



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**Ταυτοποίηση ενός νέου κυκλικού RNA του γονιδίου *PRMT1* σε ανθρώπινα
καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου και *in silico* μελέτη
των αλληλεπιδράσεων του**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΓΙΟΜΑΥΡΙΤΗ ΣΤΕΦΑΝΟΠΟΥΛΟΥ ΕΥΘΑΛΙΑ ΦΑΙΔΡΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΟΝΤΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2021

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο διάστημα μεταξύ Ιανουαρίου 2021 και Σεπτεμβρίου 2021 στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών επιστημών, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Χρήστου Κοντού.

Καταρχάς, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον Επίκουρο Καθηγητή Χρήστο Κοντό, τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντας μου την ευκαιρία να μελετήσω το συγκεκριμένο ερευνητικό θέμα, όσο και για τη συνεχή επίβλεψη και καθοδήγηση του καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας. Η αρωγή και οι γνώσεις του ήταν μείζονος σημασίας για την επιτυχή ολοκλήρωση αυτής της έρευνας καθώς και η αλληλεπίδραση μαζί του διεκπεραιώθηκε κάτω από άψογες συνθήκες.

Ευχαριστώ την Υποψήφια Διδάκτορα Παρασκευή Καρούση για την καθοδήγηση, την υπομονή και την άριστη συνεργασία σε όλο το διάστημα διεξαγωγής της διπλωματικής αυτής εργασίας, που με τη διάθεση και τις αξιόλογες επιστημονικές της γνώσεις συνέβαλε δραστικά και καίρια στην επιτυχή ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά και την Υποψήφια Διδάκτορα Μαρία Παπατσίρου, για τις παρεμβάσεις και τη συμβολή του όποτε ήταν αναγκαίο.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα και την εξαιρετική συνεργασία, τα οποία συντέλεσαν στην εξέλιξη και διεκπεραίωση της διπλωματικής αυτής εργασίας και πιο συγκεκριμένα τις την Υποψήφιες Διδάκτορες Πηνελόπη Αρτεμάκη και Κατερίνα Κατσαράκη, τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Χριστίνα Σωτηροπούλου, καθώς και τους προπτυχιακούς φοιτητές Ιωάννα Ζούπα και Πέτρο Λέτσο.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για τη στήριξη και την αγάπη τους όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και όσους ήταν κοντά μου και με βοήθησαν με τις πολύτιμες συμβουλές τους όλο αυτό το διάστημα.

Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	iii
1.1 Δομή και λειτουργία χρωματίνης	1
1.1.1 Διαμόρφωση χρωματίνης	1
1.1.2 Παράγοντες που εμπλέκονται στο <i>remodelling</i> της χρωματίνης	3
1.2 Μεθυλίωση	3
1.2.1 Μεθυλίωση DNA και Ιστονών	3
1.2.2 Μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης	4
1.2.2 PRMT1	6
1.3 Καρκινός παχέος εντέρου	8
1.3.1 PRMT1 στο καρκίνο του παχέος εντέρου	9
1.4 Κυκλικό RNA	10
1.4.1 Βιογένεση του κυκλικού RNA	10
1.5 Λειτουργίες των κυκλικών RNAs	15
1.5.1 Κυκλικά RNAs και γονικά γονίδια	15
1.5.2 Τα <i>CircRNA</i> μπορούν να ρυθμίσουν την εναλλακτική συρραφή, την μεταγραφή και τη μετάφραση	16
1.5.3 Τα κυκλικά RNAs μπορούν να δράουν ως «σπόγγιο» για <i>microRNAs</i>	16
1.5.4 Τα <i>circRNAs</i> λειτουργούν ως σπόγγιο πρωτεϊνών και συμμετέχουν σε σύμπλοκα αυτών	17
1.5.5 Μεταφράσιμα <i>CircRNAs</i>	18
1.6 Κυκλικά RNAs στο γονίδιο PRMT1	20
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
2.1 Βιολογικό Υλικό	20
2.2 Απομόνωση Νουκλεϊκών Οξέων - RNA	22
2.3 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων	23
2.4 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT)	24
2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	25
2.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	28
2.6 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel extraction)	29
En συνέχεια η ζώνη ενδιαφέροντος που παρατηρήθηκε στο πήκτωμα αφού απομονώθηκε με τη χρήση νυστεριού από τις άλλες, καθαρίστηκε με χρήση μικροφυγοκεντρικών στηλών	29
2.7 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων με φθορισμομετρία	30
2.8 Μέθοδος αλληλούχισης κατά Sanger	30
2.9 Βιοπληροφορική ανάλυση αποτελεσμάτων	32

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	34
3.1 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης.....	34
3.1.1 Έλεγχος έκφρασης του γονιδίου <i>PRMT1</i>	34
3.1.2 Παρατήρηση κυκλικών <i>RNAs</i> στο <i>PRMT1</i>	36
3.2 Βιοπληροφορική ανάλυση του Κυκλικού RNA	44
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	73
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	78
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	80

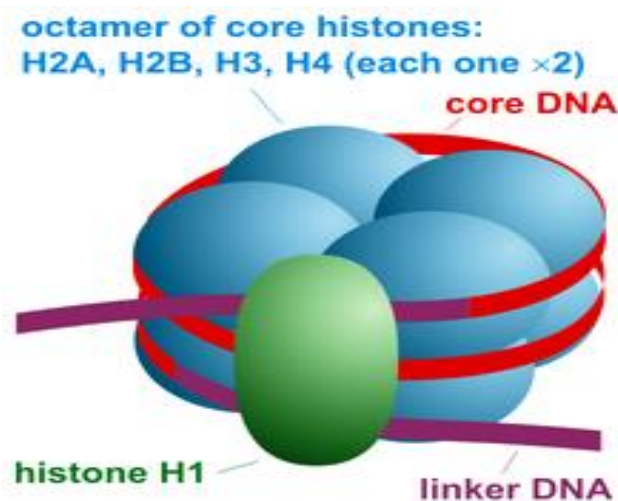
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Δομή και λειτουργία χρωματίνης

1.1.1 Διαμόρφωση χρωματίνης

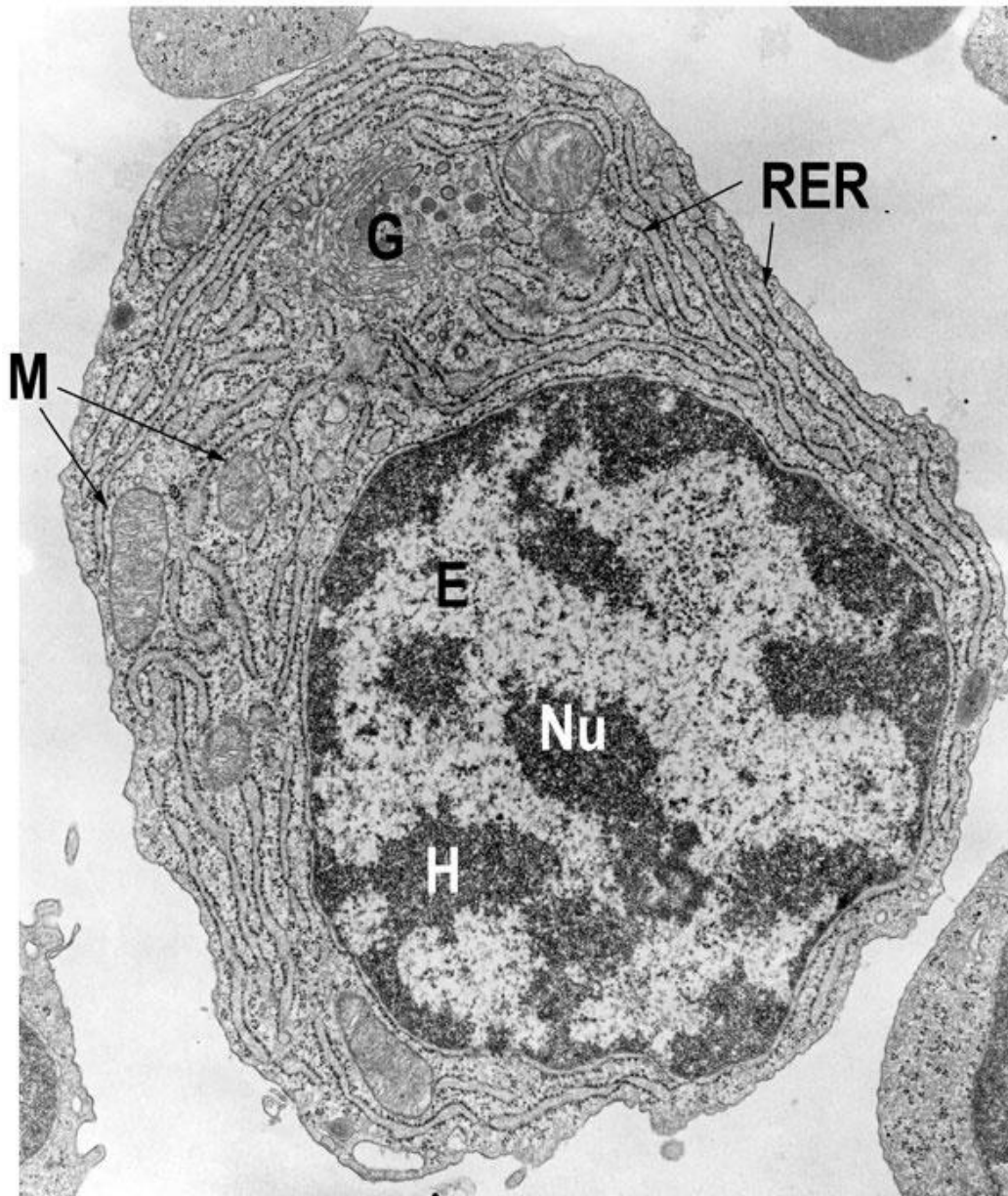
Οι φυσιολογικές λειτουργίες των κυττάρων διασφαλίζονται και διεξάγονται, άμεσα ή έμμεσα, μέσω ενεργοποίησης και καταστολής των ποικίλων γονιδίων τους. Οι γενετικές πληροφορίες που καθοδηγούν την όλη διαδικασία υπάρχουν αποθηκευμένες στα ενδότερα του πυρήνα, λαμβάνοντας μια δομή ανώτερης τάξης γνωστή ως χρωματίνη.

Τα βασικά δομικά συστατικά της χρωματίνης είναι τα νουκλεοσώματα, τα οποία αποτελούνται από 146 ζεύγη βάσεων του DNA. Τα ζεύγη αυτά είναι τυλιγμένα γύρω από ένα οκταμερές που περιέχει τέσσερα ζεύγη από πυρηνικές ιστόνες, τις H2A, H2B, H3 και H4 (εικόνα 1.1). Τα νουκλεοσώματα βρίσκονται με τη σειρά τους τυλιγμένα με τη βοήθεια της συνδετικής ιστόνης H1 και άλλων πρωτεϊνών, σε ένα οργανωμένο, νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο. Η χρωματίνη μπορεί να διαιρεθεί λειτουργικά σε δύο υποκατηγορίες, την ευχρωματίνη και την ετεροχρωματίνη. Η ετεροχρωματίνη είναι ένα είδος συμπυκνωμένης χρωματίνης που βρίσκεται, για παράδειγμα, σε ειδικές χρωματοσωματικές δομές, όπως τα κεντρομερή και τα τελομερή. Ελάχιστο τμήμα από τις κωδικοποιούσες αλληλουχίες βρίσκονται στην ετεροχρωματίνη. Η μεγάλη πλειοψηφία των γονιδίων βρίσκεται στην ευχρωματίνη (εικόνα 1.2) [1, 2].



Εικόνα 1.1: Το νουκλεόσωμα. Με κόκκινο χρώμα διακρίνεται η διπλή έλικα του DNA, με μπλε το οκταμερές των ιστονών H2A, H2B, H3 και H4 και με πράσινο η ιστόνη H1 [3].

Η έκφραση των γονιδίων, τα οποία συναντώνται κυρίως στην περιοχή της ευχρωματίνης, εξαρτάται άρρηκτα από ρυθμιστικές δομικές αλλαγές, που είναι ικανές να μεταβάλουν την αρχιτεκτονική της χρωματίνης. Κατά την τελευταία δεκαετία σημειώθηκε έκρηξη πληροφοριών σχετικών με τους παράγοντες που αναδιαμορφώνουν τη χρωματίνη και τη συμμετοχή τους στη γονιδιακή ρύθμιση [4, 5].



Εικόνα 1.2: Η γραφική αναπαράσταση του πώς φαίνονται η ευχρωματίνη και η ετεροχρωματίνη. Nu: Πυρήνας, E: Ευχρωματίνη, H: Ετεροχρωματίνη, M: Μιτοχόνδρια, RER: Αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο [4].

1.1.2 Παράγοντες που εμπλέκονται στο *remodelling* της χρωματίνης

Μετα-μεταγραφικές μεταβολές των απολήξεων των πυρηνικών ιστονών (histone tails) είναι γνωστό ότι εμφανίζονται σε συγκεκριμένες φάσεις της χρωματίνης. Πολλές μελέτες υποθέτουν ότι αυτές οι μεταβολές μπορούν να επηρεάσουν την τάση σύνδεσης μεταξύ ιστονών και DNA, μειώνοντας ή αυξάνοντας τη μεταξύ τους σχέση. Οι απολήξεις των πυρηνικών ιστονών μπορούν να μεταβληθούν μέσω ακετυλίωσης, μεθυλίωσης ή φωσφορυλίωσης [6, 7].

Η μεθυλίωση συγκεκριμένων μορίων λυσίνης στις ιστόνες H3 και H4 θεωρείται υπεύθυνη για την ενίσχυση της σχέσης τους με το DNA γεγονός που συμφωνεί με τη συσχέτιση μεταξύ καταστολής γονιδίων και μεθυλίωσης των ιστονών. Για πολλά χρόνια, η φωσφορυλίωση της σερίνης των ιστονών H1 και H3 έχει ενοχοποιηθεί για το φαινόμενο της χρωματοσωματικής συμπίκνωσης κατά τη διάρκεια της μίτωσης [8, 9].

Η ακετυλίωση των ιστονικών λυσινών έχει συνδεθεί με αυξημένη μεταγραφή. Η ακετυλίωση των ιστονών θεωρείται υπεύθυνη για το συνολικό θετικό φορτίο των απολήξεων, γεγονός που προκαλεί μια χαλαρή κατάσταση του DNA μέσα στο νουκλεόσωμα, μέσω μείωσης των ηλεκτροστατικών επαφών μεταξύ ιστονών και DNA [10]. Οι αρχικές μελέτες συσκοτίστηκαν από την έλλειψη γνώσης σχετικής με τους παράγοντες που ευθύνονται γι' αυτές τις μεταβολές. Το σκηνικό, όμως, άλλαξε με το χαρακτηρισμό της πρώτης ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών (histone acetyltransferase - HAT) στο μικροοργανισμό *Tetrahymena thermophila*, ο οποίος συνοδεύθηκε από την ανακάλυψη πολλών άλλων ενζύμων και παραγόντων που επηρεάζουν τη χρωματίνη [11].

1.2 Μεθυλίωση

1.2.1 Μεθυλίωση DNA και Ιστονών

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών είναι ένας σημαντικός τρόπος επέκτασης της δομικής και λειτουργικής πολυπλοκότητας του πρωτεώματος. Ανάλογα με τη λειτουργία τους, οι μετα-μεταφραστικές ρυθμίσεις μπορεί να είναι είτε παροδικές είτε σταθερές. Παρότι οι παροδικές τροποποιήσεις, αποτελούν τη βάση της κυτταρικής σηματοδότησης και δρουν ως αναστρέψιμοι διακόπτες ενεργοποίησης, σταθερές τροποποιήσεις όπως η γλυκοζυλίωση ή η πρωτεολυτική επεξεργασία, συνήθως επηρεάζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών, συχνά χωρίς άμεση επίδραση στη δράση της πρωτεΐνης [12]. Ωστόσο, οι μοριακοί μηχανισμοί που συνδέουν την τροποποίηση με οποιαδήποτε λειτουργική απόκριση, μόλις πρόσφατα έχουν αρχίσει να κατανοούνται [13].

Η παρουσία συγκεκριμένων θέσεων μεθυλίωσης καταλοίπων λυσίνης και αργινίνης κοντά σε θέσεις ακετυλίωσης και φωσφορυλίωσης των αμινοτελικών άκρων των ιστονών, υποδηλώνουν πιθανή συνεργασία μεταξύ των διαφόρων τύπων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών, ώστε να καθορίζεται η δομή της χρωματίνης και κατ' επέκταση να ρυθμίζεται η μεταγραφή των γονιδίων. Συγκεκριμένοι συνδυασμοί ομοιοπολικών τροποποιήσεων μπορούν να διασπούν και / ή να ενισχύουν την αλληλεπίδραση ανάμεσα στις ουρές των ιστονών, του DNA και άλλων πρωτεϊνών. Η μεθυλίωση θα μπορούσε επίσης να επηρεάσει την επάρκεια με την οποία πραγματοποιούνται άλλου είδους ομοιοπολικές τροποποιήσεις στα μόρια των ιστονών [8, 14].

Παρόλο που τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA φαίνεται να είναι σχετικά σταθερά σε σωματικά κύτταρα, τα πρότυπα μεθυλίωσης ιστόνης μπορούν να αλλάξουν γρήγορα κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Παρά τη διαφορά αυτή, όπως αναφέρεται και παραπάνω αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η μεθυλίωση DNA και η μεθυλίωση ιστόνης σε ορισμένες θέσεις συνδέονται [15]. Για παράδειγμα, τα αποτελέσματα των μελετών ανοσοκαταβύθισης που χρησιμοποιούν ανθρώπινα κύτταρα υποδηλώνουν ότι η μεθυλίωση DNA και η μεθυλίωση ιστόνης συνεργάζονται κατά τη διάρκεια της αντιγραφής για να διασφαλιστεί ότι συγκεκριμένα πρότυπα μεθυλίωσης μεταδίδονται στα κύτταρα απογόνων. Πράγματι, έχουν παρουσιαστεί στοιχεία ότι σε ορισμένους οργανισμούς, όπως *Neurospora crassa* και *Arabidopsis thaliana*, απαιτείται μεθυλίωση H3-K9 (μεθυλίωση συγκεκριμένου υπολείμματος λυσίνης στην ιστόνη H3) προκειμένου να λάβει χώρα μεθυλίωση DNA. Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί εξαιρέσεις στις οποίες η σχέση αντιστρέφεται [16, 17].

1.2.2 Μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης

Από τη σκοπιά της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, η μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης φαίνεται να λειτουργεί ως επιγενετικός δείκτης στην χρωματίνη, όπως και η μεθυλίωση καταλοίπων λυσίνης, συμμετέχοντας στον ιστονικό κώδικα και επηρεάζοντας την έκφραση της γενετικής πληροφορίας τοπικά. Επιπλέον, τέτοιου είδους ομοιοπολικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των αμινοξικών καταλοίπων ενσωματώνονται στις πρωτεΐνες από τα ριβοσώματα, κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνοσύνθεσης [18].

Οι αντιδράσεις μεθυλίωσης αποτελούν μη αντιστρεπτές τροποποιήσεις παραλλάσσοντας αποτελεσματικά τα αμινοξέα στόχους με συνέπεια τη διεύρυνση της χημικής ποικιλομορφίας των πολυπεπτιδίων. Πιο συγκεκριμένα, η μεθυλίωση πρωτεϊνών αφορά τη μεταφορά μεθυλικών ομάδων από το μόριο της S-αδενοσυλμεθειονίνη σε ομάδες-δέκτες πάνω στα πρωτεϊνικά υποστρώματα. Οι διάφορες πρωτεΐνες μπορούν να μεθυλιωθούν σε κατάλοιπα

αργινίνης, λυσίνης, ιστιδίνης ή ακόμα και σε καρβοξυλικά κατάλοιπα. Η μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης στις πρωτεΐνες εμφανίζεται στα περισσότερα κύτταρα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών, καθώς και σε κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως το τρυπανόσωμα [18, 19].

Με την μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης είναι δυνατή η παραγωγή τριών πιθανών προϊόντων. Η αντίδραση πραγματοποιείται είτε σε ένα είτε και στα δυο τελικά άτομα αζώτου της γουανιδίνης και μπορεί να οδηγήσει στα εξής προϊόντα:

1) μονομεθυλαργινίνη,

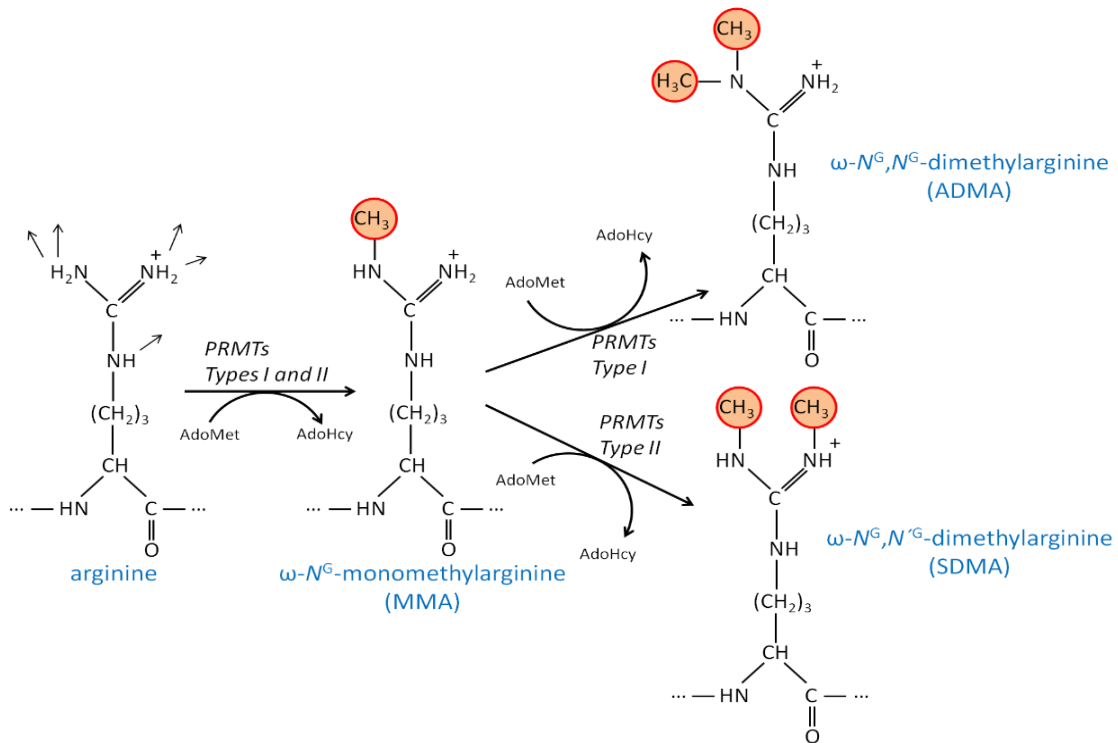
2) N^G , N^G - διμεθυλαργινίνη, στην οποία και οι δυο μεθυλικές ομάδες βρίσκονται στο ίδιο άτομο αζώτου (ασύμμετρη διμεθυλαργινίνη) και

3) N^G , N^G - διμεθυλαργινίνη, στην οποία κάθε άτομο αζώτου λαμβάνει μια μεθυλική ομάδα (συμμετρική διμεθυλαργινίνη).

Έχουν εντοπιστεί τουλάχιστον τρεις διακριτές τάξεις πρωτεϊνικών N - μεθυλοτρανσφερασών αργινίνης, υπεύθυνες για την παραγωγή των παραπάνω δομών. Το ένζυμο τύπου I καταλύει το σχηματισμό της N^G - μονομεθυλαργινίνης, καθώς και των ασύμμετρων καταλοίπων N^G , N^G - διμεθυλαργινίνης. Το ένζυμο τύπου II καταλύει επίσης το σχηματισμό της N^G - μονομεθυλαργινίνης, αλλά και των συμμετρικών καταλοίπων N^G , N^G - διμεθυλαργινίνης [20, 21].

Τέλος, το ένζυμο τύπου III καταλύει τη μονομεθυλίωση του εσωτερικού ατόμου αζώτου της γουανιδίνης προς σχηματισμό του καταλοίπου ω- N^G - μονομεθυλαργινίνης (εικόνα 1.3). Ωστόσο, η ακριβής σημασία της συμμετρικής ή ασύμμετρης μεθυλίωσης της αργινίνης, όσον αφορά την κυτταρική λειτουργία, είναι ένα ακόμα ερώτημα που πρέπει να διευκρινιστεί [20, 21].

Βασιζόμενοι στη μέχρι τώρα αποκτηθείσα γνώση, η μεθυλίωση από τις πρωτεϊνικές μεθυλοτρανσφεράσες αργινίνης (protein arginine methyltransferases - PRMTs) μπορεί να αποτελεί μια σημαντική ρυθμιστική τροποποίηση για τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταμεταφραστική ρύθμιση, την ωρίμανση και την μεταφορά του RNA. Επιπλέον, αυτή η σταθερή και δυναμική τροποποίηση είναι πολύ πιθανό να συσχετίζεται με κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι η σηματοδότηση, η επιδιόρθωση του DNA, η προστασία των πρωτεϊνών, η συναρμολόγηση των ριβοσωμάτων καθώς και η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [13].



Εικόνα 1.3: Μεθυλίωση της πλευρικής αλυσίδας αργινίνης σε πρωτεΐνες με πρωτεϊνικές μεθυλοτρανσφεράσες αργινίνης (PRMTs). Το κατάλοιπο αργινίνης περιέχει 5 πιθανούς δότες δεσμών υδρογόνου. Οι PRMTs των θηλαστικών χρησιμοποιούν την ομάδα μεθυλίου από ένα μόριο S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνης (AdoMet) για να σχηματίσουν ω -N^G-μονομεθυλαργινίνη (MMA). Στη συνέχεια, οι PRMT τύπου I προσθέτουν μια ομάδα μεθυλίου στο ίδιο άτομο αζώτου σχηματίζοντας ω -N^G, N^G-διμεθυλαργινίνη (ADMA), ενώ οι PRMT τύπου II παράγουν ω -N^G, N^O-διμεθυλαργινίνη (SDMA) [20].

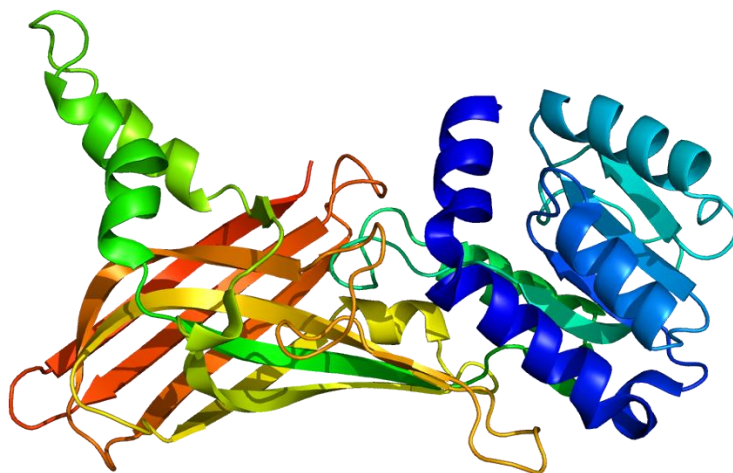
1.2.2 PRMT1

Για να κατανοηθεί η επίδραση της μεθυλίωσης στα κατάλοιπα αργινίνης στις κυτταρικές λειτουργίες, έχουν γίνει προσπάθειες να απομονωθούν, να κλωνοποιηθούν και να χαρακτηριστούν τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για αυτήν την τροποποίηση, με αποτέλεσμα να ανακαλυφθεί μία μικρή οικογένεια πρωτεϊνών που λειτουργούν ως μεθυλοτρανσφεράσες αργινίνης (PRMTs). Στα κύτταρα στον άνθρωπο, η οικογένεια PRMT αποτελείται από 9 μέλη (εικόνα 1.4) [22, 23].

PRMTs	Domains	Family
PRMT1	1 316	Type I
PRMT2	1 SH3 433	Type I
PRMT3	1 zinc finger 531	Type I
PRMT4 (CARM1)	1 608	Type I
PRMT5	1 637	Type II
PRMT6	1 375	Type I
PRMT7	1 692	Type III
PRMT8	1 Myr 394	Type I
PRMT9	1 FBox zinc finger 843	Type II

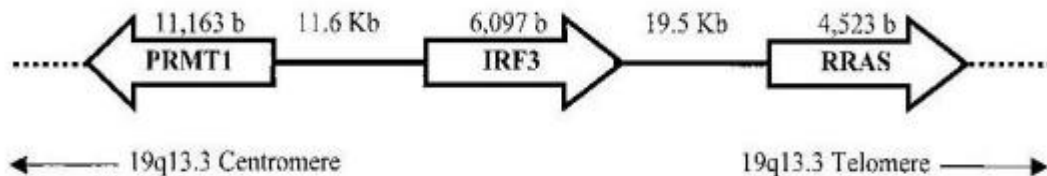
Εικόνα 1.4: Επισκόπηση της ανθρώπινης οικογένειας PRMT. Οι καταλυτικές περιοχές μεθυλτρανσφεράσης περιέχουν μια διατηρημένη περιοχή σύνδεσης (γκρι) με διατηρημένα μοτίβα (μαύρα) που είναι σημαντικά για την ενζυματική αντίδραση. Πρόσθετα μοτίβα: τομέας SH3, τομέας δακτύλου ψευδαργύρου, μοτίβο μυριστουλίωσης, μοτίβο FBox [24].

Το γονίδιο PRMT1 (εικόνα 1.5) αποτελεί μέλος την παραπάνω οικογένειας και κωδικοποιεί την πρωτεϊνική μεθυλτρανσφεράση αργινίνης που λειτουργεί ως μεθυλτρανσφεράση ιστόνης ειδική για την ιστόνη H4 σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Δρα ως ένζυμο τύπου I, καταλύοντας το σχηματισμό ασύμμετρα διμεθυλιωμένης αργινίνης. Ακόμα, το PRMT1 συνιστά το πιο κυρίαρχο PRMT τύπου I σε κύτταρα θηλαστικών, αντιπροσωπεύει το 85% της κυτταρικής δραστηριότητας PRMT και εμπλέκεται σε πολλές βιολογικές λειτουργίες [22]



Εικόνα 1.5: Δομή της πρωτεΐνης PRMT1.

Το γονίδιο PRMT1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 (γενετικός τόπος 19q13.3). Το γονίδιο εκτείνεται σε μια γενωμική περιοχή μήκους 11,163 ζευγών βάσεων και αποτελείται από 12,11 ή 10 εξώνια, εφόσον εντοπίζονται τρεις ισομορφές του γονιδίου στους υγιείς ιστούς που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA. Με σύγκριση της αμινοξικής τους ακολουθίας φαίνεται πως είναι όλες ενεργές μεθυλτρανσφεράσες, αλλά διαφέρουν στην υδρόφοβη αμινοτελική περιοχή. Η θέση του PRMT1 σε σχέση με τα άλλα δυο γονίδια φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί). Το RRAS (related RAS viral oncogene homolog) είναι το πιο τελομερικό, ακολουθούμενο από το IRF3 (interferon regulatory factor 3) και το PRMT1, αντίστοιχα. Το PRMT1 μεταγράφεται με κατεύθυνση αντίθετη από αυτή της μεταγραφής των άλλων δύο γονιδίων. Η απόσταση μεταξύ των RRAS και IRF3 έχει υπολογιστεί σε 19.5kb, ενώ το PRMT1 βρίσκεται κατά 11.6kb κεντρομερικά του IRF3 (εικόνα 1.6) [25].



Εικόνα 1.6: Χαρτογράφηση του γονιδίου PRMT1 στην χρωμοσωμική περιοχή 19q13.3 [25].

Η έκφραση του PRMT1 έχει ανιχνευτεί σε μία πληθώρα ιστών. Έχει παρατηρηθεί επίσης, ότι η σχετική αφθονία των εναλλακτικών ισομορφών διαφέρει μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών ιστών μαστού [26]. Ενδεχομένως, σημαντικό ρόλο στην έκφραση του σε φυσιολογικούς και μη ιστούς διαδραματίζουν τα μη κωδικά μόρια RNAs (ncRNAs). Ωστόσο, τα δεδομένα είναι λιγοστά σχετικά με τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου, καθώς και για τον ακριβή του ρόλο στην εξέλιξη της καρκινογένεσης [27].

1.3 Καρκινός παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του ορθού είναι ο τρίτος πιο κοινός τύπος παγκοσμίως. Στην Ευρώπη περίπου 250.000 νέα περιστατικά παχέος εντέρου διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 9% όλων των κακοηθειών. Τα ποσοστά αυτού του καρκίνου αυξάνονται με την εκβιομηχάνιση και την αστικοποίηση [28].

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου εμφανίζεται συχνότερα σποραδικά και κληρονομείται μόνο στο 5% των περιπτώσεων. Η διαίτα είναι σίγουρα ο πιο σημαντικός εξωγενής παράγοντας που έχει εντοπιστεί μέχρι τώρα στην αιτιολογία του καρκίνου του παχέος εντέρου. Πρόσφατα, το Παγκόσμιο Ταμείο Έρευνας για τον Καρκίνο και το Αμερικανικό Ινστιτούτο Έρευνας για τον Καρκίνο στην εκτενή τους έκθεση σχετικά με την επιστημονική βιβλιογραφία σχετικά με τη

διατροφή, τη σωματική δραστηριότητα και την πρόληψη του καρκίνου, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο καρκίνος του παχέος εντέρου μπορεί να προληφθεί ως επί το πλείστον με κατάλληλες δίαιτες και συναφείς παράγοντες [28, 29].

Επιπλέον, υπό βιολογική σκοπιά η ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων που περιλαμβάνει διαδοχική απώλεια γονιδίων και κυτταρικών αλλαγών. Ωστόσο, χάρις της ταχείας προόδου και εξέλιξης στις τεχνικές της μοριακής βιολογίας καθίσταται δυνατός ο χαρακτηρισμός και η μελέτη των γενετικών αλλαγών που πιστεύεται ότι ευθύνονται για αυτή τη διαδικασία πολλαπλών βημάτων [28, 29].

1.3.1 PRMT1 στο καρκίνο του παχέος εντέρου

Υπάρχουν δεδομένα που καταδεικνύουν πιθανή σχέση της λειτουργία του πρωτεϊνικού προϊόντος του PRMT1 με τον καρκίνο. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου η υπερέκφραση ορισμένων από τα υποστρώματα του ενζύμου καθώς και η δραματική αύξηση της κυτταρικής μεθυλίωσης καταλοίπων αργινίνης. Όσον αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου φαίνεται να σχετίζεται με γεγονότα μεθυλίωσης. Τα ένζυμα που καταλύουν τη μεθυλίωση των ιστόνων είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τη διατήρηση ενός συγκεκριμένου μεταγραφικού προγράμματος και τον καθορισμό της κυτταρικής ταυτότητας και πορείας [30-32].

Ακόμα, έχει σημειωθεί πως η δράση της μεθυλοτρανσφεράσης αργινίνης εμφανίζεται αντιστρόφως ανάλογη της κυτταρικής ανάπτυξης και της ογκογένεσης. Το PRMT1 αναφέρθηκε ότι αυξορυθμίζεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου και σχετίζεται με αρνητική πρόγνωση της ασθένειας [30, 31].

Ισομορφές του γονιδίου έχει ανακαλυφθεί ότι συνδέονται άμεσα με το καρκίνο του παχέος εντέρου και την εξέλιξη του. Έχει διαπιστωθεί ότι η έκφραση του PRMT1 v1, μια παραλλαγή του γονιδίου που προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα, σχετίζεται με τα κλινικά και ιστολογικά δεδομένα του όγκου. Πρώτα απ' όλα, η έκφραση της παραλλαγής v1 φαίνεται να αυξάνεται κατά την εξέλιξη της νόσου. Επιπλέον, τα επίπεδα της ισομορφής v1 είναι σημαντικά υψηλότερα στον ιστό του καρκίνου του παχέος εντέρου σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό. Παρόμοια, ευρήματα υπάρχουν και για την παραλλαγή v2, η οποία επίσης μπορεί να θεωρηθεί ως δείκτης δυσμενούς πρόγνωσης σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου [31].

1.4 Κυκλικό RNA

Το κυκλικό RNA (ή το CircRNA) είναι ένας τύπος μονόκλωνου RNA το οποίο, σε αντίθεση με το γραμμικό RNA, σχηματίζει έναν ομοιοπολικά κλειστό, συνεχή βρόχο και αποτελεί μια μεγάλη κατηγορία μη κωδικοποιητικού RNA που παράγεται από ένα μη κανονικό συμβάν ματίσματος. Ως εκ τούτου, στο κυκλικό RNA, τα άκρα 3' και 5' που υπάρχουν συνήθως σε ένα μόριο RNA έχουν ενωθεί με επανασύνδεση εξωνίων από ένα μόνο προ-mRNA. Αυτή η δυνατότητα παρέχει πολλές ιδιότητες σε κυκλικό RNA, πολλές από τις οποίες έχουν πρόσφατα παρατηρηθεί και μελετηθεί [33, 34].

Σύγχρονες μελέτες επισημαίνουν ότι τα κυκλικά RNA εκφράζονται ευρέως σε κύτταρα θηλαστικών και επενεργούν σε συγκεκριμένου κυτταρικούς τύπους και ιστούς. Παρά τα κατά κύριο λόγο χαμηλά επίπεδα έκφρασης τους, τα μόρια αυτά εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης σε εκάστοτε κυτταρικό τύπο και ιστό. Ακόμη, είναι αξιοσημείωτο ότι, η έκφραση ενός υποσυνόλου των CircRNAs είναι ανεξάρτητη από τις γραμμικές ισομορφές τους, με αποτέλεσμα να σημειώνουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης από αυτά των αντίστοιχων γραμμικών mRNA τους. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι τα circRNAs συμμετέχουν στη ρύθμιση ποικίλων βιολογικών διεργασιών. Έτσι, είναι ικανά να επηρεάσουν την κυτταρική φυσιολογία και λειτουργία μέσω διαφόρων μοριακών μηχανισμών, όπως με το να δεσμεύουν microRNAs ή πρωτεΐνες που προσδένονται στο RNA επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης ή/και της μετάφρασης ρυθμιστικών πρωτεϊνών [35].

Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι κάποια κυκλικά RNAs κωδικοποιούν πρωτεΐνες καθώς και ότι ορισμένοι τύποι κυκλικού μπορούν να δράσουν ως ρυθμιστές γονιδίων. Ωστόσο, η βιολογική λειτουργία του περισσότερου κυκλικού RNA είναι μέχρι στιγμής ασαφής [35].

Τα CircRNAs βρίσκονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και η έλλειψη πολυ(A) ουράς και καλύπτρας, συνήθως, τα καθιστά τα κυκλικά αυτά μόρια πιο ανθεκτικά στην αποδόμηση από RNase σε σύγκριση με τα γραμμικά συγγενή τους. Η ύπαρξη circRNAs θηλαστικών αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1979 από τον Hsu, ο οποίος παρατήρησε τις συγκεκριμένες δομές στο κυτταρόπλασμα του HeLa και άλλων κυττάρων θηλαστικών με τη μέθοδο της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας [36].

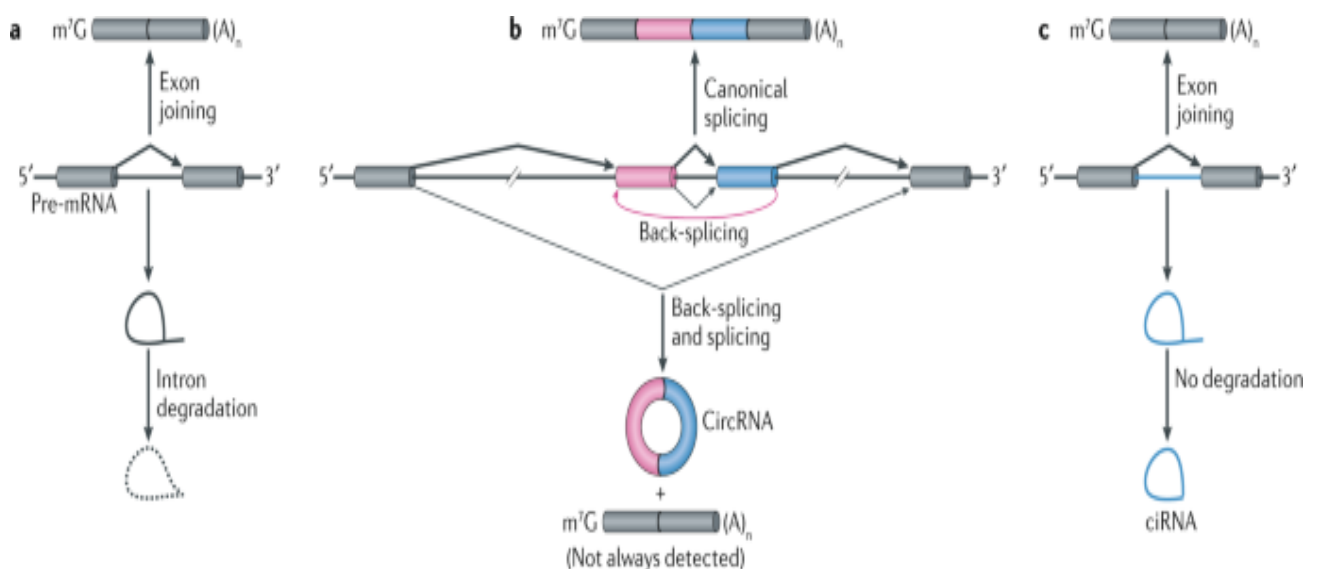
1.4.1 Βιογένεση του κυκλικού RNA

Η βιογένεση των κυκλικών RNAs ρυθμίζεται στενά από cis- (ιντρονικές συμπληρωματικές αλληλουχίες) και/ή trans-παράγοντες (παράγοντες ματίσματος) που συνιστούν ένα κυτταρικό και εξαρτώμενο από το περιβάλλον ρυθμιστικό σύνολο με σκοπό τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Είναι γνωστό ότι τα ευκαρυωτικά πρόδρομα mRNAs (προ-mRNAs) μεταγράφονται

με RNA πολυμεράση II (Pol II) και υφίστανται μάτισμα για την απομάκρυνση των ιντρονίων και στη συνέχεια ένωση των εξωνίων τους για να αποδώσουν ώριμα και λειτουργικά mRNAs (Εικόνα 1.7.α) [33, 37].

Σε αντίθεση με τα γονίδια στα βακτήρια, τα ευκαρυωτικά γονίδια χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη των μη κωδικοποιητικών αλληλουχιών που ονομάζονται ιντρόνια. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, καθώς ένα γονίδιο μεταγράφεται από το DNA σε αγγελιοφόρο RNA (mRNA), τα παρεμβαλλόμενα ιντρόνια απομακρύνονται, αφήνοντας μόνο εξώνια στο ώριμο mRNA. Το spliceosome, ένα σύμπλοκο πρωτεΐνης-RNA που βρίσκεται στον πυρήνα, καταλύει το μάτισμα με τον ακόλουθο τρόπο:

Το spliceosome αναγνωρίζει ένα ιντρόνιο, το οποίο πλαισιώνεται από συγκεκριμένες αλληλουχίες στα 5' και 3' άκρα του, γνωστές ως θέση ματίσματος δότη και θέση ματίσματος δέκτη, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, το 5' άκρο υποβάλλεται σε πυρηνόφιλη προσβολή από μια καθοδική ακολουθία που ονομάζεται σημείο διακλάδωσης, καταλήγοντας σε μια κυκλική δομή σε σχήμα βρόχου. Τέλος, Το ελεύθερο 5' εξώνιο επιτίθεται στη θέση ματίσματος δέκτη, ενώνοντας τα δύο εξώνια και απελευθερώνοντας το εσώνιο, το οποίο τάχιστα αποικοδομείται [33, 37, 38].



Σχήμα 1.7: Back-splicing και εναλλακτικό (back-) splicing στο σχηματισμό κυκλικών RNAs. Α. Απεικόνιση ενός γονιδίου που δείχνει τη σύνδεση δύο γειτονικών εξωνίων (κύλινδροι). Ο βρόχος εσωνίου αποικοδομείται γρήγορα μετά το μάτισμα.

B. Το κυκλικό RNA (circRNA) παράγεται μέσω της επανασύνδεσης των εξονίων. Ένα πρόδρομο mRNA (προ-mRNA) μπορεί να υποβληθεί είτε σε κανονικό μάτισμα ώστε να παραχθεί ένα γραμμικό mRNA (πάνω), είτε σε οπίσθιο μάτισμα για να παραχθεί ένα CircRNA και ένα εναλλακτικά ματισμένο γραμμικό mRNA με χωρίς εξόνια (κάτω).

Γ. Ένα κυκλικό ιντρονικό RNA (ciRNA) προέρχεται από ένα βρόχο ιντρονίου, ο οποίος περιέχει συναινετικές αλληλουχίες RNA που του επιτρέπουν να αποφεύγει την αποδιάταξη [38].

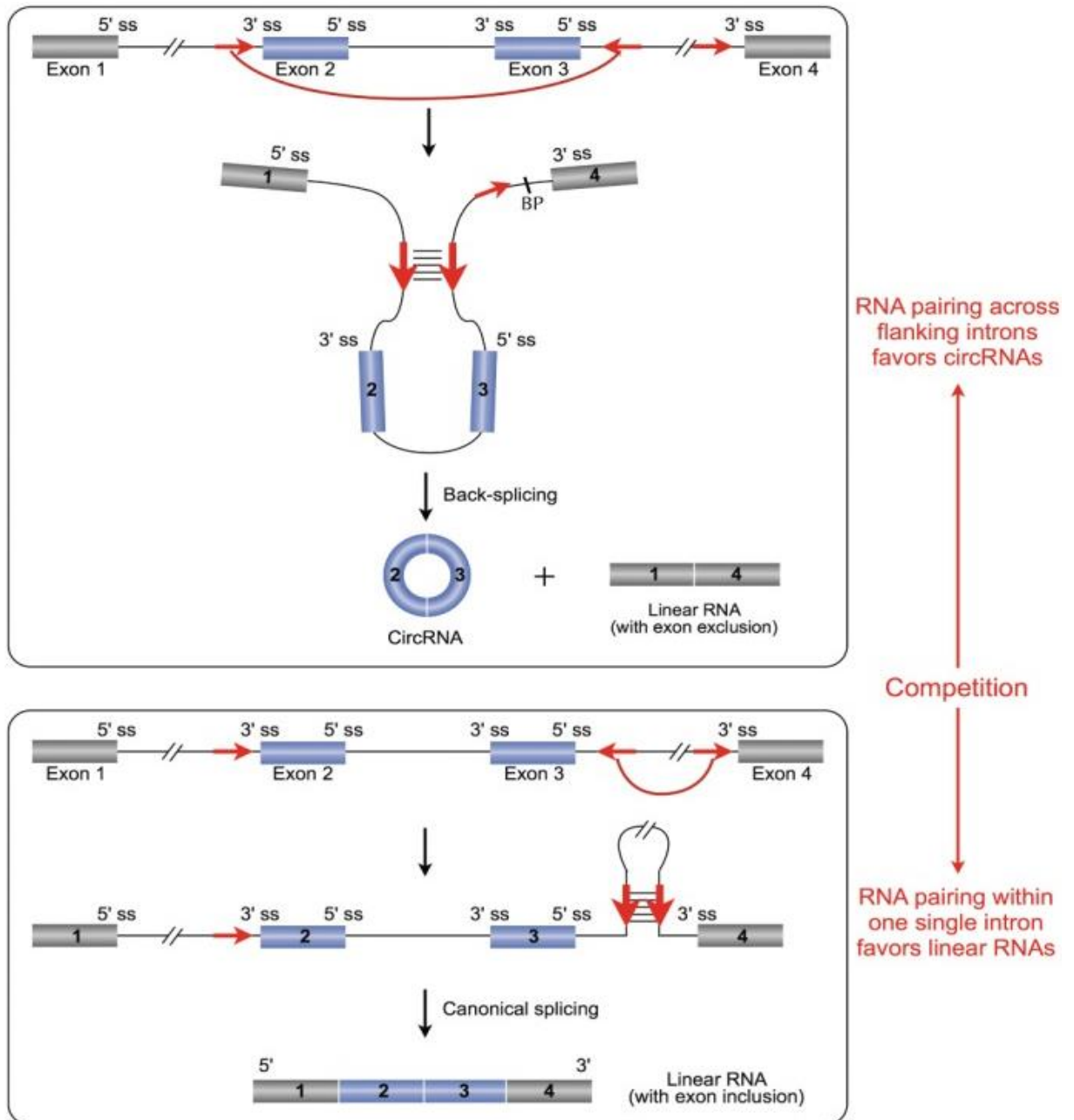
Ωστόσο, πέρα από το συμβατικό μάτισμα πολλά προ-mRNAs μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία μέσω οπίσθιας συρραφής (back-splicing), στην οποία μια κατάντη 5' θέση ματίσματος ενώνεται σε μια ανάντη 3' θέση ματίσματος σε αντίστροφη σειρά σε ένα εξόνιο ή εξόνια, για να σχηματίσουν κυκλικά RNAs (circRNAs) μέσω ενός 3', 5'-φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των εξονίων που έχουν οπισθοσυρραφεί. Επομένως, η επανασύνδεση των εξονίων για σχηματισμό κυκλικού RNA είναι ένας ασυνήθιστος τύπος εναλλακτικού ματίσματος [38].

Μελέτες σχετικά με τα εξόνια που σχηματίζουν circRNAs έχουν τονίσει ότι η διαδικασία της οπισθοσυρραφής απαιτεί τις 3' και 5' θέσεις ματίσματος και την αρωγή του σωματίου συρραφής. Ακόμη έχει παρατηρηθεί ότι δεν απαιτούνται συγκεκριμένα πρότυπα για την κυκλοποίηση του RNA εκτός από τις θέσεις ματίσματος, ωστόσο υπάρχει ένα ελάχιστο μήκος εξονίου που είναι ικανό να σχηματίσει κυκλικό RNA και τα περισσότερα ενδογενή ανθρώπινα circRNAs περιέχουν αρκετά εξόνια, συνήθως δύο ή τρία. Επιπλέον, διαφορετικά CircRNAs μπορούν να παραχθούν από την ίδια αλληλουχία μέσω εναλλακτικού ματίσματος. Εναλλακτικά, τα εσόνια που αποκόπτονται κατά τη συμβατική σύνδεση μπορεί μερικές φορές να διαφύγουν και να υιοθετήσουν μια κυκλική μορφή μεταξύ του δότη ματίσματος και του σημείου διακλάδωσης (Εικόνα 1.7.γ) [38].

Αν και όπως προαναφέρθηκε τα κυκλικά RNAs είναι πιο σταθερές δομές από αντίστοιχα γραμμικά τους και καταλύονται από το ίδιο σωματίο συρραφής, τα περισσότερα CircRNA είναι λιγότερο παρόντα στο κυτταρικό περιβάλλον από τα αντίστοιχα γραμμικά mRNA. Μία πιθανή εξήγηση αυτού του γεγονότος είναι ότι ο σχηματισμός της κυκλικής δομής δεν είναι τόσο ευνοϊκός και ως εκ τούτου καταλύεται λιγότερο αποτελεσματικά από το σωματίο. Για να ξεπεραστεί αυτό το φυσικό μειονέκτημα, απαιτούνται τόσο cis-στοιχεία όσο και trans-παραγόντες για να φέρουν κοντά τις τοποθεσίες του δότη και του αποδέκτη έτσι ώστε να επιτευχθεί το back-splicing. Για παράδειγμα, πρόσφατες μελέτες έχουν αναφέρει ότι η επεξεργασία των CircRNAs μπορεί να διευκολυνθεί είτε μέσω ζευγαρώματος

αντιπαράλληλων συμπληρωματικών αλληλουχιών RNA που οριοθετούνται κατά μήκος των γειτονικών εσώνίων τους ή πρωτεϊνικών παραγόντων που συνδέονται με προ-mRNAs ώστε να γεφυρώσουν τα γειτονικά εσώνια μεταξύ τους. Συνεπώς, η σύζευξη αλληλουχιών RNA μπορεί να σχηματιστεί είτε από επαναλαμβανόμενα στοιχεία, όπως από τα συχνά απαντούμενα στοιχεία Alu στον άνθρωπο, είτε από μη επαναλαμβανόμενες αλλά συμπληρωματικές αλληλουχίες [39].

Ωστόσο, συχνά συναντάται ανταγωνισμός μεταξύ του backsplicing για circRNAs και κανονικού ματίσματος για γραμμικά RNA όπου μπορεί να συμβεί είτε ένωση είτε των συμπληρωματικών αλληλουχιών μεταξύ RNAs δύο γειτονικών ιντρονίων είτε εντός ενός μεμονωμένου ιντρονίου, αντίστοιχα. Μάλιστα, ο ανταγωνισμός αυτός μπορεί να είναι πολύ δυναμικός, οδηγώντας σε διαφορετικά μοτίβα έκφρασης των CircRNA και των γραμμικών RNA (Εικόνα 1.8) [40].



Εικόνα 1.8: Το μοντέλο ανταγωνισμού μεταξύ splicing – backsplicing. Πάνω: το ζευγάρισμα των αλληλουχιών RNA που σχηματίζεται σε γειτονικά εσώνια προάγει τον σχηματισμό ενός CircRNA και ενός γραμμικού RNA με έλλειψη εξωνίων. Κάτω: το ζευγάρισμα των αλληλουχιών RNA που σχηματίζεται εντός ενός μεμονωμένου ιντρονίου προάγει το κανονικό μάτισμα, με αποτέλεσμα ένα γραμμικό RNA. Κόκκινα βέλη: συμπληρωματικές αλληλουχίες, ss: θέσεις ματίσματος, BP: σημείο διακλάδωσης [40].

Επιπλέον, οι πρωτεΐνες που προσδένονται σε RNA (RBP), οι οποίες συνήθως περιέχουν μοτίβα σύνδεσης για το RNA τους, παίζουν κεντρικό ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων. Τα RBP μπορούν να μειώσουν την απόσταση μεταξύ της θέσης δότη και της θέσης

δέκτη δεσμεύοντας τα ιντρόνια στις γειτονικές περιοχές, συμβάλλοντας έτσι στον σχηματισμό του κύκλου των εξονίων και κατά επέκταση στη βιογενέση του CircRNA. Η πρωτεΐνη του γονιδίου QKI είναι η πρώτη ταυτοποιημένη RBP που εμπλέκεται στο σχηματισμό circRNA, ενισχύοντας το σχηματισμό circRNA δεσμεύοντας το μοτίβο-στόχο της, μονόκλωνο RNA (ssRNA), το οποίο συναντάται σε ιντρόνια που πλαισιώνουν τα εξώνια που καταλήγουν σε κυκλικά RNAs [41].

Επομένως, διαφορετικές RBPs διαδραματίζουν διαφορετικούς, ή ακόμη και αντίθετους, ρόλους στη διαδικασία back-splicing. Για παράδειγμα, το ESRP1 και το QKI μπορούν να προάγουν την παραγωγή circRNAs, ενώ το ένζυμο επεξεργασίας RNA (που επεξεργάζεται αδενοσίνη σε ινδοσίνη) δρα στο ένζυμο RNA 1 (ADAR1) για την αναστολή του σχηματισμού circRNA [41].

1.5 Λειτουργίες των κυκλικών RNAs

Τα circRNAs έχει διαπιστωθεί ότι συμμετέχουν στην ρύθμιση της έκφρασης των γονικών γονιδίων, του εναλλακτικού ματίσματος, της μεταγραφής καθώς και της μετάφρασης. Επίσης, μπορούν δράσουν ως σπόγγοι για miRNAs, RBPs και γενικότερα ως «δολώματα» πρωτεϊνών. Έχει παρατηρηθεί ότι κάποια κυκλικά RNAs μπορούν και μεταφράζονται σε πεπτίδια / πρωτεΐνες και άλλα είναι ικανά να παράγουν ψευδογονίδια. Ακόμη, τα circRNAs συμμετέχουν στην καρκινική ρύθμιση με ποικίλους τρόπους, επηρεάζοντας την πορεία της γονιδιακής έκφρασης, αλληλοεπιδρώντας με πρωτεΐνες και άλλων ειδών RNAs και μέσω επιγενετικών μηχανισμών [34, 42].

1.5.1 Κυκλικά RNAs και γονικά γονίδια

Έχει παρατηρηθεί ότι circRNA είναι σε θέση να ρυθμίσει το γονικό του γονίδιο από τόσο επιγενετικά όσο και κατά τις διαδικασίες του ματίσματος, της μεταγραφής ή/και της μετάφρασης. Για παράδειγμα, το circFECR1, το οποίο προέρχεται από το γονίδιο FL1, αλληλεπιδρά με τον υποκινητή FLI1 και στρατολογεί την TET1 απομεθυλάση για να προκαλέσει απομεθυλίωση του DNA στις CpG νησίδες. Ταυτόχρονα, το circFECR1 δεσμεύεται και ρυθμίζει το DNMT1, ένα κρίσιμο ένζυμο που διατηρεί το DNA απομεθυλιωμένο κατά την αντιγραφή του. Έτσι, το circFECR1 επηρεάζει την πορεία των καρκινικών κυττάρων μέσω της συντονισμένης ρύθμισης των TET1 και DNMT1 [41].

Εάν το circRNA περιέχει το ίδιο εξώνιο με το γονικό γονίδιο και σύμφωνα με τα παραπάνω ο σχηματισμός του circRNA θα ανταγωνίζεται με το μάτισμα του προ-mRNA, με αποτέλεσμα πολλές φορές χαμηλά επίπεδα γραμμικού mRNA. Γενικά, όσο περισσότερο συμμετέχει στις δομές κυκλικών RNAs ένα εξώνιο, τόσο λιγότερο τείνει να εμφανίζεται στο τελικό mRNA.

Ακόμη, το κυκλικό RNA μπορεί να επηρεάσει τη μεταγραφή του γονικού γονιδίου του. Για παράδειγμα, τα circRNAs που περιέχουν εσώνια και εξώνια, όπως τα EIciRNAs που βρίσκονται στον πυρήνα, μπορούν να συνδεθούν στην U1 περιοχή των snRNPs μέσω αλληλεπιδράσεων RNA-RNA, καθώς η U1 σχηματίζει ένα σύμπλοκο με την RNA πολυμεράση II δεσμεύοντας το μεταγραφικό παράγοντα TFIID. Έτσι, τα EIciRNAs ρυθμίζουν τη δραστηριότητα της RNA πολυμεράσης II και προάγουν τη μεταγραφή του γονιδίου. Παρόμοια με το EIciRNA, το κυκλικό RNA μπορεί επίσης να προωθήσει τη μεταγραφή του γονικού γονιδίου του ρυθμίζοντας ανοδικά τη δραστηριότητα της RNA πολυμεράσης II. Επιπλέον, έχει αποδεχθεί ότι ορισμένα circRNA ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω του συμπλέγματος που προσδένεται με την RNA πολυμεράση II και των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη μετάφραση [43].

1.5.2 Τα CircRNA μπορούν να ρυθμίσουν την εναλλακτική συρραφή, την μεταγραφή και τη μετάφραση

Μερικά κυκλικά RNAs είναι ικανά να προκαλέσουν την αποτυχία της μετάφρασης λαμβάνοντας υπόψιν ότι κατά το σχηματισμό της κυκλικής τους δομής δεσμεύουν τη θέση έναρξης της μετάφρασης και ανταγωνίζονται με αυτόν το τρόπο το γραμμικό τους mRNA. Τα CircRNAs στον πυρήνα εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταγραφής, του εναλλακτικού ματίσματος και του σχηματισμού βρόχου χρωματίνης [38].

Στο *Arabidopsis thaliana*, το circSEP3 προέρχεται από το εξώνιο 6 του SEP3 και ρυθμίζει το μάτισμα του RNA του. Το circSEP3, λοιπόν, σχηματίζει ένα υβρίδιο RNA-DNA με το συγγενές του DNA, με αποτέλεσμα την παύση της μεταγραφής και στη συνέχεια την παράλειψη του εξωνίου 6 και τον σχηματισμό ενός εναλλακτικά συραμμένου SEP3 mRNA [44].

Ακόμη, οπισθοσυρραφή παρατηρήθηκε σε μόρια RNA που μεταγράφονται από κεντρομερή ρετροτρανσποζονίων στο *Zea Mays* με αποτέλεσμα τα προκύπτοντα circRNAs να δεσμεύονται στα κεντρομερή αυτά και να προωθούν το σχηματισμό βρόχου χρωματίνης, σχηματίζοντας βρόγχους R σε αυτές τις περιοχές (Εικόνα 1.9.β) [45].

1.5.3 Τα κυκλικά RNAs μπορούν να δρουν ως «σπόγγοι» για microRNAs

Μόλις βρεθούν στο κυτταρόπλασμα, έχει διαπιστωθεί πως ορισμένα κυκλικά RNAs λειτουργούν ως ανταγωνιστικά ενδογενή RNAs (ceRNAs), τα οποία ορίζονται ως σφουγγάρια miRNA, και προσδένουν miRNAs αποτρέποντάς τα τελευταία να δεσμευθούν και να καταστείλουν τα mRNAs στόχους τους. Παραδείγματος χάριν το circSry του ποντικού περιέχει 16 θέσεις στόχους για το miR-138 και σχετίζεται με την ανάπτυξη των όρχεων. Στα

ανθρώπινα κύτταρα, το circZNF1 συνιστά ένα σπόγγο του miR-23b-3p κατά τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων επιδερμικών βλαστικών κυττάρων ενώ το circBIRC6 μπορεί να ρυθμίσει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων ES κυττάρων απομονώνοντας τα miR-34a και miR-145. Μερικά άλλα κυκλικά RNAs μπορούν να συμβάλλουν στην πρόοδο των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων ενεργοποιώντας τον άξονα circMAT2B – miR-338-3p – PKM2 κάτω από υποξία ή την οδό σηματοδότησης CircASAP1 – miR-326 – miR-532-5p – MAPK1 – CSF1 [46]. Έτσι, ένα circRNA μπορεί να καταστέλλει τον όγκο ή να έχει ογκογόνο δράση καθώς δρα ως σπόγγος miRNA σε πολλαπλά διαφορετικά ή ίδια miRNAs αφού διαθέτει πολλαπλές θέσεις δέσμευσης για αυτά [47].

Ωστόσο, δεδομένου ότι τα circRNAs στα θηλαστικά γενικά εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα και με συγκεκριμένες θέσεις δέσμευσης για miRNAs, η δυνατότητα ελέγχου της σταθερότητας και της ποσότητας των miRNAs από circRNAs και η επίτευξη σημαντικών και αισθητών επιδράσεων θα πρέπει να εξεταστεί με προσοχή (Εικόνα 1.9.α) [38].

1.5.4 Τα circRNAs λειτουργούν ως σπόγγοι πρωτεϊνών και συμμετέχουν σε σύμπλοκα αυτών

Ορισμένα circRNAs που διαθέτουν πολλαπλές θέσεις σύνδεσης για μία ή περισσότερες πρωτεΐνες που προσδέονται στο RNA μπορεί να λειτουργήσουν ως πρωτεϊνικά σφουγγάρια ή δολώματα. Για παράδειγμα το circRNA το οποίο προέρχεται από τον τόπο mbl, λειτουργεί ως σπόγγος για την ίδια την πρωτεΐνη MBL. Έτσι, η MBL δεν είναι σε θέση συνδεθεί με άλλους στόχους όταν συνδέεται με το circRNA. Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη MBL συνδέεται με τα ιντρόνια που πλαισιώνουν το κυκλικό μόριο, διευκολύνοντας τη βιογένεσή της σαν ένα αυτορρυθμιστικό κύκλωμα όπου όταν η πρωτεΐνη είναι σε περίσσεια, μπορεί να μειώσει την παραγωγή του δικού της mRNA προάγοντας τη βιογένεση του CircRNA [48, 49].

Επομένως, γίνεται αντιληπτό ότι, για τον συντονισμό των διαφόρων κυτταρικών διεργασιών, μερικές από τις πρωτεΐνες που συνδέονται με το CircRNA μπορεί να είναι ένας ουσιαστικός ρυθμιστής της βιογένεσης του CircRNA τους (Εικόνα 1.9.δ).

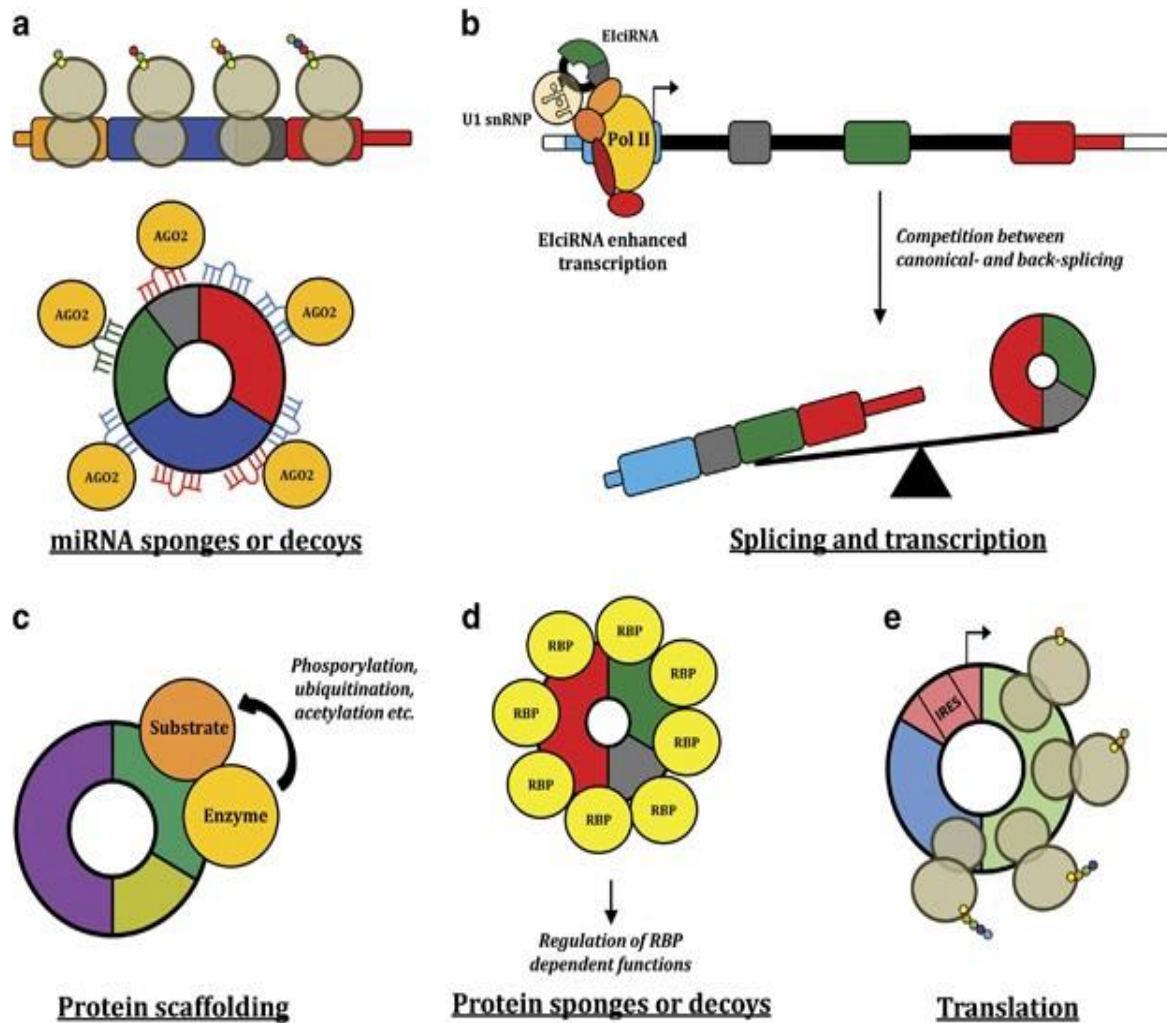
Το κυκλικό RNA, έχει αποδειχτεί ότι μπορεί επίσης να σχηματίζει λειτουργικά σύμπλοκα με πρωτεΐνες. Τα circRNAs που φιλοξενούν θέσεις δέσμευσης για ένζυμα και τα υποστρώματά τους είναι πιθανό να λειτουργούν ως κριώματα διευκολύνοντας την επαφή μεταξύ δύο ή περισσότερων πρωτεϊνών. Αυτό γίνεται καλύτερα κατανοητό από το circFoxo3, το οποίο διαθέτει θέσεις δέσμευσης για τις πρωτεΐνες MDM2 και p53 στο ποντικό. Μεταλλάξεις σε αυτές τις θέσεις ή knockdown του CircRNA επηρέασαν την σχέση μεταξύ του p53 με της MDM2 υποστηρίζοντας έτσι την ιδέα ότι το circFoxo3 μπορεί να λειτουργήσει ως κριώμα πρωτεΐνης. Επιπλέον, οι μεγάλοι χρόνοι ημιζωής των circRNAs πιθανώς ενισχύουν την

ικανότητά τους να λειτουργούν ως ικριώματα και περισσότερα κυκλικά μόρια που λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο είναι πολύ πιθανό να ανακαλυφθούν στο μέλλον (Εικόνα 1.9.γ) [50, 51].

Αξίζει να σημειωθεί ότι, στον καρκίνο, τα circRNAs μπορεί να είναι ικανά δεσμεύσουν πρωτεΐνες που καταστέλλουν τον όγκο ή τον διεγείρουν, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο την καρκινική εξέλιξη του κυττάρου και κατ' επέκταση του οργανισμού [37].

1.5.5 Μεταφράσιμα CircRNAs

Αν και τα circRNAs θεωρούνται μη κωδικά RNAs με χαμηλό δυναμικό κωδικοποίησης πρωτεΐνης, έχει αποδειχθεί ότι τα CircRNAs που περιέχουν μια εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος (IRES) ή τροποποίηση N6-μεθυλοαδενοσίνης είναι ικανά να μεταφραστούν σε πεπτίδια *in vitro* και *in vivo*. Συγκεκριμένα, πολλά κυκλικά RNAs περιέχουν το κωδικόνιο έναρξης των συγγενών mRNA τους. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι τα circRNAs μερικές φορές μπορούν να μεταφραστούν. Παραδείγματος χάριν το κυκλικό circMbl3 παράγει ένα ανιχνεύσιμο προϊόν πρωτεΐνης στην κεφαλή της μύγας, ομοίως έχει διαπιστωθεί ότι το circZNF609 ρυθμίζει τη μυογένεση και μπορεί να μεταφραστεί σε πεπτίδια, υποδηλώνοντας πως το RNA αυτό μπορεί να ασκήσει τη λειτουργία του μέσω έκφρασης πρωτεΐνης. Επιπλέον, ορισμένα circRNAs βρέθηκαν να σχετίζονται με τη μετάφραση ριβοσωμάτων σε κύτταρα θηλαστικών, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτά τα κυκλικά RNAs έχουν τη δυνατότητα να παράγουν λειτουργικά πεπτίδια (Εικόνα 1.9.ε) [52, 53].



Εικόνα 1.9: Λειτουργίες των CircRNAs. Α. Πολλά circRNAs είναι πιθανό να λειτουργούν ως miRNA σφουγγάρια ή δολώματα. Η δέσμευση των miRNAs στα circRNAs μπορεί να απελευθερώσει mRNA στόχους από εξαρτώμενη από το miRNA αποδόμηση με αποτέλεσμα πιο αποτελεσματική μετάφραση τους. Β. Τα circRNAs αλληλοεπιδρούν με την RNA pol II και ενισχύουν τη μεταγραφή των γονικών γονιδίων τους μέσω αλληλεπίδρασης με το U1 snRNP. Το μάτισμα και η μεταγραφή πολλών γονιδίων μπορούν επίσης να ρυθμιστούν έμμεσα μέσω ενός ανταγωνισμού μεταξύ του κανονικού μάτίσματος και του οπίσθιου μάτίσματος. Γ. Τα CircRNA με θέσεις δέσμευσης για ένα ένζυμο και το υπόστρωμά του μπορούν να λειτουργήσουν ως ικριώματα που διευκολύνουν τη συν-εντοπισμό και την κινητική της αντίδρασης. Δ. Τα CircRNA μπορούν να λειτουργούν ως σφουγγάρια για πρωτεΐνες και επομένως να ρυθμίζουν τη δραστηριότητά τους. Ε. Τα CircRNA με στοιχεία IRES και ιστότοπους AUG μπορούν, υπό ορισμένες συνθήκες, να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα για μετάφραση [54].

Εν κατακλείδι, τα κυκλικά RNAs εκφράζονται ευρέως σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές και σε διάφορα είδη επεκτείνοντας σε μεγάλο βαθμό τις ήδη υπάρχουσες γνώσεις για τον συνεχώς αναπτυσσόμενο κατάλογο των lncRNAs. Δεδομένου ότι έχουν εντοπιστεί δεκάδες χιλιάδες circRNA, θα έχει μεγάλο ενδιαφέρον να μελετηθεί και να εξακριβωθεί τι ικανότητες και δυνατότητες χαρακτηρίζουν τη συντριπτική πλειονότητα των CircRNAs τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις.

1.6 Κυκλικά RNAs στο γονίδιο PRMT1

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αντικείμενο μελέτης ήταν η έρευνα κυκλικών μοριών RNA στο γονίδιο PRMT1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές κυττάρων παχέος εντέρου με χρήση στοχευμένων divergent – εκκινητών για το γονίδιο και επακόλουθη βιοπληροφορική μελέτη των αποτελεσμάτων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιολογικό Υλικό

Στα πλαίσια διεξαγωγής της παρούσας διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 55 ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, εκ των οποίων οι 54 είναι καρκινικές σειρές και η 1 φυσιολογική σειρά. Ακολουθεί πίνακας (Πίνακας 2.1) στον οποίο αναγράφονται οι κυτταρικές σειρές καθώς και οι ιστοί προέλευσης τους.

Πίνακας 2.1: Καταγραφή ανθρώπινων κυτταρικών σειρών και ιστού προέλευσης.

Κυτταρική σειρά	Ιστός προέλευσης
1. Colo205	Παχύ Έντερο
2. HT-29	
3. RKO	
4. CACO-2	
5. HCT-116	
6. SW 620	
7. DLD-1	
8. MKN45	Στόμαχος
9. AGS	
10. NUGC-4	
11. HuH-7	Συκώτι
12. Hep G2	

13. PC-3	Προστάτης
14. DU 145	
15. LNCaP	
16. ZR-75-1	Μαστός
17. BT-20	
18. MDA-MB-231	
19. MDA-MB-468	
20. BT-474	
21. MCF-12A	
22. T-47D	
23. MDA-MB-453	
24. MCF-7	
25. SK- BR-3	
26. Ishikawa	
27. MADH-2774	
28. OVCAR-3	
29. SK-OV-3	
30. ES-2	Τράχηλος της μήτρας
31. SiHa	
32. HeLa	Νεφρός
33. Caki-1	
34. 786-O	Μήτρα
35. SK-UT-1B	
36. A549	Πνεύμονας
37. BB49-SCCHN	Στοματική κοιλότητα
38. CAL-33	Γλώσσα
39. SH-SY5Y	Εγκέφαλος
40. u-251 MG	
41. u-87 MG	
42. H4	
43. D54	
44. HaCat	

45. FM3	Δέρμα
46. T24	Ουροδόχος κύστη
47. RT4	
48. HTB-9	
49. H929	Μυελός των οστών
50. U266	Περιφερικό αίμα
51. HL-60	
52. U-2 OS	Οστικός
53. HEK-293	Φυσιολογικός
54. Raji	
55. SUDHL-1	

2.2 Απομόνωση Νουκλεϊκών Οξέων - RNA

Μετά την επιλογή των κυτταρικών σειρών, ακολούθησε η απομόνωση νουκλεϊκών οξέων και απομόνωση ολικού RNA, με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol™ Reagent της εταιρίας Invitrogen. Στα πειράματα απομόνωσης ολικού RNA και DNA που ακολούθησαν ωστόσο, έγινε χρήση του αντιδραστηρίου TRIidyl G™ της εταιρίας PanReac AppliChem.

Το TRIzol™ Reagent όπως και το TRIidyl G™ είναι διαλύματα σχεδιασμένα για να απομονώνουν υψηλής ποιότητας ολικό RNA, DNA ή πρωτεΐνες από ομογενοποιημένους ιστούς και κύτταρα. Αποτελούν μονοφασικά όξινα διαλύματα ισοθειοκυανικής γουανιδίνης και φαινόλης, τα οποία προκαλούν τη λύση των κυττάρων, την αποδιάταξη των ανώτερων πρωτεϊνικών δομών και την προστασία του RNA και του DNA από τις RNάσες και τις DNάσες αντίστοιχα [55]. Χρησιμοποιούνται για τη διαδοχική απομόνωση RNA, DNA και πρωτεϊνών από ένα μόνο δείγμα καθώς μετά την ομογενοποίηση του δείγματος με το εκάστοτε διάλυμα προστίθεται χλωροφόρμιο, με επακόλουθο τον διαχωρισμό του ομογενοποιημένου σε τρεις φάσεις: την ανώτερη διαυγή υδατική φάση στην οποία συναντάται RNA, τη μεσόφαση που περιέχει πρωτεΐνες και την κατώτερη οργανική φάση κόκκινου χρώματος που περιέχει το DNA. Το RNA κατακρημνίζεται από την υδατική φάση με προσθήκη ισοπροπανόλης, το DNA κατακρημνίζεται από τη μεσόφαση – οργανική φάση με προσθήκη αιθανόλης, ενώ οι πρωτεΐνες με προσθήκη αιθανόλης στο υπερκείμενο φαινόλης – αιθανόλης.

Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA

1. Προσθήκη 200 μL χλωροφορμίου για κάθε 1 mL αντιδραστηρίου TRIidty GTM, και ακολουθεί έντονη ανάδευση του μείγματος για 15 sec
2. Επώαση του μείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min
3. Φυγοκέντρωση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4° C για 15 min σε 12.000g
4. Συλλογή της ανώτερης υδατικής φάσης σε νέο αποστειρωμένο σωληνάκι τύπου eppendorf
5. Προσθήκη ισοπροπανόλης με όγκο ίσο με αυτό που συλλέχθηκε από το μείγμα στο προηγούμενο βήμα και ακολουθεί ήπια ανάδευση
6. Επώαση του μείγματος σε πάγο για 15 min
7. Φυγοκέντρωση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4° C, για 15 min σε 12.000g
8. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και απορρίπτεται
9. Προσθήκη 1 mL αιθανόλης 75% v/v στο εναπομείναν ίζημα και γίνεται ανάδευση με vortex
10. Φυγοκέντρωση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4° C, για 5 min σε 7.500g
11. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και απορρίπτεται
12. Το εναπομείναν ίζημα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min για να στεγνώσει το ίζημα
13. Διαλυτοποίηση του ιζήματος του RNA με κατάλληλο όγκο διαλύματος RNase free water

2.3 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ολικού RNA και DNA έγινε φασματοφωτομετρικά σε φασματοφωτόμετρο Micro – volume UV – Vis BioSpec-nano. Το RNA όπως και το DNA παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης σε μήκος κύματος 260 nm και για αυτό χρησιμοποιήθηκε 1 μL απομονωμένου ολικού RNA και DNA αντίστοιχα, το οποίο φωτομετρήθηκε σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του διαλύματος ολικού RNA γίνεται με βάση τον τύπο:

$$C_{\text{RNA}} (\text{ng}/\mu\text{L}) = A_{260} \times 40$$

Όπου: A_{260} : η απορρόφηση του αραιωμένου διαλύματος RNA στα 260 nm (σε O.D)

40: η συγκέντρωση στην οποία αντιστοιχεί 1 O.D. διαλύματος RNA (σε ng/ μL DNA).

Ομοίως για υπολογισμό της συγκέντρωσης διαλύματος ολικού DNA χρησιμοποιείται ο τύπος:

$$C_{\text{DNA}} (\text{ng}/\mu\text{L}) = A_{260} \times 50$$

Όπου: A_{260} : η απορρόφηση του αραιωμένου διαλύματος DNA στα 260 nm (σε O.D)

50: η συγκέντρωση στην οποία αντιστοιχεί 1 O.D. διαλύματος DNA (σε ng/ μ L DNA).

Η καθαρότητα του απομονωμένου ολικού RNA και DNA ελέγχεται μέσω του λόγου των απορροφήσεων των αντίστοιχων διαλυμάτων στα 260 nm και 280 nm βάση του τύπου:

$$\lambda = A_{260}/A_{280}$$

όπου: A_{260} : η απορρόφηση του αραιωμένου διαλύματος RNA ή DNA στα 260 nm (σε O.D)

και A_{280} : η απορρόφηση του αραιωμένου διαλύματος RNA ή DNA στα 280 nm (σε O.D)

Λόγος $A_{260}/A_{280}=2$ είναι χαρακτηριστικός διαλύματος καθαρού RNA ενώ,

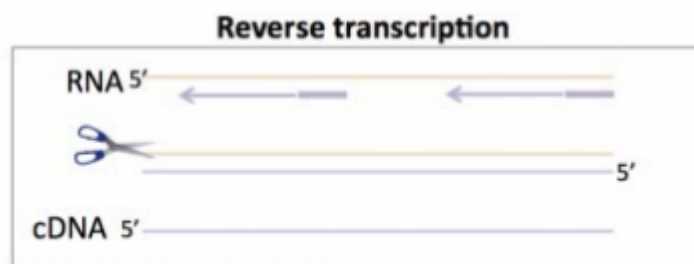
Λόγος $A_{260}/A_{280}=1,8$ είναι χαρακτηριστικός διαλύματος καθαρού DNA.

Κατά συνέπεια και σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του TRIidty GTM που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων, ικανοποιητικοί είναι οι λόγοι απορροφήσεων για διαλύματα RNA και DNA στα 260 nm και 280 nm που κυμαίνονται μεταξύ 1,8 – 2.2. Ας σημειωθεί ότι η μέθοδος αυτή δε μπορεί να διακρίνει ανάμεσα στο RNA και το DNA.

2.4 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT)

Για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT) χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα τα πολυαδενυλιωμένα RNA μόρια που συντέθηκαν σε προηγούμενο βήμα. Η αντίδραση βασίζεται στη δράση ενός ιικού ενζύμου, της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase, RTase) μιας RNA – εξαρτώμενης, DNA πολυμεράσης η οποία συνθέτει μόρια cDNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο μόρια RNA. Στα μόρια RNA υβριδοποιούνται μόρια κατάλληλου εκκινητή, στα οποία η RTase προσθέτει τα συμπληρωματικά με το RNA δεοξυριβονουκλεοτίδια για τη δημιουργία του cDNA (Εικόνα 2.1). Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται σχεδιάζονται κατάλληλα, και ανήκουν σε μια από τις παρακάτω κατηγορίες:

- i. Ολιγομερή δεοξυθυμιδίνης (oligo dT): μικρές αλληλουχίες από δεοξυθυμιδίνες οι οποίες υβριδοποιούνται στην πολύ(A) ουρά των προϊόντων της RNA πολυμεράσης II ή των μικρών μη-κωδικών μορίων που έχουν υποστεί πρώτα πολυαδενυλίωση.
- ii. Τυχαία εξαμερή (random examers): εκκινητές που απαρτίζονται από μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων μήκους 6 βάσεων με τυχαία νουκλεοτιδική σύσταση.
- iii. Ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές για συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλυσίδες RNA με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η μέγιστη ειδικότητα κατά την αντίδραση.



Εικόνα 2.1: Απεικόνιση της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής, κατά την οποία από εκμαγείο RNA συντίθεται με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση, το συμπληρωματικό του μόριο DNA, δίνοντας γένεση σε ένα τελικό προϊόν cDNA [56].

Για τις αντιδράσεις RT που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές τυχαία εξαμερή. Κατά την αντίδραση 5 µg ολικού RNA αραιωμένου σε νερό, αναμείχθηκαν με 1 µL τυχαίων εκκινητών και 10 mM dNTPs (10 mM έκαστο), με τελικό όγκο 12 µL. Ακολουθεί επώαση στους 65° για 5 min και γρήγορη τοποθέτηση στον πάγο. Στο επόμενο στάδιο της αντίδρασης, στο ήδη υπάρχον μείγμα προστέθηκαν 4 µL 5X ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης [250 mM Tris-HCl (8,3 στους 25 °C), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂], 0,1 M DTT, 40 U αναστολέα RNase Inhibitor, Human Placenta (New England Biolabs *Inc.*), με τελικό όγκο 19 µL. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση στους 37° C για 2 min και γρήγορη τοποθέτηση στον πάγο. Στη συνέχεια προστίθεται 100 µM αντίστροφης μεταγραφάσης MMLV (Life Technologies Ltd.). Το μείγμα αυτό επωάζεται για 10 min στους 25° C και έπειτα στους 37° C για 50 min. Τέλος, πραγματοποιείται επώαση στους 70° C για 15 min, ώστε να απενεργοποιηθεί η δραστηριότητα του ενζύμου.

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι μια μέθοδος που επιτρέπει με ενζυμικό τρόπο την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού *in vitro*. Χαρακτηρίζεται για την αυξημένη ειδικότητα, ευαισθησία και ταχύτητα, ενώ ταυτόχρονα το κόστος της είναι χαμηλό.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ένα μείγμα καθορισμένου pH και κατάλληλης ιοντικής ισχύος, που περιέχει εκτός από το υπόστρωμα DNA, μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, ένα ρυθμιστικό διάλυμα με κατιόντα Mg²⁺, δεοξυριβονουκλεοτίδια όλων των βάσεων (dNTPs) και ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων ειδικών για την αλληλουχία – στόχο που ονομάζονται εκκινητές (primers). Οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι συμπληρωματικές με τα άκρα των δύο αλυσίδων της επιθυμητής αλληλουχίας δίκλωνου DNA. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι μια θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση (Taq DNA polymerase) που προέρχεται από

το βακτήριο *Thermus aquaticus*. Η Taq pol, χρησιμοποιεί ως εκμαγείο ένα μονόκλωνο μόριο DNA, από το οποίο συνθέτει τη συμπληρωματική του αλυσίδα βάση του κανόνα συμπληρωματικότητας των βάσεων κατά Watson – Crick. Πιο συγκεκριμένα, το ένζυμο αυτοκαταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της 3' υδροξυλομάδας (3' – OH) ενός δεοξυριβονουκλεοτιδίου και της 5' φωσφορική ομάδας του επόμενου. Για το λόγο αυτό απαιτούνται οι αλληλουχίες των εκκινητών, καθώς για να δράσει η DNA pol πρέπει να υπάρχουν ελεύθερα 3' – OH. Οι εκκινητές έχουν μήκος 18-22 nt και σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιείται ένα ζεύγος. Ο ένας εκκινητής είναι συμπληρωματικός με την κωδική αλυσίδα του υποστρώματος και ονομάζεται πρόσθιος (forward primer), ενώ ο δεύτερος είναι συμπληρωματικός με τη μη – κωδική αλυσίδα και ονομάζεται ανάστροφος (reverse primer). Οι εκκινητές προσδένονται στην αρχή και στο τέλος της επιθυμητής αλληλουχίας, οριοθετώντας τη, παρέχοντας την ελεύθερη 3' – υδροξυλομάδα, για να μπορέσει η DNA pol να ξεκινήσει τη σύνθεση της νέας αλυσίδας. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μιας νέας εκτεταμένης αλυσίδας δίκλωνου DNA.

Αρχικά, κατασκευάζουμε ένα PCR master mix που περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Δεδομένου ότι το τελικό mix πρέπει να έχει όγκο 25 μL προσθέτουμε κάθε ουσία με βάση τον Πίνακα 2.2.

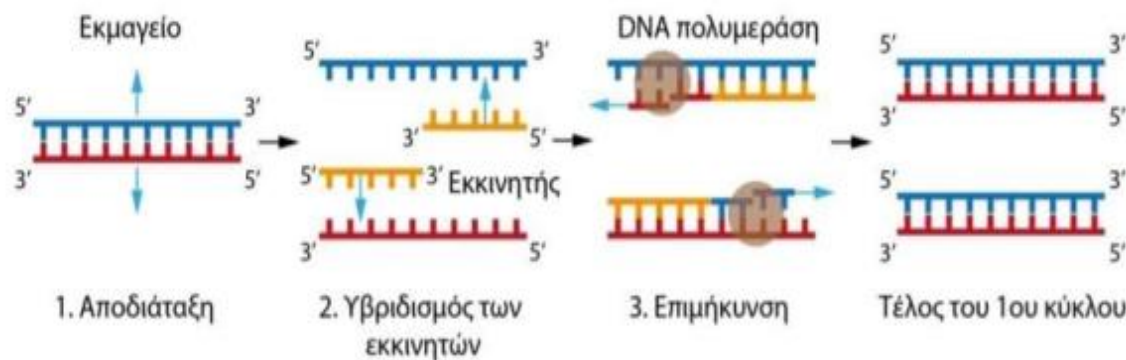
Πίνακας 2.2: Αναγράφονται οι ουσίες, οι όγκοι και οι συγκεντρώσεις για την δημιουργία ενός PCR mix.

Ουσία	Υπελικό= 25 μL	Τελική Συγκέντρωση
H ₂ O	Μέχρι V= 25 μL	N/A
10X KAPA Taq Ρυθμιστικό Διάλυμα	2.5 μL	1X
25 mM MgCl ₂	Όσο απαιτείται	$\geq 1,5$ mM
10 mM dNTP Mix	0,5 μL	0,2 mM έκαστο
10 μM Forward Εκκινητής	1,0 μL	0,4 μM
10 μM Reverse Εκκινητής	1,0 μL	0,4 μM
5 U/L KAPA Taq DNA Πολυμεράση	0,1 μL	0,5 U
Δείγμα CDNA	Όσο απαιτείται	Όσο απαιτείται

Έπειτα ακολουθεί η τοποθέτηση των δειγμάτων στον θερμικό κυκλοποιητή και εφαρμογή των παρακάτω σταδίων.

Η αντίδραση περιλαμβάνει τρία επαναλαμβανόμενα στάδια, που συνολικά συνιστούν ένα κύκλο (Εικόνα 2.2). Κάθε κύκλος ενίσχυσης αποτελείται από:

1. Αποδιάταξη: οι δύο αλυσίδες DNA αποδιατάσσονται με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για 30-60 sec.
2. Υβριδισμός εκκινητών (annealing): οι εκκινητές υβριδοποιούνται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C για 30-60 sec.
3. Επιμήκυνση: σύνθεση της νέας αλυσίδας, κατά την οποία η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72° C που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό.



Εικόνα 2.2: Απεικόνιση των τριών σταδίων ενός κύκλου ενίσχυσης μιας συμβατικής PCR. Πρώτο είναι το στάδιο αποδιάταξης του δίκλωνου μορίου DNA, δεύτερο είναι το στάδιο υβριδισμού των εκκινητών στις κατάλληλες θέσεις στις πλέον μονόκλωνες αλληλουχίες DNA και τέλος είναι το στάδιο επιμήκυνσης και σύνθεσης της νέας συμπληρωματικής αλυσίδας, που καταλήγει στη σύνθεση ενός νέου δίκλωνου μορίου DNA.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25-35 φορές. Η PCR εκτελείται σε θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα ικανή να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το ολικό απομονωμένο DNA από κύτταρα των 55 κυτταρικών σειρών ως υπόστρωμα για κάθε μια από τις αντιδράσεις PCR. Αυτές οι PCR έχουν ως στόχο την ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου PRMT1 στους συγκεκριμένους ιστούς. Για το σκοπό

αυτό επιλέχθηκαν συγκεκριμένα ζεύγη εκκινητών τα οποία αναγράφονται αναλυτικά μαζί με τις αλληλουχίες τους στον παρακάτω Πίνακα 2.4.

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε PCR με divergent - εκκινητές σε κάποιες από αυτές τις κυτταρικές σειρές, με στόχο να διαπιστωθεί η ύπαρξη κυκλικών RNAs. Οι σειρές που επιλέχθηκαν καθώς και οι εκκινητές παραθέτονται στον Πίνακα 2.3.

Η εξέλιξη του πειράματος συνεχίστηκε μόνο με τις σειρές του καρκίνου του παχέος εντέρου. Για αυτό τον σκοπό δημιουργήθηκε ένα cDNA pool από 6 σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου (DLD-1, Colo 205, HT-29, RKO, Caco-2, HCT-116), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την πραγματοποίηση επάλληλης εμφωλιασμένης PCR.

Όλα τα προϊόντα που προέκυψαν από τις ανωτέρω PCR ηλεκτροφορήθηκαν στη συνέχεια σε πήκτωμα αγαρόζης.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Μήκος (nt)	Tm
PRMT1_5F	5'-CGGCACCTCTTCAAGGACAA-3'	20	58
PRMT1_5R	5'-ACCGCAACTCCATGTTTCAT-3'	20	61
PRMT1_5Fin	5'-GGCATCCTCTGCATGTTTGC-3'	20	61
PRMT1_5Rin	5'-GAGATGCTGAAGGACGAGG-3'	19	59
PRMT1_7F	5'-GAGTCCATGCTCAACACCGT-3'	20	61
PRMT1_7R	5'-GGATGGGCTACTGCCTCTTC-3'	20	61
PRMT1_7Fin	5'-CTATGCCCGGGACAAGTGG-3'	19	62
PRMT1_7Rin	5'-GGTGGACATCATCATCAGCGA-3'	21	60

Πίνακας 2.3: Αναγράφονται όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις απλής PCR, μαζί με τις αλληλουχίες τους. Χρησιμοποιήθηκαν είτε σε ζεύγη, είτε μεμονωμένα όταν ήταν απαραίτητο για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων.

2.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική κατάλληλη για το διαχωρισμό τμημάτων DNA με διαφορετικό μήκος. Όσο το μέγεθος ενός μορίου DNA αλλάζει, τόσο αλλάζει και η ηλεκτροφορητική του κινητικότητα μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο λόγω του διαφορετικού μεγέθους. Είναι ο συνηθέστερος, ταχύτερος και απλούστερος τρόπος ανίχνευσης και ανάλυσης των προϊόντων της PCR.

Τα νουκλειικά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα λόγω των φωσφορικών ομάδων που υπάρχουν στις νουκλεοτιδικές βάσεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μετακίνηση τους από την κάθοδο (-) στην άνοδο (+), με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του δεκαδικού λογαρίθμου (\log_{10}) του μοριακού τους βάρους. Επιπλέον, παράγοντες όπως η στερεοδιαμόρφωση των μορίων, ή η σύσταση του πηκτώματος σε αγαρόζη και η ένταση του ρεύματος που διέρχεται μέσα από το πήκτωμα, μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα των μορίων. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που δημιουργεί πόρους στο πήκτωμα, με διάμετρο αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσής της. Οι πόροι αυτοί είναι υπεύθυνοι για το διαχωρισμό των μορίων, καθώς ανάλογα με το μέγεθος τους μπορούν να διέλθουν τα μόρια από αυτούς με μεγαλύτερη ή μικρότερη ευκολία. Μαζί με τα δείγματα, «τρέχει» κι ένας μάρτυρας (ladder), οι ζώνες του οποίου είναι γνωστού μεγέθους και έτσι γίνεται εφικτός ο προσδιορισμός του μήκους των άγνωστων ζωνών των δειγμάτων. Η οπτικοποίηση της ηλεκτροφόρησης γίνεται υπό υπεριώδη ακτινοβολία (UV light) και η χρώση του πηκτώματος γίνεται συνήθως με βρωμιούχο αιθίδιο είτε άλλες χρωστικές όπως η χρωστική Midori.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία οι ηλεκτροφορήσεις DNA σε πήκτωμα αγαρόζης που πραγματοποιήθηκαν ήταν της τάξης 2% αγαρόζη, με εξαίρεση τις ηλεκτροφορήσεις από τις οποίες ακολούθησε κοπή και καθαρισμός της επιθυμητής ζώνης DNA όπου η συγκέντρωση αγαρόζης ήταν της τάξης 1,5% ώστε να βρίσκεται σε μικρότερη ποσότητα και να είναι ευκολότερος ο καθαρισμός του επιθυμητού προϊόντος.

2.6 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel extraction)

Εν συνεχεία η ζώνη ενδιαφέροντος που παρατηρήθηκε στο πήκτωμα αφού απομονώθηκε με τη χρήση νυστεριού από τις άλλες, καθαρίστηκε με χρήση μικροφυγοκεντρικών στηλών.

Πρωτόκολλο Gel extraction

1. Για κάθε 100 mg αγαρόζης προστίθενται 200 μ L Binding Buffer
2. Επώαση στους 50° C για 5-10 min με παράλληλο vortex, μέχρι να διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη
3. Μεταφορά του διαλύματος σε κολώνα (έως 700 μ L) και φυγοκέντρωση για 30 sec στα 11.000g. Επαναλαμβάνω μέχρις ότου να έχει φυγοκεντρηθεί όλο το δείγμα
4. Το υπερκείμενο απορρίπτεται
5. Προσθήκη 700 μ L Wash Buffer
6. Φυγοκέντρωση για 30 sec στα 11.000g.
7. Επαναλαμβάνονται τα βήματα 5 και 6 για μια ακόμη φορά
8. Απορρίπτεται το υπερκείμενο

9. Φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 g
10. Επώαση στους 70° C για 5 min με ανοιχτό το καπάκι
11. Μεταφορά κολώνας σε νέο σωληνάκι τύπου Eppendorf 1,5 mL και προσθήκη 20-30 μ L Elution Buffer
12. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min
13. Φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000g
14. Μετά το πέρας της διαδικασίας αποθηκεύονται τα δείγματα στους -20° C

2.7 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων με φθορισμομετρία

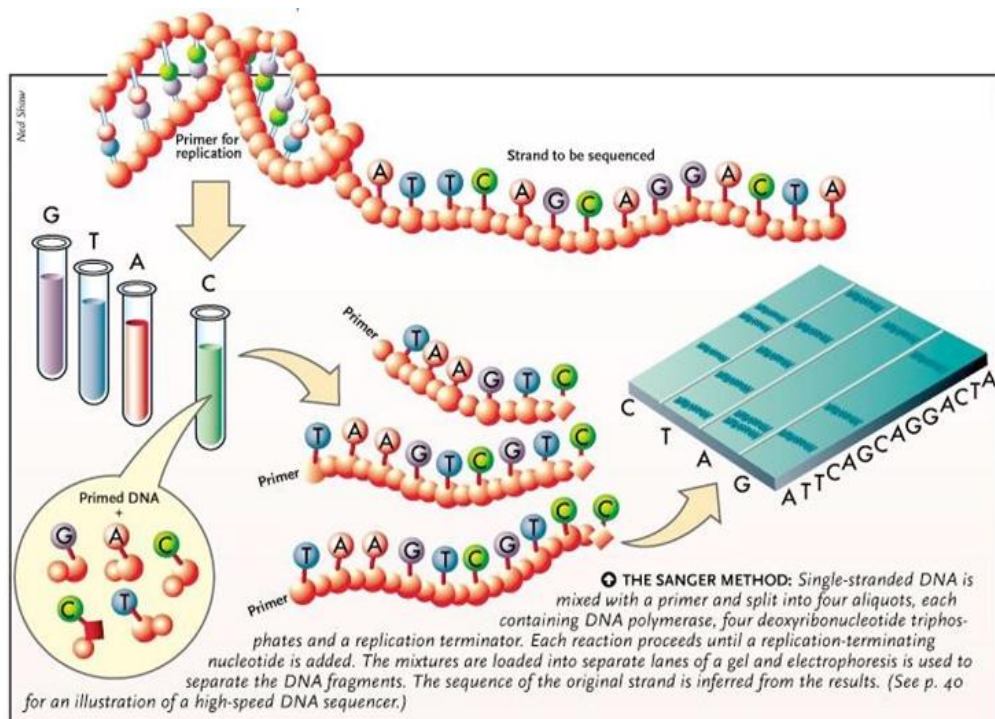
Η φθορισμομετρία είναι μια αναλυτική τεχνική που επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) και πρωτεϊνών, με τη χρήση φθορίζουσών χρωστικών. Οι χρωστικές αυτές προστίθενται στο δείγμα και ενσωματώνονται στα προς μέτρηση μόρια. Ακολουθεί διέγερση των μορίων με χρήση λέιζερ και αποδιέγερση, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση φωτονίων. Η ακτινοβολία που απελευθερώνεται αποτελεί το σήμα φθορισμού, η ένταση του οποίου είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του προς μελέτη μορίου. Η ένταση του φθορισμού σε μη δεσμευμένες χρωστικές είναι εξαιρετικά χαμηλή, ενώ αυξάνεται μερικές τάξεις μεγέθους από τη στιγμή που πραγματοποιείται η δέσμευση. Είναι μια πιο ακριβής μέθοδος σχετικά με τη σπεκτροφωτομετρία, γιατί η ευαισθησία του φθορισμού είναι 10-100 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τις μετρήσεις απορρόφησης.

Το φθορόμετρο που χρησιμοποιήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής αυτής εργασίας είναι το Quibit® 2.0 της εταιρίας Invitrogen. Το kit που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων PCR είναι το Quibit™ dsDNA HS Assay Kit και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.8 Μέθοδος αλληλούχισης κατά Sanger

Είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA. Έχει τη δυνατότητα προσδιορισμού της πρωτοταγούς δομής μιας αλληλουχίας η οποία μπορεί να φτάνει τις 1000 βάσεις. Η τεχνική βασίζεται στην ενζυμική ενσωμάτωση ενός νουκλεοτιδίου στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA. Η αρχή της τεχνικής στηρίζεται στην ύπαρξη ενός συνθετικού σημασμένου εκκινητή (αρχικά ήταν ραδιενεργά σημασμένος), ο οποίος υβριδίζεται στο μονόκλωνο DNA. Επίσης για την πραγματοποίηση της αντίδρασης απαιτείται πολυμεράση, τα 4 φυσιολογικά τριφωσφορικά ολιγονουκλεοτίδια (dNTPs) καθώς και, σε μικρή αναλογία, 2',3' διδεόξυνουκλεοτίδια (dideoxynucleotides, ddNTPs). Το διδεόξυνουκλεοτίδιο έχει ένα άτομο υδρογόνου στον 3' άνθρακα της δεοξυριβόζης αντί για ένα υδροξύλιο. Με τον τρόπο αυτό, όταν γίνεται η ενσωμάτωση του διδεόξυνουκλεοτιδίου στο

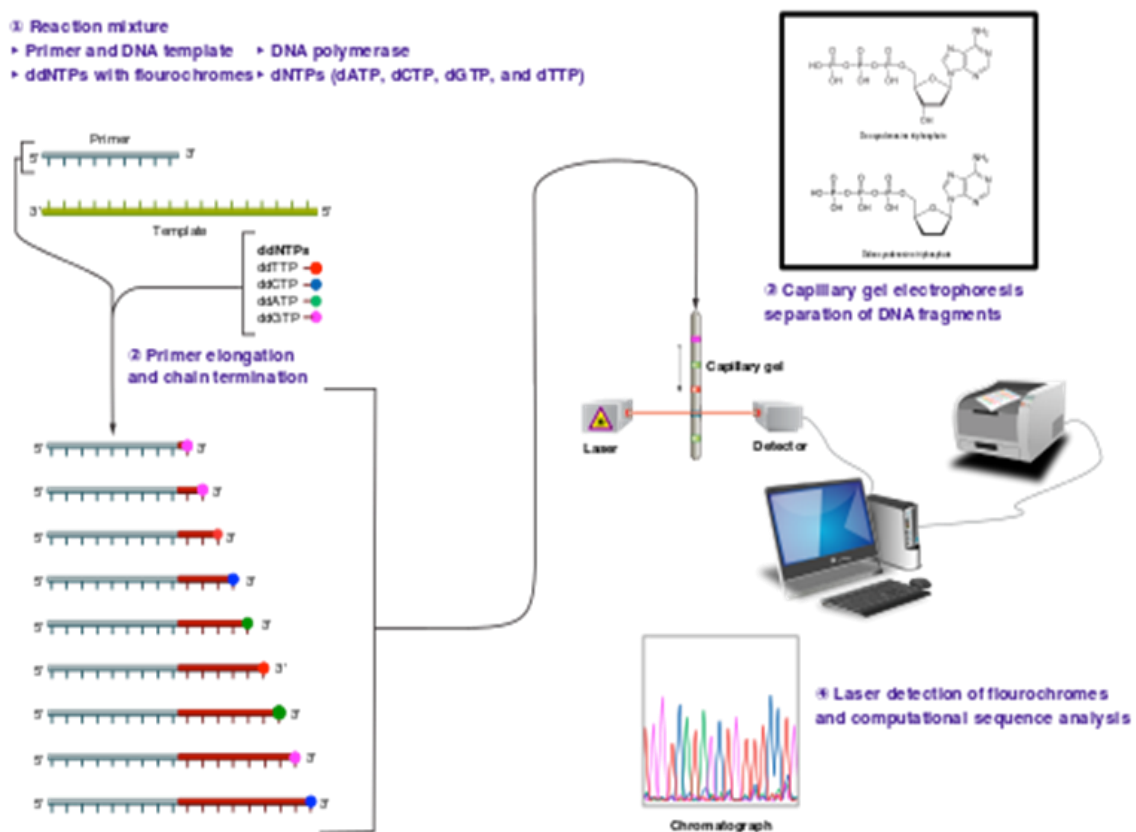
νεοσυντιθέμενο κλώνο του DNA δεν είναι δυνατή η δημιουργία άλλου φωσφοδιαστερικού δεσμού και επομένως η πρόσδεση του επόμενου νουκλεοτιδίου (λόγω της έλλειψης του υδροξυλίου) και η αντίδραση σταματάει. Για το κάθε νουκλεοτίδιο πραγματοποιείται μια αντίδραση (επομένως πραγματοποιούνται 4 αντιδράσεις, μια για κάθε νουκλεοτίδιο). Σε κάθε αντίδραση υπάρχει, σε μικρή αναλογία, ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο (για την αντίδραση της γουανίνης- το διδεόξυνουκλεοτίδιο της γουανίνης-ddGTPs κτλ). Κατά τη σύνθεση των νέων αλυσίδων, δημιουργούνται διαφορετικά, σε μήκος, τμήματα DNA λόγω της τυχαίας προσθήκης στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα των διδεόξυνουκλεοτιδίων. Το μήκος του κάθε τμήματος καθορίζεται από την απόσταση που υπάρχει από το 5' άκρο του εκκινητή έως τη θέση προσθήκης του διδεόξυνουκλεοτιδίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να έχουμε συγκεκριμένα μήκη μορίων στα οποία γνωρίζουμε το νουκλεοτίδιο που υπάρχει κάθε φορά. Ο διαχωρισμός των μορίων των παραπάνω αντιδράσεων γίνεται με τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Μέθοδος Sanger.

Από την πρώτη εφαρμογή της μεθόδου μέχρι σήμερα, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές αλλαγές στην τεχνική οι οποίες είχαν ως σκοπό την αυτοματοποίηση της. Ο εκκινητής δε χρειάζεται πλέον να είναι σημασμένος με ραδιενεργό στοιχείο αλλά με ειδική χρωστική. Η χρωστική αποτελείται από μια χρωστική δότη (φλουορεσκεΐνη) συνδεδεμένη με μια χρωστική δέκτη (διχλωροροδαμίνη) μέσω ενός συνδέτη αμινοβενζοϊκού οξέος. Υπάρχουν 4 διαφορετικές χρωστικές δέκτη οι οποίες έχουν διαφορετικό φάσμα εκπομπής και η κάθε μια

από αυτές ενσωματώνεται σε ένα συγκεκριμένο διδεοξυνουκλεοτίδιο. Η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιείται από ειδικό laser και το σύστημα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιεί τριχοειδή σωληνάρια. Η δέσμη φωτός από το laser κατευθύνεται κατά μήκος των τριχοειδών. Ως αποτέλεσμα αυτού, τα σημασμένα ddNTPs απορροφούν μια μικρή ποσότητα από τη δέσμη φωτός και την αποδίδουν ως δέσμη φωτός με μεγαλύτερο μήκος κύματος προς όλες τις κατευθύνσεις. Με το κατάλληλο λογισμικό γίνεται μετατροπή των δεδομένων στις 4 χρωστικές που έχουν καθοριστεί για την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής. Τα αποτελέσματα παρέχονται σε χρωματογράφημα το οποίο απαιτεί συγκεκριμένο λογισμικό για την ανάλυση του (Εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.4: Αυτοματοποιημένη μέθοδος αλληλούχησης Sanger [57]. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης κατά Sanger κατέδειξαν την ύπαρξη ενός νέου κυκλικού RNA το οποίο συνίσταται από το κομμάτι του 1^{ου} εξωνίου, ολόκληρου του 4^{ου} εξωνίου και κομμάτι το 5^{ου} εξώνιο του PRMT1.

2.9 Βιοπληροφορική ανάλυση αποτελεσμάτων

Για την περαιτέρω μελέτη του νέου κυκλικού RNA εφαρμόστηκαν διάφορες βιοπληροφορικές μέθοδοι.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ένα εργαλείο για την πρόβλεψη πιθανών αλληλεπιδράσεων του κυκλικού μορίου με miRNAs. Για το συγκεκριμένο σκοπό επιλέχθηκε το mirDB γιατί σε σύγκριση με παρόμοια εργαλεία είναι το μόνο που δίνει τη δυνατότητα να εισαχθεί ως input αλληλουχία RNA της επιλογής του ενδιαφερόμενου. Συγκεκριμένα το miRDB είναι μια ηλεκτρονική βάση δεδομένων για πρόβλεψη στόχων miRNA. Όλοι οι στόχοι στο miRDB προβλέπονται από ένα εργαλείο βιοπληροφορικής, το MirTarget, το οποίο αναπτύχθηκε αναλύοντας χιλιάδες αλληλεπιδράσεις στόχων miRNA από πειράματα αλληλουχίας υψηλής απόδοσης.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη πιθανών αλληλεπιδράσεων μορίου με πρωτεΐνες, με τη βοήθεια δύο προγραμμάτων. Ένα εξ αυτών είναι το RBPmap το οποίο αποτελεί έναν διακομιστή ιστού για τη χαρτογράφηση θέσεων σύνδεσης πρωτεϊνών που δεσμεύουν RNA και επιτρέπει στους χρήστες να επιλέγουν μοτίβα από μια μεγάλη βάση δεδομένων πειραματικά καθορισμένων μοτίβων. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε το beRBP που συνιστά ένα εργαλείο για την πρόβλεψη της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών που προσδένονται σε RNAs με βάση μιας δεδομένης αλληλουχίας RNA.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης και εσωτερικών θέσεων πρόσδεσης ριβοσωμάτων. Η εύρεση των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης έγινε μέσω του ORF Finder αφού πρώτα τροποποιήθηκε η αλληλουχία σε μορφή FASTA με τη βοήθεια του προγράμματος EMBOSS Seqret. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το IRESpy που είναι ένα γρήγορο, αξιόπιστο και υψηλής απόδοσης online εργαλείο πρόβλεψης εσωτερικών ιστοτόπων εισαγωγής ριβοσωμάτων (IRES).

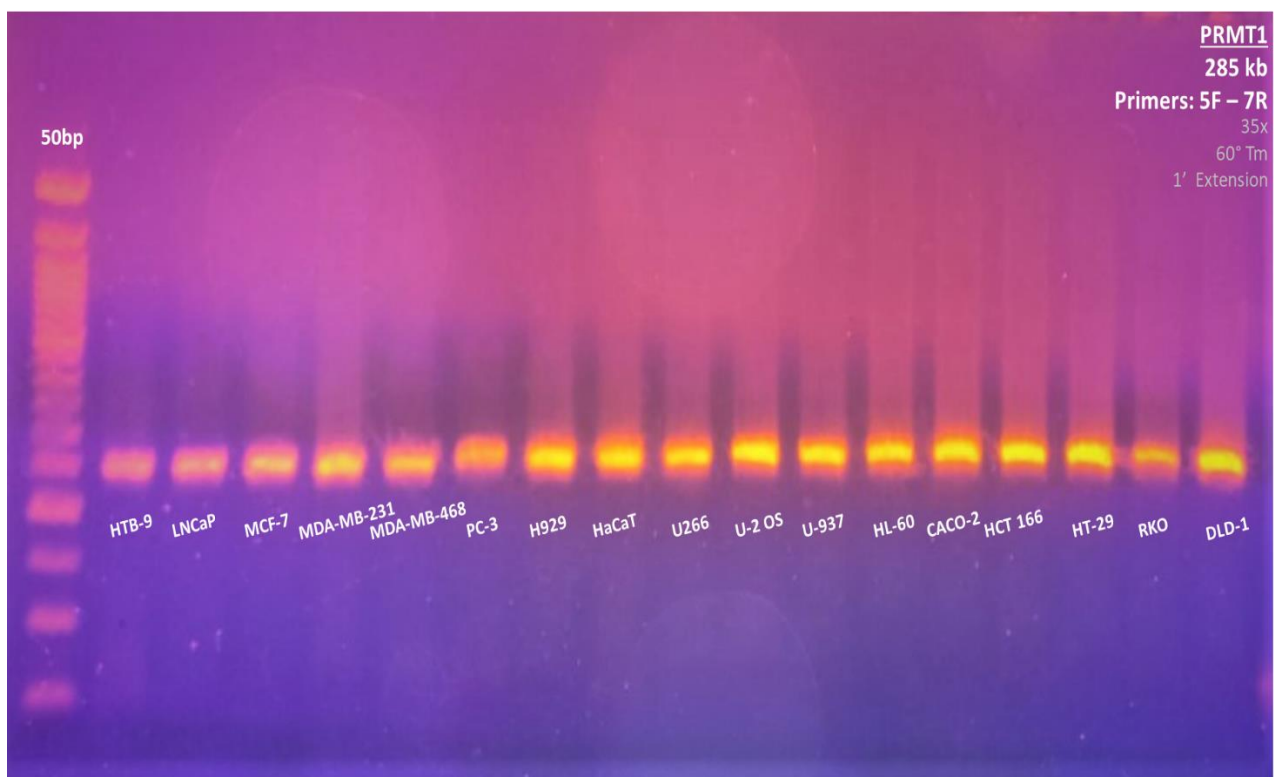
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης

3.1.1 Έλεγχος έκφρασης του γονιδίου PRMT1

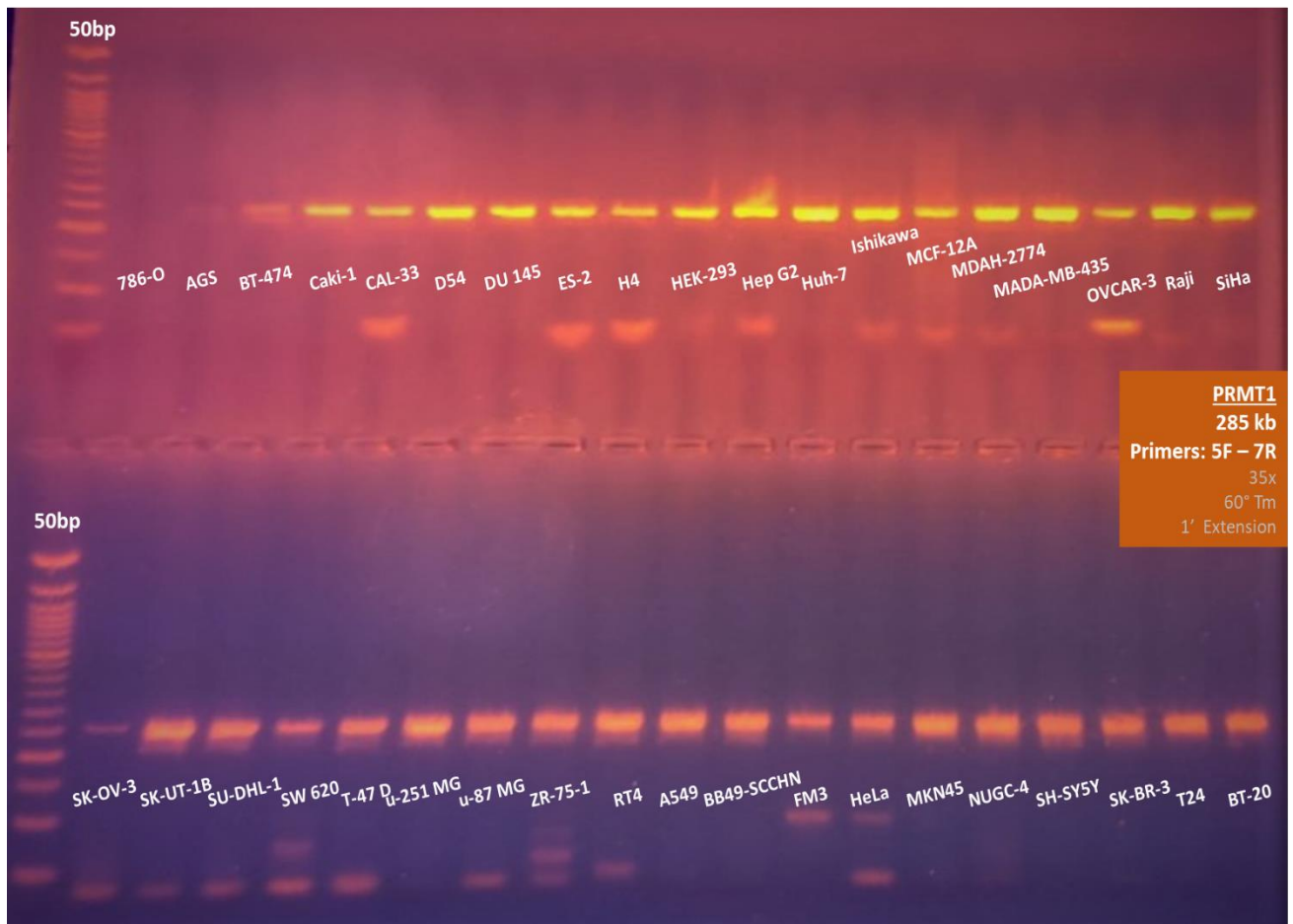
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε PCR στις 55 κυτταρικές σειρές με στόχο την ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου PRMT1 στους συγκεκριμένους ιστούς. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών που συνίσταται από τον PRMT1_5F, ο οποίος είναι συμπληρωματικός σε ένα σημείο με το 5^ο εξώνιο του γονιδίου, και τον PRMT1_7R που είναι συμπληρωματικός σε ένα σημείο με το 7^ο εξώνιο. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για τις συγκεκριμένες PCR ήταν 35 κύκλοι με Tm= 60° C και Extension για 1 min.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της συγκεκριμένης PCR παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.1, 3.2, 3.3 και επιβεβαιώνουν ότι το PRMT1 γονίδιο εμφανίζεται και μάλιστα με υψηλή έκφραση σε όλες τις σειρές που χρησιμοποιήσαμε.



Εικόνα 3.1: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% σε 17 κυτταρικές σειρές από διαφορετικούς ιστούς . Η αλληλουχία του γονιδίου, που ορίστηκε από το ζεύγος των εκκινητών ανέρχεται στις 285 bp. Στην εικόνα αυτή με τη σειρά από αριστερά προς τα

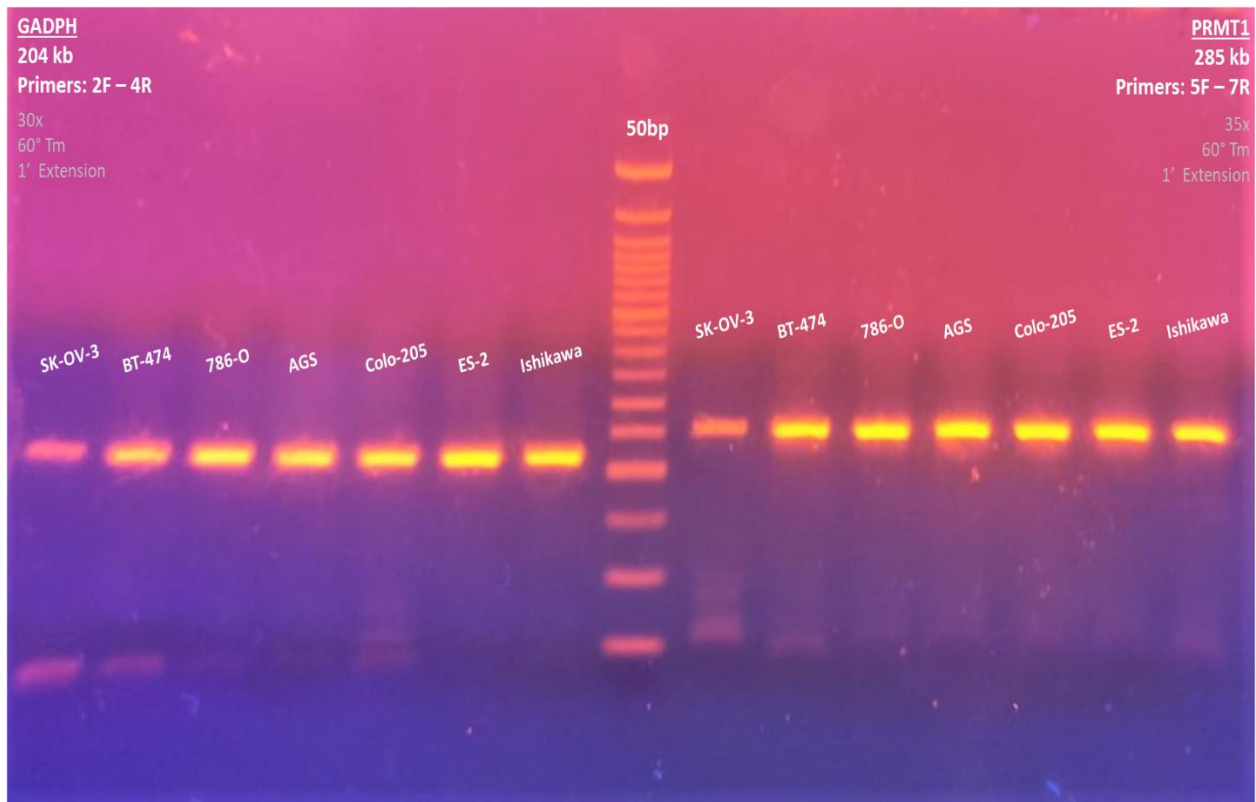
δεξιά, έχουν φορτωθεί ο Ladder (GeneRuler 50 bp Plus DNA Ladder) και τα δείγματα από τις αντιδράσεις PCR.



Εικόνα 3.2: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% σε 38 κυτταρικές σειρές από διαφορετικούς ιστούς . Η αλληλουχία του γονιδίου, που ορίστηκε από το ζεύγος των εκκινητών ανέρχεται στις 285 bp. Στην εικόνα αυτή με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά, έχουν φορτωθεί ο Ladder (GeneRuler 50 bp Plus DNA Ladder) και τα δείγματα από τις αντιδράσεις PCR.

Παρατηρώντας την Εικόνα 3.2 διακρίνουμε ότι κάποια PCR προϊόντα (786-O, AGS, BT474, SKOV-3) κατά την ηλεκτροφόρηση δεν έδωσαν την ίδια έντασης ζώνη σε σχέση με τα υπόλοιπα. Για να εξακριβώσουμε εάν αυτό αποτελεί λάθος κατά την διεξαγωγή του πειράματος ή εάν οφείλεται στην ποιότητα των cDNAs πραγματοποιήσαμε μια ακόμα αντίδραση PCR για τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου GAPDH στις κυτταρικές σειρές που δεν εμφάνισαν έντονες ζώνες στο πήκτωμα. Το GAPDH επιλέχθηκε διότι αποτελεί ένα υψηλά εκφραζόμενο housekeeping γονίδιο και άρα αναμένεται να εμφανίσει έντονες ζώνες σε όλες τις κυτταρικές σειρές που ελέγχεται εάν όντως η ποιότητα των cDNAs είναι καλή.

Πράγματι στην Εικόνα 3.3 οι σειρές που προηγουμένως δεν είχαν εμφανίσει ζώνη τελικά με επανάληψη του πειράματος και για την ανάλυση της έκφρασης του PRMT1 καθώς και για την έκφραση του GADPH εμφανίζονται. Να τονιστεί ότι για την παρατήρηση της επαναληψιμότητας χρησιμοποιήθηκαν και 3 ακόμα κυτταρικές σειρές (Colo-205, ES-2, Ishikawa) που είχαν δώσει ζώνες προηγουμένως.



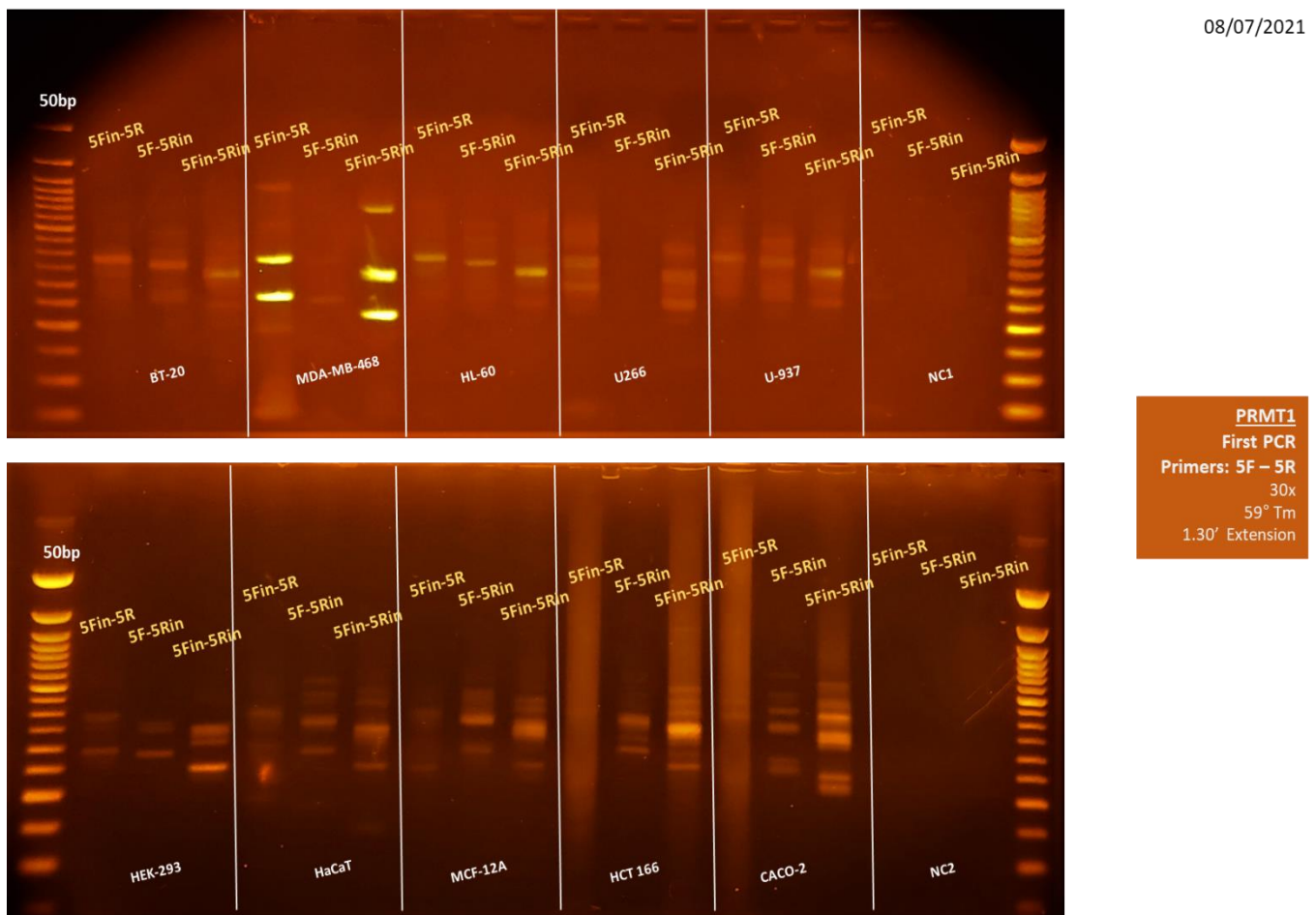
Εικόνα 3.3: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% σε 7 κυτταρικές σειρές. Στην εικόνα αυτή από τα αριστερά παρατηρούμε το πρότυπο ζώνωσης κατά την ανάλυση του GADPH. Η αλληλουχία του γονιδίου, που ορίστηκε από το ζεύγος των εκκινητών ανέρχεται στις 204 bp. Από τα δεξιά παρατηρούμε το πρότυπο ζώνωσης κατά την ανάλυση του PRMT1. Η αλληλουχία του γονιδίου, που ορίστηκε από το ζεύγος των εκκινητών ανέρχεται στις 285 bp. Ανάμεσα των δειγμάτων έχει φορτωθεί ο Ladder (GeneRuler 50 bp Plus DNA Ladder). Οι συνθήκες και των δύο PCR ήταν 35 κύκλοι με $T_m = 60^\circ \text{C}$ και Extension για 1 min.

3.1.2 Παρατήρηση κυκλικών RNAs στο PRMT1

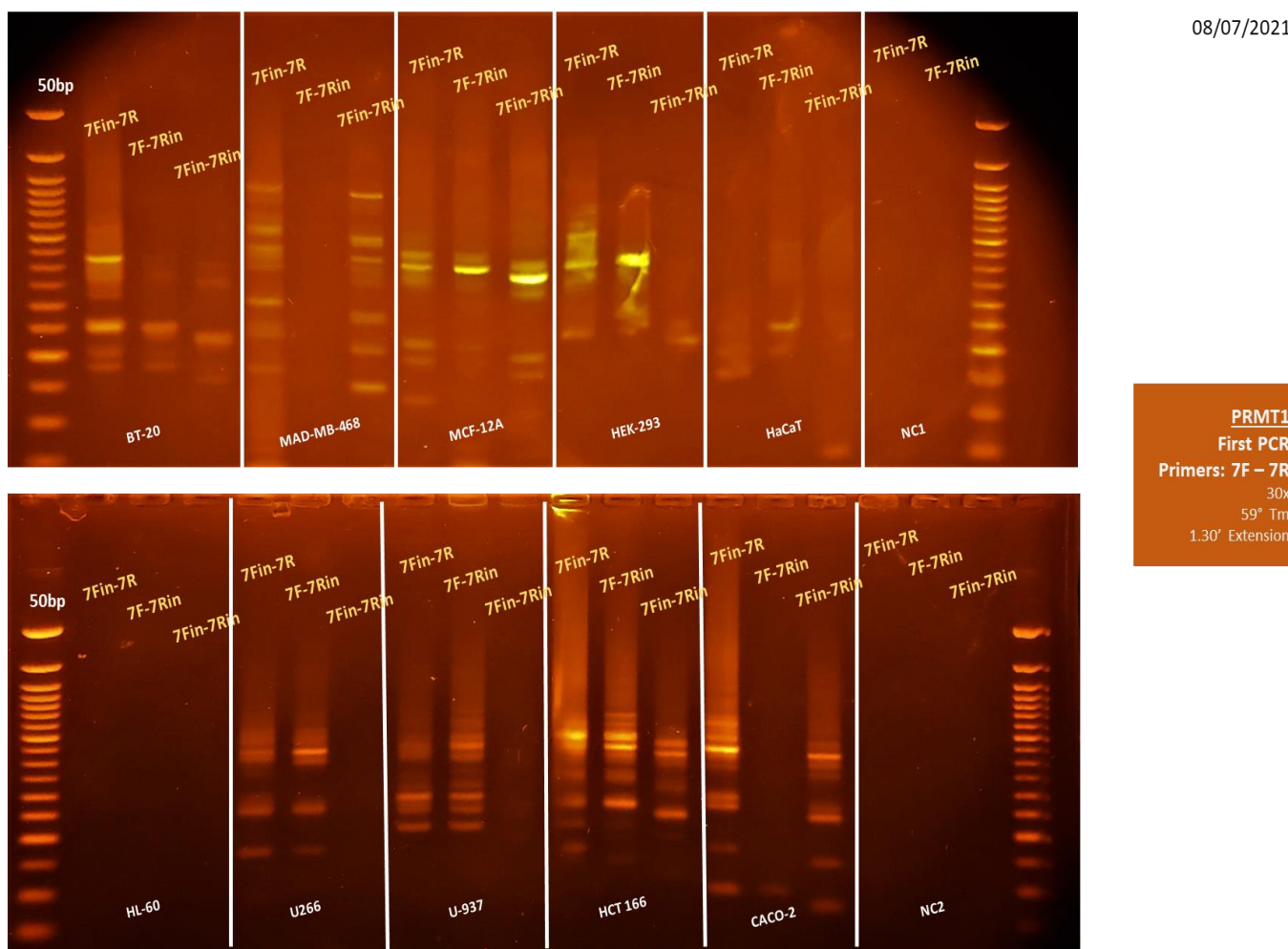
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε PCR με divergent - εκκινητές σε κάποιες από αυτές τις σειρές, με στόχο να διαπιστωθεί η ύπαρξη κυκλικών RNAs. Οι 10 σειρές που επιλέχθηκαν προέρχονταν από καρκινικούς ιστούς μαστού, παχέος εντέρου, αίματος καθώς και φυσιολογικούς.

Τα ζεύγη εκκινητών που επιλέχθηκαν για την πρώτη αντίδραση PCR ήταν οι PRMT1_5F / PRMT1_5R και οι PRMT1_7F / PRMT1_7R. Στη συνέχεια τα προϊόντα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή nested και semi-nested PCR με εκκινητές τους PRMT1_5F, PRMT1_5R, PRMT1_5Fin, PRMT1_5Rin και τους PRMT1_7F, PRMT1_7R, PRMT1_7Fin, PRMT1_7R αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 3.4 και 3.5) των παραπάνω δειγμάτων επιβεβαίωσαν τη ύπαρξη κυκλικών RNAs στις υπό μελέτη σειρές αλλά με χαμηλή έκφραση, διακρίνοντας την ένταση των ζωνών, και με αδυναμία απομόνωσης κάποιας ζώνης για επιπρόσθετη ανάλυση εξαιτίας του ότι βρίσκεται η μια σε μικρή απόσταση από την άλλη.



Εικόνα 3.4: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% σε 10 κυτταρικές σειρές από διαφορετικούς ιστούς με divergent – εκκινητές στην περιοχή του 5^{ου} εξωνίου. Στην εικόνα αυτή με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά, έχουν φορτωθεί ο Ladder (GeneRuler 50 bp Plus DNA Ladder) και τα δείγματα από τις αντιδράσεις PCR nested και semi-nested και πάλι Ladder. Οι συνθήκες των PCR ήταν 30 κύκλοι με Tm= 59° C και Extension για 1.30 min.



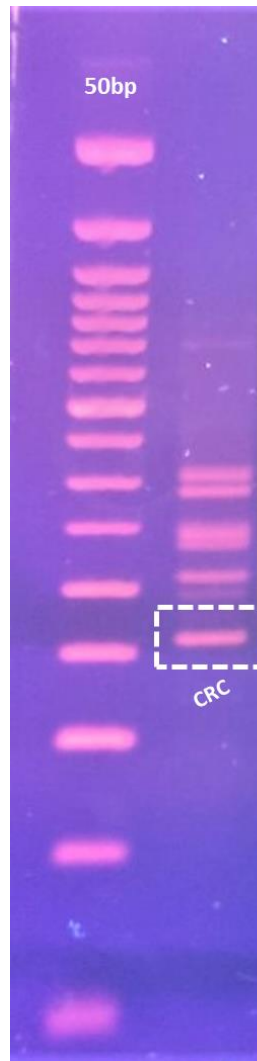
Εικόνα 3.5: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% σε 10 κυτταρικές σειρές από διαφορετικούς ιστούς με divergent – εκκινητές στην περιοχή του 7^{ου} εξωνίου. Στην εικόνα αυτή με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά, έχουν φορτωθεί ο Ladder (GeneRuler 50 bp Plus DNA Ladder) και τα δείγματα από τις αντιδράσεις PCR nested και semi-nested και πάλι Ladder. Οι συνθήκες των PCR ήταν 30 κύκλοι με Tm= 59° C και Extension για 1.30 min.

3.1.3 Μελέτη του PRMT1 σε σειρές του καρκίνου του παχέος εντέρου

Έπειτα, επιλέξαμε να συνεχίσουμε με τις σειρές του καρκίνου του παχέος εντέρου. Αρχικά, δημιουργήσαμε ένα cDNA pool από 6 σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου (DLD-1, Colo 205, HT-29, RKO, Caco-2, HCT-116), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την πραγματοποίηση επάλληλης εμφωλιασμένης PCR.

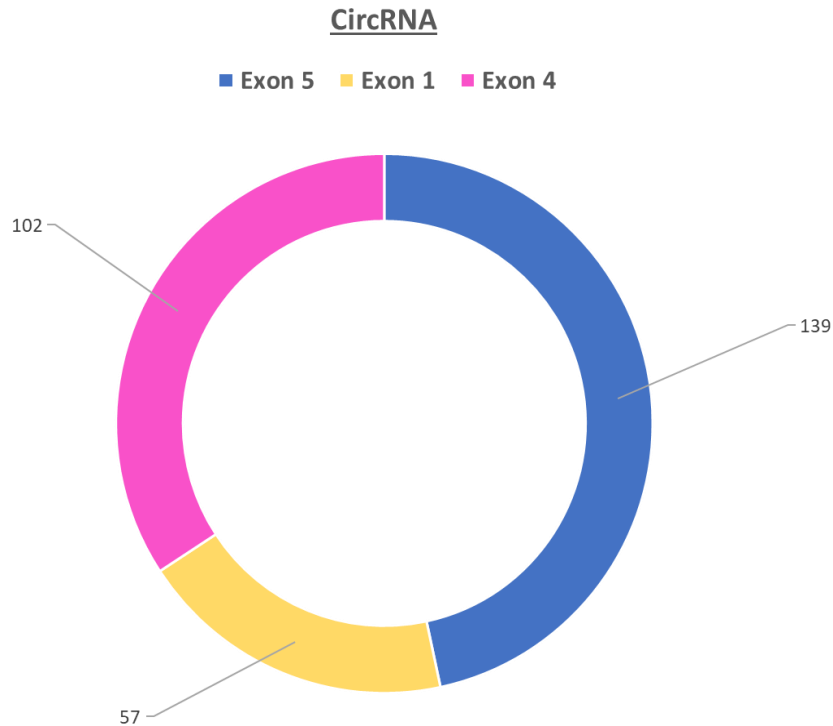
Για την πρώτη PCR που εφαρμόσαμε επιλέξαμε το ζεύγος PRMT1_5F / PRMT1_5R και τα προϊόντα αυτής χρησιμοποιήθηκαν σε μια semi-nested PCR με εκκινητές τους PRMT1_5F και PRMT1_5Rin.

Τα προϊόντα της τελευταίας PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης όπου και παρατηρήθηκε η ζώνη ενδιαφέροντος (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% cDNA pool από 6 σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου (DLD-1, Colo 205, HT-29, RKO, Caco-2, HCT-116). Στην εικόνα αυτή με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά, έχουν φορτωθεί ο Ladder (GeneRuler 50 bp Plus DNA Ladder) και το δείγμα από την αντίδραση της semi-nested PCR. Με λευκές διακεκομμένες γραμμές μαρκάρεται η ζώνη ενδιαφέροντος.

Αυτή αφού απομονώθηκε με τη βοήθεια νυστεριού από το πήκτωμα καθαρίστηκε και αλληλουχήθηκε κατά Sanger με αποτέλεσμα την εύρεση ενός νέου κυκλικού RNA το οποίο συνίσταται από το κομμάτι του 1^{ου} εξωνίου, ολόκληρου του 4^{ου} εξωνίου και κομμάτι το 5^{ου} εξώνιο του γονιδίου PRMT1 (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7: Γραφική απεικόνιση του νέου κυκλικού RNA το οποίο συνίσταται από το κομμάτι του 1^{ου} εξωνίου, ολόκληρου του 4^{ου} εξωνίου και κομμάτι το 5^{ου} εξώνιο του PRMT1. Το backsplicing του μορίου συμβαίνει μεταξύ του 1^{ου} και του 5^{ου} εξωνίου. Στην εικόνα με κίτρινο χρώμα παρουσιάζεται το 1^ο εξώνιο, με έντονο ροζ το 4^ο και με μπλε το 5^ο. Επίσης, τα βέλη δείχνουν το μήκος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κάθε εξωνίου.

Παρακάτω (Εικόνα 3.8) δίνεται η αλληλουχία του κυκλικού μορίου όπως αυτή προέκυψε από την αλληλούχιση κατά Sanger, καθώς και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν. Με βάση τα σημεία που είναι συμπληρωματικοί οι primers και την γνωστή πλέον ακολουθία RNA παραθέτονται οι αναμενόμενες αλληλουχίες των PCR.

Circ-PRMT1-Thalia

>1 (5' ext) -4-5 (3' tr)

```
GAGGAGTAGGTGCGGGTGAAGATGGCGGCAGCCGAGGCCGCGAACTGCATCATGGAGGTGTCTCT  
GTGGCCAGGCCGAAAGCAGTGAGAAGCCCAACGCTGAGGACATGACATCCAAAGATTACTACTT  
TGACTCCTACGCACACTTTGGCATCCACGAGGAGATGCTGAAGGACGAGGTGCGCACCCCTCACT  
TACCGCAACTCCATGTTTCATAACCGGCACCTCTTCAAGGACAAGGTGGTGTGCTGGACGTCGGCT  
CGGGCACCGGCATCCTCTGCATGTTTGCTGCCAAGGCCGGG
```

- 1st PCR: PRMT1_5F - PRMT1_5R
- 2nd PCR: PRMT1_5F - PRMT1_5Rin

PCR PRODUCT: 5 (3' tr) -1 (5' ext) -4-5

1st round:

```
CGGCACCTCTTCAAGGACAAGGTGGTGTGCTGGACGTCGGCTCGGGCACCGGCATCCTCTGCATGT  
TTGCTGCCAAGGCCGGGAGAGGAGTAGGTGCGGGTGAAGATGGCGGCAGCCGAGGCCGCGAACT  
GCATCATGGAGGTGTCTCTGTGGCCAGGCCGAAAGCAGTGAGAAGCCCAACGCTGAGGACATGAC  
ATCCAAAGATTACTACTTTGACTCCTACGCACACTTTGGCATCCACGAGGAGATGCTGAAGGAC  
GAGGTGCGCACCCCTCACTTACCGCAACTCCATGTTTCAT
```

2nd round:

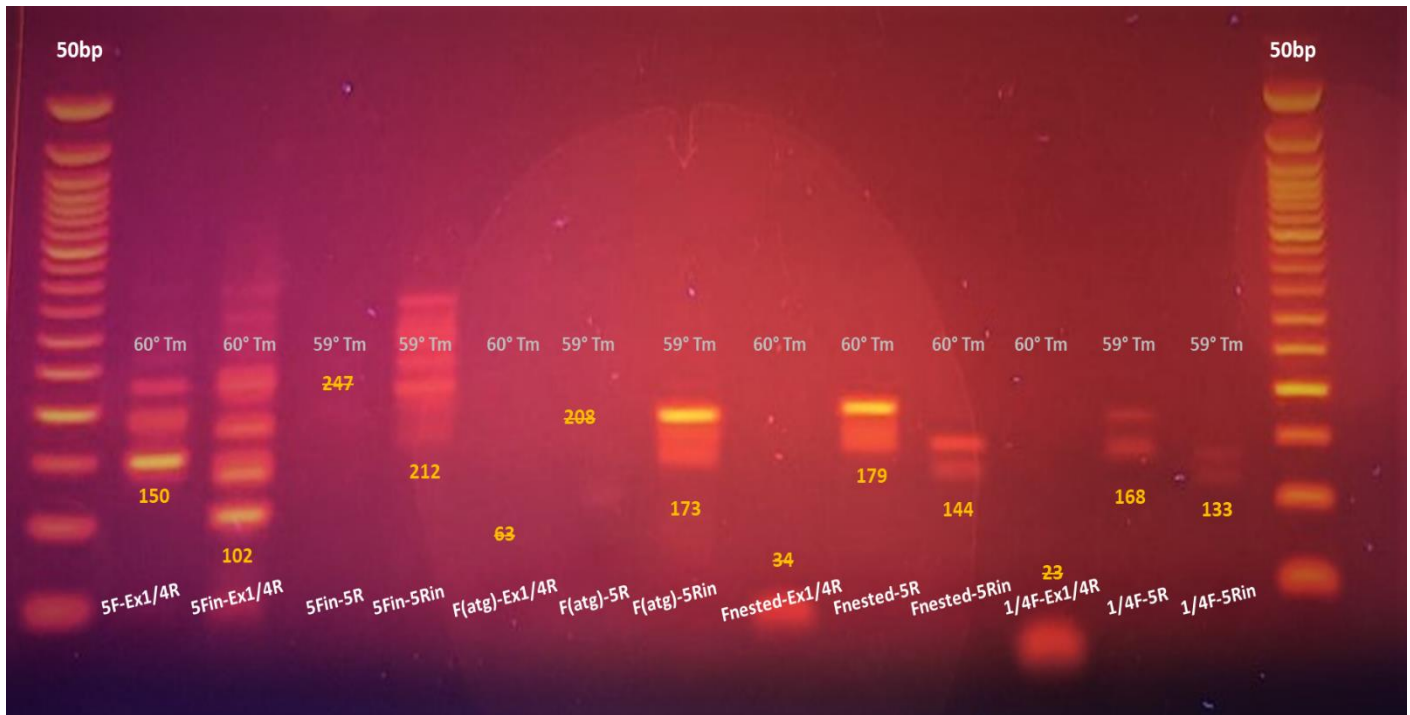
```
CGGCACCTCTTCAAGGACAAGGTGGTGTGCTGGACGTCGGCTCGGGCACCGGCATCCTCTGCATGT  
TTGCTGCCAAGGCCGGGAGAGGAGTAGGTGCGGGTGAAGATGGCGGCAGCCGAGGCCGCGAACT  
GCATCATGGAGGTGTCTCTGTGGCCAGGCCGAAAGCAGTGAGAAGCCCAACGCTGAGGACATGAC  
ATCCAAAGATTACTACTTTGACTCCTACGCACACTTTGGCATCCACGAGGAGATGCTGAAGGAC  
GAGG
```

Εικόνα 3.8: Παρουσιάζεται η αλληλουχία του κυκλικού RNA το οποίο αποτελείται από το κομμάτι του 1^{ου} εξωνίου, ολόκληρου του 4^{ου} εξωνίου και κομμάτι το 5^{ου} εξώνιο του PRMT1. Το 1^ο εξώνιο συναντάται εκτεταμένο στο 5' άκρο σε σχέση με το αντίστοιχο καταχωρημένο ενώ το 5^ο εξώνιο παρουσιάζεται κοντύτερο στο 3' άκρο.

Στην εικόνα με κίτρινο υπογραμμισμένο χρώμα παρουσιάζεται το 1^ο εξώνιο, με έντονο ροζ το 4^ο και με μπλε το 5^ο. Επίσης, ο πορτοκαλί χρωματισμός γραμμμάτων αναφέρεται στο εκτεταμένο 5' άκρο του 1^{ου} εξωνίου.

Στην πορεία διεξάγαμε επιπλέον αντιδράσεις επάλληλης εμφωλιασμένης PCR στο cDNA pool με ποικίλα ζεύγη εκκινητών με στόχο τη εύρεση ενός ζεύγος εκκινητών που θα εμφάνιζαν μόνο τη ζώνη ενδιαφέροντος στο πήκτωμα κατά την ηλεκτροφόρηση.

Ωστόσο κάτι τέτοιο όπως διακρίνουμε στην Εικόνα 3.9 δεν συνέβη, καθώς κανένα προϊόν PCR δεν έδωσε μια και μοναδική ζώνη.



Εικόνα 3.9: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% σε δείγματα PCR από το cDNA pool με 13 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών. Στην εικόνα με κίτρινο χρωματισμό γραμμάτων αναγράφεται το αναμενόμενο μήκος σε ζεύγη βάσεων της ζώνης ενδιαφέροντος, εφόσον η αλληλουχία του γονιδίου είναι ήδη γνωστή. Επιπλέον, με υπογκρί γράμματα αναγράφεται το Tm που χρησιμοποιήθηκε για κάθε ζεύγος εκκινητών.

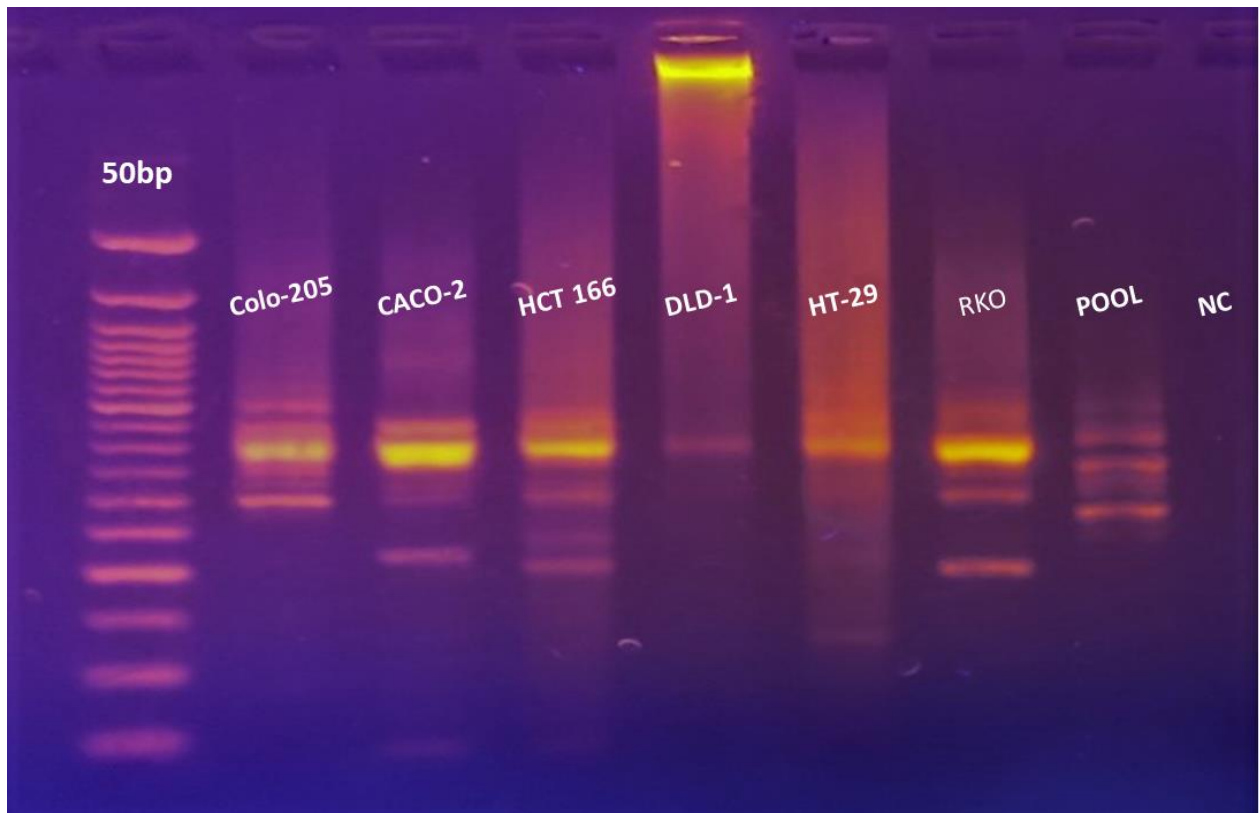
Τα απόντα πηγαδάκια οφείλονται στο ότι η αλληλουχία έχει αρκετά μικρό μέγεθος, πχ PCR product με ζεύγη εκκινητών 1/4F - Ex1/4R. Ωστόσο, σε περίπτωση αναμενόμενων ζωνών μεγάλου μήκους η απουσία μπορεί να οφείλεται σε λάθος χειρισμού, πχ PCR product με ζεύγη εκκινητών 5Fin – 5R.

Τέλος, στην εικόνα στα άκρα δεξιά και αριστερά έχει φορτωθεί ο Ladder (GeneRuler 50 bp Plus DNA Ladder) και ενδιάμεσα τα προϊόντα PCR.

Θέλοντας να ελέγξουμε αναλυτικότερα την ζώνη που ανακαλύψαμε συνεχίσαμε επαναλαμβάνοντας την επάλληλη εμφωλιασμένη PCR στα cDNAs των 6 κυτταρικών σειρών καρκίνου του παχέος εντέρου (DLD-1, Colo 205, HT-29, RKO, Caco-2, HCT-116) από τις οποίες είχε δημιουργηθεί το pool.

Έτσι, για την πρώτη PCR που εφαρμόσαμε επιλέξαμε το ζεύγος PRMT1_5F / PRMT1_5R και τα προϊόντα αυτής χρησιμοποιήθηκαν σε μια semi-nested PCR με εκκινήτες τους PRMT1_5F και PRMT1_5Rin.

Τα προϊόντα της τελευταίας PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης όπου και παρατηρήθηκε η ζώνη ενδιαφέροντος (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% σε δείγματα PCR από τα cDNAs των 6 κυτταρικών σειρών καρκίνου του παχέος εντέρου Colo 205, Caco-2, HCT-116, DLD-1, HT-29, RKO και του pool.

Στην εικόνα από δεξιά προς τα αριστερά έχει φορτωθεί ο Ladder (GeneRuler 50 bp Plus DNA Ladder), τα προϊόντα της PCR και αρνητικός μάρτυρας που συμβολίζεται με NC.

Όπως, παρατηρούμε στην Εικόνα 3.10 καμιά ζώνη που προήλθε από τις μεμονωμένες σειρές δεν αντιστοιχεί στη ζώνη που βρήκαμε και απομονώσαμε από το pool. Μια εξήγηση για αυτό το συμβάν αποτελεί ότι το κυκλικό RNA που σχετίζεται με τη συγκεκριμένη ζώνη εκφράζεται στις μεμονωμένες κυτταρικές σειρές αλλά σε πολύ μικρή συγκέντρωση. Έτσι, με την ανάμειξη αυτών των σειρών για την κατασκευή του pool, αυξάνεται η ποσότητά του με αποτέλεσμα να εμφανίζεται στο πηγαδάκι του pool στο gel.

3.2 Βιοπληροφορική ανάλυση του Κυκλικού RNA

Το κυκλικό RNA μελετήθηκε περαιτέρω στην παρούσα εργασία με βιοπληροφορικές μεθόδους. Πιο αναλυτικά, πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη πιθανών αλληλεπιδράσεων του κυκλικού αυτού μορίου με miRNAs καθώς και με πρωτεΐνες. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης και εσωτερικών θέσεων πρόσδεσης ριβοσωμάτων.

Παρακάτω παραθέεται αναλυτικά η *in silico* ανάλυση και σχολιασμός των αποτελεσμάτων της:

CASE A

>1 (5' ext) -4-5 (3' tr)

```
GAGGAGTAGGTGCGGGTGAAGATGGCGGCAGCCGAGGCCGCGAACTGCATCATGGAGGTGTCTGTGGCCAGGCCGAAAGCAGTGAGAAGCCCAACGCTGAGGACATGACATCCAAAGATTACTACTTTGACTCCTACGCACACTTTGGCATCCACGAGGAGATGCTGAAGGACGAGGTGCGCACCCTCACTTACCGCAACTCCATGTTTCATAACCGGCACCTCTTCAAGGACAAGGTGGTGCTGGA  
CGTCGGCTCGGGCACCGGCATCCTCTGCATGTTTGCTGCCAAGGCCGGG
```

CASE B

>5 (3' tr) -1 (5' ext) -4

```
GAGATGCTGAAGGACGAGGTGCGCACCTCACTTACCGCAACTCCATGTTTCATAACCGGCACCTCTTCAAGGACAAGGTGGTGCTGGACGTCGGCTCGGGCACCGGCATCCTCTGCATGTTGCTGCCAAGGCCGGGGGAGGAGTAGGTGCGGGTGAAGATGGCGGCAGCCGAGGCCGCGAACTGCATCATGGAGGTGTCTGTGGCCAGGCCGAAAGCAGTGAGAAGCCCAACGCTGAGGACATGACATCCAAAGATTACTACTTTGACTCCTACGCACACTTTGGCATCCACGAG
```

Οι δύο παραπάνω αλληλουχίες είναι το ίδιο circRNA που προέρχεται από το γονίδιο PRMT1, αλλά παρουσιάζονται με διαφορετική διάταξη των εξωνίων τους.

➤ mirDB

Το miRDB είναι μια ηλεκτρονική βάση δεδομένων για πρόβλεψη στόχων miRNA. Όλοι οι στόχοι στο miRDB προβλέπονται από ένα εργαλείο βιοπληροφορικής, το MirTarget, το οποίο αναπτύχθηκε αναλύοντας χιλιάδες αλληλεπιδράσεις στόχων miRNA από πειράματα αλληλουχίας υψηλής απόδοσης.

CASE A

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol
Details	1	77	hsa-miR-494-3p	submission
Details	2	66	hsa-miR-1306-5p	submission
Details	3	63	hsa-miR-4433b-3p	submission
Details	4	52	hsa-miR-3973	submission
Details	5	52	hsa-miR-2467-3p	submission
Details	6	51	hsa-miR-6852-3p	submission

6 miRNAs αλληλεπιδρούν με την παραπάνω ακολουθία, αλλά σημειώνουν μέτριο προς χαμηλό score.

CASE B

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol
Details	1	77	hsa-miR-494-3p	submission
Details	2	65	hsa-miR-1306-5p	submission
Details	3	65	hsa-miR-4433b-3p	submission
Details	4	54	hsa-miR-3973	submission
Details	5	52	hsa-miR-6852-3p	submission
Details	6	51	hsa-miR-648	submission

6 miRNAs αλληλεπιδρούν με την παραπάνω ακολουθία, αλλά σημειώνουν μέτριο προς χαμηλό score.

Στην συγκεκριμένη διάταξη του υπό μελέτη circRNA πάλι το hsa-miR-494-3p εμφανίζει την υψηλότερη βαθμολογία, ωστόσο παρατηρείται ένα διαφορετικό miRNA, το hsa-miR-648, και συγχρόνως απουσιάζει το hsa-miR-2467-3p.

Το hsa-miR-494-3p εμφανίζει την υψηλότερη βαθμολογία και παρακάτω αναλύεται περαιτέρω:

Mature miRNA: [hsa-miR-494-3p](#)

Mature miRNA

miRNA Name [hsa-miR-494-3p](#)
 miRNA Sequence 5' - **ugaacauacacgggaaaccuc** - 3' (length = 22)
 Predicted Targets [miRDB](#)
 Validated Targets [TarBase](#)
 miRBase ID [MIMAT0002816](#)

Precursor miRNA

Precursor Name [hsa-mir-494](#)
 Genomic Location [chr14:101029634-101029714 \(+\); nearby genomic features](#)
 Clustered miRNAs [hsa-mir-379,hsa-mir-411,hsa-mir-299,hsa-mir-380,hsa-mir-1197,hsa-mir-323a,hsa-mir-758,hsa-mir-329-1,hsa-mir-329-2,hsa-mir-494,hsa-mir-1193,hsa-mir-543,hsa-mir-495](#) (within 10kb in genome)
 NCBI GENE ID [574452](#)
 MIM ID [616036](#)
 miRBase ID [MI0003134](#)

Precursor Sequence

```

      c          gu    -  c  -  uuu
gauacu gaaggagagguu ccgugu ugu uuc uc  a
|||||  |||||||||  |||||  ||  ||  ||  u
cuauga uuuuuucccaa ggcaca aca aag ag  u
      -          ag    u  -  u  uau
  
```

➤ ORF Finder

Το ORF Finder αναζητά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF) στην νουκλεοτιδική ακολουθία που εισάγεται.

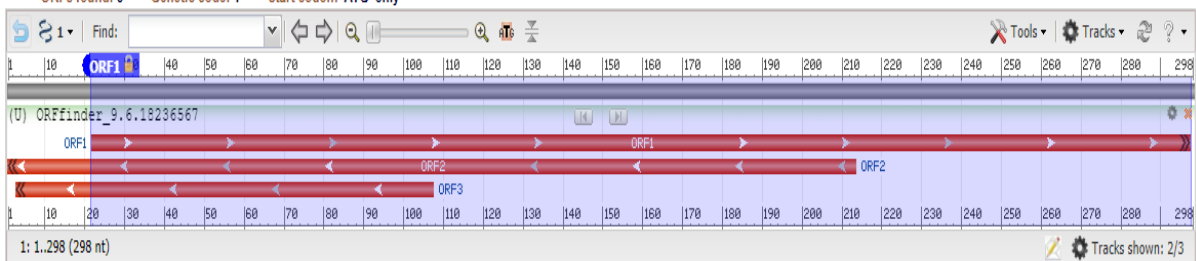
CASE A

Open Reading Frame Viewer

[Help](#)

Sequence

ORFs found: 3 Genetic code: 1 Start codon: 'ATG' only



ORF1 (91 aa)

[Display ORF as...](#)

[Mark](#)

```
>1c1|ORF1
MAAAEAAACIMEVSCGQAESSEKPIAEDMTSKDYFYFDSYAHFGIHEEMLK
DEVRTLTYRISMFHNRHLFKDKVVLVDVSGGTGLCMFAAKAG
```

[Mark subset...](#)

Marked: 0

[Download marked set](#)

as [Protein FASTA](#)

Label	Strand	Frame	Start	Stop	Length (nt aa)
ORF1	+	1	22	>297	276 91
ORF2	-	2	213	>1	213 70
ORF3	-	3	107	>3	105 34

[Six-frame translation...](#)

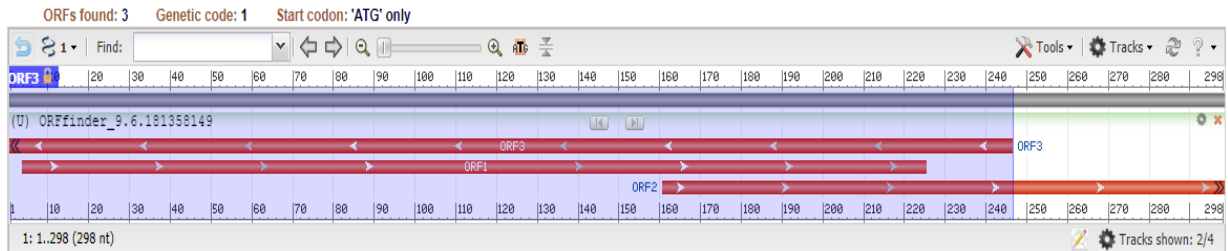
Παρατηρείται μόνο ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, με βάση την νοηματική αλυσίδα, το οποίο ωστόσο δεν εμφανίζει κωδικόνιο λήξης.

CASE B

Open Reading Frame Viewer

Help

Sequence



ORF3 (81 aa) [Display ORF as...](#) [Mark](#)

```
>|c1|ORF3
MSSALGFSLLSAHPQDTSNWF AASAAAIFRTRYSSPGLGSKHAEDAGAR
ADVQHHLVLEEVFVWIKHGVAVSEGAHLVQLHL
```

[Mark subset...](#) Marked: 0 [Download marked set](#) as [Protein FASTA](#)

Label	Strand	Frame	Start	Stop	Length (nt aa)
ORF3	-	2	246	>1	246 81
ORF1	+	1	4	225	222 73
ORF2	+	2	161	>298	138 45

[Six-frame translation...](#)

Παρατηρούνται δύο ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, με βάση την νοηματική αλυσίδα, από τα οποία ωστόσο μόνο το ένα εμφανίζει κωδικόνιο λήξης.

➤ IRESpy

Το IRESpy είναι ένα γρήγορο, αξιόπιστο και υψηλής απόδοσης online εργαλείο πρόβλεψης εσωτερικών ιστοτόπων εισαγωγής ριβοσωμάτων (IRES).

CASE A

Show Search:

	Oligo_name	Prob_IRES	Pred_label
	<input type="text" value="All"/>	<input type="text" value="All"/>	<input type="text" value="All"/>
1	EMBOSS_001	0.0597610659897327	potential not IRES

CASE B

Show entries Search:

<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>	
Oligo_name	Prob_IRES	Pred_label	
All	All	All	
1	EMBOSS_001	0.0611656755208969	potential not IRES

Παρατηρούμε ότι, κανένα IRES δεν παρατηρείται και στις δυο περιπτώσεις.

➤ **RBPmap**

Αποτελεί έναν διακομιστή ιστού για τη χαρτογράφηση θέσεων σύνδεσης πρωτεϊνών που δεσμεύουν RNA και επιτρέπει στους χρήστες να επιλέγουν μοτίβα από μια μεγάλη βάση δεδομένων πειραματικά καθορισμένων μοτίβων.

CASE A

```
Predictions for sequence: SEQ_A
Calculation parameters:
Genome: Human (hg38)
Selected motifs: All Human/Mouse motifs
Stringency level: Default
Conservation filter: Off
=====
=====
```

Protein: ANKHD1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
30		agacgww	agccgag	2.043	2.05e-02
71		agacgww	agcgga	1.725	4.23e-02
161		agacgww	agaugcu	2.507	6.09e-03
171		agacgww	ggacgag	2.072	1.91e-02

Protein: CNOT4 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
139		acacag	gcacac	2.064	1.95e-02

Protein: DAZ3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
125		acguuu	acuuug	2.025	2.14e-02

Protein: EIF4G2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
32		gcgag	ccgag	1.813	3.49e-02

Protein: ESRP1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	53	gggugg	uggagg	2.102	1.78e-02
	71	gggugg	aggcgg	2.023	2.15e-02
	236	gggugg	aggugg	1.977	2.40e-02
Protein: EWSR1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	158	aggug	aggag	1.991	2.32e-02
	161	aggug	agaug	1.991	2.32e-02
	176	aggug	aggug	2.450	7.14e-03
Protein: FMR1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	67	kgacarg	ggccagg	2.069	1.93e-02
	84	kgacarg	ugagaag	3.097	9.77e-04
	102	kgacarg	ggacaug	2.653	3.99e-03
	231	kgacarg	ggacaag	1.917	2.76e-02
Protein: FUS (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	54	ggggg	ggagg	2.016	2.19e-02
	72	ggggg	ggcgg	2.016	2.19e-02
	179	cgcg	ugcg	1.904	2.85e-02
	237	ggggg	ggugg	1.847	3.24e-02
Protein: FXR1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	100	aygacr	gaggac	3.157	7.97e-04
	105	aygacr	caugac	3.657	1.28e-04
	127	aygacr	uuugac	2.829	2.33e-03
	169	aygacr	aaggac	2.300	1.07e-02
	229	aygacr	aaggac	2.371	8.87e-03
Protein: FXR2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	171	dgacrrr	ggacgag	2.729	3.18e-03
	231	dgacrrr	ggacaag	1.757	3.95e-02
	246	dgacrrr	ggacguc	2.229	1.29e-02
Protein: G3BP2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	101	aggaur	aggacau	1.653	4.92e-02
	116	aggaur	aagauua	1.880	3.01e-02
	158	aggaur	aggagau	2.187	1.44e-02
	170	aggaur	aggacga	2.520	5.87e-03
Protein: HNRNPA0 (Hs/Mm)					

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
119		auuagu	auuacu	2.064	1.95e-02
126		auuagu	cuuuga	1.974	2.42e-02
144		auuagu	cuuugg	1.974	2.42e-02
Protein: HNRNPA1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
67		rgnyag	ggccag	2.018	2.18e-02
75		rgnyag	ggaaag	1.964	2.48e-02
82		rgnyag	agugag	1.945	2.59e-02
Protein: HNRNPF (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
52		gugkau	auggag	1.929	2.69e-02
238		gukgykg	guggugc	1.754	3.97e-02
241		gukgykg	gugcugg	1.672	4.73e-02
Protein: HNRNPH1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
85		gargag	gagaag	1.990	2.33e-02
100		gargag	gaggac	2.190	1.43e-02
157		gargag	gaggag	3.240	5.98e-04
168		gargag	gaagga	2.640	4.15e-03
172		gargag	gacgag	3.130	8.74e-04
175		gargag	gaggug	2.730	3.17e-03
Protein: HNRNPK (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
90		gccca	gccca	1.655	4.90e-02
92		ccaawmcc	ccaacgc	2.725	3.22e-03
136		cacgc	uacgc	1.952	2.55e-02
140		cacgc	cacac	1.952	2.55e-02
154		cacgc	cacga	1.952	2.55e-02
Protein: HNRNPL (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
136		uacaca	uacgca	1.895	2.90e-02
137		amayama	acgcaca	2.093	1.82e-02
138		uacaca	cgcaca	1.921	2.74e-02
140		uacaca	cacacu	1.987	2.35e-02
153		acacrav	ccacgag	1.831	3.36e-02
Protein: HNRNPU (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
59		uguauug	uguccug	2.109	1.75e-02
Protein: HNRPLL (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value

137		rcahaca	acgcaca	3.152	8.11e-04
139		rcahaca	gcacacu	2.734	3.13e-03
149		rcahaca	gcaucca	2.658	3.93e-03
Protein: IGF2BP2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
135		caacaca	cuacgca	2.057	1.98e-02
Protein: LIN28A (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
53		hggagwa	uggaggu	1.824	3.41e-02
74		hggagwa	cggaaag	2.284	1.12e-02
83		hggagwa	gugagaa	2.459	6.97e-03
98		hggagwa	cugagga	2.041	2.06e-02
158		hggagwa	aggagau	2.500	6.21e-03
Protein: MBNL1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
26		gcgcagc	cggcagc	2.861	2.11e-03
35		gcgcagc	aggccgc	2.653	3.99e-03
45		gcgcagc	cugcauc	2.458	6.99e-03
164		cgcuu	ugcug	1.788	3.69e-02
195		gcgcagc	ccgcaac	2.208	1.36e-02
242		cgcuu	ugcug	1.775	3.79e-02
253		gcuugc	ggcucg	2.532	5.67e-03
258		gcgcagc	gggcacc	1.889	2.94e-02
264		gcgcagc	cggcauc	1.736	4.13e-02
Protein: NOVA1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
209		uucauaa	uucauaa	1.667	4.78e-02
Protein: PABPC3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
75		raaaacm	ggaaagc	2.000	2.27e-02
76		raaaacm	gaaagca	2.227	1.30e-02
85		raaaacm	gagaagc	2.193	1.42e-02
Protein: PABPN1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
114		araaga	caaaga	1.667	4.78e-02
Protein: PCBP1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
190		ccwwhcc	acuuacc	2.481	6.55e-03
211		ccwwhcc	cauaacc	2.390	8.42e-03
Protein: PCBP2 (Hs/Mm)					

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
88		aaccc	aagcc	1.752	3.99e-02
89		aaccc	agccc	1.752	3.99e-02
94		aaccc	aacgc	1.752	3.99e-02
199		aaccc	aacuc	1.752	3.99e-02
Protein: PCBP3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
191		uuuycc	cuuacc	1.676	4.69e-02
Protein: PCBP4 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
250		gucgg	gucgg	1.971	2.44e-02
Protein: PRR3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
106		auuac	augac	1.815	3.48e-02
119		auuac	auuac	2.278	1.14e-02
122		auuac	acuac	1.815	3.48e-02
Protein: QKI (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
190		acuaay	acuuac	1.848	3.23e-02
Protein: RBFOX1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
265		wgcaugm	ggcaucc	2.947	1.60e-03
Protein: RBM22 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
194		accgg	accgc	1.969	2.45e-02
215		accgg	accgg	2.388	8.47e-03
Protein: RBM24 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
58		gugug	guguc	1.820	3.44e-02
63		gugug	cugug	1.720	4.27e-02
82		wgwgugd	agugaga	2.312	1.04e-02
83		gugug	gugag	1.720	4.27e-02
Protein: RBM4 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
254		gcgcgss	gcucggg	2.143	1.61e-02
Protein: RBM41 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
103		uacuu	gacau	2.337	9.72e-03
107		wuacwuk	ugacauc	2.296	1.08e-02

108	uacuu	gacau	2.337	9.72e-03
120	wuacwuk	uuacuac	2.481	6.55e-03
121	uacuu	uacua	2.692	3.55e-03
123	wuacwuk	cuacuuu	3.086	1.01e-03
124	uacuu	uacuu	3.173	7.54e-04
141	wuacwuk	acacuuu	2.160	1.54e-02
142	uacuu	cacuu	2.356	9.24e-03
189	uacuu	cacuu	1.817	3.46e-02
202	uacuu	uccau	1.971	2.44e-02
209	uacuu	uucuu	1.971	2.44e-02

Protein: RBM42 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
121		aacuamg	uacuacu	2.365	9.02e-03
133		aacuamg	uccuacg	2.514	5.97e-03

Protein: RBM45 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
78		acgca	aagca	2.687	3.60e-03
95		acgca	acgcu	3.072	1.06e-03
98		cuuac	cugag	1.743	4.07e-02
100		gacgamv	gaggaca	2.667	3.83e-03
101		acgac	aggac	2.770	2.80e-03
105		gacgamv	caugaca	2.200	1.39e-02
106		acgac	augac	2.840	2.26e-03
119		acgac	auuac	2.700	3.47e-03
122		acgac	acuac	3.270	5.38e-04
128		cuuac	uugac	2.030	2.12e-02
131		acgac	acucc	2.730	3.17e-03
134		acgac	ccuac	2.670	3.79e-03
137		acgca	acgca	3.554	1.90e-04
141		acgca	acacu	3.145	8.30e-04
155		acgca	acgag	3.301	4.82e-04
157		gacgamv	gaggaga	2.650	4.02e-03
166		cuuac	cugaa	2.366	8.99e-03
170		acgac	aggac	2.210	1.36e-02
172		gacgamv	gacgagg	2.850	2.19e-03
173		acgca	acgag	2.627	4.31e-03
180		acgca	gcgca	2.783	2.69e-03
187		cuuac	cucac	3.079	1.04e-03
191		cuuac	cuuac	3.257	5.63e-04
195		acgca	ccgca	2.602	4.63e-03
200		acacc	acucc	1.748	4.02e-02
212		cuuac	auaac	1.950	2.56e-02
229		gacgamv	aaggaca	2.000	2.27e-02
230		acgac	aggac	2.060	1.97e-02
247		gacgamv	gacgucg	2.150	1.58e-02

Protein: RBM4B (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	32	gcgcgg	ccgagg	2.663	3.87e-03
	38	gcgcgg	ccgcga	2.035	2.09e-02
	155	gcgcgg	acgagg	2.221	1.32e-02
	173	gcgcgg	acgagg	2.221	1.32e-02
	251	acggga	ucggcu	2.792	2.62e-03
	256	acggga	ucgggc	3.169	7.65e-04
	263	acggga	ccggca	2.779	2.73e-03
Protein: RBM5 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	72	garggwr	ggcggaa	1.859	3.15e-02
	76	garggwr	gaaagca	1.859	3.15e-02
Protein: RBM6 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	131	cgucca	acuccu	2.038	2.08e-02
Protein: RC3H1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	126	cuaug	cuuug	1.705	4.41e-02
	135	cuaug	cuacg	1.705	4.41e-02
	144	cuaug	cuuug	1.705	4.41e-02
Protein: SAMD4A (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	243	gckgghm	gcuggac	1.728	4.20e-02
Protein: SF1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	209	uuaaca	uucaua	1.646	4.99e-02
	212	uuaaca	auaacc	2.000	2.27e-02
Protein: SFPQ (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	55	kurrukk	gaggugu	1.741	4.08e-02
Protein: SNRNP70 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	225	rwucaag	cuucaag	1.671	4.74e-02
Protein: SNRPA (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	138	ugcaca	cgcaca	2.645	4.08e-03
	152	ugcaca	uccacg	2.671	3.78e-03
	179	ugcaca	ugcgca	2.618	4.42e-03
	181	ugcaca	cgcacc	2.855	2.15e-03

229	wugcacr	aaggaca	2.042	2.06e-02
230	ugcaca	aggaca	1.895	2.90e-02
245	ugcaca	uggacg	1.895	2.90e-02
259	ugcaca	ggcacc	2.197	1.40e-02
Protein: SRSF1 (Hs/Mm)				
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score P-value
156		gragga	cgagga	2.376 8.75e-03
168		gragga	gaagga	2.613 4.49e-03
171		gragga	ggacga	2.516 5.93e-03
228		gragga	caagga	1.742 4.08e-02
Protein: SRSF10 (Hs/Mm)				
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score P-value
26		cagcag	cggcag	2.775 2.76e-03
29		cagcag	cagccg	2.262 1.18e-02
45		cagcag	cugcau	1.813 3.49e-02
Protein: SRSF2 (Hs/Mm)				
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score P-value
27		agcagc	ggcagc	3.011 1.30e-03
53		ggagwd	uggagg	2.218 1.33e-02
56		ggagwd	aggugu	2.425 7.65e-03
79		ggagwd	agcagu	2.460 6.95e-03
101		ggagwd	aggaca	2.115 1.72e-02
158		ggagwd	aggaga	3.184 7.26e-04
Protein: SRSF4 (Hs/Mm)				
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score P-value
27		agcag	ggcag	1.842 3.27e-02
Protein: SRSF5 (Hs/Mm)				
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score P-value
28		gcagc	gcagc	2.763 2.86e-03
37		gcagc	gccgc	2.325 1.00e-02
47		gcagc	gcauc	2.325 1.00e-02
Protein: SRSF7 (Hs/Mm)				
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score P-value
100		acgacg	gaggac	2.564 5.17e-03
105		acgacg	caugac	2.346 9.49e-03
121		acgacg	uacuac	2.346 9.49e-03
154		acgacg	cacgag	2.359 9.16e-03
169		acgacg	aaggac	2.423 7.70e-03
172		acgacg	gacgag	2.603 4.62e-03
229		acgacg	aaggac	2.346 9.49e-03
247		acgacg	gacguc	2.538 5.57e-03
250		acgacg	gucggc	2.064 1.95e-02

Protein: SRSF8 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
27		agcagc	ggcagc	3.354	3.98e-04
36		agcagc	ggccgc	3.061	1.10e-03
79		agcagc	agcagu	2.159	1.54e-02
86		agcagc	agaagc	1.817	3.46e-02

Protein: SRSF9 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
53		aggag	uggag	2.238	1.26e-02
74		aggag	cggaa	2.307	1.05e-02
101		aggag	aggac	1.653	4.92e-02
155		akgavmr	acgagga	2.308	1.05e-02
158		aggag	aggag	2.990	1.39e-03
170		aggag	aggac	2.743	3.04e-03
176		akgavmr	aggugcg	2.477	6.62e-03
230		aggag	aggac	1.703	4.43e-02

Protein: TRA2A (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
85		cugaaga	gagaagc	1.687	4.58e-02
98		cugaaga	cugagga	2.164	1.52e-02
166		cugaaga	cugaagg	2.254	1.21e-02

Protein: YBX1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
43		aacaucd	aacugca	1.714	4.33e-02
46		aacaucd	ugcauca	1.766	3.87e-02
103		aacaucd	gacauga	1.766	3.87e-02
108		aacaucd	gacaucc	1.987	2.35e-02
116		aacaucd	aagauua	1.701	4.45e-02

Protein: ZC3H10 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
28		ssagcgm	gcagccg	1.877	3.03e-02
80		ssagcgm	gcaguga	1.863	3.12e-02
87		ssagcgm	gaagccc	1.863	3.12e-02
92		ssagcgm	ccaacgc	1.904	2.85e-02

Protein: ZCRB1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
208		auuaau	uuucau	1.958	2.51e-02
225		auuaau	cuucaa	1.677	4.68e-02

CASE B

Predictions for sequence: SEQ_B

Calculation parameters:

Genome: Human (hg38)

Selected motifs: All Human/Mouse motifs

Stringency level: Default

Conservation filter: Off

Protein: ANKHD1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
169		agacgww	agccgag	2.043	2.05e-02
210		agacgww	aggcgga	1.725	4.23e-02

Protein: BRUNOL5 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
119		ugugukk	uguuugc	1.763	3.89e-02

Protein: DAZ3 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
264		acguuu	acuuug	2.025	2.14e-02

Protein: EIF4G2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
123		gguugc	ugcugc	1.766	3.87e-02
151		gcgag	gcggg	1.813	3.49e-02
171		gcgag	ccgag	1.813	3.49e-02

Protein: ESRP1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
77		gggugg	aggugg	1.977	2.40e-02
135		gggugg	cggggg	2.955	1.56e-03
136		gggugg	ggggga	2.693	3.54e-03
138		gggugg	gggagg	3.068	1.08e-03
147		gggugg	aggugc	2.625	4.33e-03
153		gggugg	ggguga	2.909	1.81e-03
162		gggugg	uggcgg	2.580	4.94e-03
192		gggugg	uggagg	2.102	1.78e-02
210		gggugg	aggcgg	2.023	2.15e-02

Protein: ESRP2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
135		ugggrad	cggggga	1.816	3.47e-02
136		ugggrad	gggggag	2.053	2.00e-02
150		ugggrad	ugcgggu	1.816	3.47e-02

Protein: EWSR1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
135		gggggggg	cgggggag	2.958	1.55e-03
136		gggggggg	gggggagg	3.437	2.94e-04
138		gggggggg	gggaggag	3.380	3.62e-04
141		aggug	aggag	2.450	7.14e-03
147		aggug	aggug	2.908	1.82e-03
153		gggggggg	gggugaag	3.197	6.94e-04
159		aggug	agaug	2.450	7.14e-03

Protein: FMR1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
72		kgacarg	ggacaag	1.917	2.76e-02
126		kgacarg	ugccaag	2.417	7.82e-03
139		kgacarg	ggaggag	2.097	1.80e-02
206		kgacarg	ggccagg	2.069	1.93e-02
223		kgacarg	ugagaag	3.097	9.77e-04
241		kgacarg	ggacaug	2.653	3.99e-03

Protein: FUS (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
78		ggggg	ggugg	1.847	3.24e-02
136		ggggg	ggggg	2.790	2.64e-03
139		ggggg	ggagg	2.677	3.71e-03
163		ggggg	ggcgg	2.355	9.26e-03
193		ggggg	ggagg	2.016	2.19e-02
211		ggggg	ggcgg	2.016	2.19e-02

Protein: FXR1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
70		aygacr	aaggac	2.371	8.87e-03
239		aygacr	gaggac	3.157	7.97e-04
244		aygacr	caugac	3.657	1.28e-04
266		aygacr	uuugac	2.829	2.33e-03

Protein: FXR2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
72		dgacrrr	ggacaag	1.757	3.95e-02
87		dgacrrr	ggacguc	2.229	1.29e-02
132		dgacrrr	ggccggg	2.500	6.21e-03
139		dgacrrr	ggaggag	2.486	6.46e-03

Protein: G3BP2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
138		aggauadr	gggagga	2.240	1.25e-02
141		aggauadr	aggagua	2.520	5.87e-03
152		aggauadr	cggguga	2.240	1.25e-02
158		aggauadr	aagaugg	2.547	5.43e-03
240		aggauadr	aggacau	1.653	4.92e-02

255		aggauadr	aagauua	1.880	3.01e-02
Protein: HNRNPA0 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
258		auuagu	auuacu	2.064	1.95e-02
265		auuagu	cuuuga	1.974	2.42e-02
Protein: HNRNPA1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
139		guaguagu	ggaggagu	2.672	3.77e-03
142		guaguagu	ggaguagg	2.574	5.03e-03
206		rgnyag	ggccag	2.018	2.18e-02
214		rgnyag	ggaaag	1.964	2.48e-02
221		rgnyag	agugag	1.945	2.59e-02
Protein: HNRNPA2B1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
135		ggggg	cgggg	2.535	5.62e-03
136		ggggg	ggggg	2.783	2.69e-03
137		ggggg	gggga	2.318	1.02e-02
138		gguaguag	gggaggag	3.262	5.53e-04
139		ggggg	ggagg	2.326	1.00e-02
141		gguaguag	aggaguag	3.600	1.59e-04
143		gggua	gagua	1.800	3.59e-02
144		gguaguag	aguaggug	3.031	1.22e-03
151		ggggg	gcggg	2.326	1.00e-02
153		gguaguag	gggugaag	2.954	1.57e-03
163		ggggg	ggcgg	1.814	3.48e-02
Protein: HNRNPF (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
79		gukgykg	guggugc	1.754	3.97e-02
82		gukgykg	gugcugg	1.672	4.73e-02
132		gggagggg	ggccgggg	2.773	2.78e-03
133		gggagggg	gccggggg	2.758	2.91e-03
136		gggagggg	gggggagg	2.773	2.78e-03
137		agggu	gggga	2.194	1.41e-02
138		gggagggg	gggaggag	2.818	2.42e-03
140		gugkau	gaggag	1.893	2.92e-02
145		gukgykg	guaggug	2.557	5.28e-03
152		agggu	cgggu	2.337	9.72e-03
161		gukgykg	auggcgg	2.197	1.40e-02
191		gugkau	auggag	1.929	2.69e-02
Protein: HNRNPH1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
137		gargag	ggggag	2.460	6.95e-03
140		gargag	gaggag	3.010	1.31e-03

143		gargag	gaguag	2.500	6.21e-03
157		gargag	gaagau	3.040	1.18e-03
224		gargag	gagaag	1.990	2.33e-02
239		gargag	gaggac	2.190	1.43e-02

Protein: HNRNPH2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
132		gggaggg	ggccggg	2.533	5.65e-03
134		gggggg	ccgggg	2.736	3.11e-03
135		gggggg	cggggg	2.967	1.50e-03
136		gggggg	ggggga	2.747	3.01e-03
137		gggggg	ggggag	2.681	3.67e-03
138		gggaggg	gggagga	2.900	1.87e-03
149		gggaggg	gugcggg	2.489	6.41e-03

Protein: HNRNPK (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
229		gccca	gccca	1.655	4.90e-02
231		ccawmcc	ccaacgc	2.725	3.22e-03

Protein: HNRNPM (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
120		gguugguu	guuugcug	2.016	2.19e-02

Protein: HNRNPU (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
198		uguauug	uguccug	2.109	1.75e-02

Protein: ILF2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
132		gggugggg	ggccgggg	3.016	1.28e-03
135		gggugggg	cgggggag	2.766	2.84e-03
136		gggugggg	gggggagg	3.047	1.16e-03
137		gggua	gggga	1.800	3.59e-02
138		gggugggg	gggaggag	3.172	7.57e-04
143		gggua	gagua	1.800	3.59e-02
147		gggugggg	aggugcgg	2.844	2.23e-03
153		gggugggg	gggugaag	2.797	2.58e-03

Protein: LIN28A (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
135		hggagwa	cggggga	2.851	2.18e-03
138		hggagwa	gggagga	3.311	4.65e-04
141		hggagwa	aggagua	3.486	2.45e-04
153		hggagwa	gggugaa	3.230	6.19e-04
192		hggagwa	uggaggu	1.824	3.41e-02
213		hggagwa	cggaaag	2.284	1.12e-02
222		hggagwa	gugagaa	2.459	6.97e-03

237		hggagwa	cugagga	2.041	2.06e-02
Protein: MBNL1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
36		gcgcagc	ccgcaac	2.208	1.36e-02
83		cgcuu	ugcug	1.775	3.79e-02
94		gcuugc	ggcucg	2.532	5.67e-03
99		gcgcagc	gggcacc	1.889	2.94e-02
105		gcgcagc	cggauc	1.736	4.13e-02
115		gcuugc	ugcaug	2.078	1.89e-02
119		gcuugc	uguuug	2.195	1.41e-02
122		gcgcagc	uugcugc	1.708	4.38e-02
162		gcgcagc	uggcggc	2.444	7.26e-03
165		gcgcagc	cggcagc	2.861	2.11e-03
174		gcgcagc	aggccgc	2.653	3.99e-03
184		gcgcagc	cugcauc	2.458	6.99e-03
Protein: MSI1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
143		uaguwrg	gaguagg	2.015	2.20e-02
146		uaguwrg	uaggugc	1.818	3.45e-02
158		uaguwrg	aagaugg	1.758	3.94e-02
Protein: NOVA1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
50		uucauaa	uucauaa	1.667	4.78e-02
Protein: PABPC3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
214		raaaacm	ggaaagc	2.000	2.27e-02
215		raaaacm	gaaagca	2.227	1.30e-02
224		raaaacm	gagaagc	2.193	1.42e-02
Protein: PABPN1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
253		araaga	caaaga	1.667	4.78e-02
Protein: PCBP1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
31		ccwwhcc	acuuacc	2.481	6.55e-03
52		ccwwhcc	cauaacc	2.390	8.42e-03
Protein: PCBP2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
40		aacc	aacuc	1.752	3.99e-02
227		aacc	aagcc	1.752	3.99e-02
228		aacc	agccc	1.752	3.99e-02
233		aacc	aacgc	1.752	3.99e-02

Protein: PCBP3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	32	uuuycc	cuuacc	1.676	4.69e-02
Protein: PCBP4 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	91	gucgg	gucgg	1.971	2.44e-02
	145	gucgg	guagg	1.971	2.44e-02
Protein: PRR3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	245	auuac	augac	1.815	3.48e-02
	258	auuac	auuac	2.278	1.14e-02
	261	auuac	acuac	1.815	3.48e-02
Protein: QKI (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	31	acuaay	acuuac	1.848	3.23e-02
Protein: RBFOX1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	106	wgcaugm	ggcaucc	2.947	1.60e-03
	115	wgcaugm	ugcaugu	3.026	1.24e-03
Protein: RBM22 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	35	accgg	accgc	1.969	2.45e-02
	56	accgg	accgg	2.388	8.47e-03
Protein: RBM24 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	135	ggggg	cgggg	2.631	4.26e-03
	136	ggggg	ggggg	3.015	1.28e-03
	137	ggggg	gggga	2.631	4.26e-03
	138	ggggg	gggag	2.654	3.98e-03
	139	ggggg	ggagg	2.654	3.98e-03
	151	ggggg	gcggg	2.654	3.98e-03
	153	ggggg	gggug	2.654	3.98e-03
	163	ggggg	ggcgg	2.100	1.79e-02
	197	gugug	guguc	1.820	3.44e-02
	202	gugug	cugug	1.720	4.27e-02
	221	wgwgugd	agugaga	2.312	1.04e-02
	222	gugug	gugag	1.720	4.27e-02
Protein: RBM25 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	135	ggggag	cggggg	2.713	3.33e-03

136	ggggag	ggggga	3.011	1.30e-03
137	ggggag	ggggag	3.184	7.26e-04
152	ggggag	cgggug	2.747	3.01e-03

Protein: RBM28 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
140		gwguagd	gaggagu	3.319	4.52e-04
143		gwguagd	gaguagg	3.708	1.04e-04
155		gwguagd	gugaaga	3.292	4.97e-04

Protein: RBM38 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
147		kkguguk	aggugcg	2.205	1.37e-02
149		kkguguk	gugcggg	2.256	1.20e-02
151		kkguguk	gcgggug	2.218	1.33e-02

Protein: RBM4 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
95		gcgcgss	gcucggg	2.143	1.61e-02
134		gcgcgss	ccggggg	2.659	3.92e-03
149		gcgcgss	gugcggg	3.033	1.21e-03
151		gcgcgss	gcgggug	2.868	2.07e-03

Protein: RBM41 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
30		uacuu	cacuu	1.817	3.46e-02
43		uacuu	uccau	1.971	2.44e-02
50		uacuu	uucau	1.971	2.44e-02
242		uacuu	gacau	2.337	9.72e-03
246		wuacwuk	ugacauc	2.296	1.08e-02
247		uacuu	gacau	2.337	9.72e-03
259		wuacwuk	uuacuac	2.481	6.55e-03
260		uacuu	uacua	2.692	3.55e-03
262		wuacwuk	cuacuuu	3.086	1.01e-03
263		uacuu	uacuu	3.173	7.54e-04

Protein: RBM42 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
260		aacuamg	uacuacu	2.365	9.02e-03
272		aacuamg	uccuacg	2.405	8.09e-03

Protein: RBM45 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
28		cuuac	cucac	3.079	1.04e-03
32		cuuac	cuuac	3.257	5.63e-04
36		acgca	ccgca	2.602	4.63e-03
41		acacc	acucc	1.748	4.02e-02
53		cuuac	auaac	1.950	2.56e-02

70	gacgamv	aaggaca	2.000	2.27e-02
71	acgac	aggac	2.060	1.97e-02
88	gacgamv	gacgucg	2.150	1.58e-02
163	gacgamv	ggcggca	2.617	4.44e-03
217	acgca	aagca	2.687	3.60e-03
234	acgca	acgcu	3.072	1.06e-03
237	cuuac	cugag	1.743	4.07e-02
239	gacgamv	gaggaca	2.667	3.83e-03
240	acgac	aggac	2.770	2.80e-03
244	gacgamv	caugaca	2.200	1.39e-02
245	acgac	augac	2.840	2.26e-03
258	acgac	auuac	2.700	3.47e-03
261	acgac	acuac	3.270	5.38e-04
267	cuuac	uugac	2.030	2.12e-02
270	acgac	acucc	2.730	3.17e-03
273	acgac	ccuac	2.670	3.79e-03

Protein: RBM4B (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
92		acggga	ucggcu	2.792	2.62e-03
97		acggga	ucgggc	3.169	7.65e-04
104		acggga	ccggca	2.779	2.73e-03
134		acggga	ccgggg	2.273	1.15e-02
149		gcgcgg	gugcgg	2.872	2.04e-03
151		gcgcgg	gcgggu	2.919	1.76e-03
164		acggga	gcggca	1.844	3.26e-02
171		gcgcgg	ccgagg	2.663	3.87e-03
177		gcgcgg	ccgcga	2.035	2.09e-02

Protein: RBM5 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
139		garggwr	ggaggag	2.410	7.98e-03
211		garggwr	ggcggaa	1.859	3.15e-02
215		garggwr	gaaagca	1.859	3.15e-02

Protein: RBM6 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
270		cgucca	acuccu	2.038	2.08e-02

Protein: RC3H1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
265		cuaug	cuuug	1.705	4.41e-02

Protein: SAMD4A (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
84		gckgghm	gcuggac	1.728	4.20e-02
133		gckgghm	gccgggg	1.679	4.66e-02
151		gckgghm	gcgggug	1.790	3.67e-02

Protein: SF1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
50		uuaaca	uucaua	1.646	4.99e-02
53		uuaaca	auaacc	2.000	2.27e-02
Protein: SFPQ (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
194		kurrukk	gaggugu	1.741	4.08e-02
Protein: SNRNP70 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
66		rwucaag	cuucaag	1.671	4.74e-02
Protein: SNRPA (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
70		wugcacr	aaggaca	2.042	2.06e-02
71		ugcaca	aggaca	1.895	2.90e-02
86		ugcaca	uggacg	1.895	2.90e-02
100		ugcaca	ggcacc	2.197	1.40e-02
Protein: SRSF1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
69		gragga	caagga	1.742	4.08e-02
136		gragga	ggggga	3.097	9.77e-04
139		gragga	ggagga	3.484	2.47e-04
142		gragga	ggagua	3.043	1.17e-03
Protein: SRSF10 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
140		cagcag	gaggag	1.775	3.79e-02
143		cagcag	gaguag	2.250	1.22e-02
165		cagcag	cggcag	2.775	2.76e-03
168		cagcag	cagccg	2.262	1.18e-02
184		cagcag	cugcau	1.813	3.49e-02
Protein: SRSF11 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
141		agggg	aggag	2.019	2.17e-02
147		agggg	aggug	1.906	2.83e-02
Protein: SRSF2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
138		ggagwd	gggagg	2.977	1.46e-03
141		ggagwd	aggagu	3.299	4.85e-04
153		ggagwd	ggguga	2.782	2.70e-03
166		agcagc	ggcagc	3.011	1.30e-03
192		ggagwd	uggagg	2.218	1.33e-02

195	ggagwd	aggugu	2.425	7.65e-03
218	ggagwd	agcagu	2.460	6.95e-03
240	ggagwd	aggaca	2.115	1.72e-02

Protein: SRSF4 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
144		agcag	aguag	1.842	3.27e-02
166		agcag	ggcag	1.842	3.27e-02

Protein: SRSF5 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
164		gcagc	gcggc	2.325	1.00e-02
167		gcagc	gcagc	2.763	2.86e-03
176		gcagc	gccgc	2.325	1.00e-02
186		gcagc	gcauc	2.325	1.00e-02

Protein: SRSF7 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
70		acgacg	aaggac	2.346	9.49e-03
88		acgacg	gacguc	2.538	5.57e-03
91		acgacg	gucggc	2.064	1.95e-02
239		acgacg	gaggac	2.564	5.17e-03
244		acgacg	caugac	2.346	9.49e-03
260		acgacg	uacuac	2.346	9.49e-03

Protein: SRSF8 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
123		agcagc	ugcugc	2.280	1.13e-02
163		agcagc	ggcggc	2.963	1.52e-03
166		agcagc	ggcagc	3.354	3.98e-04
175		agcagc	ggccgc	3.061	1.10e-03
218		agcagc	agcagu	2.159	1.54e-02
225		agcagc	agaagc	1.817	3.46e-02

Protein: SRSF9 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
71		aggag	aggac	1.703	4.43e-02
138		kgrwgs	gggagga	3.296	4.90e-04
141		aggag	aggag	2.871	2.05e-03
147		akgavmr	aggugcg	1.969	2.45e-02
153		kgrwgs	gggugaa	2.944	1.62e-03
155		gggaa	gugaa	1.939	2.63e-02
192		aggag	uggag	2.238	1.26e-02
213		aggag	cggaa	2.307	1.05e-02
240		aggag	aggac	1.653	4.92e-02

Protein: TAF15 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
----------	----------	-------	-------	---------	---------

133	ggggggg	gccgggg	2.788	2.65e-03
134	ggggggg	ccggggg	2.835	2.29e-03
135	ggggggg	cggggga	2.565	5.16e-03
136	ggggggg	gggggag	2.788	2.65e-03
137	ggggggg	ggggagg	2.565	5.16e-03
139	ggggggg	ggaggag	2.694	3.53e-03
143	gggua	gagua	1.800	3.59e-02
151	ggggggg	gcgggug	2.565	5.16e-03
153	gggua	gggug	1.800	3.59e-02

Protein: TARDBP (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
120		guaug	guuug	1.837	3.31e-02
145		guaug	guagg	1.898	2.88e-02

Protein: TRA2A (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
224		cugaaga	gagaagc	1.687	4.58e-02
237		cugaaga	cugagga	2.164	1.52e-02

Protein: YBX1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
182		aacaucd	aacugca	1.714	4.33e-02
185		aacaucd	ugcauca	1.766	3.87e-02
242		aacaucd	gacauga	1.766	3.87e-02
247		aacaucd	gacaucc	1.987	2.35e-02
255		aacaucd	aagauua	1.701	4.45e-02

Protein: ZC3H10 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
167		ssagcgm	gcagccg	1.877	3.03e-02
219		ssagcgm	gcaguga	1.863	3.12e-02
226		ssagcgm	gaagccc	1.863	3.12e-02
231		ssagcgm	ccaacgc	1.904	2.85e-02

Protein: ZCRB1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
49		auuaau	uuucau	1.958	2.51e-02
66		auuaau	cuucaa	1.677	4.68e-02

Οι βαθμολογίες για τις θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνών είναι χαμηλές και για τις δύο περιπτώσεις.

➤ **beRBP**

Το beRBP είναι ένα εργαλείο για την πρόβλεψη της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών που προσδέονται σε RNAs με βάση μιας δεδομένης αλληλουχίας RNA.

CASE A

seqID	RBP	PWM	motifLen	bindingPos	Score
EMBOSS_001	A2BP1	M159_0.6	7	274	0.376
EMBOSS_001	A2BP1	M298_0.6	6	274	0.394
EMBOSS_001	CSDA	M081_0.6	7	108	0.384
EMBOSS_001	CSDA	M111_0.6	7	108	0.37
EMBOSS_001	CSDA	M260_0.6	13	86	0.376
EMBOSS_001	EIF2S1	M231_0.6	7	274	0.386
EMBOSS_001	EIF4B	M291_0.6	7	243	0.468
EMBOSS_001	FMR1	M016_0.6	7	231	0.486
EMBOSS_001	FUS	M316_0.6	4	57	0.388
EMBOSS_001	FXR1	M152_0.6	8	229	0.48
EMBOSS_001	FXR2	M020_0.6	7	171	0.408
EMBOSS_001	G3BP2	M021_0.6	7	170	0.392
EMBOSS_001	LIN28A	M153_0.6	7	98	0.434
EMBOSS_001	LIN28B	M153_0.6	7	98	0.434
EMBOSS_001	MBNL1	M037_0.6	7	117	0.414
EMBOSS_001	MBNL2	M037_0.6	7	117	0.414
EMBOSS_001	MBNL3	M037_0.6	7	117	0.414
EMBOSS_001	NCL	M245_0.6	18	158	0.388
EMBOSS_001	PABPC1	M349_0.6	7	190	0.376
EMBOSS_001	PABPC1L	M349_0.6	7	190	0.376
EMBOSS_001	PPRC1	M044_0.6	7	36	0.458
EMBOSS_001	RBFOX2	M017_0.6	7	274	0.406
EMBOSS_001	RBFOX2	M159_0.6	7	274	0.376
EMBOSS_001	RBFOX2	M297_0.6	5	47	0.388

EMBOSS_001	RBFOX2	M298_0.6	6	274	0.394
EMBOSS_001	RBFOX3	M017_0.6	7	274	0.406
EMBOSS_001	RBFOX3	M159_0.6	7	274	0.376
EMBOSS_001	RBFOX3	M297_0.6	5	47	0.388
EMBOSS_001	RBFOX3	M298_0.6	6	274	0.394
EMBOSS_001	RBM4	M050_0.6	7	254	0.424
EMBOSS_001	RBM4	M109_0.6	7	254	0.404
EMBOSS_001	RBM45	M209_0.6	7	100	0.438
EMBOSS_001	RBM47	M234_0.6	7	162	0.424
EMBOSS_001	RBM47	M235_0.6	7	162	0.43
EMBOSS_001	RBM4B	M050_0.6	7	254	0.424
EMBOSS_001	RBM4B	M109_0.6	7	254	0.404
EMBOSS_001	RBM5	M145_0.6	7	168	0.448
EMBOSS_001	RBM8A	M054_0.6	7	178	0.462
EMBOSS_001	RBMXL1	M246_0.6	5	91	0.418
EMBOSS_001	RBMXL2	M246_0.6	5	91	0.418
EMBOSS_001	RBMXL3	M246_0.6	5	91	0.418
EMBOSS_001	RBMY1A1	M246_0.6	5	91	0.418
EMBOSS_001	RBMY1B	M246_0.6	5	91	0.418
EMBOSS_001	RBMY1D	M246_0.6	5	91	0.418
EMBOSS_001	RBMY1E	M246_0.6	5	91	0.418
EMBOSS_001	RBMY1F	M246_0.6	5	91	0.418
EMBOSS_001	RBMY1J	M246_0.6	5	91	0.418
EMBOSS_001	SNRPA	M346_0.6	10	159	0.408
EMBOSS_001	SNRPA	M348_0.6	7	158	0.426
EMBOSS_001	SNRPB2	M346_0.6	10	159	0.408
EMBOSS_001	SNRPB2	M348_0.6	7	158	0.426
EMBOSS_001	SRSF1	M102_0.6	7	168	0.4
EMBOSS_001	SRSF1	M103_0.6	7	168	0.39
EMBOSS_001	SRSF1	M104_0.6	7	171	0.36
EMBOSS_001	SRSF1	M105_0.6	7	171	0.398

EMBOSS_001	SRSF1	M106_0.6	8	229	0.374
EMBOSS_001	SRSF1	M154_0.6	7	156	0.418
EMBOSS_001	SRSF1	M273_0.6	7	137	0.576
EMBOSS_001	SRSF2	M070_0.6	8	158	0.412
EMBOSS_001	SRSF3	M056_0.6	7	92	0.41
EMBOSS_001	SRSF3	M121_0.6	7	49	0.37
EMBOSS_001	SRSF4	M126_0.6	7	54	0.392
EMBOSS_001	SRSF6	M126_0.6	7	54	0.392
EMBOSS_001	SRSF7	M071_0.6	8	247	0.5
EMBOSS_001	SRSF7	M331_0.6	10	117	0.486
EMBOSS_001	SRSF9	M072_0.6	7	230	0.358
EMBOSS_001	SRSF9	M333_0.6	5	101	0.466
EMBOSS_001	STAR-PAP	M073_0.6	7	161	0.376
EMBOSS_001	TAF15	M316_0.6	4	57	0.388
EMBOSS_001	YB-1	M081_0.6	7	108	0.384
EMBOSS_001	YB-1	M111_0.6	7	108	0.37
EMBOSS_001	YTHDC1	M354_0.6	6	149	0.446
EMBOSS_001	ZC3H10	M083_0.6	7	37	0.378

GAGGAGTAGGTGCGGGTGAAGATGGCGGCAGCCGAG **GGCCGCGA**ACTGCATCATGGAGGTGTCCTGTGGCC
 ZC3H10/PPRC1 TAF15/FUS/SRSF6/SRSF4/RBFOX3/SRSF3
 AGGCGGAAAGCAGTG **AGAAAGCCCAACGCTGAGGACA** **GACATCC**AA**AGATTACTAG**TTTGACTCCT**ACGG**
 RBMY1J/RBMY1E/RBMY1F/RBMY1G/RBMY1H/RBMY1I/RBMY1J/RBMY1K/RBMY1L/RBMY1M/RBMY1N/RBMY1O/RBMY1P/RBMY1Q/RBMY1R/RBMY1S/RBMY1T/RBMY1U/RBMY1V/RBMY1W/RBMY1X/RBMY1Y/RBMY1Z/IN28A/RBMY1
 SRSF1 YTHDC1 RBM47/NCL/G3BP2/FXR2/SRSF2/STAR/BM8A/SRSF1/SNRP/PABPC1E/PABPC1
ACACTTTG**GCATCC**ACGAGGAGATGCTGAAGGACGAG**GTGGCA**CCCTC**ACTTACC**GCAACTCCATGTTT
 CATAACCGGCACCTCTTC**AAGGACAAG**GTGGT**GCTGGACGTGGGCTGGG**CACCGGCATCCTC**TGCATGT**
 FMR1/FXR1/SRSF9/SRSF8/RBM4/RBM4B/SRSF7/EIF4B RBFOX3/EIF2
 TTGCTGCCAAGGCCGGGG

CASE B

seqID	RBP	PWM	motifLen	bindingPos	Score
EMBOSS_001	A2BP1	M159_0.6	7	115	0.362
EMBOSS_001	A2BP1	M298_0.6	6	115	0.426

EMBOSS_001	EIF4B	M291_0.6	7	84	0.362
EMBOSS_001	FMR1	M016_0.6	7	72	0.452
EMBOSS_001	FUS	M316_0.6	4	78	0.37
EMBOSS_001	FXR1	M152_0.6	8	70	0.422
EMBOSS_001	FXR2	M020_0.6	7	72	0.44
EMBOSS_001	HNRNPC	M025_0.6	7	118	0.384
EMBOSS_001	LIN28A	M035_0.6	7	141	0.384
EMBOSS_001	LIN28A	M153_0.6	7	138	0.408
EMBOSS_001	LIN28B	M035_0.6	7	141	0.384
EMBOSS_001	LIN28B	M153_0.6	7	138	0.408
EMBOSS_001	PPRC1	M044_0.6	7	175	0.452
EMBOSS_001	QKI	M262_0.6	7	260	0.362
EMBOSS_001	RBFOX2	M017_0.6	7	115	0.364
EMBOSS_001	RBFOX2	M159_0.6	7	115	0.362
EMBOSS_001	RBFOX2	M297_0.6	5	116	0.398
EMBOSS_001	RBFOX2	M298_0.6	6	115	0.426
EMBOSS_001	RBFOX3	M017_0.6	7	115	0.364
EMBOSS_001	RBFOX3	M159_0.6	7	115	0.362
EMBOSS_001	RBFOX3	M297_0.6	5	116	0.398
EMBOSS_001	RBFOX3	M298_0.6	6	115	0.426
EMBOSS_001	RBM28	M047_0.6	7	143	0.388
EMBOSS_001	RBM4	M050_0.6	7	95	0.396
EMBOSS_001	RBM4	M109_0.6	7	149	0.448
EMBOSS_001	RBM45	M209_0.6	7	239	0.476
EMBOSS_001	RBM47	M235_0.6	7	157	0.358
EMBOSS_001	RBM4B	M050_0.6	7	95	0.396
EMBOSS_001	RBM4B	M109_0.6	7	149	0.448
EMBOSS_001	RBM5	M145_0.6	7	139	0.382
EMBOSS_001	RBM8A	M054_0.6	7	149	0.382
EMBOSS_001	SNRPA	M345_0.6	11	120	0.364
EMBOSS_001	SNRPA	M346_0.6	10	78	0.37

EMBOSS_001	SNRPA	M347_0.6	11	140	0.364
EMBOSS_001	SNRPB2	M345_0.6	11	120	0.364
EMBOSS_001	SNRPB2	M346_0.6	10	78	0.37
EMBOSS_001	SNRPB2	M347_0.6	11	140	0.364
EMBOSS_001	SRSF1	M102_0.6	7	139	0.412
EMBOSS_001	SRSF1	M103_0.6	7	139	0.436
EMBOSS_001	SRSF1	M104_0.6	7	139	0.384
EMBOSS_001	SRSF1	M105_0.6	7	139	0.42
EMBOSS_001	SRSF1	M106_0.6	8	70	0.452
EMBOSS_001	SRSF1	M154_0.6	7	139	0.448
EMBOSS_001	SRSF1	M273_0.6	7	177	0.464
EMBOSS_001	SRSF2	M070_0.6	8	141	0.442
EMBOSS_001	SRSF3	M056_0.6	7	231	0.41
EMBOSS_001	SRSF4	M126_0.6	7	139	0.392
EMBOSS_001	SRSF6	M126_0.6	7	139	0.392
EMBOSS_001	SRSF7	M071_0.6	8	88	0.482
EMBOSS_001	SRSF7	M331_0.6	10	256	0.414
EMBOSS_001	SRSF9	M065_0.6	7	138	0.368
EMBOSS_001	SRSF9	M333_0.6	5	71	0.388
EMBOSS_001	TAF15	M316_0.6	4	78	0.37
EMBOSS_001	YTHDC1	M354_0.6	6	107	0.424
EMBOSS_001	ZC3H10	M083_0.6	7	176	0.374
EMBOSS_001	hnRNPK	M026_0.6	7	231	0.37

GAGATGCTGAAGGACGAGGTGCGCACCTCACTTACCGCAACTCCATGTTTCATAACCGGCACCTCTTCA
BM4/FMR1/RBM4B/TAF15/FUS/FXR1/FXR2/SRSF9/SRSF7/EIF4B/SRSF1/SNRNPB2/RBFOX3/SNRPA/SNRPB2/RBFOX2/A
AGGACAAGGTGGTGGCTGGACGTCGGCTCGGGCACCGGCATCCTCTGCATGTTTGCTGCCAAGGCCGGGGG
RBM4/RBM28/RBM4B/SRSF1/SRSF9/SRSF2/SRSF1/LIN28/SRSF12/SRSF10/SNRPA/SNRPB2/RBM5/LIN28B
AGGAGTAGGTGCGGGTCAAGATGCGGCAGCCGAGGCCGCGAACTGCATCATGGAGGTGTCTGTGGCCA
hnRNPK/SRSF3/BM45 SRSF7/QKI
GGCGGAAAGCAGTGAGAAGCCCAACGCTGAGGACATGACATCCAAAGATTACTACTTTGACTCCTACGCA
CACTTTGGCATCCACGAG

Συγκρίνοντας τις δύο περιπτώσεις παρατηρούμε ότι στο σημείο που παραμένει κοινό μετά την αναδιάταξη συναντάμε τις ίδιες RBPs ωστόσο λόγω της αναδιάταξης εμφανίζονται νέες θέσεις πρόσδεσης και χάνονται άλλες.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης από πρωτεΐνες είναι μια σημαντική μετα-μεταφραστική τροποποίηση που φαίνεται να ρυθμίζει μια ποικιλία κυτταρικών διεργασιών, όπως τη μεταγωγή σήματος, το μεταβολισμό του RNA, τη δομή της χρωματίνης, καθώς και τη μετακίνηση τόσο του RNA όσο και ποικίλων πρωτεϊνών. Τα ένζυμα που ευθύνονται για αυτόν τον τύπο τροποποίησης είναι τα PRMT [58].

Η πρωτεϊνική μεθυλτρανσφεράση αργινίνης 1, μέλος της παραπάνω οικογένειας, αντιπροσωπεύει την επικρατούσα πρωτεϊνική μεθυλτρανσφεράση στα ανθρώπινα κύτταρα. Οι κύριοι στόχοι του PRMT1 περιλαμβάνουν συστατικά των hnRNPs, της ιστόνης H4 και τον συνεργοποιητή του υποδοχέα που επάγει τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων [22, 59].

Είναι γνωστό εδώ και πολύ καιρό ότι οι αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης ορισμένων γονιδίων συσχετίζονται έντονα με την εμφάνιση καρκίνου. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια εμπλέκονται σε αναπτυξιακές διαδικασίες και ρυθμιστικά γεγονότα του κυτταρικού κύκλου, όπως MLH1 και MLH2, TP53, LKB1, όσον αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Αν και ο φυσιολογικός ρόλος του PRMT1 δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη πλήρως, έχουν διατυπωθεί αρκετές υποθέσεις. Μεταξύ άλλων, έχει προταθεί ένας ρόλος στον καρκίνο του παχέος εντέρου για αυτό το ένζυμο [60].

Η παραγωγή ρυθμιστικών RNAs, τα οποία παράγονται από ένα μη κανονικό συμβάν ματίσματος μπορεί να είναι ένδειξη ασθένειας όπως ο καρκίνος και η αναλυτικότερη μελέτη τέτοιων μορίων είναι πιθανό να οδηγήσει σε απαντήσεις και συμπεράσματα σχετικά τους λόγους που τα κύτταρα ξεφεύγουν από το αυστηρά και άρτιο προγραμματισμένο μονοπάτι λειτουργίας τους. Για αυτό το λόγο στην παρούσα διπλωματική πραγματοποιήθηκε ανάλυση του PRMT1 γονιδίου με στόχο την αναζήτηση κυκλικών μορίων RNA σε κυτταρικές σειρές του καρκίνου του παχέος εντέρου

Κατά την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε PCR με δύο ζεύγη divergent – εκκινητών ένα ζεύγος συμπληρωματικό με αλληλουχίες που συναντώνται στο 5^ο εξώνιο του γονιδίου PRMT1 και το άλλο συμπληρωματικό με αλληλουχίες του 7^{ου} εξωνίου. Αρχικά, σκοπός μας ήταν να διαπιστωθεί η ύπαρξη κυκλικών RNAs σε 10 κυτταρικές σειρές προερχόμενες από διαφορετικούς ιστούς. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των PCR δειγμάτων ήταν θετικά αφού τελικά παρατηρήθηκαν πρότυπα ζωνών που μαρτυρούν την ύπαρξη κυκλικών RNAs. Ωστόσο, δεν ακολουθήθηκε περαιτέρω μελέτη αυτών των ευρημάτων, διότι επιλέξαμε να συνεχίσουμε με τις σειρές του καρκίνου του παχέος εντέρου. Έτσι, μια βελτιστοποίηση του παραπάνω πειράματος θα συνιστούσε η επιπλέον ανάλυση των αποτελεσμάτων του πιο εξειδικευμένα για κάθε κυτταρική σειρά που έδωσε θετική εικόνα, γεγονός που δεν πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική λόγω έλλειψης χρόνου.

Η αναζήτηση μας, ωστόσο, στο γονίδιο του PRMT1 οδήγησε εύρεση ενός νέου κυκλικού RNA το οποίο συνίσταται από το κομμάτι του 1^{ου} εξωνίου, ολόκληρου του 4^{ου} εξωνίου και κομμάτι το 5^{ου} εξώνιο του PRMT1. Παρόλα αυτά, η ανακάλυψη αυτή αναγεννά πολλά ερωτήματα τα οποία χρήζουν άμεσης απάντησης.

Καταρχάς, το νέο κυκλικό RNA προήλθε από ένα cDNA pool, 6 σειρών καρκίνου του παχέος εντέρου (DLD-1, Colo 205, HT-29, RKO, Caco-2, HCT-116). Εντούτοις, όταν πραγματοποιήθηκε επάλληλη εμφωλιασμένη PCR σε cDNA προερχόμενα από κάθε κυτταρική σειρά και ύστερα ηλεκτροφόρηση των προϊόντων αυτής σε πήκτωμα αγαρόζης η ζώνη ενδιαφέροντος απουσίαζε και από τις 6 σειρές. Γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το συγκεκριμένο μόριο μπορεί να υπάρχει σε κάποιες κυτταρικές σειρές αλλά όχι σε υψηλές συγκεντρώσεις. Συνεπώς, η συμπεριφορά αυτού του CircRNA σε κάθε μεμονωμένη κυτταρική σειρά δεν ήταν δυνατόν να διευκρινιστεί και να αναλυθεί περαιτέρω πειραματικά. Παρόλο τη πιθανή χαμηλή παρουσία του, μπορεί να δρα έμμεσα και συνεργατικά με άλλα ρυθμιστικά μόρια RNA, επηρεάζοντας τελικώς τις κυτταρικές λειτουργίες και κατ' επέκταση την πορεία της ασθένειας.

Ακόμη, τα προϊόντα της PCR που προήλθαν το cDNA και ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Εκτός της ζώνη ενδιαφέροντος που παρατηρήθηκε, καθαρίστηκε με χρήση μικροφυγοκεντρικών στηλών και αλληλουχίστηκε κατά Sanger. Εμφάνισαν στο πήκτωμα και άλλες ζώνες οι οποίες ωστόσο ήταν δύσκολο να απομονωθούν για να αναλυθούν εκτενέστερα. Πιθανώς, η αλλαγή της συγκέντρωσης του gel ή η επιλογή πολυακρυλαμίδης αντί της

αγαρόζης να αύξανε την διακριτική ικανότητα, καθιστώντας πιο εφικτό την απομόνωση και άλλων ζωνών. Ωστόσο, δεδομένου ότι οι ζώνες αυτές έχουν μεγαλύτερο μήκος σε bps από αυτή που ασχοληθήκαμε ίσως να μην μπορούσαμε να τις ενισχύσουμε τόσο ώστε να τηρούν τις προδιαγραφές που απαιτούνται για να εφαρμοστεί η αλληλούχηση κατά Sanger.

Επιπρόσθετα, κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήσαμε διάφορα ζεύγη εκκινητών και πραγματοποιήσαμε επιπλέον αντιδράσεις επάλληλης εμφωλιασμένης PCR στο cDNA pool με στόχο τη εύρεση ενός ζεύγους εκκινητών που θα εμφάνιζε μόνο τη ζώνη ενδιαφέροντος στο πήκτωμα κατά την ηλεκτροφόρηση. Παρόλα αυτά κάτι τέτοιο δεν συνέβη καθώς κανένα προϊόν PCR δεν έδωσε μια και μοναδική ζώνη. Μια μελλοντική βελτιστοποίηση του συγκεκριμένου πειράματος θα ήταν η επανάληψή του με περισσότερα και πιο αποτελεσματικά ζεύγη εκκινητών που πιθανώς θα οδηγούσαν στην απομόνωση ενός και μοναδικού προϊόντος.

Επιπλέον, κατά την *in silico* ανάλυση διαπιστώσαμε ότι το κυκλικό RNA που μελετάμε αλληλεπιδρά με διάφορα micro RNAs. Ύστερα, από βιβλιογραφική μελέτη αυτών των μορίων σχετικά με τον τρόπο δράσης τους στο καρκίνο του παχέος εντέρου, αναζήτησης της ύπαρξης συσχέτισης με το γονίδιο PRMT1 καθώς και παρατήρηση του τρόπου δράση τους τόσο μεμονωμένα όσο και συνεργατικά με άλλα μόρια RNAs καταλήξαμε σε κάποια εύλογα συμπεράσματα. Καταρχάς, τα microRNAs που βρέθηκαν ότι συνδέονται στο κυκλικό μας μόριο συμμετέχουν γενικότερα στην εξέλιξη του καρκίνου σε διάφορους ιστούς και ειδικότερα αρκετά από αυτά στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Παραδείγματος χάριν το miR-494-3p συνιστά το miRNA που συγκέντρωσε το υψηλότερο score κατά την ανάλυση με το πρόγραμμα miRDB για την πρόβλεψη πιθανών αλληλεπιδράσεων του κυκλικού μας μορίου με miRNA. Έχει αποδειχθεί ότι το NNT-AS1, ένα μακρύ μη κωδικοποιητικό RNA, μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση PRMT1 μέσω του miR-494-3p, προάγοντας με αυτόν τον τρόπο τον πολλαπλασιασμό και τις μεταστάσεις κυττάρων γλοιώματος μέσω του άξονα miR-494-3p/PRMT1 [61, 62]. Με βάση αυτό και με την ήδη υπάρχουσα γνώση για την θετικό ή αρνητικό τρόπο που έχουν τη δυνατότητα να επιδρούν τα κυκλικά RNAs τόσο σε φυσιολογικούς όσο και καρκινικούς ιστούς συμπεραίνουμε ότι η πρόσδεση miRNAs στο κυκλικό μόριο που βρέθηκε στο εργαστήριο μας είναι πολύ πιθανό να επηρεάζει την κυτταρική λειτουργία των καρκινικών σειρών που αναλύσαμε, αποτελώντας ένα καινούργιο θέμα για επιπλέον μελλοντική ανάλυση [63].

Προφανώς, η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία συντελεί την αποτύπωση μιας πρώτης προσπάθειας για την εύρεση κυκλικών μορίων RNA στο γονίδιο PRMT1. Με αφορμή το συγκεκριμένο εγχείρημα μπορούν να γίνουν επιπλέον πειράματα που θα σχετίζονται με την περαιτέρω μελέτη του κυκλικού RNA που ανακαλύψαμε τα οποία θα αφορούν αφενός τη δράση και τη λειτουργία του στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου αφετέρου την ύπαρξη του σε άλλες κυτταρικές σειρές και ιστούς εκτός αυτών που μελετήθηκαν. Πιο αναλυτικά, αντικείμενο άμεσης μελέτης αποτελεί επίσης η συμπεριφορά του μορίου στο κύτταρο. Ένω, εκτός του τρόπου δράσης του οφείλεται να καθοριστεί και η κυτταρική θέση όπου εκτελεί το ρόλο του. Ανοσοϊστοχημικά πειράματα έχουν αποδείξει ότι σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς του παχέος εντέρου το PRMT1 συναντάται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ η παρουσία του στον πυρήνα είναι σπάνια [64].

Εν κατακλείδι, τα CircRNAs αποτελούν ένα αρκετά καινούργιο και καινοτόμο πεδίο μελέτης, το οποίο μπορεί να αποβεί άκρως βοηθητικό και χρήσιμο στις επόμενες δεκαετίες. Τα κυκλικά RNAs μέχρι πριν μερικά χρόνια θεωρούνταν απλώς παραπροϊόντα συγκόλλησης κατά τη διαδικασία της συρραφής και οι μελέτες πάνω σε αυτά ήταν ελάχιστες ωστόσο, πλέον καταλαμβάνουν ένα βασικό και κομβικό ρόλο στον κόσμο των ρυθμιστικών RNAs και για αυτό ακριβώς το λόγο η εκτενέστερη μελέτη του κυκλικού μορίου που ανακαλύφθηκε στο εργαστήριό μας κρίνεται απαραίτητη.

Τα CircRNAs ρυθμίζουν το κυτταρικό μεταγράφο με διάφορους μηχανισμούς και συμβάλλουν σε μια σειρά λειτουργιών του κυττάρου. Ακόμα, έχει διαπιστωθεί πως τα μόρια αυτά συμμετέχουν δραστικά στην καρκινική ρύθμιση και για αυτό μπορούν να χρησιμεύσουν ως πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες για τη διάγνωση και την πρόγνωση αυτής της ασθένειας. Δυστυχώς, στις μέρες μας κανένα από τα υπο μελέτη κυκλικά RNA δεν αποτελεί αυτό καθ' αυτό επαρκές κλινικό στοιχείο για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την πορεία της νόσου με την οποία σχετίζεται. Έτσι, πιθανή πρόοδος καθίσταται η αξιολόγηση ενός συνδυασμού CircRNAs ως υπογραφή για διάγνωση και συσχέτιση με τα κλινικά χαρακτηριστικά.

Επιπρόσθετα, τα CircRNAs έχουν τεράστιες δυνατότητες για χρήση ως θεραπευτικοί στόχοι, δεδομένου ότι νέες και αποτελεσματικές θεραπείες μπορούν να σχεδιαστούν είτε με την εκούσια ρύθμιση της έκφρασης των ενδογενών κυκλικών μορίων είτε με την εξωγενή χορήγηση εργαστηριακά κατασκευασμένων με επιλεγμένα χαρακτηριστικά CircRNAs. Προς

το παρόν, η χρήση των circRNA ως θεραπευτικών παραγόντων περιορίζεται στον εργαστήριο και απαιτεί περαιτέρω έρευνα για κλινική τους χρήση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η ύπαρξη κυκλικών RNAs του γονιδίου *PRMT1* σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου. Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί την *πρωτεϊνική μεθυλτρανσφεράση αργινίνης 1*, ένα ένζυμο που λειτουργεί ως μεθυλτρανσφεράση ιστόνης ειδική για την ιστόνη H4 στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η μεθυλίωση της συγκεκριμένης ιστόνης από το ένζυμο επάγει την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, επηρεάζοντας μία πληθώρα σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως τη σηματοδότηση, την επιδιόρθωση του DNA, την ωρίμανση και μεταφορά του RNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, την προστασία των πρωτεϊνών, τη συναρμολόγηση των ριβοσωμάτων, καθώς και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Το κυκλικό RNA (ή το CircRNA) είναι ένας τύπος μονόκλωνου RNA το οποίο, σε αντίθεση με το γραμμικό RNA, σχηματίζει έναν ομοιοπολικά κλειστό, συνεχή βρόχο και παράγεται από ένα μη κανονικό συμβάν ματίσματος. Τα circRNAs έχει διαπιστωθεί ότι συμμετέχουν στην ρύθμιση της έκφρασης των γονικών γονιδίων, του εναλλακτικού ματίσματος, της μεταγραφής καθώς και της μετάφρασης. Επίσης, μπορούν δράσουν ως σπόγγοι για miRNAs, RBPs και ως «δολώματα» πρωτεϊνών. Έχει παρατηρηθεί ότι κάποια κυκλικά RNAs μπορούν και μεταφράζονται σε πεπτίδια / πρωτεΐνες. Ακόμη, τα circRNAs συμμετέχουν στην ρύθμιση σε καρκινικά κύτταρα με ποικίλους τρόπους, επηρεάζοντας την πορεία της γονιδιακής έκφρασης, αλληλοεπιδρώντας με πρωτεΐνες και άλλων ειδών RNAs καθώς και μέσω επιγενετικών μηχανισμών.

Κατά την εκτέλεση της παρούσας διπλωματικής εργασίας διεξάχθηκε η αναζήτηση κυκλικών RNAs στο γονίδιο *PRMT1* σε καρκινικές σειρές κυττάρων παχέος εντέρου, μέσω μιας σειράς πειραμάτων που περιλάμβαναν την απομόνωση RNA, τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του, την εφαρμογή των μεθόδων της αντίστροφης μεταγραφής, της επάλληλης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και της αλληλούχησης κατά Sanger.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάλυση έκφρασης του γονιδίου *PRMT1* σε 55 κυτταρικές σειρές διαφορετικής ιστοικής προέλευσης. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε PCR με divergent - εκκινητές σε κάποιες από αυτές τις σειρές, με στόχο να διαπιστωθεί η ύπαρξη κυκλικών RNAs.

Επιλέξαμε να συνεχίσουμε με τις σειρές του καρκίνου του παχέος εντέρου. Δημιουργήθηκε ένα cDNA pool από 6 σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου (DLD-1, Colo 205, HT-29, RKO, Caco-2, HCT-116), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την πραγματοποίηση επάλληλης εμφωλιασμένης PCR. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Η ζώνη ενδιαφέροντος που παρατηρήθηκε, καθαρίστηκε με χρήση μικροφυγοκεντρικών στηλών και αλληλουχήθηκε κατά Sanger, με αποτέλεσμα την εύρεση ενός νέου κυκλικού RNA το οποίο συνίσταται από το κομμάτι του 1^{ου} εξωνίου, ολόκληρου του 4^{ου} εξωνίου και κομμάτι το 5^{ου} εξώνιο του PRMT1.

Συνεπώς, η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε οδήγησε στην εύρεση ενός καινούργιου μορίου το οποίο μελετήθηκε περαιτέρω στην παρούσα εργασία με βιοπληροφορικές μεθόδους. Πιο αναλυτικά, πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη πιθανών αλληλεπιδράσεων του κυκλικού αυτού μορίου με miRNAs καθώς και με πρωτεΐνες. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης και εσωτερικών θέσεων πρόσδεσης ριβοσωμάτων.

Παρ' όλα αυτά η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μια πρώτη προσέγγιση του θέματος η οποία επιδέχεται αρκετών βελτιστοποιήσεων. Επιπροσθέτως, με αφορμή τη συγκεκριμένη εργασία, μπορούν να γίνουν επιπλέον πειράματα που θα σχετίζονται με την περαιτέρω μελέτη του συγκεκριμένου κυκλικού RNA που θα αφορούν αφενός τη δράση και τη λειτουργία του στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου αφετέρου την ύπαρξη του και σε άλλες κυτταρικές σειρές και ιστούς εκτός αυτών που μελετήθηκαν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gordon, J.A.R., et al., *Chromatin*, in *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, S. Maloy and K. Hughes, Editors. 2013, Academic Press: San Diego. p. 538-541.
2. Lee, J.Y. and T.L. Orr-Weaver, *Chromatin*, in *Encyclopedia of Genetics*, S. Brenner and J.H. Miller, Editors. 2001, Academic Press: New York. p. 340-343.
3. Osamor, V., et al., *The interplay of post-translational modification and gene therapy*. Drug Design, Development and Therapy, 2016. **10**: p. 861.
4. Grewal, S.I. and S. Jia, *Heterochromatin revisited*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(1): p. 35-46.
5. Han, M. and M. Grunstein, *Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo*. Cell, 1988. **55**(6): p. 1137-45.
6. Luger, K. and T.J. Richmond, *The histone tails of the nucleosome*. Curr Opin Genet Dev, 1998. **8**(2): p. 140-6.
7. Wolffe, A.P. and J.J. Hayes, *Chromatin disruption and modification*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(3): p. 711-20.
8. Rice, J.C. and C.D. Allis, *Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(3): p. 263-73.
9. Zhang, Y. and D. Reinberg, *Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails*. Genes Dev, 2001. **15**(18): p. 2343-60.
10. Struhl, K., *Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms*. Genes Dev, 1998. **12**(5): p. 599-606.
11. Brownell, J.E., et al., *Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation*. Cell, 1996. **84**(6): p. 843-51.
12. Lebrilla, C.B. and L.K. Mahal, *Post-translation modifications*. Current opinion in chemical biology, 2009. **13**(4): p. 373-374.
13. Conserva, F., L. Gesualdo, and M. Papale, *A Systems Biology Overview on Human Diabetic Nephropathy: From Genetic Susceptibility to Post-Transcriptional and Post-Translational Modifications*. Journal of Diabetes Research, 2016. **2016**: p. 7934504.
14. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
15. Du, J., et al., *DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2015. **16**: p. 519-532.
16. Tamaru, H. and E.U. Selker, *A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in Neurospora crassa*. Nature, 2001. **414**(6861): p. 277-83.
17. Vaillant, I., et al., *MOM1 mediates DNA-methylation-independent silencing of repetitive sequences in Arabidopsis*. EMBO reports, 2006. **7**(12): p. 1273-1278.
18. Gary, J.D. and S. Clarke, *RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1998. **61**: p. 65-131.
19. Yarlett, N., A. Quamina, and C.J. Bacchi, *Protein methylases in Trypanosoma brucei brucei: activities and response to DL-alpha-difluoromethylornithine*. J Gen Microbiol, 1991. **137**(3): p. 717-24.
20. Esse, R., et al., *Deciphering Protein Arginine Methylation in Mammals*. 2012. p. 91-116.
21. Zakrzewicz, D., et al., *Protein Arginine Methyltransferases (PRMTs): Promising Targets for the Treatment of Pulmonary Disorders*. International journal of molecular sciences, 2012. **13**: p. 12383-400.
22. Chan, J.Y., et al., *Physical and functional interactions between hnRNP K and PRMT family proteins*. FEBS Lett, 2009. **583**(2): p. 281-6.
23. Fackelmayer, F.O., *Protein arginine methyltransferases: guardians of the Arg?* Trends in Biochemical Sciences, 2005. **30**(12): p. 666-671.
24. Zhang, J., et al., *Regulation of histone arginine methylation/demethylation by methylase and demethylase (Review)*. Molecular Medicine Reports, 2019. **49**.

25. Scorilas, A., et al., *Genomic organization, physical mapping, and expression analysis of the human protein arginine methyltransferase 1 gene*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **278**(2): p. 349-59.
26. Mathioudaki, K., et al., *Clinical evaluation of PRMT1 gene expression in breast cancer*. *Tumour Biol*, 2011. **32**(3): p. 575-82.
27. Li, B., et al., *miR-503 suppresses metastasis of hepatocellular carcinoma cell by targeting PRMT1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **464**(4): p. 982-987.
28. Labianca, R., et al., *Colon cancer*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2010. **74**(2): p. 106-33.
29. Recio-Boiles, A. and B. Cagir, *Colon Cancer*, in *StatPearls*. 2021, StatPearls Publishing

Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).

30. Papadokostopoulou, A., et al., *Colon Cancer and Protein Arginine Methyltransferase 1 Gene Expression*. *Anticancer Research*, 2009. **29**(4): p. 1361.
31. Mathioudaki, K., et al., *The PRMT1 gene expression pattern in colon cancer*. *British journal of cancer*, 2008. **99**(12): p. 2094-2099.
32. Plotnikov, A., et al., *PRMT1 inhibition induces differentiation of colon cancer cells*. *Scientific Reports*, 2020. **10**(1): p. 20030.
33. Kristensen, L.S., et al., *The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs*. *Nat Rev Genet*, 2019. **20**(11): p. 675-691.
34. Salzman, J., *Circular RNA Expression: Its Potential Regulation and Function*. *Trends in genetics : TIG*, 2016. **32**(5): p. 309-316.
35. Yu, C.-Y. and H.-C. Kuo, *The emerging roles and functions of circular RNAs and their generation*. *Journal of Biomedical Science*, 2019. **26**(1): p. 29.
36. Patop, I.L., S. Wüst, and S. Kadener, *Past, present, and future of circRNAs*. *The EMBO journal*, 2019. **38**(16): p. e100836-e100836.
37. Geng, X., et al., *Circular RNA: biogenesis, degradation, functions and potential roles in mediating resistance to anticarcinogens*. *Epigenomics*, 2019. **12**(3): p. 267-283.
38. Chen, L.L., *The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020. **21**(8): p. 475-490.
39. Wilusz, J.E., *Repetitive elements regulate circular RNA biogenesis*. *Mobile genetic elements*, 2015. **5**(3): p. 1-7.
40. Chen, L.-L. and L. Yang, *Regulation of circRNA biogenesis*. *RNA biology*, 2015. **12**(4): p. 381-388.
41. Zhao, X., Y. Cai, and J. Xu, *Circular RNAs: Biogenesis, Mechanism, and Function in Human Cancers*. *International journal of molecular sciences*, 2019. **20**(16): p. 3926.
42. Barrett, S.P. and J. Salzman, *Circular RNAs: analysis, expression and potential functions*. *Development*, 2016. **143**(11): p. 1838-47.
43. Shao, T., Y.-H. Pan, and X.-D. Xiong, *Circular RNA: an important player with multiple facets to regulate its parental gene expression*. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 2020. **23**: p. 369-376.
44. Zhang, P., S. Li, and M. Chen, *Characterization and Function of Circular RNAs in Plants*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2020. **7**(91).
45. Birchler, J.A. and F. Han, *Maize centromeres: structure, function, epigenetics*. *Annu Rev Genet*, 2009. **43**: p. 287-303.
46. Hu, Z.Q., et al., *Circular RNA Sequencing Identifies CircASAP1 as a Key Regulator in Hepatocellular Carcinoma Metastasis*. *Hepatology*, 2020. **72**(3): p. 906-922.
47. Panda, A.C., *Circular RNAs Act as miRNA Sponges*. *Adv Exp Med Biol*, 2018. **1087**: p. 67-79.
48. Ashwal-Fluss, R., et al., *circRNA Biogenesis Competes with Pre-mRNA Splicing*. *Molecular Cell*, 2014. **56**(1): p. 55-66.
49. Panda, A.C., et al., *Emerging roles and context of circular RNAs*. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 2017. **8**(2): p. 10.1002/wrna.1386.
50. Du, W., et al., *Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity*. *Cell Death and Differentiation*, 2016. **24**.

51. Lu, W.-Y., *Roles of the circular RNA circ-Foxo3 in breast cancer progression*. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 2017. **16**(7): p. 589-590.
52. Lei, M., et al., *Translation and functional roles of circular RNAs in human cancer*. Molecular Cancer, 2020. **19**(1): p. 30.
53. Pamudurti, N.R., et al., *Translation of CircRNAs*. Molecular cell, 2017. **66**(1): p. 9-21.e7.
54. Kristensen, L.S., et al., *Circular RNAs in cancer: opportunities and challenges in the field*. Oncogene, 2018. **37**(5): p. 555-565.
55. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
56. ; Available from: <https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/functional-genomics-ii-commontechnologies-and-data-analysis-methods/real-time-pcr>.
57. Qiang-long, Z., et al., *High-throughput Sequencing Technology and Its Application*. Journal of Northeast Agricultural University (English Edition), 2014. **21**.
58. Litt, M., Y. Qiu, and S. Huang, *Histone arginine methylations: Their roles in chromatin dynamics and transcriptional regulation*. Bioscience reports, 2009. **29**: p. 131-41.
59. Teyssier, C., et al., *Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1alpha by arginine methylation*. Genes Dev, 2005. **19**(12): p. 1466-73.
60. Iacopetta, B., *Are there two sides to colorectal cancer?* International Journal of Cancer, 2002. **101**(5): p. 403-408.
61. Zheng, D., et al., *LncRNA NNT-AS1 promote glioma cell proliferation and metastases through miR-494-3p/PRMT1 axis*. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 2020. **19**(13): p. 1621-1631.
62. Chai, J., et al., *MicroRNA-494 sensitizes colon cancer cells to fluorouracil through regulation of DPYD*. IUBMB Life, 2015. **67**(3): p. 191-201.
63. Wang, Z., et al., *LncRNA DANCR improves the dysfunction of the intestinal barrier and alleviates epithelial injury by targeting the miR-1306-5p/PLK1 axis in sepsis*. Cell Biol Int, 2021. **45**(9): p. 1935-1944.
64. Tang, J., et al., *PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation*. J Biol Chem, 1998. **273**(27): p. 16935-45.