



**Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών**

**Τμήμα Βιολογίας**

***Δ.Π.Μ.Σ. Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική***

***ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ***

**Ανάλυση της έκφρασης και κλινική αξιολόγηση μη κωδικών RNA  
(ncRNAs) σε καρκινικά κύτταρα και όγκους ουροδόχου κύστεως**

**ΤΖΕΝΗ ΚΡΕΣΠΙΑ**

**ΒΙΟΛΟΓΟΣ, ΕΚΠΑ**

Επιβλέπων: κ. Ανδρέας Σκορίλας,

Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2020



**Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών**

**Τμήμα Βιολογίας**

***Δ.Π.Μ.Σ. Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική***

*ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ*

**Ανάλυση της έκφρασης και κλινική αξιολόγηση μη κωδικών RNA  
(ncRNAs) σε καρκινικά κύτταρα και όγκους ουροδόχου κύστεως**

ΤΖΕΝΗ ΚΡΕΣΠΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ, ΕΚΠΑ

**Τριμελής εξεταστική επιτροπή**

κ. Ανδρέας Σκορίλας, Καθηγητής ΕΚΠΑ

κ. Διαμαντής Σίδερης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

κ. Μαργαρίτης Αυγέρης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2020

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στον τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Ίδρυμα Μποδοσάκη για τη διετή χορήγηση υποτροφίας προκειμένου να ακολουθήσω το επόμενο ακαδημαϊκό μου βήμα στο χώρο της έρευνας. Η υποστήριξη του σε ηθικό και οικονομικό επίπεδο αποτέλεσε για μένα σημαντικό κίνητρο για την υλοποίηση των στόχων μου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Ανδρέα Σκορίλα για την υποστήριξη και εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, με την ανάθεση της παρούσας εργασίας, αλλά και για τη δυνατότητα να εξοικειωθώ με πληθώρα μοριακών τεχνικών. Ελπίζω να φάνηκα αντάξια της εμπιστοσύνης και της καθοδήγησής του.

Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή της Ιατρικής σχολής του ΕΚΠΑ κ. Μαργαρίτη Αυγέρη για τη συνεργασία και τη βοήθειά του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής για την αξιολόγηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, σε γραπτό και προφορικό επίπεδο.

Χρυστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για τη στήριξη που όλα αυτά τα χρόνια μου δείχνει.

Τζένη Κρέσπα, 2020

## Πίνακας περιεχομένων

1.Εισαγωγή.....	1
1.1Ανατομία ουροποιητικού συστήματος.....	1
1.2Το φαινόμενο της καρκινογένεσης.....	3
1.3Καρκίνος της ουροδόχου κύστεως.....	4
1.3.1 Επιδημιολογικά στοιχεία.....	4
1.3.2 Παράγοντες κινδύνου.....	5
1.3.3 Γενετικό υπόβαθρο.....	6
1.3.4 Μοριακός παθογενετικός μηχανισμός.....	11
1.3.5 Σταδιοποίηση και βαθμός διαφοροποίησης.....	15
1.3.6 Συμπτώματα και Διαγνωστικές προσεγγίσεις.....	17
1.3.7 Βιοδείκτες και FDA εγκεκριμένα τεστ.....	18
1.3.7 Θεραπεία.....	22
1.4 Μη κωδικά μόρια RNA (ncRNAs).....	23
1.4.1 miRNAs.....	23
1.4.2 lncRNAs.....	26
1.4.3 tRNAs και οι τροποποιήσεις (epitranscriptomics).....	26
1.4.5 tRFs βιογένεση.....	29
1.4.6 tRFs/t-halves (tiRNAs) (ή tiRNAs) βιολογικοί ρόλοι.....	31
1.4.7 tRFs και καρκίνος.....	34
2.Υλικά και μέθοδοι.....	39
2.1 Βιολογικό Υλικό.....	39
2.2 Ομογενοποιήσεις ιστών.....	39
2.3 Απομόνωση ολικού RNA.....	40
2.4 Φωτομετρήσεις δειγμάτων ολικού RNA.....	41
2.5 Πήκτωμα αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση για έλεγχο ακεραιότητας ολικού RNA.....	41
2.6 Πρωτόκολλα πολυαδενυλίωσης και αντίστροφης μεταγραφής για μη κωδικά μόρια (miRNAs/tRFs/t-halves (thalves ή tiRNAs)).....	42
2.7 Πρωτόκολλο αντίστροφης μεταγραφής για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων.....	44
2.8 Πρωτόκολλο συμβατικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	45
2.9 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR).....	46
2.10 Ηλεκτροφορήσεις νουκλεϊκών οξέων.....	50
2.11 Βιοστατιστική ανάλυση.....	51
2.11.1 Μη παραμετρική στατιστική δοκιμασία Mann – Whitney U.....	51
2.11.2 Μη παραμετρική στατιστική δοκιμασία Kruskal -Wallis.....	52

2.11.3 Ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman .....	52
2.11.4 Ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan Meier.....	53
2.12 Βιοπληροφορικά εργαλεία.....	53
3. Αποτελέσματα .....	56
3.1 Απομόνωση ολικού RNA και έλεγχος ακεραιότητας σε πήκτωμα αγαρόζης .....	56
3.2 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός συγκέντρωσης ολικού RNA και ποιότητας.....	56
3.2 Μελέτη επιπέδων έκφρασης των tRFs/t-halves (tiRNAs) και των γονιδίων-δεικτών οξειδωτικού στρες: καμπύλες ενίσχυσης (amplification plots)-καμπύλες τήξης (melt curves)-Πίνακες περιγραφικής στατιστικής.....	57
3.3 Εκτίμηση κλινικής αξίας μη κωδικών μορίων: συσχέτιση επιπέδων έκφρασης με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών (grade/stage) και μη παραμετρική ανάλυση Spearman .....	70
3.4 Εκτίμηση προγνωστικής αξίας ncRNAs: Ανάλυση επιβίωσης Kaplan Meier .....	73
3.5 Ανάλυση συσχέτισης Spearman: συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης <i>GSTP1</i> , <i>SOD2</i> και <i>NRF2</i> με τα επίπεδα έκφρασης των ncRNAs .....	74
3.6 Συσχέτιση γονιδίων-δεικτών οξειδωτικού στρες με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών .....	75
3.7 Εκτίμηση προγνωστικής αξίας των επιπέδων έκφρασης των <i>GSTP1</i> , <i>SOD2</i> , <i>NRF2</i> : Ανάλυση επιβίωσης Kaplan Meier .....	78
3.8 Ποιοτικά διαγράμματα βιοπληροφορικής ανάλυσης: Μοριακά μονοπάτια και λειτουργίες των γονιδίων-στόχων των ncRNAs και σχεδιασμός δικτύων αλληλεπίδρασης (network analysis) .....	79
3.9 Διαγράμματα GO και KEGG ανάλυσης, χρήση προγραμματιστικού περιβάλλοντος R .....	86
4. Συζήτηση.....	89
Περίληψη .....	97
Abstract.....	100
5. Βιβλιογραφία.....	102

## 1.Εισαγωγή

### 1.1Ανατομία ουροποιητικού συστήματος

Το ουροποιητικό σύστημα διακρίνεται σε δυο μέρη την αποχετευτική και την εκκριτική, με την πρώτη μέρη να συγκροτείται από τους νεφρούς. Η αποχετευτική μέρη αποτελείται από το πυελοκαλυκτικό σύστημα, την ουρήθρα, την ουροδόχο κύστη και τους ουρητήρες. Το όργανο του ουροποιητικού συστήματος με την πιο καθοριστική σημασία για τη ζωή είναι οι νεφροί καθώς είναι επιφορτισμένοι με πληθώρα λειτουργιών, όπως η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Οι δυο νεφροί εντοπίζονται οπισθοπεριτοναϊκά, με το δεξιό να βρίσκεται σε χαμηλότερο επίπεδο από τον αριστερό, λόγω της πίεσης που δέχεται από το λοβό του ήπατος.

Η ουροδόχος κύστη αποτελεί μώδες όργανο που εντοπίζεται εντός της πυέλου και στο αντρικό φύλο παρεμβάλλεται ανάμεσα στην ηβική σύμφυση και στο ορθό, ενώ στο γυναικείο φύλο παρεμβάλλεται ανάμεσα στην ηβική σύμφυση και στη μήτρα. Ο εντοπισμός της κύστεως εντός της πυέλου στηρίζεται από δομές όπως το πυελικό έδαφος, το περιτόναιο και οι σύνδεσμοι. Οι λειτουργίες της κύστεως αφορούν τη συλλογή, την αποθήκευση και την ελεγχόμενη αποβολή ούρων <sup>1</sup>.

Για να είναι επαρκής η λειτουργία της ουροδόχου κύστης θα πρέπει να υφίσταται ένα προστατευτικός φραγμός έναντι των τοξινών που υπάρχουν στα ούρα και μια ισορροπημένη νευρομυϊκή ρύθμιση ώστε η αποθήκευση και η έκκριση ούρων από το σώμα να γίνεται με ελεγχόμενο τρόπο. Το τοίχωμα της κύστης συντίθεται από διακριτά στρώματα ιστών, κάθε ένα εκ των οποίων συνεισφέρει στην εκδήλωση των οργανοειδικών λειτουργιών της ουροδόχου κύστης. Ξεκινώντας από το εσωτερικό και πηγαίνοντας προς το εξωτερικό του τοιχώματος εντοπίζουμε τις εξής περιοχές: το ουροθήλιο (ή βλεννογόνο στιβάδα), τη στιβάδα του συνδετικού ιστού (ή υποβλεννογόνιος στιβάδα ή χόριο), το έσω στρώμα των λείων μυών, την στιβάδα των κυκλοτερών λείων μυών και τελικά το έξω στρώμα μυών <sup>2</sup>.

Το ουροθήλιο αποτελεί ένα στρώμα επιθηλιακών κυττάρων που αναπτύσσεται επάνω στη βασική μεμβράνη. Ο επιθηλιακός ιστός αποτελείται από τρία διαφορετικά είδη κυττάρων, τα βασικά, τα ενδιάμεσα και τα κύτταρα "ομπρέλα". Τα βασικά κύτταρα συγκροτούν ένα μονόστιβο στρώμα κυττάρων, που περιλαμβάνει μικρότερα κύτταρα, τα οποία είναι ενωμένα με τη βασική μεμβράνη με δεσμοσωμάτια και ειδικές ιντεγκρίνες. Το επιφανειακό

στρώμα που καλύπτει το στρώμα των ενδιάμεσων κυττάρων συγκροτείται από κύτταρα τα οποία συνδέονται τόσο μεταξύ τους όσο και με τα υπόλοιπα κύτταρα <sup>3</sup>.

Τα εξειδικευμένα κύτταρα του ουροθηλίου αλλάζουν δραστικά το σχήμα τους κατά τη φάση πλήρωσης της ουροδόχου κύστης από το πολυεδρικό σχήμα που εμφανίζουν στην κατάσταση όπου η κύστη είναι άδεια. Τα επιφανειακά κύτταρα διαθέτουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά για να διαχειρίζονται τη συνεχή έκθεση στα ούρα και επομένως είναι προσαρμοσμένα για να ελαχιστοποιήσουν την έκθεση της μεμβρανικής τους επιφάνειας σε αυτά <sup>4</sup>.

Ο τραυματισμός του ουροθηλίου αυξάνει την μιτογόνο δραστικότητα σε όλα τα στρώματα κυττάρων του και επάγει τη ραγδαία διαφοροποίηση των ανώτερων ενδιάμεσων κυττάρων σε επιφανειακά κύτταρα. Ο αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση έχουν ως στόχο την ραγδαία παραγωγή βασικών δομών και πρωτεϊνών που θα επιφέρουν την αποκατάσταση του φραγμού.

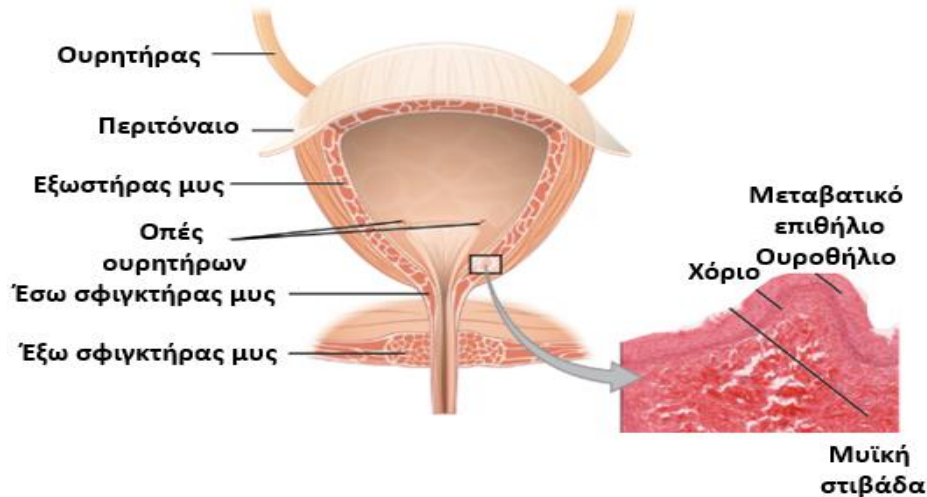
Η υποβλεννογόνιος στιβάδα αποτελείται κυρίως από το κολλαγόνο τύπου I της εξωκυττάριας μήτρας και σε αυτή συνυπάρχουν διάφοροι ιστοί. Χαρακτηρίζεται ως αγγειοβριθής και σε αυτή εντοπίζεται ένα πλούσιο λεμφικό σύστημα, που επιτρέπει την αντιμετώπιση των παθογόνων που καταφέρνουν να διεισδύσουν στην ουροποιητική οδό. Ακόμη, η υποβλεννογόνιος στιβάδα περιέχει νευρικές απολήξεις και εξειδικευμένα κύτταρα, τα οποία διευκολύνουν τη σηματοδότηση και την επικοινωνία με τα επιθηλιακά κύτταρα του ουροθηλίου <sup>5</sup>.

### **Έλεγχος της ουροδόχου κύστης από το νευρικό σύστημα**

Η επίδραση του νευρικού συστήματος στην ουροδόχο κύστη διαφέρει σημαντικά από τα άλλα όργανα του ανθρώπινου σώματος, καθώς η κύστη αποτελεί ένα ημιαυτόνομο όργανο. Αυτό σημαίνει ότι ο ρυθμός με τον οποίο εκτείνεται το τοίχωμα του οργάνου και η δύναμη με την οποία αποβάλλονται τα ούρα δεν υπόκεινται σε διαρκή έλεγχο. Το τοίχωμα της οριοθετείται από διάφορα στρώματα μυϊκών ινών, τα οποία όταν ενεργοποιούνται επιτρέπουν την αποβολή είτε όλης της ποσότητας των ούρων που έχει αποθηκεύσει η κύστη είτε ενός μέρους. Η βλεννογόνος και η υποβλεννογόνιος στιβάδα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση λόγω μηχανικής καταπόνησης <sup>3</sup>.

Το τοίχωμα της κύστης νευρώνεται από παρασυμπαθητικούς χολινεργικούς νευρώνες και από συμπαθητικούς αδρενεργικούς που εκφύονται από το υπογαστρικό νεύρο. Οι

προσαγωγές νευρικές ίνες δεν είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες στην ουροδόχο κύστη. Συγκεκριμένα, στην περιοχή του τριγώνου της κύστης παρατηρείται μεγαλύτερη πυκνότητα προσαγωγών ινών συγκριτικά με την περιοχή του θόλου της κύστης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι προέρχονται εμβρυολογικά από διαφορετικές δομές <sup>5</sup>.



*Εικόνα 1. Δομή ουροδόχου κύστεως και τρεις ιστολογικές στιβάδες τοιχώματος, ουροθήλιο-χόριο-μυϊκοί χιτώνες (University of Michigan Medical School © 2012).*

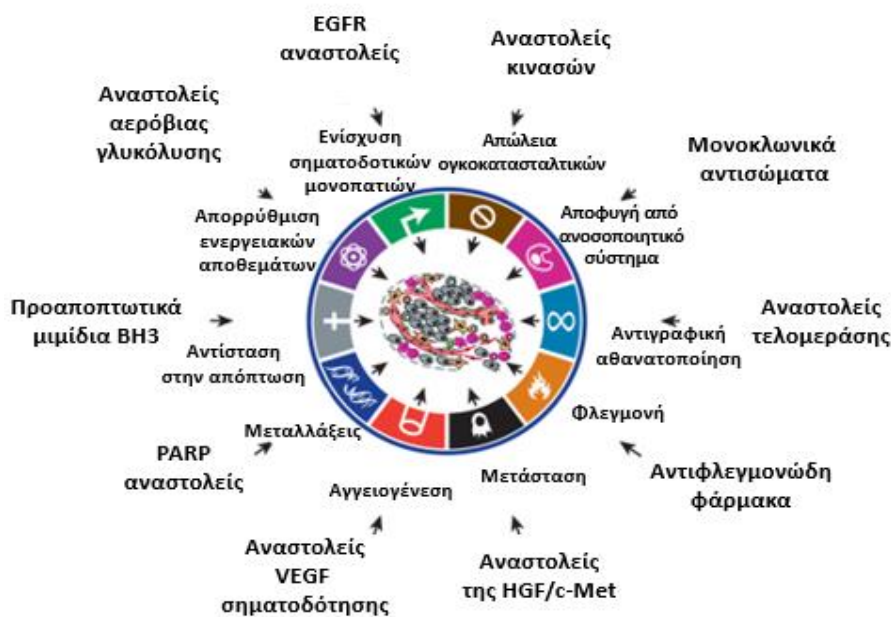
## 1.2 Το φαινόμενο της καρκινογένεσης

Η διαρκής ενεργοποίηση των σηματοδοτικών πορειών που οδηγούν στην αύξηση, η απώλεια των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, η αντοχή στο φαινόμενο του κυτταρικού θανάτου, η αντιγραφική αθανатоποίηση των κυττάρων, η επαγωγή της αγγειογένεσης και η ενεργοποίηση της διήθησης και της μετάστασης αποτελούν τους ακρογωνιαίους λίθους του φαινομένου της καρκινογένεσης. Η περαιτέρω προώθηση του φαινομένου οφείλεται στη γενωμική αστάθεια και τη φλεγμονή. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια εδραιώνεται και ο σημαντικός ρόλος του επαναπρογραμματισμού των ενεργειακών αποθεμάτων και της διαφυγής από την ανοσολογική επιτήρηση των καρκινικών κυττάρων <sup>6</sup>.

Ο καρκίνος αποτελεί μια πολυπαραγοντική νόσο που κατευθύνεται τόσο από περιβαλλοντικούς όσο και από γενετικούς παράγοντες. Τα σημαντικότερα γενετικά χαρακτηριστικά του είναι η απώλεια ετεροζυγωτίας για διάφορα ογκοκατασταλτικά γονίδια, η γονιδιακή ενίσχυση ορισμένων ογκογονιδίων, η παρουσία σημειακών μεταλλάξεων και ορισμένων μετατοπίσεων που μετατρέπουν τα πρωτοογκογονίδια σε ογκογονίδια και οι διάφοροι τύποι μεταλλαγών σε γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα τα οποία συμμετέχουν



σε μονοπάτια επιδιόρθωσης. Η συσσώρευση μεταλλάξεων προκαλεί αύξηση της γενωμικής αστάθειας και με δεδομένη την παρουσία μεταθετών στοιχείων σε μεγάλο ποσοστό στα γονιδιώματα αλλά και των επιγενετικών μηχανισμών, όπως η μεθυλίωση, καθίσταται σαφής η πολυπλοκότητα της γενετικής συνιστώσας που οδηγεί στην προώθηση της καρκινογένεσης <sup>6</sup>.

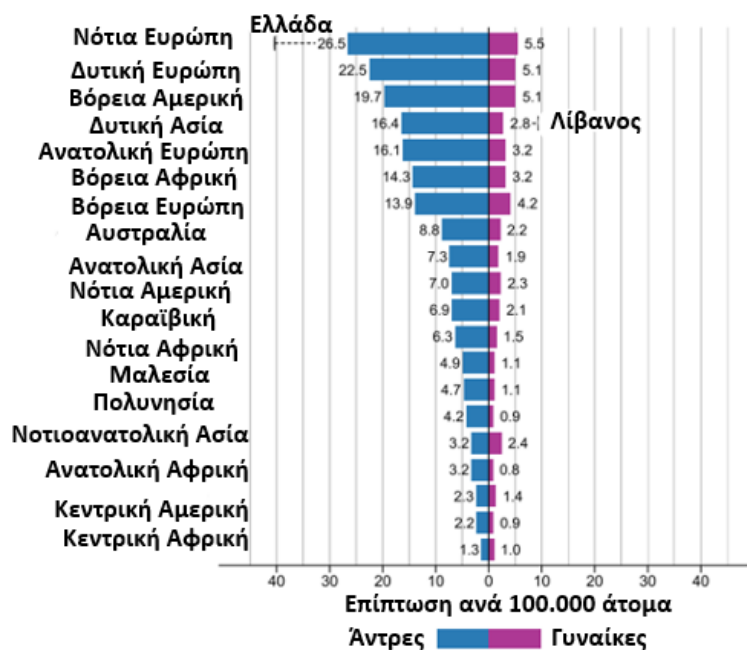


Εικόνα 2. Βασικά χαρακτηριστικά καρκινογένεσης και οι θεραπείες που χρησιμοποιούνται <sup>6</sup>.

### 1.3 Καρκίνος της ουροδόχου κύστεως

#### 1.3.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης (BC) αποτελεί τον ένατο, στο γενικό πληθυσμό, πιο συχνό καρκίνο παγκοσμίως και τον έβδομο στο αρσενικό φύλο <sup>7</sup>. Οι νεοδιαγνωσθέντες περιπτώσεις προσεγγίζουν ετησίως τις 430.000, ενώ οι θάνατοι που καταμετρώνται σε ετήσια βάση είναι περίπου 165.000. Η διαφορά της συχνότητας εμφάνισης στο αρσενικό φύλο συγκριτικά με το θηλυκό είναι περίπου 3 με 4 φορές μεγαλύτερη. Ωστόσο, οι γυναίκες εμφανίζουν συχνότερα όγκους πιο προχωρημένων και επιθετικών σταδίων με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν αυξημένη θνητότητα. Η παρατηρούμενη διαφοροποίηση ανάμεσα στα δυο φύλα δεν έχει έως σήμερα εξηγηθεί, αλλά ως προτεινόμενοι λόγοι φαίνεται να αναδύονται τα διαφορετικά ορμονικά προφίλ των ατόμων (π.χ. η δράση των μονοπατιών που επάγονται από τις φυλετικές στεροειδείς ορμόνες) και ίσως και η καθυστέρηση της διάγνωσης στις γυναίκες, λόγω της απουσίας συμπτωμάτων <sup>8</sup>.



Εικόνα 3. Επίπτωση ανά 100.00 του καρκίνου της κύστεως (με κανονικοποιημένες τιμές ως προς την ηλικία) ανά τον κόσμο και ανά φύλο. Στην Ελλάδα, ειδικά στον αντρικό πληθυσμό, παρατηρούνται τα μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης της νόσου <sup>7</sup>.

### 1.3.2 Παράγοντες κινδύνου

Η εξωγενής έκθεση σε καρκινογόνα, μέσω του αναπνευστικού συστήματος, της γαστρεντερικής οδού ή διαμέσου του δέρματος αποτελεί βασική αιτία της εμφάνισης του καρκίνου της κύστεως. Το κάπνισμα αποτελεί τον καθοριστικότερο παράγοντα κινδύνου, με το 50% των περιπτώσεων να οφείλονται σε αυτό, αλλά η συνεισφορά του ποικίλει ανάλογα με το φύλο, το ιστορικό καπνίσματος και το είδος του καπνού που καταναλώνεται. Για παράδειγμα ο μαύρος καπνός διαθέτει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε νιτροζαμίνες, διφαινύλια και αρυλαμίνες <sup>9</sup>. Ο καπνός αποτελεί βασική πηγή γνωστών καρκινογόνων συστατικών, όπως οι αρωματικές αμίνες, τα οποία προκαλούν δίκλωνες θραύσεις του γενετικού υλικού, τροποποιήσεις των αζωτούχων βάσεων και σχηματισμό συμπλόκων που αλλοιώνουν τη δομή της έλικας του DNA.

Η περιστασιακή έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες φαίνεται να συνεισφέρει περίπου 6%. Οι μετα-αναλύσεις που έχουν γίνει σε εργαζόμενους σε χώρους όπως οι βιομηχανίες βαφών έχουν αναδείξει τον μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου της κύστεως σε αυτές τις ομάδες. Τα καρκινογόνα που έως σήμερα έχουν βρεθεί να προκαλούν καρκίνο της ουροδόχου κύστεως είναι η βενζιδίνη, η ορθο-τολουϊδίνη, η 2-ναφυλαμίνη, η 4-αμινοδιφαινυλανίνη και το 4,4'-μεθυλένιο-bis (2-χλωροανιλίνη) <sup>10</sup>.

Οι διαιτητικές συνήθειες φαίνεται να έχουν ακόμη ενοχοποιηθεί για την εκδήλωση της νόσου. Για παράδειγμα, η υψηλή κατανάλωση αλκοόλ, η μειωμένη πρόσληψη φρούτων και λαχανικών και τα χαμηλά επίπεδα ενυδάτωσης έχουν, εν μέρει, συσχετιστεί με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Την πιο σημαντική συνεισφορά στην πρόκληση της νόσου φαίνεται να έχει η κατανάλωση νερού, το οποίο είναι μολυσμένο με αρσενικό. Άλλες ουσίες που περιέχονται στο νερό και έχει αναφερθεί ότι αυξάνουν τον κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, είναι τα προϊόντα της χλωρίωσης και οι τριχαλομεθάνες <sup>11</sup>.

Η ακτινοθεραπεία φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο της κύστης ενώ άλλες ιατρογενείς αιτίες που μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο της ουροδόχου κύστεως είναι η θεραπεία με κυκλοφωσφαμίδη και εν δυνάμει η θεραπεία με φαρμακευτικό σκεύασμα, που χορηγείται σε ορισμένες περιπτώσεις ασθενών με διαβήτη. Η σχιστοσωμίαση θεωρείται μια σίγουρη αιτία πρόκλησης καρκίνου της ουροδόχου κύστεως αλλά η νεοπλασία έχει ως προέλευση τα πλακώδη κύτταρα <sup>12</sup>.

Η ραγδαία αύξηση των γενετικών δεδομένων σε σχέση με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως έχει επιτρέψει την καλύτερη κατανόηση του γενετικού υποβάθρου για τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου και την εδραίωση του ρόλου των γενετικών πολυμορφισμών της γαμετικής σειράς στην αύξηση του κινδύνου εμφάνισης του καρκίνου της κύστεως, λόγω της έκθεσης σε καρκινογόνους παράγοντες. Οι πιο αναγνωρισμένοι κληρονομήσιμοι γενετικοί δείκτες είναι οι πολυμορφισμοί που έχουν βρεθεί στα δυο γονίδια *NAT2* και *GSTM1*, τα προϊόντα των οποίων συμμετέχουν σε αντιδράσεις αποτοξίνωσης των καρκινογόνων ουσιών. Οι μεταλλαγές αυτών των γονιδίων οδηγούν σε παρατεταμένη έκθεση στα καρκινογόνα περιβαλλοντικά ερεθίσματα <sup>4</sup>.

### **1.3.3 Γενετικό υπόβαθρο**

Η απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) και οι ελλείψεις στο χρωμόσωμα 9 είναι οι πιο κοινές γενετικές αλλοιώσεις που εμφανίζονται σε περισσότερους από τους μισούς ουροθηλιακούς όγκους. Η γενετική αλλοίωση του χρωμοσώματος 9 φαίνεται να συμβαίνει στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης και να έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση των δυο μοριακών μονοπατιών που χαρακτηρίζουν τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, διότι πιθανώς επιτρέπει την ενεργοποίηση ενός καταρράκτη γενετικών μεταλλάξεων <sup>13</sup>. Οι πιο κρίσιμες περιοχές που φέρει το χρωμόσωμα 9 είναι οι γενετικοί τόποι που εδράζονται ορισμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Για παράδειγμα, στην περιοχή 9p21.3 όπου εντοπίζεται το

*CDKN2A*, το οποίο κωδικοποιεί για δυο εναλλακτικά μετάγραφα που δίνουν ως προϊόντα τα *INK4A* και *ARF*, τα οποία καθλώνουν τον κυτταρικό κύκλο διαμέσου των μονοπατιών της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος, *pRB* και του *p53* <sup>13</sup>.

*Πίνακας 1. Τα ογκογονίδια που έχουν καταγραφεί στον καρκίνο της κύστεως και τα είδη των μεταλλαγών που μετέτρεψαν τα πρωτο-ογκογονίδια σε ογκογονίδια <sup>4</sup>.*

Γονίδια	Χρωμοσωμικός εντοπισμός	Συχνότητα (%)	Είδη μεταλλαγών
<b>Low-grade Τα όγκοι</b>			
<i>TERT</i>	5p15	73-83%	Σημειακές μεταλλαγές
<i>FGFR3</i>	4p16	60-70% 80%	Σημειακές μεταλλαγές Υπερέκφραση
<i>PIK3CA</i>	3q26	16-25%	Σημειακές μεταλλαγές
<i>HRAS</i>	11p15	10%	Σημειακές μεταλλαγές
<i>KRAS</i>	12p12	5%	Σημειακές μεταλλαγές
<i>MDM2</i>	12q14-q15	3%	Ενίσχυση
<i>AKT1</i>	14q32	1-3%	Σημειακές μεταλλάξεις
<b>Μυοδιηθητικοί όγκοι (MIBC)</b>			
<i>E2F3</i>	6p22	20%	Ενίσχυση
<i>PIK3CA</i>	3q26	9-20%	Σημειακές μεταλλαγές
<i>FGFR3</i>	4p16	5-20% 40%	Σημειακές μεταλλαγές Υπερέκφραση
<i>MDM2</i>	12q14-q15	5-15%	Ενίσχυση
<i>HRAS</i>	11p15	5-12%	Σημειακές μεταλλαγές

<b><i>ERBB3</i></b>	12q13	11%	Σημειακές μεταλλάξεις
<b><i>CCND1</i></b>	11q13	10%	Ενίσχυση
<b><i>RXRA</i></b>	9q34	9%	Μεταλλάξεις
<b><i>HER2 (ERBB2)</i></b>	17q12	7% 4.5% 42%	Ενίσχυση Σημειακές Ενίσχυση
<b><i>EGFR</i></b>	7p12	6%	Ενίσχυση
<b><i>FGFR1</i></b>	8p12	6%	Ενίσχυση
<b><i>KRAS</i></b>	12p12	6%	Σημειακές μεταλλάξεις
<b><i>AKT1</i></b>	14q32	1-3%	Σημειακές μεταλλάξεις

*Πίνακας 2. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια που απενεργοποιούνται στον καρκίνο της κύστεως και τα είδη των μεταλλάξεων <sup>4</sup>.*

Γονίδια	Χρωμοσωμικός εντοπισμός	Συχνότητα (%)	Είδη μεταλλαγών
<b>Low-grade Τα όγκοι</b>			
<b><i>CDKN2A</i></b>	9p21	50-60%  18% 15%	Απώλεια ετεροζυγωτίας Ημίζυγη έλλειψη Ομόζυγη έλλειψη
<b><i>KDM6A</i></b>	Xp11	12-60%	Απενεργοποιητικές μεταλλάξεις
<b><i>STAG2</i></b>	Xq25	32-36%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<b><i>ELF3</i></b>	1q32	20-25%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<b><i>ARID1A</i></b>	1p35	12-35%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<b><i>EP300</i></b>	22q13	12-25%	Απενεργοποιητικές

			Μεταλλάξεις
<i>KMT2D</i>	12q13	15-24%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<i>TP53</i>	17p13	6-20%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<i>RBM10</i>	Xp11	20%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<i>CREBBP</i>	16p13	16-20%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<i>ERCC2</i>	19q13	20%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<i>ATM</i>	11q22-23	5-15%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<i>TSC1</i>	9q34	12%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<i>RBI</i>	13q14	5%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<b>Μυοδιηθητικοί όγκοι (MIBC)</b>			
<i>ARID1A</i>	1p35	25%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<i>TXNIP</i>	1q21	7%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<i>ELF3</i>	1q32	8%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<i>NFE2L2</i>	2q31	8%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<i>FBXW7</i>	4q31	10%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<i>APC</i>	5q21-q22	6-16%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<i>CDKN1A</i>	6p21	14%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<i>EP300</i>	22q13	15%	Απενεργοποιητικές

			Μεταλλάξεις
<b><i>CDKN2A</i></b>	9p21	50-60% 28% 22%	Απώλεια ετεροζυγωτίας Ημίζυγη έλλειψη Ομόζυγη έλλειψη
<b><i>TSC1</i></b>	9q34	8-12%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<b><i>PTEN</i></b>	10q23	13-58%  17% 1-6%	Απώλεια ετεροζυγωτίας/ Ημίζυγη έλλειψη Σημειακές Ομόζυγη έλλειψη
<b><i>ATM</i></b>	11q22-23	14%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<b><i>KMT2D</i></b>	12q13	27%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<b><i>MDM2</i></b>	12q14-q15	4-9%	Ενίσχυση
<b><i>RBI</i></b>	13q14	13%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<b><i>KLF5</i></b>	13q22	8%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις
<b><i>TSC2</i></b>	16p13	2%	Απενεργοποιητικές Μεταλλάξεις

### Επιγενετικές αλλαγές

Η υπερμεθυλίωση των νησίδων CpG έχει συσχετισθεί με την μεταγραφική καταστολή των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και είναι συχνά παρατηρούμενη σε διηθητικούς όγκους. Για για ένα μεγάλο αριθμό ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως τα *p16*, *CDH1*, *CDH13*, *INK4A*, *RASSF1A*, *APC*, *ARF*, *MLH1* και *DAPK* έχει αναφερθεί η υπομεθυλίωσή τους. Η υπερμεθυλίωση των *CDH1*, *CDK2AP2* και *RASSF1A* σε τμήματα DNA που εντοπίζονται στα δείγματα ούρων έχει ανιχνευτεί στο 85% των επιφανειακών καλά διαφοροποιημένων όγκων, στο 79% των πιο προχωρημένων σταδίων και στο 75% των διηθητικών όγκων.

Πολλές από τις μη μεθυλωμένες περιοχές των υποκινητών για ιστοειδικά γονίδια μπορεί να επιφέρουν χρωμοσωμική αστάθεια και εντοπίζονται στους μη μυοδιηθητικούς όγκους <sup>14</sup>.

Η εικόνα της συνολικής υπομεθυλίωσης των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, όπως τα LINE-1, συμπληρώνεται και από την παρατήρηση ότι ένα ειδικό LINE-1 εντοπίζεται μέσα στο ογκογονίδιο *LI-MET* και είναι υπομεθυλωμένο και ενεργό μεταγραφικά στους ουροθηλιακούς όγκους <sup>15</sup>.

Το ουροθηλιακό καρκίνωμα αποτελεί μια ετερογενή επιθηλιακή νεοπλασία, η οποία εμφανίζεται συνήθως ως μη μυοδιηθητικός όγκος που περιορίζεται στη στιβάδα του ουροθηλίου ή στην υποβλεννογόνιο στιβάδα. Ωστόσο, σε ποσοστό ασθενών περίπου 25% παρατηρείται ο μυοδιηθητικός τύπος, ο οποίος χαρακτηρίζεται από χειρότερη πρόγνωση <sup>16</sup>. Σε μελέτη που διενεργήθηκε και βασίστηκε σε δεδομένα TCGA παρατηρήθηκε εξαιρετικά υψηλός μεταλλακτικός ρυθμός (διάμεση τιμή 5.5 ανά MB), παρόμοιος με εκείνον για το μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα και για το μελάνωμα. Ακόμη, καταγράφηκαν 32 γονιδιακές υπογραφές που σχετίζονται με την υποτροπή των ασθενών, ανάμεσα σε αυτές περιλαμβάνονται και γονίδια που κωδικοποιούν για τροποποιητές της χρωματίνης. Όπως ανέκυψε από την ανάλυση της κοόρτης των 412 μυοδιηθητικών δειγμάτων του TCGA προγράμματος η σημασία της μεταλλακτικής υπογραφής του *APOBEC* γονιδίου σχετίζεται στενά με τον υψηλό μεταλλακτικό ρυθμό του μυοδιηθητικού ουροθηλιακού καρκίνου <sup>17</sup>.

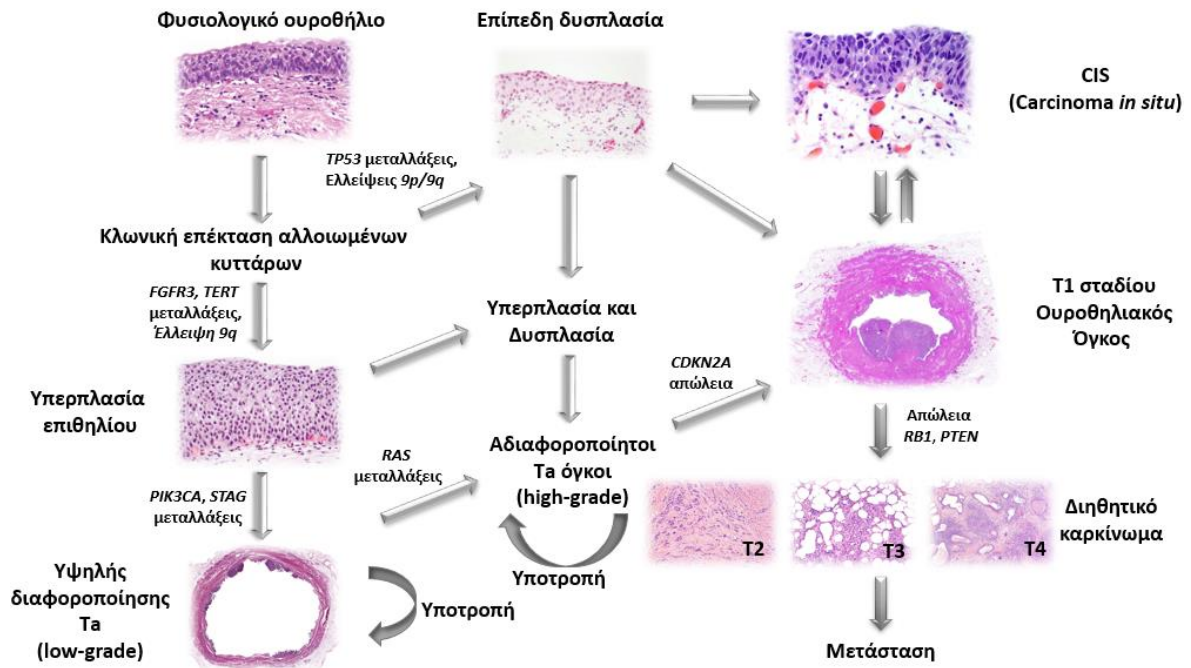
#### **1.3.4 Μοριακός παθογενετικός μηχανισμός**

Το ουροθήλιο αποτελεί έναν ιδιαίτερο τύπο επιθηλίου που επενδύει τους ουρητήρες, τους κάλυκες, τους αγωγούς και την ουρήθρα. Το ουροθηλιακό καρκίνωμα που αναφέρεται και ως καρκίνωμα του μεταβατικού επιθηλίου (TCC) αποτελεί έναν ιστοπαθολογικό τύπο καρκίνου, του οποίου η προέλευση ξεκινά από τα κύτταρα του επιθηλίου και αποτελεί το 90% των όγκων που αναπτύσσονται στην ουροδόχο κύστη. Είναι μείζονος σημασίας η αντιμετώπιση αυτού του καρκινώματος λόγω της κλινικής και κοινωνικής πρόκλησης που αποτελεί δεδομένης της επίπτωσης, του μετεγχειρητικού ρυθμού υποτροπής και της πρόγνωσης. Ακόμη, έχουν παρατηρηθεί διάφοροι ιστολογικοί υπότυποι, όπως το καρκίνωμα που προέρχεται από τα πλακώδη κύτταρα και το αδενοκαρκίνωμα που παρατηρούνται σε ποσοστά 5% και 1%, αντίστοιχα <sup>18</sup>.

Η μοριακή βάση του φαινομένου της καρκινογένεσης στην ουροδόχο κύστη ερμηνεύεται από την ύπαρξη δυο ξεχωριστών μοριακών μονοπατιών που σε ορισμένα σημεία φαίνεται



να συγκλίνουν. Η διάκριση των μοριακών μονοπατιών αποτυπώνεται φαινοτυπικά στην ύπαρξη των μη μυοδιηθητικών (επιφανειακών) όγκων της κύστης και των μυοδιηθητικών, ενώ η σύγκλιση των δυο διαφορετικών αυτών μονοπατιών μπορεί να ερμηνεύσει εν μέρει την εξέλιξη των επιφανειακών όγκων σε μυοδιηθητικούς (περίπου το 10-15% των περιπτώσεων) <sup>4</sup>.



*Εικόνα 4. Παθογενετικός μηχανισμός που διέπει το φαινόμενο της καρκινογένεσης στην κύστη (αυτοσχέδια εικόνα, οι ιστολογικές εικόνες πάρθηκαν από τη δημοσίευση <sup>19</sup>).*

Πληθώρα μοριακών μονοπατιών έχουν αναφερθεί ότι σχετίζονται με τα επιφανειακά ουροθηλιακά καρκινώματα, όπως το μονοπάτι του FGFR3, το PI3K/AKT μονοπάτι και το μονοπάτι RAS/MAPK. Στους μυοδιηθητικούς όγκους οι αλλαγές σχετίζονται κυρίως με τον κυτταρικό κύκλο και τον αριθμό των ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

### FGFR3 μονοπάτι

Το 80% των καλά διαφοροποιημένων θηλωδών ουροθηλιακών καρκινωμάτων παρουσιάζει ενεργοποιητικές μεταλλαγές στο γονίδιο του υποδοχέα για τον αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (*FGFR3*), ενώ στους μυοδιηθητικούς όγκους οι μεταλλάξεις αυτές παρατηρούνται σε ποσοστό 10-20%. Οι πιο συχνές μεταλλαγές κατά μήκος του γονιδίου εντοπίζονται στο εξόνιο 7 και αποτελούν το 50-80% των μεταλλάξεων που έχουν βρεθεί στο *FGFR3* γονίδιο. Το εξόνιο 10 του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα φέρει μεταλλαγές σε ποσοστό 15-40%, ενώ οι μεταλλαγές στο εξόνιο 15 που κωδικοποιεί για την επικράτεια της κινάσης της τυροσίνης προσεγγίζουν το 5-10%.

Η ενεργοποίηση του *FGFR3* επάγει πολλά καταρροϊκά μονοπάτια κινασών. Οι σχεδόν αδιαφοροποίητοι όγκοι με μεταλλάξεις στο γονίδιο *FGFR3* εμφανίζουν μοναδικά ιστολογικά χαρακτηριστικά όπως η διακλαδισμένη θηλώδης αρχιτεκτονική. Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι το 42% των όγκων που δε φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο του *FGFR3*, συμπεριλαμβανομένων και των μυοδιηθητικών, χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση του φυσιολογικού αλληλομόρφου. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας μπορεί να επάγει το μονοπάτι *STAT* και να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη *PYK2* <sup>14</sup>.

### **RAS μονοπάτι**

Φαίνεται ότι οι μεταλλάξεις στο *HRAS* γονίδιο σχετίζονται κυρίως με τους μη μυοδιηθητικούς όγκους ενώ οι μεταλλάξεις στο *NRAS* γονίδιο δεν είναι συχνές στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως <sup>4</sup>.

### **PI3K/AKT μονοπάτι**

Το μονοπάτι *PI3K/AKT* ρυθμίζει μια σειρά βιολογικών λειτουργιών, όπως η κυτταρική αύξηση, η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός. Οι συχνότερες θέσεις που παρατηρούνται μεταλλάξεις είναι στα κωδικόνια 542, 545 και 1047 και απαντώνται σε ποσοστό 20% στους επιφανειακούς όγκους της ουροδόχου κύστεως <sup>20</sup>.

### **TSC1, TSC2 και mTOR μονοπάτι**

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TSC1* έχει βρεθεί μεταλλαγμένο στο 16% των ουροθηλιακών καρκινωμάτων και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί συμβάλλει στην καταστολή του μονοπατιού *mTOR*. Το αξιοσημείωτο είναι ότι η *TSC1* ρυθμίζεται από την *AKT1* και για αυτό μπορεί εν δυνάμει να αποτελεί καταρροϊκό στόχο του σηματοδοτικού μονοπατιού που εκκινείται από την πλασματική μεμβράνη, μέσω του υποδοχέα *FGFR3*. Σε αυτή τη σηματοδοτική πορεία συμμετέχουν οι πρωτεΐνες *PIK3R1*, *PTEN* και *TSC2*. Η πρωτεΐνη *TSC2* σχηματίζει σύμπλοκο με την πρωτεΐνη *TSC1* το οποίο μπορεί να αναστείλει το μονοπάτι της *mTOR* <sup>14</sup>.

### **P53 μονοπάτι**

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53* επάγουν μια σειρά καταρροϊκών αλλαγών, οι οποίες έχουν επίπτωση στην πορεία του κυτταρικού κύκλου. Η σημαντικότερη συνέπεια των μεταλλαγών στο *TP53* είναι η μείωση της έκφρασης ή η απώλεια του p21. Τα κωδικόνια που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλαγών στο γονίδιο του *TP53* είναι τα 280 και 285 και φαίνεται αυτή η προτίμηση να διαφοροποιείται σε άλλους επιθηλιακούς όγκους, γεγονός που τονίζει τη διασύνδεσή τους με τα ουροθηλιακά καρκινώματα. Οι μεταλλάξεις στο *TP53*

είναι πολύ συχνές στους αδιαφοροποίητους μυοδιηθητικούς όγκους (>50%) και στα καρκινώματα *in situ* (CIS). Πέρα από τις απενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο *TP53* μπορεί να υπάρξει και λειτουργική αδρανοποίηση του p53, λόγω απενεργοποίησης του *MDM2* <sup>11</sup>.

### **RB και κυτταρικός κύκλος**

Η πρωτεΐνη RB είναι βασικός ρυθμιστής για την μετάβαση των κυττάρων από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η απώλεια ετεροζυγωτίας για το ογκοκατασταλτικό γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος σχετίζεται με τους αδιαφοροποίητους και πιο προχωρημένων σταδίων όγκους της ουροδόχου κύστεως.

### **EGFR και RAS/MAPK μονοπάτι**

Στο φυσιολογικό ουροθήλιο ο EGFR εκφράζεται μόνο στα κύτταρα της βασικής μεμβράνης του επιθηλίου και ο αυξητικός παράγοντας EGF εκκρίνεται φυσιολογικά στα ούρα αλλά η πρόσδεσή του στον υποδοχέα παρεμποδίζεται από ένα στρώμα κυττάρων που δεν εκφράζουν τον EGFR. Η διατάραξη αυτού του φραγμού επιτρέπει την αλληλεπίδραση υποδοχέα-προσδέτη (EGFR- EGF) με επακόλουθο την προώθηση της καρκινογένεσης <sup>14</sup>.

Στους μυοδιηθητικούς όγκους της ουροδόχου κύστεως υπάρχει συνεχής ενεργοποίηση του μονοπατιού RAS-MAPK, μέσω της ενεργοποίησης του EGFR. Η πρόσδεση του EGF στον EGFR που εμφανίζεται υπερεκφρασμένος προκαλεί την ενίσχυση της σηματοδότησης, μέσω στρατολόγησης των RAS πρωτεϊνών στον ενεργοποιημένο υποδοχέα. Η λειτουργία των ενεργοποιημένων RAS πρωτεϊνών μπορεί να ανασταλεί από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *RASSF1A* που εμφανίζεται μεθυλιωμένο στους όγκους της ουροδόχου κύστεως. Σε πολλές μελέτες έχει φανεί ότι η υπερέκφραση του *EGFR* γονιδίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για την επιβίωση και τη θνησιμότητα λόγω συγκεκριμένης νόσου <sup>20</sup>.

Η διαδοχή των γεγονότων που οδηγούν στη γένεση των μυοδιηθητικών όγκων ξεκινώντας από ένα φυσιολογικό επιθήλιο είναι η εμφάνιση δυσπλασίας, καρκινώματος *in situ* και εν τέλει η διείσδυση του μυϊκού τοιχώματος. Οι μυοδιηθητικοί όγκοι που αναπτύσσονται στην ουροδόχο κύστη (στάδια T2-T4) αντιπροσωπεύουν το 20% των διαγνωσθέντων περιστατικών και εμφανίζουν 50% πιθανότητα μετάστασης. Πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών φαίνεται να διαταράσσεται στους μυοδιηθητικούς όγκους της ουροδόχου κύστεως. Ειδικότερα, το μονοπάτι p53 που ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο φαίνεται να απενεργοποιείται στο 89% των περιπτώσεων, λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο *TP53* και

γονιδιακών ενισχύσεων στο *MDM2* ή υπερέκφρασης του *MDM2*. Η απώλεια του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *TP53* συσχετίζεται με την παρουσία διπλασιασμών στο γονιδίωμα των καρκινικών αυτών κυττάρων. Οι μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *RBI* είναι κυρίως απενεργοποιητικές και οδηγούν στη μείωση της έκφρασης του. Τα μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό εξαιτίας των μεταλλαγών στα γονίδια *ATM*, *ERCC2* και *RAD51B* <sup>11</sup>.

### 1.3.5 Σταδιοποίηση και βαθμός διαφοροποίησης

Το πιο διαδεδομένο σύστημα διεθνώς για τη σταδιοποίηση είναι το TNM και σύμφωνα με αυτό στους μη μυοδιηθητικούς τύπους εντάσσονται οι θηλώδεις όγκοι που εντοπίζονται στο επιθήλιο (στάδιο Ta), οι όγκοι που διηθούν την υποβλεννογόνιο στιβάδα (T1) και τα καρκινώματα *in situ* (CIS) <sup>19</sup>.

*Πίνακας 3. Σύστημα σταδιοποίησης των όγκων της κύστεως (TNM) <sup>19</sup>.*

Σταδιοποίηση (TumourNodeMetastasis-TNM σύστημα)	
<b>Πρωτοπαθής εντοπισμένος όγκος (T)</b>	
Tx	
T0 Έλλειψη πρωτοπαθούς όγκου	
Ta Μη διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα	
Tis <i>In situ</i> καρκίνωμα	
T1 Όγκος διηθητικός σε χόριο	
T2 Όγκος διηθητικός σε μυϊκό τοίχωμα	
pT2a Διήθηση επιφανειακού μυϊκού χιτώνα	
pT2b Διήθηση σε βαθύτερες στιβάδες μυϊκού τοιχώματος	
T3 Όγκος που διηθεί το περιφερικό λίπος	
pT3a Μικροσκοπική διήθηση	
pT3b Μακροσκοπική διήθηση	
T4	
T4a Επέκταση όγκου σε γειτονικά όργανα (προστάτης, μήτρα και κόλπος)	
T4b Επέκταση όγκου στο πυελικό ή κοιλιακό τοίχωμα	
<b>Επιχώριοι λεμφαδένες (N)</b>	
Nx Επιχώριοι λεμφαδένες μη αξιολογήσιμοι	
N0 Έλλειψη μεταστάσεων σε λεμφαδένες	

N1 Μεταστάσεις σε πυλαίους λεμφαδένες
N2 Μεταστάσεις σε περιαορτικούς, περιπυλαίους, άνω μεσεντέριους και αορτής λεμφαδένες
N3 Μεταστάσεις σε λαγόνιους λεμφαδένες
<b>Μεταστάσεις (M)</b>
M0 Έλλειψη απομακρυσμένων μεταστάσεων
M1 Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) θέσπισε το 1973 ένα σύστημα για την κατηγοριοποίηση των βαθμών κακοήθειας των όγκων της κύστεως που περιείχε τις κατηγορίες Grade 1, Grade 2 και Grade 3 με βάση το βαθμό αποδιαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων. Η διαφορά ανάμεσα στις παρατηρήσεις των διαφόρων παθολογοανατόμων είχε ως συνέπεια τη σημαντική μεταβλητότητα ανάμεσα στα αποτελέσματα, γεγονός που οδήγησε στη διατύπωση ενός νέου συστήματος το 2004, από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) και την Διεθνή Ένωση της Ουρολογικής Παθολογίας (ISUP), με λεπτομερή ιστολογική περιγραφή. Το νεότερο σύστημα εντάσσει τη διάκριση ανάμεσα στα θηλώδη ουροθηλιακά νεοπλάσματα χαμηλού νεοπλασματικού δυναμικού (PUNLMP) και στους όγκους χαμηλού και υψηλού βαθμού διαφοροποίησης <sup>21</sup>.

Με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες από την EAU για τους μη μυοδιηθητικούς τύπους πρέπει να χρησιμοποιούνται και τα δυο συστήματα κατάταξης για το βαθμό διαφοροποίησης (grading) έως ότου το σύστημα του 2004 επιβεβαιωθεί με περαιτέρω κλινικές μελέτες <sup>12</sup>.

Περίπου το 75-80% των όγκων που αναπτύσσονται στην ουροδόχο κύστη ανήκουν στους μη μυοδιηθητικούς τύπους και συγκροτούν μια εξαιρετικά ετερογενή ομάδα με τελείως διαφορετική έκβαση. Οι καλά διαφοροποιημένοι όγκοι εμφανίζουν μέτριο ρυθμό υποτροπής αλλά μικρό κίνδυνο εξέλιξης, ενώ οι αδιαφοροποίητοι όγκοι σχετίζονται με σημαντικούς ρυθμούς υποτροπής, εξέλιξης και θνησιμότητας <sup>12</sup>. Αυτή η ετερογένεια περιπλέκει τη σύγκριση της απόδοσης διαφορετικών θεραπευτικών σχημάτων. Επομένως, η εκτίμηση του κινδύνου είναι σημαντικός παράγοντας διαστρωμάτωσης των ασθενών με παρόμοιο κίνδυνο υποτροπής και εξέλιξης και συνεισφέρει στον καθορισμό της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής για κάθε κατηγορία κινδύνου. Έως σήμερα οι πίνακες εκτίμησης κινδύνου από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Έρευνας και Θεραπείας του καρκίνου (EORTC) θεωρούνται τα πλέον αξιόπιστα εργαλεία για την εκτίμηση της εξέλιξης και/ή της υποτροπής των μη μυοδιηθητικών τύπων. Το σύστημα βαθμολόγησης του EORTC συνδυάζει τα δεδομένα από

προηγούμενους ρυθμούς υποτροπής, τον αριθμό των όγκων, τη διάμετρο του όγκου, το στάδιο του όγκου, το βαθμό διαφοροποίησης κατά WHO και τη παρουσία ή απουσία καρκινώματος *in situ* για την εκτίμηση του κινδύνου υποτροπής και εξέλιξης <sup>21</sup>.

*Πίνακας 4. Εκτιμώμενος κίνδυνος υποτροπής-εξέλιξης των ασθενών με μη μυοδιηθητικό όγκο στην ουροδόχο κύστη, με βάση το EORTC <sup>16</sup>.*

Παράγοντας	Υποτροπή	Εξέλιξη
<b>Αριθμός όγκων</b>		
<b>1</b>	0	0
<b>2-7</b>	3	3
<b>&gt;8</b>	6	3
<b>Διάμετρος όγκου</b>		
<b>&lt;3cm</b>	0	0
<b>&gt;3cm</b>	3	3
<b>Προηγούμενος ρυθμός υποτροπής</b>		
<b>Απουσία</b>	0	0
<b>&lt;1 υποτροπή ανά χρόνο</b>	2	2
<b>&gt;1 υποτροπή ανά χρόνο</b>	4	2
<b>Κατηγορία</b>		
<b>Ta</b>	0	0
<b>T1</b>	1	4
<b>Καρκίνωμα <i>in situ</i></b>		
<b>Ναι</b>	1	4
<b>Όχι</b>	0	0
<b>Βαθμός κακοήθειας (grade, WHO 1973)</b>		
<b>G1</b>	0	0
<b>G2</b>	1	0
<b>G3</b>	2	5
<b>Συνολικό σκορ</b>	0-17	0-23

### 1.3.6 Συμπτώματα και Διαγνωστικές προσεγγίσεις

Δεν υπάρχει έντονη συμπτωματολογία στην περίπτωση του καρκίνου της κύστεως και ίσως η βασικότερη παρατήρηση είναι η αιματουρία που καταγράφεται στις γενικές εξετάσεις

ούρων. Η αιματουρία μπορεί να είναι είτε μικροσκοπική είτε μακροσκοπική και αποτελεί το βασικότερο σύμπτωμα, μαζί με τη συχνή τάση για ούρηση των ασθενών.

Οι πλέον χρησιμοποιούμενες διαγνωστικές προσεγγίσεις είναι η κυστεοσκόπηση και η κυτταρολογική εξέταση ούρων. Η κυστεοσκόπηση αποτελεί μια επεμβατική διαγνωστική διαδικασία με μειωμένη ευαισθησία για τα καρκινώματα *in situ*, ενώ η κυτταρολογική εξέταση ούρων θεωρείται μη επεμβατική προσέγγιση αλλά χαρακτηρίζεται από μειωμένη ευαισθησία για τους καλά διαφοροποιημένους όγκους. Η διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητά τους εμφανίζουν μεγάλη διακύμανση και συγκεκριμένα για την κυστεοσκόπηση τα ποσοστά είναι 62-84% και 43-98%, αντίστοιχα <sup>22</sup>.

Σημαντική είναι η ενσωμάτωση του φθορισμού στη διαδικασία της κυστεοσκόπησης για την πραγματοποίηση μιας νέας φωτοδυναμικής διαγνωστικής τεχνολογίας, η οποία επιτρέπει τον εντοπισμό των αλλοιώσεων που μπορεί να μην ανιχνεύονταν από την κλασική κυστεοσκόπηση <sup>23</sup>.

### **1.3.7 Βιοδείκτες και FDA εγκεκριμένα τεστ**

Η μετεγχειρητική παρακολούθηση των ασθενών (follow-up) που έπασχαν από ουροθηλιακό καρκίνωμα απαιτεί την πραγματοποίηση εκ νέου της επεμβατικής διαδικασίας, κυστεοσκόπηση, σε συνδυασμό συνήθως με τα αποτελέσματα της μη επεμβατικής διαγνωστικής μεθόδου, της κυτταρολογικής εξέτασης ούρων. Επομένως, η ανάγκη εύρεσης βιοδεικτών που θα επιτρέπουν την αντικατάσταση των παραδοσιακών επίπονων διαδικασιών στη διάγνωση και στην παρακολούθηση των ασθενών είναι εξέχουσας σημασίας.

Οι μοριακοί βιοδείκτες που σήμερα χρησιμοποιούνται μπορούν να διακριθούν σε δυο κατηγορίες, ανάλογα με το αν είναι διαλυτοί δείκτες στα ούρα ή εντοπίζονται στα κύτταρα που ανιχνεύονται στα ούρα, λόγω της απώλειας της αρχιτεκτονικής των ιστών που εμφανίζουν τους ουροθηλιακούς όγκους. Έως σήμερα έξι διαλυτοί δείκτες που ανιχνεύονται στα ούρα των ασθενών έχουν εγκριθεί για κλινική χρήση για τον εντοπισμό του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Τα πλέον χρησιμοποιούμενα εμπορικά τεστ είναι τα ImmunoCyt/uCyt™ και UroVysion™ <sup>14</sup>.

### **Διαλυτοί βιοδείκτες ούρων**

1. Η ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης NMP-22 με την ανοσοδιαγνωστική μεθοδολογία της ELISA τύπου sandwich αποτελεί ένα εγκεκριμένο διαγνωστικό τεστ από τον

FDA, με διαγνωστική ευαισθησία που κυμαίνεται από 50-70% και διαγνωστική ειδικότητα 60-90%. Βασικά μειονεκτήματα του είναι η χαμηλή ευαισθησία για την ανίχνευση των καλά διαφοροποιημένων όγκων (30-50%) και τα αυξημένα ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε φλεγμονώδεις καταστάσεις <sup>20</sup>.

2. Ένας ακόμη σημαντικός βιοδείκτης είναι το καρκινικό αντιγόνο της ουροδόχου κύστης (BTA) που ανιχνεύεται κυρίως με ποιοτικές δοκιμασίες, οι οποίες εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία για τους διηθητικούς όγκους της κύστεως.
3. Το HA-HAse αποτελεί ένα τεστ που βασίζεται στις αρχές της ELISA και συνδυάζει την ανάλυση του υαλουρονικού οξέος και της υαλουρονιδάσης. Η διαγνωστική ευαισθησία του τεστ είναι 83%, η διαγνωστική ειδικότητα είναι 78%, η θετική προβλεπτική αξία είναι 64% και η αρνητική 90%.
4. Η πρωτεΐνη Survivin έχει αντι-αποπτωτική δράση και αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο δείκτη για τη διάγνωση και την μετεγχειρητική παρακολούθηση. Η ευαισθησία και η ειδικότητα του τεστ για την ανίχνευση της υποτροπής των ασθενών είναι 100% και 78%, αντίστοιχα. Η πρωτεΐνη αυτή έχει συσχετισθεί με πιο προχωρημένα στάδια καρκίνου της κύστεως, με διείσδυση στο λεμφαγγειακό σύστημα, με την μετάσταση στους λεμφαδένες και την υποτροπή των ασθενών που έχουν υποστεί ριζική κυστεκτομή.
5. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *FGFR3* παρατηρούνται σε ποσοστό 50% στους πρωτοπαθείς όγκους της κύστεως και έχουν συσχετισθεί με ευνοϊκή πρόγνωση των ασθενών αυτών. Ειδικότερα, οι καλά διαφοροποιημένοι όγκοι της κύστεως χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα, με τους pTa όγκους να αποτελούν το 85% αυτών των περιπτώσεων <sup>22</sup>.

### **Βιοδείκτες-κυτταρικοί και πρωτεϊνικές δοκιμασίες**

#### **1. Ανάλυση μικροδορυφορικών αλληλουχιών**

Οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες συνιστούν μικρού μήκους επαναλαμβανόμενες περιοχές (2 έως 4 ζευγών βάσεων) που βρίσκονται διάσπαρτες στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Οι μικροδορυφορικοί γενετικοί τόποι είναι χρήσιμοι βιοδείκτες για την ανίχνευση της απώλειας ετεροζυγωτίας (LOH) και την αστάθεια των μικροδορυφορικών αλληλουχιών. Στο ουροθηλιακό καρκίνωμα, η απώλεια ετεροζυγωτίας εντοπίζεται συχνά στα χρωμοσώματα 4p, 8p, 9q, 9p, 11p, 13p, 16q και 17p. Η μοριακή μεθοδολογία για την ανίχνευση των μικροδορυφορικών τόπων είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR.



Μελέτες έχουν αναδείξει ότι οι ελλείψεις της περιοχής 9q21 συσχετίζονται με την ανάπτυξη των διεισδυτικών όγκων, ενώ η απώλεια ετεροζυγωτίας των περιοχών 18q21.1 και 9p21-22 φαίνεται να σχετίζεται με τη δυσμενή πρόγνωση και τον υψηλότερο ρυθμό θνησιμότητας. Η ανάλυση των μικροδορυφορικών αλληλουχιών (MSI) είναι ένας καλός προγνωστικός δείκτης που σχετίζεται με τον κίνδυνο υποτροπής των επιφανειακών όγκων (Ta-T1), ανεξαρτήτως βαθμού διαφοροποίησης <sup>14</sup>.

## 2. Ενεργότητα τελομεράσης

Η ενεργότητα της τελομεράσης σε δείγματα ούρων είναι ένας καλός δείκτης για τον άμεσο εντοπισμό και την παρακολούθηση των ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Η έκφραση των υπομονάδων της τελομεράσης, όπως η υπομονάδα με την ενεργότητα αντίστροφης μεταγραφάσης (hTERT), συνδέονται πιθανά με την ανάπτυξη του όγκου και την εξέλιξη του. Η αναλογία hTERT/GAPDH και hTERT mRNA/ ολικό RNA είναι σημαντικά μειωμένες στους επιφανειακούς όγκους της κύστεως, συγκριτικά με τους διηθητικούς όγκους <sup>20</sup>.

## 3. Κυτοκερατίνες

Τα βασικά τεστ που υπάρχουν για τις κυτοκερατίνες είναι το UBC test, το τεστ των 20 κυτοκερατινών και το CYFRA 21-1. Το πρώτο βασίζεται στις αρχές της ELISA τύπου sandwich και στοχεύει για τις κυτοκερατίνες 8 και 18, το δεύτερο αποτελεί μια ανάλυση που στηρίζεται στις μεθοδολογίες της αντίστροφης μεταγραφής και της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (ανάλυση RT-PCR) και το CYFRA 21-1 αποτελεί μια ανοσοραδιομετρική δοκιμασία για την στόχευση της κυτοκερατίνης 19 <sup>14</sup>.

## **Κυτταρολογικά τεστ**

1. UroVysion <sup>TM</sup> αποτελεί ένα μοριακό διαγνωστικό τεστ που στηρίζεται στον φθορίζοντα *in situ* υβριδισμό (FISH) και εξυπηρετεί τον προσδιορισμό των χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα κύτταρα που ανιχνεύονται στα δείγματα ούρων των ασθενών. Δυο είδη ιχνηθετών χρησιμοποιούνται: οι κεντρομερικοί ιχνηθέτες για την ανίχνευση αριθμητικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών (για τα χρωμοσώματα 3,7 και 17) και οι ιχνηθέτες που είναι ειδικοί για γενετικούς τόπους, για την ανίχνευση ειδικών μεταλλαγών σε γνωστά ογκοκατασταλτικά γονίδια (για παράδειγμα ιχνηθέτες για την περιοχή 9p21, η οποία περιλαμβάνει το γονίδιο *CDKN2A*). Το UroVysion <sup>TM</sup> παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία από την κυτταρολογική εξέταση

ούρων για τους όγκους όλων των σταδίων και των βαθμών διαφοροποίησης και είναι εγκεκριμένο από τον FDA για τη διάγνωση νέων περιστατικών ή την παρατήρηση της υποτροπής των ασθενών. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι το UroVysion™ μπορεί να είναι χρήσιμο για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης των ασθενών στην ανοσοθεραπεία με το BCG εμβόλιο και για την ανίχνευση ουροθηλιακών καρκινωμάτων στο ανώτερο ουροποιητικό σύστημα. Η ευαισθησία και η ειδικότητα του UroVysion™ κυμαίνονται περίπου στο 40% και 90%, αντίστοιχα, ενώ για την κυτταρολογική εξέταση ούρων είναι 41% και 90%. Ο συγκερασμός των δυο διαγνωστικών εργαλείων επιφέρει αύξηση της διαγνωστικής ευαισθησίας, 53% αλλά μείωση της ειδικότητας, 80%<sup>22</sup>.

2. Το ImmunoCyt / uCyt™ αποτελεί ένα ακόμη εγκεκριμένο διαγνωστικό εργαλείο από τον FDA και στηρίζεται στο συνδυασμό τριών μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων που ομοιάζουν με τις μουκίνες (M344, LDQ10, 19A211). Η διαγνωστική ευαισθησία του ImmunoCyt / uCyt™ φτάνει το 79% για τους καλά διαφοροποιημένους όγκους (grade 1), 84% για τους μέτρια διαφοροποιημένους όγκους (grade 2) και 92% για τους σχεδόν αδιαφοροποίητους όγκους (grade 3). Οι βασικοί περιορισμοί της εφαρμογής του ImmunoCyt / uCyt™ είναι η εξάρτηση του αποτελέσματος από τον χειριστή, η μεγάλη χρονική απαίτηση για τη διεξαγωγή του και η απαίτηση τουλάχιστον 500 κυττάρων για να θεωρηθεί αρνητικό το αποτέλεσμα. Η διαγνωστική ευαισθησία του ImmunoCyt / uCyt™ (συνήθως 64-95%) μειώνεται σε περιπτώσεις ασθενών που παρακολουθούνται ύστερα από την ανοσοθεραπεία με το BCG εμβόλιο, αλλά ο συνδυασμός με την κυτταρολογική εξέταση ούρων οδηγεί σε ευαισθησία 100% για τις καταστάσεις υποτροπών<sup>22</sup>.
3. Κυτταρομετρία ροής και ψηφιακή απεικονιστική ανάλυση (DIA): Οι καλά διαφοροποιημένοι θηλώδεις όγκοι φαίνεται να μην παρουσιάζουν σημαντικές διαταραχές στη διπλοειδή κατάσταση των κυττάρων τους, σε αντίθεση με τους αδιαφοροποίητους μυοδιηθητικούς όγκους που χαρακτηρίζονται από ανεύπλοειδίες. Τα κύτταρα που φέρουν ανεύπλοειδίες μπορούν να ανιχνευτούν με DNA κυτταρομετρία ροής ή ψηφιακή απεικονιστική ανάλυση. Η ευαισθησία της κυτταρομετρίας επηρεάζεται σημαντικά από την αντιπροσώπευση των ανεύπλοειδικών κυττάρων στα δείγματα ούρων. Στη ψηφιακή απεικονιστική ανάλυση (DIA) τα κύτταρα μονιμοποιούνται για να επιτευχθεί η ανίχνευσή τους. Η διαγνωστική ευαισθησία για την DNA κυτταρομετρία ροής και τη ψηφιακή

απεικονιστική ανάλυση είναι 91% και 72%, αντίστοιχα και η διαγνωστική ειδικότητα είναι 83% και 80%, αντίστοιχα <sup>14</sup>.

### **DNA μεθυλίωση**

Στην πρώτη μελέτη που διενεργήθηκε μελετήθηκε ένα πάνελ δεικτών (DAPK, RARβ, E-καδερίνη και p16) και η υπολογισμένη ευαισθησία που προέκυψε ήταν 91% και η ειδικότητα 76%. Ενώ η ανάλυση μεθυλίωσης των δεικτών DAPK, BCL2 και TERT οδήγησε σε ευαισθησία 78% και ειδικότητα 100% <sup>14</sup>.

### **miRNAs**

Τα miRNAs αποτελούν εξαιρετικούς βιοδείκτες για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως διότι εκκρίνονται στα ούρα, είναι εύκολοι στο χειρισμό και είναι σταθερά μόρια ως προς την επίδραση των νουκλεασών, λόγω του μικρού τους μεγέθους. Η υπερέκφραση των miR-126, miR-182 και miR-199a φαίνεται να διαχωρίζει τους ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο της κύστεως από τους υγιείς <sup>20</sup>.

Συμπερασματικά, την υψηλότερη ευαισθησία εμφανίζουν οι βιοδείκτες που μελετήθηκε η μεθυλίωση τους (94%), ακολουθούν τα διαγνωστικά εργαλεία ImmunoCyt / uCyt <sup>TM</sup> (81%), NMP22 (69%), UroVysion <sup>TM</sup> (64%) και η κυτταρολογική εξέταση ούρων (38%). Ως προς τη διαγνωστική ειδικότητα οι μη επεμβατικές διαγνωστικές μεθοδολογίες εμφανίζουν την εξής φθίνουσα σειρά: κυτταρολογική εξέταση ούρων (94%), NMP22 (81%), ImmunoCyt / uCyt <sup>TM</sup> (75%), UroVysion <sup>TM</sup> (73%) και οι DNA δείκτες που μελετάται η μεθυλίωση τους (66%) <sup>14</sup>.

### **Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs)**

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα εντοπίζονται στο περιφερικό αίμα ασθενών με μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα. Ορισμένοι κυτταρικοί δείκτες επί των καρκινικών κυττάρων της κύστεως είναι η Uroplakin II (UPII), CK20, EGFR και MUC-7 έχουν μελετηθεί ως υποψήφια μόρια για την ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων. Η ευαισθησία των τεχνικών που βασίζονται σε τέτοιους βιοδείκτες είναι υψηλή, ενώ η ειδικότητά τους δεν είναι ακόμη ορθά τεκμηριωμένη για διαγνωστικούς σκοπούς <sup>14</sup>.

### **1.3.7 Θεραπεία**

Οι επιφανειακοί μη μυοδιηθητικοί όγκοι αντιμετωπίζονται με διουρηθρική αφαίρεση του όγκου (TUR-BT) και λόγω της συχνής υποτροπής αυτών των όγκων για την προφύλαξη των

ασθενών χρησιμοποιείται είτε ενδοκυστική έγχυση χημειοθεραπείας είτε ανοσοθεραπεία με τα εξασθενημένα στελέχη του μυκοβακτηριδίου που προκαλεί τη φυματίωση (BCG) <sup>24</sup>. Η πρώτη μετεγχειρητική παρακολούθηση συντελείται στους τρεις πρώτους μήνες πριν την αφαίρεση του όγκου.

Οι μυοδιηθητικοί όγκοι αντιμετωπίζονται είτε με μερική είτε με ριζική κυστεκτομή, όπου πέρα από την αφαίρεση της ουροδόχου κύστης, απομακρύνονται και γειτονικά όργανα. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι αποκατάστασης της κύστης που αφαιρείται, με βασικότερο την αξιοποίηση των τοιχωμάτων του εντέρου ως έξοδο των ούρων <sup>12</sup>.

## 1.4 Μη κωδικά μόρια RNA (ncRNAs)

Το μεταγράφομα των κυττάρων διακρίνεται σε δυο μεγάλες κατηγορίες: τα κωδικά και τα μη κωδικά μόρια RNA. Η ανακάλυψη των πρώτων μικρών μη κωδικών RNA μορίων (lin-4 και let-7) τα οποία ρυθμίζουν την αναπτυξιακή πορεία του *Caenorhabditis elegans* αποτέλεσε ορόσημο και έως σήμερα έχουν μελετηθεί εκτενώς, διότι από το πρόγραμμα αλληλούχησης του ανθρώπινου γονιδιώματος προέκυψε ότι μόνο το 2% κωδικοποιεί για πρωτεΐνες <sup>25</sup>.

Με βάση το μέγεθός τους τα μη κωδικά μόρια διαίρονται σε μεγάλου μήκους (long non coding RNAs) που διαθέτουν μήκος >200 νουκλεοτιδίων και στα μικρού μεγέθους μη κωδικά μόρια (small non coding RNAs), στα οποία περιλαμβάνονται τα miRNAs, τα siRNAs, τα piRNAs, τα tRFs. Τα μη κωδικά μόρια RNA (ncRNAs) διαίρονται περαιτέρω σε μόρια που επιτελούν βασικές λειτουργίες του κυττάρου (housekeeping) και σε ρυθμιστικά μόρια. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα tRNAs, rRNAs, snRNAs και snoRNAs τα οποία εκφράζονται συνεχώς, ενώ στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν διάφορες κλάσεις με βάση το μέγεθος, τη βιογένεση, την πολικότητα που έχουν ένα κοινό χαρακτηριστικό ως προς τη δράση τους, την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

### 1.4.1 miRNAs

Τα miRNAs είναι η πιο γνωστή κλάση μη κωδικών μορίων, που ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά στον *C.elegans*, και έως σήμερα η απορρύθμισή τους έχει συσχετισθεί με διάφορες ασθένειες. Ορισμένα miRNAs είναι εξελικτικά συντηρημένα, όπως το let-7, ενώ άλλα εμφανίζουν όμοιες αλληλουχίες στο 5' άκρο τους συγκροτώντας οικογένειες miRNAs μορίων. Τα miRNAs ρυθμίζουν την έκφραση των στόχων τους μέσω της πλήρους ή της

μερικής συμπληρωματικότητάς τους με την 3' αμετάφραστη περιοχή των mRNA στόχων. Επομένως, ένα συγκεκριμένο miRNA μπορεί να στοχεύσει πολλά μετάγραφα, λόγω του μικρού μεγέθους και της ατελούς συμπληρωματικότητάς του με τους στόχους <sup>26</sup>.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για miRNA μόρια έχουν εντοπιστεί σε όλα τα ανθρώπινα χρωμοσώματα, με εξαίρεση το χρωμόσωμα Υ. Περίπου το 50% των γνωστών γονιδίων που κωδικοποιούν για miRNA μόρια βρίσκονται ομαδοποιημένα (clusters) και μεταγράφονται ως πολυσιστρονικά μετάγραφα <sup>26</sup>.

### **Βιογένεση των miRNA μορίων-Κανονικό μονοπάτι**

Αρχικά, η μεταγραφή των γονιδίων των miRNA επιτρέπει τον σχηματισμό πρόδρομων μεταγράφων (pri-miRNAs), τα οποία αφού επεξεργαστούν θα προκύψουν τα pre-miRNAs. Η μεταφορά των pre-miRNAs από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα πραγματοποιείται μέσω ενός εκλεκτικού μηχανισμού και διαμέσου των πυρηνικών πόρων.

Η μεταγραφή των γονιδίων των miRNA πραγματοποιείται από την RNA πολυμεράση II και τα pri-miRNAs που προκύπτουν φέρουν δομές που αναγνωρίζονται από το σύμπλοκο του μικροεπεξεργαστή, το οποίο αποτελείται από την DGCR8 πρωτεΐνη που δεσμεύει RNA και τη ριβονουκλεάση Drosha. Η DGCR8 πρωτεΐνη αναγνωρίζει τα μονόκλινα άκρα των δίκλωνων RNA μορίων, ενώ η ριβονουκλεάση Drosha διασπά σε απόσταση 11 ζευγών βάσεων από τη θέση που αναγνωρίζει η DGCR8 πρωτεΐνη, για να απελευθερωθεί ένα pre-miRNA μήκους 55-70 νουκλεοτιδίων. Σε περίπτωση ιντρονικών miRNAs, η Drosha διασπά συνμεταγραφικά πριν τη συρραφή των RNA μορίων και η θηλιά RNA που προκύπτει καλείται πρόδρομο miRNA ή pre-miRNA <sup>27</sup>.

Ο μηχανισμός της μεταφοράς των pre-miRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα περιλαμβάνει την εξπορτίνη-5, την Ran-GTP, μια πυρηνική πρωτεΐνη που δεσμεύει GTP και αναγνωρίζει δομικά χαρακτηριστικά των pre-miRNA μορίων. Μετά την μετατόπιση στο κυτταρόπλασμα, η Ran-GTP υδρολύεται σε Ran-GDP, με αποτέλεσμα την αποσυναρμολόγηση του συμπλόκου και την απελευθέρωση του pre-miRNA. Η απώλεια της εξπορτίνης-5 φαίνεται να επιδρά αρνητικά στα επίπεδα των ώριμων miRNA μορίων, χωρίς την πυρηνική κινητοποίηση των pre-miRNA μορίων, προτείνοντας ότι η εξπορτίνη-5 δεν εμπλέκεται μόνο στη μεταφορά των pre-miRNA μορίων αλλά ίσως προστατεύει τα μόρια αυτά από την νουκλεολυτική επίθεση στον πυρήνα <sup>25</sup>.

Τα pre-miRNAs αφού μεταφερθούν στο κυτταρόπλασμα θα υποστούν επεξεργασία προς ώριμα δίκλιωνα miRNA μόρια από τη ριβονουκλεάση Dicer, μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη TRBP, η οποία αναγνωρίζει τα 3' άκρα που παράγονται από τη Drosha και διασπά τα pre-miRNAs για να παράξουν ένα miRNA-miRNA διμερές με προεξέχοντα άκρα δυο νουκλεοτιδίων.

Η θραύση των pre-miRNAs από τη Dicer οδηγεί στο σχηματισμό των ώριμων δίκλωνων miRNA μορίων, των οποίων η μια αλυσίδα καλείται οδηγός και η συμπληρωματική της καλείται συνοδός αλυσίδα. Η συνοδός αλυσίδα ενσωματώνεται στο σύμπλοκο τελεστή, γνωστό ως RISC, ενώ η συνοδός αλυσίδα απελευθερώνεται και αποικοδομείται. Η σχετική θερμοσταθερότητα των δυο άκρων στο διμερές RNA καθορίζει ποια αλυσίδα θα επιλεγεί, με την αλυσίδα που θα φέρει σχετικά πιο ασταθή ζεύγη βάσεων στο 5' άκρο να ενσωματώνεται στο σύμπλοκο τελεστή, RISC.

Το σύμπλοκο RISC αποτελεί ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο περιλαμβάνει την αλυσίδα miRNA, τις πρωτεΐνες Αργοναύτες και ορισμένες ακόμη βοηθητικές πρωτεΐνες. Στα θηλαστικά, έχουν βρεθεί επτά μέλη της οικογένειας των Αργοναυτών, τα οποία κατηγοριοποιούνται σε δυο υποοικογένειες: την υποοικογένεια των AGO πρωτεϊνών και την υποοικογένεια των PIWI πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες AGO1-4 περιλαμβάνονται στα μονοπάτια των miRNA και siRNA μορίων, ενώ οι PIWI πρωτεΐνες σχετίζονται με τα piRNAs. Οι AGO πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τρεις εξελικτικά συντηρημένες επικράτειες, τη PAZ, τη MID και τη PIWI, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τα 3' και 5' άκρα των miRNA μορίων, αντίστοιχα. Η AGO2 πρωτεΐνη φέρει μια επικράτεια η οποία πραγματοποιεί την ενδονουκλεολυτική θραύση των πλήρως συμπληρωματικών mRNA στόχων. Οι AGO πρωτεΐνες γεφυρώνουν τα miRNAs με τους τελεστές της αποσιώπησης, ενώ οι GW182 πρωτεΐνες δρουν καταρροϊκά των AGO πρωτεϊνών για να οδηγήσουν στην αποσιώπηση μέσω των miRNA μορίων.

### **Μηχανισμοί δράσης των miRNAs**

Τα miRNA μόρια έχουν ως βασική λειτουργία τους τη μετα-μεταγραφική σίγηση και η αλυσίδα οδηγός επιτρέπει την αναγνώριση του mRNA στόχου, μέσω της υβριδοποίησης της συνήθως στην 3' αμετάφραστη περιοχή. Ο βαθμός συμπληρωματικότητας του miRNA και του στόχου καθορίζει το αν το mRNA στόχος θα αποικοδομηθεί ή θα κατασταλλεί η μετάφρασή του. Η περιοχή 2-8nts (νουκλεοτιδίων) από το 5' άκρο του miRNA αλληλεπιδρά πλήρως με την 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA στόχου ("seed" region). Η περιοχή

πρόσδεσης των miRNAs δεν περιορίζεται μόνο στην 3' αμετάφραστη περιοχή, υπάρχουν αναφορές και για την 5' αμετάφραστη περιοχή, τον υποκινητή και τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων. Η επιλογή μεταξύ καταστολής της μετάφρασης και αποικοδόμησης εξαρτάται από το βαθμό υβριδοποίησης του miRNA-mRNA συμπλόκου. Η καταστολή της μετάφρασης από τα miRNAs μπορεί να γίνει είτε στο στάδιο της έναρξης είτε στο στάδιο της επιμήκυνσης<sup>26</sup>.

Το κανονικό μονοπάτι βιογένεσης των miRNAs μπορεί να ρυθμιστεί σε τρία επίπεδα: στο επίπεδο της μεταγραφής των pri-miRNAs, στο επίπεδο των τροποποιήσεων που επηρεάζουν τα miRNA πρόδρομα μόρια και μέσω τροποποιητικών ενζύμων των miRNAs όπως η DROSHA και η DICER.

#### **1.4.2 lncRNAs**

Τα μεγάλα μη κωδικά μόρια RNA προκύπτουν συνήθως ύστερα από μεταγραφή μέσω της RNA πολυμεράση II και συχνά φέρουν ανάλογες τροποποιήσεις με τα mRNAs. Τα lncRNAs δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένα και εκδηλώνουν με διάφορους μηχανισμούς τον τρόπο δράσης τους. Συχνά συγκροτούν τρισδιάστατες δομές λόγω αλληλεπιδράσεών τους με βιομόρια και πρωτεΐνες, όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες, οι ιστόνες ή οι τροποποιητές της χρωματίνης<sup>25</sup>.

Ανάλογα με το επίπεδο δράσης τους τα lncRNAs μπορεί να διακριθούν σε cis ή trans. Τα cis-lncRNAs ρυθμίζουν τα γονίδια που βρίσκονται σε κοντινές περιοχές, ενώ τα trans-lncRNAs ρυθμίζουν απομακρυσμένα γονίδια. Στους δυο αυτούς μηχανισμούς, τα lncRNAs αλληλεπιδρούν είτε άμεσα είτε έμμεσα με το γενωμικό DNA για να πραγματοποιήσουν τις ειδικές βιολογικές λειτουργίες τους. Συνεπώς, τα lncRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση με μια ποικιλία επιγενετικών (οργάνωση της χρωματίνης) και μη επιγενετικών τρόπων<sup>25</sup>.

#### **1.4.3 tRNAs και οι τροποποιήσεις (epitranscriptomics)**

Τα tRNAs αποτελούν την πιο άφθονη ομάδα μικρών μη κωδικών μορίων RNA, καθώς αποτελούν το 4%-10% του συνολικού RNA (Kirchner and Ignatova 2015). Μεταγράφονται από γενωμικές περιοχές μέσω της RNA πολυμεράσης III και των μεταγραφικών παραγόντων, TFIIIB και TFIIIC και ο υποκινητής των γονιδίων τους περιέχει δυο συντηρημένες περιοχές, τα Box A και BoxB. Η μεταγραφή των tRNA γονιδίων είναι εξαιρετικά έντονη σε όλες τις επικράτειες της ζωής, για παράδειγμα στο κύτταρο του σακχαρομύκητα περιλαμβάνονται περίπου 3 εκατομμύρια tRNA μόρια<sup>28</sup>. Τα πρόδρομα

μετάγραφα (pre-tRNA) που προκύπτουν περιλαμβάνουν τόσο την αλληλουχία 5' leader όσο και την αλληλουχία 3' trailer. Το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο RNάσης P απομακρύνει την αλληλουχία στο 5' άκρο των πρόδρομων μεταγράφων, ενώ η απομάκρυνση του 3' άκρου πραγματοποιείται από την RNάση Z, η οποία είναι μια μεταλλο-β-λακταμάση ενδονουκλεάση. Η ενεργότητα της έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός 3' υδροξυλίου και τον σχηματισμό της περιοχής του δέκτη αμινοξέων. Για τους περισσότερους προκαρυωτικούς οργανισμούς και για όλους τους ευκαρυωτικούς ένα ώριμο 3' άκρο απαιτεί την προσθήκη της τρινουκλεοτιδικής αλληλουχίας 'CCA' μέσω ενζυματικής αντίδρασης. Στον άνθρωπο, η κατάλυση αυτή επιτελείται από το ένζυμο TRNT1 ενώ σε ορισμένους οργανισμούς όπως η *Escherichia coli* η αλληλουχία αυτή κωδικοποιείται από το γονιδίωμα<sup>28</sup>.

Τα ένζυμα αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες αναγνωρίζουν την προεξέχουσα βάση, αμέσως μετά την αλληλουχία 'CCA', και ορισμένα στοιχεία της αλληλουχίας που εντοπίζεται στη θηλιά του αντικωδικονίου, με αποτέλεσμα να καθοδηγούν τη φόρτιση των tRNA μορίων με τα κατάλληλα αμινοξέα. Τα γονίδια ορισμένων tRNA μορίων περιέχουν εσώνια (το 7% στον άνθρωπο) και η πλήρης ωρίμανσή τους απαιτεί την αποκοπή τους<sup>28</sup>.

### **Μη τυπικές λειτουργίες των tRNA μορίων**

Πέρα από τον κεντρικό τους ρόλο στην πρωτεϊνοσύνθεση τα tRNA μόρια συμμετέχουν σε πληθώρα διαδικασιών στους ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς και στα αρχαία. Στα βακτήρια, τα tRNA μόρια προσδένονται στην Hfq πρωτεΐνη που προσδένει RNA και συμμετέχουν στη ρύθμιση των μικρών μη κωδικών μορίων που συμμετέχουν στην αποσιώπηση ορισμένων mRNAs, υπό στρεσογόνες συνθήκες. Επί παραδείγματι, το tRNA<sup>Gly</sup> αποτελεί ένα δομικό στοιχείο του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ το αμινοξύ φαινυλαλανίνη μαζί με το tRNA μόριο που το φέρει και το αμινοξύ λευκίνη μαζί με το tRNA του, αποτελούν υποστρώματα των αμινο-ακυλοτρανσφερασών, οι οποίες προσδένουν τη λευκίνη ή τη φαινυλαλανίνη στο αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών. Αυτή η σύνδεση επιτρέπει τη σήμανση και τη στόχευση των πρωτεϊνών προς αποικοδόμηση. Ακόμη, τα tRNA<sup>Lys</sup> και tRNA<sup>Ala</sup> χρησιμοποιούνται στην αμινοακυλίωση των μεμβρανικών λιπιδίων, ώστε να ελέγχεται η κυτταρική διαπερατότητα για τα κατιονικά αντιβιοτικά<sup>28</sup>.

Επιπροσθέτως, τα tRNA μόρια φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στη σηματοδότηση υπό στρεσογόνες συνθήκες. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί η λανθασμένη σύζευξη του αμινοξέος της μεθειονίνης με tRNA μόρια που κανονικά δεν θα



έπρεπε να την φέρουν. Στα κύτταρα των θηλαστικών αυτή η αντίδραση επιτελείται σε ποσοστό 1% και αυξάνεται έως 10% σε περιπτώσεις ιογενούς λοίμωξης ή έκθεσης σε οξειδωτικό στρες. Το ερέθισμα του αυξημένου οξειδωτικού φορτίου επάγει τη λανθασμένη σύζευξη μεθειονίνης και στην *E.coli* και στο ζυμομύκητα., άρα αποτελεί μια συντηρημένη απόκριση σε τέτοιες συνθήκες. Παρά το γεγονός ότι η ενίσχυση της ενσωμάτωσης της μεθειονίνης σε άλλα tRNA μόρια αυξάνει τη συσσωμάτωση των πεπτιδίων και πρωτεϊνών, ο ωφέλιμος ρόλος της διαδικασίας αυτής βρίσκεται στην προστασία που παρέχει έναντι των οξειδωτικών συνθηκών. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι οι δραστηκές ρίζες οξυγόνου εξουδετερώνονται από την μεθειονίνη, λόγω της δημιουργίας συμπλόκων με τις πρωτεΐνες που επιτελούν την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια, για να αντιρροπήσουν τα αυξημένα οξειδωτικά επίπεδα εντός της μεμβράνης του μιτοχονδρίου <sup>28</sup>.

### **Τροποποιήσεις και θραύση των tRNA μορίων**

Για να επιτελέσουν τη βιολογική τους λειτουργία, τα tRNA μόρια θα πρέπει να υποστούν μια σειρά μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων. Ο τύπος και ο αριθμός των τροποποιήσεων μπορεί να ποικίλλει ανάμεσα στα διάφορα tRNAs. Η βιολογική σημασία των τροποποιήσεων σχετίζεται τόσο με τη συνεισφορά τους στην αναδίπλωση των μορίων στο χώρο όσο και με τη βελτιστοποίηση των αλληλεπιδράσεων με άλλα μοριακά σύμπλοκα (όπως για παράδειγμα η αλληλεπίδραση κωδικονίου-αντικωδικονίου εντός του ριβοσώματος).

Από τις 170 RNA τροποποιήσεις που έως σήμερα είναι γνωστές, οι 93 βρίσκονται στα tRNA μόρια αλλά η συχνότητα και η διασπορά τους ποικίλλει ανάμεσά τους. Η ψευδοοϋριδίνη αποτελεί την πιο άφθονη νουκλεοτιδική τροποποίηση των μορίων αυτών και εντοπίζεται κυρίως στη θέση 55 της θηλιάς του T βραχίονα. Εξίσου άφθονη είναι και η τροποποίηση m1A τόσο στα mRNA όσο και στα tRNA μόρια. Η μεθυλίωση του καταλοίπου της αδενίνης στη θέση 58 συνιστά μια εξελικτικά συντηρημένη τροποποίηση. Οι παραπάνω μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις συνεισφέρουν στη δομική σταθερότητα της τεταρτοταγούς δομής των tRNA μορίων <sup>29</sup>.

Η απαμινάση της αδενοσίνης (ADAT) δρα στα μεταφορικά RNA μόρια, tRNAs, καταλύοντας την απαμίνωση της αδενοσίνης σε ιωσίνη στην πρώτη θέση των αντικωδικονίων. Στα θηλαστικά, οι απαμινάσες τροποποιούν οκτώ διαφορετικά tRNAs και η αναγνώριση των υποστρωμάτων τους βασίζεται στη στερεοδιαμόρφωση των τελευταίων.

Φαίνεται ότι η ανθρώπινη απαμινάση μπορεί να ανασταλεί *in vitro* από τα θραύσματα των tRNA μορίων, tRFs <sup>30</sup>.

Η ιωσίνη στη 1<sup>η</sup> θέση του αντικωδικονίου των tRNAs (θέση 34, Wobble θέση) επιτρέπει την αναγνώριση τριών διαφορετικών νουκλεοτιδίων: της κυτιδίνης, της ουριδίνης και της αδενοσίνης στην 3<sup>η</sup> θέση του κωδικονίου, αυξάνοντας την ικανότητα αποκωδικοποίησης των tRNAs (Crick 1966; Piñeyro et al. 2014). Ως αποτέλεσμα η τροποποίηση I34 μπορεί να αλλάξει τη διαθεσιμότητα των tRNAs για κάθε κωδικόνιο, γεγονός που αναδεικνύει έναν συσχετισμό ανάμεσα στη χρήση των κωδικονίων και τον αριθμό των αντιγράφων των tRNA γονιδίων στα θηλαστικά. Έχει προταθεί ότι η I34 ενισχύει την απόδοση και την ακρίβεια της μετάφρασης, ειδικά για mRNAs τα οποία είναι εμπλουτισμένα σε κωδικόνια που μπορούν να μεταφραστούν από I34-tRNAs <sup>30</sup>.

Η ανθρώπινη απαμινάση της αδενοσίνης (ADAT) αναγνωρίζει ως υποστρώματα τα εξής 8 tRNAs: tRNA<sup>Thr-AGU</sup>, tRNA<sup>Ala-AGC</sup>, tRNA<sup>Pro-AGG</sup>, tRNA<sup>Ser-AGA</sup>, tRNA<sup>Leu-AAG</sup>, tRNA<sup>Ile-AAU</sup>, tRNA<sup>Val-AAC</sup>, tRNA<sup>Arg-ACG</sup>.

Η μεθυλίωση της κυτοσίνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πορεία θραύσης των tRNA μορίων και στους ανώτερους ευκαρυωτικούς η ενσωμάτωση της πραγματοποιείται από την NSUN1 ή την DNMT2. Η DNMT2 μεθυλιώνει τα tRNA<sup>Val-AAC</sup>, tRNA<sup>Gly-GCC</sup> και tRNA<sup>Asp-GTC</sup>. Σε πειραματόζωα που είναι μεταλλαγμένη η DNMT2 εκλείπουν τα σημάδια μεθυλίωσης και παρατηρείται αύξηση των θραυσμάτων που προέρχονται από τα συγκεκριμένα tRNA μόρια. Επομένως, η μεθυλίωση από την DNMT2 λειτουργεί ως προστατευτικό σημάδι και αποτρέπει τη θραύση των tRNA μορίων. Αντίστοιχη είναι και η δράση της NSUN2 που μέσω της μεθυλίωσης αποτρέπει τη θραύση των tRNA μορίων από τη ριβονουκλεάση αγγειογενίνη <sup>29</sup>.

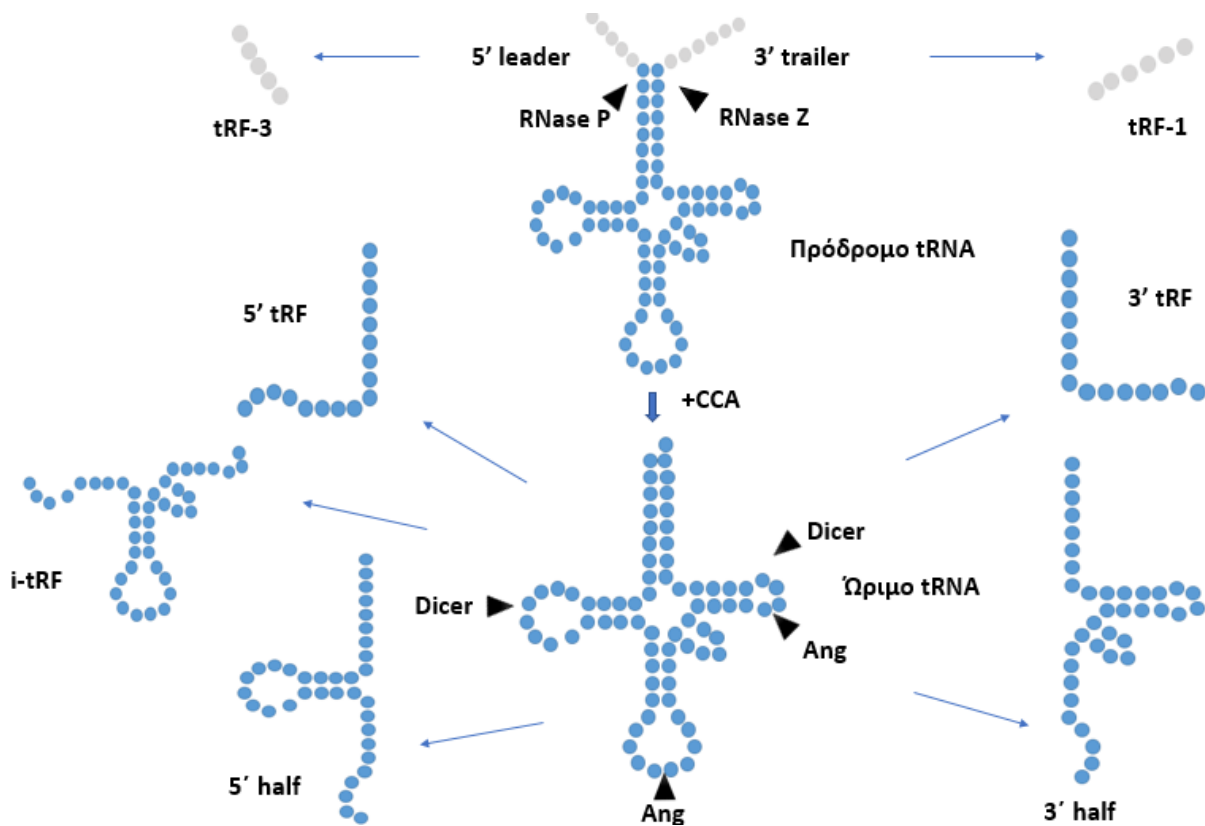
#### 1.4.5 tRFs βιογένεση

Η δύναμη των σύγχρονων μεθοδολογιών αλληλούχησης και οι τεχνολογίες των μικροσυστοιχιών έχουν δώσει τη δυνατότητα για καλύτερη μελέτη του μεταγραφώματος και ειδικότερα του μη κωδικού. Για παράδειγμα, οι πλατφόρμες Illumina, SOLiD και 454 είναι ισχυρά εργαλεία για την ανάλυση των μη κωδικών RNAs σε διάφορους οργανισμούς <sup>31</sup>. Μια αναδυόμενη ομάδα μικρών μη κωδικών RNA είναι και τα θραύσματα που προκύπτουν από τα tRNA μόρια, τα οποία έχουν εντοπιστεί σε ένα μεγάλο εύρος

οργανισμών από την *E.coli* έως τα θηλαστικά. Τα tRFs και τα t-halves (tiRNAs) (ή tiRNAs) συγκροτούν το σύνολο των θραυσμάτων που προέρχονται από τα tRNAs.

Τα tRFs αποτελούν μικρά μη κωδικά μόρια RNA μήκους 14-40 νουκλεοτιδίων και υποδιαιρούνται σε τρεις κύριες κατηγορίες: 5'-tRFs, 3'-tRFs, tRF-1. Οι δυο πρώτες ομάδες θραυσμάτων προέρχονται από τα ώριμα tRNAs μέσω ενδονουκλεολυτικής διάσπασης και εξωνουκλεολυτικής πέψης, αντίστοιχα, ενώ η κατηγορία tRF-1 προέρχεται από το 3' άκρο των πρόδρομων tRNA μορίων. Το μέγεθος των 5'-tRFs θραυσμάτων εμφανίζει ένα πρότυπο κανονικής κατανομής το οποίο κυμαίνεται από τα 15 έως τα 25 νουκλεοτίδια, με αποτέλεσμα να έχουμε μια περαιτέρω υποδιαίρεση σε 5a'-tRFs (14-16 νουκλεοτίδια), 5b'-tRFs (22-24 νουκλεοτίδια) και 5c'-tRFs (28-30 νουκλεοτίδια). Τα διαφορετικά αυτά μεγέθη οφείλονται στις διαφορετικές θέσεις θραύσης των tRNA μορίων στη D-θηλιά τους ή στην ενδιάμεση περιοχή της D-θηλιά και της θηλιάς του αντικωδικονίου. Σε αντίθεση με τα 5'-tRFs, το μέγεθος των 3'-tRFs παρουσιάζει ένα μικρότερο εύρος από 13 έως 22 νουκλεοτίδια και διακρίνονται σε 3a'-tRFs και 3b'-tRFs, με τις θέσεις θραύσεις των tRNA μορίων από τα οποία προέρχονται να είναι στη θηλιά TψC. Ως μια καινούργια κατηγορία των tRFs θεωρείται η ομάδα των tRF-2, η οποία περιλαμβάνει τις περιοχές της θηλιάς του αντικωδικονίου. Τέλος, στα tRFs ανήκει και η ομάδα των i-tRFs, της οποίας τα θραύσματα κυρίως προέρχονται από την ενδιάμεση περιοχή των tRNA ώριμων μορίων <sup>32</sup>.

Τα t-halves (tiRNAs) επάγονται κάτω από συνθήκες στρες ή ανεπάρκειας θρεπτικών, καθώς η αγγειογενίνη (στις ζύμες η ομόλογη της είναι η RNY1) διαμεσολαβεί τη θραύση των ώριμων tRNA μορίων στην περιοχή της θηλιάς του αντικωδικονίου. Το μήκος αυτών των θραυσμάτων είναι 31-40 νουκλεοτίδια <sup>32</sup>.



Εικόνα 5. Πορεία βιογένεσης των θραυσμάτων που προέρχονται είτε από ώριμα είτε από πρόδρομα tRNA και οι ριβονουκλεάσες που συμμετέχουν (αυτοσχέδια εικόνα).

#### 1.4.6 tRFs/t-halves (tiRNAs) (ή tiRNAs) βιολογικοί ρόλοι

##### Μηχανισμοί δράσης των tRFs και των tiRNAs

##### 1. Αλληλεπίδραση των θραυσμάτων με πρωτεΐνες και mRNA μόρια

Τα tRFs/tiRNAs διαδραματίζουν πολλαπλούς ρόλους μέσω διάφορων μηχανισμών όπως οι αλληλεπιδράσεις τους με πρωτεΐνες και mRNA μόρια, η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η ρύθμιση της χρωματίνης και οι επιγενετικές τροποποιήσεις. Ακόμη, ο Torres και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι η διαφορική έκφραση των tRNA γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της αφθονίας των tRFs, δίχως να επηρεάζεται η αφθονία των ώριμων tRNA μορίων. Αυτή η παρατήρηση τονίζει ότι οι διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των tRNA γονιδίων τροποποιεί την ικανότητα των tRFs να πραγματοποιούν μη κανονικές λειτουργίες των tRNAs. Αλληλεπιδρώντας με πρωτεΐνες ή mRNAs τα θραύσματα αναστέλλουν τη μετάφραση με μια ποικιλία τρόπων. Τα θραύσματα μπορεί να αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω αποδιοργάνωσης των ριβοσωμάτων. Στο αλόφιλο αρχαίο, *Halophilic volcanii*, υπό στρεσογόνες συνθήκες παράγεται ένα 5'-tRF

από το tRNA<sup>Val</sup>, το οποίο προσδέεται στη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα και αναστέλλει την ενεργότητα της πεπτιδυλο-τρανσφεράσης, με αποτέλεσμα την αποδυνάμωση της μετάφρασης<sup>33</sup>.

Στα φυτά τα θραύσματα 5'-tiRNA<sup>Ala</sup> και 5'-tiRNA<sup>Cys</sup> φέρουν ένα μοτίβο ολιγο-γουανινών (TOG motif) που αναστέλλει τη μετάφραση μέσω σχηματισμού τετραπλών υπερδομών RNA, τα οποία αντικαθιστούν το εναρκτήριο σύμπλοκο της μετάφρασης eIF4G/eIF4E επάνω στη δομή του 5' καλύμματος των mRNA μορίων. Ακόμη, οι ερευνητές έχουν αναφέρει ότι η πρόσδεση του TOG μοτίβου που υπάρχει στα 5'-tiRNAs στην πρωτεΐνη YBX1 επάγει τον σχηματισμό των στρεσογόνων συσσωμάτων, την "απομόνωση" των παραγόντων έναρξης της μετάφραση από τα ριβοσώματα και εν τέλει οδηγεί στην αναστολή της μετάφρασης συνολικά<sup>34</sup>.

## 2. Ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης

Η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για tRNA μόρια είναι ιστοειδική και μπορεί να ρυθμίσει την αφθονία των tRFs. Σε μελέτη που διενεργήθηκε φάνηκε ότι τα μισά γονίδια των tRNA εμφανίζουν είτε χαμηλή είτε καθόλου έκφρασή τους. Συγκεκριμένα, το tRF-3006 φαίνεται να αλληλεπιδρά με το tRNA<sup>Lys</sup>, από το οποίο προέρχεται και σε ανθρώπινα κύτταρα που είναι μολυσμένα από τον ιό HIV-1 αναστέλλει τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής του λόγω απουσίας του ελεύθερου tRNA<sup>Lys</sup> που δρα ως εκκινήτης για την παραγωγή cDNA από το RNA του ιού. Περαιτέρω το tRF-3006 προάγει την καταστολή του ιού μέσω της αλληλεπίδρασης με την DICER και την AGO2<sup>31</sup>.

Τα 3'-tRFs και τα 5'-tRFs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση, μέσω αλληλεπίδρασης με τις PIWI πρωτεΐνες και τις AGO<sup>35</sup>. Το θραύσμα που προέρχεται από το tRNA<sup>Gly-GCC</sup> και βρίσκεται σε αφθονία στο σπέρμα φαίνεται να καταστέλλει την έκφραση περίπου 70 γονιδίων που σχετίζονται με τον ενδογενή παράγοντα αντίστροφης μεταγραφής MERVL-σχετιζόμενο με έμβρυα και βλαστοκύτταρα. Η τάση των 5'-tRFs να προσδέονται στην AGO1 και όχι στην AGO2 συνδέεται με την μετα-μεταγραφική αποσιώπηση του RNA<sup>35</sup>. Η PIWI πρωτεΐνη, Twi12, αλληλεπιδρά με το tRF-3 και τα σύμπλοκα αυτά δρουν συνεργιστικά με την Xrn2 και τη Tan1 για τη ρύθμιση της επεξεργασίας του rRNA<sup>34</sup>.

Στα ανθρώπινα μονοκύτταρα, συγκριτικά με τα δενδριτικά, το θραύσμα που προέρχεται από το tRNA<sup>Glu</sup> που αλληλεπιδρά με PIWI πρωτεΐνες εκφράζεται εντονότερα. Η ρύθμιση της ενεργότητας της RNA πολυμεράσης III επιτρέπει στην ιντερλευκίνη 4 (IL-4) να μειώσει αποτελεσματικά την παραγωγή του tRNA<sup>Glu</sup> και κατ' επέκταση του θραύσματός του.

### 3. Ρύθμιση των επιγενετικών τροποποιήσεων

Φαίνεται ότι οι διαιτητικές συνήθειες του πατέρα μπορεί να επηρεάζουν τον μεταβολισμό του νεογέννητου<sup>36</sup>. Χρησιμοποιώντας ως πειραματόζωα αρσενικά ποντίκια, τα οποία έχουν ακολουθήσει δίαιτα πλούσια σε λιπαρά και μελετώντας τους απογόνους φάνηκε ότι εκδηλώνουν ινσουλινο-αντίσταση, 7 εβδομάδες μετά τη γέννησή τους, η οποία γίνεται πιο σοβαρή μετά τις 15 εβδομάδες. Το φαινόμενο αυτό στα πειραματόζωα ποντίκια προκαλείται από θραύσματα μεγέθους 30-34 νουκλεοτιδίων. Με έγχυση των θραυσμάτων που προέρχονται από tRNAs στο σπέρμα των αρσενικών ποντικών με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, τα προφίλ έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με μεταβολικά μονοπάτια στα εμβρυονικά κύτταρα τροποποιούνται σημαντικά. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν την επίδραση της διατροφής στα tRFs που εντοπίζονται στο σπέρμα<sup>37</sup>. Επομένως, στο σπέρμα ενυπάρχει μια ποικιλία γενετικών υλικών που μπορούν να διαβιβάσουν τη γενετική πληροφορία στις επόμενες γενιές.

Ακόμη, το θραύσμα που προέρχεται από το tRNA<sup>Gly-GCC</sup> και εντοπίζεται στο σπέρμα αναστέλλει την έκφραση πολλών γονιδίων. Η φτωχή δίαιτα σε πρόσληψη πρωτεΐνης στα ποντίκια επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης των θραυσμάτων, ενώ ο αριθμός των 5'-tRFs από το tRNA<sup>Gly-GCC</sup> αυξάνεται. Στα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα και τα έμβρυα, τα θραύσματα αυτά αναστέλλουν λειτουργικά την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την ενδογενή αντίστροφη μεταγραφή. Επίσης, το θραύσμα που προκύπτει από το tRNA<sup>Glu-TTC</sup> φαίνεται να δρα ως δυνητικός νέος επιγενετικός ρυθμιστής για την παραγωγή λίπους<sup>38</sup>.

### 4. Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Τα πειράματα αποσιώπησής του tRF-1001 φανέρωσαν ότι εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την καθήλωση των κυττάρων στη φάση G2 και την αναστολή της σύνθεσης του DNA<sup>39</sup>. Το θραύσμα αυτό σχετίζεται με τις πρωτεΐνες AGO3 και AGO4. Ορισμένα θραύσματα προσδένονται με το κυτόχρωμα C και αναστέλλουν την πρόσδεση του στον APAF-1 και αποτρέπουν την ενεργοποίηση της κασπάσης-9, η οποία αναστέλλει το σχηματισμό των αποπτωτικών σωματίων άρα και την απόπτωση.

Στα φυσιολογικά κύτταρα, τα θραύσματα δρουν ως ενδογενή αποπτωτικά σήματα, τα οποία καταστέλλουν σχετικές αποπτωτικές πρωτεΐνες. Όταν τα κύτταρα υπόκεινται σε στρες, τα επίπεδα των θραυσμάτων αυξάνονται με αποτέλεσμα την απορρύθμιση των αποπτωτικών διαδικασιών και τη διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων. Επίσης, η ανεπάρκεια της tRNA μεθυλοτρανσφεράσης, TRMT10A, που

διαμεσολαβείται από τα θραύσματα 5'-tRFs του tRNA<sup>Gln</sup> και επάγει τον θάνατο των παγκρεατικών β-κυττάρων<sup>34</sup>.

## 5. Ρύθμιση της χρωματίνης

Ο πυρηνικός εντοπισμός των 5'-tRFs και η αλληλεπίδρασή τους με τις πρωτεΐνες Αργοναύτες προτείνουν ότι ένας ακόμη ρόλος των θραυσμάτων αυτών σχετίζεται με τη ρύθμιση της χρωματίνης<sup>34</sup>.

### 1.4.7 tRFs και καρκίνος

#### Στον καρκίνο του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί τον πιο συχνό τύπο καρκίνου παγκοσμίως και πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν τη σημασία των ts-4521 και ts-3676, τα οποία προκύπτουν από τα tRNA<sup>Ser</sup> και tRNA<sup>Thr</sup>, αντίστοιχα<sup>40</sup>. Τα θραύσματα αυτά αλληλεπιδρούν τόσο με τις πρωτεΐνες AGO1 και AGO2 αλλά και με την Piwil2 πρωτεΐνη<sup>41</sup>. Ακόμη, η μελέτη των επιπέδων έκφρασής τους έδειξε την υποέκφρασή τους σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα συγκριτικά με τους παρακείμενους υγιείς ιστούς. Η υποέκφραση του ts-4521 σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τα σηματοδοτικά μονοπάτια της απόπτωσης. Στην εξέλιξη του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC) φαίνεται να συνεισφέρει η υπερπαραγωγή του θραύσματος που προέρχεται από το tRNA<sup>Leu-CAG</sup>, διότι επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προωθεί τον κυτταρικό κύκλο<sup>42</sup>.

#### Στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του καρκίνου παχέος εντέρου είναι ο τρίτος συχνότερος καρκίνος στον Δυτικό κόσμο και η επίπτωσή του αυξάνεται σε μεγαλύτερες ηλικίες. Ο Huang και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι το tRF/miR-1280, το οποίο είναι ένα θραύσμα μήκους 17nt που προέρχεται από το tRNA<sup>Leu</sup>, εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch και προάγει τη δράση των καρκινικών κυττάρων που ομοιάζουν με βλαστοκύτταρα (CSCs). Η μειωμένη έκφραση του tRF/miR-1280 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι ο συνδέτης JAG2 που συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch προσδέεται απευθείας στο tRF/miR-1280, περιορίζοντας τον σχηματισμό και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων<sup>43</sup>. Επομένως, το συγκεκριμένο θραύσμα και η απενεργοποιητική δράση του για το μονοπάτι Notch οδηγεί στην αναστολή του CSC φαινοτύπου, μέσω μεταγραφικής αποσιώπησης για τα γονίδια που κωδικοποιούν το miR-200b και το Gata1/3<sup>42</sup>. Πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι η μείωση των επιπέδων

του miR-200b και η αύξηση των επιπέδων των JAG2, Zeb1, Suz12, Gata1 και Gata3 σε δείγματα ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του παχέος εντέρου. Αυτά τα ευρήματα εξηγούν τη δράση του θραύσματος tRF/miR-1280 στην επαγωγή της έντονης σηματοδότησης του μονοπατιού Notch <sup>43</sup>.

### **Στον καρκίνο του προστάτη**

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί την έκτη πιο συχνή νεοπλασία παγκοσμίως και τη δεύτερη σε συχνότητα στο αντρικό φύλο. Τα επίπεδα έκφρασης των περισσότερων tRFs εμφάνιζαν διαφοροποίηση ανάμεσα στους όγκους και στους παρακείμενους γειτονικούς ιστούς. Τα περισσότερα tRFs προέρχονται από το 5' και 3' άκρο των ώριμων κυτταροπλασματικών tRNAs, με τα πιο άφθονα στις κυτταρικές σειρές προστάτη να είναι τα 5'-tRFs. Έχει παρατηρηθεί μια αντίστροφη σχέση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των 5'-tRFs και των 3'-tRFs, με την πρώτη κατηγορία να εμφανίζει υπερέκφραση και τη δεύτερη να είναι σημαντικά υποεκφρασμένη στον καρκίνο του προστάτη. Ο λόγος των θραυσμάτων που προκύπτουν από τα tRNA<sup>Lys-CTT</sup> και tRNA<sup>Phe-GAA</sup> φαίνεται να είναι χρήσιμος βιοδείκτης για την επιβίωση των ασθενών <sup>44</sup>. Το tRF-1001 έχει συσχετισθεί με το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων του προστάτη. Μελέτες αποσιώπησης της έκφρασης του θραύσματος tRF-1001 έχουν αποδείξει την καθήλωση των κυττάρων στη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου, την αναστολή της σύνθεσης του DNA και την μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας <sup>39</sup>. Επιπροσθέτως, η αλληλούχηση του ολικού μεταγραφώματος των μικρών μη κωδικών μορίων στους καρκινικούς ιστούς προστάτη και στους μεταστατικούς λεμφαδένες αποκάλυψε ότι οι προς έλεγχο λεμφαδένες είναι εμπλουτισμένοι με θραύσματα που προκύπτουν από τα tRNA μόρια. Η διαφοροποίηση στο μέγεθος των θραυσμάτων που προκύπτουν από tRNA μόρια σε δείγματα ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του προστάτη και εμφανίζουν είτε μεταστατική νόσο (μήκος θραυσμάτων περίπου 27) είτε εντοπισμένη (μήκος θραυσμάτων περίπου 18), αναδεικνύει τη διαφορετική θραύση των tRNA μορίων στους φυσιολογικούς ιστούς. Μια ακόμη σημαντική παρατήρηση είναι ο εμπλουτισμός των καρκινικών κυτταρικών σειρών σε θραύσματα τα οποία φαίνεται να επάγονται με ορμονοεξαρτώμενο τρόπο <sup>45</sup>.

### **Στον καρκίνο του μαστού**

Ένας ακόμη ορμονοεξαρτώμενος καρκίνος είναι αυτός του μαστού και η μελέτη του Honda και των συνεργατών επισήμανε την επαγωγή των t-halves (thalves ή tiRNAs), λόγω του υποδοχέα των οιστρογόνων, σε κυτταρικές σειρές για τον υπότυπο ER+ του καρκίνου του



μαστού. Η έκφραση των 5'-tiRNA<sup>Asp</sup> και 5'-tiRNA<sup>His</sup> είναι σημαντικά αυξημένη σε ιστούς ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του μαστού ή σε κυτταρικές σειρές, συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου<sup>45</sup>. Στον καρκίνο του μαστού, τα θραύσματα των tRNA μορίων ρυθμίζονται μέσω μονοπατιών που εμπλέκουν τα προϊόντα των ογκογονιδίων. Επίσης, η έκφραση ορισμένων θραυσμάτων διαφοροποιείται ανάλογα με τα στάδια της καρκινογένεσης. Για παράδειγμα, το ts-3 παρουσιάζει σημαντικά μειωμένη έκφραση στις κυτταρικές σειρές που προσομοιάζουν διηθητικά στάδια της νόσου, ενώ τα ts-6, ts-48 και ts-67 υπερεκφράζονται σε κυτταρικές σειρές προχωρημένων σταδίων<sup>46</sup>.

Τα tRFs που προέρχονται από τα tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup> και tRNA<sup>Glu</sup> προσδένονται με την πρωτεΐνη YBX1 και ανταγωνίζονται με ενδογενή μετάγραφα ογκογονιδίων για αυτή την πρόσδεση. Άρα η ανταγωνιστική πρόσδεση των θραυσμάτων στην YBX1 οδηγεί στην αποσταθεροποίηση των μεταγράφων που προκύπτουν από ογκογονίδια και εν τέλει στην αναστολή της ανάπτυξης του καρκίνου στον μαστικό αδένα, λόγω της μετα-μεταγραφικής δράσης στη γονιδιακή ρύθμιση των θραυσμάτων. Όπως προαναφέρθηκε η συνδυαστική δράση των t-halves (tiRNAs) με την YBX1 μπορεί να αναστείλει και την μετάφραση<sup>42</sup>.

### **Στον καρκίνο των ωθηκών**

Όπως και στον καρκίνο του μαστού, το φαινόμενο της γονιδιακής ρύθμισης μέσω των tRFs παρατηρείται και στον καρκίνο των ωθηκών. Συγκεκριμένα, το θραύσμα που προκύπτει από tRNA<sup>Glu</sup> προσδέεται απευθείας στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) του mRNA που κωδικοποιεί για την BCAR3 πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα την μείωση της έκφρασής του<sup>47</sup>. Με αυτόν τον τρόπο το θραύσμα αυτό μπορεί να επηρεάσει την πολλαπλασιαστική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων που αναπτύσσονται στην ωθήκη. Αυτές οι βιολογικές δράσεις των tRFs είναι εξαρτώμενες από τις πρωτεΐνες Αργοναύτες. Η ανάλυση των tRFs σε δεδομένα πειραμάτων AGO-CLIP ανέδειξε την αλληλεπίδρασή τους με τις πρωτεΐνες Αργοναύτες και την αναγνώριση ειδικών RNA μορίων στόχων. Ειδικότερα, το θραύσμα που προκύπτει από tRNA<sup>Glu</sup> αλληλεπιδρά με την AGO1 και το σύμπλοκο που σχηματίζεται υβριδοποιείται με το mRNA στόχο<sup>47</sup>.

### **Στο λέμφωμα των Β-κυττάρων**

Το πλέον χαρακτηρισμένο θραύσμα (tRF) για το συγκεκριμένο καρκίνο του αιμοποιητικού συστήματος έχει ονομαστεί CU1276 και η δράση του είναι όμοια με των miRNA μορίων. Στις κύριες βιολογικές δράσεις του περιλαμβάνονται η πρόσδεση σε πρωτεΐνες Αργοναύτες, ύστερα από την επίδραση της Dicer, και η καταστολή της μεταγραφής με αλληλουχιο-

εξαρτώμενο τρόπο. Το CU1276 αναστέλλει τον ενδογενή απαραίτητο γονιδιακό διπλασιασμό με τελικό προϊόν την RPA1<sup>48</sup>. Το γονίδιο *RPA1* είναι σημαντικό για την κινητική των διαδικασιών, όπως η αντιγραφή του γενωμικού DNA. Ακόμη, η επαγωγή της σταθερής έκφρασης του CU1276 αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με τρόπο που εξαρτάται από την RPA1 σε κυτταρικές σειρές για το λέμφωμα Burkitt. Τα ιστοτεμάχια που προκύπτουν από τη βιοψία και οι κυτταρικές σειρές λεμφώματος αποκαλύπτουν τη μειωμένη έκφραση του CU1276. Τα δεδομένα από πειράματα αποσιώπησης του CU1276 και τα αυξημένα επίπεδα της RPA1 πρωτεΐνης μπορούν να επάγουν την αύξηση των νεοπλασματικών κυττάρων. Επομένως, το CU1276 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στο B-λέμφωμα και ρυθμίζει την απόκριση των μορίων στο μηχανισμό επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA<sup>48</sup>.

### **Στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία**

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία επηρεάζει την λευκοκυτταρική σειρά και αφορά κυρίως άτομα άνω των 60 ετών. Τα θραύσματα ts-3676 και ts-4521 φέρουν μεταλλάξεις και είναι σημαντικά μειωμένη η παραγωγή τους στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία<sup>40</sup>. Όπως ήδη είναι γνωστό, τα σύμπλοκα piRNA-Piwi πρωτεϊνών μπορούν να ρυθμίσουν τη μεθυλίωση του DNA και τα piRNAs εμφανίζουν ορισμένες παρόμοιες ιδιότητες με τα θραύσματα που προέρχονται από τα tRNA μόρια. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι τόσο το ts-3676 όσο και το ts-4521 προσδέονται στην πρωτεΐνη Piwil2. Τα ts-101, ts-53, ts-46 και ts-47 υποαντιπροσωπεύονται στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία<sup>46</sup>. Το ενεργοποιημένο πρωτο-ογκογονίδιο *MYC* στα λεμφοκύτταρα αναστέλλει τα επίπεδα του ts-47. Το ts-46 φαίνεται να ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω αναστολής του μονοπατιού SIP/κεραμίδιο και σε πειράματα αποσιώπησης του αποδείχθηκε ότι η σηματοδότηση από την κινάση που συνδέεται με ιντεγκρίνη (ILK), η οποία εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του όγκου και στη μετάσταση, ενισχύθηκε<sup>49</sup>.

## ΣΚΟΠΟΣ

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως αποτελεί σημαντικό πρόβλημα υγείας, ιδιαίτερα για τον αντρικό πληθυσμό, και προβληματίζει τα συστήματα υγείας, λόγω της μετεγχειρητικής παρακολούθησης των ασθενών και του αυξημένου ρυθμού υποτροπής. Η παρούσα διπλωματική εργασία εστίασε στη μελέτη της έκφρασης μιας κατηγορίας μη κωδικών μορίων RNA, tRFs/t-halves (tiRNAs) και στη διασύνδεσή τους με το οξειδωτικό στρες. Η ομογενοποίηση ιστών, η απομόνωση ολικού RNA, ο σχεδιασμός εκκινητών, οι βελτιστοποιήσεις πρωτοκόλλων πολυαδενυλίωσης και αντίστροφης μεταγραφής καθώς και η διεξαγωγή πειραμάτων ποσοτικής PCR (qPCR) πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της μελέτης των επιπέδων έκφρασης των tRFs/t-halves (thalves ή tiRNAs), για τα μελετώμενα μόρια tRFs/t-halves (tiRNAs). Επιχειρήθηκε η διερεύνηση τριών εξ αυτών με κλινικοπαθολογικά δεδομένα και η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan Meier, μέσω της στατιστικής ανάλυσης με το πρόγραμμα SPSS. Ακόμη, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *GSTP1*, *SOD2*, *NRF2* που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, προκειμένου να παρατηρηθεί η σχέση των τριών μιτοχονδριακών t-halves (tiRNAs) με σημαντικά αντιοξειδωτικά συστήματα. Τέλος, η βιοπληροφορική μελέτη των πιθανών στόχων των t-halves (tiRNAs) επέτρεψε τη λειτουργική ανάλυση ως προς τον βιολογικό τους ρόλο.

## 2.Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Βιολογικό Υλικό

Για την πραγματοποίηση της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας αξιοποιήθηκαν δείγματα ασθενών, τα οποία προήλθαν από την Α' Πανεπιστημιακή Ουρολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Λαϊκό». Η συγκεκριμένη βιοτράπεζα, στο διάστημα πραγματοποίησης της παρούσας εργασίας, κατά κύριο λόγο περιλάμβανε απομονωμένο ολικό RNA ιστών και για την εκπαίδευση στο πρωτόκολλο ομογενοποίησης χρησιμοποιήθηκαν 10 ακέραιοι ιστοί. Στο πλαίσιο της εργασίας, φωτομετρήθηκε εκ νέου το ολικό RNA, για την εύρεση κατάλληλης ποσότητας ολικού RNA, που θα απέδιδε τα βέλτιστα αποτελέσματα στα πρωτόκολλα πολυαδενυλίωσης και αντίστροφης μεταγραφής και πραγματοποιήθηκαν 120 αντιδράσεις των παραπάνω πρωτοκόλλων. Οι μονόκλωνες αλυσίδες cDNA που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα για τη μελέτη της έκφρασης των μη κωδικών μορίων, με πειράματα qPCR (για 120 δείγματα ασθενών). Η στατιστική ανάλυση περιλαμβάνει τιμές για 114 δείγματα, καθώς αποκλείστηκαν έξι τιμές που εκτιμήθηκαν ως αναξιόπιστες, από τα πειράματα qPCR. Τέλος, για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *GSTP1*, *SOD2*, *NRF2* χρησιμοποιήθηκαν 60 δείγματα της βιοτράπεζας (53 εκ των οποίων παρουσίασαν τις πιο αξιόπιστες τιμές), στα οποία είχε ήδη προηγηθεί η μελέτη των ncRNAs (άρα συνολικά πραγματοποιήθηκαν 180 αντιδράσεις ποσοτικής qPCR)

### 2.2 Ομογενοποιήσεις ιστών

#### Αρχή μεθόδου

Η ομογενοποίηση των ιστών συντελείται σε υγρό άζωτο και με τη χρήση πολτοποιητή (γουδί) για να επιτευχθεί η κονιορτοποίησή τους. Αυτός ο κατακερματισμός των ιστοτεμαχίων επιτρέπει την αύξηση της στερεάς επιφάνειας που αντιδρά με το αντιδραστήριο TRIzol, με αποτέλεσμα τη διατάραξη των κυτταρικών μεμβρανών και την απελευθέρωση των κυτταρικών στοιχείων (RNA, DNA, πρωτεΐνες).

Βήματα ομογενοποίησης ιστοτεμαχίων:

1. Ψύξη των εργαλείων κονιορτοποίησης και των ιστοτεμαχίων σε υγρό άζωτο.
2. Υπολογισμός της μάζας του κάθε ιστοτεμαχίου σε ζυγό ακριβείας.
3. Μηχανική θραύση των κατεψυγμένων ιστοτεμαχίων με τη χρήση πολτοποιητή.

4. Συλλογή της προκύπτουσας σκόνης και προσθήκη του διαλύματος TRIzol για διατάραξη των κυτταρικών μεμβρανών.

5. Αναμονή 5min σε θερμοκρασία δωματίου για δράση του αντιδραστηρίου και στη συνέχεια είτε φύλαξη των δειγμάτων στους  $-80^{\circ}\text{C}$  είτε απευθείας απομόνωση του ολικού RNA.

Στο πλαίσιο της μεταπτυχιακής εκπαίδευσής, δόθηκαν 10 καρκινικοί ιστοί προς ομογενοποίηση για να την εφαρμογή του παραπάνω πρωτοκόλλου, διότι η διαθέσιμη βιοτράπεζα του εργαστηρίου διέθετε κυρίως RNA από τους καρκινικούς ιστούς, το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

### 2.3 Απομόνωση ολικού RNA

#### Αρχή μεθόδου

Το RNA αποτελεί ένα σημαντικό πολυμερές που συγκροτείται από τη σύνδεση με 3'-5' φωσφοδιεστερικό δεσμό των ριβονουκλεοτιδίων και μπορεί είτε να κωδικοποιεί για πρωτεΐνες είτε να παρουσιάζει ρυθμιστικό ρόλο. Η απομόνωση υψηλής καθαρότητας και ακεραιότητας ολικού RNA είναι σημαντική για την επιτυχία και των επακόλουθων πειραμάτων στα πλαίσια της μοριακής βιολογίας. Το αντιδραστήριο TRIzol επιτρέπει τη διατήρηση ακέραiou ολικού RNA, κατά την ομογενοποίηση των ιστών, ενώ την ίδια στιγμή επάγει τη διατάραξη των κυτταρικών μεμβρανών και λόγω της σύστασής του (μίγμα ισοθειοκυανικής γουανιδίνης-φαινόλης)<sup>50</sup>. Η προσθήκη χλωροφορμίου επιτρέπει τον διαχωρισμό του διαλύματος σε τρεις φάσεις: την υδατική, τη μεσόφαση και την οργανική φάση. Η οργανική φάση περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες, οι οποίες είναι διαλυτές στον οργανικό διαλύτη της φαινόλης, ενώ στη μεσόφαση εντοπίζεται η στιβάδα του DNA. Το RNA εντοπίζεται στην υδατική φάση και μετά την απομόνωσή της και την προσθήκη του διαλύματος ισοπροπανόλης κατακρημνίζεται<sup>51</sup>.

Βήματα απομόνωσης ολικού RNA:

1. Προσθήκη 1mL TRIzol διαλύματος για 20mg καρκινικού ιστού

**Για την κατακρήμνιση του RNA:**

2. Προθήκη 200μL διαλύματος χλωροφορμίου με τελικό αποτέλεσμα τη γαλακτοποίηση του μίγματος.
3. Ανάδευση έντονη και στη συνέχεια επώαση για 12min.
4. Πραγματοποίηση φυγοκέντρησης στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 15min στα 13.000rpm.

5. Από τις τρεις διαμορφωμένες φάσεις του διαλύματος γίνεται μεταφορά της υδατικής φάσης (ανώτερης στιβάδας) σε νέο σωλήνα.
6. Στην υδατική φάση που απομονώθηκε γίνεται προσθήκη 500μL διαλύματος ισοπροπανόλης.
7. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10min.
8. Η φυγοκέντρηση των μιγμάτων γίνεται στους 4° C για 10min στα 13.000rpm.

**Για τον καθαρισμό του ιζήματος RNA και την επαναδιαλυτοποίηση του:**

9. Ύστερα από απομάκρυνση του υπερκειμένου στο ίζημα που προκύπτει προστίθεται διάλυμα 70% (ή 75%) αιθανόλης για να πραγματοποιηθούν οι πλύσεις.
10. Φυγοκέντρηση 13.000rpm για 10min στους 4° C.
11. Απομάκρυνση του υπερκειμένου με σύριγγα και εν τέλει αφήνεται το ίζημα για ορισμένα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για πλήρη απομάκρυνση των μορίων της αιθανόλης (air-dry).
12. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε διάλυμα RSS και φύλαξη στους -80 °C.

#### **2.4 Φωτομετρήσεις δειγμάτων ολικού RNA**

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του ολικού RNA και την εκτίμηση της καθαρότητάς του χρησιμοποιείται η προσέγγιση της φασμαφωτομετρίας UV-ορατού.

Αρχικά, με 1μL διαλύματος RSS μηδενίζεται η απορρόφηση στο BioSpec-Nano (Shimadzu). Στη συνέχεια, εφαρμόζεται 1μL του δείγματος RNA και η απορρόφηση του επιτρέπει τον υπολογισμό της ποσότητας του ολικού RNA, ενώ με βάση τον λόγο της απορρόφησης στα 260nm/280nm που προκύπτει εκτιμάται η καθαρότητα που επετεύχθη ή πιθανή παρουσία προσμίξεων DNA/πρωτεϊνών. Οι αποδεκτές τιμές για την καθαρότητα κυμαίνονται στο εύρος 1,8-2,2.

#### **2.5 Πήκτωμα αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση για έλεγχο ακεραιότητας ολικού RNA**

Παρασκευάζεται πήκτωμα αγαρόζης 1,5% w/v με διαλυτοποίηση, σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1x, σκόνης αγαρόζης και με προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου. Για την προετοιμασία της φόρτωσης των δειγμάτων RNA στο πήκτωμα χρησιμοποιείται 1μg ολικού RNA, το οποίο αραιώνεται με δισαπεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 4μL και ακολουθεί η προσθήκη του διαλύματος φόρτωσης 2x RNA Loading Dye. Η ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x και σε συνθήκες 50Volt/ 50min.

## 2.6 Πρωτόκολλα πολυαδενυλίωσης και αντίστροφης μεταγραφής για μη κωδικά μόρια (miRNAs/tRFs/t-halves (thalves ή tiRNAs))

### Αρχή μεθόδου

Το μεταγράφομα των κυττάρων συγκροτείται από τα mRNA που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και τα μη κωδικά μόρια RNA. Η βασική δομική διαφοροποίηση των mRNAs και των lncRNAs από τα υπόλοιπα στοιχεία του μεταγραφώματος είναι η παρουσία της ουράς των αδενινών στο 3' άκρο τους. Ωστόσο, τα miRNAs και τα tRFs δε διαθέτουν αυτή την poly-A-ουρά. Στο πρωτόκολλο της πολυαδενυλίωσης, η πολυμεράση που χρησιμοποιείται και φυσιολογικά υπάρχει στην *Escherichia coli* προσθέτει κατάλοιπα αδενινών στα ώριμα miRNAs ή στα tRFs/t-halves (tiRNAs) με στόχο την απόκτηση μεγαλύτερου μεγέθους. Σε μια αντίδραση προσθήκης της poly-A-ουράς, το μέγεθός της εξαρτάται από τον χρόνο αντίδρασης, την ποσότητα του ενζύμου και τη συγκέντρωση του ATP. Το ένζυμο αυτό παρουσιάζει τη βέλτιστη απόδοση σε θερμοκρασία 37°C.

Στα δείγματα που πραγματοποιήθηκε η πολυαδενυλίωση προστίθεται ένας αντάπτορας oligo-δεοξυθυμινών για να πραγματοποιηθεί η σύνθεση των μορίων cDNA., λόγω της υβριδοποίησης του στην poly-A-ουρά, με βάση τη συμπληρωματικότητα των βάσεων κατά Watson-Crick. Η αλληλουχία του είναι η εξής:

5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGTTTTTTTTTTTTTVN-3', με τα V,N να αποτελούν εκφυλισμένες βάσεις που μπορούν να αναπτύξουν δεσμούς υδρογόνου με παραπάνω από ένα νουκλεοτίδιο, συγκεκριμένα V=G, A, C και N=G, A, T, C<sup>52</sup>.

Βήματα πειραματικής διαδικασίας:

1. Με βάση τις τιμές των συγκεντρώσεων του ολικού RNA που προέκυψαν από τις φωτομετρήσεις χρησιμοποιείται ο κατάλληλος όγκος από τα διαλύματα RNA ώστε σε όγκο 8μL να υπάρχει 1μg RNA και ο αντίστοιχος όγκος νερού.
2. Σε επόμενο στάδιο παρασκευάζεται το μίγμα με τα παρακάτω συστατικά και τις ποσότητες προσαρμοσμένες στον αριθμό δειγμάτων ολικού RNA:

Πίνακας 5. Σύσταση μίγματος για αντίδραση πολυαδενυλίωσης.

Αντίδραση 1x	
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα 10x</b>	<b>1 μL</b>
<b>ATP (10nM)</b>	<b>0,8 μL</b>
<b>Πολυμεράση της <i>Escherichia coli</i></b>	<b>0,2 μL</b>

3. Ο διαμοιρασμός 2μL του μίγματος σε κάθε δείγμα ολικού RNA οδηγεί στην παρασκευή ενός νέου μίγματος που διαθέτει τελικό όγκο 10μL.
4. Ακολουθεί επώαση στους 37° C για 60min, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση πολυμερισμού από το ένζυμο της πολυμεράσης.
5. Στη συνέχεια το θερμικό πρωτόκολλο περιλαμβάνει επώαση στους 65° C για 10min, προκειμένου να αδρανοποιηθεί το ένζυμο και να τερματιστεί η αντίδραση.
6. Ο αραιωμένος προσαρμογέας που αποτελείται από ολιγο-δεοξυθυμίνες μαζί με την αντίστοιχη ποσότητα νερού σχηματίζουν ένα δεύτερο μίγμα με την παρακάτω σύνθεση:

*Πίνακας 6. Αραίωση του oligo-dT adapter*

Αντίδραση 1x	
<b>ddH2O</b>	<b>2 μL</b>
<b>Oligo-dT αντάπτορας (1/10)</b>	<b>0,5 μL</b>

7. Ύστερα από την προσθήκη σε κάθε δείγμα του αντάπτορα ακολουθεί επώαση στους 70° C για 5min και απευθείας τοποθέτηση στον πάγο.
8. Τέλος η σύνθεση του τρίτου μίγματος περιλαμβάνει τα ακόλουθα συστατικά:

*Πίνακας 7. Σύσταση μίγματος για αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, ύστερα από πολυαδενυλίωση.*

Αντίδραση 1x	
<b>5x first strand buffer</b>	<b>4 μL</b>
<b>DTT</b>	<b>2 μL</b>
<b>dNTPs</b>	<b>1 μL</b>
<b>RNase OUT</b>	<b>0,25 μL</b>
<b>MMLV</b>	<b>0,25 μL</b>

9. Το θερμικό πρωτόκολλο που εφαρμόζεται είναι:
  - 37° C για 60min
  - 70° C για 15min
  - 4° C



## 2.7 Πρωτόκολλο αντίστροφης μεταγραφής για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων

### Αρχή μεθόδου

Αξιοποιώντας την πολύ-A-ουρά των mRNA μορίων που περιέχονται στο ολικό RNA και τα εμπορικά διαθέσιμα ένζυμα αντίστροφης μεταγραφής που προέρχονται από ιούς, όπως η MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) πραγματοποιείται η σύνθεση της μονόκλωνης cDNA αλυσίδας, με εκμαγεία τα mRNA μόρια. Η σύνθεση της μονόκλωνης αλυσίδας του cDNA οφείλεται στην αντίδραση του πολυμερισμού των δεοξυριβονουκλεοτιδίων που καταλύει το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης.

Στάδια πειραματικής διαδικασίας:

1. Ο όγκος του ολικού RNA που χρησιμοποιείται αντιστοιχεί σε 1μg RNA και ύστερα από καλή ανάδευση των δειγμάτων παρασκευάζεται το μίγμα με τα εξής συστατικά:

*Πίνακας 8. Σύσταση μίγματος με την κατάλληλη ποσότητα ολικού RNA και του oligo-dT εκκινητή.*

Αντίδραση (1x)	
<b>Ποσότητα ολικού RNA</b>	<b>1μg</b>
<b>Oligo-dT εκκινητής</b>	<b>1μL</b>
<b>Δισαπεσταγμένο νερό</b>	<b>έως τα 12,5μL</b>

2. Η επώαση γίνεται σε συνθήκες 65°C για 5min, για να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές που μπορεί να αναπτυχθούν λόγω μερικής συμπληρωματικότητας στα μονόκλιωνα μόρια RNA και ακολουθεί απευθείας τοποθέτηση στον πάγο.
3. Η ακόλουθη σύσταση αποτελεί το τελικό μίγμα που όταν προστίθεται στα δείγματα επιτρέπει την πραγματοποίηση της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής από το ένζυμο MMLV, λόγω παρουσίας των νουκλεοτιδίων και της μήτρας των RNA μορίων.

*Πίνακας 9. Σύσταση μίγματος για αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής των mRNA μορίων που ενυπάρχουν στο ολικό RNA.*

Αντίδραση 1x	
<b>5x first strand buffer</b>	<b>4 μL</b>
<b>DTT</b>	<b>2 μL</b>
<b>dNTPs</b>	<b>1 μL</b>
<b>RNase OUT</b>	<b>0,25 μL</b>
<b>MMLV</b>	<b>0,25 μL</b>

4. Το θερμικό πρωτόκολλο που εφαρμόζεται είναι το εξής:

37°C για 60min

70°C για 15min

4°C

## 2.8 Πρωτόκολλο συμβατικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

### Αρχή μεθόδου

Η μεθοδολογία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) αναπτύχθηκε από τον Kary Mull το 1980 και αποτέλεσε μια από τις καθοριστικότερες ανακαλύψεις. Η σημαντική συνεισφορά της στο επιστημονικό πεδίο αναγνωρίστηκε το 1994 με την απονομή του βραβείου Nobel στον Mull. Η μεθοδολογία PCR επιτρέπει την *in vitro* σύνθεση DNA μορίων, με την αξιοποίηση θερμοάντοχων DNA πολυμερασών και οδηγεί στην ενίσχυσή τους. Για να μπορέσουν να επιμηκύνουν οι DNA πολυμεράσες χρησιμοποιούνται τεχνητά ολιγονουκλεοτίδια που ονομάζονται εκκινητές και επιτρέπουν την οριοθέτηση συγκεκριμένης περιοχής του γενετικού υλικού που αποτελεί το εναρκτήριο υπόστρωμα της αντίδρασης.

Η αντίδραση συντελείται σε αυτοματοποιημένους θερμικούς κυκλοποιητές και διακρίνεται σε τρία βασικά στάδια: την αποδιάταξη, την υβριδοποίηση και την επιμήκυνση. Στο στάδιο της αποδιάταξης (denaturation) με την αύξηση της θερμοκρασίας στους 95° C επιτυγχάνεται η διάσπαση των δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στους δυο κλώνους των DNA μορίων. Στις μονόκλωνες αλυσίδες που προέκυψαν με τη μείωση της θερμοκρασίας επιτρέπεται η υβριδοποίηση των εκκινητών σε συγκεκριμένες θέσεις. Εν τέλει ο κύκλος ολοκληρώνεται

με την επιμήκυνση, λόγω της ύπαρξης του ελεύθερου υδροξυλίου στο 3' άκρο των εκκινητών και της παρουσίας δεοξυνουκλεοτιδίων στο διάλυμα, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δίκλωνων μορίων DNA που στον επόμενο κύκλο θα αποδιαταχθούν εκ νέου.

*Πίνακας 10. Βασικά συστατικά μίγματος PCR αντίδρασης, για δυο διαφορετικούς τελικούς όγκους αντιδράσεων (20 και 50).*

	Αντίδραση 1x	Αντίδραση 1x
Δισαπεσταγμένο νερό	έως 25 $\mu\text{L}$	έως 50 $\mu\text{L}$
10x Taq buffer (Καρρα Α)	2,5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
dNTPs (10mM)	0,5 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
F (1/5)	0,5 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
R (1/5)	0,5 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
Καρρα Taq pol	0,125 $\mu\text{L}$	0,25 $\mu\text{L}$
+ cDNA	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$

## 2.9 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

### Αρχή μεθόδου

Η παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της ενίσχυσης του DNA επιτυγχάνεται με διάφορες χημείες και οργανολογίες. Γενικά, οι χημείες που έχουν χρησιμοποιηθεί στη PCR αντίδραση, περιλαμβάνουν τη χρήση φθοριζουσών χρωστικών και ιχνηθετών, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο ή η SYBR Green χρωστική, την υδρόλυση ιχνηθετών, την υβριδοποίηση ιχνηθετών και τους μοριακούς φάρους. Η Real-time PCR αποτελεί μια καινοτόμο εξέλιξη της συμβατικής PCR με σημαντικά πλεονεκτήματα την ταχεία, εύκολη, ευαίσθητη ποσοτικοποίηση που αποδίδει ακριβή και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα.

Χρησιμοποιώντας ως χημεία ανίχνευσης τους TaqMan ιχνηθετές, η παραγωγή σήματος φθορισμού οφείλεται στην υδρόλυση των ιχνηθετών από την 5'-3' εξωνουκλεολυτική ενεργότητα, διότι αποσυνδέεται το φθορισμογόνο από τη χρωστική που δρα με τρόπο που αποσβάνει το φθορισμό. Η χημεία αυτή επιτρέπει υψηλή εξειδίκευση, λόγω της υβριδοποίησης των ιχνηθετών σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του στόχου προκειμένου να παραχθεί φθορισμός.

Η SYBR Green χρωστική προσδένεται στη μικρή αύλακα των δίκλωνων μορίων DNA και εκπέμπει φθορισμό 1.000 φορές περισσότερο από όταν παραμένει ελεύθερη στο διάλυμα. Η μέθοδος αυτή είναι εύκολη και παρουσιάζει σχετικά χαμηλό κόστος, αλλά και μειωμένη ειδικότητα, λόγω μη εξειδικευμένης πρόσδεσης στο δίκλωνο DNA. Τα μη ειδικά προϊόντα που μπορεί να ενισχύονται παρατηρούνται στις καμπύλες τήξης που προκύπτουν (melt curves).

Η καμπύλη ενίσχυσης που παρατηρείται στην ποσοτική qPCR περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές φάσεις: την εναρκτήρια (initiation phase), όπου το σήμα του υποβάθρου δε ξεχωρίζει από το προσμετρούμενο, την εκθετική φάση (ή λογαριθμική) και τη φάση του πλατώ. Η ποσοτικοποίηση είναι δυνατή μόνο στην εκθετική φάση. Αρχικά, ορίζεται η τιμή του κατωφλιού,  $C_T$ , ως εκείνο το σημείο που το καταμετρούμενο σήμα φθορισμού διαφέρει δέκα τυπικές αποκλίσεις από το σήμα υποβάθρου. Σε κάθε πείραμα ποσοτικοποίησης υπάρχουν τα γονίδια αναφοράς, το δείγμα βαθμονομητής (calibrator) και οι θετικοί-αρνητικοί μάρτυρες.

Το σήμα της SYBR Green χρωστικής κανονικοποιείται από τη χρωστική ROX και στο τέλος κάθε κύκλου ενίσχυσης προκύπτει ο λόγος  $R_n$ , ο οποίος με τη βοήθεια του λογισμικού αναπαρίσταται στις καμπύλες ενίσχυσης (Amplification plots). Στην εκθετική φάση, όπου αρχίζει η έντονη παραγωγή των PCR προϊόντων υπολογίζεται το μέγεθος  $\Delta R_n$  που συνιστά τη διαφορά του λόγου  $R_n$  από το σήμα υποβάθρου.

Για να πραγματοποιηθεί η ποσοτικοποίηση των προϊόντων μπορεί να εφαρμοστεί είτε απόλυτη ποσοτικοποίηση είτε σχετική. Για την απόλυτη ποσοτικοποίηση απαιτείται ο σχεδιασμός της καμπύλης αναφοράς με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης.

Στα πλαίσια της σχετικής ποσοτικοποίησης, για κάθε δείγμα υπολογίζεται η ποσότητα του στόχου σε σχέση με τη ποσότητα του γονιδίου αναφοράς. Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιούνται εκείνα που επιτελούν ζωτικής σημασίας λειτουργίες εντός του κυττάρου (housekeeping functions) άρα διαθέτουν σχετικά σταθερά επίπεδα έκφρασης, ανεξαρτήτως της κυτταρικής διαφοροποίησης.

Η μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  παρέχει κανονικοποιημένα αποτελέσματα για τα επίπεδα έκφρασης του στόχου, συγκριτικά και με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς αλλά και με το δείγμα του βαθμονομητή. Ως βαθμονομητής χρησιμοποιείται κυρίως κάποια κυτταρική σειρά που εκφράζει τόσο το γονίδιο στόχο όσο και το γονίδιο αναφοράς<sup>53</sup>.

### Πειραματική διαδικασία:

Για την πραγματοποίηση των συγκεκριμένων πειραμάτων qPCR ως δείγμα βαθμονομητής χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά **T24** και ως γονίδια αναφοράς το **HPRT1** για τη σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *GSTP1*, *MnSOD2* και *NRF2* που μελετήθηκαν ενώ για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των θραυσμάτων που προέρχονται από tRNA μόρια ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το **RNU48** (*SNORD48*).

Τα μίγματα με τη σύσταση που αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα επέτρεψαν την ενίσχυση των στόχων, ακολουθώντας τις απαραίτητες αραιώσεις εκκινητών για κάθε μόριο στόχο. Όλες οι αντιδράσεις των δειγμάτων συντελέστηκαν εις διπλούν (*duplicates*) για την εξασφάλιση της ορθότητας των τιμών που προέκυψαν. Για όλα τα διαφορετικά μίγματα υπήρχε ο αρνητικός μάρτυρας που δεν περιείχε ποσότητα cDNA δείγματος, για τον έλεγχο της επιμόλυνσης του εκάστοτε πειράματος.

*Πίνακας 11. Αναλογίες συστατικών για qPCR αντίδραση και οι αντίστοιχες ποσότητες για την πραγματοποίηση των duplicates.*

	1x	2.2x
<b>SYBR green mix</b>	<b>5 μL</b>	<b>11 μL</b>
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	<b>2,8μL</b>	<b>6,16 μL</b>
<b>F</b>	<b>1 μL</b>	<b>2,2 μL</b>
<b>R</b>	<b>1 μL</b>	<b>2,2 μL</b>
<b>+ cDNAs</b>	<b>0,2 μL</b>	

Το θερμικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στο 7500 real-time μηχάνημα ήταν το εξής:

95°C για 3min, για να ενεργοποιηθεί το ένζυμο (το οποίο αρχικά είναι συζευγμένο με μονοκλωνικό αντίσωμα για να παραμένει αδρανές)

Για 40 κύκλους αντίδρασης:

95°C για 15sec

60°C για 1min,

ώστε να πραγματοποιηθεί η ενίσχυση των PCR προϊόντων με συνεχιζόμενους κύκλους αποδιάταξης των αλυσίδων-υβριδοποίησης των εκκινητών-πολυμερισμού από τη

θερμοάντοχη DNA πολυμεράση. Η αντίδραση πολυμερισμού επιτελείται στους 72°C, όπου το ένζυμο της πολυμεράσης πραγματοποιεί την αντίδραση επιμήκυνσης με τη βέλτιστη απόδοση.

Με το λογισμικό Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Software πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των αποτελεσμάτων των qPCR δεδομένων που προέκυψαν και με βάση τις αρχές της σχετικής ποσοτικοποίησης  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

Ακόμη, πραγματοποιήθηκε ο θεωρητικός σχεδιασμός των πειραμάτων για να επιλεγούν τα συγκεκριμένα μη κωδικά μόρια και σχεδιάστηκαν με επιτυχία δέκα εξειδικευμένοι εκκινητές για την ενίσχυση tRFs/t-halves (thalves ή tiRNAs), που όπως αναφέρεται βιβλιογραφικά ο *in silico* σχεδιασμός τους είναι εξαιρετικά δύσκολος, λόγω των μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων που φέρουν τα tRNAs και εκκινητές για τέσσερα γονίδια οξειδωτικού στρες, τα οποία επελέγησαν ύστερα από ενδελεχή βιβλιογραφική μελέτη του ρόλου τους. Οι εκκινητές του πίνακα 14 προϋπήρχαν στο εργαστήριο, δηλαδή οι εκκινητές για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων αναφοράς.

**Πίνακας 12. Ονομασία θραυσμάτων και αλληλουχίες εκκινητών που σχεδιάστηκαν.**

Θραύσματα	Πρόσθιοι Εκκινητές (5→3)
<b>ts-36</b>	CGGAAGCGGGTGCTCTTAT
<b>ts-46</b>	GTACGGCAAGGGCCTCTTT
<b>3'half-His-GTG</b>	GAATCTGACAACAGAGGCTTACGA
<b>3'-tRF-Val-TAC</b>	CTTAACCTTGACCGCTCTGACCA
<b>i-tRF Val-TAC</b>	GGACTTAACTTGACCGCTCTGAA
<b>5' half-Val-TAC</b>	TGTAGCTTAAACACAAAGCACCCA
<b>5' half-Met-CAT</b>	AGTAAGGTCAGCTAAATAAGCTATCGG
<b>i-tRF-Gln-CTG</b>	GGATGGTTAGCACTCTGGACTA
<b>5' tRF-Gly-CCC</b>	GGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCAA
<b>5'half-Val-AAC</b>	GTGGTCATCACGTTCCGCCTA

**Πίνακας 13. Γονίδια που μελετήθηκε η έκφρασή τους, οι αλληλουχίες των εκκινητών που σχεδιάστηκαν και το αναμενόμενο μέγεθος των PCR προϊόντων.**

Γονίδια	Εκκινητές (5→3)	Μέγεθος PCR προϊόντων
<b>GSTP1 F</b>	TCACTCAAAGCCTCCTGCCTAT	243bp
<b>GSTP1 R</b>	CAGTGCCTTCACATAGTCATCC	
<b>MnSOD2 F</b>	GGCCTACGTGAACAACCTGA	203bp
<b>MnSOD2 R</b>	CACGTTTGATGGCTTCCAGC	

<b><i>NRF2 F</i></b>	CAACTACTCCCAGGTTGCCC	130bp
<b><i>NRF2 R</i></b>	AAGTGA CTGAAACGTAGCCGA	
<b><i>NOX4 F</i></b>	CCGGCTGCATCAGTCTTAACC	220bp
<b><i>NOX4 R</i></b>	TCGGCACAGTACAGGCACAA	

*Πίνακας 14. Γονίδια αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν και οι αλληλουχίες των εκκινητών.*

Γονίδια αναφοράς	Εκκινητές (5→3)
<b><i>SNORD48 F</i></b>	TGATGATGACCCCAGGTA ACTCT
<b><i>HPRT1 F</i></b>	TGGAAAGGGTGT TTTATTCCTCAT
<b><i>HPRT1 R</i></b>	ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA

Η ενίσχυση των θραυσμάτων βασίστηκε στην προσθήκη της poly-A ουράς στα μη κωδικά αυτά μόρια και στον προσαρμογέα (oligo-dT adapter) που αποτέλεσε τον εκκινητή για τη σύνθεση της μονόκλωνης συμπληρωματικής αλυσίδας cDNA. Με εκμαγείο τα μονόκλιωνα cDNA που παρήχθησαν συντέθηκαν δίκλιωνα DNA μόρια, τα οποία ενισχύθηκαν λόγω της παρουσίας εξειδικευμένων πρόσθιων εκκινητών και του καθολικού ανάστροφου εκκινητή, PAPR: 5'-GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3', ο οποίος υβριδοποιείται στην αλληλουχία του προσαρμογέα που είναι ενσωματωμένος.

Για την παρασκευή των μονόκλωνων αλυσίδων cDNA κυτταρικών σειρών (RT112, T24, HTB9) χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA, το οποίο διέθετε το εργαστήριο και τα στάδια της φωτομέτρησης, πολυαδενυλίωσης, αντίστροφης μεταγραφής και qPCR πραγματοποιήθηκαν εκ μέρους μου.

## 2.10 Ηλεκτροφορήσεις νουκλεϊκών οξέων

### Αρχή μεθόδου

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης επιτρέπει τον διαχωρισμό των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών, καθώς αποτελούν φορτισμένα βιομόρια που με την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου μπορούν να κινηθούν. Η κίνησή τους γίνεται σε πηκτώματα που αποτελούνται από πόρους διαφόρων μεγεθών, ανάλογα με τη συγκέντρωση του μονομερούς που χρησιμοποιήθηκε για τον πολυμερισμό τους. Η οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων που

διασχίζουν τις διάφορες διαδρομές στα πηκτώματα μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση χρωστικών (π.χ. βρωμιούχο αιθίδιο) και την εφαρμογή UV ακτινοβολίας.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα αγαρόζης βασίζεται στη χρήση του πολυσακχαρίτη της αγαρόζης, ο οποίος προέρχεται από τα φύκη και περιλαμβάνει την παρασκευή του πηκτώματος, τη φόρτωση των δειγμάτων στα κατάλληλα σημεία που έχουν διαμορφωθεί και την εφαρμογή κατάλληλης τάσης. Η φόρτωση των δειγμάτων καθίσταται δυνατή λόγω της παρουσίας γλυκερόλης στα διαλύματα φόρτωσης, που αυξάνει το ιξώδες των υδατικών διαλυμάτων που περιλαμβάνουν τα PCR προϊόντα.

### **Διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης:**

Ανάλογα με την περιεκτικότητα του πηκτώματος σε αγαρόζη διαμορφώνονται διαφορετικού μεγέθους πόροι. Επομένως, ανάλογα με το αναμενόμενο μέγεθος των PCR προϊόντων που θα ηλεκτροφορηθούν επιλέγεται η μάζα της αγαρόζης, που υφίσταται σε μορφή σκόνης και διαλυτοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE ή TBE. Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι να γίνει διαυγές και ύστερα από την προσθήκη του βρωμιούχου αιθιδίου, τοποθετείται σε μια επιφάνεια μαζί με το σκεύος που δημιουργεί τις θέσεις υποδοχής των δειγμάτων. Σε θερμοκρασία δωματίου σχηματίζεται το πήκτωμα, το οποίο μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου θα προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι την πλήρη κάλυψή του. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται τάση μέσω της σύνδεσης των ηλεκτροδίων του τροφοδοτικού με τη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τα μόρια DNA ως αρνητικά φορτισμένα κινούνται προς την κάθοδο. Το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης γίνεται παρατηρήσιμο μέσω των χρωστικών που προστίθενται στα δείγματα και επιτρέπουν τον τερματισμό της εφαρμογής τάσης στο σωστό σημείο. Οι χρωστικές που περιλαμβάνονται στο διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων είναι το μπλε της βρωμοφαινόλης και το κυανό του ξυλενίου. Η παρατήρηση του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού γίνεται με την έκθεση του πηκτώματος σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

## **2.11 Βιοστατιστική ανάλυση**

### **2.11.1 Μη παραμετρική στατιστική δοκιμασία Mann – Whitney U**

Τα επίπεδα έκφρασης των θραυσμάτων tRNA και των γονιδίων που μελετήθηκαν συνιστούν ποσοτικές μεταβλητές, ενώ η κατάταξη των όγκων της ουροδόχου κύστεως ως προς το βαθμό διαφοροποίησης (grade) κατά WHO 2004 διαχωρίζει δυο ανεξάρτητους πληθυσμούς



δειγμάτων, τα δείγματα των ασθενών που εμφάνισαν όγκους υψηλής διαφοροποίησης και εκείνα τα δείγματα ασθενών που εμφάνισαν όγκους αδιαφοροποίητους. Επομένως, η μεταβλητή του βαθμού διαφοροποίησης είναι ποιοτική ενώ τα επίπεδα έκφρασης των στόχων αποτελούν ποσοτική μεταβλητή με συνεχείς τιμές. Η μη παραμετρική στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney U επιτρέπει τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης (ποσοτική εξαρτημένη μεταβλητή) ανάμεσα στους δυο ανεξάρτητους πληθυσμούς, τους low-grade και high-grade όγκους της ουροδόχου κύστεως.

### **2.11.2 Μη παραμετρική στατιστική δοκιμασία Kruskal -Wallis**

Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των θραυσμάτων που προέρχονται από τα tRNA μόρια (ποσοτική μεταβλητή) σε τρία διαφορετικά δείγματα ( $k=3$ ), τους όγκους T<sub>a</sub> και T1 και τους μυοδιηθητικούς όγκους T2-T4, πραγματοποιείται με την μη παραμετρική δοκιμασία Kruskal -Wallis. Εφόσον τα στάδια της νόσου (σταδιοποίηση TNM σύστημα) αποτελούν διατάξιμη μεταβλητή μπορεί να εφαρμοστεί πιο ορθά η μη παραμετρική δοκιμασία **Jonckheere-Terpstra**.

### **2.11.3 Ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman**

Τα επίπεδα έκφρασης των θραυσμάτων και των γονιδίων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες αποτελούν ποσοτικές μεταβλητές και η συσχέτισή τους επιτυγχάνεται με την ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman. Η ανάλυση αυτή επιτρέπει την αξιολόγηση του κατά πόσο δυο ποσοτικές μεταβλητές παρουσιάζουν συμμεταβολή και το είδος της. Αρχικά παρατηρείται η παρουσία γραμμικής σχέσης ανάμεσα στις δυο μεταβλητές και στη συνέχεια εφαρμόζεται η βέλτιστη ευθεία που παριστάνει την ύπαρξη γραμμικότητας. Ο έλεγχος της γραμμικότητας απεικονίζεται με τα διαγράμματα διασποράς στη συγκεκριμένη ανάλυση.

Η ανάλυση που βασίζεται στο συντελεστή κατά Spearman είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την εκτίμηση της συσχέτισης δυο ποσοτικών μεταβλητών που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή. Επομένως, αποτελεί μια ακόμη μη παραμετρική διαδικασία που βασίζεται στη διάταξη των τιμών και όχι στις αυτούσιες τιμές των ποσοτικών μεταβλητών. Το πρόσημο του συντελεστή συσχέτισης δηλώνει την ύπαρξη αναλογικής σχέσης μεταξύ των μεταβλητών ή αντιστρόφως ανάλογη συσχέτιση.

#### 2.11.4 Ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan Meier

Η ανάλυση κατά Kaplan-Meier αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές μεθοδολογίες για την εκτίμηση της επιβίωσης. Τα ιατρικά δεδομένα που συλλέγονται μέσω της παρακολούθησης των ασθενών σε τακτά χρονικά διαστήματα είτε ύστερα από μια χειρουργική επέμβαση είτε μετά από την έναρξη συγκεκριμένης θεραπείας μπορούν να αξιοποιηθούν στην ανάλυση επιβίωσης. Ο χρόνος παρακολούθησης των ασθενών (follow up) μπορεί να διαιρεθεί σε μικρότερα χρονικά διαστήματα και σε κάθε μια από αυτές τις περιόδους να καταμετρηθούν τα συμβάντα που προέκυψαν (π.χ. θάνατος, υποτροπή ασθενών). Οι πιθανότητες επιβίωσης σε κάθε ένα από τα χρονικά διαστήματα που έχουν οριστεί πολλαπλασιάζονται για να προκύψει η συνολική πιθανότητα επιβίωσης. Η συνολική πιθανότητα επιβίωσης αποτελεί τη μεταβλητή που θα απεικονιστεί στον y άξονα του διαγράμματος επιβίωσης ενώ στον x άξονα απεικονίζονται τα χρονικά διαστήματα. Η καμπύλη κατά Kaplan Meier εμφανίζει πτωτική τάση με το κάθε συμβάν που πραγματοποιείται να απεικονίζεται ως "σκαλοπάτι". Ορισμένες φορές τα ιατρικά αρχεία παρακολούθησης δε φέρουν πληροφορίες για όλο το χρονικό διάστημα παρακολούθησης κάποιων ασθενών και θα πρέπει να γίνεται αναφορά του αριθμού των ατόμων που η παρακολούθησή τους σταμάτησε. Για την εύρεση του βέλτιστου διαχωριστικού ορίου (cut-off) χρησιμοποιήθηκε ο ελεύθερα προσβάσιμος αλγόριθμος **X-tile**.

#### 2.12 Βιοπληροφορικά εργαλεία

Αρχικά, η αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων που φέρουν δεδομένα αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS) τα οποία προέκυψαν στα πλαίσια του TCGA (The Cancer Genome Atlas), όπως η MINTbase v2.0 (<https://cm.jefferson.edu/mintbase-v2-0/>) και η χρήση κατάλληλων φίλτρων επιλογής στη συγκεκριμένη πλατφόρμα επέτρεψε την επιλογή των προς μελέτη αλληλουχιών που αποτελούν θραύσματα, τα οποία προέρχονται από tRNA μόρια που κωδικοποιούνται είτε από το πυρηνικό είτε από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα<sup>54</sup>. Η tRFdb (<http://genome.bioch.virginia.edu/trfdb/>) αποτελεί μια ακόμη βάση δεδομένων που περιέχει καταγραφές αλληλουχιών θραυσμάτων που προέρχονται από tRNA, οι οποίες έχουν προκύψει από πειράματα αλληλούχησης βιβλιοθηκών μικρών μη κωδικών RNA μορίων από διάφορους οργανισμούς και όχι μόνο για το είδος *Homo sapiens*, σε αντίθεση με την MINTbase v2.0<sup>55</sup>.

Ο *in silico* σχεδιασμός εκκινητών πραγματοποιήθηκε μέσω του Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) και με βάση τους κανόνες σχεδιασμού που αναφέρουν την επιλογή Tm και την αποφυγή διμερισμού.

Η βιβλιογραφική μελέτη του τρόπου δράσης των tRF/t-halves (tiRNAs) έχει αναδείξει ότι ορισμένα θραύσματα δρουν με τρόπο παρόμοιο με τα miRNAs, δηλαδή υβριδοποιούνται σε μετάγραφα στόχους και ασκούν μετα-μεταγραφική αποσιώπηση των στόχων. Επομένως, έγινε η παραδοχή ότι μπορεί να αξιοποιηθεί ο αλγόριθμος πρόγνωσης των στόχων που έχει κατασκευαστεί για τα miRNAs και ονομάζεται miRDB (<http://mirdb.org/>), για τα θραύσματα που επιλέχθηκαν και έχουν μέγεθος έως 30 νουκλεοτίδια. Μέσω του αλγόριθμου κατασκευάστηκαν λίστες γονιδίων (gene lists) που αποτελούν τους πιθανούς ενδοκυττάριους ή εξοκυττάριους στόχους των μη κωδικών RNA μορίων που ενισχύθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

Από τους πιθανούς στόχους που προέκυψαν μέσω της βιοπληροφορικής ανάλυσης επιχειρήθηκε η κατηγοριοποίησή τους, με βάση τη μοριακή λειτουργία τους (molecular function) και τα μοριακά μονοπάτια στα οποία ανήκουν τα πιθανά μετάγραφα- στόχοι που ρυθμίζονται από τα θραύσματα tRNA μορίων. Υπάρχει πληθώρα βιοπληροφορικών εργαλείων που πραγματοποιεί την οντολογική κατάταξη μεγάλου αριθμού γονιδίων και τον χαρακτηρισμό των μονοπατιών όπου εμπλέκονται τα προϊόντα τους (GO enrichment analysis, KEGG pathway analysis) <sup>56</sup>. Στη διπλωματική αυτή αξιοποιήθηκαν τα εξής εργαλεία οντολογίας:

- ✓ PANTHER (<http://pantherdb.org/>)
- ✓ gProfiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>)
- ✓ DAVID v6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>)

Η κατασκευή δικτύων αλληλεπίδρασης των γονιδίων που φαίνεται να ρυθμίζονται από τα θραύσματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του βιοπληροφορικού εργαλείου Cytoscape 3.8.0 (<https://cytoscape.org/>).

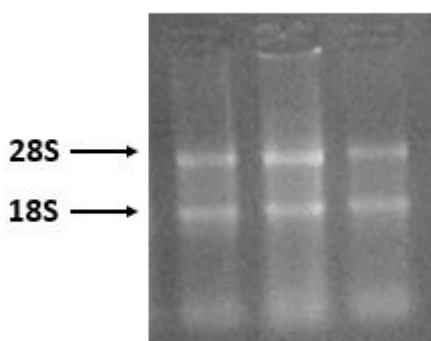
Τέλος, τα διαγράμματα που αναπαριστούν τους σημαντικότερους οντολογικούς ρόλους των γονιδίων στόχων και τα σημαντικότερα μοριακά μονοπάτια που φαίνεται να επηρεάζονται από τα μη κωδικά μόρια που μελετήθηκαν στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας σε συνάρτηση με τα p-values που προέκυψαν από τα εργαλεία gProfiler και DAVID v6.8, κατασκευάστηκαν με στατιστικά πακέτα και πακέτα οπτικοποίησης διαγραμμάτων σε προγραμματιστικό περιβάλλον R.

Ακόμη, πραγματοποιήθηκε μελέτη των μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων που φέρουν τα tRNA μόρια από τα οποία έχουν προκύψει ορισμένα θραύσματα μέσω αναζητήσεων στη βάση δεδομένων MODOMICS (<http://genesilico.pl/modomics/>).

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Απομόνωση ολικού RNA και έλεγχος ακεραιότητας σε πήκτωμα αγαρόζης

Ύστερα από τη διαδικασία απομόνωσης του ολικού RNA ακολουθεί η παρασκευή αποδιατακτικού πηκτώματος αγαρόζης 1.5% και ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός. Η εμφάνιση του πηκτώματος σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας επιτρέπει την παρατήρηση δυο διακριτών ζωνών του ριβοσωμικού RNA, τη 18S και τη 28S. Σε δείγματα που παρατηρείται η έλλειψη των δυο ζωνών και η παρουσία νεφελώδους εικόνας γίνεται αντιληπτή η αποικοδόμηση του RNA. Ακόμη, η αναλογία των ζωνών θα πρέπει να είναι 2:1 (28S/18S) για να θεωρηθεί εξαιρετικά επιτυχής η απομόνωση.



*Εικόνα 6. Πήκτωμα αγαρόζης 1,5% για έλεγχο αποικοδόμησης ολικού RNA.*

#### 3.2 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός συγκέντρωσης ολικού RNA και ποιότητας

Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού μικρού όγκου επιτρέπει τον προσδιορισμό της απορρόφησης σε δυο μήκη κύματος 260nm και 280nm, ο λόγος των οποίων είναι ενδεικτικός της ποιότητας του απομονωμένου ολικού RNA. Τιμές που κυμαίνονται από 1,8 έως 2 αποτελούν ένδειξη ικανοποιητικής απομόνωσης, ενώ τιμές μικρότερες του 1,7 μπορεί να οφείλονται σε προσμίξεις πρωτεϊνών και του οργανικού διαλύτη φαινόλη που χρησιμοποιήθηκε κατά την απομόνωση. Τιμές μεγαλύτερες του 2,1 είναι πιθανό να υποδηλώνουν πρόσμιξη με DNA. Ακόμη, μέσω του νόμου Lambert-Beer η τενική της φασματοφωτομετρίας υπεριώδους ορατού επιτρέπει την εκτίμηση της συγκέντρωσης του διαλύματος RNA.

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/μL)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
1	59C (1/2)	19/11/25 11:13:42			1923,33	2,12	1,83	48,622	23,190	26,803	0,539	0,191	1,000
2	40C (1/2)	19/11/25 11:16:50			1518,62	2,11	1,82	38,272	18,309	21,158	0,306	0,191	1,000
3	54C (1/2)	19/11/25 11:19:38			3304,43	1,69	1,30	83,770	50,005	64,758	1,159	0,191	1,000
4	54C (1/4)	19/11/25 11:23:13			2162,06	2,14	1,72	54,524	25,768	31,838	0,472	0,191	1,000
5	56C (1/2)	19/11/25 11:26:41			1220,39	2,10	1,87	30,849	14,838	16,674	0,339	0,191	1,000
6	92C (1/2)	19/11/25 11:29:13			1439,13	2,11	2,11	35,981	17,064	17,019	0,003	0,191	1,000
7	44C (1/2)	19/11/25 11:32:00			543,88	1,99	1,15	13,668	6,910	11,896	0,071	0,191	1,000
8	69C (1/2)	19/11/25 11:35:02			1276,96	2,11	2,07	31,918	15,117	15,391	-0,006	0,191	1,000

*Εικόνα 7. Φασματοφωτομετρική μέτρηση ενδεικτικών δειγμάτων ολικού RNA.*

### 3.2 Μελέτη επιπέδων έκφρασης των tRFs/t-halves (tiRNAs) και των γονιδίων-δεικτών οξειδωτικού στρες: καμπύλες ενίσχυσης (amplification plots)-καμπύλες τήξης (melt curves)-Πίνακες περιγραφικής στατιστικής

Η ενίσχυση 10 μη κωδικών μορίων στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής πραγματοποιήθηκε με τη μοριακή μεθοδολογία RT-qPCR τόσο σε κυτταρικές σειρές (RT112, T24) όσο και σε δείγματα ασθενών που είχαν υποστεί είτε διουρηθρική αφαίρεση όγκου (TUR) είτε ριζική κυστεκτομή. Με βάση τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν, τις καμπύλες τήξης που προέκυψαν και τις επιβεβαιωτικές ηλεκτροφορήσεις των PCR προϊόντων που διενεργήθηκαν φαίνεται ότι ενισχύθηκαν με ειδικό τρόπο θραύσματα που προκύπτουν από τα μη κωδικά μόρια tRNA και συγκροτούν και αυτά μια ακόμη κατηγορία μικρών μη κωδικών μορίων (tRFs/t-halves (thalves ή tiRNAs)).

Πίνακας 15. Μη κωδικά μόρια που ενισχύθηκαν, οι αλληλουχίες τους και η προέλευσή τους.

Θραύσματα	Αλληλουχίες θραυσμάτων	Προέλευση
<b>ts-36</b>	GAAGCGGGTGCTCTTATTT	Πρόδρομα
<b>ts-46</b>	TTGTGGAAACAATGGTACGGCAAGG GCCTCTTT	Πρόδρομα
<b>3'half-His-GTG</b>	TGAATCTGACAACAGAGGCTTACGA CCCCTTATTTACCC	MT
<b>3'-tRF-Val-TAC</b>	CTTAACTTGACCGCTCTGACCA	MT
<b>i-tRF Val-TAC</b>	GATTTCAACTTAACTTGACC	MT
<b>5' half-Val-TAC</b>	CAGAGTGTAGCTTAACACAAAGCAC CCAAC	MT
<b>5' half-Met-CAT</b>	AGTAAGGTCAGCTAAATAAGCTATC GGGCC	MT
<b>i-tRF-Gln-CTG</b>	ATGGTTAGCACTCTGGACT	NC
<b>5' tRF-Gly-CCC</b>	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATT CTCGC	NC
<b>5'half-Val-AAC</b>	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTCATCAC GTTCGCCT	NC

Από το σύνολο των δέκα μη κωδικών μορίων επιλέχθηκαν τρία προκειμένου να προκύψουν στατιστικά αξιοποιήσιμα δεδομένα. Η έκφραση των επιπέδων τους μελετήθηκε σε 120 δείγματα ιστών (συγκεκριμένα απομονωμένου ολικού RNA), τα οποία προήλθαν από ασθενείς που εμφάνισαν καρκίνο στην ουροδόχο κύστη.

Για τη διερεύνηση του ρόλου που διαδραματίζει το οξειδωτικό φορτίο στην παραγωγή της κατηγορίας των t-halves (tiRNAs) πραγματοποιήθηκε ο *in silico* σχεδιασμός εκκινητών και η μελέτη της έκφρασης σε 60 δείγματα ασθενών (εκ των οποίων τα 53 αξιοποιήθηκαν στη στατιστική μελέτη, λόγω υψηλών τιμών Ct που παρατηρήθηκαν στη μελέτη της έκφρασης του *HPRT1*), όπου είχε προηγηθεί η σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων των τριών t-halves (thalves ή tiRNAs), για τα γονίδια *GSTP1*, *MnSOD2* και *NRF2*. Η συσχέτιση παραγωγής των μη κωδικών μορίων που μελετήθηκαν με το οξειδωτικό φορτίο των καρκινικών κυττάρων που αντικατοπτρίζεται στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που ενισχύθηκαν πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση κατά Spearman. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση της έκφρασης των *GSTP1*, *MnSOD2*, *NRF2* και *NOX4*

στις εξής κυτταρικές σειρές καρκίνου της κύστεως: **T24, HTB9, RT4**. Με το **NOX4** γονίδιο να εμφανίζει επίπεδα έκφρασης μόνο στην κυτταρική σειρά HTB9.

Παρακάτω παρατίθενται οι καμπύλες ενίσχυσης, οι καμπύλες τήξης, ενδεικτικές εικόνες ηλεκτροφορήσεων και τα διαγράμματα βιοστατιστικής και βιοπληροφορικής ανάλυσης.

*Πίνακας 16. Δεδομένα περιγραφικής στατιστικής των αποτελεσμάτων της σχετικής ποσοτικοποίησης για 5'half-Val-TAC (αυθαίρετες μονάδες επιπέδων έκφρασης, α.μ.)*

Μεγέθη περιγραφικής στατιστικής για τιμές 5'half-Val-TAC	
Μέση τιμή	1,36 αυθαίρετες μονάδες (α.μ.)
95% Διάστημα εμπιστοσύνης μέσης τιμής (95% CI)	(0,68 α.μ.-2,03 α.μ.)
Διάμεσος	0,28 α.μ.
Τυπική απόκλιση	3,56 α.μ.
Εύρος	25,84

*Πίνακας 17. Δεδομένα περιγραφικής στατιστικής των αποτελεσμάτων της σχετικής ποσοτικοποίησης για 5'half-Met-CAT (αυθαίρετες μονάδες επιπέδων έκφρασης, α.μ.)*

Μεγέθη περιγραφικής στατιστικής για τιμές 5'half-Met-CAT	
Μέση τιμή	2,39 α.μ.
95% Διάστημα εμπιστοσύνης μέσης τιμής (95% CI)	(1,72 α.μ.-3,06 α.μ.)
Διάμεσος	0,87 α.μ.
Τυπική απόκλιση	3,54 α.μ.
Εύρος	20,93

*Πίνακας 18. Δεδομένα περιγραφικής στατιστικής των αποτελεσμάτων της σχετικής ποσοτικοποίησης για 3'half-His-GTG (αυθαίρετες μονάδες επιπέδων έκφρασης, α.μ.)*

Μεγέθη περιγραφικής στατιστικής για τιμές 3'half-His-GTG	
Μέση τιμή	1,64 α.μ.
95% Διάστημα εμπιστοσύνης μέσης τιμής (95% CI)	(1,06 α.μ.-2,22 α.μ.)
Διάμεσος	0,49 α.μ.
Τυπική απόκλιση	3,07 α.μ.



<b>Εύρος</b>	18,05
--------------	-------

*Πίνακας 19. Δεδομένα περιγραφικής στατιστικής των αποτελεσμάτων της σχετικής ποσοτικοποίησης για GSTP1 (αυθαίρετες μονάδες επιπέδων έκφρασης, α.μ.)*

<b>Μεγέθη περιγραφικής στατιστικής για τιμές GSTP1</b>	
<b>Μέση τιμή</b>	4,72 α.μ.
<b>95% Διάστημα εμπιστοσύνης μέσης τιμής (95% CI)</b>	(2,82 α.μ.-6,62 α.μ.)
<b>Διάμεσος</b>	2,59 α.μ.
<b>Τυπική απόκλιση</b>	7,02 α.μ.
<b>Εύρος</b>	48,43

*Πίνακας 20. Δεδομένα περιγραφικής στατιστικής των αποτελεσμάτων της σχετικής ποσοτικοποίησης για SOD2 (αυθαίρετες μονάδες επιπέδων έκφρασης, α.μ.)*

<b>Μεγέθη περιγραφικής στατιστικής για τιμές MnSOD2</b>	
<b>Μέση τιμή</b>	16,61 α.μ.
<b>95% Διάστημα εμπιστοσύνης μέσης τιμής (95% CI)</b>	(11,05 α.μ.-22,19 α.μ.)
<b>Διάμεσος</b>	7,68 α.μ.
<b>Τυπική απόκλιση</b>	20,60 α.μ.
<b>Εύρος</b>	102,08

*Πίνακας 21. Δεδομένα περιγραφικής στατιστικής των αποτελεσμάτων της σχετικής ποσοτικοποίησης για NRF2 (αυθαίρετες μονάδες επιπέδων έκφρασης, α.μ.)*

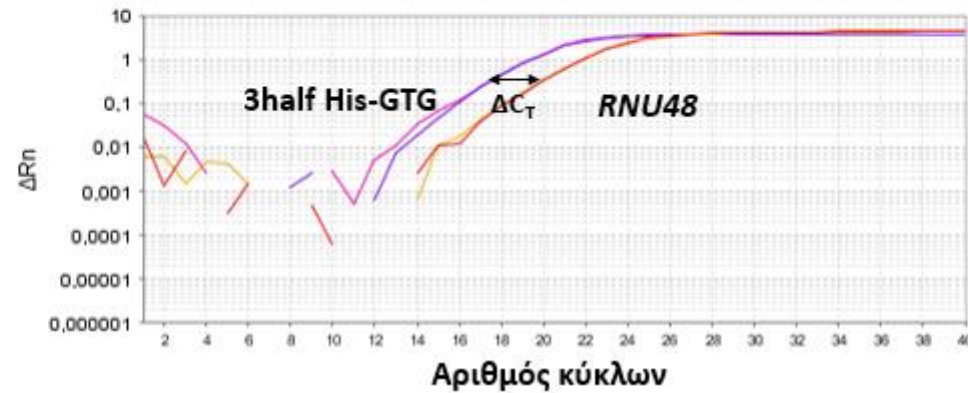
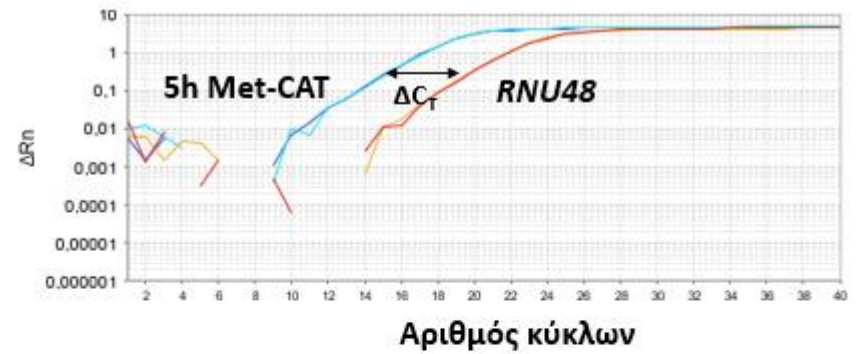
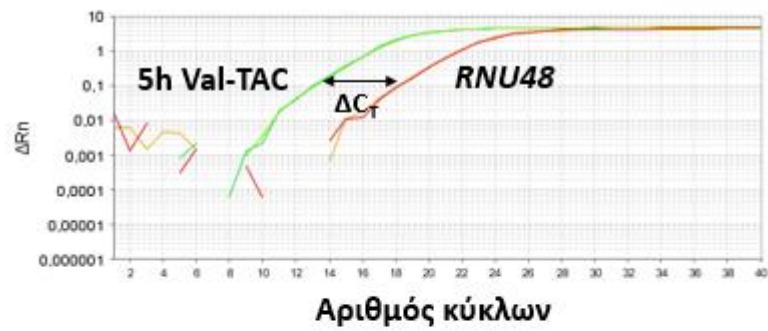
<b>Μεγέθη περιγραφικής στατιστικής για τιμές NRF2</b>	
<b>Μέση τιμή</b>	7,11 α.μ.
<b>95% Διάστημα εμπιστοσύνης μέσης τιμής (95% CI)</b>	(5,02 α.μ.-9,20 α.μ.)
<b>Διάμεσος</b>	4,08 α.μ.
<b>Τυπική απόκλιση</b>	7,72 α.μ.
<b>Εύρος</b>	31,47

Για την εφαρμογή των μη παραμετρικών δοκιμασιών προηγήθηκε ο έλεγχος κανονικότητας των πειραματικών τιμών που προέκυψαν από την μελέτη έκφρασης των τριών μη κωδικών μορίων και των γονιδίων, με τα στατιστικά τεστ **Kolmogorov-Smirnov** και **Shapiro-Wilk**. Για όλες τις τιμές παρατηρήθηκαν ιστογράμματα που δεν απεικόνιζαν κανονική κατανομή τιμών και οι τιμές p-value των τεστ Kolmogorov-Smirnov και Shapiro-Wilk ήταν μικρότερες του 0.001.

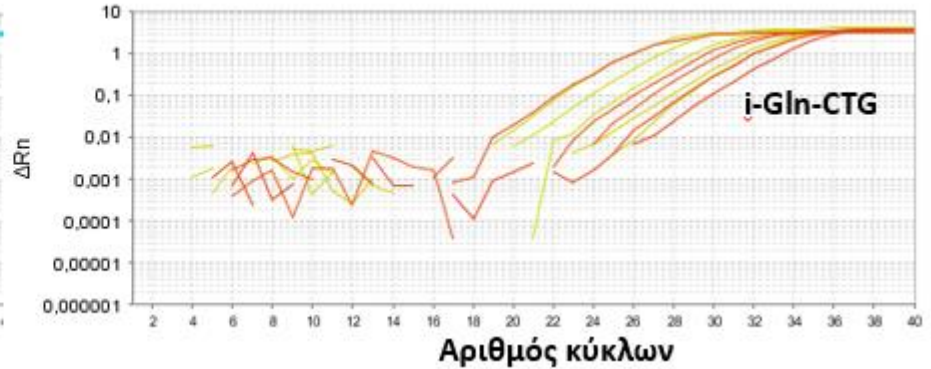
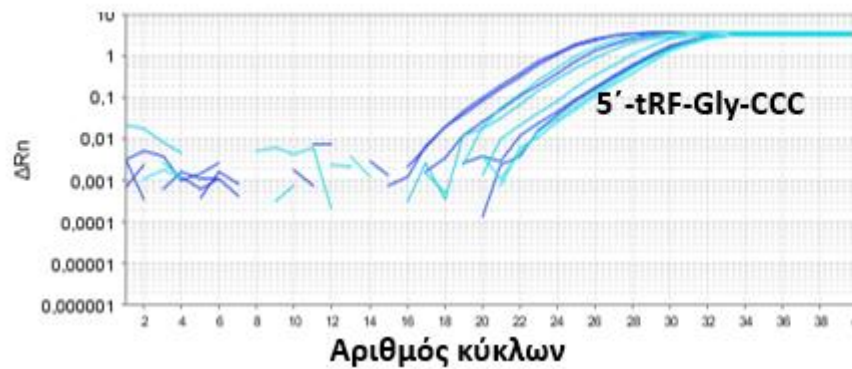
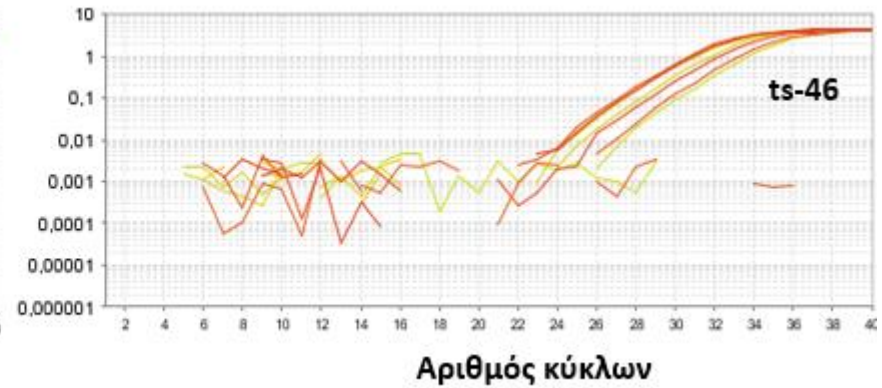
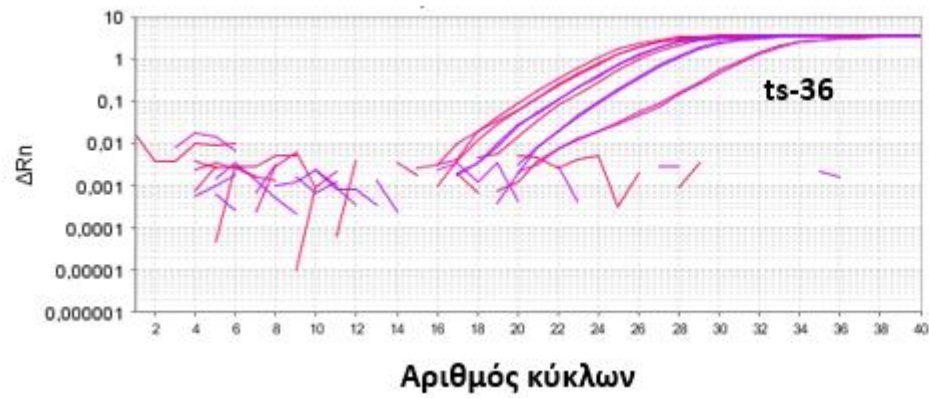
<b>Tests of Normality</b>						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
3half-His-GTG	,299	110	,000	,517	110	,000

a. Lilliefors Significance Correction

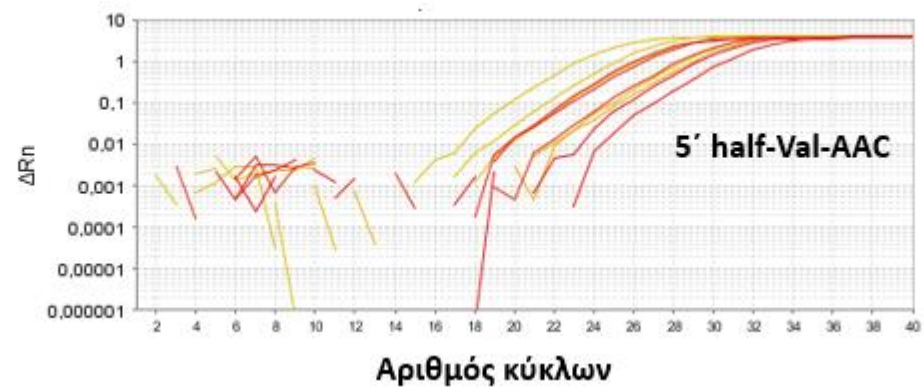
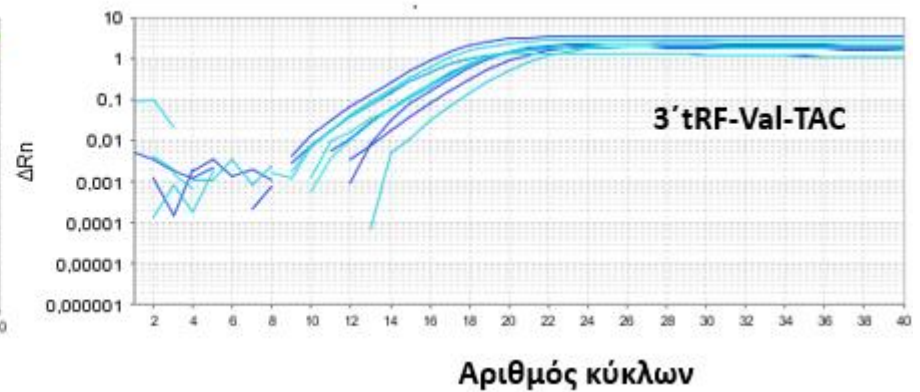
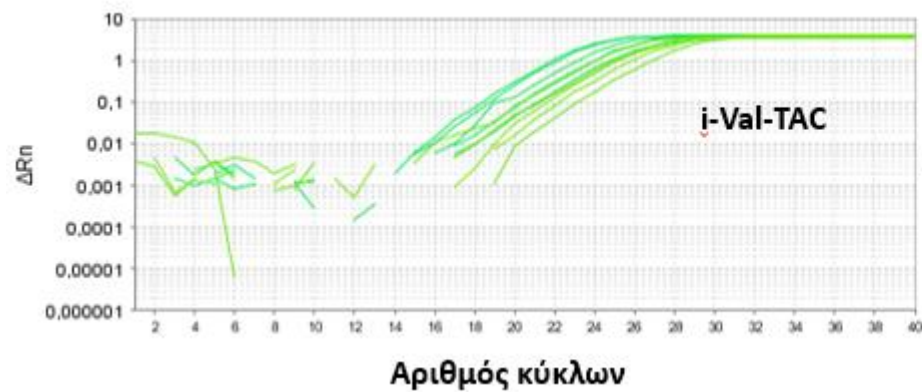
*Εικόνα 8. Kolmogorov-Smirnov και Shapiro-Wilk ανάλυση σε SPSS.*



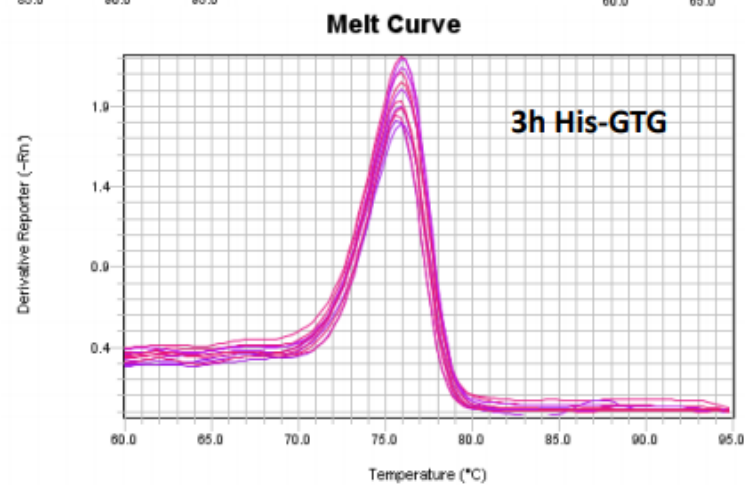
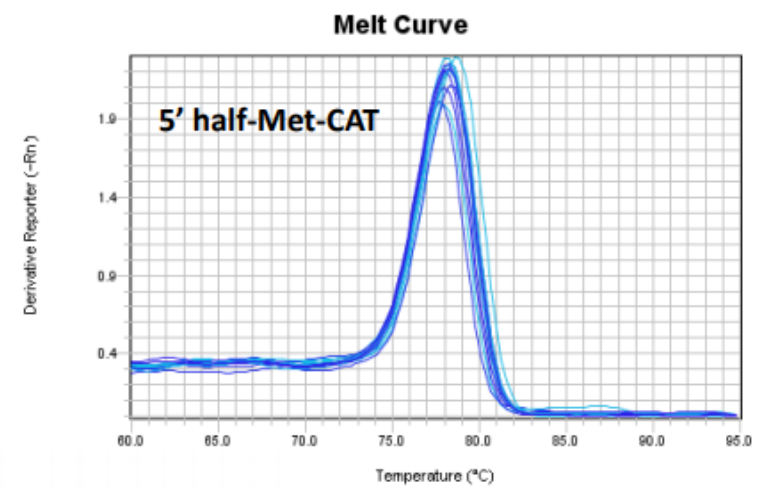
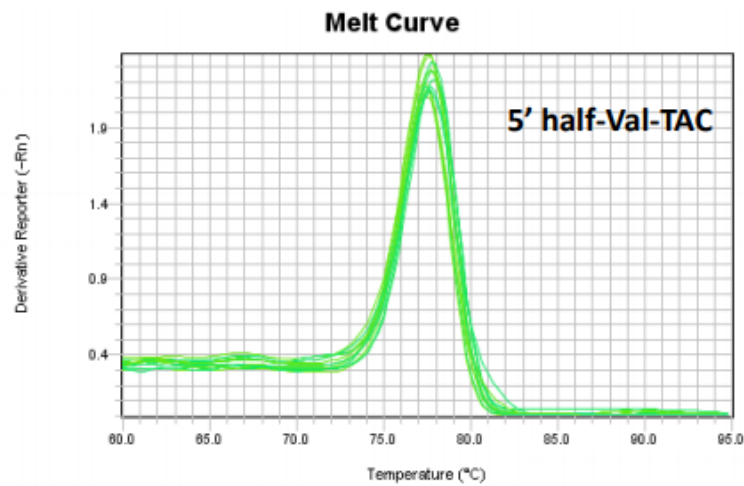
Εικόνα 9. Καμπύλες ενίσχυσης (amplification plots) των τριών μη κωδικών μορίων που μελετήθηκαν σε 120 δείγματα της κοόρτης των ασθενών (NMIBC και MIBC, με 114 δείγματα να αξιοποιούνται στη στατιστική ανάλυση). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το SNORD48 (RNU48) και ως βαθμονομητής η κυτταρική σειρά T24.



Εικόνα 10. Καμπύλες ενίσχυσης (amplification plots) που προέκυψαν από τον έλεγχο των εκκινητών για τα θραύσματα των tRNA μορίων. Απεικονίζεται το σήμα κανονικοποιημένου φθορισμού που υποδηλώνει τα επίπεδα έκφρασης των ts-36, ts-46, 5'-tRF-Gly-CCC, i-Gln-CTG στις κυτταρικές σειρές RT112, T24 και σε τρία δείγματα ασθενών.

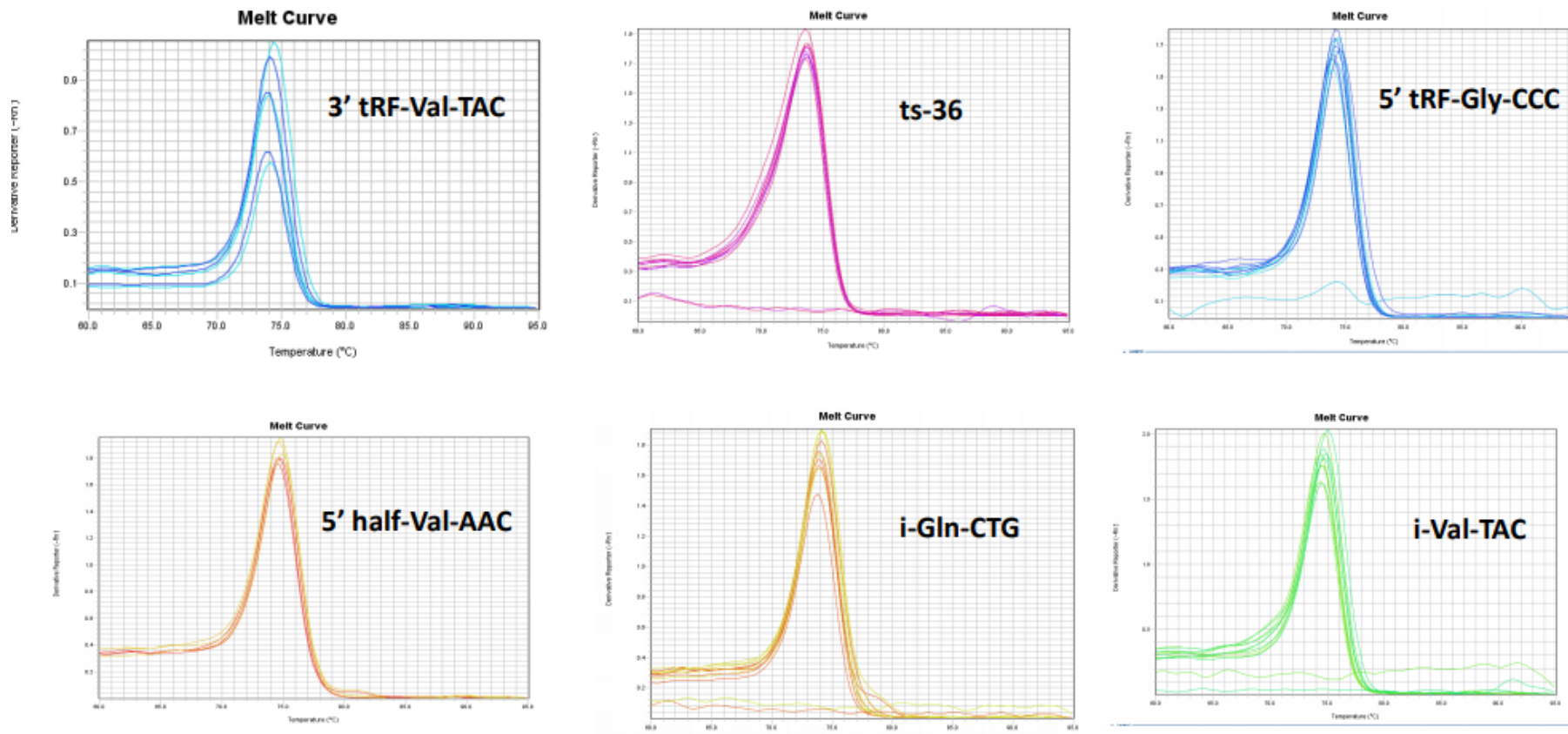


Εικόνα 11. Καμπύλες ενίσχυσης (amplification plots) που προέκυψαν από τον έλεγχο των εκκινήτων για τα θραύσματα των tRNA μορίων. Απεικονίζεται το σήμα κανονικοποιημένου φθορισμού που υποδηλώνει τα επίπεδα έκφρασης των i-Val-TAC, 3'-tRF-Val-TAC, 5' half-Val-AAC κυτταρικές σειρές RT112, T24 και σε τρία δείγματα ασθενών.

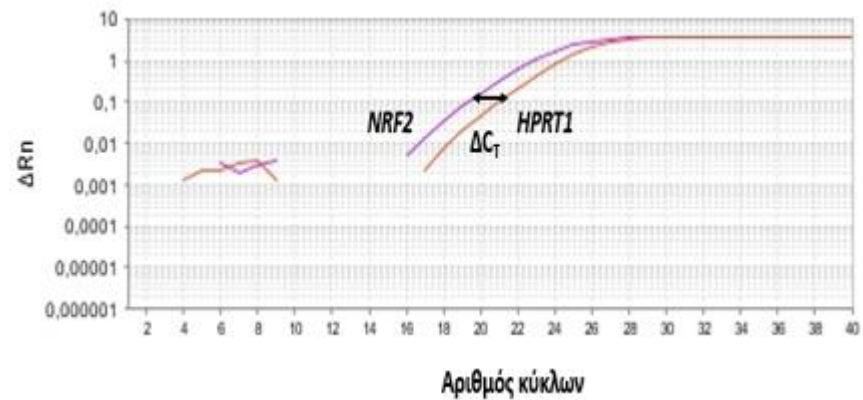
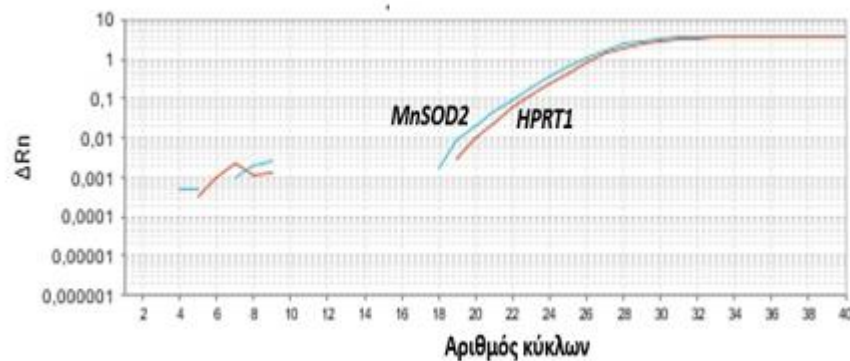
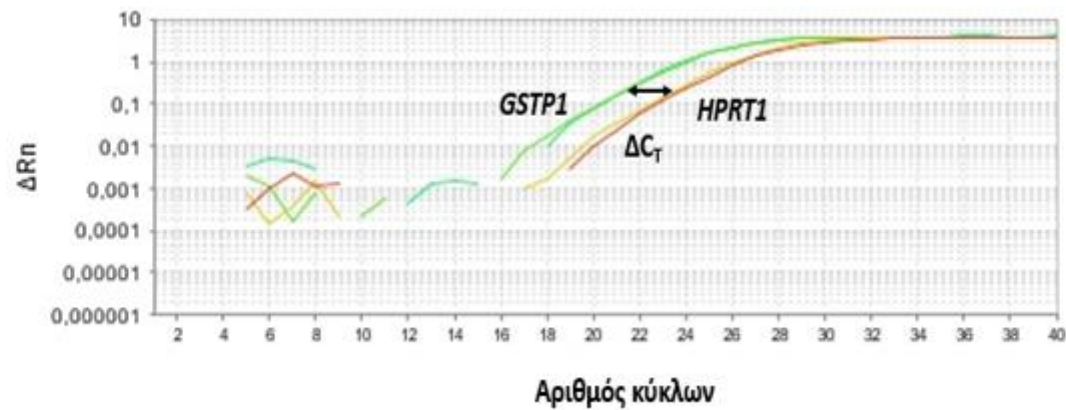


*Εικόνα 12. Καμπύλες τήξης των PCR προϊόντων (melt curve) για τα τρία μη κωδικά μόρια που μελετήθηκαν σε 120 δείγματα ασθενών με καρκίνο της κύστεως. Οι οξείες και μοναδικές κορυφές υποδηλώνουν εξειδικευμένη ενίσχυση των μορίων αυτών, η οποία επιβεβαιώθηκε και με τις εικόνες των gel ηλεκτροφόρησης.*



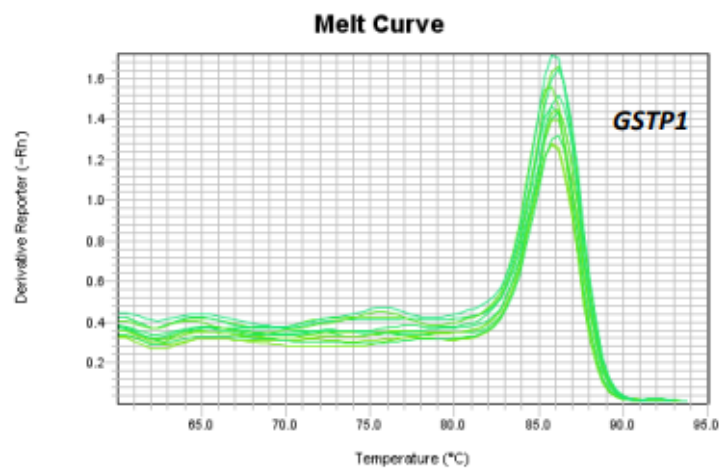
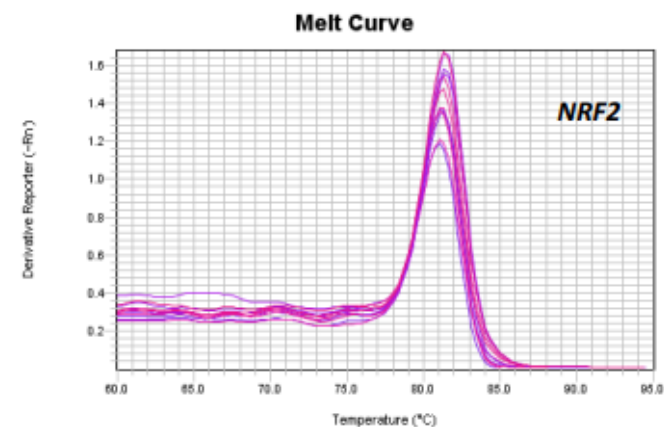
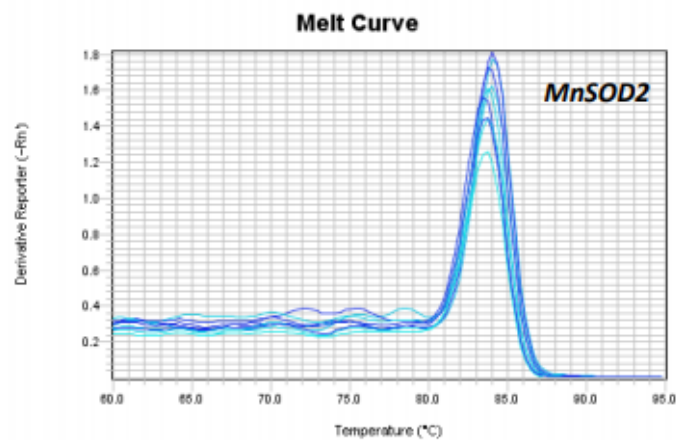


*Εικόνα 13. Καμπύλες τήξης των PCR προϊόντων (melt curve) για όλα τα θραύσματα που ανιχνεύτηκαν στην παρούσα διπλωματική. Οι εικόνες ηλεκτροφορήσεων και οι οξείες κορυφές επιβεβαιώνουν την εξειδικευμένη ενίσχυση των επιθυμητών προϊόντων.*



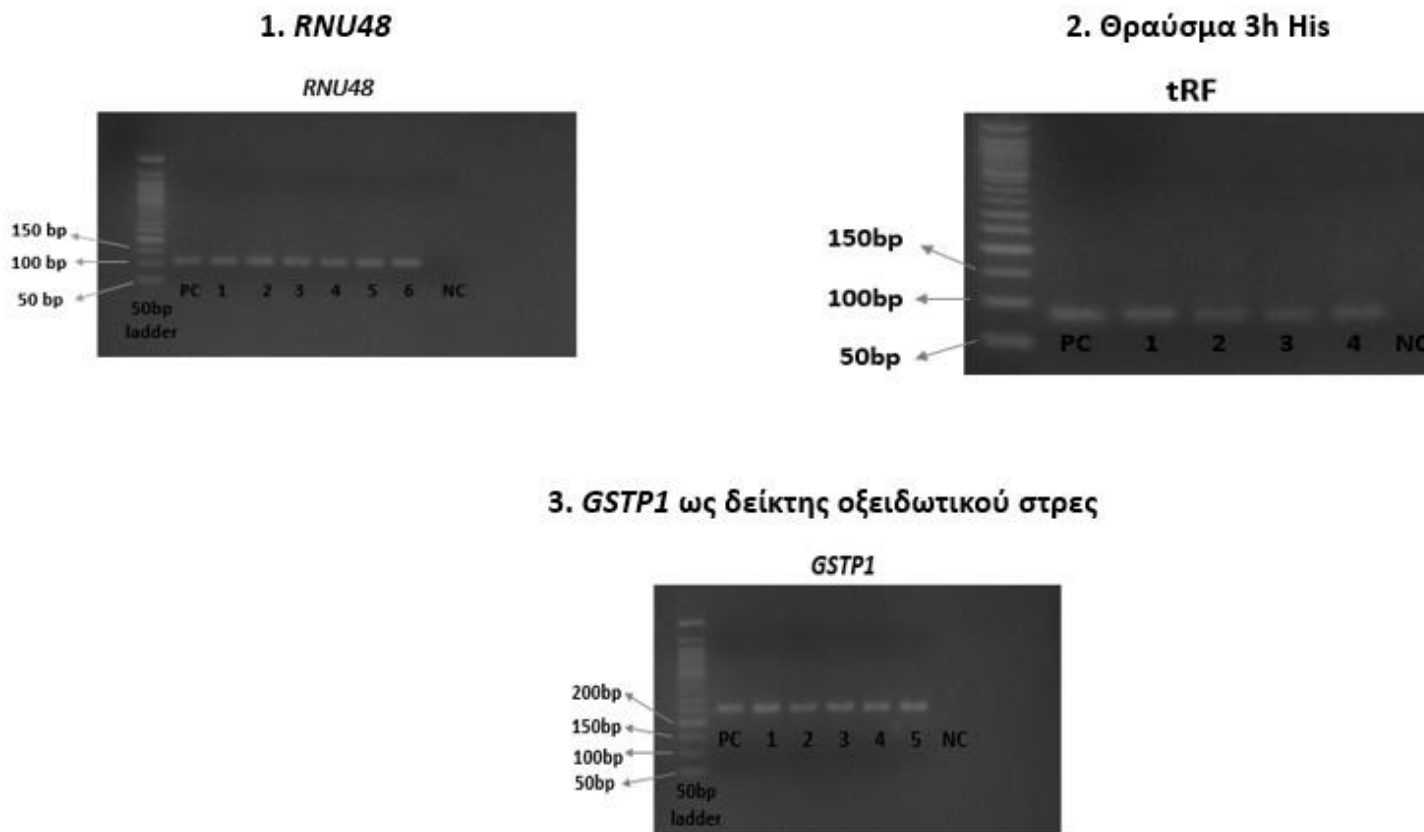
Εικόνα 14. Καμπύλες ενίσχυσης (amplification plots) για τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες *GSTP1*, *MnSOD2*, *NRF2* (53 δείγματα της κοόρτης των ασθενών), για τα οποία είχε προηγηθεί η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των μη κωδικών μορίων. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *HPRT1* και ως βαθμονομητής (calibrator) η κυτταρική σειρά T24.





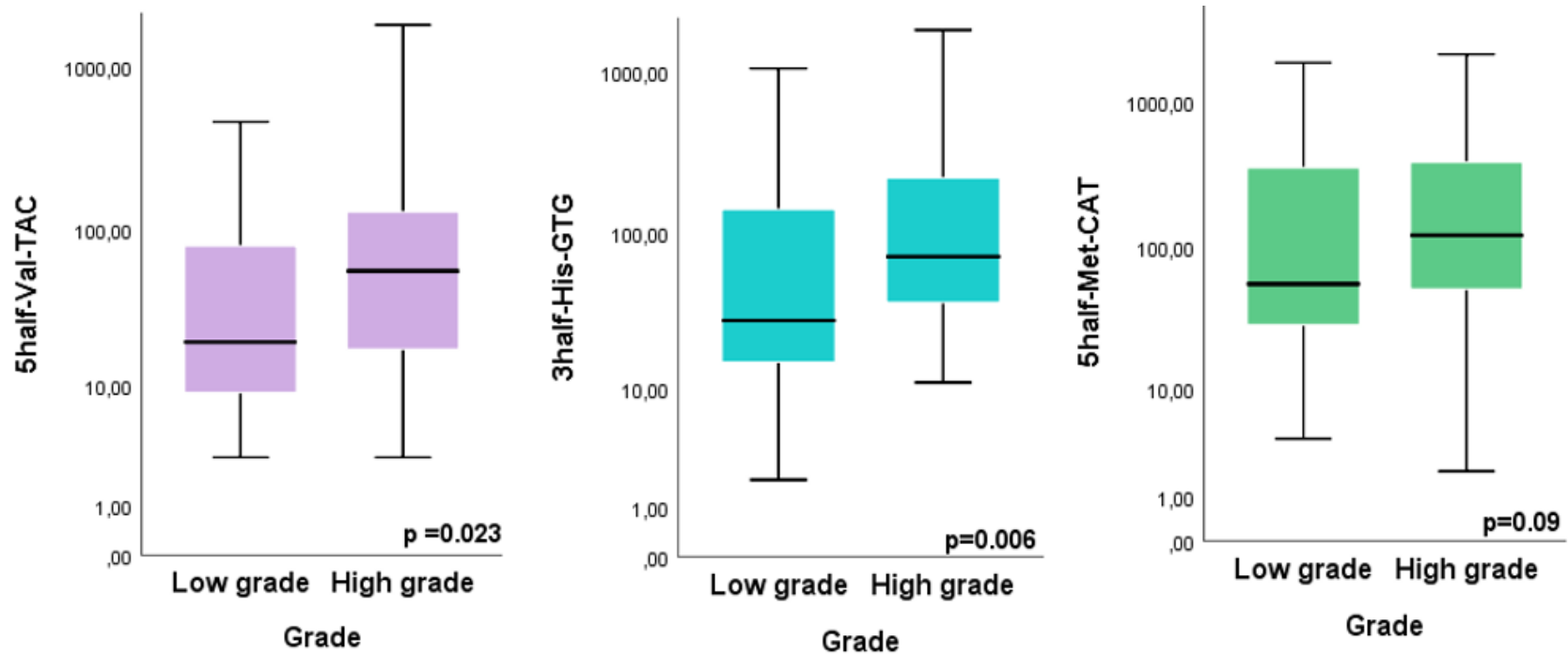
*Εικόνα 15. Καμπύλες τήξης των PCR προϊόντων (melt curve) για τα γονίδια GSTP1, MnSOD, NRF2. Οι ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων, σε συνδυασμό με τις οξείες και μοναδικές κορυφές, υποδηλώνουν την επιλεκτική ενίσχυση των επιθυμητών μορίων-στόχων.*

## Εικόνες ηλεκτροφορήσεων

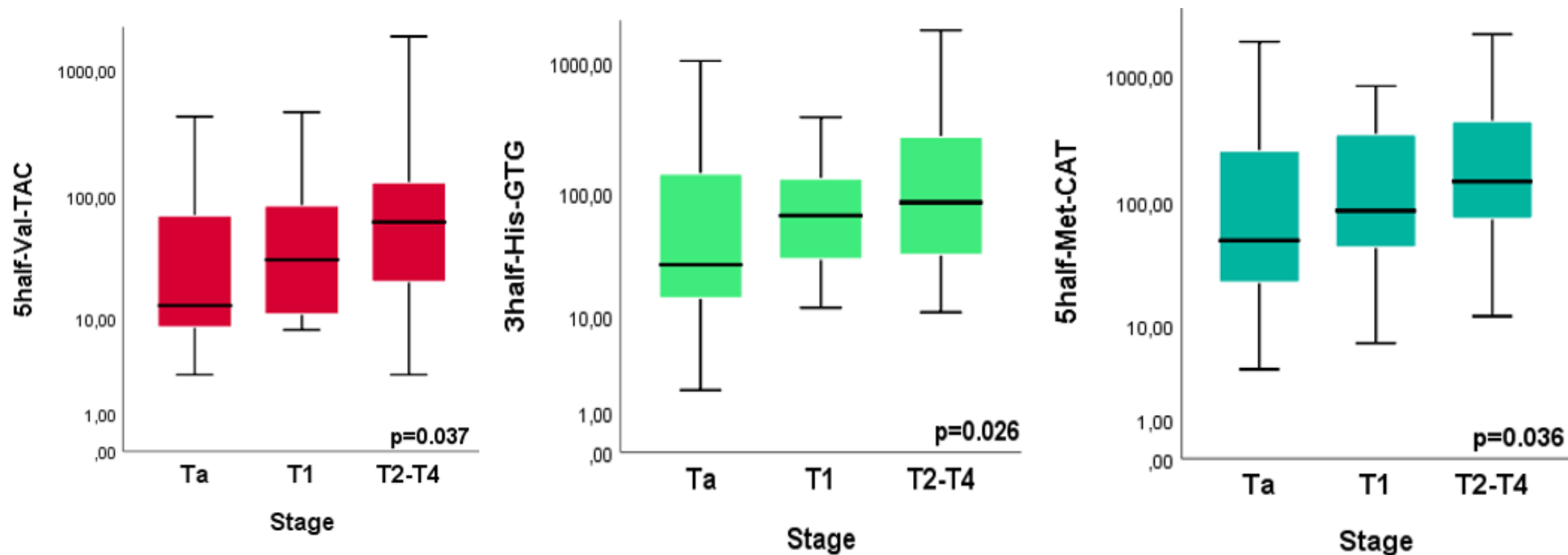


Εικόνα 16. Ενδεικτικές εικόνες ηλεκτροφορήσεων των PCR προϊόντων της ενίσχυσης των RNU48 (γονίδιο αναφοράς), 3' half-His-GTG (*t-halves* (*thalves* ή *tiRNAs*)) και GSTP1 (γονίδιο για οξειδωτικό στρες). Ο μάρτυρας μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκε απεικονίζεται στα αριστερά (50bp ladder) και επιτρέπει την εκτίμηση του μεγέθους των προϊόντων. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τις ηλεκτροφορήσεις ήταν το TBE και η περιεκτικότητα του πηκτώματος αгарόζης που παρασκευάστηκε ήταν 3%.

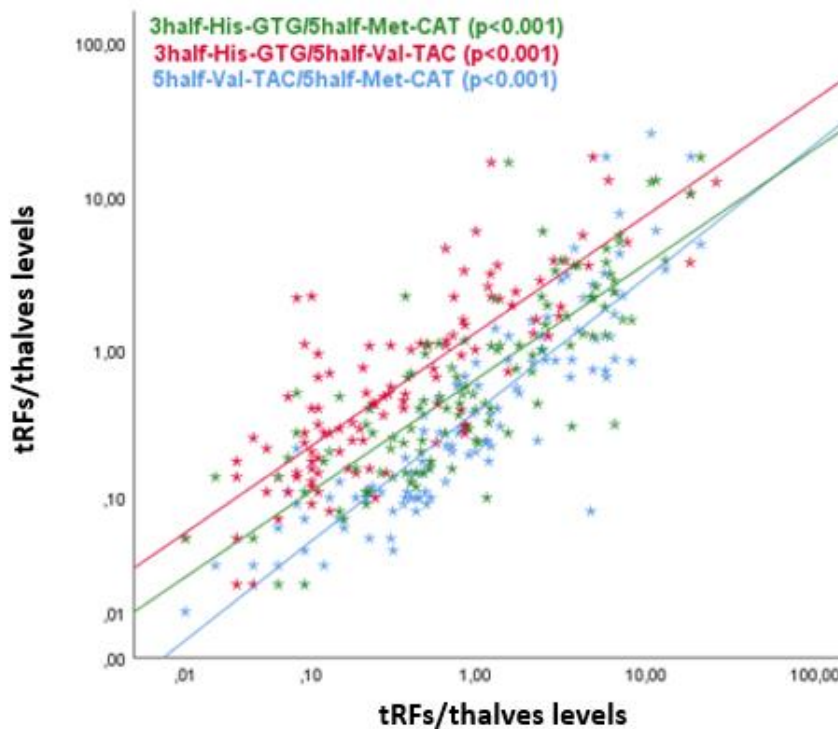
3.3 Εκτίμηση κλινικής αξίας μη κωδικών μορίων: συσχέτιση επιπέδων έκφρασης με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών (grade/stage) και μη παραμετρική ανάλυση Spearman



Εικόνα 17. Ανάλυση με το μη παραμετρική στατιστική δοκιμασία Mann – Whitney U ανέδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης και των τριών μη κωδικών μορίων αυξάνονται καθώς αυξάνεται ο βαθμός αποδιαφοροποίησης του όγκου (σύστημα WHO 2004). Η σχέση αυτή είναι στατιστικά σημαντική, όπως φαίνεται από τα p-values, ειδικά για το 3 half-His-GTG που εμφανίζει  $p=0.006$  (low grade  $n=51$ , high grade  $n=63$ , ολικό=114).

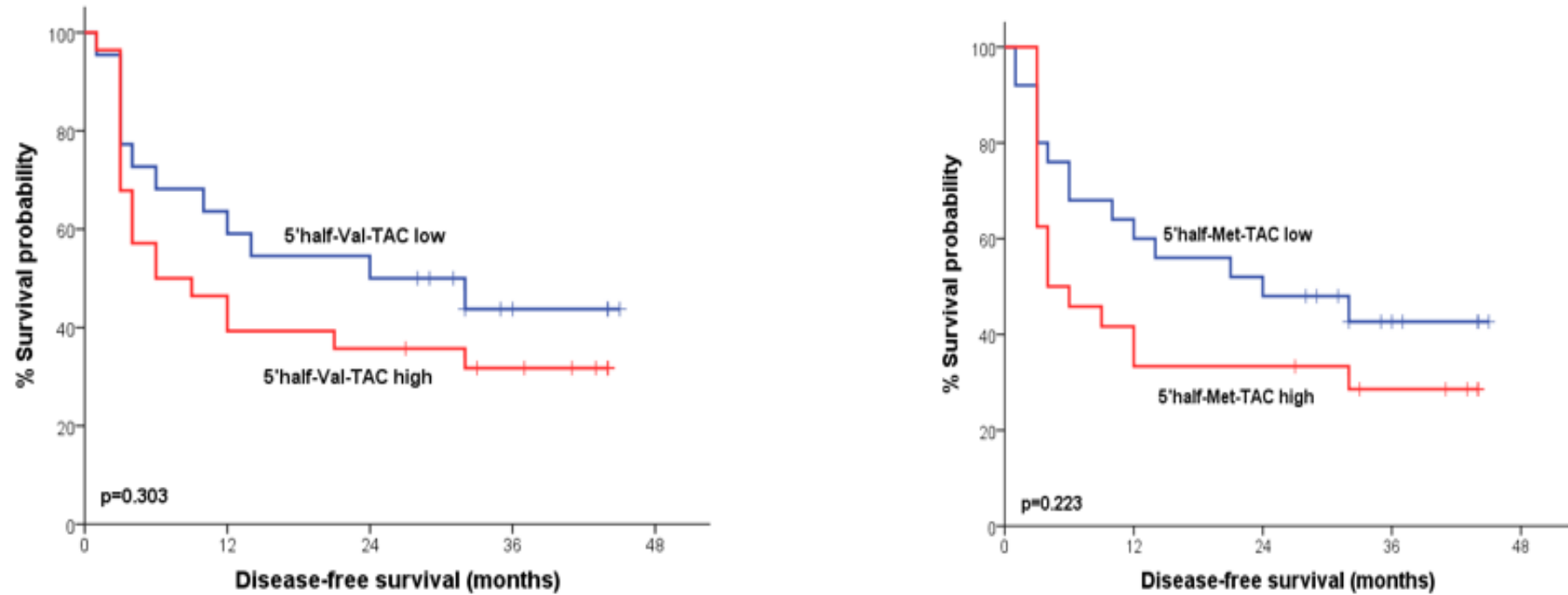


*Εικόνα 18. Η ανάλυση με τη μη παραμετρική στατιστική δοκιμασία Kruskal -Wallis ανέδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης και των τριών μη κωδικών μορίων αυξάνονται σε ανώτερα στάδια της νόσου, με τους μωδιθητικούς όγκους (T2-T4) να παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές. Η σχέση αυτή είναι στατιστικά σημαντική, όπως φαίνεται από τα p-values, ειδικότερα για το 3 half-His-GTG που εμφανίζει  $p=0.026$  και το 5 half-Met-CAT με  $p=0.037$  ( $n_{Ta}=42$ ,  $n_{T1}=27$ ,  $n_{T2-T4}=42$ ).*



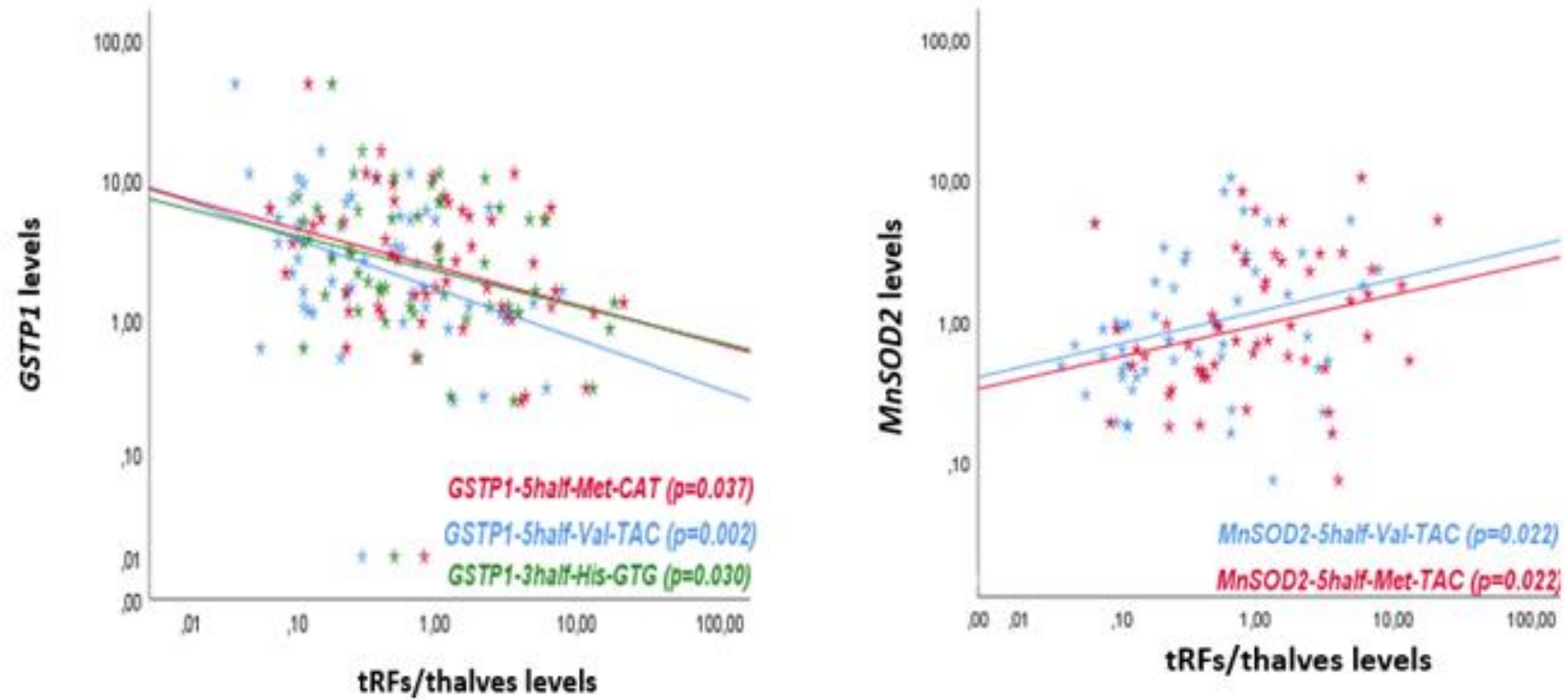
Εικόνα 19. Η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης, ανά ζεύγη, των τριών ενισχυόμενων μη κωδικών μορίων πραγματοποιήθηκε με ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman, καθώς τα επίπεδα έκφρασης αποτελούν ποσοτικές μεταβλητές και παραπάνω παρουσιάζεται το διάγραμμα διασποράς που προέκυψε. Η συσχέτιση και στις τρεις περιπτώσεις είναι θετική και διαφαίνεται ότι η αύξηση των επιπέδων έκφρασης του 5' half-Met-CAT είναι αναλογική με την αύξηση των επιπέδων έκφρασης του 3' half-His-GTG, σε βαθμό εξαιρετικά στατιστικά σημαντικό ( $p < 0.001$ ). Η ίδια γραμμική αναλογική σχέση παρατηρείται και ανάμεσα στα ζεύγη 5' half-Val-TAC και 3' half-His-GTG, 5' half-Val-TAC και 5' half-Met-CAT, με αντίστοιχα εξαιρετικά στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ( $p < 0.001$ ).

### 3.4 Εκτίμηση προγνωστικής αξίας ncRNAs: Ανάλυση επιβίωσης Kaplan Meier



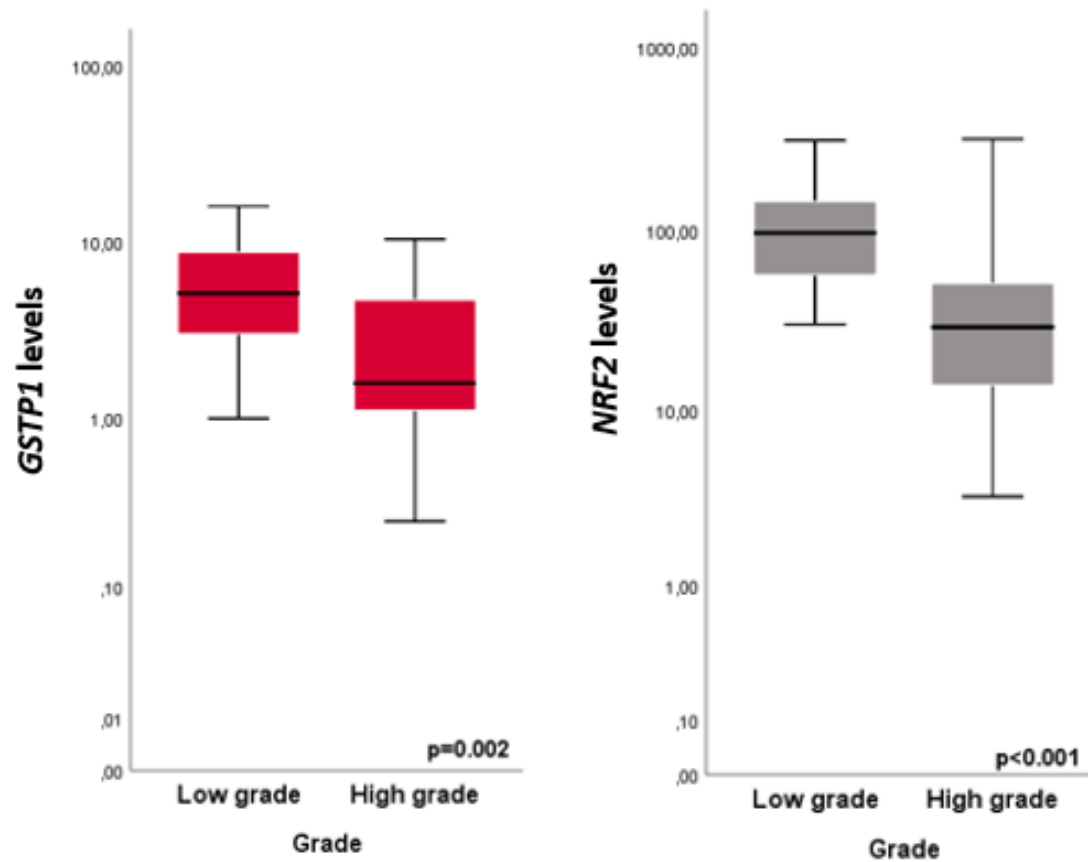
Εικόνα 20. Η ανάλυση επιβίωσης υποδηλώνει ότι η αυξημένη έκφραση των 5'half-Val-TAC και 5'half-Met-CAT σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών, ως συμβάν για την παρούσα ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η υποτροπή των ασθενών (n=73 δείγματα).

3.5 Ανάλυση συσχέτισης Spearman: συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης *GSTP1*, *SOD2* και *NRF2* με τα επίπεδα έκφρασης των ncRNAs



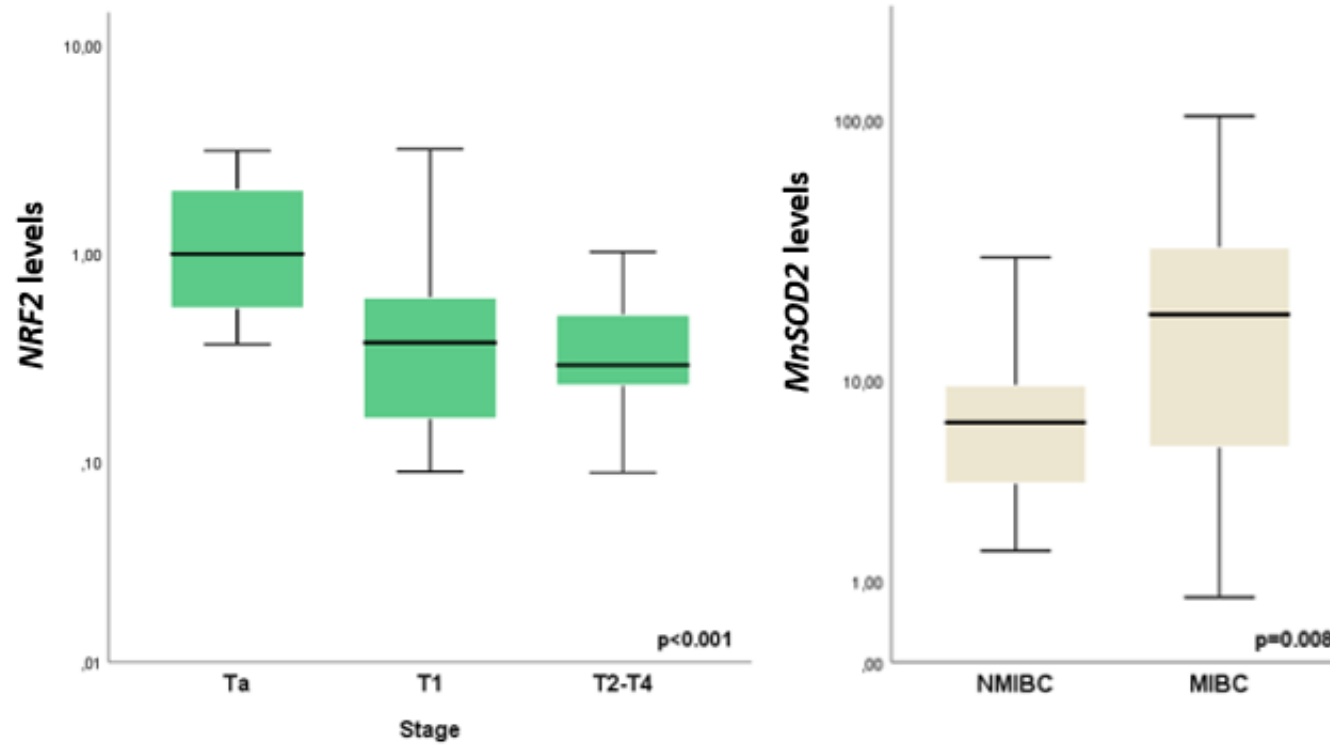
Εικόνα 21. Ανάλυση συσχέτισης Spearman και διαγράμματα διασποράς για επίπεδα έκφρασης των γονιδίων και των ncRNAs ( $n=53$ ).

### 3.6 Συσχέτιση γονιδίων-δεικτών οξειδωτικού στρες με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

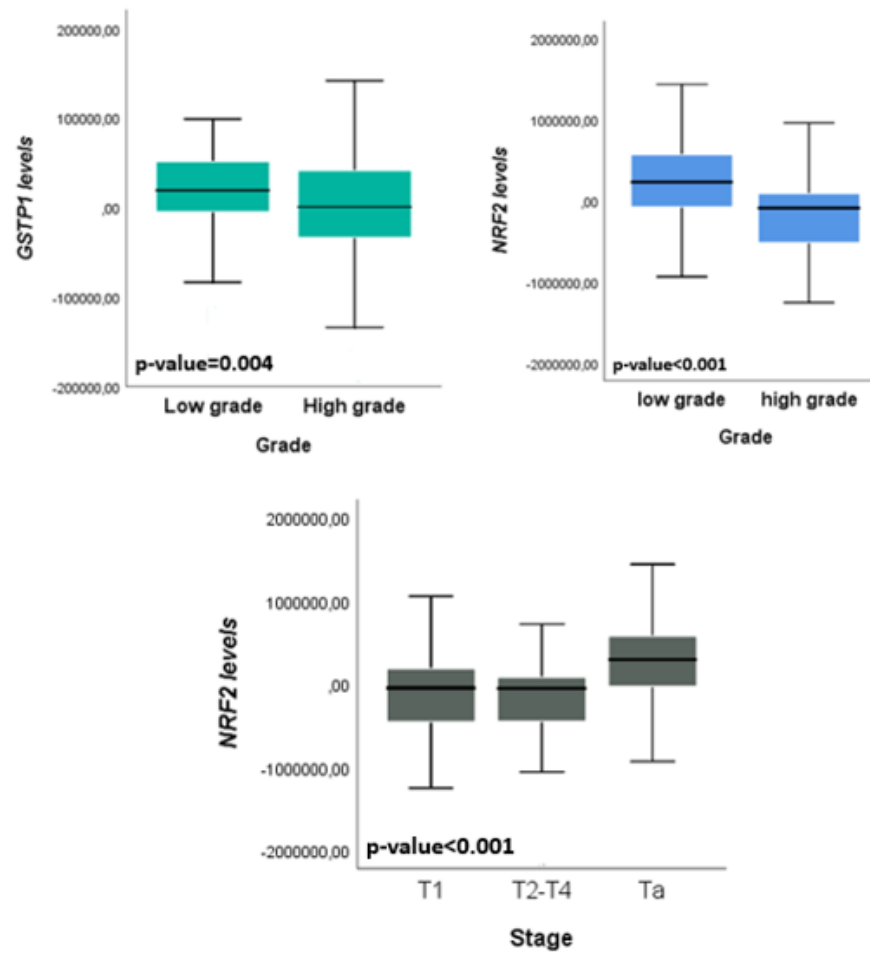


Εικόνα 22. Τα επίπεδα έκφρασης των GSTP1 και NRF2 μειώνονται στους αδιαφοροποίητους όγκους, συγκριτικά με τους καλά διαφοροποιημένους ( $p$ -value =0,002,  $p$ -value<0,001, n low grade =19, n high grade =34).



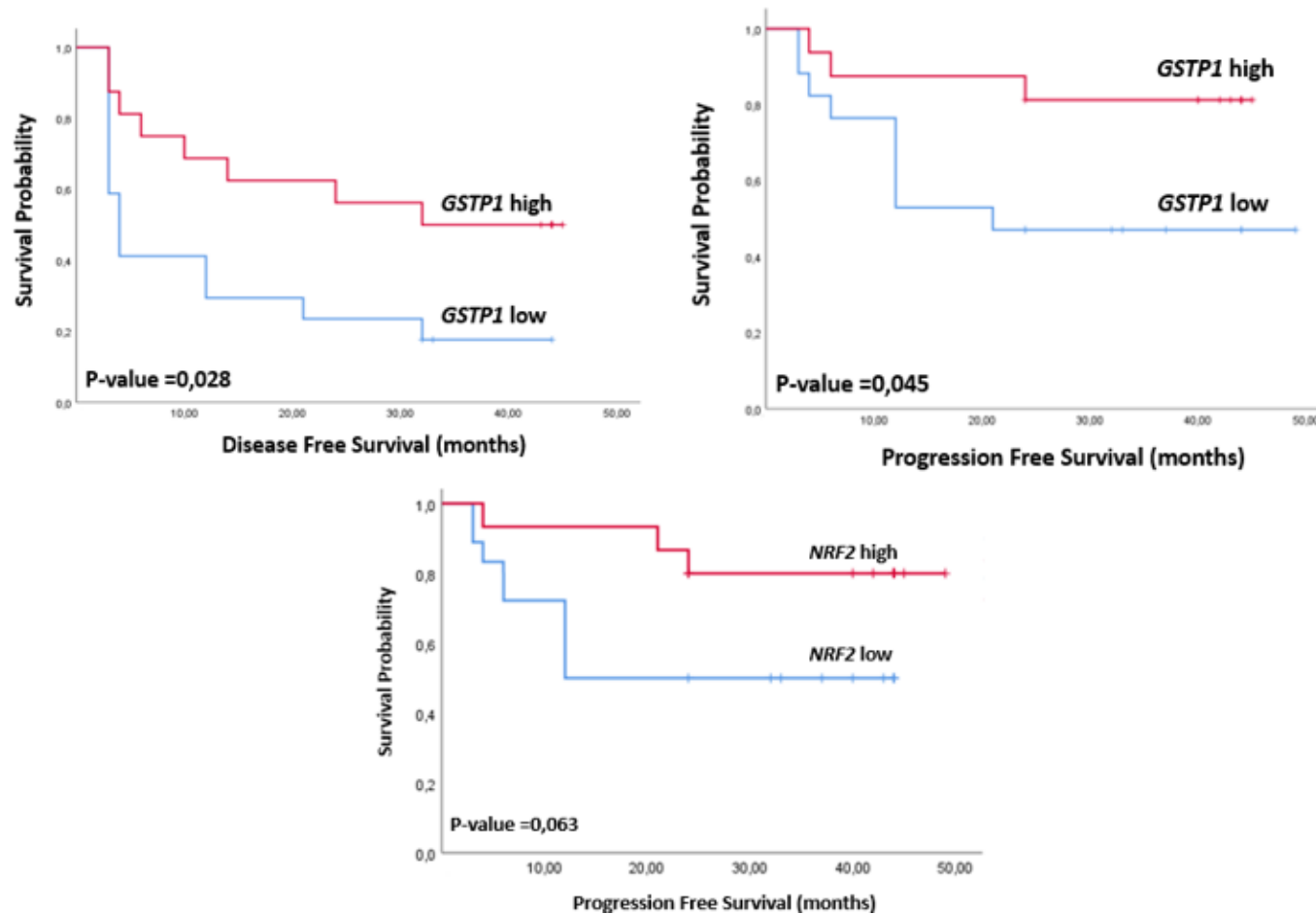


Εικόνα 23. Μείωση των επιπέδων του NRF2 σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου ( $p$ -value<0,001, Kruskal Wallis ανάλυση) και τα επίπεδα του SOD2 αυξάνονται σημαντικά στους μυοδιηθητικούς τύπους, συγκριτικά με τους επιφανειακούς όγκους ( $p$ -value=0,008, Mann Whitney,  $n_{Ta}=17$ ,  $n_{T1}=15$ ,  $n_{T2-T4}=21$ ).



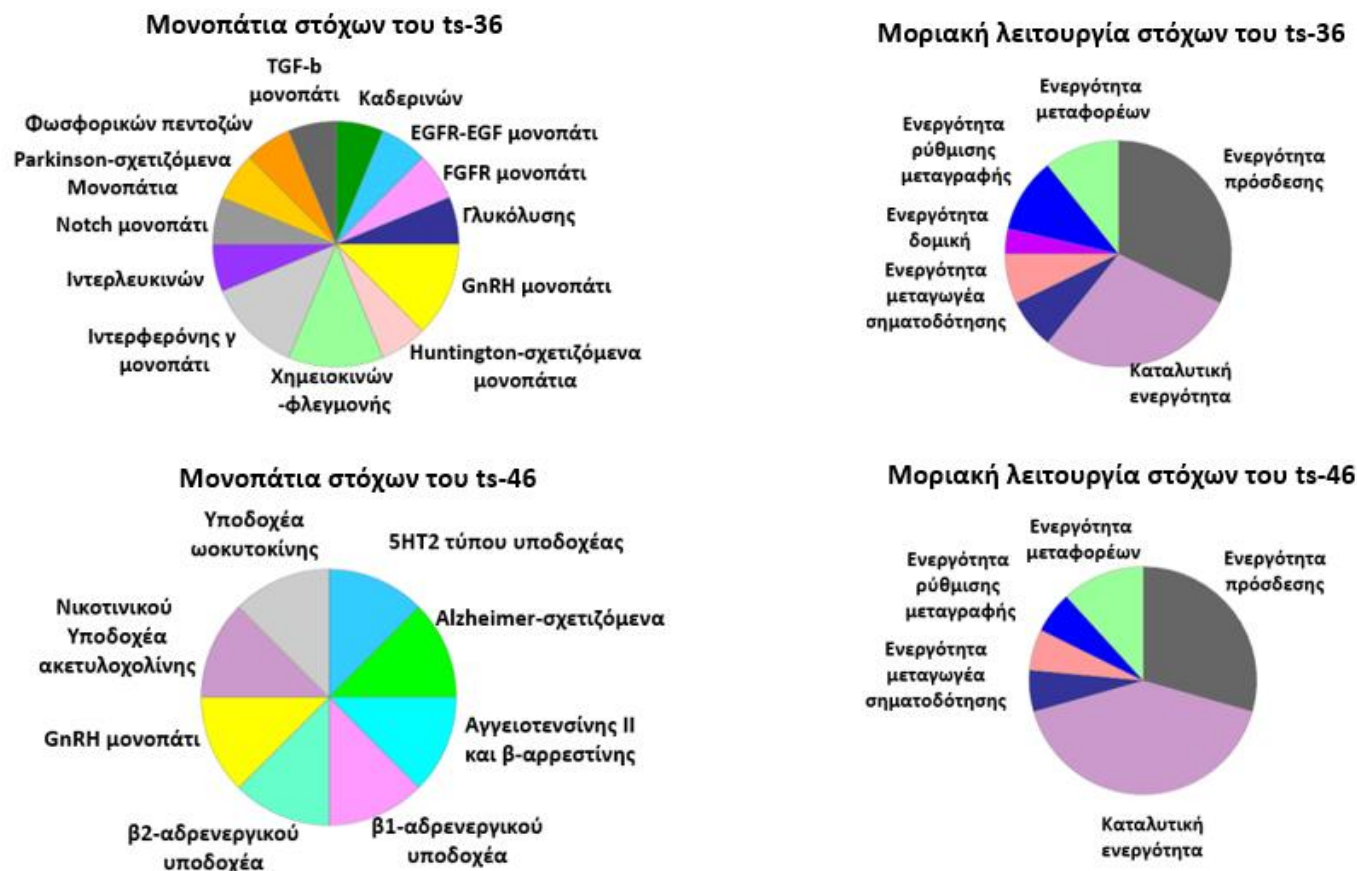
Εικόνα 24. Με τη χρήση ανεξάρτητης ομάδας επικύρωσης (δεδομένα που υπάρχουν κατατεθειμένα στη GEO, n=305) φαίνεται να επιβεβαιώνονται τα πειραματικά αποτελέσματα που αφορούν τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων και τη διασύνδεσή τους με κλινικοπαθολογικά δεδομένα.

### 3.7 Εκτίμηση προγνωστικής αξίας των επιπέδων έκφρασης των *GSTP1*, *SOD2*, *NRF2* : Ανάλυση επιβίωσης Kaplan Meier



Εικόνα 25. Καμπύλες Kaplan Meier για εκτίμηση πιθανότητας επιβίωσης των ασθενών ελεύθερας νόσου και ελεύθερας υποτροπής/εξέλιξης, με παράγοντα μελέτης τα επίπεδα των *GSTP1* και *NRF2* ( $n=35$  δείγματα NMIBC, το cut-off για κάθε καμπύλη υπολογίστηκε με τον αλγόριθμο X-tile και δεν ταυτίζεται για τα δυο γονίδια).

3.8 Ποιοτικά διαγράμματα βιοπληροφορικής ανάλυσης: Μοριακά μονοπάτια και λειτουργίες των γονιδίων-στόχων των ncRNAs και σχεδιασμός δικτύων αλληλεπίδρασης (network analysis)



Εικόνα 26. Διαγράμματα που προέκυψαν από τη βιοπληροφορική ανάλυση των πιθανών στόχων των μη κωδικών μορίων ts-36 και ts-46. Απεικονίζονται τα μοριακά μονοπάτια, στα οποία εμπλέκονται τα γονίδια-πιθανοί στόχοι των μη κωδικών μορίων και οι ομαδοποιήσεις τους με βάση τη μοριακή λειτουργία.

### Μονοπάτια στόχων του 3'-tRF-Val-TAC



### Μοριακή λειτουργία στόχων του 3'-tRF-Val-TAC



### Μονοπάτια στόχων του i-tRF-Val-TAC



### Μοριακή λειτουργία στόχων του i-tRF-Val-TAC



Εικόνα 27. Διαγράμματα που προέκυψαν από τη βιοπληροφορική ανάλυση των πιθανών στόχων των μη κωδικών μορίων 3'-tRF-Val-TAC και i-tRF-Val-TAC. Απεικονίζονται τα μοριακά μονοπάτια, στα οποία εμπλέκονται τα γονίδια-πιθανοί στόχοι των μη κωδικών μορίων και οι ομαδοποιήσεις τους με βάση τη μοριακή λειτουργία.

### Μονοπάτια στόχων του 5'-half-Val-TAC



### Μοριακή λειτουργία στόχων του 5'-half-Val-TAC



### Μοριακή λειτουργία στόχων του 5'-half-Met-CAT



Εικόνα 28. Διαγράμματα που προέκυψαν από τη βιοπληροφορική ανάλυση των πιθανών στόχων των μη κωδικών μορίων 5'-half-Val-TAC και 5'-half-Met-CAT. Απεικονίζονται τα μοριακά μονοπάτια, στα οποία εμπλέκονται τα γονίδια-πιθανοί στόχοι των μη κωδικών μορίων και οι ομαδοποιήσεις τους με βάση τη μοριακή λειτουργία.

### Μοριακή λειτουργία στόχων του 5'-tRF-Gly-CCC



### Μοριακή λειτουργία στόχων του i-tRF-Gln-CTG

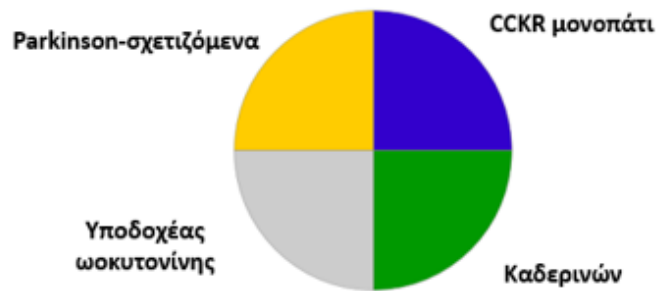


### Μοριακή λειτουργία στόχων του 5'-half-Val-AAC



Εικόνα 29. Διαγράμματα που προέκυψαν από τη βιοπληροφορική ανάλυση των πιθανών στόχων των μη κωδικών μορίων i-Gln-GTG, 5 half-Val-AAC και 5' tRF-Gly-CCC. Απεικονίζονται οι ομαδοποιήσεις των γονιδίων που αποτελούν πιθανούς στόχους των μη κωδικών μορίων, με βάση τη μοριακή λειτουργία τους.

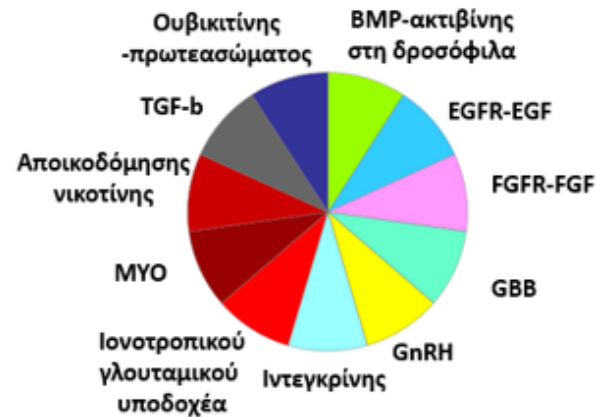
### Μονοπάτια στόχων του 5'-tRF-Gly-CCC



### Μονοπάτια στόχων του i-tRF-Gln-CTG

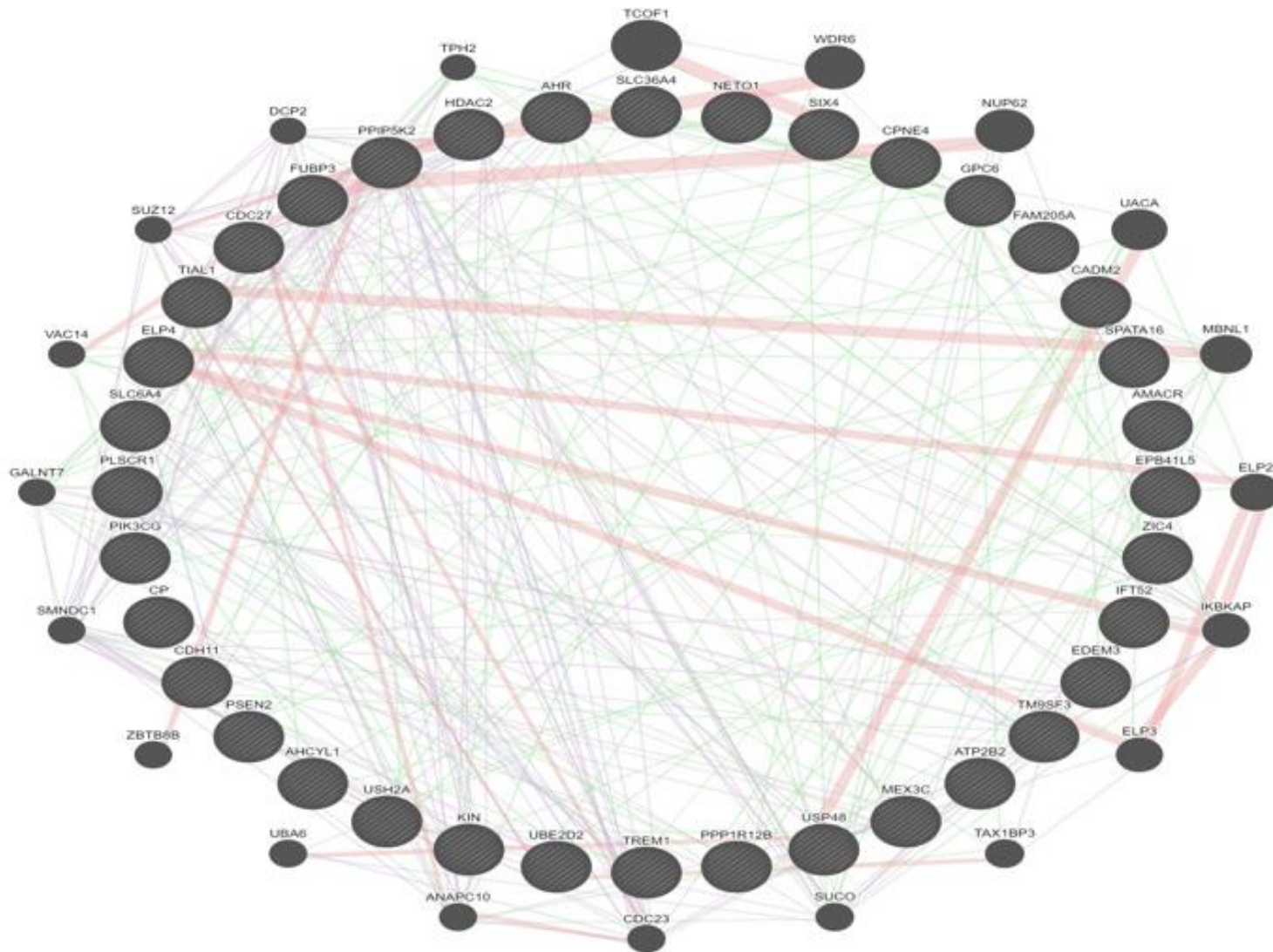


### Μονοπάτια στόχων του 5'-half-Val-AAC



Εικόνα 30. Διαγράμματα που προέκυψαν από τη βιοπληροφορική ανάλυση των πιθανών στόχων των μη κωδικών μορίων i-Gln-GTG, 5 half-Val-AAC και 5' tRF-Gly-CCC. Απεικονίζονται τα μοριακά μονοπάτια στα οποία πιθανά εμπλέκονται τα γονίδια-πιθανοί στόχοι.





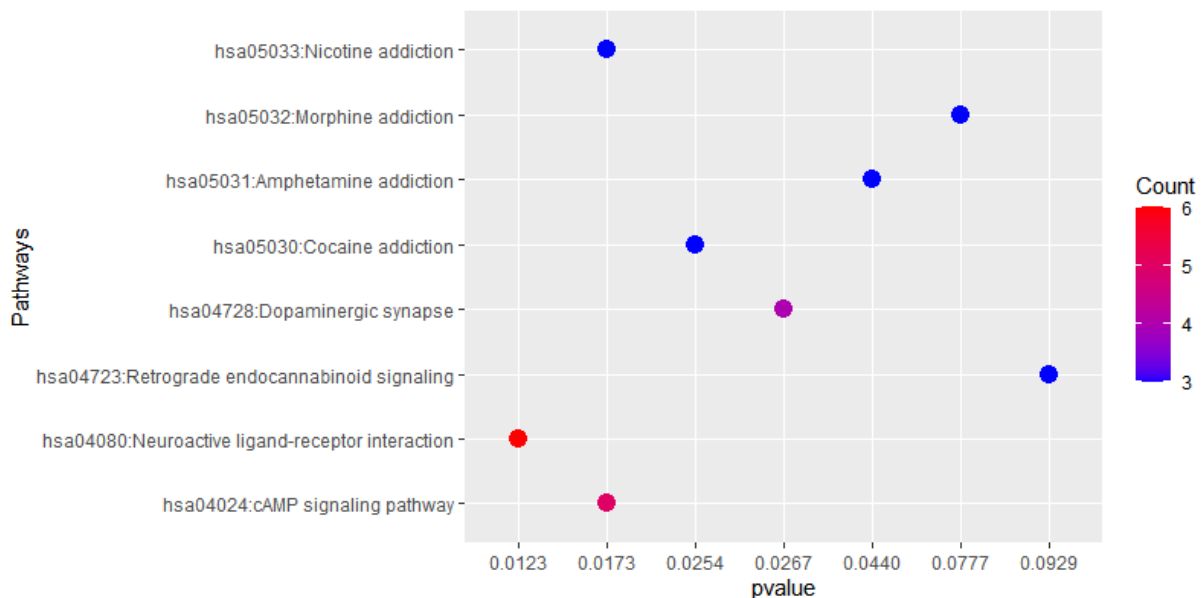
Εικόνα 31. Απεικόνιση δικτύου αλληλεπιδράσεων των πιθανών γονιδίων στόχων του 5' half-Val-TAC (network analysis).



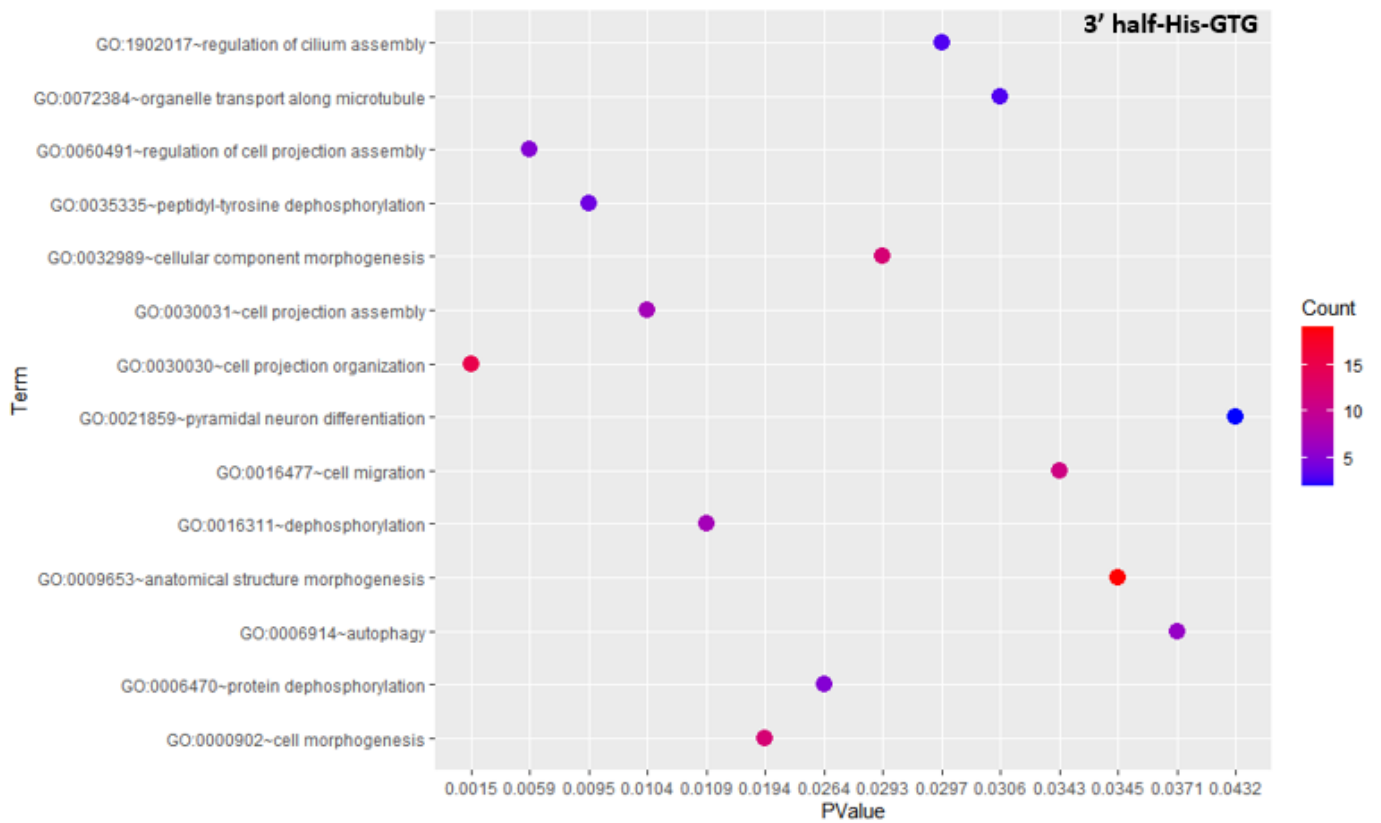
### 3.9 Διαγράμματα GO και KEGG ανάλυσης, χρήση προγραμματιστικού περιβάλλοντος

#### R

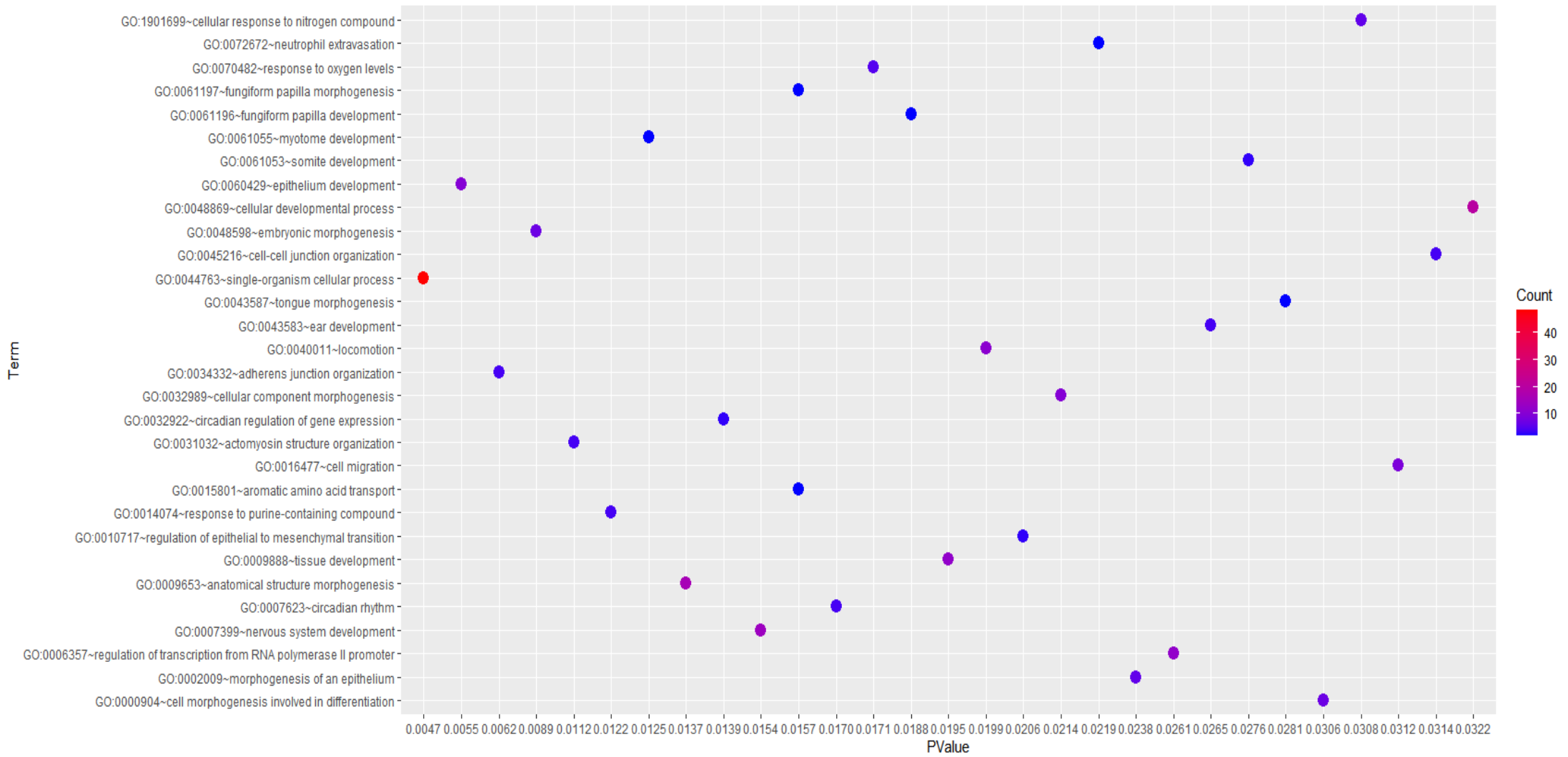
Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα που προέκυψαν από τη βιοπληροφορική ανάλυση, η οποία πραγματοποιήθηκε σε προγραμματιστικό περιβάλλον R και για το σχεδιασμό τους δημιούργησα ένα σύνολο εντολών (ο εκάστοτε ερευνητής δημιουργεί εκ νέου τις προγραμματιστικές εντολές για να απεικονίσει μονοπάτια και όρους οντολογίας συναρτήσει των τιμών p-value). Στόχος των διαγραμμάτων είναι η πιο γλαφυρή αναπαράσταση του λειτουργικού ρόλου που πιθανώς διαθέτουν τα μη κωδικά μόρια που ανιχνεύθηκαν και ελέγχθηκαν για την κλινική τους αξία σε δείγματα ασθενών.



Εικόνα 33. Μονοπάτια που πιθανώς επηρεάζονται από το 5' half-Met-CAT.



Εικόνα 34. GO ανάλυση για πιθανούς στόχους του 3' half-His-GTG.



Εικόνα 35. GO ανάλυση για πιθανούς στόχους του 5'half-Val-TAC.



#### 4. Συζήτηση

Ο επαναπρογραμματισμός της μεταγραφής διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση στο κυτταρικό στρες, μέσω τροποποιήσεων στις κυτταρικές λειτουργίες και στα πρωτεϊνικά επίπεδα. Τα θραύσματα που προέρχονται από θραύση ώριμων tRNA μορίων σε θέσεις εκατέρωθεν της θηλιάς του αντικωδικονίου, t-halves (tiRNAs) (ή tiRNAs) φαίνεται να αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση υπό στρεσογόνες συνθήκες προκειμένου να διαφυλάξουν τα ενεργειακά αποθέματα των κυττάρων. Η βασική ριβονουκλεάση που εμπλέκεται στη θραυσματοποίηση με τελικά προϊόντα τα t-halves (thalves ή tiRNAs), καλείται αγγειογενίνη<sup>32</sup>.

Έως σήμερα υπάρχει η βιβλιογραφική αναφορά ότι τα θραύσματα 5'-tiRNA-Ala/Cys, τα οποία φέρουν ένα μοτίβο ολιγογουανινών δρουν συνεργιστικά με την Y-box πρωτεΐνη 1 (YB-1) για να αποτρέψουν τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4F (eIF4F) από τη συγκρότηση προεναρκτηρίου συμπλόκου και ταυτόχρονα επάγουν τον σχηματισμό στρεσογόνων συσσωματωμάτων. Ακόμη, τα t-halves (tiRNAs) φαίνεται να συμμετέχουν στην απόπτωση, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με το κυτόχρωμα c και συγκροτώντας ένα ριβονουκλεϊνικό σύμπλοκο που οδηγεί στην μείωση της ενεργότητας του αποπτωσώματος<sup>49</sup>.

Οι συμπαγείς όγκοι χαρακτηρίζονται από ένα ιδιαίτερα υποξικό περιβάλλον και το ένζυμο της αγγειογενίνης φαίνεται να εμπλέκεται σε διάφορους καρκινικούς τύπους όπου έχει χαρακτηριστεί κυρίως ως προς την προώθηση της αγγειογένεσης. Η αγγειογενίνη μέσω της παραγωγής των t-halves (tiRNAs) φαίνεται να διαθέτει και έναν επιπρόσθετο ρόλο στον καρκίνο. Ορισμένα t-halves (tiRNAs) χαρακτηρίστηκαν για την ικανότητα τους να προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε διάφορους τύπους καρκίνου<sup>41</sup>. Ως επί το πλείστον, τα επίπεδα των t-halves (tiRNAs) αυξάνονται στους καρκινικούς ιστούς και τις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Ωστόσο, έχει φανεί ότι το ίδιο θραύσμα μπορεί να έχει διαφορετικούς ρόλους ανάλογα με το είδος του καρκινικού ιστού. Η βασικότερη ερμηνεία που έχει προταθεί για την αύξηση των επιπέδων των περισσότερων t-halves (tiRNAs) στους καρκινικούς ιστούς, σχετίζεται με την αύξηση των επιπέδων της αγγειογενίνης που φαίνεται να παρατηρείται<sup>42</sup>.

Το αυξημένο κυτταρικό στρες που επάγεται είτε από γενετικούς παράγοντες (πολυμορφισμοί μιας θέσης, SNPs) είτε από περιβαλλοντικούς αποτελεί ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του καρκίνου. Επομένως, η μελέτη των t-halves (thalves ή tiRNAs), τα

οποία φαίνεται να ευνοούν την κυτταρική επιβίωση σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι τα 22 tRNA μόρια που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα συγκριτικά με τα 610 από το πυρηνικό συνεισφέρουν κατά 30% στην παραγωγή διακριτών θραυσμάτων tRNA (tRFs/t-halves (thalves ή tiRNAs)) που ανιχνεύτηκαν στα πλαίσια του TCGA, αποτέλεσαν βασικούς λόγους για την επιλογή των μιτοχονδριακών θραυσμάτων. Ακόμη, η επιλογή του θραύσματος που προέρχεται από το mt-tRNA της μεθειονίνης, βασίστηκε και στο γεγονός ότι αποτελεί μόριο με εξέχουσα σημασία για τη μεταφραστική μηχανή του μιτοχονδρίου, καθώς ύστερα από τη μεθυλίωση και φορμυλίωση του δρα ως εναρκτήριο μόριο προσαρμογέας στη μετάφραση, γεγονός που αποτελεί ειδοποιό διαφορά από τη πρωτεϊνοσύνθεση που συντελείται στο κυτταρόπλασμα.

Τα επίπεδα των τριών μιτοχονδριακών θραυσμάτων φαίνεται να αυξάνονται σε αδιαφοροποίητους όγκους, συγκριτικά με τους καλά διαφοροποιημένους και σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου, όπως οι μυοδιηθητικοί τύποι. Η μη παραμετρική ανάλυση Mann Whitney U ανέδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης του μιτοχονδριακού θραύσματος **3'half-His-GTG** είναι αυξημένα στους αδιαφοροποίητους όγκους, συγκριτικά με τους καλά διαφοροποιημένους, με τιμή **p-value=0.006** και για τα **5'half-Val-TAC**, **p-value=0.026**, **5'half-Met-CAT**, **p-value=0.09**.

Το ίδιο ανοδικό πρότυπο των επιπέδων έκφρασης των τριών μιτοχονδριακών θραυσμάτων παρατηρείται και σε συνάρτηση με τα στάδια της νόσου. Η μη παραμετρική ανάλυση **Kruskall Wallis** έδειξε ότι αυξάνονται τα επίπεδα των μη κωδικών μορίων σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου, με το μιτοχονδριακό θραύσμα **3'half-His-GTG** να εμφανίζει την πιο στατιστικά σημαντική σχέση **p-value=0.026** και ακολουθούν το **5'half-Val-TAC** με **p-value=0.036** και το **5'half-Met-CAT**, **p-value =0.037**.

Η προγνωστική αξία των μιτοχονδριακών θραυσμάτων εκτιμήθηκε από την κατασκευή των καμπυλών Kaplan Meier. Οι όγκοι που εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα των **5'half-Val-TAC** και **5'half-Met-CAT** συγκριτικά με εκείνους που τα υποεκφράζουν παρουσιάζουν μειωμένη πιθανότητα επιβίωσης ελεύθερας νόσου (**Disease Free Survival, DFS**). Ειδικότερα, μετά τους πρώτους μήνες παρατηρείται εξαιρετικά μεγάλη πτώση της πιθανότητας επιβίωσης, με τους ασθενείς που υπερεκκράζουν τα t-halves (tiRNAs) να αγγίζουν επίπεδα μικρότερα του 40%.

Τα επίπεδα των θραυσμάτων tRNA επηρεάζονται σημαντικά από τις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις που επιδέχονται τα ώριμα tRNA μόρια. Συγκεκριμένα στην περιοχή της θηλιάς του αντικωδικονίου παρατηρούνται διάφορες τροποποιήσεις όπως μεθυλιώσεις που εισάγονται από ένζυμα όπως οι RNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMT2, NSUN2, NSUN3) και αποτρέπουν τη θραύση των ώριμων tRNAs, άρα και την παραγωγή των t-halves (tiRNAs) (tiRNAs). Το σύνολο των τροποποιήσεων του RNA έχει οδηγήσει στην εδραίωση του όρου **epitranscriptomics** που θεωρείται ότι επιδρά σημαντικά στην πτύχωση των ώριμων tRNAs με αποτέλεσμα να διαφοροποιείται η δράση των ριβονουκλεασών, καθώς αναγνωρίζουν τις δευτεροταγείς δομές των μορίων αυτών στο χώρο. Επομένως, αλλάζει το πρότυπο παραγωγής θραυσμάτων tRNA ανάλογα με τις τροποποιήσεις που φέρουν τα ώριμα μόρια. Σημαντική είναι και η παρατήρηση ότι ορισμένες RNA μεθυλοτρανσφεράσες αδρανοποιούνται σε συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού στρες με αποτέλεσμα την υποτροποποίηση των ώριμων tRNAs και τη διευκόλυνση της δράσης των ριβονουκλεασών, όπως η αγγειογενίνη, στη θηλιά του αντικωδικονίου. Απότοκο αυτού είναι η αυξημένη παραγωγή των t-halves (tiRNAs)<sup>29</sup>. Όπως φάνηκε και από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, τα μιτοχονδριακά t-halves (tiRNAs) που μελετήθηκαν, παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα σε κυτταρικές συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού φορτίου (όπως προσεγγίστηκαν μέσω της μελέτης των επιπέδων έκφρασης γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων συγκροτούν σημαντικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς).

Η βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας ανέδειξε ότι το μιτοχονδριακό θραύσμα **5'half-Val-TAC**, είναι πιθανό να στοχεύει μετάγραφα των οποίων τα προϊόντα συμμετέχουν σε δυο σημαντικά μονοπάτια, στο κυτταροπλασματικό μονοπάτι της αποικοδόμησης, το οποίο περιλαμβάνει τη σήμανση πρωτεϊνών με μόρια ουβικιτίνης και εν τέλει τη στόχευσή τους στο πρωτεάσωμα και το σηματοδοτικό μονοπάτι NOTCH. Το NOTCH μονοπάτι εκδηλώνει τόσο ογκογόνες όσο και ογκοκατασταλτικές επιδράσεις. Ωστόσο, η μελέτη του στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως έχει αναδείξει τον ογκοκατασταλτικό ρόλο του<sup>57, 58</sup>. Επομένως, πιθανά η αύξηση των επιπέδων του μιτοχονδριακού θραύσματος 5'half-Val-TAC, καθώς αυξάνεται ο βαθμός κακοήθειας του όγκου αλλά και σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, μπορεί να ερμηνευτεί εν μέρει από την πιθανή μετα-μεταγραφική δράση του σε μετάγραφα των οποίων τα προϊόντα να συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το NOTCH.



Το μιτοχονδριακό θραύσμα **5'half-Met-CAT** φαίνεται να στοχεύει κυρίως μετάγραφα των οποίων τα προϊόντα συμμετέχουν σε μονοπάτια που σχετίζονται με τον εθισμό και γενικότερα με το νευρικό σύστημα. Ειδικότερα, η βιοπληροφορική μελέτη έδειξε ως σημαντικότερα μονοπάτια στόχευσης του μιτοχονδριακού θραύσματος 5'half-Met-CAT τα μοριακά μονοπάτια πρόκλησης εθισμού στη νικοτίνη, την κοκαΐνη και την αμφεταμίνη και τα μονοπάτια που εμπλέκουν τον δευτερογενή μηνύτορα, cAMP. Αυτή η πτυχή της δράσης των θραυσμάτων tRNA στο κεντρικό νευρικό σύστημα έχει έντονα μελετηθεί στα πλαίσια νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Η ανάλυση οντολογίας (GO analysis) έδειξε ότι το μιτοχονδριακό θραύσμα 5'half-Met-CAT στοχεύει μετάγραφα των οποίων τα τελικά προϊόντα συμμετέχουν στο μεταβολισμό ετεροκυκλικών ενώσεων και στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης RNA μορίων. Γεγονός που αποτελεί ένδειξη ύπαρξης ενός αναδραστικού μηχανισμού (feedback loop) μεταξύ των RNA μορίων.

Η ανάλυση οντολογίας για το μιτοχονδριακό θραύσμα **3'half-His-GTG** αποτύπωσε την πιθανή επίδραση του θραύσματος σε μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου, όπως η αυτοφαγία και την επίδραση σε μόρια που σχετίζονται με την κυτταρική μετανάστευση και τη διακίνηση μέσω των μικροσωληνίσκων. Άρα η αύξηση των επιπέδων έκφρασης του μιτοχονδριακού θραύσματος 3'half-His-GTG που παρατηρήθηκε στους όγκους μεγαλύτερου βαθμού αποδιαφοροποίησης (high grade) και σταδίων που αντιστοιχούν στους μυοδιηθητικούς τύπους όγκων της ουροδόχου κύστεως, πιθανώς να σχετίζεται με τη δράση του θραύσματος σε μονοπάτια μετάστασης.

Η βιοπληροφορική μελέτη όλων των μιτοχονδριακών θραυσμάτων που ανιχνεύτηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία υποδηλώνει ότι οι περισσότεροι στόχοι των συγκεκριμένων θραυσμάτων είναι κυτταροπλασματικής ή πυρηνικής εντόπισης. Επακόλουθα, γίνεται αντιληπτή η πιθανή ύπαρξη μιας "μοριακής στιχομυθίας" (crosstalk) ανάμεσα σε πυρήνα και μιτοχόνδρια στην οποία θα μπορούσαν να συμμετέχουν μικρά μη κωδικά μόρια, όπως τα θραύσματα tRNA.

Η επίδραση του περιβάλλοντος στην εκδήλωση του καρκίνου αποτελεί θεμελιωμένη αντίληψη και ειδικότερα στην περίπτωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως υπάρχει πληθώρα περιβαλλοντικών παραγόντων που έχουν ενοχοποιηθεί, με σημαντικότερο το κάπνισμα. Οι GWAS μελέτες πρόσθεσαν και τη γενετική συνιστώσα που αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου και διαπλέκεται με την επίδραση των καρκινογόνων παραγόντων, καθώς βρέθηκαν πολυμορφισμοί που εντοπίζονται σε γονίδια που

κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συμβάλλουν στον μεταβολισμό και στην αποτοξίνωσή τους.

Η προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες που επάγεται από καρκινογόνους παράγοντες και χημειοθεραπευτικές αγωγές, εμπλέκει την ενεργοποίηση δυο βασικών ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών, τις S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) και τις N-ακετυλοτρανσφεράσες (NATs). Η υπεροικογένεια των S-τρανσφερασών της γλουταθειόνης (GSTs) συνιστά μια ομάδα ενζύμων αποτοξίνωσης διαφόρων καρκινογόνων ουσιών, διαμέσου της σύζευξης με μόρια γλουταθειόνης. Οι πολυμορφισμοί στα γονίδια που κωδικοποιούν για την παραπάνω υπεροικογένεια έχουν συσχετισθεί με τον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου και ανάπτυξης αντίστασης σε αντικαρκινικές θεραπείες.

Οι GSTs που εντοπίζονται στο κυτοσόλιο, διακρίνονται σε 8 κλάσεις: GST α, GSTμ, GSTκ, GSTω, GSTπ, GSTζ, GSTθ και GSTζ. Οι GSTP1 πρωτεΐνες αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό ενζυμικό μηχανισμό και είναι επιφορτισμένες με διάφορους ρόλους, πέραν της διατήρησης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων. Οι αλληλεπιδράσεις των GSTP1 πρωτεϊνικών μορίων με άλλες πρωτεΐνες, επιφέρει αντιφλεγμονώδη και αντιαποπτωτικά αποτελέσματα. Επί παραδείγματι, οι GSTP1 μπορούν να δράσουν ως ενδογενείς αναστολείς της JNK κινάσης, η οποία αποτελεί προαποπτωτικό μέλος του MAPK σηματοδοτικού μονοπατιού και του παράγοντα νέκρωσης TNFα<sup>59</sup>.

Το γονίδιο *GSTP1* έχει μελετηθεί εκτενώς στον καρκίνο του προστάτη, όπου φαίνεται να εκδηλώνει ογκοκατασταλτικό ρόλο. Η υπερμεθυλίωση σε νησίδες CpG στον υποκινητή του γονιδίου *GSTP1* αποτελεί βασικό μηχανισμό που οδηγεί στην μείωση των επιπέδων έκφρασής του, κατά τα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης<sup>59</sup>.

Η κλάση των GSTP1 πρωτεϊνών κωδικοποιείται από μια γενετική περιοχή, η οποία εδράζεται στο χρωμόσωμα 11. Σε μια πληθώρα όγκων έχει εντοπιστεί ο πολυμορφισμός στο κωδικόνιο 105, όπου το κατάλοιπο αδενίνης υποκαθίσταται από εκείνο της κυτοσίνης, με τελικό αποτέλεσμα την αντικατάσταση του αμινοξέος της ισολευκίνης από βαλίνη και τη μείωση της καταλυτικής ενεργότητας του αντιοξειδωτικού ενζύμου GSTP1. Στην παρούσα διπλωματική εργασία ο *in silico* σχεδιασμός ζεύγους εκκινητών για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του *GSTP1* γονιδίου με τη μοριακή μεθοδολογία qPCR σε 53 δείγματα ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, επέτρεψε για πρώτη φορά τη συσχέτιση της έκφρασης ενός σημαντικού αντιοξειδωτικού ενζύμου με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με το συγκεκριμένο τύπο καρκίνου (στάδιο νόσου, βαθμός αποδιαφοροποίησης

όγκου) και με τα επίπεδα έκφρασης μη κωδικών μορίων RNA. Η μη παραμετρική ανάλυση Mann-Whitney U ανέδειξε ως ισχυρά στατιστικά σημαντική (**p-value =0,002**) τη σχέση των επιπέδων έκφρασης του **GSTP1** γονιδίου με το βαθμό αποδιαφοροποίησης του όγκου (grade). Συγκεκριμένα, οι σχεδόν αδιαφοροποίητοι όγκοι της κύστεως εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης του **GSTP1** γονιδίου, συγκριτικά με τους καλά διαφοροποιημένους. Η μείωση σε μεταγραφικό επίπεδο ενός βασικού μηχανισμού άμυνας των κυττάρων έναντι των οξειδωτικών συνθηκών, σε πιο προχωρημένα επίπεδα αποδιαφοροποίησης των όγκων της ουροδόχου κύστεως, σε συνδυασμό με την υπάρχουσα βιβλιογραφική γνώση, για πολυμορφισμούς που μειώνουν την ενεργότητα των συγκεκριμένων πρωτεϊνών, αποτελεί βασική ένδειξη ότι η απώλεια συστημάτων που ρυθμίζουν το ισοζύγιο οξειδωτικών-αναγωγικών συνθηκών συντελεί στην προώθηση του καρκίνου. Τα επίπεδα έκφρασης του **GSTP1** γονιδίου φαίνεται να σχετίζονται με τα επίπεδα έκφρασης και των τριών μη κωδικών μορίων, **3'half-His-GTG**, **5'half-Val-TAC** και **5'half-Met-CAT**, όπως η ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman έδειξε, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Ειδικότερα, όπως παρατηρήθηκε από το διάγραμμα διασποράς, η γραμμική σχέση των δυο ποσοτικών μεταβλητών είναι αντιστρόφως ανάλογη. Επομένως, σε κυτταρικές συνθήκες με αυξημένο οξειδωτικό φορτίο, παρατηρείται μείωση ορισμένων αντιοξειδωτικών μηχανισμών και αύξηση των επιπέδων συγκεκριμένων t-halves (tiRNAs) μορίων.

Τα μιτοχόνδρια είναι εξοπλισμένα με αντιοξειδωτικά ένζυμα, τόσο στο διαμεμβρανικό χώρο τους όσο και στη μήτρα, όπως οι δισμουτάσες του υπεροξειδίου (SOD1 και SOD2), η θειορεδοξίνη (TXN2) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX1). Η μιτοχονδριακή ισομορφή της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (MnSOD/SOD2) συμβάλλει στην μετατροπή των ριζών  $O_2^{\bullet-}$  σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και μοριακό οξυγόνο και δρα ως ομοτετραμερές με συμπαράγοντα το δισθενές κατιόν μαγνησίου. Η SOD2 χαρακτηρίζεται από διττό ρόλο στο φαινόμενο της καρκινογένεσης και διχότομη ρύθμιση της έκφρασής της. Στα αρχικά στάδια καρκινογένεσης, παρατηρείται απώλεια των επιπέδων έκφρασης του **SOD2** ενώ η εξέλιξη σε μεταστατικές εστίες συνδέεται με αύξηση των επιπέδων της **SOD2**<sup>60</sup>. Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης του **SOD2** ανέδειξε τη σημαντική συσχέτισή του με τα επίπεδα έκφρασης των μιτοχονδριακών θραυσμάτων **5'half-Val-TAC** και **5'half-Met-CAT** (**p-value= 0.022**). Η σχέση είναι θετικά αναλογική, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει ότι σε πιο προχωρημένα στάδια του καρκίνου η μεταγραφική αύξηση του αντιοξειδωτικού ενζύμου που δρα στα μιτοχόνδρια συνδέεται με την αύξηση της παραγωγής των μη κωδικών μορίων, τα οποία κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Πέρα από τη

συσχέτιση του *SOD2* με τα μη κωδικά μόρια, παρατηρήθηκε και η αύξηση των επιπέδων έκφρασής του στην ομάδα των μυοδιηθητικών όγκων της κύστεως, συγκριτικά με τους επιφανειακούς (**p-value=0.008**).

Ο μεταγραφικός παράγοντας NRF2 αποτελεί βασικό ρυθμιστή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων, καθώς συμμετέχει στη μεταγραφή ενός μεγάλου δικτύου αντιοξειδωτικών ενζύμων, τα οποία επιτελούν λειτουργίες όπως η αποτοξίνωση ξеноβιοτικών παραγόντων, η επιδιόρθωση και η απομάκρυνση πρωτεϊνών που έχουν υποστεί οξειδωτικές αλλοιώσεις, η αναστολή της φλεγμονής και η μεταγραφή άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Φαίνεται ότι ο μεταγραφικός παράγοντας NRF2 επηρεάζει ποικιλοτρόπως και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, επεκτείνοντας το φάσμα δράσης του και πέρα από τον πυρήνα. Η παρουσία οξειδωτικών παραγόντων οδηγεί στην αποδέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα από την πρωτεΐνη αναστολέα του, Keap1 και στην επακόλουθη μετατόπισή του εντός του πυρήνα. Εκεί ο NRF2 προσδένεται σε ρυθμιστικά στοιχεία που αποκαλούνται, στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (ARE) και εντοπίζονται αναρροϊκά άλλων ρυθμιστικών στοιχείων. Τα γονίδια που υπόκεινται στο συγκεκριμένο ρυθμιστικό μηχανισμό κωδικοποιούν για αντιοξειδωτικά ένζυμα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 παραμένουν χαμηλά, καθώς υπάρχουν τρεις οδοί αποικοδόμησής του, απουσία παραγόντων οξείδωσης<sup>61</sup>. Η ανάλυση συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης του *NRF2* με τα επίπεδα έκφρασης των τριών μη κωδικών RNAs που μελετήθηκαν δε φάνηκε να έχει στατιστικά σημαντική σχέση. Ωστόσο, φαίνεται ότι ως ανεξάρτητος δείκτης σχετίζεται με το βαθμό αποδιαφοροποίησης (**grade**) των ασθενών της κοόρτης, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό (**p-value < 0.001**), καθώς τα επίπεδα έκφρασής του αυξάνονται στην ομάδα των σχεδόν αδιαφοροποίητων όγκων, συγκριτικά με την ομάδα των καλά διαφοροποιημένων όγκων. Σημαντική είναι και η διασύνδεση των επιπέδων έκφρασής του με το στάδιο της νόσου (**stage**), όπου παρατηρείται μείωση σε πιο προχωρημένα στάδια, όπως εκείνα που αντιστοιχούν σε μυοδιηθητικούς τύπους όγκων της ουροδόχου κύστεως. Ακόμη, για τους μη μυοδιηθητικούς ασθενείς (NMIBC) η ανάλυση επιβίωσης **Kaplan Meier** έδειξε ότι οι ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα επιβίωσης ελευθέρως εξέλιξης της νόσου (Progression free survival, **PFS**), συγκριτικά με τους ασθενείς με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης (**p-value=0.063**). Από την καμπύλη επιβίωσης γίνεται αντιληπτό ότι μετά το πρώτο τρίμηνο της μετεγχειρητικής παρακολούθησης των ασθενών που εμφάνισαν επιφανειακό καρκίνο της ουροδόχου

κύστεως, μειώνεται σημαντικά η πιθανότητα επιβίωσης χωρίς επανεμφάνιση του όγκου. Συνεπώς, ένας από τους σημαντικότερους ρυθμιστές της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας φαίνεται να υποεκφράζεται στους ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης, επιτρέποντας έτσι την αποδυνάμωση των κυτταρικών μηχανισμών άμυνας ενάντια στο οξειδωτικό στρες. Η μειωμένη παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης μιας σωρείας γονιδίων που δε συνδέονται μόνο άμεσα με την αντιοξείδωση, αλλά και έμμεσα μέσω της επίδρασης του στη λειτουργία των μιτοχονδρίων, βασική πηγή παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS).

**Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας**

**Δ.Π.Μ.Σ. Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική**

**Διπλωματική εργασία, Τζένη Κρέσπα**

**Ανάλυση της έκφρασης και κλινική αξιολόγηση μη κωδικών RNA (ncRNAs) σε  
καρκινικά κύτταρα και όγκους ουροδόχου κύστεως**

### **Περίληψη**

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή νεοπλασία του ουροποιητικού συστήματος στο αντρικό φύλο ενώ πλήττει το γυναικείο φύλο τρεις έως τέσσερις φορές λιγότερο. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου καρκίνου είναι ότι παρουσιάζει τον υψηλότερο ρυθμό υποτροπής συγκριτικά με όλους τους άλλους τύπους. Η ιδιαιτερότητά του αυτή το καθιστά ένα εξαιρετικά σημαντικό ζήτημα υγείας και σε συνδυασμό με το μεγάλο κόστος των διαγνωστικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων, όπως οι συχνές κυστεοσκοπήσεις και διουρηθρικές εκτομές των όγκων, είναι εμφανές ότι αποτελεί έναν από τους πιο κοστοβόρους για τα συστήματα υγείας καρκίνους. Επομένως, διαφαίνεται η ανάγκη εύρεσης βιοδεικτών που θα επιτρέπουν τη διάγνωση, την πρόγνωση και την παρακολούθηση των ασθενών, χωρίς να απαιτούνται οι επεμβατικές προσεγγίσεις που έως σήμερα αποτελούν πρότυπες διαδικασίες. Τα μη κωδικά μόρια RNA (ncRNAs) μπορούν πιθανά να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες με σημαντική συνεισφορά στη βιοϊατρική κοινότητα, διότι διαθέτουν σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως η δυνατότητα σχετικά εύκολης, αξιόπιστης και ταχείας ποσοτικοποίησης. Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στη μελέτη ενός αναδυόμενου και καινοτόμου υποσυνόλου των μη κωδικών μορίων, τα θραύσματα που προκύπτουν από τα tRNA μόρια (tRFs/t-halves (thalves ή tiRNAs)) και στη συσχέτιση τους με το οξειδωτικό φορτίο των καρκινικών ιστών που έχουν αφαιρεθεί από ασθενείς με συγκεκριμένα κλινικοπαθολογικά ευρήματα. Για να επιτευχθεί αυτή η διασύνδεση ακολουθήθηκε συγκεκριμένος θεωρητικός και πειραματικός σχεδιασμός. Συγκεκριμένα, μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης αξιοποιήθηκαν δεδομένα από πειράματα αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS) και επιλέχθηκαν τα θραύσματα προς μελέτη. Για την ποσοτικοποίηση αυτών των θραυσμάτων στα δείγματα ασθενών πραγματοποιήθηκε ο *in silico* σχεδιασμός εκκινήτων, η ομογενοποίηση των ιστοτεμαχίων που πάρθηκαν από τους ασθενείς, η εφαρμογή και βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων πολυαδενυλίωσης και

αντίστροφης μεταγραφής και η εφαρμογή της μοριακής μεθοδολογίας, ποσοτική PCR (qPCR). Η συσχέτισή των μη κωδικών RNA που ανιχνεύτηκαν, με το οξειδωτικό στρες πραγματοποιήθηκε μέσω και της μελέτης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *GSTP1*, *MnSOD2*, *NRF2*, η οποία κατέστη εφικτή λόγω του σχεδιασμού κατάλληλων εκκινητών που επέτρεψαν την ενίσχυση των περισσότερων μεταγραφικών προϊόντων που παράγονται από τα συγκεκριμένα γονίδια και της βιοστατιστικής ανάλυσης συσχέτισης κατά Spearman. Επιπλέον, στο πλαίσιο της διπλωματικής, οι κυτταρικές σειρές που προσομοιάζουν διάφορα στάδια του καρκίνου της κύστεως (RT112, T24) και τα δείγματα ασθενών βρέθηκαν να εκφράζουν 10 διαφορετικούς τύπους θραυσμάτων που προέρχονται από tRNA μόρια τα οποία κωδικοποιούνται τόσο από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα όσο και από το πυρηνικό. Τα θραύσματα που ανιχνεύτηκαν είναι τα εξής: ts-36, 3'-half-His-GTG, 5'-half-Val-TAC, 5'-half-Met-CAT, 3'-tRF-Val-TAC, 5'-half-Val-AAC, i-Gln-CTG, i-Val-TAC, 5'-tRF-Gly-CCC και ts-46.

Από το σύνολο των θραυσμάτων που ανιχνεύτηκαν επιλέχθηκαν να μελετηθούν στην κοόρτη των ασθενών (n=120 δείγματα απομονωμένου ολικού RNA) τα επίπεδα έκφρασης των 3'-half-His-GTG, 5'-half-Val-TAC και 5'-half-Met-CAT, καθώς αποτελούν μη κωδικά μόρια που κωδικοποιούνται αποκλειστικά από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα και ανήκουν στην κατηγορία των t-halves (thalves ή tiRNAs). Η βιβλιογραφική μελέτη έθεσε τις βάσεις της διπλωματικής αυτής εργασίας διότι επέτρεψε τη διατύπωση της εξής ερευνητικής υπόθεσης: Τα μη κωδικά μόρια, tRFs/t-halves (thalves ή tiRNAs), παράγονται εντονότερα υπό στρεσογόνες συνθήκες που χαρακτηρίζουν τους καρκινικούς ιστούς και καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση και την ενίσχυση του οξειδωτικού φορτίου διαδραματίζει η λειτουργία των μιτοχονδρίων.

Συμπερασματικά, τα επίπεδα της έκφρασης και των τριών μη κωδικών μορίων αυξάνονται καθώς αυξάνεται ο βαθμός αποδιαφοροποίησης του όγκου (**3'-half-His-GTG, p=0.006**) και σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου, με τους μυοδιηθητικούς όγκους (T2-T4) να παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές. Η ανάλυση επιβίωσης υποδηλώνει ότι η αυξημένη έκφρασή τους σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών που υπέστησαν είτε διουρηθρική αφαίρεση του όγκου που είχε αναπτυχθεί στην ουροδόχο κύστη (μη μυοδιηθητικοί όγκοι) είτε ριζική κυστεκτομή (μυοδιηθητικοί όγκοι). Τέλος, η μείωση των επιπέδων του **5'-half-Val-TAC** και του **5'-half-Met-CAT** σε συνθήκες αυξημένης έκφρασης του γονιδίου *GSTP1* και μειωμένης έκφρασης του γονιδίου *MnSOD2* υποδηλώνει πιθανώς

ότι οι στρεσογόνες κυτταρικές συνθήκες σχετίζονται με την παραγωγή των t-halves (tiRNAs) που προκύπτουν από μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενα tRNA μόρια .

Για την κατανόηση του βιολογικού ρόλου των θραυσμάτων και των γονιδίων που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν βιοπληροφορικά εργαλεία και δεδομένα. Για τα θραύσματα εντοπίστηκαν, μέσω αλγορίθμων πρόγνωσης, οι πιθανοί στόχοι, κάνοντας την παραδοχή ότι δρουν με τρόπο όμοιο με τα miRNAs, όπως έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά και σχεδιάστηκαν τα αντίστοιχα ενδοκυτταρικά τους δίκτυα, στη λογική της βιολογίας συστημάτων (Gene ontology analysis/ KEGG network analysis). Τα πειράματα μελέτης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *GSTP1* και *MnSOD2* που πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα των ασθενών με καρκίνο της κύστεως (πειραματικά qPCR δεδομένα) επιβεβαιώθηκαν και από τα δεδομένα της βάσης The Human Protein Atlas τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνών, καθώς τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας ανέδειξαν τον εντοπισμό των πρωτεϊνών αυτών σε ουροθηλιακά καρκινώματα.

Η παρούσα εργασία βασίστηκε στον συγκερασμό βιοπληροφορικών, βιοστατιστικών και πειραματικών διαδικασιών για τη διεξαγωγή των παραπάνω συμπερασμάτων και ενίσχυσε ακόμη περισσότερο τη θεώρηση ότι το οξειδωτικό στρες που υφίστανται τα καρκινικά κύτταρα συνδέεται πιθανώς με την κινητοποίηση της παραγωγής διαφόρων μη κωδικών μορίων, όπως τα t-halves (thalves ή tiRNAs).



**National and Kapodistrian University of Athens, Department of Biology**

**Clinical Biochemistry and Molecular Diagnostics**

**Master Thesis, Jenny Kreshpa**

**Expression analysis and clinical evaluation of non-coding RNAs (ncRNAs) in bladder cancer tumors and cell lines**

### **Abstract**

Bladder cancer (BlCa) is the second most common malignancy of the male urinary system and affects men 3 to 4 times more than women. The recurrence rate that demonstrates, among the other types of cancers is considered as a unique feature. This characteristic underscores the clinical importance of this disease, and together with the high cost diagnostic and therapeutic procedures, such as cystoscopies and transurethral resections of tumors (TURBT), the huge economic burden for health care systems is clear. Therefore, the need of discovering novel biomarkers, which contribute in diagnosis, prognosis and surveillance of patients, is essential, in order to replace invasive approaches, that are considered as gold standards. Non coding RNAs (ncRNAs) could possibly function as biomarkers with huge contribution in the biomedical field, due to their crucial advantages, such as easy, reliable and rapid quantification. The current work emphasizes in a novel subset of ncRNAs, the tRNA-derived fragments (tRFs/t-halves (halves ή tiRNAs)) and their correlation with oxidative stress in bladder cancer tissues, that exhibit certain clinicopathological features. In order to achieve those aims, theoretical and experimental design was performed. Particularly, via bioinformatical analysis, online data from NGS experiments were used for fragments selection. *In silico* design of primers, pulverization of patients' tissues, application and optimization of polyadenylation, reverse transcription protocols and qPCR molecular technique enabled the quantification of the selected tRNA-derived fragments. The linkage of ncRNAs with oxidative stress was approached by studying transcriptional levels of *GSTP1*, *SOD2*, *NRF2* due to proper design of primers and Spearman correlation analysis. In the context of this work, 10 different types of tRFs/t-halves (halves ή tiRNAs), which are encoded both from nuclear and mitochondrial genome, were identified in bladder cancer cell lines (RT112, T24) and bladder cancer tissues from patients (NMIBC, MIBC). The ncRNAs that were identified are the following: ts-36, 3'-half-His-GTG, 5'-half-Val-TAC, 5'-half-

Met-CAT, 3'-tRF-Val-TAC, 5'-half-Val-AAC, i-Gln-CTG, i-Val-TAC, 5'-tRF-Gly-CCC και ts-46.

Three of those fragments were selected and studied in a cohort of 120 patients, 3'-half-His-GTG, 5'-half-Val-TAC and 5'-half-Met-CAT, because are exclusively encoded by the mitochondrial genome (mtDNA) and belong to t-halves (tiRNAs) (tiRNAs) category. Bibliographic research led to the formulation of the following hypothesis: Non coding RNAs, tRFs/t-halves (thalves ή tiRNAs), boost their expression under stress conditions, that characterize cancer tumors, and in oxidative imbalance the role of mitochondria is crucial.

The expression levels of ncRNAs are elevated in high grade tumors (3'-half-His-GTG, p-value =0.006) and in advanced stages of bladder cancer, especially in muscular invasive (T2-T4) tumors. Survival analysis suggests that increased levels of those ncRNAs are related to unfavorable prognosis of patients who were subjected to transurethral resection or radical cystectomy. Finally, the decreased levels of 5'-half-Val-TAC and 5'-half-Met-CAT, in conditions of high expression of *GSTP1* and low expression of *SOD2*, probably suggest cellular stress correlates with t-halves (tiRNAs) production, which arise from mitochondrial tRNA encoded molecules.

The biological significance of the fragments and genes was estimated by using bioinformatic tools and data. Target prediction algorithms enabled the characterization of possible targets for tRNA fragments, using the assumption that function in a similar way as miRNAs, a fact which is extensively mentioned in literature. Also, according to philosophy of systems biology (Gene ontology analysis/ KEGG network analysis), network analysis was performed and ontology diagrams were designed in R programming environment. The Human Protein Atlas was used for the confirmation of protein products from *GSTP1* and *SOD2* in urothelial carcinoma.

The current study was based on the combination of bioinformatical, biostatistical and experimental procedures for the interpretation of results and concludes in further support of the theory that oxidative stress in cancer cells is linked to accumulation of different ncRNAs production, such as t-halves (tiRNAs) (tiRNAs).

## 5. Βιβλιογραφία

1. Rahnama'i, M. S., Ückert, S., Hohnen, R. & Van Koeveringe, G. A. The role of phosphodiesterases in bladder pathophysiology. *Nat. Rev. Urol.* **10**, 414–424 (2013).
2. Jost, S. P., Gosling, J. A. & Dixon, J. S. The morphology of normal human bladder urothelium. *J. Anat.* **167**, 103–15 (1989).
3. Ajalloueiian, F., Lemon, G., Hilborn, J., Chronakis, I. S. & Fossum, M. Bladder biomechanics and the use of scaffolds for regenerative medicine in the urinary bladder. *Nat. Rev. Urol.* **15**, 155–174 (2018).
4. Sanli, O. *et al.* Bladder cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 1–19 (2017).
5. Grundy, L., Caldwell, A. & Brierley, S. M. Mechanisms Underlying Overactive Bladder and Interstitial Cystitis/Painful Bladder Syndrome. *Front. Neurosci.* **12**, 1–11 (2018).
6. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
7. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
8. Lucca, I., Klatte, T., Fajkovic, H., de Martino, M. & Shariat, S. F. Gender differences in incidence and outcomes of urothelial and kidney cancer. *Nat. Rev. Urol.* **12**, 585–592 (2015).
9. Cumberbatch, M. G. K. *et al.* Epidemiology of Bladder Cancer: A Systematic Review and Contemporary Update of Risk Factors in 2018. *Eur. Urol.* **74**, 784–795 (2018).
10. Cumberbatch, M. G. K. & Noon, A. P. Epidemiology, aetiology and screening of bladder cancer. *Transl. Androl. Urol.* **8**, 5–11 (2019).
11. Knowles, M. A. & Hurst, C. D. Molecular biology of bladder cancer: New insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 25–41 (2015).
12. Colombel, M. *et al.* Epidemiology, Staging, Grading, and Risk Stratification of Bladder Cancer. *Eur. Urol. Suppl.* **7**, 618–626 (2008).
13. Glaser, A. P., Fantini, D., Shilatifard, A., Schaeffer, E. M. & Meeks, J. J. The evolving genomic landscape of urothelial carcinoma. *Nat. Rev. Urol.* **14**, 215–229 (2017).
14. Yousef, G. M. & Jothy, S. Molecular Testing in Urothelial Tumors. *Mol. Test. Cancer* **9781489980**, 1–442 (2014).
15. Netto, G. J. Molecular biomarkers in urothelial carcinoma of the bladder: Are we there yet? *Nature Reviews Urology* (2012) doi:10.1038/nrurol.2011.193.
16. van Rhijn, B. W. G. *et al.* Recurrence and Progression of Disease in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: From Epidemiology to Treatment Strategy. *Eur. Urol.* **56**, 430–442 (2009).
17. Robertson, A. G. *et al.* Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell* **171**, 540–556.e25 (2017).

18. Comp erat, E., Varinot, J., Moroch, J., Eymerit-Morin, C. & Brimo, F. A practical guide to bladder cancer pathology. *Nat. Rev. Urol.* **15**, 143–154 (2018).
19. Magers, M. J., Lopez-beltran, A., Montironi, R. & Williamson, S. R. Staging of bladder cancer. 112–134 (2019) doi:10.1111/his.13734.
20. Miyake, M., Owari, T., Hori, S., Nakai, Y. & Fujimoto, K. Emerging biomarkers for the diagnosis and monitoring of urothelial carcinoma. *Res. Reports Urol.* **Volume 10**, 251–261 (2018).
21. Sylvester, R. J. *et al.* Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: A combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur. Urol.* **49**, 466–477 (2006).
22. Oeyen, E. *et al.* Bladder cancer diagnosis and follow-up: The current status and possible role of extracellular vesicles. *International Journal of Molecular Sciences* (2019) doi:10.3390/ijms20040821.
23. Miyake, M. *et al.* A potential application of dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging combined with photodynamic diagnosis for the detection of bladder carcinoma in situ: Toward the future ‘MRI-PDD fusion Turbt’. *Diagnostics* **9**, 1–14 (2019).
24. Redelman-Sidi, G., Glickman, M. S. & Bochner, B. H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer—a current perspective. *Nat. Rev. Urol.* **11**, 153–162 (2014).
25. Arora, M. & Kaul, D. *Cancer RNome: Nature and evolution. Cancer RNome: Nature and Evolution* (2018). doi:10.1007/978-981-13-1568-8.
26. Lin, S. & Gregory, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 321–333 (2015).
27. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* **11**, 228–234 (2009).
28. Kirchner, S. & Ignatova, Z. Emerging roles of tRNA in adaptive translation, signalling dynamics and disease. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 98–112 (2015).
29. Lyons, S. M., Fay, M. M. & Ivanov, P. The role of RNA modifications in the regulation of tRNA cleavage. *FEBS Lett.* **592**, 2828–2844 (2018).
30. Frigol , H. R. *et al.* TRNA deamination by ADAT requires substrate-specific recognition mechanisms and can be inhibited by tRFs. *Rna* **25**, 607–619 (2019).
31. Lin, B. Biogenesis and function of transfer RNA related fragments (tRFs). *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2017).
32. Shen, Y. *et al.* Transfer RNA-derived fragments and tRNA halves: biogenesis, biological functions and their roles in diseases. *J. Mol. Med.* **96**, 1167–1176 (2018).
33. Gebetsberger, J., Zywicki, M., K unzi, A. & Polacek, N. TRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in *Haloferax volcanii*. *Archaea* **2012**, 10–12 (2012).
34. Xie, Y. *et al.* Action mechanisms and research methods of tRNA-derived small

- RNAs. *Signal Transduct. Target. Ther.* (2020) doi:10.1038/s41392-020-00217-4.
35. Kuscu, C. *et al.* tRNA fragments (tRFs) guide Ago to regulate gene expression post-transcriptionally in a Dicer-independent manner. *Rna* **24**, 1093–1105 (2018).
  36. Gapp, K. & Miska, E. A. tRNA fragments: Novel players in intergenerational inheritance. *Cell Res.* **26**, 395–396 (2016).
  37. Li, S., Xu, Z. & Sheng, J. tRNA-derived small RNA: A novel regulatory small non-coding RNA. *Genes (Basel)*. **9**, (2018).
  38. Shen, L. *et al.* tRNA-derived small non-coding RNAs as novel epigenetic molecules regulating adipogenesis. *Biomolecules* **9**, 1–8 (2019).
  39. Lee, Y. S., Shibata, Y., Malhotra, A. & Dutta, A. A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes Dev.* **23**, 2639–2649 (2009).
  40. Pekarskya, Y. *et al.* Dysregulation of a family of short noncoding RNAs, tsRNAs, in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 5071–5076 (2016).
  41. Zhu, P., Yu, J. & Zhou, P. Role of tRNA-derived fragments in cancer: novel diagnostic and therapeutic targets tRFs in cancer. *Am. J. Cancer Res.* **10**, 393–402 (2020).
  42. Huang, S. Q. *et al.* The dysregulation of tRNAs and tRNA derivatives in cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**, 1–11 (2018).
  43. Huang, B. *et al.* TRF/miR-1280 suppresses stem cell-like cells and metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res.* **77**, 3194–3206 (2017).
  44. Olvedy, M. *et al.* A comprehensive repertoire of tRNA-derived fragments in prostate cancer. *Oncotarget* **7**, 24766–24777 (2016).
  45. Honda, S. *et al.* Sex hormone-dependent tRNA halves enhance cell proliferation in breast and prostate cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E3816–E3825 (2015).
  46. Balatti, V. *et al.* tsRNA signatures in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 8071–8076 (2017).
  47. Zhou, K. *et al.* A tRNA fragment, tRF5-Glu, regulates BCAR3 expression and proliferation in ovarian cancer cells. *Oncotarget* **8**, 95377–95391 (2017).
  48. Maute, R. L. *et al.* tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage response and is down-regulated in B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 1404–1409 (2013).
  49. Zhu, L., Ge, J., Li, T., Shen, Y. & Guo, J. tRNA-derived fragments and tRNA halves: The new players in cancers. *Cancer Lett.* **452**, 31–37 (2019).
  50. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* (1987) doi:10.1016/0003-2697(87)90021-2.
  51. Hertzano, R. RNA extraction protocol for total RNA. *Life Technologies* **5**, 5–10 (2016).
  52. Mavridis, K., Stravodimos, K. & Scorilas, A. Downregulation and prognostic performance of microRNA 224 expression in prostate cancer. *Clin. Chem.* (2013)

doi:10.1373/clinchem.2012.191502.

53. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
54. Pliatsika, V. *et al.* MINTbase v2.0: A comprehensive database for tRNA-derived fragments that includes nuclear and mitochondrial fragments from all the Cancer Genome Atlas projects. *Nucleic Acids Res.* **46**, D152–D159 (2018).
55. Kumar, P., Mudunuri, S. B., Anaya, J. & Dutta, A. tRFdb: A database for transfer RNA fragments. *Nucleic Acids Res.* **43**, D141–D145 (2015).
56. Reimand, J., Kull, M., Peterson, H., Hansen, J. & Vilo, J. G:Profiler—a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acids Res.* **35**, 193–200 (2007).
57. Rampias, T. *et al.* A new tumor suppressor role for the Notch pathway in bladder cancer. *Nat. Med.* (2014) doi:10.1038/nm.3678.
58. Maraver, A. *et al.* NOTCH pathway inactivation promotes bladder cancer progression. *J. Clin. Invest.* **125**, 824–830 (2015).
59. Peklak-Scott, C., Smitherman, P. K., Townsend, A. J. & Morrow, C. S. Role of glutathione S-transferase P1-1 in the cellular detoxification of cisplatin. *Mol. Cancer Ther.* (2008) doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0250.
60. Kim, Y. S., Vallur, P. G., Phaëton, R., Mythreye, K. & Hempel, N. Insights into the dichotomous regulation of SOD2 in cancer. *Antioxidants* **6**, 1–25 (2017).
61. Saw, C. L. L. Oxidative Stress and Bladder Cancer Carcinogenesis: Early Detection and Chemoprevention Involving Nrf2—an Integrative Approach. *Curr. Pharmacol. Reports* **4**, 482–490 (2018).