



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν

Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

«Μελέτη της έκφρασης κυκλικών μορίων RNA
(circRNAs) του γονιδίου *ΒΟΚ* σε ανθρώπινες
επιθηλιακές κυτταρικές σειρές καρκίνου»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΕΤΡΟΣ ΛΕΤΣΟΣ

A.M.: 1113201700049

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΟΝΤΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2021

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Σεπτέμβριος 2020 - Ιούλιος 2021 στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.), με επιβλέποντα τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χρήστο Κοντό.

Πρώτα από όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χρήστο Κοντό και επιβλέποντα της παρούσας διπλωματικής εργασίας για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου με την ανάθεση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για όλα όσα με δίδαξε αυτό το χρονικό διάστημα, το ενδιαφέρον που επέδειξε στην καθοδήγησή μου και στην παροχή συμβουλών, την αντιμετώπισή μου ως ισότιμο μέλος του εργαστηρίου και τις ευκαιρίες εξέλιξης που μου έδωσε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω, επίσης, στην υποψήφια διδάκτορα Πηνελόπη Αρτεμάκη για την απρόσκοπτη συνεργασία μας αυτό το χρονικό διάστημα, την καθοδήγησή της, τις συμβουλές και την κατανόηση που επέδειξε.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, τις υποψήφιες διδάκτορες Παρασκευή Καρούση, Κατερίνα Κατσαράκη και Μαρία Παπατσίρου, τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Χριστίνα Σωτηροπούλου, και τις διπλωματικές προπτυχιακές φοιτήτριες Ιωάννα Ζούπα και Ευθαλία-Φαίδρα Αγιομαυρίτη-Στεφανοπούλου για την υποστήριξη και το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε κατά το χρονικό διάστημα πραγματοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και του φίλους μου και ιδιαίτερα τη μητέρα μου Ρένα, καθώς χωρίς τη συμπαράσταση και την ενθάρρυνσή της δε θα είχα καταφέρει τίποτα όλα αυτά τα χρόνια.

Πίνακας περιεχομένων

Εισαγωγή.....	1
1. Απόπτωση.....	1
1.1. Ορισμός-Γενικές πληροφορίες.....	1
1.2. Ο απαραίτητος ρόλος της απόπτωσης στην ανάπτυξη.....	1
1.3. Μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές.....	2
1.4. Κασπάσες.....	2
1.5. Μονοπάτια της απόπτωσης.....	4
1.6. Υπεροικογένεια BCL2.....	7
1.7. Αναστολείς της απόπτωσης (IAPs) και αναστολείς τους (anti-IAPs).....	10
1.8. Παράγοντες επιβίωσης.....	10
2. BCL2 family apoptosis regulator BOK (BOK).....	11
2.1. Γενικές πληροφορίες.....	11
2.2. Διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών.....	11
2.3. Ρόλος στο ενδοπλασματικό δίκτυο και συσχέτιση με την απόπτωση.....	12
2.4. Ρόλος στην πρόκληση διαπερατότητας στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (MOMP).....	13
2.5. BOK και καρκίνος.....	15
3. Κυκλικά RNAs (circRNAs).....	16
3.1. Γενικές πληροφορίες.....	16
3.2. Βιογένεση και κατηγορίες των circRNAs.....	17
3.3. Ανταγωνισμός οπισθοσυρραφής και κανονικής συρραφής και εναλλακτική κυκλοποίηση.....	18
3.4. Λειτουργίες των circRNAs με έμφαση στον καρκίνο.....	20
Σκοπός.....	25
Υλικά και Μέθοδοι.....	26
1. Βιοπληροφορική ανάλυση.....	26
2. Βιολογικό υλικό-Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.....	26
3. Απομόνωση ολικού RNA από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.....	26
3.1. Αρχή μεθόδου.....	26
3.2. Πειραματική διαδικασία απομόνωσης του ολικού RNA.....	27
4. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της καθαρότητας και της συγκέντρωσης του απομονωθέντος ολικού RNA.....	27
5. Έλεγχος της ακεραιότητας (integrity) του απομονωθέντος ολικού RNA με ηλεκτροφόρηση.....	28

6. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription-RT)	28
6.1. Αρχή μεθόδου	28
6.2. Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής.....	29
7. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	29
7.1. Αρχή μεθόδου	29
7.2. Ρόλος των συστατικών μιας αντίδρασης PCR.....	30
7.3. Συνθήκες πραγματοποίησης αντίδρασης συμβατικής PCR.....	30
7.4. Απόδοση και ευαισθησία μιας αντίδρασης PCR και οι παράγοντες που τις καθορίζουν	31
7.5. Γονίδια σταθερής έκφρασης (Housekeeping genes)	31
8. Επάλληλη Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Nested PCR)	32
8.1. Αρχή μεθόδου	32
8.2. Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης της Επάλληλης PCR (Nested PCR)	32
9. Ημι-επάλληλη Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Semi-nested PCR)	33
9.1. Αρχή μεθόδου	33
9.2. Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης της Ημι-επάλληλης PCR (Semi-nested PCR).....	33
10. Εκκινητές (primers) στις αντιδράσεις συμβατικής PCR, επάλληλης PCR (Nested PCR) και ημι-επάλληλης PCR (Semi-nested PCR)	33
10.1. Κανόνες σχεδιασμού εκκινητών	33
10.2. Χρήση του λογισμικού Primer-BLAST του NCBI για το σχεδιασμό των εκκινητών. 34	
10.3. Αποκλίνοντες εκκινητές (divergent primers) για επιλεκτική ενίσχυση των circRNAs34	
10.4. Εκκινητές συμβατικής PCR για τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς <i>GAPDH</i> και συνθήκες της αντίδρασης.....	35
10.5. Εκκινητές για συμβατική PCR, επάλληλη PCR (Nested PCR) και ημι-επάλληλη PCR (Semi-nested PCR) για τη μελέτη της έκφρασης των γραμμικών μεταγράφων (mRNAs) του γονιδίου <i>BOK</i>	35
10.6. Αποκλίνοντες εκκινητές για συμβατική PCR, επάλληλη PCR (Nested PCR) και ημι-επάλληλη PCR (Semi-nested PCR) για την εύρεση πιθανών κυκλικών μεταγράφων (circRNAs) του γονιδίου <i>BOK</i>	37
11. Αντιδράσεις και συνθήκες πραγματοποίησης συμβατικής PCR, επάλληλης PCR (Nested PCR) και ημι-επάλληλης PCR (Semi-nested PCR)	39
11.1. Αντιδράσεις και συνθήκες πραγματοποίησης συμβατικής PCR, επάλληλης PCR (Nested PCR) και ημι-επάλληλης PCR (Semi-nested PCR) για τη μελέτη της έκφρασης των γραμμικών μεταγράφων (mRNAs) του γονιδίου <i>BOK</i>	39
11.2. Αντιδράσεις και συνθήκες πραγματοποίησης συμβατικής PCR, επάλληλης PCR (Nested-PCR) και ημι-επάλληλης PCR (Semi-nested PCR) για την εύρεση πιθανών κυκλικών μεταγράφων (circRNAs) του γονιδίου <i>BOK</i>	40
12. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης	42
12.1 Αρχή μεθόδου	42

12.2 Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων του γονιδίου <i>BOK</i>	43
13. Απομόνωση και καθαρισμός ενός PCR προϊόντος από το τελικό μίγμα της αντίδρασης (PCR clean-up) ή Απομόνωση και καθαρισμός μιας ζώνης ενός PCR προϊόντος από πήκτωμα αγαρόζης (DNA extraction from agarose gels).....	43
13.1. Αρχή μεθόδου	43
13.2. Πειραματική διαδικασία PCR clean-up και gel extraction.....	43
14. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων με φθορισμομετρία	44
14.1. Αρχή μεθόδου	44
14.2. Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης φθορισμομετρίας.....	45
15. Αλληλούχιση Sanger (Sanger sequencing).....	45
15.1. Αρχή μεθόδου αυτοματοποιημένης αλληλούχισης Sanger	45
15.2. Διαδικασία αλληλούχισης Sanger	46
16. Υπολογιστικά εργαλεία για την πρόγνωση της λειτουργίας των κυκλικών RNAs (circRNAs).....	46
16.1. Πρόβλεψη της ικανότητας πρόσδεσης μορίων microRNAs με τη βάση δεδομένων miRDB	46
16.2. Πρόβλεψη της ύπαρξης εσωτερικών θέσεων πρόσδεσης του ριβοσώματος (IRES) με το υπολογιστικό πρόγραμμα IRESpy.....	46
16.3. Εύρεση πιθανών ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (Open Reading Frames, ORFs) με τη χρήση του υπολογιστικού αλγορίθμου ORFfinder του NCBI.....	47
16.4. Πρόγνωση της πρόσδεσης πρωτεϊνών (RNA-binding-proteins, RBPs) με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος beRBP (Binding Estimation for human RNA-Binding-Proteins).....	47
Αποτελέσματα	48
1. Βιοπληροφορική ανάλυση	48
2. Έλεγχος επιτυχίας απομόνωσης ολικού RNA και αντίστροφης μεταγραφής (RT) με την ηλεκτροφόρηση ενισχυμένων με PCR προϊόντων του γονιδίου αναφοράς <i>GAPDH</i>	49
3. Αποτελέσματα συμβατικής PCR, επάλληλης PCR (Nested PCR) και ημι-επάλληλης PCR (Semi-nested PCR) και ηλεκτροφόρησης των προϊόντων τους για τη μελέτη της έκφρασης των γραμμικών μεταγράφων (mRNAs) του γονιδίου <i>BOK</i>	49
3.1. Γενικότερα συμπεράσματα	54
3.2. Έκφραση συγκεκριμένων μεταγράφων σε κάθε κυτταρική σειρά.....	55
4. Αποτελέσματα συμβατικής PCR, επάλληλης PCR (Nested PCR) και ημι-επάλληλης PCR (Semi-nested PCR) και ηλεκτροφόρησης των προϊόντων τους για την εύρεση πιθανών κυκλικών μεταγράφων (circRNAs) του γονιδίου <i>BOK</i>	56
5. Απομόνωση και καθαρισμός επιθυμητής ζώνης και προετοιμασία για αλληλούχιση Sanger	60
6. Αποτελέσματα αλληλούχισης Sanger	60
6.1. Αλληλουχία του νέου circRNA του γονιδίου <i>BOK</i>	60
6.2. Συμπεράσματα που εξάγονται από την αλληλουχία του circRNA του γονιδίου <i>BOK</i> ...	61

7. Πρόγνωση λειτουργίας με τη χρήση υπολογιστικών εργαλείων.....	62
7.1. Αποτελέσματα πρόβλεψης της ικανότητας πρόσδεσης μορίων microRNAs με τη βάση δεδομένων miRDB:.....	63
7.2. Αποτελέσματα πρόβλεψης της ύπαρξης εσωτερικών θέσεων πρόσδεσης του ριβοσώματος (IRES) με το υπολογιστικό πρόγραμμα IRESpy.....	64
7.3. Αποτελέσματα της αναζήτησης πιθανών ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (Open Reading Frames, ORFs) με τη χρήση του υπολογιστικού αλγορίθμου ORFfinder του NCBI.....	65
7.4. Πρόγνωση της πρόσδεσης πρωτεϊνών (RNA binding proteins, RBPs) με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος beRBP	67
Συμπεράσματα-Συζήτηση	71
Περίληψη.....	75
Abstract	77
Βιβλιογραφία.....	79

Εισαγωγή

1. Απόπτωση

1.1. Ορισμός-Γενικές πληροφορίες

Η απόπτωση (apoptosis) ή αλλιώς προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (programmed cell death) λαμβάνει την ονομασία της από τις ελληνικές λέξεις «από» και «πτώση», υποδηλώνοντας τον τερματισμό της λειτουργίας και της ύπαρξης του κυττάρου από τον πολυκύτταρο οργανισμό, όπως η πτώση των φύλλων ενός δέντρου το φθινόπωρο. Είναι η διαδικασία κατά την οποία κύτταρα που έχουν υποστεί κάποια βλάβη, έχουν μολυνθεί, είναι επικίνδυνα ή για διάφορους λόγους πρέπει να απομακρυνθούν για να διασφαλιστεί η απρόσκοπτη λειτουργία του οργανισμού, κάτω από την επίδραση εξωτερικών ή εσωτερικών σημάτων που μεταδίδονται με τη διαδοχική συμμετοχή πολλών μορίων τελεστών, αυτοκτονούν και απομακρύνονται από τον οργανισμό με ελεγχόμενο και ρυθμιζόμενο τρόπο. Αποτελεί μια μορφή κυτταρικού θανάτου που είναι αυστηρά ρυθμιζόμενη και στην διεξαγωγή της οποίας συμμετέχουν πολλές πρωτεΐνες από διάφορες πρωτεϊνικές οικογένειες. Ενδεχόμενη απορρύθμιση αυτής της κυτταρικής διαδικασίας μπορεί να οδηγήσει σε μια πληθώρα ασθενειών, όπως ο καρκίνος, αυτοάνοσα νοσήματα και νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

1.2 Ο απαραίτητος ρόλος της απόπτωσης στην ανάπτυξη

Η ανάπτυξη και η διατήρηση των πολυκύτταρων οργανισμών προϋποθέτει ότι ο ρυθμός δημιουργίας και θανάτωσης των κυττάρων είναι παρόμοιος, ώστε να διατηρείται σταθερός ο αριθμός των κυττάρων ενός ιστού. Πολλές φορές κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, κύτταρα χρειάζεται να θανατωθούν για να σχηματιστούν οι δομές με ορθό τρόπο. Για παράδειγμα, τα κύτταρα που βρίσκονται ενδιάμεσα των δακτύλων των άκρων πρέπει να θανατωθούν με απόπτωση κατά την εμβρυϊκή φάση ανάπτυξης, ώστε να εξαφανιστεί αυτή η ενδιάμεση μεμβράνη και να σχηματιστούν τα διακριτά δάχτυλα των άκρων. Σε ένα άλλο παράδειγμα, τα κύτταρα της ουράς του γυρίνου πεθαίνουν με απόπτωση κατά την ενηλικίωση του ατόμου σε βάτραχο [1]. Το πιο εκτενές και χαρακτηριστικό φαινόμενο απόπτωσης στα σπονδυλωτά είναι αυτό της θανάτωσης των Β και Τ λεμφοκυττάρων στα λεμφικά όργανα κατά την αρνητική επιλογή τους αν αυτά είναι αυτό-αντιδραστικά και έχουν μεμβρανικούς υποδοχείς που αναγνωρίζουν ως αντιγόνα φυσιολογικά μόρια του ίδιου του οργανισμού και επιτίθενται εναντίον τους ή αν έχουν αποτύχει να παράξουν λειτουργικούς υποδοχείς που να αναγνωρίζουν ειδικά ένα ξένο αντιγόνο. Σε περίπτωση αποτυχίας αυτής της διαδικασίας αρνητικής επιλογής δημιουργούνται μια πληθώρα από αυτοάνοσα νοσήματα. Η αποτυχία ενεργοποίησης των αποπτωτικών μηχανισμών καθίσταται ιδιαίτερα επικίνδυνη στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων, τα οποία διαθέτουν πολλούς μηχανισμούς αποφυγής του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου με αποτέλεσμα την επιβίωσή τους και το συνεχόμενο πολλαπλασιασμό τους. Από την άλλη πλευρά, και η υπερβολική απόπτωση και θανάτωση ομάδων κυττάρων ενοχοποιείται για μια σειρά από επώδυνες ασθένειες, όπως η νόσος του Alzheimer [2,3]. Είναι απαραίτητη, λοιπόν, η αυστηρή ρύθμιση των μηχανισμών που διέπουν τον κυτταρικό θάνατο για τη διατήρηση της λεπτής γραμμής ανάμεσα στη φυσιολογική και την παθολογική κατάσταση του οργανισμού.

1.3. Μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές

Στα αποπτωτικά κύτταρα διακρίνονται χαρακτηριστικές μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές. Οι περισσότερες από αυτές μπορούν εύκολα να παρατηρηθούν με τις συνήθειες τεχνικές μικροσκοπίας. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η μέθοδος TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) που επιτρέπει την ανίχνευση των τεμαχισμένων κομματιών DNA που είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό των αποπτωτικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, το ένζυμο της τελικής δεοξυνουκλεοτιδικής τρανσφεράσης (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) καταλύει τη μεταφορά δεοξυνουκλεοτιδίων που είναι σημασμένα με ένα φθορισμογόνο ή χρωμογόνο μόριο στο 3' OH δίκλωνων σπασμένων τμημάτων DNA (Double Strand Breaks, DSBs). Σε γενικές γραμμές, τα κύτταρα κατά την απόπτωση μικραίνουν σε μέγεθος και συμπυκνώνονται, ο κυτταροσκελετός ακτίνης αποδιοργανώνεται, η δομή του πυρηνικού φακέλου παύει να υφίσταται, το DNA θρυμματίζεται σε μικρότερα κομμάτια, τα κύτταρα χάνουν τις διακυτταρικές συνδέσεις τους και η μεμβράνη αρχικά σχηματίζει εγκολπώσεις και εξογκώματα για να σχηματιστούν τελικά τα χαρακτηριστικά αποπτωτικά σωμάτια [4,5]. Κύτταρα που πεθαίνουν με απόπτωση, σε αντίθεση με αυτά που πεθαίνουν με νέκρωση, σχηματίζουν αποπτωτικά σωμάτια και φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά τους κύτταρα, κυρίως μακροφάγα. Έτσι δεν αφήνουν πίσω τους ίχνη και δεν προκαλούν φλεγμονώδη αντίδραση. Όλα τα κύτταρα έχουν στην επιφάνειά τους δύο κατηγορίες σημάτων που καθορίζουν το αν θα απομακρυνθούν με φαγοκυττάρωση ή όχι. Πρόκειται για τα σήματα «φάε με» («eat me») ή «μη με φας» («don't eat me») και η επικράτηση ενός τύπου σήματος καθορίζει την τύχη του κυττάρου. Μια από τις πιο σημαντικές μεταβολές κατά την απόπτωση είναι η εξωτερίκευση στην πλασματική μεμβράνη του αρνητικά φορτισμένου φωσφολιπιδίου της φωσφατιδυλοσερίνης (phosphatidylserine), που αποτελεί ένα από τα πιο χαρακτηριστικά σήματα «eat me». Η φωσφατιδυλοσερίνη μπορεί να προσδένεται στην annexin V που με τη σειρά της μπορεί πάλι να είναι σημασμένη με ένα φθορισμογόνο μόριο σε μια ακόμα πολύ συχνή τεχνική ανίχνευσης των αποπτωτικών κυττάρων [3,4]. Σε αντίθεση με την απόπτωση, κύτταρα που θανατώνονται με νέκρωση (necrosis) διογκώνονται και εκρήγνυνται απελευθερώνοντάς το περιεχόμενό τους στον περιβάλλοντα ιστό με μη ελεγχόμενο τρόπο και με αποτέλεσμα την πρόκληση φλεγμονής, καθώς η εξοκυττάρια συσσώρευση των ενδοκυτταρικών συστατικών ενεργοποιεί τα στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος [2,3,6].

1.4. Κασπάσες

Μία από τις πιο σημαντικές πρωτεϊνικές οικογένειες που μεσολαβούν τον καταρράκτη της απόπτωσης είναι οι κασπάσες (caspases). Πρόκειται για πρωτεάσες που περιέχουν μια κυστεΐνη (C) στο ενεργό τους κέντρο και διασπούν τις πρωτεΐνες σε συγκεκριμένες αλληλουχίες σε αμινοξικά κατάλοιπα ασπαρτικού (Asp) και από αυτήν την ιδιότητα λαμβάνουν το όνομά τους. Οι κασπάσες ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans* (πρωτεΐνες ced) και σύντομα διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για μια συντηρημένη γονιδιακή οικογένεια που έχει καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη της απόπτωσης σε όλους τους οργανισμούς. Τα υποστρώματά τους είναι μια πληθώρα πρωτεϊνών και ως αποτέλεσμα της δράσης τους προκύπτουν τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης που αναλύθηκαν παραπάνω [5,7]. Όπως είναι εύκολα κατανοητό, λόγω της επικινδυνότητας της λανθασμένης ενεργοποίησής τους και των ολέθριων συνεπειών που θα είχε αυτό για το κύτταρο, οι κασπάσες συντίθενται ως πρόδρομα ανενεργά μόρια και η ενεργοποίησή τους βρίσκεται κάτω από αυστηρή ρύθμιση. Μία κασπάση γενικά περιέχει μια

επικράτεια (domain) με δράση πρωτεάσης στο καρβοξυτελικό της άκρο και μια επικράτεια αλληλεπιδράσεων κοντά στο αμινοτελικό της άκρο, ενώ μετά την ενεργοποίησή της ουσιαστικά αποτελείται από μία μεγάλη και μία μικρή επικράτεια πρωτεάσης. Η επικράτεια αλληλεπίδρασης του αμινοτελικού της άκρου (Caspase recruitment Domain, CARD) μπορεί να συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις με άλλες κασπάσες και την πρωτεΐνη Araf-1 ή να αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς θανάτου (Death Receptors, DRs) και τους αντίστοιχους πρωτεϊνικούς αντάπτορες (Death Effector Domains, DEDs), όπως θα εξηγηθεί αναλυτικά στη συνέχεια [8,9]. Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες κασπασών: οι ενεργητικές κασπάσες (initiator caspases) και οι κασπάσες τελεστές (effector caspases). Οι σημαντικότερες ενεργητικές κασπάσες είναι οι κασπάσες-2, -8, -9 και -10, ενώ οι σημαντικότερες κασπάσες τελεστές είναι οι κασπάσες-3, -6, -7 και -14. Μια ενεργητική κασπάση αρχικά βρίσκεται σε διαλυτή ανενεργή και μονομερή μορφή στο κυτταρόπλασμα αποτελώντας την προ-κασπάση. Η επικράτεια αλληλεπίδρασης του αμινοτελικού της άκρου αλληλεπιδρά με ειδικά μόρια προσαρμοστές-αντάπτορες (adaptors), οι οποίοι διαδοχικά αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς θανάτου (death receptors) της μεμβράνης, και με αυτόν τον τρόπο οι ενεργητικές κασπάσες συγκεντρώνονται στις περιοχές συμπλόκων των υποδοχέων θανάτου της μεμβράνης. Γενικότερα, η συγκέντρωση και ο διμερισμός των ενεργητικών κασπασών κάτω από την επίδραση του αποπτωτικού ερεθίσματος είναι το σήμα ενεργοποίησής τους σε αυτές τις πλατφόρμες αλληλεπίδρασης που συγκροτούν. Σε αυτό το σύμπλοκο οι ενεργητικές κασπάσες διμερίζονται και ενεργοποιούνται με αποτέλεσμα τη διάσπαση μιας κασπάσης από μια άλλη σε συγκεκριμένες θέσεις στην επικράτεια πρωτεάσης που επιφέρει το διαχωρισμό της επικράτειας πρωτεάσης σε μια μικρή και μια μεγάλη υπομονάδα, ενώ συνήθως πρωτεολύεται και απομακρύνεται και η ρυθμιστική περιοχή που αλληλεπιδρά με τον αντάπτορα. Σε αντίθεση, οι κασπάσες τελεστές αρχικά παράγονται ως ανενεργά διμερή και πρωτεολύονται από τις ενεργητικές κασπάσες σε μια συγκεκριμένη θέση στην επικράτεια πρωτεάσης. Αυτό επιφέρει στερεοδιατακτικές αλλαγές με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κασπασών τελεστών, οι οποίες στη συνέχεια διασπούν τα διάφορα υποστρώματά τους. Η ενεργοποίηση πολλών καθοδικών μορίων στην πορεία μεταγωγής σήματος από ένα ανοδικό τους, όπως η πρωτεόλυση πολλών κασπασών τελεστών από μια ενεργητική κασπάση και πολλών υποστρωμάτων από μια κασπάση τελεστή, έχουν ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό και την ενίσχυση του αποπτωτικού σήματος [7,10,11].

1.4.1. Υποστρώματα των κασπασών

Τα υποστρώματα των κασπασών τελεστών χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλομορφία, ωστόσο μερικά έχουν μελετηθεί εκτενέστερα, γιατί έχουν σημαντικότερη επίδραση στη διαδικασία της απόπτωσης. Ειδικότερα, διασπώνται οι πυρηνικές λαμίνες (lamins) με αποτέλεσμα την κατάρρευση του πυρηνικού φακέλου, η γκελσολίνη (gelsolin) με αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης και η διάσπαση πρωτεϊνών που μεσολαβούν τις διακυτταρικές συνδέσεις, ώστε το κύτταρο να μπορεί να φαγοκυτταρωθεί εύκολα στη συνέχεια από ένα μακροφάγο. Ιδιαίτερη σημασία έχει η διάσπαση του iCAD (inhibitor of caspase-activated DNAase), αναστολέα της ενδονουκλεάσης CAD (caspase-activated DNAase), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση αυτής της ενδονουκλεάσης και το θρυμματισμό του DNA σε περιοχές ανάμεσα στα νουκλεοσώματα, που οδηγεί σε χαρακτηριστικά πρότυπα «σκάλας» (ladder) σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Ένα σημαντικό ένζυμο που διασπάται επίσης είναι η PARP (Poly ADP-Ribose Polymerase) που συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA [4,7,10-13].

1.5. Μονοπάτια της απόπτωσης

Η απόπτωση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω δύο διαφορετικών οδών: του εξωγενούς μονοπατιού που ενεργοποιείται από εξωκυτταρικά ερεθίσματα και του ενδογενούς μονοπατιού που ενεργοποιείται από ενδοκυτταρικά σήματα και ρυθμίζεται κυρίως από τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, για αυτό λέγεται αλλιώς και μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης. Τα σήματα ενεργοποίησης, η μεταγωγή του σήματος και τα μόρια που συμμετέχουν σε κάθε μονοπάτι αναλύονται διεξοδικά στη συνέχεια.

1.5.1 Εξωγενές μονοπάτι

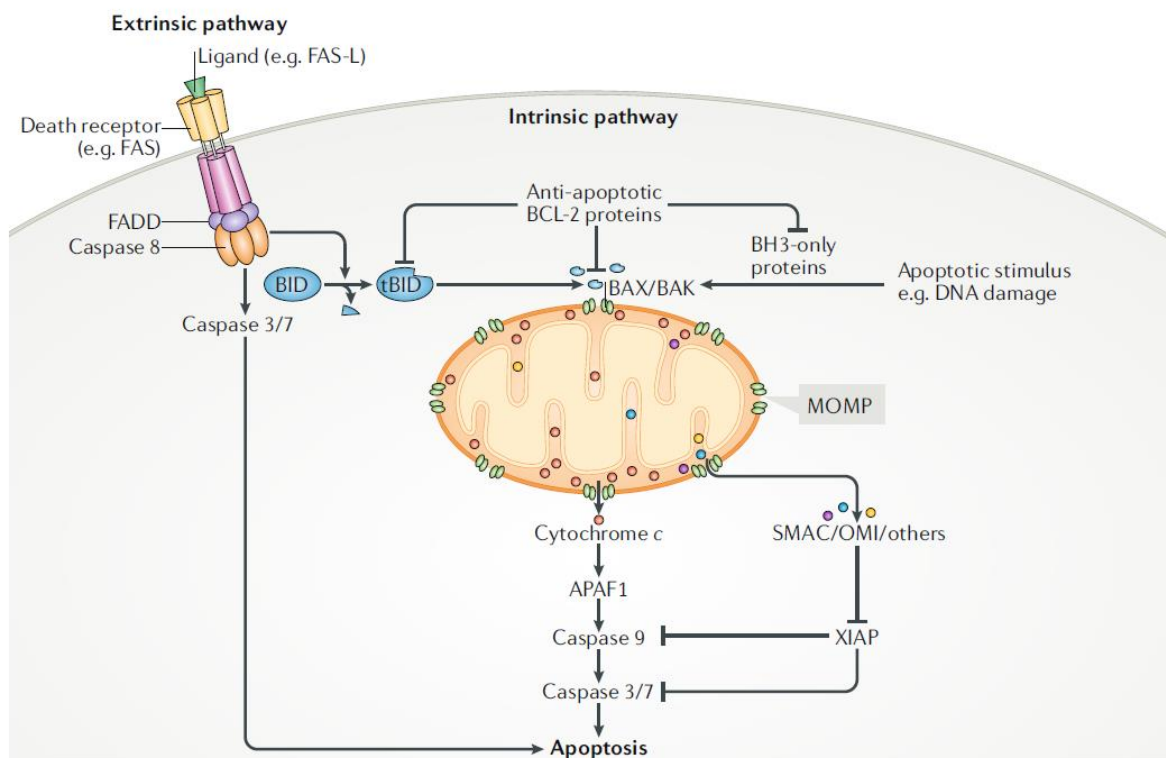
Το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης (extrinsic pathway) ενεργοποιείται από εξωκυτταρικά ερεθίσματα. Στην επιφάνεια των κυττάρων βρίσκονται οι λεγόμενοι διαμεμβρανικοί υποδοχείς θανάτου (death receptors, DRs), οι οποίοι είναι ομοτριμερή που ανήκουν στην πρωτεϊνική υπεροικογένεια των υποδοχέων παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor Receptors, TNFRs). Αυτοί οι υποδοχείς αποτελούνται από μία εξωκυτταρική επικράτεια, μία διαμεμβρανική επικράτεια και μία ενδοκυτταρική επικράτεια σηματοδότησης θανάτου (Death Domain, DD). Στο εξωκυτταρικό τμήμα προσδέονται οι ομοτριμερείς εξωκυτταρικοί προσδέτες (ligands) που ανήκουν στην πρωτεϊνική υπεροικογένεια του παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factors, TNFs) και ενεργοποιούν τους υποδοχείς θανάτου. Τα σημαντικότερα ζεύγη προσδέτη-υποδοχέα αυτού του είδους είναι ο διαλυτός προσδέτης TNF και ο υποδοχέας του TNFR1 και ο μεμβρανικός προσδέτης των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων (CTLs) Fas ligand (CD95L) και ο υποδοχέας του Fas (CD95). Η ενεργοποίηση ενός υποδοχέα θανάτου έχει ως αποτέλεσμα την στρατολόγηση στην ενδοκυτταρική του ουρά πρωτεϊνών προσαρμοστών-ανταπτόρων, όπως η FADD (Fas-Associated Death Domain) στην περίπτωση του Fas και η TRADD (TNFR-Associated Death Domain) στην περίπτωση του TNFR1. Οι πρωτεΐνες αντάπτορες αποτελούνται βασικά από δύο επικράτειες: μία επικράτεια αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα θανάτου που ονομάζεται επικράτεια θανάτου (Death Domain, DD) και μία επικράτεια αλληλεπίδρασης με τις εναρκτήριες κασπάσες που ονομάζεται επικράτεια τελεστή θανάτου (Death Effector Domain, DED) [9,14]. Αυτές οι πρωτεΐνες προσαρμοστές με τη σειρά τους στρατολογούν τις εναρκτήριες κασπάσες, όπως αναλύθηκε προηγουμένως. Η πιο διαδεδομένη εναρκτήρια κασπάση είναι η κασπάση-8. Έτσι σχηματίζεται το σηματοδοτικό σύμπλοκο επαγωγής θανάτου (Death-Inducing Signaling Complex, DISC) [11,15,16]. Οι εναρκτήριες κασπάσες με τη σειρά τους διμερίζονται, ενεργοποιούνται και αυτοπρωτεολύονται. Στη συνέχεια πρωτεολύουν τις κασπάσες τελεστές με αποτέλεσμα τη μετάδοση του αποπτωτικού σήματος στο κύτταρο. Το πιο σημαντικό υπόστρωμα της κασπάσης-8 είναι η κασπάση-3 και η πρωτεΐνη Bid [4]. Πολλά κύτταρα διαθέτουν ανασταλτικούς μηχανισμούς ρύθμισης του εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης, όπως η στρατολόγηση της πρωτεΐνης c-FLIP (cellular FLICE Inhibitory Protein). Αυτή η πρωτεΐνη μοιάζει δομικά με τη εναρκτήρια κασπάση-8, αλλά δε διαθέτει την κατάλληλη κυστεΐνη στο ενεργό της κέντρο. Συνεπώς, σε ένα διμερές με την κασπάση-8 δε μπορεί να τη διασπάσει και η κασπάση-8 δεν ενεργοποιείται. Έτσι, ρυθμίζεται η ακατάλληλη ενεργοποίηση του εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης [7,15].

1.5.2. Ενδογενές μονοπάτι

Το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης (intrinsic pathway) ρυθμίζεται κυρίως από τη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Ενεργοποιείται από ενδοκυτταρικά σήματα, όπως είναι οι βλάβες του DNA ή άλλα αναπτυξιακά σήματα. Κομβικό σημείο στην εξέλιξη του ενδογενούς μονοπατιού είναι η δημιουργία διαπερατών πόρων στις μιτοχονδριακές μεμβράνες (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) από κατάλληλες πρωτεΐνες της υπεροικογένειας Bcl2 που θα αναλυθεί στη συνέχεια και η έξοδος στο κυτταρόπλασμα του κυτοχρώματος C (Cytochrome C). Το κυτόχρωμα C φυσιολογικά βρίσκεται στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων και αποτελεί πολύ σημαντικό στοιχείο στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης που εξασφαλίζει στο κύτταρο την παραγωγή ATP και ενέργειας μέσω της κυτταρικής αναπνοής. Κατά τη λειτουργία του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης, όμως, το κυτόχρωμα C μετακινείται μέσω των μιτοχονδριακών πόρων στο κυτταρόπλασμα, συνδέεται με την πρωτεΐνη Araf1 (Apoptotic-protease activating factor 1), δημιουργώντας έναν επταμελή δακτύλιο που στρατολογεί ακολούθως την εναρκτήρια κασπάση-9 [5,17]. Κάθε μόριο Araf1 περιέχει μια επικράτεια στρατολόγησης κασπάσης (Caspase Recruitment Domain, CARD) που μοιάζουν με τις αντίστοιχες επικράτειες CARD των κασπασών. Σε αυτό το σύμπλεγμα που ονομάζεται «αποπτώσωμα» η κασπάση-9 διμερίζεται, πρωτεολύεται από τα ίδια της μόρια και ενεργοποιείται με παρόμοιο τρόπο με την κασπάση-8 στο σύμπλοκο DISC. Στη συνέχεια διασπά μια σειρά υποστρωμάτων, με σημαντικότερη την κασπάση-3 [11,16,18]. Άλλα εξίσου σημαντικά μόρια που εξέρχονται από το μεσομεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων μέσω των πόρων της μεμβράνης κατά την ενεργοποίηση του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης είναι οι πρωτεΐνες AIF (Apoptosis-Inducing Factor) και endonuclease G, καθώς και οι SMAC/DIABLO και OMI/HtrA2 [9,17]. Οι πρωτεΐνες AIF και ενδονουκλεάση G μετακινούνται στον πυρήνα, όπου καταλύουν το τεμαχισμό του DNA σε ακόμα μικρότερα κομμάτια ακόμα και ανάμεσα στα νουκλεοσώματα σε έναν επιπρόσθετο μηχανισμό αποικοδόμησης του DNA κατά την απόπτωση πέρα από την ενδονουκλεάση CAD. Οι πρωτεΐνες SMAC/DIABLO και OMI/HtrA2 ανήκουν στους αναστολείς της απόπτωσης (Inhibitors of Apoptosis, IAPs) και ο ρόλος τους αναλύεται παρακάτω στην αντίστοιχη ενότητα [4,11-13].

1.5.3. Σύνδεση ενδογενούς και εξωγενούς μονοπατιού

Πολλές φορές είναι δυνατό το εξωγενές μονοπάτι να συνδέεται και να ενεργοποιεί το ενδογενές μονοπάτι. Αυτό συμβαίνει μέσω της κασπάσης-3, η οποία πρωτεολύει την πρωτεΐνη Bid και προκύπτει το καρβοξυτελικό της θραύσμα tBid (truncated Bid) ή cBid, το οποίο μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στη εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και βοηθά στο σχηματισμό πόρων και την επακόλουθη έξοδο του κυτοχρώματος C [4,11,19].



Εικόνα 1: Σηματοδοτικά αποπτωτικά μονοπάτια

Στην παραπάνω **εικόνα 1**, φαίνονται τα σημαντικότερα μόρια που συμμετέχουν στην απόπτωση και ο ρόλος τους μέσω του ενδογενούς ή του εξωγενούς μονοπατιού. Στο εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης ένας προσδέτης της οικογένειας του παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF), όπως οι FASL και TNF, προσδένεται σε έναν υποδοχέα θανάτου (Death Receptor, DR) της οικογένειας του υποδοχέα παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor Receptor, TNFR), όπως οι FAS και TNFR1. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας θανάτου DR προσελκύει μόρια προσαρμοστές, όπως το Fas-Associated Death Domain (FADD). Το FADD με τη σειρά του προσελκύει πολλά μόρια της εναρκτήριας προ-κασπάσης-8, τα οποία διμερίζονται και αυτοπρωτεολύονται με αποτέλεσμα την παραγωγή ενεργοποιημένων μορίων κασπάσης-8. Οι ενεργοποιημένες κασπάσες-8 πρωτεολύουν τις κασπάσες τελεστές -3 και -7. Οι τελευταίες με τη σειρά τους πρωτεολύουν μια πληθώρα κυτταρικών υποστρωμάτων με τελικό αποτέλεσμα το θάνατο του κυττάρου. Το ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης ενεργοποιείται από μια σειρά ενδοκυτταρικών ερεθισμάτων που δηλώνουν καταπόνηση, όπως οι βλάβες του DNA, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση σε πρώτη φάση των πρωτεϊνών με μια μόνο επικράτεια BH3 (BH3-only) της υπεροικογένειας Bcl-2. Οι BH3-only πρωτεΐνες αναστέλλουν τη δράση των αντι-αποπτωτικών μελών της *BCL2* υπεροικογένειας και ενεργοποιούν τη δράση των προ-αποπτωτικών μελών τελεστών της *BCL2* οικογένειας BAX και BAK, οι οποίες με τη σειρά τους μετακινούνται και ολιγομερίζονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη προκαλώντας πόρους διαπερατότητας πρωτεϊνών από αυτήν (mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP)). Μέσω αυτών των πόρων μπορούν να εξέλθουν στο κυτταρόπλασμα μια σειρά πρωτεϊνών που βρίσκονται κανονικά στο διαμεμβρανικό μιτοχονδριακό χώρο. Η σημαντικότερη από αυτές είναι το κυτόχρωμα c που στο κυτταρόπλασμα προσδένεται στην πρωτεΐνη Apaf1 (Apoptotic peptidase activating factor 1), σχηματίζοντας έναν επταμερή δακτύλιο που ονομάζεται «αποπτώσωμα». Σε αυτήν την δομή στρατολογείται και προσδένεται

η προ-κασπάση-9, η οποία ενεργοποιείται με αυτοπρωτεόλυση και στη συνέχεια πρωτεολύει τις κασπάσες τελεστές -3 και -7. Από το μεσομεμβρανικό μιτοχονδριακό χώρο απελευθερώνονται επίσης οι πρωτεΐνες SMAC/DIABLO και OMI/HtrA2 που αναστέλλουν τη δράση της πρωτεΐνης αναστολέα των κασπασών XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis). Η πρωτεόλυση της BH3-only πρωτεΐνης BID από την κασπάση-8 για να προκύψει το καρβοξυτελικό της θραύσμα tBid ή cBid που με τη σειρά του διεγείρει τον ολιγομερισμό των BAX και BAK και την πρόκληση MOMP, συνδέει το ενδογενές και το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης. (Τροποποιημένη εικόνα από: Bock, F.J.; Tait, S.W.G., Mitochondria as multifaceted regulators of cell death., Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, [17])

1.6. Υπεροικογένεια BCL2

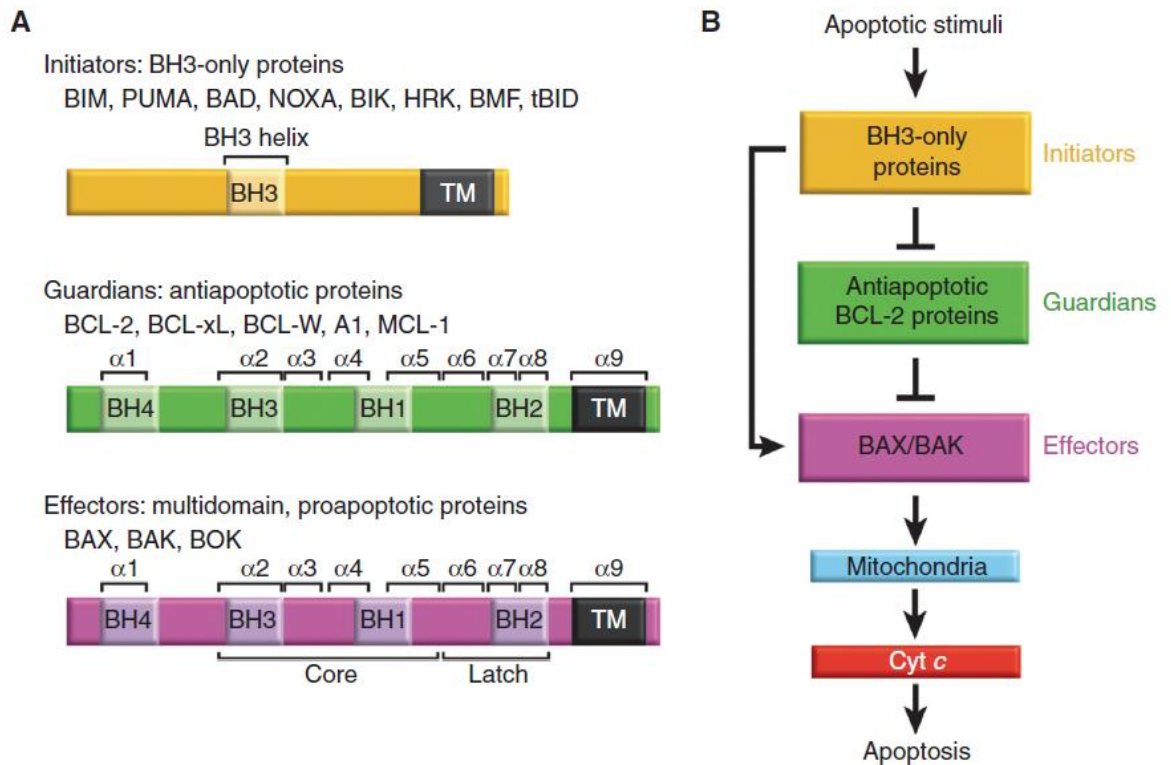
Οι πιο σημαντικές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης στα κύτταρα των θηλαστικών είναι τα μέλη της υπερικογένειας BCL2 (BCL2 superfamily). Τα μέλη αυτής της οικογένειας είναι συντηρημένα σε πολύ μεγάλο βαθμό και διακρίνονται σε προ-αποπτωτικά (pro-apoptotic), που διευκολύνουν και ενισχύουν την αποπτωτική διαδικασία και σε αντι-αποπτωτικά (anti-apoptotic), που αναστέλλουν και εμποδίζουν την απόπτωση. Βασικός ρόλος αυτών των πρωτεϊνών είναι η ρύθμιση της εξόδου διαμεμβρανικών μιτοχονδριακών μορίων στο κυτταρόπλασμα με σημαντικότερη αυτή του κυτοχρώματος c. Τα μέλη αυτών των δύο βασικών υποκατηγοριών μπορούν να συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ετεροδιμερή με αποτέλεσμα την αλληλοκαταστολή της δράσης τους, αν ανήκουν σε προ- και αντι-αποπτωτικά μέλη ή την ενίσχυση της δράσης τους αν και οι δύο είναι προ-αποπτωτικά μέλη αντίστοιχα. Η σχετική αφθονία και επικράτηση των μελών μιας συγκεκριμένης υποκατηγορίας θα καθορίσει την τύχη του κυττάρου και αν αυτό θα επιβιώσει ή θα αυτοκτονήσει [20,21]. Οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας μπορούν να διακριθούν σε τρεις βασικές κατηγορίες ανάλογα με τις επικράτειες BCL2 ομολογίας που περιέχουν (BCL2 homology domain, BH domain). Υπάρχουν: οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες με τέσσερις BH επικράτειες (BH1-BH4) και σπουδαιότερα μέλη τις BCL2, BCLXL, MCL1 και A1, υπάρχουν οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες τελεστές (effectors) με τρεις BH επικράτειες (BH1-BH3) και σπουδαιότερα μέλη τις BAK και BAX και υπάρχουν οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες με μία μόνο BH3 επικράτεια (BH3-only) και σπουδαιότερα μέλη τις BAD, BID, BIM, PUMA και NOXA. Όπως διαπιστώνεται, η επικράτεια BH3 είναι η μόνη κοινή σε όλα τα μέλη της οικογένειας και αυτή είναι η βασική υπεύθυνη επικράτεια για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προ-αποπτωτικών και των αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας. Οι περισσότερες πρωτεΐνες διαθέτουν επιπλέον ένα υδρόφοβο μοτίβο στο καρβοξυτελικό τους άκρο που χρησιμεύει στην πρόσδεσή τους σε μεμβράνες, όπως αυτή του μιτοχονδρίου ή του ενδοπλασματικού δικτύου. Επιπλέον, έχει πρόσφατα βρεθεί ότι ορισμένες προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες τελεστές (effectors) με τρεις BH επικράτειες έχουν τελικά και μια περιοχή που προσομοιάζει την επικράτεια BH4 των αντι-αποπτωτικών μελών, περιπλέκοντας ακόμα περισσότερο την κατάσταση. Μερικές, όπως οι BAX και BAK έχουν περιοχή μικρής ομολογίας με την επικράτεια BH4, ενώ άλλες, όπως η BOK, έχουν περιοχή μεγάλης και ξεκάθαρης ομολογίας με την επικράτεια BH4 [19,20,22].

Υπό την επίδραση ενός αποπτωτικού ερεθίσματος, τα προ-αποπτωτικά μέλη τελεστές της οικογένειας Bcl2 μετακινούνται στα μιτοχόνδρια, όπου ολιγομερίζονται σχηματίζοντας πόρους που επιτρέπουν τη διέλευση του κυτοχρώματος c κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Πειράματα που έχουν γίνει σε ποντικούς και αναλύονται παρακάτω έδειξαν ότι τουλάχιστον

μία πρωτεΐνη εκ των Bak ή Bax είναι απαραίτητη για την ολοκλήρωση της απόπτωσης. Η BAK βρίσκεται κυρίως στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, ενώ η BAX εντοπίζεται κανονικά κυρίως στο κυτταρόπλασμα και μετακινείται στα μιτοχόνδρια κατά τη διάρκεια της απόπτωσης. Εκεί, είναι οι βασικές υπεύθυνες για την πρόκληση διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (MOMP) [22,23].

Τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας BCL2 αλληλεπιδρούν άμεσα με τα προ-αποπτωτικά μέλη τελεστές σχηματίζοντας διμερή είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και έτσι εμποδίζουν τον ολιγομερισμό των τελευταίων και τη δημιουργία πόρων στη μεμβράνη. Χαρακτηριστικές είναι οι αλληλεπιδράσεις των BCL2 και BCLXL με την BAX και η αποτροπή του ολιγομερισμού της τελευταίας [21,24]. Το αντι-αποπτωτικό γονίδιο *BCL2* (B cell lymphoma 2) ήταν το πρώτο μέλος της οικογένειας που ανακαλύφθηκε να υπερεκφράζεται σε έναν τύπο B λεμφώματος (follicular lymphoma), συνδέθηκε με τη χρωμοσωμική μετατόπιση t(14;18) και δίνει την ονομασία του στην αντίστοιχη υπεροικογένεια [25,26].

Τα μέλη με μια μόνο επικράτεια BH3 (BH3-only) θεωρείται ότι δρουν κυρίως αλληλεπιδρώντας άμεσα είτε με τα αντι-αποπτωτικά μέλη είτε με τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας. Συγκεκριμένα, μέσω της BH3 επικράτειας, προσδένονται σε μια υδρόφοβη αύλακα των αντι-αποπτωτικών μελών, οπότε οι τελευταίες δε μπορούν να αλληλεπιδράσουν πλέον με τα μέλη τελεστές της οικογένειας. Αυτήν την ιδιότητα προσπαθούν να αξιοποιήσουν ορισμένοι ερευνητές για να δημιουργήσουν μικρά φαρμακευτικά μόρια αναστολείς (BH3 mimetics, όπως η ουσία ABT-737), που θα μιμούνται την BH3 επικράτεια και θα προσδένονται σε αυτήν την υδρόφοβη αύλακα αναστέλλοντας τα αντι-αποπτωτικά μέλη [14,21]. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες BH3-only μπορούν να αλληλεπιδρούν άμεσα και με τα προ-αποπτωτικά μέλη τελεστές υποβοηθώντας τον ολιγομερισμό των τελευταίων. Μερικές BH3-only πρωτεΐνες, όπως οι tBid, Bim και Puma μπορούν να αλληλεπιδράσουν τόσο με τα αντι-αποπτωτικά μέλη (BCL2 και BCLXL) όσο και με τα προ-αποπτωτικά μέλη (BAX και BAK). Οι υπόλοιπες BH3-only πρωτεΐνες, όπως οι BAD και NOXA μπορούν να αλληλεπιδρούν μόνο με τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας [20,22,27]. Επίσης, οι BH3-only πρωτεΐνες μπορούν αποτελέσουν τον κρίσιμο συνδετικό κρίκο μεταξύ του αποπτωτικού ερεθίσματος και της ενεργοποίησης του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης. Για παράδειγμα, η ύπαρξη βλαβών στο DNA ενεργοποιεί την πρωτεΐνη p53, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες PUMA και NOXA που θεωρούνται οι άμεσοι τελεστές των αντι-αποπτωτικών ιδιοτήτων της p53 και έτσι ενεργοποιείται το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης [28,29].



Εικόνα 2: Δομή και ρόλος των πρωτεϊνικών μελών της οικογένειας BCL2

Στην παραπάνω **εικόνα 2.A.** παρουσιάζονται οι επικράτειες ομολογίας με την πρωτεΐνη BCL2 (BCL2 Homology Domain, BH) που διαθέτουν τα σπουδαιότερα μέλη της υπερικογένειας BCL2 και η κατάταξή τους στις τρεις υποομάδες με βάση αυτό το γνώρισμα υποδηλώνει και το ρόλο τους. Επίσης, φαίνεται το υδρόφοβο μοτίβο πρόσδεσης σε μεμβράνες, όπως αυτές του μιτοχονδρίου και του ενδοπλασματικού δικτύου, καθώς και στοιχεία δευτεροταγών δομών, όπως οι δευτεροταγείς δομές α -έλικας ($\alpha 1$ - $\alpha 9$) που υπάρχουν σε κάθε μόριο. Στην **εικόνα 2.B.** παρουσιάζεται ο ρόλος των πρωτεϊνικών μελών της υπερικογένειας BCL2. Οι BH3-only πρωτεΐνες (Εκκινητές-Initiators) υπερεκφράζονται κάτω από την επίδραση αποπτωτικών ερεθισμάτων και αναστέλλουν τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας, ενώ μπορούν να διεγείρουν τον ολιγομερισμό των προ-αποπτωτικών μελών τελεστών της οικογένειας. Τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας (Φύλακες-Guardians) αντίθετα αναστέλλουν τη δράση των προ-αποπτωτικών μελών τελεστών. Τα προ-αποπτωτικά μέλη τελεστές (Effectors) ολιγομερίζονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη προκαλώντας πόρους διαπερατότητας πρωτεϊνών από αυτήν (mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP)). Μέσω αυτών των πόρων μπορεί να εξέλθει από το διαμεμβρανικό μιτοχονδριακό χώρο στο κυτταρόπλασμα το κυτόχρωμα c που προσδένεται στην πρωτεΐνη Apaf1 (Apoptotic reprotidase activating factor 1) και την κασπάση-9, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του αποπτωσώματος και την διεκπεραίωση του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης. (Τροποποιημένη εικόνα από: Moldoveanu, T.; Czabotar, P.E., BAX, BAK, and BOK: A Coming of Age for the BCL-2 Family Effector Proteins., Cold Spring Harb Perspect Biol, 2020, [23])

1.7. Αναστολείς της απόπτωσης (IAPs) και αναστολείς τους (anti-IAPs)

Καθώς η ενεργοποίηση του καταρράκτη κασπασών οδηγεί το κύτταρο σε μη αναστρέψιμο θάνατο, υπάρχουν ορισμένες πρωτεΐνες που αναστέλλουν και ρυθμίζουν τη δράση τους, ώστε η απόπτωση να ενεργοποιείται μόνο όταν είναι απαραίτητο. Μια πολύ σημαντική κατηγορία αυτών των πρωτεϊνών ονομάζονται αναστολείς της απόπτωσης (Inhibitors of apoptosis, IAPs) και ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά σε μπακουλοϊούς (baculoviruses) εντόμων, όπου εμποδίζουν το μολυσμένο με τον ιό κύτταρο να αυτοκτονήσει, αλλά πλέον είναι γνωστό ότι αποτελούν αναπόσπαστο στοιχείο όλων των ζωικών κυττάρων. Όλες οι πρωτεΐνες IAPs έχουν μία ή περισσότερες επικράτειες BIR (Baculovirus IAP Repeat), που επιτρέπουν τη σύνδεση με τις ενεργοποιημένες κασπάσες και την αναστολή τους [10,18]. Σε απόκριση ενός αποπτωτικού ερεθίσματος ενεργοποιείται παράλληλα και η παραγωγή πρωτεϊνών αντι-IAPs (anti-IAPs), οι οποίες περιέχουν ένα μικρό αμινοτελικό μοτίβο σύνδεσης στις επικράτειες BIR των IAPs με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης των πρωτεϊνών IAPs. Στη *Drosophila* οι σημαντικότερες πρωτεΐνες αντι-IAP είναι οι: Reaper, Grim και Hid. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών IAPs και anti-IAPs είναι λιγότερο μελετημένες στα θηλαστικά. Η βασική πρωτεΐνη IAP των θηλαστικών είναι η XIAP, ενώ οι βασικές πρωτεΐνες anti-IAP είναι οι SMAC/DIABLO και OMI/HtrA2. Κάτω από την επίδραση ενός αποπτωτικού ερεθίσματος οι anti-IAPs μετακινούνται από το διαμεμβρανικό μιτοχονδριακό χώρο στο κυτταρόπλασμα, όπου και αναστέλλουν τις IAPs. Συγκεκριμένα, η SMAC δεσμεύει την XIAP, οπότε απελευθερώνεται η κασπάση-9, ενώ η OMI έχει μια επιπρόσθετη ενεργότητα πρωτεάσης σερίνης/θρεονίνης και ίσως διασπά την XIAP [7,11,12]. Βέβαια, έρευνες έχουν δείξει ότι κύτταρα ποντικού επιβιώνουν αν στερούνται την XIAP ή τις SMAC/DIABLO και OMI/HtrA2. Γίνεται κατανοητό, λοιπόν, ότι διαφορετικοί ζωικοί οργανισμοί μπορεί να ρυθμίζουν με διαφορετικά μόρια και τρόπο την ενεργοποίηση των αποπτωτικών μονοπατιών και είναι αναγκαία η περεταίρω διερεύνηση αυτών των μηχανισμών [7,10,16].

1.8. Παράγοντες επιβίωσης

Ένας άλλος μηχανισμός μέσου του οποίου διασφαλίζεται η ανθεκτικότητα στην απόπτωση και η επιβίωση των κυττάρων είναι η εξωκυτταρική σηματοδότηση μέσω των παραγόντων επιβίωσης (survival factors). Συνήθως, μάλιστα, απαιτείται η διαρκής ύπαρξη παραγόντων επιβίωσης προσδεσμένων στους κατάλληλους υποδοχείς των κυττάρων, ώστε αυτά να επιβιώνουν. Διαφορετικά ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί απόπτωσης που αναλύθηκαν προηγουμένως. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση των νευρικών κυττάρων και η σηματοδότηση μέσω του παράγοντα αύξησης των νευρικών κυττάρων (Nerve Growth Factor, NGF). Γενικά, παράγονται πολυάριθμοι νευρώνες που ανταγωνίζονται για τους παράγοντες επιβίωσης που εκκρίνονται από τα κύτταρα στόχους και η πλειοψηφία αυτών πεθαίνει, ενώ επιβιώνουν μόνο αυτοί που χρειάζονται για να σχηματιστούν οι κατάλληλες συνάψεις με τα κύτταρα στόχους [1].

2. BCL2 family apoptosis regulator BOK (BOK)

2.1. Γενικές πληροφορίες

Το γονίδιο *BOK* (BCL2 family apoptosis regulator BOK) ονομάζεται αλλιώς και «BCL2 related ovarian killer», ενώ παλαιότερες ονομασίες αποτελούν οι «BCL2L9» και «Matador (Mtd)». Ανακαλύφθηκε πρώτη φορά το 1997 από τους Hsu και συνεργάτες με ένα σύστημα δύο υβριδίων ζύμης (yeast two-hybrid screen) από μια βιβλιοθήκη cDNA ποντικού προερχόμενη από κύτταρα ωοθήκης χρησιμοποιώντας ως δόλωμα αλληλεπίδρασης «bait» την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη MCL1 της BCL2 υπεροικογένειας με την οποία φάνηκε αρχικά να υπάρχει αλληλεπίδραση [30]. Την ίδια περίοδο, οι Inohara και συνεργάτες ανακάλυψαν παράλληλα χρησιμοποιώντας υπολογιστικούς αλγορίθμους πρόγνωσης μια πρωτεΐνη που ονόμασαν Mtd και περιείχε τις τέσσερις BH επικράτειες (BH1-BH4) και ένα διαμεμβρανικό υδρόφοβο μοτίβο πρόσδεσης στο καρβοξυτελικό της άκρο [31]. Το υδρόφοβο αυτό μοτίβο είναι πολύ σημαντικό για την πρόσδεση της πρωτεΐνης σε μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και των μιτοχονδρίων [32]. Αυτές οι δύο πρώτες έρευνες έδειξαν ότι η νέα αυτή πρωτεΐνη έχει προ-αποπτωτικό ρόλο *in vitro* κατά ομολογία των BAX και BAK, αλλά δεν αλληλεπιδρά με όλες τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως οι BCL2 και BCLXL, παρά μόνο με ορισμένες, όπως οι MCL1, BHFR1 και A1, σε μια ακόμα ξεχωριστή της ιδιότητα σε σχέση με τις ήδη τότε υπόλοιπες γνωστές προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες τελεστές. Αρχικά, θεωρούνταν ότι η έκφραση του *BOK* περιορίζεται στους αναπαραγωγικούς ιστούς, όπως οι ωοθήκες και οι όρχεις, σήμερα είναι όμως γνωστό ότι εκφράζεται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, όπως οι νευρώνες, το ήπαρ και οι νεφροί [32,33]. Το ενδιαφέρον για το γονίδιο *BOK* αυξήθηκε, όταν διαπιστώθηκε ότι βρίσκεται εντός μιας γονιδιωματικής περιοχής που είναι από τις πιο συχνές ελλείψεις σε ανθρώπινους καρκίνους, μια ακόμα ένδειξη για την πιθανή ογκοκατασταλτική του δράση [34]. Η πρωτεΐνη *BOK* κατατάσσεται γενικά στα προ-αποπτωτικά μέλη τελεστές της οικογένειας BCL2 μαζί με τις BAX και BAK με τις οποίες έχει μεγάλη ομολογία σε επίπεδο αλληλουχίας και γενικά θεωρείται ότι έχει προ-αποπτωτική δράση. Υπάρχουν, όμως, αρκετές αντικρουόμενες έρευνες που αποδεικνύουν ότι μπορεί οι βασικές της κυτταρικές λειτουργίες να μη σχετίζονται με την απόπτωση ή να μην επάγει τελικά από μόνη της την απόπτωση [35]. Τα στοιχεία αυτά σε συνδυασμό με το γεγονός ότι πρόκειται για ένα παραμελημένο μέλος της οικογένειας BCL2 καθιστούν αναγκαία την έρευνα σχετικά με αυτήν την πρωτεΐνη και τη διαλεύκανση του ρόλου της στην κυτταρική λειτουργία.

2.2. Διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών

Αναπόσπαστο πειραματικό εργαλείο που διαφωτίζει το ρόλο και τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην απόπτωση αποτελούν οι διαγονιδιακοί ποντικοί που δημιουργούνται και διασταυρώνονται μεταξύ τους και στους οποίους μπορεί να απουσιάζει η έκφραση μιας ή και περισσότερων πρωτεϊνών. Ποντικοί από τους οποίους απουσιάζει η έκφραση της Bax (Bax^{-/-} knockouts) ή της Bak (Bak^{-/-} knockouts) επιβιώνουν και αναπτύσσονται κανονικά χωρίς την εκδήλωση σοβαρών ασθενειών που σχετίζονται με τη γήρανση. Όταν όμως αυτοί οι ποντικοί διασταυρωθούν για την παραγωγή απογόνων από τους οποίους απουσιάζει η έκφραση και των δύο αυτών πρωτεϊνών (Bax^{-/-} Bak^{-/-} double knockouts, DKOs), λιγότερο από το 10% των απογόνων επιβιώνει μέχρι την ενηλικίωση και όλοι οι ποντικοί εμφανίζουν αναπτυξιακές ανωμαλίες, όπως η συσσώρευση κυττάρων σε νευρικούς και αιμοποιητικούς ιστούς που αδυνατούν να απομακρυνθούν με την απόπτωση και η ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων [36,37]. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν τον

απαραίτητο, αλλά και επικαλυπτόμενο ρόλο των Bax και Bak στην πραγματοποίηση της απόπτωσης. Στους πρώτους διαγονιδιακούς ποντικούς που δημιουργήθηκαν από τους Ke και συνεργάτες και στους οποίους λείπει η έκφραση της Bok (Bok^{-/-}) παρατηρήθηκε κανονική ανάπτυξη και γονιμότητα, ενώ η έλλειψη της Bok δεν επιδεινώνει την ανάπτυξη λεμφώματος σε διαγονιδιακούς ποντικούς Em-Myc [33]. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από επόμενα μοντέλα διαγονιδιακών ποντικών Bok^{-/-} που δημιουργήθηκαν από τους Llambi και συνεργάτες και τους Carpio και συνεργάτες [38,39]. Σε άλλα διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία έλειπε η έκφραση της Bax και της Bok (Bax^{-/-} Bok^{-/-} double knockouts, DKO) ή της Bak και της Bok (Bak^{-/-} Bok^{-/-} double knockouts, DKO), δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο φαινότυπο σε σύγκριση με τα Bax^{-/-} και τα Bak^{-/-} διαγονιδιακά ποντίκια αντίστοιχα. Εξαιρέση αποτέλεσε η υψηλή συγκέντρωση ωοκυττάρων διάφορων αναπτυξιακών σταδίων στα γερασμένα θηλυκά ποντίκια Bax^{-/-} Bok^{-/-} DKO, υποδηλώνοντας ότι η Bax και η Bok μπορεί να έχουν αλληλοεξαρτώμενο προ-αποπτωτικό ρόλο στα ωοθυλάκια και την ατρησία. Επιπρόσθετα, ένα άλλο διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού με έλλειψη έκφρασης και των τριών αυτών πρωτεϊνών (Bax^{-/-} Bak^{-/-} Bok^{-/-} triple knockouts, TKO) στο αιμοποιητικό σύστημα είχε ελαφρώς σοβαρότερα συμπτώματα από τα DKO ποντίκια με την ανάπτυξη αρκετών αυτοάνοσων νοσημάτων, ενώ η δημιουργία TKO ποντικών με έλλειψη της έκφρασης των τριών πρωτεϊνών σε όλο το σώμα είχε σοβαρότερο φαινότυπο με 99% των ποντικών να πεθαίνουν [40-42]. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη Bok έχει πλεονάζοντες λειτουργίες (redundant) σε σχέση με τις Bax και Bak, δηλαδή έχει προ-αποπτωτική δράση αλλά μάλλον δε μπορεί από μόνη της να επάγει την απόπτωση και έχει και άλλες σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες που δε σχετίζονται με την απόπτωση ή ρυθμιστές και αλληλεπιδράσεις που δεν είναι ακόμα γνωστά.

2.3. Ρόλος στο ενδοπλασματικό δίκτυο και συσχέτιση με την απόπτωση

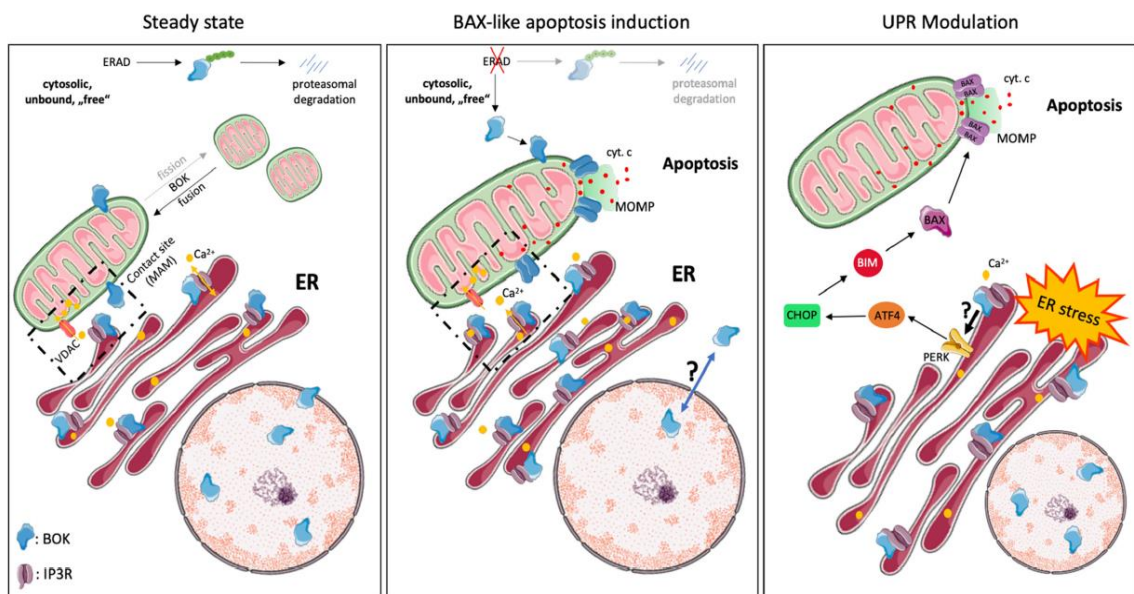
Η βασική θέση της BOK στο κύτταρο είναι στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Endoplasmic Reticulum, ER) και σε μικρότερο βαθμό στο σύστημα Golgi. Σε ακόμα μικρότερες ποσότητες παρατηρείται όμως και στον πυρήνα, όπου ο ρόλος της παραμένει άγνωστος, και στις θέσεις επαφής ενδοπλασματικού δικτύου και μιτοχονδρίων [32,33,43,44]. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις BAX και BAK που εδράζονται κυρίως στο κυττασόλιο και στα μιτοχόνδρια αντίστοιχα. Στο ενδοπλασματικό δίκτυο η BOK προσδέεται ισχυρά και σταθερά στους υποδοχείς 1,4,5-τριφωσφορικής ινσιτόλης (inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, IP3Rs) και κυρίως στους IP3R1 και IP3R2, οι οποίοι είναι τετραμερείς διάλυτοι ασβεστίου που ρυθμίζουν την απελευθέρωση του αποθηκευμένου ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο κυτταρόπλασμα. Αυτή η σύνδεση πραγματοποιείται μέσω της BH4 επικράτειας. Σύμφωνα με τη Schulman και τους συνεργάτες της, αυτή η σύνδεση δε φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα απελευθέρωσης ασβεστίου από τους IP3Rs και, κυρίως, προστατεύει τους IP3Rs από πρωτεόλυση από την κασπάση-3. Όσον αφορά τη BOK, αν δεν είναι προσδεδεμένη στους υποδοχείς IP3Rs οδηγείται σε ταχεία αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα σε έναν ενδογενή μηχανισμό ρύθμισης της συγκέντρωσης της κυτοσολικής BOK που θα οδηγούσε το κύτταρο διαφορετικά σε απόπτωση [32,39,45,46]. Τα παραπάνω δεδομένα έρχεται να ενισχύσει το γεγονός ότι αναστολή των πρωτεϊνών που οδηγούν την Bok για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα ή του ίδιου του πρωτεασώματος, καθώς και προσθήκη παραγόντων που διαταράσσουν τη φυσιολογική λειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου και του συμπλέγματος Golgi, όπως η brefeldin A και η thapsigargin, καθιστούν τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στην απόπτωση με έναν Bok εξαρτώμενο τρόπο. Αντίθετα, τα κλασικά αποπτωτικά

ερεθίσματα του ενδογενούς μονοπατιού, όπως η etoposide και η staurosporine, οδηγούν τα κύτταρα στην απόπτωση μέσω της δράσης κυρίως μιας εκ των BAX ή BAK, αποδεικνύοντας τον ξεχωριστό ρόλο της BOK στην πρόκληση της απόπτωσης και στην πιθανή αξιοποίηση διαφορετικών φαρμακευτικών παραγόντων για τη ρύθμισή της [38,39]. Σημαντικός αποδεικνύεται επίσης ο ρόλος της BOK στην απόκριση στις μη ορθά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response, UPR). Με βάση τα αποτελέσματα των Carpio και συνεργατών, η BOK μπορεί μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού να ενεργοποιεί τον υποδοχέα PERK (*EIF2AK3*) στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η κινάση PERK φωσφορυλιώνει τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF2a (*EIF2A*) με αποτέλεσμα την εξασθένιση του ρυθμού μετάφρασης και την αύξηση των επιπέδων της ATF4 που μεταγράφει το γονίδιο της CHOP (*DDIT3*). Η CHOP μπορεί με τη σειρά της να ενεργοποιήσει την BIM και αυτή στη συνέχεια να ενεργοποιήσει την BAX. Αυτός ο μηχανισμός φανερώνει ένα ρόλο της BOK ανοδικά των BAX/BAK για το σχηματισμό MOMP's που εξηγεί πολλά από τα αποτελέσματα και των υπόλοιπων ερευνών [38,47,48]. Στα πειράματά τους, οι Carpio και συνεργάτες έδειξαν, επίσης, ότι η BOK δε μπορεί από μόνη της να προκαλέσει επαρκή απελευθέρωση του κυτοχρώματος c χωρίς τη συνεργιστική δράση των BAX ή BAK [38].

2.4. Ρόλος στην πρόκληση διαπερατότητας στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (MOMP)

Όπως αναλύθηκε και προηγουμένως, οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες τελεστές BAX και BAK που περιέχουν τρεις BH επικράτειες (BH1, BH2 και BH3) μπορούν να ολιγομερίζονται και να σχηματίζουν στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη πόρους διαπερατότητας (Mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP). Λαμβάνοντας υπόψιν την ομοιότητα στο επίπεδο της αλληλουχίας, η BOK αναμένεται επίσης να κατέχει αυτήν την ιδιότητα. Σύμφωνα, λοιπόν, με μια θεμελιώδη έρευνα των Lambi και συνεργατών, η πρωτεΐνη BOK είναι συνεχώς ενεργή χωρίς να αναστέλλεται από άλλα μέλη της BCL2 οικογένειας, όπως η MCL1, BCL2 και BCLXL. Αντίθετα, τα πρωτεϊνικά της επίπεδα ρυθμίζονται από συστατικά του μονοπατιού αποικοδόμησης πρωτεϊνών που σχετίζονται με το ενδοπλασματικό δίκτυο (endoplasmic reticulum (ER)-associated protein degradation pathway, ERAD). Συγκεκριμένα, σε κύτταρα HCT 116 η BOK ουβικιτιλιώνεται από το σύμπλοκο της E3 λιγάσης ουβικιτίνης AMFR/grp78 και οδηγείται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα από το σύμπλοκο VCP/p97. Όταν μία εκ των grp78, VCP ή το πρωτεάσωμα αναστέλλονται, η BOK σταθεροποιείται, μπορεί να προκαλέσει τη δημιουργία MOMP's και να οδηγήσει το κύτταρο σε απόπτωση ανεξάρτητα από τη συμβολή άλλων μελών της οικογένειας BCL2 [39]. Αυτή είναι μια σημαντική ανακάλυψη, καθώς η BOK θα μπορούσε να συντελεί έναν μηχανισμό που εξηγεί ότι οι αναστολείς του πρωτεασώματος έχουν τοξική *in vivo* δράση έναντι πολλών τύπων κακοηθειών [49]. Η πρωτεΐνη BOK υποστηρίζεται από μια ακόμα έρευνα ότι μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c μέσω της δημιουργίας MOMP's σε κύτταρα καρκίνου των ωοθηκών ανεξάρτητα από τη δράση των BAX ή BAK [44]. Σε μια αντικρουόμενη έρευνα παρατηρήθηκε πειραματικά ότι μία ισομορφή της BOK, η BOK^{ΔC}, η οποία έχει προκύψει από την αποκοπή του καρβοξυτελικού της άκρου μήκους 24 αμινοξέων, μπορεί να σχηματίζει πόρους διαπερατότητας σε τεχνητά λιπώματα που μιμούνται τη μιτοχονδριακή μεμβράνη, αλλά όχι τη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Αυτή η ιδιότητα ενισχύεται από την προσθήκη του καρβοξυτελικού θραύσματος της πρωτεΐνης Bid (cBID ή tBID), ενώ δεν εμποδίζεται από την πρωτεΐνη BCLXL, σε αντίθεση με την επίδρασή της στην BAX. Ωστόσο, φαίνεται ότι αυτός ο ρόλος δεν μπορεί να διεκπεραιωθεί σε

πραγματικά μιτοχόνδρια που απομονώνονται από κύτταρα ποντικού (mouse embryo fibroblasts (MEFs)) *Bax*^{-/-} και *Bak*^{-/-}, ακόμα και μετά την προσθήκη cBID, όπως συμβαίνει με την πρωτεΐνη *Bax*. Από αυτούς τους πόρους αδυνατεί να γίνει επίσης και η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c σε μεγάλες ποσότητες [50]. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με τις προηγούμενες δημοσιεύσεις, σύμφωνα με τις οποίες η BOK μπορεί να προκαλεί πόρους στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και την επακόλουθη απελευθέρωση του κυτοχρώματος c χωρίς να χρειάζεται την παρουσία μίας εκ των BAX ή BAK. Για τη διαλεύκανση του πραγματικού μηχανισμού λειτουργίας χρειάζονται in vivo πειράματα με τη χρήση της πρωτεΐνης στην πλήρη της μορφή [51]. Μια σημαντική δομική μελέτη με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) έρχεται να ρίξει φως στη λειτουργία της πρωτεΐνης BOK. Σύμφωνα με την τριτοταγή δομή που προκύπτει, η ανθρώπινη BOK στη διαλυτή της μορφή έχει μια μη τυπική υδρόφοβη αύλακα σε σχέση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της BCL2 οικογένειας που εμποδίζει την αλληλεπίδρασή με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες μέσω της BH3 επικράτειας, κάτι που υποστηρίζει την άποψη ότι η cBID τελικά δεν αλληλεπιδρά με την BOK in vivo. Ένα ακόμα κρίσιμο στοιχείο είναι η ύπαρξη ενός καταλοίπου γλυκίνης (G35) εντός της έλικας α1 της BOK που της προσδίδει μια ενδογενή δομική αστάθεια, που θεωρείται υπεύθυνη για την ενσωμάτωση της BOK σε μεμβράνες και την πρόκληση MOMP's [35,52]. Σύμφωνα με πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης από τους Echeverry και συνεργάτες, η BOK δεν αλληλεπιδρά ούτε με την MCL-1, όπως θεωρούνταν με βάση την πρώτη δημοσίευση που αναφερόταν στην ανακάλυψη της BOK, αλλά θα μπορούσε να αλληλεπιδρά με τον εαυτό της μέσω της BH3 επικράτειας [32]. Δεν υπάρχουν όμως πειραματικά στοιχεία δομικών μελετών που να αποδεικνύουν το διμερισμό ή τον ολιγομερισμό της BOK και αν αυτό οδηγεί στην πρόκληση MOMP [51]. Μια ακόμα ενδιαφέρουσα έρευνα ξανά από τη Schulman και τους συνεργάτες της ανακάλυψε το σημαντικό ρόλο της πρόσδεσης της BOK στους IP3Rs για τη διατήρηση της ικανότητας σύντηξης των μιτοχονδρίων και διατήρησης της βιοενεργητικής τους ικανότητας [53]. Είναι πιθανό, λοιπόν, η BOK να επηρεάζει τη μιτοχονδριακή ακεραιότητα με μηχανισμούς που δε σχετίζονται με την απόπτωση.



Εικόνα 3: Ενδοκυτταρική θέση της πρωτεΐνης BOK και οι κυτταρικές λειτουργίες της

Σε φυσιολογικές κυτταρικές συνθήκες (steady state), η πρωτεΐνη BOK βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά δεσμευμένη στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου (Endoplasmic Reticulum, ER) και του συμπλέγματος Golgi. Σε πολύ μικρότερες ποσότητες μπορεί να βρεθεί μέσα στον πυρήνα, όπου ο ρόλος της δεν είναι ακόμα γνωστός, και στις θέσεις επαφής του ενδοπλασματικού δικτύου και της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η BOK βρίσκεται σταθερά προσδεσμένη στους υποδοχείς IP3R (inositol 1,4,5-trisphosphate receptors) του ενδοπλασματικού δικτύου και τους προστατεύει από αποικοδόμηση από την κασπάση-3, χωρίς να επηρεάζει τη διέλευση ιόντων ασβεστίου. Η μη δεσμευμένη και ελεύθερη πρωτεΐνη BOK ουβικιτινιλιώνεται και οδηγείται γρήγορα στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση μέσω του μονοπατιού ERAD (endoplasmic reticulum (ER)-associated protein degradation pathway). Έτσι, αποτρέπεται η μη αναγκαία προ-αποπτωτική της δράση. Πρόσφατα, η πρωτεΐνη BOK βρέθηκε να είναι σημαντική για τη σύντηξη των μιτοχονδρίων και τη διατήρηση της ορθής μορφολογίας τους. Σε περίπτωση διαταραχής του μηχανισμού απομάκρυνσής της, δηλαδή σε συνθήκες καταπόνησης του ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress) και του συμπλέγματος Golgi και διαταραχής του μονοπατιού ERAD, αυξάνονται τα επίπεδα της κυτοσολικής BOK και πιστεύεται από τους περισσότερους ότι μπορεί να προκαλέσει πόρους διαπερατότητας πρωτεϊνών από την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) με έναν μηχανισμό παρόμοιο με τη BAX. Επίσης, σε συνθήκες καταπόνησης του ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress) και της συσσώρευσης μη ορθά διπλωμένων πρωτεϊνών (Unfolded Protein Response, UPR), η BOK ενεργοποιεί μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού την κινάση υποδοχέα PERK του ER, που ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα ATF4, ο οποίος μεταγράφει το γονίδιο της CHOP. Η τελευταία ενεργοποιεί την BH3-only πρωτεΐνη BIM, η οποία διευκολύνει τον ολιγομερισμό των BAX/BAK και την πρόκληση πόρων διαπερατότητας πρωτεϊνών από την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP)). Έτσι, μπορεί η πρωτεΐνη BOK να μεσολαβεί έμμεσα την πρόκληση MOMP δρώντας ανοδικά των BAX/BAK. (Τροποποιημένη εικόνα από: Naim, S.; Kaufmann, T., The Multifaceted Roles of the BCL-2 Family Member BOK., Front Cell Dev Biol, 2020, [51])

2.5. BOK και καρκίνος

Το γονίδιο *BOK* κίνησε το ενδιαφέρον των ερευνητών όταν ανακαλύφθηκε ότι βρίσκεται σε μια χρωμοσωμική περιοχή που λείπει από αρκετούς τύπους καρκίνου, οπότε είναι πιθανή η εμπλοκή του στην εξέλιξη του καρκίνου ή η χρήση του ως καρκινικού βιοδείκτη [34]. Μια πρόσφατη έρευνα από τους Srivastava και συνεργάτες αποκάλυψε ότι η BOK ρυθμίζει θετικά και ενισχύει τη δράση του ενζύμου συνθετάση μονοφωσφορικής ουριδίνης (uridine monophosphate synthetase, UMPS), μέσω αλληλεπίδρασης με τη BH3 επικράτεια. Η UMPS καταλύει τη μετατροπή της 5-φθοροουρακίλης (5-fluorouracil, 5-FU) στους τοξικούς μεταβολίτες που σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα προκαλώντας βλάβες στο DNA. Ως αποτέλεσμα, κύτταρα MEFs ποντικού και κύτταρα καρκίνου του παχέος εντέρου (CRC cells) *Bok*^{-/-} είχαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην 5-FU και σε κυτταρικές σειρές CRC που ήταν ήδη ανθεκτικές στην 5-FU παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης του BOK. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν έναν πιθανό ρόλο αξιοποίησης του BOK ως καρκινικού βιοδείκτη της ανταπόκρισης στη θεραπεία με 5-FU ή της αξιοποίησης φαρμακευτικών παραγόντων που

μιμούνται τη δράση της για την ενίσχυση της τοξικότητας της 5-FU [35,54,55]. Εκτός από τη μετατροπή της 5-FU στους ενεργούς μεταβολίτες της, η UMPS συμμετέχει επίσης στη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων και την παραγωγή πυριμιδινών [51]. Έτσι, η απώλεια της BOK σε κύτταρα CRC από τη μία πλευρά τα κάνει πιο ανθεκτικά στην 5-FU, αλλά από την άλλη πλευρά τους στερεί νουκλεοτίδια απαραίτητα για την αντιγραφή του DNA μειώνοντας το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους. Αυτό ίσως προκαλεί εξελικτική πίεση που ωθεί στην απώλεια της p53 ή άλλων αναστολέων του κυτταρικού κύκλου και ίσως οδηγεί τελικά σε έναν πιο επιθετικό φαινότυπο [51]. Έτσι, λοιπόν, τα αποτελέσματα μιας έρευνας που αποδεικνύει τα επίπεδα έκφρασης της BOK στους καρκινικούς ιστούς να είναι μειωμένα σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς, αλλά τα υψηλά επίπεδα της BOK μεταξύ των καρκινικών δειγμάτων να συνδέονται με δυσμενή πρόγνωση στον καρκίνο του παχέος εντέρου να έχουν να κάνουν με το στάδιο του καρκίνου στο οποίο ανήκουν τα δείγματα και την απώλεια επιπρόσθετων παραγόντων και να μην εναντιώνονται στην προ-αποπτωτική δράση του BOK [51,56]. Σε ένα άλλο μοντέλο ηπατοκυτταρικού καρκίνου στον ποντικό που επάγεται από την τοξική ουσία DEN, ο θάνατος των ηπατοκυττάρων εξαναγκάζει τα κύτταρα του περιβάλλοντα ιστού σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό με συσσώρευση μεταλλάξεων και τελικά στη δημιουργία καρκίνου. Έτσι, η επίδραση με DEN που προκαλεί τον ηπατοκυτταρικό θάνατο είχε λιγότερο σοβαρά αποτελέσματα σε ποντικούς Bok^{-/-} με λιγότερους και μικρότερους όγκους. Η απώλεια της Bok βρέθηκε ότι προστατεύει τα ηπατοκύτταρα από την απόπτωση με αναστολή της απόκρισης του ενδοπλασματικού δικτύου σε συνθήκες καταπόνησης (ER-stress) και με μείωση της δράσης των προ-αποπτωτικών BH3-only πρωτεϊνών BIM και PUMA και της CHOP. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με το λειτουργικό ρόλο της Bok στο ER και της δράσης της ανοδικά των Bax/Bak και της πρόκλησης MOMP [57]. Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης του *BOK* βρέθηκαν αρκετά χαμηλά σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Non-Small Cell Lung Carcinoma, NSCLC) και συσχετίστηκαν με μικρότερες πιθανότητες επιβίωσης, αλλά κυρίως με αυξημένη μεταστατική ικανότητα των κυττάρων. Τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του *BOK* οφείλονται κυρίως σε υπερμεθυλίωση του υποκινητή του. Το ενδιαφέρον αποτέλεσμα της έρευνας είναι επίσης, ότι η ογκοκατασταλτική δράση της BOK δε σχετίζεται με την απόπτωση, αλλά με την αναστολή του TGF- β και της αναστολής της μεταστατικής ικανότητας των κυττάρων. Με βάση τα αποτελέσματα, πιθανόν αυτό συμβαίνει μέσω της ρύθμισης του PERK υποδοχέα και το ρόλο του BOK στο μονοπάτι UPR που αναλύθηκε παραπάνω [58].

3. Κυκλικά RNAs (circRNAs)

3.1. Γενικές πληροφορίες

Τα κυκλικά μόρια RNA (circRNAs ή circularRNAs) είναι μια πρόσφατα μελετημένη κατηγορία μη κωδικών RNAs (non-coding RNAs, ncRNAs). Πρόκειται για μονόκλιωνα κυκλικά μόρια RNA χωρίς άκρα που είναι εξελικτικά συντηρημένα σε διάφορους οργανισμούς. Προκύπτουν με έναν ιδιαίτερο μηχανισμό οπισθοσυρραφής (back-splicing) και μπορεί να έχουν ποικίλες λειτουργίες, όπως να προσδένουν μόρια microRNAs ή πρωτεΐνες που προσδένονται σε αλληλουχίες RNA (RNA Binding Proteins, RBPs) [59-61]. Τα πρώτα παρατηρήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία πολλά χρόνια πριν κατά τη δεκαετία του 1970 και ονομάστηκαν ιοειδή (viroids), καθώς έμοιαζαν με δομές ιών [62]. Από τότε παρατηρήθηκαν και σε άλλους οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων των ευκαρυωτικών, αλλά δεν προσέλκυσαν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, καθώς θεωρούνταν ότι ήταν παραπροϊόντα της κανονικής συρραφής του pre-mRNA χωρίς κάποιον ρόλο [63]. Μόνο

πρόσφατα, πειράματα RNA αλληλούχισης νέας γενιάς (RNAseq) έδειξαν ότι πρόκειται για έναν πολυπληθή τύπο RNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα, εκ των οποίων ορισμένα έχουν σταθερή υψηλή έκφραση, άλλα έχουν αυξομειούμενη έκφραση ανάλογα με τη παθοφυσιολογική κατάσταση του κυττάρου και τον κυτταρικό τύπο και σε κάθε περίπτωση συνιστούν ενδιαφέροντα μόρια με ποικίλους βιολογικούς ρόλους [64,65]. Στη συνέχεια, αναλύονται οι μηχανισμοί βιογένεσης των circRNAs και οι κατηγορίες τους, η ρύθμιση της παραγωγής τους, καθώς και οι λειτουργίες τους με έμφαση στον καρκίνο.

3.2. Βιογένεση και κατηγορίες των circRNAs

Υπάρχουν τρία βασικά είδη κυκλικών RNAs με βάση τις αλληλουχίες του γονιδίου προέλευσης που περιέχουν και αν αυτές πρόκειται για εξώνια ή εσώνια που εντοπίζονται στα αντίστοιχα γραμμικά μετάγραφα mRNA των γονιδίων. Τα EcircRNAs (Exonic circRNAs) περιέχουν αποκλειστικά αλληλουχίες εξωνίων, τα ElicircRNAs (Exonic Intronic circRNAs) περιέχουν αλληλουχίες τόσο εξωνίων όσο και ιντρονίων και τα ciRNAs (circular intronic circRNAs) περιέχουν μόνο αλληλουχίες ιντρονίων. Σε αυτό το πλαίσιο, υπάρχουν τρεις βασικοί μηχανισμοί βιογένεσης από τους οποίους προκύπτουν και τα διαφορετικών ειδών circRNAs. [66,67].

Σύμφωνα με τον πρώτο μηχανισμό βιογένεσης που ονομάζεται παράλειψη εξωνίων ή κυκλοποίηση μέσω «λάσου» (Exon skipping ή lariat driven circularization) κατά τη διάρκεια της μεταγραφής ενός pre-mRNA και πριν την κανονική του συρραφή, μία 5' θέση δότη ενός ανοδικού ιντρονίου επιτίθεται σε μία 3' θέση δέκτη ενός καθοδικού ιντρονίου, οδηγώντας στο σχηματισμό μιας δομής σχήματος «λάσου» που περιέχει το εξώνιο που παραλείφθηκε (skipped exon). Αυτός ο ξεχωριστός τρόπος συρραφής που οδηγεί στη δημιουργία κυκλικών RNAs ονομάζεται οπισθοσυρραφή (back-splicing). Συνήθως, τα εσώνια αποκόπτονται από το σωματίο συρραφής (spliceosome), οδηγώντας στο σχηματισμό ενός exonic circular RNA (EcircRNA), παράλληλα με ένα γραμμικό μετάγραφο που δεν περιέχει τα εξώνια που παραλείφθηκαν. [68,69].

Σύμφωνα με το δεύτερο μηχανισμό που ονομάζεται κυκλοποίηση μέσω ζευγαρώματος ιντρονίων (intron pairing-driven circularization), το ζευγάρισμα λόγω συμπληρωματικότητας ιντρονίων που βρίσκονται εκατέρωθεν κάποιων εξωνίων φέρνει κοντά τις θέσεις δότη και δέκτη με αποτέλεσμα την πραγματοποίηση του μηχανισμού οπισθοσυρραφής που αναλύθηκε προηγουμένως. Αυτές οι συμπληρωματικές και ανάστροφες αλληλουχίες μεταξύ εκατέρωθεν ιντρονίων είναι συνήθως ανάστροφες επαναλήψεις των μεταθετών στοιχείων Alu [70,71]. Αν τα εσώνια σε αυτήν την ενδιάμεση δομή «λάσου» διατηρηθούν σχηματίζεται ένα exonic intronic circRNA (ElicircRNA). Αντίθετα, αν τα εσώνια αποκοπούν σχηματίζεται ένα exonic circRNA (EcircRNA). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, είναι δυνατό να σχηματιστούν και circRNAs που περιέχουν μόνο αλληλουχίες εσωνίων. Όπως είναι γνωστό, ένα εσώνιο απομακρύνεται με μια δομή «λάσου» από το spliceosome κατά τη διάρκεια της συρραφής ενός pre-mRNA. Αλληλουχίες πλούσιες σε GU στο 5' σημείο συρραφής μερικώς συμπληρωματικές σε πλούσιες σε C αλληλουχίες κοντά στο σημείο διακλάδωσης στη 3' θέση συρραφής είναι συνήθως αρκετές, ώστε ένα «λάσο» εσωνίου να αποφύγει την αποικοδόμησή του. Η αποκοπή της ουράς που περισσεύει οδηγεί τελικά στη δημιουργία ενός circular intronic circRNA (ciRNA) [66,72,73].

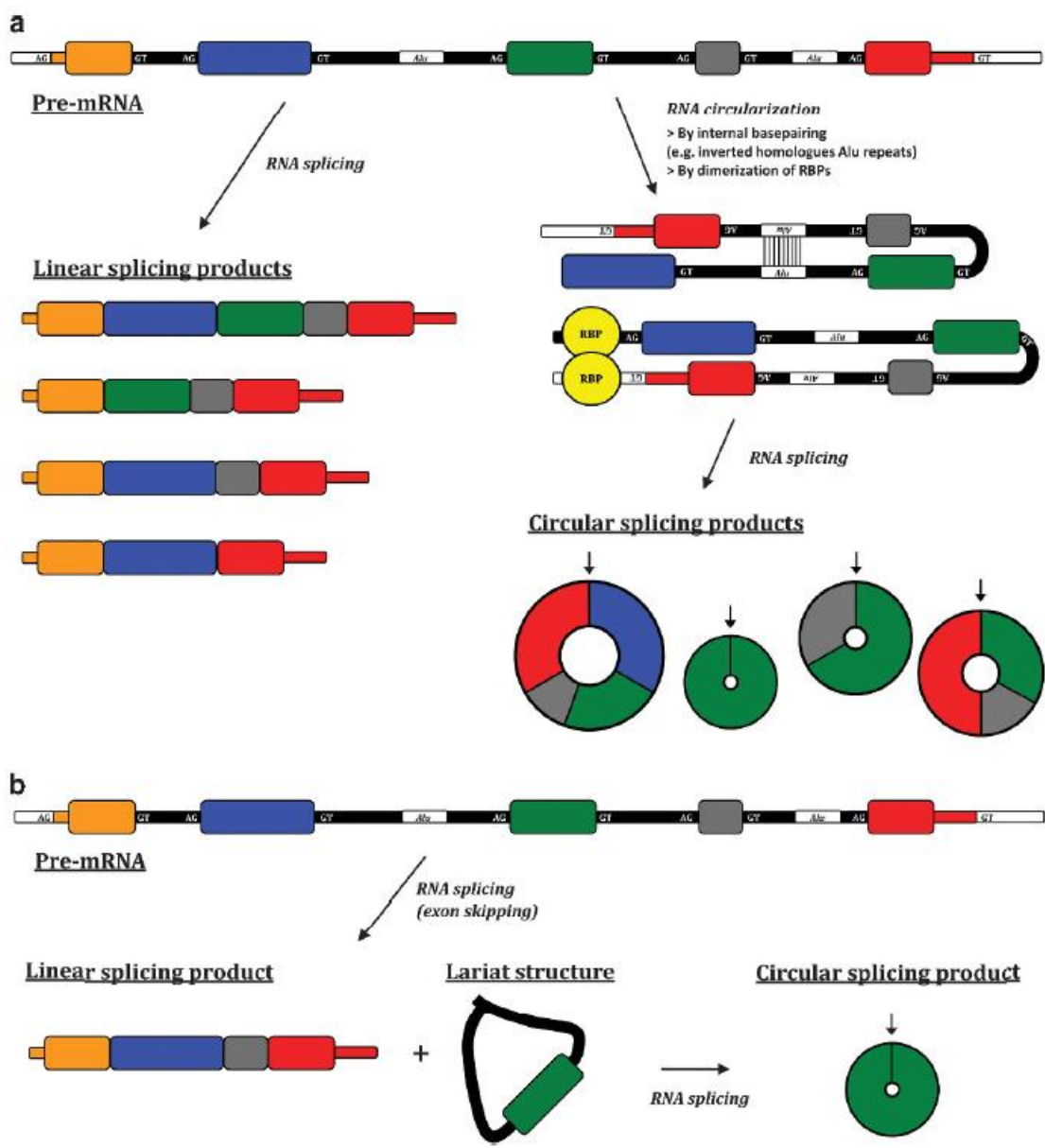
Ο τρίτος μηχανισμός βιογένεσης ονομάζεται κυκλοποίηση μέσω πρόσδεσης πρωτεϊνών στο RNA (RNA binding proteins (RBPs)-driven circularization). Η βασική ιδέα

αυτού του μηχανισμού είναι ότι ο διμερισμός RBPs που προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες σε εσώνια εκατέρωθεν εξωνίων φέρνουν κοντά τις θέσεις συρραφής δότη και δέκτη, με αποτέλεσμα την πραγματοποίηση του μηχανισμού της οπισθοσυρραφής. Όπως αναφέρθηκε στο πρώτο μέρος του δεύτερου μηχανισμού, έτσι και ο τρίτος μηχανισμός οδηγεί στο σχηματισμό ενός exonic intronic (EicircRNA) ή ενός exonic circRNA (EcircRNA). Υπάρχουν πολλές πρωτεΐνες RBPs που ελέγχουν και ρυθμίζουν αυτήν τη διαδικασία με θετικό ή αρνητικό τρόπο [71,73]. Από τη μία πλευρά, υπάρχουν πολλές πρωτεΐνες που συμβάλλουν στη βιογένεση των circRNAs με διάφορους τρόπους. Ο παράγοντας συρραφής muscleblind (mbl), που ονομάζεται Muscleblind Like Splicing Regulator 1 (MBNL1) στον άνθρωπο, ανακαλύφθηκε αρχικά στη *Drosophila* ότι μπορεί να προσδένεται σε ειδικές ιντρονιακές αλληλουχίες του γονιδίου του (ειδικότερα οι πρωτεϊνικές ισομορφές MBL-A και MBL-C) και να προωθεί τη βιογένεση του circMbl από το δεύτερο εξώνιο σε έναν μηχανισμό αρνητικής τροφοδότησης της μεταγραφής του γραμμικού mRNA του γονιδίου [73-75]. Ένας ακόμα παράγοντας συρραφής με παρόμοιο μηχανισμό δράσης που φαίνεται να σταθεροποιεί το ζευγάριωμα αναστροφών και συμπληρωματικών ιντρονιακών αλληλουχιών ευνοώντας την κυκλοποίηση και την παραγωγή των circRNAs κατά τον επιθηλιακό-μεσεγχοματικό μετασχηματισμό των κυττάρων (epithelial-mesenchymal transformation, EMT) είναι ο QKI (Quaking homolog KH domain RNA-binding protein). Ο QKI έχει βρεθεί ότι υποεκφράζεται στον καρκίνο του πνεύμονα και αυτή η χαμηλή έκφρασή του θα μπορούσε να αποτελέσει δυσμενή προγνωστικό δείκτη [76,77]. Τα αποτελέσματα μιας ακόμα ενδιαφέρουσας έρευνας έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες NF90 και NF110 σε φυσιολογικές συνθήκες μπορούν να προσδένονται σε ιντρονιακές αλληλουχίες και να σταθεροποιούν το ζευγάριωμά τους, προωθώντας έτσι το σχηματισμό των circRNAs με το μηχανισμό που αναφέρθηκε προηγουμένως. Όταν, όμως υπάρχει κάποια ιϊκή λοίμωξη οι πρωτεΐνες αυτές μετακινούνται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου προσδένονται σε ιϊκά mRNAs για να επιτελέσουν την αντιϊκή τους δράση και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη γενικότερη μείωση της έκφρασης των circRNAs σε μια ιϊκή μόλυνση [78]. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν αρκετές πρωτεΐνες που εμποδίζουν τη βιογένεση των circRNAs. Μια από τις σημαντικότερες είναι το ένζυμο ADAR (double-stranded RNA (dsRNA)-specific adenosine deaminase), η οποία είναι μια απαμινάση αδενοσίνης που μετατρέπει την αδενοσίνη (A) σε ινοσίνη (I) και έχει κομβικό ρόλο στις τροποποιήσεις του RNA (RNA editing). Μέσω αυτής της μετατροπής, η ADAR μπορεί να τήκει τις δευτεροταγείς δομές που δημιουργούνται μεταξύ αναστροφών και συμπληρωματικών περιοχών ιντρονίων που βρίσκονται εκατέρωθεν ενός εξωνίου και να αποτρέπει ουσιαστικά το μηχανισμό βιογένεσης που περιεγράφηκε ενισχύοντας την παραγωγή των γραμμικών μεταγράφων από τα γονίδια [79,80]. Αυτές τις δευτεροταγείς δομές μπορεί, επίσης, να αποελκώσει και να αποδιοργανώσει και η ATP-εξαρτώμενη RNA ελικάση A DHX9 [81,82].

3.3. Ανταγωνισμός οπισθοσυρραφής και κανονικής συρραφής και εναλλακτική κυκλοποίηση

Αν πραγματοποιηθεί πρώτα η κανονική συρραφή, θα παραχθεί αρχικά ένα κύριο γραμμικό μόριο mRNA και ως παραπροϊόν ένα «λάσο» (lariat) που θα περιέχει τα εξώνια και τα ιντρόνια που θα έχουν παραλειφθεί. Έτσι, με το μηχανισμό exon skipping το γραμμικό mRNA του γονιδίου παράγεται πρώτο και βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία σε σύγκριση με το αντίστοιχο circRNA. Αντίθετα, αν οι θέσεις συρραφής δότη και δέκτη έρθουν κοντά μέσω συμπληρωματικότητας ιντρονιακών περιοχών ή και διμερισμού ορισμένων RBPs και

πραγματοποιηθεί πρώτα η οπισθοσυρραφή με το μηχανισμό που αναφέρθηκε προηγουμένως, το άμεσο «back-splicing» είναι το κύριο γεγονός και τα επίπεδα του παραγόμενου circRNA είναι μεγαλύτερα από αυτά του αντίστοιχου γραμμικού mRNA. Όπως προκύπτει από τα προαναφερθέντα μοντέλα συρραφής, η συμπληρωματικότητα μεταξύ περιοχών εντός ενός εσωνίου ευνοεί την κανονική συρραφή, ενώ η συμπληρωματικότητα μεταξύ περιοχών εντός εσωνίων εκατέρωθεν εξωνίων ευνοεί την οπισθοσυρραφή. Έτσι, λοιπόν, μέσω του ανταγωνισμού για ζευγάρωμα μεταξύ διαφορετικών ιντρονιακών περιοχών μπορεί να προκύψουν διαφορετικοί συνδυασμοί εξωνίων και εσωνίων κατά τη συρραφή και να σχηματιστούν ακόμα και ισομορφές ενός circRNA [66,83]. Σε αυτήν τη διαδικασία φυσικά σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν RBPs, όπως η MBNL1 και η ADAR, αλλά και συγκεκριμένες αλληλουχίες, όπως τα μεταθετά στοιχεία Alu, ο ρόλος των οποίων αναλύθηκε προηγουμένως.



Εικόνα 4: Μηχανισμοί βιογένεσης των circRNAs

Στην παραπάνω **εικόνα 4.a.** φαίνεται ότι η πραγματοποίηση του μηχανισμού της οπισθοσυρραφής (back-splicing) απαιτεί ένα 3' άκρο ενός εξωνίου να έρθει κοντά σε ένα ανοδικό 5' άκρο ενός άλλου εξωνίου. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη ζευγάρωση συμπληρωματικών και ανάστροφων μεταθετών στοιχείων Alu που βρίσκονται εκατέρωθεν των εξωνίων ή το διμερισμό και την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών που προσδέονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του RNA (RNA Binding Proteins, RBPs). Τα βέλη υποδεικνύουν τα σημεία οπισθοσυρραφής (back-splice junctions) των circRNAs. Στην παραπάνω **εικόνα 4.b.** φαίνεται ότι ένα circRNA μπορεί να προκύψει επίσης από μια ενδιάμεση δομή «λάσου» (lariat) που προκύπτει με τον μηχανισμό παράλειψης εξωνίου (exon skipping) και την αποκοπή της «ουράς του λάσου» και των εσωνίων από το σωματίο συρραφής (spliceosome). Η παραγωγή των circRNAs βρίσκεται σε ανταγωνισμό με την παραγωγή των αντίστοιχων γραμμικών mRNAs του γονιδίου. Στην εικόνα δε φαίνεται ότι τα εσώνια των πρόδρομων δομών μπορούν να διατηρούνται στα παραγόμενα circRNAs και ότι με την ενδιάμεση δομή «λάσου» απομακρύνονται επίσης οι εσωνιακές δομές και η αποκοπή της ουράς τους μόνο μπορεί επίσης να οδηγήσει στην παραγωγή ενός circRNA που περιέχει μόνο αλληλουχίες εσωνίων. (Τροποποιημένη εικόνα από: Kristensen, L.S.; Hansen, T.B.; Venø, M.T.; Kjems, J., Circular RNAs in cancer: opportunities and challenges in the field., *Oncogene*, 2018, [84])

3.4. Λειτουργίες των circRNAs με έμφαση στον καρκίνο

Τα circRNAs έχουν πολλές και διαφορετικές λειτουργίες. Επιγραμματικά, οι σημαντικότερες ιδιότητές τους είναι ότι μπορούν να δράσουν σαν «σφουγγάρια» για την πρόσδεση συγκεκριμένων μορίων microRNAs (miRNA sponges), να προσδέσουν μία σειρά από διαφορετικές πρωτεΐνες και να λειτουργήσουν ως ικριώματα για πρωτεΐνες (protein scaffolds), να μεταφραστούν παράγοντας νέες πρωτεϊνικές ισομορφές και τέλος, να επηρεάσουν τα επίπεδα μεταγραφής και έκφρασης των γονιδίων προέλευσής τους ή άλλων γονιδίων. Πολλά circRNAs έχουν βρεθεί να υπερεκφράζονται ή να υποεκφράζονται σε διάφορους τύπους καρκίνου, μία ιδιότητα που θα μπορούσε ίσως να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων βιοδεικτών, αλλά ο ρόλος τους σε αυτήν την παθολογική κατάσταση είναι σχετικά άγνωστος, κάτι που εμποδίζει την αξιοποίησή τους ως θεραπευτικούς στόχους [71,84].

Η πρώτη ιδιότητά τους που ανακαλύφθηκε το 2013 και η καλύτερα μελετημένη είναι ότι μπορούν να διαθέτουν πολυάριθμες θέσεις επιλεκτικής και αποδοτικής πρόσδεσης για ένα συγκεκριμένο μόριο microRNA (miRNA). Έτσι, μπορούν να λειτουργούν σαν σφουγγάρια για microRNAs (miRNA sponges). Με αυτόν τον τρόπο, στερούν τα διαθέσιμα microRNAs του κυττάρου που μπορούν να προσδεθούν στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' Untranslated Region, 3' UTR) ενός συγκεκριμένου μορίου mRNA και αποτρέπουν τη στρατολόγηση των πρωτεϊνών της οικογένειας των Αργοναυτών, με σημαντικότερη την AGO2, και τη συγκρότηση του συμπλόκου RISC (RNA-induced silencing complex) που οδηγεί στην επακόλουθη παρεμπόδιση της μετάφρασης του mRNA ή και την αποικοδόμησή του. Έτσι, η ισχυρή πρόσδεση πολλών μορίων miRNA από ένα μόριο circRNA μπορεί να έχει ως έμμεση επίδραση την αύξηση των επιπέδων του mRNA και της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται. Το πρώτο και καλύτερα μελετημένο μόριο circRNA που ανακαλύφθηκε με αυτήν την ιδιότητα είναι το ciRS-7, επίσης γνωστό και ως CDR1as. Το ciRS-7 (circRNA sponge for miR-7) περιέχει πάνω από 70 συντηρημένες θέσεις πρόσδεσης για το miRNA miR-7-5p. Η ονομασία του CDR1as (CDR1 antisense) οφείλεται στο γεγονός ότι βρίσκεται στην απέναντι αλυσίδα του γονιδίου *CDR1* (Cerebellar Degeneration Related Protein 1) και εκφράζεται κυρίως σε νευρικά κύτταρα, με σημαντικότερη έκφραση να υπάρχει στους νευρώνες του νεοφλοιού και του ιπποκάμπου. Έχει

αποδειχθεί πειραματικά ότι το ciRS-7 προσδένει ισχυρά πολλά μόρια του miRNA miR-7-5p με παράλληλο συσχετισμό αυτών των δύο μορίων με τις πρωτεΐνες Αργοναύτες (AGO) και το τελικό αποτέλεσμα είναι η αναστολή της δράσης του miR-7-5p. Συγκεκριμένα, η έκφραση του CDR1as στον οργανισμό μοντέλο *Danio rerio* (zebrafish) παρεμποδίζει την ορθή ανάπτυξη του μεσεγκεφάλου, όπως συμβαίνει και σε πειράματα αποσιώπησης της έκφρασης του miR-7 (knock-down experiments) [64,85]. Καθώς το miR-7-5p στοχεύει πολλά ογκογονίδια, το ciRS-7 μελετάται εκτενώς με σκοπό να διαφωτιστούν πολλά μονοπάτια που οδηγούν στην καρκινογένεση [86]. Επιπρόσθετα, ένα από τα πρώτα κυκλικά μόρια που είχε ανακαλυφθεί το 1993 να εκφράζεται σε όρχεις ποντικού και είχε άγνωστο ρόλο, ένα κυκλικό μόριο RNA του γονιδίου *Sry* (Sex Determining Region Y) αποδείχτηκε ότι διαθέτει 16 θέσεις πρόσδεσης για το miR-138-5p και μπορεί να λειτουργήσει ως σφουγγάρι για αυτό το miRNA [85,87]. Ένα άλλο αξιοσημείωτο μόριο circRNA που έχει αρκετές θέσεις πρόσδεσης ενός miRNA και μπορεί να λειτουργεί ως σφουγγάρι του είναι το circZNF91. Αυτό το circRNA περιέχει 24 θέσεις πρόσδεσης για το miR-23b-3p, το οποίο στοχεύει το γονίδιο *TGIF1* και ρυθμίζει τα τελικά στάδια διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων [88,89]. Τέλος, το circPVT1 είναι ένα circRNA που προβλέφθηκε να προσδένει αρκετά ογκοκαταστακτικά miRNAs και αποδείχτηκε πειραματικά ότι μπορεί να προσδένει το let-7b-5p, που έχει ως στόχο αρκετά ογκογονίδια και υποεκφράζεται σε αρκετούς καρκινικούς τύπους [90,91].

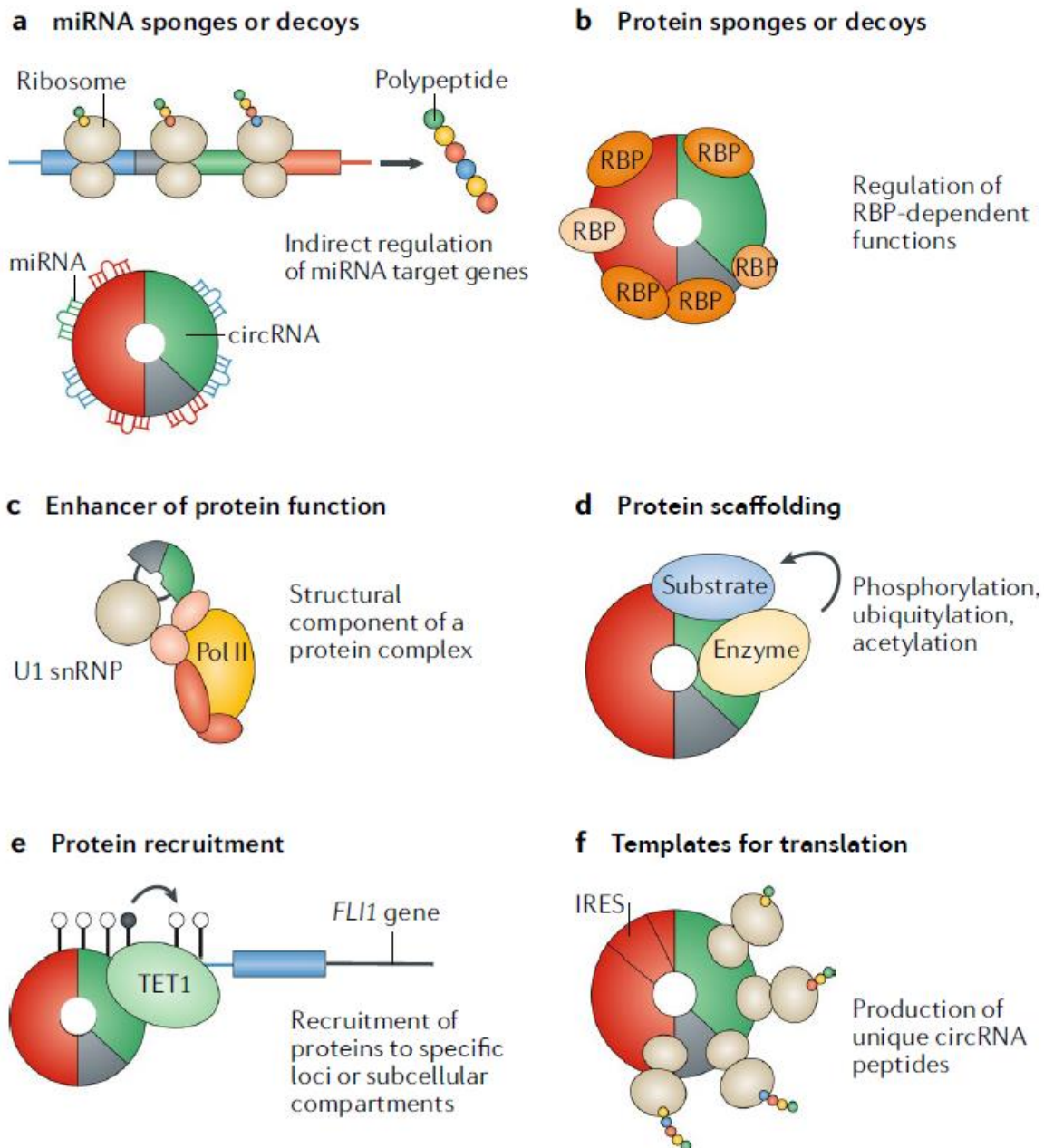
Μια ακόμα πολύ σημαντική ιδιότητα των circRNAs είναι ότι μπορούν να διαθέτουν πολυάριθμες θέσεις πρόσδεσης για πρωτεΐνες που προσδένονται σε αλληλουχίες RNA (RNA Binding Proteins, RBPs) και με αυτόν τον τρόπο να λειτουργούν ως σφουγγάρια ή ικριώματα για πρωτεΐνες (protein scaffolds). Η επίδραση αυτής της πρόσδεσης για την κυτταρική ανάπτυξη ποικίλει και εξαρτάται από την πρωτεΐνη που δεσμεύεται και από το ρόλο που αυτή επιτελεί. Στη συνέχεια αναλύονται ορισμένα χαρακτηριστικά παραδείγματα circRNAs που δρουν ως ικριώματα για πρωτεΐνες και η σημασία που έχει αυτή η σύνδεση για την ανάπτυξη και την επιβίωση του κυττάρου. Αρχικά, ανακαλύφθηκε ότι το circ-Foxo3 μπορεί να προσδέσει ταυτόχρονα σε ένα τριαδικό σύμπλεγμα την πρωτεΐνη CDK2 (cyclin dependent kinase 2) και την πρωτεΐνη p21 που κωδικοποιείται από το γονίδιο *CDKN1A* (cyclin dependent kinase inhibitor 1A). Αυτή η αλληλεπίδραση έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου [92]. Η κυκλίνη E (cyclin E) μπορεί να σχηματίζει σύμπλοκο με την κινάση σερίνης-θερονίνης που εξαρτάται από κυκλίνες CDK2 και να φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη Rb με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης της στην καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα E2F και τη μετάβαση από τη G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου [93], ενώ η p21 μπορεί να αλληλεπιδράσει και να αναστείλει τη δράση της CDK2 [94]. Φέρνοντας λοιπόν σε κοντινή απόσταση την πρωτεΐνη p21 που μπορεί να καταστείλει την πρωτεΐνη CDK2 και στερώντας την πρωτεΐνη CDK2 από τα υποστρώματά της και τη δράση της, το circ-Foxo3 φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η πρόσδεση μιας πρωτεΐνης σε ένα circRNA μπορεί να τη στερήσει από τα υποστρώματά της και να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις της. Σε μια άλλη ενδιαφέρουσα περίπτωση, το circ-Amot1l μπορεί να προσδένει τις πρωτεΐνες PDK1 (3-phosphoinositide dependent protein kinase 1) και AKT που λέγεται αλλιώς και protein kinase B (PKB). Η PDK1 φωσφορυλιώνει την AKT και η pAKT μετακινείται στον πυρήνα, όπου πιστεύεται ότι έχει προστατευτικό ρόλο για την καρδιά [95]. Διαπιστώνεται, λοιπόν, ότι ένα circRNA μπορεί να φέρει κοντά ένα ένζυμο και το υπόστρωμά του και να καταστήσει εφικτή την αλληλεπίδρασή τους. Επίσης, σε κύτταρα HeLa ανακαλύφθηκε ότι η πρωτεΐνη HuR που προσδένεται και ενισχύει τη μετάφραση του mRNA του γονιδίου *PABN1* (polyadenylate-binding nuclear protein 1), μιας πρωτεΐνης που

προσδένεται σε πολύ-A ουρές και χρησιμεύει στο σχηματισμό της πολύ-A ουράς σε ευκαρυωτικά μετάγραφα, μπορεί να προσδένεται επίσης σε ένα κυκλικό RNA που προέρχεται επίσης από αυτό το γονίδιο και ονομάστηκε circPABPN1. Λόγω αυτής της πρόσδεσης, η πρωτεΐνη HuR δεν είναι πλέον διαθέσιμη και μειώνονται τα επίπεδα του mRNA και της παραγόμενης πρωτεΐνης PABN1. Έτσι, λοιπόν, η έκφραση ενός circRNA ανταγωνίζεται την έκφραση του αντίστοιχου mRNA του γονιδίου και της μετάφρασής του, προσδένοντάς μια πρωτεΐνη που κανονικά ενισχύει τη μετάφραση [96]. Η περαιτέρω μελέτη αυτής της αλληλεπίδρασης μεταξύ του circPABPN1 και της HuR θα ήταν ενδιαφέρουσα, γιατί η πρωτεΐνη HuR προσδένεται στην 3' UTR και γενικά σταθεροποιεί και αυξάνει το χρόνο ημιζωής των mRNAs γονιδίων που συμπεριλαμβάνουν τα *TP53*, *MYC*, *BCL2* και *HIF1A*, τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [96-98].

Η αλληλεπίδραση ορισμένων circRNAs με πρωτεΐνες που προσδένονται σε αυτά ή με ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση στο επίπεδο της μεταγραφής για τα γονίδια προέλευσης των circRNAs ή για άλλα γονίδια. Αρχικά, αξιοσημείωτη είναι η περίπτωση του circRNA FECR1, ενός εξωνικού κυκλικού μορίου RNA του γονιδίου *FLII* (Friend Leukemia Virus Integration 1). Το FECR1 προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου *FLII* και στρατολογεί την απομεθυλάση TET1 (TET1 demethylase), με αποτέλεσμα την απομεθυλίωση του υποκινητή και την ενίσχυση της μεταγραφής του γονιδίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μεταστατικής ικανότητας των κυττάρων καρκίνου του μαστού που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα. Πέρα από αυτήν την in cis δράση, το FECR1 δρα και in trans προσδεδεμένο στον υποκινητή της *DNMT1* μεθυλοτρανσφεράσης (DNA Methyltransferase 1) και μειώνοντας τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου της με έναν άγνωστο μηχανισμό έως τώρα. Η DNMT1 μεθυλοτρανσφεράση μεθυλιώνει δινουκλεοτιδικές νησίδες CpG στους υποκινητές διαφόρων γονιδίων προκαλώντας τη μεταγραφική τους καταστολή. Έτσι, το FECR1 μπορεί έμμεσα να προκαλέσει τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων που πιθανόν έχουν ογκογόνο δράση [99]. Σε έναν άλλο μηχανισμό δράσης, το ci-ankrd52 πρόκειται για ένα circular intronic RNA (ciRNA) που προκύπτει από το δεύτερο εσώνιο του γονιδίου *ANKRD52*, παραμένει μέσα στον πυρήνα στο σημείο που μεταγράφεται το θυγατρικό γονίδιο και δρα in cis στρατολογώντας την RNA πολυμεράση II (RNAPII) με αποτέλεσμα την επιπλέον ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου *ANKRD52* [72]. Από τα γονίδια *EIF3J* (eukaryotic translation initiation factor 3, subunit J) και *PAIP2* (poly(A) binding protein interacting protein 2) προκύπτουν τα Exonic Intronic circRNAs circEIF3J και circPAIP2 αντίστοιχα. Τα συγκεκριμένα EircRNAs συγκεντρώνονται στον πυρήνα στο σημείο μεταγραφής του γονιδίου, αλληλεπιδρούν κυρίως με το U1 snRNP ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο με τη σειρά του αλληλεπιδρά με την RNA πολυμεράση II, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της μεταγραφής των θυγατρικών γονιδίων [100]. Γίνεται αντιληπτό ότι πολλά circRNAs που εντοπίζονται στον πυρήνα και περιέχουν ιντρονιακές αλληλουχίες μπορούν να ενισχύουν τη μεταγραφή των θυγατρικών γονιδίων σε ένα βρόχο θετικής ανατροφοδότησης (positive feedback loop).

Μια τελευταία ξεχωριστή ιδιότητα των circRNAs είναι ότι μερικά μπορούν να μεταφράζονται και να παράγουν νέες πρωτεϊνικές ισομορφές, θέτοντας τελικά το ερώτημα κατά πόσο είναι πραγματικά μη κωδικά μόρια. Τα circRNAs δε διαθέτουν ούτε 5' κάλυμμα (5' cap) 7-μέθυλο γουανίνης m⁷GpppN ούτε πολύ-A ουρά (poly-A tail) που είναι απαραίτητα για την κυκλοποίηση ενός mRNA και την προσέλκυση των παραγόντων έναρξης της μετάφρασης για την αποδοτική μετάφρασή του σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο. Το 5' cap είναι υπεύθυνο για την προσέλκυση του βασικού ευκαρυωτικού συμπλόκου έναρξης της

μετάφρασης eIF4F complex (eukaryotic initiation factor 4F complex). Ειδικότερα, η πρωτεΐνη eIF4E προσδένεται στο 5' cap του mRNA προσελκύνοντας την eIF4G που στρατολογεί με τη σειρά της τους υπόλοιπους παράγοντες έναρξης. Παρ' όλα αυτά, τα circRNAs διαθέτουν ήδη κυκλικό σχήμα. Η μετάφρασή τους επιτυγχάνεται μέσω της πρόσδεσης του ριβοσώματος σε εσωτερικές θέσεις έναρξης της μετάφρασης (Internal Ribosome Entry Sites, IRES). Οι αλληλουχίες αυτές παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία και μπορούν να δρουν μέσω πολλών μηχανισμών. Αυτός είναι ένας μηχανισμός μετάφρασης που είναι γνωστό ότι χρησιμοποιείται κυρίως από ιούς για την έκφραση ορισμένων πρωτεϊνών τους ή από ορισμένα ευκαρυωτικά μετάγραφα, όταν το κύτταρο βρίσκεται σε συνθήκες καταπόνησης. Πολλές 5' αμετάφραστες περιοχές (5' Untranslated Regions, 5' UTRs) μπορούν να προσελκύνουν τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα 40S και να ζευγαρώνουν με βάση τους κανόνες συμπληρωματικότητας των Watson-Crick με το 18S rRNA που αποτελεί βασικό συστατικό της. Έχουν ανακαλυφθεί, επίσης, εναλλακτικοί παράγοντες έναρξης της μετάφρασης που δρουν *in trans* σε αλληλουχίες IRES (IRES-Trans-Acting-Factors, ITAFs). Η σημαντικότερη από αυτούς είναι η πρωτεΐνη eIF4G2 ή αλλιώς DAP-5. Σε αντίθεση με την κανονική eIF4G, η eIF4G2 δε διαθέτει επικράτεια πρόσδεσης της eIF4E και μπορεί να σηματοδοτήσει την έναρξη της μετάφρασης χωρίς να απαιτείται η πρόσδεση της eIF4E [101,102]. Μια ακόμα σημαντική νουκλεοτιδική τροποποίηση που αυξάνει τα επίπεδα μετάφρασης ενός mRNA και φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στη μετάφραση ενός circRNA είναι η 6-μέθυλο αδενοσίνη και, ειδικότερα, το συναινετικό μοτίβο RRm6ACH (R = G ή A, H = A, C ή U), που θα μπορούσε να θεωρηθεί και ως μια περιοχή IRES. Η μετάφραση μέσω m6A απαιτεί την πρωτεΐνη YTHDF3, που «διαβάζει» την τροποποίηση της m6A και στρατολογεί τον εναλλακτικό παράγοντα έναρξης eIF4G2, μια διαδικασία που ενισχύεται από τη μεθυλοτρανσφεράση METTL3/14, εμποδίζεται από την απομεθυλάση FTO και συμβαίνει ιδιαίτερα μετά από θερμικό σοκ (heat shock) [102,103]. Ένα από τα πρώτα μόρια circRNA που βρέθηκαν ότι μεταφράζονται είναι το circ-ZNF609. Αυτό το circRNA έχει το ίδιο κωδικόνιο έναρξης με το γραμμικό mRNA που κωδικοποιεί την πλήρη πρωτεΐνη ZNF609 (Zinc Finger Protein 609), αλλά έχει ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης που σχηματίζεται με την κυκλοποίηση. Το παραγόμενο προϊόν ελέγχει την ορθή ανάπτυξη ανθρώπινων μυοβλαστών με έναν άγνωστο έως τώρα μηχανισμό [104]. Επίσης, σε ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα, το circ-β-catenin, που προέρχεται από το γονίδιο της β-κατενίνης *CTNNB1* (β-catenin), κωδικοποιεί ένα μικρότερο πεπτίδιο 370 αμινοξέων που χρησιμοποιεί το ίδιο κωδικόνιο έναρξης με το αντίστοιχο mRNA, αλλά ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης που προκύπτει με την κυκλοποίηση. Αυτή η νέα ισομορφή εμποδίζει τη φωσφορυλίωση και επακόλουθη αποικοδόμηση της β-κατενίνης από το ένζυμο GSK3B, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt και την αύξηση κυττάρων καρκίνου του ήπατος [105]. Ένα άλλο παράδειγμα που το παραγόμενο προϊόν από ένα circRNA προστατεύει την πρωτεΐνη πλήρους μήκους είναι το circ-SHPRH. Αυτό το circRNA κωδικοποιεί μια πρωτεϊνική ισομορφή 146 αμινοξέων που ονομάζεται SHPRH-146aa. Η SHPRH (SNF2 Histone Linker PHD RING Helicase) είναι μια E3 λιγάση ουβικιτίνης που ουβικιτινιλιώνει το PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Η SHPRH-146aa προστατεύει την πλήρη SHPRH από αποικοδόμησή της στο πρωτεάσωμα και με αυτόν τον τρόπο ενισχύει την αντικαρκινική δράση της SHPRH στο γλιοβλάστωμα [106]. Παρ' όλα αυτά, η *in vivo* μετάφραση φαίνεται να είναι ιδιότητα ελάχιστων circRNAs, καθώς τα περισσότερα circRNAs που περιέχουν κωδικόνιο έναρξης AUG δε μεταφράζονται [107].



Εικόνα 5: Οι λειτουργίες των circRNAs

Στην παραπάνω **εικόνα 5**, παρουσιάζονται οι βασικές λειτουργίες των circRNAs. Αυτά τα μόρια μπορούν να δρουν ως: **a)** σφουγγάρια για microRNAs, οπότε τα microRNAs δεν μπορούν να στοχεύσουν την 3' αμετάφραστη περιοχή των mRNAs στόχων με αποτέλεσμα τα mRNAs να συνεχίζουν να μεταφράζονται και να μην αποικοδομούνται, **b)** σφουγγάρια για πρωτεΐνες που προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες RNA (RNA Binding Proteins, RBPs) με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της πρωτεϊνικής δράσης τους, **c)** ρυθμιστές της μεταγραφής στρατολογώντας την RNA πολυμεράση II (RNA Pol II) ή την U1snRNP (U1 small nuclear ribonucleoprotein) που ενεργοποιούν τη μεταγραφή των γονιδίων, **d)** ικρίωματα για πρωτεΐνες οπότε καθίσταται δυνατή η αλληλεπίδραση και φωσφορυλίωση, ακετυλίωση ή ουβικιτινίωση των υποστρωμάτων από τα αντίστοιχα ένζυμα, **e)** επιγενετικοί ρυθμιστές, όπως στην περίπτωση του FECR1 που στρατολογεί την απομεθυλάση TET1 στον υποκινητή

του θυγατρικού του γονιδίου FLI1, f) μόρια που μεταφράζονται μέσω θέσεων εσωτερικής πρόσδεσης του ριβοσώματος (Internal Ribosome Entry Site, IRES) παράγοντας πρωτεϊνικές ισομορφές. (Τροποποιημένη εικόνα από: Kristensen, L.S.; Andersen, M.S.; Stagsted, L.V.W.; Ebbesen, K.K.; Hansen, T.B.; Kjems, J., The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs., Nat Rev Genet, 2019, [71])

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανακάλυψη της πρωτοταγούς δομής-αλληλουχίας νέων κυκλικών μεταγράφων (circRNAs) του γονιδίου BOK. Για τα νέα μόρια που ανακαλύφθηκαν έγινε προσπάθεια πρόγνωσης της λειτουργίας τους με τη χρήση υπολογιστικών εργαλείων. Παράλληλα, στόχος ήταν η εξοικείωση του φοιτητή με βασικές τεχνικές της μοριακής βιολογίας και η καλλιέργεια σωστής και ασφαλούς συμπεριφοράς στο χώρο του εργαστηρίου. Η μεθοδολογία και τα ευρήματα της διπλωματικής εργασίας παρουσιάζονται εκτενώς στις ακόλουθες ενότητες.

Υλικά και Μέθοδοι

1. Βιοπληροφορική ανάλυση

Πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων προηγήθηκε εκτενής βιοπληροφορική ανάλυση, η οποία περιελάμβανε: την αναζήτηση στη βάση δεδομένων GenBank και την επιμελημένη από ανεξάρτητους ερευνητές Refseq του NCBI της δομής του γονιδίου BOK και των μεταγράφων του. Με βάση αυτές τις πληροφορίες κατασκευάστηκε η εικόνα που παρουσιάζεται στην αντίστοιχη ενότητα στα αποτελέσματα, καθώς και ένα αρχείο αναφοράς που περιείχε την αλληλουχία του γονιδίου και οριοθετημένα τα εξώνια, τα εσώνια και το πλαίσιο ανάγνωσης. Το αρχείο αυτό χρησιμοποιήθηκε για το σχεδιασμό των εκκινητών παράλληλα με το εργαλείο Primer Blast του NCBI και για την εύρεση της ακριβούς αλληλουχίας του circRNA που ανακαλύφθηκε, όπως παρουσιάζεται αναλυτικά στα αποτελέσματα.

2. Βιολογικό υλικό-Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

Στον ακόλουθο **πίνακα 1** παρουσιάζονται οι επτά ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που αξιοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, καθώς και ο ιστός προέλευσης και ο τύπος καρκίνου από τους οποίους προέρχονται. Από τις επτά αυτές κυτταρικές σειρές που διατηρούνται σε κατάλληλες συνθήκες και θρεπτικά μέσα από τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου απομονώθηκε ολικό RNA και έγινε η σύνθεση του cDNA, όπως περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια. Οι καλλιέργειες των κυτταρικών σειρών έγιναν με βάση της οδηγίες της ATCC.

Πίνακας 1: Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία και ο τύπος καρκίνου και ο ιστός προέλευσης στον οποίον αντιστοιχούν

Αριθμός	Όνομα κυτταρικής σειράς	Τύπος καρκίνου	Ιστός προέλευσης
1	Hep G2	Καρκίνος του ήπατος	Ήπαρ
2	HT-29	Καρκίνος του παχέος εντέρου	Παχύ έντερο
3	HEK-293	-	Εμβρυονικός νεφρός
4	HCT 116	Καρκίνος του παχέος εντέρου	Παχύ έντερο
5	NUGC-4	Γαστρικός καρκίνος	Στομάχι
6	MCF-7	Αδενοκαρκίνωμα του μαστού	Μαστός
7	SK-BR-3	Αδενοκαρκίνωμα του μαστού	Μαστός

3. Απομόνωση ολικού RNA από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

3.1. Αρχή μεθόδου

Για την απομόνωση ολικού RNA από τις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που αναφέρθηκαν προηγουμένως χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο TRIzol G (PanReac AppliChem). Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο στηρίζεται στη μέθοδο του Chomczynski και περιέχει φαινόλη (phenol) και γουανιδινικά άλατα (guanidinium thiocyanate) ως δραστικές ουσίες που βοηθούν στον ταυτόχρονο διαχωρισμό των βασικών μακρομορίων του βιολογικού

δείγματος. Συγκεκριμένα: το RNA καταλήγει στην υπερκείμενη υδατική φάση, το DNA στη μεσόφαση και οι πρωτεΐνες στην υποκείμενη οργανική φάση. Αυτό το αντιδραστήριο προκαλεί τη λύση των κυττάρων, την αποδιάταξη των μεγάλων μακρομοριακών συμπλεγμάτων και προστατεύει την αποικοδόμηση του RNA από τις RNases.

3.2. Πειραματική διαδικασία απομόνωσης του ολικού RNA

Αρχικά, 1 mL αντιδραστηρίου TRItidy G προστίθεται σε κάθε ομογενοποίηση κυττάρων και το μίγμα ομογενοποιείται πιπετάροντας καλά πάνω-κάτω. Το μίγμα αυτό επωάζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου για να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των συμπλόκων RNA/πρωτεΐνης και στη συνέχεια προστίθενται 0.2 mL χλωροφορμίου. Το διάλυμα αναδεύεται ξανά καλά και αφήνεται στον πάγκο για 5-10 min. Ακολούθως, το μίγμα φυγοκεντρείται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4°C στα 12000 g για 15 min και η υπερκείμενη διαυγής υδατική φάση μεταφέρεται πολύ προσεκτικά σε ένα νέο σωλήνα τύπου Eppendorf. Προστίθεται ίδιος όγκος ισοπροπανόλης (0.5 mL στη συγκεκριμένη απομόνωση) και το διάλυμα αφήνεται σε πάγο για τουλάχιστον 15 min για να κατακρημνιστεί το RNA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του μίγματος σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4°C στα 12000 g για 15 min και απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό. Στο ίζημα προστίθενται 1 mL αιθανόλης περιεκτικότητας περίπου 70% και έπεται ισχυρή ανάδευση και με τη χρήση του vortex για την επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος. Στη συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4°C στα 7500 g για 5 min και απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό. Τέλος, το απομονωμένο RNA αφήνεται για 5-10 min σε θερμοκρασία δωματίου για να εξατμιστεί η τυχόν αιθανόλη που έχει παραμείνει στο δείγμα και επαναδιαλυτοποιείται σε 20 μ L DEPC-νερού (0.1% diethylpyrocarbonate), που είναι ελεύθερο νουκλεασών που θα μπορούσαν να αποικοδομήσουν το RNA. Το απομονωμένο RNA αποθηκεύεται και διατηρείται στους -80°C για μελλοντική χρήση.

4. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της καθαρότητας και της συγκέντρωσης του απομονωθέντος ολικού RNA

Με τη χρήση ενός φασματοφωτομέτρου υπεριώδους-ορατού, όπως το NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), μπορεί να προσδιοριστεί η καθαρότητα και η συγκέντρωση των απομονωμένων δειγμάτων RNA ή DNA.

Ειδικότερα, αξιοποιείται η ιδιότητα των νουκλεϊκών οξέων να απορροφούν υπεριώδη ακτινοβολία με μέγιστο απορρόφησης στα 260 nm. Αντίθετα, στα 280 nm βρίσκεται το μέγιστο απορρόφησης των αρωματικών αμινοξέων των πρωτεϊνών και της φαινόλης, ενώ στα 230 nm βρίσκεται το μέγιστο απορρόφησης κυρίως των γουανιδινικών αλάτων. Ερευνητική αξία έχει ο υπολογισμός της τιμής του λόγου της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm προς την οπτική απορρόφηση στα 280 nm: OD_{260}/OD_{280} . Τιμή αυτού του λόγου ανάμεσα σε 1.8-2.2 υποδηλώνει ότι το διάλυμα είναι αρκετά καθαρό σε RNA, ενώ τιμή μεγαλύτερη του 2.0 υποδηλώνει ότι υπάρχει στο διάλυμα σημαντική ποσότητα DNA και τιμή μικρότερη από 1.6 υποδηλώνει την παρουσία σημαντικής ποσότητας πρωτεϊνών ή φαινόλης. Επίσης, μικρότερη ερευνητική αξία έχει και ο υπολογισμός της τιμής του λόγου της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm προς την οπτική απορρόφηση στα 230 nm: OD_{260}/OD_{230} . Η τιμή αυτού του λόγου πρέπει να είναι περίπου ίση με 2.0-2.2. Διαφορετικά, μπορεί να υπάρχουν προσμίξεις αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του RNA και κυρίως των γουανιδινικών αλάτων ή της φαινόλης.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA και του DNA αξιοποιούνται οι εξής εξισώσεις:

- $C_{RNA} (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = A_{260} * 40 * \text{παράγοντας αραίωσης}$, όπου:
 - A_{260} : η τιμή απορρόφησης (O.D.) του δείγματος RNA στα 260 nm
 - 40: η τιμή της συγκέντρωσης σε $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ του δείγματος RNA που αντιστοιχεί σε τιμή απορρόφησης $A_{260}=1$
- $C_{DNA} (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = A_{260} * 50 * \text{παράγοντας αραίωσης}$, όπου:
 - A_{260} : η απορρόφηση (O.D.) του δείγματος DNA στα 260 nm
 - 50: η τιμή της συγκέντρωσης σε $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ του δείγματος DNA που αντιστοιχεί σε τιμή απορρόφησης $A_{260}=1$

Για την πειραματική εκτέλεση αυτής της διαδικασίας 1 μL ολικού απομονωμένου RNA (μη αραιωμένου ή αραιωμένου σε DEPC- H_2O και σε αραιώση συνήθως 1:2) φωτομετρείται στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop και το μηχάνημα ρυθμιζόμενο κατάλληλα μπορεί να υπολογίσει τις τιμές οπτικής απορρόφησης (O.D.) των παραπάνω λόγων που αναφέρθηκαν και τη συγκέντρωση του δείγματος.

5. Έλεγχος της ακεραιότητας (integrity) του απομονωθέντος ολικού RNA με ηλεκτροφόρηση

Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% ολικού απομονωμένου RNA μπορεί να προσδιοριστεί η ακεραιότητα (integrity) του απομονωθέντος ολικού RNA. Αν το RNA είναι καλής ποιότητας σχηματίζονται δύο εμφανείς ζώνες: η πάνω αντιστοιχεί στο 28S rRNA και η κάτω αντιστοιχεί στο 18S rRNA. Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης αναλύεται διεξοδικά στην αντίστοιχη ενότητα.

6. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription-RT)

6.1. Αρχή μεθόδου

Κατά την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, μόρια μονόκλωνου RNA (single stranded RNA, ssRNA) μεταγράφονται αντίστροφα σε μονόκλιωνα μόρια συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA), μέσω της δράσης του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase, RTase), η οποία για να καταλύσει την αντίδραση χρειάζεται επιπλέον τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), έναν εκκινητή (primer) και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer). Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι μια RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση που φυσιολογικά συναντάται σε ρετροϊούς και για αυτό απαιτούνται 37°C για την άριστη δράση της, αφού αυτή είναι η φυσιολογική θερμοκρασία των ανθρώπινων κυττάρων ξενιστών. Με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων ξεκινά από το 3' άκρο του εκκινητή και συνθέτει μια αλυσίδα cDNA έχοντας ως πρότυπο την αντίστοιχη μονόκλιωνα αλυσίδα RNA πάνω στην οποία έχει υβριδοποιηθεί ο εκκινητής. Υπάρχουν ακόμα πιο εξειδικευμένες αντίστροφες μεταγραφάσες, όπως αυτές που είναι θερμοανθεκτικές και χρησιμοποιούνται σε υψηλότερες θερμοκρασίες (π.χ. 42°C) στις οποίες αποδιατάσσονται οι δευτεροταγείς δομές RNA, όπως στην περίπτωση των tRNAs. Υπάρχουν τριών ειδών εκκινητές που χρησιμοποιούνται σε μια αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής: τα τυχαία εξαμερή (random hexamers) που είναι εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας και επομένως συνδέονται μη ειδικά στα διάφορα μόρια RNA που υπάρχουν στο δείγμα, οι εκκινητές ολιγομερών δεοξυθυμιδίνης (oligo-dTs) που με την πολύ-T ουρά προσδένονται στις πολύ-A ουρές των μεταγράφων της RNA πολυμεράσης II, δηλαδή κυρίως των μορίων mRNAs, ενώ

στο 3' άκρο τους έχουν συνήθως και ένα ζεύγος νουκλεοτιδίων εκτός της T για να προσδεθούν στο υπόλοιπο 3' άκρο των διάφορων μορίων RNA, και, τέλος, οι εκκινητές που είναι ειδικά σχεδιασμένοι για να προσδένονται σε μια συγκεκριμένη περιοχή μεταγράφων ενός συγκεκριμένου γονιδίου με αποτέλεσμα να ενισχύονται τα μετάγραφα του συγκεκριμένου γονιδίου. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν τυχαία εξαμερή (random hexamers), ώστε να συντεθεί το cDNA όλων των πιθανών circRNAs του γονιδίου BOK, η αλληλουχία των οποίων ήταν άγνωστη. Τέλος, στην αντίδραση προστίθεται DTT (Dithiothreitol), η οποία δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας και αναστολέας RNασών (RNaseOUT, Thermo Fisher Scientific) για να αποτραπεί η αποικοδόμηση του RNA.

6.2. Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής

Αρχικά, αξιοποιώντας τις τιμές συγκέντρωσης που υπολογίστηκαν μέσω της φασματοφωτομετρίας προσδιορίζεται για κάθε δείγμα απομονωμένου ολικού RNA από τις επτά κυτταρικές σειρές που αναφέρθηκαν αρχικά ο όγκος σε μL που απαιτείται για να υπάρχει σε κάθε αντίδραση ποσότητα 3 μg ολικού RNA. Έτσι σε κάθε σωληνάκι τύπου Eppendorf που θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής πρέπει να υπάρχει: 1 μL από random hexamers συγκέντρωσης 50 ng που προκύπτει με αραιώση 1:8 του stock διαλύματος, όγκος (σε μL) που αντιστοιχεί σε 3 μg ολικού RNA, 1 μL dNTPs mix σε συγκέντρωση 10 mM και συμπληρώνεται ο κατάλληλος όγκος αποστειρωμένου ελεύθερου RNασών νερού για να ανέλθει ο συνολικός όγκος στα 12 μL . Με βάση αυτά τα κριτήρια κατασκευάζονται τα κατάλληλα master mixes της αντίδρασης κάθε φορά που περιέχουν random hexamers, dNTPs mix και νερό. Στη συνέχεια τα σωληνάκια θερμαίνονται στο θερμικό κυκλοποιητή (thermal cycler) στους 65°C για 5 min και τοποθετούνται άμεσα σε πάγο. Έπειτα, σε κάθε σωληνάκι πρέπει να προστεθούν: 4 μL ρυθμιστικού διαλύματος 5X First-Strand Buffer, 2 μL DTT συγκέντρωσης 0.1 M και 1 μL αναστολέα RNασών RNaseOUT (40 units/ μL). Έτσι, παρασκευάζονται κάθε φορά τα αντίστοιχα master mixes που περιέχουν αυτά τα τρία συστατικά. Τα δείγματα ανακατεύονται και επωάζονται στους 37°C για 2 min. Έπειτα, σε κάθε δείγμα προστίθεται 1 μL (200 units) αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV-RT (Moloney-Murine Leukemia Virus RT) και ο τελικός όγκος των 20 μL αναδεύεται με καλό πιπετάρισμα πάνω-κάτω. Αφού στην αντίδραση χρησιμοποιούνται random hexamers είναι απαραίτητη η επώαση στους 25°C για 10 min. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 50 min και η αντίδραση τερματίζεται με θέρμανση και αδρανοποίηση του ενζύμου στους 70°C για 15 min. Τα αντιδραστήρια και τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση προέρχονται από την Thermo Fisher Scientific. Τελικά, τα δείγματα cDNA που προκύπτουν διατηρούνται και φυλάσσονται στον καταψύκτη για μελλοντική χρήση.

7. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

7.1. Αρχή μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια ενζυμική μέθοδος που επιτρέπει τον επιλεκτικό *in vitro* πολλαπλασιασμό σε εκατομμύρια αντίγραφα μιας επιθυμητής αλληλουχίας από ένα σύνθετο μίγμα μορίων DNA. Ανακαλύφθηκε το 1983 από τον Kary Banks Mullis και αποτελεί μια ανακάλυψη ορόσημο στη μοριακή βιολογία. Έχει ποικίλες εφαρμογές στη βιοϊατρική έρευνα, στη μοριακή διαγνωστική, στην ιατροδιαγνωστική και στη βιοτεχνολογία. Πραγματοποιείται σε ειδικά μηχανήματα που

ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές (thermal cyclers) και έχουν τη δυνατότητα να αυξομειώνουν τη θερμοκρασία για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Μια αντίδραση PCR αποτελείται ουσιαστικά από τρία βήματα που επαναλαμβάνονται διαδοχικά σε κύκλους μέχρι να αποκτηθεί ο επιθυμητός αριθμός αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA. Αναλυτικότερα, τα τρία βασικά στάδια της PCR που επαναλαμβάνονται συνήθως για 35 κύκλους είναι τα εξής:

1. Αποδιάταξη (denaturation) του δίκλωνου εκμαγείου DNA στους 95°C για 30 s και διαχωρισμός των αλυσίδων,
2. Επαναδιάταξη (annealing) και υβριδοποίηση των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στις πρότυπες αλυσίδες για 30 s σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία που ονομάζεται T_a (Tannealing) και εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών, όπως αναλύεται εκτενώς παρακάτω,
3. Επιμήκυνση (extension) στους 72°C για 1 min για τη σύνθεση μιας θυγατρικής συμπληρωματικής αλυσίδας από τη DNA πολυμεράση.

Αρχικά προηγείται μια ισχυρή αποδιάταξη για 3 min στους 95°C για να διαχωριστούν καλά όλες οι δίκλωνες δομές που τυχόν υπάρχουν και στο τέλος γίνεται μια ακόμα τελική επιμήκυνση για 1 min στους 72°C για τη συμπλήρωση των ημιτελών προϊόντων.

7.2. Ρόλος των συστατικών μιας αντίδρασης PCR

Ο ρόλος των απαραίτητων συστατικών μιας αντίδρασης PCR είναι:

1. Το DEPC-νερό είναι απιονισμένο και ελεύθερο από μικροοργανισμούς που θα μπορούσαν να προκαλέσουν μολύνσεις και από DNases που θα μπορούσαν να αποικοδομήσουν το εκμαγείο DNA (template DNA).
2. Το ρυθμιστικό διάλυμα KAPA Taq buffer δημιουργεί το κατάλληλο περιβάλλον για την απρόσκοπτη δράση της DNA πολυμεράσης, ενώ στο συγκεκριμένο κιτ αντιδραστηρίων περιέχει και $MgCl_2$ σε τελική συγκέντρωση 1.5 mM στα 25 μL της αντίδρασης, καθώς τα ιόντα μαγνησίου Mg^{2+} είναι απαραίτητος συμπαράγοντας της DNA πολυμεράσης.
3. Το μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs mix) παρέχει τα μονομερή που χρειάζονται για τη σύνθεση των νέων μορίων DNA.
4. Ο πρόσθιος και ο ανάστροφος εκκινητής, forward and reverse primer (FP and RP) αντίστοιχα, υβριδοποιούνται κατά το στάδιο της επαναδιάταξης (annealing) στις αλυσίδες εκμαγεία DNA και από το 3' άκρο τους ξεκινά η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων από τη DNA πολυμεράση.
5. Η DNA πολυμεράση με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων και με πρότυπο ένα εκμαγείο DNA (template DNA) συνθέτει ξεκινώντας από το 3' άκρο των εκκινητών τις θυγατρικές συμπληρωματικές αλυσίδες DNA. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη DNA πολυμεράση είναι η Taq polymerase που απομονώθηκε για πρώτη φορά από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus* και για αυτό έχει μέγιστη θερμοκρασία λειτουργίας τους 72°C, μια απαραίτητη ιδιότητα για τη διεξαγωγή της PCR.

7.3. Συνθήκες πραγματοποίησης αντίδρασης συμβατικής PCR

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις συμβατικής PCR προέρχονται από το KAPA Taq PCR Kit της εταιρίας KAPA BIOSYSTEMS. Για την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης PCR αρχικά παρασκευάζεται το master mix, έτσι ώστε σε κάθε σωληνάκι τύπου Eppendorf που θα γίνει μια αντίδραση συνολικού όγκου 25 μL να

περιέχονται: 19.4 μL DEPC-νερού, 2.5 μL 10X KAPA Taq Buffer σε τελική συγκέντρωση 1X στα 25 μL της αντίδρασης (τα διαλύματα KAPA Taq Buffer 1X περιέχουν MgCl_2 σε τελική συγκέντρωση 1.5 mM), 0.5 μL 10 mM dNTPs mix σε τελική συγκέντρωση 0.2 mM για το κάθε dNTP, 1 μL 10 μM του πρόσθιου εκκινητή (forward primer, FP) σε τελική συγκέντρωση 0.4 μM , 1 μL 10 μM του ανάστροφου εκκινητή (reverse primer, RP) σε τελική συγκέντρωση 0.4 μM και 0.1 μL 5 U/ μL KAPA Taq DNA Polymerase σε τελική ποσότητα 0.5 U. Τα 24.5 μL του master mix μοιράζονται στα σωληνάκια της αντίδρασης και σε κάθε σωλήνα προστίθενται 0.5 μL cDNA από την αντίστοιχη κυτταρική σειρά. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιείται και ένα δείγμα για αρνητικό έλεγχο (negative control), στο οποίο αντί για εκμαγείο DNA (cDNA) προστίθεται νερό, έτσι ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει μόλυνση με κάποιο άλλο μόριο DNA στο πείραμά μας.

Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης που επιλέγεται στο θερμικό κυκλοποιητή με τα στάδια 2-4 να επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους περιλαμβάνει:

1. Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 3 min
2. Αποδιάταξη στους 95°C για 30 s
3. Επαναδιάταξη σε θερμοκρασία T_a °C (ξεχωριστή για κάθε ζεύγος εκκινητών) για 30 s
4. Επιμήκυνση στους 72°C για 1 min (υπολογίζεται 1min/Kbp)
5. Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 1 min
6. Διατήρηση του PCR προϊόντος στους 4°C

7.4. Απόδοση και ευαισθησία μιας αντίδρασης PCR και οι παράγοντες που τις καθορίζουν

Οι δύο σημαντικές παράμετροι επιτυχίας μιας αντίδρασης PCR είναι η απόδοση και η ευαισθησία. Απόδοση ονομάζεται η παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος σε μεγάλη ποσότητα, ενώ ευαισθησία ονομάζεται η παραγωγή ενός μόνο συγκεκριμένου προϊόντος (μίας ζώνης στην ηλεκτροφόρηση). Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση και την ευαισθησία της αντίδρασης είναι η ποσότητα MgCl_2 και συνεπώς η συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου Mg^{2+} . Τα ιόντα μαγνησίου είναι απαραίτητος συμπαραγόντας της DNA πολυμεράσης και διευκολύνουν επίσης τον υβριδισμό εκκινητή-αλυσίδας εκμαγείου. Συνεπώς, αυξημένη ποσότητα Mg^{2+} οδηγεί σε μείωση της ευαισθησίας και αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης και αντίστροφα. Συνήθως χρησιμοποιείται αρχικά συγκέντρωση MgCl_2 1.5 mM και αυτή τροποποιείται ανάλογα με τα αποτελέσματα της αντίδρασης. Ένας άλλος πολύ σημαντικός παράγοντας είναι η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών (T_a , $T_{annealing}$) του δεύτερου σταδίου της PCR. Όσο μεγαλύτερη είναι η T_a τόσο περισσότερο δυσκολεύεται η μη ειδική πρόσδεση των εκκινητών στην αλυσίδα εκμαγείου και συνεπώς αυξάνεται η ευαισθησία, αλλά μειώνεται η απόδοση και αντίστροφα. Η T_a συνήθως μπορεί να είναι μέχρι και 5°C μικρότερη από την T_m των εκκινητών.

7.5. Γονίδια σταθερής έκφρασης (Housekeeping genes)

Τα γονίδια σταθερής έκφρασης (housekeeping genes) κωδικοποιούν προϊόντα που είναι απαραίτητα για την επιβίωση του κυττάρου, καθώς ρυθμίζουν βασικές βιολογικές διεργασίες. Έτσι, η έκφρασή τους δεν επηρεάζεται από ενδογενή ή εξωγενή σήματα, από το αναπτυξιακό στάδιο ή το στάδιο του κυτταρικού κύκλου. Ως αποτέλεσμα, έχουν σταθερά επίπεδα έκφρασης τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις στους διάφορους τύπους ιστών. Λόγω αυτής της ιδιότητάς τους, η έκφραση ενός άλλου γονιδίου σε

ποικίλα δείγματα μπορεί να συγκριθεί και να κανονικοποιηθεί με βάση τα επίπεδα έκφρασης των housekeeping genes. Επιπλέον, η ανίχνευση της έκφρασής τους μπορεί να αξιοποιηθεί για τον έλεγχο της επιτυχίας μιας αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής, άρα και της απομόνωσης RNA, αλλά και ως θετικός μάρτυρας σε μια αντίδραση PCR. Στην παρούσα διπλωματική εργασία ως γονίδιο σταθερής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε το *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

8. Επάλληλη Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Nested PCR)

8.1. Αρχή μεθόδου

Σε μια Επάλληλη Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Nested PCR) χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το PCR προϊόν μιας πρώτης συμβατικής PCR έπειτα από αραίωση (συνήθως 1:50) για να απομακρυνθούν προσμίξεις (carry-over) της πρώτης αντίδρασης, όπως άλατα και ένζυμα. Επιπλέον, χρησιμοποιείται ένα δεύτερο ζεύγος εκκινητών εσωτερικότερων των πρώτων με αποτέλεσμα να ενισχύεται μια εσωτερική περιοχή του πρώτου PCR προϊόντος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας της αντίδρασης και την αποφυγή λήψης μη ειδικών παραπροϊόντων της πρώτης αντίδρασης. Επιπλέον, επιτυγχάνεται και αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης για τη λήψη του επιθυμητού προϊόντος και για αυτό η Nested PCR χρησιμοποιείται για την ενίσχυση αλληλουχιών που υπάρχουν σε μικρή συγκέντρωση στο αρχικό δείγμα. Λόγω αυτών των πλεονεκτημάτων της, η Nested PCR χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό στην παρούσα διπλωματική εργασία για την εύρεση των μεταγράφων του γονιδίου *BOK* που έχει γενικά αρκετά χαμηλή έκφραση.

8.2. Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης της Επάλληλης PCR (Nested PCR)

Το εκμαγείο-υπόστρωμα DNA που χρησιμοποιείται σε μια αντίδραση Nested PCR ή Semi-nested PCR έχει προκύψει με αραίωση 1:50 του μίγματος της πρώτης αντίδρασης συμβατικής PCR (1 μL μίγμα πρώτης αντίδρασης και 49 μL νερό). Σε μια Nested PCR και σε μια Semi-nested PCR ακολουθείται το ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο με την απλή συμβατική PCR με τις εξής τροποποιήσεις: στα 25 μL της αντίδρασης αντιστοιχούν 18.9 μL νερού αντί για 19.4 μL και αυτό γιατί προστίθενται 1 μL αραιωμένου PCR προϊόντος της πρώτης αντίδρασης ως υπόστρωμα DNA. Τα υπόλοιπα συστατικά του master mix προστίθενται στις ίδιες ποσότητες με τη συμβατική PCR, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Ειδικότερα σε κάθε σωληνάκι τύπου Eppendorf που θα γίνει μια αντίδραση συνολικού όγκου 25 μL πρέπει να περιέχονται: 18.9 μL DEPC-νερού, 2.5 μL 10X KAPA Taq Buffer σε τελική συγκέντρωση 1X στα 25 μL της αντίδρασης (τα διαλύματα KAPA Taq Buffer 1X περιέχουν MgCl_2 σε τελική συγκέντρωση 1.5 mM), 0.5 μL 10 mM dNTPs mix σε τελική συγκέντρωση 0.2 mM για το κάθε dNTP, 1 μL 10 μM του πρόσθιου εκκινητή (forward primer, FP) σε τελική συγκέντρωση 0.4 μM , 1 μL 10 μM του ανάστροφου εκκινητή (reverse primer, RP) σε τελική συγκέντρωση 0.4 μM και 0.1 μL 5 U/ μL KAPA Taq DNA Polymerase σε τελική ποσότητα 0.5 U. Τα 24 μL του master mix μοιράζονται στα σωληνάκια της αντίδρασης και σε κάθε σωλήνα προστίθενται 1 μL αραιωμένου 1:50 προϊόντος της πρώτης αντίδρασης PCR από την αντίστοιχη κυτταρική σειρά. Στις Nested PCR και Semi-nested PCR εκτός από τον αρνητικό μάρτυρα του πειράματος (negative control 2, NC2) γίνεται χρήση και ενός αρνητικού μάρτυρα του πρώτου πειράματος (negative control 1, NC1), ο οποίος περιέχει 1 μL αραιωμένου 1:50 δείγματος από το σωληνάκι της αντίδρασης του αρνητικού μάρτυρα του πρώτου πειράματος.

Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης που επιλέγεται στο θερμικό κυκλοποιητή με τα στάδια 2-4 να επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους περιλαμβάνει:

1. Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 3 min
2. Αποδιάταξη στους 95°C για 30 s
3. Επαναδιάταξη σε θερμοκρασία T_a °C (ξεχωριστή για κάθε ζεύγος εκκινητών) για 30 s
4. Επιμήκυνση στους 72°C για 1 min (υπολογίζεται 1min/Kbp)
5. Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 1 min
6. Διατήρηση του PCR προϊόντος στους 4°C

9. Ημι-επάλληλη Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Semi-nested PCR)

9.1. Αρχή μεθόδου

Σε μια Ημι-Επάλληλη Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Semi-nested PCR) χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το PCR προϊόν μιας πρώτης συμβατικής PCR έπειτα από αραίωση (συνήθως 1:50) για να απομακρυνθούν προσμίξεις (carry-over) της πρώτης αντίδρασης, όπως άλατα και ένζυμα. Σε αντίθεση, όμως, με μια Nested PCR, στη Semi-nested PCR ένας εκκινητής είναι ίδιος με αυτόν που είχε χρησιμοποιηθεί στην πρώτη αντίδραση συμβατικής PCR και ο άλλος εκκινητής είναι εσωτερικότερος του πρώτου. Έτσι, και σε αυτήν την περίπτωση επιτυγχάνεται αύξηση της απόδοσης και της ευαισθησίας της αντίδρασης με την ενίσχυση μιας εσωτερικής υποπεριοχής του PCR προϊόντος της πρώτης αντίδρασης, αλλά αυτό συμβαίνει σε μικρότερο βαθμό σε σύγκριση με μια Nested PCR. Επίσης, ένα πρόβλημα που προκύπτει σε μια Semi-nested PCR είναι η παραγωγή παραπροϊόντων που οφείλονται στην επιμήκυνση του ενός κοινού εκκινητή. Για αυτό μπορεί να χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας ένα δείγμα που περιέχει νερό αντί για αυτόν τον εκκινητή. Για αυτό το λόγο στην παρούσα διπλωματική εργασία η Semi-nested PCR χρησιμοποιείται όταν δε γίνεται να σχεδιαστεί ένας λειτουργικός εκκινητής εσωτερικότερα ενός που χρησιμοποιείται στο πρώτο ζεύγος εκκινητών της συμβατικής PCR.

9.2. Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης της Ημι-επάλληλης PCR (Semi-nested PCR)

Το πειραματικό πρωτόκολλο, οι ποσότητες των αντιδραστηρίων και το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης Semi-nested PCR είναι ίδιο με αυτό της Nested PCR που αναλύθηκε προηγουμένως.

10. Εκκινητές (primers) στις αντιδράσεις συμβατικής PCR, επάλληλης PCR (Nested PCR) και ημι-επάλληλης PCR (Semi-nested PCR)

10.1. Κανόνες σχεδιασμού εκκινητών

Ο σχεδιασμός ενός ζεύγους εκκινητών που θα ενισχύει αποτελεσματικά και ειδικά την επιθυμητή αλληλουχία στόχο είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχία μιας αντίδρασης PCR. Για αυτό το λόγο έχουν θεσπιστεί ορισμένοι κανόνες που διέπουν το σχεδιασμό τους:

1. Το μήκος τους ιδανικά πρέπει να κυμαίνεται από 18-25 bp. Εκκινητές μεγαλύτερου μήκους έχουν αρκετά υψηλό σημείο τήξης (T_m) που δυσχεραίνει την υβριδοποίησή τους στις αλληλουχίες στόχους στα θερμοκρασιακά εύρη του σταδίου υβριδοποίησης,

ενώ εκκινητές μικρότερου μήκους έχουν μεγάλη πιθανότητα να συνδέονται μη ειδικά σε άλλες γονιδιωματικές περιοχές.

2. Η θερμοκρασία τήξης του εκκινητή (T_m), δηλαδή εκείνη η θερμοκρασία στην οποία τα μισά μόρια εκκινητή κατά προσέγγιση είναι υβριδοποιημένα στις αλυσίδες εκμαγεία, κυμαίνεται ιδανικά από 55-62°C. Τα T_m των δύο εκκινητών μπορούν να διαφέρουν μέχρι 5°C. Μια εμπειρική εξίσωση που υπολογίζει το T_m ενός εκκινητή με μήκος μικρότερο των 25 bp είναι η εξής: $T_m = 2*(A+T) + 4*(G+C)$ °C.
3. Το περιεχόμενο GC (GC content) πρέπει να είναι 40-60%, καθώς οι τρεις δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των G και C σταθεροποιούν μη ειδικές συνδέσεις μεταξύ μη τελείως συμπληρωματικών μορίων.
4. Στις πέντε τελευταίες βάσεις του εκκινητή μπορούν να βρίσκονται το πολύ 3 ζεύγη GCs (GC clamp), ώστε να μην υπάρξει μη ειδική σύνδεση του 3' άκρου του εκκινητή από όπου ξεκινά την επιμήκυνση η DNA πολυμεράση.
5. Πρέπει να μην υπάρχουν μερικώς συμπληρωματικές περιοχές μεταξύ των εκκινητών ώστε να αποφεύγεται η δημιουργία διμερών εκκινητών (primer dimers) ή η δημιουργία διμερών εντός ενός εκκινητή (self-dimers).
6. Χρειάζεται να αποφεύγεται η επανάληψη βάσεων για να εμποδίζεται η ολίσθηση του εκκινητή στην αλυσίδα εκμαγείο.
7. Είναι αναγκαίο να ελέγχεται με τον αλγόριθμο BLAST η μη ειδική σύνδεση των εκκινητών σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος.

10.2. Χρήση του λογισμικού Primer-BLAST του NCBI για το σχεδιασμό των εκκινητών

Για το σχεδιασμό των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Primer-BLAST του NCBI. Από τη μία πλευρά, αυτό το λογισμικό δίνει τη δυνατότητα να εισαχθεί ένα ζεύγος εκκινητών (ένας πρόσθιος και ένας ανάστροφος) και να βρεθούν οι γονιδιωματικές περιοχές και τα μετάγραφα που ενισχύονται με τη χρήση τους. Από την άλλη πλευρά, μπορεί να εισαχθεί μια αλληλουχία σε κατάλληλη μορφή FASTA και να βρεθούν πιθανά ζεύγη εκκινητών που ενισχύουν συγκεκριμένα σημεία αυτής της αλληλουχίας. Σε κάθε περίπτωση, παρέχονται το μήκος των εκκινητών, το σημείο τήξης τους (T_m °C), το % ποσοστό GC και ενδεικτικές τιμές της συμπληρωματικότητας μεταξύ ενός εκκινητή και του 3' άκρου του. Αυτές οι παράμετροι αξιολογούνται κάθε φορά για την επιλογή του καλύτερου εκκινητή για την ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας.

10.3. Αποκλίνοντες εκκινητές (divergent primers) για επιλεκτική ενίσχυση των circRNAs

Για την ενίσχυση μέσω μιας αντίδρασης PCR μιας γραμμικής αλληλουχίας χρησιμοποιούνται παραδοσιακά συγκλίνοντες εκκινητές (convergent primers), οι οποίοι ενισχύουν την περιοχή που βρίσκεται εσωτερικά των δύο εκκινητών. Αντίθετα, για την ενίσχυση μιας αλληλουχίας ενός κυκλικού RNA και την αποφυγή ενίσχυσης των γραμμικών μεταγράφων χρησιμοποιούνται αποκλίνοντες εκκινητές (divergent primers), με τον πρόσθιο εκκινητή να τοποθετείται καθοδικά του ανάστροφου συγκριτικά με την αλληλουχία του γονιδίου και ιδανικά το σημείο έναρξης του ανάστροφου εκκινητή (5' άκρο) να βρίσκεται αμέσως πριν το σημείο έναρξης του πρόσθιου εκκινητή (5' άκρο) χωρίς ενδιάμεσο κενό. Έτσι, αποφεύγεται η ενίσχυση τμημάτων εσωτερικά των εκκινητών και είναι δυνατή η ενίσχυση πιθανών κυκλικών μεταγράφων του γονιδίου. Για το σχεδιασμό τους με τη χρήση του

λογισμικού Primer-BLAST μπορούν να βρεθούν ορισμένοι πρόσθιοι και ανάστροφοι εκκινητές ειδικοί για την γονιδιωματική περιοχή ενδιαφέροντος και να σχηματιστούν έπειτα τα κατάλληλα ζεύγη αποκλινόντων εκκινητών (divergent primers) για τη λήψη κυκλικών μεταγράφων.

10.4. Εκκινητές συμβατικής PCR για τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *GAPDH* και συνθήκες της αντίδρασης

Για την ενίσχυση μέσω συμβατικής PCR του γονιδίου αναφοράς *GAPDH* και τον έλεγχο της επιτυχίας της απομόνωσης ολικού RNA και της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε ως πρόσθιος εκκινητής ο *GAPDH_Ex2F* και ως ανάστροφος εκκινητής ο *GAPDH_Ex4R*. Ο πρόσθιος εκκινητής *GAPDH_Ex2F* υβριδοποιείται σε μια περιοχή του δεύτερου εξωνίου και ο ανάστροφος εκκινητής *GAPDH_Ex4R* υβριδοποιείται σε μια περιοχή του τέταρτου εξωνίου. Σύμφωνα με το υπολογιστικό πρόγραμμα Primer BLAST ενισχύεται μια περιοχή του μεταγράφου NM_001289745.3 του γονιδίου *GAPDH* και το παραγόμενο προϊόν πρέπει να έχει μήκος 223 bp. Μόνο σε αυτήν την αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκαν 30 επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αντί για 35 που πραγματοποιούνταν συνήθως και η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών ήταν $T_a=59\text{ }^\circ\text{C}$ και ο χρόνος επιμήκυνσης στο τρίτο στάδιο ήταν $t_{ext.}=1\text{ min}$. Οι ιδιότητες των εκκινητών για ενίσχυση μέσω συμβατικής PCR του γονιδίου αναφοράς *GAPDH* παρουσιάζονται στον ακόλουθο **πίνακα 2**:

Πίνακας 2: Ιδιότητες των εκκινητών για ενίσχυση μέσω συμβατικής PCR του γονιδίου αναφοράς *GAPDH*

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος (nt)	Ποσοστό GC (%)	Tm (°C)
<i>GAPDH_Ex2F</i>	CCACATCGCTCAGACACCAT	20	55	60.11
<i>GAPDH_Ex4R</i>	TGACAAGCTTCCCGTTCTCA	20	50	59.24

10.5. Εκκινητές για συμβατική PCR, επάλληλη PCR (Nested PCR) και ημι-επάλληλη PCR (Semi-nested PCR) για τη μελέτη της έκφρασης των γραμμικών μεταγράφων (mRNAs) του γονιδίου *BOK*

Πριν τη διεξαγωγή αντιδράσεων PCR με αποκλινόντες εκκινητές (divergent primers) για την εύρεση πιθανών circRNAs του γονιδίου *BOK*, έγιναν αντιδράσεις PCR με τη χρήση συμβατικών συγκλινόντων εκκινητών (convergent primers) για τη μελέτη της έκφρασης των γραμμικών μεταγράφων (mRNAs) του γονιδίου. Αυτό έγινε με σκοπό την επιβεβαίωση της γενικής έκφρασης του γονιδίου *BOK* στις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, τη διαπίστωση των μεταγράφων που εκφράζονται σε κάθε κυτταρική σειρά και ως αποτέλεσμα την εύρεση των εξωνίων του που εκφράζονται σταθερά. Αυτές οι παρατηρήσεις είχαν ως απώτερο σκοπό και αξιοποιήθηκαν στη συνέχεια για το σχεδιασμό αποκλινόντων εκκινητών σε αυτά τα εξώνια. Οι ιδιότητες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της έκφρασης των γραμμικών μεταγράφων (mRNAs) του γονιδίου *BOK* παρουσιάζονται στον ακόλουθο **πίνακα 3**:

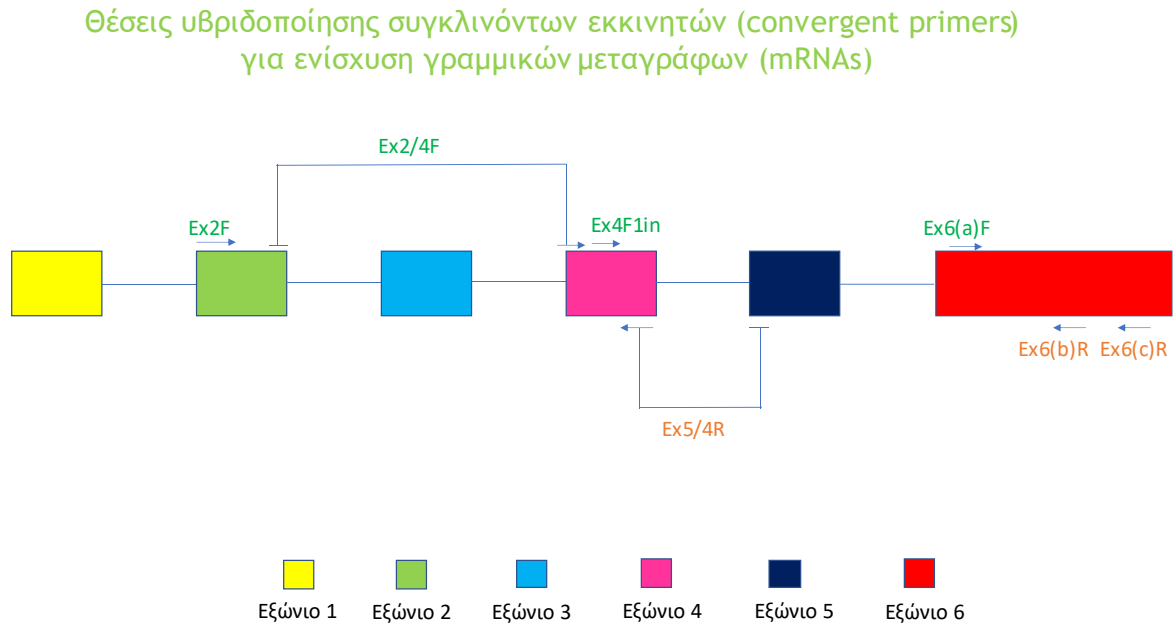
Πίνακας 3: Οι ιδιότητες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της έκφρασης των γραμμικών μεταγράφων (mRNAs) του γονιδίου *BOK*

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία (5'→3')	Μήκος (nt)	Ποσοστό GC (%)	Tm (oC)
BOK_Ex2F	ATGGAGGTGCTGCGGC	16	68.75	59.71
BOK_Ex2/4F	GCGCCTGGGCGATGA	15	73.33	59.38
BOK_Ex6(a)F	ATGTCCTCAAGTGTGTGGTCAGC	23	52.17	62.93
BOK_Ex_4F1in	TGTGGTGACCGATGCGTT	18	55.56	59.58
BOK_Ex6(c)R	ATCTGAGGCCTGGGAGTTGAC	21	57.14	61.52
BOK_Ex6(b)R	GATGTGTTCTGGGTGCTGAGG	20	60	61.02
BOK_Ex5/4R	CCACGTGATGCCTGCAGA	18	61.11	60.05

10.5.1. Θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών

Από τους πρόσθιους εκκινητές: ο BOK_Ex2F υβριδοποιείται σε μια περιοχή στην αρχή του δεύτερου εξωνίου, ο BOK_Ex2/4F υβριδοποιείται στο σημείο συρραφής μεταξύ του δεύτερου και του τέταρτου εξωνίου, ο BOK_Ex_4F1in υβριδοποιείται σε μια περιοχή στο μέσο του τέταρτου εξωνίου και ο BOK_Ex6(a)F υβριδοποιείται σε μια περιοχή στην αρχή του έκτου εξωνίου. Από τους ανάστροφους εκκινητές: ο BOK_Ex6(c)R υβριδοποιείται σε μια περιοχή στην 3' αμετάφραστη περιοχή του έκτου εξωνίου, ο BOK_Ex6(b)R υβριδοποιείται σε μια περιοχή του έκτου εξωνίου ανοδικότερα του BOK_Ex6(c)R και ο BOK_Ex5/4R υβριδοποιείται στο σημείο συρραφής μεταξύ του τέταρτου και του πέμπτου εξωνίου. Τα προβλεπόμενα μήκη των αναμενόμενων προϊόντων για κάθε ζεύγος εκκινητών και μετάγραφο παρουσιάζονται στον αντίστοιχο πίνακα στα αποτελέσματα. Οι θέσεις αυτές παρουσιάζονται σχηματικά στην ακόλουθη **εικόνα 6**:

Εικόνα 6: Θέσεις εκκινητών για ενίσχυση γραμμικών μεταγράφων (mRNAs) του γονιδίου *BOK*



10.6. Αποκλίνοντες εκκινητές για συμβατική PCR, επάλληλη PCR (Nested PCR) και ημι-επάλληλη PCR (Semi-nested PCR) για την εύρεση πιθανών κυκλικών μεταγράφων (circRNAs) του γονιδίου *BOK*

Οι ιδιότητες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση πιθανών κυκλικών μεταγράφων (circRNAs) του γονιδίου *BOK* παρουσιάζονται στον ακόλουθο **πίνακα 4**:

Πίνακας 4: Ιδιότητες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση πιθανών κυκλικών μεταγράφων (circRNAs) του γονιδίου *BOK*

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία (5'→3')	Μήκος (nt)	Ποσοστό GC (%)	Tm (oC)
BOK_Ex6(b)F	TGTGGTCAGCACAGACCCT	19	60.77	57.89
BOK_Ex3F	TTCTGGGGTCACACACGGTC	20	60	62.04
BOK_Ex6(a)F	ATGTCCTCAAGTGTGTGGTCAGC	23	52.17	62.93
BOK_Ex_6F1	TCTTCGTGCTGCTGCCA	17	58.82	59.18
BOK_Ex_4F1	GTCTGAGCCTGTGGTGAC	18	61.11	57.32
BOK_Ex_4F1in	TGTGGTGACCGATGCGTT	18	55.56	59.58
BOK_Ex_4F2	TGGCTGGCCACATCTTCTC	19	57.89	59.7
BOK_Ex_6F1in	CCTCAGCACCCGAACACATC	20	60	61.02

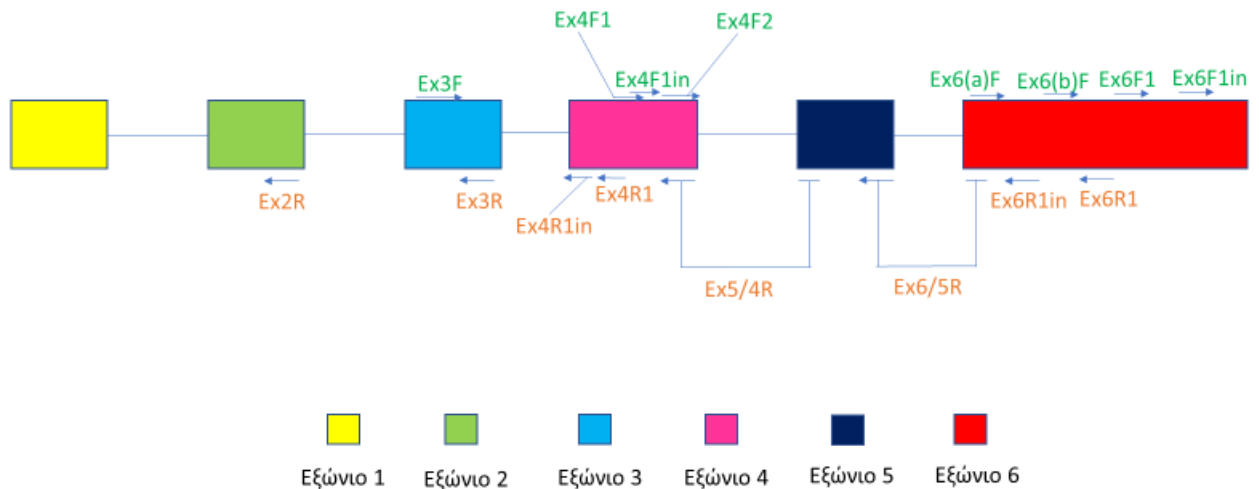
BOK_Ex5/4R	CCACGTGATGCCTGCAGA	18	61.11	60.05
BOK_Ex6/5R	TGAGGACATCAGTCCATCCGC	21	57.14	61.91
BOK_Ex2R	TTGTCTGTGGGCGAGCG	17	64.71	60.01
BOK_Ex3R	GACCGTGTGTGACCCCAGAA	20	60	62.04
BOK_Ex_6R1	TGCAGCCACCAGCCAGT	17	64.71	61.62
BOK_Ex_6R1in	GACCACACACTTGAGGACAT	20	50	57.45
BOK_Ex_4R1	TGCAGGGAGATGTGCAGCT	19	57.89	61.6
BOK_Ex_4R1in	ACGTTGCGGTAGACGCT	17	58.82	58.95

10.6.1. Θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών

Από τους πρόσθιους εκκινητές: ο BOK_Ex3F υβριδοποιείται σε μια περιοχή του τρίτου εξωνίου, ο BOK_Ex_4F1 υβριδοποιείται σε μια περιοχή του τέταρτου εξωνίου, ο BOK_Ex_4F1in υβριδοποιείται σε μια περιοχή του τέταρτου εξωνίου καθοδικότερα του BOK_Ex_4F1, ο BOK_Ex_4F2 υβριδοποιείται σε μια περιοχή του τέταρτου εξωνίου καθοδικότερα του BOK_Ex_4F1in, ο BOK_Ex6(a)F υβριδοποιείται σε μια περιοχή στην αρχή του έκτου εξωνίου, ο BOK_Ex6(b)F υβριδοποιείται σε μια περιοχή στην αρχή του έκτου εξωνίου καθοδικότερα του BOK_Ex6(a)F, ο BOK_Ex_6F1 υβριδοποιείται σε μια περιοχή του έκτου εξωνίου καθοδικότερα του BOK_Ex6(b)F και ο BOK_Ex_6F1in υβριδοποιείται σε μια περιοχή του έκτου εξωνίου καθοδικότερα του BOK_Ex_6F1. Από τους ανάστροφους εκκινητές: ο BOK_Ex2R υβριδοποιείται σε μια περιοχή του δεύτερου εξωνίου, ο BOK_Ex3R υβριδοποιείται σε μια περιοχή του τρίτου εξωνίου, ο BOK_Ex_4R1 υβριδοποιείται σε μια περιοχή του τέταρτου εξωνίου αμέσως ανοδικότερα του BOK_Ex_4F1, ο BOK_Ex_4R1in υβριδοποιείται σε μια περιοχή του τέταρτου εξωνίου ανοδικότερα του BOK_Ex_4R1, ο BOK_Ex5/4R υβριδοποιείται στο σημείο συρραφής μεταξύ του τέταρτου και του πέμπτου εξωνίου, ο BOK_Ex6/5R υβριδοποιείται στο σημείο συρραφής μεταξύ του πέμπτου και του έκτου εξωνίου, ο BOK_Ex_6R1 υβριδοποιείται σε μια περιοχή του έκτου εξωνίου λίγο καθοδικότερα του BOK_Ex6(b)F και ο BOK_Ex_6R1in υβριδοποιείται σε μια περιοχή του έκτου εξωνίου ανοδικότερα του BOK_Ex_6R1 και σχεδόν στην περιοχή υβριδοποίησης του BOK_Ex6(a)F. Οι θέσεις αυτές παρουσιάζονται σχηματικά στην ακόλουθη **εικόνα 7**:

Εικόνα 7: Εκκινητές για ενίσχυση κυκλικών μεταγράφων (circRNAs) του γονιδίου *BOK*

Θέσεις υβριδοποίησης αποκλινόντων εκκινητών (divergent primers) για ανακάλυψη κυκλικών μεταγράφων (circRNAs)



11. Αντιδράσεις και συνθήκες πραγματοποίησης συμβατικής PCR, επάλληλης PCR (Nested PCR) και ημι-επάλληλης PCR (Semi-nested PCR)

Παρακάτω παρατίθενται τα ζεύγη εκκινητών και οι συνθήκες των αντιδράσεων συμβατικής PCR, επάλληλης PCR (Nested PCR) και ημι-επάλληλης PCR (Semi-nested PCR) που πραγματοποιήθηκαν αρχικά για τη μελέτη της έκφρασης των γραμμικών μεταγράφων (mRNAs) του γονιδίου *BOK* και έπειτα για την ανακάλυψη νέων πιθανών κυκλικών μεταγράφων (circRNAs) του γονιδίου *BOK*.

11.1. Αντιδράσεις και συνθήκες πραγματοποίησης συμβατικής PCR, επάλληλης PCR (Nested PCR) και ημι-επάλληλης PCR (Semi-nested PCR) για τη μελέτη της έκφρασης των γραμμικών μεταγράφων (mRNAs) του γονιδίου *BOK*

- 1) Στην πρώτη αντίδραση συμβατικής PCR που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών BOK_Ex2F-BOK_Ex6(c)R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=60^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$.

Χρησιμοποιώντας το προϊόν αυτής της πρώτης αντίδρασης ως υπόστρωμα πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια οι εξής αντιδράσεις:

- a) Nested PCR: χρήση του ζεύγους εκκινητών BOK_Ex6(a)F-BOK_Ex6(b)R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=58^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 30 \text{ s}$.
- b) Nested PCR: χρήση του ζεύγους εκκινητών BOK_Ex_4F1in-BOK_Ex6(b)R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$.

- c) Nested PCR: χρήση του ζεύγους εκκινητών BOK_Ex2/4F-BOK_Ex6(b)R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=58^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$.
- d) Semi-nested PCR: χρήση του ζεύγους εκκινητών BOK_Ex2F-BOK_Ex5/4R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=58^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$.

Τα ηλεκτροφορητικά αποτελέσματα αυτών των αντιδράσεων, καθώς και τα αναμενόμενα μήκη σε κάθε περίπτωση, παρουσιάζονται και αναλύονται στην αντίστοιχη ενότητα στα αποτελέσματα.

11.2. Αντιδράσεις και συνθήκες πραγματοποίησης συμβατικής PCR, επάλληλης PCR (Nested-PCR) και ημι-επάλληλης PCR (Semi-nested PCR) για την εύρεση πιθανών κυκλικών μεταγράφων (circRNAs) του γονιδίου BOK

Παρακάτω παρουσιάζονται διαδοχικά οι πρώτες αντιδράσεις συμβατικής PCR με αποκλίνοντες εκκινητές (divergent primers) και οι επακόλουθες αντιδράσεις Nested PCR και Semi-nested PCR με τη χρήση ζεύγους εσωτερικότερων αποκλινόντων εκκινητών που έχουν ως υπόστρωμα το προϊόν της πρώτης συμβατικής αντίδρασης PCR, καθώς και οι συνθήκες που πραγματοποιήθηκε η κάθε αντίδραση:

- 1) Πρώτη αντίδραση συμβατικής PCR με το ζεύγος αποκλινόντων εκκινητών BOK_Ex6(b)F- BOK_Ex5/4R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$. Ακολούθησαν:
 - a) Semi-nested PCR: χρήση του ζεύγους αποκλινόντων εκκινητών BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex3R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$
 - b) Semi-nested PCR: χρήση του ζεύγους αποκλινόντων εκκινητών BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex2R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$
- 2) Πρώτη αντίδραση συμβατικής PCR με το ζεύγος αποκλινόντων εκκινητών BOK_Ex6(b)F- BOK_Ex6/5R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$. Ακολούθησαν:
 - a) Semi-nested PCR: χρήση του ζεύγους αποκλινόντων εκκινητών BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex5/4R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$
 - b) Semi-nested PCR: χρήση του ζεύγους αποκλινόντων εκκινητών BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex2R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$
 - c) Semi-nested PCR: χρήση του ζεύγους αποκλινόντων εκκινητών BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex3R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$
- 3) Πρώτη αντίδραση συμβατικής PCR με το ζεύγος αποκλινόντων εκκινητών BOK_Ex3F-BOK_Ex2R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$. Ακολούθησαν:

- a) Semi-nested PCR: χρήση του ζεύγους αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex2R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$
- b) Semi-nested PCR: χρήση του ζεύγους αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex6(a)F-BOK_Ex2R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$
- 4) Πρώτη αντίδραση συμβατικής PCR με το ζεύγος αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex6(a)F-BOK_Ex5/4R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$. Ακολούθησαν:
 - a) Semi-nested PCR: χρήση του ζεύγους αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex3R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$
 - b) Semi-nested PCR: χρήση του ζεύγους αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex2R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$
 - c) Semi-nested PCR: χρήση του ζεύγους αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex5/4R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$
 - d) Semi-nested PCR: χρήση του ζεύγους αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex6(a)F-BOK_Ex3R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$
 - e) Semi-nested PCR: χρήση του ζεύγους αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex6(a)F-BOK_Ex2R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$
- 5) Πρώτη αντίδραση συμβατικής PCR με το ζεύγος αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex_6F1-BOK_Ex_6R1 σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$. Ακολούθησαν:
 - a) Nested PCR: χρήση του ζεύγους αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex_6F1in-BOK_Ex_6R1in σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=57^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$
 - 6) Πρώτη αντίδραση συμβατικής PCR με το ζεύγος αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex_4F1-BOK_Ex_4R1 σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=57^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$. Ακολούθησαν:
 - a) Nested PCR: χρήση του ζεύγους αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex_4F1in-BOK_Ex_4R1in σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=58^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$
 - b) Nested PCR: χρήση του ζεύγους αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex_4F2-BOK_Ex_4R1in σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=58^{\circ}\text{C}$ και χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}} = 1 \text{ min}$

Τα σημαντικότερα ηλεκτροφορητικά αποτελέσματα αυτών των αντιδράσεων παρουσιάζονται και αναλύονται στην αντίστοιχη ενότητα στα αποτελέσματα.

12. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

12.1 Αρχή μεθόδου

Με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης επιτυγχάνεται με βάση το μοριακό τους βάρος-μέγεθος ο διαχωρισμός νουκλεϊκών οξέων ή πρωτεϊνών που φορτώνονται σε ένα πήκτωμα (gel) υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Ειδικότερα, υπάρχουν δύο βασικά είδη πηκτώματος (gels): αυτά της αγαρόζης που χρησιμοποιούνται συνήθως για το διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων (DNA/RNA) και αυτά της πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιούνται συνήθως για το διαχωρισμό πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων που έχουν διαφορά στο μέγεθος της τάξης των λίγων βάσεων (ακόμα και 1 bp). Στην παρούσα διπλωματική εργασία που διαχωρίζονται κυρίως με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης μόρια DNA στο εξής θα αναφερόμαστε σε πηκτώματα αγαρόζης (agarose gels). Η συγκέντρωση της αγαρόζης που χρησιμοποιείται είναι αντιστρόφως ανάλογη της διαπερατότητας των πόρων του πηκτώματος, δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση αγαρόζης που χρησιμοποιείται τόσο μικρότερη είναι η διάμετρος των πόρων και αντίστροφα. Συνεπώς, πηκτώματα υψηλής συγκέντρωσης χρησιμοποιούνται κυρίως για το διαχωρισμό μορίων που διαφέρουν σε μικρό βαθμό στο μήκος τους, ενώ αντίστροφα πηκτώματα χαμηλής συγκέντρωσης χρησιμοποιούνται κυρίως για το διαχωρισμό μορίων που διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό στο μήκος τους. Τα νουκλεϊκά οξέα έχουν αρνητικό φορτίο, λόγω των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του φωσφοδιεστερικού σκελετού της αλυσίδας τους και για αυτό το λόγο υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου κινούνται από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο. Το μήκος της διαδρομής που διανύουν και η ταχύτητα με την οποία κινούνται είναι αντιστρόφως ανάλογα του μοριακού τους βάρους-μεγεθούς. Τα μεγαλύτερα μόρια δυσκολεύονται περισσότερο να διέλθουν μέσω των στενών πόρων του πηκτώματος και επομένως κινούνται αργότερα και βρίσκονται σε ανωδικότερες θέσεις του πηκτώματος σε αντίθεση με τα μικρότερα μόρια που κινούνται γρηγορότερα και ευκολότερα και εντοπίζονται στις καθοδικότερες θέσεις του πηκτώματος. Παράλληλα με τα άγνωστα δείγματα σε κάθε πήκτωμα ηλεκτροφορείται και ένας μάρτυρας (ladder) που αποτελεί μίγμα τμημάτων DNA γνωστού μήκους που δίνουν χαρακτηριστικό πρότυπο ζωνών έτσι ώστε να μπορούν να διαπιστωθούν τα μήκη των αγνώστων ζωνών. Ορισμένες ζώνες του ladder έχουν τμήματα DNA καθορισμένης συγκέντρωσης, οπότε με αυτό τον τρόπο μπορεί να ληφθεί μία σχετική και συγκριτική πρώτη εικόνα για τη συγκέντρωση ενός μορίου. Για την απεικόνιση των ζωνών χρησιμοποιείται συνήθως η φθορίζουσα χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide, EtBr). Αυτή η ουσία έχει την ιδιότητα να ενσωματώνεται στις αλυσίδες των νουκλεϊκών οξέων, να απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία (UV) και να φθορίζει. Έτσι με παρατήρηση του gel κάτω από UV φως είναι ορατές οι ζώνες. Το EtBr είναι, όμως, μια δυνητικά μεταλλαξογόνος και καρκινογόνος ουσία και απαιτεί μεγάλη προσοχή στο χειρισμό της. Η χρωστική φορτώματος (loading dye) που αναμιγνύεται μαζί με το δείγμα πριν τη φόρτωσή του στο gel έχει διττό ρόλο: από τη μια πλευρά έχει ουσίες με αυξημένη πυκνότητα που συμπαρασύρουν το δείγμα στο πάτο του πηγαδιού του gel και από την άλλη πλευρά περιέχει έναν δείκτη που δείχνει το μέτωπο και την πρόοδο της ηλεκτροφόρησης. Γενικά, η ηλεκτροφόρηση είναι ένας εύκολος, γρήγορος και οικονομικός τρόπος διαχωρισμού και απομόνωσης των νουκλεϊκών οξέων που επιτρέπει τον υπολογισμό του μήκους και της σχετικής συγκέντρωσης ενός αγνώστου τμήματος DNA.

12.2 Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων του γονιδίου *BOK*

Για την εκτέλεση μιας ηλεκτροφόρησης κατασκευάζεται αρχικά η βάση με το χτενάκι πάνω στην οποία θα σχηματιστεί το gel με τα πηγάδια. Υπολογίζεται και ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό η κατάλληλη μάζα (σε g) αγαρόζης ανάλογα με το μήκος των μορίων που θέλουμε να διαχωριστεί (συνήθως τα gels είναι περιεκτικότητας 1.6-2.0% σε αγαρόζη) και της ποσότητας TBE 1X που θα χρησιμοποιηθεί. Μετρείται σε ογκομετρικό κύλινδρο ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1X (Tris/Boric acid/EDTA buffer) ανάλογα με τη βάση του gel που θα χρησιμοποιηθεί και αυτός είναι συνήθως 100 ή 150 mL. Η αγαρόζη τοποθετείται στο δοχείο με το TBE 1X και θερμαίνεται στους 100°C για 2-3 min μέχρι να διαλυτοποιηθεί. Ενώ το δοχείο βρίσκεται υπό συνεχή ήπια ανάδευση προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος EtBr (μL), ώστε αυτό να βρίσκεται σε αναλογία όγκου 1:10000 με το TBE 1X. Το υγρό αυτό διάλυμα τοποθετείται στη βάση του gel και αφήνεται να πήξει και να στερεοποιηθεί για 35-45 min. Έπειτα, αφαιρείται το χτενάκι και το gel τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0.5X μέχρι την κάλυψη του gel και φορτώνονται 10 μL δείγματος που έχει παρασκευαστεί ως εξής: 10 μL δείγματος DNA και 2 μL loading dye 6X αναμιγνύονται πάνω σε parafilm. Τέλος, συνδέονται προσεκτικά τα ηλεκτρόδια του τροφοδοτικού μηχανήματος (μαύρο-κόκκινο/άνοδος/κάθοδος) και το gel αφήνεται να τρέξει στα 120 V περίπου μέχρι το μέτωπο της χρωστικής-δείκτη να φτάσει την άκρη του. Η εμφάνιση και φωτογράφιση των ζωνών γίνεται σε ειδικά διαμορφωμένο σκοτεινό θάλαμο κάτω από λάμπα εκπομπής UV ακτινοβολίας, λαμβάνοντας τα ατομικά μέσα προστασίας των οφθαλμών και του δέρματος από την υπεριώδη ακτινοβολία.

13. Απομόνωση και καθαρισμός ενός PCR προϊόντος από το τελικό μίγμα της αντίδρασης (PCR clean-up) ή Απομόνωση και καθαρισμός μιας ζώνης ενός PCR προϊόντος από πήκτωμα αγαρόζης (DNA extraction from agarose gels)

13.1. Αρχή μεθόδου

Για να σταλεί ένα επιθυμητό PCR προϊόν στο εξειδικευμένο κέντρο αλληλούχισης πρέπει να έχει ένα εύρος υψηλών συγκεντρώσεων και να βρίσκεται σε καθαρή μορφή χωρίς προσμίξεις. Αυτός ο καθαρισμός και απομόνωση επιτυγχάνεται με την εκλεκτική πρόσδεση του DNA σε στήλες πυριτίου (silica membrane) σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, ξέπλυμα του DNA από τις προσμίξεις και έκλουσή του σε συνθήκες χαμηλής αλατότητας από τη στήλη.

13.2. Πειραματική διαδικασία PCR clean-up και gel extraction

Το συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο εκτός από τον καθαρισμό ενός PCR προϊόντος από το τελικό μίγμα της αντίδρασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και γενικότερα για τη συμπύκνωση μορίων DNA και τον καθαρισμό τους από προσμίξεις προηγούμενων αντιδράσεων (carry-over), όπως ένζυμα. Τα αντιδραστήρια NucleoSpin Gel and PCR Clean-up που χρησιμοποιούνται προέρχονται από την εταιρία Macherey-Nagel. Το πρώτο βήμα είναι η πρόσδεση του DNA στη στήλη. Σε ένα νέο σωληνάκι τύπου Eppendorf προστίθενται τα μίγματα όλων των αντιδράσεων PCR που πραγματοποιήθηκαν. Για έναν ορισμένο όγκο δείγματος που πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 30 μL (διαφορετικά χρειάζεται προσθήκη

νερού) προστίθεται διπλάσιος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος NTI (NTI buffer). Σε ένα συλλεκτικό σωλήνα των 2 mL που παρέχεται μαζί με το κιτ τοποθετείται μια στήλη NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column και τοποθετούνται μέχρι 700 μ L του διαλύματος δείγμα-NTI. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11000 g για 30 s και το υποκείμενο υγρό απορρίπτεται. Η στήλη τοποθετείται ξανά στο συλλεκτικό σωλήνα και η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να εξαντληθεί το δείγμα του PCR προϊόντος-NTI και να προσδεθεί όλο το προϊόν στη στήλη. Ακολουθεί το ξέπλυμα της στήλης με προσθήκη 700 μ L ρυθμιστικού διαλύματος NT3 (NT3 buffer) και φυγοκέντρηση στα 11000 g για 30 s. Το υποκείμενο υγρό απορρίπτεται και η στήλη τοποθετείται ξανά στο συλλεκτικό σωλήνα. Το συγκεκριμένο βήμα ξέπλυματος επαναλαμβάνεται για την επίτευξη καλύτερου αποτελέσματος και την απομάκρυνση επιπλέον αλάτων. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11000 g για 1 min για την πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος NT3 και την ξήρανση της στήλης. Τέλος, γίνεται έκλυση του δεσμευμένου στη στήλη DNA με προσθήκη 30 μ L ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης (NE buffer) που προηγουμένως έχει θερμανθεί στους 70°C για 1 min, επώαση του μίγματος-στήλης για 1 min στον πάγκο και φυγοκέντρηση στα 11000 g για 1 min. Η στήλη απορρίπτεται και το καθαρό πλέον PCR προϊόν συλλέγεται στο σωληνάκι τύπου Eppendorf και αποθηκεύεται στον καταψύκτη για μελλοντική χρήση. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του PCR clean-up, γιατί όπως είχε φανεί από την προηγούμενη ηλεκτροφόρηση υπήρχε στο πήκτωμα μόνο μια πολύ ισχυρή ζώνη του επιθυμητού προϊόντος. Αν από μια αντίδραση PCR και επακόλουθη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προκύπτουν περισσότερες από μια ζώνες ή η επιθυμητή ζώνη έχει χαμηλή ένταση χρειάζεται να γίνει κόψιμο αυτής της ζώνης με νυστέρι μιας χρήσης από το πήκτωμα και να προηγηθεί ένα ελαφρώς τροποποιημένο πρώτο βήμα της αντίδρασης. Συγκεκριμένα, το κομμένο κομμάτι πηκτώματος αγαρόζης ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό και για κάθε 100 mg αγαρόζης σε ένα πήκτωμα περιεκτικότητας λιγότερο από 2% προστίθενται 200 μ L NTI buffer, ενώ για κάθε 100 mg αγαρόζης σε ένα πήκτωμα περιεκτικότητας περισσότερο από 2% προστίθενται 400 μ L NTI buffer. Το μίγμα θερμαίνεται στους 50°C για 5-10 min και αναδεύεται ανά 2-3 min μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Στη συνέχεια ακολουθούνται τα βήματα που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

14. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων με φθορισμομετρία

14.1. Αρχή μεθόδου

Κατά το φαινόμενο του φθορισμού ηλεκτρόνια φθορισμογόνων μορίων διεγείρονται και επιστρέφουν στη θεμελιώδη κατάσταση σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα εκπέμποντας ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος και χωρίς αλλαγή στον προσανατολισμό του σπιν, δημιουργώντας έτσι φθορισμό που μπορεί να ανιχνευτεί από ειδικά όργανα. Ειδικές φθορίζουσες χρωστικές μπορούν να ενσωματωθούν στις έλικες των νουκλεϊκών οξέων, να απορροφήσουν ενέργεια σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και να φθορίσουν. Αυτή η ιδιότητα αξιοποιείται για την ποσοτική μέτρηση της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων. Η φθορισμομετρία είναι πολύ πιο ευαίσθητη και ακριβής τεχνική από τη φασματοφωτομετρία.

14.2. Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης φθορισμομετρίας

Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό του ενισχυμένου με PCR προϊόντος είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί με ακρίβεια η συγκέντρωσή του και να γίνουν οι κατάλληλες αραιώσεις ή συμπυκνώσεις (με εξάτμιση του διαλύτη) για να σταλεί στο εξειδικευμένο κέντρο αλληλούχισης. Συγκεκριμένα, ως αντιδραστήριο χρησιμοποιήθηκε το Qubit dsDNA HS Assay Kit της Thermo Fisher Scientific. Για κάθε αντίδραση φθορισμομετρίας 1 μL φθορίζουσας χρωστικής (reagent) αναμιγνύεται με 199 μL ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) για να προκύψουν τα 200 μL του διαλύματος εργασίας (working solution). Ο όγκος του δείγματος σε μια αντίδραση (αραιωμένο ή όχι) μπορεί να κυμαίνεται από 1-20 μL και ο όγκος του διαλύματος εργασίας από 180-199 μL αντίστοιχα μέχρι συμπλήρωσης του τελικού όγκου των 200 μL . Στις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν όγκοι δείγματος PCR προϊόντος 1 μL από αραιώση 1:10. Μετά από επώαση στον πάγκο για 2 min, το κατάλληλο σωληνάκι Qubit τοποθετείται στην αντίστοιχη συσκευή της εταιρίας και προσδιορίζοντας την αντίστοιχη αραιώση και τους όγκους των αντιδραστηρίων το μηχάνημα δίνει το αποτέλεσμα της μέτρησης της συγκέντρωσης του PCR προϊόντος στις επιθυμητές μονάδες μέτρησης (ng/ μL στη δική μας περίπτωση).

15. Αλληλούχιση Sanger (Sanger sequencing)

15.1. Αρχή μεθόδου αυτοματοποιημένης αλληλούχισης Sanger

Η αλληλούχιση κατά Sanger ανακαλύφθηκε το 1977 από τον Frederick Sanger και από τότε έχει εξελιχθεί και αυτοματοποιηθεί ως διαδικασία. Σε μια αυτοματοποιημένη αλληλούχιση Sanger ενισχυμένα με PCR προϊόντα αποδιατάσσονται και στο μίγμα προστίθενται: ο εκκινητής (primer) που θα υβριδοποιηθεί στην αλυσίδα εκμαγείου, η DNA πολυμεράση για την *in vitro* αντιγραφή της αλληλουχίας εκμαγείου ξεκινώντας από το 3' άκρο του εκκινητή, μίγμα των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και μίγμα των τεσσάρων ειδικά τροποποιημένων διδεοξυριβονουκλεοτιδίων (ddNTPs) σε χαμηλότερη συγκέντρωση από τα απλά dNTPs. Τα ειδικά τροποποιημένα διδεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs) έχουν ένα 3' Η αντί για 3' OH και έτσι με την προσθήκη τους η DNA πολυμεράση δε μπορεί να σχηματίσει επιπλέον 3'-5' φωσφοδιεστερικό δεσμό και τερματίζεται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας. Επιπλέον τα τέσσερα διαφορετικά ddNTPs είναι σημασμένα με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική με αποτέλεσμα να είναι δυνατόν να εντοπίζεται κάθε φορά το είδος του νουκλεοτιδίου που ενσωματώθηκε τελευταίο στην αλυσίδα. Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες-προϊόντα αυτής της σύνθεσης τερματισμού της αλυσίδας σε διαφορετικά σημεία διαχωρίζονται βάσει μεγέθους με τριχοειδική ηλεκτροφόρηση, διεγείρονται με τη ρίψη ακτίνας laser και ο φθορισμός που προκαλείται από τα διαφορετικά είδη ddNTPs ανιχνεύεται, πολλαπλασιάζεται και καταγράφεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται κάθε φορά σε ένα αντίστοιχο χρωματογράφημα, όπου σε κάθε βάση που διαβάζεται αντιστοιχεί μια κορυφή χαρακτηριστικού χρώματος και επομένως μια συγκεκριμένη αζωτούχος βάση. Με την αλληλούχιση Sanger μπορούν να διαβαστούν γενικά τμήματα DNA μέχρι 1000 bp.

15.2. Διαδικασία αλληλούχισης Sanger

Τα δείγματα προς αλληλούχιση στάλθηκαν μαζί με τον κατάλληλο εκκινητή στην εξειδικευμένη εταιρία CeMIA SA και ύστερα από ορισμένο χρονικό διάστημα επέστρεψαν τα αποτελέσματα της αλληλούχισης που παρουσιάζονται στην αντίστοιχη ενότητα στα αποτελέσματα.

16. Υπολογιστικά εργαλεία για την πρόγνωση της λειτουργίας των κυκλικών RNAs (circRNAs)

Γνωρίζοντας την αλληλουχία ενός κυκλικού μορίου RNA (circRNA), μπορούν να αξιοποιηθούν διάφορα υπολογιστικά προγράμματα που είναι ελεύθερα προσβάσιμα στο διαδίκτυο για να προβλεφθούν διάφορες πιθανές λειτουργίες των circRNAs που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή. Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματα αυτά είναι ενδεικτικά και τα πειραματικά αποτελέσματα μπορεί να διαφέρουν. Για την πρόγνωση διάφορων πιθανών λειτουργιών του κυκλικού μορίου RNA που ανακαλύφθηκε χρειάζεται η εισαγωγή της αλληλουχίας του σε απλή μορφή ή σε μορφή FASTA. Επειδή όμως το μόριο είναι κυκλικό και σε έναν κύκλο δεν υπάρχουν σαφή άκρα με αρχή και τέλος χρειάζεται κάθε φορά η εισαγωγή της αλληλουχίας σε δύο διαφορετικές μορφές: μία όπως παρουσιάστηκε στα αποτελέσματα στην ενότητα παρουσίασης των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης Sanger και μία στην οποία ένα τελικό κομμάτι της αλληλουχίας έχει τοποθετηθεί στην αρχή, ώστε να ληφθεί υπόψιν η αλληλουχία-σύνδεσμος (junction) του εξωνίου 4 που υπάρχει φυσιολογικά στο κυκλικό μόριο, αλλά απουσιάζει στην πρώτη γραμμική μορφή της αλληλουχίας. Συγκεκριμένα και για την παρούσα ανάλυση οι 189 bp της πρώτης μορφής της αλληλουχίας (εξώνιο 6 και επακόλουθο τμήμα του εξωνίου 4) τοποθετήθηκαν πριν το υπόλοιπο κομμάτι της αλληλουχίας και έτσι προκύπτει η δεύτερη μορφή της αλληλουχίας. Οι αλληλουχίες αυτές παρουσιάζονται στην αντίστοιχη ενότητα των αποτελεσμάτων.

Αναλυτικότερα, τα υπολογιστικά προγράμματα και οι παράμετροι επιλογής που αξιοποιήθηκαν στο καθένα στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι:

16.1. Πρόβλεψη της ικανότητας πρόσδεσης μορίων microRNAs με τη βάση δεδομένων miRDB

Η βάση δεδομένων miRDB (<http://mirdb.org/mirdb/custom.html>) δίνει την ικανότητα εισαγωγής μιας γραμμικής αλληλουχίας mRNA και της πρόβλεψης της πρόσδεσης σε αυτή διάφορων μορίων microRNAs. Έτσι, στην ενότητα Custom prediction (εξατομικευμένη πρόβλεψη) μπορεί να εισαχθεί η αλληλουχία του circRNA στις δύο διαφορετικές γραμμικές του μορφές και ο αλγόριθμος αναγνωρίζει πιθανές συμπληρωματικές θέσεις πρόσδεσης microRNAs σε όλο το μήκος του σαν να πρόκειται για ένα γραμμικό μόριο mRNA. Στο είδος του οργανισμού επιλέγεται άνθρωπος (human) και στο είδος της υποβληθείσας αλληλουχίας αυτή του mRNA στόχου (mRNA target sequence). Τέλος, υποβάλλεται η αλληλουχία και εξάγονται τα αποτελέσματα, που παρουσιάζονται παρακάτω στην αντίστοιχη ενότητα.

16.2. Πρόβλεψη της ύπαρξης εσωτερικών θέσεων πρόσδεσης του ριβοσώματος (IRES) με το υπολογιστικό πρόγραμμα IRESpy

Το υπολογιστικό πρόγραμμα IRESpy (<https://irespy.shinyapps.io/IRESpy/>) δίνει την ικανότητα εισαγωγής μιας γραμμικής αλληλουχίας που υπάρχει σε ένα αρχείο σε FASTA format και τον εντοπισμό πιθανών θέσεων εσωτερικής πρόσδεσης του ριβοσώματος (IRES).

Μέσω αυτών των αλληλουχιών είναι δυνατό να προαχθεί η συγκρότηση του συμπλόκου έναρξης της μετάφρασης και η μετάφραση των circRNAs, όπως αναλύθηκε προηγουμένως στην εισαγωγή. Εισάγονται τα κατάλληλα αρχεία με τις δύο μορφές της αλληλουχίας και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω στην αντίστοιχη ενότητα.

16.3. Εύρεση πιθανών ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (Open Reading Frames, ORFs) με τη χρήση του υπολογιστικού αλγορίθμου ORFfinder του NCBI

Με τη χρήση του προγνωστικού αλγορίθμου ORFfinder του NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) μπορεί να γίνει εύρεση των πιθανών ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (ORFs) που υπάρχουν σε μια γραμμική αλληλουχία και να βρεθεί η αμινοξική ακολουθία των πιθανών πρωτεϊνικών ισομορφών. Συγκεκριμένα, μπορεί να εισαχθεί μια γραμμική αλληλουχία σε FASTA format, επιλέγεται ο τυπικός γενετικός κώδικας (standard) που θα χρησιμοποιηθεί κατά τη μετάφραση της ανθρώπινης αλληλουχίας μας και επιλέγεται το ORF να ξεκινά με το κωδικόνιο έναρξης ATG και να έχει ελάχιστο μήκος 75 νουκλεοτιδίων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και αναλύονται παρακάτω στην αντίστοιχη ενότητα.

16.4. Πρόγνωση της πρόσδεσης πρωτεϊνών (RNA-binding-proteins, RBPs) με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος beRBP (Binding Estimation for human RNA-Binding-Proteins)

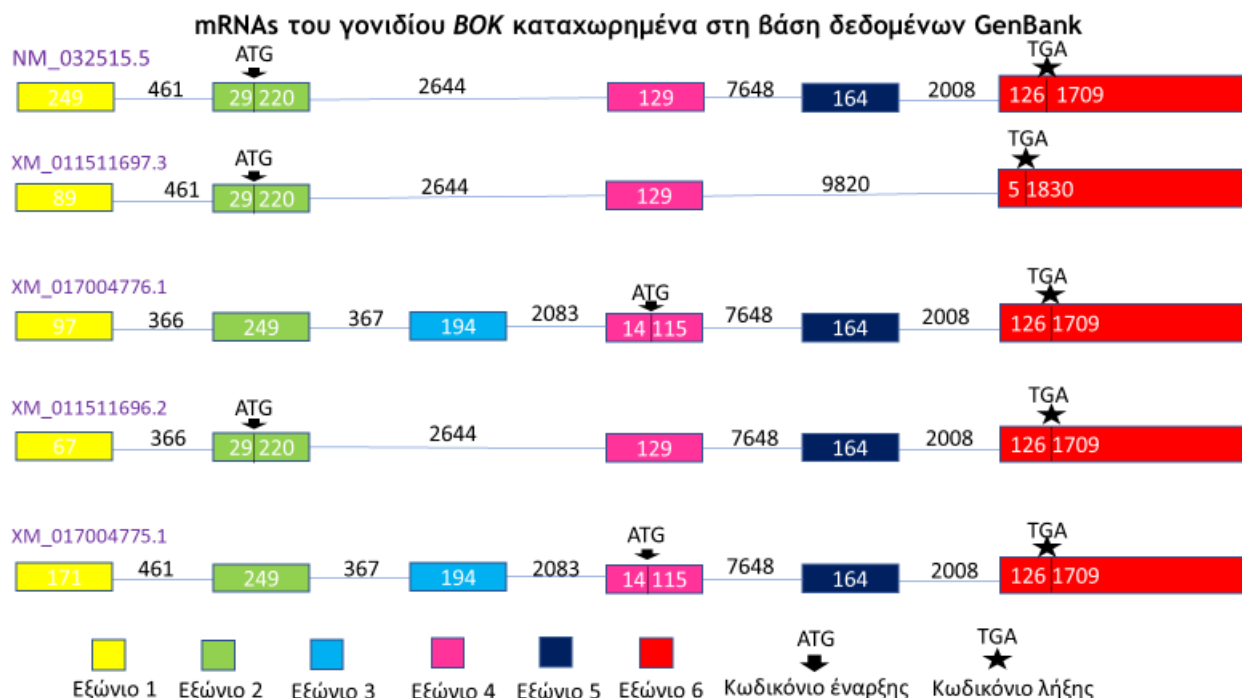
Όπως αναλύθηκε στην εισαγωγή, τα circRNAs μπορούν να λειτουργούν ως ικρίωματα (scaffolds) με πολλές θέσεις πρόσδεσης μιας πρωτεΐνης που προσδένεται σε αλληλουχίες RNA. Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες RNA μέσω συγκεκριμένων αμινοξικών μοτίβων που ονομάζονται PWMs (Power Weight Matrices). Τα δύο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα για αυτήν την πρόβλεψη ελεύθερα προσβάσιμα στο διαδίκτυο υπολογιστικά προγράμματα είναι το RBPmap και το beRBP. Το beRBP ελέγχει την πρόσδεση ανθρώπινων RBPs σε μια οποιαδήποτε αλληλουχία RNA αξιοποιώντας μοντέλα πρόγνωσης ειδικών αλληλεπιδράσεων RBPs-RNA και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαφέστερα και απλούστερα σε σύγκριση με το RBPmap, που ελέγχει την πρόσδεση RBPs του ανθρώπου και του ποντικού ταυτόχρονα χωρίς διαχωρισμό, συνήθως προσπαθεί να ταυτοποιήσει την αλληλουχία προς αναζήτηση σε μια ήδη γνωστή γονιδιωματική περιοχή και με βάση αυτή τη στοίχιση και αξιοποιώντας παράλληλα μοντέλα γενικών γνωστών αλληλεπιδράσεων RBPs-RNA να δώσει τα αποτελέσματά του που παρουσιάζονται πιο δυσνόητα. Για αυτούς τους λόγους για την παρούσα διπλωματική εργασία έγινε χρήση του αλγορίθμου πρόγνωσης beRBP (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/beRBP/predict.html>). Στο πρόγραμμα αυτό εισάγεται μια αλληλουχία RNA σε FASTA format και επιλέγονται όλα τα πιθανά αμινοξικά μοτίβα των RBPs του ανθρώπου (General Model-all pre-built PWMs). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και εξηγούνται παρακάτω στην αντίστοιχη ενότητα.

Αποτελέσματα

1. Βιοπληροφορική ανάλυση

Τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης έπειτα από αναζήτηση στη βάσεις δεδομένων GenBank και Refseq του NCBI σχετικά με την πρωτοταγή δομή του γονιδίου *BOK* και των μεταγράφων του συνοψίζονται στην παρακάτω **εικόνα 8**:

Εικόνα 8: Μετάγραφα mRNA του γονιδίου *BOK* καταχωρημένα στη βάση δεδομένων GenBank του NCBI

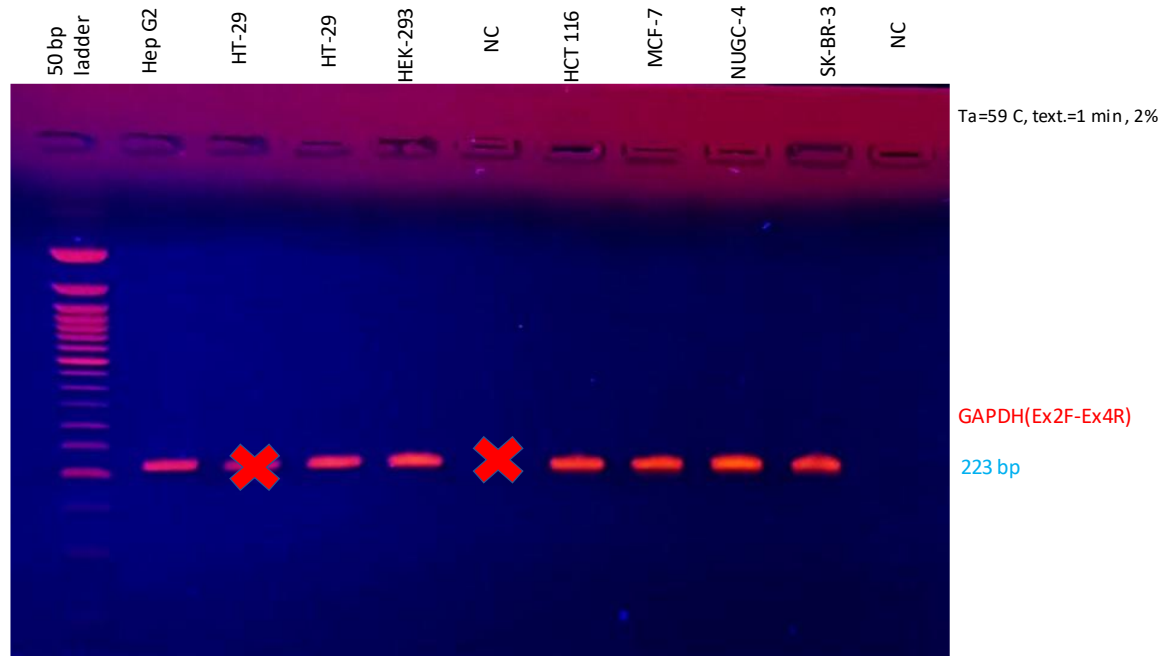


Στην παραπάνω **εικόνα 8** φαίνεται ότι το γονίδιο *BOK* διαθέτει πέντε διαφορετικά πιθανά μετάγραφα που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της εναλλακτικής συρραφής του mRNA. Μόνο το ένα NM_032515.5 που ξεκινά με κωδικό NM και είναι το βασικό μετάγραφο είναι πειραματικά επιβεβαιωμένο ότι κωδικοποιεί την προβλεπόμενη πρωτεΐνη. Με βάση την αλληλουχία αυτού του μεταγράφου έγινε ο σχεδιασμός των εκκινητών και η συμπλήρωση και η εξαγωγή της τελικής αλληλουχίας του circRNA που ανακαλύφθηκε. Τα υπόλοιπα τέσσερα που ξεκινούν με κωδικό XM έχουν προκύψει από υπολογιστική *in silico* ανάλυση και προβλέπεται ότι κωδικοποιούν τις εκάστοτε πρωτεϊνικές ισομορφές, χωρίς αυτό να έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά. Το γονίδιο *BOK* διαθέτει έξι εξώνια και με βάση τον παραπάνω χρωματικό κώδικα με κίτρινο συμβολίζεται το πρώτο εξώνιο, με πράσινο το δεύτερο, με γαλάζιο το τρίτο, με φούξια το τέταρτο, με μπλε το πέμπτο και με κόκκινο το έκτο. Με βέλος συμβολίζεται το κωδικόνιο έναρξης ATG και με αστέρι συμβολίζεται το κωδικόνιο λήξης TGA. Συμπερασματικά, προκύπτουν τρεις πιθανές πρωτεϊνικές ισομορφές, τα μετάγραφα μπορεί να έχουν εναλλακτικά 5' άκρα και ένα μετάγραφο μπορεί να έχει εναλλακτικό 3' άκρο. Τέλος, τα μετάγραφα μπορεί να έχουν διαφορετική αρχή στο πρώτο τους εξώνιο, αλλά θα μπορούσαν επίσης να ομαδοποιηθούν με βάση το τέλος του πρώτου αυτού εξωνίου ως εξής: τρία μετάγραφα: τα NM_032515.5, XM_011511697.3 και XM_017004775.1 έχουν κοινό 3'

άκρο στο πρώτο εξώνιο που τελειώνει στις 249 bp, ενώ δύο μετάγραφα: τα XM_017004776.1 και XM_011511696.2 έχουν κοινό 3' άκρο στο πρώτο εξώνιο που τελειώνει στις 344 bp.

2. Έλεγχος επιτυχίας απομόνωσης ολικού RNA και αντίστροφης μεταγραφής (RT) με την ηλεκτροφόρηση ενισχυμένων με PCR προϊόντων του γονιδίου αναφοράς *GAPDH*

Εικόνα 9: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης ενισχυμένων με συμβατική PCR προϊόντων του γονιδίου αναφοράς *GAPDH*



Στην παραπάνω **εικόνα 9** παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης με το ζεύγος εκκινητών *GAPDH_EX2F-GAPDH_Ex4R* για την ενίσχυση μέσω συμβατικής PCR του γονιδίου *GAPDH*. Πράγματι, παρατηρείται μόνο η έντονη αναμενόμενη ζώνη των 223 bp. Αυτό σημαίνει ότι η απομόνωση του ολικού RNA και η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής ήταν επιτυχείς σε όλες τις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Τα δείγματα της κυτταρικής σειράς HT-29 και του αρνητικού ελέγχου NC φορτώθηκαν δύο φορές, λόγω αβεβαιότητας ορθής φόρτωσης την πρώτη φορά και για οπτική διευκόλυνση και αφού το αποτέλεσμα είναι πανομοιότυπο λαμβάνεται υπόψιν μόνο το αποτέλεσμα του ενός δείγματος.

3. Αποτελέσματα συμβατικής PCR, επάλληλης PCR (Nested PCR) και ημι-επάλληλης PCR (Semi-nested PCR) και ηλεκτροφόρησης των προϊόντων τους για τη μελέτη της έκφρασης των γραμμικών μεταγράφων (mRNAs) του γονιδίου *BOK*

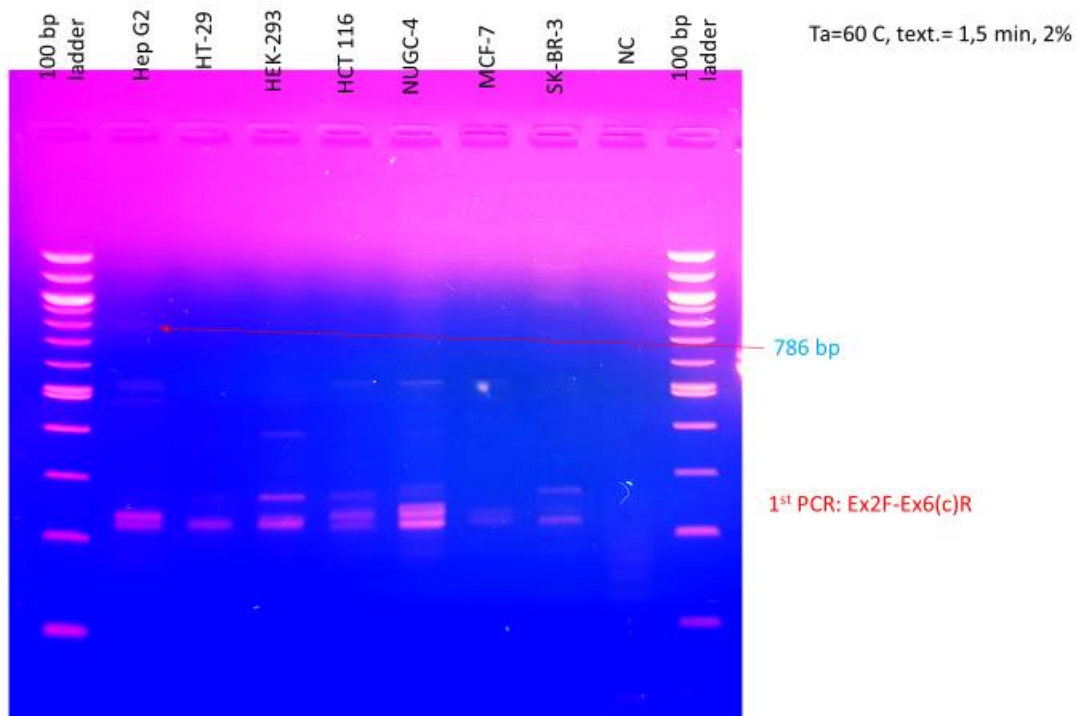
Η πραγματοποίηση των ακόλουθων αντιδράσεων συμβατικής PCR, επάλληλης PCR και ημι-επάλληλης PCR έχουν ως σκοπό τη διαπίστωση των μεταγράφων του γονιδίου *BOK* που εκφράζονται σε κάθε κυτταρική σειρά, την εύρεση των επιπέδων έκφρασής τους και την αναζήτηση των εξωνίων που εκφράζονται σταθερά σε όλες τις κυτταρικές σειρές και θα αξιοποιηθούν στη συνέχεια για το σχεδιασμό αποκλιόντων εκκινητών σε αυτά. Τα προβλεπόμενα μήκη ζωνών για κάθε ζεύγος εκκινητών και μετάγραφο σύμφωνα με τον αλγόριθμο Primer BLAST παρουσιάζονται στον ακόλουθο **πίνακα 5**:

Πίνακας 5: Προβλεπόμενα μήκη ζωνών για κάθε ζεύγος εκκινητών και μετάγραφο σύμφωνα με τον αλγόριθμο Primer BLAST

Μετάγραφα			Ζεύγη εκκινητών- μήκη (bp)		
	BOK_Ex2F- BOK_Ex6(c)R	BOK_Ex4F1in- BOK_Ex6(b)R	BOK_Ex2/4F- BOK_Ex6(b)R	BOK_Ex2F- BOK_Ex5/4R	BOK_Ex6(a)F- BOK_Ex6(b)R
NM_032515.5	950	414	501	360	196
XM_011511697.3	786	250	337	.	196
XM_017004776.1	1144	414	.	554	196
XM_011511696.2	950	414	501	360	196
XM_017004775.1	1144	414	.	554	196

Ακολουθούν τα ηλεκτροφορητικά αποτελέσματα και ο σχολιασμός των αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν και αναγράφονται στην αντίστοιχη ενότητα στα Υλικά-Μέθοδοι:

Εικόνα 10: Αποτελέσματα της πρώτης συμβατικής PCR με το ζεύγος εκκινητών BOK_Ex2F-BOK_Ex6(c)R

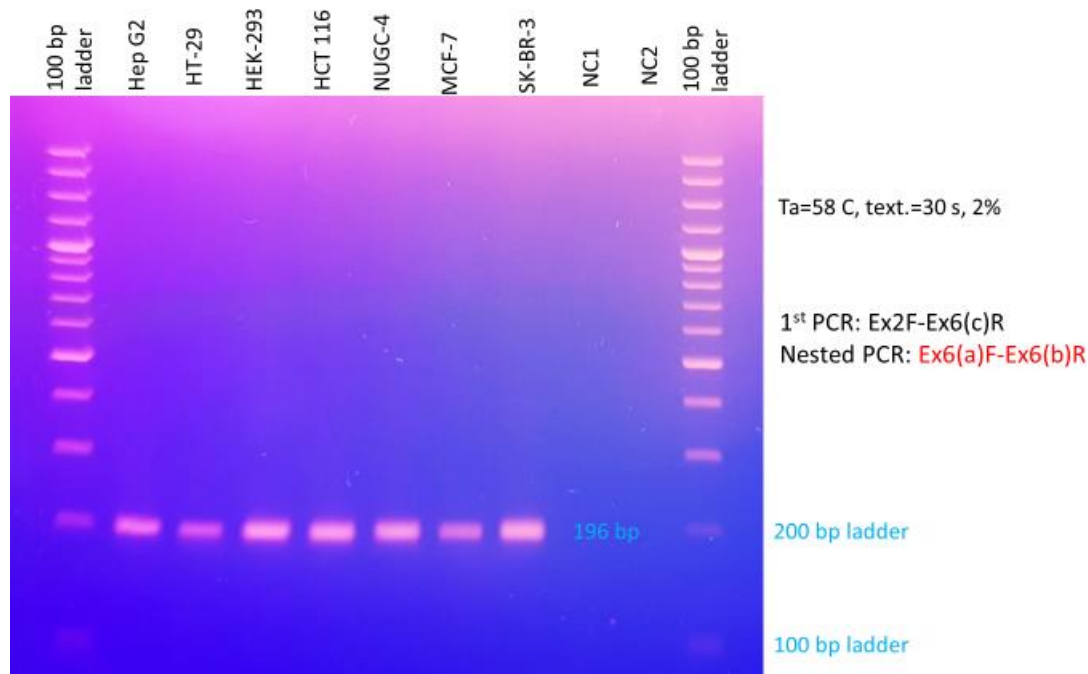


Στην παραπάνω **εικόνα 10** φαίνονται τα ηλεκτροφορητικά αποτελέσματα της πρώτης συμβατικής PCR με το ζεύγος εκκινητών BOK_Ex2F-BOK_Ex6(c)R. Διακρίνεται με μεγάλη δυσκολία μια πολύ αχνή ζώνη των 786 bp στη σειρά Hep G2. Η ένταση της ζώνης δεν επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος για την έκφραση των αντίστοιχων μεταγράφων. Παρατηρούνται επίσης πολλές άλλες μη ειδικές ζώνες. Από αυτή την πρώτη αντίδραση εξάγεται το συμπέρασμα ότι το γονίδιο *BOK* εκφράζεται πράγματι σε πολύ μικρό βαθμό και, μάλλον, μη σταθερά και είναι απαραίτητη κάθε φορά η πραγματοποίηση επιπλέον

αντιδράσεων Nested PCR και Semi-nested PCR για την αύξηση της ευαισθησίας και της απόδοσης των αντιδράσεων PCR.

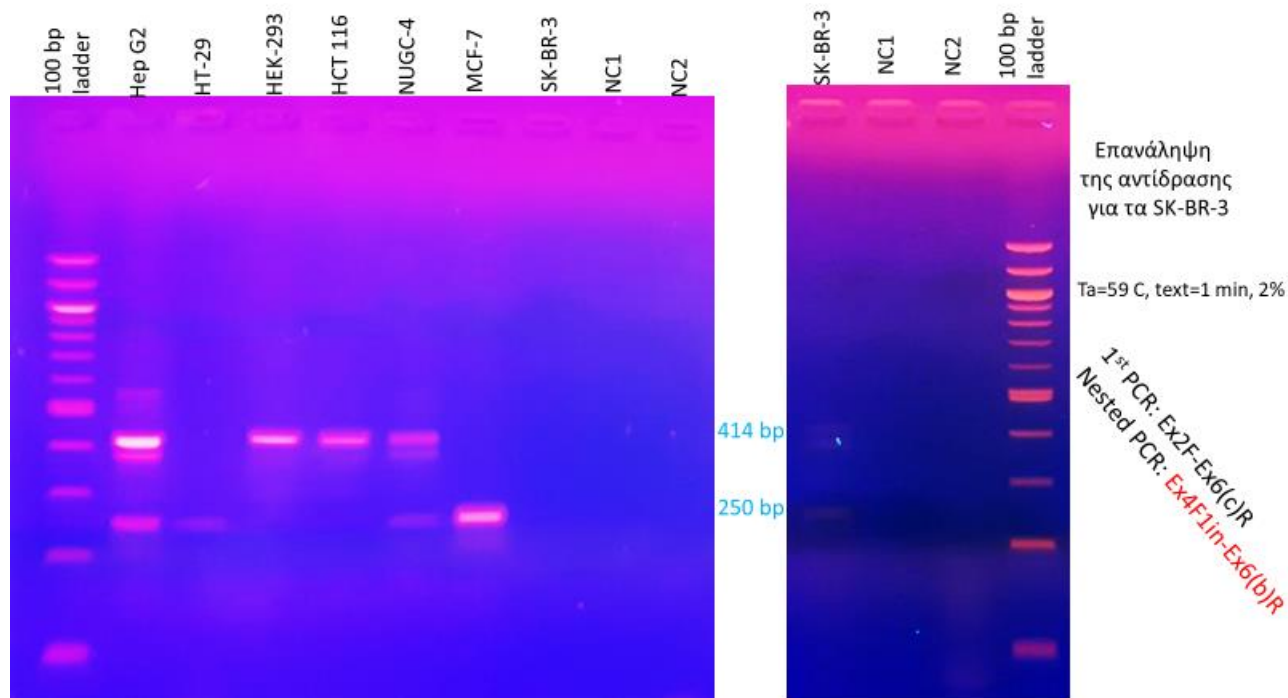
Τα προϊόντα αυτής της πρώτης αντίδρασης PCR αποτελούν το υπόστρωμα για την πραγματοποίηση των επόμενων αντιδράσεων Nested PCR και Semi-nested PCR:

Εικόνα 11: Αποτελέσματα της Nestsed PCR με το ζεύγος εκκινητών BOK_Ex6(a)F-BOK_Ex6(b)R



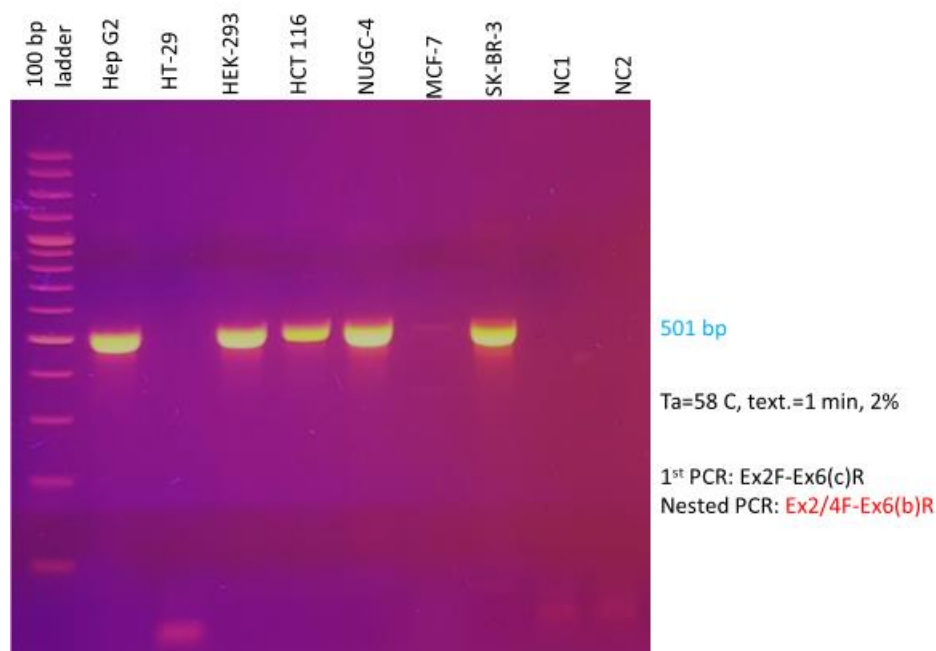
Στην παραπάνω **εικόνα 11** φαίνονται τα ηλεκτροφορητικά αποτελέσματα της Nestsed PCR με το ζεύγος εκκινητών BOK_Ex6(a)F-BOK_Ex6(b)R. Διαπιστώνεται ότι σε όλες τις κυτταρικές σειρές παρουσιάζεται η αναμενόμενη ζώνη των 196 bp. Το εξώνιο 6 που ενισχύεται με αυτήν την αντίδραση, λοιπόν, εκφράζεται έντονα σε όλες τις κυτταρικές σειρές και όπως έχει δειχθεί προηγουμένως αποτελεί τμήμα όλων των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *BOK*.

Εικόνα 12: Αποτελέσματα της Nestsed PCR με το ζεύγος εκκινητών BOK_Ex4F1in-BOK_Ex6(b)R



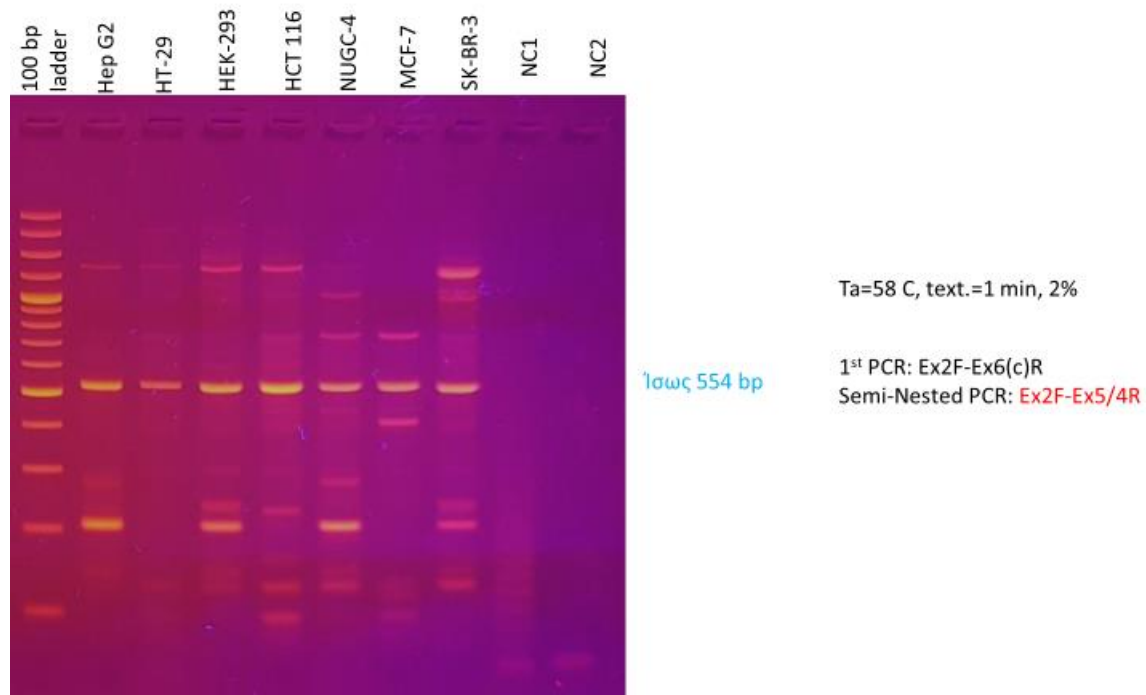
Στην παραπάνω **εικόνα 12** φαίνονται τα ηλεκτροφορητικά αποτελέσματα της Nestsed PCR με το ζεύγος εκκινητών BOK_Ex4F1in-BOK_Ex6(b)R. Στην πρώτη αντίδραση Nested PCR που πραγματοποιήθηκε παρατηρήθηκε η έκφραση της αναμενόμενης ζώνης των 414 bp στις κυτταρικές σειρές Hep G2, HEK-293, HCT 116 και NUGC-4 και αυτής των 250 bp στις κυτταρικές σειρές Hep G2, HT-29, NUGC-4 και MCF-7. Λόγω της απουσίας κάποιας αναμενόμενης ζώνης στα κύτταρα SK-BR-3 οι συγκεκριμένες αντιδράσεις Nestsed PCR πραγματοποιήθηκαν ξανά και διαπιστώθηκε η πολύ ασθενής έκφραση των δύο αυτών αναμενόμενων ζωνών στα κύτταρα SK-BR-3. Αυτή η ασθενής έκφραση των αναμενόμενων ζωνών στα κύτταρα SK-BR-3 σημαίνει ότι τα μετάγραφα του *BOK* εκφράζονται ασθενώς σε αυτήν την κυτταρική σειρά και για αυτό δεν ανιχνεύθηκαν με την πρώτη αντίδραση. Συνεπώς, και από αυτές τις αντιδράσεις συμπεραίνεται ότι το γονίδιο *BOK* εκφράζεται ασθενώς, ποικιλοτρόπως και με διαφορετικά εναλλακτικά μετάγραφα σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Παρ' όλα αυτά, φαίνεται ότι το εξώνιο 4 που ενισχύεται με τη χρήση του πρόσθιου εκκινητή εκφράζεται επίσης σταθερά στις διάφορες κυτταρικές σειρές, όπως το εξώνιο 6, και επιβεβαιώνεται η παρουσία του εξωνίου 4 σε όλα τα εναλλακτικά μετάγραφα.

Εικόνα 13: Αποτελέσματα της Nestsed PCR με το ζεύγος εκκινητών BOK_Ex2/4F-BOK_Ex6(b)R



Στην παραπάνω **εικόνα 13** φαίνονται τα ηλεκτροφορητικά αποτελέσματα της Nestsed PCR με το ζεύγος εκκινητών BOK_Ex2/4F-BOK_Ex6(b)R. Η αναμενόμενη ζώνη των 501 bp παρατηρείται στις κυτταρικές σειρές Hep G2, HEK-293, HCT 116, NUGC-4 και SK-BR-3. Η απουσία της αναμενόμενης ζώνης σε κάποιες σειρές μπορεί να εξηγηθεί από την απουσία του συγκεκριμένου συνδέσμου εξωνίων (junction) έναντι του οποίου είναι συμπληρωματικός ο εκκινητής BOK_Ex2/4F. Θα μπορούσε επίσης να υβριδοποιείται μόνο το μέρος του πρόσθιου εκκινητή που είναι συμπληρωματικό του εξωνίου 4. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα αποτελέσματα εδώ διαπιστώνεται η ισχυρή έκφραση των αντίστοιχων μεταγράφων.

Εικόνα 14: Αποτελέσματα της Semi-nestsed PCR με το ζεύγος εκκινητών BOK_Ex2F-BOK_Ex5/4R



Στην παραπάνω **εικόνα 14** φαίνονται τα ηλεκτροφορητικά αποτελέσματα της Semi-nestsed PCR με το ζεύγος εκκινητών BOK_Ex2F-BOK_Ex5/4R. Η παρατηρούμενη ζώνη που εκφράζεται έντονα σε όλες τις σειρές είναι λίγο μικρότερη από την αναμενόμενη των 554 bp. Αυτό ίσως συμβαίνει λόγω διαφορετικής εναλλακτικής συρραφής που έχει ως αποτέλεσμα ένα μικρότερο μετάγραφο ή οφείλεται σε μη πλήρως συμπληρωματική υβριδοποίηση του BOK_Ex5/4R σε ένα πιθανώς διαφορετικό σύνδεσμο (junction) αυτών των εξωνίων. Επίσης, παρατηρούνται επιπλέον αρκετές μη ειδικές ζώνες που αποδεικνύει τη μειωμένη ευαισθησία και απόδοση της Semi-nested PCR έναντι της Nested PCR.

3.1. Γενικότερα συμπεράσματα

Από την ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων προκύπτουν ποικίλα συμπεράσματα. Αρχικά, επιβεβαιώνεται ότι το γονίδιο *BOK* έχει γενικά χαμηλή και μη σταθερή έκφραση. Επίσης, επιβεβαιώνεται ότι η Nested PCR έχει πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία και απόδοση έναντι της Semi-nested PCR και θα πρέπει να προτιμείται όταν υπάρχουν διαθέσιμοι οι κατάλληλοι εκκινητές. Ακόμα, τεκμηριώνεται η ύπαρξη των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *BOK* που έχουν προβλεφθεί βιοπληροφορικά με *in silico* μεθόδους. Με βάση τις αναμενόμενες ζώνες που παρατηρούνται σε κάθε ζεύγος εκκινητών τα εξώνια 2, 4 και 6 φαίνεται να εκφράζονται σταθερά σε όλα τα μετάγραφα που υπάρχουν καταχωρημένα στη βάση δεδομένων GenBank και για αυτό σχεδιάστηκαν στη συνέχεια αποκλίνοντες εκκινητές (divergent primers) συμπληρωματικοί σε περιοχές των εξωνίων 4 και 6 για την ανακάλυψη πιθανών circRNAs. Επιπλέον, είναι πολύ πιθανό αρκετές μη αναμενόμενες ζώνες που παρατηρούνται να ανήκουν σε άλλα εναλλακτικά μετάγραφα mRNAs ή ncRNAs που δεν έχουν ανακαλυφθεί πειραματικά ακόμα. Αυτή η θέση ενισχύεται από την αυξημένη ειδικότητα

της αντίδρασης Nested PCR και οριστική επαλήθευση ή διάψευση θα δινόταν με κόψιμο των ζωνών από το πήκτωμα και αλληλούχισή τους με τη μέθοδο Sanger.

3.2. Έκφραση συγκεκριμένων μεταγράφων σε κάθε κυτταρική σειρά

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων Nested PCR με τα ζεύγη εκκινητών BOK_Ex4F1in-BOK_Ex6(b)R και BOK_Ex2/4F-BOK_Ex6(b)R προκύπτει ο ακόλουθος πίνακας 6 που αφορά τα μετάγραφα που σίγουρα υπάρχει πιθανότητα να εκφράζονται σε κάθε κυτταρική σειρά. Με X σημειώνονται τα μετάγραφα που μπορεί να εκφράζονται σε κάθε κυτταρική σειρά.

Πίνακας 6: Μετάγραφα που σίγουρα εκφράζονται σε κάθε κυτταρική σειρά

Μετάγραφο	Κυτταρικές σειρές						
	Hep G2	HT-29	HEK-293	HCT 116	NUGC-4	MCF-7	SK-BR-3
NM_032515.5	X	.	X	X	X	.	X
XM_011511697.3	X	X	.	.	X	X	X
XM_017004776.1	X	.	X	X	X	.	X
XM_011511696.2	X	.	X	X	X	.	X
XM_017004775.1	X	.	X	X	X	.	X

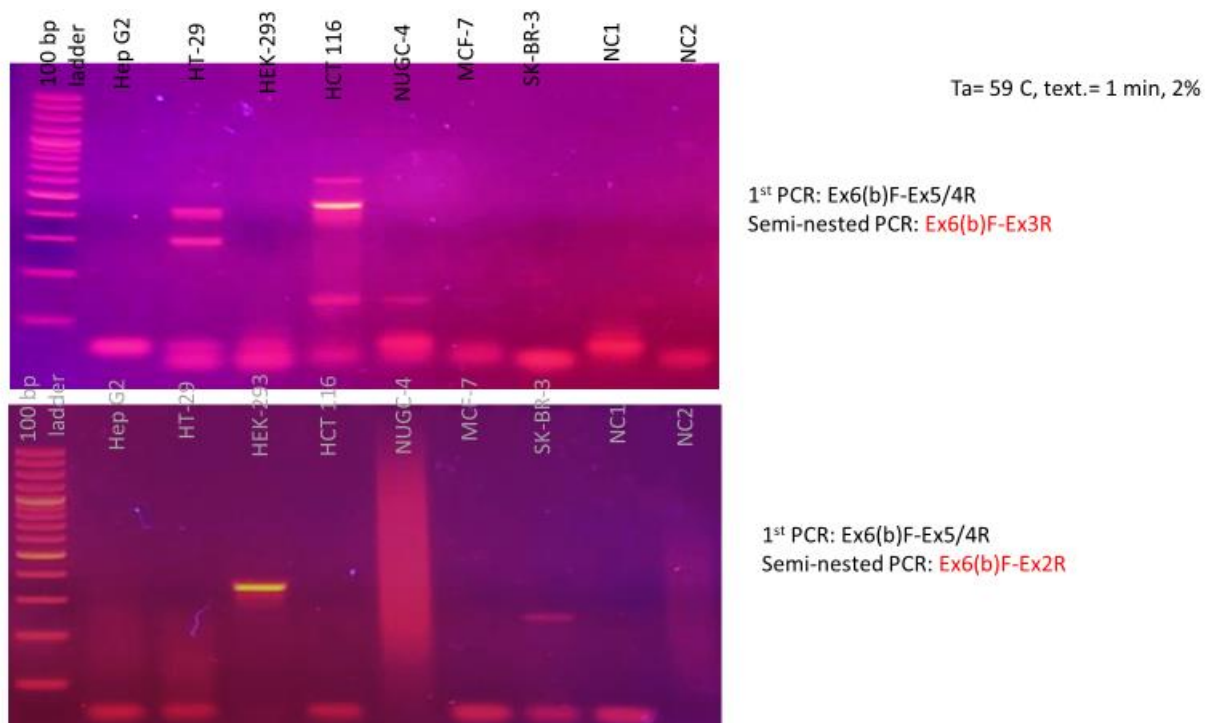
Από την αντίδραση Nested PCR με το ζεύγος εκκινητών BOK_Ex6(a)F-BOK_Ex6(b)R η αναμενόμενη ζώνη των 196 bp μπορεί να προκύψει από οποιοδήποτε μετάγραφο και έτσι η ανάλυση αυτού του πηκτώματος δεν είναι πληροφοριακή για τα μετάγραφα που εκφράζονται σε κάθε κυτταρική σειρά, αλλά φανερώνει ότι είναι πιθανό όλα τα μετάγραφα να εκφράζονται σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Επιπλέον, αν ληφθεί υπόψιν ότι η παρατηρούμενη ζώνη στην αντίδραση Nested PCR με το ζεύγος εκκινητών BOK_Ex2F-BOK_Ex5/4R αντιστοιχεί πράγματι σε 554 bp, τότε τα μετάγραφα XM_017004776.1 και XM_017004775.1 θα μπορούσαν να εκφράζονται σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Ακόμα, αν ληφθούν υπόψιν και οι αμυδρές ζώνες της πρώτης συμβατικής αντίδρασης PCR, τότε αυτές επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα. Τέλος, είναι σημαντικό να διευκρινιστεί ότι θα μπορούσαν όλα τα μετάγραφα να εκφράζονται σε όλες τις κυτταρικές σειρές, αλλά αυτό δε μπορεί να ειπωθεί με βεβαιότητα από τα αποτελέσματα των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

4. Αποτελέσματα συμβατικής PCR, επάλληλης PCR (Nested PCR) και ημι-επάλληλης PCR (Semi-nested PCR) και ηλεκτροφόρησης των προϊόντων τους για την εύρεση πιθανών κυκλικών μεταγράφων (circRNAs) του γονιδίου *BOK*

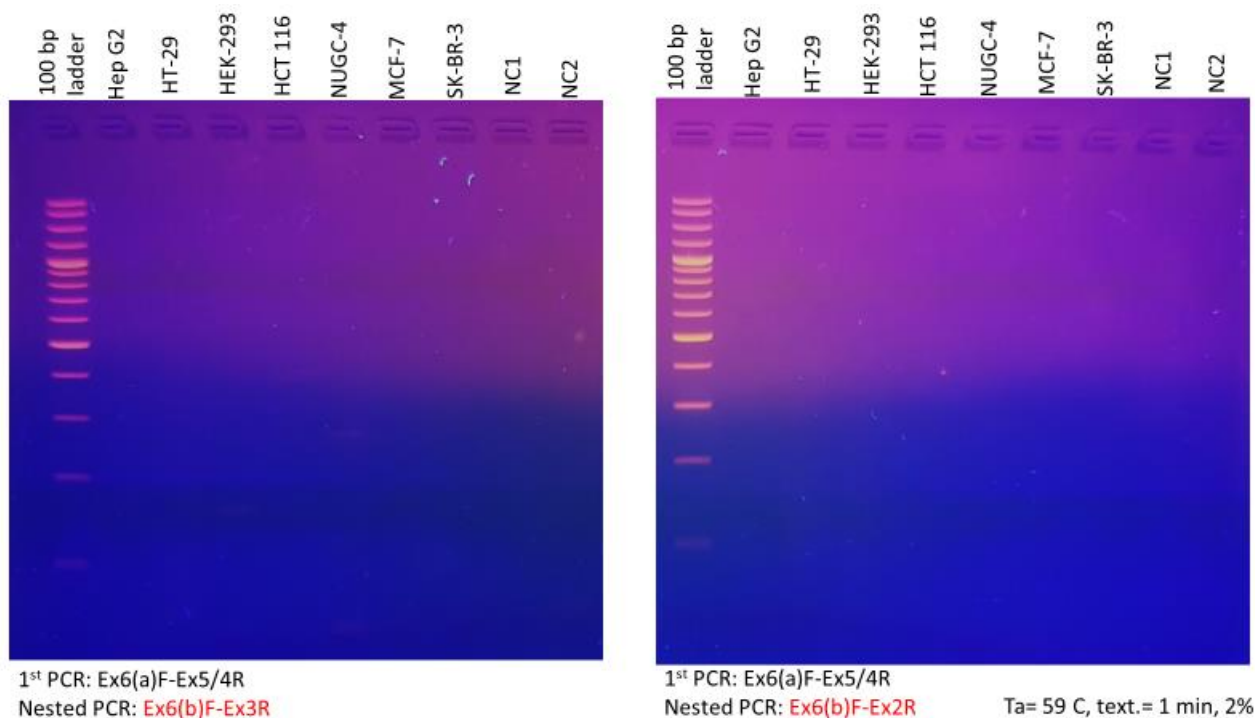
Η πραγματοποίηση των ακόλουθων αντιδράσεων συμβατικής PCR, επάλληλης PCR και ημι-επάλληλης PCR έχουν ως σκοπό την ανακάλυψη νέων πιθανών κυκλικών μορίων RNA (circRNAs) του γονιδίου *BOK*.

Με εξαίρεση τις αντιδράσεις Nested PCR 6a και 6b που πραγματοποιήθηκαν με τα ζεύγη αποκλινόντων εκκινητών BOK_Ex_4F1in-BOK_Ex_4R1in και BOK_Ex_4F2-BOK_Ex_4R1in αντίστοιχα, οι υπόλοιπες αντιδράσεις PCR δεν οδήγησαν στην ανακάλυψη νέων μορίων circRNAs. Ωστόσο, παρακάτω παρουσιάζονται και αναλύονται ορισμένα ηλεκτροφορητικά αποτελέσματα που αναδεικνύουν σημαντικές πτυχές των circRNAs και της αντίδρασης PCR και από τα οποία μπορούν να εξαχθούν ορισμένα χρήσιμα συμπεράσματα.

Εικόνα 15: Αποτέλεσμα των αντιδράσεων Semi-nested PCR με τα ζεύγη αποκλινόντων εκκινητών BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex3R και BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex2R πάνω στο υπόστρωμα της πρώτης συμβατικής αντίδρασης PCR που έγινε με τους αποκλινόντες εκκινητές BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex5/4R

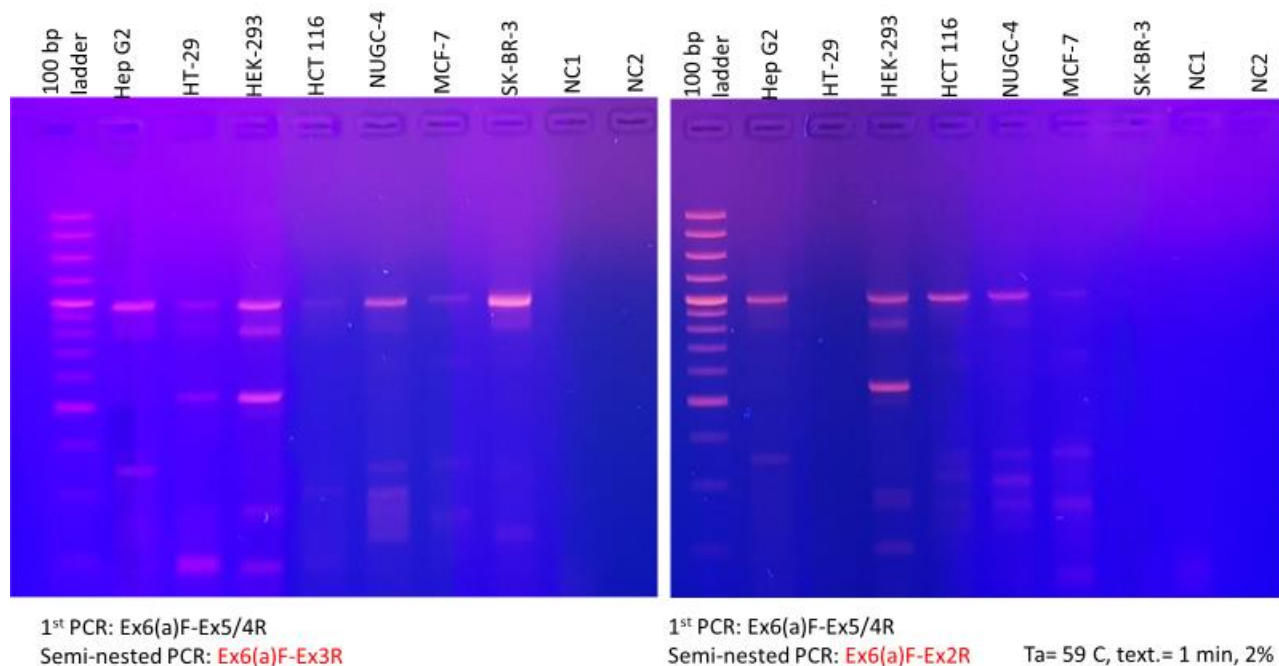


Εικόνα 16: Αποτέλεσμα των αντιδράσεων Nested PCR με τα ζεύγη αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex3R και BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex2R πάνω στο υπόστρωμα της πρώτης συμβατικής αντίδρασης PCR που έγινε με τους αποκλίνοντες εκκινητές BOK_Ex6(a)F-BOK_Ex5/4R



Στην πρώτη παραπάνω **εικόνα 15** παρουσιάζεται το ηλεκτροφορητικό αποτέλεσμα των αντιδράσεων Semi-nested PCR με τα ζεύγη αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex3R και BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex2R πάνω στο υπόστρωμα της πρώτης συμβατικής αντίδρασης PCR που έγινε με τους αποκλίνοντες εκκινητές BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex5/4R. Στη δεύτερη παραπάνω **εικόνα 16** παρουσιάζεται το ηλεκτροφορητικό αποτέλεσμα των αντιδράσεων Nested PCR με τα ζεύγη αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex3R και BOK_Ex6(b)F-BOK_Ex2R πάνω στο υπόστρωμα της πρώτης συμβατικής αντίδρασης PCR που έγινε με τους αποκλίνοντες εκκινητές BOK_Ex6(a)F-BOK_Ex5/4R. Παρά το γεγονός ότι ο εκκινητής BOK_Ex6(a)F βρίσκεται μόνο λίγες βάσεις ανοδικά του εκκινητή BOK_Ex6(b)F, στη δεύτερη περίπτωση εξαφανίζονται οι ζώνες της πρώτης περίπτωσης. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το αποτέλεσμα της πρώτης αντίδρασης Semi-nested PCR είναι μη ειδικό και μπορεί οι παρατηρούμενες ζώνες να αποτελούν παραπροϊόντα της επιμήκυνσης του ενός μόνο εκκινητή (πιθανότερα του BOK_Ex6(b)F). Η αντίδραση της Nested PCR χαρακτηρίζεται γενικά από μεγαλύτερη ακρίβεια και αυτή η έλλειψη ειδικότητας απέτρεψε την κοπή και αλληλούχηση με τη μέθοδο Sanger μίας από τις παρατηρούμενες ζώνες των αντιδράσεων Semi-nested PCR.

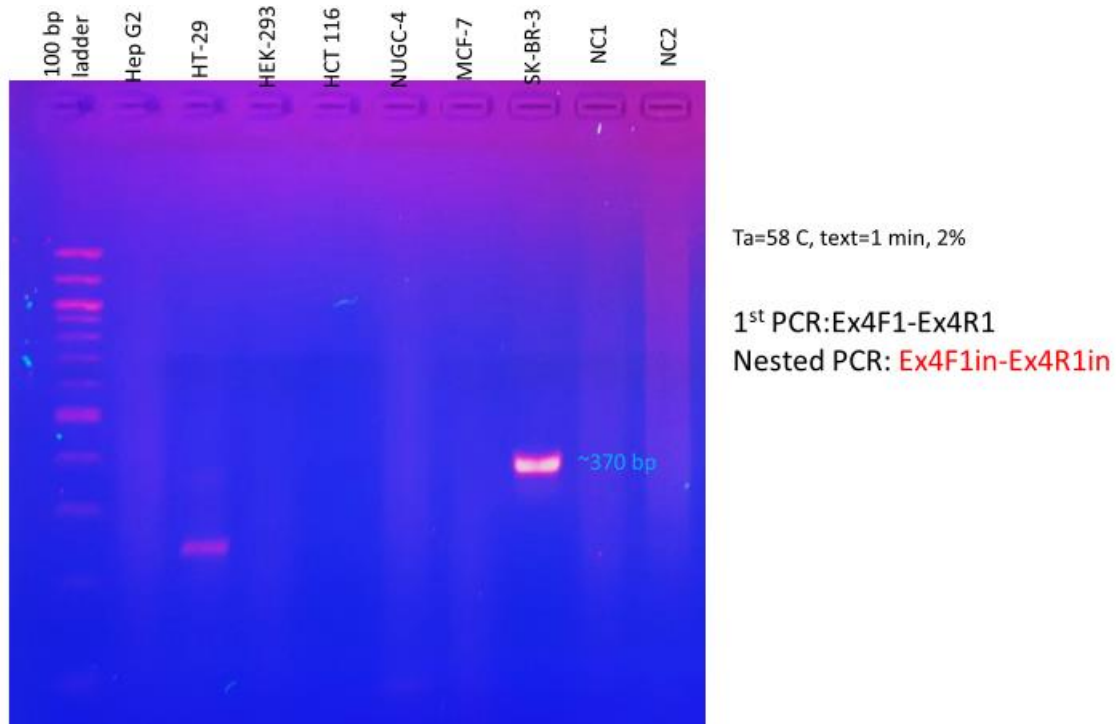
Εικόνα 17: Αποτέλεσμα των αντιδράσεων Semi-nested PCR με τα ζεύγη αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex6(a)F-BOK_Ex3R και BOK_Ex6(a)F-BOK_Ex2R πάνω στο υπόστρωμα της πρώτης συμβατικής αντίδρασης PCR που έγινε με τους αποκλιόντες εκκινητές BOK_Ex6(a)F-BOK_Ex5/4R



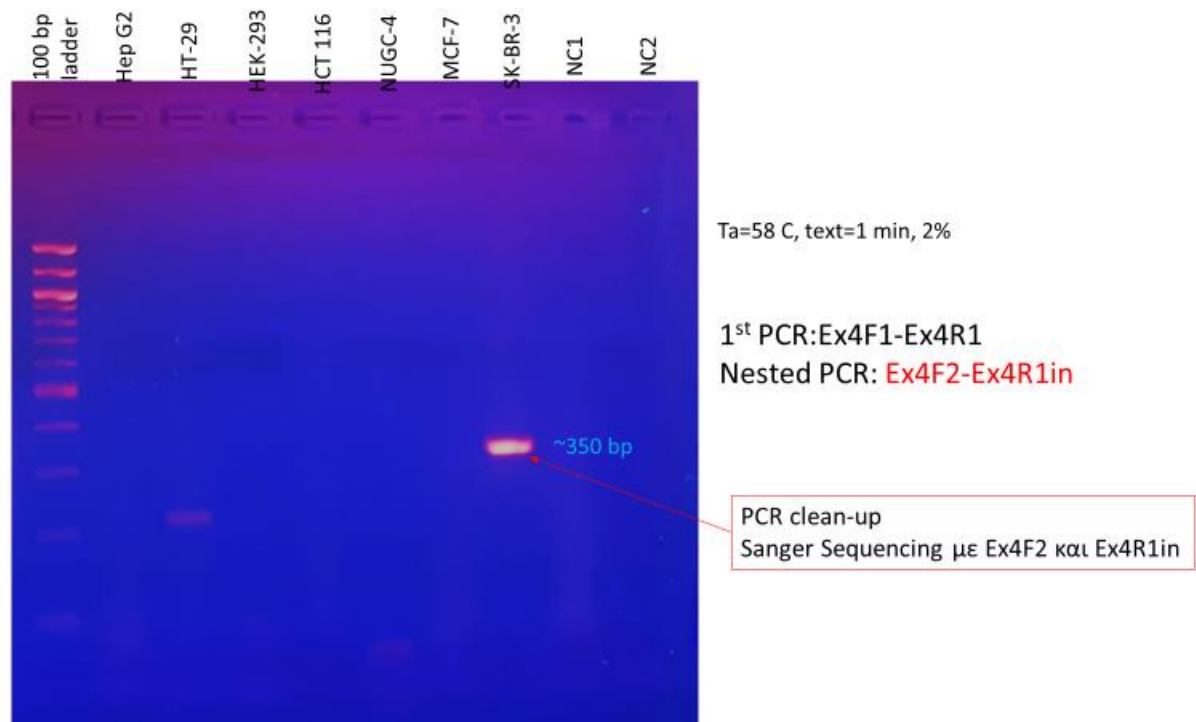
Στην παραπάνω **εικόνα 17** παρουσιάζεται το ηλεκτροφορητικό αποτέλεσμα των αντιδράσεων Semi-nested PCR με τα ζεύγη αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex6(a)F-BOK_Ex3R και BOK_Ex6(a)F-BOK_Ex2R πάνω στο υπόστρωμα της πρώτης συμβατικής αντίδρασης PCR που έγινε με τους αποκλιόντες εκκινητές BOK_Ex6(a)F-BOK_Ex5/4R. Παρά τη χρήση διαφορετικών ανάστροφων εκκινητών (reverse primers), λαμβάνεται σχεδόν το ίδιο πρότυπο. Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι παρατηρούμενες ζώνες κατά πάσα πιθανότητα αποτελούν παραπροϊόντα της επιμήκυνσης του πρόσθιου εκκινητή BOK_Ex6(a)F και είναι μη ειδικές.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα ηλεκτροφορητικά αποτελέσματα των αντιδράσεων Nested PCR 6a και 6b που πραγματοποιήθηκαν με τα ζεύγη αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex_4F1in-BOK_Ex_4R1in και BOK_Ex_4F2-BOK_Ex_4R1in αντίστοιχα και οδήγησαν στην ανακάλυψη του νέου κυκλικού μορίου RNA του γονιδίου *BOK*.

Εικόνα 18: Αποτέλεσμα της αντίδρασης Nested PCR με τα ζεύγη αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex_4F1in-BOK_Ex_4R1in πάνω στο υπόστρωμα της πρώτης συμβατικής αντίδρασης PCR που έγινε με τους αποκλίνοντες εκκινητές BOK_Ex_4F1-BOK_Ex_4R1



Εικόνα 19: Αποτέλεσμα της αντίδρασης Nested PCR με τα ζεύγη αποκλιόντων εκκινητών BOK_Ex_4F2-BOK_Ex_4R1in πάνω στο υπόστρωμα της πρώτης συμβατικής αντίδρασης PCR που έγινε με τους αποκλίνοντες εκκινητές BOK_Ex_4F1-BOK_Ex_4R1



Ο πρόσθιος εκκινητής BOK_Ex_4F1in βρίσκεται μόνο λίγες βάσεις ανοδικά του πρόσθιου εκκινητή BOK_Ex_4F2. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι πρόκειται για αποτελέσματα αντιδράσεων Nested PCR συνηγορούν στο ότι η έντονη μονή ζώνη που παρατηρείται σε κάθε πήκτωμα (περίπου ίση με 370 bp στο πρώτο gel και περίπου ίση με 350 bp στο δεύτερο gel) στα κύτταρα SK-BR-3 πρόκειται για ένα νέο μόριο circRNA με έντονη και ειδική έκφραση στην κυτταρική σειρά SK-BR-3.

5. Απομόνωση και καθαρισμός επιθυμητής ζώνης και προετοιμασία για αλληλούχιση Sanger

Η έντονη μονή ζώνη με μήκος περίπου 350 bp στα κύτταρα SK-BR-3 αποφασίστηκε να σταλεί για αλληλούχιση Sanger για να επιβεβαιωθεί η ανακάλυψη ενός νέου κυκλικού μορίου circRNA του γονιδίου BOK. Για το σκοπό αυτό η αντίδραση Nested-PCR με το ζεύγος εκκινητών BOK_Ex_4F2-BOK_Ex_4R1in και σε κύτταρα SK-BR-3 πραγματοποιήθηκε τέσσερις φορές και τα προϊόντα PCR της αντίδρασης απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν με τη διαδικασία του PCR clean-up. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της φθορισμομετρίας και το αντιδραστήριο Qubit και λαμβάνοντας υπόψιν τη δεκαδική αραιώση του δείγματος η συγκέντρωση του καθαρού PCR προϊόντος προσδιορίστηκε ίση με 125 ng/μL. Για αυτό στάλθηκε προς αλληλούχιση ποσότητα δείγματος ίση με 1 μL αραιωμένη με DEPC-νερό σε τελικό όγκο 10 μL και με τελική συγκέντρωση 12.5 ng/μL που συμφωνεί με τις προδιαγραφές της εταιρίας που πραγματοποίησε τις αλληλουχίσεις Sanger. Ακολούθησαν δύο αλληλουχίσεις Sanger, μία με τον πρόσθιο εκκινητή BOK_Ex_4F2 και μία με τον ανάστροφο εκκινητή BOK_Ex_4R1in και παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα της αλληλούχισης.

6. Αποτελέσματα αλληλούχισης Sanger

Μετά τη σύζευξη των αποτελεσμάτων αλληλούχισης και για τους δύο εκκινητές (για τον ανάστροφο εκκινητή BOK_Ex_4R1in λαμβάνεται πριν την επεξεργασία η ανάστροφη και συμπληρωματική αλληλουχία-reverse complement), και αφού επιβεβαιώθηκε με τη χρήση του αλγορίθμου BLASTn του NCBI ότι η αλληλουχία ανήκει στο ανθρώπινο γονίδιο BOK, πραγματοποιήθηκε η εύρεση της ακριβούς αλληλουχίας του με βάση την αλληλουχία του γονιδίου που είναι καταχωρημένη στην GenBank και υπάρχει και στο αρχείο αναφοράς που αναφέρθηκε στην ενότητα 1 των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα, αυτό βοήθησε στην εύρεση της σωστής βάσης σε σημεία που δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός της από την αυτοματοποιημένη αλληλούχιση και για τη συμπλήρωση του τμήματος που υπάρχει στο PCR προϊόν της πρώτης αντίδρασης (BOK_Ex_4F1-BOK_Ex_4R1), αλλά δεν ενισχύεται με τη δεύτερη αντίδραση της Nested-PCR (BOK_Ex_4F2-BOK_Ex_4R1in).

6.1. Αλληλουχία του νέου circRNA του γονιδίου BOK

>4-5-6-4

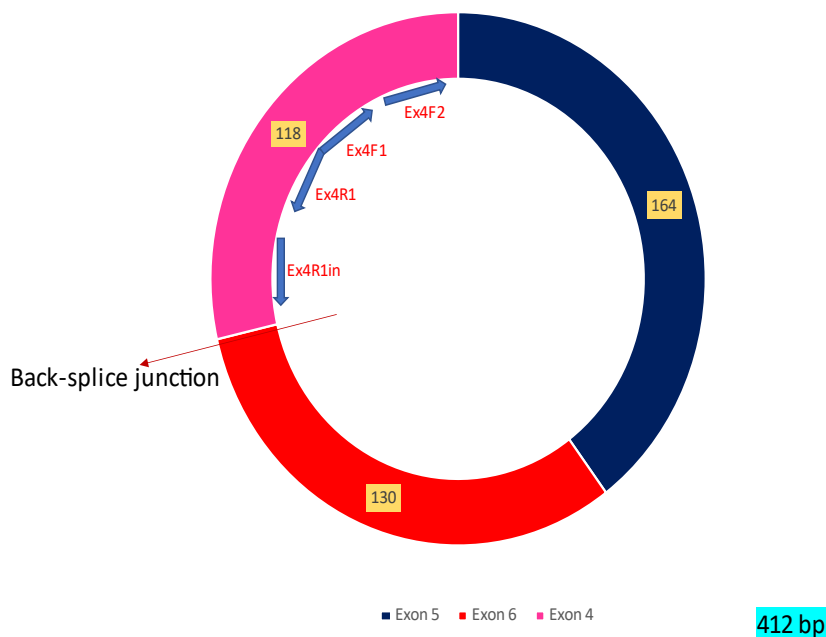
```
GTCTGAGCCTGTGGTGACCGATGCGTTCCTGGCCGTGGCTGGCCACATCTTCTCT  
GCAGGCATCACGTGGGGCAAGGTGGTGTCCCTGTATGCGGTGGCCGCGGGGCTG  
GCCGTGGACTGTGTGAGGCAGGCCAGCCTGCCATGGTCCACGCCCTCGTGGACT  
GCCTGGGGGAGTTCGTGCGCAAGACCCTGGCAACCTGGCTGCGGAGACGCGGCG  
GATGGACTGATGTCCTCAAGTGTGTGGTCAGCACAGACCCTGGCCTCCGCTCCCA  
CTGGCTGGTGGCTGCACTCTGCAGCTTCGGCCGCTTCCTGAAGGCTGCCTTCTTC  
GTGCTGCTGCCAGAGAGATGAGCTGGAGATGATCCGGCCAGCGTCTACCGCAA  
CGTGGCGCGTCAGCTGCACATCTCCCTGCA
```

Παραπάνω αναγράφεται η αλληλουχία του νέου circRNA του γονιδίου *BOK* και η εξωνιακή του σύσταση δηλώνεται με τον αντίστοιχο χρωματικό κώδικα. Με μαυροσκιασμένα γράμματα (bold) αναγράφονται οι 9 βάσεις που θα μπορούσαν να ανήκουν τόσο στο εξώνιο 6 όσο και στο εξώνιο 4.

6.2. Συμπεράσματα που εξάγονται από την αλληλουχία του circRNA του γονιδίου *BOK*

Τελικά, η ζώνη που απομονώθηκε αντιστοιχεί πράγματι σε ένα κυκλικό μετάγραφο circRNA του γονιδίου *BOK* συνολικού μήκους 412 bp. Αυτό πιστοποιείται από την ύπαρξη του σημείου οπισθοσυρραφής (back-splice junction) που δημιουργείται μεταξύ του εξωνίου 6 και 4. Οι 9 βάσεις που είναι έντονα σημειωμένες με bold γραφή στο σημείο οπισθοσυρραφής είναι κοινές τόσο στο εξώνιο 6 όσο και στο εξώνιο 4 και για αυτό δε μπορεί να διασαφηνιστεί σε ποιο εξώνιο πραγματικά ανήκουν. Επίσης απουσιάζει το μεγαλύτερο τμήμα του 3' άκρου του εξωνίου 6 και αυτό είναι ατελές (3'-truncated exon 6). Μεταξύ των εκκινητών BOK_Ex_4F1 και BOK_Ex_4R1 δεν υπάρχει κενό κάποιων βάσεων που δεν ενισχύθηκαν στην πρώτη αντίδραση PCR και ως αποτέλεσμα ο κύκλος είναι πλήρης. Μεταξύ των εκκινητών BOK_Ex4_F1-BOK_Ex_4F2 και BOK_Ex_4R1-BOK_Ex_4R1in υπάρχουν συνολικά και από τις δύο πλευρές 62 bp που δεν ενισχύονται στη Nested-PCR. Αυτές οι βάσεις συμπληρώθηκαν στην τελική αλληλουχία του μορίου με βάση την αλληλουχία του γονιδίου, όπως αυτή προκύπτει από τη βάση δεδομένων GenBank του NCBI.

Εικόνα 20: Σχηματική αναπαράσταση του νέου circRNA του γονιδίου *BOK*



Στην παραπάνω **εικόνα 20** παρουσιάζεται σχηματικά το νέο circRNA του γονιδίου *BOK* με τις εξωνιακές υποπεριοχές του να βρίσκονται σε κλίμακα μεγέθους και με βέλη να προσδιορίζονται τα σημεία πρόσδεσης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και το σημείο οπισθοσυρραφής (back-splice junction). Για λόγους ευκολίας σχεδιασμού της εικόνας θεωρείται ότι οι 9 κοινές βάσεις του εξωνίου 6 και 4 ανήκουν στο εξώνιο 6.

7. Πρόγνωση λειτουργίας με τη χρήση υπολογιστικών εργαλείων

Όπως αναλύθηκε στην αντίστοιχη ενότητα των Υλικών-Μεθόδων χρειάζεται κάθε φορά η εισαγωγή της αλληλουχίας του circRNA του γονιδίου *BOK* σε κάθε υπολογιστικό πρόγραμμα σε δύο μορφές: μία που ταυτίζεται με αυτήν που παρουσιάστηκε στα αποτελέσματα της αλληλούχισης Sanger και μία στην οποία οι τελευταίες 189 bp του μορίου (εξώνιο 6 και επακόλουθο τμήμα του εξωνίου 4) τοποθετούνται στην αρχή του μορίου για να σχηματιστεί η αλληλουχία-σύνδεσμος (junction) στο τμήμα του εξωνίου 4 που απουσιάζει στην πρώτη περίπτωση, αλλά υπάρχει φυσιολογικά στο κυκλικό αυτό μόριο. Έτσι:

Η μορφή 1 της αλληλουχίας είναι:

>4-5-6-4

```
GTCTGAGCCTGTGGTGACCGATGCGTTCCTGGCCGTGGCTGGCCACATCTTCTCT  
GCAGGCATCACGTGGGGCAAGGTGGTGTCCCTGTATGCGGTGGCCGCGGGGCTG  
GCCGTGGACTGTGTGAGGCAGGCCAGCCTGCCATGGTCCACGCCCTCGTGGACT  
GCCTGGGGGAGTTCGTGCGCAAGACCCTGGCAACCTGGCTGCGGAGACGCGGCG  
GATGGACTGATGTCCTCAAGTGTGTGGTCAGCACAGACCCTGGCCTCCGCTCCCA  
CTGGCTGGTGGCTGCACTCTGCAGCTTCGGCCGCTTCCTGAAGGCTGCCTTCTTC  
GTGCTGCTGCCAGAGAGATGAGCTGGAGATGATCCGGCCAGCGTCTACCGCAA  
CGTGGCGCGTCAGCTGCACATCTCCCTGCA
```

Η μορφή 2 της αλληλουχίας είναι:

>6-4-5

```
ACTGATGTCCTCAAGTGTGTGGTCAGCACAGACCCTGGCCTCCGCTCCCCTGGC  
TGGTGGCTGCACTCTGCAGCTTCGGCCGCTTCCTGAAGGCTGCCTTCTTCGTGCTG  
CTGCCAGAGAGATGAGCTGGAGATGATCCGGCCAGCGTCTACCGCAACGTGG  
CGCGTCAGCTGCACATCTCCCTGCAGTCTGAGCCTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT  
GGCCGTGGCTGGCCACATCTTCTCTGCAGGCATCACGTGGGGCAAGGTGGTGTCC  
CTGTATGCGGTGGCCGCGGGGCTGGCCGTGGACTGTGTGAGGCAGGCCAGCCT  
GCCATGGTCCACGCCCTCGTGGACTGCCTGGGGGAGTTCGTGCGCAAGACCCTG  
GCAACCTGGCTGCGGAGACGCGGCGGATGG
```

Παρακάτω παρουσιάζονται και αναλύονται τα αποτελέσματα της χρήσης καθενός υπολογιστικού εργαλείου:

7.1. Αποτελέσματα πρόβλεψης της ικανότητας πρόσδεσης μορίων microRNAs με τη βάση δεδομένων miRDB:

Μορφή 1 της αλληλουχίας:

There are 13 predicted miRNAs targeting the submitted 412 nt long mRNA sequence.

[Return to Custom Prediction](#)

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol
Details	1	70	hsa-miR-6894-3p	submission
Details	2	68	hsa-miR-3944-5p	submission
Details	3	68	hsa-miR-5004-5p	submission
Details	4	67	hsa-miR-1224-5p	submission
Details	5	63	hsa-miR-4441	submission
Details	6	62	hsa-miR-1199-3p	submission
Details	7	58	hsa-miR-4758-3p	submission
Details	8	56	hsa-miR-2467-3p	submission
Details	9	54	hsa-miR-455-3p	submission
Details	10	52	hsa-miR-4267	submission
Details	11	52	hsa-miR-6817-3p	submission
Details	12	50	hsa-miR-6754-5p	submission
Details	13	50	hsa-miR-4270	submission

Μορφή 2 της αλληλουχίας:

There are 9 predicted miRNAs targeting the submitted 412 nt long mRNA sequence.

[Return to Custom Prediction](#)

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol
Details	1	69	hsa-miR-6894-3p	submission
Details	2	67	hsa-miR-3944-5p	submission
Details	3	62	hsa-miR-1199-3p	submission
Details	4	59	hsa-miR-4441	submission
Details	5	57	hsa-miR-4758-3p	submission
Details	6	55	hsa-miR-2467-3p	submission
Details	7	54	hsa-miR-24-3p	submission
Details	8	51	hsa-miR-6817-3p	submission
Details	9	51	hsa-miR-4267	submission

Το υπολογιστικό αυτό πρόγραμμα κατατάσσει κατά φθίνοντα σειρά πιθανά ανθρώπινα μόρια microRNAs που προσδένονται στην αλληλουχία στόχο που εισάχθηκε με βάση ένα σκορ πρόσδεσης που έχει άριστα το 100. Το σκορ πρόσδεσης υπολογίζεται με βάση τον αριθμό των θέσεων πρόσδεσης και το ποσοστό συμπληρωματικότητας του εκάστοτε μορίου microRNA με την αλληλουχία στόχο. Ειδική αξία έχει η «αλληλουχία σπόρος» (seed region) που βρίσκεται συνήθως 2-7 βάσεις από το 5' άκρο του microRNA, έχει μήκος περίπου 8 νουκλεοτίδια και πρέπει να είναι πλήρως συμπληρωματική με την αλληλουχία στόχο. Για κάθε

μόριο microRNA μπορεί κανείς να δει την αλληλουχία του, επιπλέον προβλεπόμενους και επιβεβαιωμένους στόχους mRNAs, το πρόδρομο μόριο του microRNA και βιβλιογραφία ενδεικτικών ερευνών που το περιλαμβάνουν. Τα σκορ είναι σχετικά μέτρια και όλα τα πιθανά microRNAs στόχοι έχουν μία ή δύο θέσεις πρόσδεσης με τη seed region τους, ενώ μεταξύ των δύο μορφών της αλληλουχίας υπάρχουν μικρές διαφοροποιήσεις. Συμπερασματικά, αυτό το μόριο circRNA, κατά πάσα πιθανότητα, δεν αποτελεί σφουγγάρι για την ειδική και αποδοτική πρόσδεση κάποιου μορίου microRNA.

7.2. Αποτελέσματα πρόβλεψης της ύπαρξης εσωτερικών θέσεων πρόσδεσης του ριβοσώματος (IRES) με το υπολογιστικό πρόγραμμα IRESpy

Μορφή 1 της αλληλουχίας:

IRESpy--Prediction of IRES by XGBoost

The screenshot shows the IRESpy web interface. On the left, there is a file upload section with a 'Browse...' button and a file named 'seq1.fa'. Below it, the 'Prediction P cut-off value' is set to 0.5. The 'Input Seq Display' section has 'Head' selected. The main area shows a table with one entry:

Id	Oligo_name	Prob_IRES	Pred_label
1	4-5-6-4	0.0701246485114098	potential not IRES

At the bottom, it says 'Showing 1 to 1 of 1 entries' and has 'Previous' and 'Next' buttons.

Μορφή 2 της αλληλουχίας:

IRESpy--Prediction of IRES by XGBoost

The screenshot shows the IRESpy web interface. On the left, there is a file upload section with a 'Browse...' button and a file named 'seq2.fa'. Below it, the 'Prediction P cut-off value' is set to 0.5. The 'Input Seq Display' section has 'Head' selected. The main area shows a table with one entry:

Id	Oligo_name	Prob_IRES	Pred_label
1	6-4-5	0.0717252045869827	potential not IRES

At the bottom, it says 'Showing 1 to 1 of 1 entries' and has 'Previous' and 'Next' buttons.

Το αποτέλεσμα που προκύπτει και για τις δύο μορφές της αλληλουχίας είναι ότι δεν εντοπίζεται κάποια εσωτερική θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος (IRES), άρα το συγκεκριμένο μόριο circRNA πιθανόν δεν μεταφράζεται και δεν παράγει κάποια πρωτεϊνική ισομορφή.

7.3. Αποτελέσματα της αναζήτησης πιθανών ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (Open Reading Frames, ORFs) με τη χρήση του υπολογιστικού αλγορίθμου ORFfinder του NCBI

Μορφή 1 της αλληλουχίας:

ORFfinder PubMed Search

COVID-19 Information
Public health information (CDC) | Research information (NIH) | SARS-CoV-2 data (NCBI) | Prevention and treatment information (HHS) | Español

Open Reading Frame Viewer Help

Sequence
ORFs found: 4 Genetic code: 1 Start codon: 'ATG' only

ORFfinder_9.6.211114991

1: 1..412 (412 nt)

ORF1 (68 aa) Display ORF as... Mark

```
>1c1|ORF1
INHALVDCLLGEFVRKTLATNLRRRGGWTDVLCVSTDPGLRSHMLVAAL
CSGGRFLKAFFVLLPER
```

Mark subset... Marked: 0 Download marked set as Protein FASTA

Label	Strand	Frame	Start	Stop	Length (nt aa)
ORF1	+	2	143	349	207 68
ORF4	-	2	144	>1	144 47
ORF2	+	3	21	125	105 34
ORF3	+	3	228	314	87 28

Six-frame translation...

Μορφή 2 της αλληλουχίας:

ORFfinder PubMed Search

COVID-19 Information
Public health information (CDC) | Research information (NIH) | SARS-CoV-2 data (NCBI) | Prevention and treatment information (HHS) | Español

Open Reading Frame Viewer Help

Sequence
ORFs found: 4 Genetic code: 1 Start codon: 'ATG' only

1: 1..412 (412 nt)

ORF2 (92 aa) Display ORF as... Mark

```
>1c11ORF2
MIRPSVYRINVARQLHISLQSEPVVTDFAFLAVAGHIFSAGITNGKVVSLYA
VAAGLAVDCVRQAQPA'NVHALVDCLGEFVRKTLATNLRRGGN
```

Mark subset... Marked: 0 Download marked set as Protein FASTA

Label	Strand	Frame	Start	Stop	Length (nt aa)
ORF2	+	2	134	>412	279 92
ORF4	-	2	333	169	165 54
ORF3	+	3	210	314	105 34
ORF1	+	2	5	91	87 28

Six-frame translation...

Λαμβάνονται υπόψιν μόνο τα αποτελέσματα που αναφέρονται στη νοηματική αλυσίδα (sense-positive strand), καθώς πρόκειται για την αναζήτηση πιθανών ORFs σε μια αλληλουχία RNA. Έτσι, δε μας απασχολεί η αντίθετη παρανοηματική αλυσίδα (antisense-negative strand). Με βάση την πρώτη μορφή της αλληλουχίας προκύπτουν τρία πιθανά ORFs, εκ των οποίων τα δύο είναι πολύ μικρά και μόνο το ένα θα μπορούσε ενδεχομένως να κωδικοποιεί μια λειτουργική πρωτεϊνική ισομορφή του *BOK*. Αναζήτηση με τον αλγόριθμο BLAST του ORF1 δείχνει ότι η κωδικοποιούμενη πρωτεϊνική αλληλουχία αποτελεί μέρος της ισομορφής X2 της ανθρώπινης πρωτεΐνης BOK. Με βάση τη δεύτερη μορφή της αλληλουχίας προκύπτουν τρία πιθανά ORFs, εκ των οποίων τα δύο είναι πολύ μικρά και το τρίτο δεν έχει κωδικόνιο λήξης εντός της γραμμικής αλληλουχίας.

7.4. Πρόγνωση της πρόσδεσης πρωτεϊνών (RNA binding proteins, RBPs) με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος beRBP

Μορφή 1 της αλληλουχίας:

Detail:

seqID	RBP	PWM	motifLen	bindingPos	Score
4-5-6-4	A2BP1	M159_0.6	7	55	0.39
4-5-6-4	A2BP1	M298_0.6	6	55	0.37
4-5-6-4	BRUNOL6	M178_0.6	7	239	0.428
4-5-6-4	CELF3	M178_0.6	7	239	0.428
4-5-6-4	CIRBP	M048_0.6	7	208	0.376
4-5-6-4	CNOT4	M147_0.6	7	250	0.358
4-5-6-4	CSDA	M260_0.6	13	42	0.372
4-5-6-4	EIF2S1	M231_0.6	7	135	0.452
4-5-6-4	EIF4B	M291_0.6	7	284	0.39
4-5-6-4	ESRP1	M141_0.6	7	168	0.392
4-5-6-4	ESRP2	M141_0.6	7	168	0.392
4-5-6-4	FXR2	M020_0.6	7	209	0.406
4-5-6-4	LIN28A	M153_0.6	7	214	0.364
4-5-6-4	LIN28B	M153_0.6	7	214	0.364
4-5-6-4	PPRC1	M044_0.6	7	385	0.53
4-5-6-4	RBFOX2	M017_0.6	7	55	0.368
4-5-6-4	RBFOX2	M118_0.6	8	54	0.364
4-5-6-4	RBFOX2	M159_0.6	7	55	0.39
4-5-6-4	RBFOX2	M297_0.6	5	56	0.416
4-5-6-4	RBFOX2	M298_0.6	6	55	0.37
4-5-6-4	RBFOX3	M017_0.6	7	55	0.368
4-5-6-4	RBFOX3	M118_0.6	8	54	0.364
4-5-6-4	RBFOX3	M159_0.6	7	55	0.39
4-5-6-4	RBFOX3	M297_0.6	5	56	0.416
4-5-6-4	RBFOX3	M298_0.6	6	55	0.37
4-5-6-4	RBM3	M048_0.6	7	208	0.376
4-5-6-4	RBM38	M049_0.6	7	238	0.37

4-5-6-4	RBM38	M238_0.6	7	238	0.43
4-5-6-4	RBM38	M240_0.6	8	238	0.374
4-5-6-4	RBM4	M050_0.6	7	99	0.476
4-5-6-4	RBM4	M109_0.6	7	99	0.442
4-5-6-4	RBM4B	M050_0.6	7	99	0.476
4-5-6-4	RBM4B	M109_0.6	7	99	0.442
4-5-6-4	RBM8A	M054_0.6	7	179	0.538
4-5-6-4	RBMX	M344_0.6	4	133	0.388
4-5-6-4	RBMXL1	M344_0.6	4	133	0.388
4-5-6-4	RBMXL2	M344_0.6	4	133	0.388
4-5-6-4	RBMXL3	M344_0.6	4	133	0.388
4-5-6-4	RBMY1B	M344_0.6	4	133	0.388
4-5-6-4	RBMY1D	M344_0.6	4	133	0.388
4-5-6-4	RBMY1E	M344_0.6	4	133	0.388
4-5-6-4	RBMY1F	M344_0.6	4	133	0.388
4-5-6-4	RBMY1J	M344_0.6	4	133	0.388
4-5-6-4	SAMD4A	M061_0.6	7	38	0.538
4-5-6-4	SAMD4B	M061_0.6	7	38	0.538
4-5-6-4	SNRPA	M069_0.6	7	285	0.384
4-5-6-4	SNRPA	M346_0.6	10	86	0.412
4-5-6-4	SNRPB2	M069_0.6	7	285	0.384
4-5-6-4	SNRPB2	M346_0.6	10	86	0.412
4-5-6-4	SRSF1	M273_0.6	7	150	0.394
4-5-6-4	SRSF4	M334_0.6	17	192	0.45
4-5-6-4	SRSF6	M334_0.6	17	192	0.45
4-5-6-4	SRSF7	M071_0.6	8	146	0.406
4-5-6-4	YTHDC1	M354_0.6	6	161	0.374
4-5-6-4	ZC3H10	M083_0.6	7	367	0.412

Μορφή 2 της αλληλουχίας:

Detail:

seqID	RBP	PWM	motifLen	bindingPos	Score
6-4-5	A2BP1	M159_0.6	7	244	0.396
6-4-5	BRUNOL6	M178_0.6	7	199	0.422
6-4-5	CELF3	M178_0.6	7	199	0.422
6-4-5	CSDA	M260_0.6	13	231	0.366
6-4-5	EIF2S1	M231_0.6	7	324	0.422
6-4-5	EIF4B	M291_0.6	7	61	0.408
6-4-5	ESRP1	M141_0.6	7	357	0.41
6-4-5	ESRP2	M141_0.6	7	357	0.41
6-4-5	PPRC1	M044_0.6	7	162	0.516
6-4-5	RBFOX2	M017_0.6	7	244	0.384
6-4-5	RBFOX2	M118_0.6	8	243	0.382
6-4-5	RBFOX2	M159_0.6	7	244	0.396
6-4-5	RBFOX2	M297_0.6	5	245	0.408
6-4-5	RBFOX3	M017_0.6	7	244	0.384
6-4-5	RBFOX3	M118_0.6	8	243	0.382
6-4-5	RBFOX3	M159_0.6	7	244	0.396
6-4-5	RBFOX3	M297_0.6	5	245	0.408
6-4-5	RBM4	M050_0.6	7	288	0.44
6-4-5	RBM4	M109_0.6	7	288	0.452
6-4-5	RBM45	M209_0.6	7	373	0.362
6-4-5	RBM4B	M050_0.6	7	288	0.44
6-4-5	RBM4B	M109_0.6	7	288	0.452
6-4-5	RBM8A	M054_0.6	7	368	0.498
6-4-5	RBMX	M344_0.6	4	115	0.394
6-4-5	RBMXL1	M344_0.6	4	115	0.394
6-4-5	RBMXL2	M344_0.6	4	115	0.394
6-4-5	RBMXL3	M344_0.6	4	115	0.394

6-4-5	RBMX	M344_0.6	4	115	0.394
6-4-5	RBMXL1	M344_0.6	4	115	0.394
6-4-5	RBMXL2	M344_0.6	4	115	0.394
6-4-5	RBMXL3	M344_0.6	4	115	0.394
6-4-5	RBMY1B	M344_0.6	4	115	0.394
6-4-5	RBMY1D	M344_0.6	4	115	0.394
6-4-5	RBMY1E	M344_0.6	4	115	0.394
6-4-5	RBMY1F	M344_0.6	4	115	0.394
6-4-5	RBMY1J	M344_0.6	4	115	0.394
6-4-5	SAMD4A	M061_0.6	7	227	0.538
6-4-5	SAMD4B	M061_0.6	7	227	0.538
6-4-5	SNRPA	M346_0.6	10	275	0.392
6-4-5	SNRPB2	M346_0.6	10	275	0.392
6-4-5	SRSF4	M334_0.6	17	381	0.39
6-4-5	SRSF6	M334_0.6	17	381	0.39
6-4-5	SRSF7	M071_0.6	8	335	0.372
6-4-5	YTHDC1	M354_0.6	6	350	0.358
6-4-5	ZC3H10	M083_0.6	7	144	0.412

Στα αποτελέσματα για κάθε μία πρωτεΐνη RBP που μπορεί να προσδένεται σε αλληλουχίες RNA παρουσιάζεται το μοτίβο πρόσδεσης, το μήκος του, η θέση πρόσδεσης πάνω στο RNA και ένα συγκεκριμένο σκορ πρόσδεσης με άριστα το 1. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, οι περισσότερες RBPs έχουν μία ή δύο θέσεις πρόσδεσης με μέτρια σκορ με εξαίρεση τις πρωτεΐνες RBFOX2 και RBFOX3 που ρυθμίζουν την εναλλακτική συρραφή. Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες που παρουσιάζονται συμμετέχουν στη διαδικασία και ρύθμιση της συρραφής ή αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες. Αυτό είναι αναμενόμενο με βάση τις λειτουργίες των circRNAs που συζητήθηκαν στην εισαγωγή. Μεταξύ των δύο μορφών της αλληλουχίας παρατηρούνται, επίσης, κάποιες μικρές διαφοροποιήσεις. Συμπερασματικά, είναι πιθανό ορισμένες από τις πρωτεΐνες που παρουσιάζονται να προσδένονται πραγματικά στο circRNA που ανακαλύφθηκε. Σε κάθε περίπτωση, όμως, χρειάζεται πειραματική επαλήθευση των προβλέψεων.

Συμπεράσματα-Συζήτηση

Στην παρούσα διπλωματική εργασία απομονώθηκε ολικό RNA από μία φυσιολογική και έξι καρκινικές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Αφού ελέγχθηκε η ποιότητά του και η συγκέντρωσή του, ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή με τυχαία εξαμερή εκκινητών για την ενίσχυση όλων των πιθανών circRNAs του γονιδίου BOK που πιθανώς υπάρχουν και η επιτυχία των πειραμάτων απομόνωσης RNA και αντίστροφης μεταγραφής ελέγχθηκαν μέσω συμβατικής PCR για την ενίσχυση του γονιδίου αναφοράς GAPDH. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν αρχικά μια σειρά από συμβατικές, επάλληλες και ημι-επάλληλες αντιδράσεις PCR με τη χρήση συγκλίνοντων εκκινητών (convergent primers) για την ενίσχυση γραμμικών μορίων mRNA του γονιδίου BOK. Από αυτά τα πειράματα διαπιστώθηκε ποια μετάγραφα που υπάρχουν καταχωρημένα στη βάση δεδομένων GenBank εκφράζονται με βεβαιότητα στις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν και επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη των μεταγράφων που προβλέπονται με υπολογιστικές μεθόδους. Παράλληλα, επιβεβαιώθηκε η σχετικά χαμηλή και μη σταθερή έκφραση του γονιδίου BOK, γεγονός που καθιστά κάθε φορά απαραίτητη τη διενέργεια αντιδράσεων Nested PCR ή Semi-nested PCR για την αύξηση της ειδικότητας και της απόδοσης της αντίδρασης συμβατικής PCR. Κυρίως, όμως, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη των εξωνίων 4 και 6 σε όλα τα μετάγραφα και η γενική τους έκφραση και για αυτό επιλέχθηκαν αυτά τα εξώνια για το σχεδιασμό αποκλινόντων εκκινητών (divergent primers) για την ανακάλυψη πιθανών μορίων circRNA. Επιπλέον, είναι πολύ πιθανό αρκετές μη αναμενόμενες ζώνες που παρατηρούνται να ανήκουν σε άλλα εναλλακτικά μετάγραφα mRNAs ή ncRNAs που δεν έχουν ανακαλυφθεί πειραματικά ακόμα. Αυτή η θέση ενισχύεται από την αυξημένη ειδικότητα της αντίδρασης Nested PCR και οριστική επαλήθευση ή διάψευση θα δινόταν με κόψιμο των ζωνών από το πήκτωμα και αλληλούχισή τους με τη μέθοδο Sanger. Τέλος, όπως διαπιστώθηκε και στη συνέχεια με τις αντιδράσεις Nested PCR και Semi-nested PCR για την εύρεση νέων μορίων circRNAs, τα γραμμικά μετάγραφα ενός γονιδίου γενικά εκφράζονται πιο έντονα από τα αντίστοιχα κυκλικά.

Μετά, λοιπόν, από μια σειρά πειραμάτων με αποκλινόντες εκκινητές βρέθηκε και ταυτοποιήθηκε με αλληλούχιση Sanger ένα νέο circRNA του γονιδίου BOK στην κυτταρική σειρά SK-BR-3 (καρκίνος του μαστού) μήκους συνολικά 412 bp που περιέχει τα εξώνια 4, 5 και 6 και με σημείο οπισθοσυρραφής (back-splice junction) ανάμεσα στο εξώνιο 6 και 4. Το μεγαλύτερο τμήμα του εξωνίου 6 που είναι ο δότης συρραφής με το 3' άκρο του βρέθηκε να απουσιάζει (truncated) και στο σημείο οπισθοσυρραφής (back-splice junction) 9 βάσεις θα μπορούσαν να ανήκουν είτε στο εξώνιο 6 είτε στο εξώνιο 4 χωρίς να μπορούμε να τις διακρίνουμε. Αυτές είναι παρατηρήσεις που έχουν διαπιστωθεί και με την ταυτοποίηση άλλων circRNAs από την ερευνητική μας ομάδα και ίσως υποδηλώνουν έναν μηχανισμό βιογένεσης και τις συνθήκες που πρέπει να επικρατούν για την παραγωγή ενός circRNA. Τέλος, έγινε προσπάθεια πρόγνωσης των πιθανών λειτουργιών του νέου αυτού circRNA με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων και διαπιστώθηκε ότι ίσως αποτελεί ένα μόριο πρόσδεσης πρωτεϊνών που προσδέονται στο RNA (RBPs). Σε κάθε περίπτωση τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν προβλέψεις και χρειάζεται πειραματική διερεύνηση των πιθανών λειτουργιών του.

Το νέο αυτό circRNA βρέθηκε μόνο στα κύτταρα SK-BR-3 και αυτή η ειδικότητα συχνά συντελεί γνώρισμα ενός βιοδείκτη. Τα κύτταρα SK-BR-3 αποτελούν τον βασικό κυτταρικό τύπο στις μελέτες που εξετάζουν το ογκογονίδιο *HER2/neu* (*ERBB2*) στον καρκίνο

του μαστού [108]. Για αυτό το λόγο θα ήταν πολύ χρήσιμη η μελέτη της έκφρασή του σε πρώτη φάση με πειράματα Real-Time PCR και σε δεύτερη φάση σε ανθρώπινα βιολογικά δείγματα προερχόμενα από καρκίνο του μαστού. Η βιοστατιστική ανάλυση ίσως αποδείκνυε την εύρεση ενός νέου βιοδείκτη πρόγνωσης της επιβίωσης, της ανταπόκρισης στη θεραπεία ή της έγκαιρης διάγνωσης.

Οι ρόλοι της πρωτεΐνης BOK που αναλύθηκαν διεξοδικά στην εισαγωγή περιλαμβάνουν την έναρξη της απόπτωσης σε συνθήκες καταπόνησης του ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress) και συσσώρευσης μη ορθά πτυχωμένων πρωτεϊνών (UPR) με την πρόκληση πόρων διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης είτε άμεσα από αυτήν είτε έμμεσα με την ανοδική ενεργοποίηση των BAX/BAK. Παράλληλα, διαθέτει ρόλους που δε σχετίζονται με την απόπτωση, όπως η διατήρηση της μορφολογίας των μιτοχονδρίων και η ρύθμιση του μεταβολισμού πυριμιδινών μέσω της ενεργοποίησης του ενζύμου UMPS [35,51]. Η περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου αυτής της πρωτεΐνης και της ρύθμισης της λειτουργίας της κρίνεται απαραίτητη, καθώς πρόκειται για ένα σχετικά παραμελημένο μέλος της υπερικογένειας BCL2 με ασυμφωνία ορισμένων ερευνών σχετικά με τη δράση του.

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα της εισαγωγής, η γονιδιωματική περιοχή όπου εδράζεται το BOK λείπει συχνά από πολλές μορφές καρκίνου [34], ενώ τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης αυτού του γονιδίου σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) και η έκφρασή του είναι χαμηλότερη σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου (Colorectal cancer) σε σχέση με υγιή άτομα και αυτό σχετίζεται με το ρόλο της BOK στην ενεργοποίηση του ενζύμου UMPS και τη ρύθμιση των επιπέδων της 5-FU [51,55,56,58]. Σε κύτταρα καρκίνου του μαστού διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα του BOK mRNA ρυθμίζονται αρνητικά από την πρόσδεση στην 3' UTR του miRNA miR-296-5p και ότι τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του BOK σχετίζονται με δυσμενέστερη πρόγνωση για τους ασθενείς με καρκίνο του μαστού [109].

Σε ό,τι αφορά τα circRNAs που σχετίζονται με το καρκίνο του μαστού και όπως αναλύθηκε στην εισαγωγή, το κυκλικό RNA FECR1 του γονιδίου *FLII* στρατολογεί στον υποκινητή του θυγατρικού γονιδίου την απομεθυλάση TET1 με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του *FLII*. Παράλληλα, δρα και in trans προσδεδεμένο στον υποκινητή της μεθυλοτρανσφεράσης *DNMT1* και μειώνοντας τα επίπεδα μεταγραφής της με έναν άγνωστο έως τώρα μηχανισμό. Ως αποτέλεσμα, το FECR1 μπορεί να αυξήσει τη μεταστατική ικανότητα κυττάρων καρκίνου του μαστού [99]. Επιπλέον, το circ-ABCB10 του γονιδίου *ABCB10* βρέθηκε να υπερεκφράζεται και να συμβάλλει στην ανάπτυξη κυττάρων καρκίνου του μαστού με την πρόσδεση του miRNA miR-1271-5p [110]. Σε μια ακόμα ενδιαφέρουσα έρευνα, το circFOXO3 βρέθηκε να υποεκφράζεται σε ιστούς καρκίνου του μαστού σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς, αλλά τα επίπεδα του στα καρκινικά κύτταρα να αυξάνονται και να προάγουν την απόπτωση υπό την επίδραση αποπτωτικών ερεθισμάτων. Αυτό συνέβη μέσω της πρόσδεσης στο circFOXO3 της p53 και της MDM2, με αποτέλεσμα την ουβικιτινίωση της p53 από την MDM2, αλλά την αποτροπή με αυτόν τον τρόπο της ουβικιτινίωσης της FOXO3 από την MDM2, καθώς το circFOXO3 δε βρέθηκε να αλληλεπιδρά άμεσα με την FOXO3 που αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της προ-αποπτωτικής BH3-only πρωτεΐνης PUMA [111].

Ύστερα από τη βιβλιογραφική αναζήτηση που πραγματοποιήθηκε δε βρέθηκε κάποια δημοσίευση που να αναφέρεται στο ρόλο ή την έκφραση κάποιου circRNA του γονιδίου BOK. Μόνο στην κεντρική βάση δεδομένων circBase ύστερα από αναζήτηση για το ανθρώπινο γονίδιο BOK βρέθηκαν καταχωρημένα δύο μετάγραφα πολύ μεγάλου μήκους που έχουν προκύψει από περιγραφή (annotation) δεδομένων αλληλούχισης RNA νέας γενιάς (RNAseq) από τους Salzman και συνεργάτες. Τα μετάγραφα αυτά είναι τα: hsa_circ_0059100 και hsa_circ_0059101 και δεν υπάρχει κάποια επιπρόσθετη πληροφορία για το ρόλο τους [112]. Επομένως, το circRNA που ταυτοποιήθηκε αποτελεί ένα από τα πρώτα κυκλικά μετάγραφα του γονιδίου BOK που ανακαλύπτονται. Σε αυτό το πλαίσιο, κρίνεται απαραίτητη η ανακάλυψη και των υπόλοιπων πιθανών κυκλικών μεταγράφων του γονιδίου και η περεταίρω έρευνα για τη διερεύνηση του ρόλου τους και των επιπέδων έκφρασής τους.

Τη μελέτη αυτών των μορίων δυσχεραίνουν ορισμένοι παράγοντες, οι οποίοι πρέπει να ξεπεραστούν για την πρόοδο αυτού του ερευνητικού πεδίου. Πρώτα απ' όλα, απουσιάζει ένα κοινό σύστημα ονοματολογίας που δυσχεραίνει την ταυτοποίηση circRNAs που πραγματεύονται διάφορες μελέτες αναφερόμενες στο ίδιο μόριο με άλλη ονομασία. Μία λύση θα ήταν η καθιέρωση ενός χαρακτηριστικού circRNA ID, όπως δηλαδή παρουσιάζονται τα μόρια στη βάση δεδομένων circBase, με το πρόθεμα «circ-» ακολουθούμενο από ένα μοναδικό επταψήφιο κωδικό και με παράλληλο προσδιορισμό του γονιδίου προέλευσης. Υπάρχουν πολυάριθμες βάσεις δεδομένων που δίνουν πληροφορίες σχετικά με την αλληλουχία, την έκφραση, την τοπολογία και τις λειτουργίες των circRNAs. Απουσιάζει όμως μία πρόσφατα ανανεωμένη βάση δεδομένων που θα έχει συγκεντρωμένες όλες αυτές τις πληροφορίες και θα είναι σημείο αναφοράς για τα circRNAs όλων των οργανισμών. Ακόμα και η πιο θεμελιώδης βάση δεδομένων για τα circRNAs, η circBase, δεν είναι πρόσφατα ανανεωμένη [66,113]. Σε ό,τι αφορά τις πειραματικές προσεγγίσεις, η ανίχνευση των circRNAs γίνεται κυρίως μέσω της ανάλυσης δεδομένων αλληλούχισης RNAseq (NGS). Το μειονέκτημα είναι ότι κατά την προετοιμασία της βιβλιοθήκης ενός πειράματος RNAseq, γίνεται συνήθως εμπλουτισμός των μεταγράφων με πολύ-A ουρά (poly-A enrichment) και τα περισσότερα circRNAs δε διαθέτουν πολύ-A ουρά. Αντίθετα, προτείνεται κατά την προετοιμασία της βιβλιοθήκης να γίνεται χρήση της RNase R για την ενίσχυση των circRNAs, καθώς αυτό το ένζυμο διασπά τα γραμμικά, άλλα όχι τα κυκλικά RNA. Ίσως το μεγαλύτερο πρόβλημα στην ανίχνευση και μελέτη των circRNAs να είναι η επικάλυψη του μεγαλύτερου μέρους της αλληλουχίας τους με τα αντίστοιχα γραμμικά mRNAs με εξαίρεση το σημείο οπισθοσυρραφής. Για αυτό οι περισσότερες μελέτες που χρησιμοποιούν εκκινητές και ιχνηθέτες για τη μελέτη των circRNAs στοχεύουν το μοναδικό σημείο οπισθοσυρραφής. Λύση στο πρόβλημα αυτό θα μπορούσε να δώσει η αλληλούχιση τρίτης γενιάς (3rd generation sequencing, Oxford Nanopore Sequencing) που επιτρέπει την αλληλούχιση μεγάλων τμημάτων RNA άμεσα, χωρίς την πραγματοποίηση αντίδρασης PCR και την κατασκευή βιβλιοθήκης, για την ανάγνωση ολόκληρου του back-splice junction. Για τη μελέτη της έκφρασης ενός συγκεκριμένου circRNA η τεχνική που χρησιμοποιείται πιο συχνά είναι η RT-qPCR, αλλά χρειάζεται προσοχή στην επιλογή κατάλληλου μορίου αναφοράς. Τη μελέτη αυτών των μορίων δυσχεραίνει επίσης η ύπαρξη κοινού υποκινητή με τα γραμμικά mRNAs και τα γενικότερα χαμηλά επίπεδα έκφρασης των circRNAs [66,114]. Για την ανίχνευση νέων μορίων circRNAs και τον προσδιορισμό της λειτουργίας και των επιπέδων έκφρασής τους είναι αναγκαίο αυτοί οι περιορισμοί να ξεπεραστούν.

Το πεδίο έρευνας των circRNAs παρουσιάζει ενδιαφέρον και λόγω των εφαρμογών που μπορεί να έχει η ανακάλυψη της λειτουργίας και της έκφρασης αυτών των μορίων. Τα circRNAs έχει αποδειχτεί ότι είναι ιδιαίτερα σταθερά και ανθεκτικά στην αποικοδόμηση από νουκλεάσες. Για αυτό το λόγο και σε συνδυασμό με το ότι μπορούν να μεταφράζονται μέσω IRES γίνεται προσπάθεια αξιοποίησής τους για μετάφραση και παραγωγή συγκεκριμένων πρωτεϊνών μέσα σε ευκαρυωτικά κύτταρα αντί για τη χρήση μορίων mRNAs που έχουν μικρότερο χρόνο ημιζωής. Παρ' όλα αυτά, η μετάφραση των γραμμικών μεταγράφων μέσω των γνωστών μηχανισμών μετάφρασης των ευκαρυωτικών οργανισμών είναι πιο αποδοτική και τελικά οδηγεί σε παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων πρωτεΐνης. Το πρόβλημα αυτό, καθώς και η στοχευμένη μεταφορά τους στα ευκαρυωτικά κύτταρα χωρίς την πρόκληση ανοσολογικής αντίδρασης αποτελεί βιοτεχνολογική πρόκληση και δεν είναι σίγουρο αν θα ξεπεραστεί [115]. Ο μεγάλος χρόνος ημιζωής, η σταθερότητά τους, η εύρεση τους σε εξωσώματα και η αυξομειούμενη ιστοειδική έκφραση με διαφορά σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις καθιστούν τα circRNAs ιδανικά μόρια για την καθιέρωσή τους ως βιοδείκτες. Γενικότερα, τα μη κωδικά RNAs (non-coding RNAs, ncRNAs) μπορούν να αξιοποιηθούν ως βιοδείκτες της έγκαιρης διάγνωσης μιας πάθησης, της πρόγνωσης και εξέλιξης της νόσου και την επιλογή ή την παρατήρηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Πρόκειται για ένα νέο ερευνητικό πεδίο που έχει μεγάλες προοπτικές για την εξατομικευμένη ιατρική (personalised medicine) και την ογκολογία. Ιδιαίτερα, μη επεμβατικές τεχνικές, όπως ο υπολογισμός των επιπέδων ενός μορίου στα βιολογικά υγρά, μπορεί να οδηγήσουν γρήγορα και εύκολα σε κρίσιμα συμπεράσματα. Πρόκληση για αυτό το πεδίο αποτελούν η διάκριση των ασθενών και υγιών ατόμων και ο γρήγορος και φθηνός προσδιορισμός των μορίων που πραγματικά έχουν ειδική και διαφορική έκφραση σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις [116,117]. Εκμεταλλευόμενοι την ιδιότητα επιλεκτικής πρόσδεσης miRNAs και RBPs, τα circRNAs θα μπορούσαν ακόμα να αξιοποιηθούν και ως φορείς (vectors) μεταφοράς αυτών των μορίων μέσα στα κύτταρα [84].

Συμπερασματικά, τόσο το γονίδιο *BOK* όσο και τα circRNAs αποτελούν ενδιαφέροντα πεδία έρευνας με πολλές προοπτικές και δυνατότητες αξιοποίησής τους στην αποτελεσματική διάγνωση και θεραπεία πολλών ασθενειών με σημαντικότερη αυτή του καρκίνου.

«Μελέτη της έκφρασης κυκλικών μορίων RNA (circRNAs) του γονιδίου *BOK* σε ανθρώπινες επιθηλιακές κυτταρικές σειρές καρκίνου»

Πέτρος Λέτσος

Διπλωματική Εργασία
Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Περίληψη

Η απόπτωση είναι μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που απομακρύνει κύτταρα που έχουν συσσωρεύσει γενετικές βλάβες, έχουν μολυνθεί από κάποιον ιό ή γενικότερα είναι επικίνδυνα για τον οργανισμό. Πρόκειται για μια αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία που δεν αφήνει πίσω της ίχνη καταπόνησης ή φλεγμονής και σε περίπτωση απορρύθμισης μπορεί να οδηγήσει σε αρκετές επικίνδυνες ασθένειες, όπως ο καρκίνος. Το μονοπάτι που ενεργοποιείται από ενδοκυτταρικά ερεθίσματα καλείται ενδογενές ή μιτοχονδριακό και βασικοί ρυθμιστές του είναι οι πρωτεΐνες της υπεροικογένειας *BCL2*. Τα μέλη αυτής της οικογένειας μπορεί να έχουν αντι-αποπτωτικό ή προ-αποπτωτικό ρόλο και να αλληλεπιδρούν με ανασταλτική ή θετική επίδραση. Κοινό γνώρισμα των μελών αυτής της οικογένειας είναι η ύπαρξη επικρατειών ομολογίας με την πρωτεΐνη *BCL2* που υπήρξε και το πρώτο μέλος της οικογένειας που ανακαλύφθηκε (*BCL2* Homology Domain, BH domain). Τα μέλη της οικογένειας διακρίνονται σε τρεις υποομάδες: τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες με τέσσερις BH επικράτειες (BH1-BH4), τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες τελεστές με τρεις BH επικράτειες (BH1-BH3) και τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες με μια μόνο BH3 επικράτεια. Ένα ιδιαίτερο μέλος των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών τελεστών είναι η πρωτεΐνη *BOK*, που σε αντίθεση με τα υπόλοιπα ομόλογα μέλη της ομάδας της διαθέτει τέσσερις BH επικράτειες. Ο ακριβής ρόλος της στην απόπτωση παραμένει άγνωστος. Υποστηρίζεται ότι σε περίπτωση διαταραχής της ορθής λειτουργίας του ενδοπλασματικού δικτύου ή της συσσώρευσης μη ορθά πτυχωμένων πρωτεϊνών, η *BOK* παύει να αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα και μπορεί να επάγει την απόπτωση άμεσα η ίδια με το σχηματισμό πόρων διαπερατότητας στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη ή έμμεσα σηματοδοτώντας τον ολιγομερισμό των προ-αποπτωτικών μελών τελεστών *BAX* και *BAK*. Υποστηρίζεται, ωστόσο ότι έχει και άλλες σημαντικές λειτουργίες μέσα στο κύτταρο, όπως η διατήρηση της σωστής μορφολογίας των μιτοχονδρίων. Τα κυκλικά μόρια RNA (circRNAs) δημιουργούνται με το μηχανισμό της οπισθοσυρραφής (back-splicing) και έχουν αρκετούς διαφορετικούς ρόλους μέσα στο κύτταρο, όπως η πρόσδεση μορίων microRNA ή πρωτεϊνών που προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες RNA (RNA Binding Proteins, RBPs), η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων και η πιθανή μετάφρασή τους προς την παραγωγή πρωτεϊνικών ισομορφών. Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανακάλυψη της έκφρασης νέων circRNAs του γονιδίου *BOK* σε ανθρώπινες επιθηλιακές κυτταρικές σειρές καρκίνου. Για το σκοπό αυτό, απομονώθηκε RNA από επτά ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, έγινε αντίστροφη μεταγραφή του με τη χρήση τυχαίων εξαμερών εκκινητών και πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από αντιδράσεις συμβατικής, επάλληλης και ημι-επάλληλης PCR με τη χρήση αποκλιόντων εκκινητών για την ανίχνευση

νέων πιθανών κυκλικών μεταγράφων του γονιδίου. Για το ένα νέο circRNA που ταυτοποιήθηκε με τη μέθοδο αλληλούχισης Sanger στην κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού SK-BR-3 έγινε προσπάθεια πρόγνωσης της λειτουργίας του με τη χρήση υπολογιστικών εργαλείων. Η πειραματική διερεύνηση των προβλεπόμενων λειτουργιών του ίσως αναδείκνυε το ρόλο του στη λειτουργία του κυττάρου, ενώ η μελέτη της έκφρασής του σε ανθρώπινα βιολογικά δείγματα ίσως οδηγούσε στην ανακάλυψη ενός νέου βιοδείκτη. Τα ευρήματα αυτά, σε συνδυασμό με την ανακάλυψη και άλλων πιθανών circRNAs του γονιδίου *BOK*, πιθανόν να συμβάλλουν στην εύρεση νέων θεραπευτικών στόχων ή βιοδεικτών και αποτελούν ερωτήματα που θα μπορούσαν να διερευνηθούν στο μέλλον.

**«Analysis of the expression of circular RNAs (circRNAs) of the *BOK* gene
in human epithelial cancer cell lines»**

Petros A. Letsos

Bachelor of Science thesis

Department of Biochemistry and Molecular Biology

Faculty of Biology

National and Kapodistrian University of Athens

Abstract

Apoptosis is a form of programmed cell death in which cells that have accumulated mutations, have been infected with a virus or, in general, are considered perilous or unnecessary, are eliminated. It is a tightly regulated process, which does not leave behind traces of inflammation or stress and dysregulation of this procedure may lead to several diseases, such as cancer. The intrinsic or mitochondrial pathway of apoptosis is activated by intracellular stress stimuli and is regulated mostly by members of the BCL2 protein superfamily. Members of this superfamily can directly or indirectly enhance or suppress each other's function and exhibit pro-apoptotic or anti-apoptotic role. All members of this family share BCL2 homology domains (BH domains) that resemble the domains of the BCL2 protein, which was the first member of this protein family that has been identified in a type of B cell lymphoma. Based on this feature, the members of this family are divided into three categories: the anti-apoptotic proteins that contain four BH domains (BH1-BH4), the pro-apoptotic proteins effectors that contain three BH domains (BH1-BH3) and the pro-apoptotic proteins that contain only one BH3 domain (BH3-only). An intriguing and newly discovered member of the effectors' group is the pro-apoptotic protein BOK, which in contrast to other effectors has all four BH domains. Few and controversial studies regarding its role in apoptosis have been conducted and its exact role in the intrinsic apoptotic pathway has not been fully elucidated yet. It is generally accepted that in case of endoplasmic reticulum stress or accumulation of misfolded proteins, BOK is no longer degraded in the proteasome and can induce mitochondrial outer membrane permeabilization and subsequent apoptosis either by itself or by promoting indirectly the oligomerization of the most crucial effectors BAX and BAK. Whether it can induce apoptosis by itself or not, as well as whether it regulates other normal cellular functions, such as the fusion of mitochondria, is not yet clear and needs further investigation. Circular RNAs (circRNAs) are created upon a unique back-splicing mechanism and can have several cellular functions. Their role ranges from binding microRNA molecules and RNA binding proteins to regulating transcription and being translated in order to produce novel protein isoforms. The aim of this dissertation has been the discovery of circRNAs deriving from the *BOK* gene in human epithelial cancer cell lines. The experimental procedure consisted of total RNA isolation from seven human cell lines, followed by reverse transcription of RNA to cDNA using random hexamers and a series of conventional PCR, Semi-nested PCR or Nested PCR experiments

utilizing various divergent primers to discover potential circRNAs originating from the *BOK* gene. Ultimately, a novel circRNA has been identified using Sanger Sequencing and has been found to be greatly and specifically expressed in SK-BR-3 breast cancer cells. Subsequently, several computational tools have been utilized to predict its potential cellular function. Besides the experimental validation of its potential role, analysis of its expression profile in patient-derived breast cancer samples may reveal an original biomarker for this disease. Consequently, these findings may lead to the discovery of new therapeutics or biomarkers, and it is essential that the function and the expression profile of many more *BOK*-circRNAs are investigated in the future.

Βιβλιογραφία

1. Jacobson, M.D.; Weil, M.; Raff, M.C. Programmed cell death in animal development. *Cell* **1997**, *88*, 347-354, doi:10.1016/s0092-8674(00)81873-5.
2. Xu, X.; Lai, Y.; Hua, Z.C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep* **2019**, *39*, doi:10.1042/BSR20180992.
3. Elliott, M.R.; Ravichandran, K.S. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol* **2010**, *189*, 1059-1070, doi:10.1083/jcb.201004096.
4. Nagata, S. DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol* **2005**, *23*, 853-875, doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115811.
5. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **2007**, *35*, 495-516, doi:10.1080/01926230701320337.
6. Vanden Berghe, T.; Linkermann, A.; Jouan-Lanhouet, S.; Walczak, H.; Vandenabeele, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15*, 135-147, doi:10.1038/nrm3737.
7. Kumar, S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* **2007**, *14*, 32-43, doi:10.1038/sj.cdd.4402060.
8. Raff, M. Cell suicide for beginners. *Nature* **1998**, *396*, 119-122, doi:10.1038/24055.
9. Kiraz, Y.; Adan, A.; Kartal Yandim, M.; Baran, Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol* **2016**, *37*, 8471-8486, doi:10.1007/s13277-016-5035-9.
10. Crawford, E.D.; Wells, J.A. Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu Rev Biochem* **2011**, *80*, 1055-1087, doi:10.1146/annurev-biochem-061809-121639.
11. Jiang, X.; Wang, X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* **2004**, *73*, 87-106, doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073706.
12. Danial, N.N.; Korsmeyer, S.J. Cell death: critical control points. *Cell* **2004**, *116*, 205-219, doi:10.1016/s0092-8674(04)00046-7.
13. Susin, S.A.; Daugas, E.; Ravagnan, L.; Samejima, K.; Zamzami, N.; Loeffler, M.; Costantini, P.; Ferri, K.F.; Irinopoulou, T.; Prevost, M.C., et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* **2000**, *192*, 571-580, doi:10.1084/jem.192.4.571.
14. Carneiro, B.A.; El-Deiry, W.S. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **2020**, *17*, 395-417, doi:10.1038/s41571-020-0341-y.
15. Lavrik, I.; Golks, A.; Krammer, P.H. Death receptor signaling. *J Cell Sci* **2005**, *118*, 265-267, doi:10.1242/jcs.01610.
16. Mace, P.D.; Riedl, S.J. Molecular cell death platforms and assemblies. *Curr Opin Cell Biol* **2010**, *22*, 828-836, doi:10.1016/j.ceb.2010.08.004.
17. Bock, F.J.; Tait, S.W.G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2020**, *21*, 85-100, doi:10.1038/s41580-019-0173-8.

18. Yuan, S.; Akey, C.W. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure* **2013**, *21*, 501-515, doi:10.1016/j.str.2013.02.024.
19. Youle, R.J.; Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, *9*, 47-59, doi:10.1038/nrm2308.
20. Czabotar, P.E.; Lessene, G.; Strasser, A.; Adams, J.M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15*, 49-63, doi:10.1038/nrm3722.
21. Siddiqui, W.A.; Ahad, A.; Ahsan, H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Arch Toxicol* **2015**, *89*, 289-317, doi:10.1007/s00204-014-1448-7.
22. Kale, J.; Osterlund, E.J.; Andrews, D.W. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ* **2018**, *25*, 65-80, doi:10.1038/cdd.2017.186.
23. Moldoveanu, T.; Czabotar, P.E. BAX, BAK, and BOK: A Coming of Age for the BCL-2 Family Effector Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2020**, *12*, doi:10.1101/cshperspect.a036319.
24. Warren, C.F.A.; Wong-Brown, M.W.; Bowden, N.A. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis* **2019**, *10*, 177, doi:10.1038/s41419-019-1407-6.
25. Tsujimoto, Y.; Cossman, J.; Jaffe, E.; Croce, C.M. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* **1985**, *228*, 1440-1443, doi:10.1126/science.3874430.
26. Tsujimoto, Y.; Gorham, J.; Cossman, J.; Jaffe, E.; Croce, C.M. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* **1985**, *229*, 1390-1393, doi:10.1126/science.3929382.
27. Willis, S.N.; Adams, J.M. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **2005**, *17*, 617-625, doi:10.1016/j.ceb.2005.10.001.
28. Pemberton, J.M.; Pogmore, J.P.; Andrews, D.W. Neuronal cell life, death, and axonal degeneration as regulated by the BCL-2 family proteins. *Cell Death Differ* **2021**, *28*, 108-122, doi:10.1038/s41418-020-00654-2.
29. Zinkel, S.; Gross, A.; Yang, E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* **2006**, *13*, 1351-1359, doi:10.1038/sj.cdd.4401987.
30. Hsu, S.Y.; Kaipia, A.; McGee, E.; Lomeli, M.; Hsueh, A.J. Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94*, 12401-12406, doi:10.1073/pnas.94.23.12401.
31. Inohara, N.; Ekhterae, D.; Garcia, I.; Carrio, R.; Merino, J.; Merry, A.; Chen, S.; Nunez, G. Mtd, a novel Bcl-2 family member activates apoptosis in the absence of heterodimerization with Bcl-2 and Bcl-XL. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 8705-8710, doi:10.1074/jbc.273.15.8705.
32. Echeverry, N.; Bachmann, D.; Ke, F.; Strasser, A.; Simon, H.U.; Kaufmann, T. Intracellular localization of the BCL-2 family member BOK and functional implications. *Cell Death Differ* **2013**, *20*, 785-799, doi:10.1038/cdd.2013.10.
33. Ke, F.; Voss, A.; Kerr, J.B.; O'Reilly, L.A.; Tai, L.; Echeverry, N.; Bouillet, P.; Strasser, A.; Kaufmann, T. BCL-2 family member BOK is widely expressed but its loss has only

- minimal impact in mice. *Cell Death Differ* **2012**, *19*, 915-925, doi:10.1038/cdd.2011.210.
34. Beroukhi, R.; Mermel, C.H.; Porter, D.; Wei, G.; Raychaudhuri, S.; Donovan, J.; Barretina, J.; Boehm, J.S.; Dobson, J.; Urashima, M., et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **2010**, *463*, 899-905, doi:10.1038/nature08822.
 35. Shalaby, R.; Flores-Romero, H.; Garcia-Saez, A.J. The Mysteries around the BCL-2 Family Member BOK. *Biomolecules* **2020**, *10*, doi:10.3390/biom10121638.
 36. Lindsten, T.; Ross, A.J.; King, A.; Zong, W.X.; Rathmell, J.C.; Shiels, H.A.; Ulrich, E.; Waymire, K.G.; Mahar, P.; Frauwirth, K., et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* **2000**, *6*, 1389-1399, doi:10.1016/s1097-2765(00)00136-2.
 37. Mason, K.D.; Lin, A.; Robb, L.; Josefsson, E.C.; Henley, K.J.; Gray, D.H.; Kile, B.T.; Roberts, A.W.; Strasser, A.; Huang, D.C., et al. Proapoptotic Bak and Bax guard against fatal systemic and organ-specific autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 2599-2604, doi:10.1073/pnas.1215097110.
 38. Carpio, M.A.; Michaud, M.; Zhou, W.; Fisher, J.K.; Walensky, L.D.; Katz, S.G. BCL-2 family member BOK promotes apoptosis in response to endoplasmic reticulum stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, 7201-7206, doi:10.1073/pnas.1421063112.
 39. Llambi, F.; Wang, Y.M.; Victor, B.; Yang, M.; Schneider, D.M.; Gingras, S.; Parsons, M.J.; Zheng, J.H.; Brown, S.A.; Pelletier, S., et al. BOK Is a Non-canonical BCL-2 Family Effector of Apoptosis Regulated by ER-Associated Degradation. *Cell* **2016**, *165*, 421-433, doi:10.1016/j.cell.2016.02.026.
 40. Ke, F.; Grabow, S.; Kelly, G.L.; Lin, A.; O'Reilly, L.A.; Strasser, A. Impact of the combined loss of BOK, BAX and BAK on the hematopoietic system is slightly more severe than compound loss of BAX and BAK. *Cell Death Dis* **2015**, *6*, e1938, doi:10.1038/cddis.2015.304.
 41. Ke, F.; Bouillet, P.; Kaufmann, T.; Strasser, A.; Kerr, J.; Voss, A.K. Consequences of the combined loss of BOK and BAK or BOK and BAX. *Cell Death Dis* **2013**, *4*, e650, doi:10.1038/cddis.2013.176.
 42. Ke, F.F.S.; Vanyai, H.K.; Cowan, A.D.; Delbridge, A.R.D.; Whitehead, L.; Grabow, S.; Czabotar, P.E.; Voss, A.K.; Strasser, A. Embryogenesis and Adult Life in the Absence of Intrinsic Apoptosis Effectors BAX, BAK, and BOK. *Cell* **2018**, *173*, 1217-1230 e1217, doi:10.1016/j.cell.2018.04.036.
 43. Bartholomeusz, G.; Wu, Y.; Ali Seyed, M.; Xia, W.; Kwong, K.Y.; Hortobagyi, G.; Hung, M.C. Nuclear translocation of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bok induces apoptosis. *Mol Carcinog* **2006**, *45*, 73-83, doi:10.1002/mc.20156.
 44. Einsele-Scholz, S.; Malmshaimer, S.; Bertram, K.; Stehle, D.; Johanning, J.; Manz, M.; Daniel, P.T.; Gillissen, B.F.; Schulze-Osthoff, K.; Essmann, F. Bok is a genuine multi-BH-domain protein that triggers apoptosis in the absence of Bax and Bak. *J Cell Sci* **2016**, *129*, 2213-2223, doi:10.1242/jcs.181727.
 45. Schulman, J.J.; Wright, F.A.; Kaufmann, T.; Wojcikiewicz, R.J.H. The Bcl-2 protein family member Bok binds to the coupling domain of inositol 1,4,5-trisphosphate

- receptors and protects them from proteolytic cleavage. *J Biol Chem* **2013**, *288*, 25340-25349, doi:10.1074/jbc.M113.496570.
46. Schulman, J.J.; Wright, F.A.; Han, X.; Zluhan, E.J.; Szczesniak, L.M.; Wojcikiewicz, R.J. The Stability and Expression Level of Bok Are Governed by Binding to Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors. *J Biol Chem* **2016**, *291*, 11820-11828, doi:10.1074/jbc.M115.711242.
 47. Eizirik, D.L.; Miani, M.; Cardozo, A.K. Signalling danger: endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. *Diabetologia* **2013**, *56*, 234-241, doi:10.1007/s00125-012-2762-3.
 48. Puthalakath, H.; O'Reilly, L.A.; Gunn, P.; Lee, L.; Kelly, P.N.; Huntington, N.D.; Hughes, P.D.; Michalak, E.M.; McKimm-Breschkin, J.; Motoyama, N., et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* **2007**, *129*, 1337-1349, doi:10.1016/j.cell.2007.04.027.
 49. Nencioni, A.; Grunebach, F.; Patrone, F.; Ballestrero, A.; Brossart, P. Proteasome inhibitors: antitumor effects and beyond. *Leukemia* **2007**, *21*, 30-36, doi:10.1038/sj.leu.2404444.
 50. Fernandez-Marrero, Y.; Bleicken, S.; Das, K.K.; Bachmann, D.; Kaufmann, T.; Garcia-Saez, A.J. The membrane activity of BOK involves formation of large, stable toroidal pores and is promoted by cBID. *FEBS J* **2017**, *284*, 711-724, doi:10.1111/febs.14008.
 51. Naim, S.; Kaufmann, T. The Multifaceted Roles of the BCL-2 Family Member BOK. *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8*, 574338, doi:10.3389/fcell.2020.574338.
 52. Zheng, J.H.; Grace, C.R.; Guibao, C.D.; McNamara, D.E.; Llambi, F.; Wang, Y.M.; Chen, T.; Moldoveanu, T. Intrinsic Instability of BOK Enables Membrane Permeabilization in Apoptosis. *Cell Rep* **2018**, *23*, 2083-2094 e2086, doi:10.1016/j.celrep.2018.04.060.
 53. Schulman, J.J.; Szczesniak, L.M.; Bunker, E.N.; Nelson, H.A.; Roe, M.W.; Wagner, L.E., 2nd; Yule, D.I.; Wojcikiewicz, R.J.H. Bok regulates mitochondrial fusion and morphology. *Cell Death Differ* **2019**, *26*, 2682-2694, doi:10.1038/s41418-019-0327-4.
 54. Griffith, M.; Mwenifumbo, J.C.; Cheung, P.Y.; Paul, J.E.; Pugh, T.J.; Tang, M.J.; Chittaranjan, S.; Morin, R.D.; Asano, J.K.; Ally, A.A., et al. Novel mRNA isoforms and mutations of uridine monophosphate synthetase and 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer. *Pharmacogenomics J* **2013**, *13*, 148-158, doi:10.1038/tpj.2011.65.
 55. Srivastava, R.; Cao, Z.; Nedeva, C.; Naim, S.; Bachmann, D.; Rabachini, T.; Gangoda, L.; Shahi, S.; Glab, J.; Menassa, J., et al. BCL-2 family protein BOK is a positive regulator of uridine metabolism in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2019**, *116*, 15469-15474, doi:10.1073/pnas.1904523116.
 56. Carberry, S.; D'Orsi, B.; Monsefi, N.; Salvucci, M.; Bacon, O.; Fay, J.; Rehm, M.; McNamara, D.; Kay, E.W.; Prehn, J.H.M. The BAX/BAK-like protein BOK is a prognostic marker in colorectal cancer. *Cell Death Dis* **2018**, *9*, 125, doi:10.1038/s41419-017-0140-2.
 57. Rabachini, T.; Fernandez-Marrero, Y.; Montani, M.; Loforese, G.; Sladky, V.; He, Z.; Bachmann, D.; Wicki, S.; Villunger, A.; Stroka, D., et al. BOK promotes chemical-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Cell Death Differ* **2018**, *25*, 708-720, doi:10.1038/s41418-017-0008-0.

58. Moravcikova, E.; Krepela, E.; Donnenberg, V.S.; Donnenberg, A.D.; Benkova, K.; Rabachini, T.; Fernandez-Marrero, Y.; Bachmann, D.; Kaufmann, T. BOK displays cell death-independent tumor suppressor activity in non-small-cell lung carcinoma. *Int J Cancer* **2017**, *141*, 2050-2061, doi:10.1002/ijc.30906.
59. Barrett, S.P.; Salzman, J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions. *Development* **2016**, *143*, 1838-1847, doi:10.1242/dev.128074.
60. Qu, S.; Yang, X.; Li, X.; Wang, J.; Gao, Y.; Shang, R.; Sun, W.; Dou, K.; Li, H. Circular RNA: A new star of noncoding RNAs. *Cancer Lett* **2015**, *365*, 141-148, doi:10.1016/j.canlet.2015.06.003.
61. Chen, L.L. The biogenesis and emerging roles of circular RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2016**, *17*, 205-211, doi:10.1038/nrm.2015.32.
62. Sanger, H.L.; Klotz, G.; Riesner, D.; Gross, H.J.; Kleinschmidt, A.K. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1976**, *73*, 3852-3856, doi:10.1073/pnas.73.11.3852.
63. Cocquerelle, C.; Mascrez, B.; Hetuin, D.; Bailleul, B. Mis-splicing yields circular RNA molecules. *FASEB J* **1993**, *7*, 155-160, doi:10.1096/fasebj.7.1.7678559.
64. Memczak, S.; Jens, M.; Elefsinioti, A.; Torti, F.; Krueger, J.; Rybak, A.; Maier, L.; Mackowiak, S.D.; Gregersen, L.H.; Munschauer, M., et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* **2013**, *495*, 333-338, doi:10.1038/nature11928.
65. Salzman, J.; Gawad, C.; Wang, P.L.; Lacayo, N.; Brown, P.O. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS One* **2012**, *7*, e30733, doi:10.1371/journal.pone.0030733.
66. Artemaki, P.I.; Scorilas, A.; Kontos, C.K. Circular RNAs: A New Piece in the Colorectal Cancer Puzzle. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, doi:10.3390/cancers12092464.
67. Yang, L.; Fu, J.; Zhou, Y. Circular RNAs and Their Emerging Roles in Immune Regulation. *Front Immunol* **2018**, *9*, 2977, doi:10.3389/fimmu.2018.02977.
68. Zaphiropoulos, P.G. Exon skipping and circular RNA formation in transcripts of the human cytochrome P-450 2C18 gene in epidermis and of the rat androgen binding protein gene in testis. *Mol Cell Biol* **1997**, *17*, 2985-2993, doi:10.1128/MCB.17.6.2985.
69. Wilusz, J.E. A 360 degrees view of circular RNAs: From biogenesis to functions. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2018**, *9*, e1478, doi:10.1002/wrna.1478.
70. Jeck, W.R.; Sorrentino, J.A.; Wang, K.; Slevin, M.K.; Burd, C.E.; Liu, J.; Marzluff, W.F.; Sharpless, N.E. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA* **2013**, *19*, 141-157, doi:10.1261/rna.035667.112.
71. Kristensen, L.S.; Andersen, M.S.; Stagsted, L.V.W.; Ebbesen, K.K.; Hansen, T.B.; Kjems, J. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nat Rev Genet* **2019**, *20*, 675-691, doi:10.1038/s41576-019-0158-7.
72. Zhang, Y.; Zhang, X.O.; Chen, T.; Xiang, J.F.; Yin, Q.F.; Xing, Y.H.; Zhu, S.; Yang, L.; Chen, L.L. Circular intronic long noncoding RNAs. *Mol Cell* **2013**, *51*, 792-806, doi:10.1016/j.molcel.2013.08.017.
73. Patop, I.L.; Wust, S.; Kadener, S. Past, present, and future of circRNAs. *EMBO J* **2019**, *38*, e100836, doi:10.15252/embj.2018100836.

74. Wang, E.T.; Cody, N.A.; Jog, S.; Biancolella, M.; Wang, T.T.; Treacy, D.J.; Luo, S.; Schroth, G.P.; Housman, D.E.; Reddy, S., et al. Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell* **2012**, *150*, 710-724, doi:10.1016/j.cell.2012.06.041.
75. Ashwal-Fluss, R.; Meyer, M.; Pamudurti, N.R.; Ivanov, A.; Bartok, O.; Hanan, M.; Evantal, N.; Memczak, S.; Rajewsky, N.; Kadener, S. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Mol Cell* **2014**, *56*, 55-66, doi:10.1016/j.molcel.2014.08.019.
76. Conn, S.J.; Pillman, K.A.; Toubia, J.; Conn, V.M.; Salmanidis, M.; Phillips, C.A.; Roslan, S.; Schreiber, A.W.; Gregory, P.A.; Goodall, G.J. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell* **2015**, *160*, 1125-1134, doi:10.1016/j.cell.2015.02.014.
77. Zong, F.Y.; Fu, X.; Wei, W.J.; Luo, Y.G.; Heiner, M.; Cao, L.J.; Fang, Z.; Fang, R.; Lu, D.; Ji, H., et al. The RNA-binding protein QKI suppresses cancer-associated aberrant splicing. *PLoS Genet* **2014**, *10*, e1004289, doi:10.1371/journal.pgen.1004289.
78. Li, X.; Liu, C.X.; Xue, W.; Zhang, Y.; Jiang, S.; Yin, Q.F.; Wei, J.; Yao, R.W.; Yang, L.; Chen, L.L. Coordinated circRNA Biogenesis and Function with NF90/NF110 in Viral Infection. *Mol Cell* **2017**, *67*, 214-227 e217, doi:10.1016/j.molcel.2017.05.023.
79. Ivanov, A.; Memczak, S.; Wyler, E.; Torti, F.; Porath, H.T.; Orejuela, M.R.; Piechotta, M.; Levanon, E.Y.; Landthaler, M.; Dieterich, C., et al. Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals. *Cell Rep* **2015**, *10*, 170-177, doi:10.1016/j.celrep.2014.12.019.
80. Eisenberg, E.; Levanon, E.Y. A-to-I RNA editing - immune protector and transcriptome diversifier. *Nat Rev Genet* **2018**, *19*, 473-490, doi:10.1038/s41576-018-0006-1.
81. Aktas, T.; Avsar Ilik, I.; Maticzka, D.; Bhardwaj, V.; Pessoa Rodrigues, C.; Mittler, G.; Manke, T.; Backofen, R.; Akhtar, A. DHX9 suppresses RNA processing defects originating from the Alu invasion of the human genome. *Nature* **2017**, *544*, 115-119, doi:10.1038/nature21715.
82. Koh, H.R.; Xing, L.; Kleiman, L.; Myong, S. Repetitive RNA unwinding by RNA helicase A facilitates RNA annealing. *Nucleic Acids Res* **2014**, *42*, 8556-8564, doi:10.1093/nar/gku523.
83. Chen, L.L.; Yang, L. Regulation of circRNA biogenesis. *RNA Biol* **2015**, *12*, 381-388, doi:10.1080/15476286.2015.1020271.
84. Kristensen, L.S.; Hansen, T.B.; Veno, M.T.; Kjems, J. Circular RNAs in cancer: opportunities and challenges in the field. *Oncogene* **2018**, *37*, 555-565, doi:10.1038/onc.2017.361.
85. Hansen, T.B.; Jensen, T.I.; Clausen, B.H.; Bramsen, J.B.; Finsen, B.; Damgaard, C.K.; Kjems, J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* **2013**, *495*, 384-388, doi:10.1038/nature11993.
86. Hansen, T.B.; Kjems, J.; Damgaard, C.K. Circular RNA and miR-7 in cancer. *Cancer Res* **2013**, *73*, 5609-5612, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1568.
87. Capel, B.; Swain, A.; Nicolis, S.; Hacker, A.; Walter, M.; Koopman, P.; Goodfellow, P.; Lovell-Badge, R. Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis. *Cell* **1993**, *73*, 1019-1030, doi:10.1016/0092-8674(93)90279-y.

88. Barbolat-Boutrand, L.; Joly-Tonetti, N.; Dos Santos, M.; Metral, E.; Boher, A.; Masse, I.; Berthier-Vergnes, O.; Bertolino, P.; Damour, O.; Lamartine, J. MicroRNA-23b-3p regulates human keratinocyte differentiation through repression of TGIF1 and activation of the TGF-ss-SMAD2 signalling pathway. *Exp Dermatol* **2017**, *26*, 51-57, doi:10.1111/exd.13119.
89. Kristensen, L.S.; Okholm, T.L.H.; Veno, M.T.; Kjems, J. Circular RNAs are abundantly expressed and upregulated during human epidermal stem cell differentiation. *RNA Biol* **2018**, *15*, 280-291, doi:10.1080/15476286.2017.1409931.
90. Roush, S.; Slack, F.J. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol* **2008**, *18*, 505-516, doi:10.1016/j.tcb.2008.07.007.
91. Panda, A.C.; Grammatikakis, I.; Kim, K.M.; De, S.; Martindale, J.L.; Munk, R.; Yang, X.; Abdelmohsen, K.; Gorospe, M. Identification of senescence-associated circular RNAs (SAC-RNAs) reveals senescence suppressor CircPVT1. *Nucleic Acids Res* **2017**, *45*, 4021-4035, doi:10.1093/nar/gkw1201.
92. Du, W.W.; Yang, W.; Liu, E.; Yang, Z.; Dhaliwal, P.; Yang, B.B. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2. *Nucleic Acids Res* **2016**, *44*, 2846-2858, doi:10.1093/nar/gkw027.
93. Hinds, P.W.; Mitnacht, S.; Dulic, V.; Arnold, A.; Reed, S.I.; Weinberg, R.A. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* **1992**, *70*, 993-1006, doi:10.1016/0092-8674(92)90249-c.
94. Harper, J.W.; Adami, G.R.; Wei, N.; Keyomarsi, K.; Elledge, S.J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **1993**, *75*, 805-816, doi:10.1016/0092-8674(93)90499-g.
95. Zeng, Y.; Du, W.W.; Wu, Y.; Yang, Z.; Awan, F.M.; Li, X.; Yang, W.; Zhang, C.; Yang, Q.; Yee, A., et al. A Circular RNA Binds To and Activates AKT Phosphorylation and Nuclear Localization Reducing Apoptosis and Enhancing Cardiac Repair. *Theranostics* **2017**, *7*, 3842-3855, doi:10.7150/thno.19764.
96. Abdelmohsen, K.; Panda, A.C.; Munk, R.; Grammatikakis, I.; Dudekula, D.B.; De, S.; Kim, J.; Noh, J.H.; Kim, K.M.; Martindale, J.L., et al. Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of PABPN1 translation by CircPABPN1. *RNA Biol* **2017**, *14*, 361-369, doi:10.1080/15476286.2017.1279788.
97. Mukherjee, N.; Corcoran, D.L.; Nusbaum, J.D.; Reid, D.W.; Georgiev, S.; Hafner, M.; Ascano, M., Jr.; Tuschl, T.; Ohler, U.; Keene, J.D. Integrative regulatory mapping indicates that the RNA-binding protein HuR couples pre-mRNA processing and mRNA stability. *Mol Cell* **2011**, *43*, 327-339, doi:10.1016/j.molcel.2011.06.007.
98. Lebedeva, S.; Jens, M.; Theil, K.; Schwanhausser, B.; Selbach, M.; Landthaler, M.; Rajewsky, N. Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR. *Mol Cell* **2011**, *43*, 340-352, doi:10.1016/j.molcel.2011.06.008.
99. Chen, N.; Zhao, G.; Yan, X.; Lv, Z.; Yin, H.; Zhang, S.; Song, W.; Li, X.; Li, L.; Du, Z., et al. A novel FLI1 exonic circular RNA promotes metastasis in breast cancer by coordinately regulating TET1 and DNMT1. *Genome Biol* **2018**, *19*, 218, doi:10.1186/s13059-018-1594-y.
100. Li, Z.; Huang, C.; Bao, C.; Chen, L.; Lin, M.; Wang, X.; Zhong, G.; Yu, B.; Hu, W.; Dai, L., et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol* **2015**, *22*, 256-264, doi:10.1038/nsmb.2959.

101. Weingarten-Gabbay, S.; Elias-Kirma, S.; Nir, R.; Gritsenko, A.A.; Stern-Ginossar, N.; Yakhini, Z.; Weinberger, A.; Segal, E. Comparative genetics. Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. *Science* **2016**, *351*, doi:10.1126/science.aad4939.
102. Shi, Y.; Jia, X.; Xu, J. The new function of circRNA: translation. *Clin Transl Oncol* **2020**, *22*, 2162-2169, doi:10.1007/s12094-020-02371-1.
103. Yang, Y.; Wang, Z. IRES-mediated cap-independent translation, a path leading to hidden proteome. *J Mol Cell Biol* **2019**, *11*, 911-919, doi:10.1093/jmcb/mjz091.
104. Legnini, I.; Di Timoteo, G.; Rossi, F.; Morlando, M.; Briganti, F.; Sthandier, O.; Fatica, A.; Santini, T.; Andronache, A.; Wade, M., et al. Circ-ZNF609 Is a Circular RNA that Can Be Translated and Functions in Myogenesis. *Mol Cell* **2017**, *66*, 22-37 e29, doi:10.1016/j.molcel.2017.02.017.
105. Liang, W.C.; Wong, C.W.; Liang, P.P.; Shi, M.; Cao, Y.; Rao, S.T.; Tsui, S.K.; Waye, M.M.; Zhang, Q.; Fu, W.M., et al. Translation of the circular RNA circbeta-catenin promotes liver cancer cell growth through activation of the Wnt pathway. *Genome Biol* **2019**, *20*, 84, doi:10.1186/s13059-019-1685-4.
106. Zhang, M.; Huang, N.; Yang, X.; Luo, J.; Yan, S.; Xiao, F.; Chen, W.; Gao, X.; Zhao, K.; Zhou, H., et al. A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis. *Oncogene* **2018**, *37*, 1805-1814, doi:10.1038/s41388-017-0019-9.
107. Stagsted, L.V.; Nielsen, K.M.; Daugaard, I.; Hansen, T.B. Noncoding AUG circRNAs constitute an abundant and conserved subclass of circles. *Life Sci Alliance* **2019**, *2*, doi:10.26508/lsa.201900398.
108. Watanabe, S.; Yonesaka, K.; Tanizaki, J.; Nonagase, Y.; Takegawa, N.; Haratani, K.; Kawakami, H.; Hayashi, H.; Takeda, M.; Tsurutani, J., et al. Targeting of the HER2/HER3 signaling axis overcomes ligand-mediated resistance to trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *Cancer Med* **2019**, *8*, 1258-1268, doi:10.1002/cam4.1995.
109. Onyeagucha, B.; Subbarayalu, P.; Abdelfattah, N.; Rajamanickam, S.; Timilsina, S.; Guzman, R.; Zeballos, C.; Eedunuri, V.; Bansal, S.; Mohammad, T., et al. Novel post-transcriptional and post-translational regulation of pro-apoptotic protein BOK and anti-apoptotic protein Mcl-1 determine the fate of breast cancer cells to survive or die. *Oncotarget* **2017**, *8*, 85984-85996, doi:10.18632/oncotarget.20841.
110. Liang, H.F.; Zhang, X.Z.; Liu, B.G.; Jia, G.T.; Li, W.L. Circular RNA circ-ABCB10 promotes breast cancer proliferation and progression through sponging miR-1271. *Am J Cancer Res* **2017**, *7*, 1566-1576.
111. Du, W.W.; Fang, L.; Yang, W.; Wu, N.; Awan, F.M.; Yang, Z.; Yang, B.B. Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity. *Cell Death Differ* **2017**, *24*, 357-370, doi:10.1038/cdd.2016.133.
112. Salzman, J.; Chen, R.E.; Olsen, M.N.; Wang, P.L.; Brown, P.O. Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS Genet* **2013**, *9*, e1003777, doi:10.1371/journal.pgen.1003777.
113. Vromman, M.; Vandesompele, J.; Volders, P.J. Closing the circle: current state and perspectives of circular RNA databases. *Brief Bioinform* **2021**, *22*, 288-297, doi:10.1093/bib/bbz175.

114. Li, X.; Yang, L.; Chen, L.L. The Biogenesis, Functions, and Challenges of Circular RNAs. *Mol Cell* **2018**, *71*, 428-442, doi:10.1016/j.molcel.2018.06.034.
115. Wesselhoeft, R.A.; Kowalski, P.S.; Anderson, D.G. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells. *Nat Commun* **2018**, *9*, 2629, doi:10.1038/s41467-018-05096-6.
116. Wang, Y.; Liu, J.; Ma, J.; Sun, T.; Zhou, Q.; Wang, W.; Wang, G.; Wu, P.; Wang, H.; Jiang, L., et al. Exosomal circRNAs: biogenesis, effect and application in human diseases. *Mol Cancer* **2019**, *18*, 116, doi:10.1186/s12943-019-1041-z.
117. Slack, F.J.; Chinnaiyan, A.M. The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell* **2019**, *179*, 1033-1055, doi:10.1016/j.cell.2019.10.017.