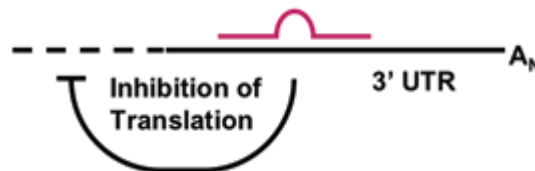


Τμήμα Βιολογίας & Ιατρικής
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Μοριακής Βιολογίας και Βιοϊατρικής

Διατριβή μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης

«Επιβεβαίωση των υποψηφίων γονιδίων-στόχων των
mir15a και *mir16*».



Σκρέκα Κωνσταντινιά

Υπεύθυνος ερευνητής:

Martin Tabler

Υπεύθυνος συνεργ. ερευνητής:

Κρίτων Καλαντίδης

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Χρήστος Δελιδάκης

Ηράκλειο 3/10/05

Δε θα ήταν δυνατόν να προχωρήσω στη συγγραφή της παρούσας εργασίας χωρίς να αναφερθώ στον *Martin Tabler*. Δυστυχώς, λόγω του σύντομου χρονικού διαστήματος κατά το οποίο υπήρξα στο εργαστήριο, είχα την ευκαιρία να γνωρίσω μόνο μια πτυχή του χαρακτήρα του *Martin*, την ιδιοσυγκρασία του ως ερευνητή και υπευθύνου εργαστηρίου.

Πιστεύω, ότι υπήρξε από τους πιο λαμπρούς επιστήμονες που έχω γνωρίσει, προικισμένος με ευφυΐα και εφευρετικότητα. Ήταν πάντα πρόθυμος να απαντήσει σε οποιαδήποτε ερώτηση μου, όσο αφελής και να ήταν αυτή και όσες φορές και αν επαναλαμβανόταν, χρησιμοποιώντας πάντα κάποια από τις πένες του. Δε θα ξεχάσω το πόσο προσπαθούσε να με ενθαρρύνει, όταν τα πειράματα δεν πετύχαιναν για πολύ καιρό. Η αμεσότητα, η απλότητά του και η ισότιμη συμπεριφορά του απέναντι σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου του, ήταν που τον είχαν κάνει τόσο αγαπητό.

Ο *Martin* ήταν πολύ καλός δάσκαλος. Το τελευταίο μάθημα που διδάχτηκα από αυτόν ήταν να μπορώ να φέρω σε πέρας μια εργασία στηριζόμενη κυρίως στον εαυτό μου και θεωρώ ότι ήταν το πιο δύσκολο και πολύτιμο μάθημα που διδάχτηκα ποτέ.

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση αυτού του Master αποδείχθηκε ιδιαίτερα δύσκολη, όχι λόγω της εργαστηριακής δουλειάς αλλά λόγω των γεγονότων που συνέβησαν κατά τη διάρκεια του. Για αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω καταρχάς μια σειρά ανθρώπων οι οποίοι συνέβαλαν σημαντικά στο να είναι δυνατόν να συνεχιστεί αυτό το Master.

Πάνω από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Κρίτωνα, ο οποίος κλήθηκε να επιβλέπει τελικά μια εργασία για την οποία αρχικά δεν ήταν υπεύθυνος και αποδείχθηκε άφογος σε αυτό. Συνέβαλλε πολύ στο να λυθούν πολλά προβλήματα που ανέκυψαν κατά την πορεία και η στήριξή του ήταν πολύτιμη. Επίσης, με βοήθησε με πολλά πρωτόκολλα και τεχνικές λεπτομέρειες. Ακόμη, ευχαριστώ πολύ την Αλεξάνδρα, η οποία μου έδωσε τις κατάλληλες κατευθύνσεις στο Master και υπήρξε πρόθυμη να συζητήσει οποιοδήποτε πρόβλημα. Θα ήταν παράλειψη, να μην ευχαριστήσω και τον συνεργάτη μου στην Ελβετία, Fabrice Kolb, για την προθυμία του να λυθούν τα όποια τεχνικά προβλήματα και για την εποικοδομητική συζήτηση των αποτελεσμάτων.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον κ. Χρήστο Δελιδάκη για την διόρθωση του Master ως επιβλέποντα Καθηγητή, τον κ. Ιωσήφ Παπαματθαϊάκη για την χορήγηση υλικών προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι διαμολύνσεις και τις εποικοδομητικές του συμβουλές και τον Γιώργο Βρέντζο για την βοήθεια με τις κυτταροκαλλιέργειες.

Σε καθημερινή βάση πολλά πειράματα δεν θα είχαν πετύχει, αν ο Νίκος Βρεττός δεν είχε την υπομονή να δέχεται έναν καταιγισμό ερωτήσεων εκ μέρους μου. Πολύτιμη υπήρξε και η βοήθεια της Σεργίας κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Θα ήθελα, επιπλέον, να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά του εργαστηρίου Νίκο Δατσέρη (γνωστό και ως Datch), τη Βαγγελιώ, τον Θανάση, τον Τάσο, την Amalia, το Vesco, το Venci, την Edyta, τη Βαρβάρα, τον Κωστή για το ευχάριστο κλίμα και την πολύ καλή παρέα.

Ακόμη θέλω να ευχαριστήσω το εργαστήριο του κ. Ν. Μοσχονά, ειδικά τη Λιλίκα και τη Μαρία, για τη βοήθεια κατά την εύρεση πρωτοκόλλων και τις συμβουλές σχετικά με τις κυτταροκαλλιέργειες.

Ευχαριστώ και τους φίλους μου Ευαγγελία, Βαγγέλη, Αγάπη, Φλώρα, Μαρία, Κατερίνα, Γεωργία, Άντα που υπήρξαν δίπλα μου στις ευχάριστες και στις δύσκολες στιγμές.

Το μεγαλύτερο όμως ευχαριστώ το χρωστώ στην οικογένειά μου, που για άλλη μια φορά στήριξε τις προσπάθειές μου και στον Φίλιππα που ήταν πάντα δίπλα μου.

Περίληψη

Τα μικρο-RNAs (micro-RNAs – mirs) είναι ριβονουκλεοτίδια 21-24 bp, που προκαλούν μετα-μεταγραφική σίγηση γονιδίων, η οποία ονομάζεται PTGS (post transcriptional gene silencing) στα φυτά και RNAi (RNA interference) στα ζώα. Στους ζωικούς οργανισμούς οι περιοχές πρόσδεσής τους (binding sites), στις οποίες προσδένονται με ατελή συμπληρωματικότητα, εντοπίζονται στο 3' UTR των γονιδίων. Τα μικρο-RNAs έχουν συσχετιστεί τα τελευταία χρόνια με διάφορες μορφές καρκίνου, ενώ έχει βρεθεί ότι κάποια ογκογονίδια, όπως το *RAS*, ρυθμίζονται από αυτά. Συγκεκριμένα, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας (Chronic Lymphocytic Leukemia-CLL) που οφείλεται σε έλλειψη στη χρωμοσωμική περιοχή 13q14, υπάρχει μειωμένη ποσότητα των mir15 και mir16. Η αναζήτηση των γονιδίων-στόχων των mir15 και mir16, κατά τη διάρκεια πρόσφατων πειραμάτων του εργαστηρίου, οδήγησε στην ανακάλυψη μιας σειράς υποψηφίων γονιδίων. Κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης, τα υποψήφια γονίδια-στόχοι υποβλήθηκαν σε ανάλυση με το πρόγραμμα microInspector τόσο για να διαπιστωθεί αν αποτελούν *in silico* στόχους για τα παραπάνω μικρο-RNA όσο και για την εύρεση των περιοχών πρόσδεσης των mir15 και mir16 στο 3'UTR τους. Οι περιοχές πρόσδεσης κλωνοποιήθηκαν σε φορέα έκφρασης λουσιφεράσης και πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαμόλυνσης, από τα αποτελέσματα των οποίων φαίνεται, ότι τουλάχιστον ένα από τα γονίδια, το ογκογονίδιο *Bcl2*, αποτελεί πιθανό στόχο για το mir16, πληροφορία που δημοσιεύτηκε πρόσφατα από τους Cimmino και συνεργάτες (Cimmino, A. et al 2005). Η εύρεση γονιδίων-στόχων των mir15 και mir16, όπως του *Bcl2*, είναι σημαντική για την περαιτέρω αποσαφήνιση των αιτιών που προκαλούν την CLL.

Summary

Micro-RNAs are ribonucleotides of 21-24 bp, which cause gene silencing called PTGS (post transcriptional gene silencing) in plants and RNAi (RNA interference) in animals. Their binding sites, to which they match imperfectly, are located in the 3'UTR of animal genes. In the past few years micro-RNAs have been implicated in some cases of cancer, while oncogenes, like *RAS*, have been found to be regulated by them. In the majority of Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) cases caused by a deletion in the chromosomal region 13q14, there is a reduction in the quantity of mir15 and mir16. The research for mir15 and mir16 target-genes carried out in our lab led to the identification of putative candidate genes. While elaborating this Master thesis, the candidate genes were analyzed using the microInspector program both to reveal whether they constitute *in silico* targets of mir15 and mir16 and in order to find the mir15 and mir16 binding sites in their 3'UTRs. The binding sites were cloned in a luciferase expression vector and transfections were carried out. The results point out to at least one gene, the oncogene *Bcl2*, as being a possible mir16 target, which was recently published by Cimmino et al 2005. The characterization of mir15 and mir16 target genes, like *Bcl2*, is highly significant in order to resolve the reasons causing CLL.

Εισαγωγή

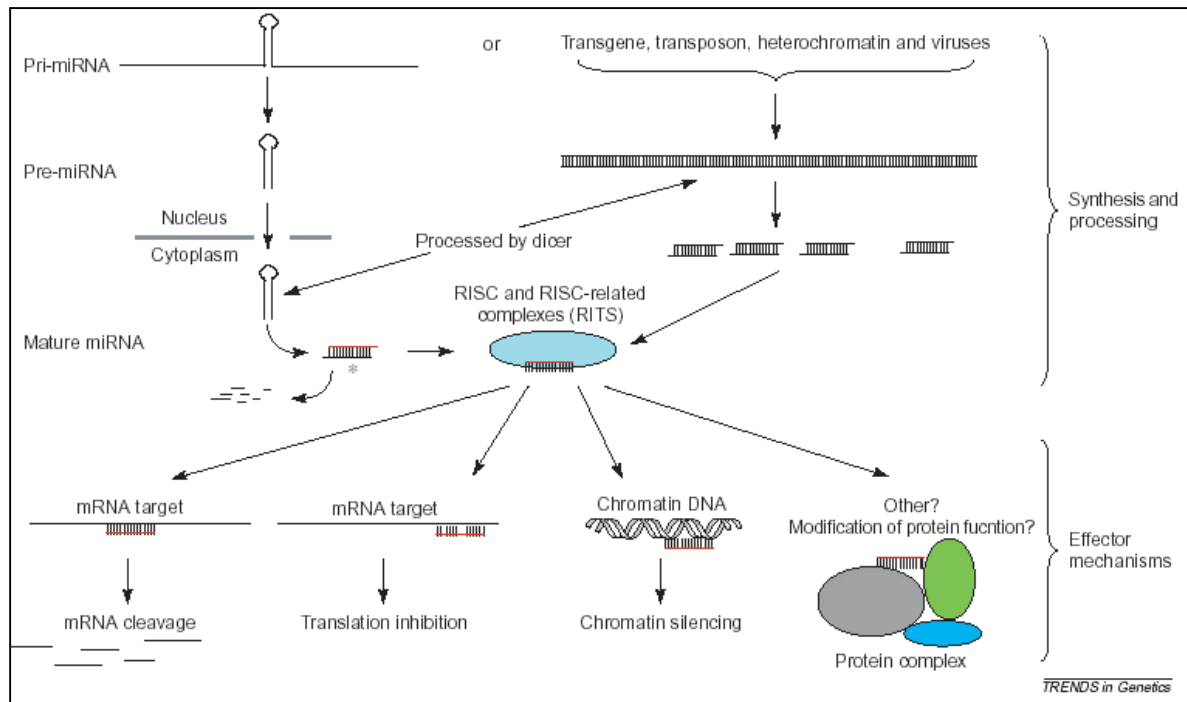
Μικρο- RNA (micro-RNAs): χαρακτηρισμός και λειτουργία

Ο μηχανισμός της σίγησης (silencing) χρησιμοποιείται για να εμποδίσει την έκφραση γονιδίων. Διακρίνεται στη μεταγραφική σίγηση (transcriptional gene silencing – TGS), κατά την οποία εμποδίζεται η μεταγραφή κάποιας αλληλουχίας μέσω μιας διαδικασίας που, σε κάποιες περιπτώσεις, περιλαμβάνει μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (short interfering RNAs-siRNAs), και στη μετα-μεταγραφική σίγηση (post transcriptional gene silencing - PTGS) στα φυτά ή παρεμπόδιση μέσω RNA (RNA interference - RNAi) σε ζωικούς οργανισμούς, όπου εμποδίζεται η μετάφραση του μεταγράφου (Almeida, R and Allshire, M.C. 2005, Filipowicz, W. et al 2005). Η μετα-μεταγραφική σίγηση είναι δυνατόν να συμβαίνει με δύο τρόπους: είτε μέσω siRNAs είτε μέσω μικρο-RNA (microRNAs - miRNA).

Τα μικρο-RNAs είναι μόρια περίπου 22 νουκλεοτιδίων τα οποία δεν περιέχουν κάποια κωδικοποιημένη πληροφορία (non-coding), απαντώνται σε όλα τα μετάζωα που έχουν μελετηθεί μέχρι στιγμής και προκύπτουν από γονίδια του ίδιου του οργανισμού (Ambros , V. 2004). Ανάλογα με τον οργανισμό ο αριθμός των γονιδίων που κωδικοποιούν μικρο-RNA κυμαίνεται περίπου στα 300. Είναι δυνατόν να είναι πολυκυστρωτικά, να προέρχονται από ένα γονίδιο ή να εντοπίζονται στο ιντρόνιο κάποιου άλλου γονιδίου του οργανισμού (Ambros, V. 2004, Xu, P. et al 2004).

Στην εικόνα 2α απεικονίζεται η διαδικασία σχηματισμού των μικρο-RNAs στους ζωικούς οργανισμούς. Αρχικά προκύπτει ένα πρώιμο μετάγραφο miRNA (primary RNA- pri-miRNA) το οποίο μετατρέπεται μέσα στον πυρήνα σε pre-miRNA από ένα ένζυμο τύπου RNase III, τη Drosha (Lee, Y. et al 2003). Η Drosha συνεργάζεται με μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται σε δίκλωνο RNA και η οποία ονομάζεται Pasha στις μύγες και DGCR8 στους ανθρώπους (Tomari, Y. and Zamore, P.D. 2005). Το pre-miRNA έχει μορφή φουρκέτας-θηλιάς με μέγεθος περίπου 70-100 νουκλεοτιδίων που αναδιπλώνεται σε μια δομή με πολλαπλές προεκβολές (bulldges) και εμφανίζει ατελή συμπληρωματικότητα (mismatch) σε πολλά σημεία. Το pre-miRNA μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα μέσω της εξπορτίνης 5 (exportin 5) και η μεταφορά του εξαρτάται από τη Ran-GTP (Nakahara, K. and Carthew, R.W. 2004), που ανήκει στις Ras-GTPάσες και συμμετέχει μεταξύ άλλων στις μεταφορές μορίων μέσα και έξω από την πυρηνική μεμβράνη.

Στο κυτταρόπλασμα μετατρέπεται σε miRNA μεγέθους 21-24 νουκλεοτιδίων από το ένζυμο Dicer (Lee, Y. et al 2003). Αρχικά η Dicer δημιουργεί ένα δίκλωνο μόριο, ο ένας κλώνος του οποίου αποτελεί το miRNA. Ακολούθως το miRNA ενσωματώνεται σε ένα ριβονουκλεοπρω-



Εικόνα 1α. Ο μηχανισμός της σίγησης

τεϊνικό σύμπλοκο, το miRNP, το οποίο μοιάζει ή είναι ίδιο με το σύμπλοκο RISC, στο οποίο ενσωματώνονται τα siRNAs (Hutvagner, G. and Zamore, P.D. 2002). Κύρια συστατικά του συμπλόκου RISC είναι οι πρωτεΐνες ARGONAUTE (Meister, G. et al 2004, Sontheimer, E.G. 2005)

Σε κάποιους οργανισμούς, όπως στον *C.elegans* και στον άνθρωπο, η ίδια Dicer που δημιουργεί τα siRNAs δημιουργεί και τα miRNAs. Στα φυτά και στις μύγες διαφορετικά παράλογα (paralogs) της Dicer δημιουργούν τα siRNAs και τα miRNAs (Tomari Y. and Zamore P.D. 2005, Lee, Y.S. et al 2004, Xie, Z. et al 2004). Στα φυτά κάποια πυρηνική Dicer ενδέχεται να έχει διπλό ρόλο δρώντας ως Drosha και Dicer ταυτόχρονα (Finnegan, E.J. et al 2003, Papp, I. et al 2003)

Τα μικρο-RNAs δρουν προκειμένου να καταστείλουν τη μεταγραφή. Αυτό πραγματοποιείται με το να προσδένονται στο mRNA του υπό καταστολή γονιδίου. Η πρόσδεση είναι δυνατόν να συμβαίνει με σχεδόν τέλεια συμπληρωματικότητα, όπως συμβαίνει στα φυτά, με αποτέλεσμα να αποικοδομείται το μετάγραφο mRNA (Tang, G. et al 2003). Στους ζωικούς οργανισμούς, ωστόσο το μικρο-RNA δεν προσδέεται με τέλεια συμπληρωματικότητα στο mRNA του γονιδίου στόχου, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια προεκβολή που εμποδίζει την περαιτέρω μετάφραση του mRNA σε πρωτεΐνη (Wightman, B. et al 1993, Olsen, P.H. and Ambros, V. 1999, Reinhart, B.J. et al 2000, Zeng, Y. et al 2002, Brennecke, J. et al 2003). Η

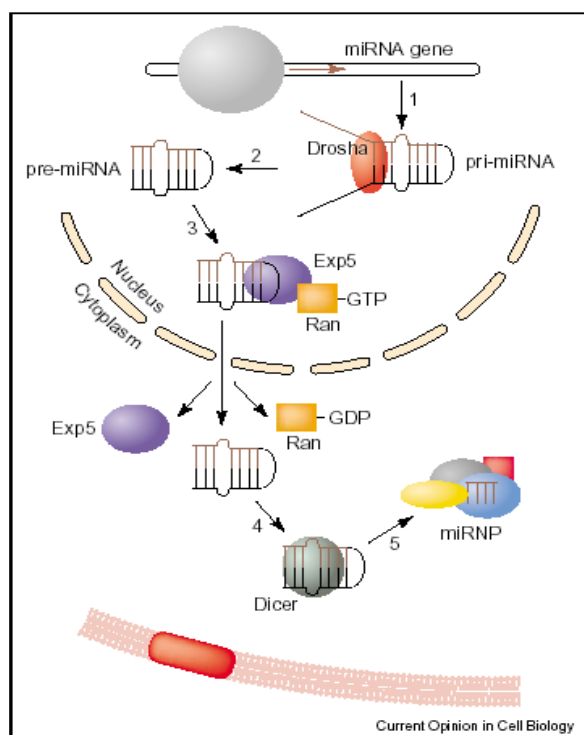
αλληλεπίδραση αυτή λαμβάνει χώρα στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3'UTR) του mRNA του γονιδίου, στους ζωικούς οργανισμούς, ενώ στα φυτά ενδεχομένως να συμβαίνει και στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο εμποδίζεται η μετάφραση είναι άγνωστος.

Ο αναπτυξιακός ρόλος των μικρο-RNA

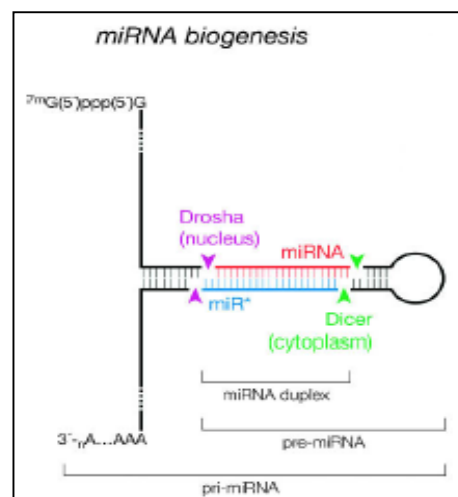
Τα τελευταία χρόνια υπήρξε αυξημένο ενδιαφέρον για την αποσαφήνιση του ρόλου που διαδραματίζουν τα μικρο-RNA. Όπως προκύπτει, είναι σημαντικά για τη ρύθμιση διαφόρων λειτουργιών του κυττάρου.

Στον οργανισμό *C. elegans* το mir let7 φαίνεται να ρυθμίζει την ανάπτυξη του καθώς τα μεταλλάγματα, από τα οποία λείπει το let7, αποτυγχάνουν να περάσουν από το στάδιο της προνύμφης (larva) στο στάδιο του ενήλικου ατόμου (adult) (Reinhart et al 2000). Ο ρόλος του let7 είναι να καταστέλλει μετα-μεταγραφικά το γονίδιο *lin-41* (Slack, F.J. et al 2000). Επίσης αναπτυξιακό ρόλο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη έχει το μικρο-RNA lin4, του οποίου στόχοι είναι τα γονίδια *lin14* (Lee, R.C. et al 1993) και *lin28* (Moss, E.G. et al 1997).

Σημαντικός είναι ο ρόλος των μικρο-RNAs κατά τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Το 2003 οι Brennecke και συνεργάτες ανακάλυψαν ένα γονίδιο στη δροσόφιλα, το *bantam*, το οποίο δεν κωδικοποιούσε καμία πρωτεΐνη αλλά, όπως αποδείχθηκε ακολούθως, ένα μικρο-RNA του οποίου στόχος ήταν το προ-αποπτωτικό γονίδιο *hid* (head involution defective) (Brennecke, J. et al 2003). Άλλο μικρο-RNA που φαίνεται να διαδραματίζει σημα-ντικό ρόλο στην απόπτωση είναι το mir14, που επίσης ανακαλύφθηκε στη δροσόφιλα από τους Xu και συνεργάτες το 2003. Το mir14 καταστέλλει τον κυτταρικό θάνατο, ωστόσο δεν έχει βρεθεί το πιθανό γονίδιο ή τα πιθανά γονίδια στόχοι του. Επίσης, απαιτείται για το φυσιολογικό μεταβολισμό των λιπών (Xu, P. et al 2003). Ακόμη κατά την ένεση antisense νουκλεοτιδίων για τα mir-2 και mir-13 σε έμβρυα δροσόφιλας, που είχε ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της δράσης τους, παρατηρήθηκαν αναπτυξιακές ανωμαλίες (Boutla, A. et al 2003). *In silico*, πιθανοί στόχοι του mir-2 αποτελούν τα προ-αποπτωτικά γονίδια *reaper* και *grim* (Stark, A. et al 2003).



A



B

Εικόνα 2α. Δημιουργία των miRNAs στους ζώϊκούς οργανισμούς. Α. Η μεταφορά τους από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Β. Η Drosha στον πυρήνα δημιουργεί ένα δίκλωνο μόριο το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για την Dicer στο κυτταρόπλασμα. Το μόριο miRNA - miR* ξεδιπλώνεται και το miRNA θα ενσωματωθεί στο miRNP (Tomari Y. and Zamore P.D. 2005)

Μικρο-RNA και καρκίνος

Εκτός από τις παραπάνω λειτουργίες τα μικρο-RNA φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο. Προφίλ έκφρασης των μικρο-RNA που σκιαγραφούνται μέσω μικροσυστοιχειών (microarrays) αποδεικνύουν ότι γενικά εμφανίζεται απορύθμιση της έκφρασης των μικρο-RNAs σε καρκινικούς ιστούς (Lu, J. et al Nature 2005) και ότι κάθε είδος καρκίνου χαρακτηρίζεται από ένα συγκεκριμένο προφίλ έκφρασης μικρο-RNA (Calin, G.A. et al 2004, Lu, J. et al Nature 2005). Η παραπάνω ανακάλυψη ενισχύεται από αποτελέσματα προγενέστερων ερευνών, που η απορύθμιση κάποιου ή κάποιων μικρο-RNA συνδέεται με ένα είδος καρκίνου.

Έτσι, παρατηρείται συσσώρευση του miR155 και του BIC RNA στα ανθρώπινα λεμφώματα των Β-λεμφοκυττάρων, όπως για παράδειγμα στα παιδιά με λέμφωμα του Burkitt (Metzler, M. et al 2004). Το BIC αποτελεί γονίδιο το οποίο δεν κωδικοποιεί κάποια πληροφορία, αλλά το

mir155 (Eis, P.S. et al 2005). Κατά την νεοπλασία στο κόλον (colorectal neoplasia) παρατηρείται μειωμένη έκφραση κάποιων άλλων μικρο-RNA, των mir143 και mir145 (Michael, M.Z. et al 2003). Εκτός αυτού έχει παρατηρηθεί αύξηση της έκφρασης της οικογένειας των miRNAs της περιοχής 13q31-13q32 στα κακοήγη λεμφώματα (Ota, A. et al 2004) και μειωμένη έκφραση του let7 στον καρκίνο του πνεύμονα (Takamizawa, J. et al 2004). Τέλος, ανακαλύφθηκε πολύ πρόσφατα ότι το ογκογονίδιο *RAS* ρυθμίζεται από μέλη της οικογένειας των μικρο-RNAs let-7 (Johnson, S.M. et al 2005).

Ο ρόλος των mir15 και mir16 στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Το 2002 οι G.A. Calin και συνεργάτες ανακάλυψαν ότι στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (Chronic Lymphocytic Leukemia - CLL), που αποτελεί την πιο συχνή λευχαιμία στο δυτικό κόσμο (Dohner, H. et al 2000), η έκφραση των mir15 και mir16 είναι μειωμένη (Calin, G.A. et al 2002). Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία χαρακτηρίζεται από αυξημένη συγκέντρωση μονοκλωνικών CD5⁺ B-λεμφοκυττάρων, τα οποία συσσωρεύονται στο αίμα, στον μυελό των οστών και στα περιφερικά λεμφοειδή όργανα.

Στο 50% και πάνω των ατόμων που πάσχουν από CLL εμφανίζεται ομόζυγη ή ημίζυγη έλλειψη στη χρωμοσωμική περιοχή 13q14, που αποτελεί και την πιο συχνή χρωμοσωμική ανωμαλία στα άτομα με CLL. Ελλείψεις στην περιοχή 13q14 εμφανίζονται και σε άλλες μορφές καρκίνων, συγκεκριμένα στο 60% των περιπτώσεων του καρκίνου του προστάτη, στο 50% του λεμφώματος του μανδύα του κυτάρου (mantle cell lymphoma), στο 16-40% του πολλαπλού μυελώματος (multiple myeloma) (Dong, J.T. et al 2001), καταδεικνύοντας αυτόν τον χρωμοσωμικό τόπο ως πολύ σημαντικό για τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και ως πιθανή κωδική περιοχή ογκογονιδίων. Κατόπιν τούτου αλληλουχήθηκε περίπου 1Mb περιοχής και βρέθηκαν διάφορα υποψήφια γονίδια. Ωστόσο κανένα από αυτά δε φαίνεται να εμπλέκεται στη δημιουργία CLL (Liu, Y. et al 1997, Bullrich, F. et al 2001, Migliazza, A. et al 2001, Mabuchi, H. et al 2001, Rondeau, G. et al 2001, Wolf, S. et al 2001, Mertens, D. et al 2002, Rowntree, C. et al 2002).

Στην προσπάθειά τους να χαρακτηρίσουν τη μικρότερη περιοχή έλλειψης στο 13q14 που ευθύνεται για τη CLL, οι G. A. Calin και συνεργάτες εντόπισαν μέσω γενετικών πειραμάτων μια περιοχή 29kb μεταξύ των εξωνίων 2 και 5 του γονιδίου *LEU2*, το οποίο εντοπίζεται στην περιοχή του 1Mb που αναφέρθηκε παραπάνω. Στην περιοχή των 29kb, ωστόσο εντοπίζονται

τα γονίδια *miR15* και *miR16*. Με στύπωμα κατά Northern (Northern blot) σε φυσιολογικά και σε καρκινικά CD5⁺ B-λεμφοκύτταρα από CLL βρέθηκε ότι στα τελευταία τα επίπεδα των *mir15* και *mir16* ήταν μειωμένα, πράγμα που τα συνδέει με τη CLL. Βρέθηκε ότι στο 68% των ασθενών τα επίπεδα των *mir15* και *mir16* ήταν σημαντικά μειωμένα σε σχέση με τα υγιή άτομα. Εκτός από τα *mir15* και *mir16* του χρωμοσώματος 13q14 (*mir15a*, *mir16-1*) υπάρχει ένα ακόμη ζεύγος αυτών των μικρο-RNA στο χρωμόσωμα 3 (*mir15b*, *mir16-2*). Μέσω πειραμάτων υβριδοποίησης και απώλειας της ετεροζυγωτίας (LOH-loss of heterozygosity) αποδείχθηκε ότι η μείωση στα επίπεδα των *mir15* και *mir16* οφείλεται αποκλειστικά στην παραπάνω έλλειψη στον τόπο 13q14. Πιθανόν ο ρόλος των *mir15* και *mir16* να είναι η ρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας κάποιων γονιδίων στόχων κατά την ανάπτυξη των CD5⁺ B-λεμφοκυττάρων.

Πειραματική διαδικασία

Με βάση το πόσο σημαντικός φαίνεται να είναι ο ρόλος των μικρο-RNA τόσο αναπτυξιακά όσο και για τον καρκίνο και με δεδομένο, ότι πλέον αυξάνονται συνεχώς τα *in silico* αποτελέσματα για γονίδια-στόχους των μικρο-RNA και δημιουργούνται νέα υπολογιστικά προγράμματα για την πρόβλεψή τους (Lewis, B.P. et al 2003, Enright, A.J. et al 2003, Kiriakidou, M. et al 2004, Vella, M.C. et al 2004, John, B. et al 2004, Adai, A. et al 2005, Zhang, Y. 2005), είναι αναγκαία η *in vitro* επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Για αυτό, περιεχόμενο της παρούσης εργασίας αποτελεί η εύρεση των γονιδίων-στόχων των *mir15* και *mir16*.

Η έρευνα αυτή πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το εργαστήριο του Witold Filipowicz του ινστιτούτου FMI στη Βασιλεία της Ελβετίας. Κάθε εργαστήριο απομόνωσε τα πιθανά γονίδια-στόχους χρησιμοποιώντας διαφορετική προσέγγιση. Στο εργαστήριο του Witold Filipowicz προτιμήθηκε η χρήση μικροσυστοιχιών της εταιρίας Affymetrix.

Στο δικό μας εργαστήριο, προκειμένου να βρεθούν τα πιθανά γονίδια-στόχοι των *mir15* και *mir16* χρησιμοποιήθηκε κανονικοποιημένη βιβλιοθήκη cDNA λεμφοκυττάρων. Τα γονίδια-στόχοι απομονώθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), στην οποία χρησιμοποιήθηκαν ως 5' εκκινήτες αντι-DNA ολιγονουκλεοτίδια για τα *mir15* και *mir16* και ως 3' εκκινήτες πολυ-T ολιγονουκλεοτίδια. Τα προϊόντα της PCR κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pGEM t-easy και στάλθηκαν για αλληλούχιση. Προκειμένου να αναγνωρισθεί σε ποια γονίδια ανήκαν οι αλληλουχίες, πραγματοποιήθηκε σάρωση μέσω του προγράμματος BLAST.

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων οδήγησε στην κατηγοριοποίηση των πιθανών γονιδίων-στόχων ανάλογα με το ποιο μικρο-RNA τα ρυθμίζει και με ποια μέθοδο βρέθηκαν. Το επόμενο βήμα ήταν να εργαστεί κάθε ομάδα πάνω σε ορισμένα από τα γονίδια αυτά με τελικό σκοπό να κλωνοποιηθούν τα 3'UTR των υποψήφιων γονιδίων σε φορέα έκφρασης λουσιφεράσης και να πραγματοποιηθούν πειράματα έκφρασης της λουσιφεράσης σε κυτταρική σειρά HeLa. Τα υποψήφια γονίδια-στόχοι που αποτέλεσαν αρχικά αντικείμενο έρευνας αυτής της εργασίας περιγράφονται στον πίνακα 1α. και είναι το *MYCBP* ή *AMY-1* (c-myc binding protein), το *ZBTB* (zinc finger protein), το *Ventx2* (VENT-like homeobox 2), η ανκυρίνη G (ankyrin G-ankG) και το *Rab11-FIP3* (Homo sapiens eferin). Από αυτά, το *Ventx2* και το *Rab11-FIP3*, έχουν βρεθεί με τη μέθοδο των μικροσυστοιχειών. Έπειτα, προστέθηκε στη λίστα των υποψήφιων γονιδίων και το *Bcl2*, το οποίο βρέθηκε *in silico* ότι ρυθμίζεται από το mir16, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα microInspector (Rusinov, V. et al 2005).

Οι Bcl-2 είναι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην απόπτωση. Περιέχουν περιοχές που ονομάζονται περιοχές ομολογίας Bcl-2 (BH - Bcl-2 homology), τις BH1-4, καθώς και μια τρανσμεμβρανική περιοχή (transmembrane domain – TM). Η οικογένεια περιλαμβάνει τρεις κατηγορίες πρωτεϊνών: τις αντι-αποπτωτικές (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1), τις προ-αποπτωτικές με πολλές λειτουργικές περιοχές (multidomain) (Bax, Bak, Bok) και τις προ-αποπτωτικές που περιέχουν μόνο την περιοχή BH3 (Bid, Bim, Bad). Οι πρώτες περιέχουν όλες τις περιοχές BH, οι δεύτερες τις περιοχές BH1-3 και οι τελευταίες μόνο την περιοχή BH3 (Hengartner, M.O. 2000, Packham, G. and Stevenson, F.K. 2005). Την περιοχή TM την περιέχουν όλα τα μέλη της οικογένειας με εξαίρεση την πρωτεΐνη Bid (Packham, G. and Stevenson, F.K. 2005).

Η τρανσμεμβρανική περιοχή χρησιμοποιείται για να δεσμεύονται οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Οι αντι-αποπτωτικές ρυθμίζουν την απόπτωση με το να αλληλεπιδρούν με τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας (Cory, S. et al 2003).

Η απόπτωση συμβαίνει μέσω δύο μονοπατιών. Το ένα περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 (intrinsic) και το άλλο μεμβρανικούς υποδοχείς (extrinsic), όπως τον υποδοχέα Fas (Packham, G. and Stevenson, F.K. 2005). Το μονοπάτι της απόπτωσης μέσω των πρωτεϊνών Bcl-2 καταλήγει στην απελευθέρωση κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια. Το κυτόχρωμα C συνδέεται με την πρωτεΐνη Araf1 και την κασπάση 9 σχηματίζοντας έτσι το αποπτόσωμα (apoptosome) (Hengartner, M.O. 2000, Packham, G. and Stevenson, F.K. 2005). Το αποπτόσωμα ενεργοποιεί τις υπόλοιπες κασπάσες και τελικά την κασπάση 3, που

συνεπάγεται τελεσίδικα την έναρξη των διαδικασιών της απόπτωσης. Στο άλλο μονοπάτι η ενεργοποίηση της κασπάσης 3 φέρεται σε πέρας μέσω της ενεργοποιημένης από τον κατάλληλο υποδοχέα κασπάσης 8 (εικόνα 3α).

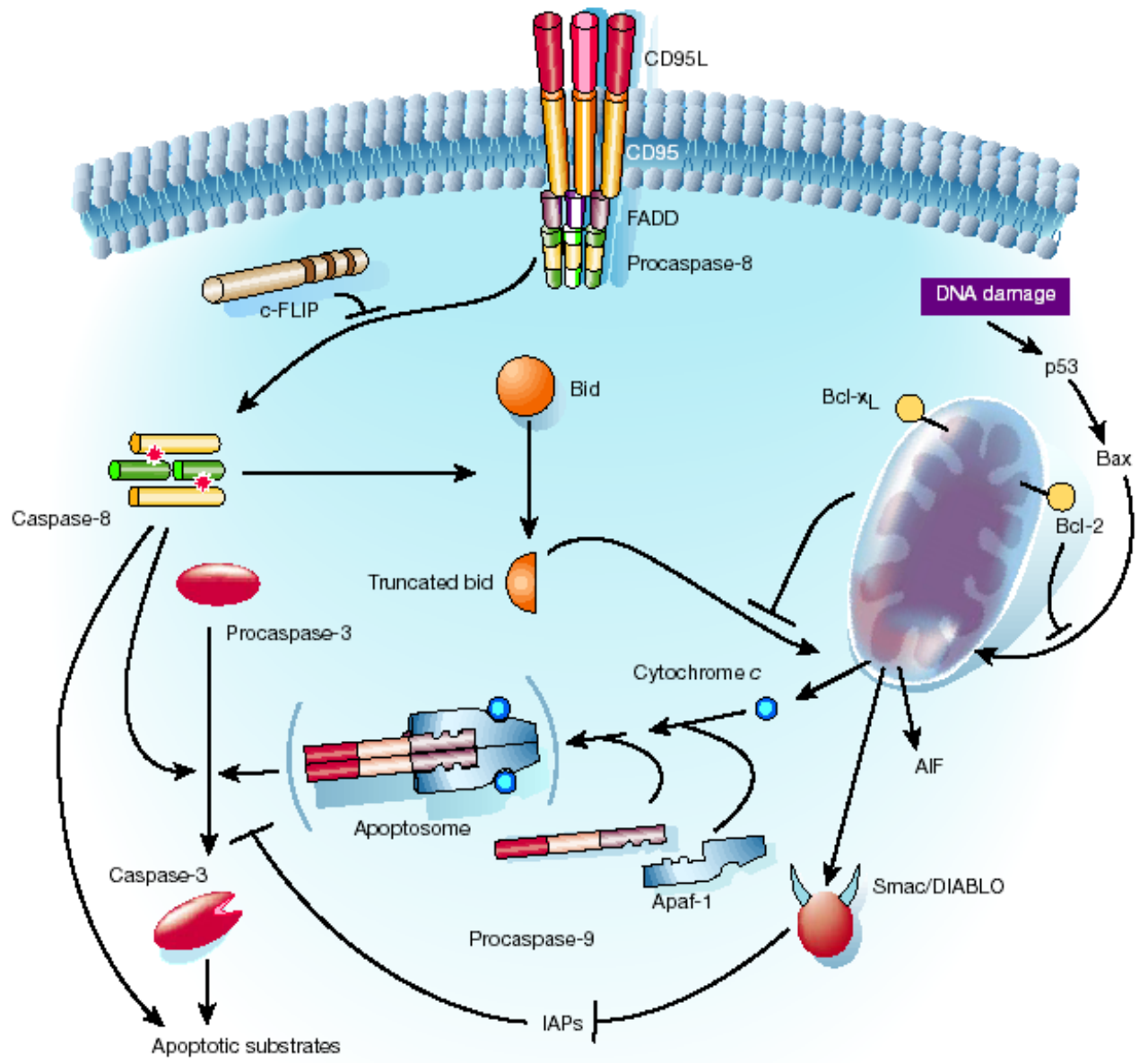
Το γονίδιο *MYCBP*, που χαρτογραφείται στην περιοχή 1p32.2-33, παράγει μια πρωτεΐνη που ονομάζεται και AMY-1, η οποία προσδένεται μέσω της καρβοξυτελικής περιοχής της στην αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης του ογκογονιδίου *c-Myc* (Taira, T. et al 1998). Από το γονίδιο παράγονται δύο mRNA, μήκους 0,85 kb και 1,8 kb, τα οποία διαφέρουν ως προς τον ιστολογικό τους εντοπισμό. Η AMY-1 δεν περιέχει σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), αλλά εντοπίζεται στον πυρήνα, όταν αυξάνεται η ποσότητα της c-MYC κατά τον κυτταρικό κύκλο. Θεωρείται ότι ενισχύει τη μεταγραφή μέσω E-box που ρυθμίζεται από τη c-MYC (Taira, T. et al 1998).

Το γονίδιο *Ventx2* ανήκει στην οικογένεια των ομοιοτικών γονιδίων. Είναι ομόλογο της οικογένειας των ομοιωτικών γονιδίων *Xvent* που απαντώνται στον *X. laevis*, τα οποία είναι σημαντικά κατά το σχηματισμό του κοιλιακού (ventral) μεσοδέρματος και της αιμοποιητικής ανάπτυξης του εμβρύου (Moretti, P.A. et al 2001). Στην αμινοτελική του περιοχή υπάρχει μοτίβο που απαντάται σε πολλούς ομοιοτικούς μεταγραφικούς καταστολείς (Smith, S.T. and Jaynes, J.B. 1996)

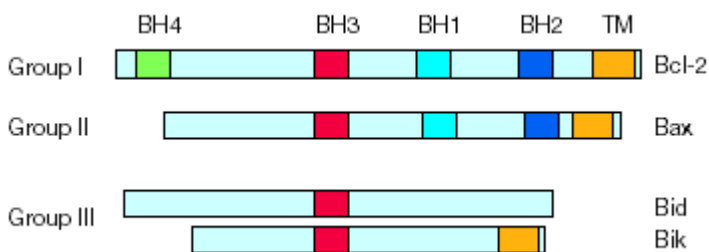
Η αγκυρίνη G είναι τρανσμεμβρανική πρωτεΐνη και απαντάται στον εγκέφαλο, συγκεκριμένα στους κόμβους του Ranvier, καθώς και σε άλλους ιστούς (Kordeli, E. et al 1995). Στον εγκέφαλο σχετίζεται με τους διαύλους ιόντων και τους καθοδηγεί στα αρχικά τμήματα (initial segments) των νευραξόνων και στα εκφυλιζόμενα νεύρα (Kretschmer, T. et al 2002).

Η πρωτεΐνη Rab11-FIP3 ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των FIP πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τις Rab11 GPTασες, ως μετέπειτα (downstream) διαβιβαστές του μηνύματος. Η αλληλεπίδραση συμβαίνει μέσω μιας περιοχής στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, την περιοχή πρόσδεσης στην Rba11 (Rab-11 binding domain) (Prekeris, R. et al 2001). Γνωστός είναι ο ρόλος του συμπλόκου των δύο πάνω πρωτεϊνών κατά την κυτταροδιαίρεση, κατά την οποία συμμετέχουν στην μεταφορά ενδοσωμάτων και κατά την απόσχιση των θυγατρικών κυττάρων (Wilson, G. M. et al 2005).

Τέλος, για το γονίδιο *ZBTB* δεν υπάρχει βιβλιογραφία. Πρόκειται για αλληλουχία η οποία έχει καταχωρηθεί στην τράπεζα δεδομένων, αλλά δεν έχει χαρακτηριστεί η λειτουργία της πρωτεΐνης.



Εικόνα 3α. Το μονοπάτι της απόπτωσης (Hengartner, M.O. 2000)



Εικόνα 4α. Οι λειτουργικές περιοχές των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl2 (Hengartner, M.O. 2000)

Στην παρούσα εργασία περιγράφονται αναλυτικά οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν προκειμένου να κλωνοποιηθούν οι περιοχές πρόσδεσης (binding sites) των mir15 και mir16 που εντοπίζονται στα 3'UTR των υποψήφιων γονιδίων-στόχων, στον φορέα έκφρασης λουσιφεράσης *Renilla* (*Renilla Luciferase*) pHRL-TK και τα αποτελέσματα των πειραμάτων διαμόλυνσης αυτών των πλασμιδιακών κατασκευών σε κύτταρα HeLa.

γονίδια-στόχοι των mir15 και mir16 ονομασία γονιδίων

mir15

c-myc binding protein (MYCBP)	AMY1
zinc finger protein	
* VENT-like homeobox 2	VENTX2
ankyrin 3 - isoform 2	Ankyrin-G

mir15+16

* Homo sapiens eferin	Rab11-FIP3
-----------------------	------------

Πίνακας 1α. Τα υποψήφια γονίδια-στόχοι των mir15 και mir16. Τα γονίδια τονισμένα με αστερίσκο έχουν βρεθεί με την μέθοδο των μικροσυστοιχειών.

Υλικά και Μέθοδοι

Υλικά

Αντιβιοτικό: αμπικιλίνη, αραίωση 1/1000

Κυτταρική σειρά: HeLa

Θρεπτικό: DMEM

Ορός: Fetal Bovine serum, Biochrom

Αντιβιοτικό για κυτταροκαλλιέργεια: τζενταμυκίνη (gentamycin), αραίωση 1/1000

Κυτταροκαλλιέργεια: Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM, που περιείχε 10% ορό και το αντιβιοτικό τζενταμυκίνη σε αραίωση 1/1000.



Εικόνα 1β. Ο φορέας pHRL-TK της Promega.

Κωδικοί πρόσβασης (accession numbers): Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση των περιοχών πρόσδεσης των μικρο-RNA στο 3'UTR των γονιδίων-στόχων αναζητήθηκαν στο Pubmed υπό τους κωδικούς πρόσβασης NM_0123333 για το *MYCBP*, NM_014415 για το *ZBTB*, NM_014468 για το *Ventx2*, NM_001149 για το *ankG*, NM_014700 για το *Rab11-FIP3* και NM_000633 για το *Bcl2*.

Ολιγονουκλεοτίδια: Τα ολιγονουκλεοτίδια παραγγέλθηκαν από την Metabion. Σχεδιάστηκε ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων το οποίο περιέχει δύο περιοριστικές αλληλουχίες, GGTGACC και GGTTACC, για το *BstEII*. Για κάθε γονίδιο σχεδιάστηκαν 3 ζεύγη ολιγονουκλεοτιδίων: ένα ζεύγος που περιέχει την περιοχή πρόσδεσης του μικρο-RNA (wild type-wt), ένα ζεύγος που περιέχει μία μεταλλαγή (mut), και ένα ζεύγος όπου το μικρο-RNA προσδέεται με πλήρη συμπληρωματικότητα (perfect match-PM). Παραγγέλθηκαν antisense DNA ολιγονουκλεοτίδια για τα mir15a και mir16, τα οποία είναι φωσφοροθειικά (phosphorothioates) (εικόνα 3β). Η ιδιότητά αυτή τους προσφέρει σταθερότητα έναντι ενδο-και εξωνουκλεασών 2 συμπεριλαμβανομένου της 3'-5' DNA POL 1 εξωνουκλεάσης, νουκλεασών S1 and P1, RNAσών, και νουκλεασών του ορού. Επιπλέον αυξάνεται η ικανότητά τους για διέλευση της φωσφορικής διπλοστιβάδας.

Ολιγονουκλεοτίδια

Κατεύθυνση 5' → 3'

Anti-16	CGCCAATATTTACGTGCTGCTA
Anti-15a	CACAAACCATTTATGTGCTGCTA
<i>BstEII</i>	
<i>BstEIIa</i>	CTAGAGGTGACCGATCGGTTACCGC
<i>BstEIIb</i>	TCCACTGGCTAGCCAATGGCGCCGG

MYCBP

WtMYCBPa	GTGACGGTCCTAGTGCACAATGGCCTTTCTGTGCTGTTTTTCAATTT
WtMYCBPb	GTAACAAATTGAAAAACAGCACAGAAAGGCCATTGTGCACTAGGACC
MYCBPmut4a	GTGACGGTCCTAGTGCACAATGGCCTTTCTGTGCTATTTTTCAATTT
MYCBPmut4b	GTAACAAATTGAAAAATAGCACAGAAAGGCCATTGTGCACTAGGACC
PMmir15a1	GTGACGGTCCTAGCACAAACCAUUAUGUGUCUGCUATTCAATTT
PMmir15a2	GTAACAAATTGAATAGCAGCACATAATGGTTTGTGCTAGGACC

Bcl2

wtBcl2a	GTGACTGGAATATCCAATCCTGTGCTGCTATCCTGCC
wtBcl2b	GTAACCTGGCAGGATAGCAGCACAGGATTGGATATCCA

Bcl2mut3a	GTGACTGGAATATCCAATCCTGTGCTGATATCCTGCC
Bcl2mut3b	GTAACGGCAGGATATCAGCACAGGATTGGATATTCCA
PMmir16-1	GTGACTGGAATATCGCCAATATTTACGTGCTGCTATCCTGCC
PMmir16-2	GTAACGGCAGGATAGCAGCACGTAAATATTGGCGATATTCCA

Μέθοδοι

Μετασχηματισμός βακτηρίων (transformation)

- Προσθήκη της μισής ποσότητας της αντίδρασης συγκόλλησης (ligation) στα επιδεκτικά κύτταρα
- 20min στον πάγο.
- 1,5 min θερμικό σοκ (heat shock) στους 42⁰C
- 2 min στον πάγο
- Προσθήκη 900λ θρεπτικού LB
- Στους 37⁰C για 30 min
- Κατακρημνίση κυττάρων με γρήγορη φυγοκέντρωση
- Αφαίρεση το θρεπτικού και προσθήκη 200λ LB
- Απλώμα των κυττάρων σε τρυβλίο με το αμπικιλίνη
- O/N στους 37⁰C

Φωσφορυλίωση και υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων: Τα ολιγονουκλεοτίδια φωσφορυλιώθηκαν μέσω αντίδρασης κινάσης. Χρησιμοποιήθηκαν 20pmol από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο από απόθεμα (working stock) 10pmol/ml, 10x διάλυμα λιγάσης (ligase buffer) της Promega και 1λ κινάσης σε τελικό όγκο αντίδρασης 20λ. Επώστηκαν στους 37⁰C για 30 min. Χρησιμοποιήθηκαν 10pmol φωσφορυλιωμένου μονόκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου για υβριδοποίηση. Η υβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε στους 90⁰C για 5 min.

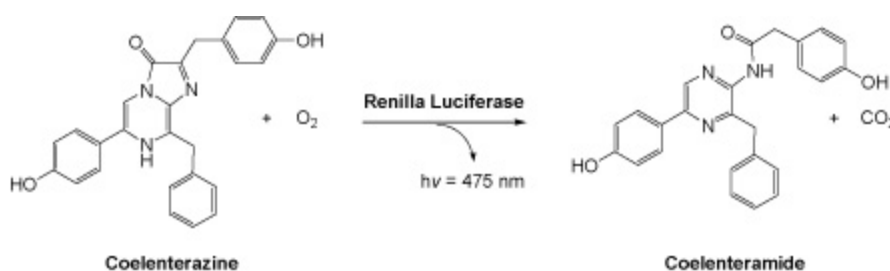
Κλωνοποίηση: Τα ολιγονουκλεοτίδια κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pHRL-BstEII, ο οποίος προέκυψε έπειτα από μετατροπή του φορέα έκφρασης *Renilla luciferase* της Promega pHRL-TK (εικόνα 1β), με την κλωνοποίηση σε κατεύθυνση 5' *Xba*I-3' *Not*I της κασσέτας για το *Bst*EII. Η κλωνοποίηση των υπολοίπων ολιγονουκλεοτιδίων πραγματοποιήθηκε με κοπή με το ένζυμο *Bst*EII.

Αντίδραση σύνδεσης (ligation): Για κάθε αντίδραση σύνδεσης χρησιμοποιήθηκαν 100ng φορέα, 10x διάλυμα λιγάσης (ligation buffer) (Promega), 1l λιγάσης (Promega) και η αντίστοιχη ποσότητα φωσφορυλιωμένων, υβριδοποιημένων ολιγονουκλεοτιδίων σε τελικό όγκο αντίδρασης 10λ. Η αναλογία φορέα:ένθεσης ήταν 1:3. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες.

Μέτρηση φωταύγειας: Μετρήθηκε η φωταύγεια που παράχθηκε από την αντίδραση της λουσιφεράσης *Renilla* με το υπόστρωμά της κοελεντεραζίνη (coelenterazine). Η λουσιφεράση *Renilla* προέρχεται από τον θαλάσσιο οργανισμό *Renilla reniformis*. Το υπόστρωμά της διαφέρει από το υπόστρωμα της λουσιφεράσης του οργανισμού *Photinus pyralis* (firefly), που είναι η λουκιφερίνη (luciferin). Η εκπομπή φωτός είναι στα πλαίσια του ορατού και η μέγιστη εκπομπή παρατηρείται στα 475nm. Επίσης η αντίδραση φθίνει πιο αργά από την αντίδραση της *Firefly luciferase* (εικόνα 2β)

Η εκπομπή φωτός μετρήθηκε σε ιλουμινόμετρο με όρια μέτρησης μεταξύ 300 και 600nm. Ο χρόνος αναμονής προσαρμόστηκε στα 2sec και ο χρόνος μέτρησης στα 10sec.

Για το μάζεμα και τη λύση των κυττάρων και για τη μέτρηση της έκφρασης της *Renilla luciferase* χρησιμοποιήθηκε κιτ της Biotium Inc. (*Renilla luciferase* assay kit 150 assays). Τα παραπάνω πραγματοποιήθηκαν ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρίας.



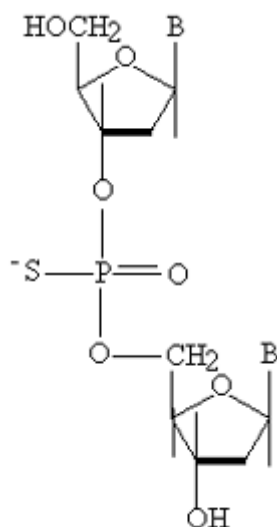
Εικόνα 2β. Η αντίδραση της λουσιφεράσης του θαλάσσιου οργανισμού *Renilla reniformis*. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται η ουσία κοελεντεραζίνη. Η μέγιστη εκπομπή φωτός παρατηρείται στα 475nm.

Μέτρηση β-γαλακτοσιδάσης: Η μέτρηση της β-γαλακτοσιδάσης πραγματοποιήθηκε προσθέτοντας σε 100λ εκχυλίσματος κυττάρων 150λ ONPG (4μg/ml) και 850λ LacZ buffer. Η αντίδραση αφέθηκε στους 37°C μέχρι κορεσμού (αλλαγή χρώματος σε κίτρινο). Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε φωτόμετρο στα 470nm.

Διαμόλυνση κυττάρων (transfection): Η διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε σε κυτταρική σειρά HeLa. Χρησιμοποιήθηκαν πιάτα με 12 πηγάδια (12 well plates), ενώ για τη διαμόλυνση τα κύτταρα περιείχαν θρεπτικό DMEM, χωρίς ορό και αντιβιοτικό. Πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση (titration) των ποσοτήτων των φορέων, για να διαπιστωθεί ποιες είναι οι βέλτιστες συγκεντρώσεις τους για το συγκεκριμένο σύστημα έκφρασης. Η ποσότητα τόσο του κενού (control) φορέα έκφρασης λουσιφεράσης όσο και με τις ενθέσεις κυμάνθηκε από 50ngr έως 200ngr ανά πηγάδι και ανά πηγάδι προστέθηκε ίση ποσότητα φορέα β-γαλακτοσιδάσης.

Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε λιποφεκταμίνη 2000 (lipofectamine 2000) της Invitrogen. Το DNA προστέθηκε σε 50μl DMEM και επώαστηκε για 15min σε θερμοκρασία δωματίου. Η λιποφεκταμίνη προστέθηκε σε 50μl DMEM και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10min. Η ποσότητά της ανά αντίδραση καθορίστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας. Μετά την επώαση οι αντιδράσεις αναμίχθηκαν (τελικός όγκος 100μl/αντίδραση) και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15min. Έπειτα προστέθηκαν στα κύτταρα.

Μετά από 2,5 ώρες προστέθηκε στα κύτταρα θρεπτικό DMEM με 10% ορό, χωρίς αντιβιοτικό. Έπειτα από 48 ώρες, τα κύτταρα αναλύθηκαν για έκφραση λουσιφεράσης και β-γαλακτοσιδάσης.



Εικόνα 3β. Τα φωσφοροθειικά ολιγονουκλεοτίδια περιέχουν στη θέση ενός ατόμου οξυγόνου του φωσφορικού ένα άτομο θείου. Αυτό τους προσδίδει μεγάλη σταθερότητα έναντι νουκλεασών.

Αποτελέσματα – Συζήτηση

Βιοπληροφορική και *in silico* αποτελέσματα

Αρχικός στόχος ήταν η κλωνοποίηση των 3' UTR των πιθανών γονιδίων-στόχων στον φορέα έκφρασης της λουσιφεράσης *Renilla* (*Renilla luciferase*) pHRL-TK της εταιρίας Promega. Ωστόσο, επειδή στο 3'UTR πιθανόν να υπήρχαν αλληλουχίες που ίσως να οδηγούσαν σε ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης της λουσιφεράσης από άλλους παράγοντες (Xie, X. et al 2005), όπως από άλλα μικρο-RNA, προτιμήθηκε να κλωνοποιηθεί αυτούσια στον φορέα μόνο η περιοχή πρόσδεσης (binding site) των mir15 ή/και mir16 στο 3' UTR του εκάστοτε γονιδίου.

Έτσι, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα microInspector, τόσο για να βρεθούν οι περιοχές πρόσδεσης των mir15 και mir16 στο 3' UTR κάθε γονιδίου που περιγράφεται στον Πίνακα 1α της εισαγωγής και στο γονίδιο *Bcl2* όσο και για να διερευνηθεί αν υπάρχουν άλλα μικρο-RNA τα οποία προσδένονται στο 3'UTR της λουσιφεράσης του pHRL-TK, που είναι το 3' UTR του ιού SV40. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι *in silico*, κανένα μικρο-RNA δεν προσδένεται με τέτοιο τρόπο, ώστε να πληρεί τις προϋποθέσεις για να χαρακτηριστεί πιθανός ρυθμιστής. Εξάλλου οποιαδήποτε πρόσδεση μικρο-RNA θα συνεπαγόταν τη ρύθμιση των βασικών επιπέδων της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα του προγράμματος microInspector για τα υποψήφια γονίδια φαίνονται στην εικόνα 1γ και στον πίνακα 1γ.

Σύμφωνα με το άρθρο των Brennecke και συνεργατών (Brennecke, J. et al 2005), τα νουκλεοτίδια 2-8 του μικρο-RNA σε κατεύθυνση 5'-3' που είναι συμπληρωματικά με την 3' αλληλουχία του mRNA είναι τα σημαντικότερα για τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου. Η συμπληρωματικότητα του mRNA με το 3' άκρο του μικρο-RNA είναι λιγότερο σημαντική. Επίσης η ύπαρξη ζευγών G:U μειώνει την αποτελεσματικότητα της δράσης του μικρο-RNA ανάλογα με τον αριθμό των ζευγών.

Έτσι, φαίνεται, ότι για το *Bcl2* τα πρώτα 9 νουκλεοτίδια του 3'άκρου του είναι πλήρως συμπληρωματικά με τα 9 πρώτα νουκλεοτίδια του 5'άκρου του mir16. Αυτό το καθιστά σημαντικό υποψήφιο γονίδιο-στόχο, ιδιαίτερα αν παρατηρήσει κανείς και την υπόλοιπη δομή που χαρακτηρίζεται από σχηματισμό θηλιάς και πολύ καλή συμπληρωματικότητα στο 3' άκρο του μικρο-RNA.

Επίσης, και στην περίπτωση του *MYCBP* παρατηρεί κανείς πλήρη συμπληρωματικότητα στο 5' άκρο για τα πρώτα 9 νουκλεοτίδια τόσο για το mir15a όσο και για το mir16. Ωστόσο υπάρχει ένα ζεύγος G:U στο 3^ο νουκλεοτίδιο που πιθανόν να μειώνει την αποτελεσματικότητα

της δράσης των mir15a και mir16, ίσως όχι όμως σε υψηλό βαθμό όπως δείχνουν και οι Brennecke και συνεργάτες. Πιθανόν το *MYCBP* να ρυθμίζεται από τα δύο μικρο-RNA.

Επιπλέον συμπληρωματικότητα για τα πρώτα 8 νουκλεοτίδια μεταξύ του mir15 και του mRNA του γονιδίου-στόχου παρατηρείται για το *Ventx2*, το *Rab11-FIP3* και το *ZBTB*. Στην περίπτωση του *Ventx2* δεν είναι γνωστό, αν ο σχηματισμός δύο θηλιών εμποδίζει ή ενισχύει τη μεταγραφική ρύθμιση από το mir15b, ωστόσο η πολύ καλή συμπληρωματικότητα στο 5' άκρο δείχνει ότι πιθανόν το mir15b να αποτελεί ρυθμιστή του γονιδίου. Ακόμη, πιθανόν το mir-15a να αποτελεί ρυθμιστή για το *Rab11-FIP3* και το *ZBTB*

Αντιθέτως, στην περίπτωση της αγκυρίνης G η συμπληρωματικότητα περιορίζεται μόνο στα 7 πρώτα νουκλεοτίδια του 5' άκρου του mir15a. Συνεπώς η ρύθμιση δεν είναι τόσο ισχυρή. Ακόμη υπάρχουν δύο ζευγη G:U στο 2^ο και στο 7^ο νουκλεοτίδιο. Πιθανόν η αγκυρίνη G να μην ρυθμίζεται από το mir15a ή αν ρυθμίζεται η ρύθμιση να μην είναι ισχυρή.

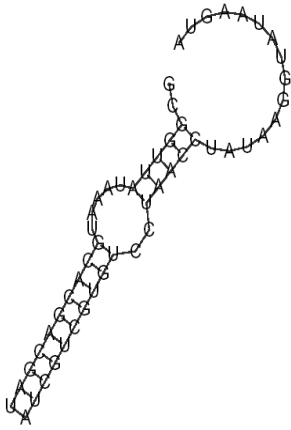
In vitro αποτελέσματα

Κλωνοποίηση

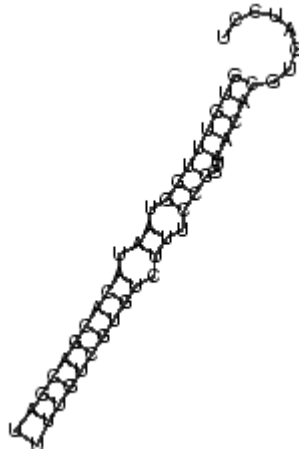
Αποφασίστηκε να κλωνοποιηθεί η περιοχή πρόσδεσης των mir15 ή/και mir16 μόνο μια φορά στο 3' UTR του φορέα έκφρασης, προσέγγιση που έχει χρησιμοποιηθεί και από άλλη ερευνητική ομάδα (Cheng, A.M. et al 2005). Για να είναι αποτελεσματική η κλωνοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων ο φορέας pHRL-TK τροποποιήθηκε κατάλληλα. Προστέθηκαν σε αυτόν δύο διαφορετικές περιοριστικές αλληλουχίες για το ίδιο ένζυμο, το *BstE*I, ώστε με κοπή με ένα μόνο ένζυμο να δημιουργούνται διαφορετικά άκρα που δεν θα επανασυνδέονται και η σύνδεση να προκύπτει μόνο έπειτα από κλωνοποίηση των κατάλληλων ολιγονουκλεοτιδίων στον φορέα (Εικόνες 2γ, 3γ και 4γ).

Η προσθήκη των περιοριστικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με την κλωνοποίηση κασσέτας 25 βάσεων σε κατεύθυνση 5' *Xba*I – 3' *Not*I στον φορέα. (Εικόνες 2γ και 3γ). Οι περιοριστικές αλληλουχίες για το *BstE*I είναι οι GGTGACC και GGTTACC. Αρχικά αποφασίστηκε να μελετηθεί η αποτελεσματικότητα των πειραμάτων για κάποια από τα υποφύγια γονίδια. Έτσι επιλέχθηκαν το *Bcl2* και το *MYCBP*.

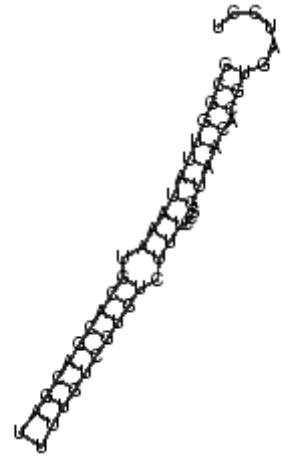
A



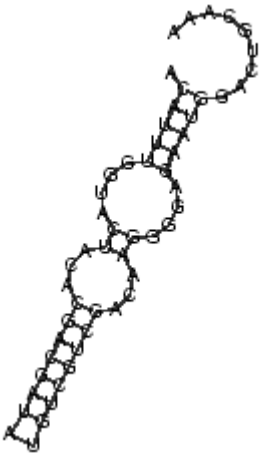
B



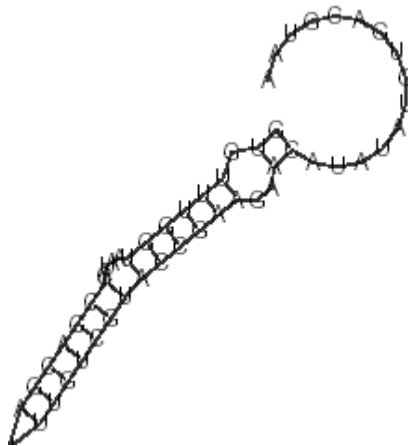
Γ



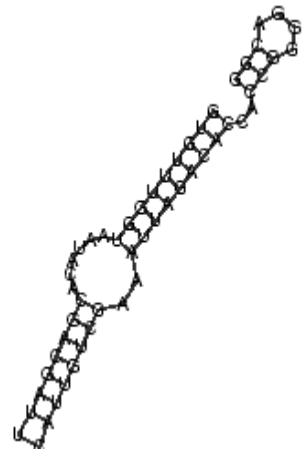
Δ



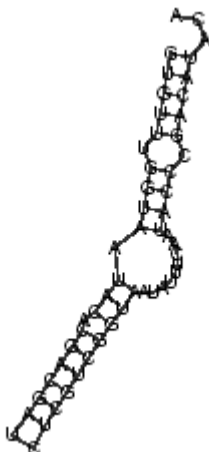
E



Z



H



Εικόνα 1γ. Αποτελέσματα του προγράμματος microInspector. Δισδιάστατη εικόνα της δομής που προκύπτει από την πρόσδεση των mir15 ή/και mir16 στην πιθανή περιοχή πρόσδεσης στο 3'UTR του υποψήφιου γονιδίου-στόχου. A.*Bcl2*-mir16, B *MYCBP*-mir15a, Γ.*MYCBP*-mir16, Δ.*Ventx2*-mir15b, E.*ankyrinG*-mir15a, Z. *Rab11-FIP3*- mir15a, H. *ZBTB*-mir15a

Αλληλουχία περιοχής
πρόσδεσης μικρο-RNA

Αλληλουχία μικρο-RNA

Μοτίβο

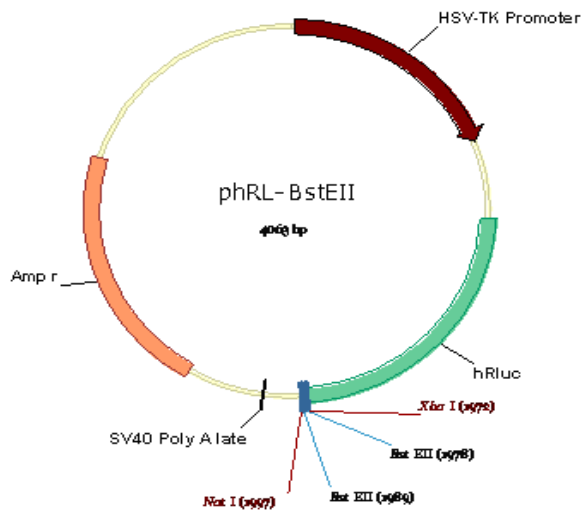
<i>Bcl2</i> atgaatatggaatatccaatcctgtgctgcta	hsa miR16,uagcagcacguaaaauuggcg	..((((.....(((((((((&))))))))))..)).....
<i>MYCBP</i> tcctagtgcacaatggccttctgtgctgtt	hsa-miR15a,uagcagcacauaaugguuug	((((((((.....(((((((((&))))))))))..))..)).....,
MYCBP tcctagtgcacaatggccttctgtgctgtt	hsa-miR-16,uagcagcacguaaaauuggcg	((((((((.....(((((((((&))))))))))..))..)).....,
<i>Ventx2</i> ,aaacgtcaggaagaggggaacagctgctgta	hsa-miR-15b,uagcagcacaucaugguuuaca	..((((.....((.....(((((((((&..))))))))..)).....)).....,-
<i>AnkG</i> ,aatgcagtgatatacaagaagccatgctgtt	hsa-miR-15a,uagcagcacauaaugguuug	((.....((((.....(((((((((&))))))))))..)).....,
<i>Rab11FIP3</i> ggcaggggccaccacagattaagctgttact	hsa-miR-15a,uagcagcacauaaugguuug	((((((((.....(((((((((&..))))))))..)).....)).....)((.....)),-
ZBTB acatacagcccataactttataatggctgctc	hsa-miR-15a,uagcagcacauaaugguuug	((((.....((((.....(((((((((&))))))))..)).....)).....)).....,-

Πίνακας 1γ. Οι περιοχές πρόσδεσης των μικρο-RNA στα γονίδια-στόχους, οι αλληλουχίες των μικρο-RNA και τα μοτίβα πρόσδεσης

Στον νέο φορέα, τον pHRL-BstEII, αποφασίστηκε για κάθε υπό μελέτη γονίδιο να κλωνοποιηθούν 3 κασσέτες. Μία αγρίου τύπου (wild type- wt), που να περιέχει αυτούσια την περιοχή πρόσδεσης των mir15 ή/και mir16 στο 3'UTR του γονιδίου, μία που να περιέχει μεταλλαγές της περιοχής πρόσδεσης (mutants- mut) και μία στην οποία το αντίστοιχο μικρο-RNA να προσδένεται με τέλεια συμπληρωματικότητα (perfect match-PM), λειτουργώντας ως siRNA. Οι μεταλλαγές δημιουργήθηκαν λαμβάνοντας υπόψη τη μελέτη των Brennecke και συνεργατών (Brennecke, J. et al 2005).

Έτσι για το *Bcl2* αποφασίστηκε ότι το νουκλεοτίδιο που έπρεπε να μεταλλαχθεί ήταν το 3^ο από το 3' άκρο της περιοχής πρόσδεσης του μικρο-RNA, ενώ για το *MYCBP* το 4^ο νουκλεοτίδιο από το 3' άκρο της περιοχής πρόσδεσης του μικρο-RNA. Συγκεκριμένα για το *Bcl2* το 3^ο νουκλεοτίδιο μετατράπηκε από κυτοσίνη σε αδενίνη, ενώ για το *MYCBP* το 4^ο μετράπηκε από γουανίνη σε αδενίνη (Πίνακας 2γ).

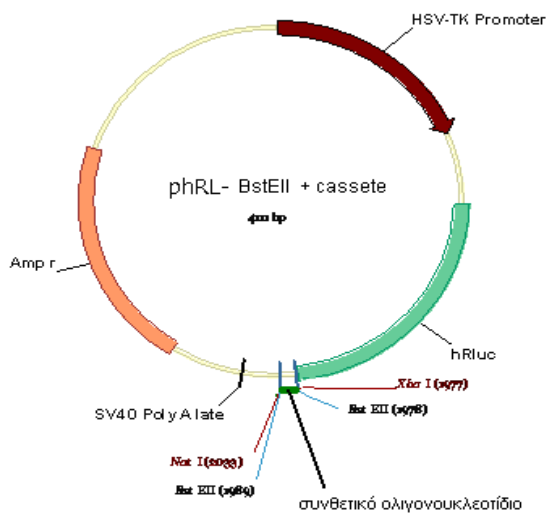
Τα ολιγονουκλεοτίδια υβριδοποιήθηκαν και κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pHRL-BstEII μετά από κοπή του με το ένζυμο *BstEII*. Τα ολιγονουκλεοτίδια για το *Bcl2* και το *MYCBP* είχαν σχεδιαστεί με συγκεκριμένα 5'-3' προεξέχοντα άκρα, ώστε να κλωνοποιηθούν στον φορέα, χωρίς να προηγηθεί πέψη τους με το ένζυμο *BstEII*. Οι κατασκευές αλληλουχήθηκαν και επιβεβαιώθηκε ότι τα ολιγονουκλεοτίδια εντέθηκαν σωστά.



```

                                     BstEII      BstEII
                                     ~~~~~~      ~~~~~~
XbaI                                     NotI
1901  GACGCTCCAG ATGAAATGGG TAAGTACATC AAGAGCTTCG TGGAGCGCGT GCTGAAGAAC GAGCAGTAAT TCTAG GGTG ACCGATCGGT TACC CCGGCC
      CTGCGAGGTC TACTTTACCC ATTCATGTAG TTCTCGAAGC ACCTCGCGCA CGACTTCTTG CTCGTCATTA AGATC CCAC TGGCTAGCCA ATGG CCGCCG
      NotI
2001  CCTTCGAGCA GACATGATAA GATACATTGA TGAGTTTGA CAAACCACAA CTAGAATGCA GTGAAAAAAA TGCITTTATT GTGAAATTTG TGATGCTATT
      CCAAGCTCGT CTGTAATATT CTATGTAAGT ACTCAAACCT GTTTGGTGT GATCTTACGT CACTTTTTTT ACGAAATAAA CACTTTAAAC ACTACGATAA
  
```

Εικόνα 2γ. Ο φορέας pHRL-BstEII που περιέχει τα σημεία κοπής BstEII



```

                                     BstEII
                                     XbaI~~~~~+8nt
1901  GACGCTCCAG ATGAAATGGG TAAGTACATC AAGAGCTTCG TGGAGCGCGT GCTGAAGAAC GAGCAGTAAT TTAAT TCTAG AGGTGACNNN NNNNNNNNNN
      CTGCGAGGTC TACTTTACCC ATTCATGTAG TTCTCGAAGC ACCTCGCGCA CGACTTCTTG CTCGTCATTA AATTAAGATC TCCACTGNNN NNNNNNNNNN
      NotI
2001  3'UTR Binding site +8nt
      NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNGTTACC CCGGCCCGCT CGAGGGCCGC TTCGAGCAGA CATGATAAGA TACATTGATG AGTTTGGACA AACCACAACT
      NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNCAATGG CGCCGGCGAA GCTCCGGCGC AAGCTCGTCT GTACTATTCT ATGTAAC TCAACCTGT TTGGTGTGA
      ~~~~~
      BstEII
  
```

Μπλέ χρώμα: η αλληλουχία του ολιγονουκλεοτιδίου

Εικόνα 3γ. Ο φορέας pHRL-BstEII με την ένθεση

Διαμόλυνση κυττάρων (transfection)

Η διαμόλυνση με τις κατασκευές που περιγράφηκαν παραπάνω πραγματοποιήθηκε σε κυτταρική σειρά HeLa. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε β-γαλακτοσιδάση. Οι διαμολύνσεις πραγματοποιήθηκαν μόνο μια φορά, κάτι που αφήνει ανοιχτό πεδίο για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με επανάληψη των πειραμάτων.

Τα mir15a και mir16 εκφράζονται στα κύτταρα HeLa σε μέτριες συγκεντρώσεις (Baskerville, S. and Bartel, D.P. 2005). Καθώς το σύστημα που μελετήθηκε ήταν καινούργιο, δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις των φορέων έκφρασης λουσιφεράσης, τόσο του κενού (control) όσο και αυτών με τις ενθεμένες κασσέτες, χρησιμοποιώντας αρχικά τους φορείς για το γονίδιο *MYCBP*. Οι συγκεντρώσεις των φορέων έκφρασης κατά την πειραματική διαδικασία κυμάνθηκαν από 50ngr/πηγάδι έως 200ngr/πηγάδι με ίσες συγκεντρώσεις του φορέα της β-γαλακτοσιδάσης. Αυτό όμως είχε ως αποτέλεσμα σε μικρές ποσότητες β-γαλακτοσιδάσης να μην υπάρχει επαρκής έκφραση της και να είναι αδύνατον να πραγματοποιηθεί η κανονικοποίηση. Τα αποτελέσματα της εικόνας 5γ αναφέρονται σε συγκέντρωση 100ngr/πηγάδι για το γονίδιο *Bcl2* και 200ngr/πηγάδι για το γονίδιο *MYCBP*. Σε κάθε περίπτωση συνδιαμολύνθηκε ίση ποσότητα φορέα β-γαλακτοσιδάσης.

Στην εικόνα 5γΑ φαίνεται ότι σε σχέση με τον κενό φορέα (control), η αγρίου τύπου κασσέτα (wtMYCBP) για την περιοχή πρόσδεσης του mir15a στο *MYCBP* προκαλεί μείωση της έκφρασης της λουσιφεράσης *Renilla* κατά 1,5 φορές, η κασσέτα με τη μετάλλαξη (MYCBPmut4) προκαλεί μικρή μείωση στην έκφραση της λουσιφεράσης, ενώ η κασσέτα πλήρους συμπληρωματικότητας (PM15a) προκαλεί μείωση στην έκφραση της λουσιφεράσης κατά 8,5 φορές. Σε σύγκριση με την κασσέτα wtMYCBP, η κασσέτα MYCBPmut4 αυξάνει τα επίπεδα της λουσιφεράσης κατά 1 φορά, ενώ η κασσέτα PM15a τα μειώνει κατά 6 φορές.

Στην εικόνα 5γΒ παρατηρεί κανείς, σε σχέση με τον κενό φορέα, ότι η αγρίου τύπου κασσέτα (wtBcl2) για την περιοχή πρόσδεσης του mir16 στο *Bcl2* μειώνει την έκφραση της λουσιφεράσης *Renilla* κατά 4,6 φορές (folds), η μεταλλαγμένη κασσέτα (Bcl2mut3) κατά 2,5 φορές και η κασσέτα πλήρους συμπληρωματικότητας (PM16) κατά 9,2 φορές. Σε σχέση με την κασσέτα wtBcl2, η κασσέτα Bcl2mut3 αυξάνει την έκφραση της λουσιφεράσης 2 φορές, ενώ η κασσέτα PM16 τη μειώνει 2 φορές.

Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρεί κανείς ένα αναμενόμενο μοτίβο, εφόσον κάποιο μικρο-RNA ρυθμίζει ένα γονίδιο: η ένθεση της περιοχής πρόσδεσης αγρίου τύπου του μικρο-RNA σε κάποιο γονίδιο έκφρασης πρέπει να οδηγεί σε μείωση των επιπέδων έκφρασής του,

διότι υπόκειται σε μεταγραφική ρύθμιση από το μικρο-RNA αυτό. Η μεταλλαγή της περιοχής πρόσδεσης πρέπει να απορυθμίζει τη μεταγραφική ρύθμιση από το μικρο-RNA, μειώνοντάς τη, αφού το μικρο-RNA δεν προσδένεται σωστά στο mRNA. Βέβαια, περιμένει να παρατηρήσει κανείς μια σχετική μείωση στην έκφραση της λουσιφεράσης, όχι όμως στο επίπεδο της κασσέτας του αγρίου τύπου, ειδικά αν έχει μεταλλαχθεί μόνο ένα νουκλεοτίδιο. Όταν υπάρχει κασσέτα όπου το μικρο-RNA προσδένεται σαν siRNA, τότε είναι αναμενόμενο να μειωθεί η έκφραση της λουσιφεράσης κάτω από τα επίπεδα έκφρασης της κασσέτας αγρίου τύπου. Ακόμη, σε σχέση με την κασσέτα αγρίου τύπου, η μεταλλαγμένη κασσέτα πρέπει να αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της λουσιφεράσης, ενώ η κασσέτα πλήρους συμπληρωματικότητας να τα μειώνει ακόμη περισσότερο.

Είναι αναγκαίο να τονιστεί, ότι στα παραπάνω πειράματα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μια σταθερή ποσότητα φορέα β-γαλακτοσιδάσης ανά αντίδραση, της τάξης των 500ngr και άνω, ώστε να υπάρχει υψηλότερη έκφραση ενζύμου και να διευκολυνθεί η κανονικοποίηση. Αυτό θα μπορούσε να γίνει σε επόμενα πειράματα.

Στα παραπάνω πειράματα δεν χρησιμοποιήθηκαν τα antisense DNA ολιγονουκλεοτίδια για τα mir15a και mir16. Προκειται για μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια στα οποία ένα άτομο O της φωσφορικής ομάδας έχει αντικατασταθεί από ένα άτομο S, ώστε να είναι σταθερά και να μην αποικοδομούνται από νουκλεάσες (βλέπε υλικά και μέθοδοι, εικόνα 3β). Η χρήση αυτών των ολιγονουκλεοτιδίων θα είχε ως αποτέλεσμα την απορρόφηση (out-titration) των mir15a και mir16, εμποδίζοντας τη δράση τους. Είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί διαμόλυνση που θα περιλαμβάνει και αυτά, ώστε να διαπιστωθεί πλήρως αν οι διαφορές στην έκφραση της λουσιφεράσης οφείλονται αποκλειστικά στο mir15a και στο mir16. Αφού χρησιμοποιήθηκαν και κασσέτες στις οποίες τα πάνω μικρο-RNA προσδένονται τέλεια, είναι δυνατόν να υποθέσει κανείς ότι οι μεταβολές στην έκφραση της λουσιφεράσης οφείλονται σε αυτά. Όμως, δεδομένου ότι στα κύτταρα HeLa εκφράζονται πολλά μικρο-RNA, δεν είναι δυνατόν να γνωρίζει κανείς με βεβαιότητα, αν τα αποτελέσματα των πειραμάτων οφείλονται αποκλειστικά στα mir15a και mir16.

Στην περίπτωση του γονιδίου *MYCBP*, παρόλο που παρατηρεί κανείς τα παραπάνω, οι διαφορές στην έκφραση λουσιφεράσης, με εξαίρεση την κασσέτα PM15a, δεν είναι σημαντικές για ένα τέτοιο πείραμα. Θα ήταν δυνατόν να υποθέσει κανείς, ότι το γονίδιο δεν ρυθμίζεται από το mir15a. Βέβαια, το γεγονός ότι η κασσέτα PM15a προκαλεί σημαντική μείωση, τόσο σε σχέση με τον κενό φορέα όσο και με την κασσέτα wtMYCBP, δεν είναι αμελητέο. Δεδομένου ότι η ποσότητα του συγκεκριμένου μικρο-RNA είναι μέτρια στα κύτταρα

HeLa, θα έπρεπε να επαναληφθεί το πείραμα με μικρότερη ποσότητα φορέα λουσιφεράσης. Υπάρχει το ενδεχόμενο η μικρή ποσότητα του μικρο-RNA σε σχέση με την πιθανόν περισσή ποσότητα λουσιφεράσης να μην είναι δυνατόν να μειώσει ικανοποιητικά την έκφραση της. Άρα, πρέπει να προσφερθεί μικρότερη ποσότητα στόχου (λουσιφεράσης) για το μικρο-RNA

Τελευταία έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη E2F1, η οποία δρα έπειτα από το *c-Myc* (downstream) στο μονοπάτι ενεργοποίησης του, ρυθμίζεται από κάποια μικρο-RNAs (miR-17-5p και miR-20a) τα οποία κωδικοποιούνται σε μια οικογένεια (cluster) που ρυθμίζεται μεταγραφικά από το ίδιο το *c-Myc* (O' Donnell, K.A. et al 2005). Δεν αποκλείεται λοιπόν, και άλλες πρωτεΐνες που συνεργάζονται με τη *c-Myc*, όπως η MYCBP, να ρυθμίζονται μεταγραφικά από μικρο-RNA.

Για το γονίδιο *Bcl2* φαίνεται να υπάρχει ρύθμιση από το miR16. Η μείωση των επιπέδων της λουσιφεράσης κατά 4,6 φορές ως προς τον κενό φορέα λόγω της κασσέτας wt*Bcl2* είναι αρκετά σημαντική. Επίσης, με την κασσέτα *Bcl2mut3* παρατηρείται μείωση των επιπέδων λουσιφεράσης, σε μικρότερο βαθμό όμως από ότι με την κασσέτα wt*Bcl2* και παράλληλα η κασσέτα PM16 μειώνει σε μεγάλο βαθμό την έκφραση λουσιφεράσης, κάτω από τα επίπεδα της wt*Bcl2*. Το γεγονός ότι, σε σχέση με την κασσέτα wt*Bcl2*, η κασσέτα *Bcl2mut3* αυξάνει τα επίπεδα της λουσιφεράσης, ενώ η PM16 τα μειώνει ενισχύει ακόμη περισσότερο την πιθανότητα να ρυθμίζεται το *Bcl2* από το miR16, αν και οι διαφορές στην έκφραση δεν είναι αρκετά υψηλές για να το υποθέσει κανείς με σιγουριά.

Το ότι το *Bcl2* ρυθμίζεται από το miR16, αλλά και από το miR15a, αποδεικνύεται από μια πολύ πρόσφατη δημοσίευση των Cimmino και συνεργατών (Cimmino, A. et al 2005). Συγκεκριμένα, παρατήρησαν ότι υπήρχε αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας της *Bcl2* και των miR15a και miR16 σε ασθενείς με CLL. Ακόμη, είχαν παρατηρήσει ότι υπήρχε πλήρης συμπληρωματικότητα μεταξύ των 9 πρώτων νουκλεοτιδίων του 5' άκρου των miR16 και miR15 με τα νουκλεοτίδια 3287-3279 του 3'UTR του *Bcl2*, κάτι το οποίο προέκυψε και από τη χρήση του microInspector (βλέπε, εικόνα 1γ και πίνακας 1γ).

Έχοντας τα παραπάνω ως δεδομένα, προχώρησαν στην κλωνοποίηση τόσο των γονιδίων των miR15a και miR16, όσο και στην κλωνοποίηση 546 bp από το 3'UTR του *Bcl2*, που περιέχει την περιοχή πρόσδεσης των μικρο-RNA αυτών. Με τις κατασκευές για τα miR15a και miR16 διαμολύνθηκαν κύτταρα της σειράς MEG-01, τα οποία παρουσιάζουν υψηλή έκφραση *Bcl2* και καθόλου έκφραση των miR15a και miR16. Παρατηρήθηκε ότι μειώθηκαν τα επίπεδα της *Bcl2* κατά 7%.

Προκειμένου να αποδειχθεί ότι τα mir15a και mir16 δρουν απευθείας στην Bcl2 και όχι μέσω ενδιάμεσων στόχων, η κατασκευή για το *Bcl2* με αυτούσιο το 3'UTR καθώς και μεταλλαγές της περιοχής πρόσδεσης από όπου έλειπαν τα πρώτα 9 και τα πρώτα 5 συμπληρωματικά νουκλεοτίδια, συνδιαμολύνθηκε με τις κατασκευές για τα mir15a και mir16 στα παραπάνω κύτταρα. Παρατηρήθηκε μείωση στην έκφραση της λουσιφεράσης στην πρώτη περίπτωση, ενώ οι μεταλλαγές δε μείωσαν σημαντικά την έκφραση της λουσιφεράσης. Τέλος, με πείραμα TUNEL στην κυτταρική σειρά MEG-01 αποδείχθηκε, ότι με την καταστολή της Bcl2 από τα mir15a και mir16 επάγεται απόπτωση.

Τα αποτελέσματα των Cimmino και συνεργατών είναι πολύ σημαντικά καθώς η αποτυχία ανταπόκρισης των κύτταρων στην απόπτωση αποτελεί χαρακτηριστικό πολλών καρκίνων (Packham, G. and Stevenson, F.K. 2005). Η CLL θεωρείται μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από αποτυχημένη απόπτωση (Caligaris-Cappio, F. et al 1999, Jewell, A.P. 2002) και η απώλεια της απόπτωσης θεωρείται σημαντικό στοιχείο της απορύθμισης της φυσιολογικής ομοιόστασης των Β-λεμφοκυττάρων σε όλα τα στάδια της ασθένειας.

Η αποτυχία απόπτωσης στην περίπτωση των λεμφωμάτων οφείλεται σε πολλές περιπτώσεις στην υπερέκφραση της Bcl-2 λόγω μετάθεσης του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσής της στις ρυθμιστικές περιοχές των ανοσοσφαιρινών, συγκεκριμένα των ενισχυτών της βαριάς αλυσίδας Ig (Cory, S. et al 2003, Kirkin, V. et al 2004). Η μετάθεση αυτή t(14:18)(q32;q21) απαντάται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων των θηλακοειδών (follicular) λεμφωμάτων που οφείλονται σε Β-λεμφοκύτταρα, δεν αντιπροσωπεύει όμως το σύνολο των περιπτώσεων CLL.

Μελλοντικές προοπτικές

Το γεγονός, ότι ακόμη ένα ογκογονίδιο, μαζί με το *Ras* (άμεσα) και το *c-MYC* (έμμεσα), αποδεικνύεται ότι ρυθμίζεται από μικρο-RNAs, αποτελεί σημαντικό στοιχείο, προκειμένου να συνδεθούν πλέον τα δεδομένα για την απορύθμιση της έκφρασης των ογκογονιδίων με τα μικρο-RNA. Ειδικά για την περίπτωση του *Bcl2* η συσχέτισή του με τα mir15a και mir16 ολοκληρώνει την εικόνα σχετικά με μια από τις αιτίες για τη δημιουργία CLL. Προφανώς, η έλλειψη στο χρωμόσωμα 13q14 που συνεπάγεται την έλλειψη των mir15a και mir16 οδηγεί σε υπερέκφραση του *Bcl2* με επακόλουθο την αποτυχία της απόπτωσης στα Β-λεμφοκύτταρα και τη δημιουργία CLL.

Συνεπώς, τα μικρο-RNA αποδεικνύονται σημαντικοί παράγοντες που η έλλειψη τους ενδεχομένως να οδηγεί σε δημιουργία καρκίνων. Με δεδομένο, ότι ένα μικρο-RNA πιθανόν να έχει αρκετά γονίδια-στόχους σε ένα κύτταρο, η έλλειψη του ενδέχεται να απορυθμίζει κάποιες λειτουργίες του κυττάρου. Όταν οι στόχοι αυτοί είναι ογκογονίδια, τότε το κύτταρο αποτυγχάνει να λειτουργήσει φυσιολογικά και μετατρέπεται σε καρκινικό.

Θα ήταν ενδιαφέρον να ερευνηθεί πια επιπλέον γονίδια αποτελούν στόχους των miR15a και miR16. Σε ότι αφορά στην παρούσα εργασία, η πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω πρέπει να ακολουθηθεί και για τα υπόλοιπα υποψήφια γονίδια, προκειμένου να βρεθούν και άλλοι στόχοι.

Εφόσον, λοιπόν, αποδεικνύεται ότι ένας από τους λόγους σχηματισμού CLL είναι και η έλλειψη μικρο-RNA, η έρευνα θα μπορούσε να οδηγηθεί στην κατεύθυνση του να διαπιστωθεί πόσο καθοριστική είναι τελικά η έλλειψη των miR15 και miR16 για το σχηματισμό CLL. Το γεγονός, ότι υπάρχει ακόμη ένα ζεύγος αυτών των μικρο-RNA στο 3^ο χρωμόσωμα θα συνεπαγόταν, ίσως, την μερική αντιστάθμιση της έλλειψης, κάτι το οποίο όμως μέχρι στιγμής δε φαίνεται να συμβαίνει.

Τα πιθανά πειράματα θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν την υπερέκφραση των miR15 και miR16 σε καρκινικά B- λεμφοκύτταρα, ώστε να παρατηρηθεί αν είναι ικανά να επαναφέρουν το φαινότυπο στον προηγούμενο φυσιολογικό. Αν αυτό είναι δυνατόν, τότε θα πρέπει να σχεδιαστούν και *in vivo* πειράματα, ώστε να διαπιστωθεί, αν η υπερέκφρασή τους είναι δυνατόν να μειώσει τον καρκινικό φαινότυπο. Εφόσον προκύψουν τέτοια δεδομένα, τότε θα έπρεπε να μελετηθεί πως θα ήταν δυνατόν να χρησιμοποιηθούν τα miR15 και miR16 στο σχεδιασμό φαρμάκων κατά της CLL.

Εν κατακλείδι, παρόλο που η θεραπεία ασθενειών, όπως ο καρκίνος, ακόμη δεν είναι πλήρως εφικτή, με τα πρόσφατα δεδομένα που εμπλέκουν τα μικρο-RNA στον καρκίνο ανοίγουν νέοι ορίζοντες στην έρευνα, προκειμένου να ερευνηθεί περαιτέρω το μοριακό υπόβαθρο που δημιουργεί τους καρκίνους και να ανακαλυφθούν αποτελεσματικότερες θεραπείες.

Βιβλιογραφία

Adai A, Johnson C, Mlotshwa S, Archer-Evans S, Manocha V, Vance V, Sundaresan V. Computational prediction of miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.* 2005 Jan;15(1):78-91.

Almeida R, Allshire RC. RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol.* 2005 May;15(5):251-8.

Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004 Sep 16;431(7006):350-5. Review.

Baskerville S, Bartel DP Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA.* 2005 Mar;11(3):241-7.

Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell.* 2003 Apr 4;113(1):25-36.

Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 2005 Mar;3(3):e85

Boutla A, Delidakis C, Tabler M Developmental defects by antisense-mediated inactivation of micro-RNAs 2 and 13 in *Drosophila* and the identification of putative target genes. *Nucleic Acids Res.* 2003 Sep 1;31(17):4973-80.

Bullrich F, Fujii H, Calin G, Mabuchi H, Negrini M, Pekarsky Y, Rassenti L, Alder H, Reed JC, Keating MJ, Kipps TJ, Croce CM Characterization of the 13q14 tumor suppressor locus in CLL: identification of ALT1, an alternative splice variant of the LEU2 gene. *Cancer Res.* 2001 Sep 15;61(18):6640-8.

Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol.* 1999 Jan;17(1):399-408. Review.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Alder H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 26;99(24):15524-9. Epub 2002 Nov 14.

Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM .MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 10;101(32):11755-60. Epub 2004 Jul 29.

Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res.* 2005 Mar 1;33(4):1290-7. Print 2005.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 15;

Cory,S., Huang, D.C., Adams, J.M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 2003 Nov 24;22(53):8590-607. Review.

Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000 Dec 28;343(26):1910-6.

Dong JT, Boyd JC, Frierson HF Jr Loss of heterozygosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer. *Prostate.* 2001 Nov 1;49(3):166-71.

Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 8;102(10):3627-32. Epub 2005 Feb 28.

Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol*. 2003;5(1):R1. Epub 2003 Dec 12.

Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol*. 2005 Jun;15(3):331-41. Review.

Finnegan EJ, Margis R, Waterhouse PM. Posttranscriptional gene silencing is not compromised in the *Arabidopsis* CARPEL FACTORY (DICER-LIKE1) mutant, a homolog of Dicer-1 from *Drosophila*. *Curr Biol*. 2003 Feb 4;13(3):236-40.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):770-6. Review.

Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 2002 Sep 20;297(5589):2056-60. Epub 2002 Aug 1.

Jewell AP. Role of apoptosis in the pathogenesis of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Biomed Sci*. 2002;59(4):235-8. Review.

John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol*. 2004 Nov;2(11):e363. Epub 2004 Oct 5.

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005 Mar 11;120(5):635-47.

Kiriakidou M, Nelson PT, Kouranov A, Fitziev P, Bouyioukos C, Mourelatos Z, Hatzigeorgiou A A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev*. 2004 May 15;18(10):1165-78. Epub 2004 May 6.

Kirkin V, Joos S, Zornig M The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Mar 1;1644(2-3):229-49. Review

Kordeli E, Lambert S, Bennett V AnkyrinG. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. *J Biol Chem*. 1995 Feb 3;270(5):2352-9.

Kretschmer T, England JD, Happel LT, Liu ZP, Thouron CL, Nguyen DH, Beuerman RW, Kline DG Ankyrin G and voltage gated sodium channels colocalize in human neuroma--key proteins of membrane remodeling after axonal injury. *Neurosci Lett*. 2002 Apr 26;323(2):151-5.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):415-9.

Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, Carthew RW Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*. 2004 Apr 2;117(1):69-81.

Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003 Dec 26;115(7):787-98.

Liu Y, Corcoran M, Rasool O, Ivanova G, Ibbotson R, Grander D, Iyengar A, Baranova A, Kashuba V, Merup M, Wu X, Gardiner A, Mullenbach R, Poltaraua A, Hultstrom AL, Juliusson G, Chapman R, Tiller M, Cotter F, Gahrton G, Yankovsky N, Zabarovsky E, Einhorn S, Oscier D Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10 kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*. 1997 Nov 13;15(20):2463-73.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):834-8.

Mabuchi H, Fujii H, Calin G, Alder H, Negrini M, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Croce CM Cloning and characterization of CLLD6, CLLD7, and CLLD8, novel candidate genes for leukemogenesis at chromosome 13q14, a region commonly deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 2001 Apr 1;61(7):2870-7.

Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*. 2004 Jul 23;15(2):185-97.

Mertens D, Wolf S, Schroeter P, Schaffner C, Dohner H, Stilgenbauer S, Lichter P Down-regulation of candidate tumor suppressor genes within chromosome band 13q14.3 is independent of the DNA methylation pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002 Jun 1;99(11):4116-21.

Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004 Feb;39(2):167-9.

Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*. 2003 Oct;1(12):882-91

Migliazza A, Bosch F, Komatsu H, Cayanis E, Martinotti S, Toniato E, Guccione E, Qu X, Chien M, Murty VV, Gaidano G, Inghirami G, Zhang P, Fischer S, Kalachikov SM, Russo J, Edelman I, Efstratiadis A, Dalla-Favera R Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001 Apr 1;97(7):2098-104.

Moretti PA, Davidson AJ, Baker E, Lilley B, Zon LI, D'Andrea RJ .Molecular cloning of a human Vent-like homeobox gene. *Genomics*. 2001 Aug;76(1-3):21-9.

Moss EG, Lee RC, Ambros V The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell*. 1997 Mar 7;88(5):637-46.

Nakahara K, Carthew RW. Expanding roles for miRNAs and siRNAs in cell regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Apr;16(2):127-33. Review.

O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):839-43.

Olsen PH, Ambros V. The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol*. 1999 Dec 15;216(2):671-80.

Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, Yoshida Y, Seto M Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res*. 2004 May 1;64(9):3087-95.

Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*. 2005 Apr;114(4):441-9. Review.

Papp I, Mette MF, Aufsatz W, Daxinger L, Schauer SE, Ray A, van der Winden J, Matzke M, Matzke AJ. Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiol.* 2003 Jul;132(3):1382-90.

Prekeris R, Davies JM, Scheller RH Identification of a novel Rab11/25 binding domain present in Eferin and Rip proteins. *J Biol Chem.* 2001 Oct 19;276(42):38966-70. Epub 2001 Jul 31.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000 Feb 24;403(6772):901-6.

Rondeau G, Moreau I, Bezieau S, Petit JL, Heilig R, Fernandez S, Pennarun E, Myers JS, Batzer MA, Moisan JP, Devilder MC Comprehensive analysis of a large genomic sequence at the putative B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) tumour suppresser gene locus. *Mutat Res.* 2001 Dec;458(3-4):55-70.

Rowntree C, Duke V, Panayiotidis P, Kotsi P, Palmisano GL, Hoffbrand AV, Foroni L. Deletion analysis of chromosome 13q14.3 and characterisation of an alternative splice form of LEU1 in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2002 Jul;16(7):1267-75.

Rusinov V, Baev V, Minkov IN, Tabler M. MicroInspector: a web tool for detection of miRNA binding sites in an RNA sequence. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jul 1;33(Web Server issue):W696-700.

Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell.* 2000 Apr;5(4):659-69.

Smith ST, Jaynes JB A conserved region of engrailed, shared among all en-, gsc-, Nk1-, Nk2- and msh-class homeoproteins, mediates active transcriptional repression in vivo. *Development.* 1996 Oct;122(10):3141-50.

Stark A, Brennecke J, Russell RB, Cohen SM. Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. *PLoS Biol.* 2003 Dec;1(3):E60. Epub 2003 Oct 13.

Sontheimer EJ Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Feb;6(2):127-38. Review.

Taira T, Maeda J, Onishi T, Kitaura H, Yoshida S, Kato H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. AMY-1, a novel C-MYC binding protein that stimulates transcription activity of C-MYC. *Genes Cells.* 1998 Aug;3(8):549-65.

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3753-6.

Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.* 2003 Jan 1;17(1):49-63.

Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* 2005 Mar 1;19(5):517-29. Review

Vella MC, Reinert K, Slack FJ. Architecture of a validated microRNA::target interaction. *Chem Biol.* 2004 Dec;11(12):1619-23.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):855-62.

Wilson GM, Fielding AB, Simon GC, Yu X, Andrews PD, Hames RS, Frey AM, Peden AA, Gould GW, Prekeris R. The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis. *Mol Biol Cell*. 2005 Feb;16(2):849-60. Epub 2004 Dec 15.

Wolf S, Mertens D, Schaffner C, Korz C, Dohner H, Stilgenbauer S, Lichter P B-cell neoplasia associated gene with multiple splicing (BCMS): the candidate B-CLL gene on 13q14 comprises more than 560 kb covering all critical regions. *Hum Mol Genet*. 2001 Jun 1;10(12):1275-85.

Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, Lander ES, Kellis M. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*. 2005 Mar 17;434(7031):338-45. Epub 2005 Feb 27.

Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE, Carrington JC. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*. 2004 May;2(5):E104. Epub 2004 Feb 24.

Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol*. 2003 Apr 29;13(9):790-5.

Xu P, Guo M, Hay BA. MicroRNAs and the regulation of cell death. *Trends Genet*. 2004 Dec;20(12):617-24. Review.

Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell*. 2002 Jun;9(6):1327-33.

Zhang Y miRU: an automated plant miRNA target prediction server. *Nucleic Acids Res*. 2005 Jul 1;33(Web Server issue):W701-4.