



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**



ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΟΛΥΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΗΝΥΜΑΤΟΣ RNA ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

ΚΟΜΙΝΗ ΧΡΥΣΟΥΛΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018

Η διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε με υποτροφία του ΙΚΥ, η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών για μεταπτυχιακές σπουδές δεύτερου κύκλου σπουδών» από πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (Ε.Κ.Τ.) και του Ελληνικού Δημοσίου».



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΟΛΥΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΗΝΥΜΑΤΟΣ RNA ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

ΚΟΜΙΝΗ ΧΡΥΣΟΥΛΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018

Η διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε με υποτροφία του ΙΚΥ, η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών για μεταπτυχιακές σπουδές δεύτερου κύκλου σπουδών» από πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (Ε.Κ.Τ.) και του Ελληνικού Δημοσίου».

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα» (Ν. 5343/32, Παρ.2, Άρθρο 202).

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Ιωάννινα, 20 Σεπτεμβρίου 2018

ΟΜΟΤΙΜΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Θεώνη Τράγκα

Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 451 10

ΤΗΛΕΦΩΝΟ: (26510) 07917

e-mail: ttrangas@cc.uoi.gr

ΠΡΑΚΤΙΚΟ
ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ, ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Την Τρίτη, 18 Σεπτεμβρίου, ώρα 12:00μμ, στην αίθουσα Τηλεδιασκέψεων του Μεταβατικού κτιρίου, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της δημόσιας παρουσίασης, εξέτασης και αξιολόγησης της Διδακτορικής Διατριβής της υποψήφιας Διδάκτορος κας Χρυσούλας Κομίνη.

Την επταμελή εξεταστική επιτροπή, που συγκροτήθηκε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύνοψης (συνεδρία αριθμ. 253/16-05-2018), αποτελούν οι:

- | | |
|--------------------------|--|
| 1. Βελετζά Σταυρούλα | Καθηγήτρια Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΔΠΘ |
| 2. Μαρουλάκου Ιωάννα | Καθηγήτρια Γενετικής, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, ΔΠΘ |
| 3. Μαυρομαρά Πηνελόπη | Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, ΔΠΘ |
| 4. Μαραγκός Πέτρος | Αναπληρωτής Καθηγητής Αναπτυξιακής Βιολογίας, ΤΒΕΤ, Π.Ι |
| 5. Μιχαηλίδης Θεολόγος | Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής, ΤΒΕΤ, Π.Ι. |
| 6. Χατζηλουκάς Ευστάθιος | Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, ΤΒΕΤ, Π.Ι. |
| 7. Φίλιου Μιχάελα | Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας, ΤΒΕΤ, Π.Ι |

Αφού διαπιστώθηκε απαρτία σύμφωνα με τα οριζόμενα από το Νόμο 3685/2008, προσήλθε η κα Χρυσούλα Κομίνη, η οποία υποστήριξε στην Επιτροπή τη Διδακτορική της Διατριβή με τίτλο «*Διερεύνηση του ρόλου παραγόντων που συμμετέχουν στην διαδικασία πολυαδενυλίωσης του μηνύματος RNA στην*

ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού ». Της έγιναν ερωτήσεις από την επιτροπή, απαντήθηκαν και αποχώρησε. Στη συνέχεια, η επιτροπή έκρινε το πρωτότυπο του περιεχομένου της διδακτορικής διατριβής, την ουσιαστική συμβολή της στην επιστήμη, καθώς και την επάρκεια της υποψηφίου στο γνωστικό αντικείμενο της διατριβής της. Ακολούθησε ψηφοφορία όπου εγκρίθηκε η Διδακτορική Διατριβή και αποφασίστηκε ομόφωνα να απονεμηθεί το Διδακτορικό Δίπλωμα με βαθμό **ΑΡΙΣΤΑ**.

Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής

Βελετζά Σταυρούλα
Καθηγήτρια



Μαρουλάκου Ιωάννα
Καθηγήτρια



Μαυρομαρά Πηνελόπη
Καθηγήτρια



Μαραγκός Πέτρος
Αναπληρωτής Καθηγητής



Μιχαηλίδης Θεολόγος
Αναπληρωτής Καθηγητής



Χατζηλουκάς Ευστάθιος
Αναπληρωτής Καθηγητής



Φίλιου Μιχάελα
Επίκουρη Καθηγήτρια



Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Βιοχημείας Τράγκα Θεώνης.

Καθοριστικό ρόλο στην ολοκλήρωση αυτής της δουλειάς διαδραμάτισαν μια σειρά ανθρώπων στους οποίους θα ήθελα να αναφερθώ και να ευχαριστήσω.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω από την καρδιά μου την επιβλέπουσα, κα Τράγκα, της οποίας η επιστημονική καθοδήγηση, η στήριξη και η ενθάρρυνση αποτέλεσαν βασικά στοιχεία όλης αυτής της προσπάθειας. Το πραγματικό ενδιαφέρον και νοιάξιμο τόσο στο επιστημονικό όσο και στο προσωπικό επίπεδο, αποτέλεσαν κύριο χαρακτηριστικό αυτής της συνεργασίας και συνέβαλαν στο να γίνει αυτή η δουλειά αβίαστα και ευχάριστα.

Θα ήθελα επίσης να αναφερθώ και στην υπόλοιπη ομάδα του εργαστηρίου Βιοχημείας. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κονιδάρη Κώστα για την πραγματική προθυμία του να παρέχει βοήθεια ανά πάσα στιγμή καθώς και για τις συμβουλές του, κυρίως στο πειραματικό κομμάτι αυτής της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη συνεργασία τη Λαμπριανίδου Μάχη, με την οποία ξεκινήσαμε αυτή τη διαδρομή μαζί, η κάθε μια στη δική της προσπάθεια.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Βιολογίας Βελετζά Σταυρούλα και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας Χατζηλουκά Ευστάθιο που δέχτηκαν να συμμετέχουν στη τριμελή συμβουλευτική επιτροπή και να συμβάλλουν στην ολοκλήρωση αυτής της δουλειάς. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς επιτροπής, την Καθηγήτρια Γενετικής Μαρουλάκου Ιωάννα, την Καθηγήτρια Βιοχημείας Μαυρομαρά Πηνελόπη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αναπτυξιακής Βιολογίας Μαραγκό Πέτρο, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Γενετικής Μιχαηλίδης Θεολόγο, και την Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας Φίλιου Μιχαέλα, για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην κρίση της διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Ομότιμη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Νακοπούλου Λυδία, η οποία με δέχθηκε στο εργαστήριο της ώστε να πραγματοποιήσω τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας καθώς και τη Δρ. Θεοχάρη Ειρήνη για τη

συνεργασία και τη βοήθεια της τόσο στο θεωρητικό όσο και στο πειραματικό κομμάτι αυτών των πειραμάτων.

Ακόμη, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Ανοσολογίας Θυφρονήτη Γιώργο, στο εργαστήριο του οποίου πραγματοποιηθήκαν τα πειράματα κυτταροκαλλιιεργειών καθώς και αυτά της κυτταρομετρίας ροής. Η ευγενική αυτή φιλοξενία διευκόλυνε σημαντικά την ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να αναφερθώ στην εξαιρετική συνεργασία που υπάρχει ανάμεσα στα εργαστήρια του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών και να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά, υποψήφιους διδάκτορες ή τώρα πια διδάκτορες με τους οποίους συνεργαστήκαμε όλον αυτόν τον καιρό.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ την οικογένεια μου, το Γιώργο και τους φίλους μου για την αγάπη, τη στήριξη και την κατανόηση όλα αυτά τα χρόνια.

Συντμήσεις

3'RACE: 3' Rapid Amplification of cDNA Ends

5'ss: 5' splicing site

AGO2: Argonaute 2 protein

AREs: AU-rich elements

BPV: Bovine papillomavirus

BSA: Bovine serum albumin

CCND1: Cyclin D1

CDK: Cyclin-dependent kinase

CDS: Coding sequence

CFIIm: Cleavage factors II

CFIm: Cleavage factors I

CPSF: Cleavage and polyadenylation specificity factor

CRM: Cyclin recognition motif

CS: Cleavage site

CstF: Cleavage stimulation factor

CTD: Carboxy terminal domain

DAB: 3,3'-Diaminobenzidine

DCIS: Ductal carcinoma in situ

DMSO: Dimethylsulfoxide

DNTPs: Deoxyribonucleotides 5' triphosphate

DSE: Downstream sequence element

dsRNA: Double strand DNA

Συντμήσεις

ECL: Enhanced ChemiLuminescence

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

eIF4G: Eukaryotic Initiation Factor 4 G

E-PAT: Extension Poly(A) Test

ER: Estrogen receptor

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GREs: GU-rich elements

HER2: Human epidermal growth factor receptor 2

HRP: Horseradish peroxidase

IDC: *In situ* ductal carcinoma

IGF2BP1: Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1

ILC: *In situ* lobular carcinoma

iPSCs: Induced pluripotent stem cells

IRES: Internal ribosome entry

LB: Luria-Bertani θρεπτικό μέσο

LCIS: Lobular carcinoma *in situ*

NLS 1, 2: Nuclear localization signals

NOS: Not otherwise specified

NSG: Nottingham Grading System

PABP: Poly(A) binding protein

PABPC: Poly(A) binding protein cytoplasmic

PABPN1: Poly(A) binding protein nuclear1

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis

PAP: Poly(A) polymerase

PAPOLA: Poly(A) polymerase A

PAPOLB: Poly(A) polymerase B

PAPOLG: Poly(A) polymerase G

PARN: Poly(A) -specific ribonuclease

PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase

PAS: Polyadenylation signal

PCR: Polymerase chain reaction

PEI: Polyethylenimin

PI: Propidium iodide

PMF: Maturation/mitosis-promoting factor

PR: Progesterone receptor

PVDF: Polyvinylidene difluoride

RBP: RNA binding proteins

RISC: RNA-induced silencing complex

RNAi: RNA interference

RT-qPCR: Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

SDS: Sodium dodecyl sulfate

siRNA: Small interfering RNA

TAE: Tris-acetate-EDTA

TBS: Tris-buffered saline

TDLU: Terminal Ductal Lobular Unit

Συντμήσεις

TNF: Tumor Necrosis Factor

TNM: Tumor-Node-Metastasis

U1 snRNP: U1 small nuclear ribonucleoprotein

uORF: Upstream open reading frame

USE: Upstream Sequence Element

UTR: Untranslated region

ΧΛΛ: Χρόνια λεμφογενής λευχαιμία

ΧΜΛ: Χρόνια μυελογενής λευχαιμία

Περιεχόμενα

Γενικό μέρος

Περίληψη	1
Summary	5
I. Εισαγωγή	9
I.1. Καρκίνος	10
I.2. Μετα-μεταγραφική ρύθμιση	11
I.2.1. Σημαντικό κομμάτι της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης αποτελεί η πολυαδενυλίωση	12
I.2.1.1. Η σημασία της πολυαδενυλίωσης	12
I.2.1.1.2. Σύνδεση ανάμεσα στην πολυαδενυλίωση και τις υπόλοιπες διαδικασίες μορφοποίησης των mRNA	16
I.2.1.3. Η πολυαδενυλίωση των πρώιμων mRNA	18
I.2.1.3.1. <i>cis</i> -Αλληλουχίες αλληλεπίδρασης στο mRNA	19
I.2.1.3.2. Πρωτεϊνικοί παράγοντες (<i>trans</i> acting factors) της μοριακής μηχανής πολυαδενυλίωσης	20
I.2.1.4. Ο μηχανισμός της πολυαδενυλίωσης των mRNA	23
I.3. Εναλλακτική πολυαδενυλίωση	25
I.3.1. Εναλλακτική πολυαδενυλίωση στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA	25
I.3.2. Εναλλακτική πολυαδενυλίωση και βιολογικές διεργασίες	27
I.3.2.1. Εναλλακτική πολυαδενυλίωση και ιστοειδικότητα	27
I.3.2.2. Εναλλακτική πολυαδενυλίωση και ανάπτυξη – διαφοροποίηση	28
I.3.2.3. Εναλλακτική πολυαδενυλίωση και πολλαπλασιασμός	28
I.3.2.4. Εναλλακτική πολυαδενυλίωση και καρκίνος	30
I.3.3. Ρύθμιση της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης	31
I.3.3.1. Συμβολή των <i>cis</i> αλληλουχιών στην επιλογή του σήματος πολυαδενυλίωσης	31
I.3.3.2. Συσχέτιση παραγόντων πολυαδενυλίωσης με τη διαδικασία της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης	32
I.4. Η βιολογική σημασία της PAP αιτία του αυστηρού ελέγχου της	37
I.4.1. Μεταφραστικός έλεγχος	37
I.4.2. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις	38
I.5. Πολυ(A) πολυμεράση	40
I.5.1. Συσχέτιση PAP με επίπεδα πολλαπλασιασμού και καρκίνο	42

Περιεχόμενα

I.5.1.1. Αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης της PAP επηρεάζουν το ρυθμό ανάπτυξης των DT40 κυττάρων.....	42
I.5.1.2. Εμπλοκή της PAP στον καρκίνο	43
I.6. Καρκίνος του μαστού	43
I.6.1. Ανατομία μαστού	44
I.6.2. Κατηγοριοποίηση καρκίνου μαστού.....	45
I.6.2.1. Ιστολογική ταξινόμηση καρκινωμάτων μαστού	45
I.6.2.1.1. In situ καρκινώματα	47
I.6.2.1.2. Διηθητικά καρκινώματα μαστού.....	49
I.6.2.2. Ταξινόμηση καρκινωμάτων μαστού ανάλογα με το βαθμό κακοήθειας	50
I.6.2.3. Σταδιοποίηση καρκινωμάτων μαστού με εφαρμογή του συστήματος TNM	54
I.6.2.4. Μοριακή ταξινόμηση των καρκινωμάτων του μαστού	54

Ειδικό μέρος

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής	59
II. Υλικά & Μέθοδοι.....	61
II.1. Βιολογικό υλικό.....	62
II.1.1. Καρκινικοί ιστοί μαστού	62
II.1.2. Κυτταρικές σειρές	62
II.2. Ανοσοϊστοχημεία	63
II.3. Διαμόλυνση κυττάρων με μικρό παρεμβαλλόμενο RNA (siRNA) και πλασμιδιακό DNA.....	66
II.3.1. Αποσιώπηση της PAPOLA με εφαρμογή της μεθόδου παρεμβολής RNA (RNAi)	66
II.3.2. Υπερέκφραση του γονιδίου της PAPOLA	69
II.3.2.1. Χρήση πλασμιδιακών φορέων	69
II.3.2.2. Παρασκευή επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων Escherichia Coli και μετασχηματισμός με πλασμιδιακό DNA-Ανάπτυξη βακτηριακής καλλιέργειας	70
II.3.2.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	71
II.3.2.4. Διαμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA	72
II.4. Προσδιορισμός του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων	72
II.4.1. Μέτρηση των κυττάρων με αιμοκυττόμετρο	72
II.4.2. Χρώση κυττάρων με κρυσταλλικό ιώδες	74
II.5. Ανάλυση κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής.....	76

II.6. Μελέτη των επιπτώσεων της έκφρασης της PAPOLA στο μετασχηματισμό των καρκινικών κυττάρων μαστού.....	78
II.7. Απομόνωση ολικού RNA	79
II.8. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) σε ένα βήμα.....	81
II.8.1. Προετοιμασία αντίδρασης -Υπολογισμός των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων.	83
II.9. Σχετικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης της ορθόλογης και της εναλλακτικά πολυαδενυλιωμένης ισομορφής του mRNA της κυκλίνης D1.....	84
II.10. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδιου SDS-PAGE-Ανοσοαποτύπωση κατά WESTERN.....	86
II.10.1. Λύση κυττάρων-συλλογή ολικού εκχυλίσματος πρωτεΐνης.....	86
II.10.2. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο BRADFORD	87
II.10.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-PAGE	87
II.10.4. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης	89
II.10.5. Ανοσοαποτύπωση κατά Western	90
II.11. Ταυτοποίηση των ισομορφών mRNA της κυκλίνης D1 λόγω εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης με τη μέθοδο ενίσχυσης του 3' άκρου του cDNA: 3' RACE (3' Rapid Amplification of cDNA Ends)..	92
II.12. Προσδιορισμός του μήκους της πολυ(A) ουράς του mRNA της κυκλίνης D1 με τη μέθοδο E-PAT (Extension Poly(A) Test)	95
II.13. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης	100
II.13.1. Ηλεκτροφόρηση DNA.....	100
II.13.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης υψηλής διαχωριστικής ικανότητας.....	102
II.13.3. Ηλεκτροφόρηση RNA-Έλεγχος της ακεραιότητας του RNA.....	103
II.14. Απομόνωση PCR προϊόντων από πήκτωμα αγαρόζης.....	103
II.15. Έλεγχος της μορφολογίας του πυρήνα μέσω χρώσης με DAPI	104
II.16. Στατιστική ανάλυση	105
III. Αποτελέσματα	107
III.1. Πρότυπο έκφρασης της PAPOLA στον καρκίνο του μαστού βάση της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου	108
III.1.1. Συσχέτιση της έκφρασης της PAPOLA με κλινικοπαθολογικές και ιστολογικές παραμέτρους των καρκινωμάτων του μαστού	110

Περιεχόμενα

III.2. Αποσιώπηση του γονιδίου της PAPOLA οδηγεί σε αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του μαστού.....	114
III.3. Καταστολή της έκφρασης της PAPOLA μειώνει τα επίπεδα ανάπτυξης αποικιών σε ημιστερεό υλικό (soft agar)	122
III.4. Υπερέκφραση της PAPOLA οδηγεί σε αναστολή του πολλαπλασιασμού και κυτταρικό θάνατο στα MCF-7 και HEK 293	125
III.4.1. Υπερέκφραση της PAPOLA οδηγεί σε κατακερματισμό του DNA των κυττάρων παρουσία ενεργής κασπάσης 3	136
III.4.2. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA ενεργοποιούν το αποπτωτικό μονοπάτι στα MCF-7 και HEK 293 κύτταρα	137
III.5. Υπερέκφραση της PAPOLA προωθεί τον κυτταρικό κύκλο απουσία του λειτουργικού p53 στα MDA-MB 231 κύτταρα	137
III.6. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA ενισχύουν τον καρκινικό φαινότυπο των MDA-MB 231 κυττάρων	141
III.7. Η έκφραση της PAPOLA συνδέεται με δομικές αλλαγές στο mRNA της κυκλίνης D1.....	141
III.7.1. Μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA οδηγούν σε μεταβολές των επιπέδων έκφρασης της κυκλίνης D1.....	142
III.7.2. Η έκφραση της PAPOLA συμβάλλει στην επιλογή του σήματος πολυαδενυλίωσης του mRNA της CCND1	147
III.7.3. Μεταβολές στο μήκος της πολυ(A) ουράς του mRNA CCND1	150
III.8. Η αποσιώπηση της PAPOLA ενισχύει τη χημειοευαισθησία των MCF-7 κυττάρων στον αντικαρκινικό παράγοντα Paclitaxel	153
IV. Συζήτηση.....	157
IV.1. Έκφραση της πολυ(α) πολυμεράσης α στον καρκίνο του μαστού	160
IV.2. Μελέτη του βιολογικού ρόλου της PAPOLA στον καρκίνο του μαστού.....	162
IV.3. Η έκφραση της PAPOLA επηρεάζει τη διαμόρφωση του 3' άκρου του mRNA της CCND1...	165
Βιβλιογραφία	173

Περίληψη

Η προσθήκη της πολυ(Α) ουράς είναι καθοριστική και απαραίτητη για τις λειτουργίες των ώριμων μηνυμάτων mRNA, συμπεριλαμβανομένης της σταθερότητας, της μετατόπισης από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και της αποτελεσματικής μετάφρασης. Η θέση της πολυαδενυλίωσης καθορίζεται από συγκεκριμένες αλληλουχίες στην 3'αμετάφραστη περιοχή των μηνυμάτων. Πληθώρα μηνυμάτων φέρει στην 3'αμετάφραστη περιοχή περισσότερα από ένα σήματα πολυαδενυλίωσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή διαφορετικών ισομορφών mRNA ως προς το μήκος της 3'μετάφραστης περιοχής, λόγω της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης. Η παραγωγή μηνυμάτων RNA με βραχύτερες 3'αμετάφραστες περιοχές, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης της κωδικευμένης πρωτεΐνης, λόγω απομάκρυνσης αλληλουχιών αρνητικής ρύθμισης, όπως π.χ. θέσεις αναγνώρισης από miRNA. Το φαινόμενο της μαζικής εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης πιθανά οδηγεί στην υπερέκφραση ογκογονιδίων και έχει συσχετιστεί με την ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού και τον καρκινικό φαινότυπο.

Ως πιθανός μηχανισμός προτίμησης εναλλακτικών σημάτων πολυαδενυλίωσης έχει προταθεί η έκτοπη έκφραση όλων/ή κάποιων από τους παράγοντες που συμμετέχουν στην διαδικασία της πολυαδενυλίωσης.

Η πολυ(Α) πολυμεράση (PAP) αποτελεί σημαντική συνιστώσα της μετα-μεταγραφικής διαδικασίας της πολυαδενυλίωσης του mRNA, προσθέτοντας τα κατάλοιπα αδενοσίνης στο 3' άκρο τους. Η PAP εκφράζεται σε όλους τους ιστούς χωρίς να παρουσιάζει ιδιαίτερη διακύμανση στα επίπεδα έκφρασής της, γεγονός που δεν φαίνεται να ισχύει στον καρκίνο. Τα επίπεδα του mRNA που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του ενζύμου παρουσιάζονται αυξημένα στους καρκίνους του μαστού, του κόλον, των ωοθηκών και του παγκρέατος συγκριτικά με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς. Ταυτόχρονα, η ενεργότητα της PAP, παρατηρείται αυξημένη στις πιο επιθετικές μορφές καρκίνου του μαστού και έχει προταθεί ως ανεξάρτητος, δυσμενής προγνωστικός δείκτης σε ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες. Την πιο καλά μελετημένη ισομορφή του ενζύμου αποτελεί η πολυ(Α) πολυμεράση α (PAPOLA).

Περίληψη

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη του πιθανού **ρόλου της PAPOLA** στον καρκινικό φαινότυπο του καρκίνου του μαστού κα ταυτόχρονα η διερεύνηση των **πιθανών μηχανισμών** με τους οποίους η PAPOLA συνεισφέρει στην ανάπτυξη των χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων και τελικά στην καρκινογένεση.

Τα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA μελετήθηκαν μέσω εφαρμογής ανοσοϊστοχημείας σε καρκινώματα μαστού, όπου παρατηρήθηκε πυρηνικός εντοπισμός του ενζύμου σε όλους τους ιστολογικούς τύπους των καρκινωμάτων αλλά με μεγάλη διακύμανση στα επίπεδα έκφρασης. Η έκφραση της PAPOLA συσχετίστηκε ισχυρά με τον σποραδικό έναντι του οικογενούς καρκίνου, με τον τριπλά αρνητικό υπότυπο καρκίνου του μαστού, με το λοβιακό ιστολογικό τύπο, καθώς και με τα καρκινώματα που εμφανίζονται αρνητικά για προγεστερρονικούς υποδοχείς. Επιπλέον, ανάμεσα στους καλά διαφοροποιημένους όγκους (Grade I), η έκφραση της PAPOLA συσχετίστηκε με δυσμενείς παράγοντες πρόγνωσης, όπως το μέγεθος του όγκου, το προχωρημένο στάδιο της νόσου και επιπλέον τα χαμηλά ποσοστά επιβίωσης.

Ύστερα από την αποσιώπηση του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την PAPOLA στις καρκινικές σειρές μαστού MCF-7 και MDA-MB 231 διαπιστώθηκε αναστολή των επιπέδων πολλαπλασιασμού με ακόλουθη μετατόπιση των κυττάρων στη G_0/G_1 φάση του κυτταρικού κύκλου. Τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του ενζύμου οδήγησαν σε μείωση της ικανότητας των κυττάρων να αναπτύσσουν αποικίες σε ημι-στερεή καλλιέργεια, ανεξάρτητα της προσκόλλησης, υποδηλώνοντας τη μείωση ενός χαρακτηριστικού του μετασχηματισμού τους. Επιπλέον, προκαταρκτικά πειράματα επίδρασης στα κύτταρα με ελάχιστες συγκεντρώσεις του αντικαρκινικού παράγοντα Paclitaxel και ταυτόχρονη αποσιώπηση του γονιδίου της PAPOLA, έδειξαν ότι απουσία του ενζύμου παρατηρήθηκε αύξηση της χημειοευαισθησίας των κυττάρων.

Απροσδόκητα, η υπερέκφραση της PAPOLA στην καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7 οδήγησε σε αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, μετακίνηση τους στη G_2/M φάση του κυτταρικού κύκλου και επακόλουθο κυτταρικό θάνατο. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε σταθεροποίηση του ογκοκατασταλτικού παράγοντα p53. Τα MCF-7 κύτταρα λόγω μετάλλαξης δεν εκφράζουν το γονίδιο της κασπάσης 3 και συνεπώς ενώ η απόπτωση ενεργοποιείται δεν συνοδεύεται από βασικά χαρακτηριστικά όπως ο

κατακερματισμός του DNA κλπ. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του προϊόντος πέψης 89KDa της PARP, υποδεικνύοντας την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού. Στα HEK 293 κύτταρα, στα οποία το αποπτωτικό μονοπάτι εμφανίζει όλα τα συνοδά χαρακτηριστικά, η υπερέκφραση της PAPOLA οδήγησε σε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού και αύξηση του ποσοστού των νεκρών κυττάρων, ενώ ανάλυση με κυτταρομετρία ροής έδειξε μετατόπιση των κυττάρων στη G₂/M και SubG₁ φάση του κυτταρικού κύκλου. Η ύπαρξη SubG₁ πληθυσμού υποδηλώνει τον κατακερματισμό των πυρήνων των κυττάρων, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και ύστερα από χρώση τους με DAPI. Τέλος, η αύξηση των επιπέδων του προϊόντος πέψης της PARP επιβεβαίωσε την ύπαρξη αποπτωτικών κυττάρων ύστερα από την υπερέκφραση της PAPOLA. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η υπερέκφραση της PAPOLA αξιολογήθηκε ως πιθανή ενεργοποίηση ογκογονιδίου, μη ανεκτή από τα κύτταρα, οδηγώντας σε απόπτωση, πιθανώς εξαρτώμενη από το p53.

Η υπερέκφραση της PAPOLA στα καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB 231, δεν είχε ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο, πιθανά διότι φέρουν τη μεταλλαγμένη μορφή του γονιδίου του p53, αλλά αντιθέτως οδήγησε σε αύξηση του πολλαπλασιασμού και προώθηση του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του ενζύμου οδήγησαν σε δραματική αύξηση του μεγέθους των αποικιών των κυττάρων, όταν αυτά καλλιεργήθηκαν σε ημι-στερεή καλλιέργεια, ενισχύοντας ένα από τα χαρακτηριστικά των μετασχηματισμένων κυττάρων.

Με δεδομένο ότι στόχος της διατριβής αποτελούσε η διερεύνηση της συμμετοχής της PAPOLA στη διαμόρφωση του 3' άκρου των μηνυμάτων, εξετάστηκαν οι επιπτώσεις της αποσιώπησης και της υπερέκφρασης του ενζύμου στη δομή του mRNA και στα επίπεδα έκφρασης της κυκλινής D1 (CCND1). Η CCND1 επιλέχθηκε με δεδομένο ότι υφίσταται τη διαδικασία της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης με επιπτώσεις στα επίπεδα έκφρασης. Συγκεκριμένα, αποσιώπηση της PAPOLA οδήγησε σε μείωση των επιπέδων της CCND1, ενώ υπερέκφρασή της, όπου ήταν ανεκτή, σε αύξηση. Η συμμετοχή της CCND1 εν γένει στη διαμόρφωση του κυτταρικού κύκλου, πιθανά συνδέει τις αλλαγές αυτές στην έκφραση της πρωτεΐνης με τις μεταβολές που παρατηρήθηκαν στα επίπεδα πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων μαστού.

Περίληψη

Επιβεβαιώθηκε η παρουσία βραχείας ισομορφής mRNA στις κυτταρικές σειρές μαστού και στη συνέχεια ακολούθησε η ποσοτικοποίηση και των δυο ισομορφών. Τόσο κατά την αποσιώπηση όσο και την υπερέκφραση του γονιδίου, παρατηρήθηκαν μεταβολές στην αντιπροσώπευση της μεγάλου μήκους ισομορφής του mRNA της CCND1, η οποία παρουσιάστηκε αντιστρόφως ανάλογη των επιπέδων έκφρασης της PAPOLA. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν τη συμμετοχή της PAPOLA στην εναλλακτική πολυαδενυλίωση του mRNA της CCND1 και το φαινόμενο της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης ως τον πιθανό υπαίτιο μηχανισμό.

Εκτός από τις μεταβολές στο μήκος της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA της CCND1 που παρατηρήθηκαν, διερευνήθηκε η ύπαρξη πιθανών μεταβολών στο μήκος της πολυ(A) ουράς του μηνύματος, που ίσως να επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασής του. Κατά την αποσιώπηση της PAPOLA στα κύτταρα, η πολυ(A) ουρά του mRNA της CCND1 παρέμεινε ανεπηρέαστη, ενώ αντίθετα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου φαίνεται να είχαν ως αποτέλεσμα την επιμήκυνση των πολυ(A) αλυσίδων, πιθανά συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην αποτελεσματικότερη μετάφρασή του.

Τα αποτελέσματα επιπλέον έδειξαν ότι η μεγάλου μήκους ισομορφή mRNA της CCND1 συνοδεύεται από μια μικρότερου μήκους πολυ(A) ουρά σε αντίθεση με τη βραχεία ισομορφή η οποία φέρει μια μεγάλου μήκους αλυσίδα. Η σχέση αυτή ανάμεσα στο μήκος της 3' αμετάφραστης περιοχής και σε αυτό της πολυ(A) ουράς πιθανά συμβάλλει ως ένας μηχανισμός διατήρησης της ισορροπίας του συνολικού μήκους των μετάργραφων, με σκοπό την αποτελεσματικότερη μετάφραση.

Συμπερασματικά, η PAPOLA υπερεκφράζεται στον καρκίνο του μαστού και η έκφρασή της πιθανά να συμβάλλει στην ανάπτυξη των χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων, μέσω ενίσχυσης των επιπέδων έκφρασης, μεταξύ των άλλων της CCND1, ενδεχομένως μέσω της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης του mRNA και της επιμήκυνσης της πολυ(A) ουράς του. Σε κάθε περίπτωση, η έκφραση της PAPOLA ενδεχομένως να επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης και άλλων γονιδίων τα οποία φέρουν πολλαπλά σήματα πολυαδενυλίωσης στην 3' αμετάφραστη περιοχή, γεγονός που μεταβάλλει το φαινότυπο των κυττάρων.

Summary

The addition of the poly(A) tail is a necessary and crucial post-transcriptional modification and has been suggested to influence all aspects of mRNA metabolism, including mRNA stability, transport from the nucleus to the cytoplasm and translational efficiency. A great number of eukaryotic genes, such as CCND1, encode multiple mRNA isoforms with shorter 3' untranslated regions (3'UTRs), due to alternative polyadenylation (APA), leading to a potential escape from miRNAs and RNA binding proteins-mediated degradation and repression of protein synthesis. A possible scenario has been proposed in which the upregulation of some *trans*-acting factors increases the probability of the proximal poly (A) signal use. Either way, it is now clear that there is a strong correlation between global APA and increased proliferation and cancer and APA has been proposed as a mechanism of oncogene activation.

Poly(A) polymerase (PAP) belongs to the core of the polyadenylation machinery and is the enzyme responsible for the addition of the poly(A) tail at the 3' end of nearly all mRNA. It is expressed among all types of tissues and no significant variability of expression has been observed in normal cells. On the other hand, increased PAP mRNA levels have been recorded in various types of cancer, including that of breast, colon, ovaries and pancreas and high levels of PAP activity in breast cancer have been proposed as an independent unfavorable prognostic factor in node-negative breast cancer patients. Among PAPs, poly(A) polymerase α (PAPOLA) has been the most extensively investigated mammalian polyadenylating enzyme.

Our study aims to investigate any possible **contribution of PAPOLA** to the malignant phenotype of breast cancer and to elucidate the **possible mechanisms** through which PAPOLA may be involved in carcinogenesis.

PAPOLA expression levels were evaluated through immunohistochemical staining of breast cancer tissues. PAPOLA positive staining was observed in the nucleus in all histological subtypes of breast carcinomas, whereas its expression levels significantly varied among them. PAPOLA expression was strongly correlated with sporadic rather than familial breast cancer, triple negative breast cancer, lobular histological type and negative

Summary

for progesterone receptor samples. Furthermore, within the well differentiated, Grade I tumor category, PAPOLA was associated with adverse prognostic factors such as larger tumor's size, advanced TNM stage and also survival status.

Silencing PAPOLA in MCF-7 and MDA-MB 231 breast cancer cells resulted in reduction of proliferative rates and a higher fraction of cells in G₀/G₁ phase of cell cycle, as determined by flow cytometry. Moreover, cells lacking PAPOLA almost lost their ability to grow in an anchorage independent manner and form colonies in soft agar. Also, preliminary experiments showed that silencing PAPOLA increased breast cancer cells chemosensitivity to Paclitaxel, a well known anti-tumor drug.

Surprisingly, overexpressing PAPOLA in MCF-7 cells resulted in inhibition of proliferation followed by a significant increase in G₂/M phase of cell cycle and eventually cell death. Furthermore, a strong stabilization of the tumor suppressor factor p53 was observed. MCF-7 cells do not express caspase 3 and therefore apoptosis occurs in the absence of apoptotic hallmarks such as DNA fragmentation, SubG₁ population etc. Ectopic expression of PAPOLA in the cells resulted in cleavage of PARP and upregulation of the 89KDa fragment, a well known apoptotic marker. HEK 293 cells possess all the functional components of the apoptotic pathway and apoptosis occurs in a traditional way. In this case high expression levels of PAPOLA in addition to inhibition of proliferation and increased population of cells in G₂/M, a SubG₁ phase of cell cycle became apparent, demonstrating the fragmentation of cell's nucleus, a phenomenon that was also confirmed after DAPI staining. Once more, the activation of apoptosis was confirmed by the up regulation of cleaved PARP. Our results demonstrate that increased levels of PAPOLA cannot be tolerated by cells and might be recognized as oncogenic signal, activating the apoptotic pathway through p53 stabilization.

On the contrary, overexpressing PAPOLA in MDA-MB 231 cells, which carry a mutant isoform of p53, not only did not serve as a stressful signal but also promoted cell proliferation and the cell cycle. Moreover, high levels of the enzyme promoted the oncogenic transformation of the cells, as it dramatically increased the size of their colonies in soft agar.

Alterations of PAPOLA expression levels in MCF-7 and MDA-MB 231 cells affected the expression levels of CCND1 both in terms of mRNA and protein. Silencing PAPOLA led

to reduced CCND1 levels, whereas overexpression resulted in up regulation in the cells that could tolerate it. CCND1 is a key regulator of the cell cycle and therefore the observed fluctuation of its expression may be the underlying cause of the alterations in the proliferation levels of breast cancer cells correlating with PAPOLA levels.

In order to investigate whether PAPOLA contributes to CCND1 expression levels through promoting APA of its corresponding mRNA, the presence of the short CCND1 mRNA isoform in MCF-7 and MDA-MB 231 cells was confirmed and subsequently both isoforms were quantified. Low expression levels of PAPOLA resulted in lengthening of the 3' UTR of CCND1, whereas ectopic expression of the enzyme led to its shortening. These results indicated that PAPOLA contributes to the poly(A) signal selection of CCND1 mRNA and APA may be possible the underlying mechanism of its differential expression levels. Shorter transcripts produce substantially higher amounts of protein than do their full length counterparts.

Subsequently, the possibility that changes of the poly(A) tail length of CCND1 mRNA could also underlie the alterations of its expression upon PAPOLA silencing and overexpression, was investigated. No changes in the poly(A) tail length were observed in MCF-7 cells lacking PAPOLA, whereas high levels of the enzyme in MDA-MB 231 cells resulted in the lengthening of the poly(A) tail of both the short and the long mRNA isoform. The longer poly(A) tail detected, could also contribute to the up regulation of CCND1, along with APA. The poly(A) tail analysis also revealed an interesting information about the correlation between the 3' UTR length and that of poly(A) tail of CCND1. Long transcripts acquire a shorter poly(A) tail compared to alternative polyadenylated counterparts which carry a longer one. This relationship could be regarded as a possible mechanism for the regulation and maintenance of the total mRNA length, in order to be efficiently translated.

In conclusion, PAPOLA is overexpressed in breast cancer carcinomas and its expression contributed to the breast cancer phenotype and development. CCND1 expression levels seem to be determined by PAPOLA expression through the alterations recorded in the corresponding mRNA 3' end formation. Nevertheless, the possibility exists that the oncogenic potential of PAPOLA could be exerted by affecting the expression of additional mRNAs possessing multiple adenylation signals.

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I.1. Καρκίνος

Η καρκινογένεση είναι μια πολύπλοκη και πολυπαραγοντική διεργασία. Η ανάπτυξη του καρκίνου στηρίζεται στην εμφάνιση γενετικών μεταλλάξεων οι οποίες προοδευτικά οδηγούν στο μετασχηματισμό των φυσιολογικών σε κακοήθη κύτταρα. Παρόλα αυτά, η εμφάνιση γενετικών αλλαγών πιθανά αποτελεί μεταγενέστερο βήμα στον καταρράκτη γεγονότων που οδηγούν στην ογκογένεση. Πρωταρχικό γεγονός ενδεχομένως αποτελεί η ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω σημάτων προώθησης του κυτταρικού κύκλου (μιτογόνα ερεθίσματα). Με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα οδηγούνται σε μια κατάσταση ανεξέλεγκτης διαίρεσης, η οποία αδιαμφισβήτητα αποτελεί και το βασικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. Η διατήρηση των υψηλών επιπέδων πολλαπλασιασμού και η συνεχής κυτταρική διαίρεση σταδιακά έχουν ως αποτέλεσμα την συσσώρευση βλαβών στο DNA. Η συσσώρευση των βλαβών αυτών συμβάλλει στην περαιτέρω απόκτηση των ιδιοτήτων που χαρακτηρίζουν τα καρκινικά κύτταρα (Hanahan και Weinberg 2000, 2011).

Αυτά είναι:

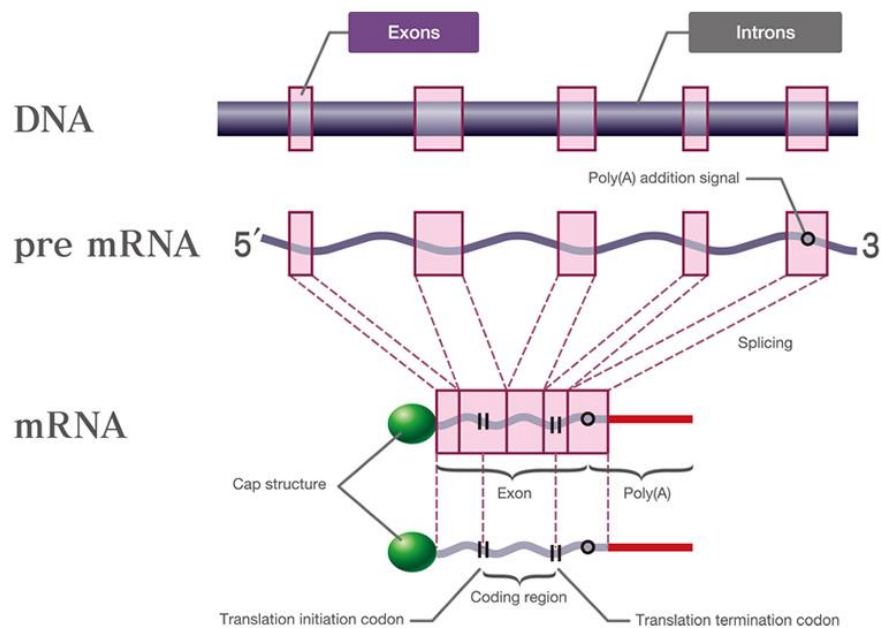
- Αθανатоποίηση –ατελεύτητοι πολλαπλασιασμοί
- Απώλεια της εξ επαφής αναστολής
- Καταστολή της απόπτωσης
- Ανεξαρτησία από αυξητικούς παράγοντες
- Μετάσταση/Αγγειογένεση
- Αυξημένη έκκριση πρωτεολυτικών ενζύμων
- Αυξημένη γλυκόλυση
- Γονιδιακή αστάθεια
- Αποφυγή ανοσολογικής καταστροφής
- Αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού
- Προαγωγή φλεγμονής

Όλες αυτές οι ιδιότητες συνδέονται με μεταβολές στην έκφραση ή στη λειτουργική κατάσταση των πρωτεϊνών εκείνων που είναι προϊόντα των γονιδίων, που αναφέρονται ως ογκογονίδια, όταν συμβάλλουν στον καρκινικό φαινότυπο και ως ογκοκατασταλτικά γονίδια όταν τον αναστέλλουν. Οι μεταβολές που ενεργοποιούν τα ογκογονίδια ή καταστούν ανενεργά τα ογκοκατασταλτικά μπορεί να είναι εκτεταμένες αλλαγές στο γενετικό υλικό, όπως η γονιδιακή επέκταση ογκογονιδίων, η απαλοιφή ογκοκατασταλτικών γονιδίων, οι χρωμοσωμικές μεταθέσεις που έχουν ως αποτέλεσμα μεταβολές στην έκφραση ή τη *de novo* δημιουργία χιμαιρικών πρωτεϊνών που δρουν ως προϊόντα ογκογονιδίων. Ακόμα η εμφάνιση σημειακών μεταλλάξεων καθιστούν ιδιοσυστατικά ενεργές τις ογκογόνες πρωτεΐνες ή ανενεργά τα ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Παρόλα αυτά, πολλές είναι οι περιπτώσεις κατά τις οποίες ενεργοποίηση ογκογονιδίων πραγματοποιείται χωρίς την εμφάνιση μεταλλάξεων στο γενετικό τους υλικό. Η ενεργοποίηση αυτή μπορεί να οφείλεται σε μεταβολές στους μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς γονιδιακής ρύθμισης, όπως η ωρίμανση του mRNA και η δημιουργία ισομορφών των μηνυμάτων καθώς και η επίδραση των miRNA στην σταθερότητα και μεταφρασιμότητά του. Είναι πλέον πολυάριθμα τα δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η διαμόρφωση του 3' άκρου των mRNA διαδραματίζει καίριο ρόλο στη καρκινογένεση και πιθανές μεταβολές επηρεάζουν το τελικό προϊόν της έκφρασης των γονιδίων, τις πρωτεΐνες και καθορίζουν τον φαινότυπο των κυττάρων.

1.2. Μετα-μεταγραφική ρύθμιση

Μετά τη μεταγραφή τα νέο-συντιθέμενα μηνύματα mRNA (pre-mRNA) υπόκεινται σε μια σειρά τροποποιήσεων ωρίμανσης ώστε να μπορούν να μεταφραστούν με σκοπό την παραγωγή του τελικού προϊόντος, τις πρωτεΐνες. Μέσω της ωρίμανσης τα ευκαρυωτικά mRNA αποκτούν ένα κάλυμμα (καλύπτρα) στο 5' άκρο τους, υπόκεινται στη σύνθετη διαδικασία του ματίσματος και τέλος τέμνονται σε καθορισμένο σημείο στο 3' άκρο τους και πολυαδενυλιώνονται (εικόνα 1). Οι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις αποτελούν σημαντικά σημεία ρύθμισης και ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης και πιθανές αλλαγές μπορεί να οδηγήσουν σε παθολογικές καταστάσεις (π.χ. ο καρκίνος).



Εικόνα 1: Μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις του mRNA που οδηγούν στην ωρίμανση και ρυθμίζουν την έκφραση του στο ευκαρυωτικό κύτταρο (CSLS-University of Tokyo).

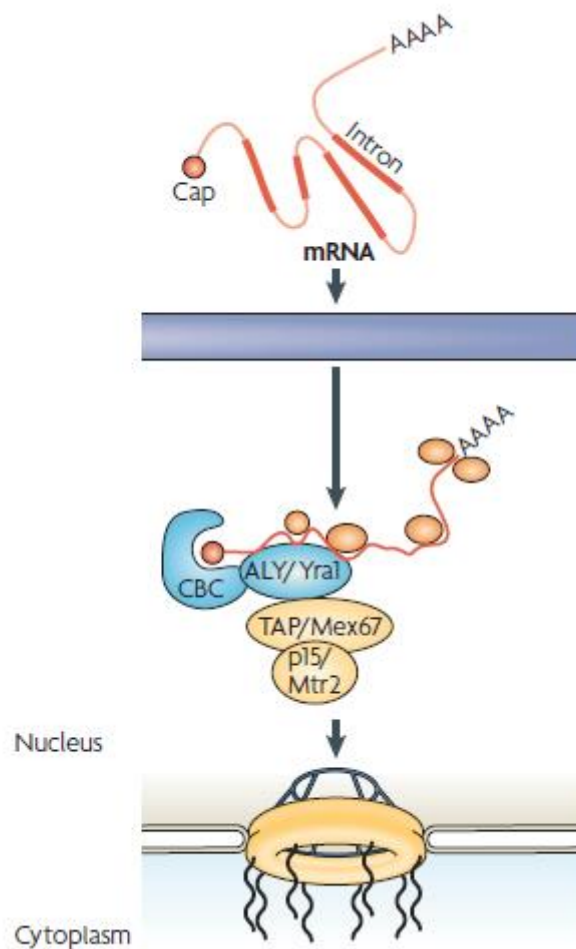
1.2.1. Σημαντικό κομμάτι της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης αποτελεί η πολυαδενυλίωση

1.2.1.1. Η σημασία της πολυαδενυλίωσης

Η μορφοποίηση του 3' άκρου των mRNA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ομαλή λειτουργία των οργανισμών και πιθανές διαταραχές στην διαδικασία επιφέρουν καταστροφικά αποτελέσματα όσον αφορά την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση (Zhao *et al.*, 1999).

Η πολυαδενυλίωση του mRNA είναι απαραίτητη για την εξαγωγή του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Vinciguerra *et al.*, 2004) (εικόνα 2). Η ουρά του πολυ(A) αλληλεπιδρά με πρωτεϊνικούς παράγοντες της διαδικασίας εξόδου του mRNA και η προσθήκη της είναι απαραίτητη ώστε αυτό να εξέλθει του πυρήνα. Πειράματα μεταλλάξεων των παραγόντων πολυαδενυλίωσης αλλά και των ρυθμιστικών αλληλουχιών στο mRNA έχουν ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εξόδου του στο κυτταρόπλασμα (Hammell *et al.*, 2002). Επιπλέον, η υποκατάσταση του σημείου πέψης

στο mRNA ύστερα από την οποία ακολουθεί η προσθήκη της πολυ(A) ουράς, συνεπάγεται την αναστολή της πολυαδενυλίωσης με ταυτόχρονη μεταβολή της αναλογίας της συγκέντρωσης του πυρηνικού προς το κυτταροπλασματικό mRNA κατά 10 φορές, καταδεικνύοντας την αναστολή της εξόδου από τον πυρήνα (Huang *et al.*, 1996). Αιτία του γεγονότος αυτού αποτελεί η αλληλεπίδραση της πολυ(A) ουράς με πρωτεϊνικούς παράγοντες της διαδικασίας εξόδου του mRNA ώστε αυτό να εξέλθει του πυρήνα.



Εικόνα 2: Γραφική αναπαράσταση της διαδικασίας της εξόδου του mRNA από τον πυρήνα. Περιγράφονται χαρακτηριστικές δομές του mRNA, όπως η καλύπτρα, η πολυ(A) ουρά καθώς και πρωτεΐνες προσαρμοστές και πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA (πορτοκαλί σφαίρες) (Köhler *et al.*, 2007).

Επιπλέον, η προσθήκη της πολυ(A) ουράς συμβάλλει στη σταθερότητα των μηνυμάτων (Wilusz *et al.*, 2004), αναστέλλοντας την αποικοδόμηση τους μέσω

προστασίας του 3' άκρου από το οποίο και ξεκινά (Wickens *et al.*, 1997). Οι μεγάλοι μήκους ουρές σταθεροποιούν το μετάγραφο στο κυτταρόπλασμα, ακολουθώντας όμως σταδιακή μείωση του μεγέθους τους, η οποία πέραν ενός ορισμένου σημείου έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του. Η αποαδενυλίωση του mRNA αποτελεί τον κύριο τρόπο αποικοδόμησής του καθορίζοντας το χρόνο ημι-ζωής των μηνυμάτων (Meyer *et al.*, 2004, Parker *et al.*, 2004) και πραγματοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης ειδικών αλληλουχιών του mRNA και διαφόρων πρωτεϊνών πρόσδεσης RNA (RBPs), οι οποίες στη συνέχεια προσελκύουν αποαδενυλάσες, όπως η PARN (Poly(A) ribonuclease) και το σύμπλοκο CCR4–NOT. Αφού το mRNA αποαδενυλιωθεί και ταυτόχρονα χάσει την καλύπτρα στο 5' άκρο, εξωριβονουκλεάσες καθώς και το σύμπλοκο του εξωσώματος το αποικοδομούν με κατεύθυνση 3-5 (εικόνα 3). Η αποαδενυλίωση δεν εξυπηρετεί μόνο την αποικοδόμηση μηνυμάτων που πλέον δεν είναι απαραίτητα για το κύτταρο. Η σταδιακή απομάκρυνση της πολυ(A) ουράς μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία σταθερών μεταγράφων τα οποία όμως δεν μπορούν να μεταφραστούν αλλά είναι απαραίτητο να βρίσκονται άμεσα διαθέσιμα προς μετάφραση. Αυτά αποθηκεύονται σε μια ανενεργή μορφή και μπορούν να ενεργοποιηθούν μέσω της πολυαδενυλίωσης, που αυτή τη φορά πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα (Mendez και Richter 2001). Χαρακτηριστική εφαρμογή αυτής της κατάστασης αποτελεί η άμεση ανταπόκριση σε ερεθίσματα όπως η φλεγμονή, η ανάγκη για επιτόπια μετάφραση π.χ. στους νευρώνες ή όταν η μεταγραφή δεν υφίσταται όπως στα γαμετικά κύτταρα και τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης.

Σε κάθε περίπτωση, αλλαγές στην ουρά του πολυ(A) εξυπηρετούν στον έλεγχο της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος, λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι το μήκος της επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τα διάφορα είδη mRNA.

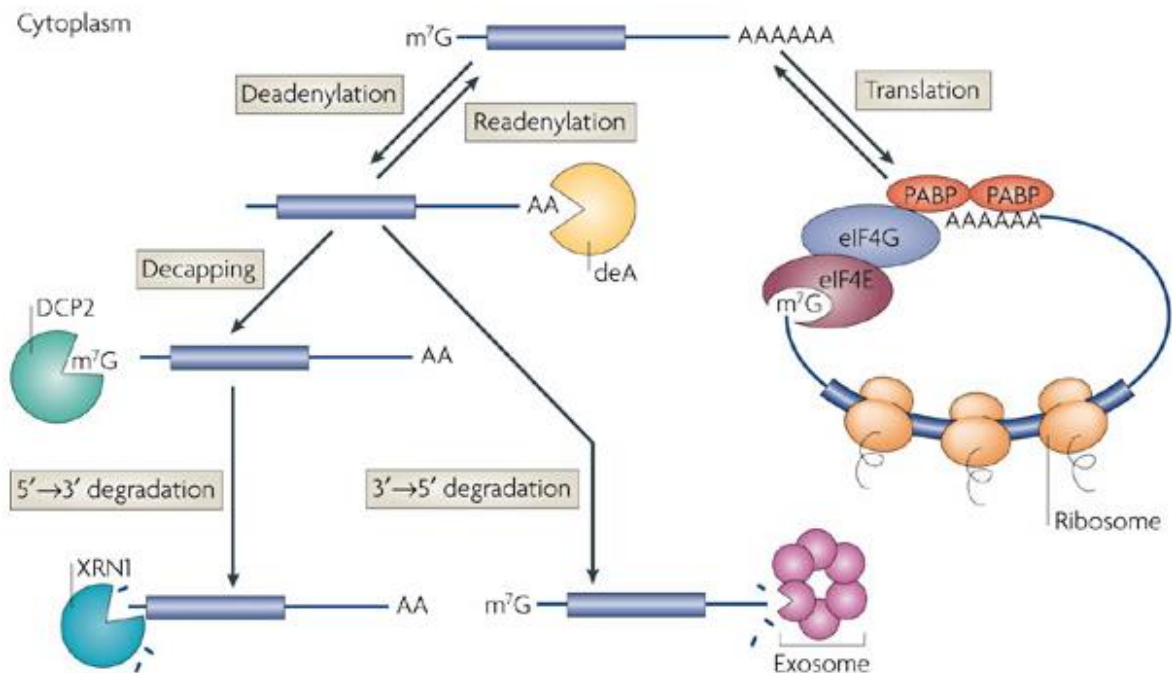
Ταυτόχρονα, η πολυ(A) ουρά είναι απαραίτητη για την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης και την παραγωγή των πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην αλληλεπίδραση της ουράς με την καλύπτρα στο 5' άκρο, που έχει ως αποτέλεσμα την κυκλοποίηση του mRNA, με τη βοήθεια της PABP (Poly(A) binding protein) και του παράγοντα της μετάφρασης eIF4G (eukaryotic Initiation Factor 4 G), ο οποίος βρίσκεται προσδεδεμένος στην καλύπτρα του 5' άκρου (εικόνα 3) (Wilusz *et al.*, 2001, Sachs *et al.*, 1997). Η αλληλεπίδραση αυτή καθώς και η επακόλουθη κυκλοποίηση προσελκύουν τη

μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος και στη συνέχεια τους υπόλοιπους παράγοντες της μετάφρασης (εικόνα 3). Επιπλέον του παραπάνω μηχανισμού, η πολυ(Α) ουρά φαίνεται να προωθεί και την επαγόμενη από την IRES (Internal ribosome entry) περιοχή μετάφρασης. Στις περιπτώσεις που η μετάφραση των mRNA πραγματοποιείται ανεξάρτητα της καλύπτρας στο 5' άκρο, η υπομονάδα 40S του ριβοσώματος προσελκύεται απευθείας στην IRES περιοχή του μετάγραφου από όπου και ξεκινά, ανεξάρτητα του παράγοντα PABP καθώς και του eIF4G και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης (Thoma *et al.*, 2004). Πειράματα στο μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, έχουν δείξει ότι η παρουσία και μόνο της πολυ(Α) ουράς είναι αρκετή για να ξεκινήσει η διαδικασία της μετάφρασης ενώ η ταυτόχρονη ύπαρξη και της καλύπτρας στο 5' άκρου του mRNA απαιτείται για να ολοκληρωθεί (Preiss *et al.*, 1998). Διάφορες μελέτες υποστηρίζουν ότι η αποτελεσματικότητα της μετάφρασης είναι ανάλογη του μήκους της πολυ(Α) ουράς και συνεπώς μετάγραφα με μακριές ουρές μεταφράζονται καλύτερα από αυτά με βραχείς (Preiss *et al.*, 1998, Beilharz *et al.*, 2007). Αν και ο μηχανισμός για αυτό το αποτέλεσμα δεν έχει διευκρινιστεί, πιθανά το μεγάλο μήκος της πολυ(Α) ουράς να επιτρέπει εκτεταμένη αλληλεπίδραση ανάμεσα στους παράγοντες της μετάφρασης και αυτούς της πολυαδενυλίωσης. Η σχέση αυτή ανάμεσα στο μήκος της πολυ(Α) ουράς και τη μεταφρασιμότητα των μηνυμάτων αποτελεί το γενικό κανόνα, υπάρχουν όμως και δεδομένα που υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα έκφρασης μπορεί να είναι ανεξάρτητα του μήκους αυτής. Συγκεκριμένα, επώαση διαφόρων κυτταρικών σειρών με κορδουσεπίνη, ένα ανάλογο αδενοσίνης που αναστέλλει τη σύνθεση της πολυ(Α) ουράς, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του μήκους της ουράς στο mRNA του *c-myc*, χωρίς όμως την ακόλουθη μείωση της μεταφρασιμότητας του, με τα επίπεδα της πρωτεΐνης να παραμένουν υψηλά (Ioannidis *et al.*, 1999). Είναι γνωστό από προηγούμενα δεδομένα ότι η ολιγοαδενυλιωμένη μορφή του mRNA του *c-myc* οδηγεί σε αύξηση της σταθερότητας του (Ioannidis *et al.*, 1996) και η μείωση της πολυ(Α) ουράς παρουσία κορδουσεπίνης διατηρεί τη σταθερότητα του μηνύματος σε αυτά τα επίπεδα, χωρίς να παρατηρείται αύξηση της σταθερότητας της πρωτεΐνης. Η αναντιστοιχία αυτή ανάμεσα στα επίπεδα του mRNA και της αντίστοιχης πρωτεΐνης μπορεί να οφείλεται στο γεγονός, ότι μόνο ένας μικρός αριθμός μορίων mRNA μεταφράζεται σε κάθε δεδομένη στιγμή στο κύτταρο και συνεπώς η μείωση των επιπέδων του μηνύματος να

Εισαγωγή

μην προλαβαίνει να επηρεάσει τα επίπεδα της πρωτεΐνης (Ioannidis *et al.*, 1999, Lima *et al.*, 2017).

Τέλος, η μορφοποίηση του 3' άκρου αποτελεί σύνδεσμο ανάμεσα στις διαδικασίες της μεταγραφής και του ματίσματος, όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

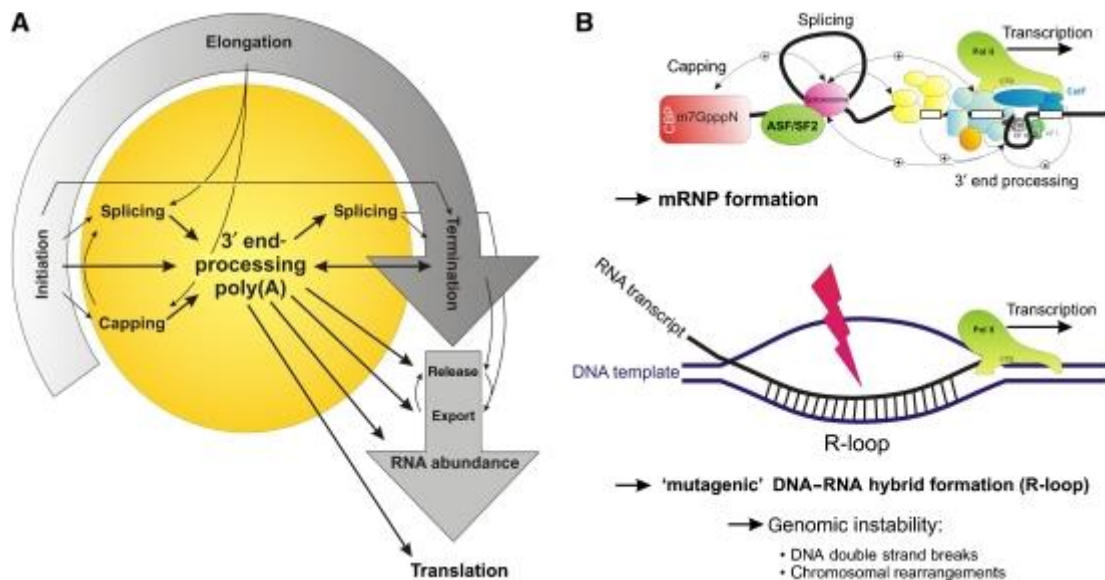


Εικόνα 3: Το μονοπάτι της αποικοδόμησης και της μετάφρασης του mRNA και ο ρόλος της πολυ(A) ουράς. (Goldstrohm και Wickens, 2008).

1.2.1.2. Σύνδεση ανάμεσα στην πολυαδενυλίωση και τις υπόλοιπες διαδικασίες μορφοποίησης των mRNA

Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων στο επίπεδο του RNA στηρίζεται στη σύνδεση και αλληλεπίδραση μιας σειράς μοριακών μηχανισμών που αφορούν την πολυαδενυλίωση του mRNA, τη μεταγραφή και την σχεδόν ταυτόχρονη διαδικασία του ματίσματος και της προσθήκης της καλύπτρας στο 5' άκρο. Δημιουργείται έτσι ένα δίκτυο, τα συστατικά του οποίου δρουν συνδυαστικά και συνεργατικά, με σκοπό τη

βελτιστοποίηση της αποτελεσματικότητας και της εξειδίκευσης κάθε ενζυματικής αντίδρασης (εικόνα 4).



Εικόνα 4: Παρουσίαση των δικτύων μορφοποίησης του mRNA με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. **A.** Τα τρία στάδια της μεταγραφής (έναρξη, επιμήκυνση, λήξη) συνδέονται άρρηκτα με τις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις του mRNA, **B, Γ.** Η σύνδεση των μετα-μεταγραφικών διαδικασιών προωθεί τη συγκρότηση του mRNA σε ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια και αποτρέπει τη δημιουργία δομών που οδηγούν σε θραύσεις του DNA (Danckvardt et al., 2008).

Για την έναρξη της μεταγραφής προϋπόθεση αποτελεί η αλληλεπίδραση του συμπλόκου της πολυαδενυλίωσης με την RNA πολυμέραση II και μεταγραφικούς παράγοντες. Επιπλέον, η διαδικασία τερματισμού της μεταγραφής ξεκινά όταν η RNA πολυμεράση συναντήσει το σήμα πολυαδενυλίωσης στο mRNA (Proudfoot et al., 2002, Rosonina et al., 2006) και ακολούθως η καρβοξυτελική περιοχή της (CTD: Carboxy terminal domain) μεταφέρει τους παράγοντες πολυαδενυλίωσης CPSF και CstF στις θέσεις πρόσδεσής τους. Κομβικό σημείο για την επίτευξη της διαδικασίας αυτής αποτελεί η φωσφορυλίωση των καταλοίπων σερίνης της CTD (Ahn et al., 2004). Επιπρόσθετα, παράγοντες που συμμετέχουν στη διαδικασία πέψης του ιντρονίου που βρίσκεται στην

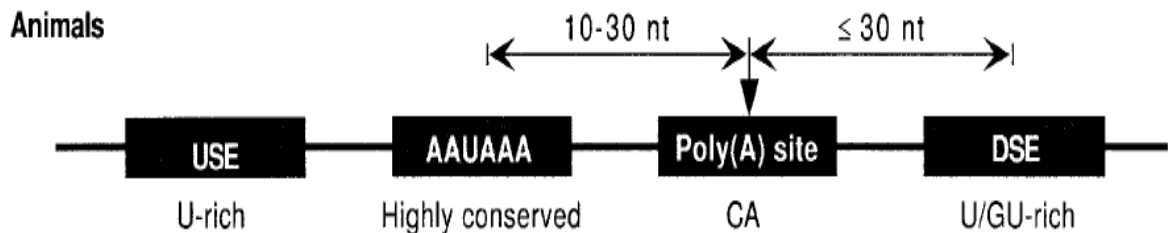
3'αμετάφραστη περιοχή (3'UTR) του mRNA αλληλεπιδρούν με τους παράγοντες πολυαδενυλίωσης ώστε να ολοκληρωθεί τόσο η διαδικασία του ματίσματος της περιοχής όσο και της πολυαδενυλίωσης (Niwa *et al.*, 1990, Gunderson *et al.*, 1997, Millevoi *et al.*, 2002, 2006, Danckwardt *et al.*, 2007). Το δίκτυο αλληλεπίδρασης των παραπάνω μηχανισμών διασφαλίζει ταυτόχρονα και την ορθότητα του τρόπου της τροποποίησης του mRNA μέσω αλλαγών στον τρόπο αλληλεπίδρασης των παραγόντων αλλά και των σημείων πρόσδεσής τους στην 3'αμετάφραστη περιοχή. Μέσω του ελέγχου αυτού επιτυγχάνεται τόσο η επιλογή των σωστών θέσεων ματίσματος όσο και η αποτελεσματικότητα και η ακρίβεια της προσθήκης της πολυ(A) ουράς, ενώ ταυτόχρονα πιθανά τα χρωμοσώματα προστατεύονται από καταστροφικές αλλαγές λόγω της αλληλεπίδρασης του πρόδρομου mRNA με το DNA εκμαγείο (Li και Manley, 2006) (εικόνα 4). Ως εκ τούτου, η αποδοτικότητα της πολυαδενυλίωσης και η αποτελεσματική αλληλεπίδραση των παραγόντων πολυαδενυλίωσης με τους υπόλοιπους παράγοντες μορφοποίησης του mRNA επηρεάζει σημαντικά τη γονιδιακή έκφραση και συνεπώς τη βιωσιμότητα και την ανάπτυξη των κυττάρων.

1.2.1.3. Η πολυαδενυλίωση των πρώιμων mRNA

Η μορφοποίηση του 3'άκρου των ευκαρυωτικών mRNA είναι μια μετα-μεταγραφική διαδικασία κατά την οποία σχεδόν όλα τα πρώιμα μετάγραφα αποκτούν μια ουρά περίπου 250 καταλοίπων αδενοσίνης στο 3'άκρο τους. Τα μοναδικά μετάγραφα τα οποία δεν πολυαδενυλιώνονται κωδικοποιούν τις ιστόνες. Η σύνθετη αυτή διαδικασία της πολυαδενυλίωσης πραγματοποιείται από μια μοριακή μηχανή, αποτελούμενη από έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών παραγόντων (*trans factors*), η οποία τέμνει και πολυαδενυλιώνει το μετάγραφο, αφού πρώτα αλληλεπιδράσει με καθορισμένες αλληλουχίες (*cis elements*) που βρίσκονται σε αυτό (Mandel *et al.*, 2008). Η πολυαδενυλίωση του mRNA συμβάλλει στην έξοδο του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, στη σταθερότητα και στην ενίσχυση της μετάφρασης. Η διαδικασία της πολυαδενυλίωσης λαμβάνει χώρα κυρίως στον πυρήνα αλλά σε πολλές περιπτώσεις πραγματοποιείται και στο κυτταρόπλασμα την κάθε χρονική στιγμή, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

1.2.1.3.1. *cis*-Αλληλουχίες αλληλεπίδρασης στο mRNA

Συγκεκριμένες αλληλουχίες που βρίσκονται στην 3'αμετάφραστη περιοχή του πρόδρομου mRNA καθορίζουν την αποτελεσματικότητα της πολυαδενυλίωσης (εικόνα 5).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση των *cis* αλληλουχιών της 3'αμετάφραστης περιοχής του mRNA. USE: upstream enhancer, DSE: downstream element; CA: cleavage site, (Zhao *et al.*, 1999).

➤ Σήμα πολυαδενυλίωσης (PAS, Polyadenylation signal)

Πρόκειται για μια εξαιρετικά συντηρημένη αλληλουχία 6 νουκλεοτιδίων, **AAUAAA**, η οποία βρίσκεται περίπου 10-30 νουκλεοτίδια πριν το σημείο τομής (**CS, cleavage site**) του μηνύματος (Manley, 1988) και θεωρείται ως η κύρια αλληλουχία ανοδικά αυτού. Μεταλλάξεις που οδηγούν στην απαλοιφή του PAS έχουν ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της πολυαδενυλίωσης (Fitzgerald *et al.* και Shen *et al.*, 1981), ενώ σημειακές μεταλλάξεις στην αλληλουχία αυτή οδηγούν σε δραματική μείωση της αποτελεσματικότητας της διαδικασίας (Sheets *et al.*, 1990, Wilusz *et al.*, 1989). Ταυτόχρονα, η αλληλουχία AAUAAA λειτουργεί ως σημείο απευθείας πρόσδεσης του παράγοντα πολυαδενυλίωσης CPSF (cleavage polyadenylation specificity factor) (Keller *et al.*, 1991, Murthy και Manley, 1992).

➤ Αλληλουχία DSE (Downstream sequence element)

Μια δεύτερη αλληλουχία, η οποία βρίσκεται περίπου 30 νουκλεοτίδια καθοδικά του σημείου πέψης αποτελεί ρυθμιστή της διαδικασίας της πολυαδενυλίωσης. Αποτελείται είτε από μια μικρή περιοχή πλούσια σε ουρακίλη (U-rich element) είτε από μια περιοχή

πλούσια σε γουανίνη και ουρακίλη (GU-rich element) η οποία συνήθως ακολουθεί το μοτίβο YGUGUUY (Y: πυριμιδίνη) (McLauchlan *et al.*, 1985). Μεταλλάξεις που οδηγούν σε έλλειψη της αλληλουχίας αυτής μειώνουν την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης (Gil και Proudfoot, 1987, Sadofsky *et al.*, 1985 Rynen *et al.*, 1989).

➤ **Σημείο πέψης CS (Cleavage Site)**

Συνίσταται από το δινουκλεοτίδιο CA. Το σημείο εντοπισμού του καθορίζεται από την απόσταση ανάμεσα στο PAS και το DSE και τοποθετείται τουλάχιστον 11-23 νουκλεοτίδια μακριά από το πρώτο (Chen *et al.*, 1995).

➤ **Αλληλουχία USE (Upstream Sequence Element)**

Πρόκειται για περιοχές πλούσιες σε ουρακίλη (U-rich) (Brackenridge *et al.*, 1998, Moreira *et al.*, 1995) οι οποίες δρουν ενισχυτικά της αποτελεσματικότητας της διαδικασίας της πολυαδενυλίωσης.

1.2.1.3.2. Πρωτεϊνικοί παράγοντες (*trans* acting factors) της μοριακής μηχανής πολυαδενυλίωσης

Πάνω από 80 πρωτεΐνες συμμετέχουν στη διαδικασία πολυαδενυλίωσης του mRNA και αλληλεπιδρούν τόσο μεταξύ τους όσο και με τις ρυθμιστικές αλληλουχίες του μηνύματος, καταδεικνύοντας την πολυπλοκότητα της διαδικασίας. Περίπου 20 από αυτές αποτελούν τον πυρήνα της μοριακής μηχανής πολυαδενυλίωσης με τις υπόλοιπες να δρουν επικουρικά (Mandel *et al.*, 2008). Η δομή τους είναι αρκετά συντηρημένη μεταξύ των ειδών και κάποιες από αυτές αποτελούν στην ουσία ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Ακολούθως, περιγράφονται τα βασικά χαρακτηριστικά των παραγόντων αυτών:

➤ **CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor)**

Το σύμπλοκο αναγνωρίζει και προσδένεται απευθείας στο PAS. Αποτελείται από 6 υπομονάδες (WDR33, CPSF30, CPSF160, hFip1, CPSF100 και CPSF73) οι οποίες είναι απαραίτητες για την πέψη του μηνύματος, ενώ οι 4 από αυτές σχετίζονται με την προσθήκη της πολυ(A) ουράς (Schonemann *et al.*, 2014).

➤ **CstF (cleavage stimulation factor)**

Αποτελείται από 3 υπομονάδες (CstF77, CstF64 και CstF50) και αναγνωρίζει και προσδένεται στην αλληλουχία DSE στο mRNA. Προσελκύεται στην 3'αμετάφραστη περιοχή και στη διαδικασία της πολυαδενυλίωσης από τον CPSF.

➤ **CFIm και CFII (cleavage factors I and II)**

Το σύμπλοκο CFIm αποτελείται από 4 υπομονάδες (CFIm25, CFIm68, CFIm59 και CFIm72). Αλληλεπιδρά με μια συγκεκριμένη αλληλουχία UGUAA της USE περιοχής ανοδικά του PAS (Brown *et al.*, 2003). Ο λιγότερο καλά χαρακτηρισμένος παράγοντας πολυαδενυλίωσης είναι ο CFII. Αποτελείται από δύο κλάσματα, το CFIIA, το οποίο και συμμετέχει στην πέψη του mRNA και το CFIIB, το οποίο μέχρι στιγμής είναι γνωστό ότι έχει ενισχυτικό ρόλο για τη ολοκλήρωσή της.

➤ **Συμπλεκίνη**

Η συμπλεκίνη σχηματίζει ένα σύμπλοκο μεγάλου μοριακού βάρους με τον CPSF και τον CstF αλληλεπιδρώντας μαζί τους. Λειτουργεί επικουρικά ως πρωτεΐνη-ικρίωμα για το πρωτεϊνικό σύμπλοκο πολυαδενυλίωσης (Takagaki και Manley, 2000)

➤ **PAP (Poly(A) polymerase)**

Η PAP είναι το ένζυμο υπεύθυνο για την προσθήκη των κατάλοιπων αδενοσίνης στο ελεύθερο 3' άκρο που δημιουργείται μετά την αντίδραση πέψης του mRNA. Έχει την ικανότητα να καταλύει την αντίδραση πολυμερισμού ανεξάρτητα από την ύπαρξη εκμαγείου.

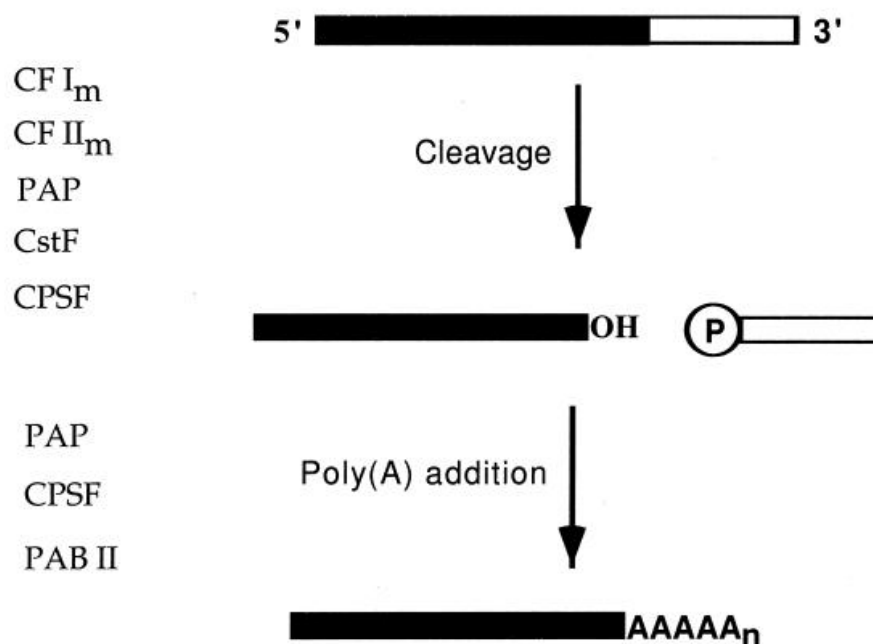
➤ **PABP (poly(A) binding protein)**

Η PABP προσδένεται στην πολυ(A) ουρά και αλληλεπιδρά με την PAP και τον CPSF αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της πολυαδενυλίωσης. Ταυτόχρονα, βοηθά την PAP να επιταχύνει την προσθήκη των καταλοίπων αδενοσίνης (Wahle, 1991) και ελέγχει το μήκος της πολυ(A) ουράς (Kuhn *et al.*, 2009). Εντοπίζεται τόσο στην πυρηνική ισομορφή (PABPN1) όσο και στην κυτταροπλασματική (PABPC).

➤ **CTD περιοχή της RNA πολυμεράσης II**

Η περιοχή CTD λειτουργεί ως γέφυρα ανάμεσα στην πολυαδενυλίωση και τη μεταγραφή του mRNA. Η RNA πολυμέραση κατά τη διάρκεια της μεταγραφής προσελκύει τους παράγοντες πολυαδενυλίωσης μέσω της CTD περιοχής στο mRNA ώστε να ξεκινήσει η διαμόρφωση του 3' άκρου. Μετά την αλληλεπίδραση των παραγόντων, αυτοί αποδεσμεύονται από τη CTD ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της πολυαδενυλίωσης (Hirose και Manley 1998).

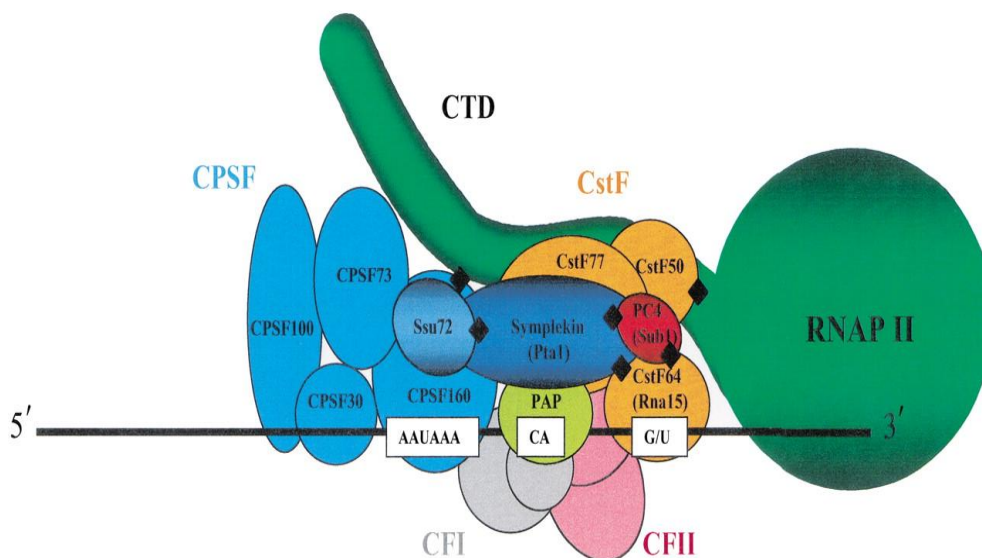
Για την αντίδραση της πέψης είναι απαραίτητοι όλοι οι παράγοντες εκτός της PABP ενώ για την προσθήκη των καταλοίπων αδενοσίνης χρειάζονται μόνο ο CPSF (Fip1L), η PAP και ο PABP (Mandel *et al.*, 2008) (εικόνα 6).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των παραγόντων πολυαδενυλίωσης που συμμετέχουν στις επιμέρους διαδικασίες της πέψης του mRNA και της προσθήκης της πολυ(A) ουράς (Zhao *et al.*, 1999).

1.2.1.4. Ο μηχανισμός της πολυαδενυλίωσης των mRNA

Κατά τη διάρκεια της μεταγραφής ο CPSF είναι προσδεδεμένος στη CTD περιοχή της RNA πολυμεράσης II με αποτέλεσμα την προσέγγιση της αλληλουχίας πρόσδεσης και επακόλουθο τόσο τον τερματισμό της μεταγραφής όσο και την έναρξη της πολυαδενυλίωσης του mRNA (Glover *et al.*, 2008). Η διαδικασία ξεκινά με την αναγνώριση του PAS και του DSE από τον CPSF και τον CstF αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, οι υπομονάδες WDR33 και CPSF30 προσδένονται απευθείας στο PAS. Στη συνέχεια, η υπομονάδα CstF64 μέσω της περιοχής RRM (RNA Recognition Motif) προσδένεται στην U/GU πλούσια περιοχή του DSE (Takagaki *et al.*, 1997), ενώ ο CstF77 γεφυρώνει τη δράση των παραγόντων διευκολύνοντας τη συνεργασία τους, ενισχύοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας (Murthy *et al.*, 1995). Στη συνέχεια ο CFIm και ο CFII μαζί με την PAP προσεγγίζουν το σημείο σχηματίζοντας έτσι το σύμπλοκο της πολυαδενυλίωσης (εικόνα 7)

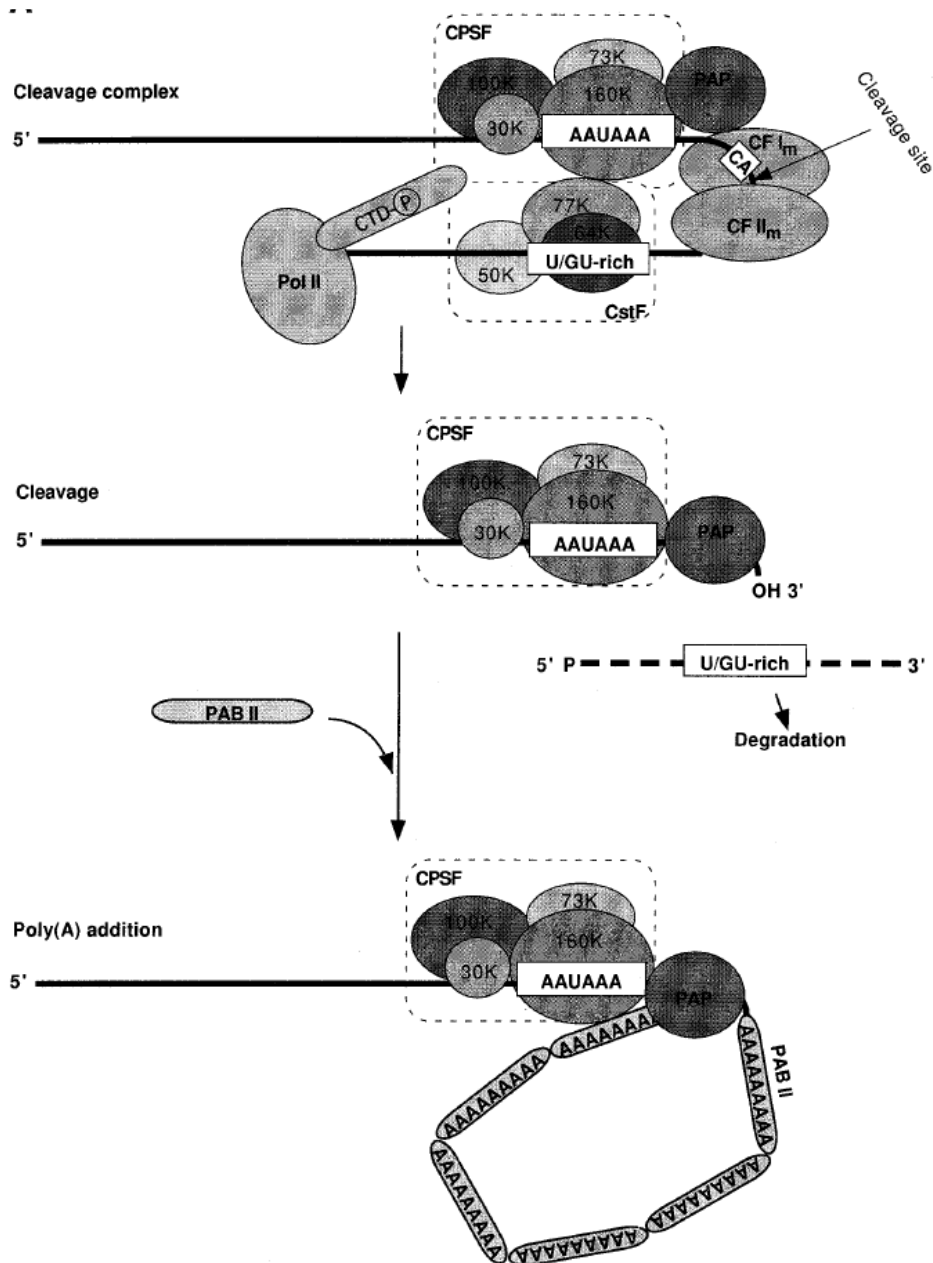


Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του συμπλόκου που σχηματίζουν οι παράγοντες πολυαδενυλίωσης στην 3'αμετάφραση περιοχή του mRNA (Calvo *et al.*, 2003).

Η πρόσδεση της PAP στο mRNA από μόνη της είναι μη ειδική και άρα ασθενής αλλά η παρουσία του παράγοντα CPSF επιφέρει ειδικότητα και το ένζυμο προσδένεται ισχυρά στο PAS, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του συμπλόκου PAP, CPSF, CstF και RNA (Zhao και Manley, 1996). Ακολουθεί η ενδονουκλεολυτική πέψη από τον CPSF73 και αμέσως μετά η PAP προσθέτει περίπου 250 κατάλοιπα αδενοσίνης στο 3'άκρο του

Εισαγωγή

mRNA (Zarkower και Wickens, 1987, Meijer *et al.*, 2007, Cevher *et al.*, 2010). Ο παράγοντας PABP ελέγχει το μήκος της πολυ(A) ουράς (Kerwitz *et al.*, 2003), συμβάλλοντας στον τερματισμό της διαδικασίας της πολυαδενυλίωσης, αφού ύστερα από την προσθήκη του κατάλληλου αριθμού καταλοίπων αδενοσίνης, η δομή του σύμπλοκου mRNA - PABP αλλάζει, με αποτέλεσμα να διακόπτεται η αλληλεπίδραση ανάμεσα στη PAP και τον CPSF (Kuhn *et al.*, 2009) (εικόνα 8).



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της πολυαδενυλίωσης του mRNA. Διαφαίνονται τα βήματα της στρατολόγησης των trans παραγόντων, της πέψης και της προσθήκης της πολυ(A) ουράς (Zhao *et al.*, 1999).

1.3. Εναλλακτική πολυαδενυλίωση

Μεγάλος αριθμός γονιδίων διαθέτει πολλαπλά σήματα πολυαδενυλίωσης με αποτέλεσμα η διαδικασία της πέψης και της προσθήκης της πολυ(A) ουράς να λαμβάνει χώρα σε διαφορετικά σημεία του mRNA. Τα σήματα αυτά μπορεί να εδράζονται στην κωδική περιοχή του μετάγραφου και συνεπώς η επιλογή τους να έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας διαφορετικής πρωτεΐνης (εικόνα 9). Το πιο συνηθισμένο όμως φαινόμενο εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης αφορά την 3'αμετάφραστη περιοχή του mRNA (Di Giammartino *et al.*, 2011).



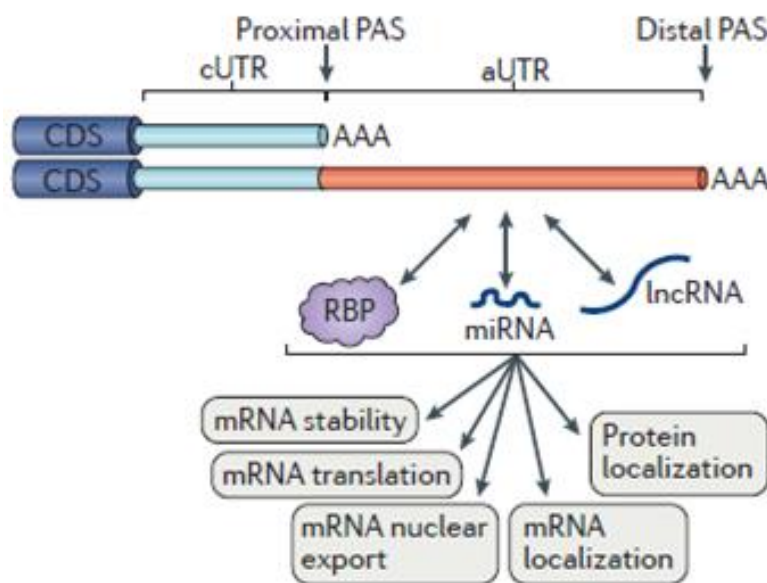
Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης του mRNA στην κωδική περιοχή, με αποτέλεσμα την παραγωγή μιας διαφορετικής πρωτεΐνης (Di Giammartino *et al.*, 2011) .

1.3.1. Εναλλακτική πολυαδενυλίωση στην 3'αμετάφραστη περιοχή του mRNA

Περίπου το 70% των γονιδίων διαθέτουν στην 3'αμετάφραστη περιοχή περισσότερα από ένα σήματα πολυαδενυλίωσης (Beaudoin *et al.*, 2000) με αποτέλεσμα τη δημιουργία διαφορετικών ισομορφών mRNA με την ίδια κωδική περιοχή και διαφορετικές ως προς το μήκος 3'αμετάφραστες περιοχές (Tian *et al.*, 2005). Στις 3'αμετάφραστες περιοχές εδράζονται αλληλουχίες που επηρεάζουν τη σταθερότητα του μηνύματος, την κυτταρική τοποθέτηση (localization) και τη μετάφραση και τελικά καθορίζουν τη γονιδιακή έκφραση. Η απώλεια των θέσεων πρόσδεσης των miRNA αποτελούν την καλύτερα μελετημένη συνέπεια της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης. Τα miRNA είναι μικρά μόρια RNA περίπου 22 νουκλεοτιδίων τα οποία καθορίζουν τη σταθερότητα και τη μετάφραση των mRNA στα οποία προσδένονται (Bartel, 2009), ενεργοποιώντας την αποικοδόμηση τους. Εναλλακτικά πολυαδενυλιωμένα μετάγραφα

Εισαγωγή

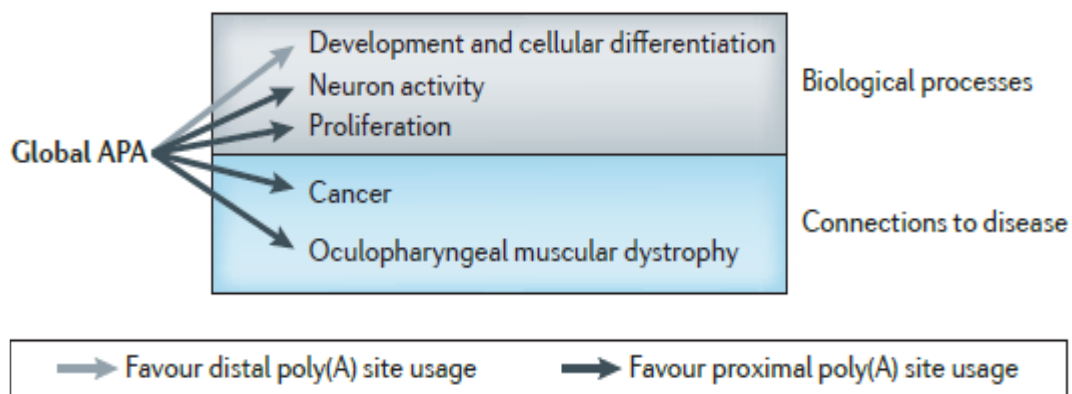
πολλές φορές είναι πιο σταθερά, παράγοντας έως και 10 φορές περισσότερη πρωτεΐνη λόγω απώλειας των θέσεων αναγνώρισης από τα miRNA (Mayr και Bartel, 2009). Επιπλέον, στην 3' αμετάφραστη περιοχή εδράζονται στοιχεία αποσταθεροποίησης του mRNA, όπως περιοχές πλούσιες σε AU (AREs: AU-rich elements), σε GU (GREs: GU-rich elements) και περιοχές πρόσδεσης των PUF πρωτεϊνών, με τα οποία αλληλεπιδρούν πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA (RBPs), (Garneau *et al.*, 2007). Η απώλεια των αλληλουχιών αυτών όπως και στην περίπτωση των miRNA σταθεροποιεί περαιτέρω το mRNA. Τέλος, μέσω της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης χάνονται και οι αλληλουχίες της 3' αμετάφραστης περιοχής που αλληλεπιδρούν με τα μεγάλα μη-κωδικα (long non coding) RNA, οι οποίες συμβάλλουν στην αποικοδόμηση του mRNA (Gong *et al.*, 2011) (εικόνα 10).



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης του mRNA στην 3' αμετάφραστη περιοχή. Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση οδηγεί στη δημιουργία ισομορφών mRNA με διαφορετικές ως προς το μήκος 3' αμετάφραστες περιοχές. cUTR (constitutive UTR): η περιοχή πριν το εγγύς σήμα πολυαδενυλίωσης, εντοπίζεται σε όλες τις ισομορφές, aUTR (alternative UTR): η περιοχή που συναντάται μόνον όταν τα μεταγράφα πολυαδενυλιωθούν στο απομακρυσμένο σήμα. Αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην 3' UTR και σε πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA (RBPs), miRNAs και lncRNAs έχουν σημαντικές επιπτώσεις στις βιολογικές διεργασίες (Tian και Manley, 2016).

1.3.2. Εναλλακτική πολυαδενυλίωση και βιολογικές διεργασίες

Αλλαγές στις συνθήκες κάτω από τις οποίες βρίσκονται τα κύτταρα έχουν πολλές φορές ως αποτέλεσμα την αλλαγή της προτιμώμενης θέσης πολυαδενυλίωσης και την παραγωγή mRNA με βραχύτερες 3'αμετάφραστες περιοχές. Η μετατόπιση αυτή σε ορισμένες περιπτώσεις εξυπηρετεί μια προσπάθεια προσαρμογής και βελτιστοποίησης των κυτταρικών λειτουργιών ενώ σε άλλες αποτελεί μια παθογένεια (εικόνα 11).



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της συσχέτισης της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης και των βιολογικών διεργασιών (Elkon *et al.*, 2013).

1.3.2.1. Εναλλακτική πολυαδενυλίωση και ιστοειδικότητα

Η θέση της πολυαδενυλίωσης συχνά επιλέγεται με ιστοειδικό τρόπο ή μεταβάλλεται σαν αποτέλεσμα εξωκυττάρων ερεθισμάτων (Edwards-Gilbert *et al.*, 1997). Κάποιοι ιστοί χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένο μοτίβο εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης όπως π.χ. ο νευρικός ιστός στον οποίο παρατηρούνται ισομορφές mRNA με μεγάλου μήκους 3'αμετάφραστες περιοχές ενώ αντίθετα στα κύτταρα του αίματος και στους όρχεις παράγονται mRNA με ιδιαίτερα βραχείς 3'αμετάφραστες περιοχές (Zhang *et al.*, 2005, Liu *et al.*, 2007). Ταυτόχρονα, γονίδια που εκφράζονται σε διάφορα είδη ιστών είναι πιο πιθανό να υφίσταται τη διαδικασία εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης, σε αντίθεση με αυτά που εκφράζονται μόνο σε συγκεκριμένα είδη

(Lianoglou *et al.*, 2013), καταδεικνύοντας ότι πιθανά η εναλλακτική πολυαδενυλίωση είναι αναγκαία ως μηχανισμός ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης ανάμεσα στους ιστούς.

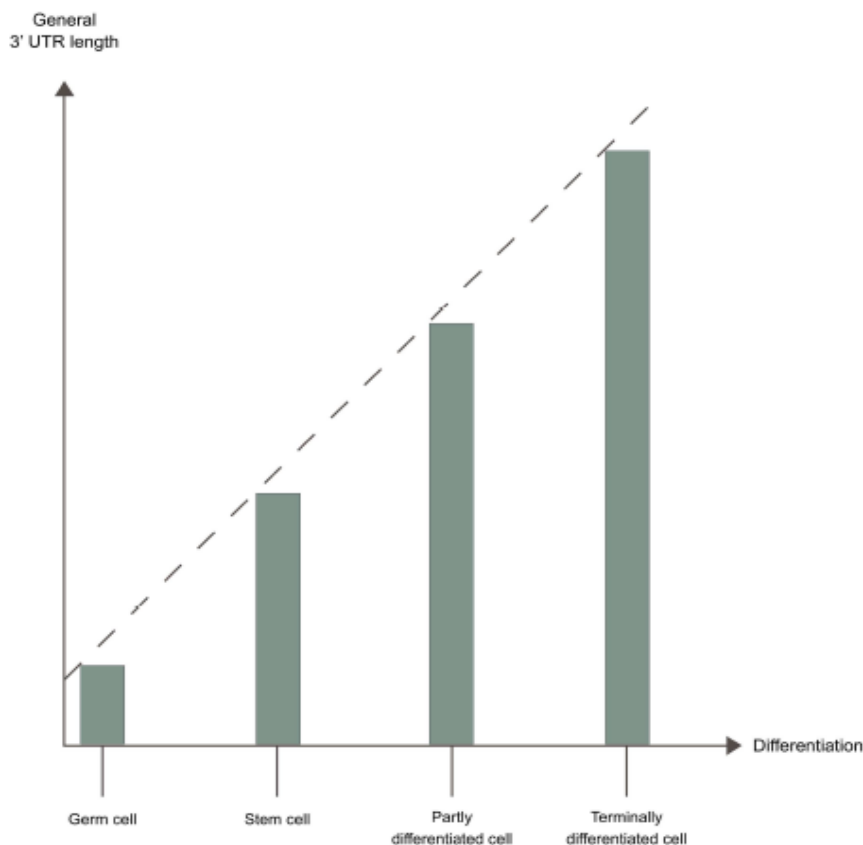
1.3.2.2. Εναλλακτική πολυαδενυλίωση και ανάπτυξη - διαφοροποίηση

Κατά την εμβρυική ανάπτυξη παρατηρούνται αλλαγές στην προτίμηση του σήματος πολυαδενυλίωσης και στο ισοζύγιο ανάμεσα στις ισομορφές των μεταγράφων. Μεγάλης κλίμακας αναλύσεις δεδομένων καταδεικνύουν ότι κατά την εμβρυική ανάπτυξη στον ποντικό προοδευτικά παρατηρείται αύξηση του μήκους της 3'αμετάφραστης περιοχής των mRNA και συνεπώς προτίμηση της απομακρυσμένης θέσης πολυαδενυλίωσης. Τα συμπεράσματα αυτά ακολούθησαν *in vitro* μελέτες χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά ινοβλαστών ποντικού C2C12 με παρόμοια αποτελέσματα. Γενική μετατόπιση προς την απομακρυσμένη θέση πολυαδενυλίωσης επιβεβαιώθηκε και από ανάλογες μελέτες στη *Drosophila melanogaster* και το zebrafish (*Danio rerio*) (Hilgers *et al.*, 2011, Smibert *et al.*, 2012, Ulitsky *et al.*, 2012). Επιπλέον, κατά την επαγωγή διαφοροποιημένων κυττάρων σε πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs: induced pluripotent stem cells) παρατηρείται καθολική μείωση των 3'αμετάφραστων περιοχών. Η μοναδική περίπτωση κατά την οποία παρατηρήθηκε αύξηση του μήκους των 3'αμετάφραστων περιοχών αφορούσε τον επαναπρογραμματισμό σπερματικών κυττάρων σε iPSCs, γεγονός όμως που εξηγείται από το ότι οι γονάδες χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα βραχεία mRNA (Ji και Tian, 2009). Γενικά, θα μπορούσε να θεωρηθεί μια συγκεκριμένη αναλογία στη σχέση ανάμεσα στην εναλλακτική πολυαδενυλίωση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων κατά την οποία όσο αυξάνει ο βαθμός διαφοροποίησης τόσο μειώνεται ο αριθμός των εναλλακτικά πολυαδενυλιωμένων mRNA (εικόνα 12).

1.3.2.3. Εναλλακτική πολυαδενυλίωση και πολλαπλασιασμός

Μια από τις πιο καλά μελετημένες συσχετίσεις του φαινομένου της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης αφορά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η πρώτη μελέτη που επεσήμανε αυτήν τη σύνδεση αφορούσε την ενεργοποίηση των T κυττάρων κατά την οποία παρατηρήθηκε επιλογή του εγγύς σήματος πολυαδενυλίωσης (Sandberg *et al.*,

2008). Η ενεργοποίηση των T κυττάρων συνοδεύεται από δραματική αύξηση των επιπέδων του πολλαπλασιασμού και συνεπώς η εναλλακτική πολυαδενυλίωση συσχετίστηκε με τον αυξημένο πολλαπλασιασμό. Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν και κατά τη διάρκεια της διέγερσης των B κυττάρων και των μονοκυττάρων, ενώ ανάλυση ιστών και κυτταρικών σειρών διαφόρων ειδών καταδεικνύει πως όσο μεγαλύτερος είναι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τόσο πιο βραχείς είναι οι 3' αμετάφραστες περιοχές. Η διαπίστωση αυτή συνδέεται και με τη σχέση ανάμεσα στην εναλλακτική πολυαδενυλίωση και την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση που περιγράφηκε παραπάνω, μιας και αποτελούν καταστάσεις κατά τις οποίες παρατηρείται χαμηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού. Τέλος, πειράματα σε διάφορα κυτταρικά μοντέλα που αφορούν καταστάσεις αυξημένου πολλαπλασιασμού ή αναστολής του επιβεβαιώνουν περαιτέρω την πλέον γενικά αποδεκτή ισχυρή σύνδεση των δυο φαινομένων (Elkon *et al.*, 2012).



Εικόνα 12: Διαγραμματική απεικόνιση της συσχέτισης του μήκους της 3' UTR και του βαθμού διαφοροποίησης των κυττάρων ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης (Rehfeld *et al.*, 2013).

1.3.2.4. Εναλλακτική πολυαδενυλίωση και καρκίνος

Ο ισχυρός συσχετισμός του μήκους της 3' αμετάφραστης περιοχής των mRNA με το βαθμό διαφοροποίησης και το ρυθμό πολλαπλασιασμού άνοιξε το δρόμο για τη μελέτη της πιθανής συμμετοχής της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης στον καρκίνο. Οι μαζικές μεταβολές που καταγράφονται στο μεταγράφημα και το πρωτέωμα των καρκινικών κυττάρων δεν μπορούν να συνδεθούν άμεσα με τις γενετικές μεταβολές που ανιχνεύονται. Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση αποτελεί ένα μηχανισμό μαζικής ενεργοποίησης της έκφρασης πρωτεϊνών που φέρουν στο mRNA πολλαπλές θέσεις πολυαδενυλίωσης και ως επί το πλείστον κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες, κυττοκίνες και γενικά δυνητικά ογκογονίδια. Οι βραχείς ισομορφές mRNA εντοπίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό στις μετασχηματισμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές από ότι σε μη μετασχηματισμένα κύτταρα που όμως χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι η εναλλακτική πολυαδενυλίωση συσχετίζεται ακόμα πιο ισχυρά με το μετασχηματισμό από ότι με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η υπερέκφραση μάλιστα της εναλλακτικά πολυαδενυλιωμένης ισομορφής του *IGF2BP1* (*Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1*) οδηγεί στο μετασχηματισμό των κυττάρων σε πειράματα ανάπτυξης αποικιών σε ημι-στερεή καλλιέργεια (soft agar), σε αντίθεση με την υπερέκφραση της μεγάλου μήκους ισομορφής που αφήνει τα κύτταρα ανεπηρέαστα. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν τη συμμετοχή της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης στην παθογένεια του καρκίνου (Mayr και Bartel, 2009). Ανάλυση δεδομένων μικροσυστοιχιών από όγκους όπως του μαστού και του μελανώματος αποκάλυψε υψηλή ειδικότητα στο μοτίβο εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης και προτάθηκε ως προγνωστικός και διαγνωστικός δείκτης (Singh *et al.*, 2009), ενώ στην καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MCF-7 η εγγύς θέση πολυαδενυλίωσης προτιμάται έναντι της απομακρυσμένης συγκριτικά με τα MCF-10A κύτταρα, τα οποία είναι μη μετασχηματισμένα (Fu Y *et al.*, 2011). Για την περαιτέρω μελέτη της έκτασης που λαμβάνει η εναλλακτική πολυαδενυλίωση στον καρκίνο μελετήθηκαν 358 TCGA Pan-Cancer ζεύγη υγιούς-καρκινικού ιστού και διαπιστώθηκε ότι 1346 γονίδια εμφανίζονται επαναλαμβανόμενα εναλλακτικά πολυαδενυλιωμένα σε επτά είδη καρκινικών ιστών, παράγοντας mRNA με βραχείς 3' αμετάφραστες περιοχές

συγκριτικά με τους υγιείς ιστούς (Xia *et al.*, 2014). Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν ότι το φαινόμενο της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης αποτελεί χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων και μάλιστα παρουσιάζει χαρακτηριστικό μοτίβο για κάθε είδος καρκίνου.

1.3.3. Ρύθμιση της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης

Καθώς οι επιπτώσεις της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης στη γονιδιακή έκφραση και κατά συνέπεια στην κυτταρική λειτουργία γίνονται όλο και πιο ξεκάθαρες, είναι επιτακτική η ανάγκη κατανόησης των μηχανισμών που ελέγχουν την εναλλακτική πολυαδενυλίωση. Για το λόγο αυτό έχει μελετηθεί μια σειρά παραγόντων που πιθανά εμπλέκονται στη ρύθμιση της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης.

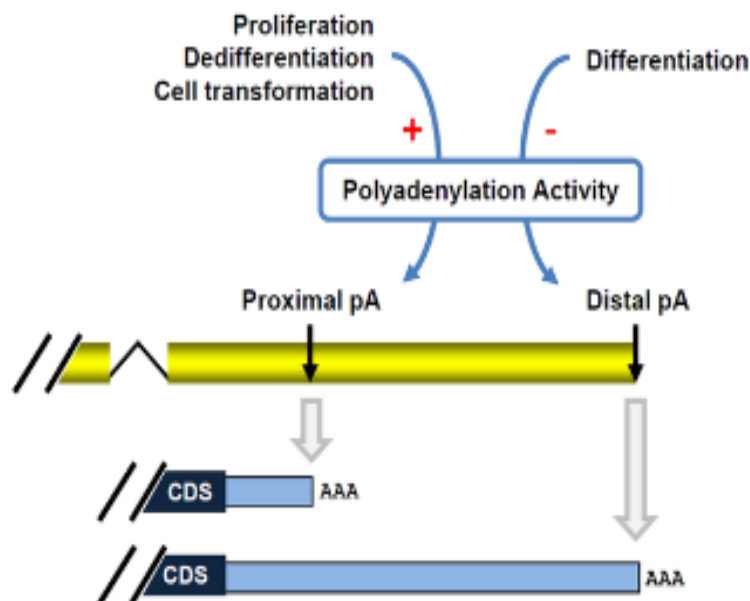
1.3.3.1. Συμβολή των *cis* αλληλουχιών στην επιλογή του σήματος πολυαδενυλίωσης

Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης διαδραματίζουν τα σήματα πολυαδενυλίωσης που εδράζονται στην 3' αμτάφραστη περιοχή των mRNA. Στις περιπτώσεις ύπαρξης πολλαπλών σημάτων πολυαδενυλίωσης, το απομακρυσμένο σήμα, η επιλογή του οποίου παράγει mRNA με μεγάλου μήκους 3' αμετάφραστες περιοχές, συνίσταται από την κλασσική ακολουθία AAUAAA και χαρακτηρίζεται ως ορθόλογο. Τα υπόλοιπα εδράζονται ανοδικά αυτού συμβάλλοντας στην παραγωγή βραχύτερων 3' αμετάφραστων περιοχών και χαρακτηρίζονται ως μη-ορθόλογα. Η αλληλουχία τους διαφέρει ελαφρώς και συνήθως είναι μία από τις AUUAAA, AAGAAA, UAUAAA, AGUAAA ακολουθίες (Tian *et al.*, 2005). Τα μη-ορθόλογα σήματα είναι ασθενέστερα και παρουσιάζουν ελαφρώς μικρότερη συγγένεια με τους *trans* παράγοντες πολυαδενυλίωσης και συνεπώς απαιτούνται κατάλληλες συνθήκες ώστε να επιλεγούν. Το γεγονός αυτό παρέχει στο κύτταρο έναν επιπλέον μηχανισμό ελέγχου της γονιδιακής ρύθμισης αλλά ταυτόχρονα και τη βεβαιότητα ότι η μεταγραφή θα ολοκληρωθεί όταν συναντήσει το απομακρυσμένο, ορθόλογο σήμα πολυαδενυλίωσης (Dresser *et al.*, 1995).

1.3.3.2. Συσχέτιση παραγόντων πολυαδενυλίωσης με τη διαδικασία της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης

Μια πολλά υποσχόμενη υπόθεση για την αιτία που οδηγεί στην προτίμηση του εναλλακτικού σήματος πολυαδενυλίωσης υποστηρίζει ότι αυξημένα επίπεδα έκφρασης όλων ή μερικών από τους *trans* παράγοντες που συμμετέχουν στην διαδικασία πολυαδενυλίωσης μπορεί να επηρεάζει την επιλογή της θέσης πολυαδενυλίωσης (εικόνα 13). Υπάρχουν πολλά παραδείγματα στα οποία η ενισχυμένη έκφραση συγκεκριμένων παραγόντων πολυαδενυλίωσης ευνοεί τη χρήση εναλλακτικών θέσεων πολυαδενυλίωσης και σχετίζεται άμεσα με την κατάσταση πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων.

CSTF64: Ένα από τα πρώτα παραδείγματα συμβολής των *trans* παραγόντων στην εναλλακτική πολυαδενυλίωση αφορά τον CSTF64. Κατά την ωρίμανση των Β λεμφοκυττάρων τα επίπεδα του CSTF64 αυξάνονται ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται χρήση ενός ιντρονικού σήματος πολυαδενυλίωσης στο mRNA της βαριάς αλυσίδας της IgM (Takagaki *et al.*, 1996). Επίσης, αποσιώπηση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή του CSTF64 και της ισομορφής του CSTF64t με siRNA στα HELA κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα καθολική προτίμηση του εγγύς σήματος πολυαδενυλίωσης, χωρίς όμως την ίδια έκταση του φαινομένου όταν οι παράγοντες αυτοί αποσιωπούνται μεμονωμένα (Yao *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2015). Τη συμβολή του CSTF64 στην εναλλακτική πολυαδενυλίωση επισημαίνουν και μεγάλου εύρους μελέτες βιοπληροφορικής ανάλυσης, οι οποίες καταγράφουν καθολική μείωση του μήκους των 3'αμετάφραστων περιοχών σε πέντε διαφορετικά είδη καρκίνων με ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων του mRNA του (Xia *et al.*, 2014). Τέλος, αυξημένα επίπεδα έκφρασης του παράγοντα με ταυτόχρονη μείωση του μήκους των 3'αμετάφραστων περιοχών καταγράφονται και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του εντέρου και του μαστού (Mayr και Bartel, 2009, Morris *et al.*, 2012).



Εικόνα 13: Συσχέτιση της υπερέκφρασης ή της υπερλειτουργίας των παραγόντων πολυαδενυλίωσης με το βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων και την εναλλακτική πολυαδενυλίωση (Ji και Tian *et al.*, 2009).

CPSF: Τα επίπεδα έκφρασης των παραγόντων CPSF και συμπλεκίνη παρουσιάζονται αυξημένα στα καρκινώματα του εντέρου και του μαστού και φαίνεται ότι συσχετίζονται με την εναλλακτική πολυαδενυλίωση (Mayr και Bartel, 2009; Morris *et al.*, 2012). Αυξημένα επίπεδα έκφρασης των παραγόντων αυτών εντοπίζονται και στα γαμετικά κύτταρα τα οποία όπως προαναφέρθηκε χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα βραχείς 3'αμετάφρασες περιοχές (Dass *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 2007), ενώ η ίδια συσχέτιση ισχύει και κατά την επαγωγή βλαστικών κυττάρων από διαφοροποιημένα κύτταρα. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης του CPSF εμφανίζονται μειωμένα κατά την εμβρυική ανάπτυξη όπου το φαινόμενο της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης είναι περιορισμένο (Ji και Tian, 2009).

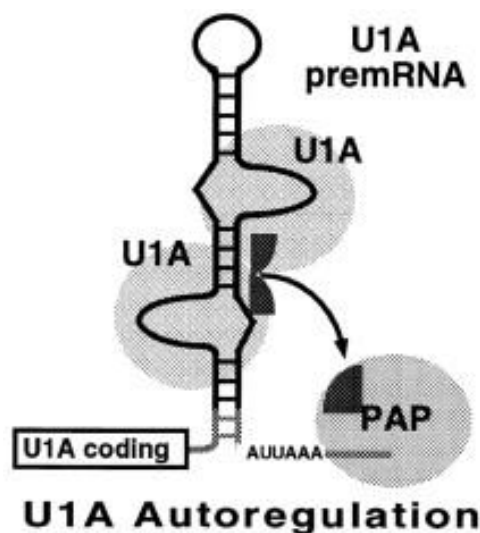
CFI: Ο παράγοντας CFI εντοπίζεται ενισχυμένος σε συνθήκες όπου ευνοείται η εναλλακτική πολυαδενυλίωση, όπως στα γαμετικά κύτταρα (Liu *et al.*, 2007, Sartini *et al.*, 2008) και κατά την επαγωγή κυττάρων σε βλαστικά (Ji και Tian, 2009). Παρόλα αυτά, στις περισσότερες περιπτώσεις τα επίπεδα έκφρασης του παράγοντα είναι ανάλογα του μήκους της 3'αμετάφραστης περιοχής των mRNA. Συγκεκριμένα, η αποσιώπηση και των

δύο υπομονάδων του συμπλόκου οδηγεί στη μείωση του μήκους των 3' αμετάφραστων περιοχών. Μια πιθανολογούμενη εκδοχή υποστηρίζει ότι αιτία για αυτό το αποτέλεσμα αποτελεί η αλληλουχία UGUA στην οποία προσδένεται ο CFI25. Η περιοχή ανοδικά του απομακρυσμένου σήματος πολυαδενυλίωσης είναι εμπλουτισμένη με την αλληλουχία αυτή (Li *et al.*, 2015, Martin *et al.*, 2012) και πιθανόν το σύμπλοκο προσδένεται σε δύο τέτοιες αλληλουχίες που το περιβάλλουν, καθιστώντας έτσι τη σύνδεση πιο αποτελεσματική. Το αποτέλεσμα στην περίπτωση αυτή είναι η επιλογή του ορθόλογου σήματος πολυαδενυλίωσης έναντι του εγγύς (Yang *et al.*, 2011). Τέλος, σε κύτταρα γλιοβλαστώματος αποσιώπηση του CFI25 οδηγεί στη χρήση του εναλλακτικού σήματος πολυαδενυλίωσης και την ενισχυμένη ογκογονικότητα, ενώ αντίθετα η υπερέκφραση του οδηγεί στην αναστολή της αύξησης του όγκου (Masamha *et al.*, 2014).

PABN1: Αρχικά θεωρούνταν ότι η PABN1 δεν συμμετέχει στην επιλογή του σήματος πολυαδενυλίωσης μιας και ο ρόλος της περιορίζεται στον έλεγχο του μήκους της πολυ(A) ουράς. Απροσδόκητα, τα επίπεδα του παράγοντα είναι αυξημένα κατά την επαγωγή των βλαστικών κυττάρων από διαφοροποιημένα κύτταρα και σχετίζεται αντίστοιχα με το προφίλ της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης, όπως και οι υπόλοιποι παράγοντες (Ji and Tian, 2009). Γενικά όμως, αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PABN1 ευνοούν την επιλογή του ορθόλογου σήματος πολυαδενυλίωσης. Η αποσιώπηση του γονιδίου οδηγεί σε καθολική μείωση του μήκους της 3' αμετάφραστης περιοχής των μετγράφων (Jenal *et al.* 2012, De Klerk *et al.* 2012).

PAP: Παλαιότερες μελέτες αποδεικνύουν ότι η PAP αναστέλλεται από το σύμπλοκο U1 snRNP με αποτέλεσμα την προστασία των pre-mRNA από την πρόωμη πέψη και πολυαδενυλίωση. Τα πρώτα δεδομένα που υποστήριξαν τη σχέση αυτή αφορούσαν την αναστολή της PAP από την υπομονάδα U1A του συμπλόκου U1 snRNP η οποία φυσιολογικά αλληλεπιδρά με την 5' περιοχή του ματίσματος (5' ss). Η U1A υπομονάδα αναστέλλει την PAP μέσω πρόσδεσης της στο ίδιο το pre-mRNA που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της. Με τον τρόπο αυτό καταστέλλεται η πολυαδενυλίωση του διαδραματίζοντας έναν αυτορυθμιστικό ρόλο της έκφρασης της (Boelens *et al.*, 1993) (εικόνα 14).

Τα δεδομένα αυτά επεκτάθηκαν ισχυροποιώντας το φαινόμενο καταστολής της PAP από το σύμπλοκο U1 snRNP και συσχετίζοντας την πολυμεράση για πρώτη φορά με το φαινόμενο της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης, στην περίπτωση της έκφρασης γονιδίων που εκφράζονται σε μεταγενέστερο χρόνο της ζωής του ιού θηλωμάτων μόσχου (BPV: Bovine Papillomavirus). Στην περίπτωση αυτή το σύμπλοκο U1 snRNP συμβάλλει στην επιλογή του σήματος πολυαδενυλίωσης (Furth *et al.*, 1994). Συγκεκριμένα, η υπομονάδα 70K του συμπλόκου U1 snRNP αλληλεπιδρά απευθείας με την PAP και την καταστέλλει με αποτέλεσμα και την καταστολή του απομακρυσμένου σήματος των γονιδίων αυτών (Gunderson *et al.*, 1998) (εικόνα 15).

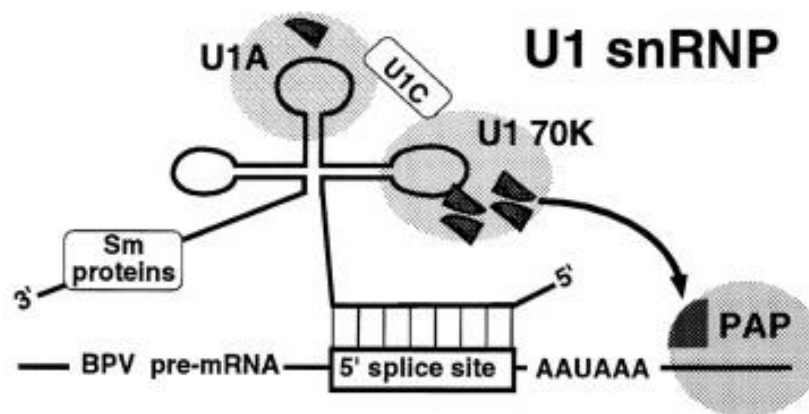


Εικόνα 14: Απεικόνιση του μηχανισμού αναστολής της PAP από την υπομονάδα U1A κατά τη διαδικασία αυτορύθμισης της. Η πρόσδεση δυο μορίων U1A στο pre- mRNA που είναι υπεύθυνο για την έκφραση του U1A οδηγεί στη πρόσδεση τους με την PAP και τελικά την αναστολή της (Gunderson *et al.*, 1998).

Επιπλέον, το σύμπλοκο U1 snRNP προστατεύει τα mRNA από την πρόωρη πέψη και πολυαδενυλίωση συμπεριλαμβανομένης αυτής που λαμβάνει χώρα σε ιντρονικές θέσεις, (Kaida *et al.*, 2010). Μάλιστα, η ποσότητα του συμπλόκου που βρίσκεται διαθέσιμο στο κύτταρο καθορίζει τη θέση της πολυαδενυλίωσης του mRNA. Η παντελής έλλειψη του U1 snRNP οδηγεί σε πρόωμη πέψη και πολυαδενυλίωση συνήθως στο πρώτο ιντρόνιο του

Εισαγωγή

mRNA, ενώ μέτρια μείωση των επιπέδων του έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεταγράφων με βραχύτερες 3'αμετάφραστες περιοχές λόγω εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης (Berg *et al.*, 2012). Η αναστολή της PAP από το σύμπλοκο πιθανά να σχετίζεται με την εναλλακτική πολυαδενυλίωση που παρατηρείται στις παραπάνω περιπτώσεις.



U1 snRNP via U1 70K blocks polyadenylation

Εικόνα 15: Αναστολή της PAP από την υπομονάδα U1 70K του συμπλόκου U1 snRNP . Όταν το σύμπλοκο προσδεθεί με την περιοχή πρόσδεσης 5'ss προσδένεται ταυτόχρονα και με την PAP αναστέλλοντας τη (Gunderson *et al.*, 1998).

Η πιθανή συσχέτιση της PAP με το φαινόμενο της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης καταγράφεται και μέσω πειραμάτων όπου χρησιμοποιείται το ανάλογο αδενοσίνης κορδυσεπίνη (3'δεοξαδενοσίνη). Η κορδυσεπίνη εκτός από την αναστολή της σύνθεσης και επιμήκυνσης της πολυ(A) ουράς των mRNA, έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την PAP με αποτέλεσμα τόσο τη μείωση του μήκους της ουράς όσο και αλλαγές στη διαμόρφωση της 3'αμετάφραστης περιοχής των mRNA. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία κορδυσεπίνης και μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, επιλέγονται τα καθοδικά σήματα πολυαδενυλίωσης με αποτέλεσμα την επιμήκυνση των 3'αμετάφραστων περιοχών (Holbein *et al.*, 2009). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι ο τερματισμός της πολυ(A) ουράς δεν αποτελεί τη μόνη και κύρια συνέπεια του μηχανισμού δράσης της κορδυσεπίνης, αλλά ταυτόχρονα συμμετέχει και στη διαμόρφωση του 3'άκρου των μεταγράφων, πιθανά μέσω της αλληλεπίδρασης με την

PAP. Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζονται και από πρόσφατες μελέτες οι οποίες προτείνουν ότι η PAPOLA και η PAPOLG σχετίζονται με την επιλογή του σήματος πολυαδενυλίωσης και τη γονιδιακή έκφραση και μάλιστα αναστολή τους οδηγεί σε καθολική επιμήκυνση των 3' αμετάφραστων περιοχών των mRNA (Weimin *et al.*, 2017). Παρά τις αναφερθείσες ενδείξεις, δεν έχει ακόμη διερευνηθεί η πιθανή συνεισφορά της πρωτεΐνης αυτής στην εναλλακτική πολυαδενυλίωση των μηνυμάτων.

1.4. Η βιολογική σημασία της PAP αιτία του αυστηρού ελέγχου της

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, παρεκκλίσεις που διαταράσσουν τη διαδικασία της πολυαδενυλίωσης των mRNA έχουν βλαβερές επιπτώσεις για το κύτταρο και η πολυπλοκότητα της διαδικασίας αποτελεί ένα είδος ελέγχου της επιτυχούς ολοκλήρωσης της. Η PAP, ως το ένζυμο υπεύθυνο για την προσθήκη της πολυ(A) ουράς των mRNA, φαίνεται να υπόκειται με τη σειρά της σε πολύ αυστηρό έλεγχο της λειτουργίας της. Η αυστηρή ρύθμιση της έκφρασης του ενζύμου λαμβάνει χώρα τόσο σε μεταφραστικό όσο και σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο, μέσω πολλαπλών μηχανισμών με αποτέλεσμα τα επίπεδα έκφρασης του να ελέγχονται επακριβώς καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Το γεγονός αυτό πιθανά αναδεικνύει την ανάγκη του κυττάρου να διατηρεί τα επίπεδα έκφραση και λειτουργικότητας της PAP κάτω από αυστηρό έλεγχο ώστε να εξασφαλίζει την ομαλή λειτουργία του.

1.4.1. Μεταφραστικός έλεγχος

Η δομή της 5' αμετάφραστης περιοχής του mRNA της PAPOLA παρουσιάζει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τα οποία συμβάλλουν στη ρύθμιση των επιπέδων του ενζύμου. Πρόκειται για μακριές 5' αμετάφραστες περιοχές, υψηλής περιεκτικότητας σε GC που χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός μικρού, δεύτερου ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (uORF) ανοδικά του πρώτου (Rapti *et al.*, 2010). Τέτοιου είδους χαρακτηριστικά συχνά απαντώνται σε μετάγραφα που δεν μεταφράζονται σε μεγάλες ποσότητες όπως κινάσες, αυξητικοί παράγοντες, ογκογονίδια, υποδοχείς και μεταγραφικοί παράγοντες (Colgan και Manley., 1997, Churbanov *et al.*, 2005). Απροσδόκητα, όλα αυτά τα στοιχεία χαρακτηρίζουν την 5' αμετάφραστη περιοχή του

mRNA της PAPOLA, η οποία επιπλέον παρουσιάζει πολύ μεγάλη ομολογία στα νουκλεοτίδια που απαρτίζουν το uORF (νουκλεοτίδια 1-75) ανάμεσα σε πέντε διαφορετικά είδη. Η ύπαρξη ενός δεύτερου uORF λειτουργεί ως μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης της PAPOLA στο επίπεδο της μετάφρασης με αποτέλεσμα την καταστολή της (Rapti *et al.*, 2010). Πιστεύεται ότι αυτού του είδους η ρύθμιση εξασφαλίζει χαμηλά επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών που μπορεί να βλάψουν το κύτταρο όταν βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες, όπως τα ογκογονίδια (Morris *et al.*, 2000, Sachs *et al.*, 2006).

1.4.2. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

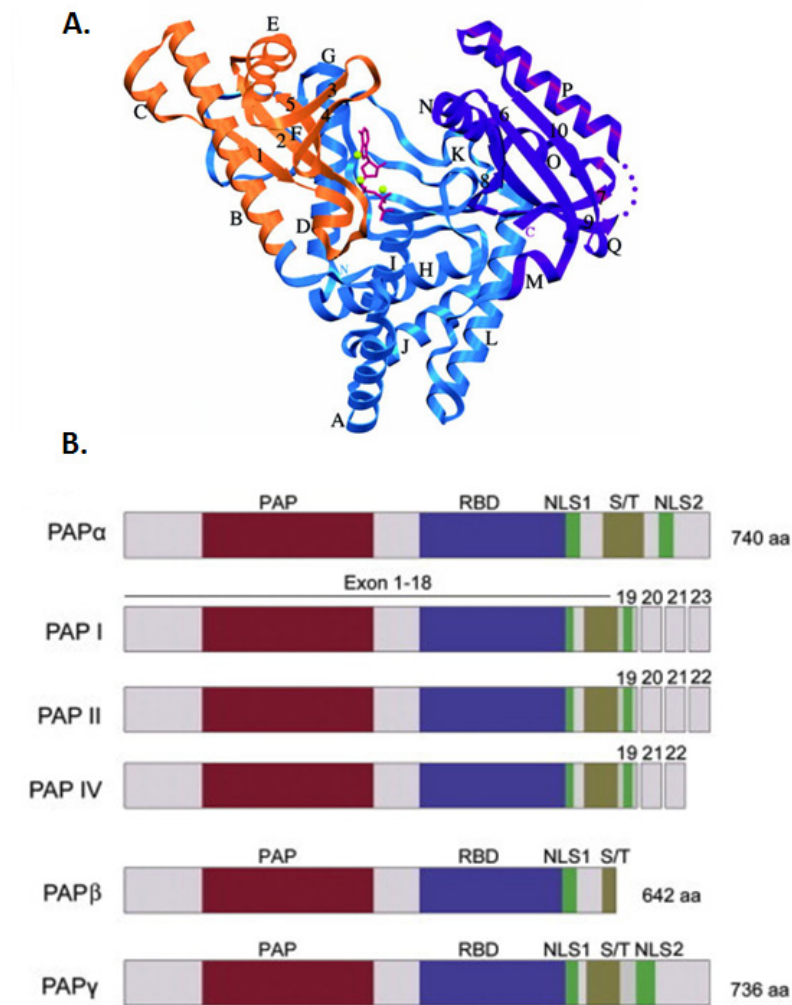
Το καρβοξυτελικό άκρο της PAPOLA αποτελεί στόχο κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (cdk) οι οποίες μπορούν και καταστέλλουν το ένζυμο υπερφωσφορυλιώνοντας το. Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο p34cdc2-cyclin B (maturation/mitosis-promoting factor, MPF) είναι υπεύθυνο για τη φωσφορυλίωση στις θέσεις αυτές τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (Colgan *et al.*, 1998). Η υπερφωσφορυλίωση αυτή καταστέλλει την ενεργότητα της PAPOLA κατά την φάση M της μείωσης και της μίτωσης του κυτταρικού κύκλου. Το αποτέλεσμα είναι η αναστολή της πολυαδενυλώσης των mRNA και κατά συνέπεια της παραγωγής πρωτεϊνών που θα διατηρούσαν το κύτταρο σε μια ενεργή κατάσταση, με αποτέλεσμα λάθη κατά την κυτταρική διαίρεση. Η καταστολή της ενεργότητας της PAP πιθανά να αποτελεί ένα μηχανισμό προστασίας από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Συγκεκριμένα, κατά τη M φάση του κυτταρικού κύκλου των ωοκυττάρων του *Xenopus laevis* και κατά τη μίτωση στα Hela κύτταρα, η PAP παρουσιάζεται υπερφωσφορυλιωμένη και λειτουργικά ανενεργή (Ballantyne και Wickens, 1995, Colgan και Manley, 1996). Επίσης, μελέτες καταδεικνύουν ότι ταυτόχρονη εισαγωγή της PAP, της p34cdc2 και της κυκλίνης B στα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της ενεργότητας του ενζύμου η οποία αντιστρέφεται μετά την προσθήκη σε αυτά φωσφατασών (Colgan *et al.*, 1998). Είναι σημαντικό ότι η αναστολή της ενεργότητας της PAP κατά την M φάση δεν αποτελεί μια στατική κατάσταση καθώς είναι αναγκαίο το ένζυμο να μπορεί να ανακτήσει τη λειτουργικότητα του ώστε το κύτταρο να διεκπεραιώνει τις ανάγκες του μετά την κυτταρική διαίρεση. Η περίπτωση αυτή δεν είναι η μοναδική κατά την οποία η ενεργότητα της PAP καταστέλλεται μέσω φωσφορυλίσεων από τις κινάσες. Μελέτες

αποκάλυψαν ότι η PAP περιέχει μια διατηρημένη αλληλουχία αμινοξέων ανοδικά της πλούσιας σε σερίνη θρεονίνη περιοχής, η οποία προσομοιάζει με την περιοχή πρόσδεσης κυκλινών, CRM (Cyclin Recognition Motif). Έχει βρεθεί ότι η PAP συνδέεται απευθείας τόσο με G_1 όσο και με G_2 κυκλίνες μέσω αυτού του μοτίβου και φωσφορυλιώνεται από τις αντίστοιχες κινάσες. Ο μηχανισμός αυτός αποτελεί έναν τρόπο ελέγχου της πολυαδενυλίωσης και κατ' επέκταση της γονιδιακής ρύθμισης σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου (Bond *et al.*, 2000). Η PAP φωσφορυλιώνεται επίσης στη σερίνη 537 του καρβοξυτελικού άκρου της από την ERK στα πλαίσια των τροποποιήσεων που μεταβάλλουν τη δραστηριότητά της. Η φωσφορυλίωση είναι αποτέλεσμα εξωκυττάριας διέγερσης και συνεπάγεται αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου. Ύστερα από την επίδραση αυξητικού ορού σε κύτταρα που βρίσκονται στην G_0 φάση του κυτταρικού κύκλου (quiescent cells), η ERK ενεργοποιείται συμβάλλοντας στην είσοδο των κυττάρων στη G_1 φάση και προωθώντας τον πολλαπλασιασμό. Άμεσο επακόλουθο αποτελεί η φωσφορυλίωση της PAP και η αύξηση της ενεργότητας της η οποία με τον τρόπο αυτό συσχετίζεται και με τα αυξημένα επίπεδα του πολλαπλασιασμού (Lee *et al.*, 2007). Ακόμη μια σειρά μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων αφορούν την PAP όπως η ακετυλίωση στα κατάλοιπα λυσίνης 635/644/730/734 του καρβοξυτελικού της άκρου, με αποτέλεσμα την μείωση της αποτελεσματικής αλληλεπίδρασης της PAP με τον CFIm25. Ο ακριβής μηχανισμός με το οποίο η ακετυλίωση επηρεάζει τη σύνδεση των δυο παραγόντων δεν έχει πλήρως κατανοηθεί αλλά πιθανά μορφολογικές αλλαγές ευθύνονται για τη μείωση. Επίσης, η ακετυλίωση της PAP στην NLS2 περιοχή έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά της στο κυτταρόπλασμα, με πειράματα να αποδεικνύουν ότι η αλληλεπίδραση του ενζύμου με το σύμπλοκο ιμπορτίνης εμφανίζεται εμφανώς μειωμένη (Shimazu *et al.*, 2006). Τέλος, μελέτες έχουν δείξει ότι σε συγκεκριμένα κύτταρα και ιστούς τα επίπεδα σουμοϋλιωμένης PAP είναι ιδιαίτερα αυξημένα, περισσότερο από κάθε άλλο γνωστό υπόστρωμα σουμοϋλίωσης. Η τροποποίηση αυτή βοηθά τον πυρηνικό εντοπισμό του ενζύμου και ενώ ο μηχανισμός δεν είναι πλήρως γνωστός πιθανά η σουμοϋλίωση εμποδίζει την ακετυλίωση στην NLS2 περιοχή και άρα την επακόλουθη μεταφορά της PAP στο κυτταρόπλασμα. Επίσης η σουμοϋλίωση αυξάνει τη σταθερότητα του ενζύμου,

ενώ αντίθετα μειώνει τη δραστικότητα του με τρόπο παρόμοιο της φωσφορυλίωσης (Vethantham *et al.*, 2007).

1.5. Πολυ(A) πολυμεράση

Η PAP ανήκει στην οικογένεια των νουκλεοτιδυλοτρανσφερασών (Martin G 1996) και τοποθετεί ATP στο 3' άκρο του mRNA χωρίς την ανάγκη ύπαρξης εκμαγείου. Στα θηλαστικά τρία γονίδια είναι υπεύθυνα για την παραγωγή τριών ειδών PAP: της PAPOLA, της PAPOLB και της PAPOLG. Η PAPOLA εκφράζεται σε όλα τα είδη των κυττάρων ενώ η PAPOLB εντοπίζεται μόνο στους όρχεις όπου και ενέχεται στη διαδικασία της σπερματογένεσης (Kashiwabara *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2000, 2001). Η PAPOLG παρουσιάζει μεγάλες ομοιότητες με την PAPOLA και φαίνεται να έχει τον ίδιο ρόλο κατά τη διαδικασία της πολυαδενυλίωσης (Perumal *et al.*, 2001). Οι διαφορετικές αυτές ισομορφές του ενζύμου πιθανά προκύπτουν από ένα κοινό αρχικό γονίδιο ύστερα από διπλασιασμό (Kashiwabara *et al.*, 2000, Kyriakopoulou *et al.*, 2011, Lee *et al.*, 2000). Την πιο καλά μελετημένη ισομορφή του ενζύμου αποτελεί η PAPOLA. Το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο εδράζεται στο χρωμόσωμα 14 στη θέση q32.31. Λόγω εναλλακτικού ματίσματος, από τη μεταγραφή του γονιδίου προκύπτουν πολλαπλές ισομορφές mRNA που κωδικοποιούν την PAPOLA (Raabe *et al.*, 1991, Wahle *et al.*, 1991, Thuresson *et al.*, 1994, Ballantyne *et al.*, 1995, Gebauer and Richter, 1995, Zhao και Manley, 1996, 1998). Οι μακρύτερες ισομορφές των μεταγράφων αυτών κωδικοποιούν τις PAP I, PAP II και PAP IV οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την αλληλουχία του καρβοξυτελικού άκρου τους (Raabe *et al.*, 1991). Οι βραχύτερες ισομορφές είναι υπεύθυνες για την παραγωγή των PAP III, PAP V και PAP VI από τις οποίες λείπουν περιοχές από το καταλυτικό κέντρο, με αποτέλεσμα να είναι ανενεργές/μη λειτουργικές (Zhao και Manley, 1996). Η PAP II αποτελεί την κύρια μορφή του ενζύμου και εντοπίζεται σε όλα τα είδη των κυττάρων. Πειράματα κρυσταλλογραφίας απέδειξαν ότι η PAP αποτελεί ένα μόριο σχήματος U με διαστάσεις $48 \times 55 \times 75 \text{ \AA}$ και περιέχει τρεις βασικές δομές.



Εικόνα 16: **A.** Απεικόνιση κρυσταλλογραφικής δομής της bovine PAP σε σύμπλοκο με 3'-dATP. Απεικονίζεται το καταλυτικό κέντρο (πορτοκαλί) η κεντρική περιοχή (μπλε), και η καρβοξυτελική περιοχή (μωβ), το 3'-dATP (κόκκινο) και τα τρία μεταλλικά ιόντα (κίτρινο) οι έλικες απεικονίζονται με γράμματα και οι β πτυχωτές με αριθμούς (G martin 2000), **B.** Απεικόνιση της αρχιτεκτονικής δομής διαφόρων ισομορφών της PAP, καταλυτική δομή (κόκκινο), περιοχή πρόσδεσης του RNA (μπλε), NLS (πράσινο), καρβοξυτελική περιοχή (καφέ) (Laishram et al., 2014).

Μία καταλυτική δομή άκρως συντηρημένη από τον μύκητα έως τον άνθρωπο (Ligner et al., 1991, Raabe et al., 1991, Wahle et al., 1991) στο αμινοτελικό άκρο, μία περιοχή πρόσδεσης RNA και δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού NLS1 και NLS2 στο καρβοξυτελικό άκρο τα οποία είναι απαραίτητα για τη μεταφορά του ενζύμου στον πυρήνα. Τα σήματα αυτά ακολουθούνται από μια περιοχή περίπου 20 KDa πλούσια σε

κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης, η οποία φέρει πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης κυκλινοεξαρτώμενων κινασών και όπως ήδη αναφέρθηκε διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο για τη λειτουργία του ενζύμου (Martin *et al.*, 1999, Raabe *et al.*, 1994) (εικόνα 16).

1.5.1. Συσχέτιση της PAP με τα επίπεδα πολλαπλασιασμού και τον καρκίνο

Η εμπλοκή της PAP σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις αλλά και οι συνέπειες της αυξημένης έκφρασης της στο κύτταρο πιθανά να σχετίζεται και να δικαιολογεί τον αυστηρό έλεγχο του ενζύμου σε όλες τις φάσεις της κυτταρικής ανάπτυξης μέσω των πολλαπλών τροποποιήσεων που υφίσταται.

1.5.1.1. Αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης της PAP επηρεάζουν το ρυθμό ανάπτυξης των DT40 κυττάρων

Στην προσπάθεια κατανόησης της σημασίας τόσο της λειτουργίας της PAP όσο και της ρύθμισης της έκφρασης της βοήθησαν μια σειρά πειραμάτων στα οποία επιχειρήθηκε τόσο η καταστολή όσο και η εισαγωγή της εξωγενώς στην κυτταρική σειρά βλαστικού λεμφώματος όρνιθας DT40. Για την καταστολή του ενζύμου επιχειρήθηκε η εξουδετέρωση των δυο αλληλόμορφων που κωδικοποιούν την PAP, γεγονός το οποίο δεν μπόρεσε να επιτευχθεί, καταδεικνύοντας την καίρια σημασία του ενζύμου για τα κύτταρα αλλά και το βαθμό στον οποίο πρέπει να ελέγχεται η έκφραση του σε αυτά. Επετεύχθη μόνο μέτρια μείωση των επιπέδων της PAP ύστερα από την εξουδετέρωση του ενός μόνο αλληλόμορφου, με τα DT40 κύτταρα να παρουσιάζουν μικρή μείωση των επιπέδων ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Η μείωση αυτή συνοδεύτηκε από αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στην S φάση του κυτταρικού κύκλου όπως προσδιορίστηκε με εφαρμογή κυτταρομετρίας ροής. Από την άλλη μεριά, η παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης του ενζύμου στα κύτταρα ύστερα από απενεργοποίηση των cdk περιοχών μέσω αντιδράσεων μεταλλαξιγένεσης, είχε τις πιο ισχυρές επιπτώσεις. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα στα οποία η έκφραση της PAP δεν καταστέλλεται μέσω μιας σειράς φωσφορυλίσεων, παρουσίασαν εμφανή μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και αύξηση των ποσοστών της G₀/G₁ φάσης του κυτταρικού κύκλου

(Zhao και Manley 1998). Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι το ανώτερο όριο των επιπέδων έκφρασης της PAP ελέγχεται πολύ αυστηρά από τα DT40 κύτταρα και επιβεβαιώνουν την ανάγκη της καταστολής της από το σύμπλοκο cdc2-κυκλίνη B κατά την Μ φάση του κυτταρικού κύκλου για την φυσιολογική ανάπτυξη τους.

I.5.1.2. Εμπλοκή της PAP στον καρκίνο

Μέχρι σήμερα αρκετά είναι τα δεδομένα που εμπλέκουν τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης και ενεργότητας της PAP με μια σειρά νεοπλασιών. Μια από τις πρώτες μελέτες που εστίασαν στη συσχέτιση αυτή αφορούσε τον εντοπισμό αντισωμάτων έναντι της PAP σε ορούς ποντικών και ανθρώπων με διάφορα είδη νεοπλασιών (Stetler *et al.*, 1981). Επίσης τα επίπεδα του mRNA που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του ενζύμου παρουσιάζει αύξηση στους καρκίνους του μαστού, του κόλον, των ωοθηκών και του παγκρέατος συγκριτικά με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς (Pendurthi *et al.*, 1997). Όσον αφορά την ενεργότητα της PAP, παρατηρείται αυξημένη στη χρόνια λεμφογενή λευχαιμία (ΧΛΛ) και τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ) (Pangalis *et al.*, 1985), ενώ ακόμα πιο αυξημένη εντοπίζεται στον επιθετικό τύπο οξείας λευχαιμίας σε σχέση με τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα (Trangas *et al.*, 1984, Toralian *et al.*, 2001). Μάλιστα, στη ΧΛΛ διαφορές στα επίπεδα ενεργότητας της PAP παρατηρούνται ανάλογα το στάδιο, την εμπλοκή του μυελού των οστών και των ασθενών οι οποίοι απαιτούν ή όχι θεραπεία. Μελέτες επίσης δείχνουν ότι η ενεργότητα της PAP παρουσιάζεται αυξημένη και στον καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό. Όγκοι θετικοί για την PAP έχουν ως αποτέλεσμα αύξηση έως 2 φορές της πιθανότητας επανεμφάνισης της νόσου και έως 3 φορές αυξημένη πιθανότητα θανάτου για τους ασθενείς, συγκριτικά με τους αρνητικούς για την PAP όγκους. Επίσης, η αυξημένη ενεργότητα της PAP συσχετίζεται με τους αρνητικούς για λεμφαδένες ασθενείς προσδίδοντας τους λιγότερο καλή πρόγνωση και έτσι μπορεί να αποτελέσει έναν ανεξάρτητο δυσμενή προγνωστικό δείκτη για αυτήν την κατηγορία ασθενών (Scorilas *et al.*, 2000).

I.6. Καρκίνος του μαστού

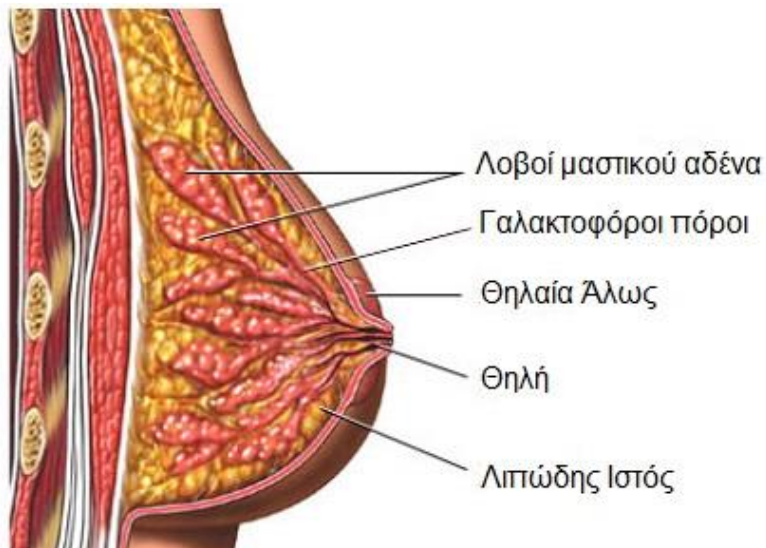
Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πιο συνήθη νεοπλασία στις γυναίκες και χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια όσον αφορά τα κλινικά αλλά και τα βιολογικά

χαρακτηριστικά (Tang *et al.*,2008). Το 95% των νεοπλασιών του μαστού αποτελούν αδενοκαρκινώματα (Vinay *et al.*,2010).Τα καρκινώματα αυτά χωρίζονται σε διάφορους υποτύπους, ανάλογα με την ιστοπαθολογία και την επιθετικότητα, το μοριακό προφίλ και το βαθμό κακοήθειας (grade) και κάθε ένας από αυτούς χαρακτηρίζεται από διαφορετικούς παράγοντες κινδύνου, κλινική εικόνα, έκβαση της νόσου και ανταπόκριση στις θεραπείες.

1.6.1. Ανατομία μαστού

Ο μαστός αποτελεί αδένα (μαστικός αδένας) και περιβάλλεται από πτυχή του δέρματος η οποία καταλαμβάνει την πρόσθια επιφάνεια του θώρακα (Moore *et al.*,1999). Στον άνδρα, ο μαστός παραμένει στις περισσότερες περιπτώσεις ανενεργός εκτός από παθολογικές καταστάσεις. Σε αντίθεση, στη γυναίκα παρατηρούνται μια σειρά μορφολογικών και λειτουργικών μεταβολών του μαστού οι οποίες σχετίζονται με τα στάδια ανάπτυξης του ατόμου και την αναπαραγωγή και ο σκοπός που εξυπηρετεί είναι η παραγωγή γάλακτος για τη θρέψη των απογόνων.

Ο μαστός αποτελείται από δέρμα, λιπώδη ιστό (περιμαστικό λίπος) και αδενικό ιστό ο οποίος είναι και υπεύθυνος για την παραγωγή του γάλακτος (εικόνα 17).



Εικόνα 17: Απεικόνιση γυναικείου μαστικού αδένος στην οποία περιγράφονται οι βασικές δομές.

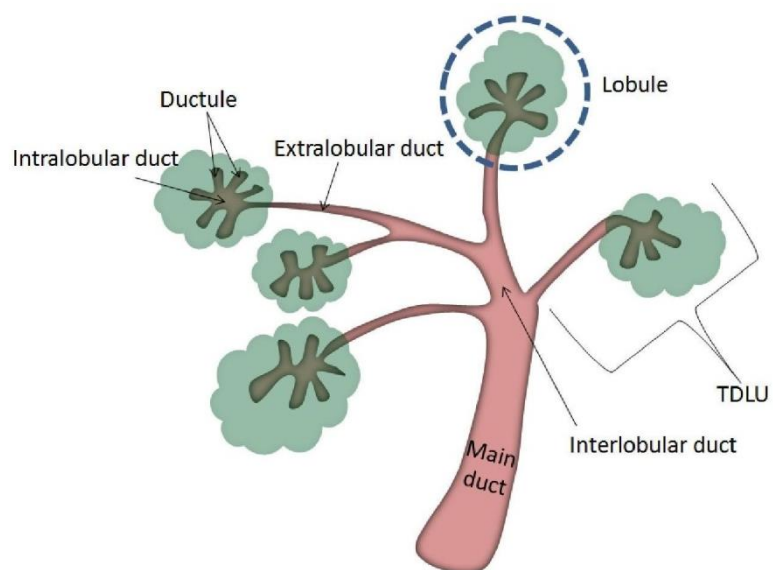
Το δέρμα είναι λείο και λεπτό και περιέχει σμηγματογόνους και ιδρωτοποιούς αδένες και συνδέεται με το περιμαστικό λίπος. Στην περιοχή του δέρματος βρίσκονται επίσης η θηλή, η οποία περιέχει 15-20 στόμια στα οποία καταλήγουν οι γαλακτοφόροι πόροι και η θηλέα άλω, η οποία συμβάλλει στη λίπανση του μαστού κατά το θηλασμό. Στην πρόσθια στοιβάδα του περιμαστικού λίπους βρίσκονται οι σύνδεσμοι του Cooper, ίνες συνδετικού ιστού που στηρίζουν τον αδένα και τον διαιρούν σε περίπου 15-20 λοβούς (lobes). Κάθε λοβός αποτελείται από μικρότερες αδενικές δομές τα λόβια (lobules) στα οποία παράγεται το γάλα. Τα λόβια συνδέονται με τους πόρους (ducts), οι οποίοι αποτελούν μικρούς σωλήνες μέσω των οποίων το γάλα μεταφέρεται στη θηλή. Οι πόροι συγκλίνουν σε έναν μεγαλύτερο κύριο πόρο ο οποίος και θα φτάσει μέχρι τη θηλή. Σχηματίζεται έτσι η τελική πορολοβιακή μονάδα (TDLU-Terminal Ductal Lobular Unit) (εικόνα 18).

Ο μαστός χαρακτηρίζεται από πλούσιο αγγειακό και λεμφικό δίκτυο. Όσον αφορά το λεμφικό δίκτυο, οι λεμφαδένες του μαστού χαρακτηρίζονται ως μασχαλιαίοι, υπερκλείδιοι και λεμφαδένες της έσω μαστικής αρτηρίας ανάλογα με το σημείο εντοπισμού. Η λέμφος από το μαστό παροχετεύεται τόσο προς τους μασχαλιαίους όσο και προς τους λεμφαδένες της έσω μαστικής αρτηρίας (Moore *et al.*, 1999). Το λεμφικό σύστημα είναι καθοριστικής σημασίας σε περιπτώσεις εμφάνισης κακοήθειας του μαστού όσον αφορά τη σταδιοποίηση και την έκβαση της νόσου.

1.6.2. Κατηγοριοποίηση καρκίνου μαστού

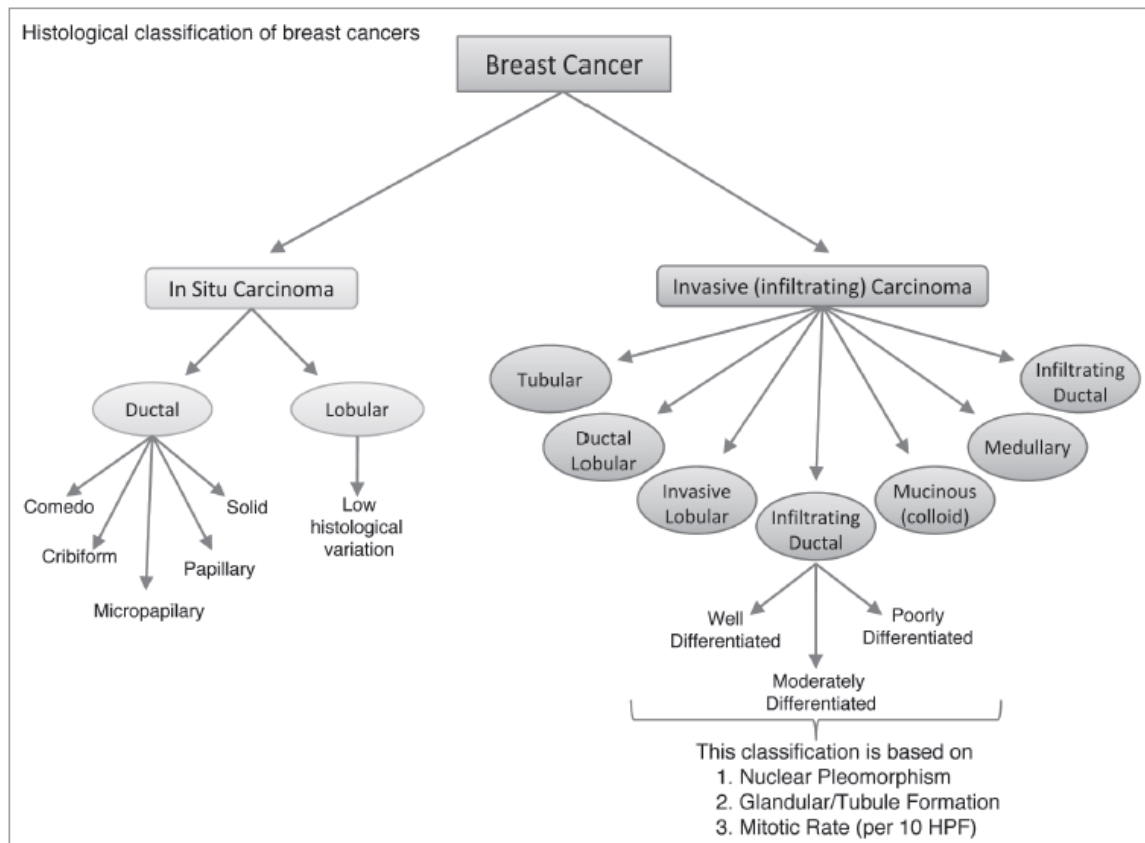
1.6.2.1. Ιστολογική ταξινόμηση καρκινωμάτων μαστού

Τα καρκινώματα του μαστού σε πρώτη φάση ταξινομούνται ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο στον οποίον ανήκουν. Όσον αφορά τη μορφολογική μελέτη, εάν ο όγκος περιορίζεται στο επιθήλιο αναφερόμαστε σε *in situ* καρκινώματα ή εάν έχει εισβάλει στο στρώμα σε διηθητικά καρκινώματα. Ταυτόχρονα, εάν προέρχεται από τους πόρους του μαστού χαρακτηρίζεται ως πορογενές καρκίνωμα (ductal carcinoma), ενώ αν η προέλευση είναι από τους λοβούς ως λοβιακό (lobular carcinoma). Ανεξαρτήτως ιστολογικής προέλευσης, η πλειοψηφία των όγκων του μαστού ξεκινούν από την TDLU (Wellings *et al.*, 1975).



Εικόνα 18: Γραφική αναπαράσταση της τελικής πορολοβιακής μονάδας του μαστού.

Βάσει της παραπάνω ταξινόμησης, προκύπτουν περαιτέρω ιστολογικές υποκατηγορίες που βασίζονται τόσο στα χαρακτηριστικά των κυττάρων όσο και στο ρυθμό πολλαπλασιασμού τους (εικόνα 19).



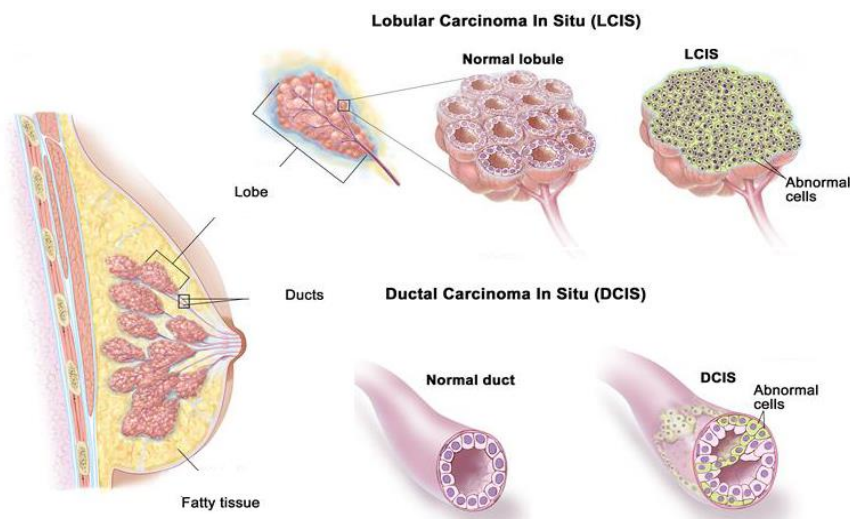
Εικόνα 19: Ιστολογική κατηγοριοποίηση των καρκινωμάτων του μαστού, όπου απεικονίζεται η ετερογένεια ανάμεσα στα καρκινώματα βάσει των δομικών χαρακτηριστικών και του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους (Gautam et al., 2010).

1.6.2.1.1. *In situ* καρκινώματα

Το **πορογενές καρκίνωμα in situ (DCIS)** αποτελεί την πιο συχνά απαντώμενη *in situ* νεοπλασία. Αποτελείται από ταχέως πολλαπλασιαζόμενα, κακοήγη επιθηλιακά κύτταρα του πόρου, τα οποία χαρακτηρίζονται ως άτυπα και έχουν την ικανότητα να αναπτύξουν διηθητικό καρκίνωμα σε μεταγενέστερο χρόνο (Lakhani et al., 2012). Περιορίζεται στους πόρους ή μπορεί να επεκταθεί και στα λοβία προκαλώντας εκτεταμένες βλάβες, μια διαδικασία που ονομάζεται λοβιακή καρκινοποίηση (Vinay et al., 2010) (εικόνα 20).

Ανάλογα με την αρχιτεκτονική του όγκου, το πορογενές καρκίνωμα *in situ* κατηγοριοποιείται περεταίρω σε 5 υποκατηγορίες: **το φαγεσωρικό, το ηθμοειδές, το θηλώδες, το τροχοειδές και το τοιχωματικό.**

Το **λοβιακό καρκίνωμα *in situ* (LCIS)** αφορά πολλαπλασιαζόμενα επιθηλιακά κύτταρα εντός των λοβών του μαστού (εικόνα 20). Αποτελεί περισσότερο παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης διηθητικού καρκινώματος και όχι κατά συνθήκη πρόδρομο αυτού (Fattaneh *et al.*, 2003). Χαρακτηρίζεται από σχετικά αμιγή πληθυσμό μικρού ή μεσαίου μεγέθους, στρογγυλών κυττάρων τα οποία είναι υπεύθυνα για τη διόγκωση των λοβών, ενώ δεν παρατηρείται ιδιαίτερη ποικιλομορφία στους κυτταρικούς πληθυσμούς με βάση ιστολογικά χαρακτηριστικά (εικόνα 20). Άτυπες αλλαγές όπως πλειομορφισμός, μιτώσεις, και νέκρωση κατά κανόνα απουσιάζουν ή εμφανίζονται σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις. Τα λοβιακά καρκινώματα *in situ* χαρακτηρίζονται από απουσία ϵ -καδερίνης και β -κατενίνης και την ύπαρξη κερατινών υψηλού μοριακού βάρους κερατίνες (Mastracci *et al.*, 2005).



Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση φυσιολογικού λοβού και του αντίστοιχου λοβιακού καρκινώματος *in situ* καθώς και φυσιολογικού πόρου και του αντίστοιχου πορογενούς καρκινώματος *in situ* (newhealthguide.org)

1.6.2.1.2. Διηθητικά καρκινώματα μαστού

Κύριες κατηγορίες διηθητικών καρκινωμάτων

Το **πορογενές διηθητικό καρκίνωμα (IDC)** αποτελείται από κακοήγη πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα των πόρων τα οποία διηθούν το στρώμα παρουσία ή απουσία DCIS και χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια. Αποτελεί το πιο συχνά απαντώμενο διηθητικό καρκίνωμα μαστού (Eheman *et al.*, 2009). Κατατάσσεται περαιτέρω σε διάφορες υποκατηγορίες ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων, τον αριθμό και την αρχιτεκτονική τους. Ορισμένα από τα κύτταρα του IDC παρουσιάζουν ιδιαίτερα διακριτά χαρακτηριστικά και συγκεκριμένη συμπεριφορά, συνεπώς είναι εύκολο να ταξινομηθούν αναλόγως, ενώ οι πλειοψηφία αυτών (75%) δεν φέρει συγκεκριμένα μορφολογικά γνωρίσματα ώστε να ταξινομηθεί περαιτέρω (Elston και Ellis, 1998). Οι νεοπλασίες αυτές ονομάζονται **NOS** (Not otherwise specified).

Το **διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (ILC)** αποτελεί τη δεύτερη μεγάλη κατηγορία διηθητικών νεοπλασιών του μαστού και αντιπροσωπεύει το 5-15% αυτών. Προέρχεται από κακοήθεια που αναπτύσσεται στα λοβία του μαστού με ακόλουθη διήθηση στο στρώμα. Ο **κλασσικός τύπος** ILC αποτελείται από στρογγυλά, μικρά, ομοιόμορφα και μη συνεκτικά κύτταρα με χαρακτηριστικό τρόπο ανάπτυξης. Τα κύτταρα αυτά εμφανίζονται είτε μονήρη και διασκορπισμένα στον ινώδη συνδετικό ιστό ή οργανώνονται σε μια γραμμική σχοινοειδή διάταξη γνωστή ως Indian file και τελικά διηθούν το στρώμα (895,1780). Οι πυρήνες των κυττάρων είναι ωοειδείς ή οδοντωτοί ενώ το κυτταρόπλασμα περιορίζεται σε μια λεπτή γραμμή περιμετρικά (Quincey *et al.*, 1991). Ο κλασσικός τύπος ILC σχετίζεται με το λοβιακό καρκίνωμα *in situ* στο 90% των περιπτώσεων (Newman, 1966, Dixon *et al.*, 1982). Άλλα είδη ILC περιλαμβάνουν **το συμπαγή τύπο, το σωληνολοβιακό, τον πλειομορφικό και το ιστοκυτταροειδές**.

Λοιπές κατηγορίες διηθητικών καρκινωμάτων

Το **διηθητικό σωληνώδες καρκίνωμα** αποτελεί μια ιδιαίτερη νεοπλασία που αποτελείται από πολύ καλά διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα με αποτέλεσμα τη θετική πρόγνωση της νόσου. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία σωληνοειδών δομών που σχηματίζονται από κύτταρα που αναπτύσσονται σε μονοστοιβάδες (WHO, 2002).

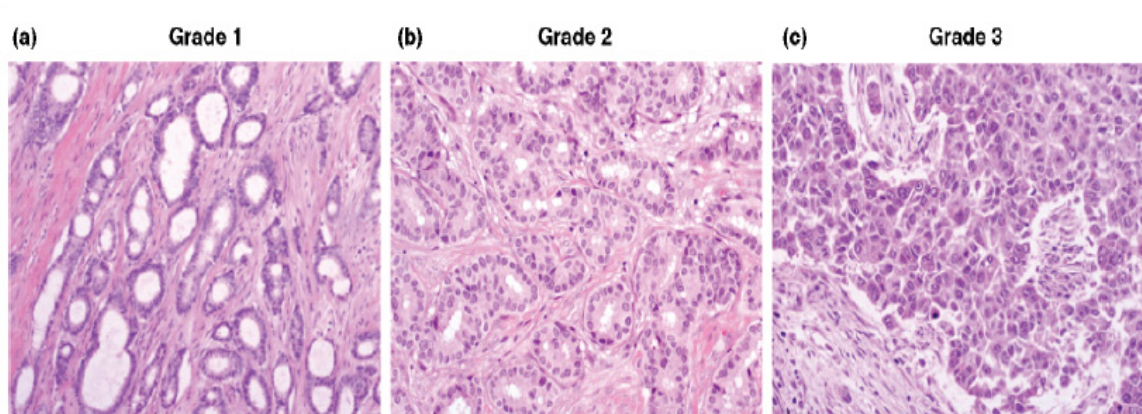
Το διηθητικό βλεννώδες καρκίνωμα χαρακτηρίζεται από την παραγωγή ενδοκυττάριας ή εξωκυττάριας βλέννης. Τα κύτταρα είναι μικρά και παρουσιάζουν ομοιομορφία ενώ αναπτύσσονται σχηματίζοντας συστάδες οι οποίες επιπλέουν σε μεγάλες ποσότητες εξωκυττάριας βλέννης, ορατής ακόμα και με γυμνό ματι (WHO, 2002).

Το διηθητικό μυελοειδές καρκίνωμα αποτελείται κυρίως από κακοήγη λεμφοκύτταρα και ένα μικρό ποσοστό επιθηλιακών κυττάρων με μικρό βαθμό διαφοροποίησης, τα οποία σχηματίζουν μια καλά οριοθετημένη μάζα. Τα κύτταρα σε αυτή την περίπτωση αναπτύσσονται σχηματίζοντας επίπεδες επιφάνειες, νηματοειδείς δομές ή συστάδες (WHO, 2002).

Το διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα παρομοιάζει στην αρχιτεκτονική με το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα και αποτελείται από κύτταρα που διατάσσονται γύρω από ινοαγγειακές εστίες (cores) σχηματίζοντας όγκο με διακριτά όρια (McCulloch *et al.*, 1997).

1.6.2.2. Ταξινόμηση καρκινωμάτων μαστού ανάλογα με το βαθμό κακοήθειας

Τα καρκινώματα του μαστού κατηγοριοποιούνται βάσει των μορφολογικών χαρακτηριστικών, το μοτίβο ανάπτυξης και το βαθμό διαφοροποίησης. Το ποσοστό διαφοροποίησης των κυττάρων του όγκου καταδεικνύει πόσο παρομοιάζουν με τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του μαστού και κατ' επέκταση καθορίζει το βαθμό κακοήθειας (εικόνα 21). Για τον προσδιορισμό του βαθμού κακοήθειας του καρκίνου του μαστού εφαρμόζεται το σύστημα Nottingham (Elston-Ellis) γνωστό και ως NSG (Nottingham Grading System), το οποίο αποτελεί εξέλιξη του προγενέστερου Scarff-Bloom-Richardson συστήματος ταξινόμησης (Elston και Ellis, 1991). Χρησιμοποιείται κυρίως για το διηθητικό καρκίνωμα του μαστού, χωρίς να αποκλείονται και οι *in situ* περιπτώσεις. Η εφαρμογή του NSG προτείνεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.



Εικόνα 21: Απεικόνιση καρκινωμάτων μαστού ύστερα από ταξινόμηση βάσει του βαθμού κακοήθειας με το σύστημα NSG (Nottingham Grading System). a) καλά διαφοροποιημένος όγκος (grade 1) και μικρό αριθμό μιτώσεων που παρομοιάζει με φυσιολογικό ιστό της τελικής πορτοβιακής μονάδας, b) όγκος ενδιάμεσου βαθμού διαφοροποίησης (grade 2), c) πολύ χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης όγκος (grade 3) με συχνή εμφάνιση μιτωτικών γεγονότων (Rakha et al., 2010).

Ο βαθμός κακοήθειας προσδιορίζεται λαμβάνοντας υπ' όψιν τρία μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, στα οποία αντιστοιχεί βαθμολογία 1-3 ανάλογα με τη συχνότητα εμφάνισής τους. Στην περίπτωση που ο όγκος παρουσιάζει **σχηματισμό σωληναρίων** σε ποσοστό μεγαλύτερο του 75% της έκτασης του βαθμολογείται με 1, όταν το ποσοστό κυμαίνεται από 10 έως και 75% βαθμολογείται με 2, ενώ εάν οι σωληνώδεις σχηματισμοί εκτείνονται σε λιγότερο του 10% της μάζας βαθμολογείται με 3. Ο **πυρηνικός** πλειομορφισμός αποτελεί το δεύτερο κριτήριο και αξιολογείται τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά. Σχετικά μικροί πυρήνες, με ελαφριά μόνο αύξηση του μεγέθους σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα, ομαλό περίγραμμα και ομοιομορφία της χρωματίνης βαθμολογούνται με 1. Βαθμολογία 2 δίνεται όταν τα κύτταρα είναι εμφανώς μεγαλύτερα από τα φυσιολογικά, με φυσαλιδωτούς (κύστες) πυρήνες και ελαφριά ποικιλομορφία στο μέγεθος και το σχήμα. Τέλος, κύτταρα με εκτεταμένες διαφορές στο σχήμα και το μέγεθος, γιγαντωμένους πυρήνες με ανώμαλο σχήμα και παρουσία πολλαπλών πυρηνίσκων δίνουν στον όγκο βαθμολογία 3. Ο **αριθμός των μιτώσεων** υπολογίζεται μέσω της παρατήρησης τουλάχιστον 10 οπτικών πεδίων μεγάλης μεγέθυνσης και καταγράφεται, προτιμώντας την περιφέρεια του όγκου όπου τα

Εισαγωγή

κύτταρα είναι πιο ενεργά. Τα κριτήρια για τον υπολογισμό των μιτώσεων είναι πολύ αυστηρά και μόνο πυρήνες με διακριτή μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση επιλέγονται. Η βαθμολόγηση που προκύπτει ανάλογα με τον αριθμό των μιτώσεων περιγράφεται στον πίνακα 1.

Για τον υπολογισμό του βαθμού κακοήθειας η βαθμολογία από κάθε κατηγορία προστίθεται δίνοντας άθροισμα που κυμαίνεται από 3-9 (πίνακας 2).

Πίνακας 1: Αντιστοίχιση αριθμού μιτώσεων και βαθμολογίας ανάλογα το προς έρευνηση πεδίο με χρήση διαφόρων τύπων μικροσκοπίων (Elston και Ellis, 1991).

Είδος μικροσκοπίου			
	Leitz Ortholux	Nikon Labophot	Leitz Diaplan
Αντικειμενικός φακός	x 25	x 40	x 40
Διάμετρος πεδίου	0,59	0,44	0,63
Επιφάνεια πεδίου	0,274	0,152	0,312
Βαθμολογία	Αριθμός μιτώσεων (ανά 10 πεδία στην περιφέρεια του όγκου)		
1	0-9	0-5	0-11
2	10-19	6-10	12-22
3	>20	>11	>23

Πίνακας 2: Τρόπος υπολογισμού του βαθμού κακοήθειας των καρκινωμάτων του μαστού (Elston και Ellis, 1991).

Αντιστοιχία βαθμού κακοήθειας-διαφοροποίησης		
Βαθμολογία	Βαθμός κακοήθειας	Βαθμός διαφοροποίησης
3-5	Grade I	Καλά διαφοροποιημένα
6-7	Grade II	Ενδιάμεσα διαφοροποιημένα
8-9	Grade III	Ελάχιστα διαφοροποιημένα

Υπάρχουν πλέον αδιάσειστα στοιχεία που καταδεικνύουν ότι ο βαθμός κακοήθειας μιας νεοπλασίας μπορεί να προβλέψει με ακρίβεια τη βιολογική συμπεριφορά του όγκου, ιδιαίτερα σε πρώιμα στάδια της νόσου όταν το μέγεθος του είναι ακόμη μικρό. Μάλιστα, η ακρίβεια της πρόγνωσης εμφανίζεται μεγαλύτερη σε σχέση με άλλους χρονοεξαρτώμενους παράγοντες όπως για παράδειγμα το μέγεθος του όγκου (Sundquist *et al.*, 1999, Frkovic-Grazio *et al.*, 2002, Rakha *et al.*, 2008). Όγκοι με χαμηλό βαθμό κακοήθειας χαρακτηρίζονται από θετική έκβαση της νόσου συνήθως χωρίς επανεμφάνιση, η οποία εάν συμβεί θα αφορά στα όψιμα χρόνια της ζωής του ασθενή. Όταν ο βαθμός κακοήθειας είναι ενδιάμεσος, τέτοια είναι και η έκβαση της νόσου το επόμενο χρονικό διάστημα. Μακροπρόθεσμα, τα καρκινώματα αυτά έχουν την τάση να επανεμφανίζονται, τις περισσότερες φορές με αρνητική έκβαση. Τέλος, καρκινώματα του μαστού με υψηλό βαθμό κακοήθειας τείνουν να επανακάμψουν και να δώσουν μεταστάσεις ακόμα και στο άμεσο διάστημα μετά τη διάγνωση, συνήθως στα πρώτα 8 χρόνια, με μικρές πιθανότητες μακρόχρονης επιβίωσης (Rakha *et al.*, 2008). Ο προσδιορισμός του βαθμού κακοήθειας του όγκου έχει ως αποτέλεσμα τον καλύτερο σχεδιασμό και ανάπτυξη νέων στρατηγικών όσον αφορά τον τρόπο αντιμετώπισης της νόσου.

1.6.2.3. Σταδιοποίηση καρκινωμάτων μαστού με εφαρμογή του συστήματος TNM

Για τον προσδιορισμό του σταδίου, δηλαδή της έκτασης του καρκίνου του μαστού στο σώμα, εφαρμόζεται το σύστημα TNM (Tumor-Node-Metastasis) το οποίο στηρίζεται στο μέγεθος του πρωτογενούς όγκου, στην εμπλοκή των λεμφαδένων και την παρουσία ή την απουσία μακρινών μεταστάσεων (πίνακας 3). Βάση αυτών προκύπτει η σταδιοποίηση του καρκίνου η οποία περιλαμβάνει 4 στάδια: 0-IV (πίνακας 4).

1.6.2.4. Μοριακή ταξινόμηση των καρκινωμάτων του μαστού

Δεδομένης της μεγάλης ετερογένειας του καρκίνου του μαστού για την ολοκληρωμένη κατάταξη και ταξινόμηση κάθε κατηγορίας, εκτός από τις παραπάνω παραμέτρους (ιστολογική ταξινόμηση, βαθμός κακοήθειας, σταδιοποίηση TNM) καίριο ρόλο διαδραματίζει το μοριακό προφίλ κάθε όγκου. Ο προσδιορισμός μοριακών δεικτών των καρκινωμάτων του μαστού σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά, συμπληρώνει και καθορίζει το είδος του καρκίνου, ο οποίος δεν πρέπει να αντιμετωπίζεται σαν ενιαία οντότητα. Η παρουσία υποδοχέων οιστρογόνων (ER), προγεστερονικών υποδοχέων (PR) καθώς και υποδοχέων για τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα 2 (HER2: human epidermal growth factor receptor 2) χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση των όγκων στους υποτύπους του καρκίνου του μαστού (Fulford *et al.*, 2006). Αυτοί οι υποδοχείς ορμονών και αυξητικών παραγόντων προωθούν την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό.

- **Οι οιστρογονικοί υποδοχείς** αποτελούν τον πλέον σημαντικό δείκτη όσον αφορά τη μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού καθώς και την πρόγνωση (Group EBCTC 2005, Badve *et al.*, 2009, Oh *et al.*, 2006). Παρόλο που ως μεμονωμένη πληροφορία για το προφίλ του όγκου δεν παρέχει ολοκληρωμένη πρόγνωση της νόσου, η παρέμβαση στη λειτουργικότητα των υποδοχέων αυτών (ενεργοί/ανενεργοί) είναι γνωστό ότι μπορεί να παρέχει μακρόχρονη επιβίωση (Group EBCTC, 2005). Ήδη από το 1970 η ύπαρξη αυτών των υποδοχέων χρησιμοποιούνταν για τη διαχείριση της νόσου ως πρωταρχική ένδειξη

ανταπόκρισης στην ενδοκρινή θεραπεία (Rakha *et al.*, 2010). Η αναστολή της λειτουργίας των υποδοχέων αυτών αποτελεί βασικό μηχανισμό δράσης της ενδοκρινούς θεραπείας. Περίπου το 50% των όγκων αυτών ανταποκρίνεται στη χρήση αντι-οιστρογόνων και αναστολέων αρωματασών σε αντίθεση με τους αρνητικούς για οιστρογόνα όγκους (Group EBCTC, 1998). Όγκοι θετικοί για οιστρογονικούς υποδοχείς αποτελούν περίπου το 75% των καρκίνων του μαστού. Αποτελούνται από καλά διαφοροποιημένα κύτταρα, χαρακτηρίζονται ως λιγότερο επιθετικοί και έχουν καλύτερη έκβαση από ότι οι αρνητικοί για οιστρογονικούς υποδοχείς όγκοι (Dunnwald *et al.*, 2007).

Πίνακας 3: Περιγραφή των επιμέρους χαρακτηριστικών των καρκινωμάτων του μαστού που οδηγούν στην σταδιοποίηση του

Χαρακτηριστικά συστήματοςTNM						
Χαρακτηριστικά	Tx	T0/Tis	T1	T2	T3	T4
Μέγεθος όγκου	Απουσία πρωτογενούς όγκου	T0: Απουσία πρωτογενούς όγκου Tis: in situ καρκίνωμα	0-2cm	2-5cm	>5cm	Επέκταση του όγκου στα τοιχώματα του στήθους ή/και στο δέρμα
Κατάσταση λεμφαδένων	Nx	N0	N1	N2	N3	
	Δεν μπορεί να προκύψει εκτίμηση	Ανέπαφοι	Καρκινικά κυττάρα σε 1-3 μασχαλιαίους	Καρκινικά κυττάρα σε 4-9 μασχαλιαίους	Καρκινικά κυττάρα σε >10 μασχαλιαίους	
Μετάσταση	M0	M1				
	Απουσία ενδείξεων μετάστασης	Παρουσία μεταστάσεων				

Πίνακας 4: Σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού βάση του συστήματος TNM.

Σταδιοποίηση Συστήματος TNM			
Στάδιο	Tumor	Node	Metastasis
0	T0	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0/T1	N1mi	M0
IIA	T0/T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0-T2	N2	M0
	T3	N1-N2	M0
IIIB	T4	N0-N2	M0
IIIC	Tis-T4	N3	M0
IV	Tis-T4	N0-N4	M1

- Οι θετικοί όγκοι για **προγεστερονικούς υποδοχείς** αποτελούν το 65-75% του συνόλου των όγκων. Συνήθως οι όγκοι αυτοί σπανίως είναι αρνητικοί για οιστρογονικούς υποδοχείς (Olivotto *et al.*, 2004). Η διπλή θετικότητα (ER+PR+) χαρακτηρίζει την πλειοψηφία των όγκων (Dunnwald *et al.*, 2007, Rakha *et al.*, 2007) ανάμεσα στους οποίους η μεγάλη πλειοψηφία αναταποκρίνεται στην ορμονική θεραπεία (31). Αντίθετα η διπλή αρνητικότητα (ER-PR-) στα καρκινώματα χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά επανεμφάνισης της νόσου, χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης και δεν ανταποκρίνονται στην ορμονική θεραπεία (Ravdin *et al.*, 1992, Elledge *et al.*, 2000, Bardou *et al.*, 2003). Όσον αφορά τη συσχέτιση της επιθετικότητας του όγκου με το ορμονικό του προφίλ, οι υπότυποι κατατάσσονται με αύξουσα σειρά ER+PR+, ER+PR-, ER-PR+, ER-PR με επιπρόσθετα κριτήρια το μέγεθος του όγκου, το βαθμό κακοήθειας, την ανταπόκριση στην ορμονική θεραπεία και την έκβαση της (Dunnwald *et al.*, 2007, Ravdin *et al.*, 1992, Elledge *et al.*, 2000, Rahka *et al.*, 2007, Dowsett *et al.*, 2005).
- Τα καρκινώματα που είναι θετικά για το **HER2** χαρακτηρίζονται ως επιθετικά και η υπερέκφραση του ογκογονιδίου έχει δειχθεί ότι ενισχύει την ανάπτυξη και την εξέλιξη τους. Τα κύτταρα των όγκων με θετικότητα στον HER2 παρουσιάζουν

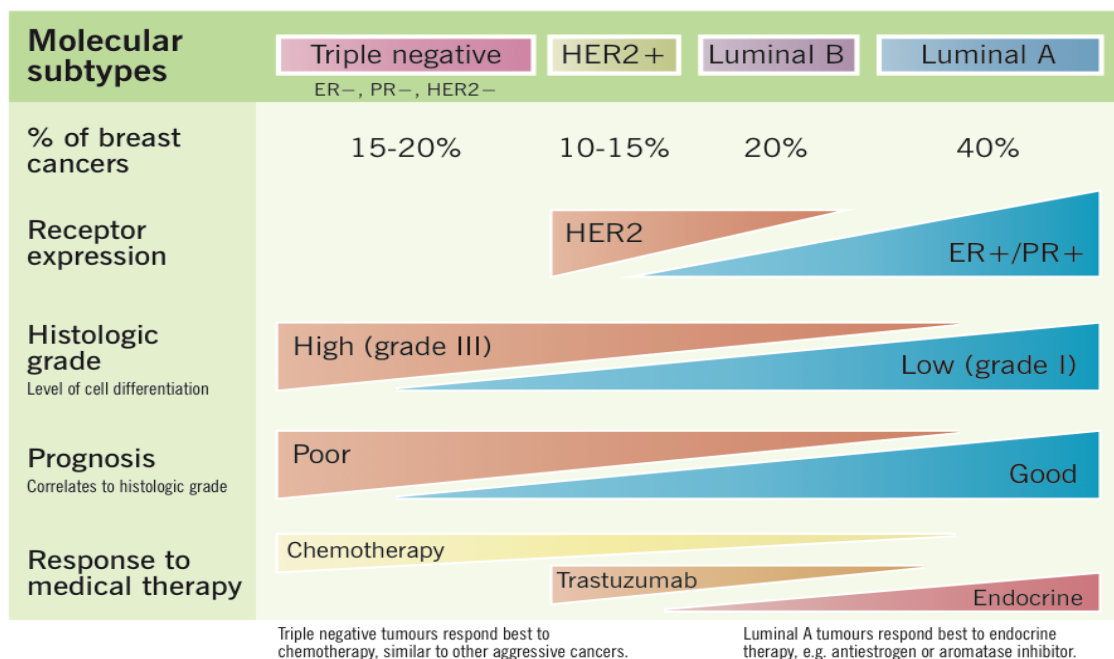
χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης και συνεπώς σπανίως αφορούν διηθητικά καρκινώματα χαμηλού βαθμού κακοήθειας (Rosenthal *et al.*, 1987), αντιθέτως σχετίζεται με όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας, αυξημένου επιπέδου πολλαπλασιασμού, ανευπλοειδία και απουσία ορμονικών υποδοχέων (Ecless *et al.*, 2001, Yarden *et al.*, 2001) και κατ' επέκταση άσχημη εξέλιξη της νόσου. Η δημιουργία και χρήση φαρμάκων τα οποία στοχεύουν τον υποδοχέα του HER2 έχουν βελτιώσει κατά πολύ την έκβαση της νόσου.

Ανάλογα με την έκφραση των παραπάνω υποδοχέων καθώς και με το συνδυασμό τους στα κύτταρα τα καρκινώματα του μαστού χωρίζονται σε 4 κατηγορίες (εικόνα 6):

- ❖ **Αυλικού τύπου Α όγκοι (Luminal A):** Θετικοί για οιστρογονικούς ή/και προγεστερονικούς υποδοχείς και αρνητικοί για HER2 υποδοχέα (**ER+PR+HER2-**). Πρόκειται συνήθως για χαμηλού βαθμού κακοήθειας καρκινώματα, με πολύ καλή πρόγνωση και πολύ καλή ανταπόκριση στην ορμονική θεραπεία αλλά όχι στην κλασσική χημειοθεραπεία.
- ❖ **Αυλικού τύπου Β όγκοι (Luminal B):** Θετικοί για οιστρογονικούς ή/και προγεστερονικούς υποδοχείς και θετικοί για HER2 υποδοχέα (**ER+PR+HER2+**). Αποτελούνται από ελαφρώς διαφοροποιημένα κύτταρα και ανταποκρίνονται καλύτερα σε χημειοθεραπευτικές μεθόδους αντιμετώπισης και λιγότερο καλά στην ορμονική θεραπεία.
- ❖ **HER 2 θετικοί όγκοι:** Αρνητικοί για οιστρογονικούς ή προγεστερονικούς υποδοχείς και θετικοί για HER2 υποδοχέα (**ER-PR-HER2+**). Πριν την ανακάλυψη και εφαρμογή των θεραπειών που στοχεύουν τον HER2 αποτελούσε μια από τις πιο επιθετικές μορφές καρκίνου του μαστού με πολύ υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Η εφαρμογή όμως της στόχευσης αυτών των υποδοχέων έχει βελτιώσει πλέον κατά πολύ την πρόγνωση και έκβαση της νόσου.

- ❖ **Τριπλά αρνητικοί όγκοι (Triple Negative):** Αρνητικοί για οιστρογονικούς ή προγεστερονικούς υποδοχείς και αρνητικοί για HER2 υποδοχέα (**ER-PR-ER2-**). Προέρχεται από μυοεπιθηλιακά κύτταρα και είναι γνωστός ως και βασικού τύπου (basal-like). Αποτελεί τον πιο επιθετικό τύπο καρκίνου και χαρακτηρίζεται από τα μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας. Μεγάλο μειονέκτημα του τύπου αυτού είναι η αποτυχία ανάπτυξης στοχευμένης θεραπείας κυρίως λόγω της απουσίας υποδοχέων-στόχων όπως στις υπόλοιπες κατηγορίες.

Ο συνδυασμός των επιμέρους χαρακτηριστικών από κάθε κατηγορία ταξινόμησης των καρκινωμάτων του μαστού οδηγεί στην πλήρη κατάταξη ενός όγκου



Εικόνα 22: Απεικόνιση της συσχέτισης όλων των χαρακτηριστικών των καρκινωμάτων του μαστού (Wong and Rebelo 2012).

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Η πολυ(A) πολυμεράση (PAP), αποτελεί κεντρικό παίκτη της μηχανής πολυαδενυλίωσης, καθώς είναι το ένζυμο υπεύθυνο για την προσθήκη της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο των mRNA. Η PAP εκφράζεται καθολικά και σχεδόν σταθερά σε όλους τους φυσιολογικούς ιστούς. Όμως, τα επίπεδα έκφρασής της παρουσιάζουν ιδιαίτερη διακύμανση σε ότι αφορά τον καρκίνο, όπου παρατηρείται αύξηση των επιπέδων του mRNA που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του ενζύμου (Toralian *et al.*, 2001). Επίσης, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η ενεργότητα της πολυαδενυλίωσης εμφανίζεται σημαντικά ενισχυμένη στα επιθετικά καρκινώματα του μαστού σε σχέση με τα αντίστοιχα λιγότερο επιθετικά και η αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου έχει προταθεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για τους αρνητικούς για τους λεμφαδένες ασθενείς (Scorilas *et al.*, 2000).

Η διαδικασία της πολυαδενυλίωσης των μηνυμάτων RNA αποτελεί κρίσιμο σημείο ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης. Η ύπαρξη πολλαπλών θέσεων πολυαδενυλίωσης στην 3' αμετάφραστη περιοχή των περισσότερων γονιδίων, οδηγεί στην παραγωγή διαφορετικών ισομορφών mRNA ως προς το μήκος της 3' μετάφραστης περιοχής, λόγω της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης. Η επιλογή των εναλλακτικών σημάτων πολυαδενυλίωσης οδηγεί στην παραγωγή βραχέων ισομορφών mRNA, με αποτέλεσμα την απώλεια μεγάλου μέρους της 3' αμετάφραστης περιοχής και συνεπώς την απομάκρυνση αλληλουχιών αρνητικής ρύθμισης, όπως τα miRNA. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην αύξηση της έκφρασης της παραγόμενης πρωτεΐνης. Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση πιθανά οδηγεί στην υπερέκφραση ογκογονιδίων και έχει συσχετιστεί με τον καρκινικό φαινότυπο. Ως πιθανός μηχανισμός προώθησης της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης έχει προταθεί η έκτοπη έκφραση όλων/ή κάποιων από τους παράγοντες που συμμετέχουν στην διαδικασία της πολυαδενυλίωσης.

Η πολυ(A) πολυμεράση-α (PAPOLA) αποτελεί την πιο καλά μελετημένη ισομορφή του ενζύμου. Η πιθανή συνεισφορά της PAPOLA στην καρκινογένεση δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Επίσης, παρόλο που υπάρχουν ενδείξεις σύνδεσης της PAPOLA με την εναλλακτική πολυαδενυλίωση, η πιθανή συμβολή της στην επιλογή του σήματος πολυαδενυλίωσης δεν έχει διερευνηθεί.

Σκοπό της διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση της:

1. Συμμετοχής της PAPOLA στην αυξημένη ενεργότητα της πολυαδενυλίωσης που έχει καταγραφεί στον καρκίνο του μαστού. Θα εξεταστούν τα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA σε 211 κλινικά δείγματα καρκίνου μαστού με ανοσοϊστοχημεία.
2. Πιθανής συνεισφοράς της PAPOLA στον καρκινικό φαινότυπο κατόπιν της αποσιώπησης μέσω χρήσης siRNA και της υπερέκφρασης μέσω πλασμιδιακών φορέων σχεδιασμένων να εκφράζουν την πρωτεΐνη, σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού.
3. Ενδεχόμενης συμμετοχής της PAPOLA στη διαμόρφωση του 3' άκρου των μηνυμάτων RNA, η οποία θα μπορούσε να επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης της παραγόμενης πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, θα διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του ενζύμου με μεταβολές στην προτιμώμενη θέση πολυαδενυλίωσης καθώς και με πιθανές αλλαγές στο μήκος της πολυ(A) ουράς του σε mRNA, που είναι γνωστό ότι υπόκεινται σε εναλλακτική πολυαδενυλίωση η οποία μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασής τους,

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

II.1. Βιολογικό υλικό

II.1.1. Καρκινικοί ιστοί μαστού

Χρησιμοποιήθηκαν 211 τομές καρκινικού ιστού μαστού από το αρχειακό υλικό του τμήματος Παθολογίας της Ιατρικής σχολής Αθηνών. Τα δείγματα από τους ασθενείς είχαν προηγουμένως υποστεί την κλασική επεξεργασία μονιμοποίησης σε φορμαλδεΰδη και εμποτισμού σε παραφίνη. Όλες οι τομές μαστού αξιολογήθηκαν ιστολογικά από Παθολογοανατόμους με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Τα δείγματα συνοδεύονταν από μια ενημερωμένη βάση δεδομένων που περιελάμβανε κλινικά και ιστολογικά στοιχεία σχετικά με τον κάθε όγκο (μέγεθος, βαθμός αποδιαφοροποίησης, στάδιο, κ.α.), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Το βιολογικό υλικό θεωρείται καλά χαρακτηρισμένο ως προς τις κλινικοπαθολογικές και ιστολογικές παραμέτρους από παθολογοανατόμους, ενώ ταυτόχρονα οι όγκοι έχουν μελετηθεί στο παρελθόν για την έκφραση διαφόρων μοριακών δεικτών. Η σταδιοποίηση των καρκινικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το σύστημα TNM, όπως καταρτίστηκε από την Αμερικανική Συντονιστική Επιτροπή για τον Καρκίνο (American Joint Committee on Cancer) (Edge *et al.*, 2010).

Ως χρόνος ολικής επιβίωσης ορίστηκε το χρονικό διάστημα μεταξύ της ημερομηνίας χειρουργικής αφαίρεσης του όγκου και της ημερομηνίας θανάτου του ασθενούς ή της ημερομηνίας της τελευταίας παρακολούθησης για τους ασθενείς που ζούσαν ως το τέλος της μελέτης. Η έρευνα διεξήχθη σύμφωνα με τα ηθικά κριτήρια της Διακήρυξης του Ελσίνκι το 1955, όπως αναθεωρήθηκε στο Τόκιο το 2004. Όλοι οι ασθενείς ήταν ενημερωμένοι για την έρευνα και συγκατατέθηκαν εγγράφως για τη συμμετοχή τους.

II.1.2. Κυτταρικές σειρές

Οι καρκινικές σειρές μαστού MCF-7, MDA-MB 231 και τα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα ανθρώπου HEK 293 καλλιεργήθηκαν σε κλίβανο κυτταροκαλλιεργειών στους 37°C παρουσία 5% CO₂. Χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο RPMI 1640 (Sigma Aldrich

εμπλουτισμένο με 10% εμβρυικό ορό μόσχου (Fetal Bovine Serum, Gibco ,Life Technologies) και 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Pen-Strep , Gibco, Life Technologies). Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε πλαστικές φιάλες ή τρυβλία καλλιέργειας διαφόρων εμβადών, ανάλογα με τις πειραματικές ανάγκες, έως ότου το ταπήτιο των κυττάρων καλύψει περίπου το 80% της επιφάνειας τους. Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων, προστέθηκε διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS, Sigma Aldrich) με σκοπό την πλύση και ανάλογη ποσότητα θρυψίνης (0,025% Trypsin-EDTA, Gibco, Life Technologies) ώστε να αποκολληθούν από τον πυθμένα της φλάσκας. Στη συνέχεια, προστέθηκε ίση ποσότητα θρεπτικού υλικού με αυτή της θρυψίνης ώστε να αυτή να απενεργοποιηθεί και τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε σωλήνα τύπου falcon 15ml, φυγοκεντρήθηκαν στις 2000rpm για 7 λεπτά και επαναιωρήθηκαν σε 2ml θρεπτικού υλικού. Περίπου το 1/3 του εναιωρήματος τοποθετήθηκε εκ νέου στις πλαστικές φιάλες καλλιέργειας ώστε να ανακαλλιεργηθούν. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας των κυττάρων λάμβανε χώρα κάθε 2-3 ημέρες. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν ύστερα από το συγχρονισμό των κυττάρων μέσω επώασης για 24 ώρες σε θρεπτικό μέσο απουσία ορού σε κλίβανο κυτταροκαλλιιεργειών. Με τον τρόπο αυτό κύτταρα που βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου σε μια καλλιέργεια συγχρονίζονται στην ίδια φάση και αποκτούν έτσι κοινό εναρκτήριο σημείο. Με την απουσία ορού από το θρεπτικό μέσο τα κύτταρα συγκεντρώνονται στη G₁ φάση και ο κυτταρικός κύκλος ξεκινά ύστερα από προσθήκη πλήρους μέσου. Ύστερα από αυτήν τη διαδικασία ακολούθησε η εφαρμογή των εκάστοτε πειραματικών συνθηκών.

Η διαδικασία των κυτταροκαλλιιεργειών πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής κάτω από ασηπτικές συνθήκες.

II.2. Ανοσοϊστοχημεία

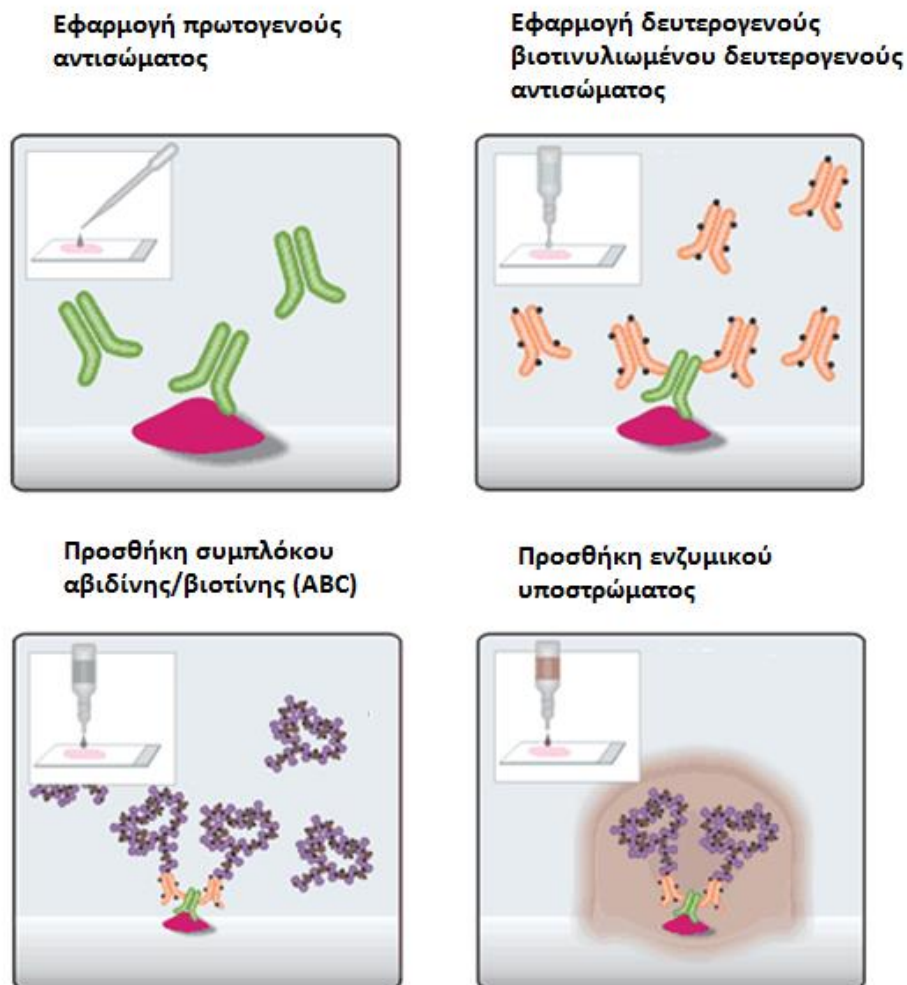
Η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας εφαρμόζεται με σκοπό τον εντοπισμό των πρωτεϊνών στα κύτταρα των ιστών και χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της PAPOLA σε καρκινικούς ιστούς μαστού. Βασίζεται στην αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος και χαρακτηρίζεται ως άμεση όταν το αντίσωμα είναι σημασμένο ή ως έμμεση όταν

χρησιμοποιείται δευτερογενές σημασμένο αντίσωμα (Bancroft *et al.*, 2008). Η ανίχνευση και η μελέτη της PAPOLA στα καρκινώματα μαστού πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή έμμεσης ανοσοϊστοχημείας με το σύστημα αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης (ABC/HRP) (εικόνα 1).

Πειραματική πορεία

Οι τομές επώστηκαν ολονύκτια σε κλίβανο στους 37°C και την επόμενη μέρα για 2 ώρες στους 60°C. Ακολούθησε αποπαραφίνωση με εμβάπτιση σε ξυλόλη και εν συνεχεία ενυδάτωση σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις αιθανόλης (100°, 96°). Η ανάκτηση της αντιγονικότητας των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με θέρμανση για 15 λεπτά σε διάλυμα κιτρικού οξέος 0,01 M στα 750 W σε φούρνο μικροκυμάτων και στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά ώστε οι πρωτεΐνες να ανακτήσουν την τρισδιάστατη δομή τους. Οι ιστοί ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό και διάλυμα φωσφορικών αλάτων TBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl). Ακλούθησε εξουδετέρωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης μέσω επώασης σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) 0,3% σε TBS για 30 λεπτά στο σκοτάδι ώστε να αποφευχθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Μετά από έκπλυση με TBS, στις τομές προστέθηκε φυσιολογικός ορός αλόγου αραιωμένος σε TBS σε αναλογία 1:5 για 30 λεπτά για την αποφυγή των μη ειδικών αντιδράσεων λόγω μη ειδικής χρώσης. Στη συνέχεια τα δείγματα επώστηκαν ολονύκτια στους 4°C με το πρωτογενές αντίσωμα για την PAPOLA (rabbit πολυκλωνικό αντίσωμα, Sigma-Aldrich) σε αραιώση 1:120. Την επόμενη μέρα, μετά από πλύσεις με TBS προστέθηκε το βιοτυνιλιωμένο δευτερογενές αντίσωμα (anti-rabbit δευτερογενές αντίσωμα, Vector Labs) για 30 λεπτά σε αραιώση 1:40 και ακολούθησαν εκ νέου πλύσεις με TBS. Οι τομές έπειτα επώστηκαν με το σύμπλοκο αβιδίνης-βιοτινυλιωμένης υπεροξειδάσης (Vectastain ABC Kit, Vector Labs) για 30 λεπτά, με σκοπό η βιοτίνη του δευτερογενούς αντισώματος να δεσμεύσει την ελεύθερη αβιδίνη και ακολούθησαν 3 πλύσεις με TBS. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η χρωστική αντίδραση μέσω της προσθήκης τετραϋδροχλωρικής 3,3 διαμινοβενζιδίνης (DAB) (Applichem) σε 0,06% H₂O₂ για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Το χρωμογόνο DAB πολυμερίζεται παρουσία H₂O₂ και υπεροξειδάσης δίνοντας ένα καφέ

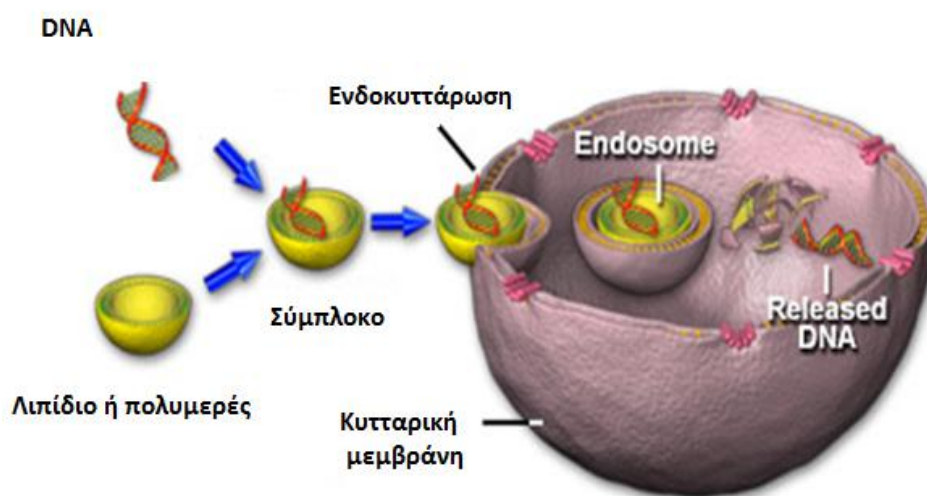
χρώμα στις θέσεις σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος, ώστε αυτές να είναι ορατές με κοινό μικροσκόπιο. Ύστερα από έκπλυση των δειγμάτων με νερό βρύσης ακολούθησε η χρώση τους με αιματοξυλίνη. Τέλος, οι τομές αφυδατώθηκαν με εμβάπτιση σε αιθανόλη (96°,100°) και ακολούθως σε ξυλόλη και επικαλύφθηκαν με καλυπτρίδα. Ακολούθησε παρατήρηση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο και η ποσοτικοποίηση της έκφρασης της PΑΡΟΛΑ στα κύτταρα των καρκινωμάτων του μαστού.



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των βασικών σταδίων της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου.

II.3. Διαμόλυνση κυττάρων με μικρό παρεμβαλλόμενο RNA (siRNA) και πλασμιδιακό DNA

Για την καταστολή της έκφρασης ή την υπερέκφραση του γονιδίου της PAPOLA στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων με μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (siRNA) και πλασμιδιακούς φορείς αντίστοιχα. Η διαμόλυνση αποτελεί μια διαδικασία κατά την οποία εξωγενή νουκλεϊκά οξέα εισάγονται σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Επιλέχθηκε η χρήση κατιονικού λιπιδίου ή πολυμερούς (χημική μέθοδος), κατά την οποία η θετικά φορτισμένη ουσία δημιουργεί σύμπλοκο με το αρνητικά φορτισμένο νουκλεϊκό οξύ, περικλείοντας το. Το θετικά φορτισμένο σύμπλοκο έλκεται από την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη την οποία και διαπερνά. Ο ακριβής μηχανισμός εισόδου στο κύτταρο δεν είναι γνωστός, πιστεύεται όμως ότι το σύμπλοκο ενδοκυτταρώνεται και στην περίπτωση του DNA αυτό μεταφέρεται στον πυρήνα ώστε να εκφραστεί (εικόνα 2).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση διαμόλυνσης ευκαρυωτικού κυττάρου με πλασμιδιακό DNA.

II.3.1. Αποσιώπηση PAPOLA με εφαρμογή της μεθόδου παρεμβολής RNA (RNAi)

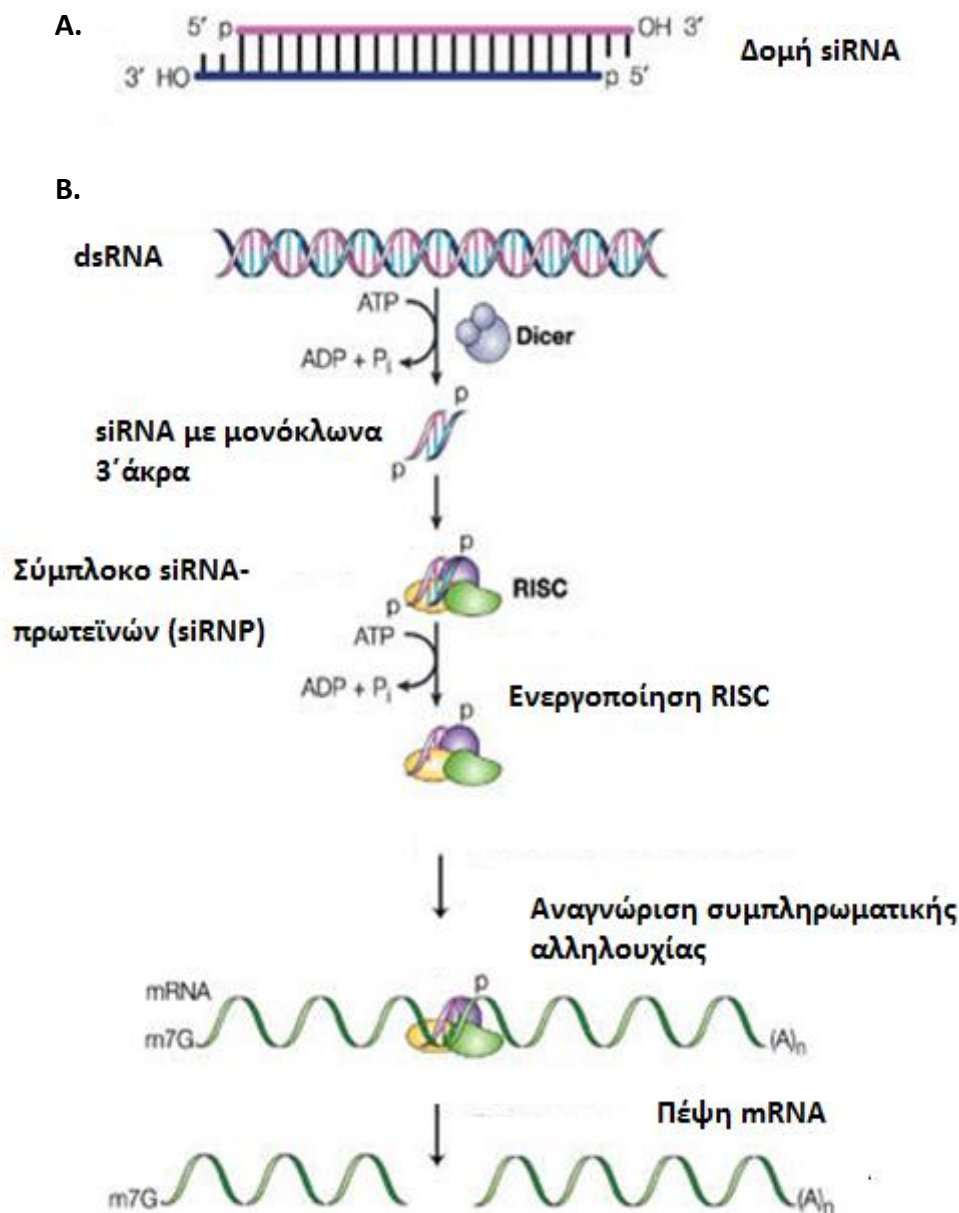
Για την αποσιώπηση του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την έκφραση της PAPOLA στα κύτταρα εφαρμόστηκε η μέθοδος RNAi, η οποία αποτελεί έναν μετα-μεταγραφικό τρόπο καταστολής της έκφρασης των γονιδίων, κατά τον οποίο το mRNA

ενός συγκεκριμένου γονιδίου καταστρέφεται. Η καταστροφή του mRNA-στόχου ή η παρεμπόδιση της μετάφρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μη παραγωγή του γονιδιακού προϊόντος, στις περισσότερες περιπτώσεις των πρωτεϊνών. Η γονιδιακή αποσιώπηση επιτυγχάνεται μέσω χρήσης μικρών μορίων RNA μήκους 20-23 νουκλεοτιδίων, των siRNA (small interfering RNA) και αποτελεί έναν πολύ διαδεδομένο και αποτελεσματικό τρόπο γονιδιακής αποσιώπηση στα κύτταρα των θηλαστικών (Brummelkamp *et al.*, 2002). Η τεχνολογία των siRNA εκμεταλλεύεται το φυσιολογικό μηχανισμό του κυττάρου για την αποικοδόμηση των mRNA, αυτόν των miRNA, με τη διαφορά ότι τα siRNA εισάγονται εξωγενώς στο κύτταρο. Η διαδικασία ξεκινά με την αναγνώριση και πέψη δίκλωνου RNA (dsRNA) από μια ειδική ριβονουκλεάση τύπου III, τη Dicer, στο κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα τη δημιουργία μικρότερων dsRNA, των siRNA, με χαρακτηριστικό γνώρισμα τα 2 ελεύθερα 3' νουκλεοτίδια και στους δυο κλώνους. Στη συνέχεια τα siRNA αλληλεπιδρούν και ενεργοποιούν το σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex). Η ενδονουκλεάση argonaute 2 (AGO2) αποτελεί μέρος του συμπλόκου RISC και τέμνει τον νοηματικό κλώνο του siRNA, ενώ ο αντινοηματικός συμπληρωματικός παραμένει προσδεσμένος στο RISC καθοδηγώντας το στο mRNA-στόχο το οποίο τέμνεται από την AGO2 (εικόνα 3). Η ειδικότητα της γονιδιακής αποσιώπησης επιτυγχάνεται λόγω της πλήρους συμπληρωματικότητας του κλώνου του siRNA με το mRNA-στόχο (Agrawal *et al.* 2003, Pecot *et al.* 2011). Έχει επίσης επισημανθεί ότι η AGO2 μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες επιταχύνει την αποαδενυλίωση των μηνυμάτων στόχων.

Πειραματική πορεία

Για τις ανάγκες της γονιδιακής αποσιώπησης του γονιδίου της PAPOLA στα MCF-7 και MDA-MB 231 κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικά siRNA με στόχο το mRNA του ενζύμου (Flexitube, Qiagen) ώστε να επιβεβαιωθεί η ειδικότητα του γονιδίου στόχου ως προς τις βιολογικές επιπτώσεις της καταστολής της έκφρασης του καθώς και αρνητικό siRNA ελέγχου (All stars, Qiagen) το οποίο δεν παρουσιάζει συμπληρωματικότητα προς κάποιο mRNA, ώστε να προσδιοριστεί τυχόν μη ειδική δράση. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειών έξι φρεατίων για 24 ώρες ώστε να σχηματίσουν ταπήτιο και την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο X-fect siRNA transfection

reagent (Clontech). Σε σωλήνα τύπου eppendorf προστέθηκαν 100μl διάλυμα διαμόλυνσης (transfection buffer) και ποσότητα siRNA τελικής συγκέντρωσης 10nM, ενώ σε δεύτερο σωλήνα, 90μl διάλυμα διαμόλυνσης και 10 μl λιπιδίου και ακολούθησε ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια τα δυο διαλύματα αναμείχθηκαν και το μίγμα επωάστηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ τέλος προστέθηκε στάγδην στα κύτταρα. Ύστερα από επώαση των κυττάρων 24 ώρες, το θρεπτικό μέσο ανανεώθηκε και τα κύτταρα επωάστηκαν για ακόμη 48h στον κλίβανο κυτταροκαλλιιεργειών.

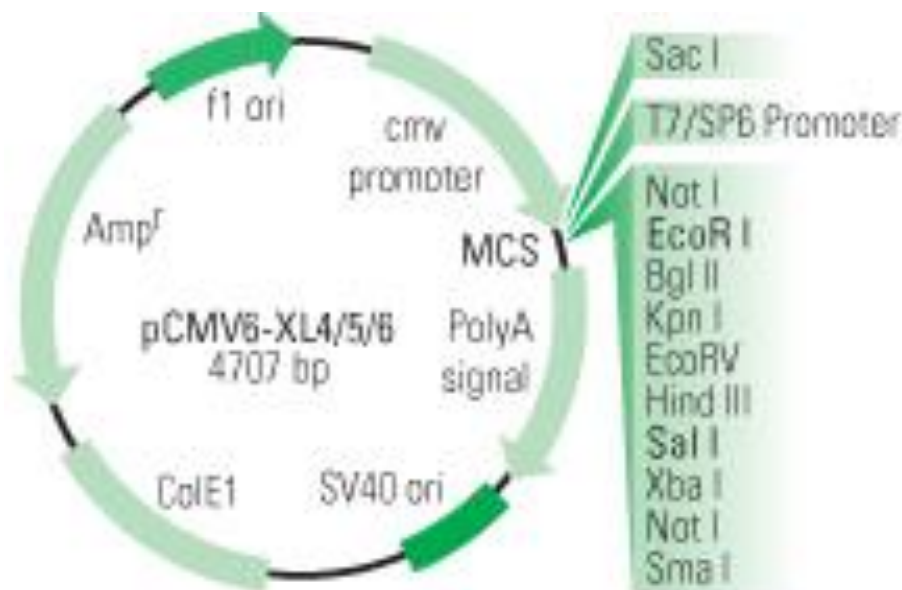


Εικόνα 3: Αναπαράσταση μηχανισμού παρεμβολής RNAi. **A.** Απεικόνιση δομής siRNA, **B.** Μονοπάτι δράσης siRNA.

II.3.2. Υπερέκφραση του γονιδίου της PAPOLA

II.3.2.1. Χρήση πλασμιδιακών φορέων

Για τη διερεύνηση των συνεπειών των αυξημένων επιπέδων έκφρασης της PAPOLA στα κύτταρα, το ένζυμο υπερεκφράστηκε μέσω χρήσης πλασμιδιακών φορέων. Για τον μετασχηματισμό των MCF-7, MDA-MB 231 και HEK 293 κυττάρων με σκοπό την υπερέκφραση του γονιδίου της PAPOLA χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pCMV6-XL5-PAPOLA (Origene) και ως αρνητικός μάρτυρας για τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω, ο πλασμιδιακός φορέας pCMV6-XL5 (Origene). Χαρακτηριστικά του φορέα που χρησιμοποιήθηκε αποτελούν ο υποκινητής του κυτταρομεγαλοϊού (CMV promoter), οι θέσεις αναγνώρισης διαφόρων περιοριστικών ενδονουκλεασών και η ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη (εικόνα 4). Επιπλέον, περιέχεται αλληλουχία 2740 βάσεων που αποτελούν την κωδική περιοχή της PAPOLA με σκοπό την υπερέκφραση της.



Εικόνα 4: Χάρτης πλασμιδιακού φορέα pCMV6-XL5. Αναπαριστώνται βασικές δομές όπως ο υποκινητής, οι θέσεις αναγνώρισης από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες κλπ.

Τα περισσότερα είδη βακτηρίων έχουν την ιδιότητα να προσλαμβάνουν και να ενσωματώνουν μόρια DNA από το θρεπτικό υλικό στο οποίο καλλιεργούνται. Ενώ στις

περισσότερες των περιπτώσεων το «ξένο» DNA αποικοδομείται στο εσωτερικό του κυττάρου, υπό κατάλληλες συνθήκες μπορεί να ενσωματωθεί επιτυχώς, ιδιαίτερα όταν το DNA είναι πλασμιδιακό. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

II.3.2.2. Παρασκευή επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli* και μετασχηματισμός με πλασμιδιακό DNA-Ανάπτυξη βακτηριακής καλλιέργειας

Μικρή ποσότητα βακτηριακών κυττάρων *E. coli*, στελέχους DH5A τοποθετήθηκε σε 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB (1% Tryptone, 0,5% Yeast extract, 1% NaCl) απευθείας από τους -80°C και επώαστηκε ολονύκτια στους 37°C για την παραγωγή προκαλλιέργειας. Την επόμενη ημέρα 250μl από την αρχική καλλιέργεια προστέθηκαν σε 5 ml θρεπτικού μέσου LB (αραίωση 1:20) και επώαστηκαν για 2 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε 1 ml από την καλλιέργεια αυτή σε σωλήνες τύπου errendorf και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 8000 rpm. Μετά από απόρριψη του υπερκείμενου, προστέθηκαν στο ίζημα 100μl διαλύματος TSB (LB, PEG 3,35, DMSO 5%, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10 mM) και αυτό τοποθετήθηκε για δέκα λεπτά στον πάγο. Στο στάδιο αυτό τα κύτταρα είναι επιδεκτικά και μπορούν να αποθηκευτούν στους -80°C για μελλοντική χρήση, είτε να χρησιμοποιηθούν απευθείας για μετασχηματισμό. Για τον μετασχηματισμό προστέθηκαν στα κύτταρα 100 ng πλασμιδιακού DNA και αυτά στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για τριάντα λεπτά στον πάγο. Έπειτα, συμπληρώθηκαν 900 μl διαλύματος TSB-20 mM γλυκόζης μέχρι τελικό όγκο 1 ml και το μείγμα επώαστηκε για μία ώρα στους 37°C υπό ανάδευση. Ακολούθησε επίστρωση 200μl από τα μετασχηματισμένα βακτήρια σε τρυβλία με LB- άγαρ 1,5% και αυτά επώαστηκαν ολονύκτια στους 37°C . Την επόμενη ημέρα, μονήρης αποικία συλλέχθηκε με τη βοήθεια ρύγχους από το τρυβλίο, τοποθετήθηκε σε 5 ml LB και επώαστηκε ολονύκτια στους 37°C. Στη συνέχεια τα 5 ml μικρής καλλιέργειας μεταφέρθηκαν σε διάλυμα LB μέχρι τελικό όγκο 50 ml και επώαστηκαν στους 37°C υπό ανάδευση για 24 ώρες. Σε όλα τα διαλύματα LB και LB-άγαρ τα οποία χρησιμοποιήθηκαν προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού με σκοπό την επιλογή μόνο των

μετασχηματισμένων με τα επιθυμητά πλασμίδια κυττάρων, όπως θα αναφερθεί αναλυτικά παρακάτω. Ως αντιβιοτικό χρησιμοποιήθηκε η αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100ng/ml.

II.3.2.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από την βακτηριακή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε το NucleoBond Plasmid DNA Purification kit (Macherey-Nagel). Η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση αλκαλικού διαλύματος SDS (NaOH-SDS) για τη λύση των βακτηριακών κυττάρων και στήλης ρητίνης ιοντοανταλλαγής η οποία δεσμεύει το πλασμιδιακό DNA. Τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν και στο ίζημα προστέθηκε διάλυμα NaOH-SDS με αποτέλεσμα την αποδιάταξη των πρωτεϊνών του χρωμοσωμικού DNA και του πλασμιδιακού DNA, τα οποία κατακρημνίστηκαν με τη φυγοκέντρωση ύστερα από την προσθήκη διαλύματος οξικού καλίου το οποίο επιπλέον εξουδετερώνει το αλκαλικό περιβάλλον του κυτταρολύματος και έτσι το πλασμίδιο παίρνει την υπερελικωμένη μορφή. Επιπλέον, για τον κατακερματισμό του RNA προστέθηκε ριβονουκλεάση A. Τέλος, το πλασμιδιακό DNA εκλούστηκε από την στήλη και αφού αφυδατώθηκε με την προσθήκη 70% αιθανόλης επαναδιαλύθηκε σε νερό.

Η ποσοτικοποίηση του πλασμιδίου πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης στα 260nm σε φωτόμετρο και εφαρμογή του τύπου:

Συγκέντρωση DNA = 50μg/ml x A260 x παράγοντας αραίωσης

Ταυτόχρονα καταμετρήθηκε και η απορρόφηση στα 280nm ώστε να υπολογιστεί η καθαρότητα του DNA σύμφωνα με το λόγο A260 / A280. Το καθαρό DNA έχει λόγο A260 / A280 μεταξύ 1,8-2. Για τον ποιοτικό έλεγχο του πλασμιδιακού DNA ακολούθησε αντίδραση πέψης με χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών οι οποίες αναγνωρίζουν και τέμνουν συγκεκριμένες αλληλουχίες. Τα προϊόντα της πέψης καθώς και το ακέραιο πλασμίδιο ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και επιβεβαιώθηκαν τα μεγέθη σε κάθε περίπτωση.

II.3.2.4. Διαμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA

Για την εισαγωγή των πλασμιδιακών φορέων στα κύτταρα επιλέχθηκε το κατιονικό πολυμερές της πολυαιθυλενιμίνης (PEI: Polyethylenimin) το οποίο αραιώθηκε σε νερό (4,5μl PEI σε 300μl νερό) ώστε να παρασκευαστεί το διάλυμα προς χρήση (working PEI). Συγκεκριμένα, για κάθε αντίδραση διαμόλυνσης των κυττάρων σε τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας 6 φρεατίων αναμείχθηκαν σε δυο σωλήνες τύπου errendorf 2,5 μg πλασμιδιακού DNA και 25μl θρεπτικού υλικού απουσία ορού (διάλυμα 1) καθώς και 1 μl διαλύματος working PEI και 75 μl θρεπτικού υλικού απουσία ορού (διάλυμα 2) αντίστοιχα. Ακολούθησε ανάδευση και στη συνέχεια τα δυο διαλύματα αφού αναμείχθηκαν και αναδεύτηκαν εκ νέου επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά ώστε να δημιουργηθεί το σύμπλοκο DNA-πολυμερούς. Το μείγμα στη συνέχεια προστέθηκε στα κύτταρα στάγδην και ακολούθησε ολονύκτια επώαση. Την επόμενη μέρα το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας ανανεώθηκε με φρέσκο και τα κύτταρα επώαστηκαν για ακόμη 48 ώρες πριν συλλεχθούν για την περαιτέρω ανάλυση.

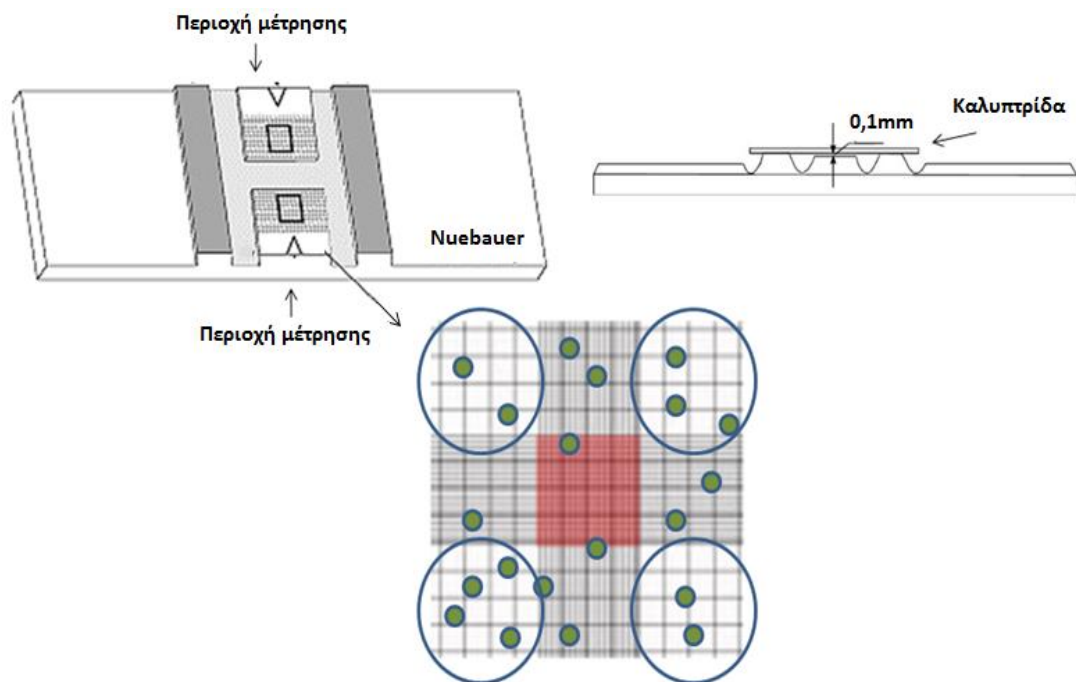
II.4. Προσδιορισμός του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων πολλαπλασιασμού των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αιμοκυττόμετρο και συγκεκριμένα η πλάκα Neubauer, καθώς επίσης και η χρώση με κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet). Επιλέχθηκε η εφαρμογή δύο μεθόδων για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

II.4.1. Μέτρηση των κυττάρων με αιμοκυττόμετρο

Ανάμεσα στο πλήθος των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του αριθμού και της ανάπτυξης των κυττάρων σε μια καλλιέργεια, η χρήση της πλάκας Neubauer αποτελεί μια αξιόπιστη και εύκολη μέθοδο για την μέτρηση των κυττάρων. Το σύστημα αποτελείται από μια λεπτή γυάλινη πλάκα διαστάσεων 30x70x4mm και περιλαμβάνει δυο περιοχές μέτρησης των κυττάρων. Κάθε περιοχή μέτρησης μεγέθους 3mm² χωρίζεται σε τέσσερα μεγάλα τετράγωνα τα οποία διαιρούνται περαιτέρω σε δέκα έξι ακόμη τετράγωνα. Μόνο τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται εντός των τεσσάρων αυτών τετραγώνων καταμετρώνται (εικόνα 5). Το σύστημα ολοκληρώνει γυάλινη

καλυπτρίδα η οποία τοποθετείται πάνω στην πλάκα Neubauer και καλύπτει τις δυο περιοχές μέτρησης δημιουργώντας ένα κενό χώρο 0,1mm (εικόνα 5).



Εικόνα 5: Απεικόνιση της πλάκας Neubauer και αναπαράσταση των βασικών δομών της.

Κατά τη διαδικασία της μέτρησης χρησιμοποιήθηκε επιπλέον η χρωστική Trypan Blue η οποία δίνει τη δυνατότητα αναγνώρισης και μέτρησης και των νεκρών κυττάρων μαζί με τα ζωντανά. Τα ζωντανά κύτταρα εμποδίζουν τη χρωστική να εισέλθει στο εσωτερικό τους εξαιτίας των ακέραιων κυτταρικών μεμβρανών, σε αντίθεση με τα νεκρά τα οποία επιτρέπουν στη χρωστική να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα. Μετά την είσοδο της στα κύτταρα η χρωστική προσδένεται στις πρωτεΐνες προσδίδοντας ένα διάχυτο μπλε χρώμα στο κυτταρόπλασμα.

Πειραματική πορεία

Ακολουθώντας της εκάστοτε πειραματικής διαδικασίας που εφαρμόστηκε, τα κύτταρα συλλέχθηκαν όπως περιγράφηκε παραπάνω και επαναιωρήθηκαν σε 1ml θρεπτικού υλικού. Για την προετοιμασία του διαλύματος χρώσης σε σωλήνα τύπου errendorf αρχικό διάλυμα Trypan Blue 0,4% αραιώθηκε 1:1 σε PBS. Σε δεύτερο σωλήνα τύπου errendorf τοποθετήθηκαν 90μl από το διάλυμα χρώσης και 10μl από το εναιώρημα των

κυττάρων. Το μείγμα αναμείχθηκε και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 10 λεπτά. Στη συνέχεια, 10 μl από το μείγμα μεταφέρθηκαν σε κάθε θέση μέτρησης της πλάκας Neubauer και τα κύτταρα καταμετρήθηκαν με τη βοήθεια του ανάστροφου μικροσκοπίου. Ο τελικός αριθμός των κυττάρων υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{ΚΥΤΤΑΡΑ/ml} = \text{Μέσος όρος αριθμού κυττάρων 4 τετραγώνων} \times \text{παράγοντας αραιώσης} \times 10^4$$

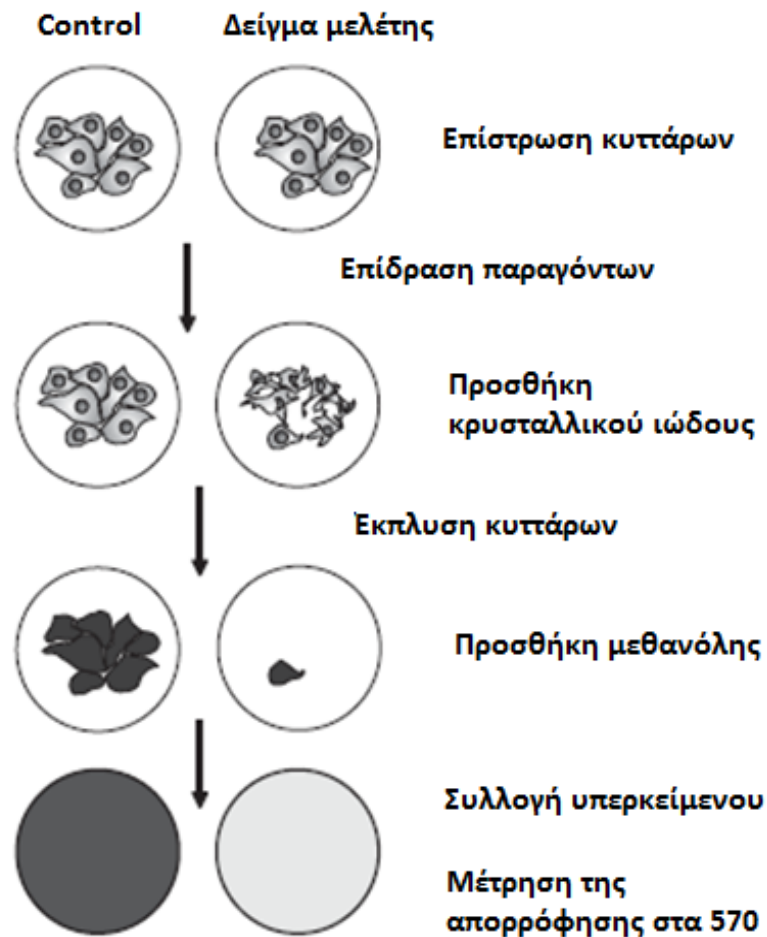
II.4.2. Χρώση κυττάρων με κρυσταλλικό ιώδες

Για τον προσδιορισμό του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων εφαρμόστηκε επίσης και χρώση με κρυσταλλικό ιώδες. Πρόκειται για μια μη-ενζυματική μέθοδο που επιτρέπει τον υπολογισμό του ποσοστού των ζωντανών επιθηλιακών κυττάρων που παραμένουν προσκολλημένα και σχηματίζουν ταπήτιο (Chiba *et al.* 1998. Feoktistova *et al.*, 2016). Η μέθοδος στηρίζεται στην ικανότητα της χρωστικής να προσδένεται στην εξωτερική επιφάνεια της διπλής έλικας του DNA και σε πρωτεΐνες. Συνεπώς, η ποσότητα της χρωστικής που δεσμεύεται είναι ανάλογη του συνολικού αριθμού των κυττάρων.

Πειραματική πορεία

Ύστερα από επώαση των κυττάρων κάτω από διάφορες συνθήκες σε τρυβλία κυτταροκαλλιεργειών 12 φρεατίων, το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και ακολούθησαν δυο πλύσεις με διάλυμα PBS. Στη συνέχεια προστέθηκαν 500μl από το διάλυμα χρώσης κρυσταλλικού ιώδους (0,4% κρυσταλλικό ιώδες, 50% αιθανόλη, 0,25% NaCl, 3,7% φορμαλδεΰδη) απευθείας στα κύτταρα κάθε φρεατίου και αυτά επώαστηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Για την απομάκρυνση της περίσσειας της χρωστικής ακολούθησε πλύση των κυττάρων βυθίζοντας το τρυβλίο τρεις φορές σε λεκάνη με απιονισμένο νερό, αλλάζοντας το νερό αν χρειαστεί. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα στον πάγκο να στεγνώσουν καλά για 16-24 ώρες. Στη συνέχεια προστέθηκε 1ml μεθανόλης σε κάθε θέση και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να διαλυτοποιηθεί η προσδεσμεμένη χρωστική (εικόνα 6). Τέλος, αφού το διάλυμα συλλέχθηκε και αραιώθηκε

1:3 σε νερό καταμετρήθηκε η απορρόφηση στα 570nm. Ως δείγμα μηδενισμού (τυφλό) χρησιμοποιήθηκε διάλυμα μεθανόλης-νερού σε αναλογία 1:3.



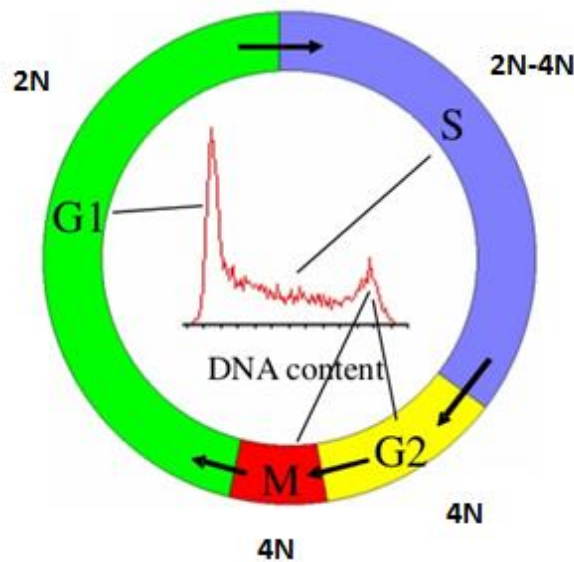
Εικόνα 6: Χαρακτηριστική αναπαράσταση εφαρμογής της μεθόδου κρυσταλλικού ιώδους για τον προσδιορισμό των επιπέδων πολλαπλασιασμού ύστερα από την επίδραση παραγόντων στα κύτταρα.

II.5. Ανάλυση κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής

Για την διερεύνηση των βιολογικών επιπτώσεων της έκφρασης της PAPOLA στο φαινότυπο των κυττάρων μελετήθηκε ο κυτταρικός κύκλος ύστερα από την αποσιώπηση και την υπερέκφραση του γονιδίου, μέσω εφαρμογής κυτταρομετρίας ροής.

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια διαδεδομένη τεχνική μέσω της οποίας μπορούν να καταγραφούν χαρακτηριστικά του κυττάρου όπως το μέγεθος, η περιεκτικότητα σε DNA και συνεπώς η φάση του κυτταρικού κύκλου, οι πρωτεΐνες επιφανείας ή/και οι ενδοκυττάρια αλλά και ο διαχωρισμός κυτταρικών υποπληθυσμών. Η δυνατότητα αυτή επιτρέπει τη συλλογή πληροφοριών ακόμη και για ένα μεμονωμένο κύτταρο με την προϋπόθεση ότι το κυτταρικό εναιώρημα δεν περιέχει συσσωματώματα, αλλά μονήρη κύτταρα. Η μέθοδος στηρίζεται σε τρία συστήματα τα οποία αποτελούν το κυτταρόμετρο: το σύστημα υγρών, το οπτικό σύστημα και το ηλεκτρονικό σύστημα. Μέσω του συστήματος υγρών τα κύτταρα εισέρχονται στο κυτταρόμετρο, μεταφέρονται στο σημείο εκπομπής των ακτινών λέιζερ και ύστερα από την ανάλυση εξέρχονται του οργάνου στη μορφή αποβλήτων. Καθώς τα κύτταρα διέρχονται από την ακτίνα φωτός ένα-ένα σκεδάζουν το φως και τα σήματα που εκπέμπονται ανιχνεύονται από το οπτικό σύστημα. Επίσης, η ανίχνευση μπορεί να αφορά την εκπομπή φθορισμού που προκύπτει είτε από την πρόσδεση χρωστικών όπως το ιωδιούχο προπίδιο (PI: Propidium iodide) στο DNA είτε από την αναγνώριση πρωτεϊνών από σημασμένα αντισώματα. Τέλος, τα σήματα αυτά ψηφιοποιούνται από το ηλεκτρονικό σύστημα και τα δεδομένα που συλλέγονται αφορούν τα χαρακτηριστικά των κυττάρων τα οποία στη συνέχεια αναλύονται μέσω εφαρμογής κατάλληλου λογισμικού. Κύρια χαρακτηριστικά της ανάλυσης της κυτταρομετρίας ροής αποτελούν η πρόσθια σκέδαση (forward scatter) η οποία στηρίζεται στην περίθλαση του φωτός και σχετίζεται με το μέγεθος των κυττάρων καθώς και η πλάγια σκέδαση (side scatter) η οποία δίνει πληροφορίες για την πολυπλοκότητα της δομής τους. Βάσει των παραπάνω χαρακτηριστικών γίνεται δυνατή η επιλογή του επιθυμητού πληθυσμού των κυττάρων για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου. Για την μελέτη του κυτταρικού κύκλου χρησιμοποιήθηκε η χρωστική PI η οποία δρα στοιχειομετρικά και συνεπώς η ποσότητα που προσδένεται στο DNA είναι ανάλογη με την παρουσία αυτού στο κύτταρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα κύτταρα που βρίσκονται

στην S και G₂/M φάση και έχουν περισσότερη ποσότητα DNA από αυτά στη G₁ να αντιστοιχεί αναλογικά περισσότερο PI και συνεπώς να φθορίζουν περισσότερο (εικόνα 7).



Εικόνα 7 . Διαγραμματική αναπαράσταση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και αντιστοίχιση τους με την ποσότητα του γενετικού υλικού στα κύτταρα.

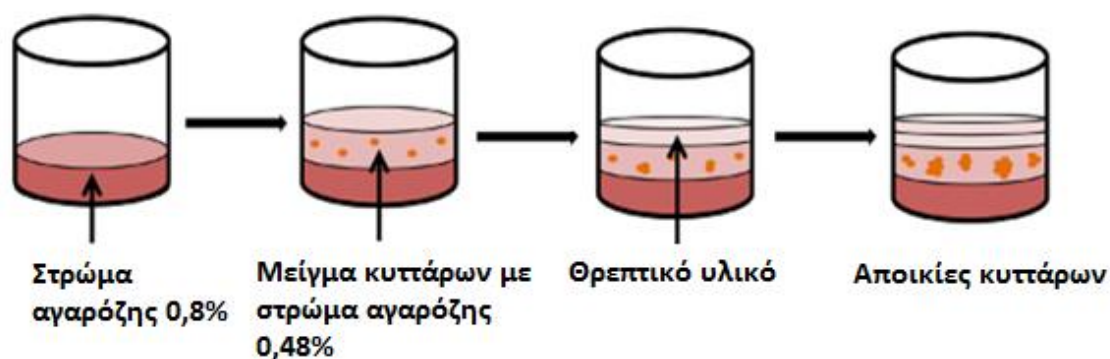
Πειραματική πορεία

Για τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου τα κύτταρα αφού συλλέχθηκαν σε σωλήνα τύπου falcon μονιμοποιήθηκαν με την προσθήκη 1 ml παγωμένης 70% αιθανόλης στάγδην κατά τη διάρκεια ισχυρής ανάδευσης (vortexing). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τόσο τη μονιμοποίηση των κυττάρων ακριβώς στη κατάσταση που βρίσκονται πριν τη συλλογή τους όσο και την εξασφάλιση της εισόδου του PI στα κύτταρα λόγω διαπερατότητας της μεμβράνης. Τα μονιμοποιημένα δείγματα μπορούν να τοποθετηθούν -20°C για μισή ώρα και στη συνέχεια να αναλυθούν ή εναλλακτικά να αποθηκευτούν στους -20°C έως και περίπου ένα μήνα. Σε κάθε περίπτωση τα κύτταρα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm για δέκα λεπτά και απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Ακολούθησαν 2 πλύσεις με PBS και η χρώση του ιζήματος. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 300μl διαλύματος χρώσης (284μl κιτρικό νάτριο 38mM p.H 7,4, 13 μl PI 1 mg/ml, 3 μl Rnase A 10mg/ml) και ακολούθησε επώαση στους 37°C για μισή ώρα στο

σκοτάδι. Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε κυτταρόμετρο ροής (BD FACS Diva, BD Bioscience).

II.6. Μελέτη των επιπτώσεων της έκφρασης της PAPOLA στο μετασχηματισμό των καρκινικών κυττάρων μαστού

Για την μελέτη των πιθανών επιπτώσεων των επιπέδων έκφρασης της PAPOLA στο μετασχηματισμό των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάπτυξης αποικιών σε ημι-στερεό υλικό (Soft Agar Colony Formation Assay). Η τεχνική βασίζεται στη δημιουργία μιας κατώτερης στιβάδας αγαρόζης χαμηλής τήξης σε πλήρες θρεπτικό υλικό πάνω από την οποία δημιουργείται ένα ανώτερο, πιο αραιό στρώμα αγαρόζης χαμηλής τήξης σε πλήρες θρεπτικό υλικό, το οποίο περιέχει συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων. Η κατώτερη στιβάδα αποτελεί κρίσιμο σημείο της μεθόδου μιας και παρεμποδίζει τα κύτταρα να διαφύγουν της στιβάδας και να σχηματίσουν ταπήτιο στον πάτο του τρυβλίου κυτταροκαλλιεργειών. Τέλος, στο επάνω μέρος προστίθεται κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού ως παροχή συστατικών θρέψης (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Απεικόνιση της μεθόδου ελέγχου της ικανότητας των κυττάρων να σχηματίζουν αποικίες σε ημι-στερεό υλικό ανεξάρτητα από την ικανότητα προσκόλλησης.

Πειραματική πορεία

Για κάθε συνθήκη παρασκευάστηκε ένα πυκνό διάλυμα αγαρόζης χαμηλής τήξης (Nusieve, Lonza) συγκέντρωσης 3,2% σε νερό και αφού αποστειρώθηκε τοποθετήθηκε σε

υδατόλουτρο σε σταθερή θερμοκρασία 38,5 °C καθ' όλη τη διάρκεια της μεθόδου. Για κάθε τρυβλίο κυτταροκαλλιιεργειών 6 φρεατίων αναμείχθηκαν 3,5 ml από το αρχικό διάλυμα αγαρόζης με 10,5 ml πλήρες θρεπτικό υλικό και τοποθετήθηκε 1ml από αυτό σε κάθε φρεάτιο ώστε να δημιουργηθεί η κατώτερη στιβάδα συγκέντρωσης 0,8%. Το τρυβλίο τοποθετήθηκε στους 4 °C για δέκα λεπτά ώστε να στερεοποιηθεί η αγαρόζη. Ύστερα από την ολοκλήρωση αυτού του σταδίου, τα κύτταρα από κάθε πειραματική συνθήκη συλλέχθηκαν από τα τρυβλία κυτταροκαλλιιεργειών με τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω και μετά την πλύση τους μετρήθηκαν με τη χρήση αιμοκυττόμετρου και τη χρωστική Trypan blue. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό σε πυκνότητα 11500 κύτταρα/ml για τα MCF-7 και 60000 κύτταρα/ml για τα MDA-MB 231 σε συνολικό όγκο 5 ml αντίστοιχα. Ακολούθησε η παρασκευή της ανώτερης στιβάδας αγαρόζης 0,48%, προσθέτοντας 750μl από το πυκνό διάλυμα αγαρόζης απευθείας στα 5 ml θρεπτικού υλικού το οποίο περιέχει τα κύτταρα και από το μείγμα αυτό προστέθηκε 1 ml σε κάθε φρεάτιο. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν για πέντε λεπτά στους 4°C ώστε να στερεοποιηθεί η αγαρόζη και στη συνέχεια προστέθηκε 1ml πλήρους θρεπτικού υλικού σε κάθε φρεάτιο. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για 10-20 ημέρες στον κλίβανο κυτταροκαλλιιεργειών, ενώ κατά το διάστημα αυτό 1ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού προστίθετο κάθε 3-5 ημέρες σε κάθε θέση. Μετά το πέρας αυτού του διαστήματος οι αποικίες φωτογραφήθηκαν σε αντεστραμμένο μικροσκόπιο. Για κάθε φρεάτιο, καταγράφηκε η μορφολογία και ο αριθμός των αποικιών από τουλάχιστον 8 διαφορετικά πεδία με σκοπό την αξιόπιστη μέτρηση των χαρακτηριστικών των αποικιών (διάμετρος, αριθμός).

II.7. Απομόνωση ολικού RNA

Για την απομόνωση του ολικού RNA από τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Nucleozol (Macherey-Nagel). Το Nucleozol στηρίζεται στη θειοκυανική γουανιδίνη, η οποία έχει την ιδιότητα να αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, να καταστρέφει τις ριβονουκλεάσες και να διαχωρίζει το ριβοσωμικό RNA από τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες καθώς και στη φαινόλη η οποία όταν συνδυαστεί με το χλωροφόρμιο το αποτέλεσμα είναι ο διαχωρισμός του μείγματος σε τρεις φάσεις: μία υδατική, μία ενδιάμεση και μία οργανική φάση. Το RNA εντοπίζεται στην υδατική φάση ενώ το DNA και οι πρωτεΐνες

στις άλλες δυο. Η φαινόλη έχει πυκνότητα μεγαλύτερη από αυτήν του νερού και έτσι σχηματίζει μια χαμηλότερη φάση, ενώ το χλωροφόρμιο το οποίο μπορεί και αναμειγνύεται με τη φαινόλη και έχει υψηλότερη πυκνότητα από αυτήν βοηθά στο σωστό διαχωρισμό των φάσεων και αποτρέπει την ανάμειξή τους (O'Neil, 2006). Όταν η αναλογία φαινόλη : χλωροφόρμιο είναι 5:1 σε όξινο περιβάλλον τότε μόνο RNA εντοπίζεται στην υδατική φάση ενώ όταν η αναλογία είναι 1:1 σε όξινο περιβάλλον επιτυγχάνεται αποτελεσματικότερη ανάκτηση όλων των μορίων RNA σε αυτήν με κάποιες όμως μικρές προσμίξεις από DNA (Kedzierzki και Porter, 1991).

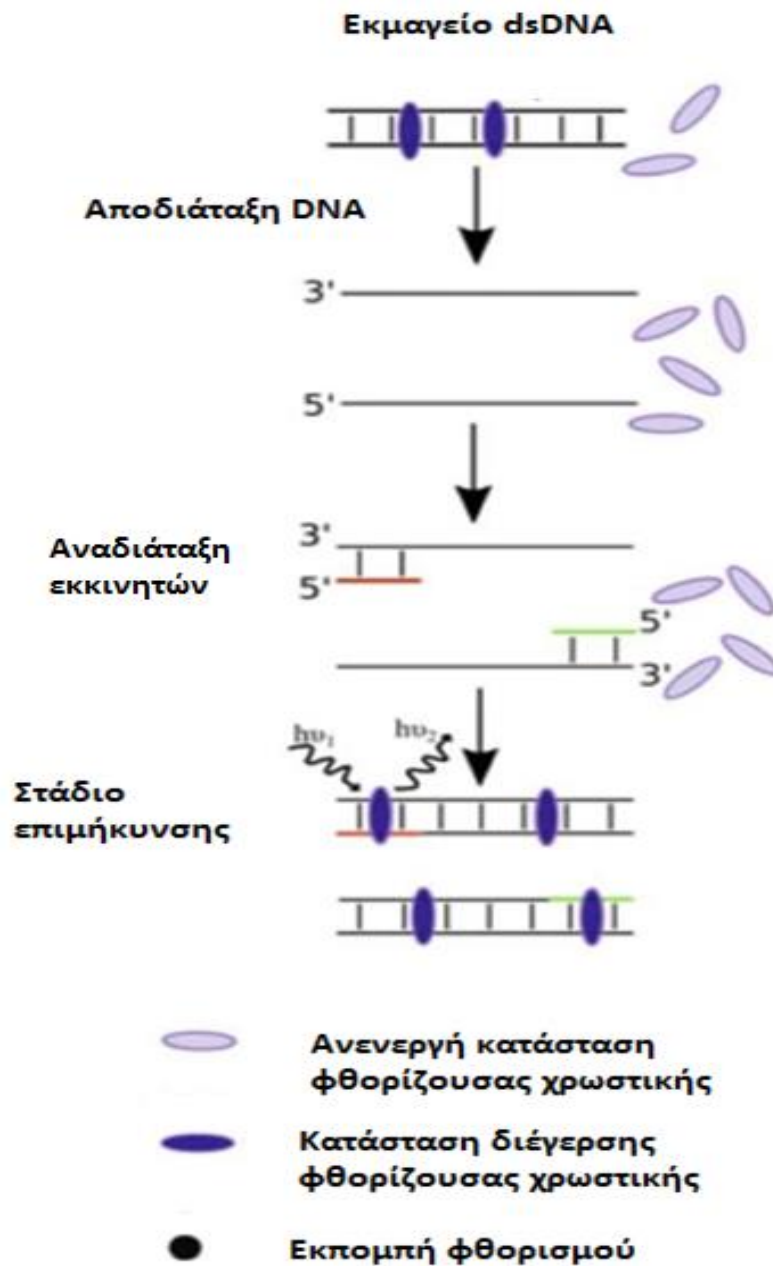
Πειραματική πορεία

Κύτταρα τα οποία έχουν επωαστεί κάτω από διάφορες συνθήκες σε τρυβλία κυτταροκαλλιιεργειών 6 θέσεων ξεπλύθηκαν με PBS και στη συνέχεια προστέθηκε σε αυτά απευθείας 1 ml Nucleozol. Ακολούθησαν επαναλαμβανόμενες αναρροφήσεις με χρήση αυτόματης πιπέτας μέχρι τη λύση των κυττάρων και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για πέντε λεπτά. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στα 12000g στους 4°C για δέκα λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα όπου προστέθηκαν 200μl χλωροφόρμιο. Ύστερα από έντονη ανάδευση το μείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για δυο λεπτά και φυγοκεντρήθηκε στα 12000g στους 4°C για ακόμη δεκαπέντε λεπτά. Η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα όπου προστέθηκαν σε αυτήν 500μl ισοπροπυλική αλκοόλη και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε εκ νέου στα 12000g στους 4°C για δέκα λεπτά. Το ίζημα που σχηματίστηκε ξεπλύθηκε με την προσθήκη 1 ml 70% αιθανόλης και φυγοκεντρήθηκε στα 7500g στους 4°C για πέντε λεπτά. Τέλος, το RNA διαλυτοποιήθηκε σε 20-40μl νερό απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες και χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω ανάλυση. Η ποσοτικοποίηση του RNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον υπολογιστικό τύπο που αναφέρθηκε προηγουμένως για την ποσοτικοποίηση του πλασμιδιακού DNA.

II.8. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR) σε ένα βήμα

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των σχετικών επιπέδων έκφρασης των μηνυμάτων mRNA των γονιδίων της PAPOLA και της CCND1 χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR). Αποτελεί μια ευαίσθητη τεχνική η οποία ανιχνεύει και μετρά τα προϊόντα που παράγονται κατά τη διάρκεια της εκθετικής ενίσχυσης της επιθυμητής αλληλουχίας. Βασίζεται στην κινητική της ενίσχυσης του DNA το οποίο παράγει σήμα φθορισμού και είναι ανάλογο του πληθυσμού των παραγόμενων αλληλουχιών. Ο χρόνος εμφάνισης ανιχνεύσιμου προϊόντος (Ct) αντανάκλα την ποσότητα της αλληλουχίας στόχου στο υπό διερεύνηση δείγμα. Η διαδικασία απαιτεί το σχεδιασμό ολιγονουκλεοτιδίων, εκκινητών, τα οποία είναι συμπληρωματικά προς την αλληλουχία στόχο και ως εκ τούτου υβριδοποιούνται με αυτή και στη χρήση της Taq πολυμεράσης η οποία επιμηκύνει τα τμήματα αυτά με αποτέλεσμα την ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας στόχου. Η αλληλουχία που ενισχύεται αποτελεί ένα μικρό τμήμα του γονιδίου-στόχου, το οποίο καθορίζεται από τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται. Για τον προσδιορισμό της ποσότητας του προϊόντος επιλέχθηκε η φθορίζουσα ουσία Sybr Green I η οποία προσδένεται στο δίκλωνο και όχι στο μονόκλωνο DNA. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα εκπέμπει πολύ μικρές ποσότητες φθορισμού, ενώ όταν προσδένεται στο δίκλωνο DNA η εκπομπή αυξάνεται έως και 1000 φορές (εικόνα 9).

Για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς GAPDH, με σταθερή έκφραση στο κύτταρο στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες, ώστε να εξομαλυνθούν πιθανές διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στα δείγματα λόγω πειραματικών αποκλίσεων (πχ διαφορές στην ποσότητα του αρχικού RNA κλπ). Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων εφαρμόστηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε έναν χρόνο (one step RT-qPCR). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την παραγωγή του cDNA από το RNA μέσω της αντίστροφης μεταγραφής και την ακόλουθη ενίσχυση του προϊόντος σε μια μόνο αντίδραση. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια (πίνακας 1), ενώ οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Real-time PCR, CFX96, Biorad).



Εικόνα 9: Μηχανισμός αλληλεπίδραση χρωστικής Sybr Green I με το δίκλωνο DNA κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

Πίνακας 1: Θερμικό πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε ένα στάδιο.

Συνθήκη		Χρόνος	
Αντίστροφη μεταγραφή	42°C	5:00 λεπτά	35 κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	4:00 λεπτά	
Αποδιάταξη	95°C	0:02 λεπτά	
Υβριδοποίηση εκκινητών	60°C	0:20 λεπτά	

II.8.1. Προετοιμασία αντίδρασης-Υπολογισμός των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης ποσοτικού RT- qPCR χρησιμοποιήθηκε το KAPA SYBR FAST One-Step RT-qPCR (Kapa) αντιδραστήριο ενώ για κάθε αντίδραση παρασκευάστηκε κατάλληλο μείγμα σε τελικό όγκο 10μl (πίνακας 2).

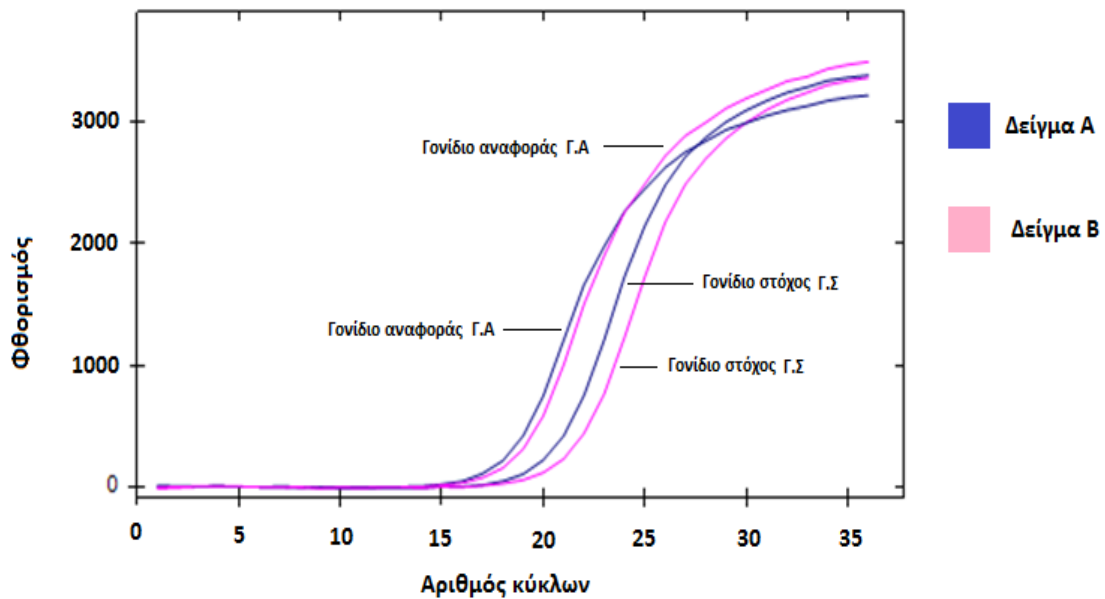
Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε εις διπλούν τόσο για κάθε γονίδιο στόχο όσο και για το γονίδιο αναφοράς και χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή. Για τον υπολογισμό των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (VanGuilder *et al.*, 2008) (εικόνα 10).

II.9. Σχετικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης της ορθόλογης και της εναλλακτικά πολυαδενυλιωμένης ισομορφής του mRNA της κυκλίνης D1

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου εφαρμόστηκε και για την εκτίμηση πιθανών αλλαγών στα επίπεδα των ισομορφών του mRNA της CCND1 που προκύπτουν λόγω εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης. Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκαν 2 αντιδράσεις RT-qPCR (εικόνα 11): η μία για τον προσδιορισμό τόσο των μεγάλου μήκους όσο και των βραχέων ισομορφών μέσω του σχεδιασμού ζεύγους εκκινητών που προσδένονται πριν το πλησιέστερο σήμα πολυαδενυλίωσης και η άλλη για την ανίχνευση μόνο των μεγάλου μήκους 3'UTR των μεταγράφων μέσω χρήσης ζεύγους εκκινητών που αναγνωρίζουν αλληλουχία ακριβώς πριν το απομακρυσμένο σήμα (πίνακας 3). Για να υπάρξει απευθείας σύγκριση των επιπέδων των ισομορφών του mRNA εφαρμόστηκε η μέθοδος $\Delta\Delta C_t$ με μια εναλλακτική προσέγγιση. Εφόσον και οι δύο ισομορφές περιέχονται στο ίδιο δείγμα, τα επίπεδα του προϊόντος της μεγάλου μήκους ισομορφής κανονικοποιήθηκαν ως προς το επίπεδα του προϊόντος που αφορούν τόσο τη μακριά και τη βραχεία 3'αμετάφραστη περιοχή και συνεπώς δεν χρειάστηκε να χρησιμοποιηθεί ως γονίδιο αναφοράς το GAPDH. Χρησιμοποιήθηκαν το πρωτόκολλο και τα αντιδραστήρια που περιγράφηκαν παραπάνω.

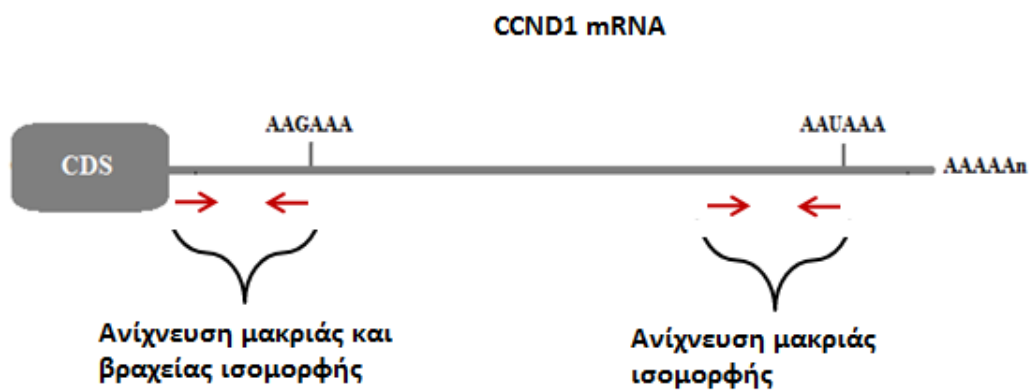
Πίνακας 2: Πρωτόκολλο Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
1. SYBR® FAST qPCR Master Mix 2X	5μl
2. KAPA RT Mix 50X	0,2μl
3. Εκκινητές	400nM
4. Ολικό RNA	500ng
5. H ₂ O	Έως τελικό όγκο 10μl



$$2^{-((\Gamma.Σ_B - \Gamma.Α_B) - (\Gamma.Σ_A - \Gamma.Α_A))}$$

Εικόνα 10: Γραφική παράσταση παραγωγής προϊόντος μέσω αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου και υπολογισμός επιπέδων έκφρασης του γονιδίου στόχου με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_t}$.



Εικόνα 11: Απεικόνιση του mRNA της CCND1. Επισημαίνονται η κωδική περιοχή (CDS), το εγγύς και το απομακρυσμένο σήμα πολυαδενυλίωσης στην 3'αμετάφραστη περιοχή καθώς και η θέση των δύο ζευγών εκκινήτων (κόκκινα βέλη) που ενισχύουν τις δύο ισομορφές mRNA.

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά εκκινητών που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση της μεγάλης μήκους και της βραχείας ισομορφής του mRNA της CCND1.

Χαρακτηριστικά εκκινητή			Tm	Μέγεθος προϊόντος
Μακριά ισομορφή CCND1	Πρόσθιος	5'-GCTCACGCTTACCTCAACCA-3'	60.32	133
	Αντίστροφος	5'-GCCTTTGGCCTCTCGATACA-3'	59.82	
Βραχεία ισομορφή CCND1	Πρόσθιος	5'-CCTCCTCTCCGGAGCATTTT-3'	59.46	98
	Αντίστροφος	5'-AGTCAGAGATGGAAGGGGGA-3'	59.28	

II.10. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου SDS-PAGE-Ανοσοαποτύπωση κατά WESTERN

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων-στόχων PAOLA, CCND1, p53 και cleaved PARP στο επίπεδο παραγωγής πρωτεΐνης εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έλαβε χώρα ως εξής:

II.10.1. Λύση κυττάρων-συλλογή ολικού εκχυλίσματος πρωτεΐνης

Ύστερα από επώαση των κυτταρικών σειρών στις επιθυμητές συνθήκες, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ακολούθησε λύση τους με σκοπό την απομόνωση του ολικού εκχυλίσματος πρωτεΐνης. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 50 μ l από το διάλυμα λύσης RIPA (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Δεοξυ-χολικό νάτριο, 0,1% δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS), 50 mM Tris pH 8) και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στον πάγο. Επικουρικά, εφαρμόστηκε και μηχανική θραύση του ομογενοποίησης με χρήση σύριγγας βελόνας διαμέτρου 23G και 27G και στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στα 18000g στους 4°C με σκοπό την κατακρήμνιση των

μεμβρανικών συστατικών. Τέλος, συλλέχθηκε η υπερκείμενη φάση η οποία αποτελεί το ολικό εκχύλισμα των πρωτεϊνών.

II.10.2. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο BRADFORD

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης στα δείγματα εφαρμόστηκε η μέθοδος Bradford. Η μέθοδος βασίζεται στη δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant BlueR-250 στις πρωτεΐνες σε όξινα υδατικά διαλύματα, η οποία οδηγεί στην δημιουργία σταθερού έγχρωμου προϊόντος που παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm. Για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα δείγματα γνωστής πρωτεϊνικής περιεκτικότητας με σκοπό την κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν δείγματα περιεκτικότητας 5, 10, 20, 30 και 40 $\mu\text{g/ml}$ αλβουμίνης ορού βοός (BSA: bovine serum albumin) σε νερό. Ο συνολικός όγκος των υπό μελέτη δειγμάτων ανήλθε σε 1 ml σε αναλογία 950 μl αντιδραστήριο Bradford : 45 μl νερό : 5 μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και ύστερα από έντονη ανάδευση (vortexing) η απορρόφηση μετρήθηκε στα 595 nm.

II.10.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-PAGE

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου SDS-PAGE χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος και την ικανότητα τους να μετακινούνται μέσα στο πήκτωμα ακρυλαμιδίου όταν σε αυτό εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο. Η μέθοδος ασυνεχούς πηκτής στηρίζεται στη χρήση 2 πηκτωμάτων ακρυλαμιδίου διαφορετικής συγκέντρωσης, το πήκτωμα επιστοίβαξης pH 6,8 και το πήκτωμα διαχωρισμού pH 8,8 (πίνακας 4).

Ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου επιτυγχάνεται μέσω της προσθήκης στο διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου το οποίο ενισχύει την έναρξη του πολυμερισμού καθώς και TEMED το οποίο λειτουργεί ως επιταχυντής του. Το σύστημα της ηλεκτροφόρησης συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-γλυκίνης pH 8,3 (0,025M Tris-base, 0,192M Γλυκίνη, 0,1% (w/v) SDS.). Το πήκτωμα επιστοίβαξης φέρει πόρους μεγάλου μεγέθους ώστε οι πρωτεΐνες να συσσωρευτούν σε μια στενή περιοχή ανάμεσα στα ιόντα Cl^- και γλυκίνης. Κατά συνέπεια, οι πρωτεΐνες εισέρχονται στο πήκτωμα διαχωρισμού

ταυτόχρονα και μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με το μέγεθός τους σε συμπαγείς ζώνες.

Πίνακας 4: Σύσταση πηκτωμάτων ακρυλαμιδίου ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών SDS-PAGE.

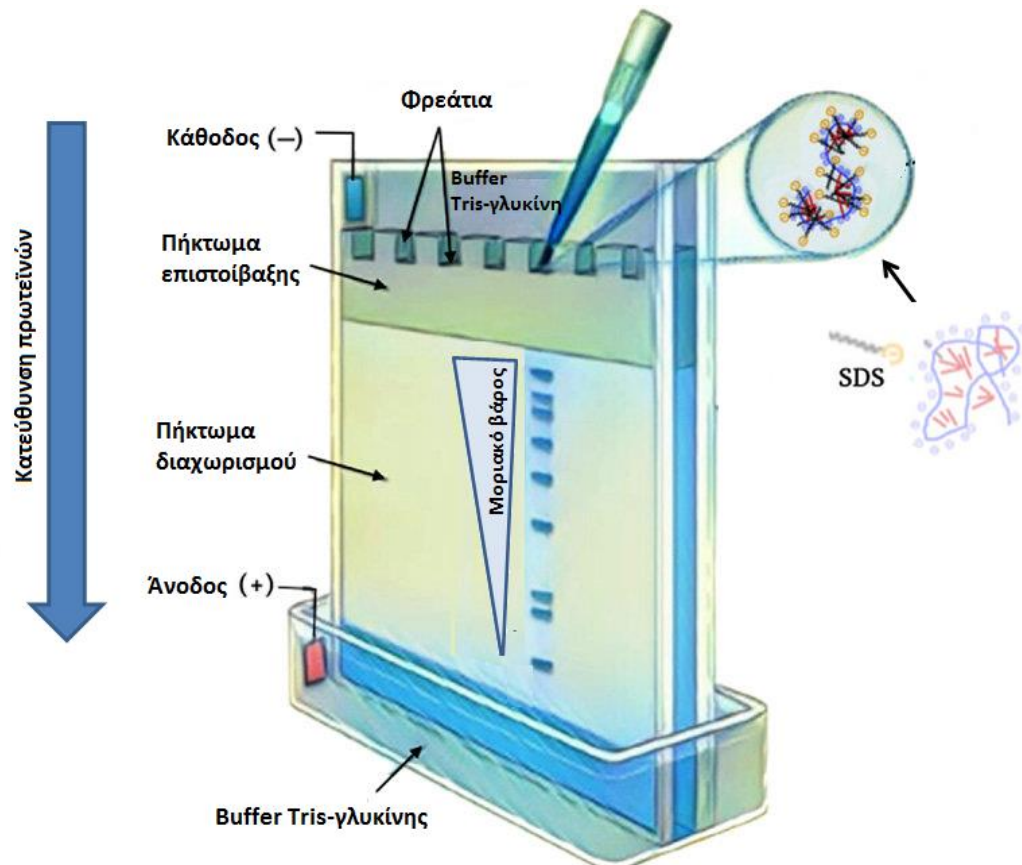
	Πήκτωμα επιστοίβαξης %	Πήκτωμα διαχωρισμού %
Ακρυλαμίδιο/Bis 37:5:1 40%	0,66ml	5ml
1,5M Tris-HCl p.H 8,8		3,75ml
1,5M Tris-HCl p.H 8,8	1,25ml	
dH ₂ O	2,99ml	5,8ml
SDS 10%	0,05ml	0,150ml
Υπερθειϊκό αμμώνιο 10%	0,05ml	0,150ml
TEMED	0,006ml	0,012ml

Το φορτίο των πρωτεϊνών, που ποικίλει ανάλογα με τη σύσταση των αμινοξέων τους αλλά και η τριτοταγής τους δομή δεν επιτρέπουν στις πρωτεΐνες να διαχωριστούν βάσει αποκλειστικά του μοριακού τους βάρους. Για το λόγο αυτό πριν την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα προετοιμάστηκαν καταλλήλως ώστε οι πρωτεΐνες να φορτιστούν αρνητικά αλλά και να αποκτήσουν μια ευθύγραμμη δομή. Αυτό επιτυγχάνεται με την επίδραση του διαλύματος Laemmli-SDS [10% (w/v) SDS, 36% (v/v) γλυκερόλη, 5% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη, 0,35M Tris-HCl pH 6,8 και 0,005% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης] ύστερα από βρασμό στους 95 °C για 4 λεπτά. Το SDS καταστρέφει τις ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται στις πρωτεΐνες με αποτέλεσμα την αποδιάταξη τους, ενώ ταυτόχρονα τους προσδίδει αρνητικό φορτίο. Με την προσθήκη μερκαπτοαιθανόλης επιτυγχάνεται η αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών ενώ η γλυκερόλη συμβάλλει στην πύκνωση του διαλύματος αποτρέποντας τη διάχυση των πρωτεϊνών. Τέλος, η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης εξυπηρετεί την παρακολούθηση των πρωτεϊνών καθ' όλη τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Επιπρόσθετα, το SDS που βρίσκεται στο ρυθμιστικό διάλυμα Tris-γλυκίνης διασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες θα διατηρήσουν αυτά τα χαρακτηριστικά καθ' όλη τη διάρκεια της

ηλεκτροφόρησης, χωρίς να επιστρέψουν στην αρχική τους μορφή. Μετά την επεξεργασία, το δείγμα που περιείχε 60μg πρωτεΐνης τοποθετήθηκε στα φρεάτια του πηκτώματος και ηλεκτροφορήθηκε ταυτόχρονα με πρότυπα μοριακών βαρών (Prestained protein marker, Biorad), ώστε να προσδιοριστεί το μέγεθός τους. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας στο πήκτωμα ρεύμα σταθερής έντασης 100 Volt για 3 ώρες στη συσκευή mini PROTEANIII cell (BioRad), η οποία συναρμολογήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (εικόνα 12) .

II.10.4. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Για να μπορέσει να μελετηθεί η επιθυμητή πρωτεΐνη ανάμεσα στο σύνολο των ολικών πρωτεϊνών που απομονώθηκαν, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες πρέπει να μεταφερθούν σε ειδική μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε το σύστημα της ημι-ξηρής μεταφοράς πρωτεϊνών (Trans Blot Turbo, Biorad). Για τη μεταφορά, το πήκτωμα διαχωρισμού όπου και περιέχονται οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες εμβαπτίστηκε για 20 λεπτά σε διάλυμα μεταφοράς [0,038M Γλυκίνη, 0,05M Tris-base, 20% (v/v) μεθανόλη και 0,04% SDS pH 8-9]. Στις ειδικές πλάκες-ηλεκτρόδια της συσκευής τοποθετήθηκαν στη σειρά τέσσερα χαρτιά Watman εμποτισμένα σε διάλυμα μεταφοράς, το πήκτωμα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά από διαπότιση σε απιονισμένο νερό και διάλυμα μεταφοράς και τέλος ακόμη τέσσερα χαρτιά Wattman, ώστε να σχηματίζεται μια δομή «σάντουιτς». Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο, στα 1A, 25V για 30-40 λεπτά. Μετά το τέλος της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμβαπτίστηκε σε διάλυμα Ponceau S, που περιείχε 2% (w/v) χρωστικής Ponceau S σε 30% (v/v) τριχλωρο-οξικό οξύ, για 1 λεπτό υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η χρώση της μεμβράνης εξυπηρετεί τον έλεγχο της μεταφοράς των πρωτεϊνών και την ισόποση φόρτωση των δειγμάτων. Κατόπιν, η μεμβράνη αποχρωματίστηκε σταδιακά με πλύσεις υπό ανάδευση σε διάλυμα TBS-Tween 0,1%.



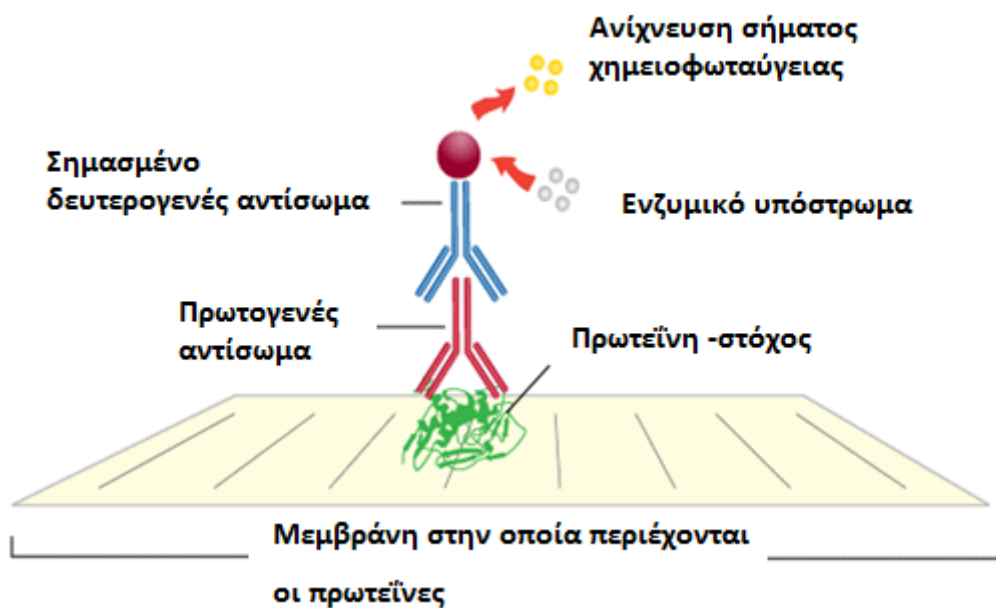
Εικόνα 12: Σύστημα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών SDS-PAGE.

II.10.5. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Όταν οι πρωτεΐνες πλέον είναι δεσμευμένες στη μεμβράνη, η πρωτεΐνη-στόχος μπορεί να ανιχνευθεί με τη χρήση πρωτογενούς αντισώματος που προσδένεται ειδικά σε αυτήν και στη συνέχεια με προσθήκη δευτερογενούς αντισώματος το οποίο είναι συζευγμένο με ειδικά ένζυμα. Τέλος, η ανίχνευση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με επίδραση κατάλληλων υποστρωμάτων και ανίχνευσης σήματος χημιοφωταύγειας (εικόνα 13).

Για να αποφευχθεί η μη ειδική σύνδεση του αντισώματος η μεμβράνη αρχικά επώαζεται για 1 ½ ώρα υπό ανάδευση με διάλυμα TBS-Tween 0,1%, γάλα 2% για να καλυφθούν οι θέσεις αυτές. Ακολουθούν πλύσεις TBS-Tween 0,1% τρεις φορές για πέντε λεπτά και ολονύκτια επώαση στους 4°C με τα αντισώματα anti-PAPOLA (1:800), (Santa Cruz) anti-CCND1(1:800), (Santa Cruz), anti-p53(1:200), (Santa Cruz), anti-cleaved

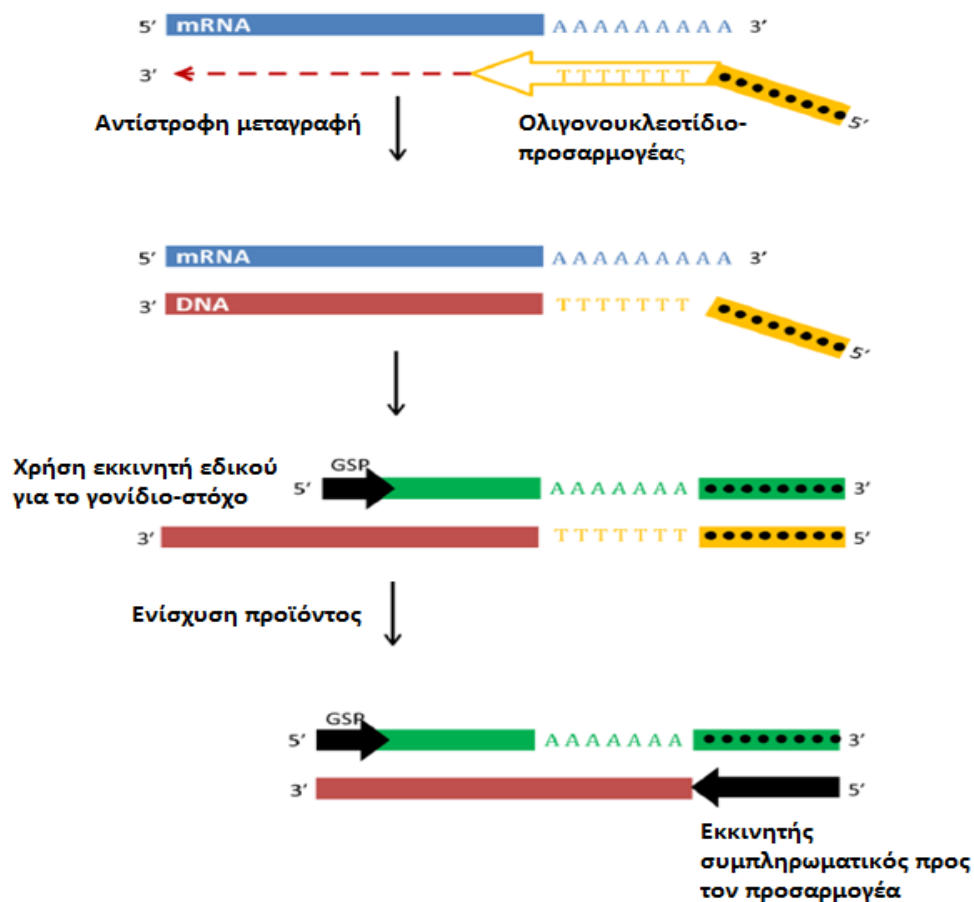
PARP(1:800), (Santa Cruz) καθώς και το αντίσωμα ελέγχου της φόρτωσης και άρα της ποσότητας των πρωτεϊνών anti-ακτίνη B (1:1000), (Santa Cruz). Την επόμενη ημέρα η περίσσεια αντισώματος ξεπλύθηκε όπως και προηγουμένως και επώαστηκε για 1 ½ ώρα με το αντίστοιχο δευτερογενές αντίσωμα anti-mouse (1:4000), (Sigma Aldrich) σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση, το οποίο βρίσκεται σε σύζευξη με υπεροξειδάση του χρένου (HRP). Όλα τα αντισώματα αραιώθηκαν σε διάλυμα επώασης TBS-Tween 0,1%, γάλα 0,3%. Ακολούθησαν πλύσεις της μεμβράνης και στη συνέχεια αυτή επώαστηκε με το σύστημα ECL (Enhanced ChemiLuminescence, Biorad), το οποίο λειτουργεί ως υπόστρωμα της HRP και στηρίζεται στη χημειοφωταύγεια. Η ανίχνευση του σήματος καθώς και η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με το Image Lab (Biorad).



Εικόνα 13: Απεικόνιση ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

II.11. Ταυτοποίηση των ισομορφών mRNA της CCND1 λόγω εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης με τη μέθοδο ενίσχυσης του 3' άκρου του cDNA: 3'RACE (3' Rapid Amplification of cDNA Ends)

Η ανίχνευση και ταυτοποίηση των διαφόρων ισομορφών mRNA της CCND1 που προκύπτουν λόγω της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης, πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της μεθόδου 3' RACE (εικόνα 14). Η μέθοδος αποτελεί μια πολύ αποτελεσματική προσέγγιση προσδιορισμού ολόκληρου του μήκους επιθυμητού cDNA ακόμη και όταν ένα μικρό μόνο μέρος της αλληλουχίας είναι γνωστό (Frohman *et al.* 1988, Park *et al.* 2003). Για την ενίσχυση των 3' αμετάφραστων περιοχών της CCND1 χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο First Choice RLM (Life Technologies). Η διαδικασία ξεκινά με την αντίδραση σύνθεσης του cDNA από το ολικό RNA χρησιμοποιώντας το ειδικό ολιγονουκλεοτίδιο-προσαρμογέα το οποίο υβριδοποιείται με το RNA σε τελικό όγκο 20μl ύστερα από επώαση μιας ώρας στους 42 °C (πίνακας 5).



Εικόνα 14: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση μεθόδου 3'RACE.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση των 3'αμετάφραστων περιοχών μέσω εφαρμογής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με εκμαγείο το cDNA από το προηγούμενο βήμα, χρησιμοποιώντας καθολικό εκκινητή με συμπληρωματική αλληλουχία προς αυτήν του προσαρμογέα και εκκινητή ειδικό για το γονίδιο της CCND1, ο οποίος προσδένεται ακριβώς πριν την έναρξη της 3'αμετάφραστης περιοχής (πίνακας 6). Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι τα ημιτελή cDNA που δεν μεταγράφηκαν αντιστρόφως μέχρι το 5' άκρο δεν θα αποδώσουν προϊόν κατά την αντίδραση PCR μιας και δεν φέρουν την αλληλουχία πρόσδεσης του συμπληρωματικού ως προς τον προσαρμογέα εκκινητή. Η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης ενισχύθηκε με τη χρήση της Long amplification DNA πολυμεράσης (Takara), μιας ειδικής DNA πολυμεράσης που έχει την ικανότητα να ενισχύει αλληλουχίες DNA, μεγαλύτερες από 20kb. Τέλος, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σύμφωνα με το πρωτόκολλο (πίνακας 7).

Πίνακας 5: Αντίδραση σύνθεσης cDNA με χρήση ολιγονουκλεοτιδίου-προσαρμογέα.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
1. Ολιγονουκλεοτίδιο-προσαρμογέας 2000nM 5'- GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGT12VN-3'	1μl
2. M-MLV αντίστροφη μεταγραφάση 200U/μl (Life Technologies)	1μl
3. dNTPs 10 mM (Takara)	4 μl
4. Ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφής 10x (Life Technologies)	2μl
5. Αναστολέας ριβονουκλεοπρωτεασών 200U/μl (Life Technologies)	0,5μl
6. Ολικό RNA	1μg

Πίνακας 6: Αντίδραση ενίσχυσης των 3' αμετάφραστων περιοχών.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
1. Ρυθμιστικό διάλυμα PCR 10X (Life Technologies)	5 Μl
2. dNTP 10mM (Takara)	4 μl
3. Εκκινητής ειδικός για CCND1 10μM 5'-AGGCTGTGTCCCTCTTCTCT-3'	2 μl
4. Καθολικός εκκινητής 10μM 5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACT-3'	2 μl
5. H ₂ O	Τελικό όγκο 50μl
6. Long amplification DNA πολυμεράση 5U/μL (Takara)	0,25μl
7. cDNA	1 μl

Πίνακας 7: Θερμικό πρωτόκολλο αντίδρασης ενίσχυσης των 3' αμετάφραστων περιοχών της CCND1

Συνθήκη	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	94°C	3:00 λεπτά
Hot start	94°C	
Αποδιάταξη	94°C	0:30 λεπτά
Υβριδοποίηση εκκινητών	60°C	0:30 λεπτά
Επιμήκυνση	72°C	3:00 λεπτά
Τελική επιμήκυνση	72°C	7:00 λεπτά

40
κύκλοι

Τα προϊόντα που παράχθηκαν κατά την αντίδραση PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 1% και οπτικοποιήθηκαν σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας. Για την επιβεβαίωση των τμημάτων DNA που παράχθηκαν κατά την

αντίδραση, τα προϊόντα απομονώθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης και αλληλουχήθηκαν. Η διαδικασία της απομόνωσης του προϊόντος θα περιγραφεί αναλυτικά παρακάτω.

II.12. Προσδιορισμός του μήκους της πολυ(A) ουράς του mRNA της κυκλίνης D1 με τη μέθοδο E-PAT (Extension Poly(A) Test)

Για τον προσδιορισμό του μήκους της ουράς του πολυ(A) του μηνύματος της κυκλίνης D1 ύστερα από την αποσιώπηση και την υπερέκφραση του γονιδίου της PAPOLA στις καρκινικές σειρές MCF-7 και MDA-MB 231 και για την καταγραφή πιθανών μεταβολών, εφαρμόστηκε η μέθοδος E-Pat (Jänicke *et al.*, 2012). Η μέθοδος μπορεί να παρέχει υψηλής ανάλυσης αποτελέσματα κατόπιν σωστού σχεδιασμού και παρακάμπτει σοβαρούς περιορισμούς άλλων τεχνικών όπως οι ραδιοσημασμένοι ανιχνευτές, οι μεγάλες ποσότητες RNA-εκμαγείου κ.α.

Η μέθοδος ξεκινά αναμειγνύοντας 2 μ g ολικού RNA με ένα 1 μ l από ολιγονουκλεοτίδιο-προσαρμογέα (5'-GCGAGCTCCGCGGCCGCGTTTTTTTTTTTTT) 100mM που φέρει μια αλληλουχία πολύ-δεοξυθυμιδίνης στο 5' άκρο του, σε τελικό όγκο 8 μ l. Το μείγμα επωάστηκε στους 80°C για πέντε λεπτά σε στερεό θερμόλουτρο ώστε να υβριδοποιηθεί. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ ακολούθως προστέθηκαν 12 μ l από το μείγμα της αντίδρασης πολυμερισμού από την Klenow πολυμεράση σε κάθε ένα από αυτά και επωάστηκαν για 1 ώρα στους 25°C σε θερμικό κυκλοποιητή (πίνακας 8). Το βήμα αυτό αποτελεί κομβικό σημείο της μεθόδου και χαρακτηρίζεται από τη δράση της Klenow πολυμεράσης η οποία έχει την ικανότητα να μετατρέπει σε δίκλωνο μόριο την μονόκλωνη περιοχή του προσαρμογέα επιμηκύνοντας το RNA εκμαγείο με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους 80°C ώστε να απενεργοποιηθεί η Klenow πολυμεράση. Ακολούθως, μεταφέρθηκαν στους 42 °C για ένα λεπτό όπου και προστέθηκε 1 μ l από την MML-V αντίστροφη μεταγραφάση 200U/ μ l (Life Technologies) και επωάστηκαν για μία ώρα ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφή, με εκκινητή το 5' άκρο του προσαρμογέα. Η απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματοποιήθηκε ύστερα από τοποθέτηση των δειγμάτων στους 80 °C για δέκα λεπτά. Η ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων πραγματοποιήθηκε μέσω

αντίδρασης PCR (πίνακας 9) χρησιμοποιώντας έναν καθολικό εκκινητή συμπληρωματικό της αλληλουχίας που προέκυψε από την αντίστροφη μεταγραφή του ολιγονουκλεοτιδίου-προσαρμογέα και ειδικά σχεδιασμένο εκκινητή που προσδένεται ακριβώς πριν το σήμα πολυαδενυλίωσης, δηλαδή πριν την έναρξη της πολυ(A) ουράς.

Πίνακας 8: Αντίδραση πολυμερισμού Klenow πολυμεράσης.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
1. Ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφής 10x (περιεκτικότητας 100mM DTT) (Life Technologies)	2μl
2. dNTPs 10mM (Takara)	4 μl
3. Αναστολέας ριβονουκλεοπρωτεασών (Life Technologies)	0,5 μl
4. Klenow πολυμεράση 5U/μl (Promega)	1μl
5. H ₂ O	4,5 μl

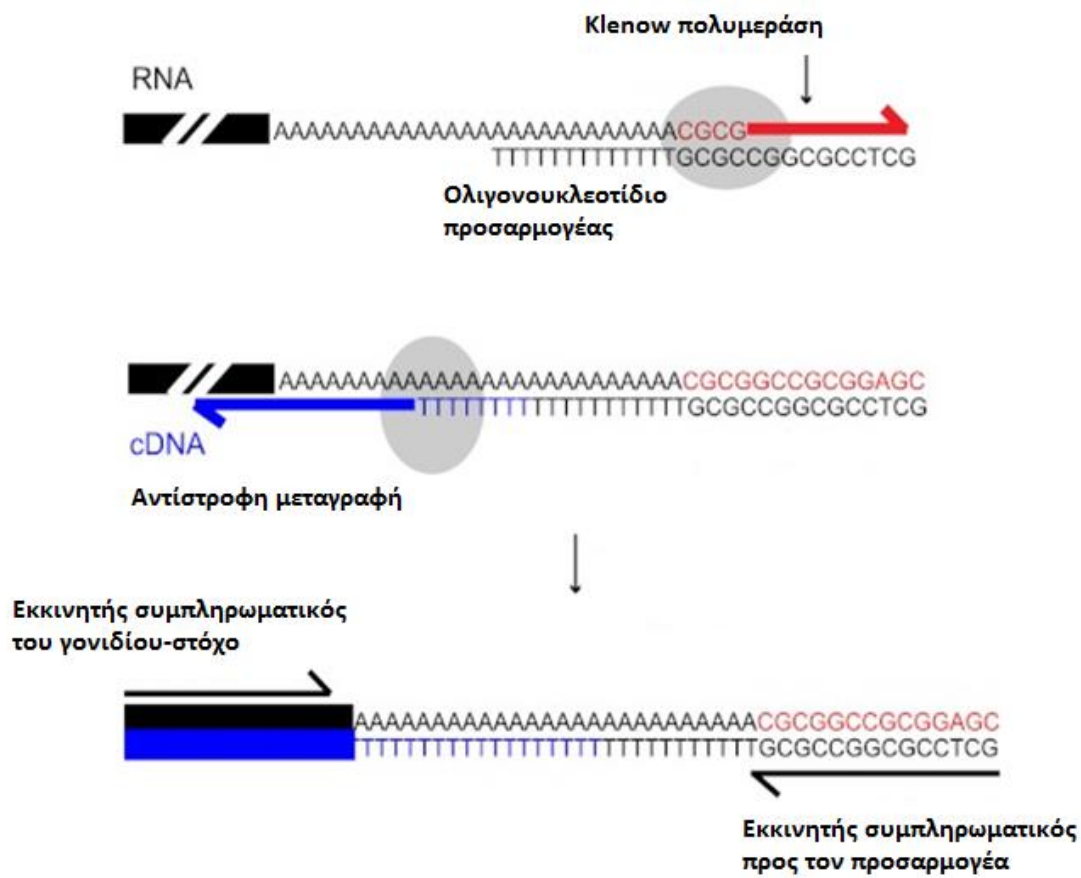
Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίστηκε ότι θα ενισχυθεί όλο το μήκος της πολυ(A) ουράς χωρίς να παραλείπεται κάποιο τμήμα το οποίο θα οδηγούσε σε ψευδή συμπεράσματα (εικόνα 15). Προσδιορίστηκε το μήκος της πολυ(A) ουράς τόσο της βραχείας όσο και της μακριάς ισομορφής του mRNA της CCND1, σχεδιάζοντας δυο πρόσθιους εκκινητές, ο κάθε ένας συμπληρωματικός προς την αλληλουχία ακριβώς πριν το εγγύς και το απομακρυσμένο σήμα πολυαδενυλίωσης αντίστοιχα (εικόνα 16).

Με σκοπό την ενίσχυση της ειδικότητας στην παραγωγή του προϊόντος κρίθηκε απαραίτητη η χρήση της iTaq Hot Start πολυμεράσης (Biorad). Η αναστολή της παραγωγής μη ειδικών προϊόντων στηρίζεται στην ιδιότητα της Hot start πολυμεράσης να παραμένει ανενεργή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, συνήθως κάτω από τους 72°C, όπου και υβριδίζονται οι εκκινητές, σε αντίθεση με την Taq πολυμεράση η οποία διατηρεί τη δραστικότητα της ακόμα και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Η αναστολή

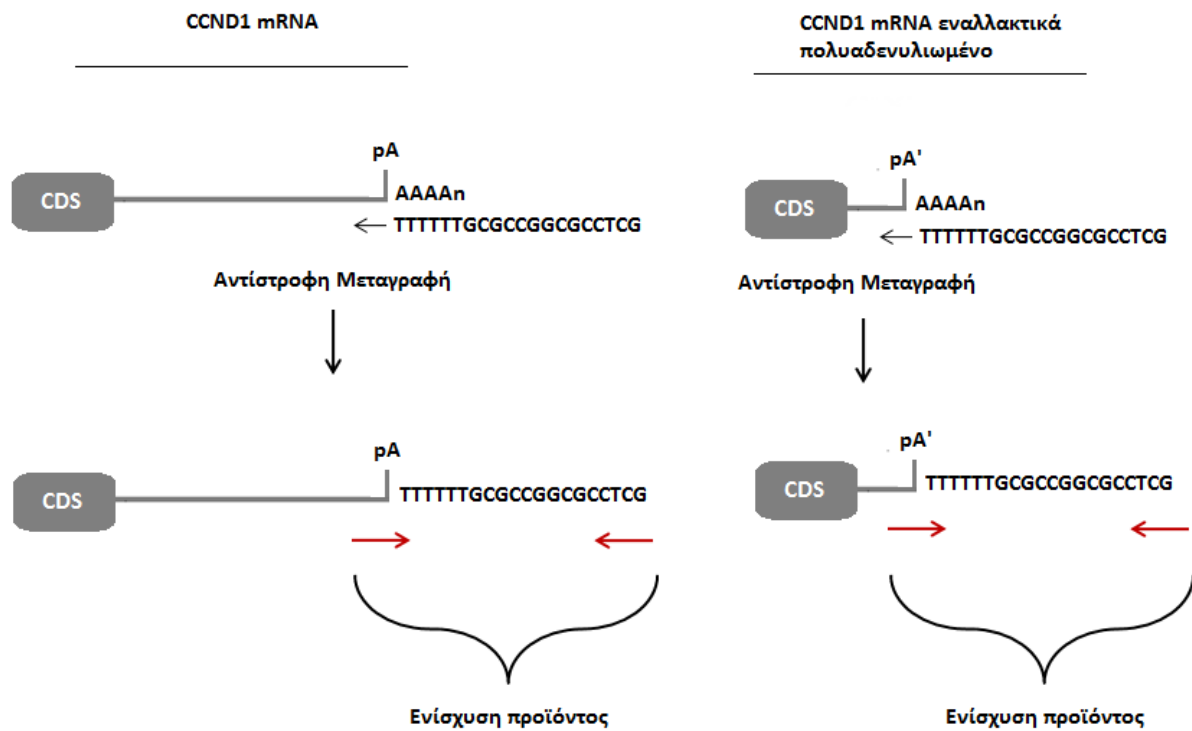
της δράσης αυτού του είδους των πολυμερασών στηρίζεται κυρίως στη χρήση ειδικών αντισωμάτων τα οποία είναι συνδεδεμένα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ενίσχυσης του προϊόντος στον θερμικό κυκλοποιητή (πίνακας 10) η αύξηση της θερμοκρασίας στους 94°C στην αρχή της αντίδρασης εξυπηρετεί εκτός από την αποδιάταξη των κλώνων του DNA και την αποκόλληση του αντισώματος με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ενζύμου.

Πίνακας 9: Πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ενίσχυση των πολυ(Α) ουρών του μηνύματος CCND1.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
1. Ρυθμιστικό διάλυμα PCR 10x (Life Technologies)	5μl
2. 50mM MgCl ₂	1,5μl
3. dNTPs 10 mM (Takara)	4 μl
4. Πρόσθιος εκκινητής 4000nM	
5'-TGGGTCTGTGCATTTCTGGT-'3 (μακριά ισομορφή)	5 μl
5'-CCTCCTCTCCGGAGCATTTT-3' (βραχεία ισομορφή)	5μl
5. Ανάστροφος εκκινητής 4000n M	
5'-GCGAGCTCCGCGGCCGCGT-3'	5μl
6. cDNA (αραιωμένο 1:3)	15 μl
7. iTaq Hot start πολυμεράση 5U/μl (Biorad)	0,25μl
8. H ₂ O	Μέχρι 50μl



Εικόνα 15: Αναπαράσταση μεθόδου E-PAT για τον προσδιορισμό του μήκους των πολυ(A) ουρών.



Εικόνα 16: Διαγραμματική αναπαράσταση της ενίσχυσης των πολυ(A) ουρών της μακριάς και της βραχείας ισομορφής του mRNA της CCND1 μέσω των αντίστοιχων ζευγών εκκινητών (κόκκινα βέλη).

Πίνακας 10: Θερμικό πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ενίσχυση των πολυ(A) ουρών του mRNA της CCND1.

Συνθήκη	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3:00 λεπτά
Αποδιάταξη	95°C	0:30 λεπτά
Υβριδοποίηση εκκινητών	60°C	0:30 λεπτά
Επιμήκυνση	72°C	2:00 λεπτά
		35 κύκλοι

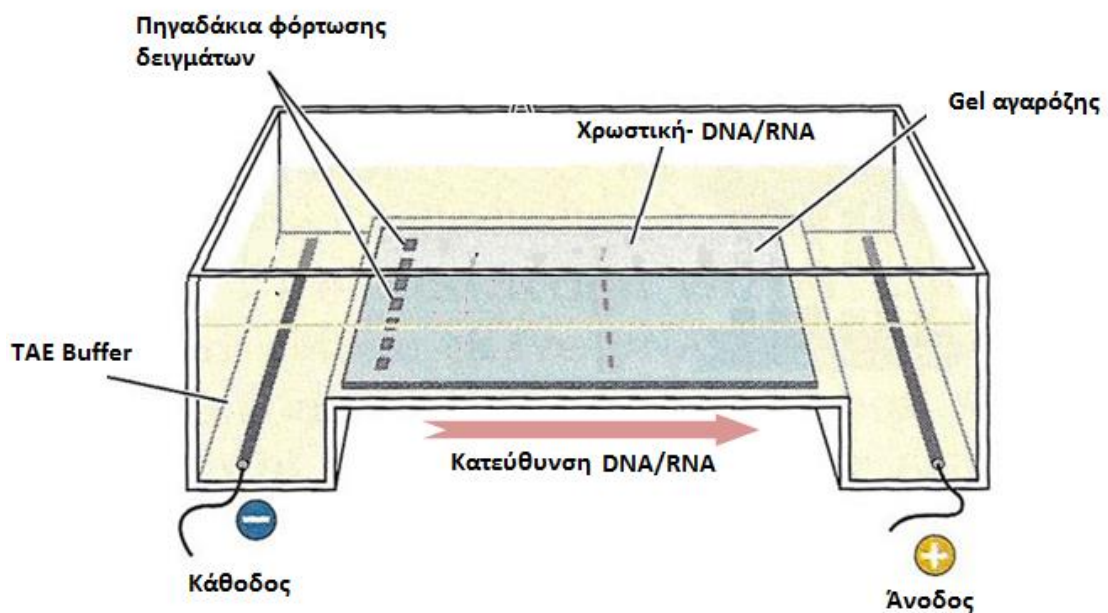
Τέλος, για τον προσδιορισμό του μεγέθους των πολυ(Α) ουρών τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε αгарόζης υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (Nuesieve, Lonza) 2,5%, διαδικασία που θα περιγραφεί παρακάτω και οπτικοποιήθηκαν μέσω έκθεσης στην υπεριώδη ακτινοβολία.

II.13. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση των νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό τους ανάλογα με το μέγεθος τους. Τα νουκλεϊκά οξέα εξαιτίας του σκελετού φωσφορικών ομάδων-πεντόζης χαρακτηρίζονται από συνολικό αρνητικό φορτίο όταν κάτω από συγκεκριμένο pH τα άτομα οξυγόνου ιονίζονται. Συνεπώς όταν εκτεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο μπορούν να μετακινηθούν λόγω έλξης προς το θετικό πόλο (εικόνα 17).

II.13.1. Ηλεκτροφόρηση DNA

Η ηλεκτροφόρηση του DNA πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης, έναν πολυσακχαρίτη που απομονώνεται από το άγαρ, το οποίο προέρχεται από διάφορες ποικιλίες κόκκινων φυκιών. Το πήκτωμα αγαρόζης καθώς πήζει δημιουργεί πόρους μεγέθους ανάλογου της περιεκτικότητας σε αγαρόζη από όπου περνούν τα μόρια DNA. Η ταχύτητα με την οποία τα μόρια DNA διαπερνούν τους πόρους είναι ανάλογη του μεγέθους τους. Για την επιτυχία της ηλεκτροφόρησης απαιτείται η προσθήκη στο πήκτωμα βρωμιούχου αιθιδίου, μιας χρωστικής η οποία προσδένεται ανάμεσα στις βάσεις των νουκλεϊκών οξέων και φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία με αποτέλεσμα την οπτικοποίηση των δειγμάτων που ηλεκτροφορούνται. Τέλος, το σύστημα συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Tris-οξικό-EDTA σε αναλογία 40mM Tris, 20mM οξικό και 1mM EDTA) pH περίπου 8,6 μέσα στο οποίο τοποθετείται το πήκτωμα και πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση. Η χρήση του διαλύματος TAE είναι κομβικής σημασίας μιας και το αλκαλικό pH αποτρέπει την υδρόλυση του DNA. Ακόμη, το διάλυμα TAE διατηρεί σταθερό pH εξασφαλίζοντας το αρνητικό φορτίο καθ όλη τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 17: Σύστημα ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων.

Πειραματική πορεία

Η παρασκευή του πηκτώματος περιελάμβανε την ανάμειξη κατάλληλης ποσότητας αγαρόζης (0,8-1,5%) με ρυθμιστικό διάλυμα TAE. Το μείγμα θερμάνθηκε υπό ανάδευση στους 100°C έως ότου διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη και γίνει διαυγές. Στη συνέχεια, παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 περίπου λεπτά και προστέθηκε σε αυτό το βρωμιούχο αιθίδιο, σε τελική συγκέντρωση περίπου 0,5 μg/ml. Το μείγμα τοποθετήθηκε στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου περίπου 45 λεπτά έως ότου στερεοποιηθεί. Για την προετοιμασία των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση σε σωλήνα τύπου errendorf αναμείχθηκαν κατάλληλη ποσότητα DNA με διάλυμα φόρτωσης. Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει κατάλληλες χρωστικές (μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανούν του ξυλενίου), οι οποίες βοηθούν στην παρατήρηση των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση καθώς και γλυκερόλη η οποία προσδίδει «βάρος» στα δείγματα ώστε να τοποθετούνται στα φρεάτια φόρτωσης. Τέλος, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν στα 100 Volt για περίπου 45 λεπτά και οπτικοποιήθηκαν ύστερα από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

II.13.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης υψηλής διαχωριστικής ικανότητας

Η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA αρκετά μικρού μεγέθους ή ο προσδιορισμός μικρών μόνο μεταβολών ανάμεσα στα προϊόντα αντιδράσεων PCR των δειγμάτων ελέγχου και αυτών των πειραματικών συνθηκών απαιτεί τη χρήση πηκτωμάτων αγαρόζης υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και μικρού βαθμού τήξης. Το θεωρητικό υπόβαθρο αυτής της κατηγορίας πηκτωμάτων παραμένει ίδιο με αυτό που περιγράφηκε παραπάνω σχετικά με τα πηκτώματα αγαρόζης.

Πειραματική πορεία

Η διαδικασία παρασκευής ενός πηκτώματος αγαρόζης υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και μικρού βαθμού τήξης (NuSieve agarose, Lonza) διαφέρει ελαφρώς από αυτήν που ήδη αναφέρθηκε. Συγκεκριμένα, για την παρασκευή πηκτώματος περιεκτικότητας 2,5% χρησιμοποιήθηκε ποτήρι ζέσεως μεγέθους τουλάχιστον δυο φορές μεγαλύτερο του όγκου του προς παρασκευή διαλύματος. Σε αυτό τοποθετήθηκε η ανάλογη ποσότητα διαλύματος TAE και στη συνέχεια προστέθηκε βαθμηδόν η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης υπό ισχυρή ανάδευση ώστε να μην δημιουργηθούν συσσωματώματα. Το μείγμα ζυγίστηκε σε ζυγό και καταγράφηκε ο τελικός του όγκος. Στη συνέχεια, ο ποτήρι ζέσεως καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκε στους 100°C υπό ανάδευση ώστε να διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη. Ύστερα από την διαλυτοποίηση της αγαρόζης το διάλυμα ξαναζυγίστηκε και οι απώλειες του όγκου συμπληρώθηκαν με απιονισμένο νερό θερμοκρασίας περίπου 55°C. Ακολούθησε η προσθήκη του βρωμιούχου αιθιδίου, η τοποθέτηση της ρευστής αγαρόζης στο εκμαγείο για την παρασκευή πηκτώματος και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον δυο ώρες. Ύστερα από τη φόρτωση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE στα 100V και αυτά οπτικοποιήθηκαν ύστερα από έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία όπως περιγράφηκε παραπάνω.

II.13.3. Ηλεκτροφόρηση RNA-Έλεγχος της ακεραιότητας του RNA

Η εφαρμογή ευαίσθητων μοριακών τεχνικών οι οποίες βασίζονται στη χρήση του RNA ως υπόστρωμα απαιτούν πολύ καλής ποιότητας RNA ώστε να είναι επιτυχείς και να παράγουν το επιθυμητό αποτέλεσμα. Για τον έλεγχο της ποιότητας του ολικού RNA που απομονώθηκε εφαρμόστηκε μια απλή και εύκολη μέθοδος η οποία παρακάμπτει την ανάγκη χρονοβόρων και ακριβών τεχνικών όπως η παρασκευή πηκτώματος φορμαλδεΰδης. Στο διάλυμα αγαρόζης- TAE το οποίο περιγράφηκε παραπάνω, προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα οικιακής χλωρίνης η οποία έχει ως αποτέλεσμα τόσο την αποδιάταξη του RNA όσο και την καταστροφή των ριβονουκλεασών (Aranda *et al.*, 2012). Το πήκτωμα αγαρόζης-χλωρίνης παρασκευάστηκε σύμφωνα με τον πίνακα 11 και η ακεραιότητα του RNA εκτιμήθηκε μέσω έκθεσης στη υπεριώδη ακτινοβολία.

II.14. Απομόνωση PCR προϊόντων από πήκτωμα αγαρόζης

Με σκοπό την ταυτοποίηση των προϊόντων της μεθόδου 3' RACE πραγματοποιήθηκε απομόνωση τους από το πήκτωμα αγαρόζης και χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey Nagel). Ύστερα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων, το πήκτωμα μεταφέρθηκε στην πλάκα υπεριώδους ακτινοβολίας. Το τμήμα της αγαρόζης που περιείχε το προϊόν της αντίδρασης κόπηκε προσεκτικά με τη βοήθεια νυστεριού ώστε να είναι ακέραιο και όποια περίσσεια αγαρόζης απομακρύνθηκε. Σημαντικό σημείο του σταδίου αυτού αποτελεί η όσον το δυνατό σύντομη έκθεση του DNA στην υπεριώδη ακτινοβολία ώστε να αποφευχθούν τυχόν βλάβες σε αυτό. Στη συνέχεια το τμήμα που απομονώθηκε, ζυγίστηκε και προστέθηκε σε αυτό διάλυμα χαοτροπικών αλάτων που βοηθούν στην πρόσδεση του DNA σε μεμβράνη πυριτίου. Για κάθε 100 mg πηκτώματος αγαρόζης αντιστοιχούν 200μl διαλύματος. Η προσθήκη του διαλύματος διατηρεί το pH περίπου στο 5-6 ώστε ακόμη και πολύ μικρά τμήματα DNA να προσδεθούν στη μεμβράνη. Το μείγμα στη συνέχεια επώαστηκε για 10 λεπτά στους 50°C με ενδιάμεση ισχυρή ανάδευση (vortexing) ώστε να διαλυτοποιηθεί εντελώς η αγαρόζη. Ύστερα από διαδοχικές πλύσεις με σκοπό τον

καθαρισμό του DNA, αυτό τελικά εκλούστηκε από τη στήλη και συλλέχθηκε σε σωλήνα τύπου erpendorf.

Πίνακας 11: Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης-χλωρίνης για την ηλεκτροφόρηση του RNA.

1. Προσθήκη αγαρόζης σε ανάλογο όγκο TAE (1%w/v). 2. Προσθήκη 500μl οικιακής χλωρίνης 6% στο διάλυμα (1% v/v). 3. Επώαση του μίγματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. 4. Θέρμανση του μίγματος υπό ανάδευση και προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου. 5. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων RNA στα 100V .

II.15. Έλεγχος της μορφολογίας του πυρήνα μέσω χρώσης με DAPI

Για τον έλεγχο ύπαρξης πιθανών μεταβολών της μορφολογίας των πυρήνων των κυττάρων ύστερα από την υπερέκφραση της PAPOLA στα MCF-7 και HEK 293 κύτταρα πραγματοποιήθηκε χρώση με DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) και απεικόνιση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Το DAPI αποτελεί μια δεδομένη φθορίζουσα χρωστική η οποία χαρακτηρίζεται από την ιδιότητα να προσδένεται σε περιοχές πλούσιες σε αδενίνη-θυμίνη του DNA. Η χρωστική διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και προτιμάται για τη χρώση μονιμοποιημένων κυττάρων αν και χρησιμοποιείται και σε ζωντανά κύτταρα με μικρότερη απόδοση και συνεπώς σε μεγαλύτερες ποσότητες (Zink *et al.*, 2003). Ύστερα από την πρόσδεση του DAPI στο δίκλωνο DNA, αυτό παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 358nm (υπεριώδες) και μέγιστη εκπομπή στα 461nm (μπλε), ενώ λόγω της σύνδεσης ο φθορισμός που εκπέμπεται αυξάνει έως και 20 φορές συγκριτικά με την ελεύθερη μορφή του.

Πειραματική πορεία

Για τη διαδικασία της χρώσης τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία κυτταροκαλλιεργειών 6 φρεατίων και ακολούθησε διαμόλυνση τους με πλασμιδιακούς φορείς κάτω από τις ίδιες συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω. Στην περίπτωση αυτή τα κύτταρα αναπτύχθηκαν πάνω σε γυάλινες καλυπτρίδες οι οποίες είχαν τοποθετηθεί στα φρεάτια του τρυβλίου πριν την επίστρωση τους. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν τρεις φορές με διάλυμα PBS και μονιμοποιήθηκαν με την προσθήκη 1ml διαλύματος φορμαλδεϋδης 3,7% και επώαση 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, το διάλυμα μονιμοποίησης αφαιρέθηκε και ακολούθησε πλύση των κυττάρων με PBS δυο ακόμη φορές διάρκειας 5 λεπτά η κάθε μία. Σε κάθε καλυπτρίδα τοποθετήθηκαν 50μl DAPI (0,2μg/ml σε PBS) με ακόλουθη επώαση 1-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, σε κάθε καλυπτρίδα τοποθετήθηκαν 50μl PBS ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής και η διαδικασία της πλύσης επαναλήφθηκε ακόμη 3 φορές. Τέλος, σε αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκε μια σταγόνα ειδικού παρασκευάσματος (Mounting, Vectashield) με σκοπό τη μείωση της φωτοευαισθησίας και τη ρύθμιση της διάθλασης και οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν ανεστραμμένες πάνω σε αυτό. Ακολούθησε παρατήρηση των δειγμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού (Tirf). Σημαντική παράμετρος για την επιτυχή χρώση αποτελεί η αποφυγή αφυδάτωσης των κυττάρων καθ ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

II.16. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημείας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού STATISTICA (StatSoft). Η συσχέτιση της έκφρασης της PAPOLA με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους υπολογίστηκε με εφαρμογή του Pearson Chi-square test. Εκτός της μονοπαραγοντικής ανάλυσης (συσχέτιση PAPOLA με επιμέρους παραμέτρους) πραγματοποιήθηκε και πολυπαραγοντική ανάλυση ώστε να διερευνηθεί η συσχέτιση της έκφρασης της PAPOLA με τις μεταβλητές κάτω από επιμέρους συνθήκες.

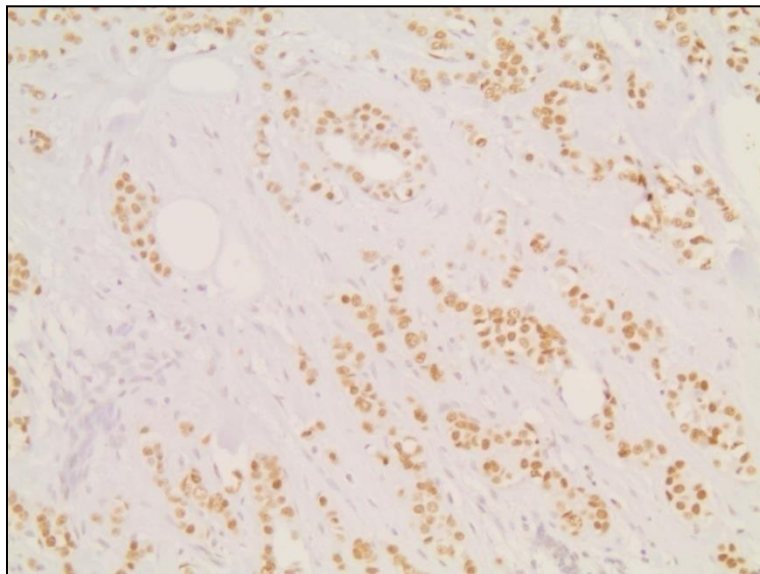
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρουσιάζονται ως η μέση τιμή των επαναλήψεων που πραγματοποιήθηκαν και για αυτά υπολογίστηκαν οι τιμές σφάλματος. Επιπλέον για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων και τη σύγκριση δυο ομάδων εφαρμόστηκε η δοκιμασία Students T-test με τη βοήθεια του λογισμικού Graphpad. Υπολογίστηκε η τιμή P που προκύπτει ύστερα από τη σύγκριση των μέσων τιμών κάθε πειράματος.

Και στις δυο περιπτώσεις υπολογισμού της στατιστικής σημασίας η τιμή του P value $P < 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική ενώ η τιμή $P = 0.05$ θεωρήθηκε οριακά στατιστικά σημαντική. Για όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις και για κάθε πείραμα κάθε συνθήκη εφαρμόστηκε εις διπλούν.

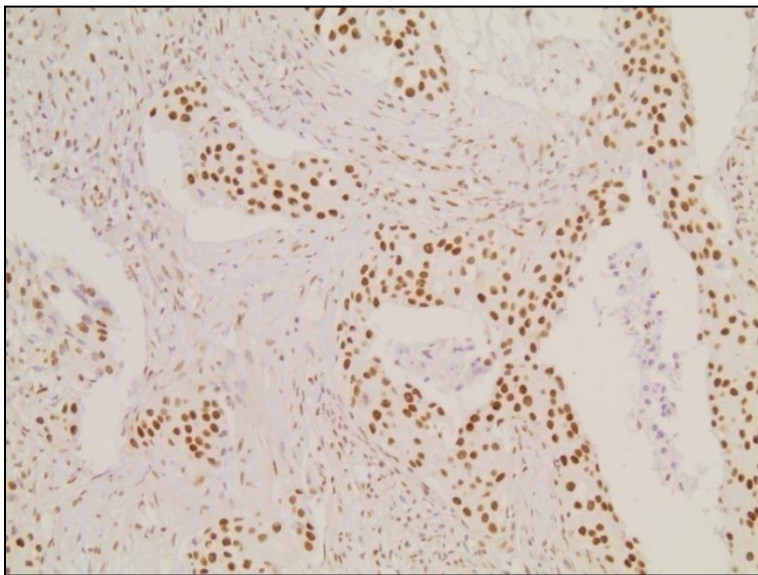
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

III.1. Πρότυπο έκφρασης της PAPOLA στον καρκίνο του μαστού βάση της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου

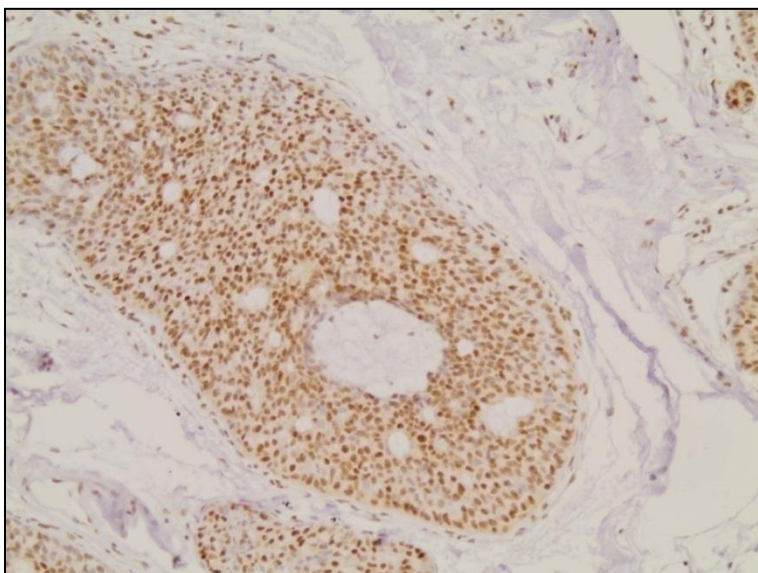
Με σκοπό τη διερεύνηση της πιθανότητας η υπερέκφραση της PAPOLA να συμβάλλει στην αυξημένη ενεργότητα της πολυαδενυλίωσης που παρατηρήθηκε στον καρκίνο του μαστού (Scorilas *et al.*, 2000), τα επίπεδα έκφρασης της μελετήθηκαν με εφαρμογή ανοσοϊστοχημείας σε 211 καρκινώματα μαστού. Παρατηρήθηκε πυρηνικός εντοπισμός της PAPOLA στα κύτταρα, ενώ θετικά ως προς την έκφραση της θεωρήθηκαν τα δείγματα στα οποία περισσότερα από 10% των κυττάρων παρουσίασαν πυρηνική χρώση. Το ένζυμο εντοπίστηκε σε όλους τους ιστολογικούς τύπους των καρκινωμάτων και παρουσίασε μεγάλη διακύμανση στα επίπεδα έκφρασης του (εικόνα 1-4).



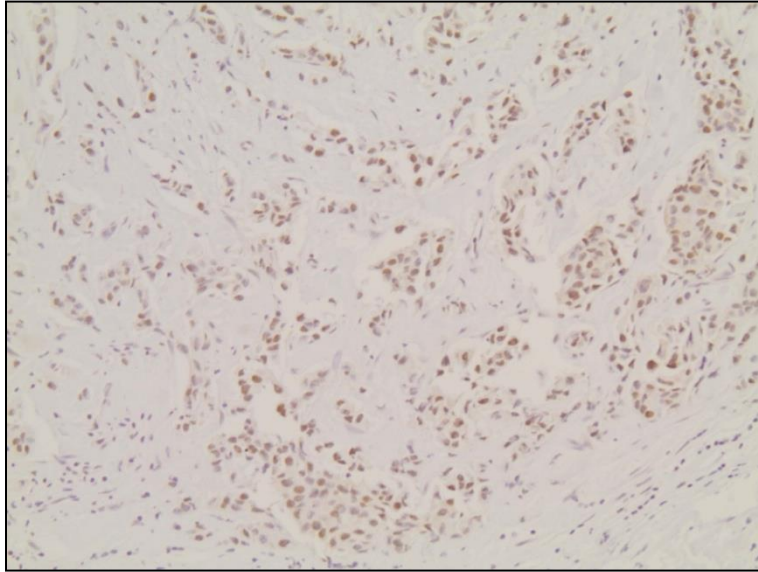
Εικόνα 1: Πυρηνική έκφραση της PAPOLA σε **πορογενές διηθητικό** καρκίνωμα μαστού (ABC/HRP, x250).



Εικόνα 2: Υψηλής έντασης πυρηνική έκφραση της PAPOLA σε ιστολογική τομή **διηθητικού πορογενούς** καρκίνωματος μαστού (ABC/HRP, x250).



Εικόνα 3: Πυρηνική έκφραση της PAPOLA σε **in situ πορογενές** καρκίνωμα μαστού (ABC/HRP, x200).



Εικόνα 4: Πυρηνική έκφραση της PAPOLA σε λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα μαστού (ABC/HRP, x250).

III.1.1. Συσχέτιση της έκφρασης της PAPOLA με κλινικοπαθολογικές και ιστολογικές παραμέτρους των καρκινωμάτων του μαστού

Διερευνήθηκε η έκφραση της PAPOLA με σειρά κλινικοπαθολογικών και ιστολογικών παραγόντων ώστε να προσδιοριστεί η πιθανή συμβολή της στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (πίνακας 1).

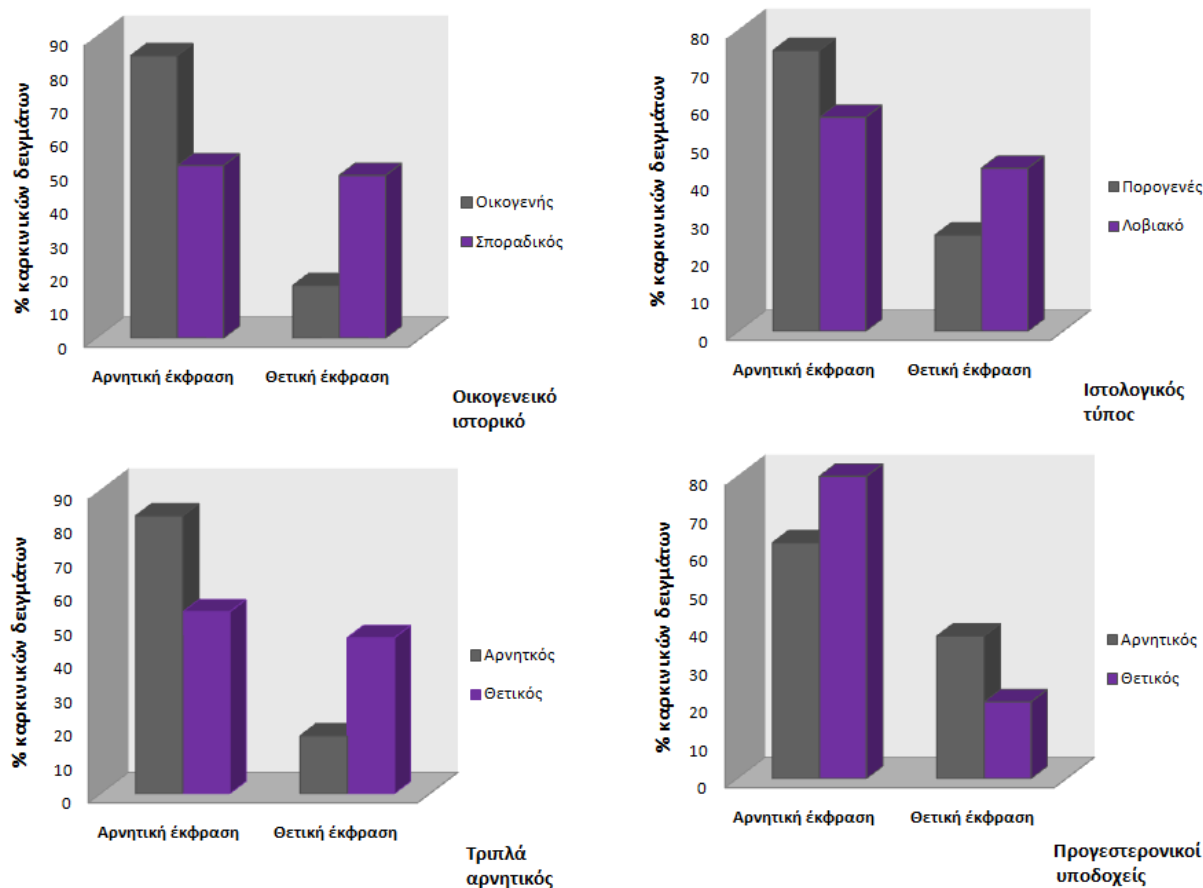
Η έκφραση της PAPOLA συσχετίστηκε ισχυρά με τον σποραδικό έναντι του οικογενούς καρκίνου ($P < 0,001$), με τον τριπλά αρνητικό υπότυπο καρκίνου του μαστού ($P < 0,001$), και με τον λοβιακό ιστολογικό τύπο ($P = 0,0084$). Επιπλέον, συσχέτιση παρουσιάστηκε και με τα καρκινώματα που εμφανίζονται αρνητικά για προγεστερρονικούς υποδοχείς ($P = 0,01$). Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της έκφρασης του ενζύμου με κάποιον από τους υπόλοιπους κλινικοπαθολογικούς παράγοντες που μελετήθηκαν. Η ποσοστιαία κατανομή των καρκινωμάτων μαστού με τους κλινικοπαθολογικούς παράγοντες που προαναφέρθηκαν ανάλογα με την έκφραση της PAPOLA απεικονίζεται στα ακόλουθα διαγράμματα (εικόνα 5).

Πίνακας 1: Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της PAPOLA με κλινικοπαθολογικούς παράγοντες και ιστολογικά χαρακτηριστικά των καρκινωμάτων μαστού.

	Έκφραση PAPOLA		¹ p
	Αρνητική	Θετική	
Οικογενειακό ιστορικό			
Οικογενής	91 (84,26%)	17 (15,74%)	<0,0001
Σποραδικός	53 (51,46%)	50 (48,54%)	
Τριπλά αρνητικός			
Αρνητικό	88 (82,25%)	19 (17,75%)	<0,0001
Θετικό	56 (53,85%)	48 (46,15%)	
Ιστολογικός τύπος			
Πορογενές	102 (74,46%)	35 (25,54%)	
Λοβιακό	42 (56,75%)	32 (43,25%)	
Βαθμός κακοήθειας			
I	10 (58,82%)	7 (41,18%)	² N.S
III	85 (68,54%)	39 (31,56%)	
IIII	48 (69,56%)	21 (30,44%)	
Μέγεθος όγκου			
<2cm	46 (69,69%)	20 (30,31%)	² N.S
>2cm	98 (68,05%)	46 (31,95%)	
Λεμφαδένες			
Αρνητικοί	70 (72,16%)	27 (27,84%)	² N.S
Θετικοί	74 (65,48%)	39 (34,52%)	
Στάδιο			
I	36 (72%)	14 (28%)	² N.S
III	87 (67,44%)	42 (32,56%)	
IIII	21 (67,74%)	10 (32,26%)	
ER			
Αρνητικοί	81 (63,77%)	46 (36,23%)	² N.S
Θετικοί	61 (75,3%)	20 (24,7%)	
PR			
Αρνητικοί	86 (62,32%)	52 (37,68%)	
Θετικοί	55 (79,92%)	14 (20,28%)	
Επιβίωση			
0	111 (68,94%)	50 (31,06%)	² N.S
1	32 (66,66%)	16 (33,34%)	
Υποτροπή			
0	103 (70,06%)	44 (29,94%)	² N.S
1	40 (64,51%)	22 (35,49%)	

¹P: τιμές Pearson's chi-square test ($p \leq 0,05$) ²N.S.: Not Significant

Αποτελέσματα



Εικόνα 5: Διαγραμματική απεικόνιση ποσοστιαίας κατανομής των καρκινωμάτων μαστού με τους αντίστοιχους κλινικοπαθολογικούς παράγοντες ανάλογα με την θετικότητα ή την αρνητικότητα για την έκφραση της PAPOLA.

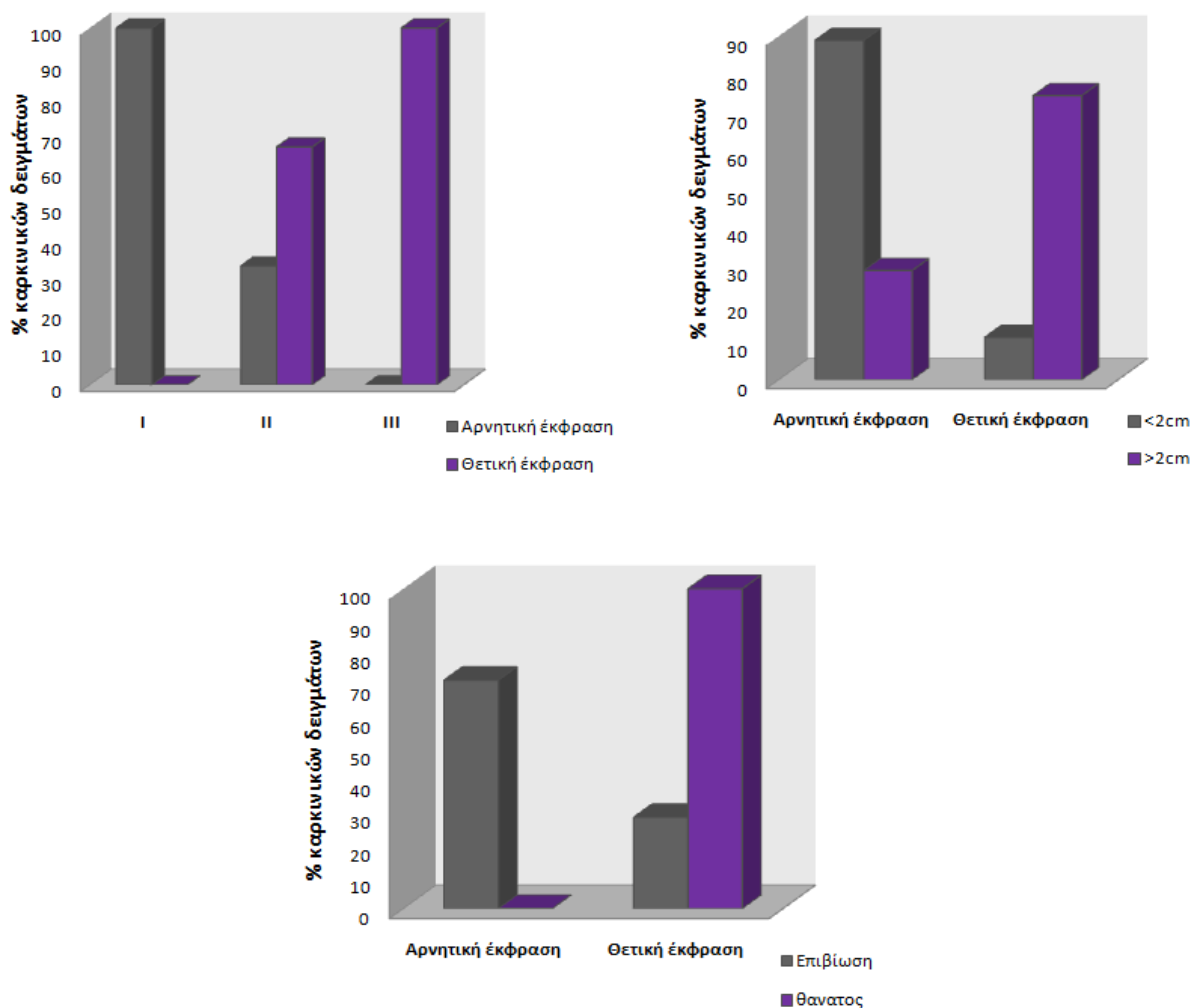
Τέλος, παρατηρήθηκε ακόμη ότι στους όγκους με υψηλό βαθμό διαφοροποίησης, Grade I, η έκφραση της PAPOLA συσχετίστηκε με δυσμενείς παραμέτρους πρόγνωσης (πίνακας 2). Συγκεκριμένα ανάμεσα στους καλά διαφοροποιημένους όγκους, αυτοί που εμφάνισαν θετικότητα για την PAPOLA ήταν μεγαλύτερου μεγέθους ($>2\text{cm}$) ($P=0,013$) ενώ οι αντίστοιχοι ασθενείς χαρακτηρίζονταν από προχωρημένο στάδιο της νόσου ($P=0,006$) και χαμηλά ποσοστά επιβίωσης ($P=0,05$). Τα δεδομένα αυτά πιθανά αντικατοπτρίζουν ότι η έκφραση της PAPOLA σε καλά διαφοροποιημένους όγκους πρώιμου σταδίου στην καρκινογένεση προδιαθέτει τη δυσμενή εξέλιξη τους. Ακολούθως απεικονίζεται η ποσοστιαία κατανομή των καρκινωμάτων μαστού χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης Grade I με τους αντίστοιχους κλινικοπαθολογικούς παράγοντες ανάλογα με την έκφραση της PAPOLA (εικόνα 6).

Πίνακας 2: Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της PAPOLA με κλινικοπαθολογικούς παράγοντες ανάμεσα στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα του μαστού.

	Grade I καρκινώματα Έκφραση PAPOLA		¹ p
	Αρνητική	Θετική	
Στάδιο			
I	8 (100%)	0 (0%)	0,006
III	2 (33,34%)	4 (66,66%)	
IIII	0 (0%)	2 (100%)	
Μέγεθος όγκου			
<2cm	8 (88,89)	1 (11,11%)	0,013
>2cm	2 (28,58%)	5 (74,42%)	
Επιβίωση			
0	10 (71,43%)	4 (28,57%)	0,05
1	0 (0%)	2 (100%)	

¹P: τιμές Pearson's chi-square test ($p \leq 0,05$)

Αποτελέσματα

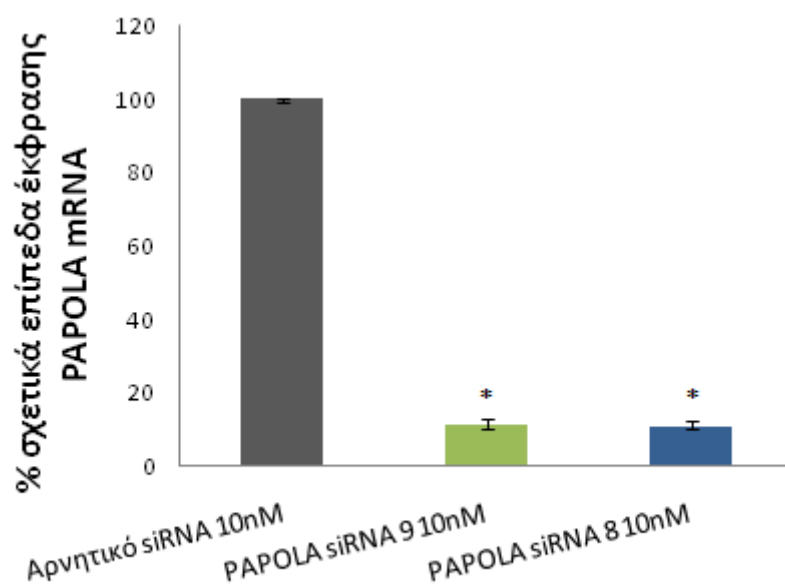


Εικόνα 6: Διαγραμματική απεικόνιση ποσοστιαίας κατανομής των καρκινωμάτων μαστού χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης Grade I με τους αντίστοιχους κλινικοπαθολογικούς παράγοντες ανάλογα με την θετικότητα ή την αρνητικότητα για την έκφραση της PAPOLA.

III.2. Αποσιώπηση του γονιδίου της PAPOLA οδηγεί σε αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του μαστού

Για τη μελέτη της πιθανής συνεισφοράς της έκφρασης της PAPOLA στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού, το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την έκφραση της αποσιωπήθηκε στα καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 και MDA-MB 231 και διερευνήθηκαν πιθανές αλλαγές στο φαινότυπο των κυττάρων. Αρχικά, για την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν 2 siRNA (siRNA 9, siRNA 8)

ειδικά για το γονίδιο, στα MCF-7 κύτταρα και η επιτυχία της διαδικασίας επιβεβαιώθηκε μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση. Και στις δύο περιπτώσεις επετεύχθη μείωση των επιπέδων του mRNA της PAPOLA κατά περίπου 90% σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία χρησιμοποιήθηκε siRNA αρνητικού ελέγχου όπως διαπιστώθηκε μέσω εφαρμογής RT-qPCR (εικόνα 7).

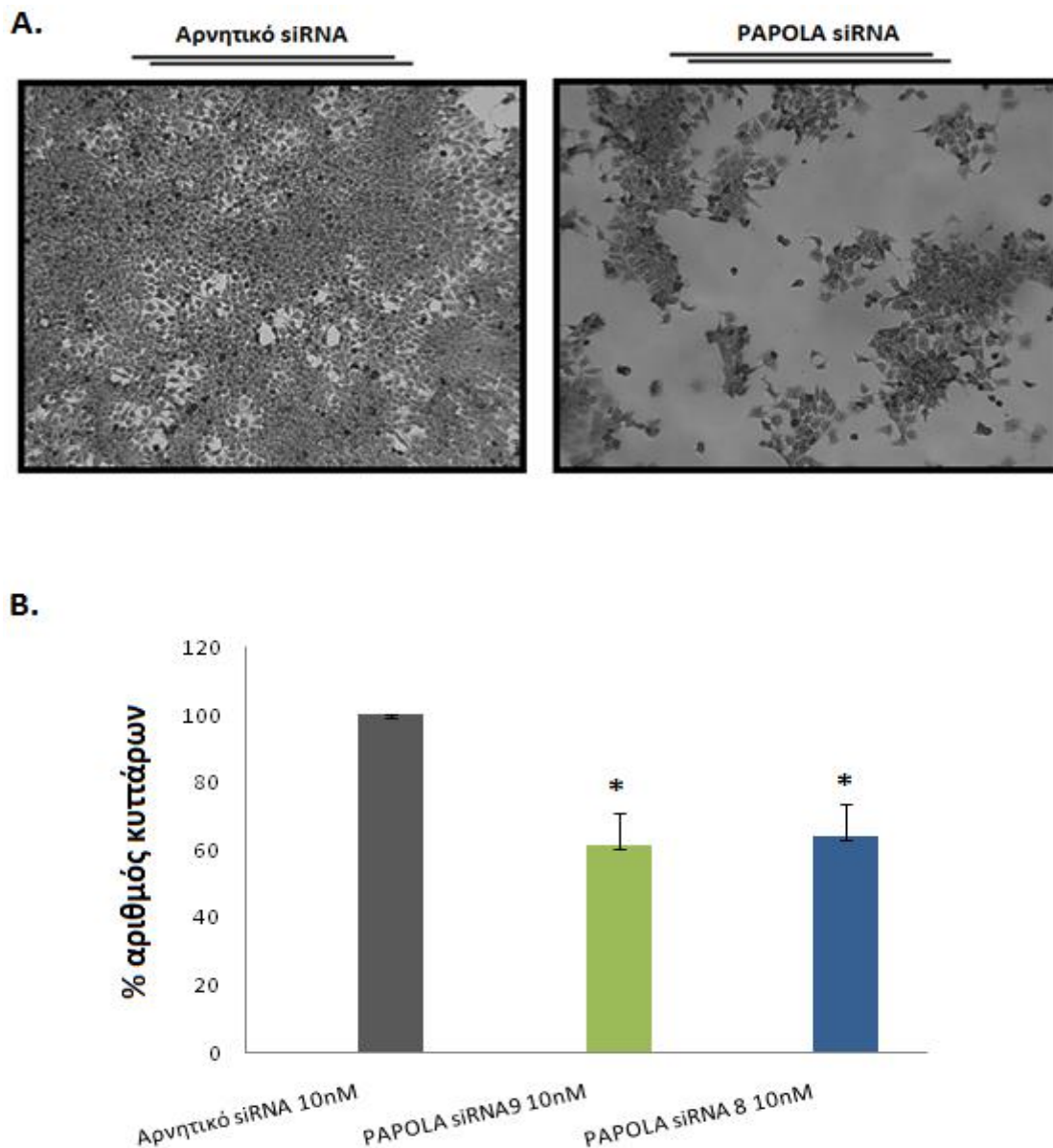


Εικόνα 7: Διαγραμματική απεικόνιση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA της PAPOLA 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση με δυο siRNA για την PAPOLA (siRNA9, siRNA 8) και αρνητικό siRNA στα MCF-7 κύτταρα. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή RT-qPCR και η κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από 3 ανεξάρτητα πειράματα (* $P < 0,01$).

Για τη διερεύνηση πιθανών αλλαγών στον καρκινικό φαινότυπο των MCF-7 κυττάρων ύστερα από την αποσιώπηση της PAPOLA, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του πολλαπλασιασμού σε κάθε μια από τις παραπάνω περιπτώσεις μέσω μέτρησης τους χρησιμοποιώντας την πλάκα Neubauer. Πράγματι, τα κύτταρα στα οποία η έκφραση της

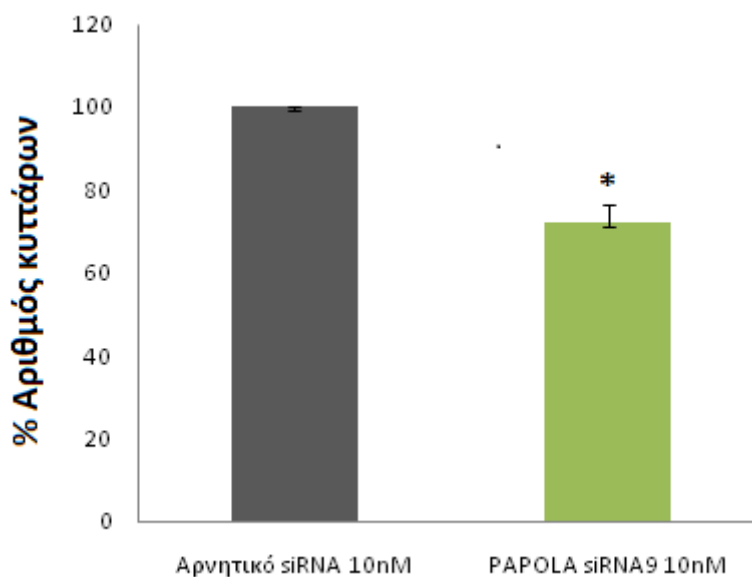
Αποτελέσματα

PAPOLA κατεστάλη εμφάνισαν μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού κατά 39 και 35,8% αντίστοιχα για κάθε siRNA που χρησιμοποιήθηκε συγκριτικά με τα κύτταρα αρνητικού ελέγχου ύστερα από 72 ώρες επώαση (εικόνα 8).



Εικόνα 8: **A.** Απεικόνιση καλλιέργειας των MCF-7 κυττάρων 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με δυο siRNA για την PAPOLA (siRNA9, siRNA8) και αρνητικό siRNA (10x), **B.** Ποσοστιαία ποσοτικοποίηση αριθμού κυττάρων μέσω χρήσης της πλάκας Neubauer. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από 3 ανεξάρτητα πειράματα (* $P < 0,01$).

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν, τα επίπεδα του πολλαπλασιασμού των κυττάρων προσδιορίστηκαν και μέσω χρώσης με κρυσταλλικό ιώδες κάτω ακριβώς από τις ίδιες συνθήκες, επιλέγοντας την επώαση με ένα από τα δυο siRNA που χρησιμοποιήθηκαν προηγουμένως (siRNA9). Και σε αυτήν την περίπτωση παρατηρήθηκε μείωση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων κατά 30% (εικόνα 9).

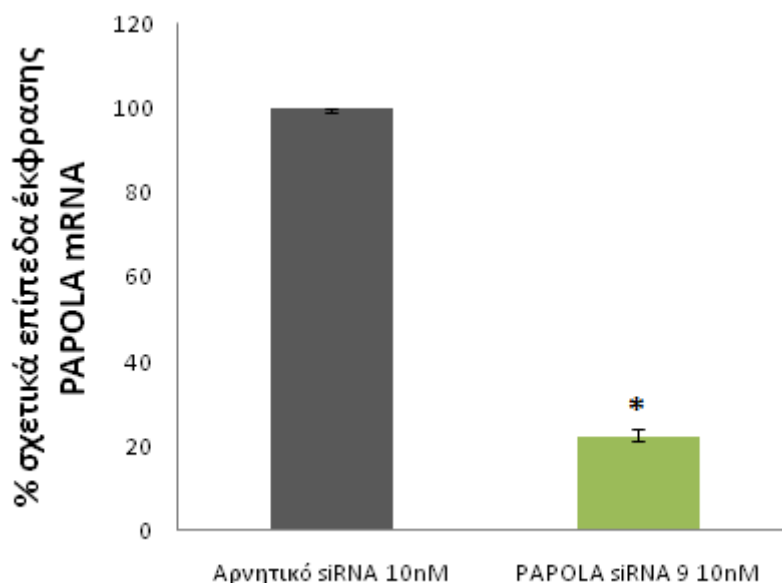


Εικόνα 9: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων πολλαπλασιασμού των MCF-7 κυττάρων 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με siRNA για την PAPOLA και αρνητικό siRNA. Τα επίπεδα πολλαπλασιασμού προσδιορίστηκαν μέσω χρώσης των κυττάρων με κρυσταλλικό ιώδες. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από 3 ανεξάρτητα πειράματα (* $P < 0,01$).

Εφόσον τα αποτελέσματα της αποσιώπησης του γονιδίου της PAPOLA στον φαινότυπο των MCF-7 κυττάρων επιβεβαιώθηκαν μέσω της χρήσης και των δυο siRNA (siRNA9, siRNA8), επιλέχθηκε η χρήση ενός εκ των δυο (siRNA9) για την διερεύνηση του φαινομένου στα MDA-MB 231 κύτταρα. Και σε αυτήν την περίπτωση η επιτυχία της αποσιώπησης επιβεβαιώθηκε μέσω εφαρμογής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση. Επετεύχθη μείωση των επιπέδων του mRNA της PAPOLA κατά περίπου 80% σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία

Αποτελέσματα

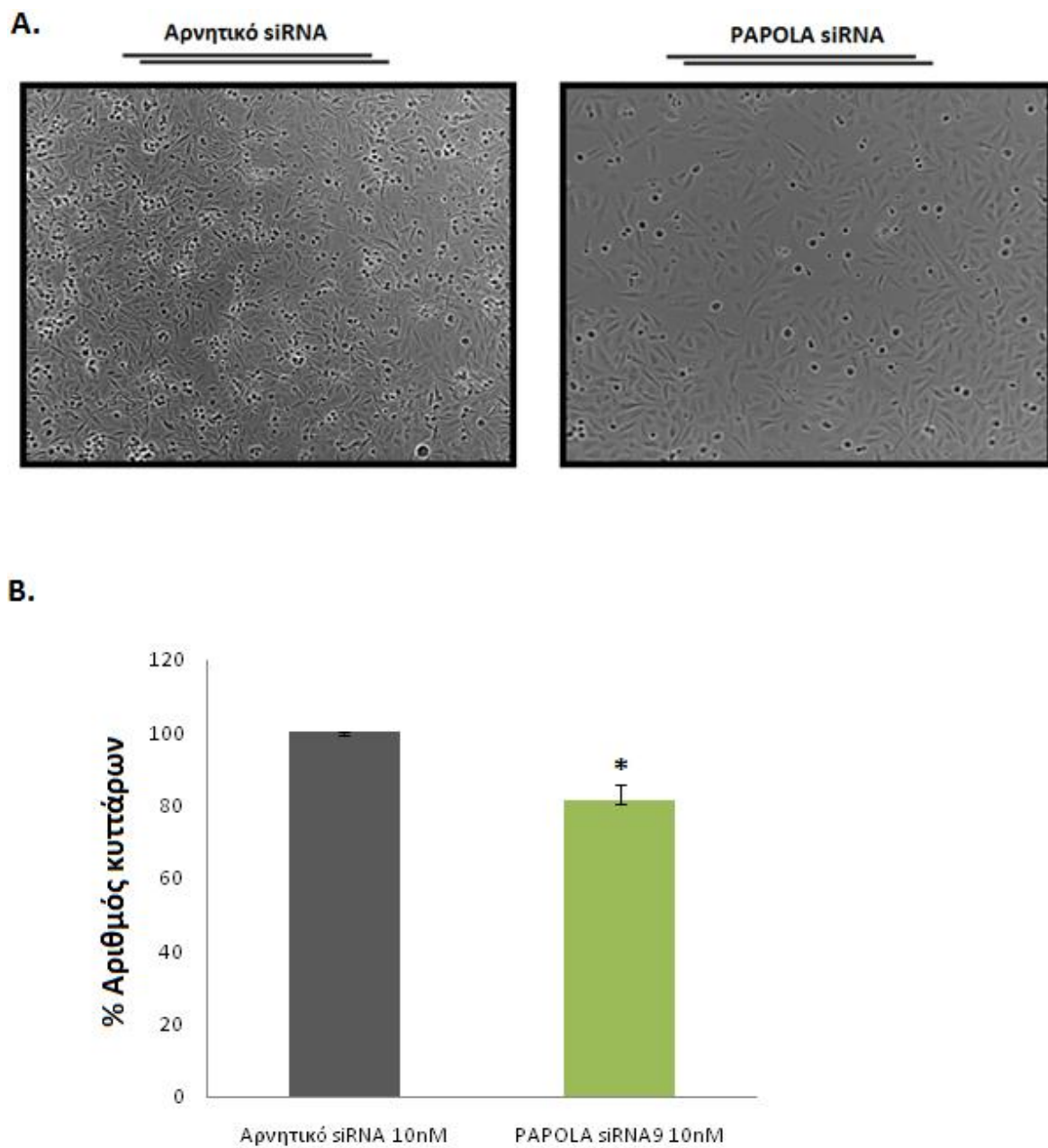
χρησιμοποιήθηκε siRNA αρνητικού ελέγχου, όπως διαπιστώθηκε μέσω εφαρμογής RT-qPCR (εικόνα 10).



Εικόνα 10: Διαγραμματική απεικόνιση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA της PAPOLA 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση siRNA για την PAPOLA (siRNA9) και αρνητικό siRNA στα MDA-MB 231 κύτταρα. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή RT-qPCR και η κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από 3 ανεξάρτητα πειράματα (* $P < 0,01$).

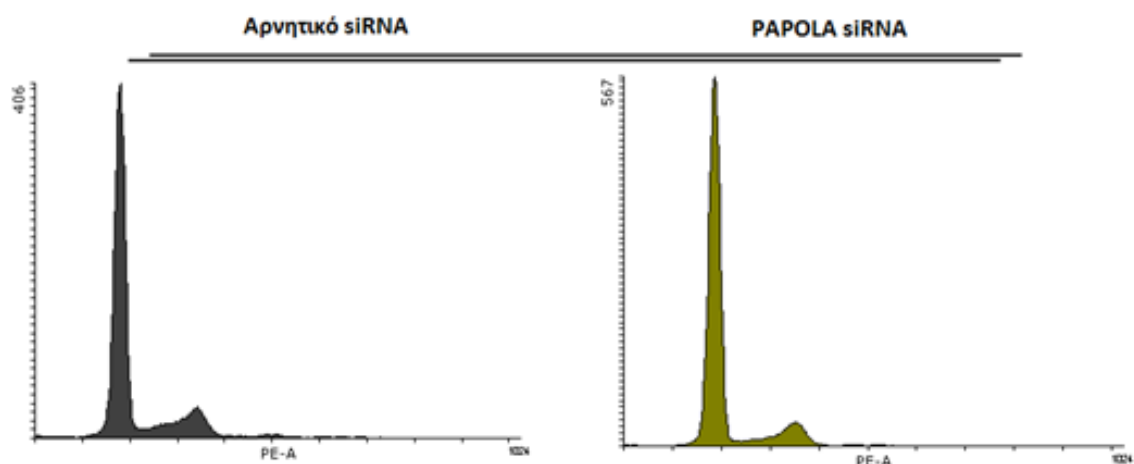
Και στην περίπτωση των MDA-MB 231 κυττάρων η αποσιώπηση της PAPOLA είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού κατά 20% συγκριτικά με τα κύτταρα αρνητικού ελέγχου ύστερα από 72 ώρες επώαση (εικόνα 11). Για την περαιτέρω μελέτη της αναστολής του πολλαπλασιασμού που παρατηρήθηκε, διερευνήθηκε στη συνέχεια το προφίλ του κυτταρικού κύκλου των MCF-7 και MDA-MB 231 κυττάρων μέσω εφαρμογής κυτταρομετρίας ροής και ελέγχθηκαν πιθανές μεταβολές στις φάσεις του. Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου έδειξε μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων στη G_0/G_1 φάση ύστερα από την καταστολή της PAPOLA συγκριτικά με τα κύτταρα αρνητικού

ελέγχου κατά περίπου 8% για τα MCF-7 κύτταρα (εικόνα 12) και κατά 5% για τα MDA-MB 231 κύτταρα (εικόνα 13).

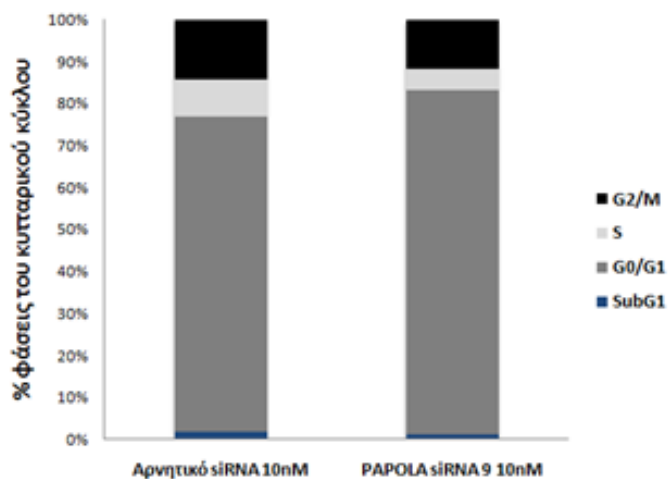


Εικόνα 11: **A.** Απεικόνιση καλλιέργειας των MDA-MB 231 κυττάρων 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με siRNA για την PAPOLA (siRNA9) και αρνητικό siRNA (10x), **B.** Ποσοστιαία ποσοτικοποίηση αριθμού κυττάρων μέσω χρήσης της πλάκας Neubauer. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από 3 ανεξάρτητα πειράματα (* $P < 0,01$).

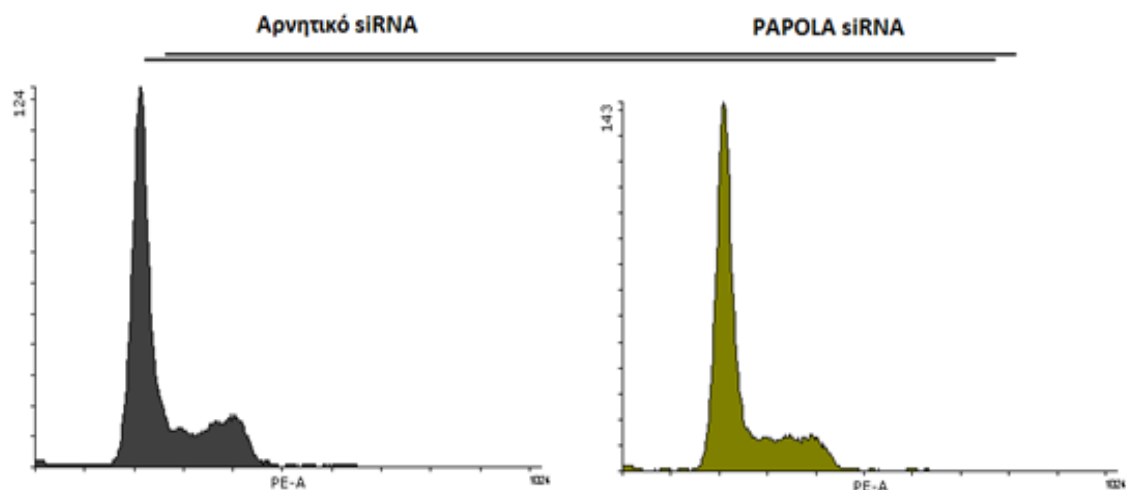
Αποτελέσματα



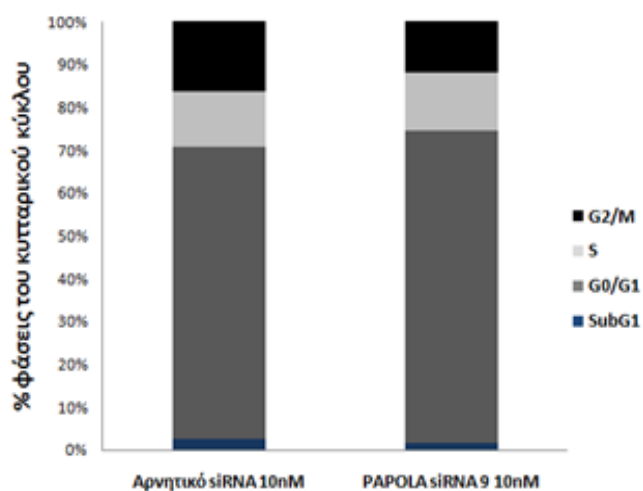
ii.



Εικόνα 12: i. Ανάλυση κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρία ροής των MCF-7 κυττάρων ii. Απεικόνιση ποσοστιαίας μεταβολής κάθε φάσης του κυτταρικού κύκλου. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση με siRNA για την PAPOLA (siRNA9) και αρνητικό siRNA.



ii.



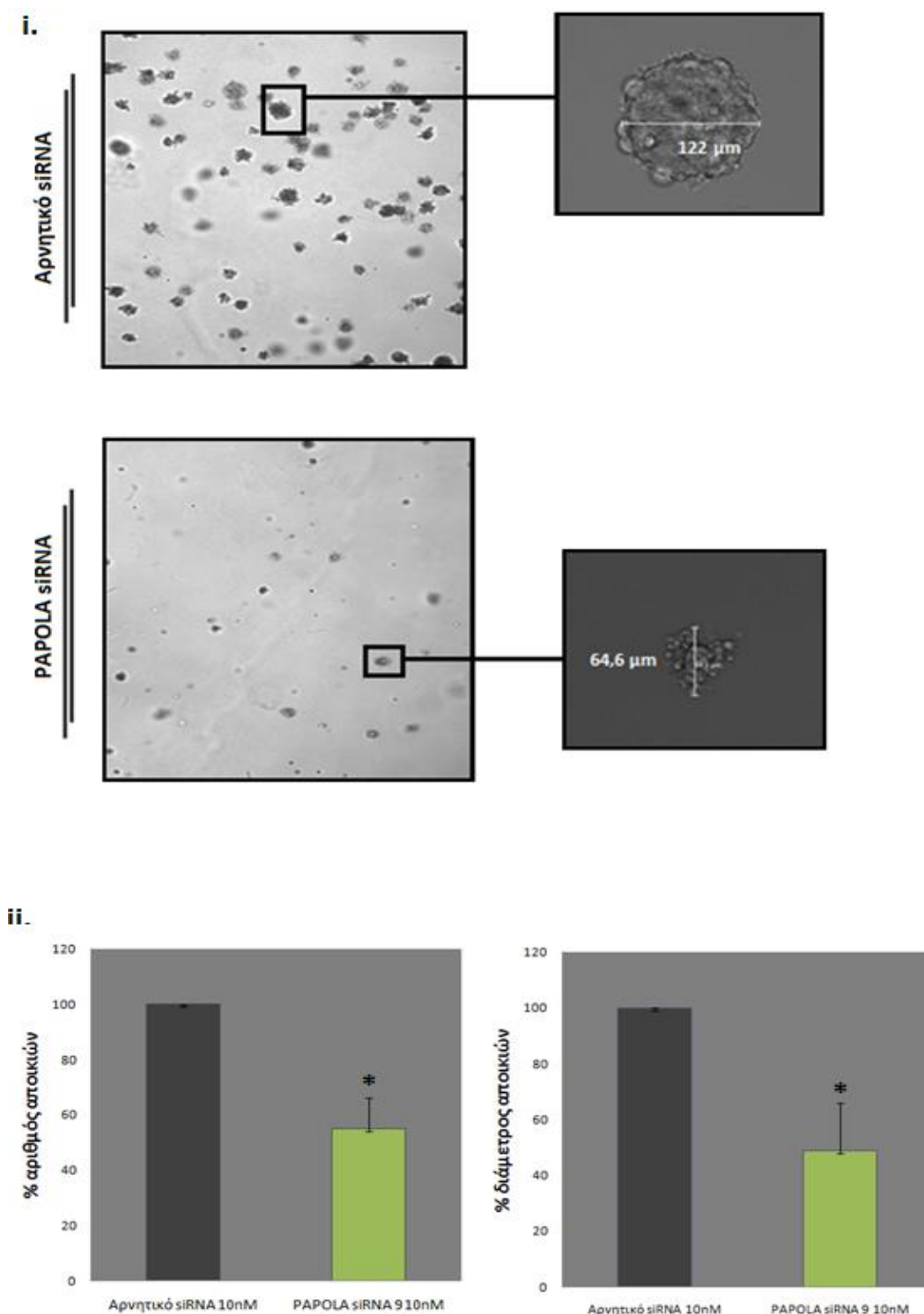
Εικόνα 13: i. Ανάλυση κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρία ροής των MDA-MB 231 κυττάρων
 ii. Απεικόνιση ποσοστιαίας μεταβολής κάθε φάσης του κυτταρικού κύκλου. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση με siRNA για την PAPOLA (siRNA9) και αρνητικό siRNA.

Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η έκφραση της PAPOLA συμβάλλει στον φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων μαστού MCF-7 και MDA-MB 231 και έλλειψη της είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του πολλαπλασιασμού μέσω ανάρχησης στη φάση G_0/G_1 του κυτταρικού κύκλου (G_0/G_1 arrest).

III.3. Καταστολή της έκφρασης της PAPOLA μειώνει τα επίπεδα ανάπτυξης αποικιών σε ημι-στερεό υλικό (soft agar)

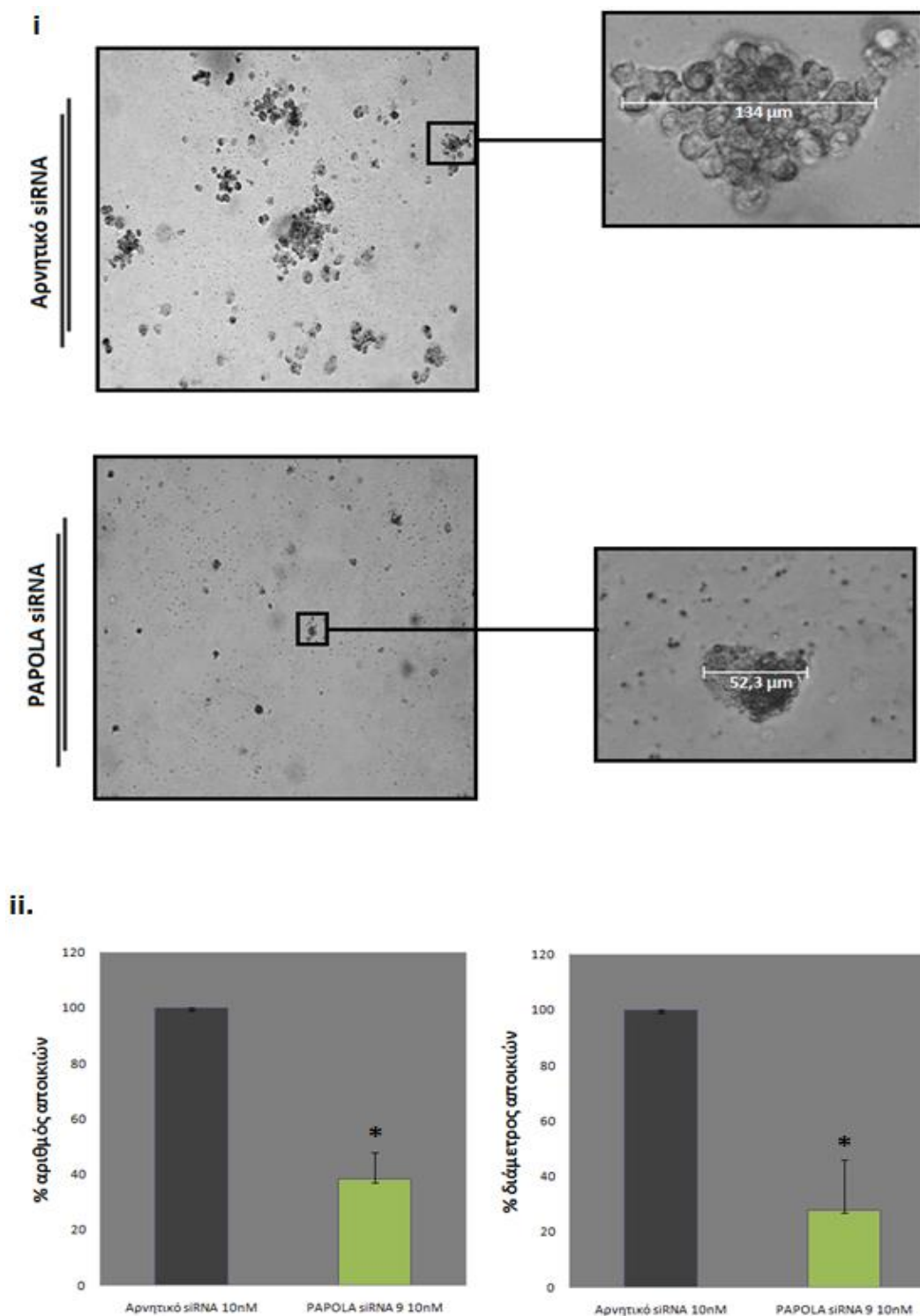
Οι επιπτώσεις της καταστολής της έκφρασης της PAPOLA στα επίπεδα του πολλαπλασιασμού, τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκινικού κυττάρου, στάθηκε αφορμή για τη διερεύνηση πιθανών μεταβολών σε ακόμη ένα βασικό γνώρισμα, του κυτταρικού μετασχηματισμού. Τα καρκινικά κύτταρα, χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να αναπτύσσονται ανεξάρτητα από την προσκόλληση σε υπόστρωμα (Anchorage Independent Growth). Κάτω από συνθήκες απουσίας της έκφρασης της PAPOLA όπου ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων εμφανίζεται μειωμένος θα μπορούσε να επηρεάζεται αυτή τους η ικανότητα και συνεπώς ο βαθμός μετασχηματισμού τους; Πράγματι, κύτταρα στα οποία αποσιωπήθηκε το γονίδιο της PAPOLA εμφάνισαν μειωμένη ικανότητα να αναπτύσσονται ανεξάρτητα της προσκόλλησης και να σχηματίζουν αποικίες σε ημι-στερεό μέσο καλλιέργειας σε σχέση με τα κύτταρα αρνητικού ελέγχου. Οι αποικίες των MCF-7 (εικόνα 14) και MDA-MB 231 (εικόνα 15) κυττάρων ύστερα από την αποσιώπηση του γονιδίου της PAPOLA παρουσιάστηκαν μειωμένες τόσο ως προς τον αριθμό κατά 45 και 62% όσο και ως προς το μέγεθος τους κατά 50 και 72% αντίστοιχα, συγκριτικά με τα κύτταρα αρνητικού ελέγχου.

Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν ότι η έκφραση της PAPOLA σχετίζεται με το βαθμό μετασχηματισμού των κυττάρων και συμβάλλει στην ανάπτυξη καρκινικού φαινότυπου. Συγκεκριμένα, απουσία του ενζύμου τα MCF-7 και MDA-MB 231 κύτταρα έχασαν την ικανότητα τους να αναπτύσσονται ανεξάρτητα της προσκόλλησης, δημιουργώντας λιγότερες και μικρότερου μεγέθους αποικίες σε ημι-στερεό μέσο καλλιέργειας.



Εικόνα 14: *i.* Ανάπτυξη αποικιών των MCF-7 κυττάρων ύστερα από 10 ημέρες καλλιέργειας σε ημι-στερεό μέσο καλλιέργειας μετά τη διαμόλυνση με siRNA για την PAPOLA (siRNA9) και αρνητικό siRNA (10x και 20x αντίστοιχα), *ii.* Διαγραμματική απεικόνιση ποσοστιαίας μεταβολής του αριθμού και της διαμέτρου των αποικιών. Τα αποτελέσματα αποτελούν τις μέσες τιμές από 8 διαφορετικά πεδία για κάθε φρεάτιο, κάθε πειραματικής επανάληψης (* $P < 0,01$).

Αποτελέσματα



Εικόνα 15: *i.* Ανάπτυξη αποικιών των MDA-MB 231 κυττάρων ύστερα από 10 ημέρες καλλιέργειας σε ημι-στερεό μέσο καλλιέργειας μετά τη διαμόλυνση με siRNA για την PAPOLA (siRNA9) και αρνητικό siRNA (10x και 20x αντίστοιχα), *ii.* Διαγραμματική απεικόνιση ποσοστιαίας μεταβολής του αριθμού και της διαμέτρου των αποικιών. Τα αποτελέσματα αποτελούν τις μέσες τιμές από 8 διαφορετικά πεδία για κάθε φρεάτιο, κάθε πειραματικής επανάληψης (* $P < 0,01$).

III.4. Υπερέκφραση της PAPOLA οδηγεί σε αναστολή του πολλαπλασιασμού και κυτταρικό θάνατο στα MCF-7 και HEK 293

Τα αποτελέσματα της αποσιώπησης της έκφρασης της PAPOLA στον καρκινικό φαινότυπο των MCF-7 και MDA-MB 231 κυττάρων που παρατηρήθηκαν οδήγησαν στο ερώτημα κατά πόσο η υπερέκφραση του γονιδίου επηρεάζει τη βιολογική τους συμπεριφορά. Αρχικά, η PAPOLA υπερεκφράστηκε στα MCF-7 κύτταρα και για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακοί φορείς σχεδιασμένοι να εκφράζουν την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) καθώς και κενοί φορείς (pCMV6) ως αρνητικοί μάρτυρες. Ύστερα από 72 ώρες επώασης των κυττάρων τα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA προσδιορίστηκαν στο επίπεδο του mRNA καθώς και της πρωτεΐνης μέσω εφαρμογής RT-qPCR και ανοσοαποτύπωσης κατά Western αντίστοιχα (εικόνα 16).

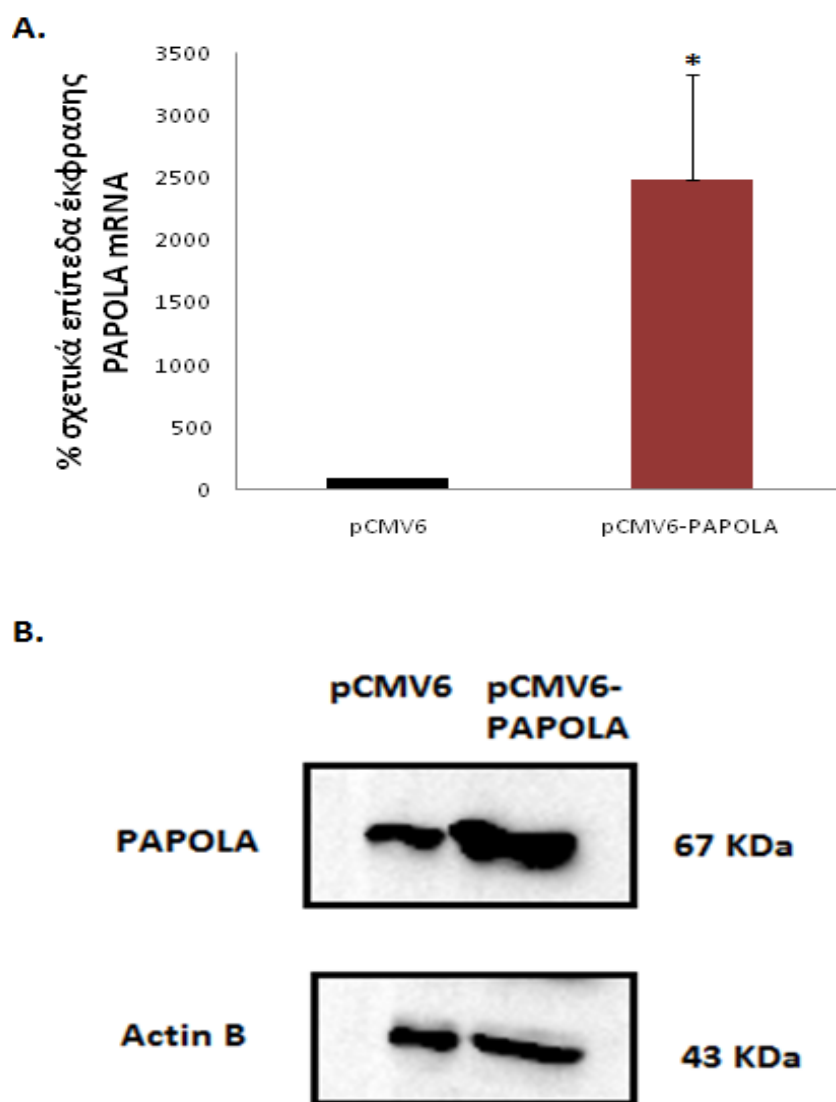
Απροσδόκητα, η υπερέκφραση της PAPOLA οδήγησε σε αναστολή του πολλαπλασιασμού των MCF-7 κυττάρων κατά 46,5% (εικόνα 17) με χαρακτηριστική την παρουσία κυττάρων τα οποία αποκολλήθηκαν από το ταπήτιο της καλλιέργειας και επέπλεαν στο θρεπτικό μέσο, υποδηλώνοντας την ύπαρξη κυτταρικού θανάτου. Ακολούθως, προσδιορίστηκε η ύπαρξη κυτταρικού θανάτου των MCF-7 κυττάρων ύστερα από την υπερέκφραση της PAPOLA μέσω χρώσης με Trypan blue και καταμέτρησης με πλάκα Neubauer. Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση του πληθυσμού των νεκρών κυττάρων κατά 46% σε σχέση με αυτόν των κυττάρων αρνητικού ελέγχου ύστερα από 72 ώρες επώασης (εικόνα 18).

Για την περαιτέρω διερεύνηση του φαινομένου που παρατηρήθηκε εφαρμόστηκε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με εφαρμογή κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA είχαν ως αποτέλεσμα αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στη G₂/M φάση του κυτταρικού κύκλου κατά 6% (εικόνα 19).

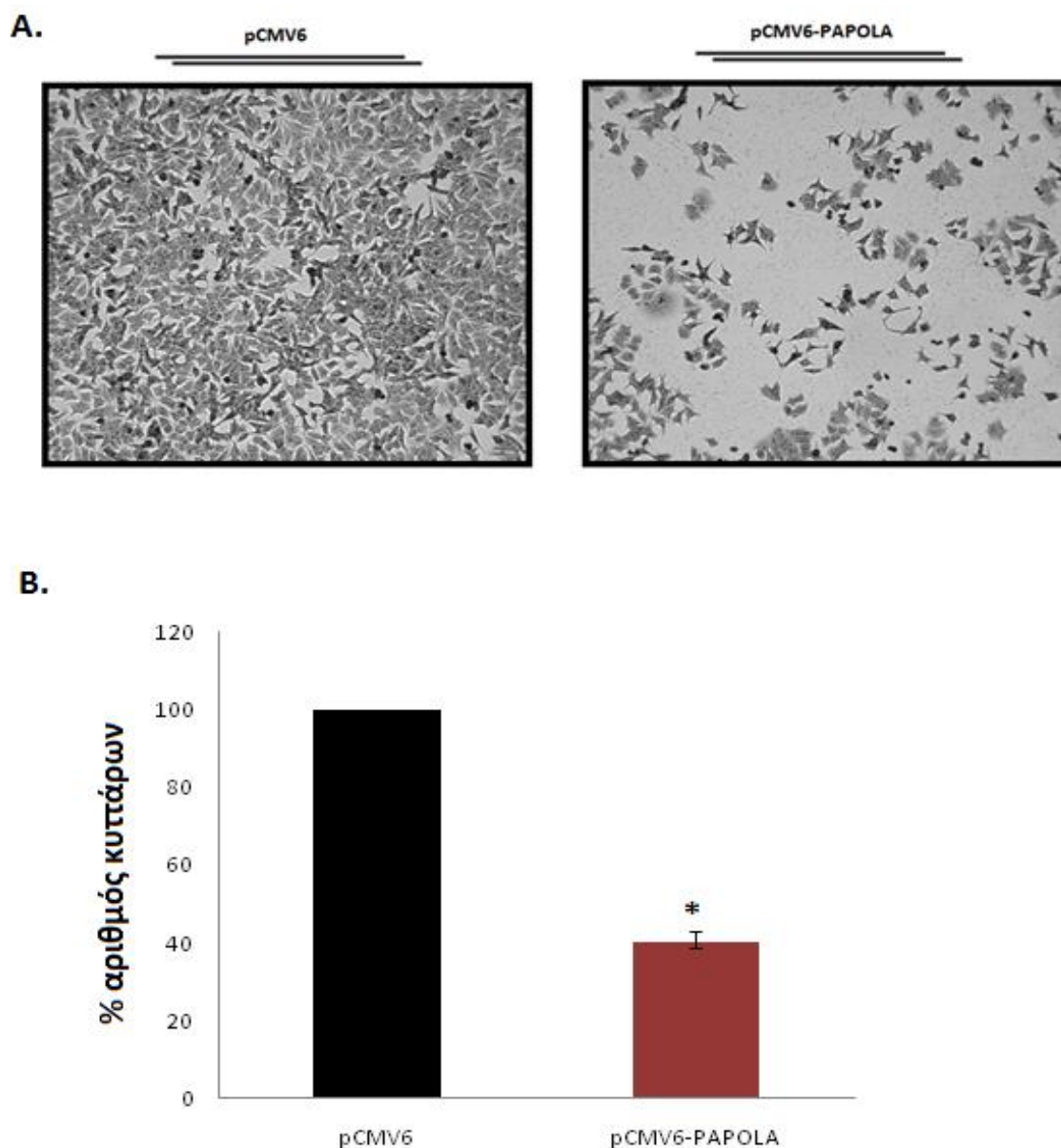
Δεδομένου ότι υψηλά επίπεδα έκφρασης της PAPOLA επάγουν μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των MCF-7 κυττάρων με ακόλουθη μεταβολή του κυτταρικού κύκλου και κυτταρικό θάνατο, κρίθηκε αναγκαίο να διερευνηθεί ο πιθανά υπεύθυνος μοριακός μηχανισμός του φαινομένου. Για το λόγο αυτό ελέγχθηκαν τυχόν μεταβολές στην έκφραση του p53, ενός γνωστού ογκοκατασταλτικού παράγοντα, ο οποίος ενέχεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης. Πράγματι, η υπερέκφραση της

Αποτελέσματα

PAPOLA στα MCF-7 τα οποία φέρουν την αγρίου τύπου μορφή του p53 οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων του λόγω σταθεροποίησης του (εικόνα 20).

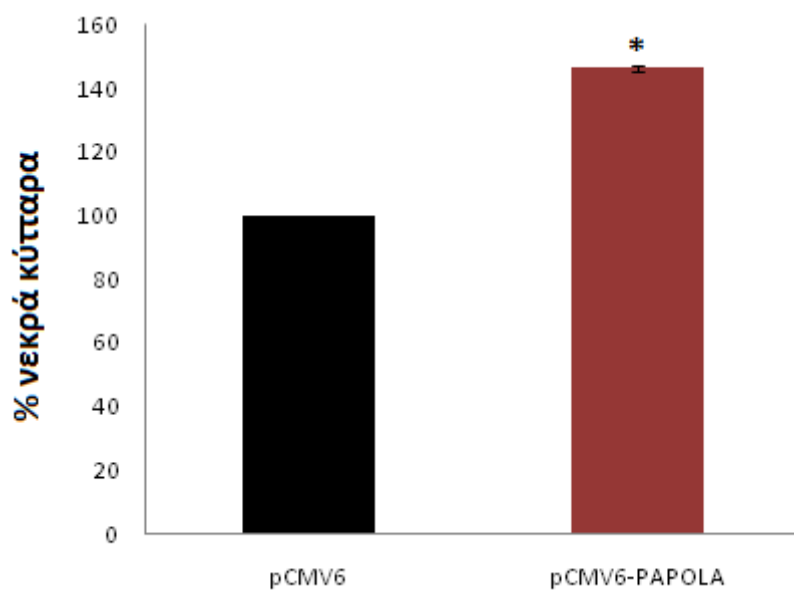


Εικόνα 16: **A.** Διαγραμματική απεικόνιση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA της PAPOLA στα MCF-7 κύτταρα. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή RT-qPCR και η κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από 3 ανεξάρτητα πειράματα (* $P < 0,01$), **B.** Απεικόνιση της έκφρασης της PAPOLA πρωτεΐνης. Τα επίπεδα της έκφρασης προσδιορίστηκαν 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς φορείς (pCMV6).

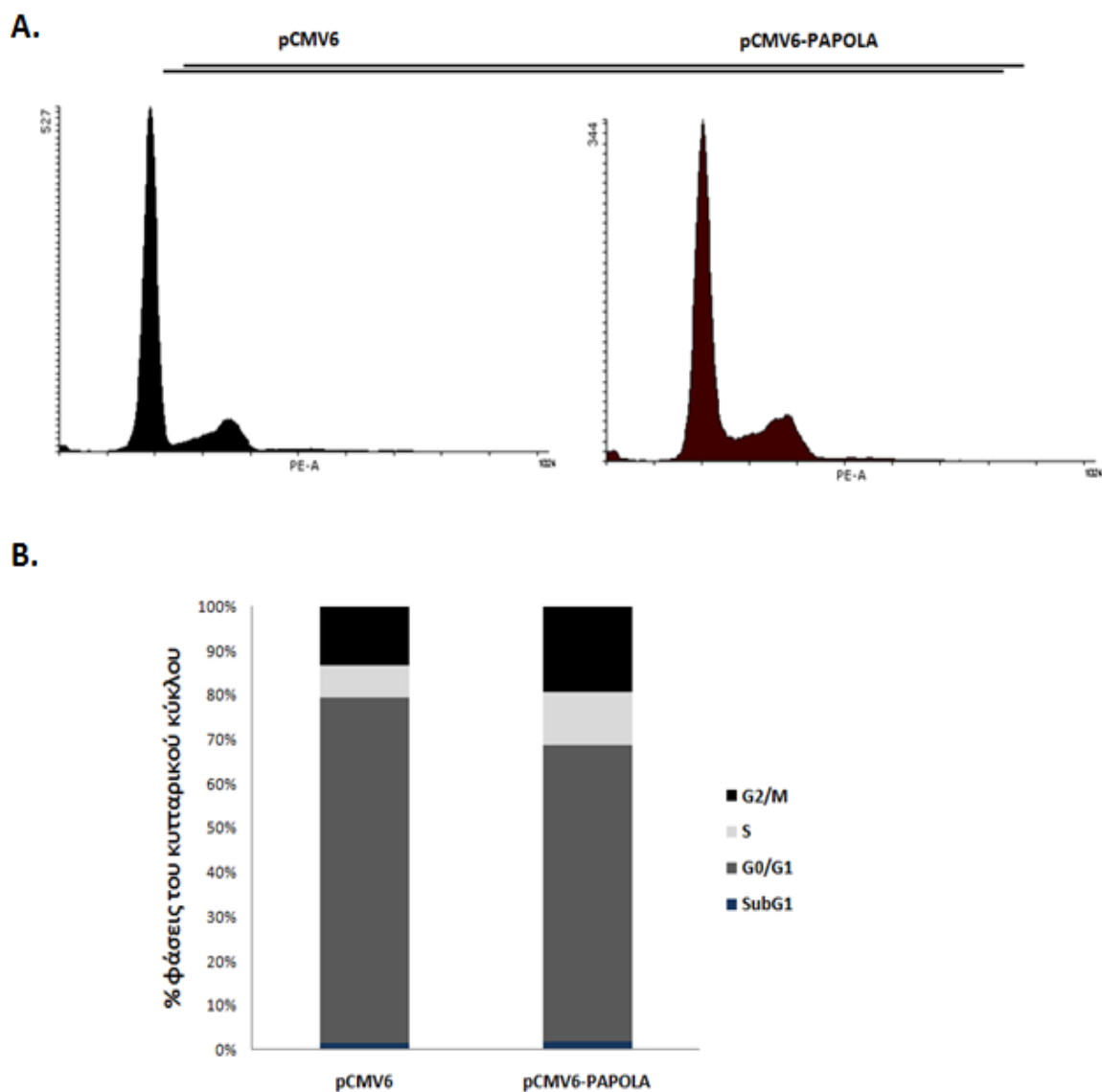


Εικόνα 17: **A.** Απεικόνιση των MCF-7 κυττάρων 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς φορείς (pCMV6) (10x), **B.** Ποσοστιαία ποσοτικοποίηση των επίπεδων πολλαπλασιασμού μέσω χρήσης της πλάκας Neubauer. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από 6 ανεξάρτητα πειράματα (* $P < 0,01$).

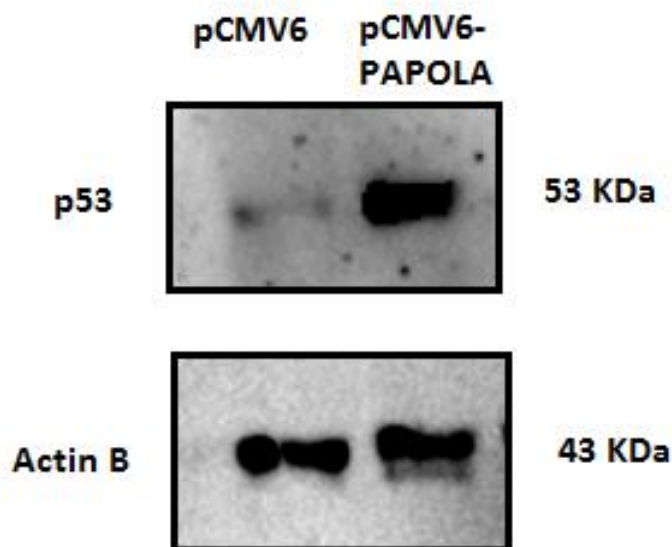
Αποτελέσματα



Εικόνα 18: Ποσοστιαία ποσοτικοποίηση των επιπέδων του πληθυσμού νεκρών MCF-7 κυττάρων μέσω χρώσης με Trypan blue 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς φορείς (pCMV6).(* $P < 0,01$).



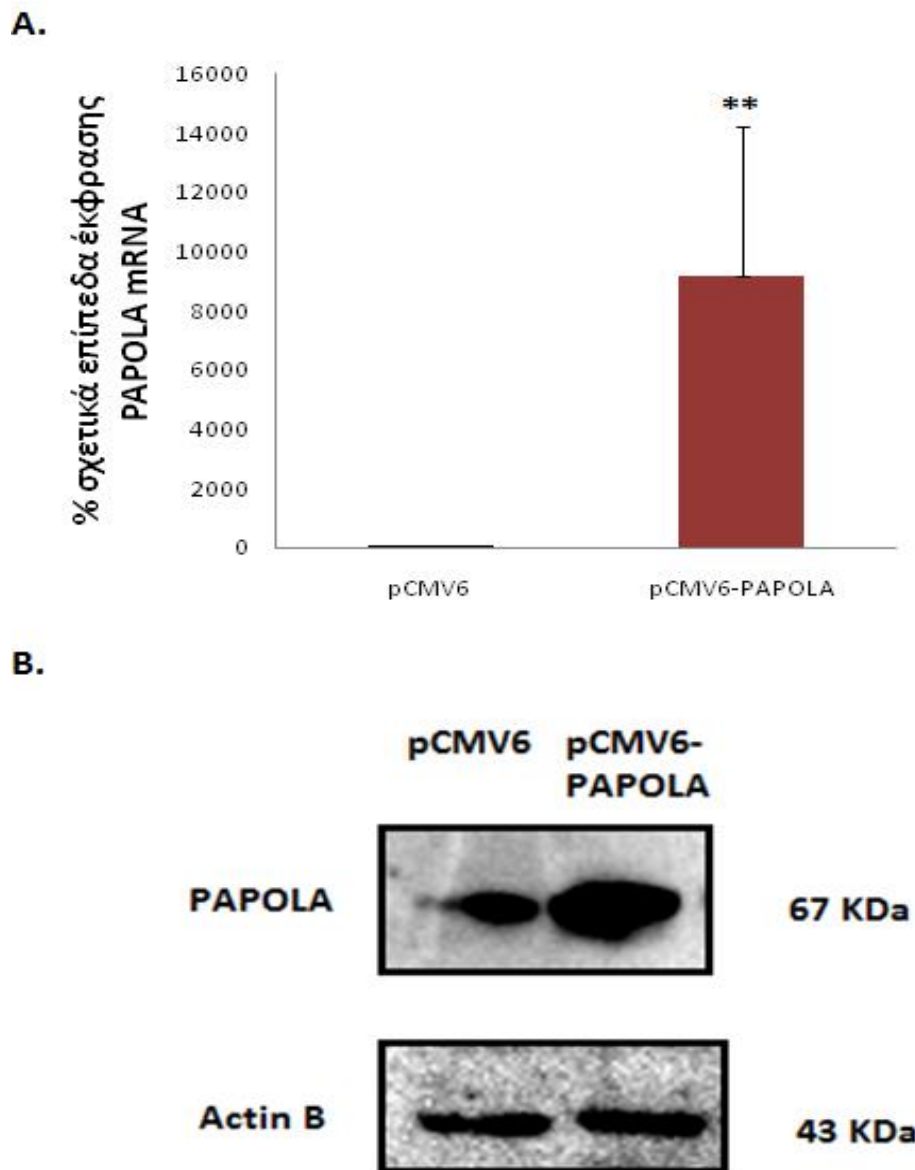
Εικόνα 19: **A.** Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής των MCF-7 κυττάρων 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς φορείς (pCMV6), **B.** Απεικόνιση ποσοστιαίας μεταβολής κάθε φάσης των κυττάρων.



Εικόνα 20: Απεικόνιση της έκφρασης της p53 πρωτεΐνης 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA)) και κενούς φορείς (pCMV6) στα MCF-7 κύτταρα.

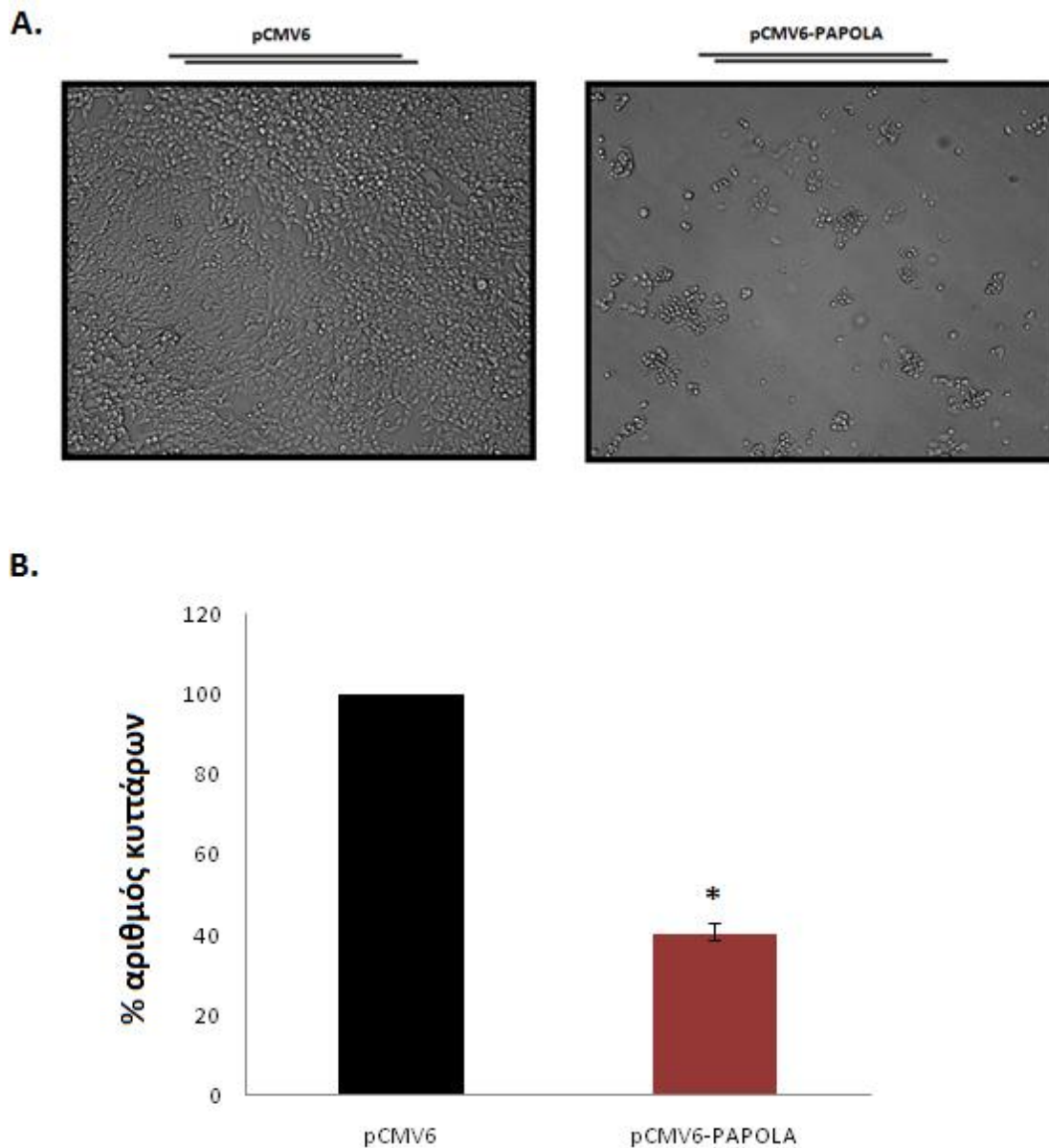
Τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν υποδεικνύουν έναν πιθανό μηχανισμό μέσω του οποίου αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA οδήγησαν σε εξαρτώμενη από το p53 αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και τελικά κυτταρικό θάνατο. Προέκυψε όμως το ερώτημα τι είδους κυτταρικός θάνατος παρατηρήθηκε στα κύτταρα λόγω της υπερέκφρασης της PAPOLA. Τα MCF-7 κύτταρα δεν εκφράζουν το γονίδιο της κασπάσης 3 λόγω μετάλλαξης και ως εκ τούτου απόπτωση μπορεί να παρατηρείται κάτω από διάφορες συνθήκες χωρίς να συνοδεύεται από βασικά χαρακτηριστικά όπως η παρουσία SubG₁ πληθυσμού, κατακερματισμός του DNA κλπ (Oberhammer *et al.*, 1993, Janicke *et al.*, 1998). Με σκοπό τη διερεύνηση του κατά πόσο η υπερέκφραση της PAPOLA λαμβάνεται ως αποπτωτικό ερέθισμα, το ένζυμο υπερεκφράστηκε στην κυτταρική σειρά HEK 293 η οποία φέρει τόσο το p53 αγρίου τύπου όσο και ενεργή κασπάση 3 και συνεπώς το μονοπάτι της απόπτωσης λειτουργεί φυσιολογικά. Η υπερέκφραση της PAPOLA επιβεβαιώθηκε και σε αυτήν την περίπτωση με εφαρμογή RT-qPCR και ανοσοαποτύπωση κατά Western (εικόνα 21). Αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA είχαν και σε αυτήν την περίπτωση ως αποτέλεσμα μείωση του ρυθμού

πολλαπλασιασμού των κυττάρων κατά 60% συγκριτικά με τα κύτταρα αρνητικού ελέγχου (εικόνα 22).



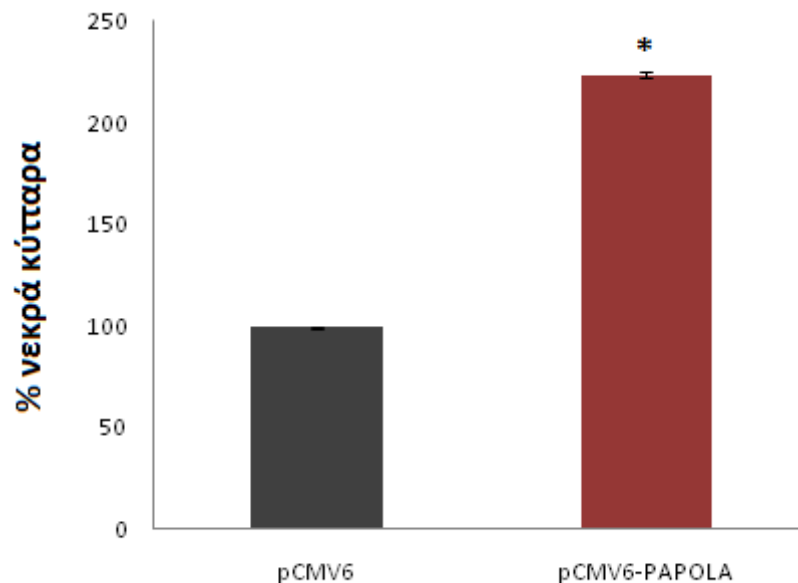
Εικόνα 21: **A.** Διαγραμματική απεικόνιση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA της PAPOLA στα HEK 293 κύτταρα. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή RT-qPCR και η κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από 3 ανεξάρτητα πειράματα (** $P < 0,05$), **B.** Απεικόνιση της έκφρασης της PAPOLA πρωτεΐνης στα HEK 293 κύτταρα. Τα επίπεδα έκφρασης προσδιορίστηκαν 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς φορείς (pCMV6).

Αποτελέσματα



Εικόνα 22: **A.** Απεικόνιση των HEK 293 κυττάρων 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς φορείς (pCMV6). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από 3 ανεξάρτητα πειράματα (* $P < 0,01$), **B.** Ποσοστιαία ποσοτικοποίηση των επιπέδων πολλαπλασιασμού μέσω χρήσης της πλάκας Neubauer.

Ο προσδιορισμός των επιπέδων του κυτταρικού θανάτου ύστερα από την υπερέκφραση της PAPOLA και στην περίπτωση των HEK 293 κυττάρων προσδιορίστηκε ύστερα από χρώση με Trypan blue. Παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των νεκρών κυττάρων κατά 123% σε σχέση με τα κύτταρα αρνητικού ελέγχου (εικόνα 23).

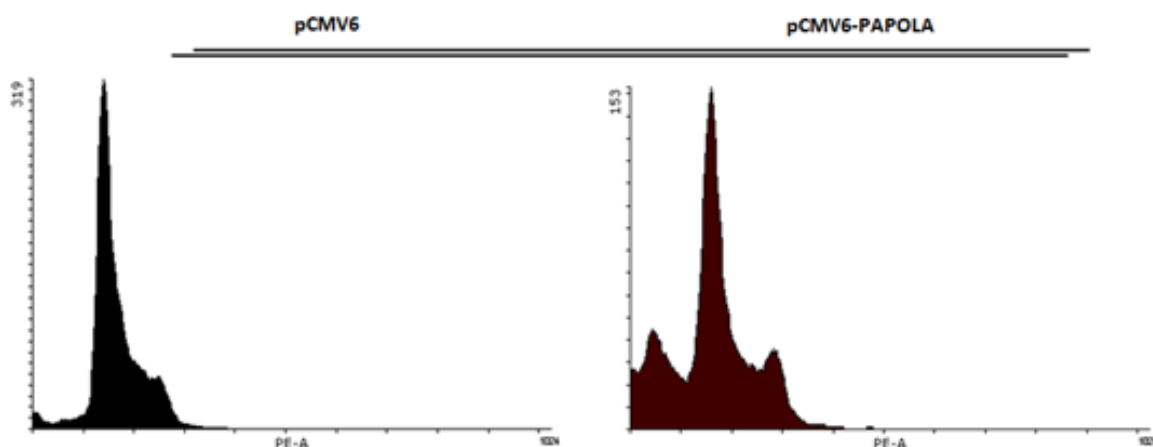


Εικόνα 23: Ποσοστιαία ποσοτικοποίηση των επιπέδων του πληθυσμού νεκρών HEK 293 κυττάρων μέσω χρώσης με Trypan blue 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς φορείς (pCMV6) (* $P < 0,01$).

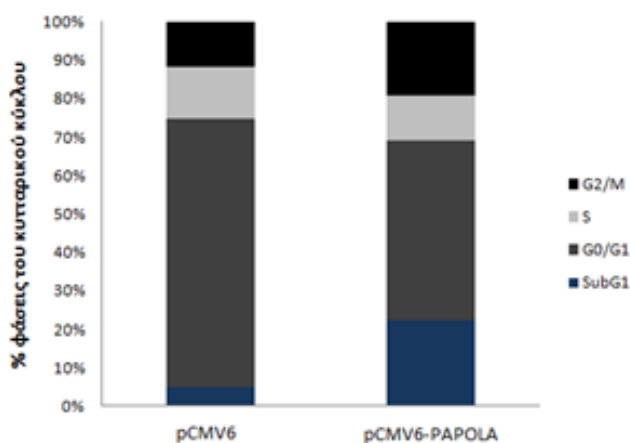
Η επίπτωση της υπερέκφρασης της PAPOLA στο ρυθμό ανάπτυξης των HEK 293 κυττάρων μελετήθηκε και στο επίπεδο του κυτταρικού κύκλου. Υπερέκφραση του ενζύμου είχε ως αποτέλεσμα αύξηση του ποσοστού των κυττάρων κατά 8% στη G_2/M φάση του κυτταρικού κύκλου ενώ ταυτόχρονα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων της Sub G_1 φάσης κατά 17,5% επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη κυτταρικού θανάτου ύστερα από 72 ώρες επώαση (εικόνα 24).

Αποτελέσματα

A.

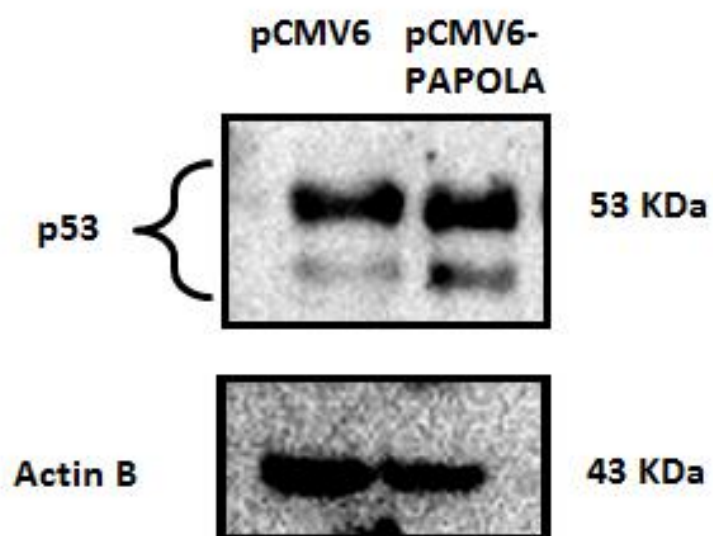


B.



Εικόνα 24: **A.** Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής των HEK 293 κυττάρων 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς φορείς (pCMV6) για 72 ώρες, **B.** Απεικόνιση ποσοστιαίας μεταβολής κάθε φάσης των κυττάρων.

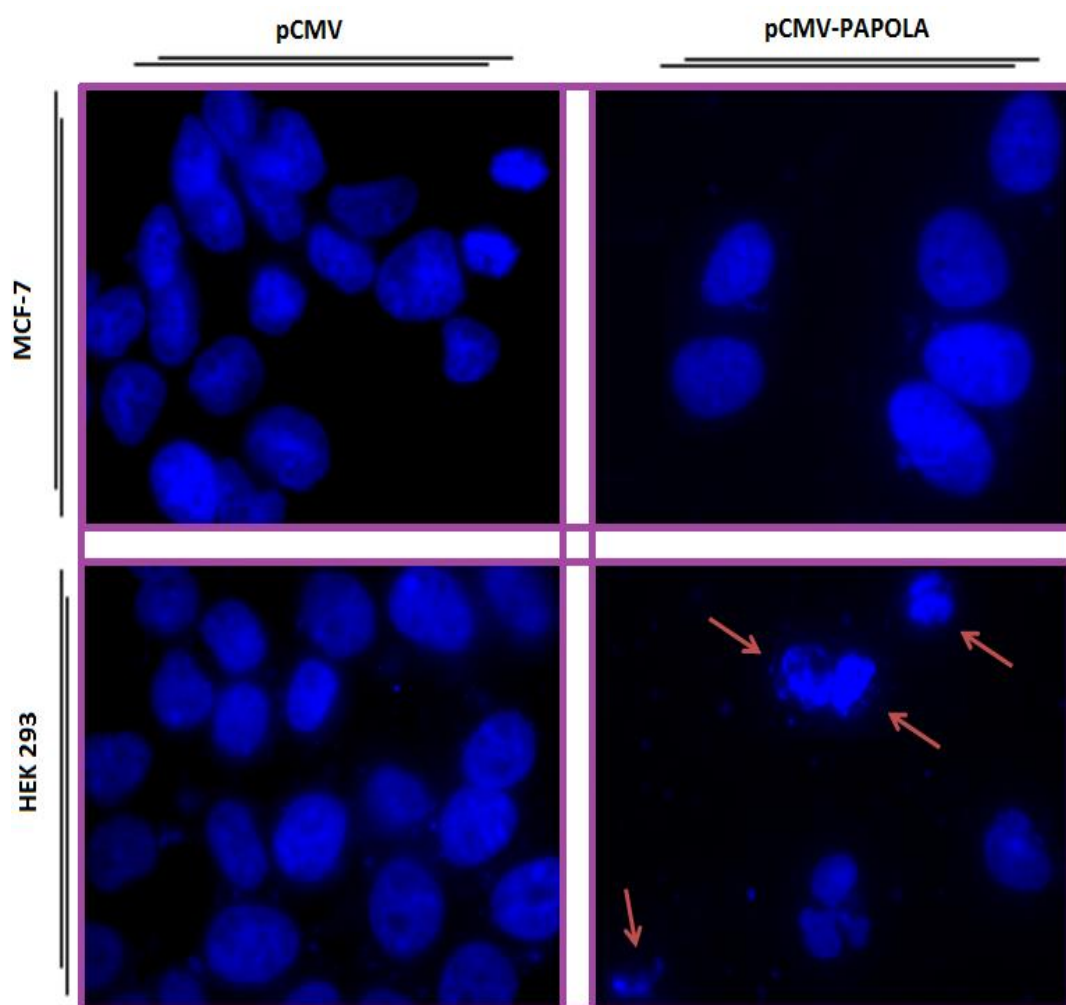
Η μείωση των επιπέδων του πολλαπλασιασμού και συνεπακόλουθος κυτταρικός θάνατος που παρατηρήθηκε στα HEK 293 κύτταρα συνοδεύτηκε με αύξηση των επιπέδων έκφρασης του p53 ύστερα από ανάλυση με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western (εικόνα 25)



Εικόνα 25: Απεικόνιση της έκφρασης της p53 πρωτεΐνης ύστερα από διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς φορείς (pCMV6) για 72 ώρες στα HEK 293 κύτταρα.

III.4.1. Υπερέκφραση της PAPOLA οδηγεί σε κατακερματισμό των πυρήνων των κυττάρων παρουσία ενεργής κασπάσης 3

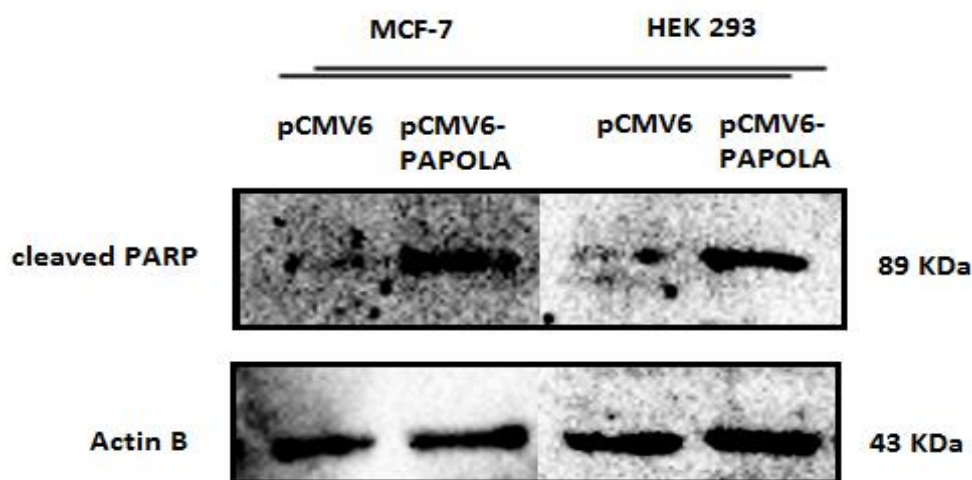
Με σκοπό την επιβεβαίωση των μέχρι στιγμής αποτελεσμάτων που παρατηρήθηκαν πραγματοποιήθηκε χρώση των MCF-7 και HEK 293 κυττάρων με DAPI ύστερα από την υπερέκφραση της PAPOLA, ώστε να διαπιστωθεί τυχόν κατακερματισμός των πυρήνων. Πράγματι, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι έκτοπη έκφραση του ενζύμου οδήγησε σε θραύσεις των πυρήνων των HEK 293 κυττάρων, γεγονός το οποίο δεν παρουσιάστηκε στα MCF-7 κύτταρα (εικόνα 26).



Εικόνα 26: Απεικόνιση των MCF-7 και HEK 293 κυττάρων ύστερα από χρώση με DAPI 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA)) και κενούς φορείς (pCMV6) (100x). Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν τον κατακερματισμό του πυρήνα.

III.4.2. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA ενεργοποιούν το αποπτωτικό μονοπάτι στα MCF-7 και HEK 293 κύτταρα

Για τη διερεύνηση της πιθανής ενεργοποίησης του αποπτωτικού μονοπατιού στα MCF-7 και HEK 293 κύτταρα ύστερα από την υπερέκφραση της PAPOLA, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του τμήματος 89KDa της PARP (Cleaved-PARP), ενός γνωστού αποπτωτικού δείκτη, ο οποίος εκφράζεται και στις δυο κυτταρικές σειρές. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA οδήγησαν σε αύξηση των επιπέδων του τμήματος 89KDa της PARP, συγκριτικά με τα κύτταρα αρνητικού ελέγχου και στις δυο περιπτώσεις (εικόνα 27). Το γεγονός αυτό επιβεβαίωσε την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού των κυττάρων.



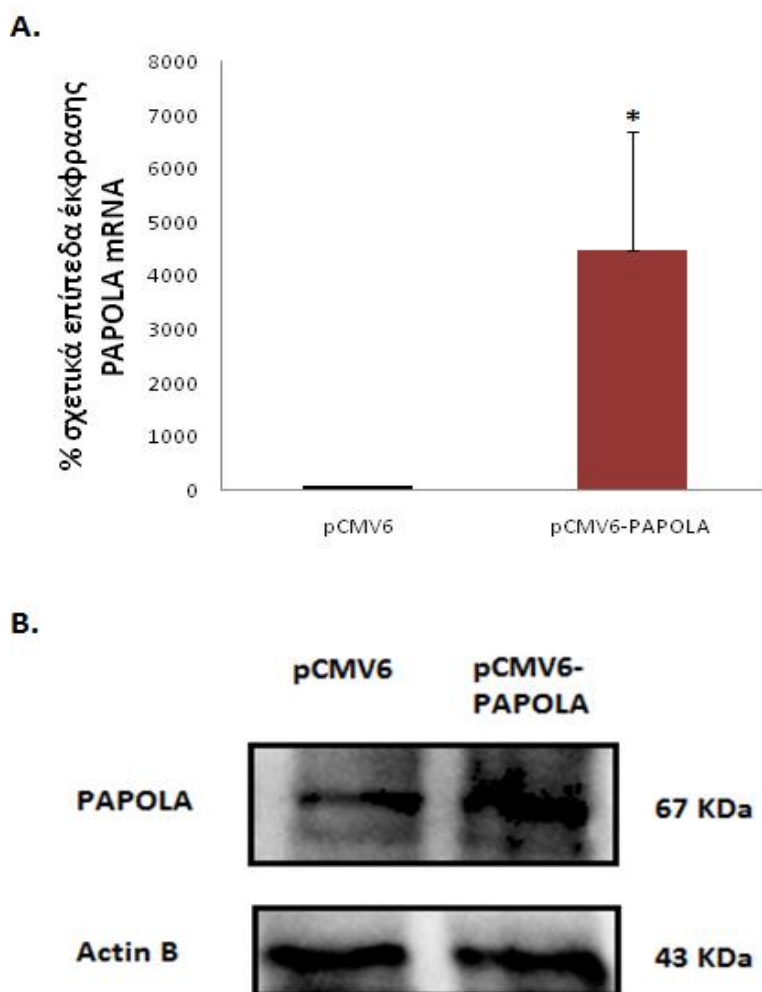
Εικόνα 27: Απεικόνιση της έκφρασης της cleaved-PARP πρωτεΐνης 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς φορείς (pCMV6) στα MCF-7 και HEK 293 κύτταρα.

III.5. Υπερέκφραση της PAPOLA προωθεί τον κυτταρικό κύκλο απουσία του λειτουργικού p53 στα MDA-MB 231 κύτταρα

Εφόσον τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της PAPOLA λειτούργησαν ως στρεσογόνο ερέθισμα για τα MCF-7 κύτταρα οδηγώντας σε αναστολή του πολλαπλασιασμού και απόπτωση μέσω σταθεροποίησης του p53, το ένζυμο υπερεκφράστηκε στα MDA-MB 231 κύτταρα τα οποία φέρουν τη μεταλλαγμένη μορφή του p53 και διερευνήθηκαν

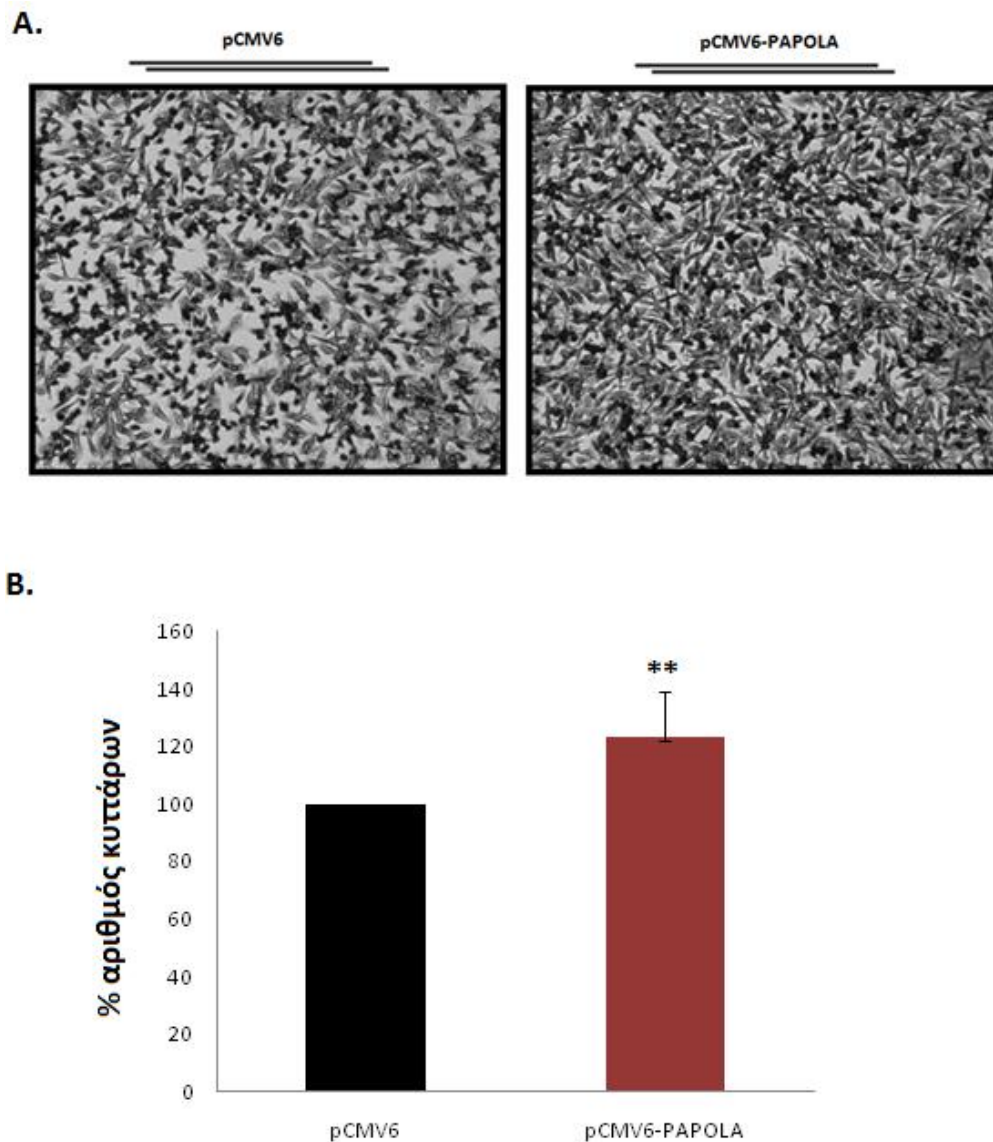
Αποτελέσματα

τυχόν φαινοτυπικές αλλαγές. Με τον τρόπο αυτό επιδιώχθηκε να διευκρινιστεί κατά πόσο η PAPOLA επάγει το αποπτωτικό μονοπάτι μέσω ενεργοποίησης του p53 αλλά και να διερευνηθούν τυχόν αλλαγές στο φαινότυπο των MDA-MB 231 κυττάρων. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες διαμόλυνσης που περιγράφηκαν προηγουμένως τα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA στα κύτταρα προσδιορίστηκαν με RT-qPCR και ανοσοαποτύπωση κατά Western (εικόνα 28).



Εικόνα 28: **A.** Διαγραμματική απεικόνιση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA της PAPOLA στα MDA-MB 231 κύτταρα. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή RT-qPCR και η κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από 6 ανεξάρτητα πειράματα (* $P < 0,01$), **B.** Απεικόνιση της έκφρασης της PAPOLA πρωτεΐνης στα MDA-MB 231 κύτταρα. Τα επίπεδα έκφρασης προσδιορίστηκαν 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς φορείς (pCMV6).

Ύστερα από την επιβεβαίωση της υπερέκφρασης της PAPOLA, διερευνήθηκαν πιθανές μεταβολές στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου είχαν ως αποτέλεσμα αύξηση του πολλαπλασιασμού των MDA-MB 231 κυττάρων κατά 23% 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση (εικόνα 29).

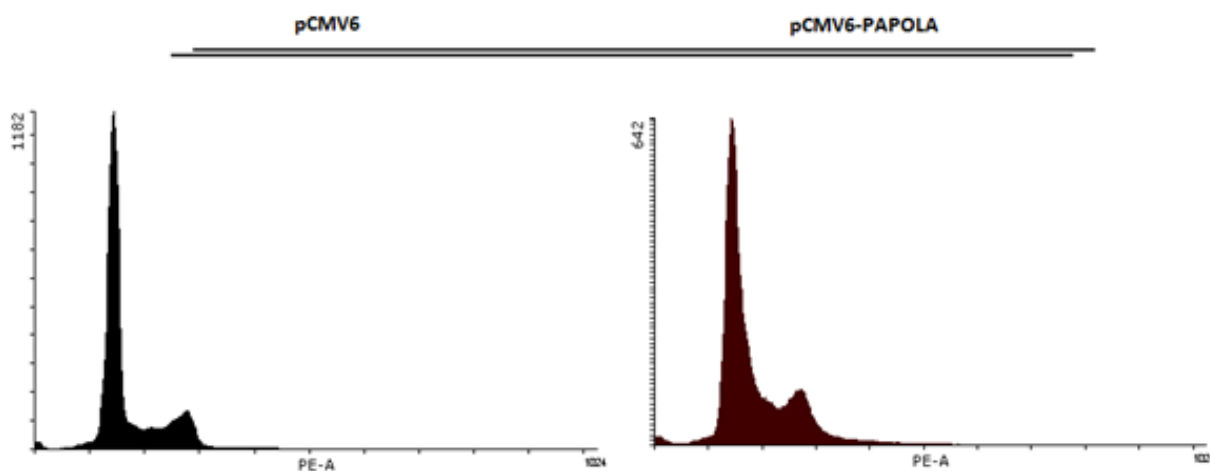


Εικόνα 29: A. Απεικόνιση της καλλιέργειας των MDA-MB 231 κυττάρων 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς φορείς (pCMV6) για 72 ώρες (10x), **B.** Ποσοστιαία ποσοτικοποίηση των επίπεδων πολλαπλασιασμού μέσω χρήσης της πλάκας Neubauer. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από 4 ανεξάρτητα πειράματα (** $P < 0,05$).

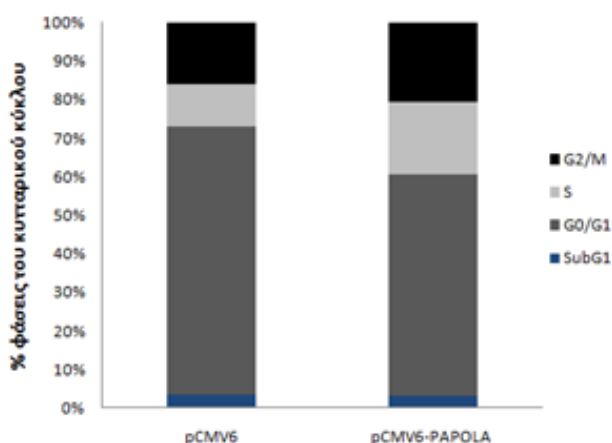
Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και ύστερα από ανάλυση του κυτταρικού κύκλου μέσω εφαρμογής κυτταρομετρίας ροής. Υψηλά επίπεδα έκφρασης του ενζύμου οδήγησαν σε αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στην S και G₂/M φάσεις του κυτταρικού κύκλου κατά 7 και 5% αντίστοιχα (εικόνα 30).

A.



B.



Εικόνα 30: **A.** Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής των MDA-MB 231 κυττάρων 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς φορείς (pCMV6), **B.** Απεικόνιση ποσοστιαίας μεταβολής κάθε φάσης των κυττάρων.

III.6. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA ενισχύουν τον καρκινικό φαινότυπο των MDA-MB 231 κυττάρων

Βάσει των προηγούμενων αποτελεσμάτων, αποσιώπηση του γονιδίου της PAPOLA είχε ως αποτέλεσμα μείωση του πολλαπλασιασμού των MCF-7 και MDA-MB 231 κυττάρων συνοδευόμενη από μείωση της ογκογονικότητας και στις δυο περιπτώσεις. Εξετάστηκε κατά πόσο η έκτοπη έκφραση της PAPOLA εκτός από την αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού, επηρέασε το βαθμό μετασχηματισμού των MDA-MB 231 κυττάρων. Πράγματι, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA ενίσχυσαν την ικανότητα των κυττάρων να σχηματίζουν αποικίες σε ημι-στερεό μέσο καλλιέργειας λόγω της αύξησης του βαθμού μετασχηματισμού τους. Οι αποικίες των κυττάρων ενισχύθηκαν δραματικά ως προς το μέγεθος τους συγκριτικά με τα κύτταρα αρνητικού ελέγχου κατά μέσο όρο 2,5 φορές (εικόνα 31).

Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η έκφραση της PAPOLA ενίσχυσε την κυτταρική ανάπτυξη και προώθησε τον καρκινικό φαινότυπο απουσία του λειτουργικού p53. Επιπλέον, φαίνεται να σχετίζεται με τον ογκογονικό μετασχηματισμό των κυττάρων και την ικανότητα διήθησης. Τέλος, επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι η PAPOLA επάγει την αναστολή του πολλαπλασιασμού και την απόπτωση μέσω ενεργοποίησης του p53 μονοπατιού, όπως παρατηρήθηκε από τα προηγούμενα αποτελέσματα.

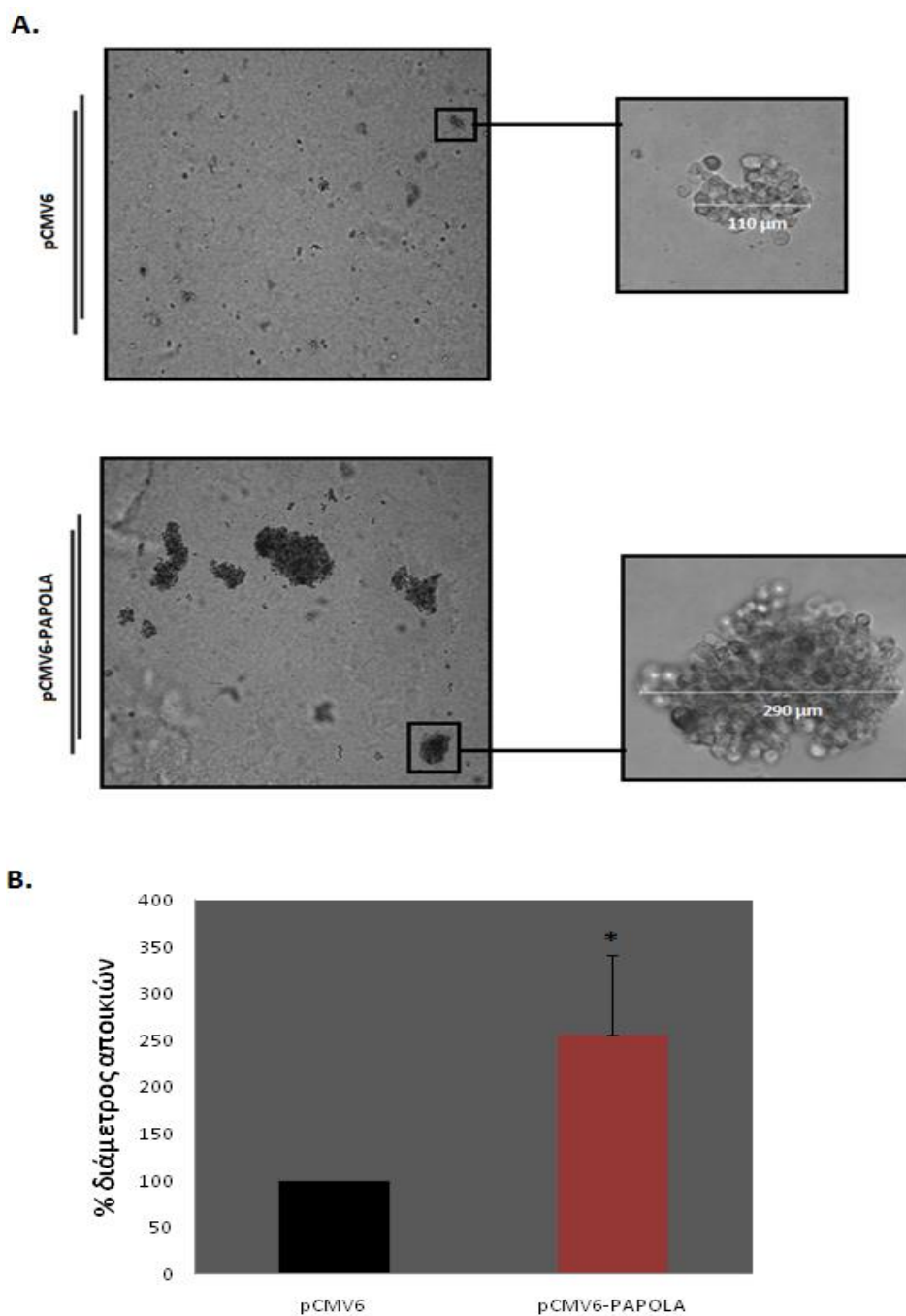
III.7. Η έκφραση της PAPOLA συνδέεται με δομικές αλλαγές στο mRNA της κυκλίνης D1

Βάσει των αποτελεσμάτων, η έκφραση της PAPOLA συνέβαλε στον καρκινικό φαινότυπο των MCF-7 και MDA-MB 231 κυττάρων του μαστού. Συγκεκριμένα, επηρέασε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων καθώς επίσης και το βαθμό μετασχηματισμού και διηθητικότητας τους. Ποιος είναι όμως ο πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου η έκφραση της PAPOLA συνεισφέρει στον καρκινικό φαινότυπο των κυττάρων; Μια υπόθεση αφορά τη συμβολή της PAPOLA στην έκφραση των βραχύβιων mRNA. Μετάγραφα που κωδικοποιούν για κυκλίνες, αυξητικούς παράγοντες, πρωτο-ογκογονίδια, στηρίζονται στο μήκος της πολυ(A) ουράς ώστε να διατηρήσουν τη

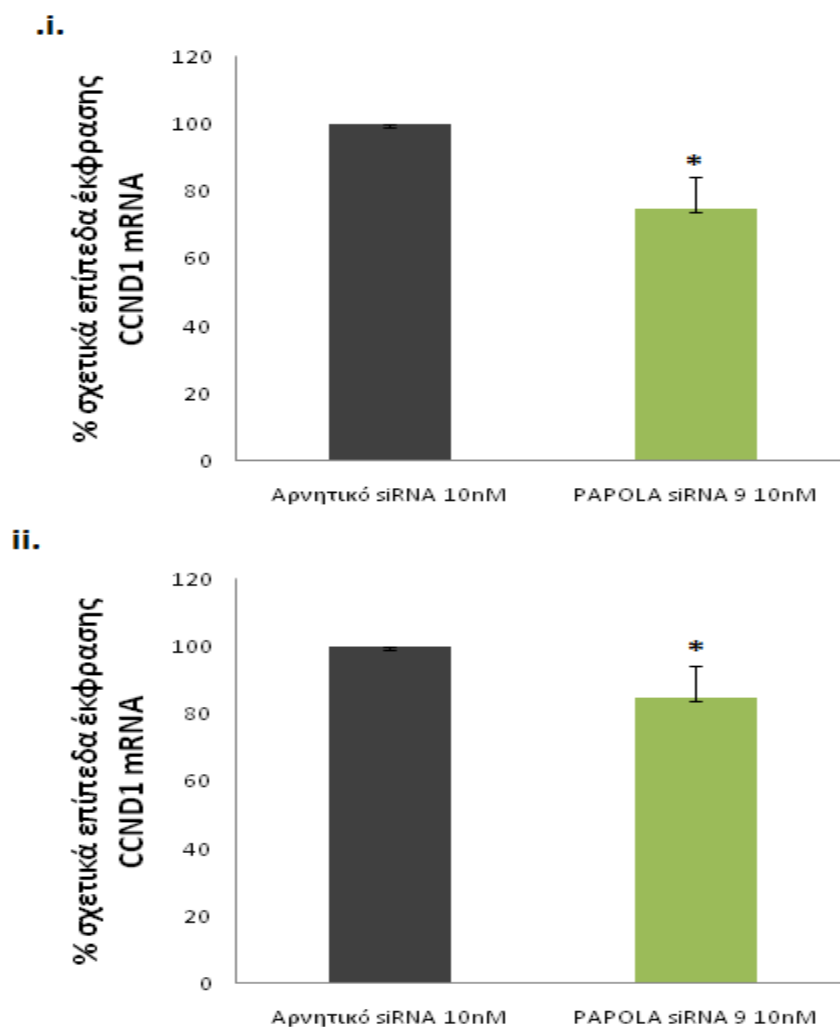
σταθερότητα τους. Μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA μπορεί να οδηγούν σε μεταβολές στο μήκος των πολυ(Α) ουρών και συνεπώς στα επίπεδα του τελικού προϊόντος των γονιδίων αυτών. Ένας άλλος μηχανισμός που μετα-μεταγραφικά μπορεί να συμβάλλει στην αυξημένη έκφραση γονιδίων είναι η εναλλακτική πολυαδενυλίωση. Μέχρι στιγμής, τα επίπεδα έκφρασης ορισμένων παραγόντων που συμμετέχουν στη διαδικασία της πολυαδενυλίωσης συμβάλλουν στην εναλλακτική επιλογή του σήματος πολυαδενυλίωσης. Όπως παρατηρήθηκε μέχρι στιγμής, αποσιώπηση του γονιδίου της PAPOLA είχε ως αποτέλεσμα αναστολή του πολλαπλασιασμού και ακινητοποίηση των κυττάρων στη G₀/G₁ φάση του κυτταρικού κύκλου ενώ υπερέκφραση της οδήγησε σε προώθηση του κύκλου και αύξηση του ποσοστού των MDA-MB 231 κυττάρων στην S και G₂/M φάση. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η κυκλίνη D1 (CCND1) ως προς μελέτη μοντέλο. Η CCND1 υπερεκφράζεται σε διάφορα είδη καρκίνου, αποτελεί βασικό ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου και είναι απαραίτητη για τη μετάβαση από τη G₁ στην S φάση. Επιπλέον, το mRNA της CCND1 έχει σύντομο χρόνο ζωής και φέρει πολλαπλές θέσεις πολυαδενυλίωσης στην 3' αμετάφραστη περιοχή οι οποίες συχνά έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή βραχύτερων ισομορφών mRNA που παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες πρωτεΐνης (Mayr και Bartel, 2009).

III.7.1. Μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA οδηγούν σε μεταβολές των επιπέδων έκφρασης της κυκλίνης D1

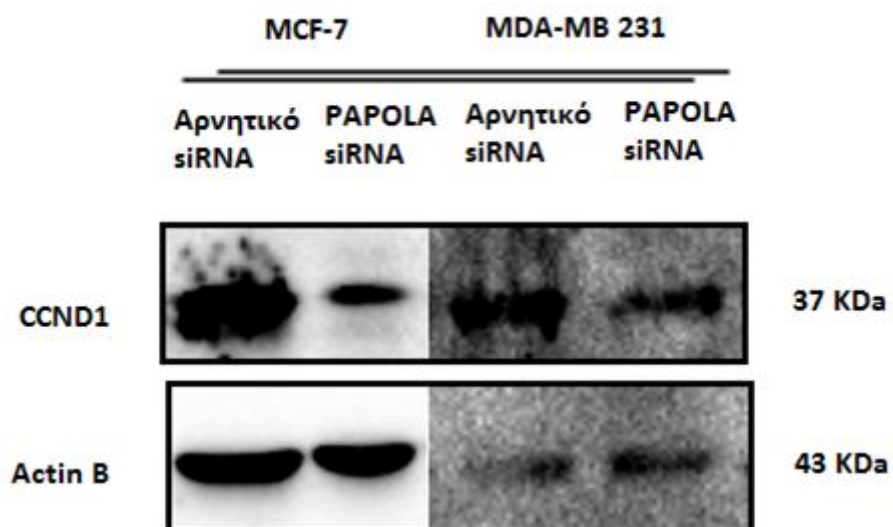
Η αποσιώπηση του γονιδίου της PAPOLA στα MCF-7 και MDA-MB 231 κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων έκφρασης της CCND1 κατά 25 και 15% αντίστοιχα στο επίπεδο του mRNA όπως προσδιορίστηκε μέσω εφαρμογής RT-qPCR (εικόνα 32). Επιπλέον, μείωση παρατηρήθηκε και στο επίπεδο της αντίστοιχης πρωτεΐνης μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western (εικόνα 33). Αντίστοιχα, αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA στα MDA-MB 231 κύτταρα οδήγησαν σε αύξηση των επιπέδων έκφρασης του mRNA της CCND1 κατά 60% καθώς και της αντίστοιχης πρωτεΐνης (εικόνα 34).



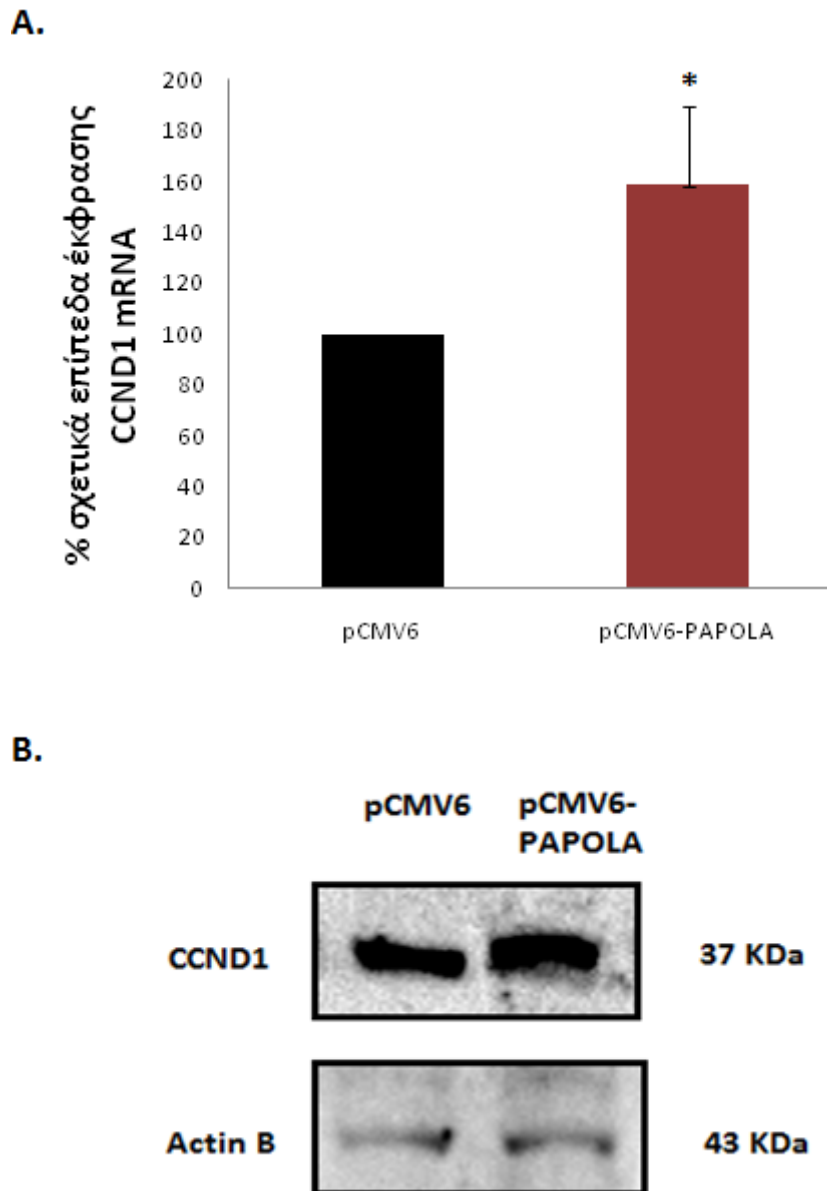
Εικόνα 31: Α. Ανάπτυξη αποικιών των MDA-MB 231 κυττάρων σε ημιστερέο μέσο καλλιέργειας ύστερα από τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς φορείς (pCMV6). Απεικονίζονται αποικίες (10x και 20x αντίστοιχα) ύστερα από 11 ημέρες καλλιέργειας. **Β.** Διαγραμματική απεικόνιση ποσοστιαίας μεταβολής της διαμέτρου των αποικιών των MDA-MB 231 κυττάρων ύστερα από 11 ημέρες καλλιέργειας με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς φορείς (pCMV6). Τα αποτελέσματα αποτελούν τις μέσες τιμές από 8 διαφορετικά πεδία για κάθε φρεάτιο κάθε πειραματικής επανάληψης (* $P < 0,01$).



Εικόνα 32: Α. Διαγραμματική απεικόνιση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA της CCND1 *i.* στα MCF-7 και *ii.* στα MDA-MB 231 κύτταρα. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή RT-qPCR και η κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από 3 και 4 ανεξάρτητα πειράματα αντίστοιχα για κάθε κυτταρική σειρά (* $P < 0,01$).



Εικόνα 33: Απεικόνιση της έκφρασης της CCND1 πρωτεΐνης μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Τα επίπεδα έκφρασης προσδιορίστηκαν 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με siRNA για την PAPOLA (siRNA9) και αρνητικό siRNA.



Εικόνα 34: **A.** Διαγραμματική απεικόνιση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA της CCND1 στα MDA-MB 231 κύτταρα. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή RT-qPCR και η κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από 4 ανεξάρτητα πειράματα (* $P < 0,01$), **B.** Απεικόνιση της έκφρασης της CCND1 πρωτεΐνης στα MDA-MB 231 κύτταρα. Τα επίπεδα έκφρασης προσδιορίστηκαν 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς πλασμιδιακούς φορείς (pCMV6).

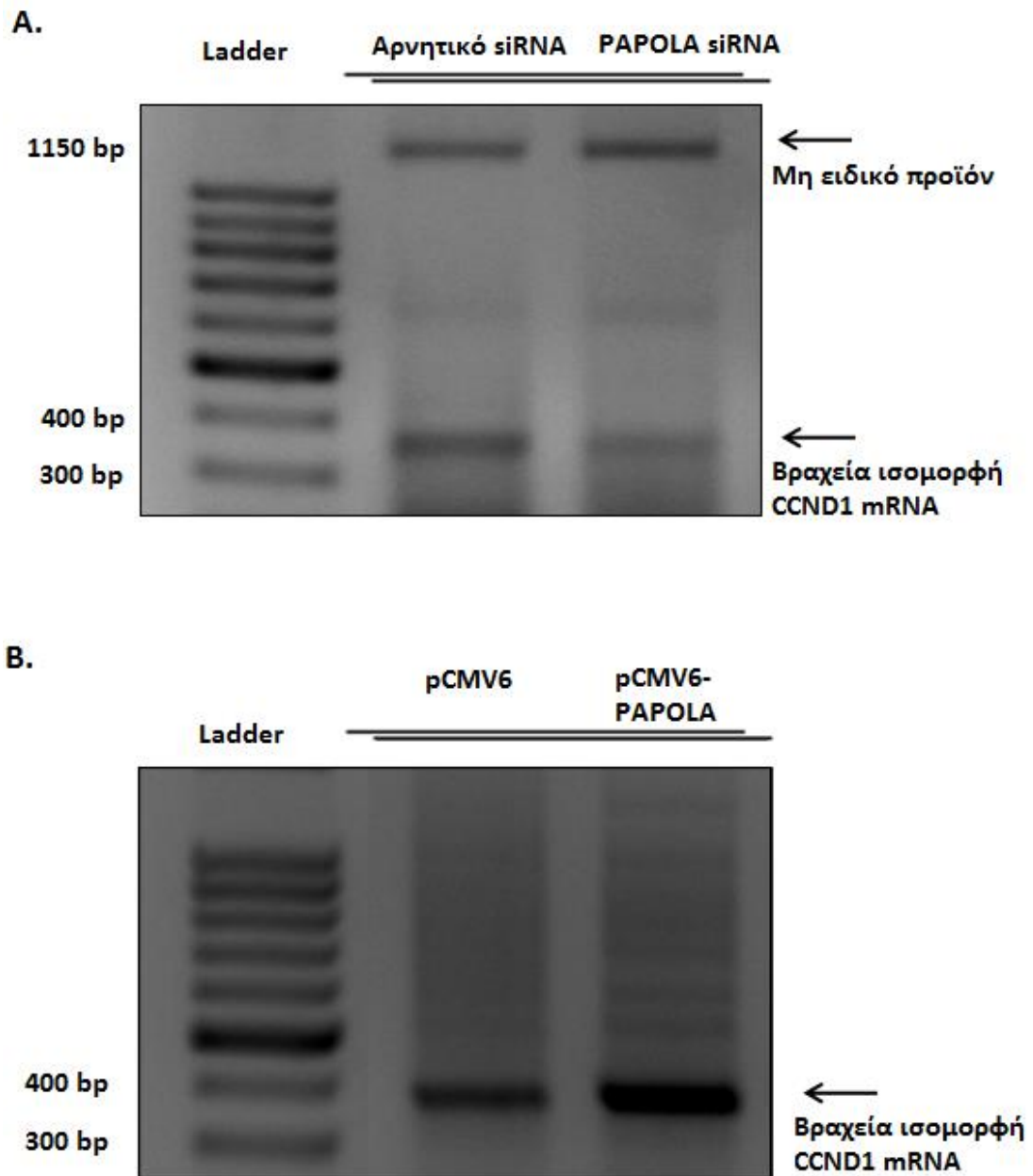
III.7.2. Η έκφραση της PAPOLA συμβάλλει στην επιλογή του σήματος πολυαδενυλίωσης του mRNA της CCND1

Ύστερα από την επιβεβαίωση ότι η αποσιώπηση και η υπερέκφραση της PAPOLA στα MCF-7 και MDA-MB 231 αντίστοιχα είχαν ως αποτέλεσμα μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης της CCND1, διερευνήθηκε η πιθανότητα αυτές να οφείλονται στην εναλλακτική πολυαδενυλίωση του υπεύθυνου mRNA. Επιλέχθηκε η μελέτη αυτής της υπόθεσης να εφαρμοστεί στα MCF-7 κύτταρα όπου τα αποτελέσματα της αποσιώπησης του γονιδίου της PAPOLA στον φαινότυπο παρουσιάστηκαν αισθητά πιο έντονα και στα MDA-MB 231 όσον αφορά τις επιπτώσεις της υπερέκφρασης του γονιδίου, στα οποία παρατηρήθηκε ενίσχυση του πολλαπλασιασμού. Αρχικά, εφαρμόστηκε η μέθοδος 3'RACE ώστε να προσδιοριστεί το μήκος της 3'αμετάφραστης περιοχής του mRNA της CCND1 και συνεπώς η παρουσία διαφορών στο μήκος της 3'αμετάφραστης περιοχής στα κύτταρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη βραχείας 3'αμετάφραστης περιοχής τόσο στα MCF-7 όσο και στα MDA-MB 231 κύτταρα μεγέθους περίπου 350bp (εικόνα 35). Τα αποτελέσματα αυτά προέκυψαν ύστερα από την απομόνωση και αλληλούχιση του προϊόντος, του οποίου το μέγεθος ταυτίζεται σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Mayr και Bartel, 2009) με τη βραχεία 3'αμετάφραστη περιοχή της CCND1. Βάσει των αποτελεσμάτων, προέκυψε ακόμη ένα προϊόν μεγέθους περίπου 1100bp, το οποίο επίσης αλληλουχήθηκε ώστε να προσδιοριστεί η ταυτότητα του. Η αλληλουχία του προϊόντος αυτού δεν ταυτίζεται με κανένα τμήμα της CCND1 (μη ειδικό προϊόν) και η παρουσία του χρησίμευσε ως ποσοτική αναφορά. Λόγω του μεγάλου μήκους της 3'αμετάφραστης περιοχής της CCND1, περίπου 3500bp, δεν κατέστη δυνατό να ανιχνευθεί με τη μέθοδο 3'RACE η μεγαλύτερου μήκους 3'αμετάφραστη περιοχή του mRNA της CCND1.

Παρόλο που η μέθοδος παρέχει ποιοτική απεικόνιση των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε ότι ύστερα από την αποσιώπηση του γονιδίου της PAPOLA το προϊόν της αντίδρασης εμφάνιζε μειωμένη ένταση, ενώ αντίστοιχα αυξήθηκε σημαντικά στα κύτταρα που υπερεκφράστηκε το ένζυμο, συγκριτικά με τα κύτταρα αρνητικού ελέγχου σε κάθε περίπτωση. Τα αποτελέσματα αυτά αποτέλεσαν μια πρώτη εκτίμηση σχετικά με

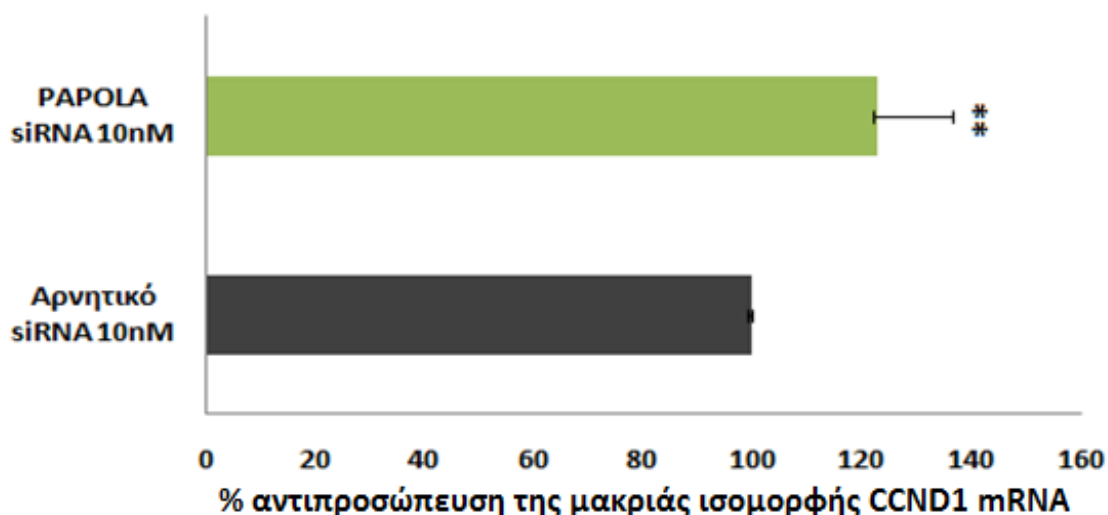
Αποτελέσματα

την πιθανή αλλαγή του μοτίβου πολυαδενυλίωσης του mRNA της CCND1 κατόπιν μεταβολής στα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA.



Εικόνα 35: Απεικόνιση της βραχείας 3'αμετάφραστης περιοχής του mRNA της CCND1 μέσω εφαρμογής της μεθόδου 3'RACE, **A.** στα MCF-7 κύτταρα 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με siRNA για την PAPOLA (siRNA9) και αρνητικό siRNA, **B.** στα MDA-MB 231 κύτταρα 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς πλασμιδιακούς φορείς (pCMV6).

Για να επιβεβαιωθούν τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την ενίσχυση της βραχείας 3'αμετάφραστης περιοχής του mRNA της CCND1 και να διερευνηθούν περαιτέρω τυχόν μεταβολές και στη μεγαλύτερου μήκους ισομορφή του, πραγματοποιήθηκε σχετική ποσοτικοποίηση και των δυο. Για να επιτευχθεί αυτό σχεδιάστηκαν 2 αντιδράσεις RT-qPCR, ώστε η μια να ανιχνεύει μόνο τη βραχεία ισομορφή και η άλλη τόσο τη βραχεία όσο και την μεγαλύτερου μήκους ισομορφή και υπολογίστηκε η μεταξύ τους αναλογία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αποσιώπηση του γονιδίου της PAPOLA στα MCF-7 κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού της μεγαλύτερου μήκους ισομορφής κατά 23% υποδεικνύοντας τη χρήση του απομακρυσμένου σήματος πολυαδενυλίωσης (εικόνα 36).

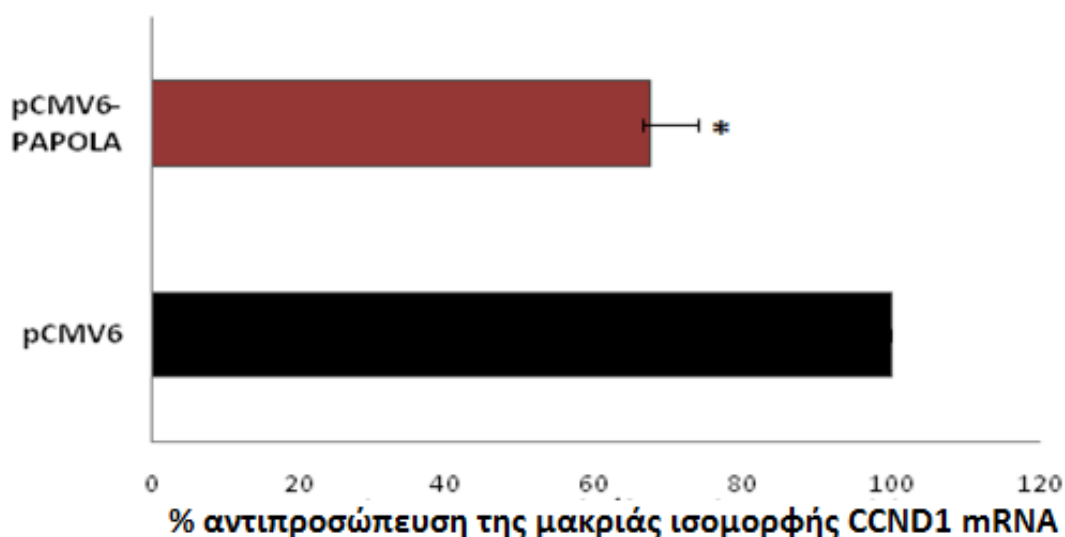


Εικόνα 36: Ποσοστιαία αντιπροσώπευση της μεγαλύτερου μήκους ισομορφής του mRNA της CCND1 στα MCF-7 κύτταρα 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με siRNA για την PAPOLA (siRNA9) και αρνητικό siRNA. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από 3 ανεξάρτητα πειράματα (**P<0,05).

Αντίθετα, υψηλά επίπεδα έκφρασης της PAPOLA στα MDA-MB 231 κύτταρα είχαν ως αποτέλεσμα μείωση του ποσοστού της μεγαλύτερου μήκους ισομορφής του mRNA της CCND1 κατά 32% και συνεπώς την προτίμηση του εγγύς σήματος πολυαδενυλίωσης (εικόνα 37).

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA επηρεάζουν την επιλογή της θέσης πολυαδενυλίωσης του mRNA της CCND1 συμβάλλοντας έτσι στην εναλλακτική πολυαδενυλίωση και τελικά τα επίπεδα έκφρασης του τελικού προϊόντος, της πρωτεΐνης.



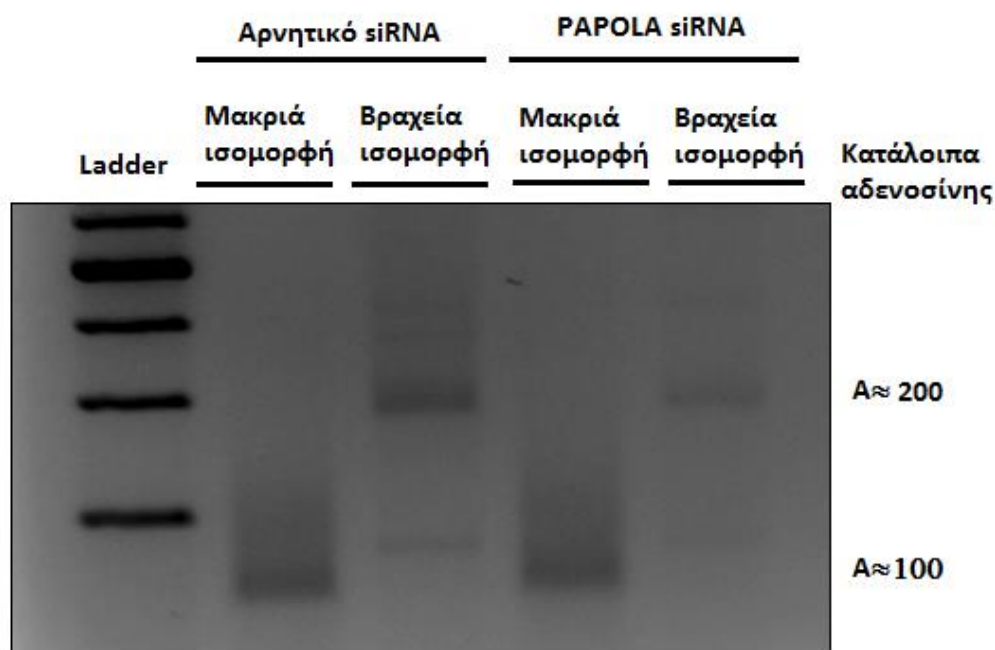
Εικόνα 37: Ποσοστιαία αντιπροσώπευση της μεγαλύτερου μήκους ισομορφής του mRNA της CCND1 στα MDA-MB 231 κύτταρα 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς πλασμιδιακούς φορείς (pCMV6). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από 4 ανεξάρτητα πειράματα (* $P < 0,01$).

III.7.3. Μεταβολές στο μήκος της πολυ(A) ουράς του mRNA CCND1

Για τη διερεύνηση πιθανών μεταβολών στο μήκος της πολυ(A) ουράς του mRNA της CCND1 ύστερα από την αποσιώπηση της PAPOLA στα MCF-7 κύτταρα, εφαρμόστηκε η μέθοδος E-PAT. Εφόσον στα κύτταρα εκτός από την ύπαρξη της μεγαλύτερου μήκους εντοπίστηκε και η βραχεία ισομορφή του mRNA της CCND1 θεωρήθηκε αναγκαίος ο προσδιορισμός του μήκους της πολυ(A) ουράς και για τις δυο περιπτώσεις. Απροσδόκητα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μήκος της πολυ(A) ουράς διαφέρει ανάμεσα στη μεγαλύτερου μήκους και τη βραχεία ισομορφή του mRNA της CCND1 στα MCF-7 κύτταρα. Συγκεκριμένα, τα μεγαλύτερου μήκους μετάγραφα φέρουν μια

βραχύτερη πολυ(A) ουρά στο 3' άκρο τους, ενώ αντίθετα τα εναλλακτικά πολυαδενυλιωμένα mRNA χαρακτηρίζονται από μακρύτερες πολυ(A) ουρές (εικόνα 38). Όσον αφορά τη διερεύνηση πιθανών αλλαγών ύστερα από την αποσιώπηση της PAPOLA στα MCF-7 κύτταρα, καμία δεν παρατηρήθηκε. Το μήκος της πολυ(A) ουράς τόσο της μεγαλύτερου μήκους όσο και της βραχείας ισομορφής παρέμεινε ανεπηρέαστο από την απουσία της PAPOLA στα κύτταρα (εικόνα 38).

Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε κατόπιν της υπερέκφρασης της PAPOLA στα MDA-MB 231 κύτταρα. Και σε αυτήν την κυτταρική σειρά, παρατηρήθηκε το φαινόμενο mRNA με πλήρεις 3' αμετάφραστες περιοχές να χαρακτηρίζονται από βραχύτερες πολυ(A) ουρές, ενώ μακριές ουρές χαρακτηρίζουν τη βραχεία ισομορφή των μεταγράφων (εικόνα 39). Σε αντίθεση με τα προηγούμενα αποτελέσματα, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση στο μήκος των πολυ(A) ουρών και των δυο ισομορφών του mRNA της CCND1 (εικόνα 39).

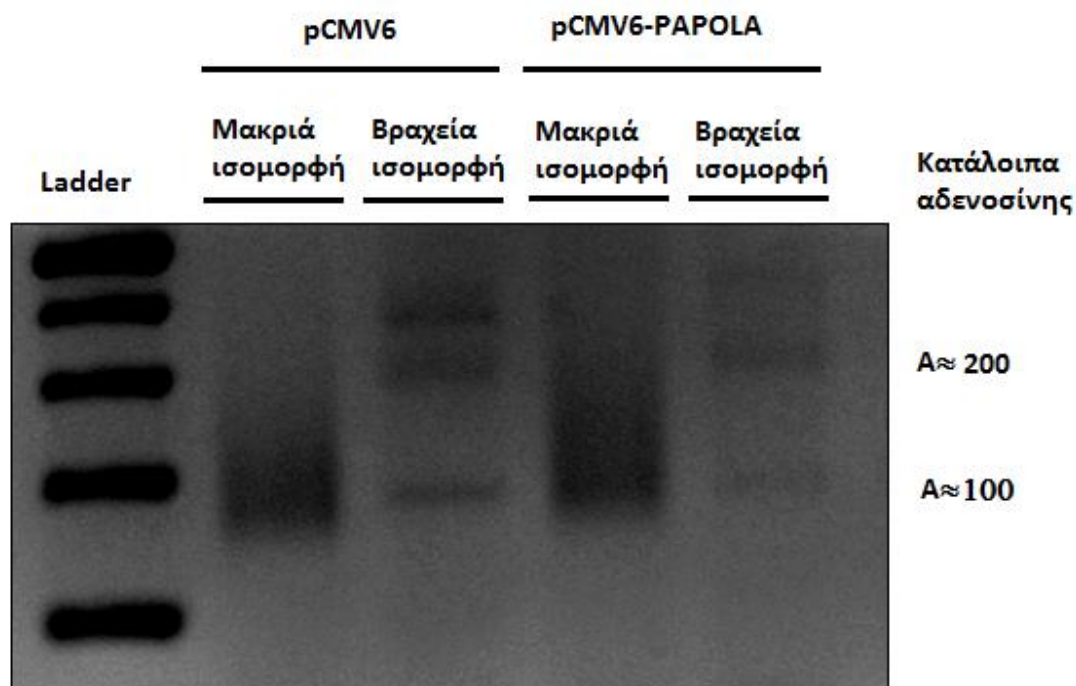


Εικόνα 38: Απεικόνιση των πολυ(A) ουρών της μεγαλύτερου μήκους και της βραχείας ισομορφής του mRNA της CCND1 στα MCF-7 κύτταρα 72 ώρες ύστερα από τη διαμόλυνση με siRNA για την PAPOLA (siRNA9) και αρνητικό siRNA.

Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν ότι παρόλο που η απουσία της PAPOLA από τα κύτταρα δεν αρκεί ώστε να μεταβληθεί το μήκος της πολυ(A) ουράς του mRNA της

Αποτελέσματα

CCND1, αυξημένα επίπεδα έκφρασης οδηγούν σε αύξηση του μήκους της, συμβάλλοντας πιθανά και με αυτόν τον τρόπο, στα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της CCND1 που παρατηρήθηκαν .



Εικόνα 39: Απεικόνιση των πολυ(A) ουρών της μεγαλύτερου μήκους και της βραχείας ισομορφής του mRNA της CCND1 στα MDA-MB 231 κύτταρα ύστερα από τη διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς για την PAPOLA (pCMV6-PAPOLA) και κενούς πλασμιδιακούς φορείς (pCMV6).

Συμπερασματικά, τα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA συμβάλλουν στη διαμόρφωση της δομής του mRNA της CCND1, επηρεάζοντας έτσι τα επίπεδα έκφρασης της. Συγκεκριμένα, η PAPOLA φαίνεται να συμμετέχει στην επιλογή του σήματος πολυαδενυλίωσης αλλά και στη διαμόρφωση του μήκους της πολυ(A) ουράς .

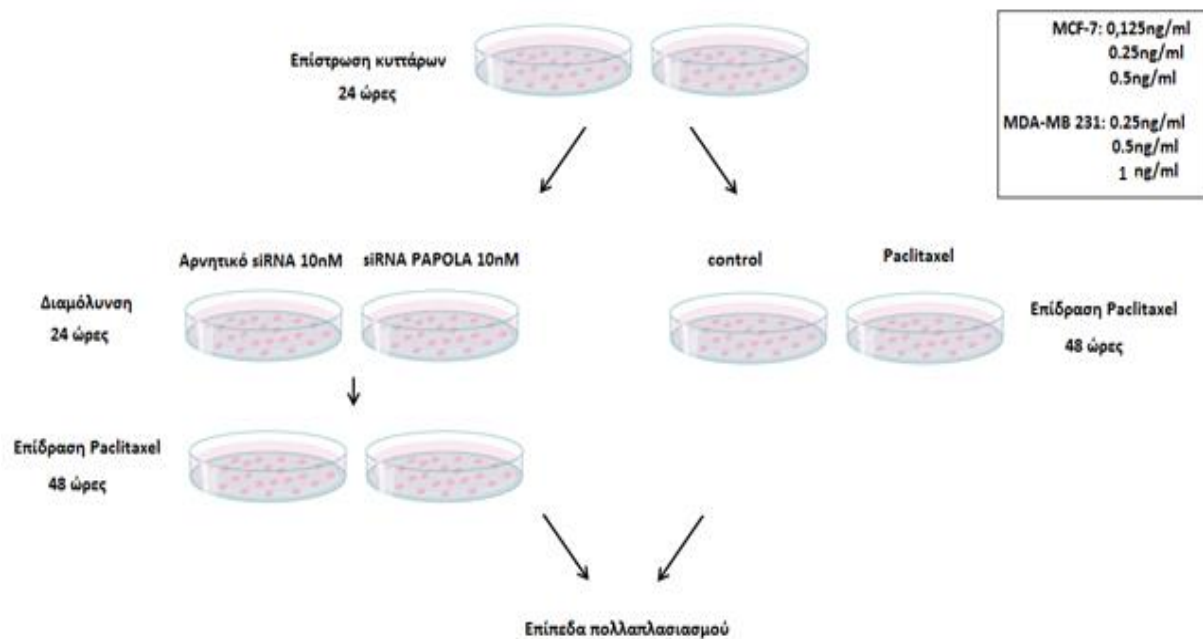
III.8. Η αποσιώπηση της PAPOLA ενισχύει τη χημειοευαισθησία των MCF-7 κυττάρων στον αντικαρκινικό παράγοντα Paclitaxel

Για τον έλεγχο πιθανών αλλαγών στη χημειοευαισθησία των κυττάρων στο Paclitaxel εξαιτίας της μείωσης των επιπέδων έκφρασης της PAPOLA, επιλέχθηκε η επίδραση με τον παράγοντα να ακολουθήσει της αποσιώπησης του γονιδίου. Σε πιάτα κυτταροκαλλιιεργειών επιστρώθηκαν MCF-7 και MDA-MB 231 κύτταρα και την επόμενη ημέρα πραγματοποιήθηκε η διαμόλυνση των κυττάρων με siRNA που στοχεύει το γονίδιο της PAPOLA και με siRNA αρνητικού ελέγχου. Στη συνέχεια ακολούθησε επίδραση διαφόρων ελάχιστων συγκεντρώσεων Paclitaxel (0,125, 0,25, 0,5 και 1ng/ml) και τα κύτταρα επώαστηκαν για ακόμη 48 ώρες. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων επίδρασης του παράγοντα για 48 ώρες μεμονωμένα στα κύτταρα χωρίς προηγούμενη αποσιώπηση του γονιδίου. Για όλες τις συνθήκες ελέγχθηκαν τα επίπεδα πολλαπλασιασμού με εφαρμογή της μεθόδου crystal violet (εικόνα 40).

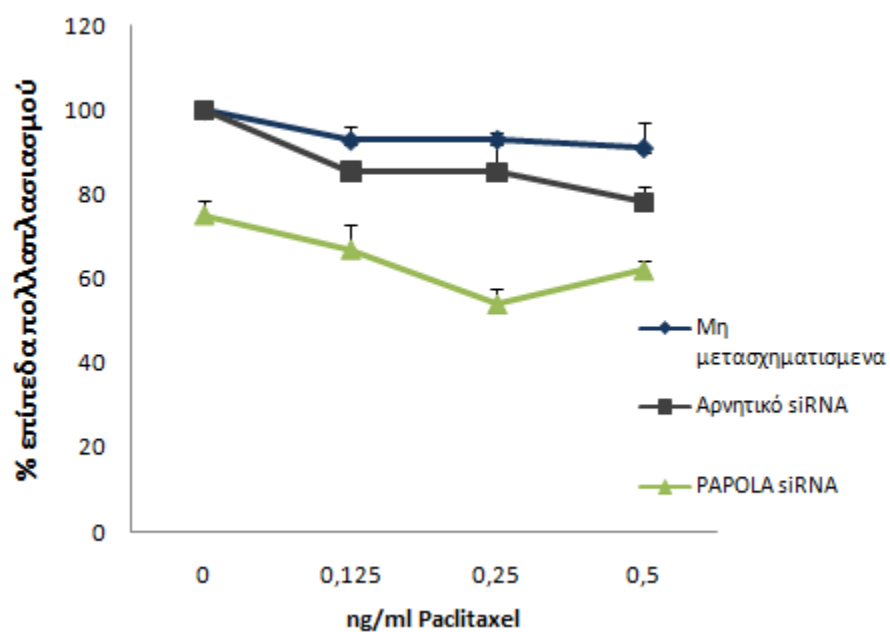
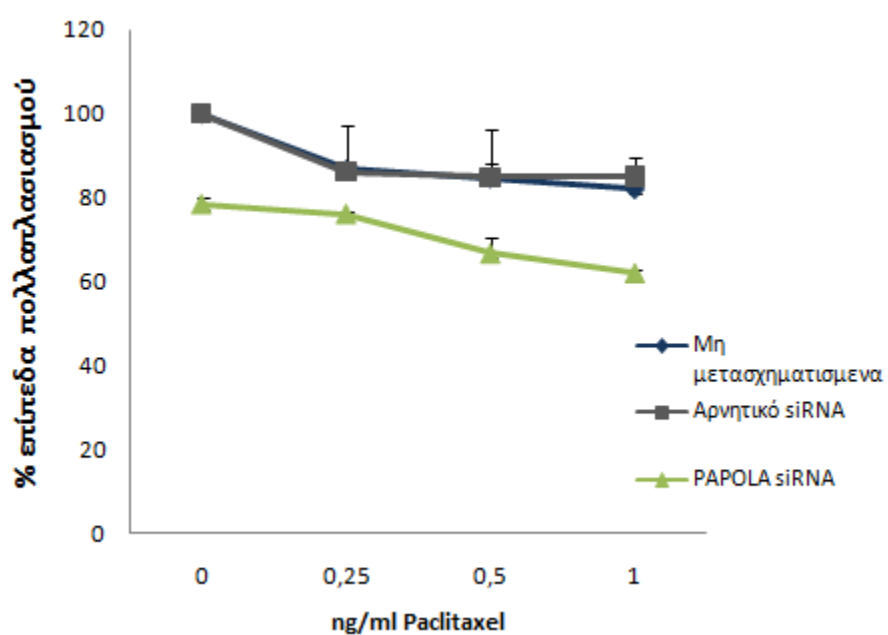
Τα αποτελέσματα πρωταρχικών πειραμάτων έδειξαν ότι τα επίπεδα του πολλαπλασιασμού ύστερα από 48 ώρες επώασης με τον παράγοντα Paclitaxel σε μη μετασχηματισμένα MCF-7 και MDA-MB 231 κύτταρα μειώθηκαν κατά περίπου 7-9% και 13-15% αντίστοιχα, για κάθε συγκέντρωση σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Η συνδυαστική επώαση με αρνητικό siRNA και επίδραση με τον παράγοντα είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του πολλαπλασιασμού των MCF-7 και MDA-MB 231 κατά 14-21% και 14-15% αντίστοιχα, ενώ κύτταρα στα οποία χρησιμοποιήθηκε siRNA για την PAPOLA και επώαση με τον παράγοντα παρουσίασαν μείωση 33-46% και 24-38%. Η σύγκριση των επιπέδων του πολλαπλασιασμού σε αυτές τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε με κύτταρα τα οποία επώαστηκαν μόνο με αρνητικό siRNA (εικόνα 41).

Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η απουσία της PAPOLA ενίσχυσε τη χημειοευαισθησία MCF-7 κυττάρων κατά 6,2% όταν αυτά επωάζονται με 0,25ng/ml Paclitaxel καθώς και των MDA-MB 231 κυττάρων κατά 4% ύστερα από την επίδραση με 1ng/ml Paclitaxel (εικόνα 41).

Αποτελέσματα



Εικόνα 40: Σχεδιάγραμμα πειραματικού πρωτοκόλλου επίδρασης με Paclitaxel ή/και αποσιώπηση του γονιδίου της PAPOLA για τον έλεγχο της χημειοευαισθησίας των κυττάρων.

A.**B.**

Εικόνα 41: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων πολλαπλασιασμού **A.** των MCF-7 και **B.** των MDA-MB 231 κυττάρων, ύστερα από την επίδραση με Paclitaxel ή/και διαμόλυνση με siRNA για την PAPOLA (siRNA9) και αρνητικό siRNA έπειτα από επώαση 48 και 72 ώρες αντίστοιχα για τον έλεγχο της χημειοευαισθησίας των κυττάρων.

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο στάδιο που ακολουθεί τη μεταγραφή, το 3' άκρο σχεδόν όλων των πρώιμων ευκαρυωτικών mRNA υπόκειται σε μια διαδικασία μορφοποίησης μέσω της οποίας αποκτούν μια ουρά περίπου 250 καταλοίπων αδενοσίνης. Στη σύνθετη αυτή διαδικασία της πολυαδενυλίωσης συμμετέχουν πληθώρα πρωτεϊνικών παραγόντων (*trans factors*), οι οποίοι τέμνουν και πολυαδενυλώνουν το μετάγραφο, αφού πρώτα αλληλεπιδράσουν με καθορισμένες αλληλουχίες (*cis elements*) που βρίσκονται σε αυτό (Mandel *et al.*, 2008). Η προσθήκη της πολυ(A) ουράς του mRNA συμβάλλει στην έξοδό του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, στη σταθερότητα και στην ενίσχυση της μετάφρασης.

Περίπου το 70% των γονιδίων διαθέτουν στην 3' αμετάφραστη περιοχή πολλαπλά σήματα πολυαδενυλίωσης (Beaudoing *et al.*, 2000) με αποτέλεσμα τη δημιουργία διαφορετικών ισομορφών mRNA με την ίδια κωδική περιοχή και διαφορετικές ως προς το μήκος 3' αμετάφραστες περιοχές (Tian *et al.*, 2005). Η 3' αμετάφραστη περιοχή των mRNA αποτελεί σημείο ελέγχου της έκφρασης των γονιδίων καθώς σε αυτήν εδράζονται θέσεις αναγνώρισης από τα miRNA και θέσεις αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA (RBPs) (Garneau *et al.*, 2007), οι οποίες καθορίζουν τη σταθερότητά του αλλά και το χρόνο αποικοδόμησης του μηνύματος. Η απώλεια μέρους της 3' αμετάφραστης περιοχής λόγω εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης και συνεπώς η απώλεια θέσεων πρόσδεσης miRNA που είναι παράγοντες αρνητικής ρύθμισης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας ή/και της μεταφρασιμότητας του mRNA και τελικά την παραγωγή έως και 10 φορές περισσότερης πρωτεΐνης (Mayr και Bartel 2009).

Η θέση της πολυαδενυλίωσης μπορεί να επιλέγεται με ιστοειδικό τρόπο ή να μεταβάλλεται σαν αποτέλεσμα εξωκυττάριων ερεθισμάτων (Edwards-Gilbert *et al.*, 1997), σε φυσιολογικές συνθήκες (π.χ. ανοσία - φλεγμονή), όσο και σε παθολογικές διεργασίες (π.χ. καρκίνος) (Danckwardt *et al.*, 2008). Μάλιστα, ισχυρότερη συσχέτιση του φαινομένου της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης παρατηρείται σε καταστάσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα πολλαπλασιασμού, όπως η ενεργοποίηση των T, των B κυττάρων και των νευρώνων, τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης και ο καρκίνος. Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση αποτελεί έναν μηχανισμό ενεργοποίησης ογκογονιδίων στον καρκίνο μέσω του οποίου παρακάμπτεται ο έλεγχος από τα miRNA και τις RBPs. Τα περισσότερα είδη καρκίνου χαρακτηρίζονται από μαζική μεταβολή στο μήκος της 3' αμετάφραστης περιοχής των mRNA μέσω της προτίμησης του εγγύς σήματος

πολυαδενυλίωσης, ενώ και οι μετασχηματισμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο ποσοστό εναλλακτικά πολυαδενυλιωμένων mRNA συγκριτικά με τα μη μετασχηματισμένα κύτταρα.

Ποιος είναι όμως ο μηχανισμός μέσω του οποίου προκύπτει η εναλλακτική πολυαδενυλίωση; Τα επίπεδα έκφρασης όλων ή μερικών από τους trans παράγοντες που συμμετέχουν στην διαδικασία πολυαδενυλίωσης μπορούν να επηρεάζουν την επιλογή της θέσης πολυαδενυλίωσης (Mayr και Bartel 2009). Αυτή την υπόθεση υποστηρίζουν αρκετά δεδομένα με αρχικό παράδειγμα τον CstF64 του οποίου η αυξημένη έκφραση συνδέεται άμεσα με την εναλλακτική πολυαδενυλίωση του mRNA της βαρείας αλυσίδας της IgM (Takagaki *et al.*, 1996). Επίσης, διάφορες μελέτες μέσω εφαρμογής μεθόδων μαζικής αλληλούχησης RNA έχουν συνδέσει την έκφραση παραγόντων πολυαδενυλίωσης με την εναλλακτική πολυαδενυλίωση (Ji *et al.*, 2009). Τέλος, τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο και σε συνθήκες αυξημένου πολλαπλασιασμού παρατηρείται αυξημένη έκφραση παραγόντων πολυαδενυλίωσης (Elkon *et al.*, 2012).

Μεταξύ των trans παραγόντων που συμμετέχουν στη διαδικασία πολυαδενυλίωσης, η πολυ(A) πολυμεράση (PAP) μπορεί να αποτελέσει έναν υποψήφιο παράγοντα ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Αποτελεί απαραίτητο παράγοντα της μοριακής μηχανής πολυαδενυλίωσης, προσθέτοντας κατάλοιπα αδενοσίνης στο 3' άκρο των mRNA. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της PAP αποτελεί το γεγονός ότι εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, χωρίς να παρουσιάζει ιστοειδικότητα ή ιδιαίτερη διακύμανση στα επίπεδα έκφρασης της. Κάτι τέτοιο φαίνεται ότι δεν ισχύει σε ό,τι αφορά στον καρκίνο. Τα επίπεδα του mRNA που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του ενζύμου παρουσιάζονται αυξημένα στους καρκίνους του μαστού, του κόλον, των ωοθηκών και του παγκρέατος συγκριτικά με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς (Toralian *et al.*, 2001). Προηγούμενες μελέτες προτείνουν την πολυ(A) πολυμεράση ως προγνωστικό δείκτη στον καρκίνο. Στις επιθετικές οξείες λευχαιμίες η ενεργότητα της πολυαδενυλίωσης εμφανίζεται σημαντικά ενισχυμένη σε σχέση με τις λιγότερο επιθετικές χρόνιες λευχαιμίες και τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα (Trangas *et al.*, 1984). Παρόμοια δεδομένα ισχύουν και για τα επιθετικά καρκινώματα του μαστού σε σχέση με τα αντίστοιχα λιγότερο επιθετικά και η αυξημένη ενεργότητα

του ενζύμου έχει προταθεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για τους αρνητικούς για τους λεμφαδένες ασθενείς (Scorilas *et al.*, 2000). **Το κατά πόσον και πώς η πολυ(Α) πολυμεράση συμβάλλει στην καρκινογένεση δεν έχει διευκρινιστεί.**

Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η επιμήκυνση της πολυ(Α) ουράς σε ασταθή μηνύματα όπως αυτά των κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων και ογκογονιδίων συμβάλλει στη σταθεροποίηση και κατ' επέκταση στην αυξημένη έκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Υπάρχει όμως και η πιθανότητα, αυξημένα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου να συμβάλλουν στην επιλογή του εγγύς σήματος πολυαδενυλίωσης αυτών των μηνυμάτων με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών.

IV.1. Έκφραση της πολυ(α) πολυμεράσης α στον καρκίνο του μαστού

Αυξημένα επίπεδα ενεργότητας της PAP έχουν συνδεθεί με δυσμενή πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού, όμως δεν έχει προσδιοριστεί ποια πρωτεΐνη συμβάλλει στην ενεργότητα. Η πολυ(Α) πολυμεράση α (PAPOLA) είναι το εκτενέστερα μελετημένο ένζυμο πολυαδενυλίωσης. Μέσω πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας προσδιορίστηκε η έκφραση της PAPOLA σε 211 καρκινώματα μαστού. Η έκφραση της πρωτεΐνης εντοπίστηκε σε όλα τα ιστολογικά είδη καρκινωμάτων μαστού παρουσιάζοντας μεγάλη διακύμανση και σαν κριτήριο θετικότητας ορίστηκε ο πυρηνικός εντοπισμός της πρωτεΐνης σε πάνω από το 10% των κυττάρων. Η έκφραση της PAPOLA συσχετίστηκε ισχυρά με τον τριπλά αρνητικό υπότυπο καρκίνου του μαστού ($P < 0,001$). Ο τύπος αυτός καρκίνου χαρακτηρίζεται ως ο πιο επιθετικός λόγω απουσίας οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων καθώς και του υποδοχέα HER2 και για το λόγο αυτό στερείται στοχευμένης θεραπείας. Η αυξημένη έκφραση της PAPOLA στα τριπλά αρνητικά καρκινώματα πιθανά να αποτελεί ένδειξη της συμβολής της στη διαμόρφωση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών τους. Τα καρκινώματα και οι κυτταρικές σειρές που ανήκουν στον τριπλά αρνητικό τύπο χαρακτηρίζονται από καθολική μείωση του μήκους των 3'αμετάφραστων περιοχών συγκριτικά με φυσιολογικούς ιστούς και κύτταρα μαστού (Akman *et al.*, 2015). Επίσης, η εναλλακτική πολυαδενυλίωση συγκεκριμένων γονιδίων στον τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού έχει προταθεί ως δυσμενής δείκτης μετάστασης

και επανεμφάνισης της νόσου (Wang *et al.*, 2016). Συνεπώς, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA στην κατηγορία αυτή καρκίνου μαστού συμπίπτουν με την ενισχυμένη εμφάνιση του φαινομένου της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης που τα χαρακτηρίζει, δημιουργώντας το ερώτημα κατά πόσο το ένζυμο συμβάλλει στην επιλογή του εγγύς σήματος πολυαδενυλίωσης των mRNA. Επίσης, βάσει των αποτελεσμάτων, η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της PAPOLA με τον σποραδικό καρκίνο ($P<0,001$) καταδεικνύουν ότι τα αυξημένα επίπεδα του ενζύμου δεν σχετίζονται με κληρονομήσιμες μεταλλάξεις του γενετικού υλικού. Η συσχέτιση της PAPOLA με τους όγκους που εμφανίζονται αρνητικοί για προγεστερονικούς υποδοχείς ($P=0,01$) δυνητικά συνδέουν τα αυξημένα επίπεδα του ενζύμου και με τις υπόλοιπες κατηγορίες καρκινωμάτων, ανάλογα με το συνολικό μοριακό τους προφίλ [αυλικού τύπου A: (ER⁺, PR^{+/-}, HER2⁻), αυλικού τύπου B: (ER⁺, PR^{+/-}, HER2⁺) ή HER 2 (ER⁻, PR⁻, HER2⁺)]. Όγκοι αρνητικοί για προγεστερονικούς υποδοχείς ανταποκρίνονται μόνο στην ενδοκρινή θεραπεία που εφαρμόζεται έναντι των οιστρογονικών υποδοχέων. Τέλος, τα αποτελέσματα συνδέουν την έκφραση της PAPOLA με την ιστολογική κατηγορία του λοβιακού καρκινώματος ($P=0,0084$).

Γενικά, τα κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης και συνεπώς χαμηλού βαθμού κακοήθειας προσομοιάζουν με τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα και ασθενείς με τέτοιου είδους όγκους χαρακτηρίζονται στην πλειονότητα τους από θετική έκβαση της ασθένειας και υψηλό προσδόκιμο ζωής. Όμως, ανάμεσα στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα (Grade I) του μαστού τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της PAPOLA που παρατηρήθηκαν σχετίζονται με όγκους μεγαλύτερου μεγέθους ($>2\text{cm}$) ($P=0,013$), με προχωρημένο στάδιο της νόσου (TNM) ($P=0,006$) καθώς και οριακά με χαμηλό ποσοστό επιβίωσης ($P=0,05$). Συνεπώς, η υπερέκφραση της PAPOLA στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα πιθανόν να προδιαθέτει για δυσμενή έκβαση της νόσου. Τα δεδομένα αυτά συνάδουν με προηγούμενες μελέτες στις οποίες εντοπίζεται αυξημένη ενεργότητα της PAP στον καρκίνο του μαστού η οποία έχει προταθεί ως ένας ανεξάρτητος δυσμενής προγνωστικός δείκτης για ασθενείς που εμφανίζονται αρνητικοί για μετάσταση στους λεμφαδένες (Scorilas *et al.*, 2000).

IV.2. Μελέτη του βιολογικού ρόλου της PAPOLA στον καρκίνο του μαστού

Δεδομένου ότι η έκφραση της PAPOLA βρέθηκε να σχετίζεται με διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους στον καρκίνο του μαστού καθώς και με χαρακτηριστικά των όγκων που αφορούν την εξέλιξη της νόσου, διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις της αποσιώπησης του γονιδίου στις καρκινικές σειρές μαστού MCF-7 και MDA-MB 231. Απουσία της PAPOLA τα κύτταρα εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα πολλαπλασιασμού και αύξηση του ποσοστού της G₀/G₁ φάσης του κυτταρικού κύκλου. Τα δεδομένα αυτά αποτελούν μια πρώτη συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της PAPOLA με τα επίπεδα πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων μαστού στον άνθρωπο. Πιθανά η έκφραση της PAPOLA, μεταξύ άλλων παραγόντων, αποτελεί στοιχείο αναγκαίο για τη διατήρηση των υψηλών επιπέδων πολλαπλασιασμού που χαρακτηρίζουν τα καρκινικά κύτταρα. Σχεδόν είκοσι χρόνια πριν, πειράματα στα κύτταρα λεμφώματος όρνιθας DT40 έδειξαν ότι η καταστολή της έκφρασης της PAP μέσω και των δυο αλληλόμορφων γονιδίων δεν ήταν ανεκτή. Εφικτή υπήρξε η εξουδετέρωση μόνο του ενός αλληλόμορφου γονιδίου, γεγονός που οδήγησε σε μείωση των επιπέδων έκφρασης της PAP και είχε ως αποτέλεσμα μικρή μείωση του πολλαπλασιασμού (Zhao *et al.*, 1998).

Εκτός από τις επιπτώσεις στον πολλαπλασιασμό, η αποσιώπηση της PAPOLA είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας των καρκινικών κυττάρων μαστού να σχηματίζουν αποικίες σε ημι-στερεό υλικό. Η δοκιμασία αυτή είναι ενδεικτική της ικανότητας των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα της προσκόλλησης σε υπόστρωμα, ένα γνώρισμα χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. Η αποσιώπηση της PAPOLA είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του βαθμού του καρκινικού μετασχηματισμού, υποδηλώνοντας πιθανά ότι η έκφραση της συμβάλλει στη διατήρηση των βασικών χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων.

Η συμβολή της PAPOLA σε βασικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων μαστού φάνηκε επιπροσθέτως και από το γεγονός ότι αποσιώπηση του γονιδίου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της χημειοευαισθησίας των κυττάρων στον γνωστό αντικαρκινικό παράγοντα Paclitaxel. Πρωταρχικά πειράματα στα πλαίσια της διατριβής έδειξαν ότι η μείωση των επιπέδων πολλαπλασιασμού των κυττάρων εξαιτίας της

δράσης ελάχιστων αποτελεσματικών συγκεντρώσεων Paclitaxel ενισχύθηκε απουσία της PAROLA από τα κύτταρα. Η πιθανότητα η αποσιώπηση ή η αναστολή της δράσης της PAROLA μπορεί να ενισχύει τη χημειοευαισθησία των κυττάρων σε καθιερωμένα χημειοθεραπευτικά σχήματα χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Από την άλλη μεριά, απροσδόκητα, τα αυξημένα επίπεδα έκφραση της PAROLA στα MCF-7 κύτταρα τα οποία φέρουν το λειτουργικό p53 είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων πολλαπλασιασμού μέσω ανασχεσης τους στη G₂/M φάση του κυτταρικού κύκλου και τελικά τον κυτταρικό θάνατο. Μάλιστα, οι αλλαγές αυτές στο φαινότυπο των κυττάρων συνοδεύονταν από αύξηση των επιπέδων του p53, γεγονός το οποίο πιθανά υποδηλώνει την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού μέσω σταθεροποίησής του.

Όπως προαναφέρθηκε, τα MCF-7 κύτταρα δεν εκφράζουν την κασπάση 3 λόγω έλλειψης 47 hr στο εξώνιο 3 με αποτέλεσμα τη δημιουργία πρόωρου κωδικονίου λήξης το οποίο αναστέλλει τη μετάφραση του mRNA και συνεπώς την παραγωγή της πρωτεΐνης (Janicke *et al.*, 1998). Γενικά, η σημασία της κασπάσης 3 για τη διαδικασία της απόπτωσης διαφαίνεται όχι μόνο από το γεγονός ότι ενεργοποιείται τόσο στο εξωτερικό όσο και στο εσωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης αλλά και το ότι είναι υπεύθυνη και για την ενεργοποίηση παραγόντων πέψης του DNA σε πολλές περιπτώσεις (Porter *et al.*, 1999). Εντούτοις, η επαγωγή της απόπτωσης στα MCF-7 κύτταρα από διάφορα ερεθίσματα όπως ο TNF, η σταυροσπορίνη κ.α είναι δυνατή και απουσία της κασπάσης 3, χωρίς όμως να παρατηρούνται τα βασικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης, όπως ο κατακερματισμός του DNA, η συρρίκνωση των κυττάρων (Janicke *et al.*, 1998). Τα αποτελέσματα της διατριβής συμβαδίζουν με τα δεδομένα αυτά, διότι παρά το γεγονός ότι ύστερα από την υπερέκφραση της PAROLA στα MCF-7 κύτταρα δεν παρατηρήθηκαν τα κλασσικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης, υπήρξε ενεργοποίηση του αποπτωτικού μονοπατιού, όπως επιβεβαιώθηκε από την πέψη της PARP και αύξηση του τμήματος 89 kD (cleaved-PARP) το οποίο αποτελεί γνωστό αποπτωτικό δείκτη. Η πέψη της PARP αποτελεί ένα γεγονός που στις περισσότερες περιπτώσεις συνδέεται με την εμφάνιση βλαβών του DNA. Παρόλα αυτά η πέψη της έχει παρατηρηθεί και στο παρελθόν απουσία κατακερματισμού του DNA και πολλά είναι τα δεδομένα που αναφέρουν ότι η απόπτωση που προκαλείται στα MCF-7 κύτταρα από τον TNF, τον Bax, την

κυκλοσπορίνη, το κυκλοεξιμίδιο συνοδεύεται από πέψη της PARP (Tewari *et al.*, 1995, Janicke *et al.*, 1996, Kagawa *et al.*, 2001). Επιπλέον, ινοβλάστες και λεμφοκύτταρα από ποντικούς με γονότυπο PARP-/- οδηγούνται σε απόπτωση ύστερα από επίδραση με τον TNF, γ-ακτινοβολία και δεξαμεθαζόνη καταδεικνύοντας ότι η πέψη της PARP αποτελεί μάλλον μια επίπτωση της αποπτωτικής διαδικασίας παρά μια από τις αιτίες της (Wang *et al.*, 1997). Αν και δεν έχει διευκρινιστεί απολύτως ο ρόλος που εξυπηρετεί η πέψη της PARP κατά την απόπτωση, πιθανά είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης ενός καταρράκτη διεργασιών που οδηγούν στην αυτοκαταστροφή του κυττάρου, μέσω της εξάλειψης των μηχανισμών εκείνων που δρουν προστατευτικά.

Για την επιβεβαίωση του βιολογικού ρόλου των υψηλών επιπέδων έκφρασης της PAPOLA στα κύτταρα, το γονίδιο υπερεκφράστηκε και στα HEK 293 κύτταρα στα οποία το αποπτωτικό μονοπάτι λειτουργεί φυσιολογικά. Και σε αυτήν την περίπτωση τα επίπεδα πολλαπλασιασμού μειώθηκαν με ακόλουθη αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στη G₂/M φάση του κυτταρικού κύκλου και επαγωγή κυτταρικού θανάτου καθώς επίσης και σταθεροποίηση του p53. Η έκτοπη έκφραση της PAPOLA είχε ως αποτέλεσμα κατακερματισμό των πυρήνων των κυττάρων ύστερα από χρώση με DAPI, γεγονός που επιβεβαιώθηκε επίσης και με την παρουσία SubG₁ πληθυσμού ύστερα από ανάλυση των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής. Και σε αυτήν την περίπτωση η επαγωγή της απόπτωσης λόγω των αυξημένων επιπέδων έκφρασης της PAPOLA επιβεβαιώθηκε μέσω της αύξησης της cleaved-PARP. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η υπερέκφραση της PAPOLA λαμβάνεται ως στρεσογόνο ερέθισμα από τα κύτταρα, πιθανώς ως ενεργοποίηση ογκογονιδίου, οδηγώντας σε απόπτωση εξαρτώμενη από το p53. Ακόμη μια περίπτωση έχει αναφερθεί στο παρελθόν κατά την οποία τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της PAP επηρεάζουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Συγκεκριμένα, ακόμη και μικρή αύξηση των επιπέδων της PAP στα κύτταρα λεμφώματος όρνιθας DT40 οδηγεί σε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων, υποδεικνύοντας πιθανά την τοξική δράση της (Zhao *et al.*, 1998). Επιπλέον, τα αποτελέσματα της διατριβής, αποτελούν μια ένδειξη ότι τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA οδηγούν σε απόπτωση ανεξάρτητα από την παρουσία της κασπάσης 3.

Η υπερέκφραση της PAPOLA στα MDA-MB 231 κύτταρα, τα οποία φέρουν τη μεταλλαγμένη ισομορφή του p53 δεν είχε τα ίδια αποτελέσματα όπως προηγουμένως,

παρατήρηση που επιβεβαιώνει επιπλέον το γεγονός ότι η PAPOLA ενεργοποιεί το αποπτωτικό μονοπάτι μέσω του p53. Αντίθετα, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων ενισχύθηκε ύστερα από την έκτοπη έκφραση του ενζύμου, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από πειράματα κυτταρομετρίας ροής. Επιπλέον, παρατηρήθηκε δραματική ενίσχυση του βαθμού μετασχηματισμού των MDA-MB 231 κυττάρων με το μέγεθος των αποικιών σε ημι-στερεό καλλιέργεια να παρουσιάζεται κατά μέσο όρο 2,5 φορές αυξημένο, καταδεικνύοντας ότι η υπερέκφραση της PAPOLA ενισχύει τα χαρακτηριστικά του καρκινικού κυττάρου.

Από τα δεδομένα προκύπτει ότι πιθανά τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA λειτουργούν αρχικά ως σήμα ενίσχυσης του πολλαπλασιασμού. Ακόμη και στην περίπτωση που η υπερέκφραση της PAPOLA οδήγησε στην απόπτωση των MCF-7 και HEK 293 κυττάρων, η αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στη G₂/M φάση του κυτταρικού κύκλου πιθανά υποδεικνύει την ύπαρξη σήματος ενεργοποίησης του κυτταρικού κύκλου. Η προώθηση όμως αυτή φάνηκε να αναστέλλεται από το σημείο ελέγχου G₂ αποτρέποντας τα κύτταρα να εισέλθουν στη μίτωση και να πολλαπλασιαστούν. Τελικά, η μοίρα που θα ακολουθήσουν τα κύτταρα (ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός ή απόπτωση) εξαρτάται από την ακεραιότητα και την λειτουργικότητα μηχανισμών προστασίας τους, στη συγκεκριμένη περίπτωση από τη λειτουργικότητα του p53. Πολλά είναι τα παραδείγματα στα οποία η έκφραση ογκογονιδίων οδηγεί είτε στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό ή στην απόπτωση, με χαρακτηριστικό το MYC ογκογονίδιο (Evan *et al.*, 1992), το οποίο είναι ικανό να ενισχύσει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μόνο παρουσία βλαβών που αναστέλλουν την απόπτωση (μη λειτουργικό p53) ή υπερέκφραση αντιαποπτωτικών παραγόντων (BCL2), εναλλακτικά αυτά αποπίπτουν (Strasser *et al.*, 1990).

IV.3. Η έκφραση της PAPOLA επηρεάζει τη διαμόρφωση του 3' άκρου του mRNA της CCND1

Βάσει των αποτελεσμάτων της διατριβής η αποσιώπηση της PAPOLA στα κύτταρα οδήγησε σε αναστολή του ρυθμού πολλαπλασιασμού γεγονός που συνοδεύτηκε από μείωση των επιπέδων έκφρασης της CCND1 στο επίπεδο του mRNA και της πρωτεΐνης. Αντίθετα, ύστερα από την υπερέκφραση του γονιδίου στα MDA-MB

231 κύτταρα καταγράφηκε προώθηση του κυτταρικού κύκλου καθώς και αύξηση των επιπέδων έκφρασης της CCND1. Πρόσφατα, μελέτες έδειξαν ότι η αποκλειστική χρήση του εγγύς σήματος πολυαδενυλίωσης του mRNA της CCND1, ύστερα από εξουδετέρωση του ορθόλογου, οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του mRNA αλλά και της αντίστοιχης πρωτεΐνης και οδηγεί σε ενίσχυση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων που τα εκφράζουν (Wang *et al.*, 2018). Το ερώτημα που προέκυψε αφορούσε κατά πόσο οι μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης της CCND1 στα καρκινικά κύτταρα μαστού που παρατηρήθηκε και η σύνδεση τους με την έκφραση της PAPOLA αντανakλούν πιθανές αλλαγές στην προτιμώμενη θέση πολυαδενυλίωσης του αντίστοιχου mRNA.

Τόσο στην περίπτωση της αποσιώπησης όσο και της υπερέκφρασης του γονιδίου, τα επίπεδα έκφρασης της PAPOLA παρουσιάστηκαν αντιστρόφως ανάλογα του μήκους της 3' αμετάφραστη περιοχής του mRNA της CCND1. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η PAPOLA συμβάλλει στην εναλλακτική πολυαδενυλίωση του mRNA της CCND1. Παλαιότερα δεδομένα καταγράφουν την ύπαρξη της βραχείας ισομορφής του mRNA της CCND1 στον καρκίνο του μαστού καθώς και τα αυξημένα επίπεδα του mRNA της PAPOLA μεταξύ και άλλων παραγόντων πολυαδενυλίωσης, χωρίς όμως να διερευνούν μια πιθανή συσχέτιση των δυο (Mayr και Bartel 2009).

Είναι εύλογο ότι η έκφραση της PAPOLA πιθανά να επηρεάζει την προτιμώμενη θέση πολυαδενυλίωσης και άλλων mRNA. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι τόσο η PAPOLA όσο και η PAPOLG φαίνεται να συμμετέχουν στη διαδικασία της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης διαφόρων μηνυμάτων μέσω ανάλυσης βάσεων δεδομένων καθολικής έκφρασης mRNA (Weimin *et al.*, 2017). Επιπλέον, παλαιότερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η αναστολή της PAP από το σύμπλοκο U1 snRNP έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή του εγγύς σήματος πολυαδενυλίωσης (Gunderson *et al.*, 1998). Τα αποτελέσματα της διατριβής σε συνδυασμό με τα δεδομένα αυτά οδηγούν στο ερώτημα κατά πόσο η έκφραση της PAPOLA μπορεί να συμβάλλει στην εναλλακτική πολυαδενυλίωση και άλλων mRNA τα οποία ενέχονται σε διαδικασίες του κυττάρου που δεν αφορούν μόνο τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι μεγάλες διαφορές που παρατηρήθηκαν στην ικανότητα των κυττάρων να αναπτύσουν αποικίες σε ημι-στερεή καλλιέργεια τόσο ύστερα από την αποσιώπηση όσο και από την υπερέκφραση του γονιδίου συνάδουν με δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η εναλλακτική

πολυαδενυλίωση συνδέεται ακόμη πιο ισχυρά με την ενίσχυση του μετασχηματισμού των κυττάρων από ότι με τον αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Συγκεκριμένα, υποστηρίζεται ότι βραχείες ισομορφές mRNA παρατηρούνται σε καρκινικές σειρές σε σχέση με μη μετασχηματισμένα κύτταρα, ενώ δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες διαφορές ανάμεσα στα τελευταία και τους φυσιολογικούς ιστούς. Επιπλέον, πειράματα ανάπτυξης αποικιών σε ημι-στερεό μέσο ύστερα από τη διαμόλυνση ινοβλαστών και κυτταρικών σειρών μαστού με τη μεγάλου μήκους και τη βραχεία ισομορφή του ογκογονιδίου IGF2BP1 έδειξαν ότι το εναλλακτικά πολυαδενυλιωμένο mRNA ενίσχυσε σημαντικά τον ογκογονικό μετασχηματισμό τους (Mayr και Bartel 2009). Σε κάθε περίπτωση, το γεγονός ότι αυξημένη έκφραση της PAPOLA οδήγησε στην εναλλακτική πολυαδενυλίωση του mRNA της CCND1 αποτελεί ένα ακόμη παράδειγμα που ενισχύει την υπόθεση ότι αυξημένη έκφραση των παραγόντων πολυαδενυλίωσης οδηγεί στην εναλλακτική πολυαδενυλίωση των μηνυμάτων.

Εκτός από τη διερεύνηση πιθανών αλλαγών στη διαμόρφωση της 3'αμετάφραστης περιοχής του mRNA της CCND1, στα πλαίσια της διατριβής διερευνήθηκε και κατά πόσο μεταβολές στην έκφραση του γονιδίου επηρεάζουν το μήκος της πολυ(A) ουράς αντίστοιχα. Απουσία της PAPOLA το μήκος της πολυ(A) ουράς τόσο της μεγάλου μήκους όσο και της βραχείας ισομορφής του mRNA της CCND1 παρέμεινε αμετάβλητο. Τα δεδομένα αυτά πιθανά αντικατοπτρίζουν ότι η μείωση στα επίπεδα έκφρασης της CCND1 που παρατηρήθηκε δεν οφείλεται σε αποσταθεροποίηση του mRNA λόγω μείωσης της πολυ(A) ουράς. Αν και η PAPOLA είναι υπεύθυνη για την προσθήκη των καταλοίπων αδενοσίνης στο 3' άκρο των mRNA, η παρουσία της PAPOLG στο κύτταρο φαίνεται ότι αναπληρώνει την απουσία της και αρκεί για την πολυαδενυλίωση του mRNA της CCND1. Η πιθανή συμβολή της PAPOLA στο μήκος της πολυ(A) ουράς των mRNA έχει διερευνηθεί στο παρελθόν σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα καθώς και σε κύτταρα λείων μυών των αεραγωγών. Η αποσιώπηση της PAPOLA στα κύτταρα αυτά αν και οδηγεί σε μικρή μόνο μείωση του μήκους των πολυ(A) ουρών των mRNA, συνοδεύεται από μείωση των επιπέδων έκφρασης των mRNA που είναι υπεύθυνα για την έκφραση παραγόντων που σχετίζονται με τη φλεγμονή (Kondrashov et al., 2012). Εφόσον η PAPOLA συμμετέχει στην επιλογή του σήματος πολυαδενυλίωσης, όπως καταγράφηκε μέσω των αποτελεσμάτων της

διατριβής, θα μπορούσε η εναλλακτική πολυαδενυλίωση να αποτελεί έναν μηχανισμό ο οποίος συμβάλλει στην παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων των mRNA που είναι υπεύθυνα για τους παράγοντες της φλεγμονής. Αντίθετα, βάση των αποτελεσμάτων της διατριβής, η υπερέκφραση της PAPOLA οδηγεί σε αύξηση του μήκους της πολυ(A) ουράς τόσο της μεγάλου μήκους όσο και της βραχείας ισομορφής του mRNA της CCND1 στα MDA-MB 231 και η αύξηση αυτή ενδέχεται να συμβάλλει επίσης στα ενισχυμένα επίπεδα έκφρασης της CCND1 που καταγράφηκαν. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το μήκος της πολυ(A) ουράς των mRNA ελέγχεται από παράγοντες του κυττάρου όπως η PABP, η οποία μέσω αλληλεπίδρασης με την PAP ενισχύει την αποτελεσματικότητα της πολυαδενυλίωσης (Wahle *et al.*, 1991) καθώς επίσης ελέγχει το μήκος της πολυ(A) ουράς (Kuhn *et al.*, 2009). Είναι πιθανό οι παράγοντες αυτοί ελέγχου του μήκους της πολυ(A) ουράς των μηνυμάτων να μην μπορούν να τερματίσουν την προσθήκη καταλοίπων αδενοσίνης από την PAPOLA όταν βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο κύτταρο και συνεπώς να παρατηρείται επιμήκυνση των πολυ(A) ουρών.

Τα πειράματα προσδιορισμού του μήκους της πολυ(A) ουράς αποκάλυψαν ακόμη ένα δεδομένο που αφορά τη συσχέτιση του μήκους της πολυ(A) ουράς με το μήκος της 3'αμετάφραστης περιοχής. Οι δύο ισομορφές mRNA της CCND1 διαφέρουν ως προς το μήκος των πολυ(A) ουρών: η βραχεία ισομορφή mRNA της CCND1 φέρει μια μεγαλύτερου μήκους ουρά στο 3'άκρο της σε αντίθεση με τη μεγάλου μήκους ισομορφή η οποία χαρακτηρίζεται από βραχύτερη πολυ(A) αλυσίδα. Παλαιότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι mRNA με βραχείες 3'αμετάφραστες περιοχές χρειάζονται μεγάλου μήκους πολυ(A) ουρές ώστε να επιτευχθεί η κυκλοποίηση του μετάγραφου και να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της μετάφρασης (Tanguay *et al.*, 1996). Η σχέση ανάμεσα στο μήκος της 3'αμετάφραστης περιοχής και της πολυ(A) ουράς φαίνεται να λειτουργεί ως ένας μηχανισμός διατήρησης της ισορροπίας του ελάχιστου δυνατού μήκους του mRNA ώστε να μεταφραστεί αποτελεσματικά. Η αντιστρόφως ανάλογη σχέση του μήκους της 3'αμετάφραστης περιοχής και της πολυ(A) ουράς καθώς και η συσχέτιση της με την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης επιβεβαιώνεται και από μελέτες ανάλυσης βάσεων δεδομένων γονιδιώματος με αλληλούχηση νέας γενιάς. Μάλιστα, υποστηρίζεται ότι συγκεκριμένες αλληλουχίες που βρίσκονται στην 3'αμετάφραστη περιοχή οδηγούν στην από-αδενυλίωση των μηνυμάτων και συνεπώς στον καθορισμό

του μήκους της πολυ(A) ουράς (Beilharz *et al.*, 2007). Παρόλα αυτά, υπάρχουν και δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν ότι μια μεγάλου μήκους πολυ(A) ουρά δεν αποτελεί στοιχείο απαραίτητο για την αποτελεσματική μετάφραση των mRNA (Lima *et al.*, 2017).

Τα τελευταία χρόνια μέσω της ανάπτυξης τεχνικών που επιτρέπουν την καθολική και μαζική ανάλυση δεδομένων (genome wide analysis, RNA seq, TAIL seq κλπ) έχει καταστεί δυνατή η συλλογή μεγάλου όγκου πληροφοριών σχετικά με τη σημασία της διαμόρφωσης του 3' άκρου των mRNA. Παρόλα αυτά για τη διερεύνηση και κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ευθύνονται για το φαινόμενο αυτό ακόμη απαιτείται η ανάλυση συγκεκριμένων γονιδίων μέσω μοριακών και βιοχημικών προσεγγίσεων. Η δυναμική της βιοπληροφορικής ανάλυσης μπορεί να αξιοποιηθεί πλήρως ύστερα από τον συνδυασμό της με πειραματικές προσεγγίσεις που σχεδιάζονται βάσει συγκεκριμένων υποθέσεων-ερωτημάτων. Στη βάση αυτή, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της διατριβής προτείνεται ότι αλλαγές στη διαμόρφωση του 3' άκρου του mRNA της CCND1 πιθανά αποτελούν μια ψηφίδα στο μηχανισμό μέσω του οποίου η έκφραση της PAPOLA συμβάλλει στον φαινότυπο και στα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων μαστού.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η απορρύθμιση της διαδικασίας μορφοποίησης του 3' άκρου των mRNA σχετίζεται με μια πληθώρα ασθενειών που αφορούν το ανοσοποιητικό σύστημα, τη φλεγμονή και τον καρκίνο, ενώ ταυτόχρονα τα επίπεδα της ενεργότητας αλλά και της έκφρασης της PAP συσχετίζονται με διάφορα είδη νεοπλασιών και εν γένει με την ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Επιπλέον, βασικό γνώρισμα της PAP αποτελεί ο πολύπλευρος τρόπος μέσω του οποίου ελέγχονται τα επίπεδα έκφρασης της στο κύτταρο. Η ρύθμιση της έκφρασης της ξεκινά από το στάδιο μετά τη μεταγραφή κατά την οποία μια σύνθετη διαδικασία εναλλακτικού ματίσματος συμμετέχει στη διαμόρφωση του καρβοξυτελικού της άκρου, βασικό στοιχείο της ρύθμισης της στο επίπεδο μετά τη μετάφραση (Zhao *et al.*, 1996). Παράλληλα, η μακριά 5' αμετάφραστη περιοχή της PAPOLA χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε GC και την παρουσία ενός δεύτερου πλαισίου ανάγνωσης (Rapti *et al.*, 2010) το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό των γονιδίων που κωδικοποιούν για κινάσες, αυξητικούς παράγοντες, ογκογονίδια, υποδοχείς και μεταγραφικούς παράγοντες,

στοιχεία τα οποία βρίσκονται κάτω από αυστηρή ρύθμιση στο κύτταρο (Colgan *et al.*, 1997, Churbanov *et al.*, 2005). Τέλος, μια σειρά φωσφορυλιώσεων οι οποίες καταστέλλουν την ενεργότητα του ενζύμου καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου συμπληρώνουν το μοτίβο ελέγχου της έκφρασης της PAP. Ο στοχευμένα αυστηρός έλεγχος έναντι της PAP πιθανά να οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ενώ τα φυσιολογικά επίπεδα του ενζύμου στο κύτταρο είναι απαραίτητα για την επιβίωση του, αυξημένα επίπεδα μπορεί να αποβούν καταστροφικά για την τύχη του. Το μοτίβο αυτό είναι γνωστό ότι ισχύει για τα πρωτο-ογκογονίδια, ανοίγοντας το δρόμο για την περαιτέρω μελέτη του ρόλου της PAP και της συμβολής της σε παθογένειες που αφορούν τα κύτταρα. Τα αποτελέσματα της διατριβής φαίνεται να συμφωνούν με την άποψη αυτή, αφού η έκφραση της PAPOLA συμβάλλει στη διαμόρφωση των βασικών χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων ενώ τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της πυροδοτούν τον αποπτωτικό μηχανισμό στα κύτταρα, όπου αυτός είναι λειτουργικός. Τα χαρακτηριστικά αυτά αποτελούν βασικές ιδιότητες των ογκογονιδίων.

Όλα τα παραπάνω αναδεικνύουν ως πιθανή στρατηγική αντιμετώπισης του καρκίνου τη στόχευση της πολυαδενυλίωσης αλλά και της PAPOLA μιας και αποτελούν απαραίτητα στοιχεία για την επιβίωση του κυττάρου. Με σκοπό την επιβεβαίωση μιας τέτοιας υπόθεσης, η χρήση ενώσεων που αναστέλλουν τη διαδικασία της πολυαδενυλίωσης παρεμβαίνοντας στην λειτουργία της PAPOLA με σκοπό τη συσχέτιση της έκφρασης της και της βιολογικής απόκρισης των καρκινικών κυττάρων μαστού, αποτελεί μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση. Ήδη, τροποποιημένα ανάλογα βάσεων χρησιμοποιούνται ως χημειοθεραπευτικά μέσα, με ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα έναντι διαφόρων ειδών καρκίνων (Ewald *et al.*, 2008, Chang *et al.*, 2005). Συγκεκριμένα, η χρήση ανάλογων αδενοσίνης εμφανίζει ιδιαίτερη αντικαρκινική δράση όχι μόνο στοχεύοντας το DNA των κυττάρων αλλά αναστέλλοντας την πολυαδενυλίωση των mRNA. Μια σειρά τροποποιημένων ανάλογων αδενοσίνης στον άνθρακα 8 (C8 modified analogues) έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν τη δράση της PAP (Chen *et al.*, 2004, 2010) και κατ' επέκταση μπορούν πιθανά να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτική στρατηγική έναντι διαφόρων νεοπλασιών.

Επίσης, μια από τις πρώτες ενώσεις οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την αναστολή της πολυαδενυλίωσης αποτελεί η κορδουσεπίνη (3' δεοξαδενοσίνη) (Rose *et*

al., 1977). Η κορδουσεπίνη επίσης αποτελεί ανάλογο της αδενοσίνης στο οποίο απουσιάζει το 3'υδροξύλιο και κατά συνέπεια στη φωσφορυλιωμένη της μορφή ενσωματώνεται στην αλυσίδα του πολυ(A) παρεμποδίζοντας την προσθήκη των επόμενων νουκλεοτιδίων. Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως εκτός από τον τερματισμό της πολυ(A) ουράς των mRNA η κορδουσεπίνη αλληλεπιδρά με την PAP αναστέλλοντας τη δράση της με συνέπεια την παραγωγή εναλλακτικά πολυαδενυλιωμένων μεταγράφων. Η αναστολή του πολ/σμού (Chang *et al.*, 2008, Nakamura *et al.*, 2006), η επαγωγή της απόπτωσης (Wehbe *et al.*, 2007, Thomadaki *et al.*, 2008) και η ρύθμιση της φλεγμονής (Kim *et al.*, 2006) είναι αποτελέσματα της δράσης της κορδουσεπίνης. Σύντομη έκθεση των κυττάρων σε κορδουσεπίνη οδηγεί σε μείωση των επιπέδων των mRNA στο κυτταρόπλασμα πιθανά λόγω της μείωσης του mRNA της PAP, ενώ μεγαλύτερη διάρκεια επώασης οδηγεί σε γενικευμένη μείωση των επιπέδων των μεταγράφων (Müller *et al.*, 1977). Οι επιπτώσεις της δράσης της κορδουσεπίνης στην τύχη των κυττάρων σε συνδυασμό με την εμπλοκή της στην αναστολή της πολυαδενυλίωσης και την αλληλεπίδραση της με την PAP την καθιστά πιθανό υποψήφιο αναστολέα του ενζύμου.

Τέλος, ενδιαφέρουσα προσέγγιση θα αποτελούσε η διερεύνηση των πιθανών επιπτώσεων στο φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων μαστού ο εξειδικευμένος σχεδιασμός ανάλογων αδενοσίνης τα οποία δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο της PAP μειώνοντας την ενεργότητα της και όχι απλά τερματίζουν την δημιουργία της πολυ(A) ουράς των μηνυμάτων. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να αναδειχθεί μια πιθανή στρατηγική αντιμετώπισης του καρκίνου του μαστού στο επίπεδο του RNA.

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agrawal N., Dasaradhi P.V., Mohmmmed A., Malhotra P., Bhatnagar R.K., et al. (2003) RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 657–685.

Ahn S.H., Kim M., Buratowski S. (2004). Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol Cell* 13: 67–76

Aranda, P. S., LaJoie, D. M. & Jorcyk, C. L. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* 33, 366–369

Akman H. B., Oyken M., Tuncer T., Can T., Erson-Bensan A., E. 3'UTR shortening and EGF signaling: implications for breast cancer. *Hum. Mol. Genet.* 24, 6910–6920 (2015).

Badve S., Nakshatri H. Oestrogen-receptor-positive breast cancer: towards bridging histopathological and molecular classifications. *Journal of clinical pathology.* 2009; 62: 6-12.

Ballantyne S., Wickens M.(1995) Poly(A) polymerase in the nucleus and cytoplasm of frog oocytes: Dynamic changes during oocyte maturation and early development.

Bancroft J.D., Gamble M. Theory and practice of histological techniques. 6th Edition, Elsevier, Philadelphia (2008).

Bardou V.J., Arpino G., Elledge R.M., Osborne C.K., Clark G.M. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *Journal of clinical oncology.* (2003).

Bartel D. P., Micrnas: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136 (2009) 215–33.

Beaudoing E., Freier S., Wyatt J.R., Claverie J.M., Gautheret D. Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res.* 2000;10:1001–1010. doi: 10.1101/gr.10.7.1001.

Beilharz T. H. and Preiss, T. Widespread use of poly(A) tail length control to accentuate expression of the yeast transcriptome. *RNA* 13, 982–997, 10.1261/rna.569407 (2007).

Berg M.G., Singh L.N., Younis I., Liu Q., Pinto A.M., Kaida D., Zang Z., Cho S., Sherrill-Mix M., Wan L., et al. 2012. U1 snRNP determines mRNA length and regulates isoform expression. *Cell* 150: 53–

Boelens W.C., Jansen E.J.R., Van Venrooij W.J., Stripecke R., Mattaj I.W. Gunderson S.I. (1993) The human U1 snRNP-specific U1A protein inhibits polyadenylation of its own pre-mRNA. *Cell*, 72, 881–892.

Bond G.L., Prives C., Manley J.L. 2000. Poly(A) polymerase phosphorylation is dependent on novel interactions with cyclins. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5310 – 5320.

Brackenridge S., Ashe H.L., Giacca M., Proudfoot N.J. Transcription and polyadenylation in a short human intergenic region. *Nucleic Acids Res.* 1998;25:2326–2335.

Brown K.M. and Gilmartin, G.M. A mechanism for the regulation of pre-mRNA 3' processing by human cleavage factor Im (2003). *Mol. Cell* 12: 1467-1476.

Brummelkamp T.R., Bernards R. and Agami R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296, 550–553.

Calvo O., Manley J.L. (2003). Strange bedfellows: polyadenylation factors at the promoter. *Genes Dev* 17: 1321–1327

Cevher M.A., Zhang X., Fernandez S., Kim S., Baquero J., Nilsson P., Lee S., Virtanen A., Kleiman F.E. Nuclear deadenylation/polyadenylation factors regulate 3' processing in response to DNA damage. *EMBO J.* 2010;29:1674–1687.

Chang H., Qi X.Y., Samiee S., et al. Genetic risk identifies multiple myeloma patients who do not benefit from autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005;36:793-796

Chang W., et al. Cordycepin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation. *Eur. J. Pharmacol.* 597, 64–69 (2008).

Chen F., MacDonald C.C., Wilusz J.: Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal. *Nucleic Acids Res.* 1995, 23: 2614-2620.

Chen L.S and Sheppard T.L. Chain termination and inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* poly(A) polymerase by C-8-modified ATP analogs. *J. Biol. Chem.* 279 (2004), 40405–40411.

Chen L.S., Du-Cuny L., Vethantham V., Hawke D.H., Manley J.L., Zhang S., Gandhi V. Chain termination and inhibition of mammalian poly(A) polymerase by modified ATP analogues. *Biochem. Pharmacol.* 79 (2010), 669–677.

Chiba K., Kawakami K. & Tohyama K. (1998). Simultaneous Evaluation of Cell Viability by Neutral Red, MTT and Crystal Violet Staining Assays of the Same Cells. *Toxicology in vitro*, 12(3), pp 251-258.

Churbanov A., Rogozin I.B., Babenko V.N., Ali H., Koonin E.V. (2005). Evolutionary conservation suggests a regulatory function of AUG triplets in 50-UTRs of eukaryotic genes. *Nucleic Acids Res* 33:5512–5520

Colgan D.F., Manley J.L. (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* 11:2755–2766.

Colgan D.F., Murthy,K.G., Prives,C. and Manley,J.L. (1996) Cell-cycle related regulation of poly(A) polymerase by phosphorylation. *Nature*, 384, 282–285.

Colgan D.F., Murthy,K.G., Zhao,W., Prives,C. and Manley,J.L. (1998) Inhibition of poly(A) polymerase requires p34cdc2/cyclin B phosphorylation of multiple consensus and nonconsensus sites. *EMBO J.*, 17, 1053–1062.

Danckwardt S., Hentze M.W., Kulozik A.E. 2008. 3' end mRNA processing: Molecular mechanisms and implications for health and disease. *EMBO J* 27: 482–498

Danckwardt S., Kaufmann I., Gentzel M., Foerstner .K.U, Gantzer A.S., Gehring N.H., Neu-Yilik G., Bork P., Keller W., Wilm M., et al. Splicing factors stimulate polyadenylation via USEs at non-canonical 3' end formation signals. *EMBO J.* 2007;26:2658–2669.

Dass B., Attaya E.N., Wallace A.M., MacDonald C.C. Overexpression of the CstF-64 and CPSF-160 polyadenylation protein messenger RNAs in mouse male germ cells. *Biol Reprod.* 2001;64:1722–1729.

De Klerk E., et al. Poly(A) binding protein nuclear 1 levels affect alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:9089–9101. doi: 10.1093/nar/gks655.

Di Giammartino D.C, Nishida K., Manley J.L. 2011. Mechanisms and consequences of alternative polyadenylation. *Mol Cell* 43: 853–866.

Dixon J.M., Anderson T.J., Page D.L., Lee D., Duffy S.W. (1982). Infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Histopathology* 6:149-161.

Dowsett M., Cuzick J., Wale C., Howell T., Houghton J., Baum M. Retrospective analysis of time to recurrence in the ATAC trial according to hormone receptor status: an hypothesis-generating study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2005; 23: 7512-7.

Dowsett M., Houghton J., Iden C., Salter J., Farndon J., A'Hern R., et al. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.* 2006; 17: 818-26.

Dresser D. W., Hacker A., Lovell-Badge R., Guerrier D. (1995). The genes for a spliceosome protein (SAP62) and the anti-Müllerian hormone (AMH) are contiguous. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1613–1618 10.1093/hmg/4.9.1613

Dunnwald L.K., Rossing M.A., Li C.I. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast cancer research : BCR.* 2007; 9: R6.

Edge S., MD and Compton C., MD PhD. *Annals of Surgical Oncology* (2010). The AJCC the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM

Edwards-Gilbert G., Veraldi K.L., Milcarek C. Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res* 1997; 25:2547–61.

Eheman C.R., Shaw K.M., Ryerson A.B., Miller J.W., Ajani U.A., White M.C. The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(6):1763–9.

Elkon R., Ugalde A.P., Agami R. (2013). Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nat Rev Genet* 14: 496–506.

Elkon R., Drost J., Van Haaften G., Jenal M., Schrier M., Oude Vrielink J.A., Agami R. E2F mediates enhanced alternative polyadenylation in proliferation. *Genome Biol.* 2012;13(7):R59.

Elledge R.M., Green S., Pugh R., Allred D.C., Clark G.M., Hill J., et al. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2000; 89: 111-7.

Elston C.W., Ellis I.O. (1998). Classification of malignant breast disease. In: *The Breast. Systemic Pathology.* CW Elston and IO Ellis (Eds.) 3rd ed. Churchill Livingstone: Edinburgh, pp. 239-247.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer: I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* (1991);19: 403-10.

Evan G.I., Wyllie A.H., Gilbert C.S., Littlewood T.D., Land H., Brooks M., Waters C.M., Penn L.Z., Hancock D.C. 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69: 119–128.

Ewald B., Sampath D., Plunkett W. Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene*. 2008;27(50):6522-37.

Feoktistova M., Geserick P., Leverkus M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016;2016(4):pdb.prot087379.

Fitzgerald J. V. and Shen J. (1981) *CeU*, 24, 251-260

Foote F.W., Stewart F.W. (1946). A histologic classification of carcinoma of the breast. *Surgery* 19: 74-99..

Frkovic-Grazio S., Bracko M.: Long term prognostic value of Nottingham histological grade and its components in early (pT1N0M0) breast carcinoma. *J Clin Pathol* 2002, 55:88-92.

Frohman M.A., Dush M.K. & Martin G.R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts by amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 8998–9002 (1988).

Fu Y., Sun Y., Li Y., Li J., Rao X., Chen C., Xu A. 2011. Differential genome-wide profiling of tandem 3' UTRs among human breast cancer and normal cells by high-throughput sequencing. *Genome Res* 21: 741–747.

Fulford L.G., Easton D.F., Reis-Filho J.S., Sofronis A., Gillett C.E., Lakhani S.R., et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology*. 2006; 49: 22-34.

Furth P.A, Choe W., Rex H., Byrne J.C., Baker C.C. Sequences homologous to 5' splice sites are required for the inhibitory activity of papillomavirus late 3' untranslated regions *Mol. Cell. Biol*, 14 (1994), pp. 5278-5289

Garneau N. L., Wilusz J., and Wilusz C. J. 2007. The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 8:113-126

Gautam M., Zhao X., Band H, and Band V. “Histological, Molecular and Functional Subtypes of Breast Cancers.” *Cancer Biology & Therapy* 10, no. 10 (November 15, 2010): 955–60. doi:10.4161/cbt.10.10.13879.

Gil A. and Proudfoot, N.J. (1987) Position-dependent sequence elements downstream of AAUAAA are required for efficient rabbit β -globin mRNA 3' end formation. *Cell*, 49, 399–406.

Glover-Cutter K., Kim S., Espinosa J. , Bentley D.L. RNA polymerase II pauses and associates with pre-mRNA processing factors at both ends of genes *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15 (2008), pp. 71-78

Goldstrohm A.C., Wickens M. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:337–44.

Gong C., Maquat L. E. “Alu”strous long ncRNAs and their role in shortening mRNA half-lives. *Cell Cycle* 10, 1882–1883 (2011)

Group EBCTC. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. *The Lancet*. 2005; 365: 1687-717.

Group EBCTC. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *The Lancet*. 1998; 351: 1451-67.

Gunderson S.I., Polycarpou-Schwarz M., Mattaj I.W.. U1 snRNP inhibits pre-mRNA polyadenylation through a direct interaction between U1 70K and poly(A) polymerase. *Mol Cell* 1998; 1: 255–264.

Gunderson, S.I., Vagner S. , Polycarpou-Schwarz M., and MatColgan I. and Manley J.L. 2764 GENES & DEVELOPMENT. Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press taj. 1997. Involvement of the carboxyl terminus of vertebrate poly(A) polymerase in U1A autoregulation and in the coupling of splicing and polyadenylation. *Genes & Dev*. 11: 761–773

Hammell C.M., Gross S., Zenklusen D. , Heath C.V., Stutz F., Moore C., Cole C.N. Coupling of termination, 3' processing, and mRNA export *Mol. Cell. Biol.*, 22 (2002), pp. 6441-6457

Hanahan D.,Weinberg R.A.The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;**100**:57–70.

Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;**144**:346–674.

Hilgers V., Perry M.W., Hendrix D., Stark A., Levine M., Haley B. Neural-specific elongation of 3' UTRs during Drosophila development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108:15864–15869.

Hirose Y. and Manley J.L. 1998. RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor. *Nature* 395: 93-96.

Holbein S., Wengi A., Decourty L., Freimoser F.M., Jacquier A., Dichtl B. Cordycepin interferes with 3' end formation in yeast independently of its potential to terminate RNA chain elongation. *RNA* 2009;15:837–49.

Huang Y. , Carmichael G.C. Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA *Mol. Cell. Biol.*, 16 (1996), pp. 1534-1542

Ioannidis P., Courtis N., Havredaki M., Michailakis E., Tsiapalis C.M., et al. (1999) The polyadenylation inhibitor cordycepin (3'dA) causes a decline in c-MYC mRNA levels without affecting c-MYC protein levels. *Oncogene* 18: 117–125.

Ioannidis P., Havredaki M., Courtis N.,Trangas T.1996 *Nucl. Acids Res.* 24: 4969–4977.

Janicke A., Vancuylenberg J., Boag P.R., Traven A., Beilharz T.H. 2012. ePAT: a simple method to tag adenylated RNA to measure poly(A)-tail length and other 3' RACE applications. *RNA* 18: 1289–1295.

Janicke F. U., Schulze-Osthoff R.U., K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates.*Cell Death Differ.* 2003; 10: 76-100

Jänicke R.U, Walker P.A., Lin X.Y., Porter A.G. Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J* 1996; 15: 6969-6978.

Janicke R.U., Sprengart M.L., Wati M.R., Porter A.G. Caspase-3 Is Required for DNA Fragmentation and Morphological Changes Associated with Apoptosis *J. Biol. Chem.*, 273 (1998), pp. 9357-9360

Jenal M., Elkon R., Loayza-Puch F., Van Haaften G., Kuhn U., Menzies F. M., et al. (2012). The poly(A)-binding protein nuclear 1 suppresses alternative cleavage and polyadenylation sites. *Cell* 149, 538–553. doi:10.1016/j.cell.2012.03.022

Ji Z., Lee J.Y., Pan Z., Jiang B., Tian B. Progressive lengthening of 3' untranslated regions of mRNAs by alternative polyadenylation during mouse embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009;106:7028–7033

Ji Z., Tian B. Reprogramming of 3' untranslated regions of mRNAs by alternative polyadenylation in generation of pluripotent stem cells from different cell types. *PLoS ONE.* 2009; 4: e8419

Kagawa S., Gu J., Honda T., et al. Deficiency of caspase-3 in MCF7 cells blocks Bax-mediated nuclear fragmentation but not cell death. *Clin Cancer Res* 7: 1474-1480, 2001.

Kaida D., Berg M.G., Younis I., Kasim M., Singh L.N., Wan L., Dreyfuss G. U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. *Nature.* 2010;468:664–668.

Kashiwabara S., Noguchi J., Zhuang T., Ohmura K., Honda A., Sugiura S., Miyamoto K., Takahashi S., Inoue K., Ogura A., Baba T. Regulation of spermatogenesis by testis-specific, cytoplasmic poly(A) polymerase TPAP. *Science* 298: 1999-2002, 2002.

Kedzierzki W. and Porter J.C. "A Novel Non-Enzymatic Procedure for Removing DNA Template from RNA Transcription Mixtures". *Biotechniques* 10 (2); 1991.

Keller W., Bienroth S., Lang K.M., Christofori G. Cleavage and polyadenylation factor CPF specifically interacts with the pre-mRNA 3' processing signal AAUAAA. *EMBO J.* 1991;10:4241–4249.

Kerwitz Y., Kuhn U., Lilie H., et al. Stimulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA. *EMBO J.* 2003;22:3705–3714.

Kim H.G., Shrestha B., Lim S.Y., Yoon D.H., Chang W.C., Shin D.J., Han S.K., Park S.M., Park J.H., et al. 2006. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- κ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur. J. Pharmacol.* 545(2–3): 192-199

Kohler A., and Hurt E. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:761-773.

Kondrashov A., Meijer H.A., Barthet-Barateig A., et al. Inhibition of polyadenylation reduces inflammatory gene induction. *RNA.* 2012;18(12):2236–2250.

Kuhn U., Gundel M., Knoth A., Kerwitz Y., Rudel S., Wahle E. Poly(A) tail length is controlled by the nuclear poly(A)-binding protein regulating the interaction between poly(A) polymerase and the cleavage and polyadenylation 2009; 284:22803-14.

Kyriakopoulou C.B., Nordvang H., Virtanen A. (2001). "A novel nuclear human poly(A) polymerase (PAP), PAP gamma". *J. Biol. Chem.* 276 (36): 33504–11.

Laishram R.S. Poly(A) polymerase (PAP) diversity in gene expression--star-PAP vs canonical PAP. *FEBS Lett* 2014; 588: 2185–2197.

Lakhani S.R., Ellis I.O., Schnitt S.J., Tan P.H., Van de Vijver M.J. WHO Classification of Tumours of the Breast. Fourth ed. IARC, Lyon; 2012. ISBN.13.

Lau A.G., Irier H.A., Gu J., Tian D., Ku L., Liu G., Xia M., Fritsch B., Zheng J.Q., Dingledine R., et al. Distinct 3'UTRs differentially regulate activity-dependent translation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:15945–15950.

Lee S.H., Choi H.S., Kim H., Lee Y. ERK is a novel regulatory kinase for poly(A) polymerase. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:803–13.

Lee Y. J., Kim H., Chung J.H., Lee Y. Testis-specific expression of an intronless gene encoding a human poly(A) polymerase. *Molec. Cells* 11: 379-385, 2001

Lee Y. J., Lee, Y., Chung, J.H. (2000). An intronless gene encoding a poly(A) polymerase is specifically expressed in testis.

Li W. , Li X., Laishram R.S.,Hoque M., Ji Z. , Tian B., Anderson R.A. Distinct regulation of alternative polyadenylation and gene expression by nuclear poly (A) polymerases. *Nucleic acids research* 45 (15), 8930-8942

Li W., You B., Hoque M., Zheng D., Luo W., Ji Z., Park J.Y., Gunderson S.I., Kalsotra A., Manley J.L., Tian B. Systematic profiling of poly(A)+ transcripts modulated by core 3' end processing and splicing factors reveals regulatory rules of alternative cleavage and polyadenylation. *PLoS Genet.* 2015;11:1–28.

Li X., Manley J.L. Cotranscriptional processes and their influence on genome stability. *Genes & Dev.* 2006;20:1838–1847.

Lianoglou S., Garg V., Yang J.L., Leslie C.S. and Mayr C. (2013). Ubiquitously transcribed genes use alternative polyadenylation to achieve tissuespecific expression. *Genes Dev.* 27, 2380-2396.

Lima A.S., Chipman L.B., Nicholson A.L., Chen Y.H., Yee B.A., Yeo G.W., Collier J., Pasquinelli A.E. (2017). Short polyA tails are a conserved feature of highly expressed genes. *Nature Structural and Molecular Biology*

Lingner J., Radtke I., Wahle E., Keller W. Purification and characterization of poly(A) polymerase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 1991;266:8741–8746.

Liu D., Brockman J.M., Dass B., Hutchins L.N., Singh P., McCarrey J.R., MacDonald C.C., Graber J.H. Systematic variation in mRNA 3'-processing signals during mouse spermatogenesis. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:234–246.

Mandel C.R., Bai Y., Tong L. Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008 65;1099 – 1122.

Manley J.L. Polyadenylation of mRNA precursors. *Biochim Biophys Acta.* 1988 May 6;950(1):1–12.

Martin G. and Keller W. (1996) Mutational analysis of mammalian poly(A) polymerase identifies a region for primer binding and a catalytic domain, homologous to the family X polymerases and to other nucleotidyltransferases. *EMBO J.*, 15, 2593±2603

Martin G., Gruber A.R., Keller W., Zavolan M. Genome-wide analysis of pre-mRNA 3' end processing reveals a decisive role of human cleavage factor I in the regulation of 3' UTR length. *Cell Rep.* 2012;753–763.

Martin G., Jeno P., Keller W. Mapping of ATP binding regions in poly(A) polymerases by photoaffinity labeling and by mutational analysis identifies a domain conserved in many nucleotidyltransferases. *Protein Sci.* 1999;8:2380–2391.

Martin G., Keller W., Doublie S. Crystal structure of mammalian poly(A) polymerase in complex with an analog of ATP. *Embo J.* 2000;19:4193–4203.

Martinez V., Azzopardi J.G. (1979). Invasive lobular carcinoma of the breast: incidence and variants. *Histopathology* 3:467-488.

Masamha C.P., Xia Z., Yang J., Albrecht T.R., Li M., Shyu A.-B., Li W., Wagner E.J. CFIm25 links alternative polyadenylation to glioblastoma tumour suppression. *Nature.* 2014;510(7505):412–416.

Mastracci T.L., Tjan S., Bane A.L., O'Malley F.P., Andrulis I.L. E-cadherin alterations in atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma in situ of the breast. *Mod Pathol.* 2005;18:741–51.

Mayr C., Bartel D.P. Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* 2009; 138:673–84.

McCulloch G.L., Evans A.J., Yeoman L. Radiological features of papillary carcinoma of the breast. *Clin Radiol.* 1997; 73:865–8. [PubMed: 9392466]

McLauchlan J., Gaffney D., Whitton J.L., Clements J.B. The consensus sequence YGTGTTY located downstream from the AATAAA signal is required for efficient formation of mRNA 3' termini. *Nucleic Acids Res.* 1985 Feb 25;13(4):1347–1368.

Meijer H.A., Bushell M., Hill K., Gant T.W., Willis A.E., Jones P., De Moor C.H. 2007. A novel method for poly(A) fractionation reveals a large population of mRNAs with a short poly(A) tail in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 35: e132.

Mendez R. and Richter J. D. (2001). Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 521-529.

Meyer S., Temme C., Wahle E. 2004. Messenger RNA turnover in eukaryotes: Pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39: 197–216

Millevoi S, Geraghty F., Idowu B., Tam J.L., Antoniou M., Vagner S. (2002). A novel function for the U2AF 65 splicing factor in promoting pre-mRNA 3'-end processing. *EMBO Rep* 3: 869–874

Millevoi S., Loulergue C, Dettwiler S, Karaa SZ, Keller W, Antoniou M, Vagner S (2006) An interaction between U2AF 65 and CF I(m) links the splicing and 3' end processing machineries. *EMBO J* 25: 4854–4864

Moore K.L. Dalley A.F. Breasts. In: **Moore KL. Dalley AF** (eds). *Clinically Oriented Anatomy.* Fourth Edition. Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins; 1999:72-77.

Moreira A., Wollerton M. , Monks J., Proudfoot N.J. 1995. Upstream sequence elements enhance poly(A) site efficiency of the C2 complement gene and are phylogenetically conserved. *EMBO J.* 14: 3809–3819

Morris D.R., Geballe A.P. (2000). Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol Cell Biol* 20:8635–8642

Muller W.E., Seibert G., Beyer R., Breter H.J., Maidhof A., Zahn R.K. Effect of cordycepin on nucleic acid metabolism in L5178Y cells and on nucleic acid-synthesizing enzyme systems *Cancer Res.*, 37 (1977), pp. 3824-3833

Murthy K.G., Manley J.L. 1992. Characterization of the multisubunit cleavage-polyadenylation specificity factor from calf thymus. *J Biol Chem* 267: 14804–14811

Murthy K.G., Manley J.L. 1995. The 160-kD subunit of human cleavage-polyadenylation specificity factor coordinates pre-mRNA 3'-end formation. *Genes Dev* 9: 2672–2683

Nakamura K., Yoshikawa N., Yamaguchi Y., Kagota S., Shinozuka K., Kunitomo M. Antitumor effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on mouse melanoma and lung carcinoma cells involves adenosine A3 receptor stimulation. *Anticancer Res* 26: 43-48, 2006.

Newman W. (1966). Lobular carcinoma of the female breast. Report of 73 cases. *Ann Surg* 164: 305-314.

Niwa M., Rose S.D. , Berget S.M. 1990. In vitro polyadenylation is stimulated by an upstream intron. *Genes & Dev.* 9: 1552-1559.

Oberhammer F., Wilson J.W., Dive C., Morris I.D., Hickman J.A., Wakeling A.E., Walker P.R., Sikorska M. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J.* 1993;12:3679–3684.

Oh D.S., Troester M.A., Usary J., Hu Z., He X., Fan C., et al. Estrogen-regulated genes predict survival in hormone receptor-positive breast cancers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2006; 24: 1656-64.

Olivotto I.A., Truong P.T., Speers C.H., Bernstein V., Allan S.J., Kelly S.J., et al. Time to stop progesterone receptor testing in breast cancer management. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2004; 22: 1769-70.

O'Neil M. The Merck Index. 14th edition. New Jersey: Merck & Co.; 2006

- Pangalis G.A., Trangas T., Papanastasiou C.J., Roussou P.A., Tsiapalis C.M.** Poly(A)-polymerase activity in chronic lymphocytic leukemia of the B cell type. *Acta Haematol.* 1985;74:31–4.
- Park D.J., Park A.J., Renfree M.B. Graves, J.A.M.** 2003. 3' RACE walking along a large cDNA employing tiered suppression PCR. *BioTechniques.* 34:750-756.
- Parker R., Song H.** The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11:121–127.
- Pecot C.V., Calin G.A., Coleman R.L., Lopez-Berestein G., Sood A.K.** 2011. RNA interference in the clinic: challenges and future directions. *Nat Rev Cancer* 11: 59–67
- Pendurthi U.R., Alok D., Rao L.V.M.** (1997) Binding of factor VIIa to tissue factor induces alterations in gene expression in human fibroblast cells: upregulation of poly(A) polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12598–12603
- Perumal K., Sinha K., Henning D., Reddy R.** (2001). "Purification, characterization, and cloning of the cDNA of human signal recognition particle RNA 3'-adenylating enzyme". *J. Biol. Chem.* 276 (24): 21791–6.
- Porter A.G. and Jänicke R.U.** Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*,99–104 (1999).
- Preiss T., Muckenthaler M., and Hentze M.W.** 1998. Poly(A)-tail-promoted translation in yeast: Implications for translational control. *RNA* 4: 1321–1331.
- Proudfoot N.J., Furger A., Dye M.J.** (2002). Integrating mRNA Processing with Transcription. *Cell* 108: 501–512.
- Qiong Wang, Guopei He, Mengmeng Hou, et al.** Cell Cycle Regulation by Alternative Polyadenylation of CCND1. *Scientific Reports* volume 8, Article number: 6824 (2018)
- Quincey C., Raitt N., Bell J., Ellis I.O.** (1991). Intracytoplasmic lumina--a useful diagnostic feature of adenocarcinomas. *Histopathology* 19: 83-87.
- Raabe T., Bollum F.J., Manley J.L.** Primary structure and expression of bovine poly(A) polymerase. *Nature.* 1991;353(6341):229–234.
- Raabe, T., Murthy K.G.K., and Manley J.L.** 1994. Poly(A) polymerase contains multiple functional domains. *Mol. Cell. Biol.* 14: 2946–2957
- Rakha E.A., El-Sayed M.E., Green A.R., Paish E.C., Powe D.G., Gee J., et al.** Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype.

Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2007; 25: 4772-8.

Rakha E.A., El-Sayed M.E., Lee A.H., Elston C.W., Grainge M.J., Hodi Z., Blamey R.W., Ellis I.O. Prognostic significance of nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. J Clin Oncol 2008, 26:3153-3158.

Rakha E.A., Reis Filho J.S., Bahener F., Dabbs D. J., Decker T. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade (2010). Breast Cancer Research 2010, 12:207.

Rakha E.A., Reis-Filho J.S., Ellis I.O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. Breast cancer research and treatment. 2010; 120: 293-308.

Rapti A., Trangas T., Samiotaki M., Ioannidis P., Dimitriadis E., Meristoudis C., Veletza S., Courtis N. The structure of the 5'-untranslated region of mammalian poly(A) polymerase- α mRNA suggests a mechanism of translational regulation. Mol Cell Biochem 340, 91–96 (2010).

Ravdin P.M., Green S., Dorr T.M., McGuire W.L., Fabian C., Pugh R.P., et al. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 1992; 10: 1284-91.

Rehfeld A., Plass M., Krogh A., Friis-Hansen L. (2013). Alterations in polyadenylation and its implications for endocrine disease. Front Endocrinol (Lausanne) 4:53

Rose K.M., Bell L.E., Jacob S.T. 1977. Specific inhibition of chromatin-associated poly(A) synthesis in vitro by cordycepin 5'-triphosphate. Nature 267: 178–180.

Rosonina, E., Kaneko, S., Manley, J.L. Terminating the transcript: Breaking up is hard to do. Genes & Dev. 2006;20:1050–1056.

Sachs A.B., Sarnow, P. and Hentze, M.W. (1997). Starting at the beginning, middle and end: translation initiation in eukaryotes. Cell, 89, 831–838.

Sachs M.S., Geballe A.P. (2006). Downstream control of upstream open reading frames. Genes Dev 20:915–921

Sadofsky, M., Connelly S., Manley J. L. and Alwine J. C. (1985). Identification of a sequence element on the 3' side of AAUAAA which is necessary for simian virus 40 late mRNA 3'-end processing. Mol. Cell. Biol. 5:2713-2719.

- Sandberg R., Neilson J.R., Sarma A., Sharp P.A., Burge C.B.** (2008). Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science* 320:1643–1647
- Sartini B.L., Wang H., Wang W., Millette C.F., Kilpatrick D.L.** Pre-messenger RNA cleavage factor I (CFIm): potential role in alternative polyadenylation during spermatogenesis. *Biol Reprod.* 2008;78:472–482.
- Schönemann L., Kühn U., Martin G., Schäfer P., Gruber A.R., Keller W., Zavolan M., Wahle E.** (2014) Reconstitution of CPSF active in polyadenylation: Recognition of the polyadenylation signal by WDR33. *Genes Dev* 28:2381–2393.
- Scorilas A., Talieri M., et al.** Polyadenylate polymerase enzymatic activity in mammary tumor cytosols: a new independent prognostic marker in primary breast cancer. *Cancer Res* 2000;60:5427–33.
- Sheets M.D., Ogg S.C., Wickens M.P.** Point mutations in AAUAAA and the poly (A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation in vitro. *Nucleic Acids Res.* 1990;18:5799–5805.
- Shimazu T., Horinouchi S., Yoshida M.** 2007. Multiple histone deacetylases and the CREB-binding protein regulate pre-mRNA 3'-end processing. *J Biol Chem* 282:4470–4478. doi:10.1074/jbc.M609745200.
- Singh P. , Alley T.L. , Wright S.M., Kamdar S., Schott W., Wilpan R.Y., Mills K.D., Graber J.H.** Global changes in processing of mRNA 3' untranslated regions characterize clinically distinct cancer subtypes. *Cancer Res.*, 69 (2009), pp. 9422-9430
- Smibert P., Miura P., Westholm J.O., Shenker S., May G., Duff M.O., Zhang D., Eads B.D., Carlson J., Brown J.B., et al.** Global patterns of tissue-specific alternative polyadenylation in *Drosophila*. *Cell reports.* 2012;1:277–289.
- Stetler D.A., Rose K.M., Jacob S.T.** (1981) Anti-poly(A) polymerase antibodies in sera of tumor-bearing rats and human cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7732–7736
- Strasser A., Harris A. W., Bath M. L., Cory S.** (1990) Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348:331–333.
- Sundquist M., Thorstenson S., Brudin L., Nordenskjöld B.** Applying the Nottingham Prognostic Index to a Swedish breast cancer population. South East Swedish Breast Cancer Study Group. *Breast Cancer Res Treat* 1999, 53:1-8.

Takagaki Y. and Manley J. L. “Complex protein interactions within the human polyadenylation machinery identify a novel component,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, no. 5, pp. 1515–1525, 2000.

Takagaki Y. , Seipelt R.L. , Peterson M.L., Manley J.L. The polyadenylation factor CstF-64 regulates alternative processing of IgM heavy chain pre-mRNA during B cell differentiation. *Cell*, 87 (1996), pp. 941-952

Takagaki Y. and Manley J.L. (1997) RNA recognition by the human polyadenylation factor CstF. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 3907–3914.

Tang P., Wang J., Bourne P. Molecular classifications of breast carcinoma with similar terminology and different definitions: are they the same?. *Human pathology*. 2008;39:506-13

Tanguay R.L. and Gallie D.R. Translational Efficiency Is Regulated by the Length of the 3' Untranslated Region. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, Jan. 1996, p. 146–156 Vol. 16

Tewari M., Beidler D.R. and Dixit V.M. (1995) 3'-terminal cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis, 1. *Biol. Cizem.* 270, 18738-18741

Thoma, C., Bergamini, G., Galy, B., Hundsdoerfer, P., and Hentze, M.W. 2004a. Enhancement of IRES-mediated translation of the c-myc and BiP mRNAs by the poly(A) tail is independent of intact eIF4G and PABP. *Mol. Cell* 15: 925–935.

Thomadaki H., Scorilas A., Tsiapalis C.M. and Havredaki M. The role of cordycepin in cancer treatment via induction or inhibition of apoptosis: implication of polyadenylation in a cell type specific manner. *Cancer Chemother Pharmacol* 61: 251-265, 2008.

Thureson A.C., Astrom,J., Astrom,A., Gronvik,K.O. and Virtanen,A. (1994) Multiple forms of poly(A) polymerases in human cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91, 979–983.

Tian B. , Manley J.L. Alternative polyadenylation of mRNA precursors *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 18 (1) (2017), pp. 18-30, 10.1038/nrm.2016.116

Tian B., Hu J., Zhang H., Lutz C.S. (2005) A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Res* 33: 201–212.

Topalian S.L., Kaneko S. et al. Identification and functional characterization of neo-poly(A) polymerase, an RNA processing enzyme overexpressed in human tumors. *Mol Cell Biol* 2001;21:5614–23.

Trangas T., Courtis N. et al. Polyadenylic acid polymerase activity in normal and leukemic human leukocytes. *Cancer Res* 1984;44:3691–7.]

Ulitsky I., Shkumatava A., Jan C.H., Subtelny A.O., Koppstein D., Bell G.W., Sive H., Bartel D.P. Extensive alternative polyadenylation during zebrafish development. *Genome research*. 2012;22:2054–2066.

VanGuilder H.D., Vrana K.E. Freeman W.M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* (2008). 44(5): 619-626

Vethantham V., Rao N., Manley J.L. Sumoylation regulates multiple aspects of mammalian poly(A) polymerase function, *Genes Dev* , 2008, vol. 22 (pg. 499-511)

Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Nelson Fausto, JonC.Aster. Neoplasia. Robbins and Cotran, Pathologic Basis of Disease. Eighth edition: Elsevier Publ 2010; 259-330.

Vinciguerra P., Stutz F. mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004;16:285–292.

Wahle E. A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. *Cell* 1991; 66:759-68. 14.

Wahle E. Purification and characterization of a mammalian polyadenylate polymerase involved in the 3' end processing of messenger RNA precursors. *J Biol Chem.* 1991;266(5):3131–3139.

Wang L., Hu X., Wang P., Shao Z.-M. The 3'UTR signature defines a highly metastatic subgroup of triple-negative breast cancer. *Oncotarget* . 2016; 7:59834–59844.

Wang Z.Q., Stingl L., Morrison C., Jantsch M., Los M., Schulze-Osthoff K., Wagner E.F. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev* 1997; 11:2347-58

Wehbe-Janeck, H., Shi Q. & Kearney C. M. Cordycepin/Hydroxyurea synergy allows low dosage efficacy of cordycepin in MOLT-4 leukemia cells. *Anticancer Res.* 27, 3143–3146 (2007).

Weimin Li, Wencheng Li, et al. Distinct regulation of alternative polyadenylation and gene expression by nuclear poly(A) polymerases. *Nucleic acids research* (2017).

Wellings S. R., Jensen H . M. and Marcum, R. G. An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J. Nat. Cancer Inst.* 55, 231-273 (1975)

Wickens M., Anderson P. and Jackson R.J (1997). Life and death in the cytoplasm: Messages from the 3' end. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 220–232.

Wilusz C.J, Wilusz J. Bringing the role of mRNA decay in the control of gene expression into focus. *Trends Genet.* 2004;20:491–497. doi: 10.1016/j.tig.2004.07.011.

Wilusz C.J. , Wormington M., Peltz S.W. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2 (2001), pp. 237-246

Wilusz, J., Pettine S.M., and Shenk T. (1989). Functional analysis of point mutations in the AAUAAA motif of the SV40 late polyadenylation signal. *Nucleic Acids Res.* 17: 3899 - 3909.

World Health Organization Classification of Tumours, (WHO) 2002

Xia Z., Donehower L.A., Cooper T.A., Neilson J.R., Wheeler D.A., Wagner E.J., Li W. 2014. Dynamic analyses of alternative polyadenylation from RNA-seq reveal a 3' -UTR landscape across seven tumour types. *Nat Commun* 5: 5274

Yang Q., Coseno M., Gilmartin G.M., Doublé S. Crystal structure of a human cleavage factor CFI(m)25/CFI(m)68/RNA complex provides an insight into poly(A) site recognition and RNA looping. *Structure.* 2011;19:368–377.

Yao C., Biesinger J., Wan J., Weng L., Xing Y., Xie X., Shi Y. Transcriptome-wide analyses of CstF64-RNA interactions in global regulation of mRNA alternative polyadenylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:18773-8; PMID:23112178; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1211101109>

Yarden Y. 2001. Biology of HER2 and its importance in Breast cancer. *Oncology* 2001;61 (Suppl2):1-13

Zarkower D., and Wickens M. (1987) *EMBO J.* 6, 177-186

Zhang,H., Lee,J.Y. and Tian,B. (2005) Biased alternative polyadenylation in human tissues. *Genome Biol.*, 6, R100. 13. Wang,E.T., Sandberg,R., Luo,S., Khrebtkova,I., Zhang,L

Zhao J., Hyman L., Moore C. Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63 (1999), pp. 405-445

Zhao W. , Manley J.L. Complex alternative RNA processing generates an unexpected diversity of poly(A) polymerase isoforms. *Mol. Cell. Biol.*, 16 (1996), pp. 2378-2386

Zhao W. Manley J.L. Deregulation of Poly(A) Polymerase Interferes with Cell Growth *Mol. Cell. Biol.* September 1, 1998 18: 5010-5020

Zink D, Sadonia N, Stelzerb E.et al. (2003) Visualizing chromatin and chromosomes in living cells. *Methods* 29(1): 42–50. (Chromosome staining/FISH)

