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

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών

Ανάλυση της συμβολής των ρυθμιστικών περιοχών του c-myc mRNA στην μετάφραση μέσω 5΄ καλύπτρας και εσωτερικής θέσης εισόδου ριβοσωμάτων.

ΜΕΡΙΣΤΟΥΔΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Τράγκα Θεώνη

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε με τη συνεργασία του Τμήματος Βιοχημείας του Κέντρου Ογκολογικής Έρευνας "Γ. Παπανικολάου" του Α.Ο.Ν.Α. "Ο Άγιος Σάββας", καθώς και του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε όλους και τον καθένα ξεχωριστά από τα άτομα που συνέβαλαν ώστε να μπορέσει να ολοκληρωθεί η συγκεκριμένη μελέτη.

Την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Κα Θεώνη Τράγκα, Ομότιμη Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την πολύτιμη συμπαράστασή της, το ανεξάντλητο ενδιαφέρον της για τη δουλειά μου και την υπομονή της όλα αυτά τα χρόνια.

Τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής μου κο Θεολόγο Μιχαηλίδη, Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Γενετικής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον κο Νικόλαο Μπαλατσό, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Την υπεύθυνη του Τμήματος Βιοχημείας του Κέντρου Ογκολογικής Εέρευνας "Γ. Παπανικολάου" Κα Νέλλη Κούρτη για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε στο εργαστήριο και για το άριστο περιβάλλον εργασίας.

Τον Κο Παναγιώτη Ιωαννίδη για τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές που μου έδωσε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας και για τις αμέτρητες ώρες που αφιέρωσε κοντά μου κατά τη διεξαγωγή πολλών πειραμάτων στο εργαστήριο. Η καθοδήγηση και η επιστημονική του κατάρτιση ήταν πολύτιμες.

Τον Κο Ευθύμιο Δημητριάδη, ερευνητή του τμήματος γενετικής του Α.Ο.Ν.Α. "Ο Άγιος Σάββας" για την παραχώρηση εξοπλισμού και για την καθοδήγησή του σε αρκετά θέματα επιστημονικής φύσης.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής κο Μαραγκό Πέτρο, Καθηγητή Αναπτυξιακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κα Φίλιου Μιχαέλα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του

Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κο Δουρή Βασίλη, Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και κο Μυλωνά Ευστράτιο, Επίκουρο Καθηγητή Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ευχαριστώ την συνάδελφο κα Έλενα Μαυρίδου για την βοήθειά της στην μορφοποίηση του κειμένου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου την σύζυγό μου Σοφία για την συμπαράστασή και τη στήριξή της καθώς επίσης και την οικογένειά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 15

1.1 ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ 18

1.1.1 CIS ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ 19

1.1.1.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ 5′ (5′ UTR) 19

1.1.1.1.1 Κάλυμμα 5′ και η Εξαρτώμενη από αυτό Μετάφραση 19

1.1.1.1.2 Εναλλακτικοί Μηχανισμοί Έναρξης της Μετάφρασης 22

1.1.1.1.3 Εσωτερική Θέση Εισόδου Ριβοσώματος και Μετάφραση μη Εξαρτώμενη από Κάλυμμα 5′ 27

1.1.1.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ 3′ (3′UTR) ΣΤΗ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ 30

1.1.1.2.1 Στοιχεία AU-rich (AREs) και Σταθερότητα του Μηνύματος RNA 30

1.1.1.2.2 Μεταφραστικός Έλεγχος Μέσω της 3′ UTR 32

1.1.1.2.3 Ενδοκυττάρια Χωροθέτηση Μέσω της 3′ UTR 32

1.1.1.2.4 Η Ουρά πολυ(Α) και ο Ρόλος των Πρωτεϊνών Πρόσδεσης σε Αυτήν (PABPs) 33

1.1.1.2.5 Εναλλακτική Πολυαδενυλίωση 35

1.1.2. TRANS ΜΕΤΑΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ 36

1.1.2.1 ΜΙΚΡΟ-RNAs (miRNAs) ΚΑΙ Η ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗ ΠΕΡΙΟΧΗ 3′ 36

1.1.2.2 ΤΑ ΜΑΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ RNA (LONG ncRNA) 38

1.1.2.3 RNA-ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ 39

1.1.2.4.1 Οι RNA-Δεσμευτικές Πρωτεΐνες στην Ασθένεια 40

1.2 ΤΟ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΟ MYC 44

1.2.1 Η ΔΟΜΗ ΚΑΙ Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ C-MYC 45

1.2.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ C-MYC 47

1.2.2.1 Το C-MYC ΠΡΟΩΘΕΙ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ 47

1.2.2.2 ΤΟ C-MYC ΠΡΟΑΓΕΙ ΤΗΝ ΓΛΥΚΟΛΥΣΗ 48

1.2.2.3 Το C-MYC ΔΙΕΓΕΙΡΕΙ ΤΗΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΓΕΝΕΣΗΣ 48

1.2.2.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ C-MYC ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ 49

1.2.2.5 Το C-MYC ΕΜΠΛΕΚΕΤΑΙ ΣΤΟΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΘΑΝΑΤΟ 50

1.2.2.6 Το C-MYC ΕΝΕΧΕΤΑΙ ΣΤΗΝ ΡΥΘΜΙΣΗ miRNAs..... 52

1.2.2.7 C-MYC ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ..... 53

1.2.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ C-MYC 55

1.2.3.1 ΡΥΘΜΙΣΗ ΣΤΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ 55

1.2.3.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΣΤΟ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ. 59

1.2.3.2.1 Η Μη Μεταφραζόμενη Περιοχή 5′ 59

1.2.3.2.2 Η Μη Μεταφραζόμενη Περιοχή 3′ 62

1.2.3.2.3 Η Κωδική Περιοχή του c-myc mRNA και η Συμβολή στον Μετα-Μεταγραφικό Έλεγχο..... 65

1.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ IGF2BP1 67

1.3.1 RNA ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ IGF2BP1..... 69

1.3.2 Η IGF2BP1 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ..... 73

1.4 ΣΚΟΠΟΣ 75

1.4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ cis ΤΟΥ C-MYC mRNA ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΙΜΟΤΗΤΑ..... 75

1.4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΤΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΘΕΣΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΗΣ IGF2BP1 ΣΤΗΝ ΤΥΧΗ ΤΩΝ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ ΣΤΟΧΩΝ..... 76

1.4.3 Διερεύνηση του ρόλου της IGF2BP1 και της μετα-μεταφραστικής της τροποποίησης στη μεταφρασιμότητα του c-myc mRNA..... 76

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 79

2.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ 80

2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΑΡΟΔΙΚΗΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ 80

2.2.1 ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA 80

2.2.2 ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA ΚΑΙ ΜΟΡΙΑ siRNA..... 81

2.3 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ..... 82

2.3.1. ΥΓΡΟ ΜΕΣΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ LB 82

2.3.2. ΣΤΕΡΕΟ ΜΕΣΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ 82

2.3.3. ΜΑΚΡΟΠΡΟΘΕΣΜΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ 82

2.4. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ 83

2.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ 84

2.5.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ NucleoSpin Kit (Macherey-Nagel) 84

2.5.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ Nucleobond EF kit (Macherey-Nagel) 85

2.6. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ 87

2.6.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΒΑΣΙΚΟΥ ΦΟΡΕΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ 87

2.6.1.1 Πέψη του φορέα έκφρασης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες 87

2.6.2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΝΘΕΜΑΤΩΝ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ 90

2.6.2.1. Σχεδιασμός εκκινητών 90

2.6.2.2. Πρόγραμμα Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) 93

2.6.2.3. Παραλαβή ενθεμάτων από πήκτωμα αγαρόζης 93

2.6.2.4 Πέψη ενθεμάτων 94

2.6.2.5 Αντίδραση Σύνδεσης Άκρων 94

2.7. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ 96

2.7.1. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΜΟΝΟΣΙΣΤΡΟΝΙΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ 96

2.7.1.1 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/ Control 96

2.7.1.2 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/3΄CRD 97

2.7.1.3 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/5΄CRD 97

2.7.1.4 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/CRD 98

2.7.1.5 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/5΄MYC 98

2.7.1.6 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/5΄MYC-CRD 99

2.7.1.7 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/5΄MYC-CRD-3΄MYC 99

2.7.1.8 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/5΄MYC-3΄MYC 100

2.7.1.9 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/3΄MYC 100

2.7.1.10 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/CRD-3΄MYC..... 101

2.7.1.11 Κατασκευή των φορέων έκφρασης Luc/MDR1, Luc/5΄MDR1 και Luc/3΄MDR1101

2.7.2. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΔΙΣΙΤΡΟΝΙΚΩΝ (BISISTRONIC) ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ..... 102

2.7.2.1 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Bis/Control..... 102

2.7.2.2 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Bis/CRD..... 103

2.7.2.3 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Bis/CRD-3΄UTR 103

2.7.2.4 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Bis/3΄UTR..... 104

2.8. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΜΕ ΣΗΜΕΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ 104

2.9. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΩΝ (FIREFLY ΚΑΙ RENILLA) 106

2.10. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΗΜΙΖΩΗΣ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ RNA ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΚΤΙΝΟΜΥΚΙΝΗΣ D 107

2.11 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA..... 108

2.12 ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA ΜΕ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ 109

2.13 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΤΩΝ FIREFLY ΚΑΙ RENILLA ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΩΝ, IGF2BP1, C-MYC ΚΑΙ GAPDH ΜΕ REAL-TIME PCR..... 110

2.14 ΣΧΕΤΙΚΗ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΤΟΧΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ CT (2^-Δ(ΔCT)).... 111

2.14.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΤΟΥ IGF2BP1 112

2.14.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΤΟΥ C-MYC..... 113

2.14.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΤΗΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ FIREFLY..... 113

2.14.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΤΗΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ RENILLA..... 114

2.14.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΤΟΥ GAPDH..... 114

2.15 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΜΕΡΑΦΡΑΣΙΜΟΤΗΤΑΣ 115

2.16 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΣΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOT) 115

2.16.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ 115

2.16.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (SDS-PAGE). 116

2.16.3 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ 116

2.16.4 ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΚΑΙ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ 117

2.17 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ 119

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 121

3.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ. 122

3.1.1 ΜΟΝΟΣΙΣΤΡΟΝΙΚΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ 122

3.1.2 ΔΙΣΙΣΤΡΟΝΙΚΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ 123

3.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ FIREFLY 124

3.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ C-MYC mRNA ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ 125

3.3.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ ΟΓΚΟΓΟΝΟΔΙΟΥ C-MYC ΣΤΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕΣΩ ΚΑΛΥΜΜΑΤΟΣ 5΄ 126

3.3.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ ΟΓΚΟΓΟΝΟΔΙΟΥ C-MYC ΣΤΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕΣΩ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗΣ ΘΕΣΗΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΡΙΒΟΣΩΜΑΤΟΣ (IRES). 128

3.4 ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΣΤΗΝ «ΤΥΧΗ» ΤΩΝ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ ΤΟΥ C-MYC ΚΑΙ MDR1 131

3.4.1 Η ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ 131

3.4.2 Η ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΣΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ 134

3.4.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΗΣ IGF2BP1 ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥ C-MYC mRNA 137

3.4.3.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ IGF2BP1 ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ ΟΓΚΟΓΟΝΟΔΙΟΥ C-MYC 137

3.4.3.2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ IGF2BP1 ΚΑΙ ΕΠΙΠΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ 139

3.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ 3΄ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥ c-myc mRNA 143

3.5.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΟΥΡΑΣ ΠΟΛΥ(Α): ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΛΟΓΟΥ ΑΔΕΝΟΣΙΝΗΣ, ΚΟΡΔΥΣΕΠΙΝΗ, ΣΤΗΝ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ 3′ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕΣΩ ΚΑΛΥΜΜΑΤΟΣ 5′ΚΑΙ IRES 143

3.5.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ 3′ΤΟΥ C-MYC ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕΣΩ ΚΑΛΥΜΜΑΤΟΣ 5′ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ. 147

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ *151*

4.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ C-MYC mRNA ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕΣΩ ΚΑΛΥΜΜΑΤΟΣ 5′ 153

4.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ C-MYC mRNA ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕΣΩ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗΣ ΘΕΣΗΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΡΙΒΟΣΩΜΑΤΟΣ (IRES)..... 156

4.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ CRD ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕΣΩ ΚΑΛΥΜΜΑΤΟΣ 5′ ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ IGF2BP1 ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥ C-MYC mRNA 157

4.4. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΑΝΑΛΟΓΟΥ ΑΔΕΝΟΣΙΝΗΣ, ΚΟΡΔΥΣΕΠΙΝΗ, ΕΝΙΣΧΥΕΙ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ 3′ ΤΟΥ C-MYC ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕΣΩ ΚΑΛΥΜΜΑΤΟΣ 5′.165

4.5. Η ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗ ΠΕΡΙΟΧΗ 3 ′ΤΟΥ C-MYC ΑΠΟΚΑΘΙΣΤΑ ΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕΣΩ ΚΑΛΥΜΜΑΤΟΣ 5′ ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ. 166

Περίληψη *171*

Abstract *174*

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ *177*

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κυτταρικό πρωτο-ογκογονίδιο *c-myc* είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της ανάπτυξης, διαφοροποίησης και απόπτωσης, του οποίου η απορυθμισμένη έκφραση εμπλέκεται στην καρκινογένεση. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι η *c-myc* ασκεί το ρόλο της κυρίως μέσω της διαμόρφωσης των επιπέδων έκφρασης. Τα επίπεδα της έκφρασης του *c-myc* έχουν σημασία και έχει διατυπωθεί η άποψη ότι ακόμη και μικρές διακυμάνσεις σε αυτά μπορεί να διαδραματίσουν καθοριστικό ρόλο τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθοφυσιολογικές διεργασίες, που ρυθμίζονται από το γονίδιο αυτό [Chung και Levens, 2005]. Οι ενορχηστρωμένοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί, που δρουν σε πολλαπλά στάδια, συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου των μεταγραφής, της μετάφρασης και της αποικοδόμησης τόσο του mRNA όσο και της πρωτεΐνης, επιτυγχάνουν τη ακριβή ρύθμιση της έκφρασης του *c-myc* [Shi *et al*., 2011; Noubissi *et al.,* 2006; Thomas and Tansey 2011; Vervoorts *et al*., 2006).

Ο μετα-μεταγραφικός έλεγχος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του *c-myc* τόσο σε επίπεδο σταθερότητας του mRNA όσο και της μετάφρασης του και πολλές πτυχές αυτών των ρυθμιστικών μηχανισμών έχουν αποσαφηνιστεί. Οι αρχικές μελέτες επικεντρώθηκαν κυρίως στον έλεγχο της αποικοδόμησης του *c-myc* mRNA μελετώντας εξαντλητικά τη συμβολή των *cis* στοιχείων και των *trans* παραγόντων και τον τρόπο λειτουργίας τους. Τα στοιχεία *cis* και *trans* που ελέγχουν τη μετάφραση του *c-myc* mRNA έχουν επίσης διερευνηθεί εκτενώς. Οι αμετάφραστες περιοχές 5′ και 3′ (Un*trans*lated Region, UTR) του mRNA του *c-myc*, που βρίσκονται στα αντίθετα άκρα του μηνύματος, παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μετάφρασής του.

Η 5′ UTR του *c-myc*, που κωδικοποιείται από το εξόνιο 1, περιέχει μια εσωτερική θέση εισόδου ριβοσωμάτων (IRES) που λειτουργεί προκειμένου να διατηρηθεί η έκφραση του *c-myc* κατά τη διάρκεια ορισμένων φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών συνθηκών, συμπεριλαμβανομένης της φάσης του κυτταρικού κύκλου G2/M [Kim *et al*., 2003], της απόπτωσης [Stoneley *et al*., 2000], του γενοτοξικού στρες [Subkhankulova *et al*., 2001] και της ιογενούς μόλυνσης [Johannes and Sarnow, 1999].

Στο άλλο άκρο του μηνύματος η 3′ UTR, εκτός από την καθιερωμένο ρόλο στην ταχεία αποαδενυλίωση και αποικοδόμηση [Brewer, 1991], έχει αναφερθεί ότι ασκεί και μεταφραστικό έλεγχο μέσω ρυθμιστικών miRNA και πρωτεϊνών

δέσμευσης RNA (RNA Binding Proteins, RPBs), όπως η HuR, η AUF1 και η TIAR [Liao *et al*., 2007, Kim *et al*., 2009].

Εκτός από τα ρυθμιστικά στοιχεία *cis* που βρίσκονται στα UTRs, το mRNA του *c-myc* περιέχει μια αλληλουχία εντός της κωδικοποιητικής του περιοχής, η οποία μπορεί να επηρεάζει τόσο τη σταθερότητα όσο και τη μεταφρασιμότητα. Αυτή η αλληλουχία, καθοριστικός παράγοντας αστάθειας της περιοχής κωδικοποίησης (CRD), περιλαμβάνει τα τελευταία 249 νουκλεοτίδια της κωδικοποιητικής περιοχής του μηνύματος. Λειτουργεί ανεξάρτητα από την πλούσια σε AU 3΄ αμετάφραστη περιοχή για να καταστήσει το mRNA ασταθές [Bernstein *et al*., 1992]. Η μεταφραστική παύση στο CRD λόγω της παρουσίας ενός σπάνιου κωδικονίου αργινίνης (CGA) και ενός παρακείμενου κωδικονίου θρεονίνης (ACA) προκαλεί μια καθυστέρηση του ριβοσώματος, καθιστώντας την περιοχή ευάλωτη στην προσβολή από ριβονουκλεάσες, εκτός αν προστατεύεται από την πρωτεΐνη δέσμευσης CRD (CRD-BP ή IMP-1 ή IGF2BP1) που συνδέει τον μεταφραστικό ρυθμό με την αποικοδόμηση [Lemm and Ross, 2002]. Έχει επίσης προταθεί ότι η δέσμευση της IGF2BP1 μπορεί να προσελκύσει το *c-myc* mRNA στο μη μεταφραζόμενο κλάσμα ριβονουκλεοπρωτεϊνών (RNP) και έτσι να επηρεάζει τη μετάφρασή του [Weidensdorfer *et al*., 2005]. Στο άκρο 3′, η ουρά πολυ(Α) που υπάρχει στη συντριπτική πλειονότητα των ευκαρυωτικών mRNA, έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας ισχυρός διεγέρτης της μετάφρασης. Μέσω της σύνδεσης με τον κυτταροπλασματικό της δεσμευτικό εταίρο, την πρωτεΐνη δέσμευσης πολυ(Α) (Poly(A)-binding protein, PABP), η ουρά πολυ(Α) συμμετέχει σε βασικά στάδια στο μονοπάτι έναρξης της μετάφρασης [Zhang *et al*., 2010]. Ωστόσο, όσον αφορά στο *c-myc* mRNA έχει αποδειχθεί ότι η έλλειψη μιας μακράς πολυ(Α)ουράς δεν εμποδίζει τη μετάφραση [Ioannidis *et al*., 1999]. Από την άλλη πλευρά, η μετάφραση μέσω του *c-myc* IRES απαιτεί την παρουσία της ουράς πολυ(Α), επιστρατεύοντας ένα υποσύνολο παραγόντων έναρξης της μετάφρασης που διαφέρουν από αυτούς που απαιτούνται για τη μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄ [Thoma *et al*., 2008].

Η συμβολή καθενός από τα ανωτέρω στοιχεία *cis* στη μετάφραση του *c-myc* mRNA έχει προσεγγιστεί κυρίως μέσω της μελέτης καθενός από αυτά μεμονωμένα. Ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ρυθμιστικών στοιχείων *cis* έχουν αναφερθεί για μια σειρά από ιικά και κυτταρικά μηνύματα [Fähling *et al*., 2006; Chen and Kastan, 2010]. Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε το ζήτημα της συμβολής των

διαφόρων περιοχών του *c-myc* mRNA, και των υποθετικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους, στον μεταφραστικό έλεγχο υπό φυσιολογικές συνθήκες, καθώς και σε συνθήκες στρες.

1.1 ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε μεταμεταγραφικό επίπεδο αναδεικνύεται σε σημαντική συνιστώσα για τον καθορισμό του φάσματος των πρωτεϊνών που συντίθενται στο κύτταρο κάθε στιγμή και ως εκ τούτου για τον φαινότυπο του κυττάρου. Ο μετα-μεταγραφικός έλεγχος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση πολλών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου του *c-myc*.

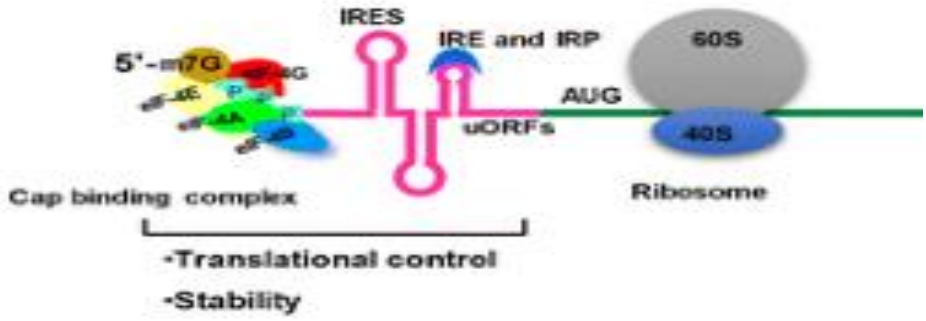
Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι μια πολύπλοκη και αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία σε όλα τα στάδια όπως κατά την μεταγραφή, ωρίμανση, πυρηνοκυτταροπλασματική μεταφορά, σταθερότητα, χωροθέτησή και μετάφραση του mRNA, στα οποία εμπλέκονται πάρα πολλοί διαφορετικοί παράγοντες. Οι αμετάφραστες περιοχές 5΄ και 3΄ καθώς επίσης και η κωδική, αποτελούν τις κύρια εμπλεκόμενες περιοχές στην μεταμεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Παρά το γεγονός ότι αρκετές διαγονιδιακές περιοχές για πολλά χρόνια έχουν χαρακτηριστεί ως μη γονιδιακό DNA (junk DNA), εν τούτοις έχουν μελετηθεί και έχει βρεθεί ότι συνεισφέρουν σε μεγάλο βαθμό στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [Birney et al., 2007; Carninci et al., 2005]. Μελέτες φέρνουν συνεχώς στην επιφάνεια στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η πολυπλοκότητα των ανώτερων οργανισμών, η οποία συνάδει με την αύξηση του μεγέθους των μη κωδικών περιοχών ενός γονιδίου, είναι αποτέλεσμα της αύξησης τόσο του αριθμού όσο και της πολυπλοκότητας των διαφόρων ρυθμιστικών μονοπατιών. Η ποικιλομορφία που συναντάται σε αυτές τις μη κωδικές περιοχές είναι ο κύριος παράγοντας στον οποίο οφείλεται η φαινοτυπική διαφοροποίηση που παρατηρείται μεταξύ των ανώτερων οργανισμών [Levine and Tjian 2003; Mattick, 2001]

1.1.1 *CIS* ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ

1.1.1.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ 5΄ (5΄ UTR)

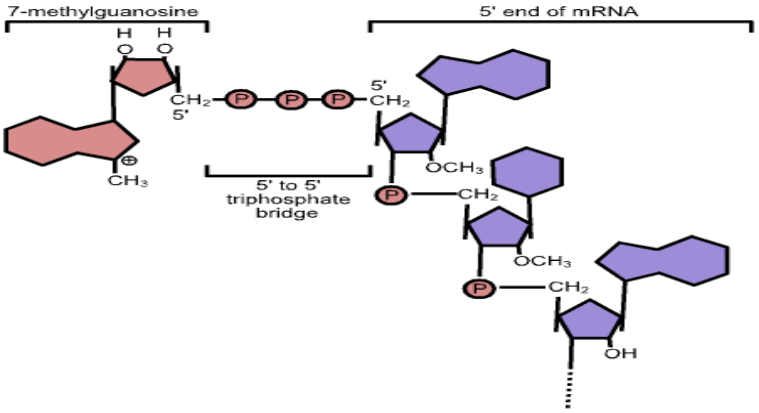
Η αμετάφραστη περιοχή 5΄ είναι μια ρυθμιστική περιοχή η οποία βρίσκεται στο άκρο 5΄ όλων των RNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Στις 5΄UTR περιοχές μπορεί να εντοπίζονται, ανάλογα με το γονίδιο, αρκετά διαφορετικά ρυθμιστικά στοιχεία τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη της μετάφρασης. (εικόνα 1)



Εικόνα 1.Τυπικά ρυθμιστικά στοιχεία της 5΄ αμετάφραστης περιοχής [Rao *et al.,* 2017]

1.1.1.1.1 Κάλυμμα 5΄ και η Εξαρτώμενη από αυτό Μετάφραση

Το κάλυμμα 5΄ είναι ένα τροποποιημένο νουκλεοτίδιο που προστίθεται μετα-μεταγραφικά στο άκρο 5΄ των πρώιμων mRNA, και είναι απαραίτητο για την αποτελεσματική μετάφρασή τους σε πρωτεΐνη. Αποτελείται από ένα τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο γουανοσίνης το οποίο συνδέεται με το mRNA μέσω μιας ασυνήθιστης 5΄-5΄ τριφωσφορικής γέφυρας. Η γουανίνη στη συνέχεια μεθυλιώνεται στη θέση 7 από μία μεθυλοτρανσφεράση. Η όλη δομή ονομάζεται κάλυμμα 7-μεθυλογουανοσίνης και εν συντομία m^7G. [Banerjee , 1980] (εικόνα 2)

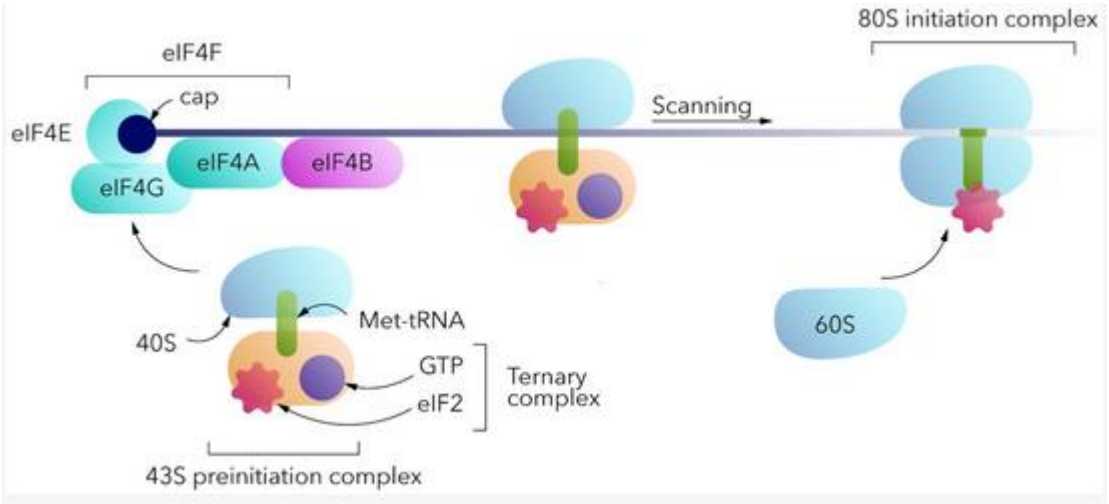


Εικόνα 2. Δομή του καλύμματος 5΄. Η μεθυλιωμένη στη θέση 7 γουανίνη ενώνεται διαμέσου μιας τριφωσφορικής γέφυρας με το άκρο 5΄ του τελικού νουκλεοτιδίου του mRNA και έτσι δημιουργείται ένας ασυνήθης 5΄-5΄ δεσμός μεταξύ της 7-μεθυλογουανοσίνης και του τελικού νουκλεοτιδίου του mRNA.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης ρυθμίζεται από τους παράγοντες έναρξης που σχηματίζουν σύμπλοκα αλληλεπίδρασης με την μικρή υπομονάδα. Ο παράγοντας eIF2, που αποτελείται από 3 πολυπεπτιδικές αλυσίδες α, β και γ, προσδένει το εναρκτήριο Met-tRNAi με την βοήθεια του eIF2B. Οι παράγοντες eIF3 και eIF1A συμμετέχουν σταθεροποιώντας το σύμπλοκο αυτό που στη συνέχεια προσδένεται πάνω στη μικρή υπομονάδα (40S). Με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται το 43S σύμπλοκο [Pain, 1996]. Ο παράγοντας eIF3 αποτελείται από πολλές υπομονάδες και είναι σημαντικός για τη σταθεροποίηση του συμπλόκου, την πρόσδεση του mRNA στην υπομονάδα 40S και την παρεμπόδιση του σχηματισμού του ριβοσώματος 80S [Chaudhuri *et al.*,1999].

Ο παράγοντας eIF4 συμβάλλει στην πρόσδεση του mRNA στην μικρή ριβοσωματική υπομονάδα [Gingras *et al.*, 1999]. Αποτελείται από τους παράγοντες eIF4E, eIF4A και eIF4G και προσδένει το mRNA μέσω του eIF4E που αναγνωρίζει τη δομή (m^7G), στο άκρο 5΄ των περισσοτέρων mRNA. Δευτεροταγείς δομές που πιθανά σχηματίζονται στην αμετάφραστη περιοχή 5΄ του mRNA διασπώνται από τη δράση ελικάσης του παράγοντα eIF4A που υποβοηθείται από τον eIF4B. Τέλος, ο eIF4G, αλληλεπιδρά με τον eIF4E και γεφυρώνει το κάλυμμα 5΄ με την 40S υπομονάδα. Κατά αυτό τον τρόπο σχηματίζεται το σύμπλοκο έναρξης 48S. [Marcotrigiano *et al.*, 1997, Sachs *et al.*,1997].

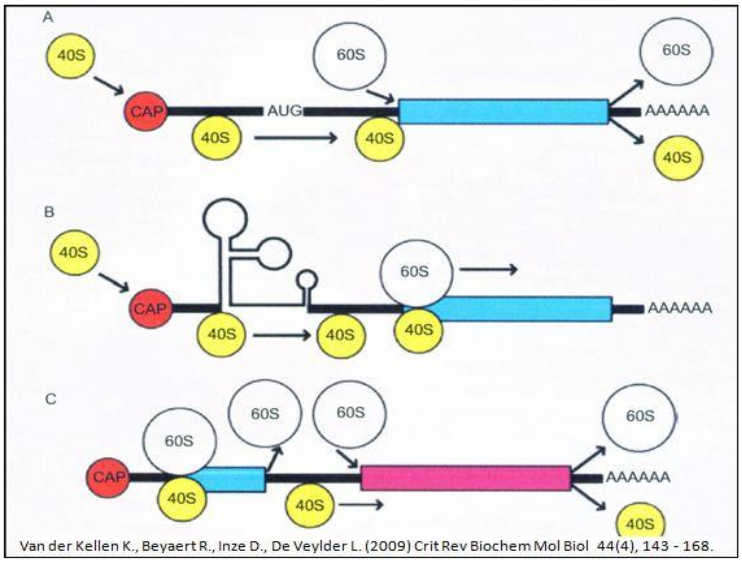
Το επόμενο στάδιο της εξαρτώμενης από καλύπτρα έναρξης της μετάφρασης είναι η "σάρωση" της 5΄ αμετάφραστης περιοχής προκειμένου να εντοπιστεί το κατάλληλο κωδικόνιο έναρξης και να τοποθετηθεί στη θέση P της ριβοσωματικής υπομονάδας για να συνδεθεί με το Met-tRNAi [Gross *et al*., 2003]. Η αναγνώριση του κωδικονίου έναρξης από το αντικωδικόνιο της μεθειονίνης έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση του συμπλόκου eIF2-GDP, αλληλεπίδραση με την 60S ριβοσωματική υπομονάδα και τον σχηματισμό του συμπλόκου 80 S. Η επιλογή του κωδικονίου έναρξης και η αποτελεσματικότητα της μετάφρασης επηρεάζονται από αρκετούς παράγοντες, όπως είναι η απόστασή του από το κάλυμμα καθώς επίσης και η σύσταση των κοντινών αλληλουχιών που αναγνωρίζονται από το ριβόσωμα. Στα θηλαστικά, η ιδανική αλληλουχία, είναι η GCCRCCaugG (όπου R πουρίνη) και αναφέρεται ως «αλληλουχία Kozak»[Kozak, 1980].



Εικόνα 3. Αναπαράσταση του μοντέλου έναρξης της εξαρτώμενης από κάλυμμα 5΄ μετάφρασης [Deviatkin et al., 2023]

Το συγκεκριμένο μοντέλο έναρξης της μετάφρασης μέσω σάρωσης από το ριβόσωμα (εικόνα 3) οδήγησε στην παραδοχή ότι όλα τα mRNA με σύνθετη 5΄ UTR δομή παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα μεταφρασιμότητας λόγω της αδυναμίας του ριβοσώματος να σαρώσει τις πολύπλοκες δευτεροταγείς δομές που βρίσκονται στη συγκεκριμένη περιοχή. Παρόλα αυτά, μελέτες έδειξαν ότι κάτι τέτοιο δεν ισχύει πάντα αφού η ύπαρξη σύνθετης δομής 5΄ UTR βρέθηκε να αυξάνει τη μεταφραστική

ικανότητα πολλών mRNA κατά αρκετές τάξεις μεγέθους [Dmitriev *et al.*, 2009]. Η ίδια ομάδα επίσης έδειξε ότι δεν υπήρχε δραματική διαφορά στην μεταφραστική αποτελεσματικότητα μεταξύ απλών και σύνθετων 5΄UTR δομών, πράγμα που αποδεικνύει ότι οι σύνθετες δομές που απαντώνται στις 5΄ αμετάφραστες περιοχές, πολλές φορές δεν παρεμποδίζουν την μετάφραση.



Εικόνα 4. Εναλλακτικοί μηχανισμοί έναρξης. (Α) Διαρρέουσα Σάρωση. Το πρώτο κωδικόνιο AUG είναι δυνατό να παρακαμφθεί και η μετάφραση να ξεκινήσει από το επόμενο κωδικόνιο AUG. (Β) Ριβοσωματικό Άλμα. Το ριβόσωμα εκτρέπεται από ένα μεγάλο τμήμα με εκτεταμένη δευτεροταγή δομή, που πιθανόν περιέχει κωδικόνια έναρξης. (Γ) Επανέναρξη. Μετά την έναρξη από το πρώτο κωδικόνιο έναρξης, η 40S ριβοσωματική 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]

1.1.1.1.2 Εναλλακτικοί Μηχανισμοί Έναρξης της Μετάφρασης

Αποκλίσεις από τον κανόνα σάρωσης του mRNA από το ριβόσωμα μέχρι το πρώτο κωδικόνιο έναρξης αποτελούν οι μηχανισμοί της διαρρέουσας σάρωσης, του ριβοσωματικού άλματος και της επανέναρξης. (εικόνα 4)

α. Διαρρέουσα σάρωση (Leaky Scanning)

Στην πλειονότητα τους τα μόρια mRNA μεταφράζονται από το κοντινότερο στο άκρο 5΄ κωδικόνιο AUG. Υπάρχουν ωστόσο και μερικές περιπτώσεις κατά τις οποίες το πρώτο στη σειρά AUG παρακάμπτεται στο πλαίσιο μιας διαδικασίας που ονομάζεται *διαρρέουσα σάρωση* (*leaky scanning*) (εικόνα 4A).

Σε αυτές τις περιπτώσεις η υπομονάδα 40S παρακάμπτει το πρώτο κωδικόνιο έναρξης και προσδένεται στο επόμενο ή ακόμη και στο τρίτο έτσι ώστε να ξεκινήσει τη μετάφραση. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να παρατηρηθεί, επίσης, όταν το εναρκτήριο κωδικόνιο είναι πολύ κοντά στο άκρο 5΄ ώστε να αναγνωριστεί σωστά ή όταν το ριβόσωμα ξεκινά τη μετάφραση μαζί με το κανονικό AUG και από ένα ανοδικό μη εναρκτήριο κωδικόνιο. Τότε η έναρξη της μετάφρασης από δυο διαφορετικά AUG οδηγεί στην παραγωγή δυο διαφορετικών πρωτεϊνών [Suzuki *et al*., 2010]

Αν αυτά τα δυο AUG απέχουν μεταξύ τους κατά μια τριπλέτα ή περισσότερο, τότε τα δυο πολυπεπτίδια που προκύπτουν έχουν διαφορετικό μήκος και μπορεί να προορίζονται για διαφορετικά τμήματα του κυττάρου. Ένα παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση της μετάφρασης του mRNA του γονιδίου IDE (Insulin-degrading enzyme). Ο μηχανισμός της διαρρέουσας σάρωσης οδηγεί στην παραγωγή μιας επιμηκυμένης στο αμινοτελικό άκρο πρωτεΐνης, που κατευθύνεται στα μιτοχόνδρια [Leissring *et al.*, 2004]. Σε περίπτωση που τα δυο AUG ανήκουν σε διαφορετικά πλαίσια ανάγνωσης, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την σύνθεση δύο διαφορετικών μεταξύ τους πρωτεϊνών [Schwartz *et al.*, 1992].

β. Μηχανισμός ριβοσωματικού άλματος (Ribosome shunting) και ανοδικό πλαίσιο ανάγνωσης (uORF).

Υπάρχουν περιπτώσεις κατά τις οποίες το ριβόσωμα παρακάμπτοντας τις δευτεροταγείς δομές, μπορεί να «υπερπηδήσει» ένα μεγάλο τμήμα του mRNA που περιέχει κωδικόνια AUG (εικόνα 4B).

Τα ανοδικά πλαίσια ανάγνωσης (uORF) εντοπίζονται στην 5΄ αμετάφραστη περιοχή όταν υπάρχει κωδικόνιο λήξης εντός πλαισίου ανάγνωσης μετά από μία

ανοδική τριπλέτα AUG αμέσως πριν το κυρίως κωδικόνιο έναρξης [Mignone *et al.*, 2002, Morris and Geballe, 2000] (Εικόνα 5). Εντοπίζονται περίπου στο 50% των αμετάφραστων περιοχών 5΄ στον άνθρωπο και λειτουργούν ως κατασταλτικοί παράγοντες της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία των uORFs μειώνει τα επίπεδα του mRNA κατά 30% και τα επίπεδα πρωτεϊνοσύνθεσης κατά 30-80% [Calvo *et al*., 2009].



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση της έναρξης έκφρασης μέσω ανοδικού πλαισίου ανάγνωσης. Τα ανοδικά κωδικόνια έναρξης και λήξης (AUG και UGA αντίστοιχα) εντοπίζονται αμέσως πριν το κωδικόνιο έναρξης AUG του φυσιολογικού πλαισίου ανάγνωσης. [Barbosa et al., 2013]

Τα ριβοσώματα που προσδένονται σε ανοδικό κωδικόνιο έναρξης μπορεί να μεταφράσουν ένα ανοδικό πλαίσιο ανάγνωσης. Το συγκεκριμένο γεγονός μπορεί να έχει επίπτωση στη μετέπειτα πορεία της γονιδιακής έκφρασης μεταβάλλοντας την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης από το κυρίως πλαίσιο ανάγνωσης. Εάν η πρόσδεση ριβοσωμάτων δεν είναι επαρκής, αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης από το συγκεκριμένο γονίδιο. Εναλλακτικά, η σύνθεση της πρωτεΐνης μπορεί να εξελιχθεί κανονικά μόνο που σε αυτή την περίπτωση η τελευταία ενδέχεται να είναι επιβλαβής για τον οργανισμό. Η μειωμένη μεταφραστική ικανότητα κάποιων γονιδίων εξαιτίας της ύπαρξης ανοδικών πλαισίων ανάγνωσης στην αμετάφραστη περιοχή 5΄ είναι ένας μηχανισμός καλά χαρακτηρισμένος. Μελέτες στο γονίδιο της πολυ(Α) πολυμεράσης Α (PAPOLA) έδειξαν ότι το τελευταίο περιέχει δύο πολύ καλά συντηρημένα ανοδικά πλαίσια ανάγνωσης στην 5΄ αμετάφραστη περιοχή του. Σημειακή μετάλλαξη του εγγύτερου στην 5΄ περιοχή ανοδικού κωδικονίου έναρξης (uAUG) είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της μεταφραστικής ικανότητας του γονιδίου υποδεικνύοντας ότι το ανοδικό πλαίσιο ανάγνωσης λειτουργεί κατασταλτικά στην γονιδιακή έκφραση [Rapti *et al*., 2010].

Παρά το γεγονός ότι στην πλειονότητά τους οι περιοχές uORF επιδρούν αρνητικά στην έκφραση ενός γονιδίου, υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες η ύπαρξή τους ενισχύει τη μετάφραση. Μία τέτοια περίπτωση είναι τα δισιστρονικά vpu-env mRNAs του ιού HIV-1 τα οποία περιέχουν ένα συντηρημένο uORF. Το ανοδικό αυτό πλαίσιο ανάγνωσης βρίσκεται μόνο 5 νουκλεοτίδια πριν το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου vpu και ακολουθείται από ένα κωδικόνιο λήξης που επικαλύπτει το φυσιολογικό AUG κωδικόνιο [Krummheuer *et al*.,2007]. Μελέτη έδειξε ότι το συγκεκριμένο uORF επιδρά θετικά στην μετάφραση του γονιδίου Env χωρίς όμως να παρεμβαίνει στην έκφραση του Vpu. Μετάλλαξη που οδήγησε στην αύξηση της απόστασης κατά 5 νουκλεοτίδια μεταξύ του uORF και του φυσιολογικού AUG έδειξε ότι το uORF δεν εμπλέκεται στην μεταφραστική έναρξη του γονιδίου Vpu. Το μοντέλο που προτάθηκε σε αυτή την περίπτωση ήταν ότι το uORF λειτουργεί ως θέση ριβοσωματικής παύσης επιτρέποντας στο τελευταίο να αλληλεπιδράσει με μια RNA δομή επιτρέποντας ένα “ριβοσωματικό άλμα”, διαδικασία κατά την οποία το ριβόσωμα παρακάμπτει μέρος της 5΄ αμετάφραστης περιοχής για να προσεγγίσει το κωδικόνιο έναρξης [Krummheuer *et al*., 2007, Yueh and Schneider, 1996].

Επιπλέον έρευνες έχουν δείξει ότι η ρύθμιση μέσω ανοδικών πλαισίων ανάγνωσης είναι μία πολύ σύνθετη διαδικασία που έχει σαν σκοπό τον αυστηρό έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων στα οποία βρίσκονται. Ένα παράδειγμα σύνθετου ελέγχου γονιδιακής έκφρασης μέσω uORF αποτελεί η περίπτωση της RNασης H1 (RNase H1 gene) [Suzuki *et al*., 2010]. Η RNαση H1 εδράζεται στον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια των κυττάρων των θηλαστικών και εκφράζεται διαφορικά ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου. Δύο διαφορετικά εντός πλαισίου ανάγνωσης κωδικόνια AUG καθώς επίσης και ένα uORF στην αμετάφραστη περιοχή 5΄ του γονιδίου ελέγχουν την έκφραση των πρωτεϊνικών αυτών ισομορφών. Μελέτες έδειξαν ότι η έναρξη της μετάφρασης στη μιτοχονδριακή ισομορφή της RNase H1 γίνεται στο πρώτο κωδικόνιο AUG, το οποίο περιορίζεται από την ύπαρξη του ανοδικού πλαισίου ανάγνωσης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η μιτοχονδριακή ισομορφή να αποτελεί μόνο το 10% της αντίστοιχης πυρηνικής [Suzuki *et al*., 2010]. Η έναρξη της μετάφρασης της τελευταίας γίνεται στο δεύτερο κωδικόνιο AUG και δεν επηρεάζεται από την παρουσία του uORF. Είναι λοιπόν προφανές ότι αυτού του είδους η αυστηρή ρύθμιση επιτρέπει την ελεγχόμενη έκφραση της συγκεκριμένης ριβονουκλεάσης στα μιτοχόνδρια καθώς σε περίπτωση

υπερέκφρασης ή απουσίας της, αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο.

Συνοψίζοντας λοιπόν, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της αμετάφραστης περιοχής 5΄ περιλαμβάνει τη συνδυαστική δράση μίας πληθώρας παραγόντων και βασίζεται σε πολύ μεγάλο βαθμό τόσο στην δευτεροταγή δομή όσο και στην προσβασιμότητα των θέσεων πρόσδεσης πρωτεϊνών. Μελλοντικές έρευνες είναι πολύ πιθανόν να αποκαλύψουν την ύπαρξη νέων ρυθμιστικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με την αμετάφραστη περιοχή 5΄ πριν την έναρξη της μετάφρασης, επηρεάζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την έκβαση της γονιδιακής έκφρασης.

γ. Μηχανισμός επανεκκίνησης

Όταν υπάρχει ανοδικό πλαίσιο ανάγνωσης, πέρα από το κυρίως, το ριβόσωμα προσδένεται στο ανοδικό κωδικόνιο έναρξης και το μεταφράζει παράγοντας έτσι το αντίστοιχο ολιγοπεπτίδιο. Στη συνέχεια προχωρά στη μετάφραση του κύριου πλαισίου ανάγνωσης χωρίς να αποδεσμευτεί από το mRNA. Αν και ο μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός, αυτό που πιθανώς συμβαίνει είναι ότι όταν το ριβόσωμα συναντήσει το κωδικόνιο λήξης του ανοδικού πλαισίου ανάγνωσης αποδεσμεύεται η 60S υπομονάδα, ενώ η 40S υπομονάδα παραμένει προσδεμένη και συνεχίζει τη διαδικασία της σάρωσης (εικόνα 5) [Barbosa *et al.*, 2013].

Έχει δειχθεί ότι ο μηχανισμός της επανεκκίνησης μπορεί να παίζει ρόλο σε περιπτώσεις γονιδίων τα οποία όταν συνθέτουν πρωτεΐνες σε μεγάλες συγκεντρώσεις, οι τελευταίες δρουν τοξικά και επιζήμια στον οργανισμό [Pecqueur *et al.*, 2001].

Όταν τα επίπεδα του συμπλόκου eIF2 – GTP είναι χαμηλά, το πλησιέστερο καθοδικό AUG μπορεί να προσπεραστεί και η επανεκκίνηση να γίνει από ένα ακόμα πιο καθοδικό AUG. Η ρύθμιση των επιπέδων eIF2 – GTP γίνεται από κινάσες και εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης ή άλλες συνθήκες [Clemens, 2001]. Μέσω αυτών των συνθηκών στη συνέχεια καθορίζεται από ποιο AUG θα γίνει η

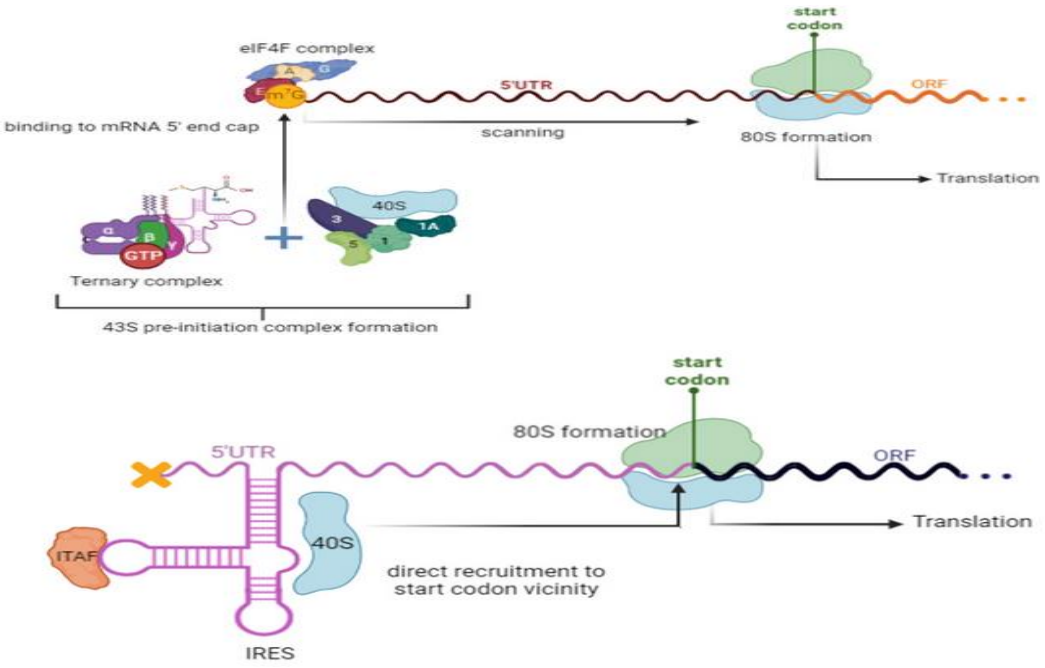
επανεκκίνηση. Ένα παράδειγμα αποτελεί η ρύθμιση του γονιδίου της ζύμης GCN4, το οποίο ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των αμινοξέων. Το mRNA του GCN4 διαθέτει 4 στοιχεία uORF. Μετά τη μετάφραση του πρώτου, η επανεκκίνηση γίνεται είτε στο τέταρτο uORF είτε απευθείας στο κύριο. Στην πρώτη περίπτωση η μετάφραση του κύριου παρεμποδίζεται. Στην δεύτερη περίπτωση η ριβοσωματική υπομονάδα 40S υπερπηδά το τέταρτο uORF και μεταφράζει φυσιολογικά το αναγνωστικό πλαίσιο του GCN4 [Gaba *et al*., 2001].

1.1.1.1.3 Εσωτερική Θέση Εισόδου Ριβοσώματος και Μετάφραση μη Εξαρτώμενη από Κάλυμμα 5’

Οι εσωτερικές θέσεις εισόδου ριβοσώματος είναι ρυθμιστικές περιοχές οι οποίες διευκολύνουν την μη εξαρτώμενη από το κάλυμμα 5΄ μετάφραση ενός μορίου mRNA. Το ριβόσωμα προσδένει μία περιοχή RNA, γνωστή ως εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος (internal ribosome entry site, IRES), η οποία βρίσκεται κοντά στη θέση έναρξης της μετάφρασης [Birney *et al*., 2007, Van Der Kelen *et al*., 2009]. Μέσω της δομής IRES στρατολογούνται στο mRNA ριβοσώματα υπό συνθήκες κάτω από τις οποίες δεν είναι δυνατή η εξαρτώμενη από το κάλυμμα 5΄ μετάφραση. Συνθήκες που μπορεί να παρεμποδίσουν την μετάφραση μπορεί να είναι το κυτταρικό στρες, φάση του κυτταρικού κύκλου καθώς επίσης και η απόπτωση. Η ύπαρξη ενός τέτοιου ρυθμιστικού μηχανισμού σε αυτή την περίπτωση εξασφαλίζει την απρόσκοπτη έκφραση πρωτεϊνών οι οποίες κρίνονται απαραίτητες για την ομαλή λειτουργία του κυττάρου. Περιπτώσεις γονιδίων που ελέγχονται από αυτόν τον μηχανισμό είναι τα *c-myc*, Apaf-1 και Bcl-2 των οποίων, ενώ η έκφραση μειώνεται κατά τη διάρκεια της ομαλής κυτταρικής ανάπτυξης, έχει δειχθεί ότι επάγεται μέσω το μονοπατιού IRES σε συνθήκες στρες [Komar and Hatzoglou, 2005]. Η εξαρτώμενη από το κάλυμμα 5΄ μετάφραση παρεμποδίζεται σε συνθήκες στρες μέσω δύο κυρίως μηχανισμών που αφορούν είτε τη φωσφορυλίωση του παράγοντα eIF2a ή την υποφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών 4E-BP μέσω του μονοπατιού mTOR. Στην πρώτη περίπτωση, λόγω ισχυρής χημικής συγγένειας μεταξύ eIF2A-P και eIF2B σχηματίζεται ένα σύμπλοκο eIF2α-P/eIF2B, το οποίο

μειώνει δραστικά την διαθεσιμότητα του παράγοντα eIF2B και την πρόσδεσή του στον eIF2. Αυτό έχει σαν επακόλουθο τον μη σχηματισμό του συμπλόκου eIF2-GTP-$tRNA_i^{Met}$ και κατ' επέκταση την παρεμπόδιση πρόσδεσης της 40S υπομονάδας και την εξαρτώμενη από το 5' κάλυμμα μετάφραση [Jennings *et al*., 2017]. Στην δεύτερη περίπτωση οι υποφωσφορυλιωμένες 4E-BPs έχουν μεγαλύτερη χημική συγγένεια για τον παράγοντα eIF4E απ' ότι ο τελευταίος για τον eIF4G. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ο eIF4E να μην προσδένει τον eIF4G, κάτι που αναστέλλει τον σχηματισμό του eIF4F και την αναγνώριση του καλύμματος 5' προκειμένου να ξεκινήσει η μετάφραση [Marques-Ramos *et al*., 2017]. Είναι επίσης ξεκάθαρο ότι η αποτελεσματικότητα της μετάφρασης μέσω IRES εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη δράση *trans* ρυθμιστικών πρωτεϊνικών παραγόντων επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την ιστοειδική και εξαρτώμενη από IRES μετάφραση πολλών μορίων mRNA (εικόνα 6) [Pickering and Willis 2005, Godet *et al*., 2019, Marques *et al*., 2022].

΄Εχει δειχθεί ότι διάφορες δομές μιας αμετάφραστης περιοχής 5΄ επηρεάζουν τον τρόπο λειτουργίας του IRES μέσω αλληλεπιδράσεων με ριβοσώματα ή και *trans* ρυθμιστικούς παράγοντες. Ένα καλά μελετημένο παράδειγμα γονιδίων στα οποία η δράση του IRES ρυθμίζεται από τέτοιους παράγοντες είναι η οικογένεια των πρωτο-ογκογονιδίων *Myc* τα οποία εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε αυτήν την περίπτωση η πρόσδεση ριβοσωμάτων σε IRES εξαρτάται από τουλάχιστον 4 πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν με το mRNA και μεταβάλουν τη στερεοδιάταξή του, προκειμένου το τελευταίο να αλληλεπιδράσει με τη σειρά του με την 40S ριβοσωματική υπομονάδα [Cobbold *et al*., 2008].



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση των δύο μοντέλων έναρξης της μετάφρασης μέσω καλύμματος 5'και IRES. Στην πρώτη περίπτωση, η έναρξη της μετάφρασης εξαρτάται από την αναγνώριση του καλύμματος 5' από την 40S ριβοσωματική υπομονάδα, πρόσδεση ευκαρυωτικών παραγόντων έναρξης της μετάφρασης και σχηματισμό του 43S συμπλόκου. Στην συνέχεια το τελευταίο προσδένει το κάλυμμα 5' προκειμένου να σχηματιστεί το 48S σύμπλοκο έναρξης και να σαρωθεί η 5' αμετάφραστη περιοχή έως ότου εντοπιστεί το κωδικόνιο έναρξης. Στην δεύτερη περίπτωση δεν απαιτείται αναγνώριση του καλύμματος 5' ούτε σάρωση της 5' αμετάφραστης περιοχής. Αντ' αυτού η 40S υπομονάδα στρατολογείται απευθείας κοντά στο κωδικόνιο έναρξης με την βοήθεια λίγων μόνο παραγόντων έναρξης της μετάφρασης καθώς και πρωτεϊνών πρόσδεσης στο IRES που ονομάζονται IRES trans-acting factors (ITAFs) [Marques et al., 2022].

Ακόμη ένα καλά μελετημένο παράδειγμα αποτελεί ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η αρκετά σύνθετη δομή IRES του ιού επιτρέπει την ανεξάρτητη από κάλυμμα 5΄ έναρξη της μετάφρασης μέσω δύο μειζόνων δομικών περιοχών. Οι τελευταίες περιλαμβάνουν συντηρημένες δομές βρόγχων, οι οποίες αλληλεπιδρούν με την 40S ριβοσωματική υπομονάδα προκειμένου να σχηματίσουν σύμπλοκο και να στρατολογήσουν τον παράγοντα eIF3 [Lukavsky, 2009].

Οι δομές των ευκαρυωτικών IRES διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους και μέχρι στιγμής δεν έχουν εντοπιστεί συντηρημένες αλληλουχίες και δομικά μοτίβα. Για κάποια γονίδια, προκειμένου το IRES να λειτουργεί αποτελεσματικά, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ύπαρξη συγκεκριμένων και σταθερών δομών RNA, ενώ για κάποια άλλα ισχύει ακριβώς το αντίθετο καθώς μία σταθερή δομή RNA λειτουργεί κατασταλτικά στην IRES-εξαρτώμενη μετάφραση [Filbin and Kieft, 2009]. Έχει προταθεί ότι η δομή των IRES δεν είναι άκαμπτη αλλά πολλές φορές υπόκειται σε

μεταβολές, οι οποίες επηρεάζουν τη λειτουργικότητά του. Επιπρόσθετα, η δράση των IRES κατά την έναρξη της μετάφρασης έχει πολλές φορές σαν αποτέλεσμα την παραγωγή διαφόρων ισομορφών μιας πρωτεΐνης επεκτείνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο το "ρεπερτόριο" έκφρασης ενός συγκεκριμένου γονιδίου [Komar and Hatzoglou, 2005].

1.1.1.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ 3΄ (3΄UTR) ΣΤΗ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Η αμετάφραστη περιοχή 3΄ εδράζεται καθοδικά της κωδικής περιοχής και έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται σε πληθώρα ρυθμιστικών διεργασιών όπως για παράδειγμα στη σταθερότητα και πολυαδενυλίωση του μηνύματος RNA, καθώς και στη μετάφραση και την ενδοκυττάρια χωροθέτησή του. Είναι λοιπόν προφανές ότι παίζει δραματικό ρόλο στην μετα-μεταγραφική τύχη των μηνυμάτων RNA. Σε αντίθεση με τις αμετάφραστες περιοχές 5΄, οι οποίες περιέχουν αλληλουχίες υπεύθυνες κυρίως για την έναρξη της μετάφρασης, οι περιοχές 3΄ χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη πιο ευέλικτων αλληλουχιών με μεγάλο εξελικτικό δυναμικό. Παρόλα αυτά, αρκετά συντηρημένες περιοχές έχουν εντοπιστεί στις 3΄UTRs καθώς επίσης και πληθώρα στοιχείων που εμπλέκονται σε μεγαλύτερο φάσμα ρυθμιστικών λειτουργιών στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των ανώτερων οργανισμών [Siepel *et al*., 2005, Hong *et al*., 2023].

1.1.1.2.1 Στοιχεία AU-rich (AREs) και Σταθερότητα του Μηνύματος RNA

Η τροποποίηση της σταθερότητας ενός μηνύματος RNA είναι ένας ακόμη μηχανισμός ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης μέσω του οποίου επιτρέπεται γρήγορη προσαρμογή. Αυτού του είδους ο μηχανισμός εμπλέκεται σε ζωτικής σημασίας διαδικασίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη, η διαφοροποίηση καθώς επίσης και η προσαρμογή του οργανισμού σε εξωτερικά ερεθίσματα [Elkon , *et al*., 2010]. Τα πιο καλά χαρακτηρισμένα στοιχεία σταθερότητας του mRNA μηνύματος είναι τα AU-rich, τα οποία βρίσκονται στην αμετάφραστη περιοχή 3΄ κάποιων γονιδίων [Jeffares, *et al*., 2008]. Το μέγεθός τους είναι μεταξύ 50 και 150 νουκλεοτιδίων και περιέχουν αρκετά αντίγραφα του πεντανουκλεοτιδίου AUUUA [Chen *et al*., 2006].

Τα AU-rich στοιχεία προσδένουν πρωτεΐνες (ARE-BPs) οι οποίες συνήθως προάγουν την αποικοδόμηση του μηνύματος RNA αποκρινόμενα σε μια πληθώρα ενδογενών και εξωγενών ερεθισμάτων. Γονίδια των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται από AREs περιλαμβάνουν κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες, όγκο-κατασταλτικούς παράγοντες, πρώτο-ογκογονίδια, καθώς επίσης και κάποια που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο, όπως κυκλίνες, ένζυμα, μεταγραφικούς παράγοντες, υποδοχείς και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες [Eberhardt *et al.*, 2007]. Παράδειγμα της δράσης των ARE, αποτελεί το γονίδιο c-jun το οποίο σε συνδυασμό με το c-fos συνθέτουν τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1. Έχει δειχθεί ότι στην 3΄UTR περιοχή του το c-jun περιέχει ένα AU-rich στοιχείο, το οποίο ρυθμίζει τα επίπεδα ισορροπίας του mRNA ενώ παράλληλα εμπλέκεται στην αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης [Barreau *et al.*, 2006].

Σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση ρυθμιστικών πρωτεϊνών σε AU-rich στοιχειά παίζουν και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες. Συνθήκες καταπόνησης του κυττάρου όπως το θερμικό σοκ και η υπεριώδης ακτινοβολία επιδρούν ανάλογα στη σταθερότητα των μηνυμάτων RNA κάποιων γονιδίων [Eberhardt *et al*., 2007]. Ένα παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση του αντι-αποπτωτικού παράγοντα Bcl-X_L του οποίου η έκφραση αυξάνεται μέσω σταθεροποίησης του μηνύματος RNA έπειτα από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, μια διαδικασία η οποία εμπλέκεται στη δημιουργία καρκίνου του δέρματος καθώς και άλλων ειδών καρκίνου. Μελέτη των πρωτεϊνών που προσδένουν AREs στην αμετάφραστη περιοχή 3΄ του Bcl-X_L οδήγησε στην ταυτοποίηση της νουκλοελίνης ως μείζονος σταθεροποιητικού παράγοντα, του οποίου η ικανότητα πρόσδεσης στο AU-rich στοιχείο επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας. Μέσω αυτής της πρόσδεσης αποτρέπεται στη συνέχεια η αποικοδόμηση του mRNA του Bcl-X_L [Zhang *et al*., 2008].

Εκτός από το ρόλο που παίζουν στη σταθερότητα των μηνυμάτων RNA, τα AREs έχει βρεθεί ότι μπορούν να δράσουν και ως ρυθμιστές της μετάφρασης. Ένα παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο TNF alpha το οποίο περιέχει ένα πολύ καλά συντηρημένο AU-rich στοιχείο στην αμετάφραστη περιοχή 3΄ του, μήκους 34 νουκλεοτιδίων [Vasudevan and Steitz, 2007]. Έχει βρεθεί ότι σε περιπτώσεις φλεγμονής του οργανισμού ακολουθεί παύση της κυτταρικής ανάπτυξης και αύξηση

της μετάφρασης του TNFa mRNA μέσω πρόσδεσης των παραγόντων AGO2 και FXR1 στο AU-rich στοιχείο του γονιδίου [Vasudevan and Steitz , 2007].

1.1.1.2.2 Μεταφραστικός Έλεγχος Μέσω της 3΄ UTR

Οι αμετάφραστες περιοχές 3΄ περιέχουν ρυθμιστικά στοιχεία *cis* που ενέχονται στον έλεγχο της μετάφρασης. Ένα παράδειγμα αποτελεί ο σχηματισμός ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων της 3΄ UTR του Hunchback mRNA εμβρύων δροσόφιλας με τις πρωτεΐνες Pumilio, Nanos, και Brat και την καταστολή της πρωτεινοσύνθεσης έως ότου αναπτυχθεί σωστά το έμβρυο [Kuersten *et al*., 2003]. Επιπρόσθετα, η αποτελεσματικότητα της μετάφρασης είναι συνδεδεμένη με το μήκος της 3΄ UTR καθώς αυτό καθορίζει την ύπαρξη ή όχι *cis* ρυθμιστικών περιοχών. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ρύθμισης μέσω του μήκους της 3΄ UTR αποτελεί το γονίδιο UCP1, του οποίου το μετάγραφο με την μεγαλύτερου μήκους 3΄ UTR περιέχει θέσεις πρόσδεσης για την RNA-δεσμευτική πρωτεΐνη CPEB2. Μέσω πρόσδεσης της τελευταίας επιτυγχάνεται καταστολή της έκφρασης υπό φυσιολογικές κυτταρικές συνθήκες και επαγωγή σε περιπτώσεις έκθεσης σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως οι χαμηλές θερμοκρασίες [Chen et al., 2018].

1.1.1.2.3 Ενδοκυττάρια Χωροθέτηση Μέσω της 3΄ UTR

Ο ρόλος της 3΄ UTR στην ρύθμιση μέσω ενδοκυττάριας χωροθέτησης έχει επίσης μελετηθεί εκτενώς και αφορά την έκφραση μηνυμάτων RNA αφού μεταφερθούν στις κατάλληλες περιοχές του κυττάρου. Παραδείγματα αποτελούν η CaMK2A κινάση, της οποίας αμετάφραστη περιοχή 3΄ περιλαμβάνει ρυθμιστικά στοιχεία προκειμένου η μετάφραση να λαμβάνει χώρα στα άκρα των συνάψεων στην Δροσόφιλα [Broix et al., 2021]. Αντίστοιχα στα θηλαστικά, η συγκέντρωση της CaMK2A διατηρείται σε υψηλά επίπεδα στον ιππόκαμπο μέσω αλληλεπίδρασης της RNA-δεσμευτικής πρωτείνης Mub με ένα ρυθμιστικό στοιχείο 23 βάσεων που εδράζεται στην 3΄ UTR του CaMK2A mRNA [Chen *et al*., 2022]. Τέλος, ένα ακόμη

καλά μελετημένο παράδειγμα αποτελεί η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της β-ακτίνης μέσω πρόσδεσης της πρωτείνης ZBP1 στο ρυθμιστικό στοιχείο zipcode που εδράζεται στην 3΄ UTR του mRNA [Huttelmaier *et al*., 2005].

1.1.1.2.4 Η Ουρά πολυ(Α) και ο Ρόλος των Πρωτεϊνών Πρόσδεσης σε Αυτήν (PABPs)

Οι ουρές πολυ(Α) προστίθενται στην πλειονότητα των mRNAs κατά τη διάρκεια των σταδίων επεξεργασίας του 3΄ άκρου ταυτόχρονα με τη μεταγραφική διαδικασία [Millevoi, 2010]. Ορισμένα μη κωδικοποιητικά RNAs, όπως αρκετά μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (lncRNAs) και μερικά μικρά μη κωδικοποιητικά RNAs, έχει επίσης βρεθεί ότι περιέχουν ουρές πολυ(Α) [Cai *et al*., 2004]. Η ουρά πολυ(Α) είναι σημαντική για τη διαμεσολάβηση της μετατόπισης του ώριμου mRNA στο κυτταρόπλασμα [Natalizio B.J., 2013] και παίζει βασικό ρυθμιστικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της μετάφρασης ιδίως σε ορισμένα αναπτυξιακά στάδια [Preiss, 1998]. Τέλος, οι ουρές πολυ(Α) είναι ζωτικής σημασίας για τον ποιοτικό έλεγχο του mRNA και την αποικοδόμηση του [Bresson *et al.*, 2013].

Η δημιουργία της ουράς πολυ(Α) στα νεοσυντιθέμενα RNA περιλαμβάνει τη συνεργασία πολλών πρωτεϊνών και στοιχείων αλληλουχίας. Σχεδόν όλα τα mRNA των μεταζώων περιέχουν ένα σήμα πολυαδενυλίωσης (PAS) το οποίο έχει την κανονική αλληλουχία AAUAAA ή μια παραλλαγή. Αυτό το PAS καθώς και μια καθοδική αλληλουχία πλούσια σε GU ή U καθοδηγούν το σχηματισμό της ουράς πολυ(Α) με την προσέλκυση πολλαπλών πρωτεϊνικών συμπλόκων που εμπλέκονται στην αρχική επεξεργασία του άκρου 3΄ [Proudfoot 2011]**.** Η διάσπαση του RNA λαμβάνει χώρα εντός 10-30 νουκλεοτιδίων καθοδικά του PAS, και η πολυ(Α) πολυμεράση (PAP) προσθέτει στη συνέχεια την ουρά πολυ(Α). Μόλις προστεθούν 11-14 αδενοσίνες, η πυρηνική πρωτεΐνη δέσμευσης πολυ(Α) (PABPN) είναι σε θέση να δεσμεύσει την αυξανόμενη ουρά πολυ(Α) [Meyer *et al*., 2002]**.** Αυτή η δέσμευση επιτρέπει στην πολύ(Α) πολυμεράση να συνθέσει γρήγορα μια ουρά πολυ(Α), η οποία έχει μήκος περίπου 200-250 νουκλεοτιδίων στα μετάζωα [Brawerman, 1981] αν και δεν είναι όλα τα μετάγραφα "πλήρως" πολυαδενυλιωμένα με ~250 αδενοσίνες σε όλους τους ιστούς. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι ορισμένα

γονίδια περιλαμβάνουν ένα στοιχείο περιορισμού της πολυ(Α), το οποίο δρα έτσι ώστε να περιορίζει το αρχικό μήκος της ουράς στο πρόδρομο mRNA σε λιγότερο από 20 νουκλεοτίδια [Gu *et al.*, 1999]. Στο κυτταρόπλασμα, η ουρά πολυ(Α) επικαλύπτεται κυρίως με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη δέσμευσης πολυ(Α) (PABPC). Η PABPC επικαλύπτει επαναλαμβανόμενα την ουρά πολυ(Α) με ένα αποτύπωμα περίπου 20-30 νουκλεοτιδίων αδενοσίνης [Smith *et al.*, 1997]. Η PABPC διευκολύνει πλήθος αλληλεπιδράσεων σημαντικών για τη μετάφραση και τη σταθερότητα, συμπεριλαμβανομένης της σύνδεσης με τον παράγοντα έναρξης eIF4G, του συμπλόκου δέσμευσης καλύμματος eIF4F, καθώς και με τον παράγοντα τερματισμού της μετάφρασης eRF3 [Wigington *et al*., 2014]. Μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων, η PABPC και η ουρά πολυ(Α) είναι σε θέση να προωθήσουν συνεργιστικά τη μετάφραση.

Ενώ η PABPC έχει εμπλακεί στην προστασία και τη σταθερότητα του mRNA, συμμετέχει και στη στρατολόγηση των αποαδενυλασών, ένας φαινομενικά αντιφατικός ρόλος που μόλις άρχισε να διευκρινίζεται σε πρόσφατες δημοσιεύσεις. Το πολύπλοκο τοπίο των αλληλεπιδράσεων πρόσδεσης της ουράς πολυ(Α) περιπλέκεται περαιτέρω από το γεγονός ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες, όπως οι πρωτεΐνες La, που μπορούν να συνδεθούν σε αυτήν και στην PABPC για να τροποποιήσουν δυνητικά τη μετάφραση [Vinayak *et al*., 2018]. Σε πολλές περιπτώσεις η ουρά πολυ(Α) παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του mRNA. Η αποαδενυλίωση από το 3΄ άκρο, ακολουθούμενη από την αφαίρεση του καλύμματος 5΄ είναι το πρώτο και ουσιαστικό βήμα για την αποικοδόμηση του mRNA [Parker and Song, 2004]. Ωστόσο, η αποαδενυλίωση δεν συνδέεται απαραίτητα με την αποικοδόμηση του mRNA. Τα αποαδενυλιωμένα mRNA μπορεί επίσης να είναι σταθερά αλλά μεταφραστικά ανενεργά και μπορούν να επανεργοποιηθούν με κυτταροπλασματική πολυαδενυλίωση, επανεκκινώντας έτσι τη γονιδιακή έκφραση [Mendez and Richter., 2001]. Υπάρχουν επίσης δεδομένα που υποστηρίζουν ότι ολιγοαδενυλιωμένα mRNA μεταφράζονται εξίσου και ενίοτε πιο αποτελεσματικά [Lima *et al*., 2017, Ioannidis *et al*., 1996]

Η αποαδενυλίωση πραγματοποιείται μέσω μιας πολύπλοκης συνδυαστικής διάταξης *cis*-δρώντων στοιχείων που αναγνωρίζονται από ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών δέσμευσης RNA (RNA-BPs), οι οποίες σε πολλές περιπτώσεις ανταγωνίζονται μεταξύ τους και μπορεί να έχουν ακόμη και αντίθετες λειτουργίες.

Αυτές οι RNA-BPs προσλαμβάνουν καταλυτικά ενεργές αποαδενυλάσες όπως την πολυ(Α) RNάση (PARN), επίσης γνωστή ως deadenylating nuclease (DAN) και το σύμπλοκο CCR4-NOT [Yi *et al*., 2018]**.**

1.1.1.2.5 Εναλλακτική Πολυαδενυλίωση

Τα σήματα πολυαδενυλίωσης κρίνονται απαραίτητα για τον τερματισμό της μεταγραφής και την έξοδο του μεταγράφου από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Ένας μεγάλος αριθμός μηνυμάτων RNA φέρουν πάνω από μια θέσεις πολυαδενυλίωσης (pAs) μέσω των οποίων καθίσταται εφικτό το εναλλακτικό μάτισμα και πολυαδενυλίωση τους, κάτι το οποίο προσφέρει στο κύτταρο ακόμη έναν μηχανισμό ελέγχου ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης [Carninci *et al.*, 2005, Edwalds-Gilbert *et al.*, 1997]. Εναλλακτικά pAs εντοπίζονται τόσο σε εσώνια όσο και σε εξώνια επιτρέποντας στο κύτταρο να παράξει διαφορετικές ισομορφές συγκεκριμένων πρωτεϊνών, ή μπορούν ακόμη και να εντοπιστούν στις αμετάφραστες περιοχές 3΄ των μηνυμάτων RNA, κάτι το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μεταγράφων με διαφορετικού μήκους 3΄ UTRs που παρόλα αυτά συνθέτουν την ίδια πρωτεΐνη. Την τελευταία δεκαετία μάλιστα μέσω της εξέλιξης στην αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS), έχει δειχθεί ότι πάνω από τα δύο τρίτα των γονιδίων στον άνθρωπο περιέχουν θέσεις εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης [Zhang *et al.,* 2021].

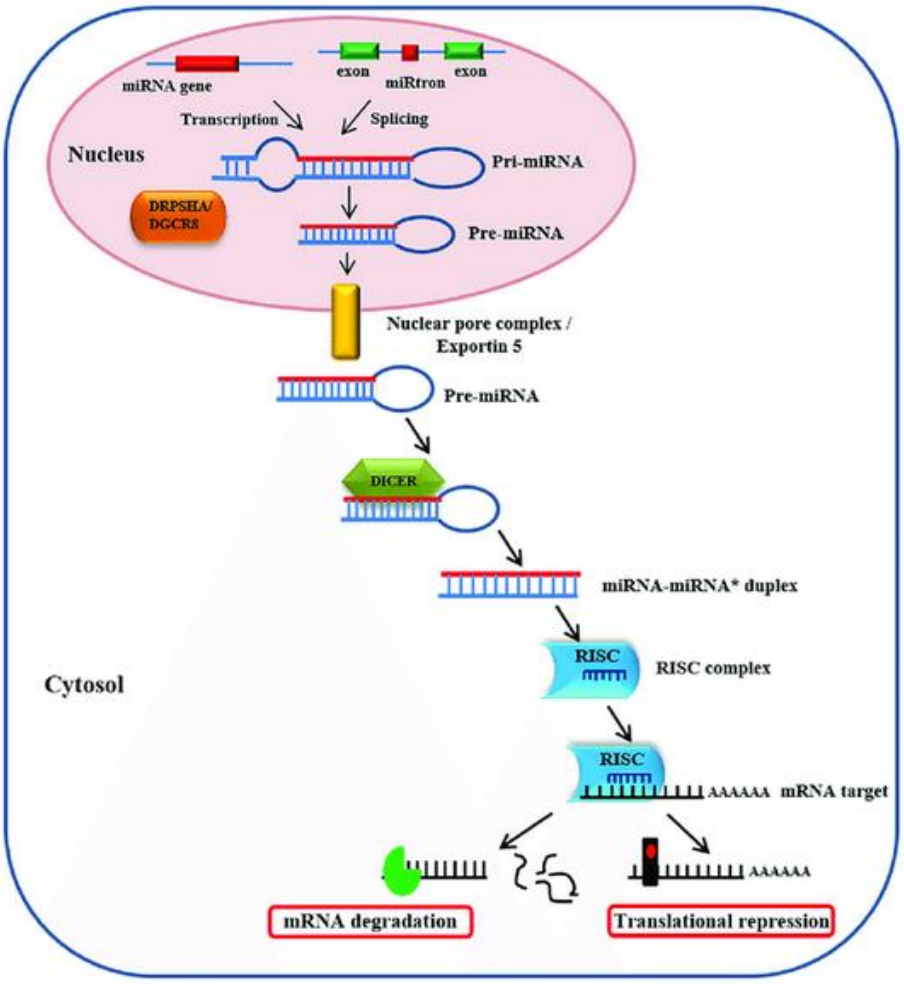
Έχει δειχθεί ότι κατηγορίες γονιδίων που παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης τείνουν να προτιμούν ‘’κοντινά’’ pAs παράγοντας έτσι μηνύματα με βραχείες αμετάφραστες περιοχές 3΄, σε αντίθεση με γονίδια που χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα έκφρασης και προτιμούν πιο ‘’απομακρυσμένα’’ pAs [Ji *et al.*, 2009]. Οι 3΄ UTR ισομορφές που προκύπτουν μέσω της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης αντικατοπτρίζουν τον ρόλο που οι ίδιες παίζουν στην γονιδιακή έκφραση. Μηνύματα με βραχείες 3΄ αμετάφραστες περιοχές τείνουν να είναι σταθερότερα καθώς αποφεύγουν μηχανισμούς αποικοδόμησης και κατ’ επέκταση αναστολής της μετάφρασης. Ο κυριότερος λόγος για αυτό είναι η έλλειψη περιοχών

στις οποίες δεσμεύονται miRNAs, τα οποία με την σειρά τους αναστέλλουν την μετάφραση. Σαν γενικός κανόνας ισχύει ότι βραχείες 3΄ UTR ισομορφές παρατηρούνται περισσότερο σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται [Sandberg *et al.*, 2008]. Σε αντίθεση με κύτταρα που πολλαπλασιάζονται, διαφοροποιημένα κύτταρα τείνουν να ‘’επιλέγουν’’ μεγαλύτερου μήκους 3΄ UTRs [Ji *et al.*, 2009].

1.1.2. TRANS ΜΕΤΑΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

1.1.2.1 ΜΙΚΡΟ-RNAs (miRNAs) ΚΑΙ Η ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗ ΠΕΡΙΟΧΗ 3΄

Η αμετάφραστη περιοχή 3΄ είναι η περιοχή του mRNA που στοχεύουν κατά γενικό κανόνα τα μικρο-RNAs. Αυτά είναι ενδογενή μονόκλωνα μη κωδικά μόρια RNA μεγέθους περίπου 22 νουκλεοτιδίων, τα οποία ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση αλληλεπιδρώντας σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο με τους mRNA στόχους τους. Στα θηλαστικά δρουν μέσω "μερικού" ζευγαρώματος βάσεων με ένα miRNA στοιχείο απόκρισης (MRE - miRNA Response Element), το οποίο βρίσκεται στην 3΄ UTR του mRNA στόχου μέσω μίας αλληλουχίας αναγνώρισης (seed) που βρίσκεται στην περιοχή 5΄ του miRNA. Στη συνέχεια στρατολογείται η πρωτεΐνη Argonaut και τελικώς έχουμε την καταστολή της έκφρασης του συγκεκριμένου μηνύματος [Paik *et al.*, 2011, Song *et al.*, 2008]. Ένας ακόμη μηχανισμός με τον οποίο τα miRNAs μπορούν να καταστείλουν τη μετάφραση είναι μέσω πλήρους ζευγαρώματος βάσεων με την αλληλουχία-στόχο προάγοντας έτσι την διάσπαση του mRNA μορίου (εικόνα 7) [Yekta *et al.*, 2004]. Εκτός από το να καταστέλλουν τη μετάφραση, τα miRNAs έχει επίσης βρεθεί ότι μπορούν να την ενισχύουν όπως γίνεται στην περίπτωση των γονιδίων TNF-alpha και β-ακτίνη [Ghosh *et al.*, 2008, Vasudevan *et al.*, 2007]. Μία πιο πρόσφατη μελέτη επίσης έδειξε την ενισχυτική δράση των miRNAs στην περίπτωση του ενζύμου ST6GAL1, το οποίο παίζει ρόλο στην μετα-μεταφραστική τροποποίηση του σιαλικού οξέος [Jame-Chenarboo *et al.,* 2022].



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση της δράσης των miRNA. Μέσω του ενζύμου dicer, πρόδρομα μόρια miRNA μήκους περίπου 70 νουκλεοτιδίων "κόβονται" σε μόρια μήκους περίπου 20 νουκλεοτιδίων. Στη συνέχεια τα ώριμα miRNAs δρουν είτε μέσω πλήρους είτε μέσω μερικού ζευγαρώματος βάσεων στην 3΄ αμετάφραστη περιοχή του mRNA προκαλώντας αποικοδόμηση του μορίου ή καταστολή της έκφρασης αντίστοιχα. [Melone *et al.*, 2018]

Ένα και μοναδικό miRNA έχει τη δυνατότητα να ρυθμίσει την έκφραση πολλών γονιδίων-στόχων και αυτό διότι η συμπληρωματικότητα βάσεων είναι απαραίτητη μόνο για την seed αλληλουχία που βρίσκεται στην 5΄ περιοχή του. Επιπρόσθετα η έκφραση ενός mRNA μπορεί να ρυθμιστεί από πολλά διαφορετικά miRNAs. Κατ' αυτόν τον τρόπο επεκτείνεται το ρεπερτόριο έκφρασης ενός mRNA σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή ή ακόμη και σε ένα συγκεκριμένο τύπο ιστού [Stark *et al.*, 2005].

Τα miRNAs έχει επίσης δειχθεί ότι μπορούν να αλληλεπιδράσουν με διάφορες RNA-δεσμευτικές πρωτεΐνες μεσολαβώντας έτσι στη δημιουργία κατάλληλων κυτταρικών αποκρίσεων σε διάφορα ερεθίσματα και μεταβολές. Ένα παράδειγμα αποτελεί η νόσος του συνδρόμου Down, αποτέλεσμα της ύπαρξης τριών αντιγράφων του 21ου χρωμοσώματος. Μελέτες έχουν δείξει ότι 5 γονίδια που κωδικοποιούν miRNAs διπλασιάζουν τα αντίγραφά τους στην περίπτωση τρισωμίας 21. Υπερέκφραση των γονιδίων αυτών έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της έκφρασης των γονιδίων στόχων των miRNAs, γεγονός στο οποίο αποδίδεται εν μέρει η κλινική εικόνα των ατόμων που πάσχουν από αυτό το σύνδρομο [Elton *et al.*, 2010].

1.1.2.2 ΤΑ ΜΑΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ RNA (LONG ncRNA)

Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (long ncRNAs , lncRNA) είναι ένας τύπος RNA , τα οποία γενικά ορίζονται ως μετάγραφα περισσότερων από 200 νουκλεοτιδίων που δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνη. Τα lncRNAs αποτελούν μια μοναδική οικογένεια μετα-μεταγραφικών ρυθμιστών, καθώς η λειτουργία τους δεν εξαρτάται κυρίως από την αλληλουχία (όπως συμβαίνει με τα miRNAs) ή τη δομή (όπως συμβαίνει με τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν RNA). Αντίθετα, τα lncRNAs, ιδίως τα μεγαλύτερα lncRNAs, μπορούν να λειτουργήσουν τόσο μέσω της ομολογίας/συμπληρωματικότητας της αλληλουχίας με άλλα νουκλεϊκά οξέα, όσο και μέσω της δομής, σχηματίζοντας μοριακά πλαίσια και ικριώματα για τη συναρμολόγηση μακρομοριακών συμπλόκων [Yoon *et.al*., 2013].

Έχει αναφερθεί ότι ένας μικρός αριθμός lncRNAs ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση μετα-μεταγραφικά με διάφορους τρόπους. Για παράδειγμα, το lncRNA MALAT1 (metastasis-associated long adenocarcinoma transcript 1) εμπλέκεται στο μάτισμα επηρεάζοντας την κατανομή των πρωτεϊνών SR [Tripathi *et al*., 2010.] Τα κυτταροπλασματικά 1/2-sbsRNAs (μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs που δεσμεύουν τη μισή θέση Staufen 1) προωθούν την αποικοδόμηση του mRNA μέσω μερικής σύζευξης βάσεων με συγκεκριμένα mRNA-στόχους και προσέλκυσης της πρωτεΐνης Staufen 1. Το lncRNA BC1 αλληλεπιδρώντας με τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4A και με την πρωτεΐνη δέσμευσης πολυ(Α)

(PABP) αναστέλλει την μετάφραση [Wang *et al.*, 2005], ενώ επίσης έχει δειχθεί ότι το lncRNA-p21 καταστέλλει τη μετάφραση των mRNA που κωδικοποιούν τη β-κατενίνη και το JunB μέσω μερικής σύζευξης βάσεων και στρατολόγησης πρωτεϊνών καταστολέων της μετάφρασης [Yoon *et al.,* 2012] Συνοψίζοντας, εκτός από την καθιερωμένη λειτουργία των lncRNAs στη μεταγραφική και επιγενετική γονιδιακή ρύθμιση, τα lncRNAs διαθέτουν επίσης τη δυνατότητα να προάγουν και να αναστέλλουν τις μετα-μεταγραφικές διεργασίες του ματίσματος, της αποικοδόμησης και της μετάφρασης του mRNA.

1.1.2.3 RNA-ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

Οι RNA-δεσμευτικές πρωτεΐνες (RBPs) αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι του ρυθμιστικού μηχανισμού στο μεταβολισμό του mRNA. Ρυθμίζουν διεργασίες όπως την ωρίμανση του mRNA, τη μεταφορά του στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, την ενδοκυττάρια χωροθέτησή του, τη μετάφραση καθώς και την αποικοδόμηση. Οι RNA-δεσμευτικές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με κωδικές καθώς επίσης και αμετάφραστες περιοχές σε ένα μόριο mRNA σχηματίζοντας ριβονουκλεοπρωτεινικά σύμπλοκα (RNPs) [Glisovic *et al*., 2008].

Η συστηματική μελέτη των προαναφερθέντων ριβονουκλεοπρωτεινικών συμπλόκων οδήγησε στην ταυτοποίηση των πρώτων αμινοξικών ακολουθιών και ρυθμιστικών περιοχών μέσω των οποίων είναι εφικτή η πρόσδεση των πρωτεϊνών αυτών σε μόρια mRNA [Burd and Dreyfuss 1994]. Οι RNA-δεσμευτικές πρωτεΐνες περιέχουν ένα ή και περισσότερα πεδία πρόσδεσης σε ένα μόριο mRNA. Μερικά από τα πιο γνωστά και καλά μελετημένα είναι το RBD, RRM, K-homology (KH) και RGG [Chen and Varani, 2005]. Χρησιμοποιώντας εργαλεία βιοπληροφορικής σε συνδυασμό με τα δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη των περιοχών αυτών, έρευνες έδειξαν ότι τα ευκαρυωτικά γονιδιώματα κωδικοποιούν ένα αρκετά μεγάλο αριθμό RNA-δεσμευτικών πρωτεϊνών. Για παράδειγμα περίπου 5-8% των γονιδίων της ζύμης κωδικοποιούν RBPs. Ομοίως στους οργανισμούς *D. Melanogaster* και *C. Elegans* 2% των γονιδίων τους έχουν βρεθεί ότι συνθέτουν RBPs [Chen and Varani 2005, Lasko 2000]. Στο ερώτημα γιατί είναι απαραίτητη η παρουσία ενός τόσο

μεγάλου αριθμού RBPs η ποιο πιθανή απάντηση θα μπορούσε να είναι το γεγονός ότι οι ανώτεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί μέσω της εξέλιξής τους έχουν αναπτύξει πολύπλοκα μονοπάτια μετα-μεταγραφικής ρύθμισης με αποτέλεσμα να κρίνεται απαραίτητη η παρουσία αυτών των ρυθμιστικών παραγόντων trans για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [Anantharaman *et al*., 2002].

Ένα πολύ καλά μελετημένο σύστημα μετα-μεταγραφικής ρύθμισης είναι αυτό του μεταβολισμού του σιδήρου σε κύτταρα θηλαστικών στο πλαίσιο ρύθμισης της ομοιόστασης του σιδήρου στον οργανισμό. Το μήνυμα RNA του υποδοχέα της τρανσφερίνης, μέσω του οποίου μεταφέρεται ο σίδηρος στο κύτταρο, σταθεροποιείται όταν τα επίπεδα του τελευταίου πέσουν κάτω του φυσιολογικού. Στην περίπτωση αυτή, ο ρυθμός παραγωγής του υποδοχέα αυξάνεται προκειμένου να αποκατασταθεί η επιθυμητή συγκέντρωση σιδήρου. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω πρόσδεσης των RNA-δεσμευτικών πρωτεϊνών IRP1 και IRP2 σε μια stem-loop δομή γνωστή ως Iron Responsive Element (IRE) [Pantopoulos K., 2004].

1.1.2.4.1 Οι RNA-Δεσμευτικές Πρωτεΐνες στην Ασθένεια

Οι πρωτεΐνες δέσμευσης RNA (RBPs) δεσμεύουν RNAs μέσω μιας ή πολλαπλών σφαιρικών περιοχών δέσμευσης RNA (RBDs) και αλλάζουν την τύχη ή τη λειτουργία των δεσμευμένων RNA στόχων τους. Αρκετές εκατοντάδες τέτοιες RBPs έχουν ανακαλυφθεί και διερευνηθεί και αντιστοιχούν στο 7,5% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες [Neelamraju *et al* 2015, Gerstberger, *et al* 2014]. Πρόσφατες μελέτες σε επίπεδο πρωτεώματος υπερδιπλασίασαν τον αριθμό των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη δέσμευση RNA και αποκάλυψαν εκατοντάδες επιπλέον RBPs που στερούνται συμβατικών αλληλουχιών αναγνώρισης.

Διαπιστώνεται ότι υπάρχουν περίπου 1914 ανθρώπινες πρωτεΐνες που δεσμεύουν RNAs. Οι RBPs είναι εξαιρετικά συντηρητικές ως προς τα είδη και διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης της γονιδιακής έκφρασης [Anantharaman *et al*., 2002]. Πληθώρα μελετών έχουν δείξει ότι οι RBPs εμπλέκονται σε διάφορες σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, όπως για παράδειγμα στην κυτταρική μεταφορά, τον εντοπισμό, την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και τον

μεταβολισμό. Επιπλέον, οι RBPs συμμετέχουν σχεδόν σε κάθε βήμα της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης, επιβλέπουν το σχηματισμό και τη λειτουργία των μεταγράφων και διατηρούν την κυτταρική ομοιόσταση. Μηχανιστικά, οι RBPs ρυθμίζουν το μάτισμα του RNA, την πολυαδενυλίωση, τη σταθερότητα του mRNA, τον εντοπισμό και τη μετάφραση του μέσω της αλληλεπίδρασης με κωδικοποιητικά και μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs) καθώς και άλλες πρωτεΐνες [Qin *et al*., 2020]. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι οι RNA-δεσμευτικές πρωτεΐνες συντονίζουν ένα πολύ σύνθετο δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ RNA και πρωτεϊνών με απώτερο σκοπό τη ρύθμιση του μεταβολισμού του RNA, είναι κατανοητό ότι η μη φυσιολογική λειτουργία τους μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική δυσλειτουργία και στη δημιουργία ασθενειών. Για παράδειγμα, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στη δυσλειτουργία των RNA-δεσμευτικών πρωτεϊνών εξαιτίας του μεγάλου αριθμού εναλλακτικών ματισμάτων στο RNA εγκεφαλικών κύτταρων, λειτουργία που ελέγχεται από τη δράση των RBPs [Gabut *et al*., 2008].

Οι ασθένειες που οφείλονται σε δυσλειτουργία των RBPs χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η μία αφορά αυτές οι οποίες οφείλονται σε υπολειτουργία των RBS ενώ η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τις ασθένειες που οφείλονται στην υπέρ-λειτουργία τους. Υπολειτουργία των RBPs παρατηρείται όταν λόγω γενετικών μεταλλάξεων η λόγω της αυτοάνωσης δράσης αντισωμάτων οι RNA-δεσμευτικές πρωτεΐνες καθίστανται ανενεργές. Για παράδειγμα η επέκταση του τρινουκλεοτιδίου (CGG) στην 5΄ αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου FMR1 έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της RNA-δεσμευτικής πρωτεΐνης FMRP, η οποία εμπλέκεται στη μετα–μεταγραφική ρύθμιση πολλών μορίων σημαντικών για την αναπτυξιακή και συναπτική νευροβιολογία. Κατ’ επέκταση, απενεργοποίηση της FMRP προκαλεί το σύνδρομο του εύθραυστου Χ, μία από τις ποιο κοινές μορφές διανοητικής υστέρησης [Chelly and Mandel, 2001]. Ο εγκλωβισμός των RBPs σε αυτήν την περίπτωση παρεμποδίζει την φυσιολογική δράση άλλων πρωτεϊνών στις περιοχές αυτές. Παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση της μυοτονικής δυστροφίας 1 (DM1). Εδώ, η εξάπλωση του τρινουκλεοτιδίου (CUG) στην 3΄ αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου DMPK έχει σαν αποτέλεσμα τον εγκλωβισμό και απενεργοποίηση των RNA-δεσμευτικών πρωτεϊνών MBNL1 και CUGBP1 [Wang and Cooper, 2007].

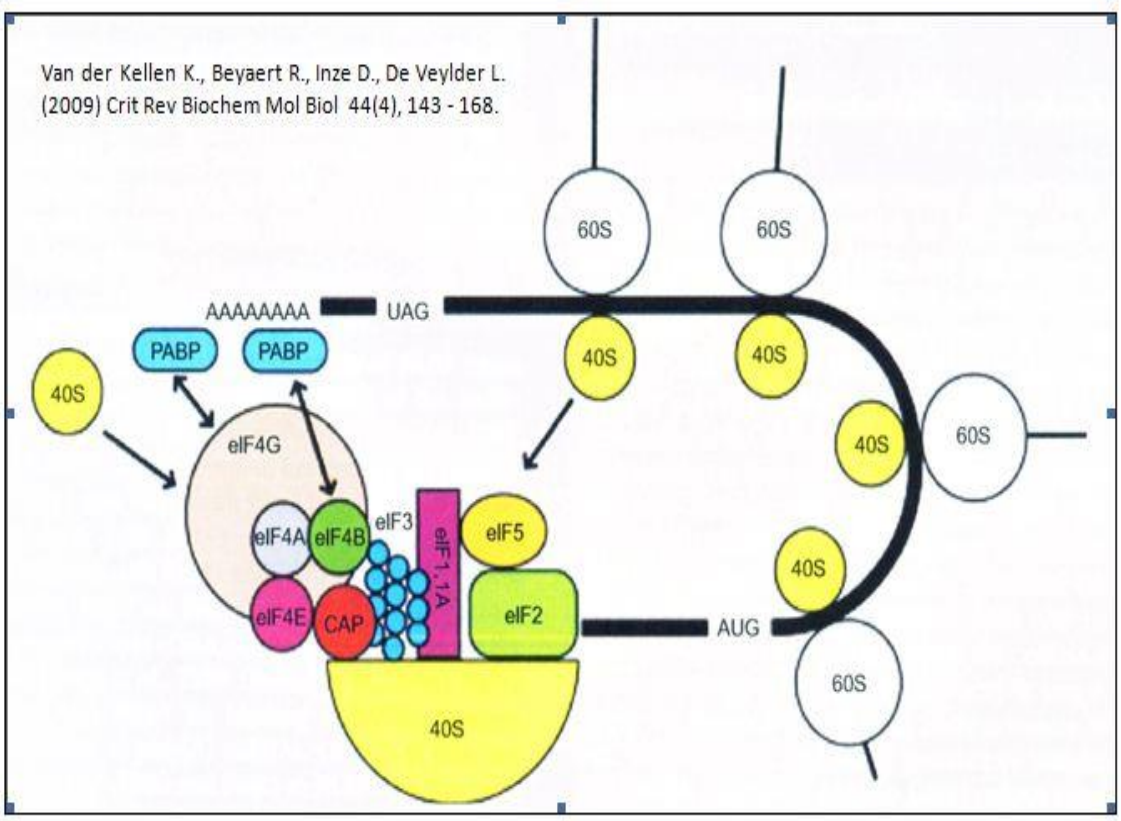
Όλο και περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι οι τροποποιήσεις RNA που διαμεσολαβούνται από τις RBP είναι κρίσιμες για την εξέλιξη του καρκίνου [Qin, *et al* 2020]. Μη φυσιολογική λειτουργία των RNA-δεσμευτικών πρωτεϊνών έχει επίσης παρατηρηθεί και σε πολλές κακοήθειες και θεωρείται ότι μπορεί να σχετίζεται με τη διαδικασία της καρκινογένεσης. Μια τέτοια περίπτωση αποτελεί η πρωτεΐνη HuR η οποία έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου και των ωοθηκών. Ένα από τα μηνύματα του οποίου την έκφραση επηρεάζει η HuR μέσω πρόσδεσης σε μια AU-rich περιοχή της 3΄ UTR είναι το COX-2, ένα γονίδιο το οποίο εμπλέκεται στη εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου [Dixon *et al*., 2001].

Άλλη μία κατηγορία RNA-δεσμευτικών πρωτεϊνών των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται σε κάποιες μορφές καρκίνου είναι αυτές της οικογένειας STAR (ενεργοποιητές μεταγωγής σήματος του μεταβολισμού του RNA) οι όποιες παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό. Η πρωτεΐνη Sam86 αυτής της κατηγορίας για παράδειγμα έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα μαστού και προστάτη ενώ η QKI να υπό-εκφράζεται σε κύτταρα γλιοβλαστώματος [Lukong *et al*., 2005, Busa *et al*., 2007, Chenard and Richard, 2008].

Μελέτες έχουν δείξει ότι το κάλυμμα 5΄ και η ουρά πολυ(Α) λειτουργούν συνεργιστικά ρυθμίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη μετάφραση του μηνύματος RNA [Tanguay RL, Gallie DR, 1996]. Η πρόσδεση των PABPs στην ουρά πολυ(Α) επιτρέπει την αλληλεπίδρασή της με τον παράγοντα eIF4 στο κάλυμμα 5' επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την "κυκλοποίηση" του mRNA, η οποία με τη σειρά της προάγει την έναρξη της μετάφρασης και εξασφαλίζει την ανακύκλωση των ριβοσωμάτων σε διαδοχικούς κύκλους μετάφρασης του ιδίου μηνύματος (εικόνα 8) [Mazumder B. *et al*., 2003, Van Der Kelen K. *et al.,* 2009].

Η πρόσδεση στο κάλυμμα 5΄ δεν επιτυγχάνεται μόνο μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων αλλά και μέσω συμπληρωματικότητας αλληλουχιών μεταξύ της αμετάφραστης περιοχής 5΄ και 3΄. Το γονίδιο p53 περιέχει μία περιοχή συμπληρωματικότητας μεταξύ των 5΄ και 3΄ UTRs, η οποία αλληλεπιδρά με τον μεταφραστικό παράγοντα RPL26 και ενισχύει τη μετάφραση σε περίπτωση βλαβών του DNA [Chen J, Kastan MB, 2010]. Έχει δειχθεί ότι σε περιπτώσεις μετάλλαξης του κωδικονίου λήξης, του σήματος πολυαδενυλίωσης και της δευτεροταγούς δομής της 3΄ UTR αυτό μπορεί να οδηγήσει σε απορρύθμιση της μετάφρασης ενός

γονιδίου γεγονός που μπορεί να επιφέρει βλάβη στον οργανισμό [Chatterjee S, Pal JK, 2009].



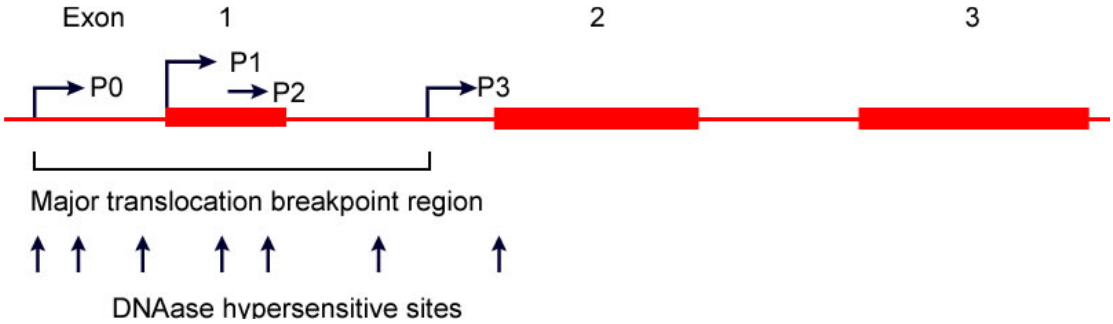
Εικόνα 8. Η αλληλεπίδραση του PABP με το 48S σύμπλοκο έναρξης. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο PABP, το οποίο είναι προσδεμένο στην poly(A) ουρά, και των eIF4G και eIF4B με βέλη. Αυτή η αλληλεπίδραση έχει σαν αποτέλεσμα την κυκλοποίηση του mRNA.

1.2 ΤΟ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΟ MYC

Ευρέως εμπλεκόμενη στην ανθρώπινη ογκογένεση, η οικογένεια των πρωτο-ογκογονιδίων MYC αποτελεί μία από τις καλύτερα μελετημένες κατηγορίες γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο. Το πρώτο ογκογονίδιο αυτής της οικογένειας που ανακαλύφθηκε ήταν το *c-myc* (ομόλογο του ιικού γονιδίου *v-myc*, του ρετροιού MC29, υπεύθυνο για την πρόκληση πλασματοκυτταρικού μυελόματος σε κοτόπουλα) [Payne, *et al*., 1982.] Σε δείγματα όγκων νευροβλαστώματος στη συνέχεια ταυτοποιήθηκε ως ομόλογο του MYC το γονίδιο MYCN, το οποίο μέχρι σήμερα αποτελεί έναν από τους ποιο αξιόπιστους γενετικούς δείκτες επιθετικής ασθένειας [Seeger *et al*., 1985].

Το γονίδιο του *c-myc* αποτελείται συνολικά από 3 εξώνια και φέρει πολλαπλές θέσεις έναρξης της μεταγραφής, επιτρέποντας έτσι το σχηματισμό τεσσάρων μεταγράφων, ανάλογα με τη δράση καθενός από τους 4 διαφορετικούς υποκινητές (P0, P1, P2, και P3 με μεγέθη 3.1, 2.4, 2.25 και 2.0 kb αντίστοιχα). Το συνηθέστερο μετάγραφο είναι το P2 και φέρει αμετάφραστη περιοχή 5΄ μεγέθους περίπου 400 νουκλεοτιδίων. Τα εξώνια 2 και 3 είναι κατά 70 και 90% όμοια μεταξύ των ειδών, ενώ το 1 είναι κατά 70% συντηρημένο μεταξύ ανθρώπου και ποντικού. Η περιοχή στο άκρο 5΄ περιέχει σταθερές θέσεις οι οποίες είναι ευαίσθητες στη δράση νουκλεασών DNase I.

Οι υπερευαίσθητες περιοχές DNase I (DHS) είναι περιοχές της χρωματίνης που είναι ευαίσθητες στη διάσπαση από το ένζυμο DNase I. Σε αυτές η χρωματίνη έχει χάσει τη συμπυκνωμένη δομή της, εκθέτοντας το DNA και καθιστώντας το προσβάσιμο. Αυτό αυξάνει τη διαθεσιμότητα του DNA στην αποικοδόμηση από ένζυμα, όπως η DNάση I. Αυτές οι προσβάσιμες ζώνες της χρωματίνης σχετίζονται λειτουργικά με τη μεταγραφική δραστηριότητα, δεδομένου ότι αυτή η αναδιαμορφωμένη κατάσταση είναι απαραίτητη για τη σύνδεση πρωτεϊνών, όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες [Hesketh R,, 1997] (Εικόνα 9).



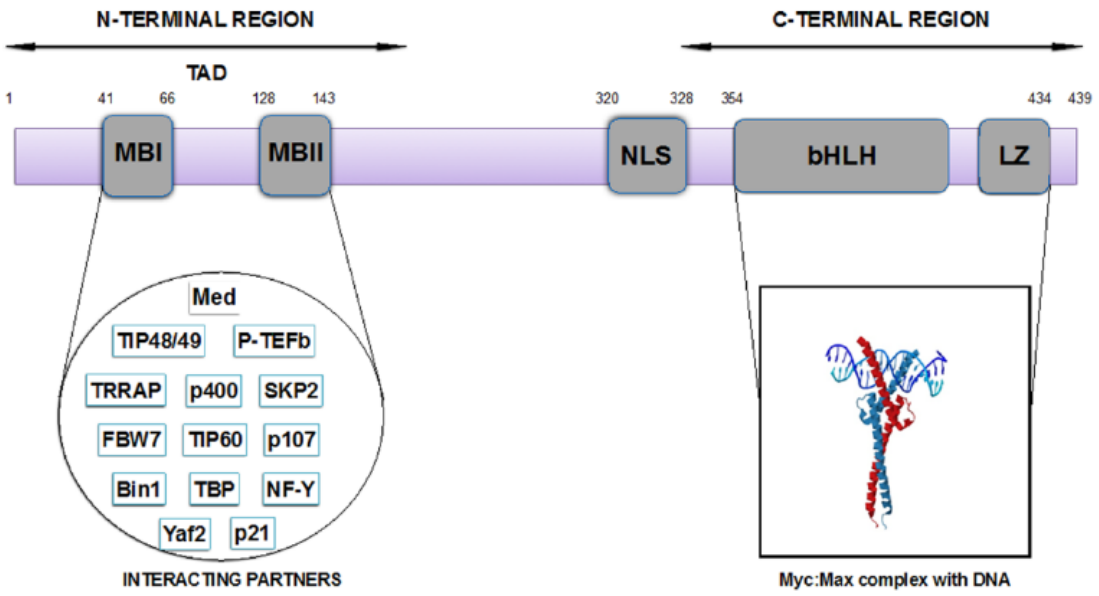
Εικόνα 9. Η δομή του ογκογονιδίου c-myc. Διακρίνονται τα τρία εξώνια, οι υποκινητές P0, P1, P2 και P3. Με βέλη διακρίνονται οι θέσεις στις οποίες δρουν οι νουκλεάσες υποδεικνύοντας αλληλεπίδραση με trans ρυθμιστικά στοιχεία [Hesketh R,, 1997].

1.2.1 Η ΔΟΜΗ ΚΑΙ Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ C-MYC

Η πρωτεΐνη C-MYC είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας με δομή "leucine-zipper", ο όποιος στο καρβοξυτελικό του άκρο έχει τη δομή φουρκέτας "helix-loop-helix". Η πρωτεΐνη εδράζεται στον πυρήνα και σχηματίζει ετεροδιμερή με το μόριο Max το οποίο έχει επίσης δομή "helix-loop-helix" [Blackwood and Eisenman 1991; Prendergast *et al*., 1991; Berberich and Cole, 1992; Kumar *et al.,* 2017] (εικόνα 10). Τα ετεροδιμερή Myc/Max προσδένονται στο DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες που ονομάζονται "E-box" και είναι της μορφής CAC(G/A)TG [Blackwell *et al*., 1990]. Μέσω αυτής της πρόσδεσης στη συνέχεια επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων που ενέχονται σε διεργασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική αύξηση, η απόπτωση, η διαφοροποίηση και ο μεταβολισμός. [Pelengaris *et al*., 2002, Eliers, 1999; Kumar *et al.,* 2017].

Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης περιέχει δύο υψηλά συντηρημένες περιοχές γνωστές ως MYC Box I και II οι οποίες αλληλεπιδρούν με το DNA. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν είτε την περιοχή αυτή είτε τη δομή της φουρκέτας καθιστούν το μόριο ανενεργό [Ayer, 1993].

Το μόριο Max έχει επίσης βρεθεί ότι σχηματίζει ετεροδιμερή με τις πρωτεΐνες Mxd και MAD επηρεάζοντας τη μεταγραφή άλλων γονιδίων και συχνά ανταγωνίζεται την πολλαπλασιαστική δράση της πρωτεΐνης MYC. [Ayer, 1993].



Εικόνα 10. Η δομή της πρωτεΐνης C-MYC. Το καρβόξυ-τελικό άκρο (C-TERMINAL REGION) έχει τη δομή helix-loop-helix μέσω της οποίας διμερίζεται με το Max και προσδένεται στο DNA. Το αμινο-τελικό άκρο (N-TERMINAL REGION) έχει τις αλληλουχίες MYC Box I και II , απαραίτητες για την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων. [Kumar *et al.,* 2017]

Σε φυσιολογικές κυτταρικές συνθήκες, τα επίπεδα των MAX μορίων είναι σταθερά, ενώ τα επίπεδα της πρωτεΐνης MYC αυξάνονται κατά τη διάρκεια έντονου πολλαπλασιασμού και χαμηλής διαφοροποίησης και αντίθετα. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης MAD αυξάνονται όταν μειώνεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και προάγεται η κυτταρική διαφοροποίηση. Όλες αυτές οι μεταβολές ρυθμίζονται από τα επίπεδα των μορίων που συνεργάζονται με την MAX πρωτεΐνη.

Φυσιολογικά το *c-myc* εκφράζεται κατά την εμβρυογένεση ενώ στον ενήλικα μόνο σε συγκεκριμένους ιστούς όπως η επιδερμίδα και ο γαστρεντερικός σωλήνας. Η έκφρασή του σχετίζεται με τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων [Eliers, 1999]. Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής αύξησης και του πολλαπλασιασμού, το *c-myc* αναστέλλει την διαφοροποίηση των περισσότερων τύπων κυττάρων και τα καθιστά ευαίσθητα στην απόπτωση.

1.2.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ *C-MYC*

Το *c-myc* εμπλέκεται σε μία πληθώρα βιολογικών αποκρίσεων που σχετίζονται με την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, τη γενομική αστάθεια, τον μεταβολισμό της γλυκόζης και των νουκλεοτιδίων, το ριβόσωμα και τη βιογένεση των μιτοχονδρίων, την απόπτωση, τη διακυτταρική επικοινωνία και τον έλεγχο της κυτταρικής διαφοροποίησης. [Conacci-Sorrell *et al*., 2014].

1.2.2.1 Το *C-MYC* ΠΡΟΩΘΕΙ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ

Μια από τις βασικότερες λειτουργίες του *c-myc* είναι η εμπλοκή του στον κυτταρικό κύκλο [Dang C, 1999, Amati *et al., 1998; Ahmadi et al., 2021*]. Σε συνθήκες εργαστηρίου τα επίπεδα του είναι μη ανιχνεύσιμα σε κύτταρα που δεν πολλαπλασιάζονται. Η δράση ενός μιτογόνου ερεθίσματος σε αυτή την περίπτωση επάγει την έκφραση του με αποτέλεσμα τα κύτταρα να εισέλθουν στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου. Πειράματα σε ποντίκια έχουν δείξει ότι η απαλοιφή του *c-myc*, οδηγεί σε θάνατο κατά τις μέρες 9, 5-10, 5 της εμβρυικής φάσης γεγονός που αποδεικνύει τον σημαντικό ρόλο που παίζει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των θηλαστικών [Davis *et al*., 1993]. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε πειράματα με ινοβλάστες αρουραίου όπου και πάλι η παρεμπόδιση της έκφρασης του *c-myc* οδήγησε σε χαμηλούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού των κυττάρων [Mateyak et al., 1997].

Έχει δειχθεί ότι η ιδιότητα που έχει το *c-myc* να ενεργοποιεί ή να καταστέλλει γονίδια στόχους που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο, αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα μέσω του οποίου είναι εφικτή η προαγωγή του τελευταίου. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα μεταβαίνουν από την G1 φάση στην S μέσω των εξαρτωμένων από κυκλίνες κινασών και συγκεκριμένα από τις D–CDK4 και E–CDK2. Έχει αποδειχτεί ότι το γονίδιο τόσο της CDK4 όσο και της CDK2 είναι άμεσοι στόχοι του *c-myc*. Επάγοντας την έκφρασή τους, ξεκινά η ενεργοποίηση μιας σειράς άλλων μορίων που καταλήγουν στην απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F [Mateyak et el.,1997]. Το *c-myc* έχει επίσης βρεθεί ότι δρα και ως αναστολέας

αρνητικών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου όπως οι p15, p21 και p27. [Garcia *et al.,* 2019]

1.2.2.2 ΤΟ *C-MYC* ΠΡΟΑΓΕΙ ΤΗΝ ΓΛΥΚΟΛΥΣΗ

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*., 1998]. Επιπλέον γονίδια που ενέχονται στον μεταβολισμό 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*., 1999]. 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 αν και λιγότερο αποτελεσματικός από την οξειδωτική φωσφορυλίωση όσον αφορά την παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης, προμηθεύει ενδιάμεσα μόρια για τα βιοσυνθετικά μονοπάτια απαραίτητα για τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα [Morrish *et al*., 2010].

1.2.2.3 Το *C-MYC* ΔΙΕΓΕΙΡΕΙ ΤΗΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Η έκφραση της πρωτεΐνης MYC ενέχεται στον σχηματισμό λειτουργικών μιτοχονδρίων [Li *et al*., 2005]. Οι πιο ολοκληρωμένες αναλύσεις των μιτοχονδριακών στόχων του MYC μέχρι σήμερα έχουν εντοπίσει 400 πυρηνικά γονίδια που κωδικοποιούν μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, από τα 7054 γονίδια που αναγνωρίστηκαν ως στόχοι του MYC με ανάλυση χρωμοσωμικής ανοσοκατακρήμνισης σε μικροσυστοιχίες υποκινητών, και 198 από τα 1578 γονίδια

που επάγονται από την έκτοπη έκφραση του MYC [Kim *et al*. 2008, Seitz *et al*. 2011].

Επιπρόσθετα, η αυξημένη έκφραση της 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 έκφραση της την αναστέλλει όπως αναφέρθηκε.

1.2.2.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ *C-MYC* ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει τη σπουδαιότητα του δικτύου MYC/MAD/MAX όσον αφορά τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης [Grandori, *et al*., 2000] Ο γενικός κανόνας 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 "κλειδώνει" τα κύτταρα σε μια αδιαφοροποίητη και ανορθόδοξα πολλαπλασιαστική κατάσταση [Iavarone *et al*., 2014]. Η υπερέκφραση του 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 συσσωρευμένα στοιχεία υποδεικνύουν έντονα ότι η κυρίαρχη λειτουργία της οικογένειας MYC για τη διατήρηση της πολυδυναμίας σε ES κύτταρα ποντικών είναι η ισχυρή καταστολή στο πρώιμο στάδιο της διαφοροποίησης. Όμως η αποσιώπηση της έκφρασης του *c-myc* στον μυελό των οστών έχει σαν αποτέλεσμα κυτταροπενία και συσσώρευση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων *in situ*. (Wilson *et al*., 2004). Επιπρόσθετα, αποδόθηκε και ένας τελείως διαφορετικός ρόλος στην MYC. Έχει δειχθεί ότι η πορεία της διαφοροποίησης δεν προϋποθέτει πάντα διακοπή του κυτταρικού κύκλου, οπότε η πρωτεΐνη MYC μπορεί να είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των κυττάρων προς τα τελικά στάδια της επιδερμικής ή της αιμοποιητικής σειράς [Dotto *et al*., 1986, Lemaitre *et al*., 1996].

Τα επίπεδα έκφρασης λοιπόν του *c-myc* ελέγχουν την λεπτή ισορροπία μεταξύ της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων [Hurlin *et al*., 2013].

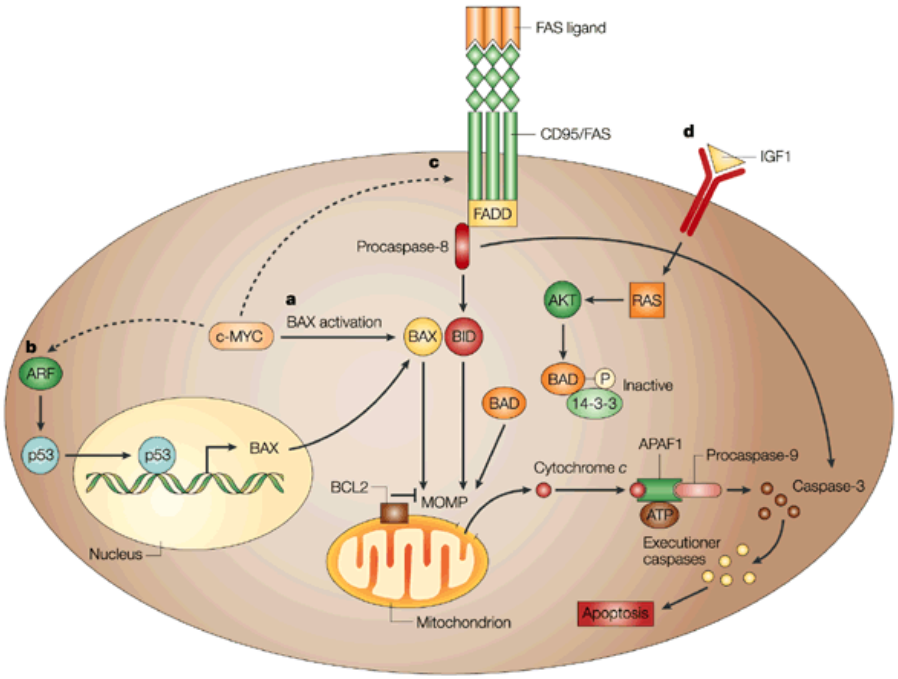
1.2.2.5 Το *C-MYC* ΕΜΠΛΕΚΕΤΑΙ ΣΤΟΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΘΑΝΑΤΟ

Προκειμένου τα κύτταρα να εξελιχθούν σε καρκινικά, απαραίτητη προϋπόθεση είναι να αποφύγουν την απόπτωση. Η πολλαπλασιαστική ικανότητα και μόνο μια αποικίας μετασχηματισμένων κυττάρων δεν είναι αρκετή εάν δεν συνοδεύεται και από μειωμένους ρυθμούς απόπτωσης.

Έχει βρεθεί ότι ογκοπρωτεΐνες όπως η MYC συνεργάζονται με μηχανισμούς που καταστέλλουν την απόπτωση όπως οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-XL [Qin *et al*., 1994, Wu *et al*., 1994]. Πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία εξέφραζαν στη μία περίπτωση το *c-myc* και το *Bcl-2* και στην άλλη μόνο το *c-myc*, έδειξαν ότι στην πρώτη περίπτωση η συνεργασία των δύο αυτών πρωτεϊνών οδηγούσε στην ανάπτυξη λεμφώματος.

Ακόμη πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η απορυθμισμένη MYC πρωτεΐνη σε συνθήκες στρες, όπως για παράδειγμα η αφαίρεση γλουταμίνης από το θρεπτικό υλικό ινοβλαστών MRC-5, ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στην απόπτωση αυξάνοντας την συσσώρευση AMP και τον καταβολισμό νουκλεοτιδίων [Edwards *et al.,* 2022]

Μία αναπαράσταση των αποπτωτικών μονοπατιών που επάγονται από το *c-myc* φαίνεται στην εικόνα 11. Το επικρατέστερο μοντέλο δράσης του *c-myc* όσον αφορά την απόπτωση είναι ότι η έκφραση του καθιστά τα κύτταρα ευαίσθητα σε μια πληθώρα προ-αποπτωτικών ερεθισμάτων όπως βλάβη στο DNA και η έλλειψη οξυγόνου καθώς επίσης και σε σηματοδότηση από τους λεγόμενους "υποδοχείς θανάτου", όπως ο FAS και ο TRAIL [Hueber *et al*., 1997 Lutz *et al*.,1998].



Εικόνα 11. c-myc και απόπτωση. Η πρωτεΐνη MYC ευαισθητοποιεί τα κύτταρα σε μια πληθώρα προ-αποπτοτικών ερεθισμάτων (βλάβη στον DNA, υποδοχείς TRAIl, υποξία κ.α.) [Pelengaris et al., 2002]

Μία από τις πρώτες μελέτες για το μηχανισμό δράσης του *c-myc* στην απόπτωση έδειξε ότι το τελευταίο επάγει την απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα του κυτοχρώματος c, το οποίο αφού ενωθεί με τον παράγοντα APAF1 σχηματίζει το αποπτώσωμα. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα η ενεργοποίηση μιας σειράς κασπασών μέσω των οποίων το κύτταρο οδηγείται σε θάνατο [Juin *et al*., 1998].

Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μηχανισμού αυτού βρέθηκε ότι παίζουν οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2. Παρόλο που μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί ο τρόπος με τον οποίο το *c-myc* αλληλεπιδρά με αυτές τις πρωτεΐνες, πιθανολογείται ότι γίνεται μέσω ενεργοποίησης της πρωτεΐνης BAX. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη κατά την απόπτωση ολιγομερίζεται και μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Τα ολιγομερή αυτά στη συνέχεια και κάτω από την επίδραση πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 επάγουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. Αντι–αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως το Bcl2 και το Bcl–XL βρίσκονται πάντα στην εξωτερική πλευρά της μιτοχονδριακής μεμβράνης και εμποδίζουν τη δράση της πρωτεΐνης BAX. Σε περίπτωση που διαταραχθεί αυτή η

ισορροπία σε ένα ενεργοποιημένο από το *c-myc* κύτταρο, από κει και πέρα καθορίζεται και το αν θα ζήσει ή όχι [Martinou J. C., Green D. R., 2001].

1.2.2.6 Το *C-MYC* ΕΝΕΧΕΤΑΙ ΣΤΗΝ ΡΥΘΜΙΣΗ miRNAs

Τα μικρο-RNA (miRNA) αποτελούν μόρια RNA, μεγέθους 18-24 νουκλεοτιδίων συνήθως, των οποίων η ρύθμιση επηρεάζεται και από την πρωτεΐνη MYC. Επιτελούν ρυθμιστικό ρόλο επηρεάζοντας την σταθερότητα και τη μεταφρασιμότητα των mRNA στόχων τους. Τα πρωτογενή μετάγραφα (pri-miRNAs) που προκύπτουν από την RNA πολυμεράση ΙΙ, αφού υποστούν πολυαδενυλίωση και μάτισμα, αναδιπλώνονται σε δομές φουρκέτας. Σε περιπτώσεις απορρύθμισης της έκφρασής τους προάγεται η ογκογένεση και είναι κάτι που παρατηρείται σε καρκινικά κύτταρα. Στην MYC έχει αποδοθεί διττός ρόλος στον έλεγχο της έκφρασης τους. Από την μία δεσμεύεται στους υποκινητές miRNAs που έχουν αντι-πολλαπλασιαστική και αντι-αποπτωτική δράση 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. (Kota et al., 2009). Από την άλλη, ενισχύει την έκφραση κάποιων miRNA, όπως γίνεται για παράδειγμα στην περίπτωση του συμπλέγματος miR-17-92, μιας ομάδας αποτελούμενης από έξι miRNA που προάγουν τον πολλαπλασιασμό και επιταχύνουν την ογκογένεση και την αγγειογένεση. Η MYC πρωτεΐνη λοιπόν, μέσω του ελέγχου της έκφρασης ενός συνόλου miRNAs εμπλέκεται έμμεσα στην ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων τους (Chang et al., 2008).

1.2.2.7 *C-MYC* ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Τα μη φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης του *c-myc* είναι ένα χαρακτηριστικό που συναντάται σχεδόν σε όλες τις μορφές καρκίνου. Η απορρύθμιση του συχνά σχετίζεται με κακή πρόγνωση της νόσου και μόνο η λεπτομερής μελέτη των μηχανισμών δράσης του ογκογονιδίου αυτού θα μπορούσε να βοηθήσει σε μία ενδεχομένως καλύτερη αντιμετώπιση μιας νεοπλασίας. Η απορρύθμιση της έκφρασης του *c-myc* στον καρκίνο επιτυγχάνεται μέσω χρωμοσωμικών μεταθέσεων, γονιδιακών επεκτάσεων και σημειακών μεταλλάξεων, μηχανισμοί οι οποίοι αναλύονται παρακάτω.

Οι χρωμοσωμικές μεταθέσεις είναι ένας μηχανισμός στον οποίο συνήθως ενέχονται οι ανοσοσφαιρίνες IgH. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του λεμφώματος Burkitt στον άνθρωπο, το ογκογονίδιο *c-myc* ενεργοποιείται αφού έρθει κοντά στην γονιδιακή θέση των ανοσοσφαιρινών. Αυτό στη συνέχεια έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των πληθυσμών των Β κυττάρων και τη δημιουργία λευχαιμίας Β. Στην περίπτωση δημιουργίας Τ λευχαιμίας, το *c-myc* μετατίθεται σε άλλη θέση πάνω στο χρωμόσωμα και συγκεκριμένα εκεί όπου κωδικοποιείται ο υποδοχέας κυττάρων Τ (T cell receptor) [Spencer and Groudine, 1991].

Στα πλαίσια της μελέτης Cancer Genome Atlas, βρέθηκε ότι η MYC πρωτεΐνη καθώς και οι παράλογές της, MYCL και MYCN, παρουσιάζουν επέκταση στο 28% των τύπων καρκίνων που μελετήθηκαν [Schaub et al., 2018]. Γονιδιακή επέκταση καθώς και χρωμοσωμική μετάθεση του *c-myc* έχει παρατηρηθεί σε πληθώρα νεοπλασιών όπως ο καρκίνος του ήπατος και του μαστού καθώς και σε περιπτώσεις λευχαιμιών [Beroukhim *et al.,* 2010]. Αύξηση της έκφρασης της MYC μπορεί να επιτευχθεί τόσο σε επίπεδο γονιδίου, όπως για παράδειγμα μέσω προσθήκης ανοδικών ενισχυτών ή μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών, όσο και σε επίπεδο πρωτείνης μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως για παράδειγμα στις θέσεις 58 (P-T58) και 62 (P-S62) της αμινοξικής αλυσίδας της πρωτεΐνης. Έχει δειχθεί ότι όγκοι με σταθερή έκφραση της MYC έχουν αυξημένα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης στην θέση 62 και μειωμένα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής στην θέση 58. Σηματοδοτικά μονοπάτια όπως αυτό του MAPK τείνουν να αυξάνουν τα επίπεδα της P-S62 μορφής, ενισχύοντας έτσι την σταθερότητα της πρωτεΐνης, ενώ μεταλλάξεις που αφορούν στην θέση 58 της

αμινοξικής αλυσίδας έχουν ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση της θέσης 62, οδηγώντας και πάλι σε σταθερότητα της P-S62 μορφής [Sears *at el.,* 2000*,* Farrell *et al.,* 2017, Wang *et al.,* 2011].

Η υπερ-οικογένεια MYC περιλαμβάνει γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες καθώς και συν-ρυθμιστικές πρωτεΐνες που συχνά έχουν βρεθεί να υπερ-εκφράζονται σε διάφορες μορφές καρκίνων. Παραδείγματα αποτελούν τα γονίδια *MAX* και *MLX* καθώς επίσης και τα *MGA*, *MXD1*, *MXD3*, *MXD4*, *MXI1, MNT*, *MLXIP* και *MLXIPL* που αλληλεπιδρούν με τα *MAX* και *MLX* [Grandori *et al.,*2000]. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μελών της υπερ-οικογένειας του *myc* μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή ή καταστολή της έκφρασης γονιδίων που ενέχονται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και του μετασχηματισμού των κυττάρων. Μεταλλάξεις και παραλλαγές αριθμού αντιγράφων σε αυτά τα γονίδια έχουν παρατηρηθεί σε αρκετές περιπτώσεις νεοπλασιών [Edelmann *et al.,* 2017].

Η ενεργοποίηση και μόνο της MYC δεν είναι αρκετή για να προκαλέσει τον μετασχηματισμό φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά. Η ογκογόνος δράση της πολλές φορές αναστέλλεται από την παρουσία μηχανισμών που προκαλούν παύση του κυτταρικού κύκλου, γήρανση και απόπτωση. Για παράδειγμα ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση της MYC μπορεί να οδηγήσει σε έκφραση της TP53 καθώς και γονιδίων σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, όπως το *CDKN2A.* Αντίστοιχα, καταστολή της έκφρασης της TP53 και της CDKN2A σε συνδυασμό με την επαγωγή έκφρασης γονιδίων όπως του *BCL2* έχει σαν αποτέλεσμα, την αναστολή της παύσης του κυτταρικού κύκλου, της γήρανσης και της απόπτωσης, γεγονότα που μπορεί να οδηγήσουν στον καρκινικό φαινότυπο [Vaux *et al.,* 1988, Bailey *ey al.,* 2017, Wu *et al.,* 1999].

Ο συσχετισμός των αυξημένων επιπέδων έκφρασης της MYC με τον καρκινικό φαινότυπο αποτελεί απόδειξη της ογκογονόνου δράσης της πρωτεΐνης αυτής. Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία επαγόταν η έκφραση του *c-myc* από διαφόρων ειδών υποκινητές, έδειξαν ότι η μη φυσιολογική έκφραση του είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία νεοπλασίας αντίστοιχης με την ιστοειδικότητα του υποκινητή που χρησιμοποιήθηκε. Για παράδειγμα, όταν χρησιμοποιήθηκε υποκινητής ογκογόνου ιού που δρα στους μαστικούς αδένες ποντικών, αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία όγκων στον αντίστοιχο ιστό [Elson *et al*., 1995].

Τροποποιημένη MYC πρωτεΐνη που λόγω σημειακών μεταλλάξεων δεν αποικοδομείται με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται σε μεγάλο βαθμό στο κύτταρο έχει επίσης δειχθεί ότι έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία όγκων [Salghetti *et al*.,1999].

1.2.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ *C-MYC*

Όλες οι κρίσιμες πτυχές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης ρυθμίζονται θετικά από το *c-myc*. Κατά συνέπεια, η χρονικά σωστή, στο σωστό μέρος και στη σωστή ποσότητα, παρουσία του είναι απαραίτητη για την φυσιολογική κυτταρική λειτουργία. Αυτό απαιτεί τον πολύ αυστηρό έλεγχο της έκφρασης του, ώστε να μπορεί να ενεργοποιείται ή να καταστέλλεται άμεσα και με ακρίβεια, όταν αυτό κρίνεται απαραίτητο. Η σημασία του *c-myc* για τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων αντικατοπτρίζεται από την εκτίμηση των 17.000-33.000 θέσεων πρόσδεσης του στο ανθρώπινο γονιδίωμα [Bieda *et al*., 2006], τον εντοπισμό 4296 θέσεων πρόσδεσης σε ανθρώπινα κύτταρα B P493 [Zeller *et al*., 2006] και από τη διαπίστωση ότι η MYC συνδέεται στο 10-15% των γονιδίων του ανθρώπου και της μύγας (Fernadez *et al*., 2003], αν και φαίνεται να μεταβάλλει τα επίπεδα μεταγραφής μόνο ενός υποσυνόλου από αυτά [Zeller *et al*., 2006]. Η ρύθμιση της έκφρασης του είναι πολλαπλή και γίνεται σε επίπεδο μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό και μεταφραστικό.

1.2.3.1 ΡΥΘΜΙΣΗ ΣΤΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

Ο εξαιρετικά πολύπλοκος έλεγχος του υποκινητή του *c-myc* περιλαμβάνει ρύθμιση σε πολλαπλά επίπεδα όπως:

- Από ένα πλήθος σηματοδοτικών μονοπατιών που περιλαμβάνουν μιτογόνους, αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες.
- Μέσω της ακεραιότητας της χρωμοσωμικής δομής.
- Μέσω αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (κατάσταση ακετυλίωσης και μεθυλίωσης ιστονών).
- Μέσω μεθυλίωσης του DNA

- Μέσω της διαμόρφωσης και τοπολογίας του DNA
- Μέσω ενός πλήθους μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται στον υποκινητή (εικ. 13)

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το *c-myc* έχει περιοχές οι οποίες έχει βρεθεί ότι είναι υπερευαίσθητες στη δράση νουκλεασών DNase I. Μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερευαισθησία συγκεκριμένων περιοχών σε νουκλεάσες οδηγεί είτε σε ενεργοποίηση ή σε καταστολή ενός γονιδίου. Οι περιοχές αυτές αποτελούν ρυθμιστικά στοιχεία *cis* με τα οποία αλληλεπιδρούν παράγοντες ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση [Marcu *et al., 1992*].

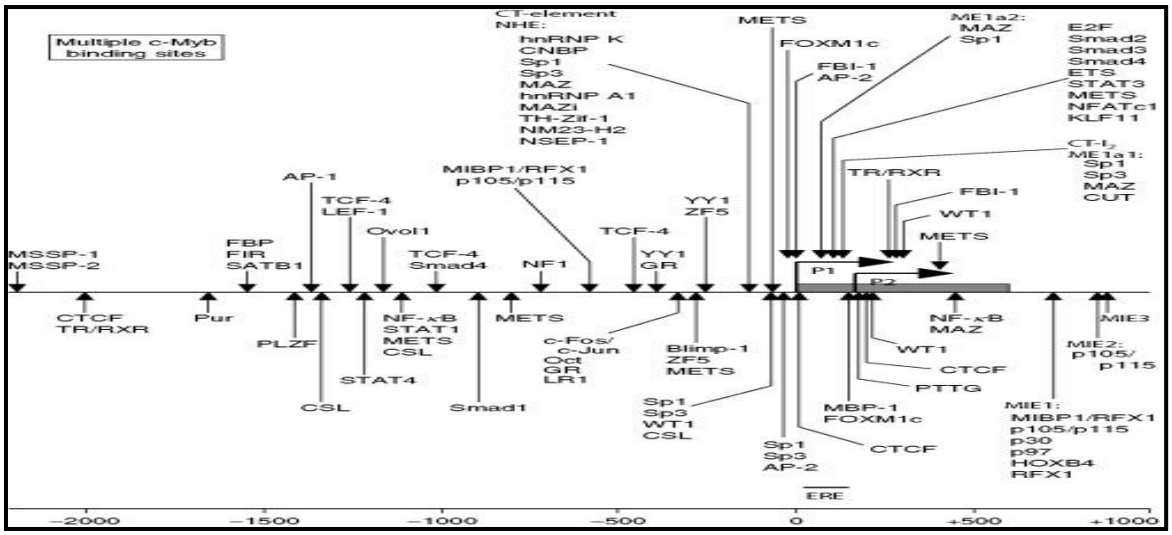
Αρκετές περιοχές οι οποίες είναι ευαίσθητες στη δράση νουκλεασών έχουν βρεθεί στο γονίδιο του *c-myc* στον άνθρωπο. Πριν τον υποκινητή P1 έχουν εντοπιστεί τέσσερις οι οποίες είναι η DH I, DH II1, DH II2 και DH III που βρίσκονται 1850, 1380, 750 και 130 ζεύγη βάσεων αντίστοιχα πριν το σημείο έναρξης της μεταγραφής. 90 ζεύγη βάσεων μετα τον P1 έχει βρεθεί η περιοχή ευαισθησίας DH III2. Τέλος οι περιοχές ευαισθησίας DH IV και DH V έχουν εντοπιστεί 800 και 1800 ζεύγη βάσεων αντίστοιχα μετά τον P1 [Marcu *et al*.,1992]. Οι περιοχές αυτές αποτελούν σημεία πρόσδεσης *trans* ρυθμιστικών παραγόντων μέσω των οποίων ρυθμίζεται η έκφραση ενός γονιδίου και συγκεκριμένα το αν θα υπάρξει καταστολή ή επαγωγή της έκφρασής του.

Ενδεικτικά αναφέρεται μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην κυτταρική σειρά HL-60, όπου κατά την τελική διαφοροποίηση της, η έκφραση του *c-myc* καταστέλλεται αφού προηγουμένως έχει ανασταλεί η ευαισθησία των περιοχών DH III1 και DH III2 στη δράση νουκλεασών. Συγκεκριμένα δείχθηκε ότι η μείωση των ρυθμών της μεταγραφής και η καταστολή της συσχετίζεται με την μείωση στην περιοχή DH IV της ευαισθησίας στη δράση νουκλεασών. Σε πειράματα με κυτταρικές σειρές που επάγονται για διαφοροποίηση δείχτηκε ότι μερικά εικοσιτετράωρα μετά την επαγωγή, η μεταγραφική έναρξη καταστέλλεται σε συνδυασμό με την μείωση στην υπερευαισθησία σε νουκλεάσες των περιοχών DH II2, DH III1 και DH III2 [Siebenlist *et al*.,1988]. Αντίθετα, όταν τα κύτταρα επάγονται για πολλαπλασιασμό, τότε παρατηρείται παύση του μηχανισμού μεταγραφικής καταστολής και αυξημένα επίπεδα του *c-myc* mRNA [Bentley and Groudine, 1988].

Τα πειραματικά λοιπόν αυτά δεδομένα συνηγορούν στο γεγονός ότι η ρύθμιση της έκφρασης στο μεταγραφικό επίπεδο για το γονίδιο του *c-myc* γίνεται αμέσως μετα την έναρξη της μεταγραφής και κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης του mRNA μορίου [Krumm *et al*., 1992]. Η ύπαρξη ρυθμιστικών παραγόντων *trans* σε αυτή την περίπτωση είναι καταλυτική για τον αυστηρό έλεγχο του μηχανισμού αυτού.

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην έναρξη της μεταγραφής. Οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες (General *Trans*cription Factors, GTFs), οι ενεργοποιητές (activators) 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 τον σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής. Για να αρχίσει η μεταγραφή ενός γονιδίου απαραίτητη είναι και η παρουσία ενεργοποιητών, δηλαδή πρωτεϊνών που προσδένουν τον ενισχυτή του γονιδίου και αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες που βοηθούν την πρόσδεση της μεταγραφικής μηχανής στον υποκινητή, ενεργοποιώντας την μεταγραφή και αυξάνοντας τον ρυθμό έναρξής της. Επιπρόσθετα υπάρχουν οι καταστολείς (repressors), πρωτεΐνες που ανταγωνίζονται την δράση των ενεργοποιητών και κατ' επέκταση παρεμποδίζουν την έναρξη της μεταγραφής και την γονιδιακή έκφραση.

Ο υποκινητής του *c-myc* ενεργοποιείται από αυξητικούς παράγοντες, μιτογόνα, κυτοκίνες (IL-2, IL-3, IL-6, IL-12), ορμόνες και βιταμίνες (Εικόνα 12). Για να διασφαλιστεί η κανονικότητα και η διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων MYC, ο υποκινητής του ρυθμίζεται αρνητικά από αντι-πολλαπλασιαστικούς παράγοντες και παράγοντες διαφοροποίησης (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή του c-myc. [Wierstra I, Alves J. 2008]

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 (*Trans*forming 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.

1.2.3.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΣΤΟ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ.

1.2.3.2.1 Η Μη Μεταφραζόμενη Περιοχή 5΄

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, στα ευκαρυωτικά κύτταρα η έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης ρυθμίζεται από τους ευκαρυωτικούς παράγοντες έναρξης που σχηματίζουν σύμπλοκα αλληλεπίδρασης με την μικρή ριβοσωματική υπομονάδα. Ο παράγοντας eIF4F συμβάλλει στην πρόσδεση του mRNA σε αυτήν [Gingras A.C., *et al*., 1999]. Αποτελείται από τους παράγοντες eIF4E, eIF4A και eIF4G και προσδένει το mRNA μέσω του eIF4E που αναγνωρίζει τη δομή (m^7G), στο άκρο 5΄ των περισσοτέρων mRNAs. Η δευτεροταγής δομή που σχηματίζεται από την 5΄ αμετάφραστη περιοχή (5΄UTR) του mRNA διασπάται από τη δράση ελικάσης του παράγοντα που υποβοηθείται από τον eIF4B. Τέλος, ο eIF4G, αλληλεπιδρά με τον eIF4E και γεφυρώνει το κάλυμμα 5΄ με την 40S υπομονάδα. Κατά αυτό τον τρόπο σχηματίζεται το σύμπλοκο έναρξης 48S. [Gingras *et al*., 1999, Sachs *et al*., 1997, Gross *et al*., 2003]. Το τελευταίο στάδιο είναι η "σάρωση" της 5΄ αμετάφραστης περιοχής προκειμένου να εντοπιστεί το κατάλληλο κωδικόνιο έναρξης και να τοποθετηθεί στη θέση P της ριβοσωματικής υπομονάδας για να συνδεθεί με το Met-tRNAi [Kozak M, 1980].

Το συγκεκριμένο μοντέλο έναρξης της μετάφρασης μέσω σάρωσης από το ριβόσωμα οδήγησε στην παραδοχή ότι όλα τα mRNA με σύνθετη 5΄ UTR δομή παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα μεταφρασιμότητας λόγω της αδυναμίας του ριβοσώματος να σαρώσει τις πολύπλοκες δευτεροταγείς δομές που βρίσκονται στη συγκεκριμένη περιοχή. Το ίδιο ακριβώς φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και στην περίπτωση του ογκογονιδίου *c-myc* όπου in vitro μελέτες σε ελεύθερα κυττάρων συστήματα έχουν δείξει ότι μεταφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα [Koromilas *et al*., 1992, Nanbru *et al*., 1997]. Παρόλα αυτά, διαπιστώθηκε ότι σε μερικά mRNAs ιικής κυρίως προέλευσης, η ύπαρξη σύνθετης 5΄ UTR δομής παίζει ακριβώς τον αντίθετο ρόλο καθώς περιέχει μία εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος (IRES) μέσω της οποίας είναι εφικτή η έναρξη της μετάφρασης ανεξάρτητα από το μηχανισμό του καλύμματος 5΄.

Μέσω της δομής IRES στρατολογούνται στο mRNA ριβοσώματα υπό συνθήκες όπως το κυτταρικό στρες, φάση του κυτταρικού κύκλου καθώς επίσης και η απόπτωση, κάτω από τις οποίες δεν είναι δυνατή η εξαρτώμενη από κάλυμμα 5΄ μετάφραση [Stoneley *et al*., 2000].Περιπτώσεις γονιδίων που ελέγχονται από αυτόν τον μηχανισμό είναι το *c-myc*, Apaf-1 και *Bcl-2* των οποίων ενώ η έκφραση μειώνεται κατά τη διάρκεια της ομαλής κυτταρικής ανάπτυξης, έχει δειχθεί ότι επάγεται μέσω το μονοπατιού IRES σε συνθήκες στρες [Komar and Hatzoglou, 2005].

Η εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος του *c-myc* βρίσκεται μετά τον υποκινητή P2. Τα μετάγραφα που προκύπτουν από αυτόν μεταφράζονται τόσο μέσω καλύμματος 5΄ όσο και μέσω IRES. Το ποιος από τους δύο μηχανισμούς όμως θα υπερισχύσει εξαρτάται από τις συνθήκες στις οποίες βρίσκεται εκείνη τη στιγμή το κύτταρο. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο μηχανισμός μετάφρασης μέσω IRES ενεργοποιείται κατά την κυτταρική απόπτωση, όπου η πρωτεόλυση του παράγοντα eIF4G καθιστά την μετάφραση μέσω καλύπτρας αδύνατη [Stoneley *et al*., 2000a]. Η ίδια ομάδα με in vitro μελέτες έδειξε ότι τα μετάγραφα που προκύπτουν από τον P2 υποκινητή έχουν δομή IRES στην αμετάφραστη περιοχή 5΄ τους μέσω της οποίας μπορούν να μεταφραστούν όταν ο μηχανισμός της καλύπτρας καθίσταται ανενεργός. Από την εν λόγο μελέτη προέκυψε επίσης ότι η μεταφρασιμότητα μέσω IRES διαφέρει από κυτταρική σε κυτταρική σειρά [Stoneley *et al*., 2000b].

Το μοντέλο που προτάθηκε βάσει των πειραματικών αυτών δεδομένων ήταν ότι η έναρξη της μετάφρασης στο *c-myc* μπορεί να γίνει μέσω δύο μηχανισμών. Σε συνθήκες κάτω από τις οποίες δεν είναι δυνατή η μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄ ενεργοποιείται αυτομάτως ο μηχανισμός του IRES, γεγονός που αποδεικνύεται στην περίπτωση της κυτταρικής απόπτωσης όπου παρόλο που η πρωτεϊνοσύνθεση γενικά ελαττώνεται το *c-myc* μεταφράζεται φυσιολογικά.

Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι ο μηχανισμός έναρξης της μετάφρασης μέσω IRES ελέγχεται αυστηρά. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι η λειτουργικότητα του IRES διαφέρει από ιστό σε ιστό με υψηλά επίπεδα να παρατηρούνται σε εμβρυικούς ιστούς και χαμηλά ή ανύπαρκτα σε ενήλικους [Creancier, *et al*., 2001].

Μελέτες σε κύτταρα πολλαπλού μυελώματος έδειξαν ότι όταν μέσω της δράσης αναλόγων ραπαμυκίνης παρεμποδίζεται η λειτουργία της mTOR κινάσης τότε παύει η μετάφραση του *c-myc* μέσω καλύμματος 5΄ και ενεργοποιείται ο

μηχανισμός του IRES προκειμένου να συνεχιστεί η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Στην προκειμένη περίπτωση σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του μηχανισμού IRES παίζουν οι MNK κινάσες [Shi *et al*., 2012].

Από αυτά τα δεδομένα λοιπόν γίνεται φανερό ότι ή μετάφραση μέσω IRES δεν είναι απλά ένας μηχανισμός που ενεργοποιείται σε συνθήκες όπου η εξαρτώμενη από το κάλυμμα 5΄ μετάφραση είναι αδύνατη, αλλά αποτελεί και ένα μηχανισμό ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού μια δεδομένη χρονική στιγμή.

Ο τρόπος με τον οποίο στρατολογούνται τα ριβοσώματα στη δομή του IRES ήταν μέχρι πρότινος μια περιοχή "αχαρτογράφητη". Πειραματικά δεδομένα όμως έδειξαν ότι η πολυ(A) ουρά ενισχύει τον σχηματισμό του 48S συμπλόκου από το IRES του *c-myc* ανεξάρτητα από τη δράση της πολυ(A) δεσμευτικής πρωτεΐνης (PABP) πάνω της. Καθαρισμός και ανάλυση των 48S συμπλόκων, μέσω υγρής χρωματογραφίας και φασματογραφίας μάζας που είχαν σχηματιστεί πάνω στο IRES ταυτοποίησε την παρουσία των ευκαρυωτικών παραγόντων έναρξης (eIFs) 2, 3, 4A, 4B, 4GI, και 5 [Thoma *et al*., 2008].

Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές πρωτεΐνες (ITAFs) που αλληλεπιδρούν με το IRES του *c-myc*, των οποίων η λειτουργία ρυθμίζεται μεταξύ άλλων από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. [Lewis and Holcik 2007]. Οι κανονικοί παράγοντες έναρξης της μετάφρασης απαιτούνται για τη μετάφραση με τη μεσολάβηση IRES, αν και το IRES του *c-myc* λειτουργεί απουσία αλληλεπίδρασης eIF3-eIF4F [Spriggs *et al*., 2009]. Η διαμεσολαβούμενη από το *c-myc* IRES μετάφραση διεγείρεται από τις πρωτεΐνες δέσμευσης poly(rC) 1 και 2 (PCBP1 και PCBP2) και την ετερογενή πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη K (hnRNP K) [Evans *et al*., 2003]. Είναι ενδιαφέρον ότι η hnRNP K δεσμεύεται ισχυρότερα στη μεταλλαγμένη αλληλουχία IRES που απαντάται σε κύτταρα πολλαπλού μυελώματος, με αποτέλεσμα την ενισχυμένη έκφραση του *c-myc*. Επιπλέον, οι PCBP1, PCBP2 και hnRNP K είναι σε θέση να μετακινούνται μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες μπορούν να αλληλεπιδρούν με το IRES του *c-myc* ενώ βρίσκονται ακόμη στον πυρήνα. [Makeyev and Liebhaber, 2002]. Μια άλλη πρωτεΐνη, η hnRNP C, προσδένεται ειδικά σε μια επταμερή αλληλουχία U που βρίσκεται μεταξύ των δύο εναλλακτικών κωδικονίων έναρξης της μετάφρασης CUG και AUG στην 5΄ UTR του ανθρώπινου *c-myc* mRNA. Στη φάση G2/M του

κυτταρικού κύκλου, η hnRNP C είναι ιδιαίτερα αυξημένη στο κυτταρόπλασμα, προκαλώντας αυξημένη μετάφραση του *c-myc* mRNA [Kim *et al*., 2003]. Επιπλέον, η hnRNP A1, ο παράγοντας δέσμευσης αλληλουχίας G-rich RNA 1 (GRSF-1), η πρωτεΐνη δέσμευσης Y-box 1 (YB-1), η πρωτεΐνη δέσμευσης πολυπυριμιδινικής οδού (PTB) καθώς και ο σχετιζόμενος με αυτήν παράγοντας ματίσματος (PSF) έχουν βρεθεί ότι δεσμεύουν το IRES του *c-myc*, ρυθμίζοντας έτσι την έκφρασή του. Επιπλέον πρόσφατα δείχτηκε ότι η ανεξίνη (AnxA2) προσδένεται στο IRES του *c-myc* mRNA και ρυθμίζει την έκφρασή του ανάλογα με τα επίπεδα ασβεστίου, παίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο το ρόλο ''διακόπτη'' μεταξύ της μετάφρασης μέσω καλύμματος ή IRES [Strand *et al*., 2021].

1.2.3.2.2 Η Μη Μεταφραζόμενη Περιοχή 3΄

Το *c-myc* mRNA είναι ιδιαίτερα βραχύβιο με χρόνο ημιζωής τα 30 λεπτά. Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, η τροποποίηση της σταθερότητας ενός μηνύματος RNA είναι ένας από τους μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Η 3΄ UTR του *c-myc* περιέχει μια περιοχή πλούσια σε A-U που ονομάζεται AU-rich. Τα στοιχειά AU-rich (AREs) είναι από τα πιο καλά χαρακτηρισμένα στοιχεία σταθερότητας του mRNA, τα οποία βρίσκονται στην αμετάφραστη περιοχή 3΄ γονιδίων που κωδικοποιούν κυτοκίνες, αυξητικούς και όγκο-κατασταλτικούς παράγοντες, πρωτο-ογκογονίδια, καθώς επίσης και κάποια που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο, όπως κυκλίνες, ένζυμα, μεταγραφικούς παράγοντες, υποδοχείς και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες [Eberhardt *et al*, 2007]. Τα AU-rich στοιχεία αποτελούν θέσεις πρόσδεσης ρυθμιστικών παραγόντων *trans* (ARE-BPs), οι οποίοι συνήθως προάγουν την αποικοδόμηση του μηνύματος RNA αποκρινόμενα σε μια πληθώρα ενδογενών και εξωγενών ερεθισμάτων. Όπως τα γονίδια που προαναφέρθηκαν, έτσι και το mRNA του *c-myc* βρέθηκε ότι περιέχει ένα AU-rich στοιχείο στην αμετάφραστη περιοχή 3΄. Ο αποσταθεροποιητικός παράγοντας που βρέθηκε ότι προσδένεται στο ARE του *c-myc* είναι η πρωτεΐνη hnRNP D [Brewer G., 1991].

Για τα περισσότερα ασταθή ή σταθερά mRNA μηνύματα, το πρώτο στάδιο πριν την αποικοδόμηση του κυρίως σώματος του μηνύματος είναι η σταδιακή

απομάκρυνση της ουράς πολυ(Α), η οποία οδηγεί στη σύνθεση ενός ολιγοαδενυλιομένου ενδιάμεσου μορίου [Decker and Parker, 1994]. Το 5΄-3΄ μονοπάτι αποικοδόμησης του mRNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα απαιτεί τη συντονισμένη δράση αρκετών πρωτεϊνικών συμπλόκων. Το αρχικό ρυθμορυθμιστικό βήμα είναι η αποαδενυλίωση του μηνύματος RNA, στην οποία ενέχονται δύο σύμπλοκα. Το Pan2-Pan3 ολοκληρώνει την ταχεία αποαδενυλίωση του mRNA ενώ το Ccr4-Not εμπλέκεται σε μια δεύτερη πιο αργή αποαδενυλίωση. Στην συνέχεια το σύμπλοκο Lsm1-7/Pat1 προσδένει το άκρο 3΄και τέλος το Dcp1-Dcp2 αφαιρεί το κάλυμμα 5΄ αφήνοντας το μήνυμα RNA εκτεθειμένο σε ριβονουκλεολυτική πέψη από το ένζυμο Xrn1 [Pavanello *et al.,* 2023]. Στο συγκεκριμένο μονοπάτι ο βασικός μηχανισμός που οδηγεί στην αποαδενυλίωση του μηνύματος περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις μεταξύ ρυθμιστικών παραγόντων *trans* που προσδένουν το mRNA και της αποαδενυλάσης Ccr4-Not. Έχει επίσης δειχθεί ότι η τελευταία στρατολογείται και μέσω μηχανισμών που αφορούν την παρουσία σπανίων κωδικονίων καθώς και μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη PABC1 [Stupfler *et al.,* 2017*,* Buschauer *et al.,* 2020].

Ο τρόπος με τον οποίο αποαδενυλιώνονται τα ασταθή μηνύματα RNA διαφέρει από τον αντίστοιχο των σταθερών. Τα AU-rich στοιχεία των ασταθών μηνυμάτων χωρίζονται σε τρεις οικογένειες ανάλογα με την αλληλουχία και τη ρυθμιστική τους λειτουργία. Τα οικογένειας II AU-rich στοιχεία επάγουν ασύγχρονη αποαδενυλίωση που οδηγεί στη σύνθεση ενός εντελώς αποαδενυλιωμένου και ασταθούς mRNA μορίου. Τα οικογένειας I και III AU-rich στοιχεία που συναντώνται σε γονίδια άμεσης επαγωγής (early response genes) όπως το *c-fos* και το *c-myc* κατευθύνουν μια διφασική αποικοδόμηση του mRNA. Κατά την πρώτη φάση, όλα το μόρια mRNA αποαδενυλιώνονται συγχρόνως χωρίς να αποικοδομείται το μήνυμα, ενώ στη δεύτερη φάση τα μηνύματα με κολοβή ουρά πολυ(Α) αποικοδομούνται γρήγορα. Μελέτες έχουν δείξει ότι το *c-myc* ακολουθεί αυτό ακριβώς το μοντέλο διφασικής αποικοδόμησης του μηνύματος RNA και ότι τα ολιγοαδενυλιωμένα ενδιάμεσα μόρια RNA που συντίθενται έχουν μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής από αυτόν των πολυαδενυλιομένων αντιγράφων τους [Ioannidis *et al*., 1996].

Η ύπαρξή ενός εναλλακτικού μοντέλου αποικοδόμησης του mRNA του *c-myc* προτάθηκε έπειτα από πειράματα στην κυτταρική σειρά HL-60 [Swartwout S. G.,

Kinniburgh A. J., 1989]. Τα ευρήματα αυτά αργότερα επιβεβαιώθηκαν και στην κυτταρική σειρά HeLa με τη σύνθεση μορίων RNA κολοβωμένων στην 5΄ περιοχή και αδενυλιωμένων στην 3΄ κάτω από την επίδραση ιντερφερόνης άλφα [Ioannidis P. *et al*., 1996]. Η σύνθεση αυτών των μορίων mRNA ήταν αποτέλεσμα ενδονουκλεολυτικής πέψης στην αμετάφραστη περιοχή 3΄ του *c-myc* μέσω ενός μηχανισμού που δεν απαιτεί την απομάκρυνση της ουράς πολυ(Α). Αργότερα δείχθηκε ότι η 3΄ UTR του *c-myc* αποτελεί στόχο της ενδοριβονουκλεάσης G3BP η οποία σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη Ras-GAP ρυθμίζει την ημιζωή του μηνύματος του *c-myc* [Tourriere H *et al*., 2001]. Ακόμη πιο πρόσφατες μελέτες που εστιάστηκαν στην δημιουργία προφίλ πολυσωμάτων, έδειξαν ότι το *c-myc* mRNA αποαδενυλιώνεται ταυτόχρονα με την μετάφρασή του σε κλάσματα που περιέχουν μεγαλύτερα πολυσώματα. Στην προκειμένη περίπτωση, σε αντίθεση με το μήνυμα RNA του *c-myc*, το μήκος της ουράς πολύ(Α) άλλων γονιδίων δεν φάνηκε να επηρεάζεται από το μέγεθος των πολυσωμάτων. Επιπρόσθετα δείχθηκε ότι η εξαρτώμενη από την μετάφραση αποαδενυλίωση του *c-myc* μετριάζεται έπειτα από την αποσιώπηση του παράγοντα τερματισμού της μετάφρασης eRF3, γεγονός που αποδεικνύει ότι η αποαδενυλίωση του μορίου λαμβάνει χώρα ταυτόχρονα με την μετάφρασή του μόνο στα μηνύματα RNA που έχουν μεταφραστεί και έχει λάβει χώρα τερματισμός της διαδικασίας [Jolles B *et al., 2018*] .

Μία ακόμη κατηγορία παραγόντων που ρυθμίζουν την έκφραση του *c-myc* μέσω της 3΄UTR είναι τα miRNAs. Αναλύσεις με την χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής οδήγησαν στην πρόβλεψη αλληλουχιών που ταιριάζουν με την seed αλληλουχία του let-7a στην 3′ UTR του. Πράγματι, η έκτοπη έκφραση του let-7a βρέθηκε να αναστέλλει την έκφραση του *c-myc.* Τα Let-7a, miR-375, miR-34a, miR-145, miR-148a, και miR-494 έχουν επιβεβαιωθεί πειραματικά ως miRNAs που στοχεύουν το *c-myc* mRNA και αναστέλλουν την εξέλιξη του καρκίνου του παγκρέατος αναστέλλοντας καθοδικά μονοπάτια του.[Shams *et al*., 2020].

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ συγκεκριμένων RBPs και του mRNA του *c-myc* ελέγχουν την πυρηνική εξαγωγή, τη σταθερότητα του mRNA, τη μετάφραση και την αποικοδόμηση. Για παράδειγμα, η πυρηνική εξαγωγή του *c-myc* mRNA προς το κυτταρόπλασμα ρυθμίζεται από τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E (Tansey, 2014). Η σταθερότητα του *c-myc* mRNA μπορεί να ρυθμίζεται ποικιλοτρόπως από τον ELAV1 (που ονομάζεται επίσης HuR), μέλος της

οικογένειας ELAV/Hu (embryonic lethal abnormal vision drosophila-like/Hu antigen), ανάλογα με συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους και συνθήκες [Keene 2002, Van Kouwenhove *et al*., 2011, Simone and Keene 2013].

Η ρύθμιση της έκφρασης του *c-myc* μέσω πρόσδεσης συγκεκριμένων RBPs μπορεί επίσης να συμβεί και σε μεταφραστικό επίπεδο. Η πρόσδεση του CELF1 στην 3′ UTR ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του *c-myc* εμποδίζοντας τη σύνδεση του με τον ELAVL1 (Liu *et al*.. 2015). Εναλλακτικά, η αποικοδόμηση του μηνύματος RNA μπορεί να διαμεσολαβείται από τη συνεργιστική δράση δύο ριβοσωματικών πρωτεϊνών, των RPL5 και RPL11, στην 3′ UTR του μέσω της στρατολόγησης του συμπλόκου της επαγόμενης από RNA αποσιώπησης (σύμπλοκο miR-24/RISC) [Liao *et al*. 2014]. Η αποικοδόμησή του μπορεί επίσης να διαμεσολαβείται από τη δραστηριότητα της ενδονουκλεάσης APE1 (Barnes *et al*,. 2009).

Οι αλληλουχίες AUUUA της 3΄ αμετάφραστης περιοχής του *c-myc* mRNA αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες που προσδένουν μόρια RNA [Brewer *et al*., 1991]. Αυτοί οι ρυθμιστικοί παράγοντες *trans*, επιδρούν είτε αρνητικά είτε θετικά στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου. Παράδειγμα αποτελούν οι πρωτεΐνες AUF1 και TIAR, που προσδένονται σε αλληλουχίες AUUUA της αμετάφραστης περιοχής 3΄ του *c-myc* mRNA ρυθμίζοντας την έκφρασή του. Η TIAR έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται στο 3′ UTR των mRNAs που περιέχουν στοιχεία πλούσια σε AU προκειμένου να αναστείλει την μετάφρασή τους. Η πρωτεΐνη AUF1 ενισχύει την μετάφραση του *c-myc* mRNA ανταγωνιζόμενη την θέση πρόσδεσης της TIAR [Liao and Brewer, 2007].

1.2.3.2.3 Η Κωδική Περιοχή του c-myc mRNA και η Συμβολή στον Μετα-Μεταγραφικό Έλεγχο

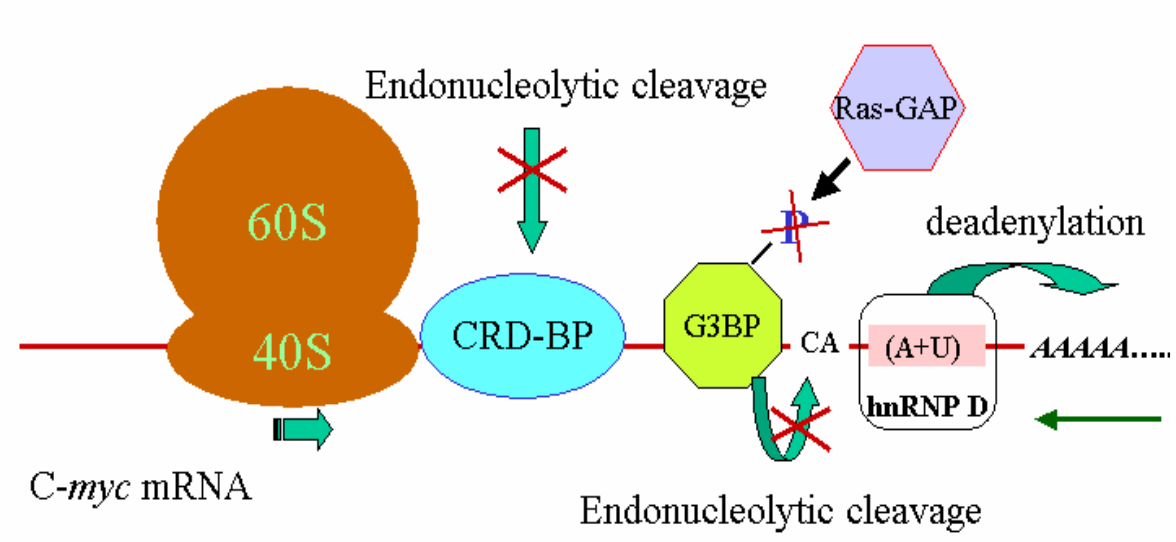
Εκτός από τα ρυθμιστικά στοιχεία *cis* που βρίσκονται στα UTRs, το mRNA του *c-myc* περιέχει και μία αλληλουχία εντός της κωδικοποιητικής του περιοχής, η οποία μπορεί να επηρεάζει τόσο τη σταθερότητα όσο και τη μεταφρασιμότητα του μηνύματος. Αυτή η αλληλουχία, καθοριστικός παράγοντας αστάθειας της περιοχής κωδικοποίησης (CRD), περιλαμβάνει τα τελευταία 249 νουκλεοτίδια της κωδικοποιητικής περιοχής του μηνύματος και λειτουργεί ανεξάρτητα από την πλούσια σε AU περιοχή για να καταστήσει το mRNA ασταθές (Bernstein *et al*.,

1992). Η μεταφραστική παύση στο CRD λόγω της παρουσίας ενός σπάνιου κωδικονίου αργινίνης (CGA) και ενός παρακείμενου κωδικονίου θρεονίνης (ACA) έχει σαν αποτέλεσμα την καθυστέρηση του ριβοσώματος, καθιστώντας έτσι την περιοχή ευάλωτη στην δράση νουκλεασών. [Wisdom R.and Lee, 1991, Bernstein., *et al*., 1992]. Το γεγονός ότι το CRD του *c-myc* είναι περιοχή που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της ημιζωής του ογκογονιδίου αποδείχθηκε από τις εξής παρατηρήσεις: α) Απομάκρυνση του CRD από το mRNA του *c-myc* σταθεροποιεί το μήνυμα. β) Προσθήκη της CRD περιοχής εντός πλαισίου ανάγνωσης του σταθερού mRNA της β-γλοβίνης αποσταθεροποιεί το μήνυμα. γ) Η παρουσία του CRD είναι απαραίτητη στον έλεγχο της ημιζωής του *c-myc* mRNA σε ηπατικά κύτταρα ποντικού όταν το ήπαρ υφίσταται αναγέννηση [Herrick, D. J., and J. Ross, 1994].

Το γεγονός ότι το στοιχείο αστάθειας CRD του *c-myc* μπορεί να αποτελέσει στόχο ενδονουκλεολυτικής πέψης διερευνήθηκε πρώτα από τον Ross και συνεργάτες. Σε *in vitro* σύστημα αποικοδόμησης, εμπλουτισμένο με ένα μόριο-ανταγωνιστή για τη θέση πρόσδεσης CRD, αποδείχτηκε ότι παρουσία του ανταγωνιστή, το mRNA του *c-myc* κατέστη 8 τάξεις μεγέθους ποιο ασταθές και μάλιστα λόγω ενδονουκλεολυτικής πέψης την οποία είχε υποστεί στη περιοχή του CRD. Αυτό συνηγορούσε στο γεγονός ότι στη συγκεκριμένη περιοχή δρα κάποιος παράγοντας ο οποίο προστατεύει το mRNA από τη δράση νουκλεασών. Λίγο αργότερα η πρωτεΐνη με την ονομασία CRD-BP (Coding Region Determinant-Binding Protein) απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε [Prokipcak *et al*., 1994, Doyle *et al*.,1998]. Ο Ioannidis και οι συνεργάτες του, το 2001, απέδειξαν ότι η πρωτεΐνη CRD-BP στον ποντικό είναι ταυτόσημη της IGF2BP1 (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 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. Προσδένουν μηνύματα και ελέγχουν την σταθερότητα, την μετάφραση, την ενδοκυττάρια μετακίνηση και την χωροθέτηση τους. Οι συνεργιστική δράση της IGF2BP1 και τεσσάρων συνδεδεμένων πρωτεϊνών (HNRNPU, SYNCRIP, YBX1 και DHX9) παρέχουν σταθερότητα στο mRNA του *c-*

myc στον καθοριστικό παράγοντα της περιοχής (CRD) περιορίζοντας τις διαδικασίες αποικοδόμησης του mRNA [Weidensdorfer *et al*., 2009].

Στην εικόνα 13 παρέχεται μια απεικόνιση των μονοπατιών αποικοδόμησης του mRNA του *c-myc*.



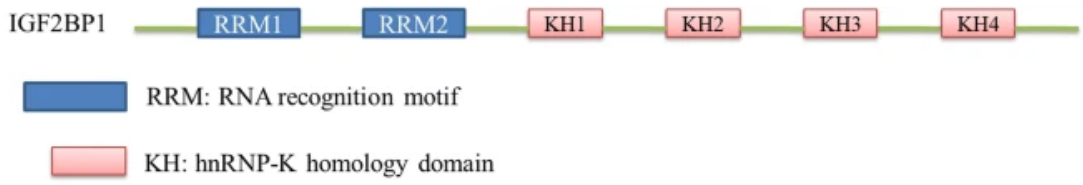
Εικόνα 13. Μονοπάτια αποικοδόμησης του *c-myc* mRNA και ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Πριν την αποικοδόμηση του κυρίως σώματος του μηνύματος, αυτό αποαδενυλιώνεται. Τα ενδιάμεσα ολιγοαδενυλιωμένα μόρια που προκύπτουν μπορεί να έχουν μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής από τα αντίστοιχα πολυαδενυλιομένα. Η πρωτεΐνη hnRNP D αλληλεπιδρά με το ARE του *c-myc* και προκαλεί την αποικοδόμηση του μηνύματος mRNA. Το mRNA του μπορεί επίσης να αποικοδομηθεί και μέσω ενδονουκλεόλυσης από τη δράση στην 3΄UTR της πρωτεΐνης G3BP μέσω του παράγοντα Ras-GAP καθώς επίσης και στη κωδική περιοχή του μέσω δράσης νουκλεασών στο στοιχείο αστάθειας CRD, εκτός αν το τελευταίο προστατεύεται από την CRD-BP πρωτεΐνη.

1.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ IGF2BP1

Έχουν ταυτοποιηθεί 229 πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το *c-myc* mRNA χρησιμοποιώντας HyPR-MS. Το σύνολο αυτό περιλαμβάνει RBPs με γνωστό ή πιθανό ρόλο στη μεταγραφή, την ωρίμανση, τη μεταφορά, τον εντοπισμό, τη σταθερότητα, την αποικοδόμηση και τη μετάφραση του μηνύματος RNA, καθώς και την αναδίπλωση της παραγόμενης πρωτεΐνης [Spiniello *et al*., 2019].

Η IGF2BP1 είναι μια ακόμη RNA-δεσμευτική πρωτεΐνη, η οποία σε φυσιολογικές συνθήκες εκφράζεται στην εμβρυογένεση. Πολυάριθμες μελέτες μέχρι στιγμής έχουν δείξει ότι η *de novo* ενεργοποίησή της συνάδει με την δημιουργία και

εξέλιξη αρκετών τύπων καρκίνου. Αποτελείται από 577 αμινοξέα και περιέχει 4 KH δομές στο καρβοξυτελικό άκρο της, ένα στοιχείο RGG και δύο μοτίβα RRM στο αμινοτελικό άκρο της [Doyle *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2018] (εικόνα 14). Η δομή KH όπως και η RGG είναι χαρακτηριστικά των RNA-δεσμευτικών πρωτεϊνών. Η RRM δομή αποτελείται από περίπου 90 αμινοξέα, και περιέχει δύο μικρές αλληλουχίες, τις RNP1 και 2, οι οποίες είναι οι υπεύθυνες για την πρόσδεση επάνω στο μόριο RNA [Burd and Dreyfuss, 1994]. Μελέτες πάνω στις δομές αυτές έδειξαν ότι οι 4 KH δομές επαρκούν για την πρόσδεση σε ένα RNA μόριο και ότι τα μοτίβα RRM ενώ μέχρι πρότινος θεωρούνταν απαραίτητα για την πρόσδεση, στη συνέχεια αποδείχτηκε ότι αυξάνουν τη συγγένεια προς το μόριο RNA χαμηλώνοντας την τιμή KD αλλά δεν κρίνονται απαραίτητα [Ostarek–Lederer *et al.*, 1998, Runge *et al.*, 2000].



Εικόνα 14. Δομή της πρωτεΐνης IGF2BP1. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους περίπου 64 kD. Διακρίνονται οι KH δομές στο καρβοξυ-τελικό άκρο και οι RRM στο αμινο-τελικό [Huang *et al.*, 2018]

Η πρωτεΐνη IGF2BP1 έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αποικοδόμησης του *c-myc* mRNA [Prokipcak *et al.*, 1994]. Επίσης έχει δειχθεί ότι η υπερέκφραση της εμποδίζει την έκφραση του IGF II leader 3΄ μεταγράφου [Nielsen *et al.*, 1999]. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η IGF2BP1 είναι κυρίως κυτταροπλασματική και είτε συγκεντρώνεται γύρω από τον πυρήνα και τα λαμελιπόδια είτε βρίσκεται διάχυτη [Nielsen *et al.*, 1999]. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώθηκε και έπειτα από πειράματα με χρήση φθορισμού προκειμένου να εξακριβωθεί η ενδοκυττάρια χωροθέτηση των μορίων IGF2BP1 [Hansen *et al.*, 2004].

Παρά το γεγονός ότι οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, υπάρχουν και ενδείξεις που συνηγορούν και στον πυρηνικό εντοπισμό της. Σε πειράματα διαμόλυνσης κυττάρων και υπερέκφρασης της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε ότι η παρουσία της ανιχνεύεται και στον πυρήνα. Αύτη η παρατήρηση σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το γονίδιο της IGF2BP1 περιέχει αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και σημάτων εξόδου από τον πυρήνα (NES) μπορεί να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα [Nielsen *et al*., 2003]. .

Οι ιστοί στου οποίους κυρίως εντοπίζεται η IGF2BP1 είναι οι εμβρυικοί. Εξαίρεση αποτελούν τα σπερματικά κύτταρα ενήλικου ανθρώπινου οργανισμού καθώς και τα χαμηλά επίπεδα στα οποία έχει ανιχνευθεί η πρωτεΐνη σε κύτταρα γαστρεντερικού σωλήνα ενηλίκων ποντικών [Hansen et al., 2004].

Πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη της IGF2BP1 έδειξαν ότι απουσία της προκαλεί νανισμό, ενώ επίσης είναι υπεύθυνη και για υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Στην περίπτωση αυτή μόνο το 40% των ομόζυγων ζώων επέζησαν, έχοντας σώμα κατά 40% μικρότερο σε μέγεθος σε σχέση με τα φυσιολογικά. Από αυτά τα πειραματικά δεδομένα διαφαίνεται ο πολύτιμος ρόλος που παίζει η παρουσία της πρωτεΐνης αυτής κατά την εμβρυική ανάπτυξη [Hansen V. O., *et al*., 2004].

1.3.1 RNA ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ IGF2BP1

Μέχρι στιγμής η IGF2BP1 και οι ορθόλογες με αυτήν πρωτεΐνες έχουν βρεθεί ότι προσδένονται σε μία πληθώρα μορίων RNA και ανάλογα με το είδος του RNA οι πρωτεΐνες αυτές ασκούν και διαφορετική δράση. Εκτός από το *c-myc*, όπου αναλύθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, άλλοι ενδεικτικοί RNA στόχοι είναι τα tau mRNA, H19, IGFII, MDR1, CD44 και *β-actin*.

Το H19 RNA είναι ένα ογκο–εμβρυϊκό RNA που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον πλακούντα και σε κάποιους εμβρυϊκούς ιστούς. Βρίσκεται 90 kb καθοδικά του γονιδίου IGFII στο χρωμόσωμα 11 του ανθρώπου και στο

χρωμόσωμα 7 του ποντικού. Λόγω του αμοιβαίου τρόπου με τον οποίο είναι αποτυπωμένα αυτά τα δύο γονίδια καθώς επίσης και της πανομοιότυπης χωροχρονικής έκφρασής τους έχει υποτεθεί ότι λειτουργούν μαζί. Μετά τη γέννηση τα επίπεδα έκφρασης του μειώνονται και τελικά γίνονται μη ανιχνεύσιμα στους περισσότερους ιστούς με εξαίρεση το σκελετικό μυ, την καρδιά και τα κύτταρα του μαστικού αδένα [Ohana *et al*., 1999]. Επανέκφρασή του έχει ανιχνευθεί σε όγκους εμβρυικού ιστού. Η απώλεια ή η απενεργοποίηση του αλληλόμορφου μητρικής προέλευσης έχει βρεθεί να συσχετίζεται με διάφορους όγκους, όπως αυτός του Wilms.

Ο IGFII είναι ένας εμβρυϊκός αυξητικός παράγοντας που δρα ως παράγοντας επιβίωσης, ως μιτογόνος παράγοντας καθώς επίσης και ως παράγοντας τροποποίησης του μεταβολισμού. Μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση του προκαλεί δυσανάλογη αύξηση, διόγκωση της καρδιάς και εμβρυικό θάνατο [Baker, 1993]. Το IGFII στον άνθρωπο περιλαμβάνει τέσσερις υποκινητές, των οποίων η ενεργοποίηση εξαρτάται από την φάση ανάπτυξης του οργανισμού καθώς επίσης και από τον ιστό. Τα μετάγραφα που προκύπτουν έχουν μέγεθος που κυμαίνεται από 2.2 έως 6 kb με διαφορετική το καθένα 5΄ αμετάφραστη περιοχή. Το πιο σύνηθες μετάγραφο είναι το leader 3΄, το οποίο έχει 5΄UTR μεγέθους περίπου 1.2 kb και μεταφράζεται μόνο σε κύτταρα που βρίσκονται σε φάση αύξησης. Η IGF2BP1 προσδένεται στην αμετάφραστη περιοχή 5΄ του leader 3΄ μηνύματος του IGFII και η υπερέκφραση της έχει βρεθεί ότι καταστέλλει την μετάφραση του γονιδίου αναφοράς σε χιμαιρικό όχημα [Nielsen *et al*., 1999 Nielsen *et al*., 1990]. Επιπλέον, καταστολή της έκφρασης της IGF2BP1 με χρήση siRNAs είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του IGFII τόσο σε επίπεδο RNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης [Liao, *et al*., 2004].

Το tau mRNA κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τους μικροσωληνίσκους (Microtubule Associated Protein - MAP) και βρίσκεται στο σώμα και τον άξονα των νευρώνων. Τα διάφορα μηνύματα RNA κινούνται στο κύτταρο με τη μορφή ριβονουκλεοπρωτεινικών σωματιδίων κατά μήκος του άξονα και μεταφράζονται όταν δεχθούν το κατάλληλο ερέθισμα [Schuman, 1999]. Το tau mRNA ταξιδεύει μέσω των μικροσωληνίσκων από το σώμα του νευρώνα προς μακρινά τμήματα του άξονα, στους αναπτυσσόμενους νευρώνες. Ο εντοπισμός του ελέγχεται από μία ρυθμιστική περιοχή *cis* που βρίσκεται στην 3΄ UTR του mRNA και

ονομάζεται σήμα εντοπισμού άξονα (Axon Localization Signal - ALS) [Aronov *et al*., 1999]. Με την αλληλουχία ALS έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά η πρωτεΐνη HuD, η οποία είναι σταθεροποιητικός παράγοντας πολλών μηνυμάτων RNA σε νευρικά κύτταρα. Οι Atlas και συνεργάτες χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη HuD ως "δόλωμα" απομόνωσαν ριβονουκλεοπρωτεινικά σωματίδια του tau και αναλύοντας την πρωτεϊνική τους σύσταση διαπίστωσαν την παρουσία της IGF2BP1 μαζί με την πρωτεΐνη G3BP [Atlas *et al*., 2004].

Η β-ακτίνη αποτελεί μία από τις 6 ισομορφές ακτίνης που έχουν εντοπιστεί στον ανθρώπινο οργανισμό. Πρόκειται για μία οικογένεια υψηλά συντηρημένων πρωτεϊνών που παίζουν ρόλο στην κινητικότητα καθώς και στην ακεραιότητα της κυτταρικής δομής. Ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των μορίων mRNA β-ακτίνης σε περιοχές ενεργού πολυμερισμού ακτίνης διαμορφώνει την κυτταρική μετανάστευση κατά την εμβρυογένεση, την κυτταρική διαφοροποίηση και πιθανόν την καρκινογένεση. Ο ενδοκυττάριος εντοπισμός απαιτεί την πρόσδεση της πρωτεΐνης ZBP1, η οποία είναι ορθόλογη της IGF2BP1 στο κοτόπουλο, σε μία ρυθμιστική περιοχή στην 3΄ UTR του mRNA της β-ακτίνης γνωστής ως zipcode. Μέσω της πρόσδεσης της ZBP1 καθίσταται εφικτή η μετατόπιση μεταγράφων β-ακτίνης σε πλούσιες σε ακτίνη κυτταρικές προεξοχές ινοβλαστών και νευρώνων. Η ZBP1 προσδένει μετάγραφα β-ακτίνης στον πυρήνα του κυττάρου και αφού αυτά μεταφερθούν στην περιφέρεια μεταφράζονται έπειτα από φωσφορυλίωση της ZBP1 από την κινάση Src [Huttelmaier *et al*., 2005].

Το γονίδιο CD44 κωδικοποιεί το αντιγόνο CD44, το οποίο είναι μια γλυκοπρωτεΐνη στην επιφάνεια του κυττάρου που παίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση των κυττάρων μεταξύ τους καθώς επίσης και στην προσκόλληση και μετανάστευσή τους. Μελέτες έδειξαν ότι το mRNA του CD44 περιέχει πολλαπλά σημεία πρόσδεσης της IGF2BP1 στην αμετάφραστη περιοχή 3΄ του και ότι έπειτα από καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης το mRNA γίνεται ασταθές και αποικοδομείται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης του CD44 και κατ’ επέκταση την εξαφάνιση των κυτταρικών προεξοχών μέσω των οποίων καθίσταται εφικτή η κινητικότητα των κυττάρων. Οι κυτταρικές αυτές προεξοχές είναι πολλές φορές υπεύθυνες και για το μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων [Vikesaa *et al*., 2006].

Το γονίδιο *mdr1* κωδικοποιεί την P γλυκοπρωτεΐνη η οποία λειτουργεί ως "αντλία" εκροής τοξικών ουσιών από το κύτταρο. Έχει ένα ευρύ φάσμα ειδικότητας σε πολυάριθμα υποστρώματα και έχει ενοχοποιηθεί για την ανθεκτικότητα του κυττάρου σε αρκετούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες [Yague *et al*,. 2003]. Πρόσφατες μελέτες κατέστησαν την κωδική περιοχή του γονιδίου *mdr1* ως στόχο της IGF2BP1. Συγκεκριμένα δείχτηκε ότι η πρωτεΐνη έχει την ίδια συγγένεια για την κωδική περιοχή του *mdr1* όπως για αυτήν του *c-myc*. Πρόκειται λοιπόν για ένα στοιχείο αστάθειας όμοιο με αυτό του *c-myc* με το οποίο αλληλεπιδρά η IGF2BP1 και προστατεύει το μόριο RNA από πιθανή ενδονουκλεολυτική πέψη. Είναι πολύ πιθανόν λοιπόν η ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων σε χημειοθεραπευτικές ουσίες να οφείλεται στη σταθεροποίηση του μηνύματος του *mdr1* από την IGF2BP1 με αποτέλεσμα την υπερέκφραση της γλυκοπρωτεΐνης P και την εκροή των τοξικών ουσιών από το κύτταρο [Sparanese, 2007].

Μελέτες RNA-σύνδεσης CLIP (crosslinking and immunoprecipitation) της IGF2BP1 σε HEK293, εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα και καρκινικά κύτταρα πρότειναν μια ποικιλία υποψήφιων mRNA-στόχων της IGF2BP1, προτιμώμενη πρόσδεση σε 3΄UTR και προτεινόμενα σύντομα μοτίβα πρόσδεσης της πρωτεΐνης [Hafner *et al*., 2010; Conway *et al*., 2016; Van Nostrand *et al*., 2016]. Επιπλέον, αναφέρθηκε ότι η IGF2BP1 συνδέεται με ορισμένα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNA) σε καρκινικά κύτταρα.

Άλλα γονίδια στόχοι της IGF2BP1 αποτελούν το *betaTrCP1* και το *GLI1*. Το γονίδιο *betaTrCP1* κωδικοποιεί την ομώνυμη πρωτεΐνη, μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών F-box, η οποία σε συνεργασία με τις πρωτεΐνες SKP1, Cullin1, και RBX1 σχηματίζουν το σύμπλοκο SCF ή λιγάση της ουβικουιτίνης E3 [Frescas and Pagano, 2008]. Η IGF2BP1 προσδένεται στην κωδική περιοχή του *betaTrCP1* και το σταθεροποιεί αποτρέποντας την αλληλεπίδρασή του με miRNAs μέσω της πρωτεΐνης AGO2 [Noubissi *et al*., 2006]. Το γονίδιο *GLI1* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών GLI, οι οποίες αποτελούν το κέντρο δράσης του μονοπατιού μεταγωγής σήματος Hedgehog (Hh). Οι πρωτεΐνες αυτές έχει βρεθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της τύχης του κυττάρου, στην εμβρυογένεση, την συντήρηση βλαστοκυτταρικών πληθυσμών καθώς επίσης και στην ογκογένεση [Noubissi, 2009]. Στην προκειμένη περίπτωση, η IGF2BP1

προσδένει και σταθεροποιεί το μήνυμα του GLI1 εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο αυξημένα επίπεδα μετάφρασης.

Πιο πρόσφατα, η IGF2BP1 ταυτοποιήθηκε ως ισχυρός προσδέτης της N6-μεθυλαδενοσίνης (m6A) στον καρκίνο με αποτέλεσμα την έκφραση προ-ογκογόνων παραγόντων όπως οι MYC, SRF και E2F1 [Huang H. *et al*., 2018; Lal *et al*., 2009; Müller *et al*., 2018; Müller *et al*., 2020]. Ωστόσο, μόνο για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης που καθοδηγείται από τον E2F, αναφέρθηκε ένας έντονα συντηρημένος ρόλος της IGF2BP1 στην προώθηση της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων E2F1-3 και ορισμένων από τους mRNA στόχους τους, π.χ. του MKI67 [Müller *et al*., 2020].

Η δράση της πρωτεΐνης IGF2BP1 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].

1.3.2 Η IGF2BP1 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Η εμπλοκή γονιδίων στόχων της IGF2BP1 όπως το H19, *c-myc* και IGFII στην καρκινογένεση σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η πρωτεΐνη ανιχνεύεται σχεδόν σε όλες τις γνώστες κυτταρικές σειρές καρκίνου οδήγησαν στην υπόθεση ότι η έκφραση της απορυθμίζεται σε ιστούς πρωτογενούς καρκίνου. Μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να ενεργοποιηθεί *de novo* σε πολλούς τύπους κακοηθειών και σε ποσοστά που κυμαίνονται από 12.5% στον προστάτη μέχρι 80% στον καρκίνο του παχέος εντέρου [Ioannidis *et al*., 2004 - Gu L., *et al*., 2004 - Ross J *et al*., 2001].

Στον καρκίνο των ωοθηκών, τα επίπεδα έκφρασης της IGF2BP1 είναι εξαιρετικά υψηλά σε σύγκριση με αυτά του φυσιολογικού ιστού και επιπλέον τα

αυξημένα αυτά επίπεδα έκφρασης έχουν βρεθεί να συσχετίζονται με προχωρημένο στάδιο της νόσου καθώς επίσης και με κακή πρόγνωση [Gu L *et al*., 2004].

Οι Tessier και συνεργάτες έδειξαν με διαγονιδιακά ποντίκια που εξέφραζαν IGF2BP1 στον αδένα του μαστού, ότι το γονίδιο αυτό μπορεί να δράσει ως ογκογονίδιο. Από τα πειράματά τους προέκυψαν δύο σειρές ζώων, μια που εξέφραζε πολύ υψηλά επίπεδα IGF2BP1 και μια άλλη με χαμηλά. Και στις δύο σειρές, παρουσιάστηκαν όγκοι, αλλά με διαφορετικές συχνότητες. Το 95% των ζώων της πρώτης σειράς και το 60% των ζώων της δεύτερης ανέπτυξαν όγκους περίπου στην ηλικία της 53–60 εβδομάδας, γεγονός που υποδεικνύει ότι η *de novo* ενεργοποίηση της IGF2BP1 στον ενήλικο μαστικό αδένα είναι ικανή να προκαλέσει καρκινογένεση. Ανάλυση των επιπέδων RNA γονιδίων στόχων της IGF2BP1 πολύ πριν την εμφάνιση της κακοήθειας αποκάλυψε μια αύξηση 100 φορές των επιπέδων του IGFII mRNA και 8 φορές των επιπέδων του H19 RNA. [Tessier *et al.,* 2004].

Πειραματικά δεδομένα από τον Spiegelman και συνεργάτες έδειξαν ότι η IGF2BP1 υπερεκφράζεται σε κύτταρα ανθρώπινου μελανώματος και η παρουσία της είναι υπεύθυνη για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων καθώς επίσης και για την αντοχή τους στη δράση χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Επιπρόσθετα δείχτηκε ότι μέσω της υποξίας, η οποία αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό του μικρο-περιβάλλοντος ενός όγκου, αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασης της IGF2BP1 η οποία με τη σειρά της ενισχύει το πολλαπλασιαστικό και διηθητικό δυναμικό των μεταστατικών καρκινικών κυττάρων. Καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης έχει σαν αποτέλεσμα την αδυναμία των μεταστατικών κυττάρων να πολλαπλασιαστούν και να διηθήσουν [Craig and Spiegelman, 2012 , Craig, et al., 2012]. Πράγματι, πρόσφατες μελέτες σε panels καρκινικών κυττάρων έδειξαν η IGF2BP1 προσδένει περιοχές της 3΄ UTR ανοδικά θέσεων πρόσδεσης miRNAs, ανταγωνιζόμενη κατ' αυτόν τον τρόπο την δράση τους ως αναστολείς της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στον επιθετικό φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων. [Müller et al., 2018].

1.4 ΣΚΟΠΟΣ

Ο μετα-μεταγραφικός έλεγχος είναι γνωστό ότι παίζει σπουδαίο ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης του *c-myc* τόσο στο επίπεδο της σταθερότητας του mRNA όσο και της μετάφρασής του. Τα επιμέρους ρυθμιστικά στοιχεία *cis* και *trans* που ελέγχουν τη μετάφραση του *c-myc* mRNA και η συμβολή καθενός από αυτά στη μεταφρασιμότητα του έχει μελετηθεί κυρίως εστιάζοντας στο κάθε ένα μεμονωμένα. Ενώ οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ρυθμιστικών στοιχείων *cis* και η συμβολή τους στην γονιδιακή έκφραση έχουν αναφερθεί στο παρελθόν για μια πληθώρα ιικών και κυτταρικών μηνυμάτων RNA, δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για το *c-myc*. Η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στην διερεύνηση της συμβολής των διαφόρων ρυθμιστικών περιοχών ανεξάρτητα και σε συνδυασμό μεταξύ τους στον μεταφραστικό έλεγχο κάτω από φυσιολογικές και στρεσογόνες συνθήκες.

1.4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ *cis* ΤΟΥ *C-MYC* mRNA ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΙΜΟΤΗΤΑ

Ο έλεγχος των διακυμάνσεων της έκφρασης του *c-myc* επιτυγχάνεται μέσω μηχανισμών που δρουν στο επίπεδο της μεταγραφής, της μετάφρασης και της αποικοδόμησης του mRNA και της πρωτεΐνης του.

Τα επιμέρους στοιχεία που μελετήθηκαν είναι:

α) Η μη κωδική περιοχή 5΄που φέρει μία εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος (IRES).

β) Η αλληλουχία CRD (coding region instability element) που βρίσκεται στην κωδική περιοχή του *c-myc* mRNA και του προσδίδει αστάθεια, ενώ αποτελεί και σημείο πρόσδεσης της πρωτεΐνης IGF2BP1.

γ) Η μη κωδική περιοχή 3΄που περιλαμβάνει ένα (A+U-rich) στοιχείο αστάθειας και θέσεις αναγνώρισης miRNA.

δ) Η πολυαδενυλική ουρά

Χρησιμοποιήθηκε σαν αφετηρία το χιμαιρικό CRD-luciferase όχημα που φέρει την CRD αλληλουχία στην κωδική περιοχή (in frame με την luciferase) για την κατασκευή φορέων έκφρασης που φέρουν τις μη κωδικές περιοχές 5΄ ή/και 3΄ του *c-myc* προκειμένου να μελετηθεί η μεταφρασιμότητα του γονιδίου αναφοράς παρουσία και απουσία πολυαδενιλικής ουράς και κάτω από συνθήκες μεταβολικού στρες.

1.4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΤΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΘΕΣΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΗΣ IGF2BP1 ΣΤΗΝ ΤΥΧΗ ΤΩΝ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ ΣΤΟΧΩΝ

Αλληλουχίες αναγνώρισης της IGF2BP1 έχουν εντοπισθεί στις αμετάφραστες καθώς και στην κωδική περιοχή μηνυμάτων RNA. Ένα πρώτο ερώτημα που διερευνήθηκε είναι αν η δράση των ρυθμιστικών στοιχείων *cis* εξαρτάται από την «θέση» τους στο μήνυμα. Η μελέτη εστιάστηκε στο CRD στοιχείο του *c-myc*. Δημιουργήθηκαν τα κατάλληλα οχήματα χιμαιρικών CRD-luciferase γονιδίων για να μας επιτρέψουν με διαμολύνσεις στην κυτταρική σειρά 293 να μελετήσουμε τις επιπτώσεις της θέσης του CRD στη μεταφρασιμότητα και σταθερότητα του μηνύματος.

1.4.3 Διερεύνηση του ρόλου της IGF2BP1 και της μετα-μεταφραστικής της τροποποίησης στη μεταφρασιμότητα του *c-myc* mRNA

Θεωρητικά η παρουσία της IGF2BP1 στις αλληλουχίες πρόσδεσης στην κωδική ή στην μη κωδική περιοχή 5΄αποτελεί μηχανικό εμπόδιο στις κινούμενες πάνω στο mRNA 80S και 40S ριβοσωματικές υπομονάδες. Με την χρήση ειδικών siRNAs για την IGFBP1 μελετήθηκε η επίπτωση της υπερέκφρασης ή αποσιώπησης της στην μεταφρασιμότητα του *c-myc* mRNA.

Η μεταφραστική ενεργοποίηση του mRNA της β-ακτίνης έχει δειχθεί ότι προϋποθέτει τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση της ZBP1, μέσω φωσφορυλίωσης από την Src κινάση στην Tyr 396 του μοτίβου πρόσδεσης SH3. Η φωσφορυλίωση μειώνει την ικανότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο μήνυμα και ενδεχόμενα η αποδέσμευσή της από αυτό ενεργοποιεί τη μετάφραση. Διερευνήθηκε το αν η μετα-μεταφραστική τροποποίηση της IGF2BP1 διευκολύνει ή ακόμη είναι και αναγκαία για τη μετάφραση των χιμαιρικών CRD-luciferase mRNAs. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκε μια μεταλλαγμένη, στο ίδιο κατάλοιπο τυροσίνης του συντηρημένου μοτίβου πρόσδεσης SH3, μορφή της ανθρώπινης IGF2BP1 με σκοπό τον έλεγχο της μεταφρασιμότητας / σταθερότητας των χιμαιρικών RNA παρουσία των αγρίων και μεταλλαγμένων τύπων της πρωτείνης. Σκοπός των πειραμάτων ήταν να διερευνηθεί το ενδεχόμενο το *c-myc* mRNA να υπόκειται σε μεταφραστικό έλεγχο μέσω της IGF2BP1 από την κινάση Src που αποτελεί μόριο κλειδί σε πολλά ενδοκυττάρια μονοπάτια μεταβίβασης σήματος.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

Η κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν τα HEK-293T και HeLa. Τα HEK-293T είναι φυσιολογικά εμβρυικά κύτταρα ανθρώπινου νεφρού διαμολυσμένα με αδενοϊό ενώ τα HeLa είναι κυτταρική σειρά που προέρχεται από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε κλίβανο στους 37ºC παρουσία 5% CO_2. Το θρεπτικό καλλιεργητικό μέσο ανάπτυξης των HEK-293 ήταν το DMEM + GlutaMAX™-I (Gibco, Invitrogen) ενώ των HeLa το RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen) εμπλουτισμένα με 10% εμβρυικό ορό μόσχου και 1mg/mL πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιέργειας εμβαδού 75 cm^2. Η κυτταρική σειρά συντηρήθηκε μέσω ανακαλλιεργειών κάθε 3 με 4 ημέρες.

2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΑΡΟΔΙΚΗΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

2.2.1 ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA

Σε πλάκα 6 οπών καλλιεργήθηκαν κύτταρα σε πλήρες θρεπτικό μέσο για 24 ώρες πριν τα πειράματα διαμόλυνσης σε πυκνότητα περίπου 6 x 10^5 κύτταρων / ml θρεπτικού υλικού. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το θρεπτικό μέσο, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με 1mL στείρου ρυθμιστικού διαλύματος PBS (Sigma) και προστέθηκε φρέσκο πλήρες θρεπτικό μέσο.

Σε αποστειρωμένα σωληνάρια 1,5mL αναμείχθηκαν 1 μg της προ μελέτη πλασμιδιακής κατασκευής (φορέας pCMV-Tag1) με 1 μg του πλασμιδίου αναφοράς (pRL-CMV) σε 250 μL θρεπτικού υλικού Opti-MEM I (Gibco, Invitrogen) απουσία ορού και αντιβιοτικών. Ο φορέας pCMV-Tag1 φέρει το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης *Firefly*, ενώ το πλασμίδιο pRL-CMV φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης *Renilla*.

Σε ξεχωριστά αποστειρωμένα σωληνάρια 1.5 ml αναμείχθηκαν 5 μL λιποσώματος Lipofectamine 2000 (Invitrogen) με 250 μL θρεπτικού υλικού Opti-MEM I. Το διάλυμα επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και στη συνεχεία αναμείχθηκε με το διάλυμα DNA. Προκειμένου να σχηματιστούν τα σύμπλοκα διαμόλυνσης, το τελικό διάλυμα επωάστηκε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετα το πέρας της επώασης το διάλυμα διαμόλυνσης προστέθηκε στάγδην στα κύτταρα. Οι πλάκες μεταφερθήκαν στον κλίβανο και επωάστηκαν για 48 ώρες προτού γίνει η απομόνωση βιολογικού υλικού.

2.2.2 ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA ΚΑΙ ΜΟΡΙΑ siRNA

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και σε αυτήν την περίπτωση με τη διαφορά ότι ο αριθμός των κύτταρων που μοιραστήκαν σε κάθε οπή ήταν 4 x 10^5 / ml θρεπτικού υλικού. 24 ώρες αργότερα τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με 20 pmol siRNA που είτε στόχευε το γονίδιο που κωδικοποιεί την IGF2BP1 είτε δεν στόχευε κάποιο γονίδιο και χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

Τα τρυβλία μεταφέρθηκαν στον κλίβανο και επωάστηκαν για 24 ώρες προκειμένου να δράσουν τα siRNA. Στη συνεχεία το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και αντικαταστάθηκε με φρέσκο πλήρες θρεπτικό υλικό. Κατόπιν αυτού τα κύτταρα επιμολυνθήκαν με μείγμα 20 pmol siRNAs (αρνητικό μάρτυρα ή IGF2BP1) και 2 μg πλασμιδιακού DNA (1 μg πλασμίδιο ελέγχου + 1 μg πλασμίδιο αναφοράς)

Τα κύτταρα επωάστηκαν για ακόμη 24 ώρες προτού απομονωθεί βιολογικό υλικό προς μελέτη.

2.3 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

2.3.1. ΥΓΡΟ ΜΕΣΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ LB

Για ένα λίτρο (1L) υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν 10g bacto-tryptone, 5g bacto-yeast extract και 10g NaCl. Έγινε ρύθμιση του pH στο 7,5 με την προσθήκη NaOH και το διάλυμα αποστειρώθηκε. Όταν η θερμοκρασία έπεσε στους 48^{o}C, προστέθηκε αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 40μg/mL.

2.3.2. ΣΤΕΡΕΟ ΜΕΣΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Παρασκευάστηκε όπως το υγρό LB, αλλά πριν την αποστείρωση προστέθηκαν 15g bacto-agar ανά λίτρο LB. Μετά την προσθήκη αμπικιλίνης, το υλικό μεταφέρθηκε σε τρυβλία τα οποία διατηρήθηκαν για 1-2 εβδομάδες στους 4^{o}C.

2.3.3. ΜΑΚΡΟΠΡΟΘΕΣΜΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Stock γλυκερόλης: 850μL ολονύκτιας καλλιέργειας βακτηρίων αναμίχθηκαν με 150 μL αποστειρωμένης γλυκερόλης και διατηρήθηκαν στους -20^{o}C. Ανανέωση καλλιεργειών πραγματοποιούταν κάθε 6 μήνες.

2.4. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα *E.coli* Subcloning Efficiency™ DH5α™ ” (Invitrogen) τα οποία έχουν υποστεί χημική επεξεργασία προκειμένου να μπορούν να προσλάβουν ξένο DNA. Για τη συγκεκριμένη διαδικασία ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της εταιρείας.

1. Τα DH5α™ κύτταρα ξεπάγωσαν σε πάγο και μια ποσότητα 50 μL από αυτά μεταφέρθηκε σε κάθε σωλήνα (50mL).

2. Έγινε προσθήκη 1-5μL (1-10ng πλασμιδιακού DNA) στα δεκτικά κύτταρα με ελαφριά ανάμιξη.

3. Προετοιμάστηκε μια αντίδρασης ελέγχου με 2μL (200pg) pUC19 DNA (New England Biolabs) σε 50μL δεκτικά κύτταρα.

4. Τα κύτταρα επωάστηκαν σε πάγο για 30 λεπτά.

5. Τα κύτταρα υπέστησαν θερμικό σοκ για 20 δευτερόλεπτα ακριβώς σε υδατόλουτρο στους 37 ^{0}C.

6. Αφαιρέθηκαν από το υδατόλουτρο και τοποθετήθηκαν σε πάγο για 2 λεπτά.

7. Προστέθηκαν 900μL προθερμασμένου θρεπτικού μέσου SOC σε κάθε σωλήνα.

Για την παρασκευή του SOC απαιτούνται: 2% *bactotryptone*, 0,55% *yeast extract*, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 20mM Mg2+ και 20mM γλυκόζη. Τα δυο τελευταία συστατικά προστέθηκαν μετά την αποστείρωση σε θερμοκρασία υπό πίεση, λόγω θερμοευαισθησίας. Στο τέλος το διάλυμα καθαρίστηκε χρησιμοποιώντας φίλτρο με πόρους 0,2μm.

8. Τα κύτταρα επωάστηκαν με ταυτόχρονη ανακίνηση (225rpm) στους 37^{o}C για 1 ώρα ακριβώς.

9. Εμβολιάστηκαν τρυβλία με 50 ή/και 100μL καλλιέργειας και ακολούθησε επώασή τους στους 37^{O}C εως την επόμενη μέρα.

2.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

2.5.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ NucleoSpin Kit (Macherey-Nagel)

Για τη συγκεκριμένη διαδικασία ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της εταιρείας.

1. 5mL ολονύκτιας καλλιέργειας βακτηρίων μεταφέρθηκαν σε σωλήνα φυγοκέντρησης Falcon των 50mL.
2. Φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 1000rpm στους 4^{o}C.
3. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 250 μL διαλύματος A1.
4. Μεταφέρθηκε το εναιώρημα σε σωλήνα eppendorf.
5. Προστέθηκαν 250μL διαλύματος A2 και έπειτα από ανάδευση ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
6. Προστέθηκαν 300μL διαλύματος A3 και έπειτα από ανάδευση ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 10000 g σε θερμοκρασία δωματίου
7. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε στήλη και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11000 g.
8. Το διήθημα απορρίφθηκε και προστέθηκαν στην στήλη 600 μL διαλύματος A4 *με* αιθανόλη. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11000 g.
9. Ακολούθησε στέγνωμα της μεμβράνης και έκλουση του DNA με προσθήκη 40 μL απιονισμένου νερού σε καθαρό σωλήνα eppendorf του 1.5 ml

2.5.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ Nucleobond EF kit (Macherey-Nagel)

Για την απομόνωση καθαρού DNA με σκοπό τη χρήση του σε πειράματα διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε το Nucleobond EF kit το οποίο εξασφαλίζει την απομάκρυνση ενδοτοξινών. Οι ενδοτοξίνες είναι ένα βασικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των gram-negative βακτηρίων όπως στην προκειμένη περίπτωση το βακτήριο *E.coli* που χρησιμοποιείται για την επέκταση πλασμιδιακού DNA. Οι ενδοτοξίνες όπως οι λιπο-πολυσακχαρίτες και οι λιπο-ολιγοσακχαρίτες (LPS και LOS) αποτελούν βασικούς διεγέρτες του ανοσοποιητικού συστήματος των θηλαστικών καθώς επίσης και κοινούς μολυσματικούς παράγοντες πλασμιδιακού DNA το οποίο συντίθεται σε βακτηρία E.coli.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

1. 100 ml ολονύκτιας καλλιέργειας βακτηρίων μεταφέρθηκαν σε σωλήνες τύπου Falcon των 50 ml και φυγοκεντρήθηκαν τους για 10 λεπτά στα 1000 rpm στους $4^{O}C$.
2. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 12 ml διαλύματος S1-EF + RNase A. Ακολούθησε αναδιάλυση του ιζήματος.
4. Προστέθηκαν 12 ml διαλύματος S2-EF και ακολούθησε ελαφριά ανάδευση.
5. Προστέθηκαν 12 ml διαλύματος S3-EF θερμοκρασίας $4^{O}C$ και ακολούθησε ελαφριά ανάδευση.
6. Το υλικό μεταφέρθηκε σε πάγο για 5 λεπτά.
7. Εξισορροπήθηκε μια ιοντοανταλλακτική στήλη Nucleobond AX 500 προσθέτοντας 5 ml διαλύματος N2-EF και αφήνοντας την να αδειάσει για 5 λεπτά.
8. Ένα φίλτρο Nucleobond PC 500 EF εμποτίστηκε με διάλυμα N2-EF και μεταφέρθηκε σε πλαστικό χωνί. Το προϊόν λύσης των βακτηριακών κύτταρων προστέθηκε στο φίλτρο και το διήθημα συγκεντρώθηκε σε σωλήνα τύπου Falcon των 50 ml
9. Το διήθημα προστέθηκε στην ιοντοανταλλακτική στήλη η οποία αφέθηκε να αδειάσει.

10. Η στήλη ξεπλύθηκε 2 φορές με 24 ml διαλύματος N3-EF.

11 Η στήλη ξεπλύθηκε 2 φορές με 12 ml διαλύματος N4-EF.

12. Ακολούθησε έκλουση πλασμιδιακού DNA με 15 ml διαλύματος N5-EF σε σωλήνα τύπου Falcon των 15 ml.

13. Προστέθηκαν 11 ml ισοπροπανόλης σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στα 1500 x g.

14. Προστέθηκαν 5 ml 70% ελεύθερης ενδοτοξινών αιθανόλης στο ίζημα DNA. Ακολούθησε ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 15000 x g σε θερμοκρασία δωματίου.

15. Αφαιρέθηκε η αιθανόλη και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

16. Το ίζημα αναδιαλύθηκε σε 300-400 μL διαλύματος TE-EF και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA.

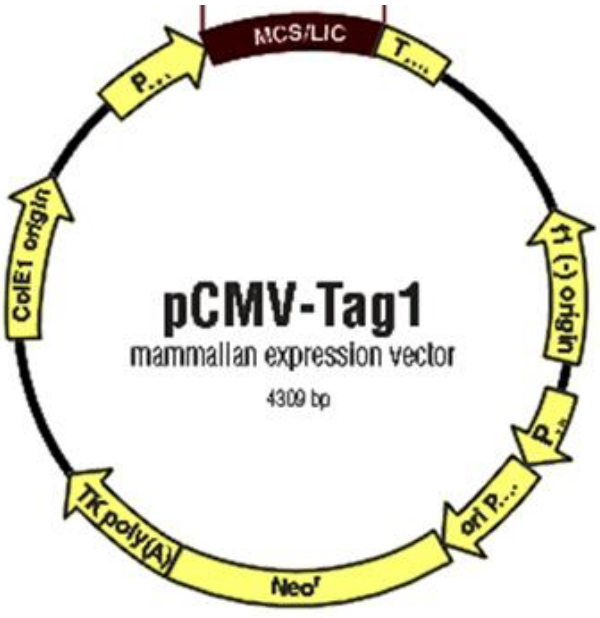
2.6. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

Για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων φορέων έκφρασης οι οποίοι φέρουν τις προς μελέτη ρυθμιστικές περιοχές του ογκογονιδίου *c-myc* ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία.

2.6.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΒΑΣΙΚΟΥ ΦΟΡΕΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

2.6.1.1 Πέψη του φορέα έκφρασης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να μελετηθεί η δράση συγκεκριμένων ρυθμιστικών περιοχών του ογκογονιδίου *c-myc* ήταν ο pCMV-Tag1 (Stratagene) (εικόνα 15)



Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση του φορέα pCMV-Tag1

Για την ένθεση αλληλουχιών που ελέγχονταν για τη δράση τους ως ρυθμιστικές περιοχές στον φορέα pCMV-Tag1 (Stratagene), πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη με διαφορά ζεύγη περιοριστικών ενδονουκλεασών της εταιρείας New England Biolabs. Οι ενδονουκλεάσες και τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

1. BglII + HindIII: 4 μg φορέα έκφρασης, 10X ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης NEBuffer 2, 10 μονάδες από την κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση και αποσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 20 μL για μια ώρα στους 37^{O}C

2. SacI + NotI: Όπως περιεγράφηκε προηγουμένως

3. BglII + SalI: Όπως περιεγράφηκε προηγουμένως με τη διαφορά ότι το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης ήταν το NEbuffer 3

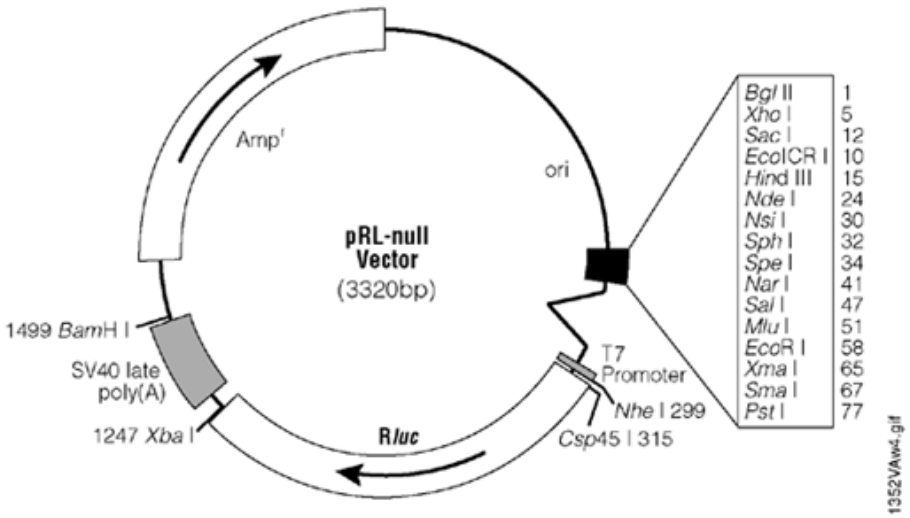
4. SalI + KpnI: λόγω ασυμβατότητας των ρυθμιστικών διαλυμάτων, σε αυτή την περίπτωση η πέψη του DNA έγινε διαδοχικά. 4 μg πλασμιδιακού φορέα υπό την παρουσία 10X ρυθμιστικού διαλύματος NEBuffer 3 επωάστηκαν με 10 μονάδες περιοριστικής ενδονουκλεάσης SalI σε τελικό όγκο 20 μL. Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και στη συνεχεία απομονώθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται παρακάτω. Το καθαρό πλέον προϊόν πέψης στη συνεχεία επωάστηκε με την περιοριστική ενδονουκλεάση KpnI υπό την παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος NEBuffer 1.

5. SacI + PstI: Όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το NEBuffer 1

6. Saci + BamHI: Όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το NEBuffer 4

Ως πλασμίδιο αναφοράς στα πειράματα διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pRL-CMV ο οποίος κατασκευάστηκε σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία:

Αρχικώς από το πλασμίδιο pCMV Tag1 (Stratagene) (Εικόνα 15) απομονώθηκε ο υποκινητής CMV με διπλή πέψη με τις ενδονουκλεάσες NsiI και SmaI (Fermentas). 4 μg του φορέα έκφρασης επωάστηκαν με 10 μονάδες από την κάθε ενδονουκλεάση υπό την παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης (Y+/Tango™) κοινό για τις ενδονουκλεάσες (10X), σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μL. Από τα 4 προϊόντα που προέκυψαν από την πέψη απομονώθηκε το τμήμα μήκους 680 bp, που περιέχει τον υποκινητή CMV (νουκλ. 1-602) από πήκτωμα αγαρόζης 1%. Επίσης υποβλήθηκε σε πέψη με τα ίδια δυο ένζυμα και ο φορέας pRL-null (Promega) (Εικόνα 16). Στη συνέχεια υποκλωνοποιήθηκε ο υποκινητής CMV με αντίδραση σύνδεσης άκρων στον φορέα pRL null που φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης *Renilla*. Έτσι προέκυψε ο ανασυνδυασμένος φορέας pRL-CMV όπου το γονίδιο της *Renilla* βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή CMV.



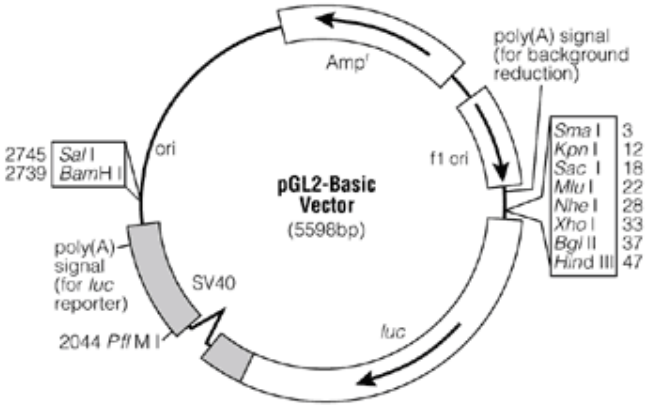
Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα pRl-null

2.6.2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΝΘΕΜΑΤΩΝ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

Οι φορείς έκφρασης φέρουν συνήθως περιοχή πολλαπλών θέσεων υποκλωνοποίησης. Στις θέσεις αυτές γίνεται η ένθεση των περιοχών που πρόκειται να μελετηθούν. Στην παρούσα διατριβή, τα ενθέματα λήφθηκαν με PCR, ενώ ταυτόχρονα προστέθηκαν δυο διαφορετικές θέσεις περιορισμού εκατέρωθεν του κάθε ενθέματος. Οι θέσεις περιορισμού εισήχθησαν έμμεσα μετά την πέψη του προϊόντος της PCR με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Άρα με τον κατάλληλο σχεδιασμό των εκκινητών της PCR και πέψη με συγκεκριμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες επιτυγχάνεται η ανάκτηση του ενθέματος με εξέχοντα άκρα τα οποία αντιστοιχούν στη θέση αναγνώρισης και δράσης των ενδονουκλεασών αυτών.

2.6.2.1. Σχεδιασμός εκκινητών

Προκειμένου να μελετηθεί η δράση των ρυθμιστικών περιοχών του *c-myc* καθώς και του *mdr1* στη μεταφρασιμότητα του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης, οι περιοχές αυτές απομονώθηκαν από ανθρώπινο γενωμικό DNA μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Η κωδική περιοχή του γονιδίου της *Firefly* λουσιφεράσης απομονώθηκε από το πλασμίδιο pGL2 (Promega) (εικόνα 17), ενώ της *Renilla* από το pRL-null (εικόνα 16)



Εικόνα 17. Σχηματική αναπαράσταση του φορέα έκφρασης pGL2

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν κατ' αυτόν τον τρόπο έτσι ώστε να φέρουν στα άκρα τους τις κατάλληλες θέσης αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών. Με αυτόν τον τρόπο έγινε εφικτή η υποκλωνοποίηση των ενθεμάτων στις αντίστοιχες θέση στον φορέα έκφρασης pCMV-Tag1.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό όλων των υπό εξέταση τμημάτων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Ένθεμα	Εμπρόσθιος εκκινητής	Αντίστροφος εκκινητής
Firefly luciferase	5΄-CGTCCGGAGATCTCAAGCTTCATGGAAGACGCCAAAAACAT-3΄	5΄-TATTCGCTCGAGGTCGACCCACAATTTGGACTTTCCGC-3΄
c-myc CRD	5΄-GGTAGATCTTACGAACACACAACGTCTTG- 3΄	5΄-CTAAAGCTTCCCGCACAAGAGTTCCGTAG-3΄
5΄ *c-myc* CRD	5΄-TGAGCTCCGAACACACAACGTCTTG-3΄	5΄-CGGATCCCGCACAAGAGTTCCGTAG-3΄
3΄ *c-myc* CRD	5΄- TCAGTCGACTAATAGCGAACACACAACGTCTTG- 3΄	5΄- GAGGTACCCGCACAAGAGTTCCGTAG- 3΄
c-myc 5΄UTR	5΄-AGAGCTCCTACTGCAGGTAATTCCAGCGAGAGGCAG-3΄	5΄-ATCCAAGGGCGGCCGCGAGAGCCTTTCAGAGAAGCG-3΄
c-myc 3΄UTR	5΄-GGTGTCGACTAATAGCTTGAGACTGAAAGATTTAG-3΄	5΄-ACGGTACCAAGACCTTAAGGCCCCCAGA-3΄
Renilla luciferase	5΄-GGAGCTCCTAGCCACCATGACTTCGAAAG-3΄	5΄-CGACTGCAGCCGCTCTAGAATTATTGTTCA-3΄
MDR1 CRD	5΄-CGCAGATCTGGATGTCAAACATCACTAATA-3΄	5΄-CGCAAGCTTCCATCATCTGTAAGTCGGGTG-3΄
5΄MDR1 CRD	5΄-CGAGCTCGATGTCAAACATCACTAATA-3΄	5΄-AGGATCCCATCATCTGTAAGTCGGGTG-3΄
3΄MDR1 CRD	5΄-GGTGTCGACTAATAGGATGTCAAACATCACTAATA-3΄	5΄-ACGGTACCCATCATCTGTAAGTCGGGTG-3΄

Πίνακας 1. Αλληλουχίες εκκινητών για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

2.6.2.2. Πρόγραμμα Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

Κάθε αντίδραση PCR έγινε σε τελικό όγκο 50μL και περιλάμβανε: 5μL 10X PCR ρυθμιστικό διάλυμα, 2,5μL 590mM $MgCl_2$, 5μL dNTPs 25mM, 1μL ανθρώπινο γενωμικό DNA (Clontech), 5μL κάθε εκκινητή 0.5μM και 1μL Taq DNA πολυμεράση (Invitrogen). Τα θερμικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

Για την απομόνωση της κωδικής περιοχής της λουσιφεράσης *Firefly*: 98ºC για 30 δευτερόλεπτα (1 κύκλος), 98ºC για 10 δευτερόλεπτα, 61ºC για 30 δευτερόλεπτα, 72ºC για 100 δευτερόλεπτα (5 κύκλοι), 98ºC για 10 δευτερόλεπτα, 65ºC για 1 λεπτό, 72ºC για 130 δευτερόλεπτα (35 κύκλοι) και 72ºC για 10 λεπτά.

Για την απομόνωση των υπολοίπων ενθεμάτων που περιγράφονται στο πίνακα 1: 94ºC για 1 λεπτό (1 κύκλος), 94ºC για ένα λεπτό, 55ºC για 1 λεπτό, 72ºC για 2 λεπτά (5 κύκλοι), 94ºC για 1 λεπτό, 65ºC για 1 λεπτό, 72ºC για 2 λεπτά (30 κύκλοι) και 72ºC για 10 λεπτά.

2.6.2.3. Παραλαβή ενθεμάτων από πήκτωμα αγαρόζης

Μετά από τον πολλαπλασιασμό των τμημάτων που προαναφέρθηκαν, τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και απομονώθηκαν ζώνες κατάλληλου μεγέθους επιτυγχάνοντας με τον τρόπο αυτό και τον καθαρισμό από τα αντιδραστήρια της PCR ώστε να είναι κατάλληλα για περαιτέρω επεξεργασία με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Η παραλαβή και καθαρισμός των ενθεμάτων έγινε μετά από σύντομο βρασμό των τεμαχίων αγαρόζης που περιέχουν τις ζώνες DNA κατάλληλου μεγέθους για να διαλυθεί η αγαρόζη και ακολούθησε καθαρισμός του DNA με το NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας.

2.6.2.4 Πέψη ενθεμάτων

Τα καθαρισμένα από πήκτωμα αγαρόζης προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης υποβλήθηκαν σε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που περιεγράφηκαν προηγουμένως.

2.6.2.5 Αντίδραση Σύνδεσης Άκρων

Για την σύνδεση τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε το Rapid Ligation kit (K1421, Fermentas) και οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας που επιτρέπει την πραγματοποίηση τους σε 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Η αναλογία άκρων φορέα κλωνοποίησης / ένθεμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:3. Κατά τις αντιδράσεις σύνδεσης άκρων χρησιμοποιήθηκαν 0,18pmol άκρων φορέα έκφρασης και 0,54pmol άκρων προϊόντων PCR σε τελικό όγκο αντίδρασης 25μL. Ο υπολογισμός της αναλογίας φορέα έκφρασης και ενθέματος έγινε με βάση τον πίνακα 2.

Μήκος DNA(ζβ)	αναλογία pmoles άκρων /1μg DNA	Ποσότητα προϊόντων PCR σε μg (0,54pmol άκρων)
100	30.0	0.018
300	10.0	0.054
500	6.0	0.09
1000	3.0	0.18
2000	1.5	0.36
3000	1.0	0.54

Πίνακας 2. Υπολογισμός αναλογίας φορέα έκφρασης και ενθέματος

Ο φορέας έκφρασης και το ένθεμα αναμίχθηκαν στην κατάλληλη αναλογία αφού προηγουμένως υποβλήθηκαν σε καθαρισμό μετά από απομόνωση από πήκτωμα αγαρόζης. Στο ίδιο σωληνάριο προστέθηκαν επίσης: 4μL ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου, 1μL του ενζύμου DNA ligase. Τέλος προστέθηκε νερό ελεύθερο νουκλεασών σε τελικό όγκο 25μL. Το μίγμα επωάστηκε στους 22^{o}C για 5 λεπτά. Ακολούθως, 2-5μL από το μίγμα χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό δεκτικών κύτταρων όπως περιεγράφηκε προηγουμένως.

2.7. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

2.7.1. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΜΟΝΟΣΙΣΤΡΟΝΙΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Για τη μελέτη της επίδρασης των ρυθμιστικών περιοχών του *c-myc* και *mdr1* στη μεταφρασιμότητα του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης *Firefly* κατασκευάστηκαν δεκατρείς ανασυνδυασμένοι φορείς έκφρασης. Η μετάφραση στην προκειμένη περίπτωση είναι εξαρτώμενη από το κάλυμμα 5. Τα βασικά βήματα που ακολουθήθηκαν για την κατασκευή τους είναι τα ακόλουθα:

2.7.1.1 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/ Control

Το πλασμίδιο pCMV-Tag1 (Stratagene) υποβλήθηκε σε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BglII και SalI (New England Biolabs) σε θέσεις που αυτές αναγνωρίζουν μέσα στο περιοχή πολλαπλής υποκλωνοποίησης 2 (Multiple Cloning Site) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιεγράφηκε προηγουμένως. Ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με εκμαγείο το πλασμίδιο pGL2 (Promega) προκειμένου να απομονωθεί η κωδική περιοχή του γονιδίου της λουσιφεράσης *Firefly*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 1) περιέχουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών BglII και SalI, ενώ ο πρόσθιος εκκινητής περιέχει και τη θέση αναγνώρισης HindIII καθοδικά της BglII προκειμένου να υποκλωνοποιηθεί έπειτα η αλληλουχία CRD του *c-myc*. Η ίδια διαδικασία πέψης ακολουθήθηκε και για το προϊόν PCR της κωδικής περιοχής της λουσιφεράσης *Firefly*. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και καθαρίστηκαν με το NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel). Ακολούθησε η αντίδραση σύνδεσης άκρων χρησιμοποιώντας το rapid DNA ligation kit (Fermentas)

2.7.1.2 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/3΄CRD

Το πλασμίδιο Luc/Control υποβλήθηκε σε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες SalI και KpnI (New England Biolabs) σε θέσεις που αυτές αναγνωρίζουν μέσα στο περιοχή πολλαπλής υποκλωνοποίησης 2 (Multiple Cloning Site) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιεγράφηκε προηγουμένως. Ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα ανθρώπινο γενωμικό DNA προκειμένου να απομονωθεί η περιοχή CRD του *c-myc*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 1) περιέχουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών SalI και kpnI, ενώ ο πρόσθιος εκκινητής περιέχει και δύο κωδικόνια λήξης αμέσως πριν την κωδική περιοχή του CRD προκειμένου να εξασφαλιστεί η λήξη της μετάφρασης. Η ίδια διαδικασία πέψης ακολουθήθηκε και για το προϊόν PCR *c-myc* CRD. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και καθαρίστηκαν με το NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel). Ακολούθησε η αντίδραση σύνδεσης άκρων.

2.7.1.3 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/5΄CRD

Το πλασμίδιο Luc/Control υποβλήθηκε σε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες SacI και BamHI (New England Biolabs) σε θέσεις που αυτές αναγνωρίζουν μέσα στην περιοχή πολλαπλής υποκλωνοποίησης 1 (Multiple Cloning Site) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιεγράφηκε προηγουμένως. Ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα ανθρώπινο γενωμικό DNA προκειμένου να απομονωθεί η περιοχή CRD του *c-myc*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 1) περιέχουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών SacI και BamHI προκειμένου το ένθεμα να υποκλωνοποιηθεί αμέσως πριν την αλληλουχία Kozak του pCMV-Tag καθιστώντας έτσι την περιοχή αυτή αμετάφραστη. Η ίδια διαδικασία πέψης ακολουθήθηκε και για το προϊόν PCR *c-myc* CRD. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και καθαρίστηκαν με το NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel). Ακολούθησε η αντίδραση σύνδεσης άκρων.

2.7.1.4 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/CRD

Το πλασμίδιο Luc/Control υποβλήθηκε σε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BglII και HindIII (New England Biolabs). Ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα ανθρώπινο γενωμικό DNA προκειμένου να απομονωθεί η περιοχή CRD του *c-myc*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 1) περιέχουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών BglII και HindIII προκειμένου το ένθεμα να υποκλωνοποιηθεί εντός πλαισίου ανάγνωσης με την κωδική περιοχή της λουσιφεράσης *Firefly*. Η ίδια διαδικασία πέψης ακολουθήθηκε και για το προϊόν PCR *c-myc* CRD. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και καθαρίστηκαν με το NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel). Ακολούθησε η αντίδραση σύνδεσης άκρων.

2.7.1.5 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/5΄MYC

Το πλασμίδιο Luc/Control υποβλήθηκε σε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες SacI και NotI (New England Biolabs) σε θέσεις που αυτές αναγνωρίζουν μέσα στην περιοχή πολλαπλής υποκλωνοποίησης 1 (Multiple Cloning Site). Ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα ανθρώπινο γενωμικό DNA προκειμένου να απομονωθεί η περιοχή 5΄UTR του *c-myc*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 1) περιέχουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών SacI και NotI ενώ ο πρόσθιος εκιννητής περιέχει και τη θέση αναγνώρισης PstI αμέσως μετά την SacI προκειμένου να υποκλωνοποιηθεί έπειτα η κωδική περιοχή του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης *Renilla*, δημιουργώντας έτσι ένα δισιστρονικό φορέα έκφρασης. Η ίδια διαδικασία πέψης ακολουθήθηκε και για το προϊόν PCR *c-myc* 5΄UTR. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και καθαρίστηκαν με το NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel). Ακολούθησε η αντίδραση σύνδεσης άκρων.

2.7.1.6 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/5΄MYC-CRD

Το πλασμίδιο Luc/5΄MYC υποβλήθηκε σε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BglII και HindIII (New England Biolabs). Ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα ανθρώπινο γενωμικό DNA προκειμένου να απομονωθεί η περιοχή CRD του *c-myc*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 1) περιέχουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών BglII και HindIII προκειμένου το ένθεμα να υποκλωνοποιηθεί εντός πλαισίου ανάγνωσης με την κωδική περιοχή της λουσιφεράσης *Firefly*. Η ίδια διαδικασία πέψης ακολουθήθηκε και για το προϊόν PCR *c-myc* 5΄UTR. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και καθαρίστηκαν με το NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel). Ακολούθησε η αντίδραση σύνδεσης άκρων.

2.7.1.7 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/5΄MYC-CRD-3΄MYC

Το πλασμίδιο Luc/5΄MYC-CRD υποβλήθηκε σε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες SalI και KpnI (New England Biolabs). Ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα ανθρώπινο γενωμικό DNA προκειμένου να απομονωθεί η περιοχή 3΄UTR του *c-myc*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 1) περιέχουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών SalI και KpnI ενώ ο πρόσθιος εκιννητής περιέχει και δύο κωδικόνια λήξης αμέσως πριν το 3΄UTR προκειμένου να εξασφαλιστεί η λήξη της μετάφρασης. Η ίδια διαδικασία πέψης ακολουθήθηκε και για το προϊόν PCR *c-myc* 3΄UTR. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και καθαρίστηκαν με το NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel). Ακολούθησε η αντίδραση σύνδεσης άκρων.

2.7.1.8 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/5΄MYC-3΄MYC

Το πλασμίδιο Luc/5΄MYC υποβλήθηκε σε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες SalI και KpnI (New England Biolabs). Ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα ανθρώπινο γενωμικό DNA προκειμένου να απομονωθεί η περιοχή 3΄UTR του *c-myc*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 1) περιέχουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών SalI και KpnI ενώ ο πρόσθιος εκιννητής περιέχει και δύο κωδικόνια λήξης αμέσως πριν την περιοχή του 3΄UTR προκειμένου να εξασφαλιστεί η λήξη της μετάφρασης. Η ίδια διαδικασία πέψης ακολουθήθηκε και για το προϊόν PCR *c-myc* 3΄UTR. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και καθαρίστηκαν με το NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel). Ακολούθησε η αντίδραση σύνδεσης άκρων.

2.7.1.9 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/3΄MYC

Το πλασμίδιο Luc/Control υποβλήθηκε σε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες SalI και KpnI (New England Biolabs). Ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα ανθρώπινο γενωμικό DNA προκειμένου να απομονωθεί η περιοχή 3΄UTR του *c-myc*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 1) περιέχουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών SalI και KpnI ενώ ο πρόσθιος εκκινητής περιέχει και δύο κωδικόνια λήξης αμέσως πριν το 3΄UTR προκειμένου να εξασφαλιστεί η λήξη της μετάφρασης. Η ίδια διαδικασία πέψης ακολουθήθηκε και για το προϊόν PCR *c-myc* 3΄UTR. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και καθαρίστηκαν με το NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel). Ακολούθησε η αντίδραση σύνδεσης άκρων.

2.7.1.10 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Luc/CRD-3΄MYC

Το πλασμίδιο Luc/CRD υποβλήθηκε σε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες SalI και KpnI (New England Biolabs). Ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα ανθρώπινο γενωμικό DNA προκειμένου να απομονωθεί η περιοχή 3΄UTR του *c-myc*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 1) περιέχουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών SalI και KpnI ενώ ο πρόσθιος εκκινητής περιέχει και δύο κωδικόνια λήξης αμέσως πριν το 3΄UTR προκειμένου να εξασφαλιστεί η λήξη της μετάφρασης. Η ίδια διαδικασία πέψης ακολουθήθηκε και για το προϊόν PCR *c-myc* 3΄UTR. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και καθαρίστηκαν με το NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel). Ακολούθησε η αντίδραση σύνδεσης άκρων.

2.7.1.11 Κατασκευή των φορέων έκφρασης Luc/MDR1, Luc/5΄MDR1 και Luc/3΄MDR1

Κατ' αντιστοιχία με τα πλασμίδια Luc/CRD, Luc/3΄CRD και Luc/5΄CRD δημιουργήθηκαν τα πλασμίδια που φέρουν το στοιχείο αστάθειας του γονιδίου *mdr1* εντός πλαισίου ανάγνωσης με την κωδική περιοχή της λουσιφεράσης *Firefly* καθώς και στις 5΄ και 3΄ αμετάφραστες περιοχές της.

2.7.2. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΔΙΣΙΤΡΟΝΙΚΩΝ (BISISTRONIC) ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ

Προκειμένου να καταστεί εφικτή η έκφραση δύο πρωτεϊνικών προϊόντων από το ίδιο μετάγραφο, η κωδική περιοχή του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης *Renilla* υποκλωνοποιήθηκε αμέσως πριν την αλληλουχία της αμετάφραστης περιοχής 5΄ του *c-myc*, η οποία περιέχει ένα εσωτερικό σημείο εισόδου ριβοσώματος (IRES). Με αυτή την προσέγγιση καθίσταται εφικτός ο διαχωρισμός μεταξύ της μετάφρασης μέσω καλύμματος 5΄ και IRES καθώς η αναφορά από το γονίδιο της λουσιφεράσης *Firefly* υποδηλώνει μετάφραση μέσω IRES, ενώ αναφορά από το γονίδιο της *Renilla* υποδηλώνει μετάφραση μέσω καλύμματοςκαλύμματός 5΄. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την κατασκευή των πλασμιδίων περιγράφονται παρακάτω.

2.7.2.1 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Bis/Control

Το πλασμίδιο Luc/5΄UTR υποβλήθηκε σε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες SacI και PstI (New England Biolabs). Ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα το πλασμίδιο pRL-null (Promega) προκειμένου να απομονωθεί η κωδική περιοχή της λουσιφεράσης *Renilla*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 1) περιέχουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών SacI και PstI προκειμένου το ένθεμα να υποκλωνοποιηθεί ανοδικά της περιοχής IRES του *c-myc*. Η ίδια διαδικασία πέψης ακολουθήθηκε και για το προϊόν PCR της λουσιφεράσης *Renilla*. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και καθαρίστηκαν με το NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel). Ακολούθησε η αντίδραση σύνδεσης άκρων.

2.7.2.2 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Bis/CRD

Το πλασμίδιο Bis/Control υποβλήθηκε σε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BglII και HindIII (New England Biolabs) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιεγράφηκε προηγουμένως. Ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα ανθρώπινο γενωμικό DNA προκειμένου να απομονωθεί η περιοχή CRD του *c-myc*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 1) περιέχουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών BglII και HindIII προκειμένου το ένθεμα να υποκλωνοποιηθεί εντός πλαισίου ανάγνωσης με την κωδική περιοχή της λουσιφεράσης *Firefly*. Η ίδια διαδικασία πέψης ακολουθήθηκε και για το προϊόν PCR *c-myc* CRD. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και καθαρίστηκαν με το NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel). Ακολούθησε η αντίδραση σύνδεσης άκρων.

2.7.2.3 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Bis/CRD-3΄UTR

Το πλασμίδιο Bis/CRD υποβλήθηκε σε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες SalI και KpnI (New England Biolabs). Ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα ανθρώπινο γενωμικό DNA προκειμένου να απομονωθεί η περιοχή 3΄UTR του *c-myc*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 1) περιέχουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών SalI και KpnI ενώ ο πρόσθιος εκκινητής περιέχει και δύο κωδικόνια λήξης αμέσως πριν την 3΄UTR προκειμένου να εξασφαλιστεί η λήξη της μετάφρασης. Η ίδια διαδικασία πέψης ακολουθήθηκε και για το προϊόν PCR *c-myc* 3΄UTR. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και καθαρίστηκαν με το NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel). Ακολούθησε η αντίδραση σύνδεσης άκρων.

2.7.2.4 Κατασκευή του φορέα έκφρασης Bis/3΄UTR

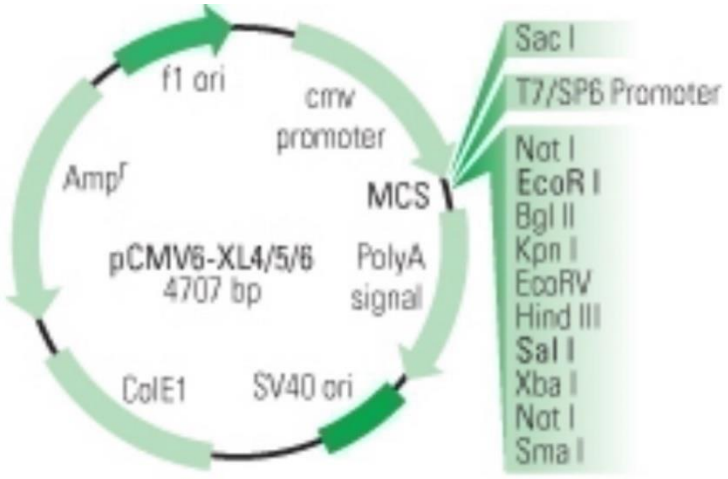
Το πλασμίδιο Bis/Control υποβλήθηκε σε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες SalI και KpnI (New England Biolabs). Ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα ανθρώπινο γενωμικό DNA προκειμένου να απομονωθεί η περιοχή 3΄UTR του *c-myc*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 1) περιέχουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών SalI και KpnI ενώ ο πρόσθιος εκκινητής περιέχει και δύο κωδικόνια λήξης αμέσως πριν την 3΄UTR προκειμένου να εξασφαλιστεί η λήξη της μετάφρασης. Η ίδια διαδικασία πέψης ακολουθήθηκε και για το προϊόν PCR *c-myc* 3΄UTR. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και καθαρίστηκαν με το NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel). Ακολούθησε η αντίδραση σύνδεσης άκρων.

2.8. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΜΕ ΣΗΜΕΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η πρωτεΐνη ZBP1, ορθόλογη της IGF2BP1 στο κοτόπουλο, ρυθμίζει την έκφραση του μηνύματος της β-ακτίνης μέσω πρόσδεσης της στο στοιχείο zipcode στην αμετάφραστη περιοχή 3΄ του mRNA. Αφού μεταφερθεί στο κατάλληλο σημείο στο κυτταρόπλασμα, η ZBP1 αποδεσμεύεται από το mRNA μέσω φωσφορυλίωσης σε θέση τυροσίνης από την κινάση Src και το mRNA μεταφράζεται. Σε μία προσπάθεια να μελετηθεί το ενδεχόμενο το *c-myc* mRNA να υπόκειται σε μεταφραστικό έλεγχο μέσω της IGF2BP1 από την κινάση Src, δημιουργήθηκε σημειακή μετάλλαξη στην ίδια θέση τυροσίνης με αυτήν της ZBP1. Με αυτήν την προσέγγιση είναι δυνατόν να ελεγχθεί η μεταφρασιμότητα/σταθερότητα των χιμαιρικών RNA παρουσία των αγρίων και μεταλλαγμένων τύπων της IGF2BP1. Η μετάλλαξη δημιουργήθηκε στη θέση 1249 της κωδικής αλυσίδας του γονιδίου της IGF2BP1 με την αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου αδενίνης σε θυμίνη. Η μεταβολή αυτή είχε σαν αποτέλεσμα την

αντικατάσταση του καταλοίπου τυροσίνης από φαινυλαλανίνη στη συγκεκριμένη θέση με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η πρόσδεση της κινάσης Src.

Ο φορέας έκφρασης που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα ήταν το pCMV6-XL6/IMP1 (Origene) (εικόνα 18) το οποίο φέρει το cDNA του γονιδίου IGF2BP1 μεταξύ των θέσεων EcoRI και SalI.

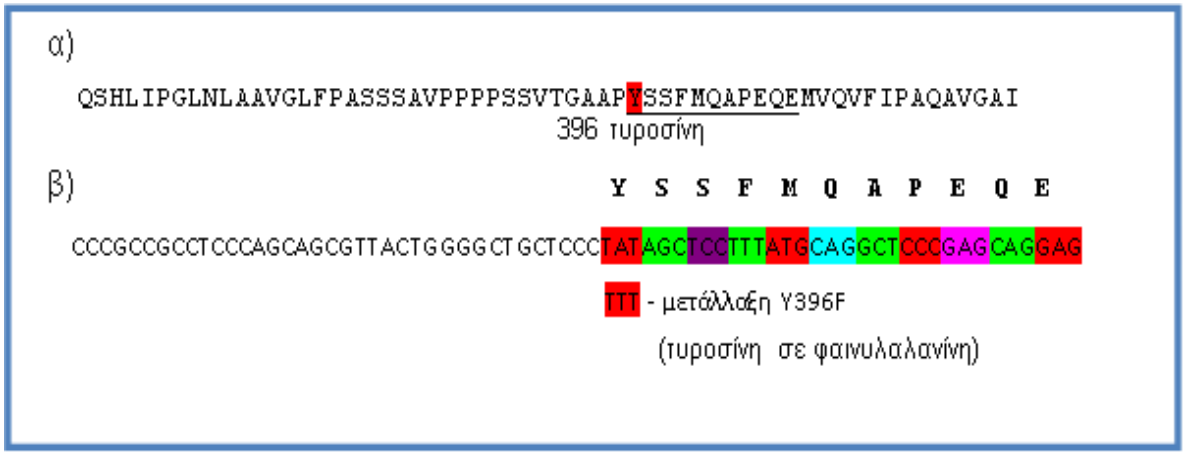


Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση του φορέα pCMV6-XL6

Για την κατασκευή πλασμιδίων με σημειακές μεταλλάξεις χρησιμοποιήθηκε το QuikChange® Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε στηρίζεται στη χρήση 2 εκκινητών που περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη. Οι εκκινητές αυτοί, που είναι συμπληρωματικοί προς τους 2 κλώνους του πλασμιδίου, επεκτείνονται κατά τη διαδικασία PCR χρησιμοποιώντας την DNA πολυμεράση Pfu Turbo. Μετά το πέρας της PCR τα μεταλλαγμένα πλασμίδια που προκύπτουν παρουσιάζουν κενά σύνδεσης. Στη συνέχεια γίνεται κατεργασία με Dpn I που πέπτει τους μητρικούς κλώνους επειδή φέρουν μεθυλιώσεις. Τα πλασμίδια που απομένουν είναι όσα συντέθηκαν και αυτά χρησιμοποιούνται για τον μετασχηματισμό δεκτικών βακτηρίων XL1-Blue. Στα βακτήρια επιδιορθώνονται τα κενά σύνδεσης. Για την κατασκευή του μεταλλαγμένου πλασμιδίου pCMV-XL6mut χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές:

Πρόσθιος: 5΄-CTGGGGCTGCTCCCTTTAGCTCCTTTATGCA-3΄
Αντίστροφος: 3΄-GACCCCGACGAGGGAAATCGAGGAAATACGT-5΄

Οι συγκεκριμένοι εκκινητές εισάγουν σημειακή μετάλλαξη προκειμένου να αντικατασταθεί η τυροσίνη της θέσης 396 από φαινυλαλανίνη όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



α) Αμινοξική ακολουθία της IGF2BP1 και η θέση πρόσδεσης της κινάσης Src στο 396 κατάλοιπο τυροσίνης. β) Η αντικατάσταση του καταλοίπου αδενίνης σε θυμίνη στο 396 αμινοξύ μέσω σημειακής μετάλλαξης.

2.9. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΩΝ (FIREFLY ΚΑΙ RENILLA)

Για τη μέτρηση της ενεργότητας λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκε το Dual Luciferase Assay System (Promega). 48 ώρες μετά τα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης έγινε μέτρηση των ενεργοτήτων των δύο λουσιφερασών (*Firefly* και *Renilla*).

Απομακρύνθηκε το πλήρες θρεπτικό μέσο από τις οπές των τρυβλίων και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με στείρο ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Τα κύτταρα λύθηκαν με την προσθήκη 500 μL διαλύματος λύσης (Passive Lysis Solution) ανά οπή. Οι πλάκες επωάστηκαν με το διάλυμα για περίπου 15 λεπτά σε συσκευή ανακινούμενης επιφάνειας. Το λύμα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε σωληνάρια

1,5mL και φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 rpm για ένα λεπτό. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο σωληνάριο 1,5mL. Σε κυψελίδα κατάλληλη για λουμινόμετρο προστέθηκαν 100 μL υποστρώματος για τη λουσιφεράση *Firefly* και 20μL από το υπερκείμενο και ακολούθησε ανάδευση. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης μετρήθηκε σε λουμινόμετρο BioOrbit 1253. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα Stop and Glo και έγινε μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης *Renilla*.

Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν και τουλάχιστον τρεις φορές. Υπολογίστηκε ο λόγος της ενεργότητας της *Firefly* λουσιφεράσης προς την αντίστοιχη της *Renilla* λουσιφεράσης για τα πειράματα με μονοσιστρονικά πλασμίδια, ενώ δεν έγινε κάτι τέτοιο στην περίπτωση των δισιστρονικών. Σε κάθε πείραμα η ενεργότητα της υπό εξέταση ρυθμιστικής περιοχής εκφράστηκε ως ποσοστό της αντίστοιχης του μονοσιστρονικού πλασμιδίου ελέγχου Luc/Control της οποίας η ενεργότητα θεωρήθηκε ως 100%. Στα πειράματα με δισιστρονικά πλασμίδια το πλασμίδιο ελέγχου του οποίου η ενεργότητα τέθηκε ως 100% ήταν το Bis/Control.

2.10. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΗΜΙΖΩΗΣ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ RNA ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΚΤΙΝΟΜΥΚΙΝΗΣ D

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση των στοιχείων αστάθειας των γονιδίων *c-myc* και *mdr1* στο χρόνο ημιζωής της *Firefly* λουσιφεράσης, η κυτταρική σειρά HEK-293T διαμολύνθηκε με 1 μg πλασμιδιακού DNA όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. 48 ώρες αργότερα, προστέθηκε στα κύτταρα ακτινομυκίνη D σε συγκέντρωση 5 μg/ml θρεπτικού υλικού και οι καλλιέργειες αφέθηκαν να επωαστούν για 0, 2, 4, 6 και 8 ώρες. Στο τέλος κάθε χρονικό σημείου τα κύτταρα απομακρύνονταν από τον επωαστικό θάλαμο με άμεση απομόνωση ολικού RNA για ανάλυση.

Η ακτινομυκίνη D ανήκει στην κατηγορία των πολυπεπτιδικών αντιβιοτικών και αποτελεί το πρώτο αντιβιοτικό που ανακαλύφθηκε να έχει αντικαρκινική δράση. Έχει την ιδιότητα να καταστέλλει τη μεταγραφή μέσω πρόσδεσής της στο σύμπλοκο

έναρξης της μεταγραφής και παρεμπόδισης της επιμήκυνσης της αλυσίδας του RNA από την RNA πολυμεράση. Χρησιμοποιώντας λοιπόν αυτόν τον παράγοντα και προσδιορίζοντας τα επίπεδα του μηνύματος σε διαφορετικά χρονικά σημεία είναι δυνατό να προσδιορίσει κανείς το χρόνο ημιζωής ενός συγκεκριμένου μηνύματος.

2.11 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA

Μετά τα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης απομονώθηκε από τα κύτταρα ολικό RNA με τη χρήση του NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel), σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. 350 μL ρυθμιστικού διαλύματος RA1 και 3.5 μL β-μερκαπτοαιθανόλης προστέθηκαν στα κύτταρα και ακολούθησε ανάδευση.
2. Το κυτταρόλυμα μεταφέρθηκε σε φίλτρο Nucleospin και φυγοκεντρήθηκε στα 11000 g για 1 λεπτό.
3. 350 μL 70% αιθανόλης προστέθηκαν στο κυτταρόλυμα και ακολούθησε ανάδευση.
4. Το υλικό μεταφέρθηκε σε ιοντοανταλλακτική στήλη Nucleospin RNA II και φυγοκεντρήθηκε στα 11000g για 30 δευτερόλεπτα
5. Προσθήκη στη στήλη 350 μL ρυθμιστικού διαλύματος MDB και φυγοκέντρηση στα 11000g για 1 λεπτό.
6. 10 μL διαλύματος rDNase και 90 μL διαλύματος αντίδρασης DNase reaction buffer προστέθηκαν στην στήλη και ακολούθησε επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Η στήλη ξεπλύθηκε με 200 μL διαλύματος RA2 και φυγοκεντρήθηκε στα 11000g για 30 δευτερόλεπτα
8. Η στήλη ξεπλύθηκε με 600 μL διαλύματος RA3 και φυγοκεντρήθηκε στα 11000g για 30 δευτερόλεπτα
9. Η στήλη ξεπλύθηκε με 250 μL διαλύματος RA3 και φυγοκεντρήθηκε στα 11000g για 2 λεπτά.

10. Έκλουση ολικού RNA έγινε μέσω προσθήκης στη στήλη 60 μL νερού ελεύθερου ριβονουκλεασών έπειτα από φυγοκέντρηση στα 11000g για 1 λεπτό.

Μετά το πέρας της διαδικασίας απομόνωσης τα δείγματα ολικού RNA φυλάχθηκαν στους -80^{O}C.

2.12 ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA ΜΕ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Περίπου 1μg ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) με τη χρήση του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript II RNase H(-) Reverse *Trans*criptase (Invitrogen). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, το RNA αναμίχθηκε με 0,5μg oligo(dT)12–18 εκκινητές και 1μl διαλύματος dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, συγκέντρωσης 10mM το καθένα) και προστέθηκε νερό ελεύθερο ριβονουκλεασών μέχρι τελικού όγκου 11μl. Το μείγμα επωάστηκε στους 65^{O}C για 5min, και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στον πάγο προκειμένου να σταθεροποιηθούν οι υβριδισμένοι εκκινητές. Έπειτα, προστέθηκαν 4μl ρυθμιστικού διαλύματος (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl2), 2μl DTT 0,1 M, 1μl RNaseOUT (40U/μl) και 1μl ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript II RNase H(-) (200U). Το μείγμα επωάστηκε στους 42^{O}C για 60min και ακολούθησε απενεργοποίηση του ενζύμου με επώαση στους 75^{O}C για 15min. Τα cDNAs φυλάχθηκαν στους -20^{O}C.

2.13 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΤΩΝ FIREFLY ΚΑΙ RENILLA ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΩΝ, IGF2BP1, C-MYC ΚΑΙ GAPDH ΜΕ REAL-TIME PCR

Για την εκτίμηση των σχετικών επιπέδων των μηνυμάτων RNA χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία της ποσοτικής ανάλυσης νουκλεικών οξέων Real time PCR σε θερμικό κυκλοποιητή 7500 της εταιρείας Applied Biosystems

Η τεχνική της real-time PCR συλλέγει πληροφορίες κατά τη διάρκεια που λαμβάνει χώρα η αντίδρασή PCR, με το να συνδυάζει την ενίσχυση του γενετικού υλικού και την ανίχνευση αυτού σε ένα μόνο βήμα. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μιας ποικιλίας διαφορετικών φθοριζόντων μορίων, των οποίων η ένταση σχετίζεται με τη συγκέντρωση του προϊόντος της PCR. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων είναι σημαντικός ο προσδιορισμός του κύκλου PCR στον οποίο για πρώτη φορά ανιχνεύεται η ενίσχυση του γονιδίου στόχου. Το σημείο αυτό αναφέρεται ως κύκλος κατώφλι (cycle threshold, Ct) και αντιπροσωπεύει τη χρονική στιγμή που η ένταση του φθορισμού είναι μεγαλύτερη από το φθορισμό θορύβου. Συνεπώς, όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του DNA στόχου στο αρχικό υλικό, τόσο γρηγορότερα θα έχουμε μια σημαντική αύξηση στο σήμα φθορισμού, το οποίο με τη σειρά του αποφέρει ένα μικρότερο Ct.

Από την αντίδραση της PCR κατασκευάζεται μια καμπύλη αναφοράς, η οποία αποτελείται από τέσσερις φάσεις. Τη γραμμική φάση (συνήθως οι πρώτοι 10-15 κύκλοι), κατά την οποία η εκπομπή φθορισμού δεν ξεπερνά ακόμη το θόρυβο. Την πρώιμη εκθετική φάση, στην οποία τα επίπεδα φθορισμού έχουν φτάσει σε ένα κατώφλι σημαντικά υψηλότερο από τα επίπεδα του θορύβου. Ο κύκλος όπου συμβαίνει αυτό ονομάζεται Ct (η τιμή του Ct χρησιμοποιείται στον υπολογισμό των πειραματικών αποτελεσμάτων). Την εκθετική φάση κατά την οποία το προϊόν της PCR διπλασιάζεται μετά από κάθε κύκλο. Και τέλος τη φάση πλατό, κατά την οποία η επαναδιάταξη του προϊόντος ανταγωνίζεται με τη σύνδεση των εκκινητών και η ένταση του φθορισμού δεν είναι πλέον χρήσιμη για τον υπολογισμό των δεδομένων.

Στην παρούσα διατριβή πέραν των εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν και ιχνηθέτες σημασμένοι με το φθορίζον μόριο FAM. Οι ιχνηθέτες αυτοί σχεδιάζονται με αλληλουχία συμπληρωματική αυτής του προϊόντος του PCR και έχουν την

ιδιότητα να εκλύουν φθορισμό μονό εάν και εφόσον υβριδιστούν πλήρως στην αλληλουχία στόχο. Αυτό εξασφαλίζει έτσι την ποσοτικοποίηση μόνο ειδικών προϊόντων της PCR.

2.14 ΣΧΕΤΙΚΗ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΤΟΧΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ CT (2^-Δ(ΔCT)).

Η σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης mRNA των γονιδίων που μελετήθηκαν σε αυτήν την διατριβή έγινε με χρήση της μεθόδου 2 ^-Δ(ΔCT) (Livak και Schmittgen *et al*.,2001). Η σχετική ποσοτικοποίηση των γονιδίων στόχων έγινε μέσω σύγκρισης των κύκλων CT που εμφανίζεται το προϊόν του γονιδίου στόχου με τους κύκλους CT 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:

ΔC_T ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ= C_T ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΤΟΧΟΥ- C_T ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

ΔC_T ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ= C_T ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΤΟΧΟΥ- C_T ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

$\Delta(\Delta C_T)$= ΔC_T ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ- ΔC_T ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ

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 λουσιφεράσης *Firefly* χρησιμοποιήθηκε η λουσιφεράση *Renilla* ως γονίδιο αναφοράς. Αντίστοιχα, στις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση του ενδογενούς *c-myc* mRNA χρησιμοποιήθηκε το GAPDH ως γονίδιο αναφοράς. Παράλληλες αντιδράσεις χωρίς δείγμα RNA διεξήχθησαν για έλεγχο καθαρότητας των αντιδραστηρίων.

2.14.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΤΟΥ IGF2BP1

Για τον προσδιορισμό του μηνύματος IGF2BP1 χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές LUX, ο ένας εκ των οποίων ήταν σημασμένος με το φθορίζον μόριο FAM στο 3΄ άκρο του με δομή «φουρκέτας» (Invitrogen). Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές:

CRDFLUX: 5΄- CATCGGACGAGCACTGGGCGAG -3΄

CRDR: 5΄- TTTGGGCACCGAATGTTCAA -3΄

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl με μήτρα 2 μl cDNA, χρησιμοποιώντας το Platinum qPCR SuperMix UDG (Invitrogen), το οποίο περιέχει το ένζυμο της DNA πολυμεράσης, μίγμα των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dCTP ,dGTP) και $MgCl_2$ σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Η τελική συγκέντρωση των εκκινητών ήταν 1pmol/μL. Το θερμικό πρωτόκολλο περιλάμβανε 50 κύκλους ο καθένας από τους οποίους αποτελούνταν από: 15 δευτερόλεπτα στους 95ºC (αποδιάταξη), 30 δευτερόλεπτα στους 60ºC (υβριδισμός), 30 δευτερόλεπτα στους 72ºC (επιμήκυνση) και μέτρηση του φθορισμού.

2.14.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΤΟΥ C-MYC

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων του *c-myc* mRNA χρησιμοποιήθηκε το Real Time PCR for Human *c-myc* Gene Expression Primer and Probe Set (Maxim Biotech Inc.) που περιέχει έναν ιχνηθέτη FRET (Fluorescence Renascence Energy Tranfer) με φθορίζον μόριο FAM. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, σε τελικό όγκο 25μl με μήτρα 2μl cDNA. Το θερμικό πρωτόκολλο περιλάμβανε 3 κύκλους που αποτελούνταν από 30 δευτερόλεπτα στους 95ºC και 60 δευτερόλεπτα στους 55ºC και στη συνέχεια 50 κύκλους που αποτελούνταν από 45 δευτερόλεπτα στους 95ºC και 60 δευτερόλεπτα στους 55ºC.

2.14.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΤΗΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ FIREFLY

Για την ποσοτικοποίηση του μηνύματος της λουσιφεράσης *Firefly* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές:

Εμπρόσθιος 5΄- GCACATATCGAGGTGAACATCAC-3΄

Αντίστροφος: 5΄-GCCAACCGAACGGACATTT-3΄

FAM ιχνηθέτης: TACGCGGAATACTTC

Το θερμικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν: 95^{O}C για 5 λεπτά (1 κύκλος), και 30 κύκλους που αποτελούνταν από 95^{O}C για 15 δευτερόλεπτα και 60^{O}C για 1 λεπτό.

2.14.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΤΗΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ RENILLA

Για την ποσοτικοποίηση του μηνύματος της *Renilla* λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές:

Εμπρόσθιος 5΄- ACGCGGCCTCTTCTTATTTATG-3΄

Αντίστροφος: 5΄- CCGCGCTACTGGCTCAA -3΄

FAM ιχνηθέτης: CGACATGTTGTGCCACAT

Το θερμικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν: 95^{O}C για 5 λεπτά (1 κύκλος), και 30 κύκλους που αποτελούνταν από 95^{O}C για 15 δευτερόλεπτα και 60^{O}C για 1 λεπτό.

2.14.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΤΟΥ GAPDH

Για τον προσδιορισμό του μηνύματος του GAPDH χρησιμοποιήθηκε το Human GAPD (GAPDH) Endogenous Control (FAM / MGB Probe, Non-Primer Limited) (Applied Biosystems).

Το θερμικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν: 95^{O}C για 5 λεπτά (1 κύκλος), και 30 κύκλους που αποτελούνταν από 95^{O}C για 15 δευτερόλεπτα και 60^{O}C για 1 λεπτό.

2.15 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΜΕΡΑΦΡΑΣΙΜΟΤΗΤΑΣ

Ο όρος μεταφρασιμότητα αναφέρεται στα επίπεδα πρωτεΐνης που προκύπτει από το μήνυμα RNA, κατά περίπτωση. Για τον υπολογισμό της μεταφρασιμότητας των γονιδίων που εκφράζουν οι φορείς έκφρασης υπολογίστηκε ο λόγος της ενεργότητας της *Firefly* λουσιφεράσης προς την ενεργότητα της *Renilla* λουσιφεράσης για κάθε δείγμα. Η τιμή της ενεργότητας στην συνέχεια διαιρέθηκε με την τιμή των επιπέδων mRNA της *Firefly* λουσιφεράσης (κανονικοποιημένη στα αντίστοιχα επίπεδα mRNA της *Renilla*). Η τιμή που προκύπτει αντιπροσωπεύει την μεταφρασιμότητα του ελεγχόμενου γονιδίου.

2.16 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΣΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOT)

2.16.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε το DC Protein Assay (Biorad).

Προετοιμάστηκαν αραιώσεις του προτύπου διαλύματος αλβουμίνης ορού (BSA) που καλύπτουν το εύρος τιμών 0.2 mg/ml έως 1.5 mg/ml (από τρεις έως πέντε ανά μέτρηση), οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς. Για κάθε μέτρηση αναμίχθηκαν 100μl από το δείγμα ή από το πρότυπο διάλυμα με 500μl αντιδραστηρίου Α, και με 4ml αντιδραστηρίου Β. Το μείγμα επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15min και στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφησή του στα 750nm σε φωτόμετρο.

2.16.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (SDS-PAGE)

Η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε συνθήκες αποδιάταξης χρησιμοποιώντας συσκευή mini ProteanII (Biorad). Το πήκτωμα που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από τη φάση στοίβαξης με σύσταση 3,9% aclylamide–bisacrylamide (29:1) σε διάλυμα 125mM Tris–HCl pH 6.8 και 0.1% SDS και τη φάση διαχωρισμού με σύσταση 10% aclylamide–bisacrylamide (29:1) σε διάλυμα 375mM Tris–HCl pH 8.8 και 0.1% SDS.

Ίση ποσότητα πρωτεΐνης από κάθε δείγμα ανάχθηκε σε τελικό όγκο 30μL έπειτα από ανάμειξή με SDS–PAGE sample buffer (Biorad). Τα δείγματα έβρασαν για 5 λεπτά και ηλεκτροφορήθηκαν αρχικά στα 80V - 50mA για να διέλθουν τη φάση στοίβαξης και έπειτα στα 150V - 60mA στην φάση διαχωρισμού για 2-3 ώρες.

2.16.3 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

Η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη έγινε με ηλεκτρομεταφορά, χρησιμοποιώντας κατάλληλη συσκευή (Biorad), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες Immobilon-P (Millipore). Τα βήματα ήταν τα ακόλουθα:

1. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης εμβαπτίστηκε για 30 δευτερόλεπτα σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (28,8g Γλυκίνης, 6 g Tris pH 8.3, 400 ml μεθανόλης σε 1.6 ml νερό).
2. Η μεμβράνη εμβαπτίστηκε για:
   - 2 δευτερόλεπτα σε μεθανόλη
   - 2 δευτερόλεπτα σε νερό
   - 10 δευτερόλεπτα σε διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς
3. 2 κομμάτια ίσου μεγέθους χαρτί διήθησης 3MM καθώς και τα σφουγγαράκια ηλεκτρομεταφοράς εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς
4. Ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά στους $4^{O}C$ για μιάμιση ώρα στα 100V-350mA

2.16.4 ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΚΑΙ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αντίδραση της ακινητοποιημένης στη μεμβράνη πρωτεΐνης (αντιγόνο) με συγκεκριμένο μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό αντίσωμα που την αναγνωρίζει (αντίσωμα 1). Το αντίσωμα αυτό στη συνέχεια αναγνωρίζεται από άλλο μη ειδικό αντίσωμα (αντίσωμα 2) στο οποίο είναι δεσμευμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης (horseradish peroxidase-HRP). Το ένζυμο αυτό καταλύει την οξείδωσης της λουμινόλης, με αποτέλεσμα να παράγεται χημειοφωταύγεια η οποία ανιχνεύεται με τη βοήθεια ευαίσθητων film.

Για τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το ECL Western Blotting Detection kit (Amersham) σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο.

1. Η μεμβράνη επωάστηκε για 12-16 ώρες σε διάλυμα PBSt-milk (5% γάλα σκόνης, 0.1% Tween 20 σε PBS), στους 4^{o}C. Με αυτό τον τρόπο μπλοκάρονται όλες οι κενές θέσεις επάνω στη μεμβράνη και αποτρέπεται η μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων.

2. Η μεμβράνη ξεπλύθηκε για 1x15΄ και 3x5΄ με διάλυμα PBSt.

3. Επωάστηκε με το πρώτο αντίσωμα κατάλληλα αραιωμένο σε PBSt για μία ώρα με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Ξεπλύθηκε για 1x15΄ και 3x5΄ με διάλυμα PBSt.

5. Επωάστηκε με το δεύτερο αντίσωμα κατάλληλα αραιωμένο σε PBSt για μία ώρα με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

6. Ξεπλύθηκε για 1x15΄ και 3x5΄ με διάλυμα PBSt.

7. Προστέθηκαν τα αντιδραστήρια ECL για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.

8. Ακολούθησε εμφάνιση σε σκοτεινό δωμάτιο με χρήση ειδικών film (Hyperfilm–ECL, Amersham)

Τα αντισώματα καθώς και οι αραιώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στον πίνακα 3.

Αντίσωμα 1	Αραίωση	Αντίσωμα 2	Αραίωση
Anti-luciferase mouse monoclonal (SC-57603, Santa Cruz Biotechnology)	1:200 σε PBSt	Goat anti-mouse HRP (W4021, Promega)	Goat anti-mouse HRP (W4021, Promega)
Anti-GAPDH mouse monoclonal (MAB374, Chemicon International)	1:5000 σε PBSt	Goat anti-mouse HRP (W4021, Promega)	1:10000 σε PBSt
Rabbit anti-IGF2BP1 (provided by Dr Finn Nielsen)	1:20000 σε PBSt με γάλα	Mouse anti-rabbit HRP (sc-2357, Santa Cruz Biotechnology	1:10000 σε PBSt
Mouse anti *c-myc* (SC-40, Santa Santa Cruz Biotechnology	1:1000 σε PBSt	Goat anti-mouse HRP (W4021, Promega)	1:10000 σε PBSt
Mouse anti β-actin (SC-47778, Santa Santa Cruz Biotechnology	1:1000 σε PBSt	Goat anti-mouse HRP (W4021, Promega)	1:10000 σε PBSt

Πίνακας 3. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και αραιώσεις τους.

Το σήμα της χημειοφωταύγειας που παράχθηκε ποσοτικοποιήθηκε μέσω σάρωσης του φιλμ και χρήσης του προγράμματος Image 1.4 Σαν εσωτερικός έλεγχος της ποσότητας του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος κάθε δείγματος, μετρήθηκε και η πρωτεΐνη GAPDH. Οι τιμές που προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης προς μελέτη διαιρέθηκαν με την αντίστοιχη τιμή της GAPDH.

2.17 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα προέκυψαν 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.

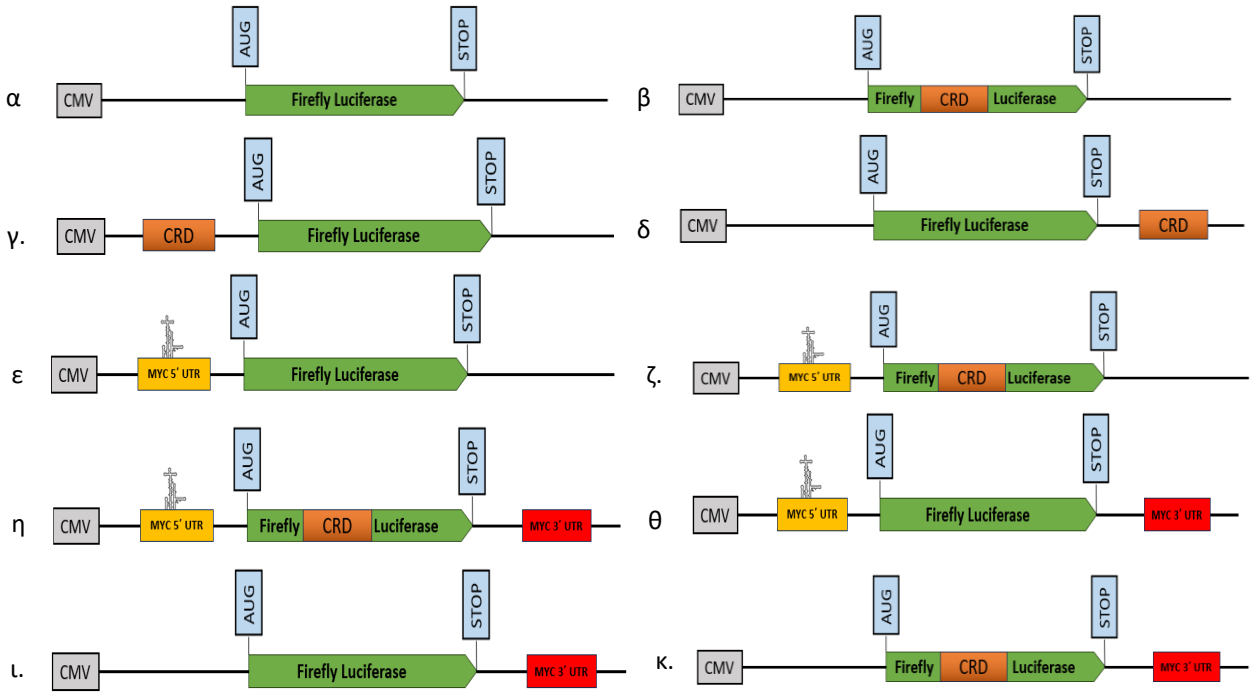
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ.

Προκείμενου να μελετηθεί η επίδραση των διάφορων ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων *c-myc* και *mdr1* στη μετάφραση, κατασκευάστηκαν πλασμίδια τα οποία φέρουν το γονίδιο της *Firefly* λουσιφεράσης. Έκφραση και μέτρηση της πρωτεΐνης που παράγεται σε αυτή την περίπτωση λειτουργεί ως αναφορά της δράσης των προαναφερθέντων ρυθμιστικών περιοχών.

3.1.1 ΜΟΝΟΣΙΣΤΡΟΝΙΚΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

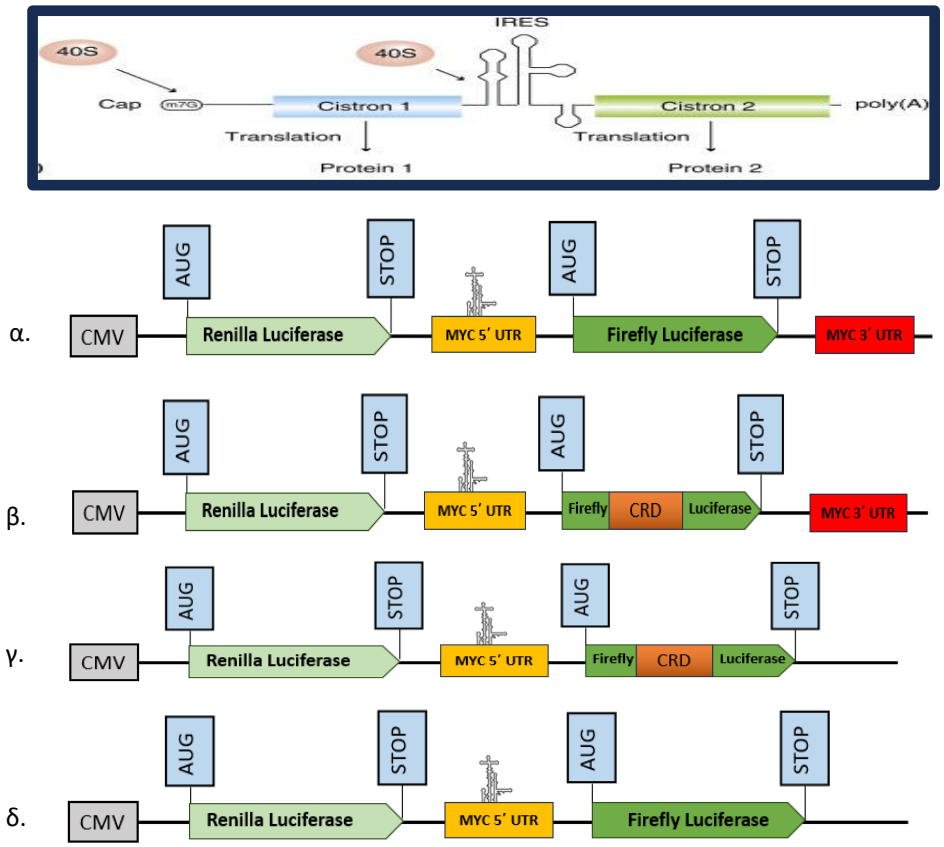
Τα μονοσιστρονικά πλασμίδια όπως φαίνονται στην εικόνα 19 κατασκευάστηκαν με βάση τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο. Στην προκειμένη περίπτωση η μετάφραση είναι εξαρτώμενη από το κάλυμμα 5΄.



Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση των μονοσιστρονικών πλασμιδίων. α. Luc/Control, β. Luc/CRD, γ. Luc/5΄CRD, δ. Luc/3΄CRD (το ίδιο ισχύει και για τις κατασκευές που φέρουν το MDR1), ε. Luc/5΄MYC, ζ. Luc/5΄MYC-CRD, η. Luc/5 MYC'-CRD-3΄MYC, θ. Luc/5΄ MYC-3΄MYC, ι. Luc/3΄MYC, κ. Luc/CRD-3΄MYC.

3.1.2 ΔΙΣΙΣΤΡΟΝΙΚΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

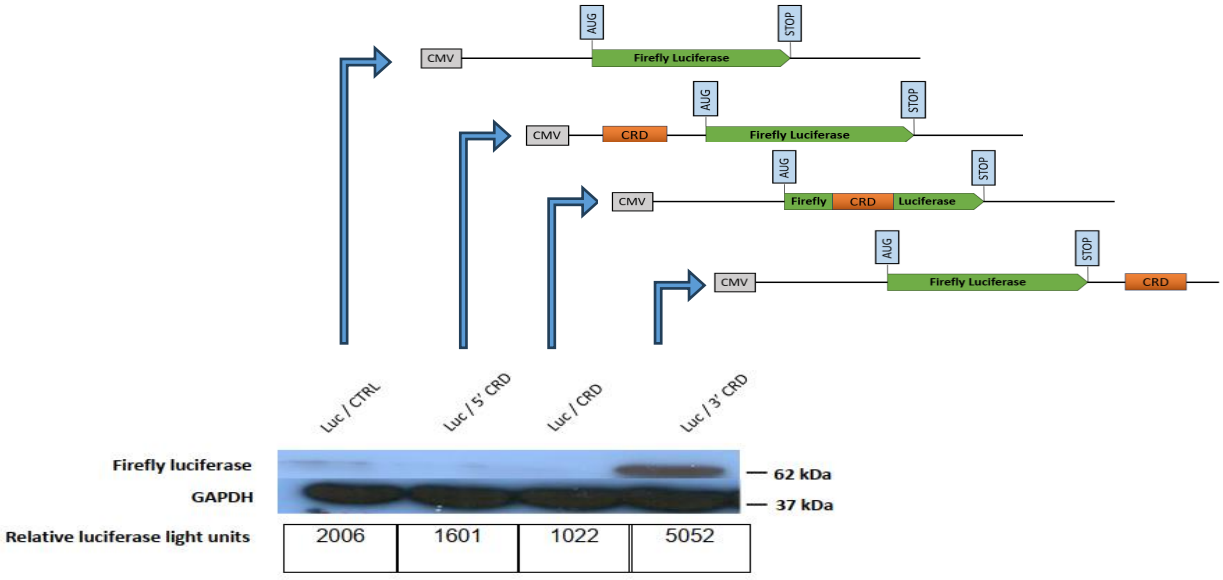
Προκειμένου να καταστεί εφικτή η έκφραση δύο γονιδίων αναφοράς από το ίδιο μετάγραφο, η κωδική περιοχή του γονιδίου αναφοράς της *Renilla* λουσιφεράσης κλωνοποιήθηκε ανοδικά της αμετάφραστης περιοχής 5΄ του *c-myc* mRNA, η οποία περιέχει ένα εσωτερικό σημείο εισόδου ριβοσώματος (IRES). Τα δισιστρονικά πλασμίδια που περιγράφονται στην εικόνα 20 κατασκευάστηκαν με βάση τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο. Σε αυτή την περίπτωση η έκφραση του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης *Firefly* είναι εξαρτώμενη από το 5΄ IRES ενώ της λουσιφεράσης *Renilla* από το κάλυμμα 5΄.



Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση των δισιστρονικών πλασμιδίων. α. Bis/3΄MYC, β. Bis/CRD-3΄MYC, γ. Bis/CRD, δ. Bis/Control.

3.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ FIREFLY

Προκειμένου να εξακριβωθεί εάν τα επίπεδα ενεργότητας των χιμαιρικών μηνυμάτων της *Firefly* λουσιφεράσης που παρατηρήθηκαν προηγουμένως είναι σε αντιστοιχία με τα επίπεδα παραγόμενης πρωτεΐνης, η κυτταρική σειρά HEK-293T διαμολύνθηκε με τους φορείς έκφρασης Luc/CRD, Luc/5΄CRD, Luc/3΄CRD και Luc/Control, όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. Στη συνέχεια απομονώθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα με βάση τα πρωτόκολλα που περιγράφονται στο προηγούμενο κεφάλαιο και 30 μg ολικής πρωτεΐνης από το κάθε δείγμα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Μετά την ηλεκτρομεταφορά τους σε μεμβράνη Immobilon-P (Millipore) ακολούθησε ανοσοανίχνευση του πρωτεϊνικού προϊόντος της λουσιφεράσης *Firefly* χρησιμοποιώντας ένα ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα *Firefly* luciferase. Ως έλεγχος ισοφορτώματος ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή, έγινε ανοσοανίχνευση των επιπέδων της ενδογενούς GAPDH χρησιμοποιώντας ένα ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα GAPDH.



Εικόνα 21. Επίπεδα έκφρασης της λουσιφεράσης *Firefly*

Τα αποτελέσματα (εικόνα 21) έδειξαν ότι τα επίπεδα ενεργότητας που παρατηρήθηκαν προηγουμένως είναι σε αντιστοιχία με τα επίπεδα του χιμαιρικού πρωτεϊνικού προϊόντος

3.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ C-MYC mRNA ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ

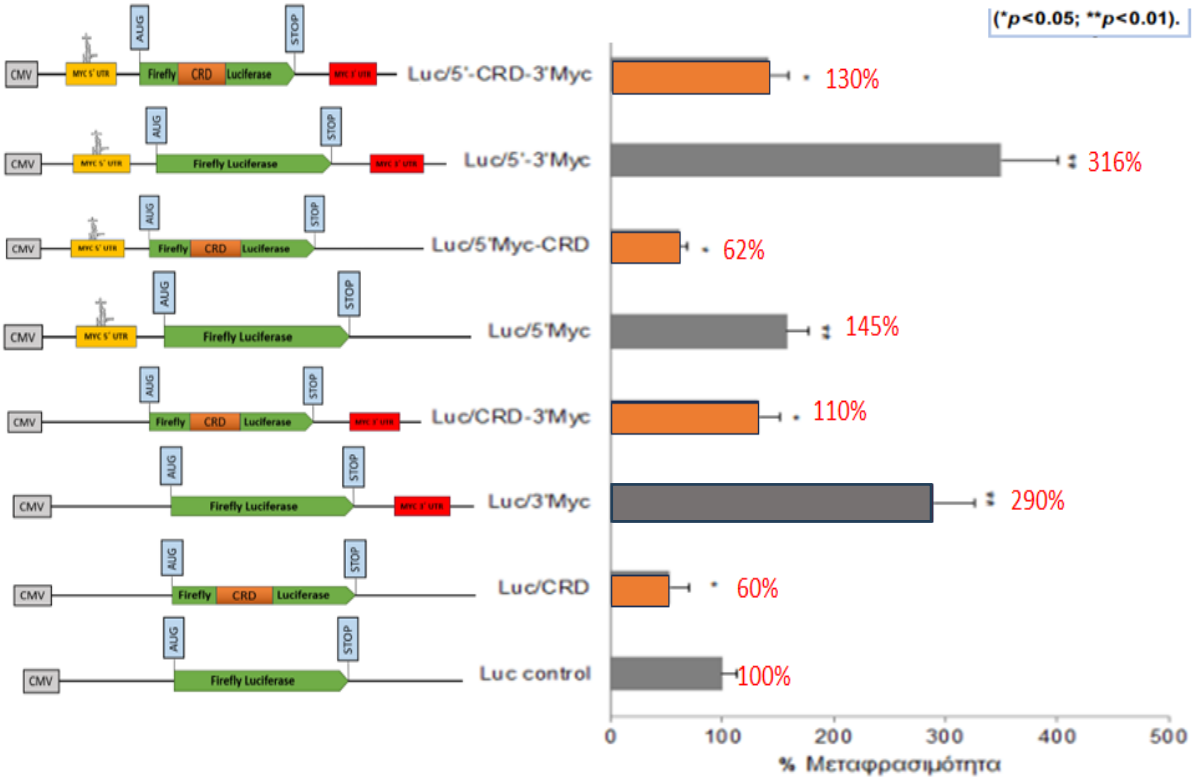
Ο μετα-μεταγραφικός έλεγχος στον οποίο υπόκειται το *c-myc* παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφρασή του τόσο σε επίπεδο σταθερότητας του μηνύματος RNA όσο και στη μετάφρασή του. Τα ρυθμιστικά στοιχεία *cis* και *trans* που ελέγχουν την μετάφραση του mRNA του *c-myc* έχουν μελετηθεί εκτενώς. Η αμετάφραστη περιοχή 5΄ περιέχει μία εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος (IRES) που επιτρέπει την μετάφραση σε συνθήκες καταπόνησης του κυττάρου, όπως για παράδειγμα κατά τη διάρκεια μια ιικής μόλυνσης. Η αμετάφραστη περιοχή 3΄του *c-myc* mRNA παίζει ρόλο στο μεταφραστικό του έλεγχο μέσω πρόσδεσης miRNAs καθώς επίσης και πρωτεϊνών όπως η HuR, η AUF1 και TIAR [Kim *et al., 2009;* Liao *et al., 2007*]. Τέλος η κωδική περιοχή περιέχει το στοιχείο αστάθειας CRD στο οποίο λόγω της ύπαρξης σπανίων κωδικονίων έχει προταθεί ότι καθυστερούν τα κυλιόμενα ριβοσώματα με αποτέλεσμα η περιοχή αυτή να μένει εκτεθειμένη σε ριβονουκλεάσες εκτός και αν προστατεύεται από την πρόσδεση της IGF2BP1 πρωτεΐνης.

Η συνεισφορά των προαναφερθέντων ρυθμιστικών περιοχών *cis* έχει διερευνηθεί κυρίως μελετώντας τη δράση καθενός από αυτά σε μεμονωμένο επίπεδο. Σε μία προσπάθεια να μελετήσουμε πιθανές αλληλεπιδράσεις αυτών των ρυθμιστικών περιοχών μεταξύ τους και τον τρόπο με τον οποίο συνεισφέρουν στον μεταφραστικό έλεγχο του γονιδίου *c-myc*, δημιουργήθηκε μία σειρά μονοσιτρονικών και δισιστρονικών φορέων έκφρασης των γονιδίων αναφοράς της λουσιφεράσης *Firefly* και *Renilla*. Τα συγκεκριμένα πλασμίδια, φέρουν τις ρυθμιστικές περιοχές που εδράζονται στις αμετάφραστες περιοχές 5΄ και 3΄ καθώς και την κωδική περιοχή του *c-myc* μεμονωμένα, καθώς και σε συνδυασμό μεταξύ τους.

3.3.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ ΟΓΚΟΓΟΝΟΔΙΟΥ C-MYC ΣΤΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕΣΩ ΚΑΛΥΜΜΑΤΟΣ 5΄

Τα πειράματα διαμόλυνσης των μονοσιστρονικών πλασμιδίων (Luc/Control, Luc/CRD, Luc/3΄MYC, Luc/CRD-3΄MYC, Luc/5΄MYC, Luc/5΄MYC-CRD, Luc/5΄-3΄MYC, και Luc/5΄-CRD-3΄MYC) σε συνδυασμό με το πλασμίδιο αναφοράς pRL-CMV πραγματοποιήθηκαν στην κυτταρική σειρά HEK-293T όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. 48 ώρες μετά την διαμόλυνση, εκχυλίσματα πρωτεϊνών και ολικό RNA απομονώθηκαν από τα κύτταρα και χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι δοκιμασίες μέτρησης της ενεργότητας των δυο λουσιφερασών. Ο λόγος της ενεργότητας της λουσιφεράσης *Firefly* προς αυτήν της *Renilla* υπολογίστηκε και διαιρέθηκε με το λόγο των αντίστοιχων μετρήσεων επιπέδων RNA προκειμένου να προσδιοριστεί η μεταφρασιμότητα των mRNA των εκάστοτε φορέων έκφρασης.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν (σχήμα 1) έδειξαν ότι η παρουσία της CRD περιοχής είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση της μεταφρασιμότητας του μηνύματος RNA είτε μεμονωμένα, είτε σε συνδυασμό με άλλες ρυθμιστικές περιοχές. Η 5΄ UTR αύξησε την μεταφρασιμότητα κατά περίπου 50%, ενώ αξιοσημείωτη ήταν η επίδραση της 3΄UTR, όπου παρατηρήθηκε αύξηση της μεταφρασιμότητας σε κάθε περίπτωση. Επιπρόσθετα, δεν υπάρχει συνεργιστική δράση μεταξύ των διαφόρων ρυθμιστικών στοιχείων του *c-myc*, καθώς μετρήσεις αποτελούν το αλγεβρικό άθροισμα των μετρήσεων της δράσης των μεμονωμένων ρυθμιστικών περιοχών.



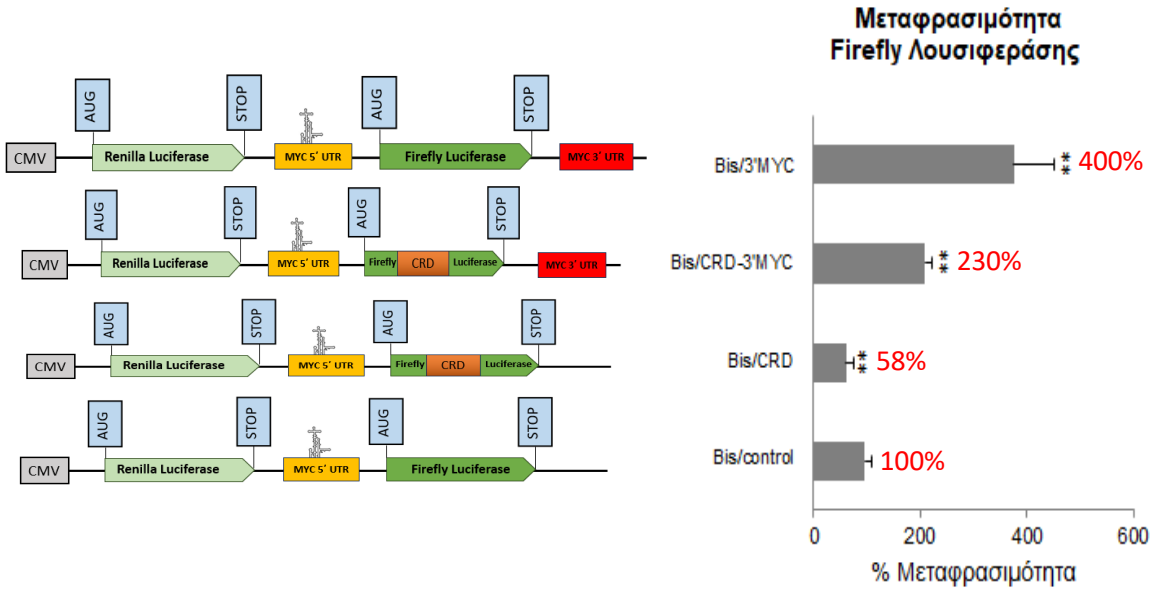
Σχήμα 1. Επίδραση των ρυθμιστικών περιοχών του *c-myc* στην μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄. Μετά από διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς HEK-293T με τα παραπάνω πλασμίδια υπολογίστηκε η μεταφρασιμότητα των μηνυμάτων RNA. Οι ρυθμιστικές περιοχές δρουν μεμονωμένα στη μεταφρασιμότητα των χιμαιρικών RNA καθώς καμία συνεργιστική δράση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ τους. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μετρήσεις από 3 διαφορετικά πειράματα.

3.3.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ ΟΓΚΟΓΟΝΟΔΙΟΥ C-MYC ΣΤΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕΣΩ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗΣ ΘΕΣΗΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΡΙΒΟΣΩΜΑΤΟΣ (IRES).

Παρά το γεγονός μη συνεργιστικής δράσης των ρυθμιστικών περιοχών του *c-myc*, η πιθανότητα επίδρασης της αμετάφραστης περιοχής 5΄ και 3΄ στη μετάφραση μέσω IRES δεν μπορούσε να μην ληφθεί υπόψη. Με σκοπό να διερευνήσουμε τη συγκεκριμένη υπόθεση, ήταν απαραίτητο να διαχωριστεί η μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄ από την μετάφραση μέσω IRES. Για αυτό τον λόγο δημιουργήθηκε μία σειρά δισιστρονικών πλασμιδίων (Bis/Control, Bis/CRD, Bis/3΄Myc, Bis/CRD-3΄Myc) μέσω των οποίων καθίσταται εφικτός ο διαχωρισμός ανάμεσα στη μετάφραση μέσω καλύμματος και μέσω IRES, καθώς η αναφορά από το γονίδιο της λουσιφεράσης *Firefly* υποδηλώνει μετάφραση μέσω IRES, ενώ αναφορά από το γονίδιο της *Renilla* υποδηλώνει μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄.

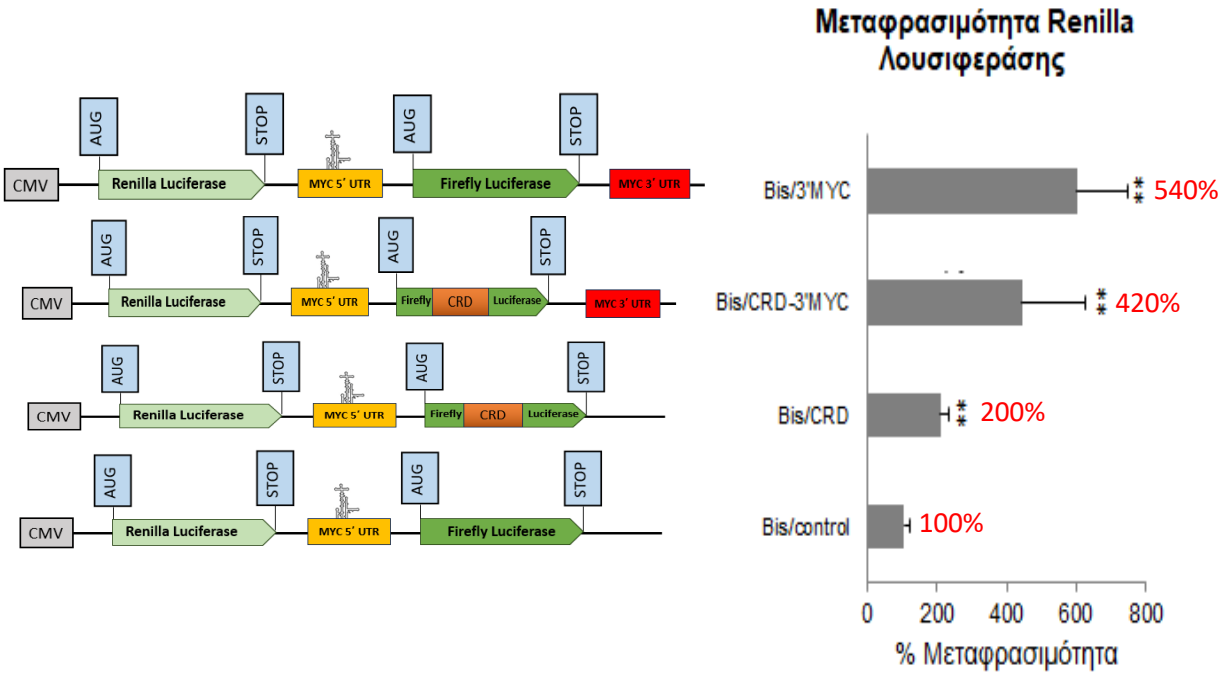
Προκειμένου να προσδιοριστεί η μεταφρασιμότητα μέσω IRES και μέσω καλύμματος 5΄ για κάθε φορέα έκφρασης, χρησιμοποιήθηκαν οι λόγοι της ενεργότητας της λουσιφεράσης *Firefly* προς το αντίστοιχο mRNA (μετάφραση μέσω IRES) και της ενεργότητας της λουσιφεράσης *Renilla* προς το αντίστοιχο mRNA (μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄). Το δισιστρονικό μετάγραφο το οποίο έφερε μόνο την περιοχή του IRES χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος και η μεταφρασιμότητα τόσο μέσω IRES όσο και μέσω καλύμματος 5΄ τέθηκαν ως 100%.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν (σχήμα 2) παρατηρήθηκε ότι μέσω IRES η παρουσία της 3΄UTR αύξησε τη μετάφραση περίπου τέσσερις φορές. Η παρουσία του στοιχείου αστάθειας CRD είχε σαν αποτέλεσμα την μειωμένη κατά 40% μεταφρασιμότητα. Δεν παρατηρήθηκε καμία συνεργιστική δράση μεταξύ του CRD και της αμετάφραστης περιοχής 3΄, καθώς η μεταφρασιμότητα από το συγκεκριμένο μήνυμα αποτελούσε το αλγεβρικό άθροισμα (net effect) των Bis/CRD και Bis/3΄MYC.



Σχήμα 2. Επίδραση των ρυθμιστικών περιοχών του *c-myc* στην μετάφραση μέσω IRES σε δισιστρονικό φορέα έκφρασης. Παρουσία του CRD η μεταφρασιμότητα πέφτει κατά 40%. (Bis/CRD) Η αμετάφραστη περιοχή 3΄ ενισχύει τη μετάφραση κατά 4 φορές (Bis/3΄MYC) ενώ δεν παρατηρείται συνεργιστική δράση μεταξύ των δύο (Bis/CRD-3΄MYC). Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μετρήσεις από 5 διαφορετικά πειράματα. (*p<0.05; **p<0.01)

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν όσον αφορά τη μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄ σε δισιστρονικό φορέα έκφρασης (σχήμα 3) έδειξαν ότι η αμετάφραστη περιοχή 3΄ δρα και σε αυτήν την περίπτωση ενισχυτικά καθώς η μεταφρασιμότητα παρουσιάζεται αυξημένη κατά περίπου 6 φορές. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα αποτελέσματα, η παρουσία του στοιχείου αστάθειας σε αυτή την περίπτωση δρα ενισχυτικά καθώς η μετάφραση παρουσιάζεται ενισχυμένη κατά 100%. Τέλος ούτε εδώ παρατηρήθηκε συνεργιστική δράση μεταξύ των δύο αυτών ρυθμιστικών περιοχών.



Σχήμα 3. Επίδραση των ρυθμιστικών περιοχών του *c-myc* στην μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄ σε δισιστρονικό φορέα έκφρασης. Παρουσία του CRD η μεταφρασιμότητα αυξάνεται κατά 100%. (Bis/CRD) Η αμετάφραστη περιοχή 3΄ ενισχύει τη μετάφραση κατά 6 φορές (Bis/3΄MYC) ενώ δεν παρατηρείται συνεργιστική δράση μεταξύ των δύο (Bis/CRD-3΄MYC). Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μετρήσεις από 5 ανεξάρτητα πειράματα. (*p<0.05; **p<0.01)

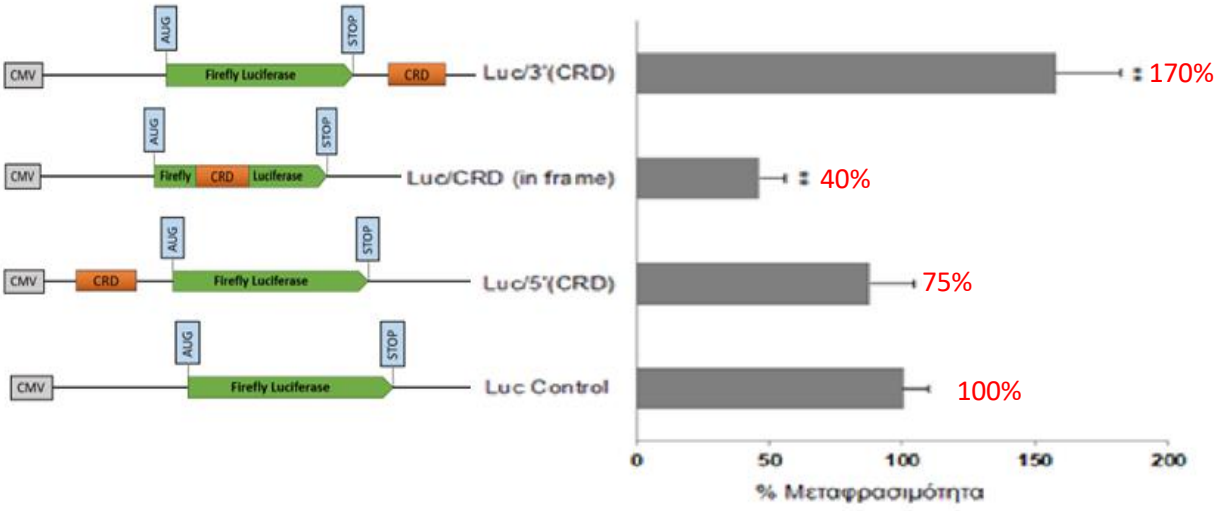
3.4 ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΣΤΗΝ «ΤΥΧΗ» ΤΩΝ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ ΤΟΥ C-MYC ΚΑΙ MDR1

Αλληλουχίες αναγνώρισης της IGF2BP1 έχουν εντοπισθεί στην 5΄, 3΄ μη κωδική όπως και στην κωδική περιοχή μηνυμάτων RNA. Τα προηγούμενα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η παρουσία της αλληλουχίας αστάθειας CRD της κωδικής περιοχής του *c-myc*, μείωσε την μετάφραση όταν βρισκόταν εντός πλαισίου ανάγνωσης. Το αμέσως επόμενο ερώτημα λοιπόν που διερευνήθηκε είναι αν η δράση των ρυθμιστικών στοιχείων *cis* εξαρτάται από την «θέση» τους στο μήνυμα. Η συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων εστιάστηκε στα στοιχεία αστάθειας των γονιδίων *c-myc* και *mdr1*. Με στόχο να μελετηθούν οι επιπτώσεις της θέσης των στοιχείων αυτών στην μεταφρασιμότητα και σταθερότητα του μηνύματος, δημιουργήθηκαν τα κατάλληλα οχήματα χιμαιρικών CRD-luciferase γονιδίων (Luc/CRD, Luc/5΄CRD, Luc/3΄CRD, Luc/MDR1, Luc/5΄MDR1, Luc'/3΄MDR1) όπως περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για παροδική διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς HEK-293T. Όλα τα πειράματα έγιναν εις τριπλούν και 6 φορές.

3.4.1 Η ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ

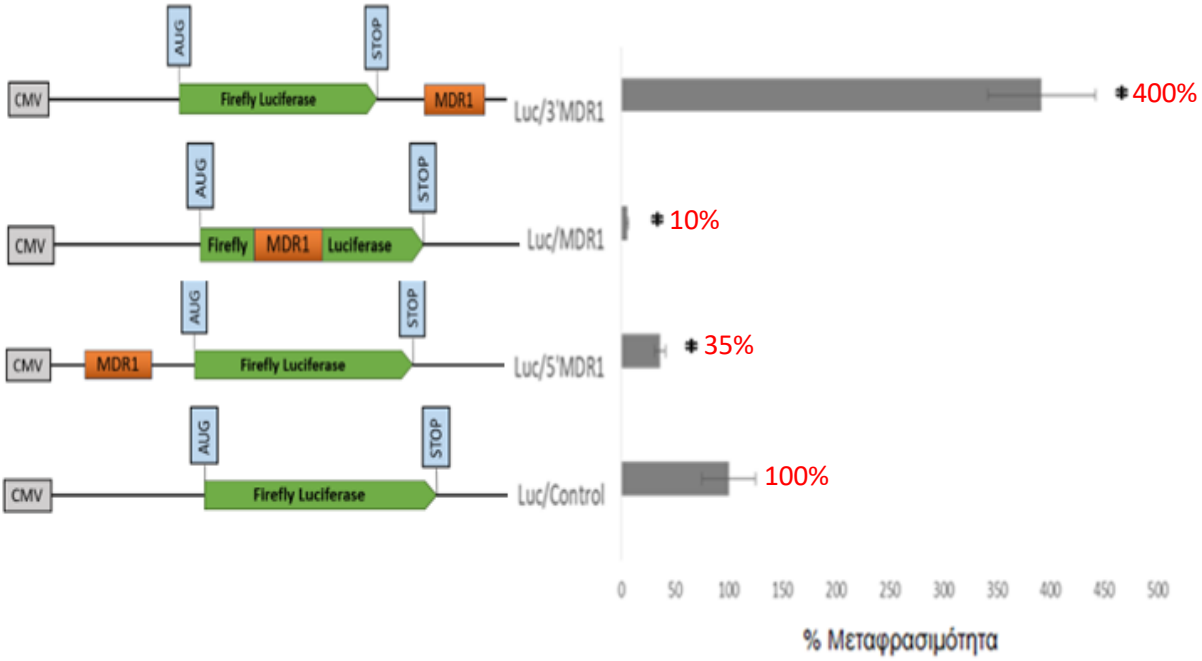
Για τα πειράματα διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δύο λουσιφερασών *Renilla* και *Firefly* οι οποίες εκφράζονται από τα πλασμίδια pRL-CMV και τα Luc/CRD, Luc/5΄CRD, Luc/3΄CRD, Luc/MDR1, Luc/5΄MDR1, Luc'/3΄MDR1 αντίστοιχα. Η διαμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 1 μg από το κάθε πλασμίδιο με τη ρυθμιστική περιοχή προς μελέτη και 1 μg του pRL-CMV ως εσωτερικού ελέγχου προκειμένου να εξασφαλίσουμε ότι ίδια ποσότητα πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά. Ο λόγος της ενεργότητας της λουσιφεράσης *Firefly* προς την λουσιφεράση *Renilla* υπολογίστηκε και διαιρέθηκε με το λόγο των αντίστοιχων μετρήσεων των

επιπέδων mRNA προκειμένου να υπολογιστεί η μεταφρασιμότητα των μηνυμάτων RNA των εκάστοτε πλασμιδίων.



Σχήμα 4. Επίδραση της αλληλουχίας αστάθειας myc-CRD στην μεταφρασιμότητα του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης *Firefly*. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των μέσων τιμών τριών επαναλήψεων έξι ανεξάρτητων πειραμάτων. Η στατιστική σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το student's t-test για ζευγαρωμένα δείγματα σε σύγκριση με το Luc-control (*$p<0.05$; **$p<0.01$).

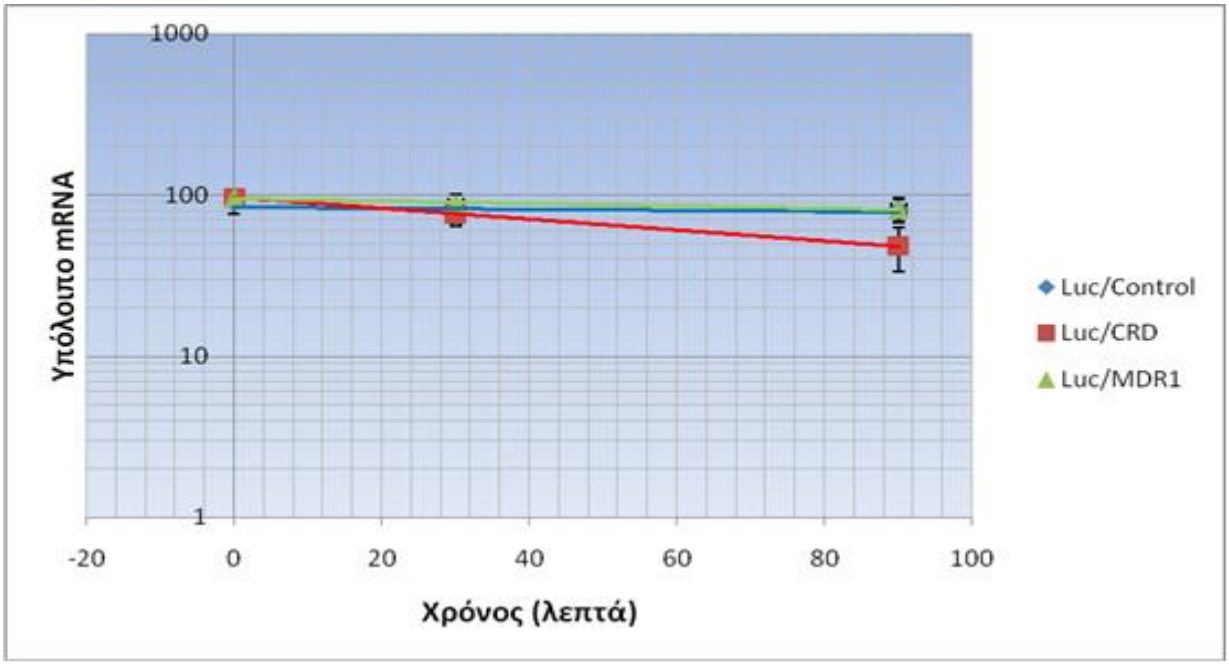
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου αναφοράς έδειξαν ότι η υποκλωνοποίηση της αλληλουχίας CRD του *c-myc* στην αμετάφραστη 5΄καθώς επίσης και στην κωδική περιοχή του χιμαιρικού γονιδίου μείωσαν τη μεταφρασιμότητα κατά 25% και 60% αντίστοιχα. Στην περίπτωση της αμετάφραστης περιοχής 3΄η αύξηση που παρατηρήθηκε ήταν της τάξης του 70% (σχήμα 4). Όσων αφορά τη μελέτη της περιοχής αστάθειας του γονιδίου MDR1, υποκλονωποίησή της εντός πλαισίου ανάγνωσης της κωδικής περιοχής του γονιδίου της λουσιφεράσης, είχε ως αποτέλεσμα την σχεδόν εκμηδένιση της μεταφρασιμότητας ενώ στην αμετάφραστη περιοχή 5΄ την μείωσε κατά περίπου 65%. Μεγάλη αύξηση της έκφρασης παρατηρήθηκε στην περίπτωση της υποκλωνοποίησης της στην αμετάφραστη περιοχή 3΄ η οποία ήταν της τάξης του περίπου 400% (σχήμα 5)



Σχήμα 5. Επίδραση της αλληλουχίας αστάθειας mdr1-CRD στην μεταφρασιμότητα του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης *Firefly*. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των μέσων τιμών τριών επαναλήψεων έξι ανεξάρτητων πειραμάτων. Η στατιστική σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το student's t-test για ζευγαρωμένα δείγματα σε σύγκριση με το Luc-control (*$p<0.05$; **$p<0.01$).

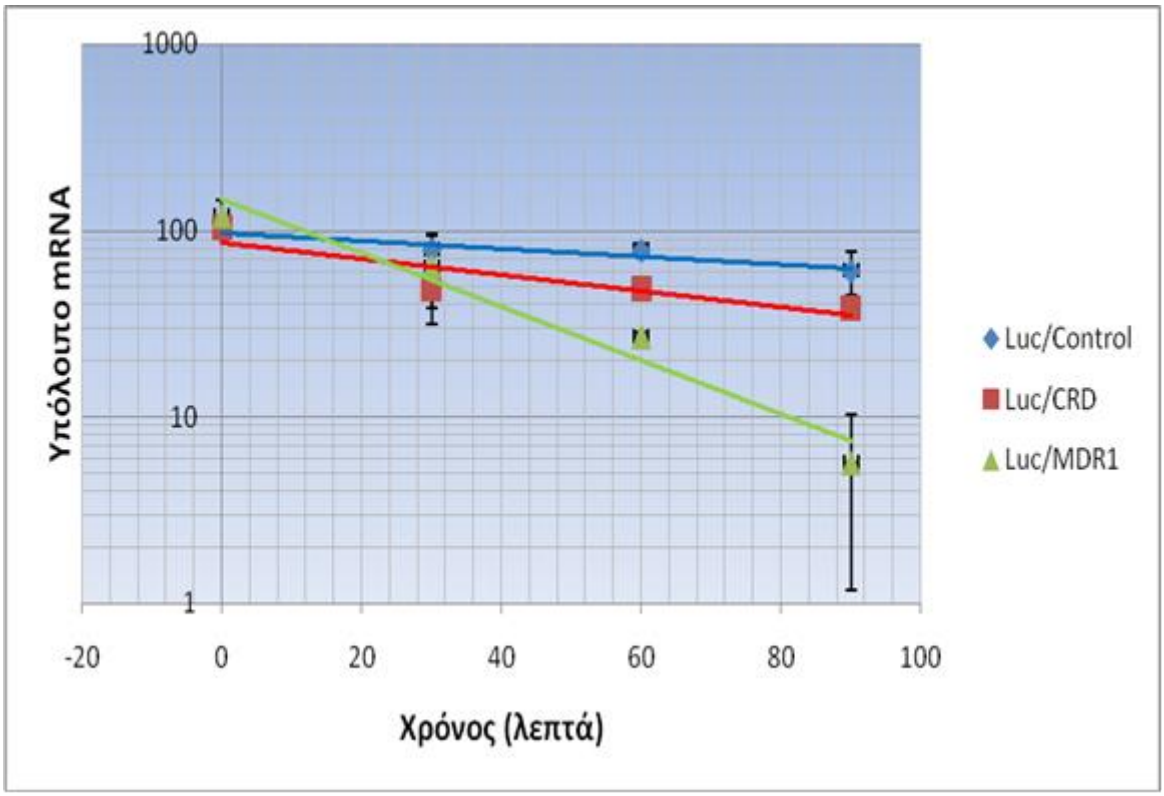
3.4.2 Η ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΣΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ

Με στόχο να επιβεβαιωθεί το γεγονός ότι οι περιοχές αυτές προσδίδουν αστάθεια στο μήνυμα RNA, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία αποικοδόμησης του (mRNA decay assay) στην κυτταρική σειρά HEK-293T υπό την παρουσία του μεταγραφικού καταστολέα ακτινομυκίνη D. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Luc/Control, Luc/CRD και Luc/MDR1 στα οποία τα στοιχεία αστάθειας είναι υποκλωνοποιημένα στην κωδική περιοχή του γονιδίου της λουσιφεράσης *Firefly*. 48 ώρες μετά την διαμόλυνσή τους, τα κύτταρα επωάστηκαν για 0', 30', 60', και 90' με 10 μg Ακτινομυκίνης D. Στη συνέχεια αφού απομονώθηκε ολικό RNA πραγματοποιήθηκε real-time PCR προκειμένου να γίνει ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA των χιμαιρικών γονιδίων. Για την ποσοτικοποίηση τους χρησιμοποιήθηκαν FAM σημασμένοι ιχνηθέτες ειδικοί για το γονίδιο της λουσιφεράσης *Firefly*, του GAPDH ως εσωτερικού ελέγχου και του *c-myc* ως ελέγχου δράσης της ακτινομυκίνης D.



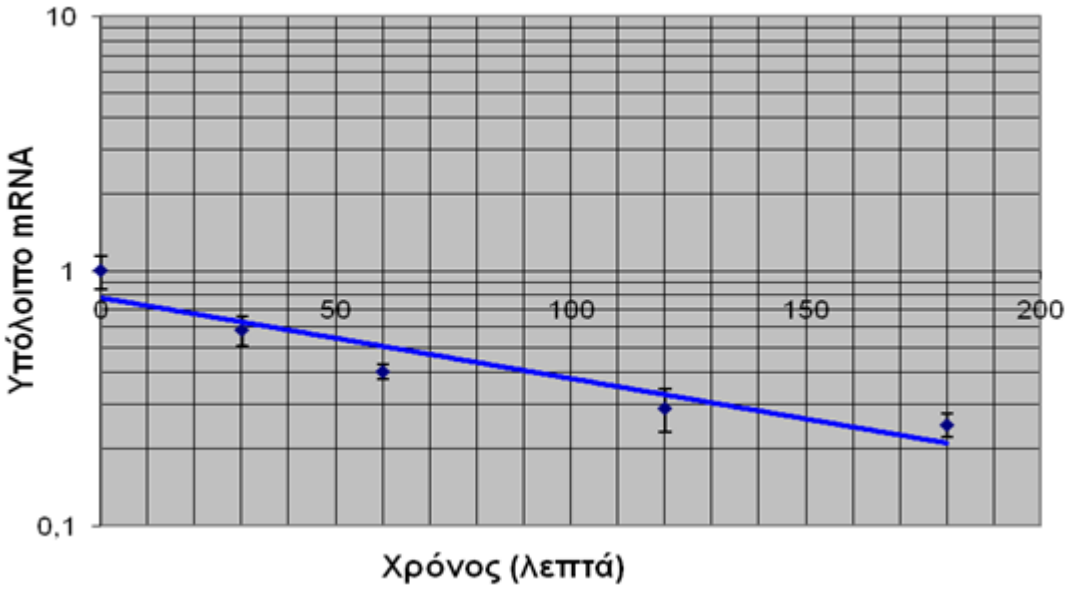
Σχήμα 6. Επίπτωση της θέσης των στοιχείων αστάθειας των γονιδίων *mdr1* και *c-myc* στη σταθερότητα του μηνύματος RNA του γονιδίου της λουσιφεράσης *Firefly* στην κυτταρική σειρά HEK-293T. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μετρήσεις από 4 διαφορετικά πειράματα μέτρησης mRNA.

Τα αποτελέσματα όπως φαίνονται και στο σχήμα 6 έδειξαν ότι μετά το πέρας το 90 λεπτών δράσης του μεταγραφικού καταστολέα, τα επίπεδα mRNA όσον αφορά το στοιχείο αστάθειας του *c-myc* είχαν μειωθεί κατά 50% σε σχέση με το πείραμα ελέγχου. Λιγότερο ασταθές παρουσιάστηκε το μήνυμα στην περίπτωση του *mdr1* καθώς τα επίπεδα του mRNA μειώθηκαν κατά περίπου 15%



Σχήμα 7. Επίπτωση της θέσης των στοιχείων αστάθειας των γονιδίων *mdr1* και *c-myc* στη σταθερότητα του μηνύματος RNA του γονιδίου της λουσιφεράσης *Firefly* στην κυτταρική σειρά HeLa. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μετρήσεις από 4 διαφορετικά πειράματα μέτρησης mRNA.

Με σκοπό να διερευνηθεί το αν ο βαθμός αποσταθεροποίησης που επιφέρουν οι αλληλουχίες *c-myc* και *mdr1* CRD λόγω διαφορικής έκφρασης παραγόντων *trans* στην κυτταρική σειρά, πραγματοποιήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία και στη σειρά HeLa. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν (σχήμα 7), έδειξαν ότι τόσο η παρουσία της αλληλουχίας MYC-CRD όσο και της αλληλουχίας MDR1-CRD δρουν αρκετά ποιο αποσταθεροποιητικά στη σειρά HeLa σε σχέση με τη σειρά 293T. Συγκεκριμένα στην περίπτωση του MYC-CRD η πτώση στα επίπεδα του mRNA άγγιξε το 60-70% ενώ στην περίπτωση του MDR1-CRD, παρατηρήθηκε πτώση περίπου 90%.



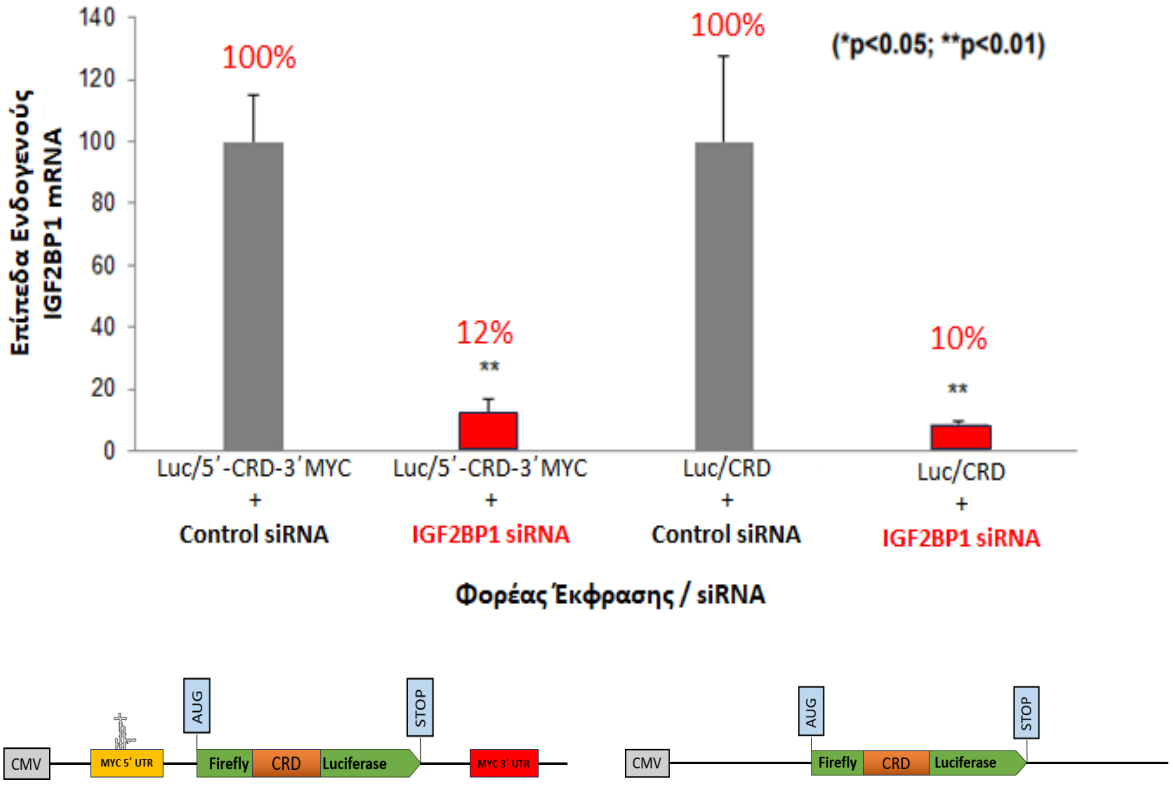
Σχήμα 8. Προσδιορισμός ημιζωής του *c-myc* mRNA. Μισή ώρα μετά την προσθήκη ακτινομυκίνης παρατηρήθηκε πτώση στα επίπεδα mRNA της τάξης του 40%. Μία ώρα αργότερα σημειώθηκε 60% πτώση ενώ στις 2 ώρες μόνο το 25% του αρχικού mRNA είχε απομείνει. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μετρήσεις από 4 διαφορετικά πειράματα μέτρησης mRNA.

Προκειμένου να εξασφαλιστεί το ότι η ακτινομυκίνη D έδρασε σωστά όσον αφορά την καταστολή της μεταγραφής, η ίδια πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε με τη διαφορά ότι ανιχνεύθηκαν τα επίπεδα του ενδογενούς mRNA του γονιδίου *c-myc*. Ο λόγος που επιλέχθηκε το συγκεκριμένο γονίδιο ως "μάρτυρας" είναι διότι έχει εξαιρετικά χαμηλό χρόνο ημιζωής και συγκεκριμένα τη μισή ώρα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι η πειραματική διαδικασία ήταν επιτυχής καθώς με την πάροδο μισής ώρας τα επίπεδα mRNA του *c-myc* είχαν μειωθεί κατά 50% σε σχέση με τα αρχικά (σχήμα 8).

3.4.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΗΣ IGF2BP1 ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥ C-MYC mRNA

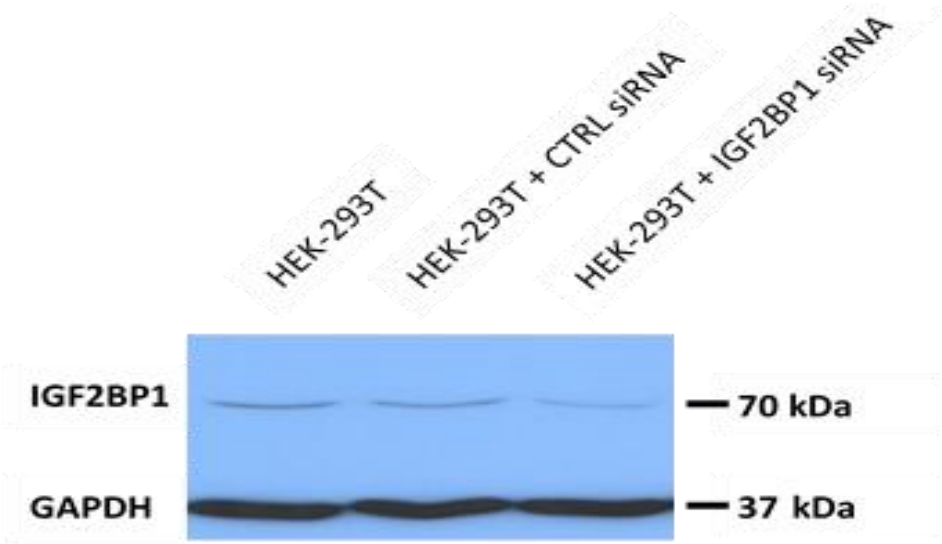
3.4.3.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ IGF2BP1 ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ ΟΓΚΟΓΟΝΟΔΙΟΥ C-MYC

Με σκοπό να διερευνηθεί η επίδραση που θα είχε η καταστολή της έκφρασης της IGF2BP1 στη δράση των ρυθμιστικών περιοχών του *c-myc* στη μετάφραση, η σειρά HEK-293T επιμολύνθηκε είτε με siRNAs που δεν στοχεύουν κάποιο γονίδιο (Control siRNA) είτε με siRNAs ειδικό για το γονίδιο που κωδικοποιεί την IGF2BP1. 24 ώρες αργότερα τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια Luc/5΄-CRD-3΄Myc και Luc/CRD.



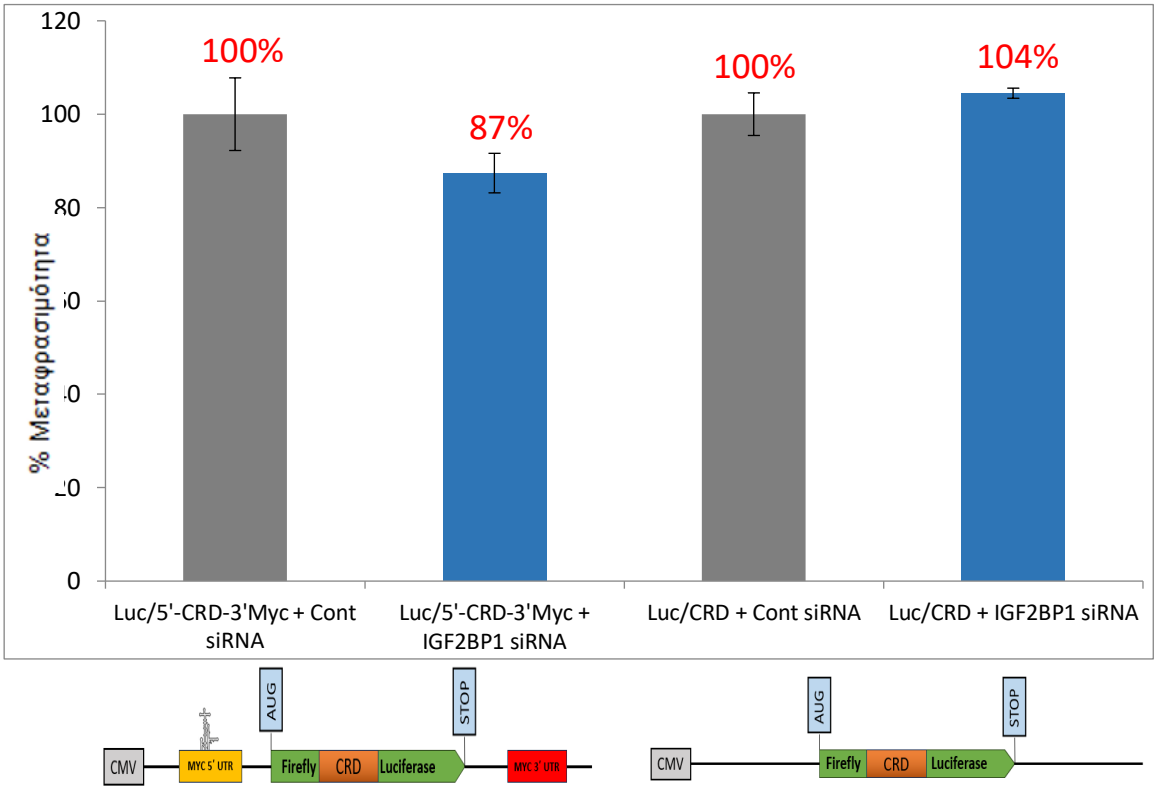
Σχήμα 9. Καταστολή της έκφρασης της ενδογενούς IGF2BP1 με siRNAs. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μετρήσεις από 3 ανεξάρτητα πειράματα (*p<0.05; **p<0.01)

Προκειμένου να ελεγχθεί αν η πτώση στα επίπεδα του mRNA της IGF2BP1 είναι σε αντιστοιχία με πτώση στα επίπεδα της ενδογενούς πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων HEK-293T με control siRNA καθώς και με το ειδικό για την IGF2BP1 siRNA. Απομονώθηκαν τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με ειδικό για την IGF2BP1 αντίσωμα. Από το αποτέλεσμα προέκυψε ότι ενώ υπάρχει αναστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης, παρόλα αυτά η παρουσία της είναι σε ανιχνεύσιμα επίπεδα. (εικόνα 22).



Εικόνα 22. Ανάλυση της έκφρασης της ενδογενούς IGF2BP1 24 ώρες μετά την διαμόλυνση κυττάρων HEK-293T με control καθώς και ειδικό για την IGF2BP1 siRNA.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνεται ότι παρά το γεγονός ότι η έκφραση της ενδογενούς IGF2BP1 μειώθηκε κατά περίπου 85% (σχήμα 9), αυτό δεν φαίνεται να επιδρά στη μεταφρασιμότητα των χιμαιρικών μηνυμάτων που φέρουν είτε όλες τις ρυθμιστικές περιοχές του *c-myc* είτε μόνο το στοιχείο αστάθειας CRD (σχήμα 10).



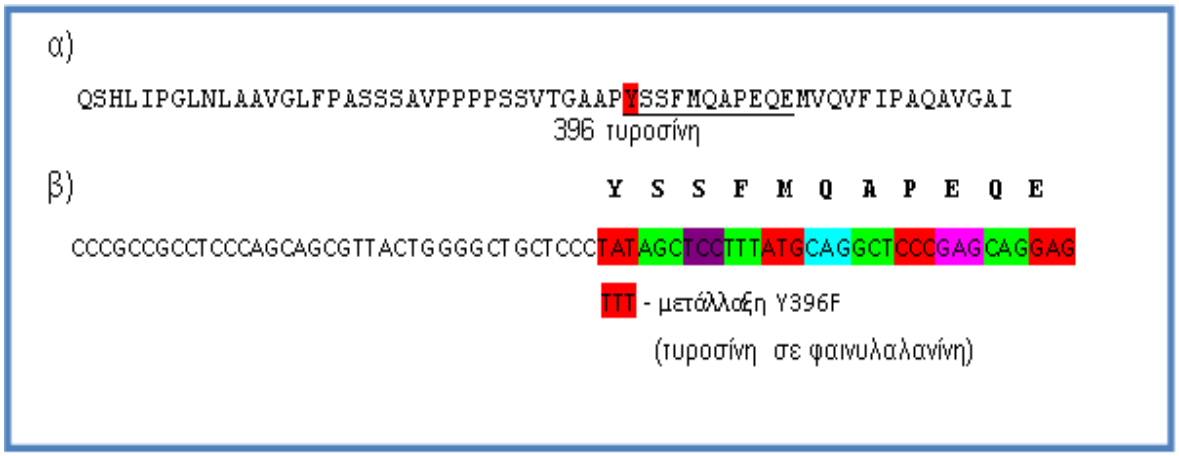
Σχήμα 10. Επίδραση της καταστολής της IGF2BP1 στη δράση των ρυθμιστικών περιοχών του *c-myc* στη μετάφραση. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μετρήσεις από 3 διαφορετικά πειράματα.

3.4.3.2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ IGF2BP1 ΚΑΙ ΕΠΙΠΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ

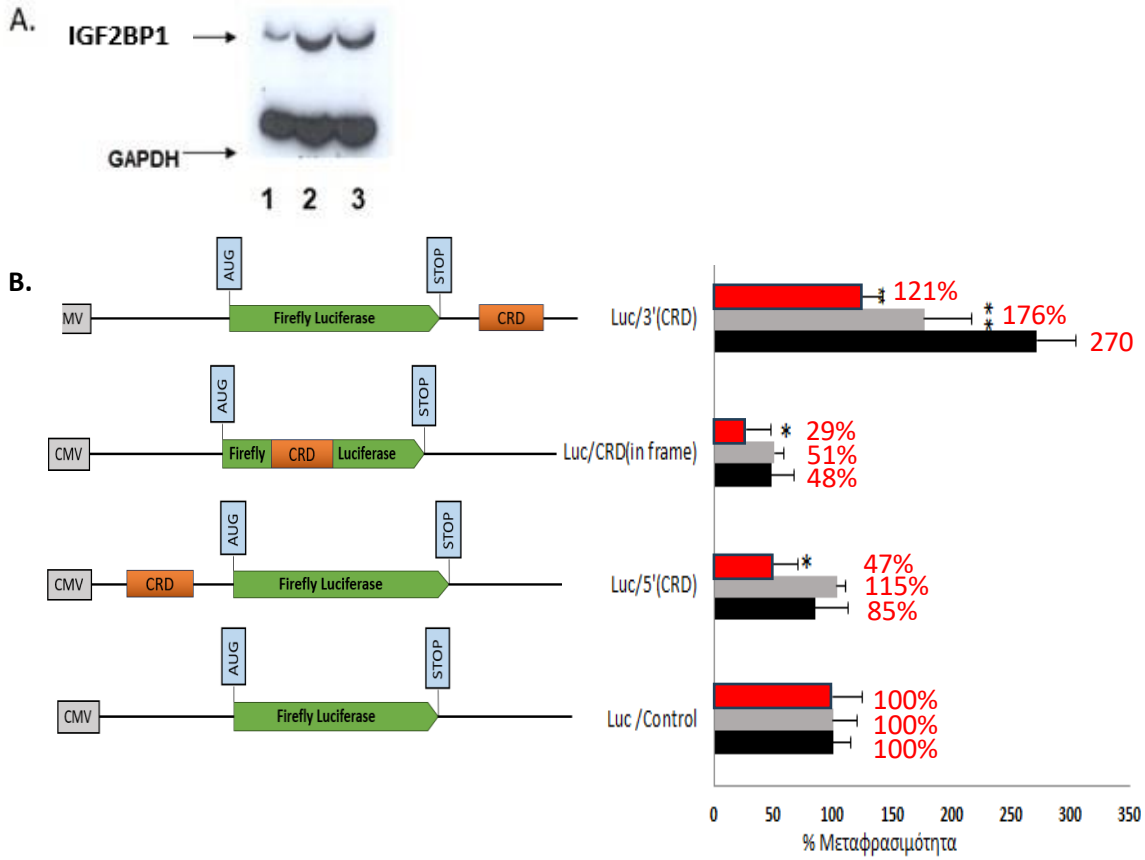
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η παρουσία της IGF2BP1 στις αλληλουχίες πρόσδεσης στην κωδική ή στην μη κωδική περιοχή 5΄ των mRNA αποτελεί μηχανικό εμπόδιο στις κινούμενες 80S και 40S ριβοσωμικές υπομονάδες αναστέλλοντας έτσι την μετάφραση. Η μεταφραστική ενεργοποίηση του mRNA της β-ακτίνης έχει δειχθεί ότι προϋποθέτει την μετα-μεταφραστική τροποποίηση της πρωτεΐνης ZBP1, μέσω φωσφορυλίωσης από την κινάση Src στην τυροσίνη 396. Η φωσφορυλίωση μειώνει την ικανότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο μήνυμα και η αποδέσμευσή της από αυτό επιτρέπει την μετάφραση. Με σκοπό να διερευνηθεί το

ενδεχόμενο το *c-myc* mRNA να υπόκειται επίσης σε μεταφραστικό έλεγχο μέσω της IGF2BP1 από την κινάση Src δημιουργήθηκε μία μεταλλαγμένη μορφή της ανθρώπινης IGF2BP1 στην ίδια θέση με της ZBP1 (εικόνα 23).

Η κυτταρική σειρά HEK-293T διαμολύνθηκε με τα πλασμίδια που φέρουν το στοιχείο αστάθειας CRD του *c-myc* (Luc/Control, Luc/CRD, Luc/5΄CRD και Luc/3΄CRD) συνδυαστικά με πλασμίδια που εκφράζουν τον άγριο (IGF2BP1wt) και μεταλλαγμένο (IGF2BP1mut) τύπο της ανθρώπινης IGF2BP1, καθώς και με πλασμίδιο που δεν εκφράζει την πρωτεΐνη (empty vector) ως εσωτερικό έλεγχο. 48 ώρες μετά την διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά western, δοκιμασία μέτρησης ενεργότητας της λουσιφεράσης *Firefly* καθώς επίσης και real time PCR για τον προσδιορισμό των αντίστοιχων επιπέδων mRNA προκειμένου να δειχθεί η υπερέκφραση του μεταλλαγμένου και άγριου τύπου της IGF2BP1



Εικόνα 23. α) Αμινοξική ακολουθία της IGF2BP1 και η θέση πρόσδεσης της κινάσης Src στο 396 κατάλοιπο τυροσίνης. β) Η αντικατάσταση του καταλοίπου αδενίνης σε θυμίνη στο 396 αμινοξύ μέσω σημειακής μετάλλαξης.



Σχήμα 11. Επίδραση της υπερέκφρασης της μεταλλαγμένης IGF2BP1 (Tyr396Phe) στη μεταφρασιμότητα.
(Α) Ανάλυση Western blot της έκφρασης της IGF2BP1 και GAPDH σε (1) κύτταρα διαμολυσμένα με κενό φορέα pCMV6, (2) κύτταρα διαμολυσμένα με τον φορέα pCMV6-XL6/IGF2BP1wt και (3) κύτταρα διαμολυσμένα με τον φορέα pCMV6-XL6/IGF2BP1mut (αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων).
(Β) Μεταφρασιμότητα του Luc/5′(CRD), Luc/CRD και LUC/3′(CRD) σε κύτταρα που συν-διαμολύνθηκαν με τον κενό φορέα pCMV6 (μαύρες ράβδοι), τον φορέα pCMV6-XL6/IMP1wt (σκούρες γκρι ράβδοι) και τον φορέα pCMV6-XL6/IMP1mut (κόκκινες ράβδοι). Η μεταφρασιμότητα του Luc-control ορίστηκε στο 100% και όλες οι μετρήσεις εκφράζονται σε σχέση με αυτό. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των μέσων τιμών τριών επαναλήψεων τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων. (*$p<0.05$; **$p<0.01$)

Όπως φαίνεται και από το σχήμα 11, υπό την παρουσία του μεταλλαγμένου τύπου της IGF2BP1, η μετάφραση φαίνεται να παρεμποδίζεται ανεξάρτητα από την θέση στην οποία βρίσκεται η περιοχή CRD. Καμία σημαντική επίδραση δεν παρατηρήθηκε στην μεταφρασιμότητα των μηνυμάτων που φέρουν το στοιχείο αστάθειας στην κωδική και την 5’ περιοχή από την παρουσία του άγριου τύπου της πρωτεΐνης. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η φωσφορυλίωση της IGF2BP1 στην θέση 396 επιτρέπει την μετάφραση των μηνυμάτων που φέρουν την αλληλουχία CRD πριν και εντός πλαισίου ανάγνωσης με την κωδική περιοχή. Το γενικό συμπέρασμα είναι ότι όσο η IGF2BP1 υφίσταται μετα-μεταφραστική τροποποίηση μέσω φωσφορυλίωσης στην θέση 396, η επίδραση της παρουσίας της CRD περιοχής στην μετάφραση του *c-myc* mRNA οφείλεται στην παρουσία σπανίων κωδικονίων, όπως έχει δειχθεί και προηγουμένως [Lemm and Ross, 2002].

3.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ 3΄ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥ c-myc mRNA

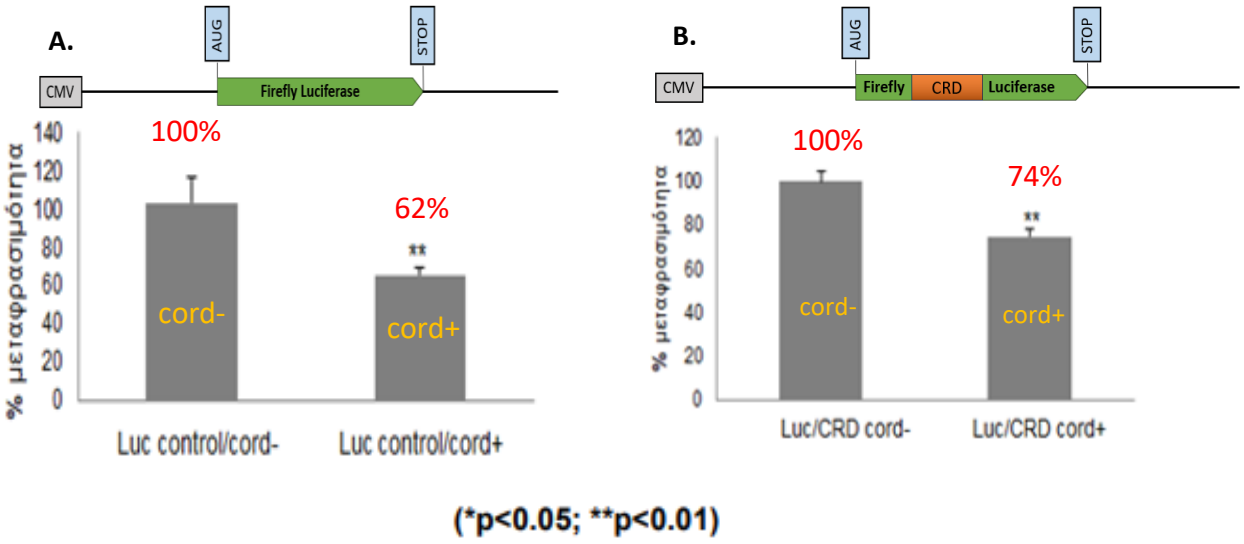
3.5.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΟΥΡΑΣ ΠΟΛΥ(Α): ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΛΟΓΟΥ ΑΔΕΝΟΣΙΝΗΣ, ΚΟΡΔΥΣΕΠΙΝΗ, ΣΤΗΝ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ 3΄ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕΣΩ ΚΑΛΥΜΜΑΤΟΣ 5΄ΚΑΙ IRES

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, σχεδόν όλα τα ευκαρυωτικά mRNA πολυαδενυλιώνονται ως μέρος της ωρίμανσής τους πριν τη μετάφραση. Η ουρά πολύ(Α) λειτουργεί ως θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης PABP η οποία στη συνεχεία δημιουργεί ένα σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες eIF4G και eIF4E. Μέσω αυτού του συμπλόκου επιτυγχάνεται η πρόσδεση της μικρής ριβοσωματικής υπομονάδας στο κάλυμμα 5΄ του μηνύματος RNA. Επιπλέον έχει δειχτεί ότι η ουρά πολύ(Α) ενισχύει τη μετάφραση μέσω εσωτερικής θέσης πρόσδεσης ριβοσωμάτων (IRES) [Thoma *et al*., 2008]. Προηγούμενες μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι η γρήγορη αποαδενυλίωση του mRNA του *c-myc* οδηγεί στο σχηματισμό ποιο σταθερών ολιγοαδενυλιομένων μηνυμάτων και ότι τα μηνύματα αυτά τα οποία έχουν συντεθεί υπό την παρουσία του παράγοντα κορδυσεπίνη εξακολουθούν να μεταφράζονται επαρκώς [Ioannidis *et al*., 1996].

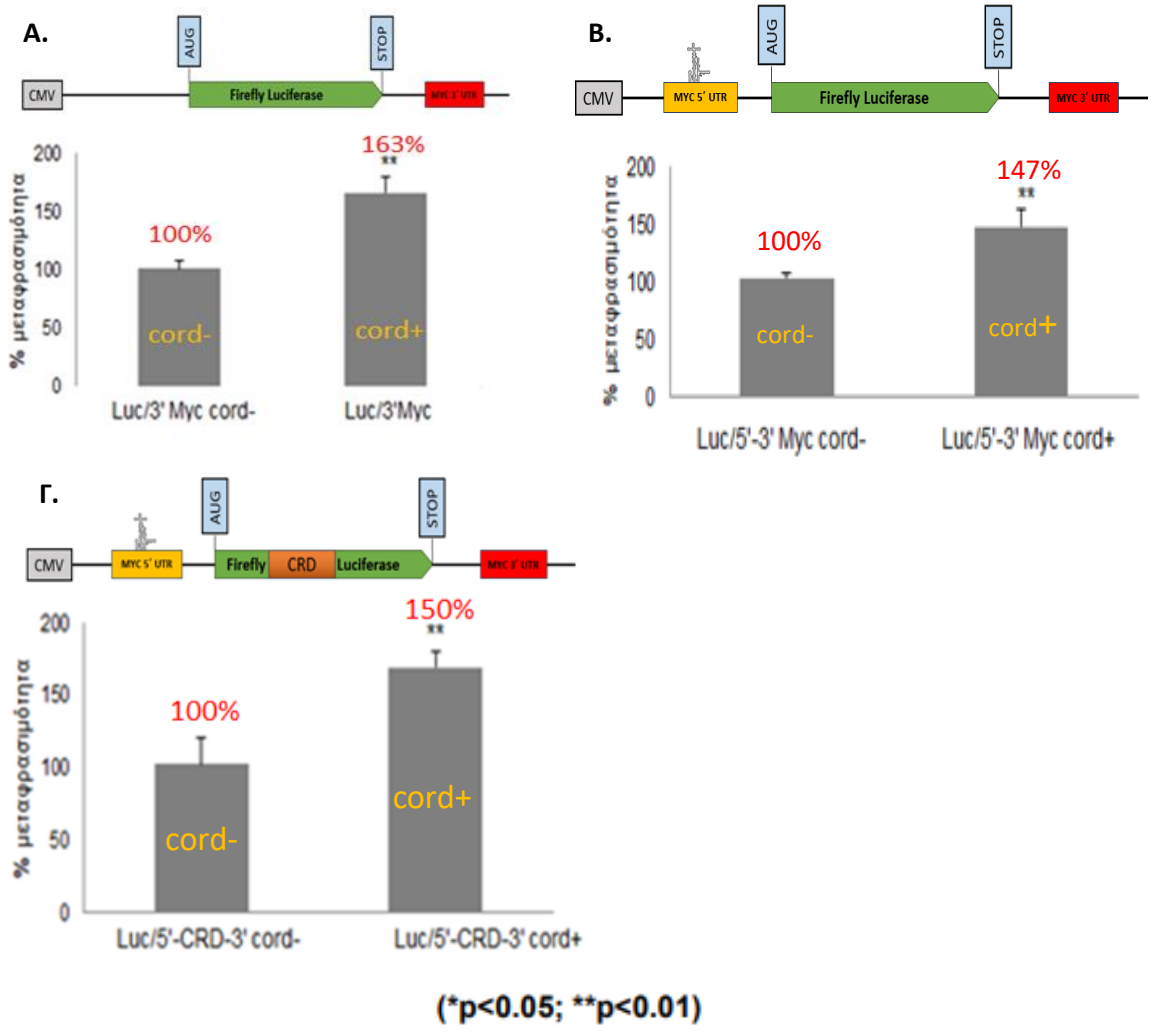
Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του στοιχείου CRD καθώς και της 3΄UTR στην μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄ υπό την παρουσία κορδυσεπίνης, η κυτταρική σειρά HEK-293T διαμολύνθηκε με πλασμίδια που φέρουν το CRD και / ή την 3΄UTR περιοχή του *c-myc*. Αμέσως μετά τα πειράματα διαμόλυνσης προστέθηκε στα κύτταρα κορδυσεπίνη, παράγοντας που καταστέλλει την πολυαδενυλίωση του mRNA, σε συγκέντρωση 50 μg/ml. Έξι ώρες αργότερα το βιολογικό υλικό απομονώθηκε και αναλύθηκε με δοκιμασία μέτρησης της ενεργότητας των δύο λουσιφερασών καθώς και real time PCR για τα δύο αυτά γονίδια.

Με βάση τα αποτελέσματα, η κορδυσεπίνη μείωσε την εξαρτώμενη από το κάλυμμα 5΄ μετάφραση του μηνύματος Luc/Control, καθώς και του μηνύματος που φέρει εντός πλαισίου ανάγνωσης της κωδικής περιοχής του γονιδίου της

λουσιφεράσης *Firefly* το στοιχείο αστάθειας CRD (σχήμα 12Α και 12Β). Αντίθετα, η παρουσία της αμετάφραστης περιοχής 3΄του *c-myc* ενίσχυσε την εξαρτώμενη από το κάλυμμα 5΄ μετάφραση του γονιδίου αναφοράς σε κύτταρα οπού έχει προστεθεί κορδυσεπίνη (σχήμα 13Α). Η ενισχυτική δράση της αμετάφραστης περιοχής 3΄ στην μεταφρασιμότητα παρατηρήθηκε και στην περίπτωση πλασμιδίων που έφεραν την αμετάφραστη περιοχή 5΄ του *c-myc* (σχήμα 13Β και 13Γ).

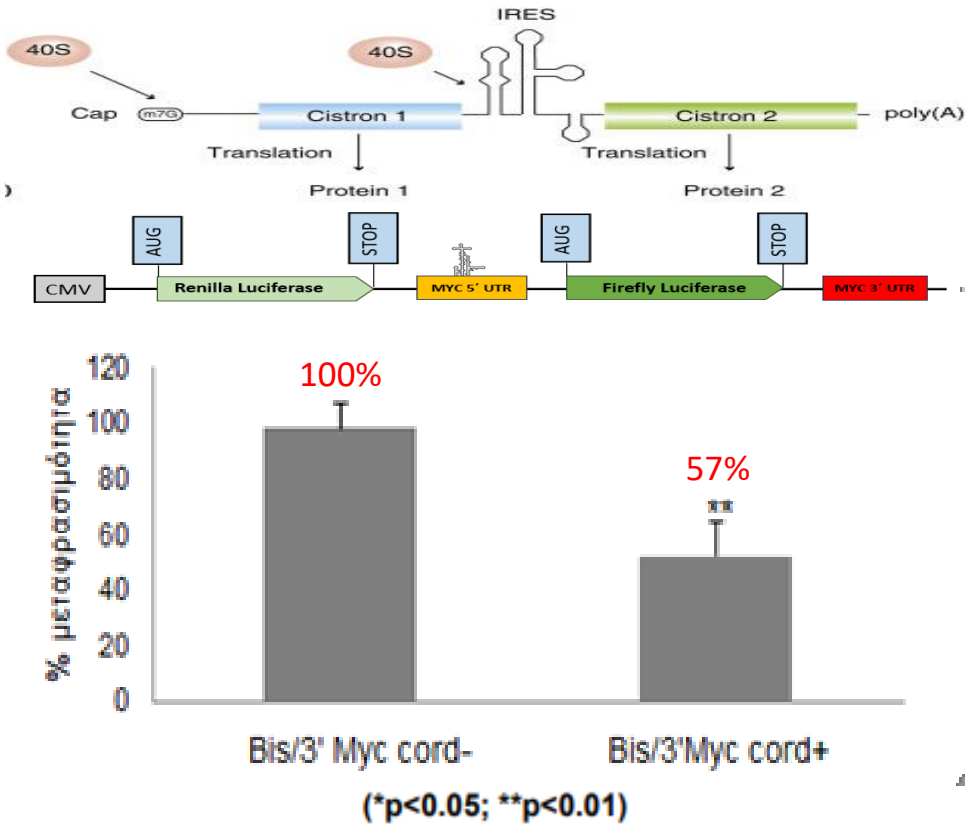


Σχήμα 12. Επίδραση του ανάλογου αδενοσίνης, κορδυσεπίνη, στην δράση της αμετάφραστης περιοχής 3΄στην μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄ στον φορέα έκφρασης Α. Luc/Control και Β. Luc/CRD.



Σχήμα 13. Επίδραση του ανάλογου αδενοσίνης, κορδυσεπίνη, στην δράση της αμετάφραστης περιοχής 3΄στην μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄ στον φορέα έκφρασης Α. Luc/3'Myc, Β. Luc/5'Myc-3'Myc και Γ. Luc/5'Myc-CRD-3'Myc

Προκειμένου να μελετηθεί το αν η αμετάφραστη περιοχή 3΄διατηρεί την ενισχυτική της δράση στην περίπτωση μετάφρασης μέσω IRES παρουσία κορδυσεπίνης, η κυτταρική σειρά HEK-293T διαμολύνθηκε με τον δισιτρονικό φορέα έκφρασης Bis/3΄Myc. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεταφρασιμότητα μέσω IRES παρουσία κορδυσεπίνης μειώθηκε κατά το ήμισυ στην περίπτωση του φορέα έκφρασης που έφερε την 3΄ αμετάφραστη περιοχή του *c-myc* (σχήμα 14). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι υπό αυτές τις πειραματικές συνθήκες, η 3΄UTR του *c-myc* αντισταθμίζει την παρουσία μιας βραχείας ουράς πολυ(Α) κατά την μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄, ενώ αυτό δεν συμβαίνει κατά την μετάφραση μέσω IRES.



Σχήμα 14. Επίδραση του ανάλογου αδενοσίνης, κορδυσεπίνη, στην δράση της αμετάφραστης περιοχής 3΄στην μετάφραση μέσω IRES στον φορέα έκφρασης Bis/3'Myc

3.5.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ 3΄ΤΟΥ C-MYC ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕΣΩ ΚΑΛΥΜΜΑΤΟΣ 5΄ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ.

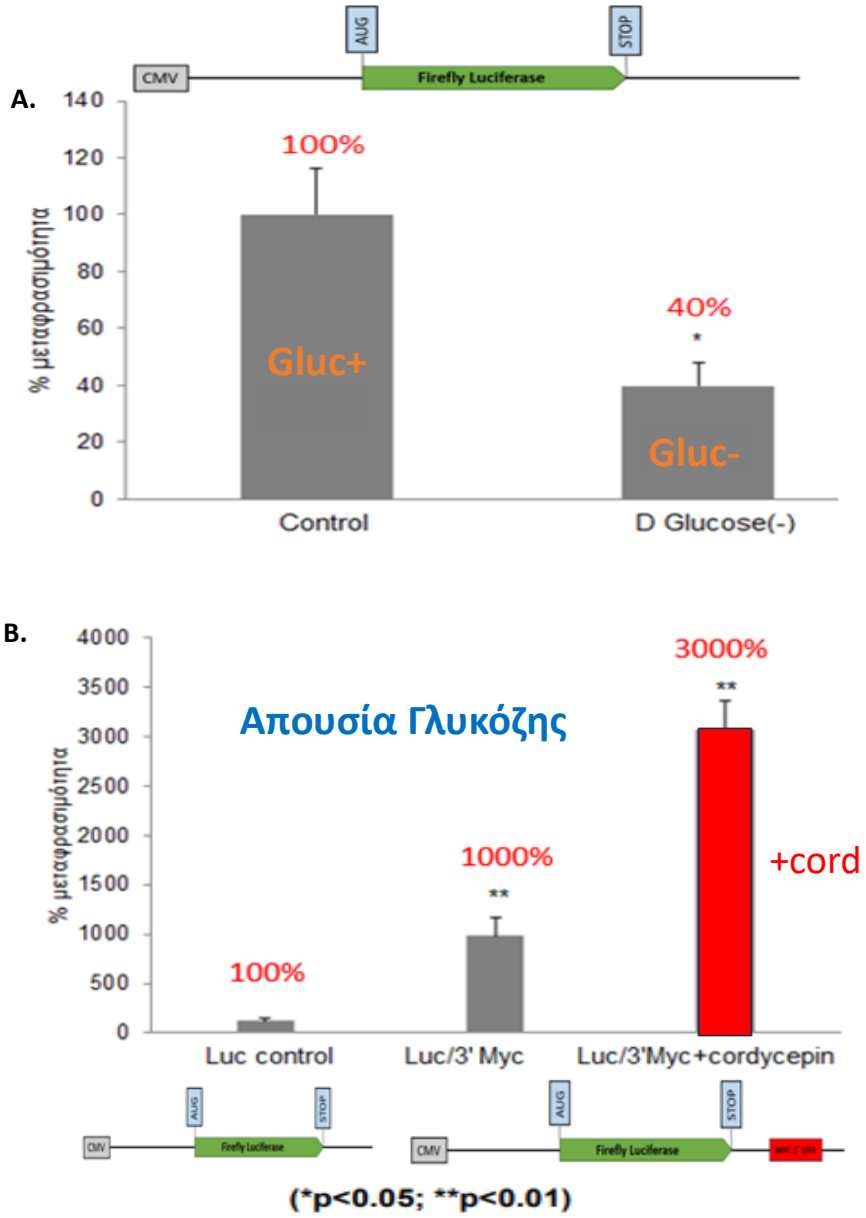
Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η κορδυσεπίνη δρα ανασταλτικά στην μετάφραση επιδρώντας στην φωσφορυλίωση του παράγοντα eIF2a και του μεταφραστικού αναστολέα 4E-BP, μιμούμενη κατ' αυτόν τον τρόπο φυσιολογικές συνθήκες στρες [Wong *et al*., 2010, Kadomatsu *et al*., 2012]. Έτσι, παρά το γεγονός ότι η μακριά ουρά πολύ(Α) δεν είναι απαραίτητη προκειμένου να μεταφραστεί το *c-myc* mRNA παρουσία κορδυσεπίνης, είναι πιθανόν η επαγωγική δράση που παρατηρήθηκε από την 3΄ αμετάφραστη περιοχή του στην μεταφρασιμότητα, να αντανακλά τον ρόλο της τελευταίας στην διατήρηση των επιπέδων του *c-myc* κάτω από συνθήκες στρες. Προκειμένου να απαντηθεί το συγκεκριμένο ερώτημα, η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση με τους φορείς έκφρασης, υποβλήθηκε σε συνθήκες στρες μέσω στέρησης γλυκόζης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κάτω από συνθήκες στρες, όπως η έλλειψη γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων, η μεταφρασιμότητα του γονιδίου αναφοράς στο πλασμίδιο ελέγχου μειώνεται κατά 60% (σχήμα 15Α). Παρουσία της αμετάφραστης περιοχής 3΄του *c-myc* (Luc/3΄Myc) η μετάφραση του μηνύματος RNA αυξάνεται κατά 1 τάξη μεγέθους σε σχέση με το πείραμα ελέγχου (Luc/control). Τέλος, προσθήκη κορδυσεπίνης σε κύτταρα υπό συνθήκες μεταβολικού στρες αύξησε την μετάφραση του ίδιου μηνύματος RNA (Luc/3΄Myc) κατά 3 τάξεις μεγέθους σε σχέση με το πείραμα ελέγχου (σχήμα 15Β).

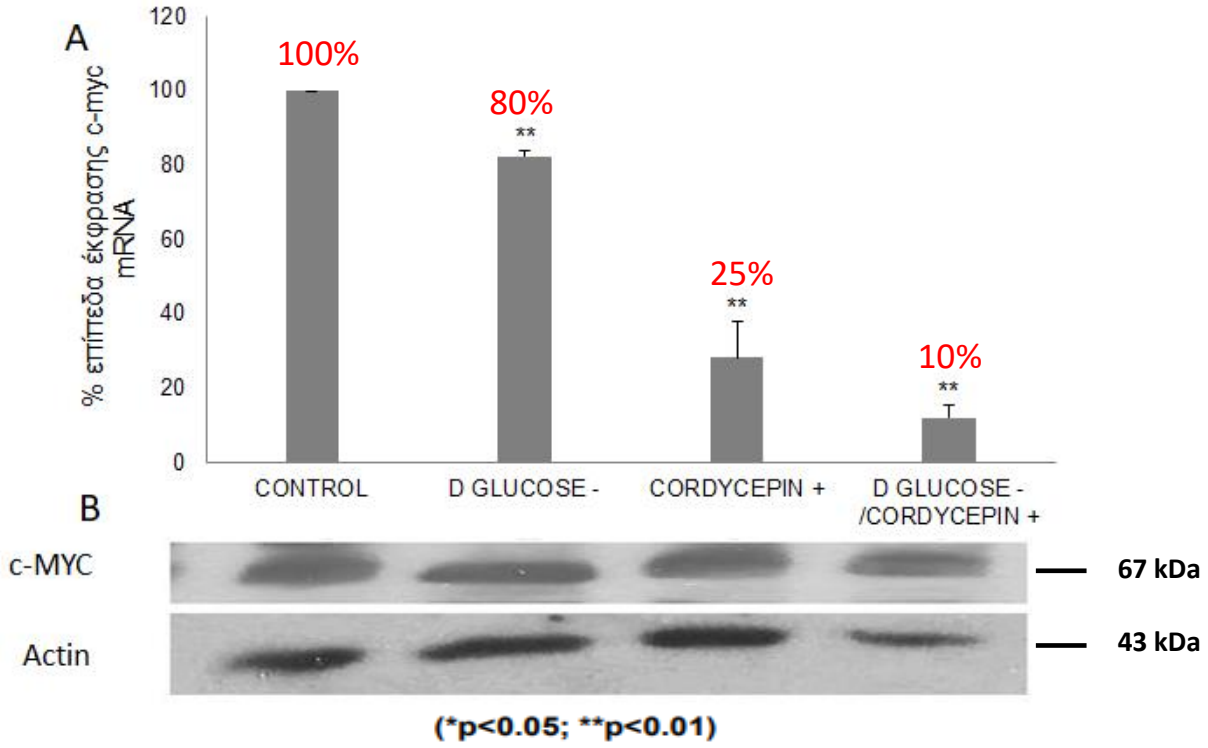
Ποσοτικοποίηση του μηνύματος του ενδογενούς *c-myc* υπό αυτές τις πειραματικές συνθήκες έδειξε ότι η στέρηση γλυκόζης οδήγησε σε μία ήπια πτώση των επιπέδων του mRNA. Η παρουσία μόνο κορδυσεπίνης καθώς επίσης και η παρουσία κορδυσεπίνης σε συνδυασμό με συνθήκες μεταβολικού στρες οδήγησαν σε δραματική πτώση των επιπέδων mRNA του *c-myc* (σχήμα 16Α). Παρόλα αυτά, καμία από αυτές τις συνθήκες δεν φάνηκαν να επηρεάζουν τα επίπεδα πρωτεινοσύνθεσης όπως έχει δειχθεί και σε προηγούμενες μελέτες (σχήμα 16Β) [Ioannidis et al., 1999].

Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι ''διάσωση'' της έκφρασης του *c-myc* κάτω από συνθήκες στρες μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη μεταφρασιμότητα του

μηνύματος RNA που επιφέρει η παρουσία της 3΄ UTR όσον αφορά την μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄.



Σχήμα 15. Επίδραση του *c-myc* 3'UTR στη μετάφραση κατά τη διάρκεια μεταβολικού στρες. (Α) Μεταφρασιμότητα του γονιδίου αναφοράς στον πλασμιδιακό φορέα ελέγχου Luc/control παρουσία και απουσία γλυκόζης. (Β) Μεταφρασιμότητα σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (Luc/control) του φορέα Luc/3'Myc σε κύτταρα χωρίς γλυκόζη, παρουσία (Luc/3΄Myc+cordycepin) ή απουσία (Luc/3΄Myc) κορδυσεπίνης.



Σχήμα 16. Επίδραση της στέρησης γλυκόζης και / ή της προσθήκης κορδυσεπίνης στα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του *c-myc*. Ολικό RNA και πρωτεΐνες απομονώθηκαν από κύτταρα HEK-293, από κύτταρα στερημένα γλυκόζης, από κύτταρα παρουσία μόνο κορδυσεπίνης και από κύτταρα στερημένα γλυκόζης και παρουσία κορδυσεπίνης.
(Α) Επίπεδα ενδογενούς μηνύματος RNA του *c-myc* κανονικοποιημένα στην έκφραση του γονιδίου GAPDH. Τα σχετικά επίπεδα mRNA των μη επεξεργασμένων κυττάρων ορίστηκαν στο 100% ως δείγμα ελέγχου και όλες οι μετρήσεις εκφράζονται σε σχέση με τον έλεγχο. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις τριών επαναλήψεων 5 ανεξάρτητων πειραμάτων. (Β) Ανάλυση κατά western της έκφρασης του *c-myc* και της β-ακτίνης ως εσωτερικό έλεγχο

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

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 κυττάρου. Πλην των εκατοντάδων μικρο-RNAs των οποίων ο ρόλος στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης έχει σε μεγάλο βαθμό αποσαφηνιστεί, μια σειρά οικογένειες πρωτεϊνών που προσδένουν RNAs και καθορίζουν την τύχη τους φαίνεται να παίζουν σημαντικό σε διαδικασίες όπως η μορφογένεση, πολλαπλασιασμός, η απόπτωση κ.α.

Η IGF2BP1 μέλος της μικρής οικογένειας πρωτεϊνών (IMPs) αποτελεί την πιο καλά μελετημένη πρωτεΐνη της οικογένειας, η οποία εμφανίζει ειδική πρόσδεση σε μεγάλο αριθμό μηνυμάτων RNA και έχει δειχθεί ότι μπορεί να ελέγχει την ενδοκυττάρια χωροθέτησή τους, μεταφέροντας τα κατά μήκος των ενδιάμεσων ινιδίων ή των μικροσωληνίσκων, την μετάφραση τους ή την ημιζωή τους.

΄Ενας από τους πιο καλά μελετημένους στόχους της IGF2BP1 αποτελεί το ογκογονίδιο *c-myc*. Το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου αυτού είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος σε φυσιολογικές συνθήκες εκφράζεται κατά την εμβρυογένεση ενώ στον ενήλικα μόνο σε συγκεκριμένους ιστούς όπως η επιδερμίδα και ο γαστρεντερικός σωλήνας. Ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας εμπλέκεται σε βασικές λειτουργίες του κυττάρου όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος.

Η απορρύθμιση της έκφρασης του *c-myc* είναι ένα χαρακτηριστικό που συναντάται σχεδόν σε όλες τις μορφές καρκίνου και συνδέεται με κακή πρόγνωση της νόσου, κάτι που καθιστά την λεπτομερή μελέτη των μηχανισμών ρύθμισής του επιτακτική. Η ύπαρξη αυστηρών μηχανισμών ρύθμισης σε μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο αποτελεί βασικό παράγοντα μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η ομαλή λειτουργία του *c-myc* προκειμένου βασικές λειτουργίες του κυττάρου όπως ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η διαφοροποίηση να διεκπεραιώνονται φυσιολογικά.

Η παρούσα διατριβή εστιάστηκε στην μελέτη των μηχανισμών ρύθμισης του *c-myc* στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Ρυθμιστικές περιοχές του γονίδιου έχουν εντοπιστεί στις αμετάφραστες περιοχές 5΄ και 3΄ καθώς επίσης και στην κωδική περιοχή. Η αμετάφραστη περιοχή 5΄ του *c-myc* έχει βρεθεί ότι περιέχει μία εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος (IRES) η οποία επιτρέπει έναρξη της μετάφρασης σε

συνθήκες καταπόνησης του κυττάρου και κατά τις οποίες η μεταφραστική έναρξη μέσω καλύμματος 5΄ δεν είναι εφικτή. Στην κωδική περιοχή έχει εντοπιστεί το στοιχείο αστάθειας CRD το οποίο αποτελεί υπόστρωμα δράσης ριβονουκλεασών και θέση πρόσδεσης της RNA-δεσμευτικής πρωτεΐνης IGF2BP1, ένας μηχανισμός που φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση του γονιδίου *mdr1*, το οποίο ενέχεται στην χημειοαντοχή του κυττάρου. Τέλος, η αμετάφραστη περιοχή 3΄περιέχει πληθώρα ρυθμιστικών περιοχών *cis* όπως στοιχεία AU-rich (AREs) στα οποία προσδένονται αποσταθεροποιητικοί παράγοντες όπως ο hnRNP D, RNA δεσμευτικές πρωτεΐνες όπως η TIAR και AUF1 καθώς και θέσεις πρόσδεσης πληθώρας miRNA.

4.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ C-MYC mRNA ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕΣΩ ΚΑΛΥΜΜΑΤΟΣ 5΄

Ο μετα-μεταγραφικός έλεγχος στον οποίο υπόκειται το *c-myc* παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφρασή του τόσο σε επίπεδο σταθερότητας του μηνύματος RNA όσο και στη μετάφρασή του. Τα ρυθμιστικά στοιχεία *cis* και *trans* που ελέγχουν την μετάφραση του *c-myc* mRNA του έχουν μελετηθεί εκτενώς. Η αμετάφραστη περιοχή 5΄ περιέχει μία εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος (IRES) που επιτρέπει την μετάφραση σε συνθήκες καταπόνησης του κυττάρου όπως μια ιική μόλυνση [Cobbold *et al*., 2008]. Η αμετάφραστη περιοχή 3΄του *c-myc* παίζει ρόλο στο μεταφραστικό του έλεγχο μέσω πρόσδεσης miRNAs καθώς επίσης και πρωτεϊνών όπως η HuR, η AUF1 και TIAR [Kim HH *et al*., 2009; Liao B, *et al*., 2007]. Τέλος η κωδική περιοχή περιέχει το στοιχείο αστάθειας CRD στο οποίο λόγω της ύπαρξης σπανίων κωδικονίων έχει προταθεί ότι καθυστερούν τα κυλιόμενα ριβοσώματα με

αποτέλεσμα η περιοχή αυτή να μένει εκτεθειμένη σε ριβονουκλεάσες εκτός και αν προστατεύεται από την πρόσδεση της IGF2BP1 πρωτεΐνης [Lemm and Ross, 2002]

Η συνεισφορά των προαναφερθέντων ρυθμιστικών περιοχών *cis* έχει διερευνηθεί κυρίως μελετώντας τη δράση καθενός από αυτά σε μεμονωμένο επίπεδο. Σε μία προσπάθεια να μελετηθούν πιθανές αλληλεπιδράσεις αυτών των ρυθμιστικών περιοχών μεταξύ τους και τον τρόπο με τον οποίο συνεισφέρουν στον μεταφραστικό έλεγχο του γονιδίου *c-myc*, δημιουργήθηκε μία σειρά μονοσιτρονικών και δισιστρονικών φορέων έκφρασης των γονιδίων αναφοράς των λουσιφερασών *Firefly* και *Renilla*. Οι φορείς αυτοί φέρουν τις ρυθμιστικές περιοχές που εδράζονται στις αμετάφραστες περιοχές 5΄ και 3΄ καθώς και στην κωδική περιοχή του *c-myc* μεμονωμένα και σε συνδυασμό μεταξύ τους.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν χρησιμοποιώντας τους μονοσιστρονικούς φορείς έκφρασης το γενικό συμπέρασμα είναι ότι δεν υπάρχει συνεργιστική δράση μεταξύ των διαφόρων ρυθμιστικών στοιχείων του *c-myc* καθώς τα αποτελέσματα αποτελούν το αλγεβρικό άθροισμα των μετρήσεων της δράσης των μεμονωμένων ρυθμιστικών περιοχών. Σε μεμονωμένο επίπεδο, η παρουσία της CRD περιοχής είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση της μεταφρασιμότητας του μηνύματος RNA κατά περίπου 50% σε σχέση με το πείραμα ελέγχου. Η μείωση της μεταφρασιμότητας σε αυτή την περίπτωση έχει αποδοθεί στην παρουσία σπανίων κωδικονίων αργινίνης και θρεονίνης που παρεμποδίζουν την κύλιση των 60S και 40S ριβοσωματικών υπομονάδων στο mRNA [[Lemm and Ross, 2002]. Επιπρόσθετα, η περίπτωση πρόσδεσης της IGF2BP1 στο mRNA του *c-myc* και αποθήκευση του τελευταίου στο αμετάφραστο ριβονουκλεοπρωτεϊνικό κλάσμα με αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης αποτελεί μηχανισμό που έχει μελετηθεί στο παρελθόν [Vikessa *et al*., 2006].

Η αύξηση της μεταφρασιμότητας κατά 50% υπό την παρουσία της 5΄ UTR περιοχής ήταν επίσης αναμενόμενη. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το mRNA του *c-myc* περιλαμβάνει μία εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος (IRES) στην αμετάφραστη περιοχή 5΄ η οποία επιτρέπει την έναρξη της μετάφρασης ανεξάρτητα από τον μηχανισμό του καλύμματος 5΄. Δείχτηκε επίσης ότι υποκλωνοποίηση της περιοχής αυτής στην 5΄UTR γονιδίων αναφοράς μπορεί να αυξήσει την μεταφρασιμότητα αρκετές τάξεις μεγέθους [Stoneley M *et al*, 1998]. Ενδιαφέρον επίσης είναι το γεγονός ότι η δράση του μηχανισμού IRES έχει βρεθεί

να διαφοροποιείται ανάλογα με το περιεχόμενο του κυττάρου σε μεταφραστικούς παράγοντες [Stoneley et al., 2000].

Η παρουσία της αμετάφραστης περιοχής 3΄ του *c-myc* ενίσχυσε την μετάφρασης του μηνύματος μέσω καλύμματος 5΄. Έχει δειχθεί ότι αυτό επιτυγχάνεται μέσω ανταγωνιστικής πρόσδεσης των πρωτεϊνών AUF1 και TIAR στο AU-rich στοιχείο (ARE) που εδράζεται στην αμετάφραστη περιοχή 3΄του μηνύματος RNA [Liao and Brewer, 2007]. Συγκεκριμένα, πρόσδεση της AUF1 στο ARE του *c-myc* mRNA αυξάνει την έκφραση της Myc πρωτεΐνης καθώς παρεμποδίζει την πρόσδεση του αναστολέα TIAR. Το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση πρόσδεσης της TIAR με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της πρόσδεσης της AUF1 και μείωση της έκφρασης της MYC πρωτεΐνης. Το συμπέρασμα που προκύπτει στην προκειμένη περίπτωση είναι ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες αποτελούν ρυθμιστές της έκφρασης του *c-myc* στο επίπεδο της μετάφρασης και η λεπτή ισορροπία μεταξύ τους αποτελεί μηχανισμό μικρο-ρύθμισης της έκφρασης του ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Αυτό πιθανόν να σημαίνει αύξηση της έκφρασης του *c-myc* σε περιπτώσεις κυττάρων που διαιρούνται σε υψηλότερους ρυθμούς, όπως η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη και μείωσή της έκφρασής του σε περιπτώσεις κυτταρικής διαφοροποίησης.

Η 3΄ UTR του *c-myc* περιλαμβάνει μία πληθώρα θέσεων πρόσδεσης miRNAs, μεταξύ των οποίων αρκετά καλά μελετημένα όπως τα Let-7a, miR-145, miR-34a, miR-375, miR-494 και miR-148a. Τα συγκεκριμένα miRNAs έχει δειχθεί ότι έχουν ογκοκατασταλτική δράση μειώνοντας την έκφραση γονιδίων στόχων όπως τα *NRAS, KRAS*, *C-MYC* σε διάφορες μορφές καρκίνων. Στον καρκίνο του παγκρέατος έχει επίσης δειχθεί ότι η μείωση ή αναστολή της έκφρασης των συγκεκριμένων miRNAs οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα της MYC πρωτεΐνης, η οποία με τη σειρά της απορυθμίζει γονίδια που ενέχονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αγγειογένεση κλπ. [Shams *et al*., 2020]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες λοιπόν θα ήταν αναμενόμενο η 3΄UTR να αποτελεί στόχο των προαναφερθέντων miRNAs μειώνοντας έτσι την έκφραση του χιμαιρικού πρωτεϊνικού προϊόντος, κάτι που δεν παρατηρήθηκε κατά την παρούσα μελέτη. Επιπρόσθετα, οι συγκεκριμένες θέσεις πρόσδεσης miRNAs δεν εδράζονται σε περιοχή της 3΄ UTR που θα μπορούσε να ‘’χαθεί’’ σε περίπτωση ενεργοποίησης του μηχανισμού εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης. Μια πιθανή εξήγηση στην

προκειμένη περίπτωση θα ήταν η μειωμένη έκφραση ή ακόμη και αναστολή κάποιων από τα miRNAs, οδηγώντας έτσι στην αύξηση της έκφρασης μέσω της 3΄ UTR του *c-myc*.

4.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ C-MYC mRNA ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕΣΩ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗΣ ΘΕΣΗΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΡΙΒΟΣΩΜΑΤΟΣ (IRES)

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα δεδομένα που προέκυψαν όσον αφορά την επίδραση των ρυθμιστικών περιοχών *cis* του *c-myc* στην μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄ δεν έδειξαν μεταξύ τους συνεργιστική δράση. Παρόλα αυτά εξετάστηκε η πιθανότητα το CRD καθώς και η 3΄ UTR να επηρεάζουν σε κάποιο βαθμό την μετάφραση μέσω της εσωτερικής θέσης εισόδου ριβοσώματος που εδράζεται στην αμετάφραστη περιοχή 5΄.

Όπως και στην περίπτωση της μετάφρασης μέσω καλύμματος 5΄, η αμετάφραστη περιοχή 3΄ του c-myc φάνηκε να ενισχύει την μετάφραση μέσω 5΄ IRES καθώς η μεταφρασιμότητα των μηνυμάτων RNA βρέθηκε αυξημένη και από τα δύο σιστρόνια (λουσιφεράση *Firefly* και *Renilla*). Η παρουσία του στοιχείου αστάθειας CRD μείωσε την μετάφραση μέσω 5΄IRES (σιστρόνιο λουσιφεράσης *Firefly*) ενώ το αντίθετο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε στην περίπτωση μετάφρασης μέσω καλύμματος 5΄. (σιστρόνιο λουσιφεράσης *Renilla*). Η συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων, όπως και στην περίπτωση της μετάφρασης μέσω καλύμματος 5΄, έδειξαν ότι το στοιχείο CRD μειώνει την μετάφραση μόνο ένα βρίσκεται εντός πλαισίου ανάγνωσης. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το CRD επιδρά στην μετάφραση μέσω δύο μηχανισμών. Ο ένας αφορά πιθανόν την παροδική παρεμπόδιση της κύλισης των ριβοσωμάτων στο mRNA λόγω της ύπαρξης σπανίων κωδικονίων αργινίνης και θρεονίνης [Lemm and Ross, 2002] και ο δεύτερος την αποθήκευση του μηνύματος RNA στο αμετάφραστο ριβονουκλεοπρωτεϊνικό κλάσμα μέσω πρόσδεσης της RNA δεσμευτικής πρωτεΐνης IGF2BP1, μειώνοντας έτσι την μεταφρασιμότητά του [Weidensdorfer *et al*., 2009]. Παρόλα αυτά, το γεγονός ότι η μεταφρασιμότητα του ανοδικού σιστρονίου της λουσιφεράσης *Renilla*, το οποίο φέρει το στοιχείο CRD εκτός πλαισίου ανάγνωσης,

εμφανίστηκε αυξημένη, μας οδηγεί στο λογικό συμπέρασμα ότι το μήνυμα RNA δεν αποθηκεύεται μέσω πρόσδεσης της IGF2BP1. Κατ' επέκταση η λογικότερη εξήγηση που μπορεί να δοθεί είναι ότι η μειωμένη μεταφρασιμότητα που παρατηρείται όταν το στοιχείο CRD βρίσκεται εντός πλαισίου ανάγνωσης, οφείλεται σε παροδική παύση των κυλιόμενων στο mRNA ριβοσωμάτων εξαιτίας σπανίων κωδικονίων.

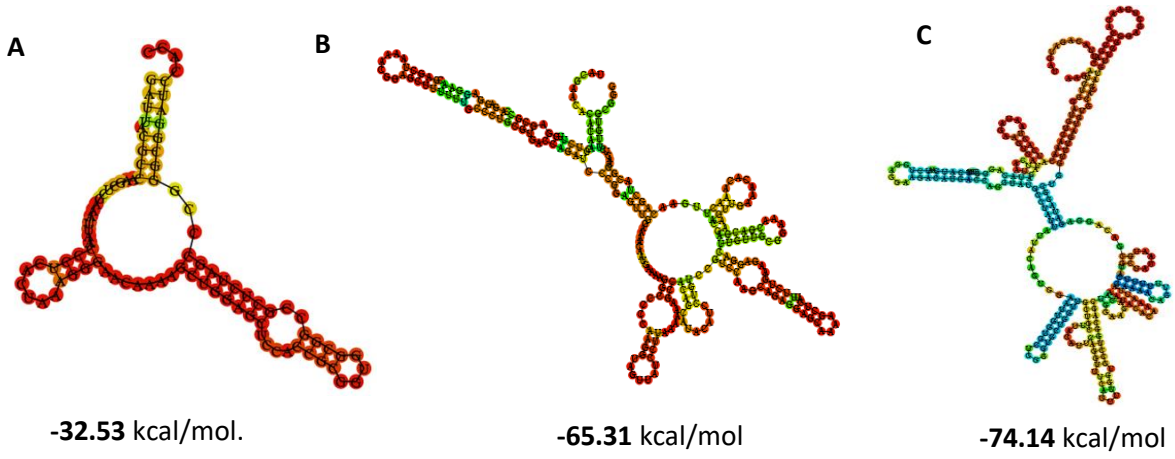
4.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ CRD ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕΣΩ ΚΑΛΥΜΜΑΤΟΣ 5΄ ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ IGF2BP1 ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥ C-MYC mRNA

Τα προηγούμενα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία του στοιχείου CRD μειώνει την μεταφρασιμότητα του mRNA μόνο όταν βρίσκεται εντός πλαισίου ανάγνωσης. Προκειμένου να βεβαιωθούμε ότι αυτό οφείλεται στην παρουσία σπανίων κωδικονίων και παροδική παύση των ριβοσωμάτων και όχι στην πρόσδεση της IGF2BP1 στο CRD, δημιουργήθηκαν τα κατάλληλα οχήματα χιμαιρικών γονιδίων τα οποία φέρουν τα στοιχεία αστάθειας τόσο του *c-myc* όσο και του *mdr1* εντός πλαισίου ανάγνωσης με την κωδική περιοχή της λουσιφεράσης *Firefly* καθώς επίσης και στις αμετάφραστες περιοχές 5΄ και 3΄. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υποκλωνοποίηση της αλληλουχίας CRD στην αμετάφραστη περιοχή 5΄ δεν είχε ιδιαίτερη επίπτωση στην μεταφρασιμότητα του με μόλις 25% μείωση, ενώ ιδιαίτερα μειωμένη παρουσιάστηκε στην περίπτωση υποκλωνοποίησης στην κωδική περιοχή με πτώση 60%. Στην περίπτωση της αμετάφραστης περιοχής 3΄ η αύξηση που παρατηρήθηκε ήταν της τάξης του 70%. Όσον αφορά τη μελέτη της περιοχής αστάθειας του γονιδίου *mdr1*, υποκλονωποίησή της εντός πλαισίου ανάγνωσης της κωδικής περιοχής του γονιδίου της λουσιφεράσης *Firefly*, είχε ως αποτέλεσμα την σχεδόν εκμηδένιση της μεταφρασιμότητας ενώ στην αμετάφραστη

περιοχή 5΄ μείωσε τη μεταφρασιμότητα κατά περίπου 65%. Μεγάλη αύξηση της έκφρασης παρατηρήθηκε στην περίπτωση της υποκλωνοποίησης της στην αμετάφραστη περιοχή 3΄ η οποία ήταν της τάξης του περίπου 400%.

Η μείωση της μεταφρασιμότητας όσον αφορά τα χιμαιρικά μηνύματα που φέρουν το στοιχείο αστάθειας στην 5΄ UTR μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Έχει δειχθεί ότι το μήκος της 5΄ αμετάφραστης περιοχής ενός μορίου mRNA, η θερμική σταθερότητά του, η περιεκτικότητα του σε νουκλεοτίδια GC καθώς επίσης και η παρουσία δευτεροταγών δομών επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την μετάφραση. Επιπρόσθετα, η περιοχή αυτή αποτελεί σημείο πρόσδεσης διαφόρων ρυθμιστικών στοιχείων *trans* τα οποία αποκρινόμενα σε μια πληθώρα κυτταρικών ερεθισμάτων μπορούν να επάγουν ή να καταστέλλουν την μετάφραση [Chatterjee and Pal, 2009]. Ειδικότερα, το μήκος της 5΄UTR επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη μεταφραστική ικανότητα ενός mRNA καθορίζοντας την ενέργεια που απαιτείται να δαπανηθεί από ένα ριβόσωμα προκειμένου αυτό να υπερπηδήσει το εμπόδιο των σύνθετων δευτεροταγών δομών και να προσδέσει το κωδικόνιο έναρξης. Παράδειγμα γονιδίου με σύνθετη 5΄ UTR δομή αποτελεί το TGF-β3 το οποίο εμπλέκεται σε κυτταρικές διεργασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η κυτταρική αύξηση, η ογκογένεση και η ανοσοκαταστολή. Από τη μεταγραφή του γονιδίου αυτού προκύπτουν 2 μετάγραφα μήκους 3,5 και 2,6 kb από τα οποία το πρώτο παρουσιάζει 5΄ αμετάφραστη περιοχή μήκους 1,1 kb. Η σύνθετη 5΄ UTR δομή του πρώτου μεταγράφου σε αυτή την περίπτωση είναι και ο βασικός λόγος για τον οποίο δεν μεταφράζεται τόσο επαρκώς όσο το δεύτερο, που χαρακτηρίζεται από απλούστερη δομή [Arrick *et al*., 1991]. Τα δικά μας πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι ενώ η μεταφρασιμότητα του χιμαιρικού γονιδίου παρουσιάζεται μειωμένη και στις δύο περιπτώσεις στοιχείων αστάθειας (*c-myc και mdr1),* στην περίπτωση του *mdr1* CRD είναι πιο έντονη (65% έναντι 25% του *c-myc* CRD). Μια λογική εξήγηση σε αυτή την περίπτωση θα μπορούσε να είναι η ύπαρξη πιο σύνθετων δευτεροταγών δομών όσον αφορά το μήνυμα που φέρει το στοιχείο αστάθειας του *mdr1* στην 5΄ UTR με αποτέλεσμα τα ριβοσώματα να "δυσκολεύονται" περισσότερο να σαρώσουν την συγκεκριμένη περιοχή και να μεταφράσουν επαρκώς το μήνυμα. Χρησιμοποιώντας την βάση δεδομένων RNAfold WebServer προκειμένου να προβλεφθούν οι δευτεροταγείς δομές των συγκεκριμένων περιοχών, παρατηρήθηκε ότι βάση της ελεύθερης ενέργειας (ΔG) η 5΄ UTR του φορέα ελέγχου

(Luc/Control) είναι λιγότερο σταθερή σε σύγκριση με τις UTRs που περιέχουν τα στοιχεία αστάθειας των *c-myc* και *mdr1,* γεγονός που ευνοεί την μετάφραση (εικόνα 25). Επιπρόσθετα, η παρουσία του *mdr1* CRD στην 5΄ UTR έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία μιας πιο σύνθετης δομής στο μόριο RNA σε σύγκριση με το αντίστοιχο του *c-myc,* αιτιολογώντας ίσως με αυτόν τον τρόπο την αρκετά μειωμένη μεταφρασιμότητα που παρατηρήθηκε [Gruber *et al*., 2008].



Εικόνα 25. Πρόβλεψη δευτεροταγών δομών της αμετάφραστης περιοχής 5΄ του φορέα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης *Firefly.* A) Luc/Control , B) Luc/5΄ *c-myc*-CRD, C) Luc/5΄ *mdr1*-CRD [Gruber et al., 2008, http://rna.tbi.univie.ac.at/RNAWebSuite/help.html]

Υποκλωνοποίηση των στοιχείων αστάθειας των γονιδίων *c-myc* και *mdr1* εντός πλαισίου ανάγνωσης στην κωδική περιοχή της λουσιφεράσης *Firefly* είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση της μεταφρασιμότητας του μηνύματος RNA σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με προηγουμένως.

Οι περιοχές αυτές αστάθειας και ειδικότερα αυτή του *c-myc* έχουν μελετηθεί εκτενώς και αποτελούν υποστρώματα δράσης ριβονουκλεασών. Το γεγονός ότι το

στοιχείο αστάθειας CRD του *c-myc* μπορεί να αποτελέσει στόχο ενδονουκλεολυτικής πέψης διερευνήθηκε πρώτα από τον Ross και συνεργάτες. Μεταφέροντας την αλληλουχία αυτή εντός πλαισίου ανάγνωσης στην κωδική περιοχή του σταθερού mRNA της β-γλοβίνης, είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση του χρόνου ημιζωής του μηνύματος. Στη συνέχεια απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε η IGF2BP1 ως πρωτεΐνη που προσδένει ειδικά την περιοχή του CRD και προστατεύει το mRNA από ενδονουκλεολυτική πέψη [Prokipcak *et al*., 1994; Doyle *et al*., 1998]. Πολύ αργότερα απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε η ριβονουκλεάση APE-1 ως ο ενδονουκλεολυτικός παράγοντας που δρα στην περιοχή CRD του *c-myc* και προκαλεί αποικοδόμηση του μηνύματος [Barnes *et al*., 2009]. Όσον αφορά το στοιχείο αστάθειας του γονιδίου *mdr1*, μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον Lee και συνεργάτες έδειξε ότι όπως και στην περίπτωση του *c-myc* mRNA έτσι και εδώ η συγκεκριμένη αλληλουχία αποτελεί ενδονουκλεολυτικό στόχο εκτός και αν προστατεύεται μέσω πρόσδεσης της IGF2BP1 [Sparanese and Lee, 2007].

Σε μία προσπάθεια να αναπαράγουμε τα συγκεκριμένα δεδομένα χρησιμοποιώντας τα χιμαιρικά μηνύματα που φέρουν τα στοιχεία αστάθειας στην κωδική περιοχή της λουσιφεράσης *Firefly*, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία αποικοδόμησης του μηνύματος RNA με τον μεταγραφικό καταστολέα ακτινομυκίνη D στις κυτταρικές σειρές HeLa και HEK-293T. Όσον αφορά την κυτταρική σειρά HEK-293T παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα mRNA όσον αφορά το στοιχείο αστάθειας του *c-myc* είχαν μειωθεί κατά 50% σε σχέση με το πείραμα ελέγχου ενώ πιο σταθερό παρουσιάστηκε το μήνυμα στην περίπτωση του στοιχείου αστάθειας του *mdr1* καθώς τα επίπεδα του μειώθηκαν κατά περίπου 15%. Πιο αποσταθεροποιητικά φάνηκαν να δρουν οι αλληλουχίες αυτές όταν πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία σε κύτταρα HeLa. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του *c-myc* CRD η πτώση στα επίπεδα του mRNA άγγιξε το 60-70% ενώ στην περίπτωση του *mdr1*-CRD, παρατηρήθηκε πτώση περίπου 90%. Μία εξήγηση που θα μπορούσε να δοθεί εδώ είναι η δράση διαφορετικών παραγόντων *trans* στις αλληλουχίες αστάθειας ανάμεσα στις δύο αυτές κυτταρικές σειρές. Ένας ακόμη παράγοντας που θα μπορούσε να παίζει ρόλο είναι η δράση συγκεκριμένων ριβονουκλεασών καθώς επίσης και η συγκέντρωση στην οποία βρίσκονται στους δύο διαφορετικούς αυτούς τύπους ιστού. Επίσης, τα επίπεδα ενδογενούς IGF2BP1 πρωτεΐνης, η οποία ως γνωστών προστατεύει το μήνυμα RNA από ενδονουκλεολυτική πέψη, θα μπορούσαν να

διαφέρουν ανάμεσα στις δύο σειρές με αποτέλεσμα τα επίπεδα σταθερότητας των χιμαιρικών RNAs να κλιμακώνονται με αυτόν τον τρόπο. Ποιο συγκεκριμένα, αυξημένα επίπεδα ενδογενούς IGF2BP1 στη σειρά HEK-293T θα μπορούσαν να είναι ο λόγος για τον οποίο τα χιμαιρικά μηνύματα παρουσιάζονται πιο σταθερά. Η πιθανότητα πρόσδεσης της IGF2BP1 στο *c-myc* mRNA και ενδεχόμενη αποθήκευσή του τελευταίου σε ριβονουκλεοπρωτεϊνικά κοκκία έχει επίσης διερευνηθεί και δειχθεί [Weidensdorfer *et al*., 2009]. Στην προκειμένη περίπτωση όμως, η παρουσία του στοιχείου αστάθειας CRD θα δρούσε κατασταλτικά στην μετάφραση ανεξαρτήτως της θέσης του στο μήνυμα RNA. Τα πειραματικά μας δεδομένα έδειξαν ότι μόνο όταν βρίσκεται εντός πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου αναφοράς έχει κατασταλτική δράση στην μετάφραση. Δεν προέκυψε κάτι τέτοιο στην περίπτωση υποκλωνοποίησης της συγκεκριμένης περιοχής στις αμετάφραστες περιοχές 5΄ και 3΄ του γονιδίου αναφοράς. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει την θεωρία ότι η κατασταλτική δράση της περιοχής CRD στην μετάφραση οφείλεται στην παρουσία σπανίων κωδικονίων και όχι στην πρόσδεση της IGF2BP1 με αποτέλεσμα την αποθήκευση των μεταγράφων σε κυτταροπλασματικά κοκκία. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη θεωρία η παρουσία κωδικονίων αργινίνης (CGA) και θρεονίνης (ACA) αναγκάζουν το ριβόσωμα να σταματήσει παροδικά με αποτέλεσμα η CRD περιοχή να μένει εκτεθειμένη σε ριβονουκλεάσες εκτός και αν προστατεύεται από την IGF2BP1. Ενδονουκλεολυτική πέψη σε αυτή την περίπτωση έχει σαν αποτέλεσμα την γρήγορη αποικοδόμηση του μηνύματος RNA, η οποία με τη σειρά της συνεπάγεται την μείωση των επιπέδων μετάφρασης. Οι Ross και Lem έδειξαν επίσης ότι αντικαθιστώντας τα συγκεκριμένα κωδικόνια με κωδικόνια που απαντώνται συχνότερα στο κύτταρο, είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της μεταφρασιμότητας των RNA μηνυμάτων. Εξετάζοντας το περιεχόμενο των αλληλουχιών CRD σε κωδικόνια αργινίνης και θρεονίνης των γονιδίων *c-myc και mdr1* διαπιστώσαμε την παρουσία 4 κωδικονίων αργινίνης και 8 θρεονίνης στο CRD του *c-myc*, ενώ 3 κωδικόνια αργινίνης και 10 θρεονίνης εντοπίστηκαν στο CRD του mdr1. Η ύπαρξη των σπανίων αυτών κωδικονίων πιθανότατα λειτουργεί κατασταλτικά στην μεταφρασιμότητα των χιμαιρικών μηνυμάτων. Επιπρόσθετα η παρουσία κωδικονίων θρεονίνης είναι πιο έντονη στην αλληλουχία CRD του *mdr1* και ίσως αυτός να είναι και ο λόγος για τον οποίο το αντίστοιχο χιμαιρικό μήνυμα μεταφράζεται λιγότερο συγκριτικά με αυτό που φέρει

το CRD του *c-myc*. Τέλος, καταστολή της έκφρασης της ενδογενούς IGF2BP1 σε ποσοστό άνω του 90% δεν είχε καμία επίπτωση στην μεταφρασιμότητα χιμαιρικών γονιδίων που φέρουν το στοιχείο αστάθειας CRD εντός πλαισίου ανάγνωσης, γεγονός που συνηγορεί στο ότι η μειωμένη μεταφρασιμότητα δεν οφείλεται στην πρόσδεση της IGF2BP1 και αποθήκευση του μηνύματος αλλά στην παρουσία σπανίων κωδικονίων.

Με βάση λοιπόν το μοντέλο που περιεγράφηκε, η ύπαρξη των κωδικονίων αργινίνης και θρεονίνης αποτελεί μηχανικό εμπόδιο για τις κινούμενες πάνω στο mRNA 60S και 40S ριβοσωμικές υπομονάδες. Σε περιπτώσεις γονιδίων, όπως η β-ακτίνη, η παρεμπόδιση της "κύλισης" των ριβοσωμάτων ενισχύεται ακόμη περισσότερο λόγω προσδεμένων RNA-δεσμευτικών πρωτεϊνών. Ένα καλά μελετημένο παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη ZBP1, ορθόλογη της IGF2BP1 στην όρνιθα, η οποία προσδένει την αμετάφραστη περιοχή 3΄ του γονιδίου σε μία περιοχή γνωστή ως "zipcode" και καταστέλλει τη μετάφραση του μηνύματος έως ότου αυτό μεταφερθεί σε πλούσιες σε ακτίνη κυτταρικές προεκβολές. Στη συνέχεια η ZBP1 μέσω φωσφορυλίωσης από την κινάση Src σε θέση τυροσίνης αποδεσμεύεται από το μήνυμα και αυτό μεταφράζεται [Huttelmaier *et al*., 2005]. Σε μία προσπάθεια να διερευνήσουμε την πιθανότητα η έκφραση του *c-myc* να υπόκειται σε αυτού του είδους τον έλεγχο, η σειρά HEK-293T διαμολύνθηκε με τους φορείς που φέρουν το CRD στοιχείο σε όλες τις πιθανές θέσεις καθώς επίσης και με πλασμίδια που εκφράζουν τον άγριο (υφίσταται φωσφορυλίωση) και μεταλλαγμένο (δεν υφίσταται φωσφορυλίωση) τύπο της IGF2BP1. Το πλασμίδιο που εκφράζει τον άγριο τύπο της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να εξασφαλίσουμε ότι τα επίπεδα ενδογενούς IGF2BP1 στο κύτταρο είναι επαρκή για να προσδέσουν τα χιμαιρικά μηνύματα έπειτα από την διαμόλυνση. Ο μεταλλαγμένος τύπος της πρωτεΐνης φέρει μία σημειακή μετάλλαξη που αντικαθιστά την τυροσίνη στη θέση 396 με φαινυλαλανίνη με αποτέλεσμα να μην φωσφορυλιώνεται. Οι φορείς αυτοί χρησιμοποιήθηκαν συνδυαστικά με τα χιμαιρικά οχήματα λουσιφεράσης. Υπερέκφραση του άγριου τύπου της IGF2BP1 στην κυτταρική σειρά HEK-293T δεν είχε καμία επίδραση στην μεταφρασιμότητα χιμαιρικών μηνυμάτων τα οποία έφεραν το στοιχείο αστάθειας CRD είτε στην αμετάφραστη περιοχή 5΄ είτε στην κωδική. Αντίθετα, υπερέκφραση της μεταλλαγμένης μορφής της IGF2BP1 μείωσε την μεταφρασιμότητα χιμαιρικών μηνυμάτων που έφεραν το στοιχεία αστάθειας σε

οποιαδήποτε θέση. Από τους Lemm Και Ross το 2002 δείχθηκε ότι το στοιχείο CRD έχει διμερή λειτουργία. Τα πρώτα 72 νουκλεοτίδια περιέχουν τα σπάνια κωδικόνια αργινίνης και θρεονίνης καθυστερώντας την μετάφραση του μηνύματος, ενώ καθοδικά της περιοχής αυτής στα επόμενα 177, περιλαμβάνεται η περιοχή πρόσδεσης της IGF2BP1 με σκοπό την αποτροπή ενδεχόμενης νουκλεολυτικής πέψης ως απόρροια της ριβοσωματικής παύσης πάνω στη μήνυμα. Τα πειραματικά μας δεδομένα ωστόσο έδειξαν έναν πιο ενεργό ρόλο της IGF2BP1 στην ρύθμισή της έκφρασης του *c-myc* μέσω πρόσδεσης στην αντίστοιχη περιοχή του στοιχείου αστάθειας CRD και στην συνέχεια καταστολή της μετάφρασης του μηνύματος εως ότου η πρωτεΐνη υποστεί μετα-μεταφραστική τροποποίηση μέσω φωσφορυλίωσης.

Μεταφορά της αλληλουχίας CRD των γονιδίων *c-myc* και *mdr1* στην αμετάφραστη περιοχή 3΄ του μηνύματος είδαμε ότι αυξάνει την μεταφρασιμότητα του και στις δύο περιπτώσεις. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το μήκος της αμετάφραστης περιοχής 3΄ παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση του mRNA μηνύματος. Οι Gallie και Tanguay χρησιμοποιώντας φορείς έκφρασης του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης *Firefly* και ενσωματώνοντας στην 3΄UTR αλληλουχίες μήκους από 4 έως 104 βάσεις, έδειξαν ότι αυξάνοντας το μήκος της, αυτό ενισχύει τη μετάφραση του μηνύματος. Πέρα από την αύξηση στη μεταφρασιμότητα, παρατήρησαν ότι η αύξηση του μήκους της 3΄UTR επιφέρει και αύξηση στη σταθερότητα του mRNA [Tanguay and Gallie, 1996]. Τα δεδομένα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη είναι σε συμφωνία με το συγκεκριμένο εύρημα καθώς οι CRD αλληλουχίες μήκους περίπου 290 νουκλεοτιδίων αύξησαν την έκφραση του χιμαιρικού μηνύματος κατά 50% στην περίπτωση του *c-myc* CRD και 400% στην περίπτωση του *mdr1.* Παρά το γεγονός ότι οι αλληλουχίες CRD που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη είχαν περίπου το ίδιο μήκος (~ 280 νουκλεοτίδια), παρατηρήσαμε ότι η μεταφρασιμότητα του μηνύματος που φέρει το CRD του *mdr1* στην 3΄UTR ήταν 8 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του *c-myc*. Ερευνώντας *in silico* για πιθανές θέσεις πρόσδεσης miRNAs και στις δύο αλληλουχίες, παρατηρήσαμε ότι στο CRD του *mdr1* δρουν περισσότερα miRNAs απ' ότι στου *c-myc*. Στην προκειμένη περίπτωση λοιπόν θα ήταν αναμενόμενη η παρεμπόδιση της έκφρασης του συγκεκριμένου mRNA στόχου καθώς ως γνωστόν τα miRNAs δρουν ως επί το πλείστων στην αμετάφραστη περιοχή 3΄ [Mazière and Enright, 2007; Williams, 2008; Eulalio *et al*., 2009]. Κάτι τέτοιο παρόλα αυτά δεν

παρατηρήθηκε. Επιπρόσθετα, δεν εντοπίστηκαν στοιχεία AU-rich σε καμία από τις δύο αλληλουχίες, κάτι το οποίο επίσης θα μπορούσε να δικαιολογήσει την μεγάλη διαφορά στην μεταφρασιμότητα μεταξύ των δύο, καθώς οι συγκεκριμένες ρυθμιστικές περιοχές παίζουν καθοριστικό ρόλο στην σταθερότητα μηνυμάτων RNA μέσω πρόσδεσης πρωτεϊνών δέσμευσής AREs (ARE-BPs) [Otsuka *et al.,* 2019]. Μία πιθανή εξήγηση για το συγκεκριμένο εύρημα θα ήταν ότι στην περίπτωση του *mdr1*-CRD δρουν ρυθμιστικοί παράγοντες *trans* με επαγωγική δράση, κάτι στο οποίο μπορεί να οφείλεται η αυξημένη μεταφρασιμότητα που παρατηρήθηκε.

Ακόμη πιο πρόσφατες μελέτες σχετικά με το στοιχείο αστάθειας CRD έχουν δείξει ότι τροποποίηση του mRNA μέσω μεθυλίωσης m6A, μια διεργασία που ελέγχεται αυστηρά από την δράση μεθυλοτρανσφερασών και απομεθυλασών, μπορεί να συμβάλει στην αναγνώριση των συγκεκριμένων περιοχών από πρωτεΐνες δέσμευσης με αποτέλεσμα την σταθεροποίηση ή αποσταθεροποίηση των μηνυμάτων RNA. Συγκεκριμένα δείχτηκε ότι πεπτίδιο που συντίθεται από το μέχρι πρότινος γνωστό ως μη κωδικοποιητικό RNA *LINC00266-1* αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη δέσμευσης IGF2BP1 συμβάλλοντας στην αναγνώριση μεθυλιώσεων στο CRD του *c-myc.* Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας και κατ' επέκταση των επιπέδων του *c-myc* mRNA μέσω πρόσληψης πρωτεϊνών όπως οι HuR, MATK3 και PABPC1 [Zhu *et al.,* 2020; Qiu *et al., 2025*]. Είναι λοιπόν πιθανόν τα ευρήματα που προέκυψαν από τα συγκεκριμένα πειράματα να οφείλονται σε έναν βαθμό σε αυτού του είδους τον μηχανισμό ρύθμισης.

4.4. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΑΝΑΛΟΓΟΥ ΑΔΕΝΟΣΙΝΗΣ, ΚΟΡΔΥΣΕΠΙΝΗ, ΕΝΙΣΧΥΕΙ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ 3΄ ΤΟΥ C-MYC ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕΣΩ ΚΑΛΥΜΜΑΤΟΣ 5΄.

Έχει δειχθεί ότι η μεταφραστική ικανότητα της πλειοψηφίας των μηνυμάτων RNA επηρεάζεται θετικά από την παρουσία μιας επιμήκους ουράς πολύ(Α). Επιπρόσθετα, για συγκεκριμένα μηνύματα RNA, μέσω του μηχανισμού της κυτταροπλασματικής πολυαδενυλίωσης επιτυγχάνεται η μετάφραση ολιγοαδενυλιομένων αδρανών mRNAs [Zhang *et al*., 2010]. Έχει επίσης δειχθεί ότι υπό την επίδραση του αναστολέα της πολυαδενυλίωσης κορδυσεπίνη, τα ολιγοαδενυλιωμένα μηνύματα RNA του *c-myc* μεταφράζονται πιο επαρκώς [Ioannidis *et al*., 1999]. Στην παρούσα διατριβή δείξαμε ότι παρουσία κορδυσεπίνης μειώνεται η μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄ όλων των χιμαιρικών γονιδίων αναφοράς, με εξαίρεση εκείνων που φέρουν την αμετάφραστη περιοχή 3΄. Στην προκειμένη περίπτωση δείχθηκε ότι η μεταφρασιμότητα των συγκεκριμένων μηνυμάτων RNA ενισχύθηκε, εύρημα το οποίο αποδίδει στην 3΄ UTR σημαντικό ρόλο στο να διατηρεί την μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄ ακόμα και σε περιπτώσεις απουσίας μιας επιμήκους ουράς πολύ(Α). Το φαινόμενο αυτό παρόλα αυτά παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση μετάφρασης μέσω καλύμματος 5΄ καθώς η 3΄ UTR δεν κατάφερε να αποκαταστήσει την μετάφραση μέσω IRES σε κύτταρα κατεργασμένα με κορδυσεπίνη. Προηγούμενες μελέτες όσον αφορά την επίδραση της ουράς πολύ(Α) στην μετάφραση μέσω εσωτερική θέσης εισόδου ριβοσώματος (IRES) στα γονίδια *c-myc* καθώς και στην πρωτεΐνη-συνοδό BiP/HSP78 έδειξαν ότι η παρουσία της είναι απαραίτητη για την μετάφραση μέσω IRES. Η εξαρτώμενη από το κάλυμμα 5΄ μετάφραση προϋποθέτει την αναγνώριση του καλύμματος από τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E, ο οποίος στην συνέχεια αλληλεπιδρά με τον παράγοντα eIF4G και την πρωτεΐνη PABP που είναι δεσμευμένη στην ουρά πολύ(Α). Η δημιουργία αυτού του συμπλόκου επιτρέπει την κυκλοποίηση του mRNA και την ‘’στρατολόγηση’’ της μικρής ριβοσωματικής υπομονάδας 40S προκειμένου να επιτευχθεί η έναρξη της μετάφρασης. Η εργασία των Thoma C. και συνεργατών έδειξε ότι η παρουσία της ουράς πολύ(Α) είναι

απαραίτητη για την ενίσχυση της μετάφρασης μέσω IRES και λειτουργεί ανεξάρτητα από την παρουσία της PABP καθώς και του παράγοντα eIF4G [Thoma *et al*., 2004]. Ακόμα πιο πρόσφατη μελέτη όσον αφορά την εξαρτώμενη από IRES μετάφραση στην περίπτωση του ιού της ηπατίτιδας A (HAV) έδειξε ότι η παρουσία της ουράς πολύ(A) είναι απαραίτητη για την έκφραση γονιδίων αναφοράς που φέρουν το HAV IRES. Συγκεκριμένα, τόσο σε κύτταρα HeLa όσο και σε κύτταρα Huh-7 (ηπατική κυτταρική σειρά) δείχθηκε ότι η παρουσία της ουράς πολύ(A) δρα ενισχυτικά στην μετάφραση μέσω IRES. Επιπρόσθετα παρατηρήθηκε ότι ελλείψει ουράς πολύ(A) το HAV mRNA μεταφράζεται πιο αποτελεσματικά σε κύτταρα Huh-7 πάρα σε HeLa, γεγονός που αποδίδεται στο προφίλ των ρυθμιστικών παραγόντων *trans* (ITAFs) που δρουν στην ηπατική κυτταρική σειρά [Sadahiro *et al.,* 2018]. Τα δεδομένα αυτά μπορούν πιθανότατα να δικαιολογήσουν το εύρημα μας σχετικά με την μειωμένη μεταφρασιμότητα μέσω IRES των χιμαιρικών mRNAs που φέρουν την 3΄ UTR του *c-myc* υπό την επίδραση της κορδυσεπίνης, δείχνοντας ότι η ουρά πολύ(A) λειτουργεί ως μηχανισμός στοχευμένου μεταφραστικού ελέγχου του *c-myc* ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες βρίσκεται το κύτταρο.

4.5. Η ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗ ΠΕΡΙΟΧΗ 3 ΄ΤΟΥ C-MYC ΑΠΟΚΑΘΙΣΤΑ ΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕΣΩ ΚΑΛΥΜΜΑΤΟΣ 5΄ ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ.

Έχει αναφερθεί ότι η κορδυσεπίνη μπορεί να επηρεάσει συνολικά την μετάφραση μηνυμάτων RNA μέσω φωσφορυλίωσης του παράγοντα έναρξης eIF2α καθώς επίσης και μέσω μείωσης της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης 4E-BP [Wong *et al*., 2010; Kadomatsu *et al*., 2012]. Αυτές οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις λαμβάνουν χώρα υπό συνθήκες κυτταρικής καταπόνησης και συνήθως αναστέλλουν την μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄. [Holcik and Sonenberg, 2005; Connolly *et al*., 2006]. Κάθε μια από τις κινάσες που δρουν στον παράγοντα eIF2α ανταποκρίνεται σε μία πληθώρα φυσιολογικών και/ή περιβαλλοντικών συνθηκών κυτταρικής καταπόνησης επάγοντας κατ’ αυτόν τον τρόπο την φωσφορυλίωση της

α-υπομονάδας του eIF2α. Στην περίπτωση διατροφικού στρες ή κατά την κυτταρική απόκριση στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (UPR), η φωσφορυλίωση του eIF2α έχει σαν αποτέλεσμα την επιλεκτική επαγωγή μετάφρασης συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα ο ATF4, οι οποίοι κατευθύνουν την έκφραση γονιδίων απαραίτητων στην κυτταρική απόκριση στις στρεσογόνες συνθήκες. Σε περιπτώσεις καταπόνησης μη ανεκτής από το κύτταρο, το αποτέλεσμα είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος [Kaufman, 2004].

Τα δεδομένα που προέκυψαν από την μελέτη της επίδρασης της αμετάφραστης περιοχής 3΄ του *c-myc* στη μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄ υπό συνθήκες έλλειψης γλυκόζης, έδειξαν ότι η παρουσία της 3΄ UTR οδήγησε σε αναστροφή της μεταφραστικής καταστολής ως αποτέλεσμα της καταπόνησης που υπέστη το κύτταρο.

Το εκτεταμένο δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας του myc παίζει σημαντικό ρόλο τόσο κατά την διάρκεια της φυσιολογικής όσο και παθολογικής κυτταρικής λειτουργίας. Μέσω του δικτύου αυτού ρυθμίζεται ο τρόπος με τον οποίο θρεπτικά συστατικά όπως η γλυκόζη χρησιμοποιούνται από το κύτταρο. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω επαγωγής της έκφρασης γονιδίων που συνθέτουν μεταφορείς γλυκόζης και ενζύμων του γλυκολυτικού μονοπατιού [Peterson and Ayer, 2011]. Η διατήρηση των επιπέδων του *c-myc* κρίνεται απαραίτητη για την ‘’διάσωση’’ κυττάρων υπό συνθήκες μεταβολικού στρες, ενώ παρατεταμένη έλλειψη γλυκόζης μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση μέσω αυξημένης έκφρασης του *c-myc*, κάτι το οποίο έχει παρατηρηθεί σε μετασχηματισμένα με *c-myc* κύτταρα όπως ινοβλάστες, λεμφοβλαστοειδή καθώς και καρκινικά κύτταρα πνεύμονα [Shim *et al*., 1998]. Υπό συνθήκες έλλειψης γλυκόζης το κύτταρο οδηγείται σε γενική καταστολή της πρωτεινοσύνθεσης μειώνοντάς έτσι τις ενεργειακές του απαιτήσεις έτσι ώστε να ανταπεξέλθει στην στρεσογόνο αυτή κατάσταση και να επιβιώσει. Στην προκειμένη περίπτωση τα ενδογενή επίπεδα του *c-myc* mRNA, της μεταφρασιμότητας του *c-myc* μηνύματος, η οποία εκτιμάται εξετάζοντας κλάσματα πολυσωμάτων και κατ’ επέκταση τα επίπεδα της MYC πρωτεΐνης παραμένουν ανεπηρέαστα. Αυτό το οποίο μεταβάλλεται στην περίπτωση καρκινικών κυττάρων υπό συνθήκες στρες είναι ο χρόνος ημιζωής της πρωτεΐνης στο κύτταρο, καθώς αυξημένα επίπεδα οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο όπου σε κάποιες περιπτώσεις επιτυγχάνεται μέσω νέκρωσης και σε άλλες μέσω απόπτωσης. Κατ’ αυτόν τον τρόπο τα καρκινικά

κύτταρα καταφέρνουν να επιβιώσουν σε συνθήκες καταπόνησης όπως έλλειψη θρεπτικών συστατικών, υποξίας κλπ. Οι συνθήκες αυτές συναντώνται συνήθως σε περιπτώσεις συμπαγών όγκων που δεν αιματώνονται και χαρακτηρίζονται από χημειοαντοχή και αυξημένο μεταστατικό δυναμικό [Okuyama *et al*., 2010]. Τα δεδομένα μας όσον αφορά την διατήρηση της μεταφρασιμότητας του *c-myc* mRNA σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών, όπως η γλυκόζη, έδειξαν ότι πιθανόν αυτό να επιτυγχάνεται μέσω της αμετάφραστης περιοχής 3΄. Δείξαμε επίσης ότι αναστολή της πολυαδενυλίωσης από το ανάλογο αδενοσίνης, κορδυσεπίνη, σε ήδη καταπονημένα κύτταρα ενίσχυσε περαιτέρω την μεταφρασιμότητα χιμαιρικών mRNA που φέρουν την 3΄UTR του *c-myc*. Η κορδυσεπίνη έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί το AMPK μονοπάτι μέσω φωσφορυλίωσης της α-υπομονάδας της στην θέση Thr^{172} καθώς και της β-υπομονάδας της στην θέση Ser^{108} [Radhi *et al*., 2021]. Σε περιπτώσεις όπου τα ενεργειακά αποθέματα του κυττάρου είναι μειωμένα, όπως στην περίπτωση της έλλειψης γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων, έχουμε επίσης ενεργοποίηση του AMPK μονοπατιού προκειμένου το κύτταρο να αυξήσει την απορρόφηση γλυκόζης και να καλύψει τις ενεργειακές απαιτήσεις του. Μελέτες έχουν δείξει ότι αυτό επιτυγχάνεται μέσω αύξησης της έκφρασης του μεταφορέα γλυκόζης glut-1 [Wu *et al*., 2013], ο οποίος αποτελεί και γονίδιο στόχο του *c-myc*. Τα δεδομένα αυτά θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν το εύρημά μας όσον αφορά την αυξημένη μεταφρασιμότητα από την 3΄ UTR του *c-myc* σε συνθήκες στρες και υπό την παρουσία κορδυσεπίνης.

Τα μέχρι τώρα δεδομένα έχουν δείξει ότι οι μηχανισμοί που συνήθως κινητοποιούνται προκειμένου να ‘’διασώσουν’’ την μετάφραση συγκεκριμένων μηνυμάτων RNA εντοπίζονται στην αμετάφραστη περιοχή 5΄, είτε πρόκειται για εσωτερικές θέσεις εισόδου ριβοσωμάτων (IRES), είτε για ανοδικά πλαίσια ανάγνωσης (uORFs) [[Holcik and Sonenberg, 2005]. Όσον αφορά το *c-myc*, είναι επίσης γνωστό ότι μέσω του IRES, επιτυγχάνεται η μετάφραση του μηνύματος RNA κατόπιν της δράσης γενοτοξικών και αποπτωτικών παραγόντων και σ ’αυτό συμβάλει το μονοπάτι σηματοδότησης των MAP κινασών [Stoneley *et al*., 2000; Subkhankulova *et al*., 2001]. Επιπρόσθετα, μελέτες που σχετίζονται με την επίδραση του κυτταρικού στρες στην γονιδιακή έκφραση σε κύτταρα NIH3T3 έδειξαν ότι η καταπόνηση μπορεί να μεταβάλλει δραστικά την απόκριση του κυττάρου μέσω εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης που λαμβάνει χώρα στη αμετάφραστη περιοχή 3΄

των μηνυμάτων RNA. Συγκεκριμένα, μελέτη της επίδρασης μεταρσενικώδους νατρίου στην κυτταρική αυτή σειρά έδειξε ότι προτιμώνται ‘’κοντινά’’ σήματα πολυαδενυλίωσης από το κύτταρο με αποτέλεσμα την παραγωγή μεταγράφων με αρκετά πιο βραχείες αμετάφραστες περιοχές 3΄. Στην προκειμένη περίπτωση, μετάγραφα με βραχείες 3΄ UTRs στερούνται πιθανών περιοχών πρόσδεσης miRNAs, τα οποία στην πλειονότητα των περιπτώσεων οδηγούν στην αποικοδόμηση του mRNA στόχου τους. Η πλειοψηφία των μεταγράφων όσον αφορά την συγκεκριμένη μελέτη αντιστοιχούν σε γονίδια που ενέχονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση [Zheng *et al.,* 2018].

Στην περίπτωση του *c-myc*, δύο καλά συντηρημένα σήματα πολυαδενυλίωσης (pAs) απαντώνται στην αμετάφραστη περιοχή 3΄ όπως φαίνεται στην εικόνα 26. Πιθανή επιλογή του κοντινού pA έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μεταγράφων με βραχείες 3΄ UTRs. Με την βοήθεια της βάσης δεδομένων miRDB, προβλέφθηκε ότι χάνονται περιοχές πρόσδεσης miRNAs όπως περιγράφονται στον πίνακα 4. Στην πλειοψηφία τους, τα miRNAs που εντοπίστηκαν να στοχεύουν την συγκεκριμένη περιοχή έχουν ογκοκατασταλτική και αποπτωτική δράση. Είναι λοιπόν πολύ πιθανό, αναστολή της δράσης τους μέσω εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης και κατ’ επέκταση απώλεια των θέσεων πρόσδεσής τους να οδηγεί στην διατήρηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων μέσω ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων όπως το *c-myc*. Επιπρόσθετα έχει δειχθεί ότι κάτω από συνθήκες διατροφικού στρες και κυτταρικής καταπόνησης ενεργοποιούνται μηχανισμοί που προάγουν την εναλλακτική πολυαδενυλίωση (Sadek *et al*., 2019), κάτι το οποίο θα μπορούσε να δικαιολογήσει τα αποτελέσματά μας όσον αφορά την διάσωση της έκφρασης του *c-myc* μέσω της 3΄ UTR σε συνθήκες έλλειψης γλυκόζης.

Καθίσταται λοιπόν κατανοητό ότι κάτω από μια πληθώρα διαφορετικών συνθηκών για το κύτταρο κινητοποιούνται διάφοροι μηχανισμοί προκειμένου τα το *c-myc* να διατηρηθεί σε επίπεδα τέτοια που να εξυπηρετούν τις ανάγκες του είτε αυτές αφορούν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο είτε την επιβίωση υπό συνθήκες στρες.



Εικόνα 26. Σήματα πολυαδενυλίωσης (pAs) στην 3΄ αμετάφραστη περιοχή του C- MYC

Target Score	miRNA name
80	hsa-miR-548e-5p
79	hsa-miR-12129
68	hsa-miR-369-3p
64	hsa-miR-10527-5p
59	hsa-miR-548c-3p
57	hsa-miR-629-5p
53	hsa-miR-24-3p
50	hsa-miR-296-3p

Πίνακας 4. miRNAs που προσδένουν την περιοχή της 3΄UTR αμέσως μετά το πρώτο pA όπως προβλέφθηκαν από την βάση δεδομένων miRDB.

Περίληψη

Τίτλος: ***Ανάλυση της συμβολής των ρυθμιστικών περιοχών του c-myc mRNA στην μετάφραση μέσω καλύμματος 5΄ και εσωτερικής θέσης εισόδου ριβοσωμάτων.***

Το πρωτο-ογκογονίδιο *c-myc* αποτελεί έναν πολύ σημαντικό ρυθμιστή κυτταρικών διεργασιών όπως ο πολλαπλασιασμός, η ανάπτυξη, διαφοροποίηση και απόπτωση. Απορρύθμιση της έκφρασής του συνδέεται άμεσα με την καρκινογένεση. Πληθώρα μελετών έχουν δείξει ότι το *c-myc* ως μεταγραφικός παράγοντας λειτουργεί μέσω διαμόρφωσης των επιπέδων έκφρασής του και ότι ακόμη και μικρές διακυμάνσεις μπορεί να παίξουν καταλυτικό ρόλο τόσο στις φυσιολογικές όσο και τις παθολογικές διεργασίες που ελέγχονται από την έκφραση του γονιδίου αυτού. Η μικρο-ρύθμιση της έκφρασης του *c-myc* επιτυγχάνεται μέσω μηχανισμών που δρουν στο επίπεδο της μεταγραφής, της μετάφρασης και της αποικοδόμησης του mRNA και της πρωτεΐνης του.

Ο μετα-μεταγραφικός έλεγχος παίζει σπουδαίο ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης του *c-myc* τόσο στο επίπεδο της σταθερότητας του mRNA όσο και της μετάφρασής του. Οι ρυθμιστικοί αυτοί μηχανισμοί σε ένα μεγάλο ποσοστό έχουν διασαφηνιστεί. Οι αρχικές μελέτες είχαν εστιαστεί κυρίως στον έλεγχο της αποικοδόμησης του *c-myc* mRNA μέσω διεξοδικής ανάλυσης της συνεισφοράς διαφόρων ρυθμιστικών παραγόντων *cis* και *trans* καθώς και του τρόπου με τον οποίο αυτοί λειτουργούν. Οι αμετάφραστες περιοχές 5΄και 3΄ που εδράζονται στα άκρα του μηνύματος RNA παίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταφρασιμότητά του. Η αμετάφραστη περιοχή 5΄που κωδικοποιείται από το εξώνιο 1 του γονιδίου περιέχει μία εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος (IRES), της οποίας ο ρόλος είναι να διατηρεί την έκφραση του *c-myc* σε λειτουργικά επίπεδα κατά την διάρκεια φυσιολογικών και παθολογικών συνθηκών όπως η φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση, το γενοτοξικό στρες και οι ιικές μολύνσεις. Στο άλλο άκρο του μηνύματος εδράζεται η αμετάφραστη περιοχή 3΄, η οποία εκτός του αποδεδειγμένου ρόλου της στην αποαδενυλίωση και αποικοδόμηση του, έχει δειχθεί ότι ασκεί μεταφραστικό έλεγχο μέσω miRNAs και πρωτεϊνών που προσδένουν την περιοχή.

Εκτός των ρυθμιστικών στοιχείων *cis* που εδράζονται στις αμετάφραστες περιοχές του μηνύματος, το *c-myc* περιέχει και μια αλληλουχία στην κωδική του περιοχή, η οποία μπορεί να επηρεάσει τόσο την σταθερότητα όσο και την μεταφρασιμότητά του. Η αλληλουχία αυτή, με την ονομασία καθοριστικό στοιχεία αστάθειας της κωδικής περιοχής (CRD), αποτελείται από τα τελευταία 249 νουκλεοτίδια της περιοχής και την καθιστά ασταθή μέσω μεταφραστικής παύσης λόγω της ύπαρξης σπανίων κωδικονίων αργινίνης και θρεονίνης. Το αποτέλεσμα είναι η ύπαρξη ενός σημείου που δεν προστατεύεται από ριβοσώματα, το οποίο γίνεται στόχος ριβονουκλεασών εκτός και αν προστατεύεται από την πρωτεΐνη πρόσδεσης IGF2BP1 στην αλληλουχία CRD. Έχει επίσης προταθεί ότι πρόσδεση της IGF2BP1 στο στοιχείο CRD έχει σαν αποτέλεσμα την αποθήκευση του *c-myc* mRNA σε αμετάφραστα ριβονουκλεοπρωτεινικά σωματίδια, επηρεάζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την μετάφρασή του.

Η συμβολή καθενός από τα προαναφερθέντα ρυθμιστικά στοιχεία στην μεταφρασιμότητα του *c-myc* έχει μελετηθεί κυρίως εστιάζοντας στο κάθε ένα ξεχωριστά. Η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στην διερεύνηση της συμβολής των διαφόρων ρυθμιστικών περιοχών ανεξάρτητα και σε συνδυασμό μεταξύ τους στον μεταφραστικό έλεγχο κάτω από φυσιολογικές και στρεσογόνες συνθήκες.

Οι αλληλεπιδράσεις των ρυθμιστικών περιοχών μεταξύ τους και ο ρόλος που παίζουν στην ρύθμιση της έκφρασης του *c-myc* διερευνήθηκαν μελετώντας την μεταφρασιμότητα του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης *Firefly* σε μονοσιστρονικούς και δισιστρονικούς φορείς έκφρασης που έφεραν συνδυασμούς των 5΄ UTR, 3΄ UTR και CRD. Η παρουσία της 5΄UTR που περιέχει μια εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος οδήγησε σε αύξηση της μεταφρασιμότητας του μηνύματος κατά 50%. Μείωση κατά 50% παρατηρήθηκε όταν ο φορέας έκφρασης έφερε το στοιχείο CRD εντός πλαισίου ανάγνωσης ανεξάρτητα από την παρουσία του αγρίου τύπου της πρωτεΐνης IGF2BP1. Υπερέκφραση μιας μεταλλαγμένης μορφής της IGF2BP1 στην θέση 396 (καταστέλλει την φωσφορυλίωση από την Src κινάση) μείωσε την μετάφραση του μηνύματος RNA που έφερε το CRD σε διάφορες θέσεις. Η παρουσία της 3΄UTR αύξησε την μεταφρασιμότητα σε μεγάλο βαθμό επηρεάζοντας την μετάφραση τόσο μέσω καλύμματος 5΄ όσο και μέσω εσωτερικής θέσης εισόδου ριβοσώματος (IRES). Επιπρόσθετα η αμετάφραστη περιοχή 3΄αποκατέστησε την εξαρτώμενη από το κάλυμμα 5΄ μετάφραση υπό την παρουσία

του αναστολέα πολυαδενυλίωσης, κορδυσεπίνη, καθώς επίσης και υπό την επήρεια μεταβολικού στρες. Η απουσία μακράς πολυαδενiλικής ουράς στην προκειμένη περίπτωση είχε ενισχυτική δράση όσον αφορά στην ‘’διάσωση της μετάφρασης’’ υπό συνθήκες κυτταρικής καταπόνησης.

Abstract

Title: ***Analysis of the contribution of c-myc mRNA constituents upon cap and IRES mediated translation***

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. Orchestrated regulatory mechanisms, acting at multiple stages, including control of *trans*cription, *trans*lation and decay of both mRNA and protein, attain the fine tuning of *c-myc* expression.

Post-*trans*criptional control plays an important role for *c-myc* regulation at the level of both mRNA stability and *trans*lation, and many aspects of these regulatory mechanisms have been elucidated. Initial studies focused mostly upon the control of the *c-myc* mRNA decay by exhaustively studying the contribution of *cis* elements and *trans* factors and their mode of action. The *cis* and *trans* elements controlling *c-myc* mRNA *trans*lation have also been extensively investigated. The 5′ and 3′ un*trans*lated regions (UTRs) of *c-myc* mRNA, located at the opposite ends of the message, play important roles in modulating its *trans*lation. The 5′ UTR of *c-myc*, encoded by exon1, is postulated to contain an internal ribosome entry site (IRES) that functions to maintain *c-myc* expression during certain physiological and pathophysiological conditions, including G2/M cell cycle phase, apoptosis, genotoxic stress, and viral infection. At the other end of the message, the *c-myc* 3′UTR, besides its established role in the rapid deadenylation and decay has also been reported to exert *trans*lational control via regulatory miRNA and RNA binding proteins (RPBs).

In addition to regulatory *cis* elements located in the UTRs, the *c-myc* mRNA contains a sequence within its coding region, which may affect both stability and

*trans*latability. This sequence, the coding region instability determinant (CRD), encompasses the last 249 nucleotides of the coding region of the message. It functions independently of the AU rich element to render the mRNA unstable. *Trans*lational pausing in the CRD due to the presence of a rare arginine (CGA) codon and to an adjacent threonine (ACA) codon generates a ribosome deficient region, vulnerable to endonuclease attack, unless shielded by the CRD binding protein IGF2BP1, linking *trans*lational rate to degradation. Conversely, it has been proposed that IGF2BP1 binding may sequester the *c-myc* mRNA to the un*trans*lated ribonucleoprotein (RNP) fraction affecting its *trans*lation. IGF2BP1 recognizes, besides the *c-myc* mRNA a number of other mRNAs, binding to either their 5′ or 3′ UTRs, or to their coding region. It has been shown that IGF2BP1 phosphorylation releases the protein from its target message, permitting *trans*lational activation. This mechanism is crucial for the localized expression of genes, like, for example, of beta-actin in actin-rich protrusions in primary fibroblasts and neurons.

At the 3′ end, the poly (A) tail present in the vast majority of eukaryotic mRNAs, has been shown to be a potent stimulator of *trans*lation. Through association with its cytoplasmic binding partner, the poly (A) binding protein, the poly (A) tail participates in key steps of the *trans*lation initiation pathway. However, regarding *c-myc* mRNA it has been shown that the lack of a long poly (A) tail does not impede *trans*latability. However, *trans*lation via the *c-myc* IRES requires the presence of the poly (A) tail, recruiting a subset of the *trans*lation initiation factors distinct to those required for cap mediated *trans*lation. The contribution of each of the above *cis* elements to *c-myc* mRNA *trans*latability has been approached mostly through studying each one individually. However, regulatory interactions between *cis* mRNA elements upon *trans*latability have been reported for a number of viral and cellular messages.

Fine tuning of *c-myc* expression is critical for its action and is achieved by several regulatory mechanisms. The contribution of *c-myc* mRNA regulatory sequences on its *trans*lational control has been investigated individually. However, putative interactions have not been addressed so far. The effect of these interactions upon the *trans*latability of mono*cis*tronic and bi*cis*tronic chimaeric mRNAs, carrying combinations of the *c-myc* mRNA 5′ UTR, 3′ UTR, and coding region instability element (CRD) was investigated in this study. The presence of the

5′ UTR induced an increase in *trans*latability by 50%. The presence of the CRD element, when in frame, reduced *trans*latability by approximately 50%, regardless of the expression levels of the wild type CRD binding protein (IGF2BP1). Conversely, overexpression of a mutated IGF2BP1 (Y396F) further impeded *trans*lation of the chimaeric mRNAs carrying its cognate sequences. The presence of the *c-myc* 3′UTR increased *trans*latability by approximately 300% affecting both cap and *c-myc* internal ribosome entry site (IRES) mediated *trans*lation. In addition, 3′UTR rescued the cap mediated *trans*lation in the presence of the polyadenylation inhibitor cordycepin. Furthermore, the 3′UTR rescued cap mediated *trans*lation under metabolic stress conditions and this was enhanced in the absence of a long poly (A) tail.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ahmadi, S. E., Rahimi, S., Zarandi, B., Chegeni, R., & Safa, M. (2021). MYC: a multipurpose oncogene with prognostic and therapeutic implications in blood malignancies. *Journal of hematology & oncology* ***14*****(1),** 121

Amati, B., Dalton, S., Brooks, M.W., Littlewood, T.D., Evan GI, Land H. (1992) *Trans*criptional activation by the human *c-myc* oncoprotein in yeast requires interaction with Max. *Nature* **359:**423–426,

Amati, B., Alevizopoulos, K., Vlach, J. (1998) Myc and the cell cycle, *Front Biosci.*, **3:** D250–D268.

Anantharaman, V., Koonin, E.V., Aravind, L. (2002) Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism. *Nucleic Acids Res* **30:** 1427–64.

Aronov, S., Marx, R., Ginzburg, I. (1999) Identification of 3′ UTR regions implicated in tau mRNA stabilization in neuronal cells, *J. Mol. Neurosci.,* **12:** 131–145.

Arrick, B.A., Lee, A.L., Grendell, R.L. and Derynck, R. (1991) Inhibition of *trans*lation of *trans*forming growth factor-β3 mRNA by its 5′ un*trans*lated region. *Mol. Cell. Biol*. **11,** 4306–4313.

Atlas, R., Behar, L., Elliot, 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.

Ayer, D.E,, Kretzner, L., Eisenman, R.N. (1993) Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc *trans*criptional activity. *Cell* **72:**211–222.

Bailey, S. T., Smith, A. M., Kardos, J., Wobker, S. E., Wilson, H. L., Krishnan, B., Saito, R., Lee, H. J., Zhang, J., Eaton, S. C., Williams, L. A., Manocha, U., Peters, D. J., Pan, X., Carroll, T. J., Felsher, D. W., Walter, V., Zhang, Q., Parker, J. S., Yeh, J. J., … Kim, W. Y. (2017). MYC activation cooperates with Vhl and Ink4a/Arf loss to induce clear cell renal cell carcinoma. *Nature* communications, **8:** 15770

Baker, J. J., Liu, P., Robertson, E. J., Efstratiadis, A. (1993) Role of insulin–like growth factors in embryonic and postnatal growth, *Cell*, **75:** 73–82.

Banerjee A. (1980) 5´-terminal cap structure in eukaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol Rev.* **44**: 175–205.

Barbosa, C., Peixeiro, I., Romão, L. (2013) Gene expression regulation by upstream open reading frames and human disease. *PLoS Genet***. 9(8):**e1003529.

Barnes, T., Kim, W. C., Mantha, A. K., Kim, S. E., Izumi, T., Mitra, S., & Lee, C. H. (2009). Identification of Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) as the endoribonuclease that cleaves c-myc mRNA. *Nucleic acids research***,** ***37*****(12):** 3946–3958**.**

Barreau, C., Watrin, T., Beverley Osborne, H., Paillard, L. (2006) Protein expression is increased by a class III AU-rich elementand tethered CUG-BP1. *Biochem Biophys Res Commun* **347:**723–730.

Bazzini, A.A., Lee, M.T., Giraldez, A.J. (2012) Ribosome profiling shows that miR-430 reduces *trans*lation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science,* **336 (6078):**233-7.

Bentley, D. L., Groudine, M., (1988) Sequences requirements for premature termination in the human c–Myc gene. *Cell*, **53:** 273–282.

Berberich, S.J., Cole, M.D.. (1992) Casein kinase II inhibits the DNA-binding activity of Max homodimers but not Myc/Max heterodimers. *Genes Dev.* **6:** 166–176.

Bernstein, J., Sella, O., Le, S., Elroy Stein O. (1997) PDGF/*cis* mRNA leader contains a differentiation–linked internal ribosome entry site, *J. Biol. Chem*, **272:** 9356–9362.

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.

Beroukhim, R., Mermel, C. H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J. S., Dobson, J., Urashima, M., Mc Henry, K. T., Pinchback, R. M., Ligon, A. H., Cho, Y. J., Haery, L., Greulich, H., Reich, M., Winckler, W., Lawrence, M. S., Weir, B. A., … Meyerson, M. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, ***463*****(7283):** 899–905.

Bieda, M., Xu, X., Singer, M. A., Green, R., and Farnham, P. J. (2006) Unbiased location analysis of E2F1-binding sites suggests a widespread role for E2F1 in the human genome. *Genome Research*, **16(5)**: 595–605,

Birney, E., Stamatoyannopoulos, J.A., Dutta, A., Guigo, R., Gingeras, T.R., Margulies E.H., Weng, Z., Snyderm, M., Dermitzakis, E.T., *et al* (2007) Identification and analysis of functional elements in 1 % of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature,* **447**:799–816.

Blackwell, T. K., Huang, J., Ma, A., Kretzner, L., Alt, F. W., Eisenman, R. N., & Weintraub, H. (1993). Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Molecular and cellular biology*, ***13*****(9):** 5216–5224.

Blackwell, T.K., Kretzner, L., Blackwood, E.M., Eisenman, R.N., Weintraub, H. (1990) Sequence-specific DNA binding by the *c-myc* protein. *Science,* **250:**1149–1151.

Blackwood, E.M., Eisenman, R.N. (1991) Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science,* **251:** 1211–1217.

Blyth, K., Terry, A., O'Hara, M., Baxter, E. W., Campbell, M., Stewart, M., Donehower, L. A., Onions, D. E., Neil, J. C., & Cameron, E. R. (1995). Synergy between a human c-myc *trans*gene and p53 null genotype in murine thymic lymphomas: contrasting effects of homozygous and heterozygous p53 loss. *Oncogene*, ***10*(9):** 1717–1723.

Bonnieu, A., Roux, P., Marty, L., Jeanteur, P., Piechaczyk, M. (1990) UUUA motifs are dispensable for rapid degradation of the mouse *c-myc* RNA. *Oncogene*. **5(10):**1585-8.

Brewer, G. (1991) An A + U-rich element RNA-binding factor regulates *c-myc* mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol*. **11(5):** 2460-6.

Broix, L., Turchetto, S., Nguyen, L. (2021). Coordination between *Trans*port and Local *Trans*lation in Neurons. *Trends in cell biology*, ***31*(5):** 372–386.

Burd, C. G., Dreyfuss, G. (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA–binding proteins, *Science*, **265:** 615–621.

Busà, R., Paronetto, M. P., Farini, D., Pierantozzi, E., Botti, F., Angelini, D. F., Attisani, F., Vespasiani, G., & Sette, C. (2007). The RNA-binding protein Sam68 contributes to proliferation and survival of human prostate cancer cells. *Oncogene*, ***26*(30):** 4372–4382.

Buschauer, R., Matsuo, Y., Sugiyama, T., Chen, Y. H., Alhusaini, N., Sweet, T., Ikeuchi, K., Cheng, J., Matsuki, Y., Nobuta, R., Gilmozzi, A., Berninghausen, O., Tesina, P., Becker, T., Coller, J., Inada, T., & Beckmann, R. (2020). The Ccr4-Not complex monitors the *trans*lating ribosome for codon optimality. *Science (New York, N.Y.)*, *368:***6488**.

Butler, J., Kadonaga, J. (2001) Enhancer–promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs *Genes and Dev*. **15**: 2515 – 2519.

Calvo, S.E., Pagliarini, D.J., Mootha, V.K. (2009) Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proc Natl Acad Sci USA,* **106:**7507–7512.

García-Gutiérrez, L., Delgado, M. D., & León, J. (2019). MYC Oncogene Contributions to Release of Cell Cycle Brakes. *Genes*, ***10*(3):** 244.

Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M. C., Maeda, N., *et al*.; (2005) FANTOM Consortium; RIKEN Genome Exploration Research Group and Genome Science Group (Genome Network Project Core Group). The *trans*criptional landscape of the mammalian genome. *Science,* **309**:1559-63.

Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., Semple, C.A., Taylor, M.S., Engstrom, P.G., Frith, M.C., et al. (2006) Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet.* **38**:626–635.

Chang, T. C., Yu, D., Lee, Y. S., Wentzel, E. A., Arking, D. E., West, K. M., Dang, C. V., Thomas-Tikhonenko, A., & Mendell, J. T. (2008). Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nature genetics*, ***40*(1):** 43–50.

Chatterjee, S., Pal, J.K. (2009) Role of 5´ and 3´ un*trans*lated regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell,* **101:**251–262.

Chaudhuri, J., Chowdhury, D. and Maitra, U. (1999) Distinct functions of eukaryotic *trans*lation initiation factors eIF1A and eIF3 in the formation of the 40S ribosomal preinitiation complex. *J Biol Chem.* **274(25):** 17975 – 17980.

Chelly, J. and Mandel, J.L. (2001) Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat. Rev. Genet*. **2**, 669–680.

Chen, J., Kastan, M.B. (2010) 5´–3´UTR interactions regulate p53 mRNA *trans*lation and provide a target for modulating p53 induction after DNA damage. *Genes Dev.* **24:**2146–2156.

Chen, J.M., Ferec, C., Cooper, D.N. (2006) A systematic analysis of disease-associated variants in the 3´ regulatory regions of human protein-coding genes II: the importance of mRNA secondary structure in assessing the functionality of 3´ UTR variants. *Hum Genet.* **120:**301–333.

Chen, Y., Varani, G. (2005) Protein families and RNA recognition. *FEBS J.* **272:** 2088–97.

Chen, H. F., Hsu, C. M., & Huang, Y. S. (2018). CPEB2-dependent *trans*lation of long 3´-UTR Ucp1 mRNA promotes thermogenesis in brown adipose tissue. *The EMBO journal*, ***37*(20):** e99071

Chen, N., Zhang, Y., Adel, M., Kuklin, E. A., Reed, M. L., Mardovin, J. D., Bakthavachalu, B., VijayRaghavan, K., Ramaswami, M., & Griffith, L. C. (2022). Local *trans*lation provides the asymmetric distribution of CaMKII required for associative memory formation. *Current biology, **CB**, **32*(12):** 2730–2738.e5

Chenard, C.A. and Richard, S. (2008) New implications for the QUAKING RNA binding protein in human disease. *J. Neurosci. Res*. **86,** 233–242.

Clemens, M.J. (2001) Initiation factor eIF2 alpha phosphorylation in stress responses and apoptosis. *Prog Mol Subcell Biol.* **27:** 57 – 89.

Cobbold, L.C., Spriggs, K.A., Haines, S.J., Dobbyn, H.C., Hayes C., de Moor, C.H., Lilley, K.S., Bushell, M., Willis, A.E. (2008) Identification of internal ribosome entry segment (IRES)-*trans*-acting factors for the Myc family of IRESs. *Mol Cell Biol.* **28**:40–49.

Conacci-Sorrell, M., McFerrin, L., Eisenman, R.N. (2014) An overview of MYC and its interactome. *Cold Spring Harb Perspect Med*. **4(1)**: a014357.

Connolly, E., Braunstein, S., Formenti, S., and Schneider, R.J. (2006) Hypoxia inhibits protein synthesis through a 4E-BP1 and elongation factor 2 kinase pathway controlled by mTOR and uncoupled in breast cancer cells. *Mol. Cell Biol*. ***26:*** 3955–3965.

Conway, A., Van Nostrand, E., Pratt, G., Aigner, S., Wilbert, M., Sundararaman, B., Freese, P., Lambert, N., Sathe, S., Liang, T., Essex, A., Landais, S., Burge, C., Jones, D., and Yeo, G. (2016). Enhanced CLIP Uncovers IMP Protein-RNA Targets in Human Pluripotent Stem Cells Important for Cell Adhesion and Survival. *Cell Reports*, **15(3):** 666–679

Cooper, S.J., Trinklein, N.D., Anton, E.D., Nguyen, L., Myers, R.M. (2006) Comprehensive analysis of *trans*criptional promoter structure and function in 1% of the human genome. *Genome Res.* **16**: 1–10.

Craig, E. A., and Spiegelman, V. S. (2011) Inhibition of coding region determinant binding protein sensitizes melanoma cells to chemotherapeutic agents. *Pigment Cell and Melanoma Research*, **25(1):** 83–87.

Craig, E. A., Weber, J. D., and Spiegelman, V. S. (2012) Involvement of the mRNA binding protein CRD-BP in the regulation of metastatic melanoma cell proliferation and invasion by hypoxia. *Journal of Cell Science*, **125(24)**: 5950–5954.

Creancier L., Mercier P., Prats A. C., Morello D. (2001) c–Myc internal Ribosome entry site activity is developmentally controlled and subjected to a strong *trans*lational repression in adult *trans*genic mice. *Mol. Cell. Biol*. **21:** 1833–1840.

Cui, H., Onyango, P., Brandenburg, S., Wu, Y., Hsieh, C. L., Feinberg, A. P. (2002) Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2, *Cancer Res.,* **62:** 6442–6446.

Dang, C. V., (1999) c–Myc target genes involved in cell growth, apoptosis and metabolism. *Mol Cell Biol*. **19:** 1–11.

Davis, A. C., Wims, M., Spotts, G. D., Hann, S. R., Bradley, A. (1993) A null c–Myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev*. **7:** 671–682.

Davuluri, R.V., Suzuki, Y., Sugano, S., Plass, C., Huang, T.H. (2008) The functional consequences of alternative promoter use in mammalian genomes. *Trends Genet.* **24**: 167–177.

Decker, C. J., and Parker, R. (1994). Mechanisms of mRNA degradation in eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, **19(8),** 336–340.

Deviatkin, A. A., Simonov, R. A., Trutneva, K. A., Maznina, A. A., Soroka, A. B., Kogan, A. A., Feoktistova, S. G., Khavina, E. M., Mityaeva, O. N., & Volchkov, P. Y. (2023). Cap-Independent Circular mRNA Translation Efficiency. *Vaccines*, ***11*****(2):** 238

Di Giammartino, D.C., Shi, Y., and Manley, J.L. (2013) PARP1 Represses PAP and Inhibits Polyadenylation during Heat Shock. *Mol. Cell, **49***: 7–17.

Dimitriadis, E., Trangas, T., Milatos, S., Foukas, P.G., Gioulbasanis, I., Courtis, N., Nielsen, F.C., Pandis, N., Dafni, U., Bardi, G., Ioannidis, P. (2007) Expression of oncofetal RNA-binding protein IGF2BP1 predicts clinical outcome in colon cancer. *Int J Cancer,* **121**: 486-94.

Dixon, D.A., Tolley N.D., King P.H., Nabos, L.B., McIntyre, T.M., Zimmerman, G. A., Prescott, S. M. (2001) Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase–2 expression in colon cancer cells, *J. Clin. Invest.***108:** 1657–1665.

Dmitriev, S.E., Andreev, D.E., Adlanova, Z.V., Terenin, I.M., Shatskii, I.N. (2009) Efficient cap-dependent in vitro and in vivo *trans*lation of mammalian mRNAs with long and highly structured 5´-un*trans*lated regions. *Mol Biol.***43:**119–125.

Dotto, G. P., Gliman, M. Z., Maruyama, M., Weinberg, R. A. (1986) *c–myc* and *c–fos* expression in differentiating mouse primary ceratinocytes. *EMBO Journal*, **5:** 2853–2857.

Doyle, G. A. R., Betz, N. A., Leeds, P. F., Fleisig, A. J., Prokipcak, R. D., Ross, J. (1998) The c–myc coding region determinant–binding protein: a member of a KH domain RNA–binding proteins. *Nucleic Acids Res.* **26:** 5036–5044.

Drewell, R. A., Brenton, J. D., Ainscough, J. F., Barton, S. C., Hilton, K. J., Arney, K. L., Dandolo, L., Surani, M. A. (2000) Deletion of a silencer element disrupts H19 imprinting independently of a DNA methylation epigenetic switch. *Development*, **127:** 3419–3428.

Duan, Z.J., Fang, X., Rohde, A., Han, H., Stamatoyannopoulos, G., Li, Q. (2002) Developmental specificity of recruitment of TBP to the TATA box of the human gamma-globin gene. *Proc Natl Acad Sci USA,* **99**: 5509–5514.

Eberhardt, W., Dolle, A, Akool, el-S, Pfeilschifter, J. (2007) Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther.* **114:**56–73.

Edelmann, J., Tausch, E., Landau, D. A., Robrecht, S., Bahlo, J., Fischer, K., Fink, A. M., Bloehdorn, J., Holzmann, K., Böttcher, S., Werner, L., Kneba, M., Gribben, J. G., Neuberg, D. S., Wu, C. J., Hallek, M., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2017). Frequent evolution of copy number alterations in CLL following first-line treatment with FC(R) is enriched with TP53 alterations: results from the CLL8 trial. *Leukemia*, ***31*(3):** 734–738.

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

Edwards-Hicks, J., Su, H., Mangolini, M., Yoneten, K. K., Wills, J., Rodriguez-Blanco, G., Young, C., Cho, K., Barker, H., Muir, M., Guerrieri, A. N., Li, X. F., White, R., Manasterski, P., Mandrou, E., Wills, K., Chen, J., Abraham, E., Sateri, K., Qian, B. Z., … Finch, A. J. (2022). MYC sensitises cells to apoptosis by driving energetic demand. *Nature communications*, ***13*(1)**: 4674.

Eliers, M. (1999**)** Control of cell proliferation by Myc family genes. *Mol. Cells,* **9:**1–6.

Elkon, R., Zlotorynski, E., Zeller, K.I., Agami, R. (2010) Major role for mRNA stability in shaping the kinetics of gene induction. *BMC Genomics,* **11:**259.

Elson, A., Deng, C., Campos–Torres J., Donehower, L. A., Leber, P. (1995) The MMTV/c–Myc *trans*gene and p53 null alleles collaborate to induce T–cell lymphomas, but not mammary carcinomas in *trans*genic mice. *Oncogene*, **11:** 181–190.

Elton, T.S., Sansom, S.E., Martin, M.M. (2010) Trisomy-21 gene dosage over-expression of miRNAs results in the haploinsufficiency of specific target proteins. *RNA Biol.* **7:**540–547.

Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., Izaurralde, E. (2009) Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA,* **15 (1):** 21–32.

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

Evans, J. R., Mitchell, S. A., Spriggs, K. A., Ostrowski, J., Bomsztyk, K., Ostarek, D., and Willis, A. E. (2003) Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the *c-myc* internal ribosome entry segment in vitro and in vivo. *Oncogene*, **22(39)**: 8012–8020.

Fähling, M., Mrowka, R., Steege, A., Nebrich, G., Perlewitz, A., Persson, P. B., & Thiele, B. J. (2006). *Trans*lational control of collagen prolyl 4-hydroxylase-alpha(I) gene expression under hypoxia. *The Journal of biological chemistry*, ***281*(36):** 26089–26101.

Farrell, A. S., Joly, M. M., Allen-Petersen, B. L., Worth, P. J., Lanciault, C., Sauer, D., Link, J., Pelz, C., Heiser, L. M., Morton, J. P., Muthalagu, N., Hoffman, M. T., Manning, S. L., Pratt, E. D., Kendsersky, N. D., Egbukichi, N., Amery, T. S., Thoma, M. C., Jenny, Z. P., Rhim, A. D., … Sears, R. C. (2017). MYC regulates ductal-neuroendocrine lineage plasticity in pancreatic ductal adenocarcinoma associated with poor outcome and chemoresistance. *Nature communications*, ***8*(1):** 1728

Fernandez, P. C., Frank, S. R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A., and Amati, B. (2003) Genomic targets of the human *c-myc* protein. *Genes and Development,* **17(9):** 1115–1129.

Filbin, M.E., Kieft, J.S. (2009) Toward a structural understanding of IRES RNA function. *Curr Opin Struct Bio.,* **19:**267–276.

Frescas, D., Pagano, M. (2008) Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat Rev Cancer,* **8(6):**438-49.

Gaba, A., Wang, Z., Krishnamoorthy, T., Hinnebusch, A.G., Sachs, M.S. (2001) Physical evidence of distinct mechanisms of *trans*lational control by upstream open reding frames. *EMBO J.* **20(22)**:6453-63

Gabut, M., Chaudhry, S., Blencowe, B.J. (2008) SnapShot: the splicing regulatory machinery. *Cell,* **133**:192.e1.

Gallie, D.R (1991) The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA *trans*lational efficiency. *Genes Dev.* **5:**2108–2116.

Gerstberger, S., Hafner, M., Tuschl, T. (2014) A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet*. **15**:829–45.

Ghosh, T., Soni, K., Scaria, V., Halimani, M., Bhattacharjee, C., Pillai, B. (2008) MicroRNA-mediated up-regulation of an alternatively polyadenylated variant of the mouse cytoplasmic {beta}-actingene. *Nucleic Acids Res.* **36:**6318–6332.

Gingras, A.C., Raught, B., Sonenberg, N. (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of *trans*lation. *Annu Rev Biochem.* **68**: 913-963.

Glisovic, T., Bachorik, J.L., Yong, J., Dreyfuss, G. (2008) RNA-binding proteins and post-*trans*criptional gene regulation. *FEBS Lett.* **582**: 1977–1986.

Godet, A.C., David, F., Hantelys, F., Tatin, F., Lacazette, E., Garmy-Susini, B., Prats, A.C. (2019) IRES *Trans*-Acting Factors, Key Actors of the Stress Response. *Int J Mol Sci*. **20(4)**:924

Gorgoni, B., **Gray, N.K**. (2004) The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective. *Brief Funct Genomic Proteomic.* **3:**125–141.

Grandori, C., Cowley, S.M., James, L.P., Eisenman, R.N. (2000) The Myc/Max/Mad network and the *trans*criptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **16:**653-99.

Gross, J.D., Moerke, N.J., Von Der Haar, T., Lugovskoy, A.A., Sachs, A.B., McCarthy, J.E., Wagner, G. (2003) Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell,* **115(6):** 739-750.

Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R., & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic acids research*, ***36*(Web Server issue)**, W70–W74.

Gu, L. Shigemasa, K., Ohama, K. (2004) Increased expression of IGFII mRNA-binding protein 1 mRNA is associated with an advanced clinical stage and poor prognosis in patients with ovarian cancer. *Int. J. Oncol.* **24:** 671–678.

Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jungkamp, A. C., Munschauer, M., Ulrich, A., Wardle, G. S., Dewell, S., Zavolan, M., and Tuschl, T. (2010) PAR-CliP - A Method to Identify *Trans*criptome-wide the Binding Sites of RNA Binding Proteins. *Journal of Visualized Experiments*, **41:** 2034.

Hansen, V. O., Hammer, N. A., Nielsen, J., Madsen, M., Dalbaeck, Ch., Wewer, U. M., Christiansen, J., Nielsen, F. C. (2004) Dwarfism and impaired gut development in Inslulin–like growth factor II mRNA–binding protein 1–deficient mice. *Mol. Cell. Biology*, **24:** 4448–4464.

Herrick, D. J., & Ross, J. (1994). The half-life of *c-myc* mRNA in growing and serum-stimulated cells: influence of the coding and 3´ un*trans*lated regions and role of ribosome *trans*location. *Molecular and cellular biology*, ***14*(3)**: 2119–2128.

Hesketh, R. The Oncogene and Tumor Suppressor Gene (1997) *Facts Book, 2nd Edition, Facts Book Series, Academic Press, Harcourt Brace and Company*,

Holcik, M. and Sonenberg, N. (2005) *Trans*lational control in stress and apoptosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. ***6***: 318–327.

Hollstein, U. (1974) Actinomycin. Chemistry and mechanism of action. *Chemical Reviews,* **74 (6):** 625–652.

Hong, D., and Jeong, S. (2023). 3´UTR Diversity: Expanding Repertoire of RNA Alterations in Human mRNAs. *Molecules and cells*, ***46*(1):** 48–56.

Huang, H., Weng, H., Sun, W., Qin, X., Shi, H., Wu, H., Zhao, B. S., Mesquita, A., Liu, C., Yuan, C. L., Hu, Y. C., Hüttelmaier, S., Skibbe, J. R., Su, R., Deng, X., Dong, L., Sun, M., Li, C., Nachtergaele, S., . . . Chen, J. (2018) Recognition of RNA N6-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and *trans*lation. *Nature Cell Biology*, **20(3)**: 285–295.

Hueber, A.O., Zörnig, M., Lyon, D., Suda, T., Nagata, S., Evan, G.I. (1997) Requirements for the CD95 receptor–ligand pathway in c–Myc–induced apoptosis. *Science*, **278:** 1305–1309.

Huntzinger, E., Izaurralde, E. (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of *trans*lational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet.* **12**:99–110.

Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dictenberg, J., Lorenz, M., Meng, X-H., Bassell, G., Condeeli, J., Singer, R.H. (2005) Spatial regulation of β-actin *trans*lation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1**.** *Nature,* **438:** 512-515.

Iavarone, A., Lasorella, A. (2014) Myc and differentiation: going against the current. *EMBO Rep.* Apr;**15(4)**:324-5.

Ioannidis, P., Mahaira, L.G., Perez, S.A., Gritzapis, A.D., Sotiropoulou, P.A., Kavalakis, G.J., Antsaklis, A., Baxevanis, C.N., Papamichail, M. (2005) IGF2BP1 expression characterizes cord blood CD34 (+) stem cells and affects *c-myc* and IGF-II expression in MCF-7 cancer cells. *J Biol Chem.* **280**: 20086-93.

Ioannidis, P., Havredaki, M., Courtis, 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., Kottaridi, Ch., Dimitriadis, E., Courtis, N., Mahaira, L., Talieri, M., Giannopoulos, A., Iliadis, K., Papaioannou, D., Nasioulas, G., Trangas, T. (2004) Expression of the RNA–binding protein CRD–BP in brain and non–small cell lung tumors. *Cancer Lett.* **209:** 245–250.

Ioannidis, P., Courtis, N., Havredaki, M., Michailakis, E., Tsiapalis, C.M., and Trangas, T. (1999) The polyadenylation inhibitor cordycepin (3′dA) causes a decline in *c-myc* mRNA levels without affecting *c-myc* protein levels. *Oncogene,* **(8):**117–125.

Ipsaro, J.J., Joshua-Tor, L.. (2015) From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nat Struct Mol Biol.* **22**:20–8.

Jame-Chenarboo, F., Ng, H. H., Macdonald, D., & Mahal, L. K. (2022). High-Throughput Analysis Reveals miRNA Upregulating α-2,6-Sialic Acid through Direct miRNA-mRNA Interactions. *ACS central science*, ***8*(11):** 1527–1536.

Jeffares, D.C., Penkett, C.J., Bahler, J. (2008) Rapidly regulated genes are intron poor. *Trends Genet.* **24:**375–378.

Jennings, M.D., Kershaw, C.J., Adomavicius, T., Pavitt, G.D. (2017) Fail-safe control of *trans*lation initiation by dissociation of eIF2α phosphorylated ternary complexes. *Elife*. **18**:6:e24542.

Ji, Z., Lee, J.Y., Pan, Z., Jiang, B., Tian, B. (2009) Progressive lengthening of 3´ un*trans*lated regions of mRNAs by alternative polyadenylation during mouse embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA,* **106**:7028-33.

Jolles, B., Aliouat, A., Stierlé, V., Salhi, S., Jean-Jean, O. (2018) *Trans*lation termination-dependent deadenylation of MYC mRNA in human cells. *Oncotarget*. **9(40):**26171-26182.

Jones, T,R., Cole, M.D. (1987) Rapid cytoplasmic turnover of *c-myc* mRNA: requirement of the 3´ un*trans*lated sequences. *Mol Cell Biol*. **7(12):** 4513-21.

Juin, P., Hueber, A. O., Littlewood, T., Evan, G., (1998) c–Myc–induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev*. **13:** 1367–1381,.

Juven-Gershon, T., Hsu, J,Y., Theisen, J.W., Kadonaga, J.T. (2008) The RNA polymerase II core promoter—the gateway to *trans*cription. *Curr Opin Cell Biol.* **20**:253–259.

Kadomatsu, M., Nakajima, S., Kato, H., Gu, L., Chi, Y., Yao, J., and Kitamura, M. (2012) Cordycepin as a sensitizer to tumor necrosis factor (TNF)-α-induced apoptosis through eukaryotic *trans*lation initiation factor 2α (eIF2α)- and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)-mediated inhibition of nuclear factor (NF)-κB.*Clin. Exp. Immunol.* **(168):**325–332.

Kato, T., Hayama, S., Yamabuki, T., Ishikawa, N., Miyamoto, M., Ito, T., Tsuchiya, E., Kondo, S., Nakamura, Y., Daigo ,Y. (2007) Increased Expression of Insulin-like Growth Factor-II Messenger RNA-Binding Protein 1 Is Associated with Tumor Progression in Patients with Lung Cancer. *Clinical Cancer Research,* **13**: 434-442.

Kaufman, R.J. (2004) Regulation of mRNA *trans*lation by protein folding in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci.* ***29*** 152–158.

Keene, J. D., and Tenenbaum, S. A. (2002) Eukaryotic mRNPs May Represent Post*trans*criptional Operons. *Molecular Cell*, **9(6)**: 1161–1167.

Kim, H,H,, Kuwano, Y., Srikantan, S., Lee, E.K., Martindale, J.L., Gorospe, M. (2009) HuR recruits let-7/RISC to repress *c-myc* expression. *Genes Dev.* **(15):**1743-8.

Kim, J., Lee, J., Iyer, V.R. (2008) Global identification of Myc target genes reveals its direct role in mitochondrial biogenesis and its E-box usage in vivo. *PloS ONE,* **3**: e1798.

Kim, J. H., Paek, K. Y., Choi, K., Kim, T. D., Hahm, B., Kim, K. T., and Jang, S. K. (2003) Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C Modulates *Trans*lation of c-myc mRNA in a Cell Cycle Phase-Dependent Manner. *Molecular and Cellular Biology*, **23(2)**: 708–720,

Kobel, M., Weidensdorfer, D., Reinke, C., Lederer, M., Schmidt, W.D., Zeng, K., Thomssen. C., Hauptmann S., Huttelmaier, S. (2007) Expression of the RNA-binding protein IMP1 correlates with poor prognosis in ovarian carcinoma. *Oncogene,* **26**: 7584-7589.

Komar, A. A., Hatzoglou, M. (2005) Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *J Biol Chem.* **280**:23425–23428.

Koromilas, A. E., Lazaris–Karatzas, A., Sonenberg, N. (1992) mRNAs containing extensive secondary structure in their 5´ non–coding region *trans*late efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF4E. *EMBO J,* **11:** 4153–4158.

Kota, J., Chivukula, R.R., O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Montgomery, C.L., Hwang, H.W., Chang, T.C., Vivekanandan, P., Torbenson, M., Clark, K.R. **(**2009). Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. Cell, **137**:1005–1017

Kozak, M. (1991) A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene Expr*. **1(2):** 111 - 115.

Kozak, M. (1980) Evaluation of the "scanning model" for initiation of protein synthesis in eukaryotes. *Cell,* **22(1 Pt 1):**7-8.

Kriaucionis, S., Bird, A. (2004) The major form of MeCP2 has a novel N-terminus generated by alternative splicing. *Nucleic Acids Res,* **32(5):** 1818 - 1823.

Krumm, A., Meulia T., Brunvard, M., Groudine, M. (1992) The block to *trans*criptional elongation within the human *c-myc* gene is determined in the promoter–proximal region. *Genes and Development*, **6:** 2201–2213.

Krummheuer, J., Johnson, A.T., Hauber, I., Kammler, S., Anderson, J.L., Hauber, J., Purcell, D.F., Schaal, H (2007) A minimal uORF within the HIV-1 vpu leader allows efficient *trans*lation initiation at the downstream env AUG. *Virology,* **363:**261–271.

Kumar, D., Sharma, N., & Giri, R. (2017). Therapeutic Interventions of Cancers Using Intrinsically Disordered Proteins as Drug Targets: c-Myc as Model System. *Cancer informatics*, ***16*,** 1176935117699408

Kuersten, S., and Goodwin, E. B. (2003). The power of the 3´ UTR: *trans*lational control and development. *Nature reviews Genetics*, ***4*(8):** 626–637

Lal, A., Navarro, F., Maher, C. A., Maliszewski, L. E., Yan, N., O'Day, E., Chowdhury, D., Dykxhoorn, D. M., Tsai, P., Hofmann, O., Becker, K. G., Gorospe, M., Hide, W., and Lieberman, J. (2009) miR-24 Inhibits Cell Proliferation by Targeting E2F2, MYC, and Other Cell-Cycle Genes via Binding to "Seedless" 3′UTR MicroRNA Recognition Elements. *Molecular Cell*, **35(5)**: 610–625.

Lasko, P. (2000) The drosophila melanogaster genome: *trans*lation factors and RNA binding proteins. *J Cell Biol.,* **150:** F51–6.

Lee, M.H., Schedl, T. (2006) RNA-binding proteins. *WormBook*: 1–13.

Leissring, M.A., Farris, W., Wu, X., Christodoulou, D.C., Haigis, M.C., Guarente, L., Selkoe, D.J. (2004) Alternative *trans*lation initiation generates a novel isoform of insulin-degrading enzyme targeted to mitochondria. *Biochem J.* **383 (Pt. 3):** 439 - 446.

Lemaitre, J. M., Buckle, R. S., Mechali, M. (1996) c–Myc in the control of cell proliferation and embryonic development. *Adv. Cancer Res*. **70:** 95–144.

Lemm, I., Ross, J. (2002) Regulation of *c-myc* mRNA decay by *trans*lational pausing in a coding region instability determinant. *Mol Cell Biol.* **22**: 3959-3969.

Levine, M., Tjian, R. (2003) *Trans*cription regulation and animal diversity. *Nature,* **424**: 147–151.

Lewis, S. M., and Holcik, M. (2007) For IRES *trans*-acting factors, it is all about location. *Oncogene,* **27(8)**: 1033–1035.

Li, F., Wang, Y., Zeller, K.I., Potter, J.J., Wonsey, D.R., O'Donnell, K.A., Kim, J.W., Yustein, J.T., Lee, D.A., Dang, C.V., *et al*. (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 *trans*lation. *Nat Struct Mol Biol.* **14(6)**: 511-8.

Liao, B., Patel, M., Hu, Y., Charles, S., Herrick, D,J., Brewer, G. (2004) Targeted knockdown of the RNA-binding protein CRD-BP promotes cell proliferation via an insulin-like growth factor II-dependent pathway in human K562 leukemia cells. *J Biol Chem.* **(47):**48716-24.

Liao, J. M., Zhou, X., Gatignol, A., and Lu, H. (2013) Ribosomal proteins L5 and L11 co-operatively inactivate *c-myc* via RNA-induced silencing complex. *Oncogene,* **33(41)**: 4916–4923.

Liu, J., and Levens, D. (2006) Making Myc. *Current Topics in Microbiology and Immunology,* **302:** 1–32.

Liu, L., Ouyang, M., Rao, J. N., Zou, T., Xiao, L., Chung, H. K., Wu, J., Donahue, J. M., Gorospe, M., and Wang, J. Y. (2015) Competition between RNA-binding proteins CELF1 and HuR modulates MYC *trans*lation and intestinal epithelium renewal. *Molecular Biology of the Cell*, **26(10)**: 1797–1810.

López-Lastra, M., **Rivas, A**., **Barría, M.I.** (2005) Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent *trans*lation initiation. *Biol Res.* **38(2-3):** 121-46.

Lukavsky, P.J. (2009) Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res.* **139**:166–171.

Lukong, K.E. *et al*. (2005) Tyrosine phosphorylation of sam68 by breast tumor kinase regulates intranuclear localization and cell cycle progression. *J. Biol. Chem*., **280:** 38639–38647.

Lukong, K. E., Larocque, D., Tyner, A. L., & Richard, S. (2005). Tyrosine phosphorylation of sam68 by breast tumor kinase regulates intranuclear localization and cell cycle progression. *The Journal of biological chemistry*, *280*(46): 38639–38647.

Lutz, W., Fulda, S., Jeremias, I., Debatin K. M., **Schwab, M.** (1998) MycN and IFNg cooperate in apoptosis of human neuroblastoma cells. *Oncogene*, **17:** 339–346.

Makeyev, A. V. and Liebhaber, S. A. (2002) The poly(C)-binding proteins: A multiplicity of functions and a search for mechanisms. *RNA*, **8(3)**: 265–278.

Marcotrigiano, J., Gingras, A.C., Sonenberg N., Burley, S.K. (1997) Cocrystal structure of the messenger RNA 5´ cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. Ce*ll,* **89(6):** 951-961.

Marcu, K. B., Bossone, S. A., Patel, A. J, (1992) Myc function and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **61:** 809–860.

Marques-Ramos, A., Candeias, M.M., Menezes, J., Lacerda, R., Willcocks, M., Teixeira, A., Locker, N., Romão, L. (2017) Cap-independent *trans*lation ensures mTOR expression and function upon protein synthesis inhibition. *RNA*, **23(11):**1712-1728

Marques, R., Lacerda, R., & Romão, L. (2022). Internal Ribosome Entry Site (IRES)-Mediated *Trans*lation and Its Potential for Novel mRNA-Based Therapy Development. *Biomedicines*, ***10*(8):** 1865.

Martinou, J. C., Green, D. R. (2001) Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Rev Mol Cell Biol*. **2:** 63–6.

Mateyak, M. K., Obaya, A. J., Adachi, S., Sedivy, J. M. (1997) Phenotypes of c–Myc–deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ*. **8:** 1039–1048.

Mattick, J.S. (2001) Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO Rep.* **2**:986–991

Mazière, P., Enrightm, A.J. (2007) Prediction of microRNA targets. *Drug Discov Today,* **12 (11-12):** 452–8.

Mazumder, B., Seshadri, V., Fox, P.L. (2003) *Trans*lational control by the 3´UTR: The ends specify the means. *Trends Biochem Sci.* **28:**91–98.

Meijer, H.A., Thomas, A.A. (2002) Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5´-un*trans*lated region of an mRNA. *Biochem J.* **367**:1–11.

Melone, M. A. B., Valentino, A., Margarucci, S., Galderisi, U., Giordano, A. and Peluso, G. (2018). The carnitine system and cancer metabolic plasticity. *Cell death & disease*, ***9*(2):** 228.

Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S. and Pesole, G. (2002) Un*trans*lated regions of mRNAs. *Genome Biol.* **3(3):** REVIEWS0004

Miller, D., Dibbens, J., Damert, A., Risau, W., Vadas, M., Goodall, G. (1998) The vascular endothelial growth factor mRNA contains an internal ribosome entry site. *FEBS Lett.* **434:** 417–420.

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

Morrish, F., Noonan, J., Perez-Olsen, C., Gafken, P.R., 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.

Mortensen, R. D., Serra, M., Steitz, J.A., Vasudevan, S. (2011) Post-*trans*criptional activation of gene expression in Xenopus laevis oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs). *Proc Nat Acad Sci USA,* **108:**8281–8286.

Müller, S., Bley, N., Busch, B., Glaß, M., Lederer, M., Misiak, C., Fuchs, T., Wedler, A., Haase, J., Bertoldo, J. B., Michl, P., and Hüttelmaier, S. (2020) The oncofetal RNA-binding protein IGF2BP1 is a druggable, post-*trans*criptional super-enhancer of E2F-driven gene expression in cancer. *Nucleic Acids Research*, **48(15)**: 8576–8590.

Müller, S., Bley, N., Glaß, M., Busch, B., Rousseau, V., Misiak, D., Fuchs, T., Lederer, M., and Hüttelmaier, S. (2018) IGF2BP1 enhances an aggressive tumor cell phenotype by impairing miRNA-directed downregulation of oncogenic factors. *Nucleic Acids Research*, **46(12)**: 6285–6303.

Müller, S., Glaß, M., Singh, A. K., Haase, J., Bley, N., Fuchs, T., Lederer, M., Dahl, A., Huang, H., Chen, J., Posern, G., and Hüttelmaier, S. (2018) IGF2BP1 promotes SRF-dependent *trans*cription in cancer in a m6A- and miRNA-dependent manner. *Nucleic Acids Research*, **47(1)**: 375–390.

Nanbru, C., Lafon, I., Audigier, S., Gensac, M. C., Vagner S., Huez, G., Prats, A. C. (1997) Alternative *trans*lation of the Proto–oncogene c–Myc by an internal ribosome entry site. *J. Biol. Chem.* **272:** 32061–32066.

Neelamraju, Y., Hashemikhabir, S., Janga, S.C. (2015) The human RBPome: from genes and proteins to human disease. *J Proteomics*, **127**:61–70.

Nielsen, F. C., Gammeltoft, S., Christiansen, J. (1990) *Trans*lational discrimination of mRNAs coding for human insulin–like growth factor II. *J. Biol. Chem.* **265:** 13431–13434.

Nielsen, F. C., Nielsen, J., Kristensen M. A., Koch G., Christiansen, J. (2002) Cytoplasmin trafficking of IGF–II mRNA–binding protein by conserved KH domains. *J. Cell. Sci.* **115:** 2087–2097.

Nielsen, J., Christiansen, J., Lykke-Andersen, J., Johnsen, A.H., Wewer, U.M., Nielsen, F.C. (1999) A family of Insulin-Like Growth Factor II mRNA- binding proteins represses *trans*lation in late development. *Mol Cell Biol.* **19**: 1262-70.

Nielsen, J., Adolf, S. K., Rajpert–De Meyts, E., Lykke–Andersen, J., Koch, G., Christiansen, J., Nielsen, F. C. (2003) Nuclear *trans*it of human zipcode–binding protein IMP1. *Biochem. J.* **376:** 383–391.

Nolis, I.K., McKay, D.J., Mantouvalou, E., Lomvardas, S., Merika, M., Thanos, D. (2009) *Trans*cription factors mediate long-range enhancer-promoter interactions. *Proc Natl Acad Sci USA,* **106**: 20222–20227.

Noubissi, F., Elcheva, I., Bhatia, N., Shakoori, A., Ougolkov, A., Liu, J., Minamoto, T., Ross, J., Fuchs, S.Y., Spiegelman, V.S. (2006) CRD-BP mediates stabilization of βTrCP1 and *c-myc* mRNA in response to β-catenin signaling. *Nature,* **44**: 898-901.

Noubissi, F.K., Goswami, S., Sanek, N.A., Kawakami, K., Minamoto, T., Moser, A., Grinblat, Y., Spiegelman, V.S. (2009) Wnt signaling stimulates *trans*criptional outcome of the Hedgehog pathway by stabilizing GLI1 mRNA. *Cancer Research,* **22:**8572-8578.

Ogami, K., Hosoda, N., Funakoshi, Y., and Hoshino, S. (2012) Antiproliferative protein Tob directly regulates *c-myc* proto-oncogene expression through cytoplasmic polyadenylation element-binding protein CPEB. *Oncogene,* **33(1)**: 55–64.

Ohana. P., Kopf. E., Bibi. O., Ayesh. S., Schneider. T., Laster. M., Tykocinski. M., de Groot. N., Hochberg. A. (1999) The expression of the H19 gene and its function in human bladder carcinoma cell lines. *FEBS Lett.,* **454:** 81–84.

Okuyama, H., Endo, H., Akashika T., Kato, K., and Inoue, M. (2010) Downregulation of *c-myc* protein levels contributes to cancer cell survival under dual deficiency of oxygen and glucose. *Cancer Res.* **70*:***10213–10223**.**

Ostarek–Lederer, A., Ostarek, D. H., Hentze, M. W. (1998) Cytoplasmic regulatory functions of the KH–domain proteins hnRNPs K and E1/E2. *Trends Biochem. Sci.* **23:** 409–411.

Otsuka, H., Fukao, A., Funakami, Y., Duncan, K. E., and Fujiwara, T. (2019). Emerging Evidence of *Trans*lational Control by AU-Rich Element-Binding Proteins. *Frontiers in genetics*, **10**: 332.

Paik, J.H., Jang, J.Y., Jeon, Y.K., Kim, W.Y., Kim, T.M, Heo, D.S., Kim, C.W. (2011) MicroRNA-146a downregulates NFκB activity via targeting TRAF6 and functions as a tumor suppressor having strong prognostic implications in NK/T cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* **17:**4761–4771.

Pain, V.M. (1996) Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells*. Eur. J. Biochem*. **236**: 747 – 771.

Pantopoulos, K. (2004) Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: An update. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1012:** 1–13.

Patel, G.P., Bag, J. (2006) IMP1 interacts with poly(A)-binding protein (PABP) and the autoregulatory *trans*lational control element of PABP-mRNA through the KH III-IV domain. *FEBS Journal,* **273**: 5678-90.

Pavanello, L., Hall, M., Winkler, G.S. (2023) Regulation of eukaryotic mRNA deadenylation and degradation by the Ccr4-Not complex. *Front Cell Dev Biol*. **11**:1153624.

Payne, G.S., Bishop, J.M., Varmus, H.E. (1982) Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas. *Nature***, 295:**209–214.

Pecqueur, C., Alves-Guerra, M.C., Gelly, C., Levi-Meyrueis, C., Couplan, E., Collins, S., Ricquier, D., Bouillaud, F., Miroux, B. (2001) Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for *trans*lational regulation. *J Biol Chem*. **276(12):** 8705 - 8712.

Pelengaris, S., Khan, M., Evan, G. (2002) c–MYC: More than just a matter of Life and Death. *Cancer Reviews, Nature Publishing Group,* **Oct., Vol 2**: 764–776.

Pelengaris, S., Khan, M., Evan, G. I. (2002) Suppression of Myc–induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell*, **109:** 321–334.

Peterson, C.W. and Ayer, D.E. (2011) An extended Myc network contributes to glucose homeostasis in cancer and diabetes. *Front. Biosc*. ***16***: 2206–2223.

Pickering, B,M,, Willism, A.E. (2005) The implications of structured 5´ un*trans*lated regions on *trans*lation and disease. *Semin Cell Dev Biol.* **16**:39–47.

Prendergast, G.C., Lawe, D., Ziff, E.B. (1991) Association of Myn, the murine homolog of max, with *c-myc* stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras co-*trans*formation. *Cell,* **65:** 395–407.

Prokipcak, R. D., Herrick, D. J., Ross, J. (1994) Purification and properties of a protein that binds to the C–terminal coding region of human c–myc mRNA. *J. Biol. Chem.* **269:** 9261–9269.

Qin, X. Q., Livingston, D., Kaein, W. G. Jr, Adams, P. D. (1994) Deregulated *trans*cription factor E2F–1 expression leads to S–phase entry and p53–mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **91:** 10918–10922.

Qin, H., Ni, H., Liu, Y., Yuan, Y., Xi, T., Li, X., & Zheng, L. (2020). RNA-binding proteins in tumor progression. *Journal of hematology & oncology*, ***13*****(1):** 90.

Qiu, L., Wu, S., Zhang, L., Li, W., Xiang, D., Kasim, V. (2025) The biological roles and molecular mechanisms of m6A reader IGF2BP1 in the hallmarks of cancer. *Genes & Diseases,* https://doi.org/10.1016/j.gendis.2025.101567

Radhi, M., Ashraf, S., Lawrence, S., Tranholm, A. A., Wellham, P. A. D., Hafeez, A., Khamis, A. S., Thomas, R., McWilliams, D., & de Moor, C. H. (2021). A Systematic Review of the Biological Effects of Cordycepin. *Molecules (Basel, Switzerland)*, ***26*(19):** 5886.

Rapti, A., Trangas, T., Samiotaki, M., Ioannidis, P., Dimitriadis, E., Meristoudis, C., Veletza, S., Courtis, N. (2010) The structure of the 5´-un*trans*lated region of mammalian poly(A) polymerase-alpha mRNA suggests a mechanism of *trans*lational regulation. *Mol Cell Biochem.* **340**:91–96.

Rao, S.J., Chatterjee, S. and Pal, J.K. (2017) Un*trans*lated regions of mRNA and their role in regulation of gene expression in protozoan parasites. *J Biosci.* **42:** 189–207

Ross, A. F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E., Taneja, K., Singer, R. (1997) Characterization of a ß–actin mRNA zipcode–binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **17:** 2158–2165.

Ross, J., Lemm, I., Berberet, B. (2001) Overexpression of an mRNA–binding protein in human colorectal cancer. *Oncogene*, **20:** 6544–6550.

Runge, S., Nielsen, F. C., Nielsen, J., Lykke–Andersen, J., Wewer, U. M., Christiansen, J. (2000) H19 RNA binds four molecules of Insulin–like Growth Factor II mRNA–binding protein. *J. Biol. Chem.* **275:** 29562–29569.

Sachs, A., Sarnow, P., Hentze, W. (1997) Starting at the beginning, middle, and end: *Trans*lation initiation in eukaryotes. *Cell,* **89:** 831-838.

Sadahiro, A., Fukao, A., Kosaka, M., Funakami, Y., Takizawa, N., Takeuchi, O., Duncan, K. E., & Fujiwara, T. (2018). *Trans*lation of Hepatitis A Virus IRES Is Upregulated by a Hepatic Cell-Specific Factor. *Frontiers in genetics*, **9**: 307.

Sadek, J., Omer, A., Hall, D., Ashour, K., and Gallouzi, I. E. (2019) Alternative polyadenylation and the stress response. *WIREs RNA*, **10(5):** e1540

Salghetti, S. E., Kim, S. Y., Tansey, W. P.(1999) Destruction of Myc by ubiquitin–mediated proteolysis: cancer–associated and *trans*forming mutations stabilize Myc. *EMBO J*. **18:** 717–726.

Sandberg, R., Neilson, J.R., Sarma, A., Sharp, P.A., Burge, C.B. (2008) Proliferating cells express mRNAs with shortened 3′ un*trans*lated regions and fewer microRNA target sites. *Science,* **320**: 1643–1647.

Schaub, F. X., Dhankani, V., Berger, A. C., Trivedi, M., Richardson, A. B., Shaw, R., Zhao, W., Zhang, X., Ventura, A., Liu, Y., Ayer, D. E., Hurlin, P. J., Cherniack, A. D., Eisenman, R. N., Bernard, B., Grandori, C., & Cancer Genome Atlas Network (2018). Pan-cancer Alterations of the MYC Oncogene and Its Proximal Network across the Cancer Genome Atlas. *Cell systems*, ***6*(3):** 282–300.e2.

Schuman, E. M. (1999) mRNA trafficking and local protein synthesis at the synapse. *Neuron*, **23:** 645–648.

Schwartz, S., Felber, B.K., Pavlakis, G.N. (1992) Mechanism of *trans*lation of mono*cis*tronic and multi*cis*tronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs. *Mol Cell Biol.* **12(1):** 207 - 219.

Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., and Nevins, J. R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes & development*, ***14*(19**): 2501–2514.

Seeger, R.C., Brodeur, G.M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S.E., Wong, K.Y., Hammond, D. (1985) Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med.* **313:**1111– 1116.

Seitz, V., Butzhammer, P., Hirsch, B., Hecht, J., Gütgemann, I., Ehlers, A., Lenze, D., Oker, E., Sommerfeld, A., von der Wall, E., König, C., Zinser, C., Spang, R., & Hummel, M. (2011). Deep sequencing of MYC DNA-binding sites in Burkitt lymphoma. *PloS one*, ***6*(11):** e26837.

Shams, R., Asadzadeh Aghdaei, H., Behmanesh, A., Sadeghi, A., Zali, M., Salari, S., and Padrón, J. M. (2020) MicroRNAs Targeting MYC Expression: Trace of Hope for Pancreatic Cancer Therapy. A Systematic Review. *Cancer Management and Research*, **Volume 12**: 2393–2404.

Shi, Y., **Frost, P**., **Hoang, B**., **Yang, Y**., **Fukunaga, R**., **Gera, J**., **Lichtenstein, A**. (2013) MNK kinases facilitate *c-myc* IRES activity in rapamycin-treated multiple myeloma cells. *Oncogene,* **10;32(2)**: 190-7.

Shim, H., Chun, Y.S., Lews, B.C., and Dang, C.V. (1998) A Unique glucose depended apoptotic pathway induced by *c-myc*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95***: 511–516.

Siebenlist, U., Bressle, P., Kelly, K. (1988) Two distinct mechanisms of *trans*criptional control operate on c–Myc in differentiation of HL–60 cells. *Mol. Cell. Biol*. **8(2):** 867–874.

Siepel, A., Bejerano, G., Pedersen, J.S., Hinrichs, A.S., Hou, M., Rosenbloom, K., Clawson, H., Spieth, J., Hillier, L.W., Richards, S., Weinstock, G.M., Wilson, R.K., Gibbs, R.A, Kent, W.J., Miller, W., Haussler, D. (2005) Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res.* **15**:1034–1050.

Simone, L. E., and Keene, J. D. (2013) Mechanisms coordinating ELAV/Hu mRNA regulons. *Curr Opin Genet Dev*. **23(1)**: 35–43.

Slusher, L.B., Gillman, E.C., Martin, N.C., Hopper, A.K. (1991) mRNA leader length and initiation codon context determine alternative AUG selection for the yeast gene MOD5. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **88(21):** 9789 - 9793.

Smale, S.T., Kadonaga, J.T. (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem.* **72**:449–479.

Song, B., Wang, Y., Kudo, K., Gavin, E.J., Xi, Y., Ju, J. (2008) miR-192 Regulates dihydrofolate reductase and cellular proliferation through the p53-microRNA circuit. *Clin Cancer Res.* **14:**8080–8086.

Sparanese, D, and Lee, C.H. (2007) CRD-BP shields *c-myc* and MDR-1 RNA from endonocleolytic attack by a mammalian endoribonuclease. Nucleic Acids Research, **35**: 1209-21.

Spencer, C. A., Groudine, M. (1991) Control of c–Myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv. Cancer Res*. **56:** 1–48.

Spiniello, M., Steinbrink, M. I., Cesnik, A. J., Miller, R. M., Scalf, M., Shortreed, M. R. and Smith, L. M. (2019) Comprehensive in vivo identification of the *c-myc* mRNA protein interactome using HyPR-MS. *RNA*, **25(10)**: 1337–1352.

Spriggs, K. A., Cobbold, L. C., Jopling, C. L., Cooper, R. E., Wilson, L. A., Stoneley, M., Coldwell, M. J., Poncet, D., Shen, Y. C., Morley, S. J., Bushell, M. and Willis, A. E. (2009) Canonical Initiation Factor Requirements of the Myc Family of Internal Ribosome Entry Segments. *Molecular and Cellular Biology*, **29(6)**: 1565–1574.

Sridharan, R., Tchieu, J., Mason, M.J., Yachechko, R., Kuoy, E., Horvath, S., Zhou, Q., Plath, K. (2009) Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell,* **136(2):**364–77.

Stark, A., Brennecke, J., Bushati, N., Russel, I.B., Cohen, S.M. (2005) Animal microRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3´UTR evolution. *Cell,* **123:**1133–1146.

Stein, I., Itin, A., Einat, P., Skaliter, R., Grossman, Z., Keshet, E. (1998) *Trans*lation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for *trans*lation under hypoxia. *Mol.Cel.Biol,* **18:** 3112–3119.

Stoneley, M., Paulin, F. E., Le Quesne, J. P., Chappell, S. A., & Willis, A. E. (1998). C-Myc 5' un*trans*lated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene*, ***16*(3):** 423–428.

Stoneley, M., Chappell, S. A., Jopling, C. L., Dickens, M., MacFarlane, M., Willis, A. E. (2000**)** c–Myc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **20:** 1162–1169.

Stoneley, M., Subkhankulova, T., Le Quesne, J. P. C., Coldwell, M. J., Jopling, C. L., Belsham, G. J., Willis, A. E. (2000) Analysis of the c–Myc IRES; a potential role for cell–type specific *trans*–acting factors and the nuclear compartment. *Nucleic Acid Research*, **28:** 687–694.

Strand, E., Hollås, H., Sakya, S. A., Romanyuk, S., Saraste, M. E. V., Grindheim, A. K., Patil, S. S., and Vedeler, A. (2021) Annexin A2 binds the internal ribosomal entry site of *c-myc* mRNA and regulates its *trans*lation. *RNA Biology*, **18(sup1)**: 337–354.

Stupfler, B., Birck, C., Seraphin, B., and Mauxion, F. (2016). BTG2 bridges PABPC1 RNA-binding domains and CAF1 deadenylase to control cell proliferation. *Nat. Commun.* **7:** 10811.

Subkhankulova, T., Mitchell, S.A., and Willis, A.E. (2001) Internal ribosome entry segment-mediated initiation of *c-myc* protein synthesis following genotoxic stress. Biochem. J. ***359***: 183–192.

Suzuki, Y., Holmes, J,B., Cerritelli, S.M., Sakhuja, K., Minczuk, M., Holt, I.J., Crouch, R.J. (2010) An upstream open reading frame and the context of the two AUG codons affect the abundance of mitochondrial and nuclear RNase H1. *Mol Cell Biol.* **30:**5123–5134.

Swartwout, S. G., Kinniburgh, A. J. (1989) c–myc mRNA degradation in growing and differentiating cells: Possible alternative pathways. *Mol. Cell. Biol.* **9:** 288–295.

Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell,* **126(4)**:663-76.

Tanguay, R.L., Gallie, D.R. (1996) *Trans*lational efficiency is regulated by the length of the 3′ un*trans*lated region. *Mol Cell Biol.* **16:**146–156.

Tansey, W. P. (2014) Mammalian MYC Proteins and Cancer. *New Journal of Science*, 1–27.

Tessier, C. R., Doyle, G. A., Clark, B. A., Pitot, H. C., and Ross, J. (2004) Mammary Tumor Induction in *Trans*genic Mice Expressing an RNA-Binding Protein. *Cancer Research*, **64(1)**: 209–214.

Thoma, C., Fraterman, S., Gentzel, M., Wilm, M., Hentze, M.W. (2008) *Trans*lation initiation by the *c-myc* mRNA internal ribosome entry sequence and the poly(A) tail. *RNA*, **14(8):** 1579-89.

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

Tourriere, H., Gallouzi, I. E., Chebli, K., Capony, J. P., Moukaikel, 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.

Trangas, T, Ioannidis, P. IGF2BP1 (insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1)**.** *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol,* November 2010**.**

Turner, R.E., Pattison, A.D., Beilharz, T.H. (2018) Alternative polyadenylation in the regulation and dysregulation of gene expression. *Semin Cell Dev Biol*. **75**: 61-69.

Urbanska, A. S., Janusz-Kaminska, A., Switon, K., Hawthorne, A. L., Perycz, M., Urbanska, M., Bassell, G. J., and Jaworski, J. (2017) ZBP1 phosphorylation at serine 181 regulates its dendritic *trans*port and the development of dendritic trees of hippocampal neurons. *Scientific Reports*, **7(1):** 1876

Van Der Kelen, K., Beyaert, R., Inzé, D., De Veylder, L. (2009) *Trans*lational control of eukaryotic gene expression. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **44(4):** 143 - 168.

Van Kouwenhove, M., Kedde, M., and Agami, R. (2011) MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer. *Nature Reviews Cancer*, **11(9)**: 644–656.

Van Nostrand, E.L., Pratt, G.A., Shishkin, A.A., Gelboin-Burkhart, C., Fang, M. Y., Sundararaman, B., Blue, S. M., Nguyen, T. B., Surka, C., Elkins, K., Stanton R., Rigo, F., Guttman, M., and Yeo, G. W. (2016) Robust *trans*criptome-wide discovery of RNA-binding protein binding sites with enhanced CLIP (eCLIP). *Nature Methods*, **13(6)**: 508–514.

Vasudevan, S., Steitz, J.A. (2007) AU-rich-element-mediated upregulation of *trans*lation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell,* **128:**1105–1118

Vasudevan, S., Tong, Y., Steitz, J.A. (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate *trans*lation. *Science,* **318:**1931–1934

Vaux, D. L., Cory, S., & Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, ***335*(6189):** 440–442.

Vikesaa, J., Hansen, T.V., Jønson, L., Borup, R., Wewer, U.M., Christiansen, J., Nielsen, F.C. (2006) RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. *EMBO J*, **25(7):**1456-68.

Wang, G.S. and Cooper, T.A. (2007) Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat. Rev. Genet*. **8:** 749–7.

Wang, X., Cunningham, M., Zhang, X., Tokarz, S., Laraway, B., Troxell, M., and Sears, R. C. (2011). Phosphorylation regulates *c-myc*'s oncogenic activity in the mammary gland. *Cancer research*, ***71*(3):** 925–936.

Weidensdorfer, D., Stöhr, N., Baude, A., Lederer, M., Köhn, M., Schierhorn, A., Buchmeier, S., Wahle, E., and Hüttelmaier, S. (2009) Control of *c-myc* mRNA stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs. *RNA, **15***: 104–115.

Wierstra, I. and Alves, J. (2008) The c-myc Promoter: Still Mystery and Challenge. *Advances in Cancer Research*, **99:** 113–333.

Williams, A.E. (2008) Functional aspects of animal microRNAs. *Cell. Mol. Life Sci*. **65 (4):** 545–62.

Wisdom, R., Lee, W. (1991) The protein coding region of c–myc mRNA contains a sequence that specifies rapid mRNA turnover and induction by protein synthesis inhibitors. *Genes Dev.* **5:** 232–243.

Wong, Y.Y., Moon, A., Duffin, R., Barthet-Barateig, A., Meijer, H.A., Clemens, M.J., and de Moor, C.H. (2010) Cordycepin inhibits protein synthesis and cell adhesion through effects on signal *trans*duction. *J. Biol. Chem.* **(*285):*** 2610–2621.

Wu, K. J., Grandori, C., Amacker, M., Simon-Vermot, N., Polack, A., Lingner, J., and Dalla-Favera, R. (1999). Direct activation of TERT *trans*cription by *c-myc*. *Nature genetics*, ***21*(2)**: 220–224

Wu, N., Zheng, B., Shaywitz, A., Dagon, Y., Tower, C., Bellinger, G., Shen, C.H., Wen, J., Asara, J., McGraw, T.E., Kahn, B.B., Cantley, L.C. (2013) AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Mol Cell*. **28;49(6)**:1167-75.

Wu, X., Levine, A. J. (1994) p53 and E2F–1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91:** 3602–3606.

Yague, E., Armesilla, A.L., Harrison, G., Elliott, J., Sardini, A., Higgins, C.F., Raguz, S. (2003) P-glycoprotein (MDR1) expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and *trans*lational initiation. *J Biol Chem.* **278(12):** 10344-52.

Yaniv, K., Yislaeli, J.K. (2002) The involvement of a conserved family of RNA binding proteins in embryonic development and carcinogenesis. *Gene,* **287**:49-54.

Yekta, S., Shih, I.H., Bartel, D.P (2004) MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science,* **304:** 594–596.

Yueh, A. and Schneider, R.J. (1996) Selective *trans*lation initiation by ribosome jumping in adenovirus-infected and heat-shocked cells. *Genes Dev*. **10(12):** 1557 - 1567.

Zeller, K. I., Zhao, X., Lee, C. W. H., Chiu, K. P., Yao, F., Yustein, J. T., Ooi, H. S., Orlov, Y. L., Shahab, A., Yong, H. C., Fu, Y., Weng, Z., Kuznetsov, V. A., Sung, W. K., Ruan, Y., Dang, C. V. and Wei, C. L (2006). Global mapping of *c-myc* binding sites and target gene networks in human B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103(47):** 17834–17839.

Zhang, J., Tsaprailis, G., Bowden, G.T. (2008) Nucleolin stabilizes Bcl-X L messenger RNA in response to UVA irradiation. *Cancer Res.* **68:**1046–1054.

Zhang, X., Virtanen, A. and Kleiman, F.E. (2010) To polyadenylate or to deadenylate. That is the question. *Cell Cycle, **9***: 4437–4449.

Zheng, D., Wang, R., Ding, Q., Wang, T., Xie, B., Wei, L., Zhong, Z., and Tian, B. (2018). Cellular stress alters 3´UTR landscape through alternative polyadenylation and isoform-specific degradation. *Nature communications*, **9(1):** 2268.

Zhu, S., Wang, J. Z., Chen, D., He, Y. T., Meng, N., Chen, M., Lu, R. X., Chen, X. H., Zhang, X. L., & Yan, G. R. (2020). An oncopeptide regulates m^6A recognition by the m^6A reader IGF2BP1 and tumorigenesis. *Nature communications*, ***11*(1)**