



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της έκφρασης κυκλικών μορίων RNA (circRNAs) του γονίδιου
BAX σε ανθρώπινες, επιθηλιακές κυτταρικές σειρές καρκίνου

Ζούπα Ιωάννα

(Α.Μ:1113201700029)

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΟΝΤΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2021

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία κατά το χρονικό διάστημα μεταξύ Σεπτεμβρίου 2020 και Σεπτεμβρίου 2021 στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών επιστημών, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Χρήστου Κοντού.

Ξεκινώντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χρήστο Κοντό που με εμπιστεύτηκε να μελετήσω το συγκεκριμένο θέμα, καθώς και τη διαρκή επίβλεψη και επιστημονική καθοδήγησή που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια αυτής της διπλωματικής εργασίας. Οι γνώσεις του και οι καίριες παρεμβάσεις του συνέβαλαν αποφασιστικά στην επιτυχή περάτωση αυτής της έρευνας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά την Υποψήφια Διδάκτορα Πηνελόπη Αρτεμάκη για την καθοδήγηση, την υποστήριξη και τις γνώσεις που μου προσέφερε, καθώς με την υπομονή της και την άριστη συνεργασία που είχαμε με βοήθησε ουσιαστικά όλο αυτόν τον καιρό.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου: τις Υποψήφιες Διδάκτορες Παρασκευή Καρούση, Μαρία Παπασίρου και Κατερίνα Κατσαράκη, την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Χριστίνα Σωτηροπούλου, καθώς και τους διπλωματικούς φοιτητές Ευθαλία- Φαίδρα Αγιομαυρίτη Στεφανοπούλου και Πέτρο Λέτσο, για την υποστήριξη, τη βοήθεια και το ευχάριστο κλίμα που επικράτησε όλη αυτή την περίοδο.

Πίνακας Περιεχομένων

1. Εισαγωγή	1
1.1. Κυκλικά RNA.....	1
1.2 Κατηγορίες κυκλικών RNA.....	2
1.3 Βιογένεση κυκλικών RNA.....	2
1.4 Λειτουργίες κυκλικών RNA.....	3
1.4.1 circRNAs ως σπόγγοι miRNA	3
1.4.2 circRNAs ως σπόγγοι πρωτεϊνών RBPs.....	4
1.4.3 circRNA με την ικανότητα να μεταφράζονται.....	4
1.4.4 circRNA ως πρωτεϊνικά ικρίωματα.....	5
1.4.5 circRNA ως ρυθμιστές της μεταγραφής.....	5
1.4.6 circRNAs που στρατολογούν πρωτεΐνες.....	5
1.5 circRNAs και καρκίνος.....	6
1.6 Κυκλικά RNA ως βιοδείκτες καρκίνου.....	7
1.7 Απόπτωση.....	8
1.8 Μορφολογία απόπτωσης.....	9
1.9 Βιοχημικά στοιχεία απόπτωσης.....	9
1.10 Μονοπάτια απόπτωσης.....	10
1.10.1 Ενδογενές μονοπάτι.....	10
1.10.2 Εξωγενές μονοπάτι.....	12
1.10.3 Μονοπάτι εκτέλεσης.....	13
1.11 Μέλη της οικογένειας των κασπασών.....	14
1.12 Οικογένεια BCL2.....	15
1.12.1 Κατηγορίες της οικογένειας BCL2.....	15
1.12.2 Οικογένεια BCL2 στον καρκίνο.....	16
1.13 Πρωτεΐνη BAX.....	17
1.13.1 Δομή της πρωτεΐνης BAX.....	17

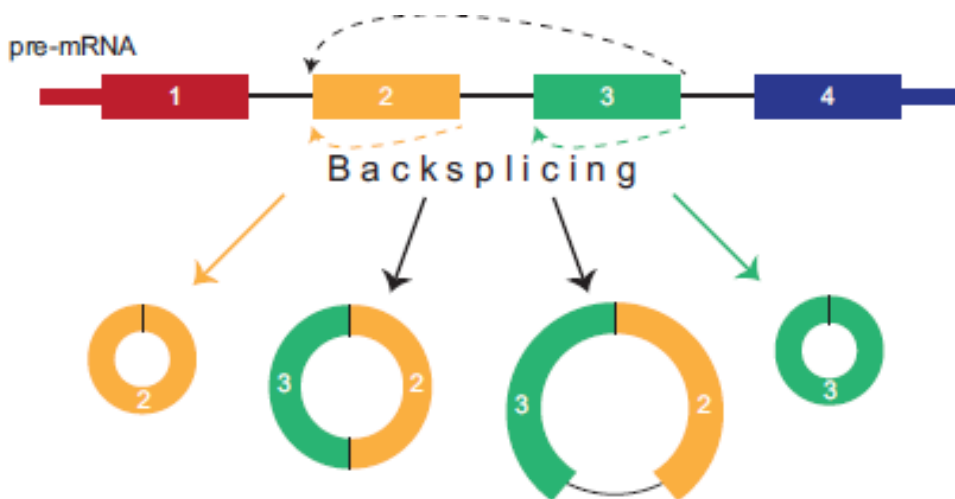
1.13.2 Λειτουργία της πρωτεΐνης BAX.....	18
1.13.3 Η ικανότητα της πρωτεΐνης BAX να σχηματίζει πόρους.....	19
2. Σκοπός.....	20
3. Υλικά και μέθοδοι.....	21
3.1 Κυτταροκαλλιέργειες.....	21
3.2 Απομόνωση ολικού RNA από καρκινικές κυτταρικές σειρές.....	21
3.3 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητας του απομονωμένου ολικού RNA.....	21
3.4 Αντίστροφη μεταγραφή.....	21
3.4.1 Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής..	22
3.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR).....	22
3.5.1 Σχεδιασμός εκκινητών PCR.....	22
3.5.2 Γονίδια σταθερής έκφρασης (housekeeping genes).....	23
3.5.3 Εκκινητές συμβατικής PCR για τον έλεγχο έκφρασης του γονιδίου αναφοράς, GAPDH.....	23
3.5.4 Μελέτη της έκφρασης ευθύγραμμων μεταγράφων του γονιδίου BAX.....	23
3.5.6 Χρήση αποκλινόντων εκκινητών για την εύρεση κυκλικών μορίων RNA.....	24
3.7 Επάλληλη PCR (Nested PCR).....	24
3.7.1 Εκκινητές για μελέτη έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου BAX σε επάλληλη PCR.....	25
3.7.2 Συνθήκες συμβατικής και επάλληλης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) του γονιδίου BAX.....	25
3.8 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	26
3.8.1 Ανίχνευση των προϊόντων της PCR του γονιδίου BAX με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και κόψιμο των ζωνών ενδιαφέροντος.....	26
3.9 Καθαρισμός PCR προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης με χρήση στηλών.....	26

3.9.1 Καθαρισμός PCR προϊόντων του BAX από πήκτωμα αγαρόζης με χρήση στηλών.....	26
3.10 Προσδιορισμός συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων με φθορισμομετρία.....	27
3.11 Αλληλούχηση με τη μέθοδο Sanger.....	27
3.12 Βιοπληροφορική ανάλυση.....	28
4. Αποτελέσματα.....	29
4.1 Εύρεση κυκλικών RNA από το γονίδιο BAX.....	29
4.2 Χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων πρόβλεψης λειτουργιών κυκλικών RNA.....	33
5. Συζήτηση.....	41
6. Περίληψη	44
7. Βιβλιογραφία	45
8. Παραρτήματα.....	55
Παράρτημα Α.....	55
Παράρτημα Β.....	63
Παράρτημα Γ.....	70
Παράρτημα Δ.....	80
Παράρτημα Ε.....	89
Παράρτημα ΣΤ.....	98

1.Εισαγωγή

1.1 Κυκλικά RNA

Τα κυκλικά RNA (circRNAs) είναι ένας τύπος RNA, που ανακαλύφθηκε πρόσφατα. Χαρακτηριστικό τους αποτελεί ότι τα 3' και 5' άκρα τους είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα μεταξύ τους, σχηματίζοντας μια κυκλική δομή. Βρέθηκαν πρώτη φορά σε ιούς το 1970. Με την ανάπτυξη τεχνικών αλληλούχισης και βιοπληροφορικής δείχθηκε πως τα circRNAs είναι ενδογενή, σχετικά άφθονα, συντηρημένα και σταθερά σε κύτταρα θηλαστικών.(1) Δημιουργούνται μέσω ενός γεγονότος εναλλακτικής συρραφής, κατά το οποίο ένα ανοδικό 5' άκρο ενώνεται με ένα καθοδικό 3' άκρο, σε μια διαδικασία που ονομάζεται οπισθοσυρραφή (backsplicing). Έχουν επίσης ιστοειδική και κυτταροειδική έκφραση. (2) Πολλαπλά κυκλικά RNA μπορούν να παράγονται από έναν γενετικό τόπο, ένα φαινόμενο που αναφέρεται ως εναλλακτική κυκλοποίηση. Η οπισθοσυρραφή επίσης ανταγωνίζεται με την κανονική συρραφή. Καθώς η οπισθοσυρραφή έχει μικρότερη απόδοση και δεν ευνοείται από τους τυπικούς μηχανισμούς συρραφής του κυττάρου, δηλαδή η κατάλυση της γίνεται σε πολύ μικρότερο βαθμό από την κανονική συρραφή, cis- στοιχεία και trans-παράγοντες απαιτούνται, ώστε να είναι δυνατή η προσέγγιση της καθοδικής θέσης- δότη με την ανοδική-θέση δέκτη και να προωθηθεί η οπισθοσυρραφή. Και οι δύο μηχανισμοί όμως χρησιμοποιούν τον ίδιο εξοπλισμό του κυττάρου για την εκτέλεσή τους.(3)



Εικόνα 1: Ωρίμανση circRNA και ποικιλία ισομορφών. Μια μεγάλη ποικιλία κυκλικών RNA μπορεί να παραχθεί από έναν μόνο γενετικό τόπο. Αυτά τα κυκλικά μόρια μπορούν να περιλαμβάνουν ένα ή περισσότερα εξώνια και μπορούν ακόμα να περιέχουν εσωνιακές αλληλουχίες. (2)

1.2 Κατηγορίες κυκλικών RNA

Τα κυκλικά RNA χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες, βάσει της προέλευσης της αλληλουχίας τους:

- a. EcircRNAs, που αποτελούνται από τμήματα εξωνίων των αντίστοιχων γονιδίων
- b. ciRNAs, που αποτελούνται από τμήματα εσωνίων
- c. EiciRNAs, που περιλαμβάνουν και εσωνιακές και εξωνιακές αλληλουχίες.(4)

1.3 Βιογένεση κυκλικών RNA

Τρία κύρια μοντέλα για την βιογένεση των circRNA έχουν προταθεί.

1) Το πρώτο ονομάζεται lariat-driven circularization ή exon skipping. Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό, το pre-mRNA διπλώνει μερικώς κατά την μεταγραφή, επιτρέποντας την σύνδεση της 3' θέσης συρραφής με την 5' θέση συρραφής. Έτσι, σχηματίζεται το κυκλικό RNA, ενώ τα εναπομείναντα εξώνια δίνουν γραμμικό RNA.

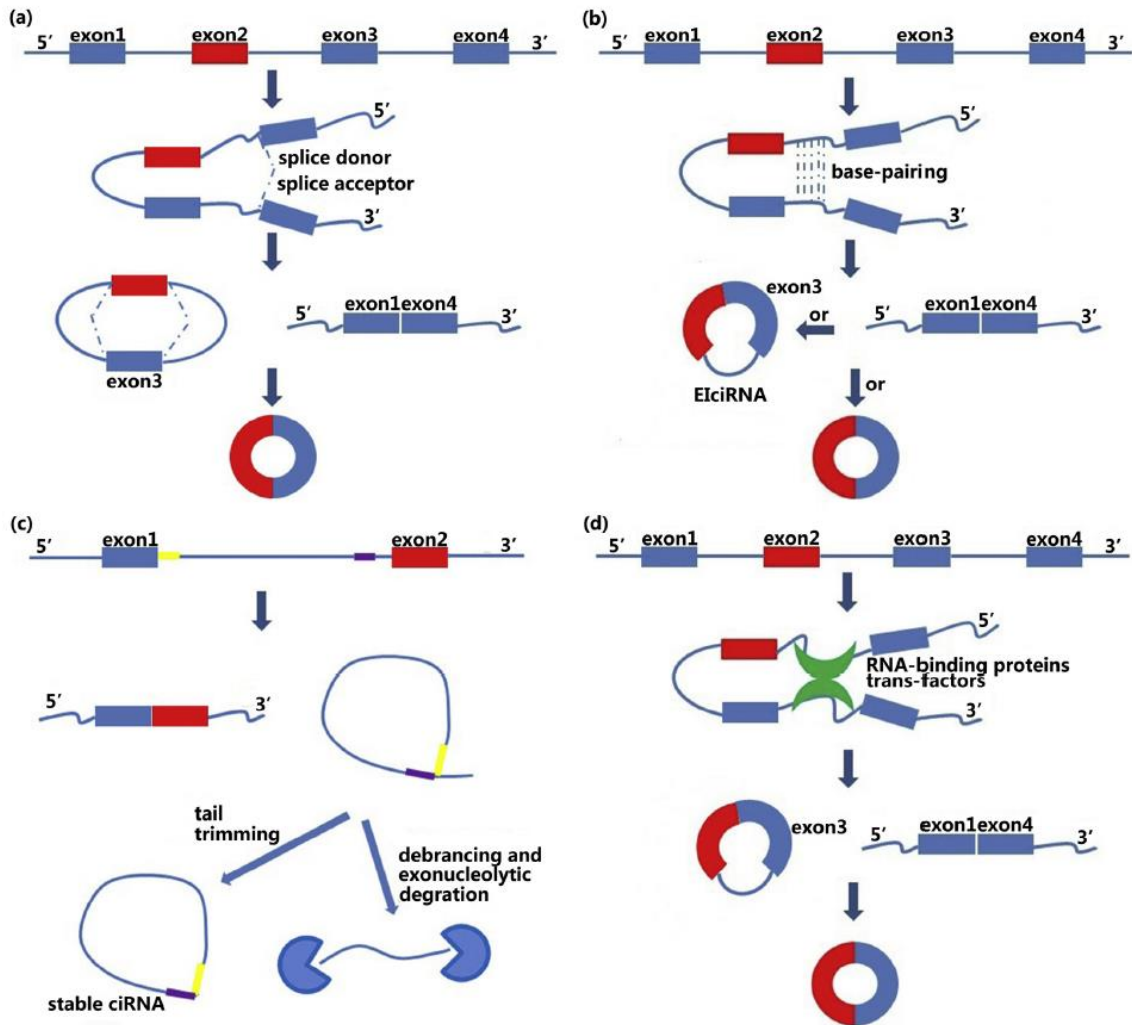
2) Το δεύτερο μοντέλο ονομάζεται απευθείας οπισθοσυρραφή (intron pairing-driven circularization ή direct backsplicing). Γειτονικές συμπληρωματικές περιοχές σε εσώνια (συχνά Alu στοιχεία) σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου, διευκολύνοντας την διαδικασία της οπισθοσυρραφής.(5)

3) Το τρίτο μοντέλο παρουσιάζει ομοιότητες με το δεύτερο. Σε αυτό RBP πρωτείνες, δηλαδή πρωτείνες που προσδένονται πάνω σε RNA, είναι αυτές που φέρνουν σε εγγύτητα τις θέσεις των δύο άκρων του circRNA, προκειμένου να ακολουθήσει κυκλοποίηση.(6)

4) Υπάρχουν επίσης και τα κυκλικά RNA που αποτελούνται αποκλειστικά από εσωνιακές αλληλουχίες, τα ciRNA. Η βιογένεση αυτών βασίζεται στην ύπαρξη δύο συντηρημένων μοτίβων: ενός στοιχείου μήκους 7 βάσεων πλούσιο σε GU κοντά στην 5' θέση συρραφής και ενός στοιχείου 11 βάσεων πλούσιο σε κυτοσίνες κοντά στη θέση διακλάδωσης. (7)

Υπάρχουν επίσης και τα λεγόμενα tricRNA, τα οποία προέρχονται από εσώνια των πρόδρομων pre-tRNA. Ο μηχανισμός της βιογένεσης αυτών των μορίων ακόμη δεν είναι γνωστός με ακρίβεια.(8)

Εικόνα 2: Μοντέλα της βιογένεσης circRNA. a) lariat-driven circularization. Το 3' άκρο του εξωνίου 1 συρράφεται με το 5' άκρο του εξωνίου 4. Τα εσώνια αφαιρούνται από το ωριμόσωμα. Προκύπτει νέο circRNA. b) Απευθείας οπισθοσυρραφή. Το εσώνιο 1 και το εσώνιο 3 σχηματίζουν κυκλική δομή μέσω συμπληρωματικότητας των βάσεων μεταξύ τους. Ύστερα τα εσώνια αφαιρούνται ή παραμένουν, για να σχηματίσουν circRNA. c) ciRNAs. Το εσώνιο παράγεται από την αντίδραση ωρίμανσης. Αλληλουχίες πλούσιες σε GU κοντά στη 5' θέση συρραφής και αλληλουχίες πλούσιες σε C κοντά στη θέση διακλάδωσης αρκούν για την παραγωγή ενός σταθερού μορίου και τη αποφυγή της αποικοδόμησης. d) κυκλοποίηση εξαρτώμενη από RBPs. RBPs ή trans-παράγοντες γεφυρώνουν δύο πλευρικά εσώνια κοντά μεταξύ τους. Τα εσώνια έπειτα αφαιρούνται για να παραχθεί circRNA. (1)



1.4 Λειτουργίες κυκλικών RNA

Τα κυκλικά RNA εμφανίζεται να έχουν μια πληθώρα λειτουργιών.

1.4.1 circRNAs ως σπόγγι miRNA

Ορισμένα κυκλικά RNA μπορεί να λειτουργήσουν ως σπόγγι miRNA με την έννοια ότι διαθέτουν στοιχεία MREs (miRNA response elements), πάνω στα οποία προσδέονται miRNA. Αποτρέπουν έτσι την πρόσδεση των miRNA σε mRNAs, ρυθμίζοντας διαδικασίες μεταγραφής και μετάφρασης μέσα στο κύτταρο. (1) Το κυκλικό RNA ciRS-7, ένα από τα πιο καλά χαρακτηρισμένα circRNA περιέχει πάνω από 70 θέσεις πρόσδεσης για το miR-7 και εμφανίζει υψηλή και σταθερή έκφραση σε πολλούς ιστούς. Συνεπώς, πιθανόν έχει την δυνατότητα να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων-στόχων του miR-7. (9)

CircRNAs, όπως τα circCCDC66, circHIPK3, circPVT1 και ciRS-7 μπορούν επίσης να λειτουργούν ως σπόγγι miRNA και στον καρκίνο.(10–13) Ένα κυκλικό RNA μπορεί να έχει ογκοκατασταλτική ή ογκογονιδιακή δράση, δρώντας ως σπόγγος miRNA σε πολλαπλά διαφορετικά miRNA, αντί να έχει πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης για ένα miRNA. Για παράδειγμα, το circCCDC66 περιέχει θέσεις πρόσδεσης για πολλαπλά miRNAs, τα οποία στοχεύουν ογκογονίδια, όπως το miR-33b και το miR-93, που αδρανοποιούν το ογκογονίδιο MYC. (12)

1.4.2 circRNAs ως σπόγγι πρωτεϊνών RBPs

Κυκλικά RNA μπορούν να λειτουργήσουν ως σπόγγι RBPs (RNA binding proteins- δηλαδή πρωτεϊνών που έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται πάνω σε RNA μόρια), εφόσον διαθέτουν συγκεκριμένες αλληλουχίες δέσμευσης αυτών των πρωτεϊνών. Αποτέλεσμα αυτής της δράσης τους είναι να ρυθμίζουν τις λειτουργίες των RBPs.(14) Το circANRIL προσδέεται στην πρωτεΐνη PES1, έναν απαραίτητο παράγοντα ωρίμανσης και συγκρότησης της 60S υπομονάδας του ριβοσώματος, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την βιογένεση ριβοσωμάτων σε λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και μακροφάγα. Άμεση συνέπεια του παραπάνω γεγονότος είναι η ενεργοποίηση του p53, που με τη σειρά της οδηγεί σε απόπτωση και παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού αυτών των κυττάρων, διαδικασίες που πιθανόν συμβάλλουν στην καταπολέμηση της αθηροσκλήρωσης.(15)

1.4.3 circRNA με την ικανότητα να μεταφράζονται

Επειδή τα κυκλικά RNA έχουν ομοιοπολικά συνδεδεμένα άκρα, δεν διαθέτουν 5' καλύπτρα (που περιέχει ένα κατάλοιπο 7'- μεθυλογουανοσίνης) ούτε poly(A) ουρά, στοιχεία απαραίτητα για την αποδοτική μετάφραση ευθύγραμμων mRNAs.(16) Πιο συγκεκριμένα, η 5' καλύπτρα αναγνωρίζεται από έναν παράγοντα έναρξης της μετάφρασης, τον eIF4E, που είναι μέρος του συμπλόκου eIF4F, ο οποίος με τη σειρά του στρατολογεί την 40S μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος, ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της μετάφρασης. (17)

Ένας μηχανισμός για μετάφραση ανεξαρτήτως της παρουσίας καλύμματος είναι μέσω των IRES (Internal Ribosome Entry site). Οι IRES είναι αλληλουχίες που δημιουργούν συγκεκριμένες δευτεροταγείς δομές στο RNA, προσελκύνοντας έτσι εναλλακτικούς παράγοντες έναρξης της μετάφρασης, τους επονομαζόμενους ITAFs (IRES Trans-Acting Factors). (18) Ένας άλλος μηχανισμός για μετάφραση κυκλικών RNA περιλαμβάνει την ύπαρξη N⁶- μεθυλοαδενοσινών (m⁶A), δηλαδή χημικά τροποποιημένων βάσεων του RNA. Συντηρημένα μοτίβα m⁶A βρέθηκαν σε αφθονία σε circRNA, με μια μόνο χημικά τροποποιημένη βάση να είναι ικανή να επάγει έναρξη της μετάφρασης του κυκλικού μορίου. Στον μηχανισμό αυτό εμπλέκεται η πρωτεΐνη YTHDF3, που αναγνωρίζει μεθυλιωμένες αδενοσίνες και αλληλοεπιδρά με τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4G2.(19)

Ο αριθμός των ενδογενών circRNA που έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά ότι παράγουν πεπτίδια είναι μικρός προς το παρόν. Ανάμεσα σε αυτά είναι το circ-ZNF609, το οποίο προκύπτει από την οπισθοσυρραφή του 2^{ου} εξωνίου του αντίστοιχου γονιδίου, το οποίο κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που περιέχει δακτυλίους σιδήρου. Ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης

753 νουκλεοτιδίων υπάρχει στο κυκλικό RNA, το οποίο μοιράζεται το ίδιο κωδικόνιο έναρξης με το ευθύγραμμο mRNA και έχει κωδικόνιο λήξης 3 βάσεις μετά το junction της οπισθοσυρραφής. Το circ-ZNF609 ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των μυοβλαστών στον άνθρωπο.(20) Ένα άλλο παράδειγμα είναι το circb-catenin, το οποίο σχηματίζεται από την οπισθοσυρραφή των εξωνίων 2 μέχρι 7 του γονιδίου της β-κατενίνης, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός κυκλικού μορίου μήκους 1129 nt. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης εκτείνεται από το κωδικόνιο έναρξης που υπάρχει και στο ευθύγραμμο μετάγραφο μέχρι ένα κωδικόνιο λήξης μετά από τον σύνδεσμο (junction). Συνεπώς, παράγεται μια ισομορφή της β-κατενίνης μήκους 370 αμινοξέων, η οποία ανιχνεύτηκε με φασματομετρία μάζας σε κυτταρική σειρά καρκίνου του ήπατος. Περαιτέρω πειράματα αποκάλυψαν πως αυτή η πρωτεΐνη προάγει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων *in vitro* και *in vivo*, μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού σηματοδότησης Wnt. Η ισομορφή που προερχόταν από το κυκλικό RNA λειτουργεί ως ικρίωμα, προστατεύοντας την β-κατενίνη από αποικοδόμηση. Βρέθηκε επίσης μια πιθανή αλληλουχία IRES ανοδικά του κωδικονίου έναρξης, η οποία αλληλεπικαλύπτεται εν μέρει με τμήμα του ORF. (21)

1.4.4 circRNA ως πρωτεϊνικά ικρίωματα

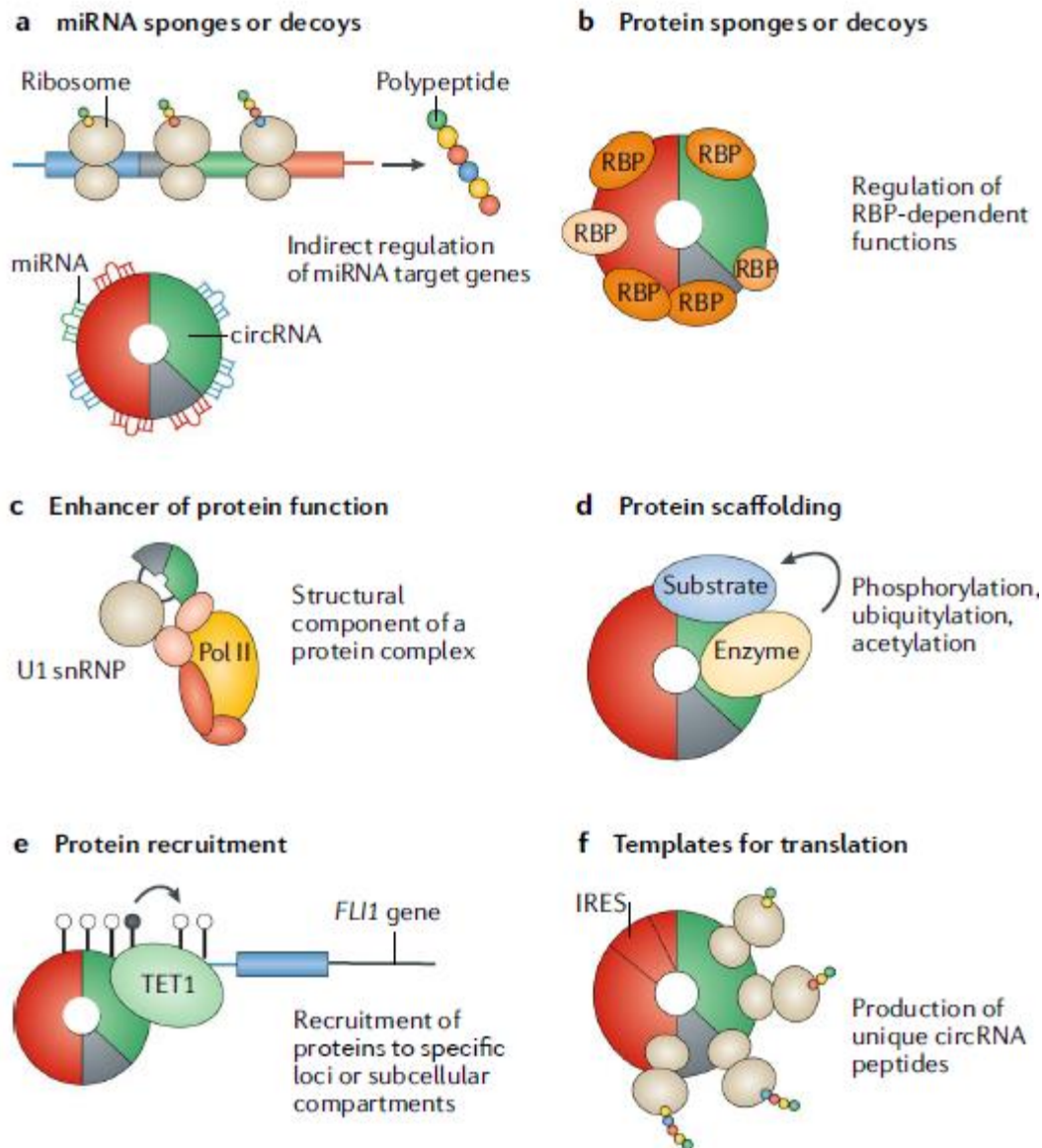
Ορισμένα circRNA δρουν ως ικρίωματα πρωτεϊνών, φέρνοντας κοντά δύο ή περισσότερες πρωτεΐνες και διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ τους.(22) Το circFOXO3 φέρνει σε επαφή μεταλλαγμένο p53 και την πρωτεΐνη MDM2, προωθώντας έτσι την ουβικιτινίωση του p53 και την επακόλουθη αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα. Εκτοπική αύξηση των επιπέδων circFOXO3 βρέθηκε να επάγει απόπτωση και να εμποδίζει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων *in vivo* και *in vitro*.(23)

1.4.5 circRNA ως ρυθμιστές της μεταγραφής

Ορισμένα κυκλικά RNA, τα οποία βρίσκονται στον πυρήνα, δρουν ως ρυθμιστές της μεταγραφής. Πιο συγκεκριμένα, ενισχύουν την δράση της RNA πολυμεράσης II.(24) EicIRNAs, τα οποία περιέχουν τμήματα εσωνίων, αλληλεπιδρούν με την U1 snRNP και με τους υποκινητές των γονιδίων από όπου προέρχονται, ώστε να προωθήσουν την μεταγραφή αυτών των γονιδίων από την RNA πολυμεράση II. Παρεμπόδιση circRNA, όπως των circEIF3J και circPAIP2, οδήγησε σε σημαντική μείωση της μεταγραφής των ευθύγραμμων γονιδίων.(25)

1.4.6 circRNAs που στρατολογούν πρωτεΐνες

Τα circRNAs μπορούν επίσης να στρατολογούν εξειδικευμένα πρωτεΐνες σε συγκεκριμένες κυτταρικές τοποθεσίες, όπως συμβαίνει με το circRNA FECR1. Αυτό το κυκλικό RNA προσδένεται στον υποκινητή του πατρικού του γονιδίου *FLI1* και προσελκύει την απομεθυλάση TET1 σε αυτόν, ώστε να προκληθεί απομεθυλίωση των CpG θέσεων του υποκινητή και να ενεργοποιηθεί η μεταγραφή του *FLI1*. Το γονίδιο *FLI1* είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος δρα ως ογκογονίδιο σε αιματολογικές κακοήθειες και υπερεκφράζεται σε σειρές καρκίνου του μαστού.(26)



Εικόνα 3: Γενικοί μηχανισμοί της λειτουργίας circRNA. a) circRNAs μπορούν να λειτουργήσουν ως σπόγγι miRNA, προστατεύοντας τους στόχους αυτών από αποικοδόμησή τους. Άρα τα mRNAs συνδέονται σε ριβοσώματα και μεταφράζονται ενεργά. b) circRNAs που περιέχουν μοτίβα δέσμευσης για RBPs μπορούν να λειτουργούν ως σπόγγι για αυτές τις πρωτεΐνες και να ρυθμίζουν την δράση τους. c) circRNAs μπορούν να αλληλεπιδρούν και να ενισχύουν την λειτουργία συγκεκριμένων πρωτεϊνών, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του συμπλόκου της RNA πολυμεράσης II, που περιέχει την U1 snRNP και άλλες πρωτεΐνες. d) Μερικά circRNAs λειτουργούν ως πρωτεϊνικά ικριώματα, φέρνοντας κοντά ένζυμα και τα υποστρώματά τους και επηρεάζοντας την κινητική της αντίδρασης. e) circRNAs μπορούν επίσης να στρατολογήσουν ειδικά πρωτεΐνες σε συγκεκριμένες θέσεις στο κύτταρο, όπως κάνει το FECR1, που στρατολογεί την TET1 στον υποκινητή του πατρικού του γονιδίου. f) circRNAs με εσωτερικές θέσεις πρόσδεσης ριβοσωμάτων και κωδικόνια έναρξης μπορούν να μεταφράζονται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, παράγοντας μοναδικά πεπτίδια. (14)

1.5 circRNAs και καρκίνος

Παρά την σχετικά υψηλή έκφρασή τους στους περισσότερους ιστούς, τα circRNAs εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα σε αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές. Μια μελέτη των επιπέδων circRNAs σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς έδειξε πως τα circRNAs είναι λιγότερο άφθονα σε κύτταρα με υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού και συγκεκριμένα σε όγκους. Παρατηρήθηκε έτσι μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της σχετικής αφθονίας circRNAs και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η οποία αποδόθηκε στην αραίωση του πληθυσμού circRNAs λόγω των υψηλών ρυθμών διπλασιασμού. Τα επίπεδα των circRNAs συγκρίθηκαν με αυτά των mRNAs που προέρχονταν από το ίδιο γονίδιο, ώστε να αποκλειστούν απλές διαφορές επιπέδων μεταγραφής του γονιδίου. (27) Παρόλα αυτά, τα circRNA μπορούν να έχουν ποικίλους ρόλους στον καρκίνο.

Είναι δυνατή η *de novo* παραγωγή ενός τοξικού circRNA, όπως έδειξαν οι Guarnerio et al. Σε αυτή την μελέτη, οι συγγραφείς περιέγραψαν πως μια χρωμοσωμική μετατόπιση οδήγησε στην παραγωγή ενός νέου circRNA, το οποίο συμμετέχει στον κυτταρικό μετασχηματισμό, προάγει την επιβίωση κυττάρων και προωθεί τον καρκίνο. Αναφέρονται σε αυτό τον νέο τύπο circRNA ως fusion circRNAs ή f-circRNAs. Η μετατόπιση συμβαίνει σε μια μορφή λευχαιμίας και εμπλέκει τα γονίδια PML και RARa. Παράγεται έτσι ένα f-circRNA όπου είναι συντηγμένο το 5' άκρο του εξωνίου 5 του PML και του 3' άκρου του εξωνίου 6 του RARa. Σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές εντόπισαν διαφορετικά f-circRNAs και επίσης διαφορετικές παραλλαγές αυτών. (28)

Ένας δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την μείωση της έκφρασης ενός συγκεκριμένου circRNA, το οποίο άμεσα ή έμμεσα έχει ογκοκατασταλτική δράση. Αυτό μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε στάδιο της ασθένειας. Αρκετά παραδείγματα του φαινομένου έχουν περιγραφεί στην βιβλιογραφία. Το circITCH φαίνεται πως εμπλέκεται σε διάφορους καρκίνους. Αυτό το circRNA βρέθηκε να έχει υποστεί καταστολή σε δείγματα οισοφαγικού καρκίνου. Διαθέτει επίσης αρκετές θέσεις δέσμευσης miRNAs, γεγονός που υποσηλώνει πως μπορεί να λειτουργεί ως σπόγγος για αυτά τα miRNAs. Επιπλέον, η υπερέκφραση του circITCH ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη και καταστέλλει την αύξηση όγκων. (29) Σε άλλη μελέτη το ίδιο circRNA φάνηκε να παίζει ρόλο στον καρκίνο του πνεύμονα, καθώς εκφραζόταν σε χαμηλότερα επίπεδα σε καρκινικές σειρές πνεύμονα σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς. Η χαμηλότερη έκφραση οφείλεται πιθανόν σε χαμηλότερο ρυθμό μεταγραφής του γενετικού τόπου, καθώς το mRNA του γονιδίου *ITCH* επίσης έχει μειωμένη έκφραση σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Η υπερέκφραση του καταστέλλει το μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης. Το circITCH είναι πιθανόν να ρυθμίζει την ογκογονική δράση των miR-7 και miR-214, προκειμένου να εμποδίσει τη εξέλιξη του καρκίνου. (30)

Ένας τρίτος πιθανός μηχανισμός που η απορρύθμιση κυκλικών RNA θα μπορούσε να παίζει ρόλο στην καρκινογένεση περιλαμβάνει την αύξηση της έκφρασης ενός πρωτοογκογόνου circRNA. Οι Yang *et al.* έδειξαν πως το circAmotl1 εμφανίζει υψηλή έκφραση σε καρκινικά δείγματα και κυτταρικές σειρές και μπορεί να προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το

circRNA αυτό αλληλεπιδρά με το c-myc και προωθεί την μετακίνηση του τελευταίου στον πυρήνα. (31)

1.6 Κυκλικά RNA ως βιοδείκτες καρκίνου

Τα circRNA είναι πολύ σταθερά μόρια, συνεπώς είναι λογικό να περιέχονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο αίμα, το πλάσμα και τα αιμοπετάλια. Λόγω αυτού έχει γίνει η υπόθεση ότι τα circRNAs θα μπορούσαν να είναι άριστοι βιοδείκτες για ασθένειες. Με δεδομένη την σταθερότητα και κυτταροειδικότητα τους, ακόμα και μικρές ποσότητες από καρκινικά κύτταρα που μεταφέρονται στην κυκλοφορία είναι ανιχνεύσιμες για μεγάλο διάστημα. (32) Αυτός ο πολλά υποσχόμενος ρόλος των circRNAs απαιτεί την διαφορική έκφραση συγκεκριμένων circRNAs στα πρόωρα στάδια ενός καρκίνου. Αυτό θα μπορούσε να συμβεί εάν το κυκλικό RNA παράγεται από έναν γενετικό τόπο, η μεταγραφή του οποίου ενισχύεται κάτω από αυτές τις συνθήκες. Εναλλακτικά, η μείωση της έκφρασης ενός άφθονου circRNA θα μπορούσε επίσης να χρησιμεύσει ως βιοδείκτης μιας ασθένειας. Τα τελευταία χρόνια αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει την δυνατότητα χρήσης των circRNA ως βιοδείκτες για τον καρκίνο.(33–35) Τα αποτελέσματα χρειάζεται να επιβεβαιωθούν σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και δειγμάτων, αλλά παραμένουν εξαιρετικά υποσχόμενα για την μελλοντική αξιοποίηση των circRNA με αυτό τον τρόπο.

1.7 Απόπτωση

Η απόπτωση είναι μια διακριτή μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου με μεγάλη βιολογική σημασία. Λαμβάνει χώρα συνήθως κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της γήρανσης ως ένας ομοιοστατικός μηχανισμός για την διατήρηση σταθερού πληθυσμού κυττάρων στους ιστούς. Λειτουργεί επίσης ως μηχανισμός άμυνας σε ανοσολογικές αποκρίσεις ή σε περιπτώσεις που κύτταρα έχουν προσβληθεί από μια ασθένεια ή έναν επιβλαβή παράγοντα. Μη φυσιολογικά επίπεδα απόπτωσης (αυξημένα ή μειωμένα) συνδέονται με πολλές διαταραχές, για παράδειγμα νευροεκφυλιστικές ασθένειες, αυτοάνοσα νοσήματα και πολλές μορφές καρκίνου. (36) Η απόπτωση είναι ο πιο μελετημένος και κατανοητός τύπος προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, όμως υπάρχουν και άλλες μορφές κυτταρικού θανάτου, όπως η πυρόπτωση, η νέκρωση και η αυτοφαγία, όπως και άλλες που μπορεί να μην έχουν ανακαλυφθεί ή αποσαφηνιστεί πλήρως ακόμα. (37)

Κάποια κύτταρα εκφράζουν ειδικούς υποδοχείς που μπορούν να επάγουν απόπτωση ύστερα από πρόσδεση των συνδετών τους. Άλλα κύτταρα διαθέτουν εξ' ορισμού μια προδιαγεγραμμένη μοίρα θανάτου που πρέπει να παρεμποδιστεί από έναν παράγοντα επιβίωσης, όπως μια ορμόνη, ώστε τα κύτταρα να επιζήσουν. Είναι σημαντικό να γίνει διαχωρισμός μεταξύ της απόπτωσης και της νέκρωσης, καθώς είναι δύο διαδικασίες που μπορεί να συμβούν ανεξάρτητα, διαδοχικά ή ταυτόχρονα. Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι το είδος των ερεθισμάτων που λαμβάνει ένα κύτταρο ή/και η ένταση αυτών που καθορίζει αν ο θάνατος θα επέλθει από απόπτωση ή νέκρωση. Σε χαμηλές ποσότητες, μια πληθώρα σημάτων βλάβης, όπως θερμότητα, ακτινοβολία, υποξία και κυτταροτοξικά αντικαρκινικά φάρμακα, μπορούν να

επάγουν απόπτωση, αλλά τα ίδια σήματα σε μεγαλύτερες ποσότητες μπορούν να οδηγήσουν σε νέκρωση. Τέλος, η απόπτωση είναι μια συντονισμένη και συχνά ενεργειακά εξαρτώμενη διαδικασία που προϋποθέτει την ενεργοποίηση μιας οικογένειας πρωτεασών κυστεΐνης που ονομάζονται κασπάσες και έναν πολύπλοκο καταρράκτη γεγονότων, ο οποίος συνδέει το αρχικό ερέθισμα με την τελική καταστροφή του κυττάρου. (36)

1.8 Μορφολογία απόπτωσης

Η οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία έχουν προσδιορίσει τις διάφορες μορφολογικές αλλαγές που προκύπτουν στην απόπτωση (38) Κατά τα πρώιμα στάδια, η συρρίκνωση των κυττάρων είναι ορατή μέσω οπτικής μικροσκοπίας. (39) Έτσι, τα κύτταρα μικραίνουν σε μέγεθος, το κυτταρόπλασμα γίνεται πιο πυκνό και τα οργανίδια πακετάρονται πιο στενά μεταξύ τους. Παρατηρείται επίσης συμπύκνωση της χρωματίνης, που αποτελεί το πιο χαρακτηριστικό στοιχείο των αποπτωτικών κυττάρων. Σε παρασκευάσματα κατεργασμένα με χρώση αιματοξυλίνης και εωσίνης, το αποπτωτικό κύτταρο εμφανίζεται ως μια στρογγυλή ή οβάλ μάζα με σκουρόχρωμα κυτταρόπλασμα και πυκνά ιώδη πυρηνικά θραύσματα χρωματίνης. Με ηλεκτρονική μικροσκοπία φαίνονται ακόμα καλύτερα οι υποκυτταρικές αλλαγές. Νωρίς στο στάδιο συμπύκνωσης της χρωματίνης, το πυρηνικό υλικό συσσωρεύεται χαρακτηριστικά περιφερειακά κάτω από την πυρηνική μεμβράνη, παρόλο που μπορεί να παρατηρούνται και ομοιογενώς πυκνοί πυρήνες.

Ακολουθεί η ρήξη του πυρήνα και ο κατακερματισμός του κυττάρου σε αποπτωτικά σωματίδια. Τα αποπτωτικά σωματίδια αποτελούνται από κυτταρόπλασμα και πυκνά πακεταρισμένα οργανίδια, ενώ μπορεί να περιέχουν και πυρηνικά θραύσματα. Η ακεραιότητα των οργανιδίων διατηρείται ακόμα και όλο το υλικό εγκλείεται με πυρηνική μεμβράνη. Τα σωματίδια αυτά στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα, παρεγχυματικά κύτταρα ή νεοπλαστικά κύτταρα και αποικοδομούνται μέσα στα λυσοσώματα τους. Δεν υπάρχει πρακτικά καμία φλεγμονώδης απόκριση που να σχετίζεται με την διαδικασία της απόπτωσης, καθώς 1) τα αποπτωτικά κύτταρα δεν απελευθερώνουν τα συστατικά τους στον περιβάλλοντα ιστό 2) φαγοκυτταρώνονται γρήγορα από τα περιβάλλοντα κύτταρα 3) τα κύτταρα που τα φαγοκυτταρώνουν δεν παράγουν αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. (40,41)

1.9 Βιοχημικά στοιχεία απόπτωσης

Τα αποπτωτικά κύτταρα εμφανίζουν διάφορα βιοχημικά χαρακτηριστικά, όπως είναι η πέψη πρωτεϊνών, η διασύνδεση αυτών (protein cross-linking), η αποικοδόμηση του DNA και η αναγνώριση τους από τα μακροφάγα, στοιχεία που συνδυαστικά ευθύνονται για την μορφολογία της απόπτωσης, όπως προαναφέρθηκε. Οι κασπάσες εκφράζονται ευρέως ως ανενεργά προένζυμα στα περισσότερα κύτταρα, τα οποία μόλις ενεργοποιηθούν ενεργοποιούν με τη σειρά τους άλλες προκασπάσες, επιτρέποντας την έναρξη ενός καταρράκτη πρωτεολύσεων. Κάποιες προκασπάσες μπορούν επίσης να συσσωρεύονται και να αυτοενεργοποιούνται. Αυτός ο καταρράκτης αντιδράσεων, όπου η μια κασπάση ενεργοποιεί

άλλες, ενισχύει το σηματοδοτικό μονοπάτι της απόπτωσης και οδηγεί σε ταχύ κυτταρικό θάνατο.(42)

Η αποικοδόμηση του DNA από Ca^{2+} και Mg^{2+} -εξαρτώμενες ενδονουκλεάσες επίσης συμβαίνει, με αποτέλεσμα τη δημιουργία θραυσμάτων μήκους 180 με 200 βάσεων. (43) Άλλο ένα βιοχημικό χαρακτηριστικό είναι η έκφραση κυτταρικών δεικτών, με συνέπεια αυτού την γρήγορη φαγοκυτταρική αναγνώριση αποπτωτικών κυττάρων από γειτονικά κύτταρα και την φαγοκυττάρωση τους, χωρίς να επηρεάζεται ο γειτονικός ιστός. Αυτό επιτυγχάνεται με την μετακίνηση της φωσφατίδυλοσερίνης από την εσωτερική μονοστιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης στην εξωτερική. (44) Και άλλες πρωτείνες όμως μπορούν να εκτίθενται στην κυτταρική επιφάνεια, ανάμεσα τους η καλρετικουλίνη. Η καλρετικουλίνη είναι μια πρωτείνη που προσδέεται σε πρωτεϊνη συγγενική με υποδοχέα LDL του μακροφάγου και φαίνεται πως συνεργάζεται με την φωσφατίδυλοσερίνη ως σήμα αναγνώρισης. (45)

1.10 Μονοπάτια απόπτωσης

Μέχρι σήμερα, οι έρευνες υποδεικνύουν την ύπαρξη δύο κύριων μονοπατιών απόπτωσης: το ενδογενές (ή μιτοχονδριακό), που περιλαμβάνει την απελευθέρωση κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, και το εξωγενές, όπου ο υποδοχέας Fas ενεργοποιείται μέσω ενός σήματος προερχόμενου από το εξωτερικό του κυττάρου. Παρόλα αυτά, υπάρχουν πλέον αποδείξεις πως τα δύο μονοπάτια συνδέονται μεταξύ τους και πως μόρια από το ένα μονοπάτι μπορούν να επηρεάσουν το άλλο. (46) Τα δύο μονοπάτια συγκλίνουν τελικώς στο ίδιο μονοπάτι, το μονοπάτι εκτέλεσης, το οποίο ξεκινά με την πρωτεόλυση της κασπάσης 3 και οδηγεί σε αποκοπή του DNA, αποικοδόμηση κυτοσκελετικών και πυρηνικών πρωτεϊνών, σχηματισμό των αποπτωτικών σωμάτων και τελικά φαγοκυττάρωση.

1.10.1 Ενδογενές μονοπάτι

Το ενδογενές μονοπάτι είναι ανεξάρτητο από σηματοδότηση υποδοχέων. Διαφόρων τύπου ερεθίσματα παράγουν ενδοκυτταρικά σήματα τα οποία με τη σειρά τους δρουν απευθείας σε στόχους μέσα στο κύτταρο. Τα ερεθίσματα που ενεργοποιούν αυτό το μονοπάτι μπορούν να επιδρούν είτε με θετικό είτε με αρνητικό τρόπο. Αρνητικά σήματα περιλαμβάνουν την απουσία ορισμένων αυξητικών παραγόντων, ορμονών και κυτταροκινών, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια της καταστολής ενός προκαθορισμένου μονοπατιού θανάτου, ενεργοποιώντας έτσι την διαδικασία της απόπτωσης. Ερεθίσματα που δρουν θετικά είναι μεταξύ άλλων ακτινοβολία, ποικίλες τοξίνες, υποξία, υπερθερμία, ιικές μολύνσεις και ελεύθερες ρίζες. Τα θετικά ερεθίσματα απευθείας ενεργοποιούν όλα τα ενδιάμεσα μόρια υπεύθυνα για την απόπτωση, ενώ τα αρνητικά δρουν με αντίθετο τρόπο, εξαλείφοντας τους παράγοντες που αναστέλλουν την απόπτωση. (47) Οι βλάβες στο DNA επίσης επάγουν την διαδικασία της απόπτωσης, ως ένα μηχανισμό προστασίας, ώστε να μην συνεχιστεί ο πολλαπλασιασμός κυττάρων με κατεστραμμένο το γενετικό υλικό τους. Η πρωτεΐνη Puma, μέλος της οικογένειας Bcl2 παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην απόπτωση και φαίνεται πως ενεργοποιείται από το p53. Υπερέκφρασή της συνδέεται με αύξηση της έκφρασης του BAX, αλλαγή της τρισδιάστατης δομής

του, μετατόπιση του στα μιτοχόνδρια και απελευθέρωση του κυτοχρώματος c.(48) Η Puma μεσολαβεί έτσι στην απόπτωση που προκαλείται από γενετική βλάβη ή ενεργοποίηση ογκογονιδίου.

Η δράση των παραπάνω σημάτων προκαλεί αλλαγές στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη με αποτέλεσμα άνοιγμα πόρων σε αυτήν, απώλεια του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού δυναμικού και απελευθέρωση δύο κύριων ομάδων προαποπτωτικών πρωτεϊνών από τον διάμεσο χώρο στο κυτοσόλιο. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από το κυτόχρωμα c, την Smac/DIABLO και την πρωτεάση σερίνης HtrA2/Omi. (49,50) Αυτές οι πρωτείνες ενεργοποιούν το μιτοχονδριακό μονοπάτι που εξαρτάται από τις κασπάσες. Το κυτόχρωμα c προσδένεται και ενεργοποιεί τον Araf-1, όπως και την προκασπάση-9 , σχηματίζοντας το “αποπτώσωμα”. Ύστερα, η προκασπάση-9 πρωτεολύεται σε κασπάση-9 και με την σειρά της ενεργοποιεί την κασπάση-3, προωθώντας το τελικό εκτελεστικό μονοπάτι. (51)

Η Smac/DIABLO και η HtrA2/Omi έχει αναφερθεί πως ενισχύουν την απόπτωση, καθώς αναστέλλουν τη δράση των IAPs (inhibitors of apoptosis proteins- αναστολείς της απόπτωσης). (52,53)

Η δεύτερη ομάδα προαποπτωτικών πρωτεϊνών , που είναι οι ενδονουκλεάσες G και AIF, όπως και η DNAση CAD, απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια κατά τη διάρκεια της απόπτωσης ως ένα από τελικά βήματα που συμβαίνει ύστερα από ένα μη αναστρέψιμο σημείο στον προγραμματισμένο θάνατο ενός κυττάρου. Η AIF μετακινείται στο πυρήνα, όπου προκαλεί κατακερματισμό του DNA σε τμήματα μήκους 50–300 kb και συμπύκνωση της περιφερικής πυρηνικής χρωματίνης.(54) Η ενδονουκλεάση G επίσης μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου πραγματοποιεί πέψη της πυρηνικής χρωματίνης. (55) Και οι δύο παραπάνω ενδονουκλεάσες λειτουργούν ανεξάρτητα από κασπάσες. Η CAD με τη σειρά της απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια και μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου, ύστερα από πέψη της από την κασπάση-3, οδηγεί σε περαιτέρω θρυμματισμό του DNA και συμπύκνωση της χρωματίνης. (56)

Ο έλεγχος και η ρύθμιση των παραπάνω αποπτωτικών γεγονότων συμβαίνει μέσω των μελών της οικογένειας Bcl-2. Οι πρωτείνες της οικογένειας Bcl-2 ελέγχουν την διαπερατότητα των μιτοχονδριακών μεμβρανών και μπορούν να είναι είτε προαποπτωτικές είτε αντιαποπτωτικές. Κάποιες από τις αντιαποπτωτικές πρωτείνες περιλαμβάνουν τις Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w και κάποιες από τις προαποπτωτικές τις Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik και Blk. Φαίνεται πως ο κύριος μηχανισμός της δράσης τους έγκειται στον ρύθμιση της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c μέσω της μεταβολής της διαπερατότητας των μιτοχονδριακών μεμβρανών. (57)

1.10.2 Εξωγενές μονοπάτι

Διαμεμβρανικοί υποδοχείς εμπλέκονται στο εξωγενές μονοπάτι. Αυτοί περιλαμβάνουν υποδοχείς «θανάτου» που είναι μέλη της υπερικογένειας του παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor-TNF). (58) Μέλη της παραπάνω ομάδας υποδοχέων μοιράζονται παρόμοιες εξωκυτταρικές επικράτειες πλούσιες σε κυστεΐνη και διαθέτουν μια κυτταροπλασματική επικράτεια μήκους περίπου 80 αμινοξέων που αποκαλείται επικράτεια «θανάτου». (59) Αυτή η επικράτεια παίζει καθοριστικό ρόλο στην μετάδοση του σήματος θανάτου από την επιφάνεια του κυττάρου προς τα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια. Οι καλύτερα χαρακτηρισμένοι υποδοχείς θανάτου και οι αντίστοιχοι συνδέτες είναι οι FasL/FasR και οι TNF-α/TNFR1. (59,60)

Η ακολουθία των γεγονότων που εκτελείται κατά την ενεργοποίηση του εξωγενές μονοπατιού είναι η παρακάτω. Οι υποδοχείς συσσωματώνονται και προσδένουν τους ομόλογους συνδέτες. Ύστερα, κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες-προσαρμογείς, οι οποίες διαθέτουν αντίστοιχες επικράτειες θανάτου για την πρόσδεση του υποδοχέα, στρατολογούνται. Η πρόσδεση του Fas συνδέτη στον FasR προσελκύει την πρωτεΐνη-προσαρμογέα FADD, ενώ ο TNF-α αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα TNFR1 με αποτέλεσμα την πρόσδεση της πρωτεΐνης TRADD. Το επόμενο βήμα είναι η ενεργοποίηση της προκασπάσης-8, που αυτοκαταλύεται σε κασπάση-8. (61,62)

Η ενεργή κασπάση 8 μπορεί να επάγει τη δράση του Bid, εμπλέκοντας με αυτό τον τρόπο και το ενδογενές μονοπάτι ή/και να ενεργοποιήσει τις κασπάσες 3 και 7, οπότε ακολουθείται το μονοπάτι εκτέλεσης της απόπτωσης. Η Bid είναι ένα προαποπτωτικό μέλος της οικογένειας Bcl-2 και κοινό μόριο του εξωγενούς και ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης. Η κασπάση-8 προκαλεί την διάσπαση της κυτταροπλασματικής Bid, ωθώντας την να μετακινηθεί προς τα μιτοχόνδρια, όπου προωθεί την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και την δημιουργία αποπτωσωμάτων, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. (63)

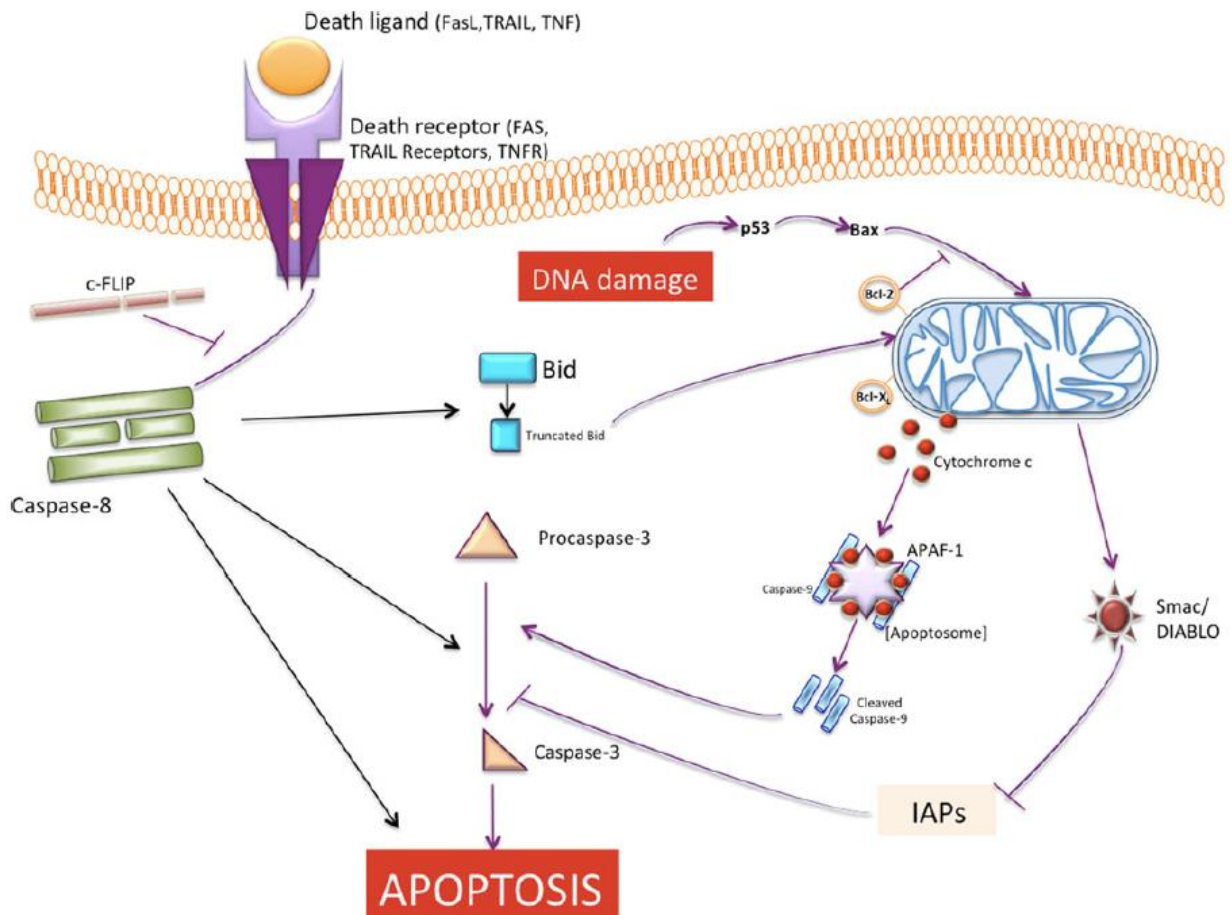
Το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης μπορεί επίσης να ανασταλεί μέσω μιας πρωτεΐνης που ονομάζεται c-FLIP και προσδένεται στη FADD και στη κασπάση-8, καθιστώντας τις ανενεργές. (64) Μια άλλη πρωτεΐνη επίσης, η Toso μπλοκάρει την βιογένεση της κασπάσης-8 σε T κύτταρα. (65)

1.10.3 Μονοπάτι εκτέλεσης

Το εξωγενές και το ενδογενές μονοπάτι συγκλίνουν στη τελική εκτελεστική φάση, η οποία ξεκινά με την ενεργοποίηση των κασπασών-τελεστών. Αυτές κινητοποιούν κυτταροπλασματικές ενδονουκλεάσες που αποικοδομούν υλικό του πυρήνα, καθώς και πρωτεάσες που καταστρέφουν τις πυρηνικές και κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες. Η κασπάση-3, η κασπάση-6 και η κασπάση-7 λειτουργούν ως κασπάσες-τελεστές, πρωτεολύοντας πλήθος υποστρωμάτων, όπως την PARP, την πυρηνική πρωτεΐνη NuMA και άλλες. (66)

Η κασπάση-3 θεωρείται η πιο σημαντική από τις κασπάσες-τελεστές και ενεργοποιείται από οποιαδήποτε από τις εναρκτήριες κασπάσες (κασπάση-8, κασπάση-9 ή κασπάση-10). Με τη σειρά της ενεργοποιεί την ενδονουκλεάση CAD με το να την απομακρύνει από τον αναστολέα της, ICAD, με τον οποίο είναι συμπλοκοποιημένη σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται. Η CAD στη συνέχεια αποικοδομεί χρωμοσωμικό DNA και προκαλεί συμπύκνωση της χρωματίνης. (67) Η κασπάση-3 προκαλεί επίσης αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. (68)

Η φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών κυττάρων αποτελεί το τελευταίο βήμα της διαδικασίας. Η ανάδειξη της φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια των κυττάρων προς απόπτωση αποτελεί το τελευταίο βήμα της διαδικασίας. Ο Fas, η κασπάση-8 και η κασπάση-3 φαίνεται πως εμπλέκονται στην παραπάνω διαδικασία. (69) Έπειτα, η εμφάνιση φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική μονοστιβάδα λιπιδίων των αποπτωτικών κυττάρων διευκολύνει μη-φλεγμονώδη φαγοκυτταρική αναγνώριση τους. Η γρήγορη και αποτελεσματική πρόσληψή τους χωρίς την απελευθέρωση κυτταρικών συστατικών στο εξωκυττάριο περιβάλλον, οδηγεί στην απουσία πρακτικά φλεγμονώδους απόκρισης. (70)



Εικόνα 4: Δύο κύρια αποπτωτικά μονοπάτια, το ενδογενές και το εξωγενές. Στο εξωγενές μονοπάτι, η αλληλεπίδραση μεταξύ των υποδοχέων θανάτου και των συνδετών τους εκκινεί τη διαδικασία, καταλήγοντας στην ενεργοποίηση της κασπάσης-8. Αυτή η ενεργοποίηση μπορεί να ανασταλεί από το cFLIP. Η κασπάση-8 απευθείας προκαλεί απόπτωση ή ενεργοποιεί την κασπάση-3 ή το Bid, που με τη

σειρά τους οδηγούν σε απόπτωση. Από την άλλη, το ενδογενές μονοπάτι ενεργοποιείται από βλάβη στο DNA. Έτσι, ενεργοποιείται το Bax, προαποπτωτικό μέλος της οικογένειας Bcl-2. Αντι-αποπτωτικές πρωτείνες καταστέλλουν τη δράση του Bax, όπως οι Bcl-2 και Bcl-XL. Το απελευθερωμένο κυτόχρωμα c, η APAF-1 και η προκασπάση-9 σχηματίζουν ένα σύμπλοκο στο κυτοσόλιο, το αποπτώσωμα. Ακολουθεί η ενεργοποίηση της κασπάσης, που με τη σειρά της ενεργοποιεί την κασπάση 3, που είναι το τελευταίο βήμα της απόπτωσης. (37)

1.11 Μέλη της οικογένειας των κασπασών

Η οικογένεια των κασπασων περιλαμβάνει πρωτεάσες κυστεϊνης, οι οποίες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της απόπτωσης. Υπάρχουν 14 διαφορετικές κασπάσες στα θηλαστικά και κατηγοριοποιούνται βασικά ως α) οι εναρκτήριες, που είναι οι κασπάσες 2, 8, 9, και 10 β) οι τελεστές, που είναι οι 3, 6,7 και 14 και τέλος γ) οι ενεργοποιητές κυτοκίνης, που είναι οι κασπάσες 1,4, 5, 11,12 και 13. (71) Δομικά, ενώ οι εναρκτήριες κασπάσες διαθέτουν μακριές αμινοτελικές επικράτειες, γνωστές και ως CARDS (caspase recruitment domains) με περισσότερα από 90 αμινοξέα, οι κασπάσες-τελεστές έχουν μικρότερες σε μήκος αλληλουχίες γνωστές ως DED (death effector domain), που περιλαμβάνουν 20-30 αμινοξέα. Ενώ οι εναρκτήριες κασπάσες αυτό-ενεργοποιούνται, οι κασπάσες-τελεστές ενεργοποιούνται από τις εναρκτήριες κασπάσες μέσω της πρωτεόλυσης τους. (72) Αντί για την απόπτωση, τα περισσότερα από τα μέλη της οικογένειας εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την δημιουργία φλεγμονής, ενώ κάποια από αυτά παίζουν ρόλο στην απόπτωση.(73)

Οι κασπάσες 3, 6 και 7, όπως προαναφέρθηκε, ανήκουν στις κασπάσες-τελεστές και δρουν με παρόμοιο τρόπο στην διαδικασία της απόπτωσης. (74) Η κασπάση 3 ενεργοποιείται τόσο από το ενδογενές όσο και από το εξωγενές μονοπάτι. (75) Παρόλο που υπάρχουν λίγες πληροφορίες για τις κασπάσες 6 και 7, η καταστολή τους δείχθηκε πως δεν επηρεάζει την απόπτωση, σε αντίθεση με την καταστολή της κασπάσης 3. (66) Όμως, κάποιες μελέτες υποδεικνύουν ότι σε συνθήκες όπου η κασπάση 3 και η κασπάση 7 είχαν υποστεί knock out, τα κύτταρα μπορούσαν να υποβληθούν σε κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης. Μελέτες με θυμοκύτταρα και εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού που ήταν διπλά knock out κασπάσης 3/ κασπάσης 7 έδειξαν πως τα θυμοκύτταρα παρέμειναν ευαίσθητα σε απόπτωση μεσολαβούμενη από το Fas, ενώ οι ινοβλάστες γινόντουσαν ανθεκτικοί. (66,76)

Η κασπάση 8, ένα καλά χαρακτηρισμένο μέλος της οικογένειας, αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από τον TNF.(77) Η προκασπάση-8 στρατολογείται από την FADD και ο διμερισμός (και τριμερισμός της) την ενεργοποιεί, καθώς το ένα μονομερές πρωτεολύει το άλλο. Η κασπάση 8 με την σειρά της πρωτεολύει και ενεργοποιεί την κασπάση 3, την κασπάση 7, την Bid και τον NF-kB.(78,79) Η ενεργοποίηση της κασπάσης 8 ελέγχεται από τη cFLIP, η οποία είναι δομικά ομόλογη στην κασπάση 8, αλλά δεν διαθέτει ενεργότητα κασπάσης. (80)

Η εναρκτήριος κασπάση 9 είναι σημαντικός παράγοντας για την δημιουργία του αποπτωσώματος κατά το μιτοχονδριακό μονοπάτι. Μόλις το κυτόχρωμα c απελευθερώνεται από το μιτοχόνδριο, προσδένεται στην Araf1, που είναι ο υποδοχέας του στο κυτοσόλιο. Οι δύο

αυτές πρωτείνες δίνουν το αποπτώσωμα.(81) Έπειτα, η προκασπάση 9 προσδένεται στην Araf1, ενεργοποιείται μέσω πρωτεόλυσης και ενεργοποιεί με τη σειρά της το αποπτώσωμα. Επακολουθεί η ενεργοποίηση της κασπάσης 3 από την κασπάση 9 του αποπτωσώματος.(82)

1.12 Οικογένεια BCL2

Η οικογένεια Bcl-2 είναι μια καλά χαρακτηρισμένη πρωτεϊνική οικογένεια, που εμπλέκεται στην ρύθμιση του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης και αποτελείται τόσο από προαποπτωτικά όσο και αντιαποπτωτικά μέλη. Η ισορροπία μεταξύ των προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών καθορίζει την ευαισθησία των κυττάρων σε αποπτωτικά ερεθίσματα. Περίσσεια προαποπτωτικών πρωτεϊνών καθιστά τα κύτταρα ευαίσθητα στην απόπτωση, ενώ περίσσεια αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών έχει αντίθετα αποτελέσματα. (57)

Η οικογένεια χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός αριθμού συντηρημένων αλληλουχιών, μήκους 20 αμινοξέων η καθεμία, που ονομάζονται BH επικράτειες.(83) Χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών αυτών επίσης είναι η ικανότητα τους να σχηματίζουν ομοδιμερή και ετεροδιμερή. (84) Ο ετεροδιμερισμός αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μελών της οικογένειας φαίνεται πως αναστέλλει την βιολογική δράση ενός από τα δύο μονομερή. (84,85)

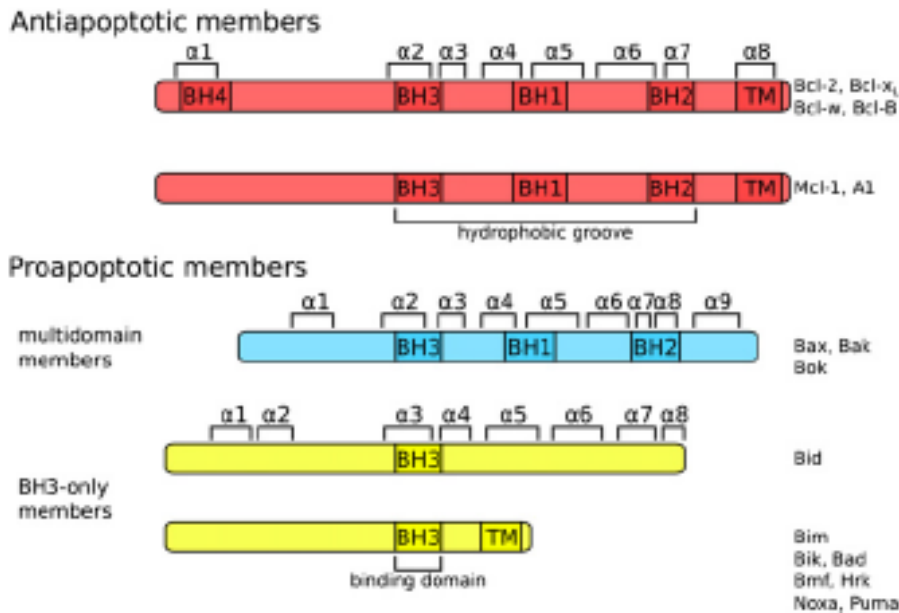
1.12.1 Κατηγορίες της οικογένειας BCL2

Τα μέλη της οικογένειας διαθέτουν 4 επικράτειες BH (ομόλογες περιοχές BCL2), που ονομάζονται BH1, BH2, BH3 και BH4 αντίστοιχα. (86) Η οικογένεια Bcl2 χωρίζεται στις παρακάτω 3 υποοικογένειες, ανάλογα με την ομολογία και την λειτουργία κάθε πρωτεΐνης:

1) Μια υποοικογένεια που περιλαμβάνει τις πρωτείνες Bcl-2, Bcl-xl και Bcl-w μεταξύ άλλων, οι οποίες στην πλειοψηφία τους έχουν αντιαποπτωτική δράση και εμφανίζουν σημαντική ομολογία στις BH1, BH2, BH3 και BH4 επικράτειες.

2) Μια υποοικογένεια που εκπροσωπείται από τις πρωτείνες Bax και Bak, οι οποίες εμφανίζουν μεγάλες ομοιότητες στις επικράτειες BH1, BH2 και BH3, αλλά όχι στην επικράτεια BH4, παρόλο που σε ορισμένα μέλη παρατηρείται ομολογία και σε αυτή την περιοχή. Όλες αυτές οι πρωτείνες είναι προαποπτωτικές. (87)

3) Μια υποοικογένεια με πρωτείνες, όπως η Bik και η Bid, που είναι όλες προαποπτωτικές και είναι ομόλογες μόνο στην BH3 περιοχή. (οι αποκαλούμενες BH3-only πρωτείνες) (88) Αυτές οι πρωτείνες φαίνεται πως είναι επιφορτισμένες να προκαλούν απόπτωση ως απόκριση σε ενδοκυτταρική βλάβη ή αναπτυξιακά σήματα. (89) Εκτός από την Bid, δρουν με το να προσδένονται πάνω στις συγγενικές τους αντιαποπτωτικές πρωτείνες και να τις απενεργοποιούν. Οι BH3-only πρωτείνες δεν μπορούν να δράσουν απουσία των Bax και Bak, συνεπώς λειτουργούν ανοδικά στο ίδιο μονοπάτι. (90)



Εικόνα 5: Η πρωτεϊνική οικογένεια Bcl-2. Οι πρωτείνες Bcl2 των θηλαστικών μπορούν να χωριστούν σε 3 υποοικογένειες, τις αντιαποπτωτικές, τις προαποπτωτικές BH3-only και τις προαποπτωτικές BAX και BAK. Η παρουσία των 4 επικρατειών BH φαίνεται στην εικόνα.

1.12.2 Οικογένεια BCL2 στον καρκίνο

Μια πιθανή συσχέτιση μεταξύ καρκινογένεσης και απόπτωσης άρχισε να διαφαίνεται, όταν το γονίδιο BCL2, το οποίο μέσω χρωμοσωμικής μετατόπισης συνδέεται με έναν γενετικό τόπο ανοσοσφαιρίνης στο θυλακοειδές λέμφωμα, βρέθηκε να εμποδίζει τον κυτταρικό θάνατο. (91) Αυτή η αναπάντεχη ανακάλυψη αποτέλεσε το έναυσμα για την σύλληψη της ιδέας, ότι η μειωμένη απόπτωση αποτελεί βασικό βήμα της καρκινογένεσης. Πράγματι, ένα ελαττωματικό πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου επιτρέπει την ανάπτυξη αναδυόμενων νεοπλαστικών κυττάρων που διαθέτουν πολλαπλά εξελικτικά πλεονεκτήματα. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να επιβιώσουν σε εχθρικά περιβάλλοντα (για παράδειγμα, υπό έλλειψη οξυγόνου), να ξεφύγουν τον θάνατο που συνήθως τους επιβάλλεται από διάφορους μηχανισμούς ασφαλείας του οργανισμού και να εξελιχθούν σε ακόμα πιο επιθετικές μορφές. Η ελαττωματική απόπτωση διευκολύνει επιπλέον την μετάσταση όγκων, καθώς τα κύτταρα αγνοούν περιοριστικά σήματα από τους γείτονές τους και επιζούν χωρίς απαραίτητα να είναι προσκολλημένα στην εξωκυττάρια μήτρα. Έτσι, η προοδευτική εξέλιξη ενός καρκίνου αντανακλά σε σημαντικό βαθμό απώλεια των φυσιολογικών αποπτωτικών μηχανισμών. (92,93)

Υπάρχουν αρκετά παραδείγματα όπου η έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν αντιαποπτωτικές ή προαποπτωτικές της οικογένειας μεταβάλλεται σε καρκίνους. Το παράδειγμα της χρωμοσωμικής μετατόπισης του γονιδίου BCL-2 στο θυλακοειδές λέμφωμα έχει ήδη αναφερθεί. Η γονιδιακή ενίσχυση του γονιδίου BCL-2 επίσης έχει παρατηρηθεί σε μη-Hodgkin λεμφώματα και σε μικροκυτταρικούς καρκίνους πνεύμονα. (94,95) Επιπλέον

μηχανισμοί φαίνεται να επιδρούν επίσης στην υπερέκφραση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών σε καρκινικούς όγκους. Ανάμεσα τους είναι η απώλεια ενδογενών microRNAs που φυσιολογικά καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων-μελών της οικογένειας BCL2, όπως συμβαίνει στην χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, όπου στο 70% των περιπτώσεων τα γονίδια που κωδικοποιούν τα miR15 και miR16 διαγράφονται ή απενεργοποιούνται λόγω μεταλλάξεων. (96) Ένας ακόμα μηχανισμός είναι η υπομεθυλίωση γονιδίων της οικογένειας σε ορισμένες κακοήθειες, η οποία αλλοιώνει την επιγενετική ρύθμιση αυτών των γενετικών τόπων. (97)

Μείωση της έκφρασης προαποπτωτικών μελών της οικογένειας BCL2 επίσης συμβαίνει συχνά σε καρκίνους, με αποτέλεσμα την απώλεια της ογκοκατασταλτικής δράσης των συγκεκριμένων γονιδίων. Από αυτή την άποψη το περισσότερο μελετημένο γονίδιο είναι το BAX, για το οποίο ομόζυγες ελλείψεις ή απενεργοποιητικές μεταλλάξεις έχουν βρεθεί, ειδικότερα σε καρκίνους με βασική αιτία μικροδορυφορική αστάθεια λόγω ελαττωματικής επιδιόρθωσης του DNA. (98,99) Βλάβες στη λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα p53 επίσης φαίνεται να προκαλούν παθολογικά μειωμένη έκφραση προαποπτωτικών γονιδίων της BCL2 οικογένειας, μεταξύ των οποίων το BAX, BID και PUMA. (63,100,101) Διαφαίνεται συνεπώς μια ισχυρή σύνδεση μεταξύ της γονιδιακής επιτήρησης που επιτελεί το p53 και την έκφραση γονιδίων θανάτου της οικογένειας BCL2. Πιο πρόσφατα, κυτοσολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του p53 και πρωτεϊνών της οικογένειας BCL2 τόσο προαποπτωτικών όσο και αντιαποπτωτικών, όπως των BAX και BCL2, παρατηρήθηκαν, γεγονός που καταδεικνύει πως το p53 ρυθμίζει την οικογένεια BCL2 σε μεταγραφικό, αλλά και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. (102,103) Η λειτουργία άλλων προαποπτωτικών μελών της οικογένειας επίσης καταστέλλονται μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Για παράδειγμα, η προαποπτωτική πρωτεΐνη BAD φωσφορυλιώνεται από την Akt, καθώς και άλλες πρωτεϊνικές κινάσες γνωστές για την μεγάλη ενεργότητα τους σε καρκίνους, με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή της μέσω πρόσδεσης με τις πρωτεΐνες-ικριώματα 14-3-3. (104)

1.13 Πρωτεΐνη BAX

Το BAX είναι μια καλά μελετημένη πρωτεΐνη, η οποία, παρόλο που εκφράζεται σε μη αποπτωτικά κύτταρα, παραμένει ανενεργή σε αυτά. Σε υγιή κύτταρα η πρωτεΐνη BAX εντοπίζεται στο κυτοσόλιο με ένα μικρό μέρος του πληθυσμού της να είναι χαλαρά συνδεδεμένο με την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.(105,106) Ένα μικρό ποσοστό μπορεί επίσης να εδράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο(107,108), αν και η λειτουργία αυτού παραμένει άγνωστη.(109) Ενεργοποιείται μετά την λήψη ενός σήματος θανάτου, οπότε και τροποποιείται δομικά, μεταναστεύει από το κυτοσόλιο στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, ολιγομερίζεται και σχηματίζει πόρους σε αυτήν, από τους οποίους διάφοροι παράγοντες απόπτωσης απελευθερώνονται. (110)

1.13.1 Δομή της πρωτεΐνης BAX

Η δομή της πρωτεΐνης BAX σε υδατικό περιβάλλον έχει προσδιοριστεί με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR. Αποτελείται από 9 α-έλικες που συνδέονται μεταξύ τους με μικρού

μήκους βρόχους. (111) Τρεις από αυτές τις έλικες, οι α5, α6 και α9 πιθανότατα εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση του BAX με την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Από αυτές οι α5 και α6 είναι αμφιπαθικές έλικες, οργανωμένες σε δομή φουρκέτας, με παρόμοιο τρόπο που οι βακτηριακές τοξίνες σχηματίζουν διπλοστιβάδες σε λιπιδικές διπλοστιβάδες. (112,113)

Οι 19 πρώτες βάσεις του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης έχει φανεί από δεδομένα ετερόλογης έκφρασης και μεταλλαξιγένεσης πως κλειδώνουν το BAX σε μια υδατοδιαλυτή ανενεργή δομή και πως η μετακίνηση αυτής της επικράτειας απαιτείται για να ευνοηθεί η μετακίνηση του BAX στα μιτοχόνδρια. Αυτή η περιοχή ονομάζεται ART (Apoptotic Regulation of Targeting). (114)

Η μοριακή βάση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών της Bcl-2 οικογένειας είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ της BH3 επικράτειας μιας πρωτεΐνης και της BH1/BH2 επικράτειας της άλλης πρωτεΐνης. Παραδείγματος χάρη, η επικράτεια BH3 μπορεί να αλληλεπιδράσει με την επικράτεια BH1 του Bcl-2. Αυτή η ιδιότητα αποτελεί μια από τις βάσεις ρύθμισης του αποπτωτικού δικτύου. Πράγματι, μια BH3-only πρωτεΐνη, όπως η BAD, έχει την ικανότητα να ανταγωνίζεται την BAX για την πρόσδεση της Bcl-2, απελευθερώνοντας έτσι την BAX από αυτή τον καταστολέα της και ενεργοποιώντας την προαποπτωτική λειτουργία της. Η BH3 επικράτεια της BAX αντιστοιχεί χονδρικά στην α2 έλικα. Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι η διαγραφή 4 συντηρημένων αμινοξικών καταλοίπων σε αυτή την έλικα κατέστρεψε ολοκληρωτικά την ικανότητα της BAX να επάγει απόπτωση. (115)

1.13.2 Λειτουργία της πρωτεΐνης BAX

Καθοριστικό σημείο στο ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης είναι η εγκαθίδρυση διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Ύστερα από αυτό το σημείο, η απόπτωση είναι μη αναστρέψιμη. Η BAX και η BAK φαίνεται πως εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία, καθώς ποντίκια με έλλειψη και των δύο πρωτεϊνών ταυτοχρόνως, αλλά όχι μόνο της μίας, εμφανίζουν ελαττωματική απόπτωση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. (116) Επιπλέον, ανάλυση των ινοβλαστών από τα μεταλλαγμένα ποντίκια έδειξε πως η απόπτωση εμποδίζεται στο βήμα της μιτοχονδριακής διαπερατότητας. (117)

Η διάρρηξη της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης απελευθερώνει πρωτείνες από τον διαμεμβρανικό χώρο στο κυτοσόλιο, προκειμένου να ενεργοποιήσει ταχύτατα τις κασπάσες. Η πιο σημαντική είναι το κυτόχρωμα c, που όπως έχει αναφερθεί, συμμετέχει στο αποπτώσωμα και την ενεργοποίηση των κασπασών 9,3, 6 και 7. Οι ενεργοποιημένες κασπάσες πρωτεολύουν διάφορα υποστρώματα και προκαλούν την διάλυση του κυττάρου σε αποπτωτικά σωματίδια, τα οποία φαγοκυτταρώνονται και αποικοδομούνται. Αυτές οι κασπάσες δρουν καθοδικά του σημείου χωρίς επιστροφή, συνεπώς η παρεμπόδιση της ενεργοποίησής τους καθυστερεί τον κυτταρικό θάνατο αλλά δεν τον αναστέλλει. (118) Αυτός ο τύπος κυτταρικού θανάτου, που είναι ανεξάρτητος από τις κασπάσες, είναι γενικά πιο αργός από την απόπτωση και ομοιάζει στην νέκρωση, καθώς το κύτταρο πεθαίνει λόγω απώλειας της μιτοχονδριακής λειτουργίας. (119)

Η δομή του BAX υπόκειται σε δραματική τροποποίηση, προκειμένου η πρωτεΐνη να ενεργοποιηθεί, διμεριστεί και καταστήσει διαπερατή την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. (116) Η ενεργοποίηση περιλαμβάνει την μετατόπιση της πρωτεΐνης από το κυτοσόλιο προς την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, στην οποία και εισάγεται. (105) Το BAX επιπλέον φαίνεται πως σχηματίζει πόρους, η δημιουργία των οποίων μπορεί να ανασταλεί από την Bcl-2. (120) Είναι επομένως δυνατό να γίνει η υπόθεση πως το BAX εμπλέκεται άμεσα στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. Η ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης σε κύτταρα ζύμης, απουσία οποιουδήποτε άλλου αποπτωτικού δικτύου, πράγματι απέδειξε πως το BAX από μόνο του μπορεί να επάγει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (121) και αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώθηκε περαιτέρω σε κύτταρα θηλαστικών. (122)

1.13.3 Η ικανότητα της πρωτεΐνης BAX να σχηματίζει πόρους

Η πρώτη απόδειξη ότι το BAX είναι δυνατόν να καθιστά διαπερατές μεμβράνες προήλθε από τη μελέτη πρωτεϊνών που είχαν ανασυσταθεί σε λιποσώματα. (120) Παρόλα αυτά, το μέγεθος των καναλιών που σχηματίζονταν κάτω από αυτές τις συνθήκες δεν συνάδει με την υπόθεση πως μια πρωτεΐνη σαν το κυτόχρωμα c (μοριακού βάρους 12.5 kDa) θα μπορούσε να περάσει μέσα από αυτά τα κανάλια. Αυτό μπορεί να οφείλονταν στο γεγονός πως, την εποχή αυτή, η τεχνική της παραγωγής ανασυνδυασμένων μελών της οικογένειας Bcl-2 δεν επέτρεπε την σύνθεση μεγάλου μήκους πρωτεϊνών, συνεπώς με πρωτεΐνες που είχαν απουσία της καρβοξυτελικής υδρόφοβης α-έλικας.

Μια σημαντική ανακάλυψη έγινε το 2001, όταν σε εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη ανασυσταμένη σε λιποσώματα βρέθηκε πως σε αποπτωτικά κύτταρα σχηματιζόταν ένα μεγάλο κανάλι, που ονομάστηκε MAC (mitochondrial apoptosis-induced channel), το οποίο δεν ήταν ενεργό παρουσία της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2. Επιπλέον, ένας παρόμοιος πόρος παρατηρήθηκε στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη κυττάρων ζύμης που εξέφραζαν ανθρώπινο BAX. (123) Αυτή ήταν η απόδειξη πως το BAX πράγματι ήταν υπεύθυνο για τη δημιουργία ενός μεγάλου καναλιού με μέγεθος ικανό να εξυπηρετήσει την έξοδο του κυτοχρώματος c. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν πως η ιονική αγωγιμότητα του MAC μειώνεται παρουσία του κυτοχρώματος c ή RNAσης (μοριακού βάρους 14 kDa), αλλά όχι παρουσία αιμοσφαιρίνης (μοριακού βάρους 68 kDa), δείχνοντας πως ο πόρος έχει ένα ανώτατο όριο στο μέγεθος της πρωτεΐνης που μπορεί να τον διαπεράσει. Επίσης, το κυτόχρωμα c δεν έχει επίδραση στην αγωγιμότητα άλλων πόρων της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, όπως του VDAC, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη του MAC ως ενός αυτόνομου πόρου, ανεξάρτητου από άλλα παρόμοια σύμπλοκα. Από σύγκριση των ιδιοτήτων του MAC με αντίστοιχων συνθετικών πόρων που αποτελούνταν από ανασυνδυασμένο BAX, έχει υπολογιστεί πως το MAC αποτελείται από 10 μονομερή του BAX. (124)

Είναι ακόμα άγνωστο αν το MAC ευθύνεται για την απελευθέρωση από τα μιτοχόνδρια όλων των αποπτωτικών παραγόντων ή είναι ειδικό μόνο για το κυτόχρωμα c. Πολλά δεδομένα δείχνουν πως οι αποπτωτικοί παράγοντες δεν απελευθερώνονται όλοι ταυτόχρονα, αλλά διαδοχικά. Όμως η ακριβής σειρά απελευθέρωσης τους διαφέρει μεταξύ διαφορετικών

μελετών. Σε μια μελέτη φάνηκε πως το κυτόχρωμα c εξέρχεται από το μιτοχόνδριο μόνο του πριν από την Smac/DIABLO και την AIF(125), ενώ σε άλλη μελέτη το κυτόχρωμα c και η Smac/DIABLO δείχθηκε να απελευθερώνονται πριν από την AIF.(126) Σε γενικές γραμμές μικρές πρωτείνες όπως το κυτόχρωμα c και η Smac/DIABLO απελευθερώνονται πριν από μεγάλες πρωτεΐνες, όπως οι ενδονουκλεάσες G και AIF. Αυτό το γεγονός θα μπορούσε να είναι συμβατό με την άποψη πως το MAC μπορεί να αυξάνεται σε μέγεθος με την πάροδο του χρόνου ή να σημαίνει πως το MAC επιτελεί μόνο την έξοδο των μικρών πρωτεϊνών από το μιτοχόνδριο με μια άγνωστη διαδικασία να είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση των μεγαλύτερων πρωτεϊνών αργότερα. Για την επίλυση του θέματος απαιτούνται περαιτέρω μελέτες που θα περιέχουν ακριβείς μετρήσεις της κινητικής απελευθέρωσης κάθε αποπτωτικού παράγοντα από το μιτοχόνδριο.

2. Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας στην εύρεση και μελέτη της πρωτοταγούς αλληλουχίας κυκλικών RNA, προερχόμενων από το γονίδιο BAX. Τα κυκλικά RNA είναι μια κατηγορία RNA μορίων, η οποία δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, συνεπώς απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση αυτής. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε μία προσέγγιση, ανεπτυγμένη από άτομα του ερευνητικής μας ομάδας για την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό αυτών των μορίων. Η μεθοδολογία και τα ευρήματα της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας παρουσιάζονται εκτενώς στις παρακάτω ενότητες.

Σε συνδυασμό με τους ερευνητικούς στόχους, η παρούσα Διπλωματική Εργασία είχε εκπαιδευτικό χαρακτήρα, με απώτερο σκοπό την εξοικείωσή του φοιτητή με ποικίλες τεχνικές και ερευνητικές μεθοδολογίες, αλλά και την καλλιέργεια ορθής συμπεριφοράς στο χώρο του εργαστηρίου.

3.Υλικά και μέθοδοι

3.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Σε αυτή τη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές για την απομόνωση RNA, ώστε να διαπιστωθεί εάν περιέχουν κυκλικά μόρια RNA. Χρησιμοποιήθηκαν 7 κυτταρικές σειρές, οι οποίες ήταν οι: Hep G2 (από ιστό συκωτιού), HT-29 και HCT 116 (από παχύ έντερο), NUGC-4 (από στομάχι), MCF-7 και SK-BR-3 (από μαστό) και HEK 293 (αθανатоποιημένα ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα-μη καρκινικά).

3.2 Απομόνωση ολικού RNA από καρκινικές κυτταρικές σειρές

Η απομόνωση RNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του χημικού αντιδραστηρίου TRIzol G™. Το αντιδραστήριο αυτό περιέχει όξινο διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, τα οποία λύουν κύτταρα και απελευθερώνουν άθικτο το RNA από μέσα τους.

Σε κάθε δείγμα ομογενοποιημένου ιστού προστίθενται 0,2 ml χλωροφορμίου και ακολουθεί επώαση 10 λεπτών, ώστε να βελτιωθεί η καθαρότητα του RNA. Ακολουθεί φυγοκέντριση 15 λεπτών στα 12.000 g στους 4 °C. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε έναν νέο δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθενται ο ίδιος όγκος ισοπροπανόλης. Τα δείγματα επώάζονται στον πάγο για 15 λεπτά, για να ιζηματοποιηθεί το RNA. Γίνεται φυγοκέντριση 15 λεπτών στα 12.000 g στους 4 °C. Το RNA αναδιαλυτοποιείται σε 1 ml αιθανόλης 70-80% με ανάδευση και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στα 7500 g στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα αναδιαλυτοποιείται σε 20 μl DEPC-H₂O (diethylpyrocarbonate-H₂O).

3.3 Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητας του απομονωμένου ολικού RNA

Βασιζόμενοι στην ιδιότητα των νουκλεϊκών οξέων να απορροφούν στο υπεριώδες φάσμα φωτός (μέγιστο απορρόφησης 260 nm), μπορούμε να προσδιορίσουμε φωτομετρικά την συγκέντρωση του ολικού RNA. 1μl απομονωμένου ολικού RNA (είτε αραιωμένου σε DEPC-H₂O είτε μη αραιωμένου) φωτομετρείται σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm με φασματοφωτόμετρο Biospec-nano (Shimadzu Europa Analytical Instruments, Japan). Από τον λόγο A₂₆₀/A₂₈₀ μπορούμε να διαπιστώσουμε την καθαρότητα του RNA. Στα 280 nm απορροφά ο δακτύλιος των αρωματικών αμινοξικών καταλοίπων.

3.4 Αντίστροφη μεταγραφή

Τα δείγματα υπέστησαν στη συνέχεια αντίστροφη μεταγραφή, ώστε να παραχθεί cDNA.

Για τη μέθοδο χρησιμοποιείται ένα ειδικό ένζυμο, η αντίστροφη μεταγραφάση, το οποίο συνθέτει συμπληρωματικό DNA από εκμαγείο μονόκλωνου RNA. Στη φύση αντίστροφες μεταγραφάσες συναντώνται κυρίως σε ορισμένους ιούς, όπως στους ρετροϊούς. Το ένζυμο χρειάζεται τριφωσφορικά νουκλεοτίδια και εκκινητές, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Οι εκκινητές μπορεί να είναι είτε εξειδικευμένοι ως προς την αλληλουχία που

επιθυμούμε να μεταγράψουμε αντίστροφα είτε μη εξειδικευμένοι. Η χρήση ειδικευμένου, ως προς το μόριο που μας ενδιαφέρει, εκκινητή αυξάνει την ειδικότητα του προϊόντος, αφού εξαλείφεται ενδεχόμενος ανταγωνισμός που θα πρόκυπτε από έναν μη εξειδικευμένο εκκινητή. Στην συγκεκριμένη περίπτωση όμως χρησιμοποιήθηκαν τυχαία εξαμερή ως εκκινητές, προκειμένου να μετατραπεί το ολικό RNA των κυττάρων σε DNA και να μπορούμε να προσδιορίσουμε πολλαπλά κυκλικά μόρια του γονιδίου *BAX*.

3.4.1 Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής

Χρησιμοποιήθηκε η M-MLV αντίστροφη μεταγραφάση. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε 3 μg ολικού RNA, 1μl dNTPs (10mM), 1μl oligo-dT αντάπτορα και H₂O ελεύθερο RNAσών. Έγινε επώαση για 5 λεπτά στους 65°C και έπειτα, ύστερα από επώαση 2 λεπτών στους 37°C προστέθηκαν στο δοκιμαστικό σωλήνα 4μl 5X First Strand Buffer, 2μl 0.1M DTT, 1μl RNaseOUT™ (Life Technologies Ltd.) αναστολέα RNAσών (40 units/ μl) και 1μl M-MLV Reverse Transcriptase (αντίστροφη μεταγραφάση) (200 units). Το μείγμα επώαστηκε για 10 λεπτά στους 25°C και για 50 λεπτά στους 37°C. Η αντίδραση απενεργοποιήθηκε με θέρμανση στους 70°C για 15 λεπτά.

3.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ταχεία *in vitro* ενίσχυση μιας μικρής ποσότητας DNA, ώστε να είναι δυνατή η μελέτη αυτής. Η μέθοδος βασίζεται στην επανάληψη θερμικών κύκλων, που ο καθένας τους αποτελείται από 3 στάδια: την αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA, τον υβριδισμό των εκκινητών στο εκμαγείο DNA και την επιμήκυνση, δηλαδή την σύνθεσης μιας νέας αλυσίδας DNA από την πολυμεράση, συμπληρωματικής με το εκμαγείο. Η θερμοκρασία για την αποδιάταξη είναι 95°C, για τον υβριδισμό των εκκινητών εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά τους, αλλά κυμαίνεται μεταξύ 50-65°C και για την επιμήκυνση είναι 72°C. Η χρονική διάρκεια της επιμήκυνσης εξαρτάται από το μήκος της αλληλουχίας που θέλουμε να ενισχύσουμε, καθώς 1 λεπτό επιμήκυνσης μπορεί να ενισχύσει DNA μήκους 1kb. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης απαιτούνται τριφωσφορικά νουκλεοτίδια, ειδικό ζεύγος εκκινητών (πρόσθιος και ανάστροφος) και DNA πολυμεράση, καθώς και ένα ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκαν ειδικά σχεδιασμένα ζεύγη εκκινητών για το γονίδιο *BAX*.

3.5.1 Σχεδιασμός εκκινητών PCR

Καθοριστική είναι η χρήση των κατάλληλων εξειδικευμένων εκκινητών για την επιτυχία ενός πειράματος PCR. Οι εκκινητές θα πρέπει να ενισχύουν αποκλειστικά την περιοχή που μας ενδιαφέρει, χωρίς να σχηματίζονται παραπροϊόντα. Θα πρέπει επίσης να μην ομοδιμερίζονται και ετεροδιμερίζονται, όπως και μην διαθέτουν δευτεροταγείς δομές, ώστε να μην μειώνεται η απόδοση της αντίδρασης. Έτσι, οι εκκινητές οφείλουν να:

- Έχουν μήκος 18-22 νουκλεοτίδια κατά προτίμηση, για να είναι αυξημένη η ειδικότητα και καλή η απόδοση.

- Έχουν περιεκτικότητα σε GC 40-60%, με τα 3' άκρα των εκκινητών να μην έχουν πάνω από 3 βάσεις GC, ώστε να αποφευχθεί μη επιθυμητός υβριδισμός.
- Μην έχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ενός ή δύο νουκλεοτιδίων.
- Μην σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές.

3.5.2 Γονίδια σταθερής έκφρασης (housekeeping genes)

Τα γονίδια σταθερής έκφρασης είναι γονίδια που εκφράζονται σταθερά σε όλα τα κύτταρα, είτε αυτά είναι φυσιολογικά είτε είναι παθολογικά και είναι απαραίτητα για την επιβίωση των κυττάρων. Για πειραματικούς σκοπούς, χρησιμοποιούνται ως έλεγχος της αξιοπιστίας μιας αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής και PCR. Για αυτή την διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

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

Ο πρόσθιος εκκινητής για την ενίσχυση τμήματος του *GAPDH* στο εξώνιο 2, ενώ ο ανόστροφος στο εξώνιο 4. Το μήκος του προϊόντος PCR που προκύπτει είναι 223 bp. (Πίνακας 1)

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

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

3.5.4 Μελέτη της έκφρασης ευθύγραμμων μεταγράφων του γονιδίου *BAX*

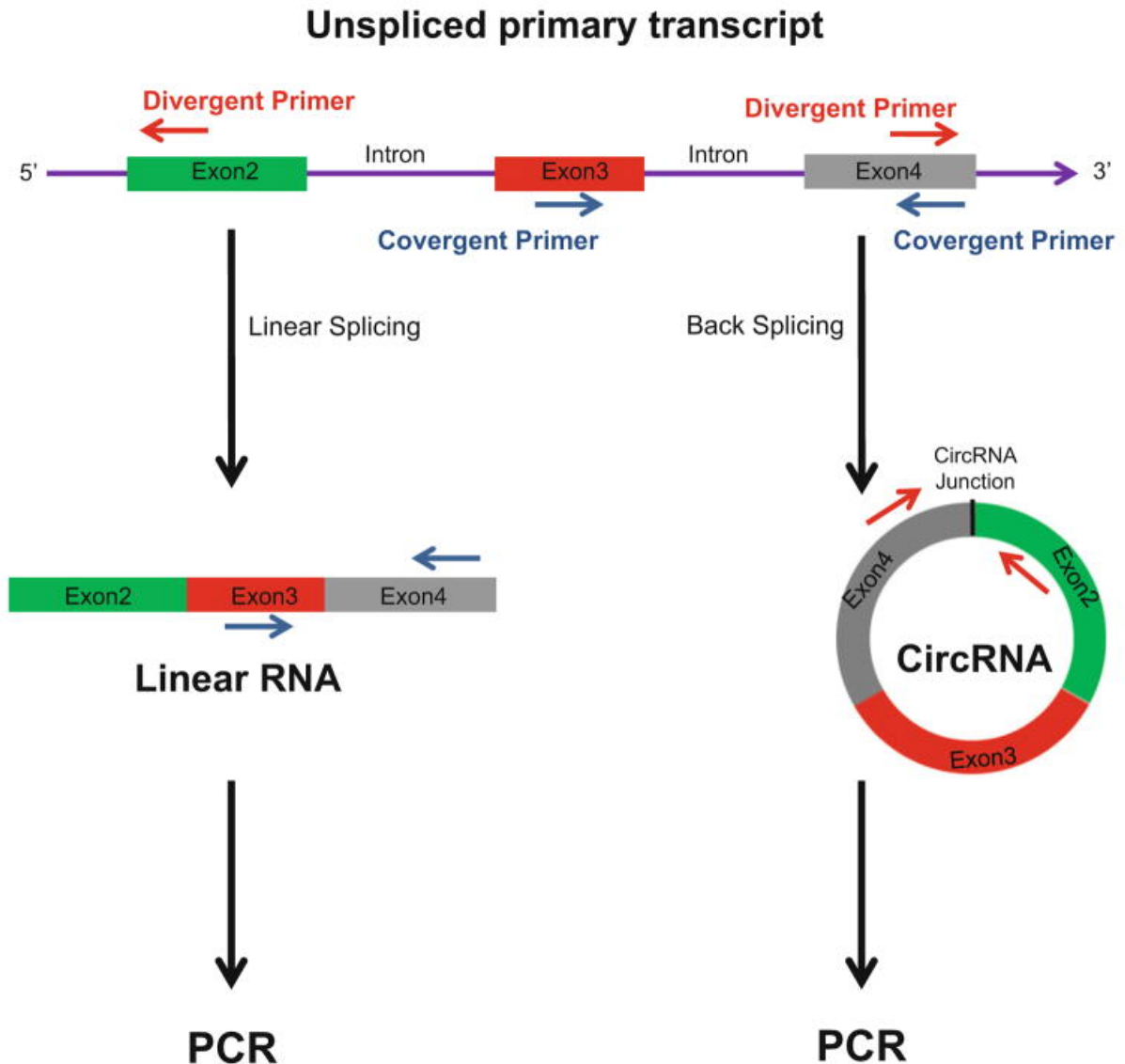
Έπειτα πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασης ευθύγραμμων μεταγράφων του γονιδίου *BAX* στις κυτταρικές σειρές του ενδιαφέροντος μας, προκειμένου να διαπιστωθεί η έκφραση του γονιδίου σε αυτά τα κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκαν αρχικά ο πρόσθιος εκκινητής *BAX F(ATG)*, που αναγνωρίζει το εξώνιο 1, και ο οπίσθιος εκκινητής *BAX aex7newR*, που αναγνωρίζει το εξώνιο 7. (Πίνακας 2) Τα μήκη των παραγόμενων προϊόντων αναφέρονται στο κομμάτι των αποτελεσμάτων.

Όνομα	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος (nt)	Ποσοστό GC (%)	T _m (°C)
<i>BAX F(ATG)</i>	GAGCGGCGGTGATGGACGG	19	74	69
<i>BAX aex7newR</i>	CCTCAGCCCATCTTCTCCAGA	22	55	62

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

3.5.6 Χρήση αποκλιόντων εκκινητών για την εύρεση κυκλικών μορίων RNA

Προκειμένου να γίνει εξειδικευμένη ενίσχυση των κυκλικών RNA και διαχωρισμός τους από τα ευθύγραμμα μόρια, χρησιμοποιούνται αποκλίνοντες εκκινητές. Οι αποκλίνοντες εκκινητές είναι στραμμένοι σε αντίθετες κατευθύνσεις, γεγονός που σημαίνει πως μπορούν να ενισχύσουν μόνο κυκλικά μόρια RNA και όχι ευθύγραμμα μόρια. Σε ένα κυκλικό RNA λόγω της παρουσίας του συνδέσμου της οπισθοσυρραφής παρατηρούνται μη αναμενόμενα junctions, τα οποία δεν συναντώνται σε ευθύγραμμα μόρια. Συνεπώς, αποκλίνοντες εκκινητές είναι δυνατόν να συγκλίνουν τελικώς στα κυκλικά RNA, λόγω ακριβώς της ένωσης ενός καθοδικού 3' άκρου με ένα ανοδικό 5' άκρο, χαρακτηριστικής του φαινομένου της οπισθοσυρραφής.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση συγκλινόντων και αποκλινόντων εκκινητών.

3.7 Επάλληλη PCR (Nested PCR)

Η επάλληλη PCR είναι μια παραλλαγή της PCR, όπου χρησιμοποιούνται δύο σετ εκκινητών σε δύο διαφορετικές αντιδράσεις. Το προϊόν της 1^{ης} αντίδρασης χρησιμοποιείται ως εκμαγείο από τους εκκινητές της 2^{ης} αντίδρασης για ενίσχυση τμήματος που βρίσκεται στο εσωτερικό του. Η τεχνική χρησιμεύει για τον περιορισμό της παραγωγής μη ειδικών προϊόντων, τα οποία οφείλονται σε μη ειδικές προσδέσεις των εκκινητών. Η χρήση του δεύτερου εσωτερικού ζευγαριού εκκινητών επιτρέπει την ενίσχυση μόνο του επιθυμητού προϊόντος. Επιπλέον, αυξάνεται η ευαισθησία της ανάλυσης, καθώς είναι δυνατή η πραγματοποίηση περισσότερων θερμικών κύκλων, συνεπώς και η ανίχνευση μιας αλληλουχίας που βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση στο δείγμα.

3.7.1 Εκκινητές για μελέτη έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου *BAX* σε επάλληλη PCR

Με χρήση του λογισμικού Primer Blast, σχεδιάστηκαν ζεύγη ειδικών αποκλιόντων εκκινητών επάλληλης PCR για την ενίσχυση τμημάτων cDNA που ανήκουν σε κυκλικά μόρια RNA. Ο πρόσθιος εκκινητής *BAX Ex6 F outer* υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 6, όπως αντίστοιχα και ο ανάστροφος εκκινητής *BAX Ex6 R inner*. Εσωτερικότερα αυτών και επίσης αποκλίνοντας μεταξύ τους, υβριδοποιούνται ο πρόσθιος εκκινητής *BAX Ex6 F inner* και ο ανάστροφος εκκινητής *BAX_Ex6_Ra_inner*. Τέλος, ο ανάστροφος εκκινητής *BAX newEx4 R* υβριδοποιείται στο εξώνιο 4.

Όνομα	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος (nt)	Ποσοστό GC (%)	T _m (°C)
<i>BAX Ex6 F outer</i>	CATGGGCTGGACATTGGAC	20	55	61
<i>BAX Ex6 R inner</i>	AGTCCAATGTCCAGCCCAT	20	55	61
<i>BAX Ex6 F inner</i>	GATCCAAGACCAGGGTGGT	20	55	60
<i>BAX_Ex6_Ra_inner</i>	GATCAGTTCGGCACCTTG	20	60	62
<i>BAX newEx4 R</i>	CACCAGTTTGCTGGCAAAG	20	50	60

3.7.2 Συνθήκες συμβατικής και επάλληλης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) του γονιδίου *BAX*

Σε όλες τις αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν 35 κύκλοι, με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης στους 95°C για 3 λεπτά, έπειτα οι θερμικοί κύκλοι με το στάδιο αποδιάταξης στους 95°C για 30 sec, το στάδιο υβριδοποίησης για 30 sec σε θερμοκρασία που εξαρτώνταν από την αλληλουχία των εκκινητών, το στάδιο επιμήκυνσης στους 72°C για 1 λεπτό και ένα τελικό στάδιο

επιμήκυνσης στους 72°C για 1 λεπτό. Η αντίδραση τερματίζεται με επώαση στους 4°C, και τα προϊόντα μπορούν να αποθηκευτούν στην ίδια θερμοκρασία.

Για την πρώτη PCR χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο 0,5 μl μη αραιωμένου διαλύματος cDNA, ενώ για τις επάλληλες PCR 1 μl αραιωμένο PCR προϊόν. Η αραιώση που εφαρμόστηκε ήταν 1:50. Επίσης, προστέθηκαν σε κάθε μίγμα 1μl πρόσθιου εκκινητή και 1μl ανάστροφου εκκινητή, τελικής συγκέντρωσης 400Mm, 2,5μl ρυθμιστικού διαλύματος (με τελική συγκέντρωση Mg^{2+} 1,5mM), 0,5μl dNTPs (συγκέντρωσης 10nM το καθένα από τα 4 νουκλεοτίδια), 0,2μl πολυμεράσης (200units) και τέλος DEPC-H₂O, σε τόσο όγκο έτσι ώστε η αντίδραση να έχει τελικό όγκο 25μl.

3.8 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος ανάλυσης και διαχωρισμού μακρομορίων, όπως DNA, RNA και πρωτεϊνών, βάσει του μεγέθους τους. Χρησιμοποιείται ευρύτατα στη βιοχημεία και μοριακή βιολογία για πολλούς σκοπούς, όπως την ανάλυση προϊόντων της PCR ή την προετοιμασία DNA αλληλούχισης. Βασίζεται στην εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, προκειμένου να μετακινηθούν τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα μέσα από ένα πήκτωμα. Τα μικρότερα σε μέγεθος μόρια μετακινούνται γρηγορότερα, καθώς μπορούν ευκολότερα να διέλθουν από τους πόρους του πηκτώματος, ενώ μεγαλύτερα μόρια κινούνται βραδύτερα. Ο πολυσακχαρίτης αγαρόζη χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του πηκτώματος, καθώς είναι κατάλληλος για τον διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων που έχουν ένα ευρύ φάσμα μεγεθών. Η αγαρόζη δημιουργεί πόρους, διαμέτρου αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης της. Όσο μεγαλύτεροι σε διάμετρο οι πόροι, τόσο ευκολότερη και ταχύτερη είναι η διέλευση των μορίων διαμέσου του πηκτώματος. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την μετακίνηση των νουκλεϊκών οξέων είναι η στερεοδιαμόρφωση τους και η ένταση του χρησιμοποιούμενου ρεύματος. Προκείμενου να είναι δυνατή μια πρώτη εκτίμηση για το μήκος των αγνώστων ζωνών του δείγματος, ηλεκτροφορείται παράλληλα και ένας μάρτυρας (ladder) με ζώνες γνωστού μεγέθους.

3.8.1 Ανίχνευση των προϊόντων της PCR του γονιδίου BAX με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και κόψιμο των ζωνών ενδιαφέροντος

Το πήκτωμα της αγαρόζης είχε συγκέντρωση 2%, κατάλληλη για τα μήκη των αναμενόμενων προϊόντων. Η σκόνη αγαρόζης αναμιγνύεται με Tris/Βορικό/EDTA Buffer 1X (TBE) και λιώνει στους 100°C για 4 λεπτά. Έπειτα, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο με αναλογία 1:1000, το οποίο εκπέμπει στο υπεριώδες, ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση των προϊόντων DNA. Το πήκτωμα τρέχει στα 170-180 V και σε διάλυμα TBE 0.5X. Χρησιμοποιώντας νυστέρι μίας χρήσης, κόβουμε τις επιθυμητές ζώνες.

3.9 Καθαρισμός PCR προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης με χρήση στηλών

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

3.9.1 Καθαρισμός PCR προϊόντων του BAX από πήκτωμα αγαρόζης με χρήση στηλών

Για κάθε 100mg αγαρόζης προστίθενται 200μl Binding Buffer (απαραίτητο για την πρόσδεση του DNA στην κολώνα) και γίνεται επώαση για 5-10min στους 50°C, μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Στη συνέχεια, το διάλυμα μεταφέρεται στην κολώνα και φυγοκεντρείται για 1min στα 11.000g, προκειμένου να προσδεθεί το DNA στην στήλη. Προστίθενται στην κολώνα 700μl Wash Buffer (το οποίο περιέχει αιθανόλη και άρα επάγει την απομάκρυνση ρύπων και προσμίξεων). Ακολουθεί και άλλη φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες με προηγουμένως, και επαναλαμβάνεται το στάδιο του πλυσίματος μία ακόμη φορά. Στο τέλος, προστίθενται 20-30μl Elution Buffer, το οποίο είναι χαμηλής περιεκτικότητας σε αλάτι και άρα οδηγεί στην έκλυση του DNA. Μετά το πέρας της διαδικασίας τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C.

3.10 Προσδιορισμός συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων με φθορισμομετρία

Προκειμένου να βρούμε την συγκέντρωση του προϊόντος ύστερα από τον καθαρισμό, χρησιμοποιούμε την μέθοδο της φθορισμομετρίας. Η φθορισμομετρία είναι πολύ πιο ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος σε σχέση με τη φωτομετρία, για αυτό και προτιμάται. Βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η φθορισμομετρία είναι η εξής: ένα μόριο διεγείρεται σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος απορρόφησης και στη συνέχεια μετρείται η εκπομπή σε ένα άλλο μήκος κύματος, που καλείται μήκος κύματος φθορισμού.

Απαραίτητα για τη μέτρηση είναι το Buffer και η φθορίζουσα χρωστική. Τα δύο αυτά αντιδραστήρια αναμιγνύονται, έτσι ώστε η χρωστική να βρίσκεται σε αναλογία 1:200 (Working Solution). Ο όγκος, ο οποίος μετρείται είναι 200μl, συμπεριλαμβανομένου του δείγματος. Ο όγκος του δείγματος μπορεί να κυμαίνεται από 1-10μl. Οπότε, αναλόγως του όγκου του δείγματος προσθέτουμε μέχρι τα 200μl το Working Solution. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.

3.11 Αλληλούχηση με τη μέθοδο Sanger

Η αλληλούχηση Sanger είναι μία μέθοδος αλληλούχισης DNA που βασίζεται στην εκλεκτική ενσωμάτωση διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) από την DNA πολυμεράση κατά τη διάρκεια *in vitro* DNA πολλαπλασιασμού. Τα νουκλεοτίδια αυτά έχουν έλλειψη της 3' υδροξυλικής ομάδας, απαραίτητης για την δημιουργία του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των νουκλεοτιδίων, άρα μπορούν να περιορίζουν την περαιτέρω επιμήκυνση της αλυσίδας. Τα ddNTPs σημαίνονται με φθορισμό ή ραδιενέργεια, ώστε να εντοπίζονται από τα αυτοματοποιημένα μηχανήματα αλληλούχισης. Το δείγμα DNA χωρίζεται σε 4 διαφορετικές αντιδράσεις αλληλούχισης, καθεμία

από τις οποίες περιέχει και τα 4 βασικά δεοξυνοκλεοτίδια (dATP, dGTP, dCTP and dTTP) και την DNA πολυμεράση. Σε καθεμία από τις αντιδράσεις, όμως, προστίθεται μόνο ένα από τα τέσσερα διδεοξυνοκλεοτίδια. Η συγκέντρωση των διδεοξυνοκλεοτιδίων πρέπει να είναι 100 φορές χαμηλότερη από αυτήν του αντίστοιχου νοκλεοτιδίου, έτσι ώστε να παραχθούν αρκετά τμήματα, ενώ η πλήρης αλληλουχία συνεχίζει να αντιγράφεται. Έπειτα από επαναλαμβανόμενους γύρους επέκτασης του DNA εκμαγείου, τα τμήματα DNA, που έχουν προκύψει, αποδιατάσσονται θερμικά και χωρίζονται βάσει μεγάλους ηλεκτροφορητικά. X-ray ταινία εκτίθεται στο πήκτωμα και οι μαύρες ζώνες, που δημιουργούνται, αντιπροσωπεύουν DNA θραύσματα διαφορετικών μηκών, τα οποία είναι το αποτέλεσμα του τερματισμού της αλυσίδας μετά την ενσωμάτωση ενός διδεοξυνοκλεοτιδίου. Οι σχετικές θέσεις διαφορετικών ζωνών από κάτω προς τα πάνω, χρησιμοποιούνται για το διάβασμα της DNA αλληλουχίας. Η προαναφερθείσα τεχνική σήμανσης αποτελεί την πρώτη προσέγγιση, την οποία ακολούθησαν ποικίλες διαφοροποιήσεις. Τα δείγματα μας στάλθηκαν σε εξειδικευμένο ερευνητικό κέντρο για αλληλούχηση Sanger.

3.12 Βιοπληροφορική ανάλυση

Στις αλληλουχίες κυκλικών RNA που απομονώθηκαν χρησιμοποιήθηκαν ορισμένα βιοπληροφορικά εργαλεία πρόβλεψης αλληλεπιδράσεων των κυκλικών RNA με άλλα μόρια, όπως και πρόβλεψης λειτουργίας αυτών.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το βιοπληροφορικό εργαλείο miRDB, το οποίο μπορεί να πραγματοποιήσει πρόβλεψη των miRNA που μπορεί να προσδένονται σε μια δεδομένη αλληλουχία circRNA. Κάθε πρόβλεψη λαμβάνει ένα σκορ που μπορεί να έχει τιμή από 50 μέχρι 100. Όσο υψηλότερο το σκορ, τόσο ισχυρότερη και πιθανότερη θεωρείται μια αλληλεπίδραση. Προβλέψεις που εμφανίζουν σκορ πάνω από 80 είναι πιο πιθανό να αντιστοιχούν σε πραγματικές αλληλεπιδράσεις. (127)

Έπειτα, εφαρμόστηκε το εργαλείο ORF finder, το οποίο ανιχνεύει ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης σε μια αλληλουχία που του δίνεται και υπολογίζει το μέγεθος και τη θέση κάθε πλαισίου, όπως και την πρωτεϊνική αλληλουχία που παράγεται από αυτό.

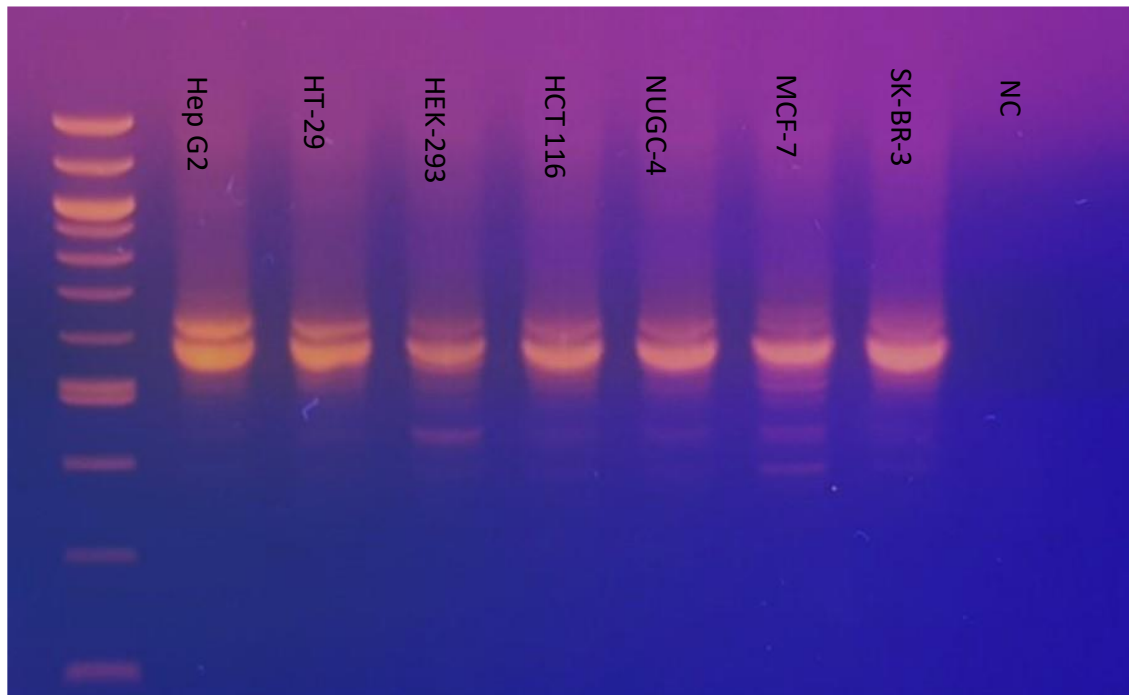
Το IRESpy είναι ένα εργαλείο που προβλέπει εσωτερικές θέσεις εισόδου ριβοσωμάτων (IRES), οι οποίες συναντώνται σε μερικά κυκλικά RNA και ρόλος τους είναι να στρατολογούν το ριβόσωμα απουσία της 5' καλύπτρας. Το πρόγραμμα λαμβάνει ως είσοδο την αλληλουχία του κυκλικού μορίου και μας δίνει αποτέλεσμα, εάν δηλαδή συναντώνται IRES στη δεδομένη αλληλουχία ή όχι. Τέλος, το RBPmap είναι ένα εργαλείο που προβλέπει RBPs που είναι πιθανόν να προσδένονται σε μια δεδομένη αλληλουχία RNA. (128)

Σημειώνουμε πως τα παραπάνω εργαλεία δεν είναι εξειδικευμένα για κυκλικά μόρια, συνεπώς κάναμε χρήση δύο διαφορετικών διατάξεων των εξωνίων των κυκλικών RNA που εντοπίσαμε, ώστε να ληφθούν υπόψη όλες οι διαφορετικές θέσεις τους που μπορεί να εμφανίζουν μια λειτουργία ή να αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια.

4.Αποτελέσματα

4.1 Εύρεση κυκλικών RNA από το γονίδιο BAX

Αρχικά, μελετήσαμε την έκφραση του BAX στους 7 ιστούς που προαναφέρθηκαν. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε PCR χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών BAX F(ATG) και BAX aex7newR (Πίνακας 2). Με αυτό τον τρόπο, διακρίνουμε εάν υπάρχει έκφραση ευθύγραμμων μεταγράφων του γονιδίου BAX. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης που εφαρμόστηκε στο πρωτόκολλο ήταν 60°C με επιμήκυνση 1,5 min και τα αναμενόμενα μήκη των προϊόντων ήταν μεταξύ άλλων 553 bp και 592 bp. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



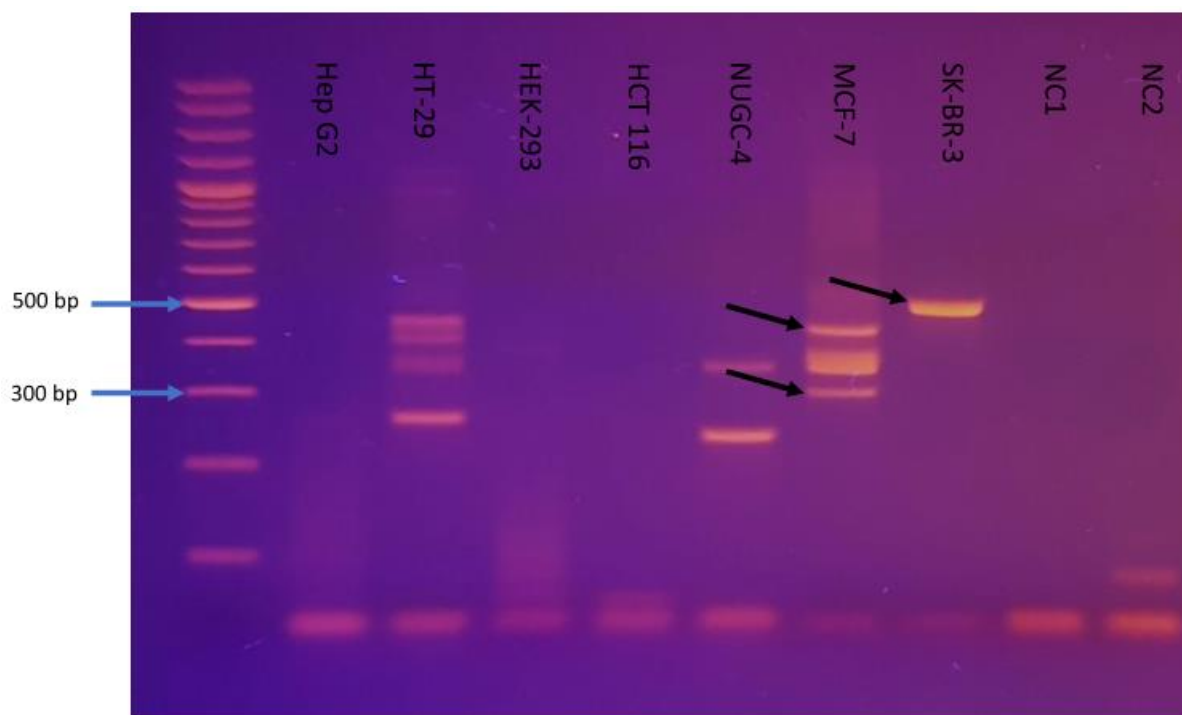
Εικόνα 7: Αποτελέσματα μελέτης της έκφρασης του BAX στους 7 ιστούς. Στο πρώτο πηγαδάκι έχει τρέξει ladder 100 bp για το σχετικό προσδιορισμό του μηκών των υπόλοιπων ζωνών, ενώ στο τελευταίο έχει τρέξει αρνητικός μάρτυρας της PCR, με προσθήκη H₂O αντί για εκμαγείου. Στα ενδιάμεσα πηγαδάκια έχουν τρέξει τα δείγματα με τη σειρά των ιστών, όπως αναφέρεται.

Όπως φαίνεται από την εικόνα, το γονίδιο BAX φαίνεται να εκφράζεται με υψηλή έκφραση σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν, παθολογικούς και φυσιολογικούς, δεδομένου ότι παίρνουμε ανιχνεύσιμες ζώνες στο πήκτωμα μετά από μόλις 1 αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Έπειτα, ακολούθησαν πολλαπλές αντιδράσεις επάλληλης PCR με χρήση αποκλινόντων εκκινητών, ώστε να διαπιστωθεί η ύπαρξη κυκλικών μορίων προερχόμενων από το γονίδιο BAX.

Τα μήκη των προϊόντων υπολογίστηκαν αρχικά κατά προσέγγιση μέσω ηλεκτροφόρησης και με τη βοήθεια του ladder. Στη συνέχεια, οι επιθυμητές ζώνες κόβονταν και στέλνονταν για αλληλούχηση Sanger. Εάν εντοπιζόταν το backsplice junction στο χρωματογράφημα, ακολουθούσαν περαιτέρω PCR με αποκλίνοντες εκκινητές που αναγνώριζαν το ίδιο εξώνιο, προκειμένου να απομονώσουμε όσο δυνατόν περισσότερο την πλήρη δομή του μορίου.

Στα παραγόμενα πηκτώματα αгарόζης βρέθηκαν αρκετές ζώνες πιθανών circRNA με προέλευση από το BAX. Εμείς αρχικά κόψαμε ζώνες που είχαν προκύψει από ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντος με πρώτη PCR να έχει γίνει με τους εκκινητές BAX Ex6Fouter- BAX Ex6Rinner και επάλληλη PCR με τους εκκινητές BAX Ex6Finner – BAX newEx4R. Η χρονική διάρκεια του σταδίου της επιμήκυνσης ήταν 1min, ενώ η θερμοκρασία υβριδοποίησης ήταν 60°C στην πρώτη PCR και 59°C στην δεύτερη. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.



Εικόνα 8: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης PCR προϊόντος, προερχομένου από επάλληλη PCR με χρήση αποκλίνοντων εκκινητών. Στα αριστερά έχει τρέξει ladder 100 bp, ενώ στα δεξιά έχουν τρέξει δύο αρνητικοί μάρτυρες, ο πρώτος από την πρώτη PCR (NC1) και ο δεύτερος από τη δεύτερη PCR (NC2). Με μαύρα βέλη υποδεικνύονται οι ζώνες που κόπηκαν και στάλθηκαν για αλληλούχηση Sanger.

Επικεντρωθήκαμε μόνο σε συγκεκριμένες ζώνες του πηκτώματος στις κυτταρικές σειρές MCF-7 και SK-BR-3, καθώς αυτές είχαν παρατηρηθεί να εμφανίζονται σε επαναλήψεις του πειράματος με σταθερό τρόπο, αυξάνοντας την πιθανότητα να αντιπροσωπεύουν πραγματικά κυκλικά μόρια. Στη σειρά MCF-7 οι ζώνες είχαν μήκος γύρω στα 300 και 450 bp αντίστοιχα, ενώ στη σειρά SK-BR-3 η ζώνη εμφανιζόταν γύρω στα 500 bp. Η αλληλούχηση Sanger έδειξε την

ύπαρξη backsplice junction, μη αναμενόμενου σε ευθύγραμμο μετάγραφο. Συνεπώς, πραγματοποιήσαμε δεύτερο κύκλο πειραμάτων, ώστε να πάρουμε όλη την δομή των μορίων.

Σε αυτή την περίπτωση, έγινε PCR στις κυτταρικές σειρές MCF-7 και SK-BR-3, χρησιμοποιώντας ως πρώτο ζευγάρι εκκινητών τους BAX Ex6Fouter- BAX Ex6Rinner και ως δεύτερο ζευγάρι εκκινητών στην επάλληλη PCR τους BAX Ex6Finner – BAX Ex6_Ra_inner, με θερμοκρασία υβριδοποίησης τους 60°C και στις δύο PCR και χρόνο επιμήκυνσης 1 min. Στα αποτελέσματα παρατηρήθηκε το ίδιο πρότυπο, όπως στην παραπάνω εικόνα, για αυτές τις δύο σειρές. Οι ζώνες κόπηκαν και αλληλουχήθηκαν, οπότε πήραμε την παρακάτω πρωτοταγή δομή για τα τρία circRNAs.

>MCF-7 300 bp

```
GATCCAAGACCAGGGTGGTTGGGTGAGACTCCTCAAGCCTCCTCACCCCCACCACCGCGCC  
TCACCACCGCCCCTGGCCCTGGACCCGGTGCCTCAGGATGCGTCCACCAAGAAGCTGAGCGAGT  
GTCTCAAGCGCATCGGGGACGAACCTGGACAGTAACATGGAGCTGCAGAGGATGATTGCCGCGT  
GGACACAGACTCCCCCGAGAGGTCTTTTCCGAGTGGCAGCTGACATGTTTTCTGACGGCAAC  
TTCAACTGGGGCCGGTTGTCGCCCTTTTCTACTTTGCCAGCAAACCTGGTGCTCAAGGCCCTGT  
GCACCAAGGTGCCGGAACCTGATCAGAACCATCATGGGCTGGACATTGGACTTCCTCCGGGAGCG  
GCTGTTGGGCTG
```

>MCF-7 450 bp

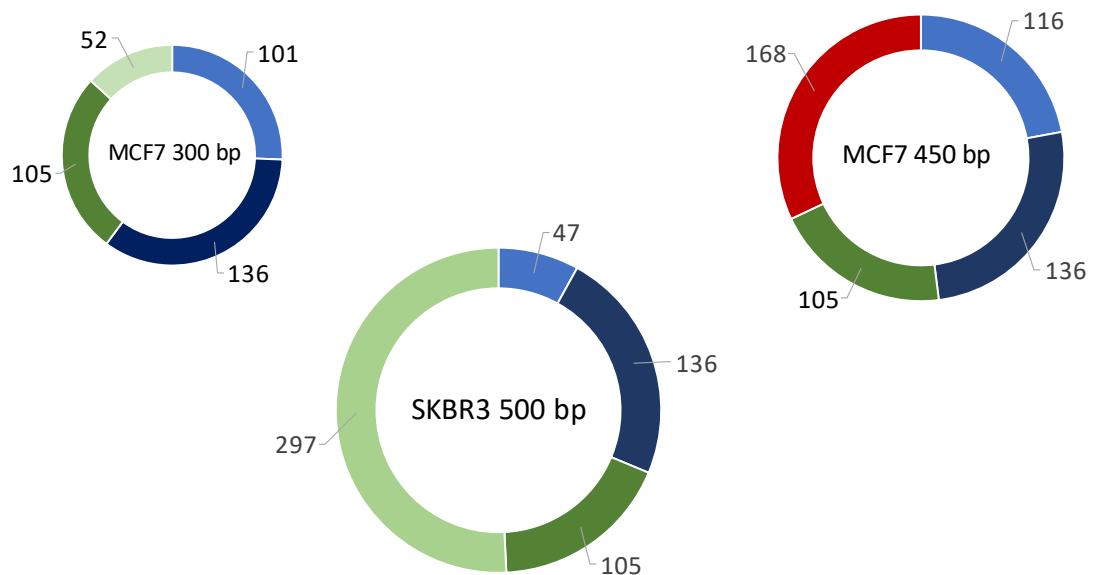
```
GATCCAAGACCAGGGTGGTTGGGACGGCCTCCTCTCCTACTTTGGGACGCCACGTGGCAGA  
CCGTGACCATCTTTGTGGCGGGAGTGTCCACCGCCTCACTCACCATCTGGAAGAAGATGGGCTG  
AGGCCCCCAGCTGCCTTGGACTGTGTTTTTCTCCATAAATTATGGCATTTTTCTGGGAGGGGT  
GGGGAGGCACCCGAGCTGGCCCTGGACCCGGTGCCTCAGGATGCGTCCACCAAGAAGCTGAGCG  
AGTGTCTCAAGCGCATCGGGGACGAACCTGGACAGTAACATGGAGCTGCAGAGGATGATTGCCG  
CGTGGACACAGACTCCCCCGAGAGGTCTTTTCCGAGTGGCAGCTGACATGTTTTCTGACGGC  
AACTTCAACTGGGGCCGGTTGTCGCCCTTTTCTACTTTGCCAGCAAACCTGGTGCTCAAGGCC  
TGTGCACCAAGGTGCCGGAACCTGATCAGAACCATCATGGGCTGGACATTGGACTTCCTCCGGGA  
GCGGCTGTTGGGCTG
```

>SK-BR-3 500 bp

```
GATCCAAGACCAGGGTGGTTGGGTGAGACTCCTCAAGCCTCCTCACCCCCACCACCGCGCC  
TCACCACCGCCCCCTGCCCCACCGTCCCTGCCCCCGCCACTCCTCTGGGACCCTGGGCCTTCTG  
GAGCAGGTCACAGTGGTGGCCTCTCCCCATCTTCAGATCATCAGATGTGGTCTATAATGCGTTT  
TCCTTACGTGTCTGATCAATCCCCGATTCATCTACCCTGCTGACCTCCAGTGACCCCTGACCT  
CACTGTGACCTTGACTTGATTAGTGCCTTCTGCCCTCCCTGGAGCCTCCACTGCCTCTGGAATT  
GCTCAAGCGCATCGGGGACGAACCTGGACAGTAACATGGAGCTGCAGAGGATGATTGCCGCGTG  
GACACAGACTCCCCCGAGAGGTCTTTTCCGAGTGGCAGCTGACATGTTTTCTGACGGCAACT  
TCAACTGGGGCCGGTTGTCGCCCTTTTCTACTTTGCCAGCAAACCTGGTGCTCAAGGCCCTGT  
CACCAAGGTGCCGGAACCTGATCAGAACCATCATGGGCTGGACATTGGACTTCCTCCGGGAGCG  
CTGTTGGGCTG
```

Στις αλληλουχίες με πράσινο σημειώνεται το εξώνιο 6, με πράσινη υπογράμμιση το εσώνιο μεταξύ των εξωνίων 6 και 7, με γαλάζιο το εξώνιο 3, με σκούρο μπλε το εξώνιο 4 και με κόκκινο το εξώνιο 7. Με κόκκινη υπογράμμιση σημειώνεται η περιοχή που αναγνωρίζεται ο πρόσθιος εκκινητής BAX Ex6Finner και με κίτρινα γράμματα η περιοχή που αναγνωρίζει ο ανάστροφος εκκινητής BAX Ex6_Ra_inner. Στο δεύτερο μόριο με μαύρη υπογράμμιση και πλάγια γραφή επισημαίνονται οι βάσεις που στοιχίζονται σε δύο εξώνια, και συγκεκριμένα στο 7^ο και στο 3^ο. Στα άλλα δύο κυκλικά επίσης υπάρχουν βάσεις, που στοιχίζονται στο εξώνιο 3 και στο εσώνιο 6 ταυτοχρόνως και επισημαίνονται με γαλάζιο χρώμα και πράσινη υπογράμμιση. Το εξώνιο 3 είναι σε όλες τις περιπτώσεις κοντύτερο στο 5' άκρο, ενώ το εσώνιο 6 και το εξώνιο 7 είναι κοντύτερα στο 3' άκρο τους.

Παράκατω δίνεται και η σχηματική αναπαράσταση των κυκλικών RNA που βρέθηκαν.



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση των νέων circRNA που απομονώσαμε. Τα μεγέθη των κύκλων είναι σε κλίμακα. Με γαλάζιο χρώμα σημειώνεται το εξώνιο 3, με μπλε το εξώνιο 4, με πράσινο το εξώνιο 6, με ανοιχτό πράσινο το εσώνιο 6 και με κόκκινο το εξώνιο 7. Οι αριθμοί δηλώνουν το μέγεθος σε αριθμό βάσεων του κάθε εξωνίου.

4.2 Χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων πρόβλεψης λειτουργιών κυκλικών RNA

Εφαρμόστηκαν τα βιοπληροφορικά εργαλεία που αναφερθηκαν παραπάνω σε κάθε ένα κυκλικό μόριο ξεχωριστά. Για το 1^ο κυκλικό RNA έχουμε τα εξής αποτελέσματα από την miRDB:

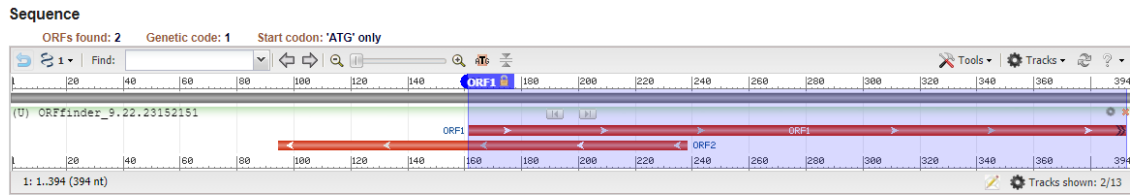
Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol
Details	1	84	hsa-miR-9851-5p	submission
Details	2	84	hsa-miR-152-5p	submission
Details	3	70	hsa-miR-4716-5p	submission
Details	4	69	hsa-miR-4641	submission
Details	5	66	hsa-miR-3663-3p	submission
Details	6	56	hsa-miR-4710	submission
Details	7	55	hsa-miR-3128	submission
Details	8	54	hsa-miR-3918	submission
Details	9	53	hsa-miR-10398-3p	submission
Details	10	50	hsa-miR-4660	submission

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol
Details	1	84	hsa-miR-9851-5p	submission
Details	2	83	hsa-miR-152-5p	submission
Details	3	70	hsa-miR-4716-5p	submission
Details	4	67	hsa-miR-4641	submission
Details	5	65	hsa-miR-3663-3p	submission
Details	6	58	hsa-miR-4710	submission
Details	7	54	hsa-miR-3128	submission
Details	8	52	hsa-miR-10398-3p	submission
Details	9	51	hsa-miR-4660	submission

Εικόνα 10: Αποτελέσματα από την ανάλυση με το εργαλείο miRDB

Εμφανίζονται υψηλά σκορ με ορισμένα miRNA, αλλά κανένα δεν έχει ιδιαίτερα υψηλή έκφραση σε ανθρώπινα κύτταρα.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήσαμε το ORF finder και είχαμε τα ακόλουθα αποτελέσματα.



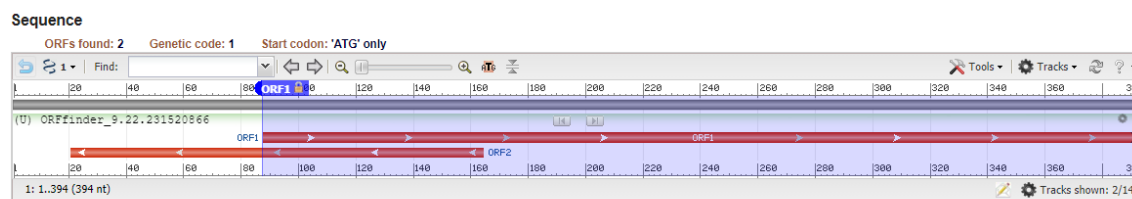
ORF1 (76 aa) [Display ORF as...](#) [Mark](#)

```
>|c1|ORF1
MELQRHIAAVDTDSPREVFRVAADHFSDGNFNMGRVVALFYFASKLVLK
ALCTKVPPELLIRTIMGWTLDFLRERLLG
```

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

Label	Strand	Frame	Start	Stop	Length (nt aa)
ORF1	+	3	162	>392	231 76
ORF2	-	1	238	95	144 47

Six-frame translation...



ORF1 (101 aa) [Display ORF as...](#) [Mark](#)

```
>|c1|ORF1
MELQRHIAAVDTDSPREVFRVAADHFSDGNFNMGRVVALFYFASKLVLK
ALCTKVPPELLIRTIMGWTLDFLRERLLGHISDQGGNVRLLKFPHPHRAALT
TA
```

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

Label	Strand	Frame	Start	Stop	Length (nt aa)
ORF1	+	1	88	>393	306 101
ORF2	-	3	164	21	144 47

Six-frame translation...

Εικόνα 11: Αποτελέσματα ανάλυσης από το ORF finder. Εστιάζουμε μόνο στα ORFs που αντιστοιχούν στην (+) αλυσίδα, καθώς το RNA μας είναι μονόκλωνο.

Παρατηρούμε ότι δεν εντοπίζονται ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης από την ανάλυση, που να έχουν καθορισμένο τέλος, λόγω απουσίας κωδικονίου λήξης.

Έπειτα, κάνουμε χρήση του εργαλείου IRESpy με τα αποτελέσματα να φαίνονται πιο κάτω.

Show entries Search:

	Oligo_name	Prob_IRES	Pred_label
	<input type="text" value="All"/>	<input type="text" value="All"/>	<input type="text" value="All"/>
1	Mcf7	0.0658299624919891	potential not IRES
2	Mcf7	0.0649467930197716	potential not IRES

Showing 1 to 2 of 2 entries Previous Next

Εικόνα 12: Αποτελέσματα από την ανάλυση με το εργαλείο IRESpy.

Το εργαλείο δεν εντοπίζει θέσεις IRES σε αυτό το κυκλικό RNA.

Εφαρμόσαμε το εργαλείο RBP map και πήραμε τα αποτελέσματα που φαίνονται στο παράρτημα Α.

Και με την δεύτερη αναδιάταξη των εξωνίων παίρνουμε αποτελέσματα που φαίνονται στο παράρτημα Β.

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

Τα παραπάνω βιοπληροφορικά εργαλεία χρησιμοποιήθηκαν και στο 2^ο κυκλικό RNA. Τα αποτελέσματα από την miRDB φαίνονται παρακάτω.

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol
Details	1	87	hsa-miR-4802-5p	submission
Details	2	87	hsa-miR-1843	submission
Details	3	84	hsa-miR-9851-5p	submission
Details	4	83	hsa-miR-152-5p	submission
Details	5	74	hsa-miR-5590-5p	submission
Details	6	70	hsa-miR-3663-3p	submission
Details	7	69	hsa-miR-766-5p	submission
Details	8	69	hsa-miR-186-3p	submission
Details	9	67	hsa-miR-4641	submission
Details	10	65	hsa-miR-4716-5p	submission
Details	11	55	hsa-miR-4258	submission
Details	12	54	hsa-miR-3128	submission
Details	13	52	hsa-miR-3918	submission
Details	14	52	hsa-miR-10398-3p	submission

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol
Details	1	87	hsa-miR-4802-5p	submission
Details	2	87	hsa-miR-1843	submission
Details	3	81	hsa-miR-152-5p	submission
Details	4	79	hsa-miR-5590-5p	submission
Details	5	76	hsa-miR-9851-5p	submission
Details	6	70	hsa-miR-766-5p	submission
Details	7	69	hsa-miR-4716-5p	submission
Details	8	68	hsa-miR-3663-3p	submission
Details	9	67	hsa-miR-186-3p	submission
Details	10	56	hsa-miR-3918	submission
Details	11	55	hsa-miR-4641	submission
Details	12	54	hsa-miR-4258	submission
Details	13	50	hsa-miR-5685	submission
Details	14	50	hsa-miR-4690-3p	submission

Εικόνα 13: Αποτελέσματα από την ανάλυση με την miRDB

Εμφανίζονται υψηλά σκορ με ορισμένα miRNA, αλλά κανένα δεν έχει ιδιαίτερα υψηλή έκφραση σε ανθρώπινα κύτταρα.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με το εργαλείο ORF finder και πήραμε τα παρακάτω.

Sequence
ORFs found: 6 Genetic code: 1 Start codon: 'ATG' only

ORF1 (40 aa) Display ORF as... Mark

```
>|c1|ORF1
MAFFNIEGHWGGTRAGPGPGASGCVHQEAEVRSQAHRGRTGQ
```

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

Label	Strand	Frame	Start	Stop	Length (nt aa)
ORF2	+	2	293	>523	231 76
ORF4	-	1	369	226	144 47
ORF1	+	1	169	291	123 40
ORF5	-	1	108	37	72 23
ORF3	-	1	483	415	69 22
ORF6	-	3	163	98	66 21

ORF1 Marked set (0) SmartBLAST SmartBLAST best hit titles...

Sequence
ORFs found: 5 Genetic code: 1 Start codon: 'ATG' only

ORF1 (119 aa) Display ORF as... Mark

```
>|c1|ORF1
MELQMIIAAVDTPSPREVFFRVAADMFSDGNFINWRVVALFYFASKLVLK
ALCTKVPPELLIRTIMGITLDFLRLLGHWIQDQGGIDGLLSYFGTPTWQTV
TIFVAGVLTASLTINKKMG
```

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

Label	Strand	Frame	Start	Stop	Length (nt aa)
ORF1	+	1	103	462	360 119
ORF5	-	2	179	36	144 47
ORF3	-	2	443	372	72 23
ORF4	-	2	293	225	69 22
ORF2	-	1	498	433	66 21

ORF1 Marked set (0) SmartBLAST SmartBLAST best hit titles...

Εικόνα 14: Αποτελέσματα ανάλυσης από το ORF finder. Εστιάζουμε μόνο στα ORFs που αντιστοιχούν στην (+) αλυσίδα.

Το εργαλείο προβλέπει την ύπαρξη δύο ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης, ενός μήκους 40 αμινοξικών καταλοίπων και ενός μήκους 119 αμινοξικών καταλοίπων.

Το εργαλείο IRESpy δεν εντοπίζει εσωτερικές θέσεις πρόσδεσης ριβοσώματος, όπως φαίνεται παρακάτω.

Show entries Search:

	Oligo_name	Prob_IRES	Pred_label
	<input type="text" value="All"/>	<input type="text" value="All"/>	<input type="text" value="All"/>
1	Mcf7	0.11692076176405	potential not IRES
2	Mcf7	0.11709289252758	potential not IRES

Showing 1 to 2 of 2 entries Previous Next

Εικόνα 15: Αποτελέσματα από την ανάλυση με το εργαλείο IRESpy.

Χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο RBPmap στο 2^ο κυκλικό RNA. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παράρτημα Γ.

Με την δεύτερη αναδιάταξη των εξωνίων παίρνουμε αποτελέσματα που παρατίθενται στο παράρτημα Δ.

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

Εφαρμόζουμε τα εργαλεία στο 3^ο κυκλικό RNA που εντοπίσαμε και παίρνουμε τα ακόλουθα αποτελέσματα αρχικά από την miRDB.

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol
Details	1	83	hsa-miR-9851-5p	submission
Details	2	83	hsa-miR-152-5p	submission
Details	3	78	hsa-miR-3619-5p	submission
Details	4	75	hsa-miR-761	submission
Details	5	75	hsa-miR-214-3p	submission
Details	6	69	hsa-miR-651-3p	submission
Details	7	68	hsa-miR-4502	submission
Details	8	67	hsa-miR-4641	submission
Details	9	65	hsa-miR-4716-5p	submission
Details	10	64	hsa-miR-3663-3p	submission
Details	11	63	hsa-miR-542-5p	submission
Details	12	62	hsa-miR-224-5p	submission
Details	13	55	hsa-miR-92a-2-5p	submission
Details	14	55	hsa-miR-4710	submission
Details	15	53	hsa-miR-3128	submission
Details	16	53	hsa-miR-216a-3p	submission
Details	17	53	hsa-miR-128-3p	submission
Details	18	52	hsa-miR-525-5p	submission
Details	19	52	hsa-miR-520a-5p	submission
Details	20	51	hsa-miR-10398-3p	submission
Details	21	51	hsa-miR-383-5p	submission
Details	22	51	hsa-miR-4728-5p	submission

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol
Details	1	83	hsa-miR-9851-5p	submission
Details	2	82	hsa-miR-3619-5p	submission
Details	3	81	hsa-miR-152-5p	submission
Details	4	78	hsa-miR-761	submission
Details	5	78	hsa-miR-214-3p	submission
Details	6	72	hsa-miR-542-5p	submission
Details	7	72	hsa-miR-224-5p	submission
Details	8	70	hsa-miR-4716-5p	submission
Details	9	70	hsa-miR-651-3p	submission
Details	10	68	hsa-miR-4502	submission
Details	11	64	hsa-miR-3663-3p	submission
Details	12	60	hsa-miR-525-5p	submission
Details	13	60	hsa-miR-520a-5p	submission
Details	14	57	hsa-miR-216a-3p	submission
Details	15	57	hsa-miR-128-3p	submission
Details	16	56	hsa-miR-4728-5p	submission
Details	17	56	hsa-miR-383-5p	submission
Details	18	55	hsa-miR-4641	submission
Details	19	54	hsa-miR-92a-2-5p	submission
Details	20	54	hsa-miR-4710	submission
Details	21	54	hsa-miR-6799-5p	submission
Details	22	53	hsa-miR-3128	submission
Details	23	50	hsa-miR-4660	submission

Εικόνα 16: Αποτελέσματα από την ανάλυση με την miRDB

Εμφανίζονται υψηλά σκορ με ορισμένα miRNA, αλλά κανένα δεν έχει ιδιαίτερα υψηλή έκφραση σε ανθρώπινα κύτταρα.

Συνεχίζουμε, κάνοντας χρήση του ORFfinder στο ίδιο κυκλικό μόριο.

Sequence

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

Label	Strand	Frame	Start	Stop	Length (nt aa)
ORF1	+	2	353	>583	231 76
ORF2	-	1	429	274	156 51
ORF3	-	1	156	43	114 37

ORF1 (76 aa) Display ORF as... Mark

```
>|c1|ORF1
MELQRHIAAVDTSPREVFRVAADHFSQGNFHWGRVVALFYFASKLVK
ALCTKVPFLIRTIMGHTLDFLRERLLG
```

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

Sequence

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

Label	Strand	Frame	Start	Stop	Length (nt aa)
ORF1	+	1	34	471	438 145
ORF2	-	2	422	309	114 37
ORF3	-	2	110	>3	108 35

ORF1 (145 aa) Display ORF as... Mark

```
>|c1|ORF1
MELQRHIAAVDTSPREVFRVAADHFSQGNFHWGRVVALFYFASKLVK
ALCTKVPFLIRTIMGHTLDFLRERLLGNIQDQGGVRLKPPHPRHALT
TAPAPPSLPATPLGPMHAFWSRQICPLIFRSDVVVYNAFLRV
```

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

Εικόνα 17: Αποτελέσματα ανάλυσης από το ORF finder. Εστιάζουμε μόνο στα ORFs που αντιστοιχούν στην (+) αλυσίδα.

Βλέπουμε πως γίνεται πρόβλεψη για την ύπαρξη ενός ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης, μήκους 145 αμινοξικών καταλοίπων, με καθορισμένη αρχή και τέλος.

Εφαρμόζουμε και το εργαλείο IRESpy, το οποίο δεν προβλέπει την ύπαρξη θέσεων IRES στην αλληλουχία αυτού του μορίου.

Show entries Search:

	↕ Oligo_name	↕ Prob_IRES	↕ Pred_label
	<input type="text" value="All"/>	<input type="text" value="All"/>	<input type="text" value="All"/>
1	skbr3	0.122994594275951	potential not IRES
2	skbr3	0.12208192050457	potential not IRES

Showing 1 to 2 of 2 entries Previous Next

Εικόνα 18: Αποτελέσματα από την ανάλυση με το εργαλείο IRESpy.

Τέλος, εφαρμόζουμε το εργαλείο RBPmap και για το 3^ο κυκλικό RNA και παίρνουμε αποτελέσματα που φαίνονται στο παράρτημα Ε.

Με την άλλη αναδιάταξη των εσωνίων παίρνουμε επίσης αποτελέσματα που παρατίθενται στο παράρτημα ΣΤ.

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

5. Συζήτηση

Το γονίδιο *BAX* αποτελεί ένα πολύ σημαντικό γονίδιο για την διαδικασία της απόπτωσης, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, υπεύθυνη για την πραγματοποίηση του καθοριστικού βήματος του ενδογενούς μονοπατιού, που είναι η έξοδος του κυτοχρώματος *c* από τα μιτοχόνδρια. Συνεπώς, το *BAX* είναι μια ισχυρά αντιαποπτωτική πρωτεΐνη, η οποία προάγει τον κυτταρικό θάνατο παρουσία συγκεκριμένων σημάτων, όπως είναι οι βλάβες στο DNA. Επιπλέον, αλληλεπιδρά με πολλές άλλες πρωτεΐνες- μέλη της οικογένειας *Bcl2* και όχι μόνο, αποτελώντας με αυτό τον τρόπο κόμβο στο αποπτωτικό δίκτυο.

Ως προαποπτωτική πρωτεΐνη, το *BAX* ουσιαστικά έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο, προωθώντας τον θάνατο κυττάρων που μπορεί να φέρουν επικίνδυνες μεταλλάξεις και να έχουν απορυθμισμένο κυτταρικό κύκλο μεταξύ άλλων. Δεν αποτελεί έκπληξη λοιπόν πως έχει δειχθεί να έχει μειωμένη έκφραση σε πολλούς καρκινικούς ιστούς και καρκινικές σειρές, αναμεσά τους και στον καρκίνο του μαστού. (129–131) Έχει προταθεί επίσης και ως χημειοθεραπευτικός στόχος, καθώς η υπερεκφρασή του μπορεί να συμβάλει στην ίαση του καρκίνου, καθιστώντας τα καρκινικά κύτταρα πιο ευαίσθητα σε ακτινοθεραπεία.(132)

Η οπισθοσυρραφή επίσης, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ανταγωνίζεται με την κανονική συρραφή, καθώς χρησιμοποιούν ίδιους μηχανισμούς του κυττάρου για την εκτέλεση τους. Με αυτό τον τρόπο, η εύρεση κυκλικών RNA προερχόμενων από το γονίδιο *BAX* σε καρκινικές σειρές μαστού είναι δυνατόν να αντανakλά την μειωμένη έκφρασή του σε αυτά τα κύτταρα ή ακόμα και να αποτελεί μηχανισμό μείωσης της έκφρασης γραμμικών μεταγράφων του γονιδίου *BAX*. Οι μηχανισμοί όμως για αυτό το φαινόμενο, εάν όντως υπάρχει, δεν είναι προς το παρόν γνωστοί, οπότε χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση προς αυτή την κατεύθυνση. Εξάλλου, η εικόνα που πήραμε στα πηκτώματα αγαρόζης από την μελέτη της έκφρασης του γραμμικού *BAX* δεν συμφωνεί με τις βιβλιογραφικές αναφορές που εντοπίζουν μειωμένη έκφραση του γονιδίου σε καρκίνους. Παρόλα αυτά, η εικόνα από το πήκτωμα αγαρόζης δεν δίνει ακριβή ποσοτική πληροφορία της παρουσίας ενός γονιδίου, κάτι που μπορεί να πραγματοποιηθεί με άλλες τεχνικές, όπως η *real-time PCR*.

Από το *BAX* πάντως φάνηκε να παράγονται πολλά κυκλικά RNA, βάσει της εικόνας από τα πηκτώματα που πήραμε, αλλά λόγω περιορισμένου χρόνου δεν ήταν δυνατός ο καθαρισμός και η αλληλούχιση όλων των αντίστοιχων ζωνών. Μελλοντικά πειράματα είναι δυνατόν να κινηθούν προς αυτή την κατεύθυνση, προσπαθώντας να αποσαφηνίσουν την πρωτοταγή δομή κυκλικών μορίων που είναι πιθανό να εμπλέκονται σε διαδικασίες ρύθμισης, εμφάνισης και εξέλιξης καρκίνου, ειδικότερα εφόσον το *BAX* είναι ένα γονίδιο με αποδεδειγμένο ρόλο στη αποτροπή νεοπλασιών. Έτσι, μπορεί να είναι δυνατή η διαλεύκανση των μηχανισμών που ωθούν τα κύτταρα να ξεφύγουν από το καθορισμένο κυτταρικό μονοπάτι και να γίνουν καρκινικά.

Επιπλέον, εμείς απομονώσαμε ζώνες που εμφανίζονταν με επαναλήψιμο τρόπο κατά την εκτέλεση της ίδιας PCR, όμως δεν διέθεταν όλες οι ζώνες το ίδιο πρότυπο έκφρασης. Επομένως, μια περαιτέρω βελτιστοποίηση της διαδικασίας αποτελεί η τροποποίηση των συνθηκών της PCR, όπως της θερμοκρασίας υβριδοποίησης ή των εκκινητών που χρησιμοποιούνται, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα εμφάνισης παραπροϊόντων.

Εν προκειμένω, εμείς πραγματοποιήσαμε επάλληλη PCR με δύο ζευγάρια εκκινητών, που πιάνουν στο εξώνιο 6 του *BAX*. Συνεπώς, απομονώσαμε κυκλικά RNA που περιείχαν ολόκληρο το εξώνιο 6 στην αλληλουχία τους. Εκτός από το εξώνιο 6, τα κυκλικά αυτά RNA περιείχαν και ολόκληρο το εξώνιο 4. Περιείχαν και μέρη του εξωνίου 3, διαφορετικά όμως μεταξύ τους. Το MCF-7 300 bp και το SK-BR-3 500 bp περιείχαν επίσης και τμήματα του εσωνίου 6, το οποίο έχει φανεί πως διατηρείται σε ορισμένα ευθύγραμμα μετάγραφα του *BAX*. Το MCF-7 450 bp όμως περιείχε αντί αυτού τμήμα του εξωνίου 7. Παρατηρείται στην πράξη δηλαδή το φαινόμενο της εναλλακτικής κυκλοποίησης, όπου πολλαπλά διαφορετικά κυκλικά RNA είναι δυνατόν να παράγονται από το ίδιο γονίδιο, λόγω της συρραφής διαφορετικών τμημάτων αυτού από διαφορετικές θέσεις.

Ειδικότερα για το εξώνιο 3, το οποίο μάλιστα έχει και σχετικά μικρό μήκος, παρατηρούμε 3 διαφορετικές εναλλακτικές θέσεις συρραφής στο 5' άκρο του, μία σε κάθε RNA που απομονώσαμε, οι οποίες όλες είναι διαφορετικές από την κανονική θέση συρραφής που χρησιμοποιείται στα ευθύγραμμα μετάγραφα. Αυτό το γεγονός καταδεικνύει την ευελιξία των μηχανισμών ματίσματος και την ικανότητα ρύθμισης αυτών σε πολλαπλά επίπεδα, όπως και την αναγκαιότητα περαιτέρω διερεύνησης αυτού του πεδίου.

Ακόμη, σε όλα τα κυκλικά RNA που εντοπίστηκαν παρατηρείται το φαινόμενο λίγες βάσεις γύρω από τη θέση της οπισθοσυρραφής να στοιχίζονται σε δύο εξώνια ταυτοχρόνως, με αποτέλεσμα να είναι αδύνατον να προσδιορίσουμε σε ποια περιοχή του γονιδίου ανήκουν. Το παραπάνω γεγονός μπορεί να αποκαλύψει στοιχεία από τον μηχανισμό της βιογένεσης των κυκλικών μορίων, καθώς μια πιθανή εξήγηση του είναι πως μια πρωτεΐνη αναγνωρίζει συγκεκριμένα μοτίβα στην αλληλουχία του γονιδίου, προκειμένου να επιτελέσει οπισθοσυρραφή σε αυτό το σημείο. Έτσι, δηλαδή συγκεκριμένες αλληλουχίες μπορεί να ευνοούν την οπισθοσυρραφή περισσότερο από άλλες. Η ιδιότητα αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για την κατασκευή αλγορίθμου που προβλέπει αλληλουχίες κυκλικών RNA, δεδομένης της αλληλουχίας ενός γονιδίου, διευκολύνοντας έτσι τον σχεδιασμό πειραματικών μεθόδων για τον εντοπισμό αυτών των μορίων. Θα έχει ενδιαφέρον επίσης η έρευνα να στραφεί σε αυτό το κομμάτι, της εύρεσης δηλαδή των πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συμπλόκων που συμβάλλουν στην βιογένεση *circRNAs* με ειδικό, αλλά και με μη ειδικό τρόπο. Η πιθανή εμπλοκή αυτών των μηχανισμών, εάν υπάρχουν, σε ασθένειες, όπως ο καρκίνος, μένει επίσης να αποδειχθεί.

Η ποσοτικοποίηση των νέων κυκλικών μορίων επίσης είναι πολύ χρήσιμη και θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με PCR πραγματικού χρόνου. Η σχετική ποσοτικοποίηση θα προκύψει από σύγκριση της αφθονίας των κυκλικών RNA με ένα γονίδιο αναφοράς ή με τα ευθύγραμμα μετάγραφα, βασιζόμενοι στην τιμή CT του καθενός. Έτσι, θα είναι δυνατόν να δούμε αν παράγονται σε ικανή ποσότητα, για να μπορούν να ρυθμίζουν αποδοτικά διάφορες διεργασίες. Ακόμη, χρήσιμη θα είναι η εύρεση της τοπολογίας των κυκλικών RNA, εάν εντοπίζονται δηλαδή στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα ή σε άλλο σημείο του κυττάρου, ώστε να διευκολυνθεί και η αποσαφήνιση των αλληλεπιδράσεων τους, αλλά και η λειτουργία τους στις διάφορες διεργασίες του κυττάρου.

Από την *in silico* ανάλυση των αλληλεπιδράσεων των κυκλικών αυτών RNA με άλλα miRNA η πλειοψηφία τους δεν βρέθηκε να έχει εντοπιστεί σε μεγάλες ποσότητες σε ανθρώπινα κύτταρα, ούτε και να εμπλέκεται με κάποιο τρόπο στον καρκίνο του μαστού. Απαιτείται όμως περισσότερο μελέτη για αυτό, καθώς οι προβλέψεις ενός αλγορίθμου μπορεί να είναι λανθασμένες, είτε παρουσιάζοντας αλληλεπιδράσεις που δεν υπάρχουν πραγματικά, είτε παραλείποντας αλληλεπιδράσεις που όντως υπάρχουν. Από την άλλη σε 2 από τα 3 κυκλικά RNA εντοπίστηκαν ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης με συγκεκριμένη αρχή και τέλος, όμως μένει να αποδειχτεί εάν υπάρχουν πραγματικά, ειδικότερα εφόσον δεν προβλέφθηκαν αντίστοιχες θέσεις IRES σε αυτά. Χρειάζονται παραπάνω πειράματα για αποσαφήνιση των λειτουργιών αυτών των κυκλικών RNA, όπως και των αλληλεπιδράσεων τους με άλλα μόρια.

Τα κυκλικά RNA αποτελούν μια ομάδα RNA μορίων που έχει ανακαλυφθεί πρόσφατα και δεν έχουν μελετηθεί ακόμα εκτενώς. Είναι πολλά υποσχόμενα μόρια με ενδείξεις που δείχνουν πως παίζουν ρόλο σε πολλές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου, αλλά και σε φυσιολογικούς ιστούς. Οι λειτουργίες τους και η ρυθμιστική τους δράση μπορούν να αποβούν καθοριστικές στην προώθηση ή αποτροπή πολλών παθολογικών καταστάσεων. Με αυτόν τον τρόπο, ορισμένα circRNA είναι πιθανό να ταυτοποιηθούν στο μέλλον ως βιοδείκτες, για παράδειγμα στον καρκίνο. Μπορούν ακόμα και να αποτελέσουν θεραπευτικό στόχο με εξειδικευμένες θεραπείες που στοχεύουν στην μείωση ή αύξηση της έκφρασης τους, ανάλογα με την επίδραση που έχουν στον καρκίνο. Χρήση ειδικών αντισωμάτων για παράδειγμα, για δέσμευση ενός ογκογόνου circRNA ή εισαγωγή ενός συνθετικά παρασκευασμένου ογκοκατασταλτικού circRNA στον οργανισμό ενός ασθενούς αποτελούν πιθανές μελλοντικές λύσεις για ένα αριθμό μη ιάσιμων προς το παρόν ασθενειών. Η ανάπτυξη της εξατομικευμένης ιατρικής μπορεί να προωθήσει ακόμα περαιτέρω τέτοιου είδους καινοτομίες. Ακόμη όμως, μια τέτοια προοπτική δεν διαφαίνεται στο βραχυπρόθεσμο μέλλον, καθώς χρειάζεται περισσότερη εργαστηριακή διερεύνηση των κυκλικών RNA, προτού είναι κατάλληλα για εργαστηριακή χρήση.

Μελέτη της έκφρασης κυκλικών μορίων RNA (circRNAs) του γονίδιου *BAX* σε ανθρώπινες, επιθηλιακές κυτταρικές σειρές καρκίνου

Ιωάννα Ζούπα

Διπλωματική Εργασία

Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η ύπαρξη κυκλικών RNAs του γονιδίου *BAX* σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα. Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη *BAX*, μια προαποπτωτική πρωτεΐνη, μέλος της οικογένειας *Bcl2*, η οποία έχει ως κύρια λειτουργία τον σχηματισμό πόρων στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβρανή, ώστε να εξέλθει το κυτόχρωμα *c* από το μιτοχόνδριο. Το βήμα αυτό αποτελεί το καθοριστικό βήμα του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης, σημαίνοντας πως η πρωτεΐνη *BAX* αποτελεί κύριο ρυθμιστή της ιδιαίτερα σημαντικής διαδικασίας του κυτταρικού θανάτου.

Τα κυκλικά RNA είναι μια κατηγορία μονόκλωνων RNA, που σε αντίθεση με τα γραμμικά RNA, έχουν ομοιοπολικά συνδεδεμένα τα 5' και 3' άκρα τους, σχηματίζοντας ένα κλειστό κυκλικό σχήμα. Παράγονται από μια μη κανονική διαδικασία συρραφής, την οπισθοσυρραφή. Έχει φανεί πως έχουν μια πληθώρα λειτουργιών, καθώς μπορούν να λειτουργούν ως ρυθμιστές της μεταγραφής, πρωτεϊνικά ικρίωματα, σπόγγοι miRNAs και RBPs, όπως και να μεταφράζονται. Έχει βρεθεί επίσης να παίζουν ρόλο στον καρκίνο με ποικίλους μηχανισμούς, ρυθμίζοντας διάφορα κυτταρικά μονοπάτια και αλληλοεπιδρώντας με πρωτεΐνες και άλλα μόρια RNA.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η παρουσία κυκλικών RNA, προερχόμενων από το γονίδιο *BAX* σε 7 κυτταρικές σειρές, οι 6 από τις οποίες ήταν καρκινικές. Η διαδικασία αποτελούνταν από την απομόνωση RNA, τον φωτομετρικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του, την εφαρμογή των μεθόδων της αντίστροφης μεταγραφής, της επάλληλης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, την απομόνωση ζωνών ενδιαφέροντος και την αλληλούχιση κατά Sanger.

Αποτέλεσμα ήταν η εύρεση τριών νέων κυκλικών RNA από τις καρκινικές σειρές μαστού MCF-7 και SK-BR-3, το οποίο μελετήθηκε περαιτέρω με χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων. Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη των πιθανών αλληλεπιδράσεων των μορίων αυτών με miRNAs καθώς και με πρωτεΐνες, αλλά και πρόβλεψη ύπαρξης ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης και εσωτερικών θέσεων πρόσδεσης ριβοσωμάτων.

Η λειτουργία και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτών των κυκλικών RNA είναι δυνατόν στη συνέχεια να προσδιοριστούν με μεγαλύτερη λεπτομέρεια, ώστε να αναδειχθεί ο ρόλος τους στον καρκίνο και πιθανώς σε άλλες παθολογικές καταστάσεις, καθώς και ο τρόπος που εμπλέκονται στις διάφορες διαδικασίες του κυττάρου.

Βιβλιογραφία:

1. Qu S, Yang X, Li X, Wang J, Gao Y, Shang R, et al. Circular RNA: A new star of noncoding RNAs. *Cancer Lett* [Internet]. 2015;365(2):141–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.06.003>
2. Barrett SP, Salzman J. Circular RNAs: Analysis, expression and potential functions. *Dev*. 2016;143(11):1838–47.
3. Chen LL, Yang L. Regulation of circRNA biogenesis. *RNA Biol*. 2015;12(4):381–8.
4. Guo JU, Agarwal V, Guo H, Bartel DP. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biol*. 2014;15(7):1–14.
5. Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *Rna*. 2013;19(3):426.
6. Artemaki PI, Scorilas A, Kontos CK. Circular RNAs: A new piece in the colorectal cancer puzzle. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9):1–22.
7. Zhang Y, Zhang XO, Chen T, Xiang JF, Yin QF, Xing YH, et al. Circular Intronic Long Noncoding RNAs. *Mol Cell* [Internet]. 2013;51(6):792–806. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.017>
8. Lu Z, Filonov GS, Noto JJ, Schmidt CA, Hatkevich TL, Wen Y, et al. Metazoan tRNA introns generate stable circular RNAs in vivo. *Rna*. 2015;21(9):1554–65.
9. Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*. 2013 Mar 21;495(7441):384–8.
10. Kristensen LS, Hansen TB, Venø MT, Kjems J. Circular RNAs in cancer: Opportunities and challenges in the field. *Oncogene*. 2018;37(5):555–65.
11. Zheng Q, Bao C, Guo W, Li S, Chen J, Chen B, et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs. *Nat Commun*. 2016;7.
12. Hsiao KY, Lin YC, Gupta SK, Chang N, Yen L, Sun HS, et al. Noncoding effects of circular RNA CCDC66 promote colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res*. 2017;77(9):2339–50.
13. Verduci L, Ferraiuolo M, Sacconi A, Ganci F, Vitale J, Colombo T, et al. The oncogenic role of circPVT1 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated through the mutant p53/YAP/TEAD transcription-competent complex. *Genome Biol*. 2017;18(1):1–24.
14. Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, Ebbesen KK, Hansen TB, Kjems J. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nat Rev Genet*. 2019;20(11):675–91.
15. Holdt LM, Stahringer A, Sass K, Pichler G, Kulak NA, Wilfert W, et al. Circular non-coding

- RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans. *Nat Commun.* 2016;7.
16. Li X, Yang L, Chen LL. The Biogenesis, Functions, and Challenges of Circular RNAs. *Molecular Cell.* 2018.
 17. Shi Y, Jia X, Xu J. The new function of circRNA: translation. *Clin Transl Oncol.* 2020;(123).
 18. Diallo LH, Tatin F, David F, Godet AC, Zamora A, Prats AC, et al. How are circRNAs translated by non-canonical initiation mechanisms? *Biochimie [Internet].* 2019;164:45–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.06.015>
 19. Yang Y, Fan X, Mao M, Song X, Wu P, Zhang Y, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N⁶-methyladenosine. *Cell Res.* 2017;27(5):626–41.
 20. Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, Morlando M, Briganti F, Sthandier O, et al. Circ-ZNF609 Is a Circular RNA that Can Be Translated and Functions in Myogenesis. *Mol Cell [Internet].* 2017;66(1):22-37.e9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.017>
 21. Liang WC, Wong CW, Liang PP, Shi M, Cao Y, Rao ST, et al. Translation of the circular RNA circ β -catenin promotes liver cancer cell growth through activation of the Wnt pathway. *Genome Biol.* 2019;20(1):1–12.
 22. Hsiao KY, Sun HS, Tsai SJ. Circular RNA – New member of noncoding RNA with novel functions. *Exp Biol Med.* 2017;242(11):1136–41.
 23. Du WW, Fang L, Yang W, Wu N, Awan FM, Yang Z, et al. Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity. *Cell Death Differ.* 2017;24(2):357–70.
 24. Chen LL. The biogenesis and emerging roles of circular RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(4):205–11.
 25. Li Z, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang X, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol [Internet].* 2015;22(3):256–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2959>
 26. Chen N, Zhao G, Yan X, Lv Z, Yin H, Zhang S, et al. A novel FLI1 exonic circular RNA promotes metastasis in breast cancer by coordinately regulating TET1 and DNMT1. *Genome Biol.* 2018;19(1):1–14.
 27. Bachmayr-Heyda A, Reiner AT, Auer K, Sukhbaatar N, Aust S, Bachleitner-Hofmann T, et al. Correlation of circular RNA abundance with proliferation - Exemplified with colorectal and ovarian cancer, idiopathic lung fibrosis, and normal human tissues. *Sci Rep.* 2015;5:8057.
 28. Guarnerio J, Bezzi M, Jeong JC, Paffenholz S V., Berry K, Naldini MM, et al. Oncogenic Role of Fusion-circRNAs Derived from Cancer-Associated Chromosomal Translocations. *Cell [Internet].* 2016;165(2):289–302. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.020>

29. Li F, Zhang L, Li W, Deng J, Zheng J, An M, et al. Circular RNA ITCH has inhibitory effect on ESCC by suppressing the Wnt/ β -catenin pathway. *Oncotarget*. 2015;6(8):6001–13.
30. Wan L, Zhang L, Fan K, Cheng ZX, Sun QC, Wang JJ. Circular RNA-ITCH Suppresses Lung Cancer Proliferation via Inhibiting the Wnt/ β -Catenin Pathway. *Biomed Res Int*. 2016;2016.
31. Yang Q, Du WW, Wu N, Yang W, Awan FM, Fang L, et al. A circular RNA promotes tumorigenesis by inducing c-myc nuclear translocation. *Cell Death Differ* [Internet]. 2017;24(9):1609–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.86>
32. Memczak S, Papavasileiou P, Peters O, Rajewsky N. Identification and characterization of circular RNAs as a new class of putative biomarkers in human blood. *PLoS One*. 2015;10(10):1–13.
33. Li P, Chen S, Chen H, Mo X, Li T, Shao Y, et al. Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2015;444:132–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2015.02.018>
34. Kulcheski FR, Christoff AP, Margis R. Circular RNAs are miRNA sponges and can be used as a new class of biomarker. *J Biotechnol* [Internet]. 2016;238:42–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.09.011>
35. Lü L, Sun J, Shi P, Kong W, Xu K, He B, et al. Identification of circular RNAs as a promising new class of diagnostic biomarkers for human breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(27):44096–107.
36. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.
37. Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biol*. 2016;37(7):8471–86.
38. Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2000;301:5–17.
39. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239–57.
40. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. *J Immunol*. 2003;171(9):4672–9.
41. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death [In Process Citation]. *Nature*. 2000;407(6805):784–8.
42. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770–6.
43. Bortner CD, Oldenburg NBE, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol*. 1995;5(1):21–6.
44. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop

- and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* [Internet]. 1997;272(42):26159–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.42.26159>
45. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*. 2005;123(2):321–34.
 46. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):277–88.
 47. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, Van Gurp M, Van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004;23(16 REV. ISS. 2):2861–74.
 48. Liu FT, Newland AC, Jia L. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;310(3):956–62.
 49. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000;102(1):33–42.
 50. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*. 2006;13(9):1423–33.
 51. Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J*. 2004;23(10):2134–45.
 52. van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, et al. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ*. 2002;9(1):20–6.
 53. Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: Translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res*. 2004;64(20):7183–90.
 54. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CYJ, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001;410(6828):549–54.
 55. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001;412(6842):95–9.
 56. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 1998;391(6662):43–50.
 57. Cory S, Adams JM. The BCL2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(9):647–56.

58. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487–501.
59. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* (80-). 1998;281(5381):1305–8.
60. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1 / Fas) -mediated apoptosis. 95:545–51.
61. Hsu H, Xiong J, Goeddel D V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell*. 1995;81(4):495–504.
62. Wajant H. The Fas signaling pathway: More than a paradigm. *Science* (80-). 2002;296(5573):1635–6.
63. Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ, El-Deiry WS. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol*. 2002;4(11):842–9.
64. Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* [Internet]. 1999;274(3):1541–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.3.1541>
65. Hitoshi Y, Lorens J, Kitada SI, Fisher J, LaBarge M, Ring HZ, et al. Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity*. 1998;8(4):461–71.
66. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. *J Biol Chem* [Internet]. 2001;276(10):7320–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M008363200>
67. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 1998;391(6662):96–9.
68. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: Effector of morphological change in apoptosis. *Science* (80-). 1997;278(5336):294–8.
69. Mandal D, Mazumder A, Das P, Kundu M, Basu J. Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem* [Internet]. 2005;280(47):39460–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M506928200>
70. Fadok VA, De Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* [Internet]. 2001;276(2):1071–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M003649200>
71. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases - An update. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol*. 2008;151(1):10–27.
72. Yan N, Shi Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*.

- 2005;21:35–56.
73. Los M, Stroh C, Jänicke RU, Engels IH, Schulze-Osthoff K. Caspases: More than just killers? *Trends Immunol.* 2001;22(1):31–4.
 74. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene.* 2003;22(53 REV. ISS. 7):8543–67.
 75. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999;6(2):99–104.
 76. Lamkanfi M, Kanneganti TD. Caspase-7: A protease involved in apoptosis and inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(1):21–4.
 77. Ghavami S, Eshraghi M, Kadkhoda K, Mutawe MM, Maddika S, Bay GH, et al. Role of BNIP3 in TNF-induced cell death - TNF upregulates BNIP3 expression. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2009;1793(3):546–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.01.002>
 78. Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, et al. Apoptosis and cancer: Mutations within caspase genes. *J Med Genet.* 2009;46(8):497–510.
 79. Carrington PE, Sandu C, Wei Y, Hill JM, Morisawa G, Huang T, et al. The Structure of FADD and Its Mode of Interaction with Procaspace-8. *Mol Cell.* 2006;22(5):599–610.
 80. Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschopp J, Nicholson DW, et al. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem.* 2002;277(47):45162–71.
 81. Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 1999;13(24):3179–84.
 82. Qin H, Srinivasula SM, Wu G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, Shi Y. Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature.* 1999;399(6736):549–57.
 83. Siddiqui WA, Ahad A, Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Arch Toxicol.* 2015;89(3):289–317.
 84. Oltval ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993;74(4):609–19.
 85. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a Heterodimeric Partner for Bcl-x, and Bcl-2, Displaces Bax and Promotes Cell Death. 2012;80:1–7. Available from: [papers2://publication/uuid/5C4F0733-65E3-4420-B08B-D275762B6D90](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22757626/)
 86. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* (80-). 1998;281(5381):1322–6.
 87. Kvanakul M, Yang H, Fairlie WD, Czabotar PE, Fischer SF, Perugini MA, et al. Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly

- selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ.* 2008;15(10):1564–71.
88. Hinds MG, Smits C, Fredericks-Short R, Risk JM, Bailey M, Huang DCS, et al. Bim, Bad and Bmf: Intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death Differ.* 2007;14(1):128–36.
 89. Huang DCS, Strasser A. BH3-only proteins - Essential initiators of apoptotic cell death. *Cell.* 2000;103(6):839–42.
 90. Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.* 2001;15(12):1481–6.
 91. Vaux DL, Cory S, Adams TM. Bcl-2 promotes the survival of haemotopoeitic cells and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* [Internet]. 1988;258:1955-1957. Available from: <https://www.nature.com/articles/335440a0.pdf>
 92. Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell.* 2002;1(1):19–30.
 93. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell.* 2002;108(2):153–64.
 94. Ikegaki N, Katsumata M, Minna J, Tsujimoto Y. Expression of bcl-2 in Small Cell Lung Carcinoma Cells. *Cancer Res.* 1994;54(1):6–8.
 95. Monni O, Joensuu H, Franssila K, Klefstrom J, Alitalo K, Knuutila S. BCL2 Overexpression Associated With Chromosomal Amplification in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood* [Internet]. 1997;90(3):1168–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V90.3.1168>
 96. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio M V., Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(39):13944–9.
 97. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 Gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* [Internet]. 1993;82(6):1820–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V82.6.1820.1820>
 98. Rampino N, Yamamoto H, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M. Cells May Contribute. 1997;275(February):967–9.
 99. Meijerink JPP, Mensink EJB, Wang K, Sedlak TW, Slöetjes AW, De Witte T, et al. Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood.* 1998;91(8):2991–7.
 100. Toshiyuki M, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995;80(2):293–9.
 101. Yu J, Wang Z, Kinzler KW, Vogelstein B, Zhang L. PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(4):1931–6.

102. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, et al. Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/3836137>. *Am Assoc Adv Sci*. 2004;303(5660):1010–4.
103. Deng X, Gao F, Flagg T, Anderson J, May WS. Bcl2's Flexible Loop Domain Regulates p53 Binding and Survival. *Mol Cell Biol*. 2006;26(12):4421–34.
104. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*. 1996;87(4):619–28.
105. Wolter KG, Hsu Y Te, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*. 1997;139(5):1281–92.
106. Hsu Y Te, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(8):3668–72.
107. Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, et al. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol*. 2003;162(1):59–69.
108. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, et al. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: A control point for apoptosis. *Science* (80-). 2003;300(5616):135–9.
109. Kim H, Tu HC, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, et al. Stepwise Activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA Initiates Mitochondrial Apoptosis. *Mol Cell* [Internet]. 2009;36(3):487–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.030>
110. Renault TT, Manon S. Bax: Addressed to kill. *Biochimie* [Internet]. 2011;93(9):1379–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2011.05.013>
111. Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of bax: Coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*. 2000;103(4):645–54.
112. Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, et al. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(21):11357–62.
113. Schendel SL, Montal M, Reed JC. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ*. 1998;5(5):372–80.
114. Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, et al. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol*. 1998;143(1):207–15.
115. Zha H, Fisk HA, Yaffe MP, Mahajan N, Herman B, Reed JC. Structure-function comparisons of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 1996;16(11):6494–508.

116. Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, 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(6):1389–99.
117. Wei MC, Zong WX, Cheng EHY, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* (80-). 2001;292(5517):727–30.
118. Ekert PG, Read SH, Silke J, Marsden VS, Kaufmann H, Hawkins CJ, et al. Apaf-1 and caspase-9 accelerate apoptosis, but do not determine whether factor-deprived or drug-treated cells die. *J Cell Biol*. 2004;165(6):835–42.
119. Chautan M, Chazal G, Cecconi F, Gruss P, Golstein P. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol*. 1999;9(17):967–70.
120. Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, et al. Inhibition of Bax Channel-Forming Activity by Bcl-2. 1997;277(July):370–2.
121. Manon S, Chaudhuri B, Guérin M. Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bar-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-x(L). *FEBS Lett*. 1997;415(1):29–32.
122. Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(9):4997–5002.
123. Pavlov E V., Priault M, Pietkiewicz D, Cheng EHY, Antonsson B, Manon S, et al. A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J Cell Biol*. 2001;155(5):725–31.
124. Martinez-Caballero S, Dejean LM, Kinnally MS, Oh KJ, Mannella CA, Kinnally KW. Assembly of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC. *J Biol Chem* [Internet]. 2009;284(18):12235–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M806610200>
125. Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J*. 2001;20(23):6627–36.
126. Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J*. 2003;22(17):4385–99.
127. Chen Y, Wang X. MiRDB: An online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D127–31.
128. Paz I, Kosti I, Ares M, Cline M, Mandel-Gutfreund Y. RBPmap: A web server for mapping binding sites of RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(W1):1–7.
129. Bargou RC, Wagener C, Bommert K, Mapara MY, Daniel PT, Arnold W, et al. Overexpression of the death-promoting gene bax- α which is downregulated in breast

- cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumor growth in SCID mice. *J Clin Invest*. 1996;97(11):2651–9.
130. Martínez-Arribas F, Martín-Garabato E, Zapardiel I, Sánchez J, Lucas AR, Tejerina A, et al. Bax expression in untreated breast cancer: An immunocytochemical study of 255 cases. *Anticancer Res*. 2008;28(5 A):2595–8.
 131. Binder C, Marx D, Binder L, Schauer A, Hiddemann W. Expression of Bax in relation to Bcl-2 and other predictive parameters in breast cancer. *Ann Oncol* [Internet]. 1996;7(2):129–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.annonc.a010538>
 132. Sakakura C, Sweeney EA, Shirahama T, Igarashi Y, Hakomori SI, Nakatani H, et al. Overexpression of bax sensitizes human breast cancer MCF-7 cells to radiation-induced apoptosis. *Int J Cancer*. 1996;67(1):101–5.

Παράρτηματα

Παράρτημα Α:

Protein: BOLL (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
214	uuuguuu	ucuuuuu	2.184	1.45e-02
236	uuuguuu	cauguuu	2.079	1.88e-02
237	guguua	auguuu	1.888	2.95e-02

Protein: CNOT4 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
170	acacag	gcagag	2.462	6.91e-03
192	gacaga	gacaca	2.022	2.16e-02
193	acacag	acacag	3.103	9.58e-04
194	gacaga	cacaga	2.033	2.10e-02
195	acacag	acagac	2.718	3.28e-03

Protein: CPEB1 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
214	uuuuu	ucuuu	2.181	1.46e-02
215	uuuuu	cuuuu	2.254	1.21e-02
216	uuuuu	uuuuu	2.717	3.29e-03
217	uuuuu	uuuuc	2.471	6.74e-03
238	uuuuu	uguuu	2.275	1.15e-02
239	uuuuu	guuuu	2.275	1.15e-02
240	uuuuu	uuuuc	2.449	7.16e-03
241	uuuuu	uuucu	2.210	1.36e-02

Protein: CPEB2 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
213	chuuuuu	gucuuuu	2.490	6.39e-03
214	chuuuuu	ucuuuuu	2.796	2.59e-03
215	chuuuuu	cuuuuuc	2.888	1.94e-03
236	chuuuuu	cauguuu	2.663	3.87e-03
277	chuuuuu	ccuuuuu	2.510	6.04e-03
278	chuuuuu	ccuuuuc	2.510	6.04e-03
279	chuuuuu	cuuuucu	2.510	6.04e-03

Protein: CPEB4 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
214	uuuuuu	ucuuuu	2.739	3.08e-03
215	uuuuuu	cuuuuu	3.104	9.55e-04
216	uuuuuu	uuuuuc	2.652	4.00e-03
238	uuuuuu	uguuuu	2.713	3.33e-03
239	uuuuuu	guuuuc	2.600	4.66e-03
278	uuuuuu	ccuuuu	1.887	2.96e-02
279	uuuuuu	cuuuuc	1.826	3.39e-02

Protein: DAZ3 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
213	uuguuu	gucuuu	2.673	3.76e-03
215	uuguuu	cuuuuu	2.971	1.48e-03
216	uuguuu	uuuuuc	2.692	3.55e-03
237	uuguuu	auguuu	3.067	1.08e-03
277	acguuu	ccuuuu	1.900	2.87e-02

278	acguuu	ccuuuu	1.900	2.87e-02
-----	--------	--------	-------	----------

Protein: EIF4G2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
53		cgccg	caccg	2.543	5.50e-03
58		cgccg	cgccc	2.543	5.50e-03
67		cgccg	caccg	2.543	5.50e-03
70		cgccg	cgccc	2.543	5.50e-03
182		cgccg	ugccg	2.543	5.50e-03
185		cgccg	cgccg	3.019	1.27e-03
204		cgccg	ccccg	2.543	5.50e-03
206		gcgag	ccgag	1.813	3.49e-02
208		gcgag	gagag	1.813	3.49e-02
221		gcgag	ccgag	1.813	3.49e-02
269		gguugc	gguugu	2.688	3.59e-03
272		gguugc	ugucgc	2.688	3.59e-03

Protein: ELAVL4 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
216		uuauu	uuuuu	2.569	5.10e-03

Protein: ENOX1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
192		hrkacag	gacacag	2.094	1.81e-02

Protein: FUBP1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
214		uauuu	ucuuu	2.528	5.74e-03
216		uauuu	uuuuu	2.880	1.99e-03
238		uauuu	uguuu	2.848	2.20e-03

Protein: FUBP3 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
216		uuuau	uuuuu	2.669	3.80e-03
241		uuuau	uuucu	2.248	1.23e-02

Protein: FUS (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
54		cgcgc	accgc	2.277	1.14e-02
56		cgcgc	cgcgc	2.506	6.11e-03
68		cgcgc	accgc	2.277	1.14e-02

Protein: FXR2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
245		dgacr rr	ugacggc	2.071	1.92e-02

Protein: G3BP2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
174		aggaurd	aggau ga	2.147	1.59e-02

Protein: HNRNPC (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
213		huuuuuk	gucuuuu	2.482	6.53e-03
214		huuuuuk	ucuuuuu	2.580	4.94e-03
215		huuuuuk	cuuuuuc	2.866	2.08e-03
216		uuuuu	uuuuu	2.808	2.49e-03
217		uuuuu	uuuuc	2.390	8.42e-03

237	huuuuuk	auguuuu	2.795	2.60e-03
238	uuuuu	uguuu	2.390	8.42e-03
239	huuuuuk	guuuucu	2.527	5.75e-03
240	uuuuu	uuuuc	2.370	8.89e-03
241	uuuuu	uuucu	2.295	1.09e-02

Protein: HNRNPCL1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
213		huuuuuk	gucuuuu	2.474	6.68e-03
214		huuuuuk	ucuuuuu	2.588	4.83e-03
215		huuuuuk	cuuuuuc	2.833	2.31e-03
216		uuuuu	uuuuu	2.940	1.64e-03
217		uuuuu	uuuuc	2.647	4.06e-03
237		huuuuuk	auguuuu	2.772	2.79e-03
238		uuuuu	uguuu	2.571	5.07e-03
239		uuuuu	guuuu	2.571	5.07e-03
240		uuuuu	uuuuc	2.624	4.35e-03
241		uuuuu	uuucu	2.504	6.14e-03

Protein: HNRNPF (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
173		gugkau	gaggau	3.036	1.20e-03

Protein: HNRNPK (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
34		cacgc	caagc	1.952	2.55e-02
44		cacgc	caccc	1.952	2.55e-02
47		gccca	cccca	1.655	4.90e-02
56		cacgc	cgcgc	1.952	2.55e-02
59		gccca	gcccu	2.109	1.75e-02
71		gccca	gcccc	2.109	1.75e-02
78		gccca	gcccu	1.655	4.90e-02

Protein: HNRNPL (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
191		amayama	ggacaca	2.147	1.59e-02
192		uacaca	gacaca	1.776	3.79e-02
193		amayama	acacaga	2.467	6.81e-03
195		amayama	acagacu	2.160	1.54e-02

Protein: HNRPLL (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
191		rcahaca	ggacaca	2.329	9.93e-03
193		rcahaca	acacaga	2.519	5.88e-03
195		rcahaca	acagacu	2.316	1.03e-02

Protein: KHSRP (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
216		uuuuu	uuuuu	2.496	6.28e-03
238		uguau	uguuu	1.888	2.95e-02

Protein: MBNL1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
165		gcgcagc	gagcugc	2.000	2.27e-02
181		gcgcagc	uugccgc	1.986	2.35e-02
282		ugcua	uucua	1.660	4.85e-02
290		ugcua	ugcca	1.660	4.85e-02

304	ugcua	ugcuc	1.660	4.85e-02
-----	-------	-------	-------	----------

Protein: NOVA1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
42		aucac	cucac	2.257	1.20e-02
51		aucac	accac	2.257	1.20e-02
62		aucac	cucac	2.257	1.20e-02
65		aucac	accac	2.257	1.20e-02
345		uucauaa	accauca	2.517	5.92e-03
348		uucauaa	aucaugg	2.533	5.65e-03

Protein: PCBP1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
41		ccwhhcc	ccucacc	2.519	5.88e-03
44		agcccc	cacccc	2.589	4.81e-03
45		agcccc	accccc	2.989	1.40e-03
47		ccwhhcc	ccccacc	2.636	4.19e-03
58		agcccc	cgcccu	3.022	1.26e-03
61		ccwhhcc	ccucacc	3.247	5.83e-04
70		agcccc	cgcccc	2.922	1.74e-03
74		ccwhhcc	ccuggcc	2.117	1.71e-02
77		agcccc	ggcccu	2.089	1.84e-02
200		agcccc	cucccc	2.122	1.69e-02
201		agcccc	uccccc	2.078	1.89e-02
202		agcccc	cccccc	2.078	1.89e-02

Protein: PCBP2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
35		aacc	aagcc	1.752	3.99e-02
41		ccccacccc	ccucacccc	3.311	4.65e-04
44		aacc	cacc	1.752	3.99e-02
45		aacc	acccc	1.752	3.99e-02
46		ccccacccc	ccccacca	3.279	5.21e-04
47		ccccacccc	ccccaccac	3.541	1.99e-04
61		ccyycch	ccucacc	2.837	2.28e-03
67		ccccacccc	caccgcccc	3.213	6.57e-04
69		ccyycch	cgcccc	2.687	3.60e-03
72		ccccacccc	cccuggcc	3.246	5.85e-04
199		ccyycch	acucccc	2.163	1.53e-02
200		uucc	cucc	2.239	1.26e-02
201		uucc	uccc	2.239	1.26e-02

Protein: PCBP3 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
216		uuuycc	uuuuuc	2.405	8.09e-03
217		uuuycc	uuuucc	2.622	4.37e-03
239		uuuycc	guuuuc	2.324	1.01e-02
279		uuuycc	cuuuuc	2.284	1.12e-02
287		uuuycc	cuuugc	2.122	1.69e-02

Protein: PCBP4 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
45		aucaccc	acccccca	2.458	6.99e-03
265		gucgg	gccgg	1.971	2.44e-02

Protein: PPRC1 (Hs/Mm)

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

55		ssgcgcs	ccgcgcc	1.679	4.66e-02
Protein: PTB3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
215		cuuucu	cuuuuu	2.099	1.79e-02
217		cuuucu	uuuucc	2.062	1.96e-02
240		cuuucu	uuuucu	2.333	9.82e-03
Protein: PTBP3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
215		cuuucu	cuuuuu	2.125	1.68e-02
217		cuuucu	uuuucc	2.088	1.84e-02
240		cuuucu	uuuucu	2.362	9.09e-03
Protein: PUF60 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
216		uuuuu	uuuuu	2.950	1.59e-03
241		uuuuu	uuucu	2.639	4.16e-03
Protein: QKI (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
156		acuaay	aguaac	1.728	4.20e-02
Protein: RALY (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
214		uuuuuub	ucuuuuu	2.580	4.94e-03
215		uuuuuub	cuuuuuc	2.795	2.60e-03
216		uuuuuub	uuuuucc	2.830	2.33e-03
238		uuuuuub	uguuuuc	2.687	3.60e-03
240		uuuuuub	uuuucug	2.804	2.52e-03
Protein: RBM22 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
68		accgg	accgc	3.010	1.31e-03
85		accgg	accgg	2.357	9.21e-03
86		accgg	cccgg	2.510	6.04e-03
Protein: RBM23 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
38		cccc	ccucc	2.954	1.57e-03
46		cccc	cccc	3.046	1.16e-03
49		cccc	ccacc	2.746	3.02e-03
52		cccc	ccacc	2.746	3.02e-03
66		cccc	ccacc	2.654	3.98e-03
69		cccc	ccgcc	2.654	3.98e-03
184		cccc	ccgcc	2.615	4.46e-03
202		cccc	cccc	2.946	1.61e-03
203		cccc	cccc	2.946	1.61e-03
Protein: RBM24 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
122		wgwgugd	cgagugu	2.065	1.95e-02
124		wgwgugd	agugucu	1.987	2.35e-02
Protein: RBM38 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
123		kkguguk	gaguguc	1.667	4.78e-02

Protein: RBM4 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
121		gcgcgu	gcgagu	2.658	3.93e-03
134		gcgcgu	gcgcau	2.822	2.39e-03

Protein: RBM42 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
320		aacuamg	caccaag	1.905	2.84e-02
334		aacuamg	aacugau	1.946	2.58e-02

Protein: RBM45 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
28		acacc	acucc	2.570	5.08e-03
43		acacc	ucacc	2.626	4.32e-03
45		acacc	acccc	2.626	4.32e-03
49		acacc	ccacc	2.626	4.32e-03
51		acgac	accac	2.220	1.32e-02
52		acacc	ccacc	2.626	4.32e-03
62		cuuac	cucac	2.297	1.08e-02
63		acacc	ucacc	2.570	5.08e-03
66		acacc	ccacc	2.570	5.08e-03
232		cuuac	cugac	1.970	2.44e-02
244		cuuac	cugac	1.970	2.44e-02

Protein: RBM6 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
38		ccacc	ccucc	3.088	1.01e-03
43		ccacc	ucacc	3.246	5.85e-04
46		ccacc	ccccc	3.272	5.34e-04
49		ccacc	ccacc	4.044	2.63e-05
52		ccacc	ccacc	4.044	2.63e-05
63		ccacc	ucacc	3.272	5.34e-04
66		ccacc	ccacc	4.018	2.93e-05
69		ccacc	ccgcc	3.193	7.04e-04
184		ccacc	ccgcc	1.658	4.87e-02
202		ccacc	ccccc	1.658	4.87e-02
203		ccacc	ccccc	1.658	4.87e-02

Protein: SNRNP70 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
305		rwucaag	gcucaag	1.877	3.03e-02
320		rwucaag	caccaag	2.521	5.85e-03

Protein: SNRPA (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
150		wugcacr	cuggaca	2.141	1.61e-02
151		ugcaca	uggaca	1.961	2.49e-02
168		wugcacr	cugcaga	2.239	1.26e-02
169		ugcaca	ugcaga	2.513	5.99e-03
190		ugcaca	uggaca	1.961	2.49e-02
304		ugcaca	ugcuca	2.355	9.26e-03
318		ugcaca	ugcacc	2.737	3.10e-03

Protein: SRSF5 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
57		gcccc	gcgcc	3.217	6.48e-04

71		gcccc	gcccc	3.235	6.08e-04
164		gcagc	ggagc	1.886	2.96e-02
167		gcagc	gcugc	1.886	2.96e-02
170		gcagc	gcaga	1.886	2.96e-02
183		gcagc	gccgc	1.886	2.96e-02

Protein: SRSF7 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
246		acgacg	gacggc	2.346	9.49e-03

Protein: SRSF8 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
166		agcagc	agcugc	2.329	9.93e-03
169		agcagc	ugcaga	2.317	1.03e-02
182		agcagc	ugccgc	2.268	1.17e-02

Protein: TIA1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
214		uuuuubk	ucuuuuu	2.549	5.40e-03
215		uuuuubk	cuuuuuc	2.706	3.41e-03
216		uuuuu	uuuuu	2.932	1.68e-03
217		uuuuu	uuuuc	2.682	3.66e-03
238		uuuuu	uguuu	2.561	5.22e-03
239		uuuuubk	guuuucu	2.588	4.83e-03
240		uuuuubk	uuuucug	2.755	2.93e-03

Protein: TRNAU1AP (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
214		uuuuauu	ucuuuuu	2.174	1.49e-02
216		uuuuauu	uuuuucc	2.326	1.00e-02
240		uuuuauu	uuuucug	2.186	1.44e-02

Protein: U2AF2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
214		uuuuuyc	ucuuuuu	2.771	2.79e-03
215		uuuuuyc	cuuuuuc	3.362	3.87e-04
216		uuuuuyc	uuuuucc	3.438	2.93e-04
238		uuuuuyc	uguuuuc	3.143	8.36e-04
239		uuuuuyc	guuuucu	2.829	2.33e-03
240		uuuuuyc	uuuucug	2.810	2.48e-03
278		uuuuuyc	ccuuuuc	2.086	1.85e-02
279		uuuuuyc	cuuuucu	2.133	1.65e-02
280		uuuuuyc	uuuucua	2.124	1.68e-02

Protein: UNK (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
161		uauaga	caugga	1.793	3.65e-02

Protein: ZC3H10 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
52		ssagcgm	ccaccgc	2.027	2.13e-02
54		ssagcgm	accgcgc	2.068	1.93e-02
66		ssagcgm	ccaccgc	2.027	2.13e-02
118		ssagcgm	ugagcga	2.301	1.07e-02
131		ssagcgm	caagcgc	2.507	6.09e-03

Protein: ZNF326 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
199	auucc	acucc	1.667	4.78e-02

Παράρτημα Β:

Protein: BOLL (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
140	uuuguuu	ucuuuuu	2.184	1.45e-02
162	uuuguuu	cauguuu	2.079	1.88e-02
163	guguua	auguuu	1.888	2.95e-02

Protein: BRUNOL6 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
311	ugugdkg	uguuggg	1.920	2.74e-02

Protein: CNOT4 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
96	acacag	gcagag	2.462	6.91e-03
118	gacaga	gacaca	2.022	2.16e-02
119	acacag	acacag	3.103	9.58e-04
120	gacaga	cacaga	2.033	2.10e-02
121	acacag	acagac	2.718	3.28e-03

Protein: CPEB1 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
140	uuuuu	ucuuu	2.181	1.46e-02
141	uuuuu	cuuuu	2.254	1.21e-02
142	uuuuu	uuuuu	2.717	3.29e-03
143	uuuuu	uuuuc	2.471	6.74e-03
164	uuuuu	uguuu	2.275	1.15e-02
165	uuuuu	guuuu	2.275	1.15e-02
166	uuuuu	uuuuc	2.449	7.16e-03
167	uuuuu	uuucu	2.210	1.36e-02

Protein: CPEB2 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
139	chuuuuu	gucuuuu	2.490	6.39e-03
140	chuuuuu	ucuuuuu	2.796	2.59e-03
141	chuuuuu	cuuuuuc	2.888	1.94e-03
162	chuuuuu	cauguuu	2.663	3.87e-03
203	chuuuuu	ccuuuuu	2.510	6.04e-03
204	chuuuuu	ccuuuuc	2.510	6.04e-03
205	chuuuuu	cuuuucu	2.510	6.04e-03

Protein: CPEB4 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
140	uuuuuu	ucuuuu	2.739	3.08e-03
141	uuuuuu	cuuuuu	3.104	9.55e-04
142	uuuuuu	uuuuuc	2.652	4.00e-03
164	uuuuuu	uguuuu	2.713	3.33e-03
165	uuuuuu	guuuuc	2.600	4.66e-03
204	uuuuuu	ccuuuu	1.887	2.96e-02
205	uuuuuu	cuuuuc	1.826	3.39e-02

Protein: DAZ3 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
139		uuguuu	gucuuu	2.673	3.76e-03
141		uuguuu	cuuuuu	2.971	1.48e-03
142		uuguuu	uuuuuc	2.692	3.55e-03
163		uuguuu	auguuu	3.067	1.08e-03
203		acguuu	ccuuuu	1.900	2.87e-02
204		acguuu	ccuuuu	1.900	2.87e-02

Protein: EIF4G2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
108		cgccg	ugccg	2.543	5.50e-03
111		cgccg	cgccg	3.019	1.27e-03
130		cgccg	ccccg	2.543	5.50e-03
132		gcgag	ccgag	1.813	3.49e-02
134		gcgag	gagag	1.813	3.49e-02
147		gcgag	ccgag	1.813	3.49e-02
195		gguugc	gguugu	2.688	3.59e-03
198		gguugc	ugucgc	2.688	3.59e-03

Protein: ELAVL4 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
142		uuauu	uuuuu	2.569	5.10e-03

Protein: ENOX1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
118		hrkacag	gacacag	2.094	1.81e-02

Protein: ESRP1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
333		gggugg	gggugg	2.955	1.56e-03
341		gggugg	ggguga	2.648	4.05e-03

Protein: FUBP1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
140		uauuu	ucuuu	2.528	5.74e-03
142		uauuu	uuuuu	2.880	1.99e-03
164		uauuu	uguuu	2.848	2.20e-03

Protein: FUBP3 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
142		uuuau	uuuuu	2.669	3.80e-03
167		uuuau	uuucu	2.248	1.23e-02

Protein: FXR2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
171		dgacrrr	ugacggc	2.071	1.92e-02

Protein: G3BP2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
100		aggau dr	aggauga	2.147	1.59e-02
332		aggau dr	agggugg	1.827	3.38e-02

Protein: HNRNPA1L2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
330		duagggw	ccagggg	1.958	2.51e-02

Protein: HNRNPA2B1 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
330	duagggw	ccagggg	1.787	3.70e-02

Protein: HNRNPC (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
139	huuuuuk	gucuuuu	2.482	6.53e-03
140	huuuuuk	ucuuuuu	2.580	4.94e-03
141	huuuuuk	cuuuuuc	2.866	2.08e-03
142	uuuuu	uuuuu	2.808	2.49e-03
143	uuuuu	uuuuc	2.390	8.42e-03
163	huuuuuk	auguuuu	2.795	2.60e-03
164	uuuuu	uguuu	2.390	8.42e-03
165	huuuuuk	guuuucu	2.527	5.75e-03
166	uuuuu	uuuuc	2.370	8.89e-03
167	uuuuu	uuucu	2.295	1.09e-02

Protein: HNRNPCL1 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
139	huuuuuk	gucuuuu	2.474	6.68e-03
140	huuuuuk	ucuuuuu	2.588	4.83e-03
141	huuuuuk	cuuuuuc	2.833	2.31e-03
142	uuuuu	uuuuu	2.940	1.64e-03
143	uuuuu	uuuuc	2.647	4.06e-03
163	huuuuuk	auguuuu	2.772	2.79e-03
164	uuuuu	uguuu	2.571	5.07e-03
165	uuuuu	guuuu	2.571	5.07e-03
166	uuuuu	uuuuc	2.624	4.35e-03
167	uuuuu	uuucu	2.504	6.14e-03

Protein: HNRNPF (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
99	gugkau	gaggau	3.036	1.20e-03
314	agggg	ugggc	2.163	1.53e-02
332	agggg	agggg	2.796	2.59e-03
340	agggg	ugggu	1.878	3.02e-02

Protein: HNRNPH2 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
302	gggaggg	gggagcg	2.078	1.89e-02
333	gggaggg	ggguggg	1.756	3.95e-02

Protein: HNRNPK (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
354	cacgc	caagc	1.952	2.55e-02
364	cacgc	caccc	1.952	2.55e-02

Protein: HNRNPL (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
117	amayama	ggacaca	2.147	1.59e-02
118	uacaca	gacaca	1.776	3.79e-02
119	amayama	acacaga	2.467	6.81e-03
121	amayama	acagacu	2.160	1.54e-02

Protein: HNRNPM (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
316	ggugguu	ggcuggau	4.016	2.96e-05
333	ggugguu	gggugguu	4.587	2.25e-06

337		gguugguu	gguugggu	4.492	3.53e-06
-----	--	----------	----------	-------	----------

Protein: HNRPLL (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
117		rcahaca	ggacaca	2.329	9.93e-03
119		rcahaca	acacaga	2.519	5.88e-03
121		rcahaca	acagacu	2.316	1.03e-02

Protein: KHSRP (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
142		uuuuu	uuuuu	2.496	6.28e-03
164		uguau	uguuu	1.888	2.95e-02

Protein: MBNL1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
91		gcgcagc	gagcugc	2.000	2.27e-02
107		gcgcagc	uugccgc	1.986	2.35e-02
208		ugcua	uucua	1.660	4.85e-02
216		ugcua	ugcca	1.660	4.85e-02
230		ugcua	ugcuc	1.660	4.85e-02

Protein: NOVA1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
271		uucauaa	accauca	2.517	5.92e-03
274		uucauaa	aucaugg	2.533	5.65e-03
362		aucac	cucac	2.257	1.20e-02

Protein: PCBP1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
126		agcccc	cucccc	2.122	1.69e-02
127		agcccc	uccccc	2.078	1.89e-02
128		agcccc	cccccc	2.078	1.89e-02
361		ccwhhcc	ccucacc	2.519	5.88e-03
364		agcccc	cacccc	2.589	4.81e-03
365		agcccc	accccc	2.544	5.48e-03
367		ccwhhcc	ccccacc	2.195	1.41e-02

Protein: PCBP2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
125		ccyycch	acucccc	2.163	1.53e-02
126		uuccc	cuccc	2.239	1.26e-02
127		uuccc	ucccc	2.239	1.26e-02
355		aacc	aagcc	1.752	3.99e-02
361		ccccacccc	ccucacccc	3.311	4.65e-04
364		aacc	caccc	1.752	3.99e-02
365		aacc	acccc	1.752	3.99e-02
366		ccccacccc	ccccacca	3.262	5.53e-04
367		ccccacccc	ccccaccac	3.508	2.26e-04

Protein: PCBP3 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
142		uuuycc	uuuuuc	2.405	8.09e-03
143		uuuycc	uuuucc	2.622	4.37e-03
165		uuuycc	guuuuc	2.324	1.01e-02
205		uuuycc	cuuuuc	2.284	1.12e-02
213		uuuycc	cuuugc	2.122	1.69e-02

Protein: PCBP4 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
191		gucgg	gccgg	1.971	2.44e-02
365		auccccc	acccccca	2.458	6.99e-03
Protein: PTB3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
141		cuuucu	cuuuuu	2.099	1.79e-02
143		cuuucu	uuuucc	2.062	1.96e-02
166		cuuucu	uuuucu	2.333	9.82e-03
Protein: PTBP3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
141		cuuucu	cuuuuu	2.125	1.68e-02
143		cuuucu	uuuucc	2.088	1.84e-02
166		cuuucu	uuuucu	2.362	9.09e-03
Protein: PUF60 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
142		uuuuu	uuuuu	2.950	1.59e-03
167		uuuuu	uuucu	2.639	4.16e-03
Protein: QKI (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
82		acuaay	aguaac	1.728	4.20e-02
Protein: RALY (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
140		uuuuuub	ucuuuuu	2.580	4.94e-03
141		uuuuuub	cuuuuuc	2.795	2.60e-03
142		uuuuuub	uuuuucc	2.830	2.33e-03
164		uuuuuub	uguuuuc	2.687	3.60e-03
166		uuuuuub	uuuucug	2.804	2.52e-03
Protein: RBM22 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
299		accgg	uccgg	1.684	4.61e-02
305		accgg	agcgg	2.408	8.02e-03
Protein: RBM23 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
110		ccccc	cgcgc	2.615	4.46e-03
128		ccccc	ccccc	2.946	1.61e-03
129		ccccc	ccccc	2.946	1.61e-03
358		ccccc	ccucc	2.954	1.57e-03
366		ccccc	ccccc	3.046	1.16e-03
369		ccccc	ccacc	2.746	3.02e-03
Protein: RBM24 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
48		wgwgugd	cgagugu	2.065	1.95e-02
50		wgwgugd	agugucu	1.987	2.35e-02
332		wgwgugd	agggugg	2.325	1.00e-02
333		gugug	gggug	1.980	2.39e-02
340		wgwgugd	uggguga	2.442	7.30e-03
341		gugug	gggug	1.980	2.39e-02
342		wgwgugd	ggugaga	2.117	1.71e-02

Protein: RBM38 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
49		kkguguk	gaguguc	1.667	4.78e-02
339		kkguguk	uugggug	2.103	1.77e-02
341		kkguguk	gggugag	2.090	1.83e-02

Protein: RBM4 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
47		gcgcgu	gcgagu	2.658	3.93e-03
60		gcgcgu	gcgcau	2.822	2.39e-03

Protein: RBM42 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
246		aacuamg	caccaag	1.905	2.84e-02
260		aacuamg	aacugau	1.946	2.58e-02

Protein: RBM45 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
158		cuuac	cugac	1.970	2.44e-02
170		cuuac	cugac	1.970	2.44e-02
348		acacc	acucc	2.570	5.08e-03
363		acacc	ucacc	2.626	4.32e-03
365		acacc	acccc	2.626	4.32e-03
369		acacc	ccacc	2.626	4.32e-03

Protein: RBM6 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
110		ccacc	ccgcc	1.658	4.87e-02
128		ccacc	ccccc	1.658	4.87e-02
129		ccacc	ccccc	1.658	4.87e-02
297		cgucca	ccuccg	2.139	1.62e-02
358		ccacc	ccucc	3.088	1.01e-03
363		ccacc	ucacc	3.246	5.85e-04
366		ccacc	ccccc	3.272	5.34e-04
369		ccacc	ccacc	4.044	2.63e-05

Protein: SNRNP70 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
231		rwucaag	gcucaag	1.877	3.03e-02
246		rwucaag	caccaag	2.521	5.85e-03

Protein: SNRPA (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
76		wugcacr	cuggaca	2.141	1.61e-02
77		ugcaca	uggaca	1.961	2.49e-02
94		wugcacr	cugcaga	2.239	1.26e-02
95		ugcaca	ugcaga	2.513	5.99e-03
116		ugcaca	uggaca	1.961	2.49e-02
230		ugcaca	ugcuca	2.355	9.26e-03
244		ugcaca	ugcacc	2.737	3.10e-03

Protein: SRSF5 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
90		gcagc	ggagc	1.886	2.96e-02
93		gcagc	gcugc	1.886	2.96e-02
96		gcagc	gcaga	1.886	2.96e-02

109		gcagc	gccgc	1.886	2.96e-02
Protein: SRSF7 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
172		acgacg	gacggc	2.346	9.49e-03
Protein: SRSF8 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
92		agcagc	agcugc	2.329	9.93e-03
95		agcagc	ugcaga	2.317	1.03e-02
108		agcagc	ugccgc	2.268	1.17e-02
Protein: TIA1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
140		uuuuubk	ucuuuuu	2.549	5.40e-03
141		uuuuubk	cuuuuuc	2.706	3.41e-03
142		uuuuu	uuuuu	2.932	1.68e-03
143		uuuuu	uuuuc	2.682	3.66e-03
164		uuuuu	uguuu	2.561	5.22e-03
165		uuuuubk	guuuucu	2.588	4.83e-03
166		uuuuubk	uuuucug	2.755	2.93e-03
Protein: TRNAU1AP (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
140		uuuuauu	ucuuuuu	2.174	1.49e-02
142		uuuuauu	uuuuucc	2.326	1.00e-02
166		uuuuauu	uuuucug	2.186	1.44e-02
Protein: U2AF2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
140		uuuuuyc	ucuuuuu	2.771	2.79e-03
141		uuuuuyc	cuuuuuc	3.362	3.87e-04
142		uuuuuyc	uuuuucc	3.438	2.93e-04
164		uuuuuyc	uguuuuc	3.143	8.36e-04
165		uuuuuyc	guuuucu	2.829	2.33e-03
166		uuuuuyc	uuuucug	2.810	2.48e-03
204		uuuuuyc	ccuuuuc	2.086	1.85e-02
205		uuuuuyc	cuuuucu	2.133	1.65e-02
206		uuuuuyc	uuuucua	2.124	1.68e-02
Protein: UNK (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
87		uauaga	caugga	1.793	3.65e-02
Protein: ZC3H10 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
44		ssagcgm	ugagcga	2.301	1.07e-02
57		ssagcgm	caagcgc	2.507	6.09e-03
Protein: ZNF326 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
125		auucc	acucc	1.667	4.78e-02

Παράρτημα Γ:

Protein: ANKHD1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
45		agacgww	ggacgcc	1.942	2.61e-02

Protein: BOLL (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
148		uuuguuu	uguguuu	2.382	8.61e-03
150		uuuguuu	uguuuuu	2.684	3.64e-03
173		uuuguuu	cauuuuu	2.474	6.68e-03
175		uuuguuu	uuuuucu	2.276	1.14e-02
345		uuuguuu	ucuuuuu	2.184	1.45e-02
367		uuuguuu	cauguuu	2.079	1.88e-02
368		guguua	auguuu	1.888	2.95e-02

Protein: BRUNOL4 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
148		kgugukk	uguguuu	2.716	3.30e-03
150		kgugukk	uguuuuu	2.459	6.97e-03

Protein: BRUNOL5 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
146		ugugukk	acugugu	2.200	1.39e-02
148		ugugukk	uguguuu	2.775	2.76e-03
150		ugugukk	uguuuuu	2.525	5.78e-03

Protein: CNOT4 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
301		acacag	gcagag	2.462	6.91e-03
323		gacaga	gacaca	2.022	2.16e-02
324		acacag	acacag	3.103	9.58e-04
325		gacaga	cacaga	2.033	2.10e-02
326		acacag	acagac	2.718	3.28e-03

Protein: CPEB1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
150		uuuuu	uguuu	2.333	9.82e-03
151		uuuuu	guuuu	2.391	8.40e-03
152		uuuuu	uuuuu	3.000	1.35e-03
153		uuuuu	uuuuc	2.623	4.36e-03
174		uuuuu	auuuu	2.413	7.91e-03
175		uuuuu	uuuuu	3.000	1.35e-03
176		uuuuu	uuuuc	2.601	4.65e-03
177		uuuuu	uuucu	2.348	9.44e-03
345		uuuuu	ucuuu	2.181	1.46e-02
346		uuuuu	cuuuu	2.254	1.21e-02
347		uuuuu	uuuuu	2.717	3.29e-03
348		uuuuu	uuuuc	2.471	6.74e-03
369		uuuuu	uguuu	2.275	1.15e-02
370		uuuuu	guuuu	2.275	1.15e-02
371		uuuuu	uuuuc	2.449	7.16e-03
372		uuuuu	uuucu	2.210	1.36e-02

Protein: CPEB2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
150		chuuuuu	uguuuuu	2.867	2.07e-03

151	chuuuuu	guuuuuc	2.694	3.53e-03
173	chuuuuu	cauuuuu	3.204	6.78e-04
174	chuuuuu	auuuuuc	2.694	3.53e-03
344	chuuuuu	gucuuuu	2.490	6.39e-03
345	chuuuuu	ucuuuuu	2.796	2.59e-03
346	chuuuuu	cuuuuuc	2.888	1.94e-03
367	chuuuuu	cauguuu	2.663	3.87e-03
408	chuuuuu	ccuuuuu	2.510	6.04e-03
409	chuuuuu	ccuuuuc	2.510	6.04e-03
410	chuuuuu	cuuuucu	2.510	6.04e-03

Protein: CPEB4 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
150	uuuuuu	uguuuu	2.748	3.00e-03
151	uuuuuu	guuuuu	3.209	6.66e-04
152	uuuuuu	uuuuuc	2.713	3.33e-03
173	uuuuuu	cauuuu	2.983	1.43e-03
174	uuuuuu	auuuuu	3.209	6.66e-04
175	uuuuuu	uuuuuc	2.687	3.60e-03
345	uuuuuu	ucuuuu	2.739	3.08e-03
346	uuuuuu	cuuuuu	3.104	9.55e-04
347	uuuuuu	uuuuuc	2.652	4.00e-03
369	uuuuuu	uguuuu	2.713	3.33e-03
370	uuuuuu	guuuuc	2.600	4.66e-03
409	uuuuuu	ccuuuu	1.887	2.96e-02
410	uuuuuu	cuuuuc	1.826	3.39e-02

Protein: DAZ3 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
149	uuguuu	guguuu	3.077	1.05e-03
151	uuguuu	guuuuu	3.058	1.11e-03
152	uuguuu	uuuuuc	2.740	3.07e-03
174	uuguuu	auuuuu	3.038	1.19e-03
175	uuguuu	uuuuuc	2.519	5.88e-03
344	uuguuu	gucuuu	2.673	3.76e-03
346	uuguuu	cuuuuu	2.971	1.48e-03
347	uuguuu	uuuuuc	2.692	3.55e-03
368	uuguuu	auguuu	3.067	1.08e-03
408	acguuu	ccuuuu	1.900	2.87e-02
409	acguuu	ccuuuu	1.900	2.87e-02

Protein: EIF4G2 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
54	gguugc	cguggc	2.143	1.61e-02
182	gcgag	gggag	1.813	3.49e-02
192	gcgag	gggag	1.813	3.49e-02
201	gcgag	ccgag	1.813	3.49e-02
313	cgccg	ugccg	2.543	5.50e-03
316	cgccg	cgccg	3.019	1.27e-03
335	cgccg	ccccg	2.543	5.50e-03
337	gcgag	ccgag	1.813	3.49e-02
339	gcgag	gagag	1.813	3.49e-02
352	gcgag	ccgag	1.813	3.49e-02
400	gguugc	gguugu	2.688	3.59e-03
403	gguugc	ugucgc	2.688	3.59e-03

Protein: ELAVL4 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
152		uuauu	uuuuu	3.000	1.35e-03
167		uuauu	uuauu	2.587	4.84e-03
175		uuauu	uuuuu	3.000	1.35e-03
347		uuauu	uuuuu	2.569	5.10e-03

Protein: ENOX1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
323		hrkacag	gacacag	2.094	1.81e-02

Protein: ESRP1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
182		gggugg	gggagg	2.591	4.78e-03
187		gggugg	gggugg	2.773	2.78e-03
192		gggugg	gggagg	2.591	4.78e-03

Protein: ESRP2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
42		ugggrad	uugggac	2.355	9.26e-03
190		ugggrad	uggggag	1.803	3.57e-02

Protein: EWSR1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
182		gggggggg	gggagggg	3.732	9.50e-05
187		gggggggg	gggugggg	3.732	9.50e-05
192		gggggggg	gggaggca	3.352	4.01e-04
204		aggug	agcug	1.991	2.32e-02

Protein: FUBP1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
150		uauuu	uguuu	2.904	1.84e-03
152		uauuu	uuuuu	3.040	1.18e-03
175		uauuu	uuuuu	3.040	1.18e-03
345		uauuu	ucuuu	2.528	5.74e-03
347		uauuu	uuuuu	2.880	1.99e-03
369		uauuu	uguuu	2.848	2.20e-03

Protein: FUBP3 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
152		uuuau	uuuuu	2.975	1.46e-03
166		uuuau	auuau	2.612	4.50e-03
175		uuuau	uuuuu	2.975	1.46e-03
177		uuuau	uuucu	2.595	4.73e-03
347		uuuau	uuuuu	2.669	3.80e-03
372		uuuau	uuucu	2.248	1.23e-02

Protein: FUS (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
183		ggggg	ggagg	1.960	2.50e-02
188		ggggg	ggugg	2.153	1.57e-02
193		ggggg	ggagg	1.960	2.50e-02

Protein: FXR2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
376		dgacrrr	ugacggc	2.071	1.92e-02

Protein: G3BP2 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
116	aggaurd	aagaugg	1.920	2.74e-02
305	aggaurd	aggaua	2.147	1.59e-02

Protein: HNRNPA1 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
167	duagggw	uuauggc	2.122	1.69e-02
189	duagggw	gugggga	2.311	1.04e-02

Protein: HNRNPA1L2 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
167	duagggw	uuauggc	2.070	1.92e-02
189	duagggw	gugggga	2.155	1.56e-02

Protein: HNRNPA2B1 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
183	duagggw	ggagggg	2.107	1.76e-02
185	ggggg	agggg	2.605	4.59e-03
189	duagggw	gugggga	2.293	1.09e-02
190	ggggg	ugggg	2.457	7.01e-03

Protein: HNRNPC (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
149	huuuuuk	guguuuu	2.634	4.22e-03
150	huuuuuk	uguuuuu	2.741	3.06e-03
151	huuuuuk	guuuuuc	3.009	1.31e-03
152	uuuuu	uuuuu	3.082	1.03e-03
153	uuuuu	uuuuc	2.527	5.75e-03
173	huuuuuk	cauuuuu	2.768	2.82e-03
174	huuuuuk	auuuuuc	3.161	7.86e-04
175	uuuuu	uuuuu	3.082	1.03e-03
176	uuuuu	uuuuc	2.507	6.09e-03
177	uuuuu	uuucu	2.459	6.97e-03
344	huuuuuk	gucuuuu	2.482	6.53e-03
345	huuuuuk	ucuuuuu	2.580	4.94e-03
346	huuuuuk	cuuuuuc	2.866	2.08e-03
347	uuuuu	uuuuu	2.808	2.49e-03
348	uuuuu	uuuuc	2.390	8.42e-03
368	huuuuuk	auguuuu	2.795	2.60e-03
369	uuuuu	uguuu	2.390	8.42e-03
370	huuuuuk	guuuucu	2.527	5.75e-03
371	uuuuu	uuuuc	2.370	8.89e-03
372	uuuuu	uuucu	2.295	1.09e-02

Protein: HNRNPCL1 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
149	huuuuuk	guguuuu	2.614	4.47e-03
150	huuuuuk	uguuuuu	2.737	3.10e-03
151	huuuuuk	guuuuuc	2.965	1.51e-03
152	uuuuu	uuuuu	3.241	5.96e-04
153	uuuuu	uuuuc	2.805	2.52e-03
173	huuuuuk	cauuuuu	2.746	3.02e-03
174	huuuuuk	auuuuuc	3.105	9.51e-04
175	uuuuu	uuuuu	3.241	5.96e-04
176	uuuuu	uuuuc	2.782	2.70e-03
177	uuuuu	uuucu	2.654	3.98e-03
344	huuuuuk	gucuuuu	2.474	6.68e-03

345	huuuuuk	ucuuuuu	2.588	4.83e-03
346	huuuuuk	cuuuuuc	2.833	2.31e-03
347	uuuuu	uuuuu	2.940	1.64e-03
348	uuuuu	uuuuc	2.647	4.06e-03
368	huuuuuk	auguuuu	2.772	2.79e-03
369	uuuuu	uguuu	2.571	5.07e-03
370	uuuuu	guuuu	2.571	5.07e-03
371	uuuuu	uuuuc	2.624	4.35e-03
372	uuuuu	uuucu	2.504	6.14e-03

Protein: HNRNPF (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
55		gukgykg	guggcag	2.508	6.07e-03
74		gukgykg	uuugugg	2.246	1.24e-02
77		gukgykg	guggcgg	2.574	5.03e-03
181		agggg	uggga	2.878	2.00e-03
182		gggagggg	gggagggg	2.939	1.65e-03
185		agggg	agggg	2.776	2.75e-03
186		agggg	ggggg	2.786	2.67e-03
187		gggagggg	gggugggg	2.909	1.81e-03
190		agggg	ugggg	2.735	3.12e-03
304		gugkau	gaggau	3.036	1.20e-03

Protein: HNRNPH2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
182		gggaggg	gggaggg	4.022	2.89e-05
184		gggggg	gagggg	3.176	7.47e-04
187		gggaggg	ggguggg	3.722	9.88e-05
189		gggggg	gugggg	3.220	6.41e-04
192		gggaggg	gggaggg	3.811	6.92e-05

Protein: HNRNPK (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
49		gccca	gccca	1.655	4.90e-02
67		gccca	gacca	2.109	1.75e-02

Protein: HNRNPL (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
322		amayama	ggacaca	2.147	1.59e-02
323		uacaca	gacaca	1.776	3.79e-02
324		amayama	acacaga	2.467	6.81e-03
326		amayama	acagacu	2.160	1.54e-02

Protein: HNRNPU (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
138		uguauug	ugccuug	2.781	2.71e-03
143		uguauug	uggacug	2.953	1.57e-03

Protein: HNRPLL (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
322		rcahaca	ggacaca	2.329	9.93e-03
324		rcahaca	acacaga	2.519	5.88e-03
326		rcahaca	acagacu	2.316	1.03e-02

Protein: ILF2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
182		gggugggg	gggagggg	3.516	2.19e-04

187	gggugggg	gggugggg	3.531	2.07e-04
-----	----------	----------	-------	----------

Protein: KHSRP (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
148		uguau	ugugu	1.897	2.89e-02
150		uguau	uguuu	2.449	7.16e-03
152		uuuuu	uuuuu	2.893	1.91e-03
175		uuuuu	uuuuu	2.893	1.91e-03
347		uuuuu	uuuuu	2.496	6.28e-03
369		uguau	uguuu	1.888	2.95e-02

Protein: MBNL1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
296		gcgcagc	gagcugc	2.000	2.27e-02
312		gcgcagc	uugccgc	1.986	2.35e-02
413		ugcua	uucua	1.660	4.85e-02
421		ugcua	ugcca	1.660	4.85e-02
435		ugcua	ugcuc	1.660	4.85e-02

Protein: NOVA1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
89		aucac	cucac	1.781	3.75e-02
97		aucac	cucac	1.781	3.75e-02
101		aucac	cucac	1.781	3.75e-02
476		uucuaaa	accucaa	2.517	5.92e-03
479		uucuaaa	aucaugg	2.533	5.65e-03

Protein: PABPN1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
114		araaga	agaaga	1.907	2.83e-02

Protein: PCBP1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
128		agcccc	ggcccc	2.211	1.35e-02
129		agcccc	gcccc	1.989	2.34e-02
331		agcccc	cucccc	2.122	1.69e-02
332		agcccc	uccccc	2.078	1.89e-02
333		agcccc	cccccc	2.078	1.89e-02

Protein: PCBP2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
330		ccyycc	acucccc	2.163	1.53e-02
331		uuccc	cuccc	2.239	1.26e-02
332		uuccc	ucccc	2.239	1.26e-02

Protein: PCBP3 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
152		uuuycc	uuuuuc	2.432	7.51e-03
153		uuuycc	uuuucc	2.635	4.21e-03
175		uuuycc	uuuuuc	2.432	7.51e-03
347		uuuycc	uuuuuc	2.405	8.09e-03
348		uuuycc	uuuucc	2.622	4.37e-03
370		uuuycc	guuuuc	2.324	1.01e-02
410		uuuycc	cuuuuc	2.284	1.12e-02
418		uuuycc	cuuugc	2.122	1.69e-02

Protein: PCBP4 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
396	gucgg	gccgg	1.971	2.44e-02

Protein: PTB3 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
153	cuuucu	uuuucc	2.383	8.59e-03
176	cuuucu	uuuucu	2.654	3.98e-03
346	cuuucu	cuuuuu	2.099	1.79e-02
348	cuuucu	uuuucc	2.062	1.96e-02
371	cuuucu	uuuucu	2.333	9.82e-03

Protein: PTBP3 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
153	cuuucu	uuuucc	2.412	7.93e-03
176	cuuucu	uuuucu	2.687	3.60e-03
346	cuuucu	cuuuuu	2.125	1.68e-02
348	cuuucu	uuuucc	2.088	1.84e-02
371	cuuucu	uuuucu	2.362	9.09e-03

Protein: PUF60 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
152	uuuuu	uuuuu	3.134	8.62e-04
175	uuuuu	uuuuu	3.134	8.62e-04
177	uuuuu	uuucu	2.790	2.64e-03
347	uuuuu	uuuuu	2.950	1.59e-03
372	uuuuu	uuucu	2.639	4.16e-03

Protein: QKI (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
287	acuaay	aguaac	1.728	4.20e-02

Protein: RALY (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
150	uuuuuub	uguuuuu	2.554	5.32e-03
151	uuuuuub	guuuuuc	2.795	2.60e-03
152	uuuuu	uuuuu	3.130	8.74e-04
174	uuuuuub	auuuuuc	2.893	1.91e-03
175	uuuuu	uuuuu	3.130	8.74e-04
176	uuuuuub	uuuucug	2.875	2.02e-03
345	uuuuuub	ucuuuuu	2.580	4.94e-03
346	uuuuuub	cuuuuuc	2.795	2.60e-03
347	uuuuuub	uuuuucc	2.830	2.33e-03
369	uuuuuub	uguuuuc	2.687	3.60e-03
371	uuuuuub	uuuucug	2.804	2.52e-03

Protein: RBM15B (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
150	uuuuauuu	uguuuuuc	2.208	1.36e-02
174	uuuuauuu	auuuuuc	2.292	1.10e-02
175	uuuuauuu	uuuuucug	2.361	9.11e-03

Protein: RBM22 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
199	accgg	accgg	2.306	1.06e-02
216	accgg	accgg	2.306	1.06e-02
217	accgg	cccgg	2.408	8.02e-03

Protein: RBM23 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
28		ccccc	ccucc	1.769	3.84e-02
130		ccccc	ccccc	1.877	3.03e-02
315		ccccc	ccgcc	2.615	4.46e-03
333		ccccc	ccccc	2.946	1.61e-03
334		ccccc	ccccc	2.946	1.61e-03
Protein: RBM24 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
253		wgwgugd	cgagugu	2.065	1.95e-02
255		wgwgugd	agugucu	1.987	2.35e-02
Protein: RBM25 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
186		ggggag	ggggug	2.575	5.01e-03
191		ggggag	ggggag	2.586	4.85e-03
Protein: RBM38 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
82		kkguguk	gggagug	1.756	3.95e-02
254		kkguguk	gaguguc	1.667	4.78e-02
Protein: RBM4 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
252		gcgcgu	gcgagu	2.658	3.93e-03
265		gcgcgu	gcgcau	2.822	2.39e-03
Protein: RBM42 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
451		aacuamg	caccaag	1.905	2.84e-02
465		aacuamg	aacugau	1.946	2.58e-02
Protein: RBM45 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
89		cuuac	cucac	2.881	1.98e-03
97		cuuac	cucac	2.465	6.85e-03
101		cuuac	cucac	2.881	1.98e-03
363		cuuac	cugac	1.970	2.44e-02
375		cuuac	cugac	1.970	2.44e-02
Protein: RBM6 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
28		cgucca	ccuccu	1.962	2.49e-02
51		ccacc	ccacg	1.658	4.87e-02
69		ccacc	ccauc	2.096	1.80e-02
90		ccacc	ucacc	2.316	1.03e-02
93		ccacc	ccgcc	2.316	1.03e-02
102		ccacc	ucacc	2.096	1.80e-02
105		ccacc	ccauc	2.316	1.03e-02
130		ccacc	ccccc	1.658	4.87e-02
133		ccacc	ccagc	1.658	4.87e-02
315		ccacc	ccgcc	1.658	4.87e-02
333		ccacc	ccccc	1.658	4.87e-02
334		ccacc	ccccc	1.658	4.87e-02
Protein: SAMD4A (Hs/Mm)					

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
205		gckgghm	gcuggcc	2.049	2.02e-02
Protein: SNRNP70 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
436		rwucaag	gcucaag	1.877	3.03e-02
451		rwucaag	caccaag	2.521	5.85e-03
Protein: SNRPA (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
281		wugcacr	cuggaca	2.141	1.61e-02
282		ugcaca	uggaca	1.961	2.49e-02
299		wugcacr	cugcaga	2.239	1.26e-02
300		ugcaca	ugcaga	2.513	5.99e-03
321		ugcaca	uggaca	1.961	2.49e-02
435		ugcaca	ugcuca	2.355	9.26e-03
449		ugcaca	ugcacc	2.737	3.10e-03
Protein: SRSF1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
183		gragga	ggaggg	2.376	8.75e-03
193		gragga	ggaggc	2.290	1.10e-02
Protein: SRSF2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
182		ggagwd	gggagg	1.885	2.97e-02
192		ggagwd	gggagg	1.885	2.97e-02
Protein: SRSF5 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
129		gcccc	gcccc	2.078	1.89e-02
197		gcccc	gcacc	2.009	2.23e-02
295		gcagc	ggagc	1.886	2.96e-02
298		gcagc	gcugc	1.886	2.96e-02
301		gcagc	gcaga	1.886	2.96e-02
314		gcagc	gccgc	1.886	2.96e-02
Protein: SRSF7 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
46		acgacg	gacgcc	3.192	7.06e-04
377		acgacg	gacggc	2.346	9.49e-03
Protein: SRSF8 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
297		agcagc	agcugc	2.329	9.93e-03
300		agcagc	ugcaga	2.317	1.03e-02
313		agcagc	ugccgc	2.268	1.17e-02
Protein: SRSF9 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
182		kgrwgs	gggaggg	2.634	4.22e-03
187		kgrwgs	ggguggg	2.535	5.62e-03
192		kgrwgs	gggaggg	2.732	3.15e-03
193		kgrwgs	ggagggca	2.535	5.62e-03
Protein: TAF15 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value

183	ggggggg	ggagggg	3.400	3.37e-04
188	ggggggg	ggugggg	3.400	3.37e-04

Protein: TIA1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
74		uuuuubk	uuugugg	1.873	3.05e-02
150		uuuuubk	uguuuuu	2.686	3.62e-03
151		uuuuubk	guuuuuc	2.824	2.37e-03
152		uuuuu	uuuuu	3.189	7.14e-04
153		uuuuu	uuuuc	2.826	2.36e-03
174		uuuuubk	auuuuuc	2.902	1.85e-03
175		uuuuu	uuuuu	3.189	7.14e-04
176		uuuuubk	uuucug	2.951	1.58e-03
177		uuuuubk	uuucugg	2.657	3.94e-03
345		uuuuubk	ucuuuuu	2.549	5.40e-03
346		uuuuubk	cuuuuuc	2.706	3.41e-03
347		uuuuu	uuuuu	2.932	1.68e-03
348		uuuuu	uuuuc	2.682	3.66e-03
369		uuuuu	uguuu	2.561	5.22e-03
370		uuuuubk	guuuucu	2.588	4.83e-03
371		uuuuubk	uuucug	2.755	2.93e-03

Protein: TRA2A (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
113		cugaaga	aagaaga	1.701	4.45e-02

Protein: TRNAU1AP (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
150		uuuuauu	uguuuuu	2.465	6.85e-03
152		uuuuauu	uuuuucc	2.535	5.62e-03
153		uuuuauu	uuuuccu	2.465	6.85e-03
175		uuuuauu	uuuuucu	2.663	3.87e-03
176		uuuuauu	uuucug	2.477	6.62e-03
345		uuuuauu	ucuuuuu	2.174	1.49e-02
347		uuuuauu	uuuuucc	2.326	1.00e-02
371		uuuuauu	uuucug	2.186	1.44e-02

Protein: U2AF2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
150		uuuuuyc	uguuuuu	2.876	2.01e-03
151		uuuuuyc	guuuuuc	3.457	2.73e-04
152		uuuuuyc	uuuuucc	3.571	1.78e-04
174		uuuuuyc	auuuuuc	3.505	2.28e-04
175		uuuuuyc	uuuuucu	3.314	4.60e-04
176		uuuuuyc	uuucug	2.914	1.78e-03
345		uuuuuyc	ucuuuuu	2.771	2.79e-03
346		uuuuuyc	cuuuuuc	3.362	3.87e-04
347		uuuuuyc	uuuuucc	3.438	2.93e-04
369		uuuuuyc	uguuuuc	3.143	8.36e-04
370		uuuuuyc	guuuucu	2.829	2.33e-03
371		uuuuuyc	uuucug	2.810	2.48e-03
409		uuuuuyc	ccuuuuc	2.086	1.85e-02
410		uuuuuyc	cuuuucu	2.133	1.65e-02
411		uuuuuyc	uuucua	2.124	1.68e-02

Protein: UNK (Hs/Mm)

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

292		uauaga	caugga	1.793	3.65e-02
-----	--	--------	--------	-------	----------

Protein: ZC3H10 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
249		ssagcgm	ugagcga	2.301	1.07e-02
262		ssagcgm	caagcgc	2.507	6.09e-03

Protein: ZC3H14 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
148		uuuuuu	uguuuu	1.835	3.33e-02
150		uuuuuu	uguuuu	2.196	1.40e-02

Protein: ZFP36 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
150		uauuu	uguuu	1.888	2.95e-02
152		uauuu	uuuuu	1.888	2.95e-02
173		uauuu	cauuu	1.888	2.95e-02
175		uauuu	uuuuu	1.888	2.95e-02

Protein: ZNF326 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
330		auucc	acucc	1.667	4.78e-02

Παράρτημα Δ:

Protein: ANKHD1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
380		agacgww	ggacgcc	1.942	2.61e-02

Protein: BOLL (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
155		uuuuuu	ucuuuuu	2.184	1.45e-02
177		uuuuuu	cauuuu	2.079	1.88e-02
178		guguua	auguuu	1.888	2.95e-02
483		uuuuuu	uguuuu	2.382	8.61e-03
485		uuuuuu	uguuuuu	2.684	3.64e-03

Protein: BRUNOL4 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
483		kgugukk	uguuuu	2.716	3.30e-03
485		kgugukk	uguuuuu	2.459	6.97e-03

Protein: BRUNOL5 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
481		ugugukk	acugugu	2.200	1.39e-02
483		ugugukk	uguuuu	2.775	2.76e-03
485		ugugukk	uguuuuu	2.525	5.78e-03

Protein: BRUNOL6 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
326		ugugdkg	uguuggg	1.920	2.74e-02

Protein: CNOT4 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
111		acacag	gcagag	2.462	6.91e-03

133	gacaga	gacaca	2.022	2.16e-02
134	acacag	acacag	3.103	9.58e-04
135	gacaga	cacaga	2.033	2.10e-02
136	acacag	acagac	2.718	3.28e-03

Protein: CPEB1 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
155	uuuuu	ucuuu	2.181	1.46e-02
156	uuuuu	cuuuu	2.254	1.21e-02
157	uuuuu	uuuuu	2.717	3.29e-03
158	uuuuu	uuuuc	2.471	6.74e-03
179	uuuuu	uguuu	2.275	1.15e-02
180	uuuuu	guuuu	2.275	1.15e-02
181	uuuuu	uuuuc	2.449	7.16e-03
182	uuuuu	uuucu	2.210	1.36e-02
485	uuuuu	uguuu	2.333	9.82e-03
486	uuuuu	guuuu	2.391	8.40e-03
487	uuuuu	uuuuu	3.000	1.35e-03
488	uuuuu	uuuuc	2.623	4.36e-03

Protein: CPEB2 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
154	chuuuuu	gucuuuu	2.490	6.39e-03
155	chuuuuu	ucuuuuu	2.796	2.59e-03
156	chuuuuu	cuuuuuc	2.888	1.94e-03
177	chuuuuu	cauguuu	2.663	3.87e-03
218	chuuuuu	ccuuuuu	2.510	6.04e-03
219	chuuuuu	ccuuuuc	2.510	6.04e-03
220	chuuuuu	cuuuucu	2.510	6.04e-03
485	chuuuuu	uguuuuu	2.867	2.07e-03
486	chuuuuu	guuuuuc	2.694	3.53e-03

Protein: CPEB4 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
155	uuuuuu	ucuuuu	2.739	3.08e-03
156	uuuuuu	cuuuuu	3.104	9.55e-04
157	uuuuuu	uuuuuc	2.652	4.00e-03
179	uuuuuu	uguuuu	2.713	3.33e-03
180	uuuuuu	guuuuc	2.600	4.66e-03
219	uuuuuu	ccuuuu	1.887	2.96e-02
220	uuuuuu	cuuuuc	1.826	3.39e-02
485	uuuuuu	uguuuu	2.748	3.00e-03
486	uuuuuu	guuuuu	3.209	6.66e-04
487	uuuuuu	uuuuuc	2.713	3.33e-03

Protein: DAZ3 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
154	uuguuu	gucuuu	2.673	3.76e-03
156	uuguuu	cuuuuu	2.971	1.48e-03
157	uuguuu	uuuuuc	2.692	3.55e-03
178	uuguuu	auguuu	3.067	1.08e-03
218	acguuu	ccuuuu	1.900	2.87e-02
219	acguuu	ccuuuu	1.900	2.87e-02
484	uuguuu	guguuu	3.077	1.05e-03
486	uuguuu	guuuuu	3.058	1.11e-03
487	uuguuu	uuuuuc	2.740	3.07e-03

Protein: EIF4G2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
123		cgccg	ugccg	2.543	5.50e-03
126		cgccg	cgccg	3.019	1.27e-03
145		cgccg	ccccg	2.543	5.50e-03
147		gcgag	ccgag	1.813	3.49e-02
149		gcgag	gagag	1.813	3.49e-02
162		gcgag	ccgag	1.813	3.49e-02
210		gguugc	gguugu	2.688	3.59e-03
213		gguugc	ugucgc	2.688	3.59e-03
389		gguugc	cguggc	2.143	1.61e-02
Protein: ELAVL4 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
157		uuauu	uuuuu	2.569	5.10e-03
487		uuauu	uuuuu	3.000	1.35e-03
Protein: ENOX1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
133		hrkacag	gacacag	2.094	1.81e-02
Protein: ESRP1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
348		gggugg	gggugg	2.443	7.28e-03
Protein: ESRP2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
354		ugggrad	uugggac	2.355	9.26e-03
377		ugggrad	uugggac	2.355	9.26e-03
Protein: FUBP1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
155		uauuu	ucuuu	2.528	5.74e-03
157		uauuu	uuuuu	2.880	1.99e-03
179		uauuu	uguuu	2.848	2.20e-03
485		uauuu	uguuu	2.904	1.84e-03
487		uauuu	uuuuu	3.040	1.18e-03
Protein: FUBP3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
157		uuuau	uuuuu	2.669	3.80e-03
182		uuuau	uuucu	2.248	1.23e-02
487		uuuau	uuuuu	2.975	1.46e-03
Protein: FXR2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
186		dgacrrr	ugacggc	2.071	1.92e-02
357		dgacrrr	ggacggc	2.429	7.57e-03
Protein: G3BP2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
115		aggau dr	aggau ga	2.147	1.59e-02
451		aggau dr	aaggau gg	1.920	2.74e-02
Protein: HNRNPA1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
353		duagggw	guuggga	2.514	5.97e-03

Protein: HNRNPA1L2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	345	duagggw	ccagggg	1.986	2.35e-02
	353	duagggw	guuggga	2.366	8.99e-03

Protein: HNRNPA2B1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	345	duagggw	ccagggg	2.013	2.21e-02
	353	duagggw	guuggga	2.493	6.33e-03

Protein: HNRNPC (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	154	huuuuuk	gucuuuu	2.482	6.53e-03
	155	huuuuuk	ucuuuuu	2.580	4.94e-03
	156	huuuuuk	cuuuuuc	2.866	2.08e-03
	157	uuuuu	uuuuu	2.808	2.49e-03
	158	uuuuu	uuuuc	2.390	8.42e-03
	178	huuuuuk	auguuuu	2.795	2.60e-03
	179	uuuuu	uguuu	2.390	8.42e-03
	180	huuuuuk	guuuuuc	2.527	5.75e-03
	181	uuuuu	uuuuc	2.370	8.89e-03
	182	uuuuu	uuucu	2.295	1.09e-02
	484	huuuuuk	guguuuu	2.634	4.22e-03
	485	huuuuuk	uguuuuu	2.741	3.06e-03
	486	huuuuuk	guuuuuc	3.009	1.31e-03
	487	uuuuu	uuuuu	3.082	1.03e-03
	488	uuuuu	uuuuc	2.527	5.75e-03

Protein: HNRNPCL1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	154	huuuuuk	gucuuuu	2.474	6.68e-03
	155	huuuuuk	ucuuuuu	2.588	4.83e-03
	156	huuuuuk	cuuuuuc	2.833	2.31e-03
	157	uuuuu	uuuuu	2.940	1.64e-03
	158	uuuuu	uuuuc	2.647	4.06e-03
	178	huuuuuk	auguuuu	2.772	2.79e-03
	179	uuuuu	uguuu	2.571	5.07e-03
	180	uuuuu	guuuu	2.571	5.07e-03
	181	uuuuu	uuuuc	2.624	4.35e-03
	182	uuuuu	uuucu	2.504	6.14e-03
	484	huuuuuk	guguuuu	2.614	4.47e-03
	485	huuuuuk	uguuuuu	2.737	3.10e-03
	486	huuuuuk	guuuuuc	2.965	1.51e-03
	487	uuuuu	uuuuu	3.241	5.96e-04
	488	uuuuu	uuuuc	2.805	2.52e-03

Protein: HNRNPF (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	114	gugkau	gaggau	3.036	1.20e-03
	329	agggg	ugggc	2.163	1.53e-02
	347	agggg	agggg	2.653	3.99e-03
	355	agggg	uggga	2.541	5.53e-03
	390	gukgykg	guggcag	2.508	6.07e-03
	409	gukgykg	uuugugg	2.246	1.24e-02
	412	gukgykg	guggcgg	2.574	5.03e-03

Protein: HNRNPH2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
317		gggaggg	gggagcg	2.078	1.89e-02
348		gggaggg	ggguggu	2.433	7.49e-03
356		gggaggg	gggacgg	2.656	3.95e-03

Protein: HNRNPK (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
384		gccca	gccca	1.655	4.90e-02
402		gccca	gacca	2.109	1.75e-02

Protein: HNRNPL (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
132		amayama	ggacaca	2.147	1.59e-02
133		uacaca	gacaca	1.776	3.79e-02
134		amayama	acacaga	2.467	6.81e-03
136		amayama	acagacu	2.160	1.54e-02

Protein: HNRNPM (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
331		gguugguu	ggcuggau	3.825	6.54e-05
348		gguugguu	gggugguu	4.238	1.13e-05
352		gguugguu	gguuggga	3.730	9.57e-05

Protein: HNRNPU (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
473		uguauug	ugccuug	2.781	2.71e-03
478		uguauug	uggacug	2.953	1.57e-03

Protein: HNRPLL (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
132		rcahaca	ggacaca	2.329	9.93e-03
134		rcahaca	acacaga	2.519	5.88e-03
136		rcahaca	acagacu	2.316	1.03e-02

Protein: KHSRP (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
157		uuuuu	uuuuu	2.496	6.28e-03
179		uguau	uguuu	1.888	2.95e-02
483		uguau	ugugu	1.897	2.89e-02
485		uguau	uguuu	2.449	7.16e-03
487		uuuuu	uuuuu	2.893	1.91e-03

Protein: MBNL1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
106		gcgcagc	gagcugc	2.000	2.27e-02
122		gcgcagc	uugccgc	1.986	2.35e-02
223		ugcua	uucua	1.660	4.85e-02
231		ugcua	ugcca	1.660	4.85e-02
245		ugcua	ugcuc	1.660	4.85e-02

Protein: NOVA1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
286		uucuaaa	accauca	2.517	5.92e-03
289		uucuaaa	aucaugg	2.533	5.65e-03
424		aucac	cucac	1.781	3.75e-02
432		aucac	cucac	1.781	3.75e-02

436		aucac	cucac	1.781	3.75e-02
Protein: PABPN1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
449		araaga	agaaga	1.907	2.83e-02
Protein: PCBP1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
141		agcccc	cucccc	2.122	1.69e-02
142		agcccc	uccccc	2.078	1.89e-02
143		agcccc	cccccc	2.078	1.89e-02
463		agcccc	ggcccc	2.211	1.35e-02
464		agcccc	gcccc	1.989	2.34e-02
Protein: PCBP2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
140		ccyycch	acucucc	2.163	1.53e-02
141		uuccc	cuccc	2.239	1.26e-02
142		uuccc	ucccc	2.239	1.26e-02
Protein: PCBP3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
157		uuuycc	uuuuuc	2.405	8.09e-03
158		uuuycc	uuuucc	2.622	4.37e-03
180		uuuycc	guuuuc	2.324	1.01e-02
220		uuuycc	cuuuuc	2.284	1.12e-02
228		uuuycc	cuuugc	2.122	1.69e-02
487		uuuycc	uuuuuc	2.432	7.51e-03
488		uuuycc	uuuucc	2.635	4.21e-03
Protein: PCBP4 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
206		gucgg	gccgg	1.971	2.44e-02
Protein: PTB3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
156		cuuucu	cuuuuu	2.099	1.79e-02
158		cuuucu	uuuucc	2.062	1.96e-02
181		cuuucu	uuuucu	2.333	9.82e-03
488		cuuucu	uuuucc	2.383	8.59e-03
Protein: PTBP3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
156		cuuucu	cuuuuu	2.125	1.68e-02
158		cuuucu	uuuucc	2.088	1.84e-02
181		cuuucu	uuuucu	2.362	9.09e-03
488		cuuucu	uuuucc	2.412	7.93e-03
Protein: PUF60 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
157		uuuuu	uuuuu	2.950	1.59e-03
182		uuuuu	uuucu	2.639	4.16e-03
487		uuuuu	uuuuu	3.134	8.62e-04
Protein: QKI (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
97		acuaay	aguaac	1.728	4.20e-02

Protein: RALY (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
155		uuuuuub	ucuuuuu	2.580	4.94e-03
156		uuuuuub	cuuuuuc	2.795	2.60e-03
157		uuuuuub	uuuuuuc	2.830	2.33e-03
179		uuuuuub	uguuuuc	2.687	3.60e-03
181		uuuuuub	uuuucug	2.804	2.52e-03
485		uuuuuub	uguuuuu	2.554	5.32e-03
486		uuuuuub	guuuuuc	2.795	2.60e-03
487		uuuuu	uuuuu	3.130	8.74e-04

Protein: RBM15B (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
485		uuuuuuu	uguuuuuc	2.208	1.36e-02

Protein: RBM22 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
26		accgg	acccg	2.306	1.06e-02
27		accgg	cccgg	2.408	8.02e-03
314		accgg	uccgg	1.684	4.61e-02
320		accgg	agcgg	2.408	8.02e-03

Protein: RBM23 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
125		ccccc	ccgcc	2.615	4.46e-03
143		ccccc	ccccc	2.946	1.61e-03
144		ccccc	ccccc	2.946	1.61e-03
363		ccccc	ccucc	1.769	3.84e-02
465		ccccc	ccccc	1.877	3.03e-02

Protein: RBM24 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
63		wgwgugd	cgagugu	2.065	1.95e-02
65		wgwgugd	agugucu	1.987	2.35e-02

Protein: RBM38 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
64		kkguguk	gaguguc	1.667	4.78e-02
417		kkguguk	gggagug	1.756	3.95e-02

Protein: RBM4 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
62		gcgcgu	gcgagu	2.658	3.93e-03
75		gcgcgu	gcgcau	2.822	2.39e-03

Protein: RBM42 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
261		aacuamg	caccaag	1.905	2.84e-02
275		aacuamg	aacugau	1.946	2.58e-02

Protein: RBM45 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
173		cuuac	cugac	1.970	2.44e-02
185		cuuac	cugac	1.970	2.44e-02
358		gacgamv	gacggcc	2.800	2.56e-03
359		acgac	acggc	2.070	1.92e-02

424		cuuac	cucac	2.881	1.98e-03
432		cuuac	cucac	2.465	6.85e-03
436		cuuac	cucac	2.881	1.98e-03

Protein: RBM6 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
125		ccacc	ccgcc	1.658	4.87e-02
143		ccacc	ccccc	1.658	4.87e-02
144		ccacc	ccccc	1.658	4.87e-02
312		cgucca	ccuccg	2.139	1.62e-02
363		cgucca	ccuccu	1.962	2.49e-02
386		ccacc	ccacg	1.658	4.87e-02
404		ccacc	ccauc	2.096	1.80e-02
425		ccacc	ucacc	2.316	1.03e-02
428		ccacc	ccgcc	2.316	1.03e-02
437		ccacc	ucacc	2.096	1.80e-02
440		ccacc	ccauc	2.316	1.03e-02
465		ccacc	ccccc	1.658	4.87e-02
468		ccacc	ccagc	1.658	4.87e-02

Protein: SNRNP70 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
246		rwucaag	gcucaag	1.877	3.03e-02
261		rwucaag	caccaag	2.521	5.85e-03

Protein: SNRPA (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
91		wugcacr	cuggaca	2.141	1.61e-02
92		ugcaca	uggaca	1.961	2.49e-02
109		wugcacr	cugcaga	2.239	1.26e-02
110		ugcaca	ugcaga	2.513	5.99e-03
131		ugcaca	uggaca	1.961	2.49e-02
245		ugcaca	ugcuca	2.355	9.26e-03
259		ugcaca	ugcacc	2.737	3.10e-03

Protein: SRSF5 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
105		gcagc	ggagc	1.886	2.96e-02
108		gcagc	gcugc	1.886	2.96e-02
111		gcagc	gcaga	1.886	2.96e-02
124		gcagc	gccgc	1.886	2.96e-02
464		gcccc	gcccc	2.078	1.89e-02

Protein: SRSF7 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
187		acgacg	gacggc	2.346	9.49e-03
358		acgacg	gacggc	2.795	2.60e-03
381		acgacg	gacgcc	3.192	7.06e-04

Protein: SRSF8 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
107		agcagc	agcugc	2.329	9.93e-03
110		agcagc	ugcaga	2.317	1.03e-02
123		agcagc	ugccgc	2.268	1.17e-02

Protein: SRSF9 (Hs/Mm)

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

348		kgrwgs	ggguggu	1.972	2.43e-02
-----	--	--------	---------	-------	----------

Protein: TIA1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
155		uuuuubk	ucuuuuu	2.549	5.40e-03
156		uuuuubk	cuuuuuc	2.706	3.41e-03
157		uuuuu	uuuuu	2.932	1.68e-03
158		uuuuu	uuuuc	2.682	3.66e-03
179		uuuuu	uguuu	2.561	5.22e-03
180		uuuuubk	guuuucu	2.588	4.83e-03
181		uuuuubk	uuucug	2.755	2.93e-03
409		uuuuubk	uuugugg	1.873	3.05e-02
485		uuuuubk	uguuuuu	2.686	3.62e-03
486		uuuuubk	guuuuuc	2.824	2.37e-03
487		uuuuu	uuuuu	3.189	7.14e-04
488		uuuuu	uuuuc	2.826	2.36e-03

Protein: TRA2A (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
448		cugaaga	aagaaga	1.701	4.45e-02

Protein: TRNAU1AP (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
155		uuuuauu	ucuuuuu	2.174	1.49e-02
157		uuuuauu	uuuuucc	2.326	1.00e-02
181		uuuuauu	uuucug	2.186	1.44e-02
485		uuuuauu	uguuuuu	2.465	6.85e-03
487		uuuuauu	uuuuucc	2.535	5.62e-03
488		uuuuauu	uuuuccu	2.465	6.85e-03

Protein: U2AF2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
155		uuuuuyc	ucuuuuu	2.771	2.79e-03
156		uuuuuyc	cuuuuuc	3.362	3.87e-04
157		uuuuuyc	uuuuucc	3.438	2.93e-04
179		uuuuuyc	uguuuuc	3.143	8.36e-04
180		uuuuuyc	guuuucu	2.829	2.33e-03
181		uuuuuyc	uuucug	2.810	2.48e-03
219		uuuuuyc	ccuuuuc	2.086	1.85e-02
220		uuuuuyc	cuuuucu	2.133	1.65e-02
221		uuuuuyc	uuucua	2.124	1.68e-02
485		uuuuuyc	uguuuuu	2.876	2.01e-03
486		uuuuuyc	guuuuuc	3.457	2.73e-04
487		uuuuuyc	uuuuucc	3.571	1.78e-04

Protein: UNK (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
102		uauaga	caugga	1.793	3.65e-02

Protein: ZC3H10 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
59		ssagcgm	ugagcga	2.301	1.07e-02
72		ssagcgm	caagcgc	2.507	6.09e-03

Protein: ZC3H14 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
483		uuuduuu	uguguuu	1.835	3.33e-02

485	uuuuuuu	uuuuuuu	2.196	1.40e-02
-----	---------	---------	-------	----------

Protein: ZFP36 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
485		uuuuu	uguuu	1.888	2.95e-02
487		uuuuu	uuuuu	1.888	2.95e-02

Protein: ZNF326 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
140		auucc	acucc	1.667	4.78e-02

Παράρτημα Ε:

Protein: BOLL (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
405		uuuuuuu	ucuuuuu	2.184	1.45e-02
427		uuuuuuu	cauuuuu	2.079	1.88e-02
428		guguua	auguuu	1.888	2.95e-02

Protein: BRUNOL4 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
197		kgugukk	cgugucu	1.743	4.07e-02
199		kgugukk	ugucuga	1.730	4.18e-02

Protein: BRUNOL5 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
184		ugugukk	ugcguuu	1.813	3.49e-02
197		ugugukk	cgugucu	1.850	3.22e-02
199		ugugukk	ugucuga	1.863	3.12e-02

Protein: CNOT4 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
361		acacag	gcagag	2.462	6.91e-03
383		gacaga	gacaca	2.022	2.16e-02
384		acacag	acacag	3.103	9.58e-04
385		gacaga	cacaga	2.033	2.10e-02
386		acacag	acagac	2.718	3.28e-03

Protein: CPEB1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
405		uuuuu	ucuuu	2.181	1.46e-02
406		uuuuu	cuuuu	2.254	1.21e-02
407		uuuuu	uuuuu	2.717	3.29e-03
408		uuuuu	uuuuc	2.471	6.74e-03
429		uuuuu	uguuu	2.275	1.15e-02
430		uuuuu	guuuu	2.275	1.15e-02
431		uuuuu	uuuuc	2.449	7.16e-03
432		uuuuu	uuucu	2.210	1.36e-02

Protein: CPEB2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
404		chuuuuu	gucuuuu	2.490	6.39e-03
405		chuuuuu	ucuuuuu	2.796	2.59e-03
406		chuuuuu	cuuuuuc	2.888	1.94e-03
427		chuuuuu	cauuuuu	2.663	3.87e-03

468	chuuuuu	ccuuuuu	2.510	6.04e-03
469	chuuuuu	ccuuuuc	2.510	6.04e-03
470	chuuuuu	cuuuucu	2.510	6.04e-03

Protein: CPEB4 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
405		uuuuuu	ucuuuu	2.739	3.08e-03
406		uuuuuu	cuuuuu	3.104	9.55e-04
407		uuuuuu	uuuuuc	2.652	4.00e-03
429		uuuuuu	uguuuu	2.713	3.33e-03
430		uuuuuu	guuuuc	2.600	4.66e-03
469		uuuuuu	ccuuuu	1.887	2.96e-02
470		uuuuuu	cuuuuc	1.826	3.39e-02

Protein: DAZ3 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
185		acguuu	gcguuu	2.212	1.35e-02
196		acguuu	acgugu	2.912	1.80e-03
404		uuguuu	gucuuu	2.673	3.76e-03
406		uuguuu	cuuuuu	2.971	1.48e-03
407		uuguuu	uuuuuc	2.692	3.55e-03
428		uuguuu	auguuu	3.067	1.08e-03
468		acguuu	ccuuuu	1.900	2.87e-02
469		acguuu	ccuuuu	1.900	2.87e-02

Protein: EIF4G2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
53		cgccg	caccg	2.543	5.50e-03
58		cgccg	cgccc	2.781	2.71e-03
67		cgccg	caccg	2.781	2.71e-03
70		cgccg	cgccc	2.905	1.84e-03
81		cgccg	caccg	2.905	1.84e-03
94		cgccg	ccccg	2.543	5.50e-03
97		cgccg	cgcca	2.067	1.94e-02
373		cgccg	ugccg	2.543	5.50e-03
376		cgccg	cgccg	3.019	1.27e-03
395		cgccg	ccccg	2.543	5.50e-03
397		gcgag	ccgag	1.813	3.49e-02
399		gcgag	gagag	1.813	3.49e-02
412		gcgag	ccgag	1.813	3.49e-02
460		gguugc	gguugu	2.688	3.59e-03
463		gguugc	ugucgc	2.688	3.59e-03

Protein: ELAVL4 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
407		uuauu	uuuuu	2.569	5.10e-03

Protein: ENOX1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
383		hrkacag	gacacag	2.094	1.81e-02

Protein: FUBP1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
405		uauuu	ucuuu	2.528	5.74e-03
407		uauuu	uuuuu	2.880	1.99e-03
429		uauuu	uguuu	2.848	2.20e-03

Protein: FUBP3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
177		uauau	ucuau	1.660	4.85e-02
179		uauau	uauaa	1.767	3.86e-02
407		uuuau	uuuuu	2.669	3.80e-03
432		uuuau	uuucu	2.248	1.23e-02
Protein: FUS (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
54		cgcgc	accgc	2.277	1.14e-02
56		cgcgc	cgcgc	2.506	6.11e-03
68		cgcgc	accgc	2.277	1.14e-02
Protein: FXR1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
240		aygacr	agugac	2.943	1.63e-03
Protein: FXR2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
436		dgacrrr	ugacggc	2.071	1.92e-02
Protein: G3BP2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
365		aggaurd	aggaua	2.147	1.59e-02
Protein: HNRNPA1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
136		guaguagu	acaguggu	1.902	2.86e-02
Protein: HNRNPC (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
404		huuuuuk	gucuuuu	2.482	6.53e-03
405		huuuuuk	ucuuuuu	2.580	4.94e-03
406		huuuuuk	cuuuuuc	2.866	2.08e-03
407		uuuuu	uuuuu	2.808	2.49e-03
408		uuuuu	uuuuc	2.390	8.42e-03
428		huuuuuk	auguuuu	2.795	2.60e-03
429		uuuuu	uguuu	2.390	8.42e-03
430		huuuuuk	guuuuuc	2.527	5.75e-03
431		uuuuu	uuuuc	2.370	8.89e-03
432		uuuuu	uuucu	2.295	1.09e-02
Protein: HNRNPCL1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
404		huuuuuk	gucuuuu	2.474	6.68e-03
405		huuuuuk	ucuuuuu	2.588	4.83e-03
406		huuuuuk	cuuuuuc	2.833	2.31e-03
407		uuuuu	uuuuu	2.940	1.64e-03
408		uuuuu	uuuuc	2.647	4.06e-03
428		huuuuuk	auguuuu	2.772	2.79e-03
429		uuuuu	uguuu	2.571	5.07e-03
430		uuuuu	guuuu	2.571	5.07e-03
431		uuuuu	uuuuc	2.624	4.35e-03
432		uuuuu	uuucu	2.504	6.14e-03
Protein: HNRNPF (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value

364		gugkau	gaggau	3.036	1.20e-03
-----	--	--------	--------	-------	----------

Protein: HNRNPK (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
34		cacgc	caagc	1.952	2.55e-02
44		cacgc	caccc	1.952	2.55e-02
47		gccca	cccca	1.655	4.90e-02
56		cacgc	cgcgc	1.952	2.55e-02
59		gccca	gcccu	2.336	9.75e-03
71		gccca	gcccc	2.455	7.04e-03
74		ccawmcc	ccugccc	2.971	1.48e-03
77		gccca	gcccc	2.336	9.75e-03
78		gccca	cccca	2.336	9.75e-03
83		ccawmcc	ccguccc	2.942	1.63e-03
88		ccawmcc	ccugccc	2.870	2.05e-03
91		gccca	gcccc	2.109	1.75e-02
99		ccawmcc	ccacucc	2.681	3.67e-03

Protein: HNRNPL (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
382		amayama	ggacaca	2.147	1.59e-02
383		uacaca	gacaca	1.776	3.79e-02
384		amayama	acacaga	2.467	6.81e-03
386		amayama	acagacu	2.160	1.54e-02

Protein: HNRPLL (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
382		rcahaca	ggacaca	2.329	9.93e-03
384		rcahaca	acacaga	2.519	5.88e-03
386		rcahaca	acagacu	2.316	1.03e-02

Protein: KHSRP (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
407		uuuuu	uuuuu	2.496	6.28e-03
429		uguau	uguuu	1.888	2.95e-02

Protein: MBNL1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
356		gcgcagc	gagcugc	2.000	2.27e-02
372		gcgcagc	uugccgc	1.986	2.35e-02
473		ugcua	uucua	1.660	4.85e-02
481		ugcua	ugcca	1.660	4.85e-02
495		ugcua	ugcuc	1.660	4.85e-02

Protein: NOVA1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
42		aucac	cucac	2.257	1.20e-02
51		aucac	accac	2.257	1.20e-02
62		aucac	cucac	2.257	1.20e-02
65		aucac	accac	2.257	1.20e-02
152		uucauaa	cccaucu	2.550	5.39e-03
163		uucauaa	aucauca	2.833	2.31e-03
536		uucauaa	accauca	2.517	5.92e-03
539		uucauaa	aucaugg	2.533	5.65e-03

Protein: PCBP1 (Hs/Mm)

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

41	ccwwhcc	ccucacc	2.519	5.88e-03
44	agcccc	cacccc	2.589	4.81e-03
45	agcccc	accccc	2.989	1.40e-03
47	ccwwhcc	ccccacc	2.636	4.19e-03
58	agcccc	cgcccu	3.122	8.98e-04
61	ccwwhcc	ccucacc	3.558	1.87e-04
70	agcccc	cgcccc	3.656	1.28e-04
73	ccwwhcc	cccugcc	3.325	4.42e-04
74	ccwwhcc	ccugccc	3.403	3.33e-04
76	agcccc	ugcccc	3.589	1.66e-04
78	ccwwhcc	ccccacc	3.143	8.36e-04
83	ccwwhcc	ccguccc	3.416	3.18e-04
87	ccwwhcc	cccugcc	3.234	6.10e-04
88	ccwwhcc	ccugccc	3.286	5.08e-04
90	agcccc	ugcccc	3.478	2.53e-04
91	agcccc	gcccc	2.978	1.45e-03
92	agcccc	cccccc	3.078	1.04e-03
99	ccwwhcc	ccacucc	3.130	8.74e-04
192	ccwwhcc	ccuuacg	1.831	3.36e-02
243	agcccc	gacccc	1.800	3.59e-02
247	ccwwhcc	ccugacc	2.117	1.71e-02
391	agcccc	cucccc	2.122	1.69e-02
392	agcccc	uccccc	2.078	1.89e-02
393	agcccc	cccccc	2.078	1.89e-02

Protein: PCBP2 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
35	aacc	aagcc	1.752	3.99e-02
41	ccccacccc	ccucacccc	3.311	4.65e-04
44	aacc	cacc	1.752	3.99e-02
45	aacc	acccc	1.752	3.99e-02
46	ccccacccc	ccccacca	3.279	5.21e-04
47	ccccacccc	ccccaccac	3.672	1.20e-04
61	ccyycch	ccucacc	3.125	8.89e-04
67	ccccacccc	caccgcccc	3.361	3.88e-04
69	ccyycch	cgcccc	3.188	7.16e-04
72	ccccacccc	cccugccc	3.738	9.27e-05
73	ccccacccc	cccugcccc	3.311	4.65e-04
74	ccyycch	ccugccc	3.425	3.07e-04
76	uucc	ugccc	1.743	4.07e-02
78	ccccacccc	ccccaccgu	3.541	1.99e-04
83	ccyycch	ccguccc	3.375	3.69e-04
85	uucc	guccc	1.734	4.15e-02
87	ccccacccc	cccugcccc	3.311	4.65e-04
88	ccyycch	ccugccc	3.400	3.37e-04
90	uucc	ugccc	2.128	1.67e-02
92	ccccacccc	cccccgcc	3.689	1.13e-04
93	ccccacccc	ccccgcca	3.377	3.66e-04
94	ccccacccc	ccccgccac	3.656	1.28e-04
143	uucc	ugccc	1.743	4.07e-02
146	ccyycch	ccucucc	2.438	7.38e-03
147	ccyycch	cucucc	2.413	7.91e-03
148	ccyycch	ucucccc	2.413	7.91e-03
149	uucc	cucc	1.734	4.15e-02
150	uucc	ucccc	1.743	4.07e-02
208	aacc	aucc	1.752	3.99e-02
209	uucc	aucc	2.761	2.88e-03

210	uuccc	ucccc	2.679	3.69e-03
223	uuccc	uacc	2.899	1.87e-03
234	ccyycch	ccuccca	2.450	7.14e-03
235	uuccc	cuccc	2.468	6.79e-03
243	aacc	gacc	1.752	3.99e-02
244	aacc	accc	1.752	3.99e-02
287	ccyycch	cccucc	2.925	1.72e-03
288	ccyycch	ccuccu	2.750	2.98e-03
390	ccyycch	acuccc	2.163	1.53e-02
391	uuccc	cucc	2.239	1.26e-02
392	uuccc	uccc	2.239	1.26e-02

Protein: PCBP3 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
407		uuuycc	uuuuuc	2.405	8.09e-03
408		uuuycc	uuuucc	2.622	4.37e-03
430		uuuycc	guuuuc	2.324	1.01e-02
470		uuuycc	cuuuuc	2.284	1.12e-02
478		uuuycc	cuuugc	2.122	1.69e-02

Protein: PCBP4 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
45		auccccc	accccc	2.458	6.99e-03
76		auccccc	ugcccc	2.389	8.45e-03
85		auccccc	guccug	2.361	9.11e-03
90		auccccc	ugcccc	2.403	8.13e-03
456		gucgg	gcccgg	1.971	2.44e-02

Protein: PPRC1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
55		ssgcgcs	ccgcgcc	1.679	4.66e-02

Protein: PRR3 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
179		uauaag	uauau	2.179	1.47e-02

Protein: PTB3 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
406		cuuucu	cuuuuu	2.099	1.79e-02
408		cuuucu	uuuucc	2.062	1.96e-02
431		cuuucu	uuuucu	2.333	9.82e-03

Protein: PTBP3 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
406		cuuucu	cuuuuu	2.125	1.68e-02
408		cuuucu	uuuucc	2.088	1.84e-02
431		cuuucu	uuuucu	2.362	9.09e-03

Protein: PUF60 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
407		uuuuu	uuuuu	2.950	1.59e-03
432		uuuuu	uuucu	2.639	4.16e-03

Protein: PUM1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
177		uguau	ucua	1.958	2.51e-02
179		uguau	uauaa	2.011	2.22e-02

Protein: QKI (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	347	acuaay	aguaac	1.728	4.20e-02

Protein: RALY (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	405	uuuuuub	ucuuuuu	2.580	4.94e-03
	406	uuuuuub	cuuuuuc	2.795	2.60e-03
	407	uuuuuub	uuuuuuc	2.830	2.33e-03
	429	uuuuuub	uguuuuc	2.687	3.60e-03
	431	uuuuuub	uuuucug	2.804	2.52e-03

Protein: RBM22 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	68	accgg	accgc	2.531	5.69e-03

Protein: RBM23 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	38	ccccc	ccucc	2.954	1.57e-03
	46	ccccc	ccccc	3.046	1.16e-03
	49	ccccc	ccacc	2.746	3.02e-03
	52	ccccc	ccacc	2.746	3.02e-03
	66	ccccc	ccacc	2.662	3.88e-03
	69	ccccc	ccgcc	2.838	2.27e-03
	80	ccccc	ccacc	2.777	2.74e-03
	92	ccccc	ccccc	3.092	9.94e-04
	93	ccccc	ccccc	3.092	9.94e-04
	96	ccccc	ccgcc	2.738	3.09e-03
	234	ccccc	ccucc	2.369	8.92e-03
	288	ccccc	ccucc	2.438	7.38e-03
	299	ccccc	ccucc	2.438	7.38e-03
	375	ccccc	ccgcc	2.615	4.46e-03
	393	ccccc	ccccc	2.946	1.61e-03
	394	ccccc	ccccc	2.946	1.61e-03

Protein: RBM41 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	194	wuacwuk	uuacgug	2.593	4.76e-03
	195	uacuu	uacgu	2.125	1.68e-02

Protein: RBM42 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	511	aacuamg	caccaag	1.905	2.84e-02
	525	aacuamg	aacugau	1.946	2.58e-02

Protein: RBM45 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
	28	acacc	acucc	2.570	5.08e-03
	43	acacc	ucacc	2.626	4.32e-03
	45	acacc	acccc	2.626	4.32e-03
	49	acacc	ccacc	2.626	4.32e-03
	51	acgac	accac	2.220	1.32e-02
	52	acacc	ccacc	2.626	4.32e-03
	62	cuuac	cucac	2.297	1.08e-02
	63	acacc	ucacc	2.626	4.32e-03
	66	acacc	ccacc	2.626	4.32e-03

80	acacc	ccacc	2.215	1.34e-02
230	cuuac	cugac	3.584	1.69e-04
248	cuuac	cugac	3.683	1.15e-04
253	cuuac	cucac	3.436	2.95e-04
423	cuuac	cugac	1.970	2.44e-02
435	cuuac	cugac	1.970	2.44e-02

Protein: RBM4B (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
330		acggga	ucgggg	2.532	5.67e-03

Protein: RBM6 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
38		ccacc	ccucc	3.088	1.01e-03
43		ccacc	ucacc	3.246	5.85e-04
46		ccacc	ccccc	3.272	5.34e-04
49		ccacc	ccacc	4.044	2.63e-05
52		ccacc	ccacc	4.044	2.63e-05
63		ccacc	ucacc	3.342	4.16e-04
66		ccacc	ccacc	4.149	1.67e-05
69		ccacc	ccgcc	3.342	4.16e-04
80		ccacc	ccacc	3.825	6.54e-05
84		cgucca	cguccc	2.468	6.79e-03
92		ccacc	ccccc	2.868	2.07e-03
93		ccacc	ccccc	2.868	2.07e-03
96		ccacc	ccgcc	2.754	2.94e-03
99		ccacc	ccacu	2.754	2.94e-03
288		ccacc	ccucc	1.658	4.87e-02
299		cgucca	ccucca	1.684	4.61e-02
302		ccacc	ccacu	1.658	4.87e-02
375		ccacc	ccgcc	1.658	4.87e-02
393		ccacc	ccccc	1.658	4.87e-02
394		ccacc	ccccc	1.658	4.87e-02

Protein: SF1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
181		uaauc	uaaug	1.913	2.79e-02
203		uaauc	ugauc	2.394	8.33e-03
207		uaauc	caauc	1.913	2.79e-02
218		uaauc	ucauc	1.913	2.79e-02

Protein: SNRNP70 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
496		rwucaag	gcucaag	1.877	3.03e-02
511		rwucaag	caccaag	2.521	5.85e-03

Protein: SNRPA (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
317		wugcacr	uugcuca	2.634	4.22e-03
318		ugcaca	ugcuca	2.474	6.68e-03
341		wugcacr	cuggaca	3.000	1.35e-03
342		ugcaca	uggaca	2.513	5.99e-03
359		wugcacr	cugcaga	2.239	1.26e-02
360		ugcaca	ugcaga	2.513	5.99e-03
381		ugcaca	uggaca	1.961	2.49e-02
495		ugcaca	ugcuca	2.355	9.26e-03
509		ugcaca	ugcacc	2.737	3.10e-03

Protein: SRSF5 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
57		gcccc	gcgcc	3.417	3.17e-04
71		gcccc	gcccc	3.583	1.70e-04
77		gcccc	gcccc	3.583	1.70e-04
91		gcccc	gcccc	3.470	2.60e-04
355		gcagc	ggagc	1.886	2.96e-02
358		gcagc	gcugc	1.886	2.96e-02
361		gcagc	gcaga	1.886	2.96e-02
374		gcagc	gccgc	1.886	2.96e-02

Protein: SRSF7 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
437		acgacg	gacggc	2.346	9.49e-03

Protein: SRSF8 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
357		agcagc	agcugc	2.329	9.93e-03
360		agcagc	ugcaga	2.317	1.03e-02
373		agcagc	ugccgc	2.268	1.17e-02

Protein: TIA1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
405		uuuuubk	ucuuuuu	2.549	5.40e-03
406		uuuuubk	cuuuuuc	2.706	3.41e-03
407		uuuuu	uuuuu	2.932	1.68e-03
408		uuuuu	uuuuc	2.682	3.66e-03
429		uuuuu	uguuu	2.561	5.22e-03
430		uuuuubk	guuuucu	2.588	4.83e-03
431		uuuuubk	uuuucug	2.755	2.93e-03

Protein: TRNAU1AP (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
405		uuuuauu	ucuuuuu	2.174	1.49e-02
407		uuuuauu	uuuuucc	2.326	1.00e-02
431		uuuuauu	uuuucug	2.186	1.44e-02

Protein: U2AF2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
186		uuuuuyc	cguuuuc	1.667	4.78e-02
187		uuuuuyc	guuuucc	1.857	3.17e-02
405		uuuuuyc	ucuuuuu	2.771	2.79e-03
406		uuuuuyc	cuuuuuc	3.362	3.87e-04
407		uuuuuyc	uuuuucc	3.438	2.93e-04
429		uuuuuyc	uguuuuc	3.143	8.36e-04
430		uuuuuyc	guuuucu	2.829	2.33e-03
431		uuuuuyc	uuuucug	2.810	2.48e-03
469		uuuuuyc	ccuuuuc	2.086	1.85e-02
470		uuuuuyc	cuuuucu	2.133	1.65e-02
471		uuuuuyc	uuuucua	2.124	1.68e-02

Protein: UNK (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
352		uauaga	caugga	1.793	3.65e-02

Protein: YBX1 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
163	aacaucd	aucauca	3.130	8.74e-04

Protein: ZC3H10 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
52	ssagcgm	ccaccgc	2.027	2.13e-02
54	ssagcgm	accgcgc	2.068	1.93e-02
66	ssagcgm	ccaccgc	2.027	2.13e-02

Protein: ZNF326 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
189	auucc	uuucc	1.667	4.78e-02
208	auucc	aaucc	2.130	1.66e-02
209	auucc	auccc	2.130	1.66e-02
216	auucc	auuca	1.667	4.78e-02
390	auucc	acucc	1.667	4.78e-02

Παράρτημα ΣΤ:

Protein: BOLL (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
86	uuuguuu	ucuuuuu	2.184	1.45e-02
108	uuuguuu	cauguuu	2.079	1.88e-02
109	guguua	auguuu	1.888	2.95e-02

Protein: BRUNOL4 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
463	kgugukk	cgugucu	1.743	4.07e-02
465	kgugukk	ugucuga	1.730	4.18e-02

Protein: BRUNOL5 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
450	ugugukk	ugcguuu	1.813	3.49e-02
463	ugugukk	cgugucu	1.850	3.22e-02
465	ugugukk	ugucuga	1.863	3.12e-02

Protein: BRUNOL6 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
257	ugugdkg	uguuggg	1.920	2.74e-02

Protein: CNOT4 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
42	acacag	gcagag	2.462	6.91e-03
64	gacaga	gacaca	2.022	2.16e-02
65	acacag	acacag	3.103	9.58e-04
66	gacaga	cacaga	2.033	2.10e-02
67	acacag	acagac	2.718	3.28e-03

Protein: CPEB1 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
86	uuuuu	ucuuu	2.181	1.46e-02
87	uuuuu	cuuuu	2.254	1.21e-02
88	uuuuu	uuuuu	2.717	3.29e-03
89	uuuuu	uuuuc	2.471	6.74e-03
110	uuuuu	uguuu	2.275	1.15e-02

111	uuuuu	guuuu	2.275	1.15e-02
112	uuuuu	uuuuc	2.449	7.16e-03
113	uuuuu	uuucu	2.210	1.36e-02

Protein: CPEB2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
85		chuuuuu	gucuuuu	2.490	6.39e-03
86		chuuuuu	ucuuuuu	2.796	2.59e-03
87		chuuuuu	cuuuuuc	2.888	1.94e-03
108		chuuuuu	cauguuu	2.663	3.87e-03
149		chuuuuu	ccuuuuu	2.510	6.04e-03
150		chuuuuu	ccuuuuc	2.510	6.04e-03
151		chuuuuu	cuuuucu	2.510	6.04e-03

Protein: CPEB4 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
86		uuuuuu	ucuuuuu	2.739	3.08e-03
87		uuuuuu	cuuuuuu	3.104	9.55e-04
88		uuuuuu	uuuuuuc	2.652	4.00e-03
110		uuuuuu	uguuuuu	2.713	3.33e-03
111		uuuuuu	guuuuuc	2.600	4.66e-03
150		uuuuuu	ccuuuuu	1.887	2.96e-02
151		uuuuuu	cuuuuuc	1.826	3.39e-02

Protein: DAZ3 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
85		uuguuu	gucuuu	2.673	3.76e-03
87		uuguuu	cuuuuu	2.971	1.48e-03
88		uuguuu	uuuuuuc	2.692	3.55e-03
109		uuguuu	auguuu	3.067	1.08e-03
149		acguuu	ccuuuu	1.900	2.87e-02
150		acguuu	ccuuuu	1.900	2.87e-02
451		acguuu	gcguuu	2.212	1.35e-02
462		acguuu	acgugu	2.912	1.80e-03

Protein: EIF4G2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
54		cgccg	ugccg	2.543	5.50e-03
57		cgccg	cgccg	3.019	1.27e-03
76		cgccg	ccccg	2.543	5.50e-03
78		gcgag	ccgag	1.813	3.49e-02
80		gcgag	gagag	1.813	3.49e-02
93		gcgag	ccgag	1.813	3.49e-02
141		gguugc	gguugu	2.688	3.59e-03
144		gguugc	ugucgc	2.688	3.59e-03
319		cgccg	caccg	2.543	5.50e-03
324		cgccg	cgccc	2.781	2.71e-03
333		cgccg	caccg	2.781	2.71e-03
336		cgccg	cgccc	2.905	1.84e-03
347		cgccg	caccg	2.905	1.84e-03
360		cgccg	ccccg	2.543	5.50e-03
363		cgccg	cgcca	2.067	1.94e-02

Protein: ELAVL4 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
88		uuauu	uuuuu	2.569	5.10e-03

Protein: ENOX1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
64		hrkacag	gacacag	2.094	1.81e-02
Protein: ESRP1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
279		gggugg	gggugg	2.955	1.56e-03
287		gggugg	ggguga	2.648	4.05e-03
Protein: FUBP1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
86		uauuu	ucuuu	2.528	5.74e-03
88		uauuu	uuuuu	2.880	1.99e-03
110		uauuu	uguuu	2.848	2.20e-03
Protein: FUBP3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
88		uuuau	uuuuu	2.669	3.80e-03
113		uuuau	uuucu	2.248	1.23e-02
443		uauau	ucuai	1.660	4.85e-02
445		uauau	uauaa	1.767	3.86e-02
Protein: FUS (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
320		cgcg	accgc	2.277	1.14e-02
322		cgcg	cgcg	2.506	6.11e-03
334		cgcg	accgc	2.277	1.14e-02
Protein: FXR1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
506		aygacr	agugac	2.943	1.63e-03
Protein: FXR2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
117		dgacr	ugacggc	2.071	1.92e-02
Protein: G3BP2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
46		aggaur	aggaua	2.147	1.59e-02
278		aggaur	aggugg	1.827	3.38e-02
Protein: HNRNPA1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
402		guaguagu	acaguggu	1.902	2.86e-02
Protein: HNRNPA1L2 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
276		duagggw	ccagggu	1.958	2.51e-02
Protein: HNRNPA2B1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
276		duagggw	ccagggu	1.787	3.70e-02
Protein: HNRNPC (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
85		huuuuuk	gucuuuu	2.482	6.53e-03
86		huuuuuk	ucuuuuu	2.580	4.94e-03

87	huuuuuk	cuuuuuc	2.866	2.08e-03
88	uuuuu	uuuuu	2.808	2.49e-03
89	uuuuu	uuuuc	2.390	8.42e-03
109	huuuuuk	auguuuu	2.795	2.60e-03
110	uuuuu	uguuu	2.390	8.42e-03
111	huuuuuk	guuuucu	2.527	5.75e-03
112	uuuuu	uuuuc	2.370	8.89e-03
113	uuuuu	uuucu	2.295	1.09e-02

Protein: HNRNPCL1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
85		huuuuuk	gucuuuu	2.474	6.68e-03
86		huuuuuk	ucuuuuu	2.588	4.83e-03
87		huuuuuk	cuuuuuc	2.833	2.31e-03
88		uuuuu	uuuuu	2.940	1.64e-03
89		uuuuu	uuuuc	2.647	4.06e-03
109		huuuuuk	auguuuu	2.772	2.79e-03
110		uuuuu	uguuu	2.571	5.07e-03
111		uuuuu	guuuu	2.571	5.07e-03
112		uuuuu	uuuuc	2.624	4.35e-03
113		uuuuu	uuucu	2.504	6.14e-03

Protein: HNRNPF (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
45		gugkau	gaggau	3.036	1.20e-03
260		agggg	ugggc	2.163	1.53e-02
278		agggg	agggg	2.796	2.59e-03
286		agggg	ugggu	1.878	3.02e-02

Protein: HNRNPH2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
248		gggaggg	gggagcg	2.078	1.89e-02
279		gggaggg	ggguggu	1.756	3.95e-02

Protein: HNRNPK (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
300		cacgc	caagc	1.952	2.55e-02
310		cacgc	caccc	1.952	2.55e-02
313		gccca	cccca	1.655	4.90e-02
322		cacgc	cgcgc	1.952	2.55e-02
325		gccca	gcccc	2.336	9.75e-03
337		gccca	gcccc	2.455	7.04e-03
340		ccawmcc	ccugccc	2.971	1.48e-03
343		gccca	gcccc	2.336	9.75e-03
344		gccca	cccca	2.336	9.75e-03
349		ccawmcc	ccguccc	2.942	1.63e-03
354		ccawmcc	ccugccc	2.870	2.05e-03
357		gccca	gcccc	2.109	1.75e-02
365		ccawmcc	ccacucc	2.681	3.67e-03

Protein: HNRNPL (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
63		amayama	ggacaca	2.147	1.59e-02
64		uacaca	gacaca	1.776	3.79e-02
65		amayama	acacaga	2.467	6.81e-03
67		amayama	acagacu	2.160	1.54e-02

Protein: HNRNPM (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
262		gguugguu	ggcuggau	4.016	2.96e-05
279		gguugguu	gggugguu	4.587	2.25e-06
283		gguugguu	gguugggu	4.492	3.53e-06

Protein: HNRPLL (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
63		rcahaca	ggacaca	2.329	9.93e-03
65		rcahaca	acacaga	2.519	5.88e-03
67		rcahaca	acagacu	2.316	1.03e-02

Protein: KHSRP (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
88		uuuuu	uuuuu	2.496	6.28e-03
110		uguau	uguuu	1.888	2.95e-02

Protein: MBNL1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
37		gcgcagc	gagcugc	2.000	2.27e-02
53		gcgcagc	uugccgc	1.986	2.35e-02
154		ugcua	uucua	1.660	4.85e-02
162		ugcua	ugcca	1.660	4.85e-02
176		ugcua	ugcuc	1.660	4.85e-02

Protein: NOVA1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
217		uucauaa	accauca	2.517	5.92e-03
220		uucauaa	aucaugg	2.533	5.65e-03
308		aucac	cucac	2.257	1.20e-02
317		aucac	accac	2.257	1.20e-02
328		aucac	cucac	2.257	1.20e-02
331		aucac	accac	2.257	1.20e-02
418		uucauaa	cccaucu	2.550	5.39e-03
429		uucauaa	aucauca	2.833	2.31e-03

Protein: PCBP1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
72		agcccc	cucucc	2.122	1.69e-02
73		agcccc	uccccc	2.078	1.89e-02
74		agcccc	cccccc	2.078	1.89e-02
307		ccwwhcc	ccucacc	2.519	5.88e-03
310		agcccc	cacccc	2.589	4.81e-03
311		agcccc	accccc	2.989	1.40e-03
313		ccwwhcc	ccccacc	2.636	4.19e-03
324		agcccc	cgcccu	3.122	8.98e-04
327		ccwwhcc	ccucacc	3.558	1.87e-04
336		agcccc	cgcccc	3.656	1.28e-04
339		ccwwhcc	ccugccc	3.325	4.42e-04
340		ccwwhcc	ccugccc	3.403	3.33e-04
342		agcccc	ugcccc	3.589	1.66e-04
344		ccwwhcc	ccccacc	3.143	8.36e-04
349		ccwwhcc	ccguccc	3.416	3.18e-04
353		ccwwhcc	ccugccc	3.234	6.10e-04
354		ccwwhcc	ccugccc	3.286	5.08e-04
356		agcccc	ugcccc	3.478	2.53e-04
357		agcccc	gcccc	2.978	1.45e-03

358	agcccc	cccccc	3.078	1.04e-03
365	ccwwhcc	ccacucc	3.130	8.74e-04
458	ccwwhcc	ccuuacg	1.831	3.36e-02
509	agcccc	gacccc	1.800	3.59e-02
513	ccwwhcc	ccugacc	2.117	1.71e-02

Protein: PCBP2 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
71	ccyycch	acucccc	2.163	1.53e-02
72	uuccc	cuccc	2.239	1.26e-02
73	uuccc	ucccc	2.239	1.26e-02
301	aaccc	aagcc	1.752	3.99e-02
307	ccccacccc	ccucacccc	3.311	4.65e-04
310	aaccc	caccc	1.752	3.99e-02
311	aaccc	acccc	1.752	3.99e-02
312	ccccacccc	ccccaccca	3.279	5.21e-04
313	ccccacccc	ccccaccac	3.672	1.20e-04
327	ccyycch	ccucacc	3.125	8.89e-04
333	ccccacccc	caccgcccc	3.361	3.88e-04
335	ccyycch	ccgcccc	3.188	7.16e-04
338	ccccacccc	ccccugccc	3.738	9.27e-05
339	ccccacccc	cccugcccc	3.311	4.65e-04
340	ccyycch	ccugccc	3.425	3.07e-04
342	uuccc	ugccc	1.743	4.07e-02
344	ccccacccc	ccccaccgu	3.541	1.99e-04
349	ccyycch	ccguccc	3.375	3.69e-04
351	uuccc	guccc	1.734	4.15e-02
353	ccccacccc	cccugcccc	3.311	4.65e-04
354	ccyycch	ccugccc	3.400	3.37e-04
356	uuccc	ugccc	2.128	1.67e-02
358	ccccacccc	ccccccgcc	3.689	1.13e-04
359	ccccacccc	cccccgcca	3.377	3.66e-04
360	ccccacccc	ccccgccac	3.656	1.28e-04
409	uuccc	ugccc	1.743	4.07e-02
412	ccyycch	ccucucc	2.438	7.38e-03
413	ccyycch	cucuccc	2.413	7.91e-03
414	ccyycch	ucucccc	2.413	7.91e-03
415	uuccc	cuccc	1.734	4.15e-02
416	uuccc	ucccc	1.743	4.07e-02
474	aaccc	aaucc	1.752	3.99e-02
475	uuccc	auccc	2.761	2.88e-03
476	uuccc	ucccc	2.679	3.69e-03
489	uuccc	uaccc	2.899	1.87e-03
500	ccyycch	ccuccca	2.450	7.14e-03
501	uuccc	cuccc	2.468	6.79e-03
509	aaccc	gaccc	1.752	3.99e-02
510	aaccc	acccc	1.752	3.99e-02
553	ccyycch	ccuccc	2.925	1.72e-03
554	ccyycch	ccucccu	2.750	2.98e-03

Protein: PCBP3 (Hs/Mm)

Sequence Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
88	uuuycc	uuuuuc	2.405	8.09e-03
89	uuuycc	uuuucc	2.622	4.37e-03
111	uuuycc	guuuuc	2.324	1.01e-02
151	uuuycc	cuuuuc	2.284	1.12e-02
159	uuuycc	cuuugc	2.122	1.69e-02

Protein: PCBP4 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
137		gucgg	gccgg	1.971	2.44e-02
311		auccccc	accccca	2.458	6.99e-03
342		auccccc	ugcccca	2.389	8.45e-03
351		auccccc	guccug	2.361	9.11e-03
356		auccccc	ugccccc	2.403	8.13e-03
Protein: PPRC1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
321		ssgcgcs	ccgcgcc	1.679	4.66e-02
Protein: PRR3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
445		uauaag	uauaau	2.179	1.47e-02
Protein: PTB3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
87		cuuucu	cuuuuu	2.099	1.79e-02
89		cuuucu	uuuucc	2.062	1.96e-02
112		cuuucu	uuuucu	2.333	9.82e-03
Protein: PTBP3 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
87		cuuucu	cuuuuu	2.125	1.68e-02
89		cuuucu	uuuucc	2.088	1.84e-02
112		cuuucu	uuuucu	2.362	9.09e-03
Protein: PUF60 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
88		uuuuu	uuuuu	2.950	1.59e-03
113		uuuuu	uuucu	2.639	4.16e-03
Protein: PUM1 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
443		uguau	ucuaa	1.958	2.51e-02
445		uguau	uauaa	2.011	2.22e-02
Protein: QKI (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
28		acuaay	aguaac	1.728	4.20e-02
Protein: RALY (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
86		uuuuuub	ucuuuuu	2.580	4.94e-03
87		uuuuuub	cuuuuuc	2.795	2.60e-03
88		uuuuuub	uuuuucc	2.830	2.33e-03
110		uuuuuub	uguuuuc	2.687	3.60e-03
112		uuuuuub	uuuucug	2.804	2.52e-03
Protein: RBM22 (Hs/Mm)					
Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
245		accgg	uccgg	1.684	4.61e-02
251		accgg	agcgg	2.408	8.02e-03
334		accgg	accgc	2.531	5.69e-03

Protein: RBM23 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
56		ccccc	ccgcc	2.615	4.46e-03
74		ccccc	ccccc	2.946	1.61e-03
75		ccccc	ccccc	2.946	1.61e-03
304		ccccc	ccucc	2.954	1.57e-03
312		ccccc	ccccc	3.046	1.16e-03
315		ccccc	ccacc	2.746	3.02e-03
318		ccccc	ccacc	2.746	3.02e-03
332		ccccc	ccacc	2.662	3.88e-03
335		ccccc	ccgcc	2.838	2.27e-03
346		ccccc	ccacc	2.777	2.74e-03
358		ccccc	ccccc	3.092	9.94e-04
359		ccccc	ccccc	3.092	9.94e-04
362		ccccc	ccgcc	2.738	3.09e-03
500		ccccc	ccucc	2.369	8.92e-03
554		ccccc	ccucc	2.438	7.38e-03

Protein: RBM24 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
278		wgwgugd	agggugg	2.325	1.00e-02
279		gugug	gggug	1.980	2.39e-02
286		wgwgugd	uggguga	2.442	7.30e-03
287		gugug	gggug	1.980	2.39e-02
288		wgwgugd	ggugaga	2.117	1.71e-02

Protein: RBM38 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
285		kkguguk	uugggug	2.103	1.77e-02
287		kkguguk	gggugag	2.090	1.83e-02

Protein: RBM41 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
460		wuacwuk	uuacgug	2.593	4.76e-03
461		uacuu	uacgu	2.125	1.68e-02

Protein: RBM42 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
192		aacuamg	caccaag	1.905	2.84e-02
206		aacuamg	aacugau	1.946	2.58e-02

Protein: RBM45 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
104		cuuac	cugac	1.970	2.44e-02
116		cuuac	cugac	1.970	2.44e-02
294		acacc	acucc	2.570	5.08e-03
309		acacc	ucacc	2.626	4.32e-03
311		acacc	acccc	2.626	4.32e-03
315		acacc	ccacc	2.626	4.32e-03
317		acgac	accac	2.220	1.32e-02
318		acacc	ccacc	2.626	4.32e-03
328		cuuac	cucac	2.297	1.08e-02
329		acacc	ucacc	2.626	4.32e-03
332		acacc	ccacc	2.626	4.32e-03
346		acacc	ccacc	2.215	1.34e-02
496		cuuac	cugac	3.584	1.69e-04
514		cuuac	cugac	3.683	1.15e-04

519	cuuac	cucac	3.436	2.95e-04
-----	-------	-------	-------	----------

Protein: RBM6 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
56		ccacc	ccgcc	1.658	4.87e-02
74		ccacc	ccccc	1.658	4.87e-02
75		ccacc	ccccc	1.658	4.87e-02
243		cgucca	ccuccg	2.139	1.62e-02
304		ccacc	ccucc	3.088	1.01e-03
309		ccacc	ucacc	3.246	5.85e-04
312		ccacc	ccccc	3.272	5.34e-04
315		ccacc	ccacc	4.044	2.63e-05
318		ccacc	ccacc	4.044	2.63e-05
329		ccacc	ucacc	3.342	4.16e-04
332		ccacc	ccacc	4.149	1.67e-05
335		ccacc	ccgcc	3.342	4.16e-04
346		ccacc	ccacc	3.825	6.54e-05
350		cgucca	cguccc	2.468	6.79e-03
358		ccacc	ccccc	2.868	2.07e-03
359		ccacc	ccccc	2.868	2.07e-03
362		ccacc	ccgcc	2.754	2.94e-03
365		ccacc	ccacu	2.754	2.94e-03
554		ccacc	ccucc	1.658	4.87e-02

Protein: SF1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
447		uaauc	uaaug	1.913	2.79e-02
469		uaauc	ugauc	2.394	8.33e-03
473		uaauc	caauc	1.913	2.79e-02
484		uaauc	ucauc	1.913	2.79e-02

Protein: SNRNP70 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
177		rwucaag	gcucaag	1.877	3.03e-02
192		rwucaag	caccaag	2.521	5.85e-03

Protein: SNRPA (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
40		wugcacr	cugcaga	2.239	1.26e-02
41		ugcaca	ugcaga	2.513	5.99e-03
62		ugcaca	uggaca	1.961	2.49e-02
176		ugcaca	ugcuca	2.355	9.26e-03
190		ugcaca	ugcacc	2.737	3.10e-03

Protein: SRSF5 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
36		gcagc	ggagc	1.886	2.96e-02
39		gcagc	gcugc	1.886	2.96e-02
42		gcagc	gcaga	1.886	2.96e-02
55		gcagc	gccgc	1.886	2.96e-02
323		gcccc	gcgcc	3.417	3.17e-04
337		gcccc	gcccc	3.583	1.70e-04
343		gcccc	gcccc	3.583	1.70e-04
357		gcccc	gcccc	3.470	2.60e-04

Protein: SRSF7 (Hs/Mm)

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

118	acgacg	gacggc	2.346	9.49e-03
-----	--------	--------	-------	----------

Protein: SRSF8 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
38		agcagc	agcugc	2.329	9.93e-03
41		agcagc	ugcaga	2.317	1.03e-02
54		agcagc	ugccgc	2.268	1.17e-02

Protein: TIA1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
86		uuuuubk	ucuuuuu	2.549	5.40e-03
87		uuuuubk	cuuuuuc	2.706	3.41e-03
88		uuuuu	uuuuu	2.932	1.68e-03
89		uuuuu	uuuuc	2.682	3.66e-03
110		uuuuu	uguuu	2.561	5.22e-03
111		uuuuubk	guuuucu	2.588	4.83e-03
112		uuuuubk	uuuucug	2.755	2.93e-03

Protein: TRNAU1AP (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
86		uuuuauu	ucuuuuu	2.174	1.49e-02
88		uuuuauu	uuuuucc	2.326	1.00e-02
112		uuuuauu	uuuucug	2.186	1.44e-02

Protein: U2AF2 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
86		uuuuuyc	ucuuuuu	2.771	2.79e-03
87		uuuuuyc	cuuuuuc	3.362	3.87e-04
88		uuuuuyc	uuuuucc	3.438	2.93e-04
110		uuuuuyc	uguuuuc	3.143	8.36e-04
111		uuuuuyc	guuuucu	2.829	2.33e-03
112		uuuuuyc	uuuucug	2.810	2.48e-03
150		uuuuuyc	ccuuuuc	2.086	1.85e-02
151		uuuuuyc	cuuuucu	2.133	1.65e-02
152		uuuuuyc	uuuucua	2.124	1.68e-02
452		uuuuuyc	cguuuuc	1.667	4.78e-02
453		uuuuuyc	guuuucc	1.857	3.17e-02

Protein: UNK (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
33		uauaga	caugga	1.793	3.65e-02

Protein: YBX1 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
429		aacaucd	aucauca	3.130	8.74e-04

Protein: ZC3H10 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
318		ssagcgm	ccaccgc	2.027	2.13e-02
320		ssagcgm	accgcgc	2.068	1.93e-02
332		ssagcgm	ccaccgc	2.027	2.13e-02

Protein: ZNF326 (Hs/Mm)

Sequence	Position	Motif	K-mer	Z-score	P-value
71		auucc	acucc	1.667	4.78e-02
455		auucc	uuucc	1.667	4.78e-02
474		auucc	aaucc	2.130	1.66e-02

475	auucc	auccc	2.130	1.66e-02
482	auucc	auuca	1.667	4.78e-02