ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ, ΝΕΩΝ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *BIRC5* ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ

ΑΔΑΜ ΕΛΕΝΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ, ΝΕΩΝ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *BIRC5* ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ

ΑΔΑΜ ΕΛΕΝΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

Τομέας Βιοχημεία και Μοριακής Βιολογίας

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ, ΝΕΩΝ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *BIRC5* ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ

ΑΔΑΜ ΕΛΕΝΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Σκορίλας Ανδρέας , Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Σκορίλας Ανδρέας, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.
- Σίδερης Διαμάντης, Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.
- Κοντός Χρήστος, Επίκ. Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης με τίτλο Κλινική Βιοχημεία - Μοριακή Διαγνωστική, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Σκορίλα Ανδρέα.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς τον επιβλέπων Καθηγητή μου, για την επιλογή μου στο θέμα της διπλωματικής του και την ευκαιρία να βρίσκομαι στο εργαστήριο του, καθώς και για την καθοδήγηση και τις συμβουλές του σε θέματα σχετικά με την εκπόνηση της παρούσας εργασίας και την άρτια διεξαγωγή των πειραμάτων. Η βοήθειά του ήταν καθοριστικής σημασίας καθ΄ όλη τη διάρκεια της πραγματοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Σίδερη Διαμάντη και τον Επίκουρο Καθηγητή Κοντό Χρήστο για την καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια τους στη πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας και τη στήριξη τους σε προβλήματα που αντιμετώπισα καθ΄όλη τη διάρκεια εργασίας μου στον τομέα του εργαστηρίου.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Αδαμόπουλο Παναγιώτη για την καθοδήγηση και τις συμβουλές του που έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής, καθώς και για τη βοήθειά του σε προβλήματα που αντιμετώπισα. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Τσιακανίκα Παναγιώτη-Ιωάννη για την πολύτιμη βοήθειά του σε προβλήματα που αντιμετώπισα, καθώς και για την καθοδήγηση του σχετικά με τις πειραματικές διαδικασίες, καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα Διαμαντόπουλο Μάριο-Ιωάννη . Η συνεργασία μαζί τους δε θα μπορούσε να είναι καλύτερη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Αυγέρη Μαργαρίτη, καθώς και όλο το ανθρώπινο δυναμικό του τομέα για το αρμονικό κλίμα συνεργασίας και κατανόησης που υπήρχε. Ονομαστικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Πανουτσοπούλου Κωνσταντίνα, την υποψήφια

διδάκτορα Παπαδημητρίου Μαρία-Αλεξάνδρα, καθώς και τις φίλες και συναδέλφους Ψυλλάκη Βασιλία-Μαρία, Γεωργούλια Κωνσταντίνα, Πιλάλα Κατερίνα και Κρέσπα Τζένη για το ευχάριστο και δημιουργικό κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο.

Θα ήθελα να εκφράσω και ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου που υπήρξε αρωγός και στήριγμα αυτής μου της προσπάθειας, καθώς και τους φίλους μου για τη στήριξη τους.

Περιεχόμενα

Πρόλογος iv

Συντομογραφίες viii

1. Εισαγωγή 1

1.1 Η μεταγραφή στους ευκαρυώτες 1

1.2 Ο μηχανισμός του εναλλακτικού ματίσματος 3

1.3 Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί του εναλλακτικού ματίσματος. 5

1.4 Η σημασία του εναλλακτικού ματίσματος στη διατήρηση της ομοιόστασης και ο ρόλος του στο καρκίνο 12

1.5 Το ανθρώπινο γονίδιο της *Survivin* 13

1.5.1 Δομή και οργάνωση του γονιδίου της *survivin* 15

1.5.2 Ισομορφές της survivin 16

1.5.3 Survivin και καρκίνος 21

1.5.4 Ο ρόλος της survivin 22

1.5.5 Ο ρόλος των εναλλακτικών μεταγράφων και ισομορφών της survivin ως βιοδείκτες. 25

1.5.6 Ρύθμιση της έκφρασης της *survivin* 26

1.6 Αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next-generation sequencing) 30

1.6.1 Πυροαλληλούχηση 31

1.6.2. Η τεχνολογία της Illumina 33

1.6.3. Η τεχνολογία Ion Torrent 34

2 Υλικά και μέθοδοι 36

2.1 Βιολογικό υλικό 36

2.2 Απομόνωση ολικού RNA 37

2.3 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός RNA. 39

2.4 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse transcription, RT) 41

2.5 Αρχή μεθόδου αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) 43

2.5.1. Ποιοτικός έλεγχος CNAs 47

2.5.2. Ποιοτική ανάλυση των προϊόντων της PCR μετά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 49

2.6 Ενίσχυση των εναλλακτικών mRNA του γονιδίου *BIRC5* μέσω touchdown PCR. . 51

2.7 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης. 52

2.8 Καθαρισμός των PCR προϊόντων. 53

2.9 Αλληλούχηση επόμενης γενιάς 55

2.9.1 Κατασκευή και ποσοτικοποίηση βιβλιοθήκης 55

2.9.2 Προετοιμασία - εμπλουτισμός εκμαγείου αλληλούχησης και αλληλούχηση νέας γενιάς 58

2.9.3 Βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων αλληλούχησης 63

2.10 Ανάλυση του προφίλ έκφρασης των νέων *BIRC5* μεταγράφων με PCR και ηλεκτροφόρηση 67

3 Αποτελέσματα 69

3.1 Ανίχνευση νέων θέσεων συρραφής εξωνίων 70

3.2 Ταυτοποίηση ενός νέου εξωνίου του γονιδίου *survivin* 73

3.3 Προσδιορισμός νέων εναλλακτικών μεταγράφων του *BIRC5* (*BIRC5* v.4 - v.9) που περιέχουν νέες θέσεις εναλλακτικού ματίσματος μεταξύ χαρακτηρισμένων εξωνίων..... 75

3.4 Ταυτοποίηση νέων εναλλακτικών μεταγράφων *BIRC5* (*BIRC5* v.10 - v.17) που φέρουν το νέο εξώνιο N. 76

3.5 Ανάλυση έκφρασης των νέων εναλλακτικών μεταγράφων *BIRC5* (*BIRC5* v.4 - v.17)... 77

4 Συζήτηση 82

Βιβλιογραφία 88

Περίληψη..... 96

Abstract 99

Συντομογραφίες

3´-UTR: 3´-UnTranslated Region – 3'-Μη Μεταφραζόμενη Περιοχή

5´-UTR: 5´-UnTranslated Region – 3'-Μη Μεταφραζόμενη Περιοχή

AEC: A-like exon-definition complex

AS: alternative splicing

BIR: Baculovirus IAP Repeat

CDE: cell cycle-dependent element

CDF-1: Cycling DOF Factor 1

CHR: cell cycle genes homology region

CSP:Core spliceosomal proteins)

CPC: Chromosomal Passenger Complex

DNA-seq: DNA sequencing

dsDNA: double strand DNA

EPR1: Effector cell peptidase receptor 1

ESE: Exonic Splicing Enhancer

ESS: Exonic Splicing Silencer

GABRG2: GABA A receptor, G2

hnRNA: heterogeneous nuclear RNA

ISEs: Intronic Slicing Enhancers

ISPs :Ion Sphere Particles

ISS: Intronic Splicing Silencer

MEK1: MAP kinase και ERK activator Kinase

mRNA: Messenger RNA

NGS: Next-Generation Sequencing

NMD: nonsense-mediated mRNA decay

ORFs: Open Reading frame

PCR: Polymerase chain reaction

PGM: Personal Genome machine

PI3K: Phosphatidy1Inositol 3 Kinase

pre-mRNA: precursor mRNA

PTC: premature termination codon

RCC: Renal cell carcinoma

RZF: RING zing finger

RNA-Seq: RNA Sequencing

RT: reverse transcription

snRNP: small nuclear RiboNucleic Particles

SR proteins: Splicing Regulatory proteins

ssDNA: single strand DNA

1. Εισαγωγή

1.1 Η μεταγραφή στους ευκαρυώτες

Στους ευκαρυώτες η μεταγραφή, η οποία καταλύεται από την RNA πολυμεράση II, δεν παράγει ώριμο αλλά πρόδρομο mRNA (pre-mRNA, precursor mRNA), το οποίο χρειάζεται επεξεργασία για να γίνει λειτουργικό, ώριμο mRNA. Στο ευκαρυωτικό κύτταρο, η επεξεργασία του πρωτογενούς μεταγράφου (pre-mRNA) συμβαίνει ταυτόχρονα με τη σύνθεσή του και αφορά: 1) την προσθήκη μιας καλύπτρας γουανοσίνης στο 5΄ άκρο της αρτιγενούς αλυσίδας, 2) την αφαίρεση συγκεκριμένων παρεμβαλλόμενων περιοχών του μεταγράφου, 3) την πρόσθεση μιας ουράς πολύ(Α) στο 3΄ άκρο του mRNA και 4) τον τερματισμό της μεταγραφής [1].

Οι πρώτες ενδείξεις ότι από την RNA πολυμεράση II συντίθενται pre-mRNA και όχι ώριμο mRNA προέκυψαν στα μέσα της δεκαετίας του 1960 από τον James Darnell και τους συνεργάτες του, οι οποίοι αναλύοντας με φυγοκέντρηση σε διαβάθμιση πυκνότητας σημασμένο RNA από εκχύλισμα κυτταρικών πυρήνων κυττάρων Hela (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τραχήλου μήτρας), παρατήρησαν πως τα νεοσυντιθέμενα μόρια πυρηνικού RNA είχαν περίπου 10 φορές μεγαλύτερο μέγεθος από το mRNA που παρατηρείται σε κύτταρα Hela [2].

Το επόμενο μεγάλο βήμα ήταν η ανακάλυψη πως τόσο τα μόρια mRNA όσο και τα hnRNA (heterogeneous nuclear RNA) διαθέτουν ουρά πολύ(Α) στο 3΄ άκρο τους [3]. Η πολυαδενυλίωση του 3' άκρου λαμβάνει χώρα πριν το mRNA βγει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Αυτή η πολύ(Α) ουρά διαθέτει μήκος περίπου 100-200 νουκλεοτιδίων και προστατεύει το mRNA από την αποικοδομητική δράση των φωσφατασών και των νουκλεασών [4]. Ενώ τα προκαρυωτικά γονίδια είναι συνεχή, δηλαδή κάθε ζεύγος βάσεων στην αλληλουχία DNA διατηρείται στο mRNA, το ευκαρυωτικό mRNA είναι μικρότερο από την αλληλουχία DNA εκμαγείου λόγω του ματίσματος των ιντρονίων και της συγχώνευσης των εξωνίων [5]. Η 5′ καλύπτρα και 3′ πολυαδενυλική ουρά δεν μεταφράζονται. Η εξαγωγή του mRNA από τον

πυρήνα στο κυτοσόλιο βασίζεται στην πολυαδενυλίωση του 3΄ άκρου του κλώνου[6].

Η ανάπτυξη της μεθοδολογίας της χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη ολιγο(dT)-κυτταρίνης, η οποία προσφέρει τη δυνατότητα απομόνωσης καθαρού mRNA, επέτρεψε τη διερεύνηση της ύπαρξης μεθυλιωμένων νουκλεοτιδίων σε αυτό. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε το πρώτο βήμα για την ανακάλυψη της ύπαρξης καλύπτρας 7-μεθυλογουανοσίνης στο 5΄ άκρο του mRNA [7].

Η 5′ m7G καλύπτρα είναι μια εξελικτικά διατηρημένη τροποποίηση του ευκαρυωτικού mRNA. Δεκαετίες έρευνας έδειξαν ότι η δομή αυτή χρησιμεύει ως μια μοναδική μοριακή μονάδα που προσλαμβάνει κυτταρικές πρωτεΐνες και μεσολαβεί σε βιολογικές λειτουργίες που σχετίζονται με αυτήν, όπως η επεξεργασία του pre-mRNA, η έξοδος από τον πυρήνα και η σύνθεση πρωτεϊνών [8]. Στο mRNA των ευκαρυωτών συναντώνται τρείς διαφορετικές δομές καλύπτρας, ωστόσο σχεδόν όλα τα μόρια mRNA διαθέτουν 5΄ καλύπτρα m^7G. Η καλύπτρα 7-μεθυλογουανοσίνης απαιτείται για την μετάφραση της πλειοψηφίας των mRNAs και έχει επίσης αναφερθεί ότι σταθεροποιεί το mRNA έναντι της επίθεσης από εξωνουκλεάσες [9]. Επιπρόσθετα, πρόσφατα επιστημονικά δεδομένα έχουν επιβεβαιώσει πως συμβάλει στην προώθηση της μεταγραφής, του ματίσματος, της πολυαδενυλίωσης και της πυρηνικής εξαγωγής του mRNA [10]. Ο σχηματισμός του καλύμματος 7-μεθυλογουανοσίνης συμβαίνει κατά την μεταγραφή του mRNA και καταλύεται από ένζυμα τα οποία στρατολογούνται στην RNA πολυμεράση II. Οι κυτταρικές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την μεθυλίωση της καλύπτρας του mRNA είναι πιθανό να λειτουργούν είτε ρυθμίζοντας τη στρατολόγηση της μεθυλοτρανσφεράσης της καλύπτρας στην RNA πολυμεράση II, είτε ρυθμίζοντας τη δράση της μεθυλτρανσφεράσης της καλύπτρας[11].

1.2 Ο μηχανισμός του εναλλακτικού ματίσματος

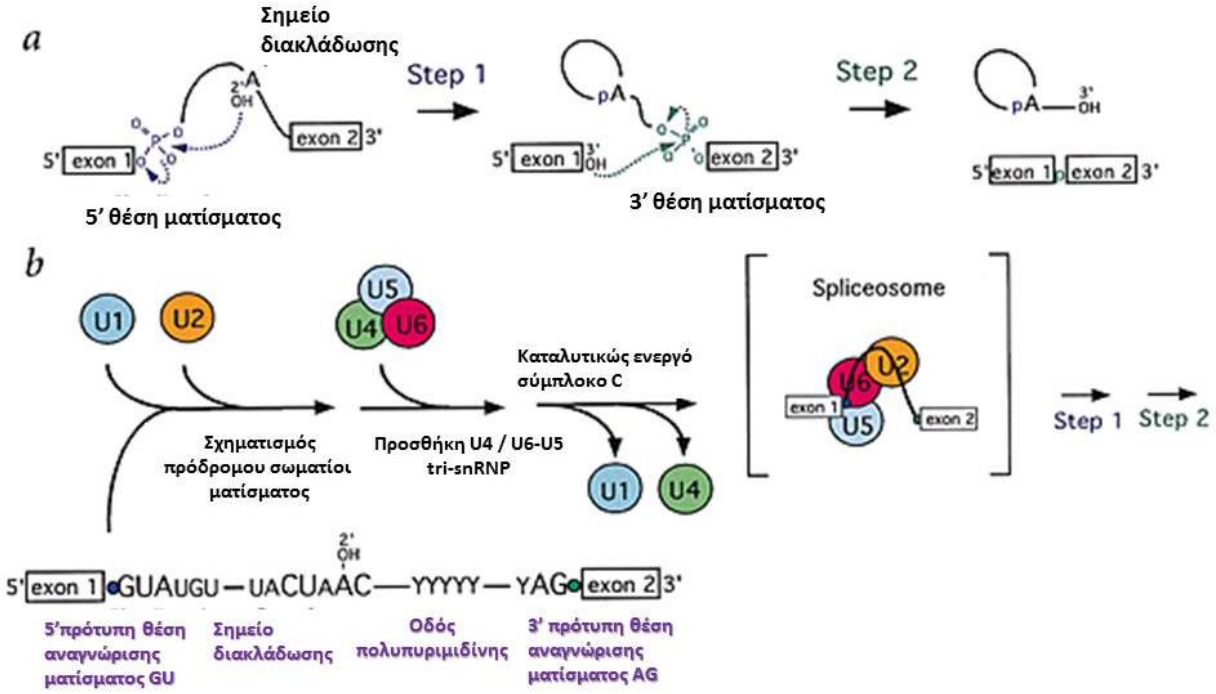
Ένα από τα πιο μη αναμενόμενα ευρήματα στη μοριακή βιολογία ήταν η ανακάλυψη ότι τα ευκαρυωτικά γονίδια είναι ασυνεχή, με τμήματα που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή εξώνια που διαταράσσονται από τμήματα ή ιντρόνια που δεν κωδικοποιούν. Η πρώτη προσέγγιση έγινε το 1977 όταν δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες, η μία του Philip A. Sharp [12] και η άλλη του Richard Roberts [13], επιβεβαίωσαν το μοντέλο του ματίσματος. Με τις εξελίξεις στην αλληλούχηση του γονιδιώματος, έχει καταστεί προφανές ότι η διαδικασία του εναλλακτικού ματίσματος του προδρόμου mRNA (pre-mRNA) μπορεί να συμβεί σε μεγάλο βαθμό που κλιμακώνεται με την οργανική πολυπλοκότητα. Πράγματι, παρόλο που τα γονιδιώματα ποντικού και ανθρώπου περιέχουν παρόμοιους αριθμούς γονιδίων, η εναλλακτική συρραφή του pre-mRNA συμβαίνει σε ποσοστό > 95 έως 100% στα ανθρώπινα γονίδια, σε σχέση με το ~63% των γονιδίων του ποντικού. Έτσι μια λειτουργία του εναλλακτικού ματίσματος είναι να επεκτείνει σημαντικά την μορφή και τη λειτουργία του ανθρώπινου πρωτεώματος [14].

Πράγματι, το εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να εξυπηρετήσει πολλές ρυθμιστικές λειτουργίες, από τον προσδιορισμό του φύλου [15] και την ποικιλομορφία των νευρωνικών δικτύων [16] στη μύγα των φρούτων, έως τον προσδιορισμό της φυσιολογικής λειτουργίας των μεμβρανικών υποδοχέων στο νευρικό σύστημα των θηλαστικών [17]. Σε μοριακό επίπεδο, ο μηχανισμός του ματίσματος στα γονίδια του πυρήνα έχει μελετηθεί σε ένα πλήθος βιολογικών συστημάτων και περιλαμβάνει την αποκοπή των ιντρονίων από τα πρώιμα μετάγραφα σε αρκετά συντηρημένες αλληλουχίες που ονομάζονται αλληλουχίες ματίσματος (splice sites) [18]. Οι θέσεις αυτές βρίσκονται στα 5΄ και 3΄ άκρα του εκάστοτε ιντρονίου και περιέχουν, κατά κύριο λόγο, τα δινουκλεοτίδια GU και AG αντίστοιχα (κανόνας GT-AG). Βέβαια έχει αποδειχθεί ότι σε ένα πολύ μικρό αριθμό ιντρονίων, οι αλληλουχίες στις θέσεις ματίσματος απαρτίζονται από τα δινουκλεοτίδια AU στην αρχή και AC στο τέλος [19]. Στη περίπτωση του ανθρώπου, περίπου το 98% από τα χιλιάδες ιντρόνια που έχουν ταυτοποιηθεί διαθέτει το πρότυπο GU-AG. Επίσης, κρίσιμο ρόλο διαδραματίζει και το λεγόμενο σημείο διακλάδωσης, μια αλληλουχία που εντοπίζεται 18 με 40 νουκλεοτίδια ανοδικά του 3’ άκρου του

ιντρονίου και περιέχει σχεδόν πάντα αδενίνη στην προτελευταία θέση. Πιο συγκεκριμένα, στον άνθρωπο και σε ορισμένα άλλα θηλαστικά η 5΄ πρότυπη αλληλουχία ματίσματος είναι η AG/GURAGU, η 3΄ πρότυπη αλληλουχία ματίσματος είναι η NYAG/G και η πρότυπη αλληλουχία για τη θέση διακλάδωσης είναι η YNCURAY (όπου το R αντιστοιχεί σε πουρίνη, το Y σε πυριμιδίνη και το N σε οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο) [20].

Το μάτισμα πραγματοποιείται από το σωμάτιο ματίσματος (spliceosome). Ο σχηματισμός του σωματίου ματίσματος και ο μηχανισμός δράσης του ταυτοποιήθηκε με αξιοσημείωτη λεπτομέρεια από μια σειρά πρόσφατων δομών μικροσκοπίας κρυοηλεκτρονίων, αποτελεί έτσι μια τεράστια δομή στην οποία πέντε μικρά σωματίδια πυρηνικής ριβονουκλεοπρωτεΐνης (snRNPs) και ένας μεγάλος αριθμός βοηθητικών πρωτεϊνών συνεργάζονται για να αναγνωρίσουν με ακρίβεια τις θέσεις συναρμολόγησης και να καταλύσουν τα δύο στάδια της αντίδρασης ματίσματος [21].

Η συναρμολόγηση του σωματίου ματίσματος ξεκινά με την αναγνώριση της θέσης ματίσματος 5’ από το U1 snRNP, τη σύνδεση του παράγοντα ματίσματος 1 (SF1) στο σημείο διακλάδωσης και του ετεροδιμερούς βοηθητικού παράγοντα U2 (U2AF) στην οδό πολυπυριμιδίνης και του τερματικού AG στο 3’ άκρο. Αυτό το συγκρότημα είναι ανεξάρτητο από ATP και οδηγεί στο σχηματισμό του συμπλέγματος E, το οποίο μετατρέπεται σε εξαρτώμενο από το ATP, προ-splicesome σύμπλεγμα μετά την αντικατάσταση του SF1 από το U2 snRNP στο σημείο διακλάδωσης. Η πρόσληψη του συμπλέγματος U4 / U6-U5 tri-snRNP οδηγεί στο σχηματισμό του συμπλέγματος B, το οποίο μετατρέπεται σε καταλυτικώς ενεργό σύμπλοκο C μετά από εκτεταμένες αλλαγές διαμόρφωσης [22].



Εικόνα 1.1. Σχηματική απεικόνιση του σχηματισμού του σωματίου ματίσματος.

1.3 Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί του εναλλακτικού ματίσματος.

Όπως προαναφέρθηκε, η συντριπτική πλειοψηφία των ανθρώπινων pre-mRNAs υπόκειται σε μηχανισμούς εναλλακτικού ματίσματος, με αποτέλεσμα κάθε γονίδιο να παράγει περισσότερες από μία αλληλουχίες mRNA. Σε ορισμένες περιπτώσεις, το τελικό πρότυπο της έκφρασης καθορίζεται από το πρωτογενές μετάγραφο, επειδή η χρήση διαφορετικών σημείων έναρξης της μεταγραφής ή η δημιουργία εναλλακτικών 3΄ άκρων αλλάζει το πρότυπο ματίσματος. Σε άλλες περιπτώσεις, ένα πρωτογενές μετάγραφο υπόκεινται σε μάτισμα με περισσότερους από έναν τρόπους, οπότε τα εσωτερικά εξώνια υποκαθίστανται, προστίθενται ή αποκόπτονται. Σε κάποιες περιπτώσεις, τα πολλαπλά προϊόντα μπορούν να παραχθούν όλα στο ίδιο κύτταρο, ενώ σε άλλες περιπτώσεις η διαδικασία ρυθμίζεται, έτσι ώστε συγκεκριμένα πρότυπα ματίσματος να λαμβάνουν χώρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες [22]. Ένα τέτοιο χαρακτηριστικό παράδειγμα θα μελετήσουμε στην παρούσα εργασία όπου αναλύονται νέες mRNA ισομορφές του γονιδίου *BIRC5* σε διαφορετικές καρκινικές σειρές. Καθώς το εναλλακτικό μάτισμα των γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο είναι ένας κοινός κυτταρικός μηχανισμός, ο οποίος

σχετίζεται άμεσα με την πολυπλοκότητα του μεταγραφώματος του καρκινικού κυττάρου, επηρεάζει τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την αγγειογένεση, τη διήθηση και την μετάσταση [23].

Η απόφαση σχετικά με το ποιό εξώνιο απομακρύνεται και ποιό εξώνιο συμπεριλαμβάνεται περιέχει στοιχεία αλληλουχίας RNA και ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές προσδένονται σε ειδικές αλληλουχίες εξωνίων ή ιντρονίων και στη συνέχεια εμποδίζουν ή διευκολύνουν την αναγνώριση του εξωνίου [24]. Μια αλληλουχία που βρίσκεται μέσα σε ένα εξώνιο ή ιντρόνιο και επάγει την επιλογή μιας θέσης ματίσματος ονομάζεται εξωνικός ενισχυτής ματίσματος (ESE, Exonic Splicing Enhancer) ή ιντρονικός ενισχυτής ματίσματος (ISEs Intronic Slicing Enhancers) [25]. Αντίθετα, μια αλληλουχία μέσα σε ένα εξώνιο ή ιντρόνιο, η οποία καταστέλλει την επιλογή μιας θέσης ματίσματος, ονομάζεται εξωνικός αποσιωπητής ματίσματος (ESS, Exonic Splicing Silencer) ή ιντρονικός αποσιωπητής ματίσματος (ISS, Intronic Splicing Silencer) αντίστοιχα [26].

Επιπλέον μια οικογένεια ρυθμιστικών πρωτεϊνών του ματίσματος ή πρωτεϊνών SR (SR proteins, Splicing Regulatory proteins) φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση των ESE και στη στρατολόγηση του U1 snRNP στην 5’ θέση ματίσματος και του U2AF στην 3’ θέση ματίσματος. Μια ρυθμιστική πρωτείνη με παρόμοια λειτουργία, η οποία προσδένεται σε αλληλουχίες αποσιωπητή είναι η hnRNP A1. Η hnRNP A1 μπορεί να παρεμποδίζει τις πρωτεΐνες SR να προσδεθούν σε παρακείμενους ESE ή να παρεμβάλλεται στις διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που είναι απαραίτητες για τον καθορισμό εξωνίου ή να παρεμποδίζει τη συναρμολόγηση του σωματίου ματίσματος [27].

Τέλος, οι ιστοειδικοί παράγοντες ματίσματος FOX1 και FOX2 αναστέλλουν το σχηματισμό του συμπλέγματος E. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δέσμευση τους σε μια ιντρονική αλληλουχία και την αποτροπή της δέσμευσης του SF1 στη θέση διακλάδωσης του CAICA (πολυπεπτίδιο που σχετίζεται με καλσιτονίνη-α) του pre-mRNA [11].

Καθορισμός ματίσματος με βάση τη θέση

Η δράση των cis-ρυθμιστικών στοιχείων και των αντίστοιχων ρυθμιστικών πρωτεϊνών σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να σχετίζεται με τη θέση τους αναφορικά με το ρυθμιζόμενο εξώνιο [28]. Αρκετές πρωτεΐνες, όπως NOVA1, NOVA2, FOX1, FOX2, hnRNP I, hnRNP I-like, hnRNP F και hnRNP H, έχει αποδειχθεί ότι ενεργούν είτε ως καταστολείς είτε ως ενεργοποιητές ανάλογα με τη θέση πρόσδεσής τους [29-31]. Για παράδειγμα, όταν η πρωτεΐνη NOVA1 προσδένεται σε μία θέση ISE στο πρόδρομο mRNA του GABRG2 (GABA A receptor, G2), προωθεί τη συμπερίληψη του εξωνίου 9, αλλά προσδεμένη στη περιοχή ESS του εναλλακτικού εξωνίου 4 του δικού της mRNA αποτρέπει τη συμπερίληψη του εξωνίου 4 [32].

Ο ρόλος της δευτεροταγούς δομής του RNA στην επιλογή της θέσης ματίσματος.

Ένα πολύ βασικό ερώτημα προκειμένου να μελετήσουμε την επίδραση των δευτεροταγών δομών του mRNA στη διαδικασία του ματίσματος είναι το κατά πόσον τα pre-mRNAs εμφανίζουν δευτεροταγείς δομές in vivo. Επάνω σε αυτό το ερώτημα προτάθηκε ότι οι ενδείξεις in vitro σχετικά με την πιθανή επίδραση της δομής RNA στο μάτισμα [33] δεν μπορούσαν να αναπαραχθούν με ακρίβεια in vivo [34]. Ο λόγος για τον οποίο αυτό πρέπει να συμβαίνει υπόκειται στη κλασική έννοια ότι το RNA επικαλύπτεται in vivo από πρωτεΐνες. Ωστόσο έρευνες έχουν αναδείξει την ύπαρξη μιας χαλαρής ποσότητας δευτερογενών δομών ειδικών για RNA οι οποίες, υπό κανονικές συνθήκες, θα μπορούσαν να επηρεάσουν τους μηχανισμούς ματίσματος. Για παράδειγμα, σε οργανισμούς όπως το Saccharomyces cerevisiae, η ανίχνευση δομών προ-mRNA από θειικό διμεθύλιο in vivo έχει δείξει την ύπαρξη δευτερογενούς δομής μεταξύ της 5΄ θέσης ματίσματος και του σημείου διακλάδωσης ικανής να προάγει τη συναρμολόγηση U1snRNP στα πρώτα στάδια ματίσματος [35]. Αν και δεν υπάρχουν συγκρίσιμα στοιχεία για ανθρώπινα συστήματα, έχει αναφερθεί πρόσφατα ότι οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου είναι ικανοί να προκαλέσουν in vivo διαφορετικές δομικές πτυχές στη δομή του mRNA [36]. Επιπλέον έρευνες έχουν αναδείξει την επίδραση της δευτεροταγούς δομής RNA στη πρόσδεση παραγόντων

ματίσματος [37], στην αναγνώρηση των 5΄ και 3΄ θέσεων ματίσματος και της θέσης διακλάδωσης [38, 39], καθώς και στις cis-δραστικές ρυθμιστικές αλληλουχίες όπως οι exonic/intronic splicing enhancers (ESE/ISE) ή silencer elements (ESS/ISS) [40].

Ρύθμιση μέσω της U1 και U2 snRNP σύνδεσης.

Αφού αναγνωριστούν οι θέσεις ματίσματος 5΄ και 3΄ και οριστούν τα εξώνια, θα πρέπει να υπάρξει μια αλληλεπίδραση μεταξύ U1 και U2 snRNP, για να σχηματιστεί ένα λειτουργικό σωμάτιο ματίσματος. Ακριβώς το πότε συμβαίνει αυτό και πότε πραγματοποιείται η σύνδεση των άκρων έχει διερευνηθεί εντατικά τα τελευταία χρόνια. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο προσδιορισμός της θέσης ματίσματος τουλάχιστον μερικών εναλλακτικών εξωνίων συμβαίνει κατά τη σύζευξη των θέσεων ματίσματος στο σύμπλεγμα A [41, 42]. Για παράδειγμα, για τη σύζευξη θέσης ματίσματος απαιτείται υδρόλυση ATP, η οποία κλειδώνει τις θέσεις συναρμογής σε ένα μοτίβο ματίσματος μετά τη σύνδεση του U2 snRNP στη θέση διακλάδωσης. Πρόσθετες μελέτες, ωστόσο, παρείχαν αποδεικτικά στοιχεία ότι η δέσμευση των U1 και U2 snRNPs σε συνδέσεις τοποθεσιών για τον ορισμό ενός εξωνίου δε δεσμεύει απαραίτητα το εξώνιο στη σύνδεση [43].

Ρύθμιση από πρωτεϊνικούς παράγοντες.

Ένας νέος μηχανισμός αναστολής ματίσματος αποδείχθηκε πρόσφατα από μια μελέτη που δείχνει ότι η δέσμευση του hnRNP I σε ένα ESS μπορεί να αναστείλει τη σύζευξη των U1 και U2 snRNPs [43]. Ένα εξαρτώμενο από ATP σύμπλοκο, γνωστό ως σύμπλοκο ορισμού εξωνίου τύπου A (A-like exon-definition complex (AEC), βρέθηκε να σχηματίζεται στο εναλλακτικό εξώνιο 4 του πρόδρομου mRNA του γονιδίου *CD45*, ακόμη και όταν παρεμποδίστηκε η συμπερίληψή του. Το σύμπλοκο AEC περιέχει τα U1 και U2 snRNPs και εμφανίζει την ίδια κινητικότητα κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με το σύμπλοκο A, αλλά αναστέλλεται η μετατροπή του σε σύμπλοκο B. Προτάθηκε έτσι ένα νέο μοντέλο, στο οποίο ένα σύμπλοκο τύπου A σχηματίζεται σε εξώνια όταν δεν υπάρχει το hnRNP I. Μετά τη δημιουργία αυτού του συμπλόκου σχηματίζεται το σύμπλοκο που αποτελείται από U4 / U6-U5 tri-

snRNP και προσλαμβάνεται στο ενδιάμεσο σύμπλοκο A για να σχηματίσει το σύμπλεγμα B.

Ωστόσο, όταν η πρωτεΐνη hnRNP I είναι παρούσα, ένα σύμπλοκο AEC, το οποίο περιέχει ένα hnRNP I, αποτρέπει τα U1 ή U2 snRNPs που προσδένονται στις θέσεις ματίσματος του εξωνίου 4 να πραγματοποιήσουν σύζευξη cross-intron με τα παρακείμενα U2 ή U1, με αποτέλεσμα την παράλειψη του εξωνίου 4. Υπάρχουν δύο πιθανοί τρόποι με τους οποίους η πρόσδεση του hnRNP I μπορεί να παρεμβάλλεται στη σύνδεση των snRNP. Ο ένας είναι ότι η δέσμευση του hnRNP I προστατεύει φυσικά την αλληλεπίδραση μεταξύ των snRNPs. Μια άλλη πιθανότητα είναι ότι η πρωτείνη hnRNP I προκαλεί μια αλλαγή στη διαμόρφωση του πρόδρομου mRNA που αποτρέπει τη σύζευξη διασταυρούμενων ιντρονίων του εναλλακτικού εξωνίου που δεσμεύεται με snRNP. Είναι ενδιαφέρον ότι το σύμπλοκο AEC, τουλάχιστον επιφανειακά, μοιάζει με το ακινητοποιημένο σύμπλοκο A που σχηματίζεται από SRp38 σε εκχύλισμα S100 [43].

Εναλλακτικό μάτισμα και ιστοειδικότητα.

Το εναλλακτικό μάτισμα έχει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της ειδικότητας των ιστών. Πρόσφατες μελέτες υψηλής απόδοσης έδειξαν ότι, από τους ανθρώπινους ιστούς που εξετάστηκαν, 50% ή και περισσότερο των εναλλακτικών μεταγράφων εκφράζονται σε διαφορετικά επίπεδα μεταξύ των ιστών, υποδεικνύοντας ότι οι περισσότερες περιπτώσεις εναλλακτικού ματίσματος υπόκεινται σε ιστοειδική ρύθμιση [44]. Οι περιπτώσεις όπου παρατηρείται ιστοειδική ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος εξηγούνται εν μέρει από την ιστοειδική έκφραση πρωτεϊνών που ρυθμίζουν το μάτισμα και την αντίστοιχη ρύθμιση των mRNA μεταγράφων-στόχων [45, 46].

Μεταξύ όλων των ανθρώπινων ιστών, ο εγκέφαλος είναι ο πολυπλοκότερος λειτουργικά ιστός, καθώς έχει την υψηλότερη εμφάνιση προϊόντων εναλλακτικής συρραφής. Κατά συνέπεια, έχουν αναγνωριστεί διάφοροι ειδικοί παράγοντες ματίσματος στον εγκέφαλο, όπως οι πρωτεΐνες nPTB, NOVA1, NOVA2 και Hu / Elav [47-49]

Επιπλέον ο γραμμωτός μυς (καρδιά και σκελετικός μυς) ήταν ένας από τους πρώτους ιστούς στους οποίους βρέθηκε ότι το εναλλακτικό μάτισμα

αυξάνει την πολυπλοκότητα των πρωτεϊνών. Μαζί με τον εγκέφαλο, είναι οι ιστοί στους οποίους λαμβάνουν χώρα τα περισσότερα συμβάντα εναλλακτικού ματίσματος ιστοειδικότητας [50]. Ωστόσο σημαντικά συμβάντα εναλλακτικού ματίσματος έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν στον έλεγχο της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης και άλλων ιστών, όπως στο πάγκρεας [51] , στο ήπαρ [52] καθώς και στην ανάπτυξη των γαμετικών κυττάρων [53].

Ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των παραγόντων ματίσματος.

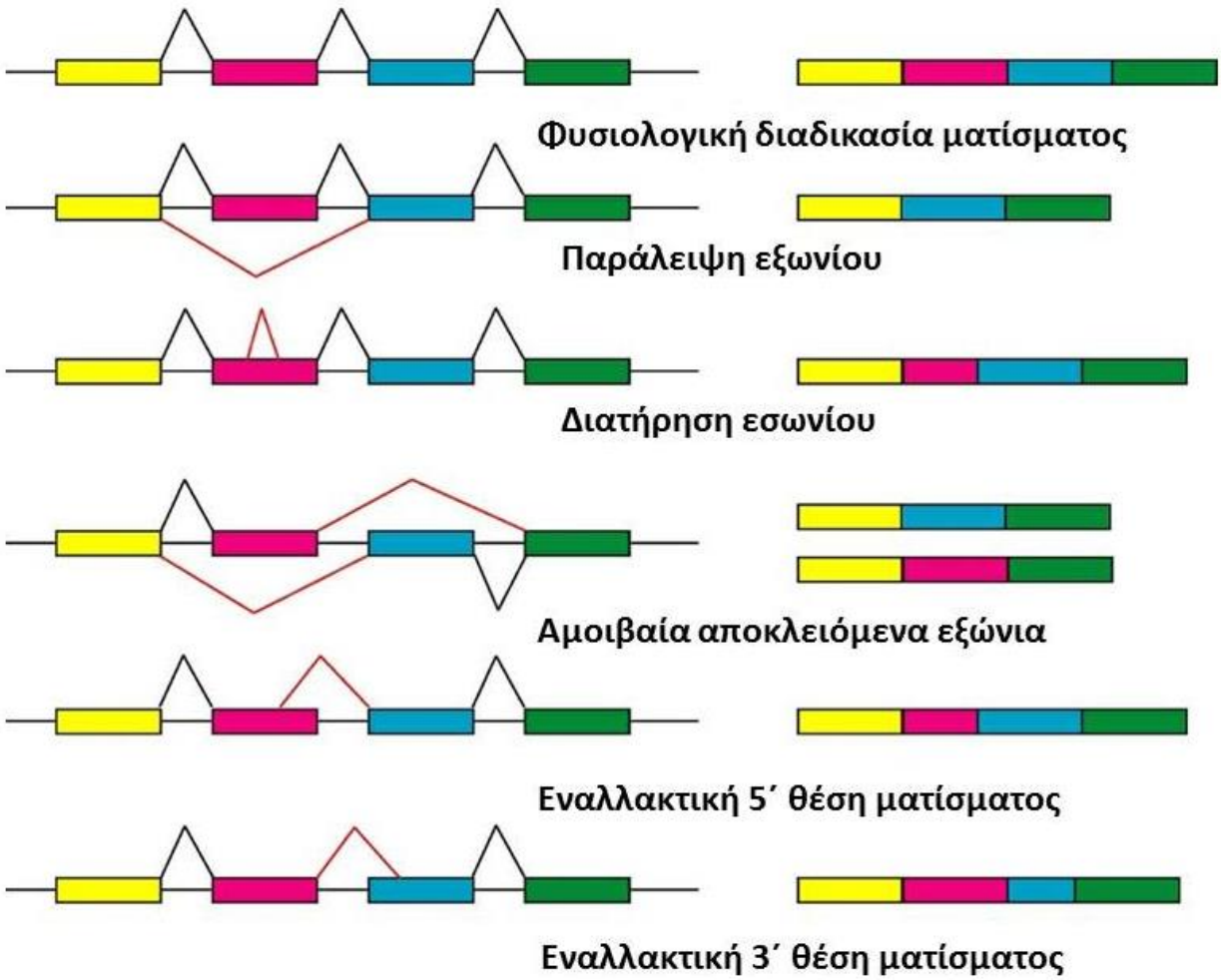
Οι διαφορές στα επίπεδα έκφρασης πρωτεΐνών είτε των ιστοειδικών ρυθμιστών ματίσματος είτε των CSP (core spliceosomal proteins) [54] μπορεί να μην εξηγούν πλήρως το πώς μπορούν τα κύτταρα να αλλάζουν γρήγορα πρότυπα εναλλακτικού ματίσματος, για παράδειγμα σε απάντηση στο κυτταρικό στρες. Τα στοιχεία έχουν δείξει ότι η μετα-μεταφραστική τροποποίηση των παραγόντων ματίσματος μπορεί να επηρεάσει το εναλλακτικό μάτισμα. Η καλύτερα μελετημένη τροποποίηση είναι η φωσφορυλίωση, μέσω της οποίας έχει αποδειχθεί ότι αρκετές διεξοδικές οδοί σηματοδότησης κυττάρων εμπλέκονται σε εναλλακτική ρύθμιση ματίσματος. Η φωσφορυλίωση έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την τοπική συγκέντρωση παραγόντων ματίσματος που γειτνιάζουν με τα υποστρώματα πριν από το mRNA, μεταβάλλοντας τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό τους, τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-RNA, ακόμη και την ενδογενή δραστηριότητα ματίσματος [55].

Τύποι εναλλακτικού ματίσματος.

Η τεράστια πρόοδος που έχει σημειωθεί στο τομέα της βιοπληροφορικής τα τελευταία χρόνια, καθώς και η ανάπτυξη όλο και πιο εξελιγμένων μηχανημάτων αλληλούχησης και προγραμμάτων επεξεργασίας δεδομένων, έχει προσφέρει σημαντικά οφέλη στις μελέτες γονιδιωμάτων οργανισμών και κατά συνέπεια και στις μελέτες που αφορούν τις διαδικασίες και τους μηχανισμούς του εναλλακτικού ματίσματος. Η διαθεσιμότητα πειραματικών αλληλουχιών που καλύπτουν ολόκληρα γονιδιώματα ευκαρυωτικών οργανισμών έχει αποδώσει σημαντικές πληροφορίες για τους διάφορους

τρόπους ματίσματος. Έχουν παρατηρηθεί αρκετοί τύποι εναλλακτικού ματίσματος, όπως φαίνεται στην εικόνα 1.2. Οι τέσσερις κύριες κατηγορίες είναι: 1) Η παράλειψη εξωνίου (exon skipping), όπου ένα εξώνιο αποκόπτεται από το εναλλακτικό μετάγραφο, 2) η διατήρηση ιντρονίου (intron retention), όπου ένα ιντρόνιο συμπεριλαμβάνεται στο ώριμο mRNA, 3) Η εναλλακτική 5΄ θέση ματίσματος (alternative donor site), κατά την οποία αλλάζει το 3΄ όριο του ανοδικού εξωνίου και 4) η εναλλακτική 3΄ θέση ματίσματος (alternative acceptor site), κατά την οποία αλλάζει το 5΄ όριο του καθοδικού εξωνίου [56].

Η παράλειψη εξωνίου (exon skipping) αποτελεί την πιο συχνά εμφανιζόμενη περίπτωση εναλλακτικού ματίσματος, κατέχοντας το ποσοστό του 40% των εναλλακτικών συμβάντων ματίσματος σε ανθρώπους και ποντίκια [57]. Οι εναλλακτικές θέσεις ματίσματος 3΄/ 5΄ (οι οποίες εμφανίζονται με την παρουσία δύο ή περισσότερων θέσεων ματίσματος στο ένα άκρο ενός εξωνίου) είναι οι επόμενες πιο συχνά παρατηρούμενες κατηγορίες (18% και 8%, αντίστοιχα) [57]. Αντίθετα, η διατήρηση ιντρονίου δεν είναι πολύ συχνή, αποτελώντας μόλις το 3% των περιπτώσεων εναλλακτικού ματίσματος [57]. Άλλες κατηγορίες εναλλακτικού ματίσματος περιλαμβάνουν εναλλακτικό πρώτο εξώνιο, εναλλακτικό τελευταίο εξώνιο, αμοιβαία αποκλειόμενα εξώνια και συντονισμένα εξώνια.



Εικόνα 1.2. Σχηματική απεικόνιση των κύριων μηχανισμών εναλλακτικού ματίσματος [58].

1.4 Η σημασία του εναλλακτικού ματίσματος στη διατήρηση της ομοιόστασης και ο ρόλος του στο καρκίνο

Το εναλλακτικό μάτισμα είναι ο κύριος μοριακός μηχανισμός που παρέχει τη βασική μεταγραφική και πρωτεωμική ποικιλομορφία ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων [59]. Η συνδυαστική επίδραση των προαναφερθέντων μηχανισμών εναλλακτικού ματίσματος αντικατοπτρίζεται όχι μόνο στο πλήθος περισσότερων ή λιγότερο άφθονων μεταγραφών σε διαφορετικά κύτταρα και / ή ιστούς, αλλά και στην μετάβαση σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης και / ή κατά τη διάρκεια κυτταρικών αποκρίσεων σε σήματα ή εξωτερικά ερεθίσματα [60, 61]. Αναμφίβολα, το εναλλακτικό μάτισμα έχει αποδειχθεί ότι προσφέρει ένα επιπλέον επίπεδο πολυπλοκότητας στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο,

συμμετέχοντας έτσι στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης, ελέγχοντας διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες, όπως ο έλεγχος κυτταρικού κύκλου, ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η αγγειογένεση [56].

Εκτός από την κυτταρική ομοιόσταση, ωστόσο, η απορρύθμιση ή τα ελαττώματα των μηχανημάτων AS έχουν συνδεθεί με πολλές ανθρώπινες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου [62, 63]. Η ανάπτυξη κακοήθων νεοπλασμάτων είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων, στην οποία τροποποιείται το γενετικό τοπίο των φυσιολογικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την απόκτηση ογκογόνων χαρακτηριστικών. Η συμμετοχή εναλλακτικών γεγονότων ματίσματος σε μείζονες σχετιζόμενες με τον καρκίνο διαδικασίες, όπως η διατήρηση του πολλαπλασιασμού [64], η αποφυγή της απόπτωσης [65], η πρόκληση αγγειογένεσης [66], καθώς και η διήθηση και μετάσταση [67], έχει ήδη αναφερθεί στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Επιπλέον, ο προσδιορισμός εναλλακτικών προϊόντων συρραφής ως βασικών στοιχείων, τα οποία είναι ικανά να μεσολαβούν στην ογκογένεση, θα μπορούσε να οδηγήσει στον εντοπισμό νέων μοριακών βιοδεικτών ή πιθανών θεραπευτικών στόχων σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων κακοηθειών [68, 69].

Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης διαφορετικών παραγόντων ματίσματος στο πλαίσιο του καρκίνου, έχει αποδειχθεί ότι αρκετοί παράγοντες ματίσματος υπερεκφράζονται σε διαφορετικούς καρκίνους στον άνθρωπο [70] όπως ο SRSF1 και ο SRSF3 που εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης σε διάφορους τύπους καρκίνου του ανθρώπου, ενώ η αποσιώπηση αυτών των γονιδίων μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές. [71]. Επιπλέον τα hnRNP A1 και hnRNP A2 έχουν από καιρό συσχετιστεί με τη ρύθμιση του καρκίνου, δεδομένης της ικανότητάς τους να αναγνωρίζουν και να προστατεύουν τις τελομερικές αλληλουχίες [72]. Αυτοί οι παράγοντες υπερεκφράζονται επίσης σε μια μεγάλη ποικιλία καρκίνων και η αποσιώπηση αυτών των γονιδίων προκαλεί απόπτωση σε καρκινικά αλλά όχι σε φυσιολογικά κύτταρα [73-75].

1.5 Το ανθρώπινο γονίδιο της *Survivin*

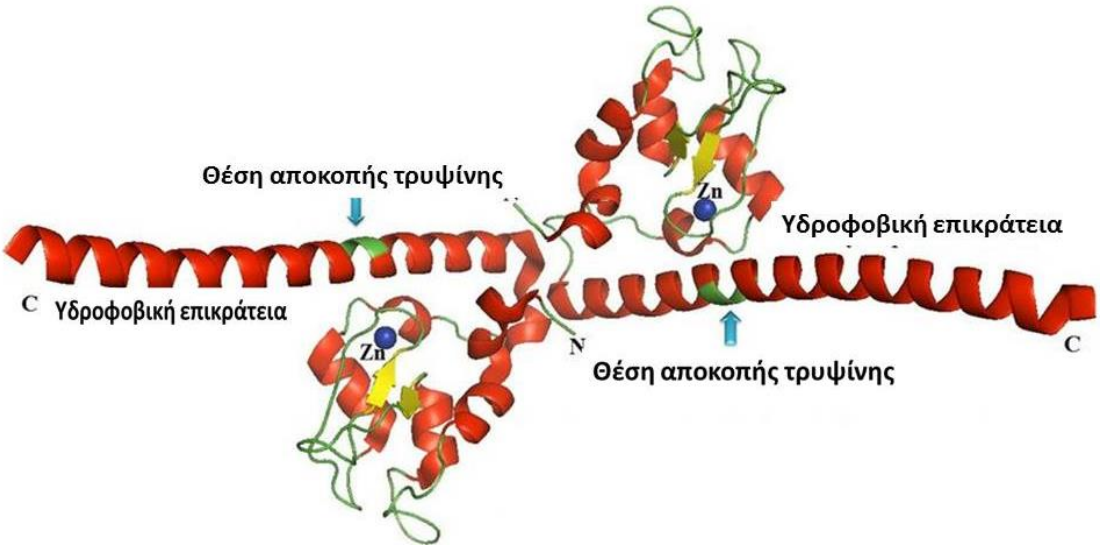
Στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη των εναλλακτικών μεταγράφων mRNA του γονιδίου *BIRC5* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη

Survivin. Για το σκοπό αυτό κρίνεται αναγκαία η αναφορά στο βιολογικό ρόλο, στη δομή και τις ιδιότητες της πρωτεΐνης.

Το ανθρώπινο γονίδιο *BIRC5* (γνωστό και ως *survivin*, GenBank® accession number: NM_001168.2), αποτελεί μέλος της γονιδιακής οικογένειας των αναστολέων της απόπτωσης IAP. Η οικογένεια αυτών των πρωτεϊνών είναι πολύ συντηρημένη, καθώς εμφανίζεται από τα έντομα μέχρι τον άνθρωπο. Η πρώτη πρωτεΐνη IAP ανακαλύφθηκε το 1993 στον Baculovirus, όπου βρέθηκε ότι καταστέλλει την απόπτωση κυττάρων ξενιστών που είχαν μολυνθεί από τον ιό. Έως τώρα έχουν αναγνωριστεί οκτώ μέλη της οικογένειας των IAP. Αυτές είναι οι Cp-IAP, Op-IAP, XIAP, cIAP1 , C-IAP2, NAIP, Livin και Survivin.[76].

Χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης οικογενείας είναι πως όλα τα μέλη της περιέχουν από ένα έως τρία αντίγραφα μίας ακολουθίας που αποτελείται από επαναλήψεις 70-80 αμινοξέων και ονομάζεται BIR. Η ακολουθία BIR προσδίδει στις IAP την αντι-αποπτωτική τους ικανότητα [77]. Οι πρωτεΐνες IAP ασκούν τη ρυθμιστική τους δράση μέσω πρόσδεσής τους στις κασπάσες 3, 7 και 9, καταστέλλοντας με τον τρόπο αυτό τη δράση τους [78]. Εκτός από την ακολουθία BIR οι περισσότερες IAP φέρουν κοντά στο καρβοξυτελικό τους άκρο έναν σχηματισμό δακτύλου ψευδαργύρου (RING zing finger, RZF). Μελέτες έδειξαν ότι οι IAP που έχουν RZF, όπως είναι η C-IAP2, μπορούν και προκαλούν την ουβικουιτίνωση της κασπάσης-3 και της κασπάσης-7 [79]-[80], υποδηλώνοντας ότι η στόχευση των κασπασών στο πρωτεάσωμα μπορεί να αποτελεί τον αντι-αποπτωτικό μηχανισμό των IAP. Ένας άλλος μηχανισμός μπορεί να περιλαμβάνει ουβικουιτίνωση, όχι των κασπασών, αλλά της Smac/DIABLO που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια και αποτελεί ανταγωνιστή της δράσης των IAP [81].

Οι IAP και η δράση τους αποτελούν τελευταία αντικείμενο έρευνας για το αν μπορούν στο μέλλον να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί θεραπευτικοί στόχοι. Μεταξύ των IAP, η *survivin* διακρίνεται από τα υπόλοιπα 8 μέλη γιατί έχει κάποια μορφολογικά χαρακτηριστικά που την κάνουν να ξεχωρίζει από τις υπόλοιπες (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3. Το μόριο της survivin. Στο βρόχο κάθε μονομερούς παρατηρούνται οι δάκτυλοι ψευδαργύρου (μπλε κουκίδες). Οι C τελικές περιοχές του διμερούς υπάρχουν ως υδρόφοβη ελικοειδής προέκταση το ένα απέναντι από το άλλο με τοποθεσίες διάσπασης τρυψίνης. Αυτό είναι ένα μοναδικό χαρακτηριστικό που θεωρείται ότι ενεργεί σαν προσαρμογέας. Τα σφαιρικά N-τελικά άκρα βρίσκονται στο κέντρο. (PDB ID: 1E31, η δομή παράγεται από το λογισμικό PyMol).

1.5.1 Δομή και οργάνωση του γονιδίου της *survivin*

Το γονίδιο της *survivin* βρίσκεται στο ανθρώπινο γονιδίωμα στο τελομερικό άκρο του χρωμοσώματος 17 (17q25) [82, 83]. Έχει 4 εξώνια και 3 ιντρόνια που κωδικοποιούν μια μικρή πρωτεΐνη 142 αμινοξέων και μοριακού βάρους 16.5 kDa. Παρά το μικρό της μέγεθος, η πρωτεΐνη περιέχει αρκετές πολυλειτουργικές επικράτειες. Κατά την κρυσταλλική της απεικόνιση, η survivin εμφανίζεται ως ομοδιμερής, ενώ τα δύο μονομερή αλληλεπιδρούν μέσω της κεντρικής περιοχής σύνδεσης μέσω των N- τελικών υπολειμμάτων L6 και W10 [84].

Η survivin είναι το μικρότερο και νεότερο μέλος της οικογένειας των IAP. Η απομόνωση του γονιδίου της έγινε το 1997 από τους Ambrossini et al.[83], ενώ ύστερα από ένα χρόνο έγινε η χαρτογράφηση του γονιδίου της στο χρωμόσωμα 17 στη θέση q25.3. Η survivin γνωστή και ως API4 (Apoptosis Inhibitor 4) ή BIRC5 (Baculoviral IAP Repeat-Containing protein 5), είναι μια ενδοκυττάρια πρωτεΐνη από την οποία απουσιάζουν το πεπτίδιο σήματος και η υδροφοβική περιοχή, που είναι υπεύθυνες για την μετακίνηση μέσω της κυτταρικής μεμβράνης

Η *survivin* περιλαμβάνει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF, open reading frame) 426 νουκλεοτιδίων. Το γονίδιο *BIRC5* κωδικοποιεί συνολικά δέκα εναλλακτικά μετάγραφα, από τα οποία τα επτά έχουν γνωστή λειτουργία Αν και τα mRNA του γονιδίου της *survivin* αναλύονται συχνά σε κλινικές μελέτες, λιγότερες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για τις πρωτεΐνες. Ως εκ τούτου, η σημασία τους ως βιοδείκτες στον καρκίνο παραμένει ασαφής και αποτελεί πεδίο έρευνας για πολλούς ερευνητές. Το αναγνωστικό πλαίσιο προσανατολίζεται με κατεύθυνση αντίθετη (antisense) από αυτή του υποδοχέα της πεπτιδάσης EPR1 (Effector cell peptidase receptor 1), ο οποίος εντοπίζεται στη συμπληρωματική αλυσίδα. Η σχέση αυτή που είναι μοναδική στο ανθρώπινο γονιδίωμα, αποκαλύπτει ότι ο EPR1 θα μπορούσε να ρυθμίζει τα επίπεδα έκφρασης της *survivin* [85].

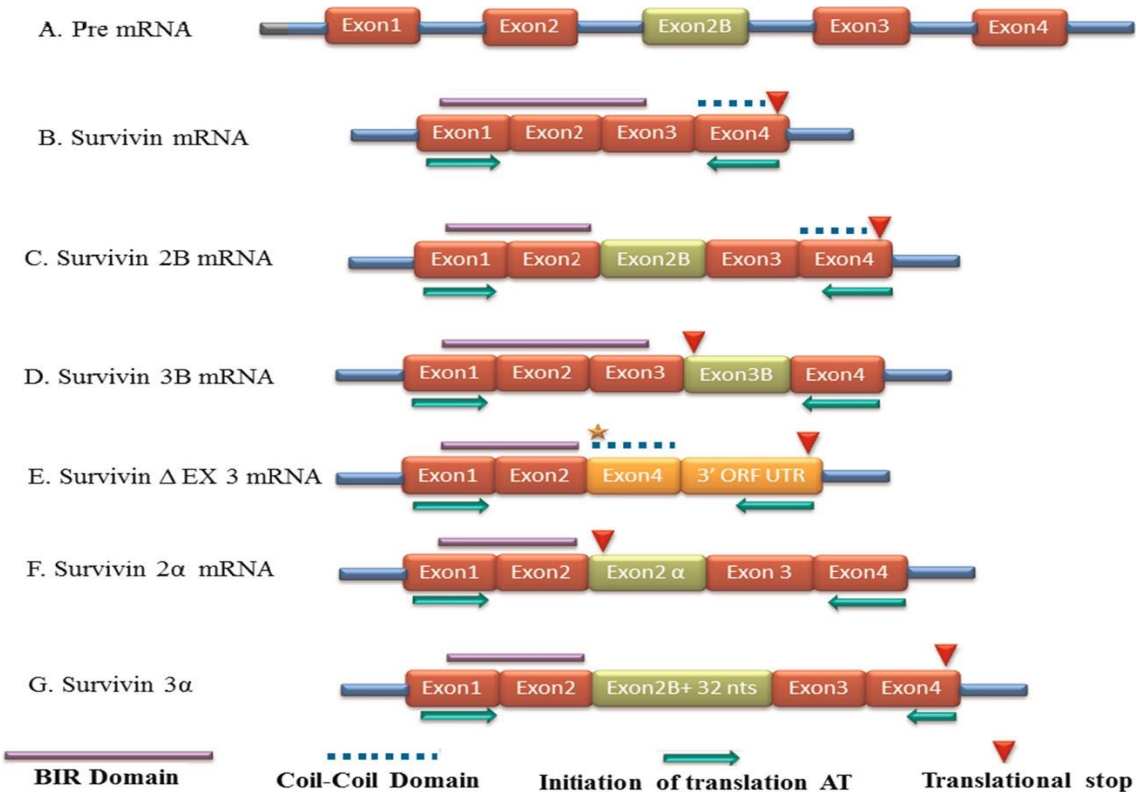
1.5.2 Ισομορφές της survivin

Το γονίδιο της *survivin* αποτελείται από 4 εξώνια, τα οποία μέσω της διαδικασίας του εναλλακτικού ματίσματος παράγουν 6 διαφορετικά mRNA που με τη σειρά τους κωδικοποιούν 6 διαφορετικές πρωτεϊνικές ισομορφές. Στον άνθρωπο αυτές είναι οι: (i) survivin, (ii) survivin-ΔEx3 [86], (iii) survivin-2B[86], (iv) survivin-3B [87], (v) survivin-2α [88], and (vi) survivin-3α [89].

- Survivin-2B (NM_001012271.2) και Survivin- ΔEx3 (NM_001012270.2)

Η Survivin-2B αποτελείται από 167 αμινοξέα, το mRNA της περιλαμβάνει μια επιπλέον περιοχή 69bp που αναφέρεται ως εξώνιο 2B και προέρχεται από το εσώνιο 2 (Εικόνα 1.4). Η εισαγωγή του εξωνίου διαταράσσει την BIR περιοχή, με αποτέλεσμα η survivin-2B να χάνει την αντί-αποπτική της δράση και να θεωρείται πλέον προ-αποπτική πρωτεΐνη. Εκτιμάται ότι ένα μεγαλύτερο κλάσμα (52%) αυτής της πρωτεΐνης εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα ενώ περίπου 22% στον πυρήνα [69]. Σχεδόν το 13% της πρωτεΐνης παραμένει εντοπισμένο στα μιτοχόνδρια. Η survivin-ΔEx3 αποτελείται από 137 αμινοξέα και περιλαμβάνει τα εξώνια 1, 2 και 4 και μια επέκταση του αναγνωστικού της πλαισίου μέσα στο αναγνωστικό πλαίσιο της 3΄ μη μεταφραζόμενης περιοχής [86]. Έχει αποδειχθεί ότι η ισομορφή S-ΔEx3 σε μεγάλο ποσοστό (56%) βρίσκεται στον πυρήνα κατά τη διάρκεια των φάσεων G1 και G2 της

κυτταρικής διαίρεσης, περίπου το 22% βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και πολύ λιγότερο στα μιτοχόνδρια (κύτταρα HeLa). Έχουν εμφανιστεί τουλάχιστον 13 διαφορετικοί τύποι καρκίνου με έκφραση αυτής της ισομορφής της survivin. Ενώ προκαλεί διαδικασίες όπως: πολλαπλασιασμό και κυτταρικό θάνατο, το S-ΔEx3 μπορεί επίσης να υποβληθεί σε ετεροδιμερισμό με τη Survivin και να υποστηρίξει διαδικασίες αγγειογένεσης [90].



Εικόνα 1.4. Το πρόδρομό mRNA της *survivin* και τα διαφορετικά ώριμα mRNA των παραλλαγών της survivin. Το πρόδρομο mRNA της survivin έχει 5 εξώνια (1, 2, 2B, 3 και 4) και 6 ιντρόνια. Το B mRNA Survivin διαθέτει τα εξώνια 1, 2,3 και 4. Το C Survivin 2B έχει ένα επιπλέον εξώνιο 2B που εισάγεται μεταξύ των εξωνίων 2 και 3. Το D Survivin 3B έχει όλα τα φυσιολογικά 4 εξώνια συν ένα επιπλέον εξώνιο 3B που προέρχεται από το ιντρόνιο 3 (165 bp) και πλαισιώνεται από τα εξώνια 3 και 4. Το E Survivin Δ Ex3 δείχνει απώλεια εξωνίου 3 και μετατόπιση πλαισίου με επέκταση του πλαισίου ανάγνωσης σε ORF 3' UTR. Το F Survivin 2α έχει τα εξώνια 1 και 2 συν 197 (195 είναι μη κωδικοποιητικά) νουκλεοτίδια 3' ιντρονίου 2 που οδηγούν σε πρώιμη διακοπή λίγο πριν το εξώνιο 2 και το G Survivin 3α διατηρεί την ιντρονική αλληλουχία του survivin-2B και περιέχει επιπλέον 32 νουκλεοτίδια από το ιντρόνιο 2 ως κρυπτικό εξώνιο [90].

- Survivin-3B (XR_243654.5)

Η Survivin-3B αποτελείται από 5 εξώνια, δηλαδή από τα τέσσερα γνωστά και από ένα επιπλέον που αναφέρεται ως 3B και προέρχεται από μια περιοχή 165 bp του εσωνίου 3 (Εικόνα 1.4). Από αυτό το μετάγραφο παράγεται μια μικρότερη πρωτεΐνη 120 αμινοξέων, εξαιτίας της ύπαρξης ενός κωδικονίου τερματισμού μέσα στο νέο εξώνιο 3B [91]. Η ισομορφή αυτή περιέχει την ακολουθία BIR, της οποίας ο ρόλος είναι η αναστολή της απόπτωσης. Πειράματα έχουν συνδέσει την αντι-αποπτωτική δράση του μεταγράφου με αναστολή των προ-κασπασών 6 και 8 [92]. Επίσης δεν περιλαμβάνει την ελικοειδή δομή, όπως η Survivin και οι άλλες ισομορφές, υποδηλώνοντας έτσι ότι η έκφρασή της δε ρυθμίζεται από τον κυτταρικό κύκλο. Τέλος μία πληθώρα πειραμάτων έδειξε πως υπήρξε πλήρης εξάλειψη των όγκων με χημειοθεραπεία, όταν η έκφραση του S-3B καταργήθηκε [93].

- Survivin-2a (AY927772.1) και Survivin-3a (DQ508248)

Η Survivin-2a αποτελείται από τα εξώνια 1 και 2, καθώς και από ένα νέο εξώνιο που ονομάζεται 2α και είναι μέρος του εσωνίου 2 (Εικόνα 1.4). Το εξώνιο 2α φέρει ένα κωδικόνιο τερματισμού, με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη που παράγεται από την ισομορφή-2α να έχει μέγεθος μόνο 74 αμινοξέα [94]. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα σε ποσοστό 39% και στον πύρινα σε ποσοστό 34,8%. Η Survivin-3a ανακαλύφθηκε το 2005, από τους Vietri et al σε κύτταρα οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Το συγκεκριμένο μετάγραφο δημιουργείται εισάγοντας ένα τερματικό 209 bp από το ιντρόνιο 2 [95]. Η πρωτεΐνη αποτελείται από 78 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 8,9 Kd. Εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα (40%) και στον πυρήνα (35%) [90].

Πίνακας 1.1. Ισομορφές της survivin και η λειτουργία τους.

Ισομορφές της survivin	Οργάνωση του μεταγράφου	Λειτουργία	Αριθμός αμινοξέων	Αναφορές
Survivin pre-mRNA	5 εξώνια (1, 2, 2B, 3, και 4) και 6 ιντρόνια	Υπόκειται σε μάτισμα για να παραχθεί το ώριμο mRNA της πρωτεΐνης.		
Survivin mRNA	4 εξώνια	Φυσιολογική λειτουργική αντί-αποπτωτική πρωτεΐνη.	142	[83]
Survivin-2B mRNA	5 εξώνια συμπεριλαμβανομένης μίας προσθήκης 2B μεταξύ των εξωνίων 2 και 3	Μειωμένη αντί-αποπτωτική δράση εξαιτίας της αποκοπής της BIR επικράτειας.	165	[96]
Survivin-3B mRNA	5 εξώνια συμπεριλαμβανομένου ενός νέου εξωνίου 3B από το ιντρόνιο 3 (165bp) το οποίο βρίσκεται μεταξύ των εξωνίων 3 και 4.	Αντί-αποπτωτική	120	[91]
Survivin-ΔEX3 mRNA	3 εξώνια (1, 2, και 4), το εξώνιο 3 λείπει με μία αλλαγή πλαισίου με μία επέκταση σε ORF της 3'UTR	Αντί-αποπτωτική	108	[86]
Survivin-2α mRNA	2 εξώνια (1 και 2) και προσθήκη 197 νουκλεοτιδίων από το 3΄ άκρο του ιντρονίου 2.	Αποπτωτική	74	[88]
Survivin-3α mRNA	Περιλαμβάνει τα εξώνια 1, 2, 3, 4, 3B, και 2B+32 νουκλεοτίδια από το ιντρόνιο 2.	Αντί-αποπτωτική	78	[69]
Survivin-ΔptEx2/3	Περιλαμβάνει το ιντρόνιο 2 συν τα τελευταία 14 νουκλεοτίδια απο το εξώνιο 2 και τα πρώτα 107 από το εξώνιο 3	Άγνωστη	136	[97]
Survivin-ΔptEx1/2	Τα τελευταία 39 bp από το εξώνιο 1 και τα πρώτα 49 bp από το εξώνιο 2 υφίστανται συρραφή στο ιντρόνιο 1.	Άγνωστη	44	[97]
Survivin-ΔptEx1/2G/T	Ένα παράγωγο του survivin-ΔptEx1 / 2 με δύο μεταλλάξεις G σε T / U στη θέση 120 και 135, και μία μετάλλαξη A σε T / U στα 209	Άγνωστη	66	[97]
Survivin-ΔptEx2	Η ακολουθία RNA από τη θέση 30 έως 55 στο εξώνιο 2 μετατρέπεται σε ένα μικρό ιντρόνιο	Άγνωστη	61	[97]
Survivin image	Το μετάγραφο φέρει πολλαπλές μεταλλάξεις στα εξώνια 2 και 3 και μια ακολουθία επτά βάσεων (GACGTTG).	Άγνωστη	117	[97]

Άλλες ισομορφές της survivin με άγνωστες βιολογικές λειτουργίες.

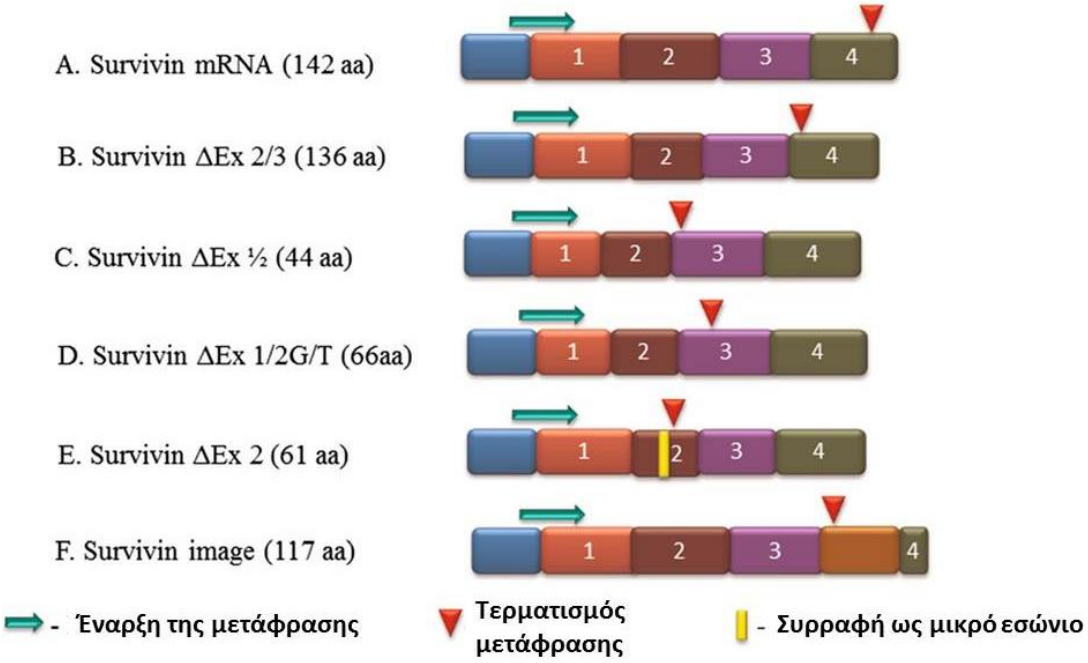
Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως αρκετά εναλλακτικά μετάγραφα της *survivin* με άγνωστο βιολογικό ρόλο έχουν εντοπιστεί μέσω αλληλουχιών ESTs, τα οποία απεικονίζονται στον Πίνακα 1.1 και αναφέρονται εν συντομία παρακάτω:

- *Survivin-ΔptEx2/3* (BP338529, BP338711)
  Αυτή είναι στην πραγματικότητα μια μοναδική ισομορφή με το ιντρόνιο 2 που περιέχει τα τελευταία 14 bp από το εξώνιο 2 και τα πρώτα 107 bp από το εξώνιο 3. Αυτή η παραλλαγή μπορεί να κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 136 αμινοξέων. Η ισομορφή Survivin-ΔptEx2 /3 και το S-2α φαίνεται να σχετίζονται με το χρωμοσωμικό DNA κατά τη διάρκεια της μίτωσης σε ορισμένες καταστάσεις. Το πώς αυτή η ισομορφή αλληλεπιδρά με το S-2α κατά τη διάρκεια της μίτωσης και ρυθμίζει τη σχετιζόμενη με το κεντρομερές survivin πρέπει να διερευνηθεί.

- *Survivin-ΔptEx1/2* (DA000819)
  Σε αυτήν την παραλλαγή ματίσματος, τα τελευταία 39 bp από το εξώνιο 1 και τα πρώτα 49 bp από το εξώνιο 2 συνδέονται στο ιντρόνιο 1. Μπορεί να συνθέσει μια πρωτεΐνη 44 αμινοξέων.

- *Survivin-ΔptEx1/2G/T* (CB149872)
  Αυτή η ισομορφή είναι ένα παράγωγο του survivin-ΔptEx1/2 με δύο μεταλλάξεις G σε T / U στη θέση 120 και 135, και μία μετάλλαξη A σε T / U στα 209. Αναμένεται να κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 66 αμινοξέων.

- *Survivin-ΔptEx2* (AU099904, BP273122)
  Σε αυτήν την παραλλαγή, η βασική αλληλουχία RNA από τη θέση 30 έως 55 στο εξώνιο 2 είναι ματισμένη ως ένα μικρό ιντρόνιο. Μια πρωτεΐνη 61 αμινοξέα αναμένεται να κωδικοποιείται από αυτή τη νέα παραλλαγή.



Εικόνα 1.5. Νέες ισομορφές της πρωτεΐνης Survivin με άγνωστες λειτουργίες που έχουν ταυτοποιηθεί από αλληλουχίες ESTs [90].

1.5.3 Survivin και καρκίνος

Τα τελευταία 22 χρόνια, η έκφραση της Survivin στον καρκίνο υπήρξε αντικείμενο έντονης έρευνας λόγω του ευρέως αναγνωρισμένου αντί-αποπτωτικού της ρόλου και του ελκυστικού δυναμικού της πρωτεΐνης ως θεραπευτικού στόχου. Η Survivin εκφράζεται έντονα σε εμβρυϊκά όργανα, αλλά δεν έχει αναφερθεί σε διαφοροποιημένους φυσιολογικούς ιστούς με εξαίρεση τον θύμο αδένα, το βασικό κολικό επιθήλιο, ενδοθηλιακά κύτταρα και τα νευρικά βλαστικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης [23].

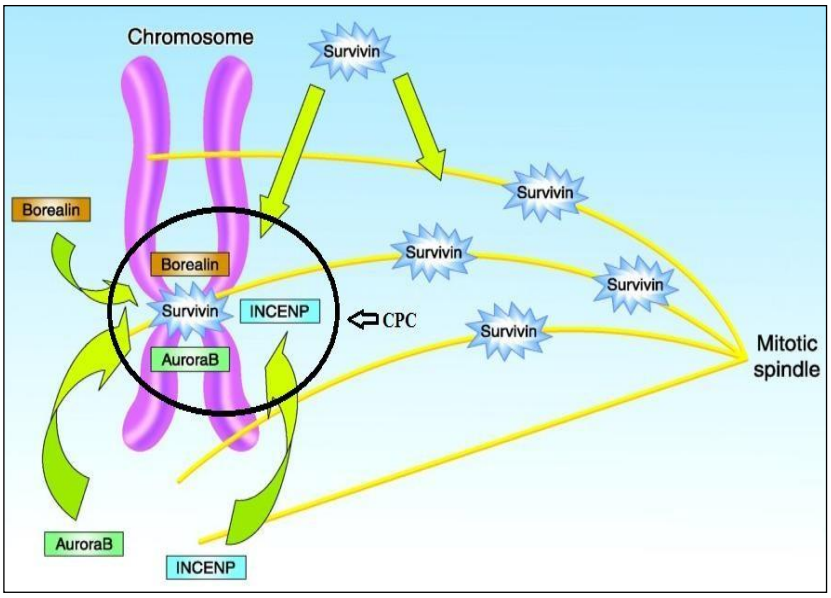
Η έκφραση της Survivin σε όγκους διαφορετικών ιστών έχει συνδεθεί με βραχύτερη συνολική επιβίωση ελεύθερης νόσου [95]-[98]. Η Survivin μπορεί να συμβάλει στην εξέλιξη του όγκου, ενισχύοντας σε μεγάλο βαθμό τα χαρακτηριστικά αντοχής στη χημειοακτινοβολία των στερεών όγκων, συμπεριλαμβανομένου του μαστού [98], του καρκινώματος πλακωδών κυττάρων του λαρυγγικού (LSCC) [99] και των καρκίνων του παχέος εντέρου [100]. Η ισχυρή έκφρασή της σε πολλά είδη νεοπλασμάτων, η συμμετοχή της στην αγγειογένεση κατά τη δημιουργία όγκων, καθώς και η συσχέτιση των υψηλών επιπέδων έκφρασης της σε όγκους με μεγαλύτερη επιθετικότητα και επομένως χειρότερη πρόγνωση, έχει καταστήσει επιτακτική την μελέτη της.

Επί του παρόντος, μελετώνται τρεις θεραπευτικές στρατηγικές που στοχεύουν τη survivin στον καρκίνο μέσω ανοσοθεραπείας, με χρήση μικρών μορίων αναστολέων ή αντινοηματικών ολιγονουκλεοτιδίων, οι συγκεκριμένες θεραπευτικές στρατηγικές αξιολογούνται ή έχουν ολοκληρώσει κλινικές δοκιμές φάσης II [101].

1.5.4 Ο ρόλος της survivin

- Μίτωση και κυτταρικός κύκλος

Ο συντονισμός της μίτωσης και της κυτταρικής διαίρεσης είναι ένας ουσιαστικός και διατηρημένος ρόλος της survivin σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα από τη μαγιά έως τον άνθρωπο. Μελέτες έχουν δείξει πως η απώλεια της survivin οδηγεί σε προβλήματα κατά τη πρόφαση, σε μιτωτική καταστροφή και αυξημένη απόπτωση σε όλα τα μοντέλα συστημάτων [102]. Επιπλέον, έρευνες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της survivin ρυθμίζονται από τον κυτταρικό κύκλο, έχοντας μέγιστη τιμή στη G2/M φάση [103]. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης, η survivin αλληλεπιδρά με τους μικροσωλινίσκους της μιτωτικής ατράκτου (Εικόνα 1.6), μέσω των α-ελίκων που βρίσκονται στο καρβοξυτελικό της άκρο. Η διατάραξη της σχέσης αυτής οδηγεί σε απώλεια της αντι-αποπτωτικής λειτουργίας της survivin και σε αυξημένη δραστικότητα της κασπάσης-3, που προάγει τον κυτταρικό θάνατο.



Εικόνα 1.6. Ο ρόλος της survivin στη μιτωτική άτρακτο.

Η survivin διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην προαγωγή του κυτταρικού κύκλου. Αυτό το επιτυγχάνει μέσω της σύνδεσής της με τα κεντρομερίδια των μεταφασικών χρωμοσωμάτων, όπου βοηθά στη σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων και στη δημιουργία των δύο πόλων της ατράκτου [104]. Στο σημείο αυτό η survivin συσχετίζεται με πρωτεΐνες ρυθμιστές της κυτοκίνησης, την κινάση Aurora B, την INCENP και την Borealin, για τη δημιουργία του συμπλόκου χρωμοσωμικής μετάβασης (CPC). Επομένως, η survivin αποτελεί κύριο συστατικό του χρωμοσωμικού συμπλέγματος CPC (Chromosomal Passenger Complex) μαζί με δύο χρωμοσωμικές πρωτεΐνες-μεταφορείς με τις οποίες ενώνεται άμεσα και ισχυρά. Το σύμπλεγμα CPC ευθύνεται για τη ρύθμιση πολλών γεγονότων που σχετίζονται με την μίτωση, όπως είναι η ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων στο κέντρο της μιτωτικής ατράκτου και η προαγωγή της κυτταρικής διαίρεσης [105]. Η υπερέκφραση της survivin στη νεοπλασία, επιτρέπει σε κύτταρα με ελαττωματικές ατράκτους και μη στοιχισμένους κινητοχώρους, να προχωρούν στην κυτοκίνηση.

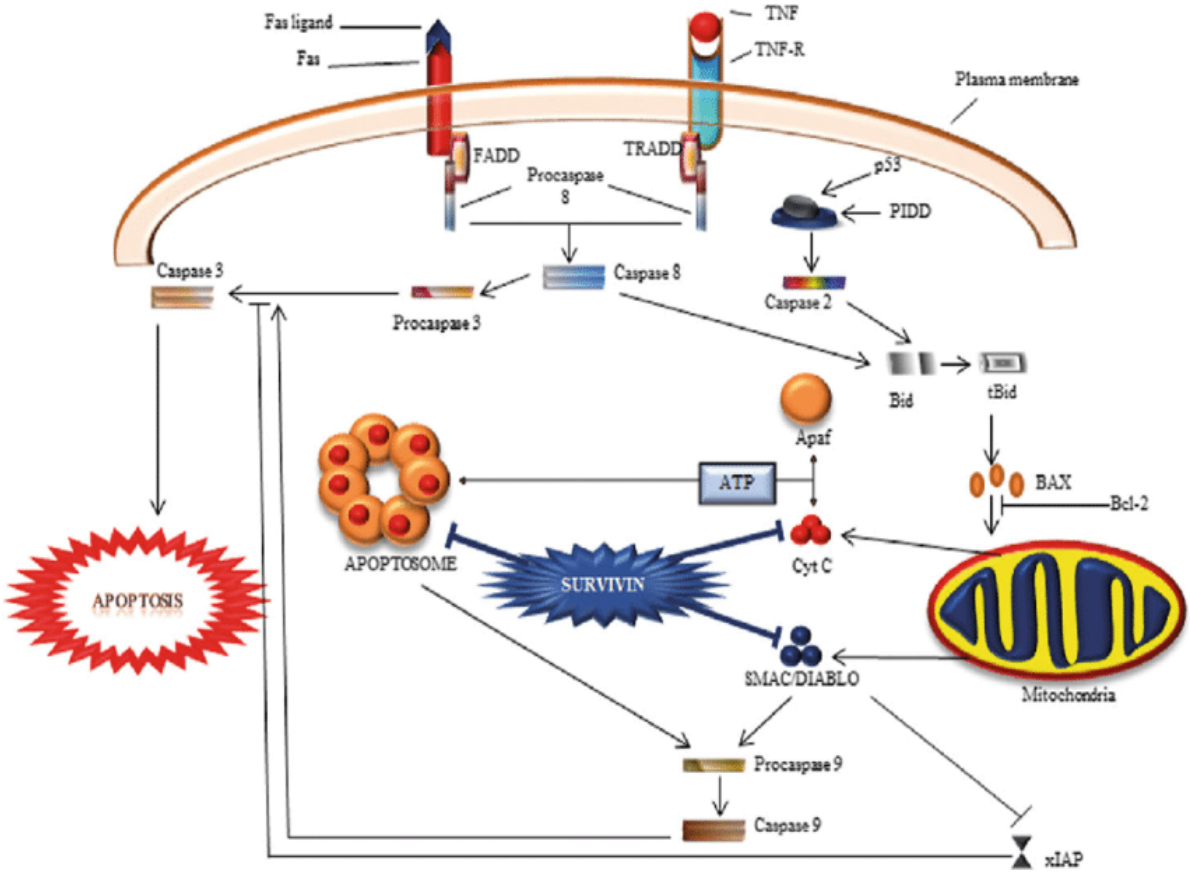
- Αναστολή της απόπτωσης

Η survivin εντοπίζεται σε πολλές και ποικίλες θέσεις μέσα στο κύτταρο, γεγονός που εξηγεί και τις ποικίλες και σε πολλές περιπτώσεις αντίθετες επιδράσεις που διαδραματίζει στις κυτταρικές λειτουργίες.Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα των παραπάνω αποτελεί η δράση της στην απόπτωση και τον κυτταρικό θάνατο. Η Survivin μπορεί και προστατεύει τα κύτταρα από τον αποπτικό και τον αυτοφαγικό θάνατο. Έχει βρεθεί πως ο εντοπισμός της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια αναστέλλει την απόπτωση και προάγει την ογκογένεση [106]. Επιπλέον, ο εντοπισμός στο κυτταρόπλασμα είναι ζωτικής σημασίας για την αντί-αποπτωτική της δραστηριότητα, καθώς η πυρηνική μετεγκατάστασή της την καταργεί [107].

Είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη survivin δεν παρουσιάζει τα δομικά στοιχεία που εντοπίζονται στα άλλα μέλη της οικογένειας και σχετίζονται με τις αλληλεπιδράσεις με την κασπάση-3. Η τρέχουσα υπόθεση είναι ότι η survivin συνεργάζεται με την XIAP και την πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον ιό της ηπατίτιδας B (HBXIP, επίσης γνωστή ως LAMTOR5). Δημιουργείται έτσι ένα σύμπλεγμα με την XIAP που σχετίζεται με τον παράγοντα 1 (XAF1) το οποίο επηρεάζει την αλληλεπίδραση του XIAP με κασπάσες ή/και την αύξηση της

επίδρασης άλλων μελών της οικογένειας IAP, όπως c-IAP1 ή c-IAP2 (επίσης γνωστά ως BIRC2 και BIRC3, αντίστοιχα), τα οποία δρουν περαιτέρω ανοδικά στην εξωγενή αποπτωτική οδό [108].

Έχει αποδειχθεί επιπλέον ότι η φωσφορυλίωση της survivin στη θρεονίνη 34 (Thr34) είναι ζωτικής σημασίας για τις αντί-αποπτωτικές της λειτουργίες. Μια άλλη ένδειξη σχετικά με τον αντι-αποπτωτικό μηχανισμό της survivin ήρθε από την ικανότητά της να αλληλεπιδρά με το Smac / DIABLO υποδηλώνοντας ότι η survivin μπορεί να καταστέλλει έμμεσα την ενεργοποίηση των κασπάσων. Το Smac / DIABLO δρα σαν προ-αποπτωτική πρωτεΐνη, λόγω της συμμετοχής του στο σχηματισμό αποπτωμάτων και ενεργοποίησης της κασπάσης-9. Ως εκ τούτου, προτείνεται ότι η survivin παρεμβαίνει πιθανότατα στα κατώτερα στάδια της μιτοχονδριακής-αποπτωτικής οδού, όπως ο ανταγωνισμός του σχηματισμού αποπτωσωμάτων (Εικόνα 1.7). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι το Smac / DIABLO ανταγωνίζεται τις λειτουργίες του XIAP. Επομένως, η παρουσία της survinin μπορεί έμμεσα να επιτρέψει τη λειτουργία του XIAP, οδηγώντας τελικά σε αναστολή της απόπτωσης [109].



Εικόνα 1.7: Ο ρόλος της survivin στην απόπτωση [109].

1.5.5 Ο ρόλος των εναλλακτικών μεταγράφων και ισομορφών της survivin ως βιοδείκτες.

Παρόλο που το κύριο μετάγραφο της survivin κυριαρχεί στους περισσότερους καρκίνους, οι πρόσφατες παρατηρήσεις δείχνουν έκφραση ορισμένων παραλλαγών ματίσματος σε συγκεκριμένους όγκους. Μερικές από αυτές τις παραλλαγές ματίσματος μπορεί να υποδηλώνουν όχι μόνο τον καρκινικό φαινότυπο, αλλά και το στάδιο του καρκίνου. Για παράδειγμα, το S-2α εκφράζεται στους περισσότερους όγκους στα κακοήθη στάδια, ιδιαίτερα στον μαστό [110].

Αυξημένα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου S-2B έχουν συσχετιστεί με καλοήθεις και όχι κακοήθεις όγκους του εγκεφάλου [111] ενώ έρευνες παρουσίασαν θετική συσχέτιση της έκφρασης του συγκεκριμένου μεταγράφου με καλύτερη πρόγνωση στο ορθοκολικό καρκίνωμα [111]. Στα καρκινώματα των νεφρικών κυττάρων (RCC), ενώ τα επίπεδα έκφρασης της survivin και της survivin-ΔEx3 δεν παρουσίασαν μείωση σε προχωρημένα στάδια όγκου σε σύγκριση με τα πρώιμα και τα ενδιάμεσα στάδια του όγκου σε 57 κλινικά δείγματα RCC, η έκφραση του survivin-2B μειώθηκε σημαντικά στα στάδια όγκου προχωρημένου σταδίου, υποδεικνύοντας έναν πιθανό δυσμενή ρόλο του survivin-2B στην ανάπτυξη καρκίνου [69].

Επιπλέον, τουλάχιστον 13 διαφορετικοί τύποι καρκίνου έχουν συνδεθεί με έκφραση της Survivin-ΔEx3. Εκτός από τον πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό θάνατο, το S-ΔEx3 μπορεί επίσης να υποβληθεί σε ετεροδιμερισμό με την survivin και να υποστηρίξει την αγγειογένεση. Επιπρόσθετες, μελέτες έχουν δείξει πώς το S-ΔEx3 μπορεί να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Bcl2 και την ενεργοποιημένη κασπάση 3, διευκολύνοντας την αναστολή της τελευταίας από την Bcl2. Επιπρόσθετα, η αλληλεπίδρασή του με τους παραπάνω παράγοντες έχει συνδεθεί με αντι-αποπτωτική δράση [112]. Σημαντικό είναι πως η συγκεκριμένη ισομορφή έχει βρεθεί να επηρεάζει, τόσο ανταγωνιστικά, όσο και συνεργατικά την ανάπτυξη του καρκίνου, καθώς μπορεί να επηρεάζει τόσο τον πολλαπλασιασμό όσο και την απόπτωση. Πρόσφατα δεδομένα υποδηλώνουν ότι το S-ΔEx3 μπορεί να χρησιμεύσει ως διαγνωστικό εργαλείο για το θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς [113].

Όσον αφορά την παραλλαγή Survivin-2B, έρευνες έχουν δείξει πως η έκφραση της παρατηρείται, όπως και της Survivin και της Survivin-ΔEx3, σε καρκινώματα προχωρημένου σταδίου, ενώ η έκφρασή της εξαρτάται σημαντικά από τη φύση και το στάδιο του όγκου [114]. Επιπλέον, πειράματα έχουν δείξει πως η παραλλαγή Survivin-2α εξασθενεί την αντι-αποπτωτική λειτουργία και επηρεάζει τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό της survivin. Παράλληλα, όσον αφορά την παραλλαγή Survivin-3α, πρόσφατα αποτελέσματα έδειξαν πως σε 73 περιπτώσεις εγκεφαλικών νεοπλασμάτων, καμία δεν βρήκε θετική το S-3α [95]. Ωστόσο, η πλειονότητα των καρκίνων του μαστού και των καλοήθων όγκων βρέθηκε να εκφράζει S-3α, με σχεδόν καμία έκφραση σε γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς [115].

Το γεγονός πως η έκφραση των διαφορετικών εναλλακτικών μεταγράφων της survivin έχει συνδεθεί σημαντικά με το στάδιο και τη φύση του καρκίνου αποτελεί βασικό στοιχείο στην περαιτέρω μελέτη των παραλλαγών αυτών στη χρήση τους ως βιοδείκτες καρκίνου.

1.5.6 Ρύθμιση της έκφρασης της *survivin*

Ο υποκινητής της *survivin* διαθέτει μία νησίδα CpG και πολυάριθμες Sp1 περιοχές, ωστόσο δε διαθέτει TATA box [83]. Μεταξύ των πολυάριθμων αυτών Sp1 περιοχών, τρείς είναι απαραίτητες για την μεταγραφή του γονιδίου και είναι οι εξής: -171, -151, και -140 [116]. Ο εγγύς υποκινητής της survivin περιέχει επίσης 3 στοιχεία CDE (στοιχείο εξαρτώμενου κύκλου κυττάρου) στις περιοχές -6, -12, -171 και ένα CHR (περιοχή ομολογίας γονιδίου κυτταρικού κύκλου) στην περιοχή -42. Και τα δύο είδη αλληλουχιών είναι χαρακτηριστικά γονιδίων που εκφράζονται κατά τη διάρκεια του G2 / M και επιτρέπουν την περιοδικότητα του κυτταρικού κύκλου μέσω αλληλεπίδρασης με το CDF-1 (Cycling DOF Factor 1), μια πρωτεΐνη ρυθμιστή της φάσης G1.

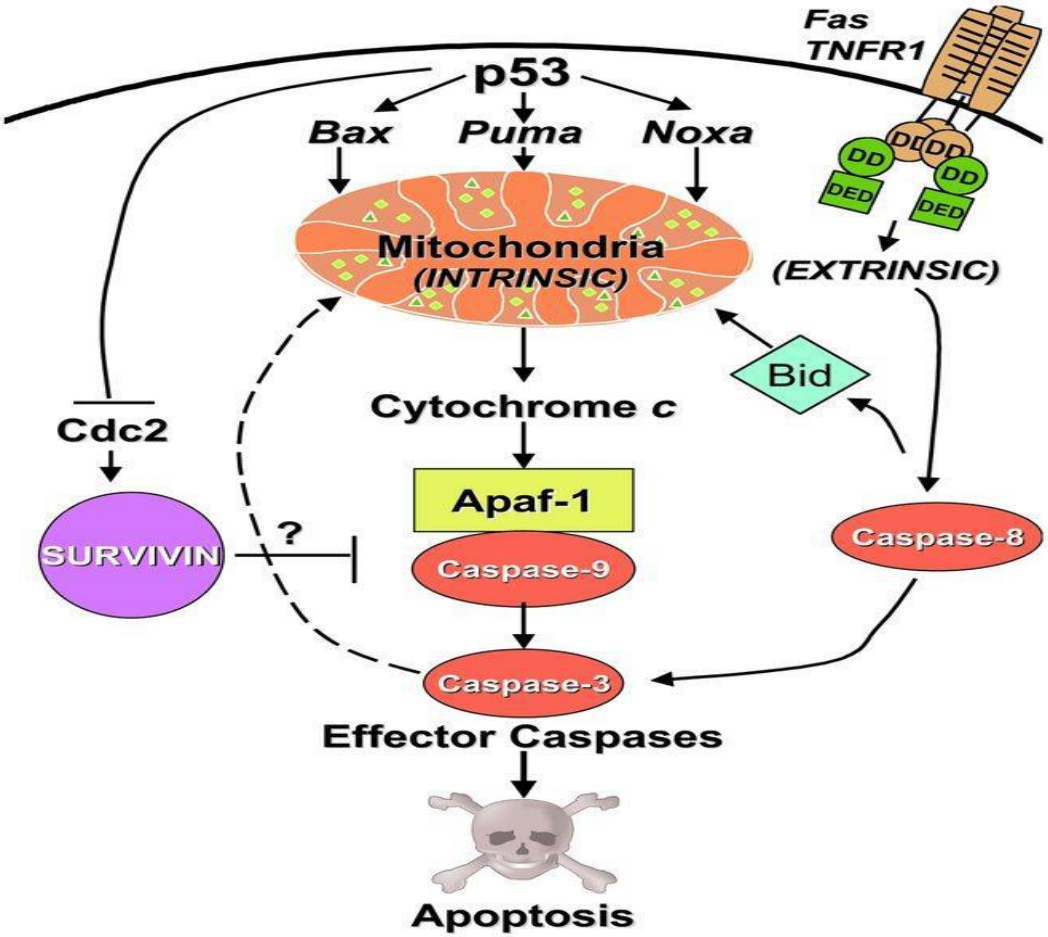
Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι ένας πολυμορφισμός C / G στη περιοχή -31, που βρίσκεται στο στοιχείο καταστολέα CDE / CHR, ήταν ένα γενετικό ελάττωμα που βρέθηκε σε κύτταρα όγκου, αλλά όχι σε φυσιολογικές κυτταρικές σειρές και ότι αυτός ο πολυμορφισμός συσχετίστηκε με αυξημένη έκφραση της *survivin*. Αυτή η αλλαγή μπορεί να παρεμποδίσει τη δέσμευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε στοιχεία CDE και έτσι να οδηγήσει στην

ενεργοποίηση της μεταγραφής της *survivin* [117], αν και στο καρκίνωμα του μαστού, αυτός ο πολυμορφισμός δεν επηρεάζει την έκφραση της survivin [118]. Ωστόσο, στην τοποθεσία -235, μια αλληλουχία G / A συνδέεται έντονα με την έκφραση της *survivin* στο καρκίνωμα του μαστού. Η παρουσία μιας A στο -235 δημιουργεί μια θέση σύνδεσης για τον παράγοντα μεταγραφής GATA-1 που επάγει την έκφραση της *survivin* μέσω της αλληλεπίδρασης του GATA-1 και του υποκινητή της *survivin* [119].

Τα ειδικά χαρακτηριστικά του υποκινητή της *survivin* θα μπορούσαν να εξηγήσουν το προφίλ έκφρασης που παρατηρείται σε φυσιολογικά κύτταρα (Εικόνα 1.8). Πράγματι, συγκεκριμένες αλληλουχίες όπως οι CDE και CHR που αναφέρθηκαν προηγουμένως επηρεάζουν άμεσα την ειδική έκφρασή της στις φάσεις G2 / M του κυτταρικού κύκλου. Παρ 'όλα αυτά, η απορρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της survivin στον καρκίνο είναι συνέπεια διαφορετικών αλλαγών, συμπεριλαμβανομένων επιγενετικών τροποποιήσεων και γενετικών ανωμαλιών.

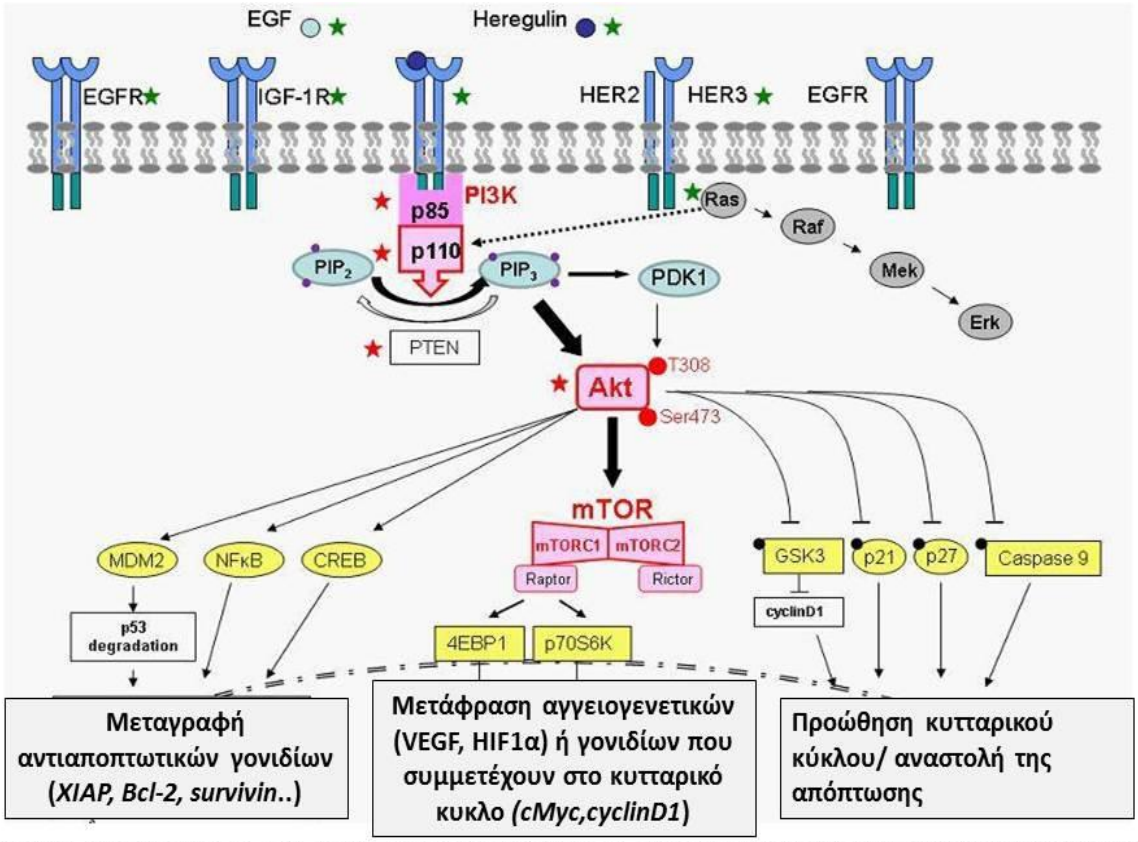
Εικόνα 1.8. Ιδιότητες του υποκινητή της *survivin.* Οι συμπαγείς κόκκινες γραμμές αντιστοιχούν σε περιοχές Sp1 και οι αστερίσκοι αντιπροσωπεύουν τις απαραίτητες θέσεις Sp1 για την έκφραση της survivin. Οι συμπαγείς μπλε γραμμές επισημαίνουν τις περιοχές CDE και η διακεκομμένη μπλε γραμμή αντιστοιχεί στις αλληλουχίες CHR. Οι περιοχές δέσμευσης του παράγοντα μεταγραφής επισημαίνονται με μωβ χρώμα. Οι ακολουθίες SNP υποδεικνύονται με πράσινες γραμμές. Το έντονο βέλος δείχνει την έναρξη της μεταγραφής και το +1 επισημαίνει το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης [120].

Διάφοροι παράγοντες ρυθμίζουν την έκφραση της *survivin* σε καρκινικά, ενδοθηλιακά και CD34+ κύτταρα. Υπάρχει μεγάλη πιθανότητα στη διαδικασία της επαγωγής της *survivin* στα καρκινικά κύτταρα να εμπλέκονται μονοπάτια που περιλαμβάνουν πρωτο-ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια. Μελέτες έδειξαν ότι ο άγριος τύπος (wild type, Wt) της p53 καταστέλλει τη μεταγραφή της *survivin* [121]-[122]. Η υπερέκφραση της survivin είναι δυνατόν να αναστέλλει την απόπτωση που εξαρτάται από την p53 και η οποία επάγεται από την αδριαμυκίνη [122] ή την υπεριώδη ακτινοβολία. Μέχρι τώρα τα δεδομένα είναι αντιφατικά ως προς τον τρόπο που η p53 καταστέλλει τη survivin. Απώλεια της δράσης της wt-p53 σε καρκινικά κύτταρα ίσως να ευθύνεται για την υπερέκφραση της survivin και την αντίσταση των κυττάρων στα αντικαρκινικά φάρμακα. Φαίνεται, λοιπόν, ότι το μονοπάτι p53-survivin είναι πολύ σημαντικό για τη διαχείριση της απόπτωσης μέσω της p53.



Εικόνα 1.9. Ρύθμιση της απόπτωσης από την p53 με συμμετοχή της survivin [123].

Επιπλέον, η ενεργοποίηση του STAT3 που παρατηρείται συχνά σε καρκινικούς όγκους, συμβάλει και στην αύξηση της έκφρασης της survivin. Επίσης, η υπερέκφραση της survivin από την ογκοπρωτεΐνη c-H-Ras έχει δειχτεί ότι δε σχετίζεται με τον κυτταρικό κύκλο ή την κυτταρική διαίρεση [124]. Ενώ αναστολείς της PI3K (Phosphatidy1Inositol 3 Kinase) και της MEK1 (MAP kinase και ERK activator Kinase) οδηγούν σε μείωση της survivin, υποδεικνύοντας ότι αυτά τα ενδοκυτταρικά Ras μονοπάτια εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης της survivin [124].



*Ανοδική ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K: άμμεση ενεργοποίηση μέσω των διαμεμβρανικών RTKs και των προσδετών τους, ή έμμεσα μέσω του Ras.

* Ενδογενής ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K μέσω μεταλλαγών στις p110 (PIK3CA) ή στο p85 (PIK3R) υπομονάδες του PI3K, μεταλλαγών στο Akt ή απώλεια του PTEN.

Εικόνα 1.10. Τα μονοπάτια σήμανσης PI3K/Akt/mTOR και Ras και η ρύθμιση έκφρασης της survivin.[125]

Μεγάλος αριθμός ερευνών έχουν δείξει ότι η έκφραση της survivin μπορεί να ρυθμίζεται από αυξητικούς παράγοντες/κυτταροκίνες [126], αντικαρκινικά φάρμακα, ορμόνες [127], και αναστολείς των κινασών [128].

1.6 Αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next-generation sequencing)

Από το 1953 όπου οι James Watson και Francis Crick ανακάλυψαν τη δομή του DNA, το οποίο αποτελείται από δύο αλυσίδες νουκλεοτιδίων με ελικοειδή τρισδιάστατη δομή, σχηματίζοντας δίκλωνη έλικα, μέχρι σήμερα έχουν γίνει τεράστια άλματα στην μελέτη της γενετικής πληροφορίας τόσο σε δομικό όσο και σε λειτουργικό επίπεδο. Τα άλματα αυτά στηρίχθηκαν τόσο στη συνεχή διεύρυνση των γνώσεων μας σχετικά με τις λειτουργίες των βιολογικών συστημάτων όσο και στην ανάπτυξη τεχνολογιών που μας επιτρέπουν μια ευκολότερη και συνεχώς οικονομικότερη μελέτη των συστημάτων αυτών.

Ένα τεράστιο βήμα στην μελέτη της γονιδιακής πληροφορίας αποτέλεσε η προσπάθεια πολλών ερευνητών για πολλά χρόνια να μελετήσουν και να αποθηκεύσουν την ακολουθία της γενετικής πληροφορίας. Η αλληλούχηση επόμενης γενιάς χρησιμοποιείται στην αλληλούχηση του γονιδιώματος, στην επαναλληλούχηση, στην μελέτη μεταγραφώματος (RNA-Seq), στην μελέτη αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-νουκλεϊκών οξέων (ChiP-seq) και στην επιγονιδιωματική μελέτη (epigenomics). Η επαναλληλούχηση είναι απαραίτητη επειδή το γονιδίωμα ενός ατόμου δεν αποτυπώνει όλη την ποικιλομορφία που υπάρχει μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους [129]. Η υψηλή απαίτηση για αλληλούχηση με όσο το δυνατόν χαμηλότερο κόστος έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη τεχνολογιών αλληλούχησης υψηλής απόδοσης (high-throughput) που προσδιορίζουν την ακολουθία πολλών αλυσίδων DNA παράλληλα, «διαβάζοντας» χιλιάδες ή εκατομμύρια αλληλουχίες ταυτόχρονα. Οι τεχνολογίες που υπάρχουν σήμερα συγκριτικά με τις βασικές μεθόδους αλληλούχησης, έχουν καταφέρει να μειώσουν δραματικά το κόστος. Σε εξαιρετικά υψηλής απόδοσης τεχνολογίες μπορούν να αλληλουχούνται μέχρι και εκατομμύρια ακολουθίες παράλληλα [130].

Οι Next-Generation Sequencing (NGS) τεχνολογίες, μέθοδοι που προτείνουν μια εντελώς διαφορετική προσέγγιση στη μέτρηση του DNA, έχουν προκαλέσει νέες ανακαλύψεις που επέφεραν μια μεγάλη επανάσταση στον κλάδο της γονιδιωματικής. Οι NGS επεκτείνουν αυτή τη δυνατότητα με εκατομμύρια αντιδράσεις, είτε αυτές περιορίζονται σε ένα μοναδικό είτε σε περισσότερα δείγματα DNA. Αυτή η εξέλιξη καθιστά ικανή την γρήγορη

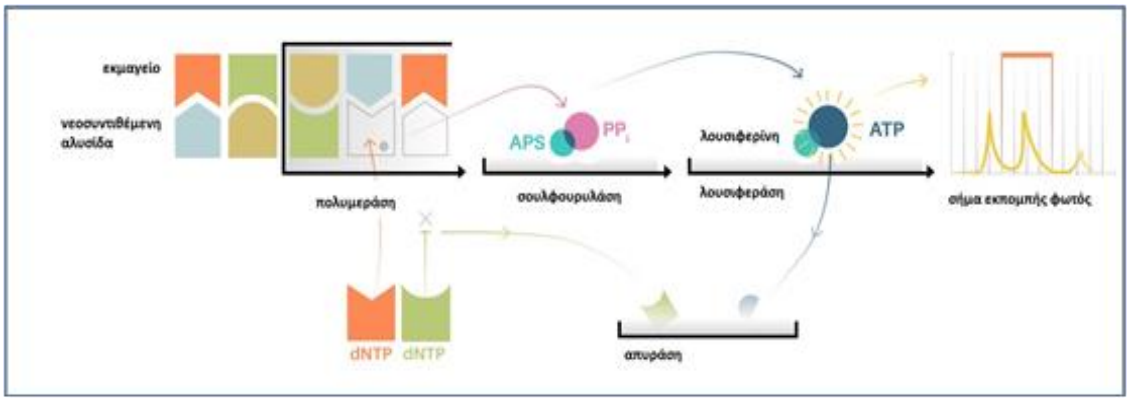
μέτρηση μεγάλων αλληλουχιών DNA μέχρι και ολόκληρου του γονιδιώματος. Ενδεικτικά αξίζει να αναφερθεί ότι οι τελευταίες πλατφόρμες αλληλούχησης είναι ικανές να παράγουν εκατοντάδες giga-βάσεις (gigabases–Gb) δεδομένων με μια μοναδική αντίδραση. Έτσι, ενώ το 2007 μια απλή αντίδραση μπορούσε να παράγει μέχρι και ένα Gb δεδομένων, το 2011 με ένα απλό τρέξιμο παραγόταν περίπου ένα Terabase (Tb) δεδομένων, δηλαδή 1000 φορές περισσότερα δεδομένα. Με τον τρόπο αυτό, οι ερευνητές μπορούν να πάρουν μια ολόκληρη ομάδα δεδομένων μέσα σε λίγες ώρες ή μέρες, ώστε να είναι δυνατή η μέτρηση περισσότερων από 5 ανθρώπινων γονιδιωμάτων μέσα σε μια εβδομάδα και με κόστος λιγότερο των 5000$ ανά γονιδίωμα. Κάνοντας μια σύγκριση, το πρώτο ανθρώπινο γονιδίωμα πήρε σχεδόν 10 χρόνια να μετρηθεί και επιπλέον άλλα τρία χρόνια να τελειώσει η ανάλυση. Παρακάτω αναφέρονται συνοπτικά κάποιες μέθοδοι που εντάσσονται γενικότερα στις NGS μεθόδους.

1.6.1 Πυροαλληλούχηση

Η πυροαλληλούχηση είναι μία μέθοδος αλληλούχησης μέσω σύνθεσης, η οποία διαφέρει από την μέθοδο αλληλούχησης Sanger στο ότι βασίζεται στην ανίχνευση πυροφωσφορικού κατά την ενσωμάτωση νουκλεοτιδίου, παρά στον τερματισμό αλυσίδας με διδεοξυνουκλεοτίδια [131]. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA γίνεται μέσω εκπομπής φωτός κατά την ενσωμάτωση του επόμενου συμπληρωματικού νουκλεοτιδίου με την προϋπόθεση ότι μόνο ένα από τα 4 νουκλεοτίδια προστίθεται, με κυκλικό τρόπο. Η ένταση της εκπομπής φωτός καθορίζει το εάν υπάρχουν περισσότερες από μία συγκεκριμένη βάση στη σειρά. Το προηγούμενο νουκλεοτίδιο που προστέθηκε αποικοδομείται πριν την προσθήκη του επόμενου για τη συνέχιση της σύνθεσης, επιτρέποντας την αποκάλυψη του επόμενου νουκλεοτιδίου/ων μέσω καταγραφής της έντασης του εκπεμπόμενου φωτός (εάν το νουκλεοτίδιο που προστέθηκε ήταν το επόμενο συμπληρωματικό της αλληλουχίας). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για καθένα από τα 4 νουκλεοτίδια μέχρι που γίνεται ο προσδιορισμός ολόκληρης της ακολουθίας. Η αλληλούχηση μέσω σύνθεσης περιλαμβάνει την ενζυμική

σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας μιας αλυσίδας DNA που επιθυμούμε να αλληλουχήσουμε.

Η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση της δράσης της DNA πολυμεράσης με ένα άλλο χημειοφθορίζον ένζυμο. Το εκμαγείο DNA είναι ακινητοποιημένο και διαλύματα των 4 νουκλεοτιδίων προστίθενται διαδοχικά και ξεπλένεται από το σημείο αντίδρασης. Φως εκπέμπεται μόνο όταν το συμπληρωματικό νουκλεοτίδιο προστέθηκε στο 3’ συντιθέμενο άκρο, και με την προϋπόθεση ότι οι βάσεις προστίθενται με κυκλικό τρόπο, είναι εφικτός τελικά ο προσδιορισμός της ακολουθίας [131]. Το μονόκλωνο DNA εκμαγείο υβριδοποιείται σε έναν εκκινητή και επωάζεται με τα ένζυμα DNA πολυμεράση, ATP σουλφουριλάση, λουσιφεράση και απυράση και με τα υποστρώματα APS (adenosine 5΄ phosphosulfate) και λουσιφερίνη. Η προσθήκη του ενός εκ των 4 dNTPs γίνεται στο επόμενο βήμα. Η DNA πολυμεράση προσθέτει το σωστό συμπληρωματικό dNTP στο εκμαγείο. Κατά την ενσωμάτωση απελευθερώνεται πυροφωσφορικό (PPi). Η ATP σουλφουριλάση μετατρέπει το PPi σε ATP παρουσία APS. Αυτό το ATP δρα ως υπόστρωμα για τη μετατροπή της λουσιφερίνης σε οξυλουσιφερίνη (η αντίδραση καταλύεται με το ένζυμο λουσιφεράση) με αποτέλεσμα να εκπέμπεται φως με ένταση ανάλογη της ποσότητας του ATP (Εικόνα 1.11). Το φως που παράγεται κατά την αντίδραση που καταλύει η λουσιφεράση ανιχνεύεται με κάμερα και αναλύεται σε ένα πυρόγραμμα (pyrogram) [132].



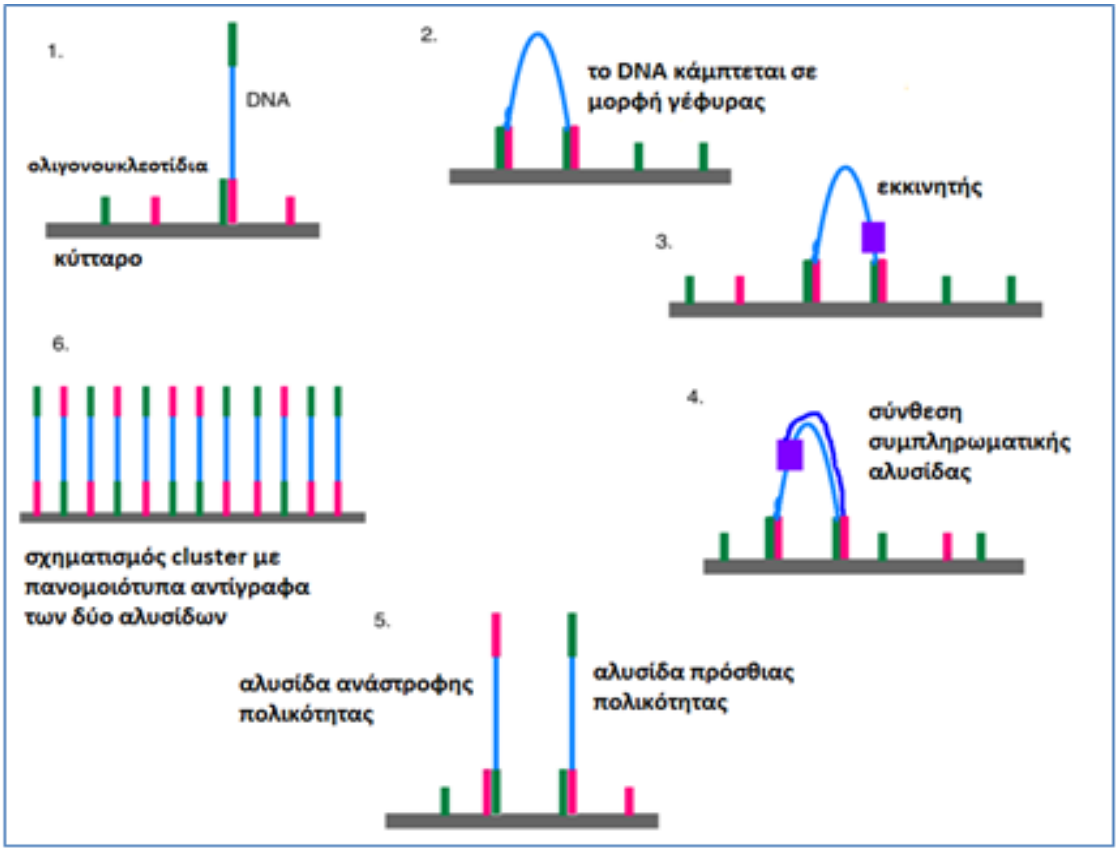
Εικόνα 1.11. Η πυροαλληλούχιση βασίζεται στην ανίχνευση πυροφωσφορικού κατά την ενσωμάτωση ενός νουκλεοτιδίου.

1.6.2. Η τεχνολογία της Illumina

Η τεχνολογία της Illumina μπορεί να διαβάσει μία τεραβάση (Tb) αλληλουχίας DNA (δηλαδή 1000 γιγαβάσεις ή Gb) σε ένα μόνο πείραμα με το μηχάνημα HiSeq. Το μοντέλο HiSeq X Ten διαβάζει έως και 1,8 Tb σε κάθε πείραμα. Ένα μικρό μηχάνημα αλληλούχησης (σαν το Miseq) διαβάζει 5 Gb DNA άνα πείραμα σε περίπου 24 ώρες.

Η μέθοδος της Illumina βασίζεται στην πραγματοποίηση κύκλων αναστρέψιμου τερματισμού της αντιγραφής των μορίων που αλληλουχίζονται. Σύμφωνα με την προσέγγιση αυτή: α) Το γονιδιωματικό DNA καθαρίζεται και στη συνέχεια κόβεται σε τυχαίες θέσεις. Αυτό μπορεί να επιτευχθέι μηχανικά, π.χ. χρησιμοποιώντας υπερήχους. Συχνά ακολουθεί ένα βήμα στο οποίο τα κομμάτια DNA που προέκυψαν από τον τεμαχισμό επιλέγονται με βάση το μέγεθος τους. Κατόπιν στα δύο άκρα των κομματιών DNA συνδέονται δίκλωνα ολιγονουκλεοτίδια που αναφέρονται ως προσαρμογείς (adapters). Έτσι προκύπτει μία βιβλιοθήκη τμημάτων DNA. β) Στη συνέχεια, το διάλυμα με τις μονόκλωνες αλυσίδες των μορίων DNA της βιβλιοθήκης διοχετεύεται σε ένα κανάλι ροής, στην επιφάνεια του οποίου βρίσκονται ακινητοποιημένα μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά με την αλληλουχία των προσαρμογέων. Με τον τρόπο αυτό οι μονόκλωνες αλυσίδες συγκρατούνται στην επιφάνεια του καναλιού ροής. γ) Κατόπιν προστίθεται DNA πολυμεράση και τα τέσσερα dNTPs και ακολουθεί μια διαδικασία επαναλαμβανόμενων κύκλων αντιγραφής του DNA που ονομάζεται πολλαπλασιασμός μέσω γέφυρας (bridge amplification) και πραγματοποιείται σε στερεή φάση. Κατά τον πολλαπλασιασμό μέσω γέφυρας, οι αλυσίδες του DNA δημιουργούν γέφυρες συγκεκριμένου σχήματος καθώς και τα δύο άκρα τους προσδένονται στα μονόκλωνα νουκλεοτίδια που βρίσκονται ακινητοποιημένα στη στερεή επιφάνεια του καναλιού ροής. δ) Με τον πολλαπλασιασμό μέσω γέφυρας δημιουργούνται εκατομμύρια συστάδες (clusters), καθεμιά από τις οποίες περιέχει εκατοντάδες αντίγραφα της ίδιας αλυσίδας DNA. ε) Προστίθεται DNA πολυμεράση, ένας εκκινητής και τα τέσσερα νουκλεοτίδια το καθένα σεσημασμένο με ένα διαφορετικό φθοροφόρο. Τα νουκλεοτίδια αυτά είναι χημικά τροποποιημένα και αναφέρονται ως αναστρέψιμοι τερματιστές (reversible terminators) γιατί η ενσωμάτωση τους εμποδίζει την περαιτέρω

επιμήκυνση της υπό σύνθεσης αλυσίδας, ωστόσο αυτή η παρεμπόδιση είναι αναστρέψιμη. στ) Οι συστάδες διεγείρονται με λέιζερ και καταγράφεται ο φθορισμός που εκπέμπουν. Έτσι ταυτοποιείται το νουκλεοτίδιο (dTTP, dATP, dGTP ή ddCTP) που ενσωματώθηκε σε κάθε συστάδα. ζ) Κατόπιν, πραγματοποιούνται διαδοχικοί κύκλοι άρσης της παρεμπόδισης της επιμήκυνσης, προσθήκης αναστρέψιμων τερματιστών και ταυτοποίησης του νουκλεοτιδίου που προστέθηκε σε κάθε συστάδα (Εικόνα 1.12).



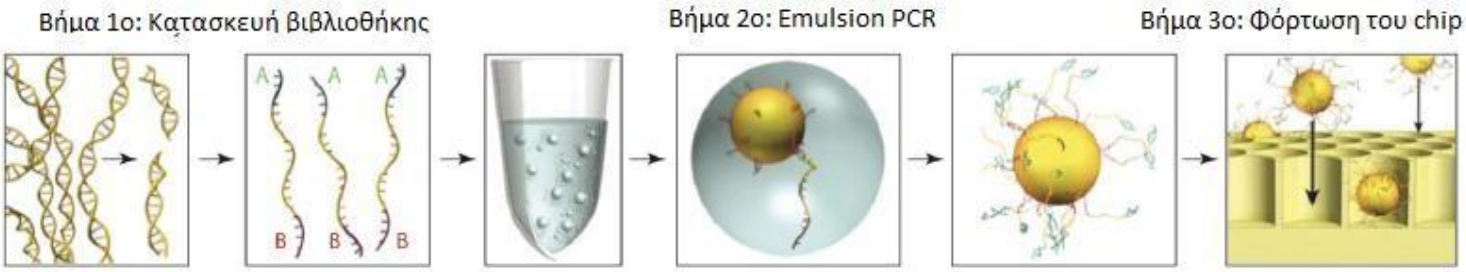
Εικόνα 1.12. Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής bridge PCR.

1.6.3. Η τεχνολογία Ion Torrent

Η ιδέα πίσω από την τεχνολογία του Ion Torrent (Life Technologies) είναι εξαιρετικά απλή. Η διαδικασία μπορεί να χωρισθεί σε 4 βήματα: i) την προετοιμασία των βιβλιοθηκών, ii) την PCR γαλακτώματος, (Emulsion PCR), iii) την αλληλούχηση και iv) τη συλλογή και επεξεργασία δεδομένων (Εικόνα 1.13). Όταν η DNA πολυμεράση ενσωματώνει ένα νουκλεοτίδιο σε μία υπό σύνθεση αλυσίδα DNA, ελευθερώνεται ένα ιόν υδρογόνου. Σε ένα microwell που περιέχει το εκμαγείο προστίθεται ένα από τα 4 dNTPs. Εάν το dNTP που προστέθηκε είναι συμπληρωματικό με το απέναντι του 3’ συντιθέμενου άκρου,

ενσωματώνεται απελευθερώνοντας ένα ιόν υδρογόνου. Αυτό διεγείρει έναν ISFET αισθητήρα ιόντων που ανιχνεύει την αντίδραση [133].

Εάν υπάρχουν ομοπολυμερή στην ακολουθία εκμαγείο τότε προστίθενται περισσότερα μόρια dNTPs σε έναν κύκλο. Αυτό οδηγεί σε ακόμα μεγαλύτερη απελευθέρωση υδρογόνων και συνεπώς το σήμα που παράγεται είναι πιο έντονο. Αυτό το μηχάνημα αλληλούχησης είναι ουσιαστικά ένας μετρητής του pH ο οποίος πραγματοποιεί παράλληλα μετρήσεις σε 1,2 εκατομμύρια πηγαδάκια και έτσι εξακριβώνει εάν σε καθένα από αυτά ενσωματώθηκε η όχι ένα νουκλεοτίδιο. Η ενσωμάτωση δύο η περισσοτέρων νουκλεοτιδίων διαπιστώνεται μέσω της αύξησης των ιόντων υδρογόνου που ελευθερώνονται. Ένας περιορισμός αυτής της τεχνολογίας έγκειται στη χαμηλή ακρίβεια με την οποία διαβάζει ομοπολυμερή. Το Ion Torrent ανιχνεύει άμεσα ένα προϊόν της χημικής αντίδρασης σχηματισμού φωσφοδιεστερικού δεσμού, χρησιμοποιώντας έναν αισθητήρα ιόντων χωρίς την χρήση κάμερας ή πηγών φωτός.



Εικόνα 1.13. Σχηματική απεικόνηση της μεθοδολογίας αλληλούχησης Ion Torrent™. Προσαρμογή από (Mardis, 2008).

2 Υλικά και μέθοδοι

2.1 Βιολογικό υλικό

Για την υλοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 52 ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, από τις οποίες οι 51 είναι καρκινικές και 1 είναι φυσιολογική (Πίνακας 2.1).

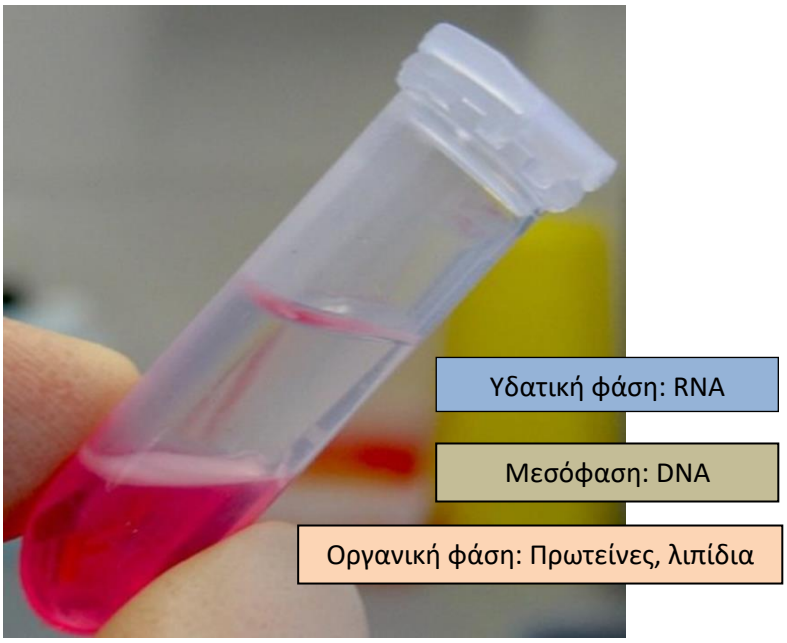
Πίνακας 2.1. Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

	Ιστοί προέλευσης/ Τύποι καρκίνου	**Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές**
1	Αδενοκαρκίνωμα μαστού	MCF-7, SK-BR-3, BT-20, MDA-MB-231, MDA-MB-468
2	Πορογενές αδενοκαρκίνωμα μαστού	BT-474, T-47D, ZR-75-1
3	Καρκίνος των ωοθηκών	OVCAR-3, SK-OV-3, ES-2, MDAH-2774
4	Αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου	Ishikawa, SK-UT-1B
5	Καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας	HeLa, SiHa
6	Καρκίνος του προστάτη	PC-3, DU 145, LNCaP
7	Καρκίνος της ουροδόχου κύστης	T24, RT4
8	Καρκίνος νεφρού	ACHN, 786-O, Caki-1
9	Καρκίνος του παχέος εντέρου	Caco-2, DLD-1, HT-29, HCT 116, SW 620, COLO 205, RKO
10	Γαστρικό αδενοκαρκίνωμα	AGS
11	Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	Hep G2, HuH-7
12	Καρκίνος του εγκεφάλου	U-87 MG, U-251 MG, D54, H4, SH-SY5Y
13	Αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα	A549
14	Μελάνωμα	FM3, MDA-MB-435S
15	Λέμφωμα	Raji, Daudi, U-937
16	Λευχαιμία	K-562, HL-60, Jurkat, REC-1, SU-DHL-1, GRANTA-519
17	Φυσιολογικό εμβρυϊκό νεφρό	HEK293

2.2 Απομόνωση ολικού RNA

Για την απομόνωση ολικού RNA από τις παραπάνω κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που στηρίζεται στη χρήση TRIzol® (ισοθειοκυανικό γουανίδιο), φαινόλη και χλωροφόρμιο. Κατά τη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται διαχωρισμός, μέσω φυγοκέντρησης, σε μία υπερκείμενη διαυγή υδατική φάση, σε μια μεσόφαση και σε μια υποκείμενη κόκκινου χρώματος οργανική φάση. Στην οργανική φάση γίνεται συγκέντρωση των πρωτεϊνικών προσμίξεων και των διαλυμένων λιπιδίων (Εικόνα 2.1)

Το ισοθειοκυανικό γουανίδιο που περιέχει το αντιδραστήριο TRIzol®, είναι ένας χαοτροπικός παράγοντας, που επιτρέπει τη λύση των κυττάρων και των κυτταρικών οργανιδίων, καθώς και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών που προσδένονται στο RNA. Με την παρουσία χλωροφορμίου-φαινόλης επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των τριών φάσεων, υδατικής, μεσόφασης και οργανικής. Η φαινόλη που περιέχει το αντιδραστήριο βοηθά στην συγκέντρωση των πρωτεϊνικών προσμίξεων στην κόκκινη οργανική φάση. Με τη χρήση ισοπροπανόλης γίνεται ανάκτηση του RNA, από την υπερκείμενη υδατική φάση, μέσω της μείωσης των υδροφιλικών αλληλεπιδράσεων του RNA με το διάλυμα, ώστε να παραλειφθεί ως ίζημα. Τέλος, το ολικό RNA παραλαμβάνεται ως καθαρό ίζημα με τη χρήση αιθανόλης 70%, απαλλαγμένο από τις πιθανές προσμίξεις αλάτων και πρωτεϊνών.



Εικόνα 2.1. Φάσεις διαχωρισμού κατά την απομόνωση RNA με TRIZOL. (http://openwetware.org/wiki/Image:Trizol_phases.png)

Αντιδραστήρια

- Χαοτροπικό αντιδραστήριο TRIzol® (Sigma-Aldrich)
- Χλωροφόρμιο
- Ισοποροπανόλη
- Αιθανόλη 75%
- RSS (RNA Storage Solution)

Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Προσθήκη 1 mL TRIzol® σε κάθε δείγμα.

2. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Προσθήκη 0.2 mL χλωροφορμίου για κάθε 1 mL TRIzol® και ανάδευση με το χέρι για 15 sec.

4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 min και φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 15 min στους 4°C.

5. Αφαίρεση του υπερκείμενου (υδατικής φάσης) με πιπέτα και μεταφορά του σε νέο tube.

6. Προσθήκη 0,5 mL 100% ισοπροπανόλης για κάθε 1mL TRIzol®

7. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10min και φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 10 min στους 4°C.

8. Αφαίρεση του υπερκείμενου για να παραμείνει μόνο το RNA pellet.

9. Προσθήκη 1mL 75% αιθανόλης για κάθε 1mL TRIzol®

10. Ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση του tube στις 12000 rpm για 5min στους 4°C και αφαίρεση του διαλύματος.

11. Περιμένω να εξατμιστεί η αιθανόλη για 5-10 min.

12. Προσθήκη RSS και αποθήκευση στους -80°C.

2.3 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός RNA.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του RNA και η εκτίμηση της καθαρότητάς του πραγματοποιήθηκαν σε φωτόμετρο, με μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm (A260) και 280nm (A280). Σε μήκος 260nm ελέγχεται η περιεκτικότητα σε νουκλεϊκά οξέα του μονόκλωνου RNA και σε μήκος κύματος 280nm ελέγχοντα οι τυχόν προσμίξεις σε πρωτεΐνες.

Η μια μονάδα απορρόφησης (OD) στα 260nm αντιστοιχεί σε 40μg RNA ανά ml σε ουδέτερο pH. Η καθαρότητα του RNA χαρακτηρίζεται από το λόγο της απορρόφησης των νουκλεϊκων οξέων στα 260nm ως προς αυτήν των πρωτεϊνών στα 280nm (A260/A280) και κυμαίνεται στις τιμές >1,6-2,1 σε συγκέντρωση 10mM.

Εικόνα 2.2. Φασματοφωτόμετρο BioSpec-nano της εταιρείας Shimadzu.

Η μέθοδος της φασματοφωτομετρίας στηρίζεται στην ιδιότητα των μορίων να απορροφούν επιλεκτικά μέρος της ακτινοβολίας του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Στη Βιοχημεία, η πιο χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV/Vis). Κάθε χημική ένωση έχει ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος (λmax) που εμφανίζει την μέγιστη απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Τα νουκλεϊκά οξέα εμφανίζουν το μέγιστο αυτό στα 260 nm, ενώ οι πρωτεΐνες εμφανίζουν δύο κύριες αιχμές απορρόφησης. Τα αρωματικά αμινοξέα (τυροσίνη, τρυπτοφάνη

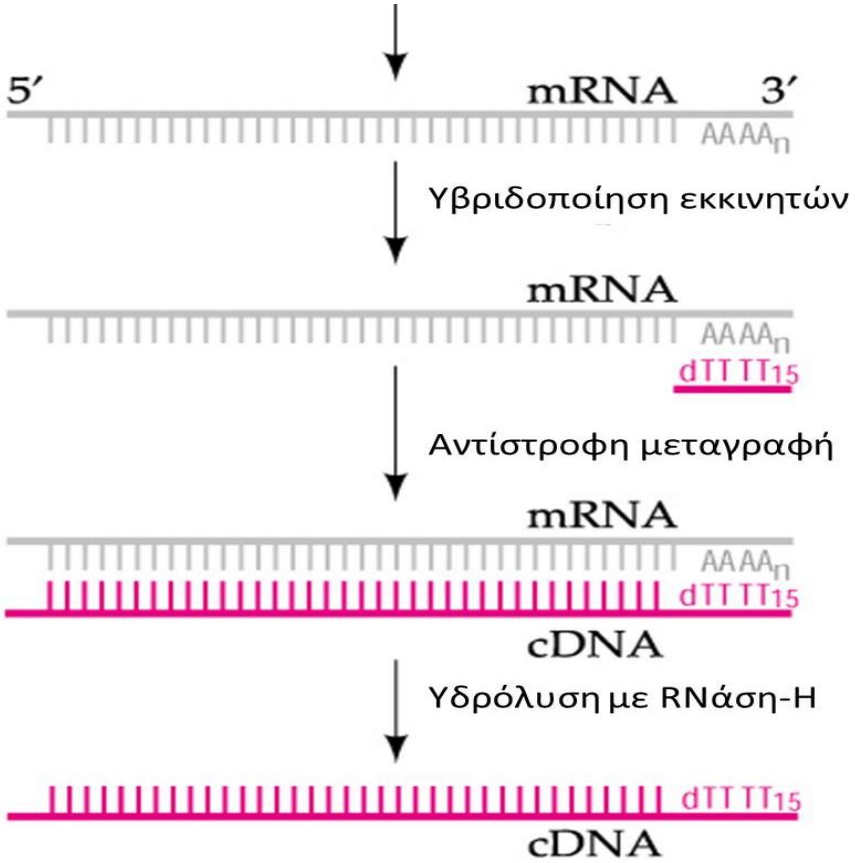
και φαινυλαλανίνη) εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση στα 280 και τα 260 nm. Τα κατάλοιπα τυροσίνης και τρυπτοφάνης απορροφούν στα 280 nm, ενώ η φαινυλαλανίνη στα 260 nm. Η δεύτερη αιχμή απορρόφησης είναι μεταξύ των 215 nm και των 230 nm και οφείλεται στους πεπτιδικούς δεσμούς [134].

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο BioSpec-nano της εταιρείας Shimadzu (Εικόνα 2.2), το οποίο λειτουργεί με βάση ειδικά συστήματα συγκράτησης του δείγματος ανάμεσα σε δύο επιφάνειες βασισμένο στην επιφανειακή τάση, χωρίς τη χρήση κυψελίδων. Το συγκεκριμένο προσφέρει ανώτερα όρια ανίχνευσης πάνω από 10 φορές καλύτερα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα του εμπορίου, γεγονός που το καθιστά το τέλειο εργαλείο για τον ποσοτικό προσδιορισμό των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του δείγματος (λόγος A260/A280) παρουσιάζονται αυτόματα στην οθόνη του υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το σύστημα. Ως πηγή ακτινοβολίας χρησιμοποιείται λυχνία ξένου. Το σύστημα συγκράτησης του δείγματος αποτελείται από δύο επιφάνειες που φέρουν οπτικές ίνες και καθορίζουν αυτόματα την απόσταση μεταξύ τους. Αυτή η διάταξη επιτρέπει την ακριβή μέτρηση διαλυμάτων με μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων.

Για την εκτίμηση της καθαρότητας ενός διαλύματος νουκλεϊκών οξέων είναι απαραίτητο να μετρηθεί η απορρόφηση στα 260 nm και στα 280 nm (A260nm και A280nm) και στη συνέχεια να υπολογιστεί ο λόγος των δύο απορροφήσεων. Ο λόγος A260/A280 πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1,8 και 2,2 ώστε να θεωρείται ότι το RNA που απομονώθηκε είναι καθαρό, δηλαδή δεν περιέχει προσμίξεις DNA και πρωτεϊνών. Τιμές μικρότερες του 1,6 είναι ενδεικτικές της ύπαρξης πρωτεϊνών ή φαινόλης που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διαδικασία της απομόνωσης, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 2,2 υποδηλώνουν ότι το δείγμα περιέχει κάποια ποσότητα DNA. Η αύξηση της απορρόφησης στα 230 nm είναι, επίσης, ενδεικτική προσμίξεων, καθώς διάφοροι παράγοντες, όπως πρωτεΐνες, άλατα, ουρία, φαινόλη και υδατάνθρακες απορροφούν στα 230 nm, μειώνοντας τον λόγο A260nm/A230nm. Τιμές του λόγου A260nm/A230nm μεγαλύτερες του 2 είναι ενδεικτικές δειγμάτων καθαρών νουκλεϊκών οξέων [134]

2.4 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse transcription, RT)

Η μετατροπή του μονόκλωνου RNA σε μόρια συμπληρωματικού DNA (cDNA) γίνεται με την τεχνική της RT και τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase) [135]. Κατά την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής των δειγμάτων ολικού RNA από κάθε ανθρώπινη κυτταρική σειρά, χρησιμοποιήθηκε ένας εκκινητής oligo-dT_{18}, προκειμένου να γίνει επιλεκτική αντίστροφη μεταγραφή των μορίων mRNA από κάθε δείγμα ολικού RNA. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript™ III, το οποίο διαθέτει μειωμένη δραστικότητα RNase H και αυξημένη θερμική σταθερότητα. Γενικότερα, η διαδικασία της RT (εικόνα 2.3) ξεκινά με την προσθήκη μορίων εκκινητή στο μείγμα της αντίδρασης. Τα μόρια αυτά υβριδοποιούνται συμπληρωματικά με μόρια RNA. Οι εκκινητές εν συνεχεία επεκτείνονται με δεοξυριβονουκλεοτίδια απέναντι από τα αντίστοιχα ριβονουκλεοτίδια, χάρη στη δράση πολυμεράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης. Με τον τρόπο αυτό προκύπτει ένα σύμπλοκο mRNA-cDNA, μετά την υδρόλυση του οποίου (με RNάση-H) παράγεται ένα μονόκλωνο μόριο cDNA από το μόριο RNA που είχε χρησιμεύσει ως μήτρα.



Εικόνα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση της αντίστροφης μεταγραφής.

Περιγραφή της μεθόδου

Αφού βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για την πραγματοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιώντας ολικό RNA από τις κυτταρικές σειρές που αναφέρθηκαν παραπάνω, ακολούθησε η σύνθεση 20μL cDNA από 2μg απομονωμένου ολικού RNA για το σύνολο των κυτταρικών σειρών.

Αρχικά, σε φιαλίδιο PCR, τοποθετήθηκε δείγμα ολικού RNA, συνολικού όγκου 4μL σε DEPC-H_2O και προστέθηκαν τα αντιδραστήρια. Ως εκμαγείο για τη σύνθεση του συμπληρωματικού DNA χρησιμοποιήθηκε 2 μg ολικού RNA. Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκε στο θερμικό κυκλοποιητή Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems), όπως παρουσιάζεται στο παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Προσθήκη 500 ng oligo(dT)18 εκκινητή, 2μg ολικού RNA και 1 μl συγκέντρωσης 10 mM dNTP Mix (10 mM για κάθε dATP, dGTP, dCTP και dTTP). Προσθήκη αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού έως 13 μl.
2. Θέρμανση του μείγματος στους 65°C για 5 λεπτά και επώαση σε πάγο για τουλάχιστον 1 λεπτό.
3. Συλλογή των περιεχομένων του σωλήνα με σύντομη φυγοκέντρηση και προσθήκη:
    - 4 μl 5X First-Strand Buffer
    - 1 μl 0.1 M DTT
    - 1 μl RNaseOUT
    - 1 μl of SuperScript™ III RT (200 units/μl)*
4. Ελαφριά ανάδευση με πιπέτα.
5. Επώαση στους 50°C για 60 λεπτά.
6. Απενεργοποίηση της αντίδρασης με θέρμανση στους 70°C για 15 λεπτά.
7. Αποθήκευση του προϊόντος στους -20°C για μελλοντική χρήση.

2.5 Αρχή μεθόδου αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η θεωρητική διαδικασία της τεχνικής PCR περιγράφηκε από τον Keppe και τους συναδέλφους το 1971. Ωστόσο, χρειάστηκαν άλλα 14 χρόνια έως ότου η πλήρης διαδικασία PCR να περιγραφεί και να εφαρμοστεί πειραματικά από τον Kary Mullis. Η αυτοματοποίηση και η τελειοποίηση αυτής της τεχνικής πραγματοποιήθηκαν με την εισαγωγή μιας θερμικά σταθερής DNA πολυμεράσης από το βακτήριο *Thermus aquaticus,* εξού και το όνομα Taq DNA πολυμεράση [136].

Πολλοί ερευνητές διαπίστωσαν ότι μετρώντας την ποσότητα του ενισχυμένου DNA σε κάθε κύκλο, θα μπορούσε η μέθοδος αυτή να καταστεί ποσοτική. Δέκα χρόνια αργότερα, αναπτύχθηκαν ειδικά σχεδιασμένα μηχανήματα, τα οποία συνδυάζοντας έναν θερμικό κυκλοποιητή με ένα οπτικό σύστημα, μπορούσαν να μετρήσουν ένα φθορίζον σήμα σε ένα δείγμα καθ' όλη τη διάρκεια της ενίσχυσης [137]

Η PCR εκμεταλλεύεται τη χρήση των DNA πολυμερασών για να ενισχύσει τμήματα του DNA, χρησιμοποιώντας ειδικά ολιγονουκλεοτίδια για μια αλληλουχία-στόχο, τα οποία έχουν προστεθεί στην αντίδραση και δρουν ως εκκινητές. Το συνηθέστερο από τα ένζυμα αυτά είναι η Taq DNA πολυμεράση (από το θερμόφιλο βακτήριο Thermus aquaticus). Δύο βασικές ικανότητές της την καθιστούν χρήσιμη για την PCR: 1) μπορεί να δημιουργήσει νέες αλυσίδες DNA με τη χρήση ενός εκμαγείου DNA και εκκινητών και 2) είναι θερμοανθεκτική, κάτι που είναι σημαντικό γιατί μετά κάθε κύκλο αντιγραφής, το δίκλωνο DNA (dsDNA) θα πρέπει να αποδιαταχθεί πάλι σε υψηλή θερμοκρασία (95°C). Επομένως, μετά από κάθε κύκλο PCR θα παραχθεί δύο φορές περισσότερο ειδικό dsDNA εφ' όσον η αντίδραση έχει τέλεια απόδοση. Στην πραγματικότητα όμως οι αποδόσεις των αντιδράσεων της PCR δεν είναι τέλειες, επειδή τα αντιδρώντα μόρια καταναλώνονται μετά πολλούς κύκλους και η αντίδραση φτάνει σε σταθερό επίπεδο (plateau) [138].

Επειδή η PCR μπορεί να ενισχύσει επαρκώς μόνο μία ορισμένη ποσότητα DNA πριν από τη φάση κορεσμού (plateau), δεν υπάρχει κανένας τρόπος αξιόπιστου υπολογισμού της ποσότητας του αρχικού μορίου DNA, αφού στη συμβατική PCR το προϊόν παράγεται μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας και δεν μπορεί να ποσοτικοποιηθεί.

Εικόνα 2.4. Διαγραμματική απεικόνιση των σταδίων PCR.

Είναι εμφανές και από την εικόνα 2.4 ότι μια αντίδραση PCR μπορεί να διακριθεί σε τρία διαφορετικά στάδια. Κατά το πρώτο εκθετικό στάδιο, όλα τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε περίσσεια, η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και η ποσότητα του DNA αυξάνεται εκθετικά. Στη γραμμική φάση ο ρυθμός της αντίδρασης μειώνεται καθώς αρχίζει να ελαττώνεται η συγκέντρωση συστατικών όπως τα dNTPs και οι εκκινητές, και η DNA πολυμεράση αρχίζει να χάνει τη δραστικότητά της. Στο τέλος η αντίδραση φτάνει σε πλατώ, καθώς τα συστατικά της αντίδρασης έχουν εξαντληθεί και δεν παράγονται πια άλλα προϊόντα.

Στο διάλυμα της αντίδρασης της PCR προστίθενται η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, το μείγμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), ένα ζεύγος χημικά συντιθέμενων εκκινητών, ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου pH και ιοντικής ισχύος και συγκέντρωση χλωριούχου μαγνησίου. Η τελική συγκέντρωση των τεσσάρων dNTPs (dATP, dTTP, dGTP και dCTP) που κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 50-200μM, επιδρά (αν είναι υψηλότερη της βέλτιστης) στην πιστότητα της αντιγραφής από την Taq πολυμεράση επιτρέποντας την εισαγωγή λανθασμένων δεοξυριβονουκλεοτιδίων και επηρεάζει (σε χαμηλότερες τιμές της) την απόδοση της PCR. Η σύνδεση των Mg2+ στοιχειομετρικά με τα dNTPs δημιουργεί διαλυτά σύμπλοκα, τα οποία ενσωματώνονται ευκολότερα στο προς ενίσχυση μόριο DNA. Τα ιόντα Mg2+ ως συμπαράγοντας της DNA πολυμεράσης, παίζουν καθοριστικό ρόλο στην απόδοση της αντίδρασης PCR, μιας και αυτή ελαττώνεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις τους. Σε αντίθετη περίπτωση παράγονται μη ειδικά προϊόντα

εξαιτίας της σταθερής πρόσδεσης των εκκινητών σε μη συμπληρωματικές θέσεις. Πηγή για τα ιόντα μαγνησίου αποτελεί η προσθήκη $MgCl_2$ στο μείγμα της αντίδρασης [139].

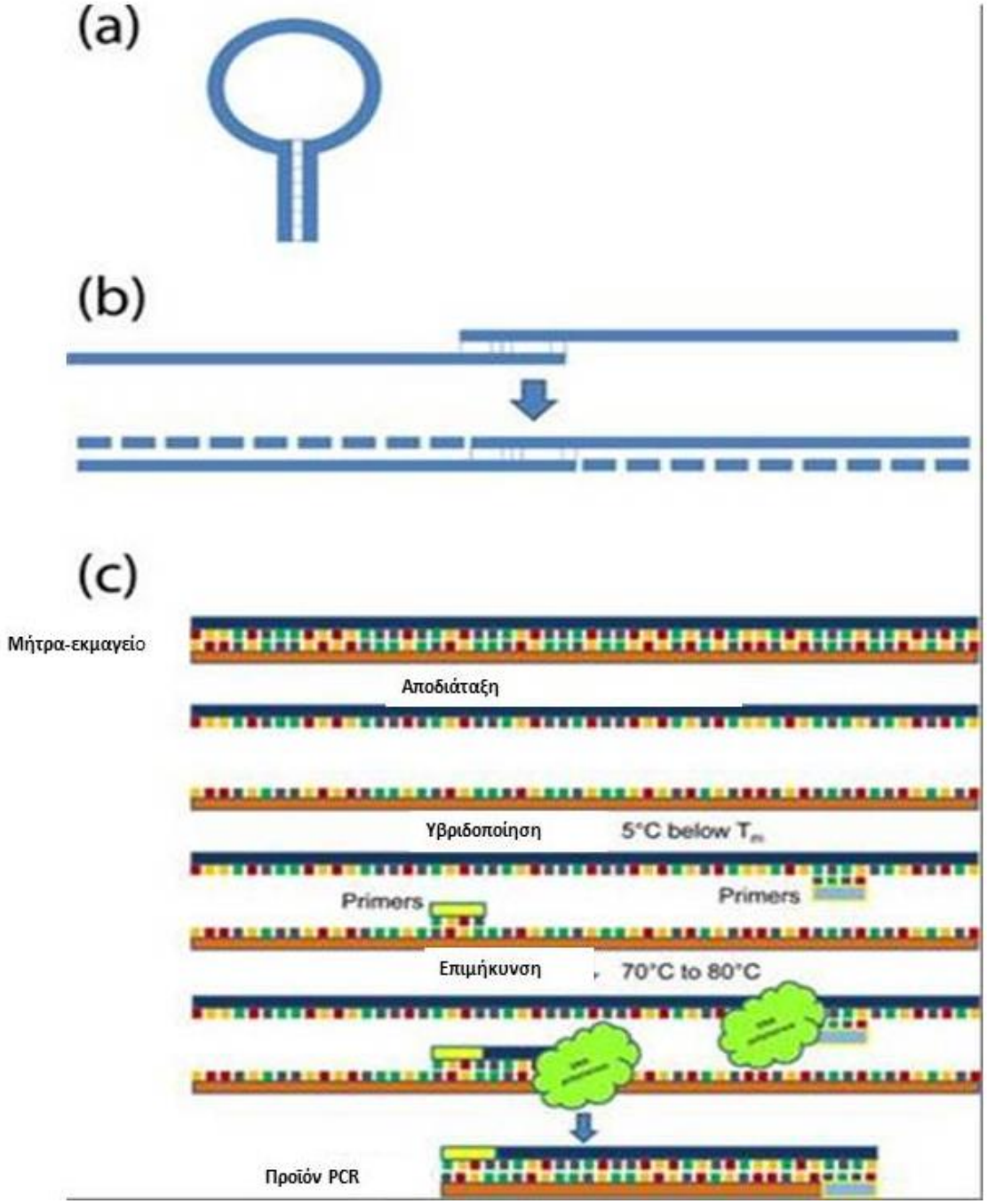
- Σχεδιασμός εκκινητών

Ο σχεδιασμός κατάλληλων εκκινητών είναι απαραίτητος για την επιτυχή έκβαση ενός πειράματος PCR. Κατά το σχεδιασμό ενός συνόλου εκκινητών σε μια συγκεκριμένη περιοχή του DNA που επιλέγεται για ενίσχυση, ένας εκκινητής θα πρέπει να υβριδοποιηθεί στον κλώνο συν, ο οποίος κατά κανόνα προσανατολίζεται στην κατεύθυνση 5 '→ 3' (επίσης γνωστή ως κωδική αλυσίδα), ένας άλλος εκκινητής θα πρέπει να υβριδοποιηθεί στο κλώνο πλην ο οποίος είναι προσανατολισμένος σε κατεύθυνση 3 '→ 5' (αντινοηματική ή μη κωδική αλυσίδα). Υπάρχουν μερικά κοινά προβλήματα που προκύπτουν κατά το σχεδιασμό των εκκινητών: 1) αυτό-υβριδοποίηση των εκκινητών με αποτέλεσμα το σχηματισμό δευτερευόντων δομών όπως οι βρόχοι φουρκέτας (εικόνα 2.5.a), (2) ο ένας εκκινητής υβριδοποιείται με τον άλλο, αντί για το πρότυπο DNA, δημιουργώντας διμερή εκκινητή (εικόνα 2.5.b), 3) δραστικά διαφορετικές θερμοκρασίες τήξης (T_m) για κάθε εκκινητή, καθιστώντας δύσκολη την επιλογή μιας θερμοκρασίας υβριδοποίησης που θα επιτρέψει και στους δύο εκκινητές να δεσμεύονται αποτελεσματικά στην αλληλουχία στόχο τους κατά τη διάρκεια του θεματικού κύκλου (εικόνα 2.5.c) [136].

Ένα γενικό πρωτόκολλο αντίδρασης συμβατικής PCR περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια :

1. Αποδιάταξη αρχικού δείγματος: Θέρμανση στους 95°C ώστε να αποδιαταχθεί το DNA με τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου και τη καταστροφή των δευτεροταγών και τριτοταγών δομών, και να ανοίξει η διπλή έλικα σε δυο μονόκλωνες αλυσίδες.
2. Υβριδισμός: Η θερμοκρασία μειώνεται μεταξύ 50 και 65°C, ώστε να γίνει πρόσδεση των εκκινητών στο DNA-εκμαγείο.
3. Επιμήκυνση: Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, η οποία είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για τη θερμοανθεκτική (Taq) πολυμεράση, όπου και γίνεται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA με τη χρήση δεοξυριβονουκλεοτιδίων του διαλύματος.

4. Αποδιάταξη προϊόντων: Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 95°C ώστε τα μικρά δίκλωνα τμήματα DNA που δημιουργήθηκαν να αποχωριστούν και πάλι και να ξεκινήσει ένας νέος κύκλος.
5. Επαναλαμβάνονται 20-35 κύκλοι των σταδίων 2-4.



Εικόνα 2.5. Συνηθισμένα προβλήματα που προκύπτουν με εκκινητές και ενίσχυση PCR 3 σταδίων του DNA στόχου [136].

2.5.1. Ποιοτικός έλεγχος CNAs

Σε επόμενο βήμα μετά από την πραγματοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων cDNA μέσω της ενίσχυσης ενός γονιδίου αναφοράς (housekeeping gene) και κατόπιν ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.

Το γονίδιο αναφοράς ή γονίδιο ελέγχου για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε έναν δεδομένο οργανισμό θα πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις, δηλαδή να εκφράζεται σε ικανοποιητικά επίπεδα για την εύκολη ανίχνευσή του, να εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα και σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων και εντός του ίδιου τύπου κυττάρου όταν αυτά υποβάλλονται σε διαφορετικούς χειρισμούς και να διατηρούν αυτά τα χαρακτηριστικά σε όσο τον δυνατόν περισσότερους διαφορετικούς τύπους ιστών του οργανισμού [140]. Από βιολογική άποψη, οι θεωρητικές απαιτήσεις για ένα ιδανικό γονίδιο αναφοράς φαίνεται να ταιριάζουν καλύτερα στα γονίδια housekeeping (HK), μια μεγάλη κατηγορία γονιδίων που εκφράζονται ιδιοστατικά, υπόκεινται σε χαμηλά επίπεδα ρύθμισης σε διαφορετικές συνθήκες και εκτελούν βιολογικές ενέργειες που είναι θεμελιώδεις για τις βασικές λειτουργίες του κυττάρου [141]. Στη παρούσα διπλωματική ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της 3-φωσφορικής αφυδρογονάσης της γλυκεραλδεϋδης (GAPDH) [142]. Χρησιμοποιήθηκαν, λοιπόν, οι κατάλληλοι εκκινητές οι οποίοι φαίνονται στον πίνακα 2.2 και πραγματοποιήθηκε επιλεκτική ενίσχυση του γονιδίου και παρατήρηση των αποτελεσμάτων μετά από ηλεκτροφόρηση.

Πίνακας 2.2 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση μέσω PCR του γονιδιίου αναφοράς *GAPDH*.

Κατεύθυνση	**Αλληλουχία (5′→3′)**	**Tm (°C)**	**Μέγεθος προϊόντος (bp)**
Πρόσθιος	5’- CCACATCGCTCAGACACCAT-3’	60.11	223
Ανάστροφος	5’-TGACAAGCTTCCCGTTCTCA-3’	59.24	

Πίνακας 2.3 Αντιδραστήρια και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στη συμβατική PCR.

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση	Όγκος (μL)
DEPC-H2O		18.9
10X KAPA Taq Buffer	1X	2.5
10 mM dNTP Mix	0.2 mM από το καθένα	0.5
10 μM Πρόσθιου εκκινητή	0.4 μM	1
10 μM Οπίσθιου εκκινητή	0.4 μM	1
5 U/μL KAPA Taq DNA Polymerase	0.5 U	0.1
cDNA Υπόστρωμα		1
Σύνολο		25

Πίνακας 2.4: Θερμικό πρωτόκολλο της PCR αντίδρασης για την ενίσχυση των cDNAs του γονίδιου αναφοράς *GAPDH*.

Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
95°C	3 min	1
95°C	30 sec	35
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	30 sec	1
4°C	∞	1

2.5.2. Ποιοτική ανάλυση των προϊόντων της PCR μετά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

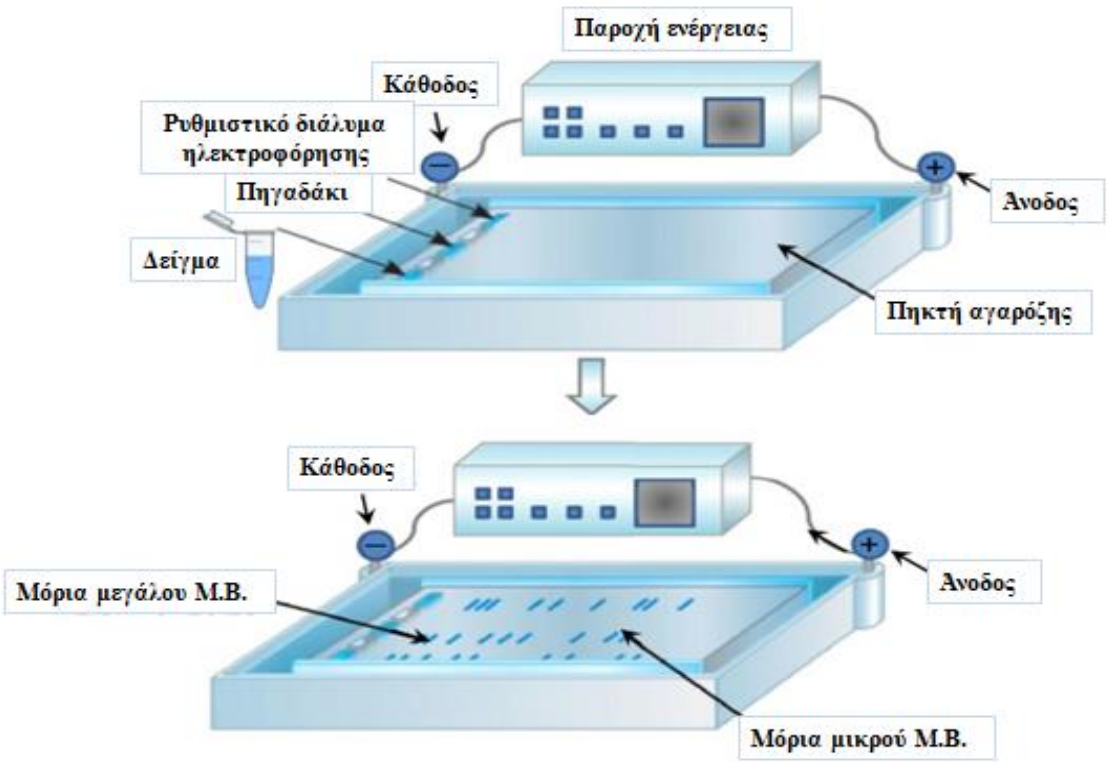
Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε μέσω της ηλεκτροφόρησης, η τεχνική αυτή στηρίζεται στην ικανότητα των δίκλωνων μορίων DNA να κινούνται με διαφορετική ταχύτητα μέσα στο πήκτωμα αγαρόζης, όταν εφαρμοστεί στο διάλυμα που το διαβρέχει ηλεκτρικό πεδίο. Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική διαχωρισμού και ανάλυσης ενός μίγματος ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους, όπως πρωτεϊνών, λιποπρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων, ενζύμων και ισοενζύμων ή μορίων με μικρότερο μοριακό βάρος, όπως τα πεπτίδια ή ακόμη και μίγματος ουσιών με μικρό μοριακό βάρος, όπως τα αμινοξέα και οι βάσεις. Βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος, στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση και μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιαδήποτε δείγμα περιέχει χημικές ενώσεις που φέρουν φορτίο. Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης είναι πολύ σημαντική για:

- τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό μορίων ποικίλου μοριακού βάρους ενός μίγματος
- τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους
- τον προσδιορισμό της καθαρότητας ενός δείγματος
- την απομόνωση, τον καθαρισμό και τον προσδιορισμό ουσιών

Η ηλεκτροφόρηση είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη και βρίσκει εφαρμογές σε διάφορους τομείς, όπως στη βιοχημεία και κλινική χημεία, τη μοριακή βιολογία, τη φαρμακολογία και τοξικολογία, την εγκληματολογία και άλλες επιστήμες. Το βασικό της πλεονέκτημα είναι ότι είναι απλή, φθηνή και εύκολα εφαρμόσιμη, γεγονός που την καθιστά θεμελιώδες εργαλείο στη μοριακή βιολογία και την εργαστηριακή διαγνωστική ιατρική. Η ηλεκτροφόρηση σε τζελ αγαρόζης έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος διαχωρισμού νουκλεϊκών οξέων [143]. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, κατά την ηλεκτροφόρηση φορτισμένα μόρια (π.χ. πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα) μετακινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου στο εσωτερικό πηκτωμάτων ή διαλυμάτων (Εικόνα 2.6). Τα διαφορετικά μόρια κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες και τα συστατικά ενός μίγματος διαχωρίζονται εάν

βρεθούν μέσα σε κατάλληλο ηλεκτρικό πεδίο. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των μορίων αυτών εξαρτάται κυρίως από τους παρακάτω παράγοντες:

- Το καθαρό φορτίο: τα αρνητικά φορτισμένα μόρια μετακινούνται προς την άνοδο (+), ενώ τα θετικά προς την κάθοδο (-). Τα μόρια που φέρουν υψηλό σθένος μετακινούνται γρηγορότερα προς το ηλεκτρόδιο με το αντίθετο φορτίο από μόρια με μικρότερο σθένος.
- Το μέγεθος: η αντίσταση (λόγω της τριβής) που υφίστανται τα μόρια που κινούνται μέσα σε ένα διάλυμα ή ένα πήκτωμα, έχει ως αποτέλεσμα τα μικρά μόρια να κινούνται πιο γρήγορα από τα μεγάλα.
- Το σχήμα: η τριβή επηρεάζεται, επίσης, από το σχήμα του μορίου, με συνέπεια η κινητικότητα να είναι διαφορετική ανάμεσα σε σφαιρικές και ινώδεις πρωτεΐνες ή ανάμεσα σε γραμμικό και κυκλικό DNA.
- Την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου: όσο αυξάνεται η τάση του πεδίου, τόσο αυξάνεται και η κινητικότητα. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμοί στη χρήση υψηλής τάσης για να μην αναπτυχθούν θερμικά φαινόμενα.



Εικόνα 2.6: Σύστημα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η παρατήρηση και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με τη χρήση βρωμιούχο αιθιδίου (EtBr), το οποίο είναι μία χρωστική που παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA (ή του RNA) μέσω σχηματισμού δεσμών Van Der Waals και έχει την ιδιότητα να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Ο φθορισμός του συμπλόκου EtBr-DNA είναι 20-30 φορές ισχυρότερος από αυτόν του ελεύθερου βρωμιούχου αιθιδίου. Η χρήση του απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή γιατί η ουσία έχει μεταλλαξιογόνο δράση.

2.6 Ενίσχυση των εναλλακτικών mRNA του γονιδίου *BIRC5* μέσω touchdown PCR.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μελέτη της έκφρασης των εναλλακτικών ισομορφών του γονιδίου BIRC5 πραγματοποιήθηκε επιλεκτική ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου μέσω PCR. Η τεχνική και το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε βασίστηκε στην αρχή της touchdown PCR η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένη ειδικότητα επιτρέποντας την επιλεγμένη ενίσχυση της προς μελέτη αλληλουχίας, με την τεχνική αυτή εξασφαλίζεται η ενίσχυση της προς μελέτη αλληλουχίας και η απουσία παραπροϊόντων λόγω μη ειδικής υβριδοποίησης των εκκινητών.

Στην touchdown PCR η επιλεγμένη θερμοκρασία κατά το στάδιο του υβριδισμού είναι αρχικά 5˚C–10˚C υψηλότερη από το T_m των εκκινητών. Η παραπάνω τροποποίηση της συμβατικής PCR ευνοεί την δημιουργία άριστων υβριδίων εκκινητών-αλληλουχίας στόχου. Στους επόμενους κύκλους και όσο προχωρά ο πολλαπλασιασμός, η θερμοκρασία υβριδισμού σταδιακά μειώνεται, έτσι ώστε κοντά στο τέλος της PCR η θερμοκρασία υβριδισμού να είναι 2 ως 5˚C πιο χαμηλή από το T_m των εκκινητών. Μέχρι τότε, η ακολουθία στόχος θα έχει υποστεί αρκετούς κύκλους γεωμετρικής ενίσχυσης και ως εκ τούτου θα γίνει το κυρίαρχο προϊόν της PCR. [144]. Στην παρούσα εργασία οι εκκινητές σχεδιάστηκαν μέσω του διαδικτυακού αλγορίθμου Primer-BLAST, προκειμένου να πληρούν τις απαραίτητες προδιαγραφές, αλλά και να στοχεύουν ειδικά τα εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου *BIRC5* (Πίνακας 2.5), ενώ οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων είναι ίδιες με αυτές του πίνακα 4 και ως αρχική θερμοκρασία υβριδισμού ορίστηκαν οι 65˚C, ενώ ορίστηκε 0,3˚C μείωση ανά κύκλο (πίνακας 2.6).

Πίνακας 2.5 Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των μεταγράφων του γονιδίου *BIRC5*.

Κατεύθυνση	Αλληλουχία (5′→3′)	Μήκος (nt)	Tm (°C)
Πρόσθιος	CGCATCTCTACATTCAAGAACTGG	24	59.73
Ανάστροφος	GCCACTGTTACCAGCAGCA	19	60.6

Πίνακας 2.6: Θερμικό πρωτόκολλο της touchdown PCR αντίδρασης για την ενίσχυση των mRNAs του γονιδίου *BIRC5.*

Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
95°C	3 min	1
95°C	30 sec	35
65°C(-0,3°C ανα κύκλο)	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	1 min	1
4°C	∞	1

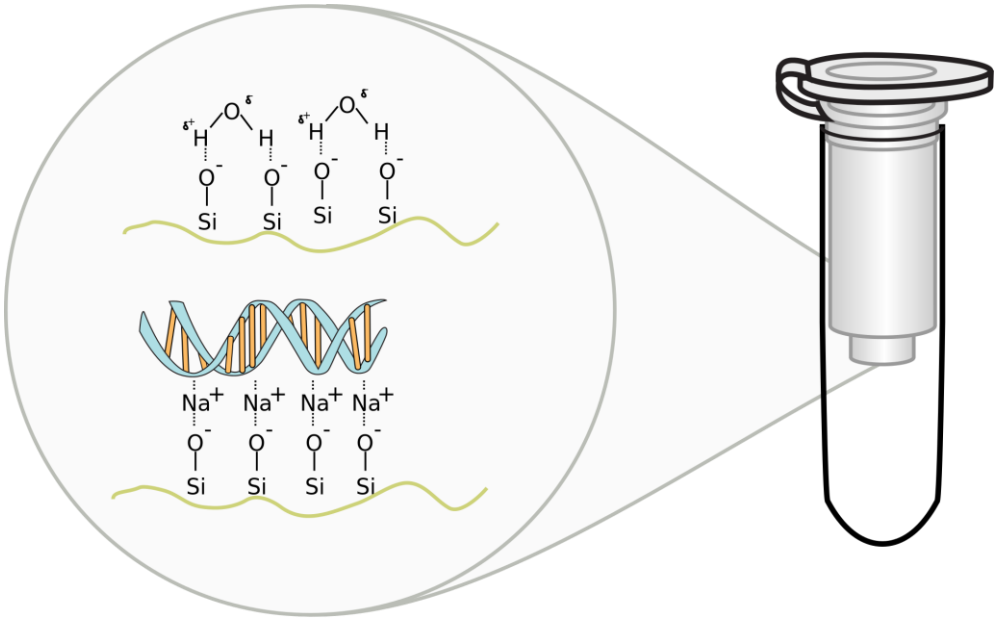
2.7 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.

Μετά το πέρας της touchdown PCR πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης προκειμένου να εξακριβωθεί η επιλεκτική στόχευση και ενίσχυση των εναλλακτικών μεταγράφων του BIRC5. Τα προϊόντα φορτώθηκαν σε gel αγαρόζης πυκνότητας 2% w/v και αφού σημάνθηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο πραγματοποιήθηκε παρατήρησή τους σε ακτίνες UV. Με τον τρόπο αυτό ελέγχτηκε η απουσία παραπροϊόντων και εξασφαλίστηκε η στοχευμένη ενίσχυση των υπό μελέτη μεταγράφων.

2.8 Καθαρισμός των PCR προϊόντων.

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του DNA, προκειμένου το υπόστρωμα το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία της βιβλιοθήκης να είναι όσο το δυνατόν πιο καθαρό και απαλαγμένο από αλλα μόρια όπως RNA, ελεύθερα νουκλεοτίδια και πρωτείνες. Το πρωτόκολλο το οποίο χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο είναι ο καθαρισμός με στήλες.

Η απομόνωση με την τεχνική αυτή βασίζεται στην επιλεκτική και παροδική πρόσδεση των μορίων DNA σε μια μεμβράνη πυριτίου που βρίσκεται στο εσωτερικό κατάλληλης στήλης. Σε συνθήκες υψηλής αλατότητας τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA έχουν μεγάλη συγγένεια προς τα θετικά φορτισμένα μόρια του πυριτίου της μεμβράνης. Η δέσμευση αυτή αναστρέφεται παρουσία ελαφρά αλκαλικού διαλύματος χαμηλής ιοντικής ισχύος και το DNA εκλούεται από τη μεμβράνη (εικόνα 2.7)



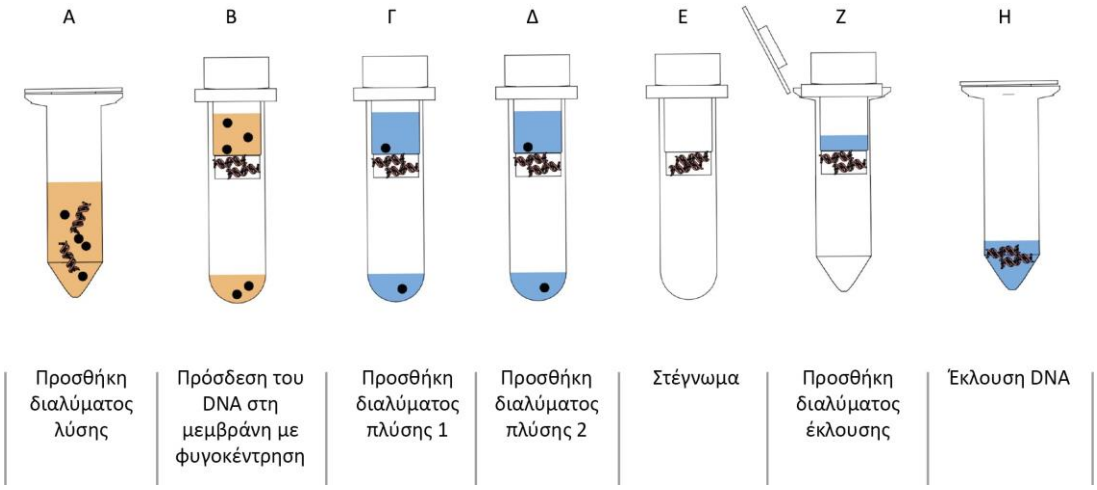
Εικόνα 2.7: Στη μεμβράνη πυριτίου μιας στήλης δεσμεύονται μόρια νερού (A) και μόρια DNA παρουσία διαλύματος υψηλής αλατότητας (B). Εικόνα: «Qiagen Mini Spin Column» από Squidonius (talk), με άδεια Public Domain. Πηγή: Wikimedia Commons.

Τα στάδια που ακολουθούνται για τον καθαρισμό DNA είναι:

- Λύση των κυττάρων του δείγματος παρουσία ενός διαλύματος χαοτροπικών αλάτων και πρωτεϊνάσης K. Στη συνέχεια προστίθεται

αιθανόλη για διαμόρφωση κατάλληλων συνθηκών για την πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη (εικόνα 2.8 Α) .

- Τα δείγματα φορτώνονται στη στήλη και κατά τη φυγοκέντρηση τα μόρια DNA προσροφώνται στη μεμβράνη, ενώ οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες, τα πολυσακχαρίδια και τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά τη διαπερνούν και συλλέγονται σε κατάλληλο σωληνάριο (εικόνα 2.8 Β).
- Το DNA παραμένει προσδεδεμένο στη μεμβράνη, ενώ γίνεται περαιτέρω απομάκρυνση αλάτων και τμημάτων πρωτεϊνών με δύο διαδοχικές πλύσεις με κατάλληλα διαλύματα με αιθανόλη (εικόνα 2.8 Γ και Δ).
- Η μεμβράνη στεγνώνεται με φυγοκέντρηση (εικόνα 2.8 Ε).
- Το καθαρό DNA εκλούεται από τη μεμβράνη με ελαφρά αλκαλικό διάλυμα χαμηλής αλατότητας



Εικόνα 2.8 Στάδια απομόνωσης DNA με στήλες που φέρουν μεμβράνη πυριτίου.

Η καθαρότητα του τελικού υποστρώματος αξιολογήθηκε με φασματοφωτομετρία με την ίδια αρχή μεθόδου και υπολογισμού που περιγράφηκε στην ενότητα 2.3.

2.9 Αλληλούχηση επόμενης γενιάς

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η μέθοδος αλληλούχησης νέας γενιάς με τον αναλυτή PGM (Personal Genome machine) της Ion Torrent βασίζεται στην τεχνολογία ημιαγωγού, η οποία ανιχνεύει τα πρωτόνια που απελευθερώνονται εξαιτίας της σύνδεσης νουκλεοτιδίων, μόνο σε περίπτωση που βρεθεί συμπληρωματικότητα, κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης ακινητοποιημένων αλυσίδων DNA πάνω σε ειδικά σφαιρίδια. Η διαδικασία γίνεται σε τέσσερα στάδια: την προετοιμασία των βιβλιοθηκών, την PCR γαλακτώματος (Emulsion PCR), την αλληλούχηση και την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Πριν από την κατασκευή της βιβλιοθήκης πραγματοποιείται φωτομέτρηση του δείγματος DNA και αραίωση τους.

2.9.1 Κατασκευή και ποσοτικοποίηση βιβλιοθήκης

Η κατασκευή βιβλιοθήκης, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την αλληλούχηση νέας γενιάς αποτελεί το επόμενο βήμα από τη στιγμή που απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν τα επιθυμητά προς αλληλούχηση προϊόντα PCR. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit.

Στο συγκεκριμένο Kit περιέχονται τα παρακάτω αντιδραστήρια (Ion Shear™ Plus Reagents):

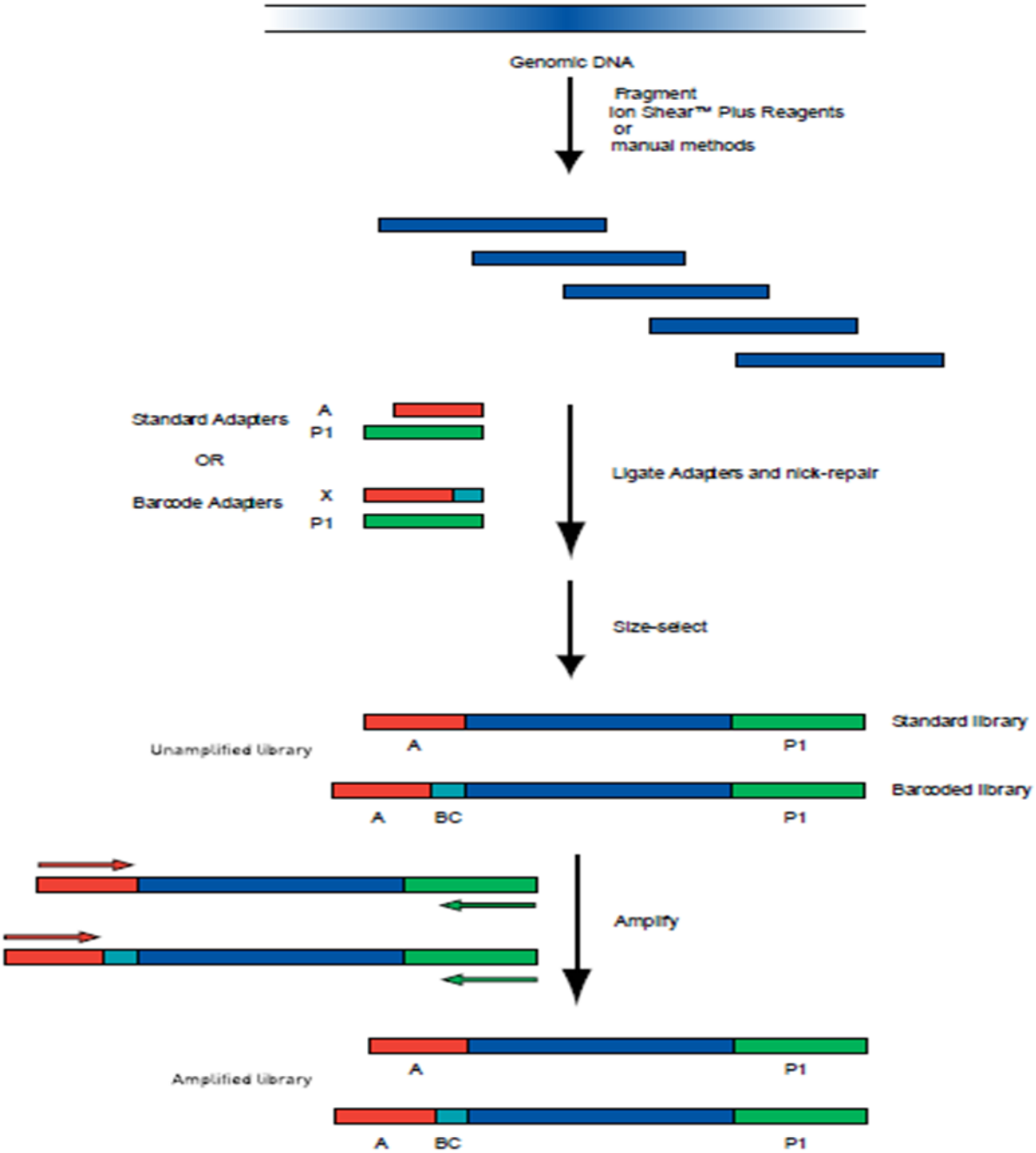
- Ion Shear™ Plus 10X Reaction Buffer
- Ion Shear™ Plus Enzyme Mix II
- Ion Shear™ Plus Stop Buffer
- Low TE

Σκοπός μας σε αυτό το σημείο είναι να κόψουμε ενζυμικά τα PCR προϊόντα σε ένα επιθυμητό μέγεθος (300-400bp) δημιουργώντας παράλληλα δίκλωνα θραύσματα. Αυτό μας εξυπηρετεί διότι στη συνέχεια εκμεταλλευόμαστε τα άκρα των δίκλωνων θραυσμάτων ώστε να συνδέσουμε πάνω τους ολιγονουκλεοτιδικά τμήματα καθορισμένης αλληλουχίας (adapters). Αυτό επιτυγχάνεται με τη δράση της λιγάσης η οποία καταλύει τη σύνδεση του 3'-OH άκρου ενός μορίου DNA με το 5 –PO_3 άκρο ενός δεύτερου μορίου σε

δίκλωνες περιοχές και στη συνέχεια ακολουθεί επιδιόρθωση των τμημάτων στα οποία υπάρχουν κενά λόγω της δράσης της λιγάσης (nick repair).

Η διαδικασία ξεκινά χρησιμοποιώντας ίση ποσότητα από κάθε κυτταρική σειρά προέλευσης η οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή βιβλιοθήκης. Ακολουθεί ο τεμαχισμός του DNA με ενζυμικές μεθόδους με τη χρήση των αντιδραστηρίων Ion Shear™ Plus Reagents και στη συνέχεια έχουμε τη σύνδεση των Adapters και τη διαδικασία επιδιόρθωσης (εικόνα 2.9).

Τέλος αφού έχει κατασκευαστεί η βιβλιοθήκη μας που φέρει συνδεδεμένα τα ολιγονουκλεοτιδικά τμήματα καθορισμένης αλληλουχίας (adapters), είναι απαραίτητο να γίνει η επιλογή των τμημάτων εκείνων που φέρουν το επιθυμητό μέγεθος (200-300bp) καθώς μπορεί η ενζυμική πέψη να έγινε για συγκεκριμένο χρόνο που παράγει θραύσματα επιθυμητού μήκους, ωστόσο δεν είναι μια αυστηρή διαδικασία και σίγουρα θα υπάρχουν πολλά άλλα μεγαλύτερου ή μικρότερου μήκους θραύσματα τα οποία δεν θέλουμε να τα συμπεριλάβουμε στην αλληλούχηση που θα ακολουθήσει. Η επιλογή έγινε ηλεκτροφορητικά με τη χρήση του E-Gel® Precast Agarose Electrophoresis System. Η ποσοτικοποίηση της βιβλιοθήκης έγινε σύμφωνα με το Ion Library Quantitation kit. Δημιουργείται έτσι μία πρότυπη καμπύλη αναφοράς με τη χρήση μίας πρότυπης βιβλιοθήκης η οποία χρησιμοποιείται για τη ποσοτικοποίηση της βιβλιοθήκης με TaqMan® real-time PCR.

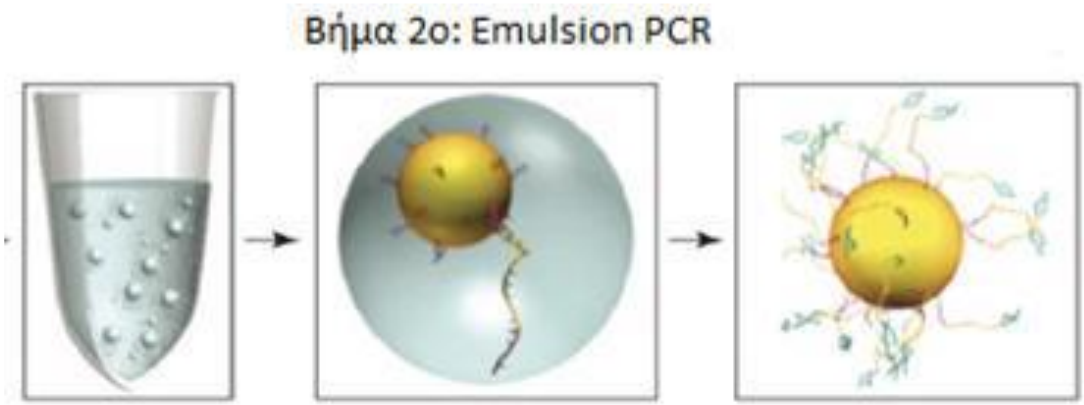


Εικόνα 2.9. Σχηματική παρουσίαση διαδικασίας κατασκευής βιβλιοθήκης.

2.9.2 Προετοιμασία - εμπλουτισμός εκμαγείου αλληλούχησης και αλληλούχηση νέας γενιάς

Επόμενο στάδιο μετά την κατασκευή βιβλιοθήκης είναι η προετοιμασία του εκμαγείου αλληλούχησης (Template preparation). Για την κατασκευή του εκμαγείου χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια και μηχανήματα:

- Ion PGM™ Template OT2 Solutions 200 Kit:
- Nuclease-Free Water
- Ion OneTouch™ Reaction Oil
- Ion OneTouch™ Recovery Solution
- Ion PGM™ Template OT2 Supplies 200 Kit:
- Ion OneTouch™ Enzyme Mix
- Ion OneTouch™ 2X Reagent Mix
- Ion OneTouch™ 200 Ion Sphere™ Particles
- Ion OneTouch™ Plus Reaction Filter Assembly
- Ion OneTouch™ 2 instrument (Εικόνα 16)



Εικόνα 2.10: Το στάδιο της PCR γαλακτώματος. Προσαρμογή από (Mardis, 2008)

Σημειώνεται πως η διαδικασία αναφέρεται στο πρωτόκολλο και ως προετοιμασία προτύπου (template preparation). Ως εκμαγείο ορίζεται ένα σφαιρίδιο στο οποίο είναι συνδεδεμένα πολλά πανομοιότυπα αντίγραφα ενός μονόκλωνου τμήματος ssDNA.

Σε αυτό το βήμα. τα προϊόντα της βιβλιοθήκης ssDNA ανακατεύονται με τα ειδικά σφαιρίδια ISPs (Ion Sphere Particles). Πραγματοποιείται γαλακτωματοποίηση του μίγματος ώστε να συνδεθούν τα τμήματα DNA με τα σφαιρίδια και να βρεθούν έγκλειστα σε υδρόφοβα μικροσταγονίδια. Οι

αντιδράσεις πραγματοποιούνται με τη βοήθεια του συστήματος Ion OneTouch System, το οποίο αποτελείται από δύο συσκευές, το Ion OneTouch 2 Instrument και Ion OneTouch ES. Μετά το τέλος της διαδικασίας, το ιδανικό σενάριο είναι ένα σφαιρίδιο με ένα μόριο βιβλιοθήκης έγκλειστο σε ένα υδρόφοβο μικροσταγονίδιο. Στη συνέχεια αυτό το μόριο βιβλιοθήκης ενισχύεται ώστε να βρίσκονται πολλά στο ίδιο σφαιρίδιο, όπως φαίνεται στην εικόνα 2.10. Η ενίσχυση της βιβλιοθήκης, ώστε να δημιουργηθούν πολλά αντίγραφα του μονόκλωνου αρχικού τμήματος ssDNA έχει ως σκοπό την ενίσχυση του χημικού σήματος της αντίδρασης επιμήκυνσης του κλώνου, την αύξηση, δηλαδή, της ποσότητας των παραγόμενων κατιόντων υδρογόνου [145].

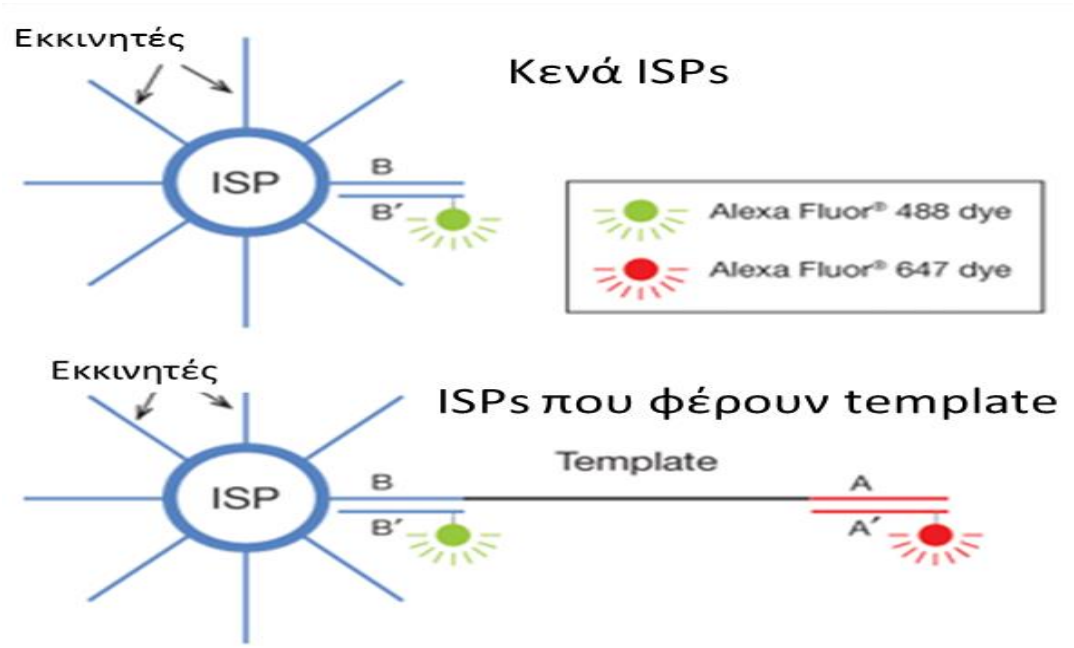
Εικόνα 2.11: Το Ion One Touch System, στο οποίο γίνεται η ενίσχυση του προτύπου και ο εμπλουτισμός της βιβλιοθήκης (www.thermofisher.com)

Μετά την διαδικασία του emulsion PCR για την προετοιμασία του εκμαγείου αλληλούχησης ακολουθεί ο φασμοτοφωτομετρικός έλεγχός της για να διαπιστώσουμε αν το προϊόν που έχουμε πάρει είναι κατάλληλο για να προχωρήσει σε αλληλούχηση.

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούμε:

- Ion Sphere™ Quality Control Kit
- Qubit® 2.0 Fluorometer (φασματοφωτόμετρο)

Στο στάδιο αυτό με την βοήθεια δύο χρωστικών των α) Alexa Fluor® 647 και β) Alexa Fluor® 488 καθορίζεται φθορισμομετρικά στο Qubit® 2.0 Fluorometer η πιθανότητα να έχουμε μια επιτυχή αλληλούχηση αν χρησιμοποιήσουμε το συγκεκριμένο εκμαγείο αλληλούχησης. Πιο αναλυτικά (Εικόνα 2.12) η χρωστική (β) σημαίνει τόσο την αλληλουχία που βρίσκεται αγκυροβολημένη πάνω στο ISP (εκκινητής ISP) όσο και περιοχές του template (τμήματα δηλαδή απο το εκμαγείο αλληλούχησης). Από την άλλη μεριά η χρωστική (α) υπάρχει μόνο στις περιοχές του template που δημιουργείται πάνω στα ISPs (δηλαδή την φέρουν εκείνα τα σφαιρίδια μόνο όπου πάνω τους ενισχύονται τα τμήματα της βιβλιοθήκης). Ο λόγος αυτών των δύο χρωστικών καθορίζει τελικά το ποσοστό των σφαιριδίων ISPs που φέρουν πάνω τους template. Προκύπτει, ανάλογα και με τις απαιτήσεις του κάθε πειράματος, ότι ένα ποσοστό 15-30% σφαιριδίων που φέρουν template είναι ιδανικό για να προσχωρήσουμε σε αλληλούχηση. Ποσοστά κάτω από 15% δείχνουν πολλά κενά ISPs ενώ ποσοστά πάνω από 30% είναι πιθανό να μην δίνουν καλά αποτελέσματα καθώς προδιαθέτουν για μεγάλο αριθμό πολυκλωνικών ISPs.



Εικόνα 2.12: Μεθοδολογία ποιοτικού ελέγχου εκμαγείου αλληλούχησης.

Αφού διαπιστώσουμε με την παραπάνω διαδικασία ότι το εκμαγείο αλληλούχησης είναι κατάλληλο για να συνεχίσουμε, προχωρούμε στο επόμενο στάδιο που είναι ο εμπλουτισμός του εκμαγείου μας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούμε:

- Ion OneTouch™ Wash Solution
- MyOne™ Beads Wash Solution
- Nuclease-Free Water
- Dynabeads® MyOne ™ Streptavidin C1 Beads
- Ion OneTouch™ ES (Εικόνα 5)

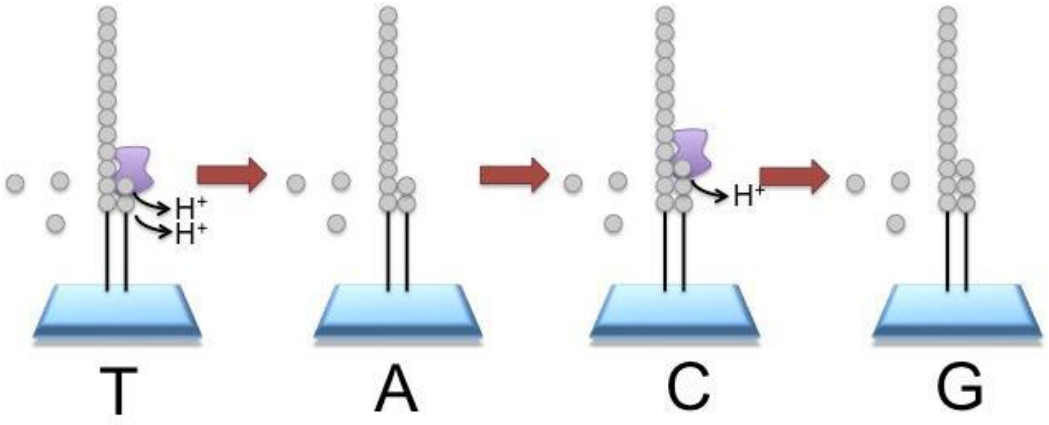
Στη συσκευή IonOneTouch™ ES γίνεται αυτοματοποιημένα όλη η διαδικασία του εμπλουτισμού του εκμαγείου αλληλούχησης. Σκοπός αυτής της διεργασίας είναι να απομακρυνθούν τα ISPs τα στα οποία δεν έχει γίνει ενίσχυση της βιβλιοθήκης μας δηλαδή είναι κενά. Για τον σκοπό χρησιμοποιούνται μαγνητικά σφαιρίδια που είναι καλυμμένα με στρεπταβιδίνη (Dynabeads® MyOne™ StreptavidinC1 Beads). Παράλληλα τα ISP τα οποία φέρουν εκμαγείο έχουν τα θραύσματα της βιβλιοθήκης που έχουν πολλαπλασιαστεί πάνω τους στη μία πλευρά βιοτινυλιωμένα. Έχουμε έτσι μια θετική επιλογή των φορτωμένων με εκμαγείο ISPs με τη βοήθεια του συστήματος βιοτίνης-στρεπταβιδίνης. Τα καλυμμένα με στρεπταβιδίνη μαγνητικά σφαιρίδια συμπλοκοποιημένα πλέον με τα ISPs που φέρουν εκμαγείο (βιοτινυλιωμένα άκρα στα θραύσματα βιβλιοθήκης), χωρίζονται με τη βοήθεια μαγνήτη και ακολουθεί ξέπλυμα και απομάκρυνση των άδειων ISPs.

Μετά τη διαδικασία του εμπλουτισμού του εκμαγείου αλληλούχησης ακολουθεί η διαδικασία αλληλούχησης νέας γενιάς σε ημιαγωγό στο σύστημα Ion Torrent Personal Genome Machine™ (Εικόνα 2.13) με τη χρήση των αντιδραστηρίων που περιλαμβάνονται στο Ion PGM™ Sequencing 400 Kit v2.

Εικόνα 2.13: Σύστημα Ion Torrent Personal Genome Machine™.

Κατά την τελική διαδικασία αλληλούχησης πραγματοποιείται ο εφοδιασμός του μηχανήματος με τα κατάλληλα αντιδραστήρια (ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου pH και dNTPs) και ξεκινά η προετοιμασία του μηχανήματος όπου ελέγχονται και ρυθμίζονται αυτόματα από το ίδιο το μηχάνημα όλα τα συστήματα του πριν προχωρήσουμε στην εισαγωγή του εκμαγείου αλληλούχησης. Στο στάδιο αυτό το διάλυμα που περιέχει τα ενισχυμένα, πλέον, σφαιρίδια φορτώνεται σε ειδικό ημιαγωγό (chip αλληλούχησης) που περιέχει εκατομμύρια εσοχές-ανιχνευτές. Σε κάθε εσοχή ιδανικά εναποτίθεται ένα, μόνο, σφαιρίδιο με μονόκλωνο ενισχυμένο ssDNA. Στο chip στη συνέχεια εισέρχονται διαδοχικά διαλύματα (flows) μονονουκλεοτιδίων. Η εισαγωγή μιας βάσης αποτελεί ένα flow, ενώ με την ολοκλήρωση εισαγωγής τεσσάρων βάσεων ολοκληρώνεται ένας κύκλος αντίδρασης. Στις νεότερες πλατφόρμες PGM ένας κύκλος έχει τροποποιηθεί ώστε να έχει μια περίοδο 32 βάσεων. Σε περίπτωση που το μονονουκλεοτίδιο που εισήχθη είναι το συμπληρωματικό, τότε επιτυγχάνεται σύνδεση και παράγεται ως παραπροϊόν ένα πρωτόνιο (ιόν υδρογόνου). Η απελευθέρωση του πρωτονίου θα αλλάξει το pH του διαλύματος στο μικροπεριβάλλον της εσοχής και αυτή η αλλαγή θα αναγνωρισθεί από τον ανιχνευτή ως σήμα συμπληρωματικότητας. Αν δεν υπάρχει συμπληρωματικότητα για το συγκεκριμένο μονονουκλεοτίδιο τότε

αυτό θα απομακρυνθεί και θα αντικατασταθεί από το επόμενο χωρίς ο ανιχνευτής να αναγνωρίσει κάποια μεταβολή στο pH. Η όλη διαδικασία συνεχίζεται διαδοχικά σε κύκλους και η χημική πληροφορία μετατρέπεται σε ψηφιακή.



Εικόνα 2.14: Σχηματική απεικόνιση των αντιδράσεων που συμβαίνουν κατά την επιμήκυνση. Ο ανιχνευτής ανιχνεύει το πρωτόνιο που απομακρύνεται από το υδροξύλιο του 3' άκρου του νουκλεοτιδίου της συντιθέμενης αλυσίδας, εφόσον το μονονουκλεοτίδιο που εκείνη τη στιγμή πλημυρίζει το σύστημα είναι το συμπληρωματικό (http://www.ebi.ac.uk/).

2.9.3 Βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων αλληλούχησης

Μετά το τέλος της αλληλούχησης νέας γενιάς ακολουθεί η συλλογή δεδομένων και η ανάλυση τους. Το παρεχόμενο από την εταιρεία Applied Biosystems λογισμικό (Torrent Suite™ software) που συνόδευε τον αλληλουχητή χρησιμοποιήθηκε για την οργάνωση και παρακολούθηση της πορείας αλληλούχησης μέσα από ηλεκτρονικό υπολογιστή (Torrent server) καθώς επίσης και για την διαχείριση των δεδομένων μετά το τέλος της αλληλούχησης. Κατά τη διεξαγωγή της αλληλούχησης μπορούμε να λαμβάνουμε πληροφορίες σχετικά με την πορεία του πειράματος μέσω του server. Αυτό είναι εφικτό μέσω 3 γραφημάτων: 1) του <<heatmap>> (κάτοψη του chip) που μας παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη πυκνότητα των Isps, που εξαρτάται από τη πυκνότητα της βιβλιοθήκης. Πιο συγκεκριμένα, μέσω του heatmap λαμβάνουμε πληροφορίες σχετικά με το ποσοστό % πληρότητας των wells, 2) στατιστικά στοιχεία σχετικά με την ποιότητα της αλληλούχισης και 3) ιστόγραμμα μήκους των reads. Στα δεδομένα του πειράματος έχουμε πρόσβαση μέσω μιας ειδικής πλατφόρμας περιήγησης (Torrent Browser) και

από εκεί μπορούμε να «κατεβάσουμε» στον Η/Υ μας τα δεδομένα σε μορφή αρχείου FASTQ (εικόνα 2.15). Το αρχείο FASTQ είναι αρχείο κειμένου που χρησιμοποιείται για την αποθήκευση δεδομένων αλληλουχιών με τα quality scores τους [146]. Οι πλατφόρμες αλληλούχησης συνήθως αποθηκεύουν τα δεδομένα που παράγονται σε μορφή FASTQ [147]. Ακολουθεί το μοτίβο 4 σειρών που αντιστοιχούν σε ένα read που αλληλουχήθηκε. Το μοτίβο αυτό επαναλαμβάνεται εκατομμύρια φορές μέσα στο αρχείο [148]. Πιο συγκεκριμένα, η διμή και η μορφολογία των αρχείων FASTQ είναι η ακόλουθη:

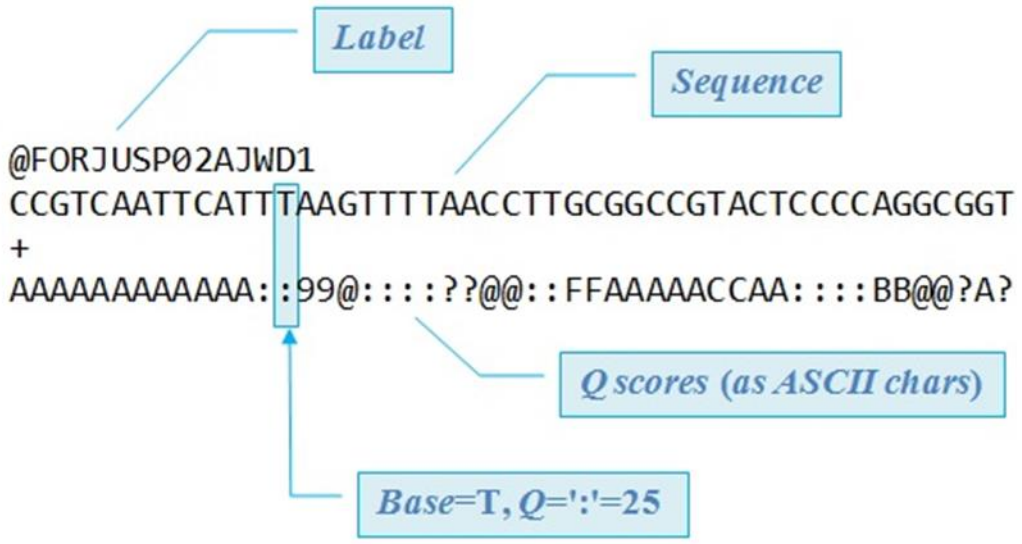
Η πρώτη σειρά ξεκινά με το σύμβολο «@» ακολουθούμενο με κάποιο αναγνωριστικό για το read, όπως και στο αρχείο FASTA με τη διαφορά ότι δεν έχουμε το σύμβολο «>».

Η δεύτερη σειρά είναι η αλληλουχία.

Η τρίτη σειρά περιλαμβάνει μόνο το σύμβολο «+».

Η τέταρτη σειρά είναι πάντα αντίστοιχη της δεύτερης σειράς και περιλαμβάνει κωδικοποιημένα τα quality scores κάθε βάσης.

Το αρχείο FASTQ έγινε upload στην online (free public) πλατφόρμα επεξεργασίας και ανάλυσης δεδομένων Galaxy (https://usegalaxy.org/). Επιτρέπει πολυεπίπεδες υπολογιστικές αναλύσεις και ενοποίηση δεδομένων (data integration) σε δεδομένα που έχουν γίνει upload. Αναγνωρίζει διάφορες μορφές αρχείου και μπορεί να κάνει μετατροπές από τη μία μορφή σε κάποια άλλη. Προσφέρει εργαλεία οργάνωσης των δεδομένων και επεξεργασίας κειμένου επιτρέποντας τροποποιήσεις που δεν είναι εφικτές με συμβατικά προγράμματα. Αρχικά είχε εργαλεία για ανάλυση κυρίως γονιδιώματος αλλά τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται και στην ανάλυση γονιδιακής έκφρασης, στη συναρμολόγηση γονιδιώματος, στην πρωτεομική, στην επιγονιδιωματική και στη μελέτη του μεταγραφώματος [148]. Χρησιμοποιήθηκε λοιπόν το εργαλείο FastQC της πλατφόρμας Galaxy, για έλεγχο της ποιότητας των πρωτογενών δεδομένων (raw data). Το εργαλείο αυτό προσφέρει μία σειρά στατιστικών αναλύσεων που παρέχουν πληροφορίες για πιθανά προβλήματα πριν την συνέχιση της εκάστοτε ανάλυσης.



Εικόνα 2.15: Δομή και μορφολογία αρχείου FASTQ.

Τα δεδομένα αλληλούχησης στη μορφή FASTQ δεν είναι εύχρηστα στην ανάλυση και γι' αυτό το λόγο θέλουμε αφενός να τα στοιχίσουμε στο γονιδίωμα αναφοράς και αφετέρου να το οπτικοποιήσουμε αυτό το αποτέλεσμα ώστε να διευκολυνθεί η ανάλυση. Το λογισμικό Torrent Suite™ παρέχει τη δυνατότητα στοίχισης των δεδομένων μέσω του προγράμματος TMAP (The Torrent Mapping Alignment Program for Ion Torrent Data) το οποίο βασίζεται σε 4 αλγόριθμους στοίχισης, τους BWA-short (Li and Durbin, 2009), BWA-long (Liand Durbin, 2010), SSAHA (Ning et al, 2001), Super-maximal Exact Matching (Li 2012). Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονίσουμε ότι το τελικό αρχείο .FASTQ δεν αποτελεί ακριβώς τα πηγαία δεδομένα αλλά είναι τα δεδομένα από τα οποία ο υπολογιστής (Torrent server) έχει κόψει από τις άκρες των αλληλουχιών τους adapters που χρησιμοποιήθηκαν κατά την κατασκευή βιβλιοθήκης. Τελικώς η στοίχιση των δεδομένων του αρχείου .FASTQ έγινε με τη χρησιμοποίηση μιας ελεύθερης στο διαδίκτυο πλατφόρμας (GALAXY) η οποία παρέχει πλήθος βιοπληροφορικών εργαλείων για την ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης νέας γενιάς. Αυτό είναι ένα εξαιρετικά σημαντικό πλεονέκτημα καθώς ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να μεταβάλει, όπως ο ίδιος θεωρεί καλύτερο για τους σκοπούς του πειράματός του, διάφορες παραμέτρους και να παίρνει διαφορετικά αρχεία που τον βοηθούν στην ανάλυση.

Στοίχιση μέσω HISAT2

Το αρχείο FASTQ που προέκυψε, χρησιμοποιήθηκε ως input για τον αλγόριθμο HISAT2 με τη ρύθμιση συγκεκριμένων παραμέτρων. Ο HISAT2 αρχικά ευθυγραμμίζει τα reads στο μεταγράφωμα (προαιρετικό βήμα) βελτιώνοντας την ευαισθησία και ακρίβεια της ευθυγράμμισης, ενώ μειώνεται και ο χρόνος εκτέλεσης του αλγορίθμου. Μετά την ευθυγράμμιση στο μεταγράφωμα αναφοράς, μερικά reads που αντιστοιχούν σε άγνωστα μετάγραφα ή είναι κακής ποιότητας δεν ευθυγραμμίζονται, ενώ μερικά reads ευθυγραμμίζονται εσφαλμένα. Ο HISAT2 ευθυγραμμίζει αυτά τα reads στο γονιδίωμα αναφοράς. Όσα reads περιέχουν ολόκληρα εξόνια ευθυγραμμίζονται, ενώ όσα εκτείνονται σε συρραφή εξονίων δεν ευθυγραμμίζονται. Χρησιμοποιώντας τα reads που παραμένουν από το προηγούμενο βήμα, ο HISAT2 αναζητά νέες θέσεις συρραφής εξονίων με βάση τα γνωστά σήματα ματίσματος (GT-AG, GC-AG, και AT-AC). Επιτρέπει μάλιστα στον χρήστη να επέμβει σε αρκετές από τις παραμέτρους βάσει των οποίων θα εκτελέσει τους υπολογισμούς. Ανιχνεύει επίσης γεγονότα διπλασιασμών, ελλειμάτων και συγχωνεύσεων γονιδίων, αλλά δεν χρειάστηκαν τα αποτελέσματα αυτά στα πλαίσια της παρούσας εργασίας. Κατόπιν μετά από αυτά τα βήματα, κάποια από τα reads μπορεί να ευθυγραμμίστηκαν εσφαλμένα, με αποτέλεσμα να υπάρχουν μικρές προεξέχουσες αλληλουχίες (3-4 βάσεις) σε θέσεις ιντρονίων. Ο HISAT2 ελέγχει για τέτοιες περιπτώσεις και διορθώνει την ευθυγράμμισή τους [149]. Τα αρχεία που προκύπτουν είναι τα BAM και BED. Το αρχείο BAM περιέχει αλληλουχίες που έχουν στοιχηθεί επιτυχώς στο reference ενώ το BED μόνο reads με splice junctions [150].

Οπτικοποίηση με IGV (Integrative Genome Viewer)

Τα αρχεία BAM και BED οπτικοποιήθηκαν και αναλύθηκαν με το πρόγραμμα περιήγησης γονιδιωμάτων Integrative Genome Viewer (IGV). Η οπτικοποίηση των δεδομένων είναι απαραίτητη στην ανάλυση αλληλουχιών. Ωστόσο, το μέγεθος και η ποικιλία των δεδομένων που παράγονται αποτελούν σημαντική πρόκληση. Το IGV είναι πρόγραμμα υψηλής αποτελεσματικότητας τόσο στην ποικιλία των μορφών αρχείου δεδομένων

που υποστηρίζει, όσο και στον όγκο τους, επιτρέποντας την ομαλή διαδραστική περιήγηση σε όλα τα επίπεδα εστίασης στο γονιδίωμα, από επίπεδο χρωμοσώματος μέχρι το επίπεδο νουκλεοτιδικής βάσης, ενώ είναι και ιδιαίτερα φιλικό προς τον χρήστη [151]. Υπάρχουν και άλλα εργαλεία απεικόνισης βιολογικών δεδομένων όπως τα Tablet, BamView, Savant και Artemis, όμως το IGV έχει το μεγαλύτερο εύρος σε αρχεία που αναγνωρίζει, επιτρέποντας ενοποιημένες αναλύσεις, όπως στην περίπτωση μας που ήταν σημαντική η απεικόνιση των αρχείων BAM και BED ταυτόχρονα.

Εκτός από την ανάλυση με τα HISAT2 και IGV, πραγματοποιήθηκε η διερεύνηση των εναλλακτικών συμβάντων ματίσματος στο παραγόμενο αρχείο FASTQ με τον ενσωματωμένο αλγόριθμο ASDT, ο οποίος σχεδιάστηκε για να ανιχνεύει νέα εναλλακτικά γεγονότα συναρμολόγησης και νέα εξώνια από υψηλή απόδοση αλληλουχία πρωτογενών δεδομένων [152].

2.10 Ανάλυση του προφίλ έκφρασης των νέων *BIRC5* μεταγράφων με PCR και ηλεκτροφόρηση

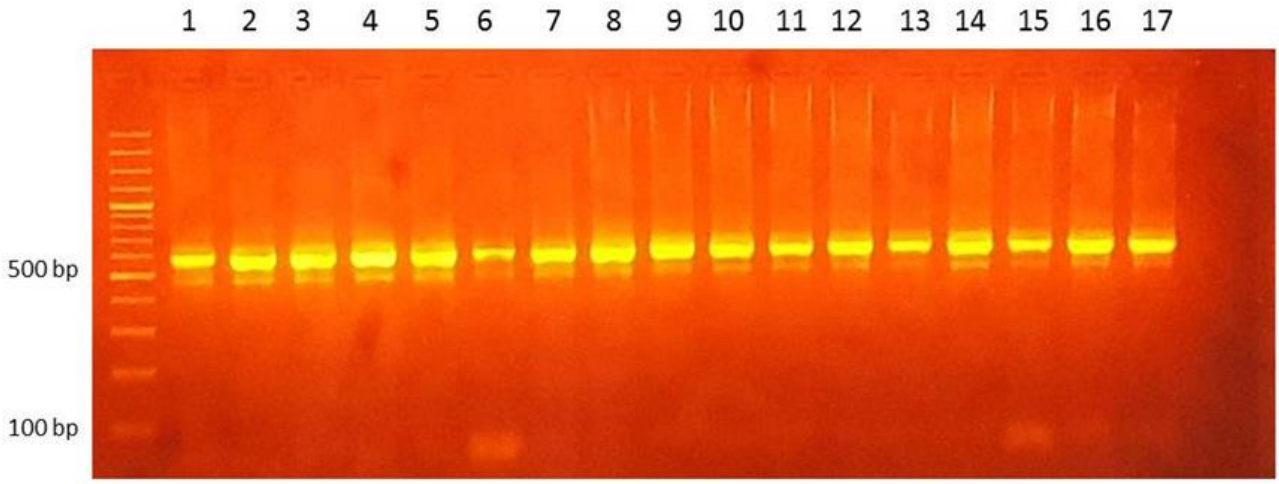
Η επικύρωση των ευρημάτων έγινε με χρήση της μεθόδου αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και με τη χρήση διαφορετικών set εκκινητών για κάθε μετάγραφο που θέλαμε να ερευνηθεί. Ο σχεδιασμός των εκκινητών πραγματοποιήθηκε στη πλατφόρμα Primer-BLAST και έτσι σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές για PCR ώστε να στοχεύουν τις νέες θέσεις συρραφής, προκειμένου να ταυτοποιηθούν νέα mRNA μετάγραφα του Survivin και να καθοριστούν τα όρια εξωνίων/ιντρονίων κάθε μεταγράφου (Πίνακας 2.7). Το θερμικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε καθώς και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων είναι οι ίδιες με αυτές που παρουσιάζονται στην ενότητα 2.5.1 στους πίνακες 2.3 και 2.4. Μετά το πέρας της επιλεκτικής ενίσχυσης του κάθε μεταγράφου πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πύκτωμα αγαρόζης για την επικυρωση ή όχι της έκφρασης των μεταγράφων στον εκάστοτε τύπου καρκίνου σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην ενότητα 2.5.2.

Πίνακας 2.7: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση έκφρασης νέων μεταγραφών *BIRC5* στις υπό μελέτη ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Η θερμοκρασία τήξης (Tm) κάθε εκκινητή υπολογίστηκε με τον αλγόριθμο Primer-BLAST.

Εκκινητές				
Κατεύθυνση	**Ονομασία**	**Αλληλουχία (5′→3′)**	**Μήκος (nt)**	**T_m (ºC)**
Πρόσθιος	1/3F	CCGGAGCGGAGAGGAACA	18	61.07
	1/3bF	CGGAGCGGGAGAGAGCT	17	60.51
	1/4F	CGGAGCGGGCAAAGGAAAC	19	61.98
	2/3bF	GACGACCCCATGAGAGAGCT	20	61.04
	2/NF	GACGACCCCATGGTCTTACTC	21	59.86
	2/3F	GATGACGACCCCATAGAGGAAC	22	59.96
	2/2bF	GATGACGACCCCATTGGGC	19	60.82
Ανάστροφος	4R	CAGAAGCACCTCTGGTGCC	19	60.67
	2b/4R	GGTTTCCTTTGCCTCGTGATC	21	59.53
	3/4R	TGTTGGTTTCCTTTGCAATTTTGTTC	26	60.35
	3b/4R	GGTTTCCTTTGCCTTTCTCCTGA	23	61.0
	N/4R	GGTTTCCTTTGCCTGTGGTC	20	59.33
	N/3bR	CAGAGCTCTCTCCTGTGGTC	20	59.18

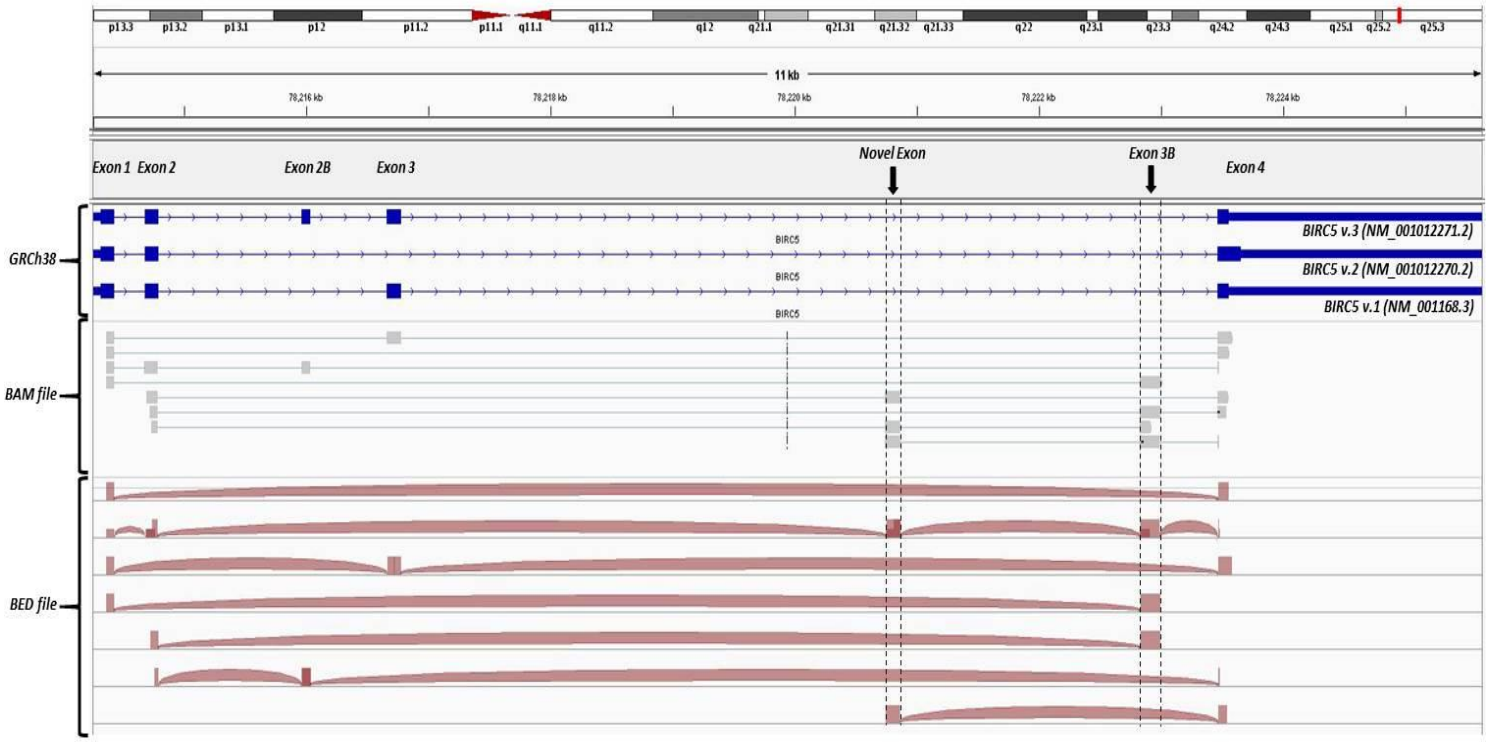
3 Αποτελέσματα

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, μετά το τέλος της touchdown PCR πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης, προκειμένου να εξακριβωθεί η επιλεκτική στόχευση και ενίσχυση των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *BIRC5*, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στην εικόνα 3.1.



Εικόνα 3.1: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης μετά τη στοχευμένη ενίσχυση των υπό μελέτη ισομορφών του mRNA *BIRC5*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιηθήκαν παρουσιάζονται στην ενότητα 2.5.1. Από τα αποτελέσματα επιβεβαιώνεται η απουσία παραπροιόντων και η ύπαρξη των ενισχυμένων τμημάτων του γονιδίου

Επιπλέον κατά την βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων της αλληλούχησης πραγματοποιήθηκε οπτικοποίηση των αρχείων BAM και BED με το πρόγραμμα περιήγησης γονιδιωμάτων Integrative Genome Viewer (IGV). Οι αλληλουχίες ευθυγραμμίστηκαν επιτυχώς στο γονιδίωμα αναφοράς GRCh38 και παρουσιάζονται στην εικόνα 3.2. Η οπτικοποίηση των δεδομένων είναι απαραίτητη στην ανάλυση αλληλουχιών Ωστόσο, το μέγεθος και η ποικιλία των δεδομένων που παράγονται αποτελούν σημαντική πρόκληση. Το IGV είναι πρόγραμμα υψηλής αποτελεσματικότητας τόσο στην ποικιλία των μορφών αρχείου δεδομένων που υποστηρίζει, όσο και στον όγκο τους, επιτρέποντας την ομαλή διαδραστική περιήγηση σε όλα τα επίπεδα εστίασης στο γονιδίωμα, από επίπεδο χρωμοσώματος μέχρι το επίπεδο νουκλεοτιδικής βάσης, ενώ είναι και ιδιαίτερα φιλικό προς τον χρήστη [144].



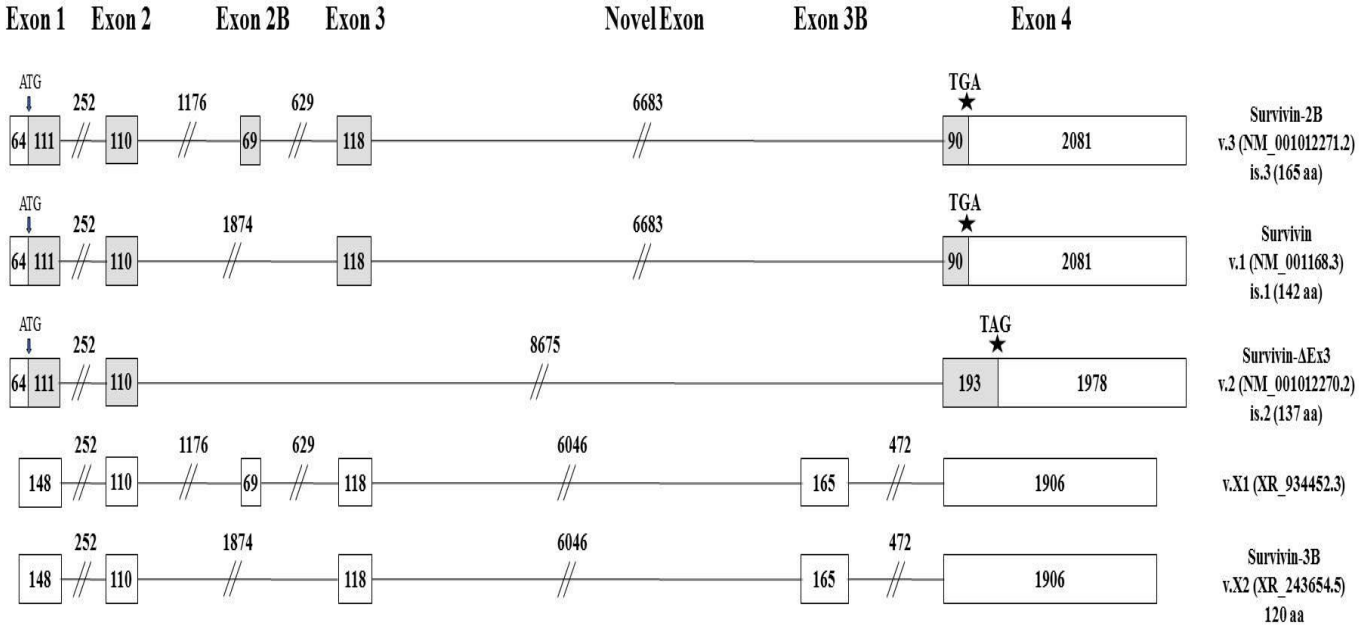
Εικόνα 3.2: Απεικόνιση των αρχείων BAM και BED μέσω του προγράμματος IGV.

3.1 Ανίχνευση νέων θέσεων συρραφής εξωνίων

Σύμφωνα με τη GenBank®, τα συμβάντα του εναλλακτικού ματίσματος εντός του πρόδρομου mRNA του *BIRC5* έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πέντε εναλλακτικών μεταγράφων. Τρία από αυτά διαθέτουν ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) και επομένως κωδικοποιούν τρεις διαφορετικές πρωτεϊνικές ισομορφές της survivin, ενώ οι υπόλοιπες δύο αντιπροσωπεύουν μη-κωδικά μόρια RNAs (ncRNAs). Ωστόσο, όπως ήδη σχολιάστηκε προηγουμένως, αρκετές ακόμη μορφές εναλλακτικών μεταγράφων και αντίστοιχες ισομορφές πρωτεΐνης έχουν αναφερθεί από διάφορες μελέτες [90]-[91].

Τα μετάγραφα τα οποία αναφέρονται στη GenBank® και επιβεβαιώθηκαν και από τα δεδομένα NGS της παρούσας εργασίας είναι: Το κύριο μετάγραφο πλήρους μήκους του γονιδίου *BIRC5* (BIRC5 v.1), (GenBank® accession number: NM_001168.3), το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη (BIRC5 is.1) 142 αμινοξέων (aa), το μετάγραφο survivin- ΔEx3 (GenBank® accession number: NM_001012270.2), το οποίο κωδικοποιεί πρωτεΐνη (BIRC5 is.2) 137 aa, καθώς και το survivin-2B (GenBank® accession number: NM_001012271.2)

που κωδικοποιεί πρωτεΐνη 165 aa. Παράλληλα, υπάρχουν δύο προβλεπόμενα εναλλακτικά μετάγραφα, τα *BIRC5* X.1 και X.2 (GenBank® accession number: XR_934452.3 και XR_243654.5, αντίστοιχα), τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός πρόσθετου εξωνίου (εξώνιο 3B) που εδράζεται μεταξύ των γνωστών εξωνίων 3 και 4. Τα μετάγραφα αυτά διαφοροποιούνται στην ύπαρξη ή όχι του εξωνίου 2B. Αξίζει επίσης να σημειωθεί, ότι το εναλλακτικό μετάγραφο *BIRC5* v.X2 (XR_243654.5), που αναφέρεται επίσης ως survivin-3B, εκφράζεται σε πολλές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και χαρακτηρίζεται από ORF που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη ισομορφής 120 aa με κυτταροπροστατευτική λειτουργία. Η δομή των παραπάνω μεταγράφων, καθώς και τα χαρακτηριστικά τους, παρουσιάζονται στην εικόνα 3.3. Τα δεδομένα από την αλληλούχηση που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, περιείχαν reads που αντιπροσώπευαν όλες τις γνωστές αλληλουχίες mRNA του *BIRC5* και συνεπώς επιβεβαιώθηκαν όλα τα γνωστά εξώνια και οι γνωστές θέσεις συρραφής.



Εικόνα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση των πέντε γνωστών μεταγράφων του *BIRC5*. Τα εξώνια αναπαριστώνται ως κουτάκια και τα ιντρόνια ως γραμμές. Οι αριθμοί εντός των κουτιών και πάνω από τις γραμμές αντιστοιχούν στο μήκος κάθε εξωνίου ή ιντρονίου σε νουκλεοτίδια. Τα γκρι και λευκά κουτάκια αναπαριστούν κωδικά και μη κωδικά εξώνια αντίστοιχα.

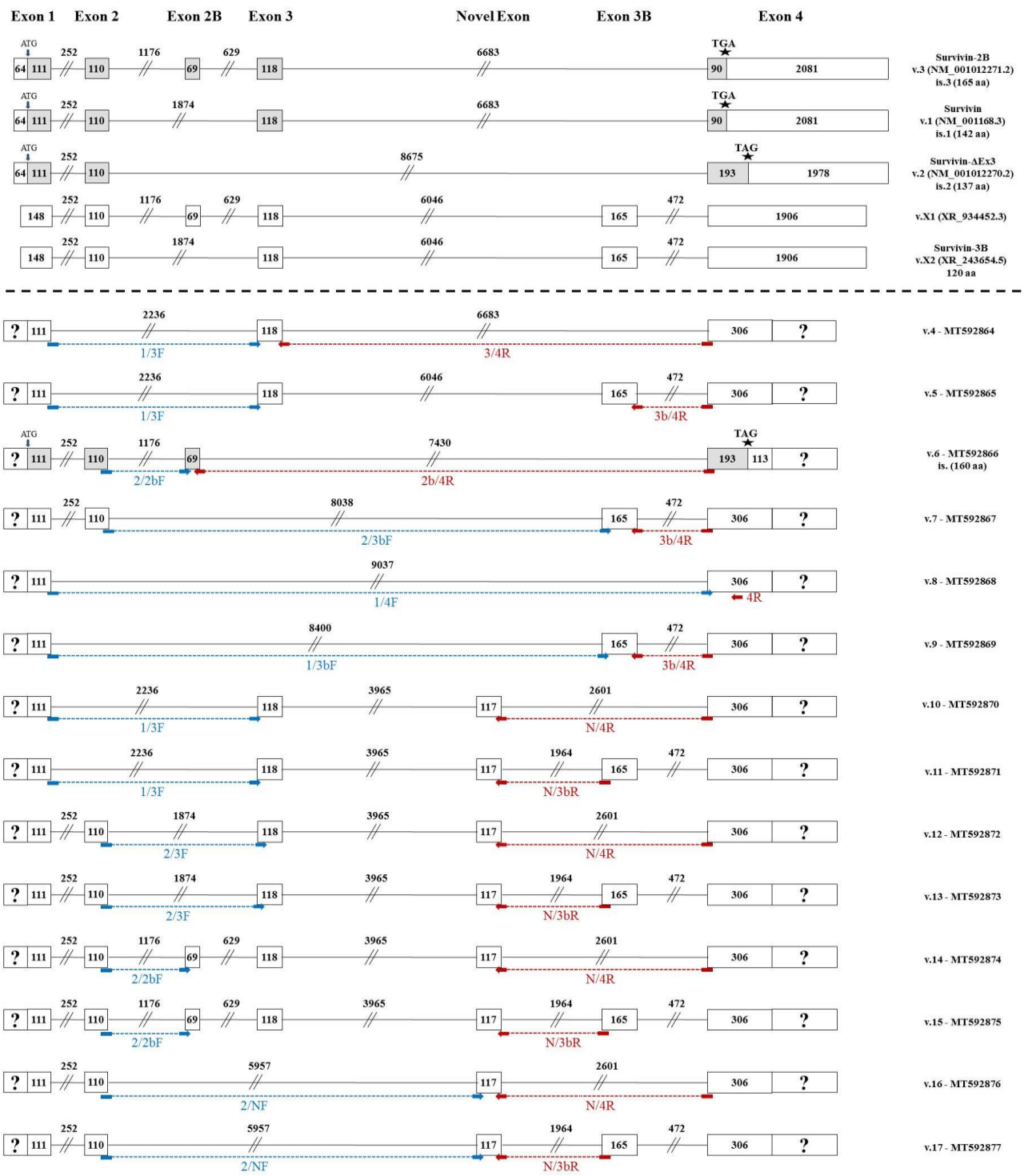
Με βάση την οπτικοποίηση μέσω του προγράμματος IGV, αποκαλύφθηκε η ύπαρξη των νέων μεταγραφών τα οποία ευθυγραμμίστηκαν επιτυχώς στο γονιδίωμα αναφοράς GRCh38. Ωστόσο, εκτός από τις γνωστές θέσεις συρραφής, με την ανάλυση των δεδομένων βρέθηκαν αρκετές νέες θέσεις συρραφής μεταξύ γνωστών εξωνίων του γονιδίου (Εικόνα 3.4). Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε η ύπαρξη της προηγουμένως άγνωστης θέσης συρραφής μεταξύ των εξωνίων 1 και 3, η οποία προκύπτει από την παράλειψη και των δύο εξωνίων 2 και 2β. Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι το εξώνιο 1 συρράπτεται όχι μόνο με το εξώνιο 3B, αλλά και με το τελευταίο εξώνιο του γονιδίου (εξώνιο 4). Τέλος, το τελευταίο νέο συμβάν ματίσματος μεταξύ γνωστών εξωνίων του γονιδίου *survivin* αντιστοιχεί στην παράλειψη των δύο εξωνίων 3 και 3B και προέρχεται από τη συρραφή του εξωνίου 2B με το εξώνιο 4 (Εικόνα 3.4).

Εικόνα 3.4: Σχηματική αναπαράσταση αντιπροσωπευτικών πειραματικών αλληλουχιών για κάθε νέα θέση συρραφής που ανιχνεύθηκε στο *BIRC5*, καθώς και των νέων θέσεων συρραφής του νέου εξωνίου. Σε κάθε πειραματική αλληλουχία, τα νουκλεοτίδια κάθε εξωνίου αναπαριστώνται με διαφορετικά χρώματα. Συνολικά, ανιχνεύτηκαν 7 νέες θέσεις συρραφής για τα ήδη γνωστά εξώνια και 4 νέες θέσεις συρραφής για το νέο εξώνιο.

3.2 Ταυτοποίηση ενός νέου εξωνίου του γονιδίου *survivin*

Η βιοπληροφορική ανάλυση των πρωτογενών δεδομένων NGS που προέκυψαν οδήγησε στον εντοπισμό όχι μόνο νέων, λιγότερο άφθονων μεταγραφών *BIRC5* που περιέχουν νέες εναλλακτικές θέσεις ματίσματος, αλλά αποκάλυψε και την ύπαρξη ενός νέου εξωνίου (εξώνιο N), το οποίο σύμφωνα με τις πρωτογενείς πειραματικές αλληλουχίες του αρχείου FASTQ εδράζεται μεταξύ των χαρακτηρισμένων εξωνίων 3 και 3B, αποτελείται από 117 νουκλεοτίδια και έχει την ακόλουθη αλληλουχία: 5' – GGTCTTACTCTGTCACCCAGGCTGAGTGCAGTGGTGTGATCTTGGCTCA CCTCAGCCTCGACCCCCTGGGCTCAAATGATTCTCCCACCTCAGCTTCC CAAGTAGCTGGGACCACAG – 3'.

Ωστόσο, σύμφωνα με τα δεδομένα NGS, το εξώνιο N δεν συρράπτεται αποκλειστικά με τα εξώνια 3 και 3B, καθώς παρατηρήθηκαν πολλά εναλλακτικά γεγονότα ματίσματος στα οποία εμπλέκεται (εικόνα 3.5). Με βάση όλα τα προαναφερθέντα νέα ευρήματα, η παρούσα μελέτη οδήγησε στον εντοπισμό δεκατεσσάρων νέων μεταγραφών του γονιδίου *survivin* (*BIRC5* v.4 - v.17), των οποίων οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων GenBank® (GenBank ID: MT592864, MT592865, MT592866, MT592867, MT592868, MT592869, MT592870, MT592871, MT592872, MT592873, MT592874, MT592875, MT592876 και MT592877, αντίστοιχα).



Εικόνα 3.5: Αναλυτική δομή των 14 νέων μεταγράφων του *BIRC5*. Τα εξώνια αναπαριστώνται ως κουτάκια και τα ιντρόνια ως γραμμές. Οι αριθμού εντός των κουτιών και πάνω από τις γραμμές προσδιορίζουν το μήκος του κάθε εξωνίου ή ιντρονίου σε νουκλεοτίδια. Τα γκρι και λευκά κουτιά αναπαριστούν κωδικά και μη κωδικά εξώνια, αντίστοιχα. Στο δεξί άκρο κάθε μεταγράφου φαίνεται επίσης η ονομασία του και ο κωδικός του στην GenBank®.

3.3 Προσδιορισμός νέων εναλλακτικών μεταγράφων του *BIRC5* (*BIRC5* v.4 - v.9) που περιέχουν νέες θέσεις εναλλακτικού ματίσματος μεταξύ χαρακτηρισμένων εξωνίων.

Το NGS επιβεβαίωσε την ύπαρξη έξι νέων μεταγραφών *survivin* που παράγονται από διαδικασίες εναλλακτικού ματίσματος μεταξύ χαρακτηρισμένων εξωνίων του γονιδίου. Δύο νέα μετάγραφα από αυτές τις παραλλαγές ματίσματος, τα *BIRC5* v.4 και v.5, περιέχουν τη νέα θέση συρραφής μεταξύ των εξωνίων 1 και 3, αλλά διαφέρουν ως προς το εξώνιο 3B, το οποίο υπάρχει μόνο στην αλληλουχία cDNA του νέου μεταγράφου *BIRC5* v.5. Αυτό το νέο συμβάν ματίσματος μεταξύ των εξωνίων 1 και 3, ωστόσο, δημιουργεί ένα πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού, το οποίο εντοπίζεται εντός της αλληλουχίας του εξωνίου 3. Συνεπώς, και τα δύο νέα μετάγραφα *BIRC5* v.4 και v.5 είναι πιθανότατα μη-κωδικά μόρια RNA.

Το επόμενο νέο εναλλακτικό μετάγραφο της *survivin* (*BIRC5* v.6) χαρακτηρίζεται από το νέο συμβάν ματίσματος μεταξύ των εξωνίων 2B και 4, και συνεπώς από την cDNA αλληλουχία του απουσιάζουν τα δύο εξώνια 3 και 3B (εικόνα 3.5). Ως αποτέλεσμα, η ακολουθία cDNA του *BIRC5* v.6 αποτελείται από τέσσερα εξώνια (1, 2, 2B και 4). Επιπλέον, το μετάγραφο *BIRC5* v.6 προβλέπεται να περιέχει ORF, με το ίδια κωδικόνια έναρξης και τερματισμού με το μετάγραφο *Survivin-ΔEx3* (NM_001012270.2) και προβλέπεται να κωδικοποιεί μια νέα πρωτεϊνική ισομορφή που αποτελείται από 160 aa (εικόνα 3.5). Το επόμενο μετάγραφο που ταυτοποιήθηκε από τη βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την αλληλούχηση, το *BIRC5* v.7, περιλαμβάνει το νέο συμβάν ματίσματος μεταξύ των εξωνίων 2 και 3B, που δημιουργείται μέσω της παράλειψης των δύο εξωνίων 2B και 3 από την αλληλουχία cDNA. Ωστόσο, αυτό το νέο συμβάν ματίσματος οδηγεί στη δημιουργία ενός πρώιμου κωδικονίου λήξης στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του εξωνίου 3 και επομένως το *BIRC5* v.7 πιθανότατα αντιπροσωπεύει ένα μη-κωδικό μόριο RNA.

Τέλος, εντοπίστηκαν δύο ακόμη νέα μετάγραφα του γονιδίου *survivin* (*BIRC5* v.8 και v.9), τα οποία παράγονται από νέα γεγονότα ματίσματος του εξωνίου 1 με άλλα γνωστά εξώνια. Αναλυτικά, το *BIRC5* v.8 προέρχεται από το μάτισμα του εξωνίου 1 με το τελευταίο εξώνιο του *survivin* (εξώνιο 4), και αποτελεί το νέο εναλλακτικό μετάγραφο με την μικρότερη νουκλεοτιδική

αλληλουχία που επιβεβαιώθηκε. Επιπλέον, το *BIRC5* v.9 παράγεται από το μάτισμα του εξωνίου 1 με το εξώνιο 3B και επομένως δε διαθέτει τα εξώνια 2, 2B και 3 (εικόνα 3.5). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι και τα δύο μετάγραφα *BIRC5* v.8 και v.9 έχουν ORF, αλλά προβλέπεται ότι κωδικοποιούν σημαντικά μικρότερες πρωτεϊνικές ισομορφές (66 aa και 44 aa, αντίστοιχα) σε σύγκριση με τις «κύριες» ισομορφές πρωτεΐνης survivin, οι οποίες επίσης δεν διαθέτουν τον τομέα BIR. Ως αποτέλεσμα, τα δυο εναλλακτικά μετάγραφα *BIRC5* v.8 και v.9 είτε κωδικοποιούν μικρά πεπτίδια με άγνωστη λειτουργία, είτε αντιπροσωπεύουν μη-κωδικά μόρια RNAs.

3.4 Ταυτοποίηση νέων εναλλακτικών μεταγράφων *BIRC5* (*BIRC5* v.10 - v.17) που φέρουν το νέο εξώνιο N.

Εκτός από έξι νέα εναλλακτικά μετάγραφα (*BIRC5* v.4 - v.9) που παράγονται από νέα γεγονότα ματίσματος μεταξύ ήδη γνωστών εξωνίων, η ανάλυση δεδομένων NGS οδήγησε στον εντοπισμό οκτώ νέων εναλλακτικών μεταγράφων (*BIRC5* v.10 - v.17), τα οποία χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός νέου εξωνίου (εξώνιο N) στις ακολουθίες cDNA τους. Συγκεκριμένα, το εξώνιο N υπάρχει σε δύο νέα εναλλακτικά μετάγραφα, τα *BIRC5* v.10 και v.11, τα οποία χαρακτηρίζονται επίσης από το νέο συμβάν ματίσματος μεταξύ των εξωνίων 1 και 3 (εικόνα 3.5). Ωστόσο, τα *BIRC5* v.10 και v.11 διαφέρουν ως προς την ύπαρξη του εξωνίου 3B, το οποίο υπάρχει μόνο στην αλληλουχία cDNA του *BIRC5* v.11. Παρά την διαφορά τους σχετικά με την ύπαρξη του εξωνίου 3B, τόσο το *BIRC5* v.10 όσο και το v.11 αναμένεται να είναι μη-κωδικά μόρια RNA, εξαιτίας του πρώιμου κωδικονίου λήξης που δημιουργείται στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του εξωνίου 3 από το νέο συμβάν ματίσματος μεταξύ των εξωνίων 1 και 3.

Παράλληλα, ταυτοποιήθηκαν δύο ακόμα εναλλακτικά μετάγραφα *survivin* που φέρουν το εξώνιο N, τα *BIRC5* v.12 και v.13 (εικόνα 3.5). Αυτές οι εναλλακτικές παραλλαγές ματίσματος περιλαμβάνουν την αλληλουχία του εξωνίου 2, η οποία συρράπτεται με το εξώνιο 3. Η δομική διαφορά των *BIRC5* v.12 και v.13 είναι η παρουσία του εξωνίου 3B, το οποίο υπάρχει μόνο στην αλληλουχία cDNA του *BIRC5* v.13. Θα πρέπει να αναφερθεί, ωστόσο, ότι με βάση τη δομή των εξωνίων τους το κωδικόνιο τερματισμού μετάφρασης και

στα δύο μετάγραφα εντοπίζεται εντός της αλληλουχίας του εξωνίου Ν. Κατά συνέπεια, η ικανότητα κωδικοποίησης πρωτεΐνης αυτών των δύο νέων προϊόντων εναλλακτικής συρραφής παραμένει ασαφής και πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

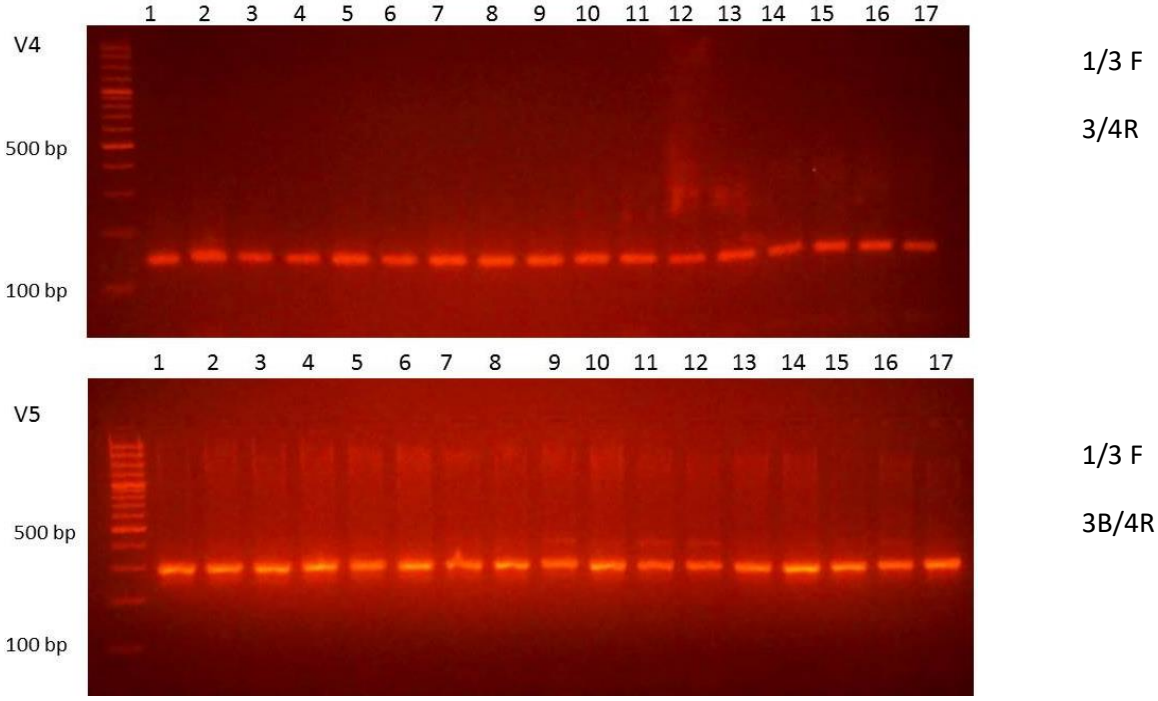
Επιπλέον, η βιοπληροφορική ανάλυση επιβεβαίωσε την ύπαρξη δύο νέων εναλλακτικών μεταγράφων (*BIRC5* v.14 και v.15) τα οποία, εκτός από το εξώνιο Ν, περιλαμβάνουν την αλληλουχία του εξωνίου 2Β (εικόνα 3.5). Τόσο το *BIRC5* v.14 όσο και το v.15 περιέχουν όλα τα χαρακτηρισμένα εξώνια μέχρι το εξώνιο 3 και συνεπώς περιλαμβάνουν την επικράτεια BIR, αλλά διαφέρουν ως προς την ύπαρξη του εξωνίου 3Β, το οποίο υπάρχει μόνο στο *BIRC5* v.15. Τέλος, τα ληφθέντα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την ύπαρξη δύο επιπλέον πρωτότυπων μεταγραφών *survivin* (*BIRC5* v.16 και v.17), τα οποία χαρακτηρίζονται από το συμβάν ματίσματος του εξωνίου 2 με το εξώνιο Ν και συνεπώς στερούνται εντελώς τα εξώνια 2Β και 3. Ωστόσο, διαφέρουν στην ύπαρξη του εξωνίου 3Β, το οποίο υπάρχει μόνο στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του *BIRC5* v.17.

3.5 Ανάλυση έκφρασης των νέων εναλλακτικών μεταγράφων *BIRC5* (*BIRC5* v.4 - v.17).

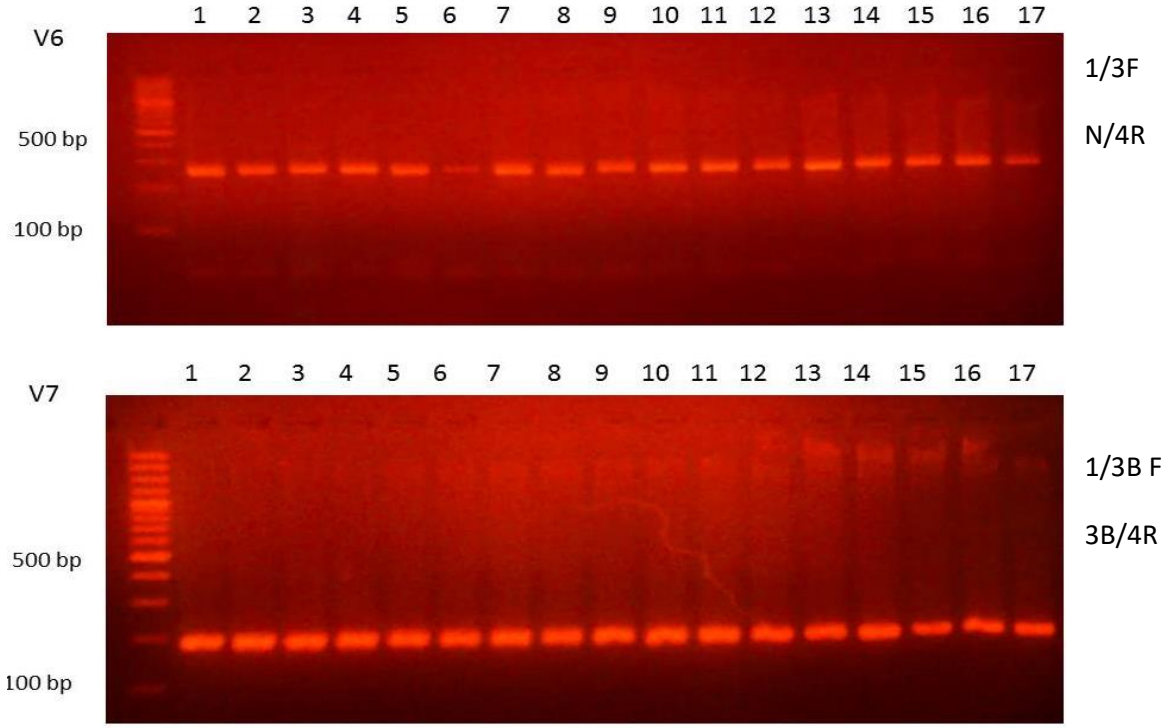
Μετά την αναγνώριση όλων των πρωτότυπων μεταγραφών *survivin* (*BIRC5* v.4 - v.17) με την μεθοδολογία στοχευμένης αλληλούχησης που παρουσιάστηκε, το προφίλ έκφρασής τους διερευνήθηκε σε ένα πάνελ cDNA από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που αντιστοιχούν σε διακριτούς καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς (αδενοκαρκίνωμα μαστού, καρκίνωμα του μαστού, καρκίνος των ωοθηκών, αδενοκαρκίνωμα του ενδομητρίου, καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας, καρκίνος του προστάτη, καρκίνος της ουροδόχου κύστης, καρκίνωμα των νεφρικών κυττάρων, καρκίνος του παχέος εντέρου, γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, καρκίνος του εγκεφάλου, καρκίνος του εγκεφάλου αδενοκαρκίνωμα, μελάνωμα, λέμφωμα, λευχαιμία και φυσιολογικό εμβρυϊκό νεφρό).

Το μοτίβο έκφρασης κάθε νέου μεταγράφου διερευνήθηκε με nested PCR, χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για κάθε μετάγραφο (Πίνακας 2.7) και ηλεκτροφορητική ανίχνευση των προϊόντων PCR σε πηκτές αγαρόζης. Με

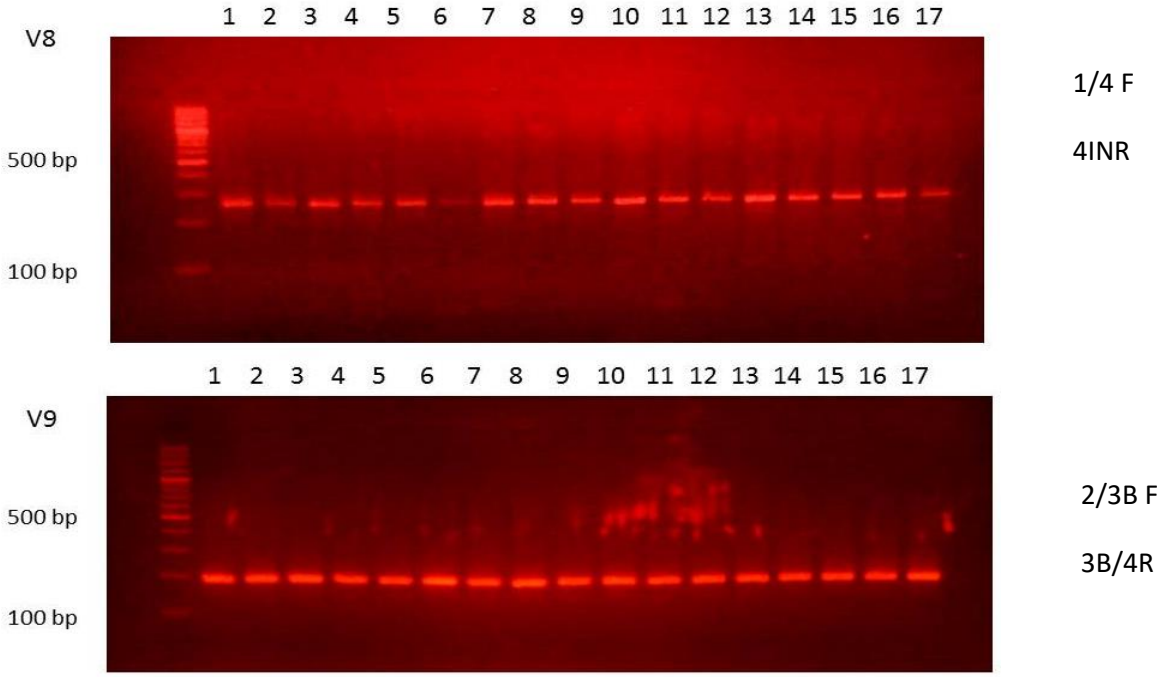
βάση τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, όλα τα νέα μετάγραφα *BIRC5* (*BIRC5* v.4 - v.17) που περιγράφονται στην παρούσα μελέτη κατέδειξαν ένα ευρύ προφίλ έκφρασης στις υπό μελέτη ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις εικόνες 3.6 εως 3.12.



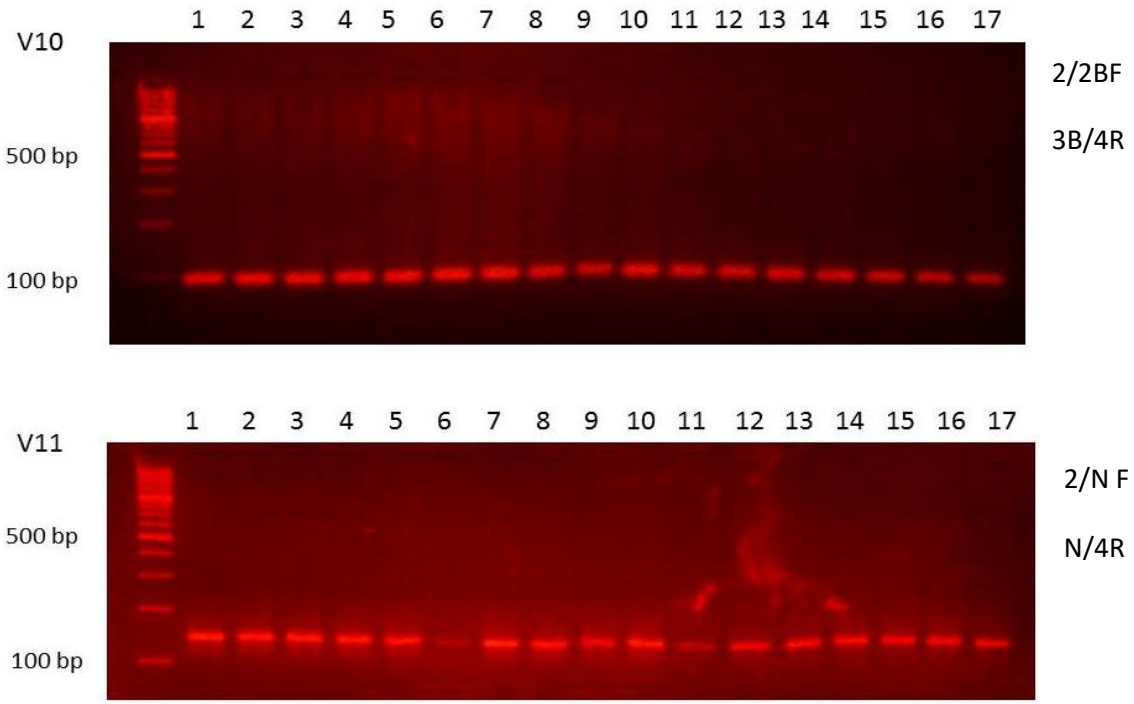
Εικόνα 3.6: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για τα μετάγραφα *BIRC5* v.4 και v.5 μετά τη διαδικασία της nested PCR στα 17 διαφορετικά δείγματα κυτταρικών σειρών. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στην εικόνα, ενώ τα αναμενόμενα μήκη του κάθε amplicon ήταν αντίστοιχα 143 bp και 305 bp.



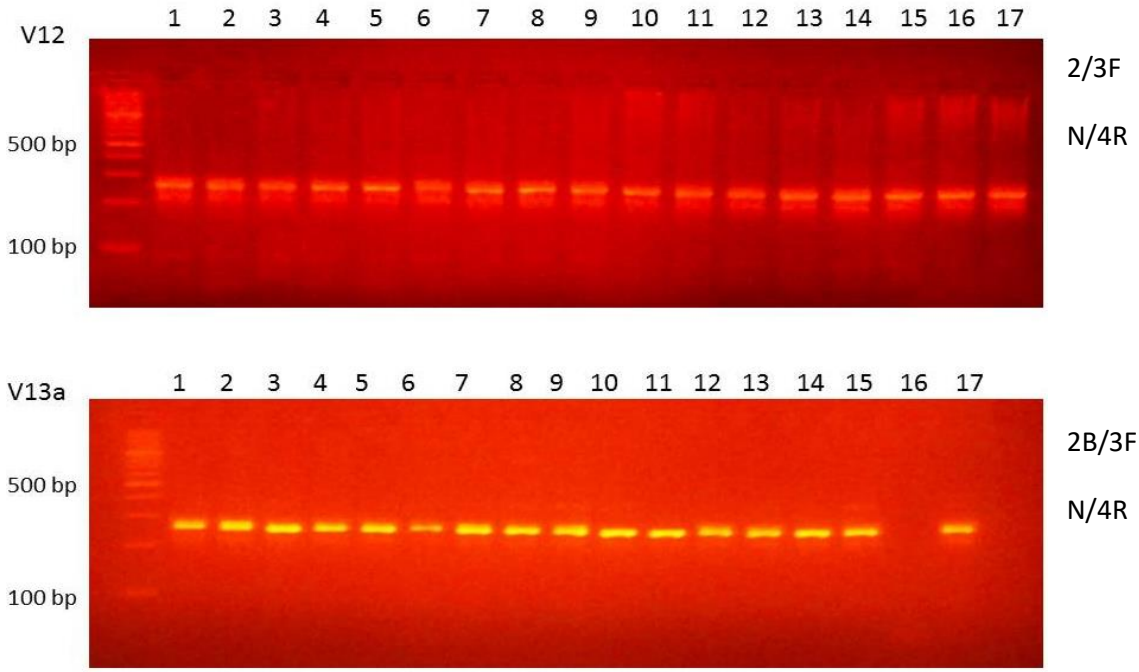
Εικόνα 3.7: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για τα μετάγραφα *BIRC5* v.6 και v.7 μετά τη διαδικασία της nested PCR στα 17 διαφορετικά δείγματα κυτταρικών σειρών. Τα μήκη του κάθε amplicon ήταν 256 και 185 αντίστοιχα.



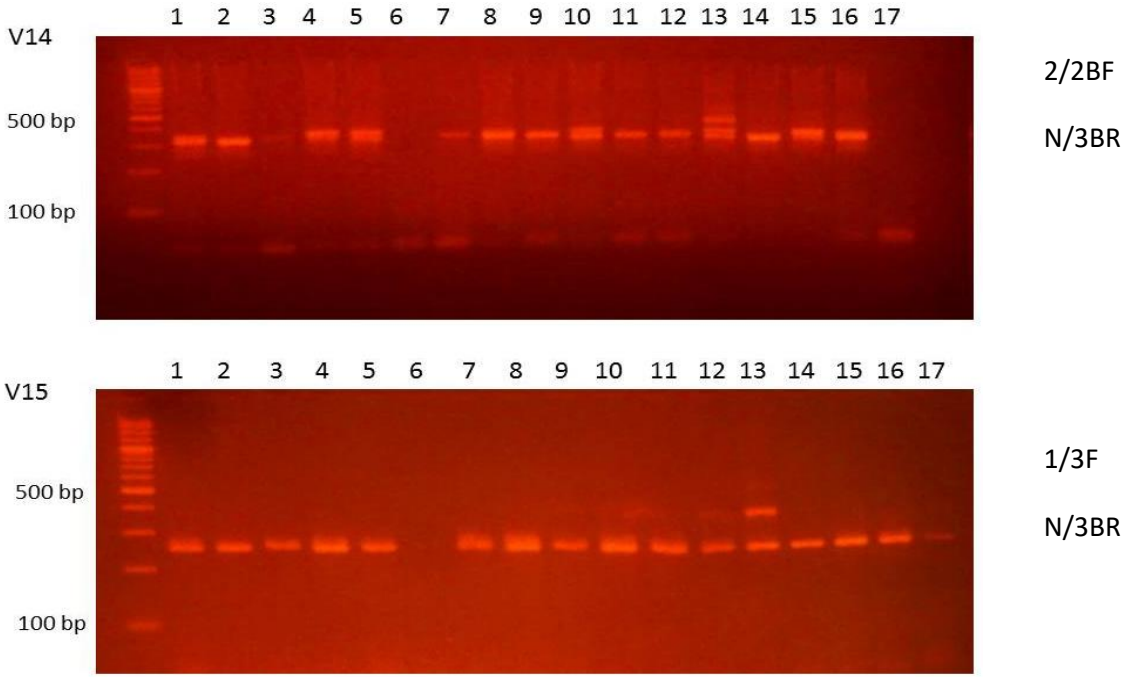
Εικόνα 3.8: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για τα μετάγραφα *BIRC5* v.8 και v.9 μετά τη διαδικασία της nested PCR στα 17 διαφορετικά δείγματα κυτταρικών σειρών. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στο σχήμα ενώ τα μήκη του κάθε amplicon ήταν αντίστοιχα 281 bp και 188 bp.



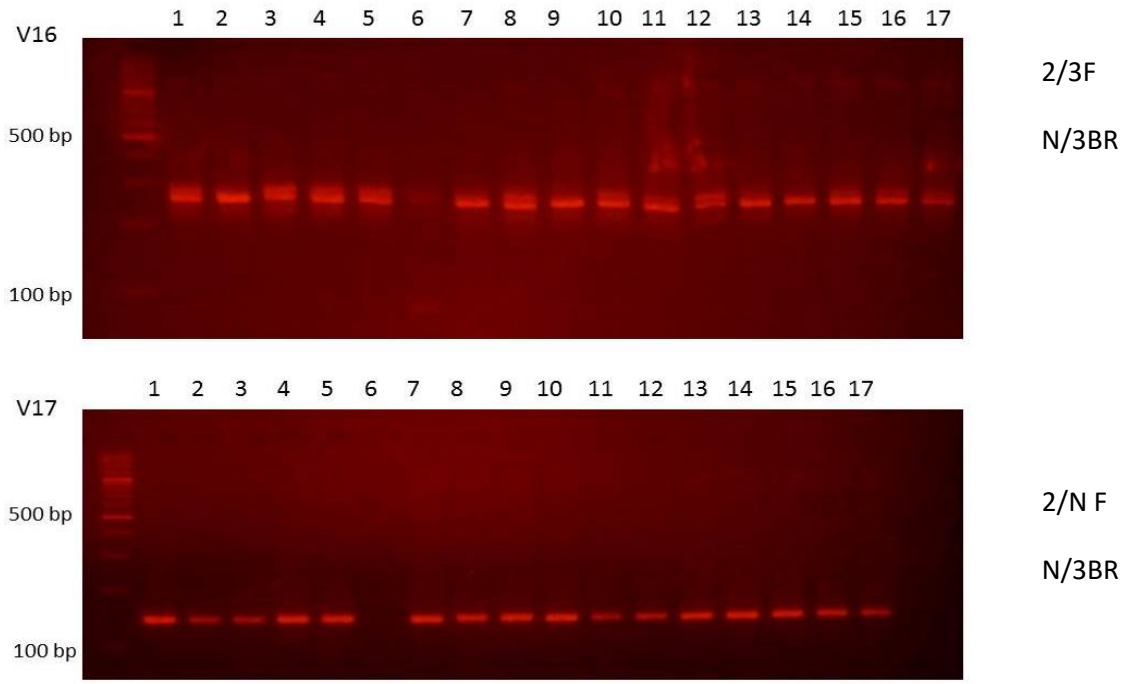
Εικόνα 3.9: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για τα μετάγραφα *BIRC5* v.10 και v.11 μετά τη διαδικασία της nested PCR στα 17 διαφορετικά δείγματα κυτταρικών σειρών. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στο σχήμα ενώ τα μήκη του κάθε amplicon ήταν αντίστοιχα 95 bp και 140 bp.



Εικόνα 3.10: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για τα μετάγραφα *BIRC5* v.12 και v.13 μετά τη διαδικασία της nested PCR στα 17 διαφορετικά δείγματα κυτταρικών σειρών. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στο σχήμα ενώ τα μήκη του κάθε amplicon ήταν αντίστοιχα 261 bp και 258 bp.



Εικόνα 3.11: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για τα μετάγραφα *BIRC5* v.14 και v.15 μετά τη διαδικασία της nested PCR στα 17 διαφορετικά δείγματα κυτταρικών σειρών. Τα μήκη του κάθε amplicon ήταν αντίστοιχα 351 bp και 265 bp.



Εικόνα 3.12: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για τα μετάγραφα *BIRC5* v.16 και v.17 μετά τη διαδικασία της nested PCR στα 17 διαφορετικά δείγματα κυτταρικών σειρών. Τα μήκη του κάθε amplicon ήταν αντίστοιχα 261 bp και 140 bp.

4 Συζήτηση

Το ανθρώπινο γονίδιο *survivin* (επίσης γνωστό και ως *BIRC5*) εμφανίζει σημαντική αύξηση σε κακοήθειες στον άνθρωπο, ενώ σχετίζεται σημαντικά με κακή πρόγνωση του ασθενούς καθώς και αντίσταση του όγκου σε ένα ευρύ φάσμα χημειοθεραπευτικών παραγόντων [101]-[153]. Το κύριο μετάγραφο του γονιδίου κωδικοποιεί μια μικρή πρωτεΐνη 142 aa, η οποία χαρακτηρίζεται από μια μοναδική περιοχή BIR εντός της N-τερματικής της περιοχής, που εκτείνεται εξ ολοκλήρου μεταξύ του 20ου και του 90ου αμινοξέως. Η παρουσία του τομέα BIR αποτελεί βασικό στοιχείο όχι μόνο για την ταξινόμηση της survivin ως μέλους της οικογένειας πρωτεϊνών IAP, αλλά επίσης καθορίζει τον θεμελιώδη ρόλο της στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης [83],[103]. Κρίσιμης σημασίας κρίνεται το γεγονός πως μια μεγάλη ποικιλία εναλλακτικών γεγονότων ματίσματος μέσα στο pre-mRNA της survivin οδηγεί στην παραγωγή πολλών παραλλαγών μεταγραφής [90]. Η έκφραση των mRNAs των εναλλακτικών μεταγράφων της survivin έχει διερευνηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως, καρκίνους του ουροποιητικού συστήματος, του γαστρεντερικού σωλήνα, του πνεύμονα, του μαστού, του τραχήλου της μήτρας και του αιμοποιητικού ιστού [154-160]. Η αναγνώριση νέων εναλλακτικών μεταγράφων της survivin καθώς και η διευκρίνιση του ρόλου τους στις ανθρώπινες κακοήθειες αποτελούν κομβικό σημείο στη μελέτη βασικών μοριακών μηχανισμών του καρκίνου. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η παρουσία της survivin σε δείγματα αίματος και ούρων ασθενών μπορεί να υποδηλώνει αιματολογικές κακοήθειες και καρκίνο της ουροδόχου κύστης, αντίστοιχα. Ενώ η έκφραση της παραλλαγής ματίσματος survivin-3α είναι ενδεικτική της έναρξης και της εξέλιξης του καρκίνου του μαστού, έτσι αρκετές εταιρείες έχουν αναπτύξει διαγνωστικά κιτ καρκίνου χρησιμοποιώντας τη survivin για την ανίχνευση καρκίνου.

Τα εναλλακτικά μετάγραφα της Survivin μπορεί να παρουσιάζουν ιστοειδική έκφραση ή/και να εκφράζονται σε διαφορετικά στάδια της νόσου, επισημαίνοντας τον μεγάλο αντίκτυπό τους στη διάγνωση του καρκίνου, ενώ συγκεκριμένες παραλλαγές μεταγραφής έχουν βρεθεί ότι μπορούν επιλεκτικά να παρέχουν αντίσταση του όγκου σε χημειοθεραπευτικές αγωγές. [93], [161]-

[68]. Σε όλες τις προηγούμενες μελέτες, η πειραματική επαλήθευση εναλλακτικών μεταγράφων της survivin πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας συμβατικές τεχνικές κλωνοποίησης και προσδιορισμού αλληλουχίας. Εδώ, για πρώτη φορά, εφαρμόσαμε μια καινοτόμο εσωτερική στοχοθετημένη ανάλυση DNA-seq για τον εντοπισμό νέων εναλλακτικών μεταγράφων με σημαντικά αυξημένο βάθος κάλυψης. Η βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων NGS αποκάλυψε αρκετά νέα γεγονότα ματίσματος μεταξύ σχολιασμένων εξωνίων του *BIRC5* καθώς και την ύπαρξη ενός νέου εξωνίου 117 nt, που εκτείνεται μεταξύ των εξονίων 3 και 3b. Κατά συνέπεια, τα πειραματικά μας αποτελέσματα οδήγησαν στον εντοπισμό δεκατεσσάρων νέων εναλλακτικών μεταγράφων (*BIRC5* v.4 - v.17, GenBank® accession numbers: MT592864-MT592877) που παρουσίασαν ένα προφίλ ευρείας έκφρασης σε συνολικά δεκαέξι ανθρώπινες κακοήθειες.

Με βάση την in-silico ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για την πιθανή ύπαρξη ORFs στις ακολουθίες cDNA των *BIRC5* v.4 - v.17, έξι από αυτά προβλέπεται να κωδικοποιούν νέες ισομορφές της πρωτεΐνης, ενώ τα υπόλοιπα οκτώ εναλλακτικά μετάγραφα περιέχουν πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού (premature termination codon PTC), με αποτέλεσμα να είναι υποψήφια μόρια για τον μηχανισμό nonsense-mediated mRNA decay NMD (μηχανισμός παρεμβολής μέσω μη κωδικών μορίων RNA). Η εξάλειψη αυτών των μεταγράφων μέσω του μηχανισμού NMD είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της πιστότητας της γονιδιακής έκφρασης σε ευκαρυωτικά κύτταρα, καθώς εμποδίζει την εμφάνιση ισομορφών της πρωτεΐνης με ελαττωματικά C-τερματικά, τα οποία θα μπορούσαν να έχουν επιβλαβής συνέπειες απώλειας ή απόκτησης λειτουργίας [162, 163]. Τρία νέα μετάγραφα (*BIRC5* v.8, v.9 and v.16, GenBank® accession numbers: MT592868, MT592869 and MT592876) περιέχουν προηγουμένως μη χαρακτηρισμένα μικρά ORF (sORFs).

Με βάση την υπόθεση ότι τα παραπάνω μετάγραφα μοιράζονται το ίδιο κωδικόνιο έναρξης ATG με τις σχολιασμένες παραλλαγές μεταγραφής, προβλέπεται ότι κωδικοποιούν μικροπεπτίδια survivin (<100 aa) των 66 aa, 44 aa και 81 aa, αντίστοιχα. Αν και, τα προηγούμενα έτη, το δυναμικό κωδικοποίησης αυτών των sORFs μπορεί να είχε παραβλεφθεί, μετέπειτα μελέτες έχουν επισημάνει τη μεγάλη ρυθμιστική λειτουργία αυτών των μικρών

πρωτεϊνών [164-166]. Ωστόσο, παρόλο που αυτές οι μελέτες παρέχουν νέες γνώσεις σχετικά με τον αναδυόμενο ρόλο αυτών των βιομορίων στην κυτταρική φυσιολογία, υπάρχει επείγουσα ανάγκη της περαιτέρω διερεύνησής τους σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές προκειμένου να χαρακτηριστεί πλήρως και να αποκαλυφθεί η λειτουργία αυτών των μικροπεπτιδίων στις ανθρώπινες κακοήθειες.

Τα υπόλοιπα τρία εναλλακτικά μετάγραφα της *survivin* που περιέχουν ORFs προβλέπεται να κωδικοποιούν νέες ισομορφές πρωτεϊνών (*BIRC5* v.6, v.12 and v.14, GenBank® accession numbers: MT592866, MT592872 και MT592874) που αποτελούνται από 160 aa, 125 aa και 144 aa αντίστοιχα. Αναλυτικά, το *BIRC5* v.6 προβλέπεται να κωδικοποιεί μια πρωτεϊνική ισομορφή που φέρει το ίδιο C-τελικό άκρο με την ισομορφή survivin-ΔEx3, ενώ σημαντικό στοιχείο αποτελεί η παρατήρηση πως περιλαμβάνει το εξώνιο 2B κοντά στο N-τελικό άκρο το οποίο έχει αποδειχθεί ότι διαταράσσει τη λειτουργική δομή της περιοχής BIR. Αυτά τα χαρακτηριστικά υποδηλώνουν τη σύνθεση μιας ισομορφής με εξασθενημένη αντι-αποπτωτική δράση, παρόμοια με την σχολιασμένη survivin-2B [86].

Τέλος, το *BIRC5* v.16 προβλέπεται να κωδικοποιεί μια μικρή πρωτεΐνη 81 aa, η οποία εμφανίζει μερικά μοναδικά δομικά χαρακτηριστικά σε σύγκριση με άλλες σχολιασμένες και προβλεπόμενες ισομορφές. Συγκεκριμένα η διαγραφή του εξωνίου 3 δημιουργεί ένα νέο αντίγραφο με περικομμένη περιοχή BIR, ενώ η συμπερίληψη του νέου εξωνίου προκαλεί μετατόπιση πλαισίου που μεταβάλλει το C-τελικό άκρο της προβλεπόμενης ισομορφής. Εξαιτίας των δομικών ομοιοτήτων στο N-τερματικό άκρο με το survivin-ΔEx3, το οποίο στερείται επίσης του εξωνίου 3, είναι αναμενόμενο ότι η προαναφερθείσα νέα πρωτεΐνική ισομορφή θα εμφανίζει επίσης αντι-αποπτωτική λειτουργία [86, 167].

Αρκετές μελέτες έχουν παράσχει στοιχεία που υποδηλώνουν τόσο άμεση όσο και έμμεση αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών ισομορφών survivin [87, 168]. Επιπλέον, πειραματικά στοιχεία έχουν δείξει ότι η κύρια ισομορφή survivin είναι οργανωμένη ως σταθερά ομο- και / ή ετεροδιμερή με τις εναλλακτικά ματισμένες ισομορφές της για τη ρύθμιση της απόπτωσης [82]. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι ένας πιθανός

μεγαλύτερος αριθμός ισομορφών survivin είναι υπεύθυνος για τη διατήρηση της εγγενούς ισορροπίας τους. Κατά συνέπεια, η αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών εναλλακτικών μεταγράφων της survivin και των ισομορφών της, επηρεάζουν άμεσα την κυτταρική της λειτουργία. Το ευέλικτο ρυθμιστικό δίκτυο των ισομορφών της survivin μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας για τον καθορισμό της ρυθμιστικής της λειτουργίας στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση [169].

Συμπερασματικά, η μελέτη μας διευκρινίζει περαιτέρω το ευρύ φάσμα των mRNA της survivin που μεταγράφονται, παρέχοντας μια εις βάθος ανάλυση των συμβάντων ματίσματος, των ορίων εξωνίων / ιντρονίων σε ένα ευρύ πλαίσιο ανθρώπινων κυτταρικών σειρών. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν δεκατέσσερις νέες παραλλαγές μεταγραφής του γονιδίου *BIRC5* (*BIRC5* v.4 - v.17) συνδυάζοντας την τεχνολογία αιχμής NGS με μια εσωτερική στοχευμένη ανάλυση DNA-seq. Τα παρατηρούμενα αντίγραφα έδειξαν ευρύ προφίλ έκφρασης mRNA στις υπό μελέτη ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, το οποίο αναμένεται, καθώς μοιράζονται το ίδιο μοτίβο έκφρασης με τις ήδη σχολιασμένες παραλλαγές ματίσματος survivin.

Ο ρόλος της survivin ως αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης μπορεί να εξηγήσει το ευρύ προφίλ έκφρασης του κύριου αλλά και των εναλλακτικών μεταγράφων στις υπό μελέτη καρκινικές σειρές. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση) αντιπροσωπεύει μια φυσιολογική διαδικασία για την αφαίρεση κατεστραμμένων ή μολυσμένων κυττάρων και τη διατήρηση της ομοιόστασης ιστού. Κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης ωστόσο, τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν την ικανότητα να αποφεύγουν την απόπτωση μέσω της ανοδικής ρύθμισης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών και / ή της καθοδικής ρύθμισης των προ-αποπτικών οδών σηματοδότησης. Τέτοιες αποκρίσεις επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να επιβιώνουν ακόμη και όταν στοχεύονται από χημειοθεραπευτικές ή βλαβερές για το DNA ενώσεις που κανονικά θα προκαλούσαν κυτταροτοξικές αποκρίσεις, επιπλέον έρευνες έχουν δείξει πως τα μέλη της οικογένειας IAP ελέγχουν τα γεγονότα σηματοδότησης που εξαρτώνται από την ουβικουϊτίνη (Ub) που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των μονοπατιών του πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB) και της μιτογόνου ενεργοποιημένης πρωτεΐνης κινάσης (MAPK). Τα παραπάνω γεγονότα με τη

σειρά τους οδηγούν στην έκφραση γονιδίων που είναι σημαντικά για φλεγμονή, ανοσία, μετανάστευση κυττάρων και επιβίωση κυττάρων Λαμβάνοντας υπ΄.οψιν λοιπόν τη φύση και λειτουργία της πρωτείνης αλλά και των υπόλοιπων μελών της οικογένειας IAP όπως η XIAP [170-172], η ευρεία έκφραση της στο πάνελ κυτταρικών σειρών θεωρείται αναμενόμενη.

Επιπλέον, με βάση τα προσδιορισμένα όρια εξωνίων / ιντρονίων, πέντε από τις νέες εναλλακτικές παραλλαγές μεταγραφής *BIRC5* (*BIRC5* v.6, v.8, v.9, v.12, v.14 και v.16) περιέχουν ORFs, επομένως αναμένεται να κωδικοποιούν τις ισομορφές και μικροπεπτίδια της πρωτεΐνης survivin. Τα υπόλοιπα εναλλακτικά μετάγραφα περιέχουν PTC και αντιπροσωπεύουν υποψηφίους NMD. Αν και τα ληφθέντα ευρήματα της τρέχουσας μελέτης παρέχουν μια σαφή επισκόπηση των mRNAs της survivin που παράγονται από το προ-mRNA, μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να επικεντρωθούν στην επικείμενη ανάγκη χαρακτηρισμού της βιολογικής λειτουργίας όλων των νέων εναλλακτικών μεταγραφικών παραλλαγών καθώς και των πιθανών ισομορφών πρωτεΐνης. Τέτοιες μελέτες θα συμβάλουν περαιτέρω στην κατανόησή μας για το πώς η ισορροπία μεταξύ των ισομορφών survivin ρυθμίζει τον κακοήθη πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την απόπτωση, παρέχοντας νέους διαγνωστικούς, προγνωστικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες καθώς και θεραπευτικούς στόχους.

Στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασης των εναλλακτικών αυτών μεταγράφων σε κυτταρικές σειρές. Ένα επιπλέον σημαντικό πεδίο επιπρόσθετης μελέτης θα μπορούσε να είναι η μελέτη της έκφρασης των εναλλακτικών μεταγράφων της survivin σε καρκινικούς ιστούς. Μέσω της μελέτης της έκφρασης σε ιστούς θα δοθεί η δυνατότητα να διευκρινιστούν οι πραγματικές διαδικασίες ρύθμισης της μεταγραφής τους καθώς και οι πιθανές αλληλεπιδράσεις των μορίων αυτών σε πραγματικούς κυτταρικούς ιστούς.

Μελέτες έχουν δείξει πως τα επίπεδα έκφρασης της survivin δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν αξιόπιστα ως δείκτης για το στάδιο του όγκου, παρόλο που στη περίπτωση του καρκίνου του μαστού περίπου το 65% των κυττάρων όγκου του μαστού φέρουν υπερεκφρασμένη φυσιολογική πρωτεΐνη survivin. Ωστόσο, κατάλληλοι συνδυασμοί της έκφρασης survivin και των εναλλακτικών

μεταγράφων σε κυτταρικούς ιστούς μπορεί να είναι πιο αξιόπιστοι όχι μόνο για την ανίχνευση καρκίνου αλλά και για το στάδιο του. Ένας κατάλληλος συνδυασμός αυτών των παραγόντων συμπεριλαμβανομένης της survivin, των ισομορφών της και των ειδικών βιομορίων θα μπορούσαν να δώσουν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα, για να βοηθήσουμε τις διαγνωστικές μεθόδους ανίχνευσης και θεραπείας καρκίνου, στο μέλλον.

Τα τελευταία χρόνια προέκυψε ένας σύνδεσμος μεταξύ της ανάπτυξης του καρκίνου και της απορρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος [173]. Ένα κοινό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων, στην πραγματικότητα, είναι η γενική απορρύθμιση του ματίσματος, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην έκφραση ειδικών για τον όγκο παραλλαγών ματίσματος και που πιθανότατα προωθείται από μεταβολές στις οδούς σηματοδότησης και από μεταβολές στη συγκέντρωση, τον εντοπισμό και τη δραστηριότητα των trans -ενεργοποιητών ρυθμιστών ματίσματος Εξακολουθεί να αμφισβητείται εάν αυτές οι αλλαγές στα προφίλ ματίσματος είναι απλώς ένας «θόρυβος» που εμφανίζεται στα καρκινικά κύτταρα ή έχουν άμεσο ρόλο στην ογκογένεση.

Στην πραγματικότητα, οι πρόσφατες εξελίξεις στη μοριακή και κυτταρική βιολογία δείχνουν ότι τα αλλοιωμένα προφίλ ματίσματος των κρίσιμων γονιδίων μπορούν να επηρεάσουν όλες τις κύριες πτυχές της βιολογίας των καρκινικών κυττάρων [174]. Η περαιτέρω μελέτη λοιπόν του προφιλ του εναλλακτικού ματίσματος και των στοιχείων που επηρεάζουν το εναλλακτικό μάτισμα σε καρκινικά κύτταρα θα μπορούσε να δώσει σημαντικά στοιχεία σχετικά με τη λειτουργία και τη φύση των καρκινικών κυττάρων και η πληθώρα των εναλλακτικών μεταγράφων της survivin θα μπορούσε να συμβάλει σημαντικά σε αυτό το στόχο.

Βιβλιογραφία

1. Wan, R., R. Bai, and Y. Shi, *Molecular choreography of pre-mRNA splicing by the spliceosome.* Curr Opin Struct Biol, 2019. **59**: p. 124-133.
2. Darnell, J.E., Jr., *Reflections on the history of pre-mRNA processing and highlights of current knowledge: a unified picture.* RNA, 2013. **19**(4): p. 443-60.
3. Lewin, B., *Units of transcription and translation: the relationship between heterogeneous nuclear RNA and messenger RNA.* Cell, 1975. **4**(1): p. 11-20.
4. Kumar, A., et al., *Mechanistic insights into mRNA 3'-end processing.* Curr Opin Struct Biol, 2019. **59**: p. 143-150.
5. Hui, J., *Regulation of mammalian pre-mRNA splicing.* Sci China C Life Sci, 2009. **52**(3): p. 253-60.
6. Nicholson, A.L. and A.E. Pasquinelli, *Tales of Detailed Poly(A) Tails.* Trends Cell Biol, 2019. **29**(3): p. 191-200.
7. Albers, R.J., B. Coffin, and F.M. Rottman, *Analysis of mRNA 5'-terminal cap structures and internal N6-methyladenosine by reversed-phase high-performance liquid chromatography.* Anal Biochem, 1981. **113**(1): p. 118-23.
8. Ramanathan, A., G.B. Robb, and S.H. Chan, *mRNA capping: biological functions and applications.* Nucleic Acids Res, 2016. **44**(16): p. 7511-26.
9. Sen, R., et al., *Distinct Functions of the Cap-Binding Complex in Stimulation of Nuclear mRNA Export.* Mol Cell Biol, 2019. **39**(8).
10. Galloway, A. and V.H. Cowling, *mRNA cap regulation in mammalian cell function and fate.* Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2019. **1862**(3): p. 270-279.
11. Tropp, E.B., *RNA polymerase II: transcriptional modifications and post-transcriptional processes.*, in *Principles of molecular biology*, M. Johnson, Editor. 2014, Jones and Bartlett Learning Burlington, England. p. 730.
12. Berget, S.M., C. Moore, and P.A. Sharp, *Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(8): p. 3171-5.
13. Raju, T.N., *The Nobel chronicles. 1993: Richard John Roberts (b 1943) Phillip A Sharp (b 1944).* Lancet, 2000. **355**(9220): p. 2085.
14. Mironov, A.A., J.W. Fickett, and M.S. Gelfand, *Frequent alternative splicing of human genes.* Genome Res, 1999. **9**(12): p. 1288-93.
15. Penalva, L.O., M.J. Lallena, and J. Valcarcel, *Switch in 3' splice site recognition between exon definition and splicing catalysis is important for sex-lethal autoregulation.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(6): p. 1986-96.
16. Venables, J.P., J. Tazi, and F. Juge, *Regulated functional alternative splicing in Drosophila.* Nucleic Acids Res, 2012. **40**(1): p. 1-10.
17. Lipscombe, D., *Neuronal proteins custom designed by alternative splicing.* Curr Opin Neurobiol, 2005. **15**(3): p. 358-63.
18. Lee, Y. and D.C. Rio, *Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing.* Annu Rev Biochem, 2015. **84**: p. 291-323.
19. Wu, Q. and A.R. Krainer, *AT-AC pre-mRNA splicing mechanisms and conservation of minor introns in voltage-gated ion channel genes.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(5): p. 3225-36.
20. Peled-Zehavi, H., et al., *Recognition of RNA branch point sequences by the KH domain of splicing factor 1 (mammalian branch point binding protein) in a splicing factor complex.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(15): p. 5232-41.
21. DeHaven, A.C., I.S. Norden, and A.A. Hoskins, *Lights, camera, action! Capturing the spliceosome and pre-mRNA splicing with single-molecule fluorescence microscopy.* Wiley Interdiscip Rev RNA, 2016. **7**(5): p. 683-701.

22. Shenasa, H. and K.J. Hertel, *Combinatorial regulation of alternative splicing.* Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2019. **1862**(11-12): p. 194392.
23. Lee, S.C. and O. Abdel-Wahab, *Therapeutic targeting of splicing in cancer.* Nat Med, 2016. **22**(9): p. 976-86.
24. Jeong, S., *SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA.* Mol Cells, 2017. **40**(1): p. 1-9.
25. Zhu, Y., et al., *Skipping of an exon with a nonsense mutation in the DMD gene is induced by the conversion of a splicing enhancer to a splicing silencer.* Hum Genet, 2019. **138**(7): p. 771-785.
26. De Conti, L., M. Baralle, and E. Buratti, *Exon and intron definition in pre-mRNA splicing.* Wiley Interdiscip Rev RNA, 2013. **4**(1): p. 49-60.
27. Wang, F., et al., *SPSB1-mediated HnRNP A1 ubiquitylation regulates alternative splicing and cell migration in EGF signaling.* Cell Res, 2017. **27**(4): p. 540-558.
28. Wang, Y. and Z. Wang, *Systematical identification of splicing regulatory cis-elements and cognate trans-factors.* Methods, 2014. **65**(3): p. 350-8.
29. Saito, Y., et al., *NOVA2-mediated RNA regulation is required for axonal pathfinding during development.* Elife, 2016. **5**.
30. Kuroyanagi, H., *Fox-1 family of RNA-binding proteins.* Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(24): p. 3895-907.
31. McClory, S.P., K.W. Lynch, and J.P. Ling, *HnRNP L represses cryptic exons.* RNA, 2018. **24**(6): p. 761-768.
32. Dredge, B.K., et al., *Nova autoregulation reveals dual functions in neuronal splicing.* EMBO J, 2005. **24**(8): p. 1608-20.
33. Solnick, D., *Alternative splicing caused by RNA secondary structure.* Cell, 1985. **43**(3 Pt 2): p. 667-76.
34. Solnick, D. and S.I. Lee, *Amount of RNA secondary structure required to induce an alternative splice.* Mol Cell Biol, 1987. **7**(9): p. 3194-8.
35. Charpentier, B. and M. Rosbash, *Intramolecular structure in yeast introns aids the early steps of in vitro spliceosome assembly.* RNA, 1996. **2**(6): p. 509-22.
36. Shen, L.X., J.P. Basilion, and V.P. Stanton, Jr., *Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 7871-6.
37. Lopez de Silanes, I., et al., *Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2987-92.
38. Eperon, L.P., et al., *Effects of RNA secondary structure on alternative splicing of pre-mRNA: is folding limited to a region behind the transcribing RNA polymerase?* Cell, 1988. **54**(3): p. 393-401.
39. Grover, A., et al., *5' splice site mutations in tau associated with the inherited dementia FTDP-17 affect a stem-loop structure that regulates alternative splicing of exon 10.* J Biol Chem, 1999. **274**(21): p. 15134-43.
40. Smith, C.W. and J. Valcarcel, *Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control.* Trends Biochem Sci, 2000. **25**(8): p. 381-8.
41. Lim, S.R. and K.J. Hertel, *Commitment to splice site pairing coincides with A complex formation.* Mol Cell, 2004. **15**(3): p. 477-83.
42. Kotlajich, M.V., T.L. Crabb, and K.J. Hertel, *Spliceosome assembly pathways for different types of alternative splicing converge during commitment to splice site pairing in the A complex.* Mol Cell Biol, 2009. **29**(4): p. 1072-82.
43. House, A.E. and K.W. Lynch, *An exonic splicing silencer represses spliceosome assembly after ATP-dependent exon recognition.* Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(10): p. 937-44.

44. Wang, E.T., et al., *Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes.* Nature, 2008. **456**(7221): p. 470-6.
45. David, C.J. and J.L. Manley, *The search for alternative splicing regulators: new approaches offer a path to a splicing code.* Genes Dev, 2008. **22**(3): p. 279-85.
46. Ohno, G., M. Hagiwara, and H. Kuroyanagi, *STAR family RNA-binding protein ASD-2 regulates developmental switching of mutually exclusive alternative splicing in vivo.* Genes Dev, 2008. **22**(3): p. 360-74.
47. Coutinho-Mansfield, G.C., et al., *PTB/nPTB switch: a post-transcriptional mechanism for programming neuronal differentiation.* Genes Dev, 2007. **21**(13): p. 1573-7.
48. Ule, J., et al., *Nova regulates brain-specific splicing to shape the synapse.* Nat Genet, 2005. **37**(8): p. 844-52.
49. Dredge, B.K. and R.B. Darnell, *Nova regulates GABA(A) receptor gamma2 alternative splicing via a distal downstream UCAU-rich intronic splicing enhancer.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(13): p. 4687-700.
50. Ellis, J.D., et al., *Tissue-specific alternative splicing remodels protein-protein interaction networks.* Mol Cell, 2012. **46**(6): p. 884-92.
51. Lin, J.C., et al., *RBM4 promotes pancreas cell differentiation and insulin expression.* Mol Cell Biol, 2013. **33**(2): p. 319-27.
52. Pihlajamaki, J., et al., *Expression of the splicing factor gene SFRS10 is reduced in human obesity and contributes to enhanced lipogenesis.* Cell Metab, 2011. **14**(2): p. 208-18.
53. Carreira-Rosario, A., et al., *Repression of Pumilio Protein Expression by Rbfox1 Promotes Germ Cell Differentiation.* Dev Cell, 2016. **36**(5): p. 562-71.
54. Schellenberg, M.J., et al., *Crystal structure of a core spliceosomal protein interface.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(5): p. 1266-71.
55. Chen, M. and J.L. Manley, *Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(11): p. 741-54.
56. Kelemen, O., et al., *Function of alternative splicing.* Gene, 2013. **514**(1): p. 1-30.
57. Sugnet, C.W., et al., *Transcriptome and genome conservation of alternative splicing events in humans and mice.* Pac Symp Biocomput, 2004: p. 66-77.
58. Hartwell, L.H., Hood, L., Goldberg, M. L., Reynolds, A. E., & Silver, L. M., *Genetics: From Genes to Genomes.* 4th ed. 2011, Boston: McGraw Hill.
59. Pan, Q., et al., *Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing.* Nat Genet, 2008. **40**(12): p. 1413-5.
60. Baralle, F.E. and J. Giudice, *Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(7): p. 437-451.
61. Moore, M.J., et al., *An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis.* Cell, 2010. **142**(4): p. 625-36.
62. Paronetto, M.P., I. Passacantilli, and C. Sette, *Alternative splicing and cell survival: from tissue homeostasis to disease.* Cell Death Differ, 2016. **23**(12): p. 1919-1929.
63. Kalsotra, A. and T.A. Cooper, *Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing.* Nat Rev Genet, 2011. **12**(10): p. 715-29.
64. Wang, H., et al., *Identification of an exon 4-deletion variant of epidermal growth factor receptor with increased metastasis-promoting capacity.* Neoplasia, 2011. **13**(5): p. 461-71.
65. Cloutier, P., et al., *Antagonistic effects of the SRp30c protein and cryptic 5' splice sites on the alternative splicing of the apoptotic regulator Bcl-x.* J Biol Chem, 2008. **283**(31): p. 21315-24.

66. Nowak, D.G., et al., *Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors.* J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 20): p. 3487-95.
67. Yae, T., et al., *Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell.* Nat Commun, 2012. **3**: p. 883.
68. Vivas-Mejia, P.E., et al., *Silencing survivin splice variant 2B leads to antitumor activity in taxane--resistant ovarian cancer.* Clin Cancer Res, 2011. **17**(11): p. 3716-26.
69. Necochea-Campion, R., et al., *Clinico-pathologic relevance of Survivin splice variant expression in cancer.* Cancer Lett, 2013. **339**(2): p. 167-74.
70. Martinez-Montiel, N., N. Rosas-Murrieta, and R. Martinez-Contreras, *[Alternative splicing regulation: implications in cancer diagnosis and treatment].* Med Clin (Barc), 2015. **144**(7): p. 317-23.
71. Jia, R., et al., *SRp20 is a proto-oncogene critical for cell proliferation and tumor induction and maintenance.* Int J Biol Sci, 2010. **6**(7): p. 806-26.
72. Fiset, S. and B. Chabot, *hnRNP A1 may interact simultaneously with telomeric DNA and the human telomerase RNA in vitro.* Nucleic Acids Res, 2001. **29**(11): p. 2268-75.
73. David, C.J., et al., *HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer.* Nature, 2010. **463**(7279): p. 364-8.
74. Patry, C., et al., *Small interfering RNA-mediated reduction in heterogeneous nuclear ribonucleoparticule A1/A2 proteins induces apoptosis in human cancer cells but not in normal mortal cell lines.* Cancer Res, 2003. **63**(22): p. 7679-88.
75. Golan-Gerstl, R., et al., *Splicing factor hnRNP A2/B1 regulates tumor suppressor gene splicing and is an oncogenic driver in glioblastoma.* Cancer Res, 2011. **71**(13): p. 4464-72.
76. Silke, J. and P. Meier, *Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(2).
77. Takahashi, R., et al., *A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases.* J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 7787-90.
78. Tamm, I., et al., *IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs.* Cancer Res, 1998. **58**(23): p. 5315-20.
79. Huang, H., et al., *The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7.* J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 26661-4.
80. Suzuki, Y., Y. Nakabayashi, and R. Takahashi, *Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8662-7.
81. MacFarlane, M., et al., *Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro.* J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36611-6.
82. Altieri, D.C., *Validating survivin as a cancer therapeutic target.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(1): p. 46-54.
83. Ambrosini, G., C. Adida, and D.C. Altieri, *A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma.* Nat Med, 1997. **3**(8): p. 917-21.
84. Muchmore, S.W., et al., *Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin.* Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 173-82.
85. Nabilsi, N.H., et al., *Sex hormone regulation of survivin gene expression.* J Endocrinol, 2010. **207**(2): p. 237-43.
86. Mahotka, C., et al., *Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties.* Cancer Res, 1999. **59**(24): p. 6097-102.

87. Noton, E.A., et al., *Molecular analysis of survivin isoforms: evidence that alternatively spliced variants do not play a role in mitosis.* J Biol Chem, 2006. **281**(2): p. 1286-95.
88. Caldas, H., L.E. Honsey, and R.A. Altura, *Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies.* Mol Cancer, 2005. **4**(1): p. 11.
89. Mola, G., et al., *Exonization of Alu-generated splice variants in the survivin gene of human and non-human primates.* J Mol Biol, 2007. **366**(4): p. 1055-63.
90. Sah, N.K. and C. Seniya, *Survivin splice variants and their diagnostic significance.* Tumour Biol, 2015. **36**(9): p. 6623-31.
91. Badran, A., et al., *Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptopsis gene survivin.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**(3): p. 902-7.
92. Vegran, F., et al., *Association of p53 gene alterations with the expression of antiapoptotic survivin splice variants in breast cancer.* Oncogene, 2007. **26**(2): p. 290-7.
93. Vegran, F., et al., *Survivin-3B potentiates immune escape in cancer but also inhibits the toxicity of cancer chemotherapy.* Cancer Res, 2013. **73**(17): p. 5391-401.
94. Eren-Keles, E., et al., *Expression of Survivin and Its Splice Variants in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia.* Genet Test Mol Biomarkers, 2018. **22**(12): p. 680-685.
95. Huang, Y., et al., *Expression and prognostic significance of survivin splice variants in diffusely infiltrating astrocytoma.* J Clin Pathol, 2011. **64**(11): p. 953-9.
96. Zhu, N., et al., *An alternatively spliced survivin variant is positively regulated by p53 and sensitizes leukemia cells to chemotherapy.* Oncogene, 2004. **23**(45): p. 7545-51.
97. Li, F. and X. Ling, *Survivin study: an update of "what is the next wave"?* J Cell Physiol, 2006. **208**(3): p. 476-86.
98. Span, P.N., et al., *Do the survivin (BIRC5) splice variants modulate or add to the prognostic value of total survivin in breast cancer?* Clin Chem, 2006. **52**(9): p. 1693-700.
99. Li, D.W., et al., *Effect of apoptotic and proliferative indices, P-glycoprotein and survivin expression on prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma.* Med Oncol, 2011. **28 Suppl 1**: p. S333-40.
100. Horisberger, K., et al., *Annexin and survivin in locally advanced rectal cancer: indicators of resistance to preoperative chemoradiotherapy?* Onkologie, 2010. **33**(8-9): p. 439-44.
101. Rodel, F., et al., *Survivin as a prognostic/predictive marker and molecular target in cancer therapy.* Curr Med Chem, 2012. **19**(22): p. 3679-88.
102. Lens, S.M., et al., *Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension.* EMBO J, 2003. **22**(12): p. 2934-47.
103. Li, F., et al., *Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin.* Nature, 1998. **396**(6711): p. 580-4.
104. Mita, A.C., et al., *Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics.* Clin Cancer Res, 2008. **14**(16): p. 5000-5.
105. Bolton, M.A., et al., *Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation.* Mol Biol Cell, 2002. **13**(9): p. 3064-77.
106. Dohi, T., et al., *Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis.* J Clin Invest, 2004. **114**(8): p. 1117-27.
107. Connell, C.M., R. Colnaghi, and S.P. Wheatley, *Nuclear survivin has reduced stability and is not cytoprotective.* J Biol Chem, 2008. **283**(6): p. 3289-96.
108. Verhagen, A.M., E.J. Coulson, and D.L. Vaux, *Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs.* Genome Biol, 2001. **2**(7): p. REVIEWS3009.

109. Khan, Z., et al., *Survivin, a molecular target for therapeutic interventions in squamous cell carcinoma.* Cell Mol Biol Lett, 2017. **22**: p. 8.
110. Wajapeyee, N., et al., *Apoptosis induction by activator protein 2alpha involves transcriptional repression of Bcl-2.* J Biol Chem, 2006. **281**(24): p. 16207-19.
111. Yamada, Y., et al., *Transcriptional expression of survivin and its splice variants in brain tumors in humans.* J Neurosurg, 2003. **99**(4): p. 738-45.
112. Malcles, M.H., et al., *Characterisation of the anti-apoptotic function of survivin-DeltaEx3 during TNFalpha-mediated cell death.* Br J Cancer, 2007. **96**(11): p. 1659-66.
113. Waligorska-Stachura, J., et al., *Survivin DEx3 as a biomarker of thyroid cancers: A study at the mRNA and protein level.* Oncol Lett, 2017. **13**(4): p. 2437-2441.
114. Shi, K., et al., *Survivin-2B promotes autophagy by accumulating IKK alpha in the nucleus of selenite-treated NB4 cells.* Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1071.
115. Moniri Javadhesari, S., et al., *Transcriptional expression analysis of survivin splice variants reveals differential expression of survivin-3alpha in breast cancer.* Genet Test Mol Biomarkers, 2013. **17**(4): p. 314-20.
116. Xu R, Z.P., Huang J, Ge S, Lu J, Qian G *Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the survivin gene.* Biochem Bio-phys Res Commun, 2007: p. 356:286–292.
117. Xu, Y., et al., *A mutation found in the promoter region of the human survivin gene is correlated to overexpression of survivin in cancer cells.* DNA Cell Biol, 2004. **23**(7): p. 419-29.
118. Romain Boidot, F.d.r.V., † Delphine Jacob, Sandy Chevrier, Nicolas Gangneux, Johann Taboureau, Claire Oudin, Vinciane Rainville, Liliane Mercier, and Sarab Lizard-Nacol*, *The Expression of BIRC5 Is Correlated with Loss of Specific Chromosomal Regions in Breast Carcinomas.* GENES, CHROMOSOMES & CANCER, 2008: p. 47:299–308.
119. Boidot, R., et al., *The transcription factor GATA-1 is overexpressed in breast carcinomas and contributes to survivin upregulation via a promoter polymorphism.* Oncogene, 2010. **29**(17): p. 2577-84.
120. Boidot, R., F. Vegran, and S. Lizard-Nacol, *Transcriptional regulation of the survivin gene.* Mol Biol Rep, 2014. **41**(1): p. 233-40.
121. Hoffman, W.H., et al., *Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53.* J Biol Chem, 2002. **277**(5): p. 3247-57.
122. Mirza, A., et al., *Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway.* Oncogene, 2002. **21**(17): p. 2613-22.
123. Reed, J.C., *The Survivin saga goes in vivo.* J Clin Invest, 2001. **108**(7): p. 965-9.
124. Sommer, K.W., et al., *Inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin is upregulated by oncogenic c-H-Ras.* Oncogene, 2003. **22**(27): p. 4266-80.
125. Cheaib, B., A. Auguste, and A. Leary, *The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges.* Chin J Cancer, 2015. **34**(1): p. 4-16.
126. Carter, B.Z., et al., *Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia.* Blood, 2001. **97**(9): p. 2784-90.
127. Ikeguchi, M., J. Liu, and N. Kaibara, *Expression of survivin mRNA and protein in gastric cancer cell line (MKN-45) during cisplatin treatment.* Apoptosis, 2002. **7**(1): p. 23-9.
128. Decker, T., et al., *Rapamycin-induced G1 arrest in cycling B-CLL cells is associated with reduced expression of cyclin D3, cyclin E, cyclin A, and survivin.* Blood, 2003. **101**(1): p. 278-85.
129. Mardis, E.R., *Next-generation DNA sequencing methods.* Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008. **9**: p. 387-402.

130. Behjati, S. and P.S. Tarpey, *What is next generation sequencing?* Arch Dis Child Educ Pract Ed, 2013. **98**(6): p. 236-8.
131. King, C. and T. Scott-Horton, *Pyrosequencing: a simple method for accurate genotyping.* J Vis Exp, 2008(11).
132. Siqueira, J.F., Jr., A.F. Fouad, and I.N. Rocas, *Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes.* J Oral Microbiol, 2012. **4**.
133. Gomez, J., et al., *Non optical semi-conductor next generation sequencing of the main cardiac QT-interval duration genes in pooled DNA samples.* J Cardiovasc Transl Res, 2014. **7**(1): p. 133-7.
134. Clark, J., *Πειραματική Βιοχημεία.* 1992.
135. Haddad, F. and K.M. Baldwin, *Reverse transcription of the ribonucleic acid: the first step in RT-PCR assay.* Methods Mol Biol, 2010. **630**: p. 261-70.
136. Lorenz, T.C., *Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies.* J Vis Exp, 2012(63): p. e3998.
137. Lutfalla, G. and G. Uze, *Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments.* Methods Enzymol, 2006. **410**: p. 386-400.
138. Garibyan, L. and N. Avashia, *Polymerase chain reaction.* J Invest Dermatol, 2013. **133**(3): p. 1-4.
139. Valones, M.A., et al., *Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review.* Braz J Microbiol, 2009. **40**(1): p. 1-11.
140. Casadei, R., et al., *Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in the zebrafish.* Gene Expr Patterns, 2011. **11**(3-4): p. 271-6.
141. Eisenberg, E. and E.Y. Levanon, *Human housekeeping genes, revisited.* Trends Genet, 2013. **29**(10): p. 569-74.
142. de Cassia-Pires, R., et al., *Multiplex PCR as a tool for the diagnosis of Leishmania spp. kDNA and the gapdh housekeeping gene of mammal hosts.* PLoS One, 2017. **12**(3): p. e0173922.
143. Lee, P.Y., et al., *Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments.* J Vis Exp, 2012(62).
144. Green, M.R. and J. Sambrook, *Touchdown Polymerase Chain Reaction (PCR).* Cold Spring Harb Protoc, 2018. **2018**(5).
145. Merriman, B., et al., *Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing.* Electrophoresis, 2012. **33**(23): p. 3397-417.
146. Cock, P.J., et al., *The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants.* Nucleic Acids Res, 2010. **38**(6): p. 1767-71.
147. Deorowicz, S. and S. Grabowski, *Compression of DNA sequence reads in FASTQ format.* Bioinformatics, 2011. **27**(6): p. 860-2.
148. Blankenberg, D., et al., *Manipulation of FASTQ data with Galaxy.* Bioinformatics, 2010. **26**(14): p. 1783-5.
149. Kim, D., B. Langmead, and S.L. Salzberg, *HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements.* Nat Methods, 2015. **12**(4): p. 357-60.
150. Zhang, H., *Overview of Sequence Data Formats.* Methods Mol Biol, 2016. **1418**: p. 3-17.
151. Robinson, J.T., et al., *Integrative genomics viewer.* Nat Biotechnol, 2011. **29**(1): p. 24-6.
152. Adamopoulos, P.G., M.C. Theodoropoulou, and A. Scorilas, *Alternative Splicing Detection Tool-a novel PERL algorithm for sensitive detection of splicing events, based on next-generation sequencing data analysis.* Ann Transl Med, 2018. **6**(12): p. 244.

153. Zaffaroni, N. and M.G. Daidone, *Survivin expression and resistance to anticancer treatments: perspectives for new therapeutic interventions.* Drug Resist Updat, 2002. **5**(2): p. 65-72.
154. Atlasi, Y., S.J. Mowla, and S.A. Ziaee, *Differential expression of survivin and its splice variants, survivin-DeltaEx3 and survivin-2B, in bladder cancer.* Cancer Detect Prev, 2009. **32**(4): p. 308-13.
155. Krieg, A., et al., *Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression.* Br J Cancer, 2002. **86**(5): p. 737-43.
156. Nakano, J., et al., *The clinical significance of splice variants and subcellular localisation of survivin in non-small cell lung cancers.* Br J Cancer, 2008. **98**(6): p. 1109-17.
157. Ryan, B., et al., *Expression of survivin and its splice variants survivin-2B and survivin-DeltaEx3 in breast cancer.* Br J Cancer, 2005. **92**(1): p. 120-4.
158. Suga, K., et al., *Correlation between transcriptional expression of survivin isoforms and clinicopathological findings in human colorectal carcinomas.* Oncol Rep, 2005. **13**(5): p. 891-7.
159. Futakuchi, H., et al., *Transcriptional expression of survivin and its splice variants in cervical carcinomas.* Int J Gynecol Cancer, 2007. **17**(5): p. 1092-8.
160. Ling, X., et al., *Differential expression of survivin-2B and survivin-DeltaEx3 is inversely associated with disease relapse and patient survival in non-small-cell lung cancer (NSCLC).* Lung Cancer, 2005. **49**(3): p. 353-61.
161. Vandghanooni, S., et al., *Survivin-deltaEx3: a novel biomarker for diagnosis of papillary thyroid carcinoma.* J Cancer Res Ther, 2011. **7**(3): p. 325-30.
162. Hentze, M.W. and A.E. Kulozik, *A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay.* Cell, 1999. **96**(3): p. 307-10.
163. Maquat, L.E., *When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells.* RNA, 1995. **1**(5): p. 453-65.
164. Orr, M.W., et al., *Alternative ORFs and small ORFs: shedding light on the dark proteome.* Nucleic Acids Res, 2020. **48**(3): p. 1029-1042.
165. Khitun, A., T.J. Ness, and S.A. Slavoff, *Small open reading frames and cellular stress responses.* Mol Omics, 2019. **15**(2): p. 108-116.
166. Plaza, S., G. Menschaert, and F. Payre, *In Search of Lost Small Peptides.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2017. **33**: p. 391-416.
167. Mahotka, C., et al., *Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants.* Cell Death Differ, 2002. **9**(12): p. 1334-42.
168. Caldas, H., et al., *Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death.* Oncogene, 2005. **24**(12): p. 1994-2007.
169. Wheatley, S.P. and D.C. Altieri, *Survivin at a glance.* J Cell Sci, 2019. **132**(7).
170. Yu, Y., et al., *XIAP overexpression promotes bladder cancer invasion in vitro and lung metastasis in vivo via enhancing nucleolin-mediated Rho-GDIbeta mRNA stability.* Int J Cancer, 2018. **142**(10): p. 2040-2055.
171. Yang, W.Z., H. Zhou, and Y. Yan, *XIAP underlies apoptosis resistance of renal cell carcinoma cells.* Mol Med Rep, 2018. **17**(1): p. 125-130.
172. Zhang, S., et al., *XIAP is highly expressed in esophageal cancer and its downregulation by RNAi sensitizes esophageal carcinoma cell lines to chemotherapeutics.* Cancer Biol Ther, 2007. **6**(6): p. 973-80.
173. Srebrow, A. and A.R. Kornblihtt, *The connection between splicing and cancer.* J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 13): p. 2635-41.
174. Venables, J.P., *Aberrant and alternative splicing in cancer.* Cancer Res, 2004. **64**(21): p. 7647-54.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ, ΝΕΩΝ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *BIRC5* ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ

ΑΔΑΜ ΕΛΕΝΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Περίληψη

Το ανθρώπινο γονίδιο της *survivin*, επίσης γνωστό και ως *BIRC5* (NM_001168.2) αποτελεί μέλος της γονιδιακής οικογένειας των αναστολέων της απόπτωσης IAP. Οι πρωτεΐνες IAP ασκούν τη ρυθμιστική τους δράση μέσω πρόσδεσής τους στις κασπάσες 3, 7 και 9, καταστέλλοντας με τον τρόπο αυτό τη δράση τους. Αν και τα επίπεδα έκφρασης της *survivin* είναι χαμηλά σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα και / ή ιστούς, μπορεί να βρεθούν σημαντικά αυξημένα σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις, καθώς και σε κακοήθεις όγκους. Πολυάριθμες έρευνες έχουν καταδείξει την σημασία του γονιδίου *BIRC5* αλλά και των εναλλακτικών του μεταγράφων στην

εμφάνιση του καρκίνου και την πορεία και την έκβαση της νόσου. Οι συμβατικές τεχνικές κλωνοποίησης και προσδιορισμού αλληλουχίας έχουν ήδη επιβεβαιώσει ότι εναλλακτικά γεγονότα ματίσματος εντός του πρόδρομου mRNA της *survivin* έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πέντε διαφορετικών εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου. Στην παρούσα μελέτη, ωστόσο, εφαρμόσαμε μια καινοτόμο μεθοδολογία στοχευμένης αλληλούχησης DNA (DNA-sequencing, DNA-seq) με τη χρήση της τεχνολογίας αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next-Generation Sequencing, NGS) για τον εντοπισμό νέων εναλλακτικών μεταγράφων της *survivin* .

Οι τεχνολογίες αλληλουχίας επόμενης γενιάς (NGS) αποτελούν βασικό εργαλείο των ερευνητών για την ανακάλυψη νέων γεγνότων εναλλακτικού ματίσματος αλλα και για την κατανόηση του ρόλου που διαδραματίζει το εναλλακτικό μάτισμα σε μείζονες κυτταρικές διαδικασίες όπως η καρκινογένεση. Στη παρούσα εργασία λοιπόν χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία αλληλούχισης επόμενης γενίας NGS προκειμένου να γίνουν γνωστά νέα εναλλακτικά αντίγραφα του γονιδίου *BIRC5* σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών με πολλές διαφορετικές προελεύσεις. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση ολικού RNA από 17 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και συντέθηκε cDNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής, χρησιμοποιώντας έναν ολιγο-dT-προσαρμογέα ως εκκινητή προκειμένου να γίνει επιλεκτική αντίστροφη μεταγραφή των mRNAs του γονιδίου. Μετά την παραγωγή του cDNA, πραγματοποιήθηκε touchdown PCR για τη μοριακή κλωνοποίηση όλων των μεταγραφών *BIRC5.* Όλα τα προϊόντα PCR καθαρίστηκαν και πραγματοποιήθηκε προετοιμασία και ποσοτικός προσδιορισμός της βιβλιοθήκης. Στο επόμενο βήμα πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση επόμενης γενίας στο Ion Torrent Personal Genome Machine™.

Μετά τη συγκέντρωση των δεδομένων που λάβαμε από την αλληλούχηση ακολούθησε η βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων η οποία αποκάλυψε αρκετές νέες θέσεις ματίσματος μεταξύ γνωστών εξωνίων του γονιδίου *survivin*, καθώς και την ύπαρξη ενός νέου εξωνίου μήκους 117 νουκλεοτιδίων, το οποίο εκτείνεται μεταξύ των γνωστών εξωνίων 3 και 3B. Η επικύρωση των ευρημάτων του NGS πραγματοποιήθηκε μέσω αντιδράσεων

PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών για κάθε νέο εναλλακτικό μετάγραφο. Με τον τρόπο αυτό, πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση δεκατεσσάρων νέων εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *survivin* (*BIRC5* v.4 - v.17), τα οποία με βάση τα αποτελέσματα της PCR εμφανίζουν ένα ευρύ προφίλ έκφρασης σε μια μεγάλη ομάδα ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών που προέρχονται από δεκαέξι ανθρώπινες κακοήθειες.

Αν και η μελέτη μας παρέχει μια ξεκάθαρη επισκόπηση των mRNAs της survivin που παράγονται από το πρόδρομο mRNA, η βιολογική λειτουργία όλων των νέων εναλλακτικών μεταγράφων καθώς και των πιθανών ισομορφών πρωτεϊνών θα πρέπει να διερευνηθεί στο εγγύς μέλλον. Οι μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν επίσης να επικεντρωθούν στις πιθανές αλληλεπιδράσεις αυτών των ισομορφών με το κύριο μετάγραφο της survivin καθώς και στις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Τέτοιες μελέτες θα παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το ρόλο της ισορροπίας μεταξύ των ισομορφών survivin στον κακοήθη πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την απόπτωση, παρέχοντας νέους διαγνωστικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες, καθώς και νέους θεραπευτικούς στόχους. Επιπλέον η μελέτη της έκφρασης των εναλλακτικών μεταγράφων της survivin σε καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς, μέσω της οποίας θα δοθεί η δυνατότητα να διευκρινιστούν οι πραγματικές διαδικασίες ρύθμισης της μεταγραφής τους, καθώς και οι πιθανές αλληλεπιδράσεις των μορίων αυτών σε πραγματικούς κυτταρικούς ιστούς αποτελεί βασικό κομμάτι μελλοντικών ερευνών.

HELLENIC REPUBLIC

National and Kapodistrian University of Athens

EST. 1837

Master in Biochemistry and Molecular Diagnostic

MASTER THESIS OF SPECIALISED DIPLOMA

STUDY AND EXPRESSION ANALYSIS OF NOVEL ALTERNATIVE TRANSCRIPT VARIANTS OF THE HUMAN BACULOVIRAL IAP REPEAT CONTAINING 5 (*BIRC5*) GENE IN CANCER CELLS USING NEXT-GENERATION SEQUENCING

ADAM ELENI

BIOLOGIST

Abstract

The human baculoviral IAP repeat containing 5 (*BIRC5*), also known as survivin, is a conserved member of the inhibitor of apoptosis protein (IAPs) family. IAP proteins exert their regulatory action by binding to caspases 3, 7 and 9, thereby suppressing their action. Although, the expression levels of survivin are low in terminally differentiated cells and/or tissues, they can be found significantly increased in certain pathological conditions as well as in malignant tumors. Numerous studies have demonstrated the importance of the *BIRC5* gene and its alternative transcripts in the development of cancer and the course and outcome of the disease. Conventional cloning and sequencing techniques have already confirmed that alternative splicing events within the survivin pre-mRNA result in five distinct alternative transcript

variants of the gene. In the present study, however, we implemented an innovative, in-house developed, targeted DNA-seq assay to identify novel survivin alternative transcript variants with significantly increased depth of coverage that high-throughput sequencing approaches offer.

Next-generation sequencing technologies (NGS) are a key tool for researchers to discover new alternative splicing events but also to understand the role of alternative splicing in major cellular processes such as carcinogenesis. In the present study, next-generation NGS sequencing technology was used in order to identify new alternative copies of the *BIRC5* gene in a wide range of human cancer cell lines with many different origins. For this purpose, total RNA was extracted from 17 human cancer cell lines and synthesized cDNA by the reverse transcription method, using an oligo-dT-adaptor as a primer to selectively reverse transcribe the *BIRC5* mRNAs. After cDNA was produced, touchdown PCR was performed for the molecular cloning of all the *BIRC5* transcripts. All PCR products were purified and library preparation and quantitation took place. At the next step NGS based on the semi-conductor sequencing technology was carried out in the Ion Torrent Personal Genome Machine™.

After collecting the data we received from the sequencing followed the bioinformatics analysis of the results which revealed several novel splice junctions between annotated exons of survivin gene as well as the existence of a novel exon of 117 nt, spanning between the annotated exons 3 and 3b. Validation of the NGS findings with PCR-based assays, using variant-specific primers, led to the identification of fourteen novel survivin alternative splice variants (*BIRC5* v.4 - v.17), which demonstrate universal expression profiles in a wide established panel of human cell lines, originating from sixteen human malignancies.

Although our study provides a crystal-clear overview of the survivin mRNAs that are actually generated from the pre-mRNA, the biological function of all novel alternative transcript variants as well as the putative protein isoforms should be investigated in the near future. Future studies could also focus in the possible interactions of these isoforms with the main transcript of survivin as well as with each-other. Such studies will provide

informations concerning the role of the balance between survivin isoforms in malignant cell proliferation and apoptosis, providing novel diagnostic, prognostic and predictive biomarkers as well as therapeutic targets. In addition, the study of the expression of alternative survivin transcripts in cancer and normal tissues, which will allow to clarify the actual processes of regulation of their transcription, as well as the possible interactions of these molecules in real cell tissues is a key part of future studies .