέσης ματίσματος επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης κάθε ισομορφής [127], γεγονός που έχει επαληθευθεί στην περίπτωση των γονιδίων *MLLT4* (myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia) [141] και *ING4* [141]. Ωστόσο δεν αποκλείεται η επιλογή των θέσεων συρραφής να πραγματοποιείται από τα κύρια συστατικά του σωματίου συρραφής ακολουθώντας έναν απλό μηχανισμό για την παραγωγή σταθερών επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων.

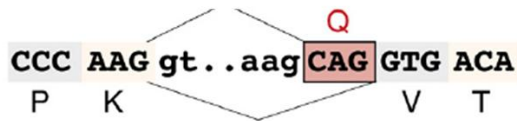
Σύμφωνα ωστόσο με το μοντέλο αυτό, δεν μπορούν να αιτιολογηθούν οι διαφορές στα επίπεδα έκφρασης που έχουν παρατηρηθεί σε συγκεκριμένους ιστούς ή αναπτυξιακά στάδια συνεπώς θεωρείται απίθανο να μην συμμετέχουν και ρυθμιστικοί παράγοντες τουλάχιστο σε ορισμένες περιπτώσεις.

1.3.5 Λειτουργικές συνέπειες γεγονότων εναλλακτικής συρραφής μικρής έκτασης

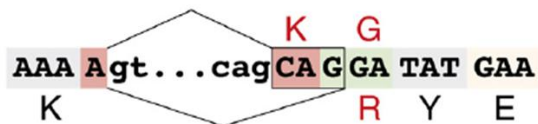
Οι επιπτώσεις των γεγονότων εναλλακτικής συρραφής στην πρωτεϊνική αλληλουχία του προϊόντος της μετάφρασης εξαρτάται από το αν η εναλλακτική συρραφή προκαλεί αλλαγή στο πλαίσιο ανάγνωσης ($\Delta 2$, 4, 5, 7, 8 κλπ) ή όχι ($\Delta 3$, 6, 9, κλπ) (εικόνα 1.13). Οι πλαισιοτροποποιητικές αλλαγές έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην πρωτεϊνική λειτουργία επειδή δημιουργούν μόρια με διαφορετικό καρβοξυτελικό άκρο ή προκαλούν αποικοδόμηση του mRNA μέσω NMD λόγω πρόωρου κωδικονίου λήξης [125,127,131]. Αντίθετα, οι συνέπειες στην περίπτωση διατήρησης του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης είναι συνήθως μικρές αφού στις περισσότερες περιπτώσεις προστίθενται ή αφαιρούνται λίγα μόνο αμινοξέα αν και έχει αναφερθεί και η αντικατάσταση ενός ολιγοπεπτιδίου από ένα αμινοξύ. Τα φαινόμενα αυτά αυξάνουν το δυναμικό κωδικοποίησης πολλών γονιδίων [142] εφόσον αρκετές πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η εναλλακτική συρραφή περιορισμένης έκτασης μπορεί να δώσει πρωτεϊνικές ισομορφές με διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες που ποικίλλουν από διαφορετική ικανότητα δέσμευσης της πρωτεΐνης σε DNA ή RNA, διαφορετική κυτταρική τοπολογία ή διαφορετική συγγένεια σε ουσίες όπως έχει αναφερθεί σε πρωτεΐνες – μεταφορείς.

Για παράδειγμα, οι τέσσερις εναλλακτικές πρωτεϊνικές ισομορφές του ING4 διαφέρουν σε διάφορες λειτουργικές ιδιότητές τους όπως είναι η ικανότητα δέσμευσης και ενεργοποίησης της μεταγραφής, καταστολής της κυτταρικής ανάπτυξης και ρύθμισης της κυτταρικής μετανάστευσης. Επιπλέον, αυτά τα γεγονότα εναλλακτικής συρραφής επηρεάζουν την ύπαρξη σήματος πυρηνικού εντοπισμού συνεπώς τα αντίστοιχα μετάγραφα κωδικοποιούν πρωτεΐνες με διαφορετικό κυτταρικό εντοπισμό. Τα γεγονότα αυτά φαίνεται να είναι συντηρημένα αφού οι αντίστοιχες mRNA ισομορφές φαίνεται να εκφράζονται και σε άλλα θηλαστικά [142].

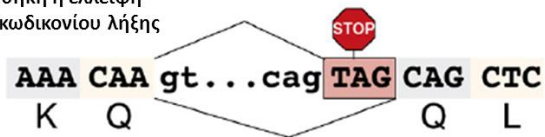
A. Διατήρηση του πλαισίου ανάγνωσης
($\Delta 3, 6, 9\dots$)



Προσθήκη ή έλλειψη μερικών αμινοξέων

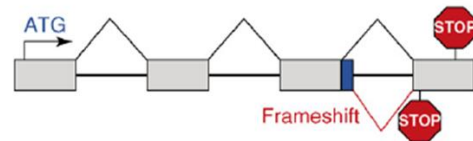


Προσθήκη ή έλλειψη
ενός κωδικονίου λήξης

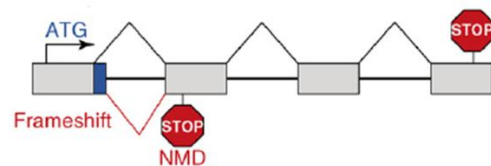


B. Αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης ($\Delta 2, 4, 5\dots$)

Τροποποίηση του -C άκρου



Αποικοδόμηση μέσω μηχανισμού NMD



Εικόνα 1.13: Επιπτώσεις της εναλλακτικής συρραφής μικρής έκτασης στα πρωτεϊνικά προϊόντα. Αναλόγως της απόστασης μεταξύ των εναλλακτικών θέσεων συρραφής διακρίνονται περιπτώσεις που **(A)** διατηρούν το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης και **(B)** τροποποιούν το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Οι συνηθέστερες περιπτώσεις διατήρησης του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης αφορούν NAGNAG θέσεις συρραφής που οδηγούν στην προσθήκη ή την έλλειψη ενός ή λίγων μόνο αμινοξέων. Τα πλαίσιοτροποποιητικά φαινόμενα συρραφής μπορεί να κωδικοποιούν τη σύνθεση πρωτεϊνικών ισομορφών με διαφορετικό καρβοξυτελικό άκρο ή τη σύνθεση mRNAs με πρόωρο κωδικόνιο λήξης καταρροϊκά του σημείου συρραφής που οδηγείται προς NMD αποικοδόμηση.

Στην περίπτωση του μεταγραφικού παράγοντα WT1, ένα $\Delta 9$ φαινόμενο εναλλακτικής συρραφής ευθύνεται για την παραγωγή μίας ισομορφής που υπολείπεται της αλληλουχίας Lys-Thr-Ser (KTS) η οποία προβλέπεται ότι είναι συντηρημένη στα Σπονδυλόζωα [138]. Οι δύο ισομορφές διαφέρουν ως προς την ικανότητα δέσμευσης DNA και RNA, ρύθμισης της μεταγραφής και τοπολογίας στον πυρήνα [149]. Στο γονίδιο *EDA* (ectodysplasin A) η προσθήκη ή έλλειψη δύο αμινοξέων προκαλείται από ένα $\Delta 6$ γεγονός και οι αντίστοιχες πρωτεϊνικές ισομορφές παρουσιάζουν διαφορετική συγγένεια ως προς συνδέτες οδηγώντας σε διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης [144].

Η μοναδική πλαίσιοτροποποιητική αλλαγή που οδηγεί στην κωδικοποίηση πρωτεΐνης που έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα είναι μία $\Delta 4$ έλλειψη στο 3' σημείο συρραφής του μεταγραφικού παράγοντα rou5f1 στο Zebrafish [150] που οδηγεί στη σύνθεση ενός ενεργού μεταγραφικού παράγοντα με πρόωρο κωδικόνιο λήξης.

Αντίθετα, σε αρκετές περιπτώσεις πρωτεϊνικών ισομορφών που προκύπτουν από εναλλακτική συρραφή μικρής έκτασης δεν έχει αποδειχθεί κάποια διαφοροποίηση των βιολογικών τους ιδιοτήτων γεγονός που μπορεί να ερμηνεύεται από τη μικρή διαφοροποίηση της αμινοξικής αλληλουχίας που δεν επηρεάζει τις λειτουργικές ιδιότητες της πρωτεΐνης. Γενικότερα, έχει επίσης αναφερθεί ότι η εναλλακτική συρραφή μικρής έκτασης επηρεάζει και την 5' αμετάφραση περιοχή μηνυμάτων RNA, τροποποιώντας τη σταθερότητά τους και την απόδοση της μετάφρασής τους [151].

Η εναλλακτική συρραφή μικρής έκτασης μπορεί να εμπλέκεται και στην εκδήλωση ασθενειών. Στην περίπτωση του ανθρώπινου γονιδίου *WT1*, μεταλλάξεις που δεν επιτρέπουν τη σωστή οριοθέτηση του 5' σημείου εκτομής του πρώτου εσωνίου τροποποιούν την αυστηρά καθορισμένη αναλογία των ισομορφών +KTS/-KTS, γεγονός που συσχετίζεται με το σύνδρομο Frasier που εκδηλώνεται με μη ομαλή φυλετική διαφοροποίηση. Στην περίπτωση του γονιδίου *ABCA4* η διαφοροποίηση της αλληλουχίας TAGGAG σε TAGCAG που επηρεάζει την επιλογή της θέσης συρραφής έχει μεγάλη συχνότητα σε ασθενής με σύνδρομο Stargardt 1 [152]. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η συχνότητα εναλλακτικής συρραφής μικρής έκτασης εμφανίζεται αυξημένη σε καρκινικούς ιστούς όπου η συχνότητα εναλλακτικής έλλειψης εξωνίου μειώνεται [153].

1.3.6 Εξελικτικές διαστάσεις της εναλλακτικής συρραφής μικρής έκτασης

Αν και σε ορισμένες περιπτώσεις τα φαινόμενα εναλλακτικής συρραφής μπορεί να έχουν μικρές ή και μηδενικές συνέπειες στην λειτουργία του μεταγράφου και της πρωτεΐνης συνεπώς είναι ανεκτά από το κύτταρο, άλλα γεγονότα μπορεί να έχουν σοβαρό αντίκτυπο συνεπώς να μην είναι ανεκτά από τη φυσική επιλογή. Σε συμφωνία με την θεωρία αυτή, τα Δ3 γεγονότα εκλείπουν από περιοχές που κωδικοποιούν τη σύνθεση πρωτεϊνών σε σύγκριση με αμετάφραστες περιοχές [127]. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην αρνητική επιλογή μεταλλάξεων που δημιουργούν NAGNAG μοτίβα που ευνοούν τέτοια φαινόμενα εναλλακτικής ωρίμανσης μικρής έκτασης. Πράγματι, περίπου το 60% αυτών των μεταλλάξεων θεωρείται ότι δεν είναι ανεκτά στις κωδικές περιοχές [127] υπονοώντας ότι ακόμα και η προσθήκη ή έλλειψη ενός μόνο αμινοξέος μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες για την λειτουργία της πρωτεΐνης. Επιπλέον, η δύναμη επιλογής στην κωδική περιοχή δεν είναι όμοια σε όλη της την έκταση εφόσον οι περιοχές που πτυχώνονται σε συγκεκριμένη τριτοταγή δομή απαγορεύουν την ενσωμάτωση αλλαγών. Το γεγονός αυτό

συμφωνεί επίσης με την παρατήρηση ότι τα φαινόμενα εναλλακτικής συρραφής μικρής έκτασης συνήθως αφορούν αμινοξικές θέσεις που εντοπίζονται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και όχι σε σημεία που συμμετέχουν σε διαμορφώσεις α-έλικας ή β-πτυχωτής επιφάνειας. Τέλος, στις περισσότερες περιπτώσεις έχουμε προσθήκη ή έλλειψη ενός μόνο αμινοξέος [128], γεγονός που δικαιολογείται από το ότι η διαφοροποίηση σε μεγαλύτερο αριθμό συνήθως έχει μεγαλύτερες συνέπειες για το πρωτεϊνικό προϊόν.

Δύο κύριοι μηχανισμοί μπορούν να εξηγήσουν την εμφάνιση μιας νέας θέσης εναλλακτικής συρραφής μικρής έκτασης. Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει την εμφάνιση μιας νέας θέσης γειτονικά στα όρια ενός προϋπάρχοντος εξωνίου [148]. Για παράδειγμα, μια μόνο νουκλεοτιδική αλλαγή μπορεί να οδηγήσει σε μία θέση NAGNAG που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θέση εναλλακτικής συρραφής [142]. Συχνά, η προγονική θέση συρραφής παραμένει η προτεινόμενη, είτε επειδή η εξελικτική πίεση που διατήρησε την αρχική θέση έχει σημασία για την παραγόμενη πρωτεϊνική ισομορφή είτε επειδή η νέα θέση συρραφής δεν είναι βέλτιστη για την αποδοτική ωρίμανση του μεταγράφου [148]. Εάν η νέα θέση συρραφής εντοπίζεται στο εσώνιο, η περιοχή που προστίθεται στο εναλλακτικό εξώνιο προκαλεί ταχεία διαφοροποίηση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας στον εξελικτικό χρόνο [148]. Το φαινόμενο αυτό είναι σε συμφωνία με την άποψη ότι η εναλλακτική συρραφή επιτρέπει την ουδέτερη ή κατευθυνόμενη εξέλιξη, επιτρέποντας στο εναλλακτικό προϊόν να επιτελέσει μία νέα λειτουργία [154]. Ο δεύτερος μηχανισμός δεν περιλαμβάνει την άμεση δημιουργία εναλλακτικών θέσεων συρραφής. Σε αυτή την περίπτωση, υπάρχουσες θέσεις λειτουργούν ως θέσεις συρραφής έπειτα από μεταλλάξεις γειτονικών θέσεων που ενισχύουν την ικανότητά τους να λειτουργήσουν ως σημεία συρραφής. Σε φυσιολογικά άτομα, οι θέσεις αυτές που ονομάζονται κρυπτικές δεν χρησιμοποιούνται [155] αλλά αποτελούν πηγή πιθανής μελλοντικής διαφοροποίησης στο πρότυπο συρραφής του γονιδίου.

1.4 Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της έκφρασης της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ και πιθανών ισομορφών της σε διάφορους ιστούς. Στα πλαίσια της μελέτης αυτής εντοπίστηκε μια νέα ισομορφή, η RNάση κ-02. Έτσι, οι ερευνητικές μας προσπάθειες εστιάστηκαν:

- Στον εντοπισμό, στην απομόνωση και στον μοριακό χαρακτηρισμό του μεταγράφου της εναλλακτικής ισομορφής της RNάσης κ-02.
- Στο βιοχημικό χαρακτηρισμό της RNάσης κ-02 έπειτα από ετερόλογη έκφραση στο σύστημα του ζυμομύκητα *Pichia pastoris*, χρωματογραφικό καθαρισμό και προσδιορισμό των λειτουργικών της ιδιοτήτων.
- Στην παραγωγή ενός ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της ανθρώπινης RNάσης κ-02.
- Στη συγκριτική μελέτη της έκφρασης των δύο ισομορφών της ανθρώπινης RNάσης κ σε επίπεδο mRNA.
- Στη μελέτη της έκφρασης της πρωτεϊνικής ισομορφής της RNάσης κ-02 σε ανθρώπινα κύτταρα.
- Στον προσδιορισμό της υποκυτταρικής κατανομής της ανθρώπινης RNάσης κ-02 σε ανθρώπινα κύτταρα.

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Χημικές ουσίες

Τα περιοριστικά ένζυμα καθώς και η T₄ πολυνουκλεοτιδική κινάση αγοράστηκαν από την εταιρεία New England Biolabs. Η ριβονουκλεάση T₁ καθώς και όλοι οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν προϊόντα της εταιρείας Sigma-Aldrich. Από την ίδια εταιρεία αγοράστηκαν όλες οι χημικές ουσίες για την παρασκευή θρεπτικών υλικών. Το αντιβιοτικό Zeocin ήταν προϊόν της εταιρείας Invitrogen. Οι πρωτεΐνες-πρότυπα μοριακών βαρών αγοράστηκαν από την εταιρεία Fermentas Life Sciences. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αγοράστηκε από την εταιρεία Macherey-Nagel. Όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και αγοράστηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich, AppliChem, Serva και Merck.

Ραδιενεργές ουσίες

Για τη σήμανση του ιχνηθέτη για την ανάλυση κατά Northern χρησιμοποιήθηκε [α -³²P] dCTP:

- Ειδική ενεργότητα: 4500 Ci/mmol
- HPLC purified
- Εταιρεία: Izotop. Ltd (Obninsk, Russia)

Για τη σήμανση των ολιγονουκλεοτιδίων κατά την ενζυμική μελέτη της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 χρησιμοποιήθηκε [γ -³²P] dATP:

- Ειδική ενεργότητα: 3000 Ci / mmol
- HPLC purified
- Εταιρεία: Izotop.Ltd (Obninsk, Russia)

Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια

Η σύνθεση όλων των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία VBC-Genomics.

2.1.2 Αντισώματα

Κατά τον ανοσολογικό εντοπισμό της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ τόσο κατά τη μέθοδο ημίστεγνης ανοσοσύτωσης όσο και κατά τη μέθοδο Dot Blot, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα πολυκλωνικά αντισώματα:

Αντίσωμα anti-AVLI

Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του δεκαπενταπτιδίου AVLIEDVPFTEKDFE (AVLI) της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-01. Τα αντισώματα αυτά προέκυψαν από ανοσοποίηση κοτόπουλων τύπου Rhode Island Red και περιλαμβάνουν αποκλειστικά ανοσοσφαιρίνες τύπου IgY (IgYolk). Η ανοσοποίηση των ζώων, η συλλογή των αυγών και η εξαγωγή των κρόκων έγινε στα εργαστήρια της εταιρείας Sigma Genosys. Η απομόνωση των αντισωμάτων από τους κρόκους, ο καθαρισμός και η περαιτέρω επεξεργασία τους έλαβε χώρα στο εργαστήριο μας κατά την εργασία της διδάκτορα Μαριάννας Κυρίτση [2].

Αντίσωμα Anti-Chicken IgG συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση

Ανοσοκαθαρισμένο πολυκλωνικό αντίσωμα τύπου IgG έναντι της σταθερής περιοχής των ανοσοσφαιρινών IgY του κοτόπουλου. Το αντίσωμα αυτό είναι προϊόν της εταιρείας Sigma-Aldrich.

Αντίσωμα Anti-Rabbit IgG συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση

Ανοσοκαθαρισμένο πολυκλωνικό αντίσωμα τύπου IgG έναντι της σταθερής περιοχής των ανοσοσφαιρινών IgG του κουνελιού. Το αντίσωμα αυτό είναι προϊόν της εταιρείας Sigma-Aldrich.

Αντίσωμα κ-02N

Ανοσοκαθαρισμένο πολυκλωνικό αντίσωμα τύπου IgG έναντι της αμινοτελικής περιοχής της ανθρώπινης RNάσης κ-02. Η διαδικασία παρασκευής του που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.12.

2.1.3 Κυτταρικά στελέχη

Βακτηριακό στέλεχος DH5a

Το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση όλων των πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν κατά τη διεξαγωγή της παρούσας διατριβής. Τα κύτταρα του στελέχους αυτού χρησιμοποιούνται ευρέως για την κλωνοποίηση πλασμιδίων, καθώς χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα υψηλές αποδόσεις μετασηματισμού, ενώ στο εισαχθέν DNA λαμβάνουν χώρα ελάχιστα γεγονότα ανασυνδυασμού. Ο γονότυπος του στελέχους είναι: endA1, hsdR17($r_K^m_K^+$), supE44, thi-1, recA1, gyrA (Na^r), Δ (lacIZYA-argF)U169, φ80(dlac Δ (lacZ)M15).

Βακτηριακό στέλεχος ER2566

Το στέλεχος αυτό παρέχεται για την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών το γονίδιο των οποίων είναι κλωνοποιημένο σε φορέα pTYB στα πλαίσια του συστήματος IMPACT-CN® (New England BioLabs). Τα κύτταρα αυτά φέρουν ένα χρωμοσωμικό αντίγραφο του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης ενσωματωμένο στο γονίδιο lacZ και επομένως κάτω από τον έλεγχο του lac υποκινητή. Απουσία επαγωγής με IPTG, η έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης καταστέλλεται καθώς ο καταστολέας lacI προσδένεται στον lac υποκινητή. Το στέλεχος στερείται των γονιδίων των πρωτεασών lon και ompT. Ο γονότυπός του είναι ο ακόλουθος : F- λ- fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm].

Στέλεχος ζυμομύκητα *Pichia pastoris* GS115

Για την έκφραση της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 στο ευκαρυωτικό σύστημα του μεθυλότροφου ζυμομύκητα *Pichia pastoris* χρησιμοποιήθηκε το μεθυλότροφο κυτταρικό στέλεχος GS115. Το πρώτο βήμα κατά το μεταβολισμό της μεθανόλης από τα κύτταρα του ζυμομύκητα είναι η οξείδωση της προς φορμαλδεΰδη από την αλκοολική οξειδάση, η οποία κωδικοποιείται από τα γονίδια AOX1 (Alcohol Oxidase 1) και AOX2 (Alcohol Oxidase 2). Η πλειονότητα της ενζυμικής ενεργότητας στο κύτταρο αποδίδεται στην έκφραση του AOX1 και για το λόγο αυτό ο ισχυρός υποκινητής του χρησιμοποιείται για την ετερόλογη έκφραση των πρωτεϊνών.

Στο ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης του *P.pastoris* υπάρχουν διαθέσιμοι δύο διαφορετικοί τύποι κυτταρικών στελεχών. Ο πρώτος τύπος είναι τύπος Mut⁺, εκμεταλλεύεται τον AOX1 υποκινητή και αναπτύσσεται γρήγορα παρουσία μεθανόλης. Ο δεύτερος τύπος ή τύπος Mut^s, λόγω μετάλλαξης ή διακοπής του AOX1 υποκινητή, βασίζεται αποκλειστικά στη λειτουργία του AOX2 γονιδίου και αναπτύσσεται με αργό ρυθμό παρουσία μεθανόλης (Methanol utilization slow). Και στις δύο περιπτώσεις το επιθυμητό γονίδιο βρίσκεται υπό τον έλεγχο του φυσικού τύπου AOX1 υποκινητή. Η επιλογή Mut⁺ ή Mut^s στελεχών είναι καθαρά εμπειρική και εξαρτάται από την παραγόμενη πρωτεΐνη. Το στέλεχος GS115 που χρησιμοποιήθηκε ανήκει στην κατηγορία Mut⁺ ενώ είναι ταυτόχρονα αυξοτροφικό στην ιστιδίνη καθώς φέρει μετάλλαξη στο γονίδιο αφυδρογονάσης της ιστιδινόλης.

Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή καλλιεργήθηκαν οι ακόλουθες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές: BT-20 (κυτταρική σειρά αδenoκαρκινώματος στήθους), AGS (γαστρικό αδenoκαρκίνωμα), DU145 (προστατικό καρκίνωμα), HeLa (καρκίνωμα τραχήλου της μήτρας), SKOV-3 (καρκίνωμα ωοθήκης), HEK-293 (κυτταρική σειρά από εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα), U251 (γλοίωμα), Jurkatt (αθανατοποιημένα T-λεμφοκύτταρα), SH-SY5Y (νευροβλάστωμα), Caco-2 (επιθηλιακό αδenoκαρκίνωμα ορθού), BL41 (B-λέμφωμα) και FM3 (μελάνωμα), HT-29 (επιθηλιακό αδenoκαρκίνωμα ορθού) και ES-2 (καρκίνωμα ωοθήκης).

2.1.4 Θρεπτικά υλικά

Θρεπτικά υλικά βακτηριακών καλλιεργειών

ΔΙΑΛΥΜΑ LB

NaCl	1%	w/v
Εκχύλισμα ζύμης	0,5%	w/v
Πεπτόνη	1%	w/v

Ρύθμιση του pH στο 7,5 με NaOH

ΔΙΑΛΥΜΑ Low salt LB

Το διάλυμα Low salt LB έχει την ίδια σύσταση με το διάλυμα LB με τη διαφορά ότι η συγκέντρωση του NaCl είναι 0,5% w/v και χρησιμοποιείται όταν ως αντιβιοτικό προστίθεται ζεοσίνη, καθώς η τελευταία είναι ασταθής σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος.

ΔΙΑΛΥΜΑ SOC

Πεπτόνη	2%	w/v
Εκχύλισμα ζύμης	0,5%	w/v
NaCl	0,05%	w/v
250 mM KCl	1%	v/v
1 M Γλυκόζη	2%	v/v

Ρύθμιση του pH στο 7 με NaOH

Θρεπτικά υλικά καλλιιεργειών του ζυμομύκητα *Pichia pastoris***ΔΙΑΛΥΜΑ YPD**

Εκχύλισμα ζύμης	1%	w/v
Πεπτόνη	2%	w/v
Γλυκόζη	2%	w/v

ΔΙΑΛΥΜΑ YPDS

Εκχύλισμα ζύμης	1%	w/v
Πεπτόνη	2%	w/v
Γλυκόζη	2%	w/v
Σορβιτόλη	1	M

ΔΙΑΛΥΜΑ BMGY

Εκχύλισμα ζύμης	1%	w/v
Πεπτόνη	2%	w/v
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου pH 6,0	100	mM
YNB	1,34%	w/v
Βιοτίνη	$4 \times 10^{-5}\%$	w/v
Γλυκερόλη	1%	v/v

ΔΙΑΛΥΜΑ BMM

Το διάλυμα BMMY έχει ακριβώς την ίδια σύσταση με το BMGY με τη διαφορά ότι περιέχει 0,5% v/v μεθανόλη αντί για 1% v/v γλυκερόλη.

Θρεπτικό υλικό ανάπτυξης ανθρώπινων κυττάρων:

FBS (Fetal Bovine Serum) 10% v/v, Πενικιλίνη 10.0000 U/mL / Στρεπτομυκίνη 10 mg/mL
1% v/v, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 89% v/v

2.1.5 Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline):

NaCl 0.8% w/v, KCl 0.024% w/v, K₂HPO₄ 0.02% w/v, NaHPO₄•2H₂O 0.18% w/v

Διάλυμα TBE:

45 mM Tris, 45 mM Βορικό οξύ, 10 mM EDTA, pH 8.0

Διάλυμα NBT:

NBT 5% w/v, DMF 70% v/v, H₂O 30% v/v

Διάλυμα BCIP:

BCIP 5% w/v, DMF 100% v/v

2.1.6 Ολιγονουκλεοτίδια – Μόρια εκκινητές

Η σύνθεση όλων των ολιγονουκλεοτιδίων και μορίων-εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία VBC-Genomics. Το σύνολο των μορίων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή περιγράφονται στον πίνακα 2.1 που ακολουθεί.

Όνομασία	Νουκλεοτιδική αλληλουχία
FH	5'- GCT TGC ACC TCG GCG AT-3'
RH	5'- GAA GGG ATT CAG TCT CTC GC-3'
NdeF	5'- CAT ATG GCG TCG CTC CTG TGC-3'
HumC1F	5'-GCG TCG CTC CTG AGC TGT GGG CCG AAG-3'
HumC3F	5'- GAA GCT GGC CGC CAG CGG CAT CGT-3'
HumC4R	5'- GCC TGC AGC GAT GAA AGA GTT GTA GCT GAC TTG C-3'
HumC5R	5'- GAG CCG AAC TTG GCT GAA AGA GAA GCC TCC-3'
RnoFat	5'- CTT ATT GAG CCG AAC TTG G-3'
NdeFAlt	5' – ATG GTT GAG GCC GGG GCC A – 3'
BUF (βιοτινυλιωμένος)	B5' - GTT TTC CCA GTC ACG AC – 3'
BUR (βιοτινυλιωμένος)	B5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC – 3'
ClaFAlt	5'-CAT CGA TGG TTG AGG CCG GGG CCA – 3'
XbaI R	5'- TCT AGA GCG CGC ACC ATG TAT TCC TTG- 3'

Πίνακας 2.1: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρούσα διδακτορική διατριβή.

Τα RNA ή DNA-RNA ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα κατά την ενζυμική μελέτη της RNάσης κ-02 αναφέρονται στον πίνακα 2.2. Τα ολιγονουκλεοτίδια #3-#10 σημαίνονται πριν τη χρήση τους στο εργαστήριο μας με ^{32}P και χρησιμοποιούνται ως ραδιενεργά υποστρώματα, ενώ το ολιγονουκλεοτίδιο subB μας προμηθεύεται ως φθορίζον υπόστρωμα φέροντας στο 5' άκρο τη φθορίζουσα ουσία FAM (φλουορεσκίνη) και στο 3' άκρο τον αποσβέστη BHQ1 (Black Hole Quencher 1).

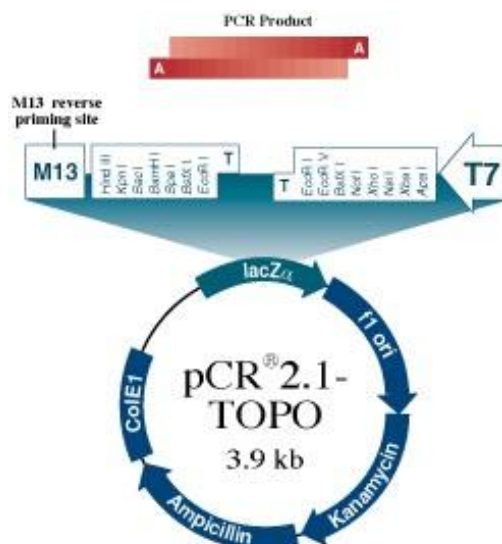
Όνομασία ολιγονουκλεοτιδίου / υποστρώματος	Νουκλεοτιδική αλληλουχία (r: ριβονουκλεοτίδιο, d: δεοξυριβονουκλεοτίδιο)
#1	5' CCCC GAUUUU AGCUAUCUGGGUUCAACUUG 3'
#3	5' dCdCdCrAdGdCdCdC 3'
#4	5' dTdTdTrAdGdTdTdT 3'
#5	5'dAdAdArAdGdAdAdA 3'
#6	5' dGdGdGrAdGdGdGdG 3'
#7	5' dTdTdTrAdCdTdTdT 3'
#8	5' dTdTdTrAdTdTdTdT 3'
#9	5' dTdTdTrAdAdTdTdT 3'
#10	5' dTdTdTdTrAdAdTdTdTdT 3'
subB	5'FAM dTdTdTdTdTrAdGdTdTdTdTdT BHQ13'

Πίνακας 2.2: Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ενζυμική μελέτη της RNάσης κ-02.

2.1.7 Πλασμίδια – Φορείς κλωνοποίησης

pCR[®]2.1-TOPO

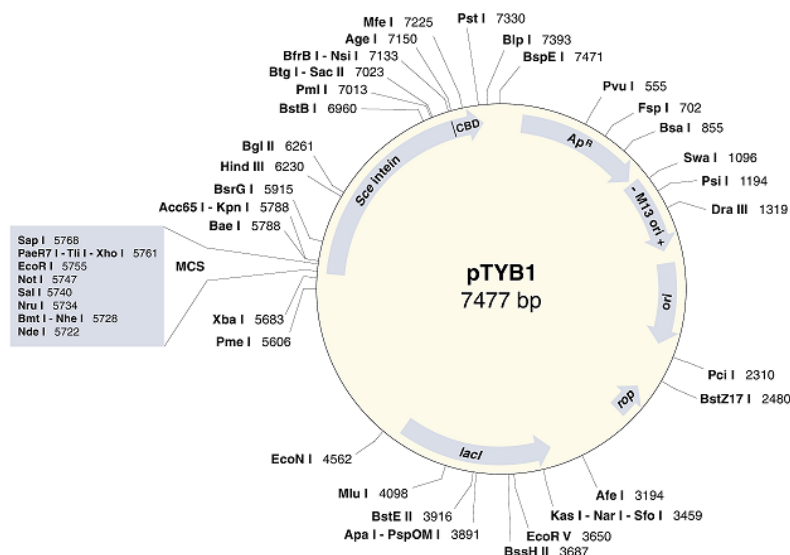
Ο φορέας αυτός χρησιμοποιήθηκε για κλωνοποίηση του cDNA της RNάσης κ-02 το οποίο έχει ενισχυθεί με PCR και μετά από επώαση με Taq πολυμεράση φέρει ελεύθερα A άκρα. Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων πραγματοποιείται παρουσία καναμυκίνης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.



Εικόνα 2.1: Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα κλωνοποίησης pCR 2.1 – TOPO.

pTYB1

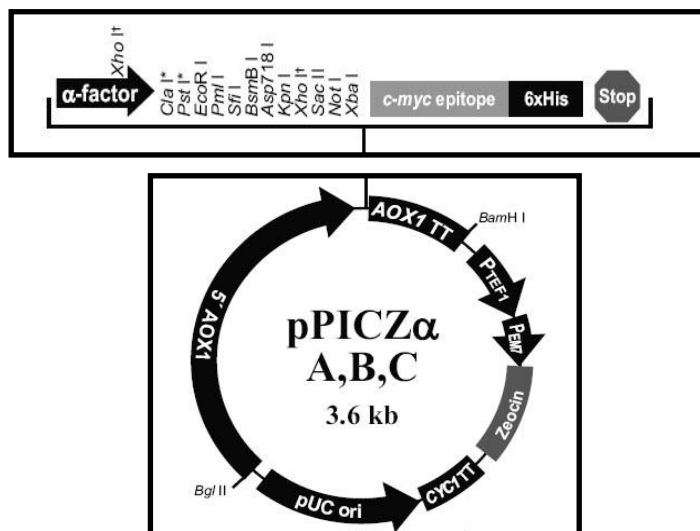
Ο φορέας pTYB1 (IMPACT™-CN, New England BioLabs) χρησιμοποιείται για κλωνοποίηση του cDNA της RNάσης κ και μετασχηματισμό των στελεχών έκφρασης *E. coli* ER2566. Σε αυτόν τον φορέα το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης συντήκεται με τον επίτοπο της ιντεΐνης. Το κωδικόνιο ATG της θέσης αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *NdeI* χρησιμοποιείται ως θέση έναρξης της μετάφρασης ενώ η ύπαρξη του T7/lac υποκινητή εξασφαλίζει την αυστηρό έλεγχο της έκφρασης της συντηγμένης πρωτεΐνης. Το πλασμίδιο φέρει αντίγραφο του γονιδίου *lacI* καταστολέα συνεπώς απουσία επαγωγέα IPTG ο καταστολέας προσδένεται στην αλληλουχία του χειριστή *lac* εμποδίζοντας τη πρόσδεση της T7 RNA πολυμεράσης στον υποκινητή της και άρα και την έκφραση της ετερόλογης πρωτεΐνης. Η ύπαρξη του γονιδίου *AmpR* (γονίδιο *bla*) προσδίδει στα μετασχηματισμένα κύτταρα ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη ενώ το σημείο *ori* επιτρέπει την ανεξάρτητη αντιγραφή του πλασμιδίου. Ο φορέας ακόμη περιέχει την αλληλουχία έναρξης της αντιγραφής του βακτηριοφάγου M13 που επιτρέπει την παραγωγή μονόκλωνου DNA όταν τα μετασχηματισμένα κύτταρα μολυνθούν από βοηθητικό φάγο.



Εικόνα 2.2: Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα έκφρασης pTYB1.

pPICZαC

Ο συγκεκριμένος φορέας επιτρέπει την ετερόλογη έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο σύστημα του ζυμομύκητα *Pichia pastoris*. Η ετερόλογη πρωτεΐνη παράγεται ως πρωτεΐνη σύντηξης με ένα πεπτιδίο οδηγητή (παράγοντας α – α factor) που κατευθύνει την έκκριση της νεοσυντιθέμενης πρωτεΐνης στο θρεπτικό υλικό. Το γεγονός αυτό διευκολύνει σημαντικά τον καθαρισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης καθώς στο σύστημα αυτό τα επίπεδα εκκρινόμενων πρωτεϊνών είναι πολύ χαμηλά. Επιπλέον, η κλωνοποίηση στο συγκεκριμένο φορέα επιτρέπει την ενσωμάτωση καταρροϊκά της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης του επιτόπου c-myc και έξι συνεχόμενων καταλοίπων ιστιδίνης. Οι συγκεκριμένες αλληλουχίες διευκολύνουν τόσο την ανοσολογική ανίχνευση όσο και τον ανοσολογικό καθαρισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Τέλος, το πλασμίδιο φέρει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό ζεοσίνη, γεγονός που επιτρέπει την επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων.



Εικόνα 2.3: Πλασμιατικός χάρτης του φορέα έκφρασης pPICZαC.

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Ηλεκτροφορητικές τεχνικές

2.2.1.1 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που χρησιμοποιείται ευρέως στην εργαστηριακή πρακτική για την παρασκευή πηκτωμάτων διαχωρισμού μορίων νουκλεϊκών οξέων. Η διαχωριστική ικανότητα ενός πηκτώματος αγαρόζης στηρίζεται στη διάμετρο των πόρων που φέρει και συγκεκριμένα όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αγαρόζης τόσο μικρότερη είναι η διάμετρος των πόρων.

Τα νουκλεϊκά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα οπότε ο διαχωρισμός των μορίων επιτυγχάνεται με τη μετακίνησή τους μέσα από τους πόρους του πηκτώματος προς τον θετικό πόλο υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Τα μόρια μικρότερου μοριακού βάρους μεταναστεύουν γρηγορότερα σε αντίθεση με τα μόρια μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Η παρατήρηση των νουκλεϊκών οξέων στο πήκτωμα αγαρόζης καθίσταται δυνατή με την ενσωμάτωση βρωμιούχου αιθιδίου το οποίο παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA/RNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο απορροφά την ενέργεια της υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας εκπέμποντας ορατό πορτοκαλί φως.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή η ηλεκτροφόρηση αγαρόζης εφαρμόστηκε για τον ποιοτικό έλεγχο κατά την απομόνωση ολικού RNA από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, για τον υπολογισμό του μεγέθους νουκλεοτιδικών προϊόντων από αντιδράσεις πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες καθώς και την επαλήθευση της ενίσχυσης νουκλεοτιδικών αλληλουχιών επιθυμητού μεγέθους κατά τις αντιδράσεις αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (παράγραφος 2.1.5) με συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου στο πήκτωμα 2 μg/ml. Η προετοιμασία των δειγμάτων πραγματοποιείται με την προσθήκη του κατάλληλου όγκου διαλύματος επιφόρτωσης DNA (τελική σύσταση: 0,03% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 10% v/v γλυκερόλη, 10 mM EDTA) και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση υπό σταθερή ένταση ρεύματος ίση με 30 mA για τον κατάλληλο χρόνο, ανάλογα με το μέγεθος των υπό ανάλυση μορίων. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης τα μόρια DNA/RNA γίνονται ορατά με παρατήρηση του πηκτώματος σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

2.2.1.2 Ηλεκτροφόρηση RNA σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση RNA σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης παρουσία φορμαλδεΰδης πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια μελέτης της έκφρασης της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μέσω ανάλυσης κατά Northern.

Προετοιμασία δειγμάτων

Μετά την απομόνωση ολικού RNA από τα κυτταρικά δείγματα ακολουθεί επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε απιονισμένο φορμαμίδιο και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι την χρήση του. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης κάθε δείγματος πραγματοποιείται με πυκνομέτρηση έπειτα από έκθεση σε πλάκα υπεριώδους μήκους κύματος 254 nm και σύγκριση της έντασης της ζώνης με πρότυπο διάλυμα RNA συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ μέσω του λογισμικού ImageJ. Από κάθε δείγμα λαμβάνεται ποσότητα ίση με 20 μg η οποία συμπληρώνεται ως τελικό όγκο 40 μl με διάλυμα TE. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -20°C για 12-16 ώρες και φυγοκεντρώνονται στις 10000 x g, 4°C για 15 λεπτά. Ακολουθεί αναδιαλυτοποίηση σε 10 μl DEPC H_2O , προσθήκη 10 μl διαλύματος φόρτωσης (1x MOPS, 50% v/v απιονισμένο φορμαμίδιο, 18.5% v/v Φορμαλδεΰδη, 4% w/v Ficoll, 0.1% w/v Bromophenol blue) και 1 μl βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Τέλος, τα δείγματα θερμαίνονται στους 90°C ώστε να αποδιαταχθούν.

Ηλεκτροφόρηση

Η συσκευή της ηλεκτροφόρησης έχει εκπλυθεί και έχει παραμείνει σε διάλυμα NaOH συγκέντρωσης 0.25 M. Το πήκτωμα αγαρόζης (1.25% αγαρόζη, 1.25 M φορμαλδεΰδη σε 1x MOPS) προστίθεται στην αντίστοιχη συσκευή και αφού πήξει προστίθεται το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x MOPS, 0.2 M φορμαλδεΰδη) μέχρι να καλυφθεί πλήρως το πήκτωμα. Τα δείγματα προστίθενται στα φρεάτια και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε σταθερές συνθήκες διαφοράς δυναμικού 60 Volts. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα παρατηρείται στο υπεριώδες φως για να διαπιστωθεί η ποιότητα του RNA, φωτογραφίζεται με χάρακα και ακολουθεί η διαδικασία της μεταφοράς στη μεμβράνη υβριδοποίησης όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.

2.2.1.3 Ηλεκτροφόρηση ραδιενεργών ολιγονουκλεοτιδίων σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης - ουρίας

Η ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης - ουρίας (17%, πολυακρυλαμίδη-8 M ουρία) πραγματοποιήθηκε για το διαχωρισμό των ραδιενεργά σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων #1-#10 (πίνακας 2.2) και των προϊόντων υδρόλυσης τους από την RNάση κ-02. Για την ανάλυση των προϊόντων υδρόλυσης του υποστρώματος #1 (30-μερές RNA υπόστρωμα) χρησιμοποιείται πήκτωμα διαστάσεων 16 x 24 cm, ενώ για την ανάλυση των προϊόντων υδρόλυσης των υποστρωμάτων #2-#10 (8-10-μερή DNA-RNA υποστρώματα) χρησιμοποιείται πήκτωμα διαστάσεων 9,5 x 10,5 cm και η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα σε ειδική συσκευή που πληρούται με διάλυμα ηλεκτροδίων (0,5x TBE). Πριν τη φόρτωση των δειγμάτων γίνεται προ-ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος, προκειμένου να απομακρυνθούν όλα τα ιόντα που δυσχεραίνουν το σωστό διαχωρισμό των ολιγονουκλεοτιδίων κατά την ηλεκτροφόρηση. Στην περίπτωση του πηκτώματος διαστάσεων 16 x 24 cm πραγματοποιείται για 2 ώρες σε σταθερή ένταση ρεύματος 25 mA ενώ στην περίπτωση του πηκτώματος 9,5 x 10,5 cm για 20 λεπτά σε σταθερή τάση ρεύματος 150 Volts. Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων στις ίδιες συνθήκες για κάθε πήκτωμα. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, τα πηκτώματα υποβάλλονται σε αυτοραδιογραφία (παράγραφος 2.2.6.4).

2.2.1.4 SDS ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS (SDS-PAGE) είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος διαχωρισμού ενός μίγματος πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες. Οι αποδιατακτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται είναι το δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο (SDS) και η μερκαπτοαιθανόλη. Η μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών. Το SDS αποτελεί ανιονικό απορρυπαντικό που διασπά σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας πρωτεΐνης. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πεπτιδικές αλυσίδες σε αναλογία 1 μόριο SDS ανά 2 αμινοξέα, γεγονός που προσδίδει στο σύμπλοκο του SDS με την αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο φορτίο περίπου ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης. Τα αρνητικά φορτισμένα μόρια κινούνται διαμέσου του πηκτώματος ακρυλαμίδης κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, το οποίο δημιουργείται στο διάλυμα που κατανέμεται κατά μήκος του πηκτώματος. Οι πρωτεΐνες του πηκτώματος εμφανίζονται με χρώση Coomassie, η οποία προσφέρει όριο ανίχνευσης της τάξης των 0,1

μg πρωτεΐνης ή εναλλακτικά με χρώση νιτρικού αργύρου που προσφέρει όριο ανίχνευσης της τάξης των 0,02 μg πρωτεΐνης.

Παρασκευή του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

Αρχικά παρασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού των πρωτεϊνών και ακολουθεί η παρασκευή του πηκτώματος επιστοιβάξης. Το πήκτωμα επιστοιβάξης τοποθετείται επάνω στο στερεό πήκτωμα διαχωρισμού (μετά τον πολυμερισμό του τελευταίου). Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα διαχωρισμού συγκέντρωσης 12% και 15% (w/v) ακρυλαμίδης-bis-ακρυλαμίδης και πήκτωμα επιστοιβάξης συγκέντρωσης 5% (w/v) διαστάσεων 8 x 9 cm (mini gels).

Προετοιμασία των δειγμάτων

Στα πρωτεϊνικά δείγματα που πρόκειται να διαχωριστούν προστίθεται κατάλληλος όγκος διαλύματος επιφόρτωσης πρωτεϊνών (τελική συγκέντρωση: 16 mM Tris-HCl pH 7,0, 10% v/v SDS, 2,5% v/v γλυκερόλη, 0,001 % w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 5% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη). Ακολουθεί βρασμός των δειγμάτων για 5 λεπτά και στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρώνται στα 9.000 x g για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα υδρόφοβα και τα ισχυρά υδρόφοβα κλάσματα υφίστανται θέρμανση σε θερμοκρασία 70°C για τρία λεπτά. Σε κάθε πείραμα ηλεκτοφόρησης μαζί με τα πρωτεϊνικά δείγματα ηλεκτροφορείται και δείγμα πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες μοριακών βαρών.

Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

Τα πρωτεϊνικά δείγματα φορτώνονται στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε ειδική συσκευή που πληρούται με διάλυμα ηλεκτροδίων (25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 0,1% w/v SDS, pH 8 χωρίς ρύθμιση). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση 150 Volts.

Ανίχνευση των πρωτεϊνών με χρωστικές ουσίες

Χρώση Coomassie

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφορητική διαδικασία το πήκτωμα μεταφέρεται σε διάλυμα χρώσης Coomassie (0,1 % w/v χρωστική Coomassie brilliant blue, 50% v/v μεθανόλη, 7% v/v οξικό οξύ) υπό ανάδευση για 1 ώρα. Μετά το πέρας του παραπάνω χρόνου, το πήκτωμα μεταφέρεται σε διάλυμα αποχρωματισμού (10% v/v οξικό οξύ), όπου ανακινείται μέχρι να εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες.

Χρώση νιτρικού αργύρου

- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετείται για 30 λεπτά σε διάλυμα στερέωσης (30% v/v αιθανόλη, 10% v/v οξικό οξύ), υπό ανάδευση.
- Κατόπιν, το πήκτωμα μεταφέρεται από το διάλυμα στερέωσης στο διάλυμα αναγωγής (4 M CH₃COOH - CH₃COONa pH 6,0, 30% v/v αιθανόλη, 1% w/v Na₂S₂O₃), στο οποίο και παραμένει για άλλα 30 λεπτά, υπό ανάδευση.
- Ακολουθούν τρεις διαδοχικές εκπλύσεις του πηκτώματος με dH₂O, διάρκειας 10 λεπτών.
- Αφού το πήκτωμα ξεπλυθεί καλά, τοποθετείται σε διάλυμα νιτρικού αργύρου (0,1% w/v AgNO₃, 0,025% v/v φορμαλδεΰδη) για 30 λεπτά υπό ανάδευση.
- Με την πάροδο του παραπάνω χρονικού διαστήματος, πραγματοποιούμε σύντομη ανάδευση του πηκτώματος με dH₂O και δύο σύντομες αλλαγές με διάλυμα εμφάνισης (2,5% w/v Na₂CO₃, 0,05% v/v φορμαλδεΰδη).
- Ακολουθεί η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών σε διάλυμα εμφάνισης, η οποία διαρκεί 1 λεπτό περίπου.
- Τέλος, η σταθεροποίηση γίνεται με την παραμονή του πηκτώματος σε διάλυμα οξικού οξέος περιεκτικότητας 1% (v/v).

2.2.1.5 SDS ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης – Tricine

Η ηλεκτροφόρηση Tricine-SDS αποτελεί συνήθη μέθοδο ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιείται για να διαχωριστούν πρωτεΐνες μεγέθους 1-100 kDa. Αποτελεί την προτιμώμενη μέθοδο για την ανάλυση πρωτεϊνών μεγέθους μικρότερου από 20 kDa [156]. Στην παρούσα διατριβή η μέθοδος εφαρμόστηκε για το διαχωρισμό και την απομόνωση του αμινοτελικού πεπτιδικού τμήματος της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 μεγέθους 6.53 kDa.

Η διαδικασία διαφοροποιείται από την SDS ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών στη σύσταση του πηκτώματος διαχωρισμού (16% ακρυλαμίδη, 0.25 M Tris, 0.02% w/v SDS), και του πηκτώματος επιστοιβάξης (4% ακρυλαμίδη, 0.25 M Tris - HCl pH 8.45, 0.02% w/v SDS) καθώς και στη σύσταση των διαλυμάτων ανόδου (0.1 M Tris-HCl, pH 8.9) και καθόδου (0.1 M Tris, 1 M Tricine, 0.1% w/v SDS, pH 8.2 χωρίς ρύθμιση). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε συνθήκες έντασης 30 mA αρχικά και κατόπιν 60 mA.

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτοφορητική διαδικασία το πήκτωμα μεταφέρεται σε

διάλυμα στερέωσης (50% v/v μεθανόλη, 10% v/v οξικό οξύ) και κατόπιν σε διάλυμα χρώσης Coomassie (0.025% w/v χρωστική Coomassie brilliant blue, 10% οξικό οξύ) όπου παραμένει υπό ανάδευση για 1 ώρα. Ακολουθεί αποχρωματισμός (10% οξικό οξύ) μέχρι να εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες και κατόπιν έκπλυση με νερό.

2.2.2 Καλλιέργειες ανθρώπινων κυτταρικών σειρών

Όλες οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές φυλάσσονται σε υγρό άζωτο (-196°C) και η καλλιέργειά τους γίνεται σε κλίβανο σταθερών συνθηκών θερμοκρασίας (37°C) και παροχής CO₂ (5.0%).

Απόψυξη κυττάρων

Η απόψυξη κυττάρων αποτελεί το πρώτο βήμα κατά την ανάπτυξη κυτταρικών σειρών. Περιλαμβάνει το γρήγορο ξεπάγωμα των κυττάρων και τη μεταφορά τους σε σωλήνα τύπου *falcon* ο οποίος περιέχει ήδη θρεπτικό υλικό ανάπτυξης θερμοκρασίας 37°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1400 rpm για 2 λεπτά στους 4°C ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα κατάψυξης και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα εμβολιάζονται σε τρυβλίο διαμέτρου 100 mm με 8-10 ml θρεπτικού και επωάζονται σε κλίβανο σταθερών συνθηκών (37°C, 5,0% CO₂).

Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής καλλιέργειας τα κύτταρα παρατηρούνται καθημερινά στο ανάστροφο μικροσκόπιο για να ελέγχεται η ανάπτυξή τους. Στην περίπτωση των κυτταρικών τύπων που δεσμεύονται στην επιφάνεια προσκόλλησης η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα σχηματίσουν τάπητα που καταλαμβάνει το 80% της συνολικής επιφάνειας του τρυβλίου. Η αναλογία αραιώσης κυμαίνεται από 1:3 έως 1:8 ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τον χρόνο διπλασιασμού.

Αρχικά απορρίπτεται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με ισοτονικό διάλυμα 1x PBS (παράγραφος 1.2.5). Κατόπιν προστίθεται θρυψίνη και ακολουθεί επώαση για λίγα λεπτά σε θερμοκρασία 37°C. Μετά την αποκόλλησή τους, τα κύτταρα μεταφέρονται ως εναιώρημα σε σωλήνα τύπου φάλκον που περιέχει ίσο όγκο θρεπτικού υλικού και φυγοκεντρούνται στις 1400 rpm για 2 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε θρεπτικό υλικό

μεγαλύτερου όγκου ανάλογα με τον επιθυμητό συντελεστή αραίωσης. Τα αναδιαλυτοποιημένα κύτταρα αναδεύονται ήπια και εμβολιάζονται σε νέα τρυβλία.

Ψύξη κυττάρων σε υγρό άζωτο

Σε αντίθεση με την απόψυξη, το πάγωμα των κυττάρων γίνεται αργά ώστε να μη σχηματιστούν κρύσταλλοι H₂O στο εσωτερικό των κυττάρων. Η διαδικασία είναι η ίδια που ακολουθείται για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων ως το σημείο στο οποίο απομονώνεται το ίζημα που περιέχει τα κύτταρα. Στη συνέχεια, το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται αργά σε 1 mL διαλύματος κατάψυξης (FBS 90% v/v, διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) 10% v/v) το οποίο χάρη στο DMSO που περιέχει έχει κρυοπροστατευτικό ρόλο μειώνοντας το σημείο κατάψυξης του θρεπτικού και ελαττώνοντας το ρυθμό ψύξης. Το κατεψυγμένο απόθεμα των κυττάρων παραμένει για τουλάχιστον 24 ώρες στους -80°C και στη συνέχεια φυλάσσεται στο υγρό άζωτο (-196°C).

Διαμόλυνση και καταστολή μέσω RNAi

Η διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς HEK-293 και η καταστολή της έκφρασης της RNάσης κ μέσω RNAi πραγματοποιήθηκε κατά τη διπλωματική εργασία της βιολόγου Βασιλικής Δελίτσικου [1^M]. Το πλασμίδιο iK3-pRS (HuSHTM, OriGene) κωδικοποιεί τη σύνθεση ενός shRNA που στοχεύει την αλληλουχία 5'-GAGCAAGTCAGCTACAACCTGTTTCA TCGC-3 της ανθρώπινης RNάσης κ. Σαν πείραμα ελέγχου η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε και με το πλασμίδιο pRS απουσία της αλληλουχίας που κωδικοποιεί το shRNA. 2 x 10⁵ κύτταρα HEK-293 διαμολύνθηκαν με 5 μg πλασμιδίου pRS ή iK3 παρουσία του αντιδραστηρίου Xfect (Clontech, CA, USA). Για την επιλογή σταθερά διαμολυσμένων κλώνων οι κυτταρικοί πληθυσμοί αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό παρουσία πουρομυκίνης (0,5 μg/mL) για 21 μέρες. Η αποδοτικότητα της καταστολής αξιολογήθηκε σε επίπεδο RNA μέσω ποσοτικής PCR.

2.2.3 Δημιουργία και χημικός μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Δημιουργία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Κατά τη διαδικασία αυτή τα βακτηριακά κύτταρα υφίστανται χημική επεξεργασία προκειμένου τα κυτταρικά τους τοιχώματα να γίνουν διαπερατά σε μακρομόρια. Αποτελεί ένα βήμα που προηγείται του μετασχηματισμού και περιλαμβάνει τον εμβολιασμό μιας

αποικίας του επιθυμητού βακτηριακού στελέχους σε θρεπτικό υλικό LB μικρού όγκου και ανάπτυξη στους 37°C για 16-18 ώρες υπό ανάδευση. Ακολουθεί ανακαλλιέργεια και αφήνεται να αναπτυχθεί υπό ανάδευση υπό τις ίδιες συνθήκες μέχρι η οπτική πυκνότητα των κυττάρων στα 600 nm να φτάσει την τιμή 0.5-0.7. Τότε η καλλιέργεια μεταφέρεται και παραμένει για 10 λεπτά σε παγωμένο σωλήνα και κατόπιν φυγοκεντρείται στα 800x g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα διαλυτοποιείται στο 1/3 του όγκου της καλλιέργειας παγωμένου διαλύματος TB(10 mM Pipes-KOH pH 6,7, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl) και παραμένει στον πάγο για 10 ακόμη λεπτά. Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση και το ίζημα των κυττάρων διαλυτοποιείται στο 1/10 του όγκου της αρχικής καλλιέργειας TB. Τα κύτταρα παραμένουν στον πάγο για 5 λεπτά και ακολουθεί η αργή προσθήκη DMSO σε τελική περιεκτικότητα 7% v/v. Τα κύτταρα χωρίζονται σε όγκους 100 µl και όσα δεν χρησιμοποιηθούν απ' ευθείας εμβαπτίζονται σε υγρό άζωτο και φυλάσσονται στους -80°C.

Χημικός μετασχηματισμός

Με τη διαδικασία αυτή τα δεκτικά κύτταρα των βακτηριακών στελεχών μετασχηματίζονται με πλασμιδιακούς φορείς, προκειμένου να επιτευχθεί η κλωνοποίηση τους (για φορείς κλωνοποίησης) ή η ετερόλογη έκφρασή τους (για φορείς έκφρασης). Σε 100 µl δεκτικών κυττάρων προσθέτουμε 2-3 ng ανασυνδυασμένου πλασμιδίου, αναδεύουμε πολύ ήπια και επωάζουμε στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολούθως, το φιαλίδιο που περιέχει τα κύτταρα τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42°C για χρονικό διάστημα 45 δευτερολέπτων και αμέσως μετά σε πάγο για 2 λεπτά (διαδικασία heat-shock). Ακολουθεί προσθήκη 450 µl θρεπτικού διαλύματος SOC υπό στείρες συνθήκες και ανάπτυξη των κυττάρων στους 37°C για 1 ώρα. Τέλος γίνεται εμβολιασμός τρυβλίων LB, που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό, με 75 µl του διαλύματος των κυττάρων και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 16-18 ώρες μέχρι να αναπτυχθούν οι αποικίες των μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων.

2.2.4 Απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων

2.2.4.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένους βακτηριακούς κλώνους πραγματοποιήθηκε μετά από ανάπτυξη των κλώνων σε θρεπτικό μέσο LB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού. Η διαδικασία απομόνωσης πραγματοποιήθηκε με

χρήση του NucleoSpin® Plasmid kit της εταιρείας *Macherey Nagel* και ακολουθεί υπολογισμός της συγκέντρωσης των ανακτηθέντων μεταλλαγμένων πλασμιδιακών φορέων. Σε περίπτωση που κλωνοποιείται για πρώτη φορά μια νουκλεοτιδική αλληλουχία τα πλασμίδια υποβάλλονται ακολούθως σε αλληλούχιση προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τη σωστή τους αλληλουχία.

2.2.4.2 Απομόνωση ολικού RNA από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

Κατά τη διαδικασία της εκχύλισης του RNA απομονώνεται ολικό RNA και δεδομένης της ευαισθησίας του μορίου η απομόνωση πραγματοποιείται υπό στείρες συνθήκες και στον πάγο, ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμησή του από ριβονουκλεάσες. Η διαδικασία της εκχύλισης του ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στη μέθοδο της ισοθειοκυανικής γουανιδίνης σε συνδυασμό με εκχύλιση φαινόλης/χλωροφορμίου [157]. Η απομόνωση RNA πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον εντοπισμό και τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης του mRNA της RNάσης κ-02 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τη διαλυτοποίηση των κυττάρων σε 1 mL μονοφασικού διαλύματος φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης αντιδραστηρίου (4°C) ανά 5×10^6 κύτταρα. Το Trizol λύει τα κύτταρα και διατηρεί την ακεραιότητα του RNA καθώς απενεργοποιεί τις ριβονουκλεάσες. Μετά από ανάδευση με vortex, τα δείγματα φυλάσσονται στους -80°C ή αναλύονται αμέσως μετά από επώαση για 5 λεπτά στους 4°C. Ακολουθεί προσθήκη 200 μ L Χλωροφορμίου (4°C) και ήπια ανάδευση 10 φορές. Η προσθήκη αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη των πρωτεϊνών που τις καθιστά διαλυτές στην οργανική φάση καθώς και τον εντοπισμό του RNA στην υδατική φάση. Ακολουθεί παραμονή για 12 λεπτά στο πάγο με ανάδευση στα 6 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 10000 x g για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το μίγμα διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις. Η ανώτερη είναι η διαυγής υδατική φάση στην οποία είναι διαλυμένο το RNA, η κατώτερη φάση είναι η οργανική όπου περιέχονται οι πρωτεΐνες και η μεσόφαση περιέχει το DNA. Γίνεται προσεκτική μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf και προστίθενται σε αυτήν 500 μ l ισοπροπανόλης που προκαλεί αφυδάτωση (4°C) και ήπια ανάδευση για 10 φορές. Το δείγμα επωάζεται στον πάγο για 10 λεπτά με ανάδευση στα 5 λεπτά, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10000 x g για 15 λεπτά στους 4°C, το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά με πιπέτα και απομένει το RNA ως λευκό ίζημα. Ακολουθεί προσθήκη 1 mL αιθανόλης 75% (-20°C) ώστε να ξεπλυθεί το ίζημα και κατόπιν φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C.

Αφαιρείται προσεκτικά η αιθανόλη υπό κενό και το ίζημα επωάζεται στον πάγο για 10-15 λεπτά ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη που απέμεινε. Το ίζημα διαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο H₂O ή απιονισμένου φορμαμιδίου σε περίπτωση που έπεται ανάλυση κατά Northern.

2.2.4.3 Απομόνωση poly(A)⁺ mRNA από δείγμα ολικού RNA

Η απομόνωση poly(A)⁺ mRNA διευκολύνει την απομόνωση και μελέτη σπάνιων μεταγράφων και εξασφαλίζει την απομάκρυνση άφθονων RNA πληθυσμών (κυρίως rRNA και tRNA) που συχνά δυσχεραίνουν την αντίστροφη μεταγραφή των μορίων – στόχων. Για το σκοπό αυτό στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν παραμαγνητικά σφαιρίδια ομοιοπολικά συνδεδεμένα με 25μερή ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμίνης - oligo (dT)₂₅. Όταν τα σφαιρίδια αναμειγνύονται με μίγμα ολικού RNA, τα μόρια που φέρουν poly(A) ουρά, συνεπώς αντιστοιχούν στους πληθυσμούς mRNA υβριδοποιούνται και δεσμεύονται στη βάση του σωλήνα με χρήση ειδικού μαγνήτη, γεγονός που επιτρέπει την απομάκρυνση των υπολοίπων πληθυσμών RNA. Η διαδικασία εφαρμόστηκε σε ολικό RNA της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς HEK-293 προκειμένου να ακολουθήσει η απομόνωση και κλωνοποίηση του RNA στις ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02.

Συνοπτικά, 75 μg ολικού RNA από εκχύλισμα της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς HEK-293 διαλυτοποιημένα σε 100 μL dH₂O θερμαίνονται σε θερμοκρασία 65°C για 2 λεπτά και αμέσως τοποθετούνται στον πάγο. Ακολούθως, 100 μl σφαιριδίων που έχουν ξεπλυθεί σε διάλυμα δέσμησης (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1.0 M LiCl, 2 mM EDTA) προστίθενται στα 100 μl ολικού RNA και αναδεύονται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (κυκλικός αναδευτήρας). Τοποθετούμε το σωλήνα στον μαγνήτη για 1-2 λεπτά και απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Απομακρύνουμε το σωλήνα από τον μαγνήτη και προσθέτουμε 200 μl διαλύματος έκπλυσης B (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA 10 mM) και αναδεύουμε ισχυρά. Τοποθετούμε το σωλήνα στο μαγνήτη για 1 λεπτό και αφαιρούμε το υπερκείμενο. Στην περίπτωση απομόνωσης του cDNA της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 συνεχίζεται από αυτό το σημείο η αντίστροφη μεταγραφή επί των σφαιριδίων oligo(dT) (παράγραφος 2.2.9).

Για την έκλυση του poly(A)⁺ mRNA, επαναλαμβάνουμε την έκπλυση μία ακόμη φορά και προσθέτουμε 10,5 μL αποστειρωμένου νερού που έχει υποστεί κατεργασία με DEPC. Θερμαίνουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 65°C, ακολουθεί παραμονή για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και επαναθέρμανση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 65°C. Το

υπερκείμενο απομονώνεται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf και ακολουθεί παραμονή στον πάγο μέχρι την χρήση ή αποθήκευση σε θερμοκρασία -80°C .

2.2.4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊνικών οξέων

Για την εκτίμηση της απόδοσης της απομόνωσης του RNA και DNA γίνεται φωτομετρική ανάλυση των δειγμάτων. Η συγκεκριμένη προσέγγιση βασίζεται στο γεγονός ότι τα νουκλεϊκά οξέα λόγω των αζωτούχων βάσεων τους εμφανίζουν μέγιστο απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας στα 260 nm, ενώ οι πρωτεΐνες λόγω των αρωματικών αμινοξέων τους στα 280 nm. Χρησιμοποιώντας το νόμο των Lambert-Beer μπορεί να συσχετιστεί η απορρόφηση με τη συγκέντρωση του μορίου που προσδιορίζεται. Στα 260 nm, η μέση σταθερά απορροφητικότητας είναι $0,027 (\mu\text{g}/\text{ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ για μονόκλωνο RNA και $0,020 (\mu\text{g}/\text{ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ για δίκλωνο DNA. Συνεπώς για το RNA μια μονάδα απορρόφησης αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ενώ για το DNA σε 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί για οπτική πυκνότητα (OD) έως 2.

Κάθε δείγμα αραιώνεται 1:200 με dH_2O (1 μL RNA και 199 μL dH_2O) και ακολουθεί η μέτρηση των οπτικών απορροφήσεων στα 260 και 280 nm. Η εκτίμηση της συγκέντρωσης σε κάθε δείγμα γίνεται βάση του τύπου:

$$C_{\text{RNA}} (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = 200 \times 0,04 \times \text{OD}_{260}$$

$$(\text{OD}_{260} = \text{απορρόφηση στα } 260 \text{ nm})$$

Ο υπολογισμός του λόγου $\text{OD}_{260}:\text{OD}_{280}$ πραγματοποιείται για να διερευνηθεί κατά πόσο υπάρχει πρόσμειξη του δείγματος με πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, για το DNA ένας επιθυμητός λόγος κυμαίνεται από 1,8 έως 2 ενώ για το RNA 1,6 έως 2,3. Οι τιμές που είναι μικρότερες του 1,6 είναι ενδεικτικές της ύπαρξης σημαντικής πρόσμειξης πρωτεϊνών στο δείγμα RNA, ενώ αντίθετα οι τιμές που υπερβαίνουν το 2,3 υποδηλώνουν υψηλά επίπεδα γενωμικού DNA στο εξεταζόμενο δείγμα.

2.2.5 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και κλασμάτωσή τους βάσει υδροφοβικότητας

Η απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και η κλασμάτωσή της πραγματοποιήθηκε βάσει της μεθόδου του Bordier [158]. Συνοπτικά, τα κύτταρα επωάζονται σε διάλυμα λύσης (50 mM Tris pH 8.5, 150 mM NaCl, 2% Triton X-

114 παρουσία 1x μείγματος αναστολέων πρωτεασών) σε θερμοκρασία 4°C για 30 λεπτά υπό ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντριση 10.000 x *g* σε θερμοκρασία 4°C για 15 λεπτά και το ίζημα που προκύπτει αποτελεί το ισχυρά υδρόφοβο κλάσμα. Το υπερκείμενο συλλέγεται και επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C μέχρι να επιτευχθεί ο διαχωρισμός φάσεων. Έπειτα από φυγοκέντριση του μείγματος 5,000 *g* για 15 λεπτά μεταφέρουμε την ανώτερη (υδατική) φάση σε νέο σωλήνα και η κάτω φάση εμπεριέχει τις ενδιάμεσα υδρόφοβες (αμφιπαθείς διαμεμβρανικές) πρωτεΐνες. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε καθένα από τα κλάσματα προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford.

Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford είναι ευρέως διαδεδομένη για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο σχηματισμό χρωστικής, που προκύπτει από την αντίδραση του αντιδραστηρίου Bradford με τα πρωτεϊνικά μόρια. Η έγχρωμη ουσία που παράγεται εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm, επιτρέποντας έτσι το φωτομετρικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών μορίων.

2.2.6 Ανάλυση κατά Northern

Η ανάλυση κατά Northern εφαρμόζεται για την ποιοτική ή ποσοτική ανάλυση της έκφρασης μορίων mRNA, επιτρέπει να καθορισθεί το μέγεθος τους και να προσδιορισθεί αν υφίστανται εναλλακτικές RNA ισομορφές διαφορετικού μεγέθους. Επιπρόσθετα, μπορεί να εφαρμοστεί κατά τη μελέτη της έκφρασης ενός μηνύματος RNA σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια ή σε διάφορους ιστούς και όργανα ενός οργανισμού. Κατά την ανάλυση κατά Northern ολικό RNA ηλεκτροφορείται σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης και στη συνέχεια μεταφέρεται σε μεμβράνη όπου και μονιμοποιείται. Στη συνέχεια, ένας ραδιοσημασμένος ή μη ανιχνευτής χρησιμοποιείται για την υβριδοποίηση των μορίων RNA που έχουν ακινητοποιηθεί στη μεμβράνη. Θετικό σήμα υβριδισμού αποδεικνύει την έκφραση του γονιδίου κάτω από τις συνθήκες πραγματοποίησης του πειράματος. Στην παρούσα διατριβή η μέθοδος εφαρμόστηκε για τη μελέτη της έκφρασης της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.

2.2.6.1 Μεταφορά RNA σε μεμβράνη υβριδοποίησης υπό κενό

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για τη μεταφορά των RNA μορίων μετά την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση ολικού RNA (παράγραφος 2.1.2) στη μεμβράνη υβριδοποίησης και περιλαμβάνει την εξισορρόπηση του πηκτώματος σε διάλυμα 0.05 M NaOH/10 mM NaCl και ξεπλένεται με DEPC H₂O για 20 λεπτά, την εξισορρόπηση του σε διάλυμα 20x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Κιτρικό Νάτριο) για 40 λεπτά με μία αλλαγή του διαλύματος στα 20 λεπτά και την εμφύσηση του πηκτώματος και της μεμβράνης υβριδοποίησης σε ζεστό DEPC H₂O για 10 λεπτά. Ακολούθως, πραγματοποιείται εξισορρόπηση του πηκτώματος και της μεμβράνης υβριδοποίησης σε 20x SSC για 5 λεπτά. Στην ειδική συσκευή μεταφοράς τοποθετείται η μεμβράνη και το πήκτωμα με προσοχή ώστε να αποφευχθεί ο εγκλωβισμός αέρα που παρεμποδίζει τη μεταφορά. Η συσκευή συνδέεται με το κενό και πραγματοποιείται η μεταφορά υπό πίεση ισχύος 50 mBar κατά τη διάρκεια της οποίας το πήκτωμα διαβρέχεται συνεχώς με προσθήκη διαλύματος 20x SSC. Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς η μεμβράνη παρατηρείται στο υπεριώδες φως για να διαπιστωθεί η μεταφορά και το πήκτωμα απορρίπτεται. Ακολουθεί επώαση σε θερμαινόμενο κλίβανο 80°C ώστε να ακινητοποιηθούν τα RNA μόρια σε αυτήν και αποθηκεύεται σε σκοτεινό και ξηρό μέρος μέχρι την χρησιμοποίησή της.

2.2.6.2 Προετοιμασία του ιχνηθέτη

Για την ενίσχυση του cDNA της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ και τη σύνθεση του ραδιενεργά σημασμένου ανιχνευτή χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pCR II-TOPO μεγέθους 3.971 ζευγών βάσεων που περιέχει κλωνοποιημένο το cDNA της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ μήκους 466 βάσεων (πλασμίδιο L1). Το πλασμίδιο L1 έχει μέγεθος 4.437 ζεύγη βάσεων και βρίσκεται σε συγκέντρωση 100 ng/μl (2.06×10^6 μόρια/μl).

Για την ενίσχυση του cDNA της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ χρησιμοποιήθηκε ο φορέας L1 σε συγκέντρωση 1 ng/μl και το ζεύγος εκκινητών FH και RH (πίνακας 2.1) σε τελική συγκέντρωση 0,2 pmol/μl έκαστος παρουσία 1 U Taq πολυμεράσης. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 30 επαναλήψεις σε θερμοκρασία υβριδοποίησης 50°C. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, παρατήρηση σε πλάκα υπεριώδους ακτινοβολίας και απομόνωση των επιθυμητών ζωνών DNA. Η απομόνωση των τμημάτων DNA από το πήκτωμα έγινε με χρήση του NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

Σήμανση με τη μέθοδο της τυχαίας έναρξης:

Για τη ραδιενεργό σήμανση του cDNA με [α - 32 P] dCTP (ICN, 370 MBq/ml, 10 mCi/ml, sp. act. 4500 Ci/mmol) χρησιμοποιείται το σύστημα τυχαίας έναρξης (DECA prime II DNA Labeling Kit). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας ενός μορίου DNA με τη χρησιμοποίηση ως εκκινητών ενός μείγματος από τυχαία δεκανουκλεοτίδια από το τμήμα Klenow της DNA πολυμεράσης I, η οποία ενσωματώνει στο μόριο του DNA ραδιενεργά νουκλεοτίδια που υπάρχουν στο μίγμα της αντίδρασης.

Αναλυτικότερα 0.1-0.5 μg cDNA (όγκου όχι μεγαλύτερου από 0.5 μl) προστίθενται σε μίγμα που περιέχει 13 μl dH₂O και 2.5 μl διαλύματος δεκανουκλεοτιδίων (10x Decamers). Στη συνέχεια, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με βρασμό για 5 min και τοποθετείται στον πάγο για λίγα λεπτά. Ακολουθεί spin στους 4°C και στο δείγμα προστίθενται 5 μl διαλύματος αντίδρασης απουσία dCTP, 3 μl [α - 32 P] dCTP (ICN 3000 Ci/mmol) και 1 μl Klenow (2 units/μl) exonuclease free. Κατόπιν το δείγμα επωάζεται στους 37°C για 1 ώρα και η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 20 mM EDTA pH 8.0.

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε στήλη SEPHADEX G-50

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των ραδιοσημασμένων μορίων DNA από τα ραδιενεργά μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια μετά την αντίδραση της σήμανσης. Γενικότερα η μέθοδος της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μορίων ανάλογα με το μοριακό τους βάρος.

Παρασκευή της ρητίνης της στήλης διαχωρισμού

30 g ρητίνης Sephadex G-50 (Pharmacia) αραιώνονται σε 250 ml διαλύματος TE και το υλικό αυτό επωάζεται στους 50°C για 12 ώρες. Στη συνέχεια το TE αφαιρείται και προστίθεται καινούριο προκειμένου να πακεταριστεί η στήλη. Το παραπάνω διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία 4°C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

Χρωματογραφία

Στο κάτω άκρο μιας πλαστικής προχοϊδας όγκου 5 ml τοποθετείται μικρή ποσότητα αποστειρωμένου υαλοβάμβακα. Στη συνέχεια, στην πιπέτα προστίθεται το υλικό της ρητίνης Sephadex G-50 και εξισορροπείται με ρυθμιστικό διάλυμα TE. Το δείγμα με το ραδιοσημασμένο ανιχνευτή φορτώνεται στη στήλη αφού προηγουμένως του έχει προστεθεί ίση ποσότητα Dextran Blue και ο κατάλληλος όγκος 6x διαλύματος φόρτωσης. Τα πρώτα κλάσματα της έκλουσης περιέχουν DNA υψηλού μοριακού βάρους. Η συλλογή των κλασμάτων που περιέχουν τον ανιχνευτή γίνεται με τη βοήθεια μετρητή ακτινοβολίας Geiger-Muller και η συλλογή του επιθυμητού κλάσματος πραγματοποιείται όταν η ένδειξη του μετρητή κυμαίνεται από 500 έως 2000 cps. Το κλάσμα του ραδιοσημασμένου ανιχνευτή φυλάσσεται σε ειδικά μολύβδινα δοχεία φύλαξης στους -20°C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

2.2.6.3 Υβριδοποίηση

Η διαδικασία περιλαμβάνει ένα στάδιο προετοιμασίας της μεμβράνης (προϋβριδοποίηση) και κατόπιν πραγματοποιείται η υβριδοποίηση.

Προϋβριδοποίηση

Η μεμβράνη ξεπλένεται σύντομα σε DEPC H₂O και τοποθετείται σε ειδική νάιλον σακούλα με διάλυμα προϋβριδοποίησης (διάλυμα Church: 10 mM Na₂HPO₄, 7% w/v SDS, 1% w/v BSA, 1 mM EDTA) σε θερμοκρασία 65°C. Ακολουθεί παραμονή για δύο ώρες σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 65°C για δύο ώρες υπό ανάδευση.

Υβριδοποίηση

Ο ιχνηθέτης διαλυτοποιείται σε διάλυμα Church και προστίθεται στην ειδική σακούλα με τη μεμβράνη υβριδοποίησης αφού αφαιρεθεί το διάλυμα προϋβριδοποίησης. Η υβριδοποίηση πραγματοποιείται σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 65°C υπό ανάδευση για 12-16 ώρες.

Ξέπλυμα της μεμβράνης υβριδοποίησης

Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο για την απομάκρυνση μορίων ιχνηθέτη που έχουν δεσμευθεί μη ειδικά στα μόρια RNA ή στη μεμβράνη υβριδοποίησης. Μετά το πέρας της υβριδοποίησης το διάλυμα που περιέχει το ραδιενεργό ιχνηθέτη συλλέγεται και απορρίπτεται σύμφωνα με τους κανόνες διαχείρισης ραδιενεργών αποβλήτων. Η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα έκλυσης (20 mM Na₂HPO₄, 0,1% SDS) τρεις φορές σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά υπό ανάδευση και κατόπιν τουλάχιστον τρεις φορές υπό ανάδευση για 10 λεπτά σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 65°C.

2.2.6.4 Αυτοραδιογραφία

Η παρατήρηση των πειραμάτων της ανάλυσης κατά Northern αλλά και του ελέγχου της υποστρωματικής εξειδίκευσης της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 πραγματοποιείται με αυτοραδιογραφία. Η κατανομή των ραδιενεργών μορίων αποτυπώνεται σε φιλμ ακτίνων X (Fuji X-Ray medical film) μετά από έκθεση της υβριδοποιημένης μεμβράνης ή του πηκτώματος της πολυακρυλαμίδης σε αυτό. Η έκθεση πραγματοποιείται παρουσία οθόνης (intensifying screen) που ενισχύει την ένταση του ραδιενεργού σήματος. Η ένταση του σήματος ισχυροποιείται περαιτέρω όταν χρησιμοποιηθούν 2 οθόνες, ενώ η ταχύτητα εμφάνισης της αυτοραδιογραφίας αυξάνεται όταν η έκθεση του φιλμ πραγματοποιείται στους -80°C. Ο χρόνος της έκθεσης εξαρτάται από τον αριθμό των κρούσεων του ραδιενεργού πηκτώματος ή της ραδιενεργής μεμβράνης.

2.2.7 Ανάλυση κατά Western

2.2.7.1 Ημίστεγνη ανοσοσύτρωση (Semi-dry Western blot) [197]

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος της ανοσοσύτρωσης είναι μια ευαίσθητη μέθοδος που επιτρέπει την ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων πρωτεϊνικών μορίων. Η μέθοδος στηρίζεται στη μεταφορά των πρωτεϊνών, όπως αυτές έχουν αναλυθεί από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης υπό την επίδραση εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης δρα ως επιφάνεια πάνω στη οποία ακινητοποιούνται οι πρωτεΐνες και επιτρέπει την εύκολη αντίδρασή τους με το αντίσωμα που προστίθεται σε επόμενο στάδιο. Αφού καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις της μεμβράνης (δηλαδή οι θέσεις όπου δεν υπάρχουν πρωτεΐνες) με ειδικό διάλυμα αλβουμίνης ορού βοός (BSA), ακολουθεί η διαδικασία της ανοσοεντόπισης.

Κατά την ανοσοεντόπιση προστίθεται ένα ειδικό αντίσωμα, (πολυκλωνικό ή μονοκλωνικό), το οποίο αναγνωρίζει ειδικά την υπό ανίχνευση πρωτεΐνη και έτσι επιτυγχάνεται η ειδική ανίχνευση της μέσα στο σύνολο των πρωτεϊνών που έχουν ακινητοποιηθεί στη μεμβράνη. Η ανίχνευση της ανοσοαντίδρασης γίνεται συνήθως με χρήση δεύτερου αντισώματος, ειδικού για το πρώτο αντίσωμα, το οποίο είναι σημασμένο είτε με κάποιο ένζυμο (οπότε η ανίχνευση της ανοσοαντίδρασης γίνεται μέσω του προσδιοριζόμενου προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης), είτε με κάποια ραδιενεργό ουσία (οπότε η ανίχνευση της ανοσοαντίδρασης γίνεται μέσω αυτοραδιογραφίας).

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της παρούσας διδακτορικής διατριβής περιγράφονται στην παράγραφο 2.1.2.

Μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Αρχικά πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης SDS κατάλληλης συγκέντρωσης, αναλόγως του είδους των πρωτεϊνικών δειγμάτων. Κατόπιν, Τοποθετούμε προς εξισορρόπηση 8 χαρτάκια Whattman διαστάσεων 8 x 9 cm υπό ήπια ανάδευση, σε διάλυμα μεταφοράς (25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 0,037% w/v SDS, 10% v/v μεθανόλη, pH 8,3) περίπου 15 λεπτά πριν από τη χρήση. Τοποθετούμε επίσης τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης διαστάσεων 8 x 9 cm σε dH₂O, υπό ήπια ανάδευση για 10 λεπτά και κατόπιν σε διάλυμα μεταφοράς, όπου την αφήνουμε μέχρι τη χρήση. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται κατά την τοποθέτηση της μεμβράνης στα

διάφορα διαλύματα, με στόχο την αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων κάτω από αυτή. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετείται σε διάλυμα μεταφοράς για χρονικό διάστημα 10 λεπτών. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά. Στη συνέχεια η κάτω βάση της συσκευής διαβρέχεται με διάλυμα μεταφοράς και τοποθετούμε κατά σειρά από κάτω προς τα πάνω: 4 χαρτιά Whattman, τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, το πήκτωμα και άλλα 4 χαρτιά Whattman. Η πάνω βάση της συσκευής διαβρέχεται επίσης με διάλυμα μεταφοράς. Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται υπό σταθερή τάση 15 Volts. Η χρονική διάρκεια της μεταφοράς ποικίλει ανάλογα με το είδος των δειγμάτων πρωτεϊνών που μεταφέρονται αλλά και με τη συγκέντρωση της ακρυλαμίδης στο πήκτωμα. Συνήθως η μεταφορά γίνεται για 40 λεπτά.

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της μεταφοράς, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετείται σε διάλυμα χρωστικής Ponceau-S (20% w/v Ponceau-S σε 3% w/v TCA) για 1-2 λεπτά προκειμένου να εκτιμηθεί η απόδοση της μεταφοράς. Το τμήμα της μεμβράνης όπου έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες πρότυπων μοριακών βαρών κόβεται και φυλάσσεται. Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με dH₂O και στη συνέχεια με διάλυμα 1x TBS (παράγραφος 2.1.5) για 10 λεπτά, υπό ισχυρή ανάδευση προκειμένου να αποχρωματιστεί.

Διαδικασία ανοσοεντόπισης και εμφάνισης

Η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα 1% w/v BSA σε TBS προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις για τουλάχιστον μία ώρα και κατόπιν τοποθετείται σε διάλυμα του πρώτου αντισώματος σε διάλυμα 1% w/v BSA σε TBS υπό ήπια ανάδευση. Ο τίτλος του πρώτου αντισώματος καθορίζεται κάθε φορά ανάλογα με το αντίσωμα που χρησιμοποιείται και το δείγμα των πρωτεϊνών ενώ ποικίλλει από 1/500 έως 1/2000. Ο χρόνος παραμονής της μεμβράνης στο διάλυμα του αντισώματος ποικίλλει ανάλογα με το δείγμα των πρωτεϊνών, αλλά και τον τίτλο του αντισώματος από 1-18 ώρες. Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα TBST για 10 λεπτά και TBS για 20 λεπτά με μία τουλάχιστον αλλαγή διαλύματος. Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετείται στο διάλυμα του δεύτερου αντισώματος σε διάλυμα 1% w/v BSA σε TBS υπό ήπια ανάδευση. Ο τίτλος του δεύτερου αντισώματος καθορίζεται ανάλογα με το δείγμα των πρωτεϊνών αλλά και τον τίτλο του πρώτου αντισώματος και κυμαίνεται από 1/50.000 έως και 1/100.000. Ο χρόνος παραμονής της μεμβράνης στο αντίσωμα αυτό είναι 1 ώρα. Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα TBST για 10 λεπτά και TBS για 20-30 λεπτά με τρεις τουλάχιστον αλλαγές διαλύματος. Κατόπιν η μεμβράνη εξισορροπείται στο διάλυμα αλκαλικής

φωσφατάσης (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) για 10 λεπτά με αλλαγή του διαλύματος. Στη συνέχεια η μεμβράνη μεταφέρεται στο διάλυμα εμφάνισης (0,0066% stock NBT, 0,0033% stock BCIP, παράγραφος 2.1.5) σε διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης. Στο στάδιο αυτό λαμβάνει χώρα η αντίδραση της αλκαλικής φωσφατάσης, η οποία παράγει χρωμογόνο προϊόν στις θέσεις όπου έχει πραγματοποιηθεί η ανοσοαντίδραση. Μετά την εμφάνιση των ζωνών πραγματοποιείται ο τερματισμός της αντίδρασης με πολλές εκπλύσεις της μεμβράνης σε dH₂O.

2.2.7.2 Ανοσοσύπωση κηλίδας (Dot Blot)

Κατά τη μέθοδο αυτή γίνεται ακινητοποίηση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, με τη χρήση ειδικής συσκευής, που πραγματοποιεί τη μεταφορά μέσω της δημιουργίας κενού αέρος. Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και χαρτί Whatman διαστάσεων 12 x 9 cm τοποθετούνται προς εξισορρόπηση σε διάλυμα TBS για 10 λεπτά. Σε όλες τις θέσεις της συσκευής (96 φρεάτια χωρητικότητας 500 μl) τοποθετούνται 100 μl διαλύματος TBS και γίνεται αναρρόφηση υπό κενό. Ακολουθεί η τοποθέτηση των δειγμάτων, ενώ στις κενές θέσεις τοποθετείται διάλυμα BSA περιεκτικότητας 0,01% w/v σε διάλυμα TBS και τα δείγματα αφήνονται να αναρροφηθούν με τη βαρύτητα. Όταν τα δείγματα απορροφηθούν πλήρως τοποθετούνται 100 μl διαλύματος TBS και γίνεται αναρρόφηση υπό κενό και η μεμβράνη μεταφέρεται αμέσως σε διάλυμα TBS. Μετά το πέρας αυτής της διαδικασίας ακολουθεί η διαδικασία ανοσοεντόπισης και εμφάνισης όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

2.2.8 Ανοσοκυτταροχημεία και μικροσκοπία φθορισμού

Η μικροσκοπία φθορισμού είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη ευαίσθητη μέθοδος για τη μελέτη της ενδοκυτταρικής κατανομής διαφόρων μορίων. Στην ανοσοκυτταροχημεία χρησιμοποιούνται σημασμένα με φθορίζοντα μόρια αντισώματα τα οποία αλληλεπιδρούν ειδικά με την υπό μελέτη πρωτεΐνη ή με το πρωτογενές αντίσωμα που αλληλεπιδρά με αυτήν. Η μέθοδος συνίσταται στην ακτινοβόληση του δείγματος με φως συγκεκριμένου μήκους κύματος που διεγείρει τη φθορίζουσα χρωστική και στην επακόλουθη καταγραφή του μήκους κύματος του φωτός που εκπέμπει η χρωστική με την χρήση κατάλληλων φίλτρων.

Η διαδικασία εφαρμόστηκε στην παρούσα διατριβή για τον προσδιορισμό της υποκυτταρικής κατανομής της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 με τα πολυκλωνικά αντισώματα anti-AVLI και K-02N. Αρχικά τα κύτταρα αναπτύσσονται στην επιφάνεια

καλυπτρίδων και αφού έφτασαν σε ποσοστό πληρότητας 50% ακολούθησε μονιμοποίηση και κατεργασία ώστε να γίνουν διαπερατά. Κατόπιν επώαστηκαν με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα που φέρει φθορίζον μόριο, υπέστησαν πυρηνική χρώση και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.

Πιο αναλυτικά, κύτταρα HEK-293 καλλιεργήθηκαν έως πληρότητα 50% σε αποστειρωμένες αντικειμενοφόρες πλάκες που είχαν τοποθετηθεί σε φρεάτια κυτταροκαλλιιεργειών κάτω από συνθήκες ανάπτυξης που περιγράφονται στην παράγραφο 2.2.2. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 15 λεπτά σε διάλυμα μονιμοποίησης (4% w/v φορμαλδεΰδη σε 1x PBS) και εκπλύθηκαν δύο φορές με διάλυμα έκπλυσης για 5 λεπτά. Κατόπιν επώαστηκαν για 10 λεπτά σε κατάλληλο διάλυμα που καθιστά τα κύτταρα διαπερατά (0.25% w/v Triton X-100, σε 1x PBS) σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα από έκπλυση με PBS ακολούθησε επώαση σε διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων (0.1% v/v Tween 20 και 1% w/v BSA σε 1x PBS) σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και επώαστηκαν με το ανοσοκαθαρισμένο αντίσωμα K02N ή το αντίσωμα PSM για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από τρεις εκπλύσεις με διάλυμα 1x PBS ακολούθησε επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα Alexa 488 που αναγνωρίζει το σταθερό τμήμα των IgG ανοσοσφαιρινών κουνελιού και φέρει φθορίζον μόριο. Μετά από τρεις εκπλύσεις με διάλυμα 1x PBS ακολούθησε επώαση με RNάση A για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, για τη διάσπαση του ολικού RNA ώστε να αποφευχθεί η χρώση του με ιωδιούχο προπίδιο, έκπλυση με 1x PBS και τέλος χρώση με ιωδιούχου προπιδίου σε τελική περιεκτικότητα 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ σε 1x PBS για 4 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (πυρηνική χρώση).

Η μικροσκοπία φθορισμού έλαβε χώρα στο συνεστιακό μικροσκόπιο (Confocal TE2000S/ECLIPSE C-1, Nikon) του τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής υπό την καθοδήγηση του διδάκτορα Θανάση Βελέντζα χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα φίλτρα για την χρωστική Alexa 488 σε τελική μεγέθυνση 60x με την χρήση καταδυτικού φακού.

Σε παράλληλα πειράματα ελέγχου παρατηρήθηκαν κύτταρα που δεν υπέστησαν καμία κατεργασία (για τον υπολογισμό του φθορισμού υποβάθρου) και κύτταρα που υπέστησαν όλη τη διαδικασία εκτός από επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα ώστε να οριστεί το κατώφλι (baseline) του φθορισμού.

2.2.9 Απομόνωση του cDNA της ανθρώπινης RNάσης κ-02

Η μικρή διαφορά στην mRNA αλληλουχία της RNάσης κ-02 σε σχέση με την RNάση κ-01 δεν επιτρέπει την απομόνωσή της μέσω κλασσικής RT-PCR προσέγγισης, καθώς δεν μπορούν να σχεδιαστούν εκκινητές ειδικοί για την εναλλακτική ισομορφή. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε μία παραλλαγή της επιλογής υβριδισμού που έχει στο παρελθόν εφαρμοστεί στο εργαστήριό μας για την κλωνοποίηση της εναλλακτικής mRNA ισομορφής του γονιδίου της RNάσης κ στο έντομο *Ceratitis capitata* [159].

Τα κύρια βήματα αυτής της μεθοδολογίας περιλαμβάνουν: **(1)** την απομόνωση poly(A)⁺ mRNA όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.4.3, **(2)** την αντίστροφη μεταγραφή τους επί των oligo(dT) σφαιριδίων, **(3)** την υβριδοποίηση των cDNA μορίων με έναν βιοτινυλωμένο μονόκλωνο ανιχνευτή συμπληρωματικό ως προς την αλληλουχία-στόχο που είναι ακινητοποιημένος σε μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης, **(4)** την πλήρη πέψη των υβριδίων με ένα ένζυμο περιορισμού που διασπά εκλεκτικά τη μία από τις δύο cDNA ισομορφές και **(5)** την ενίσχυση με PCR της επιθυμητής ισομορφής με χρήση ακραίων εκκινητών.

Αντίστροφη μεταγραφή

Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι το ένζυμο που χρησιμοποιείται στην αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής, την αντίδραση μετατροπής RNA σε DNA, τεχνική η οποία εφαρμόζεται ευρέως για μελέτες γονιδιακής έκφρασης. Η μεγάλη ποικιλία ενζύμων από διάφορους ιούς ή ακόμη και γενετικά τροποποιημένα ένζυμα με ενισχυμένη ικανότητα πολυμερισμού ή μειωμένη ενεργότητα νουκλεάσης εξασφαλίζουν την υψηλή απόδοση της αντίδρασης. Τα RNA μόρια μετατρέπονται σε μονόκλωνο συμπληρωματικό DNA (single-stranded cDNA) και αποτελούν υπόστρωμα για ένα μεγάλο αριθμό εφαρμογών (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR), κλωνοποίηση σε φορείς κλωνοποίησης και έκφρασης και άλλα). Για την κλωνοποίηση του cDNA της RNάσης κ-02 η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μία AMV αντίστροφη μεταγραφάση με ενεργότητα 5'→3' ριβονουκλεάσης. Η γεγονός που της επιτρέπει τη μεταγραφή επί των μαγνητικών σφαιριδίων χρησιμοποιώντας ως εκκινητή τις oligo(dT) αλληλουχίες.

Πριν από την έκλυση του poly(A)⁺ mRNA από τα μαγνητικά σφαιρίδια (παράγραφος 2.5.2) λαμβάνονται 50 μl σφαιριδίων διαλυτοποιημένων σε διάλυμα έκπλυσης και ξεπλένονται δύο φορές με 17.5 μl ρυθμιστικού διαλύματος αντίστροφης

μεταγραφάσης (1x FS – First Strand buffer). Αφού απορρίψουμε το υπερκείμενο με την χρήση του κατάλληλου μαγνήτη, προστίθενται στα σφαιρίδια 17.5 μl ρυθμιστικού διαλύματος αντίστροφης μεταγραφάσης συγκέντρωσης 1x, μείγμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM έκαστο, αναστολέας RNάσης A σε τελική συγκέντρωση 2 units/μl και αντίστροφη μεταγραφάση τελικής συγκέντρωσης 0.25 units/μl. Η αντίδραση πραγματοποιείται στο θερμικό κυκλοποιητή εκτελώντας τα τρία ακόλουθα στάδια: επώαση στους 45°C για 40 λεπτά, στους 50°C για 20 λεπτά και αδρανοποίηση του ενζύμου στους 70°C για 15 λεπτά.

Σύνθεση βιοτινυλωμένου ιχνηθέτη

Οι βιοτινυλωμένοι ιχνηθέτες μπορούν να συντεθούν μέσω μίας συμβατικής αντίδρασης PCR παρουσία βιοτινυλωμένων εκκινητών. Οι εκκινητές ενσωματώνονται στα νεοσυντιθέμενα μόρια κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, συνεπώς τα τελικά προϊόντα φέρουν στα άκρα τους ομοιοπολικά προσδεδεμένα μόρια βιοτίνης. Συνήθως χρησιμοποιείται ένας μόνο βιοτινυλωμένος εκκινητής και ένας μη βιοτινυλωμένος, ώστε να γίνεται σήμανση και δέσμευση του επιθυμητού κλώνου στα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης, ο οποίος είναι και συμπληρωματικός της αλληλουχίας στόχου. Για τη σύνθεση του ιχνηθέτη, 1 ng του πλασμιδίου L1 που φέρει κλωνοποιημένο το cDNA της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-01 επώαστηκε παρουσία 10 pmols του ζεύγους εκκινητών BUR και RNoFat (πίνακας 2.1) που επιτρέπουν την ενίσχυση του τμήματος 1-287 του cDNA της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-01 (accession number AM746459.1) παρουσία 2 units Taq πολυμεράσης σε αντίδραση τελικού όγκου 50 μl. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση το προϊόντος και καθαρισμός με χρήση του kit NucleoSpin® Gel έτσι ώστε να αποφευχθεί η προσθήκη βιοτινυλωμένων μορίων εκκινητή στην αντίδραση σύνδεσης σε μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης.

Σύνδεση βιοτινυλωμένου ιχνηθέτη σε μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης

Η στρεπταβιδίνη είναι μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 66 kDa που έχει πολύ ισχυρή συγγένεια σύνδεσης με τη βιοτίνη. Τα μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης που χρησιμοποιήθηκαν (Dynabeads® M-280 Streptavidin) αποτελούν ένα σύστημα για την εύκολη και ταχεία απομόνωση βιοτινυλωμένων μορίων. Η χρήση μαγνητικών σφαιριδίων στρεπταβιδίνης και βιοτινυλωμένων ιχνηθετών έχουν εφαρμογή σε πειράματα υβριδοποίησης και απομόνωσης cDNA μορίων ή τμημάτων χρωμοσωμικού DNA. Στην

παρούσα διατριβή ακινητοποιήθηκε ένας μονόκλωνος cDNA ανιχνευτής, συμπληρωματικός με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του cDNA της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-01.

Τριάντα μικρόλιτρα σφαιριδίων τοποθετούνται σε σωλήνα 1.5 ml, απομονώνονται με συλλογή του υπερκείμενου έπειτα από την τοποθέτηση του σωλήνα στον ειδικό μαγνήτη και αναδιαλύονται σε 100 µl 2x διαλύματος πρόσδεσης και ξεπλύματος (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 M NaCl, 2 mM EDTA). Επαναλαμβάνουμε ένα ακόμη ξέπλυμα σε αυτό το διάλυμα. Απομονώνουμε τα σφαιρίδια χρησιμοποιώντας τον ειδικό μαγνήτη και αφαιρούμε το υπερκείμενο διάλυμα. Στη συνέχεια αναδιαλύουμε τα σφαιρίδια σε 40 µl 2x διαλύματος πρόσδεσης και ξεπλύματος. Προσθέτουμε το καθαρισμένο προϊόν της αντίδρασης βιοτινυλίωσης ίσου όγκου και επωάζουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 30°C με ελαφρά ανακίνηση ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Απομονώνουμε τα σφαιρίδια χρησιμοποιώντας τον ειδικό μαγνήτη συγκέντρωσής τους και αφαιρούμε το υπερκείμενο. Ακολουθεί αναδιαλυτοποίηση των σφαιριδίων σε 40 µl διαλύματος 2x πρόσδεσης και πλυσίματος. Κατόπιν, απομονώνουμε τα σφαιρίδια και αφαιρούμε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια αναδιαλύουμε σε 70 µl φρέσκου διαλύματος 0.1 M NaOH και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται για να απομακρύνουμε τις μη βιοτινυλιωμένες αλυσίδες DNA για την χρησιμοποίηση μονόκλωνου DNA ως ιχνηθέτη στα πειράματα υβριδισμού. Αρχικά απομονώνουμε τα σφαιρίδια, αφαιρούμε το υπερκείμενο και τα αναδιαλυτοποιούμε σε 50 µl διαλύματος 0.1 M NaOH. Κατόπιν απομονώνουμε ξανά τα σφαιρίδια, αφαιρούμε το υπερκείμενο και αναδιαλυτοποιούμε σε 50 µl διαλύματος 1x πρόσδεσης και έκπλυσης και τα μεταφέρουμε σε έναν καινούργιο σωλήνα των 1.5 ml. Τέλος, απομονώνουμε τα σφαιρίδια, αφαιρούμε το υπερκείμενο και τα αναδιαλυτοποιούμε τα σφαιρίδια σε 50 µl διαλύματος TE. Επαναλαμβάνουμε το βήμα αυτό για μία ακόμη φορά και κατόπιν φυλάσσουμε το σωλήνα με τα σφαιρίδια που είναι διαλυτοποιημένα σε TE στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Υβριδοποίηση

Τα σφαιρίδια με τον ακινητοποιημένο ιχνηθέτη απομονώνονται με την χρήση του ειδικού μαγνήτη, το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και προστίθενται 85 µl διαλύματος υβριδοποίησης (UltraHyb buffer®, Ambion) και τοποθετούνται σε θερμαινόμενη πλάκα θερμοκρασίας 42°C υπό ανάδευση για 10 λεπτά. 15 µl από το προϊόν της αντίδρασης ενίσχυσης θερμαίνονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 100°C και τοποθετούνται ακαριαία στον πάγο όπου παραμένουν για 5 λεπτά ακόμα και προστίθενται στα σφαιρίδια με τον

ακίνητοποιημένο ανιχνευτή. Ακολουθεί επώαση σε θερμαινόμενη πλάκα θερμοκρασίας 42°C υπό ανάδευση για 4 ώρες. Τα σφαιρίδια συγκεντρώνονται με χρήση του ειδικού μαγνήτη και αναδιαλυτοποιούνται σε 100 μl διαλύματος έκπλυσης I (2x SSC, 0.1% SDS) που έχει προθερμανθεί στους 42°C όπου παραμένουν για πέντε λεπτά. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά. Τα σφαιρίδια συγκεντρώνονται και αναδιαλυτοποιούνται σε 100 μl διαλύματος έκπλυσης II (0.2x SSC, 0.1% SDS) που έχει προθερμανθεί στους 42°C όπου παραμένουν για πέντε λεπτά. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά. Τα σφαιρίδια συγκεντρώνονται ξανά και αναδιαλυτοποιούνται σε 100 μl διαλύματος TE όπου παραμένουν για πέντε λεπτά. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται 4 φορές (για να επιτευχθεί η απομάκρυνση του SDS από τα σφαιρίδια). Τα σφαιρίδια συγκεντρώνονται και αναδιαλυτοποιούνται σε 50 μl διαλύματος TE.

Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση και εφαρμογή PCR

Η διάσπαση των υβριδίων του cDNA της ισομορφής της ριβονουκλεάσης κ-01 με τον ανιχνευτή επιτυγχάνεται με την χρήση του ενζύμου περιορισμού *FatI*. Η έλλειψη των 4 βάσεων από την ισομορφή mRNA της ριβονουκλεάσης κ-02 καταργεί την αντίστοιχη θέση περιορισμού, συνεπώς αυτά τα υβρίδια παραμένουν ακέραια και τα cDNA μόρια που έχουν δεσμευθεί μπορούν να ενισχυθούν με την χρήση ακραίων εκκινητών σε συμβατική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Πιο αναλυτικά, τα σφαιρίδια μετά την υβριδοποίηση συγκεντρώνονται με χρήση του ειδικού μαγνήτη και αναδιαλυτοποιούνται σε 50 μl διαλύματος του ενζύμου περιορισμού για να εξασφαλιστούν οι άριστες συνθήκες δράσης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *FatI*. Τα σφαιρίδια συγκεντρώνονται και αναδιαλυτοποιούνται σε 17.5 μl διαλύματος 1x NEB2 και προστίθενται σε αυτά 3 units της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *FatI*. Ακολουθεί επώαση στους 55°C για 12-16 ώρες.

Τα ακέραια υβρίδια ενισχύθηκαν με PCR χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών NdeFAlt και RH (10 pmols έκαστο) (πίνακας 2.1) παρουσία 2 units Taq πολυμεράσης σε αντίδραση τελικού όγκου 50 μl σε θερμοκρασία υβριδοποίησης 50°C για 30 κύκλους. Τα προϊόντα ενίσχυσης κλωνοποιήθηκαν στον φορά κλωνοποίησης pCR 2.1 και υπέστησαν αλληλούχιση κατά Sanger.

2.2.10 Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων mRNA της ανθρώπινης RNάσης κ

Ο σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των δύο ισομορφών της ριβονουκλεάσης κ σε επίπεδο mRNA σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές επιτεύχθηκε με την ανάπτυξη μιας νέας μεθοδολογίας που επιτρέπει τη συγκεκριμένη ανάλυση. Η μεθοδολογία αυτή περιλαμβάνει την απομόνωση ολικού RNA από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.4.2 και την αντίστροφη μεταγραφή. Ακολουθεί αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με χρήση ενός ζεύγους εκκινητών που ενισχύουν μία αλληλουχία εκατέρωθεν του σημείου διαφοροποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των δύο ισομορφών και την επώαση ίσων όγκων προϊόντος παρουσία και απουσία του ενζύμου περιορισμού *FatI*. Τα ζεύγη δειγμάτων υποβάλλονται σε PCR πραγματικού χρόνου και η αναλογία των δύο ισομορφών προκύπτει από τη διαφορά του αριθμού των κύκλων (C_T) που απαιτούνται ώστε να ξεπεράσει ο φθορισμός τον φθορισμό υποβάθρου.

Αντίστροφη μεταγραφή, ενίσχυση του προϊόντος με συμβατική PCR και πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *FatI*

Δύο μικρογραμμάρια ολικού RNA υφίστανται αντίστροφη μεταγραφή παρουσία 1 unit M-MLV αντίστροφης μεταγραφάσης χρησιμοποιώντας έναν εκκινητή ειδικό για τις δύο ισομορφές της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ (RH, πίνακας 2.1) σε τελική συγκέντρωση 0.05 μ M σε αντίδραση όγκου 20 μ l. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία 42°C για 40 λεπτά και 1 μ l του προϊόντος αντίστροφης μεταγραφής ενισχύεται σε αντίδραση συμβατικής PCR παρουσία 10 pmols του ζεύγους εκκινητών HumC3F και HumC4R (πίνακας 2.1) παρουσία 2 units Taq πολυμεράσης σε αντίδραση τελικού όγκου 50 μ l σε θερμοκρασία υβριδοποίησης 60°C για 10 κύκλους. Το βήμα αυτό καθιστά τα cDNAs που αντιστοιχούν στις δύο ισομορφές δίκλωνα και ο μικρός αριθμός κύκλων εξασφαλίζει τη διατήρηση της αρχικής αναλογίας των μεταγράφων για τις δύο ισομορφές.

Πέντε μικρόλιτρα προϊόντος υφίστανται πέψη σε τελικό όγκο 20 μ l με προσθήκη κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος και 3 units της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *FatI*

σε θερμοκρασία 55°C για 18 ώρες. Ίσος όγκος δείγματος επωάζεται υπό τις ίδιες συνθήκες απουσία ενζύμου και τα ζεύγη δειγμάτων αποτελούν το υλικό που θα υποστεί ενίσχυση σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

Η τεχνική της PCR σε πραγματικό χρόνο δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης PCR κατά τη διάρκεια της εξέλιξής της. Η βασική αρχή της είναι ίδια με αυτή της κλασικής PCR με βασική διαφορά τη χρήση φθορίζουσων χρωστικών ή ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνευτών και εκκινήτων και η μέτρηση του εκπεμπόμενου φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός είναι δυνατός στην εκθετική φάση όπου ο ρυθμός ενίσχυσης είναι σταθερός και υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ του δεκαδικού λογάριθμου των αντιγράφων DNA και του αριθμού των κύκλων ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε το προϊόν να φτάσει μια συγκέντρωση κατώφλι (threshold). Η συγκέντρωση αυτή αντιστοιχεί στο κατώτερο όριο φθορισμού που μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια και να διακριθεί από το φθορισμό υποβάθρου (baseline). Συνεπώς, η μέτρηση βασίζεται στο καθορισμό του threshold και το προσδιορισμό του αριθμού των κύκλων (CT) που απαιτούνται ώστε να ξεπεράσει ο φθορισμός αυτή τη τιμή. Επομένως, όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα του DNA-στόχου, τόσο γρηγορότερα θα εμφανιστεί το πρώτο σήμα, δηλαδή τόσο μικρότερη θα είναι η τιμή του CT.

Τα μικρά μόρια που μπορούν να προσδεθούν σε δίκλωνο DNA μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες, αυτά που παρεμβάλλονται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων και αυτά που προσδέονται στη μικρή αύλακα. Η πρόσδεση στο DNA αυξάνει σημαντικά το φθορισμό αυτών των μορίων. Η χρωστική SYBR Green I είναι μια ασύμμετρη χρωστική κυανίνης η οποία δεσμεύεται κυρίως στο δίκλωνο DNA. Το σύμπλοκο που προκύπτει απορροφά στο μπλε φως ($\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$) και εκπέμπει στο πράσινο φως ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$). Κατά τη διάρκεια της τήξης του DNA τα μη δεσμευμένα μόρια της χρωστικής δεν εκπέμπουν έντονο φθορισμό. Κατά την επέκταση, λίγα μόρια της χρωστικής συνδέονται στο δίκλωνο εκκινήτη-στόχο, οπότε και φθορίζουν ενώ στο στάδιο του πολυμερισμού, περισσότερα μόρια συνδέονται στο νεοσυντιθέμενο DNA αυξάνοντας την ένταση του φθορισμού, η οποία ανιχνεύεται απευθείας. Στο τελευταίο στάδιο της αποδιάταξης του νεοσυντιθέμενου DNA, τα μόρια της χρωστικής απελευθερώνονται, ενώ το σήμα φθορισμού μειώνεται. Τελικό αποτέλεσμα είναι η αύξηση του φθορισμού που είναι αναλογική του προϊόντος που παράγεται.

Η αντίδραση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) με χρήση του kit KAPA SYBR®. Το KAPA SYBR® FAST Master περιέχει τροποποιημένη Taq DNA πολυμεράση η οποία για να ενεργοποιηθεί απαιτεί θέρμανση στους 95°C για 5 λεπτά ενώ είναι συμβατή με τη χρήση της SYBR Green. Τέλος, η παθητική χρωστική αναφοράς (ROX Passive Reference) έχει σταθερό φθορισμό όλη τη διάρκεια της αντίδρασης και ορίζει το φθορισμό υποβάθρου (baseline) ο οποίος και αφαιρείται αυτόματα από το ολικό φθορισμό των δειγμάτων. Η χρωστική δεν επηρεάζει την αντίδραση γιατί δεν παρεμποδίζει τη σύνθεση και εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος από αυτό της SYBR Green. Συνεπώς, επιτρέπει την εξομάλυνση μικρών διαφορών ανάμεσα στα δείγματα και διαφορών στο σήμα φθορισμού που δεν σχετίζονται με την PCR αντίδραση.

Ένα μικρόλιτρο προϊόντος για καθένα από τα ζεύγη δειγμάτων παρουσία και απουσία πέψης με το ένζυμο *FatI* (ένα ζεύγος για κάθε κυτταρική σειρά) ενισχύονται παρουσία του ζεύγους εκκινητών HumC3F και HumC4R (πίνακας 2.1) τελικής συγκέντρωσης 200 nM έκαστος, χρωστικής αναφοράς ROX low τελικής συγκέντρωσης 50 nM, σε μείγματος ενίσχυσης (KAPA SYBR® FAST qPCR Master mix) τελικού όγκου 10 μl ανά αντίδραση. Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις (triplicates) και μετά την ανάμειξη των συστατικών φορτώνεται στα φρεάτια ενίσχυσης [MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate with barcode (Cat No 4306737), Applied Biosystems].

Η αντίδραση περιλαμβάνει ένα στάδιο αποδιάταξης (95°C για 5 λεπτά) που ακολουθείται από 40 επαναλήψεις επώασης 95°C για 15 sec και 60°C για 1 min. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί ανάλυση καμπύλης τήξης των προϊόντων λόγω της μη εκλεκτικής πρόσδεσης της χρωστικής σε δίκλωνο DNA. Με την ανάλυση αυτή προσδιορίζεται η θερμοκρασία τήξης (T_m) των προϊόντων της αντίδρασης και μας δίνεται η δυνατότητα να διαπιστώσουμε το σχηματισμό διμερών εκκινητών και μη ειδικών προϊόντων αφού αυτά εμφανίζουν μικρότερο μήκος από την αλληλουχία στόχο και χαρακτηρίζονται από μικρότερη θερμοκρασία τήξης. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε από το λογισμικό του θερμικού κυκλοποιητή ABI 7500 Real-Time PCR System.

2.2.11 Παρασκευή πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του αμινοτελικού άκρου της ανθρώπινης RNάσης κ-02

Το αμινοτελικό τμήμα (αμινοξέα 1-62) της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 δεν ομοιάζει στο αμινοτελικό άκρο της ριβονουκλεάσης κ-01 και δεν εμφανίζει σημαντικές ομοιότητες με άλλες ανθρώπινες πρωτεΐνες. Ως εκ τούτου, κρίθηκε σκόπιμη η παραγωγή ενός πολυκλωνικού αντισώματος ειδικού έναντι αυτού προκειμένου να επιτευχθεί ο εντοπισμός και η μελέτη της υποκυττάριας κατανομής της πρωτεΐνης σε ανθρώπινα κύτταρα. Για το σκοπό αυτό, επιτεύχθηκε η ετερόλογη παραγωγή στο σύστημα IMPACT-CN® (New England Biolabs) και ο χρωματικός καθαρισμός το πεπτιδίου που αντιστοιχεί στην αλληλουχία 1-62 της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02. Το πεπτίδιο αυτό κατόπιν χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση κουνελιών και ο αντιορός που προέκυψε υπέστη καθαρισμό για την απομόνωση των ανοσοσφαιρινών που αλληλεπιδρούν με το εν λόγω πεπτίδιο.

Κλωνοποίηση αμινοτελικού άκρου και ετερόλογη έκφραση στο βακτηριακό σύστημα IMPACT-CN

Το IMPACT (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) είναι ένα νέο σύστημα πρωτεϊνικού καθαρισμού που κάνει χρήση της επαγόμενης αυτοτομής της ιντεΐνης ώστε να διαχωριστεί η επιθυμητή πρωτεΐνη από την πρωτεΐνη με την οποία είναι συντηγμένη. Το σύστημα επιτρέπει τον καθαρισμό σε ένα μοναδικό χρωματογραφικό στάδιο χωρίς τη χρήση πρωτεάσης. Το σύστημα κάνει χρήση της ιντεΐνης (454 αμινοξέα) που κωδικοποιείται από το γονίδιο VMA1 του *S.cerevisiae*. Η πρωτεΐνη-στόχος συντήκεται με τον επίτοπο ιντεΐνης ο οποίος φέρει μια περιοχή πρόσδεσης στη χιτίνη και επιτρέπει το καθαρισμό μέσω χρωματογραφίας συγγένειας. Παρουσία DTT (διθειοτριόλης), β-μερκαπτοαιθανόλης ή κυστεΐνης, η ιντεΐνη υπόκειται σε αυτοτομή με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της πρωτεΐνης στόχου από τη στήλη και την επίτευξη καθαρισμού σε ένα στάδιο.

Το σύστημα IMPACT™-CN χαρακτηρίζεται από σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων συστημάτων έκφρασης. Επιτρέπει το γρήγορο και απλό καθαρισμό της φυσικής πρωτεΐνης χωρίς επιπλέον αμινοξέα ενώ η υψηλή συγγένεια με τη κολώνα χιτίνης μειώνει τη πιθανότητα ύπαρξης μη ειδικών αλληλεπιδράσεων. Ακόμη, ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης από τον επίτοπο είναι εύκολος χωρίς τη χρήση πρωτεάσης ενώ αποτελεί το μοναδικό σύστημα με δυνατότητα σύντηξης στο καρβοξυτελικό άκρο.

Το σύστημα περιέχει πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης (pTYB) που επιτρέπουν τη σύντηξη του επιτόπου είτε στο καρβοξυτελικό άκρο (pTYB1 και pTYB2) είτε στο αμινοτελικό άκρο (pTYB11 και pTYB12) της πρωτεΐνης στόχου. Αυτή η ελαστικότητα στη θέση σύντηξης μεγιστοποιεί την πιθανότητα της επιτυχημένης έκφρασης και καθαρισμού.

Για να επιτευχθεί η ετερόλογη έκφραση του αμινοτελικού άκρου 1-62 της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 προχωρήσαμε στην ενίσχυση 1 ng του φορέα κλωνοποίησης Fat1 που περιέχει κλωνοποιημένο το cDNA της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 με το ζεύγος εκκινητών NdeFAlt και XhoRMid με τελική συγκέντρωση 200 nM έκαστος παρουσία 1 U Taq πολυμεράσης σε τελικό όγκο αντίδρασης 50 μ l, σε θερμοκρασία υβριδοποίησης 50°C για 30 κύκλους αντίδρασης. Το προϊόν που προέκυψε συνεπώαστηκε με γραμμικοποιημένο φορέα κλωνοποίησης pTYB1 που είχε υποστεί πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *NdeI* και *XhoI* παρουσία 1U T₄ DNA λιγάσης σε θερμοκρασία 14°C για 16 ώρες.

Ο ανασυνδυασμένος φορέας Exκ-02N που προέκυψε υποβλήθηκε σε αλληλούχιση κατά Sanger για να επαληθευθεί η σωστή ενσωμάτωση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του τμήματος 1-62 της RNάσης κ-02 και ακολούθησε μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα του στελέχους *E.coli* ER2566 όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.3. Η ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων ωστόσο πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 30°C για την αποφυγή καταπόνησης των μετασχηματισμένων κυττάρων. Ο φορέας έκφρασης φέρει αντίγραφο του γονιδίου *lacI* που κωδικοποιεί το καταστολέα *lac*. Η πρόσδεση του καταστολέα στο χειριστή *lac* καταστέλλει την έκφραση υποβάθρου του συντηγμένου γονιδίου απουσία IPTG.

Για την επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μία μονή αποικία εμβολιάζεται σε 5 ml θρεπτικού υλικού, που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό, και αφήνεται για ανάπτυξη στους 30°C για 16 ώρες. Στη συνέχεια, μέρος της καλλιέργειας αραιώνεται 100 φορές σε φρέσκο θρεπτικό υλικό και η καλλιέργεια αφήνεται για ανάπτυξη έως η OD₆₀₀ να φτάσει περίπου την τιμή 0.5 και η θερμοκρασία μειώνεται στους 18°C. Στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας προστίθεται ο επαγωγέας IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.3 mM και 1 ml της καλλιέργειας απομακρύνεται από αυτήν προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας για το χρονικό σημείο 0 της έναρξης της επαγωγής. Η καλλιέργεια αφήνεται για ανάπτυξη για 6 ώρες ακόμα και σε χρονικά διαστήματα 3 και 6 ώρες μετά την έναρξη της επαγωγής απομονώνονται και πάλι δείγματα όγκου 1 ml. Μετά την πάροδο 6 ωρών οι βακτηριακές καλλιέργειες φυγοκεντρώνονται στις 13000 rpm για 10

min σε θερμοκρασία 4°C και τα κύτταρα που έχουν καταβυθιστεί ως ίζημα φυλάσσονται στους -80°C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους.

Χρωματογραφικός καθαρισμός του αμινοτελικού άκρου της RNάσης κ-ο2

Ο χρωματογραφικός καθαρισμός του αμινοτελικού άκρου πραγματοποιήθηκε έπειτα από θραύση των βακτηριακών κυττάρων, εφαρμογή χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη χιτίνης και διάσπαση του αμινοτελικού άκρου από την πρωτεΐνη σύντηξης έπειτα από κατεργασία με διάλυμα μερκαπτοαιθανόλης.

Θραύση των βακτηριακών κυττάρων

Κυτταρικό ίζημα από βακτηριακή καλλιέργεια όγκου 1 L και οπτικής απορρόφησης $OD_{600} \approx 1.5$ κατεργάζεται με 30 mL παγωμένου διαλύματος στήλης (column buffer: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl) μέχρι διαλυτοποίησης. Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στον πάγο και ακολουθεί λύση με υπέρηχους (sonication) για συνολικό χρόνο 1 λεπτού με πέντε παύσεις με επώαση στον πάγο (για την αποφυγή θέρμανσης του βακτηριακού εκχυλίσματος). Ακολουθεί φυγοκέντριση σε θερμοκρασία 4°C, 8000 x g για 10 λεπτά. Το ίζημα απορρίπτεται και το υπερκείμενο αποτελεί το υλικό που θα υποβληθεί σε χρωματογραφικό καθαρισμό.

Χρωματογραφία σε στήλη χιτίνης

Η στήλη χιτίνης εξισορροπείται αργά με εικοσαπλάσιο όγκο διαλύματος στήλης. Ο όγκος της στήλης επιλέγεται βάσει του όγκου του υλικού και της απόδοσης της επαγωγής. Η ικανότητα δέσμευσης της συγκεκριμένης στήλης είναι 2 mg πρωτεΐνης ανά ml στήλης. Το βακτηριακό εκχύλισμα διέρχεται με αργή ροή από τη στήλη και κατόπιν ακολουθεί έκπλυση με τουλάχιστον εικοσαπλάσιο όγκο διαλύματος στήλης και δεκαπλάσιο όγκο διαλύματος στήλης μειωμένης αλατότητας (20 mM Tris - HCl pH 8.0, 100 mM NaCl). Προκειμένου να γίνει η έκλυση, πραγματοποιείται αρχικά ταχεία εξισορρόπηση (σε χρόνο μικρότερο από 20 λεπτά) με 2 όγκους διαλύματος έκλυσης (20 mM Tris - HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλη) και ακολουθεί παραμονή της στήλης με τη δεσμευμένη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη στο ίδιο διάλυμα για 48 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης ακολουθεί έκλυση με άμεση συλλογή κλασμάτων όπου απελευθερώνεται το επιθυμητό πεπτιδικό θραύσμα. Ο έλεγχος της έκλυσης πραγματοποιείται με SDS ηλεκτροφόρηση μικρού όγκου των κλασμάτων έκλυσης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης -

Tricine και χρώση Coomassie. Για την αναγέννηση της στήλης χιτίνης αυτή εκπλένεται με 3 όγκους 0,3 M NaOH. Η στήλη αφήνεται να ενυδατωθεί για 30 λεπτά και ξεπλένεται με ακόμη 7 όγκους 0,3 M NaOH. Τέλος, ξεπλένεται με 20 όγκους νερού και 5 όγκους διαλύματος στήλης.

Ανοσοποίηση και καθαρισμός του πολυκλωνικού αντισώματος κ-02N

Η ανοσοποίηση κουνελιών πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την εταιρεία Pacific Immunology. Το αμινοτελικό πεπτίδιο της RNάσης κ-02 εστάλη με τη μορφή ζωνών SDS-PAGE και εφαρμόστηκε πρωτόκολλο ανοσοποίησης συνολικής διάρκειας 14 εβδομάδων με 3 επαναληπτικές ανοσοποιήσεις. Μετά την παραλαβή του αντιορού ακολούθησε καθαρισμός έναντι του αμινοτελικού πεπτιδίου.

Για το σκοπό αυτό, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης διαστάσεων 2x5 cm επωάζεται με 120 μl καθαρισμένου αμινοτελικού πεπτιδίου συγκέντρωσης 2 mg/ml σταδιακά, μέχρι ολικής απορρόφησης. Ακολουθεί σύντομη ενυδάτωση της μεμβράνης με διάλυμα 1x PBS και ακολουθεί επώαση με 1% w/v BSA σε 1x PBS για μία ώρα. Ακολουθούν τρεις εκπλύσεις με διάλυμα 1x PBS. Η μεμβράνη συνεπώάζεται για 16 ώρες σε θερμοκρασία 4°C υπό ανάδευση με αντιορό αραιωμένο 1:1 σε διάλυμα 1x PBS. Ακολούθως αφαιρείται ο αντιορός και ακολουθεί έκπλυση με διάλυμα 1x PBST (1x PBS, 0.05% w/v Tween 20) και 4 εκπλύσεις με διάλυμα 1x PBS. Για την έκλυση του δεσμευμένου αντισώματος προστίθεται γλυκίνη 0.2 M pH 2.7 και ακολουθεί παραμονή για 5 λεπτά και άμεση προσθήκη 1/10 όγκου διαλύματος 1M Tris-HCl pH 8.0 για εξισορρόπηση του pH. Στον αντιορό προστίθεται BSA μέχρι τελικής συγκέντρωσης 40 mg/mL για σταθεροποίηση του αντισώματος και χωρίζεται σε μικρούς όγκους (500 μl) για χρήση σε πειράματα ανοσολογικού εντοπισμού.

2.2.12 Ετερόλογη έκφραση της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 στο σύστημα του ζυμομύκητα *Pichia pastoris*

Για την ετερόλογη παραγωγή της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 χρησιμοποιήθηκε το ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης του ζυμομύκητα *Pichia pastoris*. Το σύστημα αυτό παρέχει αρκετά σημαντικά πλεονεκτήματα καθώς επιτρέπει την πραγματοποίηση μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων όπως η γλυκοζυλίωση και ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών, οδηγώντας έτσι στην καλύτερη ανάκτηση της

φυσιολογικής διαμόρφωσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο χώρο [160]. Επιπλέον, έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την έκφραση τοξικών ριβονουκλεασών όπως η α-σαρκίνη [161] και η ογκονάση [162].

Στο σύστημα του ζυμομύκητα μπορεί να επιλεγεί ενδοκυττάρια ή εκκρινόμενη έκφραση της ετερόλογης πρωτεΐνης μέσω χρήσης του κατάλληλου φορέα έκφρασης. Κατά την παρούσα διατριβή το cDNA της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 υποκλωνοποιήθηκε στον φορέα έκφρασης pPICZαC, οπότε προέκυψε ο ανασυνδυασμένος φορέας PicFat1.

2.2.12.1 Ενσωμάτωση του cDNA της RNase κ-02 στο γονιδίωμα του ζυμομύκητα

Για την έκφραση της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης το cDNA που την κωδικοποιεί κλωνοποιήθηκε στο φορέα pPICZαC. Για την έκφραση της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης ο ανασυνδυασμένος φορέας μετασχηματίστηκε αρχικά σε κύτταρα του στελέχους DH5a της *E. coli*, ενώ για την έκφραση χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα του στελέχους GS115 του *P. pastoris*.

Συγκεκριμένα, στο φορέα pPICZαC η κλωνοποίηση της κωδικοποιούσας περιοχής της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ πραγματοποιήθηκε μεταξύ των θέσεων που αναγνωρίζονται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Cla*I και *Xba*I, δημιουργώντας τον ανασυνδυασμένο φορέα PicFat1 έπειτα από ενίσχυση του 1 ng του φορέα κλωνοποίησης που εμπεριέχει το cDNA της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 (φορέας Fat1) με το ζεύγος εκκινητών *Cla*FAlt και *Xba*I R σε θερμοκρασία υβριδοποίησης 50°C για 30 κύκλους.

Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με τον φορέα PicFat1

Ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων του στελέχους DH5a πραγματοποιείται όπως ακριβώς αναφέρεται στην παράγραφο 2.2.3 με τη διαφορά ότι το μίγμα των κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό Low Salt LB – Agar (παράγραφος 2.1.4), που περιέχει αντιβιοτικό ζεοσίνη σε συγκέντρωση 25 μg/ml. Η ανάπτυξη των βακτηρίων πραγματοποιείται στους 37°C.

Στη συνέχεια, από τα τρυβλία επιλέγουμε 2-3 αποικίες, οι οποίες αναπτύσσονται overnight στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση στις 250 rpm. Την επόμενη ημέρα οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνται και ακολουθεί απομόνωση πλασμιδιακού DNA όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.5.1. Τα απομονωμένα πλασμίδια υπόκεινται σε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Cla*I και *Xba*I, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η

ενσωμάτωση του cDNA της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ στο φορέα και η σωστή αλληλουχία τους επιβεβαιώνεται με ανάλυση Sanger.

A. Γραμμικοποίηση του φορέα έκφρασης

Η ενσωμάτωση των ανασυνδυασμένων φορέων έκφρασης στο γονιδίωμα του ζυμομύκητα γίνεται με ομόλογο ανασυνδυασμό ανάμεσα στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου AOX1 στο DNA του ζυμομύκητα και της αντίστοιχης περιοχής στον φορέα έκφρασης. Συνεπώς πρέπει να προηγηθεί η γραμμικοποίησή και ο καθαρισμός του από πρωτεϊνικές προσμίξεις.

Πιο συγκεκριμένα, 5-10 μg ανασυνδυασμένου πλασμιδίου επωάζονται με 1 U περιοριστικής ενδονουκλεάσης *SacI*, στους 37°C για 2-3 ώρες. Ο ανασυνδυασμένος φορέας έκφρασης περιλαμβάνει μία μόνο θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Ακολουθεί επώαση στους 62°C για 20 λεπτά προκειμένου να απενεργοποιηθεί το ένζυμο. Στον όγκο των αντιδρώντων προστίθεται 1,5 όγκος ρυθμιστικού διαλύματος TE (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) και ίσος όγκος διαλύματος κορεσμένης σε TE φαινόλης/χλωροφορμίου σε αναλογία 1:1 και ακολουθεί ανάδευση. Το δείγμα φυγοκεντρείται στα 15.000 x g για 15 λεπτά (4°C), λαμβάνεται το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης (υδατική φάση) και προστίθεται: 1/10 του όγκου του υπερκειμένου διαλύματος 3M NaCOOH-HCOOH pH 5,2 και 100% αιθανόλη ίση με 2,5 φορές τον όγκο του υπερκειμένου, προκειμένου να γίνει κατακρήμνιση του DNA. Το δείγμα παραμένει στους -20°C για τουλάχιστον 4 ώρες και ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 15.000 x g για 10 λεπτά (4°C). Το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα προστίθεται 75% αιθανόλη ίσου όγκου με αυτόν του υπερκειμένου. Το δείγμα φυγοκεντρείται ξανά, υπό τις ίδιες συνθήκες, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα του DNA διαλυτοποιείται σε 10μl dH₂O.

B. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων ζυμομύκητα GS115

Για την παρασκευή δεκτικών κυττάρων του ζυμομύκητα *Pichia pastoris* μία μονή αποικία κυττάρων του στελέχους GS115 απομονώνεται και καλλιεργείται για 16-18 ώρες σε 5 ml θρεπτικού διαλύματος YPD στους 30°C υπό ανάδευση στις 250 rpm. Ακολουθεί ανακαλλιέργεια σε 25 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού YPD (με περίπου 500 μl από την αρχική καλλιέργεια), η οποία αφήνεται να αναπτυχθεί στις ίδιες συνθήκες μέχρι η οπτική της πυκνότητα στα 600 nm να φτάσει την τιμή OD₆₀₀ 1,3-1,5. Στη συνέχεια τα κύτταρα

φυγοκεντρώνονται στα 1.500 x *g* για 5 λεπτά (4°C). και διαλυτοποιούνται σε 25 ml παγωμένου, αποστειρωμένου dH₂O. Τα κύτταρα επαναφυγοκεντρώνονται όπως στο βήμα 3 και επαναδιαλυτοποιούνται σε 12,5 ml παγωμένου, αποστειρωμένου dH₂O. Τα κύτταρα κατόπιν επαναφυγοκεντρώνονται και επαναδιαλυτοποιούνται σε 2 ml παγωμένου, αποστειρωμένου διαλύματος 1M σορβιτόλης. Τέλος, ακολουθεί επαναφυγοκέντρηση και επαναδιαλυτοποίηση σε 200 μl παγωμένου, αποστειρωμένου διαλύματος 1M σορβιτόλης. Τα κύτταρα διατηρούνται στον πάγο και χρησιμοποιούνται αμέσως για ηλεκτροδιάτρηση. Σε αντίθεση με τα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα, τα δεκτικά κύτταρα του ζυμομύκητα δεν μπορούν να αποθηκευτούν, οπότε πρέπει να χρησιμοποιηθούν οπωσδήποτε την ίδια μέρα που παρασκευάζονται.

Γ. Μετασχηματισμός των κυττάρων του ζυμομύκητα με ηλεκτροδιάτρηση

Η ενσωμάτωση του γραμμικοποιημένου ανασυνδυασμένου φορέα στο γονιδίωμα του ζυμομύκητα πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροδιάτρηση. Σε 80 μl δεκτικών κυττάρων προστίθενται 2,5-5 μg γραμμικού DNA και το μείγμα μεταφέρεται σε παγωμένη (0°C) κυβέττα ηλεκτροδιάτρησης πλάτους 0,2 cm. Η κυβέττα διατηρείται στον πάγο για 5 λεπτά και ακολουθεί παλμός του μίγματος σε συσκευή Gene pulser, Bio-Rad σε τάση ρεύματος 1.500 Volts. Αμέσως, προσθέτουμε 1 ml παγωμένου διαλύματος 1M σορβιτόλης και το μείγμα μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα falcon. Ακολουθεί επώαση του μίγματος στους 30°C χωρίς ανάδευση για 90 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης, ποσότητες 50, 100 και 250 μl του μίγματος επιστρώνονται σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό YPDS-1,5% w/v άγαρ και 100 μg/ml ζεοσίνη. Τα τρυβλία επωάζονται στους 30°C για 3-4 ημέρες μέχρι την εμφάνιση αποικιών.

2.2.12.2 Επαγωγή της έκφρασης της ανθρώπινης RNάσης κ-02

Στο σύστημα έκφρασης του μεθυλότροφου ζυμομύκητα *Pichia pastoris* η έκφραση του επιθυμητού cDNA βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της αλκοολικής οξειδάσης (AOX1). Παρουσία μεθανόλης ως μοναδικής πηγής άνθρακα στο θρεπτικό υλικό, επάγεται η έκφραση του γονιδίου αυτού, προκειμένου η μεθανόλη να οξειδωθεί προς φορμαλδεΰδη.

Η επαγωγή της έκφρασης της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 πραγματοποιήθηκε αρχικά σε μικρή κλίμακα, όπου τυχαία επιλεγμένοι κλώνοι

καλλιεργήθηκαν σε μικρούς όγκους θρεπτικού υλικού για να επιλεγούν εκείνοι που παράγουν ικανοποιητική ποσότητα ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η επιλογή πραγματοποιείται έπειτα από ανοσολογική ανίχνευση της RNάσης κ-02 στο υπερκείμενο των καλλιεργείων με ανοσοσύτωση κηλίδας (παράγραφος 2.2.7.2). Οι κλώνοι που επιλέγονται καλλιεργούνται σε μεγάλη κλίμακα με σκοπό να συλλεχθεί μεγαλύτερος όγκος θρεπτικού υλικού για να υποβληθεί σε χρωματογραφικό καθαρισμό.

Η διαδικασία που ακολουθείται για μικρού ή μεγαλύτερου όγκου καλλιέργεια περιλαμβάνει αρχικά τον εμβολιασμό μίας αποικίας του μετασχηματισμένου κλώνου σε θρεπτικό διάλυμα BMGY και αφήνεται για ανάπτυξη στους 30°C για 16-18 ώρες υπό συνεχή ανάδευση στις 250 rpm. Το θρεπτικό υλικό BMGY περιέχει γλυκερόλη που δρα ως καταστολέας της έκφρασης του γονιδίου της αλκοολικής οξειδάσης, κάτι που εξυπηρετεί την αποφυγή τοξικών φαινομένων μέχρι η καλλιέργεια αποκτήσει μια ικανή οπτική πυκνότητα και να εισέλθει στην εκθετική φάση. Την επόμενη ημέρα γίνεται ανακαλλιέργεια στον ίδιο όγκο θρεπτικού υλικού BMGY με περίπου 1/50 αραίωση της αρχικής καλλιέργειας, η οποία αφήνεται να αναπτυχθεί στις ίδιες συνθήκες, μέχρι η οπτική της πυκνότητα στα 600 nm να φτάσει την τιμή $OD_{600}=5-6$. Όταν η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας φθάσει την παραπάνω τιμή, γίνεται αποθήκευση των κυττάρων με ανάμιξη 425 μl καλλιέργειας με 75 μl αποστειρωμένου διαλύματος 80% γλυκερόλης. Το μίγμα εμβαπτίζεται σε υγρό άζωτο και αποθηκεύεται στους -80°C. Από τα παγωμένα φιαλίδια των κυττάρων γίνεται επίστρωση σε τρυβλίο και από αυτό απομονώνονται μεμονωμένες αποικίες και εμβολιάζονται σε θρεπτικό υλικό προκειμένου να ξεκινήσει νέα καλλιέργεια. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της υπόλοιπης καλλιέργειας στα 1.500 x g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα των κυττάρων διαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού διαλύματος BMMY προκειμένου η οπτική πυκνότητα της νέας καλλιέργειας στα 600 nm να έχει τιμή OD_{600} 1,5-2. Ταυτόχρονα απομονώνουμε υπερκείμενο όγκου 2 ml, που αντιστοιχεί στην χρονική στιγμή 0 της επαγωγής, και καταψύχουμε στους -20°C. Η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί στους 30°C για τις επόμενες 48 ώρες. Κάθε 24 ώρες προστίθεται στην καλλιέργεια 100% μεθανόλη σε τελική συγκέντρωση 0.5% (v/v) προκειμένου να διατηρηθεί η επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Κάθε 24 ώρες απομονώνουμε και καταψύχουμε 2 ml υπερκείμενου της καλλιέργειας.

2.2.12.3 Χρωματογραφικός καθαρισμός της ανασυνδυασμένης RNάσης κ-02

Κύτταρα του επιλεγμένου μετασχηματισμένου κλώνου καλλιεργούνται για 48 ώρες και στη συνέχεια λαμβάνεται υπερκείμενο όγκου 25 ml. Το υπερκείμενο αυτό

υποβάλλεται σε εξαντλητική διαπίδυση έναντι του διαλύματος A (20 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.0, 1% v/v Nonidet P-40). Ακολουθως, το υλικό χρωματογραφείται σε στήλη ηπαρίνης (0.5 ml), η οποία έχει εξισορροπηθεί με το διάλυμα A. Η ταχύτητα ροής της στήλης ρυθμίζεται, ώστε να μην ξεπερνά τα 10 ml/ώρα και όλη η διαδικασία λαμβάνει χώρα στους 4°C. Μετά την πρόσδεση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης γίνεται εξαντλητική έκπλυση της στήλης με 50 ml διαλύματος A. Ακολουθεί η έκλυση των πρωτεϊνών από τη στήλη εφαρμόζοντας γραμμικά μεταβαλλόμενη κλίση NaCl συγκέντρωσης 0-0,25 M NaCl (συνολικός όγκος 12 ml) και συλλέγονται κλάσματα όγκου 0.5 ml. Τα κλάσματα της έκλυσης υποβάλλονται σε ανάλυση ριβονουκλεολυτικής ενεργότητας και αυτά στα οποία ανιχνεύεται η μεγαλύτερη ενεργότητα αναμιγνύονται και αναλύονται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-SDS συγκέντρωσης 15%, προκειμένου να εκτιμηθεί η ποσότητα αλλά και η καθαρότητα της απομονωμένης ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02.

2.2.13 Έλεγχος της ενζυμικής ενεργότητας της RNάσης κ-02

2.2.13.1 Έλεγχος με ραδιενεργά υποστρώματα

Σήμανση των ολιγονουκλεοτιδίων με [γ -³²P]

Η ραδιοσήμανση των ολιγονουκλεοτιδίων γίνεται με μεταφορά ενός ραδιενεργού φωσφορικού ιόντος (Pi) από τη γ θέση του ATP στο 5' άκρο των ολιγονουκλεοτιδίων με τη βοήθεια του ενζύμου T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση (T4 PNK). 5-20 ng του επιθυμητού ολιγονουκλεοτιδίου ολιγονουκλεοτιδίων επωάζεται στους 70°C για 3 min και τοποθετείται αμέσως σε πάγο, όπου προστίθενται 5 μ l T4 PNK ρυθμιστικού διαλύματος, 20 units T4 PNK ενζύμου, 1-3 μ l [γ -³²P] ATP (ειδικής ενεργότητας 3000 Ci / mmol) και dH₂O ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50 μ l. Το μείγμα της αντίδρασης αναδεύεται και επωάζεται στους 37°C για 1 ώρα. Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 50 μ l διαλύματος επιφόρτωσης RNA (5 mM Tris, 5 mM Βορικό οξύ, 1 mM EDTA, 10 M Ουρία, 0,01% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,01% w/v Όξινο μπλε -xylene cyanol-). Το μείγμα της σήμανσης αναλύεται σε πήκτωμα 17% πολυακρυλαμίδης-8 M ουρίας σε ειδική συσκευή που πληρούται με διάλυμα ηλεκτροδίων 0,5x TBE, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.3. Μετά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα τοποθετείται σε χαρτί Whatmann και εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ για 10-15 λεπτά περίπου. Με τη βοήθεια του φιλμ αυτοραδιογραφίας, τα τμήματα - ζώνες του πηκτώματος που περιέχουν το

ραδιοσημασμένο RNA υπόστρωμα αποκόπτονται και τοποθετούνται σε σωληνάκια. Ακολουθεί εκχύλιση του RNA με την προσθήκη 400 µl διαλύματος εκχύλισης RNA (0,5 M CH₃COONH₄, 0,1 % w/v SDS, 0,1 mM EDTA) σε κάθε σωλήνα και ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 περίπου ώρες. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί κατακρήμνιση των ολιγονουκλεοτιδίων, με προσθήκη 5 µl γλυκογόνου (Ambion, 15 mg/ml) και 100% αιθανόλης ίσης με 2,5 φορές τον όγκο του υπερκειμένου. Το δείγμα παραμένει στους -20°C για 16-18 ώρες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος στα 15.000 x g για 20 λεπτά (4°C), πλύσιμο του ιζήματος με ίσο όγκο διαλύματος 75% αιθανόλης και επαναφυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Το τελικό ίζημα, που περιέχει το καθαρό ραδιοσημασμένο υπόστρωμα διαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού απαλλαγμένου ριβονουκλεάσης, έτσι ώστε η ένδειξη του μετρητή ακτινοβολίας Geiger-Muller για 1 µl ραδιοσημασμένου υποστρώματος να κυμαίνεται από 5 έως 7 cps. Το σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο αποθηκεύεται σε μικρούς όγκους στους -80 °C. Στο διάλυμα του ραδιενεργού ολιγονουκλεοτιδίου #1 προστίθεται μη ραδιενεργό (κρύο) RNA, που απομονώνεται από κύτταρα ζυμομύκητα, σε τελική συγκέντρωση 10 ng/ml).

Δοκιμασία ριβονουκλεολυτικής ενεργότητας (RNA assay)

Η διαδικασία που ακολουθήσαμε για τον προσδιορισμό της ριβονουκλεολυτικής ενεργότητας της RNάσης κ-02 έναντι των ραδιενεργών υποστρωμάτων-ολιγονουκλεοτιδίων έχει ως εξής:

- Διάφορες ποσότητες της ανασυνδυασμένης RNάσης κ-02 ή των μεταλλαγμένων μορφών της επωάζονται σε μίγμα αντίδρασης συνολικού όγκου 15 µl που περιέχει ως υπόστρωμα ραδιενεργό ολιγονουκλεοτίδιο, 21 mM ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα καλίου pH 6,0 και 1 mM EDTA, στους 37°C για κατάλληλο χρονικό διάστημα.
- Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένο RNA υπόστρωμα που επωάζεται απουσία ενζύμου, υπό τις ίδιες συνθήκες αντίδρασης.
- Στην περίπτωση του ολιγονουκλεοτιδίου #1 δηλαδή του 30μερούς RNA, χρησιμοποιούνται δύο ακόμη αντιδράσεις ελέγχου, προκειμένου να αποκαλυφθούν οι θέσεις όπου τα ένζυμα διασπούν το 30μερές υπόστρωμα.

1) Αντίδραση αλκαλικής υδρόλυσης του RNA υποστρώματος κατά την οποία

το υπόστρωμα αποικοδομείται σε ολιγονουκλεοτίδια. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται με επώαση καθορισμένης ποσότητας του υποστρώματος #1 σε ρυθμιστικό διάλυμα 75 mM Na₂CO₃/NaHCO₃ pH 9,2, 0,5 mM EDTA στους 90°C για 15 λεπτά, σε τελικό όγκο αντίδρασης 15 μλ. Ο χρόνος επώασης έχει καθοριστεί έτσι ώστε να μη γίνεται πλήρης υδρόλυση αλλά το τελικό προϊόν αντίδρασης να περιλαμβάνει μόρια όλων των μηκών που χρησιμεύουν ως δείκτες του μεγέθους των προϊόντων υδρόλυσης.

2) Αντίδραση μερικής αποικοδόμησης του υποστρώματος από τη ριβονουκλεάση T₁, η οποία διασπά το υπόστρωμα μετά από κατάλοιπα γουανίνης. Η αντίδραση πραγματοποιείται με επώαση καθορισμένης ποσότητας του ραδιοσημασμένου υποστρώματος #1 παρουσία 1 unit της ριβονουκλεάσης T₁ σε διάλυμα I (33 mM κιτρικό νάτριο, 1,7 mM EDTA, 0,04% w/v όξινο μπλε -xylene cyanol-, 0,08% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 7 M ουρία) στους 55°C για 10 λεπτά, σε τελικό όγκο αντίδρασης 15 μλ. Όπως κατά την αλκαλική υδρόλυση έτσι και εδώ ο χρόνος επώασης έχει καθοριστεί έτσι ώστε να μη γίνεται πλήρης υδρόλυση, αλλά το τελικό προϊόν αντίδρασης να περιλαμβάνει μόρια όλων των δυνατών μεγεθών.

- Ο τερματισμός των αντιδράσεων πραγματοποιείται με την προσθήκη όγκου διαλύματος επιφόρτωσης RNA (5 mM Tris, 5 mM βορικό οξύ, 1 mM EDTA, 10 M ουρία, 0,01% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,01% w/v όξινο μπλε -xylene cyanol-) ίσου με αυτού των αντιδρώντων.
- Τα προϊόντα των αντιδράσεων αναλύονται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα 17% πολυκαρυλαμίδης-8 M ουρίας και ακολουθεί αυτοραδιογραφία. Ο χρόνος έκθεσης ποικίλει από 1-3 ημέρες.
- Η εκτίμηση της υδρόλυσης των ραδιενεργών νουκλεοτιδίων στις αυτοραδιογραφίες γίνεται με το πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας ImageJ.

2.13.2 Έλεγχος με φθορίζοντα υποστρώματα

Ο προσδιορισμός του Km της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 και της ανασυνδυασμένης ριβονουκλεάσης κ-01 πραγματοποιήθηκε έναντι του φθορίζοντος υποστρώματος 5'-FAM -dTdTdTdTdTrAdGdTdTdTdT-BHQ1-3' (subB) με ενζυμική δοκιμασία πραγματικού χρόνου. Στο υπόστρωμα αυτό το μόριο BHQ1 κάνει απόσβεση του φθορισμού της χρωστικής αναφοράς FAM, μέσω του φαινομένου

ενεργειακής μεταφοράς αντήχησης φθορισμού (FRET). Όταν ο ApG δεσμός υδρολυθεί από τα ένζυμα, οι δύο χρωστικές απομακρύνονται και η εκπομπή φθορισμού από το FAM είναι ανιχνεύσιμη. Η δοκιμασία ριβονουκλεολυτικής ενεργότητας έναντι του φθορίζοντος υποστρώματος subB με σκοπό τον προσδιορισμό του K_m των ενζύμων, γίνεται ως εξής:

- Διαφορετικές ποσότητες του φθορίζοντος υποστρώματος που αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις εύρους από 20 nM έως 20 μ M επωάζονται παρουσία της ανασυνδυασμένης RNάσης κ-01 ή ανασυνδυασμένης RNάσης κ-02 σε μίγμα αντίδρασης 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου pH 6,0, 1 mM EDTA, τελικού όγκου 20 μ l, στους 37°C, για 40 min.
- Όλες οι αντιδράσεις συνοδεύονται από αντίδραση ελέγχου, όπου δεν προστίθεται ένζυμο και η παραγωγή φθορισμού ανιχνεύεται παράλληλα με τις αντιδράσεις διάσπασης.
- Σε κάθε περίπτωση τα υποστρώματα προεπωάζονται για 15 λεπτά στους 37°C προκειμένου να αποφευχθεί η παραγωγή φθορισμού που οφείλεται στη μεταβολή θερμοκρασίας του υποστρώματος (εκπομπή φθορισμού-υποβάθρου).
- Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε θερμικό κυκλοποιητή ABI 7500 Real-Time PCR System, όπου χρησιμοποιώντας κατάλληλο πρωτόκολλο ανιχνεύονται τα επίπεδα φθορισμού σε κανονικά χρονικά διαστήματα (ανά 40 δευτερόλεπτα για 60 επαναλήψεις).
- Μετά το πέρας της αντίδρασης, λαμβάνονται οι τιμές φθορισμού (επιλογή component) και ακολουθεί γραφική παράσταση των τιμών φθορισμού συναρτήσεως του χρόνου. Οι καμπύλες ελέγχονται ως προς τη γραμμικότητά τους ($R^2 > 0,98$) και υπολογίζεται ο συντελεστής διεύθυνσης των αντίστοιχων ευθειών. Οι τιμές αυτές εκφράζουν το ρυθμό παραγωγής προϊόντος και αντιστοιχούν στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, εκφρασμένης σε αυθαίρετες μονάδες φθορισμού συναρτήσεως του χρόνου (RFU, Relative Fluorescence Units).
- Ακολουθεί επεξεργασία των αποτελεσμάτων λαμβάνοντας υπ' όψιν την ταχύτητα αντίδρασης συναρτήσεως των διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος. Η επεξεργασία γίνεται με την χρήση ειδικού λογισμικού (GraphPad Prism) με εφαρμογή μη γραμμικής παλινδρόμησης (non-linear regression). Το διάγραμμα που προκύπτει απεικονίζει τη συσχέτιση συγκέντρωσης υποστρώματος συναρτήσεως της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης από όπου προσδιορίζεται και η τιμή K_m .
- Τα πειράματα επαναλαμβάνονται τέσσερις φορές για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος και λαμβάνεται υπόψη ο μέσος όρος της τιμής ταχύτητας που

προκύπτει.

2.2.14 *In silico* ανάλυση αλληλουχιών

Έρευνα σε βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Για τον εντοπισμό EST αλληλουχιών που αντιστοιχούν στο γονίδιο της ανθρώπινης RNάσης κ σε δείγματα ανθρώπινης προέλευσης πραγματοποιήθηκε εκτεταμένη έρευνα αναζήτησης ομολογίας σε βάσεις δεδομένων των ανθρώπινων EST (Expressed Sequence Tag) αλληλουχιών μέσω του λογισμικού TBLASTN της πλατφόρμας NCBI, χρησιμοποιώντας ως αλληλουχία - οδηγό την αμινοξική αλληλουχία της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-01.

Στοίχιση αμινοξικών και νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Για τη στοίχιση των αμινοξικών και νουκλεοτιδικών αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Clustal Omega που διατίθεται στην ιστοσελίδα του EMBL-EBI.

3 Αποτελέσματα

3.1 Έκφραση της ανθρώπινης RNάσης κ σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

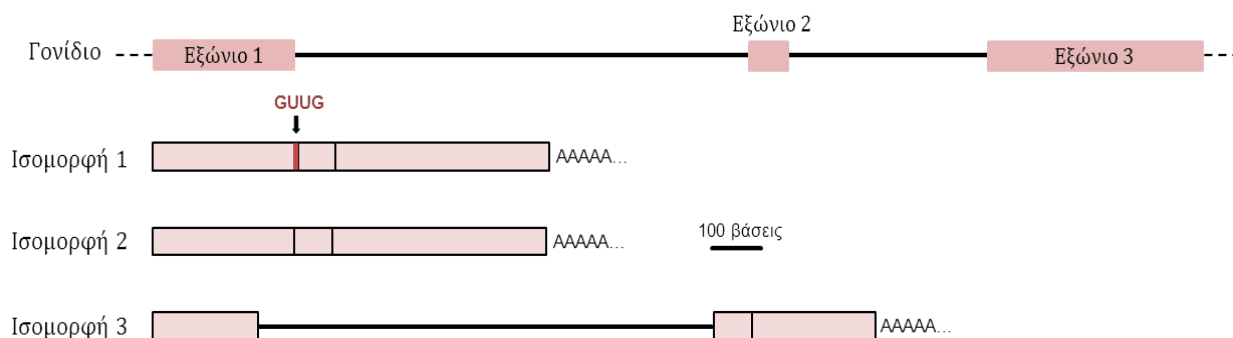
Η πρώτη προσπάθεια της μελέτης της έκφρασης της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ εστιάστηκε στη διερεύνηση ύπαρξης πιθανών εναλλακτικών mRNA ισομορφών. Για το σκοπό αυτό έγινε εκτεταμένη αναζήτηση EST αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που κωδικοποιούνται από το γονίδιο της RNάσης κ και ανάλυση κατά Northern για τον εντοπισμό πιθανών εναλλακτικών ισομορφών σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές διαφορετικής ιστικής προέλευσης.

3.1.1 Δεδομένα από EST αλληλουχίες για την έκφραση πιθανών εναλλακτικών ισομορφών της ανθρώπινης RNase κ

Η ευρεία έκφραση της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ σε όλους τους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια που έχουν μελετηθεί έχει πιστοποιηθεί από παλαιότερες ερευνητικές προσπάθειες του εργαστηρίου μας [106] και ένας μεγάλος αριθμός EST αλληλουχιών που αντιστοιχούν στην κωδική περιοχή της ανθρώπινης RNάσης κ εντοπίζεται τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε παθολογικά δείγματα που έχουν υποστεί αλληλούχιση. Δεδομένου ότι η συντριπτική πλειοψηφία των ανθρώπινων γονιδίων κωδικοποιεί τη σύνθεση εναλλακτικών RNA προϊόντων, θεωρήσαμε σκόπιμη την ανάλυση EST αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε πιθανές εναλλακτικές ισομορφές της RNase κ. Έτσι, πραγματοποιήθηκε εκτεταμένη έρευνα αναζήτησης ομολογίας σε βάσεις δεδομένων ανθρώπινων EST αλληλουχιών μέσω του προγράμματος BLAST, χρησιμοποιώντας ως αλληλουχία-οδηγό την νουκλεοτιδική αλληλουχία του cDNA της ανθρώπινης RNase κ (Accession Number AM746459).

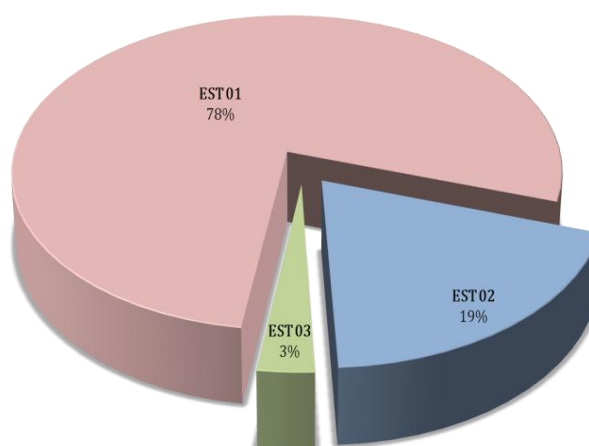
Η έρευνα αυτή αποκάλυψε έναν μεγάλο αριθμό EST αλληλουχιών που η πλειοψηφία τους αντιστοιχεί στην κλωνοποιημένη ισομορφή της ανθρώπινης RNάσης κ. Ωστόσο, οδήγησε στην αποκάλυψη δύο ακόμη τύπων EST αλληλουχιών που πιθανώς να αντιστοιχούν σε εναλλακτικές ισομορφές της ανθρώπινης RNase κ. Όπως παρουσιάζεται και διαγραμματικά στην εικόνα 3.1, ο δεύτερος τύπος EST αλληλουχιών βρέθηκε έπειτα από στοίχιση με το γονίδιο της ανθρώπινης RNase κ ότι υπολείπεται σε μία αλληλουχία 4 συνεχόμενων νουκλεοτιδικών βάσεων. Ο τρίτος τύπος EST αλληλουχιών βρέθηκε έπειτα από στοίχιση με το cDNA της ανθρώπινης RNase κ ότι περιλαμβάνει ολόκληρη τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του εσωνίου 1. Πρόκειται για μια υποθετική mRNA ισομορφή

(ισομορφή 3) μήκους περίπου 1484 βάσεων που ανιχνεύτηκε σε δείγματα με προέλευση από τον υποθάλαμο (DB505659, DB503143).



Εικόνα 3.1: Διαγραμματική απεικόνιση των υποθετικών ισομορφών που προκύπτουν από την αναζήτηση της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ σε EST βάσεις δεδομένων από ανθρώπινους ιστούς. Τα εξώνια συμβολίζονται με έγχρωμα πλαίσια και τα εσώνια με μαύρες γραμμές. Απεικόνιση σε κλίμακα, σημειώνεται το μήκος 100 βάσεων.

Όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα της εικόνας 3.2, σε δείγμα 204 EST αλληλουχιών συνολικά, ο πρώτος τύπος (EST 01) αντιστοιχεί στην ήδη κλωνοποιημένη ισομορφή (RNάση κ-01) και αντιπροσωπεύεται από 162 αλληλουχίες. Ένας δεύτερος τύπος (EST 02) διαφέρει με την κλωνοποιημένη ισομορφή γιατί υπολείπεται 4 νουκλεοτιδικών καταλοίπων (έλλειψη του τετρανουκλεοτιδίου GTTG) και αντιπροσωπεύεται από 38 EST αλληλουχίες. Τέλος, 2 μόνο EST αλληλουχίες φαίνεται να περιλαμβάνουν ολόκληρο το πρώτο εσώνιο του γονιδίου της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ (EST 03).



Εικόνα 3.2: Παρουσίαση των ποσοστών κατανομής των EST αλληλουχιών της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ σε πιθανές ισομορφές σε κυκλικό διάγραμμα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παρά την πολύ μικρή διαφορά της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των EST αλληλουχιών που αντιστοιχούν στη δεύτερη ισομορφή από την χαρακτηρισμένη ισομορφή, οι αλληλουχίες αυτές εντοπίστηκαν σε έναν μεγάλο αριθμό δειγμάτων που προέρχονται τόσο από φυσιολογικούς ιστούς (π.χ. δέρμα, Acc. No. BF213193.1, καρδιακά κύτταρα, Acc. No. BF213270.1) όσο και από παθολογικές καταστάσεις (π.χ. παγκρεατικό ισουλίνωμα, Acc. No. BG113339.1, καρκίνωμα σιελογόνων αδένων Acc. No. BM015535.1). Εξαιτίας της πολύ μικρή διαφοροποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε συνδυασμό με την ευρεία κατανομή της ισομορφής αυτής σε ανθρώπινους ιστούς, θεωρήσαμε σκόπιμη την περαιτέρω διερεύνηση της στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.

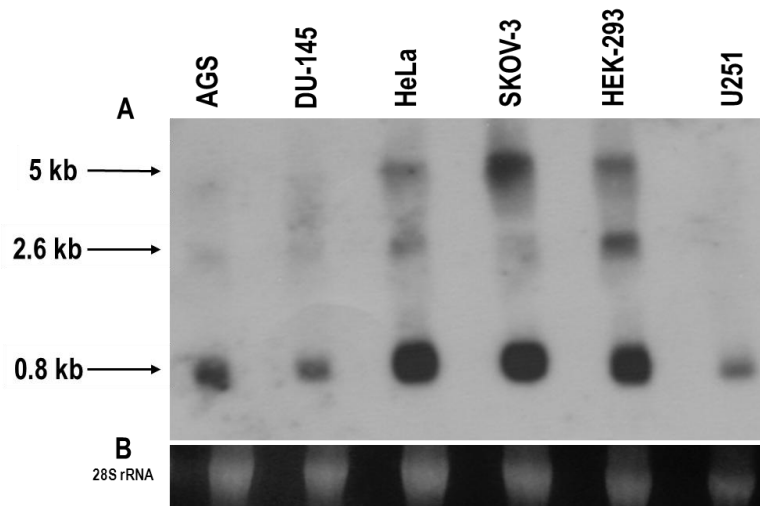
3.1.2 Ανάλυση κατά Northern της έκφρασης της ριβονουκλεάσης κ σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

Στα πλαίσια της διερεύνησης της έκφρασης του mRNA της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Northern. Συγκεκριμένα, προχωρήσαμε στην καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών AGS (Γαστρικό αδενοκαρκίνωμα), DU145 (Προστατικό αδενοκαρκίνωμα), HeLa (καρκίνωμα τραχήλου της μήτρας), SKOV-3 (Αδενοκαρκίνωμα ωοθηκών), HEK-293 (Αθανατοποιημένη σειρά εμβρυϊκού νεφρού) και U251 (Γλοίωμα).

Από όλες τις κυτταρικές σειρές απομονώθηκε RNA υψηλής ποιότητας με τη μέθοδο φαινόλης - ισοθειοκυανικής γουανυδίνης και η ποιότητα του RNA ελέγχθηκε ηλεκτροφορητικά. Έπειτα από φωτομετρική και πυκνομετρική ποσοτικοποίηση ακολούθησε ηλεκτροφόρηση 20 μg συνολικού RNA σε πήκτωμα 1.25% αγαρόζης - φορμαλδεΐδης παρουσία φορμαμιδίου. Ως ανιχνευτή χρησιμοποιήσαμε το cDNA, μήκους 466 bp, που περιλαμβάνει την κωδικοποιούσα περιοχή της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ καθώς και μέρος των 5' και 3' της μη μεταφραζόμενων περιοχών (EMBL database AM745469).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατά Northern παρουσιάζονται στην εικόνα 3.3 και έδειξαν την παρουσία ενός κύριου μεταγράφου μήκους 800 περίπου βάσεων σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Οι διαφορές στην ένταση των ζωνών αντικατοπτρίζουν πιθανώς διαφορές στα επίπεδα έκφρασης στους διάφορους κυτταρικούς τύπους, ωστόσο η συγκεκριμένη προσέγγιση επαληθεύει την έκφραση της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ σε

επίπεδο mRNA στους συγκεκριμένους ιστούς. Παρατηρούμε επίσης στις κυτταρικές σειρές AGS, DU145, HeLa, SKOV-3, HEK-293 την παρουσία δύο ακόμη ζωνών, μεγέθους περίπου 2.600 και 5.000 bp που πιθανόν αντιστοιχούν σε εναλλακτικές ισομορφές ή σε μέρη πρόδρομου mRNA.



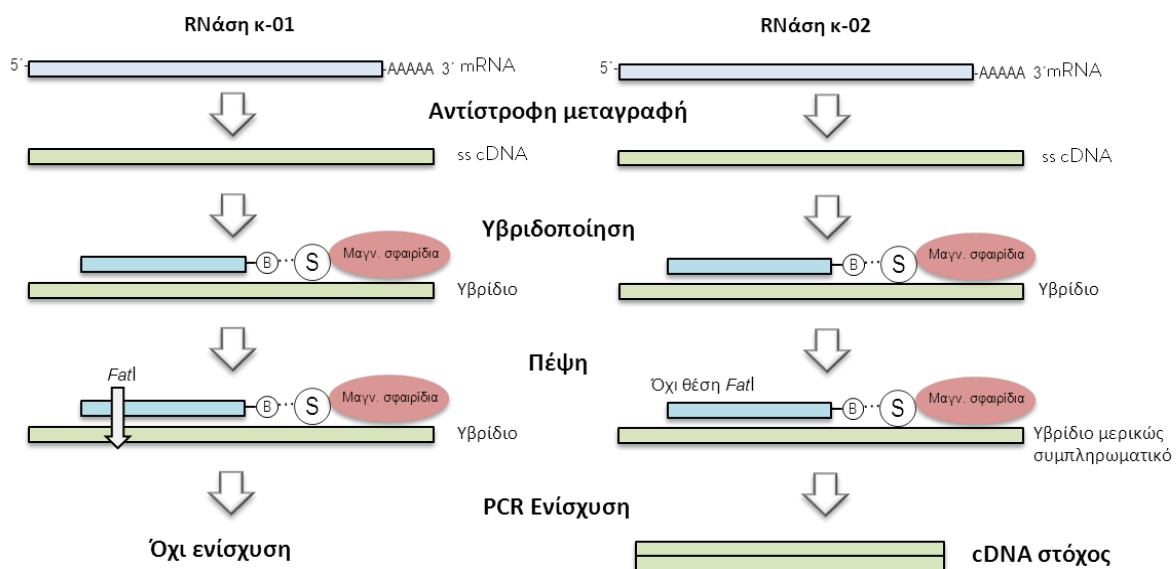
Εικόνα 3.3: Ανάλυση κατά Northern της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ σε κυτταρικές σειρές. **(Α)** Περίπου 20 µg ολικού RNA που απομονώθηκαν από έξι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές φορτώθηκαν ηλεκτροφορήθηκαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης - φορμαλδεΰδης 1,2% και μεταφέρθηκαν σε νάιλον μεμβράνη υβριδοποίησης. Η μεμβράνη υπέστη υβριδοποίηση παρουσία ^{32}P -σημασμένου ιχνηθέτη που αντιστοιχεί στη νουκλεοτιδική αλληλουχία 1-466 του cDNA της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ (accession number AM746459.1). Τα μεγέθη προσδιορίστηκαν έπειτα από σύγκριση με RNA μάρτυρες γνωστού μεγέθους. **(Β)** Οι ζώνες 28S rRNA χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες για τη συνολική ποσότητα RNA που αναλύθηκε.

Ο εντοπισμός των EST αλληλουχιών που αναφέρθηκαν παραπάνω αποτέλεσε ισχυρή ένδειξη για την έκφραση μιας mRNA ισομορφής που προκύπτει μετά από εναλλακτική συρραφή του πρόδρομου mRNA της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ. Η επιβεβαίωση της έκφρασης της ισομορφής αυτής ωστόσο δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με πειράματα ανάλυσης κατά Northern, εφόσον διαφέρει από την ήδη κλωνοποιημένη κατά 4 μόνο νουκλεοτιδικές βάσεις.

3.2 Κλωνοποίηση και μοριακός χαρακτηρισμός της εναλλακτικής ισομορφής RNάση κ-02

3.2.1 Απομόνωση και κλωνοποίηση του mRNA της ισομορφής RNase κ-02

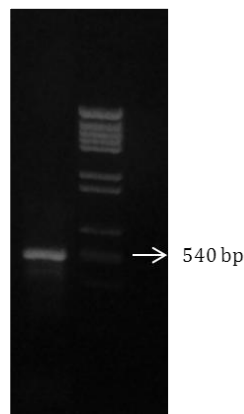
Η κλασική πειραματική προσέγγιση απομόνωσης και κλωνοποίησης εναλλακτικών μεταγράφων στηρίζεται στην αντίστροφη μεταγραφή και την χρήση ζεύγους ειδικών για το εναλλακτικό μετάγραφο εκκινητών (RT-PCR). Ωστόσο, μία τέτοια προσέγγιση δεν διευκολύνει την εκλεκτική απομόνωση μίας εναλλακτικής ισομορφής που ομοιάζει πολύ με την ιδιοσυστατική (conventional) ισομορφή όπως συμβαίνει στην περίπτωση των mRNA ισομορφών RNάση κ-01 και RNάση κ-02. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε μία νέα μεθοδολογία με σκοπό την απομόνωση και κλωνοποίηση του εν λόγω μεταγράφου το οποίο διαφέρει σε 4 μόνο νουκλεοτίδια. Η μέθοδος αυτή που περιγράφεται σχηματικά στην εικόνα 3.4 επιτρέπει την απομόνωση μεταγράφων που προκύπτουν από εναλλακτική ωρίμανση μικρής έκτασης (subtle alternative splicing) βάσει της διαφοράς στην νουκλεοτιδική τους αλληλουχία. Η διαφορά αυτή μπορεί να αξιοποιηθεί όταν στην εναλλακτική ισομορφή καταργείται μία θέση διάσπασης από ένζυμο περιορισμού που διατηρείται στην ιδιοσυστατική ισομορφή.



Εικόνα 3.4: Διαγραμματική παρουσίαση της μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε για την απομόνωση του cDNA της εναλλακτικής ισομορφής RNάση κ-02. B: Βιοτίνη S: Στρεπταβιδίνη.

Συνοπτικά η μέθοδος περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα: **(1)** αντίστροφη μεταγραφή, **(2)** υβριδοποίηση των μορίων cDNA με έναν βιοτινυλιωμένο ιχνηθέτη που έχει ακινητοποιηθεί σε μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης, **(3)** πλήρης πέψη των απόλυτα συμπληρωματικών υβριδίων με κατάλληλο ένζυμο περιορισμού **(4)** ενίσχυση της επιθυμητής cDNA ισομορφής με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Πιο συγκεκριμένα, την αντίστροφη μεταγραφή poly(A)⁺ mRNA από την αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά εμβρυϊκού νεφρού HEK-293 ακολούθησε η υβριδοποίηση των cDNA μορίων με έναν βιοτινυλιωμένο ιχνηθέτη απόλυτα συμπληρωματικού έναντι της κωδικοποιούσας περιοχής του cDNA της RNάσης κ-01. Δύο τύποι υβριδίων αναπτύσσονται τότε στο μείγμα υβριδοποίησης, υβρίδια που είναι πλήρως συμπληρωματικά και αντιστοιχούν στην ισομορφή της RNάσης κ-01 και υβρίδια που είναι μερικώς συμπληρωματικά και αντιστοιχούν στην ισομορφή της RNάσης κ-02. Δεδομένου ότι η έλλειψη της αλληλουχίας GTTG από τα μερικώς συμπληρωματικά υβρίδια καταργεί μία θέση περιορισμού στο αντίστοιχο σημείο της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *FatI*, μόνο τα υβρίδια που αντιστοιχούν στην ισομορφή της RNάσης κ-02 θα παραμείνουν αδιάσπαστα μετά τη δράση του ενζύμου. Τα επιλεγμένα υβρίδια ενισχύθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με χρήση ακραίων εκκινητών (εικόνα 3.5) και κλωνοποιήθηκαν στον φορέα κλωνοποίησης pCR 2.1.



Εικόνα 3.5: Ηλεκτροφόρηση των τελικών προϊόντων της αντίδρασης PCR με χρήση του ζεύγους εκκινητών *NdeI*/*FatI*/*RH*. Επτά μικρόλιτρα από το προϊόν αντίδρασης PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου.

Επτά cDNA κλώνοι επιλέχθηκαν και επαληθεύθηκαν ως προς την αλληλουχία τους με ανάλυση πέψης και αλληλούχιση. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης (NCBI database, Acc. Number: KF980888) δεν αποκάλυψαν διαφορές ανάμεσα σε αυτούς τους κλώνους και επαλήθευσαν την κλωνοποίηση της εναλλακτικής ισομορφής RNάση κ-02.

3.2.2 Μοριακός χαρακτηρισμός του cDNA της ισομορφής RNase κ-02

Ο κλώνος cDNA που απομονώθηκε έχει μήκος 540 ζευγών βάσεων και περιέχει ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί τη σύνθεση μιας πρωτεΐνης μήκους 134 αμινοξικών καταλοίπων με υπολογιζόμενο μοριακό βάρος 14.900 Da. Η πρωτεΐνη αυτή κωδικοποιείται με χρήση ενός αναρροϊκού κωδικονίου έναρξης σε σχέση με την κλωνοποιημένη κ-01 ισομορφή. Η πιθανότητα το συγκεκριμένο κωδικόνιο έναρξης να κωδικοποιεί τη σύνθεση μίας εναρκτήριας μεθειονίνης είναι πολύ μεγάλη (68%) σύμφωνα με την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό ATGpr [163].

```

atggttgagggcggggccacgccccctctgccccntgcgagggc
M V E A G A T P P L P P C E G
atcctgggctttctcccaccgctttccgagcccgcttgcacctcg
I L G F L P P L S E P A C T S
gcgatccccgactcccttctttatggcgctcgtcctgtgctgtgg
A I P D S L L Y G V A P V L W
gccgaagctggccgctgcgcatcgtcctcagcgcctggggagt
A E A G R L R H R P Q R L G S
gatcatataatgctcgggaatatttttcaatgtccattccgctgtg
D H I M L G I F F N V H S A V
ttgattgaggacggttcccttcacggagaaagattttgagaatggc
L I E D V P F T E K D F E N G
ccccagaacatataacaacctttacgagcaagtcagctacaactgt
P Q N I Y N L Y E Q V S Y N C
ttcatcgtgcaggcctttacctcctcctcggaggcttctctttc
F I A A G L Y L L L G G F S F
tgccaagtccggctcaataagcgcaaggaatacatgggtgctag
C Q V R L N K R K E Y M V R *
ggccccggcgcggtttccccgctccagcccctcctctattta

aagactccctgcaccgtgtcaccaggtcgcgtcccaccct

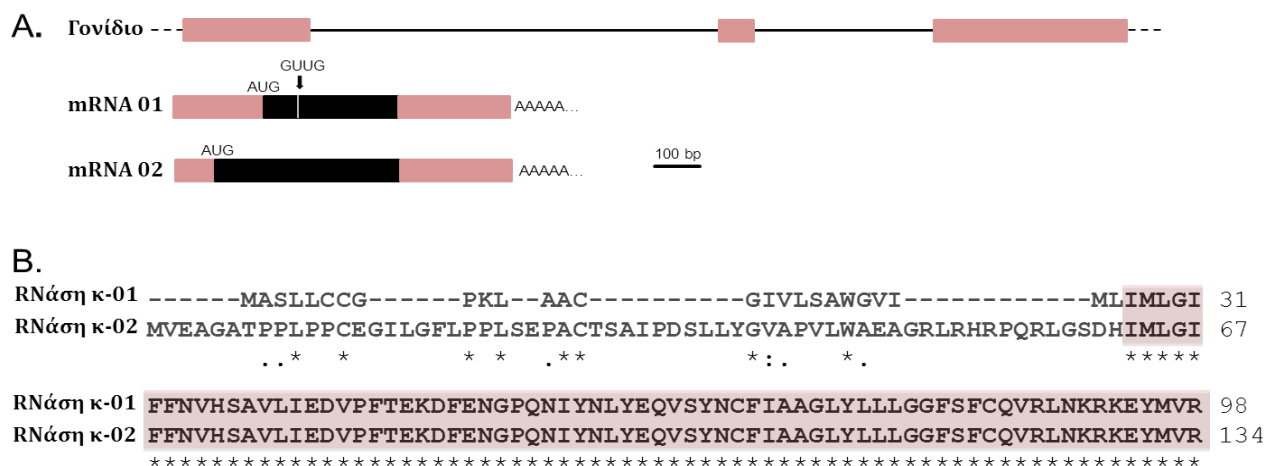
tgccggcgccctctgtgggactgggtttcccgggcgagaga

ctgaatccctt

```

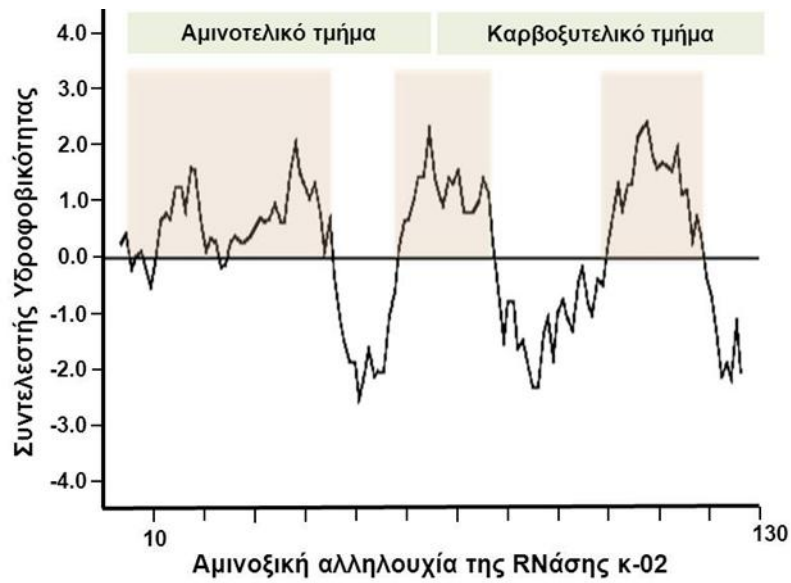
Εικόνα 3.6: Αποτελέσματα νουκλεοτιδικής αλληλούχισης και πρόβλεψη της αμινοξικής αλληλουχίας της ισομορφής RNase κ-02. Επισημαίνεται σε πλαίσιο η περιοχή σύνδεσης των εξωνίων 1 και 2. Με αστερίσκο σημειώνεται το κωδικόνιο λήξης.

Η αμινοξική στοίχιση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των δύο ισομορφών της RNάσης κ δεν αποκάλυψε καμία ομοιότητα στο αμινοτελικό τμήμα. Αντίθετα, το τμήμα της αμινοξικής αλληλουχίας 63-134 της RNάσης κ-02 είναι πανομοιότυπο με την αμινοξική αλληλουχία 27-98 της RNάσης κ-01 (εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7: Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ, των εναλλακτικών mRNA ισομορφών και αμινοξική στοίχιση των πρωτεϊνικών ισομορφών που προκύπτουν. (A) Τα εξόνια συμβολίζονται με έγχρωμα πλαίσια και τα εσώνια με μαύρες γραμμές. Στα mRNAs, τα μαύρα πλαίσια υποδηλώνουν ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης και η αλληλουχία GUUG που υπάρχει μόνο στην ισομορφή RNάση κ-01 σημειώνεται με γκρι γραμμή. Σημειώνεται επίσης και το κωδικόνιο έναρξης AUG στις δύο ισομορφές. (B) Οι αμινοξικές αλληλουχίες αριθμούνται στα δεξιά και το καρβοξυτελικό τμήμα των δύο πρωτεϊνών που ταυτίζεται τονίζεται με έγχρωμο πλαίσιο.

Όσο αφορά τα χαρακτηριστικά της πρωτεϊνικής ισομορφής RNάση κ-02, δεδομένα από λογισμικά ανάλυσης των ιδιοτήτων του μορίου έδειξαν ότι η ριβονουκλεάση κ-02 είναι ιδιαίτερα υδρόφοβο μόριο. Όπως φαίνεται και στο Kyte-Doolittle διάγραμμα υδροφοβικότητας της εικόνας 3.8, η RNάση κ-02 εμφανίζει τρεις ισχυρά υδρόφοβες αμινοξικές περιοχές. Η πρώτη περιοχή εντοπίζεται εντός του αμινοτελικού τμήματος που διαφοροποιείται πλήρως από την αλληλουχία της RNάσης κ-01 ενώ οι άλλες δύο περιοχές εντοπίζονται εντός της κοινής καρβοξυτελικής περιοχής των δύο ισομορφών. Το γεγονός αυτό δυσχέρανε σημαντικά τις διαδικασίες ετερόλογης έκφρασης και καθαρισμού της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης καθώς και τον εντοπισμό της σε εκχυλίσματα ανθρώπινων κυτταρικών σειρών.



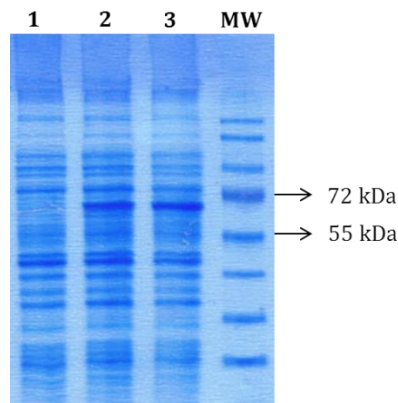
Εικόνα 3.8: Διάγραμμα υδροφοβικότητας της RNάσης κατά Kyte-Doolittle. Περιοχές με τιμές συντελεστή μεγαλύτερες από 0 θεωρούνται υδρόφοβες και σημειώνονται σε έγχρωμο πλαίσιο. Σημειώνεται επίσης το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης που διαφοροποιείται στην αλληλουχία με την RNάση κ-01 και το καρβοξυτελικό μέρος που εμφανίζει απόλυτη ταύτιση της αμινοξικής αλληλουχίας.

3.3 Παραγωγή και καθαρισμός ενός ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της RNάσης κ-02

Το αμινοτελικό τμήμα (αμινοξέα 1-62) της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 δεν ομοιάζει στο αμινοτελικό άκρο της ριβονουκλεάσης κ-01 και δεν εμφανίζει σημαντικές ομοιότητες με άλλες ανθρώπινες πρωτεΐνες. Ως εκ τούτου, κρίθηκε σκόπιμη η παραγωγή ενός πολυκλωνικού αντισώματος ειδικού έναντι του συγκεκριμένου πεπτιδικού τμήματος προκειμένου να επιτευχθεί ο εντοπισμός και η μελέτη της υποκυττάριας κατανομής της πρωτεΐνης σε ανθρώπινα κύτταρα. Για το σκοπό αυτό, επιτεύχθηκε η ετερόλογη παραγωγή στο σύστημα IMPACT-CN® (New England Biolabs) και ο χρωματικός καθαρισμός το πεπτιδίου που αντιστοιχεί στην αλληλουχία 1-62 της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02. Το πεπτίδιο αυτό κατόπιν χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο για την ανοσοποίηση κουνελιών και ο αντιορός που προέκυψε υπέστη καθαρισμό για την απομόνωση των ανοσοσφαιρινών που αλληλεπιδρούν με το συγκεκριμένο πεπτίδιο.

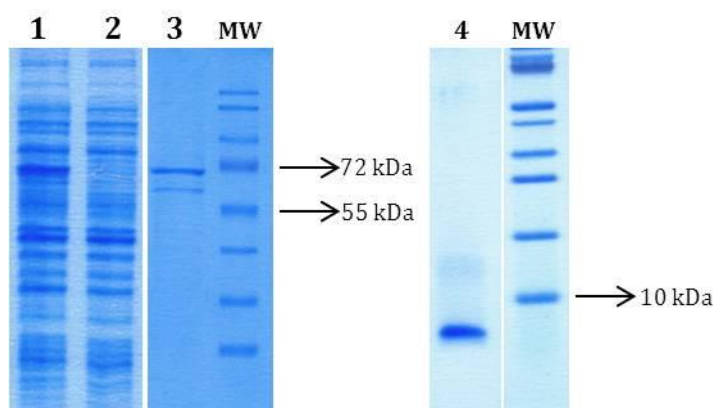
Το IMPACT (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) είναι ένα νέο σύστημα πρωτεϊνικού καθαρισμού που κάνει χρήση της επαγόμενης αυτοτομής της ιντεΐνης ώστε να διαχωριστεί η επιθυμητή πρωτεΐνη από τον επίτοπο με τον οποίο είναι σημασμένη. Το σύστημα επιτρέπει τον καθαρισμό σε ένα μοναδικό χρωματογραφικό στάδιο χωρίς τη χρήση πρωτεάσης. Η πρωτεΐνη-στόχος συντήκεται με τον επίτοπο ιντεΐνης ο οποίος φέρει μια περιοχή πρόσδεσης στη χιτίνη και επιτρέπει το καθαρισμό μέσω χρωματογραφίας συγγένειας. Παρουσία DTT (διθειοτριόλης), β-μερκαπτοαιθανόλης ή κυστεΐνης, η ιντεΐνη υπόκειται σε αυτοτομή με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της πρωτεΐνης στόχου από τη στήλη και την επίτευξη καθαρισμού σε ένα στάδιο.

Για να επιτευχθεί η ετερόλογη έκφραση του αμινοτελικού άκρου 1-62 της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 προχωρήσαμε στην ενίσχυση του και στην υποκλωνοποίησή του στον φορέα έκφρασης pTYB1 που οδήγησε στη δημιουργία του ανασυνδυασμένου φορέα ExK-02N. Η επιτυχής ενσωμάτωση επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση του ανασυνδυασμένου φορέα και ακολούθησε μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα του βακτηριακού στελέχους ER2566. Έπειτα από δοκιμή διαφόρων συνθηκών επαγωγής, βέλτιστη παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μοριακού βάρους 60,53 kDa επιτεύχθηκε παρουσία 0,3 mM IPTG σε θερμοκρασία 18°C έπειτα από 6 ώρες, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.9.



Εικόνα 3.9: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12% των προϊόντων της επαγωγής. Στη διαδρομή 1 έχουν ηλεκτροφορηθεί ολικές πρωτεΐνες των βακτηριακών κυττάρων πριν την επαγωγή, στις διαδρομές 2 και 3 ολικές πρωτεΐνες κυττάρων 3 ώρες και 6 ώρες μετά την επαγωγή αντίστοιχα. Μετά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα υπέστη χρώση Coomassie και αποχρωματισμό σε διάλυμα οξικού οξέος.

Ο χρωματογραφικός καθαρισμός του αμινοτελικού άκρου πραγματοποιήθηκε έπειτα από επώαση των βακτηριακών κυττάρων με διάλυμα στήλης (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl) και λύση με υπέρηχους, εφαρμογή χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη χιτίνης και επακόλουθη διάσπαση του αμινοτελικού άκρου από την πρωτεΐνη σύντηξης έπειτα από κατεργασία με διάλυμα μερκαπτοαιθανόλης (20 mM Tris - HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλη). Ο έλεγχος της έκλυσης πραγματοποιείται με SDS ηλεκτροφόρηση μικρού όγκου των κλασμάτων έκλυσης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης - Tricine και χρώση Coomassie όπου επιβεβαιώθηκε η επιτυχής έκλυση του επιθυμητού αμινοτελικού πεπτιδίου μοριακού βάρους 6,53 kDa (εικόνα 3.10).



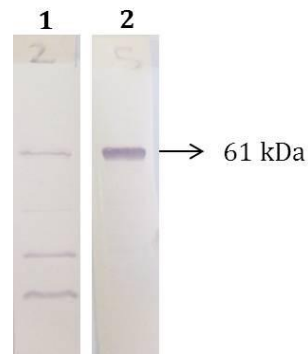
Εικόνα 3.10: Χρωματογραφικός καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *Ekc-02N* και απομόνωση του αμινοτελικού άκρου της ανθρώπινης RNάσης κ-02. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12% πρωτεϊνικού εκχυλίσματος πριν τη δέσμευση στη στήλη χιτίνης (1), μετά τη δέσμευση στη στήλη χιτίνης (2) και πρωτεϊνικού υλικού που δεσμεύτηκε στη στήλη (3) σε πήκτωμα περιεκτικότητας 12%. SDS-Tricine PAGE ηλεκτροφόρηση κλάσματος έκλουσης της στήλης (4).

Η ανοσοποίηση κουνελιών πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την εταιρεία Pacific Immunology. Το αμινοτελικό πεπτιδίδιο της RNάσης κ-02 εστάλη με τη μορφή ζωνών SDS-PAGE και εφαρμόστηκε πρωτόκολλο ανοσοποίησης συνολικής διάρκειας 14 εβδομάδων με 3 επαναληπτικές ανοσοποιήσεις. Μετά την παραλαβή του αντιορού ακολούθησε καθαρισμός έναντι του αμινοτελικού πεπτιδίου.

Για το σκοπό αυτό, τμήμα μεμβράνης νιτροκυτταρίνης επωάστηκε παρουσία καθαρισμένου αμινοτελικού πεπτιδίου σταδιακά, μέχρι ολικής απορρόφησης. Η μεμβράνη συνεπιάζεται κατόπιν υπό ανάδευση με αντιορό αραιωμένο 1:1 σε διάλυμα 1x PBS. Μετά την έκλυση με όξινο διάλυμα γλυκίνης προστίθεται στον αντιορό BSA μέχρι τελικής συγκέντρωσης 40 mg/mL για τη σταθεροποίηση του αντισώματος και οι ανοσοκαθαρισμένες ανοσοσφαιρίνες χωρίζονται σε μικρούς όγκους (vials) των 500 μl για χρήση σε πειράματα ανοσολογικού εντοπισμού.

Τα κλάσματα των ανοσοσφαιρινών που αναγνωρίζουν τον επιθυμητό αμινοτελικό επίτοπο συγκρίθηκαν ως προς την ευαισθησία και την ειδικότητά τους σε ανάλυση κατά Western. Για το σκοπό αυτό, ίσες ποσότητες βακτηριακού εκχυλίσματος 6 ώρες μετά την επαγωγή υπέστησαν ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και επωάστηκαν με ίσες συγκεντρώσεις αντιορού πριν τον καθαρισμό και καθαρισμένων ανοσοσφαιρινών. Στην περίπτωση του ολικού αντιορού ανιχνεύονται εκτός από την επιθυμητή και μη ειδικές ζώνες ενώ στην περίπτωση του ανοσοκαθαρισμένου αντιορού ανιχνεύεται μία μόνο ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη σύντηξης της ιντεΐνης με το

αμινοτελικό πεπτίδιο (εικόνα 3.11). Συνεπώς, επιβεβαιώνεται ο καθαρισμός ενός ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος, ικανού να αναγνωρίσει την ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ-02.



Εικόνα 3.11: Έλεγχος της ειδικότητας του ανοσοκαθαρισμένου πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Eκκ-02N με ανοσοσύτωση κατά Western. Ίσες ποσότητες πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (αραιωμένο 10 φορές σε σχέση με την εικόνα 3.9) *E.coli* 6 ώρες μετά την επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Eκκ-02N υποβλήθηκε σε ανοσοεντοπισμό κατά Western με ίσες συγκεντρώσεις μη ανοσοκαθαρισμένου αντιορού (1) και καθαρισμένου αντιορού (2).

3.4 Ετερόλογη έκφραση και βιοχημικός χαρακτηρισμός της εναλλακτικής ισομορφής RNase κ-02

Σε προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου μας έγιναν προσπάθειες για την ετερόλογη έκφραση της ριβονουκλεάσης κ-01 σε βακτηριακά συστήματα. Ωστόσο, παρουσιάστηκαν σημαντικά προβλήματα λόγω της υδρόφοβης φύσης του μορίου, προκαλώντας κυτταροτοξικά φαινόμενα ή την αδυναμία παραγωγής διαλυτής πρωτεΐνης [106]. Οι πρώτες προσπάθειες ετερόλογης έκφρασης της ανασυνδυασμένης RNάσης κ-02 σε προκαρυωτικό σύστημα (σύστημα IMPACT) είχαν παρόμοια προβλήματα και οδήγησαν στην παραγωγή μη διαλυτής πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό υιοθετήθηκε το ευκαρυωτικό σύστημα του μεθυλότροφου ζυμομύκητα *Pichia pastoris* που έχει εφαρμοστεί επιτυχώς από το εργαστήριό μας στο παρελθόν. Στο σύστημα αυτό επιτεύχθηκε η παραγωγή της ετερόλογης RNάσης κ-02 που επέτρεψε το βιοχημικό χαρακτηρισμό του μορίου αλλά παρουσίασε και μειονεκτήματα, που αφορούσαν κυρίως την ποσότητα και την καθαρότητα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης καθώς και τη σταθερότητα των μετασηματισμένων κλώνων του ζυμομύκητα.

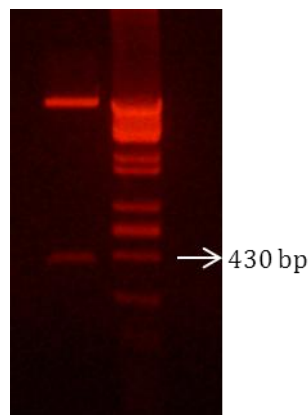
Γενικότερα, η χρήση ενός ευκαρυωτικού συστήματος έκφρασης έναντι ενός προκαρυωτικού εμφανίζει το πλεονέκτημα της δυνατότητας πραγματοποίησης μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων και της ανάκτησης της φυσιολογικής διαμόρφωσης της εκφραζόμενης πρωτεΐνης στο χώρο, γεγονός που στις περισσότερες περιπτώσεις οδηγεί στην παραγωγή ενεργής πρωτεΐνης.

3.4.1 Ετερόλογη έκφραση της ανθρώπινης RNάσης κ-02 στο σύστημα του ζυμομύκητα *Pichia pastoris*

Για την έκφραση της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος του ζυμομύκητα *Pichia pastoris* GS115 Mut⁺, το οποίο εμφανίζει αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης παρουσία μεθανόλης. Επιλέξαμε το φορέα pPICZαC, στον οποίο η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη πρωτεΐνη εκφράζεται ως πρωτεΐνη σύντηξης με τον επίτοπο c-myc και μια αλληλουχία 6 καταλοίπων ιστιδίνης στο καρβοξυτελικό της άκρο, η παρουσία των οποίων διευκολύνει τόσο τον ανοσολογικό εντοπισμό όσο και το χρωματογραφικό καθαρισμό της. Η μικρή αμινοξική αλληλουχία που εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης αποτελεί το πεπτίδιο οδηγητή, που επιτρέπει την έκκριση της στο θρεπτικό υλικό των καλλιεργειών και απομακρύνεται από τις πρωτεάσες του

ζυμομύκητα. Λαμβάνοντας υπ' όψιν την αμινοξική αλληλουχία της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης παρουσιάζει αναμενόμενο μοριακό βάρος 17,53 kDa.

Αρχικά, προκειμένου να εκφραστεί η ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ-02, το cDNA που την κωδικοποιεί πολλαπλασιάστηκε με τη μέθοδο της PCR με χρήση των εκκινητών ClaFAlt και XbaIR και υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα έκφρασης pPICZαC οδηγώντας στην κατασκευή του ανασυνδυασμένου φορέα PicFat1. Τόσο από την αντίδραση PCR όσο και από τη διπλή πέψη του ανασυνδυασμένου φορέα PicFat1 προκύπτει μια ζώνη μεγέθους 429 ζευγών βάσεων, που αντιστοιχεί στην κωδικοποιούσα περιοχή του cDNA της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης (εικόνα 3.12).

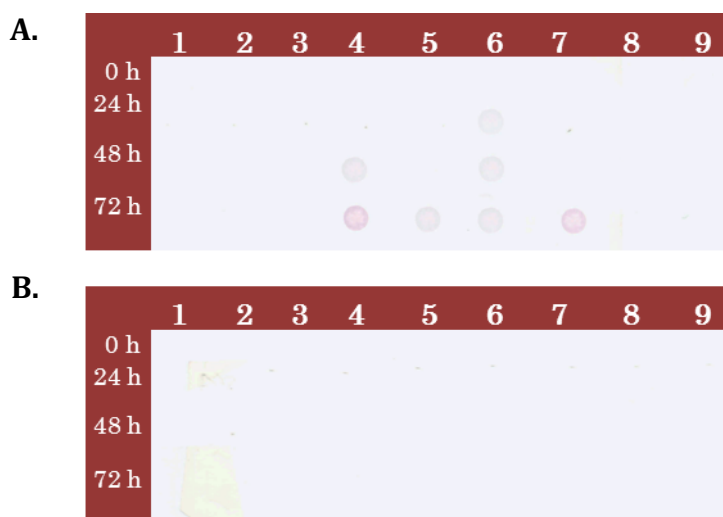


Εικόνα 3.12: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης του ανασυνδυασμένου φορέα *PicFat1* με τα ένζυμα περιορισμού *ClaI* και *XbaI*. Περίπου 150 ng του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου *PicFat1* επώαστηκαν παρουσία 1 U των ενζύμων περιορισμού *ClaI* και *XbaI* σε θερμοκρασία 37°C για 3 ώρες και τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου.

Στη συνέχεια ο ανασυνδυασμένος φορέας *PicFat1* υποβλήθηκε σε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *SacI* που διασπά τον ανασυνδυασμένο φορέα έκφρασης σε ένα μόνο σημείο προκειμένου να γίνει γραμμικός και ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα του στελέχους GS115 του ζυμομύκητα *Pichia pastoris* με ηλεκτροδιάτρηση. Η επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων πραγματοποιήθηκε βάσει της ιδιότητάς τους να επιβιώνουν σε θρεπτικό υλικό παρουσία του αντιβιοτικού ζεοσίνη.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η έκφραση της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 ένας μεγάλος αριθμός των μετασχηματισμένων κλώνων καλλιεργήθηκε και υποβλήθηκε σε επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Δείγματα από τα υπερκείμενα των καλλιεργειών απομονώθηκαν σε χρονικά

διαστήματα 0, 24, 48 και 72 ωρών μετά την έναρξη της επαγωγής και υπεβλήθησαν σε έλεγχο της επαγωγής με πείραμα ανοσοσύτωση κηλίδας χρησιμοποιώντας ένα ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα (anti-AVLI) έναντι συγκεκριμένου επιτόπου που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02. Από το σύνολο των κλώνων που εξετάστηκαν επιλέχθηκαν εκείνοι που βρέθηκαν να εκφράζουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη (εικόνα 3.13) σε περισσότερο ικανοποιητική ποσότητα.



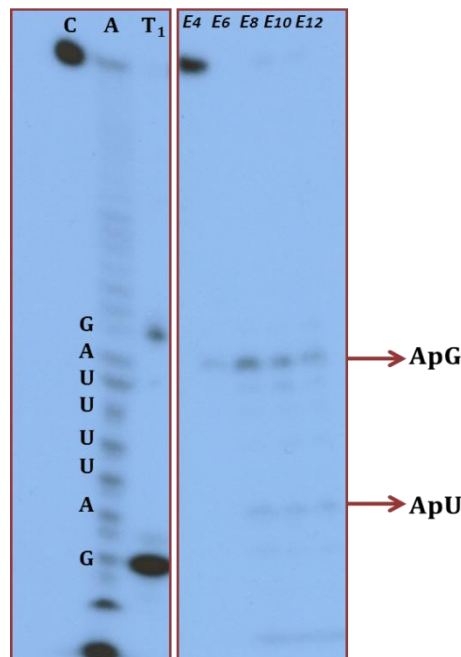
Εικόνα 3.13: Dot Blot ανάλυση των υπερκειμένων των καλλιιεργειών του ζυμομύκητα 0, 24, 48 και 72 ώρες μετά την έναρξη της επαγωγής. **(A)** Η ανασυνδυασμένη ριβονουκλεάση κ-02 ανιχνεύεται στο θρεπτικό υλικό των καλλιιεργειών με τη χρήση του πολυκλωνικού αντισώματος anti-AVLI 48 ώρες μετά την έναρξη της επαγωγής. **(B)** Σε ταυτόχρονο πείραμα ελέγχου, στο οποίο χρησιμοποιήθηκε μόνο δευτερογενές αντίσωμα, δεν ανιχνεύεται σήμα.

3.4.2 Χρωματογραφικός καθαρισμός της ανθρώπινης RNase κ-02

Για τον καθαρισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης υιοθετήθηκε κατάλληλο πρωτόκολλο που περιλαμβάνει τη διαπίδυση του υπερκειμένου της καλλιέργειας του ζυμομύκητα και την χρωματογραφία σε στήλη ηπαρίνης. Συγκεκριμένα, το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας του ζυμομύκητα φυγοκεντρείται και το υπερκείμενο υποβάλλεται σε διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM φωσφορικών pH 6.0 παρουσία του μη ιονικού απορρυπαντικού Nonidet P-40. Κατόπιν το υλικό υποβάλλεται σε χρωματογραφία ηπαρίνης όπου η έκλυση πραγματοποιείται με κλίση NaCl συγκέντρωσης 0-300 mM. Τα κλάσματα έκλυσης διερευνούνται ως προς τη ριβονουκλεολυτική ενεργότητά τους έναντι

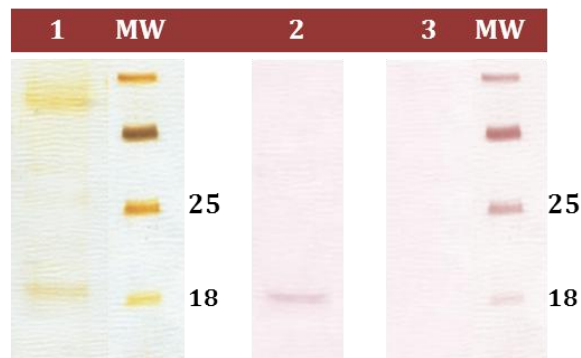
ραδιενεργά ιχνηθετημένου τριανταμερούς RNA υποστρώματος (υπόστρωμα #1, πίνακας 2.2).

Τα κλάσματα έκλουσης 6, 8, 10, 12 και 4 της χρωματογραφίας επώαστηκαν παρουσία του υποστρώματος και τα αποτελέσματα της αυτοραδιογραφίας παρουσιάζονται στην εικόνα 3.13 όπου φαίνεται ότι η ανασυνδυασμένη RNάση κ-02 διασπά κυρίως ApG και ApU φωσφοδιεστερικούς δεσμούς.



Εικόνα 3.14: Έλεγχος ριβονουκλεολυτικής ενεργότητας της RNάσης κ-02 έναντι του υποστρώματος #1. Το 30-μερές 5' ιχνηθετημένο RNA γνωστής αλληλουχίας επώαστηκε απουσία ενζύμου (αρνητικός μάρτυρας-διαδρομής C), σε διάλυμα αλκαλικής υδρόλυσης (διαδρομή A) ή παρουσία 10 units ριβονουκλεάσης T1 (διαδρομή T1). A. Ισοδύναμη ποσότητα RNA υποστρώματος επώαστηκε με ποσότητες ίσου όγκου των κλασμάτων έκλουσης για 30 λεπτά (διαδρομές E4-E12, αντίστοιχα) στους 37°C. B. Κατόπιν, τα προϊόντα των αντιδράσεων αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 17% πολυακρυλαμίδης-8M ουρίας και ακολούθησε αυτοραδιογραφία.

Τα κλάσματα που προέκυψαν από την χρωματογραφία και εμφανίζουν μέγιστη ριβονουκλεολυτική ενεργότητα κατόπιν αναμίχθηκαν, ηλεκτροφορήθηκαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης 15% και υποβλήθηκαν σε χρώση νιτρικού αργύρου και σε ανοσοσύτρωση κατά Western, χρησιμοποιώντας αντίσωμα ειδικό έναντι ολιγοπεπτιδίου στο καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης (Anti-AVLI). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 3.15, από όπου συμπεραίνουμε τον μερικό καθαρισμό και τον ανοσολογικό εντοπισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.



Εικόνα 3.15: Ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων του καθαρισμού της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 και ανοσολογικός της εντοπισμός. Πρωτεϊνικά δείγματα από το κοινό κλάσμα έκλουσης μετά από τη χρωματογραφία σε στήλη ηπαρίνης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 15% πολυακρυλαμίδης-SDS. Οι πρωτεΐνες του πήκτωματος εμφανίστηκαν με χρώση νιτρικού αργύρου (δείγμα 1) ή ακολούθησε ανοσολογική ανίχνευση κατά Western με χρήση του πολυκλωνικού αντισώματος anti-AVLI σε τίτλο 1:2000. Σε παράλληλο πείραμα ελέγχου (3) όπου χρησιμοποιήθηκε μόνο 2ο αντίσωμα δεν ανιχνεύεται καμία πρωτεΐνη. Στις διαδρομές MW έχει ηλεκτροφορηθεί δείγμα πρωτεϊνών με γνωστά μοριακά βάρη.

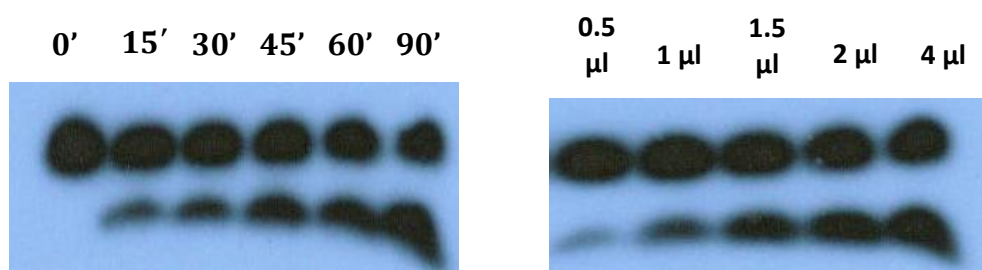
Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.15 επιτεύχθηκε ο μερικός καθαρισμός της ανασυνδυασμένης ριβονουκλεάσης κ-02 από πρωτεϊνικές προσμίξεις. Παρά τις προσπάθειες περαιτέρω καθαρισμού σε στήλες νικελίου, ανιοντοανταλλάκτη και κατιοανταλλάκτη, δεν επιτεύχθηκε ο πλήρης καθαρισμός. Ωστόσο, το μερικώς καθαρισμένο υλικό κρίθηκε ικανοποιητικό για τον προσδιορισμό των ενζυμικών ιδιοτήτων της ανασυνδυασμένης ριβονουκλεάσης κ-02 δεδομένου ότι πειράματα ελέγχου έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται κατά την ανάπτυξη του ζυμομύκητα δεν είναι ικανές να υδρολύσουν τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν.

3.4.3 Ενζυμικός χαρακτηρισμός της ανθρώπινης RNase κ-02 και προσδιορισμός της εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα

Στα πλαίσια της προσπάθειας πληρέστερης μελέτης της εξειδίκευσης της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 ως προς το υπόστρωμα, θεωρήθηκε απαραίτητη η χρήση μιας σειράς διαφορετικών ολιγονουκλεοτιδίων. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε αρχικά στη δοκιμή της ενεργότητας έναντι ενός ολιγονουκλεοτιδίου που συνίσταται από δεσοξυριβονουκλεοτίδια και ένα μόνο ριβονουκλεοτίδιο, με την αλληλουχία: 5'-dTdTdTrAdGdTdTdT-3' (υπόστρωμα #4, Πίνακας 2.2), το οποίο περιέχει μόνο την προτιμητέα από τη ριβονουκλεάση κ-02 θέση διάσπασης Arg. Επιπλέον, το εν λόγω

ολιγονουκλεοτίδιο δεν διασπάται, λόγω της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας, από ριβονουκλεάσες παγκρεατικού τύπου, που αποτελούν τη συνηθέστερη μορφή μόλυνσης πρωτεϊνικών δειγμάτων και δυσχεραίνουν τη μελέτη της ενεργότητας αλλά και εξειδίκευσης άλλων ριβονουκλεασών, ιδιαιτέρως όταν ως υποστρώματα χρησιμοποιούνται ευαίσθητα ραδιενεργά ολιγονουκλεοτίδια.

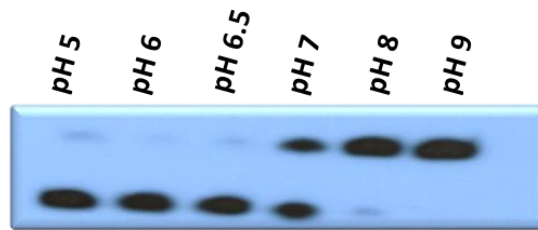
Η ριβονουκλεολυτική ενεργότητα του ανασυνδυασμένου ενζύμου έναντι του 8-μερούς υποστρώματος προσδιορίστηκε αρχικά συναρτήσει του χρόνου επώασης της ενζυμικής αντίδρασης και της ποσότητας του προστιθέμενου ενζύμου. Από τα πειράματα αυτά επαληθεύθηκε η διάσπαση του συγκεκριμένου υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου επώασης και της συγκέντρωσης του προστιθέμενου ενζύμου στο μείγμα της αντίδρασης (εικόνα 3.16).



Εικόνα 3.16: Ριβονουκλεολυτική ενεργότητα της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 έναντι του υποστρώματος #3 σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης της ενζυμικής αντίδρασης και την ποσότητα του ενζύμου. Το 5' ιχνηθετημένο οκτανουκλεοτίδιο 5'-dTdTdTrAdGdTdTdT-3' επώαστηκε με 1 μl μερικώς καθαρισμένου ενζύμου για χρονικό διάστημα 0, 15, 30, 45, 60 και 90 λεπτών και με 0.5, 1, 1.5, 2 και 4 μl μερικώς καθαρισμένου ενζύμου για 60 λεπτά στους 37°C. Τα προϊόντα των αντιδράσεων αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 17% πολυακρυλαμίδης-8M ουρίας και ακολούθησε αυτοραδιογραφία.

1. Προσδιορισμός του άριστου pH δράσης

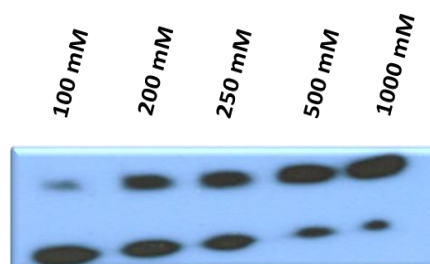
Για τον προσδιορισμό του βέλτιστου pH δράσης της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 πραγματοποιήθηκε επώαση ίσων ποσοτήτων του κλάσματος μερικού καθαρισμού του ανασυνδυασμένου ενζύμου παρουσία ισοδύναμων ποσοτήτων ραδιενεργά σημασμένου υποστρώματος #3. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 3.17 το ένζυμο παρουσιάζει βέλτιστη ενεργότητα σε τιμές pH 6-6,5 ενώ φαίνεται να αδρανοποιείται σε τιμές pH μεγαλύτερες του 8.



Εικόνα 3.17: Επίδραση του pH στην ενεργότητα της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02. Ισοδύναμη ποσότητα του οκτανουκλεοτιδίου #3 επώαστηκε παρουσία ίσων ποσοτήτων μερικά καθαρισμένης ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 στους 37°C για 30 λεπτά σε ρυθμιστικά διαλύματα 20 mM φωσφορικών pH 5, 6, 6.5 και 20 mM Tris-HCl pH 7, 8 και 9. Τα προϊόντα των αντιδράσεων αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 17% πολυακρυλαμίδης-8M ουρίας και ακολούθησε αυτοραδιογραφία.

2. Επίδραση της συγκέντρωσης NaCl

Είναι γνωστό ότι η ιονική ισχύς του διαλύματος επηρεάζει σε αρκετές περιπτώσεις τις ικανότητες λειτουργικές ιδιότητες των ενζύμων. Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της συγκέντρωσης NaCl στην ενεργότητα της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02, ίσες ποσότητες του κλάσματος μερικού καθαρισμού του ανασυνδυασμένου ενζύμου επώαστηκαν παρουσία ισοδύναμων ποσοτήτων ραδιενεργά σημασμένου υποστρώματος #3. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.18 η δράση του ενζύμου φαίνεται να επηρεάζεται από την ιονική ισχύ του διαλύματος αφού παρουσιάζει μειωμένη ενεργότητα σε τιμές συγκέντρωσης NaCl μεγαλύτερες των 500 mM



Εικόνα 3.18: Επίδραση της ιονικής ισχύος στην ενεργότητα της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02. Το ιχνηθετημένο οκτανουκλεοτιδίο #3 επώαστηκε με 1 μl μερικώς καθαρισμένου ενζύμου για χρονικό διάστημα 60 λεπτών στους 37°C παρουσία 100, 200, 250, 500 και 1000 mM NaCl. Τα προϊόντα των αντιδράσεων αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 17% πολυακρυλαμίδης-8M ουρίας και ακολούθησε αυτοραδιογραφία.

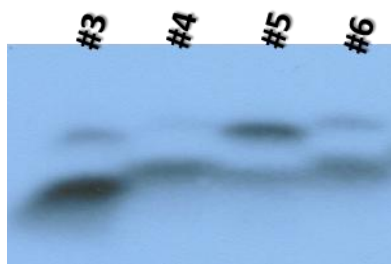
3. Εξειδίκευση ως προς την αλληλουχία εκατέρωθεν του δεσμού ApG

Με σκοπό να ελέγξουμε κατά πόσο η αλληλουχία βάσεων που προηγείται ή έπεται του δεσμού που υδρολύεται επηρεάζει την ενεργότητα της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02, προχωρήσαμε στη δοκιμασία ριβονουκλεολυτικής ενεργότητας έναντι μιας σειράς υποστρωμάτων των οποίων η αλληλουχία εκατέρωθεν της μοναδικής θέσης διάσπασης ApG αποτελείται από τρία δεοξυριβονουκλεοτίδια θυμίνης, κυτοσίνης, αδενίνης και γουανίνης αντίστοιχα (υποστρώματα #3- #6, Πίνακας 3.1).

Υπόστρωμα	Αλληλουχία							
#3	dC	dC	dC	rA	dG	dC	dC	dC
#4	dT	dT	dT	rA	dG	dT	dT	dT
#5	dA	dA	dA	rA	dG	dA	dA	dA
#6	dG	dG	dG	rA	dG	dG	dG	dG

Πίνακας 3.1: Νουκλεοτιδική αλληλουχία των υποστρωμάτων #3-#6 για τον προσδιορισμό της επίδρασης των γειτονικών νουκλεοτιδίων εκατέρωθεν του ApG δεσμού για τη δράση της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02.

Η εξάρτηση της ενεργότητας της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 από την αλληλουχία βάσεων εκατέρωθεν του ApG δεσμού προσδιορίστηκε με επώαση ίσης ποσότητας υποστρωμάτων με την ίδια ποσότητα ενζύμου για το ίδιο χρονικό διάστημα. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της εικόνας 3.19, η ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ-02 υδρολύει σε μεγαλύτερο βαθμό το υπόστρωμα όταν εκατέρωθεν του δεσμού διάσπασης υπάρχουν κατάλοιπα θυμίνης. Τα υποστρώματα με κατάλοιπα κυτοσίνης και γουανίνης διασπώνται σε αρκετά μικρότερο βαθμό, ενώ το υπόστρωμα με κατάλοιπα αδενίνης εκατέρωθεν του ApG δεσμού φαίνεται να υδρολύεται σε ελάχιστο βαθμό.



Εικόνα 3.19: Εξειδίκευση της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 ως προς την αλληλουχία εκατέρωθεν του δεσμού υδρόλυσης. Ισοδύναμη ποσότητα των οκτανουκλεοτιδίων #3 - #6 επώαστηκε παρουσία ίσων ποσοτήτων μερικά καθαρισμένης ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 στους 37°C για 30 λεπτά. Τα προϊόντα των αντιδράσεων αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 17% πολυακρυλαμίδης-8Μ ουρίας και ακολούθησε αυτοραδιογραφία.

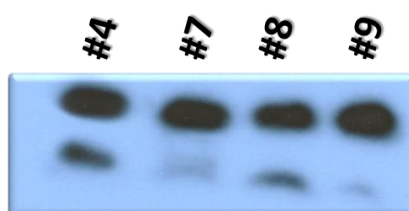
4. Εξειδίκευση ως προς τον ApN φωσφοδιεστερικό δεσμό

Τα πειράματα ριβονουκλεολυτικής ενεργότητας της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 έναντι του τριανταμερούς RNA υποστρώματος που φέρει όλους τους πιθανούς φωσφοδιεστερικούς δεσμούς έδειξαν ότι το ένζυμο διασπά κατά σειρά προτίμησης ApG και ApU δεσμούς. Δεδομένου ότι και στις δύο περιπτώσεις το πρώτο νουκλεοτίδιο του δεσμού είναι η αδενίνη, θεωρήσαμε σκόπιμη τη μελέτη της εξειδίκευσης του ενζύμου ως προς τους διάφορους ApN δεσμούς. Για το λόγο αυτό ελέγχθηκε η ενζυμική ενεργότητα του ανασυνδυασμένου ενζύμου έναντι τεσσάρων υποστρωμάτων που διαφέρουν μόνο ως προς το νουκλεοτίδιο που έπεται της αδενίνης στο δεσμό που υδρολύεται. Τα υποστρώματα αυτά αναφέρονται στον πίνακα 3.2.

Υπόστρωμα	Αλληλουχία							
#4	dT	dT	dT	rA	dG	dT	dT	dT
#7	dT	dT	dT	rA	dC	dT	dT	dT
#8	dT	dT	dT	rA	dT	dT	dT	dT
#9	dT	dT	dT	rA	dA	dT	dT	dT

Πίνακας 3.2: Νουκλεοτιδική αλληλουχία των υποστρωμάτων #4, #7-#9 που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της εξειδίκευσης της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 ως προς τον υπό διάσπαση ApN φωσφοδιεστερικό δεσμό.

Μετά από επώαση ίσης ποσότητας των υποστρωμάτων #4, #7, #8, #9 με ίση ποσότητα ενζύμου και για το ίδιο χρονικό διάστημα, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ-02 παρουσιάζει μεγαλύτερη εξειδίκευση ως προς τον ApG φωσφοδιεστερικό δεσμό (εικόνα 3.20). Σε μικρότερο βαθμό υδρολύεται ο ApT δεσμός, ενώ τα υποστρώματα που φέρουν τους ApC και ApA φωσφοδιεστερικούς δεσμούς υδρολύονται σε μικρότερο βαθμό, πρότυπο που βρίσκεται σε συμφωνία με την υδρόλυση του 30-μερούς υποστρώματος #1 που περιγράφηκε παραπάνω.



Εικόνα 3.20: Εξειδίκευση της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 ως προς τον υπό διάσπαση ApN φωσφοδιεστερικού δεσμού. Ισοδύναμη ποσότητα των οκτανουκλεοτιδίων #3 - #6 επώαστηκε απουσία παρουσία ίσων ποσοτήτων μερικά καθαρισμένης ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 στους 37°C για 30 λεπτά. Τα προϊόντα των αντιδράσεων αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 17% πολυακρυλαμίδης-8M ουρίας και ακολούθησε αυτοραδιογραφία.

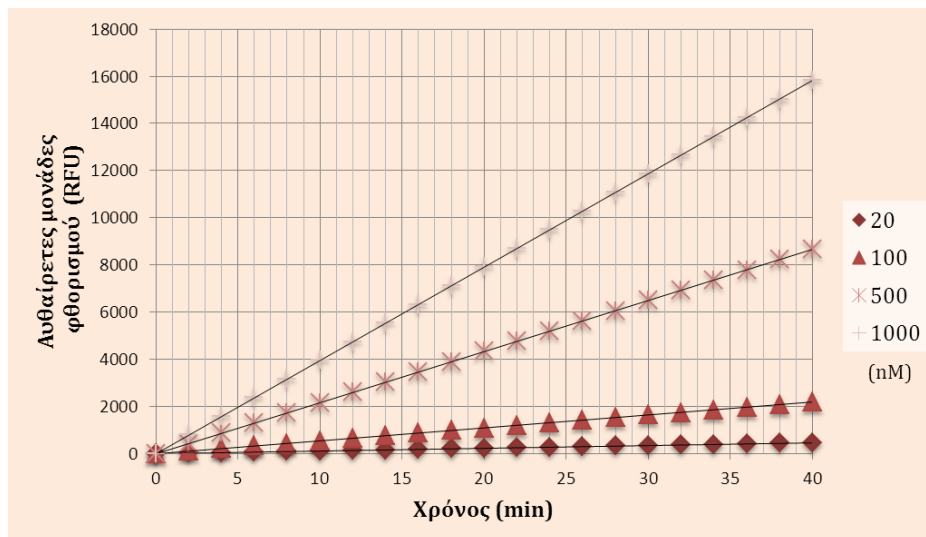
3.4.4 Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis (Km) της RNάσης κ-02 και σύγκριση της με την RNάση κ-01

Η κινητική μελέτη των ενζυμικών αντιδράσεων αποτελεί σημαντικό πεδίο διερεύνησης των λειτουργικών ιδιοτήτων των ενζύμων. Ο προσδιορισμός της συγγένειας ενός ενζύμου ως προς διάφορα υποστρώματα είναι σημαντικός τόσο για τη διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης όσο για την αποκάλυψη του λειτουργικού ρόλου του εκάστοτε ενζύμου. Επίσης, ο προσδιορισμός της συγγένειας των ενζύμων ως προς το ίδιο υπόστρωμα επιτρέπει τη συγκριτική μελέτη των ενζύμων και την αποκάλυψη πιθανών ομοιοτήτων στους μηχανισμούς κατάλυσης.

Από το βιοχημικό χαρακτηρισμό του ανασυνδυασμένου ενζύμου έναντι ραδιενεργά σημασμένων υποστρωμάτων προέκυψε ότι εμφανίζει παρόμοια εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα με την ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ-01, όπως προέκυψε κατά τις εργασίες των διδακτόρων Μαριάννα Κυρίτση και Μαριάντζελα Οικονομοπούλου. Προκειμένου να διερευνήσουμε κατά πόσο εμφανίζει παρόμοια συγγένεια η εναλλακτική πρωτεϊνική

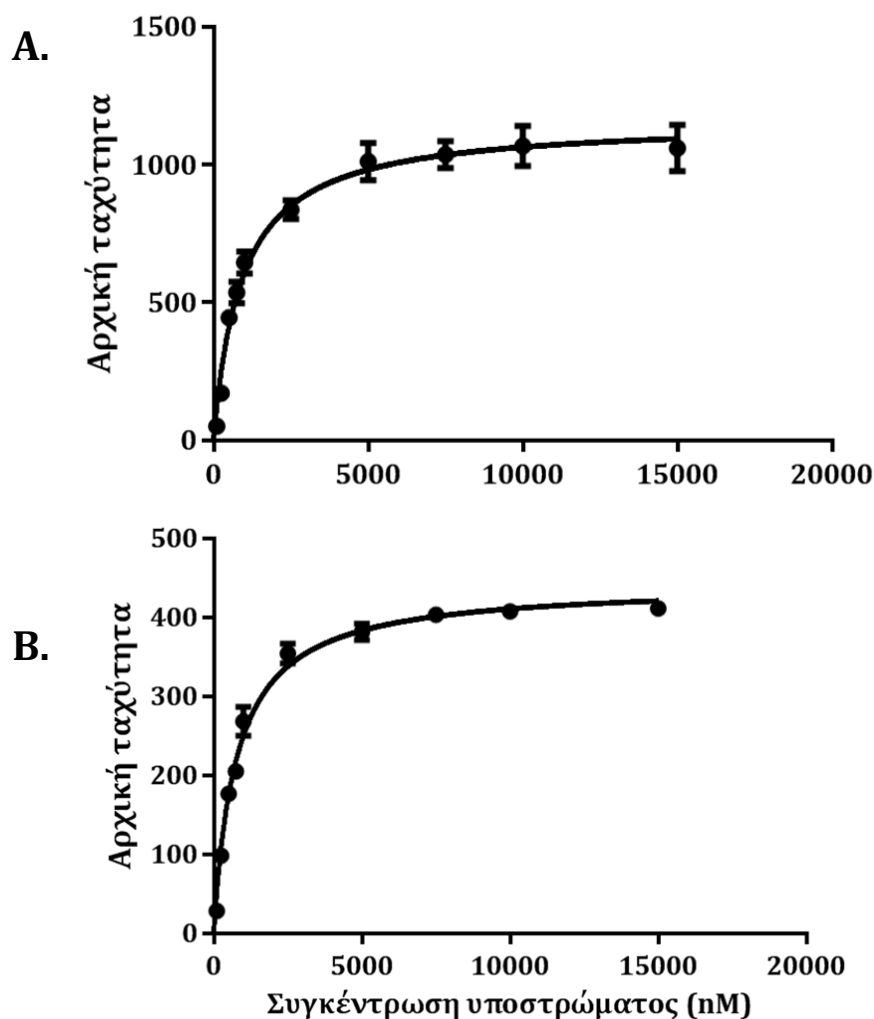
ισομορφή με τη μελετημένη ισομορφή της RNάσης κ-01 προχωρήσαμε σε μία πρώτη προσέγγιση κινητικής μελέτης της RNάσης κ-02. Συγκεκριμένα, αναπτύξαμε μία συνεχή ενζυμική δοκιμασία έναντι του φθορίζοντος μορίου subB με αλληλουχία: 5'-FAM - dTdTdTdTdTTrAdGdTdTdTdTdT-BHQ1-3'. Το συγκεκριμένο υπόστρωμα κατασκευάστηκε σύμφωνα με την αλληλουχία του ολιγονουκλεοτιδίου #10, που αποτελεί το καλύτερο από τα ως τώρα ελεγχθέντα υποστρώματα για την RNάση κ-02, με μοναδική διαφορά ότι φέρει πέντε αντί για τέσσερα κατάλοιπα θυμίνης εκατέρωθεν του δεσμού υδρόλυσης. Η δοκιμασία αυτή επιτρέπει την παρακολούθηση της ενζυμικής αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο μέσω της απόσβεσης του φθορισμού του μορίου FAM στο ακέραιο υπόστρωμα λόγω φαινομένου FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) και της εκπομπής φθορίζουσας ακτινοβολίας μόνο μετά την υδρόλυση του ApG δεσμού από τη ριβονουκλεάση κ-02.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η σταθερά Michaelis (K_m) της ριβονουκλεάσης κ-02 και να συγκριθεί η συγγένεια των δύο πρωτεϊνικών ισομορφών ως προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα περιορισμένη ποσότητα ενζύμου επωάστηκε με ένα εύρος συγκεντρώσεων του φθορίζοντος υποστρώματος και ακολούθησε αναπαράσταση των επιπέδων φθορισμού εκφρασμένα σε αυθαίρετες μονάδες φθορισμού (RFU-Relative Fluorescence Units) σε συνάρτηση με το χρόνο (εικόνα 3.21). Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, οι καμπύλες φθορισμού, που αντιστοιχούν στην παραγωγή προϊόντος, ακολουθούν την κινητική της ενζυμικής αντίδρασης και εμφανίζουν γραμμικότητα εντός του εύρους συγκεντρώσεων και χρόνου που εφαρμόσαμε στα συγκεκριμένα πειράματα. Αντίστοιχη μεθοδολογία εφαρμόστηκε και για την κινητική μελέτη της ισομορφής της RNάσης κ-01 χρησιμοποιώντας καθαρισμένη πρωτεΐνη όπως απομονώθηκε κατά τη διδακτορική διατριβή της διδάκτορα Μαριάννας Κυρίτση [2^M].



Εικόνα 3.21: Γραφική παράσταση των τιμών φθορισμού σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης της ενζυμικής αντίδρασης. Ανασυνδυασμένη RNάση κ-02 επώαστηκε παρουσία 20, 100, 500, 1000, nM του υποστρώματος subB στους 37°C για χρονικό διάστημα 40 λεπτών και ακολούθησε η αναπαράσταση των τιμών φθορισμού του υποστρώματος σε μονάδες RFU συναρτήσει του χρόνου επώασης της ενζυμικής αντίδρασης.

Στη συνέχεια, με βάση το διάγραμμα προσδιορίστηκε ο αρχικός ρυθμός παραγωγής προϊόντος (μέσω του συντελεστή διεύθυνσης των αντίστοιχων ευθειών), που αντιστοιχεί στην αρχική ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης -εκφρασμένης σε αυθαίρετες μονάδες φθορισμού συναρτήσει του χρόνου- για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος και λήφθηκε υπόψη ο μέσος όρος της τιμής ταχύτητας.



Εικόνα 3.22: Διάγραμμα Michaelis-Menten της RNάσης κ-01 (A) και της RNάσης κ-02 (B) έναντι του υποστρώματος subB. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η αρχική ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του φθορίζοντος ολιγονουκλεοτιδίου subB. Η κατασκευή του διαγράμματος έγινε με χρήση του λογισμικού GraphPad Prism.

Η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με χρήση ενός ειδικού λογισμικού που επιτρέπει την εφαρμογή της μεθόδου μη γραμμικής παλινδρόμησης (non-linear regression). Τα διαγράμματα Michaelis - Menten της εικόνας 3.22 που προέκυψαν συσχετίζουν τις αρχικές ταχύτητες των ενζυμικών αντιδράσεων εκφρασμένες σε αυθαίρετες μονάδες φθορισμού ανά λεπτό συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Με βάση την παραπάνω προσέγγιση η τιμή K_m της RNάσης κ-01 έναντι του υποστρώματος SubB είναι $0,908 \pm 0,084 \mu\text{M}$ ενώ για την RNάση κ-02 η τιμή K_m είναι $0,773 \pm 0,048 \mu\text{M}$. Παρατηρούμε δηλαδή ότι τα δύο ένζυμα εμφανίζουν παρόμοια συγγένεια δέσμευσης του συγκεκριμένου υποστρώματος παρά τη σημαντική αμινοξική διαφορά τους στο αμινοτελικό τους άκρο.

3.5 Μελέτη της έκφρασης της ισομορφής RNάση κ-02 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

Είναι γνωστό ότι η εναλλακτική ωρίμανση είναι μία λεπτά ρυθμιζόμενη μοριακή διαδικασία και σε ορισμένες περιπτώσεις συγκεκριμένες ισομορφές εμφανίζουν ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης ή εκφράζονται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Για το λόγο αυτό θεωρήσαμε σκόπιμη τη διερεύνηση της αναλογίας έκφρασης των δύο ισομορφών της RNάσης κ σε επίπεδο mRNA σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Επίσης, είναι γνωστό ότι ένα σημαντικό μέρος του ανθρώπινου μεταγραφώματος δεν σχετίζεται με τη σύνθεση πρωτεϊνών, συνεπώς ένα πολύ σημαντικό ερώτημα είναι κατά πόσο το μετάγραφο που απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε κωδικοποιεί *in vivo* της σύνθεση της αντίστοιχης πρωτεΐνης ή όχι [164].

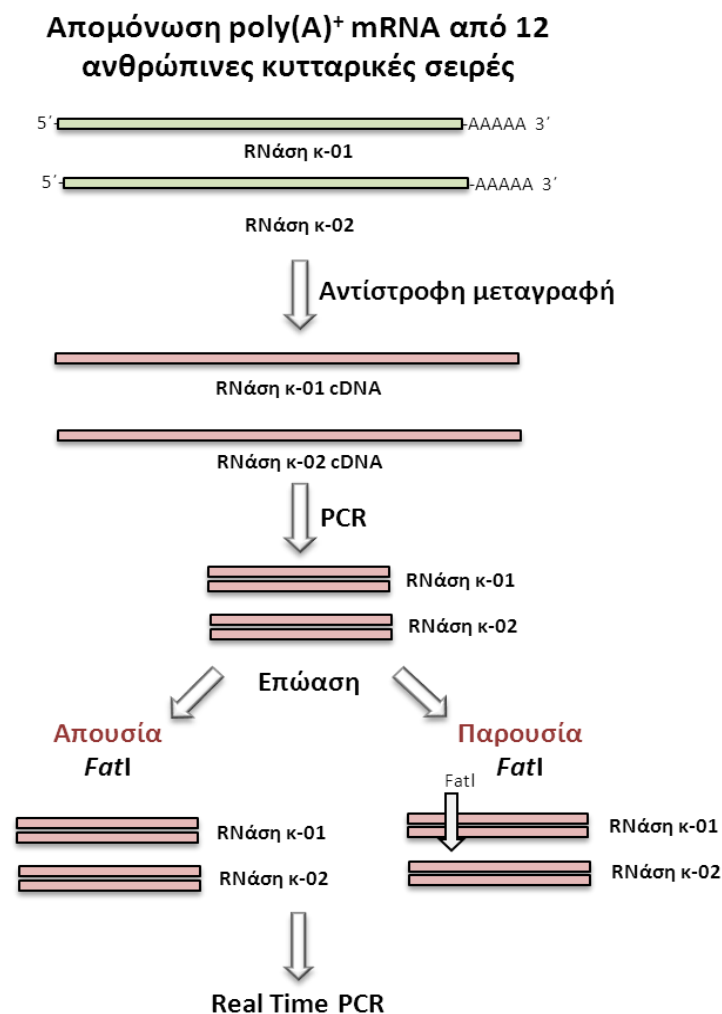
3.5.1 Προσδιορισμός των σχετικών επιπέδων έκφρασης των mRNA ισομορφών RNάση κ-01/RNάση κ-02 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

Έχει βρεθεί ότι στην περίπτωση εναλλακτικού ματίσματος μικρής έκτασης, η αναλογία των επιπέδων έκφρασης των εναλλακτικών ισομορφών μπορεί να επηρεάζεται από τον κυτταρικό τύπο, τον ιστό, το αναπτυξιακό στάδιο και την απόκριση σε εξωκυττάρια ερεθίσματα [133]. Για το λόγο αυτό, στα πλαίσια της μελέτης της έκφρασης των ισομορφών της RNάσης κ σε διάφορους κυτταρικούς τύπους εστιαστήκαμε αρχικά στον προσδιορισμό της αναλογίας τους σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι δύο ισομορφές διαφέρουν μεταξύ τους σε πολύ μικρό βαθμό συνεπώς ο συγκριτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασής τους δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση ειδικών εκκινητών και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Για το λόγο αυτό, αναπτύξαμε μια μοριακή δοκιμασία που επιτρέπει τη σχετική ποσοτικοποίηση των δύο μεταγράφων και προσδιορίσαμε την αναλογία έκφρασής τους (RNάση κ-01/RNάση κ-02) σε ένα μεγάλο εύρος ανθρώπινων κυτταρικών σειρών.

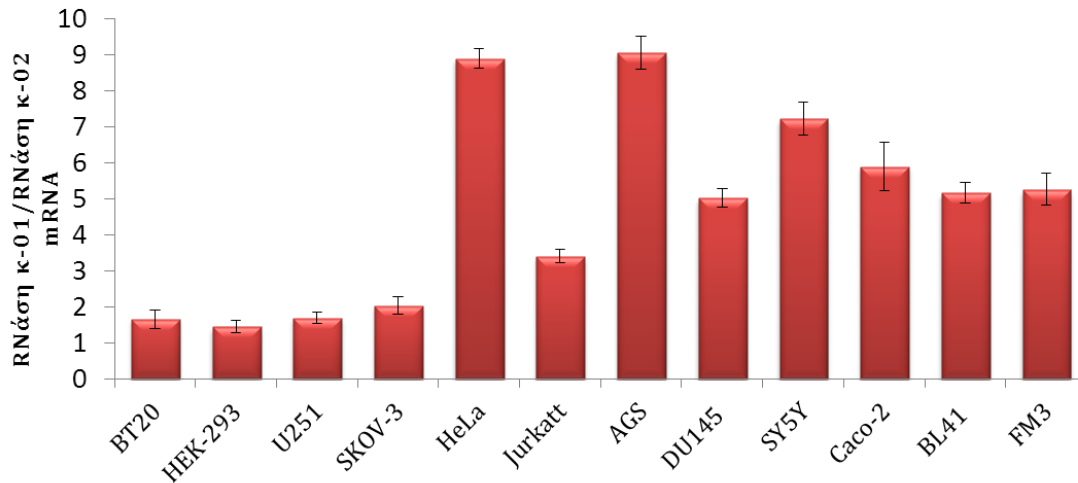
Πιο συγκεκριμένα, όπως παρουσιάζεται διαγραμματικά στην εικόνα 3.23, απομονώθηκε poly(A)⁺ mRNA, υπέστη αντίστροφη μεταγραφή και ενίσχυση με PCR για μικρό αριθμό κύκλων (10 κύκλοι ενίσχυσης) χρησιμοποιώντας ένα ζεύγος εκκινητών εκατέρωθεν του σημείου συρραφής των εξωνίων 1 και 2 (HumC1F και HumC5R, πίνακας

2.1). Το βήμα αυτό καθιστά τα cDNA μόρια και των δύο ισομορφών δίκλιωνα χωρίς να επηρεάζει τη μεταξύ τους αναλογία. Κατόπιν, ίσοι όγκοι των προϊόντων της αντίδρασης επωάζονται για 15 ώρες παρουσία ή απουσία του ενζύμου περιορισμού *FatI*. Όπως αναφέρθηκε και στη μεθοδολογία απομόνωσης και κλωνοποίησης της RNάσης κ-02 (παράγραφος 3.2.1), τα προϊόντα που αντιστοιχούν στο mRNA της RNάσης κ-01 διασπώνται ενώ εκείνα που αντιστοιχούν στην RNάση κ-02 παραμένουν αδιάσπαστα. Αντίθετα, απουσία του ενζύμου περιορισμού και οι δύο πληθυσμοί παραμένουν αδιάσπαστοι και τα ζεύγη δειγμάτων που προκύπτουν υφίστανται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Οι διαφορές των C_T μεταξύ των δειγμάτων (εικόνα 3.25) αντικατοπτρίζουν την αναλογία των δύο ισομορφών σε επίπεδο mRNA.

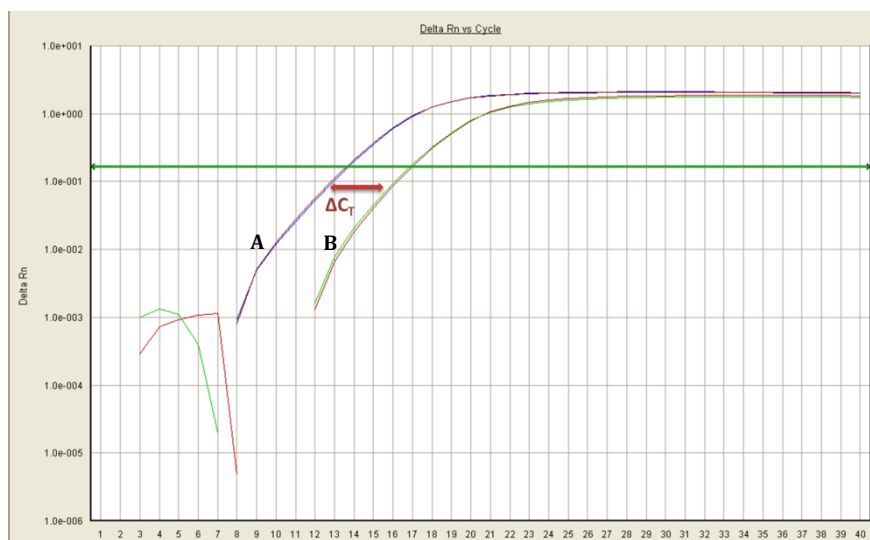


Εικόνα 3.23: Διαγραμματική απεικόνιση της μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε για το συγκριτικό προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης ισομορφών που προκύπτουν από εναλλακτική συρραφή μικρής έκτασης.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε από τρεις φορές για κάθε έναν από τους 12 κυτταρικούς τύπους που αναλύθηκαν. Όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 3.24, η RNάση κ-02 εκφράζεται σε όλες τις περιπτώσεις ενώ η αναλογία RNάση κ-01/RNάση κ-02 κυμαίνεται από 1,45 (κυτταρική σειρά HEK-293) έως 9,06 (κυτταρική σειρά AGS).

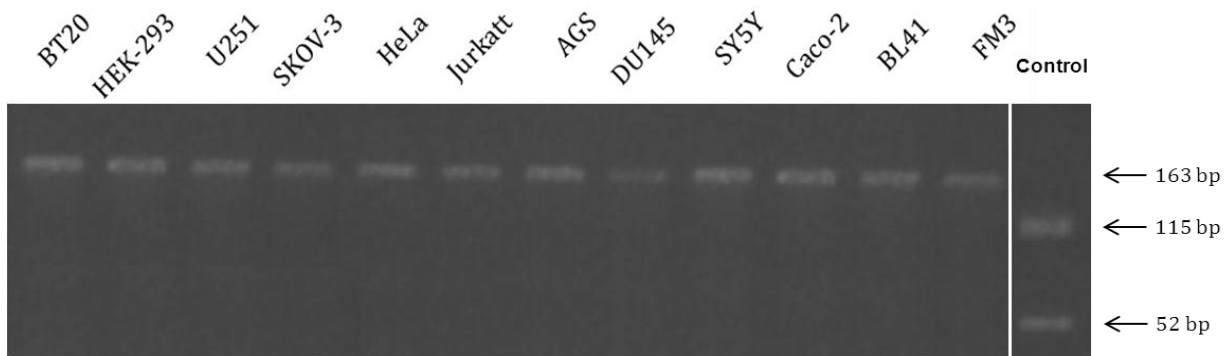


Εικόνα 3.24: Αναλογία των επιπέδων έκφρασης RNάση κ-01/RNάση κ-02 σε επίπεδο mRNA σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Ιστόγραμμα του λόγου έκφρασης των δύο ισομορφών. Το RNA που απομονώθηκε από 12 κυτταρικές σειρές υπέστη αντίστροφη μεταγραφή και PCR ενίσχυση για 10 κύκλους. Ίσες ποσότητες PCR προϊόντος από κάθε αντίδραση επωάστηκαν παρουσία και απουσία του ενζύμου περιορισμού *FatI* και τα ζεύγη δειγμάτων υπέστησαν PCR πραγματικού χρόνου. Η συγκριτική ΔC_T ανάλυση που περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.3 οδήγησε στο σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό των δύο ισομορφών. Σημειώνεται η τυπική απόκλιση από τον μέσο όρο των τριών επαναλήψεων της προσέγγισης σε κάθε κυτταρική σειρά.



Εικόνα 3.25: Ενδεικτική απεικόνιση των καμπύλων ενίσχυσης ενός ζεύγους δειγμάτων που υπέστησαν ανάλυση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου απουσία (A) και παρουσία (B) πέψης με το ένζυμο περιορισμού. Με ΔC_T σημειώνεται η διαφορά των κύκλων ενίσχυσης ανιχνεύσιμου σήματος φθορισμού.

Προκειμένου να επαληθεύσουμε την πλήρη διάσπαση της ιδιοσυστατικής ισομορφής και να βεβαιωθούμε ότι μόνο τα cDNA μόρια που αντιστοιχούν στην RNάση κ-02 ενισχύονται μετά την πέψη επαναλάβαμε την αντίδραση πέψης με το ένζυμο *FatI* στο τελικό προϊόν ενίσχυσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου και τα προϊόντα της πέψης αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.26, ένα μόνο προϊόν εντοπίζεται σε όλες τις περιπτώσεις, γεγονός που επαληθεύει την αξιοπιστία της συγκεκριμένης προσέγγισης.



Εικόνα 3.26 Τα προϊόντα της PCR πραγματικού χρόνου επώαστηκαν παρουσία και απουσία του ενζύμου *FatI* και αναλύθηκαν σε πήκτωμα 2,5% αγαρόζης. Σε παράλληλο πείραμα ελέγχου, 200 ng cDNA της RNάσης κ-01 ενισχύθηκαν με το ίδιο ζεύγος εκκινητών και υπέστησαν πέψη υπό τις ίδιες συνθήκες.

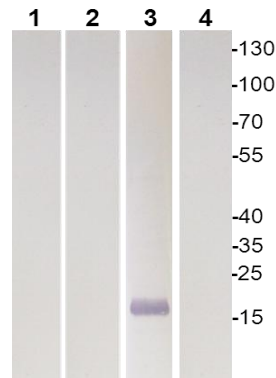
3.5.2 Ανοσολογικός Εντοπισμός της RNase κ-02 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

Όπως είναι γνωστό, ένας μεγάλος αριθμός μεταγράφων που διαθέτουν poly(A)⁺ ουρά δεν κωδικοποιεί τη σύνθεση πρωτεϊνών. Συνεπώς, ένα κρίσιμο ερώτημα στα πλαίσια του χαρακτηρισμού του μεταγράφου της RNάσης κ-02 ήταν κατά πόσο κωδικοποιεί τη σύνθεση πρωτεΐνης σε ανθρώπινα κύτταρα. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε το ανοσοκαθαρισμένο πολυκλωνικό αντίσωμα που περιγράφηκε παραπάνω (παράγραφος 3.3) έναντι ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές διαφορετικής προέλευσης (HEK-293, AGS, HeLa, SH-SY5Y και Caco2) σε ανάλυση κατά Western. Ωστόσο, σε καμία περίπτωση δεν ήταν εφικτός ο εντοπισμός της συγκεκριμένης πρωτεϊνικής ισομορφής. Επίσης, δεν επιτεύχθηκε ο ανοσοεντοπισμός καμίας από τις δύο ισομορφές (RNάση κ-01 και RNάση κ-02) έπειτα από ανάλυση κατά Western μιας σειράς εμπορικά διαθέσιμων και αντισωμάτων που είχαν αναπτυχθεί στο εργαστήριό μας, ειδικών έναντι του κοινού καρβοξυ-τελικού τμήματος των δύο πρωτεϊνικών ισομορφών.

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.1.2, η ριβονουκλεάση κ-02 είναι ιδιαίτερα υδρόφοβο μόριο. Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλά υδρόφοβη φύση της πρωτεΐνης προχωρήσαμε στην εφαρμογή μιας μεθοδολογίας που επιτρέπει τον εμπλουτισμό υψηλά υδρόφοβων μορίων σε κυτταρικά εκχυλίσματα. Πιο συγκεκριμένα, προχωρήσαμε στην κλασμάτωση των κυτταρικών πρωτεϊνών βάσει υδροφοβικότητας με χρήση του απορρυπαντικού Triton X-114. Η κατεργασία με το συγκεκριμένο απορρυπαντικό διαχωρίζει τις πρωτεΐνες ανάλογα με τη σχετική υδροφοβικότητά τους και απομονώνει τα υδρόφιλα μόρια στη διαλυτή φάση, τις αμφιπαθείς διαμεμβρανικές πρωτεΐνες στη φάση εμπλουτισμένη με απορρυπαντικό και οι αδιάλυτες πρωτεΐνες καθιζάνουν έπειτα από φυγοκέντρηση.

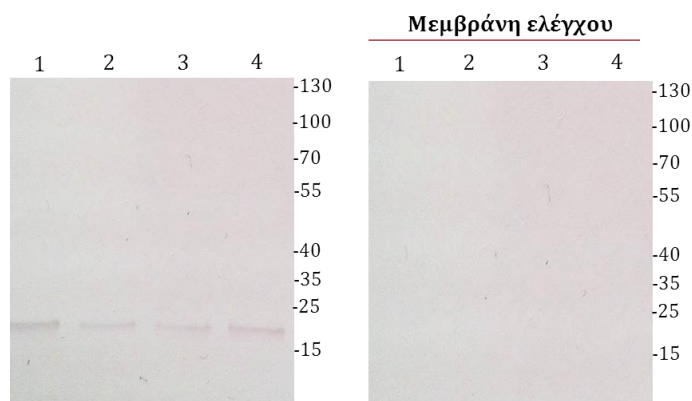
Έπειτα από κατεργασία εκχυλίσματος της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς HEK-293 με Triton X-114 και διαχωρισμό των φάσεων, τα κλάσματα που προέκυψαν υποβλήθηκαν σε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και ανοσοεντοπισμό κατά Western χρησιμοποιώντας το ανοσοκαθαρισμένο K02N αντίσωμα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.27, η RNάση κ-02 εντοπίζεται ως μοναδική ζώνη στην αδιάλυτη φάση ενώ δεν εμφανίστηκαν ζώνες στην υδατική ή στην ενδιάμεσα υδρόφοβη φάση. Σε παράλληλο πείραμα ελέγχου, επώαση με δεύτερο αντίσωμα δεν οδήγησε στην εμφάνιση πρωτεϊνικών ζωνών. Η RNάση κ-02 εμφανίζει μοριακό βάρος ~16 kDa το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με το θεωρητικά αναμενόμενο μοριακό βάρος όπως υπολογίζεται από την αμινοξική της αλληλουχία (14.900 Da). Σε ένα πείραμα ελέγχου δημιουργήθηκε μία σταθερή κυτταρική σειρά HEK-293

καταστολής της έκφρασης της ανθρώπινης RNάσης κ-02 μέσω RNAi. Η αδιάλυτη φάση των κυττάρων καταστολής υποβλήθηκε στην ίδια διαδικασία ωστόσο δεν εντοπίστηκε ανιχνεύσιμο σήμα (4), γεγονός που υποδηλώνει την ειδικότητα του αντισώματος K02N για την ανίχνευση της ανθρώπινης RNάσης κ-02.



Εικόνα 3.27: Ανάλυση κατά Western πρωτεϊνικών κλασμάτων που προέκυψαν από διαχωρισμό πρωτεϊνικού εκχυλίσματος κυττάρων HEK-293 με χρήση του απορρυπαντικού Triton X-114. Είκοσι μικρογραμμάρια πρωτεΐνης από την υδατική φάση (1), την ενδιάμεσα υδρόφοβη φάση (2) και την αδιάλυτη - ισχυρά υδρόφοβη φάση (3) αναλύθηκαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης περιεκτικότητας 15%, μεταφέρθηκαν με ημίστεγνη μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και η RNάση κ-02 εντοπίστηκε με χρήση του ανοσοκαθαρισμένου πολυκλωνικού αντισώματος Αντι-K02N. Παράλληλα ηλεκτροφορήθηκε μείγμα πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών.

Η ίδια ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε τέσσερις ακόμη ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ετερογενούς προέλευσης και σε συμφωνία με την έκφραση σε επίπεδο mRNA, η πρωτεϊνική ισομορφή RNάση κ-02 εκφράζεται σε όλες τις περιπτώσεις (εικόνα 3.28).



Εικόνα 3.28: Ανάλυση κατά Western πρωτεϊνικών κλασμάτων που προέκυψαν από διαχωρισμό πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κυττάρων AGS (1), HeLa (2), SH-SY5Y (3) και Caco2 (4) με χρήση του απορρυπαντικού Triton X-114. Είκοσι μικρογραμμάρια πρωτεΐνης από αδιάλυτη - ισχυρά υδρόφοβη φάση αναλύθηκαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης περιεκτικότητας 15%, μεταφέρθηκαν με ημίστεγνη μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και η RNάση κ-02 εντοπίστηκε με χρήση του ανοσοκαθαρισμένου πολυκλωνικού αντισώματος Αντι-K02N. Παράλληλα ηλεκτροφορήθηκε μείγμα πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών. Σε παράλληλο πείραμα επαναλήφθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία χωρίς επώαση με πρωτογενές αντίσωμα.

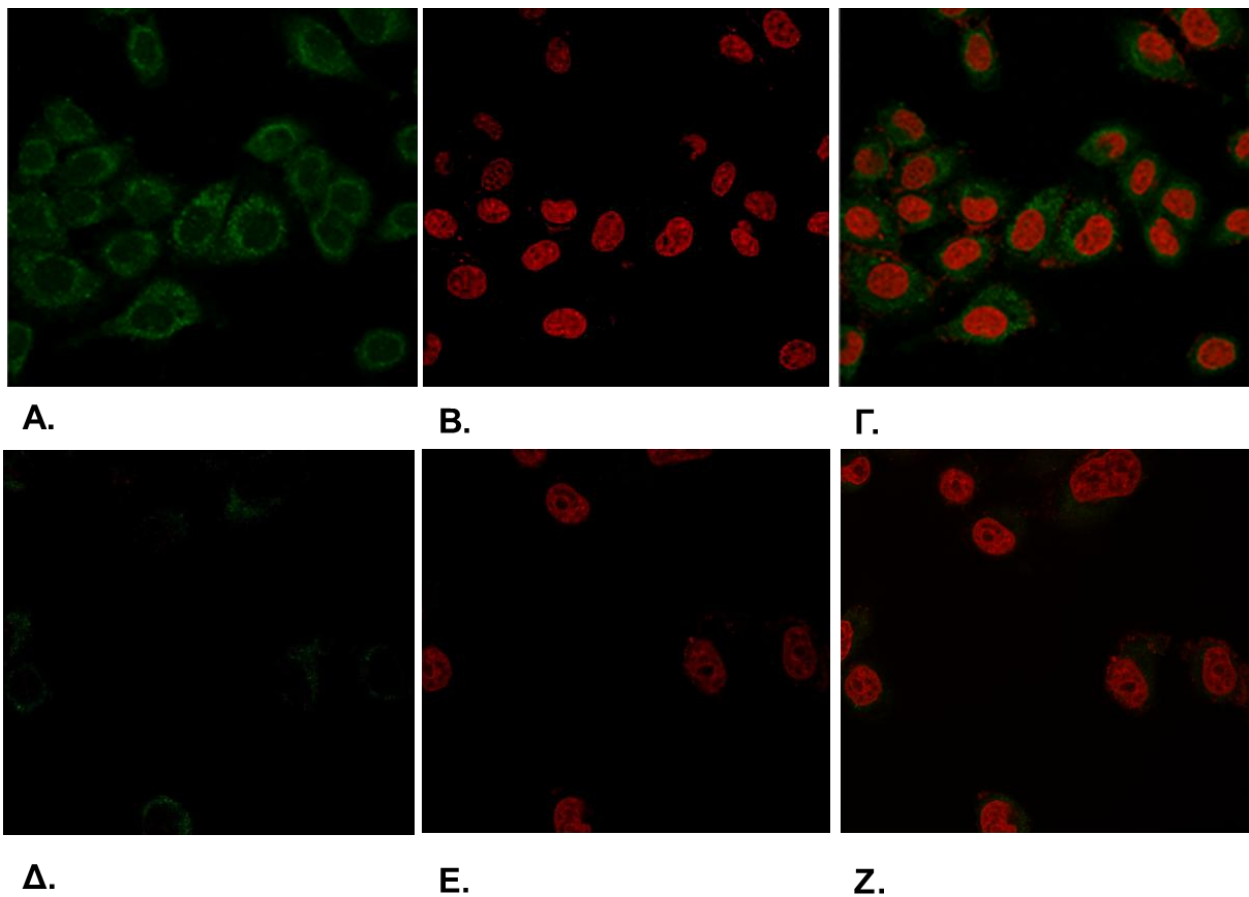
3.5.3 Υποκυτταρικός εντοπισμός της RNase κ-02 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

Η υποκυτταρική τοπολογία ενός ενζύμου αποτελεί σημαντική παράμετρο στις προσπάθειες διαλεύκανσης του βιολογικού του ρόλου. Στα πλαίσια της μελέτης της έκφρασης της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές προχωρήσαμε στη διερεύνηση του υποκυτταρικού της εντοπισμού μέσω ανοσοφθορισμού. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας το ειδικό για την RNάση κ-02 πολυκλωνικό αντίσωμα Αντι-κ02N προχωρήσαμε στον ανοσολογικό της εντοπισμό σε ανθρώπινα κύτταρα HEK-293 χρησιμοποιώντας ένα φθορίζον δευτερογενές αντίσωμα.

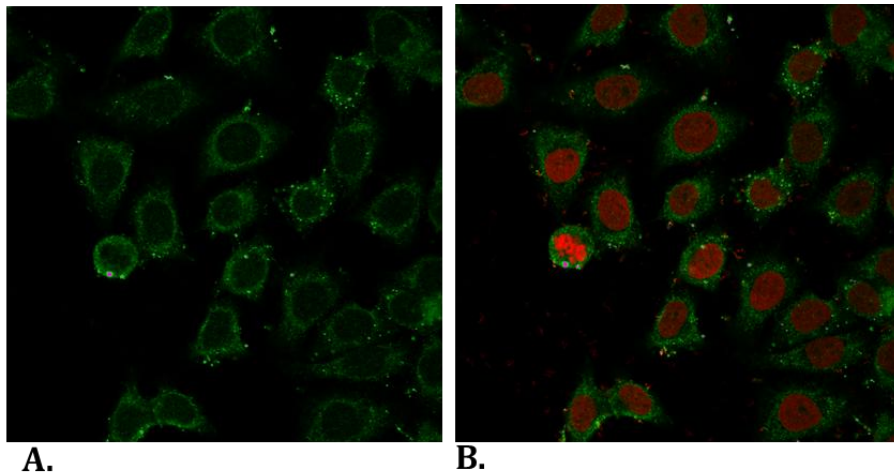
Ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση του παρασκευάσματος σε συνεστιακό μικροσκόπιο με χρήση των κατάλληλων φίλτρων τα οποία είχαν μηδενιστεί σε πειράματα αρνητικού ελέγχου (επώαση κυττάρων χωρίς καμία κατεργασία και κυττάρων που δεν είχαν υποστεί επώαση με πρωτογενές αντίσωμα). Η συγκεκριμένη μεθοδολογία εφαρμόστηκε σε συνεργασία με το Δρ. Αθανάσιο Βελέντζα στο μικροσκόπιο φθορισμού του τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Από τη συγκεκριμένη προσέγγιση προέκυψε ότι η ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ-02 κατανέμεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων (εικόνα 3.29) σε εντοπισμένες εστίες. Προκειμένου να επαληθεύσουμε το συγκεκριμένο εύρημα, επαναλήφθηκε η ίδια προσέγγιση σε κύτταρα HEK-293 που είχαν υποστεί καταστολή της έκφρασης της RNάσης κ-02 μέσω RNAi. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.29, έπειτα από την καταστολή της RNάσης κ-02 το φθορίζον σήμα έχει σχεδόν εκμηδενιστεί, γεγονός που επαληθεύει την κυτταροπλασματική κατανομή της RNάσης κ-02.

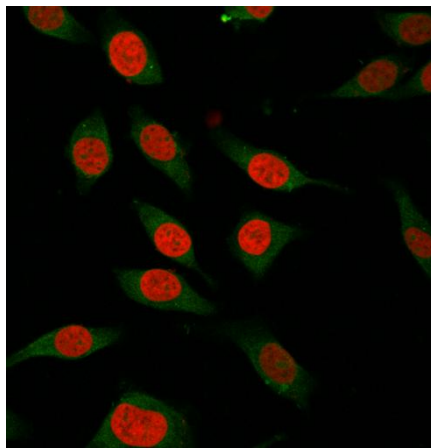
Τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν και από την χρήση ενός αντισώματος που αναγνωρίζει έναν καρβοξυτελικό, κοινό για τις δύο ισομορφές επίτοπο (Anti-PSM) γεγονός που στηρίζει ακόμη περισσότερο την κυτταροπλασματική κατανομή του ενδογενούς ενζύμου σε ανθρώπινα κύτταρα (εικόνα 3.30). Τέλος, τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν και από την επανάληψη του πειράματος στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HeLa (εικόνα 3.31).



Εικόνα 3.29: Συνεστιακή μικροσκοπία ανοσοφθορισμού για τον προσδιορισμό της υποκυτταρικής κατανομής της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02. Κύτταρα HEK-293 επώαστηκαν παρουσία του ειδικού για την ανθρώπινη RNάση κ-02 πολυκλωνικού αντισώματος K02N και παρατηρήθηκαν έπειτα από επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα Alexa-488 σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (Α). Το DNA του κυττάρου υπέστη χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (Β). Κοινή απεικόνιση των δύο χρώσεων (Γ).



Εικόνα 3.30: Συνεστιακή μικροσκοπία ανοσοφθορισμού για τον προσδιορισμό της υποκυτταρικής κατανομής της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02. Κύτταρα HEK-293 επώαστηκαν παρουσία του πολυκλωνικού αντισώματος Anti-PSM που αναγνωρίζει την καρβοξυτελική περιοχή της RNάσης κ-02 και παρατηρήθηκαν έπειτα από επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα Alexa-488 σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (A). Το DNA του κυττάρου υπέστη χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (κόκκινο) και ακολούθησε κοινή απεικόνιση των δύο χρώσεων (B).



Εικόνα 3.31: Συνεστιακή μικροσκοπία ανοσοφθορισμού για τον προσδιορισμό της υποκυτταρικής κατανομής της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02. Κύτταρα HeLa επώαστηκαν παρουσία του ειδικού για την ανθρώπινη RNάση κ-02 πολυκλωνικού αντισώματος K02N και παρατηρήθηκαν έπειτα από επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα Alexa-488 σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (πράσινο). Το DNA του κυττάρου υπέστη χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (κόκκινο).

4 | Συζήτηση

4. Συζήτηση

Οι ριβονουκλεάσες συνιστούν μία εξαιρετικά ετερογενή ομάδα ενζύμων που καταλύουν τη διάσπαση μορίων RNA και αποτελούν αντικείμενο συστηματικής μελέτης πολλών ερευνητικών ομάδων. Οι ριβονουκλεάσες είναι οι κύριοι καταλύτες του RNA καταβολισμού και συμμετέχουν σε ένα μεγάλο πλήθος διαφορετικών διεργασιών που δεν σχετίζονται απαραίτητα με τις διαδικασίες της γονιδιακής έκφρασης. Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στις ριβονουκλεάσες οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο γεγονός ότι νέα παραδείγματα εμπλοκής τους τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

Μια νέα οικογένεια ριβονουκλεασών, η οικογένεια της ριβονουκλεάσης κ, θεμελιώθηκε με το βιοχημικό και μοριακό χαρακτηρισμό της Cc RNase, η οποία εκφράζεται στο έντομο *Ceratitidis capitata* [104,165] και εδραιώθηκε περαιτέρω με την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ [106]. Αντιπρόσωποι της οικογένειας ριβονουκλεασών κ εμφανίζονται σε όλα τα taxa του ζωικού βασιλείου από τα Κνιδόζωα μέχρι τον άνθρωπο. Στην περίπτωση του εντόμου *Ceratitidis capitata* έχουν απομονωθεί δύο εναλλακτικές mRNA ισομορφές που κωδικοποιούν τη σύνθεση της Cc RNάσης οι οποίες ουσιαστικά διαφέρουν στην 3' UTR ενώ τα επίπεδα έκφρασής τους διαφοροποιούνται αναλόγως του ιστού και του αναπτυξιακού σταδίου [105].

Η ανθρώπινη RNάση κ εκφράζεται σε μια πληθώρα φυσιολογικών και καρκινικών ιστών καθώς και σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια, γεγονός που υποδεικνύει ότι το εν λόγω ένζυμο συμμετέχει σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες (housekeeping). Η νουκλεοτιδική της εξειδίκευση, η απουσία οποιασδήποτε ομολογίας με τις ριβονουκλεάσες της υπεροικογένειας A και η αδυναμία αναστολής της ριβονουκλεολυτικής της ενεργότητας από τον αναστολέα των ριβονουκλεασών (RI), θεμελίωσαν ότι η RNάση κ ανήκει σε νέα οικογένεια που διαφοροποιείται ουσιαστικά από τις μέχρι σήμερα μελετημένες οικογένειες ριβονουκλεασών [106].

Η παρούσα διατριβή εντάσσεται στην ευρύτερη ερευνητική προσπάθεια του Εργαστηρίου μας που αποσκοπεί στη διερεύνηση του βιολογικού ρόλου της ανθρώπινης RNάσης κ.

Δεδομένα από EST αλληλουχίες και πειράματα RNA αλληλούχισης δείχνουν ότι η εναλλακτική ωρίμανση περιορισμένης έκτασης (subtle alternative splicing) φαίνεται να αφορά έναν συνεχώς αυξανόμενο αριθμό ανθρώπινων γονιδίων [128,166-168]. Οι επιπτώσεις των φαινομένων εναλλακτικής ωρίμανσης μικρής έκτασης στα πρωτεϊνικά προϊόντα ποικίλλουν, ανάλογα με το αν πρόκειται για διαφοροποιήσεις που διατηρούν (Δ3, 6, 9 κλπ) ή τροποποιούν (Δ2, 4, 5, 7, 8, κλπ) το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, όπου Δ η απόσταση των εναλλακτικών θέσεων συρραφής. Οι αλλαγές που διατηρούν το πλαίσιο ανάγνωσης οδηγούν στην προσθήκη ή στην έλλειψη μερικών μόνο αμινοξέων και στη σύνθεση όμοιων πρωτεϊνικών ισομορφών που όμως συχνά διαφέρουν στις λειτουργικές τους ιδιότητες.

Για παράδειγμα, μία Δ3 περίπτωση εναλλακτικής ωρίμανσης στο προϊόν του ανθρώπινου γονιδίου ATN1 καθορίζει την υποκυτταρική κατανομή (πυρηνική ή κυτταροπλασματική) της αντίστοιχης πρωτεϊνικής ισομορφής [133]. Στην περίπτωση των εναλλακτικών θέσεων της "αλληλουχίας – δότη" κατά τη συρραφή μικρής έκτασης, η πιο κοινή νουκλεοτιδική απόσταση είναι μήκους 4 νουκλεοτιδίων. Ωστόσο, η πλαισιοτροποποιητική επίδραση της διαφοροποίησης αυτής συχνά κωδικοποιεί τη σύνθεση ισομορφών με πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού που συνιστούν υποθετικούς στόχους NMD αποικοδόμησης και δεν έχουν μελετηθεί συστηματικά [125].

Μια πρόσφατη *in silico* μελέτη συγκριτικής ανάλυσης EST αλληλουχιών στον άνθρωπο και στον ποντίκι αποκάλυψε 1849 περιπτώσεις μεταγράφων στον άνθρωπο και 733 στο ποντίκι όπου φαινόμενα εναλλακτικής ωρίμανσης μπορούν να κωδικοποιήσουν τη σύνθεση εναλλακτικών πρωτεϊνικών ισομορφών με την χρήση διαφορετικών κωδικονίων έναρξης [136]. Τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν ακόμη περισσότερο την παρουσία του φαινομένου αυτού στα γονιδιώματα των θηλαστικών καθώς και το αντίκτυπό του στο δυναμικό κωδικοποίησης σε επίπεδο πρωτεώματος. Ανάμεσα σε αυτές τις καταγραφές αναφέρεται και το φαινόμενο εναλλακτικής ωρίμανσης μικρής έκτασης που πραγματοποιείται στο γονιδιακό προϊόν της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ που μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή.

Στα πλαίσια της διερεύνησης της έκφρασης πιθανών εναλλακτικών ισομορφών της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ, εντοπίσαμε σε EST αλληλουχίες την πιθανή έκφραση μιας εναλλακτικής ισομορφής (RNάση κ-02) που υπολείπεται τεσσάρων νουκλεοτιδικών καταλοίπων στο σημείο συρραφής των δύο πρώτων εξονίων. Η κλασική πειραματική προσέγγιση απομόνωσης και κλωνοποίησης εναλλακτικών μεταγράφων που στηρίζεται στην αντίστροφη μεταγραφή και τη σύνθεση ζεύγους ειδικών για το εναλλακτικό

μετάγραφο εκκινητών (RT-PCR) δεν διευκολύνει την εκλεκτική απομόνωση μίας εναλλακτικής ισομορφής που ομοιάζει πολύ με την ιδιοσυστατική (conventional) ισομορφή όπως συμβαίνει στην περίπτωση των mRNA ισομορφών RNάση κ-01 και RNάση κ-02. Για το λόγο αυτό αναπτύξαμε μία νέα μεθοδολογία με σκοπό την απομόνωση μεταγράφων που προκύπτουν από εναλλακτική ωρίμανση μικρής έκτασης βάσει της διαφοράς στην νουκλεοτιδική τους αλληλουχία. Η διαφορά αυτή μπορεί να αξιοποιηθεί όταν στην εναλλακτική ισομορφή καταργείται μία θέση διάσπασης από ένζυμο περιορισμού που διατηρείται στην ιδιοσυστατική ισομορφή.

Η νουκλεοτιδική στοίχιση της κλωνοποιημένης cDNA αλληλουχίας της ανθρώπινης RNάσης κ-02 με το γονίδιο της RNάσης κ έδειξε ότι η ισομορφή αυτή κωδικοποιείται από μια εναλλακτική επιλογή θέσης δότη, 4 βάσεις αναρροϊκά της θέσης επιλογής της ιδιοσυστατικής ισομορφής (RNάση κ-01).

Η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε ευνοεί σημαντικά τη μελέτη μεταγράφων που προκύπτουν από φαινόμενα εναλλακτικής συρραφής περιορισμένης έκτασης. Το σημείο κλειδί σε αυτή την προσέγγιση είναι η εφαρμογή της πέψης με ένα κατάλληλο ένζυμο περιορισμού το οποίο δρα ειδικά έναντι των απόλυτα συμπληρωματικών αλληλουχιών ενώ οι μερικά συμπληρωματικές παραμένουν ακέραιες μετά την κατεργασία και μπορούν να ενισχυθούν και να κλωνοποιηθούν. Επίσης, η εφαρμογή επιλογής μέσω υβριδισμού επιτρέπει την απομόνωση σπάνιων μεταγράφων βάσει της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας. Άφθονα RNA μόρια όπως πληθυσμοί ριβοσωμικών RNA και mRNAs με υψηλά επίπεδα έκφρασης που μπορεί να παρεμποδίζουν την εκλεκτική απομόνωση RNA με περιορισμένα επίπεδα έκφρασης απομακρύνονται κατά τις εκπλύσεις, διευκολύνοντας έτσι την ενίσχυση των επιθυμητών μορίων-στόχων. Έτσι, η μεθοδολογία αυτή μπορεί να εφαρμοστεί για ένα μεγάλο εύρος μεταγράφων επιλέγοντας ένα ένζυμο περιορισμού που αναγνωρίζει και διασπά μόνο τον μη-επιθυμητό στόχο.

Είναι γνωστό ότι η διαφορική ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης ισομορφών που προέρχονται από εναλλακτική ωρίμανση μικρής έκτασης μπορεί να έχει λειτουργική σημασία. Πιο συγκεκριμένα, η αναλογία δύο ισομορφών μπορεί να διαφέρει σε διάφορους ιστούς ή κυτταρικούς τύπους [128,169], ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο [144,150] ή σε απόκριση σε εξωκυττάρια ερεθίσματα [145]. Μέχρι σήμερα, η σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των εναλλακτικών ισομορφών έχει πραγματοποιηθεί με ηλεκτροφορητικές προσεγγίσεις [128, 131, 134, 164, 165] είτε με αλληλούχιση RNA [170]. Ωστόσο αυτές οι μεθοδολογίες δεν επιτρέπουν με ακρίβεια τον προσδιορισμό των

αναλογιών είναι εμφανίζουν περιορισμούς λόγω της εξεζητημένης απαίτησής τους σε εξοπλισμό και αντιδραστήρια.

Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε μια μεθοδολογική προσέγγιση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου που επιτρέπει το σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης μεταγράφων που φέρουν αλληλουχίες με διαφορετικές θέσεις περιορισμού. Με άλλα λόγια η ποσοτικοποίηση, όμοια με την κλωνοποίηση αυτών των αλληλουχιών, μπορεί να επιτευχθεί βάσει της νουκλεοτιδικής διαφοράς των εναλλακτικών μεταγράφων. Τα αποτελέσματα της προσέγγισης αυτής σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι το mRNA της RNάσης κ-02 εκφράζεται σε όλες τις κυτταρικές σειρές που ελέγχθηκαν ενώ σχετικά επίπεδα έκφρασης των δύο ισομορφών φαίνεται να ποικίλλουν. Το συγκεκριμένο γεγονός μπορεί να αντανακλά την εμπλοκή ενός ιστο-ειδικού μηχανισμού ρύθμισης των επιπέδων έκφρασης των δύο ισομορφών του γονιδίου της ανθρώπινης RNάσης κ.

Ένα σημαντικό ερώτημα αποτέλεσε κατά πόσο η ανθρώπινη RNάση κ-02 έχει ριβονουκλεολυτική ενεργότητα. Στα πλαίσια της ερευνητικής προσπάθειας για την απάντηση του ερωτήματος αυτού, η έκφραση της ανθρώπινης RNάσης κ-02 μέσω του συστήματος του ζυμομύκητα *Pichia pastoris* οδήγησε στην έκφραση ικανοποιητικών ποσοτήτων ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, η οποία παρουσίαζε σημαντική ριβονουκλεολυτική ενεργότητα. Ένας μεγάλος αριθμός μετασχηματισμένων κλώνων ελέγχθηκε ως προς την έκφραση του ανασυνδυασμένου ενζύμου και η έκφραση του ελέγχεται ανοσολογικά με τη μέθοδο ανοσοσύτωσης κηλίδας 1,2 και 3 ημέρες μετά την έναρξη της επαγωγής. Η δυσκολία έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης οφείλεται αφενός στην παραγωγή μικρής ποσότητας από το σύστημα, γεγονός που δυσχεραίνει την αξιολόγηση των κλώνων βάσει των ανοσολογικών σημάτων αλλά και στην έντονη τοξική δράση της που φαίνεται να προκαλεί η έκφρασή της. Ο κλώνος που επιλέγεται καλλιεργείται σε μεγαλύτερο όγκο και το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας υποβάλλεται σε εξαντλητική διαπίδυση και σε χρωματογραφία ηπαρίνης όπου επιτεύχθηκε ο μερικός χρωματογραφικός του καθαρισμός. Με σκοπό τον περαιτέρω χρωματογραφικό του καθαρισμό το υλικό υπεβλήθη σε χρωματογραφία συγγένειας, ανιοντοανταλλακτική και κατιοανταλλακτική χρωματογραφία. Παρά τις προσπάθειες που εφαρμόστηκαν με δοκιμή αρκετών χρωματογραφικών μέσων, δεν επιτεύχθηκε ο πλήρης καθαρισμός του ενζύμου. Το γεγονός αυτό αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στην ισχυρά υδρόφοβη φύση του μορίου που ευνοεί το σχηματισμό συσσωματωμάτων και υπερμοριακών συμπλόκων που δυσχεραίνουν τη φυσιολογική χρωματογραφική συμπεριφορά.

Κατά τη μελέτη των λειτουργικών ιδιοτήτων των ριβονουκλεασών, ένα βασικό ερώτημα είναι ο προσδιορισμός της εξειδίκευσής τους ως προς το υπόστρωμα. Έτσι, αρχικά με την χρήση ενός τριανταμερούς RNA ολιγονουκλεοτιδίου που περιλαμβάνει όλες τις πιθανές θέσεις διάσπασης προσδιορίστηκε ότι η ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ-02 διασπά κυρίως ApG και ApU φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και σε μικρότερο βαθμό UrU δεσμούς. Σε συνέχεια των πειραμάτων αυτών προσδιορίστηκε η δράση του ενζύμου έναντι μιας σειράς διαφορετικών οκτανουκλεοτιδίων, μείγματος δεσοξυ- και ριβονουκλεοτιδίων προκειμένου να προσδιοριστεί περαιτέρω η εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα. Η χρήση δεσοξυριβονουκλεοτιδίων καθιστά τα υποστρώματα αυτά ανθεκτικά στην αποικοδόμηση από άλλες ριβονουκλεάσες, όπως εκείνες της υπεροικογένειας A που αποτελούν συχνά πηγή μόλυνσης σε αντίστοιχες μελέτες.

Έπειτα από ενζυμική δοκιμασία της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 έναντι υποστρωμάτων του τύπου 5'-dTdTdTrAdNdTdTdT-3' διαπιστώσαμε ότι το νουκλεοτιδικό κατάλοιπο που έπεται της αδενίνης στην θέση του δεσμού που διασπάται επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα υδρόλυσης από το ένζυμο. Έτσι, επαληθεύσαμε ότι η RNάση κ-02 όντως εμφανίζει πρότυπο εξειδίκευσης διάσπασης ApG και ApU και σε σημαντικά μικρότερο βαθμό ApC και ApA φωσφοδιεστερικών δεσμών. Σε ένα επόμενο βήμα προσδιορίσαμε τη δράση του ενζύμου έναντι μίας δεύτερης σειράς ολιγονουκλεοτιδίων με τη γενική αλληλουχία **dNdNdNrAdGdNdNdN-3'** θελήσαμε να προσδιορίσουμε κατά πόσο επηρεάζουν τη διάσπαση του ApG δεσμού οι αλληλουχίες που εντοπίζονται εκατέρωθεν του. Διαπιστώσαμε ότι η ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ-02 διασπά κατά σειρά προτίμησης αλληλουχίες που φέρουν κατάλοιπα θυμίνης ενώ τα κατάλοιπα γουανίνης, κυτοσίνης και αδενίνης επηρεάζουν αρνητικά την ικανότητα δράσης του ενζύμου.

Τα αποτελέσματα σχετικά με την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα δείχνουν ότι η ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ-02 είναι μία ενδονουκλεάση περιορισμένης εξειδίκευσης. Αν και μπορεί να δράσει έναντι μονόκλωνων υποστρωμάτων σε πολλαπλές θέσεις δεν εμφανίζει γενικευμένη δράση όπως άλλες καλά χαρακτηρισμένες ενδονουκλεάσες όπως τη ριβονουκλεάση A και οι ριβονουκλεάσες T₁ και T₂ [171]. Έχουν αναφερθεί και άλλες περιπτώσεις όπου η δράση ριβονουκλεασών επηρεάζεται από την αλληλουχία που περιβάλλει το δεσμό που διασπάται με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τη βακτηριακή RNάση III που διασπά δίκλωνο RNA. Σε αυτή την περίπτωση η δράση του ενζύμου επηρεάζεται από την αλληλουχία εκατέρωθεν του προς διάσπαση δεσμού σε έκταση 10 νουκλεοτιδίων [172,173].

Είναι γνωστό ότι πέρα από τα RNAs που κωδικοποιούν τη σύνθεση πρωτεϊνών, ένα σημαντικό ποσοστό μεταγράφων δεν μεταφράζεται [164]. Πέρα από τα καλά μελετημένα μετάγραφα που δεν κωδικοποιούν τη σύνθεση πρωτεϊνών όπως είναι τα rRNA, τα tRNAs, τα microRNAs και άλλα, να μεγάλα μη κωδικά RNAs (lnc RNAs- long non coding RNAs) αποτελούν μία νέα ομάδα RNAs που έχουν ένα μόνο κοινό χαρακτηριστικό, το μέγεθός τους που υπερβαίνει τα 200 νουκλεοτίδια [174]. Ένας μεγάλος αριθμός μορίων lncRNAs φέρει μοριακά χαρακτηριστικά των mRNAs όπως είναι το 5' κάλυμμα και η poly(A) ουρά [175] που φαίνεται να ρυθμίζουν τα επίπεδα σταθερότητάς τους [176]. Συνεπώς, ένα σημαντικό ερώτημα που προέκυψε μετά την απομόνωση και τον εντοπισμό του mRNA της RNάσης κ-02 ήταν κατά πόσο κωδικοποιεί τη σύνθεση πρωτεΐνης ή όχι.

Αρκετές μελέτες αναφέρουν περιπτώσεις μεταγράφων που κωδικοποιούνται έπειτα από χρήση εναλλακτικού κωδικονίου έναρξης [177]. Ο cDNA κλώνος της ανθρώπινης RNάσης κ-02 φέρει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 405 νουκλεοτιδικών βάσεων και κωδικοποιεί τη σύνθεση μίας πρωτεΐνης μήκους 134 αμινοξέων έπειτα από χρήση ενός εναλλακτικού κωδικονίου έναρξης. Η αλληλουχία 1-62 της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-01 δεν φέρει καμία ομοιότητα με την πρωτεϊνική ισομορφή της RNάσης κ-01 ενώ το τμήμα 63-134 είναι πανομοιότυπο με το αμινοξικό τμήμα 27-98 της RNάσης κ-01.

Στηριζόμενοι στην αμινοξική αλληλουχία του αμινοτελικού άκρου της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 προχωρήσαμε στην ανάπτυξη και στον καθαρισμό ενός ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της συγκεκριμένης πρωτεϊνικής ισομορφής. Με την χρήση του συγκεκριμένου αντισώματος επαληθεύσαμε τη βιοσύνθεση της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 σε ανθρώπινα κύτταρα. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη που φαίνεται να ακολουθεί κυτταροπλασματική κατανομή, αποτελεί την πρώτη περίπτωση πρωτεΐνης που έχει αναφερθεί να κωδικοποιείται μέχρι σήμερα ως αποτέλεσμα ενός Δ4 φαινομένου εναλλακτικής ωρίμανσης.

Το εύρημα ότι η ανθρώπινη RNάση κ-02 εντοπίζεται μόνο στο αδιάλυτο κλάσμα κυττάρων έπειτα από κατεργασία με το απορρυπαντικό Triton X-114 έρχεται σε συμφωνία με την υδρόφοβη φύση του μορίου. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την κυτταροπλασματική κατανομή του καθιστά πιθανή τη συμμετοχή του συγκεκριμένου μορίου στο σχηματισμό υπερμοριακών συμπλεγμάτων ή τον εντοπισμό του σε μεμβρανώδεις δομές όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο.

Οι πρωτεΐνες με ριβονουκλεολυτική ενεργότητα αφθονούν στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων θηλαστικών. Οι πρωτεΐνες του συμπλέγματος CCR4-NOT καθώς και οι

αποαδενυλάσες PAN2-PAN3 και PARN που καταλύουν την 5'→3' εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση του mRNA εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα [32] ενώ η ενδονουκλεάση SMG6 που καταλύει τη διάσπαση των μορίων mRNA με πρόωρο κωδικόνιο λήξης εντοπίζεται επίσης στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων στα Μετάζωα [14]. Πρόσφατα, η υδρόφοβη πρωτεΐνη Rgr44, συστατικό του εξωσώματος στο κυτταρόπλασμα ζυμομύκητα, βρέθηκε να εμφανίζει ενεργότητα ενδονουκλεάσης πέρα τη δράση 3'→5' που της έχει αποδοθεί. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι νέες ενεργότητες ενδονουκλεάσης αποκαλύπτονται και αποδίδονται ακόμη και σε καλά χαρακτηρισμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα [24,178].

Οι αμινοξικές αλληλουχίες των ανθρώπινων ριβονουκλεασών κ-01 και κ-02 είναι κατά 52% ταυτόσημες ενώ ο βιοχημικός χαρακτηρισμός των δύο ενζύμων έδειξε ότι σε γενικές γραμμές διαθέτουν την ίδια εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η περιοχή του μορίου που είναι υπεύθυνη για τη ριβονουκλεολυτική ενεργότητα εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό τμήμα των δύο μορίων. Όσο αφορά το ρόλο της αμινοτελικής περιοχής που διαφοροποιείται στα δύο ένζυμα, είναι πιθανό να χρησιμεύουν ως επιφάνειες για την ανάπτυξη διαφορετικών αλληλεπιδράσεων με κυτταρικά συστατικά επιτρέποντας την εμπλοκή τους σε διαφοροποιημένες βιολογικές διαδικασίες. Ακόμη, δεν αποκλείεται να διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο, επιτρέποντας τη διαφορική ρύθμιση των πρωτεϊνικών λειτουργιών των δύο μορίων εντός του κυττάρου. Άλλωστε, μια παρόμοια περίπτωση έχει αναφερθεί και στην περίπτωση των ριβονουκλεασών E και G που καταλύουν τη διάσπαση των mRNAs στην *E.coli*. Σε αυτή την περίπτωση, το ήμισυ της αμινοξικής αλληλουχίας των δύο ενζύμων είναι ταυτόσημο. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση της RNάσης E, το καταλυτικά ενεργό είναι το αμινοτελικό τμήμα του ενζύμου (αμινοξέα 1-498) ενώ το καρβοξυτελικό τμήμα λειτουργεί ως "πλατφόρμα" για τη συναρμολόγηση του συμπλέγματος αποικοδόμησης (RNA degradosome), ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου που διασπά μόρια mRNAs [179,180]. Η RNάση G φέρει πανομοιότυπη αμινοτελική αλληλουχία με την RNάση E, και από το μόριο εκλείπει μία περιοχή πλούσια σε αργινίνες καθώς και η περιοχή "πλατφόρμας". Το ένζυμο αυτό έχει τις ίδιες καταλυτικές ιδιότητες με την RNάση E αλλά η λειτουργίες των δύο ενζύμων δεν ταυτίζονται [181].

Τα δεδομένα από πειράματα μικροσυστοιχιών αλλά και από τη μελέτη της έκφρασης της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ σε ανθρώπινους ιστούς δείχνουν ότι οι δύο ενζυμικές ισομορφές εκφράζονται σε ένα πλήθος ιστών, φυσιολογικών και παθολογικών. Τα δύο μόρια καταλύουν πολύ αποδοτικά την αποικοδόμηση συνθετικών RNA υποστρωμάτων ενώ η ετερόλογη έκφρασή τους συνοδεύεται από φαινόμενα

κυτταροτοξικότητας. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη ενδογενών μηχανισμών ρύθμισης της ενεργότητάς τους, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στην περίπτωση της SMG6, μιας ενδοριβονουκλεάσης συντηρημένης επίσης σε όλα τα Μετάζωα η ενεργότητα της οποίας ρυθμίζεται μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες (UPF1, UPF2 και UPF3) [182,183].

Συνολικά, η εργασία που επιτεύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής αναδεικνύει τη δυναμική πλαστικότητα του ανθρώπινου γονιδιώματος, καθώς μία μικρή διαφοροποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε επίπεδο mRNA μπορεί να εκδηλώνεται σαν σημαντική αλλαγή σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Το εύρημα ότι ένα πλαισιοτροποποιητικό φαινόμενο εναλλακτικής ωρίμανσης μπορεί να οδηγήσει στη σύνθεση μιας εναλλακτικής πρωτεϊνικής καθιστά αμφίβολο το κατά πόσο αντίστοιχες ισομορφές διασπώνται ως μη κωδικοποιούσες μέσω του μονοπατιού NMD. Έτσι, κρίνεται χρήσιμη η ανάλυση παρόμοιων φαινομένων που έχουν αναφερθεί στα προϊόντα των ευκαρυωτικών γονιδίων. Η διαφορά στην αμινοξική αλληλουχία του αμινοτελικού άκρου των δύο ισομορφών της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ υποδεικνύει την πιθανή εμπλοκή των ενζύμων σε διαφορετικές κυτταρικές διαδικασίες ή σε μηχανισμούς λεπτής ρύθμισης, ένδειξη που καθιστά τη διαλεύκανση του βιολογικού τους ρόλου ακόμα πιο επιτακτική.

5. Βιβλιογραφία

1. Stoecklin G, Muhlemann O (2013) RNA decay mechanisms: specificity through diversity. *Biochim Biophys Acta* 1829: 487-490.
2. Beintema JJ, Kleeneidam RG (1998) The ribonuclease A superfamily: general discussion. *Cell Mol Life Sci* 54: 825-832.
3. Malik A, Batra JK (2012) Antimicrobial activity of human eosinophil granule proteins: involvement in host defence against pathogens. *Crit Rev Microbiol* 38: 168-181.
4. Sorrentino S (2010) The eight human "canonical" ribonucleases: molecular diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. *FEBS Lett* 584: 2194-2200.
5. Findlay D, Herries DG, Mathias AP, Rabin BR, Ross CA (1961) The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. *Nature* 190: 781-784.
6. Raines RT (1998) Ribonuclease A. *Chem Rev* 98: 1045-1066.
7. Mathy N, Benard L, Pellegrini O, Daou R, Wen T, et al. (2007) 5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. *Cell* 129: 681-692.
8. Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, et al. (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425: 737-741.
9. Houseley J, Tollervey D (2009) The many pathways of RNA degradation. *Cell* 136: 763-776.
10. Cordin O, Banroques J, Tanner NK, Linder P (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367: 17-37.
11. Lou CH, Shao A, Shum EY, Espinoza JL, Huang L, et al. (2014) Posttranscriptional control of the stem cell and neurogenic programs by the nonsense-mediated RNA decay pathway. *Cell Rep* 6: 748-764.
12. Rufener SC, Muhlemann O (2013) eIF4E-bound mRNPs are substrates for nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 20: 710-717.
13. Schoenberg DR, Maquat LE (2012) Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* 13: 246-259.
14. Eberle AB, Lykke-Andersen S, Muhlemann O, Jensen TH (2009) SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. *Nat Struct Mol Biol* 16: 49-55.
15. Deutscher MP (2006) Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res* 34: 659-666.
16. Slomovic S, Laufer D, Geiger D, Schuster G (2006) Polyadenylation of ribosomal RNA in human cells. *Nucleic Acids Res* 34: 2966-2975.
17. Lorentzen E, Conti E (2006) The exosome and the proteasome: nano-compartments for degradation. *Cell* 125: 651-654.
18. Mullen TE, Marzluff WF (2008) Degradation of histone mRNA requires oligouridylation followed by decapping and simultaneous degradation of the mRNA both 5' to 3' and 3' to 5'. *Genes Dev* 22: 50-65.
19. Beggs JD (2005) Lsm proteins and RNA processing. *Biochem Soc Trans* 33: 433-438.
20. Zhou L, Hang J, Zhou Y, Wan R, Lu G, et al. (2014) Crystal structures of the Lsm complex bound to the 3' end sequence of U6 small nuclear RNA. *Nature* 506: 116-120.
21. Sittka A, Lucchini S, Papenfort K, Sharma CM, Rolle K, et al. (2008) Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS Genet* 4: e1000163.
22. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, et al. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315: 1709-1712.
23. Henras AK, Soudet J, Gerus M, Lebaron S, Caizergues-Ferrer M, et al. (2008) The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci* 65: 2334-2359.
24. Schneider C, Leung E, Brown J, Tollervey D (2009) The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *Nucleic Acids Res* 37: 1127-1140.
25. Mroczek S, Kufel J (2008) Apoptotic signals induce specific degradation of ribosomal RNA in yeast. *Nucleic Acids Res* 36: 2874-2888.
26. LaRiviere FJ, Cole SE, Ferullo DJ, Moore MJ (2006) A late-acting quality control process for mature eukaryotic rRNAs. *Mol Cell* 24: 619-626.

27. Staley JP, Guthrie C (1998) Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92: 315-326.
28. Isken O, Maquat LE (2007) Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev* 21: 1833-1856.
29. Muhlemann O, Jensen TH (2012) mRNP quality control goes regulatory. *Trends Genet* 28: 70-77.
30. Rougemaille M, Villa T, Gudipati RK, Libri D (2008) mRNA journey to the cytoplasm: attire required. *Biol Cell* 100: 327-342.
31. Haimovich G, Choder M, Singer RH, Trcek T (2013) The fate of the messenger is pre-determined: a new model for regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1829: 643-653.
32. Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ (2007) The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 113-126.
33. Reznik B, Lykke-Andersen J (2010) Regulated and quality-control mRNA turnover pathways in eukaryotes. *Biochem Soc Trans* 38: 1506-1510.
34. Isken O, Maquat LE (2008) The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation. *Nat Rev Genet* 9: 699-712.
35. Nicholson P, Yepiskoposyan H, Metz S, Zamudio Orozco R, Kleinschmidt N, et al. (2010) Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cell Mol Life Sci* 67: 677-700.
36. Hwang J, Maquat LE (2011) Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) in animal embryogenesis: to die or not to die, that is the question. *Curr Opin Genet Dev* 21: 422-430.
37. Hwang J, Sato H, Tang Y, Matsuda D, Maquat LE (2010) UPF1 association with the cap-binding protein, CBP80, promotes nonsense-mediated mRNA decay at two distinct steps. *Mol Cell* 39: 396-409.
38. Maquat LE (2005) Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *J Cell Sci* 118: 1773-1776.
39. Zund D, Gruber AR, Zavolan M, Muhlemann O (2013) Translation-dependent displacement of UPF1 from coding sequences causes its enrichment in 3' UTRs. *Nat Struct Mol Biol* 20: 936-943.
40. Schweingruber C, Rufener SC, Zund D, Yamashita A, Muhlemann O (2013) Nonsense-mediated mRNA decay - mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1829: 612-623.
41. Melero R, Buchwald G, Castano R, Raabe M, Gil D, et al. (2012) The cryo-EM structure of the UPF-EJC complex shows UPF1 poised toward the RNA 3' end. *Nat Struct Mol Biol* 19: 498-505, S491-492.
42. Grolach M, Burd CG, Dreyfuss G (1994) The mRNA poly(A)-binding protein: localization, abundance, and RNA-binding specificity. *Exp Cell Res* 211: 400-407.
43. Wollerton MC, Gooding C, Wagner EJ, Garcia-Blanco MA, Smith CW (2004) Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay. *Mol Cell* 13: 91-100.
44. Eystathiou T, Chan EK, Tenenbaum SA, Keene JD, Griffith K, et al. (2002) A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell* 13: 1338-1351.
45. Moser JJ, Fritzler MJ (2010) Cytoplasmic ribonucleoprotein (RNP) bodies and their relationship to GW/P bodies. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 828-843.
46. Stalder L, Muhlemann O (2009) Processing bodies are not required for mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *RNA* 15: 1265-1273.
47. Li WM, Barnes T, Lee CH (2010) Endoribonucleases--enzymes gaining spotlight in mRNA metabolism. *FEBS J* 277: 627-641.
48. Chernokalskaya E, Dubell AN, Cunningham KS, Hanson MN, Dompenciel RE, et al. (1998) A polysomal ribonuclease involved in the destabilization of albumin mRNA is a novel member of the peroxidase gene family. *RNA* 4: 1537-1548.
49. Cunningham KS, Hanson MN, Schoenberg DR (2001) Polysomal ribonuclease 1 exists in a latent form on polysomes prior to estrogen activation of mRNA decay. *Nucleic Acids Res* 29: 1156-1162.
50. Yang F, Schoenberg DR (2004) Endonuclease-mediated mRNA decay involves the selective targeting of PMR1 to polyribosome-bound substrate mRNA. *Mol Cell* 14: 435-445.

51. Yang F, Peng Y, Murray EL, Otsuka Y, Kedersha N, et al. (2006) Polysome-bound endonuclease PMR1 is targeted to stress granules via stress-specific binding to TIA-1. *Mol Cell Biol* 26: 8803-8813.
52. Peng Y, Liu X, Schoenberg DR (2008) The 90-kDa heat shock protein stabilizes the polysomal ribonuclease 1 mRNA endonuclease to degradation by the 26S proteasome. *Mol Biol Cell* 19: 546-552.
53. Bremer KA, Stevens A, Schoenberg DR (2003) An endonuclease activity similar to *Xenopus* PMR1 catalyzes the degradation of normal and nonsense-containing human beta-globin mRNA in erythroid cells. *RNA* 9: 1157-1167.
54. Stevens A, Wang Y, Bremer K, Zhang J, Hoepfner R, et al. (2002) Beta -Globin mRNA decay in erythroid cells: UG site-preferred endonucleolytic cleavage that is augmented by a premature termination codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12741-12746.
55. Ron D, Hubbard SR (2008) How IRE1 reacts to ER stress. *Cell* 132: 24-26.
56. Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, et al. (2002) The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 411-421.
57. Calton M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, et al. (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415: 92-96.
58. Hollien J, Weissman JS (2006) Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* 313: 104-107.
59. Zhang K, Wong HN, Song B, Miller CN, Scheuner D, et al. (2005) The unfolded protein response sensor IRE1alpha is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. *J Clin Invest* 115: 268-281.
60. Zhou J, Liu CY, Back SH, Clark RL, Peisach D, et al. (2006) The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14343-14348.
61. Lee KP, Dey M, Neculai D, Cao C, Dever TE, et al. (2008) Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing. *Cell* 132: 89-100.
62. Gonzalez TN, Sidrauski C, Dorfler S, Walter P (1999) Mechanism of non-spliceosomal mRNA splicing in the unfolded protein response pathway. *EMBO J* 18: 3119-3132.
63. Yoshida H, Oku M, Suzuki M, Mori K (2006) pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J Cell Biol* 172: 565-575.
64. Khabar KS, Siddiqui YM, al-Zoghaibi F, al-Haj L, Dhalla M, et al. (2003) RNase L mediates transient control of the interferon response through modulation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *J Biol Chem* 278: 20124-20132.
65. Scherbik SV, Paranjape JM, Stockman BM, Silverman RH, Brinton MA (2006) RNase L plays a role in the antiviral response to West Nile virus. *J Virol* 80: 2987-2999.
66. Bisbal C, Silverman RH (2007) Diverse functions of RNase L and implications in pathology. *Biochimie* 89: 789-798.
67. Han JQ, Wroblewski G, Xu Z, Silverman RH, Barton DJ (2004) Sensitivity of hepatitis C virus RNA to the antiviral enzyme ribonuclease L is determined by a subset of efficient cleavage sites. *J Interferon Cytokine Res* 24: 664-676.
68. Bisbal C, Silhol M, Laubenthal H, Kaluza T, Carnac G, et al. (2000) The 2'-5' oligoadenylate/RNase L/RNase L inhibitor pathway regulates both MyoD mRNA stability and muscle cell differentiation. *Mol Cell Biol* 20: 4959-4969.
69. Liu W, Liang SL, Liu H, Silverman R, Zhou A (2007) Tumour suppressor function of RNase L in a mouse model. *Eur J Cancer* 43: 202-209.
70. Silverman RH (2003) Implications for RNase L in prostate cancer biology. *Biochemistry* 42: 1805-1812.
71. Tanaka N, Nakanishi M, Kusakabe Y, Goto Y, Kitade Y, et al. (2005) Molecular basis for recognition of 2',5'-linked oligoadenylates by the N-terminal ankyrin repeat domain of human ribonuclease L. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*: 323-324.
72. Tanaka N, Nakanishi M, Kusakabe Y, Goto Y, Kitade Y, et al. (2004) Structural basis for recognition of 2',5'-linked oligoadenylates by human ribonuclease L. *EMBO J* 23: 3929-3938.

73. Nakanishi M, Tanaka N, Mizutani Y, Mochizuki M, Ueno Y, et al. (2005) Functional characterization of 2',5'-linked oligoadenylate binding determinant of human RNase L. *J Biol Chem* 280: 41694-41699.
74. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, et al. (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305: 1437-1441.
75. Jinek M, Doudna JA (2009) A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 457: 405-412.
76. Maiti M, Nauwelaerts K, Lescrinier E, Herdewijn P (2011) Structural and binding study of modified siRNAs with the Argonaute 2 PAZ domain by NMR spectroscopy. *Chemistry* 17: 1519-1528.
77. Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M (2003) Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* 426: 465-469.
78. Tolia NH, Joshua-Tor L (2007) Slicer and the argonautes. *Nat Chem Biol* 3: 36-43.
79. Nakanishi K, Weinberg DE, Bartel DP, Patel DJ (2012) Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature* 486: 368-374.
80. Canete-Soler R, Reddy KS, Tolan DR, Zhai J (2005) Aldolases a and C are ribonucleolytic components of a neuronal complex that regulates the stability of the light-neurofilament mRNA. *J Neurosci* 25: 4353-4364.
81. Paez-Valencia J, Valencia-Mayoral P, Sanchez-Gomez C, Contreras-Ramos A, Hernandez-Lucas I, et al. (2008) Identification of Fructose-1,6-bisphosphate aldolase cytosolic class I as an NMH7 MADS domain associated protein. *Biochem Biophys Res Commun* 376: 700-705.
82. Wang M, Cohen SN (1994) ard-1: a human gene that reverses the effects of temperature-sensitive and deletion mutations in the *Escherichia coli* rne gene and encodes an activity producing RNase E-like cleavages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10591-10595.
83. Claverie-Martin F, Wang M, Cohen SN (1997) ARD-1 cDNA from human cells encodes a site-specific single-strand endoribonuclease that functionally resembles *Escherichia coli* RNase E. *J Biol Chem* 272: 13823-13828.
84. Gupta S, Ciungu A, Jameson N, Lal SK (2006) Alternative splicing expression of U1 snRNP 70K gene is evolutionary conserved between different plant species. *DNA Seq* 17: 254-261.
85. Irvine K, Stirling R, Hume D, Kennedy D (2004) Rasputin, more promiscuous than ever: a review of G3BP. *Int J Dev Biol* 48: 1065-1077.
86. Zekri L, Chebli K, Tourriere H, Nielsen FC, Hansen TV, et al. (2005) Control of fetal growth and neonatal survival by the RasGAP-associated endoribonuclease G3BP. *Mol Cell Biol* 25: 8703-8716.
87. Tourriere H, Gallouzi IE, Chebli K, Capony JP, Mouaikel J, et al. (2001) RasGAP-associated endoribonuclease G3Bp: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization. *Mol Cell Biol* 21: 7747-7760.
88. Holloway DE, Shapiro R, Hares MC, Leonidas DD, Acharya KR (2002) Guest-host crosstalk in an angiogenin-RNase A chimeric protein. *Biochemistry* 41: 10482-10489.
89. Shapiro R, Strydom DJ, Olson KA, Vallee BL (1987) Isolation of angiogenin from normal human plasma. *Biochemistry* 26: 5141-5146.
90. Fu H, Feng J, Liu Q, Sun F, Tie Y, et al. (2009) Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. *FEBS Lett* 583: 437-442.
91. Acharya KR, Shapiro R, Allen SC, Riordan JF, Vallee BL (1994) Crystal structure of human angiogenin reveals the structural basis for its functional divergence from ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2915-2919.
92. Lorentzen E, Basquin J, Tomecki R, Dziembowski A, Conti E (2008) Structure of the active subunit of the yeast exosome core, Rrp44: diverse modes of substrate recruitment in the RNase II nuclease family. *Mol Cell* 29: 717-728.
93. Anderson JS, Parker RP (1998) The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J* 17: 1497-1506.
94. Schaeffer D, Tsanova B, Barbas A, Reis FP, Dastidar EG, et al. (2009) The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat Struct Mol Biol* 16: 56-62.

95. Grundmann U, Romisch J, Siebold B, Bohn H, Amann E (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding human placental protein 11, a putative serine protease with diagnostic significance as a tumor marker. *DNA Cell Biol* 9: 243-250.
96. Laneve P, Gioia U, Ragno R, Altieri F, Di Franco C, et al. (2008) The tumor marker human placental protein 11 is an endoribonuclease. *J Biol Chem* 283: 34712-34719.
97. Izumi T, Mitra S (1998) Deletion analysis of human AP-endonuclease: minimum sequence required for the endonuclease activity. *Carcinogenesis* 19: 525-527.
98. Kuninger DT, Izumi T, Papaconstantinou J, Mitra S (2002) Human AP-endonuclease 1 and hnRNP-L interact with a nCaRE-like repressor element in the AP-endonuclease 1 promoter. *Nucleic Acids Res* 30: 823-829.
99. Jackson EB, Theriot CA, Chattopadhyay R, Mitra S, Izumi T (2005) Analysis of nuclear transport signals in the human apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1/Ref1). *Nucleic Acids Res* 33: 3303-3312.
100. Qu J, Liu GH, Huang B, Chen C (2007) Nitric oxide controls nuclear export of APE1/Ref-1 through S-nitrosation of cysteines 93 and 310. *Nucleic Acids Res* 35: 2522-2532.
101. Tell G, Damante G, Caldwell D, Kelley MR (2005) The intracellular localization of APE1/Ref-1: more than a passive phenomenon? *Antioxid Redox Signal* 7: 367-384.
102. Vascotto C, Fantini D, Romanello M, Cesaratto L, Deganuto M, et al. (2009) APE1/Ref-1 interacts with NPM1 within nucleoli and plays a role in the rRNA quality control process. *Mol Cell Biol* 29: 1834-1854.
103. Sideris DC, Fragoulis EG (1987) Purification and characterization of a ribonuclease specific for poly(U) and poly(C) from the larvae of *Ceratitis capitata*. *Eur J Biochem* 164: 309-315.
104. Rampias TN, Sideris DC, Fragoulis EG (2003) Cc RNase: the *Ceratitis capitata* ortholog of a novel highly conserved protein family in metazoans. *Nucleic Acids Res* 31: 3092-3100.
105. Rampias TN, Fragoulis EG, Sideris DC (2008) Genomic structure and expression analysis of the RNase kappa family ortholog gene in the insect *Ceratitis capitata*. *FEBS J* 275: 6217-6227.
106. Economopoulou MA, Fragoulis EG, Sideris DC (2007) Molecular cloning and characterization of the human RNase kappa, an ortholog of Cc RNase. *Nucleic Acids Res* 35: 6389-6398.
107. Kim YS, Hwan JD, Bae S, Bae DH, Shick WA (2010) Identification of differentially expressed genes using an annealing control primer system in stage III serous ovarian carcinoma. *BMC Cancer* 10: 576.
108. Gkratsou AS, Fragoulis EG, Sideris DC (2013) Effect of Cytostatic Drugs on the mRNA Expression Levels of Ribonuclease k in Breast and Ovarian Cancer Cells. *Anticancer Agents Med Chem*.
109. Kiritsi MN, Fragoulis EG, Sideris DC (2012) Essential cysteine residues for human RNase kappa catalytic activity. *FEBS J* 279: 1318-1326.
110. McCormick M, Chen K, Ramaswamy P, Kenyon C (2012) New genes that extend *Caenorhabditis elegans*' lifespan in response to reproductive signals. *Aging Cell* 11: 192-202.
111. Matlin AJ, Clark F, Smith CW (2005) Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 386-398.
112. Hoskins AA, Moore MJ (2012) The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine. *Trends Biochem Sci* 37: 179-188.
113. Schmucker D, Flanagan JG (2004) Generation of recognition diversity in the nervous system. *Neuron* 44: 219-222.
114. Farkas MH, Grant GR, White JA, Sousa ME, Consugar MB, et al. (2013) Transcriptome analyses of the human retina identify unprecedented transcript diversity and 3.5 Mb of novel transcribed sequence via significant alternative splicing and novel genes. *BMC Genomics* 14: 486.
115. Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, et al. (2008) Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456: 470-476.
116. Kim H, Klein R, Majewski J, Ott J (2004) Estimating rates of alternative splicing in mammals and invertebrates. *Nat Genet* 36: 915-916; author reply 916-917.
117. Graveley BR (2001) Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet* 17: 100-107.
118. Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, et al. (2005) Function of alternative splicing. *Gene* 344: 1-20.

119. Ule J, Ule A, Spencer J, Williams A, Hu JS, et al. (2005) Nova regulates brain-specific splicing to shape the synapse. *Nat Genet* 37: 844-852.
120. Black DL (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72: 291-336.
121. Ni JZ, Grate L, Donohue JP, Preston C, Nobida N, et al. (2007) Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay. *Genes Dev* 21: 708-718.
122. Kim E, Magen A, Ast G (2007) Different levels of alternative splicing among eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 35: 125-131.
123. Holste D, Huo G, Tung V, Burge CB (2006) HOLLYWOOD: a comparative relational database of alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 34: D56-62.
124. Wojtowicz WM, Flanagan JJ, Millard SS, Zipursky SL, Clemens JC (2004) Alternative splicing of *Drosophila* Dscam generates axon guidance receptors that exhibit isoform-specific homophilic binding. *Cell* 118: 619-633.
125. Dou Y, Fox-Walsh KL, Baldi PF, Hertel KJ (2006) Genomic splice-site analysis reveals frequent alternative splicing close to the dominant splice site. *RNA* 12: 2047-2056.
126. Sugnet CW, Kent WJ, Ares M, Jr., Haussler D (2004) Transcriptome and genome conservation of alternative splicing events in humans and mice. *Pac Symp Biocomput*: 66-77.
127. Chern TM, van Nimwegen E, Kai C, Kawai J, Carninci P, et al. (2006) A simple physical model predicts small exon length variations. *PLoS Genet* 2: e45.
128. Hiller M, Huse K, Szafranski K, Jahn N, Hampe J, et al. (2004) Widespread occurrence of alternative splicing at NAGNAG acceptors contributes to proteome plasticity. *Nat Genet* 36: 1255-1257.
129. Hiller M, Nikolajewa S, Huse K, Szafranski K, Rosenstiel P, et al. (2007) TassDB: a database of alternative tandem splice sites. *Nucleic Acids Res* 35: D188-192.
130. Campbell MA, Haas BJ, Hamilton JP, Mount SM, Buell CR (2006) Comprehensive analysis of alternative splicing in rice and comparative analyses with *Arabidopsis*. *BMC Genomics* 7: 327.
131. Ermakova EO, Nurtdinov RN, Gelfand MS (2007) Overlapping alternative donor splice sites in the human genome. *J Bioinform Comput Biol* 5: 991-1004.
132. Zavolan M, Kondo S, Schonbach C, Adachi J, Hume DA, et al. (2003) Impact of alternative initiation, splicing, and termination on the diversity of the mRNA transcripts encoded by the mouse transcriptome. *Genome Res* 13: 1290-1300.
133. Tadokoro K, Yamazaki-Inoue M, Tachibana M, Fujishiro M, Nagao K, et al. (2005) Frequent occurrence of protein isoforms with or without a single amino acid residue by subtle alternative splicing: the case of Gln in DRPLA affects subcellular localization of the products. *J Hum Genet* 50: 382-394.
134. Hiller M, Huse K, Szafranski K, Rosenstiel P, Schreiber S, et al. (2006) Phylogenetically widespread alternative splicing at unusual GYNGYN donors. *Genome Biol* 7: R65.
135. Hollins C, Zorio DA, MacMorris M, Blumenthal T (2005) U2AF binding selects for the high conservation of the *C. elegans* 3' splice site. *RNA* 11: 248-253.
136. Wilson LO, Spriggs A, Taylor JM, Fahrner AM (2014) A novel splicing outcome reveals more than 2000 new mammalian protein isoforms. *Bioinformatics* 30: 151-156.
137. Unoki M, Shen JC, Zheng ZM, Harris CC (2006) Novel splice variants of ING4 and their possible roles in the regulation of cell growth and motility. *J Biol Chem* 281: 34677-34686.
138. Hammes A, Guo JK, Lutsch G, Leheste JR, Landrock D, et al. (2001) Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* 106: 319-329.
139. Tsai KW, Tarn WY, Lin WC (2007) Wobble splicing reveals the role of the branch point sequence-to-NAGNAG region in 3' tandem splice site selection. *Mol Cell Biol* 27: 5835-5848.
140. Tsai KW, Lin WC (2006) Quantitative analysis of wobble splicing indicates that it is not tissue specific. *Genomics* 88: 855-864.
141. Lai CH, Hu LY, Lin WC (2006) Single amino-acid InDel variants generated by alternative tandem splice-donor and -acceptor selection. *Biochem Biophys Res Commun* 342: 197-205.

142. Hiller M, Huse K, Szafranski K, Jahn N, Hampe J, et al. (2006) Single-nucleotide polymorphisms in NAGNAG acceptors are highly predictive for variations of alternative splicing. *Am J Hum Genet* 78: 291-302.
143. Smith CW, Chu TT, Nadal-Ginard B (1993) Scanning and competition between AGs are involved in 3' splice site selection in mammalian introns. *Mol Cell Biol* 13: 4939-4952.
144. Yan M, Wang LC, Hymowitz SG, Schilbach S, Lee J, et al. (2000) Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors. *Science* 290: 523-527.
145. Xu Q, Belcastro MP, Villa ST, Dinkins RD, Clarke SG, et al. (2004) A second protein L-isoaspartyl methyltransferase gene in Arabidopsis produces two transcripts whose products are sequestered in the nucleus. *Plant Physiol* 136: 2652-2664.
146. Wang Z, Xiao X, Van Nostrand E, Burge CB (2006) General and specific functions of exonic splicing silencers in splicing control. *Mol Cell* 23: 61-70.
147. Lev-Maor G, Sorek R, Shomron N, Ast G (2003) The birth of an alternatively spliced exon: 3' splice-site selection in Alu exons. *Science* 300: 1288-1291.
148. Koren E, Lev-Maor G, Ast G (2007) The emergence of alternative 3' and 5' splice site exons from constitutive exons. *PLoS Comput Biol* 3: e95.
149. Wagner KD, Wagner N, Schedl A (2003) The complex life of WT1. *J Cell Sci* 116: 1653-1658.
150. Takeda H, Matsuzaki T, Oki T, Miyagawa T, Amanuma H (1994) A novel POU domain gene, zebrafish pou2: expression and roles of two alternatively spliced twin products in early development. *Genes Dev* 8: 45-59.
151. Joyce-Brady M, Jean JC, Hughey RP (2001) gamma -glutamyltransferase and its isoform mediate an endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem* 276: 9468-9477.
152. Maugeri A, van Driel MA, van de Pol DJ, Klevering BJ, van Haren FJ, et al. (1999) The 2588G-->C mutation in the ABCR gene is a mild frequent founder mutation in the Western European population and allows the classification of ABCR mutations in patients with Stargardt disease. *Am J Hum Genet* 64: 1024-1035.
153. Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, et al. (2007) The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol* 14: 185-193.
154. Modrek B, Lee CJ (2003) Alternative splicing in the human, mouse and rat genomes is associated with an increased frequency of exon creation and/or loss. *Nat Genet* 34: 177-180.
155. Roca X, Sachidanandam R, Krainer AR (2003) Intrinsic differences between authentic and cryptic 5' splice sites. *Nucleic Acids Res* 31: 6321-6333.
156. Schagger H (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 1: 16-22.
157. Ribaud R, Gilman M, Kingston RE, Choczynski P, Sacchi N (2001) Preparation of RNA from tissues and cells. *Curr Protoc Immunol Chapter 10: Unit 10 11*.
158. Bordier C (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem* 256: 1604-1607.
159. Rampias TN, Fragoulis EG, Sideris DC (2012) Efficient cloning of alternatively polyadenylated transcripts via hybridization capture PCR. *Curr Issues Mol Biol* 14: 1-8.
160. Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga J, Madden K, et al. (2009) Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods Enzymol* 463: 169-189.
161. Martinez-Ruiz A, Martinez del Pozo A, Lacadena J, Mancheno JM, Onaderra M, et al. (1998) Secretion of recombinant pro- and mature fungal alpha-sarcin ribotoxin by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: the Lys-Arg motif is required for maturation. *Protein Expr Purif* 12: 315-322.
162. Kim BM, Kim H, Raines RT, Lee Y (2004) Glycosylation of onconase increases its conformational stability and toxicity for cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 315: 976-983.
163. Salamov AA, Nishikawa T, Swindells MB (1998) Assessing protein coding region integrity in cDNA sequencing projects. *Bioinformatics* 14: 384-390.
164. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS (2009) Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet* 10: 155-159.
165. Sideris DC, Rampias TN, Fragoulis EG (2000) Isolation and sequencing of a cDNA encoding for a ribonuclease from the insect *Ceratitis capitata*. *Insect Biochem Mol Biol* 30: 153-161.

166. Schindler S, Szafranski K, Hiller M, Ali GS, Palusa SG, et al. (2008) Alternative splicing at NAGNAG acceptors in *Arabidopsis thaliana* SR and SR-related protein-coding genes. *BMC Genomics* 9: 159.
167. Iida K, Shionyu M, Suso Y (2008) Alternative splicing at NAGNAG acceptor sites shares common properties in land plants and mammals. *Mol Biol Evol* 25: 709-718.
168. Hiller M, Platzer M (2008) Widespread and subtle: alternative splicing at short-distance tandem sites. *Trends Genet* 24: 246-255.
169. Hiller M, Szafranski K, Sinha R, Huse K, Nikolajewa S, et al. (2008) Assessing the fraction of short-distance tandem splice sites under purifying selection. *RNA* 14: 616-629.
170. Bradley RK, Merkin J, Lambert NJ, Burge CB (2012) Alternative splicing of RNA triplets is often regulated and accelerates proteome evolution. *PLoS Biol* 10: e1001229.
171. Irie M, Ohgi K (2001) Ribonuclease T2. *Methods Enzymol* 341: 42-55.
172. Mitra S, Bechhofer DH (1994) Substrate specificity of an RNase III-like activity from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 269: 31450-31456.
173. Krinke L, Wulff DL (1990) The cleavage specificity of RNase III. *Nucleic Acids Res* 18: 4809-4815.
174. Kung JT, Colognori D, Lee JT (2013) Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics* 193: 651-669.
175. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, et al. (2005) The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309: 1559-1563.
176. Beaulieu YB, Kleinman CL, Landry-Voyer AM, Majewski J, Bachand F (2012) Polyadenylation-dependent control of long noncoding RNA expression by the poly(A)-binding protein nuclear 1. *PLoS Genet* 8: e1003078.
177. Kochetov AV (2008) Alternative translation start sites and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs. *Bioessays* 30: 683-691.
178. Drazkowska K, Tomecki R, Stodus K, Kowalska K, Czarnocki-Cieciura M, et al. (2013) The RNA exosome complex central channel controls both exonuclease and endonuclease Dis3 activities in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Res* 41: 3845-3858.
179. McDowall KJ, Cohen SN (1996) The N-terminal domain of the rne gene product has RNase E activity and is non-overlapping with the arginine-rich RNA-binding site. *J Mol Biol* 255: 349-355.
180. Vanzo NF, Li YS, Py B, Blum E, Higgins CF, et al. (1998) Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes Dev* 12: 2770-2781.
181. Ow MC, Perwez T, Kushner SR (2003) RNase G of *Escherichia coli* exhibits only limited functional overlap with its essential homologue, RNase E. *Mol Microbiol* 49: 607-622.
182. Mascarenhas R, Dougherty JA, Schoenberg DR (2013) SMG6 cleavage generates metastable decay intermediates from nonsense-containing beta-globin mRNA. *PLoS One* 8: e74791.
183. Kashima I, Jonas S, Jayachandran U, Buchwald G, Conti E, et al. (2010) SMG6 interacts with the exon junction complex via two conserved EJC-binding motifs (EBMs) required for nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 24: 2440-2450.

Μονογραφίες

- 1^Μ. Δελίτσικου Βασιλική, Ερευνητική εργασία μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης Κλινικής Βιοχημείας και Μοριακής Διαγνωστικής: Μελέτη των επιπτώσεων καταστολής της έκφρασης της ανθρώπινης RNase κ σε κυτταρικές σειρές μέσω RNAi, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2012.
- 2^Μ. Κυρίτση Μαριάννα, Διδακτορική διατριβή: Λεπτομερής ενζυμικός χαρακτηρισμός μιας νέας ανθρώπινης ριβονουκλεάσης, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2013.

6. Περίληψη

Μετά τον κεντρικό βιολογικό ρόλο που έχει αποδωθεί στα μόρια RNA ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, ο ενδοκυττάριος μεταβολισμός τους αποτελεί περισσότερο από ποτέ αντικείμενο συστηματικής έρευνας. Έτσι, η ιστο-και χρονο-ειδική αποικοδόμηση των μορίων RNA θεωρείται ότι εμπλέκεται σε ένα μεγάλο πλήθος βιολογικών μηχανισμών που μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ασύνδετοι με τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Οι ριβονουκλεάσες, που αποτελούν τους βιολογικούς καταλύτες για τον καταβολισμό του RNA εμπλέκονται επίσης και σε ένα μεγάλο αριθμό βιολογικών διεργασιών ως παράγοντες ωρίμανσης και "ποιοτικού ελέγχου", ως αμυντικοί μηχανισμοί έναντι ιικών μορίων RNA αλλά και ως παράγοντες ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Παρά τη μεγάλη ετερογένειά τους χαρακτηρίζονται στο σύνολό τους σχεδόν από υψηλή αποδοτικότητα, πλειοτροπική δράση – όπου το ίδιο μόριο RNA μπορεί να αποτελεί στόχο για περισσότερες από μία ριβονουκλεάσες – και τη δυνατότητα πολλαπλών λειτουργιών – όπου μία ριβονουκλεάση μπορεί να διασπά έναν μεγάλο αριθμό RNA-στόχων.

Στο σύνολό τους, οι ριβονουκλεάσες δρουν στα πλαίσια ενός πολύπλοκου δικτύου αποικοδόμησης RNA μορίων που κατευθύνεται από μηχανισμούς λεπτομερούς ρύθμισης. Κατά τη δράση τους αλληλεπιδρούν με ένα σύνολο κυτταρικών παραγόντων που περιλαμβάνουν πρωτεΐνες (RNA πολυμεράσες, ελικάσες, πρωτεΐνες συνοδούς και αναστολείς), ρυθμιστικά RNA μόρια (όπως τα miRNAs) και άλλα μικρά μόρια που εξασφαλίζουν έναν δυναμικό μηχανισμό ρύθμισης των ενδογενών επιπέδων RNA που βρίσκεται σε συνεχή συντονισμό με το κυτταρικό περιβάλλον προκειμένου να ικανοποιούνται οι ιστοειδικές, αναπτυξιακές και μεταβολικές απαιτήσεις που εξασφαλίζουν την κυτταρική αύξηση, διαφοροποίηση και λειτουργία.

Η πρωτεϊνική οικογένεια της ριβονουκλεάσης κ αποτελεί αντικείμενο συστηματικής έρευνας του εργαστηρίου μας. Πρόκειται για μια ορθόλογη πρωτεϊνική οικογένεια με αντιπροσώπους σε όλα τα Μετάζωα από το φύλο των Κνιδοζώων μέχρι τον άνθρωπο. Οι πρωτεϊνικοί αντιπρόσωποι της παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συντηρητικότητας, γεγονός που υποδηλώνει υψηλή εξελικτική πίεση που οδήγησε στη διατήρηση των αντίστοιχων μορίων. Η ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια σε επίπεδο mRNA. Το γονίδιο της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 και ακολουθεί το αυστηρό πρότυπο γονιδιακής οργάνωσης της οικογένειας που χαρακτηρίζεται από τρία εξόνια και δύο

εσώνια. Κωδικοποιεί τη σύνθεση μιας πρωτεΐνης 98 αμινοξικών καταλοίπων και μοριακού βάρους 10,98 kDa. Δεν αναστέλλεται από τον αναστολέα RI της υπεροικογένειας A ριβονουκλεασών ενώ διασπά κυρίως ApG και ApU φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Τέλος, απαραίτητη προϋπόθεση για την καταλυτική ενεργότητα του μορίου είναι ο σχηματισμός ενός δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης 6 και 69.

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της έκφρασης της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ και πιθανών ισομορφών της σε διάφορους ιστούς. Στα πλαίσια της έρευνας αυτής απομονώθηκε και μελετήθηκε μια νέα εναλλακτική ισομορφή, η ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ-02.

Σύμφωνα με EST δεδομένα, η ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ εκφράζεται σε ένα πλήθος ιστών, σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια. Προκειμένου να επαληθεύσουμε πειραματικά την έκφραση αυτή σε επίπεδο RNA, προχωρήσαμε στην καλλιέργεια 6 κυτταρικών σειρών που αντιστοιχούν σε ιστούς διαφορετικής προέλευσης, από όλες τις κυτταρικές σειρές απομονώθηκε RNA υψηλής ποιότητας και ακολούθησε ανάλυση κατά Northern. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν την παρουσία ενός κύριου μεταγράφου μήκους 800 περίπου βάσεων σε όλες τις κυτταρικές σειρές γεγονός που επαληθεύει και πειραματικά την ευρεία έκφραση του mRNA της ανθρώπινης RNάσης κ σε ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών τύπων.

Η έρευνα σε βάσεις EST δεδομένων οδήγησε επίσης στην αποκάλυψη ενός υποσυνόλου EST αλληλουχιών που παρουσιάζει μία μικρή διαφορά σε σχέση με την κλωνοποιημένη ισομορφή της ανθρώπινης RNάσης κ. Έπειτα από στοίχιση των αλληλουχιών αυτών, που εντοπίστηκαν σε έναν μεγάλο αριθμό κυτταρικών τύπων, με το γονίδιο της RNάσης κ βρέθηκε ότι υπολείπονται σε μία αλληλουχία 4 συνεχόμενων νουκλεοτιδικών βάσεων, γεγονός που προκύπτει από εναλλακτική συρραφή μικρής έκτασης (subtle alternative splicing). Για την απομόνωση και κλωνοποίηση της ισομορφής αυτής εφαρμόστηκε με τροποποιήσεις η μέθοδος επιλογής μέσω υβριδισμού, η οποία είχε εφαρμοστεί στο παρελθόν με επιτυχία για την απομόνωση του εναλλακτικού μεταγράφου της RNάσης κ του εντόμου *Ceratitis capitata*. Ο κλώνος cDNA που απομονώθηκε έχει μήκος 540 ζευγών βάσεων και περιέχει ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί τη σύνθεση μιας πρωτεΐνης μήκους 134 αμινοξικών καταλοίπων με υπολογιζόμενο μοριακό βάρος 14.900 Da. Η πρωτεΐνη αυτή κωδικοποιείται με χρήση ενός αναρροϊκού κωδικονίου έναρξης σε σχέση με την κλωνοποιημένη κ-01 ισομορφή το οποίο εμφανίζει μεγάλη πιθανότητα σύνθεσης εναρκτήριας μεθειονίνης (68%). Η αμινοξική στοίχιση των

πρωτεϊνικών αλληλουχιών των δύο ισομορφών της RNάσης κ δεν αποκάλυψε καμία ομοιότητα στο αμινοτελικό τμήμα. Αντίθετα, το τμήμα της αμινοξικής αλληλουχίας 63-134 της RNάσης κ-02 είναι πανομοιότυπο με την αμινοξική αλληλουχία 27-98 της RNάσης κ-01.

Σε ένα πρώτο στάδιο προχωρήσαμε στη διαλεύκανση των βιοχημικών ιδιοτήτων της εναλλακτικής πρωτεϊνικής ισομορφής. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε στην ετερόλογη έκφραση της ανασυνδυασμένης RNάσης κ-02 στο σύστημα του ζυμομύκητα *Pichia pastoris* και στον μερικό χρωματογραφικό της καθαρισμό. Το ανασυνδυασμένο ένζυμο που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ενεργότητας και της υποστρωματικής εξειδίκευσης της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 έναντι ενός συνόλου συνθετικών RNA και RNA-DNA ραδιενεργά σημασμένων υποστρωμάτων. Τα αποτελέσματα ανάλυσης των προϊόντων ενζυμικής δράσης του ενζύμου έναντι ενός μονόκλωνου τριανταμερούς RNA υποστρώματος που περιλαμβάνει όλους τους πιθανούς συνδυασμούς φωσφοδιεστερικών δεσμών έδειξαν ότι η ανασυνδυασμένη RNάση κ-02 καταλύει τη διάσπαση κυρίως ApG και ApU φωσφοδιεστερικών δεσμών.

Για την περαιτέρω μελέτη εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα ακολούθησε η χρήση μιας σειράς οκτανουκλεοτιδίων του τύπου 5'-dNdNdNrAdGdNdNdN-3' και 5'-dTdTdTrAdNdTdTdT-3', όπου περιέχουν μία μόνο θέση υδρόλυσης από την ανθρώπινη RNάση κ-02. Η ανάλυση των προϊόντων δράσης του ενζύμου έναντι των υποστρωμάτων έδειξε ότι η ενεργότητα της RNάσης κ-02 επηρεάζεται από την αλληλουχία βάσεων εκατέρωθεν του φωσφοδιεστερικού δεσμού που υδρολύεται. Το ανθρώπινο ένζυμο δρα αποδοτικότερα έναντι του υποστρώματος που φέρει κατάλοιπα θυμίνης εκατέρωθεν του ApG δεσμού. Επίσης η ενεργότητα επηρεάζεται και από το νουκλεοτιδικό κατάλοιπο που έπεται της αδενίνης στην θέση διάσπασης διασπώντας κυρίως ApG και ApT φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Επίσης με την χρήση κατάλληλων υποστρωμάτων προσδιορίστηκε το βέλτιστο pH δράσης του ενζύμου στην τιμή 6,0 ενώ η ενεργότητά του επηρεάζεται από την ιονική ισχύ του διαλύματος.

Προκειμένου να διερευνήσουμε κατά πόσο εμφανίζει παρόμοια συγγένεια ως προς το βέλτιστο συνθετικό υπόστρωμα η εναλλακτική πρωτεϊνική ισομορφή RNάση κ-02 με τη μελετημένη ισομορφή RNάση κ-01 προχωρήσαμε σε μία πρώτη προσέγγιση κινητικής μελέτης της RNάσης κ-02. Συγκεκριμένα, αναπτύξαμε μία συνεχή ενζυμική δοκιμασία έναντι του φθορίζοντος μορίου subB με αλληλουχία: 5'-FAM - dTdTdTdTdTrAdGdTdTdTdT-BHQ1-3'. Η δοκιμασία αυτή επιτρέπει την

παρακολούθηση της ενζυμικής αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο μέσω της απόσβεσης του φθορισμού του μορίου FAM στο ακέραιο υπόστρωμα λόγω φαινομένου FRET και της εκπομπής φθορίζουσας ακτινοβολίας μόνο μετά την υδρόλυση του ApG δεσμού από τη ριβονουκλεάση. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε για τις RNάσες κ-01 και κ-02 έδειξαν ότι εμφανίζουν παρόμοια συγγένεια δέσμευσης του συγκεκριμένου υποστρώματος παρά τη σημαντική αμινοξική διαφορά τους στο αμινοτελικό τους άκρο.

Σε ένα επόμενο επίπεδο θεωρήθηκε σκόπιμη η διερεύνηση των συγκριτικών επιπέδων έκφρασης των δύο ισομορφών σε επίπεδο mRNA σε ένα σύνολο ανθρώπινων κυτταρικών σειρών διαφορετικής προέλευσης. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι δύο ισομορφές διαφέρουν μεταξύ τους σε πολύ μικρό βαθμό συνεπώς ο συγκριτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασής τους δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση ειδικών εκκινητών και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Για το λόγο αυτό, αναπτύξαμε μια νέα μοριακή δοκιμασία που επιτρέπει τη σχετική ποσοτικοποίηση των δύο μεταγράφων προσδιορίζοντας την αναλογία έκφρασής τους (RNάση κ-01/RNάση κ-02) σε ένα μεγάλο εύρος ανθρώπινων κυτταρικών σειρών. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ανάλυσης έδειξαν ότι η RNάση κ-02 εκφράζεται σε όλες τις περιπτώσεις ενώ η αναλογία RNάση κ-01/RNάση κ-02 κυμαίνεται από 1,45 (κυτταρική σειρά HEK-293) έως 9,06 (κυτταρική σειρά AGS).

Όπως είναι γνωστό, ένας μεγάλος αριθμός μεταγράφων δεν κωδικοποιεί τη σύνθεση πρωτεϊνών. Συνεπώς, ένα κρίσιμο ερώτημα στα πλαίσια του χαρακτηρισμού του μεταγράφου της RNάσης κ-02 ήταν κατά πόσο κωδικοποιεί τη σύνθεση πρωτεΐνης σε ανθρώπινα κύτταρα. Για το λόγο αυτό, στα πλαίσια της παρούσας διατριβής προχωρήσαμε στην ανάπτυξη, τον ανοσοκαθαρισμό και το βιοχημικό χαρακτηρισμό ενός ειδικού για την RNάση κ-02 πολυκλωνικού αντισώματος. Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλά υδρόφοβη φύση της RNάσης κ-02 προχωρήσαμε στην εφαρμογή μιας μεθοδολογίας που επιτρέπει τον εμπλουτισμό υψηλά υδρόφοβων μορίων σε κυτταρικά εκχυλίσματα από ένα σύνολο πέντε κυτταρικών διαφορετικής προέλευσης. Έπειτα από κατάλληλη κατεργασία των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων και διαχωρισμό των φάσεων, τα κλάσματα που προέκυψαν υποβλήθηκαν σε ανοσοεντοπισμό κατά Western χρησιμοποιώντας το ανοσοκαθαρισμένο αντίσωμα. Η RNάση κ-02 εντοπίζεται ως μοναδική ζώνη στην αδιάλυτη φάση ενώ η ειδικότητα της ανίχνευσης επαληθεύθηκε με την επανάληψη του πειράματος έπειτα από καταστολή της έκφρασης της RNάσης κ-02 μέσω RNAi σε ανθρώπινα κύτταρα νεφρού.

Στα πλαίσια της μελέτης της έκφρασης της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ-02 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές προχωρήσαμε στη διερεύνηση του υποκυτταρικού της εντοπισμού μέσω ανοσοφθορισμού. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας το ειδικό για την RNάση κ-02 πολυκλωνικό αντίσωμα προχωρήσαμε στον ανοσολογικό της εντοπισμό σε ανθρώπινα κύτταρα χρησιμοποιώντας ένα φθορίζον δευτερογενές αντίσωμα και συνεστιακή μικροσκοπία. Από τη συγκεκριμένη προσέγγιση προέκυψε ότι η ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ-02 κατανέμεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων ενώ το φθορίζον σήμα σχεδόν εκμηδενίστηκε έπειτα από καταστολή της έκφρασης της RNάσης κ-02 μέσω RNAi.

Συνολικά, η εργασία που επιτεύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής αναδεικνύει τη δυναμική πλαστικότητα του ανθρώπινου γονιδιώματος, καθώς μία μικρή διαφοροποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε επίπεδο mRNA μπορεί να εκδηλώνεται σαν σημαντική αλλαγή σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Η διαφορά στην αμινοξική αλληλουχία του αμινοτελικού άκρου των δύο ισομορφών της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ υποδεικνύει την πιθανή εμπλοκή των ενζύμων σε διαφορετικές κυτταρικές διαδικασίες ή σε μηχανισμούς λεπτής ρύθμισης, ένδειξη που καθιστά τη μελλοντική διαλεύκανση του βιολογικού τους ρόλου ακόμα πιο επιτακτική.

7. Summary

Recent advances in RNA biology have portrayed a central role for RNA as gene expression regulator and the intracellular RNA metabolism constitutes an ever-rising field of scientific research. Tissue- and time-specific decay of RNA molecules is involved in a broad field of biological phenomena that until recently seemed to be irrelevant to the regulation of gene expression.

Ribonucleases catalyze RNA catabolism and participate in a wide range of mechanisms as splicing and quality control effectors, as protective shields against virus RNAs or as effectors of gene expression regulation. Despite their high heterogeneity, ribonucleases are considered as highly active enzymes that portray redundancy and the capacity to act often against multiple RNA targets. They function as members of a highly complicated RNA decay network that is governed by rules of subtle regulation by interacting with several cellular factors that include proteins (RNA polymerases, RNA helicases, inhibitors and chaperones), regulatory RNAs (such as miRNAs) and other small molecules that guarantee their specific activity. Overall, RNases are capable of acting through a dynamic regulation pattern that is constantly in accordance with the cellular environment with a view to fulfilling the developmental and metabolic requirements that allow cellular survival and function.

Our research team has focused its research efforts on the novel ribonuclease κ (kappa) family, an orthologous protein family with representatives in all metazoans from Cnidaria to humans. Its protein counterparts portray a high conservation rate, a fact denoting a strong selective force that maintained its expression in a wide range of organisms. Human RNase κ is expressed in all tissues and developmental stages, its gene is harbored in chromosome 17 and it retains the strict family gene organization pattern of three exons and two introns. It encodes the synthesis of a 98-amino acid protein that exhibits a molecular weight of 10.98 kDa. It catalyzes the hydrolysis of ApG and ApU phosphodiester bonds, its activity is not inhibited by RI, the RNase A family inhibitor and the formation of a disulfide bond between the cysteine 6 and 69 residues is essential for the enzyme activity.

The present PhD thesis focuses on the expression analysis of human RNase κ and its possible alternative isoforms. During this research effort a novel isoform was isolated and studied, human RNase κ -02.

According to EST data, human RNase κ is expressed in a broad range of human tissues in all developmental stages. In order to experimentally validate this expression pattern in RNA level we performed a Northern Blot analysis in six cell lines corresponding to tissues of different origin. The results of this analysis revealed the expression of a main 800 bp RNase κ transcript in all cases, a fact that verifies the expression of human RNase κ in a wide range of cell types.

EST data analysis also led to the retrieval of a sequence subset that harbors a minor differentiation compared to the constitutive RNase κ isoform. Alignment of these sequences with human RNase κ gene showed that they lack 4 consecutive bases that occurs from a subtle alternative splicing event.

In order to isolate and clone this alternative isoform we applied a combined molecular approach that led to the retrieval of a 540 bp cDNA clone that harbors an open reading frame of 134 aminoacids and the corresponding protein has a calculated molecular mass of 14.900 Da. This protein is encoded by the utilization of an upstream (compared to RNase κ -01) initiation codon as proposed by initiation prediction analysis. The protein sequences alignment of the two RNase κ isoforms portrayed that they bear no similarity within their amino-terminal portion whereas the 63-134 RNase κ -02 portion is identical to the 27-98 RNase κ -01 portion.

In a first step we attempted to study the biochemical properties of the alternative isoform. For this reason, we proceeded to its heterologous expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* system and to its partial chromatographic purification. The recombinant enzyme was used to identify the activity and the substrate specificity of human RNase κ -02 against a series of RNA and DNA-RNA radiolabelled substrates. The analysis performed against a 30-mer RNA containing every possible dinucleotide combination revealed that human RNase κ -02 cleaves mainly ApG and ApU phosphodiester bonds.

In order to further investigate human RNase κ -02 substrate specificity, we applied a series of 5'-dNdNdNrAdGdNdNdN-3' and 5'-dTdTdTrAdNdTdTdT-3' substrates that contain a single hydrolysis point. This analysis revealed that RNase κ -02 activity depends on the sequence that surrounds the hydrolyzed bond showing a higher efficiency in the presence of dT residues. Moreover, the enzyme's activity is affected by the second phosphodiester bond residue portraying a higher efficiency against ApG and ApT

phosphodiester bonds. Last, human RNase κ -02 portrays optimum activity at pH 6.0 whereas its activity seems to be hindered by the presence of NaCl in the reaction mixture.

In order to determine kinetic constants for the rApG cleavage reaction, a sensitive assay for the RNase κ -02 activity based on the relief of fluorescence quenching within a defined oligomeric substrate was used. When the substrate is cleaved, the fluorescence of fluorescein is manifested. The determination of the RNase κ -02 kinetic parameters against the fluorescent substrate 5'-6-FAM-TTTrAGTTT-BHQ1-3'. The continuous kinetic assay of the recombinant human RNases κ -01 and κ -02 revealed that despite their difference in their amino-terminal portions, the two enzymes portray a similar affinity (K_m) to their optimum substrate.

In a next step we proceeded to the quantification of the two alternative isoforms mRNA levels in a series of human cell lines. Since the use of isoform-specific primers in a broad spectrum of RT-qPCR amplification conditions did not provide specific products, we invented a rapid molecular approach and the quantitative analysis of the two transcripts relative abundance portrayed the expression of the RNase κ -02 isoform in all cases, with a ratio of RNase κ -01/ RNase κ -02 mRNA ranging from 1.45 (HEK-293 cells) to 9.06 (AGS cells).

It is well established that an important portion of the transcriptome has no protein-coding capacity. Therefore, a significant question raised was whether RNase κ -02 transcript is protein coding or not. Given that the RNase κ -02 amino-terminal portion (1-62 aa) is different to the RNase κ -01 protein and bears no important similarities with other known human proteins, we proceeded to the production, purification and characterization of a specific polyclonal antibody that recognizes only the RNase κ -02 protein isoform. Based on RNase κ -02 relative hydrophobicity, we opted for a strategy that would allow us the considerable enrichment of highly hydrophobic proteins in cell extracts from 5 cells lines. Phase separation was followed by Western blot analysis using the purified RNase κ -02 specific polyclonal antibody. The analysis resulted in the recovery of RNase κ -02 protein in the detergent-insoluble fraction and the protein was not detected in the detergent insoluble fraction of RNase κ -02 RNAi knock-down HEK-293 cells. This result verifies the expression of RNase κ -02 at protein level in human cells.

Finally, in order to analyze the subcellular distribution of the RNase κ -02 protein we proceeded to an immunofluorescence analysis using the K02N polyclonal specific antibody. According to the performed analysis, RNase κ -02 seems to be distributed only in the

cytoplasm. In order to verify the cytoplasmic distribution of human RNase κ -02 isoform we performed RNAi mediated knock down of human RNase κ -02. In this experiment, the protein was virtually undetected, a fact that validates the specificity of the applied antibody.

The results of this work highlight the dynamic plasticity of the existing transcriptome by the observation that a subtle change at the mRNA level can manifest as a profound change in protein content. The difference in the amino-terminal portion of the two human RNase κ isoforms could serve as a distinctive feature that would allow the differential action of the two enzymes in the cellular environment. For this reason, the identification of their biological role and their mechanistic features is considered imperative.



A Subtle Alternative Splicing Event Gives Rise to a Widely Expressed Human RNase κ Isoform

Evangelos D. Karousis, Diamantis C. Sideris*

University of Athens, Faculty of Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Athens, Greece

Abstract

Subtle alternative splicing leads to the formation of RNA variants lacking or including a small number of nucleotides. To date, the impact of subtle alternative splicing phenomena on protein biosynthesis has been studied in frame-preserving incidents. On the contrary, mRNA isoforms derived from frame-shifting events were poorly studied and generally characterized as non-coding. This work provides evidence for a frame-shifting subtle alternative splicing event which results in the production of a novel protein isoform. We applied a combined molecular approach for the cloning and expression analysis of a human RNase κ transcript (RNase κ -02) which lacks four consecutive bases compared to the previously isolated RNase κ isoform. RNase κ -02 mRNA is expressed in all human cell lines tested and encodes the synthesis of a 134-amino-acid protein by utilizing an alternative initiation codon. The expression of RNase κ -02 in the cytoplasm of human cells was verified by Western blot and immunofluorescence analysis using a specific polyclonal antibody developed on the basis of the amino-acid sequence difference between the two protein isoforms. The results presented here show that subtle changes during mRNA splicing can lead to the expression of significantly altered protein isoforms.

Citation: Karousis ED, Sideris DC (2014) A Subtle Alternative Splicing Event Gives Rise to a Widely Expressed Human RNase κ Isoform. PLoS ONE 9(5): e96557. doi:10.1371/journal.pone.0096557

Editor: Emanuele Buratti, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Italy

Received: February 16, 2014; **Accepted:** April 9, 2014; **Published:** May 5, 2014

Copyright: © 2014 Karousis, Sideris. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was financed by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program “Education and Lifelong Learning” of the National Strategic Reference Framework (NSRF) - Research Funding Program: Heracleitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: dsideris@biol.uoa.gr

Introduction

Alternative splicing appears to be the rule for higher eukaryotic genomes. It is estimated that approximately 95% of human multiple exon pre-mRNAs are differentially processed to yield multiple mRNA products [1,2]. This fact underlines the dynamics of transcriptome plasticity, allowing for the evolutionary emergence of novel motifs and biological functions on the protein level by combining efficient structural features. Furthermore, in higher eukaryotes, several molecular mechanisms such as alternative splicing, alternative transcriptional initiation points, alternative polyadenylation and RNA editing compensate for the difference between the number of genes and expressed transcripts and proteins [3].

Alternative splicing events taking place at donor or acceptor sites located in close proximity to the conventional splice sites, give rise to mRNAs which differ by a few nucleotides [4]. The events leading to such subtle splice variants involve the utilization of alternative donor or acceptor splice sites, since polymorphisms on the corresponding splice sites eliminate these subtle alternative splicing events [5]. Concerning the molecular mechanisms involved, it has been proposed that the tandem pairs of alternative splice sites generally resemble normal splice sites. It appears that intrinsic properties of the spliceosome substances favor alternative splicing on tandem sites [6]. Subtle alternative splice sites bearing a NAGNAG motif (N standing for any nucleotide) have been shown to be the most frequent since approximately 2000 alternative spliced acceptors of this type have been observed in humans [7]. The most common distance length between two splice

sites is 4 nucleotides long at the donor site. It has been suggested, though, that their frameshift impact gives rise to products that are predicted as non-sense mediated (NMD) targets [8].

It has been shown that alternative splicing occurring at NAGNAG sites generates important differences between the proteomes of mammalian tissues. This fact implies that the evolutionary paths of mammalian proteins are highly affected by the attribution of introns within the coding sequences of the genes. NAGNAG events observed in human tissues are often tightly regulated by sequence-specific determinants. Alternative splicing at tandem sites constitutes a subtle mechanism which allows the modification of protein products without affecting the stability of the existing transcripts. This fact seems to exert an accelerating force on protein evolution at exon-exon boundaries [8].

Recent experimental data have added a novel perspective in the transcriptome analysis by revealing an important group of transcripts termed long non coding RNAs (lncRNAs). lncRNAs are regulatory RNAs exceeding the length of 200 nucleotides [9]. Large-scale sequencing and prediction analyses of full length cDNA libraries have revealed that lncRNAs constitute an important portion of the total human transcriptome with an ever-rising number of reports reaching 23,000 transcripts [10–13]. Even though the mechanisms of lncRNAs biogenesis are quite diverse, their transcription and splicing are mediated similarly to protein-coding mRNAs, with the majority of them being 5' capped and polyadenylated [14]. Concerning their function, lncRNAs seem to take part in transcriptional [15] and post-transcriptional regulation [16], epigenetic regulation by recruiting chromatin remodelling [17], whereas they seem to implicate in

tumorigenesis mechanisms [18–22]. Given the relative abundance of lncRNAs and their features similarity with mRNAs a crucial issue considering novel poly(A)⁺ isolated mRNAs is whether they are protein coding or not.

Human RNase κ is a previously established protein belonging to a family conserved in all metazoans. The high conservation of all members along with the fact that the human enzyme is widely expressed in all tissues and developmental stages [23] suggest a very important biological function that is currently under investigation. Human RNase κ is represented by a single copy in the human genome and retains the pattern of gene organization that is preserved by almost all known members of the gene family, consisting of three exons interrupted by two introns [24]. The human representative exhibits *in vitro* endoribonucleolytic activity cleaving preferentially ApG and ApU phosphodiester bonds, while it hydrolyzes UpU bonds at a lower rate [23]. Reducing reagents and site-directed mutagenesis experiments showed that a disulfide bond between cysteine residues 6 and 69 is essential for the ribonucleolytic activity of the enzyme [25].

The present work reports a human subtle alternative splicing event giving rise to a protein coding mRNA variant (RNase κ -02) that lacks 4 nucleotides compared to the previously reported RNase κ mRNA isoform. Cloning and expression analysis of this subtly alternatively spliced mRNA was achieved by the development of a modified hybrid selection approach which may provide a tool for the study of similar cases. RNase κ -02 mRNA encodes the synthesis of an alternative protein isoform in human cell extracts which follows a cytoplasmic distribution.

Results

RNase κ expression in human cell lines

In a previous work we reported the identification and isolation of a cDNA sequence of 466 bp (RNase κ , hereinafter designated as RNase κ -01) encoding the synthesis of a 98 amino-acid protein exhibiting endoribonucleolytic activity [23]. An EST and deep RNA sequencing data *in silico* analysis revealed that RNase κ -01 is expressed in a large variety of normal and pathological tissues in all developmental stages. In order to investigate the expression pattern of the human *RNase κ* gene, a Northern blot analysis was performed using total RNA isolated from various human cell lines (Figure 1). Our results show that a main band of approximately 0.8 kilobases is expressed at different levels in all cell lines examined, while two additional bands of approximately 2.6 and 5 kb appeared in some cases.

In addition, a TBLASTN search of the available EST sequence databases using the RNase κ -01 amino acid sequence as query resulted in the retrieval of a large number of EST sequences among which an important subset, distributed in a wide variety of tissues, differs from the RNase κ -01 cDNA only in the absence of 4 consecutive bases. It is conceivable that no information concerning the expression of this putative isoform could be deduced by Northern Blot analysis.

RNase κ -02 mRNA isolation and cloning by means of a novel hybrid selection strategy

Conventional RT-PCR experimental approaches do not facilitate the selective isolation between two very closely related mRNA variants such as RNase κ -01 and RNase κ -02 mRNA isoforms, which differ only in 4 nucleotides. For this reason, aiming at the isolation and cloning of the RNase κ -02 variant we devised and implemented a new hybrid selection methodology outlined in Fig. 2. This approach enables the isolation and cloning

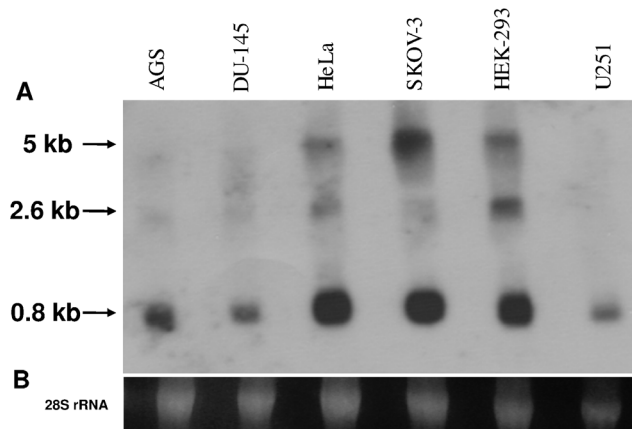


Figure 1. Northern blot analysis of RNase κ in human cell lines. Approximately 20 μ g of total RNA isolated from 6 human cell lines were loaded per lane, separated by electrophoresis in a 1.2% agarose-formaldehyde gel and transferred to a Porablot NY plus Nylon membrane. The membrane was hybridized with a ³²P-labelled cDNA probe corresponding to nucleotides 1–466 of the human RNase κ cDNA sequence (accession number AM746459.1). Sizes were estimated by comparison with RNA size markers. (B) 28S rRNA was used as a control for the amounts of RNA loaded.
doi:10.1371/journal.pone.0096557.g001

of subtle alternative transcripts on the basis of their sequence difference.

More specifically, a poly(A)⁺ cDNA library from human HEK-293 cells was prepared and hybridized with a 5' biotinylated single stranded DNA probe corresponding to a portion of the RNase κ -01 cDNA coding region. Two types of hybrids are formed in the hybridization pool, hybrids which are fully complementary and hybrids that are partially complementary with the cDNA probe. Since the absence of GTTG sequence eliminates a *FatI* restriction site, only hybrids corresponding to RNase κ -02 isoform remain unaffected after the complete digestion with *FatI*. The selected hybrids were amplified by PCR and were cloned into the pCR 2.1 vector. Seven cDNA clones were selected and verified by restriction endonuclease mapping and sequencing analysis. Sequencing results (NCBI database, Acc. Number: KF980888) revealed no differences among these clones, which additionally appear to be identical to portions of two other mRNA sequences submitted in the NCBI database (Acc. Number BC070349.1 and BC095436.1).

A subtle alternative splicing event occurring at the exons 1 and 2 junction site was revealed by alignment of the isolated clone with the human *RNASEK* gene sequence. As a result of this event, the sequence GTTG is absent in RNase κ -02 cDNA compared to RNase κ -01 as presented in Fig. 3A.

The isolated clone is 540 bp long and harbors an ORF of 405 nucleotides, encoding a 134-amino acid protein with a calculated mass of 14.900 Da. This protein occurs from the use of an upstream initiation codon compared to the previously reported κ -01 isoform. The probability of this codon encoding the initiator methionine is very high (68%) according to an initiation codon analysis performed using the ATGpr program [26]. Protein alignment of the deduced amino acid sequences of the two RNase κ isoforms revealed no similarities within their amino-terminal portion whereas the 63–134 amino acid region of RNase κ -02 is absolutely identical to the 27–98 amino acid part of RNase κ -01 (Fig. 3B).

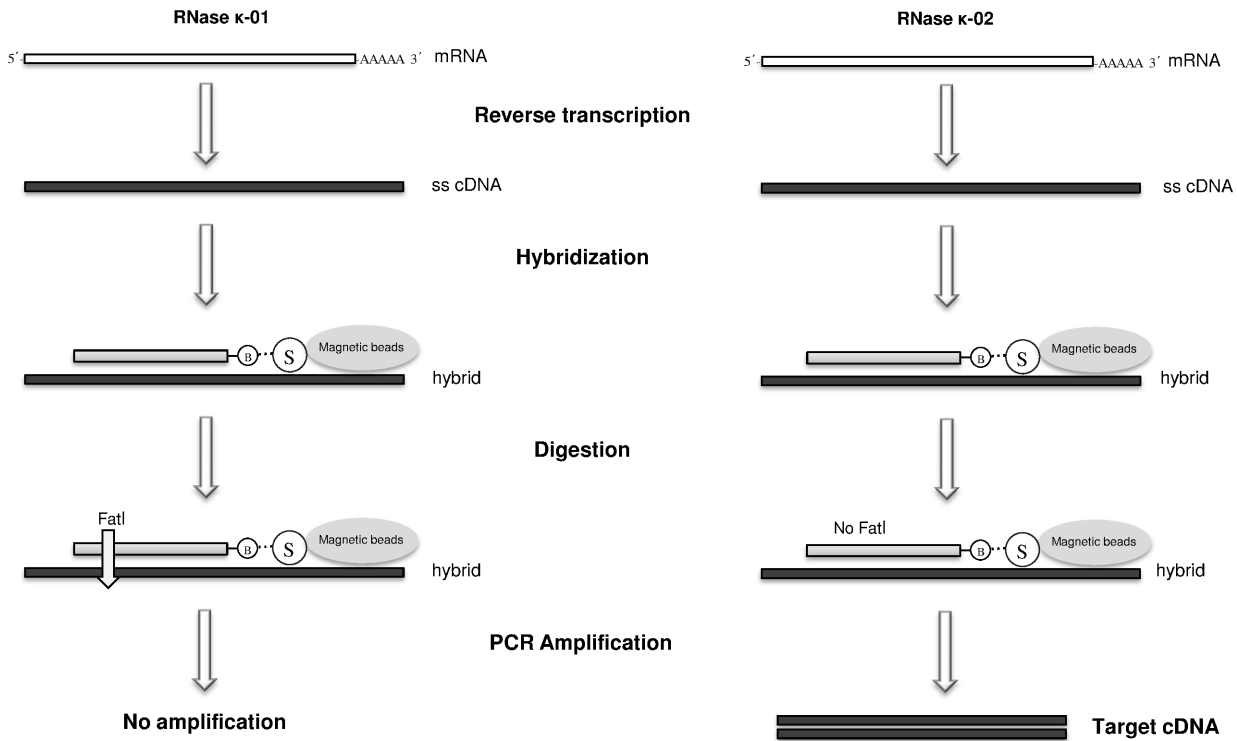


Figure 2. Schematic representation of the human RNase κ gene, its derived mRNA isoforms and amino acid sequence alignment of the protein isoforms. (A) White boxes represent gene exons and the horizontal bold lines introns. In mRNAs, the black parts of the rectangles demonstrate the protein-coding regions and the white the non-coding regions. The grey line represents the GTTG sequence that is present in RNase κ -01 isoform. The positions of ATG initiation codons are marked on both isoforms. (B) Amino acid sequences are numbered on the right and the identical portion of the two proteins is marked in grey frame.
doi:10.1371/journal.pone.0096557.g002

Relative quantitative expression analysis of RNase κ -01/ RNase κ -02 mRNA isoforms

Alternative splicing is a highly regulated molecular process and in some cases specific splice variants are expressed under varying conditions. Accordingly, the observed expression ratio between

two short-distance tandem sites splice variants is affected by cell and tissue type, developmental stages and external stimuli [27]. To this end, the relative expression ratio of the RNase κ -01/RNase κ -02 mRNA isoforms was examined. Since the use of isoform-specific primers in a broad spectrum of RT-qPCR amplification conditions did not provide specific products, we applied an

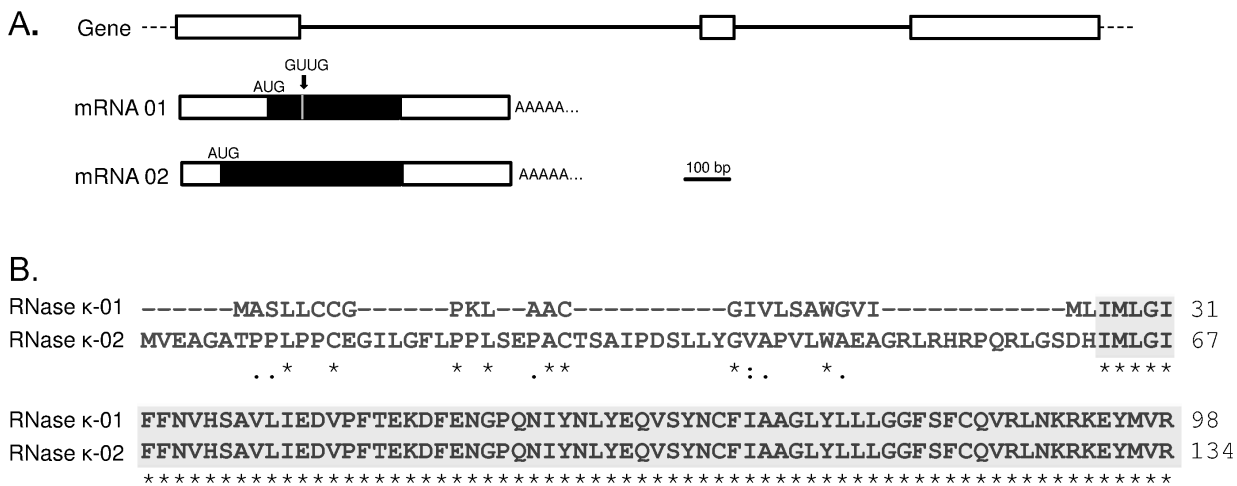


Figure 3. Schematic representation of the hybrid capture protocol for the selection of RNase κ -02 alternative transcript. The method consists of the following steps: (i) Reverse transcription of poly(A)⁺ mRNA and construction of a single stranded cDNA library. (ii) Hybridization of cDNA molecules with a biotinylated single stranded RNase κ specific DNA probe immobilized on streptavidin magnetic beads. (iii) Complete digestion of the hybrids with an appropriate restriction enzyme. (iv) PCR amplification of the selected target cDNA.
doi:10.1371/journal.pone.0096557.g003

alternative molecular approach. More specifically, total RNA was reverse transcribed and amplified for 10 cycles by PCR using a set of primers on both sides of the exons 1–2 junction site. This step renders both isoforms double-stranded without affecting their initial ratio. Next, equal volumes of the PCR product are incubated overnight in the presence or in the absence of the *FatI* restriction enzyme. As mentioned above, the products corresponding to RNase κ -01 mRNA are digested, whereas PCR products corresponding to RNase κ -02 remain unaffected. On the other hand, in the absence of *FatI* both populations remain unaffected. Finally, these sample couples undergo Real-Time PCR amplification and their C_T differences reveal the RNase κ -01/RNase κ -02 mRNA ratio. Three independent mRNA preparations from 12 human cell lines were analyzed as mentioned, and the obtained results are represented in Fig. 4A.

Quantitative analysis of the two transcripts relative abundance portrayed the expression of the RNase κ -02 isoform in all cases, with a ratio of RNase κ -01/RNase κ -02 mRNA ranging from 1.45 (HEK-293 cells) to 9.06 (AGS cells).

For the accurate interpretation of the quantification data it is important to verify that only RNase κ -02 cDNA molecules were amplified after the digestion step. For this reason, the Real Time PCR products underwent an additional digestion with *FatI* and were analyzed by agarose gel electrophoresis. As demonstrated in Fig. 4B, a unique product of the expected size was detected in all cases, denoting the reliability of our results.

RNase κ -02 protein is expressed in human cell lines

It is well established that an important portion of the transcriptome has no protein-coding capacity [28]. Therefore, a

significant question raised was whether RNase κ -02 transcript is protein coding or not.

Given that the RNase κ -02 amino-terminal portion (1-62 aa) is different to the RNase κ -01 protein and bears no important similarities with other known human proteins, we proceeded to the production of a specific polyclonal antibody that recognizes only the RNase κ -02 protein isoform. For this reason, the amino-terminal portion of the RNase κ -02 was expressed as a fusion protein with intein in *E.coli* expression system as described in Materials and Methods. After cleavage of the fusion protein with β -mercaptoethanol, the desired peptide was isolated and used for the immunization of two rabbits. The serum was affinity-purified against the target peptide and the purified IgGs (K02N antibody) were collected. When a series of total cell extracts (HEK-293, AGS, HeLa, SH-SY5Y and FM3 cell lines) underwent Western Blot analysis, no bands were detected. Moreover, no immunodetection signals were observed even when a commercially available antibody against the common carboxy-terminal region of RNase κ -01 and RNase κ -02 protein isoforms were used (data not shown).

RNase κ -02 is highly hydrophobic according to protein prediction analysis. As shown in the Kyte-Doolittle hydrophobicity plot [29], RNase κ -02 protein bears 3 highly hydrophobic regions (Fig. 5A). The first region is located within the amino-terminal portion that differs from RNase κ -01, whereas the other two hydrophobic areas lie within the common carboxy-terminal region of the two isoforms.

Based on RNase κ -02 relative hydrophobicity, we opted for a strategy that would allow us the considerable enrichment of highly hydrophobic proteins in cell extracts. To achieve this goal, we proceeded to the temperature-induced phase separation using

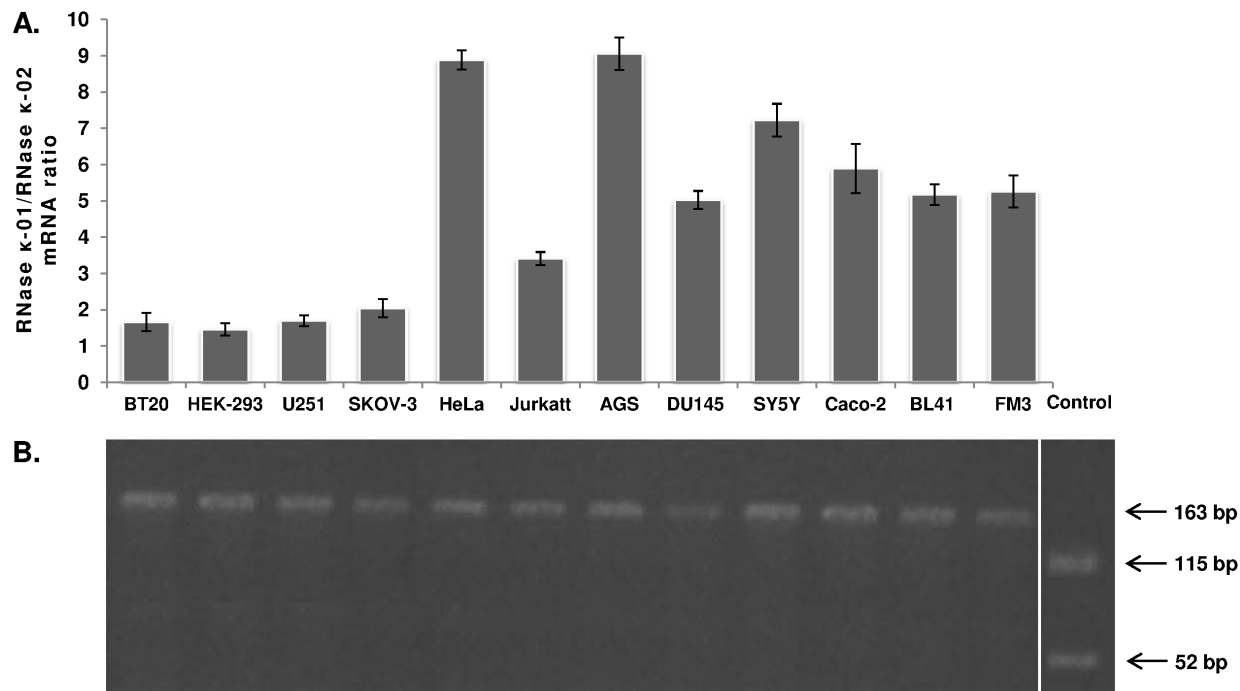


Figure 4. RNase κ -01/RNase κ -02 mRNA ratio in human cell lines. (A) A histogram of RNase κ mRNA isoforms ratio. Total RNA isolated from 12 human cell lines was reverse transcribed and amplified for 10 cycles by regular PCR. Equal amount of the PCR products from each reaction were incubated in the presence or in the absence of *FatI* and the samples were re-amplified by Real Time PCR. The comparative ΔC_T analysis performed as described in Materials and Methods resulted in the relative quantification of RNase κ mRNA isoforms. Error bars denote the standard error of the mean of triplicate reactions performed three times for each cell line. (B) The Real Time PCR products from the digested samples were overnight incubated with *FatI* and analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel. In a parallel experiment, 200 ng of RNase κ -01 cDNA amplified by the same primers were digested under the same conditions as a control reaction. doi:10.1371/journal.pone.0096557.g004

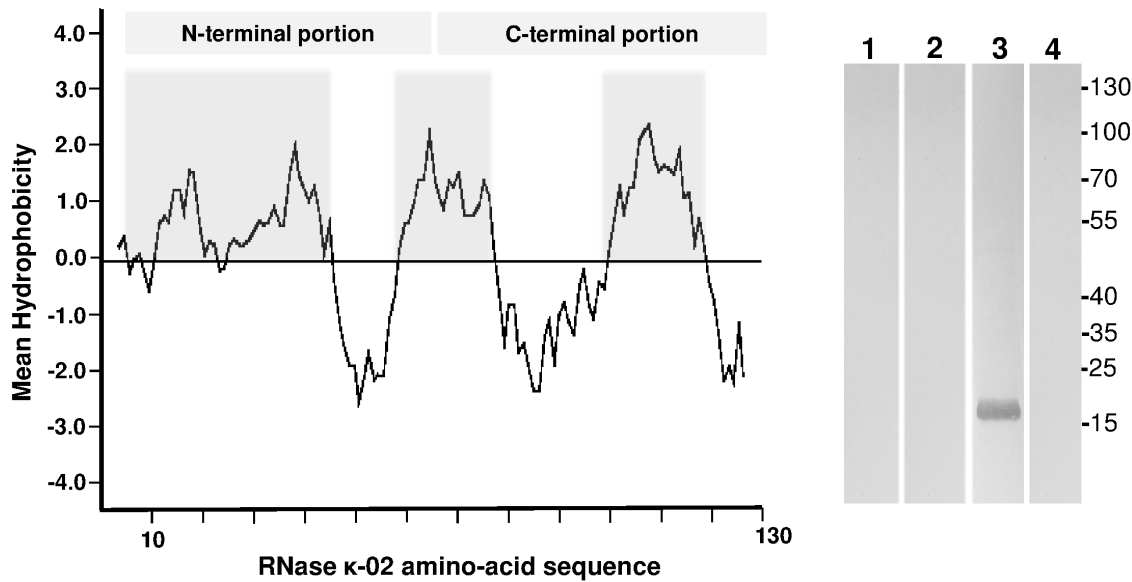


Figure 5. RNase κ -02 hydrophobicity plot and Western blot analysis of HEK-293 protein fractions. (A) Kyte-Doolittle Hydrophobicity plot of the RNase κ -02 protein. Regions with values above 0 are hydrophobic in character and are marked in grey boxes. (B) Western blot analysis of normal and RNAi depleted RNase κ -02 HEK-293 protein fractions collected by Triton X-114 phase separation. Twenty micrograms of proteins from detergent-depleted phase (lane 1), detergent-enriched phase (lane 2) and insoluble fraction (lane 3) from normal cells and insoluble fraction of RNAi depleted RNase κ -02 cells were analyzed by SDS/PAGE, electro-transferred onto a nitrocellulose membrane. RNase κ -02 was detected using the specific K02N polyclonal antibody. A set of marker proteins of known molecular weight were run in parallel. doi:10.1371/journal.pone.0096557.g005

Triton X-114, which is widely employed in similar cases [30,31]. This process separates proteins according to their relative hydrophobicity leading to the separation of hydrophilic molecules in the detergent-depleted (aqueous) phase, amphipathic integral membrane proteins are recovered in the detergent-enriched phase and insoluble proteins are pelleted after centrifugation. Treatment of HEK-293 cell homogenate with Triton X-114 and phase separation was followed by SDS-PAGE analysis and immunodetection using the K02N polyclonal antibody of the three protein fractions. As shown in figure 5B, the analysis resulted in the recovery of RNase κ -02 protein in the detergent-insoluble fraction (lane 3), whereas no bands were observed in the aqueous (lane 1) or in the detergent-enriched (lane 2) fractions. In a parallel experiment, no signal was detected in the detergent insoluble fraction prepared from RNase κ -02 RNAi knock-down HEK-293 cells (lane 4), a fact denoting the specificity of the utilized antibody against RNase κ -02. In all cases, control experiments were performed adding only secondary antibody and no bands were observed (data not shown). RNase κ -02 protein exhibited a molecular mass of ~16 kDa which is in accordance with the calculated mass deduced from its amino-acid sequence (14,900 Da).

Finally, in order to analyze the subcellular distribution of the RNase κ -02 protein we proceeded to an immunofluorescence analysis using the K02N polyclonal specific antibody. As shown in figure 6, RNase κ -02 seems to be distributed only in the cytoplasm (Fig. 6A), since its fluorescence signal does not overlap with the iodine propide signal used to stain the cell nucleus (Fig. 6B). In order to verify this finding, we performed RNAi mediated knock down of human RNase κ -02. HEK-293 cells that were transfected with shRNA-expressing plasmids (iK3) and were subsequently fixed, permeabilized and incubated with the K02N antibody under the same conditions. As shown in Fig. 6D, after the knock down of RNase κ -02 the immunofluorescence signal was virtually

depleted, a fact that validates the cytoplasmic distribution of RNase κ -02 protein isoform.

Discussion

Subtle alternative splicing events are being observed in an ever-increasing number of human genes, as depicted by the exponential accumulation of EST and high throughput RNA sequencing data [6,32–34]. The impact of subtle alternative splicing on protein products depends on whether they are frame-shifting ($\Delta 2, 4, 5, 7, 8$, etc.) or frame-preserving ($\Delta 3, 6, 9$, etc.) with Δ denoting the sequence length between the tandem splice sites. Frame-preserving tandem sites result in the addition or absence of only a few amino-acids, leading to the production of similar protein isoforms which may bear different functional properties. For instance, a $\Delta 3$ subtle alternative splicing event occurring in *ATN1* human gene product determines the cellular topology (nuclear or cytoplasmic) of the corresponding protein isoforms [27]. At the donor site, alternative splicing events in which the distance between two splice sites is 4 nucleotides long are the most frequent. However, their frameshift effect often creates mRNA isoforms that are predicted as nonsense mediated decay (NMD) targets [4] and therefore these cases have not been systematically investigated.

The methodological approach presented allowed us to achieve the cloning of a human RNase κ mRNA variant that occurs after a $\Delta 4$ splicing event. This experimental strategy offers several advantages for the study of transcripts generated by alternative splicing compared to conventional RT-PCR approaches. The key point of our procedure is the addition of a digestion step with an appropriate restriction enzyme which specifically acts against complementary sequences, allowing for the selective amplification of the unaffected molecules. Moreover, the application of a hybrid selection step permits the isolation of rare transcripts in terms of sequence specificity. Abundant RNA molecules such as ribosomal RNAs and highly expressed mRNAs that may hinder the selective

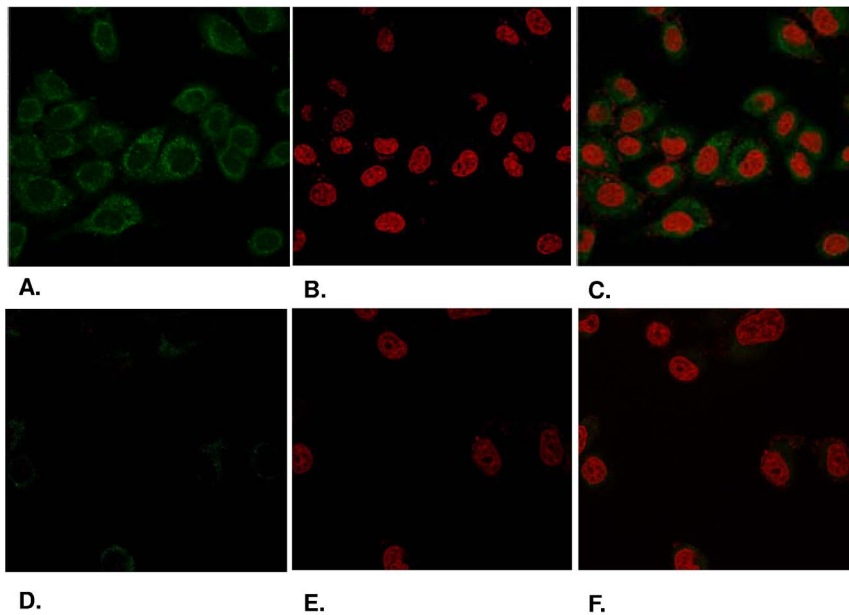


Figure 6. Immunofluorescence microscopy analysis of RNase κ -02. HEK-293 cells (A) and RNAi depleted RNase κ -02 HEK-293 cells (B) were treated with K02N specific polyclonal antibody and protein – primary antibody complexes were visualized with rabbit matched Alexa-488 secondary antibody. DNA was stained with propidium iodide (B,E). Merged image of the two stains (C,F). doi:10.1371/journal.pone.0096557.g006

isolation of low expression transcripts are removed during the washing steps and the amplification of target molecules is facilitated. Based on the above, this protocol may prove valuable for the experimental validation of a broad spectrum of transcripts by selecting a digestion enzyme that recognizes the non-desired target. Along these lines it is conceivable that the elimination of a unique restriction site could provide the selection edge required for the isolation of a desired alternative transcript.

Sequence alignment of the isolated RNase κ -02 cDNA with the human *RNASEK* gene revealed that the RNase κ -02 mRNA isoform occurs as a result of an alternative $\Delta 4$ donor event within the first intron, a phenomenon which is considered to be quite frequent in human gene products [4,35].

It has been proposed that differential regulation of subtle alternative splicing isoforms expression levels may denote function. Particularly, the ratio between the two short-distance splice isoforms may differ in various tissues and cell types [34,36], depending on developmental stages [37,38] or in response to external factors [39]. To date, a variety of methodological implementations such as polyacrylamide [40,41] and agarose [27,42] gel electrophoresis, capillary electrophoresis [43] as well as RNA sequencing analysis [8] have been employed in order to specify the expression ratio. However, these approaches cannot provide accurate results or they are limiting due to the sophisticated equipment requirements.

The Real-time PCR based methodological approach presented here may be applied for the expression analysis of variant sequences harboring distinctive restriction sites. In other words quantification, similarly to cloning is achieved in terms of the isoforms sequence differentiation. The results of our analysis demonstrated that RNase κ -02 mRNA is expressed in all the examined cell lines with varying degrees of isoforms expression ratio. This observation may reflect the existence of differential regulation mechanisms that are implicated in the expression pattern of the human *RNASEK* gene.

It is well known that apart from protein coding RNAs, an important percentage of transcription products bears no protein coding capacity [28]. Apart from the widely studied non coding RNA populations such as rRNAs, tRNAs and microRNAs, long non coding RNAs (lncRNAs) consist a novel group of RNAs sharing a single common feature: a size of over 200 nucleotides [44]. A large number of lncRNAs bear mRNA signatures such as 5'cap and poly(A) tail [45] that seem to participate in their turnover [46]. For this reason, a crucial issue in this study was to assess whether RNase κ -02 mRNA isoform is protein coding or not.

The isolated RNase κ -02 cDNA clone contains an ORF of 405 nucleotides and encodes the synthesis of a 134-amino acid protein by utilizing an alternative initiation codon. It should be noted that according to a recently published study [47], there are at least 1849 human transcripts that can be translated by alternate ATG initiation codons. Its 1-62 amino-terminal portion bears no similarity with the previously characterized RNase κ -01 isoform or other human proteins, whereas the 63–134 region is absolutely identical to the major part of RNase κ -01 (aa 27-98). Based on this amino-acid sequence, we managed to produce and purify an RNase κ -02 specific polyclonal antibody. By the means of our newly developed antibody we were able to demonstrate the biogenesis of the RNase κ -02 protein resulting from the RNase κ -02 mRNA translation in human cells. This alternative protein isoform bears a cytoplasmic topology. To our knowledge, this is the first instance of a human protein isoform encoded by a $\Delta 4$ subtly alternatively spliced transcript.

The finding that RNase κ -02 protein isoform is detected only in the detergent-insoluble fraction of cell extracts after Triton X-114 phase separation is in agreement with the predicted highly hydrophobic nature of this protein. This fact, in combination with its cytoplasmic localization, supports the hypothesis that RNase κ -02 could participate in the formation of macromolecular complexes *in vivo* or localize in membranous structures such as the endoplasmic reticulum.

The work presented here highlights the dynamic plasticity of the existing transcriptome by the observation that a subtle change at the mRNA level can manifest as a profound change in protein content. The finding that a $\Delta 4$ alternative splicing event gives rise to a protein coding isoform challenges the notion that other similar products constitute NMD targets (8). Thus, these products may evade NMD by utilizing an alternative initiation codon or may constitute long non-coding RNAs with unattributed functions. Further investigation of frame-shifting subtly alternatively spliced variants in human or other organisms' transcriptomes may shed light to the functional role of these molecules.

Materials and Methods

Materials

Oligonucleotide synthesis and sequence analysis were performed by VBC-Genomics (Vienna, Austria). Restriction enzymes, IMPACT-CN expression system and chitin column were purchased from New England Biolabs (Hitchin, UK). Plasmid preparation kits and porablot NY plus Nylon membrane were from Macherey-Nagel (Düren, Germany). pCR 2.1 cloning vector was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). M-MLV reverse transcriptase was obtained from Clontech Laboratories (Palo Alto, CA, USA) and AMV RT XL reverse transcriptase was from TaKaRa (Tokyo, Japan). [α - 32 P] ATP was obtained from Izotop Ltd (Obninsk, Russia). Dynabeads oligo(dT)₂₅ and Dynabeads M-280 streptavidin were from DYNAL (Oslo, Norway). Alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit IgG were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 488 was obtained from Life technologies (Carlsbad, California, USA). RNase K Antibody (E-13) was obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, USA). Marker proteins for SDS/PAGE molecular weight estimation were obtained from Fermentas Life Sciences (Vilnius, Lithuania). All other reagents used were of analytical grade and were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Cell culture, stable transfections and RNAi

In the present study the following cell lines were used: BT-20 (human breast adenocarcinoma cell line), AGS (gastric adenocarcinoma), DU145 (prostatic carcinoma), HeLa (cervical carcinoma), SKOV-3 (ovarian carcinoma), HEK-293 (embryonic kidney) and U251 (glioma), Jurkatt (immortalized T lymphocytes), SH-SY5Y (neuroblastoma), Caco-2 (epithelial colorectal adenocarcinoma), BL41 (Burkitt lymphoma) and FM3 (melanoma) under optimal growth conditions according to ATCC (American Type Culture Collection) guidelines. All the above commercially available human cell lines were obtained from ATCC. The plasmid iK3-pRS (HuSHTM, OriGene) encodes the synthesis of an shRNA targeting the human RNase κ sequence 5'-GAGCAAGTCAGC-TACAACCTGTTTCATCGC-3'. As a control, a plasmid lacking the shRNA sequence was applied (pRS). 2 \times 10⁵ HEK-293 cells were seeded into six well plates and transfected with 5 μ g pRS or iK3 plasmid with Xfect Transfection Reagent (Clontech, CA, USA). For the selection of stably transfected cell clones cells were grown in full medium containing puromycin (0.5 μ g/mL) for 21 days. The efficiency of the knockdown was assessed on the mRNA level by quantitative RT-PCR (data not shown).

Northern blot analysis

Total RNA (20 μ g) extracted from various human cell lines using Trizol LS (Invitrogen) reagent were resolved by electrophoresis in 1.25% agarose gel containing 1.25 M phormaldehyde and transferred to a porablot NY plus Nylon membrane. The

membrane was hybridized with a 32 P-labelled probe corresponding to the previously isolated human RNase κ cDNA (accession number AM746459.1) at 42°C in ULTRAhyb buffer (Life Technologies, Carlsbad, California, U.S.). After hybridization, the membranes were washed and exposed to X-ray film at -80°C for 1 day with two intensifying screens.

Identification of RNase κ -02 ESTs

The dbEST (Expression Sequence Tags) database [48] on the National Center for Biotechnology Information World Wide Web server was searched by the TBLASTN application. Multiple sequence alignment was performed by the ClustalW2 program [49] using default parameters.

Isolation of the RNase κ -02 cDNA clone

Total RNA was prepared from cells and poly(A)⁺ RNA was isolated using Dynabeads oligo(dT)₂₅. Poly(A)⁺ RNA (1 μ g) was reversed transcribed by AMV RT XL using oligo(dT)₁₂₋₁₈ as primers at 45°C for 40 min, followed by an additional incubation at 55°C for 20 min. In order to isolate the RNase κ -02 cDNA, a modified version of a hybrid selection technique developed in our laboratory [50] was employed. A 5'-biotinylated DNA probe complementary to the nucleotides 1–287 portion of the previously submitted RNase κ cDNA (accession number AM746459.1) was synthesized by PCR. The biotinylated strand of the PCR product was attached to Dynabeads M-280 streptavidin and hybridized overnight to the single-stranded cDNAs at 42°C in ULTRAhyb buffer (Life Technologies). Following the hybridization, the beads were selected and washed twice in 2 \times SSC, 0.1% SDS, twice in 0.2 \times SSC, 0.1% SDS for 5 min each at 42°C and once in TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA) with 0.1% Tween-20 at room temperature. The collected beads were washed against 1 \times NEB2 buffer (New England Biolabs), resuspended in 20 μ L of the same buffer containing 3 Units of FatI and incubated at 55°C overnight under constant agitation. The selected hybrids were amplified by PCR using RNase κ – specific oligonucleotides NdeFalt (5'-ATG GTT GAG GCC GGG GCC A-3') and RH (5'-GAA GGG ATT CAG TCT CTC GC-3'). The PCR products were cloned into the pCR 2.1 cloning vector and the isolated clones were sequenced in both directions.

Relative quantitative expression analysis of RNase κ -01/ RNase κ -02 mRNA isoforms

Two micrograms of total RNA isolated from a series of human cell lines were reverse transcribed by M-MLV RT using an RNase κ specific reverse primer (RH: 5'-GAA GGG ATT CAG TCT CTC GC-3'). The reaction products were amplified for 10 cycles in a 50 μ L PCR reaction using the gene specific primers HumC1F (5'-GCG TCG CTC CTG AGC TGT GGG CCG AAG-3') and HumC5R (5'-GAG CCG AAC TTG GCT GAA AGA GAA GCC TCC-3'). Two aliquots (15 μ L each) of the PCR products were incubated overnight at 55°C with or without 1.5 Units of *FatI* in a 20 μ L reaction.

One milliliter of each of the above products was amplified by Real Time PCR using SYBR Green Chemistry and a set of internal RNase κ – specific primers (HumC3F: 5'-GAA GCT GGC CGC CAG CGG CAT CGT-3' and HumC4R 5'-GCC TGC AGC GAT GAA AGA GTT GTA GCT GAC TTG C-3'). The reactions were performed in an ABI PRISM 7500 sequence detection system (Applied Biosystems) including a denaturation step at 95°C for 5 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. A final step was carried out for the production of a dissociation curve to ensure that the desired

amplicon was detected and to confirm the absence of nonspecific products and/or primer dimers. Each reaction was performed in triplicate to evaluate data reproducibility and the whole procedure was repeated three times for each cell line.

The RNase κ -01/RNase κ -02 transcripts ratio into the amplified by regular PCR reaction cDNA pool was calculated by using the comparative ΔC_T method. In this method, $2^{-\Delta C_T}$ expresses the fold change in the expression of the target cDNAs between digested and non-digested samples. In digested samples, the C_T values correspond to the number of copies of RNase κ -02 cDNA whereas the C_T value in non-digested samples derives from both RNase κ populations. It should be noted that through Real-Time PCR control experiments using the above primer sets, the two cDNA isoforms are equally amplified and the linearity between the cDNA quantity and the C_T is validated for concentrations 10 to 10^8 copies/ μ l.

RNase κ -02 specific antibody production

A polyclonal antibody was raised against the 1–62 amino-terminal portion of the RNase κ -02 protein. To this end, this portion was expressed as a heterologous fusion protein with intein using the IMPACT-CN expression system, which utilizes an inducible self-cleavage activity to release the target protein from the affinity tag. The cDNA corresponding to the amino-terminal portion of RNase κ -02 was amplified using NdeI and XhoI-end specific primers (NdeI: 5'-ATG GTT GAG GCC GGG GCC A-3', XhoI: 5'-CTC GAC GCG CAC CAT GTA TTC CTT G-3'). The PCR products were ligated to the similarly digested pTYB1 vector, yielding the ExK-02N construct. *E. coli* ER2566 host cells transformed with ExK-02N expression vector were inoculated into Luria-Bertani (LB) medium supplemented with 50 mg/l ampicillin and incubated at 30°C with shaking (250 rpm). When OD₆₀₀ of the culture reached 0.5, IPTG was added to 0.3 mM final concentration and bacteria were harvested after a 6-hour induction period at 18°C. Cell pellets from 1 lit culture were resuspended in 20 ml of buffer A (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl) and sonicated (6×1 min cycle). The lysate was then centrifuged at 15,000 g for 15 min at 4°C. The fusion protein was purified by affinity chromatography through its chitin binding domain. The clarified extract was loaded onto a chitin column (1 ml) pre-equilibrated with buffer A and then washed with the same buffer. After quickly flushing the column with 3 bed volumes of buffer A containing 50 mM β -merkaptoethanol (cleavage buffer), the flow was stopped and the column remained at 4°C for 40 hours. The target peptide of RNase κ -02 was eluted by adding 2 bed volumes of cleavage buffer and the fractions containing the larger amount of the target peptide were pooled and used for the immunization of two rabbits. The polyclonal antibody (K02N) production was performed by Pacific Immunology and the collected serum was affinity purified against the target peptide.

Triton X-114 phase separation

Phase partition was performed according to the method of Bordier [51]. Briefly, HEK-293 cells were lysed in Triton X-114 cell lysis buffer (50 mM Tris pH 8.5, 150 mM NaCl, and 2%

precondensed Triton X-114 containing protease inhibitors) and the suspension was incubated on ice for 30 min with frequent vortexing. The solution was centrifuged at 10,000 g at 4°C for 15 min to sediment the pellet fraction (insoluble fraction). The supernatant was collected, and incubated for 30 min at 37°C to achieve phase partitioning. After centrifugation of the mixture at 5,000 g at 25°C for 15 min, the upper detergent-depleted (aqueous) phase and the lower detergent-enriched phase were carefully collected. The protein concentration in each of the three fractions was estimated according to Bradford [52], using bovine serum albumin as standard.

SDS/PAGE and Western blot analysis

Protein samples from Triton X-114 phase separation were analyzed by SDS /PAGE according to Laemmli [53] in 15% SDS polyacrylamide gels. For immunodetection, proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane [54], which was subsequently incubated with K02N affinity purified specific polyclonal antibody. Primary antibody-antigen complexes were detected using goat anti-rabbit IgG conjugated to alkaline phosphatase and developed by 5-bromo-4-chloro-indolyl phosphate / nitroblue tetrazolium. In a parallel control experiment, the blotted membrane was not incubated with a primary antibody.

Immunocytochemistry and fluorescence imaging

HEK-293 cells were grown to 50% confluence on glass coverslips under optimum growth conditions as proposed by ATCC. The cells were fixed in PBS containing 4% formaldehyde for 15 minutes in room temperature, washed with PBS and permeabilized with PBS buffer containing 0.25% Triton X-100 for 10 minutes at room temperature. After washing with PBS, cells were blocked in PBS containing 0.1% Tween 20 and 1% BSA at room temperature and immunostained with K02N antibody for 1 hour at room temperature. Protein reacting with antibody was visualized with rabbit matched Alexa-488 secondary antibody. Cells were then incubated with RNase A for 20 minutes at 37°C, washed with PBS and incubated with propidium iodide at final concentration 1 μ g/ml in PBS buffer for 4 minutes at room temperature to visualize nuclei. Fluorescence images of Alexa 488 were recorded with a confocal microscope (Confocal TE2000S/ECLIPSE C-1, Nikon, Tokyo, Japan) and appropriate filters for Alexa 488 with a 60× oil immersion objective lens. In parallel control experiments cells were not incubated with the primary antibody.

Acknowledgments

This work is part of Ph.D. thesis of Mr E. Karousis. The authors gratefully acknowledge Prof. Emmanuel G. Fragoulis and Assoc. Prof. Dido Vassilakopoulou for critical reading of the manuscript and Mrs Vasiliki Delitsikou for developing the RNAi knockdown cell lines.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EDK DCS. Performed the experiments: EDK. Analyzed the data: EDK DCS. Contributed reagents/materials/analysis tools: EDK DCS. Wrote the paper: EDK DCS.

References

- Pan Q, Shai O, Lee IJ, Frey BJ, Blencowe BJ (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* 40: 1413–1415.
- Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, et al. (2008) Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456: 470–476.
- Graveley BR (2001) Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet* 17: 100–107.
- Dou Y, Fox-Walsh KL, Baldi PF, Hertel KJ (2006) Genomic splice-site analysis reveals frequent alternative splicing close to the dominant splice site. *RNA* 12: 2047–2056.

5. Hiller M, Huse K, Szafranski K, Jahn N, Hampe J, et al. (2006) Single-nucleotide polymorphisms in NAGNAG acceptors are highly predictive for variations of alternative splicing. *Am J Hum Genet* 78: 291–302.
6. Hiller M, Platzter M (2008) Widespread and subtle: alternative splicing at short-distance tandem sites. *Trends Genet* 24: 246–255.
7. Hiller M, Nikolajewa S, Huse K, Szafranski K, Rosenstiel P, et al. (2007) TassDB: a database of alternative tandem splice sites. *Nucleic Acids Res* 35: D188–192.
8. Bradley RK, Merkin J, Lambert NJ, Burge CB (2012) Alternative splicing of RNA triplets is often regulated and accelerates proteome evolution. *PLoS Biol* 10: e1001229.
9. Mattick JS (2001) Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO Rep* 2: 986–991.
10. Zhang Y, Qu L (2009) Non-coding RNAs and the acquisition of genomic imprinting in mammals. *Sci China C Life Sci* 52: 195–204.
11. Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, et al. (2009) Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 458: 223–227.
12. Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Duttagupta R, et al. (2007) RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* 316: 1484–1488.
13. Bertone P, Stolc V, Royce TE, Rozowsky JS, Urban AE, et al. (2004) Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. *Science* 306: 2242–2246.
14. Nie L, Wu HJ, Hsu JM, Chang SS, Labaff AM, et al. (2012) Long non-coding RNAs: versatile master regulators of gene expression and crucial players in cancer. *Am J Transl Res* 4: 127–150.
15. Martianov I, Ramadass A, Serra Barros A, Chow N, Akoulitchev A (2007) Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature* 445: 666–670.
16. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, et al. (2010) The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell* 39: 925–938.
17. Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammamaparast N, Wang JK, et al. (2010) Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* 329: 689–693.
18. Tano K, Mizuno R, Okada T, Rakwal R, Shibato J, et al. (2010) MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes. *FEBS Lett* 584: 4575–4580.
19. Weakley SM, Wang H, Yao Q, Chen C (2011) Expression and function of a large non-coding RNA gene XIST in human cancer. *World J Surg* 35: 1751–1756.
20. Fu X, Ravindranath L, Tran N, Petrovics G, Srivastava S (2006) Regulation of apoptosis by a prostate-specific and prostate cancer-associated noncoding gene, PCGEM1. *DNA Cell Biol* 25: 135–141.
21. Petrovics G, Zhang W, Makarem M, Street JP, Connelly R, et al. (2004) Elevated expression of PCGEM1, a prostate-specific gene with cell growth-promoting function, is associated with high-risk prostate cancer patients. *Oncogene* 23: 605–611.
22. Huarte M, Rinn JL (2010) Large non-coding RNAs: missing links in cancer? *Hum Mol Genet* 19: R152–161.
23. Economopoulou MA, Fragoulis EG, Sideris DC (2007) Molecular cloning and characterization of the human RNase kappa, an ortholog of Cc RNase. *Nucleic Acids Res* 35: 6389–6398.
24. Rampias TN, Fragoulis EG, Sideris DC (2008) Genomic structure and expression analysis of the RNase kappa family ortholog gene in the insect *Ceratitis capitata*. *FEBS J* 275: 6217–6227.
25. Kiriti MN, Fragoulis EG, Sideris DC (2012) Essential cysteine residues for human RNase kappa catalytic activity. *FEBS J* 279: 1318–1326.
26. Salamov AA, Nishikawa T, Swindells MB (1998) Assessing protein coding region integrity in cDNA sequencing projects. *Bioinformatics* 14: 384–390.
27. Tadokoro K, Yamazaki-Inoue M, Tachibana M, Fujishiro M, Nagao K, et al. (2005) Frequent occurrence of protein isoforms with or without a single amino acid residue by subtle alternative splicing: the case of Gln in DRPLA affects subcellular localization of the products. *J Hum Genet* 50: 382–394.
28. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS (2009) Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet* 10: 155–159.
29. Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105–132.
30. Brusca JS, Radolf JD (1994) Isolation of integral membrane proteins by phase partitioning with Triton X-114. *Methods Enzymol* 228: 182–193.
31. Wong DM, Adeli K (2009) Microsomal proteomics. *Methods Mol Biol* 519: 273–289.
32. Schindler S, Szafranski K, Hiller M, Ali GS, Palusa SG, et al. (2008) Alternative splicing at NAGNAG acceptors in Arabidopsis thaliana SR and SR-related protein-coding genes. *BMC Genomics* 9: 159.
33. Iida K, Shionyu M, Suso Y (2008) Alternative splicing at NAGNAG acceptor sites shares common properties in land plants and mammals. *Mol Biol Evol* 25: 709–718.
34. Hiller M, Huse K, Szafranski K, Jahn N, Hampe J, et al. (2004) Widespread occurrence of alternative splicing at NAGNAG acceptors contributes to proteome plasticity. *Nat Genet* 36: 1255–1257.
35. Ermakova EO, Nurtudinov RN, Gelfand MS (2007) Overlapping alternative donor splice sites in the human genome. *J Bioinform Comput Biol* 5: 991–1004.
36. Hiller M, Szafranski K, Sinha R, Huse K, Nikolajewa S, et al. (2008) Assessing the fraction of short-distance tandem splice sites under purifying selection. *RNA* 14: 616–629.
37. Takeda H, Matsuzaki T, Oki T, Miyagawa T, Amanuma H (1994) A novel POU domain gene, zebrafish pou2: expression and roles of two alternatively spliced twin products in early development. *Genes Dev* 8: 45–59.
38. Yan M, Wang LC, Hymowitz SG, Schillbach S, Lee J, et al. (2000) Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors. *Science* 290: 523–527.
39. Xu Q, Belcastro MP, Villa ST, Dinkins RD, Clarke SG, et al. (2004) A second protein L-isoaspartyl methyltransferase gene in Arabidopsis produces two transcripts whose products are sequestered in the nucleus. *Plant Physiol* 136: 2652–2664.
40. Unoki M, Shen JC, Zheng ZM, Harris CC (2006) Novel splice variants of ING4 and their possible roles in the regulation of cell growth and motility. *J Biol Chem* 281: 34677–34686.
41. Vogan KJ, Underhill DA, Gros P (1996) An alternative splicing event in the Pax-3 paired domain identifies the linker region as a key determinant of paired domain DNA-binding activity. *Mol Cell Biol* 16: 6677–6686.
42. Raho G, Miranda C, Tamborini E, Pierotti MA, Greco A (2007) Detection of novel mRNA splice variants of human ING4 tumor suppressor gene. *Oncogene* 26: 5247–5257.
43. Tsai KW, Lin WC (2006) Quantitative analysis of wobble splicing indicates that it is not tissue specific. *Genomics* 88: 855–864.
44. Kung JT, Colognori D, Lee JT (2013) Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics* 193: 651–669.
45. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, et al. (2005) The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309: 1559–1563.
46. Beaulieu YB, Kleinman CL, Landry-Voyer AM, Majewski J, Bachand F (2012) Polyadenylation-dependent control of long noncoding RNA expression by the poly(A)-binding protein nuclear 1. *PLoS Genet* 8: e1003078.
47. Wilson LO, Spriggs A, Taylor JM, Fahr AM (2014) A novel splicing outcome reveals more than 2000 new mammalian protein isoforms. *Bioinformatics* 30: 151–156.
48. Boguski MS, Lowe TM, Tolstoshev CM (1993) dbEST—database for “expressed sequence tags”. *Nat Genet* 4: 332–333.
49. Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, et al. (2010) A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* 38: W695–699.
50. Rampias TN, Fragoulis EG, Sideris DC (2012) Efficient cloning of alternatively polyadenylated transcripts via hybridization capture PCR. *Curr Issues Mol Biol* 14: 1–8.
51. Bordier C (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem* 256: 1604–1607.
52. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
53. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
54. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350–4354.