

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ &
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Διπλωματική εργασία με θέμα:

« *In silico* και *in vitro* στοιχεία δείχνουν ότι το CCND2 3'UTR
στοχεύεται από ένα νέο miRNA »

Επόπτης καθηγητής :

κ.Καλαντίδης Κρίτων
Επίκουρος Καθηγητής

Εκπόνηση εργασίας:

Λουλουπή Αννίτα
Φοιτήτρια Βιολογίας

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2012
ΗΡΑΚΛΕΙΟ

Ευχαριστίες

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που με βοήθησαν κατά την διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο και που χωρίς αυτά ο δρόμος μου θα ήταν πολύ πιο δύσκολος. Θα ήθελα να επισημάνω, πως αισθάνομαι τυχερή που είχα ως επόπτες μου, τον Νεστορα Καραθανάση και τον Αναστάση Ούλα, καθώς ήταν οπλισμένοι με αρκετή υπομονή και διάθεση για να με βοηθήσουν με ότι πρόβλημα παρουσιαζόταν. Γι'αυτό τους ευγνωμονώ ιδιαίτερος όπως και για όλα τα μαθήματα που μου παρείχαν στο εργαστηριακό και στο βιοπληροφοριακό κομμάτι της εργασίας. Ιδιαίτερα, ευχαριστώ τους Αναστάση Ούλα και Προβατάρη Παναγιώτη που με καθοδήγησαν στη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Τέλος, ευχαριστήσω βαθύτατα τον υπεύθυνο καθηγητή, κ. Κρίτωνα Καλαντίδη, τόσο που με δέχτηκε στο εργαστήριο του όσο και που είχε πάντα τη διάθεση να με καθοδηγήσει κατά το επιστημονικό έργο που μου ανατέθηκε.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ρόλος των miRNA στη ρύθμιση των βιολογικών διεργασιών στα ζώα φαίνεται να είναι πολύ σημαντικός. Η αρνητική ρύθμιση που ασκούν στην έκφραση ποικίλων γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τα κάνει απαραίτητα για την κανονική ανάπτυξη των κυττάρων. Η διαταραχή της έκφρασης των miRNA σε διάφορους ιστούς είναι στενά συνδεδεμένη με εμφάνιση καρκίνου. Περισσότερα από τα μισά γνωστά miRNA βρίσκονται μέσα σε Cancer-associated genomic regions(CAGR), περιοχές επιρρεπείς σε μεταβολές όπως διαγραφές, μετατοπίσεις, μεταλλάξεις, ενισχύσεις του γονιδιώματος και παρουσιάζουν φαινότυπο καρκίνου. Αν ένα miRNA που υπο κανονικές συνθήκες ρυθμίζει αρνητικά ένα ογκογονίδιο και βρίσκεται σε CAGR, σε μία περιοχή που είναι διαγραμμένη, τότε η ογκοπρωτεΐνη θα εκφράζεται ανεξέλεγκτα και το miRNA παίρνει χαρακτήρα ογκοκαταστολέα.[1] Μέσα από μια προηγούμενη δουλειά, χρησιμοποιώντας υπολογιστικές μεθόδους (*in silico*), γίνανε προβλέψεις σε CAGRs, όπου ανακαλύφθηκαν καινούρια δυναμικά miRNA. Βρέθηκαν τέσσερις περιοχές που εκφράζουν δυναμικά miRNA οι οποίες εκφράζονται σε HeLa κύτταρα και σχετίζονται με διαφορετικούς καρκίνους.[2] Ένα από αυτά (c-miR-Ch9) είχε τα καλύτερα χαρακτηριστικά ενός αληθινού miRNA, του οποίου η γονιδιωματική περιοχή, εικάζεται να είναι διαγραμμένη σε μεγάλο ποσοστό ασθενών καρκίνου ουροδόχου κύστης.[3] Χρησιμοποιώντας γνωστά υπολογιστικά εργαλεία πρόβλεψης καθώς και ένα μη δημοσιευμένο εργαλείο που σχεδιάστηκε από προηγούμενη δουλειά, το *Targetprofiler*, έγινε έρευνα για πιθανούς στόχους που μπορεί να έχει το c-miR-Ch9. Τα *in silico* αποτελέσματα δείχνουν ότι το c-miR-Ch9 στοχεύει το *CCND2*[4] γονίδιο που εκφράζει τη Cyclin D2 πρωτεΐνη απαραίτητη για τη μετάβαση της G1 φάσης σε S φάση στον κυτταρικό κύκλο. Τα χαρακτηριστικά αυτού του γονιδίου μας αφήνει να υποθέτουμε ότι μπορεί να είναι ένα ογκογονίδιο και το c-miR-Ch9 να έχει χαρακτήρα ογκοκατασταλτικό. Στη συνέχεια, για την επιβεβαίωση στόχευσης του *CCND2* 3'UTR από c-miR-Ch9 διεξάχθηκαν μετρήσεις λουσιφεράσης σε HeLa κύτταρα. Για τη διεκπεραίωσή τους πραγματοποιήθηκαν δυο κλωνοποιήσεις σε φορέα λουσιφεράσης. Η πρώτη κλωνοποίηση έφερε ένα κομμάτι του 3'UTR σε αγρίου τύπου μορφή εκατέρωθεν του γονιδίου της λουσιφεράσης. Η δεύτερη κατασκευή έφερε το ίδιο κομμάτι του 3'UTR στο οποίο όμως πραγματοποιήθηκαν μεταλλάξεις στην θέση στόχο του c-miR-Ch9. Οι δύο κατασκευές καθώς και δύο κλωνοποιήσεις που έγιναν από προηγούμενη δουλειά οι οποίες έφεραν τη θέση στόχο εις τριπλούν σε αγρίου τύπου και μεταλλαγμένη μορφή αντίστοιχα, μετασχηματίστηκαν σε HeLa κύτταρα με σκοπό την μέτρηση του γονιδίου αναφοράς. Για θετικό control χρησιμοποιήθηκε anti-c-miR-Ch9-LNA το οποίο υβριδοποιείται με το c-miR-Ch9 και καταστέλλει τη δέσμευση του στη θέση στόχο. Η πειραματική διαδικασία έδειξε, όχι μόνο ότι το πρωταρχικό μικρό RNA μόριο που εμφανίστηκε στο northern blot[2]είναι πραγματικό miRNA αλλά και ότι το συγκεκριμένο miRNA στοχεύει το *CCND2*. Λέξεις κλειδιά: miRNA-καρκίνος, *CCND2*,*in-vitro* ανάλυση 3'UTR, Luciferase assays, υπολογιστικά προγράμματα πρόβλεψης πιθανών στόχων miRNA, *Targetprofiler*, καρκίνος ουροδόχου κύστης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
II. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
A. MicroRNAs.....	5
i) Βιογένεση των miRNA.....	6
ii) MiRNA και Καρκίνος.....	7
B. Γνωστικό υπόβαθρο παρούσας εργασίας.....	9
Γ. Ο ρόλος του <i>CCND2</i> στον κυτταρικό κύκλο.....	13
Δ. In-vitro ανάλυση του 3'UTR.....	14
E. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	16
III. ΥΛΙΚΑ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	17
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
A. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΕΙΣ.....	32
B. ΠΙΝΑΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ.....	37
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	42
VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	46
VII. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	48

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

MicroRNAs

Τα microRNAs (miRNAs), είναι μη κωδικά RNA μονής αλυσίδας, με μήκος 22 νουκλεοτιδίων. Αντιπροσωπεύουν μια καινούργια κατηγορία ρυθμιστικών μορίων γονιδιακής έκφρασης και βρίσκονται σε φυτά και ζώα. Έχουν την ιδιότητα να υβριδοποιούνται με mRNA μετάγραφα με σκοπό την αρνητική τους ρύθμιση. Ανάλογα με το βαθμό συμπληρωματικότητας που δεσμεύονται με το mRNA στόχο τους, μπορούν να ασκούν αρνητική ρύθμιση με ένα από τους δύο τρόπους. Όταν τα miRNA δεσμεύονται με τέλεια συμπληρωματικότητα στην αλληλουχία των κωδικών-mRNA, επάγουν το μηχανισμό RNAi interference. Εν συντομία τα μετάγραφα mRNA κόβονται από ριβονουκλεάσες του miRISC σύμπλοκου και οδηγούνται σε αποδιάταξη. Αυτός ο μηχανισμός σίγησης ενδέχεται να λαμβάνει χώρα συνήθως στα φυτά και λιγότερο στα θηλαστικά. Τα ζωικά miRNA φαίνεται να χρησιμοποιούν ένα δεύτερο τρόπο γονιδιακής ρύθμισης που δεν εμπεριέχει κόψιμο των mRNA στόχων, αλλά ρυθμίζουν τους mRNA στόχους τους με το να δεσμεύονται σε αυτά, με μερική συμπληρωματικότητα στο 3'UTR τους και να καταστέλλουν την έκφραση τους μετα-μεταγράφηκα μέσω του RISC συμπλόκου. [5]

Τα νουκλεοτιδία 2 μέχρι 8 των miRNA, ορισμένα ως seed αλληλουχία, θεωρούνται απαραίτητα για την αναγνώριση και δέσμευση του στόχου.[6] Γενικά, εικάζεται ότι η ελάχιστη δέσμευση των 7 συνεχόμενων βάσεων νουκλεοτιδίων Watson-Crick, της 5' περιοχής του miRNA και του mRNA στόχου είναι αρκετή για την επαρκή καταστολή παραγωγής πρωτεΐνης. Ανάλογα με τον βαθμό συμπληρωματικότητας της seed περιοχής του miRNA με το mRNA στόχο, η στόχευση μπορεί να χαρακτηριστεί ως :

A: 8μερές εάν υπάρχει πλήρες συμπληρωματικότητα από το 2nt μέχρι 8nt του miRNA + “A” στο 3'UTR του αντίστοιχου 1nt του miRNA

B: 7μερές-m8 εάν υπάρχει πλήρες συμπληρωματικότητα από το 2nt μέχρι 8nt του miRNA

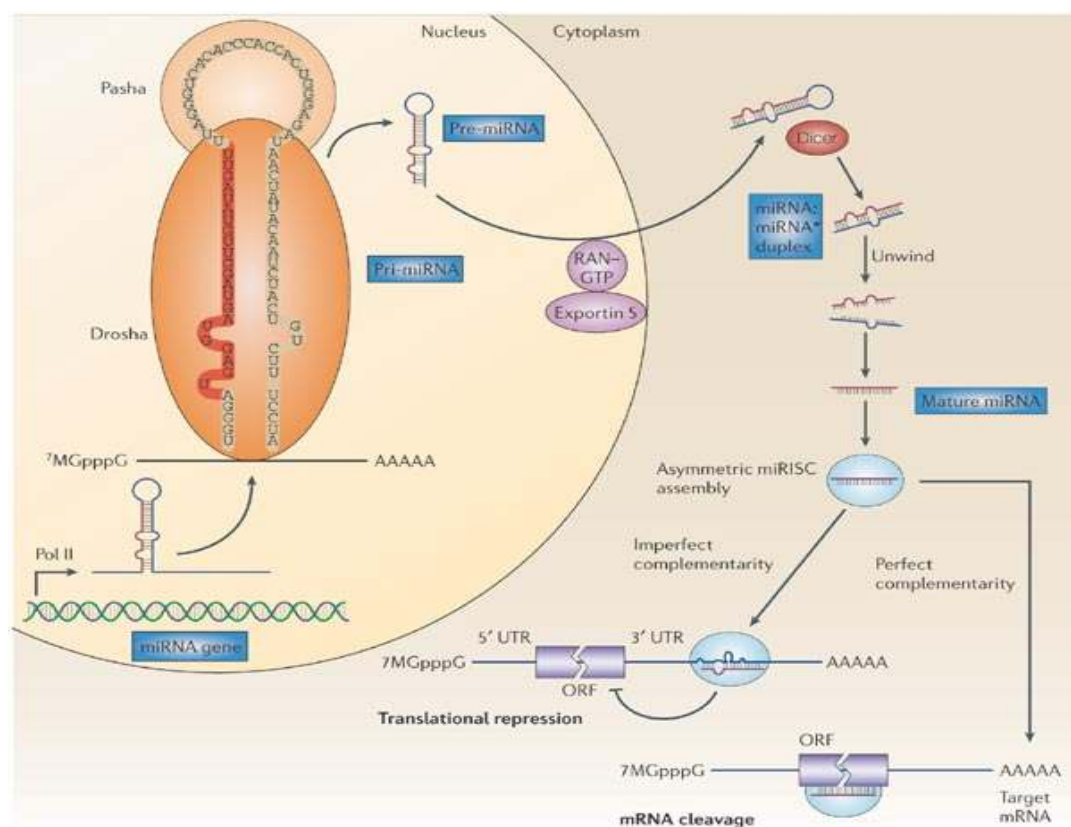
Γ: 7μερές-A1 εάν υπάρχει πλήρες συμπληρωματικότητα από το 2nt μέχρι 7nt του miRNA + “A” στο 3'UTR του αντίστοιχου 1nt του miRNA

Δ: 6μερές εάν υπάρχει πλήρες συμπληρωματικότητα από το 2nt μέχρι 7nt του miRNA

Μετέπειτες έρευνες απόδειξαν ότι κάθε κατηγορία εκδηλώνει διαφορετική δραστηριότητα όσο αφορά το επίπεδο της καταστολής. Ειδικότερα, όσο πιο αδύναμη είναι η δέσμευση του seed, τόσο πιο χαμηλό επίπεδο καταστολής έκφρασης της πρωτεΐνης προκύπτει και αντίστροφα. Η ιεράρχιση, όσον αφορά την αποτελεσματικότητα της στόχευσης ύστερα από *in-vitro* τεχνικές ελέγχου, έχει ως εξής 8μερές >> 7μερές-m8 >> 7μερές-A1 >>6μερές > καμία επαφή. Με λίγα λόγια η στόχευση 8mer έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε *in-vitro* ανάλυση στόχευσης από την 6mer [4, 7].

Βιογένεση των miRNA στα ζώα.

Τα MicroRNA (MIRNA) γονίδια μεταγράφονται στον πυρήνα από τη RNA πολυμεράση II (Pol II) σχηματίζοντας μεγάλα pri-miRNA μεταγραφώματα, τα οποία έχουν καλύπτρα (7MGpppG) και είναι πολυαδενυλιωμένα (AAAAA). (Σχήμα 1.1). Τα pri-miRNA μεταγραφώματα υποβάλλονται σε επεξεργασία από το ένζυμο Drosha (RNase III) και το συμπράγοντά του, Pasha, τα οποία απελευθερώνουν ένα ~70-νουκλεοτιδίων pre-miRNA πρόδρομο προϊόν. Η RAN-GTP και η εξαπορτίνη 5 μεταφέρουν το pre-miRNA στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, ένα άλλο ένζυμο τύπου RNase III, Dicer, επεξεργάζεται το pre-miRNA για να δημιουργήσει μια παροδική διπλή αλυσίδα ~22-νουκλεοτιδίων miRNA:miRNA*. Η διπλή αλυσίδα ακολούθως, φορτώνεται σε ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών δέσμευσης miRNA και δημιουργείται το σύμπλοκο σίγησης (miRISC), το οποίο συμπεριλαμβάνει την πρωτεΐνη Αργοναύτη και την ώριμη μονόκλωνη αλληλουχία. Έτσι το ώριμο miRNA δεσμεύεται στη συμπληρωματική θέση του mRNA στόχου για να ρυθμίσει αρνητικά την έκφραση του γονιδίου. Η αρνητική ρύθμιση πραγματοποιείται με δυο τρόπους ανάλογα με το βαθμό συμπληρωματικότητας μεταξύ του miRNA και στόχου. Όταν τα miRNA δεσμευτούν με το mRNA στόχο με ατελή συμπληρωματικότητα μπλοκάρουν την έκφραση του γονιδίου σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης.



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

ίζεται στο σχήμα
κίνο.

Παρόλα αυτά πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι τα miRNA μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη σταθερότητα του mRNA μορίου. Οι συμπληρωματικές θέσεις του στόχου mRNA στα miRNA βρίσκονται συνήθως μέσα στις 3' αμετάφραστες περιοχές (3' UTRs). Ο Guo και συνεργάτες, εικάζουν ότι η μετα-μεταγραφική ρύθμιση των mRNA στόχων από τα miRNA στα θηλαστικά, προκαλείται από την από – πολυαδενελίωση των mRNA που έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα της κλειστής κυκλικής δομής των mRNA και έτσι την καταστολή της εκκίνησης της μετάφρασης.[8] Ο άλλος τρόπος ρύθμισης των miRNA πραγματοποιείται όταν η υβριδοποίηση του mRNA στόχου με miRNA είναι τέλεια με αποτέλεσμα την κοπή του mRNA στόχου. Η δέσμευση λαμβάνει χώρα στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) του mRNA στόχου και συμβαίνει κυρίως στα φυτά.[5]

Υπό κανονικές συνθήκες τα miRNA φαίνεται να έχουν χαρακτήρα ρυθμιστικό όπου δρουν ως ρεοστάτες για την ακριβείς προσαρμογή της έκφρασης των γονιδίων. Αντιθέτως κάτω από συνθήκες στρες ή ασθένειας φαίνεται να καθορίζουν πιο έκδηλες λειτουργίες.[6]

MicroRNA και Καρκίνος

Τα ζωικά miRNA παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο διαφόρων βιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων της απόπτωσης, διαφοροποίησης, μεταβολισμού και κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Επιπλέον οι διαταραχές έκφρασης των miRNA είναι αρκετά στενά συνυφασμένες με την ανάπτυξη ανθρώπινων ασθενειών όπως ιοικές μολύνσεις και καρκίνο[9]

Έχει υποστηριχθεί ότι πάνω από τα μισά γνωστά ανθρώπινα miRNA προέρχονται από συγκεκριμένες γονιδιωματικές περιοχές που είναι επιρρεπής σε μεταβολές στα καρκινικά κύτταρα. Περιοχές όπως απώλειας ετεροζυγωτίας - LOH (loss of heterozygosity), περιοχές ενίσχυσης και εύθραυστες περιοχές - FRA (fragile sites) είναι γνωστές ως καρκινικά σχετιζόμενες γονιδιωματικές περιοχές - CAGR (Cancer associated genomic regions).[1] Πιο συγκεκριμένα σε μια εκτενή έρευνα που είχε γίνει με στόχο την αναζήτηση αναφερθέντων (Pubmed) γονιδιωματικών μεταβολών, που γίνονται σε περιοχές που περιέχουν miRNA, βρέθηκε ότι το 52.7% των miRNA (98 από 186) γονιδίων βρίσκεται μέσα σε CAGRs μεταξύ των οποίων το 43% εντοπίστηκε σε LOH ή περιοχές ενίσχυσης. Οι μεταβολές αυτές περιγράφονται σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως πνεύμονα, ήπατος και στήθους. [10]

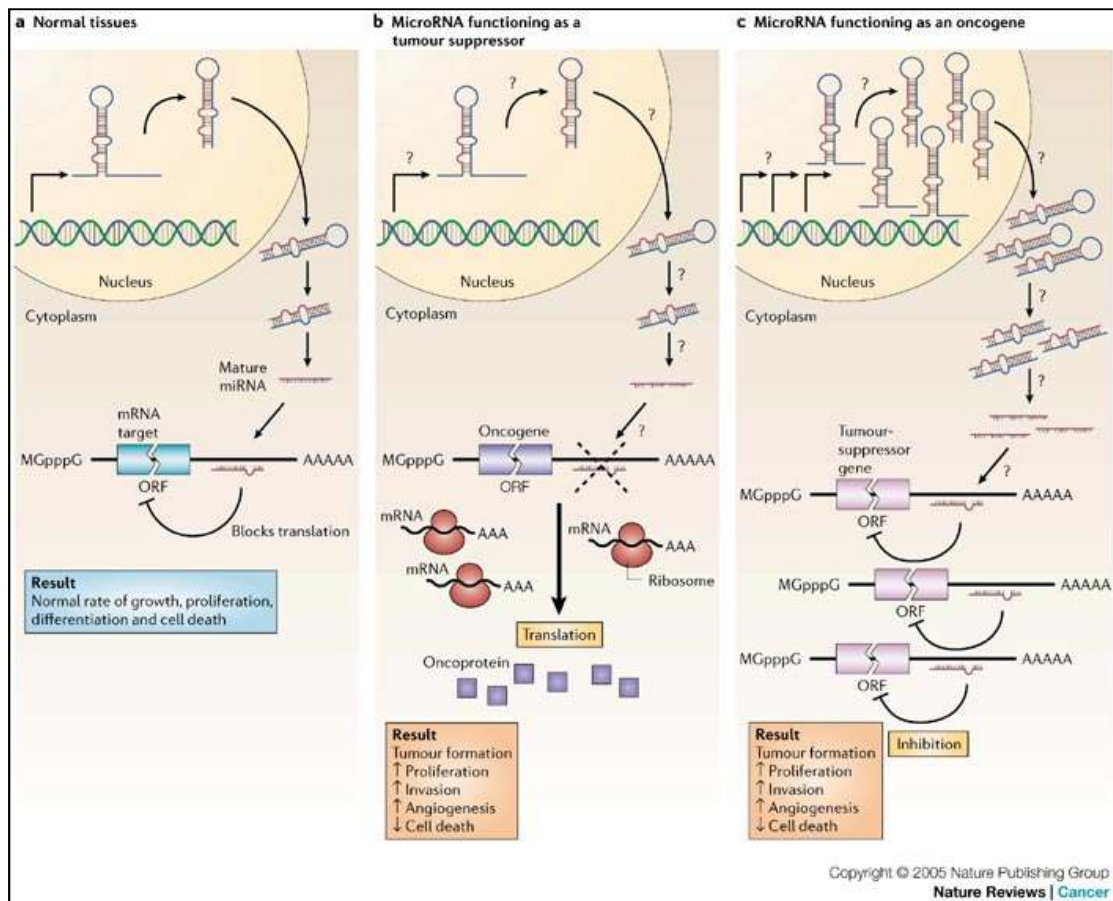
Ο καρκίνος προκαλείται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και από μη επιθυμητή επιβίωση καταστραμμένων κυττάρων που οδηγούν στο σχηματισμό όγκων. Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που διασφαλίζουν τη σωστή και συντονισμένη εμφάνιση της κυτταρική διαίρεση, της διαφοροποίηση και του κυτταρικού θανάτου, τόσο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης όσο και στο ενήλικο οργανισμό. Πολύ ρυθμιστικοί παράγοντες ενεργοποιούν και απενεργοποιούν γονίδια που κατευθύνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική διαφοροποίηση. Η καταστροφή αυτών των γονιδίων, που αναφέρονται ως ογκοκατασταλτικά γονίδια και ογκογονίδια, επιλέγεται στον καρκίνο. Τα περισσότερα ογκοκατασταλτικά γονίδια

και ογκογονίδια, μεταγράφονται πρώτα από DNA σε RNA και μετά μεταφράζονται σε πρωτεΐνες όπου ασκούν την επίδρασή τους. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι τα microRNAs (miRNAs), μπορούν επίσης να λειτουργούν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια και ογκογονίδια. Έχουμε αρχίσει να κατανοούμε πως αυτή η καινούργια κατηγορία ρυθμιστών, εμπλέκεται στη διεργασία του καρκίνου.[5]

Σε κανονικούς ιστούς η μεταγραφή των microRNA, η επεξεργασία και η υβριδοποίηση στη συμπληρωματική αλληλουχία του στόχου mRNA έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή έκφρασης του γονιδίου στόχου μέσω μπλοκαρίσματος της πρωτεϊνικής μετάφρασης ή μέσω αποσταθεροποίησης του mRNA. (Σχήμα1.2.a) Το γενικό αποτέλεσμα είναι οι κανονικοί ρυθμοί της κυτταρικής ανάπτυξης, πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και κυτταρικού θανάτου.

Η μείωση επιπέδων έκφρασης ή η γονιδιακή διαγραφή ενός miRNA που λειτουργεί ως καταστολέας όγκου οδηγεί σε σχηματισμό όγκου. Η μείωση των επιπέδων ώριμων miRNA, μπορεί να οφείλεται σε ανωμαλίες σε οποιοδήποτε στάδιο της βιογένεσής τους, που τελικά οδηγεί στη λανθασμένη έκφραση του γονιδίου στόχου. Το γενικό αποτέλεσμα συμπεριλαμβάνει αύξηση πολλαπλασιασμού, αγγειογένεση και μείωση επιπέδων απόπτωσης που οδηγεί στο σχηματισμό όγκου. (Σχήμα1.2.b)

Παράλληλα, η υπερέκφραση ενός miRNA που έχει ογκογενετικό ρόλο μπορεί επίσης, να οδηγήσει σε σχηματισμό όγκου. Σε αυτή την περίπτωση, αυξημένη έκφραση ενός miRNA, που μπορεί να παραχθεί σε ακατάλληλες στιγμές ακόμη και σε λάθος ιστούς, εξαλείφουν την έκφραση του miRNA-στόχων ογκοκατασταλτικών γονιδίων οδηγώντας στη δημιουργία καρκίνου. (Σχήμα1.2.c) Αυξημένα ποσοστά ώριμων miRNA μπορούν να εμφανίζονται λόγω ενίσχυσης miRNA γονιδίων, συνεχώς ενεργού υποκινητή, αυξημένης απόδοσης miRNA επεξεργασίας ή μείωση της αστάθειας του miRNA .[5]



Σχήμα 1.2 : (α) Η επίδραση των MicroRNA σε κανονικούς ιστούς (β) Η λειτουργία ενός miRNA ως ογκοκαταστολέας και ως (γ) ογκογονίδιο

Γνωστικό υπόβαθρο παρούσας εργασίας.

Η ταυτοποίηση γονιδίων miRNA μεσο τεχνικών εργαστηρίου είναι ιδιαίτερα αργή, γι' αυτό το λόγο η εφαρμογή υπολογιστικών μεθόδων πρόβλεψης αποτελεί πολύτιμο συμπλήρωμα. Πολλά υπολογιστικά εργαλεία προγραμματίστηκαν για να αναγνωρίζουν τα χαρακτηριστικά της βιογένεσης των miRNA και αποτέλεσαν μια μέθοδο πρόβλεψης πολλαπλών miRNA γονιδίων. Οι υπολογιστικές προσεγγίσεις παρέχουν πολύτιμες ενδείξεις ως προς τα ποια είναι τα κυρίαρχα στοιχεία που χαρακτηρίζουν αυτές τις ρυθμιστικές μονάδες και επιπλέον περιορίζουν το χώρο αναζήτησης, κάνοντας έτσι την πειραματική εξακρίβωση πιο γρήγορη και σημαντικά φθηνότερη. Επιπλέον σε συνδυασμό με μεγάλης κλίμακας, μεθόδους υψηλής απόδοσης όπως deep sequencing και tiling arrays, οι υπολογιστικές μέθοδοι πρόβλεψης βοήθησαν στην ανακάλυψη απορυθμίσεων των miRNA σε ανθρώπινους καρκίνους.[11]

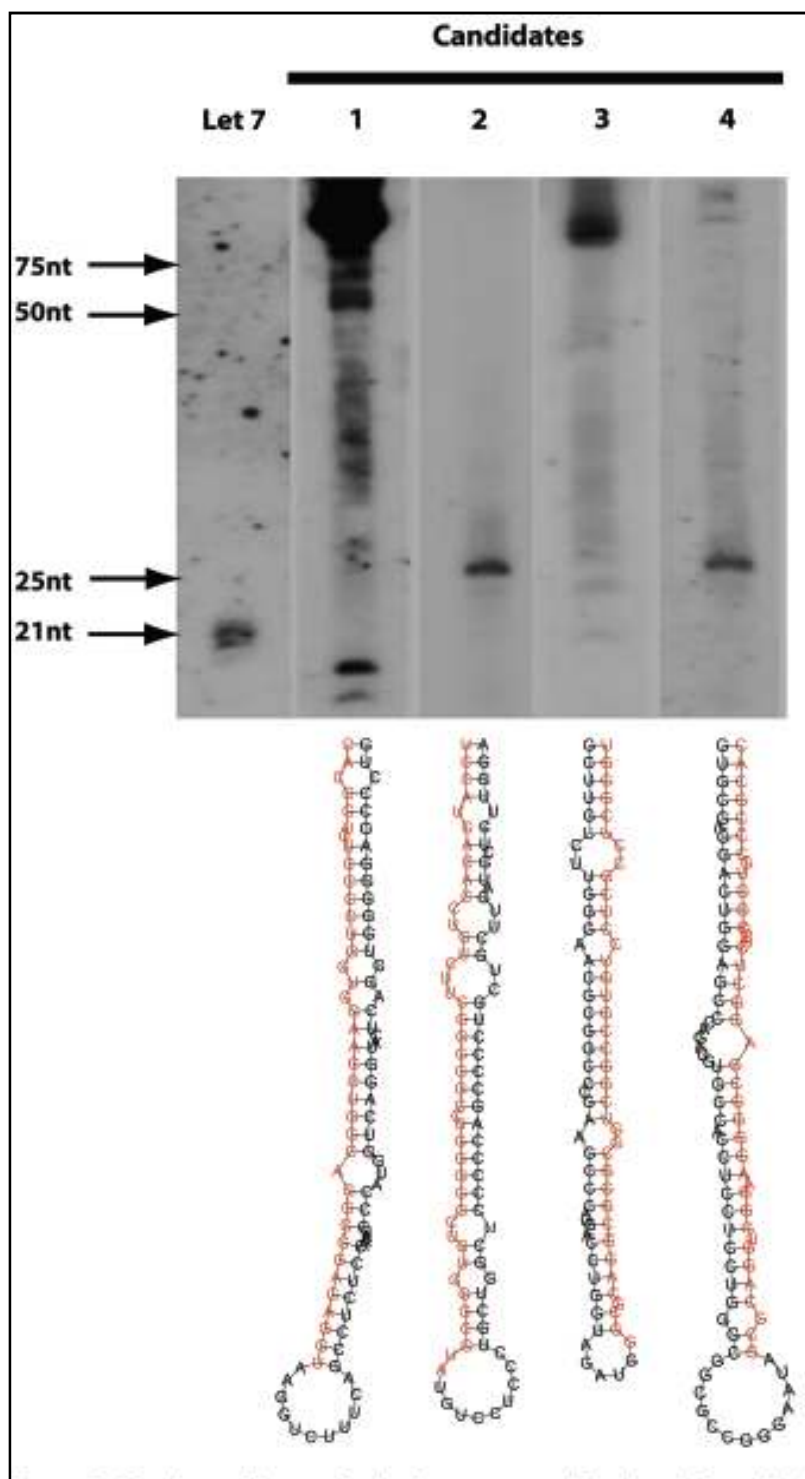
Σε μια προηγούμενη εργασία, αναπτύχθηκε ένα καινούριο υπολογιστικό εργαλείο το SSCProfiler, που χρησιμοποιεί μια πιθανολογική μέθοδο βασισμένη στο προφίλ των Hidden Markov Models για την πρόβλεψη καινούριων πρόδρομων miRNA. Το μοντέλο HMM εκπαιδεύτηκε να αναγνωρίζει ιδιότητες κλειδιά των miRNA όπως αλληλουχία, δομή και συντηρημένες περιοχές με σκοπό την αναγνώριση καινούριων πρόδρομων miRNA μέσα σε CAGRs. Οι προβλέψεις στη συνέχεια κατατάχθηκαν σύμφωνα με τις πληροφορίες πλήρους γονιδιώματικής έκφρασης και τα τέσσερα κορυφαία υποψήφια miRNA επαληθεύθηκαν πειραματικά με northern blot (Σχήμα 1.3). Το κάθε ένα υποψήφιο miRNA σχετίζεται με διαφορετικό καρκίνο και εκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα HeLa σε διαφορετικό επίπεδο. Ο πίνακας 1.1 παρουσιάζει τις περιοχές των υποψήφιων miRNA, τις CAGR περιοχές που βρίσκονται, τον τύπο καρκίνου που σχετίζονται, το πιο κοντινό miRNA που έχουν καθώς και το βαθμό έκφρασης τους σε στα HeLa κύτταρα.

Το πρώτο υποψήφιο miRNA (c-miR-Ch9) εκδηλώνει τα καλύτερα χαρακτηριστικά ενός miRNA. Παρουσιάζει τη μεγαλύτερη έκφραση σε HeLa κύτταρα και σύμφωνα με δημοσιεύσεις εικάζεται ότι το 44% ασθενών καρκίνου ουροδόχου κύστης η γονιδιωματική περιοχή που φέρει το γονίδιο του c-miR-Ch9 είναι διαγραμμαμένη.[12] Ακολούθως η αλληλουχία του, καθώς και η δομή του πρόδρομου miRNA παρουσιάζει μεγαλύτερες ομοιότητες με γνωστά miRNA. Έτσι σε ένα επόμενο βήμα επιλέχθηκε c-miR-Ch9 για περαιτέρω ανάλυση πιθανών στόχων mRNA. Για την εύρεση της αλληλουχίας του ώριμου miRNA εφαρμόστηκε μια νέα τεχνική βασισμένη στην τεχνική primer extension analysis[4]

Candidate	Candidate Information ^a	CAGR	Type of cancer	Closest miRNA	Expression in HeLa
1	chr9:123327358-123327460 st-	chr9:121153509-128793509	Bladder cancer	miR-181a; miR-199b	1667.5
2	chr5:148958951-148959053 st-	chr5:144121683-156051683	Prostate cancer aggressiveness	miR-145/miR-143	363.5
2	chr5:148958951-148959053 st-	chr5:148181683-151101683	Myelodysplastic syndrome	miR-145/miR-143	363.5
3	chr22:40863894-40863996 st+	chr22:31530000-43583971	Colorectal cancer	miR-33a	345.0
3	chr22:40863894-40863996 st+	chr22:31530000-42193557	Astrocytomas	miR-33a	345.0
4	chr5:149984684-149984786 st-	chr5:144121683-156051683	Prostate cancer aggressiveness	miR-145/miR-143	264.0
4	chr5:149984684-149984786 st-	chr5:148181683-151101683	Myelodysplastic syndrome	miR-145/miR-143	264.0

Positions are according to build 35 (hg17) version of the Human Genome at <http://genome.ucsc.edu/>
^aChromosomal location and strand (st+ or st-).

Πίνακας 1.1: Υποψήφια miRNA γονίδια που επαληθεύθηκαν με northern blot analysis, εντοπίζονται σε CAGRs και σχετίζονται με καρκίνο. (πίνακας από Oulas και συνεργάτες, [1])



Σχήμα 1.3 : Το Northern blot δείχνει ένα συγκεκριμένο σήμα και για τα τέσσερα υποψήφια miRNA. Ο ανιχνευτής let7 υβριδοποιείται με πολλά μέλη της οικογένειας γονιδίων let7 miRNA όπως φαίνεται στη μεμβράνη αναφοράς. Οι μεμβράνες που είναι αριθμημένες από το 1-4 παρουσιάζουν τα υποψήφια miRNA που προβλεύθηκαν από το SSCprofiler και έχουν την ίδια σειρά με τον Πίνακα 1.1 Τα πρότυπα ζώνης των τεσσάρων υποψηφίων είναι παρόμοια με τα πρότυπα ζώνης γνωστών miRNA δηλαδή ζώνες μεταξύ 19-27. Τα πιο πάνω σήματα εκδηλώνουν τα απεξέργαστα πρόδρομα miRNA και έχουν μέγεθος ζώνης 70nt. Κάτω φαίνονται οι δομές όπως προβλεύθηκαν από το RNAfold. Σε κάθε πρόδρομα miRNA η κόκκινη αλυσίδα είναι αυτή που δείνει το σήμα (πίνακας από Oulas και συνεργάτες, [1]).

Έχοντας γνωστή την ώριμη αλληλουχία miRNA διεξάχθηκε έρευνα για πιθανούς στόχους mRNA. Χρησιμοποιήθηκαν γνωστά υπολογιστικά εργαλεία πρόβλεψης όπως Pictar, TargetScan και DianaMicroT. Επίσης χρησιμοποιήθηκε ένα καινούργιο, μη δημοσιευμένο υπολογιστικό εργαλείο το *TargetProfiler*, που σχεδιάστηκε από το εργαστήριο μας και φαίνεται να είναι αρκετά συγκρίσιμο με τα προαναφερθέντα δημοσιευμένα υπολογιστικά εργαλεία[4]. Για τον προγραμματισμό του *TargetProfiler*, χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο HMM όπου εκπαιδεύτηκε να αναγνωρίζει βιολογικά χαρακτηριστικά των miRNA όπως, δομή και αλληλουχία με σκοπό να εντοπίζει καινούριους πιθανούς mRNA στόχους. Εν ολίγοις, τα γενικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη στόχων miRNA είναι:

- α) Η συμπληρωματικότητα της seed περιοχής του miRNA ώριμου μορίου.
- β) Η δευτεροταγής δομή της αλληλουχίας του υβριδικού μορίου miRNA: στόχος mRNA και η συνολική θερμοδυναμική της αλληλεπίδρασης αυτής, που εκφράζεται σε ελεύθερη ενέργεια.(ΔG)
- γ) Την εξελικτική συντήρηση που παρουσιάζεται με τη χρήση συστοιχιών πολλαπλών αλληλουχιών από ολόκληρα γονιδιώματα.

Τα αποτελέσματα είχαν συγκριθεί με γνωστά υπολογιστικά εργαλεία πρόβλεψης και με βάση αυτά, ο πιθανός στόχος του c-miR-Ch9 είναι η κυκλίνη D2 (CCND2). [4] Η στόχευση που κάνει το c-miR-Ch9 στην κυκλίνη D2 κατατάσσεται στην κατηγορία των 8mer και όπως φαίνεται είναι ένα γονίδιο το οποίο έχει χαρακτηριστεί ως ογκογονίδιο. Πιο συγκεκριμένα εκφράζοντας το miR-26a *in-vitro* σε ηπατικά καρκινικά κύτταρα, του οποίου η έκφραση είναι χαμηλή σε σχέση με τα κανονικά κύτταρα, επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο στοχεύοντας την κυκλίνη D2. Επίσης, με το μετασχηματισμό του miR-26a σε όγκους ουροδόχου κύστης παρουσιάζεται μείωση στο μέγεθός τους[13]. Επιπλέον, στον καρκίνο του προστάτη το miR-154 και το let-7a εκφράζονται σε μειωμένα επίπεδα και έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν και αυτά το CCND2[14, 15].

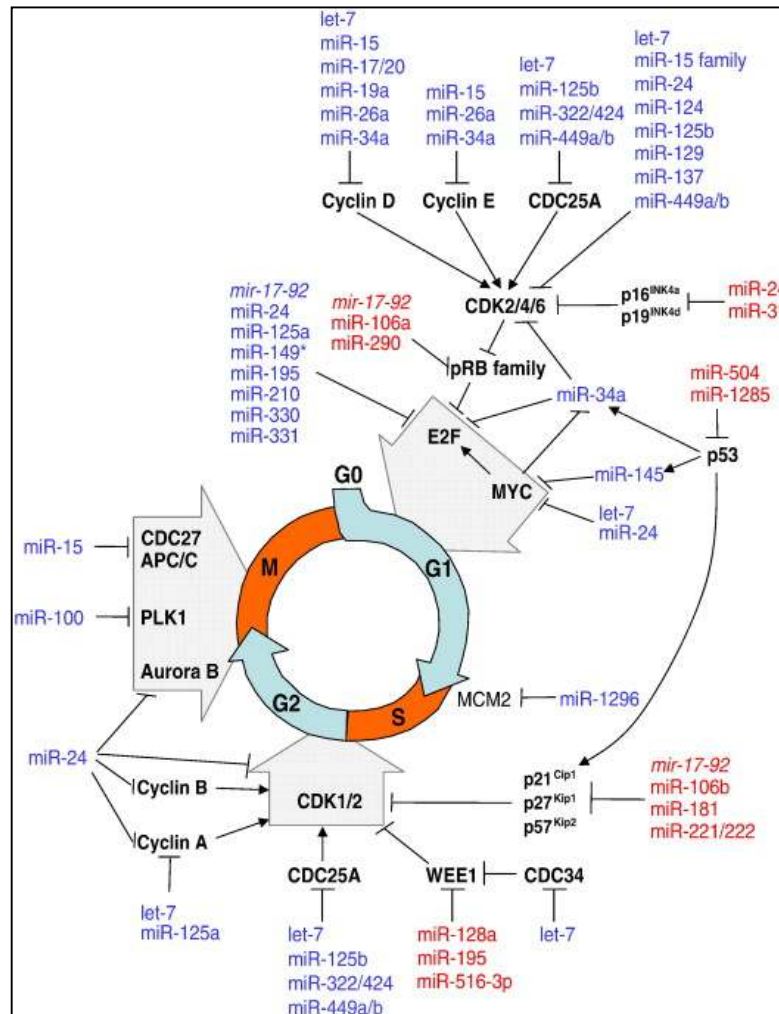
Ένα επόμενο βήμα της προηγούμενης δουλειάς ήταν να διεξαχθεί έλεγχος για άλλα miRNA που στοχεύουν στην ίδια θέση που στοχεύει το c-miR-Ch9 μέσω υπολογιστικών εργαλείων πρόβλεψης. Τα αποτελέσματα του *Targetprofiler* έδειξαν ότι δε στοχεύεται από άλλα γνωστά miRNA, αντιθέτως τα Pictar και TargetScan έδειξαν ότι στοχεύεται και από τρία άλλα miRNA τα miR-96, miR-1127 και miR-182. Σύμφωνα όμως με πρόσφατα deep sequencing δεδομένα των HeLa κυττάρων, μόνο το miR-182 εικάζεται να εκφράζεται σε αυτά και μάλιστα σε πολύ χαμηλά επίπεδα[16], έτσι προχωρήσαμε στον έλεγχο στόχευσης του c-miR-Ch9 χρησιμοποιώντας luciferase assays.

Ο ρόλος του CCND2 στον κυτταρικό κύκλο

Ο κύκλος της κυτταρικής διαίρεσης ρυθμίζεται από πολλαπλά μοριακά μονοπάτια και περνά από ποικίλα σημεία ελέγχου. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRB) είναι απαραίτητη για την εισαγωγή ενήλικων κύτταρων από θηλαστικά, που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας, στον κυτταρικό κύκλο. Επίσης, είναι απαραίτητη η μεταγραφή των γονιδίων που χρειάζονται για την αντιγραφή του DNA κατά τη διάρκεια της S φάσης και για το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της M φάσης.(Σχήμα 1.4) Τα παραπάνω μιτογενή μονοπάτια έχουν ως αποτέλεσμα την επαγωγή της μεταγραφής των κυκλίνων τύπου D και την επακόλουθη επαγωγή των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKS) όπως CDK4 και CDK6. Οι κινάσες αυτές φωσφοριλιώνουν και απενεργοποιούν το pRB, ένα μεταγραφικό καταστολέα που καταστέλλει τους E2F μεταγραφικούς παράγοντες και στρατολογεί σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης που οδηγούν στην καταστολή γονιδίων. Μετά από μιτογενικά ερεθίσματα, τα ενεργοποιημένα CDK4/6-cyclin D σύμπλοκα απενεργοποιούν το pRB, αφήνοντας τους E2F μεταγραφικούς παράγοντες ελεύθερους να ενεργοποιήσουν γονίδια του κυτταρικού κύκλου. Μόλις εκφραστεί το DNA αντιγραφώσωμα, τα κύτταρα δεσμεύονται στη S φάση και η πρόοδος τους μέσα στον κυτταρικό κύκλο ρυθμίζεται από ποικίλα σημεία ελέγχου.

Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου χρειάζεται την παρουσία και την ενεργοποίηση πρωτεϊνών που δεν εκφράζονται στα κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας. Στο σχήμα 1.4 απεικονίζονται οι περισσότερες πρωτεΐνες που χρειάζονται να εκφραστούν για την έναρξη και την ολοκλήρωση του κυτταρικού κύκλου. Η ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών είναι ένα κεντρικό ζήτημα για την κατανόηση του έλεγχου κατα τον κυτταρικό κύκλο και της απορύθμισης του στις ανθρώπινες ασθένειες. Τα σημαντικότερα αίτια εμφάνισης καρκίνου είναι οι γενετικές μεταλλάξεις που οδηγούν σε υπερέκφραση των κυκλίνων ή την εξάλειψη καταστολέων CDK.

Εν συντομία, η κυκλίνη D2 παίζει δραστικό ρόλο στο κυτταρικό κύκλο αφού είναι απαραίτητη για τη μετάβαση από τη G1 στη S φάση. Τα επίπεδα έκφρασης των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου μπορεί να ελέγχονται από μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς. Πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ότι τα microRNAs μπορούν να ελέγχουν τα επίπεδα αρκετών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου και συνεπώς να ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.[17]



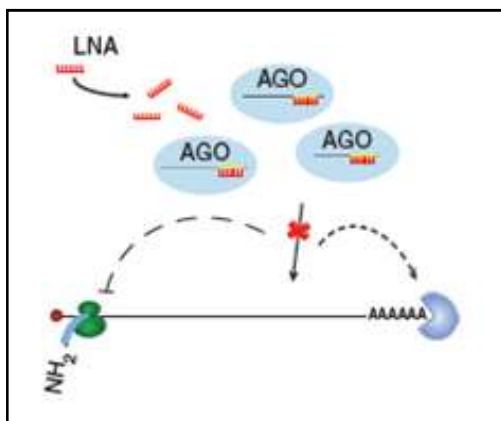
Σχήμα 1.4: Μία συνοπτική περίληψη του έλεγχου που ασκείται από τα miRNA στον κυτταρικό κύκλο. Τα miRNA με πολλαπλασιαστική δυνατότητα εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα, ενώ αυτά με αντιπολλαπλασιαστική δυνατότητα με μπλέ. S: S φάση, M: Μίτωση G1 και G2: δείχνουν της μεταβατικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου και η G0: κατάσταση ηρεμίας των κυττάρων. Οι περισσότερες από τις αλληλεπιδράσεις που φαίνονται στο σχήμα προέρχονται από reporter assays λουσιφεράσης (Σχήμα από Bueno et al.[17])

In-vitro ανάλυση 3'UTR

Η πιο συνηθισμένη προσέγγιση για την εξακρίβωση πιθανού στόχου του miRNA που έχει προβλεφθεί, γίνεται με την κλωνοποίηση του 3'UTR του mRNA στόχου, σε φορέα έκφρασης λουσιφεράσης. Με την ένωση του πιθανού στόχου 3'UTR εκατέρωθεν του γονιδίου της λουσιφεράσης, επιτυγχάνεται η άμεση σχέση του φωτός που εκπέμπει η λουσιφεράση με τη δέσμευση ή όχι του miRNA στο στόχο.[6] Πιο συγκεκριμένα διεκπερώθηκε μετασηματισμός στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HeLa 229 με φορείς λουσιφεράσης που περιέχουν την άγριο τύπου μορφή του 3'UTR γονιδίου στόχου. Επίσης με φορείς λουσιφεράσης που έχουν το 3'UTR μεταλλαγμένο στην πιθανή θέση στόχο miRNA του. Εάν του άγριου τύπου πλασμίδιο παρουσιάσει μείωση της έκφρασης της λουσιφεράσης και αυτή η μείωση δεν εμφανίζεται στη μεταλλαγμένη μορφή, τότε αυτό πιθανόν σημαίνει ότι το ενδογενές εκφραζόμενο miRNA είναι σε θέση να στοχεύει το 3'UTR.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν δύο πλασμιδιακοί φορείς λουσιφεράσης που κλωνοποιήθηκαν, από προηγούμενη εργασία, μια κασέτα τριπλέτας της θέσης στόχου σε αγρίου τύπου μορφή και σε μεταλλαγμένη μορφή. Πιο συγκεκριμένα η κασέτα αποτελείται από την θέση στόχο που βρίσκεται στο 3' UTR εις τριπλούν και έχει μήκος 151bps.

Σε ένα επόμενο βήμα του πειράματος, έγινε προσθήκη καταστολέα του c-miR-Ch9 (anti-c-miR-Ch9LNA). Πρόσφατα αναπτύχθηκαν καταστολείς των miRNA που έχουν μερικά πρωτοποριακά χαρακτηριστικά. Ονομάζονται LNA (locked nucleic acid) και έχουν μεγάλη ειδικότητα ως προς τη δέσμευση τους με τα μικρά ολιγονουκλεοτίδια που καταστέλλουν. Όταν μετασχηματίζονται στα κύτταρα προς εξέταση υβριδοποιούνται με το miRNA στόχο τους με μεγάλη ειδικότητα απομονώνοντας τα έτσι σε σταθερά ετεροδιμεροί[9].(Σχήμα 1.5) Με αυτό το τρόπο αποτρέπουν την δέσμευση του miRNA με το mRNA στόχο του. Εάν υπαρχή επαναφορά έκφρασης της λουσιφεράσης σε σχέση με τη WT μορφή, τότε έχουμε πλήρη επιβεβαίωση ότι το συγκεκριμένο miRNA στοχεύει το CCND2.



Σχήμα 1.5: Μια σχηματική περίληψη της προσέγγισης miRNA σίγησης χρησιμοποιώντας LNA. (α) Τα miRNA δεσμεύονται με μερική συμπληρωματικότητα στη θέση στόχο του 3' UTR του mRNA στόχου και προκαλούν καταστολή της μετάφρασης. (β) Η υψηλή πρόσδεση συγγένειας των μικρών LNA προκαλεί λειτουργική καταστολή των miRNA που οδηγεί στην από-καταστολή των στοχευόμενων mRNA (Σχήμα από Obad et al.[9])

Σκοπός εργασίας

Σε αυτή την εργασία ο σκοπός ήταν να επιβεβαιωθεί με *in vitro* πειράματα μια *in silico* πρόβλεψη ενός novel miRNA (c-miR-Ch9), το οποίο στοχεύει το 3' UTR του γονιδίου CCND2, ένα πιθανό ογκογονίδιο. Πρωταρχικός στόχος ήταν η διαξαγωγή δυο κλωνοποιήσεων ενός τμήματος (920bps) του CCND2 3'UTR σε α) αγρίου τύπου μορφή και β) μεταλλαγμένη μορφή (μεταλλαγή στη θέση στόχευσης) σε φορείς έκφρασης λουσιφεράσης pGL4.10. Η γονιδιωματική περιοχή του *in silico* προβλεπόμενου miRNA (c-miR-Ch9) φαίνεται να εκφράζεται στην ανθρώπινη καρκινική σειρά HeLa και γι' αυτό το λόγο ένας δεύτερος στόχος ήταν η διεκπεραίωση μετρήσεων λουσιφεράσης σε HeLa κύτταρα χρησιμοποιώντας τις δύο πιο πάνω κλωνοποιήσεις. Επίσης ένας τρίτος στόχος της εργασίας, ήταν η διεξαγωγή μετρήσεων λουσιφεράσης σε HeLa με πλασμίδια αναφοράς που κατασκευάστηκαν από προηγούμενη δουλεία, όπου έφεραν τη θέση στόχευσης σε τριπλή μορφή κασέτας στους ίδιους φορείς έκφρασης λουσιφεράσης σε αγρίου τύπου μορφή καθώς και σε μεταλλαγμένη μορφή.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Βήματα για τις κλωνοποιήσεις-Πλασμιδιακές κατασκευές :

Βήμα 1.1:

Σχεδιασμός εκκινήτων με περιοριστικές θέσεις του ενζύμου XbaI για την κλωνοποίηση 920bps του 3'UTR-CCND2.Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Primer3 <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>

P1-FORWARD: TCTAGAATGGTGACTGACCCTTGAGC

P2-REVERSE: TCTAGAATCCTGCTAGCAATGGGATG

Οι εκκινήτες είχαν Tm :60°C

Βήμα 1.2

Πραγματοποιήθηκε Reverse-Transcript PCR σε RNA extraction των HeLa κυττάρων και στη συνέχεια PCR.

1. Προσθήκη 1μg RNA (rna extraction of HeLa cells) και primer oligo dT σε PCR σωληνάκι σε τελικό όγκο 10μl
2. Μεταφορά στο PCR μηχάνημα για 10 λεπτά στους 70°C και μετά στους 4°C
3. Παύση και προσθήκη

buffer10X	2μl
dNTPs 10mM	2μl
Rnase	0.2 μl
Super RT	1 μl
dH ₂ O μέχρι	10 μl

Το σωληνάκι βρίσκεται σε πάγο όλη τη διάρκεια που βρίσκεται έξω από το μηχάνημα της PCR
4. Μεταφορά πίσω στο μηχάνημα PCR για 1 ώρα στους 42°C
5. Μετά 5 λεπτά στους 85°C
6. 4°C επ'άοριστον

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR):

DNA	100pg(πλασμιδίου) 1ng(γενωμικό)	100pg(πλασμιδίου) 1ng(γενωμικό)
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X	2,5μl	5 μl
dNTPs 10mM	1 μl	2 μl
MgCl ₂ 25mM	2.5 μl	5 μl
Εκκινητής Forward 10ng/μl	1 μl	1 μl
Εκκινητής Reverse 10ng/μl	1 μl	1 μl
Taq DNApol/ Pfu	0.3 μl	0.6 μl
ddH ₂ O	Εώς τελικό όγκο 25 μl	Εώς τελικό όγκο 50 μl

Πίνακας 2.1: Συστατικά των αντιδράσεων PCR που εκτελέστηκαν

Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το παρακάτω:

1. 94°C για 6 λεπτά
2. 94°C για 40 δευτερόλεπτα
3. 58°C για 40 δευτερόλεπτα
4. 72°C για 1.10 λεπτά
5. Επανάληψη των σταδίων 2-4 για άλλες 35 φορές
6. 72°C για 10 λεπτά
7. 4°C επ'αόριστον

Βήμα 1.4

Δημιουργία πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση των DNA κομματιών.

1. Ζύγισμα κατάλληλης ποσότητας αγαρόζης ανάλογα με την επι τις εκατόν περιεκτικότητα που χρειάζομαι
2. Προσθήκη σε φλάσκα 135ml dH₂O, 15ml TBE10X, και την αγαρόζη
3. Τοποθέτηση φλάσκας για 2 λεπτά στα μικροκύματα, μέχρι να διαλυθούν οι κόκκοι αγαρόζης
4. Επώαση φλάσκας σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταματήσουν οι υδρατμοί
5. Προσθήκη EtBr(1:20000) αραιώση 7.5 μl
6. Μεταφορά διαλύματος σε tray με κατάλληλα χτενάκια και αφαίρεση φυσαλίδων με ένα tip
7. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να πήξει το πήκτωμα
8. Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 0.5XTBE-Διαλυτοποίηση από 5XTBE
9. Αφαίρεση ταινίας και χτένων, τοποθέτηση του tray στη συσκευή ηλεκτροφόρησης
10. Γέμισμα συσκευής με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης μέχρι να καλυφθεί το πήκτωμα
11. Φόρτωμα δειγμάτων μαζί με κατάλληλη ποσότητα χρωστικής και marker
12. Ρύθμιση συσκευής στα 100V
13. Παρατήρηση κομματιών DNA σε μηχανήμα UV
14. Φωτογραφίση πηκτώματος

Βήμα 1.5**Ενοποίηση DNA τμημάτων σε T-easy φορέα**

1. T-easy vector 1 μl
2. 2X Rapid Ligation buffer 5 μl
3. PCR product 3 μl
4. T4 DNA ligase 1 μl

Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου 2 ώρες

Βήμα 1.6**Μετασχηματισμός πλασμιδίου σε βακτήρια *E.Coli* DH10 strain**

1. Επώαση δεκτικών βακτηριακών κυττάρων από τους -80°C στον πάγο για 5 λεπτά
2. Προσθήκη της αντίδραση ενοποίησης σε 100μl δεκτικών κυττάρων
3. Επώαση για 30 λεπτά στον πάγο
4. Επώαση στους 42°C για 90 δευτερόλεπτα
5. Επώαση για 2 λεπτά στον πάγο
6. Προσθήκη 1 ml θρεπτικού LB και επώαση στους 37°C για 1 ώρα
7. Φυγοκέντρηση κυττάρων 12000rpm για 1 λεπτό
8. Απομάκρυνση θρεπτικού μέχρι 100μl με φλόγα
9. Επαναδιαλυτοποίηση κυττάρων
10. Στρώσιμο των κυττάρων σε πιάτο petri το οποίο περιέχει θρεπτικό με κατάλληλο αντιβιοτικό (amp) 100ng/ml

Βήμα 1.7

Καλλιέργεια θετικών αποικιών σε 2ml LB και αντιβιοτικό

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (miniprep)

1. Φυγοκέντρηση 1.5 ml βακτηριακής καλλιέργειας στις 12.000 στροφές το λεπτό (rpm) για 1 λεπτό
2. Επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων σε 200μl SI (15Mm Tris-HCl pH=8,10mM EDTA ,100μg/ml Rnase A)
3. Προσθήκη 150μl από το διάλυμα SII (0.2M NaOH, 1%SDS) και επώαση για 5 λεπτά
4. Προσθήκη 200μl από το διάλυμα SIII(30 ml 5M potassium acetate, 5.75ml glacial acetate, 14.25ml dH₂O)
5. Φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές το λεπτό (rpm) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
6. Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωληνάκι και προσθήκη 100μg/ml Rnase A .
7. Επώαση στους 37°C για 30 λεπτά
8. Προσθήκη 250 μl φαινόλη και 250 μl χλωροφόρμιο
9. Vortex για 15 δευτερόλεπτα

10. Φυγοκέντηση στις 12.000 στροφές το λεπτό (rpm) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
11. Μεταφορά πάνω φάσης σε καθαρό σωληνάκι και προσθήκη 500 µl χλωροφόρμιο
12. Vortex για 15 δευτερόλεπτα
13. Φυγοκέντηση στις 12.000 στροφές το λεπτό (rpm) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
14. Μεταφορά πάνω φάσης σε καθαρό σωληνάκι και προσθήκη 2X όγκου 100% αιθανόλη
15. Φυγοκέντηση στις 12.000 στροφές το λεπτό (rpm) για 30 λεπτά στους 4°C
16. Αφαίρεση υπερκείμενου και πρόσθεση 700µl 70%αιθανόλης
17. Φυγοκέντηση στις 12.000 στροφές το λεπτό (rpm) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
18. Αφαίρεση υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση σε 30 µl νερό (ddH₂O).

Βήμα 1.8

Πραγματοποίηση πέψης με EcoR1 ένζυμο στο φορέα pGEM-WT-3'UTR για επιβεβαίωση της ένθεσης μέσω ηλεκτροφόρησης(βήμα 1.4).

Πέψη DNA με περιοριστικά ένζυμα

Οι περιοριστικές πέψεις πραγματοποιήθηκαν με βάση τις άριστες συνθήκες στις οποίες λειτουργεί ένα ένζυμο, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας και τα πρωτόκολλα που περιγράφονται στους Maniatis et al. Πιο συγκεκριμένα, σε σωληνάκι προστίθενται τα παρακάτω:

1. Κατάλληλη ποσότητα δείγματος DNA
2. Κατάλληλο ανά περίπτωση ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10X) σε τελική συγκέντρωση 1X
3. Συγκεκριμένη ποσότητα ενζύμου περιοριστικής ενδονουκλεάσης, έως 10% του συνολικού όγκου αντίδρασης

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 37°C για 2-3 ώρες

Βήμα 1.9

Επανάληψη βήματος 1.7:Καλλιέργεια θετικού κλώνου και απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (miniprep)

Βήμα 1.10

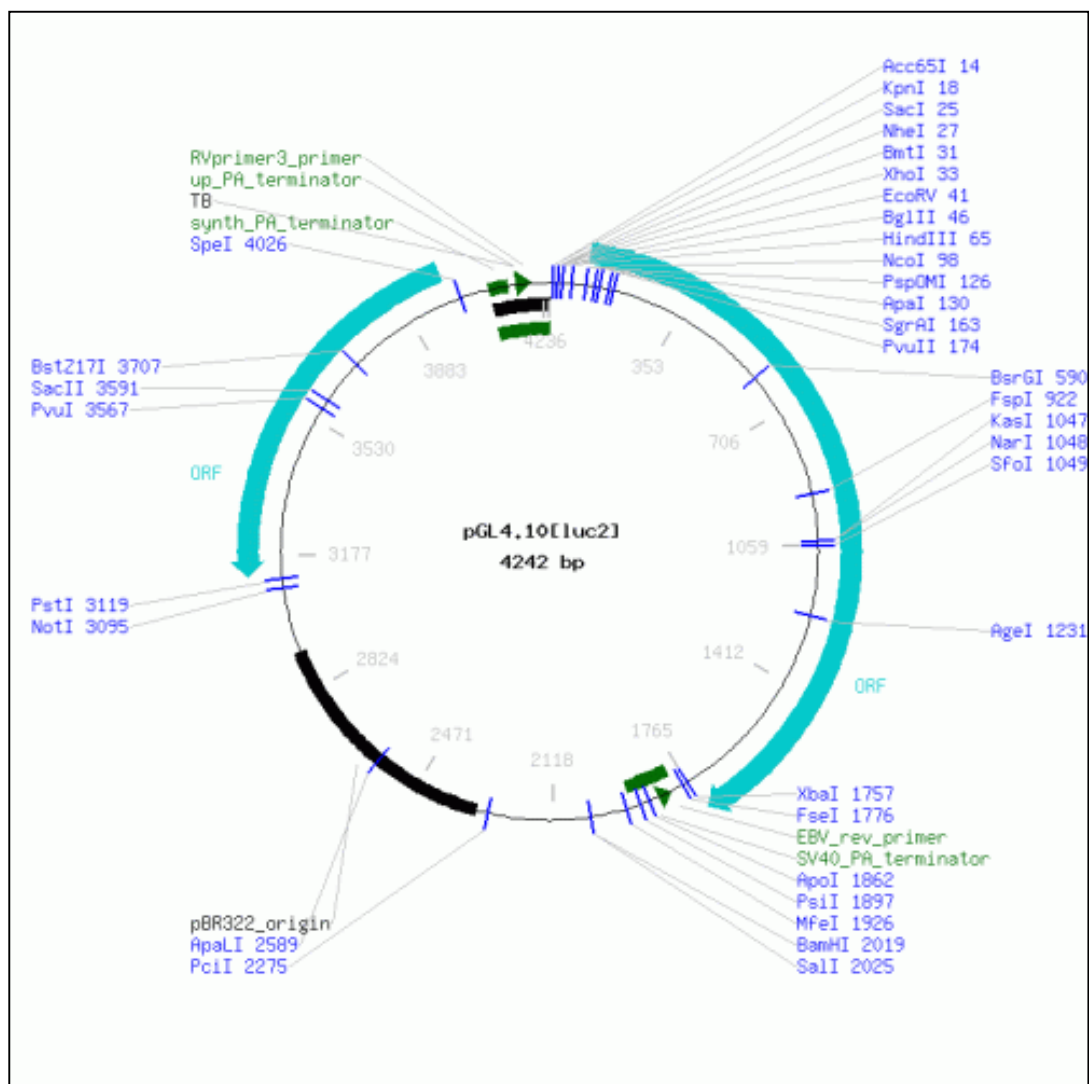
Αποστολή θετικών πλασμιδίων για αλληλούχιση γονιδιώματος (sequencing)

Βήμα 1.11

Πραγματοποίηση πέψης στο φορέα T-easy όπου είχε το ένθεμα και στο φορέα υποκλωνοποίησης pGL4.10 με περιοριστικό ένζυμο XbaI και έλεγχος μεγεθών DNA κομματιών μέσω ηλεκτροφόρησης

Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης

Επιλέχθηκε ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pGL4.10 [luc2] με μέγεθος 4242 ζεύγη βάσεων (4.2kb) για να κλωνοποιήσουμε την περιοχή που μας ενδιέφερε. Βλέπε σχήμα 2.1. Ο χάρτης του πλασμιδίου απεικονίζεται παρακάτω. Ο φορέας προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Αμπικιλίνη. Η κλωνοποίηση του ενθέματος έγινε στην περιοριστική θέση XbaI, εκατέρωθεν του γονιδίου της λουσιφεράσης.



Σχήμα 2.1 : Χάρτης φορέα κλωνοποίησης ενθέματος. Παρουσιάζονται όλες θέσεις περιοριστικής κοπής

Βήμα 1.12**Εκγύλιση DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)**

Για την απομόνωση τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροέκλυσης όπως περιγράφεται από το Qiaquick nucleotide purification Kit (Qiagen) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που υποδεικνύει η εταιρεία.

1. Αποκοπή επιθυμητής ποσότητας DNA από το gel (όσο το δυνατό λιγότερη ποσότητα αγαρόζης)
2. Προσθήκη 200μl NT3 buffer ανά 100mg πηκτώματος αγαρόζης
3. Επώαση για 10 λεπτά στους 50°C και ανά δυο λεπτά vortex μέχρι να διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη
4. Προσθήκη διαλύματος σε κολωνάκι και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12000rpm
5. Αφαίρεση έκλυσης και πλύσιμο με 700 μl NT buffer
6. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12000rpm , αφαίρεση έκλυσης
7. Επανάληψη 5,4
8. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτό στις 12000rpm για εκτενή αποστράγγιση
9. Μεταφορά κολώνας στους 70°C για 5 λεπτά
10. Έκλυση DNA με προσθήκη 30μl NE buffer το οποίο έχει προθερμανθεί στους 37°C.
11. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12000rpm

Βήμα 1.13**Αντίδραση συγκόλλησης δύο μορίων DNA (ligation)**

Σε σωλήνα προστίθενται τα παρακάτω:

1. Κατάλληλη ποσότητα πλαδισμιακού DNA και τμήματος DNA ένθεσης

$$ng \text{ of insert} = N \times \frac{(ng \text{ of vector}) \times (kbsize \text{ of inser})}{kb \text{ size of vector}} , 4 < N < 10$$

ex.100ng insert 50ng vector

2. Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης 10X τελική συγκέντρωση 1X
3. T4 λιγάση σε ποσότητα 1-3 units
4. ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 10 μl

Ακολούθως η αντίδραση επωάζεται στους 16°C overnight

Βήμα 1.14

Επανάληψη βήματος 1.6 :Μετασχηματισμός πλασμιδίου σε βακτήρια *E.Coli* DH10 strain

Βήμα 1.15**Colony PCR**

Αυτή η τεχνική σχεδιάστηκε για γρήγορο έλεγχο πλασμιδίου κατευθείαν από τις αποικίες *E.Coli*.

Σχεδιάστηκε ένας primer που υβριδοποιείται με το vector pG14.10 upstream 150 bps από τη θέση ένθεσης.

Pluc: CATGACCGAGAAGGAGATCG

Συστατικά αντίδρασης PCR:

5 µl PCR buffer 10X	}	X Αριθμός αποικιών που θέλω να ελέγξω
5 µl MgCl ₂		
2 µl dNTPs 10mM		
1 µl Primer P2-REVERSE		
1 µl Primer Pluc		
0.3Taq DNApol		
ddH ₂ O up to 50 µl		

Σε κάθε σωληνάκι PCR προσθέτω τα παραπάνω καθώς και μια μικρή ποσότητα από την αποικία(tip πιπέτας)

Ακολούθως το tip τοποθετείται σε σωλήνα που περιέχει 2ml LBκαι αντιβιοτικό αμπικιλίνη 100ng/ml

Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται δίπλα σε φλόγα

Βήμα 1.16

Αποστολή θετικών πλασμιδίων για αλληλούχιση γονιδιώματος (sequencing)

Βήμα 1.17

Καλλιέργεια θετικής αποικίας μετά από έλεγχο του sequencing σε 100ml LB amp 100 ng/µl.

Απομόνωση πλαιδισμιακού DNA μεγάλης κλίμακας(midi prep) με κολονάκι

1. Φυγοκέντρηση 200ml καλλιέργειας για 10 λεπτά στις 7000rpm στους 4°C
2. Αφαίρεση υπερκειμένου και επαναδιάλυτοποίηση πελετών σε 8ml διαλύματος επανδιάλυτοποίησης (Resuspension Buffer)
3. Προσθήκη 8ml διαλύματος λύσης(Lysis Buffer)ανακίνηση 5 φορές και επώαση για 5 λεπτά
4. Προσθήκη 12ml διαλύματος εξισορρόπησης (Equilibration Buffer) στο χείλος της κολώνας ώστε αυτή να ενεργοποιηθεί
5. Προσθήκη του διαλύματος των κυττάρων στην κολώνα
6. Ξέπλυμα κολώνας με 5ml Equilibration Buffer
7. Απομάκρυνση και προσθήκη 8ml διαλύματος πλύσης(Wash buffer)
8. Προσθήκη 5ml διαλύματος Έκλυσης (elution buffer) και έκλυση πλαδισμιακού DNA σε νέο σωλήνα
9. Προσθήκη 3.5ml ισοπροπανόλη vortex και επώαση για 2 λεπτά
10. Φυγοκέντρηση για 40 λεπτά 7000rpm στους 4°C
11. Απομάκρυνση υπερκειμένου, προσθήκη 2ml 70% EtOH, vortex και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά 7000rpm στους 4°C
12. Απομάκρυνση αιθανόλης, στέγνωμα και επαναδιάλυτοποίηση του DNA σε 100μl νερό

Όλες οι συγκεντρώσεις DNA μετρήθηκαν με τη χρήση του nanodrop.

Βήμα 1.18

Μετάλλαξη στο WT 3'UTR στη θέση στόχου του c-miR-Ch9

Wild type interaction:

```

5' AGTGGGGGCCGAGTTGTTCCCCCAGCCTGCCAA CCND2
      | | | | |
3' ATGGAGAGGGGGACGGTC c-miR-Ch9

```

Wild type: GGGGGCCGAGTTGTTCCCCCAGCCTGCCAA

Mutated interaction:

```

5' AGTGGGGGCCGAGTTGTTCCCCCAGCGAGGGAA CCND2
      | | |
3' ATGGAGAGGGGGACGGTC c-miR-Ch9

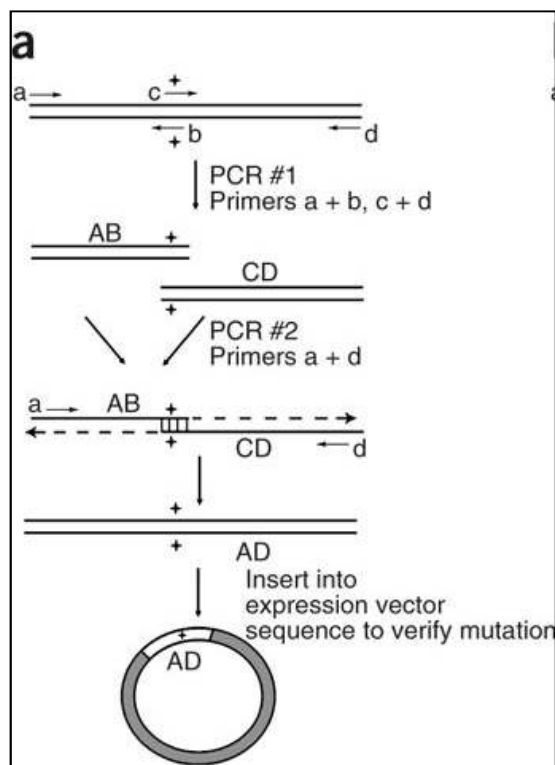
```

Mutant: GGGCCGAGTTGTTCCCCCAGCGAGGGAA

PCR αντίδραση μεταλλαξιγένεσης (PCR mutagenesis)

1) Σχεδιασμός δύο εκκινητών (b,c) , με τα εξής χαρακτηριστικά: α) Είναι συμπληρωματικοί ως προς την μήτρα (pGEM-WT-3'UTR) δίπλα από τη θέση που θα προκύψει η μεταλλαγή. β) Έχουν επικρεμάμενο άκρο (συμπληρωματικά μεταξύ τους) μια αλληλουχία περίπου 20 νουκλετιδίων που εμπεριέχει τη μεταλλαγή που θέλουμε. γ) Έχουν ίδιο Tm: 60 °C

Το σχήμα 2.2 απεικονίζει τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας.



Σχήμα 2.2 : Στάδια πρωτόκολλου της PCR-μεταλλαξιγένεσης[18]

b = Mutagenesis Left : CAGCGAGGGAAATTTTGATCCTTCCCCTCTTT

c = Mutagenesis Right: ATTTCCCTCGCTGGGGGAACAACCTCG

a = P1-FORWARD

d = P2-REVERSE

Όλες οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με Pfu πολυμεράση. Για την πρώτη αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν οι a και b εκκινητές και στη δεύτερη αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν οι c και d. Η μήτρα των δύο αντιδράσεων PCR ήταν το πλασμίδιο pGEM- WT-3'UTR.

Το Tm της επικαλυπτόμενης περιοχής ήταν 40 °C ενώ το Tm των εκκινητών a d ήταν 60 °C. Γιαυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε μια επιπλέον αντίδραση, επέκτασης εκκινητών(primer extension) έχοντας ως μήτρα 5ng από το κάθε προϊόν των παραπάνω αντιδράσεων .

Με τις ακόλουθες συνθήκες:

1. 94°C για 6 λεπτά
2. 94°C για 30 δευτερόλεπτα
3. Πτώση θερμοκρασίας με gradient 0.1s
4. 40°C για 40 δευτερόλεπτα
5. Ανέβασμα θερμοκρασίας με gradient 0.1s
6. 72°C για 1.10 λεπτά
7. Επανάληψη των σταδίων 2-4 για άλλες 35 φορές
8. 72°C για 10 λεπτά
9. 4°C επ'άοριστον

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε PCR σε 2 μl της πιο πάνω αντίδρασης με εκκινητές τους a και d

Βήμα 1.19

Επανάληψη βημάτων 1.5-1.17 για την υποκλωνοποίηση του 3'UTR-MUT ενθέματος από pGEM σε φορέα έκφρασης λουσιφερασης pGL4.10.

2. Βήματα για την διεξαγωγή μετρήσεων λουσιφεράσης σε HeLa κύτταρα.

Βήμα 2.1

Τα Luciferase Assay πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπινα κύτταρα Human HeLa 229 cell line (LGC Promochem, ATCC Number: CCL-2.1). Τα κύτταρα καλλιεργούνταν σε Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) και 10% FBS(fetal calf serum)+ αντιβιοτικά (penicillin 100units/ml + streptomycin 100 mg/ml) στους 37°C, σε ανθρώπινη ατμόσφαιρα 5% CO₂.

Επίστρωση κυττάρων υγρής καλλιέργειας- Σπάσιμο κυττάρων

Η επίστρωση των HeLa κυττάρων γίνεται σε πιάτα για υγρές καλλιέργειες που έχουν 24 πηγάδια. Το θρεπτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium + 10% FBS(fetal calf serum)+ αντιβιοτικά (penicillin 100units/ml + streptomycin 100 mg/ml).

Αυτή η διαδικασία γίνεται σε στείρες συνθήκες σε ειδικό θάλαμο κυτταροκαλλιέργειας.

1. Προθέρμανση θρεπτικών και θρυψίνης σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 37°C για 15 λεπτά
2. Αφαίρεση θρεπτικού από τη φλάσκα
3. Ξέπλυμα φλάσκας με 1XPBS(ίση ποσότητα με την ποσότητα θρεπτικού που είχε)
4. Προσθήκη 3ml θρυψίνης και επώαση για 5 λεπτά στους 37°C(η θρυψίνη ξεκολλάει τα κύτταρα από τον πάτο της φλάσκας, είναι όμως τοξική προς αυτά έτσι ο χρόνος επώασης είναι αυστηρός.)
5. Μεταφορά κυττάρων με θρυψίνη σε καθαρό σωλήνα (falcon)
6. Προσθήκη 10ml θρεπτικού
7. Φυγοκέντρηση 1200rpm για 6 λεπτά στους 21°C
8. Αφαίρεση υπερκείμενου και επαναδιάλυση σε 10ml θρεπτικού χωρίς αντιβιοτικά
9. Μέτρηση κυττάρων με το αιμοκυτταρόμετρο
10. Σε κάθε πηγάδι μεταφέρουμε 100,000 κύτταρα σε τελικό όγκο 500μl
11. Μεταφέρω πίσω στη φλάσκα καλλιέργειας το 1/10 του όγκου των κυττάρων και συμπληρώνω με θρεπτικό που έχει αντιβιοτικά

Βήμα 2.2**Μετασχηματισμός πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα HeLa πρωτόκολλο Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California)**

Η επιμόλυνση γίνεται με τη χρήση λιποφεκταμίνης (lipofectamine 2000). Το κάθε πλασμίδιο προς εξέταση 3'UTR-WT, 3'UTR-MUT, EMPTY και 3'UTR-WT+ LNA N nM (N= συγκέντρωση LNA προς εξέταση), επιμολύνεται σε 3 πηγάδια. (Βλέπε σχήμα 2.3) Για αποφυγή λάθους και ομοιόμορφης επιμόλυνσης για κάθε περίπτωση πραγματοποιήσαμε master mix. Επίσης σε κάθε πηγάδι μαζί με τα πλασμιδια προς εξέταση επιμολύνθηκε και ένας φορέας κανονικοποίησης pHRL-TK, ο οποίος εκφράζει Renila. (Σχήμα 2.2) Με αυτό το τρόπο αποφεύγουμε διαφορές όπως: 1) αριθμό των κυττάρων, 2) αποτελεσματικότητα λύσης των κυττάρων και 3) αποτελεσματικότητα της επιμόλυνσης. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο για κάθε πείραμα επιμόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν 5ng pHRL-TK, 350ng pGL4.10 (προς εξέταση) και 400 ng pBSK. (Carrier plasmid). (Παράδειγμα συγκεντρώσεων πλασμιδίων προς μετασχηματισμό βλέπε πίνακα 2.2)

Η διαδικασία ήταν ως εξής:

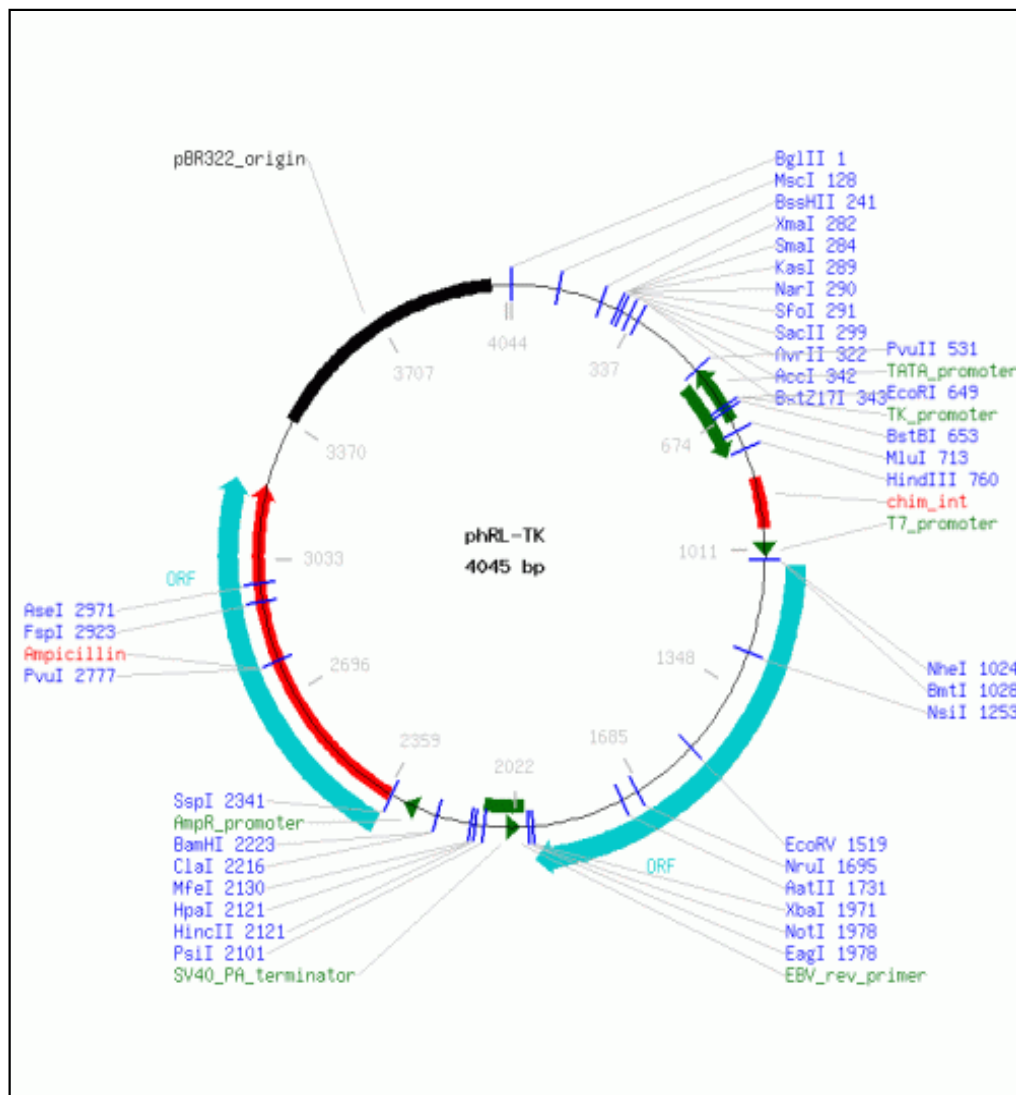
1. Διαλυτοποίηση θρεπτικού (χωρίς αντιβιοτικά και FBS) με την επιθυμητή ποσότητα πλασμιδίων και LNA που θα χρησιμοποιηθούν για επιμόλυνση σε σωληνάκι. Τελικός όγκος για κάθε πηγάδι 50μl
2. Διαλυτοποίηση λιποφεκταμίνης με DMEM σε σωληνάκι (2μl σε κάθε πηγάδι τελικός όγκος 50 μl) και επώαση για 5 λεπτά
3. Ανάμειξη των 2 πιο πάνω διαλυμάτων και επώαση για 20 λεπτά
4. Επιμόλυνση των κυττάρων 100μl ανά πηγάδι.
5. Επώαση των κυττάρων στους 37°C σε επωαστήριο CO₂ για 48 ώρες.
Προαιρετικά γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μετά από 4-5 ώρες.

	1	2	3	4	5	6
A	Empty	Empty	Empty	Wt-3UTR	Wt-3UTR	Wt-3UTR
B	mut-3'utr	mut-3'utr	mut-3'utr	Wt-3UTR+ LNA 15nM	Wt-3UTR+ LNA 15nM	Wt-3UTR+ LNA 15nM
C	Wt-3UTR+ LNA 25nM	Wt-3UTR+ LNA 25nM	Wt-3UTR+ LNA 25nM	Wt-3UTR+ LNA 50nM	Wt-3UTR+ LNA 50nM	Wt-3UTR+ LNA 50nM
D	Blank	Blank	Blank			

3SK + pHRL-TK
pGL4.10-MUT-
+pGL4.10-WT=
Κύτταρα χωρίς

Πλασμιδιακός φορέας rhRL-TK

Ο rhRL-TK είναι φορέας έκφρασης Renilla. Βλέπε σχήμα 2.4. Μετασχηματίζεται παράλληλα με το φορέα εξέτασης για τεχνικούς σκοπούς κανονικοποιήσεις. Η αντίδραση για το φωτισμό της Renilla έχει διαφορετικό υπόστρωμα από το την αντίδραση φωτισμού της Firefly, έτσι η μια δεν επηρεάζει την άλλη.



Σχήμα 2.4 : Πλασμιδιακός χάρτης φορέα έκφρασης Renilla(rhRL-TK) . Παρουσιάζονται όλες θέσεις περιοριστικής κοπής

Plasmids	Concentrations(μg/μl)	DNA per well / μg	x3.5 μg	Add in the 3.5 mix in μl
pBSK	0,337	0,4	1,4	4,154303
phRL-TK	0,1437	0,05	0,175	1,217815
pGL4	0,8652	0,35	1,225	1,415858
3'UTR-WT pGL4.10	0,27	0,35	1,225	4,537037
3'UTR-MUT pGL4.10	1	0,35	1,225	1,225

mix 1	Plasmids (μl)	DMEM up to 175(μl)
pBSK	4,15	168,21
phRL-TK	1,22	
pGL4.10	1,42	
mix2		
pBSK	4,15	165,09
phRL-TK	1,22	
3'UTR WT pGL4.10	4,54	
mix3		
pBSK	4,15	168,40
phRL-TK	1,22	
3'UTR MUT pGL4.10	1,23	
mix4		
pBSK	4,15	163,59
phRL-TK	1,22	
3'UTR WT pGL4.10	4,54	
LNA 25nM (concentration in 600μl total volume)	1,50	
from 10μM stock		
Lipofectamine for one mix (2μl/ well)	DMEM up to 175(μl) for one mix	How many samples
7	168	4,5
Lipofectamine for 4.5 mixes (24well plates) (μl)	DMEM for F11 mixes (24well plates)	
31,5	756	

Πίνακας 2.2 : Παράδειγμα ποσότητας πλασμιδίων και DMEM σε κάθε mix. Mix 1: Empty. Mix2: WT-3'UTR. Mix3: MUT-3'UTR. Mix4: WT-3'UTR LNA25nM

Βήμα 2.3**Dual-Luciferase Reporter Assay**

Το Dual-Luciferase Reporter Assay kit περιλαμβάνει 5X Passive Lysis Buffer (φυλάσσεται στους -4°C), LARII Luciferase assay Substrate in Luciferase assay Buffer II (φυλάσσεται στους -80°C), Stop & Glo reagent : 50X Stop & Glo Substrate (φυλάσσεται στους -4°C), + Stop & Glo Buffer (φυλάγεται στους -4°C).

Η διαδικασία μέτρησης έκφρασης λουσιφεράσης έχει ως εξής:

1. Επώση LARII και Stop & Glo Buffer σε θερμοκρασία δωματίου για να ξεπαγώσουν
2. Διαλυτοποίηση 5X Passive Lysis Buffer σε ddH₂O για τελική συγκέντρωση 1XPLB
3. Αφαίρεση θρεπτικού από κύτταρα και ξέπλυμα με 1XPBS-Phosphate Buffered Saline pH 7.4 (0.2M phosphate 1.5M NaCl)
4. Αφαίρεση 1XPBS και προσθήκη 1XPLB 300μl σε κάθε πηγάδι
5. Επώση για 20 λεπτά σε κινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία δωματίου
6. Διαλυτοποίηση 50X Stop & Glo Substrate με Stop & Glo Buffer για τελική συγκέντρωση 1X σε γυάλινο σωλήνα μικρής καλλιέργειας
7. Ρύθμιση του λουσιφερόμετρου Delay: 2s Reading Time:5s
8. Προσθήκη 60 μl κυττάρων με 1XPLB σε σωληνάκι
9. Προσθήκη 60 μl LARII στο σωληνάκι
10. Μέτρηση έκφρασης *Photinus pyralis* (Firefly) λουσιφεράσης στο λουσιφερόμετρο
11. Στο ίδιο σωληνάκι γίνεται προσθήκη 60 μl Stop & Glo Substrate
12. Μέτρηση έκφρασης *Renilla reniformis* (*Renilla*) luciferase
13. Υπολογισμός λόγου *Renilla* προς Firefly
14. Υπολογισμός μέσου όρου μετρήσεων ανά τριπλέττα
15. Κανονικοποίηση των μετρήσεων ως προς τη μέτρηση του Empty
16. Σχεδιασμός πινάκων

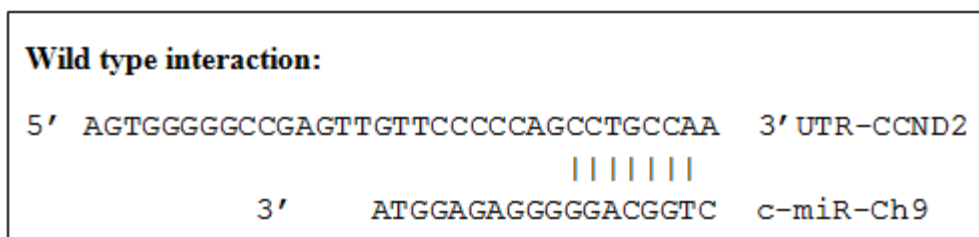
Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται σε χαμηλό φωτισμό. Το σωληνάκι του αντιδραστήριου LARII όπως ο γυάλινος σωλήνας του αντιδραστήριου Stop & Glo είναι τυλιγμένα με αλουμινόχαρτο.

Για της μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το λουσιφερόμετρο 12 Luminometer (Berthold Detection Systems, USA).

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

I. Κλωνοποιήσεις στο φορέα λουσιφεράσης

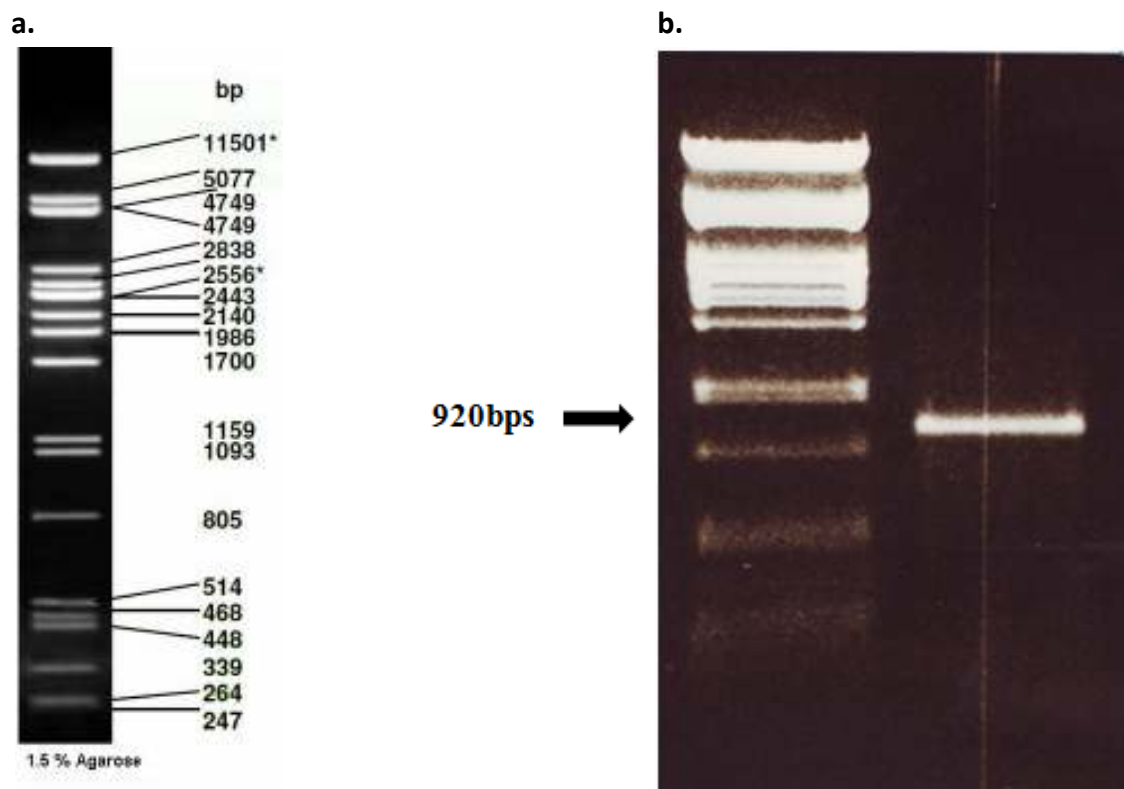
Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η *in silico* πρόβλεψη ότι το c-miR-Ch9 στοχεύει το 3'UTR του γονιδίου *CCND2*, (Σχήμα 3.1) διεκπερώθηκαν Luciferase assays σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα HeLa, τα οποία σύμφωνα με προηγούμενη έρευνα του εργαστήριου μας, εκφράζουν το c-miR-Ch9.[2] Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο κατασκευές κλωνοποίησης σε φορείς έκφρασης λουσιφεράσης pGL4.10 [luc2]. Στη πρώτη κατασκευή κλωνοποιήθηκε ένα μέρος του 3'UTR που περιείχε τη θέση στόχευσης από το c-miR-Ch9 και στη δεύτερη κατασκευή κλωνοποιήθηκε το 3'UTR αφού υπέστη τρεις σημειακές μεταλλάξεις, μέσω της τεχνικής PCR μεταλλαξιγένεσης, στη θέση στόχευσης. Αξίζει να ειπωθεί ότι δεν κλωνοποιήθηκε ολόκληρο το *CCND2* 3'UTR λόγω του μεγάλου μεγέθους του που θα έκανε αδύνατη την κλωνοποίηση του. Το κομμάτι προς εξέταση του 3'UTR που επιλέχθηκε είχε μήκος 920bps και κλωνοποιήθηκε εκατέρωθεν του γονιδίου λουσιφεράσης στο φορέα pGL4.10.



Σχήμα 3.1: Πιθανό σημείο δέσμευσης του c-miR-Ch9 στο 3'UTR του *CCND2* όπως προβλέυθηκε από το *TargetProfiler* και από άλλα υπολογιστικά προγράμματα πρόβλεψης

Σχεδιάστηκαν εκκινητές με θέσεις περιοριστικής κοπής του ενζύμου *XbaI* και στα δύο άκρα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε Reverse transcript PCR και PCR, από RNA extraction των HeLa. Το προϊόν της PCR μετά από ηλεκτροφόρηση είχε το αναμενόμενο μήκος 920bps (Σχήμα 3.2.b).

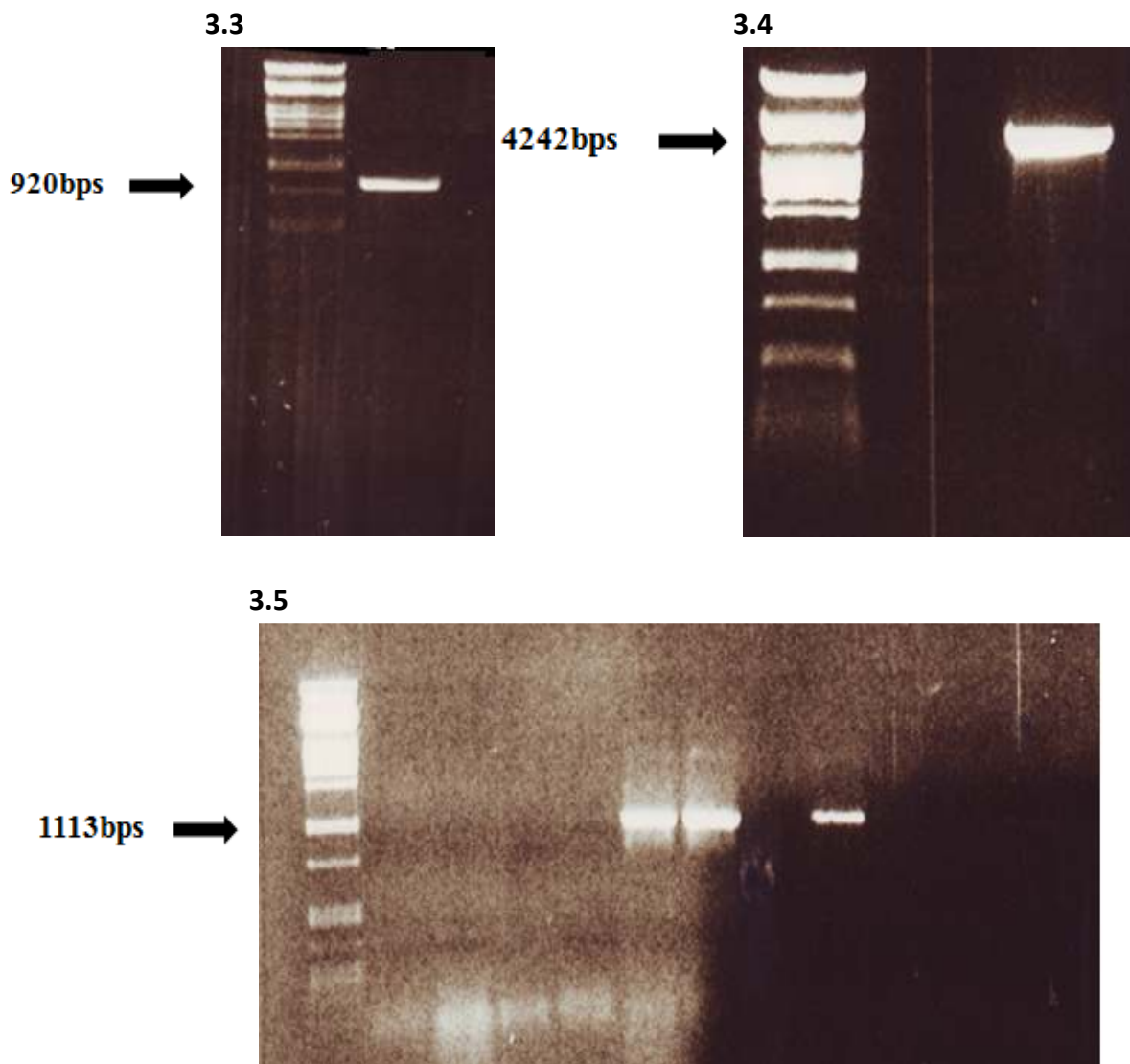
Ακολούθως, εφαρμόστηκε η αντίδραση συγκόλλησης άκρων για την ενοποίηση του PCR προϊόντος σε T-easy φορέα και αφού πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα, καλλιεργήθηκαν τέσσερις μοναδιαίες αποικίες. Έπειτα μετά από την απομόνωση των πλασμιδίων, εξακριβώθηκαν οι θετικοί κλώνοι με πέψη *EcoRI*. Ένας από αυτούς στάλθηκε για αλληλούχιση (Βλέπε παράρτημα 3.1)



Σχήμα 3. 2.α) Φωτογραφία marker PstI σε gel αγαρόζης 1.5%. Υποδεικνύει το μέγεθος της κάθε ζώνης σε bps ανάλογα με το ύψος που έχει τρέξει η κάθε ζώνη.β) Μετά από PCR ,3μl pcr product.Αριστερά:Pst1 marker Δεξιά: 920bps WT-3'UTR CCND2.

Κατα τον πολυμερισμό της Taq πολυμεράσης φαίνεται να προέκυψαν λίγες σημειακές μεταλλαγές μακριά όμως από το σημείο στόχευσης. Γι' αυτό το λόγο θεωρήθηκαν αμελητέες. Ακολούθως, διεξήχθη πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Xba*I στο pGEM-WT-3'UTR και αφού έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στη συνέχεια, έγινε εκχύλιση της DNA ζώνης. Το εκχύλισμα ηλεκτροφορήθηκε όπου φάνηκε ξεκάθαρα η αναμενόμενη ζώνη (Σχήμα 3.3) 920bps. Μετά, πραγματοποιήθηκε πέψη στο φορέα έκφρασης Firefly pGL4.10 με το ίδιο περιοριστικό ένζυμο *Xba*I. Ο ανοιχτός φορέας pGL4.10 έχει μήκος 4242bps.(Σχήμα 3.4)

Αφου έλαβε χώρα η αντίδραση συγκόλλησης άκρων του ανοιχτού φορέα pGL4.10 με το WT-3'UTR CCND2, αμέσως μετά, διεξήχθει μετασχηματισμός του προϊόντος σε βακτήρια *E.Coli* DH10 strain. Οι θετικοί κλώνοι ελέγχθηκαν με colony-PCR. Εάν η αποικία προς έλεγχο είναι θετική και με σωστό προσανατολισμό του ενθέματος, ο εσωτερικός εκκινητής Pluc μαζί με το P2 εκκινητη δημιουργούν ένα προϊόν PCR στις 1113bps(Σχήμα 3.5). Ένας από τους θετικούς κλώνους στάλθηκε για αλληλούχιση όπου διαπιστώθηκε η ορθότητα του. Για τα αποτελέσματα της αλληλούχισης βλέπε Παράρτημα 3.1.



Σχήμα 3.3 : Φωτογραφία από πήκτωμα αγαρόζης 1% ,μετά από ηλεκτροφόρηση του WT-3'UTR CCND2, προϊόν μετά από gel extraction . Αριστερά:Pst1 marker Δεξιά: 920bps WT-3'UTR CCND2. Σχήμα 3.4: Φωτογραφία μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.7% , προϊόν μετά από gel extraction pGL4.10-XbaI Αριστερά:Pst1 marker Δεξιά: 4242bps pGL4.10 -XbaI Σχήμα 3.5: Φωτογραφία μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της colony PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2%. Οι θετικές αποικίες αυτές που παράγουν προϊόν 1113bps. Αριστερά:Pst1 marker.

Προκειμένου να δημιουργηθούν μεταλλαγές στη θέση στόχο του 3'UTR (Σχήμα 3.6) χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της PCR μεταλαξίγησης. Τα βήματα της τεχνικής παρουσιάζονται στο σχήμα 2.2 (βλέπε υλικά μέθοδοι). Η διαδικασία περιλαμβάνει τρεις PCR αντιδράσεις χρησιμοποιώντας το pGL4.10-WT 3'UTR πλασμίδιο ως μήτρα, με συνθετικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές που περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη και είναι συμπληρωματικοί προς τη θέση στόχο. Οι δύο εκκινητές που σχεδιάστηκαν είναι οι παρακάτω:

Mutagenesis Left (b): CAGCGAGGGAAATTTTGATCCTTCCCCTCTTT

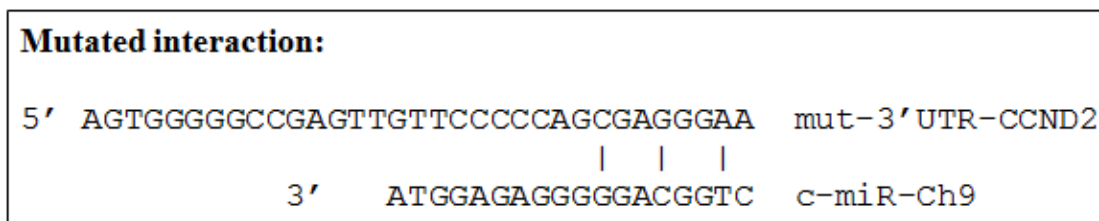
Mutagenesis Right(c): ATTTCCCTCGCTGGGGGAACAACCTCG

Το πρώτο στάδιο της τεχνικής είναι η διεκπεραίωση δύο αντιδράσεων PCR με εκκινητές. (Σχήμα 2.2)

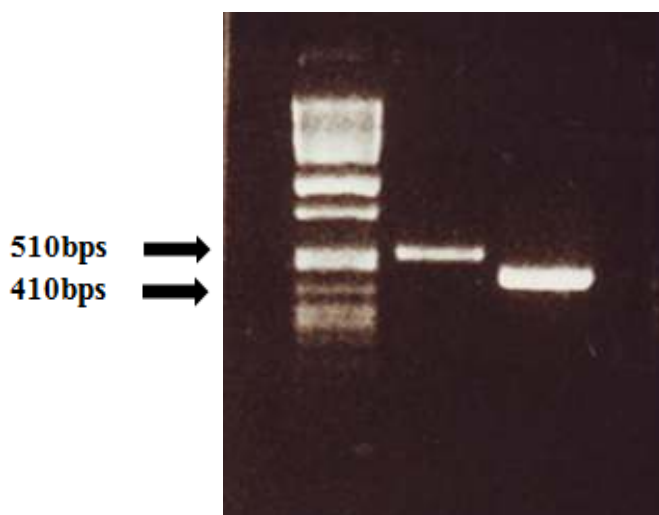
1) a + b (a = P1-FORWARD) 410bps

2) c + d (d = P2-REVERSE)

Τα δύο κομμάτια που προκύπτουν φέρουν τη μεταλλαγή που επιθυμούμε και όπως φαίνεται στο σχήμα 3.7, έχουν μήκος 410bps AB και 510bps CD αντίστοιχα.



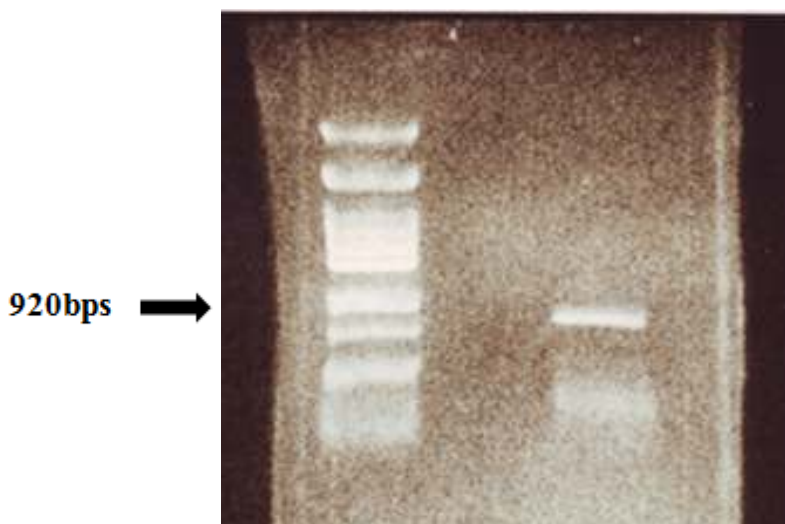
Σχήμα 3.6: Απεικονίζεται η μεταλλαγμένη θέση στόχευσης καθώς και η αλληλεπίδραση που μπορεί να έχει με το c-miR-Ch9.



Σχήμα 3.7: Φωτογραφία μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης 1.4% των δύο προϊόντων PCR με εκκινητές 1) a+b 2)c+d . Αριστερά:Pst1 marker. Δεξιά: 1)410 bps:AB 2)510 bps:CD

Στη συνέχεια, έχοντας τα δύο προϊόντα σαν μήτρα, χρησιμοποιήθηκαν οι εξωτερικοί εκκινητές a = P1-FORWARD και d = P2-REVERSE όπου διεξάχθηκε PCR με σκοπό την παραγωγή ολόκληρου του κομματιού (AD) που θα περιέχει τη μεταλλαγή. Μετά το άνοιγμα των αλυσίδων στη φάση της υβριδοποίησης τα δύο προϊόντα 1+2 είναι συμπληρωματικά στη περιοχή της μεταλλαγής. Λόγο του διαφορετικού T_m μεταξύ της περιοχής αυτής και των εξωτερικών εκκινητων εφαρμόστηκε μια επιπλέον αντίδραση επέκτασης εκκινητων και στη συνέχεια, προστέθηκαν οι εξωτερικοί εκκινητές(a,d). Το τελικό προϊόν της PCR είναι 920bps όσο δηλαδή και του WT 3'UTR όπως απεικονίζεται στο σχήμα 3.8. Ακολούθως, διεξάχθηκε η αντίδραση συγκόλλησης άκρων του προϊόν της PCR με T-easy φορέα. Στη συνέχεια, αφού πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα, καλλιεργήθηκαν τέσσερις μοναδιαίες αποικίες. Έπειτα μετά απο την απομόνωση των πλασμιδίων, εξακριβώθηκαν οι θετικοί κλώνοι με πέψη *EcoRI*. Ένας απο αυτούς στάλθηκε για αλληλούχηση. Για τα αποτελέσματα τις αλληλουχίας βλέπε Παράρτημα 3.2.

Στη συνέχεια, διεξάχθηκαν τα ίδια βήματα για την υποκλωνοποίηση του ενθέματος στο φορέα pGL4.10 που πραγματοποιήθηκαν στην πρώτη κατασκευή pGL4.10-WT 3'UTR. Το σχήμα 3.9 δείχνει τους θετικούς κλώνους. Αφού πραγματοποιήθηκαν και οι δύο υποκλωνοποιήσεις στάλθηκαν για αλληλούχιση. Τα αποτελέσματα ήταν τα ίδια με τις προηγούμενες αλληλούχισες



Σχήμα 3.8: Φωτογραφία μετά από ηλεκτοφόρηση του pcr προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.
Αριστερά:Pst1 marker. Δεξιά: 920 bps MUT-3' UTR



Σχήμα 3.9:Φωτογραφία μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των προϊόντων της colony pcr.
Αριστερά:Pst1 marker. Δεξιά: Οι θετικές αποικίες αυτές που παράγουν προϊόν 1113bps θετικοί κλώνοι.
Τελευταίο δείγμα θετικό control.

II. Μετρήσεις λουσιφεράσης

Στη συνέχεια διεκπερώθηκε μετασχηματισμός με τη χρήση λιπομφεκταμίνης των παραπάνω κατασκευών σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα HeLa. Η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού χρησιμοποιώντας λιπομφεκταμίνη μετρήθηκε με FACS και είναι 30-40%.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις λουσιφεράσης μετά από μετασχηματισμό δύο διαφορετικών κλωνοποιήσεων που κατασκευάστηκαν από προηγούμενη δουλειά. Οι κατασκευές αυτές είχαν γίνει στον ίδιο φορέα λουσιφεράσης και αποτελούνται από συγκεκριμένα ολιγονουκλεοτίδια που περιέχουν τη θέση στόχευσης τρεις φορές, υπό μορφή τριπλής κασέτας (~150bps). Η πρώτη κατασκευή είχε τη θέση στόχευσης σε WT μορφή και η δεύτερη κατασκευή σε μεταλλαγμένη μορφή MUT (ίδιες μεταλλάξεις με 3'UTR-MUT). Συγκεντρωτικά οι κατασκευές που έγιναν στον πειραματικό φορέα pGL4.10 ήταν οι ακόλουθες:

- 1) 3'UTR-WT- pGL4.10 (WT-3'UTR)
- 2) 3'UTR-MUT- pGL4.10 (MUT-3'UTR)
- 3) WT triplet- pGL4.10 (WT)
- 4) MUT triplet- pGL4.10 (MUT)

Επίσης για θετικό control χρησιμοποιήθηκε anti-c-miR-Ch9-LNA το οποίο υβριδοποιείται με το c-miR-Ch9 και καταστέλλει τη στόχευση του στη θέση στόχο (WT και WT-3'UTR). Οι συγκεντρώσεις anti-c-miR-Ch9-LNA που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεταξύ 15nM και 75 nM, για να καταλήξουμε ότι η συγκέντρωση 25nM είχε την καλύτερη κατασταλτική επίδραση.

Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκε άδειος φορέας pGL4.10 (EMPTY) για να παρατηρηθεί επίδραση του miRNA επι τοις εκατό. Επίσης για σκοπούς κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε ο φορέας phRL-TK ο οποίος εκφράζει το γονίδιο Renilla luciferase. Με την κανονικοποίηση επιτυγχάνεται, η απαλοιφή λαθών όπως, διαφορετικός αριθμός κυττάρων σε κάθε πηγάδι, αποτελεσματικότητας του μετασχηματισμού καθώς και της λύσης των κυττάρων. Επομένως, καταγράφονταν δύο μετρήσεις σε κάθε δείγμα, η πρώτη μέτρηση ήταν η έκφραση του γονιδίου αναφοράς (λουσιφεράσης) του πειραματικού φορέα pGL4.10 και η δεύτερη μέτρηση ήταν η έκφραση του γονιδίου Renilla, του φορέα ελέγχου phRL-TK .

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων ήταν η ακόλουθη:

1. Καταγραφή μετρήσεων.
2. Υπολογισμός λόγου δύο μετρήσεων (Firefly measurement / Renilla measurements)
3. Υπολογισμός μέσου όρου των τριών επαναλήψεων του άδειο φορέα (Empty).
4. Μετατροπή των μετρήσεων σε επι τις εκατόν, διαιρώντας με την πιο πάνω μέτρηση.
5. Υπολογισμός μέσου της κάθε περίπτωσης.
6. Υπολογισμός τυπικού σφάλματος. Οι τιμές των γραμμών σφάλματος υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τον τύπο του τυπικού σφάλματος της μέσης

τιμής και αντιπροσωπεύει την τυπική απόκλιση της κατανομής των δειγμάτων από το μέσο όρο.

7. Απεικόνιση μετρήσεων σε πίνακα.

Η επεξεργασία των μετρήσεων έγινε στο πρόγραμμα Microsoft Excel, όπου σχηματίστηκαν και οι παρακάτω πίνακες αποτελεσμάτων.(σελίδα 39,40,41)

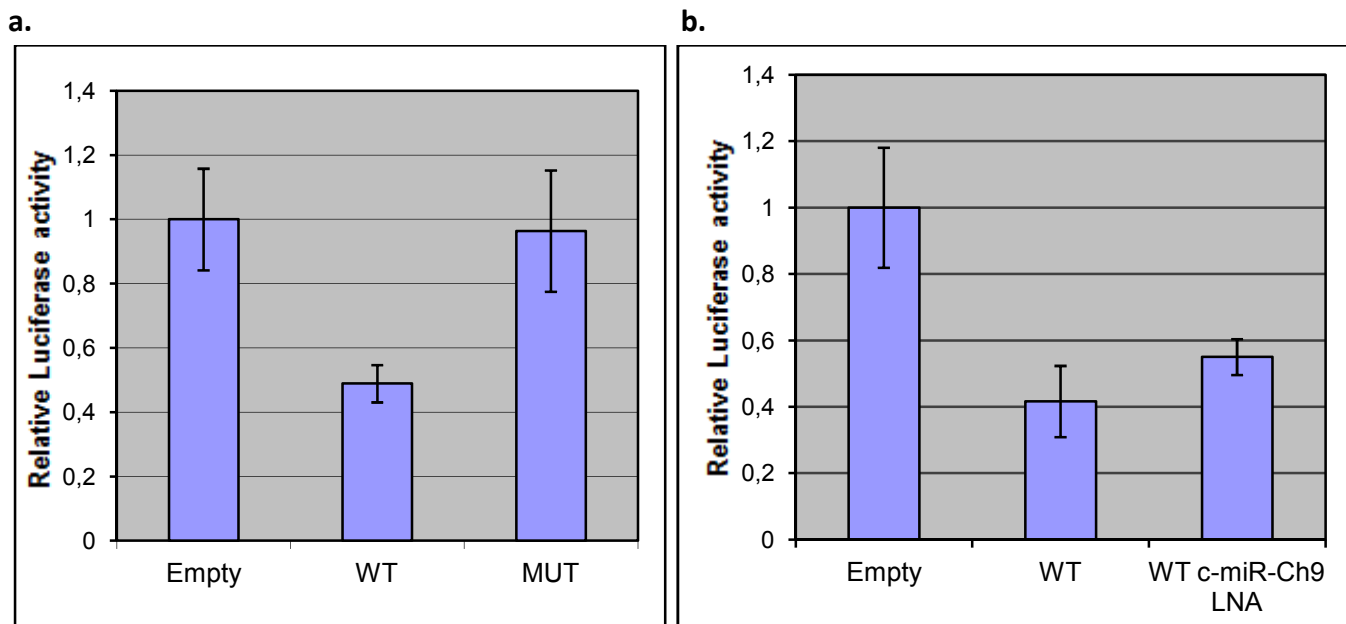
Αρχικά ελέγχθηκε το σήμα των γονιδίων αναφοράς WT triplet-pGL4.10 (WT) και MUT triplet-pGL4.10 (MUT) σε σχέση με τον άδειο φορέα (Empty).Οι μετασχηματισμοί στα HeLa κύτταρα επαναλήφθηκαν τρεις φορές με επιτυχία, όπου για κάθε συνθήκη προς εξέταση χρησιμοποιήθηκαν τρία δείγματα-πηγάδια με συγκεκριμένη ποσότητα κυττάρων. Ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης των γονιδίων αναφοράς από εννέα δείγματα των WT, MUT και Empty παρουσιάζεται στο σχήμα 3.10.a. Παρατηρείται, μείωση της σχετικής έκφρασης λουσιφεράσης στη WT μορφή της τάξεως 50% σε σχέση με τον άδειο φορέα. Αντιθέτως, η σχετική έκφραση λουσιφεράσης στην MUT μορφή κυμαίνεται στα ίδια περίπου επίπεδα με τον άδειο φορέα Empty.

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι η μείωση έκφρασης του γονιδίου αναφοράς στη WT triplet-pGL4.10 (WT) οφείλεται στο c-miR-Ch9, ελέγχθηκε η σχετική έκφραση του γονιδίου αναφοράς στη WT μορφή μετά από προσθήκη c-miR-Ch9 LNA. Ο πειραματικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με επιτυχία 2 φορές. Στο σχήμα 3.10.b φαίνεται ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης των γονιδίων αναφοράς από έξι δείγματα των WT και WT + anti-c-miR-Ch9 LNA, όπου διακρίνεται μια αύξηση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου αναφοράς της τάξεως 25%. Για να δούμε αν η διαφορά των μετρήσεων που βλέπουμε είναι στατιστικά σημαντικές χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση *t-test*. Πιο συγκεκριμένα το *t-test* ελέγχει αν η διαφορά, του μέσου όρου των μετρήσεων, μεταξύ δύο διαφορετικών καταστάσεων είναι στατιστικά σημαντική. Αν η τιμή του *t-test* για τις δύο συνθήκες είναι κάτω από 0.05 τότε η διαφορά τους θεωρείται στατιστικά σημαντική. Η εξίσωση του *t-test* είναι η εξής:

1: A κατάσταση προς έλεγχο
2: B κατάσταση προς έλεγχο
 $x_{1,2}$ = μέσος όρος μετρήσεων
 $s_{1,2}$ = διακύμανση μετρήσεων
 $n_{1,2}$ = αριθμός των μετρήσεων

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)}}$$

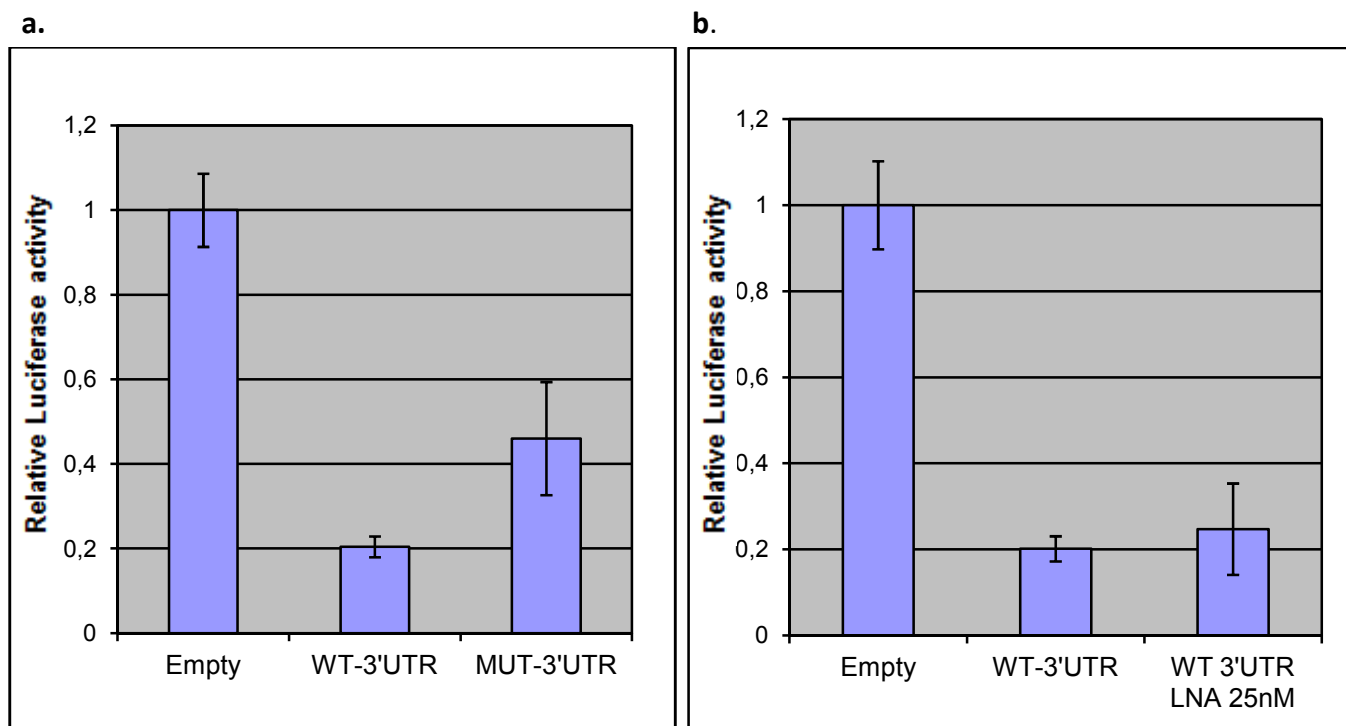
Οι διαφορές των μετρήσεων της WT μορφής με: α) τη WT + c-miR-Ch9 LNA 25nM και β) τη MUT μορφής, φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντικές. Το *t-test* έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Excel και έδωσε τις εξής τιμές: α) 0,0038 και β) 0,0018



Σχήμα 3.10.a) Relative Luciferase activity μετά από μετασχηματισμό σε HeLa cells με τρία διαφορετικά πλασμίδια. EMP –άδειος φορέας pGL4-10, WT –pGL4-10 που περιέχει τη θέση στόχου για c-miR-Ch9 σε τριπλή μορφή κασέτας, MUT– pGL4-10 τη θέση στόχου για c-miR-Ch9 σε μεταλλαγμένη μορφή σε τριπλή μορφή κασέτας
 b) Relative Luciferase activity μετά από μετασχηματισμό σε HeLa cells με WT-pGL4-10 και WT-pGL4-10 μαζί με LNA του c-miR-Ch9 25nM.

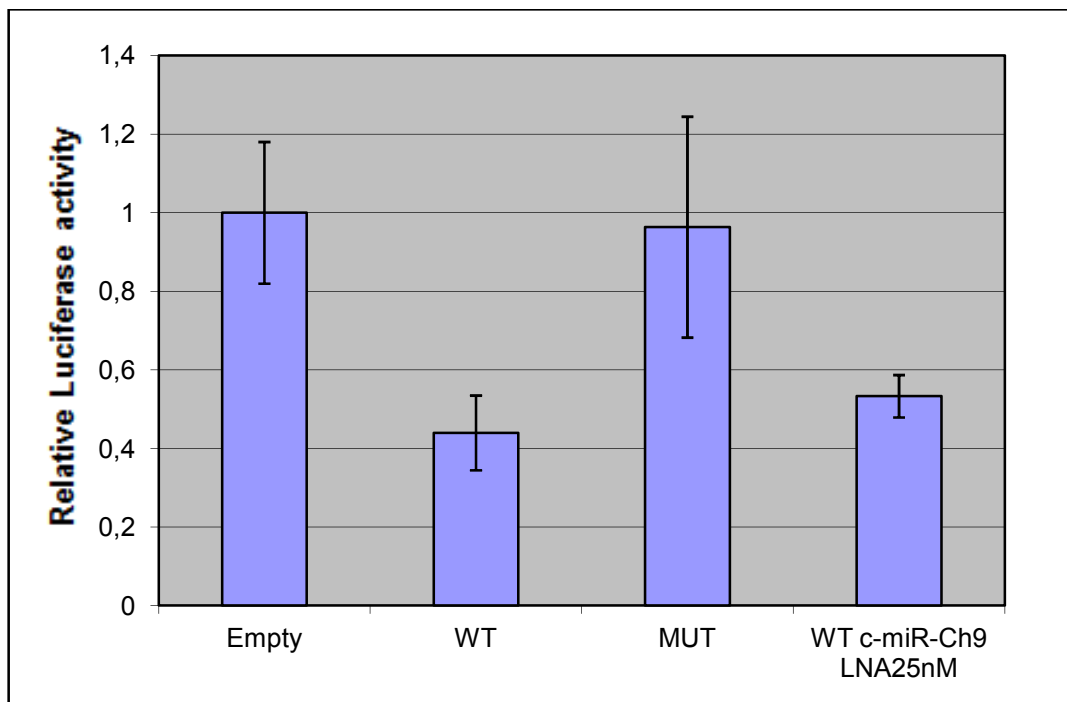
Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός με τα 3'UTR-pGL4.10 πλασμίδια όπου οι μετασχηματισμοί στα HeLa κύτταρα επαναλήφθηκαν τρεις φορές με επιτυχία και για κάθε μορφή προς εξέταση χρησιμοποιήθηκαν τρία δείγματα-wells με ορισμένη ποσότητα κυττάρων. Ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης των γονιδίου αναφοράς 3'UTR-WT-pGL4.10 (WT-3'UTR), 3'UTR-MUT-pGL4.10 (MUT-3'UTR) και Empty όπου κανονικοποιήθηκαν τα δείγματα παρουσιάζεται στο σχήμα 3.11.a. Το σήμα του γονιδίου αναφοράς, στις συνθήκες WT-3'UTR έχει μειωθεί κατά 80% σε σχέση με τον άδειο φορέα (Empty) 100%. Επίσης, η σχετική έκφραση του γονιδίου αναφοράς MUT-3'UTR αυξήθηκε κατά 26% σε σχέση με το WT-3'UTR. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η έκφραση του γονιδίου αναφοράς της WT-3'UTR μορφής μετά από προσθήκη c-miR-Ch9 LNA 25nM. Ο πειραματικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε δύο φορές και στο σχήμα 3.11.b φαίνεται ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης των γονιδίων αναφοράς WT-3'UTR και WT-3'UTR + anti-c-miR-Ch9 LNA. Η διαφορά έκφρασης της λουσιφεράσης μεταξύ του WT-3'UTR και WT-3'UTR μετά από την προσθήκη LNA 25nM, είναι της τάξεως του 5% η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική σύμφωνα με το *t-test* ($t=0,256968522$). Αντιθέτως, η διαφορά μεταξύ του 3'UTR-WT και του 3'UTR-MUT δείχνει να είναι στατιστικά σημαντική αφού το *t-test* έχει τιμή $4E-08$.

Στο σχήμα 3.12 συγκεντρώνονται τα αποτελέσματα των εννέα δειγμάτων για τον έλεγχο της σχετικής έκφρασης των WT triplet-pGL4.10 (WT) και MUT triplet-pGL4.10 (MUT), μαζί με τα έξι δείγματα για τον έλεγχο της σχετικής έκφρασης του WT triplet-pGL4.10(WT) μετά από προσθήκη c-miR-Ch9 LNA 25nM, κανονικοποιημένες με τις μετρήσεις του άδειου φορέα (Empty). Φαίνεται, ότι δεν επαναφέρεται πλήρως η έκφραση της λουσιφεράσης μετά από προσθήκη LNA

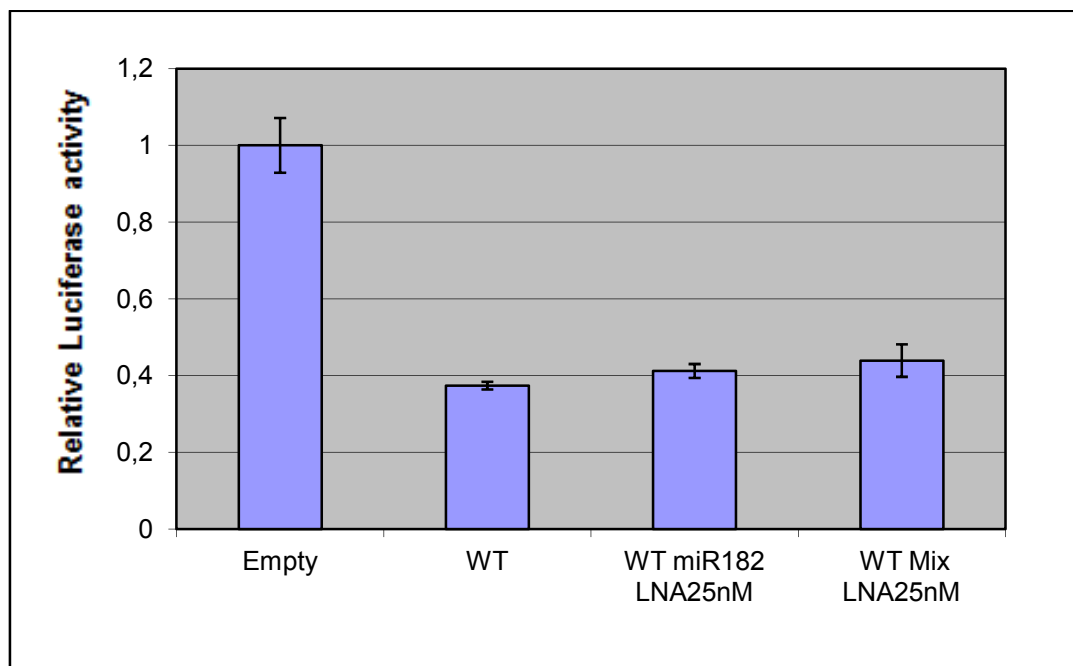


Σχήμα 3.11.α) Relative Luciferase activity μετά από μετασχηματισμό σε HeLa cells με τρία διαφορετικά πλασμίδια. EMP –άδειος φορέας pGL4-10, WT-3'UTR φορέας που περιέχει μία wild-type περιοχή του 3'UTR του CCND2 (920bps) που περιέχει πιθανή θέση στόχου του c-miR-Ch9, MUT -3'UTR(920bps) το ίδιο κομμάτι του 3'UTR με μεταλλαγμένη τη θέση στόχο για c-miR-9. β) Relative Luciferase activity μετά από μετασχηματισμό σε HeLa cells με WT-3'UTR-pGL4-10 μαζί με LNA του c-miR-Ch9 25nM.

c-miR-Ch9. Έτσι, θεωρήθηκε σημαντικό να εξεταστεί το ενδεχόμενο το miR-182 να στοχεύει το CCND2 και να ανταγωνίζεται τη θέση στόχευσης με το c-miR-Ch9. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα υπολογιστικά προγράμματα πρόβλεψης στόχου PicTar και TargetScan έδειξαν ότι το miR-182 στοχεύει το CCND2 στην ίδια θέση που στοχεύει το c-miR-Ch9. Επίσης, αναφέρθηκε ότι το miR-182 εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στα HeLa κύτταρα με βάση deep sequencing δεδομένων. Έτσι πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις λουσιφεράσης, μετά από μετασχηματισμό των πλασμιδίων: α) WT triplet- pGL4.10 (WT) β) WT triplet- pGL4.10 (WT) + miR-182 LNA25nM, γ) WT triplet- pGL4.10 (WT) + miR-182 LNA25nM + c-miR-Ch9 LNA25nM σε HeLa κύτταρα. Με αυτές τις περιπτώσεις προς εξέταση μπορούμε να διαγνώσουμε αν εν τέλει το miR182 στοχεύει το CCND2 παράλληλα με το c-miR-Ch9. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στο σχήμα 3.13 και έχουν ως εξής: α) (WT) μείωση της σχετικής έκφρασης λουσιφεράσης κατά 60% έναντι του Empty (100%) β) (WT miR182 LNA25nM) αύξηση κατά 0.04% σε σχέση με WT και γ) (WT mix LNA 25Nm) αύξηση κατά 6% σε σχέση με WT. Το πείραμα διεξάχθηκε μόνο μια φορά και για κάθε συνθήκη προς εξέταση χρησιμοποιήθηκαν τρία δείγματα-wells και γ'αυτό τα αποτελέσματα δε θεωρούνται στατιστικά σημαντικά. Παρ'όλα αυτά είναι ένα πείραμα με πολύ καλά τυπικά σφάλματα που δείχνει ότι είναι αρκετά αξιόπιστο για ένα πρώτο έλεγχο.



Σχήμα 3.12: Relative Luciferase activity μετά από μετασηματισμό σε HeLa cells με τρία διαφορετικά πλασμίδια. EMP-άδειος φορέας pGL4-10, WT- pGL4-10 που περιέχει τη θέση στόχου για c-miR-Ch9 σε τριπλή μορφή κασέτας, MUT- pGL4-10 που περιέχει τη θέση στόχου για c-miR-Ch9 σε μεταλλαγμένη μορφή σε τριπλή μορφή κασέτας. Ο μετασηματισμός του φορέα WT-pGL4-10 επαναλήφθηκε παράλληλα με προσθήκη anti-LNA για το c-miR-ch9 25nM (WT c-miR-Ch9 LNA 25Nm)



Σχήμα 3.13: Relative Luciferase activity μετά από μετασηματισμό σε HeLa cells με δύο διαφορετικά πλασμίδια. EMP-άδειος φορέας pGL4-10, WT- pGL4-10 που περιέχει τη θέση στόχου για c-miR-Ch9 σε τριπλή μορφή κασέτας. Ο μετασηματισμός του φορέα WT επαναλήφθηκε παράλληλα με προσθήκη anti LNA-miR182 και anti-LNA mix το οποίο είναι μία μίξη και των δύο LNA σε τελική συγκέντρωση 25nM.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα microRNA έχουν χαρακτηριστεί ως βαρυσήμαντοι ρυθμιστές έκφρασης πρωτεϊνών, παίζοντας τεράστιο ρόλο στα αναπτυξιακά στάδια των οργανισμών καθώς και στην κανονική λειτουργία τους. Η εμφάνιση καρκίνου σε πολλές περιπτώσεις συνδέεται με τη μη κανονική τους έκφραση. Τα γονίδια των παραπάνω γνωστών miRNA, συναντώνται σε περιοχές γονιδιώματος που είναι επιρρεπής σε μεταβολές και παράλληλα σχετίζονται με εμφάνιση καρκίνου[5]. Έτσι εδώ και αρκετά χρόνια η έρευνα στράφηκε και προς αυτά για την περαιτέρω κατανόηση της λειτουργίας τους και για τη σχέση τους με τον καρκίνο. Έχει αποδειχθεί ότι τα microRNA μπορούν να συμπεριφέρονται σαν ογκογονίδια καθώς και σαν ογκοκαταστολείς[1] όπου και οι δύο περιπτώσεις οδηγούν στην εμφάνιση καρκίνου. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί υπολογιστικά προγράμματα πρόβλεψης πιθανών στόχων miRNA, με σκοπό την αποφυγή χρονοβόρων πειραματικών διαδικασιών καθώς και τη λάθος επιλογή στόχου προς εξέταση.

Στην παρούσα εργασία γίνεται μια αναφορά σε ένα μη δημοσιευμένο υπολογιστικό εργαλείο πρόβλεψης στόχων miRNA, ονομαζόμενο *Targetprofiler* το οποίο φαίνεται να είναι αρκετά ανταγωνιστικό σε σχέση με τα γνωστά εργαλεία πρόβλεψης Pictar, TargetScan, και DIANAMicroT. Σε προηγούμενη δουλειά είχαν βρεθεί τέσσερα καινούρια δυνητικά miRNA και ως συνέχεια αυτής της δουλειάς χρησιμοποιήθηκε το *Targetprofiler* για την εύρεση πιθανών στόχων ενός από τα παραπάνω(c-miR-Ch9). Η γονιδιωματική περιοχή του c-miR-Ch9 φαίνεται να είναι διαγραμμένη σε ποσοστό 44% των ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστης[12]. Επιπρόσθετα, πρόσφατα δεδομένα έκφρασης miRNA, από deep sequencing σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης δεν ανιχνεύουν την έκφραση του c-miR-Ch9 [19].

Ο πιο αξιόπιστος στόχος που είχε ανιχνευθεί από το *Targetprofiler* καθώς και από τα άλλα προγράμματα ήταν η κυκλίνη D2 η οποία είναι απαραίτητη για τη μετάβαση της G1 φάσης στη S φάση κατά τον κυτταρικό κύκλο. Στα θηλαστικά η απορύθμιση έκφρασης της CCND2 οδηγεί στην αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού[20] και όπως φαίνεται ρυθμίζεται από αρκετά miRNA. Πιο συγκεκριμένα το let-7a στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη εκφράζεται σε μειωμένα επίπεδα έναντι των κανονικών και έχει δείχθει ότι στοχεύει μεταξύ άλλων γονιδίων και την κυκλίνη D2[15]. Υπερκραίνοντας το miR-26a σε HepG2 κύτταρα, οι Kota και οι συνεργάτες παρατήρησαν ότι τα περισσότερα κύτταρα ήταν σταθεροποιημένα στη G1 φάση. Στη συνέχεια με luciferase assays καθώς και με πρωτεϊνική ανάλυση, έδειξαν ότι το miR-26a ρυθμίζει την έκφραση του CCND2 [13]. Τέλος το miR-154 ρυθμίζει και αυτό την έκφραση του CCND2, όπως φαίνεται από Western blot ανάλυση για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη, μετά από μετασχηματισμό του miR-154 σε HepG2 κύτταρα[14]. Οι τρεις αναφερθέντες περιπτώσεις στόχευσης της κυκλίνης D2 μας

οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το *CCND2* έχει χαρακτήρα ογκογονιδίου αφού η υπερέκφραση του οδηγεί στην εμφάνιση κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Ο πρωταρχικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η κλωνοποίηση του 3'UTR του γονιδίου *CCND2* σε φορέα λουσιφεράσης στην άγριου τύπου μορφή του, καθώς και σε μεταλλαγμένη μορφή. Η μεταλλαγή πραγματοποιήθηκε σε τρία νουκλεοτίδια μέσα στη θέση στόχευσης έτσι ώστε η μεταβολή της έκφρασης της λουσιφεράσης να οφείλεται στη μη ειδική δέσμευση του miRNA στη συγκεκριμένη θέση. Στη συνέχεια, αφού ήταν γνωστό ότι το c-miR-Ch9 εκφράζεται σε HeLa κύτταρα διεξάχθηκε μετασχηματισμός σε αυτά με τις παραπάνω κλωνοποιήσεις όπου και μετρήθηκε η έκφραση λουσιφεράσης με λουσιφερόμετρο. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις λουσιφεράσης με πλασμίδια που είχαν κατασκευαστεί από προηγούμενη δουλειά, τα οποία έφεραν τη θέση στόχο σε τριπλή μορφή κασέτας σε αγρίου τύπου μορφή, καθώς και σε μεταλλαγμένη. Θα ήταν σημαντικό να πούμε ότι όλα τα πειράματα που διεξάχθηκαν για τις μετρήσεις λουσιφεράσης πραγματοποιήθηκαν κάτω από όμοιες συνθήκες.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα, όσον αφορά τη WT μορφή τριπλέτας, βλέπουμε μία σημαντική μείωση του σήματος της λουσιφεράσης και μία αύξηση του σήματος στη MUT μορφή τριπλέτας. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι στη συγκεκριμένη θέση του 3'UTR του *CCND2* δεσμεύεται ένα miRNA που πιθανώς να είναι το c-miR-Ch9.(Σχήμα 3.10.a). Το σήμα αυτό είχε επαναληφθεί αρκετές φορές για να είμαστε σε θέση να το εμπιστευτούμε. Επιπλέον, με την προσθήκη anti-c-miR-Ch9 LNA στη WT μορφή τριπλέτας σημειώθηκε μερική αύξηση του σήματος. Το σήμα αυτό είχε επαναληφθεί δύο φορές, συνεπώς υποθέτουμε ότι το c-miR-Ch9 δεσμεύεται σε αυτή τη θέση.(Σχήμα 3.10.b).

Στην περίπτωση της WT-3'UTR μορφής τα αποτελέσματα δείχνουν μείωση του σήματος του γονιδίου αναφοράς, καθώς επίσης και αύξηση του σήματος στη MUT-3'UTR μορφή. Με την προσθήκη anti-c-miR-Ch9 LNA στη WT-3'UTR μορφή παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση του σήματος του γονιδίου αναφοράς η οποία όμως δε θεωρείται στατιστικά σημαντική.(Σχήμα 3.11.a,3.11.b). Δεδομένης της στατιστικά σημαντικής μερικής επαναφοράς του σήματος της WT μορφή τριπλέτας μετά απο προσθήκη LNA, δε θεωρήθηκε σημαντικό να ελεγχθεί περαιτέρω η επαναφορά του σήματος μετά απο προσθήκη στη 3'UTR μορφή.

Παρ'όλα αυτά, το σήμα της λουσιφεράσης μετά από προσθήκη anti-c-miR-Ch9 LNA δεν έφτασε τα επίπεδα του άδειου φορέα (Empty).(Σχήμα 3.12) Το γεγονός αυτό μας προέτρεψε να εξετάσουμε το ενδεχόμενο, αν τελικά υπάρχουν και άλλα miRNA που στοχεύουν το ίδιο σημείο που στοχεύει το c-miR-Ch9. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως το *Targetprofiler* βρήκε ότι μόνο το c-miR-Ch9 στοχεύει τη συγκεκριμένη θέση στόχο, αντιθέτως το Pictar και το Targetscan ανέχνευσαν ότι υπάρχουν ακόμα τρία miRNA που στοχεύουν το ίδιο σημείο, το miR-96, το miR-182 και το miR-1127. Ωστόσο, από tilling arrays των HeLa κυττάρων φαίνεται ότι μόνο το miR-182 εκφράζεται σε αυτά και μάλιστα σε πολύ χαμηλά επίπεδα[21]. Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε σημαντικό να ελεγχθεί το ενδεχόμενο ανταγωνισμού στόχευσης του *CCND2* 3'UTR μεταξύ του miR-182 και c-miR-Ch9. Το πείραμα του συγκεκριμένου ελέγχου, πραγματοποιήθηκε μία μόνο φορά και τα αποτελέσματα δεν έδειξαν

σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς WT-triplet μετά από προσθήκη anti miR182 LNA, ούτε με την προσθήκη και των δύο LNA δεν παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση (Σχήμα 3.13). Τα αποτελέσματα όμως, ενός πειράματος δε θεωρούνται στατιστικά σημαντικά για να μπορούμε να τα εμπιστευτούμε και να διεξάγουμε συμπεράσματα, πέρα από αυτό όμως μας δίνουν ερεθίσματα για να κάνουμε κάποιες υποθέσεις.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι σύμφωνα με deep sequencing δεδομένα σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, το miR-96 και το miR-182 εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα έναντι των κανονικών κυττάρων. Επίσης, στην ίδια δημοσίευση εξετάστηκε η έκφραση του miR-182, μεταξύ άλλων, (σε πενήντα ένα ασθενείς) με Real-Time qPCR όπου τα αποτελέσματα παρουσίασαν υψηλό συσχετισμό με τα αποτελέσματα του deep sequencing[19]. Όσον αφορά την έκφραση του *CCND2*, σύμφωνα με ολιγονουκλεοτιδική ανάλυση RNA σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, φαίνεται να είναι αυξημένη σε σχέση με κανονικά κύτταρα[22]. Με αυτές τις δύο πληροφορίες μπορούμε να πούμε ότι είναι αντιφατικό να θεωρούμε ότι το miR-182 ρυθμίζει το *CCND2*. Για να είναι ορθή η πάραπανω υπόθεση, θα έπρεπε, ή το *CCND2* ή το miR-182, να έχει μειωμένη έκφραση στα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι η κυκλίνη D2 είναι στόχος του c-miR-Ch9, όμως λόγω της μη πλήρους επαναφοράς του γονιδίου αναφοράς μετά την προσθήκη anti-c-miR-Ch9 LNA εικάζουμε ότι δεν είναι το μοναδικό miRNA που στοχεύει τη συγκεκριμένη θέση στόχο. Η πιθανότητα να στοχεύετε και από το miR-182 δεν αποκλείεται λόγω του ενός πειράματος, έτσι θα ήταν εύλογο να επαναληφθεί το ίδιο πείραμα (πίνακας 3.5) ώστε να έχουμε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα και να διεξαχθούν περαιτέρω συμπεράσματα.

Ολοκληρώνοντας, τα αποτελέσματα έχουν διπλή σημασία, αφενός επιβεβαιώνουν ότι το πρωταρχικό μικρό RNA μόριο που εμφανίστηκε στο northern blot [2] είναι πραγματικό miRNA και αφετέρου ότι το συγκεκριμένο miRNA στοχεύει το *CCND2*. Το *CCND2*, όπως έχει ειπωθεί και πριν, είναι ένα ογκογονίδιο και λόγω αυτού είναι πιθανό το c-miR-Ch9 να έχει χαρακτήρα ογκοκαταστολέα. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι οι ασθενείς καρκίνου ουροδόχου κύστης που έχουν διαγραμμαμένη τη γονιδιακή περιοχή που προέρχεται το c-miR-Ch9, παρουσιάζουν έντονο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μεταξύ άλλων αιτιών, λόγω της ανικανότητας τους να ρυθμίσουν το *CCND2*. Υπερέκφραση της κυκλίνης D2 οδηγεί στην υπέρμετρη μετατροπή των κυττάρων από τη G1 φάση στη S, οδηγώντας στην εμφάνιση ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αυτή η υπόθεση όμως, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για να επιβεβαιωθεί.

Προκειμένου να απαντηθούν καίρια ερωτήματα, πρέπει να γίνει μια σειρά πειραμάτων όπως, να ερευνηθεί βαθύτερα το ενδεχόμενο το *CCND2* να στοχεύεται από το miR-182. Επίσης, η μελέτη του μεταγραφήματος *CCND2* με Real-timePCR μετά από μετασχηματισμό anti-c-miR-Ch9 LNA σε HeLa κύτταρα καθώς και η μελέτη πρωτεϊνικής μορφής της *CCND2* με την τεχνική western blot θα δώσουν απαντήσεις στο ερώτημα αν το c-miR-Ch9 ρυθμίζει τη μεταγραφή καθώς και τη μετάφραση του *CCND2*. Επιπλέον, ένα northern blot σε RNA extraction από αγρίου τύπου και από

καρκινική σειρά ανθρώπινων κυττάρων ουροδόχου κύστης με σκοπό την ανίχνευση του c-miR-Ch9. Με αυτό το πείραμα επιβεβαιώνουμε τις έρευνες των Simoneau et al ότι η γονιδιωματική περιοχή του c-miR-Ch9 είναι διαγραμμένη σε ασθενείς ουροδόχου κύστης. Τέλος, αφού πραγματοποιηθούν τα παράπανω πειράματα, θα πρέπει να ερευνηθεί η επίδραση του c-miR-Ch9 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης.

Με την ολοκλήρωση αυτών των πειραμάτων θα είμαστε απόλυτα σίγουροι ότι το c-miR-Ch9 ρυθμίζει την έκφραση της CCND2 και η μη κανονική έκφραση του οδηγεί στην εμφάνιση καρκίνου της ουροδόχου κύστης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Calin, G.A. and C.M. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 857-866.
2. Oulas, A., et al., *Prediction of novel microRNA genes in cancer-associated genomic regionsβ€”a combined computational and experimental approach*. 2009. p. 3276-3287.
3. Simoneau, A.R. and P.A. Jones, *Bladder cancer: the molecular progression to invasive disease*. World J Urol, 1994. **12**(2): p. 89-95.
4. Oulas, A., *Development of an Improved MicroRNA Target Prediction Tool and Utilization in Prediction of a Novel MicroRNA Gene::Target Interaction*. in preparation.
5. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs [mdash] microRNAs with a role in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): p. 259-269.
6. van Rooij, E., *The Art of MicroRNA Research*. 2011. p. 219-234.
7. Bartel, D.P., *MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-233.
8. Guo, H., et al., *Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels*. Nature. **466**(7308): p. 835-840.
9. Obad, S., et al., *Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs*. Nat Genet, 2011. **43**(4): p. 371-8.
10. Rossi, S., et al., *Cancer-associated genomic regions (CAGRs) and noncoding RNAs: bioinformatics and therapeutic implications*. Mammalian Genome, 2008. **19**(7): p. 526-540.
11. Oulas, A., et al., *Finding Cancer-Associated miRNAs: Methods and Tools*. Molecular Biotechnology. **49**(1): p. 97-107.
12. Simoneau, M., et al., *Four tumor suppressor loci on chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two novel candidate regions at 9q22.3 and 9q31*. *Oncogene*. 1999.
13. Kota, J., et al., *Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model*. Cell, 2009. **137**(6): p. 1005-17.
14. Wang, W., et al., *Human tumor microRNA signatures derived from large-scale oligonucleotide microarray datasets*. International Journal of Cancer, 2010. **129**(7): p. 1624-1634.
15. Dong, Q., et al., *MicroRNA let-7a inhibits proliferation of human prostate cancer cells in vitro and in vivo by targeting E2F2 and CCND2*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10147.
16. Friedlander, M.R., et al., *Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep*. Nat Biotech, 2008. **26**(4): p. 407-415.
17. Bueno, M.J. and M. Malumbres, *MicroRNAs and the cell cycle*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1812**(5): p. 592-601.
18. Karin L Heckman & Larry R Pease *Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension*. Nature Protocols 2, 2007. **924 - 932**
doi:10.1038/nprot.2007.132.
19. Han, Y., et al., *MicroRNA expression signatures of bladder cancer revealed by deep sequencing*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e18286.

20. Metcalf, R.A., et al., *Characterization of D-cyclin proteins in hematolymphoid neoplasms: lack of specificity of cyclin-D2 and D3 expression in lymphoma subtypes*. Mod Pathol, 2010. **23**(3): p. 420-33.
21. Kapranov, P., et al., *RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription*. Science, 2007. **316**(5830): p. 1484-8.
22. Su, A.I., et al., *A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 6062-7.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3.1:

Η αναμενόμενη αλληλουχία του WT-3'UTR. Η κίτρινη περιοχή είναι η δυνητική θέση στόχευσης του c-miR-9 και με κόκκινα γράμματα είναι θέσης περιοριστικού ενζύμου XbaI :

```
>TCTAGAATGGTGACTGACCCTTGAGCTTAAACAGAAGCAGCAAATGAAAGAACCGGA
CAAATAAGGAAGGGCACAGCCTACCCGACTCTATTTACAGTCTGTAACCTTCCACTC
TCCTGTAGTCCCGAGGCCCTGGGTCTTCTAGCTTTTCTCTTTCCCATCCTTGGGG
CCTTGTGTGATGATGGGTGTGGGGCTGCCGATGGGAAAGTCGGGGGTGTAGGCTTT
TCTGCCTGCTCCTGCTTAAACACAAGAAGGAATCCTGGATTTTGCCCTCTCCTTAGCT
CTTAGTCTCTTTGGTAGGAGTTTTGTTCAGAGGAGCTCTCCCCCTTGGATTTGAACT
TGCTCTTTTTGTTGTTGTTGTTCTTTCTCTTCTTTTTCTTACCTCCCACTAAAGGGGT
TCCAAATATCCTGGTCTTTTTCTACCTTGTGTGTTTCTATCTCGTCTTTACTTCCA
TCTGTTTGTTTTTTTCTCCATCAGTGGGGGCCGAGTTGTTCCCCCAGCCTGCCA AATT
TTGATCCTTCCCCTCTTTTGGCCAAATCCTAGGGGGAAGAAATCCTAGTATGCCAAA
ATATATGCTAAGCATAATTAAACTCCATGCGGGTCCATAACAGCCAAGAAGCCTGCAG
GAGAAAGCCAAGGGCAGTTCCCTCCGCAGAACACCCCATGCGTGCTGAGAGGCGAGCT
CCTTGAAGAAGGGGCTGTTCTTCCAGGAGGCCTTATTTTGAAGTGCCTCAGGACCCCA
CTGGAGAGCACAGCATGCCTTACTACTGGGTATCCTTGGTCTATGTGCTCTGTACTG
GAGGCTCTGTTCTGCCTCTTATCAGCCAGGTCAGGGGCACACATGGCTTAAGTGACAA
AGCCAGAGGAGAAGACAACCCCTGACAGCATCACGCTGCATCCCATTGCTAGCAGGAT
CTAGA
```

Αποτελέσματα της αλληλούχισης WT-3'UTR με T7 και SP6 εκκινητές. Ο T7 είναι ένας εκκινητής πάνω στο φορέα pGEM λίγο πιο ανοδικά από τη θέση ένθεσης ενώ ο SP6 είναι εκκινητής που έχει αντίθετη φορά και υβριδοποιείται στο φορέα εκατέρωθεν της ένθεσης:

>CCND2-3'UTR-T7

```
TCTAGAATGGTGACTGACCCTTGAGCTTWAACAGAAGCGGCAAATGAAAGAACCGGAC
AAATAAGGAAGGGCACAGGCCTACCCGACTCTATTTACAGTCTGTAACCTTCCACTCT
TCCTGTAGTCCCGAGGCCCTGGGTCTTCTAGCTTTTCTCTTTCCCATCCTTGGGGC
CTTGTGTGATGATGGGTGTGGGGCTGCCGATGGGAAAGTCGGGGGTGTAGGCTTTT
CTGCCTGCTCCTGCTTAAACACAAGAAGGAATCCTGGATTTTGCCCTCTCCTTAGCTC
TTAGTCTCTTTGGTAGGAGTTTTGTTCAGAGGAGCTCTCCCCCTTGGATTTGAACTT
GCTCTTTTTGTTGTTGTTGTTCTTTCTCTTCTTTTTCTTACCTCCCACTAAAGGGGT
CCAAATATCCTGGTCTTTTTCTACCTTGTGTGTTTCTATCTCGTCTTTACTTCCAT
CTGTTTGTTTTTTTCTCCATCAGTGGGGGCCGAGTTGTTCCCCCAGCCTGCCA AATT
TGATCCTTCCCCTCTTTTGGCCAAATCCTAGGGGGAAGAAATCCTAGTATGCCAAA
TATATGCTAAGCATAATTAAACTCCATGCGGGTCCATAACAGCCAAGAAGCCTGCAGG
AGAAAGCCAAGGGCAGTTCCCTCCGCAGAACACCCCATGCGTGCTGAGAGGCGAGCTC
CTTGAAGAAGGGGCTGTTCTTCCAGGAGGCCTTATTTTGAAGTGCCTCAGGACCCCA
TGAGAGACACAGCATGCCTTACTACTGGGTATCCTTGGTCTATGTGCTCTGTACTGG
AGGCTCTGTTCTGCCTCTTATCAGCCA
```

>CCND2-3'UTR-SP6

TCTAGAATYCTGCTAGCAATGGGATGCAGCGTGATGCTGTCAGGGTTGTCTTCTCCTC
 TGGCTTTGTCACTTAAGCCATGTGTGCCCTGACCTGGCTGATAAGAGGCAGAACAGA
 GCCTCCAGTACAGAGCACATAGACCAAGGATGACCCAGTAGTAAGGCATGCTGTGCTC
 TCCAGTGGGGTCTTGAGGCAGTTCAAATAAAGGCCTCCTGGAAGAACAGCCCCTTCTT
 CAAGGAGCTCGCCTCTCAGCACGCATGGGGTGTCTGCGGAGGGAACCTGCCCTTGGCT
 TTCTCCTGCAGGCTTCTTGGCTGTTATGGACCCGCATGGAGTTTAATTATGCTTAGCA
 TATATTTTTGGCATACTAGGATTTCTTCCCCCTAGGATTTGGCCAAAAGAGGGGAAGG
 ATCAAAATTTGGCAGGCTGGGGGAACAACCTCGGCCCCCACTGATGGAGAAAAAACAA
 ACAGATGGAAGTAAAGACGAGATAGAAACACAACAAGGTAGAAAAAGACCAGGATAAT
 TTGGAACCCCTTTAGTGGGAGGTAAGAAAAAGAAGAGAAAGAACAACAACAAAAA
 GAGCAAGTTCAAATCCAAGGGGGAGAGCTCCTCTGGAACAAAACCTCCTACCAAAGAGA
 CTAAGAGCTAAGGAGAGGGCAAAATCCAGGATTCCTTCTTGTGTTTAAGCAGGAGCAG
 GCAGAAAAGCCTAACAAACCCCGACTTTCCCATCGGCAGCCCCACACCCATCATCACA
 CAAGGCCCAAGGATGGGAAAGAGAAAAGCTAGAAGGACCCAGGGGCCTCGGGACTAC
 AGGAAGAG

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3.2

Η αναμενόμενη αλληλουχία MUT-3UTR, όπου η κίτρινη περιοχή είναι ή μεταλλαγμένη περιοχή της θέσης στόχευσης. Η πράσινη περιοχή θέτει τα όρια που υβριδοποιείτε ο **c** εκκινητής και η κόκκινη περιοχή εκεί που υβριδοποιείτε ο **b** εκκινητής. (βλέπε υλικά μέθοδοι Σχήμα 2.2)

>MUT-3UTR expected:

TCTAGAATGGTGAAGTACTGACCCTTGAGCTTAAACAGAAGCAGCAAATGAAAGAACCGGAC
 AAATAAGGAAGGGCACAAGCCTACCCGACTCTATTTACAGTCTGTAACCTTCCACTCT
 TCCTGTAGTCCCGAGGGCCCTGGGTCTTCTAGCTTTTCTCTTTCCCATCCTTGGGGC
 CTGTGTGATGATGGGTGTGGGGCTGCCGATGGGAAAGTCGGGGGTTGTTAGGCTTTT
 CTGCCTGCTCCTGCTTAAACACAAGAAGGAATCCTGGATTTTGCCCTCTCCTTAGCTC
 TTAGTCTCTTTGGTAGGAGTTTGTTCAGAGGAGCTCTCCCCCTTGATTTGAACTT
 GCTCTTTTTGTTGTTGTTGTTCTTTCTCTTTCTTTTCTTACCTCCCACTAAAGGGGTT
 CCAAATATCCTGGTCTTTTTCTACCTTGTGTGTTTCTATCTCGTCTTTACTTCCAT
 CTGTTTGTTTTTTCTCCATCAGTGGGGGCAGAGTTGTTCCCCAGCGAGGGGAAAATTT
 TGATCCTTCCCCCTTTTGGCCAAATCCTAGGGGGGAAGAAATCCTAGTATGCCAAAAA
 TATATGCTAAGCATAAATAAACTCCATGCGGGTCCATAACAGCCAAGAAGCCTGCAGG
 AGAAAGCCAAGGGCAGTTCCCTCCGCAGAACACCCCATGCGTGCTGAGAGGCGAGCTC
 CTTGAAGAAGGGGCTGTTCTTCCAGGAGGCCTTATTTTGAAGTGCCTCAGGACCCAC
 TGGAGAGCACAGCATGCCTTACTACTGGGTCATCCTTGGTCTATGTGCTCTGTACTGG
 AGGCTCTGTTCTGCCTCTTATCAGCCAGGTCAGGGGCACACATGGCTTAAGTGACAAA
 GCCAGAGGAGAAGACAACCCTGACAGCATCACGCTGCATCCCATTGCTAGCAGGATTC
 TAGA

Αποτελέσματα της αλληλούχισης MUT-3'UTR με T7 και SP6 εκκινητες. Η κίτρινη περιοχή είναι η μεταλλαγμένη περιοχή θέσης στόχευσης και η κόκκινη οι θέσεις περιοριστικών θέσεων του ενζύμου XbaI :

>T7-MUT-3'UTR :

GKMWRRSRMRMRTSCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTTGGTGAC
 TGACCCTTGAGCTTAAACAGAAGCGGCAAATGAAAGAACCGGACAAATAAGGAAGGGC
 ACAGGCCTACCCGACTCTATTTACAGTCTGTAACCTTCCACTCTTCCTGTAGTCCCGA
 GGCCCTGGGTCCTTCTAGCTTTTCTCTTTCCCATCCTTGGGGCCTTGTGTGATGATG
 GGTGTGGGGCTGCCGATAGGAAAGTCGGGGGTTGTTAGGCTTTTCTGCCTGCTCCTGC
 TTAGACACAAGAGGGAATCCTGGATTTTGCCCTCTCCTTAGCTCTTAGTCTCTTTGGT
 AGGAGTTTTGTTCCAGAGGAGCTCTCCCCCTTGGATTTGAACTTGCTCTTTTTTGTGTG
 TGTGTCTCTTTCTCTTTCTTTTCTTACCTCCACTAAAGGGGTTCCAAATATCCTGG
 TCTTTTTCTACCTTGTGTGTCTTCTATCTCGTCTTACTTCCATCTGTTTGTTTTTTT
 CTCCATCAGTGGGGGCCGAGTTGTTCCCCCAGC**GAGGG**AAATATTGATCCTTCCCCTC
 TTTTGGCCAAATCCTAGGGGAAGAAATCCTAGTATGCCAAAAATATATGCTAAGCAT
 AATTAACCTCCATGCGGGTCCATAACAGCCAAGAAGCCTGCAGGAGAAAGCCAAGGGC
 AGTTCCTTCCGCAGAACACCCCATGCGTGCTGAGAGGCGAGCTCCTTGAAGAAGGGGC
 TGTCTTCCAGGAGGCCTTATTTTGAAGTGCCTCAGGACCCCACTGGAGAGCACAGCA
 TGCCTTACTACTGGGTCATCCTTGGTCTATGTGCTCTGTACTGGAGGCTCTGTTCTGC
 CTCTTATCAGCCAGGTCAGGG**GC**CACACATGGCTTAAGTGACAA**AG**CCAGAGGAGAAGA
 CAACCCTGACAGCATCACGCTGCATCCCATTGCTAGCAGGAT**TCTAGA**

> SP6-MUT-3'UTR :

TCTAGAAATCCTGCTAGCAATGGGATGCAGCGTGATGCTGTCAGGGTTGTCTTCTCCTC
 TGGCTTTGTCACTTAAGCCATGTGTGCCCTGACCTGGCTGATAAGAGGCAGAACAGA
 GCCTCCAGTACAGAGCACATAGACCAAGGATGACCCAGTAGTAAGGCATGCTGTGCTC
 TCCAGTGGGGTCCTGAGGCAGTTCAAATAAAGCCTCCTGGAAGAACAG**CCCCT**TCTT
 CAAGGAGCTCGCCTCTCAGCACGCATGGGGTGTCTGCGGAAGGAACTGCCCTTGGCT
 TTCTCCTGCAGGCTTCTTGGCTGTTATGGACCCGCATGGAGTTTAATTATGCTTAGCA
 TATATTTTTGGCATACTAGGATTTCTTCCCCCTAGGATTTGGCCAAAAGAGGGGAAGG
 ATCAATATTTCCCTCGCTGGGGGAACAACCTCGGCCCCCACTGATGGAGAAAAAACAA
 ACAGATGGAAGTAAAGACGAGATAGAAACACAACAAGGTAGAAAAGACCAGGATAAT
 TTGGAACCCCTTTAGTGGGAGGTAAGAAAAAGAAGAGAAAGGACAACAACAACAAAA
 GAGCAAGTTCAAATCCAAGGGGGAGAGCTCCTCTGGAACAAAACCTCCTACCAAAGAGA
 CTAAGAGCTAAGGAGAGGGGCAAAATCCAGGATTCCTCTTGTGTCTAAGCAGGAGCAG
 GCAGAAAAGCCTAACAACCCCGACTTTCCTATCGGCAGCCCCACCCCATCATCACA
 CAAGGCCCAAGGATGGGAAAGAGAAAAGCTAGAAAGGACCCAGGGCCCTCGGGACTA
 CAGGAAGAGTGGAAAGTTACAGACTGTAAATAGAGTCGGGTAGGCCTGTGCCCTTCT
 TATTTGTCCGGTCTTTTCATTTGCCGCTTCTGTTAAGCTCAAGGTCAGTCACCAAAT
 CGAATTTCCCGCGCCGCCATGGCGCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCAATCGCCTAATA
 GTGAGTCGTATACATCMCTGCGTTCGTACACGTCTGACTGGAAACCTGCCGTACCGAC
 TTTATCGCTGCAGCCATTCCATTCCGCCAGCCTGCGTAATAGCGAGAAAGC

Η αλληλουχία της θέσης στόχευσης είναι ορθή όπως και οι θέσεις περιορισμού. Συνέβησαν μερικές σημειακές μεταλλάξεις, που εμφανίζονται με πράσινα γράμματα, οι οποίες ήταν οι ίδιες με το αρχικό πρότυπο WT-3UTR που δεν θεωρήθηκαν σημαντικές αφού δεν εμποδίζουν τη διεκπεραίωση του σκοπού μας.

