



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΣΤΑΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ
ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ RNase κ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ**

ΑΓΓΕΛΙΚΗ-ΙΩΑΝΝΑ ΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ ΙΙΙ ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗ ΚΑΘΗΓΗΤΗ
Κ.ΣΙΔΕΡΗ ΔΙΑΜΑΝΤΗ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΣΤΑΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ
ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ RNase κ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ
ΣΕΙΡΕΣ**

ΑΓΓΕΛΙΚΗ-ΙΩΑΝΝΑ ΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: κ. ΣΙΔΕΡΗΣ ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- 1.ΣΙΔΕΡΗΣ ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
- 2.ΣΚΟΡΙΛΑΣ ΑΝΔΡΕΑΣ, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
- 3.ΑΥΓΕΡΗΣ ΜΑΡΓΑΡΙΤΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής, Ιατρική Σχολή Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2020

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ, στο πλαίσιο του Δ.Π.Μ.Σ. «Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική», υπό την επίβλεψη του Αναπλ. Καθηγητή κ. Σίδηρη Διαμάντη. Οι πειραματικές διαδικασίες έλαβαν χώρα στον εργαστηριακό χώρο του κ. Σίδηρη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο χώρο του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας. Τον ευχαριστώ, επίσης, για τη βοήθειά του, την καθοδήγησή του και τις συμβουλές του σε όλη την πορεία μου.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω και στην τριμελή επιτροπή, στον Καθηγητή κ. Σκορίλα, του τμήματος Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α και στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αυγέρη, της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, οι οποίοι δέχτηκαν να διαβάσουν και να αξιολογήσουν την παρούσα εργασία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην κ. Κραββαρίτη Ελευθερία μέλος ΕΔΙΠ του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α, για την άμεση συνεργασία της και την καθημερινή της καθοδήγηση σε πειραματικό επίπεδο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του κ. Σίδηρη, τη συνάδελφο Ποταμού Μαρία για τη συνολική της βοήθεια στο χώρο του εργαστηρίου, τις Τατούλη Μαρία και Αναγνωστοπούλου Ευαγγελία και τον Άγγελο Ζαχαρογιάννη για το άριστο κλίμα, την ευχάριστη συνεργασία και την εν γένει βοήθειά τους. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αλέξανδρο Χαρωνιτάκη από την εργαστηριακή ομάδα της κ. Βασιλακοπούλου για τη βοήθεια του. Ευχαριστώ πολύ όλα τα μέλη του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος για τη συνεργασία τους σε όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των παρακάτω πειραμάτων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ	1
1.1.1	Τα κύτταρα του αίματος.....	2
1.2	ΔΥΣΚΡΑΣΙΕΣ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	4
1.2.1	Πολλαπλούν Μυέλωμα.....	5
1.2.2	Το μικροπεριβάλλον του Μυελού των Οστών.....	5
1.2.3	Αιτιολογία – Παθολογία.....	7
1.2.4	Διάγνωση.....	9
1.2.5	Κλινική Εικόνα - Συμπτώματα	12
1.2.6	Θεραπεία.....	13
1.3	ΒΟΡΤΕΖΟΜΙΜΠΗ ΚΑΙ ΚΑΡΦΙΛΖΟΜΙΜΠΗ	14
1.3.1	Η δομή και λειτουργία του πρωτεασώματος.....	15
1.3.2	Μηχανισμός δράσης των Bortezomib και Carfilzomib στο ΠΜ.....	16
1.3.3	Οι αναστολείς πρωτεασώματος στη θεραπεία του ΠΜ.....	20
1.3.4	Παρενέργειες των αναστολέων πρωτεασώματος	21
1.4	ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ	23
1.4.1	Δράσεις των Ριβονουκλεασών στους ευκαρυώτες.....	24
1.4.2	Κατηγορίες Ριβονουκλεασών.....	26
1.4.3	Η οικογένεια της Ριβονουκλεάσης κ.....	28
1.4.4	Η ανθρώπινη Ριβονουκλεάση κ (RNase κ)	29
1.4.5	Εναλλακτικό Μάτισμα.....	30
1.4.6	Τα εναλλακτικά μετάγραφα της RNase κ.....	35
1.4.7	Οι ριβονουκλεάσες στον καρκίνο και την θεραπεία του.....	39
1.5	ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	48

2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	49
2.1	ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	49
2.1.1	Απόψυξη κυττάρων	50
2.1.2	Ανακαλλιέργεια κυττάρων (Split).....	50
2.1.3	Ψύξη κυττάρων	51
2.1.4	Μέτρηση αριθμού κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο (Πλάκα Neubauer).....	52
2.1.5	Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με Trypan Blue (TB).....	53
2.1.6	Ανάλυση της βιωσιμότητας κυττάρων με τη μέθοδο ΜΤΤ.....	55
2.2	ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	57
2.2.1	Ποιοτικός έλεγχος νουκλεϊκών οξέων - Ηλεκτροφόρηση	60
2.3	ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (REVERSE TRANSCRIPTION/RT)	62
2.4	ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION/ RT-PCR).....	65
2.4.1	Φθορίζουσα χρωστική-Μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης	66
2.4.2	Μέθοδοι ποσοτικοποίησης.....	67
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	71
3.1	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΗΣ RNase κ.....	71
3.2	ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΗΣ RNase κ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ	74
3.2.1	Προσδιορισμός της τιμής IC50 για τους παράγοντες Bortezomib και Carfilzomib.....	74
3.2.2	Απομόνωση ολικού RNA - Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας	79
3.2.3	Στατιστική ανάλυση της έκφρασης των μεταγράφων της RNase κ.....	81
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	85
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	92

Στον αγαπημένο μου Χρήστο και τους γονείς μου, Βάσω και
Κώστα.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Τα πρώτα αιμοποιητικά κύτταρα διαπιστώνονται ήδη στον λεκυθικό ασκό. Προέρχονται από τους αιμαγγειοβλάστες, προγονικά κύτταρα που μπορούν να εξελιχθούν τόσο προς ενδοθηλιακά όσο και προς αιμοποιητικά κύτταρα, οπότε τα τελευταία κυκλοφορούν στους ιστούς. Υπάρχουν ακόμη ενδείξεις ότι η ίδια διεργασία γίνεται και σε μια περιοχή της πρωτοεμβρυϊκής αορτής, που ονομάζεται αορτή-γονάδες-μεσόνεφρος (AGM), από όπου τα αιμοποιητικά κύτταρα μεταναστεύουν στο ήπαρ και τον μυελό. Στο πρωτόεμβρυο η αιμοποίηση γίνεται κατά διακριτά κύματα. Το τελικό κύμα της αιμοποίησης που θα εξελιχθεί σε αιμοποίηση του ενηλίκου ανθρώπου αρχίζει την 4η εβδομάδα της κύησης με την αυτόνομη εμφάνιση στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων ΣΑΚ (διεθνώς HSC από το human stem cells), που προοδευτικά αποικίζουν το ήπαρ, τον σπλήνα και τον μυελό των οστών. Στον ενήλικο άνθρωπο η παραγωγή των κυττάρων του αίματος γίνεται στον μυελό των οστών αρχίζοντας από το μη δεσμευμένο πολυδύναμο στελεχιαίο κύτταρο. Το κύτταρο αυτό δεν αναγνωρίζεται μορφολογικά μέσα στο πλήθος των κυττάρων του μυελού (η αναλογία του είναι της τάξεως του 1 στα 20 εκατομμύρια κύτταρα), η ύπαρξή του όμως βεβαιώνεται από την ικανότητά του να επαναφέρει την αιμοποίηση, όταν ένα εναιώρημα φυσιολογικού μυελού χορηγηθεί σε πειραματόζωα, των οποίων ο μυελός έχει καταστραφεί με χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία. Από ερευνητικές εργασίες είναι γνωστό, ότι το στελεχιαίο πολυδύναμο κύτταρο μπορεί να μοιάζει με μικρομυελοβλάστη και αναγνωρίζεται από τις πρωτεΐνες-αντιγόνα που αναγνωρίζονται με ειδικούς αντισώρες στην επιφάνειά του (CD41, CD46, c-kit και sca 1). Επιπλέον, στα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ζωής φέρει και το αντιγόνο CD34, ενώ αυτό δεν διαπιστώνεται μετά την 19-13η εβδομάδα (CD34 αρνητικό). Τα αντιγόνα αυτά μπορούν να ανιχνευθούν με κυτταρομετρία ροής και είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για την μέτρηση του αριθμού ΣΑΚ στο περιφερικό αίμα ή τον μυελό. Τα στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα δεν είναι μόνιμα προσκολλημένα στον μυελό, αλλά μπορούν να κινητοποιηθούν με διάφορες κυτταροκίνες και να διακινηθούν μέσα στην κυκλοφορία. Η επανεγκατάστασή τους στις νέες τους θέσεις (homing) γίνεται με τη δράση άλλων κυτταροκινών και μορίων προσκόλλησης. Όμως στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα υπάρχουν άφθονα και στον πλακούντα, ιδιαίτερα περί το μέσον της κύησης. Το στελεχιαίο αιμοποιητικό κύτταρο αυτοανανεώνεται και διαφοροποιείται. Αυτό σημαίνει, ότι κατά την κυτταρική διαίρεση το ένα θυγατρικό κύτταρο παραμένει ως στελεχιαίο, ενώ το άλλο δεσμεύεται για εξέλιξη, δηλαδή διαφοροποιείται για να παραγάγει ερυθρά ή λευκά αιμοσφαίρια ή αιμοπετάλια ή λεμφοκύτταρα. Αν και κατά μια άποψη η δέσμευση αυτή καθορίζεται από ορισμένους εξωγενείς παράγοντες, το πιθανότερο είναι ότι η επιλογή είναι τυχαία και ότι η περαιτέρω ρύθμιση της παραγωγής γίνεται αργότερα. Η παραγωγικότητα των ΣΑΚ του μυελού είναι εντυπωσιακή. Υπολογίζεται ότι ένα τέτοιο κύτταρο μπορεί να δώσει 10⁶ ώριμα κύτταρα μετά από 20 διαιρέσεις. Κατά κανόνα, τα στελεχιαία

αιμοποιητικά κύτταρα παραμένουν στον μυελό σε φάση ηρεμίας (G_0) και κατορθώνουν να εξασφαλίσουν την ισορροπία της αιμοποίησης με πολλαπλασιασμό τους που γίνεται πολύ σπάνια, μία φορά κάθε 21 εβδομάδες. Για τον λόγο αυτό, όταν τα κύτταρα αυτά έχουν υποστεί νεοπλασματική εξαλλαγή πριν διαφοροποιηθούν περαιτέρω, δεν μπορούν να απομακρυνθούν με χορήγηση φαρμάκων που παρεμβαίνουν στον ρυθμό πολλαπλασιασμού (αντιμεταβολίτες). Με τον πολύ βραδύ ρυθμό πολλαπλασιασμού το στελεχιαίο αιμοποιητικό κύτταρο δεν εξαντλείται σύντομα, αν και η ικανότητα αυτοανανέωσης προοδευτικά μειώνεται λόγω μεταλλάξεων, επιγενετικών βλαβών και μείωσης του μήκους των τελομεριδίων. Στη συνέχεια, το πολυδύναμο στελεχιαίο κύτταρο αποδίδει πολυδύναμα προγονικά κύτταρα, τα οποία διαφοροποιούνται ολοένα περισσότερο προς μονοδύναμα προγονικά κύτταρα, που συνεχίζουν να είναι ελάχιστα χωρίς να μπορούν να ανιχνευθούν μορφολογικά, αλλά αναγνωρίζονται χάρη στην ιδιότητα να σχηματίζουν αποικίες (ομάδες ομοειδών θυγατρικών κυττάρων), όταν ένα εναιώρημα μυελού εμβολιασθεί σε κατάλληλο καλλιεργητικό υπόστρωμα. Τα μονοδύναμα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς περιλαμβάνουν τα BFU-E και τα CFU-E και αναγνωρίζονται χάρη στην ιδιότητά τους να δημιουργούν ιδιόμορφες αποικίες σε άγαρ. Συγκεκριμένα, τα σχετικά άωρα κύτταρα σχηματίζουν αποικίες που μοιάζουν με έκρηξη (Burst Forming Units-Erythroid), ενώ τα περισσότερο ώριμα σχηματίζουν κανονικές αποικίες (Colony Forming Units-Erythroid). Έπειτα, τα CFU-E μετατρέπονται σε αναγνωρίσιμα κύτταρα (προερυθροβλάστες). Όλες οι παραπάνω διεργασίες ρυθμίζονται από ένα πλήθος εξωγενών παραγόντων, οι υποδοχείς των οποίων εκφράζονται κατά κύματα στην μεμβράνη των εξελισσόμενων κυτταρικών σειρών. Από τους παράγοντες αυτούς, κομβική σημασία έχει η ερυθροποιητίνη. Στα πρώτα στάδια της εξέλιξης στη ρύθμιση μετέχουν και διάφοροι ενδογενείς παράγοντες, όπως ο GATA2 και ο GATA1, ο FOG-1, και ο NF-E2. Τα μονοδύναμα κύτταρα των άλλων σειρών αναγνωρίζονται και αυτά με την ιδιότητά τους να σχηματίζουν αποικίες σε καλλιέργειες υπό την επίδραση διαφόρων αυξητικών παραγόντων και περιλαμβάνουν τα κύτταρα CFU-GM (κοκκιώδης και μυελική σειρά), CFU-G (μυελική σειρά), CFU-Meg (μεγακαρυοκυτταρική σειρά) [1].

1.1.1 Τα κύτταρα του αίματος

❖ Ερυθρά σειρά

Η εξέλιξη της ερυθράς σειράς αρχίζει με την Προερυθροβλάστη. Μεγάλο κύτταρο, με διάμετρο 15-30μ, βαθύκυανο πρωτόπλασμα, συχνά με μικρά ψευδοπόδια, αλλά χωρίς κοκκία, και στρογγυλό πυρήνα που περιέχει αδρό (σχετικά με την μυελοβλάστη) δίκτυο χρωματίνης. Ο προερυθροβλάστης πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται προς βασεόφιλη ερυθροβλάστη, κύτταρο μικρότερο, στρογγυλό, με πυκνότερο πυρήνα, η χρωματίνη του οποίου παίρνει τροχοειδή διάταξη. Ακολουθεί η πολυχρωματόφιλη και έπειτα η οξύφιλη ερυθροβλάστη, όπου το κυτταρόπλασμα

γίνεται προοδευτικά οξύφιλο και ροδίζει (πλήρωση με αιμοσφαιρίνη), ενώ ο πυρήνας πυκνώνει περισσότερο και γίνεται ένα βαθύχρωμο σφαιροειδές μόρφωμα. Στο τέλος, ο πυρήνας εκβάλλεται και το άωρο ερυθροκύτταρο, που ονομάζεται δικτυοερυθροκύτταρο επειδή τα υπολείμματα του πυρήνα δίνουν την εικόνα δικτύου, αποδίδεται στην κυκλοφορία. Τα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα έχουν σχήμα αμφίκιουλου δίσκου (η αιμοσφαιρίνη διατάσσεται περιμετρικά) με διάμετρο περί τα 7 μ, και είναι όλα ισομεγέθη και ισόχρωμα.

❖ Κοκκιώδης (μυελική) σειρά

Αντίστοιχα, το πρώτο αναγνωρίσιμο κύτταρο της κοκκιώδους σειράς είναι η μυελοβλάστη. Πρόκειται για ένα επίσης μεγάλο κύτταρο με γαλάζιο πρωτόπλασμα χωρίς κοκκία και μεγάλο πυρήνα. Η χρωματίνη του πυρήνα σχηματίζει λεπτό δίκτυο μέσα στο οποίο αναγνωρίζονται, σχετικά ευδιάκριτα, ένα ή δύο γαλάζια πυρήνια. Η μυελοβλάστη εξελίσσεται προς προμυελοκύτταρο, που είναι μεγαλύτερο, έχει πυκνότερο πυρήνα, και το πρωτόπλασμά του γεμίζει με αδρά βαθυκύανα κοκκία. Έπειτα, το προμυελοκύτταρο διαφοροποιείται προς μυελοκύτταρο, όπου ο πυρήνας γίνεται περισσότερο πυκνωτικός, ενώ το πρωτόπλασμα, που παίρνει ρόδινο χρώμα, αρχίζει να γεμίζει με κοκκία, που καθορίζουν και την περαιτέρω εξέλιξή του ως ουδετερόφιλο μεταμυελοκύτταρο (μικρά ερυθροϊώδη κοκκία), ηωσινόφιλο μεταμυελοκύτταρο (κοκκία μεγάλα με λαμπερό πορτοκαλί χρώμα-ηωσίνη) και βασεόφιλο μεταμυελοκύτταρο, με μεγάλα, σχεδόν μαύρα κοκκία. Προοδευτικά, ο πυρήνας των μυελοκυττάρων γίνεται επιμήκης και καταλήγει με την μορφή ραβδίου στο ραβδοπύρηνο κύτταρο. Τελικά, ο πυρήνας των ραβδοπύρηνων κυττάρων κατατέμνεται σε δύο ή περισσότερους λοβούς και τα παράγωγα πολυμορφοπύρηνα κύτταρα, χαρακτηριζόμενα με βάση τα κοκκία που περιέχουν (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα), αποδίδονται στην κυκλοφορία για να επιτελέσουν τις λειτουργίες τους.

❖ Μονοκύτταρα

Η εξέλιξη της σειράς των μονοκυττάρων είναι παρόμοια. Το άωρο αναγνωρίσιμο κύτταρο είναι η μονοβλάστη, η οποία διαφοροποιείται προς μονοκύτταρο. Το μονοκύτταρο είναι μεγαλύτερο από τα πολυμορφοπύρηνα, έχει ανώμαλο, ελαφρά ιώδες πρωτόπλασμα με λεπτά κοκκία και ψευδοπόδια και πολύμορφο, αλλά μονήρη πυρήνα.

❖ Αιμοπετάλια-Μεγακαρυοκυτταρική σειρά

Τα αιμοπετάλια αποτελούν τμήματα του πρωτοπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων, τα οποία δεν εξέρχονται στην κυκλοφορία. Η προγονική μορφή τους είναι και εδώ η μεγακαρυοβλάστη, κύτταρο με βαθύχρωμο πρωτόπλασμα, συχνά με ψευδοπόδια, και πυκνό σκοτεινό πυρήνα. Η μεγακαρυοβλάστη εξελίσσεται προς άωρο μεγακαρυοκύτταρο, που είναι πολύ μεγαλύτερο από όλα τα άλλα κύτταρα του μυελού, έχει πλούσιο κυτταρόπλασμα, σαφές περίγραμμα και πυρήνα, μονήρη και στρογγυλό στην αρχή, που διαιρείται μέσα στο κύτταρο χωρίς αυτό να προχωρεί σε μίτωση και καταλήγει στο ώριμο μεγακαρυοκύτταρο, κύτταρο πολύ μεγάλο και πολυπύρηνο με πρωτόπλασμα, το οποίο κατατέμνεται άτακτα αποδίδοντας μικρά θραύσματα που αποτελούν τα αιμοπετάλια.

❖ Λεμφοκύτταρα

Μητρική μορφή των λεμφοκυττάρων του μυελού είναι η λεμφοβλάστη. Πρόκειται για ευμέγεθες σχετικά στρογγυλό κύτταρο με βαθύχρωμο πρωτόπλασμα και μεγάλο πυρήνα που συχνά περιορίζει το πρωτόπλασμα σε μια στεφάνη. Ο πυρήνας μπορεί να έχει ένα ή δύο πυρήνια, λιγότερο ευκρινή από εκείνα του μυελοβλάστη. Ο λεμφοβλάστης εξελίσσεται προς προλεμφοκύτταρο και εκείθεν σε λεμφοκύτταρο. Κατά γενικό κανόνα τα λεμφοκύτταρα είναι μικρά και στρογγυλά κύτταρα με πυκνωτικό πυρήνα που περιβάλλεται από λιγιστό κυανούν πρωτόπλασμα. Μερικά είναι μεγαλύτερα και περιέχουν αδρά αζουρόφιλα κοκκία. Τα λεμφοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού έναντι των λοιμώξεων και κάθε άλλου κινδύνου για τον οργανισμό. Περιλαμβάνουν διάφορες κατηγορίες που αναγνωρίζονται με ειδικούς ανοσολογικούς δείκτες και υποδοχείς αντιγόνων, οι οποίοι εκφράζονται στη μεμβράνη τους. Κύριες ομάδες είναι τα Β, Τ και ΝΚ λεμφοκύτταρα. Τα Β λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα, τα επεξεργάζονται, συνθέτουν την αντίστοιχη ανοσοσφαιρίνη και την εκκρίνουν μετά από μετατροπή τους σε πλασματοκύτταρα. Τα Τ λεμφοκύτταρα επίσης αναγνωρίζουν διάφορα αντιγόνα μέσω των υποδοχέων της μεμβράνης τους και γίνονται άμεσα κυτταροτοξικά για τα κύτταρα που εκφράζουν το αντίστοιχο για κάθε περίπτωση αντιγόνο. Παρόμοια δράση έχουν και τα κύτταρα φονείς (NK) [2].

1.2 ΔΥΣΚΡΑΣΙΕΣ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι δυσκρασίες των πλασματοκυττάρων περικλείουν ένα ευρύ φάσμα ασθενειών από την Μονοκλωνική γαμμαπάθεια άγνωστης σημαντικότητας (monoclonal gammopathy of unknown significance/MGUS) που χαρακτηρίζεται από έναν ασυμπτωματικό προκακοήθη πολλαπλασιασμό των πλασματοκυττάρων, το ασυμπτωματικό πολλαπλό μυέλωμα (smoldering MM / SMM), μέχρι την κακοήθη ασθένεια του ενεργού

μυελώματος (active MM ή λευχαιμία πλασματοκυττάρων) με βλάβες σε τελικά όργανα και σημαντική θνησιμότητα ασθενών [3,4]. Μέσα από έρευνες διαπιστώθηκε ότι σχεδόν όλες οι περιπτώσεις ενεργού μυελώματος εξελίχθηκαν από το MGUS προγενέστερο στάδιο [5,6]. Παρόλα αυτά, οι περισσότερες περιπτώσεις MGUS δεν καταλήγουν σε κακοήγη νεοπλασία και αντί να μετατραπούν σε ενεργό μύελωμα, κάποιες εξελίσσονται σε μακροσφαιριναιμία Waldenstrom, πρωταρχική AL αμυλοϊδωση, ή λεμφοπολλαπλασιαστική διαταραχή [7,8].

1.2.1 Πολλαπλόν Μυέλωμα

Το πολλαπλό μυέλωμα (ΠΜ) είναι μια νεοπλασία των πλασματοκυττάρων, δηλαδή Β-λεμφικών κυττάρων που βρίσκονται στο τελικό στάδιο διαφοροποίησής τους. Χαρακτηρίζεται από τον πολλαπλασιασμό και τη συσσώρευση στο μυελό των οστών μονοκλωνικών πλασματοκυττάρων, που εκκρίνουν παραπρωτεΐνη (IgG, IgA, ελαφρές αλυσούσ, κ.α.) [9]. Στο ΠΜ, τα πλασματοκύτταρα υπερέχουν σε ένα ποσοστό 10% έναντι των υπόλοιπων κυττάρων του μυελού και το μη φυσιολογικό αντίσωμα (παραπρωτεΐνη) που παράγουν, χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης για την ύπαρξη της ασθένειας [10]. Το ΠΜ αντιπροσωπεύει το 10% των αιματολογικών νεοπλασμάτων. Η επίπτωσή του είναι 3-4 ανά 100.000 πληθυσμού κατ'έτος και η διάμεση ηλικία διάγνωσης είναι τα 65 έτη.

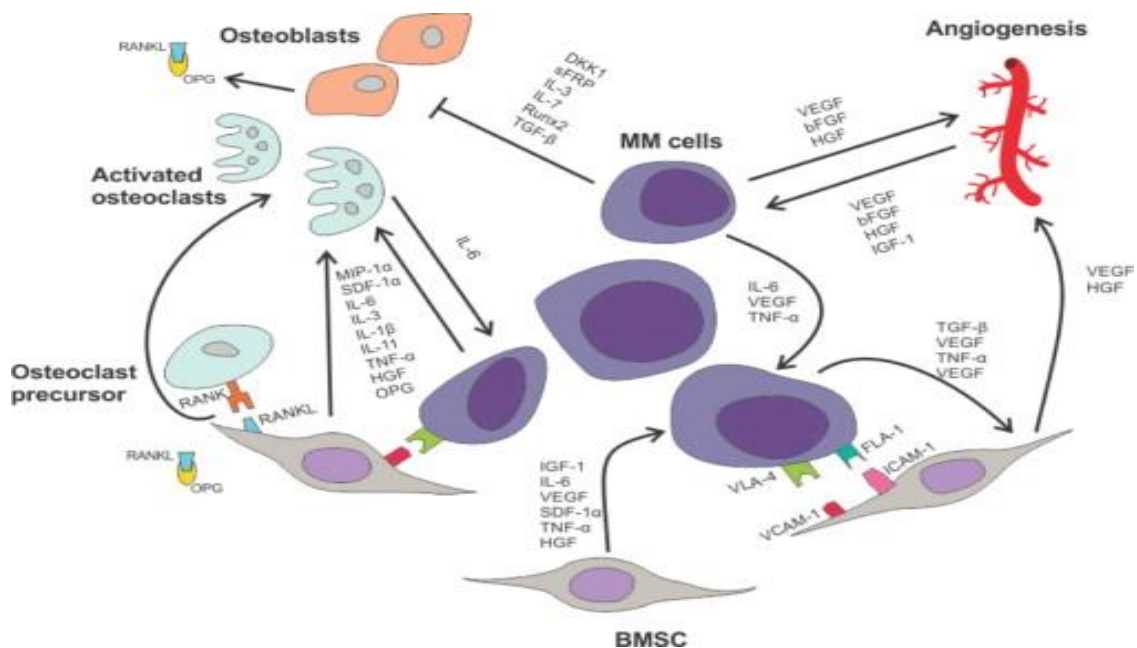
1.2.2 Το μικροπεριβάλλον του Μυελού των Οστών

Προ-B και παρθενικά Β-λεμφοκύτταρα προερχόμενα από τον μυελό των οστών εισέρχονται στα πρωτογενή και δευτερογενή λεμφοζίδια των λεμφαδένων και του σπληνός, όπου έρχονται σε επαφή με το αντιγόνο. Τότε αρχίζει η διαδικασία του ανασυνδυασμού του ισοτύπου της ανοσοσφαιρίνης (immunoglobulin class switching: M, G, A, D, E), κατά την οποία λαμβάνει πιθανώς χώρα το πρώτο μεταλλαξιγόνο συμβάν. Εν συνεχεία το νεοπλαστικό πλέον κύτταρο μεταναστεύει και εγκαθίσταται στον μυελό των οστών με τη βοήθεια των μορίων προσκόλλησης (VLA-4, LFA-1, MCP-1, VLA-5, syndecan-1), που φέρει στην επιφάνειά του. Εκεί συναντά περιβάλλον κατάλληλο για την εξέλιξη, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωσή του χάρη στις κυτταροκίνες (κυρίως IL-6/Sil-6R) και σε άλλους χυμικούς παράγοντες, που εκκρίνονται από το μικροπεριβάλλον του μυελού.

Η προσκόλληση των μυελωματικών κυττάρων στα κύτταρα του μυελικού στρώματος προάγει την έκκριση κυτταροκινών και χυμικών παραγόντων (IL-6/sIL-6R, IL-1, TNF, IL-7, IL-8, IL-10, VEGF, bFGF, TGFβ, MIP-1, μεταλλοπρωτεϊνάσες, κ.α.). Οι κυτταροκίνες αυτές, με την σειρά τους, προάγουν τον πολλαπλασιασμό και συντηρούν την επιβίωση των πλασματοκυττάρων, ενεργοποιούν τους μηχανισμούς

οστικής απορρόφησης, καταστέλλουν την ερυθροποίηση και ενεργοποιούν την νεοαγγειογένεση. Η φυσική επαφή μεταξύ πλασματοκυττάρων και οστικών κυττάρων είναι μια από τις σημαντικότερες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο μικροπεριβάλλον του μυελού. Η οστική απορρόφηση, που οδηγεί στον σχηματισμό οστεολύσεων, προκαλείται από οστεοκλάστες που πολλαπλασιάζονται όντας σε επαφή με τα πλασματοκύτταρα. Η ανάπτυξη των δυο κυτταρικών πληθυσμών είναι αλληλοεξαρτώμενη. Από τη μια τα πλασματοκύτταρα εκκρίνουν ουσίες που ενεργοποιούν τους οστεοκλάστες και από την άλλη οι οστεοκλάστες συντηρούν τα πλασματοκύτταρα με την παραγωγή IL-6/sil-6R. Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του οστικού μεταβολισμού παίζουν μέλη της οικογένειας του TNF και των υποδοχέων και συνδετών του. Ο συνδέτης του υποδοχέα-ενεργοποιητή του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (RANKL) προάγει την ανάπτυξη, την λειτουργικότητα και την επιβίωση των οστεοκλαστών με την προϋπόθεση ότι συνδέεται με τον υποδοχέα του, τον RANK, στην επιφάνεια των οστεοκλαστών. Η οστεοπροτεγερίνη (OPG), δρα ως διαλυτό σύμπλεγμα υποδοχέα-ανταγωνιστή και παρεμβάλλεται μεταξύ RANK και RANKL για να αναστείλει τη δράση τους.

Οι κυτταροκίνες με αγγειογενετική δράση (VEGF, HGF, bFGF, syndecan-1, αγγειογενίνη), εκκρίνονται τόσο από το μυελικό στρώμα όσο και από τα πλασματοκύτταρα, προάγοντας την νεοαγγειογένεση, την διαπερατότητα των αγγείων και την παραγωγή IL-6. Ο βαθμός νεοαγγείωσης του μυελού συνδέεται με το στάδιο της νόσου, την επιθετικότητα της και την οστική απορρόφηση και ως εκ τούτου σχετίζεται αντίστροφα με την οστική πυκνότητα [9].



Εικόνα 1.2.1: Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μυελωματικών κυττάρων (MM) και των κυττάρων στον μυελό των οστών

1.2.3 Αιτιολογία – Παθολογία

Όμοια με τους περισσότερους καρκίνους, το πολλαπλό μυέλωμα αποτελεί μια πολυπαραγοντική ασθένεια, της οποίας τα ακριβή αίτια είναι ακόμα ανεπαρκώς προσδιορισμένα. Παρόλα αυτά έχουν ενοχοποιηθεί γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Έτσι, έχει καταδειχθεί οικογενής επίπτωση του ΠΜ, συσχέτιση της νόσου με ορισμένα αντιγόνα του συστήματος ιστοσυμβατότητας HLA και αυξημένη επίπτωση σε άτομα της μαύρης φυλής καθώς και αυξημένη συχνότητα σε άνδρες [9]. Παρακάτω παρατίθενται πιο αναλυτικά οι πιθανές αιτίες που οδηγούν στην εμφάνιση και την πρόοδο της νόσου.

❖ Έκθεση σε χημικά:

Ο κίνδυνος ανάπτυξης πολλαπλού μυελώματος καθώς και η θνησιμότητα αυξάνονται σε συγκεκριμένα επαγγέλματα, όπως σε αυτά που σχετίζονται με τη γεωργία λόγω της υψηλής έκθεσης σε χημικά: φυτοφάρμακα, DDT, φαινοξυακετικά και χλωροφαινόλες [11]. Ακόμα, αύξηση κινδύνου παρατηρείται και σε επαγγελματίες κομμωτικής, σε ποσοστό 40%, οι οποίοι έρχονται σε επαφή με πτητικούς διαλύτες, προωθητικά, αερολύματα και με συγκεκριμένες χημικές ενώσεις όπως η φορμαλδεΰδη, τα μεθακρυλικά και οι νιτροζαμίνες [12]. Η έκθεση σε χλωριούχο μεθυλένιο ή διχλωρομεθάνιο (methylene chloride) συνδέεται ισχυρά με μελλοντική ανάπτυξη της κακοήθειας. Η συγκεκριμένη χημική ουσία χρησιμοποιείται ως διαλύτης σε αφαιρετικά χρωμάτων, σε κόλλες, ως προωθητικό σε αερολύματα, ως διαλύτης στην παρασκευή φαρμακευτικών προϊόντων και φαρμάκων, στη χημική επεξεργασία και τον καθαρισμό ή το φινίρισμα μετάλλων [13].

❖ Τρόπος ζωής:

Ο τρόπος ζωής επίσης δείχνει να συσχετίζεται με την κακοήθεια, με τους παχύσαρκους και υπέρβαρους ανθρώπους να διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισής της, ενώ η φυσική δραστηριότητα δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο [14,15]. Παραδόξως, δεν έχει βρεθεί αντίστοιχη σημαντική σύνδεση μεταξύ καπνίσματος και ανάπτυξης της νόσου [16]. Επιπλέον, στο γυναικείο υποπληθυσμό παρατηρήθηκε ότι η κατανάλωση αλκοόλ, μέσα σε φυσιολογικά πλαίσια, δρα προστατευτικά έναντι του ΠΜ. Συγκεκριμένα, οι πολυφαινόλες που είναι άφθονες στο κόκκινο κρασί, μειώνουν την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (Nf-κΒ) στα μονοπύρνα κύτταρα και τις συγκεντρώσεις της χημειοτρακτικής πρωτεΐνης 1 (MCP1) στα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα [17,18].

❖ Γενετικοί παράγοντες:

Η νεοπλασματική εκτροπή είναι συνάρτηση πολλών ενδογενών και εξωγενών παραγόντων και γίνεται σε πολλά στάδια. Από γενετικής πλευράς, το πολλαπλό μυέλωμα χαρακτηρίζεται από χρωμοσωμική αστάθεια και κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Το πρωταρχικό μεταλλαξιογόνο συμβάν περιλαμβάνει όλες τις μεταλλάξεις που εμπλέκουν το γονίδιο της βαρειάς αλύσου των ανοσοσφαιρινών στη θέση 14q32 και λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια του ανασυνδυασμού του ισοτύπου της ανοσοσφαιρίνης και μεταγενέστερα γεγονότα αφορούν τη δημιουργία υπερδιπλοειδίας, με πολλαπλά αντίγραφα χρωμοσωμάτων περιττού αριθμού (π.χ. χρωμόσωμα 3, 5, 7 κ.ο.κ) [9]. Οι μετατοπίσεις στην IgH έχουν παρατηρηθεί στο 40% των ασθενών και δεν φαίνεται να σχετίζονται με το στάδιο της νόσου ούτε με το προσδόκιμο επιβίωσης. Οι πιο συχνά εμπλεκόμενες σε μετατοπίσεις χρωμοσωμικές περιοχές, με τα αντίστοιχα ποσοστά συχνότητας μετατόπισής τους είναι οι: 4p16 (FGFR3/MMSET) (12%-15%), 11q13 (CCND1) (15%-20%), 16q23 (c-maf) (3%), 6p21 (CCND3) (5%), and 20q11 (MAFB6) (1%) [19]. Οι κυτταρογενετικές αυτές βλάβες ανευρίσκονται σε ανάλογο ποσοστό σε ασθενείς με MGUS, εύρημα που ενισχύει την άποψη ότι δεν αποτελούν παρά ένα αρχικό συμβάν που δεν είναι αρκετό για να αναπτυχθεί σε νεοπλασία. Δεύτερη βλάβη, η οποία πιθανώς εμπλέκεται σε μετατροπή της MGUS σε ΠΜ, φαίνεται να είναι η μονοσωμία 13. Στο 70% των ασθενών με ΠΜ που αναπτύσσονται επί εδάφους MGUS ανιχνεύεται μονοσωμία 13. Εν συνεχεία, κατά την πορεία της νόσου, αναπτύσσονται πολλαπλές δομικές και αριθμητικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες, εξ' αιτίας των οποίων απορρυθμίζεται η έκφραση των ογκογονιδίων (myc, ras, κ.ά.), που ενδεχομένως καθορίζουν την κλινική συμπεριφορά της νόσου.

Η μετατόπιση t4;14 έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση του υποδοχέα 3 του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGFR3) και της περιοχής SET του πολλαπλού μυελώματος (Multiple Myeloma SET domain / MMSET), καθώς με την χρωμοσωμική σύντηξη η MMSET συνδέεται με τον ενισχυτή του γονιδίου της ανοσοσφαιρίνης. Η MMSET πρωτεΐνη είναι μια μεθυλοτρανσφεράση που δρα ως κύριος ρυθμιστής της μορφής της χρωματίνης και της μεταγραφής στα πλασματοκύτταρα που έχουν την προαναφερθείσα μετατόπιση. Ακόμα, τα υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής οδηγούν σε αυξημένη συχνότητα μεθυλιώσεων στη λυσίνη 36 της ιστόνης H3 και σε μείωση των μεθυλιώσεων στη λυσίνη 27 κατά μήκος του γονιδιώματος, δημιουργώντας μια πιο ανηγμένη μορφή της χρωματίνης [20]. Ακόμα, έχουν παρατηρηθεί απαλοιφές στο χρωμόσωμα 17 και συγκεκριμένα στο γενετικό τόπο 17p13 όπου εντοπίζεται το γονίδιο TP53. Αυτά τα γεγονότα οδηγούν σε έλλειμα ή απενεργοποίηση του συγκεκριμένου γονιδίου, ανιχνεύονται συνήθως σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου και σχετίζονται με την επιθετικότητα της, κακή πρόγνωση και μειωμένη επιβίωση. Οι δομικές εκτροπές στο χρωμόσωμα 1 αποτελούν ένα συχνό φαινόμενο, με τις απαλοιφές του 1p να σχετίζονται με κακή πρόγνωση και τους διπλασιασμούς του 1q με κακή πρόγνωση και μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης. Επιπλέον, έχουν ανιχνευθεί μεθυλιώσεις στους υποκινητές

των γονιδίων P15INK4b και P16INK4a, οι οποίες οδηγούν σε 6,3 και 2,2 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης ΠΜ, αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, οι μεθυλιώσεις στον P15INK4b υποκινητή επηρεάζουν στον ίδιο βαθμό λευκούς και Ασιάτες, ενώ αυτές στον P16INK4a υποκινητή αφορούν κυρίως στον ασιατικό πληθυσμό [21]. Έχει φανεί ότι μια σειρά πολυμορφισμών SNPs στον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 6 (IL-6), που αναφέρονται ως rs6684439, rs2229238, rs8192284, καθώς και ο πολυμορφισμός rs11744523 στον μεταγωγέα σήματος gp130 της IL-6 σχετίζονται με τροποποίηση του κινδύνου ανάπτυξης της νόσου [22].

1.2.4 Διάγνωση

Εργαστηριακά ευρήματα:

Σύμφωνα με τη διεθνή ομάδα εργασίας πάνω στο ΠΜ (International Myeloma Working Group / IMWG) και τα κριτήρια CRAB (Calcium level, Renal dysfunction, Anemia, Bone lesions), τα κριτήρια για τη διάγνωση του ενεργού μυελώματος είναι τα εξής [23,24]:

Κλωνικά πλασματοκύτταρα στο μυελό των οστών >10% ή οστικό, εξωμυελικό πλασματοκύττωμα ύστερα από λήψη βιοψίας, μαζί με οποιοδήποτε ένα ή περισσότερα από τα κριτήρια CRAB και χαρακτηριστικά του ΠΜ:

- A. Ένδειξη βλάβης τελικού οργάνου που μπορεί να αποδοθεί σε υποκείμενη διαταραχή πολλαπλασιασμού των πλασματοκυττάρων, συγκεκριμένα:
- i. Υπερασβεστιαμία: Ca^{2+} ορού > 0,25mmol/L (>1mg/dL) πάνω από το ανώτατο φυσιολογικό όριο ή > 2,75 mmol/L (>11mg/dL)
 - ii. Νεφρική ανεπάρκεια: κάθαρση κρεατινίνης <40 mL ανά λεπτό ή κρεατινίνη ορού >177 mol/L (>2mg/dL)
 - iii. Αναιμία: σθένος αιμοσφαιρίνης >20g/L κάτω από το κατώτερο φυσιολογικό όριο ή τιμή αιμοσφαιρίνης <100g/L
 - iv. Οστικές κακώσεις: ένδειξη μίας ή περισσότερων οστεολυτικών κακώσεων μέσω ακτινογραφίας, CT, ή PET/CT. Στην περίπτωση που ο μυελός των οστών έχει <10% ποσοστό κλωνικών πλασματοκυττάρων, απαιτείται παραπάνω από μία οστεολυτική κάκωση για να διαχωριστεί η κακοήθης κατάσταση από ένα μονήρες πλασματοκύττωμα με ελάχιστη επιπλοκή μυελού.

B. Εύρεση ενός ή περισσότερων από τους παρακάτω βιοδείκτες για κακοήθεια (biomarkers of malignancy/ MDEs):

- i. 60% ή υψηλότερο ποσοστό κλωνικών πλασματοκυττάρων σε εξέταση μυελού των οστών
- ii. Η αναλογία εμπλεκόμενης προς αμέτοχης ελεύθερης ελαφριάς αλύσου στον ορό να είναι από 100 και άνω (δεδομένου ότι η απόλυτη τιμή της αμέτοχης ελεύθερης ελαφριάς αλύσου είναι τουλάχιστον 100mg/L)
- iii. Ανίχνευση μέσω MRI άνω της μίας εστιακής οστικής κάκωσης μεγέθους τουλάχιστον 5mm

Τα αντίστοιχα διαγνωστικά κριτήρια για το ασυμπτωματικό ΠΜ (smoldering multiple myeloma) είναι τα παρακάτω και πρέπει να πληρούνται και τα δύο για να γίνει η διάγνωση:

- i. Μονοκλωνική πρωτεΐνη ορού (IgG ή IgA) $\geq 30\text{g/L}$ ή μονοκλωνική πρωτεΐνη ούρων $\geq 500\text{mg}$ ανά 24 ώρες ή/και κλωνικά πλασματοκύτταρα μυελού των οστών σε ποσοστό 10-60%
- ii. Απουσία γεγονότων που χαρακτηρίζουν το μυέλωμα ή αμυλοϊδωση

Κυτταρογενετικές αναλύσεις διάγνωσης:

Όπως προαναφέρθηκε το ΠΜ χαρακτηρίζεται από χρωμοσωμική αστάθεια και κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Πλέον, έχουν αναπτυχθεί εξειδικευμένες τεχνικές διάγνωσης των κυτταρογενετικών ανωμαλιών του μυελώματος, με βάση τις οποίες οι ασθενείς μπορούν να χωριστούν σε υποκατηγορίες υψηλού κινδύνου. Με αυτό τον τρόπο η θεραπεία γίνεται πιο εξατομικευμένη και δίνεται μια νέα προσέγγιση στην πρόγνωση [19]. Οι διαγνωστικές τεχνικές που ακολουθούν συνήθως εστιάζουν σε διαφορετικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες.

Ο καρυότυπος αποκαλύπτει χρωμοσωμικές ανωμαλίες που μπορούν να αφορούν α) τον αριθμό των χρωμοσωμάτων (αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες) ή/και β) την δομή των χρωμοσωμάτων (δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες). Η μελέτη των χρωμοσωμάτων γίνεται μόνο σε διαιρούμενα κύτταρα κατά το στάδιο της μετάφασης, όπου τα χρωμοσώματα χαρακτηρίζονται από μέγιστη συσπείρωση και είναι ορατά σαν μεμονωμένες δομές στο οπτικό μικροσκόπιο. Η εργαστηριακή διαδικασία κατασκευής καρυότυπου ξεκινά με τη λήψη του προς εξέταση δείγματος. Ακολουθεί εγκαθίδρυση κυτταροκαλλιιεργειών και επώασή τους σε κλίβανο CO₂, θερμοκρασία 37°C και σχετική υγρασία, με την προσθήκη ουσιών με μιτογόνο δράση π.χ.

αιματογλουτινίνη για τα λεμφοκύτταρα. Όταν ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων φτάσει το επιθυμητό επίπεδο γίνεται προσθήκη ουσιών σε κάθε καλλιέργεια που σταματούν την κυτταρική διαίρεση στο στάδιο της μετάφασης π.χ. κολχικίνης. Μετά την προσθήκη κολχικίνης γίνεται η συγκομιδή των χρωμοσωμάτων (Chromosome harvesting). Τα κύτταρα μεταφέρονται από τη φιάλη καλλιέργειας σε κατάλληλο φιαλίδιο, φυγοκεντρώνονται και γίνεται επεξεργασία τους με υπότονο διάλυμα KCl, οπότε απελευθερώνονται τα χρωμοσώματα και μονιμοποιούνται με διάλυμα μεθανόλης και οξικού οξέος. Στη συνέχεια, γίνεται επίστρωση των χρωμοσωμάτων σε αντικειμενοφόρους πλάκες και χρώση τους. Η τεχνική χρώσης G (χρώση Giemsa) των χρωμοσωμάτων αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Σε αυτήν γίνεται επίδραση με πρωτεολυτικά ένζυμα ή άλλα αντιδραστήρια πάνω στα παρασκευάσματα των χρωμοσωμάτων με σκοπό την μερική πέψη των πρωτεϊνών της χρωματίνης. Ακολουθεί χρώση των χρωμοσωμάτων με τη χρωστική, που δίνει σε κάθε χρωμόσωμα ένα χαρακτηριστικό και επαναλαμβανόμενο πρότυπο ανοιχτόχρωμων και σκουρόχρωμων ζωνών. Οι σκουρόχρωμες περιοχές αντιπροσωπεύουν περιοχές πλούσιες σε AT που αντιγράφονται αργά και δεν έχουν πολλά γονίδια. Αντίθετα, οι ανοιχτόχρωμες περιοχές αντιπροσωπεύουν περιοχές οι οποίες είναι πλούσιες σε CG, αντιγράφονται νωρίς και είναι πλούσιες σε γονίδια. Στο πολλαπλό μνέλωμα ο συμβατικός καρυότυπος αποκαλύπτει κυρίως αριθμητικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες στο 20-30% των ασθενών. Αρκετές μετατοπίσεις, όπως η t(4;14), δεν μπορούν να ανιχνευθούν. Ο φυσιολογικός καρυότυπος σε ασθενείς με χαμηλό πολλαπλασιαστικό δείκτη αντιστοιχεί σε κινητική των κυττάρων ενός υγιούς μυελού των οστών. Ένας ανώμαλος καρυότυπος, σύμφωνα με έρευνες, έχει αρνητική έκβαση στη θεραπεία των ασθενών. Ολοκληρώνοντας, η καρυοτύπηση δεν αποτελεί τεστ ρουτίνας καθώς υπάρχουν πιο ειδικές τεχνικές ανίχνευσης τέτοιων ανωμαλιών για τη νόσο.

Η τεχνική φθορίζοντος υβριδισμού in situ (Fluorescence In Situ Hybridization/FISH) διενεργείται σε μεσοφασικά κύτταρα, γεγονός που επιλύει τις δυσκολίες της καρυοτύπησης. Σ' αυτή την τεχνική χρησιμοποιούνται ανιχνευτές DNA, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι ή μπορούν να συνδεθούν με φθορίζουσες χρωστικές. Προσθήκη των ανιχνευτών σε ένα χρωμοσωμικό παρασκευάσμα έχει ως αποτέλεσμα, ύστερα από ειδική επεξεργασία, την «ένωση», λόγω συμπληρωματικότητας, του ανιχνευτή με ορισμένη περιοχή DNA κάποιου χρωμοσώματος. Με αυτόν τον τρόπο μας δίνεται η δυνατότητα να αναγνωρίσουμε τη συγκεκριμένη περιοχή παρατηρώντας τα χρωμοσώματα στο μικροσκόπιο, λόγω της φθορίζουσας ουσίας που είναι συνδεδεμένη με τον ανιχνευτή. Για την FISH απαιτείται ο καθαρισμός των πλασματοκυττάρων που εκφράζουν τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη CD138 ή η διπλή χρώση για την κυττοπλασματική ανοσοσφαιρίνη (Ig). Επί του παρόντος, η FISH είναι η καθιερωμένη τεχνική για την ανάλυση των κυτταρογενετικών ανωμαλιών σε ασθενείς με ΠΜ. Τα δείγματα προβάλλονται επί της οθόνης προς ανακάλυψη ανωμαλιών, οι οποίες φαίνεται να εμφανίζονται σε ένα ποσοστό 1% μεταξύ των ασθενών. Παρόλο που η FISH αποτελεί ένα πολύ πρακτικό κυτταρογενετικό εργαλείο για την ανίχνευση γενετικών ιδιοτυπιών in situ και για την απαρρύθμιση του

ποσοστού των κυττάρων που τις φέρουν, δεν δύναται της ανίχνευσης παραλλαγών μεμονωμένων νουκλεοτιδίων (single-nucleotide variants). Γνωρίζοντας πλέον αυτούς τους περιορισμούς, η διάγνωση μέσω FISH, περιλαμβάνει: gain(1q), del(1p), t(4;14)(p16;q32), t(14;16)(q32;q23), del(17p13) κι έναν απτους δείκτες ανευπλοειδίας. Για εξέταση ρουτίνας, όμως, είναι επαρκής η δοκιμή για t(4,14) και del (17p13).

Στις τεχνικές γενοτύπησης ανηκούν και οι μικροσυστοιχίες (microarrays ή gene chips) που χρησιμεύουν στην ανίχνευση, μεταξύ άλλων, και μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms/SNPs). Οι μικροσυστοιχίες βασίζονται στον υβριδισμό (Northern ή Southern) και αποτελούν διαστάτες συστοιχίες βιολογικού υλικού, στην προκειμένη περίπτωση DNA, επάνω σε ένα στερεό υπόστρωμα που υπόκειται σε μελέτη με χρήση μεθόδων υψηλής απόδοσης και ανάλυσης (high-throughput screening). Το υπόστρωμα συνήθως είναι ένα υάλινο πλακίδιο ή ένα λεπτό πλακίδιο πυριτίου. Ουσιαστικά, με τη χρήση chips ολιγονουκλεοτιδίων SNP γίνεται η αναγνώριση μεταλλάξεων/πολυμορφισμών σε ένα ή δύο συγκεκριμένα γονίδια ανά δείγμα. Με αυτό τον τρόπο, μπορούν να ανιχνευθούν περιοχές του γονιδιώματος με απώλεια ετεροζυγωτίας και αριθμητικές ανωμαλίες. Οι μικροσυστοιχίες χαρτογράφησης SNP προσδιορίζουν, ακόμα, παραλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων (copy number variations/CNV). Συνήθως, όμως, απαιτείται συμπληρωματική FISH εξαιτίας του ότι δεν ανιχνεύονται πάντα με τις μικροσυστοιχίες οι μετατοπίσεις.

1.2.5 Κλινική Εικόνα - Συμπτώματα

Οι ασθενείς με ΠΜ συχνά παρουσιάζουν μη ειδικά για την ασθένεια συμπτώματα όπως κόπωση, απώλεια όρεξης και βάρους. Υπάρχουν όμως και πιο ειδικά συμπτώματα που χαρακτηρίζουν την νόσο και προκύπτουν από τα γεγονότα που την διέπουν. Κάποια από τα πιο κύρια είναι πόνοι στην πλάτη και στα οστά καθώς και παθολογικά κατάγματα. Ακόμα, η υπερασβεστιαμία ευθύνεται για την εμφάνιση κοιλιακών πόνων, δίψας, υπερβολικής διούρησης και νεφρικής ανεπάρκειας. Η παραπρωτεΐνη τάξης IgM έχει σχετικά μεγάλο μέγεθος με συνέπεια την αύξηση του ιξώδους του αίματος, η οποία εκδηλώνεται μέσα από πονοκέφαλους και σύγχυση. Οι ασθενείς με παραπρωτεΐνη ελαφριάς αλύσου, ένα μικρό μόριο που φιλτράρεται στα νεφρά και αποβάλλεται με τα ούρα, έχουν αυξημένο κίνδυνο νεφρικής βλάβης και οδηγούνται πιο άμεσα σε νεφρική ανεπάρκεια. Στους πάσχοντες από πολλαπλό μυέλωμα παρατηρούνται, επίσης, μολύνσεις κυρίως στο δέρμα, οι οποίες οφείλονται στη γενικευμένη μείωση των ανοσοσφαιρινών και την ελαττωματική λειτουργία των λευκών αιμοσφαιρίων. Τέλος, η φθίνουσα λειτουργία του μυελού των οστών δημιουργεί συμπτώματα κόπωσης όπως προαναφέρθηκε, λόγω της αναιμίας και οδηγεί σε μελάνιασμα ή αιμορραγία, εξαιτίας της μειωμένης παραγωγής αιμοπεταλίων [10].

1.2.6 Θεραπεία

Από την αρχή της δεκαετίας και έως το έτος 2012 τα πιο ευρέως γνωστά χημειοθεραπευτικά φάρμακα για το πολλαπλό μυέλωμα ήταν το Bortezomib και το Carfilzomib που λειτουργούν ως αναστολείς του πρωτεασώματος και τα ανοσορρυθμιστικά θαλιδομίδη και λεναλιδομίδη. Εκείνη την περίοδο η κοινή γραμμή θεραπείας, κυρίως για ασθενείς κάτω των 70 ετών και με καλή ανταπόκριση στη θεραπεία, περιλάμβανε έναν αρχικό συνδυασμό χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (combination chemotherapy/CCT) και μια επακόλουθη μεταμόσχευση αυτόλογων στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων (autologous haemopoietic stem cell transplant/HSCT). Η επιλογή της αρχικής χημειοθεραπείας περιοριζόταν στο φάρμακο Bortezomib, τα στεροειδή και τη θαλιδομίδη με ή χωρίς κυκλοφωσφαμίδη. Οι ασθενείς συνήθως χρειάζονταν μια θεραπεία διάρκειας 4-6 μηνών, μετέπειτα μεταμόσχευση και συντήρηση για ένα διάστημα με το φάρμακο Melphalan. Οι μεγαλύτερης ηλικίας ασθενείς (>70 ετών) ή αυτοί που παρουσίαζαν κακή ανταπόκριση στη θεραπεία, λάμβαναν χημειοθεραπευτικά φάρμακα που προκαλούν συλλογή βλαστικών κυττάρων, όπως το Melphalan σε συνδυασμό με το Bortezomib, στεροειδή και θαλιδομίδη.

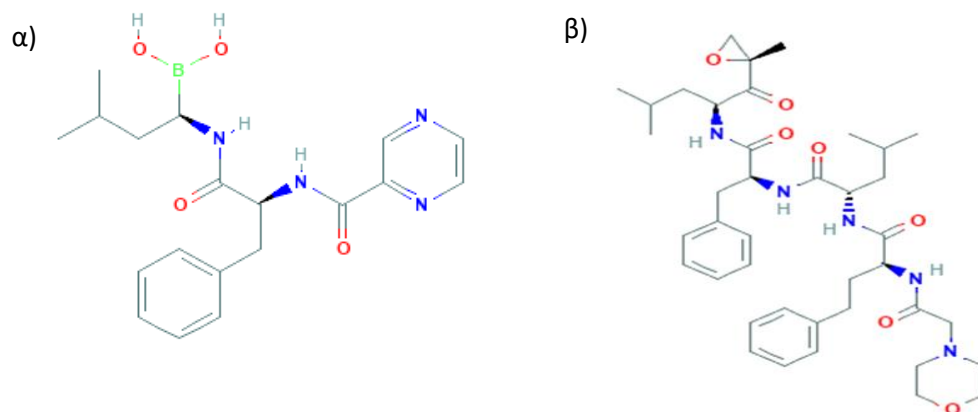
Το 2015 ο FDA ενέκρινε 4 καινούρια φάρμακα για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος, το Panobinostat, το Daratumumab, το Elotuzumab και το Ixazomib. Έκτοτε η χημειοθεραπευτική προσέγγιση της θεραπείας άρχισε να αλλάζει. Σήμερα, προτείνονται συνδυασμοί 2-3 ή ακόμα και 3-4 φαρμάκων που ως απότερο στόχο έχουν μια πιο άμεση, βαθειά, σταθερά θετική ανταπόκριση από τον οργανισμό του ασθενούς και να υπερνικήσουν την ενδοογκική ετερογένεια. Επιπλέον, η κύρια παρατήρηση που υποστηρίζει αυτή τη γραμμή θεραπείας και έχει διαπιστωθεί μέσα από έρευνες, είναι ότι το 60-70% των πρόσφατα διαγιγνωσκόμενων ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα αφού ακολούθησαν την παραπάνω πορεία θεραπείας, παρουσίασαν πλήρη ανταπόκριση και αρνητικό MRD (Minimal Residual Disease). Το τεστ MRD αντικατοπτρίζει το ποσοστό των εναπομείνοντων καρκινικών κυττάρων στο μυελό των οστών μετά τη λήψη θεραπείας [25,26,27].

Τέλος, μια παράλληλη φροντίδα υποστήριξης των ασθενών περιλαμβάνει εγχειρήσεις καταγμάτων, ακτινοθεραπεία για την αντιμετώπιση των οστικών κακώσεων, εγχύσεις διφωσφονικών με βιταμίνη D, συμπληρώματα ασβεστίου για τη διατήρηση της καλής κατάστασης των οστών και την πρόληψη της μόλυνσης. Ακόμα, η καλή διαχείριση της νόσου, της κατάστασης των οστών, των υγρών του σώματος και της πίεσης του αίματος, συμβάλλουν στην καθυστέρηση της εμφάνισης νεφρικής ανεπάρκειας [10].

1.3 ΒΟΡΤΕΖΟΜΙΜΠΗ ΚΑΙ ΚΑΡΦΙΛΖΟΜΙΜΠΗ

Η Βορτεζομίμη (Bortezomib), που κυκλοφορεί στο εμπόριο με το φαρμακευτικό όνομα Velcade, αποτελεί έναν πρώτης γενεάς παράγοντα που χορηγείται ενδοφλεβίως ή με υποδόρια έγχυση για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος. Από άποψη χημικής δομής είναι ένα διπεπτιδυλ-βορονικό οξύ το οποίο αναστέλλει επιλεκτικά και αντιστρεπτά το μονοπάτι ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος. Ακολούθως, η Καρφιλζομίμη (Carfilzomib), ένα τετραπεπτιδίο εποξυκετόνης που κυκλοφορεί με το φαρμακευτικό όνομα Kyprolis, χρησιμοποιείται ως δεύτερης γενεάς μη αντιστρεπτός αναστολέας του πρωτεασώματος και χορηγείται ενδοφλέβια σε ασθενείς με πολλαπλό μύελωμα [28, 29]. Όπως είναι γνωστό μέσα από το μονοπάτι αυτό τελείται η αποικοδόμηση πολλών πρωτεϊνών. Το πρωτεάσωμα 26S είναι ένα μεγάλο πρωτεϊνικό σύμπλοκο στο οποίο λαμβάνει χώρα η αποικοδόμηση διαφόρων ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε πολλαπλές κυτταρικές διεργασίες όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων και η απόπτωση [30, 31].

Παρόλο που αρχικά το Bortezomib χρησιμοποιήθηκε ως αντιφλεγμονώδης και αντικαχεκτικός παράγοντας, στα τέλη του 1990 ανακαλύφθηκε και η αντικαρκινική του δράση [32]. Ασκήει ουσιώδη αντιμυελωματική δράση όταν χορηγείται μόνο του ή μαζί με άλλους αντικαρκινικούς παράγοντες σε ασθενείς με ΠΜ που δεν έχουν λάβει άλλη θεραπεία αλλά και σε ασθενείς με υποτροπιάζον ΠΜ [33, 34]. Το 2003, 7 χρόνια μετά την αρχική του σύνθεση, έλαβε ταχεία έγκριση από τον FDA (US Food and Drug Administration) για τη θεραπεία ασθενών με ΠΜ που προοδεύει ύστερα από δύο προηγούμενες θεραπείες [35]. Ακολούθως, έλαβε μόνιμη έγκριση από τον FDA τον Μάρτιο του 2005 για την θεραπεία περιπτώσεων στις οποίες έχει προηγηθεί τουλάχιστον μία θεραπεία και το 2008 για ασθενείς με μύελωμα που δεν έχουν δεχθεί καμία θεραπεία [36]. Το Carfilzomib εγκρίθηκε το 2012 από τον FDA για τη μεμονωμένη χορήγησή του σε ασθενείς με υποτροπιάζον πολλαπλό μύελωμα και σε ασθενείς που έχουν λάβει ήδη μια γραμμή θεραπείας με Bortezomib ή ανοσορρυθμιστικούς παράγοντες [37].

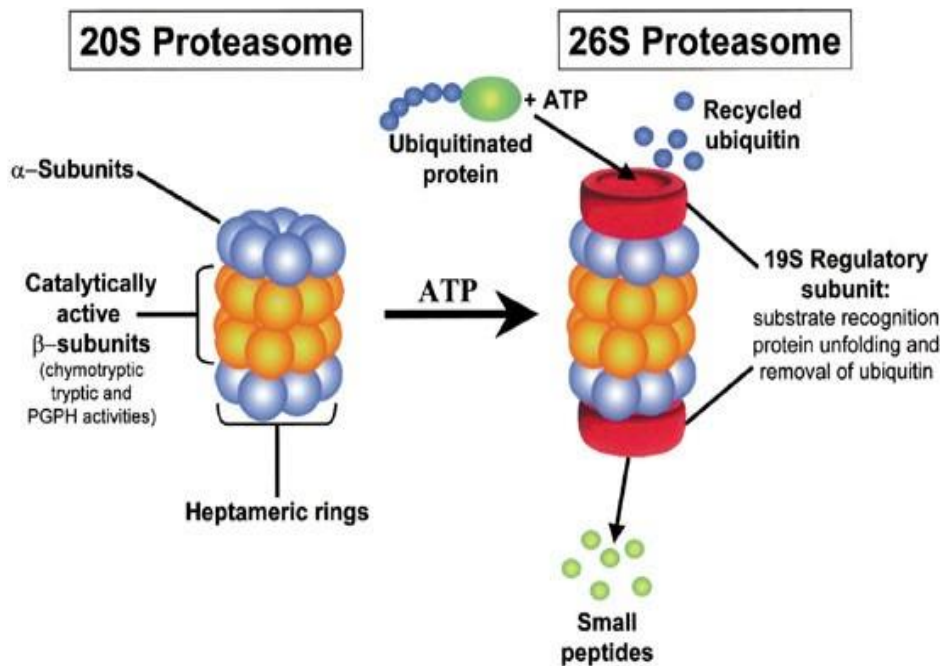


Εικόνα 1.3.1: Χημική Δομή α) Bortezomib, β) Carfilzomib

1.3.1 Η δομή και λειτουργία του πρωτεασώματος

Το πρωτεάσωμα είναι ένα πολυκαταλυτικό σύμπλεγμα ενζύμων το οποίο εδράζεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων. Εμπλέκεται στην αδενοσίνιο-τριφωσφορική- (ATP-) εξαρτώμενη ενδοκυτταρική πρωτεόλυση εξασφαλίζοντας την ταχεία αποικοδόμηση πρωτεϊνών στόχων που έχουν σημασθεί με μια αλυσίδα ουβικουϊτίνης [38,39]. Το μονοπάτι πρωτεασώματος-ουβικουϊτίνης (Ubiquitin-Proteasome Pathway/UPP) αποτελεί την κύρια οδό με την οποία κυτταρικές πρωτεΐνες, όπως αυτές που εμπλέκονται στη μεταγραφή, τον κυτταρικό κύκλο, την επιδιόρθωση του DNA και την απόπτωση, αποικοδομούνται. Ο έλεγχος της χρονικής στιγμής αποικοδόμησης που έχει οριστεί για κάθε πρωτεΐνη είναι αδιαμφισβήτα σημαντικός για τη διατήρηση της ισορροπίας των επιπέδων μεταξύ των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών και της κυτταρικής λειτουργίας στο σύνολο.

Το πρωτεάσωμα 26S αποτελείται από μια κεντρική (πυρηνική) πρωτεολυτική περιοχή 20S σε σχήμα βαρελιού και ένα ρυθμιστικό σωματίο 19S που τοποθετείται εκατέρωθεν της και είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση των πρωτεϊνών στόχων, την αποδιάταξή τους και την αφαίρεση της ουράς ουβικουϊτίνης [40,41]. Η 20S πυρηνική περιοχή σχηματίζεται από 28 υπομονάδες διατεταγμένες σε τέσσερις στοιβαγμένους επταμερείς δακτυλίους, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός θαλάμου στον οποίο τελείται η πρωτεόλυση [42]. Οι δύο εξωτερικοί και εσωτερικοί δακτύλιοι αποτελούνται από 7α και 7β διαφορετικές υπομονάδες, αντίστοιχα, τοποθετημένες η μία επάνω στην άλλη ως α-β-β-α. Η αποικοδόμηση μιας πρωτεΐνης ξεκινά με τη σύζευξη της με μια αλυσίδα ουβικουϊτίνης με την βοήθεια τριών ενζύμων (ένζυμο ενεργοποίησης ουβικουϊτίνης E1, ένζυμο πρόσδεσης ουβικουϊτίνης E2, λιγάση ουβικουϊτίνης E3) και κατανάλωση ATP. Αυτή η αλυσίδα ουβικουϊτίνης χρησιμεύει για την σήμανση των πρωτεϊνών που πρέπει να αποικοδομηθούν. Φτάνοντας στο πρωτεάσωμα και καθώς αφαιρούνται τα μόρια της ουβικουϊτίνης, η πρωτεΐνη μεταναστεύει στον εσωτερικό καταλυτικό θάλαμο όπου τρεις διαφορετικές καταλυτικές ενεργότητες την διασπούν σε μικρότερα πεπτίδια. Οι καταλυτικές αυτές ενεργότητες που συνδέονται με τους δύο κεντρικούς β-δακτυλίους και πιο συγκεκριμένα τις β5, β2, β1 υπομονάδες κατατάσσονται στις εξής τρεις κατηγορίες αντιστοίχως: ενεργότητα τύπου χυμοθρυψίνης (Chymothrypsin Like/CT-L), θρυψίνης (Thrypsin Like/T-L) και κασπάσης (Caspase Like/C-L) [42,43,44,45].



Εικόνα 1.3.2: Η δομή του πρωτεασώματος

1.3.2 Μηχανισμός δράσης των Bortezomib και Carfilzomib στο ΠΜ

Στο πολλαπλό μυέλωμα η πρωτεολυτική δραστηριότητα του πρωτεασώματος είναι αυξημένη. Ως συνέπεια αυτού, το μονοπάτι του NF-κB διατηρείται συνεχώς ενεργό εξαιτίας της συνεχούς αποικοδόμησης του αναστολέα του, IκB. Παράλληλα, αυξάνεται η παραγωγή αντιαποπτωτικών παραγόντων και η δυνατότητα προσκόλλησης των πλασματοκυττάρων στα κύτταρα του στρώματος, αποδιοργανώνονται οι διαδικασίες ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και επάγεται η προφλεγμονώδης σηματοδότηση μέσω κυτοκινών. Η δραστηριότητα αυτή του πρωτεασώματος έχει, επιπλέον, ως αντίκτυπο την αποικοδόμηση του ογκοκατασταλτικού παράγοντα p53, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε θετικούς βρόχους ανάδρασης μεταξύ των μυελοκυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος στο μυελό των οστών. Τα γεγονότα αυτά καταλήγουν σε ένα κοινό αποτέλεσμα που συμβάλλει στην κυτταρική επιβίωση και την εξέλιξη του όγκου [45].

Το Bortezomib προσδένεται αντιστρεπτά στην CT-L υπομονάδα του πρωτεασώματος εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την σωστή λειτουργία του. Έχει παρατηρηθεί πως μπορεί να προσδεθεί εξίσου στις C-L και T-L υπομονάδες με χαμηλότερη συγγένεια. Παρόλο που ο παράγοντας αυτός προσδένεται αντιστρεπτά, το σύμπλοκο βορονικού οξέος-πρωτεασώματος χαρακτηρίζεται από διαχωρισμό χαμηλού βαθμού και παραμένει σταθερό για αρκετές ώρες. Απ' την άλλη μεριά το Carfilzomib προσδένεται μη αντιστρέψιμα στην CT-L καταλυτική υπομονάδα, έτσι ώστε η επαναφορά της λειτουργίας του πρωτεασώματος να μπορεί να γίνει μόνο μέσω της σύνθεσης νέων

υπομονάδων. Σε υψηλές χορηγούμενες δόσεις έχει κι αυτό τη δυνατότητα σύνδεσης με τις C-L και T-L υπομονάδες [38].

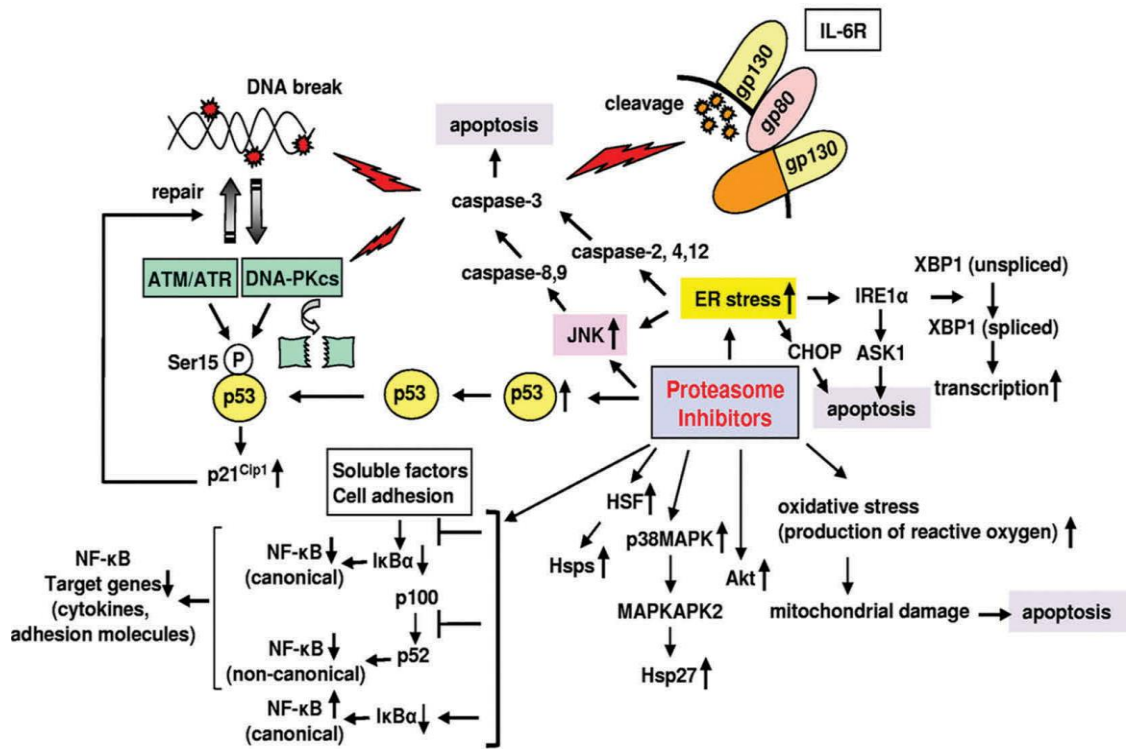
Δεδομένου ότι το πρωτεάσωμα παίζει σημαντικό ρόλο μέσα στο κύτταρο, η δραστηριότητα του συνδέεται με πλήθος διεργασιών και επακόλουθα η παρεμπόδιση της επηρεάζει πολλά διαφορετικά μονοπάτια. Αρχικά, οι αναστολές πρωτεασώματος προκαλούν την απόκριση stress ενδοπλασματικού δικτύου (Endoplasmic Reticulum/ER stress), μέσω της συσσώρευσης πρωτεϊνών, που οδηγεί το κύτταρο στην απόπτωση μέσα από το μονοπάτι απόκρισης μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (Unfolded Protein Response/UPR). Η συσσώρευση αυτή εντίνεται στη συγκεκριμένη ασθένεια από την πλεονάζουσα παραγωγή μη φυσιολογικής ανοσοσφαιρίνης από τα μυελοκύτταρα. Επιπλέον, ενεργοποιούν το εσωτερικό αποπτωτικό μονοπάτι της κασπάσης-9 και το εξωτερικό αποπτωτικό μονοπάτι της κασπάσης-8 μέσα από την παρεμπόδιση των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 και της ενεργοποίησης της c-Jun NH₂-τελικής κινάσης (JNK) και της ανοδικής ρύθμισης της πρωτεΐνης NOXA, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι με τη χορήγησή τους το ενδοκυττάριο οξειδωτικό stress αυξάνεται, οδηγώντας σε βλάβη της λειτουργίας των μιτοχονδρίων και καταληκτικά σε απόπτωση. Η αναστολή της λειτουργίας του πρωτεασώματος μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς την παραγωγή μορίων προσκόλλησης, να παρεμποδίσει τους κυτταρικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA, να ρυθμίσει καθοδικά υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και να προκαλέσει παύση του κυτταρικού κύκλου, μέσω της παρεμπόδισης της αποικοδόμησης της κυκλίνης και της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης [45].

Η παρεμπόδιση του μονοπατιού σηματοδότησης του NF-κB είναι εξίσου κριτικής σημασίας. Με τη μηχανή του πρωτεασώματος να δυσλειτουργεί ο αναστολέας IκB δεν αποικοδομείται και κατά συνέπεια το ετεροδιμερές p50 (NFκB1)/p65 (RE1A) του NF-κB δεν μεταφέρεται στον πυρήνα. Έτσι, μπλοκάρεται το «κανονικό» μονοπάτι σηματοδότησης του NF-κB. Οι αναστολές πρωτεασώματος μπορούν επίσης να μπλοκάρουν και το «εναλλακτικό» μονοπάτι του NF-κB παρεμποδίζοντας την επεξεργασία του p100 προς p52 (NF-κB2). Η αναστολή της σηματοδότησης μέσω των συγκεκριμένων μονοπατιών διακόπτει τους μηχανισμούς θετικής ανάδρασης μεταξύ μυελοκυττάρων και μικροπεριβάλλοντος, αποτρέπει την καθοδική σηματοδότηση που σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αντίσταση στη θεραπεία και παρεμποδίζει την επιδιόρθωση του DNA. Κατά συνέπεια, διακόπτεται η αύξηση των μυελοκυττάρων αλλά και η έκκριση IL-6 [45,46].

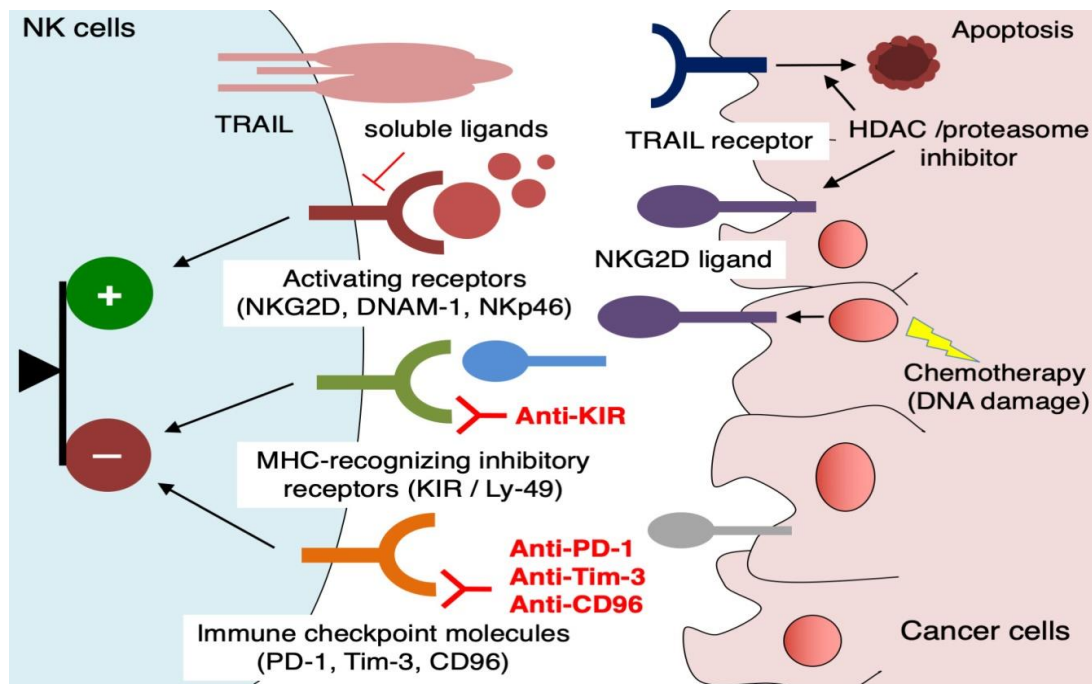
Οι παράγοντες Bortezomib και Carfilzomib φαίνεται πως εμπλέκονται με δόσοεξαρτώμενο τρόπο και στην ανάπτυξη των οστών. Η πρόσδεση του RANKL υποδοχέα στον RANK στην επιφάνεια της πρόδρομης μορφής οστεοκλαστών ενεργοποιεί τον NF-κB ο οποίος προάγει την ωρίμανση των οστεοκλαστών και την οστική απορρόφηση. Για αυτό το λόγο, η εξαρτώμενη από το πρωτεάσωμα, παρεμπόδιση της λειτουργίας του NF-κB οδηγεί σε αναστολή της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών. Στο ίδιο αποτέλεσμα καταλήγει και η αναδιαμόρφωση των p38 και AP-1 (Activator Protein-1) μονοπατιών από τους αναστολές αυτούς. Μέσα από

βιοψίες που έχουν συλλεχθεί από ασθενείς με ΠΜ που ακολουθούν γραμμή θεραπείας βασισμένη στο Bortezomib, αποδείχθηκε πως ο παράγοντας αυτός εμπλέκεται θετικά στην διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Σε αυτά τα δείγματα παρατηρήθηκε ταυτόχρονη αύξηση στην δραστηριότητα της Runx2 εξαιτίας της μη αποικοδόμησής της και στην έκφραση συγκεκριμένων οστεοβλαστικών δεικτών όπως το κολλαγόνο τύπου I, χωρίς να παρεμποδίζεται η κανονική σηματοδότηση μέσω Wnt. Σε προκλινικά μοντέλα φαίνεται πως η Βορτεζομίμη και η Καρφυλζομίμη προωθούν τον φαινότυπο των οστεοβλαστών σε μεσεγχυματικά κύτταρα του στρώματος (MSC) χωρίς να επηρεάζουν τον αριθμό των πρόδρομων οστεοβλαστών ή την βιωσιμότητα των ώριμων οστεοβλαστών. Το οστικό αναβολικό αυτό φαινόμενο οφείλεται κυρίως στην ενεργοποίηση του μονοπατιού β-κατενίνης/TCF, πιο συγκεκριμένα στη σταθεροποίηση της β-κατενίνης και την επαγωγή της μεταγραφικής δραστηριότητας του TCF [39,45].

Η επίδραση των αναστολέων πρωτεασώματος επεκτείνεται και στον TRAIL (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand), μια κυτοκίνη που παράγεται και εκκρίνεται από τα κύτταρα των περισσότερων ιστών. Λειτουργεί ως προσδέτης σε διάφορους διαμεμβρανικούς υποδοχείς θανάτου όπως οι DR4 και DR5 και επάγει την απόπτωση κυρίως σε καρκινικά κύτταρα. Η διαδικασία της απόπτωσης είναι εξαρτώμενη από το μονοπάτι της κασπάσης-8. Στον συγκεκριμένο καταρράκτη η κασπάση-8 ενεργοποιεί καθοδικά κασπάσες τελεστές όπως οι προκασπάσες-3, -6, -7 με τελικό στόχο την ενεργοποίηση συγκεκριμένων κινασών. Υπό τη χορήγηση των αναστολέων παρατηρείται μια αύξηση του αριθμού των DR5 υποδοχέων στην επιφάνεια των μυελοκυττάρων. Με αυτή την δράση οι παράγοντες ευαισθητοποιούν τα μυελοκύτταρα, τα οποία παρουσία του προσδέτη TRAIL οδηγούνται σε απόπτωση [47,48]. Τα φυσικά φονικά κύτταρα (Natural Killer cells/NK cells) του ανοσοποιητικού δύνανται να εξαλείψουν τα κύτταρα του όγκου είτε μέσω αποπτωτικών μονοπατιών υποδοχέων θανάτου (π.χ. TRAIL, FasL/Fas) είτε με έκκριση κυτταροτοξικών κοκκίων. Επομένως, η δράση των NK κυττάρων που φέρουν τον TRAIL στην επιφάνειά τους και των αναστολέων πρωτεασώματος είναι συνεργιστική. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο συσχετισμός του μη κλασσικού HLA κλάσης I μορίου, HLA-E, με τη δράση των αναστολέων. Μέσα από μελέτες έχει φανεί πως οι αναστολείς επάγουν δόσοεξαρτώμενα την απώλεια έκφρασης του συγκεκριμένου μορίου στα κύτταρα του μυελώματος με αποτέλεσμα να τα καθιστούν ευαίσθητα στην κυτταροτοξική δράση των NK2GA⁺ NK κυττάρων. Ο NK2GA υποδοχέας φυσιολογικά παρεμποδίζει την κυτταροτοξικότητα των κυττάρων αυτών έναντι κυττάρων στόχων που φέρουν στην επιφάνειά τους το HLA-E μόριο [48].



Εικόνα 1.3.3: Οι ποικίλες δράσεις των αναστολέων του πρωτεασώματος



Εικόνα 1.3.4: Η αλληλεπίδραση μεταξύ NK κυττάρων και πλασματοκυττάρων

1.3.3 Οι αναστολείς πρωτεασώματος στη θεραπεία του ΠΜ

❖ Σε περιπτώσεις που η θεραπεία βασίζεται στη μεταμόσχευση:

Η πρώτη γραμμή θεραπείας για νεοδιαγνωσκόμενους ασθενείς με ΠΜ (Newly Diagnosed Multiple Myeloma/NDMM) καθορίζεται κυρίως στην επιδεκτικότητα για μεταμόσχευση αυτόλογων βλαστοκυττάρων (Autologous Stem Cell Transplantation/ASCT), με τους ασθενείς που επιλέγονται, να δέχονται μια βραχύχρονη θεραπεία με στόχο τη μείωση του φορτίου του όγκου πριν το μόσχευμα. Για τις περιπτώσεις που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία χρησιμοποιούνται κυρίως τριπλέτες συνδυασμού παραγόντων με κοινό τον Bortezomib. Οι συνδυασμοί του Bortezomib με ανοσορρυθμιστικούς παράγοντες όπως η θαλιδομίδη ή η λεναλιδομίδη και η δεξαμεθαζόνη, που είναι γνωστοί ως VTd και VRd, έδειξαν στην πράξη τη συνεργιστικότητα μεταξύ των ουσιών αυτών και πλέον χρησιμοποιούνται σαν καθιερωμένη προ-μεταμόσχευσης θεραπεία. Επιπλέον, το Bortezomib μπορεί να συνδυαστεί και με συμβατικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες όπως η ανθρακυκλίνη δοξορουβικίνη (anthracycline doxorubicin) και ο αλκυλιωτικός παράγοντας κυκλοφωσφαμίδη. Οι πιο κοινοί συνδυασμοί που εμπίπτουν σε αυτή την κατηγορία είναι οι: PAD (Bortezomib-Doxorubicin-Dexamethasone) και CyBorD (Cyclophosphamide-Bortezomib-Dexamethasone).

Ακολουθώντας τα βήματα του Bortezomib, ο δεύτερης γενιάς αναστολέας πρωτεασώματος Carfilzomib εισέρχεται στη θεραπεία και χορηγείται με τη σειρά του μαζί με λεναλιδομίδη ή θαλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη στους συνδυασμούς KRd και KTd, αντίστοιχα. Ακόμα, διερευνούνται και συνδυασμοί του με κυκλοφωσφαμίδη και δεξαμεθαζόνη ως εναλλακτική γραμμή θεραπείας. Η χορήγηση των τριπλετών αυτών δεν περιορίζεται μόνο στο στάδιο πριν τη μεταμόσχευση, αλλά πλέον χρησιμοποιείται και σαν θεραπεία συντήρησης-σταθεροποίησης μετά τη μεταμόσχευση.

❖ Σε περιπτώσεις που η θεραπεία δεν βασίζεται στη μεταμόσχευση:

Η μακροπρόθεσμη θεραπεία με αναστολείς πρωτεασώματος φαίνεται να είναι εφικτή και πολύ αποδοτική σε πληθυσμούς νεοδιαγνωσκόμενων ασθενών με ΠΜ που δεν μπορούν να δεχθούν μεταμόσχευση, συνήθως εξαιτίας της μεγάλης ηλικίας τους ή των πολλών συννοσηροτήτων. Τα προηγούμενα χρόνια σε τέτοιες περιπτώσεις είχε καθιερωθεί η χορήγηση της αλκυλιωτικής ουσίας μελφαλάνης σε συνδυασμό με το κορτικοειδές πρεδνιζόνη (Melphalan-Prednisone/MP). Με την ανακάλυψη των αναστολέων άρχισε να εξετάζεται το ενδεχόμενο της προσθήκης τους στη διπλέτα MP. Το Bortezomib σε συνδυασμό με τη διπλέτα MP (VMP) παρουσίασε καλύτερα ποσοστά απόκρισης στη θεραπεία από τους ασθενείς σε σχέση με αυτά που είχαν παρατηρηθεί με τη μεμονωμένη χορήγηση της MP. Εξαιτίας των αποτελεσμάτων αυτών το VMP αντικατέστησε την καθιερωμένη θεραπεία και αποτέλεσε το σκελετό στον οποίο προστίθενται επιπλέον ουσίες για πιο

αποτελεσματική απόκριση. Συνδυαστικά σχήματα που χρησιμοποιούν θαλιδομίδη ή συντηρητική θεραπεία βασισμένη στο Bortezomib ύστερα από επαγωγική θεραπεία με VMP, παρουσίασαν βελτίωση της απόκτησης στη θεραπεία και αύξησαν την συνολική επιβίωση άνω των 5 χρόνων. Ακόμα, μια νέα προσέγγιση σε αυτή τη γραμμή θεραπείας ήταν η προσθήκη του μονοκλωνικού αντισώματος Daratumumab στο σκελετό VMP και η δημιουργία μιας τετραπλέτας που έφερε μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχίας σε σχέση με τη μεμονωμένη χορήγηση VMP. Να σημειωθεί ότι και ο συνδυασμός KMP όπου αντί για το Bortezomib πρωταγωνιστεί το Carfilzomib έδωσε παρόμοια ποσοστά απόδοσης στη θεραπεία.

❖ Σε περιπτώσεις υποτροπιάζοντος ΠΜ:

Στη συγκεκριμένη κατηγορία οι αναστολείς πρωτεασώματος χρησιμοποιούνται ως δεύτερη γραμμή θεραπείας, κυρίως σε ασθενείς που έχουν ήδη λάβει πολύ βαριά θεραπεία. Σε αντίθεση με την πρώτη γραμμή θεραπείας οι παράγοντες Bortezomib και Carfilzomib, εδώ, έχουν την ίδια βαρύτητα με αποτέλεσμα οι επιλογές και συνδυασμοί να μην βασίζονται τόσο στο Bortezomib. Η διπλέτα Kd (Carfilzomib-Dexamethasone) φαίνεται να αποφέρει καλύτερα αποτελέσματα ως προς την απόκριση αλλά και την επιβίωση σε σχέση με την Vd (Bortezomib-Dexamethasone). Ακόμα, οι τριπλέτες που μπορούν να δημιουργηθούν προσθέτοντας συστατικά στο σκελετό Kd ή Vd έχουν καθιερωθεί για τη θεραπεία τέτοιων περιπτώσεων. Επειδή οι ασθενείς αυτής της κατηγορίας είναι πολύ επιβαρυνμένοι λόγω των προηγούμενων θεραπειών, διερευνάται συνεχώς το ποιός είναι ο πιο θεμιτός τρόπος χορήγησης αλλά και ποιά πρέπει να είναι τα χρονικά διαστήματα μεταξύ των χορηγήσεων [45].

1.3.4 Παρενέργειες των αναστολέων πρωτεασώματος

❖ Αιματολογική τοξικότητα:

Μπορεί να δημιουργηθεί και από τους δύο αναστολείς πρωτεασώματος. Το πιο συχνό ανεπιθύμητο γεγονός που κατατάσσεται σε αυτή την κατηγορία είναι η θρομβοκυτταροπενία. Παρόλα αυτά, φαίνεται πως η μείωση στον αριθμό των αιμοπεταλίων ύστερα από χορήγηση των αναστολέων είναι παροδική, καθώς στην περίοδο ανάπαυσης μετά από κάθε κύκλο θεραπείας οι αριθμοί αυτοί επιστρέφουν στο φυσιολογικό [49,50].

❖ Γαστρεντερικά γεγονότα:

Οι επιπλοκές του γαστρεντερικού που εμφανίζονται συχνά είναι οι διάρροιες και ναυτία που κυμαίνονται από ήπια έως έντονα επίπεδα. Αποτελούν, όμως, μια διαχειρίσιμη τοξικότητα που μέσα από παράλληλη φροντίδα δεν επηρεάζει την καθημερινότητα των ασθενών [51].

❖ Καρδιοαγγειακή τοξικότητα:

Έχουν παρατηρηθεί μεγαλύτερα ποσοστά τοξικότητας ύστερα από χρήση Carfilzomib σε σύγκριση με αυτά που έχουν προκύψει από το Bortezomib. Αυτή η κατηγορία παρενεργειών προκύπτει κυρίως από την επίδραση που έχουν οι αναστολείς στα πρωετασώματα του μυοκαρδίου μέσω της διαδικασίας απόκρισης μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών ή εξαιτίας γεγονότων που λαμβάνουν χώρα στο ενδοθήλιο. Συνοπτικά, έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις καρδιακής ανακοπής, υπέρτασης και δύσπνοιας ύστερα από τη χορήγηση του συνδυασμού Kd (Carfilzomib-Dexamethasone) [52,53].

❖ Περιφερική Νευροπάθεια:

Η περιφερική νευροπάθεια αποτελεί ένα κοινό φαινόμενο τοξικότητας σε θεραπείες βασιζόμενες στο Bortezomib που χορηγούνται τόσο σε νεοδιαγιγνώσκοντες ασθενείς με ΠΜ όσο και σε ασθενείς με υποτροπιάζον ΠΜ. Παρόλο που γίνονται πολλές προσπάθειες εύρεσης της βέλτιστης δοσολογίας και του καταλληλότερου τρόπου χορήγησης, ασθενείς που έχουν ήδη εμφανίσει περιφερική νευροπάθεια σχετιζόμενη με το ΠΜ δεν δύνανται να ακολουθήσουν γραμμή θεραπείας που περιλαμβάνει το Bortezomib [54].

❖ Επανεργοποίηση του ιού του Έρπητα ζωστήρα:

Οι πιθανότητες επανεργοποίησης του ιού αυξάνονται κυρίως με τη χορήγηση του Bortezomib και λιγότερο συχνά με το Carfilzomib. Με μια παράλληλη αντιϊκή γραμμή προφύλαξης, όμως, ο κίνδυνος δύναται να περιοριστεί [55,56].

❖ Νεφρική τοξικότητα:

Παρουσιάζεται ύστερα από χορήγηση Carfilzomib. Για παράδειγμα, η χορήγηση της διπλέτας Kd έχει συσχετιστεί με περισσότερα γεγονότα νεφρικής ανεπάρκειας σε σχέση με τη χορήγηση της Vd. Για το λόγο αυτό, σε ασθενείς με νεφρική δυσλειτουργία ακολουθείται κατά προτίμηση γραμμή θεραπείας με Vd [57,58].

1.4 ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Το RNA αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα βιομόρια για τη ζωή και την εξέλιξη των κυττάρων. Η ύπαρξή του σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς, από την αρχή της εξέλιξης των διαφόρων ειδών, δηλώνει τη βιολογική του σημασία. Διάφορα είδη RNA, όπως το mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, ncRNA, κλπ., συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεϊνικής έκφρασης, της αντιγραφής του DNA, της σύνθεσης των ριβοσωμάτων, καθώς παράλληλα εμπλέκονται και σε πολλά μεταβολικά μονοπάτια. Επομένως, η σωστή έκφραση, κατανομή και δράση των RNA μορίων μπορούν να καθορίσουν τη φυσιολογική ή μη λειτουργία του κυττάρου. Για το λόγο αυτό, κρίνεται απαραίτητη η ρύθμιση της έκφρασης και αποικοδόμησής τους.

Όσον αφορά στην αποικοδόμηση, εξέχοντα ρόλο διαδραματίζουν οι ριβονουκλεάσες, γνωστές και ως RNases. Οι ριβονουκλεάσες ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεασών, μόρια τα οποία αποικοδομούν διάφορους τύπους RNA. Η αποικοδόμηση πραγματοποιείται μέσω υδρόλυσης, διασπώντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ των βάσεων του υποστρωματικού RNA. Εκτός από την αποικοδόμηση, οι RNases κατέχουν κεντρικό ρόλο στην ωρίμανση όλων των μορίων RNA, όπως τα αγγελιοφόρα RNA (mRNAs) και τα μη κωδικά RNA (ncRNAs), τα οποία συμμετέχουν σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες. Η δράση τους στην αποικοδόμηση των mRNAs συμβάλλει καθοριστικά στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και τον μεταφραστικό έλεγχο και κατά συνέπεια στην κυτταρική διαφοροποίηση. Ωστόσο, ο ρόλος τους δεν περιορίζεται σε αυτές τις διεργασίες. Οι RNases μπορούν να δράσουν και ως μόρια αγγελιοφόροι καθώς αλληλεπιδρούν με την ακτίνη, την ηπαρίνη και τις πρωτεογλυκάνες, επηρεάζοντας έτσι ένα πλήθος λειτουργιών. Πολλές ριβονουκλεάσες, ακόμα, διακρίνονται για την αντινεοπλασματική τους δράση και κυτταροτοξικότητα, αλλά και για τις αντι-εμβρυονικές και ανοσοκατασταλτικές τους δράσεις. Επιπλέον, μπορούν να αποτελέσουν μια πρώτη γραμμή υπεράσπισης έναντι των RNA ιών, συμμετέχοντας σε βιολογικές διεργασίες, όπως η RNAi [59,60].

Τα γονιδιώματα των περισσότερων οργανισμών κωδικοποιούν μια πληθώρα ριβονουκλεασών, οι οποίες συχνά εμφανίζουν αλληλοεπικαλυπτόμενες δράσεις. Μικρές μεταλλάξεις σε αυτές δε φαίνονται να εμποδίζουν την αποικοδόμηση των διαφόρων RNAs, υποδηλώνοντας πως πολλές διαφορετικές ριβονουκλεάσες αναγνωρίζουν ίδια υποστρώματα. Αυτός ο πλεονασμός στην ύπαρξη των RNases υποδεικνύει πόσο σημαντικά και συντηρημένα είναι τα μονοπάτια αποικοδόμησης του RNA [61]. Υπολογίζεται ότι ένα μόνο κύτταρο εκφράζει 20 διαφορετικές ριβονουκλεάσες, οι οποίες δρουν κυρίως ενδοκυτταρικά, αλλά και εξωκυτταρικά. Τροποποιήσεις στην έκφραση των ριβονουκλεασών, και κατ' επέκταση στη διαδικασία της αποικοδόμησης των μορίων RNA, φαίνεται πως παίζουν σημαντικό ρόλο στην τροποποίηση της κυτταρικής λειτουργίας, που πολλές φορές συνεπάγεται την καρκινογένεση [62].

1.4.1 Δράσεις των Ριβονουκλεασών στους ευκαρυώτες

❖ Επεξεργασία RNA

Επεξεργασία rRNA και tRNA: Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το ριβοσωμικό DNA (rDNA) μεταγράφεται σ' ένα μεγάλο πρόδρομο μόριο RNA (το 45S pre-rRNA), το οποίο διασπάται πρώτα σε μια θέση γειτονική προς το 5.8S rRNA στην 5' πλευρά του, δίδοντας τις δύο ξεχωριστές πρόδρομες ενώσεις 18S και 28S+5.8S rRNAs, αντίστοιχα. Περαιτέρω διασπάσεις αποδίδουν τα τελικά προϊόντα. Όπως και τα rRNAs, τα tRNAs συντίθενται ως μεγαλύτερα πρόδρομα μόρια (pre-tRNAs). Η επεξεργασία του 5' άκρου των pre-tRNAs περιλαμβάνει τη διάσπαση από ένα ένζυμο που ονομάζεται RNase P, ενώ το 3' άκρο των tRNAs προκύπτει από τη δράση μίας συμβατικής ριβονουκλεάσης [63,64].

Επεξεργασία mRNA: Το mRNA που συντίθεται στον πυρήνα πρέπει πρώτα να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα προτού χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη σύνθεση πρωτεϊνών. Τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα υφίσταται αρκετές τροποποιήσεις. Το 5' άκρο των pre-mRNAs τροποποιείται σύντομα μετά την σύνθεσή του με την προσθήκη μιας δομής που ονομάζεται καλύπτρα 7-μεθυλογουανωσίνης. Αυτή η 5' καλύπτρα σχηματίζεται με την προσθήκη στο 5' άκρο του pre-mRNA ενός GTP σε αντίστροφο προσανατολισμό, σχηματίζοντας έναν δεσμό 5'-5'. Το πρόσθετο G μεθυλιώνεται στη θέση N-7. Το 3' άκρο των περισσότερων ευκαρυωτικών mRNAs δεν καθορίζεται από τον τερματισμό της μεταγραφής, αλλά με τη διάσπαση του πρωταρχικού μεταγράφου και την προσθήκη μιας πολυ-A ουράς μήκους ≈ 200 nt, με μια αντίδραση επεξεργασίας που ονομάζεται πολυαδενυλίωση. Η διαδικασία της πολυαδενυλίωσης περιλαμβάνει 2 στάδια. Αρχικά, το μετάγραφο κόβεται ανάμεσα στην συντηρημένη ακολουθία AAUAAA και σε μια εκφυλισμένη ακολουθία πλούσια σε U/GU. Στη συνέχεια, γίνεται η προσθήκη της πολυ-A ουράς από την πολυ-A πολυμεράση. Απαραίτητη είναι και η παρουσία της πρωτεΐνης CPSF. Βέβαια, η πιο εντυπωσιακή τροποποίηση των pre-mRNAs είναι η αφαίρεση των ιντρονίων. Οι κωδικές αλληλουχίες των περισσότερων ευκαρυωτικών γονιδίων διακόπτονται από μη κωδικές αλληλουχίες (εσώνια) που αποκόπτονται με ακρίβεια από το ώριμο mRNA, μέσω ματίσματος.

Επεξεργασία miRNA και siRNA: Τα συγκεκριμένα μόρια RNA έχουν μέγεθος 21-25 νουκλεοτιδία και παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταστολή της μετάφρασης και στην αποικοδόμηση του mRNA. Τα miRNA μεταγράφονται από ενδογενή γονίδια ως pri-miRNAs (περίπου 85 νουκλεοτιδία με δομή φουρκέτας). Αυτά γίνονται pre-miRNAs όταν τα διασπάσει το ένζυμο Drosha, τα οποία με τη σειρά τους θα μετατραπούν στη λειτουργική τους μορφή στο κυτταρόπλασμα, από την Dicer. Αντίστοιχα, τα siRNAs προέρχονται από δίκλινα μόρια RNAs, τα οποία υφίστανται επεξεργασία από το ένζυμο Dicer. Και οι δύο μορφές RNAs αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες (π.χ. AGO2) σχηματίζοντας το σύμπλοκο RISC, το οποίο παρουσιάζει

δράση ενδονουκλεάσης ή έξωνουκλεάσης. Έτσι, καθίσταται δυνατή η αποικοδόμηση, συμπληρωματικών με αυτά, μορίων mRNAs.

❖ Αποικοδόμηση RNA

Από τις κυριότερες λειτουργίες των ριβονουκλεασών είναι η αποικοδόμηση των RNAs. Τα παραπάνω μόρια μπορεί να είναι μη λειτουργικά ή να μη χρησιμεύουν πλέον στο κύτταρο, με αποτέλεσμα να οδηγούνται προς αποικοδόμηση. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχει μία πληθώρα ριβονουκλεασών, τόσο σε σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες όσο και αυτοτελώς.

Τα mRNAs πρέπει να διασπαστούν με ταχείς ρυθμούς για να υπάρχει ισορροπία μεταξύ των μεταγραφόμενων μορίων και αυτών που θα οδηγηθούν προς αποικοδόμηση. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα τα διαφορετικά mRNAs αποικοδομούνται με διαφορετικούς ρυθμούς, αναλόγως τις ανάγκες του κυττάρου. Η αποικοδόμηση των περισσότερων ευκαρυωτικών mRNAs αρχίζει με αποαδενυλίωση και διάσπαση των πολυ-A ουρών τους. Το μη προστατευόμενο 3' άκρο εκτείνεται μετέπειτα στη δράση ενός μεγάλου συμπλόκου έξωνουκλεασών, γνωστό ως εξώσωμα. Ένα διαφορετικό μονοπάτι, ξεκινάει με την αφαίρεση της 5' καλύπτρας, γεγονός που επιτρέπει την έξωνουκλεοτιδική διάσπαση από την XRN1 εξωριβονουκλεάση. Ένας άλλος αποτελεσματικός τρόπος καταστροφής του mRNA είναι μέσω ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης, όπου παράγονται δύο τμήματα που είναι εύαλωτα σε έξωνουκλεάσες. Διάφορες ενδονουκλεάσες που στοχεύουν το mRNA έχουν χαρακτηριστεί συμπεριλαμβανομένων των PMR1, IRE1 και του ενζύμου επεξεργασίας του ριβοσωμικού RNA (RNase MRP) το οποίο φαίνεται να επιτελεί επιπρόσθετο ρόλο αφού επιτίθεται και σε συγκεκριμένα μόρια mRNA. Οι χρόνοι ημίσειας ζωής των mRNA σε κύτταρα θηλαστικών κυμαίνονται από λιγότερο από 30 λεπτά έως περίπου 20 ώρες [63].

Οι ριβονουκλεάσες δρουν επιπλέον σε μόρια mRNAs τα οποία έχουν εντοπιστεί με ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις ή δε φέρουν κωδικόνια τερματισμού. Η δράση τους παρόλα αυτά δεν είναι ανεξέλεγκτη. Η καταστροφή κάθε μορίου mRNA καθορίζεται από τη σταθερότητά του, από ειδικές αλληλουχίες κατά μήκος του που επάγουν την αποικοδόμησή του σε συνεργασία με siRNAs, miRNAs και συγκεκριμένες ενδοριβονουκλεάσες (πχ. AGO2). Επιπρόσθετα, υπάρχουν αρκετοί αναστολείς των ριβονουκλεασών, οι οποίοι προσδένονται με μεγάλη συγγένεια και αναστέλλουν παροδικά τη δράση τους [64]. Λαμβάνοντας υπόψιν την έντονη δράση των RNases στην κυκλοφορία και αποικοδόμηση των mRNAs, διακρίνεται η σημασία τους στην καρκινογένεση. Η αποικοδόμηση ογκοκατασταλτικών mRNAs λόγω έντονης δράσης των ριβονουκλεασών ή η παρεμπόδιση της αποικοδόμησης ογκογόνων mRNAs, αποτελούν φαινόμενα που έχουν παρατηρηθεί σε αρκετές περιπτώσεις ογκογένεσης.

1.4.2 Κατηγορίες Ριβονουκλεασών

Εξωριβονουκλεάσες:

Η κατηγορία αυτή αποτελείται από ένζυμα με 3'→5' δραστηριότητα όπως οι ριβονουκλεάσες των RNase II και D οικογενειών. Εναλλακτικά, μερικές εξωνουκλεάσες, όπως η εξωριβονουκλεάση I και II, διαθέτουν δραστηριότητα 5'→3'. Άσχετα όμως με ποιά κατεύθυνση κόβουν το RNA στόχο, σαν ευρύτερη ομάδα εμπλέκονται στην επεξεργασία του RNA, την ωρίμανση των tRNAs και την αποικοδόμηση του RNA. Επιπρόσθετα, κάποιες εξωριβονουκλεάσες κατέχουν σημαντικό ρόλο στη μείωση, τον ομόλογο ανασυνδυασμό και την διατήρηση της ακεραιότητας των τελομερών [65].

Ενδοριβονουκλεάσες:

Οι ενδοριβονουκλεάσες είναι ένζυμα τα οποία διασπούν τα μόρια RNA εσωτερικά, απελευθερώνοντας θραύσματα RNA διαφόρων μεγεθών. Μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις τύπους: 1) σε αυτές που έχουν ειδικότητα σε μονόκλωνο RNA (ssRNA), 2) σε εκείνες που ειδικεύονται σε δίκλωνο RNA (dsRNA) και 3) σε αυτές που έχουν ειδικότητα ως προς άλλου είδους υποστρώματα. Εμπλέκονται κυρίως στις διαδικασίες αποικοδόμησης μορίων RNA και στην επεξεργασία τους. Όμως η δραστηριότητα των ενδοριβονουκλεασών που ειδικεύονται σε dsRNA απαιτείται και στο μονοπάτι της παρεμβολής RNA (RNA Interference/RNAi), το οποίο παίζει ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση και την κυτταρική ανοσία [64].

Exosome Multigene Ribonuclease Complex:

Αποτελεί ένα συντηρημένο ριβονουκλεολυτικό σύμπλοκο με πολλές υπομονάδες που συμμετέχει στην 3'→5' μεταμεταγραφική επεξεργασία και αποικοδόμηση του RNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Εννιά υπομονάδες (EXOSC1-9) σχηματίζουν ένα καταλυτικά αδρανές πυρήνα τύπου βαρελιού ο οποίος λειτουργεί ως ικρίωμα για δύο ριβονουκλεολυτικές υπομονάδες, την διανεμητική εξωριβονουκλεάση (distributive exoribonuclease) EXOSC10/RRP6 που είναι κυρίως πυρηνική και την επεξεργαστική τύπου RNase R/II ριβονουκλεάση DIS3 που είναι κυρίως πυρηνική ή την DIS3L που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα.

SAM domain and HD domain containing protein:

Είναι μια περιοριστική τριφωσφορυλυδρολάση και dNTPάση που περιέχει ένα αμινοτελικό STERILE ALPHA μοτίβο (SAM DOMAIN) και κεντρικά, μια συντηρημένη ασπαρτική και ιστιδινική περιοχή (HD DOMAIN). Λειτουργεί επίσης ως ριβονουκλεάση μπλοκάροντας εγκαίρως την αναπαραγωγή των ρετροϊών όπως ο HIV-1.

Πίνακας 1.4-1: Παραδείγματα Ενδοριβονουκλεασών

ΕΝΔΟΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ
RNase A	Κόβει στο 3' άκρο κατάλοιπα U ή C
RNase H	Κόβει το RNA στα συμπλέγματα RNA/DNA προς παραγωγή ssDNA
RNase L	Είναι μια επαγόμενη από ιντερφερόνες νουκλεάση που ενεργοποιημένη καταστρέφει όλο το RNA του κυττάρου
RNase III	Κόβει το pre-miRNA (60-70bp) μετατρέποντάς το σε miRNA (20-30bp)
RNase P	Είναι ένα ριβόζυμο που κόβει μια αλληλουχία οδηγό από το 5' άκρο ενός μονόκλωνου pre-tRNA
RNase T1	Δρά πάνω σε μονόκλινα RNA (ssRNA) κόβοντας στο 3' άκρο κατάλοιπα G

Πίνακας 1.4-2: Παραδείγματα Εξωριβονουκλεασών

ΕΞΩΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ
Ολιγοριβονουκλεάση	Αποικοδομεί μικρά ολιγονουκλεοτίδια σε μονονουκλεοτίδια
RNase D	Συμμετέχει στην 3' → 5' επεξεργασία των pre-tRNAs
RNase T	Συμβάλλει στην 3' → 5' ωρίμανση πολλών σταθερών RNAs
PNPase	Πέρα από τη δράση της ως εξωνουκλεάση, δρά και ως νουκλεοτιδυλτρασφεράση
RNase PH	Πέρα από τη δράση της ως εξωνουκλεάση, δρά και ως νουκλεοτιδυλτρασφεράση

1.4.3 Η οικογένεια της Ριβονουκλεάσης κ

Η οικογένεια της ριβονουκλεάσης κ (ή RNase κ) περιέχει πρωτεΐνες μεγέθους συνήθως μεταξύ 95-101 αμινοξέων, οι οποίες δεν παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με άλλες ριβονουκλεάσες. Ιδρυτικό μέλος της οικογένειας αυτής θεωρείται η Cc RNase, η οποία εντοπίστηκε πρώτη φορά στο έντομο *Ceratitidis capitata*, το 1987, στο εργαστήριό μας. Η ριβονουκλεάση αυτή απομονώθηκε από νεαρές προνύμφες του εντόμου (6 ημερών) και αποικοδομεί εκλεκτικά poly(U) και poly(C) ουρές, χωρίς να παρουσιάζει αντίστοιχη δράση σε άλλα πολυνουκλεοτιδικά υποστρώματα. Μέσω ηλεκτροφόρησης SDS/πολυακρυλαμιδίου και σύγκρισης με γνωστές πρωτεΐνες βρέθηκε ότι η σχετική μοριακή μάζα της είναι περίπου 25000 (95 αμινοξέα) και οι βέλτιστες συνθήκες pH για τη δράση της είναι μεταξύ 7-9. Επιπλέον, η ενζυμική δραστηριότητά της φαίνεται να εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις ιόντων K^+ και Mg^{2+} , με τέτοιο τρόπο που σε συγκεντρώσεις ιόντων καλίου 30-50nM το ένζυμο παρουσιάζει βέλτιστη δραστηριότητα. Επηρεάζεται, ακόμα, από μεταβολές στη θερμοκρασία, με το ένζυμο να απενεργοποιείται μέσα σε λίγα λεπτά στους 65°C ενώ στους 37°C να διατηρεί τη δράση του [66].

Αντιπροσωπεύεται από ένα ορθόλογο γονίδιο σε πολλούς οργανισμούς, και στο έντομο *Ceratitidis capitata* δίνει δύο μετάγραφα ένα 0,9 και ένα 1,5 kb, με διαφορετικά μήκη στην 3' UTR, που προκύπτουν από διαφορετικά σήματα πολυαδενυλίωσής της. Τα ορθόλογα γονίδια αποτελούνται από τρία εξώνια και δύο εσώνια, που έχουν αρκετά συντηρημένες τις θέσεις τους, έτσι και στο έντομο *Ceratitidis capitata* και στα περισσότερα γονιδιώματα που μελετήθηκαν [67]. Από ανάλυση που έγινε με βάση αλληλουχίες EST, αποδείχτηκε ότι η Cc RNase έχει έντονη ομολογία με άλλες μη χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες, που έχουν απομονωθεί από 20 διαφορετικά ζωικά είδη. Αυτή η ευρεία κατανομή της Cc RNase στο ζωικό βασίλειο συνεπάγεται με ισχυρή επιλογή του ενζύμου κατά την εξέλιξη, υποδηλώνοντας ότι εκτελεί μια πολύ βασική βιολογική λειτουργία. Αντιπρόσωποί της υπάρχουν τόσο στα μετάζωα όσο και στα θηλαστικά, ενώ ένας μεγάλος αριθμός ανθρώπινων ESTs που προέρχονται από ενήλικους ή εμβρυικούς και καρκινικούς ιστούς, κωδικοποιούν για τον αντίστοιχο αντιπρόσωπο της οικογένειας αυτής στον άνθρωπο. Κατά συνέπεια, η ευρεία έκφραση της ριβονουκλεάσης αυτής μπορεί να της αποδώσει την ιδιότητα γονιδίου αναφοράς (housekeeping gene) [67,68].

1.4.4 Η ανθρώπινη Ριβονουκλεάση κ (RNase κ)

Η μελέτη της ανθρώπινης RNase κ στο εργαστήριό μας ξεκίνησε το 2007, όπου πραγματοποιήθηκε μοριακή κλωνοποίηση και χαρακτηρισμός του γονιδίου της (Economidou, Sideris, Fragoulis). Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης έδειξαν ότι το ορθόλογο γονίδιο της ριβονουκλεάσης αυτής εδράζεται στο χρωμόσωμα 17, με ακριβή θέση την 17p13.1, που αντιστοιχεί στο γενετικό τόπο LOC440400. Όσον αφορά στην γενωμική οργάνωση του γονιδίου της ανθρώπινης RNase κ, το γονίδιο αντιπροσωπεύεται από ένα μόνο αντίγραφο στο ανθρώπινο γονιδίωμα και το μοτίβο οργάνωσής του προσομοιάζει σε ένα συντηρημένο πρότυπο βάσει του οποίου οργανώνεται το γονίδιο σε όλα τα γνωστά μέλη της συγκεκριμένης οικογένειας. Σύγκριση της αλληλουχίας του γενωμικού DNA και του cDNA, αποκάλυψε ότι, όπως τα περισσότερα ορθόλογα γονίδια, έτσι και το γονίδιο της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ αποτελείται από 3 εξώνια και 2 εσώνια. Το πρώτο εσώνιο έχει μήκος 904bp ενώ το δεύτερο, 402bp. Όσον αφορά στο πρώτο εξώνιο, αποτελείται από 118bp, εκ των οποίων 40bp αντιπροσωπεύουν ένα κομμάτι της 5' αμετάφραστης περιοχής και το υπόλοιπο μέρος κωδικοποιεί τα πρώτα 26 αμινοξέα της πρωτεΐνης. Το δεύτερο εξώνιο αποτελείται από 77bp, οι οποίες κωδικοποιούν τα επόμενα 26 αμινοξέα της ανθρώπινης πρωτεΐνης. Τέλος, το τρίτο εξώνιο απαρτίζεται από 387bp, από τα οποία 139bp κωδικοποιούν τα τελευταία 46 αμινοξέα, ενώ τα υπόλοιπα 245 νουκλεοτίδια ανήκουν στην 3' αμετάφραστη περιοχή.

Συγκρίνοντας, λοιπόν, την ανθρώπινη RNase κ με την προηγουμένως χαρακτηρισμένη Cc RNase της ίδιας οικογένειας, εμφανίζεται μια σειρά από σημαντικές ομοιότητες. Η ανθρώπινη πρωτεΐνη είναι κατά τρία αμινοξέα μεγαλύτερη (98 αμινοξέα) και εμφανίζει 40% ομοιότητα σε επίπεδο αμινοξέων με την Cc RNase. Η ανάλυση κατά Northern οδήγησε στην ανίχνευση του κύριου mRNA της ανθρώπινης RNase κ που εμφανίζει μήκος 700 νουκλεοτιδίων, σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν. Δύο μεγαλύτερα μετάγραφα των 3,1 και 5 kb βρέθηκαν μόνο στον εγκέφαλο, τον πλακούντα και το πάγκρεας, ενώ ένα τρίτο, με μήκος 1,6 kb, εκφράζεται σε Β κύτταρα [69].

Η RNase κ παρουσιάζει δράση ενδοριβονουκλεάσης διασπώντας ειδικά μονόκλωνες αλυσίδες σε θέσεις με ApU και ApG φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, ενώ υδρολύει σε χαμηλότερο βαθμό UpU δεσμούς. Είναι θερμοευαίσθητο ένζυμο, αναστέλλεται από δισθενή κατιόντα, όπως το Zn^{2+} , και λειτουργεί στο ίδιο εύρος pH με τη Cc RNase. Η καταλυτική ενεργότητά της οφείλεται σε μερικά κατάλοιπα κυστεϊνών, τα οποία φαίνεται να είναι συντηρημένα μεταξύ των μελών της οικογένειας RNase κ, σε πολλούς οργανισμούς. Τα Cys6, Cys14 και Cys69 κατάλοιπα είναι απόλυτα συντηρημένα σε όλα τα είδη που εξετάστηκαν, ενώ τα Cys7 και Cys85 είναι συντηρημένα μεταξύ των σπονδυλωτών, αμφιβίων, πτηνών και θηλαστικών. Αυτή η συντηρητικότητα υποδεικνύει τη μεγάλη σημασία των καταλοίπων κυστεΐνης, καθώς μεταξύ των Cys6 και Cys69 σχηματίζεται ένας δισουλφιδικός δεσμός ο οποίος

επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα και κατά πάσα πιθανότητα μετέχει στη σωστή διαμόρφωση του μορίου [69,70].

Η ριβονουκλεάση κ, φαίνεται να εμπλέκεται και σε άλλες διεργασίες, που δεν απαιτούν δράση ριβονουκλεάσης. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως συμμετέχει στην μεσολαβούμενη από κλαθρίνη ενδοκύττωση πολλών ιών στο κύτταρο-ξενιστή. Τέτοιοι ιοί είναι του δάγκειου πυρετού, του Δυτικού Νείλου, των ιών της γρίπης, κ. ά.. Δεν φαίνεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην προσκόλληση των ιών στο κύτταρο, αλλά καθορίζει πιο πολύ τα αρχικά στάδια της ενσωμάτωσής τους. Επιπλέον, υποστηρίζεται πως επηρεάζει άμεσα την αντλία V-ATPase, έχοντας σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της, ενώ απώλεια της ριβονουκλεάσης κ παρεμποδίζει τα πρώιμα στάδια ενδοκύττωσης και πολλαπλασιασμού πολλών ιών [71,72].

1.4.5 Εναλλακτικό Μάτισμα

Η Διαδικασία του ματίσματος

Τα περισσότερα γονίδια στους ανώτερους ευκαρυώτες αποτελούνται από εξόνια και ιντρόνια. Το μάτισμα (splicing) αποτελεί το στάδιο επεξεργασίας του πρωτογενούς μεταγράφου ενός γονιδίου, του λεγόμενου πρόδρομου mRNA (pre-mRNA), με απομάκρυνση των ιντρονίων και συνένωση των εξονίων μεταξύ τους, ώστε να προκύψει ένα λειτουργικά ώριμο mRNA έτοιμο για μετάφραση. Οι αλληλουχίες βάσεων των χιλιάδων συνδέσμων ιντρονίων-εξονίων στα μεταγραφήματα RNA είναι γνωστές. Έτσι, στα ευκαρυωτικά, από τους ζυμομύκητες έως τα θηλαστικά, γνωρίζουμε ότι οι αλληλουχίες αυτές έχουν ένα κοινό δομικό πρότυπο: η αλληλουχία βάσεων ενός ιντρονίου αρχίζει με GU και τελειώνει με AG. Η ομόφωνη αλληλουχία στο 5' άκρο του ιντρονίου σε σπονδυλωτά είναι AGGUAAGU. Στο 3' άκρο ενός ιντρονίου η ομόφωνη αλληλουχία είναι ένα τμήμα 10 πυριμιδινών (U ή C), ακολουθούμενο από οποιαδήποτε βάση και μετά από μια C, η οποία τελειώνει με την αμετάβλητη αλληλουχία AG. Τα ιντρόνια έχουν επίσης μια σημαντική εσωτερική θέση που τοποθετείται μεταξύ 20 και 50 νουκλεοτιδίων ανοδικά της θέσης ματίσματος 3'. Το σημείο αυτό ονομάζεται θέση διακλάδωσης. Στους ζυμομύκητες, η θέση διακλάδωσης σχεδόν πάντοτε είναι η UACUAAC, ενώ στα θηλαστικά απαντά με μια ποικιλία αλληλουχιών. Τμήματα των ιντρονίων, διαφορετικά από τις θέσεις ματίσματος 5' και 3' καθώς και τη θέση διακλάδωσης, είναι λιγότερο σημαντικά για τον καθορισμό του σημείου όπου θα γίνει το μάτισμα. Το μήκος των ιντρονίων ποικίλει από 50 μέχρι 10.000 νουκλεοτίδια. Το μεγαλύτερο μέρος ενός ιντρονίου μπορεί να απαλειφθεί χωρίς να αλλάζει η θέση ή η αποτελεσματικότητα του ματίσματος. Παρομοίως, το μάτισμα δεν επηρεάζεται από την εισαγωγή μεγάλων τμημάτων DNA στα ιντρόνια γονιδίων. Επιπλέον, χιμαιρικά ιντρόνια που

κατασκευάστηκαν με μεθόδους ανασυνδυασμένου DNA από το 5' άκρο ενός ιντρονίου και το 3' άκρο ενός τελείως διαφορετικού ιντρονίου ματίζονται κανονικά, εφόσον δεν έχουν αλλαχθεί οι θέσεις ματίσματος και διακλάδωσης. Αντίθετα, μεταλλάξεις σε οποιαδήποτε από αυτές τις τρεις κρίσιμες περιοχές οδηγούν σε έκτροπο μάτισμα. Η αναγνώριση μιας θέσης ματίσματος εξαρτάται κυρίως από δύο παράγοντες: 1) την ισχύ της συναινετικής (consensus) αλληλουχίας που αντιστοιχεί στην περιοχή γύρω από την υποψήφια θέση ματίσματος (ισχύς ματίσματος) και 2) τις αλληλεπιδράσεις συγκεκριμένων αλληλουχιών του πρώιμου RNA με πληθώρα ρυθμιστικών παραγόντων όπως οι SR (serine arginine) πρωτεΐνες, οι ετερογενείς οικογένειες πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (hnRNP) και οι παράγοντες snRNA που ρυθμίζουν την επιλογή των εξωνίων και αναπτύσσονται παρακάτω.

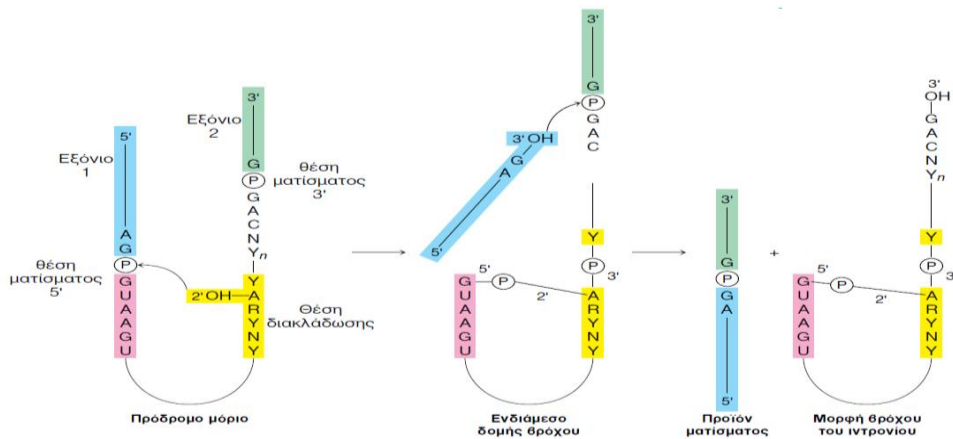
Για τη σημαντική αυτή διεργασία, όπως αναφέρθηκε, χρειάζεται η συνεργασία αρκετών μικρών μορίων RNA και πρωτεϊνών που σχηματίζουν ένα μεγάλο σύμπλοκο, το οποίο ονομάζεται σωματίο ματίσματος. Το μάτισμα αρχίζει με τη διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του ανοδικού εξωνίου (εξώνιο 1) και του 5' άκρου του ιντρονίου. Η προσβάλλουσα ομάδα στην αντίδραση αυτή είναι η 2'-υδροξυλική ομάδα ενός αδενολικού καταλοίπου στη θέση διακλάδωσης. Ένας 2', 5'-φωσφοδιεστερικός δεσμός σχηματίζεται μεταξύ αυτού του καταλοίπου A και της φωσφορικής ομάδας του 5' άκρου του ιντρονίου. Αυτή η αντίδραση ονομάζεται τρανσεστεροποίηση. Επισημαίνεται ότι το συγκεκριμένο αδενολικό κατάλοιπο συνδέεται επίσης με άλλα δύο νουκλεοτίδια διαμέσου κανονικών 3', 5'-φωσφοδιεστερικών δεσμών. Επομένως, μια διακλάδωση δημιουργείται στη θέση αυτή και σχηματίζεται μια ενδιάμεση δομή βρόχου. Στη συνέχεια, το 3'-OH άκρο του εξωνίου 1 προσβάλλει τον φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ του ιντρονίου και του εξωνίου 2. Τα εξώνια 1 και 2 συνδέονται και το ιντρόνιο ελευθερώνεται με τη μορφή βρόχου. Και στην περίπτωση αυτή επιτελείται μια αντίδραση τρανσεστεροποίησης. Επομένως, το μάτισμα επιτυγχάνεται με δύο αντιδράσεις τρανσεστεροποίησης και όχι με υδρόλυση ακολουθούμενη από ανασύνδεση. Η πρώτη αντίδραση δημιουργεί μια ελεύθερη 3'-υδροξυλική ομάδα στο 3'-άκρο του εξωνίου 1, και η δεύτερη αντίδραση συνδέει την ομάδα αυτή με την 5'-φωσφορική ομάδα του εξωνίου 2. Ο αριθμός των φωσφοδιεστερικών δεσμών παραμένει ο ίδιος κατά τη διάρκεια αυτών των βημάτων, γεγονός εξαιρετικά κρίσιμο διότι επιτρέπει στην αντίδραση ματίσματος να προχωρά χωρίς πηγή ενέργειας όπως η ATP και η GTP.

Ο πυρήνας περιέχει πολλά είδη μικρών μορίων RNA με λιγότερα από 300 νουκλεοτίδια, τα οποία αναφέρονται ως μικρά πυρηνικά μόρια RNA (small nuclear RNA, snRNA). Μερικά από αυτά, τα οποία συμβολίζονται ως U1, U2, U4, U5 και U6, είναι ουσιώδη για το μάτισμα των pre-mRNAs. Οι δευτεροταγείς δομές αυτών των μορίων RNA είναι εξαιρετικά συντηρημένες σε οργανισμούς που εκτείνονται από τους ζυμομύκητες μέχρι τον άνθρωπο. Αυτά τα μόρια RNA συνδέονται με ειδικές πρωτεΐνες σχηματίζοντας σύμπλοκα που ονομάζονται μικρά πυρηνικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια (small nuclear ribonucleoprotein particles, snRNP), που συχνά αναφέρονται ως «σναρπς» (snurps). Τα σωματίδια ματίσματος είναι μεγάλα

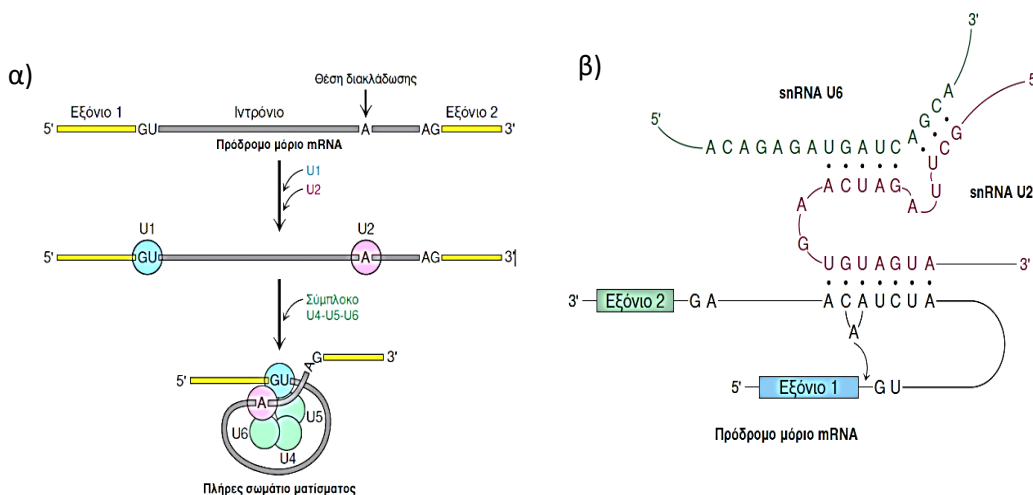
(60S) δυναμικά συγκροτήματα αποτελούμενα από μόρια snRNPs, άλλες πρωτεΐνες που ονομάζονται παράγοντες ματίσματος και το πρόδρομο μόριο mRNA που υφίσταται την επεξεργασία. Στα κύτταρα των θηλαστικών, το μάτισμα αρχίζει με την αναγνώριση της θέσης ματίσματος 5' από το snRNP U1. Το snRNP U1 περιέχει μια εξαιρετικά συντηρημένη αλληλουχία έξι νουκλεοτιδίων που σχηματίζουν ζεύγη βάσεων με τη θέση ματίσματος 5' του pre-mRNA. Αυτή η δέσμευση αρχίζει τη συναρμολόγηση στο μόριο του pre-mRNA. Στη συνέχεια, το snRNP U2 δεσμεύεται στη θέση διακλάδωσης στο ιντρόνιο διά μέσου ζευγών βάσεων μεταξύ της εξαιρετικά συντηρημένης αλληλουχίας του snRNP U2 και του pre-mRNA. Η δέσμευση του snRNP U2 χρειάζεται υδρόλυση ATP. Ένα προσυναρμολογημένο σύμπλοκο U4-U5-U6 συνδέεται με αυτό το σύμπλοκο U1, U2 και του πρόδρομου μορίου mRNA για να σχηματιστεί το πλήρες σωματίο ματίσματος. Αυτή η σύνδεση επίσης χρειάζεται υδρόλυση ATP. Χρονικά τα γεγονότα διαδραματίζονται ως εξής: πρώτα, το U5 αλληλεπιδρά με αλληλουχίες του εξωνίου στη θέση ματίσματος 5' και μετά με το εξώνιο 3'. Στη συνέχεια, το U6 αποσυνδέεται από το U4 και υφίσταται μια ενδομοριακή αναδιάταξη η οποία επιτρέπει το ζευγάρωμα των βάσεων με το U2 και εκτοπίζει το U1 από το σωματίο ματίσματος αλληλεπιδρώντας με το 5' άκρο του ιντρονίου. Η έλικα U2-U6 είναι απολύτως αναγκαία για το μάτισμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα μόρια snRNA U2 και U6 πιθανώς σχηματίζουν το ενεργό κέντρο του σωματίου ματίσματος. Το U4 χρησιμεύει ως αναστολέας ο οποίος επισκιάζει το U6 μέχρις ότου οι ειδικές θέσεις ματίσματος ευθυγραμμιστούν. Αυτές οι ανακατατάξεις έχουν ως αποτέλεσμα την πρώτη αντίδραση τρανσεστεροποίησης, δημιουργώντας το ενδιάμεσο δομής βρόχου και το διαχωρισμένο εξώνιο 5'. Περαιτέρω ανακατατάξεις του RNA στο σωματίο ματίσματος διευκολύνουν τη δεύτερη τρανσεστεροποίηση. Οι ανακατατάξεις αυτές ευθυγραμμίζουν το ελεύθερο εξώνιο 5' με το εξώνιο 3' ούτως ώστε η 3'-υδροξυλική ομάδα του εξωνίου 5' τοποθετείται κατάλληλα για να μπορεί να προσβάλλει πυρηνοφιλικά τη θέση ματίσματος 3' και να δημιουργήσει το ματισμένο προϊόν. Τα U2, U5 και U6 που είναι δεσμευμένα στο εκτεμνόμενο ιντρόνιο δομής βρόχου ελευθερώνονται συμπληρώνοντας την αντίδραση ματίσματος. Πολλά από τα βήματα στη διεργασία του ματίσματος χρειάζονται υδρόλυση ATP. Για να επιτευχθούν οι καλοδιαταγμένες ανακατατάξεις που είναι αναγκαίες για το μάτισμα, RNA-ελικάσες που ωθούνται από την υδρόλυση ATP πρέπει να ξετυλίξουν τις έλικες του RNA και να επιτρέψουν τον σχηματισμό εναλλακτικών ζευγών βάσεων. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η σταθερότητα της αλληλεπίδρασης μεταξύ του U1 snRNA και της θέσης ματίσματος διασφαλίζεται από εξωγενείς παράγοντες που περιλαμβάνουν:

- Μέλη της οικογένειας των SR πρωτεϊνών και πιο συγκεκριμένα μέσω της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης ASF/SF2 (γενικός παράγοντας ματίσματος της οικογένειας των πρωτεϊνών SR) με το U1 snRNP. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής συνδέουν επίσης τον παράγοντα U2AF με τον U1 snRNP.
- Μια ομάδα από συντηρημένες πρωτεΐνες δέσμευσης του RNA που χαρακτηρίζεται από ένα τουλάχιστον μοτίβο αναγνώρισης RNA μορίων (RNA recognition motif, RRM) και μια περιοχή RS πλούσια σε σερίνη και

αργινίνη που συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών. Τα μόρια snRNA μπορούν να δρουν καταλυτικά στο μάτισμα και σε άλλες αντιδράσεις κατά την επεξεργασία του RNA [73].



Εικόνα 1.4.1: Η δημιουργία της δομής βρόχου κατά το μάτισμα



Εικόνα 1.4.2: α) η συναρμολόγηση του συμπλόκου των snRPs, β) η διαδικασία σύνδεσης των εξωνίων

Εναλλακτική Συρραφή (Alternative Splicing)

Τα περισσότερα pre-mRNAs περιέχουν πολλαπλά εσώνια, συνεπώς πολλά διαφορετικά mRNAs μπορούν να παραχθούν από το ίδιο γονίδιο με διαφορετικούς συνδυασμούς των θέσεων συρραφής 5' και 3'. Η δυνατότητα σύνδεσης εξωνίων σε ποικίλους συνδυασμούς παρέχει ένα νέο τρόπο ελέγχου της έκφρασης των γονιδίων, δημιουργώντας πολλά διαφορετικά mRNAs και κατ' επέκταση ποικιλία πρωτεϊνών, από το ίδιο pre-mRNA. Αυτή η διαδικασία, που ονομάζεται εναλλακτική συρραφή και λαμβάνει χώρα συχνά στα γονίδια των σύνθετων ευκαρυωτικών οργανισμών,

παρέχει ένα σημαντικό μηχανισμό για εξειδικευμένη και ισορροπημένη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων.

Εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να προκύψει από διαφορετικά πρότυπα επεξεργασίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις, το τελικό πρότυπο έκφρασης καθορίζεται από το πρωτογενές μετάγραφο, επειδή η χρήση διαφορετικών σημείων έναρξης της μεταγραφής ή η δημιουργία εναλλακτικών 3' άκρων αλλάζει το πρότυπο του ματίσματος. Σε άλλες περιπτώσεις, ένα πρωτογενές μετάγραφο υπόκειται σε μάτισμα με τρόπους όπου τα εσωτερικά εξώνια υποκαθίστανται, προστίθενται ή αποκόπτονται. Το αποτέλεσμα, σε όλες τις περιπτώσεις, είναι η δημιουργία, από ένα και μόνο αρχικό μετάγραφο, πολλαπλών μεταγράφων και κατ' επέκταση διαφορετικών ισομορφών πρωτεϊνών. Τα πολλαπλά προϊόντα μπορούν να παράγονται στο ίδιο κύτταρο ή η διαδικασία να ρυθμίζεται έτσι ώστε συγκεκριμένα πρότυπα ματίσματος να λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικούς κυτταρικούς ιστούς ή κάτω από συγκεκριμένες κυτταρικές συνθήκες [74].

Ο έλεγχος του εναλλακτικού ματίσματος επιτυγχάνεται από τον παράγοντα ASF (Alternative Splicing Factor - παράγοντας εναλλακτικού ματίσματος). Ο παράγοντας αυτός αποτελεί μια πρωτεΐνη που προσδένεται στο RNA. Όταν ένα πρόδρομο mRNA διαθέτει περισσότερες από μία 5' θέσεις ματίσματος, οι οποίες προηγούνται μιας μοναδικής θέσης 3' θέσης ματίσματος, η υψηλή συγκέντρωση του ASF προωθεί την χρήση της 5' θέσης που είναι πιο κοντά στην 3' θέση, σε βάρος των υπολοίπων θέσεων [75]. Ανάλογα με την δομική τους σύσταση τα εναλλακτικά γεγονότα ματίσματος ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κύριες κατηγορίες :

I. Παράλειψη εξωνίων (cassette exon): Αφορά σε γεγονότα όπου ένα εξώνιο που περιέχεται σε μία ισομορφή απουσιάζει εξολοκλήρου από μια άλλη. Όταν το εξώνιο κασέτας περιέχεται στο ιδιοσύστατο μετάγραφο και απουσιάζει από το εναλλακτικό ονομάζεται αποκλειόμενο (skipped), ενώ όταν απουσιάζει από το ιδιοσύστατο και περιέχεται στο εναλλακτικό ονομάζεται κρυφό (cryptic).

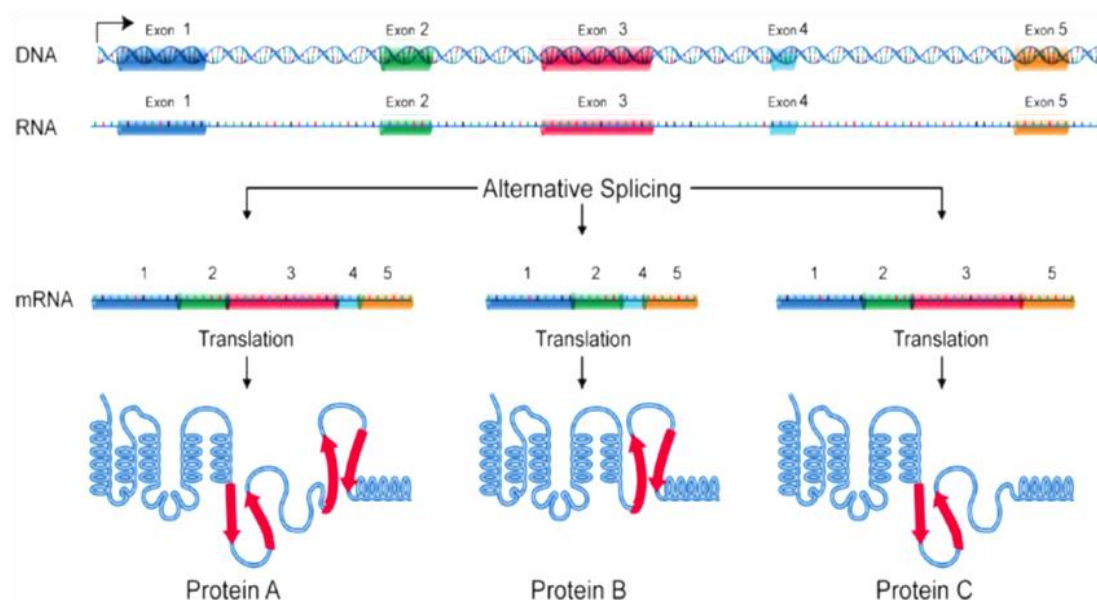
II. Διατήρηση ιντρονίου: Τα γεγονότα αυτά παρατηρούνται όταν μεταξύ ενός ζεύγους ισομορφών ένα ιντρόνιο της μιας ισομορφής περιέχεται εξολοκλήρου σε ένα εξώνιο της άλλης ισομορφής.

III. Εναλλακτικά 5' σημεία ματίσματος: Στις εναλλακτικές ισομορφές, τα όρια των εξωνίων στην 5' περιοχή διαφοροποιούνται σε σχέση με το ιδιοσύστατο.

IV. Εναλλακτικά 3' σημεία ματίσματος: Στις εναλλακτικές ισομορφές, διαφοροποιούνται τα όρια των εξωνίων στην 3' περιοχή σε σχέση με το ιδιοσύστατο.

Πέρα από αυτές τις βασικές κατηγορίες, το εναλλακτικό μάτισμα διαθέτει και άλλους μηχανισμούς από τους οποίους προκύπτουν εναλλακτικές ισομορφές μεταγράφων, όπως τα αμοιβαία αποκλειόμενα εξώνια, όπου η εναλλακτική ισομορφή περιέχει ένα αποκλειόμενο εξώνιο που συνοδεύεται από ένα κρυφό εξώνιο καθώς και εναλλακτικές περιοχές προαγωγέων/πολυαδενυλίωσης, με τις διαφοροποιήσεις στις

θέσεις του προαγωγέα ή της πολυαδενυλίωσης να οδηγούν σε εναλλακτικά αρχικά και τερματικά εξόνια αντίστοιχα [76]. Τέλος, τα γεγονότα εναλλακτικού ματίσματος διακρίνονται σε απλά και σύνθετα, ανάλογα με το αν οι εναλλακτικές ισομορφές περιέχουν έναν ή περισσότερους τύπους εναλλακτικού ματίσματος



Εικόνα 1.4.3: Διαφορετικές ισομορφές πρωτεΐνης που προκύπτουν από γεγονότα εναλλακτικού ματίσματος σε ένα pre-mRNA

1.4.6 Τα εναλλακτικά μετάγραφα της RNase κ

Σε πρόσφατα πειράματα (2014) που έλαβαν χώρα, στο εργαστήριό μας, από τους Karousis και Sideris, βρέθηκε μια ακόμα ισομορφή της ριβονουκλεάσης κ, η οποία προκύπτει από ένα καινούργιο μετάγραφο mRNA, λόγω εναλλακτικού ματίσματος. Μέχρι στιγμής, το γνωστό μετάγραφο, το οποίο μελετήθηκε με τη μορφή cDNA, είναι μήκους 466bp και οδηγεί στην παραγωγή μιας πρωτεΐνης 98 αμινοξέων (RNaseκ01) με ενδοριβονουκλεολυτική δράση. Το νέο μετάγραφο, προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα στο σημείο σύνδεσης του εξωνίου 1 και 2, με αποτέλεσμα να απουσιάζει μια αλληλουχία GTTG. Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 134 αμινοξέων (RNaseκ02), μοριακού βάρους 14.900 Da και έχει κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης ανοδικά με το αντίστοιχο της κ01. Οι δυο αμινοξικές αλληλουχίες δεν παρουσιάζουν καμία ομοιότητα στο αμινοτελικό τους άκρο, όμως η περιοχή 63-134aa της κ02 είναι απόλυτα ταυτόσημη με τη περιοχή 27-98aa περιοχή της κ01. Και οι δύο ισομορφές εκφράζονται, σε διαφορετικές αναλογίες, σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, η ισομορφή κ02 όμως φαίνεται να είναι αρκετά πιο υδρόφοβη. Αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι εντοπίζεται κυτταροπλασματικά, σε μεμβρανικές δομές όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο, οδηγεί στο συμπέρασμα πως

πιθανώς συμμετέχει στο σχηματισμό μακρομοριακών συγκροτημάτων [77]. Επιπρόσθετα, άλλα γεγονότα εναλλακτικού ματίσματος οδήγησαν στην παραγωγή ενός μη κωδικού mRNA (miscellaneous RNA) το οποίο διαθέτει ένα πρόσθετο εξώνιο που εντοπίζεται μεταξύ των δύο πρώτων εξωνίων των RNaseκ01 και RNaseκ02.

Στη μελέτη των Adamopoulos et al. περιγράφηκε η ταυτοποίηση 8 νέων μεταγράφων της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ μέσα από τη μέθοδο 3' Nested RACE, μεθόδους αλληλούχησης υψηλής απόδοσης (NGS), αλλά και από ανάλυση της έκφρασής τους σε ένα μεγάλο εύρος ανθρώπινων κυτταρικών σειρών προερχόμενων από καρκινικούς και υγιείς ιστούς. Η ανάλυση των δεδομένων της αλληλούχησης NGS αποκάλυψε την ύπαρξη των παρακάτω εναλλακτικών μεταγράφων [78]:

- I. Εναλλακτικό Μετάγραφο 4:** Το εναλλακτικό μετάγραφο 4 είναι σχεδόν πανομοιότυπο με το μη κωδικό μετάγραφο που προαναφέρθηκε. Τα δύο μεταγράφα διαφέρουν μόνο σε τέσσερα νουκλεοτίδια, καθώς το μετάγραφο 4 υπολείπεται της αλληλουχίας GTTG που αντιστοιχεί στα τελευταία τέσσερα νουκλεοτίδια του πρώτου εξωνίου. Αυτή η συγκεκριμένη μεταβολή στην αλληλουχία του mRNA θα μπορούσε να έχει συνέπειες ζωτικής σημασίας αν λάβουμε υπόψη ότι το μετάγραφο 4, σε αντίθεση με το μη κωδικό, περιέχει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF (Open Reading Frame) και κατ' επέκταση προβλέπεται πως κωδικοποιεί μια ισομορφή της RNase κ που αποτελείται από 208aa.
- II. Εναλλακτικά Μετάγραφα 6 και 17:** Τα συγκεκριμένα εναλλακτικά μεταγράφα χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός κολοβού (truncated) εξωνίου 2. Το σχολιασμένο μη κωδικό μετάγραφο περιλαμβάνει, επίσης, αυτό το εξώνιο και σε αυτή την περίπτωση το εξώνιο 2 αποτελείται από 217 νουκλεοτίδια. Απ' την ανάλυση που έγινε στα δύο νέα αυτά μεταγράφα φάνηκε πως το εξώνιο 2 υστερεί σε μήκος κατά 19 νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του, με αποτέλεσμα να έχει μήκος 198 νουκλεοτιδίων. Η μόνη διαφορά μεταξύ των μεταγράφων 6 και 17 φαίνεται να εντοπίζεται στην αλληλουχία GTTG, η οποία λείπει από το μετάγραφο 6 ενώ υπάρχει στο μετάγραφο 17. Τα δυο νέα μεταγράφα περιέχουν ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης (Premature Termination Codon/PTC) και κατά συνέπεια είναι μόρια υπογήφια για NMD (Nonsense- Mediated Mrna Decay).
- III. Εναλλακτικό Μετάγραφο 7:** Είναι ένα σπάνιο μετάγραφο το οποίο περιέχει μια προέκταση μήκους 16 νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο του εξωνίου 1 που εντοπίζεται αμέσως μετά την αλληλουχία GTTG. Το εκτεταμένο εξώνιο 1 ματίζεται στο εξώνιο 3 δημιουργώντας το μετάγραφο 7. Πέρα από αυτή την προέκταση, το μετάγραφο 7 είναι πανομοιότυπο με το κλασικό μετάγραφο της RNase κ. Επιπρόσθετα, φαίνεται να περιέχει ένα ORF και ως αποτέλεσμα

προβλέπεται πως κωδικοποιεί μια νέα ισομορφή της RNase κ που αποτελείται από 85aa.

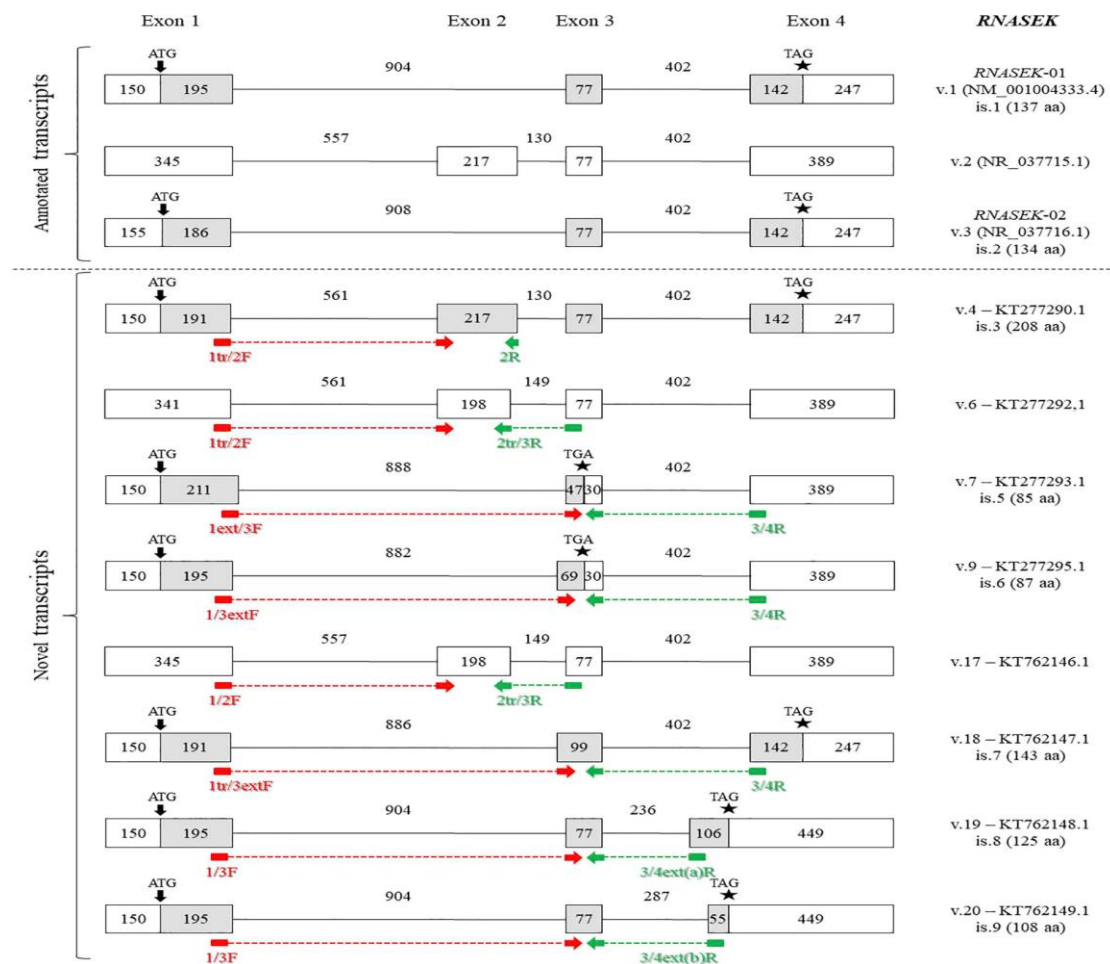
- IV. Εναλλακτικά Μετάγραφα 9 και 18:** Αυτά τα μετάγραφα περιέχουν ένα εκτεταμένο εξώνιο 3. Στα μετάγραφα RNase κ01 και RNase κ02, το εξώνιο αυτό αποτελείται από 77 νουκλεοτίδια και συνορεύει με το εξώνιο 1 στο 5' άκρο του και με το τελευταίο εξώνιο του mRNA στο 3' άκρο του. Παρόλα αυτά, το εξώνιο 3 στα νέα αυτά μετάγραφα προεκτείνεται κατά 22 νουκλεοτίδια στο 5' άκρο του οδηγώντας σε ένα τελικό μήκος 99 νουκλεοτιδίων. Η αντίθεση μεταξύ των μεταγράφων 9 και 18 έγκειται στην επιπλέον ύπαρξη της αλληλουχίας GTTG στο μετάγραφο 9 που το καθιστά σχεδόν πανομοιότυπο με το RNase κ01 και στην έλλειψη της από το μετάγραφο 18 καθιστώντας το παρόμοιο με το RNase κ02. Επειδή και τα δύο αυτά μετάγραφα περιέχουν ORFs προβλέπεται πως οδηγούν στην παραγωγή νέων ισομορφών της RNase κ.
- V. Εναλλακτικά Μετάγραφα 19 και 20:** Στα μετάγραφα αυτά παρατηρήθηκαν δύο διακριτές προεκτάσεις στο εξώνιο 4. Πέρα από αυτή την προέκταση τα δύο μετάγραφα είναι πανομοιότυπα με το RNase κ01 αφού περιέχουν την αλληλουχία GTTG. Το μετάγραφο 19 χαρακτηρίζεται από μια προέκταση μήκους 166 νουκλεοτιδίων που εντοπίζεται στο 5' άκρο του τελευταίου εξωνίου, ενώ το μετάγραφο 20 παρουσιάζει μια προέκταση μήκους 115 νουκλεοτιδίων. Καθώς και τα δύο νέα μετάγραφα περιέχουν ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης προβλέπεται πως κωδικοποιούν νέες ισομορφές της RNase κ.

Δεδομένου ότι στην παρούσα διπλωματική εργασία συμπεριλήφθηκε και το μετάγραφο 14, αξίζει να παρατεθεί η αλληλουχία του, η οποία έχει βρεθεί από αδημοσίευτα αποτελέσματα μελέτης των Adamopoulos και Sideris. Η αλληλουχία είναι η εξής:

VI. Εναλλακτικό Μετάγραφο 14:

```
1 atgggatggt tgaaggcggg gccacgcccc ctctgcccc ctgcgagggc atcctgggct
61 ttctcccacc gcttccgag cccgcttgea cctcgcgcat ccccgactcc cttcttatg
121 gcgtcgctcc tgtgctgtgg gccgaagctg gccgcctgcg gcatcgtcct cagcgcctgg
181 ggagtgatca tgttggtgag gggactcccc ggcaaggatc ggagagggcc tgaaggggctc
241 cgggctggga gggctgggag gcgaggaaac tctgggcccgc aggcaggccc gaggggcccgg
301 ggatctacag gccccggaga aggagacaga ctgaaattga aaaatgggaa ctgttcgaga
361 ccagcctgac caacatggtg aaaccccgtc tccaataaaa atacaaaaat tagccggggcg
421 tgggtggcgc cgcctgtaat ccagctact caggaggctg aggcaggaga atcgttgaa
481 tccgggaggc ggagggtgca gtgagccgag atcgcgccac tgcactccag cctgggtgac
541 agagcgagac tccgtcccca aagaaaaaga aaaaagggaa ctggagcggga gggccctgga
601 gtgggaggag ccagggctgg taaaggtgga gaccctcaa ggtaggagaa acaagagcgg
```

661 ggtgctgag aggtgcttga gttgaatgga ggacatggga ggaaaagaga gtgcttgttc
721 cagaaatgtg tagctgggcc ttgtttccc agtaatccac ccaccgccac tcaagaaga
781 aatgatatga agaagtgccg gttctcctc ccctcttccg cactgtcccg tgatgatgac
841 gcctccagag aggacgataa tctgggttcc tgggagagat ggcttggtea ctattcccac
901 ccttgctcg accactgtc tcaatgtcac cacctcagc cctgttccag gtggctgagt
961 ccgaatccag aatggcccc agaacatata caacctttac gagcaagtca gctacaactg
1021 tttcatcgct gcaggccttt acctctctct cggaggettc tttttctgcc aagttcgget
1081 caataagcgc aaggaataca tggcgcgcta gggccccggc gcgtttcccc gctccagccc
1141 ctctctatt taaagactcc ctgcaccgtg tcaccaggt cgcgtcccac cttgcccggc
1201 gcctctgcg ggactgggtt tccggggcga gagactgaat cctttctccc atctctgcea
1261 tccggcccc gtggagaggg ctgaggctgg ggggctgttc cgtttctcca ccttcgctg
1321 tgtcccgtat ctcaataaag agaattctct ctcttcag



Εικόνα 1.4.4: Λεπτομερής δομική απεικόνιση όλων των σχολιασμένων και πρωτότυπων μεταγραφών της RNase κ. Τα εξώνια απεικονίζονται ως κουτιά και τα ιντρόνια ως γραμμές. Τα γκρι και λευκά κουτιά αντιπροσωπεύουν κωδικοποιητικά και μη κωδικοποιητικά εξώνια, αντίστοιχα. Οι αριθμοί μέσα στα κουτιά και πάνω απ' τις γραμμές δείχνουν το μήκος κάθε εξωνίου ή ιντρονίου σε νουκλεοτίδια. Για κάθε μετάγραφο που προβλεπόταν να κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ισομορφής εμφανίζονται τα κωδικόνια έναρξης και διακοπής μετάφρασης.

1.4.7 Οι ριβονουκλεάσες στον καρκίνο και την θεραπεία του

Όπως είναι γνωστό οι ρυθμιστικές ανωμαλίες στη γονιδιακή έκφραση αποτελούν ένα από τα χαρακτηριστικά των διάφορων τύπων καρκίνου. Παραδείγματα τέτοιων ανωμαλιών είναι: πολλαπλασιασμοί και ελλείψεις γονιδίων, βλάβη της δομής του DNA από χημικούς παράγοντες και η διατάραξη πολλών διεργασιών κριτικής για το κύτταρο σημασίας όπως η μεταγραφή και ο ανασυνδυασμός. Έρευνες της τελευταίας δεκαετίας έχουν αναδείξει τη σημασία των μεταμεταγραφικών μηχανισμών στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, κυρίως στο πεδίο της αποικοδόμησης του αγγελιοφόρου RNA (mRNA). Οι διεργασίες που αφορούν στην σταθερότητα του mRNA, την αναστολή της μεταγραφικής πορείας και την αποικοδόμηση των μεταγράφων περιπλέκονται μεταξύ τους και μπορούν να επηρεαστούν τόσο από cis-στοιχεία όπως η πολυ-A ουρά και στοιχεία πλούσια σε AU κατάλοιπα (AU Rich Elements/AREs), όσο κι από trans-δραστικούς παράγοντες όπως είναι τα μη κωδικά RNAs (non coding RNAs/ncRNAs), πρωτεΐνες που δεσμεύονται σε RNA (RNA Binding Proteins/RBPs) και οι ριβονουκλεάσες (RNases).

Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριό μας, για το ρόλο της ριβονουκλεάσης κ στην καρκινογένεση. Πρόσφατα δεδομένα από ανάλυση έκφρασης με μικροσυστοιχίες αποκαλύπτουν ότι το γονίδιο της RNase κ βρίσκεται είτε υπερεκφρασμένο είτε υποκεφρασμένο σε έναν αριθμό ανθρώπινων καρκίνων, υποδεικνύοντας μία πιθανή διαγνωστική ή προγνωστική χρησιμότητα. Σε κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού και ωοθηκών παρουσιάστηκε μία αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του mRNA της, μετά από θεραπεία με τον αντινεοπλασματικό παράγοντα πακλιταξέλη. Αντίθετα, η θεραπεία με τα υπόλοιπα αντικαρκινικά φάρμακα δεν άλλαξε δραστικά τα επίπεδα του mRNA της RNase κ. Με βάση το γεγονός ότι η πακλιταξέλη ασκεί την κυτταροτοξική δράση της προκαλώντας απόπτωση, τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να είναι ενδεικτικά μιας πιθανής εμπλοκής της ριβονουκλεάσης κ σε αποπτωτικές οδούς [79]. Παρακάτω παρουσιάζονται στοιχεία που αναδεικνύουν την επιρροή διάφορων ριβονουκλεασών στην πολυπαραγοντική ασθένεια του καρκίνου [80].

I. Ριβονουκλεάσες που μετέχουν στα συμβατικά μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA:

❖ CCR4b

Η CCR4b, μια αποαδενυλάση που ανήκει στο σύμπλεγμα CCR4b-NOT, επάγει την ανάπτυξη των ινοβλαστικών κυτταρικών σειρών και εικάζεται πως λειτουργεί ως πρωτο-ογκογονίδιο [81]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες αυτό το ένζυμο φαίνεται να ρυθμίζει τα επίπεδα του mRNA του p27Kip1, ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου που αναστέλει κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες, επάγοντας την κυτταρική ανάπτυξη. Αυτό αποδεικνύεται και σε μελέτες όπου τα κύτταρα είχαν έλλειψη της CCR4b στις οποίες

τα επίπεδα του p27Kip1 mRNA αυξήθηκαν και επήλθε αναστολή της αύξησης των κυττάρων. Η δραστηριότητα της CCR4b μπορεί να παρεμποδιστεί *in vitro* από την αντιπολλαπλασιαστική πρωτεΐνη Tob, υποστηρίζοντας περαιτέρω τα προηγούμενα ευρήματα που δείχνουν ότι η συγκεκριμένη ριβονουκλεάση επάγει την κυτταρική αύξηση [82].

❖ PARN

Έχει φανεί πως οι ριβονουκλεάσες ελέγχουν τα επίπεδα των mRNAs αλληλεπιδρώντας με RBPs. Μια από αυτές είναι και η Poly A ριβονουκλεάση (PARN). Η αποαδενυλιωτική δράση της PARN, σε συνδυασμό με τους αποσταθεροποιητικούς παράγοντες RBPs, μπορεί δυνητικά να λειτουργήσει ογκοκασταλτικά, προκαλώντας την αποικοδόμηση των mRNAs αυξητικών παραγόντων όπως η IL-8 και ο VEGF [83,84]. Ακόμα, η PARN και το σύμπλοκο του εξωσώματος φαίνεται πως στρατολογούνται από την KSRP και από την DHAU και ευθύνονται για την αποσταθεροποίηση διαφόρων mRNAs, συμπεριλαμβανομένων των c-jun και uPA, των οποίων τα αυξημένα επίπεδα εμπλέκονται σε διάφορα είδη καρκίνων [85,86]. Σε άλλη μελέτη διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση μεταξύ της PARN και του CUG-BP όπου η RBP φάνηκε να στρατολογεί το ένζυμο με απότερο στόχο την αποσταθεροποίηση του mRNA των c-fos και TNF-alpha [87].

❖ XRN1

Πέρα από την αποαδενυλίωση, οι 5' → 3' εξωνουκλεάσες, όπως η XRN1, μπορούν επίσης να ξεκινήσουν την αποικοδόμηση του mRNA μόλις το μετάγραφο-στόχος απελευθερωθεί από την καλύπτρα. Η XRN1 είναι ένα παράδειγμα ενζύμου που εμπλέκεται σε αρκετούς καρκίνους ως απορρυθμισμένο ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Σε δείγματα που έχουν ληφθεί στα αρχικά στάδια οστεογόνου σαρκώματος (Osteogenic Sarcoma/OGS) και τις κυτταρικές σειρές που έχουν προκύψει από αυτό, βρέθηκε μείωση ή ολική έλλειψη του mRNA της XRN1 [88]. Επίσης, σε μία από αυτές τις κυτταρικές σειρές, υπήρχε μια ομόζυγη απώλεια λειτουργικής μετάλλαξης της XRN1, υποδηλώνοντας τον ρόλο της ως ογκοκατασταλτικό παράγοντα.

II. Ριβονουκλεάσες που ενεργοποιούνται παρουσία συγκεκριμένων σημάτων:

❖ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ RNase L

Η ανθρώπινη ριβονουκλεάση L είναι μια ενδοριβονουκλεάση που εκφράζεται σε ποικιλία κυτταρικών τύπων στα θηλαστικά. Είναι ικανή να κόβει ιικά RNAs [89], rRNAs [90] και αρκετά κυτταρικά mRNAs. Ακόμα, έχει βρεθεί πως κόβει το υπόστρωμα mRNA σε μονόκλωνες περιοχές UU και UA δινουκλεοτιδίων. Η RNase L ελέγχει τη σταθερότητα των κωδικοποιούμενων mRNAs που προκύπτουν από το μιτοχονδριακό DNA και αποσταθεροποιεί τα mRNAs γονιδίων που ενεργοποιούνται

ύστερα από την απόκριση ιντερφερονών σε ιικές λοιμώξεις [91]. Ο κύριος ρόλος της, όμως, έγκειται στην φυσική ανοσία όπου με την ριβονουκλεολυτική της δράση ενισχύει την αντική απόκριση [92]. Η δραστηριότητα και η έκφραση της RNase L υπόκεινται σε αυστηρή ρύθμιση. Υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται ως μονομερές σε λανθάνουσα κατάσταση και η δραστηριότητά της καταστέλλεται από τον αναστολέα της, RLI (RNase L Inhibitor). Παρόλα αυτά, κατά τη δέσμευσή της σε 2', 5'-συνδεδεμένους ολιγοαδενυλιωτές (2',5'-linked oligoadenylates/2-5A) που έχουν προκύψει από τη δράση 2-5A συνθετασών, μπορεί να διμεριστεί και να λειτουργήσει ως ενεργή ριβονουκλεάση στο κυτταρόπλασμα [93].

Το γονίδιο της RNase L χαρτογραφείται σε μια περιοχή που έχει συσχετιστεί με επιδεκτικότητα/ευαισθησία στον κληρονομικό καρκίνο του προστάτη, γεγονός που υποστηρίζεται κι από ερευνητικά δεδομένα που αποδεικνύουν ότι τα εναλλακτικά μετάγραφα της ριβονουκλεάσης συνδέονται με επιθετικές μεταστάσεις. Ένα κολοβό εναλλακτικό μετάγραφο, το E265X, στερείται της περιοχής πρόσδεσης 2-5A, γεγονός που το καθιστά μονίμως ανενεργό. Ακολούθως, μελέτες έχουν δείξει ότι σε δείγματα κληρονομικού καρκίνου του προστάτη υπάρχει μεγαλύτερη συχνότητα του E265X σε σχέση με δείγματα υγιών (control). Ένα άλλο εναλλακτικό μετάγραφο, το R462Q, έχει συνδεθεί με αυξημένη επιθετικότητα και μεταστάσεις στον καρκίνο του παγκρέατος.

Από την άλλη πλευρά του νομίσματος, η ογκοκατασταλτική δράση της ριβονουκλεάσης L έχει χαρακτηριστεί εις βάθος κυρίως κάτω από σηματοδότηση από ιντερφερόνες. Όπως προαναφέρθηκε η RNase L φαίνεται να αποικοδομεί το μιτοχondριακό mRNA, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος-C και στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3 κατά τη διαδικασία της απόπτωσης που προκαλείται είτε από τη δράση της ιντερφερόνης-α ή από κάποιον αντικαρκινικό παράγοντα. Η RNase L είναι ικανή, επιπλέον, να ρυθμίζει ανοδικά την έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Έχει παρατηρηθεί πως η δράση της απαιτείται, αλλά δεν είναι από μόνη της αρκετή, για να ρυθμίσει ανοδικά τα επίπεδα των MIC-1/NAG-1. Πιθανολογείται πως μπορεί να καταστρέψει ανασταλτικά miRNAs ή rRNAs που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των μεταγραφικών μηχανισμών. Τέλος, φαίνεται πως η RNase L λειτουργεί ως τελεστής καθοδικά στο μονοπάτι του ογκοκατασταλτικού παράγοντα BRCA1, το οποίο ενεργοποιείται κατόπιν σηματοδότησης από την ιντερφερόνη-γ και οδηγεί τα κύτταρα στην απόπτωση [80].

❖ IRE-1

Το απαιτούμενο ινοσιτόλης ένζυμο 1 (Inositol-Requiring Enzyme 1/IRE-1) αποτελεί μια διαμεμβρανική ενδοριβονουκλεάση και τοπολογείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER). Περιλαμβάνει μια δραστική περιοχή ενδοριβονουκλεάσης/κινάσης στην κυτταροπλασματική μεριά και μια περιοχή αισθητήρα stress. Ύστερα από πρόκληση stress ενδοπλασματικού δικτύου διμερίζεται και αυτοφωσφορυλιώνεται με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η ριβονουκλεολυτική της δράση. Γνωστά υποστρώματα της IRE-1 περιλαμβάνουν mRNAs που κωδικοποιούν την XBP1 πρωτεΐνη (X-box Binding Protein 1) και την CD59.

Το κόψιμο της XBP1 από την IRE-1 οδηγεί στο μάτισμα του μεταγράφου αυτού που κωδικοποιεί έναν πιθανολογούμενο μεταγραφικό παράγοντα, XBP1s, ο οποίος ενεργοποιεί γονίδια που ευθύνονται για την απόκριση μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (UPR). Η δράση της IRE-1 φαίνεται πως επηρεάζει τη διαδικασία αποικοδόμησης ενός σημαντικού αριθμού mRNAs, συμπεριλαμβανομένων κι αυτών που ρυθμίζουν τις διαδικασίες της αγγειογένεσης. Για παράδειγμα, μειωμένη έκφραση CD59 εμπλέκεται στον καρκίνο του πνεύμονα και μια εκτοπική υπερέκφραση της IRE-1 ρυθμίζει καθοδικά την έκφραση του μεταγράφου αυτού. Ακόμα, πολλές ενδείξεις τείνουν να συνδέσουν τον XBP1 με την αύξηση και εξέλιξη του όγκου υπό συνθήκες υποξίας, κάτι που είναι παρόν σε όλους τους συμπαγείς όγκους υπό συνθήκες stress ER. Η σηματοδότηση μέσω IRE-1/XBP1s φαίνεται να ευνοεί την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και την εξέλιξη της ασθένειας. Η υπερέκφραση XBP1s σε θετικά για stress ER καρκινικά κύτταρα μαστού οδηγεί σε ανάπτυξη ανεξάρτητη από οιστρογόνα και μειώνει την ευαισθησία σε αναστολή της αύξησης από τα αντι-οιστρογόνα, ανεξάρτητα από τη λειτουργία του p53. Παρόμοια, σε μια μελέτη αποδείχθηκε ότι η υπερέκφραση XBP1s οδηγεί στην ανάπτυξη πολλαπλού μυελώματος σε ποντίκια. Ακόμα, η σηματοδότηση μέσω IRE1-XBP1s σχετίζεται με την εξέλιξη καρκίνου στο συκώτι και βρέθηκε πως χρησιμοποιείται από την Hbx ογκοπρωτεΐνη, κατά το μονοπάτι ενεργοποίησής της από τον ιό της Ηπατίτιδας Β, με πιθανή συνέπεια την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Από την άλλη, η UPR ενεργοποίηση μέσω IRE-1 έδειξε πως οδηγεί και στην ογκοκαταστολή σε αρκετές έρευνες. Για παράδειγμα, το μονοπάτι IRE1-UPR έχει χρησιμοποιηθεί από πολλούς παράγοντες με στόχο τον κυτταρικό θάνατο και την ογκοκαταστολή [80].

❖ PMR1

Η πολυσωμική ριβονουκλεάση 1 (Polysomal Ribonuclease 1/PMR1) είναι μια ενδοριβονουκλεάση που βρίσκεται ομοιόμορφα κατανεμημένη κατά μήκος του κυτταροπλάσματος στα πολυσώματα. Επίσης, έχει μια ιδιαίτερη δομή και αλληλουχία που την καθιστούν ξεχωριστή σε σχέση με άλλες RNases. Η ιδιαιτερότητα της αφορά και στον τρόπο ρύθμισής της, όπου η PMR1 φαίνεται να αρχίζει την αποικοδόμηση του mRNA κατά τη διάρκεια της μεταγραφικής διαδικασίας του υποστρώματος μόνο κατόπιν της στοχευσής του στα πολυσώματα. Στο κρίσιμο αυτό σημείο στη ρύθμιση

της PMR1 μεσολαβεί φωσφορυλίωση της PMR1 στο κατάλοιπο τυροσίνης του καρβοξυτελικού της άκρου από την c-Src. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι αυτή η φωσφορυλίωση από την c-Src μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω σημάτων του EGFR, τα οποία είναι στενά συνδεδεμένα με την ογκογένεση. Ακόμα, η Hsp90 μπορεί να προσδεθεί στην PMR1 και να αποτρέψει την αποικοδόμησή της από το πρωτεάσωμα, διατηρώντας κατ'αυτόν τον τρόπο την αποικοδομητική της δραστηριότητα και αυξάνοντας τη συσσώρευσή της στο κύτταρο. Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ένα πιθανό ρόλο της PMR1 στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την c-Src είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο που υπερεκφράζεται ή ενεργοποιείται σε διάφορους τύπους καρκίνου. Η ενεργότητα κίνησης που διαθέτει ενεργοποιεί διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες καθώς και καταρράκτες σηματοδότησης, γεγονότα που ενισχύουν την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση. Το μηχανιστικό μοντέλο των Peng et al. προτείνει πως η c-Src χρησιμοποιεί εν μέρει το μονοπάτι αποικοδόμησης mRNA της PMR1 ως μια διαδρομή για την καταστροφή των μεταγράφων ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Σε αυτό το μοντέλο φάνηκε πως η Hsp90 έχει την ικανότητα να παρατείνει το χρόνο ζωής της PMR1 στο κύτταρο με στόχο τη διατήρηση της διαδικασίας αποικοδόμησης των mRNAs. Καθώς, λοιπόν, η Hsp90 λειτουργεί ως καθοριστικός μεσολαβητής στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ο παραπάνω μηχανισμός μπορεί να αποτελεί έναν από τους τρόπους της να διευκολύνει την καταστροφή των mRNAs που κωδικοποιούν για ογκοκατασταλτικούς παράγοντες [80].

III. Ριβονουκλεάσες από το μονοπάτι του miRNA:

❖ DROSHA

Η έναρξη της ωρίμανσης του miRNA ξεκινά με την επεξεργασία του pri-miRNA (primary micro RNA). Το συγκεκριμένο στάδιο φέρεται εις πέρας από την ενδοριβονουκλεολυτική δράση της Drosha σε συνδυασμό με το γονίδιο κρίσιμης περιοχής 8 του συνδρόμου Di George (Di George Syndrome Critical Region Gene 8/ DGCR8). Η Drosha είναι μέλος της οικογένειας της RNase III που είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση δίκλωνων RNAs και μελέτες υποδεικνύουν τον πιθανό της ρόλο ως πρωτο-ογκογονίδιο. Σε μια μελέτη, αυξημένη έκφραση της Drosha και των mRNAs της παρατηρήθηκε σε καρκίνους του οισοφάγου. Περαιτέρω, η αναστολή της σε καρκινικές κυτταρικές σειρές είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξής τους. Σε μια άλλη μελέτη, παρατηρήθηκε συσχετισμός μεταξύ της αύξησης των επιπέδων των mRNAs της Drosha και κέρδος στον αριθμό των γενωμικών αντιγράφων σε δείγματα ασθενών αλλά και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές από καρκίνωμα τραχηλικών πλακωδών κυττάρων (Cervical squamous cell carcinoma). Μερικές έρευνες έχουν δείξει, ακόμα, και το ρόλο της στην ογκογένεση. Σε μία εξ'αυτών βρέθηκε πως η αυξημένη προσιτότητα της Drosha προς το pri-miRNA-191 είχε ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση του miR-191 σε λευχαιμικές καρκινικές κυτταρικές σειρές. Παρόμοια, αυξητικοί παράγοντες όπως ο TGF-β και αυτοί της οικογένειας

των μορφογενετικών πρωτεϊνών των οστών (Bone Morphogenetic Proteins/BMPs) φάνηκε να επηρεάζουν καθοδικούς μεταγωγείς σήματός, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με την Drosha και διευκολύνουν την προσιτότητα της ή την δραστηριότητά της προς το pri-miRNA-21. Αυτό είχε ως συνέπεια την αύξηση των επιπέδων του miR-21 στα λεία καρδιομυϊκά κύτταρα και αρνητική ρύθμιση του ογκοκατασταλτικού παράγοντα PDCD4 [80].

❖ DICER

Το ένζυμο Dicer επεξεργάζεται τα pre-miRNAs στο κυτοσόλιο και είναι μέλος της οικογένειας της ριβονουκλεάσης III. Επιπλέον, αυξανόμενα στοιχεία αποκαλύπτουν το ρόλο του ως κρίσιμου ρυθμιστή της ωρίμανσης του miRNA και της απορρύθμισής του στην ογκογένεση. Εάν το Dicer ενεργεί ως πρωτο-ογκογονίδιο ή ογκοκατασταλτικό γονίδιο είναι άγνωστο, λαμβάνοντας υπόψη την ικανότητά του να επεξεργάζεται όλα τα δίκλινα RNA χωρίς προτίμηση αλληλουχίας. Σε γενικές γραμμές, η υπερέκφρασή του έχει συσχετιστεί κυρίως με την ογκογένεση, η οποία δείχνει τον ρόλο του ως πρωτο-ογκογονίδιο. Αντίθετα, υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν τον ρόλο του Dicer ως ογκοκατασταλτικό παράγοντα. Ωστόσο, τα στοιχεία που συγκλίνουν στο ότι η παρεκκλίνουσα λειτουργία Dicer συμβάλλει στην ογκογένεση κυριαρχούν. Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει την υπερέκφρασή του σε διάφορους καρκίνους, συμπεριλαμβανομένων αυτών των σιελολόγων αδένων, των πνευμόνων, του προστάτη και των ωοθηκών, καθώς και στο λέμφωμα του Burkitt. Αυτές οι μελέτες επεσήμαναν ότι η υπερέκφραση Dicer μπορεί να οδηγήσει σε μια συνολική αύξηση των ογκογόνων miRNA όπως το miR-21. Έχει αποδειχθεί ότι το Dicer μπορεί να προάγει την αγγειογένεση στα ενδοθηλιακά κύτταρα και η έκφρασή του μπορεί να ελεγχθεί από το miRNA let-7, το οποίο δρα ως ογκοκατασταλτικό miRNA. Έτσι, αυτές οι μελέτες υποστηρίζουν τον πρωτο-ογκογονικό ρόλο του Dicer. Η μείωση του Dicer και η επακόλουθη μείωση της ολικής ωρίμανσης miRNA μπορούν να ενισχύσουν την ανάπτυξη όγκων. Η μείωση των ειδών miRNA έχει τη δυνατότητα να απορρυθμίσει ογκογονίδια. Μερικές κλινικές μελέτες συνάδουν με αυτό το εύρημα. Η μείωση του Dicer βρέθηκε ως προγνωστικός δείκτης κακής πρόγνωσης σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η ρύθμιση του Dicer αποτελεί ισχυρό προγνωστικό παράγοντα υποτροπής σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα [80].

❖ AGO-2

Τα pre-miRNAs επεξεργάζονται από το Dicer για να προκύψουν ώριμα miRNAs που γίνονται μέρος ενός συμπλέγματος ριβονουκλεοπρωτεΐνης-miRNA (miRNP). Μέρος αυτού του συμπλέγματος είναι η Ago2 που μπορεί να καταστρέψει τα mRNAs που έχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες στο πρότυπο miRNA. Εάν μια σχεδόν τέλεια συμπληρωματική σχέση δεν μπορεί να επιτευχθεί στο mRNA: η δέσμευση miRNA, η μεταφραστική αναστολή λαμβάνει χώρα. Η Ago2 έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με το

Dicer και προτείνεται πως το βοηθάει στην επεξεργασία του pre-miRNA. Αποδείχθηκε ότι εντοπίζεται στα κέντρα αποσύνθεσης του mRNA, γνωστά ως κυτταροπλασματικά σώματα, για να ασκήσει miRNA διαμεσολαβούμενη γονιδιακή ρύθμιση. Η Ago2 είναι μοναδική στο ότι είναι η μόνη RNase μεταξύ της ανθρώπινης οικογένειας Αργοναυτών που συνεκφράζεται σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Οι πρόσφατες αναφορές επισημαίνουν τα αλλοιωμένα επίπεδα της Ago2 στην απορρύθμιση των δραστηριοτήτων του miRNA στον καρκίνο. Μια μελέτη έδειξε αυξημένα επίπεδα της Ago2 στους πιο επιθετικούς τύπους όγκων του μαστού. Το πώς η αύξηση των επιπέδων της Ago2 οδηγεί σε ογκογένεση είναι ακόμη άγνωστο. Πιθανές εξηγήσεις περιλαμβάνουν ότι η υπερέκφραση της Ago2 μπορεί να ισορροπήσει τον ανταγωνισμό που δημιουργείται μεταξύ διαφορετικών ειδών miRNAs ως προς την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και επιτρέπει στα ογκογονικά miRNAs να ασκούν πιο αποτελεσματικά τη δράση τους. Ωστόσο, αυτό που φαίνεται να είναι πιο σημαντικό είναι η διατήρηση της ισορροπίας των επιπέδων της Ago2 καθώς μια μείωση της οδηγεί σε εξασθένηση των δυνατοτήτων επεξεργασίας miRNA από το Dicer [80].

IV. Πολυλειτουργικές Ριβονουκλεάσες του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος:

❖ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗ (ANGIOGENIN)

Η αγγειογενίνη ανήκει στην υπεροικογένεια της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A. Αρχικά, απομονώθηκε ως ένας αγγειογενετικός παράγοντας προερχόμενος από όγκους που ασκεί τη δράση του έναντι σε δινουκλεοτίδια UA ή CA. Μπορεί να υδρολύει εκλεκτικά το κυτταρικό tRNA προς αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης και παρόλο που η δραστηριότητά της είναι αρκετά ασθενής σε σύγκριση με την RNase A, παίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση. Δυστυχώς, ο φυσικός mRNA στόχος της δεν έχει προσδιοριστεί και ο ρόλος της στη διαδικασία αποικοδόμησης του mRNA δεν έχει μελετηθεί. Ωστόσο, εικάζεται ότι τα υποστρώματα RNA της μπορεί να βρίσκονται στους πυρήνες των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων όπου συνήθως εντοπίζεται η αγγειογενίνη.

Δεδομένου ότι αρχικά απομονώθηκε από όγκους ως παράγοντας αγγειογένεσης, δεν αποτελούν έκπληξη δεδομένα που δείχνουν ότι μεταβολές της εμπλέκονται σε διάφορους τύπους καρκίνων. Αρκετές μελέτες αναφέρουν ταυτόχρονα ότι το υψηλότερο επίπεδο έκφρασης της συσχετίζεται με υψηλότερο πολλαπλασιασμό σε καρκίνους. Σε μια μεγάλη μελέτη δειγμάτων προστατεκτομής διαπιστώθηκε μια αυξανόμενη έκφραση αγγειογενίνης κατά την εξέλιξη από καλοήγη προστάτη σε υψηλού βαθμού προστατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και τελικά σε προστατικό αδενοκαρκίνωμα [94]. Επίσης, υψηλότερο ποσοστό mRNA αγγειογενίνης εντοπίστηκε σε δείγματα γαστρικού καρκινώματος από ό,τι στους γύρω υγιείς ιστούς [95] και μια ανάλυση δειγμάτων ορού κακοήθους μελανώματος σταδίου IV ανέφερε σημαντική αύξηση της αγγειογενίνης σε μια υποομάδα ασθενών με προοδευτική νόσο

[96]. Εδώ, τα υψηλότερα επίπεδα αγγειογενίνης συσχετίστηκαν σημαντικά με κακή ανταπόκριση στη θεραπεία χρησιμοποιώντας χημειο-ανοσοθεραπεία και η σχετιζόμενη με τη θεραπεία επιβίωση ήταν μικρότερη σε ασθενείς με πάνω από τη διάμεση τιμή επιπέδων της αγγειογενίνης σε σύγκριση με εκείνους με επίπεδα κάτω από τη μέση τιμή. Περαιτέρω, η υπερέκφραση της αγγειογενίνης φαίνεται να ενισχύει την ογκογονικότητα και την αγγειογένεση σε μια κυτταρική σειρά καρκίνου του προστάτη, καθώς knock down του γονιδίου που την κωδικοποιεί άσκησε αντίθετο αποτέλεσμα, που έρχεται σε συμφωνία με τον ογκογόνο ρόλο της [97]. Με τη σειρά της, η μείωση της δραστηριότητάς της αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό του καρκίνου. Σε μια κυτταρική σειρά μελανώματος παρατηρήθηκε ότι ο βασικός παράγοντας ανάπτυξης ινοβλαστών δεν μπορεί να προκαλέσει πολλαπλασιασμό απουσία αγγειογενίνης [98]. Μελέτες knock-down της σε κύτταρα HeLa έδειξαν αξιοσημείωτη αναστολή πολλαπλασιασμού, ενώ σε κύτταρα αδenoκαρκινώματος προστάτη, προκλήθηκε αναστολή της μεταγραφής του rRNA και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων [99,100]. Έξι από τις επτά γνωστές εναλλακτικές μορφές της αγγειογενίνης συνδέονται με την αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση και είχαν αξιοσημείωτη μείωση δραστηριότητας RNase, ενώ τρεις έδειξαν σημαντική μείωση των αγγειογόνων και πολλαπλασιαστικών δραστηριοτήτων [101]. Αυτές οι αναφορές συμπίπτουν και αποδεικνύουν τη σημασία της δραστηριότητάς της στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Είναι επίσης σύμφωνες με προηγούμενα στοιχεία από μελέτες αναστολής, οι οποίες υπαινίσσονται ότι η δραστηριότητα της RNase ελέγχει τη διαδικασία της αγγειογένεσης [102,103].

❖ G3BP

Η πρωτεΐνη G3BP είναι μια ενδοριβονουκλεάση που εκφράζεται σε όλο το μήκος του κυτταροπλάσματος και τον πυρήνα. Η G3BP διασπά την 3' UTR του c-myc mRNA με προτίμηση να κόβει μεταξύ δινουκλεοτιδίων CA in vitro. Η δραστηριότητα της ενδοριβονουκλεάσης εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση των καταλοίπων σερίνης και, σε κύτταρα που διαιρούνται, η G3BP μεταναστεύει προς τη μεμβράνη του πλάσματος όπου μπορεί να αλληλεπιδράσει με το RasGAP, αλλά όχι σε quiescent κύτταρα. Η επιτακτική ανάγκη ύπαρξής της κατά την ανάπτυξη αποδεικνύεται από την εμβρυϊκή θνησιμότητα και την επιβράδυνση της ανάπτυξης που παρατηρήθηκε σε ποντίκια μετά από αδρανοποίησή της. Έχει εξεταστεί η συσχέτιση της υπερέκφρασης της G3BP με καρκίνους του μαστού, της κεφαλής, του λαιμού, στο κόλον και τον θυρεοειδή. Πρόσφατα, η έκφραση της G3BP μελετήθηκε σε ανθρώπινο πλακώδες καρκίνωμα του οισοφάγου (ESC), και στο 71% των περιπτώσεων, υπήρχε αυξανόμενος ρυθμός έκφρασης της G3BP. Επίσης, η έκφρασή της σε μια ομάδα ασθενών με μετάσταση στους λεμφαδένες ήταν σημαντικά υψηλότερη από εκείνη στην ομάδα χωρίς μετάσταση και αυτή η έκφραση συσχετίστηκε με μικρότερο χρόνο επιβίωσης. Ωστόσο, όπως με την Αγγειογενίνη, ο μοριακός μηχανισμός πίσω από αυτόν τον συσχετισμό είναι άγνωστος και έχει γίνει επίσης μια αντίθετη παρατήρηση. Μία μελέτη αναφέρει ότι η μείωση της G3BP συσχετίζεται περισσότερο με

μεταστατικό καρκίνωμα του πνεύμονα από ότι με μη μεταστατικά κύτταρα. Είναι πιθανό ότι η G3BP βρίσκεται κατά βάση σε όλο το κυτταρόπλασμα, αλλά κατά τη διάρκεια επίδρασης με αρσενίτη ή στρες υψηλής θερμοκρασίας, μπορεί να εντοπιστεί σε μεγάλες κυτταροπλασματικές δομές που προσομοιάζουν σε κοκκία στρες (SGs). Είναι γνωστό ότι τα SGs είναι κυτταροπλασματικά συσσωματώματα ακινητοποιημένων μεταφραστικών συμπλοκών που συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια του στρες. Μία έρευνα πρότεινε ότι τα mRNAs που απελευθερώνονται από αποσυναρμολογούμενα πολυσώματα ταξινομούνται και αναδιαμορφώνονται σε SGs, από τα οποία επιλεγμένα μετάγραφα μεταφέρονται σε φορείς επεξεργασίας (PBs) για αποικοδόμηση. Κατά πόσο η G3BP συσχετίζεται με ένα υποσύνολο αυτών των μεταγραφών στα SGs και μπορεί να τα καταστρέψει πρόωρα είναι ακόμη άγνωστο [80].

❖ APE1

Η απουρινική/απουριμιδική ενδονουκλεάση 1 (APE1) είναι ένα ένζυμο που εντοπίζεται στον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια. Πρόσφατα ευρήματα έδειξαν ότι η APE1 διαθέτει δραστηριότητα ενδορινοβονουκλεάσης έναντι του c-myc mRNA, και κόβει σε UA, UG και CA θέσεις στην μονόκλωνη περιοχή διάφορων άλλων ειδών RNA in vitro. Η APE1 επιτελεί πολλαπλές λειτουργίες στο κύτταρο και σε συνδυασμό με τη δραστηριότητα της ως RNase, μπορεί να διατηρήσει τη γενετική ακεραιότητα και ενδεχομένως να ρυθμίσει την αποικοδόμηση διαφόρων mRNAs στο κύτταρο. Έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση της APE1 σε διάφορους καρκίνους. Στο πολλαπλό μύελωμα, βρέθηκε αυξημένο ποσοστό έκφρασης APE1 στο 65,6% των ασθενών. Ομοίως, η αυξημένη έκφραση της APE1 συσχετίστηκε με ανάπτυξη αντοχής στο οστεοσάρκωμα και κακή πρόγνωση. Τροποποίηση της κατανομής της APE1 ή εναλλακτικές μορφές της έχουν επίσης εντοπιστεί σε μια ποικιλία καρκίνων. Η κυτταροπλασματική έκφραση της APE1 είναι σημαντικά υψηλότερη στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) από ό,τι στους γύρω υγείς ιστούς. Στην ίδια μελέτη, παρατηρήθηκε μια τριπλάσια αύξηση της κυτταροπλασματικής έκφρασης APE1 σε ασθενείς με επιθετικό HCC σε σύγκριση με εκείνους με καλά διαφοροποιημένο HCC και ο κυτταροπλασματικός εντοπισμός της συσχετίστηκε με μικρότερο χρόνο επιβίωσης σε σύγκριση με εκείνους τους ασθενείς που παρουσίαζαν αρνητική κυτταροπλασματική επανεργοποίησή της. Στην αντίθετη πλευρά, η APE1 μπορεί να ασκήσει τη δραστηριότητα ριβονουκλεάσης της για την καταστροφή ογκογόνων mRNAs. Αυτό συμβαδίζει με το γεγονός ότι ο ογκογόνος παράγοντας Bcl-2 καταστέλλει την έκφραση της APE1 ενώ ταυτόχρονα ενισχύεται η έκφραση του c-myc. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι μειωμένη ρύθμιση της APE1 οδηγεί σε υπερέκφραση του c-myc mRNA και αυτό μπορεί ή όχι να εξηγήσει τη σχέση κάποιας εναλλακτικής μορφής της APE1 με τον καρκίνο [80].

1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Απ'όσα αναφέρθηκαν παραπάνω γίνεται φανερή η σημασία των ριβονουκλεασών στη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων, αλλά και ο καθοριστικός ρόλος τους στην ογκογένεση ή την καταπολέμηση του καρκίνου. Επιπλέον, η επιτακτική ανάγκη εύρεσης νέων βιοδεικτών που θα χρησιμεύσουν είτε στην πρόγνωση είτε στη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος μας οδήγησε στη διερεύνηση του ρόλου της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ και των διάφορων μεταγράφων της στη συγκεκριμένη νόσο. Για την υλοποίηση αυτής της σκέψης χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές μυελώματος, H929 και U266. Στο θρεπτικό των κυττάρων προστέθηκαν συγκεκριμένες ποσότητες των δύο κύριων αναστολέων πρωτεασώματος, των Bortezomib και Carfilzomib, οι οποίοι έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία ασθενών με ΠΜ. Στόχος μας ήταν να διερευνήσουμε την επίδραση που είχε η χορήγηση κάθε παράγοντα στην έκφραση του κλασικού και των εναλλακτικών μεταγράφων 7, 9, 14 και 20 της RNase κ σε κάθε κυτταρική σειρά, σε χρόνους επώασης 24, 48 και 72 ωρών. Απώτερος σκοπός, ήταν η σύνδεση των μεταβολών στην έκφρασή των μεταγράφων αυτών με τον ρόλο τους σε μηχανισμούς που εμπλέκονται θετικά ή αρνητικά με την εξέλιξη της συγκεκριμένης νεοπλασίας.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Πίνακας 2.1-1: Οι κυτταρικές σειρές και τα χαρακτηριστικά τους

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ	H929	U266
ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	Homo Sapiens, άνθρωπος	Homo Sapiens, άνθρωπος
ΙΣΤΟΣ	Μυελός των οστών	Περιφερικό αίμα
ΑΣΘΕΝΕΙΑ	Πλασματοκύττωμα /Μυέλωμα	Μυέλωμα /Πλασματοκύττωμα
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ	B-λεμφοκύτταρο, λεμφοβλάστης	B-λεμφοκύτταρο, λεμφοβλάστης
ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	RPMI-1640	RPMI-1640
ΤΥΠΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	Εναιωρήματος	Εναιωρήματος
ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	Διατήρηση πυκνότητας κυττάρων από 5×10^5 - 10^6 cells/mL	Διατήρηση πυκνότητας κυττάρων από 10^5 - 10^6 cells/mL

Πίνακας 2.1-2: Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις μεθόδους κυτταροκαλλιέργειας

ΥΛΙΚΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	ΕΤΑΙΡΙΑ
Phosphate-buffered saline 1x (PBS 1x)	NaCl, KCl, Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄	Buffer για ξέπλυμα ή μέτρηση κυττάρων	-
Fetal Bovine Serum (FBS)	παράγοντες αυξητικοί και προσκόλλησης, ορμόνες, λιπίδια κ.ά.	Συμπλήρωμα για την ανάπτυξη των κυττάρων	Biosera
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	(CH ₂) ₃ SO	Κρυοπροστατευτικό: φύλαξη των κυττάρων σε χαμηλές θερμοκρασίες	Ferac
PEN/STREP (P/S)	Πενικιλίνη, Στρεπτομυκίνη	Αντιβιοτικό: αποτρέπει την ανάπτυξη μ/ο	Biosera
RPMI-1640	Phenol Red, Glutamine Free, βιταμίνη B12, PABA κ.ά.	Ανάπτυξη κυττάρων	Biosera
Trypan Blue Solution	C ₃₄ H ₂₄ N ₆ Na ₄ O ₁₄ S ₄ , PBS	Χρωστική: βάφει τα νεκρά κύτταρα	-
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltriazolium bromide	Χρωστική	-

Θρεπτικά υλικά: Η παρασκευή των θρεπτικών υλικών για τις παραπάνω κυτταρικές σειρές είχε ως εξής: Σε 45 mL θρεπτικού μέσου RPMI-1640, προστίθενται 5 mL βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS) και 500 μ L του αντιβιοτικού που περιέχει πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (P/S). Επομένως, οι αναλογίες είναι 10% FBS και 1% P/S.

2.1.1 Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα συντηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα, σε κατάσταση ψύξης, σε ειδικό δοχείο Dewar υγρού αζώτου ή στους -80°C . Αναλόγως την κυτταρική σειρά που επιθυμείται να αποψυχθεί, επιλέγεται το αντίστοιχο cryovial. Η διαδικασία που ακολουθεί είναι η εξής:

- ❖ Επιλογή του cryovial που χρειάζεται από το υγρό άζωτο ή τους -80°C και ταχύτερη απόψυξή του με τριβή εντός θαλάμου νηματικής ροής (hood).
- ❖ Προσθήκη 500 μ L FBS στο vial και ήπια ανάδευση των κυττάρων με πιπέτα: η προσθήκη FBS χρησιμεύει στην «τόνωση» των κυττάρων ύστερα από το σοκ της απόψυξης
- ❖ Μεταφορά των επαναιωρημένων κυττάρων σε falcon (15mL) που περιέχει 2,5mL FBS
- ❖ Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 250g
- ❖ Απόρριψη υπερκειμένου
- ❖ Προσθήκη 5mL θρεπτικού στο ίζημα των κυττάρων και ανάδευση με πιπέτα με ελαφρές κινήσεις
- ❖ Προσθήκη 5mL ή 10mL θρεπτικού στη φλάσκα (75cm^2)
- ❖ Μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων με σιφόνιο στη φλάσκα
- ❖ Κυκλικές κινήσεις της φλάσκας για να απλωθούν ομοιόμορφα σε όλη την επιφάνεια τα κύτταρα
- ❖ Μεταφορά της φλάσκας σε κλίβανο (37°C , 5% CO_2)

2.1.2 Ανακαλλιέργεια κυττάρων (Split)

Αφού παρατηρηθεί η μορφολογία τους σε ανάστροφο μικροσκόπιο και αξιολογηθεί η κατάστασή τους, ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- ❖ Μεταφορά του περιεχομένου της φλάσκας με σιφόνιο σε falcon (15mL)
- ❖ Φυγοκέντρηση για 7 λεπτά σε 250g
- ❖ Απόρριψη υπερκειμένου
- ❖ Προσθήκη 2-3mL θρεπτικού για επαναιώρηση των κυττάρων
- ❖ Μεταφορά 200 μ L απ' το εναιώρημα σε erpendorf (0,5mL)
- ❖ Απ' το περιεχόμενο του erpendorf παίρνω 20 μ L και μεταφέρω σε καινούριο erpendorf (0,5mL)
- ❖ Προσθήκη στο νέο erpendorf 80 μ L PBS για περαιτέρω αραιώση ώστε η μέτρηση στη Neubauer να 'ναι πιο εύκολη και αντιπροσωπευτική: η ποσότητα

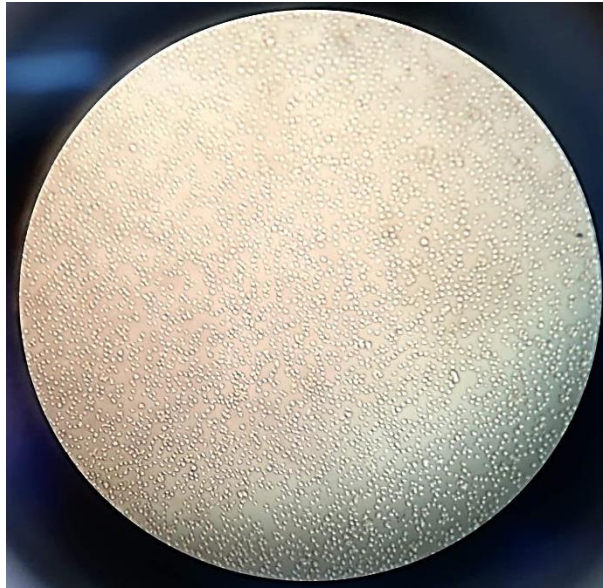
PBS που προστίθεται εξαρτάται από την πυκνότητα των κυττάρων που έχει παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο

- ❖ Μέτρηση στη Neubauer: εύρεση συγκέντρωσης και αριθμού κυττάρων που περιέχονται στο falcon (βλ. παρακάτω)
- ❖ Με βάση το με πόσα κύτταρα χρειάζεται να εμβολιάσω τη φλάσκα, παίρνω τον απαραίτητο όγκο από το falcon και συμπληρώνω τον υπόλοιπο όγκο που χρειάζεται η φλάσκα με θρεπτικό υλικό
- ❖ Κυκλικές κινήσεις της φλάσκας ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια με κύτταρα και θρεπτικό ομοιόμορφα
- ❖ Μεταφορά φλάσκας στον κλίβανο

2.1.3 Ψύξη κυττάρων

Για να διατηρηθούν οι κυτταρικές σειρές για μεγάλα χρονικά διαστήματα, πρέπει να φυλαχθούν σε ιδιαίτερα χαμηλές θερμοκρασίες, το οποίο επιτυγχάνεται με τη χρήση υγρού αζώτου (-196°C, σε ατμοσφαιρική πίεση) ή σε καταψύκτες των -80°C. Πριν την ψύξη γίνεται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων της φλάσκας. Για κάθε κυτταρική σειρά υπάρχει ένας κατάλληλος αριθμός κυττάρων για τον οποίο επιτρέπεται η ψύξη τους.

- ❖ Μεταφορά του περιεχομένου της φλάσκας με σιφόνιο σε falcon (15mL)
- ❖ Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 250g
- ❖ Απόρριψη υπερκειμένου
- ❖ Σε ένα erpendorf (1,5mL) παρασκευάζεται το δ/μα ψύξης των κυττάρων: 900μL FBS + 100μL DMSO και καλή ανάδευση με την πιπέτα ώστε να γίνει ομοιογενές
- ❖ Προσθήκη του δ/τος στο falcon με το ίζημα των κυττάρων και πολύ ήπια ανάδευση ώστε να επαναιωρηθούν τα κύτταρα αλλά παράλληλα να μην καταπονηθούν ιδιαίτερα
- ❖ Μεταφορά του περιεχομένου του falcon σε cryovial. Αναγράφονται: ο τύπος κυττάρων, η γενιά στην οποία βρίσκονται (passage/split), ημερομηνία. Σφραγισμα με parafilm

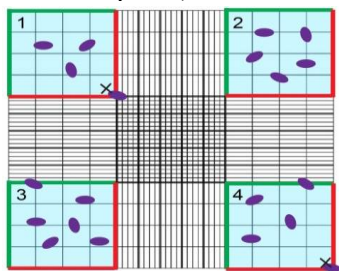


Εικόνα 2.1.1: Κύτταρα H929 σε φλάσκα όπως παρατηρούνται σε ανάστροφο μικροσκόπιο

2.1.4 Μέτρηση αριθμού κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο (Πλάκα Neubauer)

Η διαδικασία είναι ίδια με αυτή της ανακαλλιέργειας μέχρι το στάδιο της προετοιμασίας των erpendorfs όπου αραιώνεται με PBS μια ποσότητα απ'το εναιώρημα των κυττάρων. Η αραιώση είναι σημαντική ειδικά όταν η πυκνότητα των κυττάρων είναι υψηλή και καθιστά δύσκολη την μέτρηση τους στο αιμοκυτταρόμετρο. Επιπλέον, αν η επαναιώρηση τους δεν είναι αποτελεσματική, έχει ως συνέπεια στο υλικό απ'το οποίο παίρνουμε για να μετρήσουμε να μην είναι ομοιόρφα κατανεμημένα τα κύτταρα και να παρουσιάζονται ως συσσωματώματα στην πλάκα (λιγότερο αντιπροσωπευτικό δείγμα). Συνεπώς, σε τέτοιες περιπτώσεις μπορεί να απαιτούνται αραιώσεις 1:10, 1:100, 1:1000 κ.ο.κ. Τα υπόλοιπα βήματα της διαδικασίας έχουν ως εξής:

- Απ'το erpendorf με το αραιωμένο, πλέον, εναιώρημα κυττάρων παίρνω 10μL και φορτώνω στην πλάκα Neubauer
- Μέτρηση των κυττάρων σε καθένα από τα 4 μεγάλα τετράγωνα εκατέρωθεν του σταυρού (εικόνα 2.1.2)



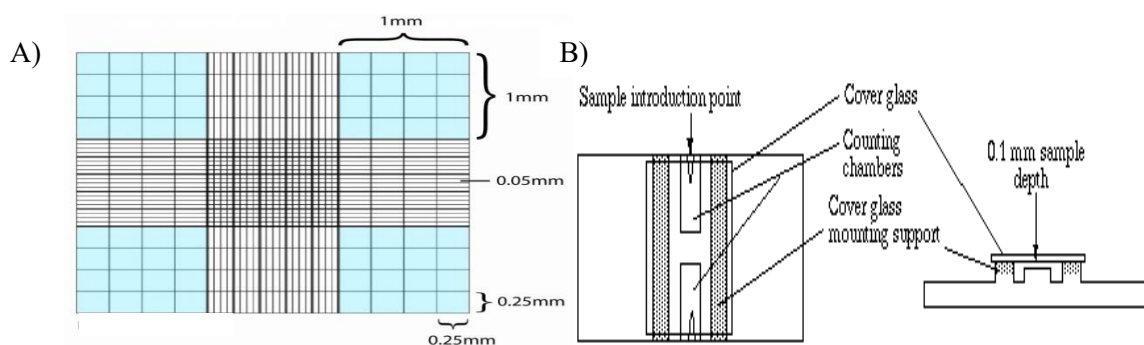
Εικόνα 2.1.2: Μεγέθυνση των τετραγώνων του αιμοκυτταρόμετρου

- Αμέσως μετά αθροίζονται οι αριθμοί κυττάρων και από τα 4 τετράγωνα και υπολογίζεται ο μέσος όρος (Μ.Ο.)
- Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των κυττάρων C πολλαπλασιάζεται ο Μ.Ο. με τον αριθμό αραιώσης και το 10^4 , δηλαδή:

$$C = \text{Μ.Ο.} \times \text{αραιώση} \times 10^4 \text{ cells/mL}$$

- Για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων (A_K) που περιέχει το falcon με το εναίωρημα των κυττάρων πολλαπλασιάζεται η συγκέντρωση C , με τον όγκο (V) που υπάρχει στο falcon, δηλαδή: $A_K = C \times V_{\text{falcon}} \text{ cells}$

Στα σχήματα της εικόνας 2.1.3 φαίνεται πως προκύπτει ο αριθμός 10^4 που υπάρχει στον τύπο της C . Το καθένα από τα 4 μεγάλα τετράγωνα έχει διαστάσεις (1mm x 1mm) και η περιοχή ανάμεσα στην καλυπτρίδα και το σημείο που φορτώνεται το δείγμα έχει ύψος 0,1mm. Επομένως, ο όγκος υγρού που αντιστοιχεί σε κάθε τετράγωνο είναι 10^{-4} ($0,1\text{mm}^3$). Γι'αυτό το λόγο στον τύπο πολλαπλασιάζεται με το 10^4 .



Εικόνα 2.1.3: **A)** Απεικόνιση του μεγέθους των τετραγώνων της πλάκας Neubauer, **B)** Απεικόνιση ολόκληρης της πλάκας και των διαστάσεών της

2.1.5 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με Trypan Blue (TB)

Η ανάλυση με Trypan Blue ή αλλιώς η τεχνική αποκλεισμού χρωστικών (The Dye Exclusion Assay) χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση του ρυθμού ανάπτυξης και τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων που καλλιεργούνται. Η TB είναι μια διάζο-χρωστική που χρωματίζει επιλεκτικά τα νεκρά κύτταρα. Ο μηχανισμός δράσης της έγκειται στο ότι είναι ένα αρνητικά φορτισμένο αλλά και ογκώδες μόριο (≈ 960 Daltons), το οποίο δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα κύτταρα ή να διαπεράσει τη μεμβράνη τους υπό φυσιολογικές συνθήκες. Στην περίπτωση όμως των νεκρών κυττάρων, η μεμβράνη είναι διαρυσμένη σε αρκετά σημεία επιτρέποντας στην χρωστική να εισέλθει στο κύτταρο. Κατά την είσοδο της

στο εσωτερικό των κυττάρων η TB προσδένεται σε διάφορες ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες προσδίδοντας στο κυτταρόπλασμα ένα χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Ο χειρισμός και η απόρριψή της πρέπει να γίνονται με μεγάλη προσοχή καθώς θεωρείται καρκινογόνος ουσία. Παρακάτω αναφέρονται τα βήματα της διαδικασίας:

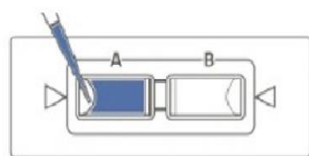
- Παίρνω μια ποσότητα από το εναιώρημα των κυττάρων την οποία αραιώνω, αν χρειάζεται, με PBS (1x)
- Σε ένα eppendorf (0,5mL) προστίθενται ίσες ποσότητες από το αραιωμένο εναιώρημα και από τη χρωστική (αναλογία 1-1): στη συγκεκριμένη εργασία προστέθηκαν 20μL εναιωρήματος + 20μL TB
- Επώαση του μείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά
- Παίρνω 10μL από το μείγμα και φορτώνω στην πλάκα Neubauer
- Μέτρηση των ζωντανών (διάφανα) και των νεκρών κυττάρων (μπλε) σε καθένα από τα 4 μεγάλα τετράγωνα της Neubauer: η μέτρηση είναι σημαντικό να διεκπεραιωθεί μέσα σε 3-5 λεπτά από την δημιουργία του μείγματος καθώς μεγαλύτερη διάρκεια επώασης οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο και μείωση της βιωσιμότητας, με αποτέλεσμα η μέτρηση να μην αντιπροσωπεύει τις συνθήκες της καλλιέργειας
- Η βιωσιμότητα του κυτταρικού πληθυσμού του δείγματος και κατ'έκταση της φλάσκας υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ\%} = \frac{\text{ΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΧΡΩΜΑΤΙΣΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ}}{\text{ΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ}} \times 100$$

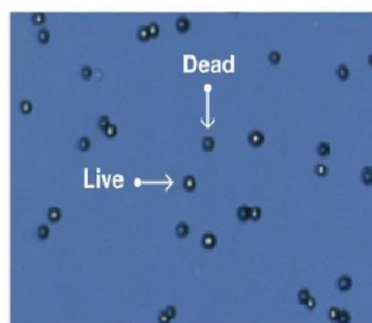
Σε περίπτωση που χρειάζεται να υπολογιστεί, για την Θνησιμότητα ισχύει ότι:

$$\text{ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ\%} = (100 - \text{ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ\%})$$

A)



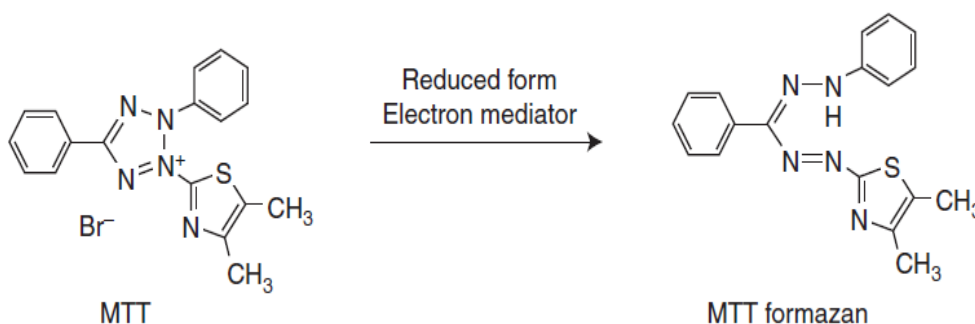
B)



Εικόνα 2.1.4: A) Απεικόνιση της εισόδου του δείγματος με τη χρωστική στην πλάκα Neubauer, B) Εικόνα νεκρών και ζωντανών κυττάρων όπως παρατηρούνται στο μικροσκόπιο

2.1.6 Ανάλυση της βιωσιμότητας κυττάρων με τη μέθοδο MTT

Η μέτρηση και η παρακολούθηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων είναι απαραίτητη σε μελέτες που χρησιμοποιούν κύτταρα. Ανάμεσα στις μεθόδους βιωσιμότητας που βασίζονται στη μετατροπή του υποστρώματος σε ένα χρωμογενές προϊόν από τα ζωντανά κύτταρα, η μέθοδος MTT αποτελεί μια από τις πιο ευέλικτες και δημοφιλείς αναλύσεις. Η μέθοδος MTT βασίζεται στη μετατροπή της υδατοδιαλυτής κίτρινης χρωστικής MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] στο αδιάλυτο μωβ φορμαζάνιο (formazan) μέσω της δράσης των μιτοχονδριακών αναγωγασών (mitochondrial reductase). Το formazan έπειτα διαλυτοποιείται και η συγκέντρωση προσδιορίζεται από την οπτική πυκνότητα στα 570nm. Το αποτέλεσμα είναι μια ευαίσθητη ανάλυση με εξαιρετική γραμμικότητα έως τα $\sim 10^6$ κύτταρα ανά πηγάδι (well). Επιτρέπει τη βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας κυττάρων αλλά και τον προσδιορισμό της κυτοκίνης, του αυξητικού παράγοντα ή της ορμονικής δραστηριότητας. Πιο σημαντικό είναι ότι, η κυτταροστατική φύση των αντικαρκινικών ενώσεων σε τοξικολογικές δοκιμές, η αποτελεσματικότητα των θεραπευτικών χημικών ουσιών στον φαρμακευτικό έλεγχο και η κυτταροτοξικότητα μπορούν να αξιολογηθούν μέσω της ποσοτικοποίησης και της παρακολούθησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που επιτρέπει η μέθοδος MTT. Μικρές μεταβολές στη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων μπορούν να προκαλέσουν μεγάλες αλλαγές στο MTT, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο να εξεταστούν στρεσογόνα γεγονότα στα κύτταρα υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων.



Εικόνα 2.1.5: Η μετατροπή της χρωστικής MTT στο φορμαζάνιο

Η διαδικασία αφορούσε στην επίστρωση κυττάρων σε 96-well plate και έχει ως εξής:

- Μέτρηση αριθμού κυττάρων της φλάσκας με τη χρήση Neubauer όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.1.4
- Μετά την εύρεση του αριθμού των κυττάρων της φλάσκας υπολογίζεται πόσα κύτταρα συνολικά χρειάζονται για την επίστρωση του 96-well plate και ο αντίστοιχος όγκος απ' το εναιώρημα

- Γίνεται μια 2^η μέτρηση στη Neubauer προς βεβαίωση ότι ο όγκος του εναιωρήματος περιέχει όσα κύτταρα απαιτούνται για τη διαδικασία
- Επίστρωση των κυττάρων στο plate έτσι ώστε ο όγκος του εναιωρήματος και ο όγκος του θρεπτικού (αν χρειάζεται να συμπληρωθεί), να καταλήγουν συνολικά σε $V_{\text{τελικό}} = 100\mu\text{L}$
- Επώαση κυττάρων στον κλίβανο για 24, 48 ή 72 ώρες: εξαρτάται από το χρονικό διάστημα στο οποίο θέλουμε να μετρήσουμε τη βιωσιμότητα τους
- Μετά το πέρας των ωρών κάθε περίπτωσης, ακολουθεί απόψυξη ενός eppendorf MTT-solution (-20°C) στο υδατόλουτρο για 15 λεπτά
- Προσθήκη 20μL MTT-solution σε κάθε well
- Το plate τυλίγεται με αλουμινόχαρτο καθώς το MTT είναι φωτοευαίσθητο και τοποθετείται σε ειδικό shaker για 2-3 λεπτά σε χαμηλές στροφές για να αναμειχθεί καλά το MTT με το υλικό των πηγαδιών
- Επώαση στον κλίβανο για 4 ώρες
- Μετά το πέρας των 4 ωρών προστίθενται 100μL 10% (w/v) SDS-solution και γίνεται καλή ανάδευση με πιπέτα ώστε να διαλυτοποιηθούν οι μωβ κρύσταλλοι φορμαζανίου που έχουν παραχθεί απ'τα ζωντανά κύτταρα
- Επώαση του plate στον κλίβανο overnight (o/n)
- Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (O.D.) σε μήκος κύματος απορρόφησης 550nm και μήκος κύματος αναφοράς 630nm στο φωτόμετρο Human Reader HS

Παρασκευή διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο:

- **MTT-solution (5mg/mL):**
 - Ζύγισμα 50mg σκόνης MTT σε ζυγό ακριβείας
 - Μεταφορά της σκόνης σε falcon (15mL)
 - Προσθήκη 10mL PBS(1x)
 - Καλή ανάδευση με σιφόνιο για λίγα λεπτά
 - Ανάδευση στο Vortex μέχρι να διαλυτοποιηθεί η σκόνη
 - Διέλευση του δ/τος από αποστειρωμένο φίλτρο με τη βοήθεια σύριγγας σε καινούριο falcon
 - Ισόποσο μοίρασμα των 10mL MTT-solution σε 10 eppendorfs (1,5mL)
 - Αποθήκευση των eppendorfs στους -20°C
- **10% (w/v) SDS-solution-0,01N HCl:**
 - Στο εργαστήριό μας υπήρχε έτοιμο δ/μα 10% SDS
 - 20mL απ' το δ/μα 10% SDS και μεταφορά σε falcon (50mL)
 - Παρασκευή 50mL 1N HCl σε νέο falcon (50mL): 4,14mL πυκνού HCl και συμπλήρωμα με δισαπεσταγμένο H₂O μέχρι τα 50mL
 - Προσθήκη 200μL 1N HCl στο falcon με τα 20mL SDS 10% (w/v)



Εικόνα 2.1.6: Φωτόμετρο Human Reader HS

2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ

Πίνακας 2.2-1: Αντιδραστήρια απομόνωσης RNA

ΥΛΙΚΑ ΜΕΘΟΔΟΥ
TRIzol REAGENT
ΧΛΩΡΟΦΟΡΜΙΟ
ΙΣΟΠΡΟΠΑΝΟΛΗ
75% ΑΙΘΑΝΟΛΗ

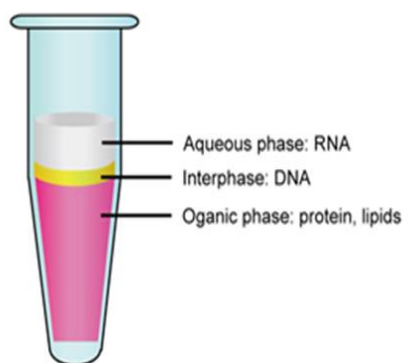
➤ Παρασκευή TRIzol Reagent:

- 38mL φαινόλης (κάτω φάση, 4°C) και μεταφορά σε ποτήρι ζέσεως για ανάδευση
- Προσθήκη 3,34mL Sodium Acetate (Οξικό Νάτριο) 3M με pH=5
- Προσθήκη 5mL Γλυκερόλης 5%

- Σε ζυγό ακριβείας ζυγίζονται 9,453g Guanidine Thiocyanate και 7,612g Ammonium Thiocyanate
- Προσθήκη στο ποτήρι ζέσεως
- Ογκομέτρηση στα 100mL με απεσταγμένο H₂O
- Τοποθέτηση του δοχείου ζέσεως πίσω στον αναδευτήρα μέχρι να γίνει ομοιογενές το δ/μα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από φλάσκες (25cm², 75cm²) με κύτταρα H929 και U266 τα οποία βρίσκονταν υπό την επίδραση των παραγόντων Bortezomib, Carfilzomib αλλά και από φλάσκες στις οποίες δεν είχε προστεθεί παράγοντας. Η πορεία είχε ως εξής:

- Μεταφορά του υλικού της φλάσκας σε ένα falcon (15mL) με σιφόνιο
- Φυγοκέντρηση για 7 λεπτά σε 250g
- Απόχυση του υπερκειμένου
- Προσθήκη 1mL TRIzol Reagent στο ίζημα των κυττάρων, καλή ανάδευση με πιπέτα και μεταφορά του περιεχομένου σε eppendorf (1,5mL)
- Αποθήκευση στους -80°C ή απομόνωση την ίδια μέρα και ακολουθούνται απευθείας τα επόμενα βήματα
- Προσθήκη 200μL Χλωροφορμίου και ανακίνηση του eppendorf: αν το δείγμα είχε αποθηκευτεί στους -80°C γίνεται πρώτα απόψυξη
- Επάση στον πάγο για 10 λεπτά. Μόλις περάσουν τα 5 πρώτα λεπτά γίνεται μια 2^η ανακίνηση
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 rpm ωστέ να δημιουργηθούν οι τρεις φάσεις
- Λήψη ≈350μl από την υδατική φάση (aqueous phase) που περιέχει το RNA και μεταφορά σε ένα καινούριο eppendorf



Εικόνα 2.2.1: Φάσεις διαχωρισμού κατά την απομόνωση RNA

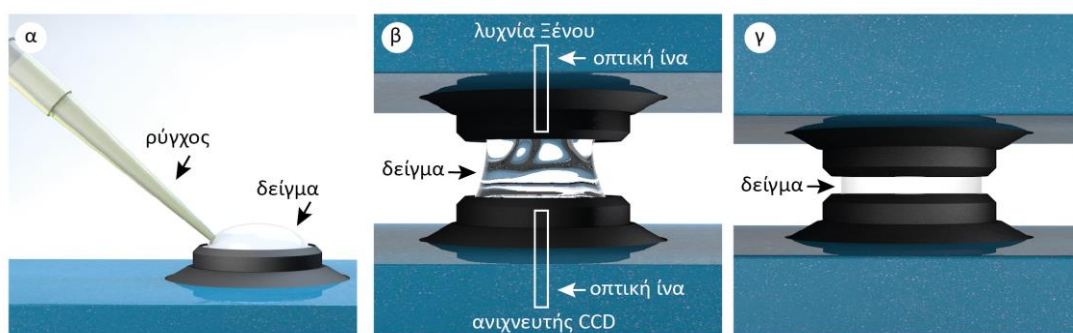
- Προσθήκη 500μL Ισοπροπανόλης και καλή ανακίνηση

- Επώαση στον πάγο για 10 λεπτά. Μόλις περάσουν τα πρώτα 5 λεπτά γίνεται μια 2^η ανακίνηση
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000rpm
- Απόρριψη της ισοπροπανόλης με τη χρήση πιπέτας σε ένα ποτήρι ζέσεως
- Προσθήκη 1mL 75% Αιθανόλης (EtOH)
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000rpm
- Απομάκρυνση της αιθανόλης με εφαρμογή κενού (air-dry)
- Αναδιαλυτοποίηση του ιζήματος RNA σε 60μL H₂O RNase-DNase Free. Βεβαιωνόμαστε ότι η αναδιαλυτοποίηση έγινε καλά ώστε οι παρακάτω μετρήσεις να 'ναι αντικειμενικές
- Μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου. Το μηχάνημα συνδέεται με Η/Υ και δίνει δύο μετρήσεις:

$$C_{RNA} = O.D.(280nm) \text{ ng}/\mu L$$

$$\text{Καθαρότητα δείγματος} = \frac{O.D.(260nm)}{O.D.(280nm)}$$

Σημείωση: η καθαρότητα του δείγματος είναι καθαρός αριθμός. Για τιμές καθαρότητας 1,8-2 ένα δείγμα RNA θεωρείται πως είναι καθαρό. Τιμές του λόγου από 1,7 και κάτω είναι ενδεικτικές της ύπαρξης προσμίξεων, συνήθως είτε πρωτεϊνών είτε φαινόλης που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της απομόνωσης.



Εικόνα 2.2.2: (α) Τοποθέτηση σταγόνας με τη βοήθεια πιπέτας, (β) θέση της λυχνίας και του ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας, (γ) η κεφαλή τοποθετείται σε συγκεκριμένη σταθερή απόσταση

2.2.1 Ποιοτικός έλεγχος νουκλεϊκών οξέων - Ηλεκτροφόρηση

Πίνακας 2.2-2: Υλικά ηλεκτροφόρησης

ΥΛΙΚΑ ΜΕΘΟΔΟΥ
ΒΡΩΜΙΟΥΧΟ ΑΙΘΙΔΙΟ (EtBr)
ΧΡΩΣΤΙΚΗ
Tris/Borate/EDTA buffer (TBE 0,5x)
ΣΚΟΝΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης είναι ο απλούστερος τρόπος διαχωρισμού και ανάλυσης των νουκλεϊκών οξέων. Πρόκειται για μια τεχνική που διαχωρίζει φορτισμένα μόρια όπως DNA, RNA ή πρωτεΐνες, με βάση το μέγεθός τους. Το πήκτωμα αγαρόζης είναι ένα στερεό πορώδες υπόστρωμα μέσα από τους πόρους του οποίου μπορούν να κινηθούν τα μόρια αυτά. Όταν εφαρμοστεί ηλεκτρική τάση στο πήκτωμα αγαρόζης, τότε η μία άκρη του αποκτά θετικό και η άλλη αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα τα φορτισμένα μόρια να μεταναστεύουν πάντα προς τον αντίθετο πόλο από το φορτίο τους. Για παράδειγμα το αρνητικά φορτισμένο DNA ή RNA κινείται προς τον θετικό πόλο. Τα μικρότερου μεγέθους μόρια κινούνται πιο γρήγορα μέσα στους πόρους του πηκτώματος σε σχέση με τα μεγαλύτερα κι έτσι διανύουν μεγαλύτερη απόσταση. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που πολυμερίζεται στους 100°C δημιουργώντας ένα κολλώδες δ/μα το οποίο πήζει σε θερμοκρασία μικρότερη από 45°C σχηματίζοντας, όπως προαναφέρθηκε, πόρους στο εσωτερικό του. Ανάλογα με τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα σχηματίζονται πόροι που επιτρέπουν το διαχωρισμό μορίων μεγέθους από 50 ζεύγη βάσεων (bp) μέχρι 60 κιλοβάσεις (kb). Καθώς μετακινούνται τα διαφορετικά μόρια RNA ή DNA σχηματίζουν χαρακτηριστικές ζώνες σε διαφορετικές θέσεις του πηκτώματος ανάλογα με την ηλεκτροφορητική κινητικότητα τους. Στο πήκτωμα της αγαρόζης περιέχεται EtBr, μια χρωστική που δεσμεύεται στα νουκλεϊκά οξέα και φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV), με αποτέλεσμα να γίνονται ορατές οι ζώνες υπό ακτινοβολία UV.

Το rRNA αποτελεί το 80% περίπου του ολικού RNA του κυττάρου, και επομένως αποτελεί έναν καλό δείκτη της ποιότητας του RNA που απομονώνεται από ένα κύτταρο. Τα κυριότερα μόρια RNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι το 28S και το 18S rRNA. Επομένως, η παρουσία δύο έντονων ζωνών κάτω από φωτισμό UV

στο πήκτωμα αγαρόζης, που αντιστοιχούν στο 28S και 18S rRNA, αλλά και η μεταξύ τους 2:1 αναλογία, αποτελούν ενδείξεις της ακεραιότητας του ολικού RNA. Αντίθετα, πολύ αχνές ζώνες για το 28S και 18S ή ακόμα και απουσία τους, καθώς και εμφάνιση κατακερματισμένων τμημάτων χαμηλού μοριακού βάρους υποδηλώνουν κακή ποιότητα του απομονωμένου RNA, το οποίο έχει υποστεί εκτεταμένη αποικοδόμηση και είναι ακατάλληλο για περαιτέρω χρήση στα πειράματα. Με αυτό τον τρόπο θέλαμε να ελέγξουμε την ποιότητα του RNA μας μετά από την διαδικασία της απομόνωσης, δηλαδή αν είχε κοπεί από ενδονουκλεάσες (σχηματισμός smear) αλλά και της καθαρότητας, δηλαδή αν υπήρχαν προσμίξεις πρωτεϊνών και DNA στο δείγμα μας. Η ηλεκτροφόρηση, όμως, χρησιμοποιήθηκε και για τον έλεγχο προϊόντων DNA από Real Time PCR σε σχέση με κάποιον ποσοτικοποιημένο μάρτυρα (ο οποίος περιέχει κομμάτια DNA γνωστού μεγέθους και συγκέντρωσης).

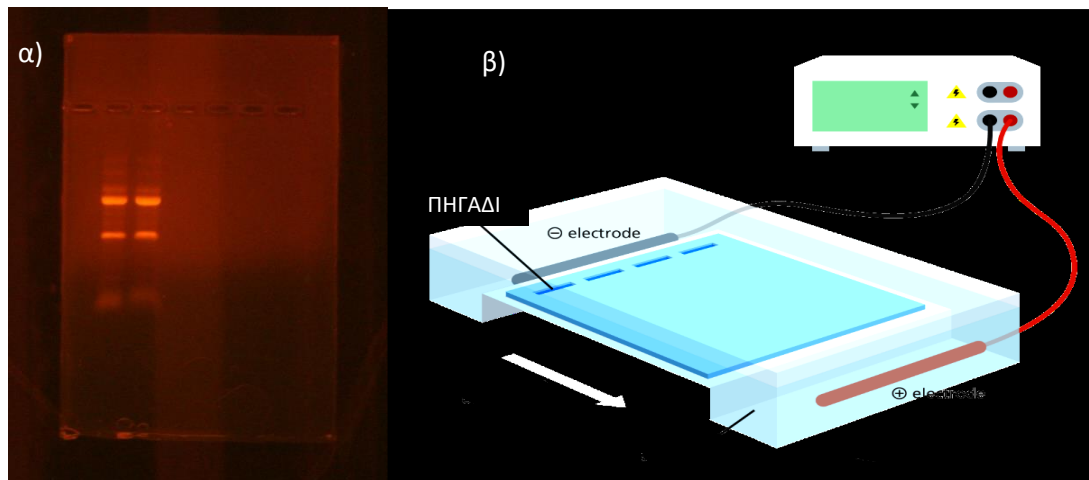
Για τον ποιοτικό έλεγχο δειγμάτων RNA:

➤ Προετοιμασία δειγμάτων

- Απομόνωση του RNA και προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA κάθε δείγματος στο φασματοφωτόμετρο
- Μετατροπή της τιμής της συγκέντρωσης σε $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- Βρίσκω πόσα μL πρέπει να πάρω από κάθε δείγμα ώστε να τρέξω $1\mu\text{g}$ RNA στην ηλεκτροφόρηση
- Θέλω τελικό όγκο ηλεκτροφόρησης $V_T = 12\mu\text{L}$. Επειδή η χρωστική είναι 6x για $V_T = 12\mu\text{L}$ θα προσθέσω $2\mu\text{L}$ χρωστικής σε κάθε δείγμα
- Εφόσον ξέρω τον όγκο του δείγματος και της χρωστικής που πρέπει να βάλω συμπληρώνω μέχρι τα $12\mu\text{L}$ με TBE

➤ Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1%

- Για την παρασκευή 50mL δ/τος αγαρόζης 1% ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας $0,5\text{g}$ σκόνης αγαρόζης
- Μεταφορά της σκόνης σε κωνική φιάλη
- Ογκομέτρηση σε κύλινδρο 50mL TBE (0,5x) και μεταφορά του υγρού στην κωνική φιάλη
- Τοποθέτηση της φιάλης σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί τελείως η σκόνη και να 'ναι διαυγές το δ/μα
- Μεταφορά του περιεχομένου σε falcon (50mL)
- Προσθήκη με πιπέτα $2,6\mu\text{L}$ EtBr ($1\mu\text{L}$ EtBr για 20mL αγαρόζης)
- Ανακίνηση του falcon ώστε να πάει παντού το EtBr
- Έγχυση του δ/τος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης ώστε παγώνοντας να πάρει τη μορφή πηκτώματος



Εικόνα 2.2.3: α) Εμφάνιση των ζωνών που αντιστοιχούν στο 28S και 18S rRNA σε δείγματα RNA υπό φωτισμό UV, β) Συσκευή ηλεκτροφόρησης και ρευματοδότησης

2.3 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (REVERSE TRANSCRIPTION/RT)

Αντίστροφη μεταγραφή, Reverse Transcription (RT), ονομάζεται η σύνθεση μιας συμπληρωματικής (complementary) αλυσίδας DNA (cDNA) έχοντας ως εκμαγείο ένα μόριο RNA. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (ή αντίστροφη τρανσκριπτάση), το οποίο στη φύση βρίσκεται σε RNA-ιούς (ρετροϊούς) όπως ο ιός HIV. Το ένζυμο μετατρέπει το γενετικό υλικό του ιού από τη μορφή του μονόκλωνου RNA σε δίκλωνο DNA, έτσι ώστε να μπορεί να ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό των κυττάρων ξενιστών. Στην παρούσα διπλωματική έγινε αντίστροφη μεταγραφή στα δείγματα RNA κυτταρικών σειρών H929 και U266, υπό ή χωρίς την επίδραση παραγόντων, που απομονώθηκαν.

Δείγμα: Για την αντίδραση της RT θέλαμε 1μg RNA από κάθε δείγμα. Επομένως, από την τιμή συγκέντρωσης που πήραμε στο φασματοφωτόμετρο υπολογίσαμε πόσα μL έπρεπε να πάρουμε από κάθε δείγμα ώστε να περιέχεται σε αυτά 1μg RNA.

Πίνακας 2.3-1: Αντιδραστήρια αντίστροφης μεταγραφής

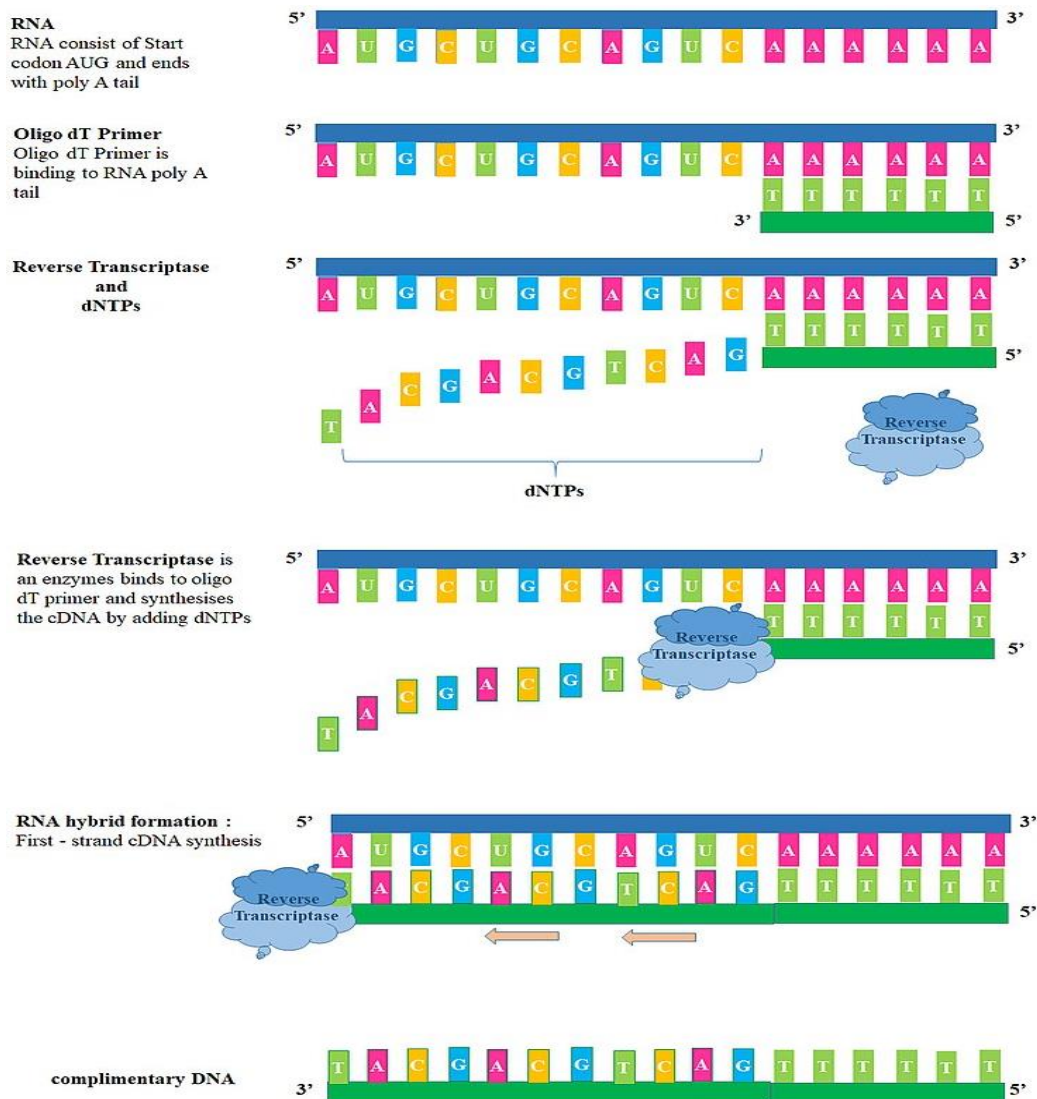
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ ΑΝΑ ΔΕΙΓΜΑ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΕΤΑΙΡΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
Εκκινητής Oligo-dTs	1μL	10μM	0,5μM	-
Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)	2μL	10mM	1mM	HyTest
Αντίστροφη μεταγραφάση MuV	1μL	200.000U/mL	10U/μL	BioLabs
Buffer MuV	2μL	10x	1x	BioLabs
RNase Inhibitor	0,25μL	40.000U/μL	0,5U/μL	BioLabs
H ₂ O RNase-DNase Free	Εξαρτάται από τον όγκο του δείγματος RNA	-	-	-

Ο τελικός όγκος αντίδρασης για κάθε δείγμα ήταν $V_T = 20\mu\text{L}$ και η διαδικασία είχε ως εξής:

- Τοποθέτηση όλων των αντιδραστηρίων σε πάγο, πλην του ενζύμου
- Λίγο πριν ξεκινήσει η διαδικασία αποψύχονται από τους -80°C τα δείγματα RNA
- Μόλις ξεπαγώσουν γίνεται Vortex του Buffer και spin down των dNTPs
- Προσθήκη σε eppendorfs (0.5mL) των oligo-dTs, μετά από καλή ανάδευση, του δείγματος και H₂O μέχρι τα 12μL: οι εκκινητές oligo-dTs είναι ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης που υβριδίζονται στην πολυ-Α ουρά των mRNAs
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στον θερμοκυκλοποιητή στους 65°C για 5 λεπτά: σε αυτό το στάδιο γίνεται η υβριδοποίηση με τους εκκινητές oligo-dTs
- Στην αναμονή παρασκευάζεται ένα POOL που περιλαμβάνει το Buffer του ενζύμου, τα dNTPs, τον RNase Inhibitor και στο τέλος προστίθεται η MuV. Τα αντιδραστήρια αυτά μπαίνουν στο POOL σε όγκους πολλαπλασιασμένους επί (τον αριθμό των δειγμάτων + 0,5). Για παράδειγμα αν έχω 8 δείγματα πολλαπλασιάζεται ο κάθε όγκος με το 8,5. Αυτό το βήμα είναι σημαντικό για να αποφευχθούν τα σφάλματα των πιπετών και των ανθρώπινων χειρισμών αλλά και να

είναι μεγαλύτερος ο όγκος του κάθε αντιδραστηρίου ώστε να κατανεμηθεί ομοιογενώς στο δ/μα. Η προσθήκη του RNase Inhibitor προστατεύει το RNA από τη δράση ενδοριβονουκλεασών.

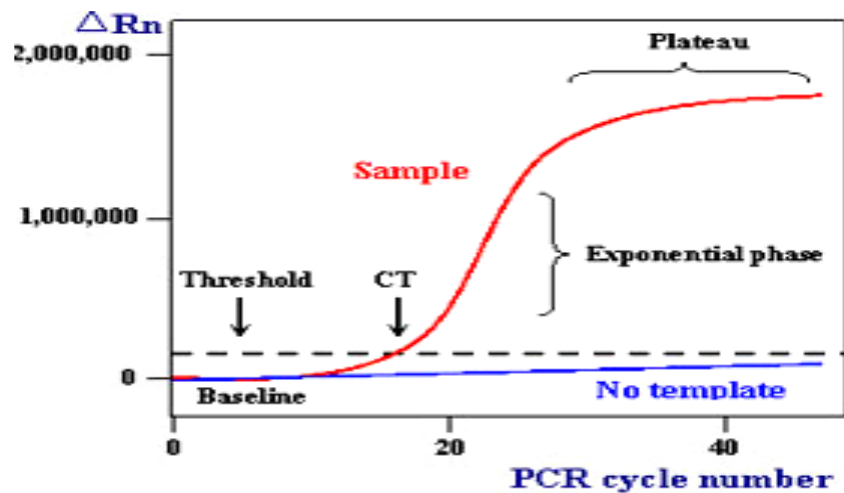
- Μετά το πέρας των 5 λεπτών στους 65°C ισομοιράζεται το POOL στα δείγματα
- Τα δείγματα τοποθετούνται πίσω στο θερμοκυκλοποιητή για 1 ώρα στους 42°C: στη θερμοκρασία αυτή δρα βέλτιστα το ένζυμο MuIV το οποίο δημιουργεί ένα υβριδικό δίκλωνο μόριο cDNA-RNA με την προσθήκη των dNTPs με βάση την αρχή της συμπληρωματικότητας
- Μετά το πέρας της 1 ώρας, η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 65°C για 20 λεπτά: με τη θέρμανση αυτή καταστρέφονται η αντίστροφη μεταγραφάση και η αρχική αλυσίδα RNA
- Βγαίνουν τα δείγματα από τον θερμοκυκλοποιητή και αραιώνονται με προσθήκη 20μL H₂O RNase-DNase Free σε καθένα.
- Αποθήκευση στους -20°C



Εικόνα 2.3.1: Τα στάδια της αντίστροφης μεταγραφής

2.4 ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION/ RT-PCR)

Η ποσοτική PCR (Quantitative PCR, qPCR) είναι μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος, η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Υπάρχουν δύο είδη ποσοτικής PCR: η τελικού σημείου (endpoint) και η πραγματικού χρόνου (Real-Time) PCR. Στην end-point PCR ο υπολογισμός του προϊόντος πραγματοποιείται στο τέλος της αντίδρασης, με εμφανές μειονέκτημα τη μείωση της αποδοτικότητας της αντίδρασης, λόγω της κατανάλωσης των αντιδρώντων και της συσσώρευσης αναστολέων, κάτι που δυσχεραίνει την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση. Αντίθετα, στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντικό παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος.

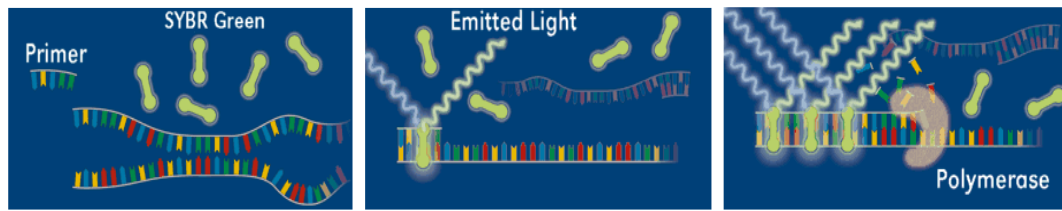


Εικόνα 2.4.1: Καμπύλη ενίσχυσης Real Time PCR

2.4.1 Φθορίζουσα χρωστική-Μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης

Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκε ως φθορίζουσα χρωστική η SYBR Green η οποία δεσμεύεται σε μόρια δίκλωνου DNA. Η ουσία αυτή διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm. Σημειώνεται ότι η SYBR green δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα. Ωστόσο, η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

Η χρήση μη ειδικών συστημάτων ανίχνευσης παρουσιάζει τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της SYBR green είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας-στόχου, γεγονός που την καθιστά πολύ πιο οικονομική μέθοδο από την χρήση ειδικού ανιχνευτή (probe). Επιπλέον, συνιστά μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο, καθώς σε κάθε μόριο DNA που συντίθεται δεσμεύονται πολλά μόρια χρωστικής, με αποτέλεσμα την ενίσχυση του προκύπτοντος σήματος. Αντίθετα, σημαντικό μειονέκτημα της SYBR green αποτελεί το γεγονός ότι προσδένεται σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύπτουν. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε λανθασμένη υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της αλληλουχίας-στόχου. Παρόλα αυτά υπάρχει τρόπος να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί. Ο σωστός σχεδιασμός ειδικών εκκινητών όπως επίσης και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, μπορούν να συμβάλλουν στην αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών. Επιπλέον, η μελέτη των καμπύλων αποδιάταξης (melting curves) μετά το πέρας της αντίδρασης, δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προέκυψε από την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου από τους φθορισμούς που οφείλονται στα διμερή των εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα.



Εικόνα 2.4.2: Περιγραφή της λειτουργίας της χρωστικής SYBR Green

2.4.2 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης

Υπάρχουν δύο μέθοδοι ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων της PCR: η απόλυτη και η σχετική ποσοτικοποίηση. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων στη συγκεκριμένη διπλωματική έγινε μέσω της σχετικής ποσοτικοποίησης. Στη περίπτωση της σχετικής ποσοτικοποίησης, οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του mRNA ενός γονιδίου-στόχου, προσδιορίζονται σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα ενός παράλληλα ενισχυόμενου mRNA, ενός κατάλληλου ενδογενούς, συστατικά εκφραζόμενου, γονιδίου-ελέγχου (internal control). Επιπλέον, πραγματοποιείται σύγκριση των Ct τιμών των δειγμάτων προς ανάλυση με τις αντίστοιχες τιμές ενός δείγματος-αναφοράς (π.χ. RNA από φυσιολογικό ιστό στη περίπτωση εξέτασης παθολογικού δείγματος). Οι τιμές Ct του mRNA-στόχου, τόσο των δειγμάτων προς εξέταση όσο και του δείγματος-αναφοράς, κανονικοποιούνται ως προς τις αντίστοιχες τιμές του ενδογενούς γονιδίου-ελέγχου. Η κανονικοποίηση ως προς το ενδογενές γονίδιο απαιτείται για τη διόρθωση των πιθανών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων, οι οποίες οφείλονται σε διαφορετική συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (cDNA) ή σε διαφορές στην αποδοτικότητα της αντίδρασης ενίσχυσης.

Η μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης χαρακτηρίζεται μαθηματικά από την εξίσωση $2^{-\Delta\Delta Ct}$, όπου $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ δείγματος - ΔCt γονιδίου αναφοράς. Η ΔCt δείγματος είναι η κανονικοποιημένη τιμή Ct για κάθε δείγμα, ως προς την αντίστοιχη τιμή του ενδογενούς γονιδίου συστατικής έκφρασης, ενώ η τιμή ΔCt αναφοράς είναι η αντίστοιχα κανονικοποιημένη τιμή Ct για το δείγμα αναφοράς. Εξ' ορισμού, για το δείγμα αναφοράς ισχύει ότι $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^0 = 1$, οπότε η διαφορά στην έκφραση του γονιδίου στόχου στο δείγμα αναφοράς σε σχέση με τον εαυτό του ισούται με 1. Οι αντίστοιχες εξισώσεις για τα υπόλοιπα δείγματα δείχνουν πόσες φορές είναι αυξημένη ή μειωμένη η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-στόχου, στα δείγματα αυτά, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς.

➤ Στάδια αντίδρασης Real Time PCR στο θερμοκυκλοποιητή:

- **1^ο Στάδιο: DNA denaturation (αποδιάταξη) 95°C για 3 λεπτά**
Όταν το DNA θερμαίνεται η διπλή έλικα αρχίζει να αποδιάσσεται και το φαινόμενο αυτό αναφέρεται ως τήξη (melting). Από τη στιγμή που το ζεύγος A=T ενώνεται με δύο δεσμούς υδρογόνου, σε αντίθεση με το ζεύγος C≡G που ενώνεται με τρεις, περιοχές του DNA με μεγάλη συγκέντρωση A και T θα διαχωριστούν πρώτες. Η θερμοκρασία κατά την οποία το μισό DNA είναι πλέον μονόκλωνο

ονομάζεται melting temperature (T_m). Η T_m των μορίων DNA δεν είναι ίδια και εξαρτάται από το μήκος της αλυσίδας DNA και από την αναλογία βάσεων A,T,C,G που περιέχει.

- **2^ο Στάδιο: DNA annealing (επαναδιάταξη και υβριδισμός εκκινητών με τις μονόκλωνες αλυσίδες DNA) 60° C για 1 λεπτό**
Απαιτεί δύο εκκινητές (PRIMERS) μήκους 17-30 βάσεων που μαρκάρουν τον στόχο DNA που θέλουμε να αντιγραφεί και των οποίων τα 3' άκρα πρέπει να είναι αντικρυστά.
- **3ο Στάδιο: DNA extension (επιμήκυνση) 60° C για 1 λεπτό**
Δράση της DNA πολυμεράσης σε περιβάλλον περίσσειας των τεσσάρων φωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων έχει σαν αποτέλεσμα την επιμήκυνση των εκκινητών με κατεύθυνση 5' → 3' και σύνθεση συμπληρωματικής ως προς τη μητρική, νέας αλυσίδας DNA με ταχύτητα αύξησης αλυσίδας 500 – 1000 ζεύγη βάσεων ανά λεπτό.
- **4ο Στάδιο: Τελική επιμήκυνση**

Σημείωση: τα στάδια 2-3 επαναλαμβάνονται για 40 κύκλους στο μηχάνημα

Πίνακας 2.4-1 : Αντιδραστήρια αντίδρασης Real Time PCR

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ ΑΝΑ ΠΗΓΑΔΙ	ΟΓΚΟΣ ΔΙΠΛΕΤΑΣ (ΟΓΚΟΣ ΑΝΑ ΠΗΓΑΔΙ x 2,2)	ΕΤΑΙΡΙΑ
Kit SYBR Green Rox-DNA Polymerase	5μL	11μL	Merck
Forward Εκκινητής (1μM)	1μL	2,2μL	-
Reverse Εκκινητής (1μM)	1μL	2,2μL	-
H ₂ O RNase-DNase Free	2μL	4,4μL	-

Πίνακας 2.4-2: Αλληλουχίες και ονόματα forward εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

ΜΕΤΑΓΡΑΦΟ	ΟΝΟΜΑ FORWARD ΕΚΚΙΝΗΤΗ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
HPRT1	F2	5' TGGAAAGGGTGTTTATTCCTCAT 3'
RNase K κανονικό	Ex1F	5' AGCGCCTGGGGAGTGATC 3'
RNase K 4	Ex1(2)/2F	5' GAGTGATCATTAATCCACCCACC 3'
RNase K 7	1ext/3F	5' ACTCCCCGATAATGCTCGGAA 3'
RNase K 9	1/3extF ή 1/ext3F	5' ATGTTGTCTACCCATTCCCCTT 3'
RNase K 14	Ex2F	5' GAAGTGCCGGTTCTCCCTC 3'
RNase K 20	1/3F	5'GGAGTGATCATGTTGATAATGCTCG 3'

Πίνακας 2.4-3: Αλληλουχίες και ονόματα reverse εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

ΜΕΤΑΓΡΑΦΟ	ΟΝΟΜΑ REVERSE ΕΚΚΙΝΗΤΗ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
HPRT1	R3	5' ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA 3'
RNase K κανονικό	Ex3/4R	5' CTGGGGGCCATTCTCAAAATCT 3'
RNase K 4	Ex2R	5' TGGATTCGGACTCAGCCAC 3'
RNase K 7	Ex3/4R	5' CTGGGGGCCATTCTCAAAATCT 3'
RNase K 9	Ex3/4R	5' CTGGGGGCCATTCTCAAAATCT 3'
RNase K 14	Ex2/4R	5' GCCATTCTGGATTCGGACTCAG 3'
RNase K 20	V20ext	5'TACTTTATTCAATCTTTCAAAATCTTTCTC3'

Δείγμα: cDNA που έχει προκύψει με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.3. Σε κάθε πηγάδι (V=10μL) θέλαμε 1μL δείγματος και φτιάχτηκαν διπλέτες (duplicates). Επομένως, από κάθε δείγμα πήραμε 2,2μL για την αντίδραση.

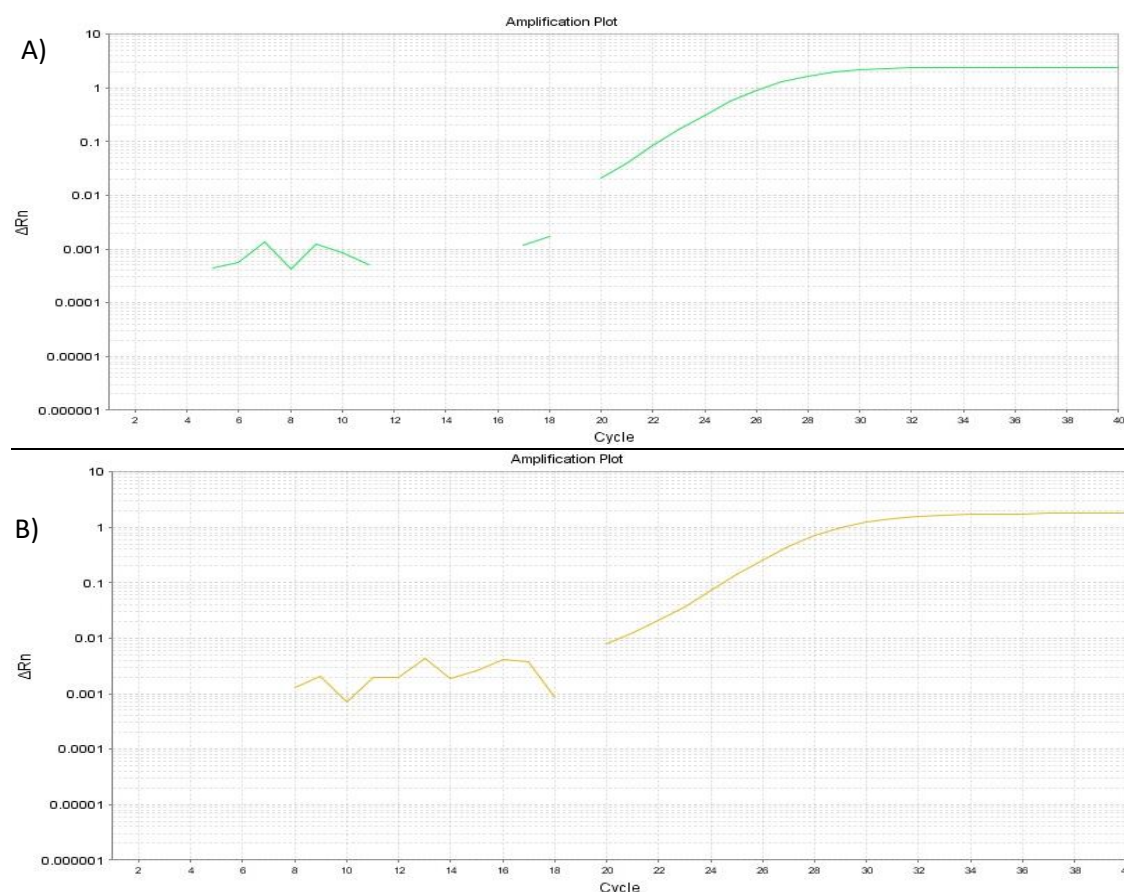
➤ **Προετοιμασία δειγμάτων για την ολοκλήρωση του plate:**

- Τοποθέτηση των δειγμάτων cDNA, των εκκινητών και του H₂O σε πάγο
- Μόλις ξεπαγώσουν γίνεται Vortex και spin down στα cDNAs και τους εκκινητές
- Παίρνω 2,2μL από κάθε δείγμα cDNA και μεταφέρω σε καινούριο eppendorf (0,5mL)
- Παρασκευή του MASTER MIX για κάθε μετάγραφο, το οποίο περιλαμβάνει τους εκκινητές (αρχική συγκέντρωση=1μM), H₂O και τη SYBR Green με το ένζυμο σε ποσότητες που προκύπτουν πολλαπλασιάζοντας τους όγκους του duplicate που φαίνονται στον Πίνακα 2.4-1 με έναν αριθμό πάνω από αυτόν των δειγμάτων
- Καλή ανάδευση με πιπέτα
- Προσθήκη 19,8μL από το MASTER MIX σε κάθε eppendorf που περιέχει 2,2μL δείγματος
- Vortex και spin down στα δείγματα
- Προσθήκη 10μL σε κάθε πηγάδι του plate
- Σφράγισμα του plate με ειδική μεμβράνη

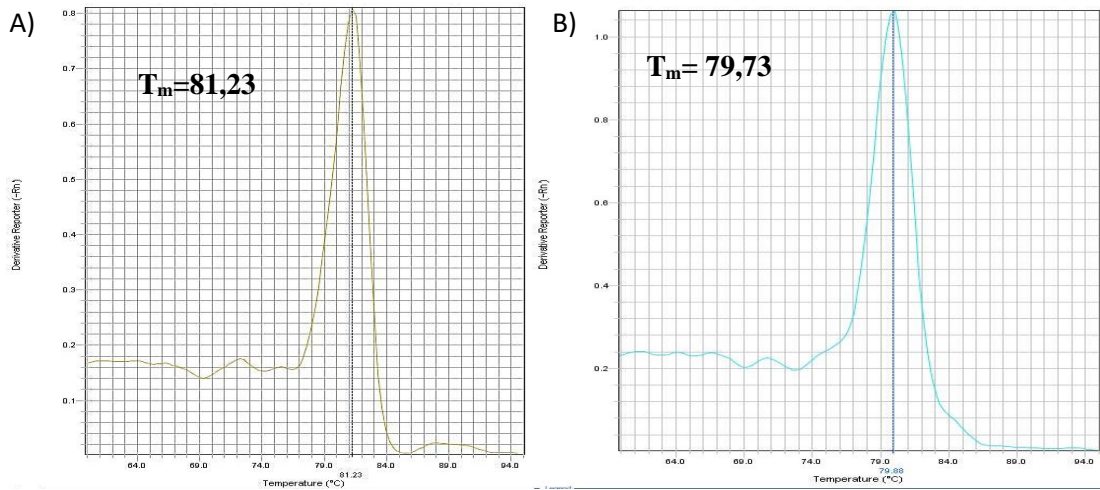
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΗΣ RNase κ

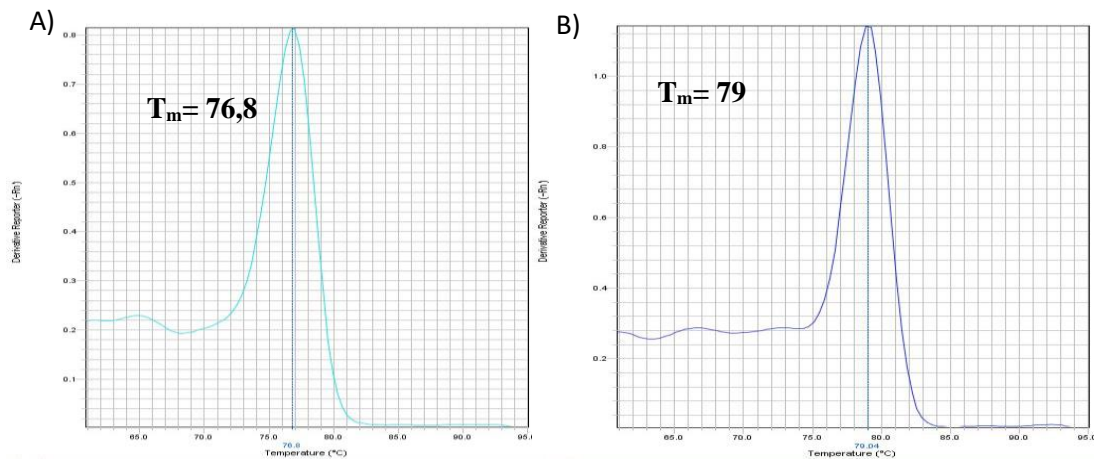
Δεδομένου ότι στην παρούσα μελέτη ασχοληθήκαμε με την έκφραση των μεταγράφων της RNase κ στις καρκινικές κυτταρικές σειρές H929 και U266 υπό την επίδραση παραγόντων, πραγματοποιήθηκε αρχικά Real Time PCR σε δείγματα cDNA από τις κυτταρικές σειρές ώστε να επιβεβαιωθεί η έκφραση των μεταγράφων κλασικό, 4, 7, 9, 14, 20 και να ελεγχθεί η ποιότητα του προϊόντος της αντίδρασης. Στη διαδικασία αυτή συμπεριλήφθηκε και το γονίδιο της HPRT-1 ως γονίδιο αναφοράς. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ήταν οι βέλτιστες, έτσι ώστε για κάθε μελετούμενο μετάγραφο να υπάρχει μοναδικό προϊόν και όσο το δυνατόν λιγότερα διμερή εκκινητών. Στην εικόνα 3.1.1 παρουσιάζονται ενδεικτικά οι καμπύλες ενίσχυσης για το γονίδιο της HPRT-1 και για το κλασικό μετάγραφο. Στις εικόνες 3.1.2-5 παρουσιάζονται οι καμπύλες αποδιάταξης για το γονίδιο της HPRT-1 και για τα εναλλακτικά μετάγραφα. Παρουσιάζονται μόνο τα αποτελέσματα της κυτταρικής σειράς H929 για λόγους ευχέρειας.



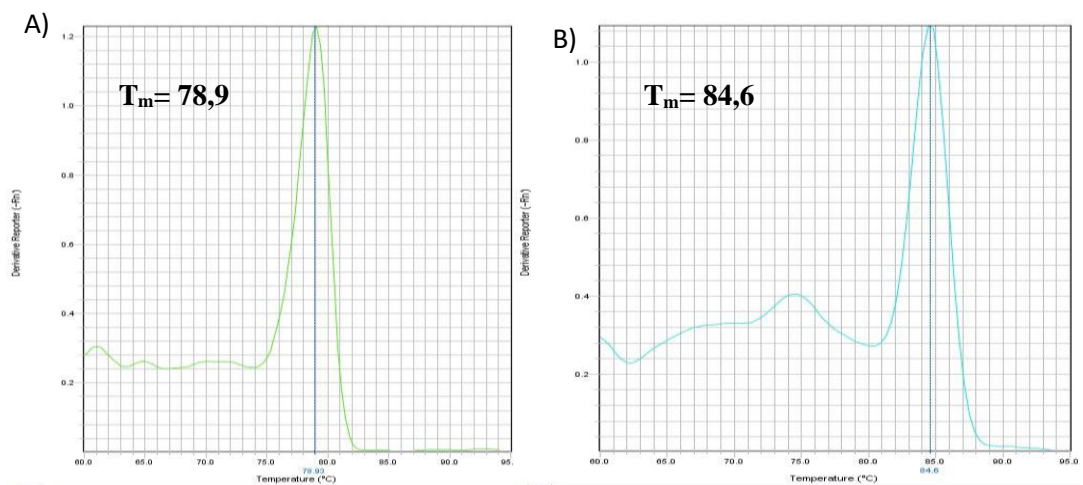
Εικόνα 3.1.1: Καμπύλες ενίσχυσης Real Time PCR για **A)** το γονίδιο της HPRT-1 και **B)** το κλασικό μετάγραφο της RNase κ



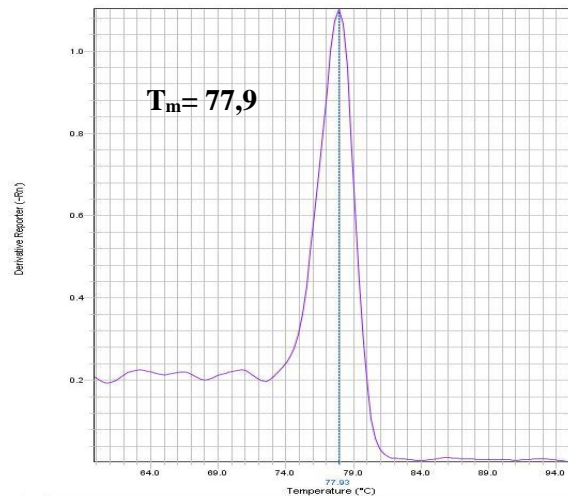
Εικόνα 3.1.2: Καμπύλες αποδιάταξης Real Time PCR **A)** για το γονίδιο της *HPRT-1* και **B)** για το κλασικό μετάγραφο



Εικόνα 3.1.3: Καμπύλες αποδιάταξης Real Time PCR **A)** για το μετάγραφο 4 και **B)** για το μετάγραφο 7



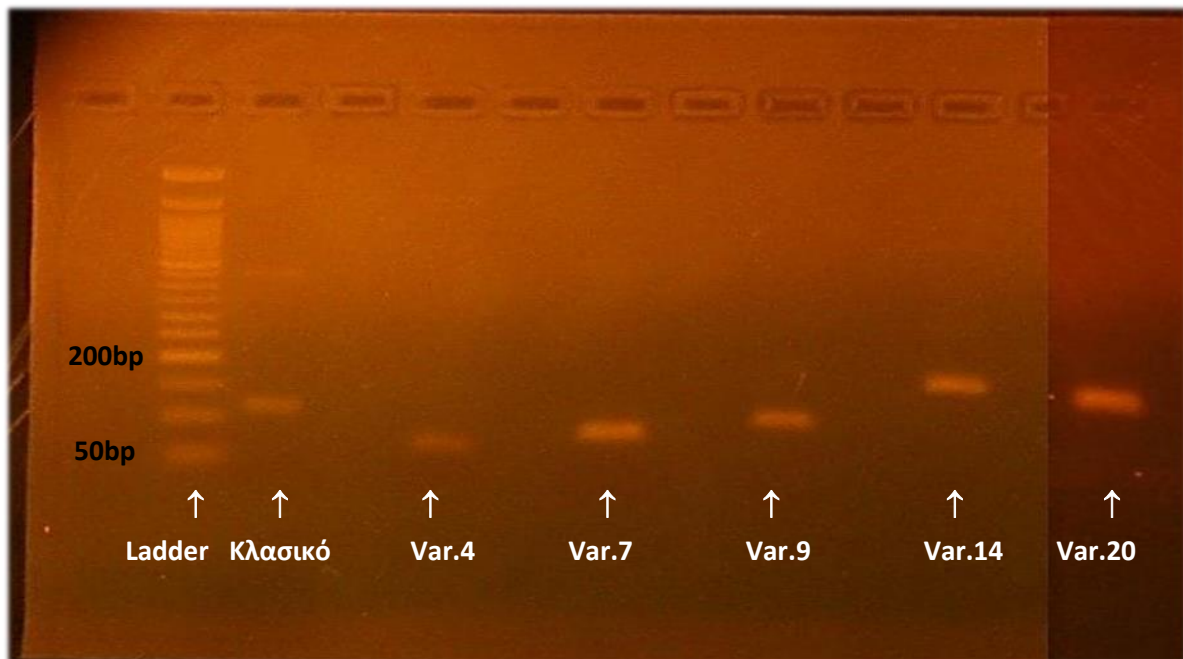
Εικόνα 3.1.4: Καμπύλες αποδιάταξης Real Time PCR **A)** για το μετάγραφο 9 και **B)** για το μετάγραφο 14



Εικόνα 3.1.5: Καμπύλη αποδιάταξης Real Time PCR για το μετάγραφο 20

Στις παραπάνω καμπύλες αποδιάταξης φάνηκε η μοναδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης. Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της Real Time PCR, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5%, έτσι ώστε να ελεγχθούν περαιτέρω ως προς το μέγεθος και τη μοναδικότητά τους. Χρησιμοποιήθηκε 50bp DNA Ladder από την εταιρία BioLabs και για να επαληθεύσουμε τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης βρέθηκε το αναμενόμενο μήκος κάθε μεταγράφου μέσω διασταύρωσης των αλληλουχιών τους από το GenBank αλλά και των θέσεων στις οποίες προσδένονται οι εκκινητές του καθενός. Τα αναμενόμενα μήκη για κάθε μετάγραφο ήταν:

Κλασικό Μετάγραφο	→ 114bp
Εναλλακτικό Μετάγραφο 4	→ 227bp
Εναλλακτικό Μετάγραφο 7	→ 98bp
Εναλλακτικό Μετάγραφο 9	→ 118bp
Εναλλακτικό Μετάγραφο 14	→ 186bp
Εναλλακτικό Μετάγραφο 20	→ 108bp



Εικόνα 3.1.6: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων ενίσχυσης Real Time PCR για τα εναλλακτικά μετάγραφα κλασικό, 4, 7, 9, 14 και 20 της RNase κ. Τα προϊόντα αφορούν στην κυτταρική σειρά H929.

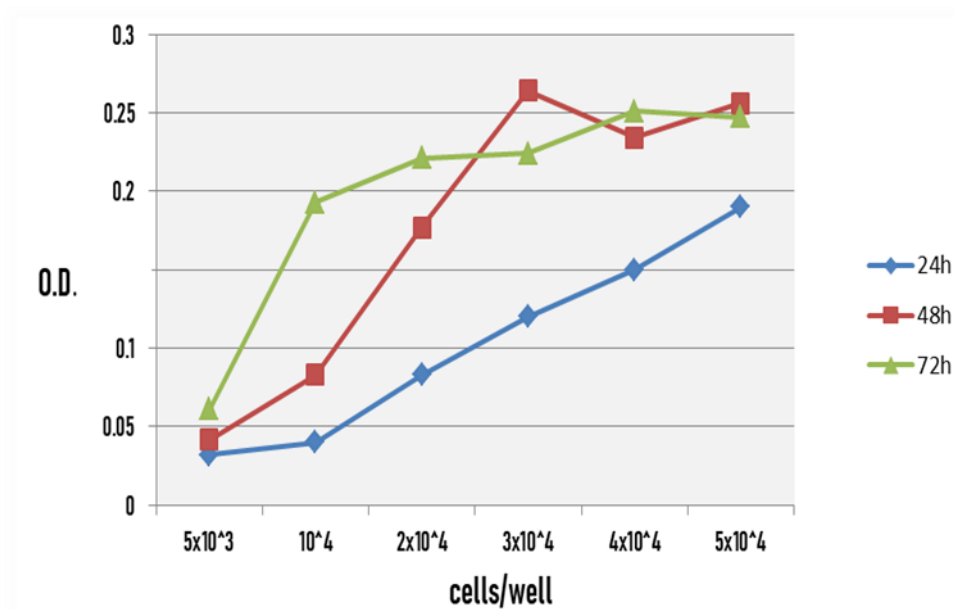
Όπως γίνεται αντιληπτό από την εικόνα της ηλεκτροφόρησης, όλα τα μετάγραφα δίνουν το αναμενόμενο μοναδικό προϊόν πλήν του μεταγράφου 4. Για το λόγο αυτό δεν το συμπεριλάβαμε στη μελέτη μας.

3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΗΣ RNase κ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

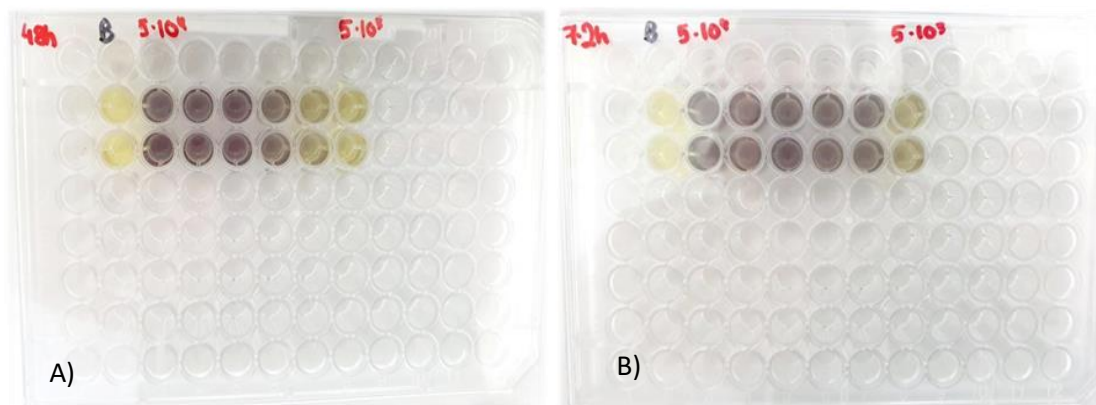
3.2.1 Προσδιορισμός της τιμής IC50 για τους παράγοντες Bortezomib και Carfilzomib

Για τον προσδιορισμό της τιμής IC50 των παραγόντων σε 96-well plate, κρίθηκε απαραίτητη η εύρεση του κατάλληλου αριθμού κυττάρων H929 και U266 για την επίστρωση του plate ώστε να μην παρεμποδιζόταν η ανάπτυξή τους μέχρι και τις 72 ώρες που θα επωάζονταν με τους παράγοντες. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν οι εξής, κατά αύξουσα σειρά, αριθμοί κυττάρων: 5×10^3 , 10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 . Η μέτρηση της βιωσιμότητας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο MTT σε χρονικά διαστήματα 24, 48 και 72 ωρών, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.1.6. Στην εικόνα 3.2.1 παρουσιάζονται οι καμπύλες βιωσιμότητας για την κυτταρική σειρά H929 στις 24, 48 και 72 ώρες. Οι καμπύλες σχεδιάστηκαν με βάση τα αποτελέσματα από τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στο φωτόμετρο Human Reader HS για τους διάφορους αριθμούς κυττάρων. Για το μηδενισμό του φωτομέτρου χρησιμοποιήθηκε πλήρες θρεπτικό

υλικό σε ένα από τα πηγάδια του plate. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι οι δύο κυτταρικές σειρές έχουν παρόμοιο ρυθμό ανάπτυξης, θεωρήθηκε ότι τα αποτελέσματα από την H929 ισχύουν και για την U266.



Εικόνα 3.2.1: Οι καμπύλες βιωσιμότητας των H929 κυττάρων για τα χρονικά διαστήματα επώασης των 24, 48 και 72 ωρών



Εικόνα 3.2.2: 96-well plate με τους προαναφερόμενους αριθμούς H929 κυττάρων για το διάστημα επώασης των **A)** 48 ωρών και **B)** 72 ωρών. Είναι εμφανείς οι χρωματικές μεταβολές λόγω της τροποποίησης του MTT.

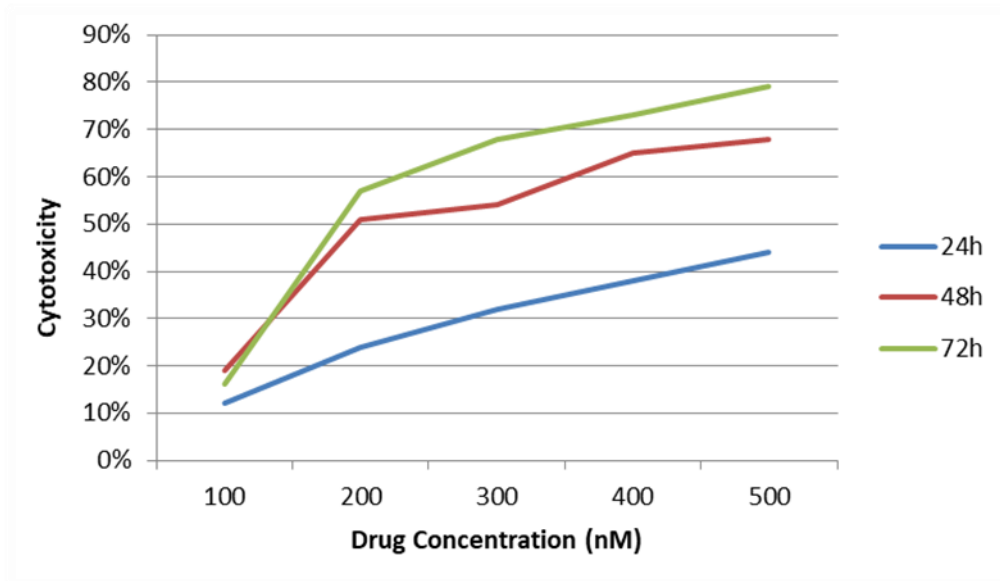
Από τις καμπύλες που παρουσιάστηκαν στην εικόνα 3.2.1 επιλέχθηκε ο αριθμός κυττάρων 5×10^4 για την πειραματική πορεία που ακολούθησε. Σε ένα δεύτερο στάδιο για την εύρεση της τιμής IC50, μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα των κυτταροστατικών παραγόντων Bortezomib και Carfilzomib, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων που παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.2-1, στις κυτταρικές σειρές H929 και U266 για περιόδους επώασης 24, 48 και 72 ωρών. Για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας αναπτύχθηκε πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα 2.1.6 βασισμένο στη μέθοδο MTT. Στις εικόνες 3.2.3 και 3.2.4 παρουσιάζονται οι καμπύλες κυτταροτοξικότητας στις περιόδους επώασης που αναφέρθηκαν για την κυτταρική σειρά H929 υπό την επίδραση των παραγόντων Bortezomib και Carfilzomib, αντίστοιχα. Στις εικόνες 3.2.5 και 3.2.6 παρουσιάζονται οι αντίστοιχες καμπύλες για την κυτταρική σειρά U266. Οι καμπύλες σχεδιάστηκαν με βάση τα ποσοστά κυτταροτοξικότητας που υπολογίστηκαν από τον παρακάτω τύπο για κάθε συγκέντρωση παράγοντα.

$$\text{ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ \%} = \frac{(1 - \text{O.D. ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ})}{\text{O.D. NEGATIVE CONTROL}} \times 100$$

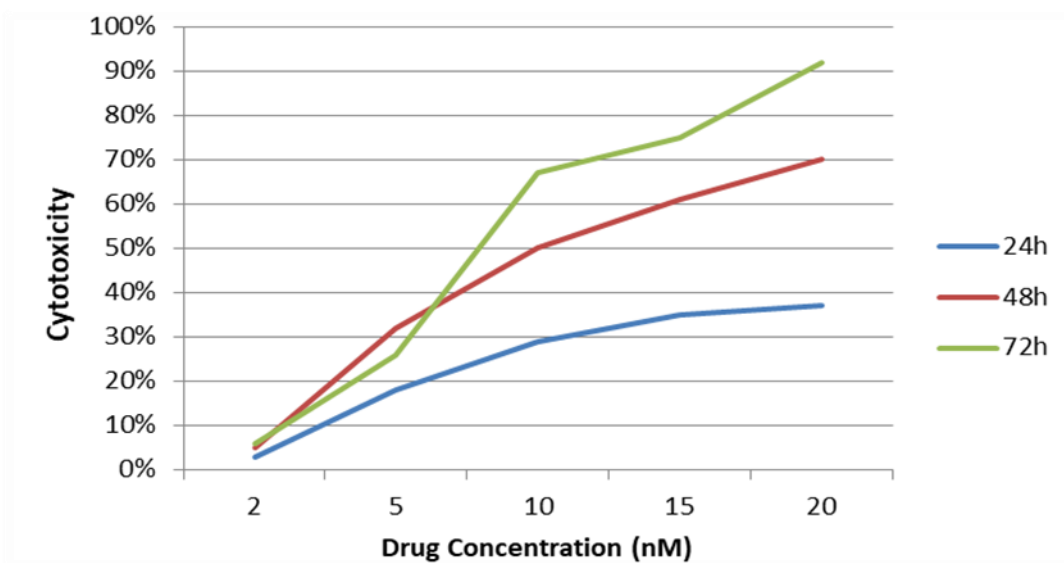
Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στο φωτόμετρο Human Reader HS και για τον μηδενισμό του χρησιμοποιήθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό.

Πίνακας 3.2-1: Πειραματικά Δεδομένα

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ	H929	U266
ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ/ΠΗΓΑΔΙ	5×10^4 cells	5×10^4 cells
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ BORTEZOMIB ΠΡΟΣ ΕΞΕΤΑΣΗ	100, 200, 300, 400, 500 nM	250, 500, 750, 1000, 1250 nM
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ CARFILZOMIB ΠΡΟΣ ΕΞΕΤΑΣΗ	2, 5, 10, 15, 20 nM	1, 2, 3, 4, 5 nM

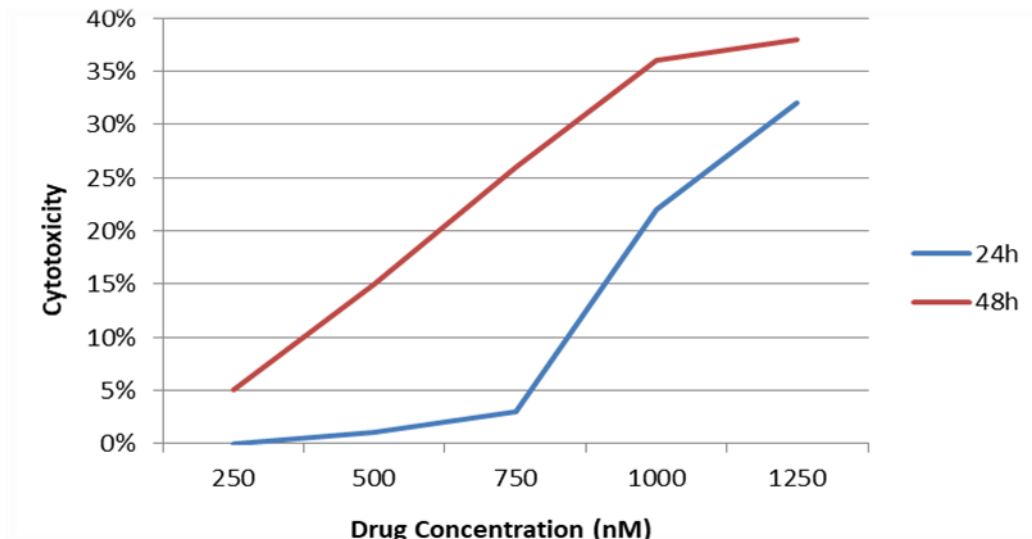


Εικόνα 3.2.3: Καμπύλες κυτταροτοξικότητας για την κυτταρική σειρά H929 υπό την επίδραση του παράγοντα Bortezomib στα χρονικά διαστήματα των 24, 48 και 72 ωρών

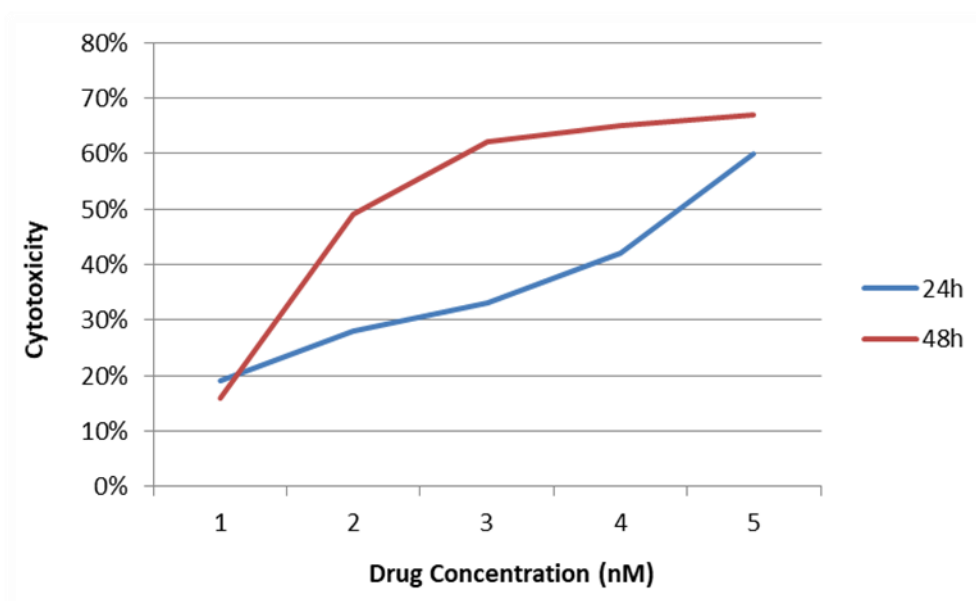


Εικόνα 3.2.4: Καμπύλες κυτταροτοξικότητας για την κυτταρική σειρά H929 υπό την επίδραση του παράγοντα Carfilzomib στα χρονικά διαστήματα των 24, 48 και 72 ωρών

Από τις καμπύλες που παρουσιάστηκαν στις παραπάνω εικόνες, φαίνεται πως η επιβίωση των κυττάρων H929 μειώνεται κατά 50% σε διάστημα 48 ωρών με τον παράγοντα Bortezomib σε συγκέντρωση 250nM και με τον παράγοντα Carfilzomib σε συγκέντρωση 15nM. Επομένως, αυτές είναι και οι τιμές IC50 για τον κάθε παράγοντα.



Εικόνα 3.2.5: Καμπύλες κυτταροτοξικότητας για την κυτταρική σειρά U266 υπό την επίδραση του παράγοντα Bortezomib στα χρονικά διαστήματα των 24 και 48 ωρών



Εικόνα 3.2.6: Καμπύλες κυτταροτοξικότητας για την κυτταρική σειρά U266 υπό την επίδραση του παράγοντα Carfilzomib στα χρονικά διαστήματα των 24 και 48 ωρών

Από τις καμπύλες που παρουσιάστηκαν στις παραπάνω εικόνες, φαίνεται πως η επιβίωση των κυττάρων U266 μειώνεται κατά 50% σε διάστημα 48 ωρών με τον παράγοντα Bortezomib σε συγκέντρωση ανώτερη των 1250nM και με τον παράγοντα Carfilzomib σε συγκέντρωση 2nM. Επομένως, η τιμή IC50 για τον παράγοντα Bortezomib θεωρήθηκε πως είναι κατά προσέγγιση 1500nM και για τον παράγοντα Carfilzomib είναι τα 2nM.

3.2.2 Απομόνωση ολικού RNA - Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας

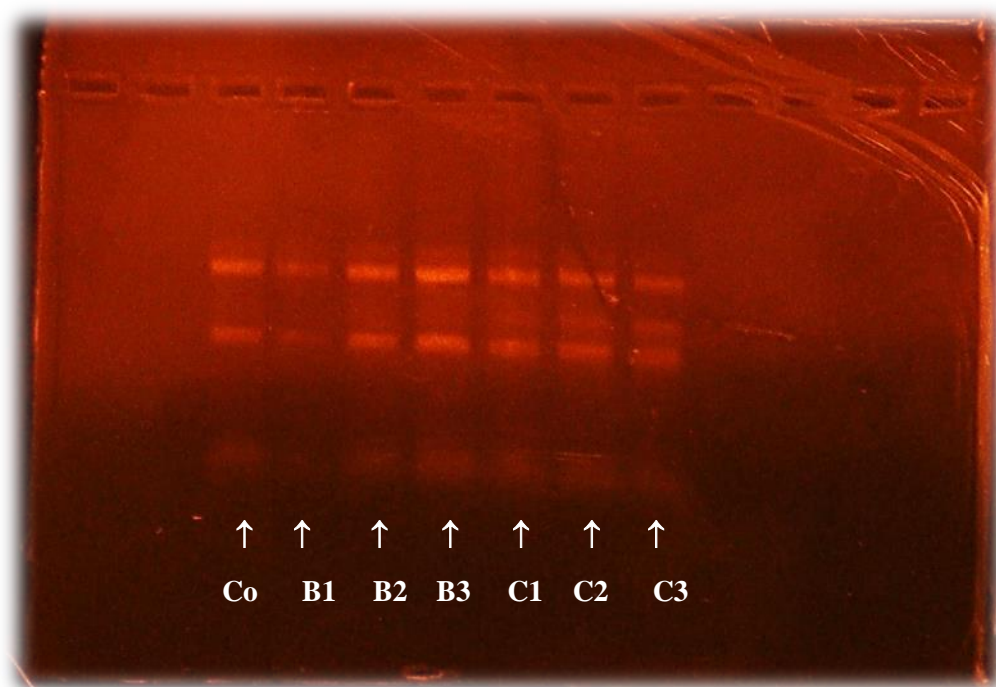
Για την απομόνωση RNA από κύτταρα H929 και U266 υπό την επίδραση των παραγόντων Bortezomib και Carfilzomib ύστερα από επώαση 24, 48 και 72 ωρών, καλλιεργήσαμε τις κυτταρικές σειρές σε φλάσκες (25cm²) και ακολούθησε η διαδικασία της απομόνωσης όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2. Σε κάθε φλάσκα επιστρώθηκαν 3x10⁶ κύτταρα και ο τελικός όγκος της ήταν 6mL (5x10⁴ cells/100μL στο πηγάδι του 96-well plate → 3x10⁶ cells/6mL στη φλάσκα). Σε κάθε φλάσκα προστέθηκε τέτοια ποσότητα παράγοντα που στον τελικό όγκο η συγκέντρωση του συνέπιπτε με την τιμή IC50. Επιπλέον, έγινε απομόνωση από κύτταρα H929 και U266 στα οποία δεν είχαμε επιδράσει με παράγοντα. Στον Πίνακα 3.2-2 παρουσιάζονται ενδεικτικές τιμές συγκέντρωσης και καθαρότητας από τις μετρήσεις που πήραμε στο φασματοφωτόμετρο.

Πίνακας 3.2-2: Τιμές μετρήσεων από το φασματοφωτόμετρο

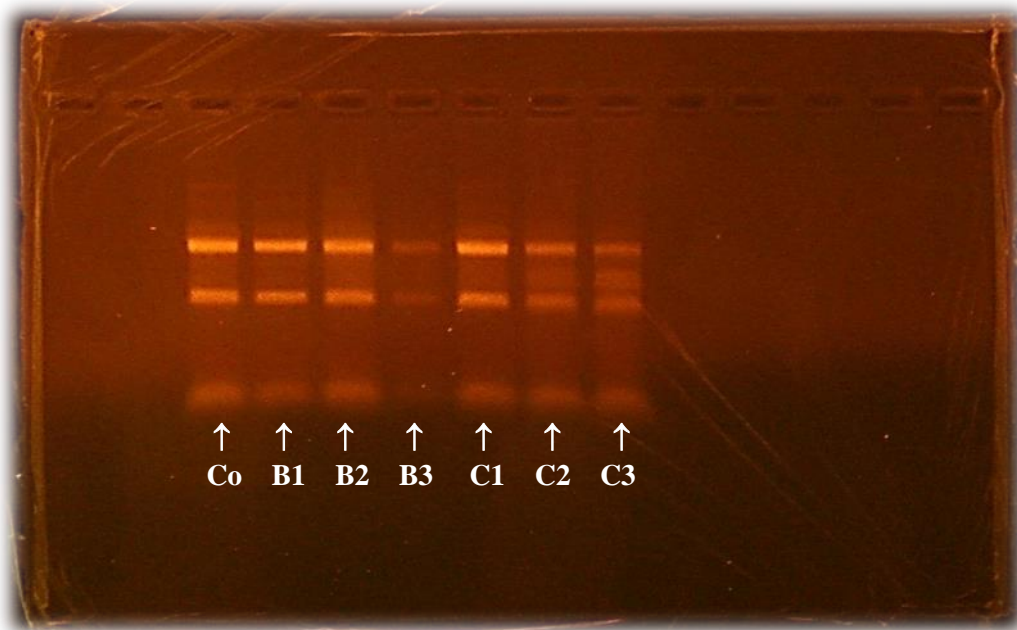
ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ng/μl)	ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ
H929 Control	542	1,8
H929 Bortezomib 24h	540	1,9
H929 Bortezomib 48h	469	1,8
H929 Bortezomib 72h	209	1,9
H929 Carfilzomib 24h	440	1,9
H929 Carfilzomib 48h	366	1,9
H929 Carfilzomib 72h	234	1,8
U266 Control	760	1,9
U266 Bortezomib 24h	718	1,8
U266 Bortezomib 48h	308	1,8
U266 Bortezomib 72h	457	1,8
U266 Carfilzomib 24h	552	1,9
U266 Carfilzomib 48h	413	1,9
U266 Carfilzomib 72h	275	1,8

Υπενθυμίζεται ότι για να θεωρηθεί καθαρό ένα δείγμα RNA πρέπει ο λόγος της απορρόφησης OD260/OD280 να είναι μεταξύ 1,8-2,0, αλλιώς υπάρχει πιθανότητα πρόσμιξης του με πρωτεΐνες ή γενωμικό DNA. Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται πως η καθαρότητα των δειγμάτων ήταν αρκετά καλή. Ακολούθησε ποιοτικός έλεγχος του RNA που προέκυψε από την απομόνωση. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση 1μg RNA από κάθε δείγμα σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.1. Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικές εικόνες από τις ηλεκτροφορήσεις και όπως φαίνεται, δύο έντονες ζώνες διακρίνονται στο πήκτωμα που αντιπροσωπεύουν το 28S και 18S rRNA.

Co=Δείγμα Control, B1=Δείγμα με Bortezomib 24h, B2=Δείγμα με Bortezomib 48h, B3=Δείγμα με Bortezomib 72h,
C1=Δείγμα με Carfilzomib 24h, C2=Δείγμα με Carfilzomib 48h, C3=Δείγμα με Carfilzomib 72h



Εικόνα 3.2.7.: Ηλεκτροφόρηση δείγματος control και δειγμάτων με προσθήκη παράγοντα στην κυτταρική σειρά H929



Εικόνα 3.2.8: Ηλεκτροφόρηση δείγματος control και δειγμάτων με προσθήκη παράγοντα στην κυτταρική σειρά U266

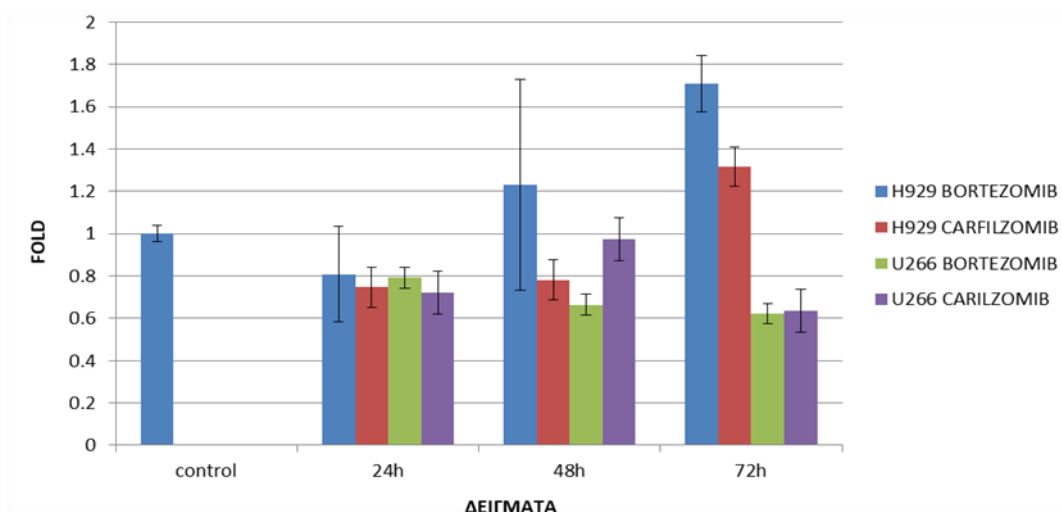
Έτσι, διασφαλίζοντας την καλή ποιότητα του RNA ακολούθησε Reverse Transcription όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.3 για τη σύνθεση cDNA που χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια της παρούσας διπλωματικής.

3.2.3 Στατιστική ανάλυση της έκφρασης των μεταγράφων της RNase κ

Αφού επιβεβαιώθηκε η έκφραση των μεταγράφων στις κυτταρικές σειρές H929 και U266, πραγματοποιήθηκε Real Time PCR στον αναλυτή Real Time PCR 7500 Biosystem στα δείγματα cDNA H929 και U266 κυττάρων υπό την επίδραση παραγόντων για την ποσοτική μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων κλασικό, 7, 9, 14 και 20. Ως control χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από κύτταρα H929 χωρίς προσθήκη παράγοντα. Ακολούθησε εξαγωγή των δεδομένων και των τιμών C_i των δειγμάτων από το πρόγραμμα 7.500 Software σε καρτέλα του Microsoft Excell. Εν συνεχεία, έγινε σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.4.2 και λαμβάνοντας υπόψιν τις τιμές για τα RQ Mean, Fold, τυπική απόκλιση (σφάλμα) κατασκευάστηκαν διαγράμματα που περιγράφουν τις αλλαγές στην έκφραση των μεταγράφων της RNase κ. Να σημειωθεί ότι η τιμή RQ Mean αντικατοπτρίζει το μέσο όρο των τιμών $RQ\ single = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ από τις διάφορες επαναλήψεις των πειραμάτων μετά την απόρριψη των ακραίων τιμών και ισχύει ότι η τιμή $FOLD = \frac{RQ\ Mean\ δείγματος}{RQ\ Mean\ Control}$.

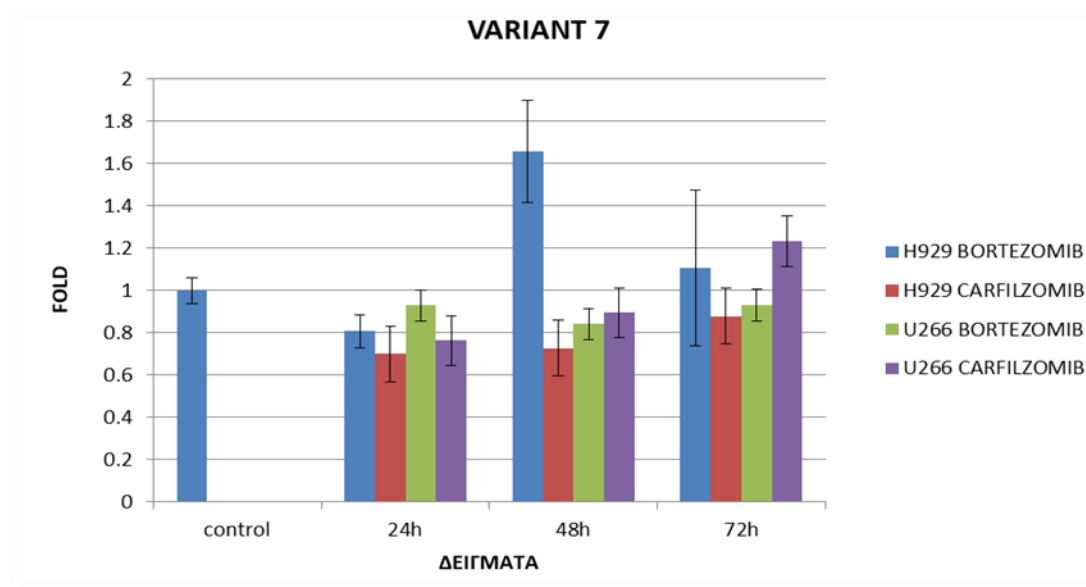
Στην εικόνα 3.2.9 παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου στο control και σε δείγματα H929 και U266 κυττάρων υπό την επίδραση των παραγόντων Bortezomib και Carfilzomib για τους χρόνους επώασης των 24, 48 και

72 ωρών. Οι μεταβολές που παρουσιάζονται δεν είναι σημαντικές και θεωρήσαμε πως τα επίπεδα έκφρασης του παραμένουν σταθερά.



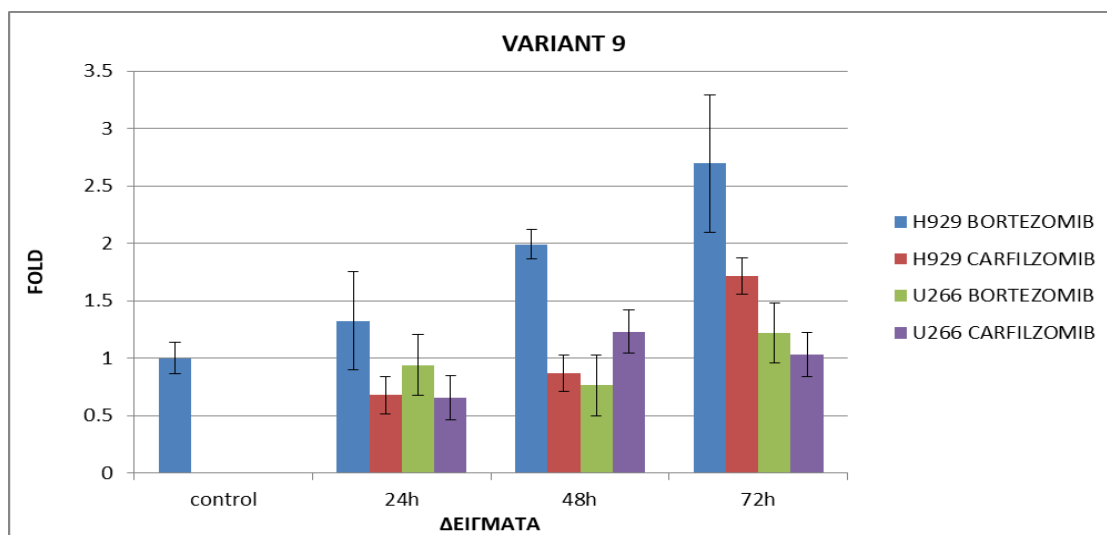
Εικόνα 3.2.9: Διάγραμμα της έκφρασης του κλασικού μεταγράφου της RNase κ στις κυτταρικές σειρές H929 και U266 υπό την επίδραση παραγόντων Bortezomib και Carfilzomib σε διαστήματα επώασης 24, 48 και 72 ωρών

Στο μετάγραφο 7 όπως φαίνεται στην εικόνα 3.2.10 εμφανίζεται μια μικρή αύξηση στις 48 ώρες στα κύτταρα H929 με την επίδραση του Bortezomib. Και σε αυτή την περίπτωση, όμως, οι μεταβολές της έκφρασης σε σχέση με το control δεν είναι σημαντικές.



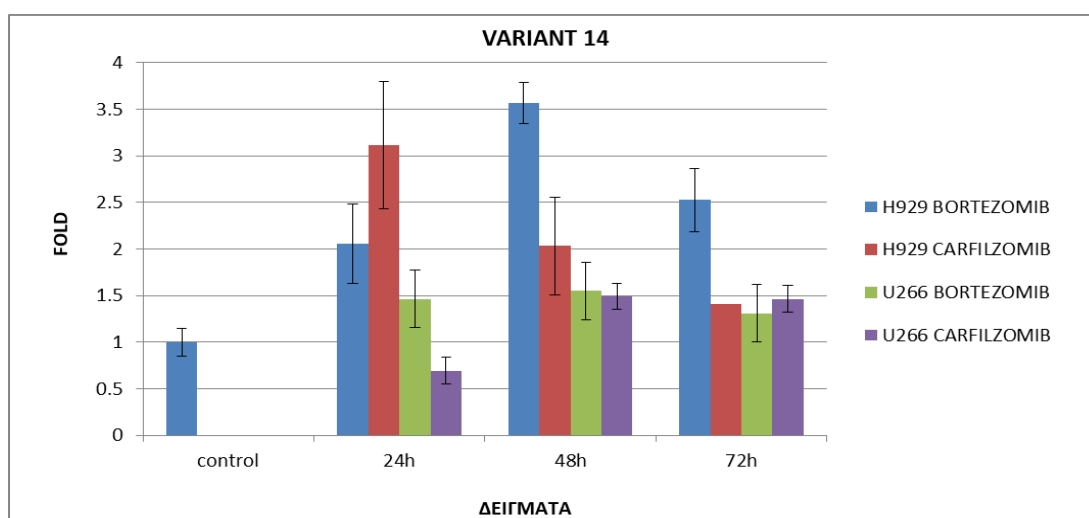
Εικόνα 3.2.10: Διάγραμμα της έκφρασης του μεταγράφου 7 της RNase κ στις κυτταρικές σειρές H929 και U266 υπό την επίδραση παραγόντων Bortezomib και Carfilzomib σε διαστήματα επώασης 24, 48 και 72 ωρών

Στην εικόνα 3.2.11 παρουσιάζονται οι διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 9 και παρατηρείται μια σταθερή αύξηση στην κυτταρική σειρά H929 με το Bortezomib που στις 72 ώρες ξεπερνάει κατά 2,5 φορές την έκφραση του control. Οι υπόλοιπες μεταβολές που παρουσιάζονται δεν είναι σημαντικές.



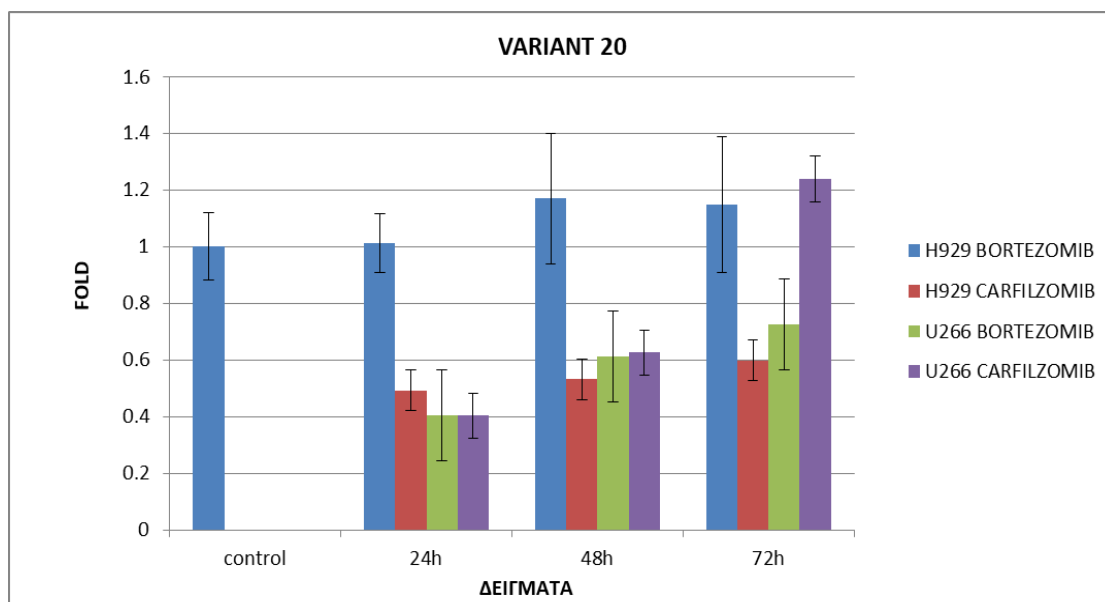
Εικόνα 3.2.11: Διάγραμμα της έκφρασης του μεταγράφου 9 της RNase κ στις κυτταρικές σειρές H929 και U266 υπό την επίδραση παραγόντων Bortezomib και Carfilzomib σε διαστήματα επώασης 24, 48 και 72 ωρών

Στα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 14, που παρουσιάζονται στην εικόνα 3.2.12, παρατηρείται αύξηση στα κύτταρα H929 με το Bortezomib σε όλα τα διαστήματα επώασης με σημαντική αυτή των 48 ωρών (3,5 φορές πάνω από το control). Στην ίδια κυτταρική σειρά παρατηρείται τριπλάσια και διπλάσια αύξηση στις 24 και 48 ώρες, αντίστοιχα, με τον παράγοντα Carfilzomib. Οι μεταβολές στην κυτταρική σειρά U266 και με τους δυο παράγοντες δεν θεωρούνται σημαντικές.



Εικόνα 3.2.12: Διάγραμμα της έκφρασης του μεταγράφου 14 της RNase κ στις κυτταρικές σειρές H929 και U266 υπό την επίδραση παραγόντων Bortezomib και Carfilzomib σε διαστήματα επώασης 24, 48 και 72 ωρών

Στην εικόνα 3.2.13 παρουσιάζονται οι αλλαγές της έκφρασης του μεταγράφου 20 όπου είναι εμφανής η μείωση της έκφρασής, στο μισό αυτής του control, στην κυτταρική σειρά H929 υπό την επίδραση του Carfilzomib και στην κυτταρική σειρά U266 και με τα δύο φάρμακα στις 24 και 48 ώρες επώασης.



Εικόνα 3.2.13: Διάγραμμα της έκφρασης του μεταγράφου 20 της RNase κ στις κυτταρικές σειρές H929 και U266 υπό την επίδραση παραγόντων Bortezomib και Carfilzomib σε διαστήματα επώασης 24, 48 και 72 ωρών

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι μονοκλωνικές γαμμαπάθειες χαρακτηρίζονται από τον πολλαπλασιασμό ενός μεταλλαγμένου κλώνου Β κυττάρων (πλασματοκυττάρων) ο οποίος αναπαράγεται συνεχώς και συνθέτει ομοιογενή-μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη, η οποία αναφέρεται ως μονοκλωνική πρωτεΐνη ή παραπρωτεΐνη (ολόκληρο μόριο ή τμήματα αυτού). Το πολλαπλό μυέλωμα (ΠΜ) αποτελεί πολυεστιακό πλασματοκυτταρικό νεόπλασμα εντοπιζόμενο στο μυελό που χαρακτηρίζεται από μονοκλωνική πρωτεΐνη στον ορό ή τα ούρα και σκελετικές διαταραχές (οστεολυτικές βλάβες) και συχνά συνοδεύεται από υπερασβεστιαμία, αναιμία, νεφρική δυσλειτουργία, και υποτροπιάζουσες βακτηριακές λοιμώξεις. Με την πάροδο των χρόνων έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στο κομμάτι της διάγνωσης, της πρόγνωσης και της θεραπείας του. Πολλοί δείκτες χρησιμοποιούνται στη διάγνωση, που βασίζεται, σε αιματολογικά και βιοχημικά ευρήματα, στην καρυστύπηση, στην εύρεση γενετικών και μοριακών διαταραχών. Τέτοιοι χαρακτηριστικοί δείκτες περιλαμβάνουν κυτταρογενετικές ανωμαλίες, μετατοπίσεις με κυρίαρχη την t4;14 και ύπαρξη της παραπρωτεΐνης ή ελαφριών αλύσεων στο αίμα και τα ούρα. Επίσης, κάποιοι από αυτούς αποτελούν δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες της νόσου, ενώ άλλοι είναι ευνοϊκότεροι.

Κεντρικό ρόλο στη θεραπεία του ΠΜ φαίνεται να έχουν οι αναστολείς πρωτεασώματος με σημαντικότερους τους παράγοντες Bortezomib και Carfilzomib. Οι παράγοντες αυτοί παρεμποδίζουν τη φυσική λειτουργία του πρωτεασώματος επηρεάζοντας μια πληθώρα ενδοκυττάρων αλλά και εξωκυττάρων μονοπατιών. Σημαντικές δράσεις τους αφορούν στην παρεμπόδιση του μονοπατιού σηματοδότησης του NF-κB, αντιαποπτωτικών σημάτων αλλά και ενεργοποίηση αποπτωτικών μονοπατιών στα οποία κεντρικό ρόλο παίζουν οι κασπάσες-8 και -9. Παράλληλα, επηρεάζουν και το μικροπεριβάλλον του μυελού, εμποδίζοντας τις αλληλεπιδράσεις και τους μηχανισμούς θετικής ανατροφοδότησης μεταξύ πλασματοκυττάρων και κυττάρων του στρώματος. Ακόμα, φαίνεται πως η δράση τους επεκτείνεται στο ανοσολογικό σύστημα καθιστώντας τα πλασματοκύτταρα πιο ευαίσθητα στα φυσικά φονικά κύτταρα (NK).

Από τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτή η ανάγκη εύρεσης νέων δεικτών, οι οποίοι θα μπορούν να παρέχουν δεδομένα για την πιθανότητα υποτροπής, την εύρεση κατάλληλης γραμμής θεραπείας αλλά και την πιο έγκαιρη διάγνωση των ασθενών. Σε αυτό το σημείο μπορούν να συνεισφέρουν η περαιτέρω διερεύνηση των μονοπατιών που επηρεάζονται από τη δράση των αναστολέων του πρωτεασώματος και ο εντοπισμός των μορίων που εμπλέκονται σε αυτά. Οι ριβονουκλεάσες, ένζυμα υπεύθυνα για την αποικοδόμηση και επεξεργασία των διάφορων ειδών RNAs, έχουν αναδειχθεί ως κρίσιμοι ρυθμιστές της εξέλιξης των όγκων που μπορούν να επηρεάσουν την διαδικασία της απόπτωσης, την κυτταρική ανάπτυξη, την αγγειογένεση και άλλα ορόσημα του καρκίνου, δρώντας ως ογκοκατασταλτικοί ή ογκογόνοι παράγοντες. Έτσι, λοιπόν, οι ριβονουκλεάσες έχουν διττό ρόλο στην

καρκινογένεση, καθώς μπορούν να την ευνοήσουν διασπώντας ογκοκατασταλτικά mRNAs, ή να την αποτρέψουν, διασπώντας mRNAs ογκογονιδίων. Ταυτόχρονα, αυξάνονται τα στοιχεία που δείχνουν ότι οι RNases μπορεί να αποτελούν νέα μοριακά εργαλεία για τη διάγνωση, πρόγνωση και θεραπεία του καρκίνου.

Τα τελευταία χρόνια, η οικογένεια της ριβονουκλεάσης κ αποτελεί αντικείμενο μελέτης του εργαστηρίου μας. Παρουσιάζει δράση ενδοριβονουκλεάσης διασπώντας ειδικά μονόκλωνες αλυσίδες σε θέσεις με ApU και ApG φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, ενώ υδρολύει σε χαμηλότερο βαθμό UpU δεσμούς. Σε πρόσφατες μελέτες των Adamopoulos et al. και του εργαστηρίου μας, ταυτοποιήθηκαν νέα μετάγραφα της RNase κ που προκύπτουν από μηχανισμούς εναλλακτικού ματίσματος. Μελέτες δείχνουν μια συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της ριβονουκλεάσης κ με διάφορους τύπους καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, δεδομένα από μικροσυστοιχίες, υποδεικνύουν μια αύξηση της έκφρασής της σε περιπτώσεις μεταστατικού μελανώματος, καρκίνου των ωοθηκών, του μαστού, μεταστατικού καρκίνου του προστάτη, σε αρχικό και προχωρημένο στάδιο καρκίνου στο νεφρό και κατά τη διάρκεια ανάπτυξης ορθοκολικού καρκινώματος. Απ' την άλλη μεριά μειωμένη έκφραση έχει παρατηρηθεί σε περιπτώσεις μυελοειδούς λευχαιμίας και πολλαπλού μυελώματος. Ακόμα, στη μελέτη των Gkratsou et al. όπου μελετήθηκε η έκφραση της RNase κ σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών υπό την επίδραση κυτταροτοξικών παραγόντων, βρέθηκαν σημαντικές αυξήσεις των επιπέδων έκφρασης με τον παράγοντα πακλιζατέλη.

Έχοντας ως δεδομένο ότι οι ριβονουκλεάσες, συμπεριλαμβανομένης της ριβονουκλεάσης κ, εμπλέκονται σε περιπτώσεις καρκινογένεσης, θέλαμε να μελετήσουμε κατά πόσο το κλασικό αλλά και μερικά από τα νέα μετάγραφα της ριβονουκλεάσης κ, παρουσιάζουν τροποποιημένη έκφραση στις κυτταρικές σειρές μυελώματος H929 και U266, υπό την επίδραση των κυτταροστατικών παραγόντων Bortezomib και Carfilzomib σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν το κλασικό μετάγραφο και τα εναλλακτικά μετάγραφα 7, 9, 14, 20 της RNase κ. Για την υλοποίηση των παραπάνω, βρέθηκε η τιμή IC₅₀ του κάθε φαρμάκου στις κυτταρικές σειρές (H929, U266) και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες χωρίς προσθήκη παράγοντα που χρησιμοποιήθηκαν ως control και υπό την επίδραση αναστολέα πρωτεασώματος για χρονικό διάστημα 24, 48 και 72 ωρών. Από τα κύτταρα αυτά έγινε απομόνωση RNA, προσδιορισμός της συγκέντρωσής του και έλεγχος της ποιότητάς του. Ακολούθησε διαδικασία αντίστροφης μεταγραφής προς δημιουργία cDNA και αναπτύχθηκε πρωτόκολλο Real Time PCR αντίδρασης για την ποσοτική ανάλυση της έκφρασης του κλασικού μεταγράφου και των εναλλακτικών 7, 9, 14 και 20. Για την σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των παραπάνω μεταγράφων, χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς η HPRT1 επειδή παρουσιάζει σταθερή έκφραση κάτω απ' τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Ακολούθησε ποιοτικός έλεγχος των προϊόντων της PCR με τη βοήθεια μάρτυρα. Τέλος, τα στοιχεία έκφρασης των μεταγράφων χρησιμοποιήθηκαν για στατιστική ανάλυση.

Όσον αφορά στο κλασικό μετάγραφο, οι μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης του σε σχέση με το control δεν ήταν σημαντικές και θεωρήθηκε πως η έκφρασή του παραμένει σταθερή. Στο μετάγραφο 7, εμφανίστηκε μια μικρή αύξηση των επιπέδων στις 48 ώρες στα κύτταρα H929 με την επίδραση του Bortezomib. Και σε αυτή την περίπτωση, όμως, οι μεταβολές της έκφρασης σε σχέση με το control και στις δύο κυτταρικές σειρές δεν κρίθηκαν σημαντικές. Στο μετάγραφο 9, παρατηρήθηκε μια σταθερή αύξηση της έκφρασης στην κυτταρική σειρά H929 με το Bortezomib που στις 72 ώρες ξεπέρασε κατά 2,5 φορές την έκφραση του control. Οι υπόλοιπες μεταβολές που παρατηρήθηκαν δεν θεωρούνται σημαντικές. Στα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 14, υπήρχε αύξηση στα κύτταρα H929 με το Bortezomib σε όλα τα διαστήματα επώασης με σημαντική αυτή των 48 ωρών (3,5 φορές πάνω από το control). Στην ίδια κυτταρική σειρά παρατηρήθηκε τριπλάσια και διπλάσια αύξηση στις 24 και 48 ώρες, αντίστοιχα, με τον παράγοντα Carfilzomib. Οι μεταβολές στην κυτταρική σειρά U266 και με τους δυο παράγοντες δεν θεωρήθηκαν σημαντικές. Τέλος, στο μετάγραφο 20 παρουσιάστηκε μείωση της έκφρασης, στο μισό αυτής του control, στην κυτταρική σειρά H929 υπό την επίδραση του Carfilzomib και στην κυτταρική σειρά U266 και με τα δύο φάρμακα στις 24 και 48 ώρες επώασης.

Συνοψίζοντας, τα ευρήματά μας δεν υποδεικνύουν ιδιαίτερα σημαντικές αλλαγές στην έκφραση των προαναφερόμενων μεταγράφων της RNase κ. Οι ριβονουκλεάσες αποτελούν, αδιαμφισβήτητα, σημαντικά μόρια για τη φυσιολογική λειτουργία και επιβίωση των κυττάρων που όπως σχολιάστηκε έχουν διττό ρόλο στην καρκινογένεση. Ο ακριβής τους ρόλος, όμως, στο συγκεκριμένο πεδίο δεν έχει διερευνηθεί πλήρως. Από το πρίσμα της ογκοκατασταλτικής δράσης τους, αύξηση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων υπό την επίδραση των αναστολέων πρωτεασώματος θα μπορούσε να υποδηλώνει την συμβολή τους στα αποπτωτικά μονοπάτια τα οποία ενεργοποιούνται από τους συγκεκριμένους παράγοντες. Από την αντίθετη πλευρά, λαμβάνοντας υπόψιν την ογκογόνο δράση μερικών ριβονουκλεασών, μείωση των επιπέδων αυτών μπορεί να υποδηλώνει την εμπλοκή τους σε μονοπάτια σηματοδότησης ογκογονιδίων τα οποία παρεμποδίζονται υπό την δράση των κυτταροστατικών φαρμάκων. Δεδομένου ότι στην παρούσα διπλωματική παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση των μεταγράφων 9 και 14 καθώς και μείωση για το μετάγραφο 20, μπορούν να τεθούν κάποιοι μελλοντικοί στόχοι. Για παράδειγμα, σε περαιτέρω μελέτη θα μπορούσε να γίνει επακόλουθη επίδραση με τον κάθε παράγοντα ύστερα από ένα ενδιάμεσο διάστημα ανάπαυσης των κυττάρων. Επίσης, καθένας από τους παράγοντες Bortezomib και Carfilzomib θα μπορούσε να χορηγηθεί σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Δρώντας συνεργιστικά, τα παραπάνω, μπορούν να οδηγήσουν σε μια μεγέθυνση των μεταβολών που παρατηρήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία. Επιπλέον, χρήσιμη θα ήταν η μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων σε δείγματα υγιών ατόμων, ασθενών που δεν έχουν λάβει θεραπεία και ασθενών ύστερα από λήψη θεραπείας. Κλείνοντας, εξαιτίας του κρίσιμου ρόλου της ριβονουκλεάσης κ στη λειτουργία του

κυττάρου είναι σημαντικό να μελετηθεί περαιτέρω η δράση της στο ΠΜ και σε άλλους τύπους καρκίνου όπου μπορεί να αποτελέσει μελλοντικά έναν σημαντικό διαγνωστικό ή προγνωστικό δείκτη.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΣΤΑΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ RNase κ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

ΑΓΓΕΛΙΚΗ-ΙΩΑΝΝΑ ΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΥ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το Πολλαπλό Μυέλωμα (ΠΜ) αποτελεί πολυεστιακό πλασματοκυτταρικό νεόπλασμα εντοπιζόμενο στο μυελό που χαρακτηρίζεται από μονοκλωνική πρωτεΐνη στον ορό ή τα ούρα και σκελετικές διαταραχές (οστεολυτικές βλάβες) και συχνά συνοδεύεται από υπερασβεστιαμία, αναιμία, νεφρική δυσλειτουργία, και υποτροπιάζουσες βακτηριακές λοιμώξεις. Πολλοί δείκτες χρησιμοποιούνται στη διάγνωση του. Οι ριβονουκλεάσες ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεασών, μόρια τα οποία αποικοδομούν τα RNAs σε μικρότερα τμήματα και έχει αποδειχτεί τα τελευταία χρόνια η συμμετοχή τους πολλές περιπτώσεις καρκινογένεσης. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων κλασικό, 7, 9, 14, 20 του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ, μιας νουκλεάσης που μελετάται έντονα τα τελευταία χρόνια στο εργαστήριό μας, σε καρκινικές σειρές μυελώματος υπό την επίδραση κυτταροστατικών παραγόντων. Για την υλοποίηση της μελέτης μας βρέθηκαν οι τιμές συγκέντρωσης IC50 για τον κάθε παράγοντα με τη χρήση της μεθόδου MTT στις κυτταρικές σειρές U266 και H929. Έπειτα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες χωρίς προσθήκη παράγοντα που χρησιμοποιήθηκαν ως controls και υπό την επίδραση αναστολέα πρωτεασώματος Bortezomib ή Carfilzomib για χρονικό διάστημα 24, 48 και 72 ωρών. Απομονώθηκε το RNA των κυττάρων, ακολούθησε έλεγχος της ποιότητάς του και δημιουργία cDNA μέσω αντίστροφης μεταγραφής. Η έκφραση των μεταγράφων μελετήθηκε με Real Time PCR ανάλυση με χρήση της χρωστικής SYBR Green και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για τη συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης με τους παράγοντες.

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης αποδεικνύουν ότι τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 14 είναι αυξημένα στην κυτταρική σειρά H929 και με τους δύο παράγοντες. Ακόμα, αύξηση της έκφρασης παρατηρήθηκε και για το μετάγραφο 9 στην κυτταρική σειρά H929 με το Bortezomib. Στο μετάγραφο 20 παρουσιάστηκε μείωση της έκφρασης και στις δύο κυτταρικές σειρές, με τη διαφορά ότι στα H929

παρατηρήθηκε μόνο με τον παράγοντα Carfilzomib, ενώ στα U266 κύτταρα και με τους δύο παράγοντες. Συμπερασματικά, παρόλο που οι παρατηρήσεις μας δεν έδειξαν πολυ μεγάλες μεταβολές στην έκφραση, τα μετάγραφα 9, 14 και 20 μπορεί μελλοντικά θέτοντας νέους στόχους να προσφέρουν πληροφορίες ως προς τον ρόλο της RNase κ στο πολλαπλό μυέλωμα.

EFFECT OF CYTOSTATIC DRUGS ON RNase κ 's EXPRESSION LEVELS IN CANCER CELL LINES

Angeliki-Ioanna Giannopoulou

Master Thesis

Faculty of Biology, N.K.U.A.

ABSTRACT

Multiple Myeloma (MM), a multifocal plasma cell neoplasma located in the bone marrow, is characterized by the existence of monoclonal protein in serum or urine and skeletal disorders (osteolytic lesions) and is often accompanied by hypercalcaemia, anemia, and renal dysfunction. Many markers are used in its diagnosis. Ribonucleases belong to the class of nucleases, molecules that degrade RNAs into smaller fragments and in the past few years seem to be involved in many cases of carcinogenesis. The aim of this study is to observe the expression levels of the transcripts classic, 7, 9, 14, 20 of the ribonuclease κ gene, a nuclease that has been extensively studied these last years in our laboratory, in myeloma's cell lines under the influence of cytostatic factors. For the implementation of our study, the concentration values of IC50 for each factor were found using the MTT method in the cell lines U266 and H929. The cells were then cultured in flasks without the addition of factors which were later used as controls and under the influence of proteasome inhibitor, in this case Bortezomib or Carfilzomib for 24, 48 and 72 hours. The RNA was then isolated from the cells and its quality control followed. In addition, cDNA was produced by reverse transcription. Transcripts' expression was observed by Real Time PCR analysis using the SYBR green dye and subsequently the results were statistically processed to correlate expression levels with the cytostatic factors.

The results of the statistical analysis show that the expression levels of transcript 14 are increased in the H929 cell line with both factors. Increased expression was also observed for transcript 9 in the H929 cell line with Bortezomib. Transcript 20 showed a decrease in expression in both cell lines, with the difference that in H929 it was observed only with factor Carfilzomib, while in U266 cells it was observed with both factors. In conclusion, although our observations did not show significant changes of the expression levels, transcripts 9, 14, and 20 may in the future, by setting new goals, provide information on the role of RNase κ in multiple myeloma.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. <https://www.vasiliadisbooks.gr/Vasiliadisbooks/wpcontent/uploads/2015/10/Δείτε-Απόσπασμα-του-Βιβλίου-2.pdf>
2. https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/3079/1/Chapter_01_Loukopoulos.pdf
3. Palumbo A, Anderson K., 2011, Multiple Myeloma, *New England Journal of Medicine*, 364:1046–1060.
4. Landgren O., 2013, Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: biological insights and early treatment strategies, *ASH Education Program Book*, 2013:478–487.
5. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al., 2009, Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study, *Blood*, 113:5412–5417.
6. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM., 2009, A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients, *Blood*, 113:5418–5422.
7. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ 3rd, 2004, Long-term follow-up of 241 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance: the original Mayo Clinic series 25 years later, *Mayo Clin Proc*, 79:859–866.
8. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al, 2002, A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, *New England Journal of Medicine*, 346:564–569.
9. Παγκάλης, 2008, Βιβλίο Αιματολογίας, σελ.795-812
10. Atul Mehta, 2015, Multiple myeloma, *Hematology*, 20:1, 58-59
11. Merhi M, Raynal H, Cahuzac E, et al., 2007, Occupational exposure to pesticides and risk of hematopoietic cancers: meta-analysis of case-control studies, *Cancer Causes Control*, 18:1209-26.
12. Takkouche B, Regueira-Mendez C, Montes-Martinez A., 2009, Risk of cancer among hairdressers and related workers: a meta-analysis, *Int J Epidemiol*, 38:1512-31.
13. Liu T, Xu QE, Zhang CH, et al., 2013, Occupational exposure to methylene chloride and risk of cancer: a meta-analysis, *Cancer Causes Control*, 24:2037-49

14. Wallin A, Larsson SC., 2011, Body mass index and risk of multiple myeloma: a meta-analysis of prospective studies, *Eur J Cancer*, 47:1606-15
15. Jochem C, Leitzmann MF, Keimling M, et al., 2014, Physical activity in relation to risk of hematologic cancers: a systematic review and meta-analysis, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 23:833-46
16. Psaltopoulou T, Sergentanis TN, Kanellias N, et al., 2013, Tobacco smoking and risk of multiple myeloma: a meta-analysis of 40 observational studies, *Int J Cancer*, 132:2413-31
17. Psaltopoulou T, Sergentanis TN, Sergentanis IN, et al., 2015, Alcohol intake, alcoholic beverage type and multiple myeloma risk: a meta-analysis on 26 observational studies, *Leuk Lymphoma*, 56:1484-501
18. Blanco-Colio LM , Munoz-Garcia B , Martin-Ventura JL , et al., 2007, Ethanol beverages containing polyphenols decrease nuclear factor kappa-B activation in mononuclear cells and circulating MCP-1 concentrations in healthy volunteers during a fat-enriched diet, *Atherosclerosis*, 192 : 335 – 341
19. Pieter Sonneveld, Herve Avet-Loiseau, Sagar Lonial, Saad Usmani, David Siegel, Kenneth C. Anderson, Wee-Joo Chng, Philippe Moreau, Michel Attal, Robert A. Kyle, Jo Caers, Jens Hillengass, Jesus San Miguel, Niels W. C. J. van de Donk, Hermann Einsele, Joan Blade, Brian G. M. Durie, Hartmut Goldschmidt, María-Victoria Mateos, Antonio Palumbo, Robert Orłowski, 2016, Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group, *Blood*, 127:24
20. Eva Martinez-Garcia, Relja Popovic, Dong-Joon Min, Steve M. M. Sweet, Paul M. Thomas, Leonid Zamdborg, Aaron Heffner, Christine Will, Laurence Lamy, Louis M. Staudt, David L. Levens, Neil L. Kelleher, Jonathan D. Licht, 2011, The MMSET histone methyl transferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells, *Blood*, 17:1
21. Wang X, Zhu YB, Cui HP, et al., 2014, Aberrant promoter methylation of p15 (INK4b) and p16 (INK4a) genes may contribute to the pathogenesis of multiple myeloma: a meta-analysis, *Tumour Biol*, 35:9035-43
22. Ziakas PD, Karsaliakos P, Prodromou ML, et al., 2013, Interleukin-6 polymorphisms and hematologic malignancy: a re-appraisal of evidence from genetic association studies, *Biomarkers*, 18:625-31
23. S Vincent Rajkumar, Meletios A Dimopoulos, Antonio Palumbo, Joan Blade, Giampaolo Merlini, María-Victoria Mateos, Shaji Kumar, Jens Hillengass, Efsthios Kastiris, Paul Richardson, Ola Landgren, Bruno Paiva, Angela Dispenzieri, Brendan Weiss, Xavier LeLeu, Sonja Zweegman, Sagar Lonial, Laura Rosinol, Elena Zamagni, Sundar Jagannath, Orhan Sezer, Sigurdur Y

Kristinsson, Jo Caers, Saad Z Usmani, Juan José Lahuerta, Hans Erik Johnsen, Meral Beksac, Michele Cavo, Hartmut Goldschmidt, Evangelos Terpos, Robert A Kyle, Kenneth C Anderson, Brian G M Durie, Jesus F San Miguel, 2014, International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma, *The Lancet Oncology*, 15

24. <https://www.myeloma.org/international-myeloma-working-group-imwg-criteria-diagnosis-multiple-myeloma>
25. Landgren O, Iskander K, 2017, Modern multiple myeloma therapy: deep, sustained treatment response and good clinical outcomes, *J Intern Med*
26. Korde N, Roschewski M, Zingone A et al., 2015, Treatment with carfilzomib-lenalidomide-dexamethasone with lenalidomide extension in patients with smoldering or newly diagnosed multiple myeloma, *JAMA Oncol*, 1:746–54
27. Landgren O, Owen RG., 2016, Better therapy requires better response evaluation: paving the way for minimal residual disease testing for every myeloma patient, *Cytometry B Clin Cytom*, 90: 14–20
28. Thomas A. Guerrero-Garcia, Sara Gandolfi, Jacob P. Laubach, Teru Hideshima, Dharminder Chauhan, Constantine Mitsiades, Kenneth C. Anderson & Paul G. Richardson, 2018, The power of proteasome inhibition in multiple Myeloma, *Expert Review of Proteomics*, 15:12, 1033-1052
29. Landgren Ola, Sonneveld Pieter, Jakubowiak Andrzej, Mohty Mohamad, Iskander Karim S., Khalid Mezzi, David S. Siegel, 2019, Carfilzomib with immunomodulatory drugs for the treatment of newly diagnosed multiple myeloma, *Leukemia*, 33:2127–2143
30. Pawel Robak and Tadeusz Robak, 2019, Bortezomib for the Treatment of Hematologic Malignancies: 15 Years Later, *Drugs in R&D*, 19:73–92
31. Voorhees PM, Orlowski RZ, 2006, The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 46:189–213.
32. Sánchez-Serrano I., 2006, Success in translational research: lessons from the development of Bortezomib, *Nat Rev Drug Discov*, 5:107–14
33. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, 2005, Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions (APEX) Investigators, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma, *N Engl J Med*, 352:2487–98
34. Palumbo A, Anderson K, 2011, Multiple myeloma, *N Engl J Med*, 364:1046–60

35. Kane RC, Bross PF, Farrell AT, Pazdur R., 2003, Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy, *Oncologist*, 8:508–13
36. Kane RC, Farrell AT, Sridhara R, Pazdur R., 2006, United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy, *Clin Cancer Res*, 12:2955–60
37. Monika Engelhardt, Magdalena Szymaniak-Vits, Stefanie Ajayi, Sandra Maria Dold, Stefan Jürgen Müller, Sophia Scheubeck and Ralph Wäsch, 2018, *Carfilzomib*, Springer Nature
38. Fabrizio Accardi, Denise Toscani, Marina Bolzoni, Benedetta Dalla Palma, Franco Aversa, and Nicola Giuliani, 2015, Mechanism of Action of Bortezomib and the New Proteasome Inhibitors on Myeloma Cells and the Bone Microenvironment: Impact on Myeloma-Induced Alterations of Bone Remodeling, *BioMed Research International*, 2015
39. I. M. Konstantinova, A. S. Tsimokha, and A. G. Mittenberg, “Role of proteasomes in cellular regulation, 2008, *International Review of Cell and Molecular Biology*, 267:59–124
40. P. J. Eriott and J. Adams, 1999, Recent advances in understanding proteasome function, *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, vol. 2, no. 5, pp. 484–490
41. K. R. Landis-Piwowar, V. Milacic, D. Chen et al., 2006, The proteasome as a potential target for novel anticancer drugs and chemosensitizers, *Drug Resistance Updates*, vol. 9, no. 6, pp. 263–273
42. M. Groll, L. Ditzel, J. Lowe et al., 1997, Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution, *Nature*, vol. 386, no. 6624, pp. 463–471
43. W. Heinemeyer, M. Fischer, T. Krimmer, U. Stachon, and D. H. Wolf, 1997, The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 40, pp. 25200–25209
44. Ernst A, Avvakumov G, Tong J, et al., 2013, A strategy for modulation of enzymes in the ubiquitin system, *Science*, 339:590–5.
45. Thomas A. Guerrero-Garcia, Sara Gandolfi, Jacob P. Laubach, Teru Hideshima, Dharminder Chauhan, Constantine Mitsiades, Kenneth C. Anderson & Paul G. Richardson, 2018, The power of proteasome inhibition in multiple myeloma, *Expert Review of Proteomics*, 15:12, 1033-1052
46. Vassilis Patriarcheas, Alexandra-Irene Bekiari, The role of Proteasome in Multiple Myeloma, Pathophysiology School of Medicine - University of Patras

47. L.H.A.M. de Wilt et al., 2013, Bortezomib and TRAIL: A perfect match for apoptotic elimination of tumour cells, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 85:363–372
48. Mattias Carlsten, Ali Namazia, Robert Regea, Emily Levya, Maria Berga, Cynthia St. Hilaire and Richard W. Childsa ,Bortezomib sensitizes multiple myeloma to NK cells via ER-stress-induced suppression of HLA-E and upregulation of DR5, 2019, *Oncoimmunology*, vol. 8, no. 2
49. Stewart AK, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, et al., 2015, Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma, *N Engl J Med*, 372(2):142–152
50. Kumar S, Moreau P, Hari P, et al., 2017, Management of adverse events associated with ixazomib plus lenalidomide/dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma, *Br J Haematol*, 178(4):571–582
51. Stansborough RL, Gibson RJ, 2017, Proteasome inhibitor-induced gastrointestinal toxicity, *Curr Opin Support Palliat Care*, 11(2):133–137
52. Koulaouzidis G, Lyon AR, 2017, Proteasome inhibitors as a potential cause of heart failure, *Heart Fail Clin*, 13(2):289–295
53. Cole DC, Frishman WH, 2018, Cardiovascular complications of proteasome inhibitors used in multiple myeloma, *Cardiol Rev*, 26(3):122–129
54. Richardson PG, Delforge M, Beksac M, et al, 2012, Management of treatment-emergent peripheral neuropathy in multiple myeloma, *Leukemia*, 26(4):595–608.
55. Chanan-Khan A, Sonneveld P, Schuster MW, et al, 2008, Analysis of herpes zoster events among bortezomib-treated patients in the phase III APEX study, *J Clin Oncol*, 26(29):4784–4790
56. Vickrey E, Allen S, Mehta J, et al, 2009, Acyclovir to prevent reactivation of varicella zoster virus (herpes zoster) in multiple myeloma patients receiving bortezomib therapy, *Cancer*, 115(1):229–232
57. Siegel D, Martin T, Nooka A, et al, 2013, Integrated safety profile of single-agent carfilzomib: experience from 526 patients enrolled in 4 phase II clinical studies, *Haematologica*, 98(11):1753–1761
58. Gavriatopoulou M, Terpos E, Kastritis E, et al, 2016, Current treatments for renal failure due to multiple myeloma, *Expert Opin Pharmacother*, 17(16):2165–2177
59. Atkins J.F., Gesteland R.F., Cech T., 2011, RNA worlds: from life’s origins to diversity in gene regulation, Cold Spring Harbor Lab Press

60. Economopoulou MA.,Fragoulis EG., Sideris DC., 2007, Molecular cloning and characterization of the human RNase kappa, an ortholog of Cc RNase, *Nucleic Acids Res* 35:6389-6398
61. Jonathan Houseley and David Tollervey, 2009, The Many Pathways of RNA Degradation, *Cell* 136: 763–776
62. Nicholson A.W., 2006, Function, mechanisms and regulation of bacterial ribonucleases, *FEMS Microbiol Rev* 23:371-390
63. Cooper GM., 2000, *The Cell: A Molecular Approach*.,Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2nd edition
64. Allen W. Nicholson, 1999, Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases, *FEMS Microbiology Reviews*, 23:371-390
65. TM Picknett and S Brenner, 2001, *RNases*, Elsevier Inc, volume 3, pp 1732–1733
66. Diamantis C. Sideris and Emmanuel G. Fragoulis, 1987, Purification and characterization of a ribonuclease specific for poly(U) and poly(C) from the larvae of *Ceratitis capitata*, *Eur. J. Biochem.*, 264:309-315
67. Theodoros N. Rampias, Emmanuel G. Fragoulis and Diamantis C. Sideris, 2008, Genomic structure and expression analysis of the RNase j family ortholog gene in the insect *Ceratitis capitata*, *FEBS Journal*, 275:6217–6227
68. Theodoros N. Rampias, Diamantis C. Sideris and Emmanuel G. Fragoulis, 2003, Cc RNase: the *Ceratitis capitata* ortholog of a novel highly conserved protein family in metazoans, *Nucleic Acids Research*, 31(12): 3092-3100
69. Marie-angela I. Economopoulou, Emmanuel G. Fragoulis and Diamantis C. Sideris, 2007, Molecular cloning and characterization of the human RNase κ , an ortholog of Cc RNase, *Nucleic Acids Research*, 35(19):6389–6398
70. Marianna N. Kiritsi, Emmanuel G. Fragoulis and Diamantis C. Sideris, 2012, Essential cysteine residues for human RNase κ catalytic activity, *FEBS Journal*, 279:1318–1326
71. Brent A. Hackett, Ari Yasunaga, Debasis Panda, Michael A. Tartell, Kaycie C. Hopkins, Scott E. Hensley and Sara Cherrya, 2015, RNASEK is required for internalization of diverse acid-dependent viruses, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 112(25):7797–7802
72. Jill M. Perreira, Aaron M. Aker, George Savidis, Annick Gauthier, Michael, Franti, Abraham L. Brass, 2015, RNASEK Is a V-ATPase-Associated Factor Required for Endocytosis and the Replication of Rhinovirus, Influenza A Virus, and Dengue Virus, *Cell Reports*, 12:850–863

73. Berg J.M., Tymoczko J.L. and Stryer L., 2012, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 7η Έκδοση, σελ. 903-909
74. Stamm S., Ben Aris S., Rafalska I., Tang Y., Zhang Z. et al., 2005, Function of alternative splicing , *Gene* 344:422-430
75. Dou Y., Fox Walsh KL., Baldi PF., Hertel K., 2006, Genomic splice-site analysis reveals frequent alternative splicing close to the dominant splice site, *RNA* 12:2047-2056
76. Allan M. Maxam and Walter Gilbert, 1977, A new method for sequencing DNA, *Biochemistry*.
77. Evangelos D. Karousis and Diamantis C. Sideris, 2014, A Subtle Alternative Splicing Event Gives Rise to a Widely Expressed Human RNase κ Isoform, *PLOS ONE*, 9(5)
78. Panagiotis G. Adamopoulos, Christos K. Kontos, Andreas Scorilas, Diamantis C. Sideris, 2019, Identification of novel alternative transcripts of the human Ribonuclease κ (RNASEK) gene using 3' RACE and high-throughput sequencing approaches
79. Gkratsou AS, Fragoulis EG and Sideris DC, 2013, The effect of cytostatic Drugs on the mRNA Expression levels of Ribonuclease κ in breast and ovarian cancer cell lines , *Anticancer Agents Med Chem.*, 14(3):400-408
80. The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer Wan-Cheol Kim, Chow H. Lee Chemistry Program, University of Northern British Columbia, 3333 University Way, Prince George, BC, Canada V2N 4Z9
81. M. Morita, T. Suzuki, T. Nakamura, K. Yokoyama, T. Miyasaka, T. Yamamoto, 2007, Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers elevation of the p27Kip1 mRNA level and impairs cell growth, *Mol. Cell. Biol.* 27 4980.
82. T. Miyasaka, M. Morita, K. Ito, T. Suzuki, H. Fukuda, S. Takeda, J. Inoue, K. Semba, T. Yamamoto, 2008, Interaction of antiproliferative protein Tob with the CCR4-NOT deadenylase complex, *Cancer Sci.*, 99:755–761
83. W.S. Lai, E.A. Kennington, P.J. Blackshea, 2003, Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease, *Mol. Cell. Biol.*, 23:3798–3812.
84. E. Suswam, Y. Li, X. Zhang, G.Y. Gillespie, X. Li, J.J. Shacka, L. Lu, L. Zheng, P.H. King, 2005, Tristetraprolin down-regulates interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in malignant glioma cells, *Cancer Res.*, 68:674–682

85. C.F. Chou, A. Mulky, S. Maitra, W.J. Lin, R. Gherzi, J. Kappes, C.Y. Chen, 2005, Tethering KSRP a decay-promoting AU-rich element-binding protein, to mRNAs elicits mRNA decay, *Mol. Cell. Biol.* 26:3695–3706.
86. H. Tran, F. Maurer, Y. Nagamine, 2003, Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2, *Mol. Cell Biol.*, 23:7177–7188
87. K.C. Moraes, C.J. Wilusz, J. Wilusz, 2006, CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase, *RNA*, 12:1084–1091
88. Atkins J.F., Gesteland R.F., Cech T., 2011, *RNA worlds: from life's origins to diversity in gene regulation*, Cold Spring Harbor Lab Press
89. C. Baglioni, A. De Benedetti, G.J. Williams, 1984, Cleavage of nascent reovirus mRNA by localized activation of the 2'-5'-oligoadenylate-dependent endoribonuclease, *J. Virol*, 52:865–871
90. D.H. Wreschner, T.C. James, R.H. Silverman, I.M. Kerr, 1981, RibosomalRNA , Cleavage, nuclease activation and 2-5A(ppp(A2'p)nA) in interferon-treated cells, *Nucleic Acids Res*, 9:1571–1581
91. X.L. Li, J.A. Blackford, C.S. Judge, M. Liu, W. Xiao, D.V. Kalvakolanu, B.A. Hassel, 2000, RNase-L-dependent destabilization of interferon-induced mRNAs. A role for the 2-5A system in attenuation of the interferon response, *J. Biol. Chem.* 275:8880–8888
92. B.A. Hassel, A. Zhou, C. Sotomayor, A. Maran, R.H. Silverman, 1993, A dominant negative mutant of 2-5A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects of interferon, *EMBO J*, 12:3297–3304
93. B. Dong, R.H. Silverman, 1995, 2-5A-dependent RNase molecules dimerize during activation by 2-5A, *J Biol Chem*, 270:4133–4137
94. T.M. Katona, B.L. Neubauer, P.W. Iversen, S. Zhang, L.A. Baldrige, L. Cheng, 2005, Elevated expression of angiogenin in prostate cancer and its precursors, *Clin. Cancer Res*, 11:8358–8363.
95. Y. Chen, S. Zhang, Y.P. Chen, J.Y. Lin, 2006, Increased expression of angiogenin in gastric carcinoma in correlation with tumor angiogenesis and proliferation, *World J. Gastroenterol*, 12:5135–5139.
96. P. Vihinen, M. Kallioinen, M.S. Vuoristo, J. Ivaska, K.J. Syrjänen, M. Hahka-Kemppinen, P.L. Kellokumpu-Lehtinen, S.O. Pyrhönen, 2007, Serum angiogenin levels predict treatment response in patients with stage IV melanoma, *Clin. Exp. Metastasis*, 24:567–574

97. M. Kawada, H. Inoue, M. Arakawa, K. Takamoto, T. Masuda, D. Ikeda, 2007, Highly tumorigenic human androgen receptor-positive prostate cancer cells overexpress angiogenin, *Cancer Sci.*, 98:350–356.
98. J. Song, J.Wang, J. Yang, C. Jiang,W. Shen, L.Wang, 2006, Influence of angiogenin on the growth of A375 human melanoma cells and the expression of basic fibroblast growth factor, *Melanoma Res.*, 16:119–126.
99. T. Tsuji, Y. Sun, K. Kishimoto, K.A. Olson, S. Liu, S. Hirukawa, G.F. Hu, 2005, Angiogenin is translocated to the nucleus of HeLa cells and is involved in ribosomal RNA transcription and cell proliferation, *Cancer Res.* 65:1352–1360
100. N. Yoshioka, L. Wang, K. Kishimoto, T. Tsuji, G.F. Hu, 2006, A therapeutic target for prostate cancer based on angiogenin-stimulated angiogenesis and cancer cell proliferation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103:14519–14524
101. B. Crabtree, N. Thiyagarajan, S.H. Prior, P. Wilson, S. Iyer, T. Ferns, R. Shapiro, K. Brew, V. Subramanian, K.R. Acharya, 2007, Characterization of human angiogenin variants implicated in amyotrophic lateral sclerosis, *Biochemistry*, 46:11810–11818.
102. T. Wang, M. Yang, J. Chen, T. Watkins, C. Xiuyun, 2005, Inhibition of B16 melanoma growth in vivo by retroviral vector-mediated human ribonuclease inhibitor, *Angiogenesis*, 8:73–81.
103. P. Fu, J. Chen, Y. Tian, T. Watkins, X. Cui, B. Zhao, 2005, Anti-tumor effect of hematopoietic cells carrying the gene of ribonuclease inhibitor, *Cancer Gene Ther.*, 12:268–275.