



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

**Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών**

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗΣ ΣΥΡΡΑΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *ΒΟΚ* ΤΗΣ
ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ *BCL2*

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΗΝΕΛΟΠΗ ΑΡΤΕΜΑΚΗ

ΑΘΗΝΑ 2019

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Σεπτέμβριος 2018 – Ιούνιο 2019 στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.), επιστημονικό υπεύθυνο τον Επίκουρο Καθηγητή Χρήστο Κοντό.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Χρήστο Κοντό και επιβλέποντα της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, την επιστημονική καθοδήγηση, αλλά και τη γενικότερη υποστήριξή του για το χρονικό διάστημα που πραγματοποιήθηκε η συγκεκριμένη εργασία.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον Καθηγητή και Διευθυντή του Τομέα Αντρέα Σκορίλα για τις συμβουλές και τις καίριες παρεμβάσεις του.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υπόλοιπους διπλωματικούς φοιτητές του εργαστηρίου, Στυλιανή Καραγιώργου, Παρασκευή Καρούση, Κατερίνα Κατσαράκη, Μαρία Μόρρου, Μιχαέλα Μπότη, Μαρία Παπασίρου και Νίκο Τσίλικα, τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Μαριάννα Καλιοράκη, Ευδοξία Καμουζά και Κατερίνα Άννα Λιόση, καθώς και τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του Καθηγητή Ανδρέα Σκορίλα για την υποστήριξη και τη βοήθειά τους, καθώς για το ευχάριστο κλίμα που επικράτησε όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Πίνακας Περιεχομένων

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. Απόπτωση	1
1.1. Μορφολογικές και βιοχημικές διεργασίες απόπτωσης	2
1.2. Μονοπάτια απόπτωσης	4
1.2.1. Ενδογενές μονοπάτι	4
1.2.2. Εξωγενές μονοπάτι	6
2. Μόρια με σημαντικό ρόλο στην απόπτωση	9
2.1. Μέλη της οικογένειας των Κασπασών	9
2.2. Οικογένεια BCL2	11
2.2.1. Κατηγορίες της οικογένειας BCL2	11
2.2.2. Οικογένεια BCL2 στο κεντρικό νευρικό σύστημα	13
2.2.3. Οι πρωτεΐνες BCL2 ελέγχουν τον νευρωνικό τραυματισμό	14
2.2.4. Οι πρωτεΐνες BCL2 στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας	16
2.2.5. Οικογένεια BCL2 στον καρκίνο	19
3. BCL2 family apoptosis regulator, BOK	22
3.1. BOK και σηματοδότηση Ca²⁺	25
4. Συρραφή (Μάτισμα)	27
4.1. Γενικός μηχανισμός συρραφής	27
4.2. Εναλλακτική συρραφή	28
4.3. Ρυθμιστικά στοιχεία και πρωτεΐνες	31
4.4. Ασθένεια	33
4.5. BOK και Εναλλακτική Συρραφή	35
ΣΚΟΠΟΣ	36
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
1. Βιοπληροφορική Ανάλυση	37
2. Κυτταροκαλλιέργειες	37
2.1. Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιεργειών	38
3. Απομόνωση ολικού RNA από καρκινικές κυτταρικές σειρές	39
4. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητας του απομονωμένου ολικού RNA	39
5. Αντίστροφη μεταγραφή	40
5.1. Αρχή μεθόδου	40

5.2.	Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής.....	40
6.	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR).....	41
6.1.	Αρχή μεθόδου	41
6.2.	Γονίδια σταθερής έκφρασης (housekeeping genes)	42
6.3.	Σχεδιασμός εκκινητών συμβατικής PCR	42
6.4.	Εκκινητές συμβατικής PCR για τον έλεγχο έκφρασης του γονιδίου αναφοράς, <i>GAPDH</i>	43
6.5.	Εκκινητές συμβατικής PCR για τη μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου <i>BOK</i>	43
6.6.	Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) του γονιδίου <i>BOK</i>	44
7.	Επάλληλη PCR (Nested PCR)	44
7.1.	Αρχή μεθόδου	44
7.2.	Εκκινητές για μελέτη έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου <i>BOK</i> σε επάλληλη PCR.....	45
7.3.	Συνθήκες επάλληλης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) του γονιδίου <i>BOK</i>	47
8.	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου – Real-time PCR	47
8.1.	Αρχή μεθόδου	47
8.2.	Σχεδιασμός εκκινητών για τη Real- time PCR	49
8.3.	Εκκινητές Real- time PCR για τη μελέτη έκφρασης του γονιδίου <i>GAPDH</i>	50
8.4.	Εκκινητές Real- time PCR για τη μελέτη έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου <i>BOK</i>	50
8.5.	Συνθήκες ποσοτικής real-time PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA του γονιδίου <i>BOK</i>	51
9.	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	52
9.1.	Αρχή μεθόδου	52
9.2.	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προϊόντα του γονιδίου <i>BOK</i> και κόψιμο των επιθυμητών ζωνών	53
10.	Καθαρισμός PCR προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης με χρήση στηλών.....	53
10.1.	Αρχή μεθόδου	53
10.2.	Καθαρισμός PCR προϊόντων του <i>BOK</i> από πήκτωμα αγαρόζης με χρήση στηλών.....	54

11.	Προσδιορισμός συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων με φθορισμομετρία.....	54
11.1.	Αρχή μεθόδου	54
11.2.	Προσδιορισμός συγκέντρωσης των PCR προϊόντων του <i>ΒΟΚ</i> φθορισμομετρικά.....	54
12.	Αλληλούχηση με τη μέθοδο Sanger.....	55
12.1.	Αρχή Μεθόδου.....	55
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	57
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	73
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	97

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Απόπτωση

Ο βασικός στόχος ενός κυττάρου είναι σε πρώτο επίπεδο να επιβιώσει με απώτερο σκοπό τον πολλαπλασιασμό του. Ο έλεγχος τόσο των γεγονότων πολλαπλασιασμού όσο και του μηχανισμού θανάτου θεωρείται ζωτικής σημασίας, προκειμένου να διατηρηθεί ισορροπία μεταξύ των ζωντανών και νεκρών κυττάρων στο σώμα. Η απόπτωση, ή αλλιώς προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, είναι ένας από τους κυτταρικούς μηχανισμούς θανάτου και μπορεί να οριστεί ως η διαδικασία θανάτου οποιουδήποτε κυττάρου κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Ο όρος, αυτός, είναι μία ελληνική λέξη, η οποία σημαίνει «πτώση των πετάλων ενός λουλουδιού ή των φύλλων ενός δέντρου κατά το φθινόπωρο». Η απόπτωση αποτελεί ένα κομμάτι του φυσικού ομοιοστατικού μηχανισμού, με σκοπό τη διατήρηση του αριθμού των κυττάρων σε έναν οργανισμό σταθερό, καθώς και την παροχή βοήθειας στον ιστό για να ελαχιστοποιηθούν οι αυξανόμενοι αριθμοί ανεπιθύμητων ή μη αναγκαίων κυττάρων, τα οποία έχουν υποστεί φθορές ή δεν είναι πλέον διαχειρίσιμα κατά τη διάρκεια την ανάπτυξης, της αύξησης ή της γήρανσης.

Η απόπτωση είναι ένας αμυντικός μηχανισμός εναντίον κυττάρων, τα οποία έχουν υποστεί φθορές, βρίσκονται σε πίεση ή έχουν διεγερθεί από οποιοδήποτε παράγοντα προκειμένου να παρεμποδιστεί η συσσώρευση μη λειτουργικών κυττάρων στους ιστούς. Εάν η μετάδοση της απόπτωσης δεν πραγματοποιηθεί σωστά στα συγκεκριμένα κύτταρα, τότε μεταλλάξεις θα συνεχίσουν να συσσωρεύονται στα κύτταρα με πιθανό επακόλουθο τη δημιουργία καρκίνου και άλλων ασθενιών, όπως αυτοάνοσα νοσήματα, AIDS ή κάποιες νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Η απόπτωση θεωρείται ως ένας από τους καλύτερα προσδιορισμένους τύπους προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου: υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι μηχανισμών κυτταρικού θανάτου, όπως η πυρόπτωση, η νέκρωση ή η αυτοφαγία, καθώς και κάποιοι ακόμη που μπορεί να μην έχουν ανακαλυφθεί ακόμη. Τα ρυθμιστικά μονοπάτια της απόπτωσης, τα οποία περιλαμβάνουν έναν μεγάλο αριθμό οικογενειών γονιδίων, ενορχηστρώνουν τις ειδικές μορφολογικές και βιοχημικές κυτταρικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

1.1. Μορφολογικές και βιοχημικές διεργασίες απόπτωσης

Πολλά βιοχημικά γεγονότα και μια σειρά μορφολογικών αλλαγών συμβαίνουν στο αρχικό στάδιο και συνεχίζονται όλο και περισσότερο μέχρι το τέλος της διαδικασίας της απόπτωσης. Μερικές από τις αλλαγές, όπως η συρρίκνωση των κυττάρων, η συμπύκνωση της χρωματίνης ή οι πυρηνικές διαφορές μπορούν να παρατηρηθούν με τεχνικές όπου χρησιμοποιείται μικροσκόπιο [1, 2]. Ένας καταρράκτης μορφολογικών γεγονότων που περιλαμβάνει τη συσσωμάτωση κυτταροπλασματικού νήματος, τη συμπύκνωση του πυρήνα, τον κυτταρικό κατακερματισμό, και τη διόγκωση της μεμβράνης πλάσματος, οδηγεί τελικά στο σχηματισμό των αποπτωτικών σωματίων. Όλα τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης μπορούν να συγκεντρωθούν σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τις αλλαγές που υφίστανται στον πυρήνα, η δεύτερη τις μεταβολές στη κυτταρική μεμβράνη και στο κυτοσόλιο, και η τρίτη όσα συμβαίνουν στα μιτοχόνδρια [1, 3]. Η συμπύκνωση χρωματίνης, ο κατακερματισμός του DNA και ο πυρηνικός κατακερματισμός είναι πυρηνικές αλλαγές που θα μπορούσαν να παρατηρηθούν με οπτικό μικροσκόπιο και μικροσκόπιο φθορισμού κατά τη διάρκεια της απόπτωσης. Το κύτταρο που βρίσκεται σε απόπτωση χάνει την επαφή του με άλλα κύτταρα, στο στάδιο έναρξης της διαδικασίας, από διαφορετικά σήματα που σπάζουν τη σύνδεση. Αυτός ο διαχωρισμός ακολουθείται από το σχηματισμό αποπτωτικών σωματίων και έχει ως αποτέλεσμα να εμποδίζει τη φλεγμονώδη αντίδραση των κυττάρων, καθώς αυτά συσκευάζουν τα συστατικά του κυττάρου, προκειμένου να μην απελευθερωθεί τίποτα το μολυσματικό έξω από το κύτταρο. Στη συνέχεια, τα σωματίδια φαγοκυτταρώνονται γρήγορα από άλλα γειτονικά κύτταρα. Τα γειτονικά αυτά κύτταρα, που ουσιαστικά τα απορροφούν, δεν παράγουν κανένα σήμα που να προκαλεί φλεγμονώδη αντίδραση. Επίσης, τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο μέσω αλληλεπίδρασης τους με πολλές διαφορετικές αποπτωτικές/αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, όσο και μέσω απελευθέρωσης σηματοδοτικών μορίων [4, 5]. Ο ρόλος αυτών αναλύεται εκτενώς παρακάτω.

Η συμπύκνωση της χρωματίνης και ο πυρηνικός κατακερματισμός είναι οι βασικές τροποποιήσεις που παρατηρούνται στον πυρήνα, επηρεάζοντας την πυκνότητα του (η χρωματίνη συμπυκνώνεται μη αναστρέψιμα, κάτι που σηματοδοτεί τον κυτταρικό θάνατο), ενώ επακόλουθο αυτών είναι η καρυόρηξη (πυρηνικός κατακερματισμός, το τελευταίο συμβάν στον πυρήνα κατά τη διάρκεια της απόπτωσης) [6]. Ο κατακερματισμός του δίκλωνου DNA σε αλληλουχίες 180-200 ζεύγη βάσεων σε μήκος με τη βοήθεια των κασπασών (πρωτεΐνες) είναι ένα ακόμη βασικό χαρακτηριστικό των πυρηνικών γεγονότων,

κατά τη διάρκεια της απόπτωσης. Οι κασπάσες είναι υπεύθυνες για την επιδιόρθωση του DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του, καθώς και για το στάδιο τερματισμού της απόπτωσης. Συμμετέχουν, επίσης, στον κατακερματισμό και στην απόπτωση μαζί με τους συντελεστές κατακερματισμού DNA (DFFs) και τις ενδονουκλεάσες. Οι περισσότερες από τις πυρηνικές μεταβολές της απόπτωσης παρατηρούνται με ηλεκτρονική μικροσκοπία ή ακόμη και με μικροσκοπία φωτός, καθιστώντας με αυτόν τον τρόπο τη διαδικασία απόπτωσης εύκολα προσδιορίσιμη [6, 7].

Μόλις ξεκινήσει η απόπτωση στα κύτταρα, χάνεται η σύνδεση αυτών με τα γειτονικά τους. Η μεμβράνη συρρικνώνεται και το κύτταρο συσकुεύζει τα κυτοσολικά συστατικά του σε αποπτωτικά σωμάτια. Τα αποπτωτικά σωμάτια θα εγκλωβωθούν από φαγοκυττάρα που αναγνωρίζουν τη φωσφατιδυλοσερίνη. Το συγκεκριμένο γλυκοφωσφολιπίδιο βρίσκεται φυσιολογικά στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ περνάει στην εξωτερική πλευρά κατά τη διάρκεια της απόπτωσης [8]. Την ίδια στιγμή, οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και οι πρωτεΐνες σύνδεσης των κυττάρων όπως η ακτίνη, η β-κατενίνη, η σπεκτρίνη ή η GAS2 απενεργοποιούνται με διάσπαση και το κύτταρο χάνει την ακεραιότητά του από τη λειτουργία των κασπασών [9].

Τα μιτοχόνδρια έχουν πολύπλοκους και σημαντικούς ρόλους παρέχοντας διάφορα προ-αποπτωτικά σήματα, δημιουργώντας έναν καταρροϊκό καταρράκτη για ενεργοποίηση της απόπτωσης. Η ισορροπία μεταξύ των προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών μορίων διατηρεί την κυτταρική ομοιόσταση σταθερή και καθορίζει τη μοίρα των κυττάρων, η οποία είναι είτε η απόπτωση είτε ο πολλαπλασιασμός. Τα μιτοχόνδρια έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο, καθώς απελευθερώνουν ένα πλήθος σημαντικών μορίων που επάγουν την απόπτωση, συμπεριλαμβανομένου του κυτοχρώματος c, του SMAC, του παράγοντα επαγωγής της απόπτωσης, ή της ενδονουκλεάσης G, με αποτέλεσμα τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η διαπερατότητα προκαλείται από προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας B λεμφοκυττάρων, BCL2 (B-cell lymphoma 2), ενώ η ακεραιότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης διατηρείται από αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας BCL2 [5, 10, 11].

Αρκετές βιοχημικές αλλαγές, όπως οι τροποποιήσεις πρωτεϊνών, η αλλοίωση του DNA και της χρωματίνης και η σύνθεση δεικτών της κυτταρικής επιφάνειας, συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της απόπτωσης. Οι κασπάσες είναι κυρίως υπεύθυνες για αυτές τις αλλαγές με τις εκτεταμένες δυνατότητές τους να διασπούν ορισμένα μόρια από ένα ή περισσότερα συγκεκριμένα σημεία, προκαλώντας υποβάθμιση και απενεργοποίηση της πρωτεΐνης στόχου. Επιπλέον, μπορούν να αναστείλλουν τις αρνητικές ρυθμιστικές περιοχές

συγκεκριμένων πρωτεϊνών, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του υποβληθέντος μορίου [12, 13]. Τέλος, συμμετέχουν και στη διαδικασία κατακερματισμού του DNA.

1.2. Μονοπάτια απόπτωσης

Η απόπτωση μπορεί να διεγερθεί από δύο διαφορετικά μονοπάτια. Το ένα μονοπάτι είναι το ενδογενές (μιτοχόνδρια) και εμφανίζεται, κυρίως, μέσω απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. Το κυτόχρωμα c, εν συνεχεία, ενεργοποιεί διαφορετικές κασπάσες ως καταρροϊκά σήματα. Το δεύτερο είναι το εξωγενές μονοπάτι, με βασικό μόριο τον υποδοχέα θανάτου, FAS, ο οποίος ενεργοποιείται από ένα σήμα προερχόμενο από το εξωτερικό του κυττάρου. Μετά την ενεργοποίηση διαφορετικών ενδιάμεσων μορίων μέσω καταρράκτη σηματοδότησης, τα δύο αυτά μονοπάτια συναντώνται στο τελικό στάδιο ενεργοποίησης κασπασών και συνήθως, οδηγούν σε διάσπαση διαφορετικών πρωτεϊνών [14].

1.2.1. Ενδογενές μονοπάτι

Το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης είναι ανεξάρτητο από κάποιον υποδοχέα σηματοδότησης. Ωστόσο, είναι άμεσα εξαρτώμενο από ερεθίσματα που σχετίζονται με τα μιτοχόνδρια, οδηγώντας τελικά στη δημιουργία μιας ενδοκυτταρικής σηματοδότησης (Εικόνα 1). Η εσωτερική ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού οδηγεί το κύτταρο να ξεκινήσει τη διαδικασία της απόπτωσης, είτε με θετικό, είτε με αρνητικό τρόπο. Τα θετικά ερεθίσματα (π.χ. τοξικά υλικά, ιικές λοιμώξεις και ακτινοβολίες) ενεργοποιούν άμεσα όλους τους διαμεσολαβητές για την απόπτωση, ενώ τα αρνητικά ερεθίσματα (απώλεια αυξητικών παραγόντων, διαφορετικές κυτοκίνες ή κάποιο συγκεκριμένο είδος ορμονών) λειτουργούν σε αντίθεση με τα θετικά και εξαλείφουν τους παράγοντες που καταστέλλουν την απόπτωση στα κύτταρα και προκαλούν ενεργοποίηση αυτής [1, 15]. Επιπροσθέτως, σε διάφορες λοιμώξεις ή σε ενδοκυτταρική ενεργοποίηση της μεσολαβούμενης από κυτοκίνες απόπτωσης, η βλάβη του DNA ενδέχεται να προκαλέσει, επίσης, απόπτωση. Η συγκεκριμένη διαδικασία μπορεί να θεωρηθεί ως ένας μηχανισμό προστασίας των κυττάρων, εμποδίζοντας την συνέχιση του πολλαπλασιασμού τους, που θα οδηγούσε σε μια ατελή αλληλουχία DNA. Οι βλάβες του DNA ή οποιοδήποτε άλλου είδους ερέθισμα που αφορά την απόπτωση, προκαλούν μεταβολές στο δυναμικό της trans-μεμβράνης των

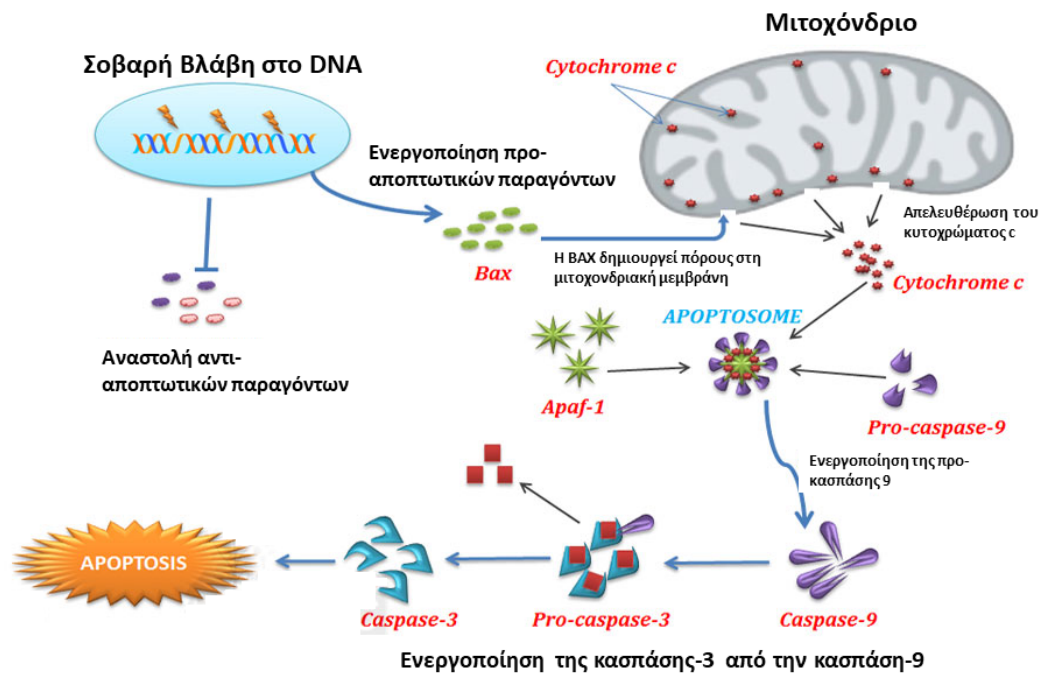
μιτοχονδρίων, που έχουν ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα.

Το κυτόχρωμα c, οι υποδοχείς SMAD ή η πρωτεΐνη A2 (HTRA2)/OMI που απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες, είναι μια ομάδα προ-αποπτωτικών μορίων που απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια και προκαλούν την ενεργοποίηση ενός καταρράκτη κασπάσων [16, 17]. Το κυτόχρωμα c αλληλεπιδρά με τον APAF1, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου αποπτωσωμάτων 'Baroptosome' που ενεργοποιεί την προ-κασπάση-9. Μετά την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 από την ενεργοποιημένη κασπάση-9, ο τελικός καταρράκτης ενεργοποιείται και ακολουθεί πυρηνικός κατακερματισμός και διάτρηση της πυρηνικής μεμβράνης [18]. Αυτό το στάδιο είναι το αρχικό συμβάν τόσο για την εξωγενή όσο και για την ενδογενή οδό απόπτωσης, όπου η κασπάση-3 διασπά τις διάφορες πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένου κινασών, πρωτεϊνών που ελέγχουν το DNA, κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών ή αναστολέων ενδονουκλεασών. Η συμπίκνωση του DNA, η διόγκωση της μεμβράνης και όλες οι μορφολογικές αλλαγές ρυθμίζονται από τις κασπάσες, ως κοινός μηχανισμός τόσο για την ενδογενή όσο και για την εξωγενή οδό [12].

Από την άλλη πλευρά, μια άλλη ομάδα μορίων, που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια, συμπεριλαμβανομένης της ενδονουκλεάσης G ή της AIF, έχουν, επίσης, προ-αποπτωτική δράση, αλλά συμμετέχουν στη διαδικασία σε πρώιμα αλλά και μεταγενέστερα στάδια. Αυτά τα μόρια μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου προκαλούν, αρχικά, κατακερματισμό του DNA και συμπίκνωση της χρωματίνης που ορίζεται ως 'στάδιο 1', και σε μεταγενέστερο στάδιο, μια προηγμένη συμπίκνωση και κατακερματισμό του DNA με τη βοήθεια της κασπάσης-3, που καλείται ως 'στάδιο' 2 [19].

Όλα τα γεγονότα της ενδογενούς απόπτωσης ελέγχονται κυρίως από την οικογένεια πρωτεϊνών BCL2 και την πρωτεΐνη καταστολής όγκων p53, που εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό στην ενεργοποίηση της οικογένειας πρωτεϊνών BCL2. Τα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών BCL2 μπορούν να ενεργήσουν είτε ως προ-αποπτωτικά (BAX, BAK, BID, BIM, PUMA, NOXA, BAD, και BLK) ή αντι-αποπτωτικά (BCL2, BCLXL, BCLX και BAG) και καθορίζουν επίσης την ακεραιότητα της μεμβράνης των μιτοχονδρίων, ενώ εμπλέκονται στη διαδικασία απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c [1, 20].

Ενδογενές Μονοπάτι Απόπτωσης



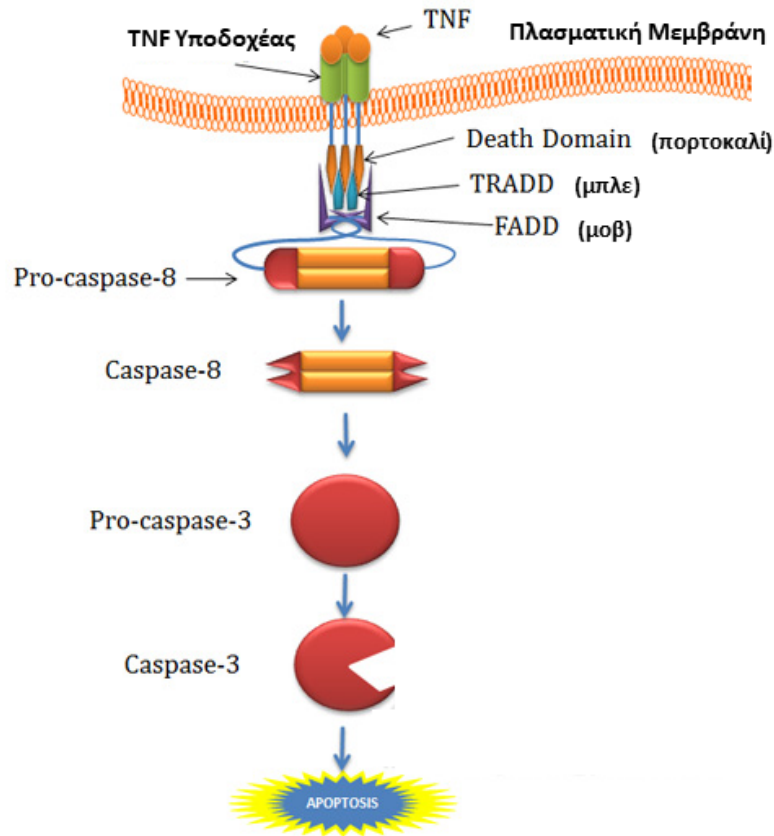
Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης. Κάποιο ερέθισμα (στη συγκεκριμένη Εικόνα το ερέθισμα αυτό είναι η βλάβη του DNA) προκαλεί ενεργοποίηση των προαποπτωτικών παραγόντων, όπως είναι το BAX, και αναστολή των αντιαποπτωτικών παραγόντων. Το BAX δημιουργεί πόρους στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, οδηγώντας σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Το κυτόχρωμα c αλληλεπιδρά με την προ-κασπάση 9 και την Apaf-1 σχηματίζοντας το αποπτωτικό σωματίο. Το σωματίο αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης 9, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την κασπάση 3, έχοντας ως ενδιάμεσο προϊόν την προ-κασπάση 3. Το τελικό αποτέλεσμα όλων των προαναφερθέντων είναι η απόπτωση (Τροποποιημένη εικόνα από: <https://www.easybiologyclass.com/intrinsic-pathway-of-apoptosis-apoptosis-molecular-mechanism-part-1/>).

1.2.2. Εξωγενές μονοπάτι

Η απόπτωση που διεγείρεται από την εξωγενή οδό, ενεργοποιείται κυρίως με σηματοδότηση μέσω δεσμευμένων με τη μεμβράνη υποδοχέων θανάτου που ανήκουν στην υπερικογένεια του γονιδίου που είναι παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF) (Εικόνα 2). Το αρχικό σήμα παρέχεται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προσδετών και της εξωκυττάριας περιοχής των υποδοχέων θανάτου. Κύρια παραδείγματα τέτοιου είδους

αλληλεπιδράσεων αναπτύσσονται μεταξύ των ακόλουθων μορίων προσδέτη και υποδοχέα: FAS/FASR, TNF/TNF R1, APO2L/DR4, ή τον σχετιζόμενο με την απόπτωση, επαγωγίμο προσδέτη του TNF (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) [21]. Η σύνδεση του προσδέτη FAS στον υποδοχέα του, επάγει τη δέσμευση μιας πρωτεΐνης-αντάπτορα που λέγεται επικράτεια θανάτου σχετιζόμενη με τον Fas (Fas Associated Death Domain (FADD)), ενώ η αλληλεπίδραση του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF) με τον TNFR, δηλαδή τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκου, προκαλεί τη σύνδεση της πρωτεΐνης-αντάπτορα, TNFR σχετιζόμενου με την επικράτεια θανάτου (TNFR Associated Death Domain, TRADD), η οποία καταλήγει σε ενεργοποίηση της προ-κασπάσης-8. Η προ-κασπάση-8 ενεργοποιείται αυτοκαταλυτικά, με τη βοήθεια του συμπλέγματος σηματοδότησης που προκαλεί θάνατο (DISC). Η ενεργή κασπάση-8 προκαλεί ενεργοποίηση, είτε της BID, και έτσι το ενδογενές μονοπάτι εμπλέκεται και ενεργοποιείται με ένα εξωτερικό σήμα, είτε της κασπάσης-3 και κασπάσης-7 και η διαδικασία ενεργοποίησης της απόπτωσης τερματίζεται με την ίδια τελική οδό όπως με τα ενδογενή ερεθίσματα [1, 14, 22, 23]. Η πρωτεΐνη BID είναι ένα προ-αποπτωτικό μέλος της οικογένειας BCL2, και αποτελεί ένα κοινό μόριο μεταξύ της ενδογενούς και της εξωγενούς οδού απόπτωσης. Η κασπάση-8 προκαλεί τη διάσπαση και τη μυριστοϋλίωση της κυτταροπλασματικής BID πρωτεΐνης, που οδηγεί στην κυκλοφορία της μέσω των μιτοχονδρίων. Έπειτα, ο σχηματισμός αποπτωτικών σωματίων επάγεται από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος μέσω των BAK1 και BAX μορίων [24].

Η εξωγενής ενεργοποίηση της απόπτωσης μπορεί επίσης να ανασταλεί μέσω δύο διαφορετικών τρόπων. Ο ένας είναι μέσω δέσμευσης της FLICE ανασταλτικής πρωτεΐνης (cFLIP) στο FADD και στην προ-κασπάση-8, εμποδίζοντας, έτσι, τη δραστηριότητά τους και ο άλλος τρόπος είναι η παρεμπόδιση της βιογένεσης της κασπάσης-8 από μια πρωτεΐνη που ονομάζεται TOSO, η οποία είναι η πρώτη που περιγράφεται στα T κύτταρα [25, 26].



Εξωγενές Μονοπάτι Απόπτωσης

Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης. Στο εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης, το σήμα που οδηγεί σε απόπτωση προκαλείται από ένα εξωτερικό ερέθισμα. Το ερέθισμα αυτό είναι, κυρίως, κυτοκίνη. Η πιο καλά μελετημένη κυτοκίνη είναι μία εξωκυττάρια πρωτεΐνη αγγελιοφόρος, ο παράγοντας νέκρωσης όγκου, TNF. Ο TNF προσδέεται, αρχικά, στον υποδοχέα του, TNFR, που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη. Η πρόσδεση του TNF στον υποδοχέα του προκαλεί διαμορφωτική αλλαγή σε μία από τις επικράτειες του, την επικράτεια θανάτου (death domain). Στην ενεργοποιημένη επικράτεια θανάτου προσδέονται δύο κυττοσολικές πρωτεΐνες προσδέτες, οι TRADD και FADD και κατάλοιπα της προ-κασπάσης 8, σχηματίζοντας, έτσι, ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο. Μετά από την αλληλεπίδραση της προ-κασπάσης 8 και του FADD, τα δύο μόρια της προ-κασπάσης 8 κόβονται και παράγεται ένα μόριο ενεργοποιημένης κασπάσης 8. Η ενεργοποιημένη κασπάση 8 οδηγεί σε καταρροϊκή ενεργοποίηση των κασπασών τελεστών (κασπάση 3), με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης (Τροποποιημένη εικόνα από: <https://www.easybiologyclass.com/extrinsic-pathway-of-apoptosis-apoptosis-molecular-mechanism-part-2/>).

2. Μόρια με σημαντικό ρόλο στην απόπτωση

Πληθώρα μορίων φαίνεται να σχετίζονται με την απόπτωση, συμπεριλαμβανομένου μέλη της οικογένειας των κασπασών, της BCL2 οικογένειας και της υπεροικογένειας του TNF γονιδίου, τον υποδοχέα θανάτου 3, η πρωτεΐνη p53, ο κυτταρικής επιφάνειας υποδοχέας θανάτου Fas και ο προσδέτης του. Παρακάτω περιγράφεται η δράση δύο εκ των προαναφερθέντων συστατικών στην απόπτωση: 1. των μελών της οικογένειας των κασπασών και 2. ο ρόλος των μελών της οικογένειας BCL2 (σε πιο εκτεταμένο βαθμό). Η συγκεκριμένη εργασία θα επικεντρωθεί στην μελέτη της οικογένειας BCL2, εστιάζοντας στο γονίδιο *BCL2-related ovarian killer (BOK)*.

2.1. Μέλη της οικογένειας των Κασπασών

Η οικογένεια κασπασών περιλαμβάνει διατηρημένες εξειδικευμένες πρωτεάσες κυστεΐνης-ασπαρτικού (cysteine aspartic-specific proteases) και τα μέλη της οικογένειας αυτής θεωρούνται κρίσιμα για τη ρύθμιση της απόπτωσης [27]. Στο *C. elegans*, η *ced-3* αναφέρθηκε ότι είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό θάνατο, ο οποίος διεξάγεται κυρίως από την κασπάση *ced-3*, την *ced-4* που ενεργοποιεί την *ced-3* και την *ced-9* που αναστέλλει την απόπτωση [28, 29]. Υπάρχουν 14 διαφορετικές κασπάσες στα θηλαστικά και ουσιαστικά ταξινομούνται ως κασπάσες-εκκινήτες που περιλαμβάνουν την κασπάση-2, -8, -9 και -10, οι κασπάσες-τελεστές που περιλαμβάνουν την κασπάση-3, -6, -7 και -14 και κασπάσες-ενεργοποιητές κυτοκίνης που περιλαμβάνουν την κασπάση-1, -4, -5, -11, -12 και -13 [30, 31].

Οι κασπάσες-3, -6 και -7 εμπλέκονται στην ομάδα κασπασών που είναι τελεστές, και ενεργούν με παρόμοιο τρόπο στην αποπτωτική διαδικασία [32]. Η κασπάση-3 ενεργοποιείται μέσω εξωγενών αλλά και ενδογενών αποπτωτικών μονοπατιών [33]. Παρά τις περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με την κασπάση-6 και -7 σε σχέση με την κασπάση-3, είναι γνωστό ότι, ενώ η καταστολή της κασπάσης-3 έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης, ενώ η καταστολή της κασπάσης-6 και της κασπάσης-7 δεν επηρεάζει σημαντικά την αποπτωτική διαδικασία [34]. Επιπλέον, η κασπάση-3 έχει αναφερθεί, ότι είναι κρίσιμη για τη διάσπαση της πολυ-(ADP-ριβόζη) πολυμεράση (PARP) και τον κατακερματισμό του DNA, που αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα της απόπτωσης [35]. Ωστόσο, μερικές μελέτες έδειξαν ότι σε κύτταρα, στα οποία είχαν απενεργοποιηθεί και η κασπάση-3 και η κασπάση-7 (knock-out) μπορούσαν να υποβληθούν σε κυτταρικό

θάνατο, με έναν εναλλακτικό τρόπο, μέσω νέκρωσης. Μελέτες με κύτταρα από θύμο αδένα, όπου έγινε εξουδετέρωση της κασπάσης-3 και της κασπάσης-7, και εμβρυονικούς (embryonic) ινοβλάστες ποντικού, έδειξαν ότι τα κύτταρα από θύμο αδένα παραμένουν ευαίσθητα στην απόπτωση που προκαλείται από τον FAS, ενώ οι ινοβλάστες γίνονται ανθεκτικοί [35, 36].

Λειτουργικά γνωστό μέλος της οικογένειας κασπασών θεωρείται η κασπάση- 8, η οποία είναι κρίσιμος παράγοντας για την προκαλούμενη από τον TNF, εξωγενή αποπτωτική οδό [37]. Η προ-κασπάση-8 προσλαμβάνεται στο επαγόμενο από το θάνατο σηματοδοτικό σύμπλοκο, DISC (death-inducing signaling complex) από το FADD, και ο διμερισμός ή ο τριμερισμός αυτής προκαλεί την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 μέσω αμοιβαίας διάσπασης. Η κασπάση-8, με τη σειρά της, διασπάται και ενεργοποιεί την κασπάση-3 και την κασπάση -7, την πρωτεΐνη Bid, καθώς επίσης και το μεταγραφικό παράγοντα NF-kB [38, 39]. Η ενεργοποίηση της κασπάσης-8 ρυθμίζεται από τη cFLIP [Cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein] που θεωρείται δομικά ομόλογη ως προς την κασπάση-8, χωρίς, ωστόσο, να έχει δραστηριότητα κασπάσης [40]. Το FLIP_s, η κοντή ισομορφή του cFLIP, ελέγχει το σχηματισμό του DISC με αρνητικό τρόπο. Ωστόσο, η μακρά ισομορφή του cFLIP, το FLIP_L, έχει αμοιβαία επίδραση στο σχηματισμό του DISC και στη δραστηριότητα της κασπάσης-8. Ενώ μερικές μελέτες ανέφεραν το FLIP_L ως επαγωγέα του σχηματισμού του DISC, ορισμένες αναφορές έδειξαν ότι θα μπορούσε να δράσει και ως αναστολέας [41, 42]. Ανασταλτικά και επαγωγικά αποτελέσματα του FLIP_L για τη δραστηριότητα της κασπάσης-8 εξαρτώνται από τα επίπεδα του FLIP_L. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, η παραγωγή ετεροδιμερών μεταξύ του FLIP_L και της προκασπάσης-8 ή της προκασπάσης-10, επάγει τη δραστηριότητά τους. Ωστόσο, σε υψηλότερα επίπεδα FLIP_L, η ενεργοποίηση της κασπάσης-8 μειώνεται και έχουμε αύξηση της ενεργοποίησης του NF-kB [43, 44].

Η κασπάση-9, η κασπάση εκκινήτης, είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τη δημιουργία του συμπλέγματος αποπτωτικών σωματίων στο μιτοχονδριακό μονοπάτι. Μόλις το κυτόχρωμα c απελευθερωθεί από τα μιτοχόνδρια, συνδέεται με τον APAF1 που είναι ο υποδοχέας του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα [45]. Το κυτοχρώματα-c και ο APAF1 παράγουν αποπτωτικά σωματίδια, και στη συνέχεια, η προκασπάση-9 δεσμεύεται με τον Araf-1. Στη συνέχεια, η κασπάση-9 ενεργοποιείται μέσω αμοιβαίας διάσπασης, και με αυτό τον τρόπο ενεργοποιείται και το σύμπλεγμα αποπτωσωμάτων. Στη συνέχεια, η κασπάση-3 διασπάται και ενεργοποιείται μέσω της κασπάσης-9 που βρίσκεται στο ενεργό σύμπλεγμα αποπτωτικών σωματίων [46].

2.2. Οικογένεια BCL2

Το γονίδιο *BCL2* (λέμφωμα Β-κυττάρων-2) πρωτοανακαλύφθηκε στο σημείο χρωμοσωμικής μετατόπισης t(14; 18) σε λεμφώματα Β-κυττάρων [47] και έχει μελετηθεί εντατικά για αρκετά χρόνια σχετικά με την επίπτωσή του στην απόπτωση, στην ογκογένεση, στην ομοιοστασία ιστών, στην ανάπτυξη αυτοάνοσων διαταραχών και στις κυτταρικές αποκρίσεις σε αντικαρκινικές θεραπείες [48]. Η οικογένεια πρωτεϊνών BCL2 αποτελείται από ένα δίκτυο προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών μελών που μέσω της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης, λειτουργούν ως οι κύριοι ρυθμιστές και τελεστές του "ενδογενούς" ή αλλιώς μιτοχονδριακού αποπτωτικού μονοπατιού. Ωστόσο, όλα τα μέλη της οικογένειας BCL2 μοιράζονται τυπικά χαρακτηριστικές λειτουργίες. Δηλαδή διμερίζονται με άλλα μέλη της οικογένειας BCL2, συμβάλλουν στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης δεσμεύοντας πρωτεΐνες, ενώ σχετίζονται και με το σχηματισμό πόρων στις εξωτερικές μιτοχονδριακές μεμβράνες [49]. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και ως αντίδραση στο στρες ή σε σήματα θανάτου, τα επίπεδα σχετικής έκφρασης και ενεργοποίησης των πρωτεϊνών BCL2 καθορίζουν τη μοίρα του κυττάρου, είτε περιορίζοντας είτε προωθώντας τον κυτταρικό θάνατο [50-52].

2.2.1. Κατηγορίες της οικογένειας BCL2

Σύμφωνα με τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά, η οικογένεια BCL2 περιέχει από μία μέχρι τέσσερις ομόλογες περιοχές BCL2 (BH domains: BH1, BH2, BH3, BH4), οι οποίες παίζουν βασικό ρόλο στη διαμεσολάβηση της ετεροδιμερικής και ομοδιμερικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των μελών της BCL2 οικογένειας [51, 53]. Οι πρωτεΐνες BCL2 χωρίζονται σε τρεις υποοικογένειες (Εικόνα 3).

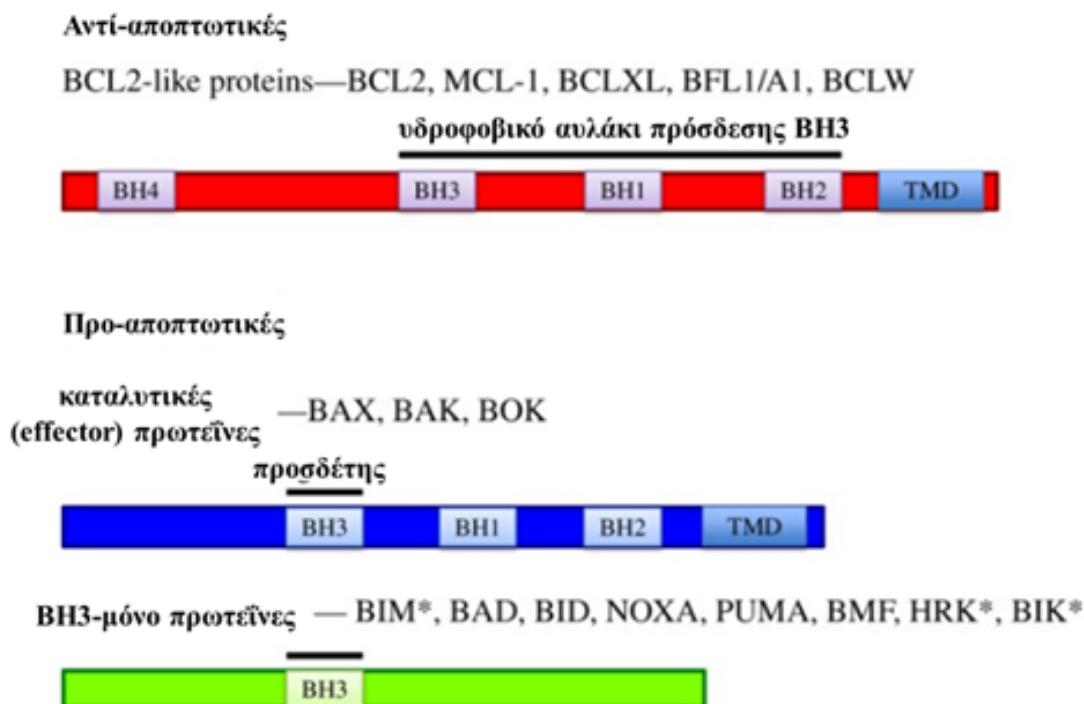
Η πρώτη υποοικογένεια περιλαμβάνει τα **αντι-αποπτωτικά μέλη** της οικογένειας BCL2, συμπεριλαμβανομένων των BCL2, BCLXL (Bcl-extralong), A1, BCLW, BOO (BCL2 homolog of ovary) και MCL1 (μυελοειδές κυτταρική λευχαιμία-1, myeloid cell leukaemia-1). Αυτά αντιπροσωπεύουν πρωτεΐνες πολλαπλών περιοχών, οι περισσότερες από τις οποίες περιέχουν και τις τέσσερις περιοχές BH (BH1, BH2, BH3 και BH4). Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες περιέχουν επίσης μία διαμεμβρανική περιοχή (TM, transmembrane domain), που επιτρέπει τη σύνδεση με μεμβράνες, συμπεριλαμβανομένης της μιτοχονδριακής εξωτερικής μεμβράνης (MOM), της μεμβράνης του ενδοπλασματικού

δικτύου (endoplasmatic reticulum, ER) και των πυρηνικών μεμβρανών [54, 55]. Μία από τις κύριες βιολογικές λειτουργίες των αντι-αποπτωτικών BCL2 πρωτεϊνών είναι η πρόληψη της διάσπασης της ακεραιότητας των μιτοχονδρίων.

Η άλλη υποοικογένεια περιλαμβάνει τις **προ-αποπτωτικές BH3-only πρωτεΐνες**, όπως η BID (BH3 interacting domain death agonist), η BIM (Bcl-2 interacting mediator), η BIK (Bcl-2 interacting killer), η BAD (Bcl-2 associated death promoter), η BMF (Bcl-2 modifying factor, η HRK (Hara-kiri), η NOXA (Latin name for “damage”) και η PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis), που περιέχουν μόνο την περιοχή BH3. Αυτές δρουν ως εκκινητές της απόπτωσης και άμεσοι ανταγωνιστές των αντι-αποπτωτικών BCL2 πρωτεϊνών. Η τρίτη υποοικογένεια ονομάζεται **προ-αποπτωτική υποοικογένεια τύπου BAX**, και περιλαμβάνει την πρωτεΐνη BAX (BCL2 associated-X) και BAK (BH3 homologous agonist killer). Αυτές οι δύο πρωτεΐνες περιέχουν τρεις διατηρημένες περιοχές BH (BH1, BH2 και BH3). Οι ενεργοποιημένες και ολιγομερισμένες BAX και BAK1 σχηματίζουν πόρους μέσα στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, που επιτρέπουν την απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων από τον διαμεμβρανικό χώρο στο κυττόςολιο. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται διαδικασία διαπερατοποίησης της μιτοχονδριακής εξωτερικής μεμβράνης (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP process) [52, 56, 57]. Ωστόσο, μετά από περαιτέρω διερεύνηση των πρωτεϊνών αυτών προέκυψαν και προαποπτωτικά μέλη τα οποία περιείχαν και την επικράτεια BH4, περιπλέκοντας έτσι την κατάσταση. Μεταξύ των συγκεκριμένων πρωτεϊνών βρίσκεται και η πρωτεΐνη BOK.

Ως απόκριση στο αποπτωτικό κυτταρικό στρες που μπορεί να προκληθεί από ιογενείς λοιμώξεις, την καταστροφή του DNA, το στρες του ER ή την έλλειψη κάποιου μεταγραφικού παράγοντα, οι επιλεγμένες BH3-only πρωτεΐνες, όπως η BID, η BIM και η PUMA, ενεργοποιούν τα προ-αποπτωτικά μέλη BAX ή/και BAK1, είτε άμεσα, μέσω διαμορφωτικών αλλαγών [58, 59], είτε έμμεσα, μέσω της εκτόπισης και της εξουδετέρωσης των αντι-αποπτωτικών BCL2 πρωτεϊνών [60, 61]. Σε υγιή κύτταρα, οι ανενεργές BAX και BAK1, διαμένουν ουσιαστικά στο κυττοσολικό (BAX) ή συνδέονται χαλαρά με τα μιτοχόνδρια (BAK1) [62-64]. Μετά από ενεργοποίηση των BH3-only πρωτεϊνών, οι BAX και BAK1 υφίστανται διαμορφωτικές αλλαγές και εισάγονται πλήρως στη MOM, όπου ολιγομερίζονται και σχηματίζουν κανάλια διαπερατά από πρωτεΐνες, προωθώντας στη συνέχεια την απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων, όπως οι cyt-c, AIF, ENDOG, SMAC/DIABLO και OMI, από το μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο στο κυττόςολιο [16, 65-67]. Ως αποτέλεσμα, η διαδικασία κυτταρικού θανάτου, εξαρτώμενου ή ανεξάρτητου

από τις κασπάσες, ενεργοποιείται μέσα σε λίγα λεπτά ή λίγες ώρες μετά τη διαδικασία MOMP.



Εικόνα 3: Απεικόνιση της χωροταξίας των επικρατειών στις κατηγορίες των μελών της BCL2 οικογένειας. Η οικογένεια BCL2 αποτελείται από προαποπτωτικά και αντιαποπτωτικά μέλη. Τα μέλη της BCL2 εμφανίζουν ομολογία με τη BCL2 σε μία ή παραπάνω BH επικράτεια. Εντός των προαποπτωτικών μελών υπάρχει μία περαιτέρω κατηγοριοποίηση μεταξύ των καταλυτικών πρωτεϊνών (effector) που περιέχουν πολλές BH επικράτειες και των πρωτεϊνών που φέρουν ομολογία με μία επικράτεια (γνωστές ως BH3-μόνο πρωτεΐνες). Η είσοδο στη μεμβράνη πραγματοποιείται μέσω της διαμεμβρανικής επικράτεια (transmembrane domain, TMD) [68].

2.2.2. Οικογένεια BCL2 στο κεντρικό νευρικό σύστημα

Μέλη των προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας BCL2 εκφράζονται σε ολόκληρο το κεντρικό νευρικό σύστημα κατά τη διάρκεια τόσο της εμβρυακής όσο και της ενήλικης ζωής [69]. Όσον αφορά τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες τύπου BAX, η BAX εκφράζεται ευρέως στον εγκέφαλο [70], ενώ η BOK είναι παρούσα στον εγκεφαλικό φλοιό και ιδιαίτερα στο υποπεδίο CA3 στον ιππόκαμπο [71-73]. Το πλήρες μήκος της BAK1 υπάρχει μόνο σε μη νευρωνικά κύτταρα στον εγκέφαλο. Ωστόσο, μελέτες αναγνώρισαν μια νέα παραλλαγή συρραφής της BAK1 (N-BAK), η οποία είναι

ειδική για το νευρώνα και περιέχει μόνο την περιοχή BH3, κάτι το ασυνήθιστο, υποδηλώνοντας έτσι το δυναμικό της ρόλο στην αναρροϊκή ρύθμιση της BAX στο μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου [74, 75]. Αν και οι πρωτεΐνες με μοναδική BH επικράτεια την BH3 έχουν το κοινό χαρακτηριστικό ότι μοιράζονται την BH3 περιοχή μήκους εννέα αμινοξέων, κάποια μέλη είναι δομικά διαφορετικά και παρουσιάζουν διακριτά επίπεδα έκφρασης σε κάθε ιστό. Ορισμένες πρωτεΐνες που έχουν μόνο την περιοχή BH3, όπως οι NOXA και PUMA, εμφανίζουν αμελητέα έκφραση σε υγιή κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των νευρώνων, αλλά μπορεί να ενεργοποιηθούν σε επίπεδο μεταγραφής υπό συνθήκες στρες. Άλλα μέλη πρωτεϊνών που έχουν μόνο την περιοχή BH3, συμπεριλαμβανομένων των BIM, BMF, BAD και BID, εκφράζονται υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά μπορούν να ενεργοποιηθούν μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, συμπεριλαμβανομένης της φωσφορυλίωσης, της ενδοκυτταρικής μετατόπισης ή της πρωτεολυτικής διάσπασης ως απόκριση στη σηματοδότηση κυτταρικού θανάτου [76-78]. Από τα αντι-αποπτωτικά μέλη, οι πρωτεΐνες BCLXL και BCLW εκφράζονται ως επί το πλείστον σε ώριμους νευρώνες στον εγκέφαλο των ενηλίκων [79-81], ενώ η BCL2 εκφράζεται ευρέως στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, ιδιαίτερα στους αισθητικούς και συμπαθητικούς νευρώνες [82]. Η MCL1 εκφράζεται επίσης στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα του ενήλικα και ιδιαίτερα σε νευροενδοκρινικά κύτταρα και συμπαθητικούς νευρώνες [83, 84].

2.2.3. Οι πρωτεΐνες BCL2 ελέγχουν τον νευρωνικό τραυματισμό

Στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα των θηλαστικών, το γλουταμινικό είναι ο κύριος νευρωνικός νευροδιαβιβαστής διέγερσης που απελευθερώνεται από τους προσυναπτικούς νευρώνες και κατέχει κρίσιμο ρόλο σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η νευροδιαβίβαση και συναπτική πλαστικότητα, η μάθηση και η μνήμη, και η μετάδοση αισθητήριων πληροφοριών. Παίζει, επίσης, σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια νευρωνικής βλάβης μετά από διάφορες νευρολογικές προσβολές, όπως ισχαιμία, τραύμα και επιληπτική κρίση. Κατά τη διάρκεια της μετάδοσης μέσω συνάψεων, το γλουταμινικό ενεργοποιεί τους μετασυναπτικούς ιονοτροπικούς υποδοχείς, συμπεριλαμβανομένων των NMDA (N-methyl-D-aspartate, N-μεθυλ-D-ασπαρτικό), AMPA (α-άμινο-3-υδρόξυ-5-μέθυλο-4-ισοξαζολεπροπιονικό οξύ) και KA (Kainate Acid-καναϊκού οξέος) υποδοχέων [85]. Αν και η φυσιολογική ενεργοποίηση των γλουταμινικών υποδοχέων είναι απαραίτητη για την κυτταρική επιβίωση, η παθο-φυσιολογική τους υπερενεργοποίηση συχνά οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο [86]. Σε πολλούς νευρώνες προκαλείται κυρίως βλάβη από την

τοξικότητα της διέγερσης λόγω υπερφόρτωσης ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) στους νευρώνες μέσω της διαπερατότητας των εξωσυναπτικών ιόντων Ca^{2+} με τους υποδοχείς NMDA [87]. Τα καλύτερα χαρακτηρισμένα και καθιερωμένα παραδείγματα νευρολογικών καταστάσεων που περιλαμβάνουν διεγερτικούς μηχανισμούς είναι το εγκεφαλικό επεισόδιο και τα εγκεφαλικά τραύματα, στα οποία η απελευθέρωση γλουταμινικού ενεργοποιείται από την εξάντληση του ATP ή από τραύμα των ιστών, καθώς και οι επιληπτικές κρίσεις, όπου οι διεγερτικές συνάψεις ενεργοποιούνται σε υπερβολικό βαθμό [88-90]. Η τοξικότητα των διεγέρσεων παίζει, επίσης, ρόλο στις χρόνιες νευροεκφυλιστικές διαταραχές, όπως η νόσος του Parkinson, η νόσος του Alzheimer, η αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση και η νόσος του Huntington [91-95].

Τα καταρροϊκά αποτελέσματα της αυξημένης εισόδου ιόντων Ca^{2+} στο κυτοσόλιο περιλαμβάνουν μείωση της ενέργειας, αυξημένο μιτοχονδριακό στρες, παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) και εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Αυτά συνοδεύονται από την ενεργοποίηση μιας σειράς εξαρτώμενων από τα ιόντα Ca^{2+} καταβολικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης πρωτεασών, φωσφολιπάσεων, PARP-1 και νουκλεασών, προκαλώντας, κατά συνέπεια, κυτταρική τοξικότητα, νευρωνική δυσλειτουργία και θάνατο [96, 97].

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τη σημασία των μελών της οικογένειας BCL2 στη ρύθμιση του τοξικού εκ υπερδιεγέρσεως/ διεγερτοτοξικού κυτταρικού θανάτου [69, 98]. Η γονιδιακή στόχευση σε μέλη της οικογένειας Bcl2 σε ποντίκια έχει παράξει βασικές γνώσεις σχετικά με το ρόλο τους στην τοξική εκ υπερδιεγέρσεως βλάβη (excitotoxic injury) και σε μοντέλα νευρολογικών διαταραχών. Για παράδειγμα, μεταφραστικά ή μετα-μεταφραστικά ενεργοποιημένες πρωτεΐνες που έχουν μόνο την περιοχή BH3, όπως οι Bim, Puma και Bid έχειδειχθεί ότι προκαλούν καθυστερημένη νευρωνική βλάβη [99-101]. Ομοίως, πολλές αναφορές έχουν καταδείξει ότι η υπερέκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των Bcl-2 και Bcl-xL, και η γενετική ανεπάρκεια ή βιοχημική αναστολή των προ-αποπτωτικών μελών, όπως η Bim και η Bax, προστατεύουν τους νευρώνες από στην τοξική εκ υπερδιεγέρσεως βλάβη [102-108]. Παρά τα δεδομένα, ότι μόνο η συνδυασμένη απουσία των Bax και Bak παρέχει αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο των προγονικών νευροκυττάρων [109, 110], αρκετά δεδομένα έδειξαν ότι η απλή διαγραφή του γονιδίου *BAX* είναι επαρκής για να υπάρχει προστασία έναντι της στέρησης νευροτροφικών αυξητικών παραγόντων, της διεγερτικής τοξικότητας, των βλαβών του DNA, και του οξειδωτικού στρες [73, 100, 108, 111-116], ενώ η απουσία του γονιδίου *BAK* απέτυχε να προσδώσει την κατάλληλη προστασία [117]. Αυτή η έλλειψη επικαλυπτόμενης

δράσης (redundancy) μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η πλήρους μήκους πρωτεΐνης Bak δεν εκφράζεται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα στους νευρώνες.

Τα αυξανόμενα στοιχεία υποδηλώνουν ότι, εκτός από το ρόλο που διαδραματίζουν ελέγχοντας την ενδογενή οδό απόπτωσης, οι πρωτεΐνες της οικογένειας BCL2 είναι επίσης απαραίτητες για τη ρύθμιση των λειτουργιών των μιτοχονδρίων, συμπεριλαμβανομένης της σύντηξης και της σχάσης [118], της βιοενέργειας [73, 108, 119, 120] και του χειρισμού των νευρωνικών ιόντων Ca^{2+} , [73, 108, 121-123] δραστηριότητες που αντιπροσωπεύουν τις "καθημερινές"/μη αποπτωτικές λειτουργίες τους [66].

2.2.4. Οι πρωτεΐνες BCL2 στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας

Τα μιτοχόνδρια είναι δυναμικά οργανίδια που αλληλεπιδρούν ενεργά με μιτοχόνδρια γειτονικών κυττάρων και άλλων ενδοκυττάρων διαμερισμάτων, προκειμένου να επιτευχθεί διατήρηση του ενεργειακού μεταβολισμού, ταχεία επισκευή κατεστραμμένων μιτοχονδρίων και ανταλλαγή κυτταρικών συστατικών, όπως DNA και πρωτεϊνών. Οι νευρώνες εξαρτώνται, κυρίως, από τα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ενέργειας, με τη μορφή ATP μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και για τη ρύθμιση πολλών φυσιολογικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της νευροδιαβίβασης και του ενδοκυτταρικού ρυθμιστικού διαλύματος ασβεστίου [124-126]. Επομένως, οι νευρώνες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι σε αλλοιώσεις της μιτοχονδριακής λειτουργίας, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε δυσλειτουργικές συνάψεις, εκφυλισμό νευραξόνων και τελικά, κυτταρικό θάνατο. Τα μιτοχόνδρια, μέσω μίας αυστηρά ελεγχόμενης διαδικασίας, η οποία περιλαμβάνει αφυδρογονάσες ευαίσθητες στα ιόντα Ca^{2+} , το μιτοχονδριακό μονομεταφορέα ασβεστίου (mitochondrial calcium uniporter- MCU) και τον κατιοντο-ανταλλάκτη Na^+/Ca^{2+} , ρυθμίζουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα Ca^{2+} στο κυτοσόλιο και ελέγχουν την έκταση, θέση και διάδοση της εισροής κυτοσολικών ιόντων Ca^{2+} , καθώς και της ανακύκλωσης αυτών προς το ER [127-129]. Η υπερφόρτωση ιόντων Ca^{2+} , όπως φαίνεται κατά την έντονη υπερενεργοποίηση των υποδοχέων γλουταμινικού, οδηγεί σε επακόλουθη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και νευρωνική βλάβη [130, 131].

Αρκετές οικογένειες πρωτεϊνών BCL2 βρίσκονται, ή μετατοπίζονται στα μιτοχόνδρια και πιστεύεται, ότι παίζουν κάποιο ρόλο στην φυσιολογική μιτοχονδριακή φυσιολογία. Οι παρατηρήσεις, ότι η απόπτωση συνοδεύεται από μιτοχονδριακό κατακερματισμό και, ότι αυτό μπορεί συχνά να συμπίπτει με τη διαδικασία MOMP και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c προέκυψαν από μια διασταυρούμενη μελέτη μεταξύ

των λειτουργιών της οικογένειας BCL2 και της ρύθμισης της δυναμικής των μιτοχονδρίων [132-135]. Πράγματι, κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, συστατικά των διαδικασιών μιτοχονδριακής σύντηξης και σχάσης, όπως η σχετιζόμενη με την δυναμίνη πρωτεΐνη (DRP1) και η MFN2 (Mitofusin-2), στρατολογούνται σε θέσεις μιτοχονδριακής σχάσης και αλληλοσυνδέονται με την BAX, προωθώντας έναν εξαρτώμενο από τη DRP1 μιτοχονδριακό κατακερματισμό [132, 133, 136, 137]. Επιπλέον, η πρωτεΐνη BAX και/ή η πρωτεΐνη BAK1 προκαλούν κατακερματισμό του μιτοχονδριακού δικτύου, παρά την απελευθέρωση της πρωτεΐνης του διαμεμβρανικού χώρου (IMS) DDP/TIMM8a στο κυτταρόπλασμα, προωθώντας την ανακατανομή της DRP1 στα μιτοχόνδρια και ενεργοποιώντας σχάση με τη μεσολάβηση DRP1 [133, 138, 139]. Έχει, επίσης, αποδειχθεί ότι η αναστολή της διεργασίας σχάσης μέσω μειωρύθμισης της FIS1 ή της DRP1, αλλάζει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και καθυστερεί την απόπτωση, προτείνοντας μια σύνδεση μεταξύ της διαμεσολαβούμενης από τη DRP1 μιτοχονδριακής σχάσης, της εξαρτώμενης από την BAX MOMP διαδικασίας και της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c [132, 140-142]. Επιπλέον, ο μιτοχονδριακός αναστολέας της DRP1, MDIVI1, παρεμποδίζει τη διαμεσολαβούμενη από τη BID και ανεξάρτητη από τις πρωτεΐνες BAX/BAK1 απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια [143]. Ωστόσο, η πρωτεΐνη BCL2 ρυθμίζει επίσης άμεσα τη μιτοχονδριακή σύντηξη και τη σχάση ανεξάρτητα από την πραγματοποίηση της μιτοχονδριακής απόπτωσης (engagement). Για παράδειγμα, η διαγραφή των γονιδίων *Bax* και *Bak* οδήγησε σε μείωση της μιτοχονδριακής σύντηξης στους εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικού (MEF) [144] παρόλο, που προστατεύονταν από την απόπτωση, ενώ η υπερέκφραση του *Bax* και *Bak* από μόνη της ήταν σε θέση να ενεργοποιήσει τη μιτοχονδριακή σχάση [145]. Επομένως, η αύξηση των *Bax* και *Bak* στη MOM, ή μεταβολές στην αναλογία των προ-αποπτωτικών *Bax* και *Bak* έναντι των αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας *Bcl2* μπορεί να επηρεάσουν όχι μόνο τη σηματοδότηση κυτταρικού θανάτου, αλλά και τη μιτοχονδριακή μορφολογία, με την αυξημένη σηματοδότηση των *Bax* και *Bak* να προκαλεί μιτοχονδριακό κατακερματισμό ή αναστολή της μιτοχονδριακής σύντηξης. Οι BAX και BAK δεν είναι οι μόνες πρωτεΐνες BCL2 που συνδέονται με τη δυναμική των μιτοχονδρίων. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι BCL2 και BCLXL συνδέονται με τη MFN2 και προάγουν τη μιτοχονδριακή σύντηξη [56]. Οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες που έχουν μόνο την περιοχή BH3, όπως οι NOXA και PUMA, έχουν, επίσης, εμπλακεί στην ενεργοποίηση του εξαρτώμενου από DRP1 μιτοχονδριακού κατακερματισμού, κατά τη διάρκεια της απόπτωσης [139, 146]. Τον τελευταίο καιρό, μια νέα μελέτη αποκάλυψε ότι η αλλαγή από την αντι-αποπτωτική μακριά

ισομορφή της πρωτεΐνης MCL1 (MCL1 L), η οποία δεσμεύεται με τη DRP1 για να προάγει τη σχάση και να αποτρέπει την απόπτωση, στην προ-αποπτωτική βραχεία ισομορφή της πρωτεΐνης MCL1 (MCL1 S) προκάλεσε μιτοχονδριακή υπερφαγία και υπερπόλωση, με αποτέλεσμα την αυξημένη συσσώρευση μιτοχονδριακών ιόντων Ca^{2+} και την ευαισθησία στο αποπτωτικό στρες [147].

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία συνδέεται, επίσης, με τον κατακερματισμό του μιτοχονδριακού δικτύου και την αναδιαμόρφωση των πτυχώσεων της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου (cristae), που χαρακτηρίζεται από τη σύντηξη μεμονωμένων πτυχώσεων και τη διεύρυνση των περιοχών των πτυχώσεων αυτών, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση του φράγματος διάχυσης και την κινητοποίηση του κυτοχρώματος c από τις εσωτερικές πτυχώσεις στο διαμεμβρανικό χώρο [132, 148]. Αρκετές πρωτεΐνες, που εμπλέκονται στη δυναμική της μιτοχονδριακής σύντηξης/σχάσης, μπορεί να παίζουν, επίσης, έναν κρίσιμο ρόλο στην προ-αποπτωτική αναδιαμόρφωση των εσωτερικών πτυχώσεων της μεμβράνης του μιτοχονδρίου. Η DRP1 απαιτείται για τη βέλτιστη απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, πιθανότατα, μέσω της συμβολής της στην αναδιαμόρφωση των πτυχώσεων αυτών [149]. Άλλες μελέτες πρότειναν ότι η πρωτεΐνη OPA1 συμβάλλει στη διατήρηση της δομής των πτυχώσεων της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου και η πρωτεολυτική της ενεργοποίηση προκαλεί μιτοχονδριακό κατακερματισμό και μεταβάλλει το σχήμα των πτυχώσεων [150]. Μετά την επαγωγή απόπτωσης, οι πρωτεΐνες που περιέχουν μόνο την περιοχή BH3, οι BID και BIK, έχει αποδειχθεί ότι διαταράσσουν τα ολιγομερή της OPA1, προκαλώντας αναδιατάξεις της υπο-μιτοχονδριακής δομής και απώλεια της διαμερισματοποίησης, οδηγώντας σε κινητοποίηση του κυτοχρώματος c, της διαδικασίας MOMP και της απελευθέρωσης των πρωτεϊνών IMS [148, 149]. Τα τελευταία χρόνια, η BID έχει, επίσης, εμπλακεί στο μιτοχονδριακό μεταβολισμό, καθώς ενεργεί αναρροϊκά ως αρνητικός ρυθμιστής του ομόλογου μιτοχονδριακού φορέα 2 (MTCH2), μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη μείωση της μιτοχονδριακής διαμέτρου και του μεταβολισμού. Η MTCH2 είχε προταθεί ότι δίνει τη δυνατότητα στη BID να στοχεύσει στα μιτοχόνδρια, λειτουργώντας ως μιτοχονδριακή πρωτεΐνη τύπου-υποδοχέα, και να επιταχύνει την ενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών BAX και BAK που ρυθμίζονται καταρροϊκά [151-153].

Η οικογένεια πρωτεϊνών BCL2 έχει, επίσης, προταθεί ότι ελέγχει το άνοιγμα του μεταβατικού πόρου μιτοχονδριακής διαπερατότητας (mitochondrial permeability transition pore, mPTP), που βρίσκεται μεταξύ της εξωτερικής και της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που πιστεύεται ότι αποτελείται από το μετατοπιστή

του νουκλεοτιδίου αδενίνης (ANT), το εξαρτώμενο από την τάση κανάλι ανιόντων (VDAC) και την ρυθμιστική πρωτεΐνη κυκλοφιλίνη D (CYPD). Δεδομένα έχουν δείξει ότι, υπό παρατεταμένη υπερβολική εισροή ιόντων Ca^{2+} στην μιτοχονδριακή μήτρα ο ANT, το VDAC και η CypD σχηματίζουν ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που επιτρέπει την απελευθέρωση των συστατικών μήτρας και σχετίζεται με νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο [154, 155]. Τα μέλη της αντιαποπτωτικής οικογένειας BCL2, συμπεριλαμβανομένων των BCL2 και BCLXL, έχει προταθεί ότι ρυθμίζουν το mPTP διατηρώντας το σε κλειστή διαμόρφωση, ενώ οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως οι BAX και BAK1, εμπλέκονται με τον ANT και/ή το VDAC για την επαγωγή ανοίγματος του mPTP [156-159]. Ωστόσο, άλλες μελέτες κατέδειξαν, ότι τα ANT και VDAC είναι μη απαραίτητα για το mPTP και για τον κυτταρικό θάνατο που ελέγχεται από τις πρωτεΐνες της οικογένειας BCL2 [160, 161]. Πιο πρόσφατα, έχει προταθεί ότι το άνοιγμα του πόρου PT, υπό συνθήκες στρες, μπορεί, επίσης, να ρυθμιστεί από την BCLXL και από την πρόσδεση αυτής στη μιτοχονδριακή β-υπομονάδα του F0/F1 της ATP συνθάσης. Τέλος, έχει προταθεί ότι η F0/F1 της ATP συνθάσης, μέσω της υπομονάδας c δρα, επίσης, ως το βασικό συστατικό του mPTP [120, 162-165].

2.2.5. Οικογένεια BCL2 στον καρκίνο

Η παρεμπόδιση της απόπτωσης μπορεί να συνδράμει στην ογκογονική μεταμόρφωση σε πολλά στάδια, μέσω διατήρησης του μεγέθους του όγκου, επιβίωσης του όγκου μέσω μεταστατικής πορείας και ανθεκτικότητα στην θεραπεία. Γι' αυτό το λόγο, δεν είναι περίεργο ότι έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών σε πολλούς τύπους καρκίνου. Αυτή η αυξημένη έκφραση μπορεί να συσχετιστεί με πληθώρα μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένου της χρωμοσωμικής μετατόπισης και της γονιδιακής ενίσχυσης. Η αυξημένη γονιδιακή έκφραση-μετατόπιση ή η πρωτεϊνική σταθερότητα μέσω ποικίλων μηχανισμών και εναλλακτικών αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών θεωρούνται πιο συχνοί και πιο πιθανοί σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου [68].

Πέρα της μετατόπισης του γονιδίου *BCL2*, η μετατόπιση, γενικά, δεν είναι συχνό φαινόμενο μεταξύ των διαφορετικών καρκινικών τύπων αλλά ούτε και σε άλλα αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός, ότι η μετατόπιση του *BCL2* βρέθηκε και σε λεμφοκύτταρα του περιφερειακού αίματος σε υγιή άτομα και μετά από μοντελοποίηση αυτής της μετατόπισης σε B κύτταρα ποντικού, αποδείχθηκε ασθενώς

ογκογονική. Από αυτά τα αποτελέσματα, μπορούμε να προτείνουμε ότι αυτή η μετάτοπιση δεν είναι εξ ολοκλήρου (overtly) ογκογονική [68].

Η αύξηση του αριθμού των γονιδιακών αντιγράφων σε αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας στον καρκίνο είναι πιο διαδεδομένη, συγκριτικά με τη μετατόπιση. Αυξημένη μεταγραφή αντιαποπτωτικών μελών μπορεί, επίσης, να οδηγήσει σε αύξηση της έκφρασής τους στον καρκίνο, ενώ η αυξημένη μεταγραφή/ μετάφραση φαίνεται σημαντική για τη ρύθμιση των επιπέδων MCL-1. Αυξημένη πρωτεϊνική μετάτοπιση επιδρά στα επίπεδα των MCL-1 και BCL-XL, με το MCL-1 θεωρείται ως ένας καταρροϊκός μεταδότης της ογκογόνου επίδρασης του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4e. Διαταραχή των μονοπατιών που ρυθμίζουν την σταθερότητα της πρωτεΐνης MCL-1 μπορεί να συμβούν στον καρκίνο. Συνεπώς, συμπληρωματικά των γενετικών αλλαγών σε μέλη της οικογένειας, ενεργοποίηση των ογκογονικών σηματοδοτικών μονοπατιών μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών [68].

Είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη, ότι η παρατήρηση υψηλών επιπέδων αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών BCL2 στον καρκίνο, δεν υποδηλώνει υποχρεωτικά ισχυρή ανθεκτικότητα στην απόπτωση. Τέλος, διαφοροποιήσεις στις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες μπορεί να έχουν σημασία πέραν της καρκινογένεσης, μιας και η διάγνωση υψηλών επιπέδων έκφρασης της MCL-1 έχει συσχετιστεί με δυσμενής πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού, ενώ η ενίσχυση αυτής πιθανολογείται να είναι η πηγή της έμφυτης και της επίκτητης ανθεκτικότητας στη θεραπεία ενάντια στον καρκίνο [68].

Μειωμένη έκφραση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών της BCL2 οικογένειας έχουν την ίδια επίδραση με την αυξημένη έκφραση των αντιαποπτωτικών στον καρκίνο. Μελέτες διαγραφής γονιδίων σε ποντίκια δεν αποκαλύπτουν ισχυρή ογκογονική επίδραση της μειωμένης έκφρασης πρωτεΐνης BH3-only. Με εξαίρεση τα BAD-knockout ποντίκια, που υποκύπτουν στο όψιμο λέμφωμα, η ανεπάρκεια σε μεμονωμένες πρωτεΐνες BH3-only δεν προδιαθέτει την ανάπτυξη όγκων στα ποντίκια [166]. Το ενδεχόμενο του λειτουργικού πλεονασμού μεταξύ των BH3-only πρωτεϊνών θα μπορούσε να το εξηγήσει αυτό. Εντούτοις, η σύνθετη διαγραφή πολλαπλών BH3-μόνο πρωτεϊνών εξακολουθεί να προάγει, ασθενώς μόνο, την ανάπτυξη του όγκου, με την αυτοανοσία να συμβάλλει στη νοσηρότητα.

Παρόμοια με την υπερβολική έκφραση προαποπτωτικών πρωτεϊνών τύπου BCL2, η απώλεια πρωτεϊνών BH3-only δεν είναι εμφανώς ογκογονική, αλλά μπορεί να επιταχύνει δραματικά την ανάπτυξη λεμφώματος, στο πλαίσιο της αυξημένης μυοκαρδιοπάθειας. Το BIM φαίνεται πιο ισχυρό σε αυτό το πλαίσιο, αφού η διαγραφή ακόμη και ενός μόνο αλληλόμορφου του εμφανίζει δραματικές επιπτώσεις στο κύτταρο.

Η θεραπεία του καρκίνου, που εμπλέκεται στην απόκριση του p53, προβλέπεται να αυξάνει την έκφραση των PUMA και NOXA και η αντίσταση στην απόπτωση θα μπορούσε να μεσολαβηθεί από τη μείωση στην έκφρασή τους. Πράγματι, η διαγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την PUMA (Bbc3) συμβαίνει σε μια σειρά τύπων καρκίνου [167], ενώ υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί ικανοί να μειώσουν την έκφραση PUMA όπως η μεθυλίωση υποκινητή (promoter).

Η εξάλειψη ή η μείωση της έκφρασης των αποπτωτικών πρωτεϊνών τελεστών, όπως το BAX/BAK1, είναι ένας ισχυρός τρόπος για να απενεργοποιηθεί η μιτοχονδριακή μεσολαβούμενη απόπτωση σε συστήματα κυτταροκαλλιέργειας. Δεδομένου ότι η λειτουργία των BAX και BAK1 είναι σε μεγάλο βαθμό αλληλοεπικαλυπτόμενη (redundant), μιας και ένα μόνο αντίγραφο εξ' αυτών το οποίο να επιτρέπει την φυσιολογική ανάπτυξη, η κατάργηση της δραστηριότητάς τους θα απαιτούσε την απώλεια και των τεσσάρων αλληλόμορφων. Υπάρχουν περιορισμένες ενδείξεις ότι αυτό συμβαίνει στον καρκίνο και τα επίπεδα BAX/ BAK1 μειώνονται φυσιολογικά με την αύξηση της ηλικία των ποντικών και των ανθρώπων. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο τοπολογικός εντοπισμός και η στερεοδιαμόρφωση μπορεί να είναι ακόμη πιο σημαντικοί από τα απόλυτα επίπεδα των BAX/ BAK. Στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML), η μιτοχονδριακά εντοπισμένη BAX συνδέεται τόσο με αυξημένη αποπτωτική ευαισθησία όσο και με βελτιωμένη πρόγνωση του ασθενούς. Μελέτες διαγραφής γονιδίων σε ποντίκια δεν υποδηλώνουν ρόλο καταστολής του όγκου για το BAX ή BAK όταν απενεργοποιηθούν (knockdown) μεμονωμένα (πιθανώς λόγω των αλληλοεπικαλυπτόμενων ρόλων τους), ενώ η διπλή απενεργοποίηση (knockout) έχει ως αποτέλεσμα την περιγεννητική θνησιμότητα. Χρησιμοποιώντας χιμαιρικά ποντίκια διαγραφή Bax/ Bak στο αιμοποιητικό διαμέρισμα οδηγεί σε θανατηφόρο αυτοάνοση νόσο. Η προβολή της αυτοάνοσης νόσου σε χιμαιρικά ποντίκια με αρτηριακά συστήματα που φέρουν ανεπάρκεια Bax/ Bak [168] μπορεί να αποκρύψει την ανάπτυξη όγκου. Οι στοχευμένες μελέτες διαγραφής γονιδίων σε ποντίκια μπορούν να βοηθήσουν στην αποφυγή αυτών των αυτοάνοσων επιπλοκών. Σε αυτή τη ρύθμιση, η απώλεια BAX / BAK στον εγκέφαλο και στους όρχεις έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση όγκων [169].

Φαίνεται, ότι η σχετική απώλεια του Bok είναι ένα σχετικά συχνό συμβάν σε μια σειρά καρκίνων [167] και η σίγαση του γονιδίου μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια πρωτεΐνης BOK σε επιπρόσθετες περιπτώσεις [168]. Το BOK μειώνεται στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Non-small-cell lung carcinoma, NSCLC) και η υψηλή έκφραση αυτού συνδέεται με καλή πρόγνωση σε ασθενείς με μετάσταση στους λεμφαδένες. Ενδιαφέρον εμφανίζει το γεγονός, ότι η κατασταλτική επίδραση του BOK στο NSCLC δεν

φαίνεται να πραγματοποιείται μέσω της αποπτωτικής ρύθμισης, αλλά αντιθέτως μέσω του ανταγωνισμού της επιθηλιακής σε μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) που διαμεσολαβείται από τον TGF- β 2 και της κυτταρικής μετανάστευσης. Σε αντίθεση με τόσες άλλες πρωτεΐνες BCL-2, η απώλεια του Bok απέτυχε να αποκαλύψει έναν ρόλο καταστολής του όγκου το μοντέλο ποντικού Eu-Myc [170], ένα σύστημα που είναι ευαίσθητο στην εύρεση αλλοιωμένης απόπτωσης, αν και παράγοντες, όπως συνεργαζόμενοι δεύτεροι χτύποι, η χρονική στιγμή της απώλειας Bok και η εξειδίκευση του κυτταρικού τύπου, θα μπορούσαν να εμπλακούν στην επίδραση που προκαλεί το BOK. Το σύνθετο knockout του Bax / Bak / Bok στο αιμοποιητικό σύστημα οδηγεί, επίσης, σε αυτοάνοση ασθένεια, αλλά όχι σε ογκογένεση. Πιο πρόσφατα, σε ένα χημικό (DEN) -επαγόμενο μοντέλο καρκινογένεσης του ήπατος, η απώλεια του BOK έχειδειχθεί ότι προστατεύει από τον καρκίνο. Σε αυτό το μοντέλο, ο καρκίνος μπορεί να προωθηθεί από το θάνατο των ηπατοκυττάρων, υποστηρίζοντας τον αντισταθμιστικό πολλαπλασιασμό με συσχετιζόμενη μεταλλαξογένεση, στον περιβάλλοντα ιστό που τελικά οδηγεί σε ζωντανό καρκίνο. Είναι ενδιαφέρον, ότι η απαλοιφή του BOK ανέστειλε την ανταπόκριση του ER-stress και την επαγωγή των προ-αποπτωτικών BH3-μόνο πρωτεϊνών BIM και PUMA, τοποθετώντας τη δράση της BOK στην προαγωγή του όγκου, ανοδικά του MOMP [171]. Τέλος, υπάρχουν δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν τη δράση της BOK στην προαγωγή της ανάπτυξης, και παρά το γεγονός, ότι οι μηχανισμοί, βάσει των οποίων επιτυγχάνεται, παραμένουν ασαφείς, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να συμβάλει στην δημιουργία του όγκου [171].

3. BCL2 family apoptosis regulator, BOK

Η BOK είναι μέλος της οικογένειας BCL2, της οποίας η λειτουργία ήταν δύσκολο να διασαφηνιστεί. Πρόσφατα, είχεδειχθεί ότι η BOK ρυθμίζεται από το μονοπάτι του ενδοπλασματικού δικτύου που σχετίζεται με την αποικοδόμηση (ERAD), είναι πιθανό να προκαλέσει διαπερατότητα της μιτοχονδριακής εξωτερικής μεμβράνης (MOMP), ενώ δε φαίνεται να ρυθμίζεται από άλλα μέλη της οικογένειας BCL2. Αυτά τα ευρήματα παρουσιάζουν ένα νέο μηχανισμό για τη ρύθμιση της απόπτωσης, αλλά παραμένει ασαφές σε ποια συγκεκριμένα πλαίσια αυτός ο μηχανισμός μπορεί να είναι πιο σημαντικός για τον κυτταρικό θάνατο.

Η οικογένεια πρωτεϊνών BCL2 ρυθμίζει τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής εξωτερικής μεμβράνης, το σημείο δέσμευσης για απόπτωση, όπως έχει ήδη προαναφερθεί. Η οικογένεια περιέχει και προαποπτωτικές και αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες. Οι BAX και

BAK1 είναι οι βασικοί τελεστές που ομο-ολιγομερίζονται για να σχηματίσουν τους μιτοχονδριακούς πόρους. Χωρίς αυτές, φαίνεται ότι η απόπτωση σε απόκριση ενός μεγάλου αριθμού επιθέσεων δεν μπορεί να προχωρήσει.

Πιο πρόσφατα ευρήματα δείχνουν ότι μπορεί να υπάρχουν περιπτώσεις όπου μια άλλη πρωτεΐνη, η BOK, μπορεί να εκτελέσει μια λειτουργία παρόμοια με τις BAX και BAK1. Η BOK εντοπίστηκε το 1997 σε cDNA αρουραίου που μελετήθηκε για πρωτεΐνες που θα μπορούσαν να δεσμεύσουν την MCL1, ένα σημαντικό αντι-αποπτωτικό μέλος της οικογένειας BCL2 [202]. Η BOK έχει σημαντική ομολογία με τις BAX και BAK1. Ποντίκια με μονή ανεπάρκεια, είτε του γονιδίου Bak είτε του Bax εμφάνισαν κανονικά ανάπτυξη [213]. Ωστόσο, ποντίκια με διπλή ανεπάρκεια Bak/Bax έχουν πολλαπλές φαινοτυπικές ανωμαλίες και τυπικά δεν είναι σε θέση να επιβιώσουν πέρα από την πρώιμη προγεννητική περίοδο [215]. Η παρατήρηση αυτή δείχνει ότι η BOK δεν είναι σε θέση να αντισταθμίσει πλήρως την απώλεια των BAX και BAK1.

Για να βοηθηθεί η αποσαφήνιση των ενδεχομένως μοναδικών λειτουργιών της BOK, ο Carpio και οι συνεργάτες του μελέτησαν ποντίκια Bok^{-/-}, τα οποία είναι φαινοτυπικά και αναπτυξιακά φυσιολογικά [218]. Παλαιότερα είχε δειχθεί ότι η BOK μπορεί να εντοπιστεί στο ER [217], και έτσι αθανατοποιημένοι εμβρυονικοί ινοβλάστες ποντικού (MEF) από αυτά τα ζώα Bok^{-/-} υποβλήθηκαν σε παράγοντες που στοχεύουν το μονοπάτι του ER για τη ρύθμιση του στρες, που ονομάζονται θαιψιγαργίνη και βορτεζομίμπη. Υπήρξε σημαντικά μειωμένος κυτταρικός θάνατος στα κύτταρα Bok^{-/-} συγκριτικά με τα ομόλογα του αγρίου τύπου, προτείνοντας ότι η BOK προωθεί την απόπτωση που ακολουθεί μετά το στρες του ER [218]. Παρόλα αυτά, η BOK δεν είναι απολύτως απαραίτητη για τέτοιο θάνατο, καθώς εξακολουθούσε να υπάρχει μία εξαρτώμενη από τη δόση, μείωση της βιωσιμότητας στα Bok^{-/-}-MEFs.

Μία ακόμη ερευνητική ομάδα, αυτή του Lambi και των συνεργατών του, πραγματοποίησε μια σειρά πειραμάτων που διερευνούν πώς η λειτουργία του πρόδρομου θανάτου της BOK ρυθμίζεται από το στρες του ER. Προσδιόρισαν κυτταρικές σειρές με υψηλά επίπεδα ενδογενούς BOK (HCT116) και δημιούργησαν, επίσης, κύτταρα MEFs με διπλά επαγωγίμη έκφραση της BOK. Σε αυτά τα μοντέλα, δείχθηκε ότι η έκφραση της BOK οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο παρουσία παραγόντων που στοχεύουν το μονοπάτι ERAD. Έδειξαν ότι η BOK μπορεί να προωθήσει το κυτταρικό θάνατο απουσία των BAX και BAK και ότι ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από τη BOK είναι εξαρτώμενος από τις κασπάσες. Σε αντίθεση με τις BAX και BAK1, η BOK δε φαίνεται να απαιτεί την παρουσία ενεργοποιητών BH3 πεπτιδίων για την επαγωγή της διαδικασίας MOMP. Επίσης

σε αντίθεση με τις BAX και BAK, η ικανότητα της BOK να προκαλεί απόπτωση δεν επηρεάζεται από την υπερβολική έκφραση των αντιαποπτωτικών μελών της οικογένειας BCL2. Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι η BOK είναι συνθετικά ενεργή αλλά δεν ρυθμίζεται από άλλα μέλη της BCL2 οικογένειας. Αντίθετα, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ρυθμίζονται από την οδό ERAD [211].

Υπάρχει κάποια διαφωνία στη βιβλιογραφία σχετικά με το αν η αντίσταση σε ορισμένους παράγοντες στρες του ER παρέχεται με την απώλεια της BOK. Ο Carpio και οι συνεργάτες του απέδειξαν σχετική αντοχή στη θαψιγαργίνη σε Bok-/- κύτταρα MEF, αλλά συμπληρωματικά δεδομένα από τον Llambi και τους συνεργάτες του αλλά και από την πρόσφατη δουλειά του Fernandez-Marrero και των συνεργατών του, δεν αποδεικνύουν κάτι τέτοιο [212]. Δεν είναι άμεσα σαφές που υπάρχουν διαφορές, αλλά μπορεί να οφείλονται σε δομικές επιδράσεις, καθώς κάθε ένα από αυτά τα τρία μοντέλα Bok-/- ποντικών προερχόταν ανεξάρτητα από τα άλλα.

Τα ευρήματα των Llambi και των συνεργατών του, δίνουν το ερέθισμα για επιπλέον ερωτήσεις. Εάν η BOK είναι πράγματι συνθετικά ενεργή, πώς μπορεί να ανιχνεύεται εύκολα σε μια ποικιλία κυτταρικών τύπων [211, 214]; Πρέπει να υπάρχει κάποιος μηχανισμός πέρα από τη σταθερότητα της πρωτεΐνης που διαμορφώνει τη λειτουργία της BOK. Επίσης, σε πόσους κυτταρικούς τύπους κάνει αυτός ο μηχανισμός της BOK ρύθμιση της λειτουργίας;

Σε τί βαθμό απαιτείται η BOK να μεσολαβήσει στην απόκριση κυτταρικού θανάτου που προκαλείται *in vivo* από αναστολές πρωτεασώματος; Ο bortezomib, ο πρώτος αναστολέας πρωτεασώματος που έχει εγκριθεί από τον FDA, δοκιμάστηκε σε έναν αριθμό αιματολογικών κακοηθειών και συμπαγών όγκων σε μελέτες φάσης I, αλλά το κλινικό όφελος έχει αποδειχθεί σε ευρεία κλίμακα μόνο στο πολλαπλό μυελώμα και σε ορισμένα non-Hodgkin λεμφώματα. Σε δύο κυτταρικές σειρές πολλαπλού μυελώματος που αξιολογήθηκαν από τον Llambi και τους συνεργάτες του, δεν υπήρχε σημαντική έκφραση της BOK. Ακόμη και εντός ενός τύπου όγκου, οι κυτταρικές σειρές διαφέρουν ως προς την επίδραση που έχει η σίγαση της BOK στην επιβίωση [211]. Έτσι, τα δεδομένα είναι μέχρι τώρα ελλιπή στο να αποδείξουν ότι η σταθεροποίηση της BOK είναι ένας μηχανισμός που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην *in vivo* απόκριση για την αναστολή του πρωτεασώματος. Αυτή η δουλειά, οδηγεί στην εύλογη ερώτηση του αν μπορεί να υπάρξουν τρόποι για να σταθεροποιηθεί ή να αυξηθεί πιο εξειδικευμένα η έκφραση της BOK. Αυτό μπορεί να βοηθήσει στην επαγωγή της MOMP σε τουλάχιστον ένα υποσύνολο όγκων που έχουν χάσει τις BAX και BAK1. Επιπλέον, η έλλειψη αλληλεπίδρασης της BOK με αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες, την καθιστά ως μια ιδιαίτερα ελκυστική υποψήφια για

παρεμβάσεις σε καρκίνους, όπου τα αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας BCL2 εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα.

Πριν από τον Lambi και τους συνεργάτες του, υπήρχε ένα καθορισμένο κύκλωμα που εξηγούσε τη ρύθμιση της μιτοχondριακής απόπτωσης της οικογένειας BCL2. Τελεστές όπως οι BAX και BAK1 ενεργοποιούνται από ενεργοποιητές BH3 πρωτεΐνες για να ολιγομεριστούν και να σχηματίσουν πόρους. Μονομερείς τελεστές και ενεργοποιητές θα μπορούσαν να δεσμευτούν και να ανασταλούν από αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες. Τώρα φαίνεται ότι η BOK δεν ακολουθεί αυτούς τους απλούς κανόνες μέσω μίας νέας ρύθμισης του στρες του ER σχετικά με τη σταθερότητα των πρωτεϊνών.

3.1. BOK και σηματοδότηση Ca^{2+}

Το BOK εκφράζεται στον ιπόκαμπο (συμπεριλαμβανομένου του CA3) και στους φλοιώδεις νευρώνες [78-80]. Λόγω της προβλεπόμενης δομικής ομολογίας του με το προαποπτωτικά BCL2 μέλη, BAX και BAK1, η BOK έχει προταθεί ότι δρα σε παρόμοια προαποπτωτική οδό [202-205]. Μέχρι στιγμής, υπάρχουν περιορισμένες αναφορές σχετικά με το ρόλο της BOK στη βλάβη των νευρώνων. Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη έδωσε νέες ιδέες για τον λειτουργικό ρόλο της BOK κατά τη διάρκεια της νευρωνικής απόπτωσης και της διαμεσολαβούμενης από ιόντα Ca^{2+} νευρωνικής βλάβης, αποδεικνύοντας ότι, σε αντίθεση με προηγούμενες προτάσεις, η BOK ασκεί νευροπροστατευτικές δραστηριότητες *in vitro* και *in vivo* [80]. Η BOK αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά με το σύστημα δύο υβριδίων του ζυμομύκητα χρησιμοποιώντας BCL2 αντι-αποπτωτικά μέλη ως δολώματα, όπου αλληλεπίδρασε έντονα με τις MCL1, BHRF1 και BFL1, αλλά όχι με τις BCL2, BCLXL και BCLW [202, 203]. Η υπερέκφραση του BOK αποδείχθηκε ότι προάγει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, τον πυρηνικό κατακερματισμό και την απόπτωση σε διάφορα κυτταρικά μοντέλα θηλαστικών [203, 204, 206-208]. Επιπλέον, η σίγαση του γονιδίου BOK παρατηρείται σε μερικούς ανθρώπινους καρκίνους, γεγονός που υποδηλώνει πιθανό ρόλο ως καταστολέα όγκων [209]. Στην BOK έχει πρόσφατα αποδοθεί ένας προ-αποπτωτικός ρόλος στη ρύθμιση της απόπτωσης προκαλούμενη από το ER και το στρες του πρωτεασώματος, όπου η BOK προάγει το MOMP ανεξαρτήτως των BAX, BAK1 και των πεπτιδίων- ενεργοποιητών που έχουν μόνο την περιοχή BH3, και η έκφραση της οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο που εξαρτάται από το ER-σχετιζόμενο μονοπάτι αποικοδόμησης (ERAD) [210, 211]. Άλλοι παρείχαν αποδείξεις ότι η καρβοξυτελική κομμένη (truncated) ανασυνδυασμένη BOK (BOKΔC) διαπερνά τα

λιποσώματα και συνεργάζεται με την tBID στο σχηματισμό μεγάλων και σταθερών πόρων σε τεχνητές μεμβράνες που μιμούνται τις μιτοχονδριακές μεμβράνες [212]. Εντούτοις, η διαγραφή μόνο του γονιδίου Bok ή η διπλή διαγραφή Bax/Bok και Bak/Bok σε ποντίκια έδειξαν φυσιολογική μορφολογική ή λειτουργική εξέλιξη [213, 214]. Αντίθετα, η διπλή αφαίρεση των γονιδίων Bax/Bak σε ποντίκια προκάλεσε πολυάριθμες φαινοτυπικές ανωμαλίες επηρεάζοντας την ικανότητά τους να φτάσουν στην ενήλικη ζωή [215, 216], υποδηλώνοντας ότι η Bok δεν είναι ικανή να αντισταθμίσει εξ ολοκλήρου την απώλεια της Bax και/ή της Bak, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω. Άλλες μελέτες σε μη νευρωνικά κύτταρα έδωσαν, επίσης, στοιχεία ότι η Bok διαθέτει μη αποπτωτικές λειτουργίες στην ρύθμιση του πολλαπλασιασμού κυττάρων τροφοβλαστών ή ακόμη και να έχει ρόλο που προάγει την επιβίωση και όχι το θάνατο [80, 217]. Αρκετές έρευνες έδειξαν, ότι η διαγραφή του Bok απέτυχε να προστατεύσει τους φλοιώδεις νευρώνες και τα αιμοποιητικά κύτταρα έναντι ορισμένων ερεθισμάτων επαγόμενων από την απόπτωση [80, 214, 217]. Ομοίως, το Bok δεν απαιτείται για την απόπτωση σε κύτταρα MEF που είναι επαγόμενη από staurosporine (STS), ετοποσίδη και UV [218]. Παρ' όλα αυτά, ο φυσιολογικός ή παθοφυσιολογικός ρόλος του Bok παραμένει ακόμα αμφιλεγόμενος και είναι πιθανό ότι η αλληλεπικαλυπτόμενη λειτουργία της Bok με τις Bax και Bak μπορεί να είναι σχετιζόμενη με τον ιστό [219].

Η BOK εντοπίζεται σε διάφορα κυτταρικά οργανίδια, αν και η άτυπα καρβοξυτελική διαμεμβρανική περιοχή της BOK έχει υψηλότερη συγγένεια για τις μεμβράνες του ER και του Golgi παρά για τα μιτοχόνδρια [217]. Στο ER, η BOK δεσμεύεται ισχυρά και σταθερά (constitutively) με τους υποδοχείς IP3R1 και IP3R2, ρυθμίζοντας τα επίπεδα πρωτεϊνών τους και προστατεύοντάς τους από πρωτεολυτική διάσπαση και από αποικοδόμηση διαμεσολαβούμενη από κασπάσες [194]. Όλη η κυτταρική BOK είναι δεσμευμένη με τους IP3Rs και η μη δεσμευμένη Bok ουβικιτινιλιώνεται και αποικοδομείται ταχέως από το πρωτεάσωμα [195]. Προηγούμενες μελέτες πρότειναν επίσης ότι η έλλειψη Bok παρήγαγε αυξημένο στρες του ER, πιθανώς μέσω ενός μηχανισμού απελευθέρωσης Ca^{2+} [211, 212, 217]. Σε νευρώνες, μια πρόσφατη αναφορά έδειξε, ότι οι φλοιώδεις νευρώνες με έλλειψη bok εμφάνισαν σημαντικά αυξημένη νευρωνική βλάβη σε μοντέλα που προκαλείται κυτταρικός θάνατος επαγόμενος από NMDA και απαμινάση της 8-οξογουανίνης (8-oxoguanine deaminase, OGD) *in vitro* και *in vivo* [80]. Οι νευρώνες με ανεπάρκεια του γονιδίου bok απέτυχαν να διατηρήσουν την νευρωνική ομοιοστασία Ca^{2+} και εμφάνισαν μειωμένη τη δυναμική των μιτοχονδρίων και αυξημένη ενεργοποίηση του υποδοχέα PARP-1 ως απόκριση στη διεγερτοτοξικότητα. Επιπλέον, η έλλειψη της Bok οδήγησε επίσης σε

μια συγκεκριμένη μείωση των επιπέδων της νευρωνικής πρωτεΐνης MCL1 και αμφότερα ελαττώματα στη βιοενέργεια των μιτοχονδρίων και στο χειρισμό των ιόντων Ca^{2+} διασώθηκαν από την υπερέκφραση της MCL1, υποδηλώνοντας ότι η συνδυασμένη παρουσία της Bok και της MCL1 ήταν απαραίτητη για τη διατήρηση της μιτοχονδριακής ενέργειας [80].

4. Συρραφή (Μάτισμα)

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το mRNA που προκύπτει από τη μεταγραφή της αλληλουχίας του γονιδίου δεν είναι έτοιμο για μετάφραση αλλά υπόκειται σε μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, όπως η συρραφή. Η συρραφή και το μάτισμα είναι συνώνυμοι όροι, αλλά στην παρούσα Διπλωματική Εργασία θα χρησιμοποιείται ο όρος συρραφή, επειδή είναι πιο σύγχρονος.

4.1. Γενικός μηχανισμός συρραφής

Όταν το πρόδρομο mRNA μεταγράφεται από το DNA, περιέχει τόσο περιοχές που δεν πρόκειται να μεταφραστούν, εσώνια, όσο και περιοχές που πρόκειται να μεταφραστούν, εξώνια. Τα εξώνια που θα διατηρηθούν στο mRNA καθορίζονται κατά τη διαδικασία της συρραφής. Η ρύθμιση και η επιλογή των θέσεων συρραφής γίνεται από έναν trans-δραστικό ενεργοποιητή συρραφής και πρωτεΐνες καταστολής συρραφής, καθώς και cis-δραστικά στοιχεία (elements) εντός του ίδιου πρόδρομου mRNA, όπως ενισχυτές συρραφής εξωνίου και αποσιωπητές συρραφής εξωνίου (exonic splicing silencers).

Το τυπικό ευκαρυωτικό πυρηνικό εσώνιο έχει αλληλουχίες κοινής ομολογίας που ορίζουν σημαντικές περιοχές. Κάθε εσώνιο έχει την αλληλουχία GU στο 5' άκρο του. Κοντά στο 3' άκρο υπάρχει σημείο διακλάδωσης. Το νουκλεοτίδιο στο σημείο διακλάδωσης είναι πάντα μια A. Η ομολογία γύρω από αυτή την αλληλουχία ποικίλλει. Στον άνθρωπο, το σημείο διακλάδωσης της αλληλουχία κοινής ομολογίας είναι γUnAy [172]. Το σημείο διακλάδωσης ακολουθείται από μια σειρά πυριμιδινών -οδός της πολυπυριμιδίνης- και έπειτα από AG στο 3' άκρο [173].

Η συρραφή του mRNA εκτελείται από ένα σύμπλοκο RNA και πρωτεΐνης, γνωστό ως σωματίο ματίσματος ή συρραφής, που περιέχει snRNPs (small nuclear RiboNucleic Particles) που ορίζονται ως U1, U2, U4, U5 και U6 (το U3 δεν εμπλέκεται στη συρραφή του mRNA). Το U1 δεσμεύεται στο 5'GU και το U2, με τη βοήθεια του πρωτεϊνικού

παράγοντα U2AF, δεσμεύεται στο σημείο διακλάδωσης A εντός της θέσης διακλάδωσης. Το σύμπλοκο σε αυτό το στάδιο είναι γνωστό ως σύμπλοκο σωμάτιου συρραφής A (spliceosome A complex). Ο σχηματισμός του συμπλόκου A αποτελεί, συνήθως, το βασικό βήμα για τον προσδιορισμό των άκρων του εσωνίου που πρόκειται να αποκοπεί (spliced out) και τον καθορισμό των άκρων του εξωνίου που θα διατηρηθεί [173]. (Η ονοματολογία U προέρχεται από την υψηλή περιεκτικότητά τους σε ουριδίνη.)

Το σύμπλοκο U4, U5, U6 προσδέεται και το U6 αντικαθιστά το U1. Το U1 και το U4 αποχωρούν. Το εναπομείναν σύμπλοκο, στη συνέχεια, εκτελεί δύο αντιδράσεις τρανσεστεροποίησης. Στη πρώτη τρανσεστεροποίηση, το 5' άκρο του εσωνίου διασπάται από το ανοδικά ευρισκόμενο εξώνιο του και ενώνεται στη θέση διακλάδωσης A με 2'-5' φωσφοδιεστερικό δεσμό. Στη δεύτερη τρανσεστεροποίηση, το 3' άκρο του εσωνίου διασπάται από το καθοδικά ευρισκόμενο εξώνιο του και τα δύο εξώνια ενώνονται με φωσφοδιεστερικό δεσμό. Το εσώνιο στη συνέχεια απελευθερώνεται σε σχήμα βρόγχου και αποικοδομείται [174].

4.2. Εναλλακτική συρραφή

Το πρόγραμμα αλληλούχησης του ανθρώπινου γονιδιώματος έδωσε μια εκπληκτική διαπίστωση ότι ο αριθμός των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες στον άνθρωπο (λιγότερα από 25.000) είναι πολύ μικρότερος από ό, τι προβλεπόταν από την πολυπλοκότητα του ανθρώπινου πρωτεώματος (που περιέχει περίπου 100.000 πρωτεΐνες) [175-177]. Αυτή η απροσδόκητη ανακάλυψη υποδηλώνει ότι ένα πρόσθετο στρώμα πολυπλοκότητας προστίθεται σε επίπεδο RNA κατά τη διάρκεια της έκφρασης των ανθρώπινων γονιδιωμάτων. Εκτιμάται, ότι περισσότερο από το 90% των ανθρώπινων γονιδίων υφίστανται εναλλακτική συρραφή [178, 179], μέσω του οποίου ένα μοναδικό πρόδρομο RNA μπορεί να συναρμολογηθεί σε αρκετές διαφορετικές λειτουργικές ισομορφές σε ξεχωριστούς ιστούς ή αναπτυξιακά στάδια [180, 181]. Ως εκ τούτου, η εναλλακτική συρραφή είναι ένας από τους πιο κοινούς μηχανισμούς για τη ρύθμιση των γονιδίων στον άνθρωπο [182] και διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στην αύξηση του αριθμού των λειτουργικών πρωτεϊνών [183]. Η μη φυσιολογική ρύθμιση της εναλλακτικής συρραφής, συχνά, προκαλεί την παραγωγή πρωτεϊνικών ισομορφών ειδικών για ασθένειες [184, 185] και δεκάδες χιλιάδες γενετικές παραλλαγές, που μεταβάλλουν τη συρραφή, εμπλουτίζονται σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων ασθενειών, σύμφωνα με την ανάλυση του γονιδιώματος [182]. Επομένως, είναι σημαντικό να διερευνηθούν οι λειτουργίες και οι μηχανισμοί της μη

φυσιολογικής συρραφής και οι επιπτώσεις τους στις ανθρώπινες ασθένειες, καθώς και να αναπτυχθούν νέες μέθοδοι για την αποκατάσταση λανθασμένων ρυθμίσεων της εναλλακτικής συρραφής για τη θεραπεία ασθενειών.

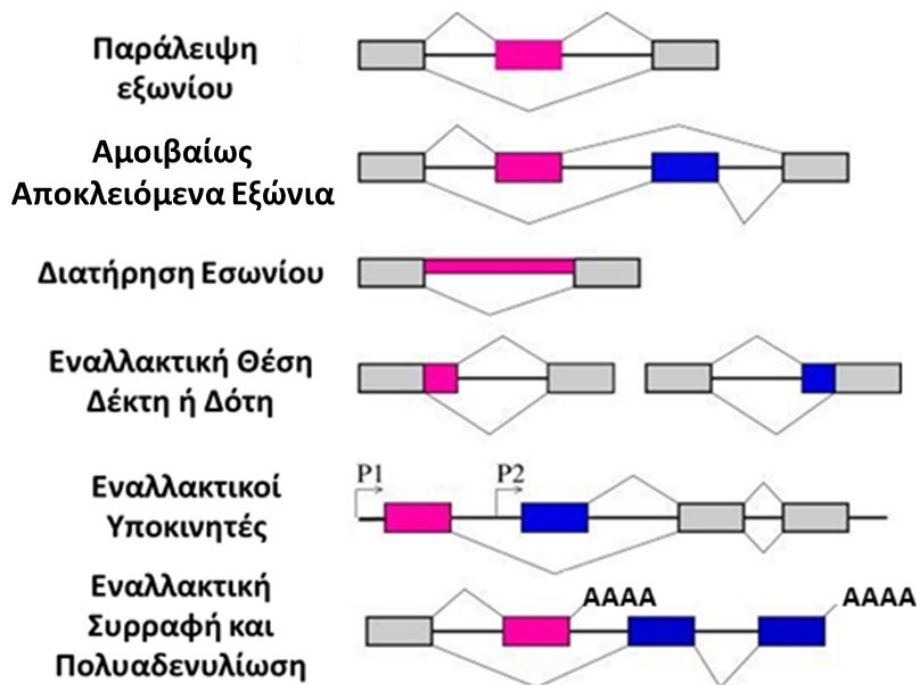
Η διαδικασία αυτή θεωρείται μία από τις πολλές εξαιρέσεις από την αρχική ιδέα ότι μία αλληλουχία DNA κωδικοποιεί ένα πολυπεπίδιο (One gene-one enzyme hypothesis). Επιπλέον υποστηρίζει τη θεώρηση, η οποία προτείνει ότι από ένα γονίδιο μπορούν να προκύψουν πολλά πολυπεπίδια. Απαιτούνται εξωτερικές πληροφορίες για να αποφασιστεί ποιο πολυπεπίδιο παράγεται, δεδομένης μιας αλληλουχίας DNA και ενός πρόδρομου mRNA. Δεδομένου ότι οι μέθοδοι ρύθμισης κληρονομούνται, αυτό παρέχει νέους τρόπους στις μεταλλάξεις για να επηρεάσουν τη γονιδιακή έκφραση [186].

Έχει προταθεί, ότι για τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η εναλλακτική συρραφή ήταν ένα πολύ σημαντικό βήμα προς την αύξηση της αποτελεσματικότητας, επειδή οι πληροφορίες μπορούν να αποθηκευτούν πολύ πιο οικονομικά. Πολλές πρωτεΐνες μπορούν να κωδικοποιηθούν από ένα μόνο γονίδιο, αντί να απαιτούν η καθεμία ξεχωριστό γονίδιο, επιτρέποντας έτσι τη δημιουργία ενός πιο ποικίλου πρωτεώματος από ένα γονιδίωμα περιορισμένου μεγέθους [174]. Παρέχει, επίσης, εξελικτική ευελιξία. Μία σημειακή μετάλλαξη μπορεί να αναγκάσει ένα δεδομένο εξώνιο περιστασιακά να αποκλείεται ή να συμπεριλαμβάνεται από ένα μετάγραφο κατά τη διάρκεια της συρραφής, επιτρέποντας την παραγωγή μιας νέας πρωτεϊνικής ισομορφής χωρίς την απώλεια της πρωτότυπης πρωτεΐνης [174]. Μελέτες έχουν εντοπίσει εγγενώς διαταραγμένες περιοχές εμπλουτισμένες σε μη βασικά εξώνια [187], υποδηλώνοντας ότι οι πρωτεϊνικές ισομορφές μπορεί να παρουσιάζουν λειτουργική ποικιλομορφία λόγω της αλλαγής των λειτουργικών ενοτήτων εντός αυτών των περιοχών. Αυτή η λειτουργική ποικιλομορφία που επιτυγχάνεται με τις ισομορφές αντανakλάται από τα πρότυπα έκφρασής τους και μπορεί να προβλεφθεί από προσεγγίσεις μηχανικής μάθησης (machine learning approaches) [188, 189].

Πιο συγκεκριμένα, η εναλλακτική συρραφή επιτρέπει στο ανθρώπινο γονιδίωμα να κατευθύνει τη σύνθεση πολλών περισσότερων πρωτεϊνών, από ότι θα περίμενε κανείς από τα 20.000 γονίδια κωδικοποίησης πρωτεϊνών. Η εναλλακτική συρραφή εμφανίζεται ως ένα φυσιολογικό φαινόμενο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, αυξάνοντας σε μεγάλο βαθμό τη βιοποικιλότητα των πρωτεϊνών που μπορούν να κωδικοποιηθούν από το ανθρώπινο γονιδίωμα [174]. Περίπου 95% των πολυ-εξωνικών γονιδίων είναι εναλλακτικά συζευγμένα [190]. Παρατηρούνται πολυάριθμοι τρόποι εναλλακτικής συρραφής, οι οποίοι αναπαρίστανται στην Εικόνα 4. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν πέντε βασικοί τρόποι εναλλακτικής συρραφής ευρέως αναγνωρισμένοι [173, 174, 190, 191].

- **Παράλειψη εξωνίου ή εξώνιο κασέτα** (Exon skipping or cassette exon): σε αυτή τη περίπτωση, ένα εξώνιο μπορεί να αποκλειστεί από το κύριο μετάγραφο ή να διατηρηθεί. Αυτός είναι ο πιο ευρέως διαδεδομένος τρόπος εναλλακτικής συρραφής στα πρόδρομα mRNAs των θηλαστικών [191].
- **Αμοιβαία αποκλειόμενα εξώνια** (Mutually exclusive exons): το ένα από τα δύο εξώνια διατηρείται στα mRNAs έπειτα από συρραφή, αλλά όχι και τα δύο.
- **Εναλλακτική θέση δότη** (Alternative donor site): Χρησιμοποιείται εναλλακτική 5' θέση συρραφής (θέση δότη), αλλάζοντας το 3' άκρο του ανοδικά ευρισκόμενου εξωνίου.
- **Εναλλακτική θέση δέκτη** (Alternative acceptor site): Χρησιμοποιείται εναλλακτική 3' θέση συρραφής (θέση δέκτη), αλλάζοντας το 5' άκρο του καθοδικά ευρισκόμενου εξωνίου.
- **Διατήρηση εσωνίου** (Intron retention): Μια αλληλουχία μπορεί να αφαιρεθεί ως εσώνιο ή απλά να διατηρηθεί. Η διαδικασία αυτή διακρίνεται από την παράληψη εξωνίου, επειδή η εναπομένουσα αλληλουχία δεν συνορεύει με εσώνια. Αν το εναπομείναν εσώνιο βρίσκεται στην κωδικοποιούσα περιοχή, το εσώνιο πρέπει να κωδικοποιεί αμινοξέα στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με τα γειτονικά εξώνια, ή ένα κωδικόνιο τερματισμού, ή μια μετατόπιση στο πλαίσιο ανάγνωσης θα οδηγήσει σε μια μη λειτουργική πρωτεΐνη. Αυτός είναι ο σπανιότερος τρόπος εναλλακτικής συρραφής στα θηλαστικά [191].

Εκτός από αυτούς τους κύριους τρόπους εναλλακτικής συρραφής, υπάρχουν άλλοι δύο κύριοι μηχανισμοί με τους οποίους μπορούν να δημιουργηθούν διαφορετικά mRNAs από το ίδιο γονίδιο, με χρήση πολλαπλών υποκινητών και πολλαπλών θέσεων πολυαδενυλίωσης. Η χρήση πολλαπλών υποκινητών περιγράφεται ορθότερα, ως ένας μηχανισμός ρύθμισης της μεταγραφής αντί για μηχανισμό εναλλακτικής συρραφής. Ξεκινώντας τη μεταγραφή σε διαφορετικά σημεία, μπορούν να δημιουργηθούν μετάγραφα με διαφορετικά κυρίως 5' εξώνια. Στο άλλο άκρο, πολλαπλές θέσεις πολυαδενυλίωσης παρέχουν διαφορετικά 3' άκρα για το μετάγραφο. Και οι δύο αυτοί μηχανισμοί δρουν συνδυαστικά με την εναλλακτική συρραφή και παρέχουν πρόσθετη ποικιλία στα mRNAs που προέρχονται από ένα γονίδιο [173, 174].



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση των τρόπων εναλλακτικής συρραφής. Στα γραφήματα αυτά, τα εξώνια αναπαριστώνται ως κουτιά και τα εσώνια ως γραμμές. Οι περιοχές των εξωνίων που συμπεριλαμβάνονται στο ώριμο mRNA μετά την εναλλακτική συρραφή είναι χρωματισμένες, ενώ τα εξώνια που εμπεριέχονται μόνιμα στο ώριμο mRNA είναι γκρι. Οι υποκινητές υποδηλώνονται με βέλη και τα σημεία πολυαδενυλίωσης με AAAA [192].

4.3. Ρυθμιστικά στοιχεία και πρωτεΐνες

Η συρραφή ρυθμίζεται από trans-δραστικές πρωτεΐνες (καταστολείς και ενεργοποιητές) και αντίστοιχες cis-δραστικές ρυθμιστικές θέσεις (αποσιωπητές και ενισχυτές) στο πρόδρομο mRNA. Ωστόσο, ως μέρος της πολυπλοκότητας της εναλλακτικής συρραφής, σημειώνεται ότι τα αποτελέσματα ενός παράγοντα συρραφής είναι συχνά εξαρτώμενα από τη θέση.

Δηλαδή, ένας παράγοντας συρραφής που χρησιμεύει ως ενεργοποιητής συρραφής, όταν προσδένεται σε μια αλληλουχία ενισχυτή εσωνίου μπορεί να χρησιμεύσει ως καταστολέας όταν προσδένεται σε αλληλουχία συρραφής στην περιοχή του εξωνίου και αντιστρόφως [193]. Η δευτερογενής δομή του μεταγράφου του πρόδρομου mRNA παίζει, επίσης, ρόλο στη ρύθμιση της συρραφής, φέρνοντας σε επαφή τις αλληλουχίες συρραφής ή καλύπτοντας μια αλληλουχία που διαφορετικά θα χρησίμευε ως αλληλουχία σύνδεσης για έναν παράγοντα συρραφής [194]. Αυτά τα στοιχεία μαζί σχηματίζουν έναν "κώδικα

συρραφής" που καθορίζει τον τρόπο με τον οποίο θα πραγματοποιηθεί η συρραφή, κάτω από διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες [195-197].

Υπάρχουν 2 κύριοι τύποι cis-δραστικών RNA αλληλουχιών που είναι παρόντες σε πρόδρομα mRNA και έχουν αντίστοιχες trans-δραστικές πρωτεΐνες δέσμευσης RNA. Οι αποσιωπητές συρραφής είναι θέσεις στις οποίες δεσμεύονται οι πρωτεΐνες-καταστολείς του συρραφής, μειώνοντας την πιθανότητα ότι μια κοντινή περιοχή θα χρησιμοποιηθεί ως σημείο συρραφής (splice junction). Αυτοί μπορούν να εντοπιστούν μέσα στο ίδιο το εσώνιο (αποσιωπητές συρραφής εσωνίου, ISS: Intronic Splicing Silencers) ή σε ένα γειτονικό εξώνιο (αποσιωπητές συρραφής εξωνίου, ESS: Exonic Splicing Silencers). Διαφέρουν στην αλληλουχία, όπως και στους τύπους των πρωτεϊνών που προσδένονται σε αυτούς. Η πλειοψηφία των καταστολέων συρραφής είναι ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (hnRNPs), όπως είναι η πρωτεΐνη σύνδεσης hnRNPA1 και η πρωτεΐνη σύνδεσης του συστήματος πολυπυριμιδίνης (PTB: Polypyrimidine Tract Binding Protein). Οι ενισχυτές συρραφής είναι θέσεις στις οποίες προσδένονται πρωτεΐνες ενεργοποιητές του συρραφής, αυξάνοντας την πιθανότητα ότι μια εγγύς περιοχή θα χρησιμοποιηθεί ως σημείο συρραφής. Οι ενισχυτές αυτοί μπορεί να εμφανιστούν στο εσώνιο (ενισχυτές συρραφής εσωνίων, ISE: Intronic Splicing Enhancers) ή στο εξώνιο (ενισχυτές συρραφής εξωνίων, ESE: Exonic Splicing Enhancers). Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες ενεργοποιητές που προσδένονται σε ISEs και ESEs είναι μέλη της οικογένειας SR πρωτεϊνών. Τέτοιες πρωτεΐνες περιέχουν μοτίβα αναγνώρισης RNA και περιοχές πλούσιες σε αμινοξικά κατάλοιπα αργινίνης και σερίνης (από εκεί προκύπτει και το όνομά τους- serine, arginine) [173, 197].

Σε γενικές γραμμές, οι καθοριστικοί παράγοντες της συρραφής δουλεύουν κατά τρόπο αλληλεξαρτώμενο που καθορίζεται από γενικότερο πλαίσιο (context) [195]. Η παρουσία συγκεκριμένων cis-δραστικών στοιχείων RNA αλληλουχιών μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα, σε μερικές περιπτώσεις, γειτονικές θέσεις να υποστούν συρραφή, αλλά να μειώσει την πιθανότητα σε άλλες περιπτώσεις, αναλόγως του πλαισίου. Το πλαίσιο, εντός του οποίου ρυθμιστικά στοιχεία δρουν, περιλαμβάνει, cis-δραστικά στοιχεία που καθιερώνονται από την παρουσία άλλων χαρακτηριστικών RNA αλληλουχιών και trans-δραστικά στοιχεία που καθιερώνονται από τις κυτταρικές συνθήκες. Για παράδειγμα, μερικά cis-δραστικά στοιχεία RNA αλληλουχιών επηρεάζουν η συρραφή μόνο αν πολλαπλά στοιχεία είναι παρόντα στην ίδια περιοχή, έτσι ώστε να δημιουργηθεί η συνθήκη. Ένα άλλο παράδειγμα, ένα cis-δραστικό στοιχείο μπορεί να έχει αντίθετα αποτελέσματα στη συρραφή, ανάλογα με τις πρωτεΐνες που εκφράζονται στο κύτταρο (π.χ., νευρωνικό έναντι

μη νευρωνικού PTB). Η προσαρμοστική σημασία των αποσιωπητών και ενισχυτών της συρραφής επιβεβαιώνεται από μελέτες, οι οποίες δείχνουν ότι υπάρχει ισχυρή επιλογή στα ανθρώπινα γονίδια έναντι μεταλλάξεων που παράγουν νέους αποσιωπητές ή που διακόπτουν υπάρχοντες ενισχυτές [198, 199].

4.4. Ασθένεια

Μεταβολές στον μηχανισμό επεξεργασίας RNA μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένη συρραφή πολλαπλών μεταγέφων, ενώ η αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου σε θέσεις συρραφής ή η μεταβολή σε ρυθμιστικές θέσεις *cis*-δραστικότητας μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετική συρραφή ενός γονιδίου και έτσι το mRNA παράγεται από μεταλλαγμένα μετάγραφα του παραπάνω γονιδίου.

Μια μελέτη του 2005, που περιλαμβάνει αναλύσεις με πιθανότητες, έδειξε ότι περισσότερο από το 60% των ανθρώπινων μεταλλάξεων που προκαλούν ασθένειες επηρεάζουν τη συρραφή αντί να επηρεάζουν άμεσα τις ακολουθίες κωδικοποίησης [200]. Μία πιο πρόσφατη μελέτη δείχνει, ότι το ένα τρίτο όλων των κληρονομικών νόσων είναι πιθανό να έχει μια συνιστώσα συρραφής [193]. Ανεξάρτητα από το ακριβές ποσοστό, υπάρχουν ορισμένες ασθένειες που σχετίζονται με τη συρραφή [201]. Όπως περιγράφεται παρακάτω, ένα σημαντικό παράδειγμα ασθενειών που σχετίζονται με τη συρραφή είναι ο καρκίνος.

Τα μη φυσιολογικά συρραμένα mRNA βρίσκονται, επίσης, σε ένα μεγάλο ποσοστό καρκινικών κυττάρων [202-204]. Συνδυασμένες αναλύσεις RNA-Seq και πρωτεομικής ανάλυσης έχουν αποκαλύψει εντυπωσιακή διαφορική έκφραση ισομορφών συρραφής βασικών πρωτεϊνών σε μονοπάτια που εμπλέκονται στον καρκίνο [205]. Δεν είναι πάντοτε σαφές εάν τέτοιου είδους ασυνήθιστα πρότυπα συρραφής συμβάλλουν στην καρκινική ανάπτυξη ή είναι απλώς συνέπεια κυτταρικών ανωμαλιών που σχετίζονται με τον καρκίνο. Για ορισμένους τύπους καρκίνου, όπως στην περίπτωση του παχέος εντέρου και του προστάτη, ο αριθμός των σφαλμάτων συρραφής ανά καρκίνο έχει δειχθεί ότι ποικίλει σημαντικά μεταξύ των μεμονωμένων καρκίνων, ένα φαινόμενο που αναφέρεται ως μεταγραφική αστάθεια [206, 207].

Η αστάθεια των μεταγραφικών παραμέτρων έχει αποδειχθεί εκτεταμένα ότι σχετίζεται αρκετά με το μειωμένο επίπεδο έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν παράγοντες συρραφής. Η μετάλλαξη της 3 άλφα DNA (κυτοσίνη-5-)-μεθυλοτρανσφεράση [DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha, DNMT3A] έχει αποδειχθεί, ότι συμβάλλει

σε αιματολογικές κακοήθειες και ότι οι κυτταρικές σειρές που έχουν μεταλλαχθεί με DNMT3A εμφανίζουν μεταγραφική αστάθεια σε σύγκριση με τα αντίστοιχα στελέχη άγριου τύπου με ίδιο γενότυπο [208].

Στην πραγματικότητα, υπάρχει μείωση της εναλλακτικής συρραφής σε καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά, και οι τρόποι συρραφής διαφέρουν. Για παράδειγμα, τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα διατήρησης εσωνίων από ότι τα φυσιολογικά κύτταρα, αλλά χαμηλότερα επίπεδα παράλειψης εξωνίου [209]. Ορισμένες από τις διαφορές στη συρραφή στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να οφείλονται στην υψηλή συχνότητα σωματικών μεταλλάξεων στα γονίδια που κωδικοποιούν τους παράγοντες συρραφής [204], ενώ μερικές μπορεί να προκύψουν από φωσφορυλίωση των trans δραστικών παραγόντων συρραφής [186]. Άλλοι μπορεί να παραχθούν με αλλαγές στις σχετικές ποσότητες παραγόμενων παραγόντων συρραφής, για παράδειγμα, έχει δείχθει ότι τα κύτταρα καρκίνου του μαστού έχουν αυξημένα επίπεδα του παράγοντα συρραφής SF2 / ASF [210]. Από μελέτη διαπιστώθηκε, ότι ένα σχετικά μικρό ποσοστό (383 από πάνω από 26000) εναλλακτικών παραλλαγών συρραφής ήταν σημαντικά υψηλότερο σε συχνότητα σε καρκινικά κύτταρα από τα φυσιολογικά κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχει ένα περιορισμένο σύνολο γονιδίων στα οποία το λανθασμένο μάτισμα συμβάλλει στην δημιουργία όγκων [211]. Πιστεύεται, ωστόσο, ότι οι επιβλαβείς επιδράσεις των μεταγραφών που έχουν υποστεί λανθασμένη συρραφή, συνήθως, προστατεύονται και εξαλείφονται από έναν κυτταρικό μετα-μεταγραφικό μηχανισμό ελέγχου ποιότητας ο οποίος ονομάζεται Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) [212].

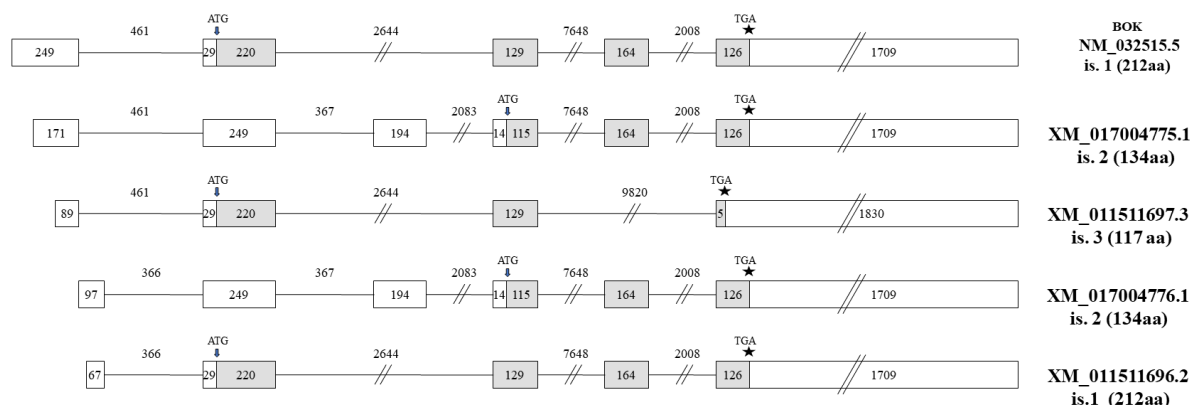
Ένα παράδειγμα μιας ειδικής παραλλαγής συρραφής που σχετίζεται με καρκίνους είναι σε ένα από τα ανθρώπινα γονίδια DNMT. Τρία γονίδια DNMT κωδικοποιούν ένζυμα που μεθυλιώνουν το DNA, μια τροποποίηση που συχνά επιδρά ρυθμιστικά. Διάφορα μη φυσιολογικά συρραμμένα DNMT3B mRNAs βρίσκονται σε όγκους και καρκινικές κυτταρικές σειρές. Σε δύο ξεχωριστές μελέτες, η έκφραση δύο από αυτά τα μη φυσιολογικά συρραμμένα mRNAs σε κύτταρα θηλαστικών προκάλεσε αλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσης DNA σε αυτά τα κύτταρα. Τα κύτταρα με ένα από τα μη φυσιολογικά mRNA αναπτύχθηκαν δύο φορές πιο γρήγορα από τα κύτταρα ελέγχου, υποδεικνύοντας μια άμεση συμβολή στην ανάπτυξη όγκων από αυτό το προϊόν [186]. Ένα άλλο παράδειγμα είναι το πρωτο-ογκογονίδιο Ron (MST1R). Μια σημαντική ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων είναι η ικανότητά τους να μετακινούνται και να εισβάλλουν στον κανονικό ιστό. Η παραγωγή ενός μη φυσιολογικά καταγεγραμμένου μεταγράφου του Ron έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα του SF2/ ASF σε κύτταρα καρκίνου του μαστού. Η μη φυσιολογική

ισομορφή της πρωτεΐνης Ron που κωδικοποιείται από αυτό το mRNA οδηγεί σε κυτταρική κινητικότητα [210].

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν μια βασική συνάρτηση της δομής της χρωματίνης και των τροποποιήσεων της ιστόνης σε ρύθμιση εναλλακτικής συρραφής. Αυτές οι ιδέες υποδηλώνουν ότι η επιγενετική ρύθμιση καθορίζει όχι μόνο ποια τμήματα του γονιδιώματος εκφράζονται αλλά και πώς γίνεται η συρραφή αυτών [213].

4.5. *BOK* και Εναλλακτική Συρραφή

Οι γνώσεις για τα μετάγραφα του *BOK* είναι αρκετές περιορισμένες και απεικονίζονται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση των μεταγράφων του ανθρώπινου γονιδίου *BOK*. Με κουτάκια απεικονίζονται τα εξώνια, ενώ με γραμμές τα εσώνια. Οι αριθμοί πάνω από κάθε σχήμα αντιστοιχούν στο μήκος των εσώνιων και των εξώνιων. Το μέγεθος των γραμμών και των κουτιών είναι κλιμακοποιημένο. Το γκρι χρώμα συμβολίζει τις περιοχές που μεταφράζονται. Το βέλος και το αστέρι αντιστοιχούν στο κωδικόνιο έναρξης και λήξης, αντίστοιχα, ενώ τέλος οι παράλληλες γραμμές συμβολίζουν τα σχήματα που βρίσκονται εκτός κλίμακας.

Πιο συγκεκριμένα, πριν την διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής υπήρχε ένα μόνο επιβεβαιωμένο στη GenBank® μετάγραφο, το οποίο αποτελούνταν από 5 εξώνια. Επιπλέον, υπήρχαν 4 ακόμη, τα οποία είχαν προκύψει από βιοπληροφορική ανάλυση (*in silico analysis*), αλλά δεν είχε ελεγχθεί η ύπαρξή τους πειραματικά. Σε δύο από τα μετάγραφα αυτά έχει προστεθεί ένα νέο εξώνιο, ενώ κάθε μετάγραφο από τα παραπάνω διαθέτει ένα εναλλακτικό πρώτο εξώνιο. Προς δικής μας διευκόλυνσης, ομαδοποιήσαμε τα πρώτα

εξώνια σε δύο κατηγορίες με βάση το 3' άκρο τους. Δηλαδή, τα 3 πρώτα μετάγραφα θεωρήσαμε ότι έχουν ένα κοινό πρώτο εξώνιο, το επονομαζόμενο από εμάς 1a και τα 2 τελευταία μετάγραφα έχουν ένα δεύτερο εξώνιο 1, το επονομαζόμενο 1b. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχουν δεδομένα μέχρι στιγμής, τα οποία να αποκλείουν το ενδεχόμενο τα εναλλακτικά αυτά πρώτα εξώνια να εκτείνονται περαιτέρω από το δοσμένο 5' άκρο και άρα να είναι ίδια ως προς το άκρο αυτό.

Εκτός του παραπάνω σχήματος, δεν διαθέταμε παραπάνω πληροφορίες για την πραγματοποίηση εναλλακτικής συρραφής στο γονίδιο αυτό στον άνθρωπο, οι οποίες να προέρχονταν από την GenBank®.

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εστιάζει στη μελέτη της πρωτοταγούς δομής των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *ΒΟΚ* που έχουν προέλθει μέσω της διαδικασίας της εναλλακτικής συρραφής. Η περιορισμένη γνώση γύρω από το συγκεκριμένο γονίδιο αποτέλεσε έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση του μορίου αυτού. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε μία προσέγγιση, ανεπτυγμένη από άτομα του ευρενητικής μας ομάδας, η οποία είχε ως αποτέλεσμα την εις βάθος ανάλυση και εν τέλει την επιτυχημένη εύρεση νέων μεταγράφων. Η μεθολογία και τα ευρήματα της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας παρουσιάζονται εκτενώς στις παρακάτω ενότητες.

Εκτός από τους ερευνητικούς στόχους που επιτεύχθηκαν πλήρως, η παρούσα Διπλωματική Εργασία στόχευε στην εκπαίδευση του φοιτητή, με απώτερο σκοπό την εξοικείωσή του με ποικίλες τεχνικές αλλά και την καλλιέργεια ορθής συμπεριφοράς στο χώρο του εργαστηρίου.

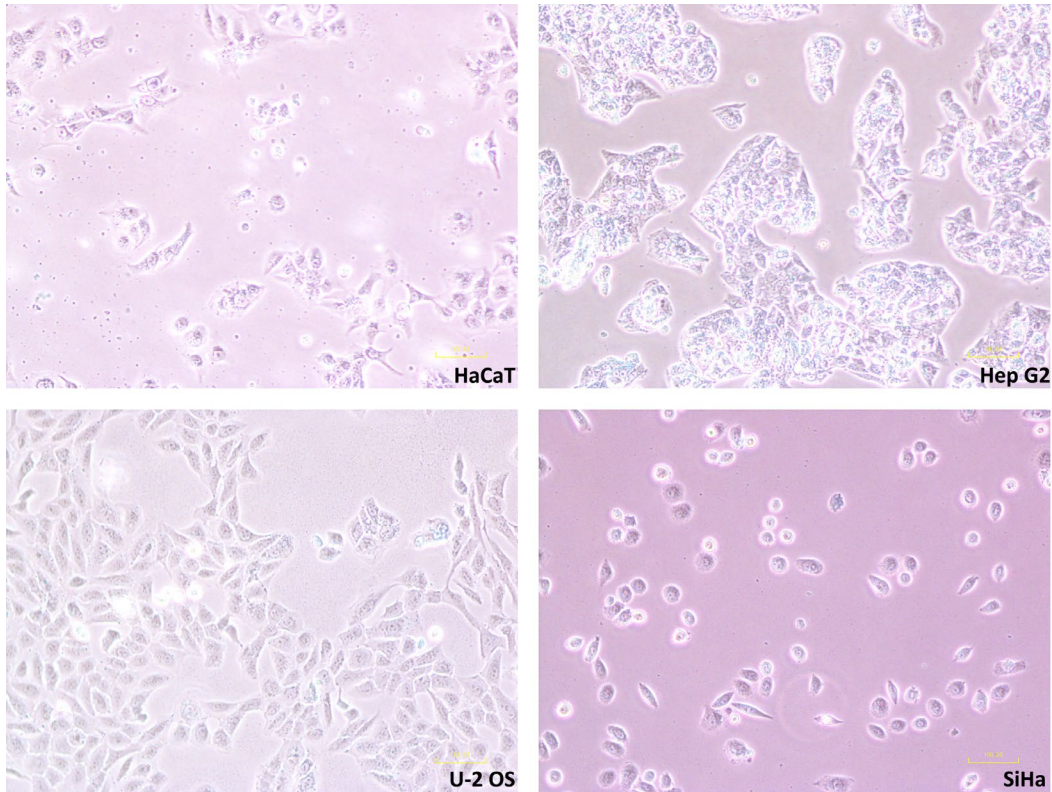
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Βιοπληροφορική Ανάλυση

Πριν την διεξαγωγή πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε εκτενής βιοπληροφορική ανάλυση, η οποία ήταν απαραίτητη για τον μετέπειτα σχεδιασμό της πειραματικής διαδικασίας. Ανατρέξαμε στη βάση GenBank[®], όπου πληροφορηθήκαμε για την υπάρχουσα γνώση σχετικά με τα υπάρχοντα μετάγραφα του γονιδίου *BOK*. Στην συνέχεια, πραγματοποιήσαμε ανάλυση expressed sequence tags (ESTs). Τα ESTs είναι μικρά τμήματα αλληλουχίας cDNA, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση μεταγράφων γονιδίων, αποτελώντας μία από τις πρώτες τεχνικές που ακολουθήθηκε στην γονιδιακή ανακάλυψη και στον προσδιορισμό της αλληλουχίας αυτών. Το EST προκύπτει μέσω one shot αλληλούχησης ενός κλωνοποιημένου cDNA, τα οποία, συνήθως, είναι μεμονωμένοι κλώνοι από μία cDNA βιβλιοθήκη. Η προκύψασα αλληλουχία είναι ένα σχετικά χαμηλής ποιότητας θραύσμα, το μήκος του οποίου είναι περίπου 500-800 νουκλεοτίδια. Επειδή αυτοί οι κλώνοι αποτελούνται από DNA, συμπληρωματικό του mRNA, τα ESTs αντιπροσωπεύουν τμήματα εκφραζόμενων γονιδίων. Αυτά μπορεί να εκπροσωπηθούν είτε ως αλληλουχίες cDNA/mRNA, είτε ως ανάστροφη συμπληρωματική αλληλουχία του mRNA, αλυσίδα οδηγός. Μέσω αυτής της ανάλυσης, προέκυψε πληθώρα δεδομένων, τα οποία αναφέρονται εκτενώς στην ενότητα Αποτελέσματα.

2. Κυτταροκαλλιέργειες

Τα καρκινικά κύτταρα αποτελούν συχνά οργανισμούς μοντέλα για την διεξαγωγή πολυάριθμων πειραμάτων και τη διερεύνηση ποικίλων λειτουργιών. Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση RNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε, εν συνεχεία, στην πειραματική διαδικασία. Η επιλογή των καρκινικών αυτών σειρών βασίστηκε σε πρωτότερη έρευνα αναφορικά με την έκφραση του *BOK*. Πιο συγκεκριμένα, καλλιεργήθηκαν οι ακόλουθες 8 ανθρώπινες καρκινικές σειρές: HeP G2, PC-3, U-2-OS, SiHa, SK-Br-3, HeLa, U251-MG, HCT-116, και μία μη καρκινική, HaCaT (Εικόνα 6). Οι ανθρώπινες καρκινικές αυτές σειρές προέρχονται από ιστό μαστού, μήτρας, εγκεφάλου, ήπατος, παχέος εντέρου. Τα U-2-OS είναι επιθηλιακά κύτταρα οστεοσαρκώματος, ενώ τα HaCaT είναι αθανατοποιημένα κερατινοποιημένα κύτταρα.



Εικόνα 6: Φωτογραφίες κυττάρων από οπτικό μικροσκόπιο. Οι φωτογραφίες αυτές προέρχονται από 4 διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Η πάνω αριστερά προέρχεται από την κυτταρική σειρά HaCaT, η πάνω δεξιά από την κυτταρική σειρά HepG2, η κάτω αριστερά από την κυτταρική σειρά U-2-OS και η κάτω δεξιά από την κυτταρική σειρά SiHa. Όπως είναι εμφανές τα κύτταρα κάθε κυτταρικής σειράς έχουν χαρακτηριστικά διαφορετική μορφολογία μεταξύ τους.

2.1. Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιιεργειών

Αναλόγως των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών κάθε κυτταρικής σειράς, χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός τύπος θρεπτικού μέσου συγκεκριμένης σύστασης. Για την καλλιέργεια των σειρών HepG2, SiHa, HaCaT, U251-MG και HeLa χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό DMEM high glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (PAA Laboratories GmbH), το οποίο περιείχε 2 mM *L*-γλουταμίνη, 0,1 mM μη απαραίτητα αμινοξέα, 1,5 g/L διττανθρακικό νάτριο, 10% (κ.ό.) FBS (fetal bovine serum, βόειος εμβρυϊκός ορός) (PAA Laboratories GmbH), 0,01 mg/mL βόεια ινσουλίνη, 100 U/mL πενικιλίνη, 0,1 mg/mL στρεπτομυκίνη (PAA Laboratories GmbH) και 4,5 g/L γλυκόζη. Για την σειρά PC-3 χρησιμοποιήθηκε RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute - 1640) (PAA Laboratories GmbH), το οποίο περιέχει 2 mM *L*-γλουταμίνη, 10mM HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-

piiperazineethanesulfonic acid], 1mM πυροσταφυλικό νάτριο, 4,5 g/L γλυκόζη, 1,5 g/L διττανθρακικό νάτριο και 10% (κ.ό.) FBS 0,01 mg/mL βόεια ινσουλίνη, 100 U/mL πενικιλίνη, 0,1 mg/mL στρεπτομυκίνη (PAA Laboratories GmbH). Τέλος, η σειρά U-2-OS και SK-Br-3 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό McCoy's, το οποίο περιείχε 1,5 mM *L*-γλουταμίνη, 10% FBS, 100 U/mL πενικιλίνη και 0,1 mg/mL στρεπτομυκίνη.

Καλλιεργήθηκαν σε επωαστήρα στους 37°C, σε συνθήκες υγρασίας και με 5% περιεκτικότητα CO₂.

3. Απομόνωση ολικού RNA από καρκινικές κυτταρικές σειρές

Η απομόνωση RNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του χημικού αντιδραστηρίου TRI Reagent[®]. Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο περιέχει όξινο διάλυμα ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, φαινόλης και χλωροφορμίου, τα οποία προκαλούν λύση των κυττάρων, αποδιάταξη πρωτεϊνών και προστασία του RNA από τις RNασες.

Σε κάθε ομογενοποίηση κυττάρων προστίθεται 1ml TRI Reagent[®] και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5min. Ακολουθεί προσθήκη 0,2 ml χλωροφορμίου και επώαση για 2-3 min. Κατόπιν, φυγοκεντρείται για 15min στα 12.000 g σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C), με αποτέλεσμα τη δημιουργία τριών διακριτών φάσεων: μία κατώτερη οργανική φάση που περιέχει τις πρωτεΐνες, μίας μεσόφασης με το DNA και μίας ανώτερης υδατικής στην οποία βρίσκεται το RNA. Μεταφέρουμε την υδατική φάση, προσθέτουμε 0.5ml ισοπροπανόλη και επωάζουμε για 10min. Φυγοκεντρούμε για 10 min στα 12.000 g σε ψυχόμενη φυγόκεντρο και κρατάμε το ίζημα. Αναδιαλυτοποιούμε το ίζημα με 1ml αιθανόλη με ανάδευση και φυγοκεντρούμε για 5min στα 7.500 g στους 4°C. Τέλος, αφαιρούμε το υπερκείμενο και αναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε 20-50μl DEPC-H₂O (diethylpyrocarbonate-H₂O). Φυλάσσεται στους -80°C.

4. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητας του απομονωμένου ολικού RNA

Βασιζόμενοι στην ιδιότητα των νουκλεϊκών οξέων να απορροφούν στο υπεριώδες φάσμα φωτός (μέγιστο απορρόφησης 260 nm), μπορούμε να προσδιορίσουμε φασματοφωτομετρικά την συγκέντρωση του ολικού RNA. 1μl απομονωμένου ολικού RNA (είτε αραιωμένου σε DEPC-H₂O είτε μη αραιωμένου) φωτομετρείται σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm με φασματοφωτόμετρο Biospec-nano (Shimadzu Europa Analytical

Instruments, Japan). Από τον λόγο A_{260}/A_{280} μπορούμε να διαπιστώσουμε την καθαρότητα του RNA. Στα 280 nm απορροφά ο δακτύλιος των αρωματικών αμινοξικών καταλοίπων.

5. Αντίστροφη μεταγραφή

Ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή των συγκεκριμένων δειγμάτων με σκοπό τη σύνθεση μονόκλωνου DNA (cDNA).

5.1. Αρχή μεθόδου

Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιείται *in vivo*, ως επί το πλείστον, σε ρετροϊούς και βασίζεται στην παρουσία ενός εξειδικευμένου ενζύμου, την αντίστροφη μεταγραφάση, για τη δημιουργία DNA, έχοντας ως καλούπι μονόκλωνο RNA. Απαραίτητα για την *in vitro* προσέγγιση θεωρούνται η ύπαρξη τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων και κάποιο είδος εκκινητή (είτε εξειδικευμένου ως προς την αλληλουχία που επιθυμούμε να μεταγράψουμε αντίστροφα είτε ενός εκκινητή συμπληρωματικού ως την πολυA ουρά του επιθυμητού μορίου). Η χρήση ειδικευμένου, ως προς το μόριο που μας ενδιαφέρει, εκκινητή αυξάνει την ειδικότητα του προϊόντος, αφού εξαλείφεται ενδεχόμενος ανταγωνισμός που θα προέκυπτε από έναν μη εξειδικευμένο εκκινητή (universal). Ωστόσο, στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε εκκινητής συμπληρωματικός ως προς το 3' άκρο του μορίου, διότι επιθυμούσαμε να προσδιορίσουμε την πλήρη δομή των μεταγράφων.

5.2. Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής

Απομονώθηκε RNA από όλες τις προαναφερθείσες σειρές καθώς και αρκετές επιπλέον, φτάνοντας στον τελικό αριθμό των 54. Παρασκευάστηκε cDNA από 51 σειρές* και η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα ABI 9700 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Το μίγμα της αντίδρασης περιλάμβανε 2μg ολικού RNA, 1μl dNTPs (10mM), 1μl oligo-dT ανάπτορα και H₂O ελεύθερο RNασών μέχρι τελικού όγκου 10 μl. Ακολούθησε επώαση για 5min στους 65 °C, για υβριδισμό του oligo-dT εκκινητή στην poly-A ουρά των ώριμων μορίων mRNA. Ακολούθησε προσθήκη 4μl 5X First Strand Buffer, 2μl 0.1 M DTT, 1μl RNaseOUT™ (Life Technologies Ltd.) αναστολέα RNασών (40 units/ μL) και 1μl M-MLV Reverse Transcriptase (αντίστροφη μεταγραφάση) (200 units). Το τελικό μίγμα της

αντίδρασης όγκου 20μl επώαστηκε για 52min στους 37°C, και τελικά, η διαδικασία ολοκληρώθηκε με θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου στους 70°C για 15min.

*Οι κυτταρικές σειρές από τις οποίες απομονώθηκε RNA και αυτό μετέπειτα χρησιμοποιήθηκε στην αντίστροφη μεταγραφή είναι οι ακόλουθες: MCF-7, SK-BR-3, BT-20, BT-474, OVCAR-3, SK-OV-3, ES-2, MDAH-2774, Ishikawa, SK-UT-1B, Hela, SiHa, PC-3, LNCaP, T-24, RT-4, 786-O, ACHN, Caki-1, AGS, A549, FM3, Raji, U937, K562, HL-60, SUDHL-1, Granta, REC-1, HCT 116, RKO, HT-29, DLD-1, Caco-2, SW-620, HepG2, Huh-7, U87 MG, U251 MG, D-54, H4, SH-SY5Y, HEK293, BB-49, Cal-33, UM-SCC 6A, UM-SCC 11A, 1.2B4, Jurkat, HaCaT, U-2-OS,

6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR)

6.1. Αρχή μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης θεωρείται μία από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους στη βιοχημεία και μοριακή βιολογία, η οποία στοχεύει στον ταχύ πολλαπλασιασμό- ταχεία ενίσχυση μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, μέσω ενζυμικής διαδικασίας και χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανών οργανισμών. Τα βασικά στάδια που περιλαμβάνει είναι: η αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA, η πρόσδεση των εκκινητών στο εκμαγείο DNA και τέλος, η επιμήκυνση, με απώτερο σκοπό των πολλαπλασιασμό του μορίου. Τα στάδια αυτά αποτελούν έναν κύκλο, ο οποίος επαναλαμβάνεται στο ειδικό μηχάνημα, που ονομάζεται θερμοκυκλωτής, για όσες φορές εμείς το επιθυμούμε, με συνηθέστερους τους 35 κύκλους. Για την επίτευξη καθενός εκ των παραπάνω σταδίων απαιτείται κατάλληλη ρύθμιση της θερμοκρασίας. Πιο συγκεκριμένα, η θερμοκρασία που επιλέγεται για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA είναι 95° C, ενώ η θερμοκρασία για την υβρισμό των εκκινητών εξαρτάται από την αλληλουχία που έχουν. Ωστόσο, κυμαίνεται από 50°C- 65° C. Τέλος, ο πολυμερισμός πραγματοποιείται, συνήθως στους 72° C, ενώ η χρονική του διάρκεια εξαρτάται από το μήκος της αλληλουχίας που επιθυμούμε να πολλαπλασιάσουμε. Για την υλοποίηση της συγκεκριμένης αντίδρασης απαιτούνται: τριφωσφορικά νουκλεοτίδια, ειδικό ζεύγος εκκινητών (πρόσθιος και ανάστροφος) και DNA πολυμεράση, καθώς και ένα ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα. Οι όγκοι των συστατικών αυτών κυμαίνονται αναλόγως τις τελικές συγκεντρώσεις που επιθυμούμε να υπάρχουν στον τελικό όγκο αντίδρασης. Για την παρούσα Διπλωματική Εργασία, σχεδιάστηκαν εξειδικευμένα ζεύγη εκκινητών ως προς τα μετάγραφα του γονιδίου *ΒΟΚ*.

6.2. Γονίδια σταθερής έκφρασης (housekeeping genes)

Τα γονίδια σταθερής έκφρασης είναι απαραίτητα για τη διατήρηση βασικών κυτταρικών λειτουργιών και εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού υπό φυσιολογικές και υπό παθο-φυσιολογικές συνθήκες. Εξαιτίας της σταθερής έκφρασής τους, μπορούν να λειτουργήσουν ως μέτρα σύγκρισης αποτελεσμάτων μελέτης μεταξύ mRNA ενός ή περισσότερων γονιδίων σε διαφορετικά δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο σταθερής έκφρασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της ποιότητας και της ποσότητας του cDNA, και συνεπώς του RNA, αλλά και την απόδοση της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής. Στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο σταθερής έκφρασης *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

6.3. Σχεδιασμός εκκινητών συμβατικής PCR

Μία από τις σημαντικότερες προκλήσεις για μία επιτυχημένη PCR είναι ο σχεδιασμός ειδικών εκκινητών, οι οποίοι θα πολλαπλασιάζουν αποκλειστικά και μόνο την επιθυμητή αλληλουχία, και όχι άλλες μη ειδικές, οι οποίες θα οδηγούσαν στην παραγωγή παραπροϊόντων. Επίσης, σημαντικό είναι η αποφυγή σχηματισμού ετεροδιμερών που θα οδηγούσαν σε μειωμένη απόδοση της αντίδρασης. Για αυτούς τους λόγους, οι εκκινητές συνήθως πληρούν τους ακόλουθους κανόνες:

- Έχουν μήκος 20-30 νουκλεοτίδια, για να έχει αυξημένη ειδικότητα έναντι της επιθυμητής αλληλουχίας
- Αποφεύγονται οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, για να μην προκύψει ολίσθηση του εκκινητή επάνω στην αλυσίδα-εκμαγείο.
- Τα 3'-άκρα των εκκινητών αποφεύγεται να έχουν περισσότερες από 2-3 G ή C, για να μην προκύψει μη επιθυμητός υβρισμός σε περιοχές πλούσιες σε GC.
- Τέλος, να έχουν περιορισμένη δυνατότητα να σχηματίσουν δευτεροταγείς δομές λόγω εσωτερικής συμπληρωματικότητας.

6.4. Εκκινητές συμβατικής PCR για τον έλεγχο έκφρασης του γονιδίου αναφοράς, *GAPDH*

Ο πρόσθιος εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό του συγκεκριμένου γονιδίου ήταν συμπληρωματικός με μία αλληλουχία του εξωνίου 2, ενώ ο ανάστροφος με μία αλληλουχία του εξωνίου 4 (Πίνακας 1). Το μήκος του προϊόντος PCR που προκύπτει έχει μήκος 223 bp.

Πίνακας 1: Ιδιότητες εκκινητών για το γονίδιο του *GAPDH*.

Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος (nt)	Ποσοστό GC (%)	T _m (°C)
GAPDH Ex2F	5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3'	20	55,0	58,1
GAPDH Ex4R	5'-TGACAAGCTTCCCGTTCTCA-3'	20	50,0	58,3

6.5. Εκκινητές συμβατικής PCR για τη μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου *BOK*

Με χρήση του λογισμικού Primer Blast, σχεδιάστηκαν ζεύγη ειδικών εκκινητών συμβατικής PCR σε πραγματικό χρόνο για την ενίσχυση τμημάτων cDNA κάθε μίας από τις κυριότερες ομάδες μεταγράφων mRNA του γονιδίου *BOK* (Πίνακας 2). Ο πρόσθιος εκκινητής (*BOK Ex1a_up F*) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 1 (ένα από τα δύο εναλλακτικά) και ο ανάστροφος εκκινητής (*BOK Ex6(a) R*) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 6. Ο πρόσθιος εκκινητής (*BOK Ex1b_up F*) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 1 (του δεύτερου από τα δύο εναλλακτικά), ενώ ο πρόσθιος εκκινητής (*BOK In2_upF_HPLC*) υβριδοποιείται σε τμήμα της προέκτασης του εξωνίου 2. Τα μήκη που προκύπτουν από τα προαναφερθέντα ζεύγη αναφέρονται αναλυτικά στο κομμάτι των αποτελεσμάτων. Είναι σημαντικό να διευκρινιστεί, ότι οι εκκινητές που αναφέρονται παρακάτω στις παραγράφους 6.6 και 7, δεν αποκλείστηκαν από την χρησιμοποίησή τους στην συμβατική PCR.

Πίνακας 2: Ιδιότητες εκκινητών για το γονίδιο του *BOK* για συμβατική PCR.

Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος (nt)	Ποσοστό GC (%)	T _m (°C)
BOK Ex1a_up F	5'-GGTCTGAATGGAAGGGTCGAGG-3'	22	59	63
BOK Ex1b_up F	5'-CCACGGGAACGGCGAG-3'	16	75	64
BOKIn2_upF_HPLC	5'-CAGCCTCGGGGAATGTCTGTAG-3'	22	59	63
BOK Ex6(a) R	5'-GGGTGGGGAGGAGGAAGAT-3'	19	63	63

6.6. Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) του γονιδίου *BOK*

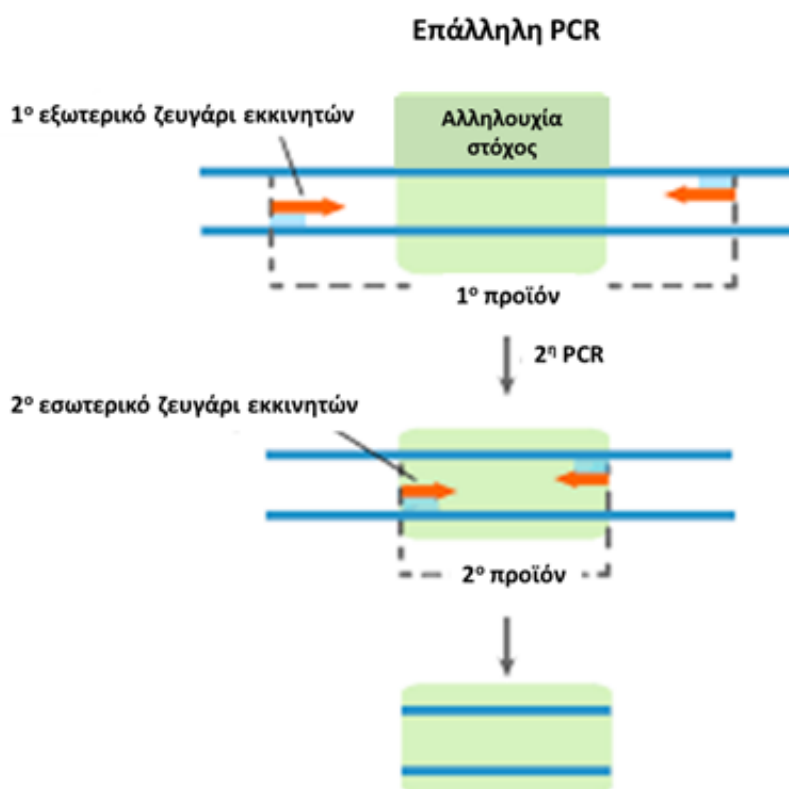
Αρχικά, έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών PCR για κάθε ένα από τα ζευγάρια των προαναφερθέντων εκκινητών. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε 0,5μl cDNA, προερχόμενο από 4 ή 5 μg RNA ή 1μl cDNA προερχόμενο από 2μg RNA. Επίσης, περιείχε 1μl πρόσθιου εκκινητή και 1μl ανάστροφου εκκινητή, τελικής συγκέντρωσης 0,4 μM, 2,5μl Buffer (με τελική συγκέντρωση Mg 1,5mM), 0,5μl dNTPs (συγκέντρωσης 10 mM το καθένα από τα 4 νουκλεοτίδια, με τελική συγκέντρωση 0,2 mM το καθένα), 0,2μl πολυμεράσης (200 units) και όγκου DEPC-H₂O, τόσο ώστε η αντίδραση να έχει τελικό όγκο 25μl. Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιλάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης σε 95°C για 3 min, ακολούθως 35 κύκλους με 95°C για 30 sec, 61°C (για τους εκκινητές BOKIn2_upF_HPLC και BOK Ex1a_up F) ή 62°C (για τον εκκινητή BOK Ex1b_up F) για 30 sec και 72°C για 1,5 min, και τέλος ένα στάδιο επιμήκυνσης σε 72°C για 2 min.

7. Επάλληλη PCR (Nested PCR)

7.1. Αρχή μεθόδου

Ένα βασικό πρόβλημα που προκύπτει στην συμβατική PCR είναι η μη ειδική πρόσδεση των εκκινητών και παραγωγή παραπροϊόντων. Αυτό μπορεί να επιλυθεί μέσω της επάλληλης PCR. Η επάλληλη PCR είναι μία τροποποίηση της συμβατικής PCR, η οποία στοχεύει στη μείωση μη ειδικών προσδέσεων εξαιτίας της ενίσχυσης μη αναμενόμενων θέσεων δέσμευσης των εκκινητών. η προσέγγιση, αυτή, περιλαμβάνει δύο σετ εκκινητών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε δύο διακριτές PCR αντιδράσεις. Το δεύτερο ζευγάρι εκκινητών

αποσκοπεί στην ενίσχυση ενός δεύτερου στόχου εντός του προϊόντος από την πρώτη αντίδραση. Αυτό επιτρέπει ενίσχυση για ένα μικρό αριθμό κύκλων στην πρώτη αντίδραση, περιορίζοντας τα μη-ειδικά προϊόντα. Το δεύτερο εσωτερικότερο ζευγάρι εκκινητών ενισχύει, μόνο, το αναμενόμενο από την πρώτη αντίδραση προϊόν και όχι παραπροϊόντα. Αυτό επιτρέπει πραγματοποίηση της αντίδρασης για περισσότερους κύκλους, ενώ ελαχιστοποιεί μη ειδικά προϊόντα. Αυτό είναι αρκετά χρήσιμο για σπάνια εκμαγεία ή για PCR με υψηλό υπόβαθρο. Ο βασικός συλλογισμός της επάλληλης PCR απεικονίζεται στην Εικόνα 7.



Εικόνα 7: Αναπαράσταση της επάλληλης PCR. Η επάλληλη PCR έχει δύο ζευγάρια εκκινητών (ένα εξωτερικό και ένα εσωτερικό) για να πολλαπλασιάσουν μία συγκεκριμένη αλληλουχία, με απώτερο σκοπό την αύξηση της ειδικότητας και τη μείωση των παραπροϊόντων.

7.2. Εκκινητές για μελέτη έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου *BOK* σε επάλληλη PCR

Με χρήση του λογισμικού Primer Blast, σχεδιάστηκαν ζεύγη ειδικών εκκινητών επάλληλης PCR για την ενίσχυση τμημάτων cDNA κάθε μίας από τις κυριότερες ομάδες μεταγράφων mRNA του γονιδίου *BOK* (Πίνακας 3). Ο πρόσθιος εκκινητής (*BOK Ex1a F*)

υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 1 εσωτερικότερα του BOK Ex1a_up F (ένα από τα δύο εναλλακτικά) και ο ανάστροφος εκκινητής (BOK Ex6(b) R) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 6, εσωτερικότερα του εκκινητή BOK Ex6(a) R. Ο πρόσθιος εκκινητής (BOK Ex1a/2 F) υβριδοποιείται στο σημείο συρραφής μεταξύ των εξωνίων 1 και 2, ενώ ο πρόσθιος εκκινητής (BOK Ex1a/5 F) υβριδοποιείται στο σημείο συρραφής μεταξύ των εξωνίων 1 και 5. Ο πρόσθιος εκκινητής (BOK Ex1b F) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 1 εσωτερικότερα του BOK Ex1b_up F (ένα από τα δύο εναλλακτικά), ο πρόσθιος εκκινητής (BOK Ex1b/2 F) υβριδοποιείται στο σημείο συρραφής μεταξύ των εξωνίων 1 και 2, ενώ ο πρόσθιος εκκινητής (BOK Ex1b/5 F) υβριδοποιείται στο σημείο συρραφής μεταξύ των εξωνίων 1 και 5. Τέλος, οι πρόσθιοι εκκινητές (BOK In2_down F_HPLC) και (BOK Ex2(ATG) F) υβριδοποιούνται εσωτερικά του εκκινητή (BOK In2_up F_HPLC) και στο εξώνιο 2, αντιστοίχως. Τα μήκη που προκύπτουν από τα προαναφερθέντα ζεύγη αναφέρονται αναλυτικά στο κομμάτι των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 3: Ιδιότητες εκκινητών για το γονίδιο του *BOK* για την επάλληλη PCR.

Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος (nt)	Ποσοστό GC (%)	T _m (°C)
BOK Ex1a F	5'-GAGCAGATCCTGAAGCCAGAACT-3'	23	52	62
BOK Ex1a/2 F	5'-GCGGGAGAGGTGCGG-3'	15	80	64
BOK Ex1a/5 F	5'-GGCGGGAGAGGCATCA-3'	16	69	62
BOK Ex1b F	5'-CGAGGCCGGGGACAC-3'	15	73	64
BOK Ex1b/2 F	5'-AGCGGCGGAGGTGC-3'	14	79	64
BOK Ex1b/5 F	5'-AGCGGCGGAGGCATC-3'	15	73	63
BOK In2_down F_HPLC	5'-GCTGAATTCGGGCTCTGAAAGAAG-3'	24	50	61
BOK Ex2(ATG) F	5'-CCGAGATCATGGACGCCTTTG-3'	21	57	62
BOK Ex6(b) R	5'-GATGTGTTCGGGTGCTGAGG-3'	18	61	62

7.3. Συνθήκες επάλληλης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) του γονιδίου *BOK*

Αρχικά, έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών PCR για κάθε ένα από τα ζευγάρια των προαναφερθέντων εκκινητών. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε 1μl αραιωμένο PCR προϊόν, προερχόμενο από την πρώτη αντίδραση. Επίσης, περιείχε 1μl πρόσθιου εκκινητή και 1μl ανάστροφου εκκινητή, τελικής συγκέντρωσης 400Mm, 2,5μl Buffer (με τελική συγκέντρωση Mg 1,5mM), 0,5μl dNTPs (συγκέντρωσης 10mM το καθένα από τα 4 νουκλεοτίδια), 0,2μl πολυμεράσης (200units) και όγκου DEPC-H₂O, τόσο ώστε η αντίδραση να έχει τελικό όγκο 25μl. Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιλάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης σε 95°C για 3 min, ακολούθως 35 κύκλους με 95°C για 30 sec, 61°C (για τους εκκινητές BOKIn2_downF_HPLC και BOK Ex1a F) ή 62°C (για τον εκκινητή BOK Ex1b F) για 30 sec και 72°C για 1,5 min, και τέλος ένα στάδιο επιμήκυνσης σε 72°C για 2 min. Για τους υπόλοιπους εκκινητές το θερμικό πρωτόκολλο ήταν το ίδιο με τη διαφορά, ότι η θερμοκρασία για τον υβρισμό των εκκινητών ήταν 61 °C αλλά με 1min πολυμερισμό. Εκτός από τους εκκινητές αυτούς, χρησιμοποιήθηκαν και εκκινητές από την παράγραφο 8.4 «Εκκινητές Real- time PCR για τη μελέτη έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου *BOK*».

8. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου – Real-time PCR

8.1. Αρχή μεθόδου

Η Real- time PCR αποτελεί μία παραλλαγή της απλής PCR μεθόδου, κατά την οποία ο πολλαπλασιασμός της επιθυμητής αλληλουχίας DNA και η ανίχνευση αυτού πραγματοποιούνται ταυτόχρονα και ο ερευνητής μπορεί να έχει άμεση και σαφή εικόνα της πειραματικής πορείας. Η προσέγγιση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο ποσοτικά όσο και ημιποσοτικά.

Οι δύο βασικές μέθοδοι για τον εντοπισμό των PCR προϊόντων στην PCR πραγματικού χρόνου είναι: 1) οι μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές, οι οποίες παρεμβάλλονται μεταξύ οποιουδήποτε δίκλωνου DNA, και 2) DNA αισθητήρες (probes), οι οποίοι είναι εξειδικευμένοι έναντι μίας αλληλουχίας και αποτελούνται από ολιγονουκλεοτίδια, σημασμένα με έναν φθορίζοντα ανιχνευτή, που επιτρέπει τον εντοπισμό μόνο μετά τον υβριδισμό του με την συμπληρωματική αλληλουχία.

Η PCR διαδικασία, γενικά, αποτελείται από μία σειρά θερμοκρασιακών αλλαγών που επαναλαμβάνονται 25-50 φορές. Αυτοί οι κύκλοι, συνήθως, αποτελούνται από 3 στάδια: το πρώτο, στους 95°C, επιτρέπει την αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας· το δεύτερο, σε θερμοκρασία μεταξύ 68-72°C, επιτρέπει τον πολυμερισμό από την DNA πολυμεράση. Εξαιτίας του μικρού μεγέθους των τμημάτων, το τελευταίο βήμα, συνήθως, παραλείπεται σε αυτό τον τύπο της αντίδρασης, χάρη στην ικανότητα του ενζύμου να αυξάνει των αριθμών των τμημάτων κατά τη διάρκεια της αλλαγής μεταξύ του σταδίου υβριδισμού (alignment stage) και αποδιάταξης. Στο τέταρτο βήμα πραγματοποιείται η μέτρηση της χρωστικής, κατά τη διάρκεια μίας σύντομης φάσης με αυξημένη θερμοκρασία πχ 80°C, η οποία διαρκεί λίγα δευτερόλεπτα σε κάθε κύκλο. Αυτό συμβαίνει προκειμένου να μειωθεί το σήμα, το οποίο μπορεί, τυχόν, να προκληθεί από την παρουσία διμερών εκκινητών, όταν χρησιμοποιείται μία μη-ειδική χρωστική. Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι, που χρησιμοποιούνται για κάθε κύκλο, εξαρτώνται από μία ποικιλία παραμέτρων, συμπεριλαμβανομένου του ενζύμου που χρησιμοποιείται για την σύνθεση του προϊόντος, της συγκέντρωσης των δισθενών ιόντων και των διδεοξυ-νουκλεοτιδίων στην αντίδραση και στην θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών.

Μία χρωστική προσδένεται σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA στην PCR, επάγοντας τον φθορισμό της. Μία αύξηση στο DNA προϊόν, κατά τη διάρκεια της PCR μπορεί, επομένως να οδηγήσει σε αύξηση της έντασης του φθορισμού, η οποία μετράται σε κάθε κύκλο. Ωστόσο, οι χρωστικές αυτές θα προσδεθούν σε όλους τους τύπους δίκλωνου DNA, άρα και σε μη ειδικά PCR προϊόντα (πχ διμερή εκκινητών). Αυτό μπορεί, ενδεχομένως, να εμπλακεί ή να παρεμποδίσει την ακριβή παρακολούθηση (monitoring) της αναμενόμενης αλληλουχίας στόχου.

Στην PCR πραγματικού χρόνου με χρωστικές για δίκλινο DNA, η αντίδραση προετοιμάζεται ως συνήθως, με την προσθήκη της φθορίζουσας χρωστικής για δίκλινο DNA. Εν συνεχεία, η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ένα μηχάνημα real-time PCR και έπειτα από κάθε κύκλο, η ένταση της χρωστικής μετριέται με έναν ανιχνευτή. Είναι σημαντικό να αποσαφηνιστεί, ότι η χρωστική εκπέμπει, μόνο όταν είναι προσδεμένη στο δίκλινο DNA. Αυτή η μέθοδος έχει το πλεονέκτημα, ότι απαιτεί μόνο ένα ζευγάρι εκκινητή για την πραγματοποίηση του πολλαπλασιασμού. Αυτό μειώνει σημαντικά το κόστος· πολλαπλές αλληλουχίες στόχοι μπορούν να παρακολουθούνται στον ίδιο σωλήνα, κάνοντας χρήση διαφορετικών χρωστικών.

Real- time PCR επιτρέπει την ταυτοποίηση εξειδικευμένων, πολλαπλασιασμένων DNA θραυσμάτων μέσω ανάλυσης των θερμοκρασιών τήξης (melting temperature, T_m).

αυτή η ανάλυση συνήθως βασίζεται σε PCR με χρωστικές έναντι δίκλωνων μορίων DNA, με συνηθέστερη όλων την SYBR Green. Η θερμοκρασία τήξης είναι ειδική για κάθε τμήμα DNA. Τα αποτελέσματα αυτής της τεχνικής λαμβάνονται μέσω σύγκρισης των dissociation curves των υπό ανάλυση δειγμάτων.

Εν αντιθέσει με την συμβατική PCR, αυτή η μέθοδος αποφεύγει την χρήση ηλεκτροφορητικών τεχνικών για να αναπαραστήσει τα αποτελέσματα όλων των δειγμάτων. Αυτό συμβαίνει, διότι εκτός του ότι αποτελεί μία τεχνική κινητικής, η ποσοτική PCR, συνήθως, αξιολογείται σε ένα διακριτό τελικό σημείο (end point). Αυτή η τεχνική, συνεπώς, παρέχει πιο γρήγορα αποτελέσματα και/ή λιγότερα αντιδρώντα συγκριτικά με την ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σε περιπτώσεις, όπου Real-time PCR αφήνει κάποιες αμφιβολίες αναφορικά την ταυτότητα του προϊόντος.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί, ότι η ανίχνευση του προϊόντος δεν πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια των πρώτων κύκλων της αντίδρασης, καθώς το σήμα είναι ασθενές. Εξαιτίας αυτού, είναι αδύνατο να διακριθεί από το σήμα του υποβάθρου του συστήματος. Η φάση αυτή είναι γνωστή ως «φάση υποβάθρου» ή «φάση θορύβου» (background phase). Με τη συσσώρευση του προϊόντος της αντίδρασης επιτυγχάνεται η ενίσχυση του σήματος του προϊόντος με αποτέλεσμα να υπερσκελίσει το σήμα υποβάθρου. Φτάνουμε, έτσι, στην εκθετική φάση, κατά την οποία τα αντιδραστήρια είναι σε περίσσεια, ενώ καταναλώνονται ταχύτατα. Μετά το πέρας κάποιου αριθμού κύκλων και αφού η απόδοση έχει μεγιστοποιηθεί με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του προϊόντος σε κάθε κύκλο, η εκθετική φάση δίνει τη θέση της στην γραμμική φάση. Στη φάση αυτή, τα συστατικά της αντίδρασης καθίστανται περιοριστικοί παράγοντες, ενώ πραγματοποιείται περιορισμένη αποικοδόμηση του προϊόντος, οδηγώντας σε σταδιακή μείωση της απόδοσης της αντίδρασης. Το τελευταίο στάδιο, αυτού του κορεσμού, χαρακτηρίζεται από μείωση της καταλυτικής δραστηριότητας των μορίων της DNA πολυμέρας.

8.2. Σχεδιασμός εκκινήτων για τη Real-time PCR

Τα χαρακτηριστικά που πρέπει να διέπουν τους εκκινήτες της Real-time PCR είναι τα ίδια με αυτά των εκκινήτων της συμβατικής PCR, με κάποιες επιπλέον ιδιαιτερότητες, που είναι οι εξής:

- Εξαιτίας του μικρού μεγέθους του προϊόντος (50-150 bp), ευνοείται η υψηλή απόδοση της ενίσχυσης και αποτρέπεται ο σχηματισμός μη ειδικών προϊόντων.

- Η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών T_m πρέπει να είναι μεταξύ 58° και 60°C.
- Το 3' άκρο των εκκινητών δεν πρέπει να περιέχει περισσότερες από δύο βάσεις G και/ή C, για να μην προκύψουν μη ειδικά προϊόντα.
- Το ποσοστό G/C που πρέπει να έχουν οι εκκινητές πρέπει να βρίσκεται μεταξύ του 30-80%, έτσι ώστε να μην υπάρξει μείωση της απόδοσης ούτε εξαιτίας μη ορθής αποδιάταξης ούτε εξαιτίας σχηματισμού μη ειδικών προϊόντων.

8.3. Εκκινητές Real- time PCR για τη μελέτη έκφρασης του γονιδίου *GAPDH*

Ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε και στην Real- time PCR, το *GAPDH*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης και επιλέχθηκε εξαιτίας των σταθερών, αν και μέτριων, επιπέδων έκφρασης του mRNA. Ο πρόσθιος εκκινητής (GAPDH Ex2 REAL F) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 2 και ο ανάστροφος εκκινητής (GAPDH Ex3 REAL R) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 3 (Πίνακας 4). Το προϊόν που παράγεται έχει μήκος 107 bp.

Πίνακας 4: Ιδιότητες εκκινητών για το γονίδιο του *GAPDH* για την Real- time PCR.

Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος (nt)	Ποσοστό GC (%)	T_m (°C)
GAPDH Ex2 REAL F	5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3'	19	57,9	58,8
GAPDH Ex3 REAL R	5'-GGGTCATTGATGGCAACAATATC-3'	23	43,5	60,4

8.4. Εκκινητές Real- time PCR για τη μελέτη έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου *BOK*

Με χρήση των λογισμικών Primer Blast, σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές PCR σε πραγματικό χρόνο για την ενίσχυση τμήματος cDNA των διαφορετικών εναλλακτικών μεταγράφων mRNA του γονιδίου *BOK* (Πίνακας 5). Τα σημεία στα οποία υβριδοποιείται ο κάθε εκκινητής προσδιορίζονται πλήρως από τους αριθμούς που έπονται της λέξης Ex, η οποία είναι συντομογραφία της λέξης εξώνιο. Τα αναμενόμενα μήκη αναφέρονται εκτενώς στο κομμάτι των αποτελεσμάτων. Επίσης, οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν δεν ανταποκρίνονται στους κανόνες που αναφέρθηκαν παραπάνω για τον σχεδιασμό

επιτυχημένων εκκινητών. Αυτό οφείλεται στην ιδιαίτερη φύση του γονιδίου, που περιέχει εξαιρετικά αυξημένο ποσοστό G/C με αποτέλεσμα αυτό να αποτελεί τροχοπέδη στη διαδικασία αυτή.

Πίνακας 5: Ιδιότητες εκκινητών για το γονίδιο του *BOK* για την Real-time PCR.

Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος (nt)	Ποσοστό GC (%)	T _m (°C)
BOK Ex2F	5'-ATGGAGGTGCTGCGGC-3'	16	69	63
BOK Ex2R	5'-TTGTCTGTGGGCGAGCG-3'	17	65	62
BOK Ex2/3 F	5'-TGCTGCGCCTGGATTCTTG-3'	19	58	62
BOK Ex2/4 F	5'-GCGCCTGGGCGATGA-3'	15	73	64
BOK Ex2/5 F	5'-CTGCGCCTGGGCATC-3'	15	73	62
BOK Ex3F	5'-TTCTGGGGTCACACACGGTC-3'	20	60	63
BOK Ex3R	5'-GACCGTGTGTGACCCAGAA-3'	20	60	63
BOK Ex5/2 R	5'-CACGTGATGCCAGGC-3'	16	69	61
BOK Ex5/4 R	5'-CCACGTGATGCCTGCAGA-3'	18	61	62
BOK Ex6/4 R	5'-ACTTGAGGACATCAGTCTGCAGAG-3'	24	50	62
BOK Ex6/5 R	5'-TGAGGACATCAGTCCATCCGC-3'	21	57	63
BOK 6R	5'-AAGCTGCAGAGTGCAGCCA-3'	19	58	64

8.5. Συνθήκες ποσοτικής real-time PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA του γονιδίου *BOK*

Η αντίδραση της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή 7500 Real-Time PCR System Fast (Applied Biosystems), ο οποίος φέρει κατάλληλη υποδοχή για μικροπλακίδια 96 θέσεων. Ως σύστημα ανίχνευσης επιλέχθηκε αυτό της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green, το οποίο έχει περιγραφεί προηγουμένως. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για τον πολυμερισμό ονομάζεται *KAPA SYBR FAST DNA polymerase*. Η *KAPA SYBR FAST DNA* πολυμεράση είναι μια

ανασυνδυασμένη *Taq* πολυμεράση η οποία παράγεται στην *Escherichia coli*, και διαθέτει υψηλή καθαρότητα και πολύ υψηλή ενεργότητα πολυμερισμού. Η *KAPA SYBR FAST DNA polymerase* είναι μια τροποποιημένη, μορφή θερμής έναρξης (hot-start) της *KAPA BIOSYSTEMS*, η οποία παραμένει αδρανής μέχρι να εκτεθεί σε θερμοκρασία 95°C για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η ενεργοποίηση του ενζύμου μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε 20 sec, αλλά για πιο περίπλοκους στόχους απαιτούνται μέχρι και 3 min για βέλτιστη αποδιάταξη. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση του ενζύμου σε θερμοκρασίες όπου το DNA είναι πλήρως αποδιαταγμένο, και έτσι αποφεύγεται ο σχηματισμός μη ειδικών προϊόντων από τυχόν λανθασμένη υβριδοποίηση των εκκινητών, γεγονός που λαμβάνει συχνά χώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή κατά την αλλαγή της θερμοκρασίας στη διάρκεια των κύκλων της αντίδρασης.

Αρχικά, έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών ποσοτικής real-time PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA του γονιδίου *BOK*. Στις αντιδράσεις αυτές, χρησιμοποιήθηκε το *KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal*, στο οποίο προσθέτουμε πριν την ανάμιξη των προϊόντων την παθητική χρωστική ROX (*KAPA Biosystems*). Συγκεκριμένα, σε 0,5μl cDNA προερχόμενου από 2, 4 ή 5 μg RNA, προσθέτουμε 5μl *KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X)* και ROX ($C_{τελ}=1X$), 1μl Ιπρόσθιο εκκινητή ($C_{τελ}=50nM$), 1μl ανάστροφο εκκινητή ($C_{τελ}=50nM$), και DEPC-H₂O μέχρι τελικό όγκο 10 μL. Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης των μορίων cDNA και ενεργοποίησης της hot-start πολυμεράσης σε 95°C για 3 min, ακολούθως 40 κύκλους που αποτελούνταν από ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του σχηματισμένου προϊόντος PCR σε 95°C για 3 sec και ένα στάδιο υβριδισμού των εκκινητών στο υπόστρωμα και πολυμερισμού σε 60°C για 30 sec, και μετά την ολοκλήρωση των κύκλων ένα τελευταίο στάδιο για τη δημιουργία καμπύλης τήξης του δίκλωνου DNA που είχε σχηματιστεί, με την οποία γινόταν δυνατή η διάκριση μεταξύ του βασικού προϊόντος PCR και διμερών των εκκινητών.

9. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

9.1. Αρχή μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση θεωρείται μία εύκολη και γρήγορη διαδικασία διαχωρισμού προϊόντων DNA και RNA, βάση του μεγέθους τους. Βασίζεται στην ιδιότητα του γενετικού υλικού να κινείται προς θετικά φορτισμένο πόλο, εξαιτίας του αρνητικού του φορτίου,

παρουσία ηλεκτρικού ρεύματος. Υπάρχουν πολλές παραλλαγές της συγκεκριμένης τεχνικής, ωστόσο εμείς πραγματοποιήσαμε ηλεκτρόφορηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη δημιουργεί πόρους στο πήκτωμα διαμέτρου αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσής της. Οι πόροι αυτοί εξυπηρετούν τον διαχωρισμό των μορίων, αφού, αναλόγως του μεγέθους τους, μπορούν να διέλθουν από τους πόρους με μεγαλύτερη ή μικρότερη ευκολία. Παράλληλα με το δείγμα, έτρεχε στο πήκτωμα και ένας μάρτυρας (ladder) οι ζώνες του οποίου ήταν γνωστού μεγέθους. Με αυτόν τον τρόπο μπορούσαμε να προσδιορίσουμε τα μήκη των άγνωστων ζωνών των δειγμάτων, και με βάση το μήκος τους να αποκτήσουμε μία πρώτη εικόνα για τη δομή του συγκεκριμένου προϊόντος.

9.2. Ηλεκτρόφορηση σε πήκτωμα αγαρόζης προϊόντα του γονιδίου *BOK* και κόψιμο των επιθυμητών ζωνών

Ανάλογα με το μήκος των αναμενόμενων προϊόντων, καθώς και τη μεταξύ τους απόσταση, κατασκευάζουμε το πήκτωμα με διαφορετική συγκέντρωση αγαρόζης. Αναμιγνύουμε την σκόνη αγαρόζης με Tris/Βορικό/EDTA Buffer 1X (TBE) και λιώνουμε την αγαρόζη στους 100°C για 4min. Στην συνέχεια, προσθέτουμε σε αναλογία 1:16.000 την φοθρίζουσα, μη τοξική χρωστική Midori η οποία εκπέμπει στο υπεριώδες. Με αυτόν τον τρόπο μπορούμε να ανιχνεύσουμε τα προϊόντα DNA, αντικαθιστώντας με αυτόν τον τρόπο το βρωμιούχο αιθίδιο. Τρέχουμε το πήκτωμα στα 100 ή 135 V, διάλυμα TBE 0.5X. Χρησιμοποιώντας νυστέρι μίας χρήσης, κόβουμε τις επιθυμητές ζώνες.

10. Καθαρισμός PCR προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης με χρήση στηλών

10.1. Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ανάκτηση DNA θραυσμάτων, έπειτα από ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό. Η ανάκτηση DNA από ένα πήκτωμα αγαρόζης περιλαμβάνει 3 διακριτά βήματα: την πρόσδεση, το πλύσιμο και την έκλυση από την κολώνα. Το DNA θεωρείται ότι προσδένεται στην κολώνα, παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αλάτων μέσω μιας γέφυρας άλατος. Ακολούθως της πρόσδεσης, το DNA καθαρίζεται από προσμίξεις και εκλύεται σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης αλάτων, οι οποίες διακόπτουν αυτήν την αλληλεπίδραση.

10.2. Καθαρισμός PCR προϊόντων του *BOK* από πήκτωμα αγαρόζης με χρήση στηλών

Για κάθε 100mg αγαρόζης προσθέτουμε 200μl Binding Buffer (απαραίτητο για την πρόσδεση του DNA στην κολώνα) και επωάζουμε για 5-10min στους 50°C, μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Εν συνεχεία, μεταφέρουμε το διάλυμα στην κολώνα και φυγοκεντρούμε για 1min στα 11.000g, προκειμένου να προσδεθεί το DNA στην στήλη. Προσθέτουμε στην κολώνα 700μl Wash Buffer (το οποίο περιέχει αιθανόλη και άρα επάγει την απομάκρυνση ρύπων και προσμίξεων). Φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες με παράπανω και επαναλαμβάνουμε το στάδιο του πλυσίματος μία ακόμη φορά. Στο τέλος, προσθέτουμε 20-30μl Elution Buffer, το οποίο είναι χαμηλής περιεκτικότητας σε αλάτι και άρα το DNA εκλύεται. Αποθηκεύουμε τα δείγματα στους -20°C.

11. Προσδιορισμός συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων με φθορισμομετρία

11.1. Αρχή μεθόδου

Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε την συγκέντρωση του προϊόντος μετά τον καθαρισμό, γι' αυτό το λόγο επιλέγουμε να προσδιορίσουμε την συγκέντρωση με τη μέθοδο της φθορισμομετρίας. Η φθορισμομετρία θεωρείται πολύ πιο ευαίσθητη και ακριβής σε σχέση με την σπεκτροφωτομετρία. Γενικά, η ευαισθησία του φθορισμού είναι 10-100πλάσια συγκριτικά με τις μετρήσεις απορρόφησης. Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η φθορισμομετρία είναι η εξής: ένα μόριο διεγείρεται σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος απορρόφησης και στη συνέχεια μετρείται η εκπομπή σε ένα άλλο μήκος κύματος που καλείται μήκος κύματος φθορισμού.

11.2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης των PCR προϊόντων του *BOK* φθορισμομετρικά

Απαραίτητα για τη μέτρηση είναι το Buffer και η φθορίζουσα χρωστική. Τα δύο αυτά αντιδραστήρια αναμιγνύονται, έτσι ώστε η χρωστική να βρίσκεται σε αναλογία 1:200 (Working Solution). Ο όγκος, ο οποίος μετριέται είναι 200μl, συμπεριλαμβανομένου του δείγματος. Ο όγκος του δείγματος μπορεί να κυμαίνεται από 1-10μl. Οπότε, αναλόγως του όγκου του δείγματος προσθέτουμε μέχρι τα 200μl το Working Solution. Επωάζουμε σε

θερμοκρασία δωματίου για 2min.

12. Αλληλούχηση με τη μέθοδο Sanger

12.1. Αρχή Μεθόδου

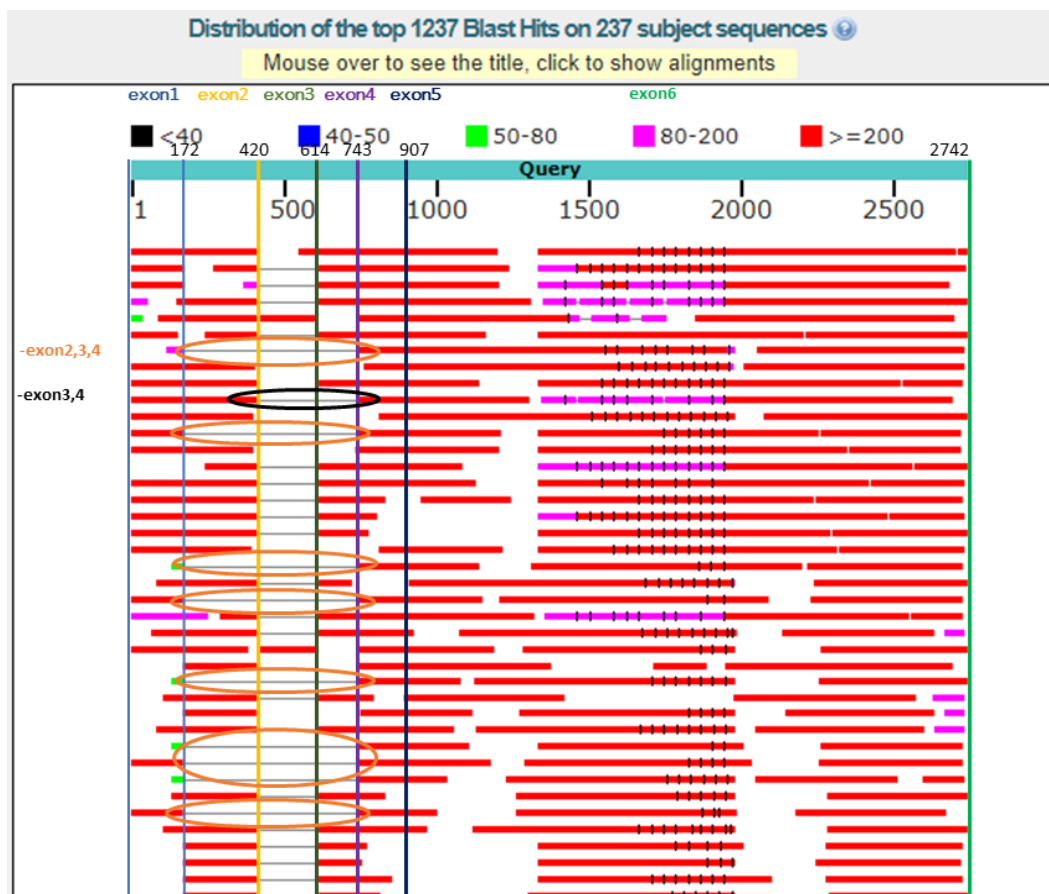
Η αλληλούχηση Sanger είναι μία μέθοδος αλληλούχησης DNA, η οποία βασίζεται στην επιλεκτική ενσωμάτωση διδεόξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) από την DNA πολυμεράση κατά τη διάρκεια *in vitro* DNA πολλαπλασιασμού. Τα νουκλεοτίδια αυτά έχουν την ιδιότητα να εμποδίζουν την περαιτέρω επιμήκυνση της αλυσίδας μετά την ενσωμάτωσή τους, εξαιτίας της έλλειψης του 3' OH. Τα ddNTPs μπορεί να είναι ραδιοενεργά ή σημασμένα με φθορισμό για τον εντοπισμό τους από τα αυτοματοποιημένα μηχανήματα αλληλούχησης.

Το δείγμα DNA χωρίζεται σε 4 διαφορετικές αντιδράσεις αλληλούχησης, καθεμία από τις οποίες περιέχει και τα 4 βασικά δεοξυνοκλεοτίδια (dATP, dGTP, dCTP and dTTP) και την DNA πολυμεράση. Σε καθεμία από τις αντιδράσεις, όμως, προστίθεται μόνο ένα από τα τέσσερα διδεόξυνουκλεοτίδια. Η συγκέντρωση των διδεόξυνουκλεοτιδίων πρέπει να είναι 100 φορές χαμηλότερη από αυτήν του αντίστοιχου νουκλεοτιδίου, έτσι ώστε να παραχθούν αρκετά τμήματα, ενώ η πλήρης αλληλουχία συνεχίζει να αντιγράφεται. Έπειτα από επαναλαμβανόμενους γύρους επέκτασης του DNA εκμαγείου, τα τμήματα DNA, που έχουν προκύψει, αποδιατάσσονται θερμικά και χωρίζονται βάσει μεγάλους ηλεκτροφορητικά. X-ray ταινία εκτείνεται στο πήκτωμα και οι μαύρες ζώνες, που δημιουργούνται, αντιπροσωπεύουν DNA θραύσματα διαφορετικών μηκών, τα οποία είναι το αποτέλεσμα του τερματισμού της αλυσίδας μετά την ενσωμάτωση ενός διδεόξυνουκλεοτιδίου. Οι σχετικές θέσεις διαφορετικών ζωνών από κάτω προς τα πάνω, χρησιμοποιούνται για το διάγραμμα της DNA αλληλουχίας. Η προαναφερθείσα τεχνική σήμανσης αποτελεί την πρώτη προσέγγιση, την οποία ακολούθησαν ποικίλες διαφοροποιήσεις όπως σήμανση με νουκλεοτίδια που περιέχουν ραδιενεργό φώσφορο για ραδιοσήμανση, ή χρησιμοποιώντας έναν εκκινητή σημασμένο στο 5' άκρο με μία φθορίζουσα χρωστική. Η αλληλούχηση με βαμμένους εκκινητές διευκολύνει την ανάγνωση των νουκλεοτιδίων, επιτρέποντας μία πιο γρήγορη, οικονομική, αλλά και αυτοματοποιημένη ανάλυση.

Τα δείγματα μας στάλθηκαν σε εξειδικευμένο ερευνητικό κέντρο για αλληλούχηση Sanger.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πριν την διεξαγωγή πειραμάτων πραγματοποιήσαμε εκτενή ανάλυση ESTs, από την οποία προέκυψαν συνδυασμοί εξωνίων που δεν υπήρχαν καταχωρημένοι στην GenBank®. Πιο συγκεκριμένα, προέκυψαν πιθανά μετάγραφα που περιείχαν τα εξόνια 1,5,6 (δηλαδή απουσιάζουν τα 2,3,4 εξόνια) ή τα εξόνια 1,2,5,6. (έλλειψη των 3,4 εξωνίων) (Εικόνα 8). Επίσης, βρήκαμε τμήματα cDNA τα οποία περιείχαν το εξόνιο 1a αλλά και το 1b σε προέκταση αυτού. Τμήματα cDNA που περιέχουν το εξόνιο 3 ήταν αρκετά σπάνια, ενώ βρέθηκαν και ESTs τα οποία έχουν μία προέκταση προς το 5' άκρο του εξωνίου 2 μήκους 365bp. Τέλος, βρήκαμε ESTs από συγγενή είδη του *Homo sapiens* τα οποία έχουν εναλλακτικό εξόνιο 6 που εμφανίζει εσωτερική έλλειψη 118 bp.



Εικόνα 8: Ανάλυση ESTs του γονιδίου *BOK* χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο BLAST. Με κόκκινα παραλληλόγραμμα αναπαρίστανται τα τμήματα cDNA, στοιχισμένα στην αλληλουχία του γονιδίου. Οι κάθετες μαύρες γραμμές συμβολίζουν τμήματα αλληλουχίας που υπάρχουν στο cDNA αλλά απουσιάζουν από το γονίδιο και οι οριζόντιες μαύρες γραμμές το ακριβώς ανάποδο.

Η βασική προσέγγιση, η οποία ακολουθήθηκε, απαρτιζόταν, επιγραμματικά, από αντίστροφη μεταγραφή δειγμάτων RNA, απλή PCR και επάλληλη PCR, ηλεκτροφόρηση και αλληλούχηση Sanger.

Στην πρώτη επιτυχημένη απόπειρα, τα δείγματα προέρχονταν από RNA των εξής κυτταρικών σειρών: LNCaP, PC3, MCF7, HePG2, D54, MDAH. Σε κάθεμια από τις προαναφερθείσες κυτταρικές σειρές πραγματοποιήθηκαν 3 διακριτές πρώτες PCR και 3 επάλληλες PCR με τα εξής ζεύγη εκκινητών: BOK Ex1a/2 F και BOK Ex6(a) R με εσωτερικότερες PCR: 1. BOK Ex2/3 F με BOK Ex6(b) R, 2. BOK Ex2/4 F με BOK Ex6(b) R και 3. BOK Ex2(ATG) F με BOK Ex6(b) R. Επίσης, πραγματοποιήθηκε πρώτη PCR χρησιμοποιώντας το ακόλουθο ζευγάρι εκκινητών BOK Ex1b/2 F με BOK Ex6(a) R και 3 επάλληλες PCR ίδιες με τις παραπάνω. Τέλος, έλαβε χώρα μία τρίτη PCR με εκκινητές τους BOK Ex2(ATG) F με BOK Ex6(a) R και τις παραπάνω επάλληλες PCR, πλην της τελευταίας. Τα αναμενόμενα μήκη για κάθε μία από τις 3 εσωτερικότερες PCR για το επιβεβαιωμένο μετάγραφο καθώς και για τα άλλα 4 αναμενόμενα που αναφέρονται στην GenBank® φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Προβλεπόμενα μήκη μεταγράφων του γονιδίου *BOK* κάνοντας χρήση τα παρακάτω ζεύγη εκκινητών.

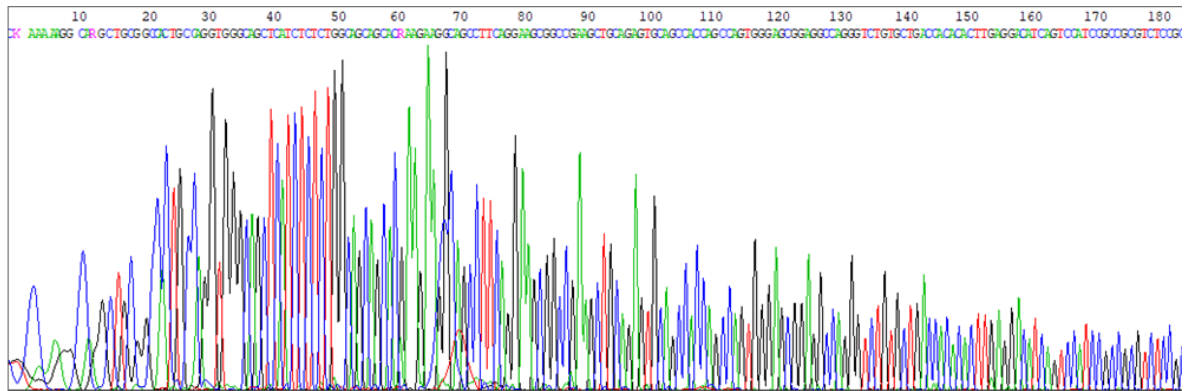
Μετάγραφα	Ζεύγη εκκινητών - Μήκη (bp)		
	BOK Ex2/3 F με BOK Ex6(b) R	BOK Ex2/4 F με BOK Ex6(b) R	BOK Ex2(ATG) F με BOK Ex6(b) R
NM_032515.5	–	500	678
XM_017004775.1	698	–	872
XM_011511697.3	–	336	514
XM_017004776.1	698	–	872
XM_011511696.2	–	500	678

Ωστόσο, στα συγκεκριμένα πειράματα η πλειοψηφία των ζωνών που προέκυψε δεν ανταποκρινόταν στα αναμενόμενα μήκη. Η πιθανότητα να αποτελούσαν παραπροϊόντα ήταν

πολύ μικρή, αφού η επάλληλη PCR περιορίζει την εμφάνιση πιθανών μη ειδικών προϊόντων.

Μετά από την αλληλούχηση των προαναφερθέντων ζωνών προέκυψαν 8 νέα μεταγράφα, για το οποία, όμως, δεν ξέρουμε ολόκληρη ούτε την 3' ούτε την 5' αμετάφραστη περιοχή. Τα δύο από αυτά επικυρώνουν την ύπαρξη των προβλεπόμενων από *in silico* ανάλυση μεταγράφων XM_011511697.3 και XM_011511696.2.

Ακολουθούν τα χρωματογραφήματα των 8 νέων μεταγράφων που προέκυψαν από την αλληλούχηση Sanger, ενώ κάτω από κάθε χρωματογράφημα βρίσκεται και η αντίστοιχη αλληλουχία του μεταγράφου. Στο χρωματογράφημα, κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε μία διαφορετική νουκλεοτιδική βάση. Κάθε βάση απεικονίζεται με ένα διαφορετικό χρώμα. Πιο συγκεκριμένα, η γουανίνη (G) απεικονίζεται με μαύρο, η θυμίνη (T) με κόκκινο, η κυτοσίνη (C) με μπλε και τέλος, η αδενίνη (A) με πράσινο.

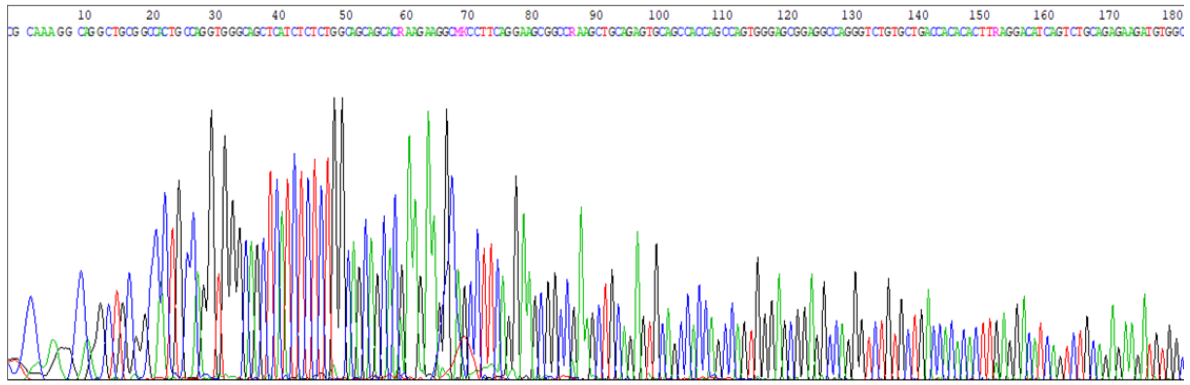


>V2 (MK328044.1)

```

1  CCAGCGGCGG AGGTGCGGCG CCCCCACCC GCGTCGCCGC CATGGAGGTG CTGCGGCGCT
61  CCTCGGTCTT CGCCGCCGAG ATCATGGACG CTTTGGACCG CTCGCCACA GACAAGGAGC
121 TGGTGGCCCA GGCCAAGGCG CTGGGCCGGG AGTACGTGCA CGCGCGGTG CTGCGCGCCG
181 GCCTCTCCTG GAGCGCGCCC GAGCGTGCCG CGCCGGTCCC GGGACGCCTG GCTGAGGTGT
241 GCGCGGTGCT GCTGCGCCTG GCGGATGAGC TGGAGATGAT CCGGCCCAGC GTCTACCGCA
301 ACGTGGCGCG TCAGCTGCAC ATCTCCCTGC AGTCTGAGCC TGTGGTGACC GATGCGTTCC
361 TGGCCGTGGC TGGCCACATC TTCTCTGCAG GCATCACGTG GGGCAAGGTG GTGTCCCTGT
421 ATGCGGTGGC CGCGGGGCTG GCCGTGGACT GTGTGAGGCA GGCCAGCCT GCCATGGTCC
481 ACGCCCTCGT GGACTGCCTG GGGGAGTTTC TGCGCAAGAC CCTGGCAACC TGGCTGCGGA
541 GACGCGGCGG ATGGACTGAT GTCCTCAAGT GTGTGGTCAG CACAGACCCT GGCCTCCGCT
601 CCCACTGGCT GGTGGCTGCA CTCTGCAGCT TCGGCCGCTT CCTGAAGGCT GCCTTCTTCG
661 TGCTGCTGCC AGAGAGATGA GCTGCCACC TGGCAGTGGC CGCAGCCTGG CCCTCTGGGC
721 CCAACGCAGG AGGCCCTCAG CACCCGAACA CATCTTCCTC CTCCCCACCC

```

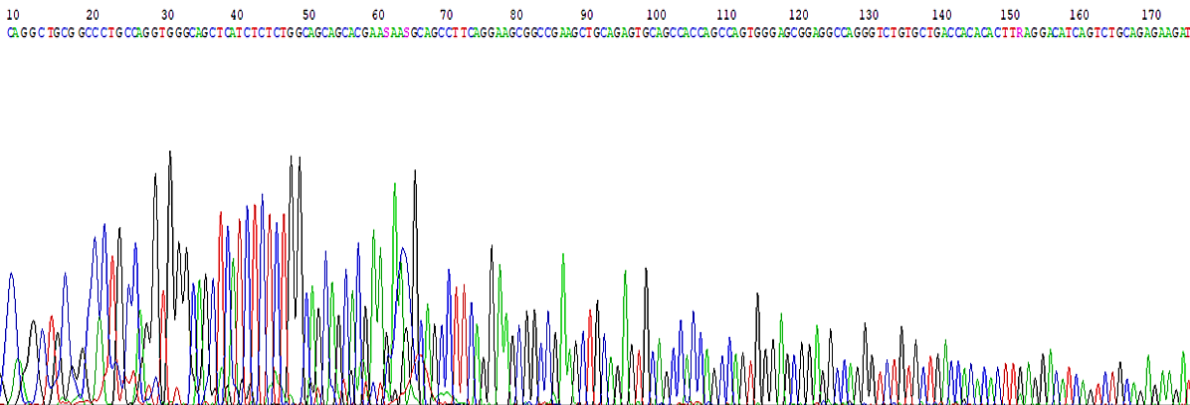
>V5 (MK328045.1)

```

1 ATGCGGCGGG AGAGGTGCGG CGCCCCCAC CCGCGTCGCC GCCATGGAGG TGCTGCGGCG
61 CTCCTCGGTC TTCGCCGCCG AGATCATGGA CGCCTTTGAC CGCTCGCCCA CAGACAAGGA
121 GCTGGTGGCC CAGGCCAAGG CGCTGGGCCG GGAGTACGTG CACGCGCGGC TGCTGCGCGC
181 CGGCCTCTCC TGGAGCGCGC CCGAGCGTGC CGCGCCGGTC CCGGGACGCC TGGCTGAGGT
241 GTGCGCGGTG CTGCTGCGCC TGGGCGATGA GCTGGAGATG ATCCGGCCCA GCGTCTACCG
301 CAACGTGGCG CGTCAGCTGC ACATCTCCCT GCAGTCTGAG CCTGTGGTGA CCGATGCGTT
361 CCTGGCCGTG GCTGGCCACA TCTTCTCTGC AGACTGATGT CCTCAAGTGT GTGGTCAGCA
421 CAGACCCTGC CCTCCGCTCC CACTGGCTGG TGGCTGCACT CTGCAGCTTC GGCCGCTTCC
481 TGAAGGCTGC CTCTTTCGTG CTGCTGCCAG AGAGATGAGC TGCCACCTGC CAGTGGCCG
541 CAGCCTGGCC CTCTGGGCC AACGCAGGAG GCCCTCAGCA CCCGAACACA TCTTCTCCT
601 CCCCACCCG

```

Τα υπόλοιπα είναι 6 εξ' ολοκλήρου νέα εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου *BOK*. Τα αποτελέσματα από την αλληλούχηση Sanger, καθώς και οι αλληλουχίες του παρατίθενται παρακάτω.

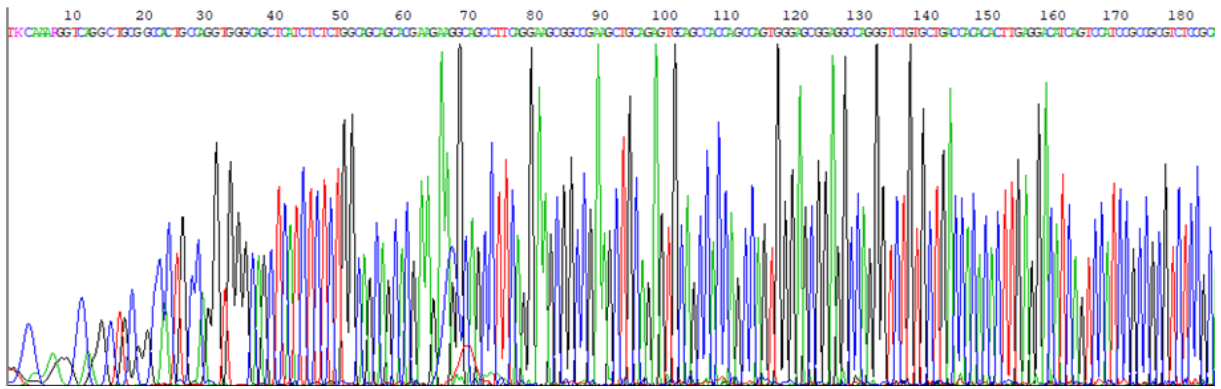


>V7 (MK328046.1)

```

1 ATGCGGCGGG AGAGGTGCGG CGCCCCCAC CCGCGTCGCC GCCATGGAGG TGCTGCGGCG
61 CTCCTCGGTC TTCGCCGCCG AGATCATGGA CGCCTTTGAC CGCTCGCCCA CAGACAAGGA
121 GCTGGTGGCC CAGCGTCTAC CGCAACGTGG CGCGTCAGCT GCACATCTCC CTGCAGTCTG
181 AGCCTGTGGT GACCGATGCG TTCTTGGCCG TGGCTGGCCA CATCTTCTCT GCAGACTGAT
241 GTCCCTCAAGT GTGTGGTCAG CACAGACCTT GGCTCCGCT CCCACTGGCT GGTGGCTGCA
301 CTCTGCAGCT TCGGCCGCTT CCTGAAGGCT GCCTTCTTCG TGCTGCTGCC AGAGAGATGA
361 GCTGCCACCC TGGCAGTGGC CGCAGCCTGG CCCTCTGGGC CCAACGCAGG AGGCCCTCAG
421 CACCCGAACA CATCTTCTCT CTCCCCACCC

```

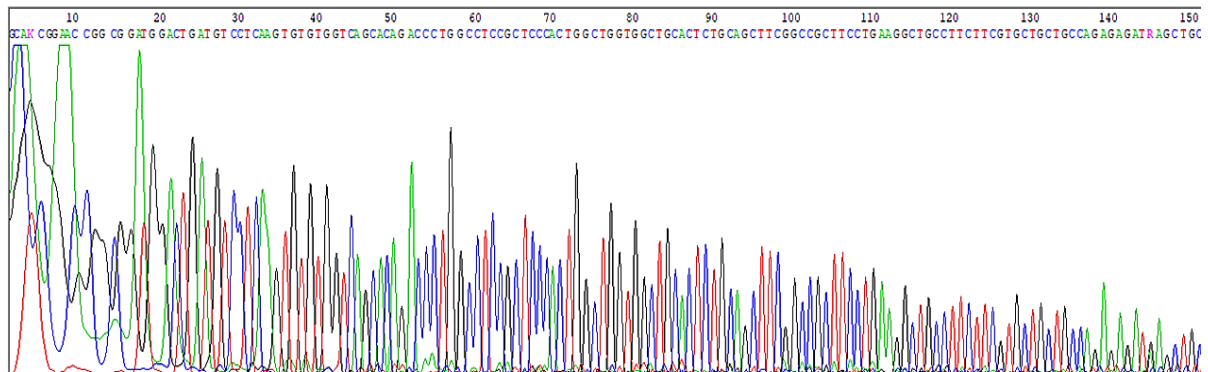


>V9 (MK328047.1)

```

1 ATGCGGCGGG AGAGGTGCGG CGCCCCCAC CCGCGTCGCC GCCATGGAGG TGCTGCGGGC
61 CTCCTCGGTC TTCGCCGCGG AGATCATGGA CGCCTTTGAC CGCTCGCCA CAGACAAGGA
121 GCTGGTGGCC CAGGCCAAGG CGCTGGGCCG GGAGTTCGTG CGCAAGACCC TGGCAACCTG
181 GCTGCGGAGA CGCGGCGGAT GGACTGATGT CCTCAAGTGT GTGGTCAGCA CAGACCCTGG
241 CCTCCGCTCC CACTGGCTGG TGGCTGCACT CTGCAGCTT GGCCGCTTCC TGAAGGCTGC
301 CTTCTTCGTG CTGCTGCCAG AGAGATGAGC TGCCACCTG GCAGTGGCCG CAGCCTGGCC
361 CTCTGGGCC AACGCAGGAG GCCCTCAGCA CCCGAACACA TCTTCCTCCT CCCACCCG

```

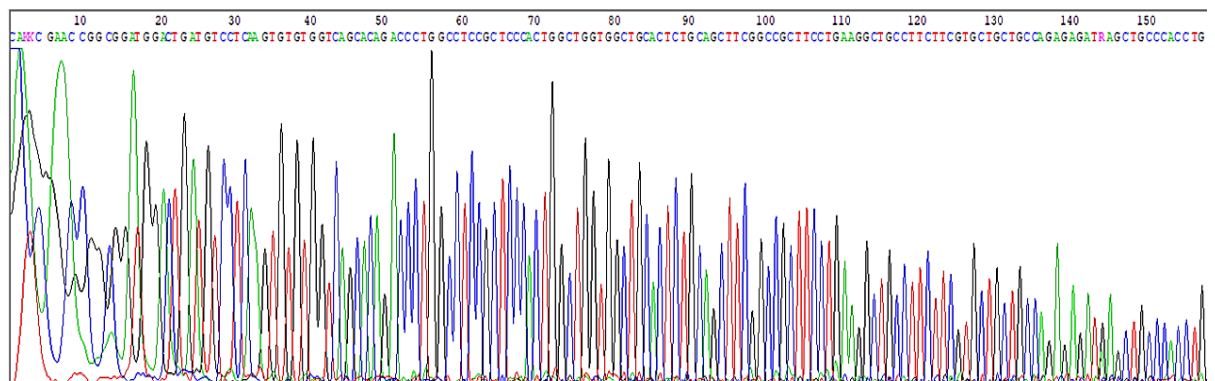


>V11 (MK354017.1)

```

1 ATGCGGCGGG AGAGGTGCGG CGCCCCCAC CCGCGTCGCC GCCATGGAGG TGCTGCGGGC
61 CTCCTCGGTC TTCGCCGCGG AGATCATGGA CGCCTTTGAC CGCTGCGGAG ACGCGGCGGA
121 TGGACTGATG TCCTCAAGTG TGTGGTCAGC ACAGACCCTG GCCTCCGCTC CACTGGCTG
181 GTGGCTGCAC TCTGCAGCTT CGGCCGCTT CTGAAGGCTG CCTTCTTCGT GCTGCTGCCA
241 GAGAGATGAG CTGCCACCT GGCAGTGGCC GCAGCTGGC CCTCTGGCC CAACGCAGGA
301 GGCCCTCAGC ACCCGAACAC ATCTTCCTCC TCCCCACCCG

```



>V12 (MK354018.1)

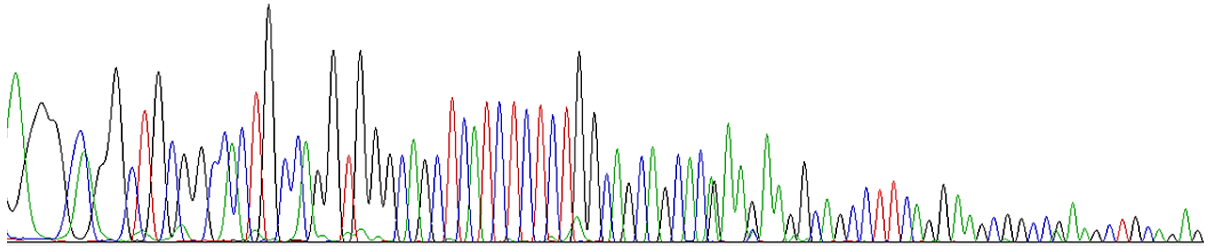
```

1 CCAGCGGCGG AGGTGCGGGC CCCCCACCC GCGTCGCCGC CATGGAGGTG CTGCGGCGCT
61 CCTCGGTCTT CGCCGCGGAG ATCATGGACG CCTTTGACCG CTGCGGAGAC GCGGCGGATG
121 GACTGATGTC CTCAAGTGTG TGGTCAGCAC AGACCCTGGC CTCCGCTCCC ACTGGCTGGT
181 GGCTGCACTC TGCAGCTTCG GCCGCTTCCT GAAGGCTGCC TTCTTCGTGC TGCTGCCAGA

```

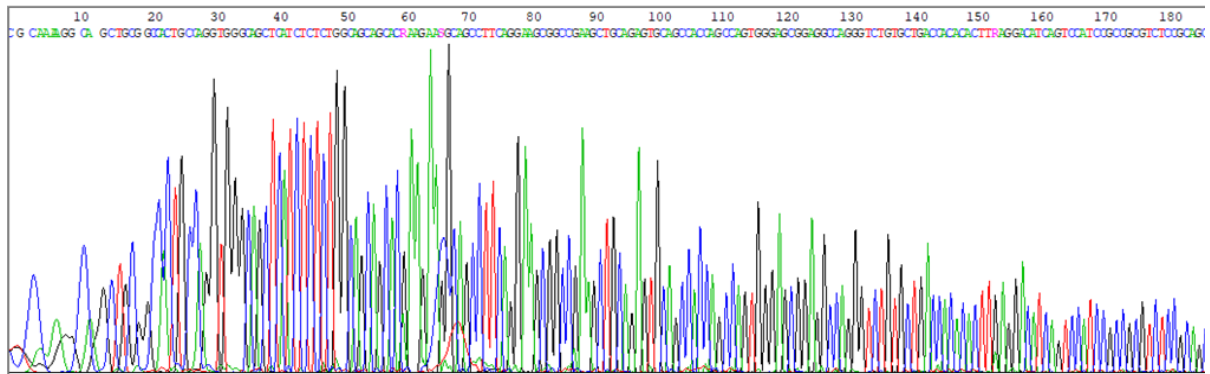
241 GAGATGAGCT GCCACCTGG CAGTGGCCGC AGCCTGGCCC TCTGGGCCCA ACGCAGGAGG
 301 CCCTCAGCAC CCGAACACAT CTCCTCCTC CCCACCCG

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 A GG M G G C T G C G G C C A C T G C C A G G T G G G C A G C T C A T C T C T C T G G C A G C A G C A C R A A M A A G G C A G C C T T C A G G A A G C G G C C R A A G C T G C A G A G



>V13 (MK354019.1)

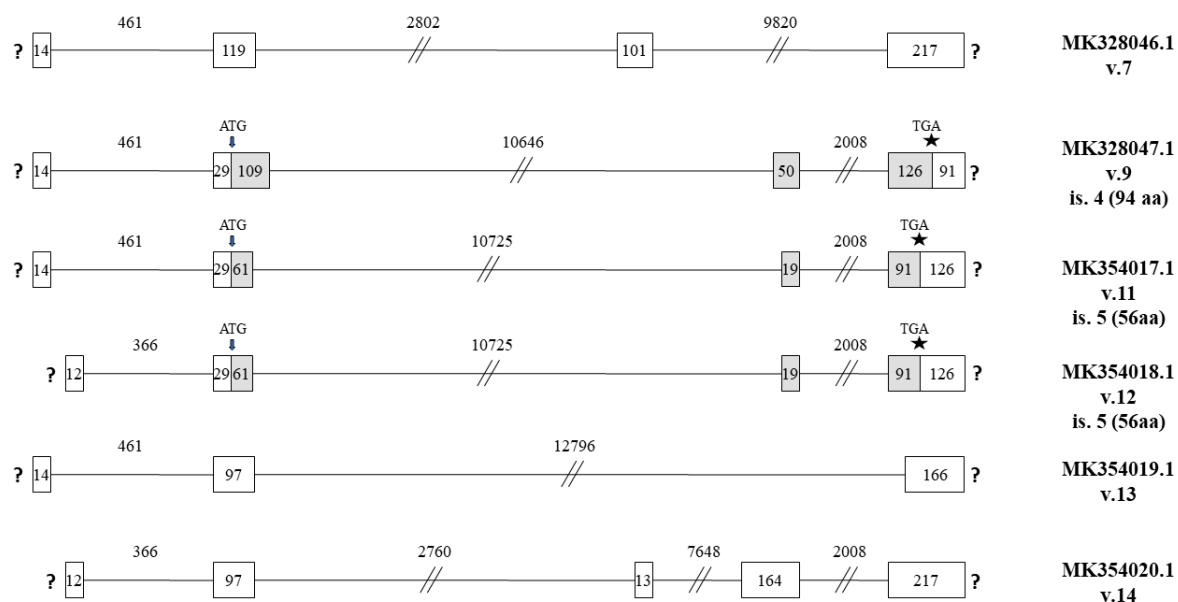
1 ATGCGGCGGG AGAGGTGCGG CGCCCCCAC CCGCGTCGCC GCCATGGAGG TGCTGCGGCG
 61 CTCCTCGGTC TTCGCCGCG AGATCATGGA CGCCTTTGAC CGCTCGCCCA CTGGCTGGTG
 121 GCTGCACTCT GCAGCTTCGG CCGCTTCCTG AAGGCTGCC TCTTCGTGCT GCTGCCAGAG
 181 AGATGAGCTG CCCACCTGGC AGTGGCCGCA GCCTGGCCCT CTGGGCCCAA CGCAGGAGGC
 241 CCTCAGCACC CGAACACAT CTCCTCCTC CCACCCG



>V14 (MK354020.1)

1 CCAGCGGCGG AGGTGCGGCG CCCCCACCC GCGTCGCCGC CATGGAGGTG CTGCGGCGCT
 61 CCTCGGTCTT CGCCGCCGAG ATCATGGACG CCTTTGACCG CTCGCCCACA TCTTCTCTGC
 121 AGGCATCAG TGGGGCAAG TGGTGTCCCT GTATGCGGTG GCCCGGGGG TGGCCGTGGA
 181 CTGTGTGAGG CAGGCCAGC CTGCCATGGT CCACGCCCTC GTGGACTGCC TGGGGGAGTT
 241 CGTGCGCAAG ACCCTGGCAA CTTGGCTGCG GAGACGCGGC GGATGGACTG ATGTCTCAA
 301 GTGTGTGGTC AGCACAGACC CTGGCTCCG CTCCCCTGG CTGGTGGCTG CACTCTGCAG
 361 CTTCGGCCGC TTCTGAAGG CTGCCTTCTT CGTGTGTGCTG CCAGAGAGAT GAGCTGCCCA
 421 CCTGGCAGTG GCCGCAGCCT GGCCCTCTGG GCCCAACGCA GGAGGCCCTC AGCACCCGAA
 481 CACATCTTCC TCCTCCCCAC CCG

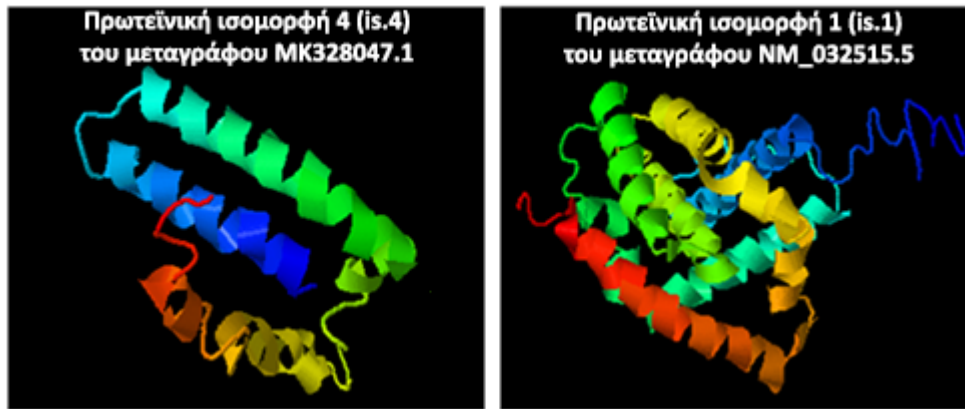
Τα συγκεκριμένα μετάγραφα φέρουν εναλλακτικά δεύτερα, τέταρτα, πέμπτα και έκτα εξώνια, τα οποία είναι κομμένα (truncated) είτε στο 3' είτε στο 5' άκρο τους. Στην σχηματική απεικόνιση, που ακολουθεί, φαίνονται αναλυτικά οι διαφοροποιήσεις των εξονίων αυτών, καθώς και η εναλλακτική συρραφή αυτών προκειμένου να σχηματιστούν τα προαναφερθέντα νέα μετάγραφα (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση των 6 νέων μεταγράφων του γονιδίου *BOK*. Με κουτάκια απεικονίζονται τα εξώνια, ενώ με γραμμές τα εσώνια. Οι αριθμοί πάνω από κάθε σχήμα αντιστοιχούν στο μήκος των εσωνίων και των εξωνίων. Το μέγεθος των γραμμών και των κουτιών είναι κλιμακοποιημένα. Το γκρι χρώμα συμβολίζει τις περιοχές που μεταφράζονται. Το βέλος και το αστέρι αντιστοιχούν στο κωδικόνιο έναρξης και λήξης, αντίστοιχα, ενώ, οι παράλληλες γραμμές συμβολίζουν τα σχήματα που βρίσκονται εκτός κλίμακας. Τέλος, το αγγλικό ερωτηματικό υπονοεί το άγνωστο άκρο της 3' και 5' αμετάφραστης περιοχής.

Τα μετάγραφα v2, v7 βρέθηκαν στην κυτταρική σειρά HepG2, τα μετάγραφα v5 και v9 εντοπίστηκαν στις κυτταρικές σειρές MCF7 και PC3, αντίστοιχως. Τα μετάγραφα v11 και v14 στην κυτταρική σειρά LNCaP, ενώ τέλος, τα μετάγραφα v12 και v13 στην κυτταρική σειρά D54.

Κάποια από τα μετάγραφα αυτά φαίνεται να φέρουν ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης και άρα ενδέχεται να κωδικοποιούν προς μία πρωτεΐνη. Σημαντικό να σημειωθεί είναι το γεγονός, ότι προκύπτουν 4 νέες προβλεπόμενες πρωτεϊνικές ισομορφές, εναλλακτικές της βασικής. Από ανάλυση της αλληλουχίας με το πρόγραμμα I-TASSER, προέκυψε η τριτοταγής δομή αυτών των προβλεπόμενων πρωτεϊνικών ισομορφών. Παρακάτω απεικονίζονται ενδεικτικά 2 από τις προβλεπόμενες πρωτεϊνικές δομές (Εικόνα 10).



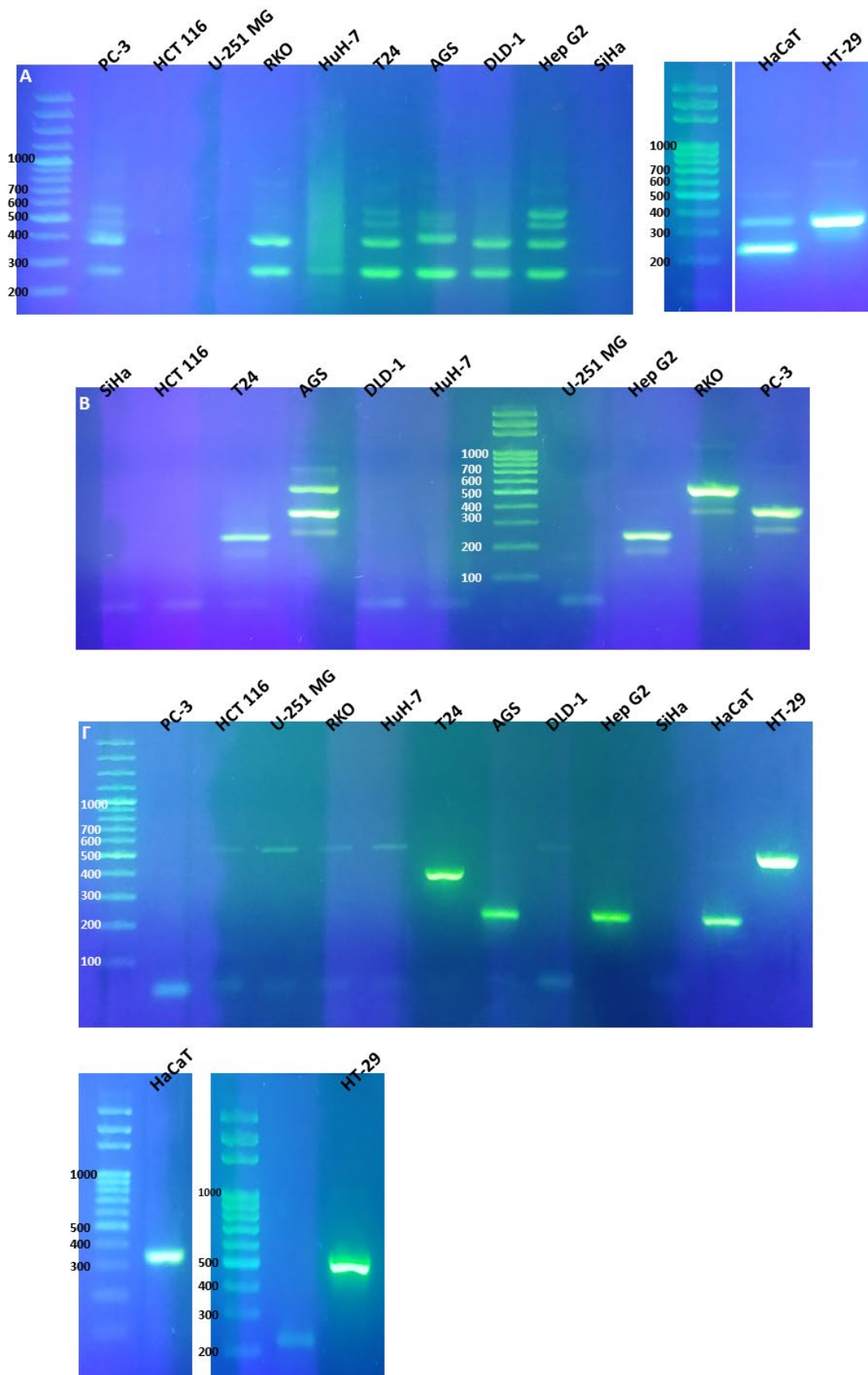
Εικόνα 10: Προβλεπόμενες δομές μίας νέας πρωτεϊνικής ισομορφής και της κλασσικής πρωτεϊνικής ισομορφής, χρησιμοποιώντας το I-TASSER λογισμικό. Εμφανίζονται οι 3D δομές με το υψηλότερο σκορ εμπιστοσύνης.

Μετά την ανακάλυψη των συγκεκριμένων μεταγράφων ακολούθησε εκ νέου σειρά πειραμάτων με διαφορετικά ζεύγη εκκινητών αλλά με την ίδια πειραματική πορεία, η οποία κατέληξε στην επιτυχημένη εύρεση 11 ακόμη εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *BOK*. Από την ανάλυση των ESTs προέκυψαν κάποια ESTs, τα οποία είχαν μία προέκταση προς το 5' άκρο του εξωνίου 2. Για την εξακρίβωση της συγκεκριμένης προέκτασης πραγματοποιήθηκε απλή PCR και επάλληλη PCR με εκκινητές συμπληρωματικούς ως προς την αλληλουχία αυτή. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι *BOK In2_up F_HPLC* και *BOK Ex6(a) R*, ενώ στην επάλληλη PCR χρησιμοποιήθηκαν οι *BOK In2_down F_HPLC* και *BOK Ex6(b) R*. Χρησιμοποιήθηκαν, επιπλέον, τα παρακάτω ζεύγη για απλή και επάλληλη PCR αντίστοιχα: 1. *BOK Ex1a_up F* με *BOK Ex6(a) R* και *BOK Ex1a F* με *BOK Ex6(b) R* και 2. *BOK Ex1b_up F* με *BOK Ex6(a) R* και *BOK Ex1b F* με *BOK Ex6(b) R*. Τα αναμενόμενα μήκη για κάθε μία από τις 3 εσωτερικότερες PCR για το επιβεβαιωμένο μετάγραφο, για τα άλλα 4 αναμενόμενα που αναφέρονται στην GenBank[®], αλλά και για τα μετάγραφα που ανακαλύφθηκαν από εμάς, φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Προβλεπόμενα μήκη των μεταγράφων του γονιδίου *BOK*, κάνοντας χρήση τα παρακάτω ζεύγη εκκινήτων.

Μετάγραφα	Ζεύγη εκκινήτων - Μήκη (bp)		
	BOK Ex1a F με BOK Ex6(b) R	BOK Ex1b F με BOK Ex6(b) R	BOK In2_down F_HPLC με BOK Ex6(b) R
NM_032515.5	851	–	957
XM_017004775.1	1045	–	1151
XM_011511697.3	687	–	793
XM_017004776.1	–	1004	1151
XM_011511696.2	–	810	957
MK328046.1	529	–	635
MK328047.1	488	–	594
MK354017.1	418	–	524
MK354018.1	–	378	524
MK354019.1	355	–	461
MK354020.1	–	543	689

Ωστόσο, παρατηρούμε ότι οι εμφανιζόμενες ζώνες στα παρακάτω πηκτώματα δεν ανταποκρίνονται στα αναμενόμενα μήκη (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης: **(Α)** τα αποτελέσματα της επάλληλης PCR με τους εκκινητές BOK Ex1a F με BOK Ex6(b) R, **(Β)** τα αποτελέσματα της επάλληλης PCR με τους εκκινητές BOK Ex1b F με BOK Ex6(b) R (Σημείωση: τα αποτελέσματα των κυτταρικών σειρών HaCaT και HT-29 δεν εμφανίζονται διότι δεν έδωσαν ζώνες) και **(Γ)** τα αποτελέσματα της επάλληλης PCR με εκκινητές τους BOK In2_down F_HPLC με BOK Ex6(b) R.

Από αλληλούχηση Sanger προέκυψαν 11 εναλλακτικά νέα μετάγραφα, η σχηματική απεικόνιση των οποίων φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 12), καθώς και οι αλληλουχίες και η προέλευση αυτών (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Αλληλουχίες των 11 νέων μεταγράφων του γονιδίου *BOK*, καθώς και η προέλευση του κάθε μεταγράφου.

Αριθμός μεταγράφου	Αριθμός καταγραφής GenBank®	Κυτταρική σειρά προέλευσης
V16	MK810726.1	Hep G2
V17	MK810727.1	RKO
V18	MK810728.1	HT-29
V19	MK810729.1	HT-29
V20	MK810730.1	PC-3
V21	MK810731.1	HaCaT
V22	MK810732.1	AGS
V24	MK810733.1	T24
V25	MK810734.1	HaCaT
V26	MK810735.1	Hep G2
V27	MK810736.1	AGS / Hep G2

>V16 (MK810726.1)

```

1 GGTCTGAATG GAAGGGTCGA GGTCTGTCGTC GGC GGCGAGC AGATCCTGAA GCCAGAACTC
61 CACCCCGGCG CCCGCGCCAT GCGGCGGGAG AGGCGATGAG CTGGAGATGA TCCGGCCCAG
121 CGTCTACCGC AACGTGGCGC GTCAGCTGCA CATCTCCCTG CAGTCTGAGC CTGTGGTGAC
181 CGATGCGTTC CTGGCCGTGG CTGGCCACAT CTTCTCTGCA GGCATCACGT GGGGCAAGGT
241 GGTGTCCCTG TATGCGGTGG CCGCGGGGCT GGCCGTGGAC TGTGTGAGGC AGGCCAGCC
301 TGCCATGGTC CACGCCCTCG TGGACTGCC TGGGGAGTTC GTGCGCAAGA CCCTGGCAAC
361 CTGGCTGCGG AGACGCGGCG GATGGACTGA TGTCCCAAG TGTGTGGTCA GCACAGACCC
421 TGGCCTCCGC TCCCACTGGC TGGTGGCTGC ACTCTGCAGC TTCGGCCGCT TCCTGAAGGC
481 TGCCTTCTTC GTGCTGCTGC CAGAGAGATG AGCTGCCAC CTGGCAGTGG CCGCAGCCTG
541 GCCCTCTGGG CCCAACGCAG GAGGCCCTCA GCACCCGAAC ACATCTTCCT CCTCCCCACC
601 C

```

>V17 (MK810727.1)

```

1 CCACGGGAAC GGCAGGCGG GGGACACGCG CGCAGGACGC CAGCGGCGGA GGCGATGAGC
61 TGGAGATGAT CCGGCCAGC GTCTACCGCA ACGTGGCGCG TCAGCTGCAC ATCTCCCTGC
121 AGTCTGAGCC TGTGGTGACC GATGCGTTCC TGGCCGTGGC TGGCCACATC TTCTCTGCAG

```


181 GCATCACGTG GGGCAAGGTG GTGTCCCTGT ATGCGGTGGC CGCGGGGCTG GCCGTGGACT
 241 GTGTGAGGCA GGCCAGCCTT GCCATGGTCC ACGCCCTCGT GGACTGCC'TG GGGGAGTTCG
 301 TGC GCAAGAC CCTGGCAACC TGGCTGCGGA GACGCGGCGG ATGGACTGAT GTCC'TCAAGT
 361 GTGTGGTCAG CACAGACCC'T GGCC'TCCGCT CCCACTGGCT GGTGGCTGCA CTCTGCAGCT
 421 TCGGCCGCTT CCTGAAGGCT GCCTTCTTCG TGCTGCTGCC AGAGAGATGA GCTGCCACC
 481 TGGCAGTGGC CGCAGCCTGG CCTCTGGGG CCAACGCAGG AGGCCCTCAG CACCCGAACA
 541 CATCTTCTC CTCCCCACCC

>V18 (MK810728.1)

1 CAGCCTCGGG GAATGTCTGT AGCTGAATTC GGGCTCTGAA AGAAGGCGAT GAGCTGGAGA
 61 TGATCCGGCC CAGCGTCTAC CGCAACGTGG CGCGTCAGCT GCACATCTCC CTGCAGTCTG
 121 AGCCTGTGGT GACCGATGCG TTCC'TGGCCG TGGCTGGCCA CATCTTCTCT GCAGGCATCA
 181 CGTGGGGCAA GGTGGTGTCC CTGTATGCGG TGGCCGCGGG GCTGGCCGTG GACTGTGTGA
 241 GGCAGGCCCA GCCTGCCATG GTCCACGCCC TCGTGGACTG CCTGGGGGAG TTCGTGCGCA
 301 AGACCCTGGC AACCTGGCTG CGGAGACGCG GCGGATGGAC TGATGTCC'TC AAGTGTGTGG
 361 TCAGCACAGA CCCTGGCCTC CGCTCCCAC'T GGCTGGTGGC TGCAC'TCTG AGCTTCGGCC
 421 GCTTCTGAA GGCTGCCTTC TTCGTGCTGC TGCCAGAGAG ATGAGCTGCC CACCTGGCAG
 481 TGGCCGCAGC CTGGCCCTCT GGGCCCAACG CAGGAGGCC TCAGCACCCG AACACATCTT
 541 CCTCCTCCCC ACCC

>V19 (MK810729.1)

1 GGTCTGAATG GAAGGGTCGA GGTCGTCGTC GGC'GGCGAGC AGATCCTGAA GCCAGAACTC
 61 CACCCCGGCG CCCGCGCCAT GCGGCGGGAG AGGCGATGAG CTGGAGATGA TCCGGCCCAG
 121 CGTCTACCGC AACGTGGCGC GTCAGCTGCA CATCTCCCTG CAGTCTGAGC CTGTGGTGAC
 181 CGATGCGTTC CTGGCCGTGG CTGGCCACAT CT'TCTCTGCA GACTGATGTC CTCAAGTGTG
 241 TGGTCAGCAC AGACCCTGGC CTCCGCTCCC ACTGGCTGGT GGCTGCAC'TC TGCAGCTTCG
 301 CCGCCTTCC'T GAAGGTGCC TTCTTCGTGC TGCTGCCAGA GAGATGAGCT GCCCACCTGG
 361 CAGTGGCCGC AGCCTGGCCC TCTGGGCCCA ACGCAGGAGG CCTCAGCAC CCGAACACAT
 421 CTTCTCTCCTC CCCACCC

>V20 (MK810730.1)

1 CCACGGGAAC GGC'GAGGCCG GGGACACGCG CGCAGGACGC CAGCGGCGGA GGC'GATGAGC
 61 TGGAGATGAT CCGGCCCAGC GTCTACCGCA ACGTGGCGCG TCAGCTGCAC ATCTCCCTGC
 121 AGTCTGAGCC TGTGGTGACC GATGCGTTCC TGGCCGTGGC TGGCCACATC TTCTCTGCAG
 181 ACTGATGTCC TCAAGTGTGT GGT'GAGCACA GACCCTGGCC TCCGCTCCCA CTGGCTGGTG
 241 GCTGCACTCT GCAGCTTCGG CCGCTTCCTG AAGGCTGCCT TCTTCGTGCT GCTGCCAGAG
 301 AGATGAGCTG CCCACCTGGC AGTGGCCGCA GCCTGGCCCT CTGGGCCCAA CGCAGGAGGC
 361 CCTCAGCACC CGAACACATC TTCTCCTCCTC CCACCC

>V21 (MK810731.1)

1 CAGCCTCGGG GAATGTCTGT AGCTGAATTC GGGCTCTGAA AGAAGGCGAT GAGCTGGAGA
 61 TGATCCGGCC CAGCGTCTAC CGCAACGTGG CGCGTCAGCT GCACATCTCC CTGCAGTCTG
 121 AGCCTGTGGT GACCGATGCG TTCC'TGGCCG TGGCTGGCCA CATCTTCTCT GCAGACTGAT
 181 GTCC'TCAAGT GTGTGGTCAG CACAGACCC'T GGCC'TCCGCT CCCACTGGCT GGTGGCTGCA
 241 CTCTGCAGCT TCGGCCGCTT CCTGAAGGCT GCCTTCTTCG TGCTGCTGCC AGAGAGATGA
 301 GCTGCCACC TGGCAGTGGC CGCAGCCTGG CCTCTGGGC CCAACGCAGG AGGCCCTCAG
 361 CACCCGAACA CATCTTCTC CTCCCCACCC

>V22 (MK810732.1)

1 GGTCTGAATG GAAGGGTCGA GGTCGTCGTC GGC'GGCGAGC AGATCCTGAA GCCAGAACTC
 61 CACCCCGGCG CCCGCGCCAT GCGGCGGGAG AGGCATCACG TGGGGCAAGG TGGTGTCCCT
 121 GTATGCGGTG GCCGCGGGC TGGCCGTGGA CTGTGTGAGG CAGGCCCAGC CTGCCATGGT
 181 CCACGCCCTC GTGGACTGCC TGGGGGAGTT CGTGC'GCAAG ACCCTGGCAA CCTGGCTGCG
 241 GAGACGCGGC GGATGGACTG ATGTCC'TCAA GTGTGTGGTC AGCACAGACC CTGGCCTCCG
 301 CTCCC'ACTGG CTGGTGGCTG CACTCTGCAG CTTCGGCCGC TTCTGAAGG CTGCCTTCTT
 361 CGTGCTGCTG CCAGAGAGAT GAGCTGCCCA CCTGGCAGTG GCCGCAGCCT GGCCCTCTGG
 421 GCCAACGCA GGAGGCCCTC AGCACCCGAA CACATCTTCC TCTCCCCAC CC

>V24 (MK810733.1)

1 CAGCCTCGGG GAATGTCTGT AGCTGAATTC GGGCTCTGAA AGAAGGCATC ACGTGGGGCA
 61 AGGTGGTGTG CCTGTATGCG GTGGCCGCGG GGCTGGCCGT GGACTGTGTG AGGCAGGCC

121 AGCCTGCCAT GGTCCACGCC CTCGTGGACT GCCTGGGGGA GTTCGTGCGC AAGACCCCTGG
181 CAACCTGGCT GCGGAGACGC GCGGGATGGA CTGATGTCC TCAAGTGTGTG GTCAGCACAG
241 ACCCTGGCCT CCGCTCCCAC TGGCTGGTGG CTGCACTCTG CAGCTTCGGC CGCTTCCTGA
301 AGGCTGCCTT CTTCGTGCTG CTGCCAGAGA GATGAGCTGC CCACCTGGCA GTGGCCGCAG
361 CCTGGCCCTC TGGGCCCAAC GCAGGAGGCC CTCAGCACCC GAACACATCT TCCTCCTCCC
421 CACCC

>V24 (MK810733.1)

1 CAGCCTCGGG GAATGTCTGT AGCTGAATC GGGCTCTGAA AGAAGGCATC ACGTGGGGCA
61 AGGTGGTGTG CCTGTATGCG GTGGCCGCGG GGCTGGCCGT GGACTGTGTG AGGCAGGCC
121 AGCCTGCCAT GGTCCACGCC CTCGTGGACT GCCTGGGGGA GTTCGTGCGC AAGACCCCTGG
181 CAACCTGGCT GCGGAGACGC GCGGGATGGA CTGATGTCC TCAAGTGTGTG GTCAGCACAG
241 ACCCTGGCCT CCGCTCCCAC TGGCTGGTGG CTGCACTCTG CAGCTTCGGC CGCTTCCTGA
301 AGGCTGCCTT CTTCGTGCTG CTGCCAGAGA GATGAGCTGC CCACCTGGCA GTGGCCGCAG
361 CCTGGCCCTC TGGGCCCAAC GCAGGAGGCC CTCAGCACCC GAACACATCT TCCTCCTCCC
421 CACCC

>V25 (MK810734.1)

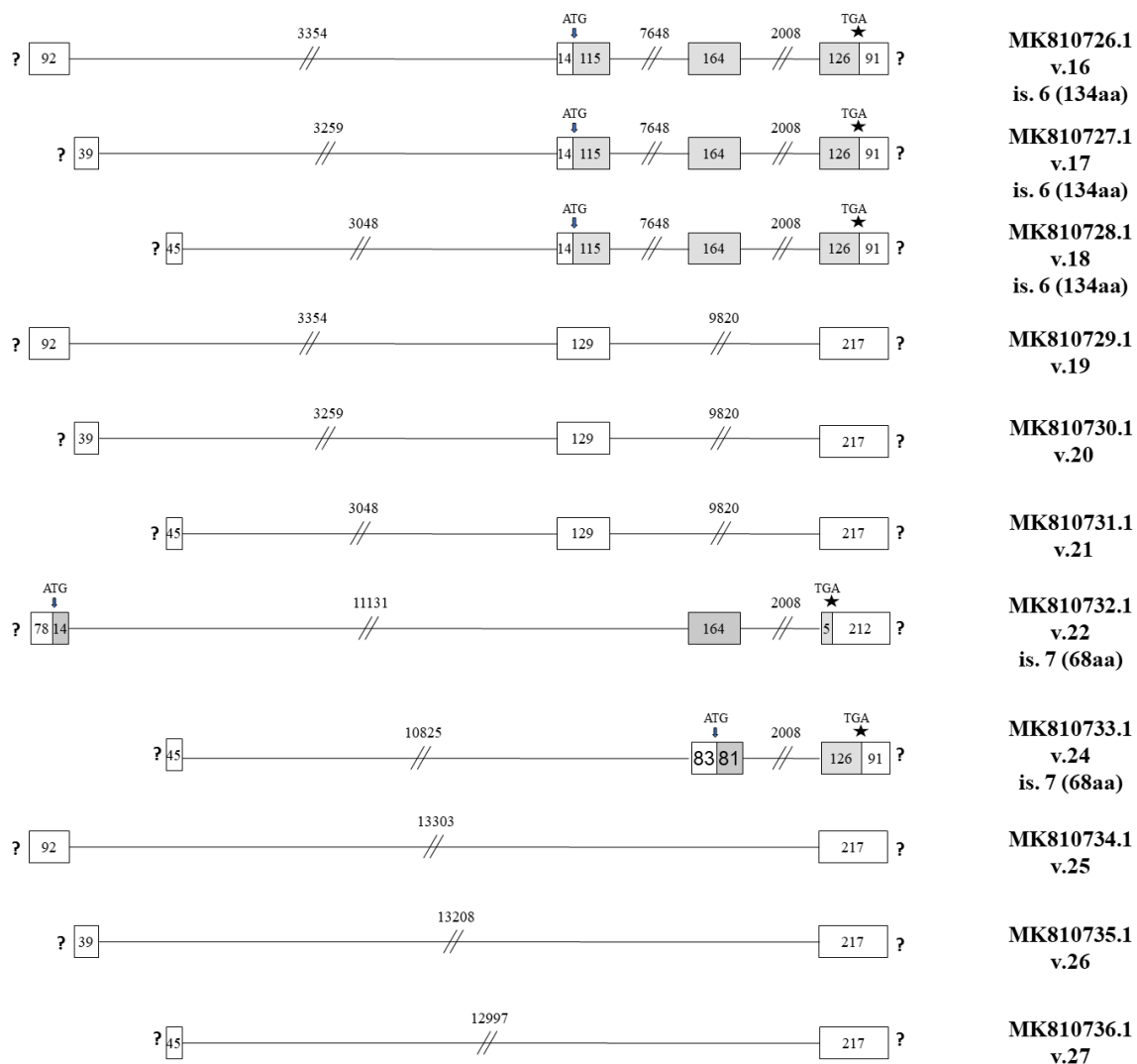
1 GGTCTGAATG GAAGGGTCGA GGTCGTCGTC GCGGCGGAGC AGATCCTGAA GCCAGAACTC
61 CACCCCGGCG CCCGCGCCAT GCGGCGGGAG AGACTGATGT CCTCAAGTGT GTGGTCAGCA
121 CAGACCCTGG CCTCCGCTCC CACTGGCTGG TGGCTGCACT CTGCAGCTTC GGCCGCTTCC
181 TGAAGGCTGC CTTCCTCGTG CTGCTGCCAG AGAGATGAGC TGCCCACCTG GCAGTGGCCG
241 CAGCCTGGCC CTCTGGGCCC AACGCAGGAG GCCCTCAGCA CCCGAACACA TCTTCCTCCT
301 CCCCACCC

>V26 (MK810735.1)

1 CCACGGGAAC GCGGAGGCCG GGGACACGCG CGCAGGACGC CAGCGGCGGA GACTGATGTC
61 CTCAAGTGTG TGGTCAGCAC AGACCCCTGGC CTCCGCTCCC ACTGGCTGGT GGCTGCACTC
121 TGCAGCTTCG GCCGCTTCCT GAAGGCTGCC TTCTTCGTGC TGCTGCCAGA GAGATGAGCT
181 GCCCACCTGG CAGTGGCCGC AGCCTGGCCC TCTGGGCCCCA ACGCAGGAGG CCCTCAGCAC
241 CCGAACACAT CTTCCTCCTC CCCACCC

>V27 (MK810736.1)

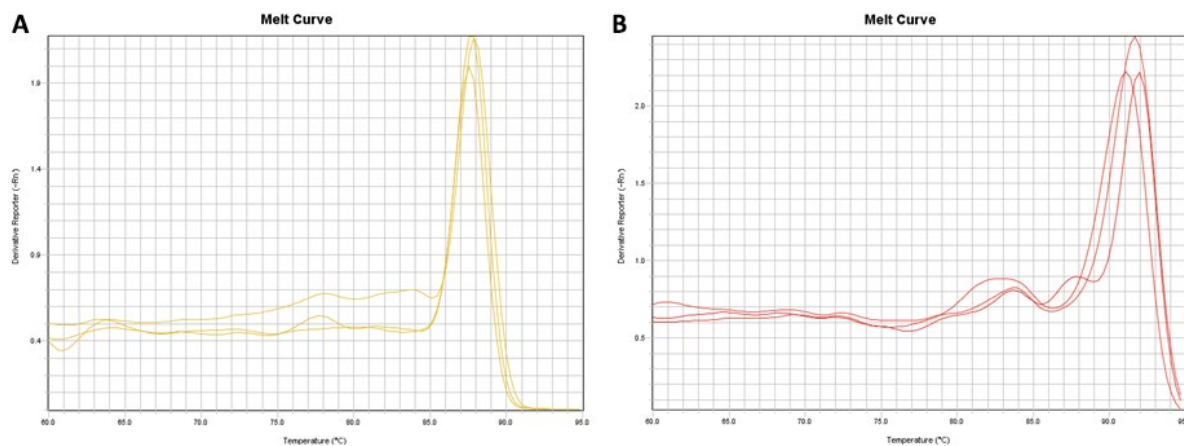
1 GGTCTGAATG GAAGGGTCGA GGTCGTCGTC GCGGCGGAGC AGATCCTGAA GCCAGAACTC
61 CACCCCGGCG CCCGCGCCAT GCGGCGGGAG AGACTGATGT CCTCAAGTGT GTGGTCAGCA
121 CAGACCCTGG CCTCCGCTCC CACTGGCTGG TGGCTGCACT CTGCAGCTTC GGCCGCTTCC
181 TGAAGGCTGC CTTCCTCGTG CTGCTGCCAG AGAGATGAGC TGCCCACCTG GCAGTGGCCG
241 CAGCCTGGCC CTCTGGGCCC AACGCAGGAG GCCCTCAGCA CCCGAACACA TCTTCCTCCT
301 CCCCACCC



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση των 11 νέων μεταγράφων του γονιδίου *BOK*. Με κουτάκια απεικονίζονται τα εξώνια, ενώ με γραμμές τα εσώνια. Οι αριθμοί πάνω από κάθε σχήμα αντιστοιχούν στο μήκος των εσώνιων και των εξώνιων. Το μέγεθος των γραμμών και των κουτιών είναι κλιμακοποιημένα. Το γκρι χρώμα συμβολίζει τις περιοχές που μεταφράζονται. Το βέλος και το αστέρι αντιστοιχούν στο κωδικόνιο έναρξης και λήξης, αντίστοιχα, ενώ, οι παράλληλες γραμμές συμβολίζουν τα σχήματα που βρίσκονται εκτός κλίμακας. Τέλος, το αγγλικό ερωτηματικό υπονοεί το άγνωστο άκρο της 3' και 5' αμετάφραστης περιοχής.

Προτού περάσουμε στο δεύτερο κύκλο πειραμάτων που αναφέρθηκε παραπάνω, πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων Real-time PCR, για να εξακριβωθεί η ύπαρξη νέων πιθανών θέσεων συρραφής μεταξύ των μεταγράφων, η ύπαρξη του εξωνίου 3 και η προέκταση του εξωνίου 2. Επίσης, αποκτήσαμε μία αδρή εικόνα για την συχνότητα των

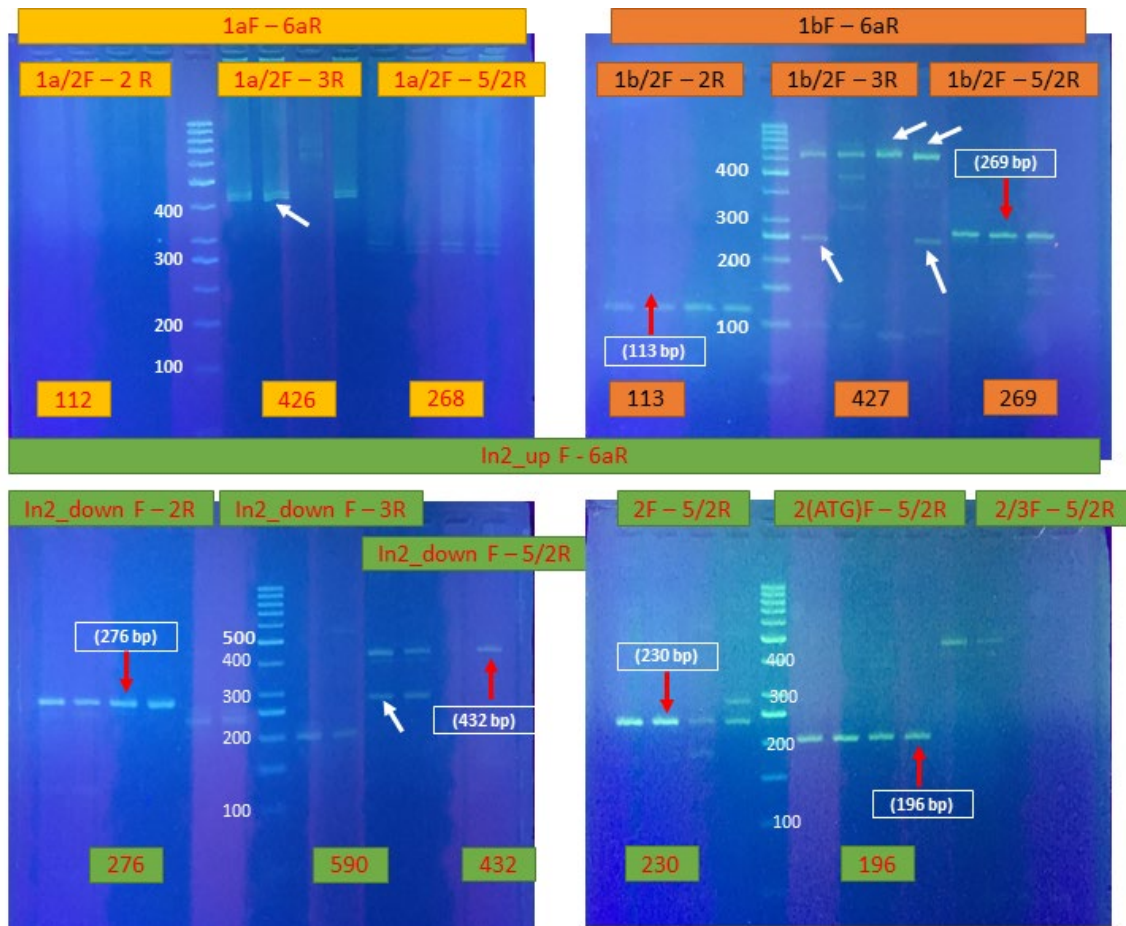
μεταγράφων σε ένα μικρό αριθμό κυτταρικών σειρών από αυτές που μελετάμε. Είδαμε, ότι η έκφραση μεταγράφων στα οποία εμπεριέχεται το εξώνιο 3 είναι πολύ χαμηλή (C_T : 33-35). Επίσης, εξακριβώθηκε και η ύπαρξη της πρόεκτασης του εξωνίου 2. Η έκφραση των προϊόντων αυτών ήταν αρκετά υψηλή μετά από επάλληλη PCR ήταν αρκετά υψηλά (C_T : 7-14) (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Καμπύλες τήξης (melting curves) από την Real-time PCR. **(A)** Οι τρεις καμπύλες τήξης του μοναδικού προϊόντος PCR προέρχονται από αντίστοιχες κυτταρικές σειρές (HCT-116, PC-3, U-2-OS). Το προϊόν αυτό έχει προέλθει από απλή PCR με ζεύγος εκκινητών: BOK Ex2/3 F και BOK Ex6/4 R. Το σημείο τήξης (T_m) του προϊόντος είναι περίπου 87,6. **(B)** Οι τρεις καμπύλες τήξης του μοναδικού προϊόντος PCR προέρχονται από αντίστοιχες κυτταρικές σειρές (HCT-116, PC-3, HaCaT). Το προϊόν αυτό έχει προέλθει από επάλληλη PCR με ζεύγη εκκινητών: BOK In2_up F_HPLC με BOK Ex6(a) R (εξωτερικό ζεύγος εκκινητών) και BOK In2_down F_HPLC με BOK Ex2R. Το T_m του προϊόντος είναι περίπου 91.

Μετά από την επιτέλεση των πειραμάτων της Real-time PCR, ηλεκτροφορήθηκαν ενδεικτικά κάποια από τα προϊόντα που προέκυψαν. Μέρος των αποτελεσμάτων φαίνονται στην Εικόνα 14 που ακολουθεί. Παρατηρούμε, ότι, ενώ εμφανίζονται ζώνες, πολλές δεν ανταποκρίνονται στο αναμενόμενο μήκος, δημιουργώντας ερωτήματα για την αλληλουχία που διαθέτουν. Στην πρώτη εικόνα, η οποία αναφέρεται σε PCR που έγινε με πρώτο ζεύγος εκκινητών τους BOK 1aF και BOK 6aR, εμφανίζει διακριτές ζώνες στη δεύτερη επάλληλη PCR και πιο αγχές στην τρίτη. Το γεγονός, ότι δεν εμφανίζει αποτέλεσμα στην πρώτη επάλληλη PCR με εκκινητές τους BOK 1a/2 F και BOK 2R, είναι αρκετά παράδοξο. Αντίθετα, στις άλλες τρεις εικόνες εμφανίζονται παντού ζώνες (είτε πιο έντονες είτε πιο

αχνές), εκτός από την τελευταία περίπτωση στην κάτω δεξιά εικόνα, η οποία αποτελούσε τον αρνητικό μάρτυρα (ορθώς αρνητικό). Απεικονίζονται, επίσης, ζώνες που διαθέτουν το εξώνιο 3 και στις πρώτες διαφορετικές PCR, με ζεύγη εκκινητών τα εξής: BOK 1aF με BOK 6aR, BOK 1bF με BOK 6aR και BOK In2_up F με BOK 6aR.



Εικόνα 14: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Τρία διαφορετικά ζεύγη εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν στην 1^η PCR, ενώ πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές επάλληλες PCR με διαφορετικά ζεύγη εκκινητών. Πάνω από κάθε φωτογραφία αναγράφεται σε χρωματιστό παραλληλόγραμμο πλαίσιο το πρώτο ζεύγος εκκινητών, ενώ από κάτω αναφέρεται το δεύτερο ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε στην επάλληλη PCR. Επίσης, φαίνονται τα αναμενόμενα μήκη στα χρωματισμένα πλαίσια στο κάτω μέρος κάθε εικόνας. Με κόκκινο βέλος συμβολίζονται οι ζώνες που ανταποκρίνονται στα αναμενόμενα μήκη, ενώ με λευκό βέλος οι άγνωστες ζώνες.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Το γονίδιο *BOK*, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, ενώ ο ρόλος του παραμένει αινιγματικός, πιθανότατα εξαιτίας της χαμηλής έκφρασης του στις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται ευρέως στην πειραματική διαδικασία. Το βασικό μετάγραφο, το οποίο ήταν γνωστό μέχρι σήμερα κωδικοποιούσε μία πρωτεϊνική ισομορφή μήκους 212 αμινοξέων (*BOK-L*). Η συγκεκριμένη ισομορφή φαίνεται να περιλαμβάνει και τις 4 επικράτειες. Η ύπαρξη της επικράτειας *BH4* δημιουργεί ένα ερωτηματικό στον προαποπτωτικό ρόλο της πρωτεΐνης, αφού η παρουσία της συγκεκριμένης επικράτειας συνήθως χαρακτηρίζει τα αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας *BCL2*. Κάποιες μελέτες αναφέρουν την ύπαρξη ενός ακόμη μεταγράφου του *MTD-P* ή *BOK-P*, στο οποίο φαίνεται να έχει αποκοπεί το εξόνιο 2. Κατ' επέκταση στην πρωτεϊνική ισομορφή απουσιάζει η επικράτεια *BH4* και μεγάλο μέρος της επικράτειας *BH3*.

Όσον αφορά τη λειτουργία της πρωτεΐνης *BOK*, είχε, αρχικά, θεωρηθεί ότι δρα με παρόμοιο τρόπο με τις *BAX* και *BAK*, εξαιτίας του σχηματισμού συμπλεγμάτων δομών (*clustered structures*) στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Αυτές οι δομές υποδηλώνουν μία πιθανή συσχέτιση με την απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c*. Ωστόσο, τα αποτελέσματα μίας πρόσφατης, έγκυρης μελέτης παρουσιάζουν την ικανότητα της *BOK* να επάγει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c*, με επακόλουθη απόπτωση σε κύτταρα μοντέλα από τα οποία απουσίαζαν τόσο η *BAX* όσο και η *BAK* πρωτεΐνες. Επομένως, προτάθηκε η ικανότητα της *BOK* να επάγει την απόπτωση μέσω ενός *BAK*- και *BAX*-ανεξάρτητου τρόπου [214]. Επιπλέον, η *BOK* φαίνεται να συμμετέχει σε πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών, κάποια εξ αυτών αναφέρονται παρακάτω: εμπλέκεται στην απόπτωση κοκκιωδών κυττάρων (*granulosa cells*) μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης 3 [215], αλλά και στον ενδογενή αποπτωτικό μηχανισμό, ο οποίος εξαρτάται από την ογκοπρωτεΐνη *p53* [216]. Αυτός ο μηχανισμός ενεργοποιείται ως απόκριση της θραύσης του DNA. Είναι, επίσης, ικανή να επάγει απόπτωση χωρίς την προϋπόθεση του ετεροδιμερισμού με άλλα προαποπτωτικά μέλη της οικογένειας *BCL2*, όταν παρεμποδίζεται το σύστημα αποικοδόμησης πρωτεϊνών που σχετίζονται με το ER. Πιο συγκεκριμένα, η *BOK*, ανεξάρτητα από τις *BAK* και *BAX*, συμμετέχει στη διαδικασία που καθιστά την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη διαπερατή, οδηγώντας στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c* [214]. Στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του πλακούντα, η ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των τροφοβλαστικών κυττάρων (*trophoblast*) μπορεί να επιτευχθεί μέσω

της BOK και της επίδρασής της στη μετάβαση από την G1 στην S φάση. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω ρύθμισης της έκφρασης της κυκλίνης E1 [217]. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι η BOK διαταράσσει την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών MCL1 και Beclin-1 και, άρα, επηρεάζει την επαγωγή της αυτοφαγίας [218].

Η πρωτεΐνη Bok έχει μελετηθεί σε αρκετά μεγάλο βαθμό στο ποντίκι. Τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών αποκαλύπτουν εναλλακτικές λειτουργίες του μορίου αυτού. Σε καταστάσεις στρες προερχόμενου από το ER, η Bok επάγει θετική ρύθμιση της PRK-like ER κινάσης για να ξεκινήσει μία καταρροϊκή απάντηση μη αναδιπλωμένης πρωτεΐνης και μία καταρροϊκή ρύθμιση της BAK/BAK ενεργοποίησης. Συνεπώς οδηγούμαστε στο ενδογενές (μιτοχονδριακό) αποπτωτικό μονοπάτι [219]. Πέραν του προαποπτωτικού του ρόλου, υπάρχουν ενδείξεις ότι η Bok έχει και αντιαποπτωτικές ιδιότητες κατά τη διάρκεια της νευρωνικής αποπτωτικής διαδικασίας. Στην προαναφερθείσα διαδικασία, ρυθμίζει την ομοιοστάση του νευρωνικού ασβεστίου και τη μιτοχονδριακή βιοενέργεια (bioenergetics), έχοντας ως αποτέλεσμα τη μειорύθμιση του εξαρτώμενου από την poly ADP-ριβόζη πολυμεράση κυτταρικού θανάτου. Αυτός ο μηχανισμός θεωρείται ως απόκριση στη διέγερση από το N-μέθυλ-D-ασπαρτικό [73]. Τέλος, η Bok φαίνεται να αλληλεπιδρά ισχυρά με τους 1,4,5- τριφωσφορικούς υποδοχείς ινοσιτόλης μέσω της BH4 επικράτειας. Με βάση το αποτέλεσμα μίας μελέτης, αυτή η αλληλεπίδραση, πιθανότατα, ενισχύει τη δομική σταθερότητα τόσο των τετραμερών του IP₃ υποδοχέα όσο και του Bok, οδηγώντας στον περιορισμό της υπερεκφραζόμενης προαποπτωτικής δραστηριότητας της Bok. Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα ευρήματα της μελέτης ήταν η προστασία από την αποικοδόμηση, η οποία παρέχεται στη Bok από την αλληλεπίδραση αυτή. Βασιζόμενοι στην ομοιότητα μεταξύ των πρωτεϊνικών ισομορφών του ανθρώπου και του ποντικού, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η ανθρώπινη πρωτεΐνη εμπλέκεται στα προαναφερθέντα μονοπάτια και δρα με παρόμοιο τρόπο.

Ωστόσο, όλα τα παραπάνω αναφέρονται στην πρωτεΐνη BOK και όχι στο γονίδιο. Η παρούσα διπλωματική εστίασε στην αναζήτηση νέων εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *BOK*.

Όπως έχει αναφερθεί εκτενώς στο κομμάτι των αποτελεσμάτων, βρέθηκαν 19 νέα εναλλακτικά μετάγραφα του συγκεκριμένου γονιδίου, κάποια εκ των οποίων δεν είχαν εντοπιστεί στην προκαταρκτική διερεύνηση του ESTs. Τα μετάγραφα αυτά δε διαθέτουν κάποιο νέο εξώνιο, αλλά προέρχονται κυρίως από εναλλακτικά σημεία συρραφής των ήδη γνωστών εξωνίων. Η αποκοπή τμημάτων εξωνίων είτε στο 3' είτε στο 5' άκρο, αλλά και οι διαφορετικοί συνδυασμοί των εξωνίων με το συνηθισμένο μήκος είναι ισχυρές ενδείξεις, ότι

στο συγκεκριμένο γονίδιο ο μηχανισμός της εναλλακτικής συρραφής είναι αρκετά συχνός. Η ύπαρξη τόσο μεγάλου αριθμού μεταγράφων (πιθανότατα να υπάρχουν και άλλα τα οποία δεν έχουν ακόμη ανακαλυφθεί) σίγουρα έχει μία βαθύτερη εξήγηση, αφού η παραγωγή εναλλακτικών μεταγράφων χωρίς ουσιαστική σημασία έρχεται σε αντιπαράθεση με την λογική του κυττάρου περί οικονομίας. Η βαθύτερη εξήγηση, πιθανότατα, να σχετίζεται με τις ποικίλες λειτουργίες του.

9 εκ των προαναφερθέντων μεταγράφων δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνη (ncRNA), ενώ τα υπόλοιπα 10 φαίνεται, με μία πρώτη εκτίμηση, να είναι mRNA. Από την *in silico* ανάλυση που πραγματοποιήσαμε, διαπιστώσαμε την ύπαρξη 6 επιπλέον προβλεπόμενων πρωτεϊνικών ισομορφών, κάποιες από τις οποίες έχουν εναλλακτικό πλαίσιο ανάγνωσης. Ωστόσο, το μέγεθος της πρωτεϊνικής αλυσίδας δεν ξεπερνάει τα 134 αμινοξέα, πλην της 1^{ης} πρωτεϊνικής ισομορφής που έχει μήκος 212 αμινοξέα. Εξαιτίας του σχετικά μικρού μήκους της δεν γνωρίζουμε αν είναι ικανές να σχηματίσουν τριτοταγείς δομές και άρα αν είναι λειτουργικές. Επιπλέον, σε κάποια από τα νέα μετάγραφα απουσιάζουν οι BH3 και BH4 επικράτειες. Αυτό πιθανότατα να επηρεάζει τόσο τη λειτουργικότητά τους όσο και τη λειτουργία τους. Βάση όλων αυτών, κρίνεται αναγκαία η περαιτέρω διερεύνηση του θέματος αυτού υπό το πρίσμα της πρωτεϊνικής ανάλυσης. Αν βέβαια ισχύει η υπόθεση των πολλαπλών πρωτεϊνικών ισομορφών, τότε πιθανότατα να μπορεί να εξηγηθεί η πολύπλευρη λειτουργικότητα του μορίου αυτού, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω.

Φυσικά, εκτός των mRNA υπάρχουν και τα ncRNA, η αποσαφήνιση του ρόλου των οποίων θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πολύ ενδιαφέρον αντικείμενο μελέτης. Ο ρόλος των ncRNAs είναι ποικίλος καθώς είναι πιθανό να εμπλέκονται σε διάφορες λειτουργίες και μηχανισμούς, όπως έχει βρεθεί στη βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται να εμπλέκονται σε βασικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως είναι η αντιγραφή και η μετάφραση, αλλά και στη συρραφή του RNA. Επιπλέον, είναι γνωστά για το ρυθμιστικό τους ρόλο, ενώ η ύπαξή τους έχει συσχετιστεί με διάφορα νοσήματα, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, του αυτισμού και της νόσου του Alzheimer.

Η αδυναμία εύρεσης του μέχρι πρότινος μοναδικού επιβεβαιωμένου γνωστού μεταγράφου μπορεί να θεωρηθεί ως παράδοξο, αλλά πιθανότατα να μπορεί να εξηγηθεί από τα παρακάτω. Τα μετάγραφα αυτά βρέθηκαν σε καρκινικές σειρές και όχι σε φυσιολογικές, όπως έγινε με το πρώτο μετάγραφο. Επίσης, η ύπαρξη των μεταγράφων αυτών σε καρκινικές σειρές θα μπορούσε πιθανότατα να συσχετιστεί είτε με την εμφάνιση είτε με την εξέλιξη της νόσου.

Μία πρόσφατη έρευνα παρέχει δεδομένα που συσχετίζουν η εναλλακτική συρραφή συνδυασμένη με την αποικοδόμηση nonsense-mediated mRNA και την εμφάνιση νόσων. Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία αποικοδόμησης nonsense-mediated mRNA (NMD) είναι ένας μηχανισμός επιτήρησης που ανιχνεύει και αποικοδομεί mRNAs που φέρουν πρώιμο κωδικόνιο λήξης (premature translation termination codon, PTC). Ο συνδυασμός της εναλλακτικής συρραφής με την NMD θεωρείται κρίσιμο βήμα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, ελέγχοντας με αυτόν τον τρόπο τα επίπεδα του mRNA των πολλαπλών μεταγράφων από μία γονιδιακή περιοχή. Εκτός του ελέγχου ποιότητας των μη φυσιολογικών μεταγράφων και της ρύθμισης των φυσιολογικών και των πλήρως λειτουργικών mRNAs, είναι ευρέως αποδεκτό, ότι η NMD αποικοδομεί εναλλακτικά ματισμένα μετάγραφα με πλαίσια ανάγνωσης που εισάγουν PTCs, μέσω της συνδυαστικής διαδικασίας που αναφέρθηκε, συνεισφέροντας στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η απορρύθμιση της διαδικασίας αυτής έχει πιθανότατα βλαβερές συνέπειες, όπως είναι ο καρκίνος και οι νευρολογικές διαταραχές [220]. Συγκεκριμένα, η AS-NMD διαδικασία έχει εμπλακεί στη ρύθμιση ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών, όπως στην περίπτωση των του πλούσιου σε κυστεΐνες αγγειογενικού επαγωγέα 61 με ογκοπροωθητική δράση (CYR61). Ο CYR61 δρα ως προαγγειογενετικός παράγοντας και τα επίπεδά του φαίνεται να επηρεάζονται από το μηχανισμό AS-NMD. Κάτω από φυσιολογικές καταστάσεις ο AS-NMD δρα στο CYR61 mRNA, εξαιτίας της διατήρησης του εσωνίου 3, το οποίο εισάγει μία αλλαγή στο πλαίσιο ανάγνωσης, δημιουργώντας ένα ευαίσθητο στη NMD μετάγραφο. Κάτω από υποξικές συνθήκες, η απώλεια του εσωνίου 3 προωθείται, με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης ενός mRNA που κωδικοποιεί μία λειτουργική πρωτεϊνική ισομορφή [220].

Οι λειτουργίες του εγκεφάλου είναι στενά ελεγχόμενες από τη γονιδιακή έκφραση. Ένας βασικός μετα-μεταφραστικός μηχανισμός, που ρυθμίζει τα επίπεδα των νευρωνικών μεταγράφων, είναι ο AS-NMD. Η διαταραχή του μηχανισμού αυτού οδηγεί σε σοβαρές νευρολογικές, νευροεκφυλιστικές ή νευροαναπτυξιακές ασθένειες. PTC μεταλλάξεις στην ATP-Binding Cassette, υποοικογένεια A, μέλος 7 του γονιδίου (ABCA7) έχουν, προσφάτως, αναγνωριστεί ως μέσοι-προς-υψηλοί διεισδυτικοί παράγοντες κινδύνου για καθυστερημένη έναρξη της νόσου του Alzheimer. Χρησιμοποιώντας στοχευμένες μεγάλου μήκους αλληλουχίες cDNA, οι De Roeck et al. βρήκαν 7 μετάγραφα που περιείχαν PTCs για το ABCA7. Οι μεταλλάξεις, αυτές, παρατηρήθηκαν σε ποικίλη αναλογία, υπονοώντας μη ολοκληρωμένη NMD. Οι ABCA7 PTC μεταλλάξεις παίζουν ουσιώδη ρόλο στην πρώιμη

έναρξη της AD, δικαιολογώντας γενετικό έλεγχο του ABCA7 σε ασθενείς που δε μπορεί να βρεθεί η γενετική αιτία [220].

Όλα αυτά θα μπορούσαν να στηρίζουν την υπόθεση μας ότι τα μετάγραφα αυτά εμφανίζονται κυρίως σε καρκινικές σειρές και είναι αποτέλεσμα της γενικότερης απορρύθμισης που επιτελείται σε μοριακό επίπεδο κατά την εμφάνιση της νόσου.

Η εύρεση της προεξοχής του εξωνίου 2 ήταν από τα πιο ενδιαφέροντα ευρήματα. Δεν γνωρίζουμε αν αυτή η προέκταση αποτελεί αρχή των μεταγράφων ή αν αποτελεί συνέχεια του εξωνίου 1. Η διαφορετική αρχή υπονοεί και διαφορετική 5' αμετάφραστη περιοχή (untranslated region, UTR). Αυτό μπορεί να οδηγεί σε διαφοροποιημένη ρύθμιση της έκφρασης των μεταγράφων αυτών. Αν πάλι, τα μετάγραφα με την επέκταση του εξωνίου 2 έχουν και το εξώνιο 1, τότε αγνοούμε μία ολόκληρη ομάδα μεταγράφων, και συνεπώς απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση. Επιπλέον, μέσω την ανάλυση των ESTs σε συγγενή είδη, όπως αυτό του γορίλλα, βρέθηκε η ύπαρξη μίας παραλλαγής του εξωνίου 6, το οποίο περιέχει μία εσωτερική έλλειψη 118 νουκλεοτιδικών βάσεων. Ωστόσο, αυτό δεν έχει αποδειχθεί, ακόμη, πειραματικά σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Εξαιτίας όμως της μεγάλης ομολογίας μεταξύ των δύο αυτών οργανισμών, η ύπαρξη του εξωνίου αυτού στο γορίλλα αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι θα υπάρχει και στον άνθρωπο.

Ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα θεωρούνται τα αποτελέσματα της Real-time PCR, αναφορικά με την ύπαρξη του εξωνίου 3, τα οποία αναφέρονται παραπάνω στην ενότητα των αποτελεσμάτων. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώνουμε ότι το εξώνιο 3 υπάρχει στις μελετώμενες κυτταρικές σειρές αλλά σε χαμηλή έκφραση. Η χαμηλή έκφραση του, σε συνδυασμό με το μεγαλύτερο μήκος της αλληλουχίας του, εξηγεί το γεγονός, ότι δε βλέπουμε τη ζώνη αυτή στα πηκτώματα. Λόγω ανταγωνισμού, ενισχύονται προϊόντα μικρότερου μήκους στην PCR και συνεπώς είναι αυτά τα οποία φαίνονται στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης. Επίσης, ύστερα από ηλεκτροφόρηση κάποιων από τα προϊόντα της Real-time PCR, προέκυψαν ζώνες μη αναμενόμενου μήκους. Πιθανότατα, τα προϊόντα με μήκος μεγαλύτερο από το αναμενόμενο περιλαμβάνουν τμήματα εσωνίων, ενώ αντίθετα προϊόντα με μικρότερο μήκος από το προβλεπόμενο διαθέτουν ένα εσωτερικότερο σημείο συρραφής σε κάποιο από τα εξώνια τους.

Σε επόμενα βήματα, θα μπορούσαμε να ασχοληθούμε με την σχετική ποσοτικοποίηση των μεταγράφων αυτών, βασιζόμενοι στις ιδιότητες της Real-time PCR. Η σχετική ποσοτικοποίηση θα προκύψει από σύγκριση της αφθονίας των μεταγράφων μεταξύ τους, βασιζόμενοι στην τιμή C_T του καθενός. Η ποσοτικοποίηση αυτή θα ήταν ωφέλιμο να γίνει σε μεγάλο αριθμό κυτταρικών σειρών. Με αυτόν τον τρόπο, θα αποκτήσουμε μία

ολοκληρώμενη εικόνα για το πού εκφράζονται τα μετάγραφα αυτά και θα διαπιστώσουμε αν υπάρχει τάση αλληλοαποκλεισμού μεταξύ των μεταγράφων. Καλό θα ήταν να συμπεριληφθεί στην αξιολόγηση και μία φυσιολογική κυτταρική σειρά για να ελεγχθεί η υπόθεση που αναφέρθηκε παραπάνω για την ύπαρξη των νέων μεταγράφων μόνο σε καρκινικές σειρές λόγω διαφυγής από το σύστημα επιτήρησης.

Μία ενδεχόμενη επέκταση της παρούσας ερευνητικής μελέτης θα μπορούσε να είναι σε πρώτο επίπεδο, η διερεύνηση της ύπαρξης των πιθανών πρωτεϊνικών ισομορφών που αναφέρονται παραπάνω και σε επόμενο, η διερεύνηση της λειτουργίας και του ρόλου αυτών. Η αποσαφήνιση του ρόλου αυτών θα βοηθούσε στη διαλεύκανση του μυστηρίου που τυλίγεται γύρω από το συγκεκριμένο γονίδιο καθώς και στην ενδεχόμενη εμπλοκή αυτών στην εμφάνιση και στην εξέλιξη νοσημάτων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495-516.
2. Power C, Fanning N, Redmond HP. Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: a review. *Shock* 2002;18:197-211.
3. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000;407:784-8.
4. Rosenblatt J, Raff MC, Cramer LP. An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr Biol* 2001;11:1847-57.
5. Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 2001;3:E255-63.
6. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-15.
7. Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT, et al. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8461-6.
8. Grimsley C, Ravichandran KS. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol* 2003;13:648-56.
9. Mashima T, Naito M, Noguchi K, Miller DK, Nicholson DW, Tsuruo T. Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene* 1997;14:1007-12.
10. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 2004;19:124-8.
11. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001;15:2922-33.
12. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-6.
13. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-6.
14. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2005;55:178-94.
15. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gorp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004;23:2861-74.

16. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102:33-42.
17. Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1999;1:5-15.
18. Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J* 2004;23:2134-45.
19. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 2000;192:571-80.
20. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;2:647-56.
21. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
22. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 1995;81:495-504.
23. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002;296:1635-6.
24. Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ, El-Deiry WS. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol* 2002;4:842-9.
25. Hitoshi Y, Lorens J, Kitada SI, Fisher J, LaBarge M, Ring HZ, et al. Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity* 1998;8:461-71.
26. Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:1541-8.
27. Kuranaga E. Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions in vivo. *Genes Cells* 2012;17:83-97.
28. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993;75:641-52.
29. Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986;44:817-29.
30. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002;9:459-70.

31. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008;151:10-27.
32. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene* 2003;22:8543-67.
33. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999;6:99-104.
34. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:7320-6.
35. Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Jr., Booth CJ, Mehal WZ, et al. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 2006;311:847-51.
36. Lamkanfi M, Kanneganti TD. Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:21-4.
37. Ghavami S, Eshraghi M, Kadkhoda K, Mutawe MM, Maddika S, Bay GH, et al. Role of BNIP3 in TNF-induced cell death--TNF upregulates BNIP3 expression. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:546-60.
38. Carrington PE, Sandu C, Wei Y, Hill JM, Morisawa G, Huang T, et al. The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Mol Cell* 2006;22:599-610.
39. Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet* 2009;46:497-510.
40. Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschopp J, Nicholson DW, et al. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 2002;277:45162-71.
41. Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;388:190-5.
42. Boatright KM, Deis C, Denault JB, Sutherlin DP, Salvesen GS. Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L). *Biochem J* 2004;382:651-7.
43. Pop C, Oberst A, Drag M, Van Raam BJ, Riedl SJ, Green DR, et al. FLIP(L) induces caspase 8 activity in the absence of interdomain caspase 8 cleavage and alters substrate specificity. *Biochem J* 2011;433:447-57.
44. Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, et al. c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J* 2002;21:3704-14.

45. Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 1999;13:3179-84.
46. Qin H, Srinivasula SM, Wu G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, Shi Y. Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature* 1999;399:549-57.
47. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985;228:1440-3.
48. Delbridge AR, Strasser A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ* 2015;22:1071-80.
49. Pepper C, Bentley P. The role of the Bcl-2 family in the modulation of apoptosis. *Symp Soc Exp Biol* 2000;52:43-53.
50. Tsujimoto Y. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol* 2003;195:158-67.
51. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116:205-19.
52. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:47-59.
53. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-6.
54. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007;87:99-163.
55. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 1993;53:4701-14.
56. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 2010;37:299-310.
57. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:49-63.
58. Strasser A, Puthalakath H, Bouillet P, Huang DC, O'Connor L, O'Reilly LA, et al. The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control. *Ann N Y Acad Sci* 2000;917:541-8.

59. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer cell* 2002;2:183-92.
60. Uren RT, Dewson G, Chen L, Coyne SC, Huang DC, Adams JM, et al. Mitochondrial permeabilization relies on BH3 ligands engaging multiple prosurvival Bcl-2 relatives, not Bak. *J Cell Biol* 2007;177:277-87.
61. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 2007;315:856-9.
62. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3668-72.
63. Hsu YT, Youle RJ. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* 1998;273:10777-83.
64. Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, et al. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* 1998;143:207-15.
65. Liu G, Shao W, Huang X, Wu H, Tang W. Structural studies of imidazole-cytochrome c: resonance assignments and structural comparison with cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 1996;1277:61-82.
66. Kilbride SM, Prehn JH. Central roles of apoptotic proteins in mitochondrial function. *Oncogene* 2013;32:2703-11.
67. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 2002;111:331-42.
68. Campbell KJ, Tait SWG. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol* 2018;8:
69. Lindsten T, Zong WX, Thompson CB. Defining the role of the Bcl-2 family of proteins in the nervous system. *Neuroscientist* 2005;11:10-5.
70. Krajewski S, Mai JK, Krajewska M, Sikorska M, Mossakowski MJ, Reed JC. Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J Neurosci* 1995;15:6364-76.
71. Lein ES, Zhao X, Gage FH. Defining a molecular atlas of the hippocampus using DNA microarrays and high-throughput in situ hybridization. *J Neurosci* 2004;24:3879-89.

72. Newrzella D, Pahlavan PS, Kruger C, Boehm C, Sorgenfrei O, Schrock H, et al. The functional genome of CA1 and CA3 neurons under native conditions and in response to ischemia. *BMC Genomics* 2007;8:370.
73. D'Orsi B, Engel T, Pfeiffer S, Nandi S, Kaufmann T, Henshall DC, et al. Bok Is Not Pro-Apoptotic But Suppresses Poly ADP-Ribose Polymerase-Dependent Cell Death Pathways and Protects against Excitotoxic and Seizure-Induced Neuronal Injury. *J Neurosci* 2016;36:4564-78.
74. Sun YF, Yu LY, Saarma M, Timmusk T, Arumae U. Neuron-specific Bcl-2 homology 3 domain-only splice variant of Bak is anti-apoptotic in neurons, but pro-apoptotic in non-neuronal cells. *J Biol Chem* 2001;276:16240-7.
75. Uo T, Kinoshita Y, Morrison RS. Neurons exclusively express N-Bak, a BH3 domain-only Bak isoform that promotes neuronal apoptosis. *J Biol Chem* 2005;280:9065-73.
76. Ward MW, Kogel D, Prehn JH. Neuronal apoptosis: BH3-only proteins the real killers? *J Bioenerg Biomembr* 2004;36:295-8.
77. Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 2008;27 Suppl 1:S2-19.
78. Engel T, Plesnila N, Prehn JH, Henshall DC. In vivo contributions of BH3-only proteins to neuronal death following seizures, ischemia, and traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011;31:1196-210.
79. Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Nakayama K, et al. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 1995;267:1506-10.
80. Roth KA, Kuan C, Haydar TF, D'Sa-Eipper C, Shindler KS, Zheng TS, et al. Epistatic and independent functions of caspase-3 and Bcl-X(L) in developmental programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:466-71.
81. O'Reilly LA, Print C, Hausmann G, Moriishi K, Cory S, Huang DC, et al. Tissue expression and subcellular localization of the pro-survival molecule Bcl-w. *Cell Death Differ* 2001;8:486-94.
82. Merry DE, Veis DJ, Hickey WF, Korsmeyer SJ. bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. *Development* 1994;120:301-11.
83. Krajewski S, Bodrug S, Krajewska M, Shabaik A, Gascoyne R, Berean K, et al. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. *Differential*

- regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am J Pathol* 1995;146:1309-19.
84. Mori M, Burgess DL, Gefrides LA, Foreman PJ, Opferman JT, Korsmeyer SJ, et al. Expression of apoptosis inhibitor protein Mcl1 linked to neuroprotection in CNS neurons. *Cell Death Differ* 2004;11:1223-33.
 85. Collingridge GL. Long-term potentiation. A question of reliability. *Nature* 1994;371:652-3.
 86. Olney JW, Sharpe LG, Feigin RD. Glutamate-induced brain damage in infant primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 1972;31:464-88.
 87. Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 2010;11:682-96.
 88. Schanne FA, Kane AB, Young EE, Farber JL. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science* 1979;206:700-2.
 89. Choi DW. Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. *Prog Brain Res* 1994;100:47-51.
 90. Zipfel GJ, Lee JM, Choi DW. Reducing calcium overload in the ischemic brain. *N Engl J Med* 1999;341:1543-4.
 91. Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, et al. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1990;28:18-25.
 92. Bezprozvanny I, Hayden MR. Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322:1310-7.
 93. Lipton SA. Pathologically activated therapeutics for neuroprotection. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:803-8.
 94. Mattson MP. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* 2007;6:337-50.
 95. Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 2013;698:6-18.
 96. Berliocchi L, Bano D, Nicotera P. Ca²⁺ signals and death programmes in neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005;360:2255-8.
 97. Friedman LK. Calcium: a role for neuroprotection and sustained adaptation. *Mol Interv* 2006;6:315-29.
 98. Anilkumar U, Prehn JH. Anti-apoptotic BCL-2 family proteins in acute neural injury. *Front Cell Neurosci* 2014;8:281.

99. Konig HG, Rehm M, Gudorf D, Krajewski S, Gross A, Ward MW, et al. Full length Bid is sufficient to induce apoptosis of cultured rat hippocampal neurons. *BMC Cell Biol* 2007;8:7.
100. Steckley D, Karajgikar M, Dale LB, Fuerth B, Swan P, Drummond-Main C, et al. Puma is a dominant regulator of oxidative stress induced Bax activation and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 2007;27:12989-99.
101. Concannon CG, Tuffy LP, Weisova P, Bonner HP, Davila D, Bonner C, et al. AMP kinase-mediated activation of the BH3-only protein Bim couples energy depletion to stress-induced apoptosis. *J Cell Biol* 2010;189:83-94.
102. Jia WW, Wang Y, Qiang D, Tufaro F, Remington R, Cynader M. A bcl-2 expressing viral vector protects cortical neurons from excitotoxicity even when administered several hours after the toxic insult. *Brain Res Mol Brain Res* 1996;42:350-3.
103. Lawrence MS, Ho DY, Sun GH, Steinberg GK, Sapolsky RM. Overexpression of Bcl-2 with herpes simplex virus vectors protects CNS neurons against neurological insults in vitro and in vivo. *J Neurosci* 1996;16:486-96.
104. Asoh S, Ohsawa I, Mori T, Katsura K, Hiraide T, Katayama Y, et al. Protection against ischemic brain injury by protein therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:17107-12.
105. Garrity-Moses ME, Teng Q, Liu J, Tanase D, Boulis NM. Neuroprotective adeno-associated virus Bcl-xL gene transfer in models of motor neuron disease. *Muscle Nerve* 2005;32:734-44.
106. Iriyama T, Kamei Y, Kozuma S, Taketani Y. Bax-inhibiting peptide protects glutamate-induced cerebellar granule cell death by blocking Bax translocation. *Neurosci Lett* 2009;451:11-5.
107. D'Orsi B, Bonner H, Tuffy LP, Dussmann H, Woods I, Courtney MJ, et al. Calpains are downstream effectors of bax-dependent excitotoxic apoptosis. *J Neurosci* 2012;32:1847-58.
108. D'Orsi B, Kilbride SM, Chen G, Perez Alvarez S, Bonner HP, Pfeiffer S, et al. Bax regulates neuronal Ca²⁺ homeostasis. *J Neurosci* 2015;35:1706-22.
109. D'Sa C, Klocke BJ, Cecconi F, Lindsten T, Thompson CB, Korsmeyer SJ, et al. Caspase regulation of genotoxin-induced neural precursor cell death. *J Neurosci Res* 2003;74:435-45.

110. Lindsten T, Golden JA, Zong WX, Minarcik J, Harris MH, Thompson CB. The proapoptotic activities of Bax and Bak limit the size of the neural stem cell pool. *J Neurosci* 2003;23:11112-9.
111. Deckwerth TL, Elliott JL, Knudson CM, Johnson EM, Jr., Snider WD, Korsmeyer SJ. BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* 1996;17:401-11.
112. Miller TM, Moulder KL, Knudson CM, Creedon DJ, Deshmukh M, Korsmeyer SJ, et al. Bax deletion further orders the cell death pathway in cerebellar granule cells and suggests a caspase-independent pathway to cell death. *J Cell Biol* 1997;139:205-17.
113. Deshmukh M, Johnson EM, Jr. Evidence of a novel event during neuronal death: development of competence-to-die in response to cytoplasmic cytochrome c. *Neuron* 1998;21:695-705.
114. Xiang H, Kinoshita Y, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Schwartzkroin PA, Morrison RS. Bax involvement in p53-mediated neuronal cell death. *J Neurosci* 1998;18:1363-73.
115. Li D, Ueta E, Kimura T, Yamamoto T, Osaki T. Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. *Cancer Sci* 2004;95:644-50.
116. Siu PM, Alway SE. Deficiency of the Bax gene attenuates denervation-induced apoptosis. *Apoptosis* 2006;11:967-81.
117. Putcha GV, Harris CA, Moulder KL, Easton RM, Thompson CB, Johnson EM, Jr. Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis: lessons from the analysis of mutant mice. *J Cell Biol* 2002;157:441-53.
118. Autret A, Martin SJ. Bcl-2 family proteins and mitochondrial fission/fusion dynamics. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:1599-606.
119. Alavian KN, Li H, Collis L, Bonanni L, Zeng L, Sacchetti S, et al. Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase. *Nat Cell Biol* 2011;13:1224-33.
120. Jonas EA, Porter GA, Alavian KN. Bcl-xL in neuroprotection and plasticity. *Front Physiol* 2014;5:355.
121. Pinton P, Ferrari D, Magalhaes P, Schulze-Osthoff K, Di Virgilio F, Pozzan T, et al. Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol* 2000;148:857-62.

122. Chen R, Valencia I, Zhong F, McColl KS, Roderick HL, Bootman MD, et al. Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Biol* 2004;166:193-203.
123. Oakes SA, Scorrano L, Opferman JT, Bassik MC, Nishino M, Pozzan T, et al. Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:105-10.
124. van Belzen R, Kotlyar AB, Moon N, Dunham WR, Albracht SP. The iron-sulfur clusters 2 and ubisemiquinone radicals of NADH:ubiquinone oxidoreductase are involved in energy coupling in submitochondrial particles. *Biochemistry* 1997;36:886-93.
125. Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 2000;80:315-60.
126. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C817-33.
127. Grienberger C, Konnerth A. Imaging calcium in neurons. *Neuron* 2012;73:862-85.
128. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:566-78.
129. Lopreiato R, Giacomello M, Carafoli E. The plasma membrane calcium pump: new ways to look at an old enzyme. *J Biol Chem* 2014;289:10261-8.
130. Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 2009;18:R169-76.
131. Su B, Wang X, Zheng L, Perry G, Smith MA, Zhu X. Abnormal mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 2010;1802:135-42.
132. Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, et al. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 2001;1:515-25.
133. Karbowski M, Lee YJ, Gaume B, Jeong SY, Frank S, Nechushtan A, et al. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol* 2002;159:931-8.

134. Perfettini JL, Roumier T, Kroemer G. Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2005;15:179-83.
135. Autret A, Martin SJ. Emerging role for members of the Bcl-2 family in mitochondrial morphogenesis. *Mol Cell* 2009;36:355-63.
136. Brooks C, Wei Q, Feng L, Dong G, Tao Y, Mei L, et al. Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:11649-54.
137. Wasiak S, Zunino R, McBride HM. Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol* 2007;177:439-50.
138. Arnoult D, Rismanchi N, Grodet A, Roberts RG, Seeburg DP, Estaquier J, et al. Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. *Curr Biol* 2005;15:2112-8.
139. Sheridan C, Delivani P, Cullen SP, Martin SJ. Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. *Mol Cell* 2008;31:570-85.
140. Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, Shore GC. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol* 2003;160:1115-27.
141. Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 2004;15:5001-11.
142. Suen DF, Norris KL, Youle RJ. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* 2008;22:1577-90.
143. Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingeman E, Song C, Yoo C, Kuwana T, et al. Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev Cell* 2008;14:193-204.
144. Karbowski M, Norris KL, Cleland MM, Jeong SY, Youle RJ. Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* 2006;443:658-62.
145. Rolland SG, Conradt B. New role of the BCL2 family of proteins in the regulation of mitochondrial dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 2010;22:852-8.

146. Woo HN, Seo YW, Moon AR, Jeong SY, Jeong SY, Choi EK, et al. Effects of the BH3-only protein human Noxa on mitochondrial dynamics. *FEBS Lett* 2009;583:2349-54.
147. Morciano G, Giorgi C, Balestra D, Marchi S, Perrone D, Pinotti M, et al. Mcl-1 involvement in mitochondrial dynamics is associated with apoptotic cell death. *Mol Biol Cell* 2016;27:20-34.
148. Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, et al. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2002;2:55-67.
149. Germain M, Mathai JP, McBride HM, Shore GC. Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J* 2005;24:1546-56.
150. Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, et al. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 2003;278:7743-6.
151. Zaltsman Y, Shachnai L, Yivgi-Ohana N, Schwarz M, Maryanovich M, Houtkooper RH, et al. MTCH2/MIMP is a major facilitator of tBID recruitment to mitochondria. *Nat Cell Biol* 2010;12:553-62.
152. Shamas-Din A, Bindner S, Zhu W, Zaltsman Y, Campbell C, Gross A, et al. tBid undergoes multiple conformational changes at the membrane required for Bax activation. *J Biol Chem* 2013;288:22111-27.
153. Maryanovich M, Zaltsman Y, Ruggiero A, Goldman A, Shachnai L, Zaidman SL, et al. An MTCH2 pathway repressing mitochondria metabolism regulates haematopoietic stem cell fate. *Nat Commun* 2015;6:7901.
154. Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:821-31.
155. Bernardi P, von Stockum S. The permeability transition pore as a Ca(2+) release channel: new answers to an old question. *Cell Calcium* 2012;52:22-7.
156. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, et al. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 1998;281:2027-31.
157. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999;399:483-7.

158. Whelan RS, Konstantinidis K, Wei AC, Chen Y, Reyna DE, Jha S, et al. Bax regulates primary necrosis through mitochondrial dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:6566-71.
159. Karch J, Kwong JQ, Burr AR, Sargent MA, Elrod JW, Peixoto PM, et al. Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice. *Elife* 2013;2:e00772.
160. Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 2004;427:461-5.
161. Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkenin JD. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* 2007;9:550-5.
162. Chen YB, Aon MA, Hsu YT, Soane L, Teng X, McCaffery JM, et al. Bcl-xL regulates mitochondrial energetics by stabilizing the inner membrane potential. *J Cell Biol* 2011;195:263-76.
163. Bonora M, Bononi A, De Marchi E, Giorgi C, Lebedzinska M, Marchi S, et al. Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell Cycle* 2013;12:674-83.
164. Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, et al. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:5887-92.
165. Alavian KN, Beutner G, Lazrove E, Sacchetti S, Park HA, Licznanski P, et al. An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:10580-5.
166. Reed JC, Pellicchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood* 2005;106:408-18.
167. Cheung CH, Wu SY, Lee TR, Chang CY, Wu JS, Hsieh HP, et al. Cancer cells acquire mitotic drug resistance properties through beta I-tubulin mutations and alterations in the expression of beta-tubulin isotypes. *PLoS One* 2010;5:e12564.
168. Yamaguchi R, Janssen E, Perkins G, Ellisman M, Kitada S, Reed JC. Efficient elimination of cancer cells by deoxyglucose-ABT-263/737 combination therapy. *PLoS One* 2011;6:e24102.

169. Hann CL, Daniel VC, Sugar EA, Dobromilskaya I, Murphy SC, Cope L, et al. Therapeutic efficacy of ABT-737, a selective inhibitor of BCL-2, in small cell lung cancer. *Cancer Res* 2008;68:2321-8.
170. Longley DB, Boyer J, Allen WL, Latif T, Ferguson PR, Maxwell PJ, et al. The role of thymidylate synthase induction in modulating p53-regulated gene expression in response to 5-fluorouracil and antifolates. *Cancer Res* 2002;62:2644-9.
171. Gong B, Chen Q, Endlich B, Mazumder S, Almasan A. Ionizing radiation-induced, Bax-mediated cell death is dependent on activation of cysteine and serine proteases. *Cell Growth Differ* 1999;10:491-502.
172. Gao K, Masuda A, Matsuura T, Ohno K. Human branch point consensus sequence is yUnAy. *Nucleic Acids Res* 2008;36:2257-67.
173. Matlin AJ, Clark F, Smith CW. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:386-98.
174. Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 2003;72:291-336.
175. International Human Genome Sequencing C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431:931-45.
176. Khatun J, Yu Y, Wrobel JA, Risk BA, Gunawardena HP, Secret A, et al. Whole human genome proteogenomic mapping for ENCODE cell line data: identifying protein-coding regions. *BMC Genomics* 2013;14:141.
177. Consortium EP. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012;489:57-74.
178. Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 2008;456:470-6.
179. Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* 2008;40:1413-5.
180. Kalsotra A, Cooper TA. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. *Nat Rev Genet* 2011;12:715-29.
181. Naftelberg S, Schor IE, Ast G, Kornblihtt AR. Regulation of alternative splicing through coupling with transcription and chromatin structure. *Annu Rev Biochem* 2015;84:165-98.

182. Xiong HY, Alipanahi B, Lee LJ, Bretschneider H, Merico D, Yuen RK, et al. RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science* 2015;347:1254806.
183. Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:108-21.
184. Paronetto MP, Passacantilli I, Sette C. Alternative splicing and cell survival: from tissue homeostasis to disease. *Cell Death Differ* 2016;23:1919-29.
185. Singh RK, Cooper TA. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends Mol Med* 2012;18:472-82.
186. Fackenthal JD, Godley LA. Aberrant RNA splicing and its functional consequences in cancer cells. *Disease models & mechanisms* 2008;1:37-42.
187. Romero PR, Zaidi S, Fang YY, Uversky VN, Radivojac P, Oldfield CJ, et al. Alternative splicing in concert with protein intrinsic disorder enables increased functional diversity in multicellular organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:8390-5.
188. Li H-D, Menon R, Omenn GS, Guan Y. The emerging era of genomic data integration for analyzing splice isoform function. *Trends in genetics : TIG* 2014;30:340-7.
189. Eksi R, Li H-D, Menon R, Wen Y, Omenn GS, Kretzler M, et al. Systematically differentiating functions for alternatively spliced isoforms through integrating RNA-seq data. *PLoS computational biology* 2013;9:e1003314-e.
190. Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature Genetics* 2008;40:1413.
191. Sammeth M, Foissac S, Guigó R. A general definition and nomenclature for alternative splicing events. *PLoS computational biology* 2008;4:e1000147-e.
192. Zahler AM. Alternative splicing in *C. elegans*. *WormBook* 2005;1-13.
193. Lim KH, Ferraris L, Filloux ME, Raphael BJ, Fairbrother WG. Using positional distribution to identify splicing elements and predict pre-mRNA processing defects in human genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:11093-8.
194. Warf MB, Berglund JA. Role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing. *Trends in biochemical sciences* 2010;35:169-78.

195. Barash Y, Calarco JA, Gao W, Pan Q, Wang X, Shai O, et al. Deciphering the splicing code. *Nature* 2010;465:53.
196. Reid DC, Chang BL, Gunderson SI, Alpert L, Thompson WA, Fairbrother WG. Next-generation SELEX identifies sequence and structural determinants of splicing factor binding in human pre-mRNA sequence. *RNA (New York, N.Y.)* 2009;15:2385-97.
197. Wang Z, Burge CB. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA (New York, N.Y.)* 2008;14:802-13.
198. Ke S, Zhang XHF, Chasin LA. Positive selection acting on splicing motifs reflects compensatory evolution. *Genome research* 2008;18:533-43.
199. Graveley BR, Hertel KJ, Maniatis T. The role of U2AF35 and U2AF65 in enhancer-dependent splicing. *RNA (New York, N.Y.)* 2001;7:806-18.
200. López-Bigas N, Audit B, Ouzounis C, Parra G, Guigó R. Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS letters* 2005;579:1900-3.
201. Ward AJ, Cooper TA. The pathobiology of splicing. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 2010;220:152-63.
202. Skotheim RI, Nees M. Alternative splicing in cancer: noise, functional, or systematic? *The international journal of biochemistry & cell biology* 2007;39:1432-49.
203. He C, Zhou F, Zuo Z, Cheng H, Zhou R. A global view of cancer-specific transcript variants by subtractive transcriptome-wide analysis. *PloS one* 2009;4:e4732.
204. Sveen A, Kilpinen S, Ruusulehto A, Lothe R, Skotheim R. Aberrant RNA splicing in cancer; expression changes and driver mutations of splicing factor genes. *Oncogene* 2016;35:2413.
205. Omenn GS, Guan Y, Menon R. A new class of protein cancer biomarker candidates: differentially expressed splice variants of ERBB2 (HER2/neu) and ERBB1 (EGFR) in breast cancer cell lines. *Journal of proteomics* 2014;107:103-12.
206. Sveen A, Ågesen TH, Nesbakken A, Rognum TO, Lothe RA, Skotheim RI. Transcriptome instability in colorectal cancer identified by exon microarray analyses: Associations with splicing factor expression levels and patient survival. *Genome medicine* 2011;3:32.
207. Sveen A, Johannessen B, Teixeira MR, Lothe RA, Skotheim RI. Transcriptome instability as a molecular pan-cancer characteristic of carcinomas. *BMC genomics* 2014;15:672.

208. Banaszak LG, Giudice V, Zhao X, Wu Z, Gao S, Hosokawa K, et al. Abnormal RNA splicing and genomic instability after induction of DNMT3A mutations by CRISPR/Cas9 gene editing. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2018;69:10-22.
209. Kim E, Goren A, Ast G. Insights into the connection between cancer and alternative splicing. *Trends in Genetics* 2008;24:7-10.
210. Ghigna C, Giordano S, Shen H, Benvenuto F, Castiglioni F, Comoglio PM, et al. Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene. *Molecular cell* 2005;20:881-90.
211. Hui L, Zhang X, Wu X, Lin Z, Wang Q, Li Y, et al. Identification of alternatively spliced mRNA variants related to cancers by genome-wide ESTs alignment. *Oncogene* 2004;23:3013.
212. Danckwardt S, Neu-Yilik G, Thermann R, Frede U, Hentze MW, Kulozik AE. Abnormally spliced β -globin mRNAs: a single point mutation generates transcripts sensitive and insensitive to nonsense-mediated mRNA decay. *Blood* 2002;99:1811-6.
213. Luco RF, Allo M, Schor IE, Kornblihtt AR, Misteli T. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* 2011;144:16-26.
214. Einsele-Scholz S, Malmsheimer S, Bertram K, Stehle D, Johanning J, Manz M, et al. Bok is a genuine multi-BH-domain protein that triggers apoptosis in the absence of Bax and Bak. *J Cell Sci* 2016;129:3054.
215. Jaaskelainen M, Nieminen A, Pokkylä RM, Kauppinen M, Liakka A, Heikinheimo M, et al. Regulation of cell death in human fetal and adult ovaries--role of Bok and Bcl-X(L). *Mol Cell Endocrinol* 2010;330:17-24.
216. Yakovlev AG, Di Giovanni S, Wang G, Liu W, Stoica B, Faden AI. BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279:28367-74.
217. Ray JE, Garcia J, Jurisicova A, Caniggia I. Mtd/Bok takes a swing: proapoptotic Mtd/Bok regulates trophoblast cell proliferation during human placental development and in preeclampsia. *Cell Death Differ* 2010;17:846-59.
218. Kalkat M, Garcia J, Ebrahimi J, Melland-Smith M, Todros T, Post M, et al. Placental autophagy regulation by the BOK-MCL1 rheostat. *Autophagy* 2013;9:2140-53.
219. Carpio MA, Michaud M, Zhou W, Fisher JK, Walensky LD, Katz SG. BCL-2 family member BOK promotes apoptosis in response to endoplasmic reticulum stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:7201-6.

220. da Costa PJ, Menezes J, Romao L. The role of alternative splicing coupled to nonsense-mediated mRNA decay in human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2017;91:168-75.

Προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής προϊόντων εναλλακτικής συρραφής του ανθρώπινου γονιδίου *BOK* της αποπτωτικής οικογένειας *BCL2*

Πηνελόπη Αρτεμάκη

Διπλωματική Εργασία

Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η απόπτωση είναι ένα είδος προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ενώ θεωρείται ένα από τα πιο μελετημένα. Πληθώρα μορίων εμπλέκεται τόσο στη ρύθμιση όσο και στην πραγματοποίησή της, ενώ εξέχοντα ρόλο κατέχουν τα μέλη της οικογένειας *BCL2*. Τα μέλη της οικογένειας αυτής εμφανίζουν δομική ομολογία μεταξύ τους και μεταξύ του γονιδίου *BCL2* (σε αυτό οφείλουν και το όνομά τους), αφού περιέχουν τουλάχιστον μία εκ των τεσσάρων *BH* επικρατειών (*BH1*, *BH2*, *BH3*, *BH4*). Χωρίζονται βάση της λειτουργικότητάς τους σε δύο κατηγορίες: προαποπτωτικές και αντιαποπτωτικές. Οι δύο κατηγορίες αυτές, συνοδεύονται και από ένα χαρακτηριστικό συνδυασμό *BH* επικρατειών. Πιο συγκεκριμένα, οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν και τις τέσσερις επικράτειες, ενώ οι προαποπτωτικές χαρακτηρίζονται από την απουσία της *BH4* επικράτειας. Στις προαποπτωτικές κατατάσσεται και μία ακόμη ομάδα πρωτεϊνών που φέρουν μόνο την επικράτεια *BH3*.

Η εναλλακτική συρραφή είναι ένας μηχανισμός, που παρατηρείται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, και οδηγεί στην παραγωγή πολλών εναλλακτικών μεταγράφων από ένα μόνο γονίδιο. Τα εναλλακτικά αυτά μετάγραφα, συνήθως, συσχετίζονται με διακριτούς και, συχνά, διαφορετικούς μεταξύ τους ρόλους. Παρά την εκτεταμένη επιστημονική έρευνα στο πεδίο της εναλλακτικής συρραφής υπάρχει πληθώρα μεταγράφων που δεν έχει, ακόμη, ανακαλυφθεί. Ένα από τα γονίδια για τα οποία διαθέτουμε περιορισμένη πληροφόρηση τόσο για το ρόλο του όσο και για την ύπαρξη εναλλακτικών μεταγράφων είναι το *BOK*, μέλος της οικογένειας *BCL2*. Η διερεύνηση εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *BOK* αποτέλεσε το αντικείμενο της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας.

Βασιζόμενοι σε εκτενή βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για τη συλλογή όλων των υπάρχοντων δεδομένων γύρω από το γονίδιο αυτό και στην ακόλουθη πειραματική διαδικασία, η οποία περιλάμβανε, κυρίως, τις τεχνικές τις αντίστροφης μεταγραφής, της απλής PCR, αλλά και της επάλληλης PCR και την αλληλούχηση Sanger, καταλήξαμε στην ύπαρξη 19 νέων εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *BOK*.

Η ύπαρξη των νεών αυτών μεταγράφων ανοίγει ένα νέο δρόμο ερευνητικής πορείας, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει στην αποσαφήνιση του αιγματοτικού ρόλου του γονιδίου αυτού στην απόπτωση, σε άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, αλλά και στη πιθανή εμπλοκή του σε νοσήματα, συμπεριλαμβανομένου και διαφόρων τύπων καρκίνου.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ

A. Πρωτότυπη Δημοσίευση σε Διεθνές Ηλεκτρονικό Επιστημονικό Περιοδικό με Κριτές

- **Artemaki PI**, Scorilas A, Kontos CK. *BOK* (BCL2 family apoptosis regulator BOK). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* (2019); *in press*.

B. Δημοσιεύσεις σε Πρακτικά Διεθνών Επιστημονικών Συνεδρίων

- **Artemaki PI**, Scorilas A, Kontos CK. Identification of new transcripts of the human *BOK* gene, a BCL2 family member. *Int Soc Enz Meeting*: 2019.
- **Artemaki PI**, Tsilikas N, Rapti SM, Adamopoulos PG, Scorilas A, Kontos CK. Alternative splicing of the *BCL2* family members produces new apoptosis-related protein isoforms with distinct combinations of BCL2-homology (BH) motifs. *Proc Adv Cancer Immunol Immunoth*: 2018.

Γ. Β. Πρωτότυπες Καταχωρήσεις Αλληλουχιών στη Διεθνή Τράπεζα Γονιδίων (GenBank® of NCBI)

- **Artemaki PI**, Scorilas A, Kontos CK. BCL-2-related ovarian killer protein transcript variants 2, 5, 9, 11, 12, 16-18, 22, 24 (BOK) mRNA, complete cds. Accession # MK328044, MK328045, MK328047, MK354017, MK354018, MK810726-MK810728, MK810732, and MK810733 (2019).
- **Artemaki PI**, Scorilas A, Kontos CK. Nonfunctional BCL2 family apoptosis regulator transcript variants 7, 13, 14, 19-21, and 25-27 (BOK) mRNA. Accession # MK328046, MK354019, MK354020, MK810729-MK810731, and MK810734-MK810736 (2019).

4th Symposium Advances in Cancer Immunology and Immunotherapy

November 29 - December 1 . 2018 Royal Olympic Hotel Athens | Greece



<http://hellenic-immunooncology.gr/>

Organized by
Hellenic Society of Immuno-Oncology



Under the Auspices of
**National and Kapodistrian
UNIVERSITY OF ATHENS**
School of Science
Faculty of Biology



Specifically, the human MM cell line U-266, as well as primary BM stromal cells (BMSCs) obtained from MM patients' biopsies were cocultured in 2D and 3D cultures using hydrogel (PuraMatrix, BD). Cells were plated in 96-well plates and exposed to the anthracycline doxorubicin (at concentrations 2 μ M, 0.2 μ M and 0.02 μ M) for 48h. Automated analysis and evaluation of single-cell viability was performed using three platforms: A) optical microscopy of cells stained with the Trypan Blue. Pictures were acquired using 4x objective lens (one picture/well). Data were analyzed with Nikon NIS-Elements image analysis software, counted and categorized based on TrypanBlue staining (live vs dead); B) flowcytometry analysis following annexinV/PI staining. Live, early apoptotic and necrotic cells were detected using BD FACSDivasa software; and C) confocal microscopy analysis after Annexin V/PI staining. Fluorescence signals of single cells were quantified with the Nikon NIS-Elements image analysis software. Our initial results indicate that using either platform, the estimation of myeloma cell viability after doxorubicin treatment is feasible. In particular, flow cytometry results (method B) and optical microscopy results (method A) were comparable and in full concordance. Results from the 2D cultures with the use of platform B confirmed the increased resistance of U-266 to doxorubicin (20% differential viability at 2 μ M) after their coculture with BMSCs. Compared to methods A and B, confocal microscopy (method C) had the greatest analytical potential, as it offers the advantage of spatial (x, y, z) and quantitative analysis. Although all methods need to be standardized, our results indicate that the increase in doxorubicin concentration leads not only to increased percentages of necrotic cells but also to increased mean fluorescence intensity. The initial encouraging results of 2D and 3D MM-BMSC cultures should be further optimized and validated in comparison to standard methods evaluating cell viability.

Funding: HESMO, grant number 6954/2017

P3. ALTERNATIVE SPLICING OF THE *BCL2* FAMILY MEMBERS PRODUCES NEW APOPTOSIS-RELATED PROTEIN ISOFORMS WITH DISTINCT COMBINATIONS OF BCL2-HOMOLOGY (BH) MOTIFS

Pinelopi I. Artemaki, Nikolaos V. Tsilikas, Stamatia-Maria Rapti, Panagiotis G. Adamopoulos, Andreas Scorilas, Christos K. Kontos

Department of Biochemistry and Molecular Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Background: The B-cell lymphoma-2 (BCL2) protein family consists of multiple members, best known for their role as key mediators of the intrinsic apoptotic pathway. A distinctive feature of the Bcl-2 family members is the presence of at least one out of four BCL2-homology (BH) motifs (BH1-4). The family consists of both pro- and anti-apoptotic members, competing for their ability to induce or suppress mitochondrial outer-membrane permeabilization (MOMP), respectively. While most of the anti-apoptotic members contain all four BH (BH1-4) motifs, the pro-apoptotic members can be further divided into multi-BH motif members and BH3-only members. Alternative splicing of *BCL2* pre-mRNAs generates a wide variety of transcripts with discrete functions, a significant portion of which has been predicted via bioinformatic analysis. This study focuses on the experimental determination of the exon structures of these transcripts.

Methods: For this purpose, we conducted *in-silico* expressed sequence tag (EST) analysis. ESTs represent short (200-800 nucleotide) cDNA sub-sequences which, through careful pre-processing, clustering and assembling, enable the discovery of novel splice variants. Next, 44 cancer cell lines were subcultured, total RNA was isolated and poly(A) RNA was reversely transcribed into first-strand cDNA. Splice variants were amplified through nested PCR, using unique combinations of exon junction-specific PCR primers. PCR products were submitted to agarose gel electrophoresis, prior to gel extraction and Sanger sequencing.

Results and Conclusions: *in silico* analysis resulted in the identification of novel RNAs containing alternative combinations of previously annotated exons, new splice sites in few of these exons, and intron retentions. Some of the novel transcripts are predicted to encode new protein isoforms that lack one or more BH motifs and are hence likely to differ in their regulatory apoptotic role, whereas other transcripts contain premature translation termination codons and are probably subjected to nonsense-mediated mRNA decay.



International Society for Enzymology Annual Meeting



23th ISE International Conference on Laboratory Medicine and Pathobiology

*An Expert forum on Innovation in Clinical and
Laboratory Medical Sciences*

*June 29 – July 3, 2019
Chios Island, Greece*

ISE 2019

Under the auspices of the:



National and Kapodistrian University of Athens



Identification of new transcripts of the human *BOK* gene, a BCL2 family member.

Pinelopi I. Artemaki, Andreas Scorilas, Christos K. Kontos*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece.

*e-mail: chkontos@biol.uoa.gr

BCL2 family members are involved in several signaling pathways and play a vital role in regulation of cell apoptosis. They share sequence homology with BCL2 in one or multiple BH domains, and can be divided in two categories based on their function: proapoptotic and antiapoptotic members. The proapoptotic members are further classified in two categories: the multi BH-containing (BH1, BH2, and BH3) effector proteins and the proteins which contain only the BH3 domain (BH3-only proteins). The antiapoptotic proteins comprise BH1, BH2, BH3, and BH4 domains. Each BCL2 family member has more than one splice variant and, despite the great research which has been made in this field, a great number of transcripts has not been experimentally confirmed. The existence of multiple splice variants could be attributed to the mechanism of alternative splicing. The variants, which are generated through this mechanism, may have distinct and different roles. One of the members of the family with limited knowledge about its role and its transcripts is "BCL-2-related ovarian killer" (*BOK*). This study focused on the research of alternative transcripts of the human *BOK* gene. Extensive bioinformatic analysis was conducted prior to experimental procedure, aiming to collect all the existing data regarding this gene. Total RNA was isolated from 54 cancer cell lines 4 µg of total RNA were then reversely transcribed. Specific pairs of primers were designed to amplify only sequences derived from *BOK* and were used in PCR and nested PCR, which followed. The PCR products were electrophoresed on an agarose gel, extracted from the gel, and sequenced using the Sanger sequencing method. 19 novel transcripts were discovered, 10 of which have a potential open reading frame (ORF), and therefore are, possibly, translated into a BOK protein isoform. Five BOK protein isoforms have been predicted, except for the known one. The perspective of additional protein isoforms could assist the efforts of the scientific community to thoroughly elucidate and clarify the role of BOK, while it could also serve as a motivation for further research in the field of alternative splicing, combined with proteomics.

Acknowledgements: This work was supported by Special Account for Research Grants of the National and Kapodistrian University of Athens.