



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



Διερεύνηση της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης του *c-myc* mRNA από πρωτεΐνες πρόσδεσης RNA

ΛΑΜΠΡΙΑΝΙΔΟΥ ΑΝΔΡΟΜΑΧΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Τράγκα Θεώνη

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους μέσω του προγράμματος χορήγησης υποτροφιών του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών στο πλαίσιο της πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής διατριβής»-1ος κύκλος, του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση (ΕΠ ΑΝΑΔΕΔΒΜ) του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς 2014-2020»



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΟΜΟΤΙΜΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Θεώνη Τράγκα

Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 451 10

ΤΗΛΕΦΩΝΟ: (26510) 07917

e-mail: ttrangas@cc.uoi.gr

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
& ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
Αριθμ. Πρωτ. 129
Ημερομηνία 1-10-2018

Ιωάννινα, 26 Σεπτεμβρίου 2018

**ΠΡΑΚΤΙΚΟ
ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ, ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

Την Τρίτη, 25 Σεπτεμβρίου, ώρα 12:00, στην αίθουσα Β του Νέου Κτηρίου του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της δημόσιας παρουσίασης, εξέτασης και αξιολόγησης της Διδακτορικής Διατριβής της υποψήφιας Διδάκτορος κας Ανδρομάχης Λαμπριανίδου .

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

1. **Βελετζά Σταυρούλα**, Καθηγήτρια Βιολογίας
Ιατρική Σχολή Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης
2. **Χριστοφορίδης Σάββας**, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
3. **Κωλέττας Ευάγγελος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
4. **Μαραγκός Πέτρος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Αναπτυξιακής Βιολογίας,
Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
5. **Μιχαηλίδης Θεολόγος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακή Γενετική,
Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
6. **Δήμας Κωνσταντίνος**, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
7. **Φίλιου Μιχαέλα**, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας,
Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Αφού διαπιστώθηκε απαρτία σύμφωνα με τα οριζόμενα από το Νόμο 3685/2008, προσήλθε η κα Ανδρομάχη Λαμπριανίδου η οποία υποστήριξε στην Επιτροπή τη Διδακτορική της Διατριβή με τίτλο: «Διερεύνηση της ρύθμισης της

μετάφρασης του *c-myc mRNA* από πρωτεΐνες πρόσδεσης *RNA*». 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

1. **Βελετζά Σταυρούλα,**
Καθηγήτρια Βιολογίας



2. **Χριστοφορίδης Σάββας**
Καθηγητής



3. **Κωλέττας Ευάγγελος**
Αναπληρωτής Καθηγητής



4. **Μαραγκός Πέτρος**
Αναπληρωτής Καθηγητής



5. **Μιχαηλίδης Θεολόγος**
Αναπληρωτής Καθηγητής



6. **Δήμας Κωνσταντίνος**
Επίκουρος Καθηγητής



7. **Φίλιου Μιχαέλα**
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 Θεώνης Τράγκα.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με στήριξαν στην πορεία της ερευνάς μου, είτε μέσω της καθοδήγησης τους σε επιστημονικό επίπεδο είτε μέσω της ψυχολογικής συμπαράστασης.

Θα ήθελα, αρχικά, να ευχαριστήσω από καρδιάς την καθηγήτρια Θεώνη Τράγκα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα και αναλαμβάνοντας την επίβλεψη αυτής της εργασίας. Την ευχαριστώ γιατί μέσα από τη μακροχρόνια και άψογη συνεργασία μας, με παρότρυνε να ασχοληθώ και να αγαπήσω τον τομέα της έρευνας, μου μετέδωσε πολύτιμες γνώσεις και με βοήθησε στο να αναπτύξω έναν κριτικό τρόπο σκέψης. Στάθηκε κοντά μου σε όλες τις δυσκολίες που προέκυψαν, τόσο επαγγελματικές όσο και προσωπικές. Την ευχαριστώ για την καθοδήγησή της, για τις συμβουλές της και για τις εποικοδομητικές μας συζητήσεις σε όλα τα θέματα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και τα δύο υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κ. Θεολόγο Μιχαηλίδη, Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Γενετικής του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον κ. Πέτρο Μαραγκό, Αναπληρωτή Καθηγητή Αναπτυξιακής Βιολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων που δέχτηκαν να είναι στην επιτροπή μου καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές τους κατά την διάρκεια της διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την κα. Βελετζά Σταυρούλα, Καθηγήτρια Βιολογίας Ιατρικής Σχολής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης, τον κ. Δήμα Κωνσταντίνο, Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τον κ. Κωλέττα Ευάγγελο, Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Κυτταρικής Βιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, την κα. Φίλιου Μιχαέλα, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον κ. Χριστοφορίδη Σάββα, Καθηγητή Βιολογικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Είναι τιμή μου να υποβάλλεται στην κρίση τους η διδακτορική μου διατριβή και ευχαριστώ θερμά για την διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους.

Ευχαριστώ πολύ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστήριου Βιοχημείας, τον Δρ.Κωνσταντίνο Κονιδάρη και την Χρυσούλα Κομίνη, για την φιλία και το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που δημιουργήσαμε όλα αυτά τα χρόνια. Ήμασταν μαζί σε όλη την πορεία και με βοήθησαν πολύ. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συνεργάτες που συμμετείχαν στο ερευνητικό έργο και κατέστη δυνατή η ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Τέλος, ένα ευχαριστώ είναι το ελάχιστο για τους αγαπημένους μου γονείς, τον αδερφό μου, τον σύντροφό μου και τους φίλους μου. Όπως πάντα, έτσι και σε αυτήν την διαδρομή με στήριξαν με την αγάπη τους, την υπομονή τους και την κατανόηση τους, δίνοντας μου δύναμη να συνεχίζω. Χωρίς αυτούς τίποτα απ' όλα αυτά δεν θα ήταν εφικτό.

Συντμήσεις:

4EBP1: Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1, Πρωτεΐνη πρόσδεσης στον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E.

ADP: Adenosine diphosphate, Αδενοσινοδιφωσφορικό οξύ.

ALV: Avian sarcoma leukosis virus, Ιός λευκοπάθειας σαρκώματος πτηνών.

APAF1: Apoptotic protease activating factor 1, Παράγοντας ενεργοποίησης αποπτωτικής πρωτεάσης 1.

AUF1: AU-rich element RNA-binding protein 1, Πρωτεΐνη πρόσδεσης 1 σε AU περιοχές.

ATP: Adenosine-5'-triphosphate, 5'-Τριφωσφορική αδενοσίνη.

B MYC: Brain expressed myelocytomatosis oncogene,

BCL2: B-cell lymphoma 2, γονίδιο Β-κυτταρικού λεμφώματος 2.

BSA: Bovine serum albumin, Αλβουμίνη ορού βοός.

B-TrCP1/ BTRC: Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase, E3 λιγάση ουβικιτίνης που περιέχει μοτίβα β- transducin .

BTYNB: 2-{{[(5-bromo-2-thienyl)methylene]amino} benzamide, (2 - {{[(5-βρωμο-2-θειενυλ) μεθυλενο] αμινο} βενζαμίδιο).

cDNA: Complementary DNA, Συμπληρωματικό DNA.

CDS: Coding sequence, Κωδική περιοχή.

ciAP1: Cellular inhibitor of apoptosis protein 1, Πρωτεΐνη κυτταρικής αναστολής της απόπτωσης 1.

C-MYC: Cellular expressed myelocytomatosis oncogene .Ογκογονίδιο myc.

CpG: 5'-C-phosphate-G-3', 5'-C-φωσφορικό-G-3 '.

CRD-BP1: Coding region determinant binding protein 1, Πρωτεΐνη πρόσδεσης στην καθοριστική περιοχή αστάθειας της κωδικής περιοχής 1.

C_T: Threshold cycle, Κύκλος όριο(κατώφλι).

CTD: C-terminal domain, Καρβοξυτελικό άκρο.

CTNNB1: Catenin Beta 1,β-κατενίνη.

DEPTOR: DEP Domain Containing MTOR Interacting Protein, Πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το mTOR και περιέχει περιοχή DEP.

DHX9: DEH-Box Helicase 9, DEH-Box ελικάση 9.

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium, Τροποποιημένο θρεπτικό μέσο Eagle.

DMSO: Dimethyl sulfoxide, Διμέθυλσουλφοξείδιο.

DNA: Deoxyribonucleic acid, Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ.

DNase I: Deoxyribonuclease I, Δεοξυριβονουκλεαση I.

DNase II: Deoxyribonuclease II, Δεοξυριβονουκλεαση II.

DNMTs: DNA Methyltransferases, Μεθυλοτρανσφεράσες σε DNA.

DOC: Sodium deoxycholate, Δεοξυχολικό νάτριο.

E2F1: E2 transcription factor 1, E2 μεταγραφικός παράγοντας 1.

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ.

EEF2: Eukaryotic elongation factor 2, Ευκαρυωτικός παράγοντας επιμήκυνσης 2.

EGTA: ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, αιθυλενογλυκόλη-δι(β-αμινοαιθυλ αιθέρας) -N, N, N', N'-τετραοξικό οξύ.

eIF2C: Protein argonaute-1, Risc catalytic component, Πρωτεΐνη συμπλόκου Risc.

eIFs: Eukaryotic initiation factors, Ευκαρυωτικοί παράγοντες έναρξης.

ENO1: Enolase 1, Ενολάση 1.

ERK: Extracellular signal-regulated kinase, Κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια σήματα.

FBS: Fetal bovine serum, Ορός εμβρύου βοός.

FGR: Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog, Ομόλογο ογκογονιδίου του σαρκώματος αιλουροειδών Gardner-Rasheed .

FMRP: Fragile X mental retardation protein, Πρωτεΐνη σχετιζόμενη με το σύνδρομο νοητικής δυσλειτουργίας.

G3BP: Ras GTPase-activating protein-binding protein 1, Πρωτεΐνη πρόσδεσης που ενεργοποιεί την GTPase Ras.

GCN5: Human histone acetyltransferase (HAT) GCN5, Ανθρώπινη ακετυλοτρανσφεράση ιστόνης GCN5.

Glut 1: Glucose transporter 1, Μεταφορέας γλυκόζης1.

GTFs: General transcription factors, Γενικοί παράγοντες μεταγραφής.

HCK: Hematopoietic cell kinase, Κινάση αιμοποιητικών κυττάρων.

HIF-1 : Hypoxia-inducible factor 1, Μεταγραφικός παράγοντας που ενισχύεται κατά την υποξία.

HMGA2: High-mobility group AT-hook 2, Πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας με περιοχή πρόσδεσης σε AT.

HMTs: Histone Methyltransferases, Μεθυλοτρανσφεράσες ιστονών.

HNRNPU: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U, Ετερογενής πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη U.

HRP: Horseradish peroxidase, Υπεροξειδάση της αγριοραφανίδας.

HS: Hypersensitive sites, Περιοχή υπερευαίσθησίας.

HSCs: Hematopoietic stem cells, Αιματοποιητικά βλαστοκύτταρα.

HSF: Heat shock factors, Παράγοντας θερμικού σοκ.

HSP70: 70 kilodalton heat shock protein, 70 kilodalton πρωτεΐνη θερμικού σοκ.

HuR (ELAVL1): Human antigen R, Ανθρώπινο αντιγόνο R.

HK2: Hexokinase-2, Εξοκινάση 2.

IGF2: Insulin-like growth factor 2, Αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης τύπου 2.

IGF2BP1: Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1, Πρωτεΐνη πρόσδεσης 1 στο IGF2 mRNA.

IgH: Immunoglobulin heavy chain, Βαριά αλυσίδα ανοσοσφαιρίνης.

IL-2, 3, 6, 12: Interleukin-2,3,6,12, Ιντερλευκίνη-2,3,6,12.

IMP1: IGF2 mRNA-binding protein 1, Πρωτεΐνη πρόσδεσης στο IGF2 mRNA 1.

IRES: Internal ribosome entry, Εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος.

ITAFs : IRES trans-acting factors, trans παράγοντες που δρουν στο IRES.

IMP2: IGF2 mRNA-binding protein 2, Πρωτεΐνη πρόσδεσης στο IGF2 mRNA 2.

KLF4: Kruppel-like factor 4, Παράγοντας 4 τύπου Kruppel.

LCK: Lymphocyte-specific protein kinase, Λεμφοκυτταρική κινάση.

let7: lethal 7.

LOX: Lipoxygenase, Λιποξυγενάση.

m⁷G: 7-Methylguanosine, 7-μεθυλογουανοσίνη.

MAPK4: Mitogen-Activated Protein Kinase 4, Κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα 4.

MDR1: Multidrug resistance 1, Γονίδιο αντοχής πολλαπλών φαρμάκων 1.

MEK: Mitogen-activated protein kinase, Κινάσες που ρυθμίζονται από μιτογόνα.

Met-tRNAi: Transfer RNA carrying methionine, Μεταφορικό RNA που φέρει μεθειονίνη.

miRNA: MicroRNA, μικρο-RNA.

MKI67: Marker of proliferation Ki67, Δείκτης πολλαπλασιασμού Ki67.

mLST8: Mammalian lethal with SEC13 protein 8,

mSIN1/MAPKAP1 :Mitogen activated protein kinase associated protein1, Πρωτεϊνική κινάση 1 που ενεργοποιείται από μιτογόνο .

mTORC1: Mammalian target of rapamycin complex 1, Στόχος ραπαμυκίνης στα θηλαστικά σύμπλοκο 1

mTORC2: Mammalian target of rapamycin complex 2, Στόχος ραπαμυκίνης στα θηλαστικά σύμπλοκο 2

N MYC: Neuroblastoma expressed myelocytomatosis oncogene.

NF-κB: Nuclear factor kappa B, Πυρηνικός παράγοντας κάπα Β.

NTD: N-terminal domain, Αμινοτελικό άκρο.

Oct4: Octamer-binding transcription factor 4, Μεταγραφικός παράγοντας Oct4.

PABP/ PABPC1: Poly-A binding protein, Πρωτεΐνη πρόσδεσης στην πολυ-A ουρά.

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis, Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

PBS: Phosphate buffered saline, Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων.

PCR: Polymerase chain reaction, Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

PDGF: Platelet-derived growth factor, Αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από αιμοπετάλια.

PFKM: Phosphofructokinase, Φωσφοφρουκτοκινάση.

PIPES: Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid), πιπεραζινο-N, N'-δισ (2-αιθανοσουλφονικό οξύ).

pre- miRNA: Precursor microRNA, Πρόδρομο μικροRNA.

pri-miRNA: Primary microRNA, Πρωτογενές μικροRNA.

P-TEF: Positive transcription elongation factor, Θετικός συντελεστής επιμήκυνσης της μεταγραφής.

PTEN: Phosphatase and tensin homolog, Ομόλογο φωσφατάσης και τενσίνης.

RAPTOR: Regulatory-associated protein of mTOR, Ρυθμιστική-πρωτεΐνη που συνδέεται του mTOR

RBM24: RNA Binding Motif Protein 24, Πρωτεΐνη πρόσδεσης RNA μοτίβο 24.

RBM38: RNA Binding Motif Protein 38, Πρωτεΐνη πρόσδεσης RNA μοτίβο 38.

RBP: RNA binding protein, Πρωτεΐνη πρόσδεσης σε RNA.

RICTOR: Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin, Ο μη ευαίσθητος στη ραπαμυκίνη εταίρος του στόχου θηλαστικών της ραπαμυκίνης.

RISC: RNA induced silencing complex, Σύμπλεγμα αποσιώπησης επαγόμενο από RNA.

RNA: Ribonucleic acid, Ριβονουκλεϊκό οξύ.

RNP: Ribonucleoprotein , Ριβονουκλεοπρωτεΐνη.

RRM: RNA recognition motif, Μοτίβο αναγνώρισης RNA.

RT: Reverse transcriptase, Αντίστροφη μεταγραφάση.

S6K1: Ribosomal protein S6 kinase beta-1, Ριβοσωμική πρωτεϊνική S6 κινάση β1.

SDS: Sodium dodecyl sulfate, Δωδεκακυλοθειικό νάτριο.

siRNA: Small-interfering RNA, Μικρό παρεμβαλλόμενο RNA.

Sox 2: Sex determining region Y-box 2, γονίδιο Sox2.

Src1: Src kinase inhibitor I, Αναστολέας της Src κινάσης.

SYNCRIP: Synaptotagmin Binding Cytoplasmic RNA Interacting Protein, Πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματικά RNA.

$t_{1/2}$: Half-life, Χρόνος ημίσειας ζωής.

TBP: TATA-binding protein , Πρωτεΐνη πρόσδεσης στην αλληλουχία TATA.

TBS: Tris buffered saline, Ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων με Tris.

TBS-T: Tris buffered saline Tween 20, Ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων με Tris και Tween 20.

TEMED: N',N',N',N' Tetramethyl-ethylene1,2-diamine, N',N',N',N' Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη.

TRRAP: Transformation-transactivation domain-associated protein, Πρωτεΐνη που σχετίζεται με το μετασχηματισμό και την ενεργοποίηση.

TAE: Tris-acetate-EDTA buffer, διάλυμα Tris-οξικού οξέος- αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος.

UTR: Untranslated region, αμετάφραστη περιοχή.

Vg1-RBP: Vg1 RNA binding protein, πρωτεΐνη πρόσδεσης στο Vg1 RNA.

Wnt: Wingless signalling pathway, σηματοδοτικό μονοπάτι Wingless.

YBX1: Y box binding protein 1, Πρωτεΐνη πρόσδεσης Y box 1.

ZBP1: Zipcode-binding protein-1, Πρωτεΐνη πρόσδεσης 1 αλληλουχίας Zipcode.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

σελίδα

I.ΕΙΣΑΓΩΓΗ:	19
I.1.Το ογκο-γονίδιο <i>c-myc</i> .	20
I.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά <i>c-myc</i> . Δομή και βιολογική δράση γονιδίου.	20
I.1.2 Δομή και βιολογική δράση <i>Myc</i> πρωτεϊνών.	21
I.1.2.1 Το <i>c-myc</i> ενέχεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.	23
I.1.2.2 Το <i>c-myc</i> ρυθμίζει ένα δίκτυο <i>miRNAs</i> .	24
I.1.2.3 Το <i>c-myc</i> διεγείρει την διαδικασία της γλυκόλυσης.	25
I.1.2.4 Το <i>c-myc</i> διεγείρει την διαδικασία της μιτοχονδριακής βιογένεσης.	25
I.1.2.5 Το <i>c-myc</i> επηρεάζει την κυτταρική διαφοροποίηση.	26
I.1.2.6 Το <i>c-myc</i> εμπλέκεται στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση).	27
I.2 Τα επίπεδα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης και η ρύθμιση της έκφρασης του <i>c-myc</i> .	27
I.2.1 Μεταγραφική ρύθμιση.(<i>Regulation of transcription</i>).	28
I.2.1.1 Τροποποιήσεις σε επίπεδο χρωματίνης.	28
I.2.1.2 Ρύθμιση της έναρξης της μεταγραφής.	30
I.2.1.3 Ρύθμιση για την ολοκλήρωση της μεταγραφής.	34
I.2.2 Μετα-μεταγραφική ρύθμιση. (<i>Post-transcriptional regulation</i>).	36
I.2.2.1 Ρύθμιση της σταθερότητας και της μεταφρασσιμότητας του μηνύματος <i>mRNA</i> .	36
I.2.2.2 Ρύθμιση της μετάφρασης	40
I.2.2.2.1 Ρύθμιση της έναρξης της μετάφρασης.	41
I.2.2.2.2 Ο έλεγχος της επιμήκυνσης των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών και του τερματισμού της μετάφρασης.	43
I.2.3 Οι <i>cis</i> - ρυθμιστικές περιοχές και <i>trans</i> παράγοντες που συμμετέχουν στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση του <i>c-myc mRNA</i> .	44
I.2.3.1 Η 5'αμετάφραστη περιοχή του <i>c-myc mRNA</i> .	44
I.2.3.2 Η 3'αμετάφραστη περιοχή του <i>c-myc mRNA</i> (3' UTR).	45
I.2.3.2.3 Η αλληλουχία αστάθειας εντός της κωδικής περιοχής του <i>c-myc mRNA</i> .	47
I.2.4 Μετα-μεταφραστική τροποποίηση.(<i>Post-translational modifications</i>).	48
I.3 <i>c-myc</i> και καρκινογένεση.	49
I.4 Η οικογένεια των <i>IMPs</i> πρωτεϊνών.	51
I.4.1 Η ρύθμιση της έκφρασης των <i>IMPs</i> .	52
I.4.2 Ο μηχανισμός δράσης των πρωτεϊνών <i>IMPs</i> .	52
I.4.3 Τα <i>mRNAs</i> στόχοι και οι βιολογικές λειτουργίες της πρωτεΐνης <i>IMP1</i> .	54
I.4.4 Η μελέτη της έκφρασης της <i>IMP1</i> στον καρκίνο.	56
I.5 Σηματοδοτικά μονοπάτια.	59
I.5.1 Η οικογένεια των <i>Src</i> κινάσων.	60
I.5.2 Το σηματοδοτικό μονοπάτι του <i>mTOR</i> .	61
Σκοπός	63
II.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ :	65
II.1. Κυτταροκαλλιέργειες.	66
II.1.1 Ανακαλλιέργεια κυττάρων.	66
II.1.2 Μέτρηση πλήθους κυττάρων / ποσοστού βιωσιμότητας κυττάρων.	67
II.1.3 Κατάψυξη κυττάρων.	68
II.1.4 Απόψυξη κυττάρων.	68
II.1.5 Αναστολείς της δράσης κινάσων και αντιδραστήρια.	68
II.2. <i>In vivo</i> μελέτη της δράσης των ουσιών <i>Torin1</i> , <i>AZD0530</i> και του διαδοχικού συνδυασμού τους με χρήση ξενομοσχεύματος (<i>xenograft</i>).	69
II.3. Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων <i>E.Coli</i> και μετασχηματισμός.	70
II.3.1 Παρασκευή επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E.Coli</i> .	70
II.3.2 Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων με πλασμιδιακό <i>DNA</i> .	70
II.3.3 Απομόνωση πλασμιδιακού <i>DNA</i> από καλλιέργεια μετασχηματισμένων βακτηρίων <i>E.Coli</i> μικρής κλίμακας(<i>mini-prep</i>).	71
II.3.4 Απομόνωση πλασμιδιακού <i>DNA</i> από καλλιέργεια μετασχηματισμένων βακτηρίων	72

<i>E. Coli</i> μεγάλης κλίμακας.	
II.4. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης.	73
II.5. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων.	74
II.6. Απομόνωση γενωμικού DNA από ευκαρυωτικά κύτταρα.	74
II.7. Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων <i>in vitro</i> με γενετικό υλικό (Transfection).	75
II.7.1 Παροδική διαμόλυνση(transient transfection).	77
II.7.2 Αποσιώπηση της έκφρασης της IMP1 με μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA.	78
II.7.3 Παροδική συν-διαμόλυνση κυττάρων(transient co-transfection).	80
II.7.4 Παροδική συν-διαμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA και με μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA (Co-transfection of Plasmid DNA and siRNA).	80
II.7.5 Σταθερή διαμόλυνση HeLa κυττάρων με εξωγενές γενετικό υλικό.	80
II.8. Προσδιορισμός με φθορισμομετρία των επιπέδων Firefly και Renilla Λουσιφερασών.	81
II.9. Προσδιορισμός επιπέδων έκφρασης mRNA γονιδίων.	82
II.9.1 Απομόνωση ολικού RNA και προσδιορισμός της συγκέντρωσης του.	83
II.9.2 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου(qRT-PCR).	83
II.9.3 Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου στόχου με την μέθοδο των $C_T^{(2^{-\Delta(\Delta CT)})}$.	86
II.10. Υπολογισμός μεταφρασιμότητας.	86
II.11. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου και ανοσοαποτύπωση κατά Western.	87
II.11.1 Λύση κυττάρων και εκχύλιση ολικών πρωτεϊνών.	88
II.11.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με την χρήση της μεθόδου Bradford.	88
II.11.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE).	89
II.11.4 Ημί-ξηρη μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.	90
II.11.5 Ανοσοπροσδιορισμός των ακινητοποιημένων στην μεμβράνη πρωτεϊνών.	91
II.12. Ανοσοφθορισμός, συνεστιακή μικροσκοπία και λήψη εικόνων.	93
II.12.1 Άμεσος ανοσοφθορισμός (direct immunofluorescence).	95
II.12.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός(indirect immunofluorescence).	95
II.12.3 Συνεστιακή μικροσκοπία και λήψη εικόνων.	95
II.12.4 Χρώση πυρήνα με φθορίζουσα χρωστική 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη (DAPI).	96
II.13 Έλεγχος της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης με χρήση κυτταρομετρίας ροής.	97
II.13.1 Ανάλυση της πορείας του κυτταρικού κύκλου ευκαρυωτικών κυττάρων.	97
II.13.2 Ανίχνευση αποπτωτικών κυτταρικών πληθυσμών έπειτα από χρώση με Αννεξίνη A5.	98
II.13.3 Ταυτόχρονη χρώση κυττάρων με Αννεξίνη A5 και αντίσωμα anti-MYC.	99
II.14. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.	100
III.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:	101
III.1. Η επίδραση της αναστολής της φωσφορυλίωσης στην τυροσίνη 396 της IMP1, μέσω της Src κινάσης, στην μετα-μεταγραφική πορεία του <i>c-myc</i> mRNA.	103
III.1.1 Η επίδραση στα χιμαιρικά μετάγραφα.	103
III.1.2 Η επίδραση στα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς <i>c-myc</i> .	107
III.1.3 Η αποκατάσταση της λειτουργίας της Src κινάσης.	109
III.1.4 Η επίδραση στην ενδοκυττάρια χωροθέτηση και τον εντοπισμό της πρωτεΐνης IMP1.	114
III.1.5 Η επίδραση στην φυσιολογία των κυττάρων.	116
III.2. Η επίδραση της αναστολής της φωσφορυλίωσης στην σερίνη 181 της IMP1, μέσω της κινάσης mTORC2, στην μετα-μεταγραφική πορεία του <i>c-myc</i> mRNA.	118
III.2.1 Η επίδραση στα χιμαιρικά μετάγραφα.	119
III.2.2 Η επίδραση στα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς <i>c-myc</i> .	120
III.2.3 Η επίδραση στη φυσιολογία των κυττάρων.	123
III.3. Ο έλεγχος της συμβολής της IMP1 στις επιπτώσεις της αναστολής της δράσης Src και mTORC2, στα επίπεδα έκφρασης του <i>c-myc</i> .	128
III.3.1 Η επίδραση στα χιμαιρικά μετάγραφα.	129
III.3.2 Η επίδραση στα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς <i>c-myc</i> .	130

III.4. Η επίδραση της διαδοχικής αναστολής της φωσφορυλίωσης, στην τυροσίνη 396 και στην σερίνη 181 της πρωτεΐνης IMP1.	130
III.4.1 Η επίδραση στα χημειοκίβητα μετάγραφα.	132
III.4.2 Η επίδραση στα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς c-myc.	132
III.4.3 Η επίδραση στη φυσιολογία των κυττάρων.	133
III.5 Ο έλεγχος της συμβολής της IMP1 στις επιπτώσεις της διαδοχικής αναστολής της δράσης Src και mTORC2, στην βιωσιμότητα.	141
III.6. In vivo μελέτη των ουσιών TORIN1, AZD0530 και του συνδυασμού τους.	143
IV.ΣΥΖΗΤΗΣΗ:	147
IV.1. Ανάλυση της επίδρασης της φωσφορυλίωσης της IMP1 στην τυροσίνη 396, στα επίπεδα της μεταφρασιμότητας του c-myc mRNA.	151
IV.2. Ανάλυση της επίδρασης της φωσφορυλίωσης της IMP1 στην σερίνη 181 στην μεταφρασιμότητα του c-myc mRNA.	153
IV.3. Η ενίσχυση της μετάφρασης του c-myc mRNA μπορεί να συνεισφέρει ένα εναλλακτικό εργαλείο για τη εξάλειψη καρκινικών κύτταρων που εκφράζουν de novo την IMP1	157
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	161
ABSTRACT	165
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	169

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

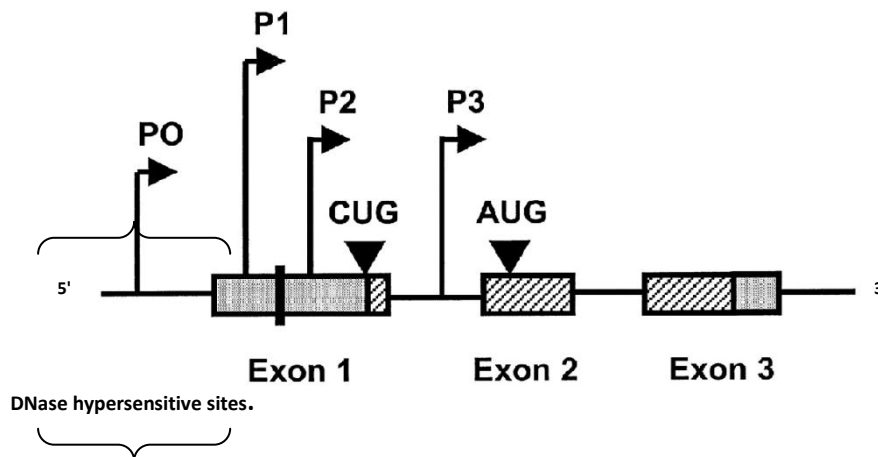
Η πρωτεΐνη MYC (PDB: P 01106 MYC HUMAN) παίζει διαφορετικούς ρόλους σε ένα πλήθος κυτταρικών διεργασιών. Το πρωτο-ογκογονίδιο *c-myc* είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης, η απορυθμισμένη έκφραση του οποίου εμπλέκεται στην καρκινογένεση. Το *c-myc* ασκεί το ρόλο του κυρίως μέσω της διαμόρφωσης των επιπέδων έκφρασής του. Έχει σημασία πότε και σε ποιό βαθμό εκφράζεται το *c-myc* και έχει δειχθεί ότι ακόμα και μικρές διακυμάνσεις στα επίπεδα έκφρασής του μπορεί να διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο τόσο στις φυσιολογικές όσο και στις παθολογικές διαδικασίες που ρυθμίζονται από αυτό το γονίδιο.

1. Το ογκο-γονίδιο *c-myc*.

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά *c-myc*.

Το *c-myc* (κυτταρικό-cellular *myc*) ανήκει στην οικογένεια γονιδίων *Myc* μαζί με τα *N-myc*, *L-myc* και *B-myc*, η έκφραση των οποίων εντοπίστηκε σε νευροβλάστωμα, σε καρκίνο του πνεύμονα και στον εγκέφαλο αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες που εκφράζουν έχουν παρόμοιες μοριακές λειτουργίες και εν δυνάμει ογκογόνο δράση.

Αρχικά το ογκο-γονίδιο *c-myc* αναγνωρίστηκε ως το κυτταρικό ομόλογο του ιϊκού *v-myc* (myelocytomatosis viral ογκογονίδιο) της οικογένειας ALV (avian leukosis virus), που ευθύνεται για την λευχαιμία των πτηνών. Στην αλληλουχία *myc* του ALV και άλλων ρετροϊών αποδόθηκε η έναρξη των καρκινικών κυτταρικών εξαλλαγών (Dudley *et al.*, 2002). Το γονίδιο *c-myc* βρέθηκε ότι μεταγράφεται σε πολλούς οργανισμούς και παρουσιάζει εξελικτική σταθερότητα ανάμεσα στα διάφορα είδη. Στον άνθρωπο εντοπίζεται στο 8^ο ζεύγος χρωμοσωμάτων. Το γονίδιο *c-myc* (Εικόνα 1) αποτελείται από 3 εξώνια. Στο δεύτερο και στο τρίτο εξώνιο αποδίδεται η συγκρότηση των κωδικών αλληλουχιών από τις οποίες προκύπτουν δύο MYC πρωτεΐνες. Το γονίδιο *c-myc* διαθέτει πολλά σημεία έναρξης της μεταγραφής και τέσσερις υποκινητές (P0, P1, P2, P3) από τους οποίους προκύπτουν μετάγραφα μεγέθους 3.1, 2.4, 2.2 και 2 kb, αντίστοιχα. Από τους υποκινητές P1 και P2 προκύπτει το σύνολο σχεδόν του *c-myc* mRNA στα φυσιολογικά κύτταρα. Από τον P0, που εδράζεται 650bp πριν από τον P1, και τον P3 που βρίσκεται στο τέλος του πρώτου ιντρονίου απουσιάζει η περιοχή πρόσδεσης της RNA πολυμεράσης II (TATA box) και τα μετάγραφα που προκύπτουν αντιστοιχούν σε λιγότερο από 5% του συνόλου. Από το 5' άκρο μέχρι και το πρώτο ιντρόνιο εδράζουν *cis* αλληλουχίες που παίζουν ρόλο στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο στάδιο της μεταγραφής (Spencer *et al.*, 1991).



Εικόνα 1: Αναπαράσταση της δομής του ανθρώπινου γονιδίου *c-myc* στο 8^ο χρωμόσωμα. Στην εικόνα φαίνονται τα τρία εξώνια, οι θέσεις των τεσσάρων υποκινητών και οι θέσεις υπερευαισθησίας σε DNase I (McGuffie *et al.*, 2000).

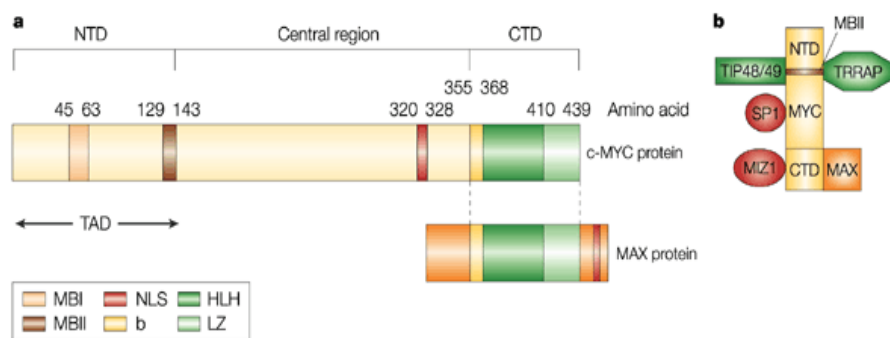
1.2 Δομή και βιολογική δράση πρωτεϊνών MYC.

Δύο προϊόντα προκύπτουν από την μετάφραση του *c-myc* mRNA με μέγεθος 64 και 67 kDa. Η μετάφραση της πρωτεΐνης μεγέθους 67kDa ξεκινάει από ένα CUG κωδικόνιο έναρξης στο 3' άκρο του πρώτου εξωνίου. Με το ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης ξεκινάει και η μετάφραση της πρωτεΐνης μεγέθους 64kDa, από ένα AUG κωδικόνιο έναρξης καθοδικά του CUG, στην αρχή του δεύτερου εξωνίου. Οι δύο πρωτεΐνες είναι λοιπόν πανομοιότυπες με εξαίρεση τα 15 αμινοτελικά αμινοξέα της πρωτεΐνης μεγέθους 67kDa, στα οποία δεν έχει αποδοθεί κάποια διαφορετική λειτουργία (Dang *et al.*, 2012).

Η κύρια πρωτεΐνη MYC μεγέθους 64kDa, είναι κυρίως πυρηνική, λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας και ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων. Η MYC είναι μια πρωτεΐνη εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Αποτελείται από τρεις περιοχές: ένα σφαιρικό αμινοτελικό άκρο (N-terminal domain -NTD, αμινοξέα 1 έως 203), μία κεντρική μη δομημένη περιοχή (αμινοξέα 204 έως 237) και ένα καρβοξυτελικό άκρο που φέρει κυρίως αλληλουχίες για πρόσδεση σε DNA (c-terminal domain- CTD, αμινοξέα 238 έως 439). Αναλυτικά, στο αμινοτελικό άκρο της φέρει μια ρυθμιστική περιοχή της μεταγραφής. Τα 150 αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου του μορίου περιέχουν υψηλά συντηρημένες περιοχές που χαρακτηρίζονται ως Myc Boxes I και II, ακολουθούμενα από το Myc Box III και IV. Τα Myc Boxes είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων γιατί σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες συν ενεργοποιητές όπως

Εισαγωγή

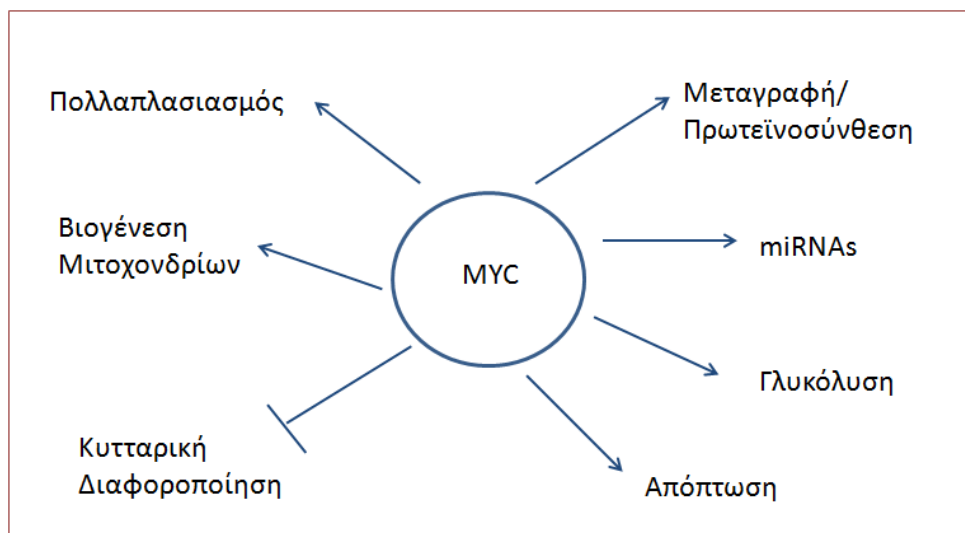
τις TRRAP, GCN5 και TBP (Liu *et al.*,2003). Το αμινοτελικό άκρο της MYC πρωτεΐνης ακολουθεί η περιοχή που αποτελεί σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal,NLS) της πρωτεΐνης. Το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης αποτελείται από τρεις δομικές περιοχές. Αρχικά αποτελείται από μια σειρά βασικών αμινοξέων (basic region),ακολουθούν αμινοξέα σε διαμόρφωση δύο α-ελίκων που διαχωρίζονται από μια θηλιά (H-L-H) και στην συνέχεια αμινοξέα σε διαμόρφωση φερμουάρ-λευκίνης (leucine-zipper) (Εικόνα 2α). Η MYC πρωτεΐνη, μέσω των δομών αυτών, αλληλεπιδρά με την MAX πρωτεΐνη, διμερίζεται και από κοινού έχουν την ικανότητα πρόσδεσης σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA που χαρακτηρίζονται ως E-boxes, όπως η 5'-CACGTG-3' αλληλουχία (Park *et al.*,2004). Μεταλλάξεις που επηρεάζουν το καρβοξυτελικό άκρο καθιστούν το μόριο ανενεργό (Grinberg *et al.*,2004).Η πρωτεΐνη Max αλληλεπιδρά και με πρωτεΐνες μιας άλλης οικογένειας, της MAD/MXII. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τους μεταγραφικούς καταστολείς MAD1, MXII, MAD3 και MAD4. Μέσω του διμερισμού τους με τη MAX καταστέλλουν την μεταγραφή, καθώς τα σύμπλοκα τροποποιούν τη χρωματίνη μέσω πρόσδεσης στα E-boxes των γονιδίων-στόχων τους, επομένως δρουν ανταγωνιστικά με τη MYC. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη MYC μπορεί να καταστέλλει την μεταγραφή γονιδίων στόχων του Miz1 όταν προσδένεται με αυτόν τον μεταγραφικό παράγοντα (Εικόνα 2β) (Pelengaris *et al.*,2002). Η διαμόρφωση λοιπόν της πρωτεΐνης MYC, καθιστά σαφές ότι ενέχεται στην ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής δρώντας κατασταλτικά για 10-25% των στόχων της (Patel *et al.*,2004).



Nature Reviews | Cancer

Εικόνα 2:Δομή της ανθρώπινης πρωτεΐνης MYC.Η καρβοξυτελική περιοχή (CTD) της πρωτεΐνης φέρει το μοτίβο βασικών αμινοξέων (BR), έλικας-βρόχου-έλικας (HLH) και φερμουάρ λευκίνης (LZ) για διμερισμό με την MAX και δέσμευση των ετεροδιμερών MYC-MAX στο DNA. Η αμινοτελική περιοχή (NTD) φιλοξενεί τα διατηρημένα «κουτιά Myc» I και II (MBI και MBII),τα οποία είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων c-MYC b) Οι πρωτεΐνες TIP48 και TIP49 αλληλεπιδρούν με το NTD του c-MYC και εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης μέσω υδρολύσεως ATP και δράση ελικάσης. Οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση, όπως η MIZ1, αλληλεπιδρούν με το CTD του c-MYC, ενώ το SP1 αλληλεπιδρά με την κεντρική περιοχή του c-MYC (Pelengaris *et al.*,2002).

Η πρωτεΐνη MYC σε φυσιολογικές συνθήκες λειτουργεί ως αισθητήρας ανταποκρινόμενος σε ενδοκυττάρια σήματα και μέσω του μεταγραφικού ελέγχου που ασκεί σε γονίδια-στόχους εμπλέκεται σε βιολογικές διαδικασίες που καθορίζουν την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση κ.α. Γενικά, ρυθμίζει μεγάλες οικογένειες γονιδίων που συμπεριλαμβάνουν παράγοντες μεταγραφής και γονίδια που συμμετέχουν στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, με αποτέλεσμα να έχει την ικανότητα να ασκεί συντονισμένες αλλαγές στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στον κυτταρικό μεταβολισμό. Επίσης έχει μελετηθεί η επίδρασή της στην έκφραση *microRNAs*. Τα αποτελέσματα της έκφρασης του *c-myc* εμφανίζονται στην Εικόνα 3 και επηρεάζουν βασικές δραστηριότητες των κυττάρων.



Εικόνα 3: Σχηματική απόδοση των πλειοτροπικών επιδράσεων της έκφρασης του *c-myc*. Τα επίπεδα της MYC ενέχονται και επηρεάζουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες.

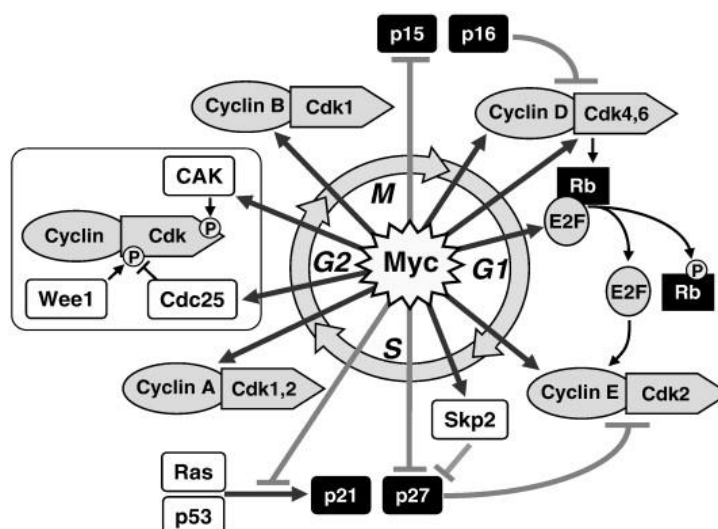
Συνοπτικά:

➤ 1.2.1 Η MYC ενέχεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου

Η MYC εμπλέκεται στη ρύθμιση των οδών μεταγωγής σήματος που προάγουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό. Μια βασική λειτουργία της είναι ο έλεγχος της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου καθώς η αλλαγή των επιπέδων έκφρασής της αποτελεί μία από τις άμεσες κυτταρικές αποκρίσεις σε διάφορα εξωκυττάρια σήματα. Τα φυσιολογικά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα εκφράζουν χαμηλά επίπεδα *c-myc* mRNA και πρωτεΐνης. Με

Εισαγωγή

την επίδραση ενός μιτογόνου ερεθίσματος επάγονται γρήγορα τόσο η μεταγραφή *c-myc* mRNA όσο και η έκφραση της πρωτεΐνης και τα κύτταρα εισέρχονται στην G₁ φάση του κυτταρικού κύκλου. Από αυτό το σημείο και μετά, τα επίπεδα της MYC επανέρχονται στα αρχικά επίπεδα. Έχει χαρακτηριστεί ως η κινητήρια δύναμη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η πρωτεΐνη MYC ρυθμίζει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου προωθώντας και συντονίζοντας τις αλλαγές στην έκφραση μεγάλου αριθμού γονιδίων. (Miller *et al.*,2012). Τα γονίδια των παραγόντων έναρξης της μετάφρασης eIF4E και eIF2a, για παράδειγμα, τα επίπεδα έκφρασης των οποίων ρυθμίζουν τη διαδικασία, έχει αποδειχτεί ότι αποτελούν άμεσο στόχο του *c-myc* (Jones *et al.*,1996). Στην Εικόνα 4 παρουσιάζονται κάποια γονίδια-στόχοι της MYC. Η συντονισμένη ρύθμιση των επιπέδων έκφρασής τους προωθεί τον κυτταρικό κύκλο.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση των φάσεων κυτταρικού κύκλου και των κύριων πρωτεϊνών-ρυθμιστών του. Παρουσιάζεται η επιρροή της MYC στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, μέσω της επαγωγής ή της καταστολής γονιδίων στόχων (Bretones *et al.*,2015).

➤ 1.2.2 Η MYC ρυθμίζει ένα δίκτυο miRNAs.

Τα μικροRNA (miRNA) είναι μια οικογένεια μορίων RNA, μεγέθους 18-24 νουκλεοτιδίων συνήθως, τα οποία έχουν εμφανιστεί ως μια κατηγορία μετάγραφων που ρυθμίζονται και από την MYC. Τα miRNA ρυθμίζουν την σταθερότητα και τη μεταφρασιμότητα των mRNA στόχων τους. Τα πρωτογενή μετάγραφα (pri-miRNAs) που προκύπτουν από την RNA πολυμεράση II, υφίστανται επεξεργασία (πολυαδενυλίωση, μάτισμα) και αναδιπλώνουν σε δομές φουρκέτας. Η απορρυθμισμένη έκφραση των miRNAs

προάγει την ογκογένεση και παρατηρείται σε καρκινικά κύτταρα. Στην MYC έχει αποδοθεί διττός ρόλος στον έλεγχο της έκφρασης των miRNA. Από την μία δεσμεύεται στους υποκινητές τους με αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασής τους. Για παράδειγμα η αύξηση των επιπέδων της MYC σε μοντέλο μελέτης Β κυτταρικού λεμφώματος καταστέλλει την έκφραση των miR-15a/16, miR-26a, miR-34a, miR-150, και miR-195. Επίσης η αύξηση της MYC καταστέλλει την έκφραση του miR-26a σε ένα μοντέλο μελέτης καρκίνου του ήπατος. Η ενίσχυση της έκφρασης αυτών των miRNA έχει αντι-πολλαπλασιαστική και προαποπτωτική επίδραση (Kota *et al.*, 2009). Από την άλλη, ενισχύει την έκφραση κάποιων miRNA. Η MYC ενεργοποιεί για παράδειγμα, άμεσα τη μεταγραφή του συμπλέγματος miR-17-92, μιας ομάδας αποτελούμενης από έξι miRNA που προάγουν τον πολλαπλασιασμό και επιταχύνουν την ογκογένεση και την αγγειογένεση. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η ρύθμιση των miRNAs είναι θεμελιώδες συστατικό της ογκογόνου δράσης της MYC. Η MYC πρωτεΐνη λοιπόν, ελέγχοντας την έκφραση ενός συνόλου miRNAs εμπλέκεται έμμεσα στην ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων τους (Chang *et al.*, 2008).

➤ **1.2.3 Η MYC διεγείρει την διαδικασία της γλυκόλυσης .**

Η πρόταση ότι η MYC διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γλυκόλυσης προήλθε από το γεγονός ότι η γαλακτική αφυδρογονάση Α (LDHA), η οποία μετατρέπει το πυροσταφυλικό σε γαλακτικό οξύ κατά την γλυκόλυση, είναι ένα από τα γονίδια-στόχους της (Shim *et al.*, 1997). Οι επόμενες εργασίες έδειξαν ότι πολλά άλλα γονίδια μεταβολισμού της γλυκόζης ρυθμίζονται άμεσα από τη MYC πρωτεΐνη. Πρόκειται για τον μεταφορέα γλυκόζης GLUT1, την εξοκινάση 2 (HK2), τη φωσφοφρουκτοκινάση (PFKM) και την ενολάση 1 (ENO1) (Dang *et al.*, 2009, Subramanian *et al.*, 2000). Τα αυξημένα επίπεδα MYC και η θετική ρύθμιση αυτών των γονιδίων, σε συνεργασία με τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1, προάγουν το φαινόμενο Warburg, δηλαδή την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να μετατρέπουν τη γλυκόζη σε γαλακτικό οξύ χωρίς την εισαγωγή στον κύκλο του κιτρικού οξέος ακόμη και σε συνθήκες επάρκειας οξυγόνου. Ο μηχανισμός αυτός είναι λιγότερο αποτελεσματικός από την οξειδωτική φωσφορυλίωση όσον αφορά την παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης, αλλά οδηγεί στην αύξηση της παραγωγής μεταβολιτών που μπορεί να χρειαστούν τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (Kim *et al.*, 2007).

➤ **1.2.4 Η MYC διεγείρει την διαδικασία της μιτοχονδριακής βιογένεσης.**

Η έκφραση της πρωτεΐνης MYC ενέχεται στον σχηματισμό λειτουργικών μιτοχονδρίων. Χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο Β-κύτταρων , αποδείχθηκε ότι η

Εισαγωγή

μιτοχονδριακή βιογένεση εξαρτάται από την έκφραση του *c-myc* (Li *et al.*, 2005). Επιπρόσθετα, η αυξημένη έκφραση MYC πρωτεΐνης ενισχύει και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, εκτός από τον αριθμό τους. Η αύξηση της λειτουργικότητας των μιτοχονδρίων παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την επιβίωση. Η αύξηση της ενδογενούς MYC κατά την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο διπλασιάζει την οξείδωση της γλυκόζης στα μιτοχόνδρια, ενώ η έκτοπη υπερέκφραση της MYC την αναστέλλει όπως αναφέρθηκε (Morrish *et al.*, 2010).

➤ **1.2.5 Η MYC αναστέλλει την κυτταρική διαφοροποίηση.**

Η οικογένεια πρωτοογκογονιδίων *Myc* διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην πορεία των βλαστοκυττάρων και των προγονικών κυττάρων είτε για να διατηρηθούν στην ίδια κατάσταση είτε για να διαφοροποιηθούν. Ο γενικός κανόνας που επικρατεί είναι ότι η παρουσία της MYC αναστέλλει τη διαφοροποίηση και προάγει τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων. Παράδειγμα αποτελεί η μελέτη σε αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα, όπου η αποσιώπηση της MYC οδηγεί σε πρόωρη νευρωνική διαφοροποίηση, ενώ η υπερέκφραση της MYC "κλειδώνει" τα κύτταρα σε μια αδιαφοροποίητη και ανορθόδοξα πολλαπλασιαστική κατάσταση (Iavarone *et al.*, 2014). Υπάρχουν όμως γενετικές αποδείξεις για μια απροσδόκητη λειτουργία της πρωτεΐνης MYC στην ομοίωση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (HSCs). Η αποσιώπηση της έκφρασης του *c-myc* στον μυελό των οστών έχει σαν αποτέλεσμα κυτταροπενία και συσσώρευση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων *in situ*. Η έλλειψη της MYC οδήγησε σε συσσώρευση των βλαστικών κυττάρων εξαιτίας της αποτυχίας τους να ξεκινήσουν τη φυσιολογική διαφοροποίηση. Ο πολλαπλασιασμός των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων, απουσία MYC συσχετίζεται με την αύξηση της έκφρασης της N-καδχερίνης και άλλων μορίων προσκόλλησης που εμποδίζουν τη μετανάστευση των κυττάρων σε περιβάλλον που επιτρέπει την διαφοροποίησή τους, γεγονός που υποδηλώνει ότι η απελευθέρωση των βλαστοκυττάρων προς την διαφοροποίηση απαιτεί την ύπαρξη MYC (Wilson *et al.*, 2004). Επιπρόσθετα, πρόσφατα αποδόθηκε και ένας τελείως διαφορετικός ρόλος στην MYC. Η υπερέκφρασή της σε συνδυασμό με την έκφραση άλλων παραγόντων (Sox 2, Oct4, KLF4) έχει οδηγήσει στην δημιουργία πολυδύναμων κυττάρων από κύτταρα ινοβλαστών (Takahashi *et al.*, 2006). Τα δεδομένα αυτής της έρευνας αποδεικνύουν ότι πολυδύναμα βλαστοκύτταρα μπορούν να δημιουργηθούν απευθείας από καλλιέργειες ινοβλαστών με την προσθήκη λίγων καθορισμένων παραγόντων. Η πρόσφατη άποψη, λοιπόν που επικρατεί είναι ότι τα επίπεδα έκφρασης του *c-myc* ελέγχουν την λεπτή

ισορροπία μεταξύ της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων (Hurlin *et al.*, 2013).

➤ **1.2.6 Η MYC εμπλέκεται στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.**

Μελέτες έχουν προσπαθήσει να διασαφηνίσουν την διττή φύση του *c-myc* ως έναν μεταγραφικό παράγοντα που επάγει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων από την μία και ως σήμα που οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο από την άλλη. Η έκτοπη αύξηση της έκφρασης του *c-myc*, χρονικά ή/και ποσοτικά, οδηγεί σε αυξημένα ποσοστά απόπτωσης ή/και γήρανσης (Wang *et al.*, 2011). Έχουν διατυπωθεί πολλές θεωρίες για το πώς τα αυξημένα επίπεδα MYC οδηγούν σε απόπτωση με δυο από αυτές να επικρατούν. Πρώτον, τα πολύ υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης θα μπορούσαν να ενεργοποιούν ή να καταστέλλουν ένα σύνολο γονιδίων που φυσιολογικά δεν ρυθμίζονται από την MYC, όταν βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα. Αυτά τα γονίδια, εμπλέκονται σε προαποπτωτικές λειτουργίες. Εναλλακτικά, η MYC μπορεί να εμπλέκεται στην έκφραση του ίδιου συνόλου γονιδίων-στόχων αλλά αλλάζοντας τα επίπεδα έκφρασης της να αλλάζει και ο ρυθμός της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων. Το ποιά πορεία ακολουθείται κάθε φορά είτε για να επιβιώσει ένα κύτταρο είτε για να οδηγηθεί σε διαδικασία προγραμματισμένου θανάτου εξαρτάται σίγουρα από την ισορροπία των ενδογενών αλλά και των εξωκυττάρων σημάτων και από την παρουσία ή απουσία επιπλέον μεταλλάξεων σε άλλα προ- και αντι-αποπτωτικά γονίδια (π,χ *Bcl-2*, *p53*) (Mac Mahon *et al.*, 2014).

Η πρωτεΐνη MYC επίσης επάγει την μεταγραφή προαποπτωτικών γονιδίων, όπως το *bax*, ικανών να προκαλέσουν διαπερατότητα στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων, απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c* στο κυτταρόπλασμα και να ενεργοποιήσουν την διαδικασία της απόπτωσης (Mitchell *et al.*, 2000, Juin *et al.*, 2002).

2. Τα επίπεδα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης και η ρύθμιση της έκφρασης του *c-myc*.

Το *c-myc* ασκεί την δράση του κυρίως μέσω του ελέγχου των επιπέδων έκφρασής του. Το *c-myc* mRNA αλλά και η MYC πρωτεΐνη είναι εξαιρετικά βραχύβια μόρια με χρόνο ημίσειας ζωής, $t_{1/2} \approx 20$ και 30 min αντίστοιχα. (Levens *et al.*, 2013). Υπάρχουν παραδείγματα που δείχνουν την απαίτηση για αυστηρή ρύθμιση της έκφρασης του *c-myc* κάθε χρονική στιγμή. Μικρές μεταβολές στα επίπεδα MYC οδηγούν τα κύτταρα από τη διακοπή του

Εισαγωγή

κυτταρικού κύκλου στον πολλαπλασιασμό ή στην απόπτωση. Πειράματα σε φυσιολογικούς διπλοειδείς ανθρώπινους ινοβλάστες, μετά από αποσιώπηση ενός αλληλόμορφου του *c-myc* οδήγησαν τα κύτταρα στην γήρανση (Guney *et al.*, 2006). Το μέγεθος των κυττάρων και μάλιστα το μέγεθος ολόκληρου του οργανισμού είναι ευαίσθητα στις αλλαγές επιπέδων MYC (Trump *et al.*, 2001). Δεν είναι παράδοξο λοιπόν ότι η έκφρασή του βρίσκεται κάτω από αυστηρό έλεγχο, που ασκείται σε πολλά επίπεδα και έχει σαν αποτέλεσμα την ρύθμιση των επιπέδων σαν να αυξομειώνονται από ρεοστάτη. Η ρύθμιση της έκφρασης του *c-myc* ασκείται κατά τη μεταγραφή, τη μετάφραση και ελέγχεται η σταθερότητα τόσο του *c-myc* mRNA αλλά και του πρωτεϊνικού προϊόντος.

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα μηχανισμών που χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα για να αυξήσουν ή να μειώσουν την παραγωγή συγκεκριμένων γονιδιακών προϊόντων (πρωτεΐνη ή RNA). Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μελετάται ευρέως και εστιάζει σε:

- ❖ Μεταγραφική ρύθμιση.(Regulation of transcription).
 - Τροποποιήσεις σε επίπεδο χρωματίνης.
 - Ρύθμιση της έναρξης της μεταγραφής.
 - Ρύθμιση για την ολοκλήρωση της μεταγραφής.
- ❖ Μετα-μεταγραφική ρύθμιση.(Post-transcriptional regulation).
 - Ρύθμιση της σταθερότητας του μηνύματος RNA.
 - Ρύθμιση της μετάφρασης.(Regulation of translation).
 - ◆ Ρύθμιση της έναρξης της μετάφρασης.
 - ◆ Έλεγχος της επιμήκυνσης των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών και του τερματισμού της μετάφρασης.
- ❖ Μετα-μεταφραστική ρύθμιση.(Post-translational regulation).

2.1 Μεταγραφική ρύθμιση (Regulation of transcription).

2.1.1 Τροποποιήσεις σε επίπεδο χρωματίνης.

Η μεταγραφή του DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα υπαγορεύεται και από τη δομή του. Το DNA είναι γνωστό ότι περιτυλίγεται γύρω από τα οκταμερή των ιστονών και σχηματίζει τα νουκλεοσώματα. Η δομή που έχει μια περιοχή του DNA είναι ενδεικτική της συχνότητας της μεταγραφής της. Τα νουκλεοσώματα που δημιουργούνται είναι υπεύθυνα για την υπερελίκωση του DNA. Η συμπύκνωση της χρωματίνης μπορεί και μεταβάλλεται ως

αποτέλεσμα τροποποιήσεων του DNA (μεθυλίωση του DNA) ή/και ως αποτέλεσμα τροποποιήσεων που επιδέχονται τα οκταμερή των ιστονών (ακετυλίωση, μεθυλίωση, ουβικουιτινίωση, φωσφορυλίωση). Ως εκ τούτου, αυτές οι τροποποιήσεις μπορούν είτε να ενισχύουν είτε να καταστέλλουν την έκφραση ενός γονιδίου.

Η ακετυλίωση των ιστονών, δηλαδή η μεταφορά ακετυλικής ομάδας σε αμινοξικό κατάλοιπο Λυσίνης ή Αργινίνης και η δημιουργία N-ακέτυλο-λυσίνης ή N-ακέτυλο-αργινίνης, διευκολύνει την χαλάρωση της δομής της χρωματίνης και ευνοεί την μεταγραφή γονιδίων. Υποακετυλίωση του DNA παρατηρείται στην ετεροχρωματίνη και σχετίζεται με καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Οι πιο καλά μελετημένες ακετυλίωσεις ιστονών αφορούν στις H3K9 και H3K14. Ακετυλίωσεις ιστονών στην περιοχή του υποκινητή γονιδίων διευκολύνουν την προσέλκυση πρωτεϊνών που επάγουν τη μεταγραφή. Η ακετυλίωση των ιστονών επιφέρει αλλαγή του φορτίου τους, χαλάρωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των «ουρών» των ιστονών και «άνοιγμα» της δομής της χρωματίνης. Η «ανοιχτή» χρωματίνη είναι ευκολότερα προσβάσιμη από μεταγραφικούς παράγοντες, από την RNA πολυμεράση και από άλλα ένζυμα (Lee *et al.*, 2012).

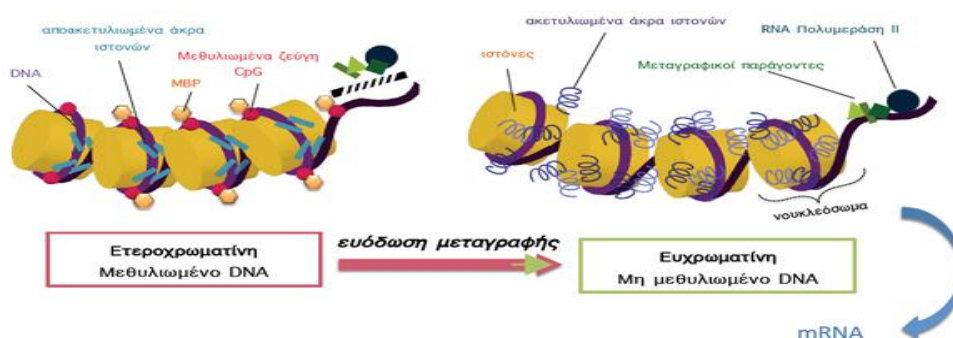
Η μεθυλίωση των ιστονών δηλαδή η τροποποίηση αμινοξικών καταλοίπων Λυσίνης ή Αργινίνης με προσθήκη ενός, δύο ή τριών μεθυλικών ομάδων, γίνεται από ένζυμα μεταφορείς μεθυλίων σε ιστόνες (Histone Methyltransferases, HMTs). Ο ρόλος της μεθυλίωσης των ιστονών δεν είναι διακριτός όπως της ακετυλίωσης. Η μεθυλίωση της H3-K9 οδηγεί σε απενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων, οδηγεί σε συμπύκνωση της χρωματίνης και έτσι δεν είναι προσβάσιμη από μεταγραφικούς παράγοντες και την RNA πολυμεράση. Αντίθετα η μεθυλιωμένη H3-K4 οδηγεί σε ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων και προσελκύει μεταγραφικούς παράγοντες.

Η μεθυλίωση του DNA είναι μια κοινή μέθοδος γονιδιακής σίγασης. Το DNA μεθυλιώνεται από ένζυμα μεταφορείς μεθυλίων σε DNA (DNA Methyltransferases, DNMTs) σε νουκλεοτίδια κυτοσίνης. Παρατηρείται συνήθως σε δινουκλεοτίδια CpG. Έως 90% των δινουκλεοτιδίων CpG είναι μεθυλιωμένα σε κύτταρα θηλαστικών. Υπερμεθυλίωση του DNA παρατηρείται στην ετεροχρωματίνη και σχετίζεται με καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Μη μεθυλιωμένα δινουκλεοτίδια CpG σχηματίζουν ομάδες στην 5' ρυθμιστική περιοχή ενεργών γονιδίων (CG νησίδες, CG islands). Σε καρκινικά κύτταρα εμφανίζεται υπερμεθυλίωση υποκινητών των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων με αποτέλεσμα να μην μεταγράφονται. Συχνά, ένζυμα αποακετυλίωσης των ιστονών προσελκύνονται σε μεθυλιωμένο DNA και αποακετυλιώνουν αμινοξέα της H3-K9, ώστε να δυσχεραίνεται η μεταγραφή του DNA. Επίσης, πρωτεΐνες που αλλάζουν την τοπολογία του DNA

Εισαγωγή

προσελκούνται μέσω πρωτεϊνών που προσδένονται σε μεθυλιωμένο DNA και προκαλούν συμπίκνωση της χρωματίνης και καταστολή της μεταγραφής (Εικόνα 5).

Σε ένα μοντέλο μελέτης για την καρκινογένεση του ήπατος αρουραίων, που προκαλείται από χρόνια ανεπαρκή διαίτα σε χολίνη, έχει προσδιοριστεί ότι η κατάσταση μεθυλίωσης θέσεων CCGG στη 5' ανοδική περιοχή του γονιδίου *c-myc* σχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης MYC πρωτεΐνης. Υπομεθυλιωμένες θέσεις CpG στο *c-myc* είχαν ως αποτέλεσμα υπερέκφραση του γονιδίου. Επίσης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές υπομεθυλίωση μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας CCGG στο τρίτο εξώνιο του *c-myc* έχει συσχετιστεί με αυξημένη έκφραση του γονιδίου. Απώλεια της μεθυλίωσης σε αυτές τις αλληλουχίες του *c-myc* εμφανίζεται σε μεταστατικούς όγκους. Όλα τα παραπάνω υποδηλώνουν ένα ρόλο της μεθυλίωσης στην ρύθμιση της έκφρασης του *c-myc* (Tsujiuchi *et al.*,1999, Sharrard *et al.*,1992).



Εικόνα 5:Σχηματική απεικόνιση της χρωματίνης ανάλογα με τις επιγενετικές τροποποιήσεις. Η ετεροχρωματίνη (αριστερά) χαρακτηρίζεται από μεθυλιωμένο DNA και αποακετυλιωμένες ιστόνες που της προσδίδει μια σφικτή δομή και την καθιστά μεταγραφικά ανενεργή. Αντίθετα η ανοικτή δομή χρωματίνης (δεξιά),γνωστή ως ευχρωματίνη είναι μεταγραφικά ενεργή. Το DNA δεν είναι μεθυλιωμένο ενώ οι ιστόνες είναι ακετυλιωμένες (Hatzimichael *et al.*,2011, http://www.med.uoi.gr/haematology/publications_presentations.html)

2.1.2 Ρύθμιση της έναρξης της μεταγραφής.

Η ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων επιτελείται κυρίως στο επίπεδο έναρξης της μεταγραφής και εμπλέκεται ένα σύνολο *cis*-δρώντων ρυθμιστικών στοιχείων. Ελέγχεται από τον υποκινητή (promoter), αλληλουχία που συνήθως βρίσκεται ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου και από τους ενισχυτές (enhancers),αλληλουχίες που έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την μεταγραφή από απόσταση. Ο κεντρικός υποκινητής περιλαμβάνει α) μια μικρή αλληλουχία που ονομάζεται εναρκτήρια περιοχή και εδράζεται πάνω από την θέση έναρξης της μεταγραφής (ορίζεται +1) και β)μια αλληλουχία TATA η

οποία βρίσκεται συνήθως στην θέση -30 και είναι το επτανουκλεοτίδιο TATAAAA. Αυτά τα δύο στοιχεία καθορίζουν συνήθως πού θα συγκροτηθεί η μεταγραφική μηχανή.

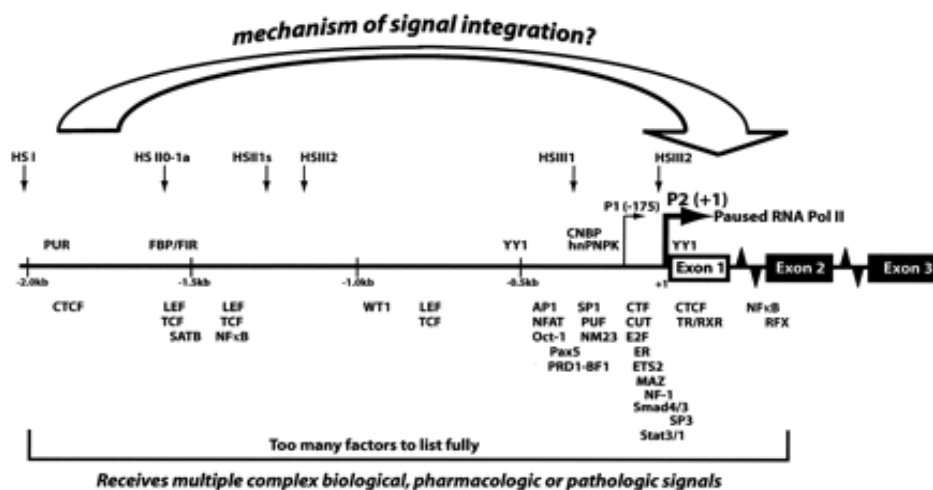
Στις περιοχές γύρω από τα μεταγραφικά ενεργά γονίδια που έχουν κατάλληλη διαμόρφωση χρωματίνης, υπάρχουν θέσεις υπερευαισθησίας για πέψη από νουκλεάσες (hypersensitive regions). Συγκεκριμένα, η υπερευαισθησία κάποιων συγκεκριμένων αλληλουχιών στην δράση ενζύμων συμπίπτει με ενεργοποίηση ή με καταστολή του γονιδίου. Η υπερευαισθησία σε νουκλεάσες (DNase I, DNase II, S1, micrococcal nuclease κλπ) υποδηλώνει ότι η περιοχή αυτή του DNA δεν προστατεύεται από σύμπλοκα ιστονών ή ακόμη ότι είναι τοπικά τροποποιημένη η δομή της δίκλωνης έλικας. Οι δομικές αυτές αλλαγές έχουν αποδοθεί στην πρόσδεση ρυθμιστικών πρωτεϊνών συνεπώς οι περιοχές αυτές θεωρούνται *cis* ρυθμιστικές αλληλουχίες.

Στην αλληλουχία του *c-myc* γονιδίου στον άνθρωπο έχουν εντοπισθεί οι εξής περιοχές υπερευαισθησίας : α). πριν τον P1 υποκινητή (-175), η HS I (-1850bp), η HS II1 (-1380bp), η HS II2 (-750bp), και η HS III1 (-130bp), β) ανάμεσα στους P1 και P2 η HS III2 90bp μετά τον P1 και γ) δύο περιοχές υπερευαισθησίας μέσα στο πρώτο ιντρόνιο , η DH IV 800bp και η DH V 1800bp μετά τον P1 υποκινητή. Επιπλέον, δύο περιοχές ευαίσθητες στην δράση S1 νουκλεάσης έχουν εντοπιστεί 1400bp και 115bp πριν από τον P1 υποκινητή (Εικόνα 6). Η προσβασιμότητα σε περιοχές χρωματίνης αντανακλά τον πιθανό θετικό ή αρνητικό ρόλο των περιοχών αυτών στη γονιδιακή έκφραση. Η υπερευαισθησία σε DNase I της περιοχής DH I, για παράδειγμα, ενισχύεται σε συνθήκες καταστολής της έκφρασης του *c-myc* και έχει έτσι υποτεθεί ότι αυτή αποτελεί θέση πρόσδεσης κάποιου καταστολέα (Marcu *et al.*, 1992).

Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης είναι λοιπόν βασικό εναρκτήριο βήμα για την μεταγραφή. Υπάρχουν όμως και άλλα γεγονότα καταλυτικά για την έναρξη αυτής της διαδικασίας. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην έναρξη της μεταγραφής ,οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες (General Transcription Factors, GTFs), οι ενεργοποιητές και οι συνενεργοποιητές (coactivators). Οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες είναι απαραίτητοι για όλη την διαδικασία της μεταγραφής, για την αναγνώριση των υποκινητών από την RNA πολυμεράση II και για την συγκρότηση του εναρκτήριου συμπλόκου μεταγραφής. Για να αρχίσει η μεταγραφή ενός γονιδίου απαραίτητη είναι και η παρουσία ενεργοποιητών, δηλαδή πρωτεϊνών με ικανότητα πρόσδεσης στον ενισχυτή του γονιδίου και αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες που βοηθούν την πρόσδεση της μεταγραφικής μηχανής στον υποκινητή, ενεργοποιώντας την μεταγραφή και αυξάνοντας δραστικά τον ρυθμό έναρξής της. Υπάρχουν οι καταστολείς (repressors), πρωτεΐνες που ανταγωνίζονται

Εισαγωγή

την δράση των ενεργοποιητών ,με στόχο την παρεμπόδιση της έναρξης της μεταγραφής και κατά συνέπεια της γονιδιακής έκφρασης.

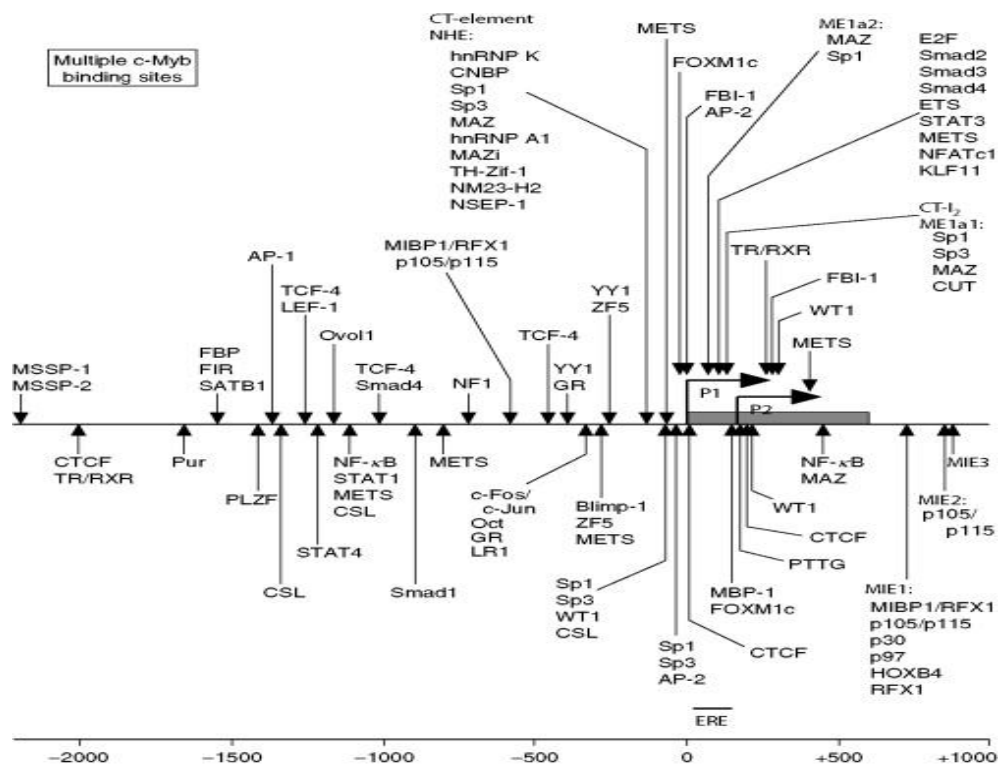


Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση παραγόντων μεταγραφής που ρυθμίζουν την δραστηριότητα του *c-myc* υποκινητή. Επιλεγμένοι ενεργοποιητές και καταστολείς της μεταγραφής που προσδέονται απευθείας στον υποκινητή *c-myc* εμφανίζονται κατά προσέγγιση στις θέσεις πρόσδεσής τους. Η μεταγραφικά εμπλεκόμενη RNA πολυμεράση II τίθεται σε παύση αμέσως μετά από τις θέσεις έναρξης μεταγραφής P1 και P2. Παρουσιάζονται οι υπερευαίσθητες θέσεις για δράση της DNase I (HS). Για να διατηρηθούν τα κατάλληλα επίπεδα *c-Myc*, θα πρέπει να υπάρχει κάποιος μηχανισμός για την ενσωμάτωση και την επεξεργασία αυτής της πληθώρας σημάτων. (Weber *et al*, 2005)

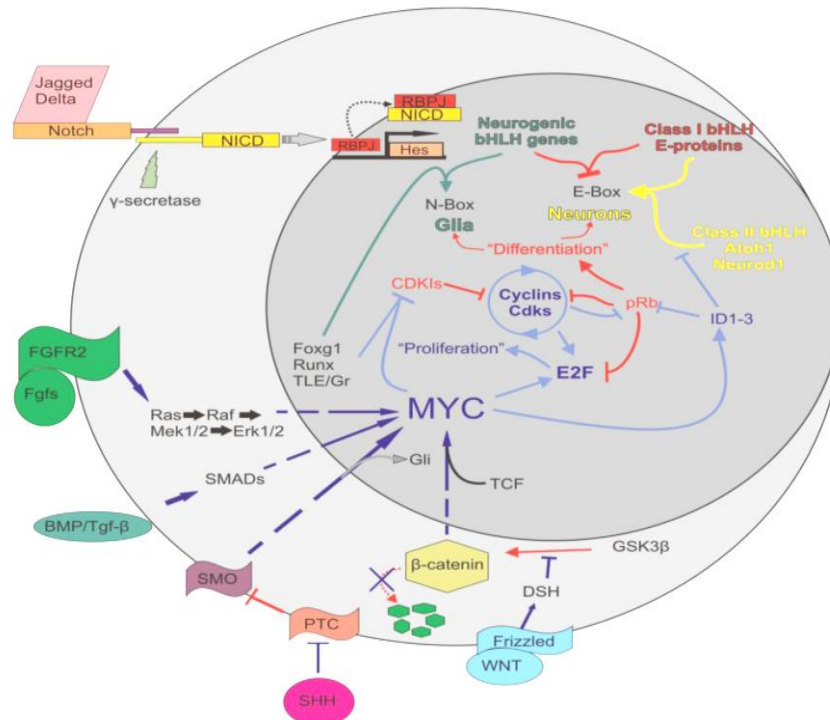
Ο υποκινητής του *c-myc* ενεργοποιείται από αυξητικούς παράγοντες, μιτογόνα, κυτοκίνες (IL-2, IL-3, IL-6, IL-12), ορμόνες και βιταμίνες (Εικόνα 7). Ο υποκινητής επηρεάζεται θετικά από τα περισσότερα μονοπάτια σηματοδότησης που προάγουν τον πολλαπλασιασμό (Liu και Levens *et al.*, 2006) (Εικόνα 8). Για να διασφαλιστεί η κανονικότητα και η διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων MYC, ο υποκινητής του *c-myc* ρυθμίζεται αρνητικά από αντιπολλαπλασιαστικούς παράγοντες και παράγοντες διαφοροποίησης (Εικόνα 7).

Μόνο για δύο παράγοντες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή του *c-myc* έχουν εντοπισθεί ειδικές αλληλουχίες για τη δράση τους. Συγκεκριμένα, η περιοχή +36 έως +100 σε σχέση με το P1 υποκινητή αναγνωρίζεται από τον PDGF (Platelet-derived growth factor) και η πρόσδεσή του ενισχύει 3 έως 5 φορές τη μεταγραφή του γονιδίου ενώ η περιοχή -71 έως +100 είναι απαραίτητη για την κατασταλτική δράση του TGF-β (Transforming growth factor b) (Marcu *et al.*, 1992, Luo *et al.*, 2004). Επιπρόσθετα, έχουν εντοπισθεί δύο περιοχές απαραίτητες για την έναρξη της μεταγραφής από τους P1 και P2 υποκινητές. Αυτές οι

περιοχές εντοπίζονται από -60 έως -37 bp του P1 για τη μεταγραφή από αυτόν και από -66 έως -56 bp του P2 για τη μεταγραφή από τον P2 αντίστοιχα. Σε αυτές τις περιοχές εδράζονται οι αλληλουχίες TATA και από ένα εξανουκλεοτίδιο CCGCCC και GGCGGG αντίστοιχα. Οι αλληλουχίες αυτές προσομοιάζουν στις αλληλουχίες που αναγνωρίζει ο SP1 (specificity protein 1) παράγοντας μεταγραφής. Οι δύο κύριοι υποκινητές της μεταγραφής P1 και P2 ελέγχονται ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλον (Spencer *et al.*, 1991). Το 75–90% των *c-myc* μεταγράφων προέρχονται από τον P2 υποκινητή.



Εικόνα 7:Θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων στον *c-myc* υποκινητή. Εμφανίζεται ένα δίκτυο που αλληλεπιδρά για την μεταγραφή του *c-myc* ,σε σχέση με την θέση των υποκινητών P1 και P2 (έντονα βέλη) και το εξόνιο 1 (γκρίζο κουτί).(Wierstra και Alves *et al.*,2008).



Εικόνα 8: Οι αλληλεπιδράσεις για την έκφραση του *c-myc* είναι σύνθετες. Το *c-myc* ρυθμίζεται από πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια: συμπεριλαμβανομένης της οδού Wnt / β-κατενίνης, Tgf-β ή Bmp / Smad, Fgf / Erk1 / 2, των οδών Shh / Smo και Notch. Μόλις ενεργοποιηθεί, η MYC αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες για να ρυθμίσει θετικά ή αρνητικά μόρια ενεργοποιητές συμπεριλαμβανομένων των κυκλινών, των E2Fs, των IDs, των CDKI και διαφόρων microRNAs. Στην εικόνα ο μεγαλύτερος κύκλος αντιπροσωπεύει το κύτταρο ως σύνολο ενώ ο μικρότερος κύκλος είναι ο πυρήνας. Τα βέλη δείχνουν θετική ρύθμιση, ενώ οι αμβλυμμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν αναστολή. Με κόκκινο φαίνονται τα μονοπάτια που ευνοούν τη διαφοροποίηση ενώ με μπλε φαίνονται μονοπάτια που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό (Korecky και Fritzsche *et al.*, 2012)

2.1.3 Ρύθμιση για την ολοκλήρωση της μεταγραφής.

Στους πολυκύτταρους οργανισμούς για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της μεταγραφής απαιτείται πολλές φορές η συνεργιστική δράση των ενεργοποιητών. Οι ενεργοποιητές, όπως αναφέρθηκε, είναι υπεύθυνοι για την προσέλκυση ρυθμιστικών παραγόντων που είναι απαραίτητοι προκειμένου η πολυμεράση να προβεί σε επιμήκυνση. Σε κάποια γονίδια έχουν βρεθεί αλληλουχίες λίγο μετά τον υποκινητή που είναι ικανές να προκαλούν παύση ή καθυστέρηση της δράσης της πολυμεράσης. Τότε είναι απαραίτητη η προσέλκυση και η δράση πρωτεϊνών ώστε να προχωρήσει η γονιδιακή μεταγραφή. Ένα παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο *HSP70* της *Drosophila*. Ο ενεργοποιητής GAGA είναι υπεύθυνος για την έναρξη της μεταγραφής. Σε απόκριση στο θερμικό σοκ η μεταγραφή του γονιδίου όμως σταματάει 25bp μετά τον υποκινητή. Τότε απαιτείται η δράση ενός δεύτερου ενεργοποιητή του HSF, ο οποίος είναι ικανός να προσελκύσει μια κινάση. Η P-TEF

κινάση φωσφορυλιώνει την μεγάλη υπομονάδα της RNA πολυμεράσης στην καρβοξυτελική περιοχή και έτσι επιτρέπεται η ολοκλήρωση της μεταγραφής του υπόλοιπου γονιδίου. Ένας άλλος λόγος που μπορεί να διακοπεί η μεταγραφή είναι βλάβες στην αλυσίδα του DNA. Και πάλι υπάρχουν ενδοκυττάριοι μηχανισμοί για να επιδιορθωθεί η βλάβη και να ολοκληρωθεί η μεταγραφή (επιδιόρθωση συζευγμένη με την μεταγραφή).

Η διαδικασία της μεταγραφής ολοκληρώνεται τέλος από σήματα μέσα στην αλληλουχία. Αυτές οι αλληλουχίες ονομάζονται τερματιστές (terminators) και οδηγούν την πολυμεράση να αποσυνδεθεί από το DNA και να απελευθερώσει και την νεοσυντιθέμενη αλυσίδα. Υπάρχουν βέβαια και μηχανισμοί οι οποίοι φυσιολογικά δρουν και είναι υπεύθυνοι για την καταστολή της επιμήκυνσης της μεταγραφής. Αυτό αποτελεί ακόμα έναν τρόπο για την ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων.

Το *c-myc* ήταν το πρώτο ευκαρυωτικό γονίδιο για το οποίο περιγράφηκε η ρύθμιση στο στάδιο της επιμήκυνσης της μεταγραφής (Bentley *et al.*, 1986). Οι δύο υποκινητές *c-myc* P1 και P2 προσφέρουν τη δυνατότητα για ανεξάρτητη και διαφορετική ρύθμιση των μετάγραφων. Σε πρώιμες μελέτες, η μείωση των επιπέδων του *c-myc* mRNA αποδόθηκε στη μείωση του αριθμού των RNA πολυμερασών που μπορούν να συνεχίσουν τη μεταγραφή πέρα από ορισμένα σημεία τερματισμού που βρίσκονται από τον υποκινητή P1 μέχρι και το πρώτο εξώνιο του γονιδίου. Η ενεργοποίηση του συμπλόκου της RNA πολυμεράσης II πιστεύεται ότι γίνεται μέσω των μεταγραφικών ενεργοποιητών που αυξάνουν την ικανότητα επιμήκυνσης της RNA πολυμεράσης με την απελευθέρωση των μορίων που ακινητοποιούνται στην περιοχή του P2 υποκινητή. Αντίστροφα, η αύξηση των επιπέδων *c-myc* mRNA οφείλεται πολλές φορές σε δυσλειτουργία των μηχανισμών καταστολής της επιμήκυνσης της μεταγραφής. Με βάση όλα τα δεδομένα έχει προταθεί ότι ο βασικός ρυθμιστικός έλεγχος στο *c-myc* γίνεται όχι στο στάδιο του σχηματισμού του συμπλόκου RNA πολυμεράσης II - DNA αλλά στο στάδιο μετά την έναρξη της μεταγραφής, δηλαδή κατά επιμήκυνση (Krumm *et al.*, 1992). Γενικά, ο έλεγχος της δράσης του συμπλόκου της RNA πολυμεράσης II στην επιμήκυνση του μετάγραφου *c-myc* παρέχει ένα τρόπο για θετικό ή/και αρνητικό έλεγχο της μεταγραφής σε ανταπόκριση σε ποικίλα ερεθίσματα που δέχεται το κύτταρο την συγκεκριμένη φάση. Η παύση της επιμήκυνσης του μετάγραφου μπορεί να γίνει σε τρεις περιοχές: (1) Τα μετάγραφα από τον P1-υποκινητή μπορούν να σταματήσουν να επιμηκύνονται σε περιοχή ανοδικά της P2 TATA αλληλουχίας ή ανάμεσα στην TATA αλληλουχία και στην θέση έναρξης μεταγραφής από τον P2 υποκινητή. (2) Τα μετάγραφα που προκύπτουν από τον P2-υποκινητή μπορούν να σταματήσουν να επιμηκύνονται σε

περιοχή καθοδικά της θέσης έναρξης μεταγραφής του P2 υποκινητή και (3) στο 3' άκρο του πρώτου εξωνίου.

2.2 Μετα-μεταγραφική ρύθμιση.(Post-transcriptional regulation)

2.2.1 Ρύθμιση της σταθερότητας και της μεταφρασιμότητας του μηνύματος mRNA

Η παραγωγή του ώριμου RNA προϋποθέτει την μεταγραφή από την RNA πολυμεράση II, την προσθήκη καλύπτρας στο 5' άκρο, την δημιουργία πολυ (A) ουρά στο 3' άκρο και την διαδικασία της συρραφής. Μόλις η RNA πολυμεράση II αρχίσει να συνθέτει τα πρώτα νουκλεοτίδια στο 5' άκρο του πρόδρομου-mRNA(pre-mRNA) το ένζυμο σύνθεσης καλύπτρας (capping enzyme) (Εικόνα 9) προσθέτει μια μεθυλο -γουανοσίνη, m⁷G, με έναν ασυνήθιστο 5'-5' φωσφοδιεστερικό δεσμό. Αυτή η διαδικασία, δημιουργίας της 5' καλύπτρας προστατεύει τα πρόδρομα αλλά και τα ώριμα mRNA από την δράση 5'-3' ριβονουκλεασών και την αποικοδόμησή τους. Στο 3' άκρο, γίνεται η προσθήκη 50-250 νουκλεοτιδίων αδενίνης από την δράση του ενζύμου πολυ(A) πολυμεράση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας πολυ (A) ουράς (poly-A tail) (Εικόνα 9), χωρίς την ύπαρξη μήτρας DNA. Έχει βρεθεί ότι υπάρχουν αλληλουχίες 'σινιάλα' τόσο πριν όσο και μετά από την θέση που θα ξεκινήσει η πολυαδενυλίωση. Το μοτίβο AAUAAA που εμφανίζεται σχεδόν σε όλα τα mRNA είναι απαραίτητο για την έναρξη της πολυαδενυλίωσης αλλά και για την ενδονουκλεολυτική πέψη. Πολλά μετάγραφα έχουν περισσότερες από μια θέσεις έναρξης της πολυαδενυλίωσης, οι οποίες διαφέρουν στην συχνότητα που χρησιμοποιούνται. Έτσι προκύπτουν μετάγραφα με μεγαλύτερου μήκους και αλλά με βραχείες αμετάφραστες περιοχές. Πιστεύεται ότι η διαδικασία της πολυαδενυλίωσης αποτελεί σημείο ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης. Η πολυ(A) ουρά των μηνυμάτων αναγνωρίζεται και σταθεροποιείται από μια πρωτεΐνη, την πρωτεΐνη πρόσδεσης του πολυ(A),(poly A binding protein, PABP). Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί 5 πρωτεΐνες πρόσδεσης του πολυ(A),μία πυρηνική και τέσσερις κυτταροπλασματικές, που λειτουργούν ως "σκαλωσιές" στις οποίες προσδέεται πληθώρα παραγόντων ρυθμίζοντας έτσι εμμέσως τη γονιδιακή έκφραση. Ενέχονται στην έξοδο του μηνύματος RNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, στην ρύθμιση της σταθερότητας και του ρυθμού αποικοδόμησης των μηνυμάτων και στην μετάφραση. Είναι γνωστό ότι η 5' καλύπτρα, η eIF4G πρωτεΐνη, η πολυ(A) ουρά και η πρωτεΐνη πρόσδεσης του πολυ(A) λειτουργούν συνεργιστικά ρυθμίζοντας κατ'αυτόν τον τρόπο τη μετάφραση του κυκλοποιημένου μηνύματος RNA (Weill *et al.*,2012).

Κατά την διάρκεια δημιουργίας της 5' καλύπτρας στο ένα άκρο του μορίου και της πολυ (A) ουράς στο απέναντι άκρο ξεκινάει και η συρραφή (RNA splicing), δηλαδή η απομάκρυνση των εσωνίων και η συρραφή των εξωνίων μεταξύ τους. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται από ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα σωματίδια συρραφής (spliceosomes). Σε κάποια γονίδια έχει παρατηρηθεί η διαδικασία της αυτο-συρραφής, δηλαδή η εκτομή εσωνίων απουσία πρωτεϊνών. Τα εσώνια αναδιπλώνονται σε μια δευτεροταγή δομή που είναι ικανή να καταλύει μόνη της την απομάκρυνσή τους. Διαφορετικά mRNA μπορούν να προκύψουν από το ίδιο πρόδρομο mRNA μετά από εναλλακτική συρραφή (Chen και Manley *et al.*,2009).

Το ώριμο mRNA μπορεί να υποστεί περαιτέρω τροποποιήσεις αποκρινόμενο σε κυτταρική σηματοδότηση, σε συνεργασία με πληθώρα trans παραγόντων και έτσι ελέγχεται η σταθερότητα του και η μεταφρασιμότητά του.

Πολλά μόρια mRNA που κωδικοποιούν πρωτο-ογκογονίδια, αυξητικούς παράγοντες, υποδοχείς και μεταγραφικούς παράγοντες διαθέτουν 5'αμετάφραστη περιοχή με εκτεταμένη δευτεροταγή διαμόρφωση, η οποία είναι φυλογενετικά συντηρημένη. Στις 5' αμετάφραστες περιοχές έχει αποδοθεί ρόλος στη ρύθμιση των mRNA. Εμπλέκονται στην διαδικασία εξόδου των μηνυμάτων από τον πυρήνα, προωθούν την διαδικασία της μετάφρασης και ενέχονται στην ρύθμιση της αποικοδόμησής τους.

Στο αντίθετο άκρο των μηνυμάτων βρίσκεται η 3' αμετάφραστη περιοχή, η οποία έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται σε πληθώρα ρυθμιστικών διεργασιών όπως στη μετάφραση, την ενδοκυττάρια χωροθέτηση αλλά και στην αποικοδόμηση των μετάγραφων. Η 3' αμετάφραστη περιοχή παίζει ρόλο στην μετα-μεταγραφική τύχη των μηνυμάτων RNA (Mignone *et al.*,2002).

Στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση των mRNA αποδείχθηκε ότι σημαντικό ρόλο επιτελεί και ένα δίκτυο miRNA (Bartel *et al.*,2009). Πρόκειται για μικρά μόρια RNA (περίπου 23 νουκλεοτίδια) που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες και συμμετέχουν στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Τα miRNA φαίνεται να ρυθμίζουν την έκφραση πάνω από το 60% των γονιδίων καταστέλλοντας την έκφρασή τους. Σε συνεργασία με άλλες πρωτεΐνες (eIF2C2/Ago2, Gemin 3, Gemin 4) συγκροτούν τα σύμπλοκα αποσιώπησης μετάγραφων RNA (RNA-induced silencing complex / RISC), μέσω των οποίων αναγνωρίζουν mRNA στόχους, βάση συμπληρωματικότητας της αλληλουχίας τους και τα οδηγούν σε αποικοδόμηση (Hutvagner *et al.*, 2002). Το γενικό συμπέρασμα είναι ότι τα miRNA συμμετέχουν στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο προκαλώντας αποικοδόμηση των

Εισαγωγή

mRNA και καταστολή της μετάφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών (Hu και Collier *et al.*, 2012). Πολλά κυκλώματα αλληλεπιδράσεων miRNA-mRNA στόχων ενέχονται στην ρύθμιση βιολογικών διεργασιών και λειτουργούν σαν διακόπτες. Παράδειγμα αποτελούν τα MYC/PTEN/miR-106b (Poliseno *et al.*, 2010), pri-miR-9-2/miR-9-3p/ MYC/ E2F1 (Zou *et al.*, 2015). Δεδομένου ότι η MYC αποτελεί σημαντικό παράγοντα κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης αλλά και της ανάπτυξης όγκων, τα κυκλώματα MYC / μικροRNA και η λειτουργία τους είναι πιθανό να συμβάλλουν στις ογκογόνες λειτουργίες του MYC.

Πρωτεΐνες που προσδένουν περιοχές μνημάτων RNA (RNA binding proteins, RBPs) ενέχονται επίσης στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση. Το κάθε μόριο RNA σπάνια βρίσκεται χωρίς τη συνοδεία πρωτεϊνών. Μόλις το RNA μεταγράφεται, αναγνωρίζεται από πρωτεΐνες που το προσδένουν και σχηματίζουν ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα. Οι πρωτεΐνες πρόσδεσης RNA ενορχηστρώνουν την επεξεργασία των RNA στόχων. Η σύνδεση των πρωτεϊνών με RNA στόχους ορίζει τη διαδικασία ωρίμανσης, τη διάρκεια ζωής, τον κυτταρικό εντοπισμό και το ρυθμό με τον οποίο μεταφράζεται ένα συγκεκριμένο μήνυμα. miRNA και πρωτεΐνες που προσδένουν τα μηνύματα εμπλέκονται στη ρύθμιση σχεδόν όλων των βιολογικών διεργασιών έχοντας είτε συνεργιστική είτε ανταγωνιστική δράση επί των στόχων. Η μοίρα των mRNAs καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από αυτό το σύμπλεγμα (Srikantan *et al.*, 2012).

Οι πρωτεΐνες που προσδένουν περιοχές RNA συμπεριφέρονται έναντι των στόχων τους και σε απόκριση των ενδο- και εξωκυττάρων σημάτων. Η σωστή λειτουργία αυτών των περίπλοκων δικτύων είναι απαραίτητη για τον συντονισμό των μετα-μεταγραφικών διαδικασιών και η διατάραξή τους μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές συνθήκες. Παράδειγμα αποτελεί η υπερέκφραση ιντερλευκίνης 10 από κύτταρα μελανώματος. Η πρωτεΐνη AUF1 προσδένεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA ιντερλευκίνης 10 και το αποσταθεροποιεί. Στα καρκινικά κύτταρα ο χρόνος ημιζωής του μηνύματος της ιντερλευκίνης 10 δεκαπλασιάζεται γιατί η πρωτεΐνη AUF1 περιορίζεται στον πυρήνα έχοντας εξαιρετικά χαμηλά κυτταροπλασματικά επίπεδα. Η αυξημένη σταθερότητα του mRNA ιντερλευκίνης 10 βοηθά στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και στην ανάπτυξη του όγκου (Brewer *et al.*, 2003). Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που ρυθμίζουν την ικανότητα των πρωτεϊνών να συνδέονται με το RNA στόχο ή/ και να αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση ενός συνόλου πρωτεϊνών (Glisovic *et al.*, 2008).

Οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν μόρια RNA περιέχουν δομικά μοτίβα για να αναγνωρίζουν και προσδένουν μια μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων. Μελέτες με

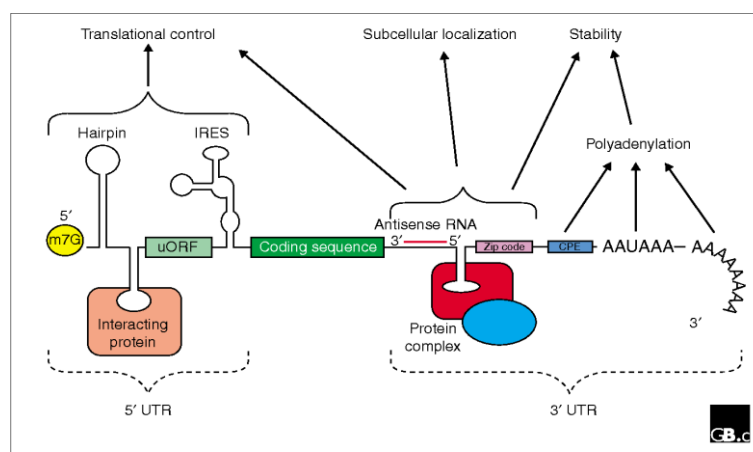
αντικείμενο RNA δεσμευτικές πρωτεΐνες οδήγησαν στην ταυτοποίηση κάποιων μοτίβων αμινοξέων αλλά και μεγαλύτερων δομικών περιοχών των πρωτεϊνών που συνεργάζονται για τη δέσμευση σε διαφορετικά μακρομόρια (Pawson *et al.*,2003). Οι λειτουργικές περιοχές, οι οποίες προσδίδουν την ικανότητα δέσμευσης στο RNA είναι καλώς χαρακτηρισμένες και μπορούν να αποτελούνται από τα εξής: Α) Την RNA-δεσμευτική περιοχή (RNA Binding Domain) ή περιοχή γνωστή ως μοτίβο αναγνώρισης RNA, (RNA Recognition Motif,RRM). Οι αλληλουχίες αναγνώρισης RNA, περίπου 80-90 αμινοξέα, σχηματίζουν αντιπαράλληλες β-πτυχωτές περιοχές με δύο α-έλικες (βαββαβ τοπολογία). Συνήθως, η παρουσία συντηρημένων καταλοίπων των β-πτυχωτών επιφανειών, όπως για παράδειγμα ένα κατάλοιπο Αργινίνης ή Λυσίνης, είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση RNA στόχων. Β)Τις περιοχές με K-ομολογία (KH Domain). Οι περιοχές αυτές πρωτεϊνών περιέχουν περίπου 70 αμινοξέα και έχουν ικανότητα δέσμευσης σε μονή έλικα DNA ή/και RNA. Η σημαντική ακολουθία αυτού του τομέα είναι η (I/L/V)IGXXGXX(I/L/V). Οι περιοχές ομολογίας K έχουν τρεις διαμορφώσεις β-πτυχωτών επιφανειών με τρεις α-έλικες. Υπάρχουν δύο υποοικογένειες πρωτεϊνών με τέτοιες δομικές περιοχές αναγνώρισης, οι περιοχές ομολογίας τύπου K I (τοπολογία βαββα) και οι περιοχές ομολογίας K τύπου II (αββαβ τοπολογία). Και για τις δύο κατηγορίες ο βρόγχος GXXG αλληλεπιδρά με περιοχές α-έλικας και β-φύλλων και αναγνωρίζουν περιοχές του RNA για να προσδεθούν. Γ) Τους δακτύλιους ψευδαργύρου, ενός δομικού μοτίβου πρωτεϊνών που δημιουργείται παρουσία ιόντων ψευδαργύρου που αλληλεπιδρά με αμινοξικά κατάλοιπα κυστεΐνης και ιστιδίνης (Cys2His2 ,CCHH) και παρέχει την δυνατότητα πρόσδεσης σε περιοχές RNA πλούσιες σε κατάλοιπα αδενίνης και ουρακίλης με δεσμούς υδρογόνου. Δ) Την περιοχή δέσμευσης σε διπλή έλικα RNA. Πρόκειται για μια μικρή περιοχή 70-90 αμινοξέων που προσδένει RNA ανεξαρτήτως αλληλουχίας αλλά έχει και την ικανότητα να αναγνωρίζει ορισμένες διαμορφώσεις των διπλών ελίκων RNA (Allain *et al.*,1996).

Τα μεμονωμένα δομικά μοτίβα των πρωτεϊνών δεν επαρκούν για να αναγνωρίσουν και να προσδέσουν ισχυρά στόχους μηνύματα RNA. Απαιτείται η συνεργασία πολλών δομικών περιοχών μιας πρωτεΐνης και χρειάζεται να μεταβληθεί η στερεοδιάταξή της ώστε να προσδέσει το RNA στόχο. Κάποιες πρωτεΐνες είναι λειτουργικές μόνον εφόσον διμεριστούν. Ένας άλλος τρόπος που έχει αναφερθεί είναι η συνεργασία περιοχών που προσδένουν RNA που συνεισφέρονται από διαφορετικές πρωτεΐνες (ετεροδιμερή) για την αναγνώριση και πρόσδεση των RNA στόχων (Lunde *et al.*,2007).

Συγκεκριμένες πρωτεΐνες μπορούν να αναγνωρίζουν πολλά διαφορετικά μόρια RNA όμως δεν έχουν εντοπιστεί αλληλουχίες ομοφωνίας στους RNA στόχους. Οι πρωτεΐνες

Εισαγωγή

δέσμευσης σε RNA δεν παρουσιάζουν εξειδίκευση στην αλληλουχία που προσδένουν. Δηλαδή, δεν υπάρχουν δεδομένα που να αποδεικνύουν ότι οι δομικές περιοχές των πρωτεϊνών που προσδένονται σε μόρια RNA έχουν συγγένεια μόνο προς κάποιες αλληλουχίες. Πρώιμα αποτελέσματά δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες που δεσμεύονται με RNA έχουν προτίμηση κάποιων μοτίβων -αλληλουχίας RNA. Για παράδειγμα όλες οι πρωτεΐνες RBM24, η ισομορφή της RBM38 και η ορθόλογη στον *C. Elegans*, SUP12 προτιμούν παρόμοιες G1U πλούσιες αλληλουχίες RNA (Ray *et al.*, 2014).



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της γενικευμένης δομής ενός ευκαρυωτικού mRNA με μετα-μεταγραφικά ρυθμιστικά στοιχεία που επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση (Mignone *et al.*, 2002).

2.2.2 Ρύθμιση της μετάφρασης.

Οι μηχανισμοί που ελέγχουν την διαδικασία της μετάφρασης είναι οι πιο καθοριστικοί για την παραγωγή του τελικού προϊόντος. Ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών για τη σύνθεση των νέων πρωτεϊνών συνεργάζονται με το ριβόσωμα κατά την έναρξη, την επιμήκυνση και τον τερματισμό της μετάφρασης. Ο έλεγχος συμβαίνει κυρίως κατά τη διάρκεια της έναρξης, στον μηχανισμό μετάφρασης εξαρτώμενης από την 5'καλύπτρα. Η εκκίνηση της μετάφρασης επηρεάζεται από την παρουσία απαραίτητων πρωτεϊνών αλλά και από την λειτουργία σηματοδοτικών μονοπατιών.

Σε συνθήκες όπου η μετάφραση που ξεκινάει από την 5' καλύπτρα παρεμποδίζεται, η μετάφραση των μεταγράφων μπορεί να πραγματοποιηθεί από την εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος με τρόπο ανεξάρτητο από την καλύπτρα.

2.2.2.1 Ρύθμιση της έναρξης της μετάφρασης.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, ο έλεγχος της μετάφρασης συμβαίνει στο στάδιο έναρξης με ένα μηχανισμό σάρωσης (μηχανισμός της έναρξης της μετάφρασης εξαρτώμενος από την 5' καλύπτρα- 5' cap dependent translation regulation). Συνοπτικά, αυτό το στάδιο ελέγχου περιλαμβάνει τη δέσμευση του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης 4F (eIF4F), ενός συμπλέγματος που περιλαμβάνει τις eIF4E, eIF4G, eIF4A και eIF4B πρωτεΐνες, αλλά και των πρωτεϊνών eIF3, eIF2 στην καλύπτρα του, την πρωτεΐνη πρόσδεσης στο πολυ(A) και την eIF4A (RNA ελικάση). Επίσης ελέγχεται η προσέλευση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας και η "σάρωση" της 5' αμετάφραστης περιοχής προκειμένου να εντοπιστεί το κατάλληλο κωδικόνιο έναρξης και να τοποθετηθεί στη θέση P της ριβοσωμικής υπομονάδας για να συνδεθεί με το Met-tRNA_i (Pain *et al.*, 1996). Στα θηλαστικά, η ιδανική αλληλουχία, μετά την οποία εντοπίζεται το κωδικόνιο έναρξης, είναι η GCCRCCaugG (όπου το R πρέπει να είναι πουρίνη) και αναφέρεται ως «αλληλουχία Kozak» (Jackson *et al.*, 2010).

Τα περισσότερα ευκαρυωτικά mRNA αρχίζουν τη μετάφραση μέσω της αλληλεπίδρασης της καλύπτρας 5' m⁷GpppN και της πολυ (A) ουράς στο 3' άκρο. Η πρωτεΐνη eIF4E που δεσμεύεται στην καλύπτρα και η πρωτεΐνη προσαρμογής eIF4G (I ή II) αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη πρόσδεσης του πολυ(A) στο 3' άκρο, γεφυρώνουν τις δύο περιοχές μεταξύ τους και μπορούν να κυκλοποιήσουν τα RNA μηνύματα. Ακολουθούν μηχανισμοί που συμβάλλουν στην ενίσχυση της μετάφρασης, μέσω της προώθησης της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας στην 5'καλύπτρα, της σύνδεσης της 60S ριβοσωμικής υπομονάδας και/ή της διευκόλυνσης του τερματισμού της μετάφρασης και την επανάληψη της λειτουργίας του ριβοσώματος.

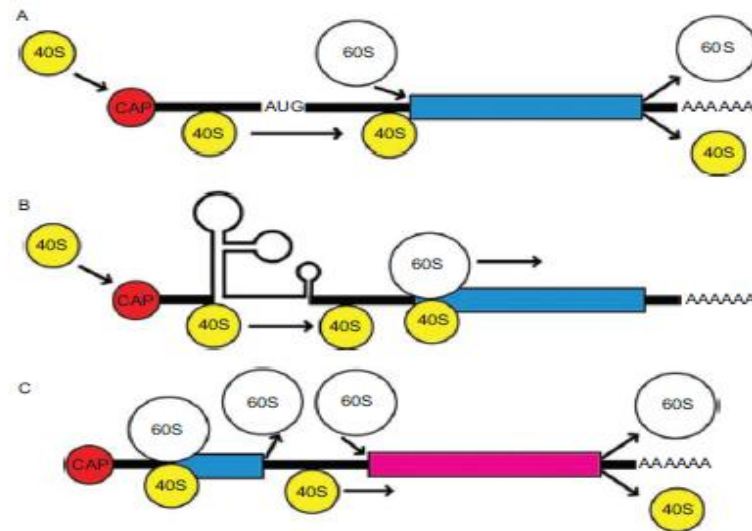
Συνοπτικά η μετάφραση ενός μετάργραφου ρυθμίζεται από: 1) την πρόσληψη του mRNA στην ριβοσωμική υπομονάδα 40S και αυτό θεωρείται ότι είναι το πρώτο περιοριστικό στάδιο του ρυθμού της έναρξης, 2) την κατάσταση φωσφορυλίωσης των παραγόντων έναρξης της μετάφρασης, γεγονός που χρησιμοποιείται συχνά για τη ρύθμιση των ποσοστών της πρωτεϊνοσύνθεσης, 3) την προσβασιμότητα του mRNA που μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης. Τα mRNA μπορούν να βρίσκονται σε κοκκία στρες (stress granules) ή σε σωματίδια P ή εντοπισμένα σε συγκεκριμένες περιοχές κυτταροπλάσματος και να παραμένουν αμετάφραστα, 4) την δράση μικροRNA και 5)την δράση trans-ρυθμιστικών πρωτεϊνών (Decker και Parker *et al.*, 2012). Οι 5' αμετάφραστες περιοχές κάποιων mRNAs περιέχουν εσωτερικές θέσεις εισόδου ριβοσώματος (Internal Ribosome Entry Site, IRES). Η αλληλουχία IRES διευκολύνει την μη εξαρτώμενη από καλύπτρα μετάφραση ενός μορίου mRNA (μηχανισμός της μετάφρασης ανεξάρτητος από

Εισαγωγή

την 5' καλύπτρα αλλά μέσω της εσωτερικής θέσης εισόδου ριβοσώματος). Η μετάφραση ως επί το πλείστον λαμβάνει χώρα μέσω του μηχανισμού που εξαρτάται από την 5' καλύπτρα. Το κυτταρικό στρες, η υποξία, η απόπτωση, η απουσία θρεπτικών συστατικών και η κυτταρική διαφοροποίηση είναι καταστάσεις κατά τις οποίες η μετάφραση κάποιων μηνυμάτων ξεκινάει από μια εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος (Komar *et al.*, 2011). Στις αλληλουχίες αυτές τα ριβοσώματα κατευθύνονται σε ένα εσωτερικό κωδικόνιο έναρξης το οποίο μπορεί να βρίσκεται και σε μεγάλη απόσταση (600 ± 1000 nts) από το 5' άκρο του μηνύματος. Αυτή η διαδικασία έχει γενικά μειωμένη απαίτηση για παράγοντες έναρξης μετάφρασης, ιδιαίτερα για τους eIF4E και eIF4G. Αντιθέτως έχουν βρεθεί πρωτεΐνες που προσδέονται RNA και προωθούν την έναρξη της μετάφρασης μέσω IRES (IRES trans-acting factors-ITAFs). Η αποτελεσματικότητα της μετάφρασης μέσω IRES εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη δράση αυτών των trans ρυθμιστικών πρωτεϊνικών παραγόντων. Σε συνθήκες στρες για παράδειγμα που ο παράγοντας έναρξης της μετάφρασης 2(eIF2) φωσφορυλιώνεται και απενεργοποιείται, η έναρξη της μετάφρασης μέσω IRES πραγματοποιείται παρουσία του eIF5B, παράγοντα ο οποίος είναι υπεύθυνος για την πρόσδεση Met-tRNA^{Met} στο ριβόσωμα. Η ύπαρξη ενός τέτοιου ρυθμιστικού μηχανισμού εξασφαλίζει την απρόσκοπτη έκφραση πρωτεϊνών οι οποίες κρίνονται απαραίτητες για την ομαλή λειτουργία του κυττάρου.

Υπάρχουν αρκετά παραδείγματα mRNA θηλαστικών που περιέχουν εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος, όπως ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από αιμοπετάλια, ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας κ.α. Συνήθως εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος φέρουν μετάγραφα που εκφράζουν πρωτεΐνες απαραίτητες στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης. Τέτοιο ρυθμιστικό μηχανισμό μετάφρασης έχουν και πολλά ογκογονίδια, όπως το *c-myc*.

Εναλλακτικοί μηχανισμοί μετάφρασης: Αποκλίσεις από τον κανόνα σάρωσης του mRNA από το ριβόσωμα μέχρι το πρώτο κωδικόνιο έναρξης αποτελούν οι μηχανισμοί της ατελούς σάρωσης, του ριβοσωμικού άλματος και της επανέναρξης. (Εικόνα 10)



Εικόνα 10: Εναλλακτικοί μηχανισμοί έναρξης της μετάφρασης. (Α) Ατελής Σάρωση. Το πρώτο κωδικόνιο AUG είναι δυνατό να παρακαμφθεί και η μετάφραση να ξεκινήσει από το επόμενο κωδικόνιο AUG. (Β) Ριβοσωμικό Άλμα. Το ριβόσωμα εκτρέπεται από ένα μεγάλο τμήμα με εκτεταμένη δευτεροταγή δομή, που πιθανόν περιέχει κωδικόνια έναρξης. (Γ) Επανάναρξη. Μετά την έναρξη από το πρώτο κωδικόνιο έναρξης, η 40S ριβοσωμική υπομονάδα παραμένει προσδεμένη στο mRNA και αρχίζει εκ νέου τη σάρωση, οδηγώντας σε έναρξη από το καθοδικό κωδικόνιο AUG. (Van Der Kelen *et al.*, 2009)

2.2.2.2 Ο έλεγχος της επιμήκυνσης των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών και του τερματισμού της μετάφρασης.

Παρόλο που αναφέρονται λιγότερο συχνά οι φάσεις επιμήκυνσης αλλά και τερματισμού της μετάφρασης, αποτελούν σημεία ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης. Ο ρυθμός επιμήκυνσης θεωρείται ότι είναι μέγιστος στις περισσότερες συνθήκες, αλλά μπορεί να ανασταλεί με ειδικούς μηχανισμούς. Ο ρυθμός της πρωτεϊνοσύνθεσης επηρεάζεται μόνο όταν η επιμήκυνση επιβραδύνεται επαρκώς, έτσι ώστε η εκκίνηση να μην είναι πλέον εφικτή. Η εμφάνιση σπάνιων κωδικονίων ή η απροσπέλαστη για το ριβόσωμα δευτεροταγής δομή στην κωδική περιοχή ενός mRNA θεωρείται ότι επιβραδύνουν τον ρυθμό επιμήκυνσης. Ο ρυθμός επιμήκυνσης επηρεάζει και την αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Εάν η επιμήκυνση είναι πολύ γρήγορη, πολλές πρωτεΐνες αποτυγχάνουν να αναδιπλωθούν σωστά.

Κατά γενικό κανόνα η φάση τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης επιδέχεται έλεγχο. Ο τερματισμός της μετάφρασης πραγματοποιείται όταν στο τέλος της κωδικής αλληλουχίας εντοπιστεί από το ριβόσωμα και κωδικόνιο τερματισμού (UAA, UGA, ή UAG). Η διαδικασία τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης ολοκληρώνεται από την λειτουργία δύο πρωτεϊνών που συνεργάζονται, τους παράγοντες τερματισμού μετάφρασης 1 και 3. Ο παράγοντας

τερματισμού της μετάφρασης 1 αναγνωρίζει το κωδικόνιο λήξης και διασπά τον δεσμό του tRNA στην P-θέση του ριβοσώματος απελευθερώνοντας την νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη. Ο παράγοντας τερματισμού της μετάφρασης 3 δρα βοηθητικά στην απελευθέρωση της πρωτεΐνης (Dever και Green *et al.*, 2012).

2.3 Οι cis- ρυθμιστικές περιοχές και trans παράγοντες που συμμετέχουν στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση του c-myc mRNA.

Η έκφραση του c-myc, όπως όλων των γονιδίων που κωδικοποιούν βραχύβια μόρια ελέγχεται αυστηρά και σε πολλά επίπεδα. Μηχανισμοί μετα-μεταγραφικού ελέγχου παίζουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου. Καλά ελεγχόμενοι μηχανισμοί εξασφαλίζουν την ταχεία εναλλαγή των επιπέδων του c-myc mRNA, γεγονός το οποίο επιτρέπει στα κύτταρα να ανταποκρίνονται άμεσα σε διαφορετικά σήματα. Οι cis-αλληλουχίες και οι αλληλεπιδράσεις τους με trans παράγοντες είναι αυτά που καθορίζουν την μετα μεταγραφική τύχη του μηνύματος.

2.3.1 Η 5' αμετάφραστη περιοχή του c-myc mRNA.

Η 5'αμεταφραστη περιοχή του c-myc mRNA κωδικοποιείται από το εξώνιο 1 και έχει μήκος ≈400nt .Πρόκειται για μακρά, καλά δομημένη αμετάφραστη περιοχή η οποία επηρεάζει τη ρύθμιση της έκφρασης του μηνύματος. Αμετάφραστες περιοχές που φέρουν δομικές διαμορφώσεις αναστέλλουν την διαδικασία της έναρξης της μετάφρασης.

Η 5'αμετάφραστη περιοχή του c-myc περιέχει μια εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος που λειτουργεί για να διατηρεί τα επίπεδα MYC κατά τη διάρκεια ορισμένων φυσιολογικών και παθολογικών συνθηκών. Η αλληλουχία IRES του c-myc mRNA προκύπτει από την μεταγραφή του γονιδίου 340 νουκλεοτιδία καθοδικά του υποκινητή P2. Το γεγονός ότι το 75-90% των μετάγραφων c-myc προκύπτουν από αυτόν τον υποκινητή υποδηλώνει ότι η πλειοψηφία των c-myc mRNA στο κύτταρο έχει την δυνατότητα εκκίνησης μετάφρασης μέσω IRES.

Η μετάφραση μπορεί να ξεκινήσει από την εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος σε συνθήκες που ο μηχανισμός έναρξης εξαρτώμενος από την καλύπτρα δυσχεραίνεται. Για παράδειγμα κατά την ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης η μετάφραση ξεκινάει από την εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος λόγω της διάσπασης του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4G. Το c-myc μεταφράζεται μέσω IRES

επίσης κατά τη διαδικασία της μίτωσης και του κυτταρικού στρες. Την αλληλουχία IRES του *c-myc* mRNA αναγνωρίζει και προσδένει ένας *trans* παράγοντας, η ετερογενής ριβονουκλεοπρωτεΐνη C (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1 -hnRNP C1), η οποία ενισχύει την μετάφραση μέσω αυτού του μηχανισμού κατά την G₂/M φάση του κυτταρικού κύκλου (Kim *et al.*, 2003, Subkhankulova *et al.*, 2001, Stoneley *et al.*, 2000).

2.3.2 Η 3' αμετάφραστη περιοχή του *c-myc* mRNA.

Η 3' αμετάφραστη περιοχή εδράζεται καθοδικά της κωδικής περιοχής και έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται σε πληθώρα ρυθμιστικών διεργασιών όπως στην αποικοδόμηση των μετάγραφων, στην πολυαδενυλίωση ή/και αποαδενυλίωση του μηνύματος RNA, στη μετάφραση και στον ενδοκυττάριο εντοπισμό. Συγκεκριμένα, η εισαγωγή της 3' αμετάφραστης περιοχής του *c-myc* σε ετερόλογα μετάγραφα μειώνει δραματικά τον χρόνο ημισείας ζωής τους. Παράδειγμα αποτελεί το mRNA της β-γλοβίνης όταν παρουσία της 3' αμετάφραστης περιοχής του *c-myc* αποικοδομήθηκε 4,3 φορές γρηγορότερα (Yeilding *et al.*, 1997). Είναι, λοιπόν, υπεύθυνη για τη διατήρηση του *c-myc* mRNA σε χαμηλά επίπεδα καθώς πρόκειται για μια περιοχή που καθορίζει την αστάθεια του μορίου. Σε αυτήν εντοπίζονται περιοχές πλούσιες σε AU- στοιχεία και δύο μοτίβα AUUUA. Οι περιοχές αυτές βρίσκονται ακριβώς πριν από τις θέσεις που αποτελούν σήμα πολυαδενυλίωσης και εφόσον η πολυαδενυλίωση ξεκινάει κυρίως από το δεύτερο σήμα, τα περισσότερα *c-myc* mRNA περιέχουν δύο δυνητικές περιοχές αποσταθεροποίησης.

Οι αλληλουχίες AUUUA της 3' αμετάφραστης περιοχής του *c-myc* mRNA αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες που προσδένουν μόρια RNA (Brewer *et al.*, 1991). Αυτές οι *trans*- ρυθμιστικές πρωτεΐνες, επιδρούν είτε αρνητικά είτε θετικά στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου. Παράδειγμα αποτελούν οι πρωτεΐνες AUF1 και TIAR, που προσδένονται σε αλληλουχίες AUUUA της 3' αμετάφραστης περιοχής του *c-myc* mRNA. Η πρωτεΐνη AUF1 ενισχύει την μετάφραση του *c-myc* mRNA ανταγωνιζόμενη την θέση πρόσδεσης της TIAR, η οποία καταστέλλει την μετάφραση. Τα επίπεδα του *c-myc* mRNA παραμένουν ανεπηρέαστα σε αυτές τις συνθήκες (Gratacos και Brewer *et al.*, 2010, Liao *et al.*, 2007). Πρωτεΐνες όμως αναγνωρίζουν και άλλες αλληλουχίες εντός της 3' αμετάφραστης περιοχής του *c-myc* mRNA εκτός των αλληλουχιών AUUUA. Για παράδειγμα οι πρωτεΐνες HuR και G3BP προσδένονται και ρυθμίζουν την μετα-μεταγραφική τύχη του μηνύματος. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης G3BP στην 3' αμετάφραστη περιοχή διασπά το *c-myc* mRNA έχοντας δράση ενδοριβονουκλεάσης. Η G3BP ρυθμίζει το χρόνο ημιζωής του *c-myc* mRNA

Εισαγωγή

σε απάντηση κατάλληλων εξωκυττάρων ερεθισμάτων (Kim *et al.*, 2009, Tourriere *et al.*,2001).

Η 3' αμετάφραστη περιοχή του *c-myc* mRNA αναγνωρίζεται από miRNA. Γενικά τα miRNA προσδέονται mRNA στόχους με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση τους και την καταστολή της μετάφρασης, όπως ήδη αναφέρθηκε. Το εργαστήριο του Lieberman το 2010 έδειξε ότι το miR-24, η έκφραση του οποίου αυξάνεται κατά την διαφοροποίηση και αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, μπορεί να καταστείλει την έκφραση του *c-myc*. Τα miRNA που ανήκουν στην οικογένεια let7 έχουν επίσης μελετηθεί εκτενώς ως προς την επίδρασή τους επί της έκφρασης του *c-myc* mRNA. Ο Kim και οι συνεργάτες του το 2009 αποκάλυψαν ότι miRNA let7 προσδέονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή του *c-myc* mRNA αναστέλλοντας την έκφραση του σε συνεργασία με την πρωτεΐνη HuR, μια πρωτεΐνη πρόσδεσης σε RNA.

Επιπρόσθετα, η πολυ (A) ουρά συμβάλει στον έλεγχο της μεταφρασιμότητας του *c-myc* mRNA. Κατά γενικό κανόνα είναι αποδεκτό ότι η αποικοδόμηση των μηνύματων mRNA είναι συζευγμένη με την απώλεια πολυ (A) ουράς. Τα mRNA που προκύπτουν με βραχεία πολυ (A) ουρά ή με έλλειψη πολυ (A) ουράς, έπειτα από διαδικασία αποαδενυλίωσης, αποικοδομούνται γρηγορότερα. Η πολυ (A) ουρά έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντική για την προστασία και τη μετάφραση των mRNA. Αυτό ενισχύεται σε μεγάλο βαθμό από τις πρωτεΐνες πρόσδεσης στο πολυ (A), οι οποίες καλύπτουν και προστατεύουν την ουρά. Εντούτοις πρόσφατες μελέτες έδειξαν μετάγραφα με βραχεία ουρά να μεταφράζονται σε υψηλά επίπεδα, όπως για παράδειγμα αυτά που κωδικοποιούν ριβοσωμικές πρωτεΐνες (Lima *et al.*,2017, Castellano και Bazzini *et al.*,2017) και προκύπτει ότι στα ευκαρυωτικά κύτταρα, οι βραχείες ουρές είναι ένα χαρακτηριστικό των άφθονων και καλά μεταφρασμένων mRNA. Για το *c-myc* υπάρχουν τα δεδομένα ότι η αποαδενυλίωση της 3'αμετάφραστης περιοχής οδηγεί στο σχηματισμό ενός σχετικά πιο σταθερού ολιγοαδενυλιωμένου *c-myc* mRNA (Ioannidis *et al.*,1996) και ότι η μεταφρασιμότητά του είναι ανεξάρτητη από το μήκος της πολυ (A) ουράς του μηνύματος. Συγκεκριμένα παρουσία κορδουσεπίνης ή 3'-δεοξυαδενοσίνης, το *c-myc* mRNA που προκύπτει είναι ολιγοαδενυλιωμένο ή ακόμα και αποαδενυλιωμένο, τα επίπεδα του *c-myc* mRNA μειώνονται αλλά τα επίπεδα της πρωτεΐνης MYC παραμένουν αμετάβλητα. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η ύπαρξη μιας μακριάς πολυ (A) ουράς δεν αποτελεί προϋπόθεση για την μετάφραση *c-myc* mRNA (Ioannidis *et al.*, 1999). Παρόλα αυτά ,ο Thoma και οι συνεργάτες του, το 2008, έδειξαν ότι η πολυ (A) ουρά ενισχύει το στάδιο έναρξης της μετάφρασης μέσω IRES για το *c-myc* mRNA, σε συνεργασία με ένα σύνολο πρωτεϊνικών παραγόντων(eIFs 2, 3,

4A, 4B, 5) ανεξάρτητα από την παρουσία της πρωτεΐνης πρόσδεσης στο πολυ(A) (Thoma *et al.*,2008).

2.3.3 Η αλληλουχία αστάθειας εντός της κωδικής περιοχής του *c-myc* mRNA.

Σε μελέτες όπου διαγράφηκαν οι πλούσιες σε AU περιοχές αστάθειας του *c-myc* mRNA, δεν έχουν σαν αποτέλεσμα την απόλυτη σταθεροποίηση του μηνύματος. Το εύρημα αυτό αποτέλεσε ισχυρή ένδειξη για την παρουσία και κάποιας άλλης αποσταθεροποιητικής περιοχής μέσα στο *c-myc* mRNA. Μελετώντας το χρόνο ημιζωής υβριδικών μηνυμάτων που περιείχαν τμήματα της κωδικής περιοχής του *c-myc* mRNA, αναγνωρίστηκε μια αλληλουχία αστάθειας και ονομάστηκε CRD (coding region instability determinant). Απόδειξη αποτέλεσε το γεγονός ότι η απομάκρυνση αυτής της περιοχής από το μήνυμα του *c-myc* σταθεροποιεί το μόριο καθώς επίσης η εισαγωγή της CRD αλληλουχίας μέσα στο πλαίσιο ανάγνωσης του μηνύματος της β -γλοβίνης αποσταθεροποιεί το μήνυμα αυτό. Σε *in vitro* σύστημα μελέτης της αποικοδόμησης του *c-myc* mRNA, οι Bernstein *et al.* (1992) ανέφεραν για πρώτη φορά ότι η περιοχή αστάθειας CRD του μηνύματος του *c-myc* θα μπορούσε να λειτουργεί ως εναλλακτικός στόχος για ενδονουκλεόλυση.

Αναλυτικά, έχει βρεθεί ότι η αλληλουχία των 249 τελευταίων νουκλεοτιδίων της κωδικής περιοχής του *c-myc* mRNA (νουκλεοτίδια 1638 - 1886) προσδίδει αστάθεια στο *c-myc* mRNA και αποτελεί στόχο ενδονουκλεασών κατά την μετάφραση. Έχει προταθεί το μοντέλο από τους Lemm και Ross σύμφωνα με το οποίο κατά τη διάρκεια της μετάφρασης συμβαίνει μία παύση του ριβοσώματος στην περιοχή του CRD λόγω της παρουσίας ενός σπάνιου κωδικονίου αργινίνης (CGA) σε μια γειτονική θρεονίνη (ACA) και η περιοχή βρίσκεται εκτεθειμένη στην πέψη από ενδονουκλεάσες εκτός εάν προστατεύεται (Lemm και Ross *et al.*, 2002). Η αλλαγή αυτών των κωδικονίων με πιο κοινά κωδικόνια αυξάνει την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης και την αφθονία του mRNA *in vitro*. Από αυτά τα πειράματα προήλθαν οι πρώτες ενδείξεις ότι η περιοχή αυτή αποτελεί θέση πρόσδεσης για μια ή περισσότερες πρωτεΐνες οι οποίες προστατεύουν το μήνυμα. Τελικά, η πρωτεΐνη που αναγνωρίζει ειδικά και δεσμεύεται στην περιοχή αυτή του *c-myc* mRNA, αναγνωρίστηκε, ταυτοποιήθηκε και ονομάστηκε CRD-BP(coding region determinant binding protein) (Doyle *et al.*,1998). Αλληλουχία αστάθειας εντός της κωδικής περιοχής, εντοπίζεται και σε άλλα βραχύβια μηνύματα RNA, όπως στο *c-fos* και στην ιντερλευκίνη-2 και επηρεάζει τον χρόνο ημίσειας ζωής με τρόπο που εξαρτάται από τη μετάφραση.

Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το *c-myc* mRNA αποικοδομείται γρήγορα εκτός αν (i) μεταφραστεί χωρίς παύση ή (ii) προστατεύεται από την πρωτεΐνη πρόσδεσης στην CRD αλληλουχία όταν συμβαίνει παύση.

Ο ρυθμός με τον οποίο λοιπόν συντίθενται οι πρωτεΐνες εξαρτάται από τον ρυθμό μεταγραφής, ωρίμανσης και μεταφοράς του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, από το χρονικό διάστημα που το ώριμο mRNA παραμένει ακέραιο ώστε να είναι διαθέσιμο για μετάφραση αλλά και από την συχνότητα με την οποία μεταφράζεται το ίδιο μόριο mRNA.

2.4 Μετα-μεταφραστική ρύθμιση.(Post-translational regulation).

Η μετα-μεταφραστική ρύθμιση αναφέρεται στις τροποποιήσεις που υφίστανται οι πρωτεΐνες μετά την σύνθεσή τους. Οι πρωτεΐνες υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις για να προκύψει το ώριμο προϊόν. Οι τροποποιήσεις αυτές μπορούν να εμφανιστούν στις πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων ή στο καρβοξυ- ή αμινο τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Οι δυναμικές θέσεις που μπορούν να τροποποιηθούν είναι αυτές στις οποίες υπάρχει μια λειτουργική ομάδα που μπορεί να συμμετέχει σε αντιδράσεις. Τροποποιείται μια υπάρχουσα λειτουργική ομάδα ή γίνεται προσθήκη μιας νέας. Για παράδειγμα οι ομάδες υδροξυλίου της σερίνης, της θρεονίνης και της τυροσίνης μπορούν να επιδέχονται φωσφορυλίωση ή τα κατάλοιπα αμίνης της λυσίνης, της αργινίνης και της ιστιδίνης μπορούν να ακετυλιώνονται.

Πληθώρα τροποποιήσεων επιδέχονται οι πρωτεΐνες, με πιο συχνές την φωσφορυλίωση, την ουβικιτινίωση, την γλυκοζυλίωση, την υδροξυλίωση, την μεθυλίωση κ.α. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις παίζουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση της στερεοδιάταξης των πρωτεϊνών, στην πρόσδεση σε μόρια στόχους ,στην μετακίνηση τους σε συγκεκριμένα υποκυττάρια διαμερίσματα, στην ημιζωή, στην αλληλεπίδρασή τους με άλλες πρωτεΐνες αλλά και στη λειτουργική τους κατάσταση.

Ορισμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (π.χ., φωσφορυλίωση) είναι εύκολα αναστρέψιμες με τη δράση συγκεκριμένων ενζύμων. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των τροποποιητικών ενζύμων επιτρέπει τον έλεγχο της πρωτεϊνικής λειτουργίας. Ένας παρόμοιος έλεγχος με την καταστροφή της πρωτεΐνης και την *de novo* σύνθεσή της θα απαιτούσε πολύ μεγαλύτερο χρόνο και περισσότερη ενέργεια (Prabakaran *et al.*,2012).

Η πρωτεΐνη MYC επιδέχεται μετα μεταφραστικών τροποποιήσεων, οι οποίες είναι απαραίτητες για την ρύθμιση της λειτουργίας της, αναλόγως με τις ενδοκυττάρειες συνθήκες (Hann *et al.*,2006). Φωσφορυλιώνεται σε δύο κατάλοιπα, στις θρεονίνη 58 και σερίνη 62, μετά την ενεργοποίηση οδών μεταγωγής σήματος. Τα κατάλοιπα αυτά βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο, το οποίο είναι εξαιρετικά συντηρημένο στις MYC ισομορφές. Αυτές οι δύο θέσεις φωσφορυλίωσης ασκούν αντίθετο έλεγχο στην αποικοδόμηση της MYC μέσω του πρωτεασώματος. Διαμέσου της σηματοδότησης από τις κινάσες Raf-MEK-ERK ή την οδό κινάσης φωσφατιδυλινοσιτόλη-3, η πρωτεΐνη MYC φωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο σερίνη 62 και σταθεροποιείται. Η παραπάνω φωσφορυλίωση αποτελεί ένα σήμα διέγερσης της ανάπτυξης. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να ανασταλεί από την δράση της κινάσης συνθετάσης γλυκογόνου-3β, η οποία φωσφορυλιώνει την MYC στο κατάλοιπο θρεονίνης 58. Αυτό το σήμα συμβάλλει στην αποικοδόμηση της. Η μετάλλαξη του κατάλοιπου θρεονίνης 58 σε αλανίνη οδηγεί σε σταθερότερη πρωτεΐνη με ογκογόνο δράση (Seo *et al.*,2008, Kalkat *et al.*,2017). Η MYC πρωτεΐνη φωσφορυλιώνεται από την κινάση της c-Jun πρωτεΐνης στα κατάλοιπα σερίνη 62 και σερίνη 71, γεγονός που ενισχύει το φαινόμενο της απόπτωσης που εξαρτάται από το *c-myc* (Noguchi *et al.*,1999).

Επομένως, τα παραπάνω παραδείγματα καθιστούν σαφές ότι σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο ελέγχεται τόσο η ημιζωή της πρωτεΐνης όσο και η λειτουργία της, καθώς η υπερέκφραση της πρωτεΐνης MYC μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις.

3. *c-myc* και καρκινογέννεση.

Η πρωτεΐνη MYC, ως μεταγραφικός παράγοντας, είναι βασικός ρυθμιστής των διεργασιών που προαναφέρθηκαν, μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των πολυάριθμων γονιδίων-στόχων της. Η έκφραση του *c-myc* έχει βρεθεί να αποκλίνει από τα φυσιολογικά επίπεδα σε πολλά κύτταρα με καρκινικό φαινότυπο. Ενέχεται στην καρκινική εξαλλαγή των κυττάρων μέσω της έκτοπης έκφρασής του ποσοτικά ή/και χρονικά και όχι απαραίτητα μέσω κάποιας μετάλλαξης που υφίσταται. Η έκτοπη έκφρασή του αλλάζει το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης και με αυτόν τον τρόπο συμβάλλει στην έναρξη και στην εξέλιξη της νόσου.

Παρόλα αυτά η υπερέκφραση της MYC και μόνο, δεν επαρκεί για να προκαλέσει τον κυτταρικό μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων. Οι συνέπειες της υπερέκφρασής της εξαρτώνται από περαιτέρω γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν την έκφραση και την δράση και άλλων γονιδίων. Για παράδειγμα σε ηπατοκύτταρα η

Εισαγωγή

υπερέκφραση της MYC συμβάλλει στην ογκογένεση μόνο με την ταυτόχρονη απώλεια της έκφρασης της ογκοκατασταλτικής *p-53* (Beer *et al.*, 2004). Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση της MYC επάγει την καρκινική εξαλλαγή των κυττάρων παράλληλα με την υπερέκφραση του αντιαποπτωτικού παράγοντα BCL2 ή με την μείωση των επιπέδων έκφρασης του *p19^{ARF}* (Jacobs *et al.*, 1999).

Η έκφραση του γονιδίου *c-myc* αυξάνεται λόγω γενωμικών μεταβολών. Οι περισσότεροι ασθενείς με λέμφωμα Burkitt και ορισμένοι με λέμφωμα B κυττάρων (DLBCL-diffuse large B-cell lymphoma) εμφανίζουν χρωμοσωμική μετατόπιση (t (8:14) (q24;q32)) που έχει ως αποτέλεσμα την είσοδο των εξωνίων 2 και 3 του γονιδίου *c-myc* υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή, όπως αυτόν του γονιδίου της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (IgH). Περίπου το 3% των ενήλικων ασθενών με οξεία Β-λεμφοβλαστική λευχαιμία παρουσιάζουν αυτήν την χρωμοσωμική μετατόπιση (Kiaei *et al.*, 2016). Ένας ακόμη μηχανισμός ενεργοποίησης του γονιδίου *c-myc* είναι η γονιδιακή επέκταση που οδηγεί σε αυξημένο αριθμό μετάγραφων. Η περιοχή 8q24, όπου εδράζεται το *c-myc* παρουσιάζει γονιδιακή επέκταση σε 20% έως 50% των περιστατικών καρκίνου του μαστού και σε όγκους στο παχύ έντερο. Η γονιδιακή επέκταση και τα υψηλά επίπεδα *c-myc* mRNA συνδέθηκαν με επιθετική μορφή της ασθένειας (Levens *et al.*, 2010, Nguyen *et al.*, 2017).

Αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του *c-myc* μπορούν να προκληθούν και από μεταβολές στην έκφραση *trans* παραγόντων, δηλαδή μικροRNA και πρωτεϊνών πρόσδεσης που αναγνωρίζουν το μετάγραφο. Τα επίπεδα έκφρασης του *c-myc* είναι πιθανόν να εντοπίζονται αυξημένα στους όγκους λόγω απώλειας των miRNA που το στοχεύουν. Για παράδειγμα η έκφραση των miRNA της οικογένειας let-7 μειώνεται συχνά στον καρκίνο. Όπως αναφέρθηκε αυτά τα miRNA αναγνωρίζουν μια περιοχή της 3' αμετάφραστης περιοχής του *c-myc* και το αποσταθεροποιούν (Balzeau *et al.*, 2017, Sampson *et al.*, 2007, Akao *et al.*, 2006). Επιπρόσθετα, η απορύθμιση της έκφρασης του *c-myc* μπορεί να οφείλεται και σε μεταβολές των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών πρόσδεσης που αναγνωρίζουν το *c-myc* mRNA και ελέγχουν την σταθερότητα και τα επίπεδα μεταφρασιμότητας. Παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη IMP1, η οποία ενεργοποιείται *de novo* ή / και υπερεκφράζεται σε διάφορες ανθρώπινες νεοπλασίες. Τα επίπεδα έκφρασης της ογκοεμβρυικής πρωτεΐνης ελέγχουν τα επίπεδα έκφρασης του *c-myc*. Η αποσιώπηση της έκφρασης της σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού (MCF-7), ωοθηκών (ES-2), ήπατος (HepG2) κ.α μείωσε τον ρυθμό του πολλαπλασιασμού, γεγονός που σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα *c-myc* mRNA και πρωτεΐνης (Ioannidis *et al.*, 2005, Kobel *et al.*, 2007, Gutschner *et al.*, 2014).

Έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο του *c-myc* που επηρεάζουν τον ρυθμό της πρωτεϊνοσύνθεσης. Πρόσφατα δεδομένα αποδεικνύουν ότι μία μετάλλαξη στην περιοχή που μεταγράφεται στο *c-myc* IRES είναι ικανή να ενισχύσει τον ρυθμό της έναρξης της μετάφρασης μέσω της εναλλακτικής εσωτερικής θέσης πρόσδεσης του ριβοσώματος, ανεξάρτητα από την μετάφραση μέσω της 5' καλύπτρας, και αντιπροσωπεύει ένα νέο μηχανισμό ογκογένεσης. Σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα η μετάλλαξη της περιοχής που μεταγράφεται στο IRES από CCCTCTC σε CTCTCTC (αλλαγή C-T) συσχετίστηκε με την έκτοπη αύξηση της έκφρασής του (Chappel *et al.*,2000).

Επίσης μεταλλάξεις στο γονίδιο του *c-myc* βρέθηκαν να επηρεάζουν και την σταθερότητα της πρωτεΐνης MYC που προκύπτει. Σημειακές μεταλλάξεις οι οποίες τροποποιούν την πρωτεΐνη στα κατάλοιπα προλίνη 57 και θρεονίνη 58 αποτρέπουν την αποικοδόμησή της μέσω του μηχανισμού της ουμπικουιτίνης. Αυτό, συνεπάγεται συσσώρευση του πρωτεϊνικού προϊόντος μέσα στο κύτταρο (Bahram *et al.*,2000).

4. Η οικογένεια των IMPs πρωτεϊνών.

Ο Ioannidis και οι συνεργάτες του, το 2001, απέδειξαν ότι η πρωτεΐνη CRD-BP1(coding region determinant-binding protein 1) στον ποντικό είναι ταυτόσημη της IMP1 (IGF-II mRNA-binding protein 1) στον άνθρωπο. Αποδείχθηκε λοιπόν ότι οι πρωτεΐνες IMP1 (IGF-II mRNA-binding protein 1) στον άνθρωπο, η ZBP1 (zipcode binding protein 1) στην όρνιθα, η Vg1-RBP/Vera(Vg1-RNA binding protein) στον *Xenopus*-βάτραχο και η CRD-BP1(coding region determinant-binding protein 1) στον ποντικό αποτελούν ορθόλογα μέλη της ίδιας ομάδας πρωτεϊνών. Η ομοιότητά τους υποδεικνύει ότι οι πρωτεΐνες αυτές έχουν παρόμοιες λειτουργίες. Προσδέχουν μηνύματα και ελέγχουν την σταθερότητα, την μετάφραση, την ενδοκυττάρια μετακίνηση και την χωροθέτηση τους.

Τρία παράλογα πρωτεϊνών, IMP1,2 και 3, έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο. Εκφράζονται κυρίως κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Στους ενήλικες η έκφραση της πρωτεΐνης IMP2 διατηρείται σε πολλούς ιστούς, αντίθετα με τις IMP1 και IMP3 που εκφράζονται μόνο σε πολυδύναμα κύτταρα. Έπειτα όμως από κάποιον κακοήγη μετασχηματισμό μπορούν να εκφραστούν εκ νέου(*de novo*). Η έκφραση τους συμβάλλει στην ογκογένεση, στην εξέλιξη της νόσου και συσχετίζεται με κακή πρόγνωση (Müller *et al.*,2018).

4.1 Η ρύθμιση της έκφρασης των IMPs.

Φυσιολογικά η έκφρασή του γονιδίου *Imp1* ελέγχεται από το μονοπάτι Wnt, την β-κατενίνη και από την MYC (Nishino *et al.*, 2013, Noubissi *et al.*, 2006, Gu *et al.*, 2008, Noubissi *et al.*, 2010). Η σηματοδότηση μέσω Wnt μπορεί να προάγει την έκφραση του *Imp1* σε νευρικά βλαστοκύτταρα. Η β-κατενίνη συνδέεται ειδικά στον υποκινητή του γονιδίου *Imp1* και ενεργοποιεί την μεταγραφή. Επιπρόσθετα, αποδείχθηκε ότι η πρωτεΐνη IMP1 συνδέεται με το mRNA της β-κατενίνης και αυξάνει την σταθερότητά του. Πρόκειται για έναν μηχανισμό θετικής ανατροφοδότησης/ έναν βρόχο θετικής ανάδρασης που IMP1 και β-κατενίνη ρυθμίζουν το ένα την έκφραση του άλλου. Η έκφραση του γονιδίου *Imp1* ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη MYC. Το γονίδιο *Imp1* φέρει στην περιοχή του υποκινητή τέσσερις αλληλουχίες που αναγνωρίζει και συνδέεται ο μεταγραφικός παράγοντας MYC. Τόσο η MYC όσο και η MAX αλληλεπιδρούν με τον υποκινητή. Η υπερέκφραση της MYC οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα μεταγραφής της IMP1. Έτσι η MYC επάγει την μεταγραφή του *Imp1* και η πρωτεΐνη που εκφράζεται σταθεροποιεί το μετάγραφο του *c-myc* γονιδίου, φαινόμενο παρόμοιο με αυτό της ρύθμισης από την β-κατενίνη. Η έκφραση του γονιδίου *Imp1* ρυθμίζεται και από την οικογένεια miRNA let-7, που προσδένουν στην 3'αμετάφραστη περιοχή και ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση του *Imp1* (Boyerinas *et al.*, 2008).

Όσον αφορά την έκφραση του *Imp2* γονιδίου ελέγχεται από την πρωτεΐνη HMGA2. Το γονίδιο *Imp2* διαθέτει μια πλούσια σε AT περιοχή στο πρώτο ιντρόνιο, περιοχή που αναγνωρίζει η HMGA2. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης αν και δεν λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας συμμετέχει στον σχηματισμό συμπλόκων νουκλεοπρωτεϊνών (ενισχυοσώματα) στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων του. Γειτονικά της HMGA2 προσδένεται ο NF-κB και συνεργάζεται με την πρωτεΐνη για να ξεκινήσει η μεταγραφή του γονιδίου *Imp2* (Cleynen *et al.*, 2007, Morishita *et al.*, 2013).

4.2 Ο μηχανισμός δράσης των πρωτεϊνών IMPs.

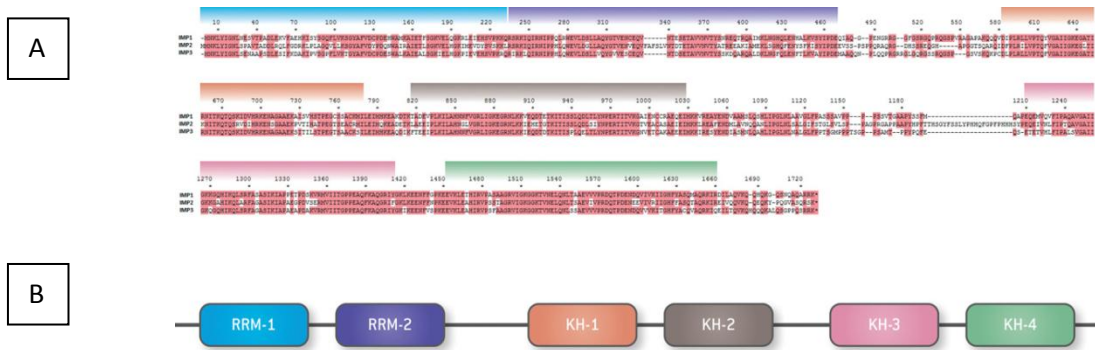
Η αλληλουχία των αμινοξέων και η δομή των τριών IMPs πρωτεϊνών είναι παρόμοιες. Η συνολική ομοιότητα της αλληλουχίας των αμινοξέων μεταξύ των τριών πρωτεϊνών είναι 56% με ακόμη μεγαλύτερη ομοιότητα εντός των περιοχών με κοινές λειτουργίες. (Bell *et al.*, 2013).

Και οι τρεις πρωτεΐνες διαθέτουν δύο μοτίβα αναγνώρισης RNA (RNA Recognition Motifs) στο αμινοτελικό άκρο και τέσσερις περιοχές ομολογίας K (hnRNP KH) στην καρβοξυτελική περιοχή (Εικόνα 11) (Nielsen *et al.*, 1999). Όλα τα μέλη της οικογένειας IMP

είναι ικανά να προσδέουν μηνύματα RNA. Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι οι περιοχές ομολογίας K των πρωτεϊνών είναι υπεύθυνες για τη δέσμευση των μορίων RNA ενώ οι RRM's περιοχές συμβάλουν στη σταθεροποίηση του συμπλέγματος IMP-mRNA (Nielsen *et al.*, 2004, Wachter *et al.*, 2013). Οι περιοχές ομολογίας K 3 και 4 δεσμεύουν το RNA ως μία ενιαία μονάδα σε μια αντιπαράλληλη διαμόρφωση ψευδοδιμερούς (Chao. *et al.*,2010). Αλληλεπιδράσεις χαμηλής συγγένειας μεταξύ των RRM's και των περιοχών ομολογίας K 3 και 4 με το mRNA στόχο οδηγούν σε ιδιαίτερα εξειδικευμένη δέσμευση πρωτεΐνης-RNA. Μετά την πρόσδεση ενός μορίου IMP στο mRNA στόχο αυτή διμερίζεται, αυξάνοντας έτσι την σταθερότητα των συμπλόκων που δημιουργεί. Ο Nielsen και οι συνεργάτες του πρότειναν το εξής μοντέλο: $R + 2P \leftrightarrow RP1 + P \leftrightarrow RP2$. Συνοπτικά, πρότειναν ότι η πρωτεΐνη δέσμευσης RNA χρησιμοποιεί ένα διαδοχικό μηχανισμό διμερισμού στο μόριο RNA, που το πρώτο βήμα είναι γρήγορο και δημιουργεί ένα σύμπλοκο RNA-Πρωτεΐνης 1(RP1) χαμηλής σταθερότητας, ενώ το δεύτερο βήμα, με την πρόσδεση ενός ακόμα μορίου πρωτεΐνης, είναι το καθοριστικό γεγονός και οδηγεί σε σχηματισμό σταθερού συμπλόκου RP2. Η διαδικασία αυτή είναι ζωτικής σημασίας για τις IMPs που ενέχονται στην μετακίνηση μηνυμάτων RNA γιατί εξασφαλίζει την σωστή συναρμολόγηση των συμπλόκων RNA-πρωτεΐνης και της σταθερότητα τους.

Εκτός από τον μηχανισμό μέσω του οποίου γίνεται η πρόσδεση των μηνυμάτων στόχων έχουν γίνει προσπάθειες να ταυτοποιηθούν αλληλουχίες στα μηνύματα που αναγνωρίζουν και προσδέουν. Οι θέσεις πρόσδεσης που έχουν αναφερθεί εντοπίζονται στην 5' αμετάφραστη περιοχή, στην κωδική περιοχή και στην 3' αμετάφραστη περιοχή των mRNAs. Δεν υπάρχει μία συγκεκριμένη αλληλουχία στόχος στα μηνύματα. Το μόνο συμπέρασμα που μπόρεσε να προκύψει είναι ότι οι στόχοι της IMP1 φέρουν την αλληλουχία/μοτίβο CCYHHCC (όπου Y = C ή U και H= C ή U ή A) και προτιμούνται οι περιοχές που δεν είναι πλούσιες σε πουρίνες (Jonson *et al.*,2007). Επίσης οι IMP1 και IMP2 βρέθηκαν να δεσμεύονται κυρίως στις 3' αμετάφραστες περιοχές των γονιδίων στόχων με επαναλήψιμο μοτίβο CA ενώ η IMP3 δεσμεύεται ως επί των πλείστων κοντά στις κωδικές περιοχές των στόχων της. Τέλος, ο Huang και οι συνεργάτες του(2018), πρόσφατα, αποκάλυψαν ότι οι IMPs αναγνωρίζουν και προσδέουν μεθυλιωμένα μόρια αδενοσίνης, N⁶-μεθυλαδενοσίνης (m⁶A). Τα τροποποιημένα μόρια βρίσκονται κυρίως στις 3'αμετάφραστες περιοχές των mRNA σε αλληλουχίες RR(m⁶ A) CH (όπουR: G ή A, όπου H: A, C ή U, C). Οι IMPs προσδέουν αυτές τις αλληλουχίες με μεθυλιωμένα μόρια αδενοσίνης, μέσω των περιοχών ομολογίας K και καθορίζουν την τύχη των mRNA.

Εισαγωγή



Εικόνα 11: Δομή των IMPs. (Α) Αντιπαράθεση των αλληλουχιών των αμινοξέων και σύγκριση. Η ομοιότητα της αλληλουχίας επισημαίνεται με κόκκινο χρώμα και τα χρώματα στα πλαίσια παρουσιάζουν τις αλληλουχίες που αντιστοιχούν στα δομικά μοτίβα που εμφανίζονται στο Β. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν αριθμούς βάσεων των αντίστοιχων γονιδίων. (Β) Σχηματική απεικόνιση των δομικών μοτίβων που φέρουν οι IMPs (Degrauwe *et al.*,2016).

4.3 Τα mRNA στόχοι και οι βιολογικές λειτουργίες της πρωτεΐνης IMP1.

Η πρωτεΐνη IMP1 είναι κυρίως κυτταροπλασματική και βρέθηκε ότι προσδένει > 3000 mRNA στόχους. Όπως αναφέρθηκε, ως trans παράγοντας, ελέγχει την μετα-μεταγραφική τύχη των μηνυμάτων που προσδένει, αμέσως μετά την διαδικασία της μεταγραφής και ρυθμίζει την ενδοκυττάρια χωροθέτηση, την σταθερότητα και την μετάφρασή τους. Φέρει παρόλα αυτά αλληλουχίες που της επιτρέπουν την είσοδο και την έξοδο από τον πυρήνα υποδηλώνοντας ότι μπορεί να δεσμεύει πυρηνικά RNA στόχους και να διευκολύνει την εξαγωγή τους προς το κυτταρόπλασμα (Hafner *et al.*,2010) .

Η πρωτεΐνη IMP1 εκφράζεται κατά την εμβρυογένεση και έχει βασικό ρόλο στην φυσιολογική ανάπτυξη των εμβρύων. Σε μελέτες ποντικών η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης οδήγησε σε νανισμό, σε μειωμένη ανάπτυξη του εντέρου και τελικά αυξημένα επίπεδα θνησιμότητας (Hansen *et al.*,2004). Επιπλέον, ελέγχει την ανάπτυξη των νευρώνων, ρυθμίζει την δημιουργία των αξόνων και τη μετανάστευση νευρωνικών κυττάρων και την καθοδήγηση των αξόνων ελέγχοντας την έκφραση του mRNA της β-ακτίνης. Μία ακόμα σημαντική λειτουργία της πρωτεΐνης είναι η διατήρησης της επιθηλιακής ακεραιότητας των ιστών των εμβρύων (Huang *et al.*,2018). Μέχρι στιγμής, οι πληροφορίες για τα ρυθμιστικά δίκτυα που συμμετέχει η πρωτεΐνη IMP1 στην εμβρυϊκή ανάπτυξη είναι συγκεχυμένες. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης οργανισμών, ενέχεται στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Η έκτοπη έκφραση του γονιδίου που έχει ως συνέπεια την απορύθμιση της έκφρασης των στόχων του, προκαλεί δυσπλασία στους ιστούς και τα όργανα.

Η IMP1 σε συνεργασία με άλλες πρωτεΐνες ελέγχει πληθώρα των στόχων της δημιουργώντας κυτταροπλασματικά κοκκία. Το 3% των συνολικών μετάγραφων βρέθηκε να ενσωματώνεται σε ριβονουκλεοπρωτεϊνικά κοκκία, που παρέχουν προστασία από πρόωρη αποικοδόμηση, προστασία από έκτοπη μετάφραση, ποσοτικά ή/και χρονικά και τέλος επιτρέπουν την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης μόνο υπό κατάλληλες ενδοκυττάρειες συνθήκες. Τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά κοκκία έχουν μέγεθος 100-300-nm (διάμετρος) και βρίσκονται συνήθως γύρω από τον πυρήνα ή/ και στις απολήξεις των αναπτυσσόμενων νευρώνων, γεγονός που υποστηρίζει τον ρόλο της στην μετακίνηση μηνυμάτων mRNA. Η IMP1 ταυτοποιήθηκε σε mRNP κοκκία παρουσία πολλών πρωτεϊνών. Όμως τα κοκκία δεν διαθέτουν τις eIF4E και eIF4G καθώς και πρωτεΐνες της 60S ριβοσωμικής υπομονάδας, υποδηλώνοντας ότι τα μετάγραφα που μεταφέρονται δεν μεταφράζονται (Jøhanson *et al.*, 2007). Τα κοκκία που σχηματίζει λοιπόν είναι διαφορετικές οντότητες και δεν πρέπει να συγχέονται με τα κοκκία που σχηματίζονται σε συνθήκες στρες (stress granules), με τα σωματίδια επεξεργασίας (Processing bodies) που δημιουργούνται στο κυτταρόπλασμα κατά την επεξεργασία των μηνυμάτων mRNA, με τα κοκκία FMRP (fragile X mental retardation protein granules) και με τα hStaufen που σχηματίζουν οι νευρώνες (Mitchell και Parker *et al.*, 2014). Συνεπώς, η IMP1 μέσω και της δημιουργίας αυτών των κυτταροπλασματικών δομών μπορεί να ρυθμίζει την πορεία των mRNA.

Η IMP1 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες και ρυθμίζει την τύχη των μετάγραφων στόχων της. Παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των Weindensdorfer *et al.* και των συνεργατών του, το 2009, που απέδειξε ότι η IMP1 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες DHX9, YBX1, HNRNPU, και SYNCRIP όταν προσδένεται στην CRD περιοχή του *c-myc* mRNA ώστε να διασφαλιστεί η σταθεροποίηση του μηνύματος. Η συγκρότηση του *c-myc* mRNA σε ριβομουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα, το προστατεύει από την ενδονουκλεολυτική επίθεση που ξεκινάει από την CRD περιοχή του.

Η δράση της IMP1 έναντι κάποιων στόχων έχει διευκρινιστεί διεξοδικά. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται κάποια mRNA στόχοι της, η *cis* αλληλουχία που προσδένει καθώς και η λειτουργία επί του μηνύματος. Από τα πρώτα μηνύματα στόχοι που μελετήθηκαν είναι η β-ακτίνη και ο ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας II.

Η πρωτεΐνη IMP1 συμμετέχει στην ρύθμιση του εντοπισμού και της μετάφρασης του mRNA της β-ακτίνης στις θέσεις ενεργού πολυμερισμού της. Με αυτόν τον τρόπο ρυθμίζει την κυτταρική μετανάστευση και τον σχηματισμό των αξόνων των νευρικών κυττάρων. Η IMP1 προσδέεται στην 3'αμετάφραστη περιοχή του mRNA β-ακτίνης μέσω μιας συντηρημένης αλληλουχίας 54 νουκλεοτιδίων που φέρει. Μόλις δημιουργηθεί το

Εισαγωγή

ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο, δημιουργούνται κοκκία στο κυτταρόπλασμα. Τα κοκκία είναι υπεύθυνα για την ενδοκυττάρια μεταφορά του mRNA β-ακτίνης. Προωθείται έτσι η μετατόπιση του μετάγραφου σε πλούσιες σε ακτίνη προεξοχές, δενδρίτες και κώνους ανάπτυξης. Το mRNA β-ακτίνης μεταφέρεται σε κατάλληλες θέσεις ενδοκυττάρια και μεταφράζεται εάν και εφόσον η IMP1 πρωτεΐνη φωσφορυλιωθεί σε ένα κατάλοιπο τυροσίνης στην θέση 396 (Tyr 396). Αυτή η μετα-μεταφραστική τροποποίηση που επιδέχεται από την Src κινάση, είναι ικανή να προκαλέσει την αποσυναρμολόγηση των κυτταροπλασματικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών και να ενεργοποιήσει τη μετάφραση του μηνύματος. Η διαδικασία είναι σημαντική και συμβάλει στην διατήρηση της πολικότητας και της κινητικότητας των κυττάρων (Huttelmaier *et al*,2005).

Ένα ακόμα καλά μελετημένο μήνυμα που αναγνωρίζεται και προσδέεται από την IMP1 είναι το mRNA του αυξητικού παράγοντα II τύπου ινσουλίνης(Insulin-like growth factor II), παράγοντας απαραίτητος για την ανάπτυξη των εμβρύων. Κατά την διάρκεια της μεταγραφής του γονιδίου *Igf2* προκύπτουν mRNA με διαφορετικού μεγέθους 5' αμετάφραστη περιοχή. Το μετάγραφο που προκύπτει από το υποκινητή P2 με 1170 νουκλεοτίδια στην 5' αμετάφραστη περιοχή είναι αυτό που μπορεί να αναγνωρίσει και να προσδέσει η IMP1(IGF2 leader 3 mRNA).Το μετάγραφο φέρει έξι θέσεις πρόσδεσης για την IMP1 πρωτεΐνη. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης καταστέλλει την έναρξη της μετάφρασης του (Nielsen *et al.*,1999). Μια πιο πρόσφατη μελέτη του Dai και των συνεργατών του όμως αποκάλυψε ότι μια μετα-μεταγραφική τροποποίηση της IMP1 από το σηματοδοτικό μονοπάτι mTORC2 είναι απαραίτητη για την έναρξη της μετάφρασης του. Αναλυτικότερα, το μονοπάτι mTORC2 κινάσης φωσφορυλιώνει την IMP1 σε ένα κατάλοιπο σερίνης στην θέση 181 (Ser 181) ανάμεσα στο RRM2 και στην περιοχή KH1, ταυτόχρονα με την μετάφραση της πρωτεΐνης. Η φωσφορυλίωση της IMP1 στο κατάλοιπο σερίνης είναι το κρίσιμο γεγονός για το μάτισμα του μηνύματος *Igf2* (leader 3)mRNA και την έναρξη της μετάφρασης του μέσω IRES (Dai *et al.*,2013).

Η σηματοδότηση λοιπόν που επιδέχεται η IMP1 τόσο από την Src κινάση όσο και από την mTORC2 κινάση ρυθμίζει και ελέγχει τις λειτουργίες της. Τέλος φαίνεται να καθορίζουν την μετα-μεταγραφική πορεία κάποιων mRNA στόχων της.

4.4 Η μελέτη της έκφρασης της IMP1 στον καρκίνο.

Η πρωτεΐνη IMP1 εκφράζεται φυσιολογικά κατά την εμβρυογένεση, όπως αναφέρθηκε και *de novo* κατά την ογκογένεση. Η έκτοπη έκφραση στους περισσότερους

τύπους καρκίνου αποδίδεται σε απομεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου (Ioannidis *et al.*,2005). Η ογκογόνος δράση της IMP1 οφείλεται στον έλεγχο της μετα-μεταγραφικής πορείας των μηνυμάτων στόχων της. Ενισχύει την έκφραση για παράδειγμα κλασικών ογκογονιδίων, όπως *c-myc*, το *k-ras*, το *gli1*, το *β-TrCP1*, με αποτέλεσμα την ενίσχυση όλων των χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων.

Η πρωτεΐνη IMP1 διαθέτει ογκογόνο λειτουργία και υπερεκφράζεται στο 80% των καρκίνων. Η έκτοπη έκφρασή της αποτελεί πρώιμο συμβάν σε κακοήθεις μετασχηματισμούς (Ioannidis *et al.*,2001). Ρυθμίζει την πολικότητα, την προσκόλληση, τη μετανάστευση και την διεισδυτικότητα των κυττάρων του όγκου. Επιπλέον, η έκφρασή της συνδέεται με τη διαδικασία της μετάστασης και συσχετίζεται με μια συνολική κακή πρόγνωση. Αυτά τα ευρήματα παρουσιάζουν την IMP1 ως ρυθμιστή της ανάπτυξης του όγκου και συνδέουν την έκφρασή της με επιθετικές μορφές καρκίνου (Dimitriadis *et al.*,2007, Hamilton *et al.*,2013, Chatterji *et al.*,2018).

Πρόσφατα δημιουργήθηκε ένα τεχνητό μόριο, το BTYNB (2 - {(5-βρωμο-2-θειενυλ) μεθυλενο] αμινο} βενζαμίδιο), το οποίο αναστέλλει την πρόσδεση της IMP1 στο *c-myc* mRNA, μειώνει τα επίπεδα μηνύματος και πρωτεΐνης και αναστέλλει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Το μόριο αυτό στοχεύει στην αναστολή της λειτουργίας του ρυθμιστικού βρόχου προώθησης της ανάπτυξης όγκων. Όπως αναλύθηκε η MYC επάγει την έκφραση της IMP1 και η IMP1 σταθεροποιεί το μετάγραφο *c-myc* επιτρέποντας την περαιτέρω έκφραση της IMP1. Το τεχνητό μόριο δεν έχει καμία επίδραση στα κύτταρα που δεν εκφράζουν IMP1, καθιστώντας το υποψήφια ουσία με θεραπευτική αξία για περαιτέρω διερεύνηση. Η εύρεση αναστολέων της δράσης της IMP1 θα μπορούσε να συμβάλει στην ανάπτυξη νέας θεραπείας του καρκίνου (Mahapatra *et al.*,2017).

Πίνακας 1:Ενδεικτικά μηνύματα στόχοι RNA της πρωτεΐνης IMP1,οι cis - περιοχές που αναγνωρίζει στο καθένα και η δράση της.			
Στόχος mRNA.	Cis περιοχή που αναγνωρίζει.	Δράση.	Ref.
MYC	CDS	Αναστολή της εξαρτώμενης από την CRD περιοχή αποικοδόμησης του mRNA	Lemm. Ross et al.,2002
PTEN	CDS	Αναστολή της εξαρτώμενης από την CRD περιοχή αποικοδόμησης του mRNA	Stohr et al.,2012
ACTB	3'UTR	Αναστολή της μετάφρασης, μεταφορά του mRNA	Huttelmaier <i>et al</i> ,2005
CD44	3'UTR	Αναστολή της αποικοδόμησης του mRNA	Stohr et al.,2012
CTNNB1	3'UTR	Αναστολή της αποικοδόμησης του mRNA	Bell et al.,2013
IGF2	5'UTR	Αναστολή της μετάφρασης	Dai et al.,2013
MAPK4	3'UTR	Αναστολή της μετάφρασης	Stohr et al.,2012
MDR1	CDS	Αναστολή της εξαρτώμενης από την CRD περιοχή αποικοδόμησης του mRNA	Bell et al.,2013
GLI1	CDS	Αναστολή της αποικοδόμησης του mRNA	Hosono et al.,2017
HCV	5'/3' UTR	Ενίσχυση της μετάφρασης	Niepmann et al.,2018
K RAS	CDS & 3' UTR	Αναστολή της αποικοδόμησης του mRNA	Bell et al.,2013
BTRC	CDS	Αναστολή της αποικοδόμησης του mRNA	Stohr et al.,2012
H19	3' UTR	Μεταφορά του μηνύματος	Hosono et al.,2017
EEF2		Αύξηση του ρυθμού της μετάφρασης	Stohr et al.,2012
TAU	3' UTR	Μεταφορά του μηνύματος	Rebucci et al.,2015
MKI67		Σταθεροποίηση του μετάγραφου	Xu et al,2017
ciAP1	5' UTR IRES	Ενίσχυση της μετάφρασης μέσω IRES	Silke et al.,2013
PABPC1	5' UTR	Ενίσχυση της μετάφρασης	Hosono et al.,2017

5. Σηματοδοτικά μονοπάτια.

Η ικανότητα των κυττάρων να αντιλαμβάνονται και να ανταποκρίνονται σωστά στο μικροπεριβάλλον τους είναι η βάση για την διατήρηση της ομοιόστασης και για την ανάπτυξη των οργανισμών. Αυτή η επικοινωνία επιτυγχάνεται μέσω της κυτταρικής σηματοδότησης που διέπει όλες τις ενδοκυττάρειες λειτουργίες. Σε όλες τις διαδικασίες κύρια ευθύνη φέρουν οι οδοί μεταγωγής σημάτων. Ένα πολύπλοκο σηματοδοτικό κύκλωμα καλά "ενορχηστρωμένο" ρυθμίζει την πορεία των φυσιολογικών κυττάρων. Διαταραχές στην μεταγωγή αλλά και την επεξεργασία της πληροφορίας στο κύτταρο είναι υπεύθυνες για πολλά νοσήματα.

Γενικά, οι υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας διεγείρουν τα ενδοκυττάρια ένζυμα-στόχους, τα οποία μπορούν είτε να συνδεθούν άμεσα στους υποδοχείς είτε να συζευχθούν έμμεσα με πρωτεΐνες G. Οι ενδοκυττάρειες οδοί σηματοδότησης συνδέουν έτσι την κυτταρική επιφάνεια με το εσωτερικό του κυττάρου, οδηγώντας σε μεταβολές στην έκφραση γονιδίων σε απόκριση εξωκυττάρων ερεθισμάτων. Ένα συγκεκριμένο μόριο-σήμα μπορεί να προσδένεται σε κάποιον υποδοχέα, δηλαδή μία πρωτεΐνη κυτταρικής επιφάνειας και να διεγείρει την απόκριση των κυττάρων. Υπάρχουν αρκετές κατηγορίες μορίων που αναγνωρίζονται ευρέως, όπως είναι οι νευροδιαβιβαστές, οι ορμόνες, οι κυτοκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες και είναι υπεύθυνα για την έναρξη βιολογικών διεργασιών. Οι αλληλεπιδράσεις κάποιου υποδοχέα με ένα "σήμα" που αναγνωρίζει είναι υπεύθυνες για την πυροδότηση της αντίδρασης του κυττάρου. Στις περισσότερες περιπτώσεις, μια αλυσίδα αντιδράσεων μεταδίδει σήματα από την κυτταρική επιφάνεια σε μια ποικιλία ενδοκυτταρικών στόχων, μια διαδικασία που ονομάζεται ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος. Ένα περίπλοκο μονοπάτι μεταγωγής σήματος μπορεί να απαιτεί διάφορες αντιδράσεις μέχρι να διαδώσει μια πληροφορία ενδοκυττάρια όπως την ενεργοποίηση κάποιου υποδοχέα ή/και την αλυσιδωτή αλληλεπίδραση πρωτεϊνών. Τελικοί στόχοι οδών σηματοδότησης είναι συχνά μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι λειτουργούν για να ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση (Rennoll *et al.*, 2015).

Πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια όπως αναφέρθηκε ρυθμίζουν θετικά ή αρνητικά την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *c-myc*, ενέχονται στην ρύθμιση του ρυθμού αποικοδόμησης του μηνύματος RNA και της πρωτεΐνης. Αποκλίσεις από το φυσιολογική μεταγωγή σημάτων, όπως για παράδειγμα συστατικά ενεργά μονοπάτια, συμβάλλουν στην ενισχυμένη μεταγραφή του *c-myc* mRNA και / ή στην αυξημένη σταθερότητα της πρωτεΐνης MYC. Σε μια πληθώρα όγκων έχουν βρεθεί απορυθμισμένα μονοπάτια που οδηγούν στην

Εισαγωγή

έκτοπη έκφραση του *c-myc*. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μετάλλαξη που υφίσταται, σε διάφορους όγκους, η κινάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 3, η οποία καθιστά την πρωτεΐνη συστατικά ενεργή. Η πρωτεΐνη ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση β, η οποία με την σειρά της φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την κινάση συνθετάση του γλυκογόνου 3. Η πρωτεΐνη έτσι δεν φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη MYC στο κατάλοιπο θρεονίνης 58 με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η αποικοδόμηση της (Kalkat *et al.*,2017).

Η IMP1 πρωτεΐνη που ενέχεται στην ρύθμιση της έκφρασης του *c-myc*, όπως αναφέρθηκε ήδη, επιδέχεται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τόσο μέσω τόσο της δράσης της Src κινάσης όσο και της mTORC2.

Συνοπτικά:

5.1 Η οικογένεια των Src κινασών.

Την οικογένεια των SRC κινασών αποτελεί μια ομάδα γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροπλασματικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (FYN, SRC, YES, BLK, FGR, LCK, YRK, HCK, LYN). Παίζουν βασικό ρόλο στην ρύθμιση της μεταγωγής σημάτων αλληλεπιδρώντας με ένα σύνολο υποδοχέων του κυττάρου. Εμπλέκονται στην ρύθμιση θεμελιωδών κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων της επιβίωσης, της ανάπτυξης, της διαφοροποίησης κ.α. Έχουν αναγνωριστεί πολλά μόρια στόχοι τους που εξαρτώνται από την δράση τους. Οι πλειοτροπικές λειτουργίες τους υπογραμμίζουν την σημαντικότητα τους. Συχνά απορρυθμίζονται, μεταλλάσσονται ή υπερεκφράζονται σε καρκίνους, οδηγώντας σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα μέλη αυτής της οικογένειας γονιδίων έχουν αναγνωριστεί ως πρωτοογκογονίδια (Parsons *et al.*,2004). Είναι διαπιστωμένο ότι η συστατική ενεργοποίηση της σηματοδότησης από την Src κινάση μπορεί να οδηγήσει σε εξαλλαγή των κυττάρων. Αναστέλλοντας την έκτοπη σηματοδότηση από την Src αναστέλλεται ο ρυθμός του πολλαπλασιασμού και η εξέλιξη του όγκου (Jain *et al.*,2015).

Μελέτες των Barone και Courtneidge από το 1995 υποδεικνύουν ότι η δράση της Src κινάσης εμπλέκεται στην έκφραση του *c-myc*. Η αναστολή της Src σηματοδότησης καταστέλλει την εξαρτώμενη από την καλύπτρα μετάφραση του *c-myc*.

5.2 Το σηματοδοτικό μονοπάτι του mTOR.

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του mTOR (mammalian target of rapamycin) αποτελεί ένα κεντρικό ρυθμιστή του μεταβολισμού και της φυσιολογίας των θηλαστικών αλληλεπιδρώντας με οδούς που ανταποκρίνονται σε εξωκυττάρια ερεθίσματα. Ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη, τη μεταγραφή, την πρωτεϊνσύνθεση και την αυτοφαγία. Συχνά η λειτουργία του απορρυθμίζεται στις ανθρώπινες ασθένειες όπως ο διαβήτης, η παχυσαρκία και ο καρκίνος (Hung *et al.*, 2012).

Η πρωτεϊνική κινάση mTOR βρίσκεται σε δύο διακριτά πρωτεϊνικά σύμπλοκα, την κινάση mTOR C1 και την mTOR C2, το καθένα από τα οποία αποτελείται από διαφορετικές πρωτεΐνες, ανταποκρίνεται σε διαφορετικά σήματα και φωσφορυλιώνει διαφορετικά υποστρώματα ρυθμίζοντας διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες.

Τα δύο σύμπλοκα σχηματίζονται από την κινάση mTOR και περιέχουν κοινές και διαφορετικές πρωτεΐνες. Το mTORC1 σύμπλοκο αποτελείται από την πρωτεΐνη mTOR, με δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης, την Raptor, την mLST8 / GβL, την DEPTOR και την πρωτεΐνη PRAS40. Η Raptor μεσολαβεί για την συναρμολόγηση του συμπλόκου, την πρόσληψη υποστρωμάτων, τη ρύθμιση της δράσης της mTOR αλλά και του υποκυτταρικού εντοπισμού (Yip *et al.*, 2010). Ο ρόλος της mLST8 στη λειτουργία της mTORC1 δεν έχει διασαφηνιστεί όμως απαιτείται για την συναρμολόγηση και τη σταθερότητα του συμπλόκου (Kennedy και Lamming *et al.*, 2016). Η PRAS40 έχει χαρακτηριστεί ως αρνητικός ρυθμιστής του mTORC1. Δρα ως ανταγωνιστικός αναστολέας για τη δέσμευση υποστρωμάτων του συμπλόκου στην Raptor. Τέλος, η πρωτεΐνη Deptor μέλος τόσο του mTORC1 όσο και του mTORC2 λειτουργεί ως ενδογενής αναστολέας (Peterson *et al.*, 2009). Το σύμπλοκο mTOR C1 απενεργοποιείται από την δράση της ραπαμυκίνης, η οποία εξασθενεί την πρόσδεση της υπομονάδας mTOR με την πρωτεΐνη Raptor (Hung *et al.*, 2012). Για τη δράση του συμπλόκου απαραίτητος είναι ο διμερισμός του. Το mTORC1 ελέγχει τη βιογένεση των ριβοσωμάτων, την μετάφραση και την αυτοφαγία, επιδρώντας σε υποστρώματα που περιλαμβάνουν τα S6K1, 4E-BP1, ULK1. Το mTORC1 αντιλαμβάνεται την επάρκεια θρεπτικών υλικών και δρα αναλόγως, αναστέλλοντας για παράδειγμα την αυτοφαγία.

Το mTORC2 σύμπλοκο αποτελείται από την κινάση mTOR, την mLST8 / GβL, την DEPTOR, την Rictor, την mSin1 και τις πρωτεΐνες Protor-1/2. Οι πρωτεΐνες Rictor και SIN1 είναι καθοριστικές για την σταθερότητα του συμπλόκου και την δράση της κινάσης mTOR. Οι Protor-1/2 μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στην ενεργοποίηση του mTORC2 για να

Εισαγωγή

ενεργοποιήσει αποτελεσματικά τα υποστρώματά του. Το σύμπλοκο mTORC2 εμφανίζει και δραστικότητα κινάσης τυροσίνης ενώ το σύμπλεγμα rapTOR-mTOR στερείται τέτοιας δραστικότητας (Yin *et al.*, 2016). Το σύμπλοκο mTOR C2 δεν παρουσιάζει ευαισθησία στην ραπαμυκίνη εκτός και αν υπερεκτεθεί σε αυτήν. Έχουν βρεθεί άλλες ουσίες που αναστέλλουν την δράση του, όπως ο Torin1 και ο PP242 (Stuttfield *et al.*, 2018). Για τη δράση του συμπλόκου απαραίτητος είναι ο διμερισμός του. Η mTORC2 χαρακτηρίστηκε αρχικά ως στόχος της IGF-1 οδού σηματοδότησης. Η mTORC2 ανταποκρίνεται κυρίως σε αυξητικούς παράγοντες. Δεν έχουν ταυτοποιηθεί πολλά υποστρώματα στα οποία δρα. Γνωστά είναι η SGK1, η κινάση AKT και μέλη της οικογένειας πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC).

Πρόσφατα, βρέθηκε ότι το σύμπλοκο mTORC1 ρυθμίζοντας την πρωτεΐνη S6K1 έχει την ικανότητα να αναστέλλει την δράση του mTORC2 μονοπατιού, μέσω της φωσφορυλίωσης των Rictor και SIN1 πρωτεϊνών, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενός διαλόγου μεταξύ αυτών των δύο συμπλόκων (Julien *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2013).

Έτσι, τα δύο διακριτά σύμπλοκα του mTOR αποτελούν ένα δίκτυο σηματοδότησης το οποίο λειτουργεί για τον έλεγχο της κυτταρικής ομοιόστασης (Haissaguerre *et al.*, 2014).

ΣΚΟΠΟΣ:

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να διερευνήσουμε περαιτέρω τους μηχανισμούς που διέπουν την έκφραση του *c-myc* σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Συγκεκριμένα θα προσεγγιστεί το ερώτημα κατά πόσο οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που επιδέχεται η IMP1 μέσω των μονοπατιών mTORC2 και Src μπορούν να επηρεάσουν τη μετα-μεταγραφική τύχη του *c-myc* mRNA.

Η IMP1 όπως αναφέρθηκε επιδέχεται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις από δύο οδούς μεταγωγής σήματος, αυτές του Src και του mTORC2. Οι επιπτώσεις των τροποποιήσεων στην πορεία των mRNAs στόχων της έχουν διασαφηνιστεί για κάποια γονίδια. Παραδόξως όμως, όχι ακόμα για το *c-myc* mRNA. Στόχος ήταν η μελέτη των πιθανών μεταβολών της σταθερότητας και της μεταφρασιμότητας του *c-myc* mRNA και κατά συνέπεια των επιπέδων της πρωτεΐνης MYC, μέσω των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που δέχεται η IMP1 από τα δύο σηματοδοτικά μονοπάτια. Η κατανόηση των μηχανισμών αυτών μπορεί να συνεισφέρει καινούριες προσεγγίσεις για την διαχείριση της έκφρασής του *c-myc* για θεραπευτικούς σκοπούς. Αποκρυπτογράφηση των επιπτώσεων της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης του IMP1 στην τύχη του *c-myc* mRNA μπορεί να το αναδείξει σε ένα επιπλέον ελκυστικό θεραπευτικό στόχο δεδομένου ότι η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται μόνο σε πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα και σε ένα μεγάλο φάσμα καρκίνων, η δε έκφραση του σηματοδοτεί επιθετική νόσο (Ioannidis *et al.*, 2001).

Η κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους ελέγχονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης MYC μπορεί να αναδείξει προσεγγίσεις που να μειώνουν τα επίπεδα της και να αναστέλλουν την ογκογόνο δράση της. Επιπλέον, δεδομένου ότι υψηλά επίπεδα έκφρασης *c-myc* επάγουν απόπτωση κάτω από ορισμένες συνθήκες, η δυνατότητα επαγόμενης ενίσχυσης της μετάφρασης του *c-myc* mRNA μπορεί να συνεισφέρει ένα εναλλακτικό εργαλείο για τη εξάλειψη καρκινικών κύτταρων που εκφράζουν *de novo* την IMP1.

**ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ
ΜΕΘΟΔΟΙ**

1. Κυτταροκαλλιέργειες.

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε αποστειρωμένες πλαστικές φιάλες(ή φλάσκες) εμβαδού 25 cm² ή 75cm², ώσπου να δημιουργήσουν μονόστιβο ταπήτιο και να καλύψουν το 80-90% της επιφάνειάς τους, παρουσία θρεπτικού υλικού DMEM (Lonza), 10% αδρανοποιημένου ορού εμβρύου βοοειδούς (Fetal bovine serum, Sigma),1% αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης(Pen-Strep, Life technologies, USA) και 1% L-γλουταμίνης (L-glutamine 200mM, Gibco). Το πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας φυλάσσεται στους 4 °C.

Ο χειρισμός των κυττάρων πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και η επώασή τους έγινε σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας, 37°C, με σταθερή παροχή CO₂ 5%.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές α)human embryonic kidney 239(HEK 293) β)HeLa και γ)MDA-MB-231. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα: HeLa σταθερά διαμολυνθέντα (stably transfected) με πλασμίδιο στο οποίο έχει κλωνοποιηθεί αλληλουχία για την παραγωγή της πρωτεΐνης IMP1, η οποία στην θέση 396 εκφράζει κατάλοιπο φαινυλαλανίνης αντί τυροσίνης (HeLa-IMP1 Y396F). Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν HeLa κύτταρα σταθερά διαμολυνθέντα με πλασμίδιο στο οποίο έχει κλωνοποιηθεί αλληλουχία για την παραγωγή της πρωτεΐνης IMP1 αγρίου τύπου(HeLa-IMP1 wt).

1.1 Ανακαλλιέργεια κυττάρων.

Όταν η πυκνότητα μιας φιάλη καλλιέργειας κυττάρων προσέγγιζε 80-90% της χωρητικότητάς της, τα κύτταρα ανακαλλιεργούνταν για να αποφευχθεί η αναστολή του ρυθμού του πολλαπλασιασμού. Η αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα της φιάλης καλλιέργειας γινόταν με επίδραση ενζύμου θρυψίνης (0,025% Trypsin/EDTA, Gibco, Life technologies, USA). Η διαδικασία θρυψινοποίησης που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού από τη φιάλη καλλιέργειας.
2. Πλύση των κυττάρων με 1X PBS(8 mM NaH₂PO₄,0.15M NaCl, pH 7.4)(X2).
3. Προσθήκη 1-2 ml διαλύματος θρυψίνης και επώαση για 10' εντός του κλιβάνου ή μέχρι να γίνει πλήρης αποκόλληση των κυττάρων
4. Προσθήκη 2 ml θρεπτικού μέσου που περιέχει ορό (για απενεργοποίηση της θρυψίνης).
5. Επανειλημμένη αναρρόφηση για τη διάσπαση των συσσωματωμάτων.
6. Μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων σε αποστειρωμένο σωλήνα των 15 ml και φυγοκέντρηση στα 2000 rpm για 10' σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Απόχυση υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό.

8. Καταμέτρηση κυττάρων. Για κάθε ανακαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν περίπου 100.000 κύτταρα ανά ml πλήρους θρεπτικού μέσου, εκτός από τις περιπτώσεις που τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν σε ειδικά πειράματα.

9. Τοποθέτηση της φιάλης καλλιέργειας στον κλίβανο-επωαστήρα (incubator). Μετά από 24 ώρες γίνεται έλεγχος της καλλιέργειας στο μικροσκόπιο και παρακολουθήση ανάπτυξης μέχρι την επόμενη ανακαλλιέργεια.

Για τα κύτταρα HeLa-IMP1 και HeLa-IMP1 Y396F ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική πορεία ανακαλλιέργειας, με τη διαφορά ότι στο θρεπτικό μέσο περιλαμβάνεται πάντα το αντιβιοτικό geneticin G418 (Gibco) σε τελική συγκέντρωση 500 µg/ml.

1.2 Μέτρηση πλήθους κυττάρων / ποσοστού βιωσιμότητας κυττάρων.

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων έγινε με χρήση αιμοκυτταρομέτρου (haemocytometer) NEUBAUER και ανάστροφου μικροσκοπίου. Ο εντοπισμός των νεκρών κυττάρων έγινε με χρήση της χρωστικής κυανού του τρυπανίου, Γενικά, αποκλείονται από την χρώση τα ζωντανά κύτταρα και βάφονται αυτά των οποίων έχει διαρραγεί η κυτταροπλασματική τους μεμβράνη (trypan blue dye exclusion).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Αποκόλληση κυττάρων από την φιάλη καλλιέργειας με διάλυμα θρυψίνης, απενεργοποίηση της δράσης της θρυψίνης με θρεπτικό μέσο που περιέχει ορό, φυγοκέντρηση των κυττάρων και απόχρηση υπεκειμένου.
2. Επαναιώρηση κυττάρων σε 2ml θρεπτικού μέσου.
3. Λήψη δείγματος κυττάρων και προσθήκη σε διάλυμα χρωστικής κυανού του τρυπανίου (90µl trypan blue + 10 µl εναιωρήματος κυττάρων). Χρόνος αναμονής: 5'.
4. Ποσότητα του διαλύματος των κυττάρων και της χρωστικής τοποθετείται για καταμέτρηση μεταξύ του αιματοκυτταρομέτρου Neubauer και της καλυπτρίδας.
5. Καταμέτρηση των κυττάρων του δείγματος με χρήση μικροσκοπίου.

Τα ζωντανά κύτταρα φαίνονται στο μικροσκόπιο "στρογγυλά και φωτεινά" ενώ το κυτταρόπλασμα των νεκρών κυττάρων βάφεται μπλε. Το πλήθος των κυττάρων ανά ml προκύπτει από την χρήση του τύπου:

$$\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων/ml} = N \cdot K \cdot 10^4,$$

όπου N: ο μέσος όρος κυττάρων που μετρήθηκαν στο αιμοκυτταρόμετρο και K: η αραιώση δείγματος κυττάρων με την χρωστική ουσία.

Η βιωσιμότητα του κυτταρικού πληθυσμού του δείγματος υπολογίζεται ως εξής:
 Βιωσιμότητα % = (συνολικός αριθμός αχρωμάτιστων- ζωντανών κυττάρων / συνολικός αριθμός κυττάρων) x 100 .

1.3 Κατάψυξη κυττάρων.

Η μακροπρόθεσμη διατήρηση των κυττάρων είναι δυνατή με την ψύξη τους σε υγρό άζωτο, σε θερμοκρασίες μεταξύ -135°C και -175°C . Με στόχο να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό των κυττάρων, καταψύχονται παρουσία διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO).

Ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Αποκόλληση κυττάρων από την φιάλη καλλιέργειας με διάλυμα θρυψίνης, απενεργοποίηση δράσης θρυψίνης με θρεπτικό μέσο που περιέχει ορό, φυγοκέντρηση κυττάρων και απόχρηση υπεκειμένου.

2. Επαναιώρηση κυττάρων σε πλήρες DMEM + 30% FBS +10% αποστειρωμένου διμεθυλοσουλφοξειδίου.

3. Μεταφορά του διαλύματος κυττάρων σε αποστειρωμένα φιαλίδια κατάλληλα για υψηλή κατάψυξη (cryovials).

Η πυκνότητα των κυττάρων υπολογίζεται ώστε να προκύπτει περίπου $1-2 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml. Η ψύξη των κυττάρων έγινε σταδιακά, στους -80°C αρχικά και έπειτα σε υγρό άζωτο.

1.4 Απόψυξη κυττάρων.

Ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Το παγωμένο φιαλίδιο που περιείχε τα κύτταρα από το υγρό άζωτο μεταφέρθηκε σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 37°C για 5'. Το κυτταρικό εναιώρημα που ξεπάγωσε προστέθηκε σε ίσο όγκο πλήρους θρεπτικού υλικού, που είχε προθερμανθεί σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 37°C και φυγοκεντρήθηκε στις 2000 rpm για 5'. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε και προστέθηκε σε φιάλες καλλιέργειας παρουσία πλήρους θρεπτικού υλικού. Οι φιάλες με τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο. Μετά από 24 ώρες ακολούθησε αλλαγή του μέσου καλλιέργειας. Οι κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιούνται για οποιαδήποτε πειραματική διαδικασία τουλάχιστον 8-10 μέρες αργότερα, όταν ευρίσκοντο στην λογαριθμική φάση της ανάπτυξής τους.

1.5 Αναστολείς της δράσης κινασών και αντιδραστήρια.

Στα πλαίσια αυτής της διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν οι αναστολείς της δράσης κινασών:

- SrcI1 (200nM, Src kinase inhibitor I, Santa Cruz Biotechnology, Catalog No sc-204303).

- Torin 1(200nM, mTOR inhibitor, Selleckchem, Catalog No.S2827 & Adooq Bioscience, Catalog No A11581).
- AZD 0530 (Adooq Bioscience, Catalog No A10108).

Άλλα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις κυτταροκαλιέργειες:

- Ακτινομυκίνη D(5 µg/mL, Sigma-Aldrich, Catalog No 50-76-0).
- Δοξορουβικίνη (5 µg/mL, Sigma-Aldrich, Catalog No D1515).
- DMSO (Thermo Fischer Scientific).

2. *In vivo* μελέτη της δράσης των ουσιών Torin1, AZD0530 και του συνδυασμού τους με χρήση ξενομοσχεύματος (xenograft).

Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 εμπλουτισμένο με 5% αδρανοποιημένο ορό εμβρύου βοοειδούς (FBS), 1% L-γλουταμίνη και 1% αντιβιοτικά πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη. Αναπτύχθηκαν και ενέθηκαν υποδόρια σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια τύπου NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J. Για το σκοπό των πειραμάτων έγιναν 2 ενέσεις, των 10⁶ κυττάρων ανά ποντίκι. Οι όγκοι άρχισαν να εμφανίζονται περίπου μετά το πέρας δεκατριών ημερών από την ένεση των κυττάρων και όταν ο μέσος όρος του μεγέθους των όγκων έφτασε στα 80-100 mm³ ξεκίνησαν οι χορηγήσεις των προς μελέτη ουσιών. Για τη μελέτη της δράσης των ουσιών Torin 1 (Adooq Bioscience), AZD0530/Saracatinib (Adooq Bioscience) και του συνδυασμού τους δημιουργήθηκαν οι παρακάτω ομάδες μελέτης ποντικών:

- 1) Δείγμα ελέγχου (untreated).
- 2) Δείγμα ελέγχου επίδραση φορέα ουσιών (carrier).
- 3) Δείγμα χορήγησης Torin 1.
- 4) Δείγμα χορήγησης AZD0530.
- 5) Δείγμα χορήγησης συνδυασμού ουσιών (combination).

Οι ουσίες που μελετηθήκαν είχαν διαφορετικό μέσο διάλυσης – φορέα, συνεπώς στην ομάδα ποντικών που μελετήθηκε η επίδραση του φορέα (Carrier) χορηγήθηκαν και οι δύο διαλύτες όπως ακριβώς και στην ομάδα μελέτης της επίδρασης του συνδυασμού των δύο ουσιών (combination). Η χορήγηση της ουσίας AZD0530 σε συγκέντρωση 50mg/kg, διαλυτή σε 5% DMSO, έγινε 3 φορές την εβδομάδα για 2 εβδομάδες, ενδοπεριτονιακά και η χορήγηση της ουσίας Torin1 σε συγκέντρωση 10mg/kg, διαλυτή σε 5% benzyl alcohol και 95% safflower oil, έγινε μία φορά ημερησίως για 10 ημέρες, ενδοπεριτονιακά.

3. Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων E.Coli και μετασχηματισμός.

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα στελέχους DH5a προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση του μετασχηματισμού.

3.1 Παρασκευή επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων E.Coli.

Τα βακτηριακά κύτταρα μπορούν με χημική επεξεργασία και θερμικό σοκ να καταστούν προσωρινά διαπερατά στο DNA. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο τα κύτταρα κατεργάζονται με ψυχρό διάλυμα CaCl_2 . Μετά από έκθεσή τους σε CaCl_2 και την απόδοση θετικού φορτίου στο τοίχωμα τους μπορεί να πραγματοποιείται έλξη των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του πλασμιδιακού DNA και να διευκολύνεται η είσοδος του στο βακτηριακό κύτταρο.

Υλικά:

- α) υγρό θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη βακτηρίων(LB): 0.5% w/v Εκχύλισμα μαγιάς (Bacto-yeast extract) ,1% w/v Βακτο-τρυπτόνη (Bacto-tryptone),1% w/v NaCl, pH7.5.
- β) διάλυμα CaCl_2 :100 μM CaCl_2 , 0,1M PIPES, pH 7,0.

Για την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων E. coli σε ξένο πλασμιδιακό DNA εφαρμόστηκε η παρακάτω διαδικασία σε στείρες/άσηπτες συνθήκες:

1. Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων αποψύχεται και αναπτύσσεται σε 5mL υγρού θρεπτικού μέσου για 12 ώρες, υπό ανάδευση στους 37°C .
2. 200μl από την καλλιέργεια προστίθενται σε 20ml αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού υλικού και επωάζονται υπό ανάδευση στους 37°C για 2 ώρες.
3. Η υγρή βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρεται για 10' σε λουτρό πάγου- H_2O .
- 4.Φυγοκέντρωση για 10' σε 4000rpm (X2) με ενδιάμεση απόχρηση του υπερκείμενου και επαναϊώρηση του ιζήματος σε κρύο διάλυμα CaCl_2 .
- 5.Επώαση για 30' σε λουτρό πάγου- H_2O με περιοδική ανάδευση.
6. Φυγοκέντρωση για 10' σε 4000rpm στους 4°C και απόχυση του υπερκείμενου.
- 7.Επαναϊώρηση του ιζήματος σε κρύο διάλυμα CaCl_2 .

Το εναιώρημα των κυττάρων μοιράστηκε σε στείρους σωλήνες και καταψύχθηκαν στους -80°C παρουσία 10% γλυκερόλης για μελλοντική χρήση.

3.2 Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA.

Γενετικός μετασχηματισμός είναι η διαδικασία κατά την οποία ένας οργανισμός δέκτης λαμβάνει το ξένο DNA από έναν δότη και εκφράζει το ξένο γονίδιο. Τα πλασμίδια χρησιμοποιούνται για το μετασχηματισμό βακτηρίων, ώστε να ακολουθήσει η παραγωγή και απομόνωσή τους σε μεγάλες ποσότητες.

Υλικά:

α) Στερεό θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη βακτηρίων (LB Agar): 1.5% w/v άγαρ + υγρό θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη βακτηρίων(LB).

Τα επιλεκτικά κύτταρα που κατασκευάστηκαν, αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε η εξής διαδικασία για την εισαγωγή πλασμιδίου στα κύτταρα:

1. Σε 200μl διαλύματος επιλεκτικών κυττάρων E.Coli προστίθενται 100ng πλασμιδίου.
2. Επώαση για 30' σε λουτρό πάγου-H₂O.
3. Επώαση για 42sec στους 42,5°C.
4. Επώαση για 3' σε λουτρό πάγου-H₂O.
5. Προσθήκη 1mL θρεπτικού υλικού.
6. Επώαση για 1 ώρα στους 37°C.
7. Επίστρωση 200 μl καλλιέργειας σε τρυβλία petri που περιείχαν LB ,άγαρ και αντιβιοτικό επιλογής.

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν είχαν είτε το γονίδιο ανθεκτικότητας αμπικιλίνης (Amp^r) είτε το γονίδιο ανθεκτικότητας καναμυκίνης (Kan^r) και τα βακτήρια που τα έφεραν αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υλικό παρουσία είτε 100μg/ml αμπικιλίνης είτε 50μg/ml καναμυκίνης αντίστοιχα. Κάθε μετασχηματισμένο κύτταρο, διαιρούμενο, δημιούργησε στην επιφάνεια του τρυβλίου μια κυκλική βακτηριακή αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων.

Μονήριες αποικίες βακτηρίων που αναπτύχθηκαν στη στερεή καλλιέργεια, εμβολιάστηκαν σε 10 ml θρεπτικού υλικού, παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού. Οι υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση. 5 ml από την υγρή καλλιέργεια εμβολιάστηκαν σε 100 ml θρεπτικού υλικού, παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού για την δημιουργία υγρής καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας. Από την καλλιέργεια μικρής κλίμακας ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA (mini-prep). Οι υγρές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση. Από την υγρή καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας αποθηκεύτηκαν κύτταρα μετασχηματισμένα στους -80°C για μελλοντική χρήση παρουσία 10% γλυκερόλης. Τέλος ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

3.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μετασχηματισμένων βακτηρίων E.Coli μικρής κλίμακας (mini-prep).

Από καλλιέργεια μικρής κλίμακας ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του NucleoSpin plasmid (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Μεταφορά 5 ml από καλλιέργεια όγκου 10 ml, σε σωληνάριο erpendorf.
 2. Φυγοκέντρηση για 30" στα 11.000 g, και απόρριψη του υπερκειμένου.
 3. Επαιναίωρηση ιζήματος σε σειρά διαλυμάτων για τη λύση των κυττάρων.
 4. Φυγοκέντρηση για 10' στα 11000g .
 5. Μεταφορά του υπερκειμένου σε στήλη Nucleospin Plasmid, η οποία έχει προσαρμοστεί σε σωληνάριο συλλογής 2 ml. Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται δέσμευση του DNA στην μεμβράνη silica της στήλης.
 6. Φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 g και απόρριψη του εκλούματος.
 7. Πλύση της μεμβράνης της στήλης.
 8. Ξήρανση της μεμβράνης με φυγοκέντρηση για 2 min στα 11.000 g και μεταφορά της στήλης σε καθαρό σωληνάριο erpendorf 1,5 ml.
 9. Προσθήκη 50 ml διαλύματος έκλουσης που έχει προθερμανθεί στους 70^o C. Επώαση για 2 min και φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 g (x2).
- Το πλασμίδιο που απομονώθηκε ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1 % w/v παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου για 1 ώρα στα 80 V, με στόχο τον έλεγχο του επιτυχημένου μετασχηματισμού των βακτηρίων και τον έλεγχο της ποιότητας του πλασμιδίου. Το πλασμίδιο αποθηκεύεται στους -20^oC.

3.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μετασχηματισμένων βακτηρίων E.Coli μεγάλης κλίμακας.

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες E. coli χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο σύνολο αντιδραστηρίων endotoxin free plasmid DNA purification (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τα πειράματα διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων το πλασμιδιακό DNA που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας, ελεύθερο από τυχόν βακτηριακές τοξίνες που επηρεάζουν τη φυσιολογία τους. Συνοπτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Φυγοκέντρηση υγρής καλλιέργειας στους 4^oC στα 6000g για 15'.
2. Επαιναίωρηση ιζήματος σε σειρά διαλυμάτων για τη λύση των κυττάρων και την εξουδετέρωση των ριβονουκλεασών.
3. Φυγοκέντρηση στα 5000 g για 10'.
4. Φόρτωση υπερκειμένου σε στήλη.
5. Πλύσεις με ρυθμιστικά διάλυματα.
6. Έκλουση πλασμιδιακού DNA με διάλυμα ισοπροπανόλης.

Το πλασμιδιακό DNA διαλυτοποιήθηκε σε H₂O. Το πλασμιδιακό DNA μπορεί να αποθηκευτεί τις πρώτες ώρες στους 4^oC ώστε να ενυδατωθεί πλήρως. Αποθηκεύθηκε στους -20^oC.

Προσδιορίστηκε η καθαρότητα και η συγκέντρωσή του με φασματοφωτομετρική μέθοδο. Ελέγχθηκε η ποιότητα του απομονωμένου πλασμιδίου μέσω ηλεκτροφόρησης σε

πήκτωμα αγαρόζης 1 % w/v παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου για 1 ώρα στα 80 V. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα παρατηρήθηκε και φωτογραφήθηκε κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

4. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στην ηλεκτρική αγωγιμότητα των υδατικών διαλυμάτων των νουκλεϊκών οξέων. Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τα μόρια κινούνται ανάλογα με το φορτίο τους και το μέγεθός τους. Τα νουκλεϊκά οξέα σε ουδέτερο pH λόγω των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στον φωσφοδιεστερικό σκελετό έχουν αρνητικό φορτίο και γι' αυτό τα μόρια που ηλεκτροφορούνται κινούνται από την κάθοδο προς την άνοδο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους.

Υλικά:

α) Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE(50X): 41 g Tris, 9.51ml Acetate, 16,66ml EDTA(500nM).

β) Διάλυμα διαλυτοποίησης/«φόρτωσης» δειγμάτων- Gel Loading Dye Blue (6X), New England Biolabs.

γ) Δείκτες μοριακού βάρους (GelPilot DNA Molecular Weight Markers 100 bp ή 1 kb Ladder).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε όπου αναφέρεται ότι πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση δειγμάτων (είτε DNA είτε RNA) ήταν η εξής:

1. Συναρμολόγηση συσκευής.

2. Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης: Προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας αγαρόζης σε 50 ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1X. Διαλυτοποίηση αγαρόζης με βρασμό. Προσθήκη διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0,5 µg/ml. Τοποθέτηση του διαλύματος αγαρόζης στο ειδικό εκμαγείο και προσθήκη εξαρτημάτων - comb που δημιουργούν τα φρεάτια υποδοχής του δείγματος.

3. Μόλις πολυμεριστεί το πήκτωμα σε θερμοκρασία δωματίου, τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και στη δεξαμενή προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X σε ποσότητα ώστε να υπερκαλύψει το πήκτωμα.

4. Προετοιμασία δειγμάτων: Τα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν προετοιμάζονται κατάλληλα με την ανάμιξή τους με διάλυμα «φόρτωσης» 6X.

5. Τοποθέτηση των δειγμάτων στα φρεάτια.

6. Ρύθμιση της κατάλληλης ηλεκτρικής τάσης.

Η πρόοδος της μετακίνησης των μορίων στο πήκτωμα εκτιμάται από την μετακίνηση των χρωστικών του διαλύματος φόρτωσης που μετακινούνται περίπου με την ίδια ταχύτητα με τα δείγματα ή από την παρατήρηση του πηκτώματος στην τράπεζα υπεριώδους.

5. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων.

Στα διαλύματα νουκλεϊκών οξέων, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω αναλύσεις, προσδιορίστηκαν η καθαρότητα και η συγκέντρωσή τους με φασματοφωτομετρική μέθοδο.

Η μέθοδος της φασματοφωτομετρίας βασίζεται στην ιδιότητα των μορίων να απορροφούν εκλεκτικά μέρος της ακτινοβολίας του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Για κάθε χημική ένωση υπάρχει ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος (λ_{max}) στο οποίο εμφανίζει τη μέγιστη απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Τα νουκλεϊκά οξέα εμφανίζουν το μέγιστο της απορρόφησής τους στα 260 nm.

Η φωτομέτρηση των δειγμάτων έγινε σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος, στα 260nm που απορροφούν τα νουκλεϊκά οξέα και στα 280nm που απορροφούν τα αρωματικά αμινοξέα. Σε μια δεύτερη κυψελίδα χαλαζία τοποθετείται H_2O , που χρησιμοποιείται ως τυφλό για το μηδενισμό του φωτομέτρου.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων προέκυψε από την μέτρηση απορρόφησης στα 260nm από τους εξής τύπους:

Διάλυμα καθαρού δίκλωνου DNA που έχει στα 260 nm απορρόφηση $A_{260nm} = 1$ έχει συγκέντρωση 50 ng/μl.

Διάλυμα καθαρού RNA που έχει στα 260 nm απορρόφηση $A_{260nm} = 1$ έχει συγκέντρωση 40 ng/μl.

Ο λόγος των τιμών των δύο απορροφήσεων είναι μια εκτίμηση για την καθαρότητα των δειγμάτων από πρωτεϊνικές προσμίξεις. Αν προκύπτει λόγος $A_{260nm}/A_{280nm} \geq 1,8$ τότε το διάλυμα είναι καθαρό.

6. Απομόνωση γενωμικού DNA από ευκαρυωτικά κύτταρα.

Για την απομόνωση DNA από ευκαρυωτικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Herrmann και των συνεργατών του (Herrmann *et al.*, 1994).

Υλικά:

α) Διάλυμα λύσης κυττάρων: 1% NP-40, 20mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 7.5.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Συλλογή περίπου $6 \cdot 10^6$ κυττάρων ανά συνθήκη με θρυψινοποίηση.

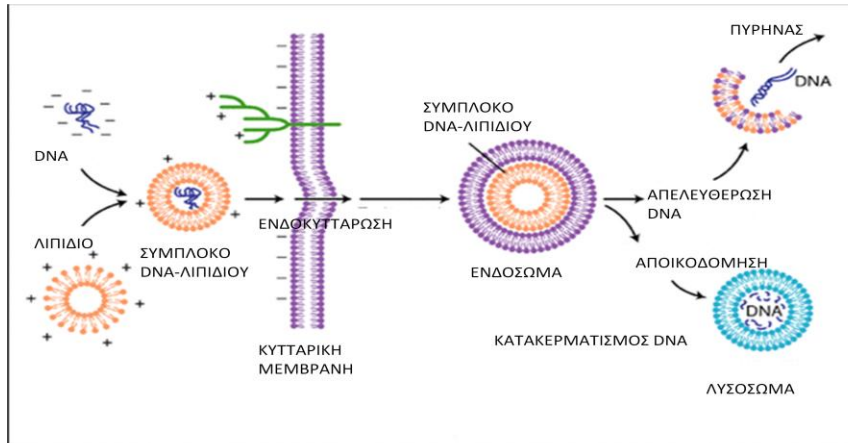
2. Πλύση των κυττάρων με 1X PBS (X2).
3. Φυγοκέντρηση 5' στα 2000 rpm.
4. Στο ίζημα προστίθενται 100μL διαλύματος λύσης για 1'.
5. Φυγοκέντρηση 5' στα 1600g.
6. Προσθήκη διαλύματος 1%SDS με RNase A (10 mg/ml) στο υπερκείμενο και επώαση για μία ώρα στους 56°C.
7. Προσθήκη 2,5 mg/ml proteinase K και επώαση για δύο ώρες στους 37°C.
8. Προσθήκη διαλύματος 10M οξικό αμμώνιο.
9. Προσθήκη παγωμένης αιθονόλης 70%. (Το DNA αρχίζει να φαίνεται υπόλευκο με ίνες).
10. Φυγοκέντρηση 5000g για 10'.
11. Προσθήκη H₂O στο ίζημα.
12. Αποθήκευση στους 4°C.

Για τον έλεγχο της ακεραιότητας το DNA που απομονώθηκε ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% w/v για 3 ώρες στα 60V. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα εμβαπτίστηκε σε διάλυμα TAE με βρωμιούχο αιθίδιο για 12 ώρες. Τέλος ακολούθησε παρατήρηση και φωτογράφιση του πηκτώματος κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

7. Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων *in vitro* με γενετικό υλικό (Transfection).

Ως διαμόλυνση ορίζεται η διαδικασία εισαγωγής νουκλεϊκών οξέων (π.χ. πλασμιδιακό DNA, cDNA, mRNA, miRNA, siRNA) στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Ένα μίγμα ουδέτερων και κατιονικών λιποσωμάτων σχηματίζει σύμπλοκα με τα νουκλεϊκά οξέα. Αυτά τα σύμπλοκα διαπερνούν την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη και στη συνέχεια απελευθερώνουν τα νουκλεϊκά οξέα στο κυτταρόπλασμα μέσω ενδοκυττάρωσης. Τα νουκλεϊκά οξέα είτε ξεφεύγουν επιτυχώς από το ενδοσωμάτιο και οδηγούνται στον πυρήνα ώστε να ξεκινήσει η έκφραση στα κύτταρα, είτε υφίστανται αποικοδόμηση. Το τελευταίο γεγονός μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη αποτελεσματικότητα της μεθόδου.

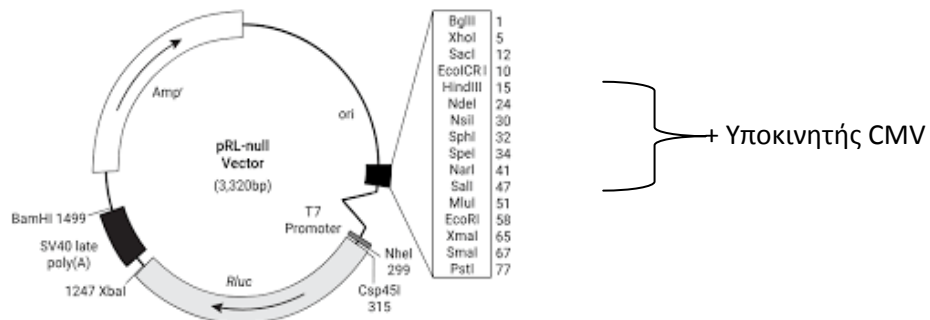
Σχηματικά:



Πηγή: <http://www.genebankbios.com/en/js2.asp>.

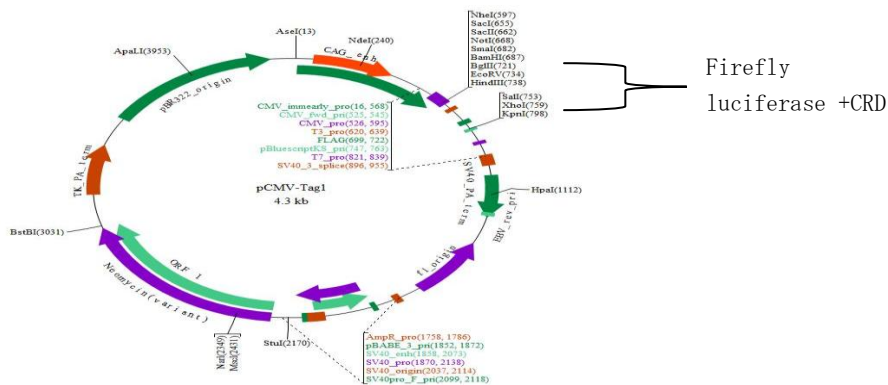
Χάρτες πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν:

i) Πλασμιδιακός φορέας αναφοράς, pRL-CMV.



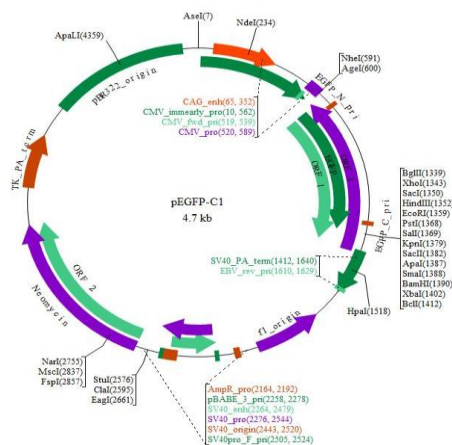
Ο πλασμιδιακός φορέας αναφοράς μετασηματισμού pRL-CMV δημιουργήθηκε με πέψη του πλασμιδίου φορέα pCMV-Tag1 με NsiI και SmaI. Το τμήμα 680 bp που περιέχει τον υποκινητή CMV προσδέθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα πλασμιδίου pRL-null που εκφράζει την *Renilla* λουσιφεράση (Meristoudis *et al.*, 2015).

ii) Πλασμιδιακός φορέας ελέγχου, pCMV-Tag1+ κωδική περιοχή της Firefly λουσιφεράσης+ περιοχή CRD του *c-myc*.



Ο πλασμιδικός φορέας pCMV-Tag1 (Stratagene) χρησιμοποιήθηκε ως σκελετός για να κατασκευαστεί το πλασμίδιο ελέγχου Luc / CRD in frame, που εκφράζει την λουσιφεράση της πυγολαμπίδας συζευγμένη με την περιοχή CRD του *c-myc*. Για την κατασκευή του πλασμιδίου ενισχύθηκε η κωδική περιοχή Firefly λουσιφεράσης από τον φορέα pGL2 Luciferase reporter vector. Το ενισχυμένο θραύσμα υπέστη πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BglIII και Sall και προσδέθηκε στις αντίστοιχες θέσεις pCMV-Tag1 για τη δημιουργία του φορέα FLuc-Control. Αντίστοιχα, ενισχύθηκε από το ανθρώπινο DNA η περιοχή CRD του *c-myc* με το κατάλληλο ζεύγος εκκινητών. Το ενισχυμένο θραύσμα υπέστη πέψη με BglIII και HindIII και κλωνοποιήθηκε εντός του φορέα FLuc-Control στις αντίστοιχες θέσεις για τη δημιουργία του FLuc / CRD εντός πλαισίου ανάγνωσης φορέα. Χρησιμοποιώντας την ίδια στρατηγική κλωνοποίησης προέκυψε και ο φορέας FLuc 5'- CRD -3' (Meristoudis et al., 2015).

iii) pEGFP-C1.



Οι πλασμιδιακοί φορείς pEGFP-C1 IMP1, pEGFP-C1 IMP1Y396F και pEGFP-C1 IMP1S181A που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της μελέτης ήταν δώρο του Finn Cilius Nielsen.

7.1 Παροδική διαμόλυνση (transient transfection):

Η παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με γενετικό υλικό πραγματοποιήθηκε με χρήση του αντιδραστηρίου Lipofectamin 2000 (Thermo fischer scientific) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, τα στάδια κάθε πειράματος διαμόλυνσης περιελάμβαναν τα παρακάτω:

1. Ημέρα 1^η: Επιστροφή $3.5 \cdot 10^4$ κυττάρων σε τρυβλίο καλλιέργειας 6 φρεατίων (6 well plate) σε 2ml πλήρες μέσου καλλιέργειας.

2. Ημέρα 2^η: Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού. Πλύση του ταπήτιου των κυττάρων με PBS(x2) και προσθήκη 1,75 ml φρέσκου πλήρους μέσου καλλιέργειας.

Προετοιμασία συμπλόκου DNA-λιπιδίου: Σε 300 μl μέσου καλλιέργειας (χωρίς ορό) προσθήκη 5 μl Lipofectamin 2000 και ποσότητα πλασμιδίου για τελική συγκέντρωση 500ng DNA/ml θρεπτικού υλικού/φρεάτιο. Έντονη ανάμιξη διαλύματος (vortex). Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15'. Προσθήκη 250 μl διαλύματος στάγδην/φρεάτιο. Επώαση κυττάρων.

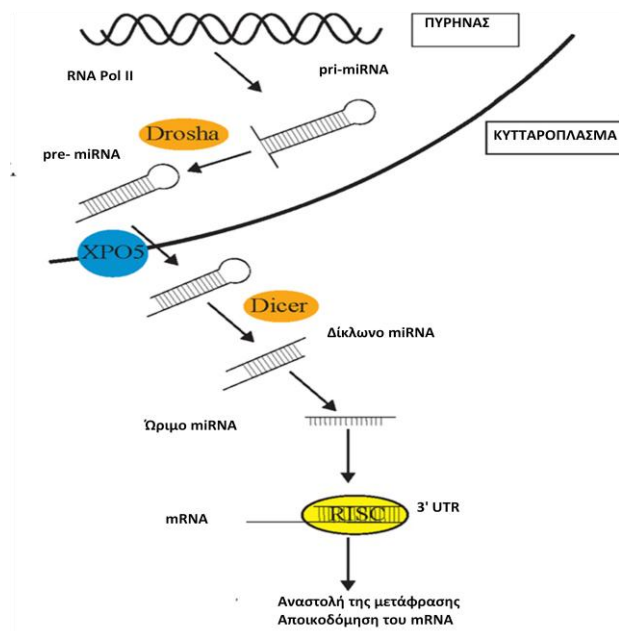
3. Ημέρα 3^η: Παρατήρηση κυττάρων. Προσθήκη φρέσκου πλήρους μέσου καλλιέργειας.

Τα κύτταρα επώαστηκαν για 2-3 ημέρες στους 37 °C αναλόγως της πειραματικής συνθήκης. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν για ανάλυση έπειτα από θρυψινοποίηση.

7.2 Αποσιώπηση της έκφρασης της IMP1 με μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA.

Η παρεμβολή RNA(RNA interference) στοχεύει στην μετα-μεταγραφική αποσιώπηση γονιδίων. Πρόκειται για έναν ενδογενή μηχανισμό, εξελικτικά συντηρημένο που λειτουργεί υπό φυσιολογικές συνθήκες και ενέχεται στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Συνοπτικά, ο μηχανισμός, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα που ακολουθεί: γονίδια των μικρών RNA(miRNA) μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II και προκύπτει το πρωτογενές μετάγραφο (pri-miRNA). Το πρωτογενές μετάγραφο κόβεται στον πυρήνα από τα ένζυμα DROSHA / DGCR8. Το μόριο με δομή φουρκέτας που σχηματίζεται από αυτή τη διάσπαση αναφέρεται πρόδρομο μόριο miRNA (pre-miRNA). Το πρόδρομο μόριο miRNA (pre-miRNA) μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα. Εκεί κόβεται ξανά από το ένζυμο Dicer και προκύπτει ένα δίκλωνο μόριο miRNA που δεν διαθέτει πλήρη συμπληρωματικά άκρα και η φουρκέτα αφαιρείται. Τότε ο ένας κλώνος συνήθως ενσωματώνεται στο σύμπλεγμα νουκλεασών RISC με στόχο να αναγνωρίσει τον συμπληρωματικό του στόχο, μια αλληλουχία RNA κυρίως στην 3' αμετάφραστη περιοχή μετάγραφων. Το σύμπλεγμα RISC-miRNA προσδένει το mRNA στόχο, με αποτέλεσμα την αναστολή της μετάφρασής του και την αποικοδόμησή του από την νουκλεάση RISC.



Πηγή: https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC4325937_fnins-09-00041-g0001&req=4.

Εκμεταλλεούμενοι τον παραπάνω μηχανισμό που λειτουργεί ενδοκυττάρια και οδηγεί στην μείωση ή την απώλεια έκφρασης μιας πρωτεΐνης, οι ερευνητές απέκτησαν ένα εργαλείο για να καταστείλουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Για αυτόν τον σκοπό κατασκευάζονται δίκλινα μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA (small interfering RNAs-siRNA),συγκεκριμένης αλληλουχίας. Τα τεχνητά μόρια siRNA εισάγονται στο κύτταρο και ενεργοποιούν τον παραπάνω μηχανισμό ώστε να αποτρέπεται στοχευόμενα η παραγωγή συγκεκριμένων πρωτεϊνών.

Η παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια πραγματοποιήθηκε με χρήση του αντιδραστηρίου Lipofectamin 2000 και ακολουθήθηκε διαδικασία παρόμοια με αυτήν που ήδη περιγράφηκε. Στην προετοιμασία όμως συμπλόκου λιπιδίου -siRNA προστέθηκε siRNA ώστε σε κάθε φρεάτιο να προκύπτει τελική συγκέντρωση 500ng siRNA/ml θρεπτικού υλικού .Σε κάθε φρεάτιο καλλιέργειας προστέθηκε το διάλυμα που περιείχε το σύμπλοκο στάγδην. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 72 ώρες και συλλέχθηκαν για ανάλυση.

Στην παρούσα διατριβή για την αποσιώπηση της IMP1 χρησιμοποιήθηκαν τα εξής siRNAs: Hs_IGF2BP1_2 FlexiTube siRNA, Hs_IGF2BP1_3 FlexiTube siRNA(Qiagen).Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που διαμολύνθηκαν παροδικά με τα Hs_IGF2BP1_FlexiTube negative siRNA ή με το αντιδραστήριο AllStars Negative Control siRNA. Για τον έλεγχο της αποσιώπησης εφαρμόστηκε qRT-PCR σε επίπεδο mRNA ,και

ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον έλεγχο των επιπέδων πρωτεΐνης, τεχνικές που αναλύονται παρακάτω.

7.3 Παροδική συν-διαμόλυνση κυττάρων (Transient co-transfection).

Η παροδική συν- διαμόλυνση των κυττάρων έγινε με χρήση δύο ή τριών διαφορετικών πλασμιδίων και πραγματοποιήθηκε με την διαδικασία που αναφέρθηκε. Στην προετοιμασία όμως συμπλόκου λιπιδίου -DNA προστέθηκε ποσότητα από τα διαφορετικά πλασμίδια ώστε σε κάθε φρεάτιο να προκύπτει τελική συγκέντρωση 1μg DNA/ml θρεπτικού υλικού, με αναλογία 1:1.

7.4 Παροδική συν-διαμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA και με μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA (Co-transfection of Plasmid DNA and siRNA).

Η παροδική συν-διαμόλυνση των κυττάρων έγινε με χρήση διαφορετικών πλασμιδίων ταυτόχρονα με χρήση μικρών παρεμβαλλόμενων μορίων RNA(siRNA) για το γονίδιο *imp1* ή siRNA ελέγχου και πραγματοποιήθηκε με την διαδικασία που αναφέρθηκε. Στην προετοιμασία όμως συμπλόκου χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα με DNA και siRNA. Για κάθε 1μg DNA προστέθηκαν 200ng siRNA. Τα διαμολυσμένα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 72 ώρες και έπειτα συλλέχθηκαν για ανάλυση.

7.5 Σταθερή διαμόλυνση HeLa κυττάρων με εξωγενές γενετικό υλικό.

Για την σταθερή διαμόλυνση των HeLa κυττάρων ώστε να ενσωματώσουν μόνιμα στο γονιδίωμά τους εξωγενές γενετικό υλικό χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της εταιρίας Lonza: guideline for generation of stable cell lines.

Συνοπτικά ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Ημέρα 1^η: Επίστρωση $3.5 \cdot 10^4$ κυττάρων σε τρυβλίο καλλιέργειας 6 φρεατίων σε 2ml πλήρες μέσου καλλιέργειας.

2. Ημέρα 2^η: Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού. Πλύση του ταπήτιου των κυττάρων με PBS(x2) και προσθήκη 1,75 ml φρέσκου πλήρους μέσου καλλιέργειας. Προετοιμασία συμπλόκου DNA-λιπιδίου και προσθήκη στα κύτταρα.

3. Ημέρα 3^η-7^η: Παρατήρηση κυττάρων. Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού και προσθήκη φρέσκου ανά 48 ώρες, παρουσία του αντιβιοτικού Geneticin 0.5mg/ml.

4. Ημέρα 8^η: Παρατήρηση κυττάρων. Πλύση κυττάρων με PBS(X2). Συλλογή κυττάρων με θρυψινοποίηση. Επαναιώρηση ιζήματος σε φρέσκο πλήρες μέσο καλλιέργειας παρουσία Geneticin, 0.5mg/ml. Επίστρωση κυττάρων σε νέο τρυβλίο καλλιέργειας 6 φρεατίων.

5. Ημέρα 9^η-13^η: Παρατήρηση κυττάρων. Προσθήκη φρέσκου πλήρους μέσου καλλιέργειας ανά 48 ώρες, παρουσία του αντιβιοτικού Geneticin 0.5mg/ml.

6. Ημέρα 14^η: Παρατήρηση κυττάρων. Πλύση κυττάρων με PBS(X2). Συλλογή κυττάρων με θρυψινοποίηση. Επαναιώρηση ιζήματος σε φρέσκο πλήρες μέσο καλλιέργειας παρουσία Geneticin, 0.5mg/ml. Μέτρηση κυττάρων. Επιστροφή κυττάρων σε νέο τρυβλίο καλλιέργειας 96 φρεατίων (≈ 1 κύτταρο / φρεατίο).

Ανάλυση κυττάρων για έλεγχο της έκφρασης του εξωγενούς DNA.

7. Ημέρα 14^η-26^η: Παρατήρηση κυττάρων μέχρι να σχηματιστούν αποικίες/κλώνοι. Προσθήκη φρέσκου πλήρους μέσου καλλιέργειας ανά 48 ώρες, παρουσία του αντιβιοτικού Geneticin 0.5mg/ml.

8. Ημέρα 27^η: Παρατήρηση κυττάρων. Πλύση κυττάρων με PBS(X2). Συλλογή κυττάρων με θρυψινοποίηση. Επαναιώρηση κυττάρων σε φρέσκο πλήρες μέσο καλλιέργειας παρουσία Geneticin, 0.5mg/ml. Επιστροφή κυττάρων σε νέο τρυβλίο καλλιέργειας 24 φρεατίων παρουσία 200μl πλήρους θρεπτικού υλικού.

9. Ημέρα 27^η:- Παρατήρηση κυττάρων. Προσθήκη φρέσκου πλήρους μέσου καλλιέργειας ανά 48 ώρες παρουσία του αντιβιοτικού Geneticin 0.5mg/ml, έως ότου οι καλλιέργειες κυττάρων προσεγγίζουν 80-90% της χωρητικότητας του φρεατίου. Μεταφορά κυττάρων από το τρυβλίο καλλιέργειας 24 φρεατίων σε τρυβλίο καλλιέργειας 12 φρεατίων.

Οι καλλιέργειες κυττάρων από το τρυβλίο καλλιέργειας 12 φρεατίων μεταφέρθηκαν σε τρυβλίο καλλιέργειας 6 φρεατίων, όταν η πληρότητα του φρεατίου προσέγγιζε το 80-90% της χωρητικότητας του φρεατίου και άρχισε η συλλογή των κλώνων. Τα κύτταρα εξετάστηκαν για έλεγχο της έκφρασης του εξωγενούς DNA. Η διατήρηση της σταθερότητας των επιμολυσμένων κλώνων όσον αφορά την παρουσία του εξωγενούς DNA, εξαρτάται από την συνεχή παρουσία του αντιβιοτικού Geneticin.

Για τους σκοπούς της συγκεκριμένης διατριβής κατασκευάστηκαν δύο σταθερές κυτταρικές σειρές, η μία ενσωμάτωσε τον φορέα pEGFPC1 -IMP1 ενώ η δεύτερη, pEGFPC1-IMP1Y396F.

8. Προσδιορισμός με φθορισμομετρία των επιπέδων Firefly και *Renilla* Λουσιφερασών.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ιδιότητα των λουσιφερασών παρουσία των κατάλληλων υποστρωμάτων, beetle luciferin για την Firefly λουσιφεράση και coelenterate luciferin για *Renilla* λουσιφεράση αντίστοιχα, να καταλύουν αντιδράσεις οξειδωσης ελευθερώνοντας φωτόνια. Η έκλυση φθορισμού που πραγματοποιείται όταν επιδρούν στα υποστρώματά τους μετράται με το λουμινόμετρο και είναι ανάλογη του ενζύμου που έχει εκφραστεί.

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων των πρωτεϊνών Firefly λουσιφεράσης και *Renilla* λουσιφεράσης στα κύτταρα που είχαν συνδιαμολυνθεί με τα αντίστοιχα πλασμίδια που φέρουν αυτά τα γονίδια, χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Dual luciferase reporter assay

(Promega) και το λουμινόμετρο Bio Orbit 1253. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, απαιτεί την εξής διαδικασία:

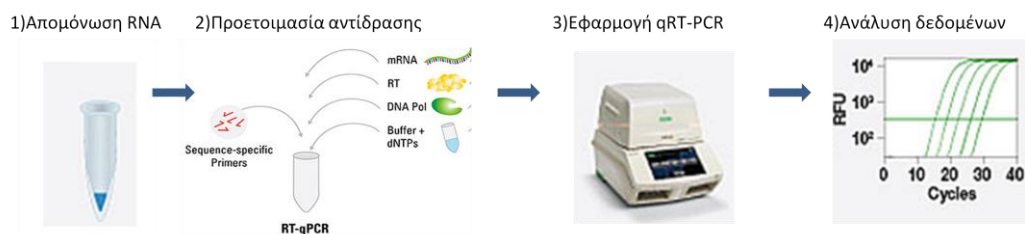
1. Αναρρόφηση θρεπτικού υλικού.
2. Πλύση των κυττάρων με 1X PBS (X2).
3. Προσθήκη 1 ml διαλύματος λύσης των κυττάρων σε τρυβλίο καλλιέργειας 35mm. Έντονη ανάδευση 15' σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθήκη 50μl υπόστρωματος της Firefly λουσιφεράσης σε ειδικό σωλήνα προπυλενίου-σιλικόνης. (Αυτό χρησιμοποιείται ως τυφλό για τον μηδενισμό του λουμινόμετρου).
5. Προσθήκη 20 μl από το κυτταρόλυμα.
6. Μέτρηση της ενεργότητας της Firefly λουσιφεράσης.
7. Προσθήκη 50μl υπόστρωματος της *Renilla* λουσιφεράσης στον ίδιο σωλήνα.
8. Μέτρηση της ενεργότητας της *Renilla* λουσιφεράσης.

Από την διαίρεση των δύο τιμών ενεργότητας που μετρήθηκαν προέκυψε η τιμή της σχετικής ενεργότητας του προς εξέταση δείγματος.

9. Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης mRNA γονιδίων.

Με στόχο να προσδιοριστούν τα επίπεδα της έκφρασης του mRNA γονιδίων στόχων που μελετήθηκαν απομονώθηκε ολικό RNA από κύτταρα. Έχοντας ως εκμαγείο RNA και με χρήση κατάλληλων εκκινητών και αντιδραστηρίων εφαρμόστηκε ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου. Κατά την διάρκεια της ενίσχυσης της αλληλουχίας στόχου στο εξεταζόμενο δείγμα, παράγεται σήμα φθορισμού. Ο κύκλος (C_T) στον οποίο αρχίζει να καταγράφεται αυτό το σήμα (πάνω από μία τιμή έντασης φθορισμού που ορίζεται ως κατώφλι) αντικατοπτρίζει την συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου στο αρχικό δείγμα. Τέλος, ακολούθησε ο σχετικός προσδιορισμός της έκφρασης ενός γονιδίου στόχου στο προς εξέταση δείγμα με βάση την έκφραση του στο δείγμα ελέγχου με χρήση της συγκριτικής μεθόδου $2^{-\Delta(\Delta CT)}$.

Σχηματικά:



9.1 Απομόνωση ολικού RNA και προσδιορισμός της συγκέντρωσης του.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε είτε ολοκληρωμένο σύστημα (kit) απομόνωσης RNA NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Germany) με το οποίο η απομόνωση του RNA πραγματοποιείται με προσρόφηση των νουκλεϊκών οξέων σε ειδικές στήλες χρωματογραφίας είτε NucleoZol (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Λόγω της ιδιαίτερης ευαισθησίας του RNA σε νουκλεάσες που μπορούν να το πέψουν, τα διαλύματα και τα υλικά που χρησιμοποιούνται σε όλα τα στάδια της απομόνωσης και χειρισμού του δείγματος πρέπει να είναι αποστειρωμένα και απαλλαγμένα από ριβονουκλεάσες

Στο διάλυμα ολικού RNA προσδιορίστηκαν η καθαρότητα και η συγκέντρωση του με φασματοφωτομετρική μέθοδο όπως ήδη περιγράφηκε, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω αναλύσεις. Η φωτομέτρηση του κάθε δείγματος έγινε στα 260nm και στα 280nm. Με το πρωτόκολλο απομόνωσης RNA που ακολουθήθηκε οι λόγοι που προέκυψαν από τα δείγματα ήταν $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$.

Το RNA ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8%w/v για 45' στα 80V. Η εμφάνιση των χαρακτηριστικών δύο ζωνών ριβοσωμικού RNA (18S και 28S) αντικατοπτρίζει την ποιότητα. Η ζώνη 28S rRNA πρέπει να είναι περίπου διπλάσια από την ζώνη 18S rRNA. Αυτή η αναλογία 2: 1 (28S: 18S) είναι μια καλή ένδειξη ότι το RNA είναι άθικτο.

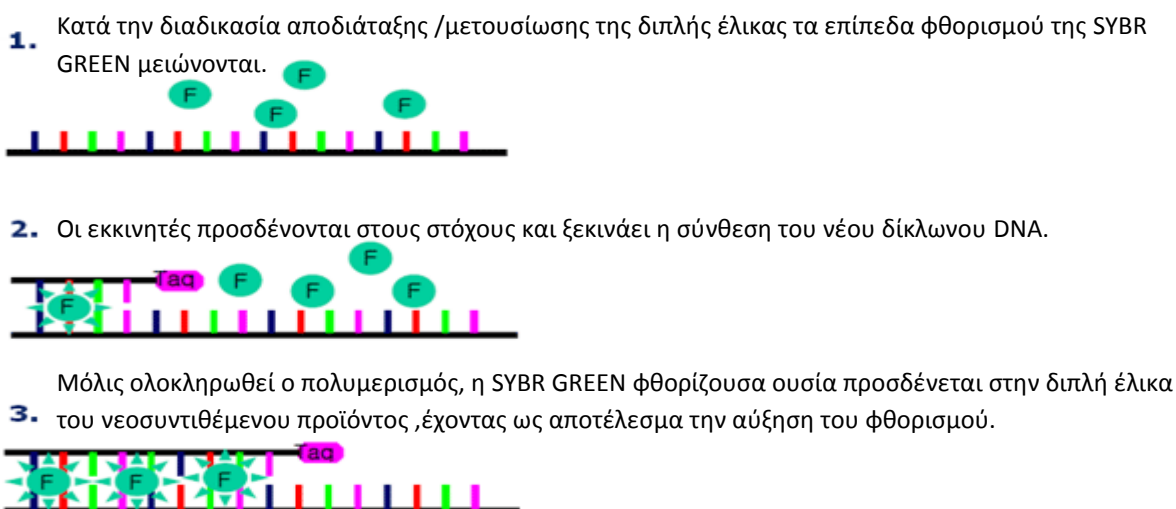
9.2 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR).

Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, έχει αναπτυχθεί μία πλειάδα τεχνικών, όπως είναι η συνδυασμένη αντίστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Reverse Transcription-quantitative real time Polymerase Chain Reaction) που εφαρμόστηκε. Πρόκειται για ποσοτική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των επιπέδων mRNA ενός γονιδίου. Χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο mRNA με χρήση του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης δημιουργείται το συμπληρωματικό του DNA (cDNA). Το πρώτο στάδιο είναι η σύνθεση υβριδίου DNA / RNA. Η αντίστροφη μεταγραφάση με την δράση ριβονουκλεάσης H που διαθέτει, διαχωρίζει το τμήμα RNA από το υβρίδιο. Εκτός από τη λειτουργία ριβονουκλεάσης H, η RT διαθέτει δραστηριότητα DNA πολυμεράσης και από το μονόκλωνο μόριο DNA προκύπτει τελικά το cDNA. Στην συνέχεια

με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και με τη χρήση ειδικών αλληλουχιών εκκινητών (primers) ενισχύεται η έκφραση του προς μελέτη γονιδίου.

Η qRT-PCR είναι ταχύτερη τεχνική από την PCR, δίνοντας την δυνατότητα παρακολούθησης ολόκληρης της πορείας της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Πρόκειται για μια ευαίσθητη τεχνική που παρέχει την δυνατότητα ποσοτικοποίησης του παραγόμενου προϊόντος της PCR αντίδρασης κατά την διάρκεια της ενίσχυσης της αλληλουχίας στόχου στο εξεταζόμενο δείγμα χωρίς να απαιτείται τα προϊόντα της αντίδρασης (τα ενισχυμένα θραύσματα DNA) να αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης όπως στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Κατά την διαδικασία ενίσχυσης του DNA, το προϊόν ανιχνεύεται με φθορίζουσα ουσία ή με σημασμένους ιχνηθέτες. Η εκπομπή σήματος φθορισμού καταγράφεται από το σύστημα της ειδικής συσκευής για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Ο κύκλος στον οποίο αρχίζει να ανιχνεύεται και να καταγράφεται το σήμα φθορισμού που παράγεται από τα νεοσυντιθέμενα δίκλινα προϊόντα αντικατοπτρίζει την συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου στο αρχικό δείγμα.

Στην παρούσα διατριβή εφαρμόστηκε one step qRT-PCR με χρήση της συσκευής CFX 96 System της Biorad και τα προϊόντα ανιχνεύτηκαν με SYBR Green I ανιχνευτή φθορισμού DNA. Η SYBR Green I είναι μια κοινώς χρησιμοποιούμενη φθορίζουσα ουσία που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, δεσμεύεται στην διπλή έλικα DNA και μόνο τότε εκπέμπει σήμα φθορισμού. Χρησιμοποιείται σε ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου γιατί η ένταση του φθορισμού αυξάνεται στο τέλος κάθε κύκλου καθώς συσσωρεύεται το παραγόμενο δίκλινο προϊόν που μπορεί να ποσοτικοποιηθεί, όπως φαίνεται και στην εικόνα:



Σε όλες τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε το KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων RT-PCR παρουσιάζονται στον πίνακα 1 με χρήση των ζευγών των εκκινητών για τα εξεταζόμενα γονίδια-στόχους που φαίνονται στον πίνακα 2. Τέλος, εφαρμόστηκε το θερμικό πρωτόκολλο της KAPA Biosystems:

35X	5' στους 42°C	Σύνθεση cDNA από εκμαγείο mRNA.
	5' στους 95 °C	Απενεργοποίηση της δράσης του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης.
	3" στους 95 °C	Αποδιάταξη του DNA.
	20" στους 60 °C	Υβριδοποίηση με τους εκκινητές και επιμήκυνση.

Σε όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονες αντιδράσεις χωρίς προσθήκη δείγματος mRNA ως δείγμα ελέγχου καθαρότητας από τυχόν προσμίξεις.

Πίνακας 1: Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων RT-PCR.		
Αντιδραστήρια	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος
Rnase free H2O μέχρι τελικού όγκου 10 μl		
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix 2X	1x	5 μl
KAPA RT mix 50x	1x	0,2 μl
Νοηματική αλληλουχία(4000 nM)	εναρκτήρια 200nM	0,5μl
Αντινοηματική αλληλουχία(4000 nM)	εναρκτήρια 200nM	0,5μl
250 ng RNA		<2,5 μl
Τελικός Όγκος		10 μl

Πίνακας 2:Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των εκκινητών ολιγονουκλεοτιδίων που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση των μετάγραφων των γονιδίων στόχων.				
ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	ΜΗΚΟΣ(bp)	ΘΕΣΗ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ	Tm(°C)
Firefly primer forward	5'-CAACTGCATAAGGCTATGAAGAGA-3'	24	73-96	58.64
Firefly primer reverse	5'-ATTTGTATTCAGCCCATATCGTTT-3'	24	225-202	57.04
Renilla primer forward	5'-GGAATTATAATGCTTATCTACGTGC-3'	25	722-746	56.29
Renilla primer reverse	5'-CTTGCGAAAAATGAAGACCTTTTAC-3'	25	874-850	57.91
c-myc primer forward	5'-TCAAGAGCGAACACACAAC-3'	20	2266-2285	58.70
c-myc primer reverse	5'-GTCGTTTCCGCAACAAGTCC-3'	20	2475-2456	60.04
bcl2 primer forward	5'-CTGAGTACCTGAACCGGCA-3'	19	1026-1044	59.03
bcl2 primer reverse	5'-GAGAAATCAAACAGAGGCCG-3'	20	1131-1112	56.81

Για την εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των *imp1* και *gardh* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές qiaagen με cat no: QT00026292 και QT0079247, αντίστοιχα.

9.3 Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου στόχου με την μέθοδο των $C_T (2^{-\Delta(\Delta C_T)})$.

Η σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης mRNA των γονιδίων που μελετήθηκαν σε αυτήν την διατριβή έγινε με χρήση της μεθόδου $2^{-\Delta(\Delta C_T)}$ (Livak και Schmittgen *et al.*, 2001). Η σχετική ποσοτικοποίηση των γονιδίων στόχων έγινε μέσω σύγκρισης των κύκλων C_T που εμφανίζεται το προϊόν του γονιδίου στόχου με τους κύκλους C_T που εμφανίζεται το προϊόν του γονιδίου αναφοράς τόσο στα προς εξέταση δείγματα όσο και στο δείγμα ελέγχου της κάθε πειραματικής διαδικασίας. Από την διαφορά των δύο τιμών που προκύπτει από το δείγμα εξέτασης και το δείγμα ελέγχου προκύπτει η ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου στόχου. Δηλαδή:

$$\Delta C_{T \text{ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ}} = \Delta C_{T \text{ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΤΟΧΟΥ}} - \Delta C_{T \text{ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ}}$$

$$\Delta C_{T \text{ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ}} = \Delta C_{T \text{ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΤΟΧΟΥ}} - \Delta C_{T \text{ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ}}$$

$$\Delta(\Delta C_T) = \Delta C_{T \text{ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ}} - \Delta C_{T \text{ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ}}$$

$$\text{Σχετικά επίπεδα έκφρασης } 2^{-\Delta(\Delta C_T)}$$

Σε όλες τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή για τον έλεγχο της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης mRNA Firefly λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκε *Renilla* λουσιφεράση ως γονίδιο αναφοράς. Αντίστοιχα, στις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν για τον έλεγχο ενδογενούς *c-myc* mRNA χρησιμοποιήθηκε το *Gardh* ως γονίδιο αναφοράς. Τα επίπεδα έκφρασης του *bcl-2* mRNA υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας *hprt* ως γονίδιο εσωτερικής αναφοράς. Παράλληλες αντιδράσεις χωρίς δείγμα RNA διεξήχθησαν για έλεγχο καθαρότητας των αντιδραστηρίων.

10. Υπολογισμός μεταφρασιμότητας.

Ο όρος μεταφρασιμότητα ουσιαστικά αναφέρετε στα επίπεδα πρωτεΐνης που προκύπτει από το μήνυμα RNA, κατά περίπτωση.

Για τον υπολογισμό της μεταφρασιμότητας των γονιδίων που εκφράζουν οι πλασμιδιακοί φορείς υπολογίστηκε ο λόγος της ενεργότητας της Firefly λουσιφεράσης προς

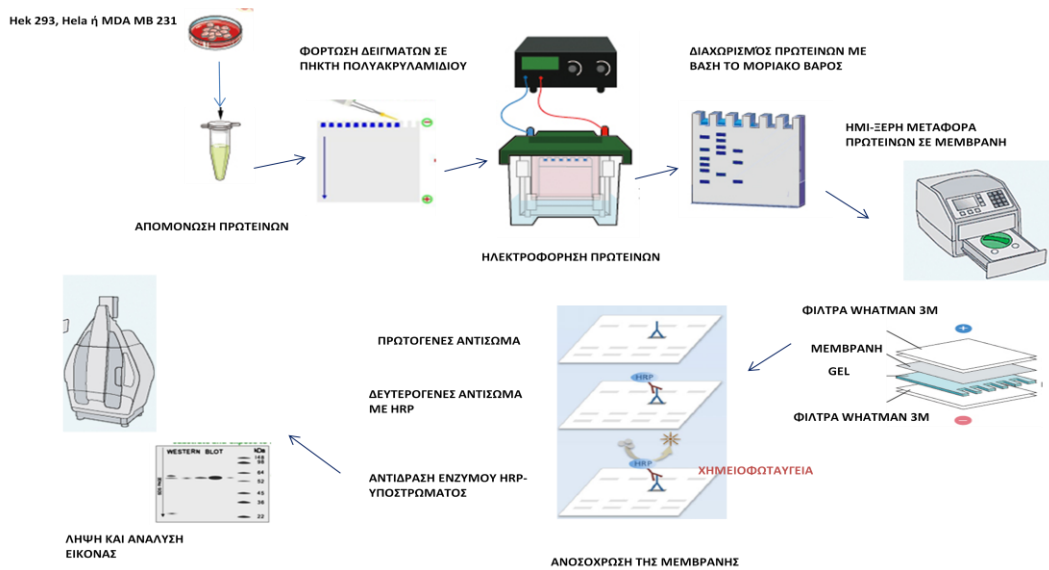
την ενεργότητα της *Renilla* λουσιφεράσης για κάθε εξεταζόμενο δείγμα. Η τιμή της ενεργότητας του προς εξέταση δείγματος που προέκυψε διαιρέθηκε με την τιμή των επιπέδων mRNA Firefly λουσιφεράσης που προέκυψε από την μέθοδο ποσοτικοποίησης $2^{-\Delta(\Delta CT)}$ στις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Η τιμή που προκύπτει από τον παραπάνω λόγο αντικατοπτρίζει την μεταφρασσιμότητα του προς εξέταση γονιδίου.

$$\text{μεταφρασσιμότητα} = \frac{\text{Ενεργότητα Firefly luciferase} / \text{Ενεργότητα Renilla luciferase}}{\text{Firefly luciferase mRNA (treated)}}$$

11. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Για του έλεγχο της έκφρασης του κάθε γονιδίου στόχου που μελετήθηκε κατά την διάρκεια της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε αρχικά ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA των γονιδίων. Στην συνέχεια προσδιοριστήκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western τα επίπεδα των πρωτεϊνών.

Σχηματικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε:



Υλικά και Μέθοδοι

Αναλυτικά:

11.1 Λύση κυττάρων και εκχύλιση ολικών πρωτεϊνών.

Υλικά:

α) Διάλυμα λύσης κυττάρων(RIPA):50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% NP-40, 0.1% SDS,0.5% DOC,150 mM NaCl, 1 mM PMSF και αναστολείς πρωτεασών (Thermo Scientific™ Halt™ Protease Inhibitor Cocktails cat no,10516495).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση εκχυλίσματος πρωτεϊνών από ευκαρυωτικά κύτταρα έγινε στον πάγο και ήταν η εξής:

1. Αποκόλληση των κυττάρων($\approx 1 \cdot 10^6$ κύτταρα/συνθήκη) με διάλυμα θρυψίνης, φυγοκέντρηση των κυττάρων και απόχρηση του υπερκείμενου.
2. Πλύση κυττάρων με 1X PBS(X2).
3. Φυγοκέντρηση κυττάρων και απόχυση υπεκειμένου.
4. Επαισιωρήση ιζήματος κυττάρων σε ≈ 200 μl διάλυμα λύσης κυττάρων.
5. Επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση με χρήση αυτόματης πιπέτας .
6. Ομογενοποίηση κυτταρολύματος με χρήση συριγγών, διαδοχικά, 23G και 18G.
7. Φυγοκέντρηση για 15' σε 12000rpm στους 4⁰C.

Το υπερκείμενο είναι το πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Μεταφέρεται σε πάγο για να ανασταλεί η δράση των πρωτεασών. Φυλάσσονται στους -20⁰C.

11.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με την χρήση της μεθόδου Bradford.

Υλικά:

α)Διάλυμα BSA 1mg/ml.

β) Διάλυμα Bradford: 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 σε 50 ml μεθανόλης και 100 ml 85% (w/v) φωσφορικού οξέος (H₃PO₄). Φυλάσσεται σε σκοτεινή φιάλη στους 4 ° C.

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα εκχυλίσματα προσδιορίστηκε με την μέθοδο Bradford, λόγω της ακρίβειας, της ευκολίας και της ταχύτητας της μεθόδου. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει το μήκος κύματος όπου παρουσιάζει τη μέγιστη απορρόφηση όταν αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Συγκεκριμένα η ελεύθερη χρωστική παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 465 nm ενώ μετά την αλληλεπίδραση το μέγιστο απορρόφησης εμφανίζεται στα 595 nm. Οπτικά η αλληλεπίδραση γίνεται εμφανής ως αλλαγή χρώματος της χρωστικής από καστανό σε γαλάζιο. Το έγχρωμο προϊόν που προκύπτει είναι σταθερό απουσία φωτός.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Προετοιμασία πέντε έως οκτώ δειγμάτων με αραιώσεις προτύπου διαλύματος αλβουμίνης βοός σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 5 έως 50 μg πρωτεΐνης. Φωτομέτρηση γνωστών συγκεντρώσεων πρότυπων πρωτεϊνικών διαλυμάτων στα 595 nm.

2. Κατασκευή καμπύλης αναφοράς $A_{595}=F(C)$.

3. Φωτομέτρηση δειγμάτων πρωτεϊνών (950 μl Διάλυμα Bradford+45 μl H₂O +5 μl δείγμα).

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα προέκυψε από την συνάρτηση της πρότυπης καμπύλης.

11.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται κυρίως με βάση διαφορές στο φορτίο (ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης), στη μάζα ή σε διάφορες άλλες φυσικές ιδιότητες των μορίων. Πολύ συχνά τα μακρομόρια αποδιατάσσονται πριν την ηλεκτροφόρηση, αλλά και κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται αποδιατακτικοί παράγοντες. Τέτοιοι αποδιατακτικοί παράγοντες είναι για τις πρωτεΐνες το δωδεκυλοθειικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate, SDS). Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες ξεδιπλώνοντας πλήρως κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο πολυπεπτιδικής αλυσίδας-SDS που είναι φορτισμένο αρνητικά. Η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση και προσθήκη μερκαπτοαιθανόλης ή διθειοθρεϊτόλης, που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς οι οποίοι αναπτύσσονται ανάμεσα σε δύο ομάδες -SH κυστεϊνών της ίδιας ή δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Τα σύμπλοκα SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται με κατεύθυνση από την κάθοδο προς την άνοδο. Σε μία τυπική ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως με βάση τη μάζα τους. Πρωτεΐνες που αποτελούνται από περισσότερες από μία πολυπεπτιδικές αλυσίδες διαχωρίζονται με το SDS στις υπομονάδες τους και με την ηλεκτροφόρηση μπορεί να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος της κάθε μίας. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου είναι ασυνεχής και αποτελείται από δύο πήκτωμα :το πήκτωμα επιστοιβάξης (stacking gel) και το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Το πήκτωμα επιστοιβάξης είναι χαμηλότερης πυκνότητας πολυακρυλαμιδίου, σχηματίζοντας μεγαλύτερους πόρους ώστε να εξασφαλίζεται η επιστοιβάξη των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε μια λεπτή ζώνη και η ταυτόχρονη είσοδός τους στο πήκτωμα διαχωρισμού που έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου.

Υλικά και Μέθοδοι

Υλικά:

α) Διάλυμα διαλυτοποίησης <<φόρτωσης>> δειγμάτων(6X): 1M Tris-HCl ,pH6,8, 20% γλυκερόλη, 20%SDS, 10% β-μερκαπτοαιθανόλη ,1% μπλε της βρωμοφαινόλης. Αποθήκευση στους -20°C.

β) Ρυθμιστικό Διάλυμα ηλεκτροφόρησης:15g Tris,72g γλυκίνη,5 g SDS σε 1LT H₂O,pH8.4. Αποθήκευση στους 4°C.

γ)Δείκτες μοριακού βάρους. (Precision Plus ProteinDual Color Standards, Biorad)

δ)Συστατικά πηκτώματος επιστοιβάξης:

Acrylamide-bis acrylamide(29:1)(30%)	660 μl
1.5M Tris pH:6.8	1.25ml
H ₂ O	3ml
10%SDS	100 μl
Ammonium Persulfate(0.1g/1000μl)	50 μl
TEMED	6 μl

ε)Συστατικά πηκτώματος διαχωρισμού (12%):

Acrylamide-bis acrylamide(29:1)(30%)	6 ml
1.5M Tris pH:8.8	3.75 ml
H ₂ O	4.95 ml
10%SDS	150 μl
Ammonium Persulfate(0.1g/1000μl)	150 μl
TEMED	12 μl

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1.Συναρμολόγηση συσκευής.

2.Προετοιμασία πηκτώματος διαχωρισμού. Τοποθέτηση στην συσκευή. Αναμονή για πολυμερισμό.

3. Προετοιμασία πηκτώματος επιστοιβάξης. Τοποθέτηση στην συσκευή. Τοποθέτηση εξαρτημάτων -comb που δημιουργούν μικρά κοιλώματα υποδοχής του δείγματος. Αναμονή για πολυμερισμό.

4. Προσθήκη διαλύματος φόρτωσης στα δείγματα πρωτεϊνών (1X).

5.Θέρμανση δειγμάτων στους 100°C για 5'.

6.Τοποθέτηση πηκτώματος στην συσκευή. Προσθήκη διαλύματος ηλεκτροφόρησης.

7. Φόρτωση δειγμάτων σε θύλακες στο πήκτωμα επιστοιβάξης.

Ίση ποσότητα πρωτεΐνης από κάθε δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε κάθε πειραματική διαδικασία (≈30μg). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 100V σταθερά για 2-3 ώρες.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα επιστοιβάσης απομακρύνθηκε, το πήκτωμα διαχωρισμού εμβαπτίστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς για 20'.

11.4 Ημί-ξερη μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Υλικά

α)Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς : 0,038M γλυκίνη, 0,04% SDS 0,05M Tris base, 20% v/v μεθανόλη με pH 8.6.Αποθήκευση στους 4°C.

β) Διάλυμα Ponceau-S (Sigma).

Πραγματοποιήθηκε ημί-ξηρη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα διαχωρισμού στην μεμβράνη. Χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0.45μm (Biorad Laboratories, USA). Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εξισορροπήθηκε. Εμβαπτίστηκε για 10' σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, όπως και τα φίλτρα whatman 3MM. Το πήκτωμα διαχωρισμού ήρθε σε επαφή με την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και εκατέρωθεν τοποθετήθηκαν φίλτρα whatman 3MM. Έγινε η τοποθέτηση στην συσκευή ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών (Trans Blot Turbo Transfer System, Biorad Laboratories, USA) με την μεμβράνη να τοποθετείται προς την άνοδο.

Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται στην μεμβράνη λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρουν με εφαρμογή σταθερής έντασης ρεύματος 1,5mA/cm².

Μετά το πέρας της μεταφοράς ακολούθησε χρώση της μεμβράνης για έλεγχο επιτυχούς μεταφοράς πρωτεϊνών. Η χρώση πραγματοποιήθηκε με διάλυμα Ponceau-S. Σε γυάλινο δοχείο τοποθετούνται περίπου 50ml διαλύματος Ponceau-S και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ήπια ανακίνηση για 25' σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν συλλέγεται το διάλυμα και εφόσον εμφανιστούν πρωτεϊνικές ζώνες στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλένουμε με διάλυμα TBS, μέχρι τον πλήρη αποχρωματισμό της μεμβράνης. Η ένταση της χρώσης των ζωνών είναι ανάλογη με την ποσότητα της πρωτεΐνης που έχει μεταφερθεί στη μεμβράνη. Οι μεμβράνες της νιτροκυτταρίνης μετά τον πλήρη αποχρωματισμό τους μπορούν να φυλαχτούν στους 4^o C σε διάλυμα TBS είτε να ξεκινήσει η διαδικασία για την ανίχνευση των πρωτεϊνών με χρήση αντισωμάτων.

11.5 Ανοσοπροσδιορισμός των ακινητοποιημένων στην μεμβράνη πρωτεϊνών.

Υλικά:

α) TBS(10X): 200mM Tris, 1400mM NaCl. pH7,4. Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.

β) Διάλυμα δέσμευσης: 3% άπαχο γάλα σκόνη, 0,05% Tween 20 σε TBS.

γ) Διάλυμα αραίωσης αντισωμάτων: 0,05% Tween 20, 0,3% άπαχο γάλα σκόνη σε TBS.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην πρόσδεση της πρωτεΐνης που βρίσκεται στην μεμβράνη (αντιγόνου) από το αντίσωμα (μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό) που την αναγνωρίζει (πρωτογενές αντίσωμα). Το αντίσωμα μπορεί να είναι σημασμένο με κάποιο φθοριόχρωμα ή να αναγνωριστεί από μη ειδικό δευτερογενές αντίσωμα που είναι συζευγμένο είτε με φθοριόχρωμα είτε με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP). Το ένζυμο μόλις

έρθει σε επαφή με το κατάλληλο υπόστρωμα αντιδρά και παράγει σήμα ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Χρησιμοποιήθηκαν δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με υπεροξειδάση για την ανίχνευση των πρωτεϊνών στόχων στην μεμβράνη.

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων των πρωτεϊνών μετά την μεταφορά του στην μεμβράνη ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία.

1.Επώση μεμβράνης με το διάλυμα μπλοκαρίσματος/δέσμησης για 90' υπό ανάδευση.

2.Πλύση της μεμβράνης με TBS/Tween(0.05%)(x3) υπό ανάδευση.

3. Επώση μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα στους 4⁰C για 12 ώρες.

4. Πλύση της μεμβράνης με TBS/Tween(0.05%)(x3) υπό ανάδευση.

5. Επώση μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.

Τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα και οι αραιώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν στην διατριβή παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

6. Πλύση της μεμβράνης με TBS/Tween(0.05%)(x3) υπό ανάδευση.

7. Επώση μεμβράνης με το διάλυμα υποστρώματος(Clarity Western ECL Blotting Substrate) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η ανίχνευση του σήματος για την συγκεκριμένη διατριβή έγινε μέσω του μηχανήματος ChemiDoc XRS+(Biorad Laboratories ,USA).Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των πρωτεϊνικών επιπέδων έγινε με χρήση του λογισμικού προγράμματος Image Lab 5.2.1.

Πίνακας 3:Λίστα με τα πρωτογενή αντισώματα και τις αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν και τα δευτερογενή αντισώματα με τα οποία έγινε η ανίχνευσή τους.

Πρωτογενές Αντίσωμα	Αραίωση	Δευτερογενές Αντίσωμα	Αραίωση
Anti c-MYC,9E10(sc-40, Santa Cruz Biotechnology)	1/800	Goat anti-Mouse(sc-2005, Santa Cruz Biotechnology)	1/4000
Anti c-MYC,N262(sc-764, Santa Cruz Biotechnology)	1/1000	Goat anti-Rabbit(Jackson immuno research, cat no:111035008)	1/3500
Anti c-MYC,c19(sc-788, Santa Cruz Biotechnology)	1/500	Goat anti-Rabbit(Jackson immuno research, cat no:111035008)	1/3500
Anti-Actin,Clone C4 (MAB1501,Millipore)	1/5000	Goat anti-Mouse (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology)	1/4000
Anti-BCL-2,AB1(Calbiochem)	1/300	Goat anti-Mouse (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology)	1/4000
Anti-p53, (sc-126,Santa Cruz Biotechnology)	1/500	Goat anti-Mouse (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology)	1/4000
Anti-Actin(sc-47778, Santa Cruz Biotechnology)	1/500	Goat anti-Mouse (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology)	1/2500
Anti-Caspase 9(sc-56076, Santa Cruz Biotechnology)	1/500	Goat anti-Mouse (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology)	1/2500

Το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-IMP1 που χρησιμοποιήθηκε ήταν δώρο του Finn Cilius Nielsen.

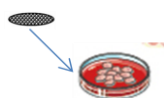
12. Ανοσοφθορισμός, συνεστιακή μικροσκοπία και λήψη εικόνων.

Ο ανοσοφθορισμός είναι ένα παράδειγμα ανοσοϊστοχημείας, μια μέθοδος που βασίζεται στην ειδικότητα πρόσδεσης αντιγόνου- αντισώματος με στόχο την οπτικοποίηση βιομορίων με την χρήση φθορίζουσων ουσιών που είναι συζευγμένα τα αντισώματα. Οι φθορίζουσες ουσίες επιτρέπουν την απεικόνιση βιομορίων με χρήση μικροσκοπίας εκπέμποντας σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος φωτός μόλις διεγερθούν. Χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση, την αξιολόγηση της χωροθέτησης, της μετακίνησης αλλά και τον υπολογισμό των ενδογενών επιπέδων έκφρασης μιας πρωτεΐνης στόχου. Η αποτελεσματική εφαρμογή της μεθόδου εξαρτάται από πολλές παραμέτρους όπως την φύση του αντιγόνου, την ειδικότητα και την ευαισθησία του πρωτογενούς αντισώματος, τις ιδιότητες της φθορίζουσας ουσίας σήμανσης, την τεχνική διαπερατότητας και σταθεροποίησης του δείγματος αλλά και την σωστή απεικόνιση του φθορισμού των δειγμάτων προς ανάλυση. Υπάρχουν δύο κατηγορίες τεχνικής του ανοσοφθορισμού, ο άμεσος και ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (direct and indirect immunofluorescence). Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το πού είναι συζευγμένη η φθορίζουσα ουσία. Αν είναι συζευγμένη με το πρωτογενές αντίσωμα πρόκειται για άμεσο ανοσοφθορισμό ενώ αν είναι συζευγμένη με το δευτερογενές πρόκειται για έμμεσο. Η τεχνική του ανοσοφθορισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μέθοδος σήμανσης και οπτικοποίησης χωρίς την χρήση αντισωμάτων, μόνο με την χρήση ειδικών φθορίζουσων ουσιών που αναγνωρίζουν μόρια στο κύτταρο π.χ χρώση και σήμανση του DNA.

Υλικά:

- α) Διάλυμα μονιμοποίησης: 4% φορμαλδεΐδης.
- β) Διάλυμα δέσμησης: 1% fish skin gelatin, 2mM MgCl₂ και 0,1 mM EGTA σε PBS. Σε αυτό αραιώνονται και τα αντισώματα.
- γ) Διάλυμα διαπερατότητας: 0,2% TritonX-100 , σε PBS.
- δ) Αντιδραστήριο αναστολής φωτοευαισθησίας φθορίζοντων χρωστικών ουσιών: Vectashield antifade mounting medium (Vectorlabs, Cat.No H-1000).

Γενικό πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού που ακολουθήθηκε:



Κύτταρα αναπτύσσονται παρουσία αποστειρωμένων γυάλινων καλυπτρίδων στις συνθήκες του πειράματος.

Υλικά και Μέθοδοι



Αφαίρεση θρεπτικού υλικού ανάπτυξης. Πλύση με κρύο PBS(X3).



Μονιμοποίηση κυττάρων παρουσία 4% φορμαλδεΐδης για 10'.



Αφαίρεση διαλύματος φορμαλδεΐδης. Πλύση με κρύο PBS(X3).



Επώαση σε διάλυμα 0,2% TritonX-100 για 5'.

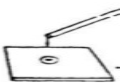


Αφαίρεση διαλύματος διαπερατότητας των μεμβρανών. Πλύση με κρύο PBS(X3).



Blocking
solution

Επώαση με διάλυμα μπλοκαρίσματος για 15'.



Οι καλυπτρίδες πάνω στις οποίες αναπτύχθηκαν τα κύτταρα αφαιρούνται από το τρυβλίο καλλιέργειας. Επωάζονται, απουσία φωτός, με τα αντισώματα για 90'. Τα αντισώματα αραιώνονται κατάλληλα(Πίνακας 4).



Αφαίρεση αντισώματος. Πλύση με διάλυμα μπλοκαρίσματος(X3). Αν το πρωτογενές αντίσωμα δεν είναι συζευγμένο με φθοριόχρωμα, ακολουθεί επώαση με δευτερογενές αντίσωμα για 90'. Αν είναι απαραίτητο τα δείγματα μετά από αυτό το στάδιο επωάζονται με χρωστική για χρώση του πυρήνα.



Οι καλυπτρίδες που φέρουν κολλημένα τα προς εξέταση κύτταρα τοποθετούνται πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες με χρήση antifade mounting medium. Σφραγίζονται/στεγανοποιούνται οι καλυπτρίδες και φυλάσσονται στους 4°C απουσία φωτός. Τα δείγματα είναι έτοιμα για λήψη εικόνας με χρήση μικροσκοπίου.

12.1 Άμεσος ανοσοφθορισμός (direct immunofluorescence).

Ο χαρακτηρισμός "άμεσος" προέρχεται από το γεγονός ότι το πρωτογενές αντίσωμα που αναγνωρίζει το αντιγόνο είναι συζευγμένο με κάποια φθορίζουσα χρωστική (FITC, PE, Cy5, κλπ.). Η άμεση σύνδεση της φθορίζουσας χρωστικής στο αντίσωμα μειώνει τον αριθμό των βημάτων της διαδικασίας, εξοικονομώντας χρόνο και μειώνοντας το μη ειδικό σήμα υποβάθρου.

12.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός(indirect immunofluorescence).

Ο χαρακτηρισμός "έμμεσος" προέρχεται από το γεγονός ότι το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιείται δεν είναι συζευγμένο με κάποια φθορίζουσα χρωστική. Απαιτούνται δύο στάδια επώασης, πρώτα με το πρωτεύον αντίσωμα ειδικό για το αντιγόνο, κατόπιν με συμβατό δευτερογενές αντίσωμα. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι αυτό που φέρει τη φθορίζουσα χρωστική. Αυτό παρέχει ενίσχυση σήματος αυξάνοντας τον αριθμό των μορίων φθοριοφόρου ανά αντιγόνο. Αυτό το πρωτόκολλο επιτρέπει μεγαλύτερη ευελιξία επειδή μια ποικιλία διαφορετικών δευτερογενών αντισωμάτων και τεχνικών ανίχνευσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ένα δεδομένο πρωτεύον αντίσωμα.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες αναγράφονται στον πίνακα 4.

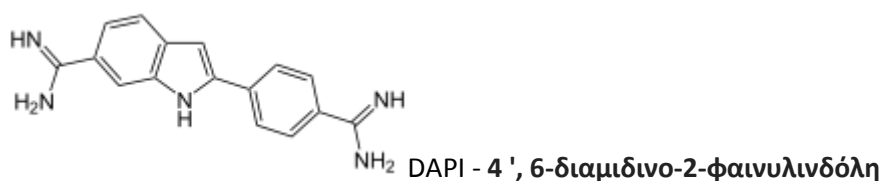
Πίνακας 4:Λίστα με τα πρωτογενή αντισώματα και τις αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν και τα δευτερογενή αντισώματα με τα οποία έγινε η ανίχνευσή τους			
Πρωτογενές Αντίσωμα	Αραίωση	Δευτερογενές Αντίσωμα	Αραίωση
Anti-γ-H2Aχ (Millipore)	1/2000	Donkey anti-mouse(Alexa Fluor 568, ab175472)	1/400
Anti-TIAR(sc 1749,santa cruz biotechnology)	1/100	Donkey anti-goat-Alexa Fluor 568 (Thermo Fischer Scientific A-11057)	1/1000

12.3 Συνεστιακή μικροσκοπία και λήψη εικόνων.

Αντίθετα με τον κλασικό τρόπο φωτισμού και παρατήρησης που γίνεται στο κοινό μικροσκόπιο, η συνεστιακή μικροσκοπία στηρίζεται στο γεγονός ότι με τη χρήση ενός πολύ μικρού διαφράγματος, περιορίζεται ο φωτισμός και η παρατήρηση σε ένα σημείο του παρασκευάσματος. Η εικόνα σχηματίζεται με σάρωση όλων των σημείων του πεδίου του μικροσκοπίου. Αυτό το πλεονέκτημα επιτρέπει τη σάρωση του παρασκευάσματος όχι μόνο ως προς τους άξονες x και y, αλλά και ως προς τον z, με αποτέλεσμα την απόκτηση καλά

εστιασμένων τρισδιάστατων εικόνων που όμως δεν παρατηρούνται άμεσα, αλλά μέσω ειδικών προγραμμάτων (software) που κάνουν ψηφιοποίηση και ανακατασκευή της εικόνας. Οι εικόνες των δειγμάτων μετά από διαδικασία ανοσοφθορισμού στην παρούσα διατριβή λήφθηκαν με σάρωση σε Leica TCS SP5 II συνεστιακό μικροσκόπιο εξοπλισμένο με LAS AF 2.6.0 software (Leica) λογισμικό, χρησιμοποιώντας τις ίδιες παραμέτρους σάρωσης σε όλα τα δείγματα.

12.4 Χρώση πυρήνα με φθορίζουσα χρωστική 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη (DAPI).



Η φθορίζουσα χρωστική DAPI - 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη δεσμεύεται ισχυρά σε περιοχές του DNA πλούσιες σε αδερίνη και θυμίνη. Πρόκειται για μια φθορίζουσα ουσία η οποία μπορεί να διέλθει την κυτταρική μεμβράνη και ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη χρώση τόσο των ζωντανών όσο και των μονιμοποιημένων κυττάρων. Μόλις προσδεθεί με το δίκλωνο DNA έχει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 358 nm (υπεριώδες) και μέγιστο εκπομπής σήματος στα 461 nm. Η χρώση των πυρήνων με DAPI χρησιμοποιείται κυρίως για την οπτικοποίησή τους. Στα κύτταρα που οδηγούνται σε θάνατο το μέγεθος των πυρήνων τους μειώνεται και υπάρχει η δυνατότητα να γίνει εμφανής η αλλαγή της έντασης της χρώσης DAPI. Χρησιμοποιείται λοιπόν και για εντοπισμό νεκρών κυττάρων. Τα βιώσιμα κύτταρα έχουν πολύ στρογγυλεμένους και διαυγείς πυρήνες ενώ τα νεκρά κύτταρα έχουν μικρότερους, συμπυκνωμένους, κομμένους ή τεμαχισμένους πυρήνες.

Για την χρώση με DAPI ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία ,παρόμοιο πρωτόκολλο με αυτό που αναλύθηκε:

1. Πλύση κυττάρων, προσκολλημένων σε καλυπτρίδες, με PBS (X3).
2. Μονιμοποίηση κυττάρων με διάλυμα 4% φορμαλδεΐδης
3. Επώαση με διάλυμα 300 nM DAPI για 15'.
4. Πλύση κυττάρων με PBS (X3).
5. Στεγανοποίηση κυττάρων σε αντικειμενοφόρες πλάκες παρουσία Vectashield antifade mounting medium.

Η επώαση έγινε απουσία φωτός. Τα κύτταρα μετά από χρώση με DAPI απεικονίστηκαν με χρήση μικροσκοπίου TIRF(Total internal reflection fluorescence microscopy) και υπό τις ίδιες παραμέτρους.

13. Έλεγχος της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης με χρήση κυτταρομετρία ροής.

Η τεχνική αυτή αποτελεί ένα από τα πιο εύχρηστα εργαλεία για τον διαχωρισμό και τον χαρακτηρισμό των κυτταρικών πληθυσμών με βάση συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τους. Πρόκειται για σύγχρονη τεχνολογία με την ικανότητα να σαρώνει κάθε κύτταρο-“γεγονός” που βρίσκεται σε ένα διάλυμα και να διακρίνει τα γεγονότα που καταγράφει βάσει των σκεδαστικών ιδιοτήτων τους. Δηλαδή παρέχει την δυνατότητα για διαχωρισμό των κυττάρων με βάση το μέγεθος, την επιφανειακή πολυπλοκότητα και τον φθορισμό. Ο φθορισμός προέρχεται έπειτα από σήμανση των κυττάρων με ουσίες ή αντισώματα που αναγνωρίζουν είτε επιφανειακά αντιγόνα στα κύτταρα είτε ενδοκυττάρια μόρια όταν οι μεμβράνες καταστούν διαπερατές. Η πιο διαδεδομένη τεχνική προσέγγιση για χρώση των κυττάρων με φθορίζοντα αντισώματα είναι ο ανοσοφθορισμός όπως αναλύθηκε παραπάνω(ενότητα 12).

13.1 Ανάλυση της πορείας του κυτταρικού κύκλου ευκαρυωτικών κυττάρων.

Η εξέλιξη της πορείας του κυτταρικού κύκλου και ο προσδιορισμός του ποσοστού των κυττάρων στις διάφορες φάσεις του αναλύθηκε στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιώντας το BD FACS Aria III κυτταρόμετρο εξοπλισμένο με το λογισμικό bd diva facs.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1.Μονιμοποίηση κυττάρων($\approx 10^6$ / συνθήκη) με κρύα αιθανόλη(70%) τουλάχιστον 12 ώρες πριν την ανάλυση.

Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C για διάστημα έως και δεκαπέντε ημερών πριν την ανάλυση. Την ημέρα της ανάλυσης τα δείγματα που συλλέχτηκαν και μονιμοποιήθηκαν,

2.Φυγοκέντρωση σε υψηλές στροφές. Απόχυση αιθανόλης.

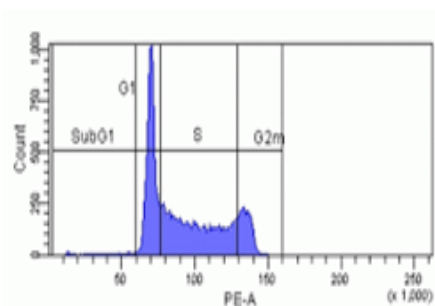
3.Πλύση με 1X PBS(X3).

4.Χρώση κυττάρων με ιωδιούχο προπίδιο (PI, Biotium cat no 40017) σε διάλυμα 30nM κιτρικού νατρίου ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -Sigma-Aldrich, catalog number: 1613859) παρουσία 1% RNAase A.

5.Επώαση δειγμάτων ε στους 37°C για 30', απουσία φωτός.

6. Επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση με χρήση αυτόματης πιπέτας ώστε να διαχωριστούν όλα τα κύτταρα πριν την ανάλυση.

Η εικόνα από την ανάλυση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου προσομοιάζει με την εικόνα που ακολουθεί:



Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου βασίζεται στην ένταση φθορισμού των κυττάρων, η οποία συσχετίζεται με την ποσότητα DNA που περιέχουν. Η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται κατά την S φάση, στην G_2/M έχει ήδη διπλασιαστεί ενώ στην G_1 φάση είναι η μισή. Η απεικόνιση του κυτταρικού κύκλου γίνεται σε ιστόγραμμα(μονοπαραμετρικό διάγραμμα). Παρουσιάζεται το πλήθος των κυττάρων συναρτήσει της έντασης της χρώσης.

13.2 Ανίχνευση αποπτωτικών κυτταρικών πληθυσμών έπειτα από χρώση με Αννεξίνη A5.

Η αννεξίνη V/A5 χρησιμοποιείται ευρέως ως ποιοτικός δείκτης για την ανίχνευση αποπτωτικών κυττάρων. Η αννεξίνη V έχει την ικανότητα να προσδένεται σε μόρια φωσφατιδυλοσερίνης(PS),η οποία σε συνθήκες προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μεταφέρεται στην εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η αννεξίνη V που χρησιμοποιείται στις πειραματικές διαδικασίες είναι συζευγμένη με κάποια φθορίζουσα ουσία ώστε με χρήση της τεχνικής κυτταρομετρίας ροής να μπορεί να γίνει η διάκριση των ζωντανών και των αποπτωτικών κυττάρων ενός πληθυσμού, όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα παρακάτω.

Σχηματική απεικόνιση:



Πηγή: <https://www.lifesci.dundee.ac.uk/technologies/flow-cytometry-cell-sorting/techniques/cell-death-and-apoptosis>

Για τις πειραματικές ανάγκες της συγκεκριμένης διατριβής χρησιμοποιήθηκε το σύνολο αντιδραστηρίων της biolegend με αντίσωμα Annexin V Alexa Fluor 647 (cat no640912) ή FITC Annexin V (cat no640922) ή PE Annexin V (cat no640908) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικά,

1. Επαναίωση κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης Annexin V ($\approx 10^6$ κύτταρα/mL διαλύματος).
 2. Προσθήκη 5μL Annexin V στο διάλυμα κυττάρων.
 3. Ήπια ανάδευση.
 4. Επώση στο σκοτάδι για 20' σε θερμοκρασία δωματίου.
 5. Προσθήκη 400 μL ρυθμιστικού διαλύματος πρόσδεσης Annexin V σε κάθε δείγμα.
- Σε κάθε συνθήκη του ίδιου πειράματος ορίστηκε στο λογισμικό πρόγραμμα του κυτταρομέτρου να διαβαστεί ίσος αριθμός γεγονότων υπό τις ίδιες ρυθμίσεις, ώστε να προκύπτουν συγκρίσιμα αποτελέσματα.

13.3 Ταυτόχρονη χρώση κυττάρων με Αννεξίνη A5 και αντίσωμα anti-MYC.

Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης πρωτεΐνης με χρήση της τεχνικής του ανοσοφθορισμού και με ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της MYC πρωτεΐνης μέσω ανοσοφθορισμού και χρήση κυτταρομετρίας ροής. Ακολουθήθηκε παρόμοια μεθοδολογία σε διάλυμα κυττάρων, με το πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού που παρουσιάστηκε. Αναλυτικά, τα προς εξέταση κύτταρα στις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες συλλέχθηκαν και καταμετρήθηκαν ώστε να χρησιμοποιηθεί ο ίδιος αριθμός κυττάρων κατά την χρώση. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 4% φορμαλδεΐδης για 5' και οι μεμβράνες τους έγιναν διαπερατές με προσθήκη διαλύματος 0,2% TritonX-100.

Υλικά και Μέθοδοι

Πριν από τη χρήση ειδικών αντισωμάτων για την ανίχνευση αντιγόνου, όλες οι πιθανές θέσεις μη ειδικής πρόσδεσης στο δείγμα καλύφθηκαν για την πρόληψη μη ειδικής δέσμευσης αντισώματος, με χρήση διαλύματος προϋβριδοποίησης, που περιέχει 1% fish skin gelatin, 2mM MgCl₂ και 0,1 mM EGTA για 15'. Ακολούθησε επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα για μια ώρα και πλύση των δειγμάτων με διάλυμα προϋβριδοποίησης τρεις φορές. Κάθε δείγμα επώαστηκε με πρωτογενές αντίσωμα anti-MYC-FITC(SAB4700448,Sigma Aldrich). Τα αντισώματα αραιώνονται κατάλληλα σε διάλυμα προϋβριδοποίησης . Τα τελευταία 15' της επώασης προστέθηκε στα δείγματα PE Annexin V και τα δείγματα επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης Annexin. Τα δείγματα ήταν έτοιμα για την ταυτόχρονη ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων MYC και την ανίχνευση αννεξίνης με χρήση κυτταρομετρία ροής.

Σε κάθε συνθήκη του ίδιου πειράματος ορίστηκε στο λογισμικό πρόγραμμα του κυτταρομέτρου να διαβαστεί ίσος αριθμός γεγονότων υπό τις ίδιες ρυθμίσεις, ώστε να προκύπτουν συγκρίσιμα αποτελέσματα.

14. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

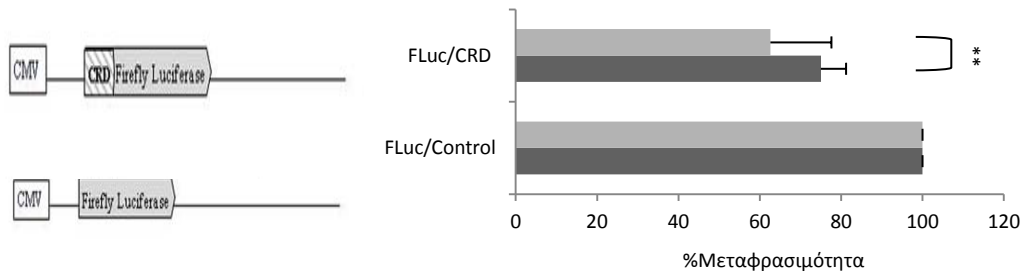
Τα αποτελέσματα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα που κάθε συνθήκη πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του unpaired t-test. Η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε μεταξύ της κάθε πειραματικής συνθήκης και του αντίστοιχου δείγματος ελέγχου ή και μεταξύ των επιμέρους συνθηκών όπου υποδεικνύεται.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αποτελέσματα

Η ρύθμιση της έκφρασης του *c-myc* mRNA έχει μελετηθεί εκτενώς και εξαρτάται από ένα σύνολο *cis* στοιχείων αλλά και *trans* παραγόντων που επιδρούν σε αυτό. Τα επίπεδα έκφρασης του εξαρτώνται από την σταθερότητα του μηνύματος mRNA αλλά την μεταφρασιμότητά του. Η αλληλουχία που εδράζεται εντός της κωδικής περιοχής του *c-myc* mRNA έχει αποδειχθεί ότι προσδίδει αστάθεια και μειώνει την μεταφρασιμότητα του μηνύματος (Coding Region instability Determinant -CRD). επικράτησε αρχικά η άποψη ότι η ύπαρξη σπάνιων κωδικονίων στην αλληλουχία αυτή προκαλεί την προσωρινή παύση της λειτουργίας των ριβοσωμάτων με αποτέλεσμα να παραμένει εκτεθειμένη στην δράση ενδονουκλεάσων. Με αυτόν τον τρόπο η αλληλουχία εντός της κωδικής περιοχής του *c-myc* mRNA μπορεί να επηρεάσει την μεταφρασιμότητα (Lemm και Ross *et al.*, 2002). Όμως η αποικοδόμηση του μηνύματος μπορεί να αποφευχθεί από την αναγνώριση και την δέσμευση της πρωτεΐνης IMP1 (ή CRD -πρωτεΐνη πρόσδεσης, CRD- binding protein) στην αλληλουχία CRD. Η δέσμευση της πρωτεΐνης IMP1 στην CRD περιοχή σταθεροποιεί το μετάγραφο.

Όπως είναι γνωστό από αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης (Meristoudis *et al.*, 2015) αλλά και όπως φαίνεται στο σχήμα 1, η CRD αλληλουχία όταν εισαχθεί εντός του πλαισίου ανάγνωσης της κωδικής περιοχής ετερόλογων mRNA μειώνει την μεταφρασιμότητά τους. Μελετήθηκαν τα επίπεδα της μεταφρασιμότητας της Firefly λουσιφεράσης (FLuc/Control) και του χιμαιρικού μετάγραφου που προκύπτει με την εισαγωγή της CRD αλληλουχίας του *c-myc* mRNA εντός πλαισίου ανάγνωσης της Firefly λουσιφεράσης (FLuc/CRD). Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η παρουσία της CRD αλληλουχίας στην κωδική περιοχή της Firefly λουσιφεράσης μείωσε την μεταφρασιμότητα των χιμαιρικών μετάγραφων κατά 25% (ράβδος με γκρι σκούρο χρώμα). Η υπερέκφραση της IMP1 πρωτεΐνης μείωσε περαιτέρω κατά 13% (ράβδος με γκρι ανοιχτό χρώμα) τα επίπεδα της μεταφρασιμότητας των χιμαιρικών μετάγραφων Firefly λουσιφεράσης που φέρουν την αλληλουχία αστάθειας, ενώ η υπερέκφραση της πρωτεΐνης δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην μεταφρασιμότητα του γονιδίου της Firefly λουσιφεράσης (FLuc/Control) (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Η επίδραση της IMP1 πρωτεΐνης στην μεταφρασιμότητα του mRNA Firefly λουσιφεράσης που φέρει την CRD αλληλουχία του *c-myc* mRNA εντός πλαισίου ανάγνωσης. Κύτταρα Hek 293 συνδιαμολύνθηκαν είτε με το πλασμίδιο FLuc/ Control είτε με το πλασμίδιο FLuc/CRD, το πλασμίδιο αναφοράς, pRL-CMV και με 1 μg είτε από pEGFP-C1 φορέα (ράβδος με γκρι σκούρο χρώμα) ή pEGFP-C1 IMP1 (ράβδος με γκρι ανοιχτό χρώμα). Παρουσιάζονται τα ποσοστιαία επίπεδα της μεταφρασιμότητας σε σχέση με το πλασμίδιο FLuc/ Control, ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα. Τα αποτελέσματα βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά με το δείγμα αναφοράς ($P < 0,01$) και μεταξύ τους, $**P < 0,01$.

Η πρωτεΐνη IMP1 αναγνωρίζει, πέραν του *c-myc* mRNA ένα πλήθος άλλων mRNA με διαφορετική επίδραση στο καθένα. Συνδέεται είτε με την 5'- είτε με την 3'-αμετάφραστη περιοχή, είτε με την κωδική περιοχή τους. Η δράση της για κάποια από τα mRNA στόχους της έχει διασαφηνιστεί πλήρως ενώ για κάποια άλλα όχι. Η δράση της πρωτεΐνης IMP1 εξαρτάται και ελέγχεται από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που επιδέχεται από δύο οδούς μεταγωγής σήματος. Φωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο τυροσίνης 396 από την κινάση Src (Hüttelmaier *et al.*, 2005) και στο κατάλοιπο σερίνης 181 από την κινάση mTORC2 (Urbanska *et al.*, 2017)

Παραδόξως, μέχρι σήμερα, δεν έχει διερευνηθεί η επίδραση των τροποποιήσεων της πρωτεΐνης IMP1 στην ρύθμιση της έκφρασης του *c-myc*. Δεδομένου λοιπόν ότι η πρωτεΐνη IMP1 αναγνωρίζει και προσδέεται στην περιοχή αστάθειας εντός της κωδικής περιοχής του *c-myc* mRNA, εξετάστηκε εάν και πώς οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της IMP1 επηρεάζουν την έκφραση του.

➤ 1. Η επίδραση της αναστολής της φωσφορυλίωσης στην τυροσίνη 396 της IMP1, μέσω της Src κινάσης, στην μετα-μεταγραφική πορεία του *c-myc* mRNA.

1.1 Η επίδραση στα χημικικά μετάγραφα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η παρουσία της CRD αλληλουχίας μειώνει την μεταφρασιμότητα των χημικικών μετάγραφων της Firefly λουσιφεράσης, ενώ η παρουσία της IMP1 πρωτεΐνης άγριου τύπου (στο εξής: IMP1) ενισχύει αυτό το φαινόμενο.

Αποτελέσματα

Επομένως, είναι εύλογο το ερώτημα κατά πόσο η καταγεγραμμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση της IMP1 στο κατάλοιπο της τυροσίνης 396 έχει επιπτώσεις στη μετα-μεταγραφική πορεία των χιμαιρικών μετάγραφων, που φέρουν την CRD αλληλουχία του *c-myc* mRNA εντός πλαισίου ανάγνωσης. Για αυτόν τον σκοπό κύτταρα Hek 293 διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο ελέγχου (FLuc/CRD) και καλλιεργήθηκαν παρουσία του αναστολέα της κινάσης Src (Src1) ώστε να ανασταλεί η φωσφορυλίωση της IMP1 στην τυροσίνη 396.

Η αναστολή της δράσης της κινάσης Src προκάλεσε σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA Firefly λουσιφεράσης σε όλες της συνθήκες. Η προσθήκη του αναστολέα Src1 αύξησε τα επίπεδα mRNA των χιμαιρικών μετάγραφων που έφεραν το CRD στοιχείο του *c-myc* κατά 43%. Για περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IMP1 κατά την μετάφραση, ο τεχνητός φορέας της Firefly λουσιφεράσης που φέρει το CRD στοιχείο του *c-myc*, συνδιαμολύνθηκε με το πλασμίδιο που εκφράζει το μεταλλαγμένο ομόλογο της πρωτεΐνης IMP1, όπου το κατάλοιπο της τυροσίνης στην θέση 396 έχει αντικατασταθεί από φαινυλαλανίνη (στο εξής: IMP1 Y396F), αποτρέποντας την μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Η υπερέκφραση της IMP1 Y396F αύξησε κατά 57% τα επίπεδα mRNA, ένα ποσοστό αύξησης παρόμοιο με αυτό που σημειώθηκε μετά την προσθήκη Src1 σε κύτταρα διαμολυσμένα με την IMP1. Η παρουσία του αναστολέα σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν με την μεταλλαγμένη μορφή της IMP1 δεν είχε επιπρόσθετο αποτέλεσμα επί των επιπέδων mRNA (Σχήμα 2α).

Η αύξηση στα επίπεδα του mRNA που παρατηρήθηκε στις προαναφερθείσες συνθήκες δεν συνοδευόταν από αύξηση του προϊόντος μετάφρασης. Επομένως η παρουσία του Src1 προκάλεσε 32% μείωση των επιπέδων της μεταφρασιμότητας του mRNA της Firefly λουσιφεράσης ενώ η υπερέκφραση της IMP1 πρωτεΐνης αγρίου τύπου με την συνακόλουθη έκθεση των κυττάρων στην δράση του αναστολέα Src1 για σαράντα οκτώ ώρες μείωσε κατά 40% τα επίπεδα της μεταφρασιμότητας. Η παρουσία του μεταλλαγμένου ομολόγου της πρωτεΐνης προκάλεσε μείωση 35% στην μεταφρασιμότητα. Στα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με την IMP1 Y396F, όπως αναμενόταν η προσθήκη του αναστολέα Src1 δεν επηρέασε περαιτέρω τα επίπεδα της σχετικής μεταφρασιμότητας (Σχήμα 2β).

Παρατηρήθηκαν λοιπόν, τα επίπεδα mRNA των χιμαιρικών μετάγραφων που έφεραν την CRD περιοχή παρουσία του Src1 ή της μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης IMP1 εξαιρετικά αυξημένα. Κάτι τέτοιο στο τεχνητό σύστημα μελέτης θα μπορούσε να προκύψει μόνο εάν απουσία Src σηματοδότησης μεταβάλλεται η σταθερότητα των μετάγραφων που προκύπτουν, αφού οι τεχνητοί φορείς δεν επηρεάζονται από άλλους ενδοκυττάριους

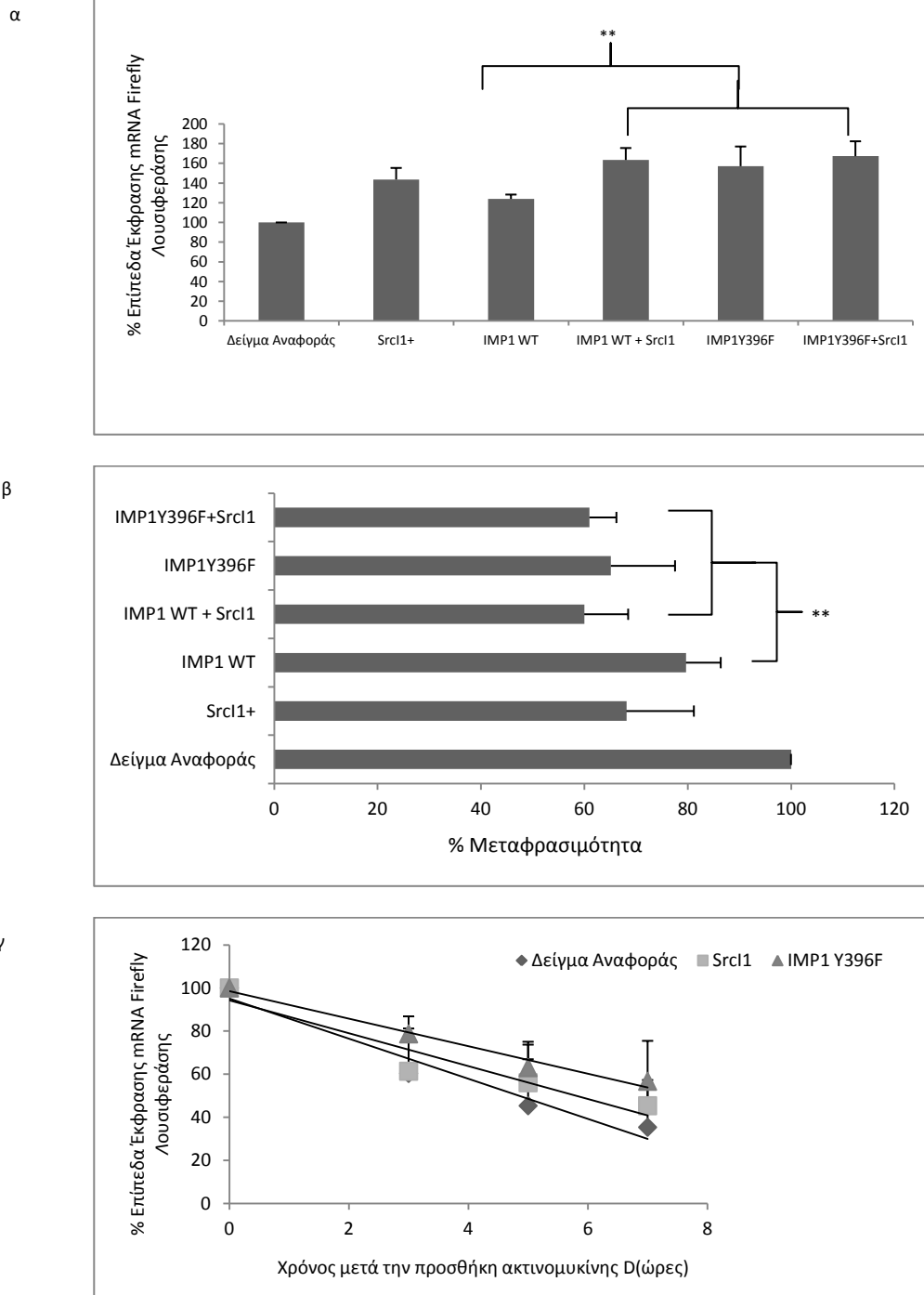
παράγοντες. Προσδιορίστηκε ο ρυθμός αποικοδόμησης των χιμαιρικών mRNA αναστέλλοντας την μεταγραφή με χρήση ακτινομυκίνης D. Ο χρόνος ημιζωής του mRNA της Firefly λουσιφεράσης αναφέρεται να είναι 7,4 ώρες (Arvatz *et al.*, 2010). Τα επίπεδα mRNA της Firefly λουσιφεράσης αναλύθηκαν με qRT-PCR τεχνική χρησιμοποιώντας το mRNA *Renilla* λουσιφεράσης ως δείγμα εσωτερικού έλεγχου. Η παρουσία της αλληλουχίας αστάθειας του *c-myc* mRNA εντός της κωδικής περιοχής της Firefly λουσιφεράσης, όπως ήταν αναμενόμενο, μείωσε τον χρόνο ημιζωής του χιμαιρικού μετάγραφου κατά 3 ώρες περίπου. Η σταθερότητα των χιμαιρικών μετάγραφων αυξήθηκε όταν ανεστάλη η φωσφορυλίωση της IMP1 πρωτεΐνης στο κατάλοιπο τυροσίνης 396. Συγκεκριμένα ο χρόνος ημίσειας ζωής αυξήθηκε κατά 35% σε συνθήκες αναστολής της σηματοδότησης από την Src κινάση. Ομοίως, αυξήθηκε κατά 60% ο χρόνος ημίσειας ζωής του χιμαιρικού mRNA Firefly λουσιφεράσης με την παρουσία της IMP1 Y396F πρωτεΐνης (σχήμα 2γ). Αυτά τα δεδομένα δείχνουν σαφώς ότι η αναστολή της φωσφορυλίωσης της IMP1 στο κατάλοιπο της τυροσίνης 396 σταθεροποίησε το μετάγραφο που φέρει το CRD στοιχείο του *c-myc*. Αντιθέτως μείωσε τα επίπεδα του ενζύμου.

Επομένως, η αναστολή της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IMP1 στο κατάλοιπο της τυροσίνης 396 όπως παρουσιάστηκε προκάλεσε μείωση της μεταφρασιμότητας των χιμαιρικών μετάγραφων λουσιφεράσης που έφεραν την CRD cis ρυθμιστική περιοχή του *c-myc*.

Είναι γνωστό ότι το *c-myc* mRNA αναγνωρίζεται και από άλλες πρωτεΐνες εκτός της IMP1 που συνήθως προσδένονται στη 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές του μηνύματος και ότι η IMP1 μπορεί να αλληλεπιδρά με αυτές τις πρωτεΐνες (Atlas *et al.*, 2004, Weidensdorfer *et al.*, 2009). Για να ελεγχθεί κατά πόσο η παρουσία των 5' και 3' αμετάφραστων περιοχών του *c-myc* mRNA προκαλεί περαιτέρω μεταβολές στην μεταφρασιμότητα των χιμαιρικών μετάγραφων λουσιφεράσης κατά την αναστολή της σηματοδότησης από την κινάση Src, χρησιμοποιήθηκε ένα πλασμίδιο που φέρει την κωδική περιοχή της Firefly λουσιφεράσης με την αλληλουχία CRD εντός πλαισίου ανάγνωσης συν τις 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές του *c-myc* mRNA (Σχήμα 3α). Όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 3, η παρουσία όλων των cis περιοχών του *c-myc* mRNA με την ταυτόχρονη αναστολή της φωσφορυλίωσης της IMP1 πρωτεΐνης στο κατάλοιπο της τυροσίνης 396, είτε παρουσία του μεταλλαγμένου ομολόγου της πρωτεΐνης είτε παρουσία του Src11 αναστολέα, δεν προκάλεσε περαιτέρω μεταβολές εκτός από αυτές που ήδη αναφέρθηκαν. Αναλυτικά, η μεταφρασιμότητα των κυττάρων που διαμολύνθηκαν με τον φορέα που φέρει όλες τις cis περιοχές του *c-myc* mRNA και αναπτύχθηκαν παρουσία Src11 μειώθηκε κατά 42% ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA

Αποτελέσματα

Σχήμα 2:



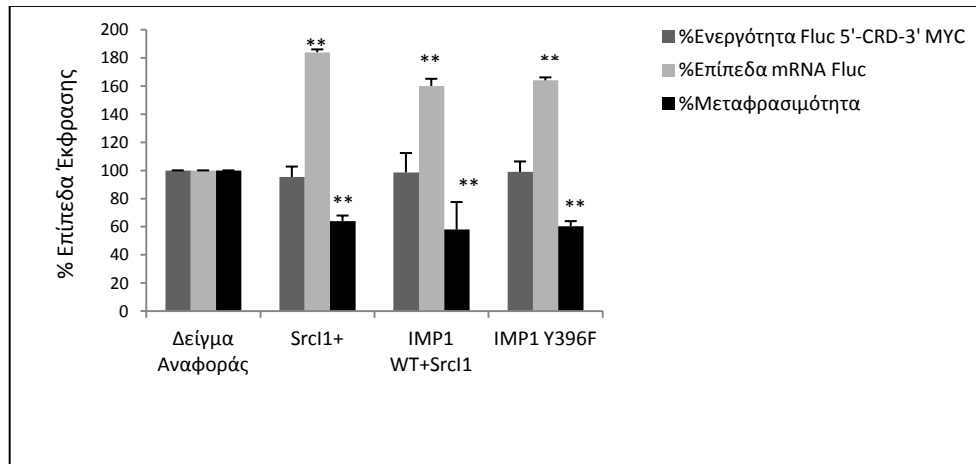
Σχήμα 2: Η επίδραση της αναστολής της φωσφορυλίωσης της IMP1 στην τυροσίνη 396. Κύτταρα Hek 293 συνδιαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο ελέγχου FLuc/CRD, με το πλασμίδιο αναφοράς pRL-CMV και με 1μg από τους φορείς pEGFP-C1 ή pEGFP-C1 IMP1 ή pEGFP-C1 IMP1 Y396F, όπως επισημαίνεται. Εικοσιτέσσερις ώρες αργότερα προστέθηκε Src1, όπου υποδεικνύεται, για σαράντα οκτώ ώρες. Παρουσιάζονται τα ποσοστιαία (α) επίπεδα έκφρασης mRNA των χιμαρικών μεταγράφων και (β) επίπεδα της μεταφρασιμότητας, συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου (πλασμίδια: FLuc/CRD, pRL-CMV, pEGFP-C1). Παρουσιάζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση έξι ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα δείγματα βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά με το δείγμα αναφοράς ($P < 0,01$) και μεταξύ τους** ($P < 0,01$). (γ) Ο χρόνος ημιζωής του mRNA Firefly λουσιφεράσης. Προσδιορίστηκε σε κύτταρα Hek 293 παρουσία Src1 αναστολέα ή παρουσία IMP1 Y396F πρωτεΐνης. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των επιπέδων του μηνύματος RNA στα χρονικά σημεία που υποδεικνύονται, τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

της Firefly λουσιφεράσης σημείωσαν αύξηση 60%. Η παρουσία της πρωτεΐνης IMP1 Y396F προκάλεσε αύξηση 64% στα επίπεδα mRNA της Firefly λουσιφεράσης και μείωσε τα επίπεδα της μεταφρασιμότητας κατά 40%. Απουσία σηματοδότησης Src κινάσης, λοιπόν, οι μεταβολές στην μεταφρασιμότητα των τεχνητών φορέων βρέθηκε να είναι ανεξάρτητη των 5' και 3' αμετάφραστων περιοχών του *c-myc* mRNA και αποδίδονται αποκλειστικά στην παρουσία της CRD αλληλουχίας και την αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη IMP1 (σχήμα 3β).

3α



3β



Σχήμα 3: Έλεγχος της μεταφρασιμότητας του χιμαιρικού μετάγραφου Firefly λουσιφεράσης που φέρει τις 5' , 3' αμετάφραστες αλληλουχίες και την CRD ,απουσία σηματοδότησης Src κινάσης. Κύτταρα Hek 293 συνδιαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο FLuc/5'-CRD-3', με το πλασμίδιο αναφοράς pRL-CMV και με 1μg από τον φορέας pEGFP-C1 ή pEGFP-C1 IMP1 ή pEGFP-C1 IMP1 Y396F όπως επισημαίνεται. Εικοσιτέσσερις ώρες αργότερα προστέθηκε Src1 για σαράντα οκτώ ώρες όπου υποδεικνύεται. Παρουσιάζονται τα ποσοστιαία επίπεδα έκφρασης mRNA Firefly λουσιφεράσης (στήλη με γκρι ανοιχτό χρώμα), ενεργότητας Firefly λουσιφεράσης (στήλη με σκούρο γκρι χρώμα) και μεταφρασιμότητας (στήλη με μαύρο χρώμα).Τα επίπεδα έκφρασης του πλασμιδίου FLuc/5'-CRD-3'(δείγμα αναφοράς) ορίστηκαν ως 100% .Παρουσιάζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. **P <0,01.

1.2 Η επίδραση στα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς *c-myc*.

Το αρχικό ερώτημα που δημιουργήθηκε ήταν εάν τα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς *c-myc* μεταβάλλονται κατά την αναστολή της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης που επιδέχεται η IMP1 στην τυροσίνη 396 μέσω της δράσης της κινάσης Src. Με στόχο λοιπόν να διασαφηνιστεί αν οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στο τεχνητό σύστημα λουσιφερασών που εξετάστηκε εμφανίζονται στα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς *c-myc* υπό τις ίδιες συνθήκες, έγινε έλεγχος των επιπέδων του ενδογενούς *c-myc* mRNA με εφαρμογή της

Αποτελέσματα

τεχνικής qRT-PCR και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης MYC με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Η παρουσία του Src11 αναστολέα αύξησε τα επίπεδα του *c-myc* mRNA κατά 74%. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης IMP1 αγρίου τύπου οδήγησε σε 23% αύξηση ενώ τα επίπεδα του μηνύματος αυξήθηκαν 81% παρουσία της πρωτεΐνης IMP1 αγρίου τύπου απουσία της σηματοδότηση της κινάσης Src. Η παρουσία της μεταλλαγμένης μορφής της IMP1 αύξησε κατά 85% τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA. Η προσθήκη αναστολέα Src11 σε κύτταρα παροδικά διαμολυσμένα για την έκφραση της IMP1 Y396F δεν είχε επιπρόσθετο αποτέλεσμα επί των επιπέδων mRNA του *c-myc* (Σχήμα 4α). Στην συνέχεια προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης πρωτεΐνης MYC σε όλες τις παραπάνω συνθήκες, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 4β. Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν αναστέλλοντας την δραστηριότητα της κινάσης Src στα επίπεδα της πρωτεΐνης δεν αντικατοπτρίζουν τις μεταβολές που καταγράφηκαν στα επίπεδα *c-myc* mRNA. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μείωση 40% στην έκφραση πρωτεΐνης MYC όταν τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε αγωγή με αναστολέα Src11 και 45 % μείωση σημειώθηκε όταν εκφράστηκε η μεταλλαγμένη IMP1 (Σχήμα 4β i και 4β ii). Αυτά τα δεδομένα έδειξαν ότι η κινάση Src ρυθμίζει την έκφραση του *c-myc*, ελέγχοντας την κατάσταση φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IMP1 στο κατάλοιπο τυροσίνης.

Στα σχήματα 5α και 5β παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων τραχήλου(HeLa) υπό τις ίδιες συνθήκες αναστολής φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IMP1. Οι μεταβολές των επιπέδων τόσο του ενδογενούς *c-myc* mRNA όσο και της πρωτεΐνης MYC που σημειώθηκαν κυμαίνονταν στα ίδια επίπεδα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μελέτη των Hek 293 κυττάρων . Δηλαδή, αναστέλλοντας την δραστηριότητα της κινάσης Src με χρήση του αναστολέα Src11 τα επίπεδα του *c-myc* mRNA αυξήθηκαν κατά 64% ενώ τα επίπεδα της πρωτεΐνης παρουσίασαν μείωση 43%. Ομοίως παρουσία της μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης IMP1 τα επίπεδα του *c-myc* mRNA αυξήθηκαν 65%, αντίθετα με τα επίπεδα της πρωτεΐνης MYC που μειώθηκαν κατά 55%.

Στην συνέχεια διερευνήθηκε κατά πόσο η αύξηση των επιπέδων *c-myc* mRNA οφείλεται στην μείωση του ρυθμού αποικοδόμησης του απουσία σηματοδότησης της κινάσης Src όπως προέκυψε και στο τεχνητό σύστημα μελέτης λουσιφερασών. Σε κύτταρα Hek 293 πραγματοποιήθηκε αναστολή της μεταγραφής, στις συνθήκες που υποδεικνύονται στο σχήμα 4γ, με έκθεση στην δράση ακτινομυκίνης-D. Ο χρόνος ημίσειας ζωής του *c-myc* mRNA έχει προσδιοριστεί περίπου στα 30 λεπτά (Stohr *et al.*,2006). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι ο χρόνος ημιζωής του *c-myc* mRNA και στις δύο περιπτώσεις απουσίας

φωσφορυλίωσης της IMP1 αυξήθηκε σημαντικά. Παρουσία της μεταλλαγμένης IMP1 στο κατάλοιπο τυροσίνης 396 υπολογίστηκε 67% αύξηση του χρόνου ημιζωής του *c-myc* mRNA (Σχήμα 4γ). Η αναστολή της δράσης της κινάσης Src οδήγησε σε παρόμοια αποτελέσματα. Καταγράφηκε 75% αύξηση του χρόνου ημιζωής του μηνύματος παρουσία του αναστολέα Src11.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μελέτη στις δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές υποδεικνύουν ότι η απουσία φωσφορυλίωσης της IMP1 στο κατάλοιπο τυροσίνης 396 αποτρέπει η ταχεία αποικοδόμηση του *c-myc* mRNA, το μόριο σταθεροποιείται και αναστέλλεται η μετάφραση του.

1.3 Η αποκατάσταση της λειτουργίας της κινάσης Src.

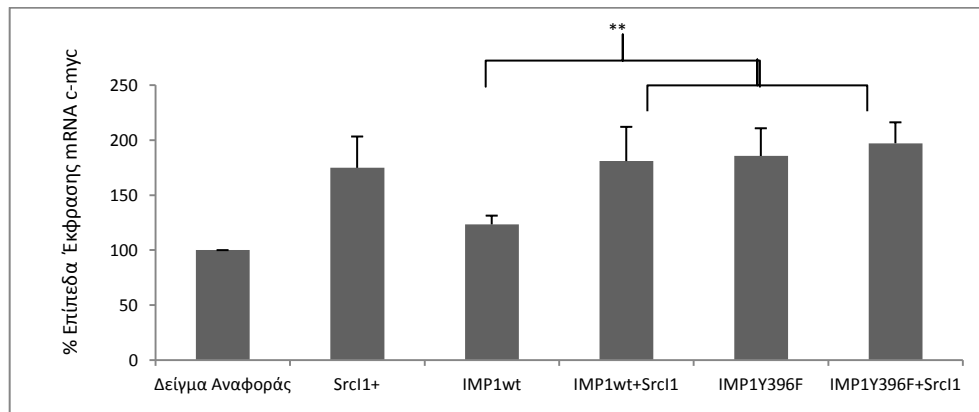
Με σκοπό να αποδειχθεί περαιτέρω ότι η πρωτεΐνη IMP1, εκτός από την προστασία και την σταθερότητα που προσδίδει στο *c-myc* mRNA, ενέχεται και στην ρύθμιση της μεταφρασιμότητας μέσω της σηματοδότησης της κινάσης Src, ελέγχθηκαν τα επίπεδα της μεταφρασιμότητας τόσο των χημικών μετάγραφων Firefly λουσιφεράσης όσο και του ενδογενούς *c-myc* mRNA σαράντα οκτώ ώρες μετά την απομάκρυνση του αναστολέα της δράσης της Src κινάσης από το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας των κυττάρων.

Αναλυτικότερα, υπολογίστηκαν τα σχετικά επίπεδα της ενεργότητας, τα σχετικά επίπεδα mRNA των χημικών μετάγραφων της Firefly λουσιφεράσης και η μεταφρασιμότητα που προκύπτουν μετά την αποκατάσταση της φυσιολογικής λειτουργίας της κινάσης Src, αφού προηγήθηκε η σαρανταοκτώωρη αναστολή της δράσης της. Συγκεκριμένα, Hek 293 και HeLa κύτταρα συνδιαμολύνθηκαν με τα κατάλληλα πλασμίδια. Τα κύτταρα αρχικά εκτέθηκαν στην δράση του αναστολέα Src11 για σαράντα οκτώ ώρες. Στην συνέχεια ακολούθησε η απομάκρυνση του αναστολέα και η παρακολούθηση της καλλιέργειας των κυττάρων για επιπλέον σαράντα οκτώ ώρες. Τα κύτταρα τότε συλλέχθηκαν για ανάλυση. Στα Hek 293 κύτταρα, όπως φαίνεται στο σχήμα 6i, η αποκατάσταση της σηματοδότησης στο κατάλοιπο της τυροσίνης της IMP1 αύξησε την ενεργότητα της Firefly λουσιφεράσης κατά 65,5% (στήλη με σκούρο γκρι χρώμα), ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA μειώθηκαν κατά 53% (στήλη με ανοιχτό γκρι χρώμα). Επομένως, η μεταφρασιμότητα των πλασμιδίων Firefly λουσιφεράσης που φέρουν την CRD αλληλουχία αυξήθηκε 84% (στήλη με μαύρο χρώμα) σε σχέση με το δείγμα αναφοράς ενώ διπλασιάστηκε συγκριτικά με το δείγμα στο οποίο είχε επιδράσει ο αναστολέας. Αντίστοιχα στην κυτταρική σειρά HeLa στις ίδιες συνθήκες, η ενεργότητα της Firefly λουσιφεράσης αυξήθηκε κατά 35,5% (στήλη με σκούρο γκρι χρώμα), ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA από 55,5% αύξηση που σημείωσαν παρουσία του αναστολέα Src11.

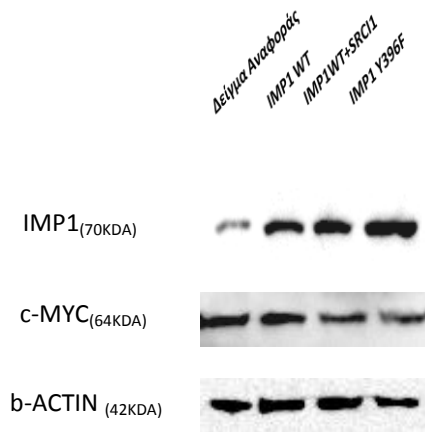
Αποτελέσματα

Σχήμα 4:

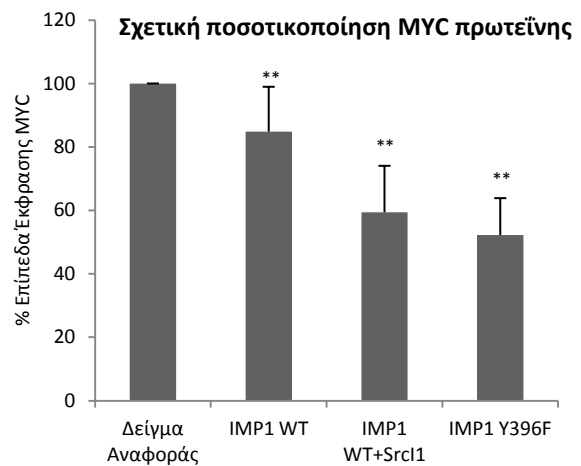
α



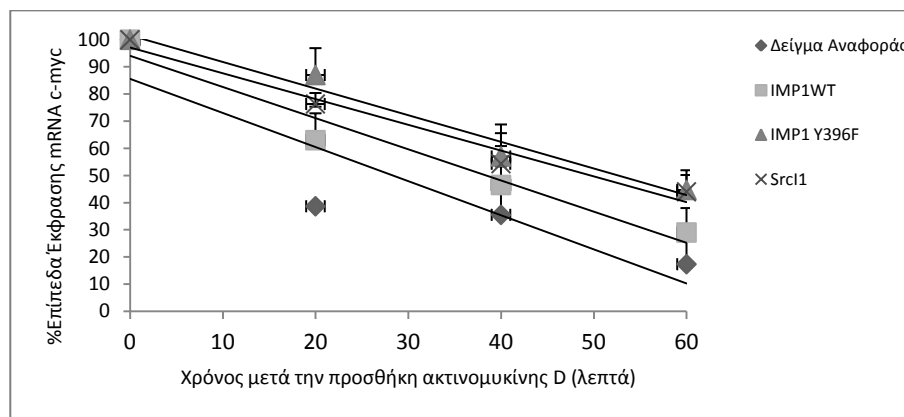
βι



βii

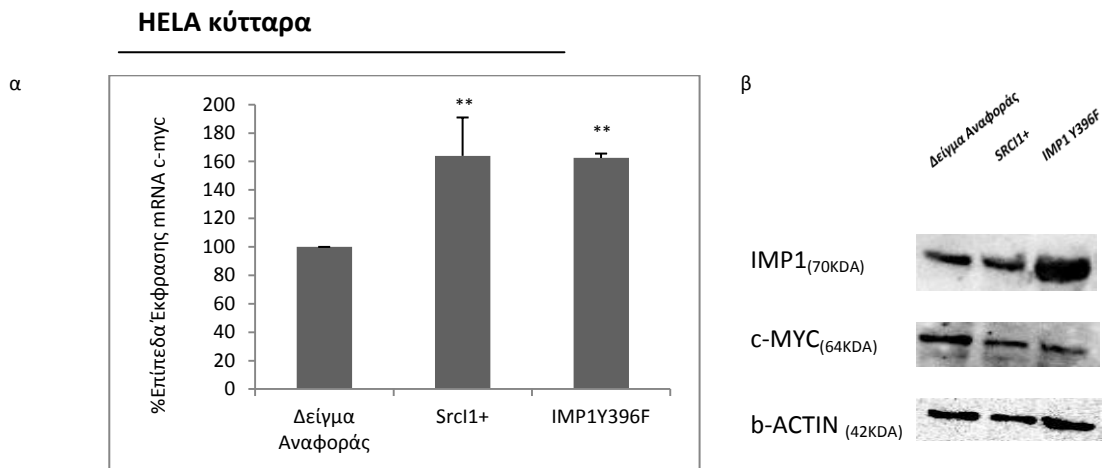


γ



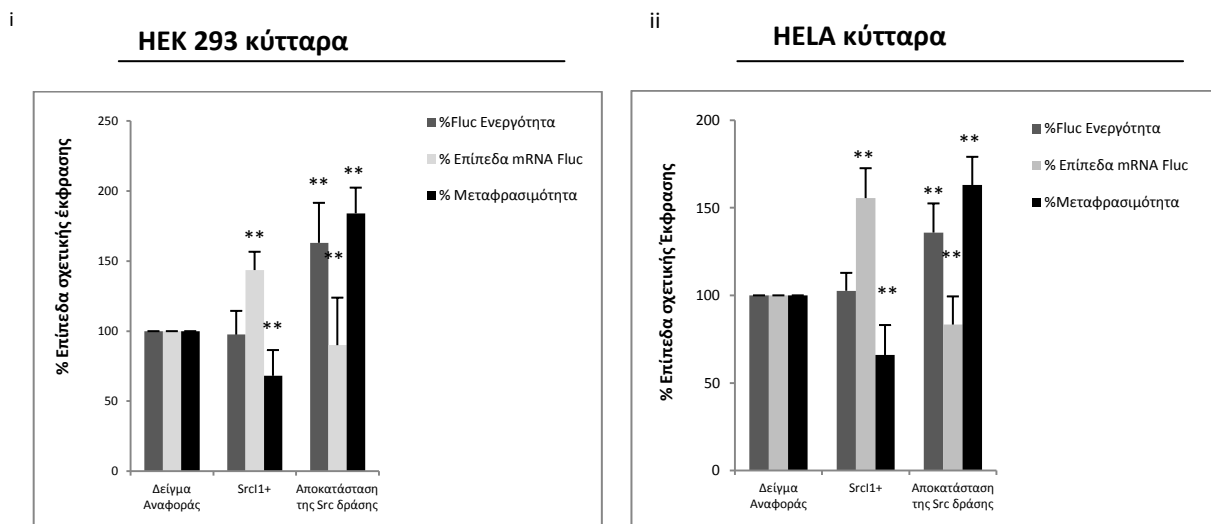
Σχήμα 4: Η επίδραση της αναστολής της σηματοδότησης της IMP1, από την Src κινάση, στα επίπεδα έκφρασης του *c-myc* σε κύτταρα HeK 293. Παρουσιάζονται στο σχήμα (α) τα ποσοστιαία επίπεδα έκφρασης του *c-myc* mRNA στις συνθήκες που υποδεικνύονται σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Παρουσιάζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από έξι ανεξάρτητα πειράματα. Τα δείγματα βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά με το δείγμα αναφοράς ($P < 0,01$) και μεταξύ τους** ($P < 0,01$). (β) Τα επίπεδα των πρωτεϊνών των IMP1, c-MYC (N-262, Santa Cruz) και β-ακτίνης (MAB1501, Millipore) Στο βι παρουσιάζεται η εικόνα από ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα και στο βii διάγραμμα ο μέσος όρος των ποσοστιαίων μεταβολών και η τυπική απόκλιση πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων. **($P < 0,01$). (γ) Ο έλεγχος του ρυθμού αποικοδόμησης του *c-myc* mRNA στις αναγραφόμενες συνθήκες. Παρουσιάζονται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των επιπέδων *c-myc* mRNA, τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, στα χρονικά σημεία που υποδεικνύονται.

Σχήμα 5:



Σχήμα 5: Η επίδραση της αναστολής της σηματοδότησης της IMP1, από την Src κινάση, στα επίπεδα έκφρασης του *c-myc* σε κύτταρα HeLa. Παρουσιάζονται στο σχήμα (α) τα ποσοστιαία επίπεδα έκφρασης του *c-myc* mRNA στις συνθήκες που υποδεικνύονται σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Παρουσιάζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από έξι ανεξάρτητα πειράματα. ** $P < 0.01$. (β) η εικόνα από ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα των επιπέδων των πρωτεϊνών IMP1, c-MYC (N-262, Santa Cruz Biotechnology) και β-ακτίνης (MAB1501, Millipore).

Σχήμα 6:



Σχήμα 6: Οι επιπτώσεις της αποκατάστασης της δράσης της Src κινάσης στα χιμαιρικά μεταγράφα. Κύτταρα (i) Hek 293 και (ii) HeLa συνδιαμολύνθηκαν με τον φορέα ελέγχου Fluc/CRD και το πλασμίδιο αναφοράς rRL-CMV και καλλιεργήθηκαν παρουσία αναστολέα Src1 200nM για σαράντα οκτώ ώρες (συνθήκη:Src1+). Μετά την αφαίρεση του αναστολέα Src κινάσης τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για δύο μέρες (συνθήκη: Αποκατάσταση της Src δράσης). Παρουσιάζονται τα ποσοστιαία επίπεδα της ενεργότητας των ενζύμων (στήλη με γκρι σκούρο χρώμα), της έκφρασης του mRNA Firefly λουσιφεράσης (στήλη με γκρι ανοιχτό χρώμα) και της μεταφρασιμότητας (στήλη με μαύρο χρώμα) σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Παρουσιάζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. ** $P < 0,01$.

Αποτελέσματα

μειώθηκαν κατά 75% όταν αποκαταστήθηκε η δράση της κινάσης (στήλη με ανοιχτό γκρι χρώμα). (Σχήμα 6ii). Επομένως, ενώ η μεταφρασιμότητα των χιμαιρικών μετάγραφων της λουσιφεράσης παρουσία αναστολέα Src11 για σαράντα οκτώ ώρες μειώθηκε κατά 44 % συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς, η επανέναρξη της σηματοδότησης στο κατάλοιπο της τυροσίνης οδήγησε σε 60% αύξηση σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς που δεν είχαν εκτεθεί στον αναστολέα (στήλη με μαύρο χρώμα).

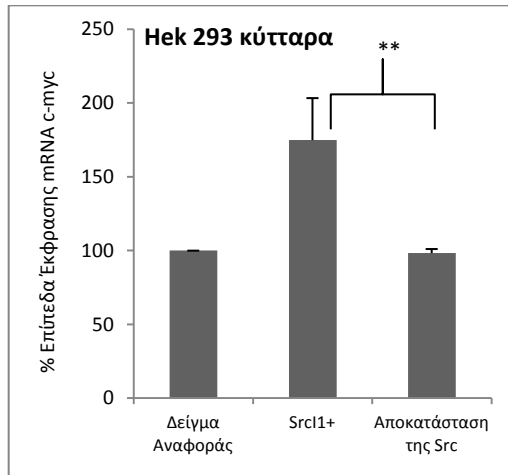
Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η αναστολή της δράσης της κινάσης Src στο μόριο της πρωτεΐνης IMP1, ανέστειλε τη μετάφραση των μηνυμάτων που φέρουν την CRD αλληλουχία. Η έναρξη της σηματοδότησης στο κατάλοιπο της τυροσίνης 396 της IMP1 επέτρεψε την πιο αποτελεσματική μετάφραση των αυξημένων επιπέδων mRNA που καταγράφηκαν.

Στην συνέχεια, όπως και προηγουμένως, τέθηκε το ερώτημα αν τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν μελετώντας το τεχνητό σύστημα των Firefly και *Renilla* λουσιφερασών αντικατοπτρίζουν τα επίπεδα μεταβολών του ενδογενούς *c-myc* mRNA και της MYC πρωτεΐνης στις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Ενώ τα επίπεδα του *c-myc* mRNA σαράντα οκτώ ώρες μετά την απομάκρυνση του αναστολέα της δράσης της κινάσης Src από το θρεπτικό μέσω καλλιέργειας των κυττάρων καταγράφηκαν μειωμένα κατά 70% σε Hek 293 κύτταρα και 85 % σε HeLa κύτταρα, αντίστοιχα (Σχήμα 7α i,ii) η πρωτεΐνη MYC διπλασιάστηκε στα κύτταρα HEK 293 (Σχήμα 7βi και 7γi) και αυξήθηκε κατά 80% σε HeLa κύτταρα (Σχήμα 7βii και 7γii). Επομένως προκύπτει ότι η μεταφρασιμότητα και του ενδογενούς *c-myc* mRNA αυξήθηκε σημαντικά με την επαναφορά της φυσιολογικής λειτουργίας του ενζύμου κινάσης Src.

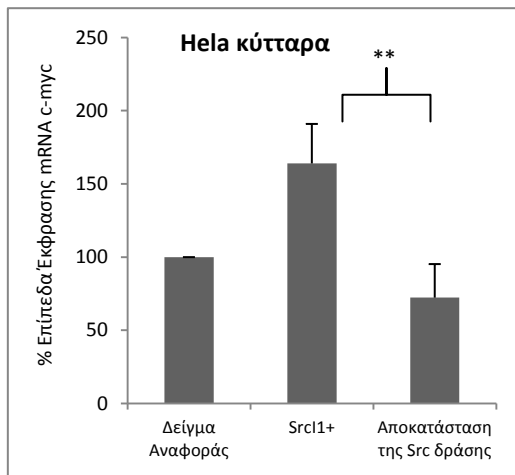
Αναστέλλοντας τη σηματοδότηση της κινάσης Src και αποτρέποντας την φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο τυροσίνης 396 της IMP1 πρωτεΐνης, τα επίπεδα *c-myc* mRNA αυξήθηκαν, καθώς μειώθηκε ο ρυθμός αποικοδόμησης τους (Σχήμα 4γ). Τα υψηλά επίπεδα *c-myc* mRNA παρόλα αυτά δεν οδήγησαν σε αυξημένα ποσοστά έκφρασης πρωτεΐνης MYC. Αντίθετα η πρωτεΐνη MYC αυξήθηκε σημαντικά μόλις αποκαταστάθηκε η δράση της Src κινάσης (Σχήμα 7β και 7γ). Το *c-myc* mRNA που είχε "συσσωρευτεί" ενδοκυττάρια ξεκίνησε να μεταφράζεται μόλις η δραστηριότητα της Src κινάσης επανήλθε στα φυσιολογικά επίπεδα.

Σχήμα 7:

α -i

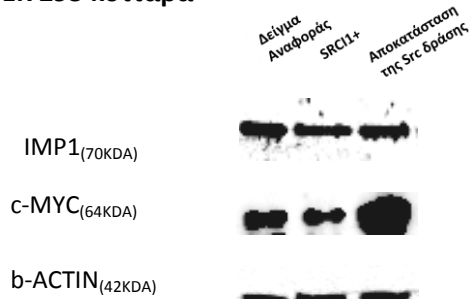


α -ii



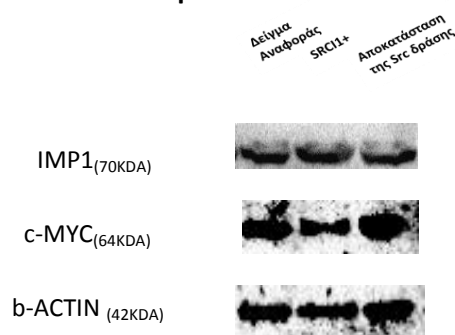
β -i

HEK 293 κύτταρα

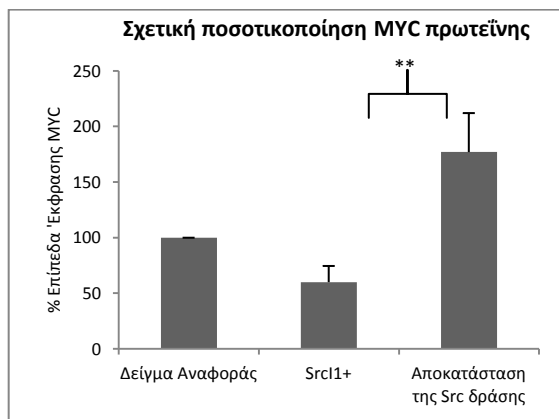


β -ii

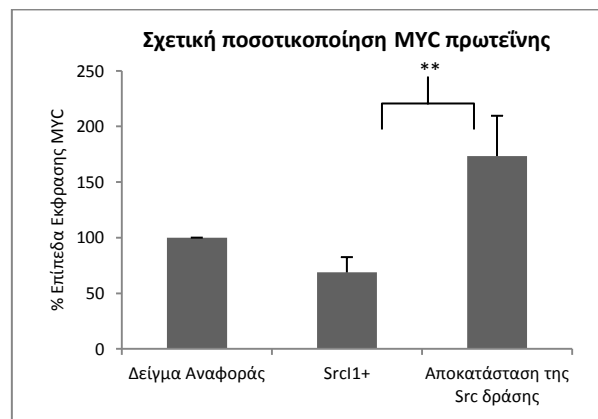
HELA κύτταρα



γ -i



γ -ii



Σχήμα 7: Οι επιπτώσεις της αποκατάστασης της δράσης της Src κινάσης στα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς c-myc. Κύτταρα (i) Hek 293 και (ii) HeLa καλλιεργήθηκαν στις συνθήκες που αναγράφονται και παρουσιάζεται : (α i,ii) τα ποσοστιαία επίπεδα c-myc mRNA. Παρουσιάζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα δείγματα βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά με το δείγμα αναφοράς ($P < 0.01$) και μεταξύ τους $**P < 0.01$. (β i και β ii) η εικόνα από ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα των επιπέδων των πρωτεϊνών IMP1, c-MYC (9E10, Santa Cruz Biotechnology) και β-ακτίνης (c4, Santa Cruz Biotechnology). (γ i και γ ii) τα ποσοστιαία επίπεδα της MYC πρωτεΐνης. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα. Τα δείγματα βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά με το δείγμα αναφοράς ($P < 0.01$) και μεταξύ τους $**P < 0.01$.

1.4 Η επίδραση στην ενδοκυττάρια χωροθέτηση και τον εντοπισμό της πρωτεΐνης IMP1.

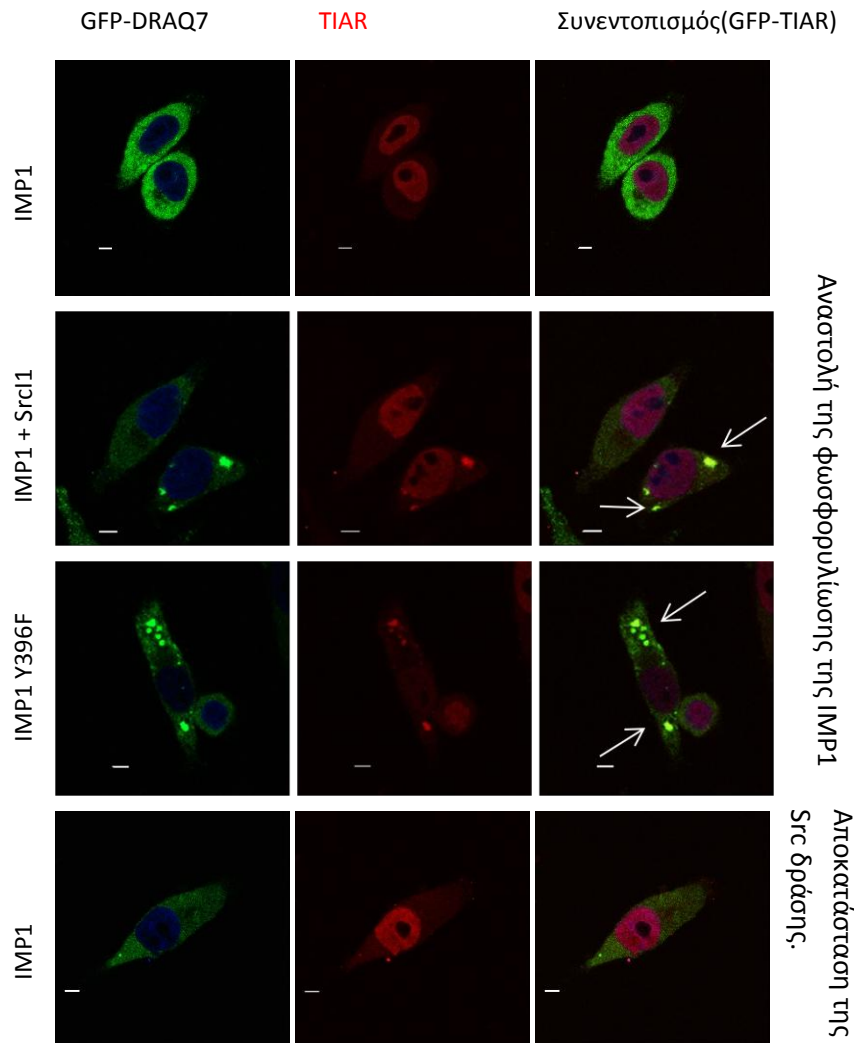
Η πρωτεΐνη IMP1, σε συνεργασία με άλλες πρωτεΐνες δημιουργεί ριβονουκλεοπρωτεϊνικά κοκκία (RNP granules) στο κυτταρόπλασμα. Στα κοκκία αυτά προσλαμβάνει τα mRNAs στόχους που δεσμεύει και ρυθμίζει την μετα-μεταγραφική πορεία τους. Τα κοκκία που σχηματίζει η πρωτεΐνη IMP1 δεν περιλαμβάνουν πρωτεΐνες απαραίτητες για την έναρξη της μετάφρασης και πρωτεΐνες για την σύσταση της 60S ριβοσωμικής υπομονάδας, υποδεικνύοντας ότι τα ενσωματωμένα mRNAs δεν μεταφράζονται (Jønson *et al.*, 2007).

Η πρόσδεση της IMP1 στο *c-myc* mRNA καθιστά δυνατή την μεταφορά του σε ριβονουκλεοπρωτεϊνικές δομές στο κυτταρόπλασμα σε συνεργασία με τις πρωτεΐνες HNRNPU, SYNCRIP, YBX1, και DHX9. Εκεί αποθηκεύεται και αποτρέπεται η μεταφορά του μηνύματος στα πολυσώματα και η επακόλουθη αποικοδόμηση του που συνδέεται με την μετάφραση (Weidensdorfer *et al.*, 2009).

Στα πειράματα που έγιναν για την μελέτη της επίδρασης της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης της IMP1 στην μεταφρασιμότητα του *c-myc* mRNA, παρατηρήθηκε ότι η αναστολή της ενεργότητας της Src κινάσης οδήγησε στον σχηματισμό κυτταροπλασματικών κοκκίων. Στις ίδιες πειραματικές συνθήκες τα επίπεδα του *c-myc* mRNA αυξήθηκαν υπό φυσιολογικές συνθήκες και δεν μεταφράστηκαν (Σχήματα 4 και 5). Αυτό το γεγονός σε συνδυασμό με την δημιουργία των κοκκίων οδήγησε στην υπόθεση ότι απουσία σηματοδότησης της Src, το *c-myc* mRNA μπορεί να αποθηκευτεί παροδικά σε κυτταροπλασματικές δομές (Εικόνα 1). Σύμφωνα με τους Anderson και Kedersha μεταφραστικά σιωπηλά mRNAs “πακετάρονται” σε κυτταροπλασματικές δομές, που δεν έχουν περιοριστική μεμβράνη και είναι ορατές με χρήση μικροσκοπίου, μέχρις ότου αυτά τα μετάγραφα που έχουν αποθηκευθεί, οδηγηθούν στην μετάφραση ανάλογα τις αναπτυξιακές ή περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν (Anderson και Kedersha *et al.*, 2007). Έτσι η πρωτεΐνη IMP1, απουσία σηματοδότησης Src, ήταν ικανή να σχηματίσει κοκκία στο κυτταρόπλασμα. Η απομάκρυνση του αναστολέα και η φυσιολογική λειτουργία της κινάσης είχε ως αποτέλεσμα την επαναφορά ενός διάχυτου μοτίβου κατανομής της IMP1 στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 1). Αυτό το αποτέλεσμα συμβάδιζε με τη μείωση των επιπέδων του *c-myc* mRNA, κατά 70% όταν αποκαταστάθηκε η δράση της Src κινάσης και ήταν ικανή να φωσφορυλιώσει το κατάλοιπο τυροσίνης της IMP1.

HeLa κύτταρα διαμολύνθηκαν με τους φορείς pEGFP-IMP1wt ή pEGFP-IMP1 Y396F ώστε να υπερεκφράζουν σταθερά τις πρωτεΐνες IMP1 WT ή IMP1 Y396F. Παρατηρήθηκε λοιπόν με

τεχνική ανοσοφθορισμού και χρήση ανάστροφης συνεστιακής μικροσκοπίας ότι η πρωτεΐνη IMP1 στο κυτταρόπλασμα είχε ένα διάχυτο μοτίβο. Αντιθέτως, το μεταλλαγμένο ομόλογο της IMP1 Y396F αλλά και η IMP1 WT κατόπιν αναστολής της σηματοδότησης της κινάσης Src, εντοπίστηκαν στο κυτταρόπλασμα σε διακριτές δομές, τα κυτταροπλασματικά κοκκία.



Εικόνα 1: Η IMP1 αγρίου τύπου παρουσία αναστολέα της δράσης της κινάσης Src και η μεταλλαγμένη IMP1 Y396F εντοπίστηκαν σε κυτταροπλασματικά κοκκία. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν ώστε να εκφράζουν σταθερά-μόνιμα είτε την IMP1 wt πρωτεΐνη συζευγμένη με GFP είτε την IMP1 Y396F πρωτεΐνη συζευγμένη με GFP. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν όπως υποδεικνύεται. Έγινε χρώση με τα αντισώματα anti-Tiar(sc 1749,Santa Cruz Biotechnology) και Donkey anti-goat-Alexa Fluor 568 (Thermo Fischer Scientific A-11057). Η χρώση του DNA των κυττάρων έγινε με Drag7(Abcam,109202). Η ανάλυση απεικόνισης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις ίδιες παραμέτρους σάρωσης (ζουμ, ένταση λέιζερ). Τα λευκά βέλη της εικόνας δείχνουν τα κυτταροπλασματικά κοκκία που προέκυψαν. Ράβδοι κλίμακας στην εικόνα 5μm.

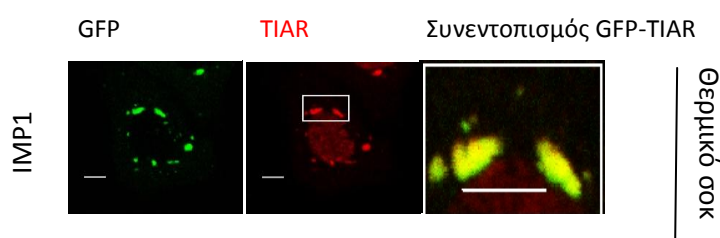
Στην εικόνα 1 παρατηρήθηκε συνεντοπισμός της IMP1 με την πρωτεΐνη TIAR, σε συνθήκες αναστολής της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης 396. Η πρωτεΐνη TIAR είναι

Αποτελέσματα

υπεύθυνη για των σχηματισμό των κοκκίων στρες (stress granules-SGs) και για την συνεχή αναπλήρωσή τους με mRNPs (Bley *et al.*,2015).

Η πρωτεΐνη IMP1 ελέγχει τη μετα-μεταγραφική πορεία των μετάγραφων στόχων της και υπό συνθήκες στρες. Τα κυτταροπλασματικά mRNPs που σχηματίζει η IMP1 μπορούν να προσλαμβάνονται και να συσσωματώνονται στα κοκκία στρες κατά τη διάρκεια κυτταρικού στρες. Η IMP1 είναι απαραίτητη για την σταθεροποίηση των mRNAs στόχων της σε αυτές τις συνθήκες, αφού μετά από την αποσιώπησή της ο ρυθμός αποικοδόμησης των mRNAs στόχων της αυξάνεται ακόμα και όταν τα κοκκία στρες σχηματίζονται στο κυτταρόπλασμα.

Εξετάστηκε λοιπόν αν οι κυτταροπλασματικές δομές που σχηματίστηκαν σε συνθήκες αναστολής της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IMP1 στο κατάλοιπο τυροσίνης 396, ταυτίζονται με τα κοκκία που σχηματίζονται ως απόκριση σε κυτταρικό στρες. Πράγματι όπως φαίνεται στην εικόνα 2,σε κύτταρα HeLa εκφράζοντας σταθερά την πρωτεΐνη IMP1 αγρίου τύπου που υπέστησαν θερμικό σοκ η πρωτεΐνη IMP1 ανιχνεύθηκε να συνεντοπίζεται με την TIAR, σε κυτταροπλασματικά κοκκία στρες . Η εικόνα των κοκκίων που δημιουργήθηκαν σε συνθήκες απουσίας φωσφορυλίωσης στο κατάλοιπο τυροσίνης 396 παρομοιάζει με την εικόνα των κοκκίων που παρατηρήθηκε έπειτα από την πρόκληση κυτταρικού στρες.

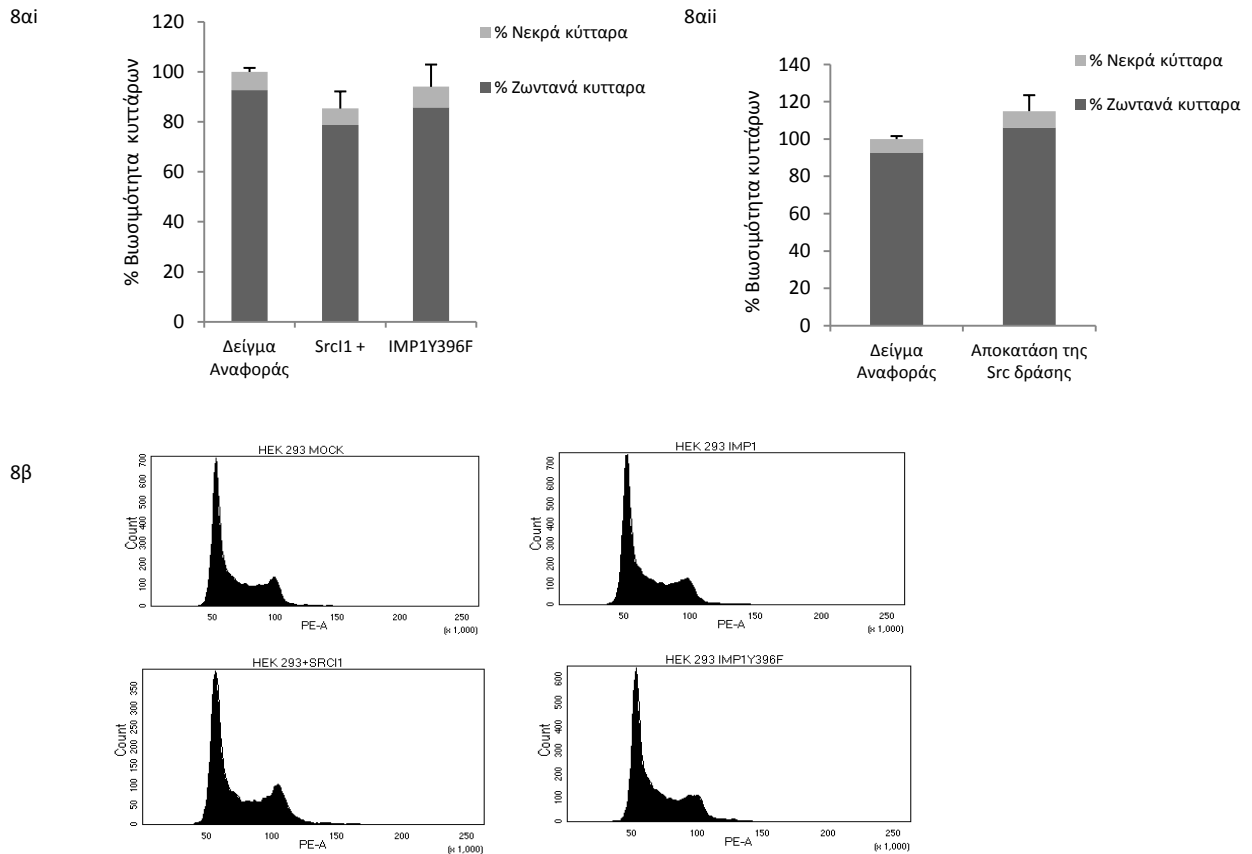


Εικόνα 2: Η πρωτεΐνη IMP1 εντοπίζεται σε κυτταροπλασματικά κοκκία στρες έπειτα από έκθεση σε στρεσογόνες συνθήκες. HeLa κύτταρα σταθερά διαμολυσμέναώστε να εκφράζουν την πρωτεΐνη IMP1 wt συζευγμένη με GFP εκτέθηκαν σε θερμικό σοκ (42 ° C).Χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα anti-Tiar(sc 1749,Santa Cruz Biotechnology)και Donkey anti-goat-Alexa Fluor 568 (Thermo Fischer Scientific A-11057). Η ανάλυση απεικόνισης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις ίδιες παραμέτρους σάρωσης (ζουμ, ένταση λέιζερ). Στα δεξιά της εικόνας απεικονίζεται η μεγέθυνση της εικόνας συνεντοπισμού. Ράβδοι κλίμακας στην εικόνα 5μm.

1.5 Η επίδραση στην φυσιολογία των κυττάρων.

Η αναστολή της φωσφορυλίωσης στο κατάλοιπο της τυροσίνης 396 της IMP1 που προκάλεσε μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης του *c-myc* δεν προκάλεσε μεταβολές στην φυσιολογία των κυττάρων. Ο ρυθμός του πολλαπλασιασμού των κυττάρων παρέμεινε σταθερός. Η αποκατάσταση της δράσης της κινάσης οδήγησε σε αύξηση της πρωτεΐνης MYC

κατά 70% περίπου γεγονός που προκάλεσε αύξηση του ρυθμού του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Σχήμα 8ai, 8aii). Η εξέλιξη της πορείας του κυτταρικού κύκλου στην συνθήκη που απετράπη η φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο της τυροσίνης 396 της IMP1 δεν παρουσίασε διαφορές συγκριτικά με τα κύτταρα του δείγματος αναφοράς (Σχήμα 8β).



Σχήμα 8: Η επίδραση της αναστολής της φωσφορυλίωσης της IMP1 στον ρυθμό του πολλαπλασιασμού και στην βιωσιμότητα των κυττάρων Hek 293. (α i,ii) Κύτταρα καλλιεργήθηκαν στις συνθήκες που υποδένονται και παρουσιάζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των ποσοστών ζωντανών και νεκρών κυττάρων που υπολογίστηκαν σε πέντε ανεξάρτητα πειράματα. (β) Σε κύτταρα διαμολυσμένα είτε με rEGFP-C1 φορέα(mock) είτε με rEGFP-C1 IMP1 wt είτε με rEGFP-C1 IMP1 Y396F είτε με rEGFP-C1 IMP1 wt που καλλιεργήθηκαν παρουσία Src11 για σαράντα οκτώ ώρες ελέγχτηκε η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου με ανάλυση μέσω κυτταρομετρία ροής. Εφαρμόστηκαν ίδιες παράμετροι σάρωσης σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν (ένταση FSC,SSC ,PE).Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα.

Συμπερασματικά, λοιπόν, η μετα-μεταφραστική τροποποίηση της πρωτεΐνης IMP1 στο κατάλοιπο τυροσίνης 396 από την κινάση Src ενέχεται στην ρύθμιση της έκφρασης του *c-myc* mRNA. Απουσία Src σηματοδότησης, το ενδογενές *c-myc* mRNA, σταθεροποιήθηκε και δεν μεταφράστηκε. Πιθανόν η πρωτεΐνη IMP1 να το ενσωματώνει, παροδικά και αντιστρεπτά σε κυτταροπλασματικά κοκκία.

➤ **2. Η επίδραση της αναστολής της φωσφορυλίωσης στην σερίνη 181 της IMP1, μέσω της κινάσης mTORC2, στην μετα-μεταγραφική πορεία του c-myc mRNA.**

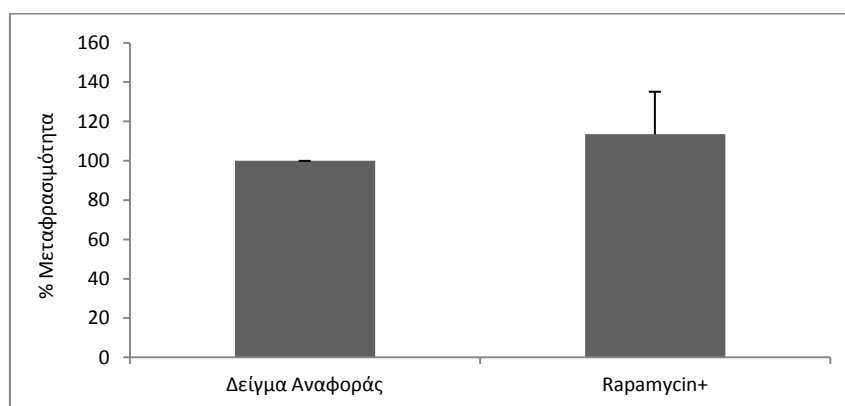
Η IMP1 πρωτεΐνη εκτός από την φωσφορυλίωση της τυροσίνης 396 επιδέχεται μια ακόμα μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη IMP1 φωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο σερίνης 181 από το σηματοδοτικό μονοπάτι του mTOR, από το δεύτερο σύμπλοκο ,mTORC2, μια διαδικασία που συμβαίνει ταυτόχρονα με την μετάφραση του *imp1* mRNA (Dai *et al.*,2012), εξετάστηκε η πιθανότητα η μετα-μεταφραστική τροποποίηση να επηρεάζει την έκφραση του *c-myc*.

Το μονοπάτι mTORC2 εμπλέκεται στην ρύθμιση αυξητικών παραγόντων, ρυθμίζει τον ρυθμό του πολλαπλασιασμού και την επιβίωση. Το μονοπάτι σηματοδότησης του mTOR εμφανίζεται απορυθμισμένο συχνά σε ασθένειες, καθιστώντας το κρίσιμο στόχο ειδικά στη θεραπεία του καρκίνου.

Έχει αναφερθεί ότι η παρουσία του αναστολέα Rapamycin ασκεί μεταφραστικό έλεγχο στο *c-myc* (Wall *et al.*,2008), επομένως ελέγχθηκε εάν η δράση της κινάσης mTORC1 προκαλεί μεταβολές στα επίπεδα της μεταφρασσιμότητας του χημειοθεραπευτικού παράγοντα Firefly λουσιφεράσης που φέρει την CRD αλληλουχία.

Στο σχήμα 9 παρουσιάζεται η μεταβολή της μεταφρασσιμότητας του γονιδίου Firefly λουσιφεράσης που φέρει την CRD αλληλουχία όπως προέκυψε μετά από έκθεση των κυττάρων στον αναστολέα Rapamycin. Δεν προκλήθηκε σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της μεταφρασσιμότητας (113,5% ±21%) του χημειοθεραπευτικού παράγοντα λουσιφεράσης παρουσία του αναστολέα Rapamycin.

9



Σχήμα 9: Η επίδραση του αναστολέα Rapamycin στην μεταφρασσιμότητα της Firefly λουσιφεράσης που φέρει το *cis* στοιχείο CRD του *c-myc*. Κύτταρα Hek 293 συνδιαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο ελέγχου FLuc/CRD και με το πλασμίδιο αναφοράς pRL-CMV. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία Rapamycin για σαράντα οκτώ ώρες. Παρουσιάζονται τα ποσοστιαία επίπεδα μεταφρασσιμότητας, ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων. Το δείγμα δεν βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά με το δείγμα αναφοράς (P=0.4).

Στην συνέχεια της παρούσας μελέτης εξετάστηκε εάν και πώς η μετα-μεταφραστική τροποποίηση της IMP1 στο κατάλοιπο της σερίνης 181 επηρεάζει την έκφραση του ενδογενούς *c-myc*.

2.1 Η επίδραση στα χιμαιρικά μετάγραφα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η αναστολή της δράσης του mTORC1 σηματοδοτικού μονοπατιού δεν είχε καμία επίδραση στην μεταφρασιμότητα των γονιδίων της Firefly λουσιφεράσης που φέρουν την CRD αλληλουχία, δεδομένου ότι δεν έχει αναφερθεί να είναι υπεύθυνο για κάποια μετα-μεταφραστική τροποποίηση επί της IMP1. Το επόμενο ερώτημα ήταν αν η τεκμηριωμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση της IMP1 στο κατάλοιπο της σερίνης 181 μέσω της δράσης της mTORC2 κινάσης έχει επιπτώσεις στη μετα-μεταγραφική πορεία των χιμαιρικών μετάγραφων. Για αυτόν τον σκοπό χορηγήθηκε ο αναστολέας της κινάσης mTORC2, Torin 1, που αναστέλλει την δράση της (Dai *et al.*, 2013) και μελετήθηκαν οι μεταβολές της μεταφρασιμότητας, της ενεργότητας και των επιπέδων mRNA της χιμαιρικής Firefly λουσιφεράσης. Επίσης για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pEGFP-C1 IMP1 S181A. Ο φορέας αυτός εκφράζει την πρωτεΐνη IMP1 όπου το κατάλοιπο της σερίνης στην θέση 181 έχει αντικατασταθεί από αλανίνη (στο εξής: IMP1 S181A).

Τα επίπεδα της ενεργότητας βρέθηκαν αυξημένα κατά 45% παρουσία του αναστολέα Torin1 και 68% αύξηση σημειώθηκε παρουσία του μεταλλαγμένου ομόλογου της IMP1 πρωτεΐνης (Σχήμα 10α). Αντίθετα τα επίπεδα mRNA παρουσία του αναστολέα και του μεταλλαγμένου ομόλογου της IMP1 μειώθηκαν κατά 30% και 20% αντίστοιχα (Σχήμα 10β). Επομένως, η παρουσία του αναστολέα Torin1 καθώς και η παρουσία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης IMP1 S181A αύξησαν την μεταφρασιμότητα των χιμαιρικών μετάγραφων Firefly λουσιφεράσης που φέρουν το στοιχείο CRD περίπου 2 φορές (Σχήμα 10γ).

Οι μεταβολές στα επίπεδα του mRNA των χιμαιρικών μετάγραφων που προέκυψαν θα μπορούσαν να είναι αποτέλεσμα μεταβολής της σταθερότητας των μετάγραφων που προκύπτουν απουσία σηματοδότησης mTORC2 μονοπατιού. Διεξήχθησαν αναλύσεις του ρυθμού αποικοδόμησης των χιμαιρικών mRNAs. Κύτταρα Hek 293 αφού συνδιαμολύνθηκαν με τα κατάλληλα πλασμίδια εκτέθηκαν στην δράση ακτινομυκίνης-D. Η αναστολή της δραστηριότητας της κινάσης mTORC2 αποσταθεροποίησε τα χιμαιρικά μετάγραφα Firefly λουσιφεράσης. Συγκεκριμένα, παρουσία του αναστολέα Torin1 μειώθηκε ο χρόνος ημίσειας ζωής του mRNA Firefly λουσιφεράσης κατά 20% ενώ παρουσία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης IMP1S181A κατά 25 % (Σχήμα 10δ).

2.2 Η επίδραση στα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς *c-myc*.

Οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στο τεχνητό σύστημα μελέτης λουσιφερασών οφειλόταν στην ύπαρξη της αλληλουχίας αστάθειας που εδράζει στην κωδική περιοχή του *c-myc* στο γονίδιο ελέγχου Firefly λουσιφεράσης, το οποίο αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη πρόσδεσης RNA, IMP1. Στην συνέχεια εξετάστηκε εάν η μετά-μεταφραστική τροποποίηση της IMP1 από το σηματοδοτικό μονοπάτι mTORC2 επιδρά στην μεταφρασιμότητα του ενδογενούς *c-myc* mRNA.

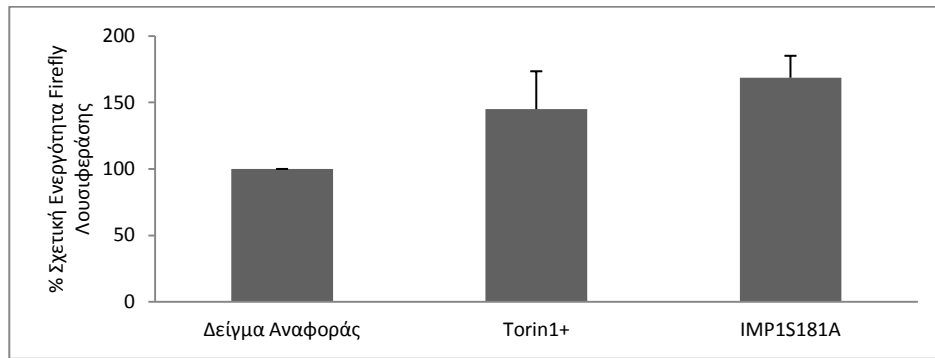
Η αναστολή της δραστηριότητας της mTORC2 με χρήση του αναστολέα Torin1 σε συγκέντρωση 200nM μείωσε τα επίπεδα του *c-myc* mRNA κατά 36%. Η υπερέκφραση της IMP1 αγρίου τύπου με ταυτόχρονη αγωγή των κυττάρων με Torin1 δεν προκάλεσε περαιτέρω μεταβολές, ενώ η έκφραση της μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης, IMP1S181A μείωσε τα επίπεδα *c-myc* mRNA κατά 35% (Σχήμα 11α). Παρόμοιες μεταβολές προέκυψαν στα επίπεδα *c-myc* mRNA, όταν ανεστάλη η σηματοδότηση της κινάσης mTORC2 σε HeLa κύτταρα (Σχήμα 12α). Τα επίπεδα *c-myc* mRNA μειώθηκαν κατά 23% και 20% παρουσία του αναστολέα Torin1 και της πρωτεΐνης IMP1S181A αντίστοιχα.

Τα επίπεδα πρωτεΐνης MYC, αντιθέτως, βρέθηκαν αυξημένα στις ίδιες συνθήκες (Σχήμα 11β και 12β). Παρουσία του αναστολέα Torin1 διπλασιάστηκαν τα επίπεδα της MYC πρωτεΐνης. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα με την υπερέκφραση της πρωτεΐνης IMP1S181A. Αντίστοιχη ήταν η αύξηση που προκλήθηκε σε HeLa κύτταρα κατόπιν αναστολής της φωσφορυλίωσης της IMP1 στην σερίνη 181, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 12β.

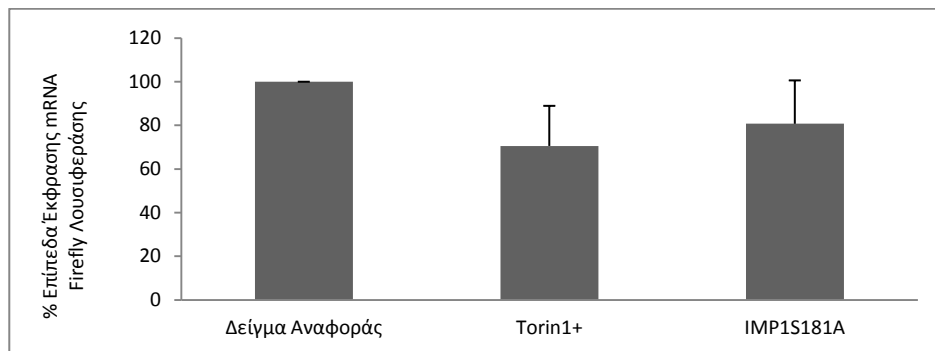
Η μείωση των ενδογενών επιπέδων *c-myc* mRNA που παρατηρήθηκε, διερευνήθηκε εάν ήταν αποτέλεσμα αυξημένου ρυθμού αποικοδόμησης απουσία σηματοδότησης της κινάσης mTORC2, όπως παρατηρήθηκε και στο τεχνητό σύστημα όπου το μήνυμα mRNA της Firefly λουσιφεράσης, αποσταθεροποιήθηκε απουσία φωσφορυλίωσης της IMP1 στην σερίνη 181. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατόπιν χειρισμού των κυττάρων με ακτινομυκίνη D υπέδειξαν ότι ο ρυθμός αποικοδόμησης του ενδογενούς *c-myc* mRNA παρουσία του αναστολέα Torin1 αυξάνεται (Σχήμα 11γ). Συγκεκριμένα, ο χρόνος ημίσειας ζωής του *c-myc* mRNA μειώθηκε κατά 30% παρουσία της μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης IMP1 στο κατάλοιπο της σερίνης και κατά 32% παρουσία του αναστολέα Torin1.

Σχήμα 10:

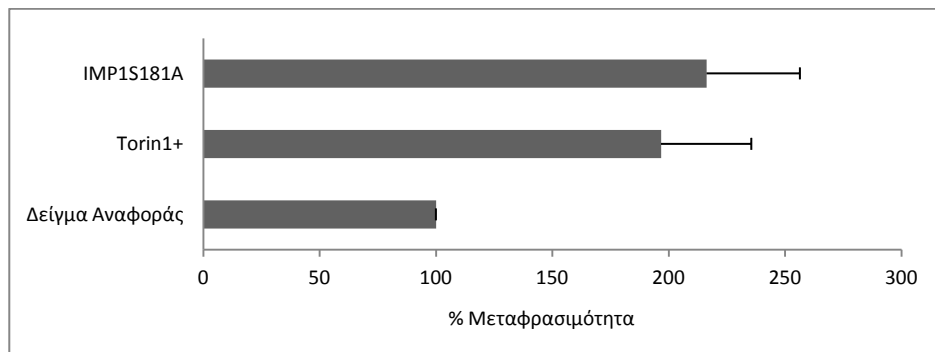
α



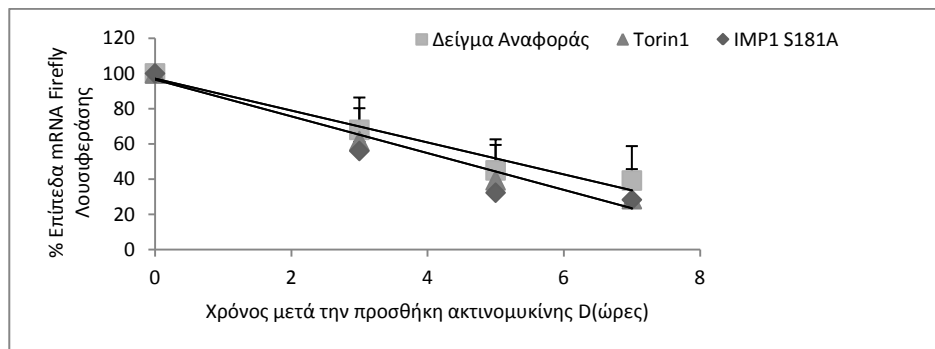
β



γ



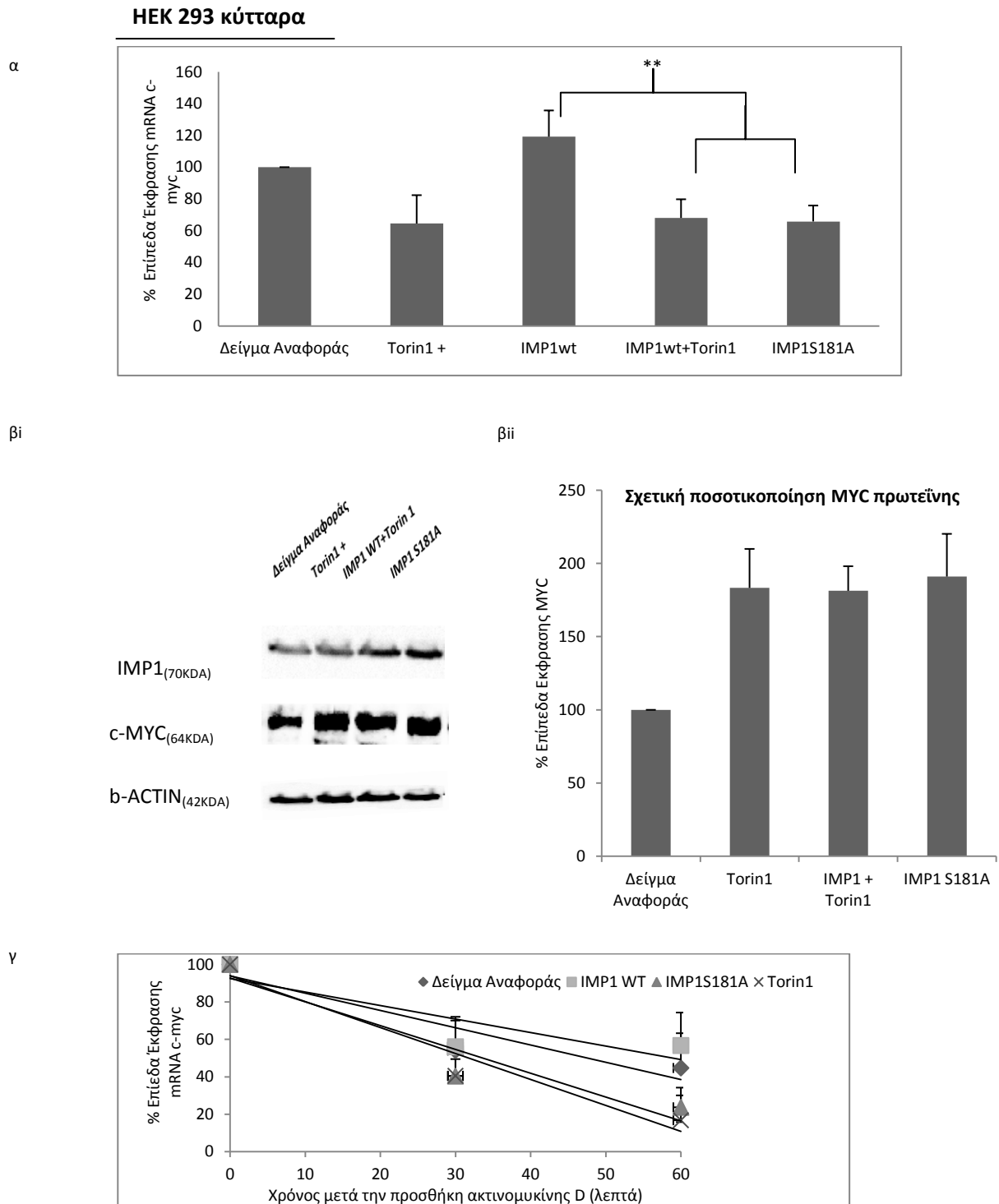
δ



Σχήμα 10: Η επίδραση της αναστολής της φωσφορυλίωσης της IMP1 στην μεταφρασιμότητα και στην σταθερότητα του χιμαϊρικού μετάγραφου. Κύτταρα Hek 293 συνδιαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο ελέγχου FLuc/CRD και με το πλασμίδιο αναφοράς rRL-CMV. Στην συνθήκη που υποδεικνύεται τα κύτταρα συνδιαμολύνθηκαν με 1μg από τον rEGFP-C1 IMP1 S181A φορέα. Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την διαδικασία συνδιαμολύνσης, όπου αναφέρεται, προστέθηκε Torin1 για σαράντα οκτώ ώρες (Συνθήκη: Torin1). Στο σχήμα παρουσιάζονται τα ποσοτικά επίπεδα: (α) ενεργότητας, (β) mRNA Firefly λουσιφεράσης και (γ) μεταφρασιμότητας σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Παρουσιάζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από έξι ανεξάρτητα πειράματα. Τα δείγματα βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά με το δείγμα αναφοράς ($P < 0,01$). (δ) Ο χρόνος ημιζωής του mRNA Firefly λουσιφεράσης στις συνθήκες που επισημαίνονται. Παρουσιάζονται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των επιπέδων c-myc mRNA, τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, στα χρονικά σημεία που υποδεικνύονται.

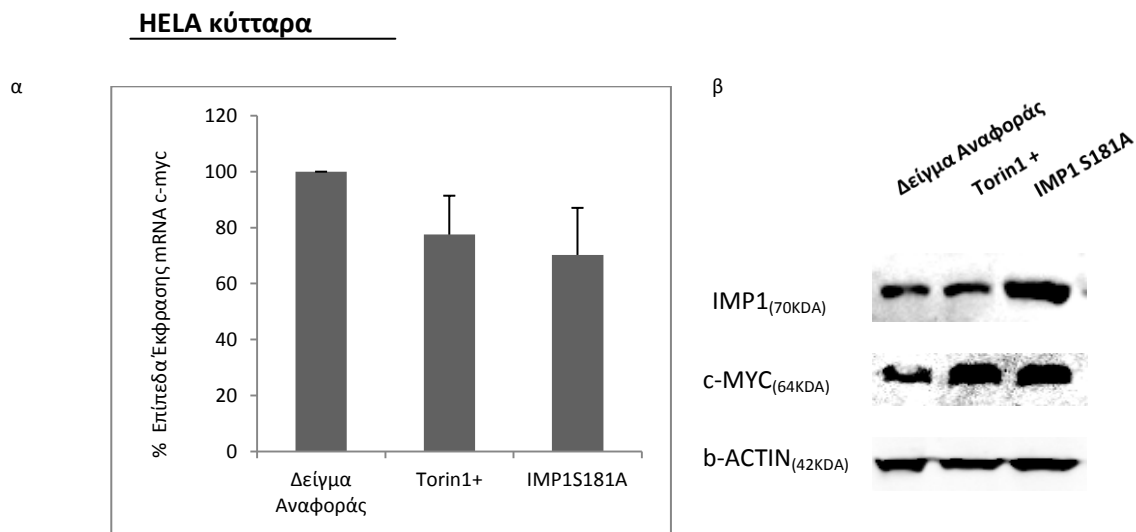
Αποτελέσματα

Σχήμα 11:



Σχήμα 11: Η επίδραση της αναστολής της σηματοδότησης της IMP1, από την mTORC2 κινάση στα επίπεδα έκφρασης του *c-myc* σε κύτταρα Hek 293. Παρουσιάζονται στο σχήμα (α) τα ποσοστιαία επίπεδα έκφρασης του *c-myc* mRNA στις συνθήκες που υποδεικνύονται σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Παρουσιάζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από έξι ανεξάρτητα πειράματα. Τα δείγματα βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά με το δείγμα αναφοράς ($P < 0,01$) και μεταξύ τους** ($P < 0,01$). (β) Τα επίπεδα των πρωτεϊνών των IMP1, c-MYC (N-262, Santa Cruz) και β-ακτίνης (MAB1501, Millipore) Στο βi παρουσιάζεται η εικόνα από ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα και στο βii διάγραμμα ο μέσος όρος των ποσοστιαίων μεταβολών και η τυπική απόκλιση πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων. **($P < 0,01$). (γ) Ο ρυθμός αποικοδόμησης του *c-myc* mRNA στις αναγραφόμενες συνθήκες. Παρουσιάζονται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των επιπέδων *c-myc* mRNA, τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, στα χρονικά σημεία που υποδεικνύονται.

Σχήμα 12:



Σχήμα 12: Η επίδραση της αναστολής της δραστηριότητας της mTORC2 στην έκφραση του *c-myc* σε κύτταρα HeLa. Παρουσιάζονται στο σχήμα (α) τα ποσοστιαία επίπεδα έκφρασης του *c-myc* mRNA στις συνθήκες που υποδεικνύονται σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Παρουσιάζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από έξι ανεξάρτητα πειράματα. Τα δείγματα βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά με το δείγμα αναφοράς ($P < 0,01$). (β) Τα επίπεδα των πρωτεϊνών των IMP1, c-MYC (9E10, Santa Cruz Biotechnology) και β-ακτίνης (MAB1501, Millipore). Παρουσιάζεται η εικόνα από ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα.

2.3 Η επίδραση στη φυσιολογία των κυττάρων. Η αναστολή της δραστηριότητας της mTORC2 κινάσης μείωσε τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων και προκάλεσε αύξηση στον πληθυσμό των νεκρών κυττάρων. Η παρουσία του αναστολέα και της μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης IMP1 μείωσε τον ρυθμό πολλαπλασιασμού κατά 46% και 38% αντίστοιχα, ενώ ο αριθμός των νεκρών κυττάρων αυξήθηκε και στις δύο περιπτώσεις (Σχήμα 13α). Η μείωση του ρυθμού του πολλαπλασιασμού άρχισε να παρατηρείται από τις πρώτες εικοσιτέσσερις ώρες και ελέγχθηκε αν αυτό επηρέαζε και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Για τον έλεγχο της κατανομής των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου αξιολογήθηκαν κύτταρα τα οποία είναι ικανά να διαιρούνται, έτσι τα κύτταρα συλλέχθηκαν έπειτα από εικοσιτέσσερις ώρες από την αγωγή με Torin1 και την παρουσία της IMP1S181A. Παρατηρήθηκαν μεταβολές στην κατανομή των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Μετά την έκθεση στον Torin1 αναστολέα, κύτταρα ανιχνεύθηκαν σε μια προ-αποπτωτική κορυφή, στην Sub-G₁ φάση (Σχήμα 13β). Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα η δοξορουβικίνη, η οποία χρησιμοποιήθηκε σαν θετικό δείγμα ελέγχου, είχε πιο ήπια δράση. Προκάλεσε αύξηση των κυττάρων στη φάση S και αντίστοιχη μείωση των κυττάρων στις φάσεις G₁ και G₂/M αλλά δεν εντοπίστηκαν κύτταρα

Αποτελέσματα

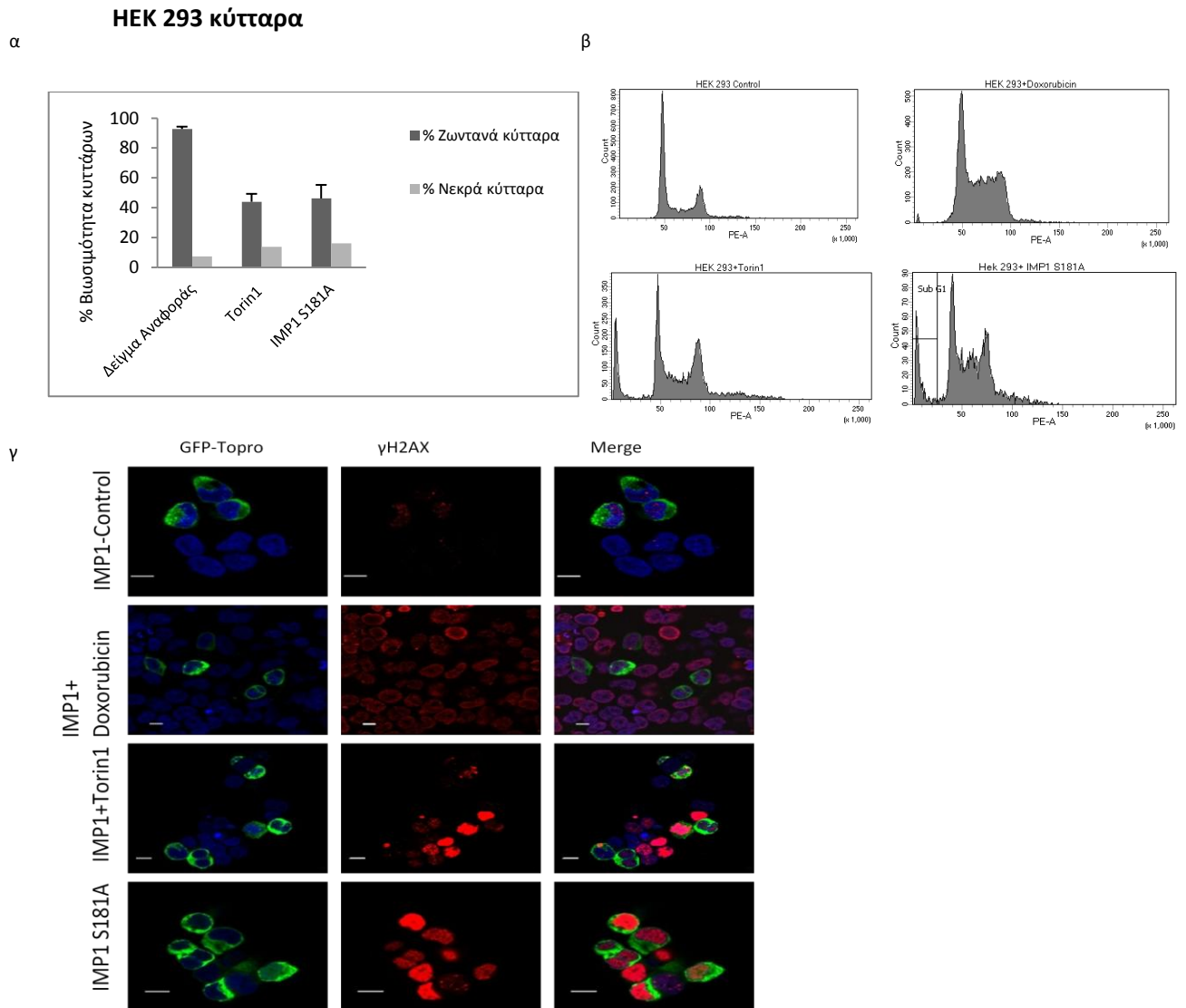
στην προ-αποπτωτική κορυφή μετά την επίδραση της. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από εξέταση άλλων κυτταρικών σειρών. Ο ίδιος χειρισμός των HeLa κυττάρων οδήγησε στην εμφάνιση της προ-αποπτωτικής κορυφής στην Sub-G₁ φάση. Το 7,6% του πληθυσμού των κυττάρων που εκτέθηκαν στην δράση δοξορουβικίνης εντοπίστηκαν στην Sub-G₁ φάση. Το 20% και 18% του πληθυσμού των HeLa κυττάρων εντοπίστηκε στην Sub-G₁ φάση στην ανάλυση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου ύστερα από υπερέκφραση της IMP1S181A και παρουσία του Torin1 αναστολέα αντίστοιχα (Σχήμα 15α).

Η ανίχνευση ενός ποσοστού του πληθυσμού των κύτταρων στην Sub-G₁ φάση του κυτταρικού κύκλου δημιούργησε το ερώτημα αν η καλλιέργεια παρουσία Torin1 αναστολέα ή η παρουσία της IMP1S181A πρωτεΐνης είχε επιπτώσεις στην ακεραιότητα του πυρήνα των κύτταρων. Η χρώση με αντίσωμα για την φωσφορυλιωμένη ιστόνη γH2Αχ, που αναγνωρίζει βλάβες και ρήγματα που δημιουργούνται στην διπλή έλικα του DNA που ακολούθησε, έδειξε ότι η ανάπτυξη των κυττάρων παρουσία Torin1 είχε ως αποτέλεσμα λίγες εστίες γH2ΑΧ στο γονιδίωμα ενώ παρουσία της IMP1 S181A το φαινόμενο αυτό ήταν πιο έντονο (Σχήμα 13γ).

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι σε συνθήκες αναστολής της δράσης της mTORC2 κινάσης επί της IMP1 πρωτεΐνης δημιουργήθηκαν θραύσεις στο DNA. Για την περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού μέσω του οποίου τα κύτταρα οδηγούνται σε θάνατο έγινε χρώση των κυττάρων με αννεξίνη A5 συζευγμένη με φθοριόχρωμα και ανάλυση των δειγμάτων με κυτταρομετρία ροής. Η αννεξίνη A5 χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αποπτωτικών πληθυσμών των κυττάρων, όπως αναλύθηκε στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Έχει την ικανότητά να δεσμεύεται στην φωσφατιδυλοσερίνη, η οποία βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης των αποπτωτικών κυττάρων. Σε Hek 293 κύτταρα το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων, τα οποία είναι θετικά σε χρώση με αννεξίνη A5 (υποπληθυσμός P3 στο σχήμα 14i), αυξήθηκε από 8% στο δείγμα αναφοράς σε 23% μετά την αγωγή των κυττάρων με Torin1 και σε 30% με την παρουσία της μεταλλαγμένης IMP1 (Σχήμα 14ii).

Η δράση ενδονουκλεασών που κατακερματίζει το DNA και συνοδεύει την διαδικασία της απόπτωσης ανιχνεύεται με την ηλεκτροφόρηση του σε πήκτωμα αγαρόζης. Στην εικόνα 15β παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση γενωμικού DNA που απομονώθηκε από κύτταρα που είτε αναπτύχθηκαν παρουσία Src1 είτε παρουσία Torin1 είτε είχαν διαμολυνθεί παροδικά ώστε να εκφράζουν την πρωτεΐνη IMP1S181A. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης

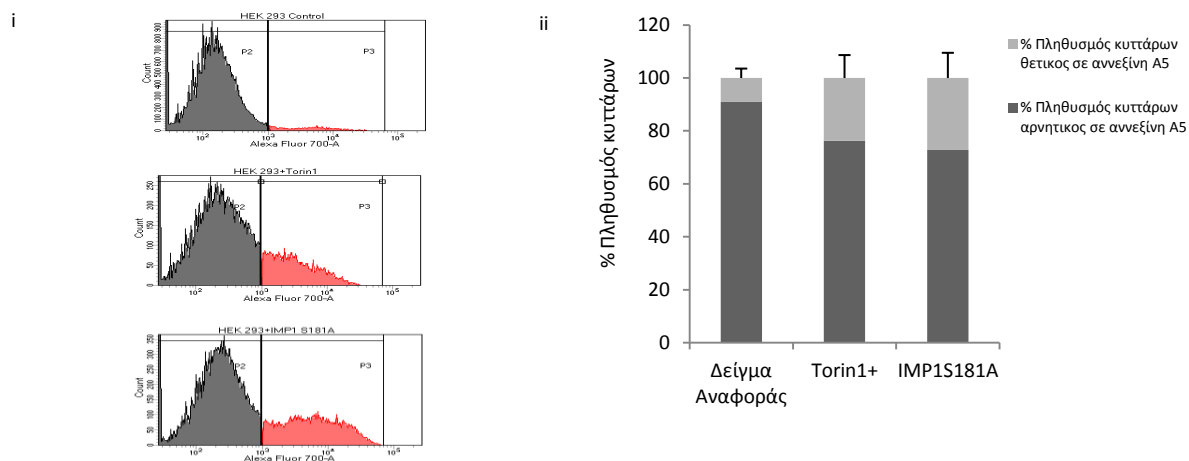
Σχήμα 13:



Σχήμα 13: Οι επιπτώσεις της αναστολής της οδού mTORC2 σε Hek 293: **α)** Στον **πολλαπλασιασμό των κυττάρων**. Στις συνθήκες που υποδεικνύονται, παρουσιάζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των ποσοστών ζωντανών και νεκρών κυττάρων πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα δείγματα βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά με το δείγμα αναφοράς ($P < 0.01$). **β)** Στην **πρόοδο του κυτταρικού κύκλου**. Κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα υποδεικνυόμενα πλασμίδια ή καλλιεργήθηκαν παρουσία δοξορουβικίνης ή Torin1 για είκοσι τέσσερις ώρες. Προσδιορίστηκαν τα ποσοστά των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής, με εφαρμογή των ίδιων παραμέτρων σάρωσης σε όλα τα δείγματα (ένταση FSC, SSC, PE). Παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα. **γ)** Στην **ακεραιότητα του DNA**. Κύτταρα διαμολύνθηκαν με rEGFP-C1 IMP1 wt (Δείγμα αναφοράς) ή με rEGFP-C1 IMP1S181A. Όπου υποδεικνύεται τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε αγωγή με δοξορουβικίνη (θετικός μάρτυρας) ή με Torin1 για σαράντα οκτώ ώρες. Ακολούθησε χρώση των κυττάρων με τα αντισώματα αντι- γ H2AX (ab11174, Abcam) και Donkey anti-mouse Alexa Fluor 568 (ab175472). Για την χρώση του πυρήνα χρησιμοποιήθηκε Topro χρωστική. Η ανάλυση απεικόνισης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις ίδιες παραμέτρους σάρωσης (ζουμ, ένταση λέιζερ), Ράβδοι κλίμακας: 10 μ m

Αποτελέσματα

Σχήμα 14:

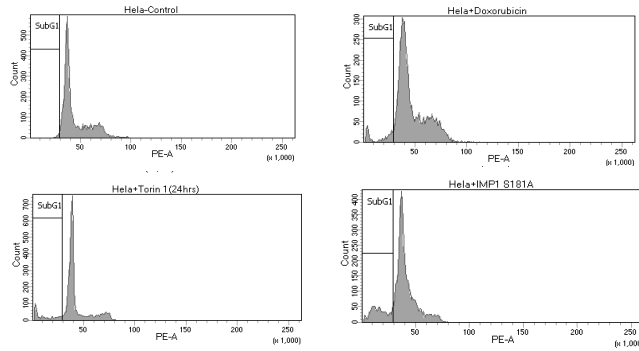


Σχήμα 14: Η αναστολή της οδού mTORC2 σε Hek 293 απόπτωση. Κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα υποδεικνυόμενα πλασμίδια ή υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αναστολέα Torin1 για σαράντα οκτώ ώρες. Σημάνθηκαν με αννεξίνη A5 (Biolegend, Annexin V Alexa Fluor 647 (cat no640912)) και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Παρουσιάζονται στο σχήμα δι' ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα, στο διί διάγραμμα ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των ποσοστών των κυττάρων, θετικών και αρνητικών σε χρώση με αννεξίνη A5, από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Τα δείγματα βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά με το δείγμα αναφοράς ($P < 0.01$).

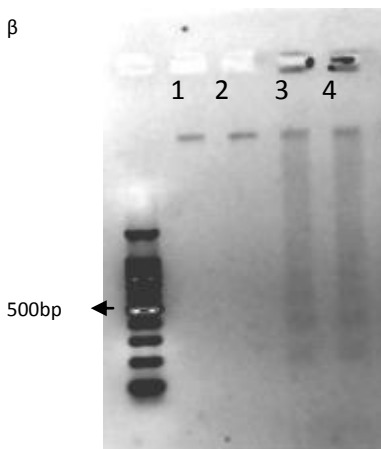
Σχήμα 15:

α

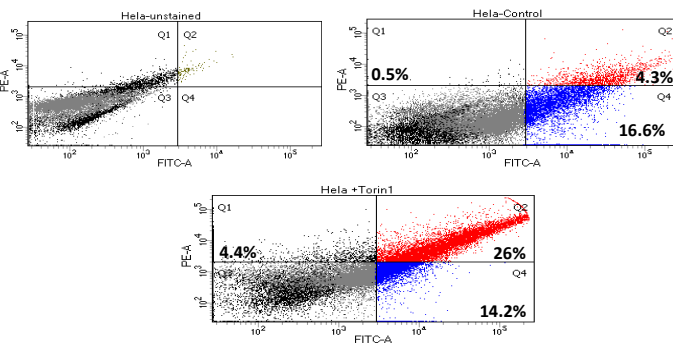
HELa κύτταρα



β



γ



Σχήμα 15: **Οι επιπτώσεις της αναστολής της οδού mTORC2 σε HeLa κύτταρα :** α) Στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα υποδεικνυόμενα πλασμίδια ή καλλιεργήθηκαν παρουσία δοξορουβικίνης ή Torin1 για είκοσι τέσσερις ώρες. Προσδιορίστηκαν τα ποσοστά των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρία ροής, με εφαρμογή των ίδιων παραμέτρων σάρωσης σε όλα τα δείγματα (ένταση FSC,SSC ,PE). Παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα. β,γ) Στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης. β) Παρουσιάζεται εικόνα από ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Το DNA απομονώθηκε από κύτταρα (1) δείγματος αναφοράς (2) που καλλιεργήθηκαν παρουσία Src11 για σαράντα οκτώ ώρες (3) που αναπτύχθηκαν παρουσία Torin1 για σαράντα οκτώ ώρες και (4) που διαμολύνθηκαν με τον φορέα pEGFP-C1 IMP1S181A. (γ) HeLa κύτταρα που καλλιεργήθηκαν όπως υποδεικνύεται σημάθηκαν ταυτόχρονα με PE Annexin V-Biolegend και anti-MYC-FITC(SAB4700448 Sigma Aldrich). Παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής με εφαρμογή των ίδιων παραμέτρων σάρωσης (ένταση FSC,SSC,FITC,PE) σε όλα τα δείγματα.

Αποτελέσματα

ανιχνεύθηκε η χαρακτηριστική κλίμακα <<ladder>> που εμφανίζεται με την κατάτμηση του μακρομορίου ενδιάμεσα των νουκλεοσωμάτων σε κομμάτια χαρακτηριστικού μεγέθους (πολλαπλάσια του 180). Το αποτέλεσμα αυτό αποτελεί μια περαιτέρω απόδειξη της αποπτωτικής δράσης του Torin1 και της μεταλλαγμένης ισομορφής της πρωτεΐνης IMP1.

Η δράση της MYC στην φυσιολογία των κυττάρων είναι πλειοτροπική και εξαρτάται από τα επίπεδα της έκφρασης του ποσοτικά ή/και χρονικά. Ως γνωστόν προωθεί την επιβίωση και ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά η έκτοπη έκφραση του μπορεί να προκαλέσει απόπτωση κάτω από ορισμένες συνθήκες. Έγινε η υπόθεση λοιπόν ότι η αύξηση των επιπέδων πρωτεΐνης MYC που προκαλείται από την αναστολή της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IMP1 στο κατάλοιπο σερίνης 181 είναι ικανή να οδηγήσει τα κύτταρα σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Για επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης, HeLa κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία Torin1 ανοσοχρώθηκαν ταυτόχρονα με anti-MYC και αννεξίνη A5 συζευγμένα με διαφορετικό φθοριόχρωμα. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο σχήμα 15γ υποδεικνύουν ότι ο πληθυσμός των κυττάρων που ήταν θετικός σε αννεξίνη A5, δηλαδή το 26% του πληθυσμού των κυττάρων που αναπτύχθηκαν παρουσία αναστολέα της δράσης της κινάσης mTORC2, ταυτιζόταν με τον κυτταρικό πληθυσμό με αυξημένα επίπεδα έκφρασης πρωτεΐνης MYC.

Λαμβάνοντας υπό όψιν αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνεται ότι τα κύτταρα έχουν μηχανισμούς που επιτρέπουν την ανίχνευση της αυξημένης MYC και ανταποκρίνονται με ενεργοποίηση μηχανισμών που οδηγούν σε απόπτωση. Υπάρχει η άποψη ότι η προκαλούμενη από MYC απόπτωση είναι ένας μηχανισμός ελέγχου της ογκογόνου δράσης της.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η κινάση mTORC2 τροποποιεί την πρωτεΐνη IMP1, η οποία ρυθμίζει τα επίπεδα έκφρασης του *c-myc* ώστε να ελέγχεται η επιβίωση των κυττάρων.

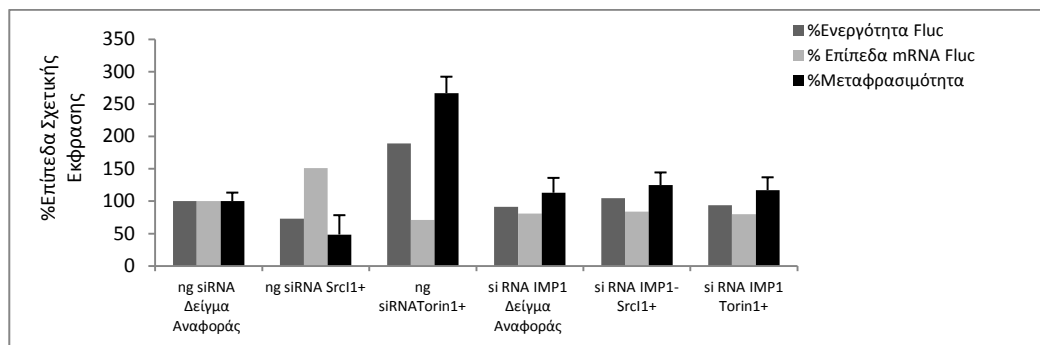
➤ **3. Ο έλεγχος της συμβολής της IMP1 στις επιπτώσεις της αναστολής της δράσης Src και mTORC2, στα επίπεδα έκφρασης του *c-myc*.**

Με στόχο να επιβεβαιωθεί ότι οι μεταβολές που καταγράφηκαν στη σταθερότητα και στα επίπεδα μεταφρασιμότητας τόσο των χιμαιρικών μετάγραφων που φέρουν την CRD αλληλουχία αστάθειας του *c-myc* mRNA όσο και του ενδογενούς μηνύματος οφείλονται στην

πρωτεΐνη IMP1 και τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που επιδέχεται, αποσιωπήθηκε η έκφραση της IMP1 πρωτεΐνης.

3.1 Η επίδραση στα χιμαιρικά μετάγραφα.

Στην περίπτωση συνδιαμόλυνσης των κυττάρων με το πλασμίδιο ελέγχου FLuc/CRD και το siRNA ελέγχου (ng siRNA), η προσθήκη των αναστολέων προκάλεσε παρόμοιες μεταβολές με αυτές που ήδη αναφέρθηκαν (σχήματα 2 και 10). Παρουσία του αναστολέα Src1 τα επίπεδα mRNA Firefly λουσιφεράσης αυξήθηκαν αλλά τα ποσοστιαία επίπεδα μεταφρασιμότητας μειώθηκαν. Αντιθέτως, παρουσία του Torin1 αναστολέα τα ποσοστιαία επίπεδα ενεργότητας και μεταφρασιμότητας των χιμαιρικών μετάγραφων αυξήθηκαν. Στα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με siRNA κατευθυνόμενο για το *imp1* γονίδιο (siRNA IMP1), όπως αναμενόταν, προκλήθηκε μείωση των επιπέδων του χιμαιρικού mRNA Firefly λουσιφεράσης που φέρει την CRD αλληλουχία του *c-myc* συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς (Σχήμα 16). Η προσθήκη των αναστολέων στα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με siRNA κατευθυνόμενο για το *imp1* γονίδιο δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή στα σχετικά επίπεδα της ενεργότητας και των επιπέδων mRNA Firefly λουσιφεράσης.



Σχήμα 16: Οι επιπτώσεις των αναστολέων Src1 και Torin 1 στην σχετική μεταφρασιμότητα των χιμαιρικών γονιδίων σε συνθήκες αποσιώπησης της έκφρασης της πρωτεΐνης IMP1. Κύτταρα Hek 293 συνδιαμολύνθηκαν με siRNA IMP1 ή negative siRNA, το πλασμίδιο ελέγχου FLuc/CRD και το πλασμίδιο αναφοράς pRL-CMV. Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την συνδιαμόλυνση προστέθηκε είτε Src1 είτε Torin1 στα κύτταρα για σαράντα οχτώ ώρες. Παρουσιάζονται τα ποσοστιαία επίπεδα ενεργότητας (στήλη με γκρι σκούρο χρώμα), mRNA του χιμαιρικού μετάγραφου (στήλη με γκρι ανοιχτό χρώμα) και μεταφρασιμότητας (στήλη με μαύρο χρώμα) σε σχέση με δείγμα αναφοράς. Παρουσιάζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι μεταβολές των επιπέδων mRNA Firefly λουσιφεράσης στα δείγματα παρουσία siRNA IMP1 βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά με το δείγμα αναφοράς παρουσία του siRNA ελέγχου ($P < 0.01$). Στα δείγματα στα οποία αποσιωπήθηκε η έκφραση της IMP1 η προσθήκη των αναστολέων δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή στα σχετικά επίπεδα ενεργότητας, mRNA Firefly λουσιφεράσης και μεταφρασιμότητας.

3.2 Η επίδραση στα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς *c-myc*.

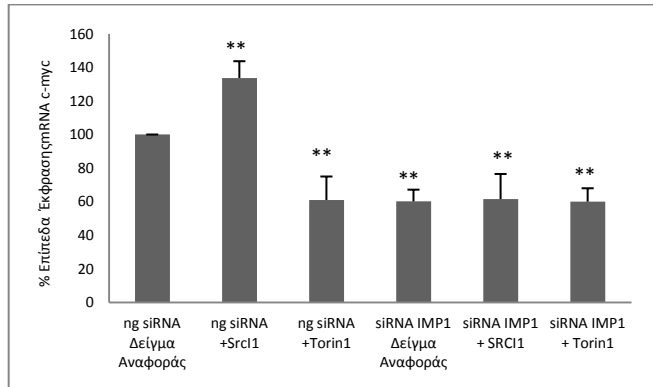
Στην συνέχεια ελέγχθηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς *c-myc* mRNA ώστε να διαπιστωθεί αν οι μεταβολές στην σταθερότητα και στη μετάφρασή του ήταν αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ της CRD αλληλουχίας του *c-myc* mRNA και της πρωτεΐνης IMP1 καθώς και των μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων που αυτή επιδέχεται. Πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση της έκφρασης του *imp1* γονιδίου με χρήση κατευθυνόμενου siRNA. Η παρουσία των αναστολέων στα δείγματα που διαμολύνθηκαν με siRNA ελέγχου προκάλεσε τις μεταβολές που ήδη αναφέρθηκαν. Η αγωγή των κυττάρων με Src11 αύξησε τα επίπεδα του *c-myc* mRNA ενώ μείωσε τα επίπεδα της πρωτεΐνης MYC. Αντίθετα η παρουσία του Torin1 προκάλεσε αύξηση της μεταφρασιμότητας του *c-myc* mRNA. Η παρουσία των αναστολέων δεν προκάλεσε μεταβολές στα επίπεδα του *c-myc* mRNA και στα επίπεδα πρωτεΐνης MYC σε σχέση με το δείγμα που διαμολύνθηκε με siRNA IMP1 (Σχήμα 17 α και β). Ελέγχθηκε στις ίδιες συνθήκες αν μεταβάλλεται ο χρόνος ημιζωής του *c-myc* mRNA με αγωγή των κυττάρων με ακτινομυκίνη-D. Η αποσιώπηση της IMP1 αύξησε τον ρυθμό αποικοδόμησης του *c-myc* mRNA κατά 17% (Σχήμα 17 γi). Η παρουσία των αναστολέων δεν επηρέασε περαιτέρω τον ρυθμό αποικοδόμησης του *c-myc* mRNA σε συνθήκες όπου η έκφραση της IMP1 αποσιωπήθηκε για αυτό και τα επίπεδα του *c-myc* mRNA παρέμειναν σταθερά παρουσία Src11 και Torin1.(Σχήμα 17 α και γ ii,γ iii).

➤ **4. Η επίδραση της διαδοχικής αναστολή της φωσφορυλίωσης,στην τυροσίνη 396 και στην σερίνη 181 της πρωτεΐνης IMP1.**

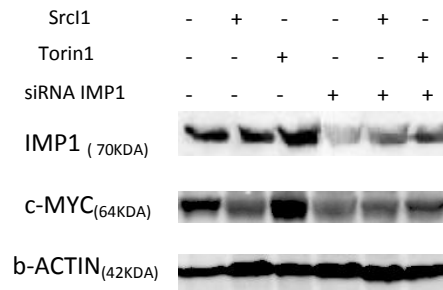
Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι η αναστολή της φωσφορυλίωσης της IMP1 στο κατάλοιπο τυροσίνης 396 από την Src κινάση σταθεροποίησε το ενδογενές *c-myc* mRNA, οδήγησε στην προσωρινή "αποθήκευση" των μετάγραφων σε κυτταροπλασματικά κοκκία και κατέστειλε την μετάφραση. Αντίθετα, η αναστολή της δράσης της mTORC2 κινάσης και η αναστολή της φωσφορυλίωσης της IMP1 στο κατάλοιπο σερίνης 181 είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων πρωτεΐνης MYC. Αυτή η αύξηση της πρωτεΐνης MYC μετά από σαράντα οκτώ ώρες ήταν ικανή να προκαλέσει την απόπτωση των κυττάρων. Οι μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις που επιδέχεται η IMP1 επηρεάζουν τη μετα-μεταγραφική πορεία του *c-myc* mRNA και μπορούν να αποτελέσουν εργαλείο για τη διαχείριση της έκφρασής του. Με βάση αυτά τα δεδομένα έγινε η απόπειρα να επιτευχθεί έμμεση διαχείριση των επιπέδων

Σχήμα 17:

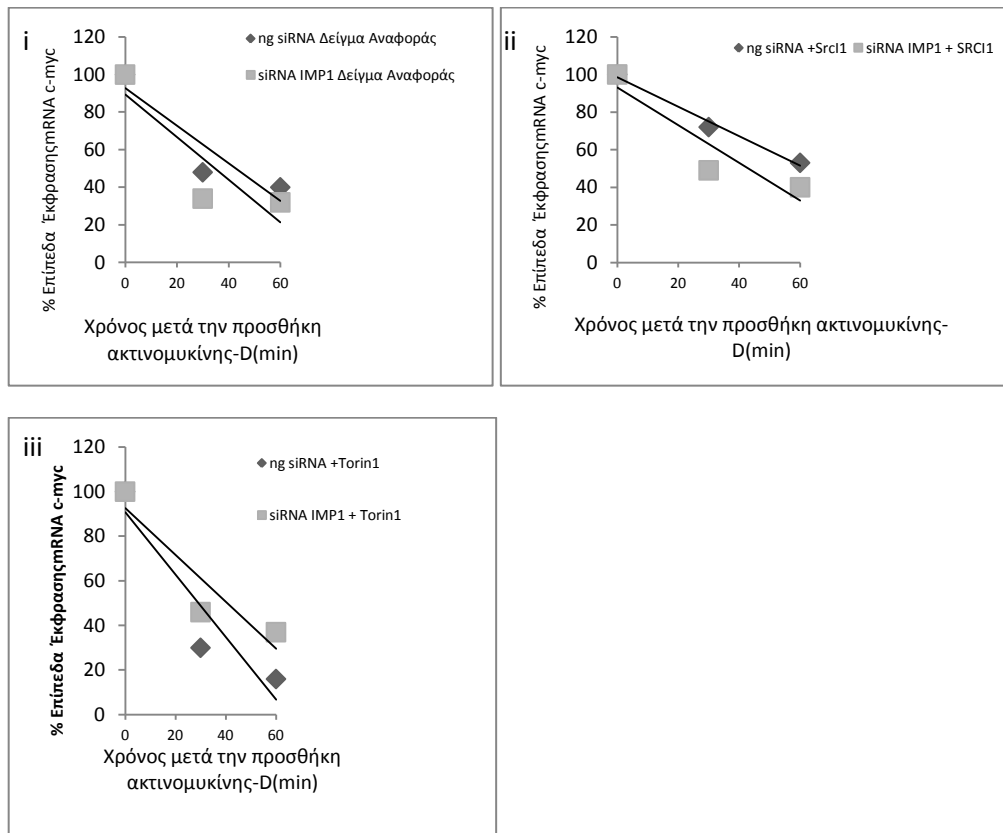
α



β



γ



Σχήμα 17: : Οι επιπτώσεις των αναστολέων Src1 και Torin 1 στην έκφραση του *c-myc* σε συνθήκες αποσιώπησης της έκφρασης της πρωτεΐνης IMP1. Κύτταρα Hek 293 διαμόλυνθηκαν είτε με siRNA IMP1 είτε με negative siRNA. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την διαμόλυνση των κυττάρων, Torin 1 ή Src1 προστέθηκαν στα κύτταρα για σαράντα οκτώ ώρες. Παρουσιάζονται (α) ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των ποσοστιαίων επιπέδων *c-myc* mRNA σε σχέση με το ng siRNA δείγμα αναφοράς, τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Σε σχέση με το ng siRNA δείγμα αναφοράς $^{***}P < 0.01$. (β) ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών IMP1, c-MYC (N-262, Santa Cruz) και β-ακτίνης (MAB1501, Millipore). (γ) Ο ρυθμός αποικοδόμησης του *c-myc* mRNA στις αναγραφόμενες συνθήκες. Παρουσιάζονται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των επιπέδων *c-myc* mRNA, τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, στα χρονικά σημεία που υποδεικνύονται.

Αποτελέσματα

της έκφρασης της MYC ελέγχοντας την κατάσταση φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IMP1 με στόχο την πρόκληση μαζικής απόπτωσης σε αθανατοποιημένα αλλά και σε καρκινικά κύτταρα.

4.1 Η επίδραση στα χιμαιρικά μετάγραφα.

Με στόχο να ελεγχθεί αν είναι εφικτή η διαχείριση της έκφρασης του *c-myc* εφαρμόστηκε διαδοχική αναστολή της φωσφορυλίωσης της IMP1 από τις δύο οδούς σηματοδότησης, δηλαδή αναστολή της δράσης της Src κινάσης για σαράντα οκτώ ώρες παρουσία Src11 ακολουθούμενη από την έκθεση των κυττάρων στον αναστολέα της σηματοδότησης μέσω του mTORC2 μονοπατιού, Torin1 και ελέγχθηκε η μεταφρασιμότητα των χιμαιρικών μετάγραφων της Firefly λουσιφεράσης που φέρουν την αλληλουχία αστάθειας του *c-myc* mRNA. Η διαδοχική αναστολή της δράσης των δύο οδών σηματοδότησης (Σχήμα 18, συνθήκη: Διαδοχική Αναστολή) είχε ως αποτέλεσμα τον διπλασιασμό των επιπέδων ενεργότητας της Firefly λουσιφεράσης. Το ποσοστό ενεργότητας της Firefly λουσιφεράσης σε συνθήκες διαδοχικής αναστολής της φωσφορυλίωσης της IMP1 ήταν ενισχυμένο κατά 68% σε σχέση με την ενεργότητα της Firefly λουσιφεράσης που υπολογίστηκε μετά την έκθεση των κυττάρων μόνο στον Torin1 αναστολέα. Η μεταφρασιμότητα παρουσία Torin1 αναστολέα, όπως αναφέρθηκε, αυξήθηκε κατά 90% ενώ σε συνθήκες διαδοχικής αναστολής της φωσφορυλίωσης της IMP1 η μεταφρασιμότητα του τεχνητού μετάγραφου Firefly λουσιφεράσης υπερδιπλασιάστηκε. Παρατηρήθηκε επίσης 60% αύξηση της μεταφρασιμότητας επιπλέον των επιπέδων μεταφρασιμότητας που προέκυψαν μετά την αποκατάσταση της λειτουργίας της κινάσης Src αφού προηγήθηκε η σαρανταοκτάωρη αναστολή της.

4.2 Η επίδραση στα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς *c-myc*.

Για να ελεγχθεί κατά πόσο είναι δυνατή η έμμεση διαχείριση των επιπέδων έκφρασης του *c-myc* μέσω της διαδοχικής αναστολής της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IMP1, Hek 293 και HeLa κύτταρα εκτέθηκαν αρχικά στην δράση του αναστολέα Src11 για σαράντα οκτώ ώρες και στην συνέχεια με χρήση του Torin1 αναστολέα απετράπη η σηματοδότηση μέσω του mTORC2 μονοπατιού. Εξετάστηκαν υπό αυτές τις συνθήκες τόσο τα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς *c-myc* mRNA όσο και τα επίπεδα της πρωτεΐνης MYC. Η διαδοχική αναστολή της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IMP1 προκάλεσε μείωση των επιπέδων του *c-myc* mRNA κατά 26% (Σχήμα 19αί, συνθήκη: Διαδοχική Αναστολή) σε σχέση με τα κύτταρα

που δεν είχαν υποστεί καμιά επεξεργασία, ενώ συγκριτικά με την συνθήκη όπου η δραστικότητα της κινάσης Src αποκαταστάθηκε μετά από σαράντα οκτώ ώρες έκθεσης των κυττάρων στον αναστολέα Src11 (Σχήμα 19ai, συνθήκη: Αποκατάσταση της Src δράσης) τα επίπεδα *c-myc* mRNA μειώθηκαν κατά 24%. Τα επίπεδα πρωτεΐνης MYC αντιθέτως αυξήθηκαν. Η πρωτεΐνη MYC κατά την διαδοχική αναστολή της φωσφορυλίωσης της IMP1 από τις δύο οδούς σηματοδότησης αυξήθηκε περίπου ≈ 3 φορές συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου, ενώ σε σχέση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν μόνον στην δράση του Torin1 αναστολέα η πρωτεΐνη MYC σχεδόν διπλασιάστηκε (Σχήμα 19aii).

Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν έπειτα από τον ίδιο χειρισμό των HeLa κυττάρων. Η διαδοχική αναστολή της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IMP1 προκάλεσε μείωση των επιπέδων του *c-myc* mRNA κατά 27% (Σχήμα 19bi, συνθήκη: Διαδοχική Αναστολή). Τα επίπεδα πρωτεΐνης MYC αντιθέτως αυξήθηκαν. Η πρωτεΐνη MYC κατά την διαδοχική αναστολή της φωσφορυλίωσης της IMP1 αυξήθηκε περίπου $\approx 3,5$ φορές συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς, ενώ σε σχέση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν μόνον στην δράση του Torin1 αναστολέα η πρωτεΐνη MYC αυξήθηκε κατά 50% (Σχήμα 19bii,iii).

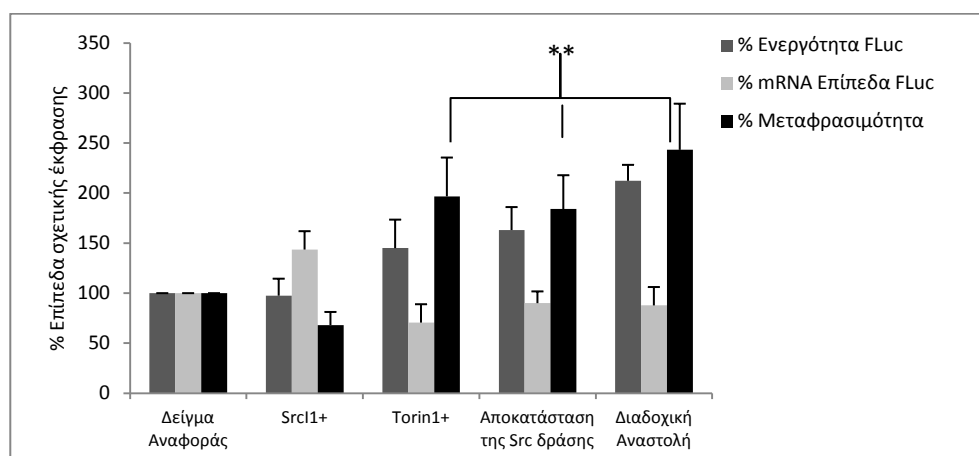
4.3 Η επίδραση στη φυσιολογία των κυττάρων.

Η παρουσία του αναστολέα της κινάσης Src για σαράντα οκτώ ώρες ακολουθούμενη από την έκθεση των κυττάρων σε Torin1 αναστολέα μείωσε τον ρυθμό πολλαπλασιασμού κατά 35% και αύξησε τον πληθυσμό των νεκρών κυττάρων κατά 10% σε σχέση με τα νεκρά κύτταρα που προέκυψαν από την επίδραση μόνο του Torin1 αναστολέα (Σχήμα 20α). Η αύξηση του ποσοστού των νεκρών κυττάρων μετέβαλλε την κατανομή του πληθυσμού των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Όπως φαίνεται στο σχήμα 20β, το 33% του κυτταρικού πληθυσμού κατόπιν διαδοχικής αναστολής της φωσφορυλίωσης της IMP1 πρωτεΐνης ανιχνεύθηκε στην Sub-G₁ προ-αποπτωτική κορυφή, ποσοστό αυξημένο κατά 13% από την έκθεση των κυττάρων μόνο στον αναστολέα Torin1.

Η ανίχνευση ενός ποσοστού του πληθυσμού των κυττάρων στην Sub-G₁ φάση του κυτταρικού κύκλου δημιούργησε το ερώτημα αν η διαδοχική έκθεση των κυττάρων στην δράση των δύο αναστολέων είχε επιπτώσεις στην ακεραιότητα του πυρήνα. Πράγματι εντοπίστηκαν κατακερματισμένοι πυρήνες και θραύσεις στην διπλή έλικα του DNA (Σχήμα 20 γ και δ).

Αποτελέσματα

Σχήμα 18:

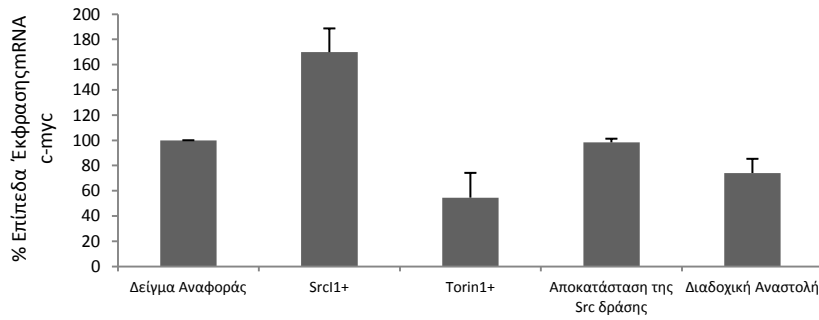


Σχήμα 18: Η επίδραση της διαδοχικής αναστολής της φωσφορυλίωσης της IMP1 στην μεταφρασιμότητα του χιμαιρικού μετάγραφου. Κύτταρα Hek 293 συνδιαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο ελέγχουFLuc/CRD και το πλασμίδιο αναφοράς pRL/CMV. Καλλιεργήθηκαν στις συνθήκες που υποδεικνύονται και προσδιορίστηκαν τα ποσοστιαία επίπεδα της ενεργότητας (στήλη με γκρι σκούρο χρώμα), των επιπέδων mRNA Firefly λουσιφεράσης (στήλη με γκρι ανοιχτό χρώμα), της μεταφρασιμότητας (στήλη με μαύρο χρώμα) σε σχέση με το δείγμα αναφοράς: η συνθήκη συνδιαμολύνησης με το πλασμίδιο ελέγχου και το πλασμίδιο αναφοράς. Παρουσιάζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Τα δείγματα βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά με το δείγμα αναφοράς(P <0,01) και μεταξύ τους** P <0,01.

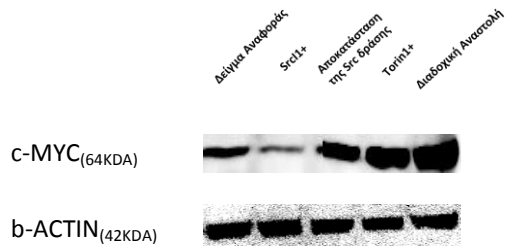
Σχήμα 19:

HEK 293 κύτταρα

αi

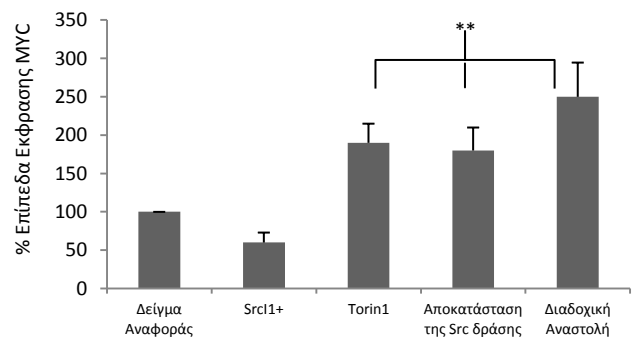


αii



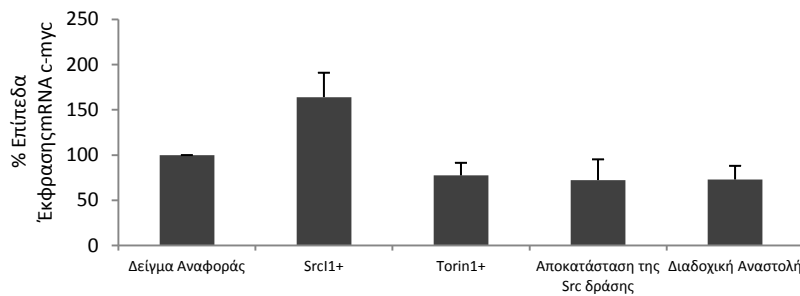
αiii

Σχετική ποσοτικοποίηση MYC πρωτεΐνης

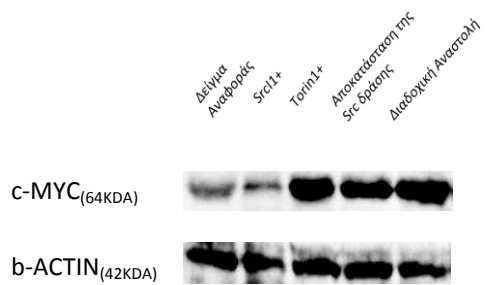


βi

HELA κύτταρα

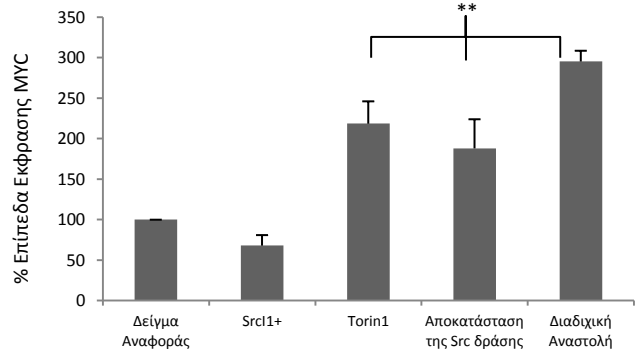


βii



βiii

Σχετική ποσοτικοποίηση MYC πρωτεΐνης



Σχήμα 19: Η επίδραση της διαδοχικής αναστολής της φωσφορυλίωσης της IMP1 στην έκφραση του c-myc σε α) Hek 293 και β) HeLa κύτταρα. (α, β i) Παρουσιάζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των ποσοστιαίων επιπέδων έκφρασης του ενδογενούς c-myc mRNA σε σχέση με το δείγμα αναφοράς, από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Τα δείγματα βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά με το δείγμα αναφοράς ($P < 0,01$). (α, β ii) Παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών c-MYC (9E10, Santa Cruz) και β-ακτίνης (MAB1501, Millipore). Στα διαγράμματα αiii και βiii παρουσιάζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των μεταβολών των ποσοστιαίων επιπέδων πρωτεΐνης MYC από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Τα δείγματα βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά με το δείγμα αναφοράς και μεταξύ τους όπου υποδεικνύεται ** $P < 0,01$

Αποτελέσματα

Για τη διερεύνηση του μηχανισμού μέσω του οποίου τα κύτταρα οδηγούνται σε θάνατο έγινε χρώση των κυττάρων με αννεξίνη A5 συζευγμένη με φθοριόχρωμα και ανάλυση των δειγμάτων με κυτταρομετρία ροής. Σε κύτταρα που διαδοχικά αναστάλθηκε η δράση των κινασών, το 40% του πληθυσμού οδηγήθηκε σε απόπτωση (Σχήμα 20 ε i,ii), ποσοστό διπλάσιο συγκριτικά με το ποσοστό του πληθυσμού των κυττάρων που υπολογίστηκε από την έκθεση των κυττάρων μόνον στην δράση του αναστολέα Torin1. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα από ανάλυση HeLa κυττάρων που καλλιιεργήθηκαν στις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Τα δείγματα των κυττάρων που συλλέχθηκαν, σημάνθηκαν ταυτόχρονα με anti-MYC και αννεξίνη A5 συζευγμένα με διαφορετικό φθοριόχρωμα. Τα δεδομένα που προέκυψαν από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής αποδεικνύουν ότι ο πληθυσμός των κυττάρων που είναι θετικός σε αννεξίνη A5 ,άρα αποπτωτικός, ταυτίζεται με αυτόν που έχει αυξημένη έκφραση πρωτεΐνης MYC. Το 30% του πληθυσμού των κυττάρων βρέθηκε διπλά θετικός. Το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων αυξήθηκε κατά 15% στην συνθήκη διαδοχικής αναστολής της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IMP1 συγκριτικά με το ποσοστό του πληθυσμού των κυττάρων που υπολογίστηκε από την έκθεση των κυττάρων μόνον στην δράση του Torin1 αναστολέα (Σχήμα 20στ).

Η δυνατότητα διαχείρισης των επίπεδων της πρωτεΐνης MYC μέσω της διαδοχικής αναστολής της δράσης των σηματοδοτικών μονοπατιών Src και mTORC2 ανέστειλε τον ρυθμό του πολλαπλασιασμού και προκάλεσε απόπτωση σε κύτταρα που εκφράζουν την IMP1.

Το επόμενο ερώτημα που τέθηκε ήταν κατά πόσο η επαγόμενη απόπτωση, από την έκφραση της MYC πρωτεΐνης ελέγχεται και από τα επίπεδα έκφρασης του προ-αποπτωτικού παράγοντα *p-53*. Βλάβες στην ακεραιότητα του DNA των κυττάρων, συνθήκες υποξίας ή η έκτοπη έκφραση ογκογονιδίων μπορεί να ενεργοποιήσουν την έκφραση του *p-53*, το οποίο προωθεί είτε μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA είτε κυτταρικής γήρανσης είτε απόπτωσης (Brosh *et al.*,2009). Εξετάστηκε αν ο έμμεσος τρόπος διαχείρισης των επιπέδων της έκφρασης του *c-myc* με στόχο την πρόκληση μαζικής απόπτωσης προκαλεί μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *p-53*. Όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 21, η απόπτωση που προκαλείται υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες είναι ανεξάρτητη της έκφρασης του *p-53*. Σε Hek 293 κύτταρα η έκφραση της P53 πρωτεΐνης παρέμεινε σταθερή στις συνθήκες που παρατηρήθηκε απόπτωση (Σχήμα 21α). Επίσης, MDA-MB 231 κύτταρα που φέρουν μεταλλαγμένο *p-53* γονίδιο αναπτύχθηκαν υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες και ελέγχθηκε η κατανομή τους στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Το 11% του πληθυσμού των κυττάρων, ύστερα από ανάπτυξη παρουσία Torin1 αναστολέα για σαράντα οκτώ ώρες,

ανιχνεύθηκαν στην Sub-G₁ φάση ενώ το 22% των κυττάρων τα οποία εκτέθηκαν διαδοχικά στην δράση των Src11 και Torin 1 αναστολέων εντοπίστηκαν σε αυτή την φάση. Στην συνέχεια MDA-MB 231 σημάνθηκαν με Αννεξίνη A5. Το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων, τα οποία είναι θετικά σε χρώση με αννεξίνη A5 (υποπληθυσμός P3 στο σχήμα 21γ), αυξήθηκε από 3% στο δείγμα αναφοράς σε 12% μετά την αγωγή των κυττάρων με Torin1 και σε 25% κατόπιν της διαδοχικής έκθεσης των κυττάρων στους αναστολείς Src11 και Torin 1. Ο μηχανισμός που ενεργοποιείται φαίνεται λοιπόν να δρα ανεξάρτητα της λειτουργικότητας του p-53 γονιδίου.

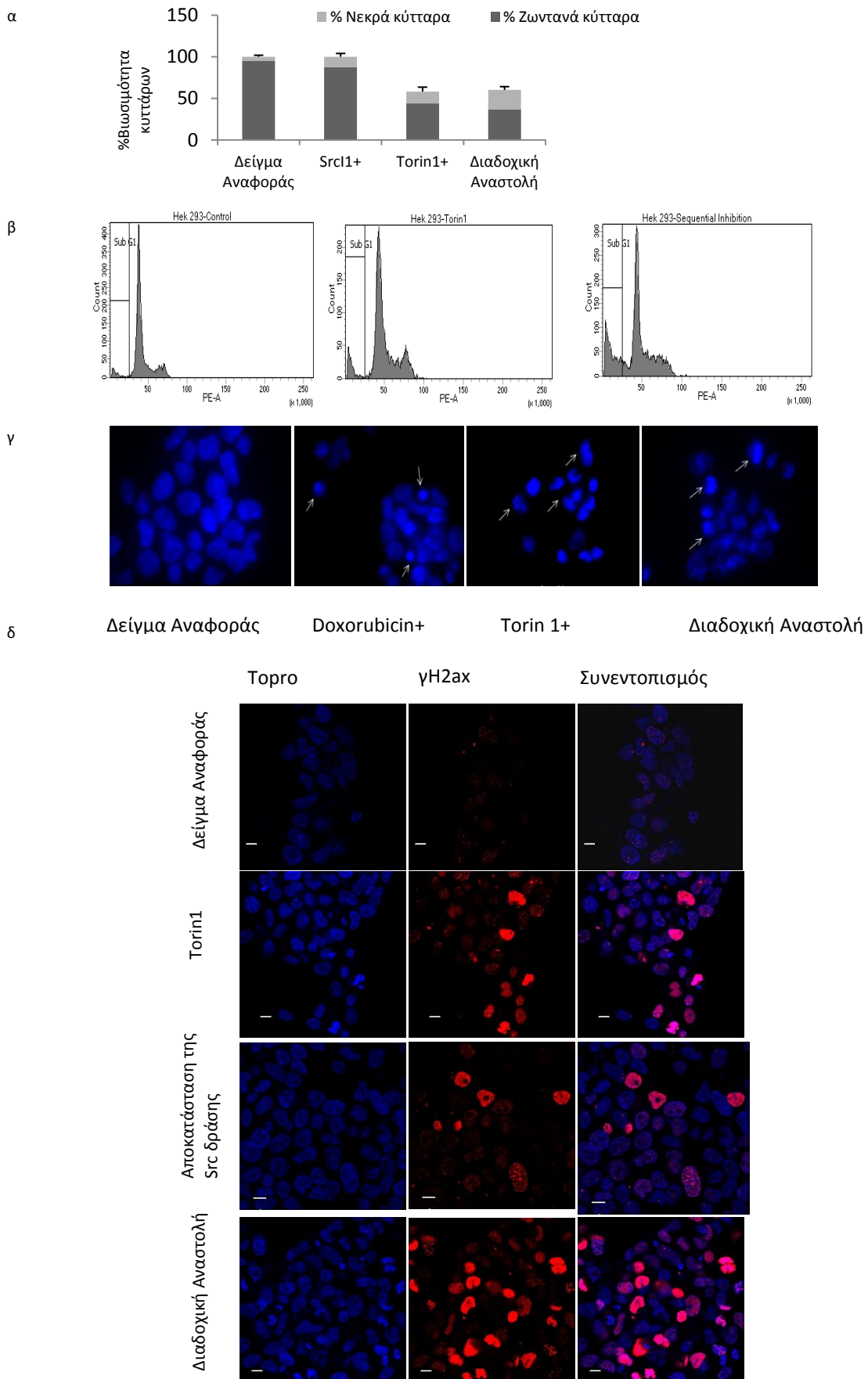
Η πρωτεΐνη IMP1 προσδένει στην 3' αμετάφραστη περιοχή του *bcl-2* mRNA και το σταθεροποιεί (Conway *et al.*, 2016). Με αυτόν τον τρόπο ενισχύει την αντι-αποπτωτική δράση του. Μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί αν η έκφραση του επηρεάζεται από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που επιδέχεται η πρωτεΐνη IMP1. Διερευνήθηκε εάν στις ίδιες συνθήκες που προκλήθηκε απόπτωση επηρεάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του *bcl2*.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις της αναστολής της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IMP1 στο κατάλοιπο σερίνης 181 στην έκφραση του *bcl-2* mRNA. Η παρουσία της πρωτεΐνης IMP1 σταθεροποιεί το *bcl-2* mRNA. Αντίθετα η παρουσία του μεταλλαγμένου ομόλογου της πρωτεΐνης στο κατάλοιπο της σερίνης 181, IMP1S181A μείωσε τον χρόνο ημίσειας ζωής κατά 50% (Σχήμα 21δ). Τα επίπεδα *bcl-2* mRNA μειώθηκαν περίπου 30% στις συνθήκες που παρατηρήθηκε απόπτωση αλλά τα επίπεδα πρωτεΐνης παρέμειναν αμετάβλητα (Σχήμα 21 α και 21 ε). Η αποσταθεροποίηση του *bcl-2* mRNA πιθανόν να είναι ένας παράγοντας που συμβάλει στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης αλλά δεν φαίνεται να ευθύνεται αποκλειστικά για αυτό.

Η δυνατότητα επαγόμενης ενίσχυσης της μετάφρασης του *c-myc* mRNA μπορεί να συνεισφέρει ένα εναλλακτικό εργαλείο για τη εξάλειψη καρκινικών κύτταρων που εκφράζουν *de novo* την IMP1.

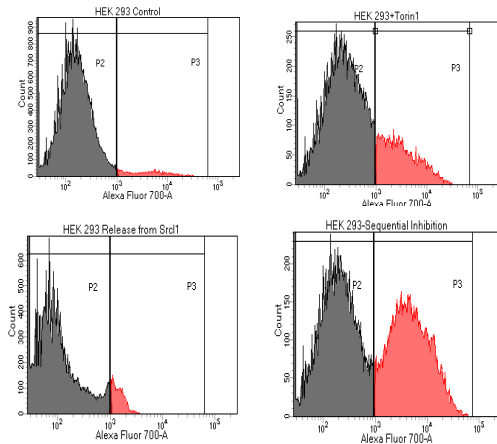
Αποτελέσματα

Σχήμα 20:

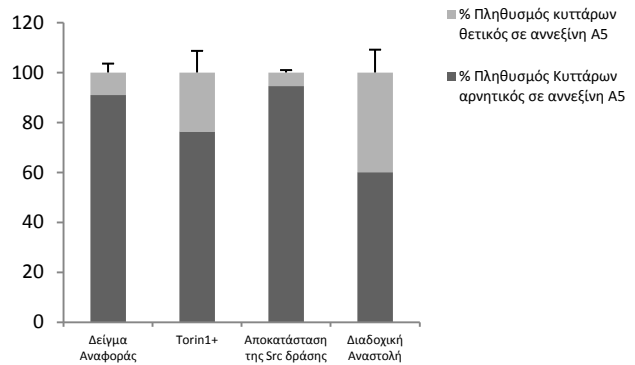


Σχήμα 20(συνέχεια):

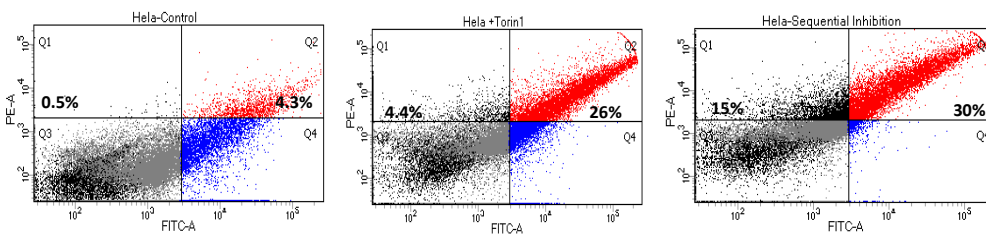
ε-ι



ε-ii



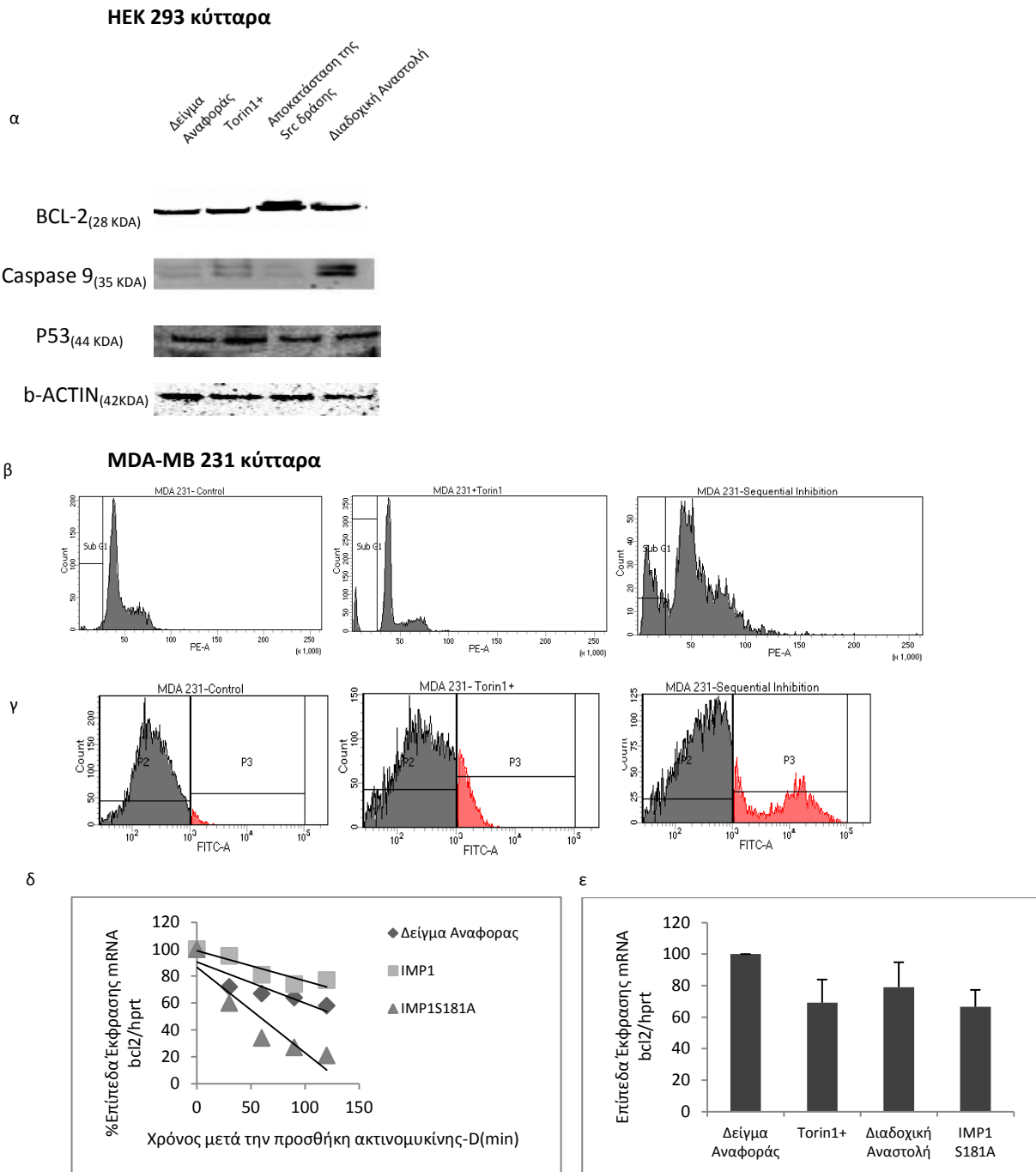
στ



Σχήμα 20: Οι επιπτώσεις της διαδοχικής αναστολής της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IMP1:
α)Στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Στις συνθήκες που υποδεικνύονται, παρουσιάζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των ποσοστών ζωντανών και νεκρών Hek 293 κυττάρων πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα δείγματα βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά με το δείγμα αναφοράς(P<0.01).**β) Στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.** Προσδιορίστηκαν τα ποσοστά των Hek293 κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου στις συνθήκες που υποδεικνύονται με ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής, με εφαρμογή των ίδιων παραμέτρων σάρωσης (ένταση FSC,SSC ,PE).Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα. **γ και δ) Στην ακεραιότητα του DNA.** (γ) Hek 293 κύτταρα καλλιεργήθηκαν στις συνθήκες που υποδεικνύονται και ακολούθησε χρώση του DNA με χρωστική Dapi (D9542-Sigma Aldrich). Οι εικόνες λήφθηκαν με χρήση μικροσκοπίου TIRF και υπό τις ίδιες παραμέτρους. (δ) Κύτταρα Hek 293 στις συνθήκες που υποδεικνύονται σημάνθηκαν με τα αντισώματα αντι-γH2AX (ab11174,Abcam) και Donkey anti-mouse(Alexa Fluor 568, ab175472). Για την χρώση του πυρήνα χρησιμοποιήθηκε Torro χρωστική. Η ανάλυση απεικόνισης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις ίδιες παραμέτρους σάρωσης (ζουμ, ένταση λέιζερ), Ράβδοι κλίμακας 10μm. **ε και στ) Στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μέσω ενεργοποίησης μηχανισμού απόπτωσης σε (ε) Hek 293 και (στ) HeLa κύτταρα.** Στο σχήμα ει παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα ενώ στο εii διάγραμμα απεικονίζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των ποσοστών των κυτταρικών πληθυσμών θετικών και αρνητικών σε χρώση με αννεξίνη A5(Biolegend, Annexin V Alexa Fluor 647) από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Τα δείγματα βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά με το δείγμα αναφοράς (P<0.01). (στ) Κύτταρα καλλιεργήθηκαν όπως υποδεικνύεται και σημάνθηκαν ταυτόχρονα με PE Annexin V-Biolegend και anti-MYC-FITC(SAB4700448 Sigma Aldrich).Παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής, με εφαρμογή των ίδιων παραμέτρων σάρωσης (ένταση FSC,SSC,FITC,PE).

Αποτελέσματα

Σχήμα 21:



Σχήμα 21: Ο έλεγχος των επιπέδων έκφρασης *bcl2* και *p53* κατά την απόπτωση. α) Hek 293 κύτταρα καλλιεργήθηκαν στις συνθήκες που υποδεικνύονται. Παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα της ανάλυσης των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης των BCL-2 (Oncogene Science), P53 (Santa Cruz Biotechnology), caspase 9 (sc56076, Santa Cruz Biotechnology) και β-ακτίνης (MAB1501, Millipore). β) Προσδιορίστηκαν στις συνθήκες που υποδεικνύονται τα ποσοστά των MDA-MB-231 κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρία ροής. Παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα. γ) MDA-MB 231 κύτταρα στις συνθήκες που επισημαίνονται, σημάθηκαν με FITC- Annexin V (Biolegend) και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής με εφαρμογή των ίδιων παραμέτρων σάρωσης (ένταση FSC, SSC, FITC). Παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα δ) Ο ρυθμός αποικοδόμησης του *bcl2* mRNA στις συνθήκες που υποδεικνύονται. Παρουσιάζονται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των επιπέδων *bcl2* mRNA σε Hek 293 κύτταρα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, στα χρονικά σημεία που υποδεικνύονται. ε) Hek 293 κύτταρα καλλιεργήθηκαν στις συνθήκες που υποδεικνύονται. Παρουσιάζονται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των ποσοσטיών επιπέδων *bcl2* mRNA σε σχέση με το δείγμα αναφοράς, έξι ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα δείγματα βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά με το δείγμα αναφοράς ($P < 0,01$).

➤ **5. Ο έλεγχος της συμβολής της IMP1 στις επιπτώσεις της διαδοχικής αναστολή της δράσης Src και mTORC2, στην βιωσιμότητα.**

Με στόχο να επιβεβαιωθεί ότι οι μεταβολές που καταγράφηκαν, κατά την διαδοχική έκθεση των κυττάρων στην δράση των δύο αναστολέων κινασών, στα επίπεδα μεταφρασσιμότητας τόσο των χιμαιρικών μεταγράφων που φέρουν την CRD αλληλουχία αστάθειας του *c-myc* mRNA όσο και του ενδογενούς μηνύματος οφείλονται στην πρωτεΐνη IMP1 και στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που επιδέχεται, αποσιωπήθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης IMP1.

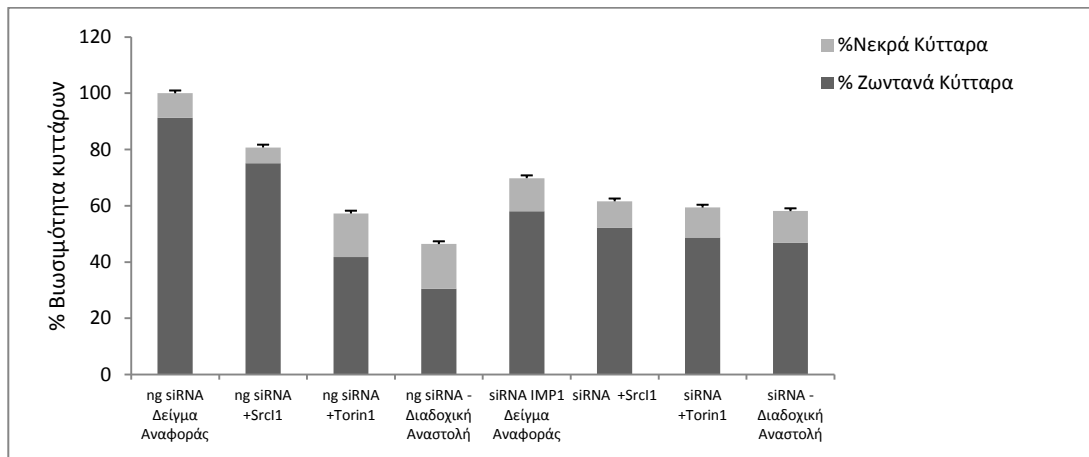
Η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης IMP1 οδήγησε σε αναστολή του ρυθμού του πολλαπλασιασμού των κυττάρων κατά 30% και προκάλεσε αύξηση στον πληθυσμό των νεκρών κυττάρων (Σχήμα 22α). Η καλλιέργεια των κυττάρων παρουσία Src11 για σαράντα οκτώ ώρες και η άμεση έκθεση των κυττάρων στον αναστολέα της δράσης της κινάσης mTORC2, παρουσία siRNA ελέγχου είχε τις επιπτώσεις που αναφέρθηκαν ήδη. Το ποσοστό των νεκρών κυττάρων αυξήθηκε κατά 30% , ποσοστό αυξημένο κατά 10% σε σχέση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν μόνον στην δράση του Torin1, παρουσία siRNA ελέγχου. Αντίθετα, η παρουσία των αναστολέων στις συνθήκες αποσιώπησης της πρωτεΐνης IMP1 δεν προκάλεσαν περαιτέρω μεταβολές πέραν από αυτές που προκλήθηκαν από την αποσιώπηση της έκφρασης της. Ο ρυθμός του πολλαπλασιασμού και το ποσοστό του πληθυσμού των νεκρών κυττάρων παρέμεινε ανεπηρέαστος.

Η αύξηση του ποσοστού των νεκρών κυττάρων που προκλήθηκε από την αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης IMP1 μετέβαλλε την κατανομή του πληθυσμού των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Όπως φαίνεται στο σχήμα 22β, περίπου το 15% του κυτταρικού πληθυσμού κατόπιν αποσιώπησης της έκφρασης της πρωτεΐνης IMP1 ανιχνεύθηκε στην Sub-G₁ προ-αποπτωτική κορυφή. Η έκθεση των κυττάρων στην δράση του αναστολέα Torin1 αλλά και ο διαδοχικός χειρισμός των αναστολέων, η έκθεση στον Src11 αρχικά και εν συνεχεία στον Torin1, δεν προκάλεσαν αύξηση στο ποσοστό του πληθυσμού των κυττάρων που εντοπίζεται στην Sub-G₁ προ-αποπτωτική κορυφή, όπως παρατηρήθηκε να συμβαίνει σε συνθήκες που εκφράζεται φυσιολογικά η IMP1 (Σχήμα 22β-ii).

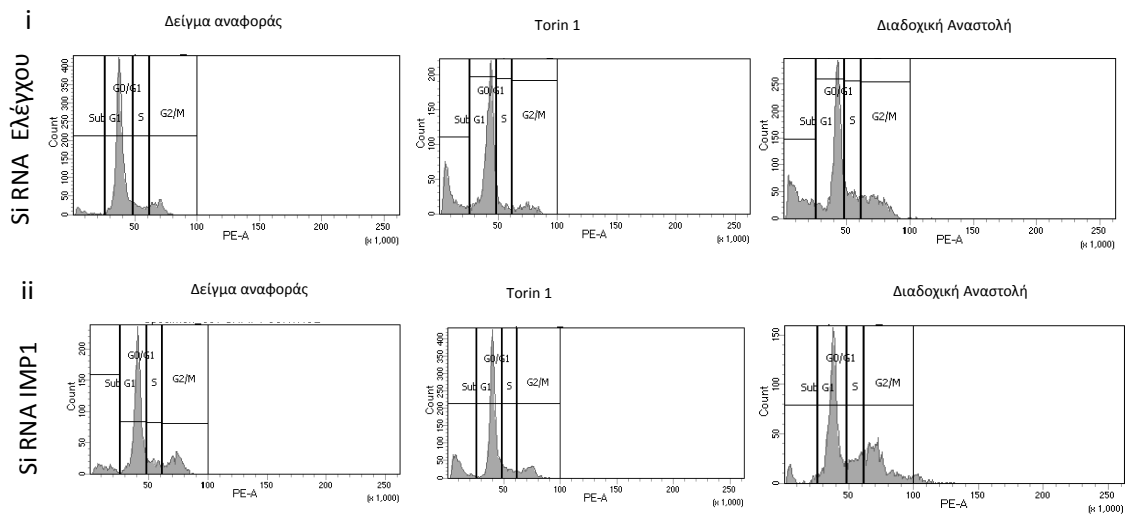
Αποτελέσματα

Σχήμα 22:

α



β



Σχήμα 22: Οι επιπτώσεις της διαδοχικής αναστολής στην βιωσιμότητα σε συνθήκες αποσιώπησης της έκφρασης της IMP1 πρωτεΐνης. Κύτταρα Hek 293 διαμολύνθηκαν είτε με siRNA IMP1 είτε με negative siRNA, και καλλιεργήθηκαν στις συνθήκες που υποδεικνύονται. Παρουσιάζονται (α) ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των ποσοστών ζωντανών και νεκρών κυττάρων πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα δείγματα βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με το δείγμα αναφοράς ng siRNA $**P < 0.01$. (β) τα ποσοστά των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου που προσδιορίστηκαν μέσω κυτταρομετρίας ροής, με εφαρμογή των ίδιων παραμέτρων σάρωσης σε όλα τα δείγματα (ένταση FSC, SSC, PE). Παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατόπιν αποσιώπησης της έκφρασης της πρωτεΐνης IMP1 και διαδοχικής αναστολής της δράσης των σηματοδοτικών μονοπατιών όπως περιγράφηκε, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο μηχανισμός προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που ενεργοποιείται στοχεύει τα κύτταρα που εκφράζουν IMP1 πρωτεΐνη.

➤ **6. In vivo μελέτη των ουσιών TORIN1, AZD0530 και του συνδυασμού τους.**

Κατόπιν της αξιολόγησης των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τα in vitro πειράματα δημιουργήθηκε το ερώτημα αν ο χειρισμός των δύο αναστολέων κατά τον ίδιο τρόπο, δηλαδή η αναστολή της δράσης των σηματοδοτικών μονοπατιών της Src κινάσης αρχικά και της mTORC2 κινάσης στην συνέχεια, θα ήταν ικανός να οδηγήσει στην αναστολή ανάπτυξης όγκων *in vivo*.

Η χρήση του αναστολέα της δράσης της Src κινάσης, Saracatinib-AZD0530, έχει μελετηθεί και από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται δεν φαίνεται να έχει επίδραση στον ρυθμό ανάπτυξης των ξενομοσχευμάτων. Η δράση του αναστολέα του mTORC2 μονοπατιού έχει μελετηθεί όσον αφορά την αναστολή του μεγέθους ξενομοσχευμάτων. Ο Torin1 χορηγήθηκε σε ξενομοσχεύματα γλοιοβλαστώματος και προκάλεσε μεγαλύτερη από 99% αναστολή της ανάπτυξης του όγκου (Liu *et al.*,2010).

Δημιουργήθηκαν όγκοι από HeLa κύτταρα σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια και όταν έφτασαν στο επιθυμητό μέγεθος ξεκίνησε η χορήγηση των αναστολέων και του συνδυασμού τους. Από τη μελέτη της δράσης των ουσιών Torin1, AZD0530 και του συνδυασμού τους προέκυψαν οι καμπύλες ανάπτυξης που παρουσιάζονται στο σχήμα 23. Η χορήγηση των ουσιών άρχισε την 32^η ημέρα από την ένεση των κυττάρων και τελείωσε την 43^η ημέρα (treatment period). Οι μετρήσεις των όγκων συνεχίστηκαν για άλλες 10 ημέρες. Φαίνεται πως η ουσία AZD0530 δεν εμφανίζει καμία δράση ενώ η ουσία Torin1 οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης των όγκων. Επίσης, η προηγηθείσα έκθεση των κυττάρων στον AZD0530 αναστολέα κατέστησε την δράση του Torin1 πιο αποτελεσματική όπως προκύπτει από το σχήμα 23. Ο συνδυασμός των δύο ουσιών εμφάνισε την καλύτερη δράση στις συνθήκες του πειράματος.

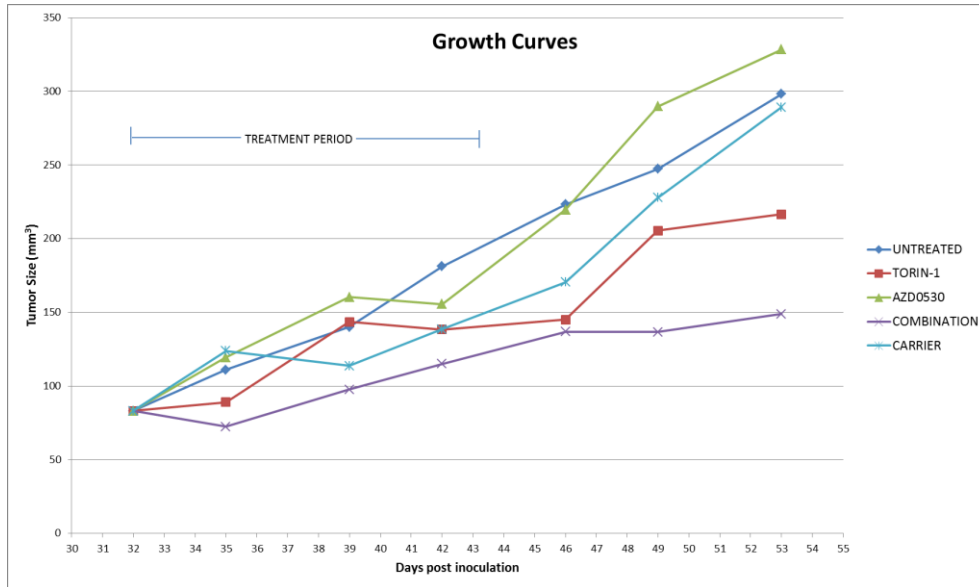
Στο σχήμα 24 φαίνεται η ποσοστιαία μεταβολή του μεγέθους των όγκων υπό την επίδραση των ουσιών Torin1, AZD0530 και του συνδυασμού τους σε σχέση με το μέγεθος

Αποτελέσματα

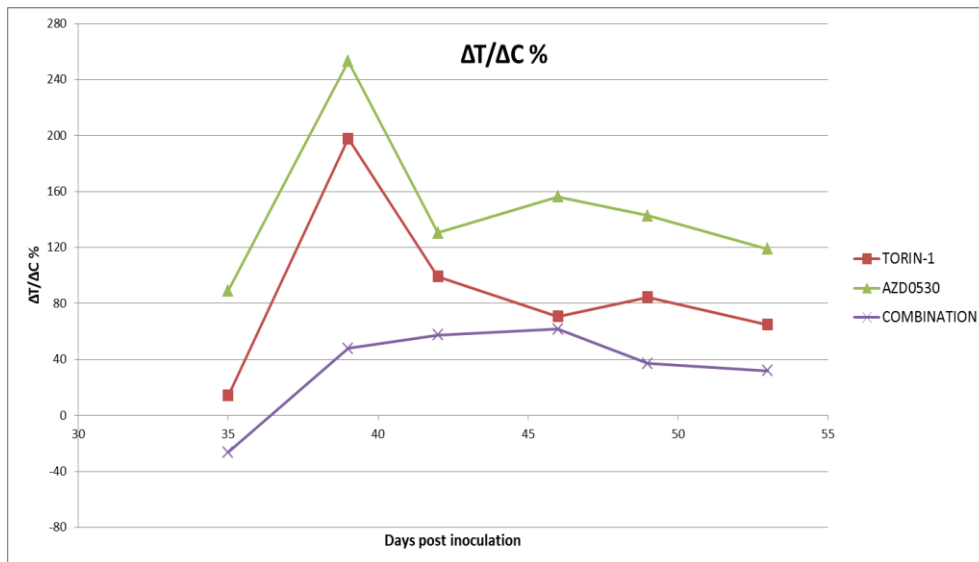
των όγκων που προέκυψαν από την ομάδα μελέτης επίδρασης του φορέα. Για κάθε ουσία που μελετήθηκε, υπολογίστηκε η μεταβολή του μεγέθους των όγκων υπό την επίδραση των ουσιών (ΔT) ως προς την αντίστοιχη μεταβολή στην ομάδα των ζώων που γινόταν η χορήγηση μόνον του φορέα (ΔC). Η μεταβολή αυτή αφορά στην ημέρα της μέτρησης των όγκων σε σχέση με την ημέρα της πρώτης χορήγησης των ουσιών. Με βάση τα παραπάνω, όταν η τιμή $\Delta T/\Delta C \leq 42\%$ είναι ενδεικτική ανασταλτικής δράσης των ουσιών που μελετώνται. Για την ομάδα διαδοχικής χορήγησης των αναστολέων η τιμή $\Delta T/\Delta C$ που προέκυψε ήταν μικρότερη του 40% (Σχήμα 24).

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι τιμές της στατιστικής σημαντικότητας (P) της διαφοράς του μεγέθους των όγκων στις διαφορετικές συνθήκες μετά την ολοκλήρωση της αγωγής την 52^η ημέρα. Παρουσιάζονται για κάθε ουσία που μελετήθηκε αλλά και του συνδυασμού τους, οι τιμές του t test που υπολογίστηκαν με βάση το μέγεθος των όγκων συγκριτικά τόσο με το μέγεθος των όγκων του δείγματος ελέγχου όσο και με το μέγεθος των όγκων της ομάδας του φορέα την 52^η ημέρα. Με κόκκινο χρώμα επισημαίνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που προέκυψαν ανάμεσα στις ομάδες μελέτης.

Οι ενδείξεις από τα αποτελέσματα των *in vitro* και των προκαταρκτικών *in vivo* πειραμάτων υποδηλώνουν ότι η διαχείριση των επιπέδων της πρωτεΐνης MYC είναι μια δυνητική προσέγγιση για την αναστολή της ανάπτυξης των όγκων που εκφράζουν *de novo* IMP1 πρωτεΐνη, μέσω του χειρισμού της κατάστασης φωσφορυλίωσης της στα δύο κατάλοιπα που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη.



Σχήμα 23: Καμπύλες μεταβολής του μεγέθους των όγκων (mm³).



Σχήμα 24: Καμπύλες ποσοστιαίας μεταβολής του μεγέθους των όγκων στις ομάδες των προς μελέτη ουσιών σε σχέση με την ομάδα του φορέα.

Πίνακας 1: Τιμή στατιστικής σημαντικότητας(p-value)της διαφοράς του μεγέθους των ξενομοσχευμάτων στις διαφορετικές συνθήκες μετά την ολοκλήρωση της αγωγής(52^η ημέρα).

		AZD0530		Torin1		Διαδοχική Αναστολή			
	Δείγμα Αναφοράς	Δείγμα Φορέα	Δείγμα Αναφοράς	Δείγμα Φορέα	Δείγμα Αναφοράς	Δείγμα Φορέα	AZD0530	Torin1	
P value	0,4	0,48	0,1	0,04	0,00	0,00	0,001	0,02	

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συζήτηση

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί, για πρώτη φορά, η επίδραση των τροποποιήσεων της IMP1 πρωτεΐνης μέσω της δράσης τόσο της κινάσης Src όσο και της κινάσης mTORC2, στην τύχη του *c-myc* mRNA. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν την συντονισμένη ρύθμιση της έκφρασης του *c-myc* mRNA, που καθορίζεται από την αλληλεπίδραση της IMP1 πρωτεΐνης και της αλληλουχίας αστάθειας εντός της κωδικής περιοχής αλλά και από την σηματοδότηση που επιδέχεται η IMP1. Πρώτον, η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IMP1 στο κατάλοιπο τυροσίνης 396, από την κινάση Src, οδηγεί στην ενεργοποίηση της μετάφρασης του *c-myc* mRNA. Αποτελεί πιθανόν, το απαραίτητο σήμα για την μετάφραση του μηνύματος που αποθηκεύεται σε ριβονουκλεοπρωτεϊνικές δομές στο κυτταρόπλασμα. Δεύτερον η σηματοδότηση στο κατάλοιπο σερίνης 181 της IMP1 από την κινάση mTORC2, που συμβαίνει ταυτόχρονα με την μετάφραση του μηνύματος, φάνηκε ικανή να διατηρεί την μεταφρασιμότητα του *c-myc* mRNA σε χαμηλά επίπεδα, γεγονός απαραίτητο για την βιωσιμότητα των κυττάρων και την σωστή ανάπτυξη. Τέλος παρουσιάζεται ένας μηχανισμός πρόκλησης απόπτωσης, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, μέσω υπερέκφρασης της πρωτεΐνης MYC. Ο έμμεσος έλεγχος των επιπέδων της MYC πρωτεΐνης μέσω του χειρισμού της κατάστασης φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IMP1, δηλαδή την αναστολή της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IMP1 στο κατάλοιπο τυροσίνης 396 αρχικά που ακολουθείται από την αναστολή της δράσης της mTORC2 κινάσης και την αναστολή της φωσφορυλίωσης στο κατάλοιπο σερίνης 181, μπορεί να αποτελέσει μια αποτελεσματική προσέγγιση στην πρόκληση απόπτωσης των κυττάρων που εκφράζουν *de novo* την ογκοεμβρυική πρωτεΐνη IMP1, ένα κύριο χαρακτηριστικό των επιθετικών κακοηθειών.

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας MYC είναι βασικοί ρυθμιστές της πορείας των κυττάρων. Το *c-myc*, που αναγνωρίστηκε αρχικά ως ογκογονίδιο, επηρεάζει την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων μέσω της ικανότητάς του να ρυθμίζει τη μεταγραφή τουλάχιστον του 15% του συνολικού γονιδιώματος. Επιπλέον η απορυθμισμένη και έκτοπη έκφραση του, ποσοτικά ή/και χρονικά οδηγεί στην καρκινική εξαλλαγή των κυττάρων, στην έναρξη και τη διατήρηση της παθολογικής κατάστασης. Η πλειοτροπική δράση που αποδίδεται στην MYC πρωτεΐνη υποδηλώνει την σημαντικότητα του μορίου. Για αυτόν τον λόγο η ρύθμιση της έκφρασης του ελέγχεται σε όλα τα πιθανά επίπεδα, μεταγραφικά, μετα-μεταγραφικά και μετα-μεταφραστικά. Ως εκ τούτου αποτελεί ένα μοντέλο μελέτης της ρύθμισης της έκφρασης των ευκαρυωτικών γονιδίων.

Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Η ρύθμιση στο επίπεδο της μεταγραφής έχει μελετηθεί εκτενώς και οι έρευνητες έχουν επικεντρωθεί στον περίπλοκο μετα-μεταγραφικό έλεγχο που υπόκεινται τα μηνύματα και συγκεκριμένα στην ρύθμιση της σταθερότητας και της μεταφρασσιμότητας τους. Τα επίπεδα έκφρασης των mRNA σε φυσιολογικές συνθήκες καθορίζονται από τον ρυθμό της μεταγραφής και από τον ρυθμό αποικοδόμησης τους. Ο ρυθμός αποικοδόμησης ενός μηνύματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία cis αλληλουχιών που προσδίδουν αστάθεια. Οι cis αλληλουχίες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με ένα εύρος miRNA και κυτταρικών πρωτεϊνικών παραγόντων. Η δέσμευση αυτών των trans παραγόντων, συνδέεται είτε με την επιτάχυνση της αποικοδόμησης του mRNA, όπως στην περίπτωση της πρωτεΐνης TIAR (Liao *et al.*,2007), είτε με την προστασία των μετάγραφων από την αποικοδόμηση και την καταστολή της μετάφρασης, όπως στην περίπτωση της πρωτεΐνης HuR (Kim *et al.*,2009). Επιπλέον, υπάρχουν πολλοί trans παράγοντες τους στους οποίους δεν έχουν αποδοθεί συγκεκριμένοι ρόλοι στην τύχη των mRNA. Η δράση ενός trans-παράγοντα επίσης εξαρτάται και μεταβάλλεται από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που επιδέχεται αποκρινόμενος σε διαφορετικά ερεθίσματα.

Οι αλληλεπιδράσεις ενός μηνύματος RNA με μια πληθώρα παραγόντων που η λειτουργία τους καθοδηγεί την ενδοκυττάρια τύχη του μηνύματος σε συνδυασμό με την διαφορετική επίδραση των trans παραγόντων στους στόχους τους κατά περίπτωση κάνουν σαφές ότι η διαδικασία ρύθμισης της έκφρασης ενός mRNA είναι σύνθετη, με μηχανισμούς που λειτουργούν ως δικλείδες ασφαλείας ώστε να εξασφαλίζεται η σωστή κυτταρική ανάπτυξη. Ένα καλά μελετημένο παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη AUF1, η οποία ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών που αναγνωρίζουν και προσδέονται σε AREs αλληλουχίες των mRNA και προάγουν την αποικοδόμηση τους. Η πρόσδεση της, κατά γενικό κανόνα επιταχύνει την αποικοδόμηση mRNA που κωδικοποιούν κυτοκίνες όπως ιντερλευκίνη 3 και η ιντερλευκίνη 10 ή ρυθμιστές κυτταρικού κύκλου όπως το mRNA της κυκλίνης D1. Το 2007 ο Liao και οι συνεργάτες του αποκάλυψαν έναν νέο ρόλο για την πρωτεΐνη AUF1 επί των mRNA που προσδέει. Η πρόσδεση της AUF1 στο *c-myc* mRNA δεν είχε την ίδια επίδραση. Η AUF1 λειτουργεί ως ρυθμιστής της μετάφρασης του μηνύματος. Ανταγωνίζεται την πρόσδεση της πρωτεΐνης TIAR στο *c-myc* mRNA, που καταστέλλει την μετάφρασή του και σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών με τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4G, την PABP, πρωτεΐνες θερμικού σοκ hsc70-hsp70 και άλλες πρωτεΐνες διεγείρει την έναρξη της μετάφρασής του.

Συζήτηση

Η πρωτεΐνη AUF1 επίσης επιδέχεται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, μέσω δύο διαφορετικών σηματοδοτικών οδών κατόπιν της επίδρασης διαφορετικών ερεθισμάτων. Η δράση της βρέθηκε να μεταβάλλεται από τις τροποποιήσεις αυτές. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης p40-AUF1 επηρεάζουν τη συγγένεια της σύνδεσης της με τις αλληλουχίες ARE στα μηνύματα που προσδέεται και μεταβάλλουν τον ρυθμό αποικοδόμησης τους. Η AUF1 μπορεί να τροποποιηθεί μετα-μεταφραστικά, τόσο με ουβικτινίωση όσο και με φωσφορυλίωση. Φωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο σερίνης 83 από την κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου 3β (GSK3β) και στο κατάλοιπο σερίνης 87 από την πρωτεϊνική κινάση A. Στην κυτταρική σειρά μονοκυτταρικής λευχαιμίας, THP-1, τα mRNA ιντερλευκίνης-1β και του παράγοντα νέκρωσης όγκου α (TNFα) βρέθηκε να σταθεροποιούνται μετά από έκθεση σε εστέρες φορβόλης (TPA). Η σταθεροποίηση αυτών των mRNA προέρχεται από μεταβολές στην δομή των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων που σχηματίζει η AUF1 μετά την αποφωσφορυλίωση της στα δύο κατάλοιπα σερίνης. Τα υποστρώματα στα οποία συνδέεται η πρωτεΐνη AUF1 βρέθηκαν να αλλάζουν τοπικά διαμόρφωση. Η πρόσδεση της μη φωσφορυλιωμένης AUF1 ή της φωσφορυλιωμένης AUF1 μόνο στο ένα κατάλοιπο σερίνης επάγει την δημιουργία μιας συμπυκνωμένης δομής στα RNA στόχους της, αναστέλλοντας την αποικοδόμηση. Αντιθέτως, η φωσφορυλίωση της AUF1 αναστέλλει την δημιουργία αυτής της συμπυκνωμένης δομής του mRNA και οδηγεί σε μια πιο χαλαρή διαμόρφωση τα μηνύματα που προσδένει, προσδίδοντας τους ευκαμψία. Ο συνδυασμός των παραπάνω δεδομένων υποδηλώνει την ικανότητα της AUF1 να προάγει την ταχεία αποικοδόμηση των mRNA όταν προσδέεται σε αυτά, φωσφορυλιώνεται και έχει την ικανότητα να τα διατηρεί σε επιμήκεις και χαλαρές διαμορφώσεις. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η αναστρέψιμη φωσφορυλίωση της AUF1 μπορεί να αποτελέσει έναν κρίσιμο μηχανισμό μέσω του οποίου να ρυθμίζεται ο χρόνος ημιζωής των mRNAs στόχων της (Wilson *et al.*, 2003). Η πληροφορία ότι η AUF1, που ελέγχει την έκφραση *c-myc* mRNA, επιδέχεται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, πιθανόν να υποδηλώνει ότι η έκφραση του *c-myc* μπορεί να συνδέεται ή/και να ελέγχεται από μονοπάτια σηματοδότησης που δεν έχουν μελετηθεί προς το παρόν. Γίνεται κατανοητό λοιπόν ότι η επίδραση ενός trans-παράγοντα δεν είναι πάντα η ίδια για την πορεία των μηνυμάτων που προσδένει.

Το *c-myc* είναι υπό φυσιολογικές συνθήκες εξαιρετικά ασταθές. Ο μικρός χρόνος ημιζωής του mRNA δηλώνει ότι πρόκειται για ενδοκυττάριο ρυθμιστή πολλών διαδικασιών. Γίνεται λοιπόν κατανοητό γιατί οι ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στις cis αλληλουχίες του *c-*

myc mRNA και την αλληλεπίδραση τους με *trans* παράγοντες που επηρεάζουν την σταθερότητα και την μεταφρασιμότητα του μηνύματος.

Ο μετα-μεταγραφικός έλεγχος που υπόκειται το *c-myc* mRNA μελετάται διεξοδικά καθώς η απόκλιση της έκφρασης του από το φυσιολογικό έχει συνδεθεί με παθολογικές καταστάσεις. Ο μετα-μεταγραφικός έλεγχος επιτελείται πάνω σε διαδικασίες όπως η εξαρτώμενη από την καλύπτρα έναρξη της μετάφρασης, η μετάφραση που κατευθύνεται από την εσωτερική θέση εισόδου ριβοσωμάτων (IRES) στην 5' αμετάφραστη περιοχή, η καταστολή της μετάφρασης από την πρόσδεση της TIAR, της HuR και του miRNA let-7, η ενεργοποίηση της μετάφρασης από την πρόσδεση της AUF1, η αποικοδόμηση του mRNA που προκαλείται από τις αλληλουχίες αστάθειας εντός της 3' UTR και της κωδικής περιοχής κ.α. Ο συντονισμός των διαδικασιών μετα-μεταγραφικού ελέγχου αποτελεί βασικό ρυθμιστή της έκφρασης του γονιδίου *c-myc*.

1. Ανάλυση της επίδρασης της φωσφορυλίωσης της IMP1 στην τυροσίνη 396, στα επίπεδα της μεταφρασιμότητας του *c-myc* mRNA.

Το *c-myc* mRNA όπως αναφέρθηκε φέρει μια αλληλουχία αστάθειας εντός της κωδικής περιοχής. Είναι γνωστό ότι η αλληλουχία των 249 τελευταίων νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο της κωδικής περιοχής του *c-myc* mRNA (νουκλεοτίδια 1638 - 1886, coding region instability determinant element-CRD) μειώνει τα επίπεδα της μεταφρασιμότητας και αποτελεί στόχο ενδονουκλεασών. Η CRD αλληλουχία όμως αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη IMP1. Η αναγνώριση και η πρόσδεση της πρωτεΐνης IMP1 στην αλληλουχία αυτή, σταθεροποιεί το μήνυμα, δημιουργώντας παροδικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικές δομές σε συνεργασία με τις πρωτεΐνες HNRNPU, SYNCRIP, YBX1, και DHX9, στις οποίες δεσμεύει το *c-myc* mRNA. Έτσι αποτρέπεται η μεταφορά του στα πολυσώματα και η επακόλουθη αποικοδόμηση του που συνδέεται με την μετάφραση (Weidensdorfer *et al.*, 2009). Η πρωτεΐνη IMP1 αποτελεί ένα καλά μελετημένο παράδειγμα *trans* παράγοντα που αλληλεπιδρά με διάφορα μόρια RNA και επιδέχεται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αποκρινόμενες σε διαφορετικά σήματα. Με αυτόν τον τρόπο μεταβάλλει την επίδραση της στο μήνυμα στόχο της.

Η παρουσία της πρωτεΐνης IMP1 σταθεροποίησε το *c-myc* mRNA. Η αναστολή της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IMP1 στο κατάλοιπο τυροσίνης 396 αύξησε 40% τον χρόνο ημίσειας ζωής του *c-myc* mRNA περαιτέρω από την παρουσία της IMP1 αγρίου τύπου, αποθηκεύοντας το παροδικά και αντιστρεπτά σε διακριτές κυτταροπλασματικές

Συζήτηση

ριβονουκλεοπρωτεϊνικές δομές. Η αναστολή της φωσφορυλίωσης μείωσε τα επίπεδα της πρωτεΐνης MYC, γεγονός που υποδηλώνει ότι η φωσφορυλίωση μέσω της δράσης Src κινάσης στο κατάλοιπο τυροσίνης 396 είναι το απαραίτητο γεγονός για την απελευθέρωση του *c-myc* mRNA από τα κοκκία που δημιουργεί η πρωτεΐνη IMP1 και την έναρξη της μετάφρασης του. Το παραπάνω αποτέλεσμα ενισχύεται από τα δεδομένα που προέκυψαν μετά την αποκατάσταση της φυσιολογικής λειτουργίας της κινάσης Src, αφού προηγήθηκε η σαρανταοκτώωρη αναστολή της δράσης της *in vitro*. Η δράση της κινάσης Src υπό αυτές τις πειραματικές συνθήκες επέτρεψε την μετάφραση του παροδικά αποθηκευμένου *c-myc* mRNA και οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης MYC. Τα αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης MYC είχαν ως αποτέλεσμα αύξηση του ρυθμού του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Αυτά τα δεδομένα παρουσιάζουν έναν νέο, ανεξάρτητο μηχανισμό για τη διασφάλιση της μετάφρασης του *c-myc* mRNA την κατάλληλη χρονική στιγμή. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα επίπεδα έκφρασης του *c-myc* είναι χαμηλά. Μικρές μεταβολές στα επίπεδα του *c-myc* mRNA ή/και στα επίπεδα της πρωτεΐνης μπορούν να εκκινήσουν πληθώρα διαφορετικών βιολογικών διαδικασιών, από την έναρξη του πολλαπλασιασμού ως την καρκινική εξαλλαγή των κυττάρων. Απουσία σηματοδότησης της κινάσης Src φαίνεται το ενδογενές *c-myc* mRNA να σταθεροποιείται και να συσσωρεύεται σε κοκκία. Η επίδραση του κατάλληλου ερεθίσματος και η έναρξη της σηματοδότησης επί της πρωτεΐνης IMP1 είναι πιθανόν τα απαραίτητα γεγονότα για την απελευθέρωση του από τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα και την έναρξη της μετάφρασης. Παρουσιάζεται ένας μηχανισμός εξοικονόμησης ενέργειας και χρόνου του κυττάρου αφού το αποθηκευμένο *c-myc* mRNA μπορεί να μεταφραστεί άμεσα όταν κριθεί απαραίτητο, χωρίς την ενεργοποίηση της διαδικασίας της μεταγραφής εκ νέου.

Επιπλέον η σηματοδότηση από την κινάση Src εξασφαλίζει και την ενίσχυση της μετάφρασης του *c-myc* mRNA. Σε καρκινικά κύτταρα μαστού η αναστολή της δράσης της κινάσης Src, με χρήση του αναστολέα *saracatinib*, αναστέλλει την έναρξη της μετάφρασης του *c-myc* mRNA, αναστέλλοντας την δράση των ERK1/2, MNK1, eIF4E. Επομένως η κινάση Src αυξάνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης MYC ενισχύοντας την έναρξη της μετάφρασης μέσω της καλύπτρας (Jain *et al.*, 2015).

Το γεγονός ότι η Src κινάση ενέχεται στην διαδικασία ενεργοποίησης της μετάφρασης mRNA, όπως φαίνεται να συμβαίνει και στην περίπτωση του *c-myc* έχει ήδη αναφερθεί. Ο Ostareck-Lederer και οι συνεργάτες του το 2002 αποκάλυψαν ότι η Src κινάση φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη hnRNP K και αναστέλλει τη δέσμευση της στην αλληλουχία ελέγχου διαφοροποίησης (DICE- differentiation control element) στην 3' αμετάφραστη

περιοχή του LOX mRNA *in vitro* και *in vivo*, ενεργοποιώντας έτσι τη μετάφρασή του. Για πρώτη φορά παρουσιάστηκε ο νέος ρόλος της κινάσης Src στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων και αποκαλύφθηκε ένας μηχανισμός στον οποίο εμπλέκεται η κινάση Src για να ενεργοποιήσει την μετάφραση. Παρόμοια ήταν και τα ευρήματα που προέκυψαν από την μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης του μηνύματος της β-ακτίνης. Η πρωτεΐνη IMP1 προσδένει το mRNA της β ακτίνης, δημιουργεί ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα και το μεταφέρει στις πλούσιες σε ακτίνη περιοχές των νευρώνων. Η φωσφορυλίωση της IMP1 πρωτεΐνης στο κατάλοιπο τυροσίνης 396 απαιτείται για την απελευθέρωση του μηνύματος mRNA της β ακτίνης και την έναρξη της μετάφρασης του (Hüttelmaier *et al.*,2005).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, απουσία Src σηματοδότησης το *c-myc* mRNA αποθηκεύτηκε για να αξιοποιηθεί όταν επανενεργοποιηθεί το μονοπάτι. Αντίθετα οι Abdullah *et al.*(2017) αναφέρουν ότι η δράση της κινάσης Src απαιτείται για την σταθερότητα του *c-myc* mRNA. Όμως, η συγκεκριμένη μελέτη διεξήχθη σε κύτταρα που εκφράζουν μια κολοβωμένη μορφή της πρωτεΐνης IMP1 (ΔN- IMP1). Η ΔN- IMP1 δεν διαθέτει τα πρώτα δύο μοτίβα αναγνώρισης RNA αλλά διατηρεί τις τέσσερις περιοχές ομολογίας K. Η κολοβωμένη μορφή της πρωτεΐνης IMP1 (ΔN- IMP1),πιθανόν, να προσδένεται με διαφορετική ειδικότητα και συγγένεια στους στόχους mRNA σε σχέση με την IMP1 που διαθέτει όλες τις περιοχές της και η φωσφορυλίωση να έχει διαφορετικές επιπτώσεις στο έλεγχο της σταθερότητας και της μεταφρασιμότητας των μηνυμάτων στόχων. Οι συνθήκες που ευνοούν άλλωστε την έκφραση της ΔN- IMP1 ισομορφής παραμένουν άγνωστες καθώς και οι συνθήκες, φυσιολογικές ή παθολογικές, που ευνοούν την συγκεκριμένη επίδραση της πρωτεΐνης στην έκφραση του *c-myc* mRNA. Πιθανόν αυτή η διαφορετική μορφή της πρωτεΐνης να αποτελεί μια προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων στην συστατική ενεργοποίηση του Src σηματοδοτικού μονοπατιού.

2. Ανάλυση της επίδρασης της φωσφορυλίωσης της IMP1 στην σερίνη 181 στην μεταφρασιμότητα του c-myc mRNA.

Η mTORC2 ανακαλύφθηκε πρόσφατα και οι πληροφορίες για τις λειτουργίες της είναι συγκεχυμένες. Ενεργοποιείται από αυξητικούς παράγοντες μέσω του μονοπατιού κινάσης της φωσφατιδιλινοσιτόλης 3(PI3K) και τα υποστρώματα που έχουν βρεθεί είναι οι τρεις ισομορφές της AKT πρωτεΐνης, η κινάση σερίνης/θρεονίνης SGK1 και η κινάση σερίνης/θρεονίνης PKC. Η λειτουργική δράση της είναι αυτή που αντιστοιχεί στα υποστρώματά της. *In vivo* μελέτες με αποσιώπηση της έκφρασης των rictor, sin1 και mlst8

Συζήτηση

έδειξαν ότι η λειτουργία της κινάσης mTORC2 είναι απαραίτητη για την πρόοδο της εμβρυϊκής ανάπτυξης (Hung *et al.*, 2012). Επίσης, σε μοντέλο ποντικού για την μελέτη του καρκίνου του προστάτη η αποσιώπηση της έκφρασης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης PTEN συνδέεται με την ογκογένεση μόνον εφόσον είναι ενεργοποιημένη η λειτουργία της κινάσης mTORC2 (Guertin *et al.*, 2009).

Η κινάση mTORC2 ελέγχει την κυτταρική επιβίωση, ελέγχοντας επίσης τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης MYC. Όπως αναφέρθηκε η φωσφορυλίωση του κατάλοιπου σερίνης 62 σταθεροποιεί την πρωτεΐνη MYC. Η πρωτεϊνική φωσφατάση 2A αποφωσφορυλιώνει το κατάλοιπο σερίνης 62 της πρωτεΐνης MYC υπό φυσιολογικές συνθήκες και προάγει την αποικοδόμηση της εκτός και αν δεσμευθεί από τον αναστολέα CIP2A (cancerous inhibitor of PP2A) και ανασταλεί η δράση της. Στην παρούσα διατριβή παρατηρήθηκε ότι η αναστολή της δράσης του mTORC2 μονοπατιού οδήγησε στην αύξηση της MYC πρωτεΐνης. Αυτό το γεγονός έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές. Η επεξήγηση της αύξησης των επιπέδων MYC, του Ζου και των συνεργατών του (2015), είναι ότι η αναστολή της δράσης του mTORC2 αυξάνει την ενεργότητα του αναστολέα CIP2A (cancerous inhibitor of PP2A) η οποία δεσμεύεται στην πρωτεϊνική φωσφατάση 2A και αναστέλλει την δράση της. Η μειωμένη δραστικότητα της φωσφατάσης μετά την απενεργοποίηση του mTORC2 μονοπατιού σταθεροποιεί την πρωτεΐνη MYC που παραμένει φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο σερίνης 62. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα εργασία η αύξηση της πρωτεΐνης MYC αποδίδεται στην απουσία σηματοδότησης της mTORC2 κινάσης επί της πρωτεΐνης IMP1. Η αναστολή της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IMP1 είτε παρουσία του αναστολέα Torin1 είτε παρουσία του μεταλλαγμένου ομόλογου της πρωτεΐνης αποσταθεροποίησε τα χιμαιρικά mRNA Firefly λουσιφεράσης που φέρουν την αλληλουχία CRD του *c-myc* mRNA και διπλασίασε τα ποσοστά της μετάφρασης τους. Η απουσία σηματοδότησης του mTORC2 μονοπατιού είχε τις ίδιες επιπτώσεις στο ενδογενές *c-myc* mRNA. Το *c-myc* mRNA αποσταθεροποιήθηκε αλλά τα επίπεδα της πρωτεΐνης MYC διπλασιάστηκαν.

Σε συνθήκες αναστολής της δράσης της κινάσης mTORC2 παρατηρήθηκαν βλάβες στην ακεραιότητα του πυρήνα των κυττάρων και απόπτωση. Η έκτοπη αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης MYC μπορεί να οδηγήσει σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Οι Ζου *et al.* προτείνουν ένα μηχανισμό που συνδέει την αναστολή της δράσης του mTORC2 μονοπατιού και την αύξηση των επιπέδων MYC με την ενεργοποίηση προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Τα αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης MYC μέσω της επαγωγής της μεταγραφής των pri-miR-9-2 / miR-9-3p αναστέλλουν την έκφραση του E2F1, ενός

μεταγραφικού παράγοντα απαραίτητου για την επιβίωση των κυττάρων. Έτσι τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης E2F1 οδηγούν σε απόπτωση (Zou *et al.*, 2015).

Οι μεταβολές που σημειώθηκαν στα επίπεδα έκφρασης του *c-myc* σαν αποτέλεσμα της αναστολής είτε του mTORC2 ή του Src μονοπατιού στην παρούσα μελέτη, διαπιστώθηκε πως ήταν αλληλένδετες με την παρουσία της IMP1 πρωτεΐνης. Οι μεταβολές της σταθερότητας και της μετάφρασης του *c-myc* mRNA ήταν το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ της CRD αλληλουχίας του *c-myc* mRNA και της πρωτεΐνης IMP1 καθώς και των μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων που αυτή επιδέχεται. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς *c-myc* mRNA υπολογίστηκαν σε συνθήκες αποσιώπησης της έκφρασης της πρωτεΐνης IMP1. Η παρουσία των αναστολέων για την δράση των δύο οδών σηματοδότησης σε αυτές τις συνθήκες δεν οδήγησε σε μεταβολές στα επίπεδα του *c-myc* mRNA και στα επίπεδα πρωτεΐνης MYC. Η παρουσία των αναστολέων υπό τις ίδιες συνθήκες δεν επηρέασε τον ρυθμό αποικοδόμησης του *c-myc* mRNA. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα προέκυψε το συμπέρασμα ότι η παρουσία της πρωτεΐνης IMP1 καθιστά τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στην δράση των αναστολέων.

Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IMP1 στο κατάλοιπο σερίνης 181, μέσω της δράσης της mTORC2 κινάσης, λαμβάνει χώρα ταυτόχρονα με την μετάφραση. Η IMP1 δεσμεύεται ταυτόχρονα και με την mTOR και με την RICTOR πρωτεΐνη, φωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο σερίνης 181 και αυτή η φωσφορυλίωση προκαλεί την απελευθέρωση του IMP1 από το mTOR σύμπλοκο. Η σύνδεση της IMP1 με τα mRNA στόχους προστατεύει την φωσφορυλιωμένη σερίνη από την δράση των πρωτεϊνικών φωσφατασών. Έτσι ενδοκυττάρια η IMP1 πρωτεΐνη φέρει την φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο σερίνης 181 ταυτόχρονα με τη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης της (Dai *et al.*, 2013).

Η παρουσία και μόνο του μεταλλαγμένου ομολόγου της πρωτεΐνης IMP1 στο κατάλοιπο της σερίνης αύξησε τα επίπεδα της πρωτεΐνης MYC και προκάλεσε εκτεταμένο κυτταρικό θάνατο. Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η IMP1 διμερίζεται για να προσδέσει τα μόρια RNA στόχους της. Δύο μόρια IMP1 δεσμεύονται στο RNA με ένα διαδοχικό, συνεργιστικό μηχανισμό. Η ικανότητα διμερισμού οδηγεί σε ένα "κλειδωμένο" σταθερό RNP σύμπλοκο (Nielsen *et al.*, 2004). Στην συγκεκριμένη περίπτωση που εξετάστηκε εδώ, η μεταλλαγμένη IMP1 στο κατάλοιπο σερίνης 181 (IMP1S181A), η οποία εκφράζεται σε περίσσεια φαίνεται να μην προσδένει τα μόρια του *c-myc* mRNA όπως και η άγριου τύπου IMP1 απουσία σηματοδότησης της κινάσης mTORC2. Είναι πιθανόν η μεταλλαγμένη μορφή IMP1S181A να δρα έχοντας κυρίαρχη αρνητική δράση (dominant negative action) για τα ενδογενή μόρια της IMP1, τα οποία είναι φωσφορυλιωμένα στο

Συζήτηση

κατάλοιπο σερίνης 181, καθώς διμερίζεται με αυτά αναιρώντας την δράση τους. Επιπρόσθετα υπάρχει η πιθανότητα αυτή η μεταμεταφραστική τροποποίηση της IMP1 να επηρεάζει την δράση της και επί των άλλων μηνυμάτων στόχων της προκαλώντας εκτεταμένη απόπτωση. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση της μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης στο κατάλοιπο σερίνης 181 (IMP1S181A), είχε ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση του mRNA του αντι-αποπτωτικού παράγοντα *bcl2*.

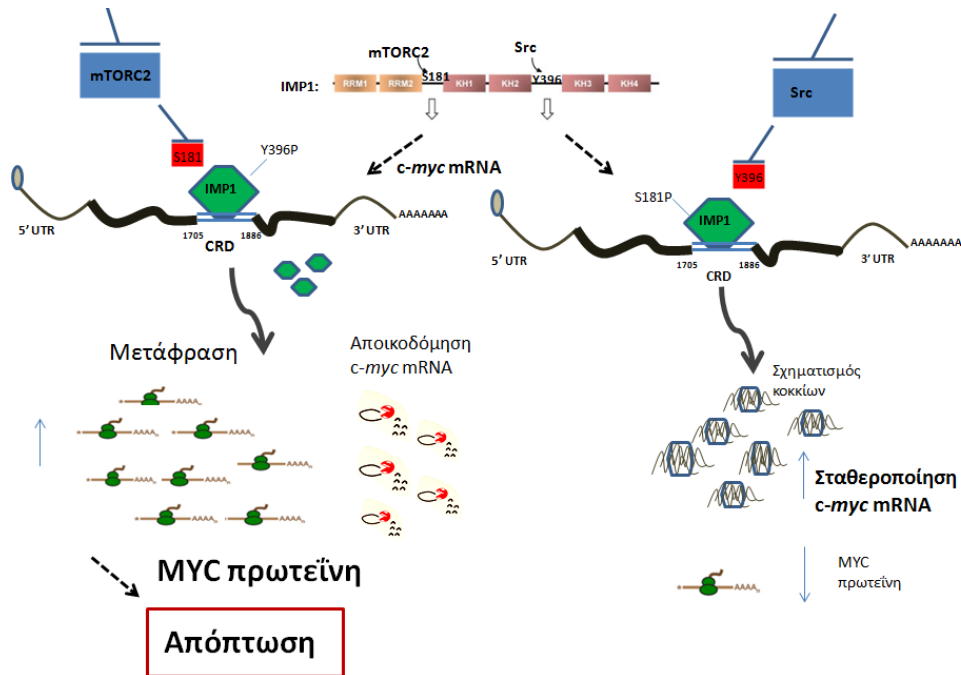
Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IMP1 λοιπόν στο κατάλοιπο σερίνης 181 μπορεί να αποτελεί το ενδοκυττάριο σήμα που σταθεροποιεί το *c-myc* mRNA και διατηρεί την μετάφραση του σε χαμηλά επίπεδα, ελέγχοντας την έκφρασή του.

Υπάρχουν κι άλλα παραδείγματα στα οποία η φωσφορυλίωση σε εναλλακτικά κατάλοιπα τροποποιεί την επίδραση των πρωτεϊνών που προσδένουν RNA έναντι των στόχων τους. Για παράδειγμα η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης hnRNP K στο κατάλοιπο σερίνης από την κινάση ERK αναστέλλει τη μετάφραση τεχνητών γονιδίων που φέρουν την 3' αμετάφραστη περιοχή του LOX mRNA την οποία αναγνωρίζει και προσδένει (Habelhah *et al.*, 2001). Αντίθετα η φωσφορυλίωση της hnRNP K σε ένα κατάλοιπο τυροσίνης, μέσω δράσης της κινάσης Src, ενεργοποιεί την μετάφραση του LOX mRNA. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι μια πρωτεΐνη που μπορεί και προσδένει μηνύματα RNA ρυθμίζει την μετα-μεταγραφική πορεία τους μέσω της φωσφορυλίωσης από δύο διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια.

Η δράση του mTORC2 συμπλόκου έχει αναφερθεί ότι ενέχεται στην ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης και ανάπτυξης. Η φωσφορυλίωση της σερίνης 181 της πρωτεΐνης IMP1 είναι απαραίτητη για την έναρξη της μετάφρασης του *Igf2* mRNA μέσω της αλληλουχίας της εσωτερικής θέσης εισόδου των ριβοσωμάτων που φέρει, παράγοντα απαραίτητου για την σωστή ανάπτυξη (Dai *et al.*, 2013).

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής επιβεβαιώνουν την λειτουργία της mTORC2 κινάσης για την διατήρηση της ομοιόστασης εντός των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η πρωτεΐνη MYC είναι μεταγραφικός παράγοντας που επάγει την μεταγραφή του *imp1* γονιδίου. Η έκφραση της πρωτεΐνης IMP1 όπως αναφέρθηκε αυξάνεται κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και *de novo* στην καρκινογένεση (Tessier *et al.*, 2004, Dimitriadis *et al.*, 2007). Η σηματοδότηση που επιδέχεται η IMP1 μέσω της mTORC2 κινάσης συγκρατεί τα επίπεδα της μεταφρασσιμότητας του *c-myc* mRNA και κατ' επέκταση την έκφραση της ίδιας της πρωτεΐνης IMP1 γιατί αποτελεί μεταγραφικό στόχο του MYC.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ενισχύουν την άποψη ότι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο αναδεικνύεται σε σημαντική συνιστώσα για τον καθορισμό του φάσματος των πρωτεϊνών που εκφράζονται στο κύτταρο κάθε στιγμή και ως εκ τούτου για τον φαινότυπο του. Η διαλεύκανση της λειτουργίας των ενδοκυττάρων μηχανισμών που λειτουργούν κατά τον πολύπλοκο γονιδιακό έλεγχο μπορούν να παρέχουν την δυνατότητα για παρέμβαση σε ασθένειες που οφείλονται στον μεταβολισμό των mRNA που παρεκκλίνει από το φυσιολογικό.



Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής προσέγγισης για πρόκληση απόπτωσης κυττάρων που εκφράζουν πρωτεΐνη IMP1.

3. Η ενίσχυση της μετάφρασης του *c-myc* mRNA μπορεί να συνεισφέρει ένα εναλλακτικό εργαλείο για τη εξάλειψη καρκινικών κύτταρων που εκφράζουν *de novo* την IMP1.

Αναφέρθηκε εκτενώς ότι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της IMP1 είναι δυνατό να διαφοροποιήσουν το αποτέλεσμα της δέσμευσης της και της δράσης της στο *c-myc* mRNA, κατά περίπτωση. Η αναστολή της φωσφορυλίωσης της IMP1 στο κατάλοιπο τυροσίνης 396 από την Src κινάση οδήγησε στην «αποθήκευση» των μεταγράφων του *c-myc* σε κυτταροπλασματικά κοκκία και κατέστειλε τη μετάφραση. Από την άλλη πλευρά, η αναστολή της σηματοδότησης μέσω της mTORC2 κινάσης αύξησε τα επίπεδα μετάφρασης του ενδογενούς *c-myc* mRNA, οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης MYC και σε

Συζήτηση

προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που επιδέχεται η IMP1 μπορούν να αποτελέσουν εργαλείο για τη διαχείριση της έκφρασης του *c-myc* mRNA. Αυτά τα αποτελέσματα σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η πρωτεΐνη IMP1 εκφράζεται σε ένα μεγάλο φάσμα καρκινικών κυττάρων οδήγησαν στην υπόθεση ότι η διαδοχική έκθεση κυττάρων στην δράση των δύο αναστολέων ίσως να συνεισφέρει ένα εναλλακτικό εργαλείο για τη εξάλειψη καρκινικών κύτταρων μέσω της δυνατότητας επαγόμενης ενίσχυσης της μετάφρασης του *c-myc* mRNA, δεδομένου ότι υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης MYC επάγουν απόπτωση κάτω από ορισμένες συνθήκες. Έγινε η υπόθεση λοιπόν ότι η δράση του αναστολέα Src11 σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν συσσωρεύει το *c-myc* mRNA και η δράση του Torin1 που έπεται μπορεί να ενισχύσει την μετάφραση αυτού του αποθηκευμένου μηνύματος με αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση της πρωτεΐνης MYC και την πρόκληση στοχευμένης και μαζικής απόπτωσης.

Πράγματι, τα αποτελέσματα που προέκυψαν έπειτα από την διαδοχική αναστολή της φωσφορυλίωσης της IMP1 από τις δύο οδούς σηματοδότησης επιβεβαίωσαν αυτήν την ιδέα. Η μεταφρασιμότητα των χιμαιρικών γονιδίων της Firefly λουσιφεράσης που φέρουν την αλληλουχία αστάθειας του *c-myc* mRNA με την οποία αλληλεπιδρά η πρωτεΐνη IMP1 υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες υπερδιπλασιάστηκε. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η μεταφρασιμότητα των χιμαιρικών γονιδίων της Firefly λουσιφεράσης στην συνθήκη διαδοχικής αναστολής της φωσφορυλίωσης της IMP1 αυξήθηκε κατά 40% συγκριτικά με τα επίπεδα μεταφρασιμότητας που υπολογίστηκαν μετά την έκθεση των κυττάρων μόνο στην δράση του Torin 1 αναστολέα. Επίσης, τα επίπεδα πρωτεΐνης MYC αυξήθηκαν σημαντικά. Κατά την διαδοχική αναστολή της φωσφορυλίωσης της IMP1 η πρωτεΐνη MYC αυξήθηκε περίπου ≈ 3 φορές συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου, ενώ σε σχέση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν μόνον στην δράση του Torin1 αναστολέα η πρωτεΐνη MYC διπλασιάστηκε.

Σε αντίθεση με την συνθήκη που αποκαταστάθηκε η δράση της Src κινάσης και η αύξηση της πρωτεΐνης MYC ώθησε σε αύξηση του ρυθμού του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες παρατηρήθηκαν μη αναστρέψιμες βλάβες στο DNA και το 40% του πληθυσμού των κυττάρων οδηγήθηκε σε απόπτωση. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο πληθυσμός των κυττάρων που ήταν αποπτωτικός, ταυτίζεται με αυτόν που είχε αυξημένη έκφραση πρωτεΐνης MYC. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι η αύξηση της MYC πάνω από ένα κατώφλι, που πρόκειται για το όριο ανοχής των κυττάρων για πρωτεΐνη MYC, ωθεί τα κύτταρα σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

Αξιοσημείωτο είναι ότι ο μηχανισμός που παρουσιάζεται προκάλεσε απόπτωση σε κύτταρα MDA-MB 231 που εκφράζουν μη λειτουργική πρωτεΐνη P53. Ο μηχανισμός που ενεργοποιείται δρα ανεξάρτητα της P53 και πιθανόν αποτελεί έναν εναλλακτικό τρόπο για την έναρξη απόπτωσης στο ήμισυ των ανθρώπινων όγκων που εμφανίζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο p53 καθώς η έλλειψη λειτουργικής P53 βρέθηκε να συμβάλλει στην χημειοαντοχή και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Όσον αφορά το *bcl2* mRNA φάνηκε να αποσταθεροποιείται στις συνθήκες που αποπίπτουν τα κύτταρα. Αναφέρθηκε ήδη, ότι το *bcl2* mRNA αποτελεί στόχο της IMP1 πρωτεΐνης (Conway et al., 2016). Πιθανόν η αποσταθεροποίηση του μηνύματος που προκαλείται μετά την αναστολή της σηματοδότησης της mTORC2 κινάσης επί της IMP1 πρωτεΐνης να ενισχύει το ενδεχόμενο η μετα-μεταγραφική πορεία του να ρυθμίζεται παρόμοια με του *c-myc*, κάτι το οποίο δεν έχει ακόμα διερευνηθεί.

Ενθαρρυντικά είναι και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα προκαταρκτικά πειράματα για την *in vivo* μελέτη της χορήγησης των ουσιών AZD0530 και Torin1, σε HeLa ξενομοσχεύματα. Ο συνδυασμός της χορήγησης των αναστολέων στους όγκους των ζώων οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αναστολή της ανάπτυξής τους. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η προηγηθείσα έκθεση των κυττάρων στην δράση του αναστολέα της κινάσης Src ενισχύει την δράση του αναστολέα της κινάσης mTORC2 *in vivo*, όπως και *in vitro*. Μάλιστα το ποσοστό της αναστολή της ανάπτυξης των όγκων μετά την διαδοχική χορήγηση των αναστολέων διαφέρει στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το ποσοστό της αναστολής της ανάπτυξης των όγκων μετά την χορήγηση μόνο του Torin1.

Πολλές έρευνες εστιάζουν σε μεθόδους θεραπείας μέσω διαδοχικού χειρισμού ουσιών, οι οποίες μειώνουν τα επίπεδα τοξικότητας που προκαλεί η θεραπεία ασθενών με ταυτόχρονη χορήγηση ουσιών. Σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού εφαρμόστηκε διαδοχική χορήγηση ουσιών χρησιμοποιώντας αρχικά αναστολείς της δράσης οδών σηματοδότησης και στην συνέχεια ουσίες που κατακερματίζουν το DNA με στόχο την ενίσχυση των αποπτωτικών σηματοδοτικών δικτύων. Συγκεκριμένα η χορήγηση του αναστολέα του EGFR (erlotinib) εικοσιτέσσερις ώρες πριν την χορήγηση δοξορουβικίνης αύξησε σημαντικά το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων έως και 500%. (Lee et al., 2012).

Είναι έντονο το ενδιαφέρον που υπάρχει για την διαλεύκανση των μηχανισμών που ρυθμίζουν την έκφραση του *c-myc* και την αξιοποίησή τους για ανάπτυξη νέων προσεγγίσεων με στόχο την αντιμετώπιση της καρκινογένεσης που προκαλείται από την απορυθμισμένη έκφραση του. Παράγοντες που εμπλέκονται στη μεταγραφή, στη μετάφραση αλλά και στη σταθερότητα του *c-myc* mRNA, θα μπορούσαν να αποτελέσουν

Συζήτηση

θεραπευτικούς στόχους (Chen *et al.*,2018). Στην παρούσα μελέτη, μέσω της κατανόησης ενός μηχανισμού ρύθμισης της έκφρασης του *c-myc*, σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, έγινε προσπάθεια να αξιοποιηθεί η ιδιότητα του ογκογονιδίου να προκαλεί απόπτωση υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Παρουσιάστηκε ένας εναλλακτικός τρόπος διαχείρισης των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης με στόχο την επιθυμητή κυτταρική απόκριση. Τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν από την χορήγηση των αναστολέων Src11 και Torin1 στην σταθερότητα και στην μετάφραση του *c-myc* mRNA μπορούν να αποδειχθούν ευεργετικά στην πρόκληση στοχευμένης απόπτωσης κυττάρων που εκφράζουν *de novo* την πρωτεΐνη IMP1, κύριο χαρακτηριστικό των επιθετικών κακοηθειών.

Περίληψη.

Τίτλος: **Διερεύνηση της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης του *c-myc* mRNA από πρωτεΐνες πρόσδεσης RNA.**

Μελέτη της επίδρασης της κατάστασης της φωσφορυλίωσης της IMP1 πρωτεΐνης από δύο διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια, στην μεταφρασιμότητα του *c-myc* mRNA.

Η πρωτεΐνη MYC παίζει διαφορετικούς ρόλους σε ένα πλήθος κυτταρικών διεργασιών. Το γονίδιο *c-myc* είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης, η απορυθμισμένη έκφραση του οποίου εμπλέκεται στην καρκινογένεση. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το *c-myc* ασκεί το ρόλο του κυρίως μέσω της διαμόρφωσης των επιπέδων έκφρασής του. Έχει σημασία πότε και σε ποιό βαθμό εκφράζεται το *c-myc* και έχει υποθεθεί ότι ακόμα και μικρές διακυμάνσεις στα επίπεδα έκφρασής του μπορεί να διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο τόσο στις φυσιολογικές όσο και στις παθολογικές διαδικασίες που ρυθμίζονται από αυτό το γονίδιο. Έτσι, η έκφρασή του απαιτεί αυστηρή ρύθμιση σε πολλά επίπεδα. Η σωστή ρύθμιση της έκφρασης είναι κρίσιμη για τη δράση του και επιτυγχάνεται μέσω διαφόρων ρυθμιστικών μηχανισμών που δρουν σε πολλαπλά στάδια, συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου της μεταγραφής, της μετάφρασης και της αποικοδόμησης τόσο του mRNA όσο και της πρωτεΐνης.

Ο μετα-μεταγραφικός έλεγχος παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης *c-myc* στο επίπεδο τόσο της σταθερότητας όσο και της μετάφρασης του mRNA. Πολλοί από αυτούς τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς έχουν διασαφηνιστεί. Οι αρχικές μελέτες επικεντρώθηκαν κυρίως στον έλεγχο της αποικοδόμησης του *c-myc* mRNA με διεξοδική μελέτη των *cis* στοιχείων και των *trans* παραγόντων και του τρόπου δράσης τους. Επίσης έχουν διερευνηθεί εκτενώς τα *cis* και *trans* στοιχεία που ελέγχουν την μετάφραση *c-myc* mRNA. Οι 5'- και 3'-αμετάφραστες περιοχές του *c-myc* mRNA παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταφρασιμότητας αλληλεπιδρώντας με miRNA και πρωτεΐνες που προσδέουν RNA. Επιπρόσθετα το *c-myc* mRNA φέρει μια αλληλουχία στην κωδική περιοχή, η οποία μπορεί να επηρεάσει τόσο τη σταθερότητα όσο και τη μεταφρασιμότητα του. Αυτή η αλληλουχία, καθοριστικό στοιχείο αστάθειας της κωδικής περιοχής (CRD), αποτελεί τα τελευταία 249 νουκλεοτίδια της κωδικής περιοχής του μηνύματος. Η παύση της διαδικασίας της μετάφρασης από το ριβόσωμα στην CRD αλληλουχία λόγω της παρουσίας ενός σπάνιου κωδικονίου Αργινίνης σε ένα γειτονικό κωδικόνιο Θρεονίνης, δημιουργεί μια περιοχή ευάλωτη στην επίθεση από ενδονουκλεάση, συνδέοντας το ρυθμό μετάφρασης με

Περίληψη

την αποικοδόμηση, εκτός αν προστατεύεται από την πρωτεΐνη πρόσδεσης στην CRD αλληλουχία (CRD-BP ή IMP1 ή IGF2BP1). Έχει προταθεί επίσης ότι η δέσμευση της IMP1 πρωτεΐνης μπορεί να απομονώσει το *c-myc* mRNA σε αμετάφραστα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα και επομένως επηρεάζει τη μετάφραση του

Εκτός από το *c-myc* mRNA, η IMP1 αναγνωρίζει ένα πλήθος άλλων mRNA, δεσμεύεται είτε στις 5'- ή 3'-μη μεταφραζόμενες περιοχές ή στην κωδική περιοχή τους, έχοντας διαφορετική επίδραση στην μετα-μεταγραφική πορεία τους. Η IMP1 εκφράζεται σε εμβρυϊκούς ιστούς και *de novo* σε μια σειρά κακοηθειών. Η IMP1 φωσφορυλιώνεται στην τυροσίνη 396 μέσω της δράσης της Src κινάσης και στην σερίνη 181 από την mTORC2 κινάση, αντίστοιχα. Αυτές οι μεταφραστικές τροποποιήσεις είναι κρίσιμες για την επίδρασή της στους στόχους mRNA. Η ZBP1, ορθόλογο της πρωτεΐνης IMP1, προσδένεται σε μια αλληλουχία 54-νουκλεοτιδίων στην 3' UTR του mRNA της β-ακτίνης και καταστέλλει τη μετάφρασή του ενώ μεσολαβεί στην μετατόπιση του στην κυτταρική περιφέρεια. Εκεί, η Src-καταλυόμενη φωσφορυλίωση της ZBP1 [Tyr396], προκαλεί την απελευθέρωση του mRNA β-ακτίνης, επιτρέποντας την τοπική μετάφρασή του. Επιπρόσθετα, η IMP1 φωσφορυλιώνεται στην Ser 181 ταυτόχρονα με την μετάφραση από το σύμπλοκο mTORC2. Αυτή η φωσφορυλίωση απαιτείται για την δέσμευση της IMP1 στην 5' UTR του IGF2-L3 mRNA και την έναρξη της μετάφρασης μέσω της εσωτερικής θέσης εισόδου του ριβοσώματος. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση αυτών των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στην έκφραση του *c-myc* mRNA.

Ερευνήθηκε η πιθανή επίδραση της φωσφορυλίωσης της IMP1 στο κατάλοιπο Tyr 396 από την Src κινάση, στην σταθερότητα και στην μετάφραση του *c-myc* mRNA. Χιμαιρικά πλασμίδια λουσιφεράσης που φέρουν την *c-myc* CRD αλληλουχία εντός πλαισίου ανάγνωσης, συνδιαμολύνθηκαν με πλασμίδια που εκφράζουν την IMP1 αγρίου τύπου πρωτεΐνη ή το μεταλλαγμένο ομόλογό της (IMP1 Y396F). Η IMP1 αγρίου τύπου μείωσε την μεταφρασιμότητα κατά 20% ενώ η υπερεκφράση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης κατά 35%. Η μεταφρασιμότητα των χιμαιρικών μετάγραφων που φέρουν την αλληλουχία *c-myc* CRD μειώθηκε κατά 35% παρουσία του αναστολέα της Src κινάσης (Src1) παρόλο που τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA αυξήθηκαν. Η αναστολή της δράσης της Src οδού παρουσία IMP1 αγρίου τύπου μείωσε περαιτέρω την μεταφρασιμότητα των χιμαιρικών μετάγραφων. Αντίθετα, η προσθήκη αναστολέα της δράσης της Src κινάσης δεν επηρέασε την μεταφρασιμότητα του χιμαιρικού mRNA στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την μεταλλαγμένη IMP1. Η IMP1 Y396F ή IMP1 αγρίου τύπου, παρουσία αναστολέα Src, εντοπίστηκαν σε κυτταροπλασματικά κοκκία. Σε αυτές τις συνθήκες, το ενδογενές *c-myc*

mRNA σταθεροποιήθηκε, αν και δεν μεταφράστηκε υποδηλώνοντας ότι απουσία Src σηματοδότησης, η IMP1 αποθηκεύει το *c-myc* mRNA σε κυτταροπλασματικές δομές. Η απομάκρυνση του Src11 είχε ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση της μεταφρασιμότητας τόσο του χημειοκινικού μετάγραφου όσο και του ενδογενούς *c-myc* mRNA. Η αύξηση της πρωτεΐνης MYC είχε ως αποτέλεσμα αύξηση του ρυθμού του πολλαπλασιασμού των κυττάρων.

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της αναστολής της Src οδού σηματοδότησης, η παρουσία του αναστολέα της κινάσης mTORC2 (Torin1) αύξησε τα επίπεδα πρωτεΐνης των χημειοκινικών μετάγραφων κατά 50%, παρόλο που αποσταθεροποιήθηκαν. Παρόμοια αποτελέσματα πρόέκυψαν μετά την διαμόλυνση με το μεταλλαγμένο ομόλογο της IMP1 στο κατάλοιπο σερίνης 181 (IMP1S181A). Η υπερέκφραση της μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη μετάφραση των μετάγραφων που φέρουν την αλληλουχία CRD εντός πλαισίου ανάγνωσης, κατά 2 φορές. Η αναστολή της σηματοδότησης mTORC2, επίσης, οδήγησε σε αυξημένη μετάφραση και αποσταθεροποίηση του ενδογενούς *c-myc* mRNA. Η αναστολή της δράσης της mTORC2 κινάσης αύξησε τον ρυθμό αποικοδόμησης του ενδογενούς *c-myc* mRNA. Συγκεκριμένα, ο χρόνος ημιζωής του *c-myc* mRNA μειώθηκε κατά 30% με την υπερέκφραση της μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης IMP1 και κατά 32% υπό την παρουσία του αναστολέα Torin1. Αντιθέτως, τα επίπεδα της πρωτεΐνης MYC αυξήθηκαν στις ίδιες συνθήκες. 80% αύξηση παρατηρήθηκε παρουσία του αναστολέα, ενώ η παρουσία της πρωτεΐνης IMP1S181A σχεδόν διπλασίασε τα επίπεδα της πρωτεΐνης MYC. Παρόμοιες μεταβολές παρατηρήθηκαν στα επίπεδα *c-myc* mRNA και πρωτεΐνης όταν η σηματοδότηση της κινάσης mTORC2 αναστάλη σε κύτταρα HeLa. Η IMP1 προκάλεσε την υπερέκφραση της MYC, μέσω της αύξησης της μεταφρασιμότητας του mRNA, απουσία σηματοδότησης της mTORC2 και είχε ως επακόλουθο βλάβη στο DNA των κυττάρων και τελικά απόπτωση.

Έτσι, η σηματοδότηση από τις οδούς Src και mTOR, που στοχεύουν επί της IMP1 μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση της μετάφρασης *c-myc* mRNA, αν και προς διαφορετικές κατευθύνσεις. Η αναστολή της φωσφορυλίωσης της IMP1 στο κατάλοιπο τυροσίνης 396 από την Src κινάση σταθεροποίησε το ενδογενές *c-myc* mRNA, οδήγησε στην προσωρινή "αποθήκευση" των μετάγραφων σε κυτταροπλασματικά κοκκία και κατέστειλε την μετάφραση. Αντίθετα, η αναστολή της φωσφορυλίωσης της IMP1 στο κατάλοιπο σερίνης 181 είχε ως αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα MYC πρωτεΐνης παρά την αποσταθεροποίηση του μηνύματος. Αυτή η αύξηση στην πρωτεΐνη MYC μετά από σαράντα οκτώ ώρες ήταν ικανή να προκαλέσει την απόπτωση κυττάρων. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της

Περίληψη

IMP1 επηρεάζουν την μετα-μεταγραφική πορεία του *c-myc* mRNA και θα μπορούσαν να είναι ένα εργαλείο για τη διαχείριση της έκφρασής του.

Η διαδοχική αναστολή της φωσφορυλίωσης της IMP1 μέσω των δύο οδών, δηλαδή η αναστολή της δράσης της Src κινάσης για 48 ώρες παρουσία Src11 ακολουθούμενη από την έκθεση των κυττάρων στον αναστολέα της σηματοδότησης mTORC2, Torin1, είχε ως αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης τόσο των χιμαιρικών μετάγραφων που φέρουν την αλληλουχία CRD εντός πλαισίου ανάγνωσης όσο και της ενδογενούς MYC, 2,5 φορές και 3 φορές αντίστοιχα. Η αξιοσημείωτη αύξηση των επιπέδων MYC είχε ως αποτέλεσμα απόπτωση στο 44% του κυτταρικού πληθυσμού. Τα δεδομένα απέδειξαν ότι ο πληθυσμός των κυττάρων που ήταν θετικός σε αννεξίνη A5, άρα αποπτωτικός, ταυτιζόταν με αυτόν που είχε αυξημένη έκφραση πρωτεΐνης MYC. Ο μηχανισμός που ενεργοποιήθηκε φάνηκε λοιπόν να δρα ανεξάρτητα της λειτουργικότητας του *p-53* γονιδίου.

Οι επιδράσεις που καταγράφηκαν παρουσία Src11 και / ή Torin1 αναστολέα επί της σταθερότητας και της μετάφρασης του *c-myc* mRNA εξαλείφθηκαν όταν αποσιωπήθηκε η έκφραση της IMP1. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, προέκυψε το συμπέρασμα ότι η αποσιώπηση της πρωτεΐνης IMP1 καθιστά τα κύτταρα πιο ανθεκτικά στην παρουσία του αναστολέα Torin 1. Αυτές οι παρατηρήσεις μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμες στην πρόκληση στοχευμένης απόπτωσης κυττάρων που εκφράζουν *de novo* την ογκοεμβρυική πρωτεΐνη IMP1, χαρακτηριστικό των επιθετικών κακοηθειών.

Τέλος, αξιολογήθηκε η επίδραση της διαδοχικής δράσης των αναστολέων AZD0530, αναστολέα της κινάσης Src, και Torin1, αναστολέα της κινάσης mTOR, σε ξενομοσχεύματα HeLa κυττάρων. Η έκθεση των όγκων στην δράση του αναστολέα AZD0530 δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στον ρυθμό ανάπτυξής τους. Η χορήγηση του αναστολέα Torin1 μείωσε τον ρυθμό ανάπτυξης των όγκων. Όμως, η προηγηθείσα έκθεση των όγκων στον αναστολέα AZD0530 κατέστησε την δράση του Torin1 πιο αποτελεσματική. Ο συνδυασμός των δύο ουσιών οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση του μεγέθους των ξενομοσχευμάτων συγκριτικά με εκείνα που εκτέθηκαν μόνο στην δράση του Torin1 ($p < 0.02$).

Abstract.

Title: Investigation of post-transcriptional regulation of *c-myc* mRNA by RNA binding proteins.

Study of the effect of the phosphorylation status of IMP1 protein through two different signaling pathways upon *c-myc* mRNA translatability.

MYC protein plays diverse roles in a multitude of cellular processes. The cellular proto-oncogene *c-myc* is an important regulator of cell proliferation, growth, differentiation and apoptosis, whose deregulated expression is implicated in carcinogenesis. Numerous studies have shown that *c-myc* exerts its role mostly by modulation of its expression levels. To what extent *c-myc* is expressed matters, and it has been postulated that even small fluctuations in its expression levels may play a crucial role in both the physiological and pathophysiological processes, regulated by this gene. Thus, its expression requires strict regulation on many levels. Fine tuning of its expression is critical for its action and is achieved through several regulatory mechanisms acting at multiple stages, including control of transcription, translation and decay of both mRNA and protein.

Post-transcriptional control plays an important role for *c-myc* regulation at the level of both mRNA stability and translation. Many aspects of these regulatory mechanisms have been elucidated. Initial studies focused mostly upon the control of the *c-myc* mRNA decay by studying the contribution of cis elements and trans factors and their mode of action. The cis and trans elements controlling *c-myc* mRNA translation have also been extensively investigated. The 5'- and 3'-untranslated regions of *c-myc* mRNA play an important role in modulating translatability by interacting with miRNA and RNA binding proteins. Additionally, the *c-myc* mRNA contains a sequence in the coding region, which can affect both stability and translatability. This sequence, the coding region instability determinant (CRD) is the last 249 nucleotides of the coding region of the message. The pausing of the ribosome translation process in the CRD sequence due to the presence of a rare Arginine codon in a threonine adjacent codon creates a region susceptible to endonuclease attack by linking the translation rate to the degradation, unless it is shielded by the CRD-binding protein (CRD-BP or IMP1 or IGF2BP1). It has also been suggested that binding of IMP1 protein can sequester *c-myc* mRNA in untranslated ribonucleoprotein complexes and therefore affects its translation.

In addition to *c-myc* mRNA, IMP1 recognizes a number of other mRNA, binds either to the 5'- or 3'-untranslated regions or their coding region, having a different effect on their

Abstract

post-transcriptional fate. IMP1 is expressed in fetal tissues and *de novo* in an array of malignancies. IMP1 is phosphorylated on Tyrosine 396 by Src kinase and on Serine 181 by mTORC2 kinase, respectively. These post translational modifications are crucial for its effect on the mRNA targets. The ZBP1 ortholog of the IMP1 protein binds to a 54-nt segment in the 3' UTR of β -actin mRNA and suppresses its translation while mediating its translocation to the cell periphery. There, cSrc-catalyzed phosphorylation of ZBP1[Tyr396], causes release of the β -actin mRNA, enabling its localized translation. In addition IMP1 is phosphorylated at Ser 181 cotranslationally by mTORC2 complex. These phosphorylation is required for IMP1 binding to the IGF2-L3 5' UTR and translational initiation by internal ribosome entry. In this study the possible effect of these post translational modifications upon the expression of *c-myc* mRNA was investigated.

The possible effect of IMP1 phosphorylation on Tyr 396 residue by Src kinase, upon the stability and translation of *c-myc* mRNA, was investigated. Chimaeric plasmid luciferase constructs having the *c-myc* CRD in frame, were co-transfected with plasmids expressing the wild-type IMP1 protein or its mutated counterpart (IMP1 Y396F). Wild type IMP1 reduced translatability by 20% whereas the over-expression of the mutated protein by 35%. The translatability of chimaeric constructs carrying the *c-myc* CRD element was reduced by 35 % in the presence of Src inhibitor (SrcI1) even though the corresponding mRNA levels increased. Inhibition of Src pathway in the presence of wild type IMP1 further reduced the translatability of the chimaeric construct. On the contrary, the addition of Src kinase inhibitor did not affect the translatability of the chimaeric mRNA in the cells over -expressing mutated IMP1. IMP1 (Y396F) or the wild type IMP1, in the presence of Src inhibitor, were localized in cytoplasmic granules. Under the above conditions the endogenous *c-myc* mRNA was stabilized albeit not translated suggesting that in the absence of Src signaling, IMP1 stores *c-myc* mRNA in cytoplasmic granules. Removal of SrcI1 resulted in marked increase of translatability of both chimaeric transcripts and the endogenous *c-myc* mRNA. Increasing the MYC protein resulted in an increase in the rate of cell proliferation.

Unlike the results of the Src signalling pathway inhibition, the presence of mTORC2 kinase inhibitor (Torin1) increased the activity of chimaeric transcripts by 50%, even though they were destabilized. Similar results were obtained upon transfection with the mutated counterpart of IMP1 on Ser 181 residue (IMP1S181A). The over-expression of the mutant form of the protein resulted in enhanced translation of the transcripts carrying the CRD sequence in frame by 2 fold. The repression of mTORC2 signalling, also, resulted in enhanced translation and destabilization of the endogenous *c-myc* mRNA. Inhibition of mTORC2 kinase

activity increased the degradation rate of endogenous *c-myc* mRNA. In particular, the half-life of *c-myc* mRNA was reduced by 30% in the presence of the mutant form of the protein and by 32% in the presence of the Torin1 inhibitor. On the contrary, MYC levels were elevated in the same conditions. 80% increase was observed in the presence of the Torin1 inhibitor, while the presence of the IMP1S181A protein almost doubled the levels of the MYC protein. Similar effects were observed in *c-myc* mRNA and protein levels when mTORC2 kinase signaling was inhibited in HeLa cells. IMP1 induced *c-MYC* over expression through increase in mRNA translatability in the absence of mTORC2 signaling and subsequent DNA damage and finally apoptosis.

Thus, signaling by Src and mTOR pathways, targeting IMP1 may be implicated in the regulation of *c-myc* mRNA translation albeit towards different directions. The inhibition of the phosphorylation of IMP1 on tyrosine 396 residue from Src kinase stabilized the endogenous *c-myc* mRNA, led to the temporary "storage" of the transcripts in cytoplasmic granules and suppressed translation. In contrast, inhibition of phosphorylation of IMP1 on serine 181 residue resulted in increased levels of MYC protein despite the destabilization of the mRNA. The increase in MYC protein levels was able to induce cell apoptosis. Post-translational modifications of IMP1 affect the post-transcriptional fate of *c-myc* mRNA and could be a tool for managing its expression.

Sequential inhibition of IMP1 phosphorylation via the two pathways, i.e inhibition of the Src kinase for 48 hours in the presence of Src11 followed by exposure of cells to the inhibitor of mTORC2 signalling, Torin1, resulted in increased protein levels of both chimaeric transcripts carrying the CRD element in frame and the endogenous MYC, 2.5-fold and 3 fold respectively. The marked increase in MYC levels had as a consequence apoptosis of 44% of the cell population. The data demonstrate that the cell population that was positive for annexin A5, thus apoptotic, coincides with the one having increased expression of MYC protein. Furthermore, the mechanism that is activated seemed to act independently of the function of the p-53 gene.

The effects recorded by either Src11 and/or Torin1 inhibitor treatment upon *c-myc* mRNA stability and translation were obscured when IMP1 was silenced. According to the results, it was concluded that silencing the IMP1 protein makes the cells more resistant to the presence of the Torin 1 inhibitor. These observations may prove to be useful in causing targeted apoptosis of cells expressing de novo the oncofetal protein IMP1, a characteristic of aggressive malignancies.

Abstract

Finally, the effect of the sequential action of AZD0530 inhibitor, a Src kinase inhibitor, and Torin1, a mTOR kinase inhibitor, on HeLa cell xenografts was evaluated. Exposure of tumors to the action of AZD0530 inhibitor did not cause any change in their growth rate. Administration of the Torin1 inhibitor reduced the tumor growth rate. The preceding exposure of the cells to the AZD0530 inhibitor rendered the effect of Torin1 more effective. The combination of the two substances resulted in statistically significant reduction in xenograft size compared to those exposed only to Torin1 ($p < 0.02$).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφία

- Abdullah C, Korkaya H, Iizuka S, Courtneidge SA. 2017. SRC increases MYC mRNA expression in ER+ breast cancer via mRNA stabilization and inhibition of p53 function. *Mol Cell Biol*.
- Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. 2006. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull*.29:903-906.
- Allain FH, Gubser CC, Howe PW, Nagai K, Neuhaus D, Varani G. 1996. Specificity of ribonucleoprotein interaction determined by RNA folding during complex formulation. *Nature*. 380:646–650.
- Arvatz G., Barash U., Nativ O., Ilan N., Vlodaysky I. 2015. Post-transcriptional regulation of heparanase gene expression by a 3' AU-rich element. *FASEB J*. 24:4969–4976.
- Atlas R, Behar L, Elliott E, Ginzburg I. 2004. The insulin-like growth factor mRNA binding-protein IMP-1 and the Ras-regulatory protein G3BP associate with tau mRNA and HuD protein in differentiated P19 neuronal cells. *J Neurochem*.89:613-26.
- Bahram F, von der Lehr N, Cetinkaya C, Larsson LG. 2000. c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover. *Blood*. 95:2104-2110.
- Balzeau J, Menezes MR, Cao S, Hagan JP. 2017. The LIN28/let-7 Pathway in Cancer. *Front Genet*. 8:31.
- Barone MV, Courtneidge SA. 1995. Myc but not Fos rescue of PDGF signalling block caused by kinase-inactive Src. *Nature*.378:509-512.
- Bartel D. P. 2009. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 136: 215–233.
- Beer S, Zetterberg A, Ijri RA, McTaggart RA, Yang Q, Bradon N, Arvanitis C, Attardi LD, Feng S, Ruebner B. 2004. Developmental context determines latency of MYC-induced tumorigenesis. *PLoS Biol* 2: e332.
- Bell JL, Wachter K, Muhleck B, Pazaitis N, Kohn M, Lederer M, Hüttelmaier S. 2013. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression? *Cell Mol Life Sci* 70: 2657–2675.
- Bentley DL, Groudine M. 1986. A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells. *Nature*. 321:702-706.
- Bernstein P.L., Herrick D.J., Prokipcak R.D, Ross, J. 1992. Control of c-myc mRNA half-life in vitro by a protein capable of binding to a coding region stability determinant. *Genes Dev*. 6, 642-654.
- Bley N, Lederer M, Pfalz B, Reinke C, Fuchs T, Glaß M, Möller B, Hüttelmaier S. 2015. Stress granules are dispensable for mRNA stabilization during cellular stress. *Nucleic Acids Res*.43
- Boyerinas B, Park SM, Shomron N, Hedegaard MM, Vinther J, Andersen JS, Feig C, Xu J, Burge CB, Peter ME. 2008. Identification of let-7-regulated oncofetal genes. *Cancer Res*. 68:2587-2591.
- Bretones G, Delgado MD, León J, 2015, Myc and cell cycle control, *Biochim Biophys Acta*., 1849:506-516.
- Brewer G, Sacconi S, Sarkar S, Lewis A, Pestka S. 2003. Increased interleukin-10 mRNA stability in melanoma cells is associated with decreased levels of A + U-rich element binding factor AUF1. *J Interferon Cytokine Res*. 23:553-564.

- Brewer G. 1991. An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol.* 11:2460-2466.
- Brosh R, Rotter V. 2009. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer.*9:701-713.
- Busch B, Bley N, Müller S, Glaß M, Misiak D, Lederer M, Vetter M, Strauß HG, Thomssen C, Hüttelmaier S. 2016. The oncogenic triangle of HMGA2, LIN28B and IGF2BP1 antagonizes tumor-suppressive actions of the let-7 family. *Nucleic Acids Res.* 44:3845-3864.
- Castellano LA, Bazzini AA. 2017. Poly(A) tails: longer is not always better. *Nat Struct Mol Biol.*,24:1010-1011.
- Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang CV, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT. 2008. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet.*40:43-50.
- Chao JA, Patskovsky Y, Patel V, Levy M, Almo SC, Singer RH. 2010. ZBP1 recognition of beta-actin zipcode induces RNA looping. *Genes Dev.* 24:148-158.
- Chappell SA, LeQuesne JP, Paulin FE, deSchoolmeester ML, Stoneley M, Soutar RL, Ralston SH, Helfrich MH, Willis AE. 2000. A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: a novel mechanism of oncogene deregulation. *Oncogene.*;19:4437-40.
- Chatterji P, Rustgi AK. 2018. RNA Binding Proteins in Intestinal Epithelial Biology and Colorectal Cancer. *Trends Mol Med.*24:490-506.
- Chen H, Liu H, Qing G. 2018. Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther.* 3:5.
- Chen M, Manley J L. 2009. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol.*10: 741–754.
- Clynen I, Brants JR, Peeters K, Deckers R, Debiec-Rychter M, Sciot R, Van de Ven WJ, Petit MM. 2007. HMGA2 regulates transcription of the Imp2 gene via an intronic regulatory element in cooperation with nuclear factor- κ B. *Mol Cancer Res* 5: 363–372.
- Conway AE, Van Nostrand EL, Pratt GA, Aigner S, Wilbert ML, Sundararaman B, Freese P, Lambert NJ, Sathe S, Liang TY, Essex A, Landais S, Burge CB, Jones DL, Yeo GW. 2016. Enhanced CLIP Uncovers IMP Protein-RNA Targets in Human Pluripotent Stem Cells Important for Cell Adhesion and Survival. *Cell Rep.* 15:666-679.
- Dai N, Christiansen J, Nielsen FC, Avruch J. 2013. mTOR complex 2 phosphorylates IMP1 cotranslationally to promote IGF2 production and the proliferation of mouse embryonic fibroblasts. *Genes Dev.* 27: 301–312.
- Dang CV, Le A, Gao P. 2009. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res.* 15:6479–6483.
- Dang CV. 2012. MYC on the Path to Cancer. *Cell.* 149:22-35.
- Decker CJ, Parker R. 2012. P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*4.
- Degrauwe N, Suvà ML, Janiszewska M, Riggi N, Stamenkovic I. 2016. IMPs: an RNA-binding protein family that provides a link between stem cell maintenance in normal development and cancer. *Genes Dev.* 30:2459-2474.

Βιβλιογραφία

- Dever TE, Green R. 2012. The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*4.
- Dimitriadis E, Trangas T, Milatos S, Foukas PG, Gioulbasanis I, Curtis N, Nielsen FC, Pandis N, Dafni U, Bardi G, Ioannidis P. 2007. Expression of oncofetal RNA-binding protein CRD-BP/IMP1 predicts clinical outcome in colon cancer. *Int J Cancer.*121:486-494.
- Doyle GA, Betz NA, Leeds PF, Fleisig AJ, Prokipcak RD, Ross J. 1998. The c-myc coding region determinant-binding protein: a member of a family of KH domain RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* 26: 5036–5044.
- Dudley JP, Mertz JA, Rajan L, Lozano M, Broussard DR. 2002. What retroviruses teach us about the involvement of c-Myc in leukemias and lymphomas *Leukemia.*,16:1086-1098.
- Facchini LM, Chen S, Marhin WW, Lear JN, Penn LZ. The Myc negative autoregulation mechanism requires Myc-Max association and involves the c-myc P2 minimal promoter. *Mol Cell Biol.* 1997;17:100–114.
- Felicite K. Noubissi, Mikhail A. Nikiforov, Nancy Colburn, Vladimir S. Spiegelman. 2010. Transcriptional Regulation of CRD-BP by c-myc. Implications for c-myc Functions. *Genes Cancer.* 1: 1074–1082.
- Frances M. Gratacós, Gary Brewer. 2010. The role of AUF1 in regulated mRNA decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 1: 457–473.
- Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, Dreyfuss G. 2008. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* 582:1977-1986.
- Green DR 1997. A Myc-induced apoptosis pathway surfaces. *Science* 278: 1246–1247
- Green DR. 1997. A Myc-induced apoptosis pathway surfaces. *Science* 278: 1246–1247
- Grinberg AV, Hu CD, Kerppola TK, 2004, Visualization of Myc/Max/Mad Family Dimers and the Competition for Dimerization in Living Cells *Mol Cell Biol*, 24:4294-4308.
- Gu W, Wells AL, Pan F, Singer RH. 2008. Feedback regulation between zipcode binding protein 1 and β -catenin mRNAs in breast cancer cells. *Mol Cell Biol*,28: 4963–4974.
- Gucalp A, Sparano JA, Caravelli J, Santamauro J, Patil S, Abbruzzi A, Pellegrino C, Bromberg J, Dang C, Theodoulou M, Massague J, Norton L, Hudis C, Traina TA. 2011. Phase II trial of saracatinib (AZD0530), an oral SRC-inhibitor for the treatment of patients with hormone receptor-negative metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer.*11:306-311.
- Guertin DA, Stevens DM, Saitoh M, Kinkel S, Crosby K, Sheen JH, Mullholland DJ, Magnuson MA, Wu H, Sabatini DM. 2009. mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice. *Cancer Cell* 15: 148–159.
- Guney I, Wu S, Sedivy JM. 2006. Reduced c-Myc signaling triggers telomere-independent senescence by regulating Bmi-1 and p16^{INK4a}. *Proc Natl Acad Sci* 103: 3645–3650.
- Gutschner T, Hämmerle M, Pazaitis N, Bley N, Fiskin E, Uckelmann H, Heim A, Groß M, Hofmann N, Geffers R, Skawran B, Longerich T, Breuhahn K, Schirmacher P, Mühleck B, Hüttelmaier S, Diederichs S. 2014. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1) is an important protumorigenic factor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.*59:1900-1911.
- Habelhah H, Shah K, Huang L, Ostareck-Lederer A, Burlingame AL, Shokat KM, Hentze MW, Ronai Z. 2001. ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nat Cell Biol.* 3:325-330.

- Hafner M, Landthaler M, Burger L, Khorshid M, Hausser J, Berninger P, Rothballer A, Ascano M Jr, Jungkamp AC, Munschauer M, Ulrich A, Wardle GS, Dewell S, Zavolan M, Tuschl T. 2010. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*. 141:129-141.
- Haissaguerre M, Saucisse N, Cota D. 2014. Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis. *Mol Cell Endocrinol*. 397:67-77.
- Hamilton KE, Noubissi FK, Katti PS, Hahn CM, Davey SR, Lundsmith ET, Klein-Szanto AJ, Rhim AD, Spiegelman VS, Rustgi AK. 2013. IMP1 promotes tumor growth, dissemination and a tumor-initiating cell phenotype in colorectal cancer cell xenografts. *Carcinogenesis*. 34(11):2647-2654.
- Hann SR. 2006. Role of post-translational modifications in regulating c-Myc proteolysis, transcriptional activity and biological function. *Semin Cancer Biol*. 16:288-302.
Ανασκότηση
- Hansen TV, Hammer NA, Nielsen J, Madsen M, Dalbaeck C, Wewer UM, Christiansen J, Nielsen FC. 2004. Dwarfism and impaired gut development in insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 24:4448-4464.
- Herrmann M, Lorenz HM, Voll R, Grünke M, Woith W, Kalden JR. 1994. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Res*. 22:5506-5507.
- Hosono Y, Niknafs YS, Prensner JR, Iyer MK, Dhanasekaran SM, Mehra R. 2017. Oncogenic role of THOR, a conserved cancer/testis long non-coding RNA. *Cell*.;171:1559-1572.
- Hu W, Collier J. 2012. What comes first: translational repression or mRNA degradation? The deepening mystery of microRNA function. *Cell Res*. 22:1322-1324.
- Huang H, Weng H, Sun W, Qin X, Shi H, Wu H, Zhao BS, Mesquita A¹, Liu C, Yuan CL, Hu YC, Hüttelmaier S, Skibbe JR, Su R, Deng X, Dong L, Sun M, Li C, Nachtergaele S, Wang Y, Hu C, Ferchen K¹, Greis KD¹, Jiang X, Wei M, Qu L, Guan JL, He C, Yang J, Chen J. 2018. Recognition of RNA N⁶-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nat Cell Biol*. 20:285-295.
- Huang X, Zhang H, Guo X, Zhu Z, Cai H, Kong X. 2018. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1) in cancer. *J Hematol Oncol*. 11:88.
- Hung CM, Garcia-Haro L, Sparks CA, Guertin DA. 2012. mTOR-dependent cell survival mechanisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4: 008771.
- Hunter T. Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21:140-146.
- Hurlin P J. 2013. Control of Vertebrate Development by MYC. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 3.
- Hüttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dichtenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH. 2005. Spatial regulation of β -actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature*. 438: 512-515.
- Hutvagner G, Zamore PD. 2002. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 297:2056-2060.
- Iavarone A, Lasorella A. 2014. Myc and differentiation: going against the current. *EMBO Rep*. 15:324-325.

Βιβλιογραφία

- Ioannidis P, Curtis N, Havredaki M, Michailakis E, Tsiapalis CM, Trangas T. 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, Curtis N, Trangas T. 1996. In vivo generation of 3' and 5' truncated species in the process of c-myc mRNA decay. *Nucleic Acids Res.* 24:4969-4977.
- Ioannidis P, Mahaira LG, Perez SA, Gritzapis AD, Sotiropoulou PA, Kavalakis GJ, Antsaklis AI, Baxevas CN, Papamichail M. 2005. CRD-BP/IMP1 expression characterizes cord blood CD34+ stem cells and affects c-myc and IGF-II expression in MCF-7 cancer cells. *J Biol Chem.*280:20089-20093.
- Ioannidis P, Trangas T, Dimitriadis E, Samiotaki M, Kyriazoglou I, Tsiapalis CM, Kittas C, Agnantis N, Nielsen FC, Nielsen J, Christiansen J, Pandis N. 2001. C-MYC and IGF-II mRNA-binding protein (CRD-BP/IMP-1) in benign and malignant mesenchymal tumors. *Int J Cancer.*94:480-484.
- Ioannidis, P., Mahaira, L., Papadopoulou, A., Teixeira, M. R., Heim, S., Andersen, J. A., Evangelou, E., Dafni, U., Pandis, N., Trangas, T. 2003. CRD-BP: a c-Myc mRNA stabilizing protein with an oncofetal pattern of expression. *Anticancer Res.*23, 2179-2183.
- Irina Elcheva, Srikantha Goswami, Felicite K. Noubissi, Vladimir S. Spiegelman. 2009. CRD-BP protects the coding region of β TrCP1 mRNA from miR-183-mediated degradation. *Mol Cell.*; 35: 240–246.
- Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:113-127.
- Jackstadt R, Hermeking H. 2015. MicroRNAs as regulators and mediators of c-MYC function. *Biochim Biophys Acta.*;1849:544-53.
- Jacobs JJ, Scheijen B, Voncken JW, Kieboom K, Berns A, van Lohuizen M. 1999. Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev.* 13: 2678–2690.
- Jagruiti H. Patel, Andrey P. Loboda, Michael K. Showe, Louise C. Showe & Steven B. McMahon, 2004, Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC, *Nature Reviews Cancer*, 4: 562–568.
- Jain S, Wang X, Chang CC, Ibarra-Drendall C, Wang H, Zhang Q, Brady SW, Li P¹, Zhao H, Dobbs J, Kyrish M, Tkaczyk TS, Ambrose A, Sistrunk C, Arun BK, Richards-Kortum R, Jia W, Seewaldt VL, Yu D. 2015. Src Inhibition Blocks c-Myc Translation and Glucose Metabolism to Prevent the Development of Breast Cancer. *Cancer Res.* 75: 4863–4875.
- Jones RM, Branda J, Johnston KA, Polymenis M, Gadd M, Rustgi A, Callanan L, Schmidt EV. 1996. An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c-myc. *Mol Cell Biol.* 16:4754-4764.
- Jonson L, Vikesaa J, Krogh A, Nielsen LK, Hansen T, Borup R, Johnsen AH, Christiansen J, Nielsen FC. 2007. Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules. *Mol Cell Proteomics* 6: 798–811.
- Juin P, Hunt A, Littlewood T, Griffiths B, Swigart LB, Korsmeyer S, Evan G. 2002. c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol Cell Biol.* 22:6158-6169.

- Julien LA , Carriere A, Moreau J, Roux PP. 2010. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol.*30(4):908-921.
- Kalkat M, De Melo J, Hickman K A, Lourenco C, Redel C, Resetca D, Tamachi A, Tu W B, Penn L Z. 2017. MYC Dereglulation in Primary Human Cancers. *Genes (Basel).*8: 151.
- Kedersha N , Anderson P. 2007. Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol.* 431:61-81.
- Kennedy B K , Lamming D W. 2016. The mechanistic Target of Rapamycin: The grand conducTOR of metabolism and aging. *Cell Metab.* 23: 990–1003.
- Kiaei A ,Onsori H, Alijani A, Andalib S , Ghorbian S, Sakhinia E.2016. Detection of t(8;14) c-myc/IgH gene rearrangement by long-distance polymerase chain reaction in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.*9:141-146.
- Kim H.H, Kuwano Y., Srikantan S., Lee E.K., Martindale J.L.,Gorospa M. 2009. HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev.* 23, 1743-1748.
- Kim JH, Kim TD, Hahm B, Kim KT, Jang SK. 2003. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C modulates translation of c-myc mRNA in a cell cycle phase-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* 23, 708-720.
- Kim JW , Gao P, Liu YC, Semenza GL, Dang CV. 2007. Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol Cell Biol.* 27:7381-7393.
- Köbel M, Weidensdorfer D, Reinke C, Lederer M, Schmitt WD, Zeng K, Thomssen C, Hauptmann S, Hüttelmaier S. 2007. Expression of the RNA-binding protein IMP1 correlates with poor prognosis in ovarian carcinoma. *Oncogene.*26:7584-7589.
- Komar AA, Hatzoglou M. 2011. Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle.*10:229-240.
- Kopecky B, Fritsch B. 2012. The myc road to hearing restoration. *Cells.*1:667-698.
- Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR. 2009. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell.* 137:1005–1017.
- Krumm A., Meulia T., Brunvard M., Groudine M., 1992. The block to transcriptional elongation within the human c-Myc gene is determined in the promoter-proximal region, *Genes and Development*, 6: 2201-2213.
- Lal A , Navarro F, Maher CA, Maliszewski LE, Yan N, O'Day E, Chowdhury D, Dykxhoorn DM, Tsai P, Hofmann O, Becker KG, Gorospa M, Hide W, Lieberman J. miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements. *Mol Cell.* 35: 610–625.
- Lee JY ,Lee TH. 2012. Effects of DNA methylation on the structure of nucleosomes. *J Am Chem Soc.* 134:173-175.
- Lee M J, Ye A. S, Gardino A K, Heijink A M, Sorger P K , MacBeath G, Yaffe MB. 2012. Sequential Application of Anti-Cancer Drugs Enhances Cell Death by Re-wiring Apoptotic Signaling Networks. *Cell.*149:780–794.
- Lemm I, Ross J. 2002. Regulation of c-myc mRNA decay by translational pausing in a coding region instability determinant. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3959-3969.

Βιβλιογραφία

- Levens D. 2010. You Don't Muck with MYC. *Genes Cancer*.1:547–554.
- Levens D. 2013. Cellular MYC Economics: Balancing MYC Function with MYC Expression. *Cold Spring Harb Perspect Med.*; 3.
- Li F, Wang Y, Zeller KI, Potter JJ, Wonsey DR, O'Donnell KA. 2005. Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol*. 25:6225–6234.
- Liao B, Hu Y, Brewer G. 2007. Competitive binding of AUF1 and TIAR to MYC mRNA controls its translation. *Nat Struct Mol Biol*. 14:511-518.
- Lima SA, Chipman LB¹, Nicholson AL, Chen YH², Yee BA, Yeo GW, Collier J², Pasquinelli AE. 2017. Short poly(A) tails are a conserved feature of highly expressed genes. *Nat Struct Mol Biol*. 24:1057-1063.
- Lima SA, Chipman LB, Nicholson AL, Chen YH, Yee BA, Yeo GW, Collier J, Pasquinelli AE. 2017. Short poly(A) tails are a conserved feature of highly expressed genes. *Nat Struct Mol Biol*. 24:1057-1063.
- Liu J, Levens D 2006. Making myc. *Curr Top Microbiol Immunol* 302: 1–32.
- Liu P, Gan W, Inuzuka H, Lazorchak AS, Gao D, Arojo O, Liu D, Wan L, Zhai B, Yu Y, Yuan M, Kim BM, Shaik S, Menon S, Gygi SP, Lee TH, Asara JM, Manning BD, Blenis J, Su B, Wei W. 2013. Sin1 phosphorylation impairs mTORC2 complex integrity and inhibits downstream Akt signalling to suppress tumorigenesis. *Nat Cell Biol*. 15:1340-1350.
- Liu Q, Chang JW, Wang J, Kang SA, Thoreen CC, Markhard A, Hur W, Zhang J, Sim T, Sabatini DM, Gray NS. 2010. Discovery of 1-(4-(4-propionylpiperazin-1-yl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-9-(quinolin-3-yl)benzo[h][1,6]naphthyridin-2(1H)-one as a highly potent, selective Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) inhibitor for the treatment of cancer. *J Med Chem*. 53: 7146–7155.
- Liu X, Tesfai J, Evrard YA, Dent SY, Martinez E. 2003. c-Myc transformation domain recruits the human STAGA complex and requires TRRAP and GCN5 acetylase activity for transcription activation. *J Biol Chem*. 278:20405-20412.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods*. 25:402-408.
- Lowe SW, Cepero E, Evan G. 2004. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 432:307-315.
- Lunde BM, Moore C, Varani G. 2007. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:479-90.
- Luo Q, Li J, Cenkci B, Kretzner L. 2004. Autorepression of c-myc requires both initiator and E2F-binding site elements and cooperation with the p107 gene product. *Oncogene*. 23:1088-1097.
- Mahapatra L, Andruska N, Mao C, Le J, Shapiro DJ. 2017. A Novel IMP1 Inhibitor, BTYNB, Targets c-Myc and Inhibits Melanoma and Ovarian Cancer Cell Proliferation. *Transl Oncol*. 10:818-827.
- Marcu K. B., Bossone S. A., Patel A. J., 1992. Myc function and regulation, *Annu. Rev. Biochem*, 61: 809-860.
- McGuffie EM, Pacheco D, Carbone GM, Catapano CV. 2000. Antigenic and antiproliferative effects of a c-myc-targeting phosphorothioate triple helix-forming oligonucleotide in human leukemia cells. *Cancer Res*. 60:3790-3799.

- Meristoudis C ,Trangas T ,Lambrianidou A ,Papadopoulos V , Dimitriadis E ,Courtis N, Ioannidis P .2015.Systematic analysis of the contribution of c-myc mRNA constituents upon cap and IRES mediated translation. *Biological Chemistry*, 396:1301-1313.
- Meyer N, Penn LZ. 2008. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer* 8: 976–990.
- Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. .2002.Untranslated regions of mRNAs .*Genome Biol*,3.
- Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. 2012.c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res*. 18:5546-5553.
- Mitchell KO, Ricci MS, Miyashita T, Dicker DT, Jin Z, Reed JC, El-Deiry WS. 2000. Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. *Cancer Res*.60:6318-6325
- Mitchell SF,Parker R. 2014.Principles and properties of eukaryotic mRNPs.*Mol Cell*. 54:547-58.
- Mongroo PS , Noubissi FK, Cuatrecasas M, Kalabis J, King CE, Johnstone CN, Bowser MJ, Castells A, Spiegelman VS,Rustgi AK. 2011.IMP-1 displays cross-talk with K-Ras and modulates colon cancer cell survival through the novel proapoptotic protein CYFIP2. *Cancer Res*.;71:2172-82.
- Morishita A , Zaidi MR, Mitoro A, Sankarasharma D, Szabolcs M, Okada Y, D'Armiento J, Chada K. 2013. HMGA2 is a driver of tumor metastasis. *Cancer Res*. 73:4289-4299.
- Morrish F, Noonan J, Perez-Olsen C, Gafken PR, Fitzgibbon M, Kelleher J. 2010. Myc-dependent mitochondrial generation of acetyl-CoA contributes to fatty acid biosynthesis and histone acetylation during cell cycle entry. *J Biol Chem*. 285:36267–36274.
- Müller S ,Bley N ,Glaß M,Busch B ,Rousseau V, Misiak D,Fuchs T, Lederer M, Hüttelmaier S. 2018. IGF2BP1 enhances an aggressive tumor cell phenotype by impairing miRNA-directed downregulation of oncogenic factors. *Nucleic Acids Res*. 46:6285-6303.
- Nadine Stöhr, Marcel Köhn, Marcell Lederer, Markus Glaß, Claudia Reinke, Robert H. Singer,Stefan Hüttelmaier.2012.IGF2BP1 promotes cell migration by regulating MK5 and PTEN signaling. *Genes Dev*. 26: 176–189.
- Nguyen L,Papenhausen P,Shao H. 2017. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. *Genes (Basel)*.8.
- Nielsen J , Kristensen MA, Willemoës M, Nielsen FC, Christiansen J. 2004. Sequential dimerization of human zipcode-binding protein IMP1 on RNA: a cooperative mechanism providing RNP stability. *Nucleic Acids Res*. 32:4368-4376.
- Nielsen J, Christiansen J, Lykke-Andersen J, Johnsen AH, Wewer UM, Nielsen FC. 1999. A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development.*Mol Cell Biol*. 19:1262–1270.
- Nishino J, Kim S, Zhu Y, Zhu H, Morrison SJ. 2013. A network of heterochronic genes including Imp1 regulates temporal changes in stem cell properties. *Elife* 2: e00924.
- Noguchi K, Kitanaka C, Yamana H, Kokubu A, Mochizuki T, Kuchino Y.1999. Regulation of c-Myc through phosphorylation at Ser-62 and Ser-71 by c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem*. 274:32580-32587.
- Noubissi FK, Elcheva I, Bhatia N, Shakoory A, Ougolkov A, Liu J, Minamoto T, Ross J, Fuchs SY, Spiegelman VS. 2006. CRD-BP mediates stabilization of betaTrCP1 and c-myc mRNA in response to beta-catenin signalling. *Nature*. 441:898-901.

Βιβλιογραφία

- Noubissi FK, Nikiforov MA, Colburn N, Spiegelman VS. 2010. Transcriptional regulation of CRD-BP by c-myc: implications for c-myc functions. *Genes Cancer*. 1: 1074–1082.
- Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Cans C, Neubauer G, Bomsztyk K, Superti-Furga G, Hentze MW. 2002. c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Mol Cell Biol*. (13):4535-4543.
- Pain, V.M. 1996. Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem*. 236: 747–771.
- Park S, Chung S, Kim KM, Jung KC, Park C, Hahm ER, Yang CH 2004. Determination of binding constant of transcription factor myc-max/max-max and E-box DNA: The effect of inhibitors on the binding. *Biochim Biophys Acta* 1670: 217–228.
- Parsons SJ, Parsons JT. 2004. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*. 23:7906-7909.
- Patel JH, Loboda AP, Showe MK, Showe LC, McMahon SB. 2004. Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nat Rev Cancer*. 4:562-568.
- Pawson T, Nash P. 2003. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science*. 300:445–452.
- Pelengaris S, Khan M, Evan G. 2002. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer*. 2:764-776.
- Peter M, Rosty C, Couturier J, Radvanyi F, Teshima H, Sastre-Garau X. 2006. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene*.;25:5985-93
- Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM. 2009. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*. 137:873-886.
- Poliseno L, Salmena L, Riccardi L, Fornari A, Song MS, Hobbs RM, Sportoletti P, Varmeh S, Egia A, Fedele G, Rameh L, Loda M, Pandolfi PP. 2010. Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation. *Sci Signal*. 3.
- Prabakaran S, Lippens G, Steen H, Gunawardena J. 2012. Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 4:565-583.
- Ray D, Kazan H, Cook KB, Weirauch MT, Najafabadi HS, Li X, Gueroussov S, Albu M, Zheng H, Yang A, Na H, Irimia M, Matzat LH, Dale RK, Smith SA, Yarosh CA, Kelly SM, Nabet B, Mecnas D, Li W, Laishram RS, Qiao M, Lipshitz HD, Piano F, Corbett AH, Carstens RP, Frey BJ, Anderson RA, Lynch KW, Penalva LO, Lei EP, Fraser AG, Blencowe BJ, Morris QD, Hughes TR. 2013. A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature*. 499: 172–177.
- Rebucci M, Sermeus A, Leonard E, Delaive E, Dieu M, Fransolet M. 2015. miRNA-196b inhibits cell proliferation and induces apoptosis in HepG2 cells by targeting IGF2BP1. *Mol Cancer*. 14:79.
- Rennoll S, Yochum G. 2015. Regulation of MYC gene expression by aberrant Wnt/ β -catenin signaling in colorectal cancer. *World J Biol Chem*. 6:290-300.
- Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, Petrelli NJ, Dunn SP, Krueger LJ. 2007. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res*.;67:9762-70.

- Schmitt CA, Lowe SW 2001. Bcl-2 mediates chemoresistance in matched pairs of primary Eμ-myclymphomas in vivo. *Blood Cells Mol Dis.* 27: 206–216
- Schmitt CA, Lowe SW. 2001. Bcl-2 mediates chemoresistance in matched pairs of primary Eμ-myclymphomas in vivo. *Blood Cells Mol Dis.* 27: 206–216
- Seo HR, Kim J, Bae S, Soh JW, Lee YS. 2008. Cdk5-mediated phosphorylation of c-Myc on Ser-62 is essential in transcriptional activation of cyclin B1 by cyclin G1. *J Biol Chem.* 283:15601–15610.
- Sever R, Brugge JS. 2015. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 5
- Sharrard R.M, Royds J.A, Rogers S, Shorthouse A.J. 1992. Patterns of methylation of the c-myc gene in human colorectal cancer progression. *Br J Cancer.* 65(5): 667–672.
- Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV. 1997. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:6658–6663.
- Silke J, Meier P. 2013. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5.
- Spencer CA, Groudine M. 1991. Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res.* 56:1-48.
- Srikantan S, Tominaga K, Gorospe M. 2012. Functional interplay between RNA-binding protein HuR and microRNAs. *Curr Protein Pept Sci.* 13: 372–379.
- Steven B. McMahon. 2014. MYC and the Control of Apoptosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 4.
- Stoneley, M., Chappell, S.A., Jopling, C.L., Dickens, M., MacFarlane, M. and Willis, A.E. 2000. c-Myc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1162-1169.
- Stuttfield E, Aylett CH, Imseng S, Boehringer D, Scaiola A, Sauer E, Hall MN, Maier T, Ban N. 2018. Architecture of the human mTORC2 core complex. *Elife.*
- Subkhankulova T, Mitchell S.A, Willis A.E. 2001. Internal ribosome entry segment-mediated initiation of c-Myc protein synthesis following genotoxic stress. *Biochem. J.* 359, 183–192.
- Subramanian A, Miller DM. 2000. Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene. *J Biol Chem.* 275:5958–5965.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126:663-676.
- Tessier C. R, Doyle G. A, Clark B.A, Pitot H.C, Ross J. 2004. Mammary tumor induction in transgenic mice expressing an RNA-binding protein. *Cancer Res.* 64, 209-214.
- Thoma C, Fraterman S, Gentzel M, Wilm M, Hentze MW. 2008. Translation initiation by the c-myc mRNA internal ribosome entry sequence and the poly(A) tail. *J Biol Chem.* 283:1579-1589.
- Tourrière H, Gallouzi IE, Chebli K, Capony JP, Mouaikel J, van der Geer P, Tazi J. 2001. RasGAP-associated endoribonuclease G3Bp: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization. *Mol Cell Biol.* 21:7747-7760.

Βιβλιογραφία

- Trumpp A, Refaeli Y, Oskarsson T, Gasser S, Murphy M, Martin GR, Bishop JM. 2001. c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size. *Nature* 414: 768–773.
- Tsujiuchi T, Tsutsumi M, Sasaki Y, Takahama M and Konishi Y. 1999. Hypomethylation of CpG sites and c-myc gene overexpression in hepatocellular carcinomas, but not hyperplastic nodules, induced by a cholinedeficient L-amino acid-defined diet in rats. *Jpn J Cancer Res.* 90: 909–913.
- Tyers M, Mann M. 2003. From genomics to proteomics. *Nature.* 422:193-197.
- Urbanska A.S., Kaminska A.J, Switon K., Hawthorne A. L.,M.Perycz,Urbanska M., Bassell G.J.,Jaworski J.2017. ZBP1 phosphorylation at serine 181 regulates its dendritic transport and the development of dendritic trees of hippocampal neurons. *Sci Rep.*7:1876.
- Van Der Kelen K, Beyaert R, Inze D, De Veylder L. 2009. Translational control of eukaryotic gene expression. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.*4:143–168.
- Ventura A, Jacks T. 2009. miRNAs and Cancer: a little RNA goes a long way. *Cell.* 136:586–591.
- Wachter K, Kohn M, Stohr N, Hüttelmaier S. 2013. Subcellular localization and RNP formation of IGF2BPs (IGF2 mRNA-binding proteins) is modulated by distinct RNA-binding domains. *Biol Chem.* 394: 1077–1090.
- Wang C, Tai Y, Lisanti MP, Liao DJ. 2011. c-Myc induction of programmed cell death may contribute to carcinogenesis: a perspective inspired by several concepts of chemical carcinogenesis. *Cancer Biol Ther.*11:615-26.
- Wall M, Poortinga G, Hannan KM, Pearson RB, Hannan RD, McArthur GA. 2008. Translational control of c-MYC by rapamycin promotes terminal myeloid differentiation. *Blood.* 112:2305-17.
- Weber A., Liu J., Collins I., Levens D.2005. TFIIH operates through an expanded proximal promoter to fine tune c-myc expression. *Mol. Cell* 25:147-161.
- Weidensdorfer D, Stöhr N, Baude A, Lederer M, Köhn M, Schierhorn A, Buchmeier S, Wahle E, Hüttelmaier S. 2009. Control of c-myc mRNA stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs. *RNA.* 15:104-115.
- Weill L, Belloc E, Bava FA, Méndez R. 2012. Translational control by changes in poly(A) tail length: recycling mRNAs. *Nat Struct Mol Biol*,19:577-585.
- Wierstra I, Alves J. 2008. The c-myc promoter: Still Mystery and challenge. *Adv Cancer Res* 99: 113–133.
- Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, Kaloulis K, Bettess MD, Oser GM, Pasche AC, Knabenhans C, Macdonald HR, Trumpp A. 2004. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev.*18:2747-2763.
- Wilson GM, Lu J, Sutphen K, Suarez Y, Sinha S, Brewer B, Villanueva-Feliciano EC, Ysla RM, Charles S, Brewer G. 2003. Phosphorylation of p40AUF1 regulates binding to A + U-rich mRNA-destabilizing elements and protein-induced changes in ribonucleoprotein structure. *J Biol Chem.*278:33039-33048.
- Xu Y, Zheng Y, Liu H, Li T. 2017 Modulation of IGF2BP1 by long non-coding RNA HCG11 suppresses apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via MAPK signaling transduction. *Int J Oncol.*;5:791–800.

- Yeilding NM , Lee WM. 1997. Coding elements in exons 2 and 3 target c-myc mRNA downregulation during myogenic differentiation. *Mol Cell Biol.* 17:2698-2707.
- Yin Y , Hua H, Li M, Liu S, Kong Q, Shao T, Wang J, Luo Y, Wang Q, Luo T, Jiang Y. 2016. mTORC2 promotes type I insulin-like growth factor receptor and insulin receptor activation through the tyrosine kinase activity of mTOR. *Cell Res.* 26:46-65.
- Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM, Kang SA. 2010. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol Cell.* 38:768-774
- Zhao B.S, Roundtree I.A, He C. 2017. Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 18: 31–42.
- Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF. 1998. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12: 2424–2433
- Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF 1998. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12: 2424–2433.
- Zou Z, Chen J, Liu A, Zhou X, Song Q, Jia C, Chen Z, Lin J, Yang C, Li M, Jiang Y, Bai X. 2015. mTORC2 promotes cell survival through c-Myc-dependent up-regulation of E2F1. *J Cell Biol.* 211:105-122.