



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

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Μελέτη της έκφρασης εναλλακτικών μεταγράφων
της RNase κ στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία**

Μαρία Ποταμού

Βιολόγος

Αθήνα 2020



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

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Μελέτη της έκφρασης εναλλακτικών μεταγράφων της RNase κ
στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία**

Μαρία Ποταμού

Βιολόγος

Αθήνα 2020



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ IV

**Μελέτη της έκφρασης εναλλακτικών μεταγράφων της RNase κ
στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία**

Μαρία Ποταμού

Βιολόγος

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: κ. Σίδερης Διαμάντης, Αναπληρωτής καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας,
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- κ. Σίδερης Διαμάντης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
- κ. Σκορίλας Ανδρέας, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
- κ. Κοντός Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2020

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική» κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020. Εκπονήθηκε στην ερευνητική μονάδα ΙΙΙ του τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας υπό την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή κ. Διαμάντη Σίδηρη. Τα δείγματα των ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, προέρχονται από το εργαστήριο του κ. Χρήστου Κοντού και συλλέχθηκαν από τον κ. Σωτήρη Παπαγεωργίου στην Β' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου "Αττικόν".

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα μου, κ. Σίδηρη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθημερινή επιστημονική υποστήριξη και καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην κα. Κραββαρίτη Ελευθερία, μέλος ΕΔΙΠ του τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, για την πολύτιμη βοήθεια και καθημερινή υποστήριξη κατά την εκπόνηση της εργασίας.

Οφείλω να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ. Χρήστο Κοντό για τη βοήθεια που μου πρόσφερε τόσο κατά την πειραματική πορεία όσο και κατά τη στατιστική ανάλυση. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες Κατερίνα Κατσαράκη και Πένυ Αρτεμάκη για τη σημαντική βοήθεια τους.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Αλέξανδρο Χαρωνιτάκη για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη κατά την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορα Κωνσταντίνα Πανουτσοπούλου για τη βοήθεια της κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Dr Παναγιώτη Αδαμόπουλο και τον υποψήφιο Διδάκτορα Μάριο Διαμαντόπουλο για την εξίσου σημαντική βοήθεια και επιστημονική υποστήριξη τους.

Ένα θερμό ευχαριστώ οφείλω στη φίλη και συνάδελφο μου Αγγελική Γιαννοπούλου για τη στήριξη, τη βοήθεια και την υπέροχη συνεργασία που είχαμε εντός και εκτός εργαστηρίου. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής μονάδας ΙΙΙ, Μαρία Τατούλη, Ευαγγελία Αναγνώστου και Άγγελο Ζαχαρογιάννη για τη βοήθεια και την άψογη συνεργασία που είχαμε.

Επιπλέον θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας για την συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους. Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στις φίλες και συναδέλφους μου Κωνσταντίνα Γεωργούλια και Χριστίνα Στρατή για την πολύτιμη υποστήριξη τους. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου, που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζει σε κάθε μου βήμα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ	1
1.2 ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	3
1.3 ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	8
1.3.1 Σταδιοποίηση	9
1.3.2 Συμπτώματα και Διάγνωση	10
1.3.3 Μοριακή Παθογένεια	12
1.3.4 Προγνωστικοί Δείκτες στην Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία.....	17
1.3.5 Θεραπεία	19
1.4 ΤΟ RNA ΩΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΜΟΡΙΟ	21
1.5 ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ	23
1.5.1 Βιολογική Λειτουργία Ριβονουκλεασών.....	24
1.5.2 Κατηγορίες Ριβονουκλεασών.....	27
1.5.3 Ριβονουκλεάσες και Καρκίνος.....	28
1.5.4 Οικογένεια Ριβονουκλεάσης κ.....	32
1.5.4.1 Ριβονουκλεάση κ και Καρκίνος	35
1.6 ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΣΥΡΡΑΦΗ	36
1.6.1 Εναλλακτική συρραφή και Ριβονουκλεάση κ.....	37
1.7 ΣΚΟΠΟΣ	40
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	41
2.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ	41
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA	46
2.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ RNA	48
2.4 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ RNA ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	48
2.5 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	51
2.6 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ-REVERSE TRANSCRIPTION (RT)	51
2.7 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME Q-PCR)	54
2.8 ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	60
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	62
3.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΗΣ RNASE K	62
3.2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΗΣ RNASE Κ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	70
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	77
3.3.1 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων της RNase κ μεταξύ ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και υγιών ατόμων και αξιολόγηση της διαγνωστικής τους αξίας.	77

3.3.2	Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων της RNase κ με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΧΛΛ.....	84
3.3.3	Ανάλυση Ολικής Επιβίωσης KAPLAN-MEIER	96
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	101
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	111

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

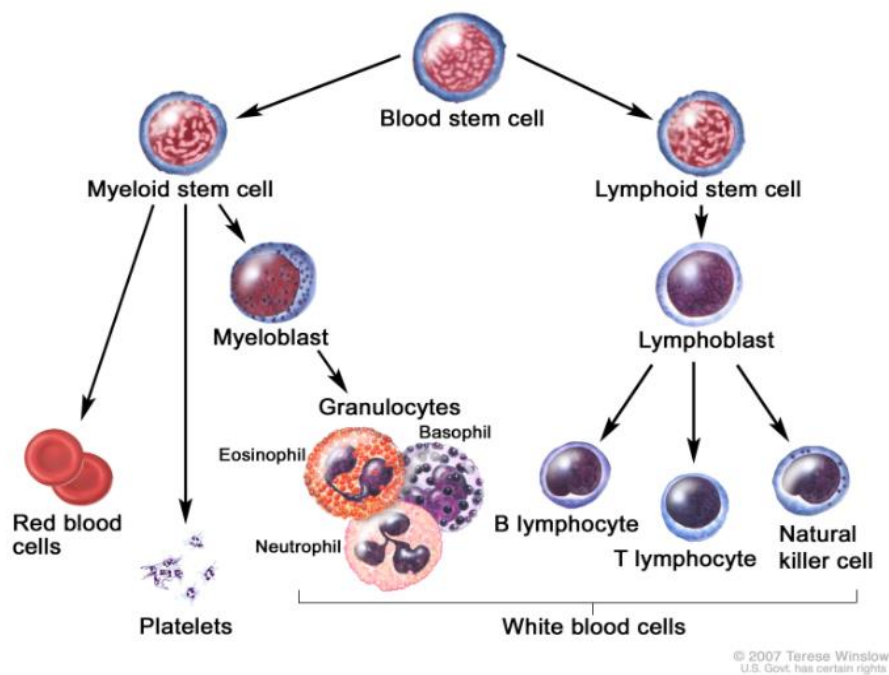
1.1 ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Η αιμοποίηση είναι η διαδικασία παραγωγής των κυττάρων του αίματος. Πραγματοποιείται στον μυελό των οστών, έναν κυτταροβριθή χαλαρό συνδετικό ιστό με πυκνή αγγείωση, που βρίσκεται στις μυελικές κοιλότητες των οστών. Τα πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται προς όλες τις κυτταρικές σειρές του αίματος. Κατά την αιμοποίηση μπορούν να δώσουν γένεση σε δύο κύριους τύπους προγονικών κυττάρων, τα αρχέγονα κύτταρα της λεμφικής σειράς και τα αρχέγονα κύτταρα της μυελικής ή αλλιώς αιμοποιητικής σειράς. Τα αρχέγονα κύτταρα της λεμφικής σειράς (λεμφοβλάστες) διαφοροποιούνται και ωριμάζουν σε τρεις τύπους λεμφοκυττάρων, τα Β λεμφοκύτταρα, τα Τ λεμφοκύτταρα και τα φυσικά κύτταρα φονείς (natural killer, NK). Τα Β και Τ λεμφοκύτταρα συμμετέχουν στην επίκτητη ανοσία του οργανισμού ενώ τα NK κύτταρα λαμβάνουν μέρος στη φυσική ανοσία. Τα NK κύτταρα αναγνωρίζουν μόρια που παρουσιάζονται μέσω του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC I) και μπορούν να διακρίνουν κύτταρα τα οποία έχουν προσβληθεί από ιούς καθώς οι ιοί αναστέλλουν την έκφραση των MHC I μορίων. Μετά την ενεργοποίησή τους, τα NK κύτταρα εκκρίνουν ιντερφερόνη-γ και κυτταροκίνες, καταστρέφοντας τελικά το κύτταρο-στόχο. Σε περίπτωση που οι μηχανισμοί φυσικής ανοσίας δεν καταφέρουν να εξουδετερώσουν τον μικροοργανισμό που εισήλθε στον οργανισμό, ενεργοποιείται η επίκτητη ανοσία. Το ξένο αντιγόνο μέσω των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων παρουσιάζεται στα λεμφοκύτταρα και οδηγεί στην ωρίμανση ειδικών Β και Τ λεμφοκυττάρων. Τα Β λεμφοκύτταρα όταν ενεργοποιηθούν μετατρέπονται σε πλασματοκύτταρα τα οποία παράγουν και εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνες (αντισώματα) που δεσμεύονται ειδικά στο αντιγόνο και με την βοήθεια άλλων κυττάρων το εξουδετερώνουν. Ρόλος των Τ λεμφοκυττάρων είναι να βοηθούν τα Β λεμφοκύτταρα, να αντιμετωπίζουν ενδοκυττάρια παθογόνα και να καταστρέφουν κύτταρα που έχουν προσβληθεί από ιούς (1).

Τα αρχέγονα κύτταρα της μυελικής σειράς (μυελοβλάστες) μπορούν να διαφοροποιηθούν σε πολυμορφοπύρηννα κύτταρα (ουδετερόφιλα, βασεόφιλα, ηωσινόφιλα) μακροφάγα/μονοκύτταρα, ερυθροκύτταρα και αιμοπετάλια. Κατά τη φυσική ανοσία

κινητοποιούνται τα πολυμορφοπύρρηνα και τα μακροφάγα κύτταρα. Συμμετέχουν σε διεργασίες όπως η αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών, οι αντιδράσεις φλεγμονής και οι αλλεργικές αντιδράσεις. Πιο συγκεκριμένα, τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς ενώ τα βασεόφιλα και τα ηωσινόφιλα εκκρίνουν κοκκία με διάφορες πρωτεΐνες και τοξίνες καταστρέφοντας έτσι τα παθογόνα. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι κύτταρα με υψηλή εξειδίκευση, που έχουν ως αποστολή την ανταλλαγή των αναπνευστικών αερίων. Τα αιμοπετάλια θεωρούνται κυτταρικά υπολείμματα και ρόλος τους είναι η διατήρηση της αιμόστασης.

Αφού ολοκληρωθεί η ωρίμανση των κυττάρων στον μυελό των οστών, τα κύτταρα ελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος όπου και επιτελούν τις διάφορες λειτουργίες τους. Η πολύπλοκη αυτή διαδικασία της ωρίμανσης και της διαφοροποίησης των κυττάρων ελέγχεται από πληθώρα μηνυμάτων και παραγόντων ώστε η παραγωγή των ώριμων κυττάρων να γίνεται ομαλά, ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού (2).



Εικόνα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της αιμοποίησης (3)

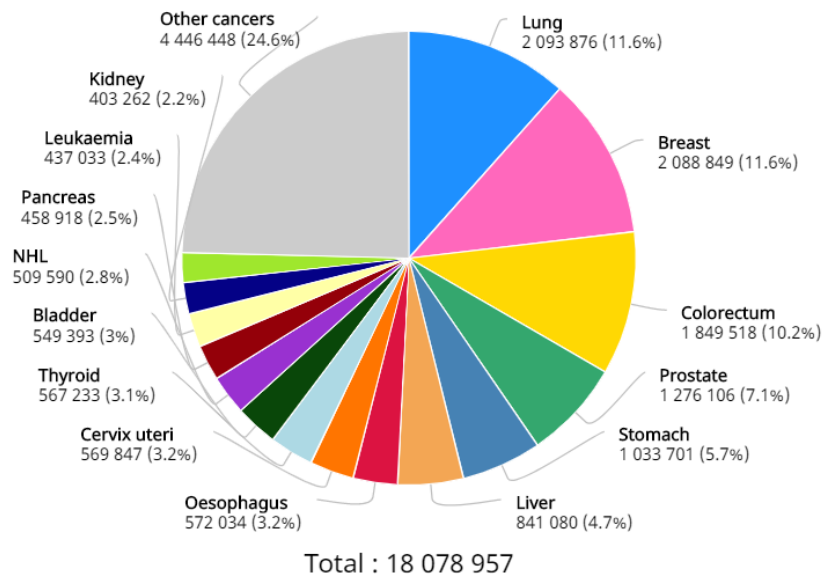
1.2 ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Η λευχαιμία ορίζεται ως το σύνολο των αιματολογικών νεοπλασιών που οδηγούν στην παραγωγή μεγάλου αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων στον μυελό των οστών ή στην κυκλοφορία του αίματος ή και στα δύο. Ο όρος λευχαιμία δόθηκε από τον Γερμανό παθολόγο Rudolf Virchow το 1847 και προέρχεται από τις λέξεις λευκός και αίμα (4).

Η λευχαιμία χωρίζεται σε τέσσερις κύριες κατηγορίες όμως λόγω της μεγάλης κλινικής και παθολογικής ετερογένειας που εμφανίζει, χωρίζεται σε περαιτέρω υποκατηγορίες. Πρώτο κριτήριο για τον διαχωρισμό είναι το χρονικό διάστημα ανάπτυξης της νόσου (οξεία ή χρόνια λευχαιμία). Η οξεία λευχαιμία αναπτύσσεται γρήγορα και συσσωρεύονται πολλά ανώριμα λευκοκύτταρα σε αντίθεση με τη χρόνια λευχαιμία που έχει βραδεία ανάπτυξη και τα κύτταρα είναι πιο ώριμα. Το δεύτερο κριτήριο είναι ο τύπος των λευκών αιμοσφαιρίων που επηρεάζονται (μυελογενής ή λεμφοκυτταρική λευχαιμία). Η λεμφοκυτταρική λευχαιμία αφορά τη μη φυσιολογική ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων ενώ η μυελογενής λευχαιμία αφορά την παθολογική ανάπτυξη των κυττάρων που αναπτύσσονται σε ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια. Οι κατηγορίες που προκύπτουν είναι οι εξής:

1. **Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ)**
2. **Οξεία Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΟΛΛ)**
3. **Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (ΧΜΛ)**
4. **Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ)**

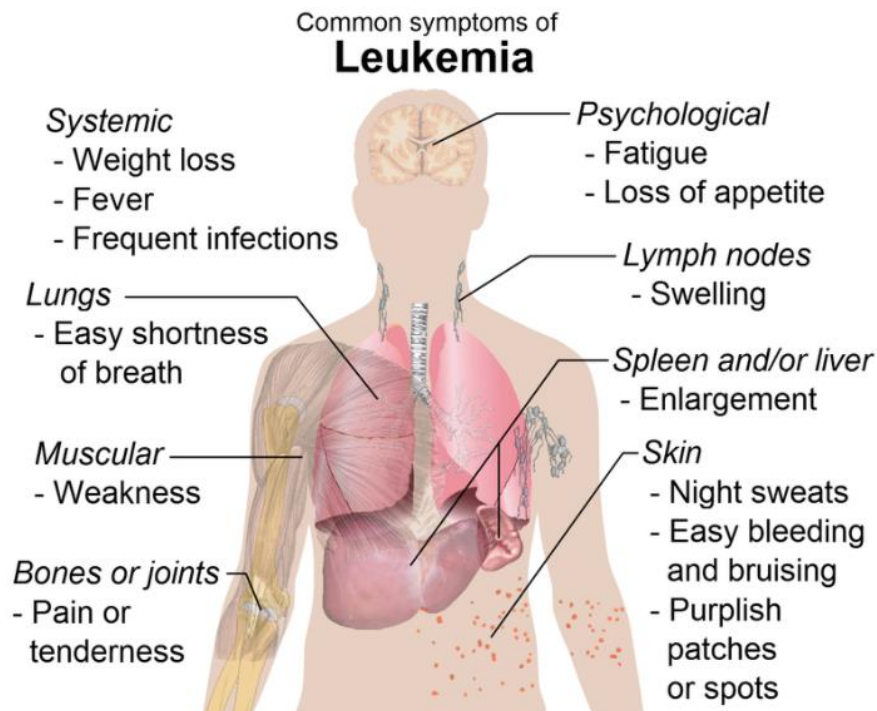
Η λευχαιμία κατατάσσεται στη 13^η θέση με τους πιο συχνούς τύπους καρκίνου. Για το 2018, αποτέλεσε το 2,4% του συνόλου των νέων περιστατικών καρκίνου ανά το παγκόσμιο. Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization,WHO) το 2018 υπήρχαν 437 033 νέα περιστατικά λευχαιμίας και 309 006 θάνατοι. Για το 2020 εκτιμάται ότι θα υπάρχουν 454 341 νέα περιστατικά λευχαιμίας και θα προκληθούν 322 015 θάνατοι από λευχαιμία (5). Ο μέσος όρος ηλικίας εμφάνισης της νόσου είναι τα 60 έτη και εμφανίζεται συχνότερα σε άνδρες απ' ότι σε γυναίκες. Η λευχαιμία πλήττει και τα παιδιά αποτελώντας τον συχνότερο τύπο καρκίνου σε παιδιατρικούς ασθενείς, με ποσοστό 32%. Η οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΟΛΛ) είναι η πιο συχνή μορφή λευχαιμίας στα παιδιά ενώ οι χρόνιες λευχαιμίες είναι σπάνιο να εμφανιστούν.



Εικόνα 1.2: Γραφική αναπαράσταση των νέων περιστατικών καρκίνου για το 2018. Η λευχαιμία αποτελεί το 2,4% του συνόλου των περιπτώσεων λαμβάνοντας την 13^η θέση στη λίστα με τους πιο συχνούς καρκίνους (5)

Τα σημεία και τα συμπτώματα ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο της λευχαιμίας, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις τα συμπτώματα απουσιάζουν και η διάγνωση γίνεται τυχαία μετά από εξετάσεις αίματος ρουτίνας. Υπάρχουν κάποια συμπτώματα που είναι κοινά σ' όλους τους τύπους λευχαιμίας, όπως ανυποχώρητες μολύνσεις, απώλεια βάρους, αίσθημα εξουθένωσης, αιμορραγίες και μελανιές, ματωμένα ούλα, πυρετός, στομαχόπονος, πρησμένοι λεμφαδένες και ωχρότητα (6). Τα συμπτώματα εμφανίζονται λόγω της συσσώρευσης των ανώμαλων λευκών αιμοσφαιρίων και της αδυναμίας τους να επιτελέσουν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες. Οι ανυποχώρητες μολύνσεις οφείλονται στο ότι τα παθολογικά λευκά αιμοσφαίρια δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν τα παθογόνα που εισέρχονται στον οργανισμό. Εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των λευχαιμικών κυττάρων στον μυελό των οστών δεν υπάρχει αρκετός χώρος, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η παραγωγή και η λειτουργία των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος. Για παράδειγμα τα ερυθροκύτταρα μειώνονται, έτσι μεταφέρεται λιγότερο οξυγόνο στον οργανισμό με συνέπεια οι ασθενείς να νιώθουν κόπωση και εξάντληση. Επίσης, μειώνεται ο αριθμός των αιμοπεταλίων γεγονός που σημαίνει ότι το αίμα δεν μπορεί να πήξει σωστά. Για αυτό και πολύ συχνά οι ασθενείς έχουν μελανιές και αιμορραγούν έστω και με μικρό κόψιμο.

Τα συμπτώματα που αναφέρθηκαν δεν αφορούν αποκλειστικά τη λευχαιμία, για αυτό η τελική διάγνωση γίνεται με γενική αίματος και κυτταρομετρία ροής. Οι αιματολογικές εξετάσεις αποδεικνύουν τον υψηλό αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων και κάποιες φορές τον χαμηλό αριθμό ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων. Ακόμη, οι εξετάσεις αίματος θα δώσουν πληροφορίες για τη λειτουργία του ήπατος και των νεφρών. Συμπληρωματικά γίνονται απεικονιστικές εξετάσεις MRI, PET καθώς και κυτταρογενετικοί και ανοσοφαινοτυπικοί έλεγχοι (7).



Εικόνα 1.3: Κοινά συμπτώματα λευχαιμίας

Οξεία Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία

Η οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΟΛΛ) αποτελεί μια ετερογενή ομάδα κακοήθων νεοπλασματικών νοσημάτων με κοινή προέλευση το πρόδρομο κύτταρο της λεμφικής σειράς (1). Είναι συχνή νόσος σε παιδιά κάτω των 14 ετών, ενώ στους ενήλικες εμφανίζεται σε όλες τις ηλικίες αλλά είναι σπανιότερη συγκριτικά με την οξεία μυελογενή λευχαιμία και τις χρόνιες λευχαιμίες. Αυξημένη επίπτωση ΟΛΛ εμφανίζουν τα άτομα που εκτέθηκαν σε ιονίζουσα ακτινοβολία καθώς και οι πάσχοντες από σύνδρομα που αφορούν αδυναμία επιδιόρθωσης του DNA όπως για παράδειγμα τα σύνδρομα Fanconi και Αταξία-Τηλεαγγειεκτασία. Διακρίνεται σε Β και Τ οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία ανάλογα με το αν τα νεοπλάσματα αφορούν τα πρόδρομα Β ή Τ λεμφοκύτταρα. (8). Με βάση τον ανοσοφαινότυπο των κυττάρων προκύπτουν περαιτέρω υποκατηγορίες. Κύρια εργαστηριακά ευρήματα είναι η αναιμία, η θρομβοπενία και η παρουσία λεμφοβλαστών στο αίμα (90%) με ή και χωρίς λευκοκυττάρωση (1). Η μοριακή παθογένεια της νόσου περιλαμβάνει κυτταρογενετικές ανωμαλίες όπως χρωμοσωμικές μεταθέσεις, διαταραχές πλοειδίας καθώς και διαταραχές ογκοκατασταλτικών γονιδίων (πχ. p15, p16). Επίσης, κεντρικό ρόλο στην παθογένεια διαδραματίζει η τροποποίηση της δράσης των μεταγραφικών παραγόντων, είτε αυτή προκύπτει από τις χρωμοσωμικές μετατοπίσεις είτε όχι. Μερικές από τις γνωστές μετατοπίσεις που αφορούν μεταγραφικούς παράγοντες είναι οι t(1;19), t(17;19) και t(12;21) που δημιουργούν τους υβριδικούς μεταγραφικούς παράγοντες E2A-PBX1, E2A-HLF και TEL-AML1 αντίστοιχα (1). Η t(12;21) εντοπίζεται συνήθως στα παιδιά με Β-ΟΛΛ και συνδέεται με καλή πρόγνωση. Τα γονίδια TEL και AML1 κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την αιμοποίηση και έχουν βρεθεί και σε άλλες χρωμοσωμικές μετατοπίσεις που αφορούν λευχαιμίες. Ακόμα μια χρωμοσωμική μετατόπιση που εμφανίζεται στην ΟΛΛ είναι η t(9;22), που είναι γνωστή και ως χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια. Το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια και η παραγόμενη υβριδική πρωτεΐνη BCR-ABL1 είναι χαρακτηριστικό εύρημα στην χρόνια μυελογενή λευχαιμία, εμφανίζεται όμως και στο 33% των ενήλικων ασθενών με ΟΛΛ. Αντίθετα το ποσοστό των παιδιών με ΟΛΛ που φέρουν την μετατόπιση t(9;22) μειώνεται στο 5%. Αυτή η διαφορά στο ποσοστό εξηγεί μερικώς και τη διαφορά στην πρόγνωση μεταξύ ενηλίκων και παιδιών. Οι ενήλικες με ΟΛΛ έχουν συνήθως μέτρια πρόγνωση ενώ τα παιδιά με ΟΛΛ έχουν καλή πρόγνωση, όμως ενήλικες και παιδιά με t(9;22) μετατόπιση έχουν δυσμενή πρόγνωση. (8).

Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία

Ο όρος οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ) χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια ετερογενή ομάδα κλωνικών κακοήθων διαταραχών στις οποίες το πρόβλημα ξεκινά από το πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο. Ως εκ τούτου, αναστέλλεται η διαφοροποίηση και η ωρίμανση των κυττάρων της μυελικής σειράς και παρουσιάζεται ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των κυττάρων στον μυελό των οστών και στο αίμα. Κάποιες φορές διασπείρεται και σε άλλα μέρη του σώματος όπως οι λεμφαδένες, το συκώτι, η σπλήνα, το κεντρικό νευρικό σύστημα και οι όρχεις. Η ΟΜΛ αποτελεί το 90% των οξείων λευχαιμιών στους ενήλικες και το 10% στα παιδιά. Η κλινική εικόνα των ασθενών με ΟΜΛ είναι αποτέλεσμα κυρίως της διήθησης του μυελού των οστών από τη νόσο με συνέπεια να παρεμποδίζεται η λειτουργία όλων των φυσιολογικών αιμοποιητικών σειρών. Τα εργαστηριακά ευρήματα περιλαμβάνουν αναιμία, ουδετεροπενία, θρομβοπενία και λευκοκυττάρωση με παρουσία άωρων κυττάρων στο αίμα. Τα άωρα κύτταρα μπορεί να είναι μυελοβλάστες, προμυελοκύτταρα, μονοβλάστες, μονοκύτταρα, άωροι-δυσπλαστικοί ερυθροβλάστες, μεγακαρυοβλάστες σε ποσοστό και αναλογία που ποικίλει βάση της υποκατηγορίας της ΟΜΛ. Οι παράγοντες κινδύνου της νόσου είναι διάφορες γενετικές ανωμαλίες όπως η αναιμία Fanconi, το σύνδρομο Blackfan-Diamond και το σύνδρομο Li-Fraumeni, έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, φάρμακα πχ. αλκυλιωτικοί παράγοντες. Η κυτταρογενετική και μοριακή μελέτη της ΟΜΛ οδήγησε στην ανακάλυψη διάφορων ανωμαλιών. Στην παθογένεια συγκαταλέγονται χρωμοσωμικές μεταθέσεις, διπλασιασμός γενετικού υλικού, μονοσωμία ή έλλειψη των χρωμοσωμάτων 5 και 7, μεταλλάξεις των γονιδίων C/EBPA, FLT3, AML1 κλπ.

Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία

Η χρόνια μυελογενής λευχαιμία (ΧΜΛ) αποτελεί μυελοϊπερπλαστικό νόσημα και χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτη αύξηση των κυττάρων της μυελικής σειράς στον μυελό των οστών και συσσώρευση τους στην κυκλοφορία του αίματος. Η παγκόσμια επίπτωση της ΧΜΛ είναι 1 με 2 περιστατικά ανά 100.000 άτομα ετησίως. Η ΧΜΛ εμφανίζεται σε όλες τις ηλικίες είναι όμως πιο συχνή σε άτομα ηλικίας 45 με 55 έτη. Κατά τη φυσική πορεία της νόσου διακρίνονται τρεις φάσεις, η χρόνια, η επιταχυνόμενη και η βλαστική κρίση. Στη χρόνια φάση το κύριο εργαστηριακό εύρημα είναι η λευκοκυττάρωση. Στην επιταχυνόμενη φάση υπάρχουν ολοένα και περισσότεροι βλάστες ενώ στη βλαστική κρίση

τα βλαστικά κύτταρα αποτελούν την μεγάλη πλειονότητα. Το κύριο και χαρακτηριστικό εύρημα στην ΧΜΛ είναι το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια. Πρόκειται για μια αμοιβαία χρωμοσωμική μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 9 και 22, t(9;22), που εντοπίζεται στο 95% των ασθενών με ΧΜΛ. Λόγω της μετατόπισης δημιουργείται το υβριδικό γονίδιο BCR-ABL1 που κωδικοποιεί την αντίστοιχη BCR-ABL1 πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη αυτή έχει πολύ μεγαλύτερη ενεργότητα κινάσης τυροσίνης από τη φυσιολογική πρωτεΐνη ABL1 και ως εκ τούτου, προάγεται ανεξέλεγκτα ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Η διάγνωση της ΧΜΛ αρχίζει με την διαπίστωση της λευκοκυττάρωσης και επιβεβαιώνεται με την ανίχνευση του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια στον μυελό των οστών. Η τρέχουσα θεραπευτική αντιμετώπιση βασίζεται στην χορήγηση αναστολέα της τυροσινικής κινάσης (Imatinib).

1.3 ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι ο συχνότερος τύπος λευχαιμίας στον Δυτικό κόσμο. Εκτιμάται ότι για το 2020 στην Αμερική θα υπάρχουν 21,040 νέα περιστατικά ΧΛΛ και 4,060 θάνατοι από ΧΛΛ. Η μέση ηλικία διάγνωσης των ασθενών είναι τα 72 έτη, επομένως είναι ασθένεια των ενήλικων και σπάνια των ανήλικων ατόμων. Υπάρχει όμως και ένα μικρό ποσοστό ασθενών που διαγιγνώσκονται πριν τα 55 τους χρόνια (9). Δεν σχετίζεται με την έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, περιβαλλοντικούς και χημικούς παράγοντες ή ιούς. Εμφανίζεται όμως με αυξημένη συχνότητα σε άτομα της ίδιας οικογένειας, γεγονός που συνηγορεί υπέρ της συμμετοχής κληρονομικών-γενετικών παραγόντων (1).

Η ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από την παρουσία φαινοτυπικά ώριμων Β λεμφοκυττάρων που όμως είναι μη λειτουργικά και με την πάροδο του χρόνου συσσωρεύονται στον μυελό των οστών, στο αίμα και σε λεμφικούς ιστούς. Υπάρχουν 2 κατηγορίες ΧΛΛ. Η πρώτη αφορά την αργή εξέλιξη της νόσου όπου μεσολαβεί αρκετός χρόνος μέχρι ο ασθενής να χρειαστεί θεραπεία και η δεύτερη κατηγορία είναι η γρήγορη και πιο σοβαρή μορφή της ΧΛΛ. Στις περισσότερες περιπτώσεις εξελίσσεται αργά και οι ασθενείς δεν εμφανίζουν συμπτώματα τουλάχιστον για κάποια χρόνια.

1.3.1 Σταδιοποίηση

Λόγω της ετερογένειας της νόσου, αναπτύχθηκαν 2 συστήματα σταδιοποίησης που χωρίζουν τους ασθενείς σε υποκατηγορίες ανάλογα με τα κλινικά χαρακτηριστικά τους. Το πρώτο είναι το σύστημα Rai που είναι πιο γνωστό στην Αμερική και το δεύτερο είναι το σύστημα Binet, που είναι πιο γνωστό στην Ευρώπη (10).

Πίνακας 1.1: Σύστημα Σταδιοποίησης κατά Binet

Στάδιο	Κλινικά Χαρακτηριστικά
A	Αιμοσφαιρίνη στη γενική αίματος $\geq 10\text{g/dl}$ Αιμοπετάλια στη γενική αίματος ≥ 100.000 < 3 διογκωμένες περιοχές*
B	Αιμοσφαιρίνη στη γενική αίματος $\geq 10\text{g/dl}$ Αιμοπετάλια στη γενική αίματος ≥ 100.000 ≥ 3 διογκωμένες περιοχές*
C	Αιμοσφαιρίνη στη γενική αίματος < 10g/dl ή Αιμοπετάλια στη γενική αίματος < 100.000

*Οι διογκωμένες περιοχές μπορεί να σημαίνουν διογκωμένους λεμφαδένες στο λαιμό, στις μασχάλες, στις βουβωνικές περιοχές, ή διογκωμένο ήπαρ ή διογκωμένο σπλήνα κατά την κλινική εξέταση με ψηλάφηση.

Πίνακας 1.2: Σύστημα σταδιοποίησης κατά Rai

Στάδιο	Κλινικά Χαρακτηριστικά
0	Μόνο αυξημένα λεμφοκύτταρα στη γενική αίματος
I	Αυξημένα λεμφοκύτταρα στη γενική αίματος και διογκωμένοι λεμφαδένες
II	Αυξημένα λεμφοκύτταρα στη γενική αίματος και διογκωμένο ήπαρ ή σπλήνας
III	Αιμοσφαιρίνη στη γενική αίματος < 11g/dl
IV	Αιμοπετάλια στη γενική αίματος < 100.000

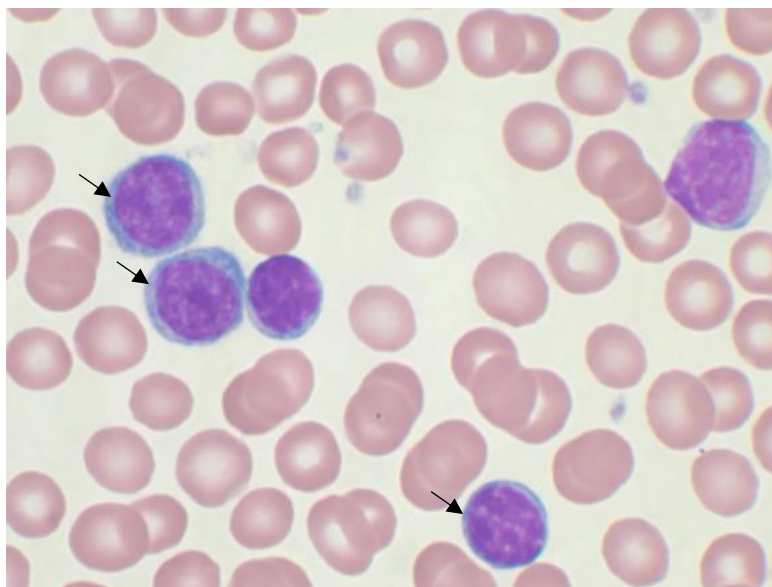
Το στάδιο της ΧΛΛ αποτελεί έναν από τους παράγοντες που επηρεάζουν την πρόγνωση της νόσου, δηλαδή το πόσο γρήγορα θα εξελιχθεί και πόσο σύντομα θα

χρειαστεί θεραπεία. Όσο πιο πρόωμο είναι το στάδιο (π.χ Α κατά Binet και 0 κατά Rai) τόσο καλύτερη είναι η πρόγνωση (11).

1.3.2 Συμπτώματα και Διάγνωση

Στα αρχικά στάδια της νόσου συνήθως δεν υπάρχουν συμπτώματα και κλινικά σημεία, όμως με την πάροδο του χρόνου ο ασθενής μπορεί να εμφανίσει πυρετό, κοιλιακό πόνο, διόγκωση τραχηλικών ή μασχαλιαίων λεμφαδένων, απώλεια βάρους, νυχτερινές εφιδρώσεις, αδυναμία και εξουθένωση καθώς και συχνές και υποτροπιάζουσες λοιμώξεις. Επειδή όμως οι ενδείξεις αυτές ενδεχομένως να μην οφείλονται στην ΧΛΛ, χρειάζονται συγκεκριμένες εξετάσεις για να διαγνωστεί η νόσος, να προσδιοριστεί το στάδιο και η ανάγκη για θεραπεία ή όχι.

Η διάγνωση της ΧΛΛ προϋποθέτει την παρουσία περισσότερων από $5 \times 10^9/L$ Β λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος για τουλάχιστον τρεις μήνες και πραγματοποιείται με κυτταρομετρία ροής. Κατά κανόνα συνοδεύεται και από λευκοκυττάρωση. Στο επίχρισμα περιφερικού αίματος παρατηρούνται μικρά ώριμα λεμφοκύτταρα που έχουν περιορισμένο κυτταρόπλασμα. Ο πυρήνας έχει μερικώς συμπυκνωμένη χρωματίνη και δεν μπορούν να διακριθούν οι πυρηνίσκοι (12). Χαρακτηριστική είναι η παρουσία πυρηνικών σκιών. Στο 15% των περιπτώσεων Β-ΧΛΛ η μορφολογία των κυττάρων μπορεί να είναι «άτυπη», που σημαίνει είτε παρουσία προλεμφοκυττάρων σε αναλογία μεγαλύτερη από 10% είτε παρουσία μεγαλύτερων κυττάρων, κυττάρων με εντομή ή λεμφοκυττάρων με πλασματοκυτταροειδή διαφοροποίηση σε αναλογία 15% (1). Συνήθως οι άλλες αιματολογικές παράμετροι είναι φυσιολογικές. Αναιμία με επίπεδα αιμοσφαιρίνης $<11g/dl$ παρατηρείται στο 10-15% των περιπτώσεων ενώ θρομβοπενία παρατηρείται στο 10% των περιπτώσεων. Συνήθως η παρουσία αναιμίας ή/και θρομβοπενίας οφείλεται στην εκτεταμένη διήθηση του μυελού των οστών από τη νόσο, μπορεί όμως να οφείλεται και σε αυτοάνοσο μηχανισμό ή υπερσπληνισμό.



Εικόνα 1.4: Επίχρισμα περιφερικού αίματος. Με μαύρα βέλη διακρίνονται B λεμφοκύτταρα

Καθοριστικό για την εξέταση αποτελεί το μυελόγραμμα που αποκαλύπτει συνήθως διήθηση του μυελού των οστών από νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα σε ποσοστό <30%. Η μορφολογία των λεμφοκυττάρων που εντοπίζονται στον μυελό των οστών είναι παρόμοια με αυτήν του αίματος. Επίσης, όταν κριθεί απαραίτητο πραγματοποιείται οστεομυελική βιοψία η οποία παρέχει περισσότερες πληροφορίες για τον τύπο διήθησης του μυελού (διάχυτη, μεικτή, οζώδης). Σε κάποιες περιπτώσεις τα λεμφοκύτταρα είναι λιγότερα από $5 \times 10^9/L$ όμως εντοπίζονται στον ασθενή διόγκωση λεμφαδένων και σπλήνας. Η βιοψία λεμφαδένα διαχωρίζει τη Β-ΧΛΛ από το λεμφοκυτταρικό λέμφωμα από μικρά λεμφοκύτταρα. Αν ο αριθμός των Β λεμφοκυττάρων στο αίμα είναι $<5 \times 10^9/L$ και δεν συνυπάρχουν διογκωμένοι λεμφαδένες ή σπλήνας τότε πρόκειται για Β λεμφοκυττάρωση η οποία μπορεί να εξελιχθεί σε ΧΛΛ με την πάροδο του χρόνου (11).

Ο βιοχημικός έλεγχος τις περισσότερες φορές αποκαλύπτει αυξημένη γαλακτική αφυδρογονάση (LHD). Η $\beta 2$ -μικροσφαιρίνη μπορεί επίσης να βρεθεί αυξημένη. Τόσο η LHD όσο και η $\beta 2$ -μικροσφαιρίνη μπορούν να έχουν ανεξάρτητη προγνωστική αξία. Η διαταραχή των γ σφαιρινών είναι ακόμη ένα συχνό εύρημα κατά την διάγνωση. Το 8% και 15% των ασθενών έχει υπογαμμασφαιριναιμία και υπεργαμμασφαιριναιμία αντίστοιχα. Όσον αφορά την υπογαμμασφαιριναιμία, κατά την διάγνωση εντοπίζεται στο 8% όμως

αυξάνεται στο 65% των ασθενών μετά από 10 έτη. Το έλλειμα αρχικά αφορά τις τάξεις IgM, IgA και ακολούθως την IgG.

Η εργαστηριακή διερεύνηση της ΧΛΛ συμπεριλαμβάνει ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό των κυττάρων του αίματος και του μυελού των οστών μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα εκφράζουν τα αντιγόνα κυτταρικής επιφάνειας CD19⁺ και CD20⁺ (13,12). Σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% εντοπίζεται συνέκφραση του CD5⁺ που αποτελεί δείκτη στα T λεμφοκύτταρα. Χαρακτηριστικό εύρημα αποτελεί η ασθενής έκφραση μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης επιφάνειας (sIg). Επιπλέον συχνή είναι και η έκφραση του CD23⁺. Ο δείκτης CD38⁺ ανευρίσκεται στο 20% των περιπτώσεων ενώ οι δείκτες CD22⁺ και FMC7 δεν εκφράζονται ή εκφράζονται ασθενώς. Τυπικό εύρημα είναι η απουσία της έκφρασης του CD79b στο 95% των περιπτώσεων, σε αντίθεση με άλλα B-χρόνια λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα (1).

Ακόμη ένα χαρακτηριστικό των B λεμφοκυττάρων στην ΧΛΛ είναι η περιορισμένη έκφραση των ελαφρών αλυσίδων κ και λ των ανοσοσφαιρινών (12). Ο προσδιορισμός των αντιγόνων επιφάνειας είναι σημαντικός για την διαφοροδιάγνωση της ΧΛΛ από άλλες παθήσεις των B λεμφοκυττάρων όπως η λευχαιμία εκ τριχωτών κυττάρων ή το λέμφωμα από κύτταρα μανδύα. Για παράδειγμα στο λέμφωμα από κύτταρα μανδύα το αντιγόνο CD5 εκφράζεται στα λεμφοκύτταρα, όμως το αντιγόνο CD23 όχι (14).

1.3.3 Μοριακή Παθογένεια

Με την εξέλιξη την τεχνολογίας και την ευρύτερη χρήση μοριακών τεχνικών διαπιστώνεται πως η ΧΛΛ είναι μια ασθένεια με μεγάλη μοριακή και γενετική ετερογένεια. Έχουν βρεθεί πολλές μεταλλάξεις σε γονίδια, χρωμοσωμικές αλλαγές, επιγενετικές τροποποιήσεις καθώς και αλλαγές στην λειτουργία των microRNAs (15). Η κατανόηση των παραπάνω παθολογικών μηχανισμών που διέπουν την ΧΛΛ είναι ιδιαίτερα σημαντική για την εύρεση νέων διαγνωστικών και προγνωστικών δεικτών αλλά και πιο ειδικών θεραπευτικών στόχων.

Οι ασθενείς με ΧΛΛ μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες ανάλογα με το αν φέρουν ή όχι μεταλλάξεις στα γονίδια της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας των

ανοσοσφαιρινών (IGHV). Ασθενείς που φέρουν μετάλλαξη στη μεταβλητή περιοχή συνήθως έχουν καλύτερη πρόγνωση εν αντιθέσει με τους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη που συνδέονται με χειρότερη πρόγνωση (13, 17). Κατά την φυσιολογική ωρίμανση των Β λεμφοκυττάρων πραγματοποιείται ανασυνδυασμός των γονιδίων της μεταβλητής περιοχής των βαριών και ελαφρών αλυσίδων με αποτέλεσμα να υπάρχει ποικιλομορφία στην παραγωγή των αντιγονικών υποδοχέων που ο καθένας έχει μοναδική ειδικότητα. Στη φύση υπάρχει μεγάλος αριθμός αντιγόνων με ποικίλες δομές, επομένως μέσω της ποικιλομορφίας των αντιγονικών υποδοχέων και των εκκρινόμενων ανοσοσφαιρινών εξασφαλίζεται ότι ο οργανισμός μπορεί να αναγνωρίσει τους διαφορετικούς επιτόπους που υπάρχουν. Στη ΧΛΛ έχει παρατηρηθεί ότι τα Β λεμφοκύτταρα δεν εμφανίζουν ετερογένεια στις ανοσοσφαιρίνες που εκφράζουν αλλά αντίθετα έχουν περιορισμένο ρεπερτόριο γονιδίων ανοσοσφαιρίνης (18). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την πιθανή εμπλοκή συγκεκριμένων αντιγόνων στην ανάπτυξη της νόσου. Μέσα από διάφορες μελέτες έχει βρεθεί ότι υποσύνολα ασθενών με ΧΛΛ φέρουν στερεότυπους υποδοχείς BCRs δηλαδή υποδοχείς με μεγάλη ομοιότητα, παρόλο που η πιθανότητα δύο ανεξάρτητοι κλώνοι Β λεμφοκυττάρων να εκφράζουν τον ίδιο BCR υποδοχέα είναι εξαιρετικά χαμηλή ($<10^{-12}$). Η στερεοτυπία που εμφανίζουν οι υποδοχείς αφορά και τις δυο ομάδες ασθενών, με μεταλλαγμένα ή μη μεταλλαγμένα IGHV γονίδια όμως πιο συχνά έχει παρατηρηθεί στους ασθενείς με μη μεταλλαγμένα IGHV γονίδια (16,17).

Στην περίπτωση της ΧΛΛ δεν έχει βρεθεί μια συγκεκριμένη μετάλλαξη που να είναι χαρακτηριστική για την νόσο. Το 80% των περιπτώσεων της ΧΛΛ διαθέτει μια γενετική αλλαγή, είτε απώλεια είτε προσθήκη γενετικού υλικού. Με την βοήθεια της τεχνικής FISH έχουν βρεθεί πολλές χρωμοσωμικές αλλαγές, με τις πιο συχνές να είναι η έλλειψη του μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος 13 (del13q14), η τρισωμία 12, η έλλειψη του μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος 11 (del11q22-q23) και η έλλειψη του κοντού βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (del17p13).

Χρωμοσωμικές μεταβολές

13q14 deletion-(del13q14) : Η έλλειψη του μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος 13 αποτελεί την πιο συχνή χρωμοσωμική ανωμαλία στην ΧΛΛ καθώς εντοπίζεται στο 50% των ασθενών και ειδικότερα στις περιπτώσεις με μη μεταλλαγμένα IGHV γονίδια. Ασθενείς με 13q14 deletion έχουν συνήθως καλύτερη πρόγνωση (10). Συνήθως η έλλειψη

είναι μονοαλληλική, δηλαδή συμβαίνει στο ένα από τα δύο χρωμοσώματα. Αν και το μέγεθος της περιοχής που διαγράφεται ποικίλει ανάμεσα στους ασθενείς, στη μικρότερη περιοχή που μπορεί να διαγραφεί, περιέχονται 2 γονίδια που κωδικοποιούν για μη κωδικά μόρια RNA (miRNA), το miR-15a και το miR-16-1. Τα miRNAs προσδένονται σε συμπληρωματικά μόρια mRNA ρυθμίζοντας τα επίπεδα των mRNAs καθώς και των πρωτεϊνών που αυτά κωδικοποιούν. Από in vitro μελέτες φαίνεται ότι στη ΧΛΛ τα miR-15a και miR-16-1 ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο κυτταρικό κύκλο, πιο συγκεκριμένα στην μετάβαση από την G0/G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου ελέγχοντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (21). Επιπρόσθετα αυτά τα miRNAs ρυθμίζουν την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2. Στα φυσιολογικά B λεμφοκύτταρα τα miR-15a και miR-16-1 μειώνουν τα επίπεδα έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 με αποτέλεσμα να προωθείται η απόπτωση. Στη ΧΛΛ υπάρχει μειωμένη έκφραση των miRNAs λόγω της απώλειας του γενετικού τόπου στο ένα από τα δύο χρωμοσώματα 13, επομένως παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα της Bcl-2 στα B λεμφοκύτταρα που οδηγούν σε αναστολή της απόπτωσης των κυττάρων αυτών (22). Η έλλειψη 13q14 έχει βρεθεί και σε άλλους καρκίνους όπως στο λέμφωμα του μανδύα (23), στο πολλαπλούν μυέλωμα (24) και στον καρκίνο του προστάτη (25).

Τρισωμία 12 (tri12) : Η τρισωμία 12 έχει βρεθεί στο 10-20% των περιπτώσεων ΧΛΛ και έχει χαρακτηριστεί ως ενδιάμεσος δείκτης κινδύνου (26). Τα λεμφοκύτταρα ασθενών με τρισωμία 12 έχουν άτυπη μορφολογία, που διαφέρει από τα λεμφοκύτταρα των περιπτώσεων ΧΛΛ με άλλες χρωμοσωμικές αλλαγές (27). Επίσης, η τρισωμία 12 σχετίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης θρομβοπενίας, συνδρόμου Richter και δευτερογενών καρκίνων (28). Ακόμη υψηλό ποσοστό ασθενών με τρισωμία 12 έχουν μεταλλάξεις στο NOTCH1 μονοπάτι, γεγονός που σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση (26,27).

11q22-q23 deletion- del(11): Η έλλειψη του μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος 11 εντοπίζεται περίπου στο 20% των ασθενών με ΧΛΛ και η παρουσία της συνδέεται με κακή πρόγνωση (26,31). Ασθενείς με del(11) συνήθως εμφανίζουν βαριά λεμφαδενοπάθεια και έχουν γρήγορη εξέλιξη της νόσου και μειωμένη συνολική επιβίωση (31). Στις περισσότερες περιπτώσεις με έλλειψη 11q απαλείφεται το γονίδιο ataxia

telangiectasia (ATM), το οποίο κωδικοποιεί πρωτεΐνη που είναι σημαντική για την επιδιόρθωση του DNA, ιδιαίτερα για την επιδιόρθωση των θραυσμάτων των 2 αλυσίδων του DNA (32). Το 1/3 των ασθενών με del(11) διαθέτουν μεταλλάξεις και στο εναπομένον ATM αλληλόμορφο με αποτέλεσμα να μειώνεται η επιβίωση των ασθενών αυτών εφόσον υπάρχει πλήρης απώλεια της λειτουργίας της ATM πρωτεΐνης (30,31). Παρόλα αυτά, έχουν βρεθεί και περιπτώσεις με del(11) στις οποίες δεν επηρεάζεται το γονίδιο ATM αλλά το BIRC3 που αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή στο εναλλακτικό μονοπάτι του NF-κB (35).

17p13 deletion-del17p: Η έλλειψη του κοντού βραχίονα στο χρωμόσωμα 17 ανιχνεύεται ως χρωμοσωμική ανωμαλία σε λιγότερο από 10% ασθενών με ΧΛΛ κατά τη διάγνωση και είναι πιο συχνή στην κατηγορία με τα μη μεταλλαγμένα IGHV γονίδια (26). Όσοι ασθενείς φέρουν την del(17p) ανήκουν στην κατηγορία υψηλού κινδύνου και έχουν τη χειρότερη πρόγνωση (14). Το γονίδιο που επηρεάζεται από την αλλαγή αυτή είναι το TP53, ογκοκατασταλτικό γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53. Η πρωτεΐνη p53 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου καθώς συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στην απόπτωση, στην επιδιόρθωση του DNA και στη γήρανση (36). Έχει βρεθεί ότι το 80% των ασθενών φέρει μεταλλάξεις και στο δεύτερο αλληλόμορφο TP53, καταλήγοντας έτσι σε μεγαλύτερη γενετική αστάθεια που εξηγεί και τη χειρότερη πρόγνωση που εμφανίζουν οι ασθενείς με del(17p) (37,38). Επιπλέον, η παρουσία της del(17p) έχει συσχετιστεί με αποτυχία μετά από θεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες, με ανάλογα πουρινών και με το μονοκλωνικό αντίσωμα Rituximab (36,37).

Μεταλλάξεις γονιδίων που εμπλέκονται στη ΧΛΛ

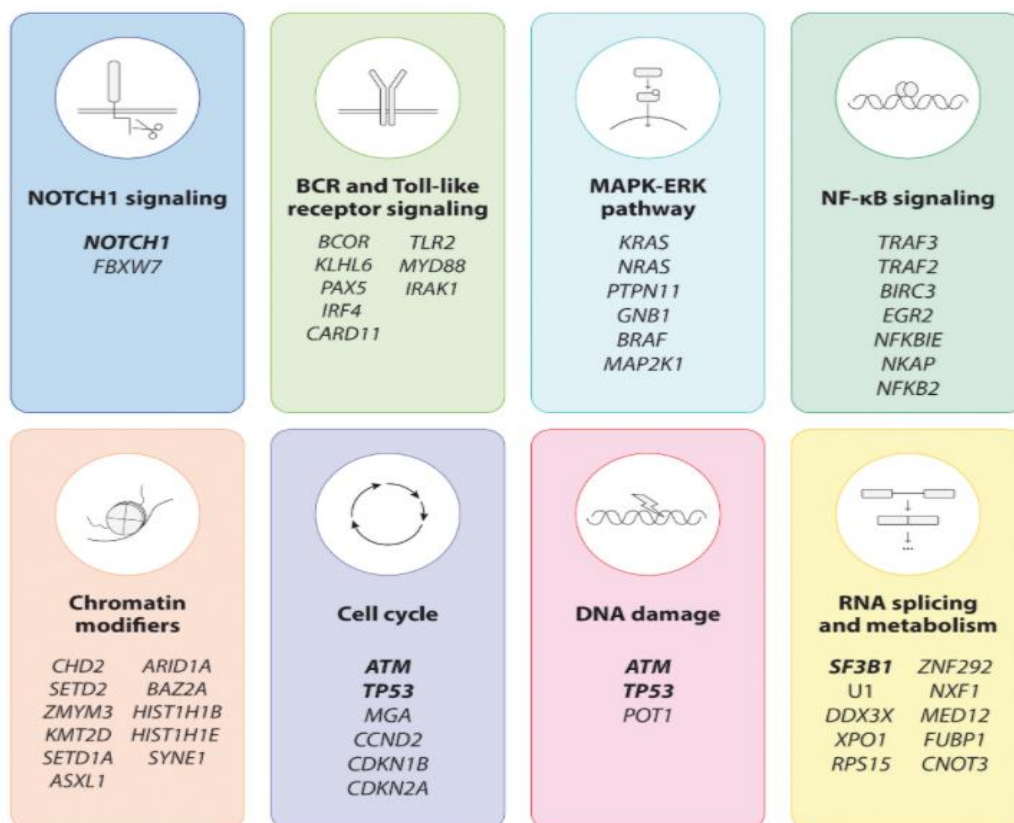
Μια από τις συχνότερες μεταλλάξεις που εντοπίζονται στην ΧΛΛ είναι η μετάλλαξη του γονιδίου NOTCH1. Το NOTCH1 είναι πρωτο-ογκογονίδιο που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα NOTCH1, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί γονίδια που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, στον μεταβολισμό και στην επιβίωση των κυττάρων. Στην ΧΛΛ, μεταλλάξεις του NOTCH1 γονιδίου ανευρίσκονται στο 12% περίπου των περιπτώσεων κατά τη στιγμή της διάγνωσης, όμως το ποσοστό αυξάνεται στο 15-20% όταν πρόκειται για ασθενείς με προχωρημένο στάδιο ΧΛΛ ή ασθενείς που εμφάνισαν υποτροπή (30,41). Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, το 40 % των

ασθενών με μεταλλάξεις στο NOTCH1 γονίδιο έχουν τρισωμία 12, γεγονός που υποδηλώνει τη σύνδεση των δύο αυτών γενετικών στοιχείων. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις του γονιδίου NOTCH1 είναι πιο συχνές στην ομάδα ασθενών με μη μεταλλαγμένα γονίδια IGHV και συνδέονται με χειρότερη πρόγνωση (42). Οι μεταλλάξεις έχουν ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της δράσης του NOTCH μεταγραφικού παράγοντα καταλήγοντας τελικά σε επαγωγή της επιβίωσης και καταστολή της απόπτωσης των λευχαιμικών κυττάρων (43).

Το γονίδιο SF3B1 κωδικοποιεί τον παράγοντα ματίσματος 3B subunit-1, σημαντικό συστατικό των σωματίων ματίσματος που αφαιρούν τα εσόνια κατά την επεξεργασία του pre-mRNA. Σε ασθενείς με ΧΛΛ, έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο SF3B1 τόσο κατά τη στιγμή της διάγνωσης όσο και αργότερα κατά την εξέλιξη της νόσου. Λαμβάνοντας υπόψη πως ο παράγοντας SF3B1 ρυθμίζει το εναλλακτικό μάτισμα γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση, καταλαβαίνουμε πως οι μεταλλάξεις σ' αυτόν τον παράγοντα έχουν άμεση επίπτωση στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (41,42).

Στην παθοφυσιολογία της ΧΛΛ φαίνεται πως εμπλέκεται και το μονοπάτι σηματοδότησης NF-κB. Μελέτες αλληλούχησης νέας γενιάς εντόπισαν γονίδια των οποίων οι μεταλλάξεις οδηγούν σε συνεχή ενεργοποίηση του μονοπατιού NF-κB. Για παράδειγμα μεταλλάξεις στο γονίδιο της BIRC3 πρωτεΐνης, έχουν ως αποτέλεσμα την επαγωγή της σηματοδότησης του κανονικού μονοπατιού NF-κB έναντι του μη κανονικού μονοπατιού NF-κB. Η ενεργοποίηση του κανονικού μονοπατιού σηματοδότησης προωθεί την ανάπτυξη και την επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων (46). Επιπρόσθετα το μονοπάτι αυτό, ενεργοποιείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο MYD88 (47). Οι μεταλλάξεις του γονιδίου MYD88 είναι λιγότερο συχνές και εμφανίζονται στο 3-10% των ασθενών με ΧΛΛ κατά τη διάγνωση.

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια NOTCH1, SF3B1, TP53 και ATM ανευρίσκονται σε >5% των ασθενών κατά τη διάγνωση. Ωστόσο, όπως φαίνεται στην εικόνα 1.5 υπάρχουν γονιδιακές μεταλλάξεις που εμφανίζονται σε μικρότερη συχνότητα και εμπλέκονται σε διάφορα μονοπάτια όπως η σηματοδότηση των BCR και Toll-like υποδοχέων, το μονοπάτι σηματοδότησης, η εναλλακτική συρραφή και ο μεταβολισμός του RNA (48)



Εικόνα 1.5: Στην εικόνα παρουσιάζονται οι γονιδιακές μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και ποιες λειτουργίες του κυττάρου επηρεάζουν. Με έντονη γραφή σημειώνονται οι πιο συχνές μεταλλάξεις (48)

1.3.4 Προγνωστικοί Δείκτες στην Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία

Τα συστήματα σταδιοποίησης κατά Binet και κατά Rai είναι απλά και βασίζονται στη φυσική εξέταση και σε ορισμένα εργαστηριακά ευρήματα. Ωστόσο, δεν εξασφαλίζουν επιτυχή πρόγνωση σε ασθενείς πρώτου σταδίου οι οποίοι μπορεί να αναπτύξουν επιθετική νόσο στην πορεία. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει διερευνηθεί μια πληθώρα παραγόντων οι οποίοι μπορούν να παρέχουν πληροφορίες για την πρόγνωση των ασθενών:

Ορολογικοί Δείκτες:

1. Χρόνος διπλασιασμού των λεμφοκυττάρων: ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται για να διπλασιαστεί ο απόλυτος αριθμός των λεμφοκυττάρων. Ασθενείς με χρόνο διπλασιασμού ≤ 12 μήνες έχουν χειρότερη πρόγνωση σε αντίθεση με τους ασθενείς που έχουν χρόνο

διπλασιασμού > 12 μήνες, οι οποίοι συνδέονται με μεγαλύτερο διάστημα χωρίς θεραπεία και καλύτερη επιβίωση (49)

2. Συγκέντρωση β2 μικροσφαιρίνης: τα αυξημένα επίπεδα της β2 μικροσφαιρίνης έχουν συσχετισθεί με χειρότερη πρόγνωση (50).

3. Συγκέντρωση κινάσης θυμιδίνης: τα υψηλά επίπεδα της κινάσης θυμιδίνης σχετίζονται επίσης με χειρότερη πρόγνωση και έχουν συνδεθεί με τον μειωμένο χρόνο διπλασιασμού των λεμφοκυττάρων και με την μη μεταλλαγμένη κατάσταση IGHV.

4. Γαλακτική αφυδρογονάση (LDH): τα επίπεδα της LDH είναι αυξημένα στην ΧΛΛ και αντιστοιχούν σε κακή πρόγνωση και μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης του συνδρόμου Richter (51).

Ανοσοφαινοτυπικοί Δείκτες:

CD38: είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που έχει υψηλή έκφραση σε Β και Τ λεμφοκύτταρα καθώς και σε NK και δενδριτικά κύτταρα (52). Η έκφραση του δείκτη αυτού στην επιφάνεια των Β-λεμφοκυττάρων αποτελεί ανεξάρτητο αρνητικό προγνωστικό παράγοντα (53). Ορίζεται θετικός ο δείκτης όταν εκφράζεται σε <30 % των Β λεμφοκυττάρων. Η παρουσία του συνδυάζεται πολλές φορές με μη μεταλλαγμένη κατάσταση IGHV και υψηλές τιμές ZAP-70.

Η ZAP-70 είναι μια κινάση τυροσίνης που υπό κανονικές συνθήκες εκφράζεται από τα Τ λεμφοκύτταρα και τα NK κύτταρα. Ωστόσο εκφράζεται από φυσιολογικά και καρκινικά Β λεμφοκύτταρα σε αρκετά στάδια κατά την κυτταρική διαφοροποίηση (54). Έχει παρατηρηθεί πως υψηλά επίπεδα ZAP-70 εκφράζονται από τα λευχαιμικά Β λεμφοκύτταρα με μη μεταλλαγμένα γονίδια IGHV. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης αυτής αντιστοιχεί σε δυσμενή πρόγνωση και σε πιο επιθετική νόσο (55).

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν την σημασία γενετικών και μοριακών δεικτών στην πρόγνωση της ΧΛΛ και στην επιλογή της κατάλληλης θεραπείας. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες ανευρίσκονταν σε περισσότερους από τους μισούς ασθενείς με την κλασική κυτταρογενετική, ενώ με τη μέθοδο FISH

(fluorescence in situ hybridization) ανευρίσκονται σε >80% των περιπτώσεων. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα στην ενότητα 1.3.3, οι πιο συχνές γενετικές ανωμαλίες που εντοπίζονται στην ΧΛΛ είναι οι del13q14, tri12, del11q22 και del17p. Η del13q συγκριτικά με τις υπόλοιπες ανωμαλίες έχει την καλύτερη πρόγνωση. Η tri12 χαρακτηρίζεται ως ενδιάμεσου κινδύνου ανωμαλία κατά τη διάγνωση. Η del11q και η del17p συνδέονται με κακή πρόγνωση.

Από τους προγνωστικούς δείκτες δεν θα μπορούσε να απουσιάζει η κατάσταση των γονιδίων IGHV. Όπως έχει ήδη αναφερθεί ασθενείς με ΧΛΛ που φέρουν μη μεταλλαγμένα γονίδια IGHV έχουν πιο επιθετική νόσο, είναι πιο επιρρεπείς σε κυτταρογενετικές ανωμαλίες και εμφανίζουν κακή πρόγνωση. Αντίθετα, οι ασθενείς που φέρουν μεταλλαγμένα IGHV γονίδια παρουσιάζουν καλύτερη πρόγνωση και μεγαλύτερη επιβίωση (56). Η κατάσταση των γονιδίων IGHV αποτελεί έναν από τους πιο σταθερούς και αξιόπιστους δείκτες πρόγνωσης για την εξέλιξη της ασθένειας. Η αλληλούχηση νέας γενιάς άνοιξε έναν νέο δρόμο όσον αφορά τους προγνωστικούς δείκτες. Πολλά από τα γονίδια που έχουν βρεθεί μεταλλαγμένα στην ΧΛΛ (TP53, NOTCH1, SF3B1, BIRC3) φαίνεται να έχουν σημαντική προγνωστική και προβλεπτική αξία και πολλές μελέτες αξιολογούν τους δείκτες αυτούς προκειμένου να ενσωματωθούν στην κλινική πράξη.

Πρόσφατα έχει αναπτυχθεί ένας διεθνής προγνωστικός δείκτης (international prognostic index) για τη ΧΛΛ (CLL-IPI) ο οποίος συνδυάζει 5 ανεξάρτητους προγνωστικούς δείκτες: 1) μεταλλάξεις στο TP53 ή/και del17p, 2) κατάσταση IGHV (μεταλλαγμένη-μη μεταλλαγμένη), 3) συγκέντρωση β2 μικροσφαιρίνης στον ορό, 4) κλινική σταδιοποίηση και 5) ηλικία. Λαμβάνοντας υπόψη τα κριτήρια το CLL-IPI ταξινομεί τους ασθενείς σε 4 επίπεδα κινδύνου με επιβίωση 5 χρόνων: χαμηλού κινδύνου, ενδιάμεσου κινδύνου, υψηλού κινδύνου και πολύ υψηλού κινδύνου (57).

1.3.5 Θεραπεία

Η θεραπεία στη ΧΛΛ δεν αρχίζει αναγκαστικά αμέσως μόλις διαγνωστεί ο ασθενής, αλλά μόνο όταν υπάρχουν συμπτώματα εξαιτίας της νόσου. Για την έναρξη της θεραπείας αξιολογούνται ορισμένες ενδείξεις όπως:

- αναιμία και θρομβοπενία (στάδιο III και IV κατά Rai ή στάδιο C κατά Binet)

- μεγάλη αύξηση του μεγέθους του σπλήνα (>6 εκατοστά κατά την ψηλάφηση από το γιατρό) ή και μικρότερη αύξηση στην περίπτωση που αυτή προκαλεί συμπτώματα (δυσφορία στην κοιλιά, δυσπεψία, βάρος)
- μεγάλη διόγκωση λεμφαδένων (>10 εκατοστά κατά την ψηλάφηση από το γιατρό) ή και μικρότερη αύξηση στην περίπτωση που αυτή προκαλεί συμπτώματα (πίεση γειτονικών οργάνων)
- γρήγορη αύξηση των λεμφοκυττάρων στη γενική αίματος (<50% σε δύο μήνες ή διπλασιασμός τους σε λιγότερο από έξι μήνες, εκτός αν ο αρχικός τους αριθμός είναι <30,000).
- Μεγάλη απώλεια βάρους ($\geq 10\%$ του βάρους του σώματος τους τελευταίους 6 μήνες)
- Μεγάλη κόπωση
- Πυρετός $>38^{\circ}\text{C}$ για περισσότερο από δύο εβδομάδες, χωρίς στοιχεία λοίμωξης.
- Νυχτερινοί ιδρώτες για διάστημα μεγαλύτερο του ενός μήνα χωρίς στοιχεία λοίμωξης
- Αυτοάνοση αναιμία ή/και θρομβοπενία που δεν ανταποκρίνεται στα κορτικοειδή

Αν λοιπόν κατά τη διάγνωση ή κατά την εξέλιξη της νόσου πληρούνται ένα ή περισσότερα από τα παραπάνω κριτήρια, ενδείκνυται η έναρξη της θεραπείας. Η επιλογή θεραπείας προϋποθέτει την αξιολόγηση ορισμένων παραγόντων όπως η ηλικία, η φυσική κατάσταση του ασθενούς, το στάδιο της ΧΛΛ, η παρουσία χρωμοσωμικής ανωμαλίας, η κατάσταση IGHV (μεταλλαγμένη-μη μεταλλαγμένη) και η μετάλλαξη στο γονίδιο TP53.

Η θεραπεία μπορεί να είναι χημειοθεραπεία, ανοσοθεραπεία, συνδυασμός χημειοθεραπείας-ανοσοθεραπείας, καθώς και νέα φάρμακα που στοχεύουν τα μονοπάτια σηματοδότησης. Τα πιο συνηθισμένα χημειοθεραπευτικά φάρμακα είναι οι αλκυλιωτικοί παράγοντες όπως η χλωραμβουκίλη, η κυκλοφωσφαμίδη, η μπενταμουστίνη και ανάλογα των πουρινών όπως η φλουνταραμπίνη, η 2-χλωροδεοξυαδενοσίνη-2CdA, και η πεντοστατίνη. Αυτά τα φάρμακα έχουν την ιδιότητα να καταστρέφουν τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται γρήγορα. Ο ταχύς πολλαπλασιασμός χαρακτηρίζει κατεξοχήν τα καρκινικά κύτταρα, ωστόσο μπορεί παράλληλα να επηρεάζονται και φυσιολογικά κύτταρα. Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες και τα ανάλογα πουρινών μπορεί να χορηγηθούν μόνα τους ή σε συνδυασμό και να δράσουν συνεργιστικά.

Στην ανοσοθεραπεία χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν

τα Β λεμφοκύτταρα. Το Rituximab είναι αντίσωμα που στοχεύει το αντιγόνο επιφανείας CD20. Τα αντισώματα Ofatumumab και Obinutuzumab είναι δύο καινούργια anti-CD20 αντισώματα που στοχεύουν ειδικούς επιτόπους του CD20 αντιγόνου. Στην χημειοανοσοθεραπεία γίνεται συνδυασμός των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και των αντισωμάτων. Για παράδειγμα σε νεότερους ασθενείς, με καλή φυσική κατάσταση, χωρίς συννοσηρότητες, ως θεραπευτικό σχήμα προτείνεται ο συνδυασμός FCR (φλουνταραμπίνη, κυκλοφωσφαμίδη, αντισώματος Rituximab). Επειδή όμως οι περισσότεροι ασθενείς είναι ηλικιωμένοι που εμφανίζουν συννοσηρότητες, δίνονται χαμηλότερης έντασης θεραπευτικά σχήματα όπως χλωραμβουκίλη ή Rituximab ή συνδυασμός των δύο, με στόχο να ανακουφίσουν από τα συμπτώματα της ΧΛΛ ή και να βελτιώσουν την κατάσταση της αναιμίας ή θρομβοπενίας. (58).

Σε ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53 ή/και την del(17), έχουν προταθεί ως θεραπεία δύο αναστολείς κινασών. Το ibrutinib στοχεύει την κινάση τυροσίνης Bruton (BTK) ενώ το idelalisib στοχεύει την κινάση φωσφατιδυλοϊνositόλης 3 (PIK3). Και οι δύο αυτές κινάσες εμπλέκονται στο μονοπάτι σηματοδότησης μέσω του υποδοχέα BCR. Το venetoclax είναι αναστολέας της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-2 η οποία εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα κύτταρα της ΧΛΛ. Έχει παρατηρηθεί πως η χορήγηση του venetoclax βελτιώνει το διάστημα ελεύθερου εξέλιξης νόσου (PFS) σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα ή ανθεκτική ΧΛΛ.

1.4 ΤΟ RNA ΩΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΜΟΡΙΟ

Το κεντρικό δόγμα της βιολογίας είναι η κατεύθυνση με την οποία η γενετική πληροφορία μεταφέρεται από το DNA στις πρωτεΐνες. Η αλληλουχία των βάσεων ενός γονιδίου μεταγράφεται στον πυρήνα του κυττάρου και οδηγεί στην παραγωγή ενός αγγελιοφόρου RNA (messenger RNA, mRNA). Ακολούθως το mRNA μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα όπου με τη βοήθεια των ριβοσωμάτων και των μεταφορικών RNA (transfer RNA, tRNA) μεταφράζεται σε πρωτεΐνη. Επομένως το DNA, το RNA και οι πρωτεΐνες αποτελούν τα τρία βασικά μακρομόρια του κυττάρου. Το κάθε μόριο ξεχωριστά έχει τον δικό του μοναδικό ρόλο στο κύτταρο. Το DNA είναι δίκλωνο μόριο, αποτελείται από δεοξυριβονουκλεοτίδια και εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου. Η γενετική πληροφορία αποθηκεύεται στο DNA ως κώδικας τεσσάρων βάσεων, της αδενίνης (A), της θυμίνης (T), της γουανίνης (G) και της κυτοσίνης (C). Οι πρωτεΐνες είναι προϊόντα

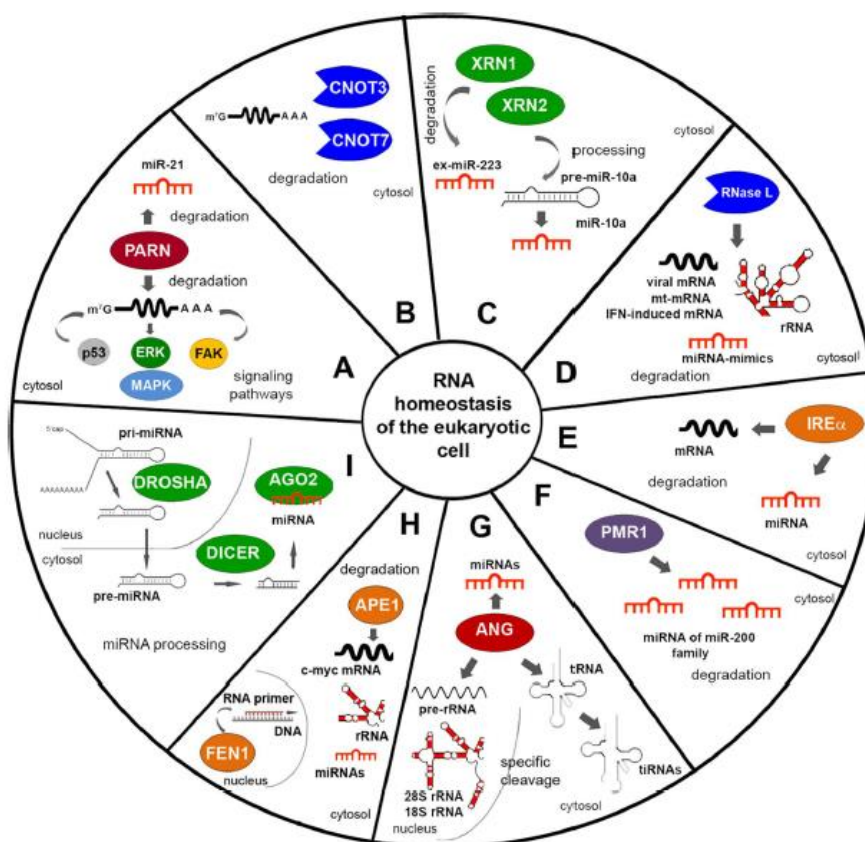
πολυμερισμού των αμινοξέων, λαμβάνουν διάφορες στερεοδιαμορφώσεις και έχουν δομική ή λειτουργική δράση.

Τα RNA μόρια είναι μονόκλωνα και αποτελούνται από ριβονουκλεοτίδια. Οι τρεις βάσεις αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, που συμμετέχουν στο σχηματισμό της αλληλουχίας του RNA είναι ίδιες με αυτές του DNA αλλά υπάρχει διαφορά στην τέταρτη βάση όπου αντί για θυμίνη υπάρχει ουρακίλη (U). Επίσης, το RNA είναι μικρότερο μόριο και λιγότερο σταθερό. Στο κύτταρο εντοπίζεται σε τρεις κύριες μορφές, το αγγελιοφόρο RNA (mRNA), το μεταφορικό RNA (transfer RNA, tRNA) και το ριβοσωμικό RNA (ribosomal RNA, rRNA). Το mRNA μεταφέρει τη γενετική πληροφορία από το DNA στις πρωτεΐνες. Το tRNA εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και ρόλος του είναι η μεταφορά των αμινοξέων στο ριβόσωμα προκειμένου να γίνει η σύνθεση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Το rRNA συνδέεται με ριβοσωμικές πρωτεΐνες ώστε να σχηματιστούν τα ριβοσώματα που είναι υπεύθυνα για την πρωτεϊνοσύνθεση. Το mRNA χαρακτηρίζεται ως κωδικό μόριο RNA ενώ τα tRNA και rRNA ανήκουν στα μη κωδικά μόρια RNA (non coding RNAs, ncRNAs). Η κατηγορία των ncRNAs χωρίζεται σε housekeeping ncRNAs και ρυθμιστικά ncRNAs. Τα housekeeping ncRNAs περιλαμβάνουν τα tRNA και rRNA ενώ τα ρυθμιστικά ncRNAs χωρίζονται περαιτέρω σε δύο ομάδες ανάλογα με το μέγεθος τους. Τα μεγάλα μη κωδικά μόρια (long non coding RNAs, lncRNAs) έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από 200 νουκλεοτίδια ενώ τα μικρά ncRNAs έχουν μέγεθος μικρότερο από 200 νουκλεοτίδια. Τα μικρά ncRNAs περιλαμβάνουν τα microRNAs (miRNAs), τα μικρά πυρηνισκικά RNAs (snoRNAs), τα μικρά πυρηνικά RNA (snRNA), τα μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (siRNA) και τα RNAs που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη PIWI (piRNAs). Τελευταία, το πεδίο των ncRNAs ελκύει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον των ερευνητών για την εμπλοκή του στη ρύθμιση φυσιολογικών και αναπτυξιακών διαδικασιών ή και ακόμα ασθενειών.

Το RNA τόσο στην κωδική όσο και στη μη κωδική του μορφή είναι απαραίτητο για την φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου. Στο κύτταρο παράγονται συνεχώς καινούργια RNA και παράλληλα αποικοδομούνται τα παλιά και ελαττωματικά RNAs. Η διατήρηση της ισορροπίας ενός τόσο πολύπλοκου συστήματος επιτυγχάνεται με διάφορους μηχανισμούς που ελέγχουν ανά πάσα στιγμή τα επίπεδα του RNA στο κύτταρο (59).

1.5 ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Βασικό στοιχείο στον μεταβολισμό του RNA αποτελούν οι ριβονουκλεάσες (RNases), ένζυμα που διασπών το RNA σε μικρότερα τμήματα μέσω κατάλυσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Κάθε κύτταρο μπορεί να περιέχει μέχρι και 20 διαφορετικές ριβονουκλεάσες, με τις λειτουργίες τους πολλές φορές να επικαλύπτονται. Η σημασία της ύπαρξης των ενζύμων αυτών αποδεικνύεται αφενός από την πολυπλοκότητα της δράσης τους και αφετέρου από την ομολογία που εμφανίζουν τα γονίδια τους στους διάφορους οργανισμούς. Συμμετέχουν σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες όπως η αποικοδόμηση του RNA, η επεξεργασία των μορίων RNA και η άμυνα έναντι ξένων μικροοργανισμών (60). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν και σε άλλες διεργασίες όπως η αγγειογένεση, η νευροτοξικότητα, και η ανοσοκαταστολή. Αξιοσημείωτη είναι και η αντικαρκινική τους δράση, γεγονός που τα καθιστά δυνητικά ως θεραπευτικούς στόχους (61).



Εικόνα 1.6: Σχηματική απεικόνιση ριβονουκλεασών που συμμετέχουν στη διατήρηση της ομοιότητας του RNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα. (A-C): RNases που συμμετέχουν στα βασικά μονοπάτια αποικοδόμησης του RNA. (D-F): RNases που δρουν σε καταστάσεις

στρες. *G*: Αγγειογενίνη. *H*: πρωτεΐνες με δράση ριβονουκλεάσης που συμβάλλουν στην ακεραιότητα του DNA. *I*: RNases που συμμετέχουν στη βιογένεση των miRNAs. (62)

1.5.1 Βιολογική Λειτουργία Ριβονουκλεασών

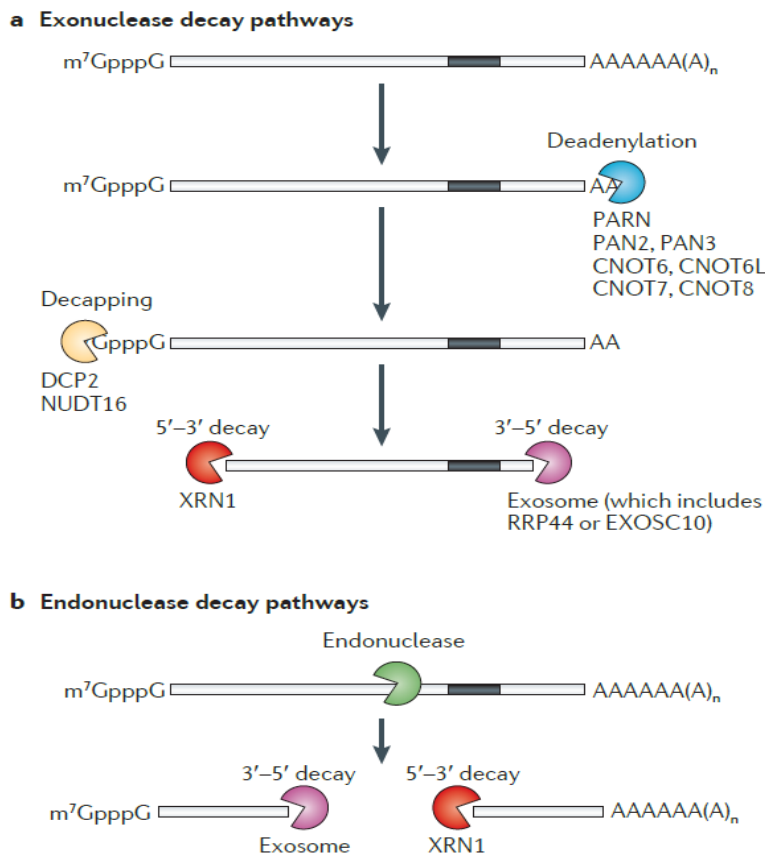
Αποικοδόμηση RNA μορίων:

Μια από τις κυριότερες λειτουργίες των ριβονουκλεασών είναι η αποικοδόμηση του RNA. Όσα μόρια RNA είναι ελαττωματικά, μη λειτουργικά ή δεν έχουν ωριμάσει σωστά πρέπει να αποικοδομούνται (63). Επίσης αποικοδομούνται όσα μόρια έχουν ολοκληρώσει τον ρόλο τους στο κύτταρο. Για παράδειγμα τα mRNA που έχουν μεταφραστεί σε πρωτεΐνη αποικοδομούνται έτσι ώστε να ρυθμίζεται η γονιδιακή έκφραση και να παράγεται όση ποσότητα πρωτεΐνης είναι απαραίτητη τη δεδομένη στιγμή στο κύτταρο. Σε καταστάσεις στρες αποικοδομούνται και πιο σταθερά μόρια RNA όπως το rRNA και το tRNA προκειμένου να παραχθούν νουκλεοτίδια για την επιβίωση του κυττάρου.

Η αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs περιλαμβάνει πολλαπλά στάδια και είναι μια περίπλοκη διαδικασία. Σχεδόν όλα τα μονοπάτια αποικοδόμησης των mRNAs ξεκινούν από το στάδιο της αποαδενυλίωσης με σκοπό την αποικοδόμηση της πολυ-A ουράς. Η αντίδραση καταλύεται από εξωριβονουκλεάσες, τις αποαδενυλάσες οι οποίες δρουν σε σύμπλοκα και αφαιρούν αδενίνες (A) από την πολυ-A ουρά. Οι πιο γνωστές αποαδενυλάσες είναι οι CCR4b-NOT, PARN και PAN2-PAN3 (64). Μετά την αποαδενυλίωση η αποικοδόμηση του mRNA μπορεί να ολοκληρωθεί μέσω δύο μονοπατιών. Κατά το πρώτο μονοπάτι το mRNA αποικοδομείται με κατεύθυνση 3'-5' από το εξώσωμα. Το εξώσωμα είναι ένα μεγάλο πρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από διάφορες 3'-5' εξωνουκλεάσες και συμμετέχει σε διεργασίες που αφορούν την επεξεργασία του RNA. Σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του εξωσώματος έχουν οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά κάθε φορά. Για παράδειγμα, για την αποικοδόμηση του κυτταροπλασματικού mRNA το εξώσωμα αλληλεπιδρά μ' ένα ετεροτριμερές σύμπλοκο που σχηματίζεται από τις πρωτεΐνες Ski2, Ski3, και Ski8 (62,63). Κατά το δεύτερο μονοπάτι αφαιρείται η καλύπτρα από το 5' άκρο του mRNA μέσω ενός ενζύμου που αποτελείται από δύο υπομονάδες, τις πρωτεΐνες Dcp1p και Dcp2p. Μετά την αφαίρεση της καλύπτρας ακολουθεί η αποικοδόμηση του «σώματος» του mRNA από την ριβονουκλεάση XRN1 με κατεύθυνση 5'-3' (64,65).

Το μονοπάτι της ενδοριβονουκλεοτιδικής διάσπασης των mRNAs είναι λιγότερο

συχνό στα ευκαρυωτικά κύτταρα παρ' όλα αυτά σε ορισμένες περιπτώσεις η αποικοδόμηση μπορεί να αρχίσει από ενδοριβονουκλεάσες (66,65). Τα προϊόντα που προκύπτουν από την δράση τους αποικοδομούνται στην συνέχεια από τις εξωριβονουκλεάσες με 5'-3' ή 3'-5' κατεύθυνση (70). Μερικές από αυτές τις ενδοριβονουκλεάσες (RNase L, PMR1 και IRE1) δρουν υπό τον αυστηρό έλεγχο κυτταρικών σημάτων, διαφορετικά η ανεξέλεγκτη δράση τους θα είχε αντίκτυπο στην γονιδιακή έκφραση (71).



Εικόνα 1.6: Σχηματική αναπαράσταση των βασικών μονοπατιών αποικοδόμησης του mRNA. α) Μονοπάτι εξωριβονουκλεοτιδικής διάσπασης. β) Μονοπάτι ενδοριβονουκλεοτιδικής διάσπασης (72)

Τα παραπάνω μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA αφορούν φυσιολογικά μόρια mRNAs. Τα κύτταρα όμως, για να προστατευτούν από ελαττωματικά μετάγραφα και επομένως από μη λειτουργικές πρωτεΐνες ανέπτυξαν μηχανισμούς ελέγχου ποιότητας, οι οποίοι εντοπίζουν και καταστρέφουν άμεσα και γρήγορα τα λανθασμένα mRNAs πριν αυτά μεταφραστούν σε πρωτεΐνες. Οι τρεις κύριοι μηχανισμοί στους οποίους εμπλέκονται ριβονουκλεάσες, είναι:

1. Αποικοδόμηση με πρόωρο κωδικόνιο λήξης (Nonsense-mediated decay, NMD)
2. Αποικοδόμηση μη τερματισμού (Non-stop decay)
3. No-go Αποικοδόμηση (No-go decay)

Επεξεργασία RNA μορίων:

Στις περισσότερες περιπτώσεις τα RNA μόρια παράγονται σε πρόδρομη μορφή και χρειάζονται επιπλέον επεξεργασία για να ωριμάσουν και να γίνουν λειτουργικά. Επίσης μετά τη μεταγραφή ακολουθούν ποικίλες μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις με σκοπό να προστατευτεί το μετάγραφο από τη δράση των ριβονουκλεασών. Οι τρεις βασικές τροποποιήσεις που υφίσταται το πρόδρομο mRNA (pre-mRNA) είναι η προσθήκη του 7'-μεθυλογουανουσινικού παραγώγου (καλύπτρα) στο 5' άκρο, η προσθήκη της πολυ-A ουράς στο 3' άκρο και η αφαίρεση των εσωνίων. Η καλύπτρα εμποδίζει τη διάσπαση του RNA μορίου από τις 5' εξωνουκλεάσες ενώ η πολυ-A ουρά είναι απαραίτητη για τη μεταφορά του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, τη σταθερότητα του mRNA και τη μετάφραση. Η απομάκρυνση των εσωνίων από τα pre-mRNAs και η επακόλουθη συρραφή των εξωνίων οδηγεί στην σύνθεση του ώριμου mRNA που πρόκειται να μεταφραστεί (73). Η αντίδραση της αφαίρεσης των εσωνίων στα ευκαρυωτικά mRNAs καταλύεται από το σωματίο συρραφής (spliceosome), ένα μεγάλο σύμπλοκο μικρών πυρηνικών RNA (snRNAs) και πρωτεϊνών. Μετά την απομάκρυνση τους, τα εσώνια αποικοδομούνται μέσω εξωριβονουκλεοτιδικής διάσπασης.

Τα ευκαρυωτικά ριβοσώματα αποτελούνται από δύο υπομονάδες οι οποίες σχηματίζονται από 79 ριβοσωμικές πρωτεΐνες σε συνδυασμό με τέσσερα rRNAs. Η μικρή υπομονάδα (40S) σχηματίζεται από το 18S rRNA και 33 ριβοσωμικές πρωτεΐνες ενώ η μεγάλη υπομονάδα (60S) περιέχει τα 5S, 5.8S και το 25/28S rRNAs και 46 ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Η βιογένεση των τριών rRNAs (18S, 5.8S, 25/28S) λαμβάνει χώρα στον πυρηνίσκο όπου τα τρία αυτά rRNAs συντίθενται ως ένα μακρύ πρώιμο μετάγραφο (74). Για την ωρίμανσή τους απαιτείται επεξεργασία από ενδοριβονουκλεάσες και εξωριβονουκλεάσες έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα εξωτερικά και εσωτερικά μεσοδιαστήματα μεταγραφόμενης αλληλουχίας (ETS και ITS) (75).

Τα γονίδια των tRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση III ως μεγάλα πρόδρομα tRNAs (pre-tRNAs). Η ωρίμανση τους προϋποθέτει διάφορες τροποποιήσεις όπως η αφαίρεση εσωνίων από ενδονουκλεάσες, η τροποποίηση των 5' και 3' άκρων και η

τροποποίηση ορισμένων βάσεων. Στο E.coli η ριβονουκλεάση P (RNase P) αποκόπτει μια αλληλουχία από το 5' άκρο ενώ η RNase Z αποκόπτει το 3' άκρο. Στη συνέχεια, στο 3' άκρο πολλών tRNAs προστίθεται το τρινουκλεοτίδιο CCA (76).

Επεξεργασία υφίστανται και τα μη κωδικά μόρια RNA (ncRNAs) έτσι ώστε να ωριμάσουν για να μπορούν στη συνέχεια να επιτελέσουν τον ρυθμιστικό τους ρόλο. Συγκεκριμένα στην επεξεργασία των miRNAs συμμετέχουν δύο ενδοριβονουκλεάσες της οικογένειας RNase III ή αλλιώς RNase C που αποικοδομεί δίκλιωνα μόρια RNA (dsRNAs). Η παρεμβολή του RNA (RNA interference-RNAi) αποτελεί μηχανισμό γονιδιακής ρύθμισης και άμυνας των ευκαρυωτικών οργανισμών εναντίων εξωγενών dsRNAs. Οι δύο κύριες ριβονουκλεάσες που συμμετέχουν στον μηχανισμό RNAi είναι η Droscha και η Dicer. Το ένζυμο Droscha σχετίζεται με την επεξεργασία των pre-rRNAs και την ωρίμανση των miRNAs. Τα miRNAs μεταγράφονται από ενδογενή γονίδια ως pri-miRNAs με δομή φουρκέτας. Με τη δράση του ενζύμου Droscha προκύπτει το pre-miRNA. Στη συνέχεια το pre-miRNA μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα μέσω της πρωτεΐνης exportin 5. Εκεί επιδέχεται τη δράση του ενζύμου Dicer και μετατρέπεται σε ώριμο miRNA μήκους 20-25 νουκλεοτιδίων (77). Το ώριμο miRNA αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες και δημιουργεί το σύμπλοκο RISC το οποίο είτε θα αποικοδομήσει το mRNA στόχο είτε θα καταστείλει την μετάφραση.

1.5.2 Κατηγορίες Ριβονουκλεασών

Λόγω των διαφορετικών τους λειτουργιών και κατ' επέκταση της εξειδίκευσης που παρουσιάζουν οι ριβονουκλεάσες, ταξινομούνται σε πολλές κατηγορίες, με βάση τον μηχανισμό κατάλυσης, την προέλευση τους κλπ. Οι δύο κύριες κατηγορίες στις οποίες χωρίζονται με βάση τον μηχανισμό κατάλυσης είναι οι εξωριβονουκλεάσες και οι ενδοριβονουκλεάσες. Οι εξωριβονουκλεάσες χωρίζονται στις 5' εξωριβονουκλεάσες και στις 3' εξωριβονουκλεάσες που υδρολύουν το RNA ξεκινώντας από το 5' και 3' άκρο αντίστοιχα (75). Στα βακτήρια έχει παρατηρηθεί μόνο η παρουσία 3' εξωριβονουκλεασών. Οι ενδοριβονουκλεάσες διασπών το RNA εσωτερικά με κατεύθυνση 5'-3' και από τη δράση τους παράγονται κομμάτια RNA διαφορετικού μεγέθους.

Οι εξωριβονουκλεάσες και οι ενδοριβονουκλεάσες ταξινομούνται σε υπεριοικογένειες και υποοικογένειες και έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για την

φυλογενετική τους προέλευση και τον τρόπο δράσης τους. Χαρακτηριστικοί αντιπρόσωποι των εξωριβονουκλεασών στον άνθρωπο είναι η PNPase, η PARN, η DIS3L2 και η XRN1. Η DISL2 αποικοδομεί με κατεύθυνση 3'-5' μη κωδικά μόρια RNAs και mRNAs. Η XRN1 είναι η μόνη γνωστή 5'-3' εξωριβονουκλεάση που εμπλέκεται στην αποικοδόμηση των κυτταροπλασματικών RNAs. Τόσο η DISL2 όσο και η XRN1 συμμετέχουν σε μονοπάτια πολλαπλασιασμού και απόπτωσης, και μεταλλάξεις στα ένζυμα αυτά σχετίζονται με διάφορες ασθένειες. Στην κατηγορία των ενδοριβονουκλεασών οι RNase A, RNase L, RNase H, RNase III, RNase T2 αποτελούν τους βασικότερους αντιπροσώπους στον άνθρωπο. Η υπεροικογένεια της ριβονουκλεάσης A είναι μια από τις πιο καλά μελετημένες ενδοριβονουκλεάσες παγκρεατικού τύπου στα θηλαστικά και αποτελείται από δεκατρείς πρωτεΐνες οι οποίες ταξινομούνται σε κανονικές RNases 1-8 και σε μη κανονικές RNase 9-13 (78). Τα μέλη εμπλέκονται σε διάφορες λειτουργίες όπως στην προστασία έναντι παθογόνων μικροοργανισμών, στον μεταβολισμό του RNA και στην αγγειογένεση (76, 77).

1.5.3 Ριβονουκλεάσες και Καρκίνος

Οι διαταραχές της γονιδιακής έκφρασης αποτελούν το σήμα κατατεθέν στον καρκίνο. Τα τελευταία χρόνια μέσα από αρκετές μελέτες αποκαλύπτεται η σημασία του μετα-μεταγραφικού μηχανισμού στον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων, ιδιαίτερα όσον αφορά την αποικοδόμηση του mRNA. Ο χρόνος ημιζωής κάθε μεταγράφου ελέγχεται από τις ριβονουκλεάσες, από τα ncRNAs, από τις πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες στο RNA ανά πάσα στιγμή και από διάφορα άλλα ρυθμιστικά στοιχεία. Όταν πρόκειται λοιπόν για μετάγραφα ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων καταλαβαίνουμε τον καθοριστικό ρόλο που έχουν οι παραπάνω παράγοντες στη σταθερότητα και στην αποικοδόμηση των μεταγράφων. Παρακάτω ακολουθούν παραδείγματα που αποκαλύπτουν τον ρόλο κλειδί των ριβονουκλεασών στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και πώς η απορρύθμισή της δράσης τους μπορεί να καταλήξει σε ογκογένεση (70).

Η ανθρώπινη RNase L είναι μια ενδοριβονουκλεάση που εκφράζεται σε αρκετούς τύπους κυττάρων στα θηλαστικά. Υποστρώματα της αποτελούν το ιικό RNA, rRNA και πολλά mRNAs (78,79,80). Ο κύριος της ρόλος είναι η συμμετοχή στην κυτταρική απόκριση έναντι ιικών μολύνσεων (84). Όσον αφορά τη δράση της στον καρκίνο, πολλές

μελέτες εξετάζουν τον ρόλο της ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη. Το γονίδιο της RNase L βρίσκεται σε μια περιοχή (γενετικός τόπος HPC1) η οποία περιέχει γονίδια που συνδέονται με ευαισθησία στον κληρονομούμενο καρκίνο του προστάτη. Συνεπώς μεταλλάξεις στο γονίδιο της RNase L πιθανότητα να συνδέονται με προδιάθεση για τον καρκίνο του προστάτη. Για παράδειγμα μια σημειακή μετάλλαξη και συγκεκριμένα μετάπτωση βάσης (G-A) οδηγεί σε γλουταμίνη αντί για αργινίνη στη θέση 462 της αμινοξικής αλληλουχίας της RNase L (R462Q). Η παρουσία της μετάλλαξης αυτής επηρεάζει την καταλυτική δράση του ενζύμου και έχει βρεθεί στο 13% των περιπτώσεων με καρκίνο του προστάτη (85). Η μετάλλαξη R462Q έχει εντοπιστεί και σε άλλους καρκίνους όπως ο καρκίνος του παγκρέατος και ο καρκίνος του παχέος εντέρου (83, 84). Η ογκοκατασταλτική δράση της RNase L έχει συσχετισθεί και με την εμπλοκή της στην απόπτωση. Μελέτη έδειξε ότι η επίδραση με ογκοκατασταλτικό παράγοντα προκαλεί την ενεργοποίηση της εξαρτώμενης από μιτοχόνδρια απόπτωσης, όπου η RNase L διασπά τα μιτοχονδριακά mRNAs, οδηγώντας σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και ενεργοποίηση της κασπάσης 3 (88).

Η IRE1 (Inositol-requiring enzyme 1) είναι μια διαμεμβρανική ενδοριβονουκλεάση που εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER). Η κυτταροπλασματική της πλευρά διαθέτει επικράτειες κινάσης και ενδοριβονουκλεάσης ενώ η πλευρά που βρίσκεται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου έχει ρόλο αισθητήρα. Σε συνθήκες καταπόνησης του ER λόγω συσσώρευσης λανθασμένων πρωτεϊνών (Unfolded Protein Response, UPR) η IRE1 διμερίζεται και αυτοφωσφορυλιώνεται με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η ριβονουκλεολυτική της δράσης (71). Στον καρκίνο η IRE1 πιθανόν να έχει διττό ρόλο, μπορεί να επάγει ή να καταστείλει την δημιουργία του όγκου (62). Σε διάφορους τύπους καρκίνου έχει παρατηρηθεί ενεργοποίηση της IRE1 και έχει συσχετισθεί με υπερέκφραση ογκογονιδίων όπως BRAFV, MYC και HRAS (89). Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν πως το IRE1-XBP1 μονοπάτι προωθεί την επιβίωση και την εξέλιξη του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, σε καρκινικά κύτταρα μαστού που είναι θετικά σε υποδοχείς οιστρογόνων, η υπερέκφραση της XBP1 πρωτεΐνης έχει φανεί ότι οδηγεί σε ανάπτυξη του όγκου ανεξάρτητα από την παρουσία οιστρογόνων. Επίσης, η υπερέκφραση της XBP1 πρωτεΐνης μειώνει την ευαισθησία των κυττάρων αυτών στα αντι-οιστρογονικά φάρμακα, επάγοντας την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων (90). Επιπρόσθετα, μελέτη υποστηρίζει πως αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής μπορούν να προκαλέσουν πολλαπλό μυέλωμα σε ποντίκια (91). Από την άλλη, αρκετές ήταν και οι μελέτες που παρατήρησαν την

ογκοκατασταλτική δράση της ενδοριβονουκλεάσης IRE1. Φαίνεται πως διάφορες ουσίες που στοχεύουν την αναστολή της ανάπτυξης και τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων, επιλέγουν το μονοπάτι IRE1-UPR (89,90,91). Δεδομένα από μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος φανερώνουν την παρουσία μεταλλάξεων της IRE1 σε πολλές νεοπλασίες όπως το γλοιοβλάστωμα (95) και το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (96). Είναι σαφές πως χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της IRE1 στον καρκίνο και των μονοπατιών μέσω των οποίων επάγει ή καταστέλλει την ανάπτυξη του όγκου.

Η αγγειογενίνη όπως έχει αναφερθεί και νωρίτερα ανήκει στην υπερικογένεια των ριβονουκλεασών A. Έχει μελετηθεί κυρίως για την ικανότητά της να επάγει την αγγειογένεση σε καρκινικούς όγκους. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από καρκινικό ιστό, γεγονός που επιβεβαιώνει την εμπλοκή της στην καρκινογένεση. Όπως είναι γνωστό, η ανάπτυξη και η επιβίωση των καρκινικών κυττάρων δεν εξαρτώνται μόνο από γενετικές και επιγενετικές αλλαγές, αλλά και από το κατάλληλο μικροπεριβάλλον. Στο μικροπεριβάλλον του όγκου περιλαμβάνονται όλοι αυτοί οι παράγοντες οι οποίοι θα ενισχύσουν τον πολλαπλασιασμό, την εγκαθίδρυση, ακόμα και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων (97). Ένα σημαντικό στοιχείο λοιπόν, είναι η δημιουργία νέων αγγείων έτσι ώστε να εξασφαλίζεται επαρκής παροχή θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου στα αναπτυσσόμενα νεοπλάσματα. Η έκφραση της αγγειογενίνης έχει παρατηρηθεί αυξημένη σε πολλούς καρκίνους όπως στον καρκίνο του παγκρέατος (98), μαστού (99), τραχήλου της μήτρας (100), ωοθηκών (101), παχέος εντέρου, στομάχου (102), ουροθηλίου και ενδομητρίου (103). Μελέτες αναφέρουν ότι η αγγειογενίνη μπορεί να μετακινηθεί προς τον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων και να προωθήσει τον πολλαπλασιασμό τους μέσω της ικανότητάς της να ρυθμίζει τη μεταγραφή διαφόρων mRNAs καθώς και rRNAs (104). Εξίσου σημαντικό είναι πως η αγγειογενίνη εκκρίνεται από τα κύτταρα και ενεργοποιεί μονοπάτια σηματοδότησης. Στην περίπτωση του ηπατοκυτταρικού καρκίνου, τα κύτταρα εκκρίνουν αγγειογενίνη, προκαλώντας αναδιαμόρφωση τόσο των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων όσο και της σύστασης της εξωκυττάριας μήτρας (105). Η αναδιαμόρφωση αυτή συμβάλλει στη δημιουργία ενός ευνοϊκού, για τα καρκινικά κύτταρα, περιβάλλοντος. Έκκριση αγγειογενίνης έχει παρατηρηθεί και από κύτταρα του γλοιοβλαστώματος (106) όπως επίσης και από καρκινικά κύτταρα του προστάτη (107).

Αξίζει να αναφερθεί πως τα επίπεδα της αγγειογενίνης στον ορό βοηθούν στην εκτίμηση του σταδίου ανάπτυξης και εξέλιξης του όγκου (97). Τα αυξημένα επίπεδα αγγειογενίνης που έχουν βρεθεί σε συμπαγείς και αιματολογικές νεοπλασίες έχουν

συσχετιστεί με κακή πρόγνωση (108). Επιπλέον έχει παρατηρηθεί μείωση των επιπέδων της μετά από θεραπεία. Συγκεκριμένα, σε ασθενείς με χρόνια ή οξεία μυελογενή λευχαιμία, τα επίπεδα της αγγειογενίνης στην κυκλοφορία μειώθηκαν σημαντικά μετά από χημειοθεραπεία ή χορήγηση ιντερφερόνης (109). Αναμφισβήτητα οι τιμές της αγγειογενίνης διαφέρουν ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους καρκίνου και στα διαφορετικά στάδια της νόσου. Ωστόσο, προτείνεται ότι η αγγειογενίνη μπορεί κλινικά να συμβάλλει στην αξιολόγηση και παρακολούθηση της θεραπείας και ενδεχομένως να προβλέψει υποτροπή της νόσου (97).

Ακόμη μια ριβονουκλεάση της υπεροικογένειας A που εμπλέκεται στον καρκίνο είναι η ογκονάση. Έχει απομονωθεί από το φυτό *Rana ripiens* και πρόκειται για μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο και να επάγει τον κυτταρικό θάνατο. Πιο ειδικά, αυξάνει τη διάρκεια της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου και μειώνει τη συχνότητα αντιγραφής του DNA (62). Οι κυτταροτοξικές της ιδιότητες έχουν επιβεβαιωθεί σε ποικίλες καρκινικές σειρές όπως για παράδειγμα σε σειρές B λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων (110), χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (111), καρκίνου του πνεύμονα, αδenoκαρκινώματος του παγκρέατος (112), πολλαπλού μυελώματος και καρκίνου του προστάτη (113). Εξαιτίας της δράσης της έχει μελετηθεί και ως φάρμακο μέσα από προκλινικές και κλινικές δοκιμές (114).

Τελευταία, αυξάνει όλο και περισσότερο ο αριθμός ερευνών που υποστηρίζουν πως η απορρύθμισή των miRNAs διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο. Στην ενότητα 1.5.1 αναφέρθηκε πως η ωρίμανση των μη κωδικών μορίων πραγματοποιείται μέσω της δράσης ενδοριβονουκλεασών, της Droscha και της Dicer. Εάν δεν γίνει σωστή επεξεργασία των miRNAs, τότε δεν θα μπορούν να ρυθμίσουν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων τους. Η Droscha και η Dicer, τόσο σε επίπεδο μεταγράφου τόσο και σε επίπεδο πρωτεϊνών έχουν βρεθεί υποεκφρασμένες ή υπερεκφρασμένες σε διάφορους τύπους καρκίνου (115).

1.5.4 Οικογένεια Ριβονουκλεάσης κ

Η οικογένεια της ριβονουκλεάσης κ ανήκει στην κατηγορία των ενδοριβονουκλεασών. Το πρώτο μέλος που έχει μελετηθεί είναι η Cc RNase η οποία απομονώθηκε πρώτη φορά στο εργαστήριο μας από προνύμφες 6 ημερών του εντόμου *Ceratitis Capitata*. Η φυλογενετική μελέτη έδειξε ότι η οικογένεια της RNase κ αντιπροσωπεύεται από ένα μοναδικό ορθόλογο γονίδιο σ' ένα μεγάλο εύρος ζωικών ταξινομικών ομάδων. Όλα τα μέλη της οικογένειας εμφανίζουν ιδιαίτερα αυξημένο βαθμό συντηρητικότητας στην αμινοξική αλληλουχία (<98%) όμως δεν εμφανίζουν σημαντικές ιδιότητες με άλλες γνωστές ριβονουκλεάσες. Η ριβονουκλεάση κ κωδικοποιείται από ένα μοναδικό γονίδιο και έχει βρεθεί ότι εκφράζεται σε μια πληθώρα φυσιολογικών και καρκινικών ιστών. Σε επίπεδο γονιδιακής οργάνωσης φαίνεται πως τα ορθόλογα γονίδια διατηρούν το ίδιο πρότυπο διαθέτοντας 3 εξώνια που παρεμβάλλονται από δύο εσώνια (116).

Η Cc RNase είναι μια μικρή, θερμοάντοχη ριβονουκλεάση η οποία αποτελείται από 95 αμινοξέα. Έχει σχετική μοριακή μάζα 25000Da και το βέλτιστο pH λειτουργίας της κυμαίνεται μεταξύ 7-9. Επίσης, η λειτουργία της επηρεάζεται από τη συγκέντρωση ιόντων καλίου και μαγνησίου (Sideris and Fragoulis 1987). Η ριβονουκλεοτιδική της δράση παρουσιάζει ειδικότητα καθώς αποικοδομεί μόρια RNA δρώντας σε poly(U) και poly(C) σημεία. Το γονίδιο της Cc RNase κ εκφράζεται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και σε όλους τους ιστούς του ενήλικου εντόμου. Το ένζυμο εκφράζεται σε δύο ισομορφές, μήκους 1,5 και 0,9 κιλοβάσεων ως αποτέλεσμα εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης στην 3' αμετάφραστη περιοχή του πρωταρχικού mRNA. Τα δύο μετάγραφα δεν διαφέρουν στην κωδική περιοχή αλλά το μετάγραφο των 1,5 κιλοβάσεων φέρει μια επέκταση 626 νουκλεοτιδίων στην 3' αμετάφραστη περιοχή. Η επέκταση αυτή χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό A και U βάσεων και περιλαμβάνει μοτίβα αλληλουχιών που επάγουν την αποσταθεροποίηση των mRNA μορίων (118).

Η ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ κωδικοποιείται από ένα μοναδικό γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 και συγκεκριμένα στη θέση 17p13.1. Η μελέτη της ξεκίνησε το 2007 στο εργαστήριο μας και οδήγησε στη μοριακή κλωνοποίηση και χαρακτηρισμό του γονιδίου (116). Το cDNA που απομονώθηκε έχει μήκος 466bp και κωδικοποιεί πρωτεΐνη μήκους 98 αμινοξέων με μοριακή μάζα 10984 kDa. Όπως και τα υπόλοιπα μέλη

της οικογένειας, το γονίδιο της ανθρώπινης RNases κ διαθέτει 3 εξώνια τα οποία διακόπτονται από δύο εσώνια μήκους 904 και 402 ζευγών βάσεων (bp) αντίστοιχα. Το πρώτο εξώνιο έχει μήκος 118bp και περιλαμβάνει 40bp της 5' αμετάφραστης περιοχής και κωδικοποιεί τα πρώτα 26 αμινοξέα της ανθρώπινης πρωτεΐνης. Το δεύτερο εξώνιο έχει μήκος 77bp και κωδικοποιεί για τα επόμενα 26 αμινοξέα της πρωτεΐνης ενώ το τρίτο εξώνιο έχει μήκος 387bp, εκ των οποίων οι 139 βάσεις κωδικοποιούν τα τελευταία 46 αμινοξέα της πρωτεΐνης. Τα υπόλοιπα 245 νουκλεοτίδια του τρίτου εξωνίου ανήκουν στην 3' αμετάφραστη περιοχή. Η χρήση δεδομένων από EST αλληλουχίες έδειξε ότι το mRNA εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς, φυσιολογικούς και καρκινικούς, και σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια. Η αποτύπωση κατά Northern επιβεβαίωσε την παρουσία ενός κύριου μεταγράφου ριβονουκλεάσης κ μήκους 700kb σε 8 διαφορετικούς ανθρώπινους ιστούς (καρδιά, εγκέφαλος, πλακούντας, πνεύμονας, συκώτι, νεφρά, πάγκρεας και σκελετικό μυ). Εκτός από το κύριο μετάγραφο ανιχνεύθηκαν και άλλα μετάγραφα mRNA μήκους 3.1kb και 5kb τα οποία εντοπίστηκαν μόνο στον εγκέφαλο, στον πλακούντα και στο πάγκρεας καθώς επίσης και ένα μετάγραφο μήκους 1,6kb το οποίο βρέθηκε μόνο στα Β κύτταρα. Η καθολική παρουσία της ριβονουκλεάσης κ υποστηρίζει ότι πιθανά η πρωτεΐνη αυτή εξυπηρετεί μια βασική λειτουργία στο κύτταρο (116).

Σε επίπεδο λειτουργίας η RNase κ αποτελεί μια εξειδικευμένη ενδοριβονουκλεάση που κόβει τον φωσφοδιεστερικό δεσμό σε AU και AG θέσεις της μονόκλωνης αλυσίδας του RNA. Επιπλέον, υδρολύει UrU δεσμούς σε χαμηλότερα επίπεδα (116). Η σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της RNase κ μεταξύ διαφόρων ειδών, έδειξε πως όλες οι ομόλογες πρωτεΐνες διαθέτουν 3-5 κατάλοιπα κυστεΐνης, εκ των οποίων οι κυστεΐνες 6, 14 και 69 είναι απόλυτα συντηρημένες σε όλα τα είδη (118). Τα κατάλοιπα Cys7 και Cys85 φαίνεται πως προέκυψαν αργότερα κατά την εξέλιξη οπότε και εντοπίζονται μόνο στα αμφίβια, στα πτηνά και στα θηλαστικά. Για την διερεύνηση του ρόλου των καταλοίπων αυτών στην ενζυμική ενεργότητα της ανθρώπινης ριβονουκλεάσης κ πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του κ. Σίδερη πειράματα κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, μελέτη επίδρασης αλκυλιωτικών και αναγωγικών παραγόντων καθώς και μελέτη ηλεκτροφορητικής κινητικότητας πρωτεϊνών υπό αναγωγικές και μη συνθήκες. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι κυστεΐνες 6 και 69 είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό ενός ενδομοριακού δισουλφιδικού δεσμού που είναι απαραίτητος για την σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης και την λειτουργική της διαμόρφωση (119).

Μελέτη του εργαστηρίου μας το 2014 από τους Karousis και Sideris έδειξε την παρουσία ακόμη μιας ισομορφής της RNases κ η οποία διαθέτει 4 νουκλεοτίδια λιγότερα στο σημείο συρραφής των εξωνίων 1 και 2. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η πρώτη ισομορφή που βρέθηκε έχει μήκος 466 ζεύγη βάσεων και κωδικοποιεί για πρωτεΐνη 98 αμινοξέων. Η 2^η ισομορφή (RNase κ-02) υπολείπεται την αλληλουχία GTTG και έχει μήκος 540 ζεύγη βάσεων και δίνει πρωτεΐνη μήκους 134 αμινοξέων. Η 2^η ισομορφή προκύπτει λόγω χρήσης ενός διαφορετικού κωδικονίου έναρξης της μεταγραφής. Από την αμινοξική στοίχιση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των δύο ισομορφών της ριβονουκλεάσης κ προέκυψε ότι δεν υπάρχει καμία ομοιότητα στο αμινοτελικό άκρο. Στο καρβοξυτελικό άκρο βρέθηκε ότι τα αμινοξέα 63-134 της RNase κ -02 είναι πανομοιότυπα με τα αμινοξέα 27-98 της RNase κ-01 (120). Επιπλέον οι δύο ισομορφές δρουν καταλυτικά στο ίδιο υπόστρωμα, διασπώντας τους ApU και ApG φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Όσον αφορά τις βιοχημικές ιδιότητες

```

RNase κ-01 -----MASLLCCG-----PKL--AAC-----GIVLSAWGVI-----MLIMLGI 31
RNase κ-02 MVEAGATPPLPPCEGILGFLPPLSEPACTSAIPDSSLYGVPVLWAEAGRLRHRPQRLGSDHIMLGI 67
          ..* *          * * .**          *:. *          *****

RNase κ-01 FFNVHSAVLIEDVVPFTEKDFENGQPONIYNLYEQVSYNCFIAAGLYLLGGFSFCQVRLNKRKEYMVR 98
RNase κ-02 FFNVHSAVLIEDVVPFTEKDFENGQPONIYNLYEQVSYNCFIAAGLYLLGGFSFCQVRLNKRKEYMVR 134
          *****

```

της καινούργιας ισομορφής έχει βρεθεί ότι πρόκειται για υδρόφοβη πρωτεΐνη.

Εικόνα 1.7: Σχηματική απεικόνιση της αμινοξικής αλληλουχίας των δύο ισομορφών της RNase κ (120)

Η λειτουργία της RNase κ δεν περιορίζεται μόνο σε διάσπαση μορίων RNA αλλά φαίνεται πως η παρουσία της επηρεάζει την είσοδο διάφορων παθογόνων στα κύτταρα. Ειδικότερα, φαίνεται πως ευνοεί την είσοδο ιών των οικογενειών flaviviruses, alphaviruses, bunyaviruses και orthomyxoviruses, οι οποίοι για να εισέλθουν στα κύτταρα χρησιμοποιούν μονοπάτια ενδοκύτωσης και εξαρτώνται από την μείωση της οξύτητας. Πιο συγκεκριμένα ο ιός του Δυτικού Νείλου, ο ιός του Δάγκειου και ο ιός της γρίπης Α στηρίζονται στη διαμεσολαβούμενη από κλαθρίνη ενδοκύτωση. Η RNase κ είναι απαραίτητη για τα πρώτα στάδια της εισόδου του ιού στα κύτταρα όμως δεν έχει επίδραση στην προσκόλληση του ιού στην μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή (121). Επίσης, υπάρχει ακόμα μια μελέτη που επιβεβαιώνει την εμπλοκή της RNase κ στην είσοδο ιών στα κύτταρα-ξενιστή. Η μελέτη αυτή υποστηρίζει πως η RNase κ και η αντλία πρωτονίων V-

ATPase είναι απαραίτητες για την είσοδο του ρινοϊού και του ιού της γρίπης Α στα κύτταρα-ξενιστή μέσω ενδοκύτωσης. Η RNase κ συνεντοπίζεται με την αντλία πρωτονίων V-ATPase στην μεμβράνη των κυττάρων και επηρεάζει τη σωστή τοποθέτηση και τα κυτταρικά επίπεδα των υπομονάδων της αντλίας V-ATPase. Αξίζει να σημειωθεί πως χαμηλά επίπεδα RNase κ εμποδίζουν την ενδοκύτωση στα αρχικά της στάδια και κατ' επέκταση τον πολλαπλασιασμό των ιών (122).

1.5.4.1 Ριβονουκλεάση κ και Καρκίνος

Δεδομένα μικροσυστοιχιών αναφέρουν πως το γονίδιο της ριβονουκλεάση κ εντοπίζεται υπερεκφρασμένο ή υποεκφρασμένο σε διάφορους τύπους καρκίνου. Ειδικότερα, αυξημένα επίπεδα έχουν αναφερθεί σε περιπτώσεις μεταστατικού μελανώματος, επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών, καρκίνου μαστού, μεταστατικού καρκίνου του προστάτη και σε καρκινικά κύτταρα προστάτη ενδοθηλιακής προέλευσης. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση του γονιδίου σε πρίμα και προχωρημένα στάδια καρκινώματος νεφρικών κυττάρων, καθώς και κατά τον σχηματισμό του ορθοκολικού καρκίνου. Από την άλλη, μειωμένα επίπεδα ριβονουκλεάσης κ έχουν εντοπιστεί σε περιπτώσεις μυελογενούς λευχαιμίας, πολλαπλού μυελώματος και κακοήθειας στην ωοθηκική ενδομητρίωση. Επιπρόσθετα, η ριβονουκλεάση κ έχει μελετηθεί σε καρκινικές σειρές υπό την επίδραση χημειοθεραπευτικών ουσιών και αντικαρκινικών φαρμάκων. Πιο συγκεκριμένα, στις καρκινικές σειρές μαστού και ωοθηκών (BT-20 και SKOV-3 αντίστοιχα), η επίδραση του φαρμάκου paclitaxel οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων έκφρασης του μεταγράφου της RNase κ. Η παρατήρηση αυτή συγκλίνει με αντίστοιχες παρατηρήσεις, καταλήγοντας έτσι στο συμπέρασμα πως τα επίπεδα έκφρασης της RNase κ επηρεάζονται έπειτα από χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων (123).

Τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου της RNase κ έχουν διερευνηθεί στον καρκίνο του προστάτη. Αναλυτικότερα, τα επίπεδα έκφρασης της RNase κ μελετήθηκαν σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του προστάτη και σε δείγματα ασθενών με καλοήγη υπερπλασία προστάτη. Τα αποτελέσματα αναφέρουν πως η έκφραση της RNase κ είναι στατιστικώς σημαντικά μειωμένη στα καρκινικά δείγματα σε σχέση με τα δείγματα της καλοήθους υπερπλασίας. Επίσης, από την συγκεκριμένη μελέτη προέκυψε πως οι ασθενείς με καρκίνο του προστάτη που υπερεκφράζουν την RNase κ, εμφανίζουν μεγαλύτερη επιβίωση ελευθέρου εξέλιξης (progression-free survival, PFS) συγκριτικά με τους ασθενείς

που εκφράζουν την RNase κ σε χαμηλότερα επίπεδα (124).

1.6 ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΣΥΡΡΑΦΗ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, για την ωρίμανση των mRNAs πραγματοποιείται αφαίρεση των εσώνιων και συρραφή των εξώνιων. Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς μέσω της εναλλακτικής συρραφής από ένα γονίδιο μπορούν να προκύψουν δύο ή περισσότερα ώριμα mRNAs, καταλήγοντας έτσι σε ποικιλία πρωτεϊνών. Τα εναλλακτικά mRNAs μπορεί να κωδικοποιούν διαφορετικές πρωτεΐνες που έχουν διαφορετική βιολογική λειτουργία. Το 95% των ανθρώπινων γονιδίων υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα. Ο μηχανισμός αυτός είναι σημαντικός για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, καθώς επιτρέπει ή παρεμποδίζει τον συνδυασμό συγκεκριμένων εξώνιων που τελικά οδηγεί σε παραγωγή διαφορετικών πρωτεϊνών.

Το σωματίο συρραφής που απομακρύνει τα εσώνια, συνίσταται από 5 μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια (snRNPs), τα U1, U2, U4, U5, U6 και πολλές πρωτεΐνες. Τα εσώνια φέρουν μια 5' και μια 3' θέση συρραφής καθώς και μία θέση διακλάδωσης. Τα συστατικά του σωματίου ματίσματος αλληλεπιδρούν με τις συγκεκριμένες αλληλουχίες του εσωνίου οπότε και πραγματοποιείται με ακρίβεια η αφαίρεση των εσώνιων. Κατά το εναλλακτικό μάτισμα, ιστο-ειδικές πρωτεΐνες δεσμεύονται σε ειδικές θέσεις, επηρεάζοντας τις τελικές θέσεις συρραφής. Οι ειδικές θέσεις αυτές, είναι γνωστές ως ενισχυτές και καταστολείς συρραφής εξώνιων καθώς και ενισχυτές και καταστολείς συρραφής εσώνιων.

Υπάρχουν αρκετοί τύποι εναλλακτικού ματίσματος, με τους βασικότερους να είναι:

1. **Εξώνια-κασέττες (cassette exon)**: είναι διακριτά εξώνια τα οποία μπορούν ανεξάρτητα να εμπεριέχονται ή όχι στο ώριμο μόριο mRNA όταν προκύπτουν τα αντίστοιχα γεγονότα εναλλακτικής συρραφής.
2. **Εναλλακτικό μάτισμα αμοιβαίου αποκλεισμού (mutually exclusive splicing)**: μόνο το ένα από τα δύο εναλλακτικά εξώνια εμπεριέχεται κάθε φορά στο ώριμο μετάγραφο
3. **Εναλλακτική 5' θέση ματίσματος (alternative donor site)**: αλλάζει το 3' όριο του ανοδικού εξωνίου
4. **Εναλλακτική 3' θέση ματίσματος (alternative acceptor site)**: αλλάζει το 5' όριο του καθοδικού εξωνίου

5. Διατήρηση εσωνίου (intron retention): ένα εσώνιο συμπεριλαμβάνεται στο ώριμο εναλλακτικό mRNA.

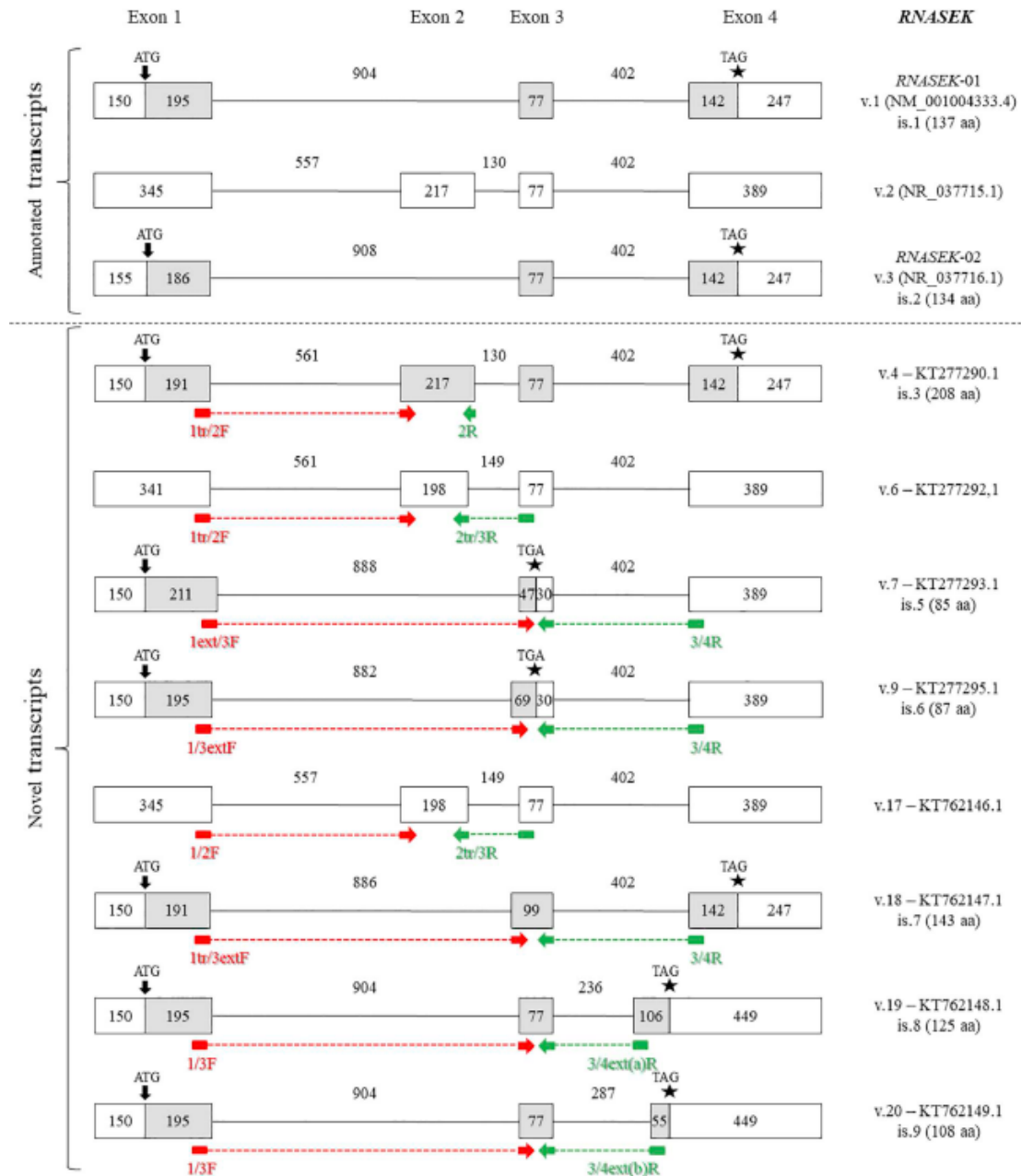
Συχνά στον καρκίνο, τα κύτταρα ακολουθούν διαφορετικά μοτίβα εναλλακτικού ματίσματος με αποτέλεσμα να παράγονται πρωτεΐνες που ευνοούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή που καταστέλλουν την απόπτωση (125). Έχει παρατηρηθεί ότι αρκετά γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση, ελέγχονται από την εναλλακτική συρραφή. Επομένως, έχει μεγάλη σημασία να αναλυθεί η σύνδεση του καρκίνου και της εναλλακτικής συρραφής διότι πιθανά κάποια από τα εναλλακτικά μετάγραφα να αποτελούν θεραπευτικούς στόχους σε διάφορους τύπους καρκίνου ή να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη ως βιοδείκτες (126). Για παράδειγμα το γονίδιο CD44 κωδικοποιεί έναν κυτταρικό υποδοχέα που εμπλέκεται σε αρκετές διεργασίες. Διαθέτει 20 εξώνια εκ των οποίων τα 10 υπόκεινται σε εναλλακτική συρραφή. Το εναλλακτικό μετάγραφο CD44v10 φαίνεται να μπορεί να διακρίνει τα μεταστατικά από τα μη μεταστατικά καρκινικά κύτταρα του παγκρεάτος (127). Επίσης, η έκφραση του μετάγραφου CD44v6 έχει συσχετισθεί θετικά με προχωρημένα στάδια στον καρκίνο του στομάχου, και μάλιστα, ασθενείς που εκφράζουν το μετάγραφο αυτό εμφανίζουν επιβίωση λιγότερη από 5 χρόνια (128).

1.6.1 Εναλλακτική συρραφή και Ριβονουκλέαση κ

Εκτός από το βασικό μετάγραφο η ριβονουκλεάση κ εμφανίζει εναλλακτικά μετάγραφα. Το πρώτο εναλλακτικό μετάγραφο είναι η (RNase κ-02) που προκύπτει λόγω εναλλακτικής συρραφής μικρής έκτασης και υπολείπεται 4 νουκλεοτίδια στο σημείο συρραφής των δύο πρώτων εξωνίων (120). Το 2014 μελέτη αλληλούχησης νέας γενιάς είχε ως αποτέλεσμα την ανακάλυψη 8 νέων εναλλακτικών μεταγράφων της ριβονουκλεάσης κ (εικόνα 1.8). Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν τα ακόλουθα μετάγραφα και καταχωρήθηκαν στην βάση δεδομένων GeneBank με τους αντίστοιχους κωδικούς:

1. RNase κ μετάγραφο 4: (KT277290.1)
2. RNase κ μετάγραφο 6 : (KT277292.1)
3. RNase κ μετάγραφο 7 : (KT277293.1)
4. RNase κ μετάγραφο 9: (KT277295.1)

5. RNase κ μετάγραφο 17: (KT762146.1)
6. RNase κ μετάγραφο 18: (KT762147.1)
7. RNase κ μετάγραφο 19: (KT762148.1)
8. RNase κ μετάγραφο 20: (KT762149.1)



Εικόνα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση των μεταγράφων της ριβονουκλεάσης κ και συγκεκριμένα του βασικού μεταγράφου (RNase κ-01), του εναλλακτικού μεταγράφου (RNase κ-02) και των οχτώ νέων εναλλακτικών μεταγράφων που ανακαλύφθηκαν με NGS. Τα κόκκινα και πράσινα βέλη υποδεικνύουν τα σημεία υβριδοποίησης των εκκινητών (129)

Η έκφραση των νέων μεταγράφων επιβεβαιώθηκε με nested PCR σε διάφορες κυτταρικές σειρές προερχόμενες από φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς (129). Επίσης, αδημοσίευτα αποτελέσματα του Δρ. Παναγιώτη Αδαμόπουλου σε συνεργασία με τον κ. Διαμάντη Σίδηρη αφορούν την εύρεση μια σειράς άλλων εναλλακτικών μεταγράφων, μεταξύ των οποίων και το μετάγραφο 14 που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία. Παρακάτω παρατίθεται η αλληλουχία του μεταγράφου 14:

```
1 atgggatggt tgaggccggg gccacgcccc ctctgcccc ctgcgagggc atcctgggct
61 ttctcccacc gctttccgag cccgcttga cctcggcgat ccccgactcc cttctttatg
121 gcgtcgctcc tgtgctgtgg gccgaagctg gccgcctgcg gcacgtcct cagcgcctgg
181 ggagtgatca tgttggtgag gggactcccc ggcaaggatc ggagagggcc tgaggggctc
241 cgggctggga gggctgggag gcgaggaaac tctgggcccgc aggcaggccg gaggggcccg
301 ggatctacag gccccggaga aggagacaga ctgaaattga aaaatgggaa ctgttcgaga
361 ccagcctgac caacatggtg aaaccccgtc tccaataaaa atacaaaaat tagccgggcg
421 tgggtggcgc cgctgtaat cccagctact caggaggctg aggcaggaga atcgcttgaa
481 tccgggaggc ggagggtgca gtgagccgag atcgcgccac tgcactccag cctgggtgac
541 agagcgagac tccgtcccca aagaaaaaga aaaaagggaa ctggagcgga gggccctgga
601 gtgggaggag ccagggctgg taaaggtgga gaccctcaa ggtaggagaa acaagagcgg
661 ggtgcctgag aggtgcttga gttgaatgga ggacatggga ggaaaagaga gtgcttgtc
721 cagaaatgtg tagctgggcc ttgtttccc agtaatccac ccaccgccac ttcaagaaga
781 aatgatatga agaagtccg gttctcctc ccctctccg cactgtcccg tgatgatgac
841 gcctccagag aggacgataa tctgggttcc tgggagagat ggcttggtca ctattcccac
901 cctgcctcg accactgtc tcaatgtcac cacctcacgc cctgttccag gtggetgagt
961 ccgaatccag aatggcccc agaacatata caaccttac gagcaagtca gctacaactg
1021 ttcatcgct gcaggcctt acctcctct cggaggcttc tcttctgcc aagtccggct
1081 caataagcgc aaggaataca tgggtgcgta gggccccggc gcgttcccc gctccagccc
1141 ctctctatt taaagactcc ctgcaccgtg tcaccaggt cgcgtcccac ccttgccggc
1201 gccctctgcg ggactgggtt tcccgggcca gagactgaat ccttctccc atctctggca
1261 tccggcccc gtggagaggc ctgaggctgg ggggctgttc cgtttctcca ccttcgctg
1321 tgtcccgtat ctcaataaag agaactgct ctctcag
```

1.7 ΣΚΟΠΟΣ

Οι ριβονουκλεάσες ως τα κύρια ένζυμα αποικοδόμησης και επεξεργασίας του RNA παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης των μορίων RNA στο κύτταρο. Ιδιαίτερα, η ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης των mRNAs έχει μεγάλη σημασία στη γονιδιακή έκφραση. Στην περίπτωση του καρκίνου, η απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης αποτελεί ένα από τα κυριότερα στοιχεία κατά την πορεία της καρκινογένεσης. Λαμβάνοντας υπόψη τον ρόλο των ριβονουκλεασών στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και πως αυτή αλλάζει σε καταστάσεις καρκινογένεσης, καταλαβαίνουμε τη σημασία της μελέτης των ενζύμων αυτών σε διάφορους τύπους καρκίνου. Μετά την ανακάλυψη των νέων εναλλακτικών μεταγράφων της ριβονουκλεάσης κ, είναι ενδιαφέρον να μελετηθεί η έκφραση και η κλινική τους αξία τόσο στον καρκίνο αλλά και σε άλλες ασθένειες.

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως σκοπό τη συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων της ριβονουκλεάσης κ με τη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Πιο συγκεκριμένα, η εργασία εστιάστηκε στη μελέτη των επιπέδων έκφρασης του βασικού μεταγράφου (RNase κ-01) και των εναλλακτικών μεταγράφων 7, 9, 14, 20 της ριβονουκλεάσης κ σε δείγματα ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Επίσης, σκοπός της εργασίας αποτελεί η διερεύνηση της πιθανής διαγνωστικής ή προγνωστικής αξίας των μεταγράφων στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία καλλιεργήθηκαν οι κυτταρικές σειρές H929, U266, HL60, U937 προκειμένου αρχικά να ελεγχθεί η παρουσία των μεταγράφων της RNase κ και έπειτα να χρησιμοποιηθούν ως βαθμονομητές στα πειράματα real time qPCR. Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονται σε εναιώρημα και καλλιεργούνται σε φλάσκες 75mm². Διατηρούνται στον επωαστικό κλίβανο σε συνθήκες 37° C και 5% CO₂.

H929: Τα κύτταρα H929 είναι B λεμφοκύτταρα που προέρχονται από τον μυελό των οστών γυναίκας 62 χρονών που έπασχε από πολλαπλούν μυέλωμα. Εμφανίζουν μορφολογία λεμφοβλαστών. Η καλλιέργεια τους διατηρείται με συγκέντρωση από 5x10⁵ έως 1x10⁶ κύτταρα ανά ml (cells/ml) και χρειάζονται ανακαλλιέργεια 2-3 φορές την εβδομάδα. Στο οπτικό μικροσκόπιο φαίνονται κυκλικά, σχηματίζουν στρώματα στο θρεπτικό υλικό και συγκεντρώνονται ανά ομάδες δύο, τριών ή και τεσσάρων κυττάρων.

U266: Τα κύτταρα U266 είναι B λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα. Έχουν μορφολογία λεμφοβλαστών και προέρχονται από άνδρα 53 χρονών που έπασχε από πολλαπλούν μυέλωμα. Η αρχική τους καλλιέργεια ξεκινά με συγκέντρωση 3x10⁵ cells/ml και έπειτα διατηρείται από 1x10⁵ έως 1x10⁶ cells/ml. Η ανακαλλιέργεια τους πραγματοποιείται 2-3 φορές την εβδομάδα. Αυτή η κυτταρική σειρά είναι κατάλληλη και για πειράματα κυτταρικής διαμόλυνσης.

HL60: Η HL60 αποτελεί μια προμυελοκυτταρική σειρά. Τα κύτταρα έχουν μορφολογία μυελοβλαστών και έχουν παρθεί μέσω λευκαφαίρεσης από το περιφερικό αίμα γυναίκας ηλικίας 36 χρονών που έπασχε από οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία και έχουν μορφολογία προμυελοβλάστη. Η κυτταρική καλλιέργεια πρέπει να διατηρείται σε συγκέντρωση 1x10⁵ έως 1x10⁶ cells/ml. Τα HL-60 κύτταρα έχουν την δυνατότητα να διαφοροποιούνται αυθόρμητα καθώς επίσης και μετά από διέγερση με χημικές ουσίες όπως ρετινοϊκό και μυριστικό οξύ.

U937: Τα U937 είναι λεμφοκύτταρα μυελοειδούς σειράς που έχουν παρθεί με πλευριτική συλλογή το 1974 από άνδρα 37 ετών που είχε ιστιοκυτταρικό λέμφωμα. Έχουν μορφολογία μονοκυττάρων και η καλλιέργεια τους διατηρείται σε συγκέντρωση 1x10⁵ έως 2x10⁶ cells/ml. Αποκρίνονται σ' ένα μεγάλο αριθμό ερεθισμάτων όπως για παράδειγμα το

μυριστικό οξύ και εκκρίνουν παράγοντες όπως ο TNF (tumor necrosis factor), B2 μικροσφαιρίνη και λυσοζύμη.

Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Η ανακαλλιέργεια ουσιαστικά είναι το μοίρασμα των κυττάρων που έχουν πολλαπλασιαστεί προκειμένου να υπάρχει χώρος για την περαιτέρω ανάπτυξή τους. Συνήθως όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει το 80-90% της επιφάνειας του τρυβλίου και ξεπεράσουν ένα συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων ανά ml γίνεται ανακαλλιέργεια. Κάθε κυτταρική σειρά απαιτεί διαφορετικό αριθμό αρχικής συγκέντρωσης κυττάρων.

Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν θρεπτικό υλικό RPMI, ορός FBS (Fetal Bovine Serum) και αντιβιοτικό πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη από την εταιρία Biosera.

Για 50ml πλήρες θρεπτικό η σύσταση διαμορφώνεται ως εξής:

1. Θρεπτικό υλικό RPMI: 45ml (89% v/v)
2. Ορός FBS: 5ml (10% v/v)
3. Αντιβιοτικό πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη: 0,5ml (1% v/v)

Διαδικασία:

1. Συλλογή των κυττάρων σε falcon και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 250g (1200rpm).
2. Απόχυση υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 3-4 ml πλήρες θρεπτικό υλικό.
3. Υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων με μέτρηση ποσότητας κυττάρων στην πλάκα Neubauer σε οπτικό μικροσκόπιο.
4. Υπολογισμός της ποσότητας των κυττάρων που πρέπει να ληφθεί από το εναιώρημα ώστε η συγκέντρωση των κυττάρων στην νέα φλάσκα να είναι η επιθυμητή.
5. Προσθήκη νέου πλήρους θρεπτικού υλικού στη φλάσκα προκειμένου κύτταρα και θρεπτικό υλικό να έχουν συνολικό όγκο 10ml (οι φλάσκες 75mm² έχουν χωρητικότητα 10-14ml)

Υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων

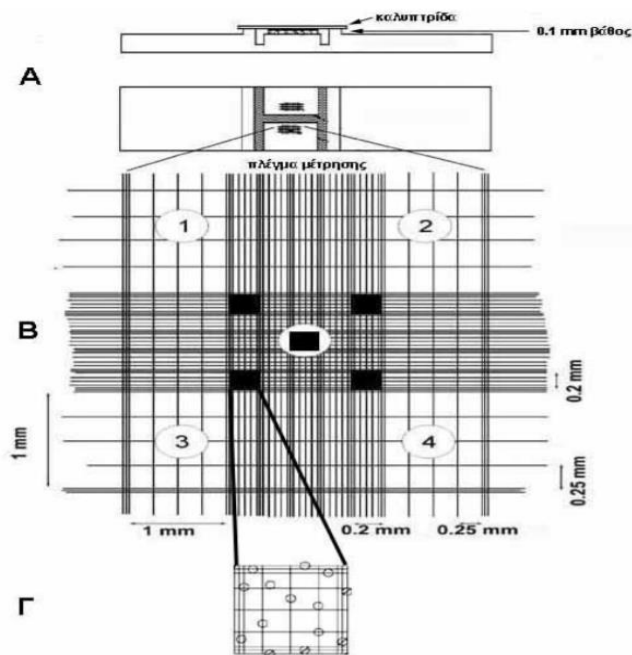
Διαδικασία:

1. Λήψη μικρής ποσότητας από το επαναιωρημένο ίζημα των κυττάρων και προσθήκη 100μl διαλύματος PBS ώστε να αραιωθεί το εναιώρημα των κυττάρων
2. Καλή ανάδευση και προσθήκη 10μl (κύτταρα+PBS) στο πλέγμα μέτρησης της πλάκας Neubauer
3. Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων που περιέχονται στα τέσσερα γωνιακά εξωτερικά τετράγωνα της πλάκας
4. Εύρεση του μέσου αριθμού των κυττάρων από τα τέσσερα τετράγωνα και υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Συγκέντρωση κυττάρων} = \text{Αριθμός κυττάρων} \times 10^4 \times \text{Αραίωση} \\ (\text{κύτταρα/ml})$$

- ❖ Η παράμετρος 10^4 αντιστοιχεί στον όγκο των τεσσάρων γωνιακών τετραγώνων. Κάθε τετράγωνο υποδιαιρείται σε 16 μικρότερα τετράγωνα των οποίων η κάθε πλευρά έχει μήκος 0,25mm άρα το συνολικό μήκος της κάθε πλευράς των τεσσάρων μεγάλων τετραγώνων έχει μήκος 1mm, όπως φαίνεται και στην εικόνα 2.1. Μεταξύ πλέγματος και καλυπτρίδας υπάρχει χώρος ύψους 0,1mm όπου εκεί γίνεται η προσθήκη του εναιωρήματος των κυττάρων. Επομένως ο όγκος είναι $0,1 \times 1 \times 1 = 0,1 \text{mm}^3 = 10^{-4} \text{ml}$. Ο μέσος όρος των κυττάρων (M) διαιρείται με τον όγκο οπότε:

$$M/10^{-4} \text{ml} = M \times 10^4 \text{κύτταρα/ml}$$



Εικόνα 2.1: Πλάκα Neubauer. A: Πλάγια όψη και κάτοψη της πλάκας που φέρει δύο πλέγματα μέτρησης. B: Πλέγμα μέτρησης στο οποίο διακρίνονται τα 4 γωνιακά εξωτερικά τετράγωνα που υποδιαιρούνται σε 16 μικρότερα τετράγωνα και το κεντρικό τετράγωνο το οποίο υποδιαιρείται σε 25 μικρότερα τετράγωνα που το καθένα στη συνέχεια υποδιαιρείται σε 16 ακόμα μικρότερα τετράγωνα. Γ: Ένα από τα 25 μικρά τετράγωνα του κεντρικού τετραγώνου.

Πάγωμα κυττάρων

Το πάγωμα των κυττάρων πραγματοποιείται προκειμένου να διατηρηθούν τα κύτταρα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αυτό επιτυγχάνεται με τη διατήρησή τους σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες όπως σε καταψύκτες με θερμοκρασία -80°C ή ακόμα καλύτερα σε υγρό άζωτο όπου εκεί η θερμοκρασία φτάνει τους -196°C . Το πάγωμα γίνεται όταν τα κύτταρα στη φλάσκα καλύψουν περίπου το 80% της συνολικής επιφάνειας του τρυβλίου. Για το πάγωμα χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο DMSO (διμεθυλ-σουλφοξείδιο) από την εταιρία FERAK και ορός FBS από την εταιρία Biosera. Το DMSO είναι φωτοευαίσθητο και διατηρείται σε σκοτεινό χώρο, καλυμμένο με αλουμινόχαρτο. Χρησιμοποιείται επειδή εισέρχεται στις μεμβράνες των κυττάρων και εμποδίζει την δημιουργία κρυστάλλων κατά την διαδικασία του παγώματος, εξασφαλίζοντας την βιωσιμότητα περισσότερων κυττάρων.

Διαδικασία:

1. Ετοιμασία διαλύματος κατάψυξης (10% DMSO και 90% FBS). Σε eppendorf του 1,5ml προστίθενται 100μl DMSO και 900μl FBS και ακολουθεί καλή ανάδευση του διαλύματος
2. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 250g και απόχυση υπερκειμένου
3. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος των κυττάρων με το διάλυμα κατάψυξης και μεταφορά του επαναδιαλυτοποιημένου ιζήματος σε κρυοπροστατευτικό φιαλίδιο (cryovial)
4. Απευθείας μεταφορά του cryovial στην κατάψυξη ή στο υγρό άζωτο

Απόψυξη κυττάρων

Η διαδικασία πρέπει να πραγματοποιείται γρήγορα ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα κυτταρικού θανάτου. Για την απόψυξη χρειάζεται μόνο πλήρες θρεπτικό RPMI, το οποίο απενεργοποιεί το DMSO που είχε προστεθεί κατά το πάγωμα των κυττάρων.

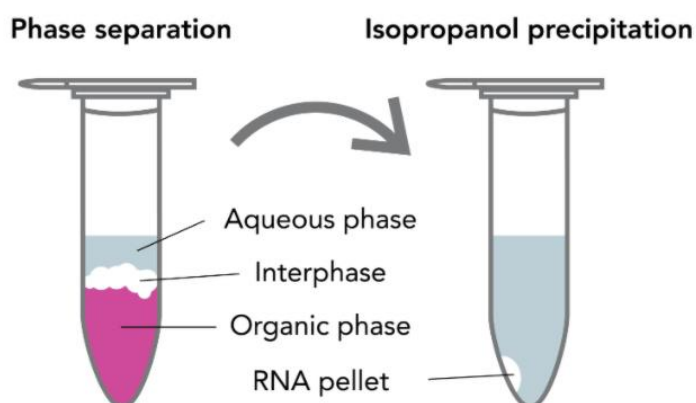
Διαδικασία:

1. Γρήγορη απόψυξη του cryovial με τριβή μέχρι να λιώσει ο πάγος στο εσωτερικό
2. Μεταφορά του περιεχομένου σε falcon και προσθήκη 4ml πλήρους θρεπτικού υλικού
3. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 1200rpm
4. Απόχυση υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 2ml πλήρες θρεπτικό
5. Μεταφορά του επαναδιαλυτοποιημένου ιζήματος σε φλάσκα 75mm² στην οποία προηγουμένως έγινε προσθήκη 8ml πλήρους θρεπτικού (εάν κατά το πάγωμα η συγκέντρωση των κυττάρων ήταν χαμηλή, τότε επιλέγεται η μικρή φλάσκα των 25mm²).

2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA

Αρχή της μεθόδου

Η απομόνωση του RNA βασίζεται στον διαχωρισμό των μακρομορίων σε φάσεις μετά από την προσθήκη των αντιδραστηρίων TRIzol και χλωροφορμίου. Το TRIzol με βασικά συστατικά την φαινόλη και την θειοκυανική γουανιδίνη χρησιμοποιείται για την απομόνωση πρωτεϊνών, RNA και DNA από ιστούς και κύτταρα. Η θειοκυανική γουανιδίνη αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και αναστέλλει την δράση των ριβονουκλεασών προστατεύοντας έτσι το RNA που πρόκειται να απομονωθεί. Η φαινόλη και το χλωροφόρμιο που προστίθεται στη συνέχεια δημιουργούν μετά τη φυγοκέντρηση τρεις φάσεις, την οργανική η οποία έχει τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια, τη μεσόφαση που αποτελείται από το DNA και την υδατική στην οποία βρίσκεται το RNA. Σε pH 7-8 οι φωσφορικές ομάδες των νουκλεϊνικών οξέων έχουν αρνητικό φορτίο οπότε και παραμένουν στην υδατική φάση. Σε όξινο pH οι περισσότερες πρωτεΐνες και μικρά κομμάτια DNA οδηγούνται στην οργανική φάση, ενώ μεγάλα κομμάτια DNA και κάποιες πρωτεΐνες μένουν στην μεσόφαση. Το TRIzol λόγω των οξέων του έχει χαμηλό pH συμβάλλοντας στον διαχωρισμό του RNA και του DNA. Αυτό συμβαίνει διότι τα ιόντα υδρογόνου (H^+) εξουδετερώνουν το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων του DNA αλλά όχι του RNA καθιστώντας το DNA ουδέτερο μόριο που καταλήγει τελικά στην μεσόφαση (130). Μετά τον διαχωρισμό των φάσεων, συλλέγεται η υδατική φάση και μετά από την προσθήκη διαλύματος ισοπροπανόλης κατακρημνίζεται το RNA ως ένα λευκό ίζημα.



Εικόνα 2.2: Διαχωρισμός των φάσεων όπως προκύπτουν μετά από προσθήκη TRIzol και χλωροφορμίου. Αριστερά απεικονίζονται οι τρεις φάσεις, υδατική (RNA), μεσόφαση (DNA) και οργανική (πρωτεΐνες). Δεξιά απεικονίζεται η κατακρήμνιση του RNA με ισοπροπανόλη.

Υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση RNA

1. TRIzol
2. Χλωροφόρμιο
3. Ισοπροπανόλη
4. EtOH-Αιθανόλη 75%
5. dH₂O-νερό ελεύθερο από RNases

➤ Σύσταση TRIzol:

1. 38ml φαινόλη
2. 3,34ml 3M Οξικό Νάτριο (Sodium Acetate) pH 5
3. 5ml 5% γλυκερόλη
4. 9,453gr θειοκυανική γουανιδίνη (Guanidine thiocyanate)
5. 7,612gr θειοκυανικό αμμώνιο (Ammonium thiocyanate)

Πρωτόκολλο Απομόνωσης RNA από κυτταρικές σειρές HL60, U937, H929, U266

1. Διαλυτοποίηση του ισζήματος των κυττάρων σε 1ml TRIzol και αναμονή στον πάγο για 10 λεπτά
2. Μετά την προσθήκη του TRIzol μπορεί να ολοκληρωθεί η διαδικασία της απομόνωσης απευθείας ή τα δείγματα μπορούν να φυλαχθούν στους -80° C. Την μέρα που θα πραγματοποιηθεί η απομόνωση τα δείγματα ξεπαγώνουν πρώτα στον πάγο και έπειτα ακολουθείται κανονικά η απομόνωση του RNA από το στάδιο της προσθήκης του χλωροφορμίου όπως περιγράφεται παρακάτω
3. Προσθήκη 200μl χλωροφορμίου, ήπια ανακίνηση και παραμονή στον πάγο για 10 λεπτά. Στα 5 λεπτά αναμονής γίνεται μια δεύτερη ανακίνηση
4. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 13.000 rpm στους 4° C
5. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο eppendorf.
6. Προσθήκη 500μl ισοπροπανόλης, ήπια ανακίνηση και παραμονή στον πάγο για 10 λεπτά. Στα 5 λεπτά αναμονής γίνεται μια δεύτερη ανακίνηση
7. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 13.000 rpm στους 4° C
8. Αφαίρεση του υπερκειμένου με πιπέτα, προσεκτικά ώστε να αποφευχθεί η αναρρόφηση του ισζήματος (RNA)
9. Προσθήκη 1ml αιθανόλης 75% (-20° C) για πλύση του ισζήματος

10. Απευθείας φυγοκέντρωση για 15 λεπτά στα 13.000 rpm στους 4° C
11. Αφαίρεση αιθανόλης υπό κενό με προσοχή για να μην ξεκολλήσει το ίζημα
12. Παραμονή στον πάγο για περίπου 15-20 λεπτά μέχρι να εξατμιστεί η αιθανόλη
13. Διαλυτοποίηση του ιζήματος σε κατάλληλο όγκο 30-60μl νερού ελεύθερου από RNases και φύλαξη του διαλυτοποιημένου RNA στους -80° C

2.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ RNA

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του ολικού RNA πρέπει να ελεγχθεί η ποιότητα του RNA που απομονώθηκε και να υπολογιστεί η συγκέντρωση του. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του RNA πραγματοποιήθηκε με το φασματοφωτόμετρο. Τα νουκλεϊνικά οξέα απορροφούν στα 260nm, μήκος κύματος που αντιστοιχεί στο υπεριώδες φάσμα της ηλιακής ακτινοβολίας. Η συγκέντρωση του RNA υπολογίζεται σε ng/μl. Η καθαρότητα του RNA, δηλαδή ο έλεγχος για προσμίξεις πρωτεϊνών, υπολογίζεται από τον λόγο της απορρόφησης του RNA στα 260nm (O.D) προς την απορρόφηση του RNA στα 280nm (O.D), λόγω του ότι σε μήκος κύματος 280nm απορροφούν οι πρωτεΐνες. Όταν ο λόγος κυμαίνεται στο 1,8-2 τότε σημαίνει ότι το RNA που απομονώθηκε έχει υψηλή καθαρότητα.

2.4 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ RNA ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Αρχή της μεθόδου

Με τον έλεγχο της ποιότητας του RNA ελέγχεται η φυσική κατάσταση του RNA δηλαδή αν το μόριο είναι ακέραιο ή αν είναι κατακερματισμένο. Ο έλεγχος πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική που βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους, για τον προσδιορισμό της καθαρότητας ενός δείγματος, για την απομόνωση και χαρακτηρισμό ουσιών και για τον ημιποσοτικό και ποιοτικό έλεγχο των μορίων. Με την ηλεκτροφόρηση μπορούν να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες, λιποπρωτεΐνες, πεπτίδια, νουκλεϊκά οξέα, αμινοξέα, και γενικά οποιοδήποτε μόριο φέρει φορτίο. Υπάρχουν

διάφορες κατηγορίες ηλεκτροφορήσεων ανάλογα με το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται, την διάταξη, το σχήμα του πηκτώματος και τις συνθήκες. Μερικές από τις κυριότερες κατηγορίες είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, τριχοειδής ηλεκτροφόρηση, ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και η ισοηλεκτρική εστίαση.

Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που βρίσκεται στο άγαρ που απομονώνεται από φύκη. Έχει ουδέτερο φορτίο και δεν αλληλεπιδρά με τα υπό ανάλυση βιομόρια. Πολυμερίζεται στους 100° C δημιουργώντας κολλώδες διάλυμα το οποίο πήζει σε θερμοκρασία μικρότερη των 45° C σχηματίζοντας πόρους στο εσωτερικό του. Ανάλογα με την συγκέντρωση της αγαρόζης δημιουργούνται πόροι που μπορούν να διαχωρίσουν μόρια μεγέθους από 50 ζεύγη βάσεων (bp) έως 60 κιλοβάσεις (kb). Η αύξηση της συγκέντρωσης της αγαρόζης επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων μικρότερου μοριακού βάρους. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους, πρωτεϊνικών συμπλόκων και νουκλεϊνικών οξέων.

Το rRNA αποτελεί το 80% του ολικού RNA για αυτό και είναι ένας καλός δείκτης της ποιότητας του RNA. Τα κυριότερα μόρια RNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι το 28S και 18S rRNAs. Η παρουσία των δύο αυτών ζωνών αλλά και η μεταξύ τους αναλογία 2:1 αποτελούν ενδείξεις για την ακεραιότητα του RNA.

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

1. Αγαρόζη 1%
 2. Ρυθμιστικό διάλυμα TBE (Tris-Borate-EDTA) 0,5 x
 3. Βρωμιούχο αιθίδιο-EtBr : eppendorf με συγκέντρωση 20mg/ml (1μl αιθίδιο ανά 20ml αγαρόζης)
 4. Χρωστική 6x (Gel Loading Dye)
- Σύσταση διαλύματος TBE 5x: 27gr TrisBase, 13,75gr Βορικό οξύ, 10ml EDTA (pH=8) σε τελικό όγκο 500ml.

Διαδικασία ηλεκτροφόρησης δειγμάτων RNA σε πήκτωμα αγαρόζης

1. Ετοιμασία του πηκτώματος αγαρόζης. Για 25ml διαλύματος αγαρόζης, ζυγίζεται 0,25gr αγαρόζη σε σκόνη η οποία διαλύεται σε 25ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE που παρέχει ιόντα για την δημιουργία της αγωγιμότητας.
 2. Το διάλυμα αγαρόζης θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να ομογενοποιηθεί και να γίνει διαυγές
 3. Προσθήκη 1μl βρωμιούχο αιθίδιο ανά 20ml διαλύματος αγαρόζης
 4. Το διάλυμα της αγαρόζης χύνεται με προσοχή στο εκμαγείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων.
 5. Ετοιμασία δειγμάτων ηλεκτροφόρησης. Το διάλυμα που πρόκειται να φορτωθεί και να αναλυθεί στην ηλεκτροφόρηση αποτελείται από 1μg RNA, χρωστική δx και ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x σε τελικό όγκο 12μl.
 6. Μεταφορά του πηκτώματος αγαρόζης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος TBE μέχρι να καλυφθεί το πήκτωμα.
 7. Τα δείγματα φορτώνονται στις θέσεις που έχουν δημιουργηθεί στο πήκτωμα
 8. Ηλεκτροφόρηση σε σταθερές συνθήκες τάσης 60 Volt και έντασης 40mA για 40 λεπτά περίπου μέχρι να αναλυθούν οι ζώνες του RNA
 9. Παρατήρηση και φωτογράφιση του πηκτώματος στο υπεριώδες φως. Το βρωμιούχο αιθίδιο φθορίζει οπότε γίνεται παρατήρηση των ζωνών του RNA που δημιουργήθηκαν
- ❖ Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι χρωστική η οποία ενσωματώνεται στο RNA και φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδες φως, έτσι οι ζώνες του RNA είναι ορατές κατά την πορεία της ηλεκτροφόρησης. Επειδή το βρωμιούχο αιθίδιο είναι τοξική και μεταλλαξιγόνος ουσία, δίνεται μεγάλη προσοχή στον χειρισμό του.
 - ❖ Η χρωστική χρησιμεύει ως δείκτης για την πορεία της ηλεκτροφόρησης και βοηθά επίσης στο φόρτωμα των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής του πηκτώματος. Λόγω του μικρού της μοριακού βάρους κινείται πιο γρήγορα από τα βιομόρια επομένως μόλις φτάσει στο άκρο του πηκτώματος τερματίζεται η ηλεκτροφόρηση.
 - ❖ Το RNA είναι αρνητικά φορτισμένο και υπό την επίδραση του ρεύματος κινείται προς τον θετικό πόλο

2.5 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Στην εργασία χρησιμοποιήθηκαν 84 δείγματα ολικού αίματος, τα οποία συλλέχθηκαν στην αιματολογική κλινική του Γενικού Νοσοκομείου “Αττικών”. Τα 64 δείγματα προέρχονται από ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και τα υπόλοιπα 20 από υγιή άτομα. Μετά την συλλογή, ακολούθησε απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMCs), μέσω φυγοκέντρησης και χρήσης του αντιδραστηρίου της φικόλης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA από τα μονοπύρηνια κύτταρα. Η απομόνωση ολικού RNA από τα 64 δείγματα ασθενών και από τα 11 δείγματα υγιών πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο του κ. Χρήστου Κοντού. Η απομόνωση του ολικού RNA από τα υπόλοιπα 9 δείγματα υγιών ατόμων, έγινε στο εργαστήριο μας. Συνολικά τα 84 δείγματα φωτομετρήθηκαν ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση και να ελεγχθεί η καθαρότητα τους.

2.6 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ-REVERSE TRANSCRIPTION (RT)

Αρχή της μεθόδου

Η πορεία της γονιδιακής έκφρασης *in vivo* αποτελείται από το στάδιο της μεταγραφής όπου το DNA μεταγράφεται σε RNA και το στάδιο της μετάφρασης όπου με την βοήθεια των ριβοσωμάτων παράγονται οι πρωτεΐνες. Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής είναι η διαδικασία μετατροπής του RNA σε DNA. Η μεταγραφή συμβαίνει αντίστροφα *in vivo* από ρετροϊούς και αποσκοπεί στην δημιουργία DNA με μήτρα το RNA το οποίο στη συνέχεια θα ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση και στο τέλος παράγεται το συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA).

Το πρωτόκολλο που ακολούθηθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία αποτελείται από δύο κύρια στάδια. Σε πρώτο στάδιο το RNA υβριδοποιείται με τους εκκινητές. Στην συγκεκριμένη περίπτωση επειδή στοχεύεται το mRNA ως εκκινητές επιλέγονται τα oligodT. Τα oligodT είναι ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης, συνήθως μήκους 12 έως 18 νουκλεοτιδίων που υβριδοποιούνται με την πολυ-A ουρά. Το στάδιο αυτό

υλοποιείται με επώαση στον θερμοκυκλοποιητή για 5 λεπτά στους 65° C. Σε δεύτερο στάδιο συντίθεται το cDNA μέσω της δράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης η οποία προσθέτει δεοξυριβονουκλεοτίδια στην πολυ-A ουρά. Το στάδιο της σύνθεσης πραγματοποιείται για 1 ώρα στους 42° C που αποτελεί την βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου. Μετά την σύνθεση του cDNA ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου για 20 λεπτά στους 65° C.

Η παρουσία του buffer στην αντίδραση εξασφαλίζει το επιθυμητό pH και την ιοντική ισχύ που χρειάζεται η αντίδραση. Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) είναι το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση που προέρχεται από τον ιό Moloney που προκαλεί λευχαιμία στους ποντικούς. Είναι μονομερές, έχει μοριακό βάρος 75kDa και είναι θερμοάντοχη. Έχει την ικανότητα να συνθέτει cDNA μήκους $\leq 7\text{kb}$. Τα νουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται είναι ένα μίγμα των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων, αδενίνης (A), θυμίνης (T), γουανίνης (G), και της κυτοσίνης (C) και ενσωματώνονται στο cDNA κατά τη σύνθεση σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας. Ο αναστολέας της RNase (RNase inhibitor) είναι μια πρωτεΐνη που αναστέλλει τη λειτουργία των ριβονουκλεασών έτσι ώστε να εξασφαλισθεί η ακεραιότητα του RNA κατά την αντίδραση. Ο RNase inhibitor που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα είναι μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη από τον ανθρώπινο πλακούντα που αναστέλλει τις RNases A, B και C.

Για τις ανάγκες της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της αντίστροφη μεταγραφή για:

- ✓ το RNA που απομονώθηκε από τις κυτταρικές σειρές H929, U266, HL60, U937
- ✓ το RNA που απομονώθηκε από τα μονοπύρρηνα κύτταρα ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία
- ✓ το RNA υλικό που απομονώθηκε από τα μονοπύρρηνα κύτταρα υγιών ατόμων

Όγκοι και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής

Πίνακας 2.5: Ενδεικτική σύσταση μείγματος για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής

	Εταιρία	Συγκέντρωση Αντιδραστηρίου	Όγκος αντιδραστηρίου για κάθε μοναδιαία αντίδραση	Τελική συγκέντρωση στα 20μl αντίδρασης
Oligo-dT εκκινητές		10μM	1μl	0,5 μM
Buffer	New England Biolabs	10x	2μl	1x
Ολιγονουκλεοτίδια (dNTPs)	HyTest	10mM	2μl	1mM
Αντίστροφη μεταγραφάση M-MuLV	New England Biolabs	200,000 U/ml	1μl	10 U/μl
RNase inhibitor human placenta	New England Biolabs	40,000 U/ml	0,25μl	0,5 U/μl
dH ₂ O -RNase free water		-	2,75μl	-

Πειραματική Διαδικασία:

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής είναι 20μl. Στην περίπτωση των κυτταρικών σειρών η αντίδραση έγινε με 2μg RNA ενώ στην περίπτωση των δειγμάτων η αντίδραση έγινε με 1μg RNA.

1. Τα δείγματα ολικού RNA που ελήφθησαν κατά την απομόνωση αφήνεται να ξεπαγώσουν στον πάγο. Παράλληλα ξεπαγώνουν τα ακόλουθα διαλύματα: oligodT, RNase free water (dH₂O), dNTPs και buffer
2. Υπολογίζεται πόσα μl ολικού RNA χρειάζονται προκειμένου να εμπεριέχονται 1μg RNA. Συμπλήρωση dH₂O στα δείγματα RNA ώστε όλα να έχουν τον ίδιο τελικό όγκο.
3. Προσθήκη 1μl oligo-dT με συγκέντρωση 10μM (τελική συγκέντρωση =0,5μM) σε κάθε δείγμα και καλή ανάδευση
4. Spin down και επώαση των δειγμάτων στον θερμοκυκλοποιητή για 5 λεπτά στους 65°C. Ακολούθως τα δείγματα μεταφέρονται κατευθείαν στον πάγο

5. Παράλληλα ετοιμάζεται το master mix το οποίο περιέχει τις συνολικές ποσότητες του κάθε αντιδραστηρίου για το σύνολο των δειγμάτων. Για κάθε δείγμα χρειάζονται 2μl buffer 10x, 2μl dNTPs με συγκέντρωση 10mM (Cτελ=1mM), 2,75μl RNase free water, 0,25μl RNase inhibitor και 1μl M-MuLV. Το buffer χρειάζεται vortex για να διαλυθούν τα άλατα που περιέχει.
6. Καλή ανάδευση του master mix με την πιπέτα και γρήγορο spin down. Έπειτα μοιράζονται 8μl master mix σε κάθε δείγμα
7. Spin down και επώαση των δειγμάτων στον θερμοκυκλοποιητή για 1 ώρα στους 42° C και για 20 λεπτά στους 65° C
8. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης τα δείγματα γίνονται spin down και αποθηκεύονται στους -20° C

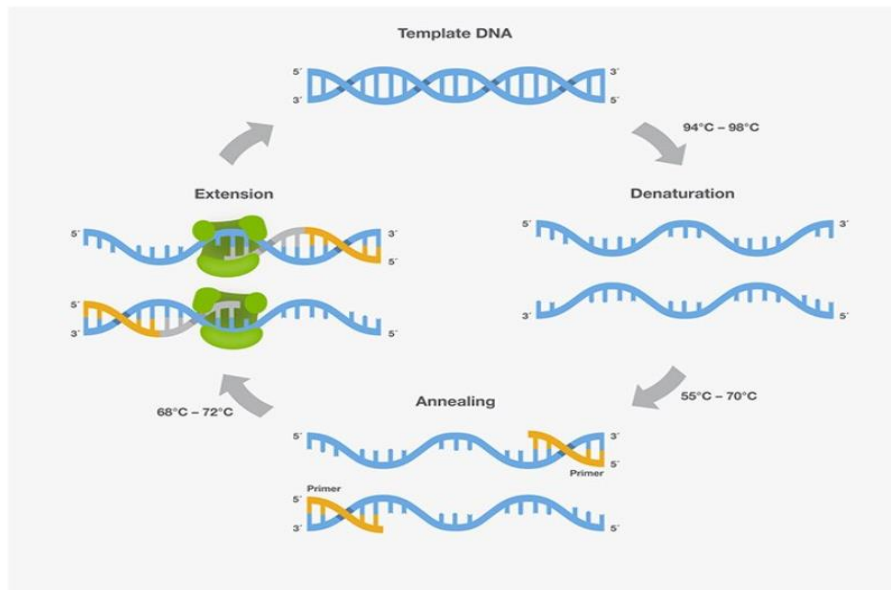
2.7 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (real time q-PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-polymerase chain reaction (PCR) ανακαλύφθηκε το 1983 από τον Kary Mullis. Είναι μια βιοχημική μέθοδος πολλαπλασιασμού συγκεκριμένου τμήματος γενετικού υλικού in vitro. Έχει την ικανότητα να πολλαπλασιάσει το γενετικό υλικό μέχρι και 1 τρισεκατομμύριο φορές. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη μεταβολή της θερμοκρασίας σε επαναλαμβανόμενους κύκλους. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκύκλους που μεταβαίνουν αυτόματα στις επιθυμητές θερμοκρασίες κάθε κύκλου. Αποτελείται από τρία στάδια τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά 25-35 φορές:

1. **Αποδιάταξη DNA:** συμβαίνει σε θερμοκρασία 94-98° C για 20-30 δευτερόλεπτα. Η υψηλή θερμοκρασία σπάει τους δεσμούς υδρογόνου της διπλής έλικας, οπότε προκύπτουν δύο μονόκλωνες αλυσίδες που χρησιμοποιούνται ως εκμαγείο
2. **Υβριδισμός εκκινητών:** η θερμοκρασία μειώνεται μεταξύ 50-70° C για 30-60 δευτερόλεπτα ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA στο 3' άκρο.
3. **Επιμήκυνση:** η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72° C όπου είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq DNA πολυμεράσης η οποία συνθέτει την νέα

(συμπληρωματική) αλυσίδα. Το στάδιο διαρκεί 1-3 λεπτά και εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA που θα πολλαπλασιαστεί.

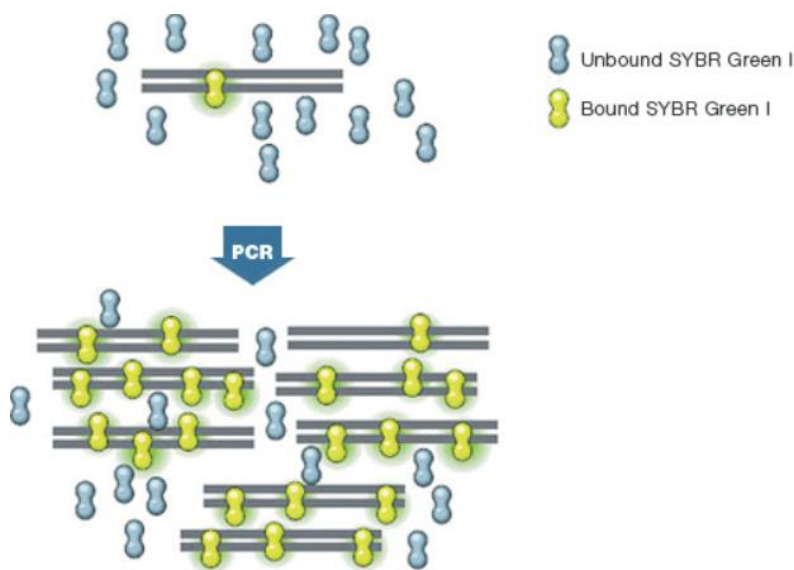


Εικόνα 2.3 Σχηματική απεικόνιση των τριών βασικών σταδίων της PCR, αποδιάταξη δίκλωνου DNA, υβριδοποίηση εκκινητών και επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA

Μετά την αυτοματοποίηση της PCR ακολούθησαν διάφορες παραλλαγές της μεθόδου. Μια από αυτές αποτελεί η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative real time polymerase chain reaction, real time q-PCR) η οποία αποτελεί την πιο ευαίσθητη και ακριβή μέθοδο ποσοτικοποίησης της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο mRNA. Η φιλοσοφία και τα βήματα είναι ίδια με αυτά της συμβατικής PCR (αποδιάταξη, υβριδοποίηση, επιμήκυνση). Η διαφορά είναι η ύπαρξη φθορίζουσών ιχνηθετών οι οποίοι συνδέονται με το προϊόν της αντίδρασης και φθορίζουν κατά τον πολυμερισμό της αλληλουχίας στόχου. Η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού. Η μέτρηση των προϊόντων γίνεται κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης και η συγκέντρωσή τους είναι ευθέως ανάλογη με την συγκέντρωση των δειγμάτων, προτού ξεκινήσει η αντίδραση.

Η ανίχνευση των προϊόντων μπορεί να γίνει με διάφορα συστήματα όπως η τεχνική TaqMan, SYBR Green I, «μοριακοί φάροι» (molecular beacons), ιχνητέες υβριδισμού (hybridization probes) και ανιχνευτές τύπου «σκορπιός» (scorpions). Η SYBR Green I

είναι μια χρωστική που συνδέεται με το δίκλωνο DNA και εκπέμπει φθορισμό. Το σήμα του φθορισμού είναι ανάλογο με την συγκέντρωση των δίκλωνων μορίων που παράγονται από την αντίδραση. Η χρωστική λόγω του ότι έχει χαμηλότερο κόστος απ' ότι τα υπόλοιπα συστήματα ανίχνευσης χρησιμοποιείται κατά κόρον σε αντιδράσεις real time PCR. Το γεγονός όμως ότι αλληλεπιδρά με οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA αποτελεί το μεγαλύτερο της μειονέκτημα διότι εκτός από τα προϊόντα της αντίδρασης μπορεί να συνδεθεί και σε κάποιο παραπροϊόν.



Εικόνα 2.4: Αρχή της μεθόδου Real Time PCR με την χρήση της χρωστικής SYBR Green I.

Στους πρώτους κύκλους αντίδρασης αθροίζεται ποσότητα φθορισμού η οποία όμως παραμένει κάτω από τα όρια ανίχνευσης του μηχανήματος. Η φάση αυτή είναι γνωστή ως φάση υποβάθρου (background phase, baseline). Όσο όμως συσσωρεύεται το προϊόν της αντίδρασης το σήμα ξεπερνά το σήμα του υποβάθρου (b) οπότε ακολουθεί η εκθετική φάση της αντίδρασης και έπειτα η γραμμική. Η τελευταία φάση της αντίδρασης είναι η στατική στην οποία η αντίδραση σταματάει και δεν συσσωρεύεται πλέον προϊόν. Ο ποσοτικός προσδιορισμός που πραγματοποιείται κατά την εκθετική φάση, βασίζεται στο αριθμό των κύκλων (Ct) που χρειάζεται προκειμένου να ξεπεραστεί το σήμα υποβάθρου. Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα του DNA-στόχου, τόσο γρηγορότερα θα εμφανιστεί το πρώτο σήμα, δηλαδή τόσο μικρότερη θα είναι η τιμή του Ct. Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος, το λογισμικό πρόγραμμα δίνει καμπύλες ενίσχυσης και καμπύλες αποδιάταξης. Από τις καμπύλες αποδιάταξης μπορεί να προσδιοριστεί η

θερμοκρασία τήξης (T_m) των προϊόντων της αντίδρασης και έτσι μπορεί να διακριθεί αν το προϊόν που ενισχύθηκε είναι μοναδικό ή εάν έχουν σχηματιστεί παραπροϊόντα ή διμερή εκκινητών, καθώς αυτά λόγω μικρότερου μήκους αλληλουχίας θα έχουν και μικρότερο T_m .

Για τις ανάγκες των υπολογισμών και του ελέγχου ποιότητας της αντίδρασης είναι απαραίτητο σε κάθε αντίδραση να υπάρχουν: ένα δείγμα που χρησιμεύει ως βαθμονομητής (calibrator), ένας αρνητικός μάρτυρας καθώς και η χρωστική αναφοράς. Ρόλος του calibrator είναι να αντισταθμίζει τις διαφορές που προκύπτουν ανάμεσα στις αντιδράσεις qPCR. Ο αρνητικός μάρτυρας περιέχει όλα τα συστατικά της αντίδρασης εκτός από το δείγμα, έτσι ελέγχεται αν κατά την προετοιμασία του πειράματος συνέβη επιμόλυνση. Παρουσία φθορισμού στον αρνητικό μάρτυρα σημαίνει επιμόλυνση. Σε αντιδράσεις που χρησιμοποιείται ως σύστημα ανίχνευσης η SYBR Green I, η χρωστική αναφοράς είναι η χρωστική ROX.

Πειραματική πορεία και συνθήκες αντίδρασης

Οι αντιδράσεις real time qPCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) με την χρήση του kit KAPA SYBR® FAST (Κωδικός KK4602). Το master mix του kit περιέχει μια τροποποιημένη Taq DNA polymerase, σχεδιασμένη για αντιδράσεις που βασίζονται στη χημεία της χρωστικής SYBR Green I. Επίσης το kit περιέχει την χρωστική SYBR GREEN I, την χρωστική αναφοράς ROX, dNTPs και $MgCl_2$.

Για κάθε δείγμα cDNA πραγματοποιούνται δύο αντιδράσεις (duplicates). Ο τελικός όγκος είναι 10μl ανά αντίδραση. Όπως φαίνεται στον πίνακα 2.6 κάθε αντίδραση που πραγματοποιείται συνίσταται από 5μl master mix από το kit, 2μl dH_2O , 1μl από τον κάθε εκκινητή με συγκέντρωση 1μM (τελική συγκέντρωση εκκινητών στην αντίδραση =0,1μM), και 1μl cDNA (αραιωμένο 1:10). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον πίνακα 2.7.

Η πειραματική πορεία ξεκινά με την ετοιμασία του μίγματος που πρόκειται να προστεθεί στα δείγματα cDNA. Σε eppendorf αναμιγνύονται το master mix από το kit, οι εκκινητές και το dH_2O . Στη συνέχεια αφού γίνει καλή ανάδευση με την πιπέτα και ελαφρύ vortex, το μίγμα αυτό μοιράζεται στα δείγματα cDNAs. Ακολουθεί καλή ανάδευση του δείγματος cDNA με τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης και έπειτα τα δείγματα

φορτώνονται στα φρεάτια του μικροπλακιδίου (96 well PCR plate). Η έναρξη της αντίδρασης περιλαμβάνει ένα στάδιο αποδιάταξης και ενεργοποίησης του ενζύμου για 3 λεπτά στους 95° C. Ακολουθούν δύο διαδοχικά στάδια που επαναλαμβάνονται για 40 κύκλους αντίδρασης. Στο 1^ο στάδιο γίνεται αποδιάταξη για 15 δευτερόλεπτα στους 95° C και στο 2^ο στάδιο γίνεται υβριδοποίηση των εκκινητών και επιμήκυνση της αλυσίδας DNA για 1 λεπτό στους 60° C.

Πίνακας 2.6: Ενδεικτική σύσταση μίγματος αντίδρασης Real-time PCR

Αντιδραστήριο	Όγκος αντιδραστηρίων ανά αντίδραση
Master mix από το kit (ένζυμο, SYBR Green I, ROX, dNTPs, MgCl ₂)	5μl
dH ₂ O-RNase free water	2μl
Εκκινητής Forward (Συγκέντρωση =1μM)	1μl
Εκκινητής Reverse (Συγκέντρωση =1μM)	1μl
Εκμαγείο cDNA (αραίωση 1:10)	1μl
	Ντελικό =10μl

Πίνακας 2.7 : Ονομασία και αλληλουχία εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο-στόχο για τις αντιδράσεις real time qPCR

Όνομα Εκκινητή	Γονίδιο	Αλληλουχία Εκκινητή	Μήκος
F2 (Forward)	HPRT1	5'-TGGAAAGGGTGTATTTCCTCAT-3'	23nt
R3 (Reverse)	HPRT1	5'-ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA-3'	22 nt
Ex1F (Forward)	RNase κ Βασικό μετάγραφο	5'-AGCGCCTGGGGAGTGATC-3'	18 nt
Ex3/4R (Reverse)	RNase κ Βασικό μετάγραφο	5'-CTGGGGGCCATTCTCAAAATCT-3'	22 nt
1ext/3F (Forward)	RNase κ μετάγραφο 7	5'-ACTCCCCGATAATGCTCGGAA-3'	21 nt
Ex3/4R (Reverse)	RNase κ μετάγραφο 7	5'-CTGGGGGCCATTCTCAAAATCT-3'	22 nt
1/ext3F (Forward)	RNase κ μετάγραφο 9	5'-ATGTTGTCTACCCATTCCCCTT-3'	22 nt
Ex3/4R (Reverse)	RNase κ μετάγραφο 9	5'-CTGGGGGCCATTCTCAAAATCT-3'	22 nt
Ex2F (Forward)	RNase κ μετάγραφο 14	5'-GAAGTGCCGGTTCTCCCTC-3'	19 nt
Ex2/4R (Reverse)	RNase κ μετάγραφο 14	5'-GCCATTCTGGATTCGGA CT CAG-3'	22 nt
1/3F (Forward)	RNase κ μετάγραφο 20	5'-GGAGTGATCATGTTGATAATGCTCG-3'	25 nt
V20ext (Reverse)	RNase κ μετάγραφο 20	5'-TACTTTATTCAATCTTTCAAAATCTTTCTC-3'	30 nt

Σχετική ποσοτικοποίηση των προϊόντων

Κατά τον σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων, η ποσότητα της αλληλουχίας-στόχου προσδιορίζεται σε σχέση με την ποσότητα ενός γονιδίου αναφοράς (housekeeping gene). Ως γονίδιο αναφοράς επιλέγεται γονίδιο το οποίο έχει σταθερή έκφραση μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων και παθολογικών κυττάρων και χρησιμεύει για την κανονικοποίηση της έκφρασης της αλληλουχίας-στόχου. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα γονίδια αναφοράς είναι τα HPRT1, GAPDH, G6PDH, ACTB, PBGD, 18S rRNA, Tfr. Στην εργασία η σχετική ποσοτικοποίηση έγινε με το γονίδιο αναφοράς

HPRT1. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται κυρίως στον σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό είναι η μέθοδος $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ή μέθοδος σύγκρισης των Ct ($\Delta\Delta Ct$) (Comparative Ct method), που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία. Οι παράμετροι της μεθόδου είναι:

ΔCt (μετάγραφου RNase κ) = (C_t μεταγράφου στο δείγμα - C_t μεταγράφου στα H929 κύτταρα)

ΔCt (HPRT1) = (C_t HPRT1 δείγματος) – (C_t HPRT1 στα H929)

$\Delta\Delta Ct$ = ΔCt (μεταγράφων RNase κ) – ΔCt (HPRT1)

Αρχικά υπολογίζεται η τιμή ΔCt για κάθε RNase κ μετάγραφο (βασικό,7,9,14,20) σε κάθε δείγμα (ασθενείς και υγιείς) και έπειτα η τιμή ΔCt για το γονίδιο αναφοράς (HPRT1). Ακολούθως υπολογίζεται το $\Delta\Delta Ct$ όπου ουσιαστικά αφαιρείται η τιμή ΔCt του γονιδίου αναφοράς από την τιμή ΔCt του κάθε μεταγράφου σε κάθε δείγμα. Έπειτα υπολογίζεται η τιμή $2^{-\Delta\Delta Ct}$ που αντιστοιχεί στην κανονικοποιημένη ποσότητα του στόχου, τόσο ως προς τον εσωτερικό μάρτυρα (γονίδιο-αναφοράς), όσο και ως προς τον βαθμονομητή H929. Η τιμή $2^{-\Delta\Delta Ct}$ εκφράζεται σε αυθαίρετες μονάδες έκφρασης RQUs.

2.8 ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Μετά τη σχετική ποσοτικοποίηση των μεταγράφων της ριβονουκλεάσης κ ακολούθησε βιοστατιστική ανάλυση μέσω του στατιστικού προγράμματος SPSS Statistics 25 με σκοπό τη συσχέτιση και την κλινική αξιολόγηση των μεταγράφων της RNase κ στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Ένα αποτέλεσμα θεωρείται στατιστικώς σημαντικό όταν το p-value είναι μικρότερο ή ίσο με το επίπεδο σημαντικότητας. Για επίπεδο σημαντικότητας 5%, εάν το $p \leq 0,05$, το αποτέλεσμα θεωρείται στατιστικά σημαντικό.

Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των προς μελέτη μεταγράφων (βασικό,7,9,14,20) ανάμεσα σε υγιείς και ασθενείς, πραγματοποιήθηκε με το μη παραμετρικό τεστ Mann-Whitney U καθώς τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων στα δείγματα δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Στη συνέχεια μέσω των καμπυλών ROC (receiver operating characteristic curves) εξετάστηκε η πιθανή χρήση των μεταγράφων της RNase κ ως βιοδείκτες για την διάκριση του λευχαιμικού από το μη λευχαιμικό πληθυσμό. Επιπρόσθετα η βιοστατιστική ανάλυση περιλαμβάνει συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων της RNase κ με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με

ΧΛΛ. Η ανάλυση συσχέτισης πραγματοποιήθηκε με τον μη παραμετρικό συντελεστή συσχέτισης Spearman.

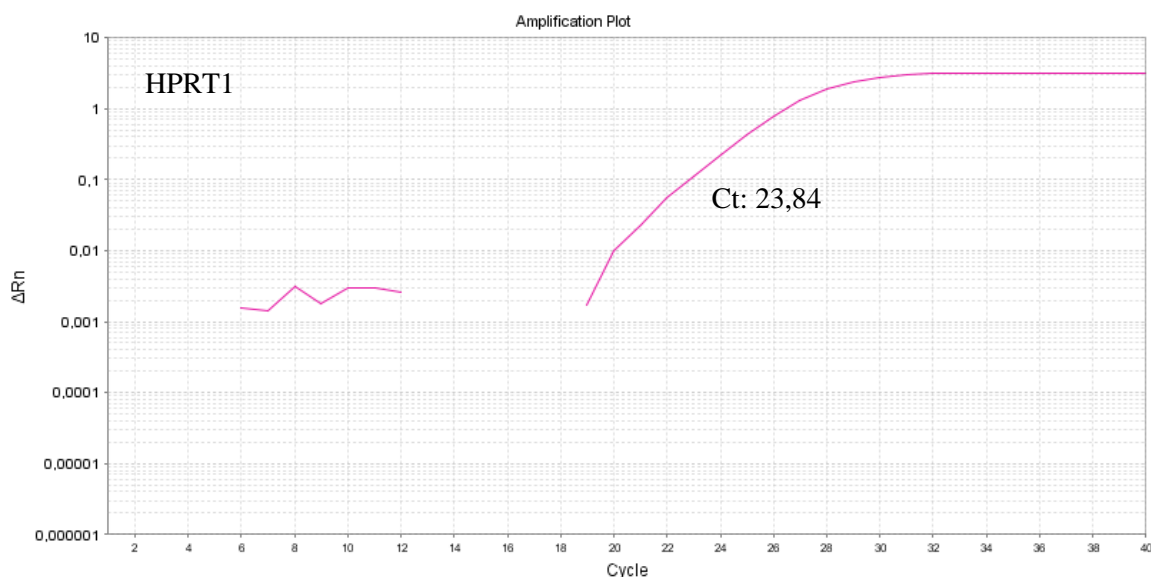
Επόμενο βήμα ήταν η μετατροπή των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων από συνεχείς σε κατηγορικές μεταβλητές. Η εύρεση του βέλτιστου σημείου λήψης απόφασης (cut-off) για τον διαχωρισμό των ασθενών με ΧΛΛ σε θετικούς και αρνητικούς έγινε μέσω του προγράμματος X-tile. Οι ασθενείς με επίπεδα έκφρασης πάνω από την τιμή cut off ορίστηκαν ως θετικοί, δηλαδή είναι οι ασθενείς που παρουσιάζουν υψηλή έκφραση των μεταγράφων της RNase κ. Από την άλλη, οι ασθενείς με επίπεδα έκφρασης κάτω από την τιμή cut off ορίστηκαν ως αρνητικοί, επομένως εκφράζουν τα RNase κ μετάγραφα σε χαμηλά επίπεδα. Μετά τον διαχωρισμό σε θετικούς και αρνητικούς ασθενείς ακολούθησε συσχέτιση τους με κατηγορικές μεταβλητές όπως το φύλο, το στάδιο κινδύνου, τη σταδιοποίηση κατά Binet και Rai, μέσω του chi-square, χ^2 τεστ.

Ακόμη, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ολικής επιβίωσης (overall survival, OS) κατά Kaplan-Meier και κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες. Ο έλεγχος στατιστικά σημαντικών διαφορών στην ολική επιβίωση των ασθενών έγινε με το long-rank τεστ. Έπειτα σχεδιάστηκαν μονοπαραγοντικά και πολυπαραγοντικά μοντέλα παλινδρόμησης κατά Cox (μοντέλα αναλογικού κινδύνου) τα οποία αξιολογούν τον κίνδυνο και εξακριβώνουν διαφορές στη ανάλυση επιβίωσης που οφείλονται σε προγνωστικούς παράγοντες ή στο είδος της θεραπείας. Η αξιοπιστία των προγνωστικών μοντέλων ενισχύθηκε με την εκτέλεση του στατιστικού τεστ bootstrap καθώς και με επιταχυνόμενη κλίση συσχέτισης (bias-corrected and accelerated BCa) με διάστημα εμπιστοσύνης (confidence intervals, CI) 95%.

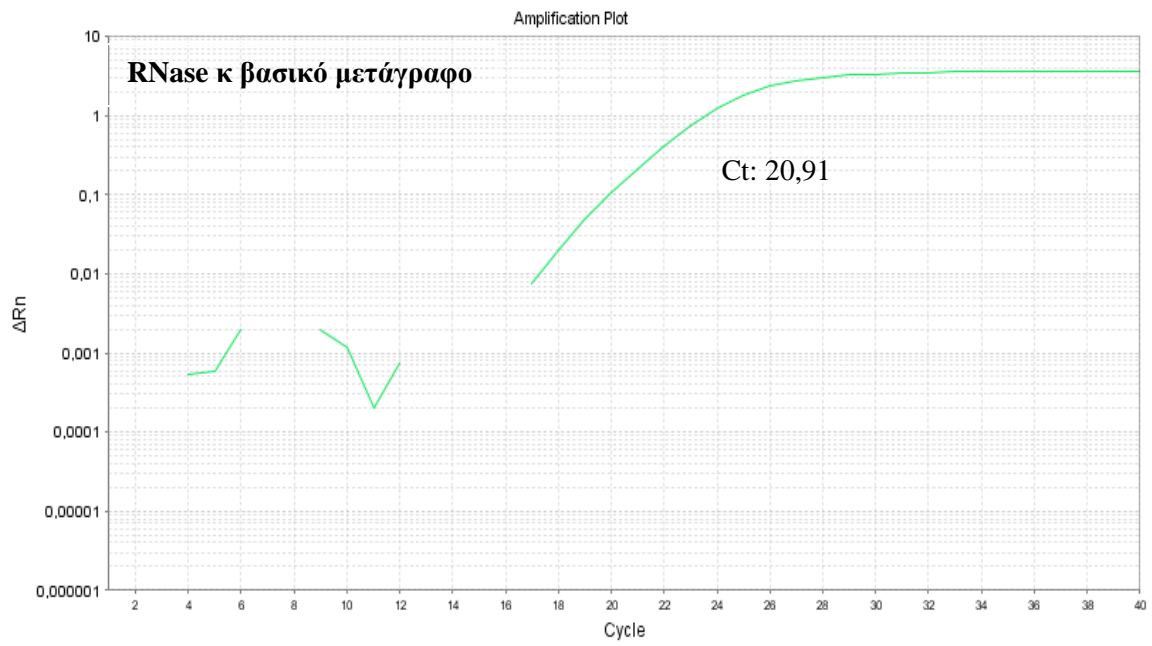
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΗΣ RNASE K

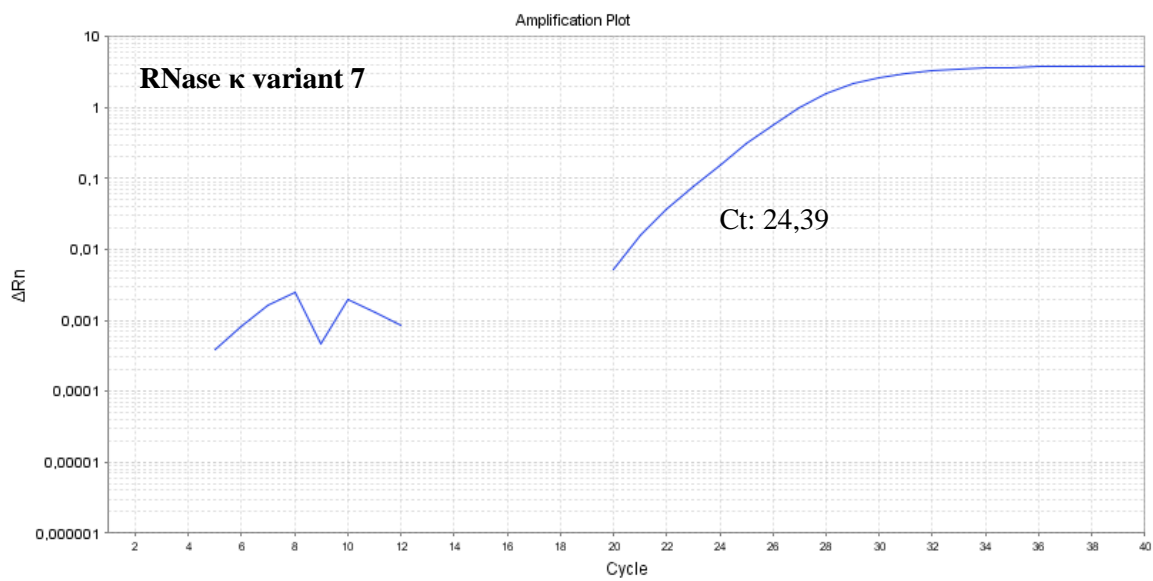
Απαραίτητο βήμα στην πειραματική πορεία ήταν ο έλεγχος της έκφρασης των μεταγράφων που μελετήθηκαν σε κυτταρικές σειρές προκειμένου αυτές να χρησιμοποιηθούν ως βαθμονομητές στα πειράματα real time qPCR. Επίσης, εξίσου σημαντικό ήταν να διερευνηθεί κατά πόσο οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν δίνουν ειδικό και μοναδικό προϊόν. Με τις αντιδράσεις real time qPCR επιβεβαιώθηκε η έκφραση του βασικού μεταγράφου της RNase κ και των εναλλακτικών μεταγράφων 7, 9, 14 και 20 στις κυτταρικές σειρές U937, HL60, H929 και U266. Ο αριθμός Ct και κατ' επέκταση οι καμπύλες ενίσχυσης που προκύπτουν από την real time qPCR, βοηθούν στον ποσοτικό προσδιορισμό κάθε μεταγράφου. Όσο μεγαλύτερο είναι το Ct, τόσο χαμηλότερη είναι και η συγκέντρωση του μεταγράφου στο εκάστοτε δείγμα. Παρακάτω παρατίθενται οι καμπύλες ενίσχυσης του γονιδίου αναφοράς HPRT1 και των προς μελέτη μεταγράφων, στην κυτταρική σειρά H929 στην οποία, σύμφωνα με το Ct, εμφάνισαν την μεγαλύτερη έκφραση.



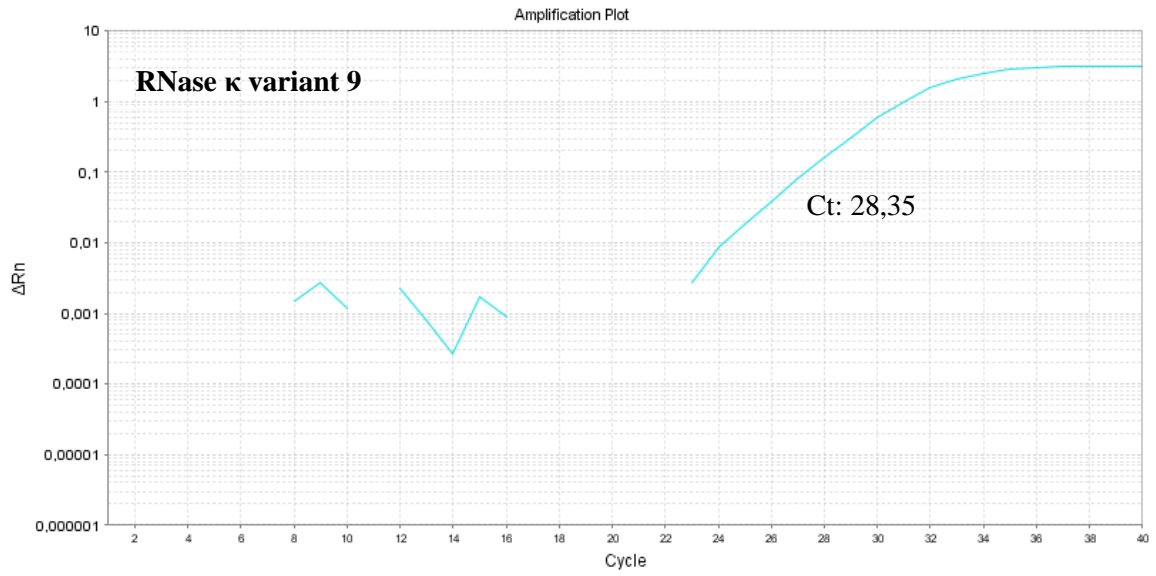
Εικόνα 3.1: Καμπύλη ενίσχυσης για το γονίδιο αναφοράς *HPRT1* στην κυτταρική σειρά H929, Ct:23,84



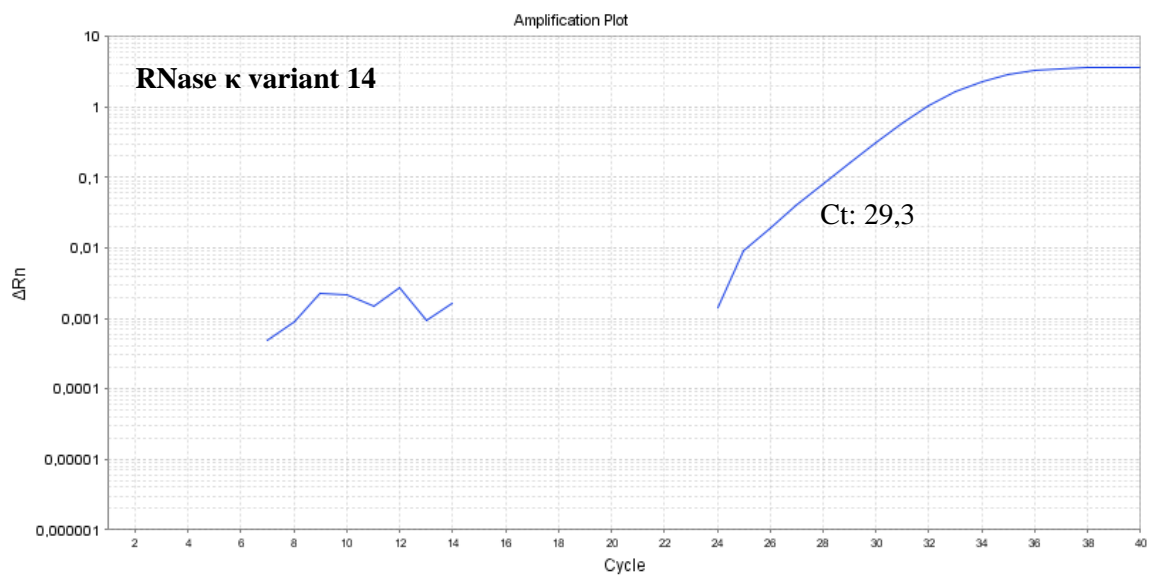
Εικόνα 3.2: Καμπύλη ενίσχυσης για το βασικό μετάγραφο στην κυτταρική σειρά H929, Ct:20,91



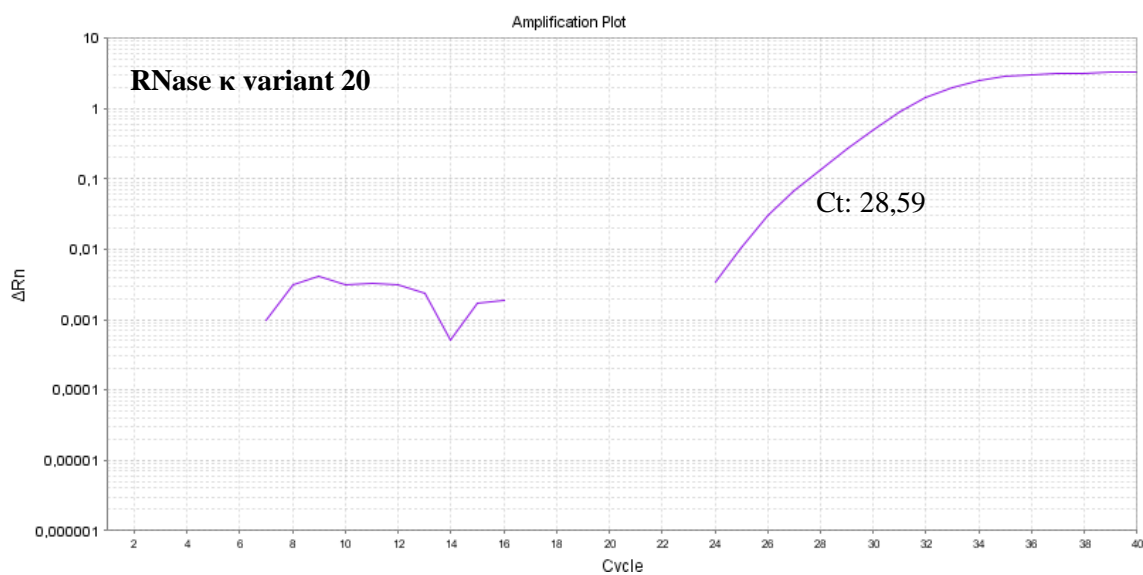
Εικόνα 3.3: Καμπύλη ενίσχυσης για το εναλλακτικό μετάγραφο 7 στην κυτταρική σειρά H929, Ct:24,39



Εικόνα 3.4: Καμπύλη ενίσχυσης για το εναλλακτικό μετάγραφο 9 στην κυτταρική σειρά H929, Ct:28,35

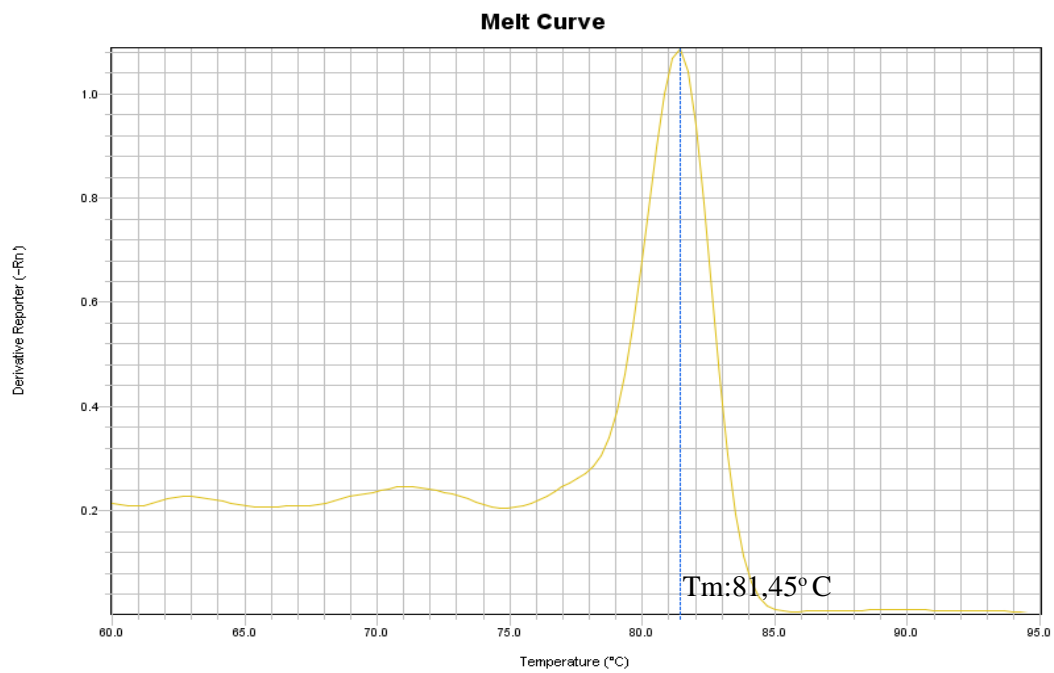


Εικόνα 3.5: Καμπύλη ενίσχυσης για το εναλλακτικό μετάγραφο 14 στην κυτταρική σειρά H929, Ct:29,3

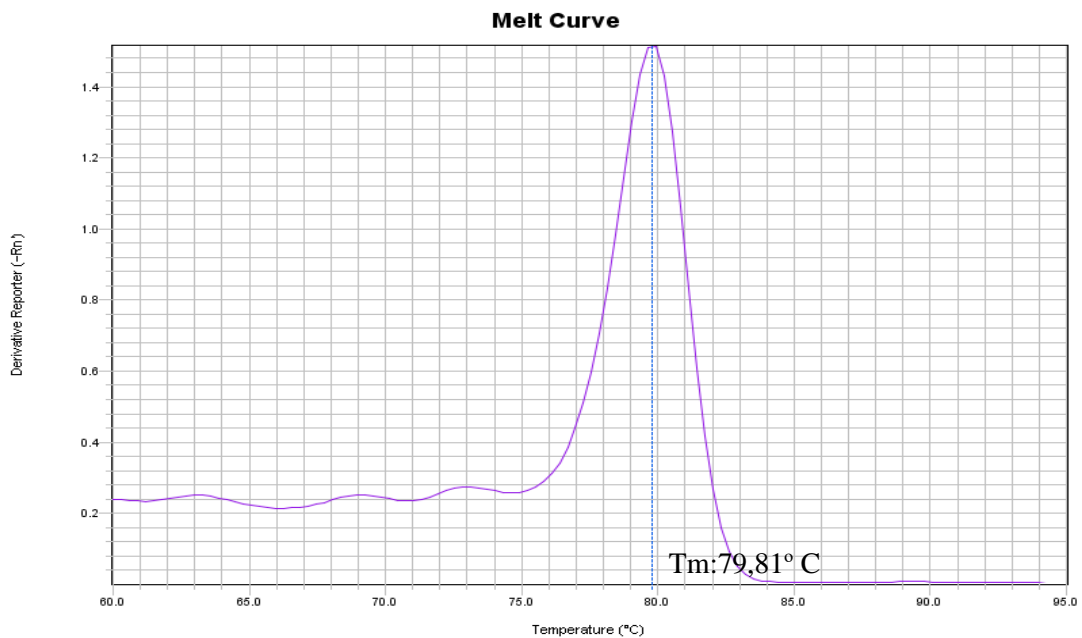


Εικόνα 3.6: Καμπύλη ενίσχυσης για το εναλλακτικό μετάγραφο 20 στην κυτταρική σειρά H929, Ct:28,59

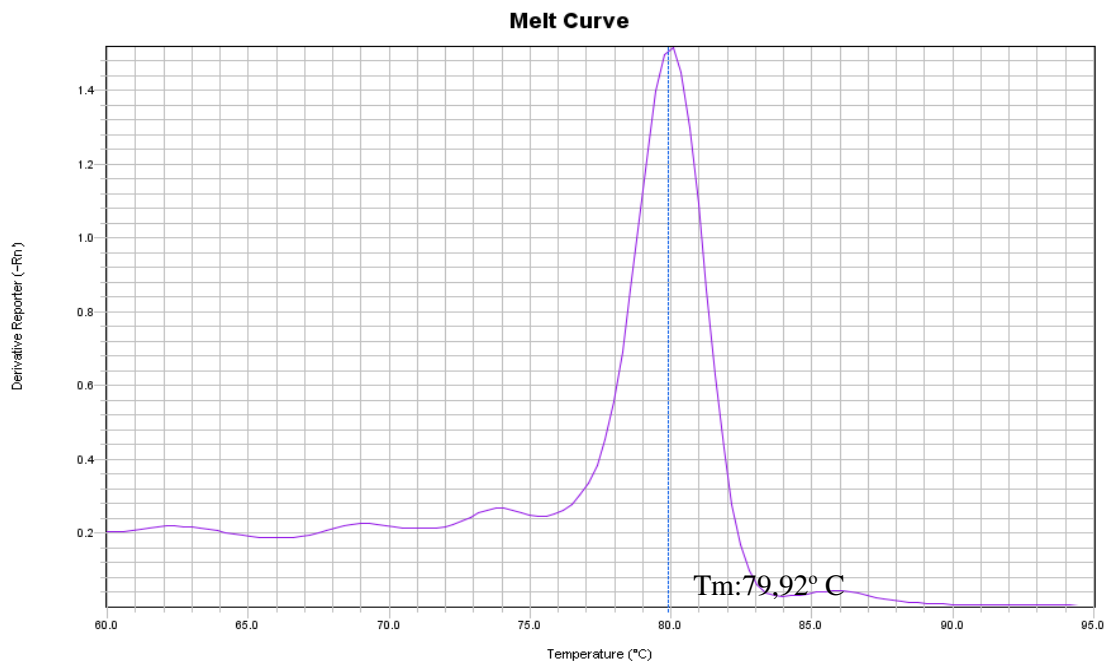
Η ενίσχυση μοναδικού προϊόντος επιβεβαιώθηκε με τις καμπύλες αποδιάταξης (melt curves). Η παρουσία μίας και μόνο κορυφής σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία τήξης (T_m) υποδηλώνει μοναδικό προϊόν και συνεπώς ειδικότητα εκκινήτων. Τα μετάγραφα που μελετήθηκαν (βασικό, 7, 9, 14 και 20) εμφανίστηκαν ως μοναδικά προϊόντα και στις τέσσερις κυτταρικές σειρές (U937, HL-60, H929, U266). Ακολούθως παρατίθενται καμπύλες αποδιάταξης κάθε μεταγράφου με τα αντίστοιχα T_m στην κυτταρική σειρά H929.



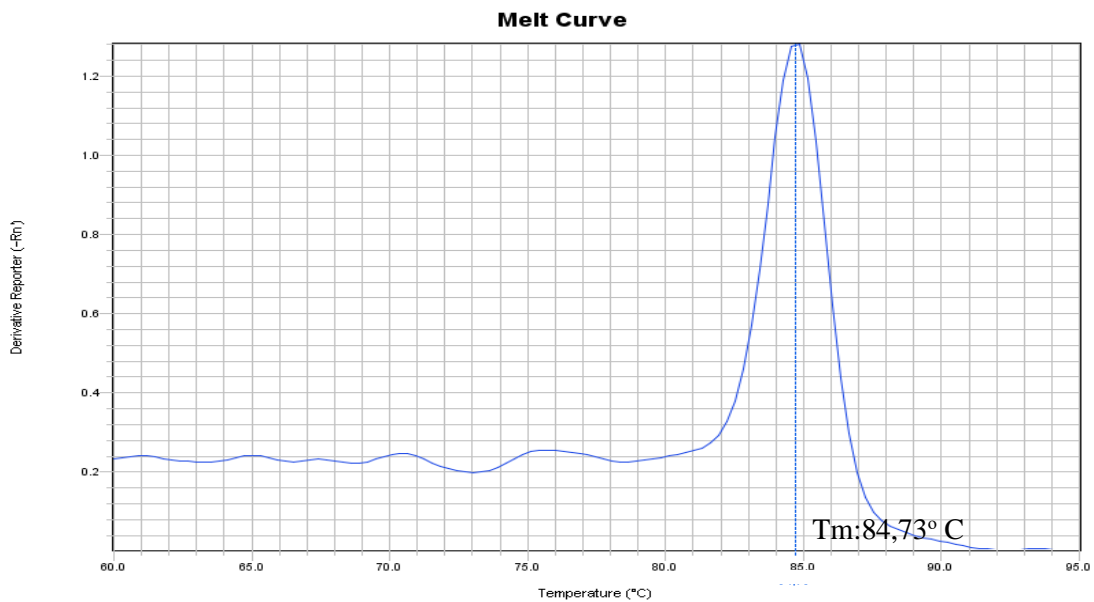
Εικόνα 3.7: Καμπύλη αποδιάταξης για το γονίδιο αναφοράς **HPRT1** στην κυτταρική σειρά H929, Tm:81,45° C



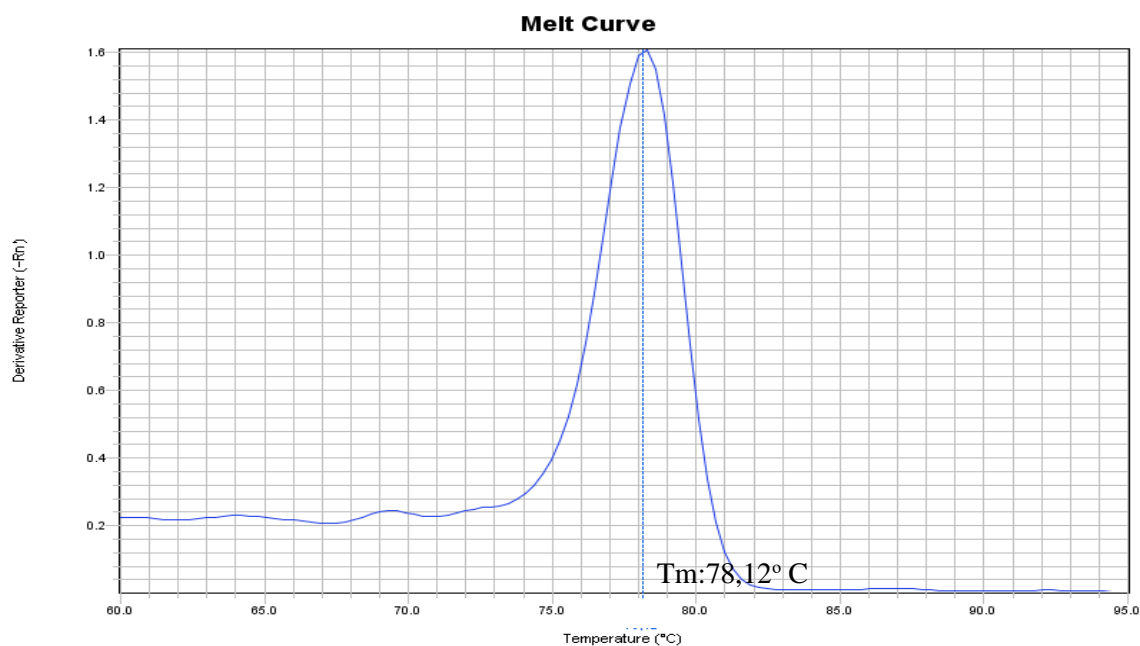
Εικόνα 3.8: Καμπύλη αποδιάταξης για το εναλλακτικό **μετάγραφο 7** στην κυτταρική σειρά H929, Tm:79,81° C



Εικόνα 3.9: Καμπύλη αποδιάταξης για το εναλλακτικό μετάγραφο 9 στην κυτταρική σειρά H929, $T_m:79,92^\circ C$



Εικόνα 3.10: Καμπύλη αποδιάταξης για το εναλλακτικό μετάγραφο 14 στην κυτταρική σειρά H929, $T_m:84,73^\circ C$



Εικόνα 3.11: Καμπύλη αποδιάταξης για το εναλλακτικό μετάγραφο 20 στην κυτταρική σειρά H929, $T_m:78,12^\circ \text{C}$

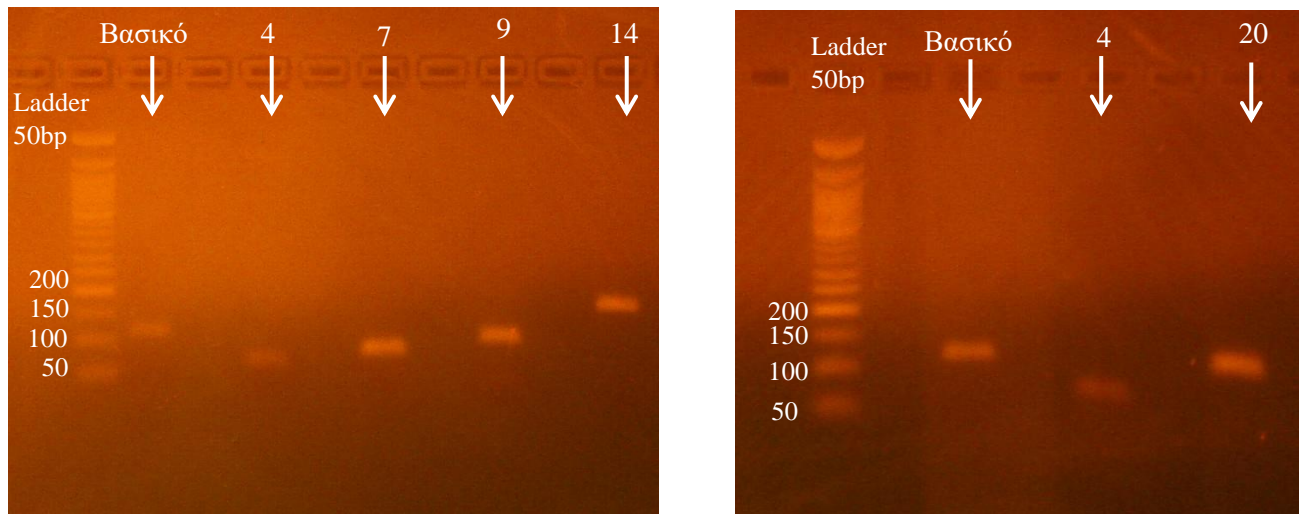
Σύμφωνα με τις καμπύλες τήξης και αποδιάταξης των εναλλακτικών μεταγράφων στις τέσσερις καρκινικές σειρές U937, HL-60, H929 και U266 καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι και οι τέσσερις σειρές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βαθμονομητές για τα επόμενα πειράματα μελέτης της ποσοτικής έκφρασης των μεταγράφων σε δείγματα ασθενών με ΧΛΛ. Εν τέλει, επιλέχθηκε η σειρά H929 λόγω της υψηλότερης έκφρασης των μεταγράφων σε αυτή την κυτταρική σειρά.

Ο ποιοτικός έλεγχος των μεταγράφων πραγματοποιήθηκε και από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης real time qPCR σε πήκτωμα αγαρόζης. Με την βοήθεια ενός μάρτυρα με γνωστό μοριακό βάρος (50bp), μπορεί να γίνει διάκριση του μήκους των μεταγράφων. Όπως διακρίνεται στην εικόνα 3.12, το βασικό μετάγραφο και τα εναλλακτικά μετάγραφα 7, 9, 14 και 20 εμφανίζονται στο επιθυμητό μήκος (Πίνακας 3.1), το οποίο έχει υπολογιστεί με βάση το προϊόν που ενισχύουν οι εκκινητές. Επίσης η παρουσία μόνο μια ζώνης για κάθε μετάγραφο, επιβεβαιώνει την ενίσχυση μοναδικού προϊόντος. Στην εργασία μελετήθηκε και η έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου 4 όμως επειδή το προϊόν δεν δίνει το αναμενόμενο μήκος απορρίφθηκε από την μελέτη. Από

την ηλεκτροφόρηση παρατηρείται πως το προϊόν που ενισχύθηκε με τους εκκινητές του μεταγράφου 4 είναι γύρω στα 50bp ενώ το αναμενόμενο μήκος είναι 227bp.

Πίνακας 3.1: Αναμενόμενα μήκη των μεταγράφων της RNase κ

Μετάγραφο RNase κ	Μήκος (bp)
Βασικό	114 bp
4	227 bp
7	98 bp
9	118 bp
14	186 bp
20	108 bp

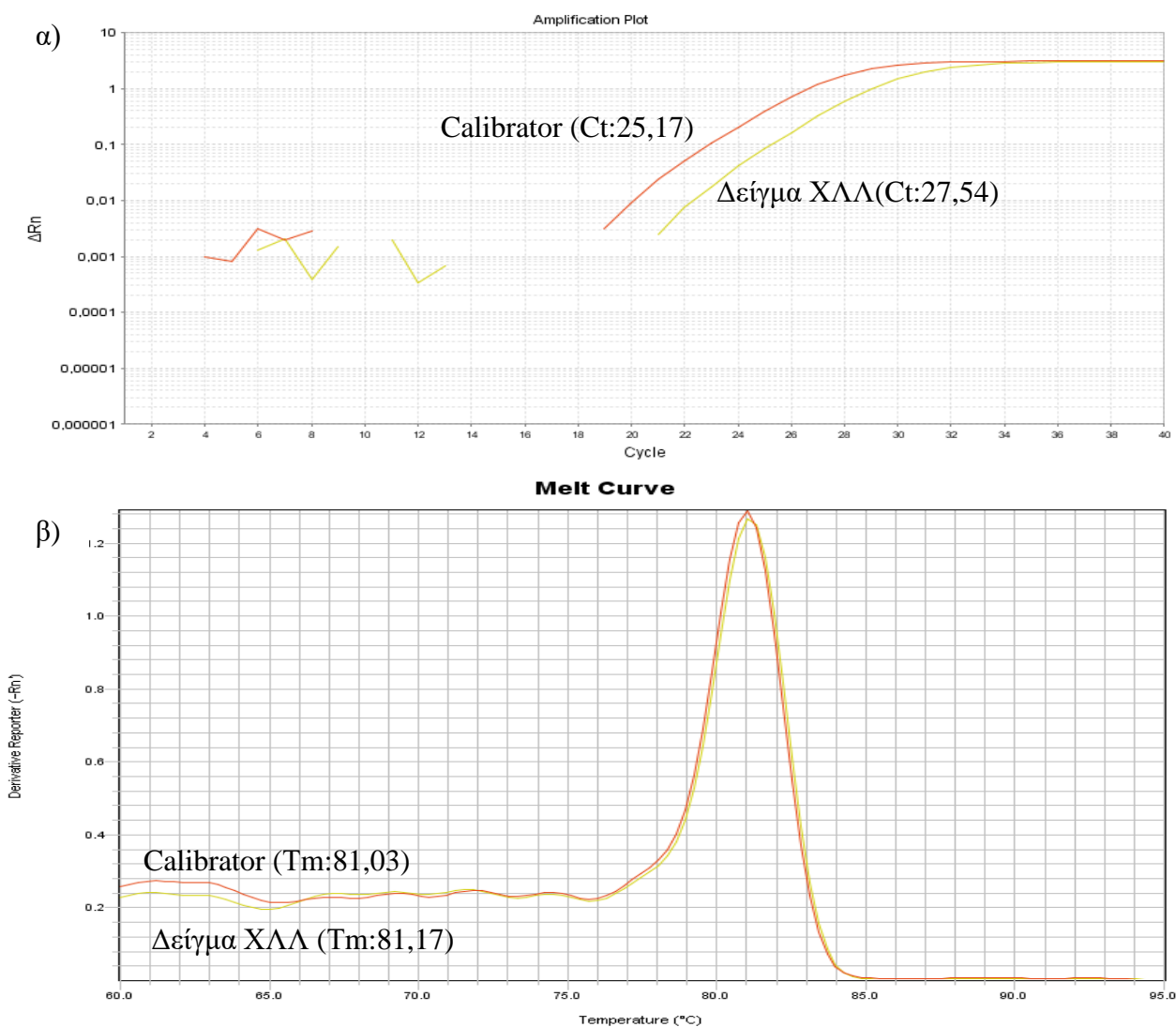


Εικόνα 3.12 : Ηλεκτροφόρηση των μεταγράφων της RNase κ στην κυτταρική σειρά H929, ως προϊόντα από την αντίδραση real time qPCR

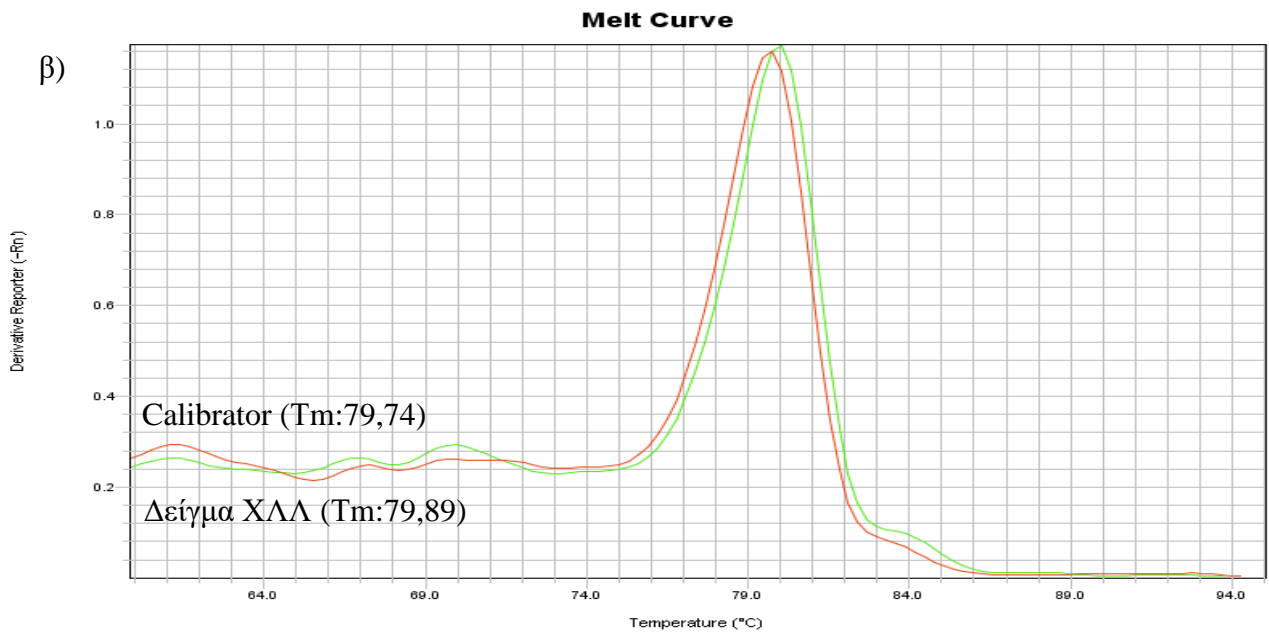
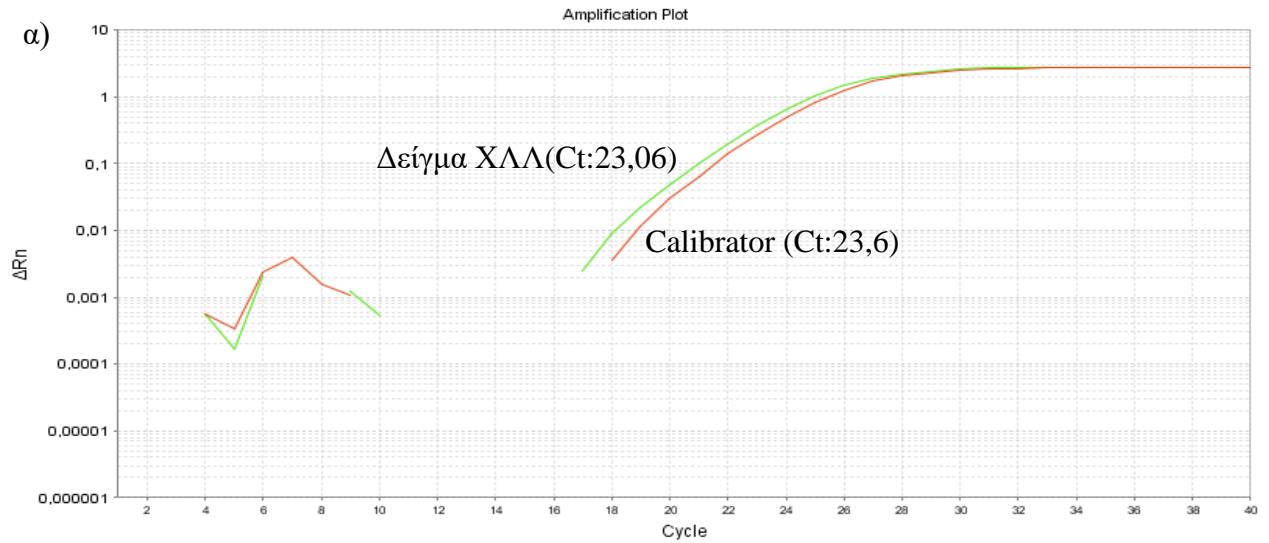
3.2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΗΣ RNase κ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Αφού επιβεβαιώθηκε η έκφραση των εναλλακτικών μεταγράφων σε κυτταρικές σειρές, ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός τους σε 64 δείγματα ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και σε 20 δείγματα υγιών ατόμων. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα ποσοτικού προσδιορισμού της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς HPRT1 το οποίο χρησιμοποιήθηκε στη στατιστική ανάλυση προκειμένου να γίνει η σχετική ποσοτικοποίηση, η σύγκριση δηλαδή της έκφρασης των μεταγράφων με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς. Κάθε αντίδραση real time PCR πραγματοποιήθηκε παρουσία της κυτταρικής σειράς H929 (βαθμονομητής) και ενός αρνητικού μάρτυρα (negative control).

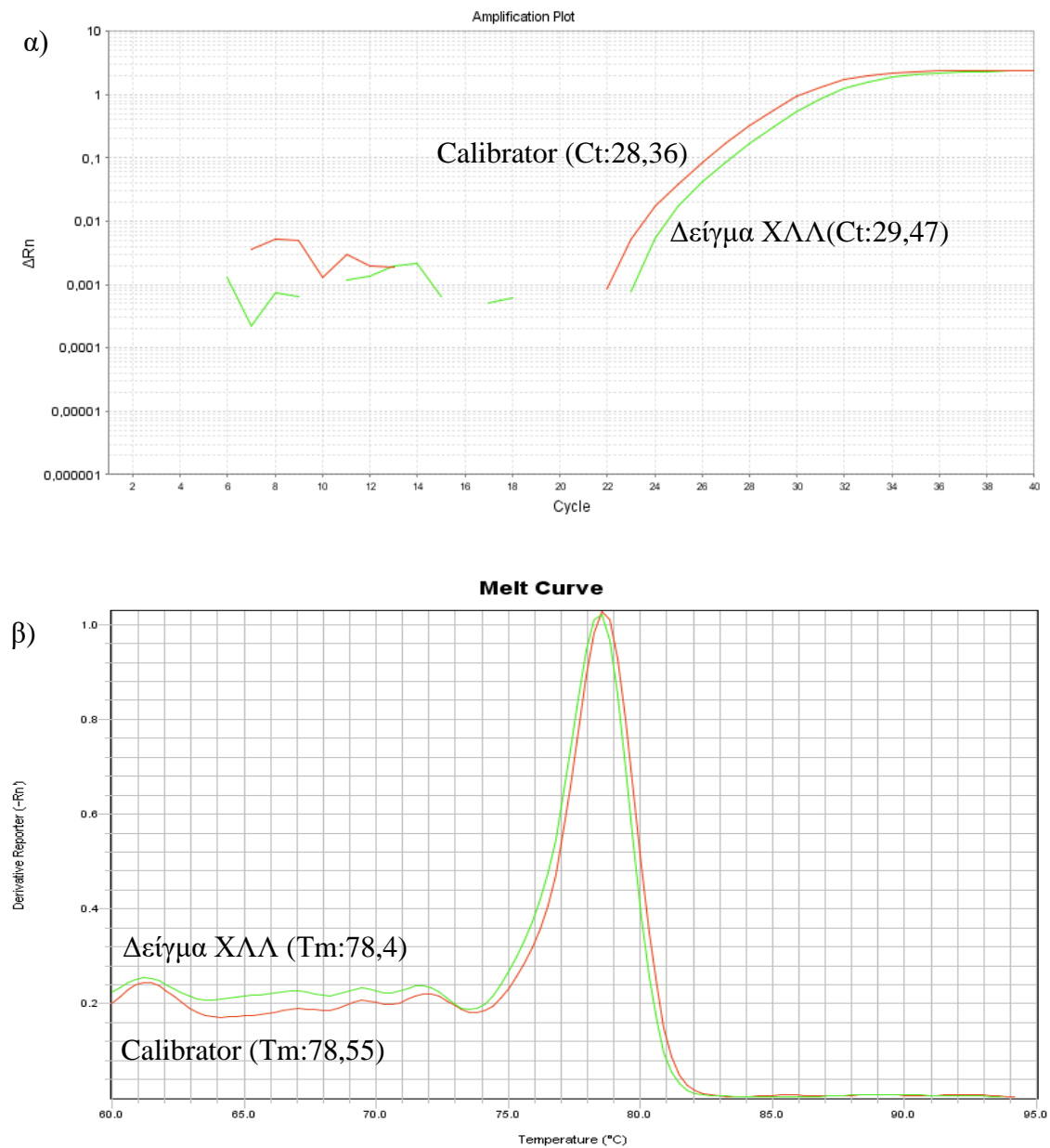
Από τα πειράματα Real time PCR φάνηκε ότι τα μετάγραφα που μελετήθηκαν εκφράζονται στα δείγματα ασθενών και υγιών ατόμων ως ειδικά και μοναδικά προϊόντα. Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά καμπύλες ενίσχυσης και αποδιάταξης για κάθε μετάγραφο σε δείγματα ασθενών και υγιών ατόμων.



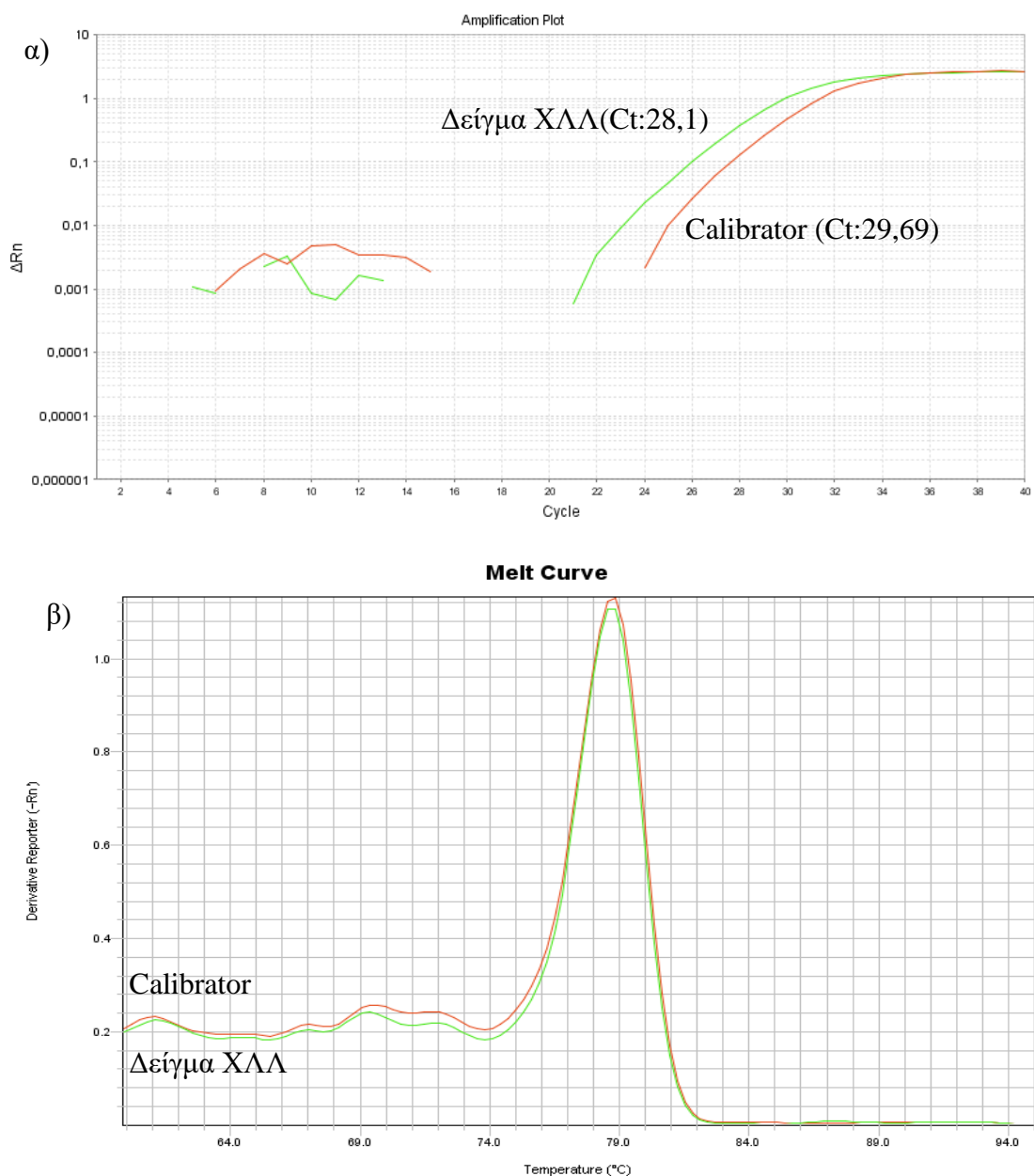
Εικόνα 3.13: Καμπύλες ενίσχυσης και αποδιάταξης του γονιδίου αναφοράς *HPRT1*
 α) Καμπύλες ενίσχυσης για το *HPRT1* στην κυτταρική σειρά H929 (calibrator) με $Ct:25,17$ και σ' ένα δείγμα ΧΛΛ με $Ct:27,54$ β) Καμπύλες αποδιάταξης για το *HPRT1* στην κυτταρική σειρά H929 με $Tm:81,03^{\circ} C$ και σ' ένα δείγμα ΧΛΛ με $Tm:81,17^{\circ} C$.



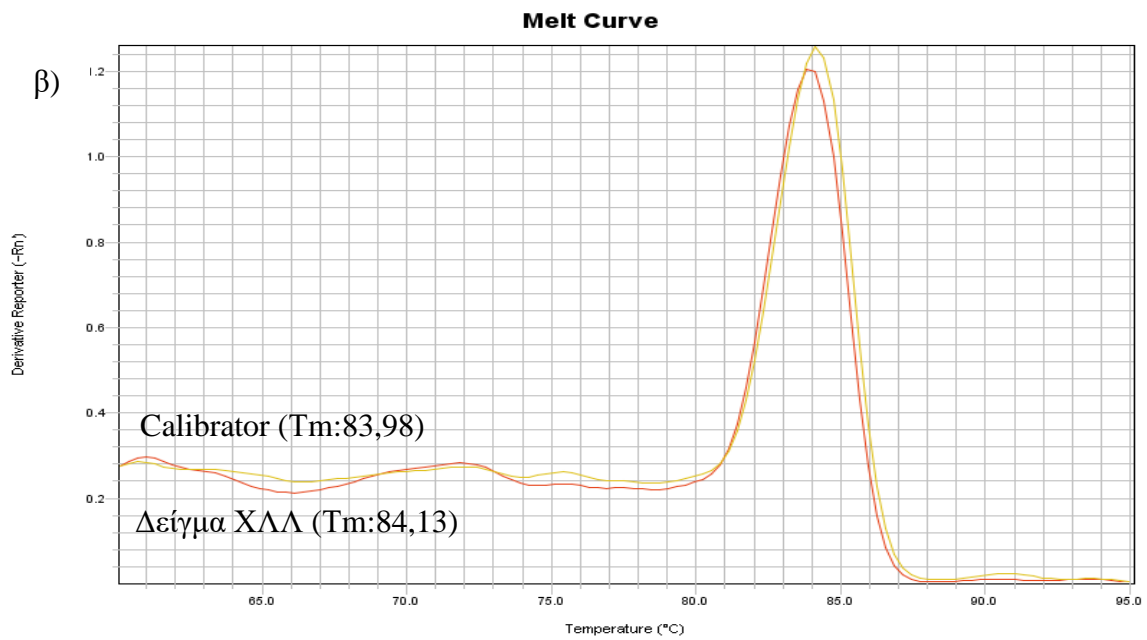
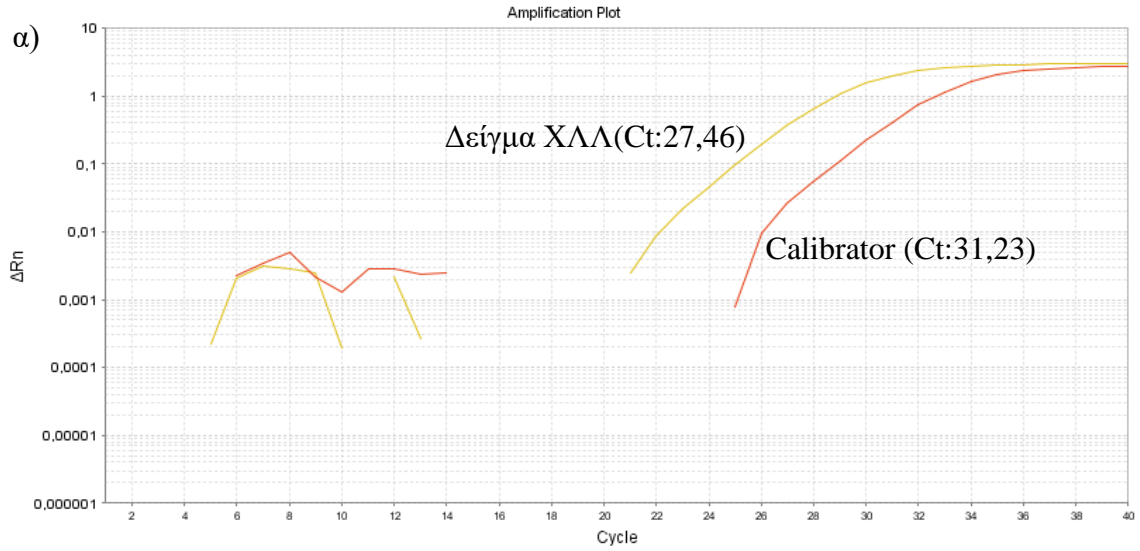
Εικόνα 3.14: Καμπύλες ενίσχυσης και αποδιάταξης του βασικού μεταγράφου της RNase κ. α) Καμπύλες ενίσχυσης για το βασικό μετάγραφο στην κυτταρική σειρά H929 (calibrator) με Ct:23,6 και σ' ένα δείγμα ΧΛΛ με Ct:23,06 β) Καμπύλες αποδιάταξης για το βασικό μετάγραφο στην κυτταρική σειρά H929 με Tm:79,74°C και σ' ένα δείγμα ΧΛΛ με Tm:79,89° C



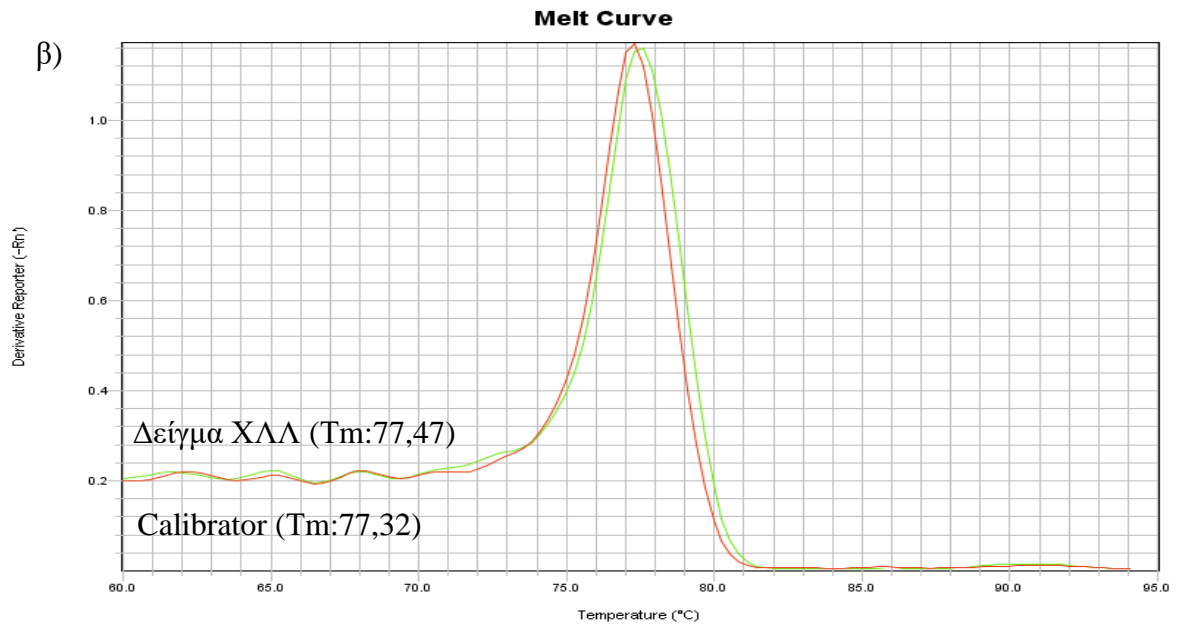
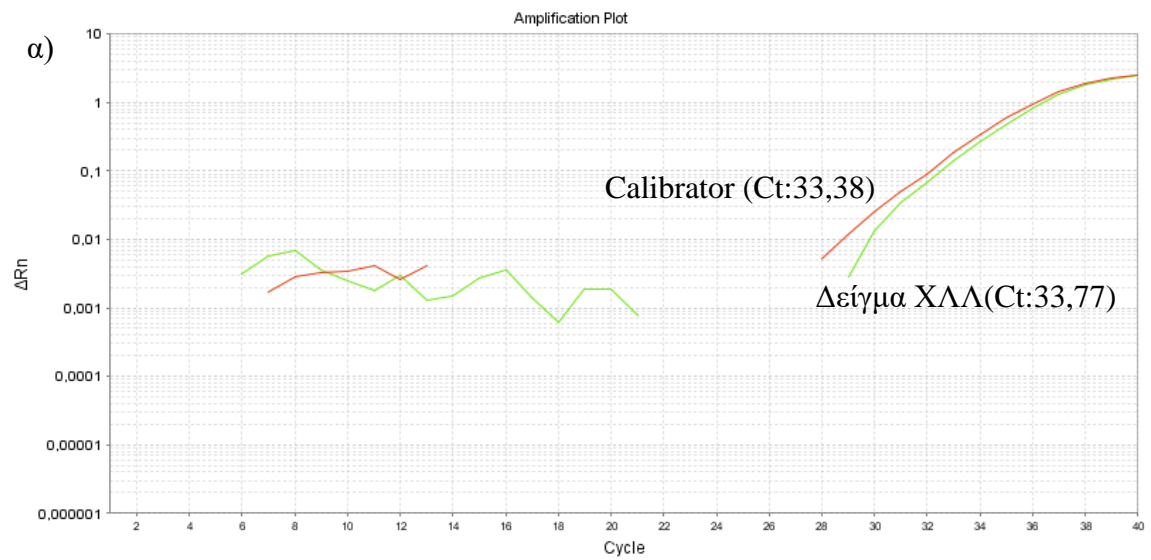
Εικόνα 3.15: Καμπύλες ενίσχυσης και αποδιάταξης του εναλλακτικού μεταγράφου 7 της RNase κ. α) Καμπύλες ενίσχυσης για το μετάγραφο 7 στην κυτταρική σειρά H929 (calibrator) με Ct:28,36 και σ' ένα δείγμα ΧΛΛ με Ct:29,47 β) Καμπύλες αποδιάταξης για το μετάγραφο 7 στην κυτταρική σειρά H929 με Tm:78,55°C και σ' ένα δείγμα ΧΛΛ με Tm:78,4° C



Εικόνα 3.16: Καμπύλες ενίσχυσης και αποδιάταξης του εναλλακτικού μεταγράφου 9 της RNase κ. α) Καμπύλες ενίσχυσης για το μετάγραφο 9 στην κυτταρική σειρά H929 (calibrator) με Ct:29,69 και σ' ένα δείγμα ΧΛΛ με Ct:28,1 β) Καμπύλες αποδιάταξης για το μετάγραφο 9 στην κυτταρική σειρά H929 και σ' ένα δείγμα ΧΛΛ



Εικόνα 3.17: Καμπύλες ενίσχυσης και αποδιάταξης του εναλλακτικού μεταγράφου 14 της RNase κ. α) Καμπύλες ενίσχυσης για το μετάγραφο 14 στην κυτταρική σειρά H929 (calibrator) με Ct:31,23 και σ' ένα δείγμα ΧΛΛ με Ct:27,46 β) Καμπύλες αποδιάταξης για το μετάγραφο 14 στην κυτταρική σειρά H929 με Tm:83,98°C και σ' ένα δείγμα ΧΛΛ με Tm:84,13° C



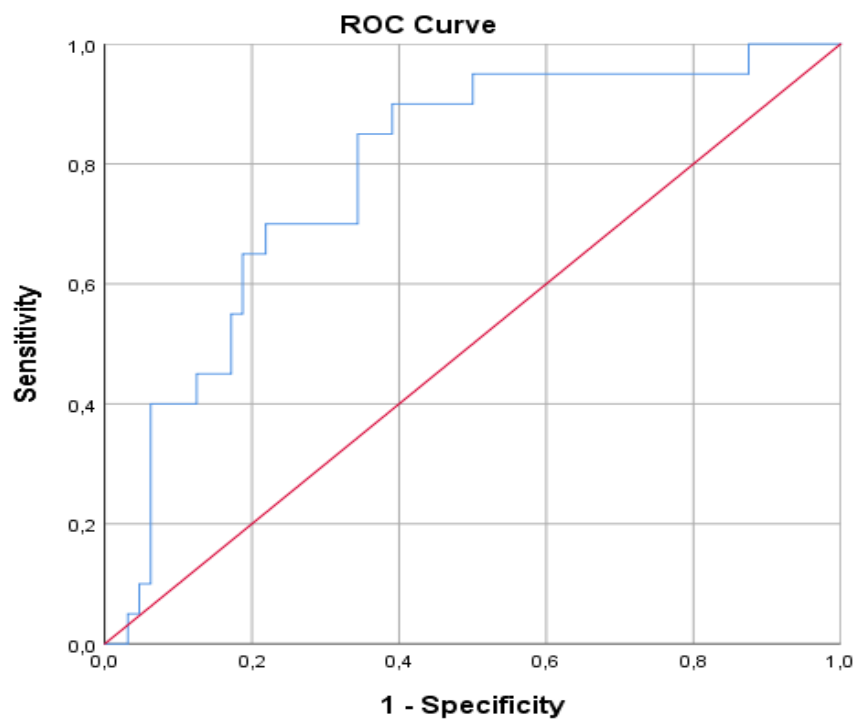
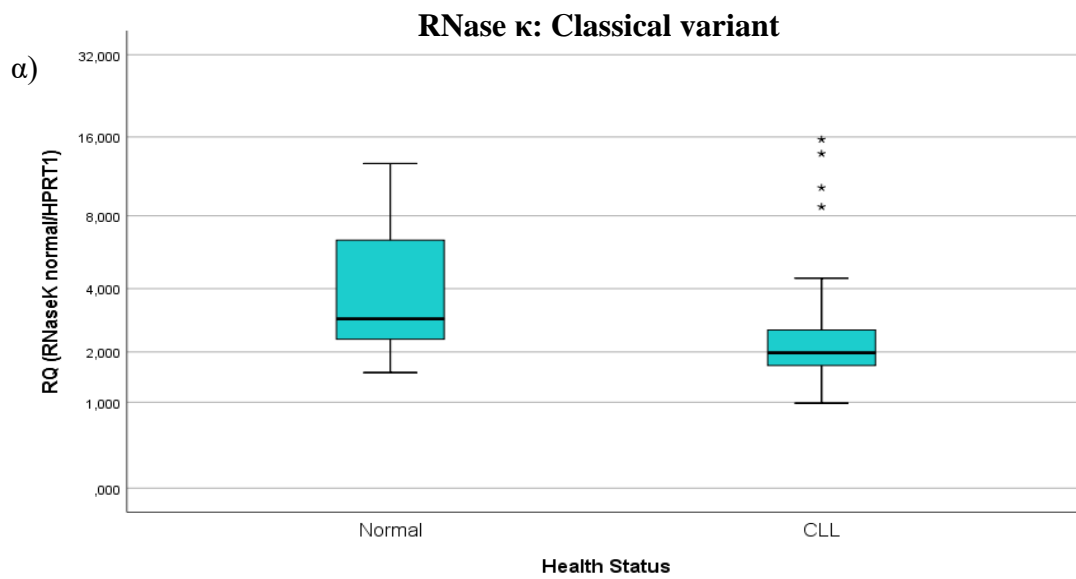
Εικόνα 3.18: Καμπύλες ενίσχυσης και αποδιάταξης του εναλλακτικού μεταγράφου 20 της RNase κ. α) Καμπύλες ενίσχυσης για το μετάγραφο 20 στην κυτταρική σειρά H929 (calibrator) με Ct:33,38 και σ' ένα δείγμα ΧΛΛ με Ct:33,77 β) Καμπύλες αποδιάταξης για το μετάγραφο 20 στην κυτταρική σειρά H929 με Tm:77,32°C και σ' ένα δείγμα ΧΛΛ με Tm:77,47° C

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

3.3.1 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων της RNase κ μεταξύ ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και υγιών ατόμων και αξιολόγηση της διαγνωστικής τους αξίας.

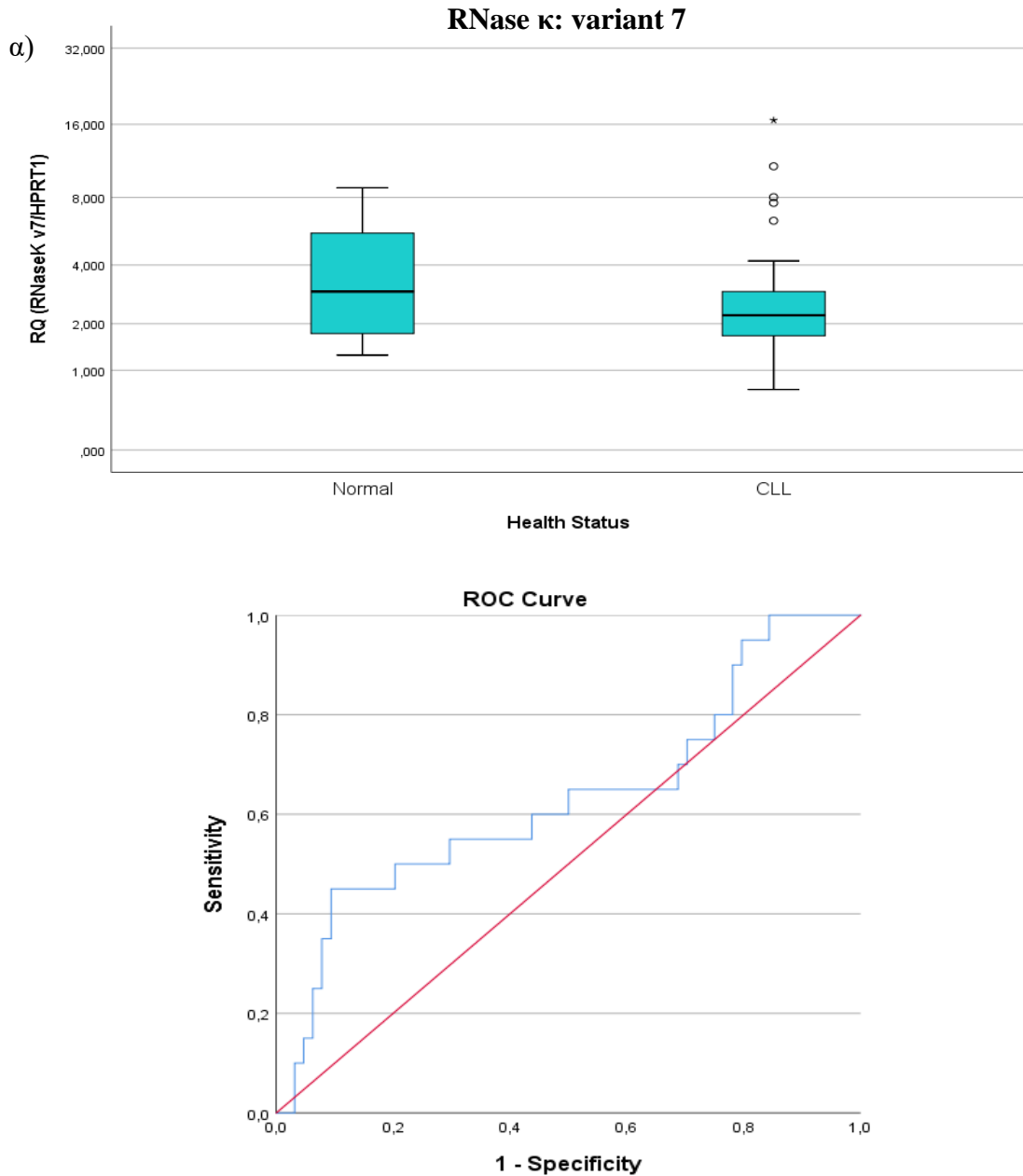
Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του βασικού μεταγράφου και των μεταγράφων 7, 9, 14 και 20 μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών, διεξήχθη μέσω του μη παραμετρικού test Mann-Whitney U test. Για τη γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων επιλέχθηκαν τα θηκογράμματα (Box-Plots), τα οποία απεικονίζουν τη διαφορά μεταξύ δύο πληθυσμών (στην συγκεκριμένη περίπτωση, υγιείς και ασθενείς). Η πιθανή διαγνωστική αξία των μεταγράφων αξιολογήθηκε με την ανάλυση ROC. Μέσω των καμπυλών ευαισθησίας-ειδικότητας, αλλιώς καμπυλών ROC συσχετίζονται τα αληθώς θετικά (άξονας χ) και ψευδώς θετικά αποτελέσματα (άξονας ψ). Το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη (area under curve, AUC) αποτελεί μέτρο διαγνωστικής ακρίβειας του τεστ. Όσο το AUC πλησιάζει την μονάδα, τόσο μεγαλύτερη είναι και η διαγνωστική αξία του δείκτη.

Στην εικόνα 3.19α διακρίνεται ότι το βασικό μετάγραφο της RNase κ εμφανίζει στατιστικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς ($p < 0,001$). Η καμπύλη ROC (εικόνα 3.19β) με $AUC = 0,784$ και $p < 0,001$ υποδηλώνει ότι το βασικό μετάγραφο της RNase κ έχει στατιστικώς σημαντική διαγνωστική αξία.



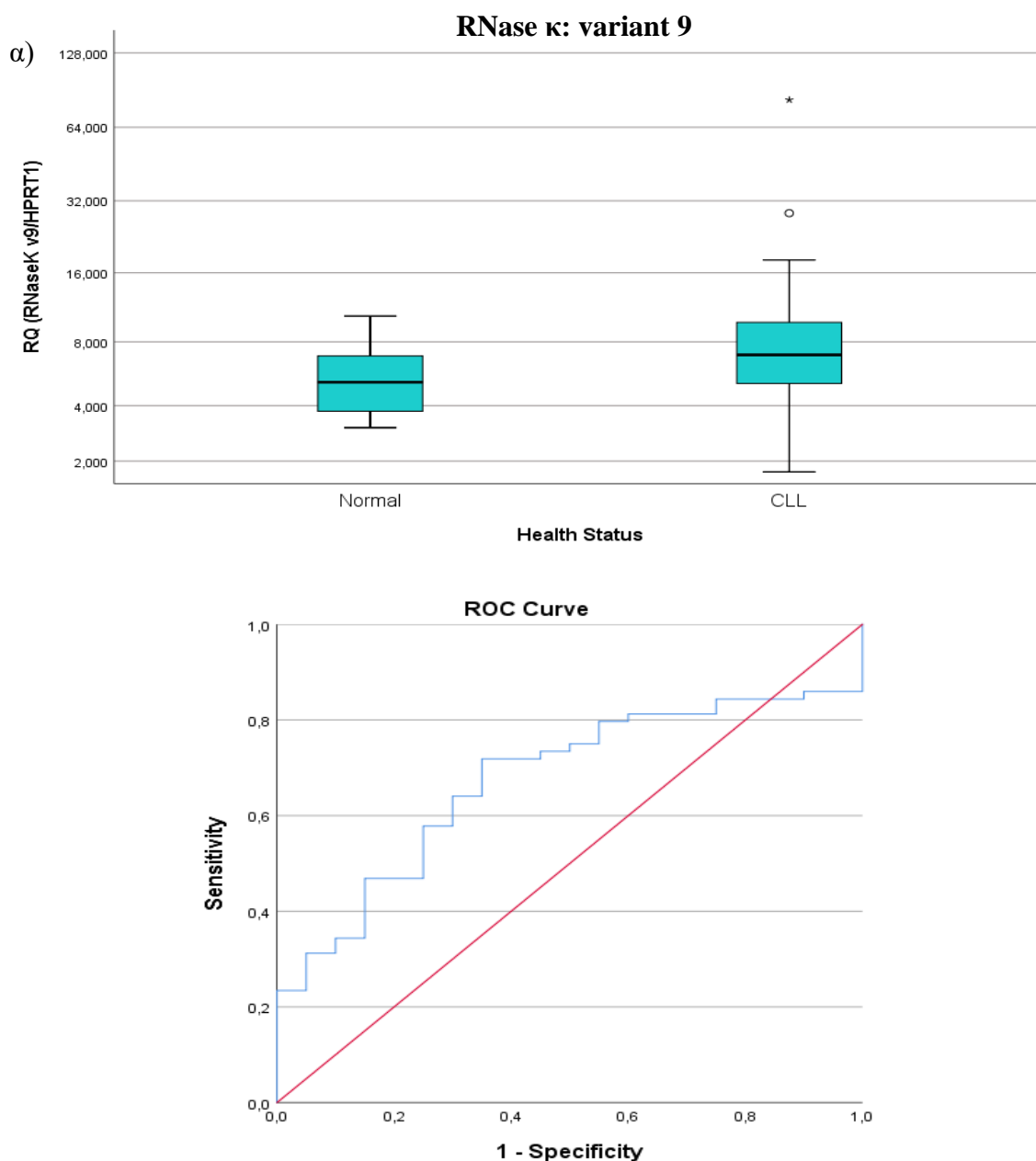
Εικόνα 3.19 α) Διάγραμμα των επιπέδων έκφρασης του βασικού μεταγράφου της RNase κ μεταξύ ασθενών με ΧΛΛ και υγιών ατόμων, $p < 0,001$. β) Καμπύλη ROC για το βασικό μεταγγραφο της RNase κ, $AUC: 0,784$ και $p < 0,001$

Το εναλλακτικό μετάγραφο 7 της RNase κ δεν εμφανίζει κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του ανάμεσα σε ασθενείς με ΧΛΛ και υγιείς, $p=0,076$. Αντίστοιχα, η καμπύλη ROC εμφανίζει $AUC= 0,632$ με $p=0,076$, γεγονός που δηλώνει ότι το μετάγραφο 7 δεν έχει τη δυνατότητα να διακρίνει τους ασθενείς με ΧΛΛ από τα υγιή άτομα.



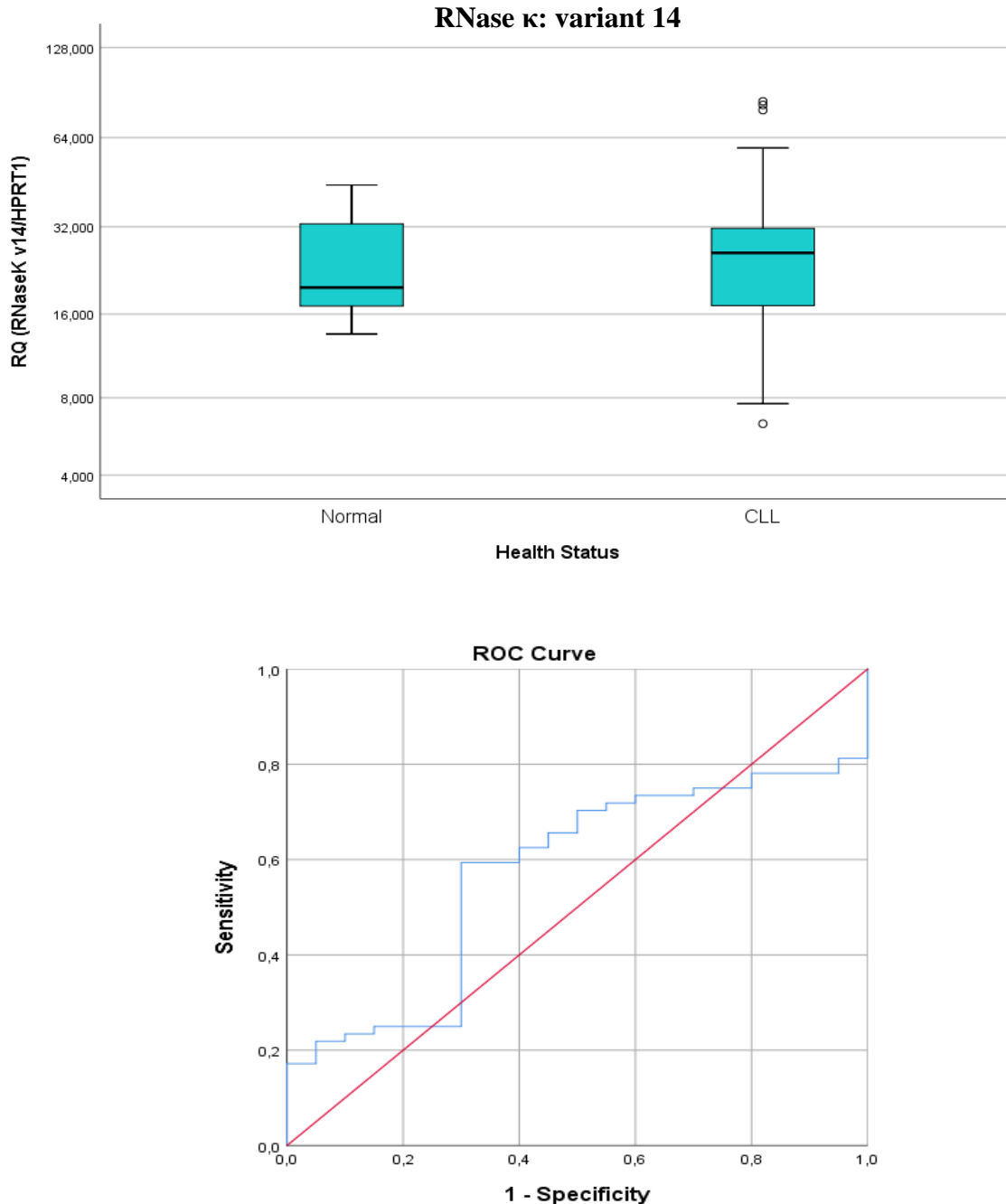
Εικόνα 3.20 α) Διάγραμμα των επιπέδων έκφρασης του εναλλακτικού μεταγράφου 7 της RNase κ μεταξύ ασθενών με ΧΛΛ και υγιών ατόμων, $p=0,076$. β) Καμπύλη ROC για το εναλλακτικό μετάγραφο 7 της RNase κ, $AUC:0,632$ και $p=0,076$

Σε αντίθεση με το βασικό μετάγραφο, τα επίπεδα έκφρασης του εναλλακτικού μεταγράφου 9 της RNase κ είναι υψηλότερα στους ασθενείς με ΧΛΛ απ' ό τι στα υγιή άτομα, με στατιστική σημαντικότητα $p=0,020$ (Εικόνα 3.21 α). Από την καμπύλη ROC με $AUC=0,673$ φαίνεται πως το μετάγραφο 9 παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαγνωστική αξία, $p=0,020$ και ενδεχομένως να μπορεί να διαχωρίσει τον λευχαιμικό από τον μη-λευχαιμικό πληθυσμό (Εικόνα 3.21 β).



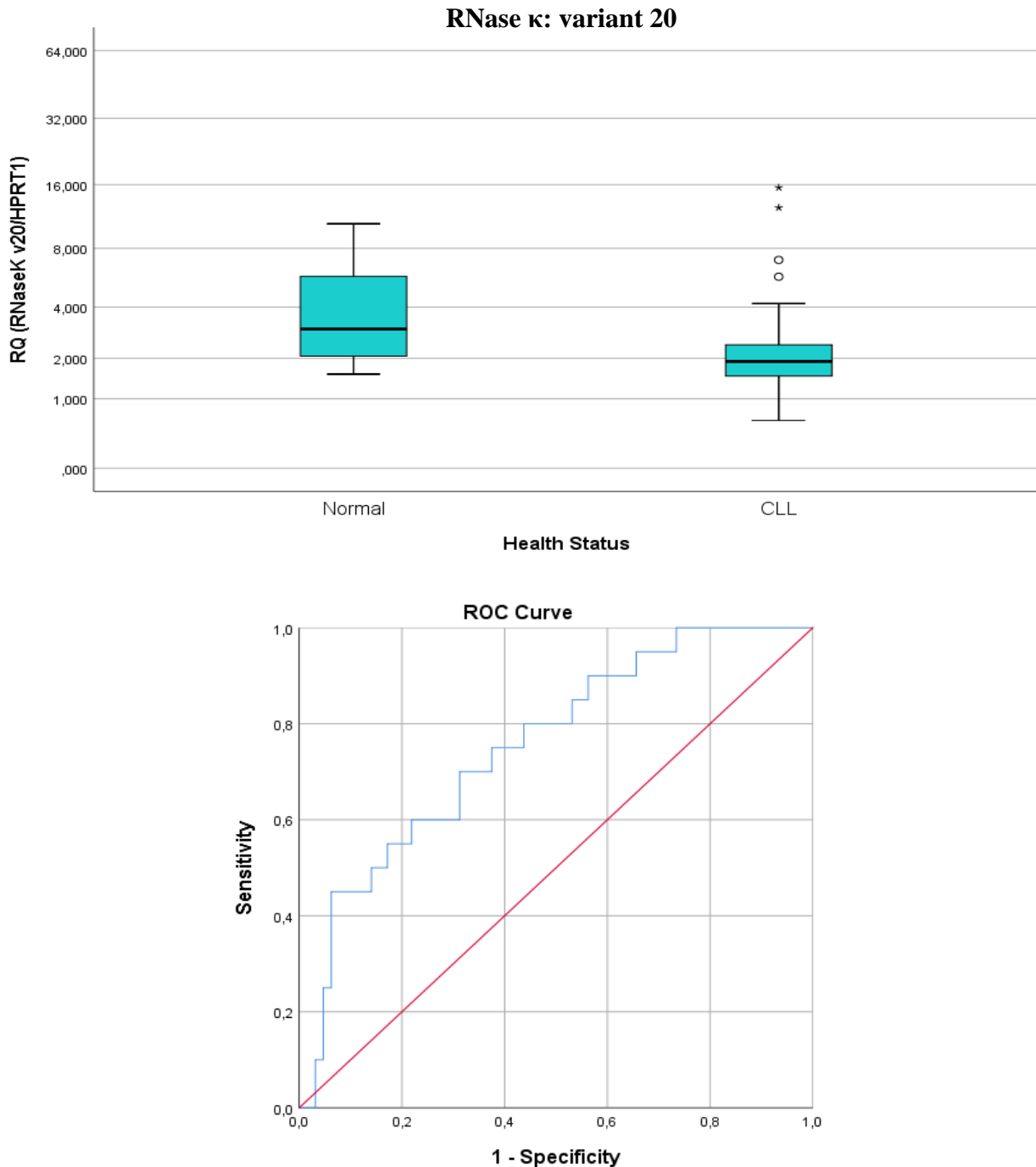
Εικόνα 3.21 α) Διάγραμμα των επιπέδων έκφρασης του εναλλακτικού μεταγράφου 9 της RNase κ μεταξύ ασθενών με ΧΛΛ και υγιών απόμων, $p=0,020$. β) Καμπύλη ROC για το εναλλακτικό μετάγραφο 9 της RNase κ, $AUC:0,673$ και $p=0,020$

Όπως μπορεί να διακριθεί από το box plot για το εναλλακτικό μετάγραφο 14 (Εικόνα 3.22 α), δεν υπάρχει διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου μεταξύ υγιών και ασθενών με ΧΛΛ, $p=0,350$. Αντίστοιχα, η καμπύλη ROC με $AUC=0,570$ και $p=0,350$ υποδηλώνει πως το μετάγραφο 14 δεν διαθέτει κλινική αξία ως διαγνωστικός δείκτης (Εικόνα 3.22 β)



Εικόνα 3.22 α) Διάγραμμα των επιπέδων έκφρασης του εναλλακτικού μεταγράφου 14 της RNase κ μεταξύ ασθενών με ΧΛΛ και υγιών ατόμων, $p=0,350$. β) Καμπύλη ROC για το εναλλακτικό μετάγραφο 14 της RNase κ, $AUC:0,570$ και $p=0,350$

Το εναλλακτικό μετάγραφο 20 εμφανίζει στατιστικώς σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς σε σχέση με τα υγιή άτομα, $p=0,001$ (Εικόνα 3.23 α). Η αντίστοιχη καμπύλη ROC με $AUC=0,755$ και $p=0,001$, δείχνει πως το μετάγραφο 20 πιθανόν να διαθέτει διαγνωστική αξία στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (Εικόνα 3.23 β)



Εικόνα 3.23 α) Διάγραμμα των επιπέδων έκφρασης του εναλλακτικού μεταγράφου 20 της RNase κ μεταξύ ασθενών με ΧΛΛ και υγιών ατόμων, $p=0,001$. β) Καμπύλη ROC για το εναλλακτικού μεταγράφου 20 της RNase κ, $AUC:0,755$ και $p=0,001$

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης η οποία επιβεβαιώνει πως τα επίπεδα του βασικού μεταγράφου και των μεταγράφων 9 και 20 μπορούν να συσχετισθούν με την παρουσία ΧΛΛ (Πίνακας 3.2) Συγκεκριμένα, τα χαμηλότερα επίπεδα του βασικού μεταγράφου στους ασθενείς με ΧΛΛ θα μπορούσαν να προβλέψουν την παρουσία της ΧΛΛ (odds ratio: 0,822, 95% CI: 0,694-0,973, p=0,023). Τα υψηλότερα επίπεδα του μεταγράφου 9 στους ασθενείς με ΧΛΛ θα μπορούσαν επίσης να προβλέψουν την παρουσία ΧΛΛ (odds ratio: 1,212, 95% CI: 1,018-1,443, p=0,031). Παρομοίως, το μετάγραφο 20 το οποίο παρουσιάζει χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς με ΧΛΛ, θα μπορούσε να συσχετισθεί με την παρουσία ΧΛΛ (odds ratio: 0,796, 95% CI: 0,651-0,973, p=0,026).

Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα λογιστικής παλινδρόμησης για την συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων της RNase κ με την παρουσία ΧΛΛ

Μετάγραφο	p-value	OR (odds ratio)	95% CI
Βασικό	0,023	0,822	0,694-0,973
7	0,108	0,857	0,709-1,034
9	0,031	1,212	1,018-1,443
14	0,184	1,028	0,987-1,071
20	0,026	0,796	0,651-0,973

3.3.2 Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων της RNase κ με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΧΛΛ

Επόμενο βήμα στη στατιστική ανάλυση ήταν η συσχέτιση των μεταγράφων που μελετήθηκαν με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Στον πίνακα 3.3 παρουσιάζονται κάποια από τα χαρακτηριστικά των ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση συσχέτισης.

Πίνακας 3.3: Συγκεντρωτικός πίνακας με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΧΛΛ που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Χαρακτηριστικό		Σύνολο ασθενών:64	
		Αριθμός	Ποσοστό %
Φύλο	Άνδρες	44	68,8 %
	Γυναίκες	20	31,3 %
Στάδιο Binet	A	40	62,5 %
	B	11	17,2 %
	C	13	20,3 %
Στάδιο Rai	0	12	18,8 %
	I	20	31,3 %
	II	20	31,3 %
	III	3	4,7 %
	IV	9	14,1 %
Στάδιο Κινδύνου	Χαμηλό	12	18,8 %
	Ενδιάμεσο	40	62,5 %
	Υψηλό	12	18,8 %
Συγκέντρωση LDH ορού	Φυσιολογική	47	73,4 %
	Παθολογική	17	26,6 %
Έκφραση CD38(%)	≤ 30%	54	84,4 %
	>30%	10	15,6 %
Κατάσταση IGHV	Μεταλλαγμένη	33	51,6 %
	Μη μεταλλαγμένη	31	48,4 %
Θεραπεία	Ναι	22	34,4 %
	Όχι	42	65,6 %

Η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε με τον μη παραμετρικό συντελεστή συσχέτισης Spearman. Πιο ειδικά, τα επίπεδα έκφρασης κάθε μεταγράφου έχουν συσχετισθεί με την ηλικία, τα λευκά αιμοσφαίρια, τα λεμφοκύτταρα, το ποσοστό(%) σε αννεξίνη, την έκφραση του CD38 δείκτη καθώς και με την έκφραση των υπόλοιπων μεταγράφων της μελέτης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του βασικού μεταγράφου της RNase κ φαίνεται να εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική αρνητική συσχέτιση με τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων και τον αριθμό των λεμφοκυττάρων με $p=0,004$ και $p=0,005$, αντίστοιχα. Με άλλα λόγια, τα χαμηλά επίπεδα του βασικού μεταγράφου πιθανόν να συσχετίζονται με τον αυξημένο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων και λεμφοκυττάρων. Επιπλέον το βασικό μετάγραφο εμφανίζει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με τα μετάγραφα 7 ($p<0,001$), 9 ($p=0,001$), 14 ($p=0,004$) και 20 ($p<0,001$). Τα αποτελέσματα για το βασικό μετάγραφο συνοψίζονται στον πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.4: Αποτελέσματα της ανάλυσης συσχέτισης με το στατιστικό test Spearman correlation για το βασικό μετάγραφο

	Συντελεστής Συσχέτισης Spearman	p-value	N
Μετάγραφο 7	0,672	<0,001	64
Μετάγραφο 9	0,394	=0,001	64
Μετάγραφο 14	0,354	=0,004	64
Μετάγραφο 20	0,793	<0,001	64
Ηλικία	0,229	=0,069	64
Λευκά Αιμοσφαίρια	-0,351	=0,004	64
Λεμφοκύτταρα	-0,344	=0,005	64
Αννεξίνη %	0,151	=0,332	43
CD38 %	0,168	=0,186	64

Το μετάγραφο 7 δεν εμφάνισε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν (Πίνακας 3.5). Παρ' όλα αυτά από την ανάλυση προκύπτει πως παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με τα υπόλοιπα μετάγραφα της μελέτης (βασικό, 9, 14, 20).

Πίνακας 3.5: Αποτελέσματα της ανάλυσης συσχέτισης με το στατιστικό test Spearman correlation για το εναλλακτικό μετάγραφο 7

	Συντελεστής Συσχέτισης Spearman	p-value	N
Βασικό Μετάγραφο	0,672	<0,001	64
Μετάγραφο 9	0,695	<0,001	64
Μετάγραφο 14	0,568	<0,001	64
Μετάγραφο 20	0,758	<0,001	64
Ηλικία	0,103	=0,416	64
Λευκά Αιμοσφαίρια	-0,117	=0,356	64
Λεμφοκύτταρα	-0,108	=0,397	64
Αννεξίνη %	-0,008	=0,958	43
CD38 %	0,118	=0,0352	64

Τα μετάγραφα 9, 14 και 20 ακολουθούν το ίδιο μοτίβο με το μετάγραφο 7. Από τα αποτελέσματα δεν προκύπτει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με κάποιο από τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, όμως φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του κάθε μεταγράφου με τα υπόλοιπα μετάγραφα. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης συσχέτισης για τα μετάγραφα 9, 14 και 20 παρουσιάζονται στους πίνακες 3.6, 3.7 και 3.8, αντίστοιχα.

Πίνακας 3.6: Αποτελέσματα της ανάλυσης συσχέτισης με το στατιστικό test Spearman correlation για το εναλλακτικό μετάγραφο 9

	Συντελεστής Συσχέτισης Spearman	p-value	N
Βασικό Μετάγραφο	0,394	=0,001	64
Μετάγραφο 7	0,695	<0,001	64
Μετάγραφο 14	0,882	<0,001	64
Μετάγραφο 20	0,473	<0,001	64
Ηλικία	-0,21	=0,871	64
Λευκά Αιμοσφαίρια	0,122	=0,339	64
Λεμφοκύτταρα	0,101	=0,427	64
Ανεξίνη %	-0,002	=0,987	43
CD38 %	-0,116	=0,363	64

Πίνακας 3.7: Αποτελέσματα της ανάλυσης συσχέτισης με το στατιστικό test Spearman correlation για το εναλλακτικό μετάγραφο 14

	Συντελεστής Συσχέτισης Spearman	p-value	N
Βασικό Μετάγραφο	0,354	=0,004	64
Μετάγραφο 7	0,568	<0,001	64
Μετάγραφο 9	0,882	<0,001	64
Μετάγραφο 20	0,367	=0,003	64
Ηλικία	0,16	=0,898	64
Λευκά Αιμοσφαίρια	0,105	=0,410	64
Λεμφοκύτταρα	0,068	=0,596	64
Ανεξίνη %	0,051	=0,747	43
CD38 %	-0,103	=0,417	64

Πίνακας 3.8: Αποτελέσματα της ανάλυσης συσχέτισης με το στατιστικό test Spearman correlation για το εναλλακτικό μετάγραφο 20

	Συντελεστής Συσχέτισης		
	Spearman	p-value	N
Βασικό Μετάγραφο	0,793	<0,001	64
Μετάγραφο 7	0,758	<0,001	64
Μετάγραφο 9	0,473	<0,001	64
Μετάγραφο 14	0,367	=0,003	64
Ηλικία	0,97	=0,448	64
Λευκά Αιμοσφαίρια	-0,176	=0,164	64
Λεμφοκύτταρα	-0,149	=0,239	64
Αννεξίνη %	0,156	=0,318	43
CD38 %	0,099	=0,436	64

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση με πίνακες διπλής εισόδου και έλεγχο χ^2 (chi-square test). Η ανάλυση αυτή συσχετίζει κατηγορικές μεταβλητές, για αυτό και τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων μετατράπηκαν σε κατηγορικές μεταβλητές. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε θετικούς και αρνητικούς με βάση το βέλτιστο όριο λήψης απόφασης (cut off), που προσδιορίστηκε με τη χρήση του αλγορίθμου X-tile. Θετικοί είναι όσοι ασθενείς εκφράζουν το μετάγραφο σε υψηλότερα επίπεδα από την τιμή της διαμέσου (cut off) και αρνητικοί όσοι έχουν τιμή έκφρασης του μεταγράφου μικρότερη από την τιμή cut off. Με την ανάλυση αυτή λοιπόν, διερευνήθηκε κατά πόσο τα χαμηλά ή τα υψηλά επίπεδα ενός μεταγράφου παρουσιάζουν συσχέτιση με κάποια κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά. Τα χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν ήταν το φύλο, η σταδιοποίηση κατά Binet και κατά Rai, την κατάσταση IGHV, η LDH, και το επίπεδο κινδύνου. Στον πίνακα 3.9 μπορεί να διακριθεί πως μόνο το μετάγραφο 9 έχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το φύλο. Ειδικότερα φαίνεται πως οι γυναίκες με ΧΛΛ έχουν υψηλά επίπεδα μεταγράφου 9. Για την σταδιοποίηση κατά Binet, τη σταδιοποίηση κατά Rai, το στάδιο κινδύνου, τον δείκτη CD38 και την κατάσταση IGHV δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με τα υψηλά ή χαμηλά επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων της μελέτης. Μόνο στην περίπτωση της LDH, προκύπτει πως όσοι ασθενείς εκφράζουν το

μετάγραφο 7 σε χαμηλά επίπεδα έχουν μη φυσιολογικές τιμές συγκέντρωσης LDH στον ορό (Πίνακας 3.13).

Πίνακας 3.9: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της συσχέτισης των μεταγράφων που μελετήθηκαν με το φύλο

Μετάγραφο		Φύλο				Σύνολο		Chi square test	
		Άνδρες		Γυναίκες		Αριθμός	Ποσοστό	Value	p-value
		Αριθμός	Ποσοστό	Αριθμός	Ποσοστό	Αριθμός	Ποσοστό		
Βασικό	Θετικοί	19	43,2 %	13	65 %	32	50 %	2,618	0,106
	Αρνητικοί	25	56,8 %	17	35 %	32	50 %		
	Σύνολο	44	100 %	20	100 %	64	100 %		
7	Θετικοί	19	43,2 %	13	65 %	32	50 %	2,618	0,106
	Αρνητικοί	25	56,8 %	17	35 %	32	50 %		
	Σύνολο	44	100 %	20	100 %	64	100 %		
9	Θετικοί	18	40,9 %	14	70 %	32	50 %	4,655	0,031
	Αρνητικοί	26	59,1 %	6	30 %	32	50 %		
	Σύνολο	44	100 %	20	100 %	64	100 %		
14	Θετικοί	19	43,2 %	13	65 %	32	50 %	2,618	0,106
	Αρνητικοί	25	56,8 %	17	35 %	32	50 %		
	Σύνολο	44	100 %	20	100 %	64	100 %		
20	Θετικοί	23	52,3 %	9	45 %	32	50 %	0,291	0,590
	Αρνητικοί	21	47,7 %	11	55 %	32	50 %		
	Σύνολο	44	100 %	20	100 %	64	100 %		

Πίνακας 3.10: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της συσχέτισης των μεταγράφων που μελετήθηκαν με τη σταδιοποίηση κατά Binet α) Αποτελέσματα για τα μεταγράφα βασικό, 7 και 9 β) Αποτελέσματα για τα μεταγράφα 14 και 20

A)		Βασικό Μετάγραφο		Μετάγραφο 7		Μετάγραφο 9		Σύνολο
Σταδιοποίηση κατά Binet		Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	
A	Αριθμός	20	20	21	19	21	19	40
	Ποσοστό%	50 %	50 %	52,5 %	47,5 %	52,5 %	47,5 %	100 %
B	Αριθμός	6	5	6	5	5	6	11
	Ποσοστό%	54,5 %	45,5 %	54,5 %	45,5 %	45,5 %	54,5 %	100 %
C	Αριθμός	6	7	5	8	6	7	13
	Ποσοστό%	46,2 %	53,8%	38,5 %	61,5 %	46,2 %	53,8 %	100 %
Σύνολο	Αριθμός	32	32	32	32	32	32	64
	Ποσοστό%	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	100 %
Chi square test	Value	0,168		0,883		0,268		
	p-value	0,920		0,643		0,875		

β)		Μετάγραφο 14		Μετάγραφο 20		Σύνολο
Σταδιοποίηση κατά Binet		Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	
A	Αριθμός	20	20	20	20	40
	Ποσοστό%	50 %	50 %	50 %	50 %	100%
B	Αριθμός	6	5	5	6	11
	Ποσοστό%	54,5 %	45,5 %	45,5 %	54,5 %	100%
C	Αριθμός	6	7	7	6	13
	Ποσοστό%	46,2 %	53,8 %	53,8 %	54,5 %	100 %
Σύνολο	Αριθμός	32	32	32	32	64
	Ποσοστό%	50 %	50 %	50 %	50 %	100 %
Chi square test	Value	0,168		0,168		
	p-value	0,920		0,920		

Πίνακας 3.11: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της συσχέτισης των μεταγράφων που μελετήθηκαν με την σταδιοποίηση κατά Rai α) Αποτελέσματα για τα μετάγραφα βασικό, 7 και 9 β) Αποτελέσματα για τα μετάγραφα 14 και 20

α)		Μετάγραφο Βασικό		Μετάγραφο 7		Μετάγραφο 9		Σύνολο
Σταδιοποίηση κατά Rai		Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	
0	Αριθμός	7	5	8	4	8	4	12
	Ποσοστό%	58,3 %	41,7 %	66,7 %	33,3 %	66,7 %	33,3 %	100 %
I	Αριθμός	12	8	12	8	11	9	20
	Ποσοστό%	60,0%	40 %	60 %	40 %	55 %	45 %	100 %
II	Αριθμός	8	12	7	13	7	13	20
	Ποσοστό%	40 %	60 %	35 %	65 %	35 %	65 %	100 %
III	Αριθμός	2	1	2	1	1	2	3
	Ποσοστό%	66,7 %	33,3 %	66,7 %	33,3 %	33,3 %	66,7 %	100 %
IV	Αριθμός	3	6	3	6	5	4	9
	Ποσοστό%	33,3 %	66,7 %	33,3 %	66,7 %	55,6 %	44,4 %	100 %
Σύνολο	Αριθμός	32	32	32	32	32	32	64
	Ποσοστό%	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	100 %
Chi square test	Value	3,267		5,267		3,778		
	p-value	0,514		0,261		0,437		

β)		Μετάγραφο 14		Μετάγραφο 20		Σύνολο
Σταδιοποίηση κατά Rai		Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	
0	Αριθμός	8	4	8	4	12
	Ποσοστό%	66,7 %	33,3 %	66,7 %	33,3 %	100 %
I	Αριθμός	12	8	7	13	20
	Ποσοστό%	60 %	40 %	35 %	65 %	100 %
II	Αριθμός	6	14	11	9	20 %
	Ποσοστό%	30 %	70 %	55 %	45 %	100 %
III	Αριθμός	2	1	2	1	3
	Ποσοστό%	66,7 %	33,3 %	66,7 %	33,3 %	100 %
IV	Αριθμός	4	5	4	5	9
	Ποσοστό%	44,4 %	55,6 %	44,4 %	55,6 %	100 %
Σύνολο	Αριθμός	32	32	32	32	64
	Ποσοστό%	50 %	50 %	50 %	50 %	100 %
Chi square test	Value	5,778		3,778		
	p-value	0,216		0,437		

Πίνακας 3.12: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της συσχέτισης των μεταγράφων που μελετήθηκαν με το στάδιο κινδύνου α) Αποτελέσματα για τα μετάγραφα βασικό, 7 και 9 β) Αποτελέσματα για τα μετάγραφα 14 και 20

α)	Στάδιο κινδύνου	Βασικό Μετάγραφο		Μετάγραφο 7		Μετάγραφο 9		Σύνολο
		Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	
Χαμηλό	Αριθμός	7	5	8	4	8	4	12
	Ποσοστό%	58,3 %	41,7 %	66,7 %	33,3 %	66,7 %	33,3 %	100 %
Ενδιάμεσο	Αριθμός	20	20	19	21	18	22	40
	Ποσοστό%	50 %	50 %	47,5 %	52,5 %	45 %	55 %	100 %
Υψηλό	Αριθμός	5	7	5	7	6	6	12
	Ποσοστό%	41,7 %	58,3 %	41,7 %	58,3 %	50 %	50%	100 %
Σύνολο	Αριθμός	32	32	32	32	32	32	64
	Ποσοστό%	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	100 %
Chi square test	Value	0,667		1,767		1,733		
	p-value	0,717		0,413		0,420		

β)	Στάδιο κινδύνου	Μετάγραφο 14		Μετάγραφο 20		Σύνολο
		Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	
Χαμηλό	Αριθμός	8	4	8	4	12
	Ποσοστό%	66,7 %	33,3 %	66,7 %	33,3 %	100 %
Ενδιάμεσο	Αριθμός	18	22	18	22	40
	Ποσοστό%	45 %	55 %	45 %	55 %	100 %
Υψηλό	Αριθμός	6	6	6	6	12
	Ποσοστό%	50 %	50%	50 %	50%	100 %
Σύνολο	Αριθμός	32	32	32	32	64
	Ποσοστό%	50 %	50 %	50 %	50 %	100 %
Chi square test	Value	1,733		1,733		
	p-value	0,420		0,420		

Πίνακας 3.13: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της συσχέτισης των μεταγράφων που μελετήθηκαν με LDH α) Αποτελέσματα για τα μετάγραφα βασικό, 7 και 9 β) Αποτελέσματα για τα μετάγραφα 14 και 20

α)		Βασικό Μετάγραφο		Μετάγραφο 7		Μετάγραφο 9		Σύνολο
Συγκέντρωση LDH ορού		Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	
Φυσιολογική	Αριθμός	26	21	27	20	26	21	47
	Ποσοστό%	55,3 %	44,7 %	57,4 %	42,6 %	55,3 %	44,7 %	100 %
Παθολογική	Αριθμός	6	11	5	12	6	11	17
	Ποσοστό%	35,3 %	64,7 %	29,4 %	70,6 %	35,3 %	64,7 %	100%
Σύνολο	Αριθμός	32	32	32	32	32	32	64
	Ποσοστό%	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	100 %
Chi square test	Value	2,003		3,925		2,003		
	p-value	0,157		0,048		0,157		

β)		Μετάγραφο 14		Μετάγραφο 20		Σύνολο
Συγκέντρωση LDH ορού		Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	
Φυσιολογική	Αριθμός	25	22	25	22	47
	Ποσοστό%	53,2 %	46,8 %	53,2 %	46,8 %	100 %
Παθολογική	Αριθμός	7	10	7	10	17
	Ποσοστό%	41,2 %	58,8 %	41,2 %	58,8 %	100%
Σύνολο	Αριθμός	32	32	32	32	64
	Ποσοστό%	50 %	50 %	50 %	50 %	100 %
Chi square test	Value	0,721		0,721		
	p-value	0,396		0,396		

Πίνακας 3.14: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της συσχέτισης των μεταγράφων που μελετήθηκαν με την δείκτη CD38 α) Αποτελέσματα για τα μεταγράφα βασικό, 7 και 9 β) Αποτελέσματα για τα μεταγράφα 14 και 20

α)	Δείκτης CD38	Βασικό Μετάγραφο		Μετάγραφο 7		Μετάγραφο 9		Σύνολο
		Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	
≤ 30 %	Αριθμός	27	27	25	29	27	27	54
	Ποσοστό%	50 %	50 %	46,3 %	53,7 %	50 %	50 %	100 %
>30 %	Αριθμός	5	5	7	3	5	5	10
	Ποσοστό%	50 %	50 %	70 %	30 %	50 %	50 %	100 %
Σύνολο	Αριθμός	32	32	32	32	32	32	64
	Ποσοστό%	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	100 %
Chi square test	Value	0,000		1,896		0,000		
	p-value	1		0,168		1		

β)	Δείκτης CD38	Μετάγραφο 14		Μετάγραφο 20		Σύνολο
		Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	
≤ 30 %	Αριθμός	26	28	25	29	54
	Ποσοστό%	48,1 %	51,9 %	46,3 %	53,7 %	100 %
>30 %	Αριθμός	6	4	7	3	10
	Ποσοστό%	60 %	40 %	70 %	30 %	100%
Σύνολο	Αριθμός	32	32	32	32	64
	Ποσοστό%	50 %	50 %	50 %	50 %	100 %
Chi square test	Value	0,474		1,896		
	p-value	0,491		0,168		

Πίνακας 3.15: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της συσχέτισης των μεταγράφων που μελετήθηκαν με την κατάσταση IGHV α) Αποτελέσματα για τα μετάγραφα βασικό, 7 και 9 β) Αποτελέσματα για τα μετάγραφα 14 και 20

α)		Βασικό Μετάγραφο		Μετάγραφο 7		Μετάγραφο 9		Σύνολο
Κατάσταση IGHV		Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	
Μεταλλαγμένη	Αριθμός	15	18	13	20	15	18	33
	Ποσοστό%	45,5 %	54,5 %	39,4 %	60,6 %	45,5 %	54,5 %	100 %
Μη μεταλλαγμένη	Αριθμός	17	14	19	12	17	14	31
	Ποσοστό%	54,8 %	45,2 %	61,3 %	38,7 %	54,8 %	45,2 %	100 %
Σύνολο	Αριθμός	32	32	32	32	32	32	64
	Ποσοστό%	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	100 %
Chi square test	Value	0,563		3,065		0,563		
	p-value	0,453		0,080		0,453		

β)		Μετάγραφο 14		Μετάγραφο 20		Σύνολο
Κατάσταση IGHV		Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	
Μεταλλαγμένη	Αριθμός	18	15	20	13	33
	Ποσοστό%	54,5 %	45,5 %	60,6 %	39,4 %	100%
Μη μεταλλαγμένη	Αριθμός	14	17	12	19	31
	Ποσοστό%	45,2 %	54,8 %	38,7 %	61,3 %	100%
Σύνολο	Αριθμός	32	32	32	32	64
	Ποσοστό%	50 %	50 %	50 %	50 %	100 %
Chi square test	Value	0,563		3,065		
	p-value	0,453		0,080		

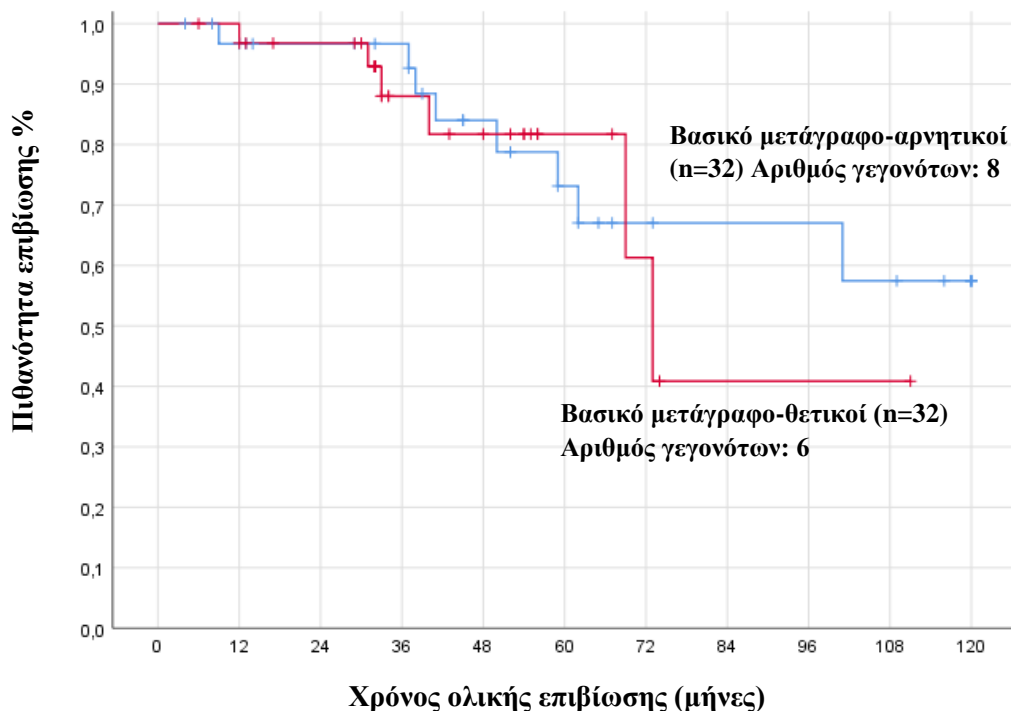
3.3.3 Ανάλυση Ολικής Επιβίωσης KAPLAN-MEIER

Σημαντικό κομμάτι της βιοστατιστικής ανάλυσης αποτελούν οι καμπύλες ολικής επιβίωσης κατά Kaplan Meier οι οποίες παρουσιάζουν την πιθανότητα ολικής επιβίωσης (OS) συναρτήσει του χρόνου επιβίωσης. Στην παρούσα μελέτη, αυτό που εξετάστηκε είναι αν υπάρχει κάποια διαφορά στην επιβίωση ανάμεσα σε ασθενείς που εκφράζουν ένα συγκεκριμένο μεταγγραφο RNase κ σε υψηλά επίπεδα και ασθενείς που έχουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου μεταγράφου. Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 3.3.2 με βάση το βέλτιστο σημείο λήψης απόφασης οι 64 ασθενείς χωρίστηκαν σε 32 ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης και σε 32 ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης ενός συγκεκριμένου μεταγράφου. Για τον έλεγχο στατιστικής σημαντικότητας χρησιμοποιήθηκε το log-rank test.

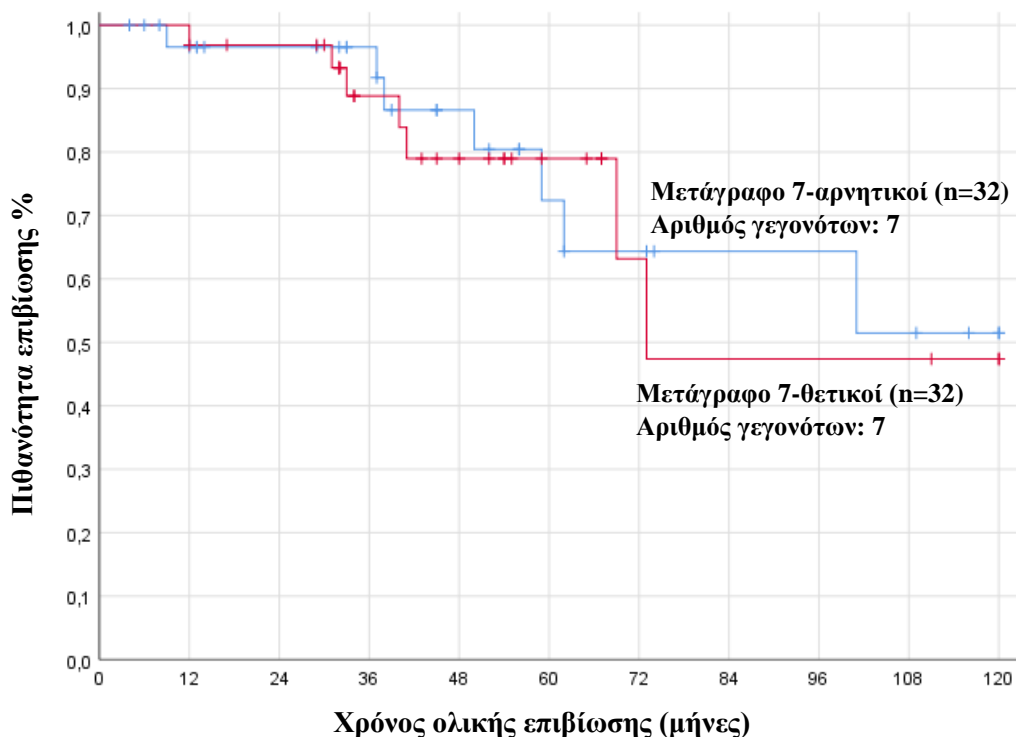
Από την ανάλυση επιβίωσης προέκυψε πως κανένα από τα μεταγγραφα που μελετήθηκαν δεν σχετίζεται με διαφορά στην ολική επιβίωση των ασθενών ($p > 0,005$). Συνεπώς, τα προς μελέτη μεταγγραφα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί βιοδείκτες για την επιβίωση των ασθενών με ΧΛΛ. Στον πίνακα 3.16 συνοψίζονται τα δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση επιβίωσης για κάθε μεταγγραφο. Στη συνέχεια, στις εικόνες 3.25-3.29 παρατίθενται οι καμπύλες επιβίωσης για κάθε μεταγγραφο της μελέτης.

Πίνακας 3.16 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της ανάλυσης επιβίωσης για όλα τα μεταγγραφα που μελετήθηκαν

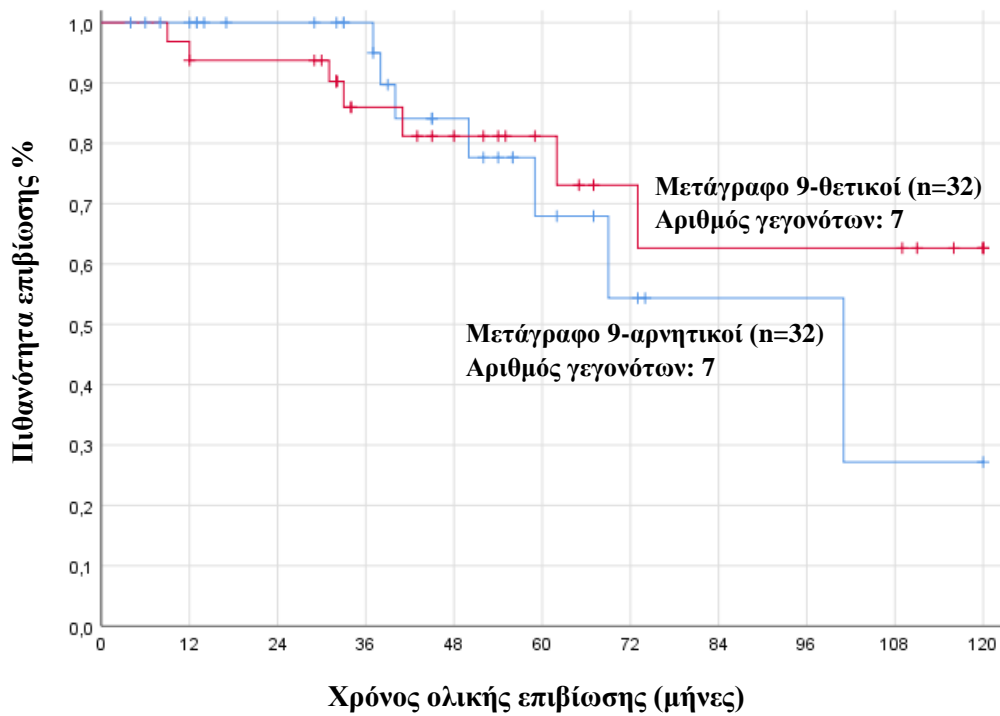
Μεταγγραφο		Αριθμός ατόμων	Αριθμός γεγονότων	Μέση Επιβίωση (μήνες)	p-value
Βασικό	Θετικοί	32	6	80,087	0,661
	Αρνητικοί	32	8	93,550	
7	Θετικοί	32	7	86,240	0,866
	Αρνητικοί	32	7	91,638	
9	Θετικοί	32	7	92,936	0,674
	Αρνητικοί	32	7	84,493	
14	Θετικοί	32	7	88,459	0,852
	Αρνητικοί	32	7	89,683	
20	Θετικοί	32	8	80,714	0,240
	Αρνητικοί	32	6	97,587	



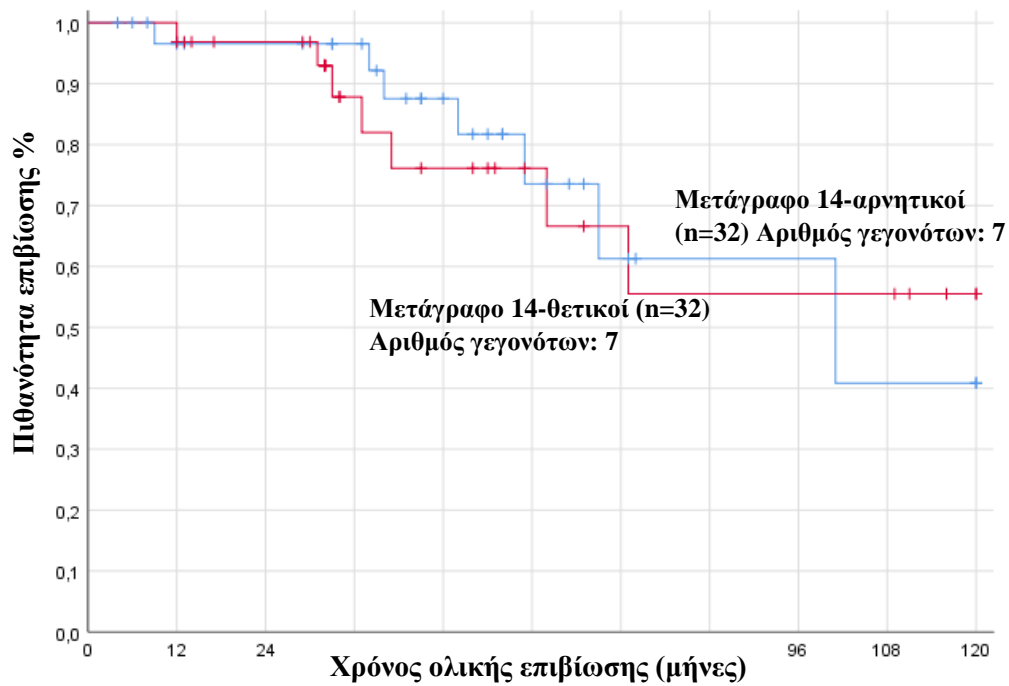
Εικόνα 3.25: Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για το **βασικό μετάγραφο** σε ασθενείς με ΧΛΛ, $p=0,866$



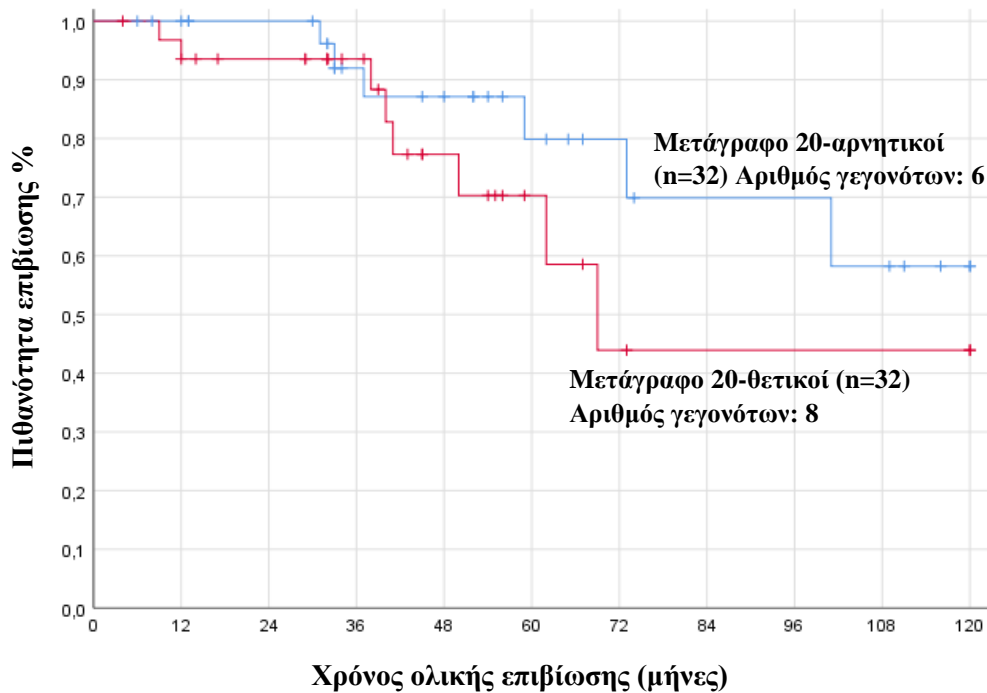
Εικόνα 3.26: Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για το **μετάγραφο 7** σε ασθενείς με ΧΛΛ, $p=0,661$



Εικόνα 3.27: Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για το **μετάγραφο 9** σε ασθενείς με ΧΛΛ, $p=0,674$



Εικόνα 3.28: Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για το **μετάγραφο 14** σε ασθενείς με ΧΛΛ, $p=0,852$



Εικόνα 3.29: Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για το **μετάγραφο 20** σε ασθενείς με ΧΛΛ, $p=0,240$

Η μονοπαραγοντική παλινδρόμηση Cox έδειξε πως δεν υπάρχει διαφορά στον κίνδυνο θανάτου ανάμεσα σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης και σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης ενός μεταγράφου της RNase κ. Συμπερασματικά επιβεβαιώνεται πως τα προς μελέτη μετάγραφα της RNase κ δεν διαθέτουν προγνωστική αξία για την πρόβλεψη της επιβίωσης των ασθενών με ΧΛΛ. Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση Cox (μοντέλο αναλογικών κινδύνων Cox) στην οποία τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων (θετικοί-αρνητικοί) συνδυάστηκαν σ' ένα προγνωστικό μοντέλο μαζί με τη σταδιοποίηση της νόσου, την έκφραση του CD38, την κατάσταση της IGHV περιοχής και το στάδιο κινδύνου. Η ανάλυση οδήγησε στην παρατήρηση πως κανένα από τα μετάγραφα της μελέτης δεν μπορεί να αποτελέσει ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη στην ΧΛΛ. Στον πίνακα 3.17 παρατίθενται τα αποτελέσματα της μονοπαραγοντικής ανάλυσης COX και στον πίνακα 3.18 παρουσιάζονται ενδεικτικά δύο παραδείγματα της πολυπαραγοντικής ανάλυσης κατά Cox. Το στατιστικό τεστ bootstrab ενίσχυσε τα αποτελέσματα της ανάλυσης Cox, ότι δηλαδή τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων της RNases κ δεν εμφανίζουν προγνωστική αξία στη ΧΛΛ.

Πίνακας 3.16: Αποτελέσματα της μονοπαραγοντικής παλινδρόμησης Cox για την διερεύνηση της έκφρασης των μεταγράφων της RNases ως προγνωστικοί δείκτες στην ΧΛΛ

Έκφραση μεταγράφου	Λόγος κινδύνου Hazard ratio (HR)	95 % Διάστημα εμπιστοσύνης	p-value	BCa Bootstrap 95% CI	p-value Bootstrap
Βασικό	1,275	0,430-3,779	0,662	0,432-3,579	0,660
7	1,095	0,382-3,142	0,886	0,304-3,586	0,860
9	0,797	0,277-2,298	0,675	0,247-2,394	0,684
14	1,105	0,384-3,180	0,852	0,322-3,281	0,587
20	1,888	0,644-5,539	0,247	0,593-7,815	0,254

Πίνακας 3.17: Ενδεικτικά αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής παλινδρόμησης Cox για την έκφραση των μεταγράφων της RNases κ και άλλων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών ως προγνωστικοί δείκτες στη ΧΛΛ α) Βασικό Μετάγραφο β) Μετάγραφο 7

α)

Μεταβλητή	Λόγος κινδύνου Hazard ratio (HR)	95 % Διάστημα εμπιστοσύνης	p-value	BCa Bootstrap 95% CI	p-value Bootstrap
Έκφραση Βασικού Μεταγράφου	1,066	1,415-26,443	0,911	0,302-5,894	0,905
Στάδιο Κινδύνου	2,626	2,552-1565,562	0,066	0,624-35,093	0,060
Έκφραση CD38	2,897	2,465-11003,845	0,074	0,368-2,52x10 ⁶	0,115
Κατάσταση IGHV	2,282	1,553-1,37x10 ⁶	0,326	0,136-2,5x10 ⁶	0,232

β)

Μεταβλητή	Λόγος κινδύνου Hazard ratio (HR)	95 % Διάστημα εμπιστοσύνης	p-value	BCa Bootstrap 95% CI	p-value Bootstrap
Έκφραση Μεταγράφου 7	0,958	1,309-30,144	0,947	0,131-8,568	0,943
Στάδιο Κινδύνου	2,553	2,226-3,4x10 ⁴	0,113	0,436-157,590	0,106
Έκφραση CD38	2,978	2,474-1,8x10 ⁵	0,072	0,282-5,4 x10 ⁶	0,113
Κατάσταση IGHV	2,325	1,522-3,9 x10 ⁶	0,334	7,9x10 ⁻⁴ -1,2 x10 ⁷	0,223

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία είναι η πιο συχνή μορφή λευχαιμίας στους ενήλικες των Δυτικών χωρών. Χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση μονοκλωνικών, φαινομενικά ώριμων Β λεμφοκυττάρων με συγκεκριμένο ανοσοφαινότυπο, που περιλαμβάνει τα αντιγόνα επιφανείας CD19 και CD20 καθώς και τα CD5 και CD23. Σταδιακά τα καρκινικά λεμφοκύτταρα συσσωρεύονται στην κυκλοφορία του αίματος, σε δευτερογενείς λεμφικούς ιστούς και στον μυελό των οστών. Η διάγνωση προϋποθέτει την παρουσία $>5 \times 10^9/L$ Β λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος. Η κλινική εικόνα των ασθενών διαφέρει, κάποιοι ασθενείς εμφανίζουν επιθετική νόσο και χρειάζονται θεραπεία ενώ άλλοι έχουν ήπια μορφή. Στην περίπτωση της ήπιας μορφής, δεν ξεκινά αμέσως θεραπεία αλλά γίνεται παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου. Κάποιοι μπορεί να μην χρειαστούν ποτέ θεραπεία, όμως τελικά στις περισσότερες περιπτώσεις αργά ή γρήγορα είναι αναγκαία η θεραπεία. Η διαφορετική εικόνα των ασθενών αντικατοπτρίζει την ετερογένεια των μοριακών και γενετικών παραγόντων που συμβάλλουν στην παθοφυσιολογία της νόσου. Ένας σημαντικός παράγοντας που εμπλέκεται στη βιολογία της είναι η ύπαρξη ή όχι μεταλλάξεων στην υπερμεταβλητή περιοχή του γονιδίου της ανοσοσφαιρίνης (IGHV). Επιπρόσθετα στη μοριακή παθογένεια συμμετέχουν χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, με τις επικρατέστερες να είναι η διαγραφή 13q (55% των περιπτώσεων), η διαγραφή 17p (7%), η διαγραφή 11q (6%-18%) και η τρισωμία 12 (12%-16%). Κάθε μια από αυτές επηρεάζει σημαντικά γονίδια όπως για παράδειγμα στην del11q επηρεάζονται τα BIRC3 και ATM γονίδια. Στην del17p επηρεάζεται το TP53 γονίδιο ενώ στην del13q επηρεάζονται τα γονίδια miR15 και miR16, που κωδικοποιούν μη κωδικά RNAs. Η τεχνολογία του NGS οδήγησε στην εύρεση και άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στη νόσο όπως NOTCH1, MYD88 και SF3B1. Τα υπάρχοντα συστήματα σταδιοποίησης κατά Binet και κατά Rai δεν συμπεριλαμβάνουν τα μοριακά και γενετικά ευρήματα. Διάφορες μελέτες κατά καιρούς, έχουν αξιολογήσει κατά πόσο ο εντοπισμός των χρωμοσωμικών ανωμαλιών και των γονιδιακών μεταλλάξεων στους ασθενείς μπορεί να συμβάλλει στην πρόγνωση και στην επιλογή της θεραπείας. Όντως, τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ολοένα και περισσότερο την άποψη πως το γενετικό και μοριακό προφίλ κάθε ασθενούς παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόγνωση της πορείας και της έκβασης της νόσου. Ένας από τους πιο σημαντικούς προγνωστικούς δείκτες είναι η κατάσταση IGHV η οποία παραμένει σταθερή κατά την διάρκεια της νόσου. Έχει παρατηρηθεί πως ασθενείς με μη μεταλλαγμένα γονίδια IGHV συνδέονται με χειρότερη πρόγνωση, χρειάζονται

νωρίτερα θεραπεία και έχουν μειωμένη ολική επιβίωση (47). Λόγω λοιπόν της μεγάλης ετερογένειας που χαρακτηρίζει την ΧΛΛ, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη για εύρεση νέων δεικτών με διαγνωστικό, προγνωστικό ή και προβλεπτικό χαρακτήρα.

Οι ριβονουκλεάσες είναι ένζυμα που διασπών τα RNAs σε μικρότερα τμήματα μέσω της κατάλυσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Η λειτουργία τους είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης των επιπέδων του RNA στο κύτταρο. Η αποικοδόμηση και η επεξεργασία των μορίων RNA έχουν καθοριστική σημασία για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Στον καρκίνο οι ριβονουκλεάσες μπορούν να έχουν είτε επαγωγικό ρόλο μέσω της αποικοδόμησης του mRNA ογκοκατασταλτικών γονιδίων, είτε κατασταλτικό ρόλο μέσω της μειωμένης αποικοδόμησης του mRNA ογκογονιδίων. Η ριβονουκλεάση κ είναι μια εξειδικευμένη ενδοριβονουκλεάση που κόβει τον φωσφοδιεστερικό δεσμό ανάμεσα σε AU και AG θέσεις της μονόκλωνης αλυσίδας του RNA. Οι αλληλουχίες ESTs έδειξαν πως το ανθρώπινο μετάγραφο της RNase κ, εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς και τα αναπτυξιακά στάδια. Μάλιστα, εκφράζεται όχι μόνο σε υγιείς αλλά και σε καρκινικούς ιστούς (116). Αυξημένα επίπεδα του γονιδίου της RNase κ έχουν βρεθεί σε περιπτώσεις μεταστατικού μελανώματος, επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών, καρκίνου μαστού, μεταστατικού καρκίνου του προστάτη και σε καρκινικά κύτταρα προστάτη ενδοθηλιακής προέλευσης. Επίσης υπερέκφραση παρατηρήθηκε στο καρκίνωμα των νεφρικών κυττάρων και στον κολορθικό καρκίνο. Από την άλλη, σε περιπτώσεις μυελογενούς λευχαιμίας, πολλαπλού μυελώματος και κακοήθειας στην ωοθηκική ενδομητρίωση, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης της RNase κ. Μετά την ανακάλυψη των νέων εναλλακτικών μεταγράφων της RNase κ πραγματοποιήθηκαν μελέτες στο εργαστήριο μας με σκοπό να αξιολογηθεί η συσχέτιση τους με τον καρκίνο και η πιθανή χρήση τους ως βιοδείκτες. Λαμβάνοντας υπόψη τον ουσιώδη ρόλο των ριβονουκλεασών στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης συμπεραίνουμε την αναγκαιότητα της μελέτης και της εύρεσης νέων, κυρίως προγνωστικών, βιοδεικτών στον καρκίνο.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία η μελέτη εστιάστηκε στο βασικό μετάγραφο της RNase κ και στα εναλλακτικά μετάγραφα 7, 9, 14 και 20. Η έκφραση των επιπέδων των μεταγράφων αυτών μελετήθηκε με πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε 64 δείγματα ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και σε 20 δείγματα υγιών ατόμων. Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων ανάμεσα σε υγιείς και ασθενείς που πραγματοποιήθηκε με τον στατιστικό έλεγχο Mann-

Wintey U test έδειξε πως το βασικό μετάγραφο και το μετάγραφο 20 της RNase κ εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς, με $p < 0,001$ και $p = 0,001$ αντίστοιχα. Αντίθετα, το μετάγραφο 9 παρουσιάζει στατιστικώς σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς με ΧΛΛ σε σχέση με τα υγιή άτομα, $p = 0,020$. Για τα μετάγραφα 7 και 14 δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς. Καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως το βασικό μετάγραφο και τα μετάγραφα 9 και 20 θα μπορούσαν πιθανά να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση του λευχαιμικού από το μη λευχαιμικό πληθυσμό. Η πιθανή διαγνωστική αξία του βασικού μεταγράφου και των μεταγράφων 9 και 20 επιβεβαιώθηκε από τις καμπύλες ROC καθώς και από τη λογιστική παλινδρόμηση η οποία αποκάλυψε τη συσχέτιση των μεταγράφων αυτών με την εκτίμηση του κινδύνου εμφάνισης της ΧΛΛ.

Με τη συνεχόμενη πρόοδο των μοριακών τεχνικών και την ανάπτυξη της βιοπληροφορικής ανάλυσης γίνεται εφικτή η πραγματοποίηση μελέτης υψηλής απόδοσης (high-throughput screening). Οι μελέτες αυτές οδήγησαν στην παρατήρηση πως τα εναλλακτικά μετάγραφα ενός γονιδίου μπορεί να έχουν διαφορετική λειτουργία απ' ότι το κανονικό μετάγραφο (131). Για παράδειγμα τα αποπτωτικά γονίδια Bcl-x, Caspase-9, Ced-4, Caspase-2/Ich-1 και hTid-1, κωδικοποιούν και αποπτωτικά και αντι-αποπτωτικά μετάγραφα. Σύμφωνα με αυτή την παρατήρηση, μπορούμε να δικαιολογήσουμε τα αυξημένα επίπεδα του μεταγράφου 9 στους ασθενείς με ΧΛΛ. Πιθανά λοιπόν, το μετάγραφο 9 να διαθέτει διαφορετική λειτουργία απ' ότι το βασικό μετάγραφο και το μετάγραφο 20 που βρέθηκαν μειωμένα. Σαφώς, τα μετάγραφα της RNase κ δεν μπορούν να αποτελέσουν ανεξάρτητο δείκτη για την διάγνωση της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας, όμως θα μπορούσαν πιθανά μαζί με άλλους δείκτες να βοηθήσουν στη διαφοροδιάγνωση της ΧΛΛ. Πρόσφατη μελέτη αναφέρει πως η RNase κ έχει στατιστικώς σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη συγκριτικά με ασθενείς που εμφανίζουν καλοήγη υπερπλασία προστάτη. Επομένως φαίνεται πως η RNase κ διαθέτει την ικανότητα να διακρίνει αυτές τις δύο ομάδες ασθενών (124).

Κατά καιρούς έχουν εντοπιστεί πολλά γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο και παρουσιάζουν εναλλακτικό μάτισμα, μερικά εκ των οποίων παρουσιάζουν πιθανή αξία ως βιοδείκτες. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα του ειδικού προστατικού αντιγόνου PSA, του οποίου η συγκέντρωση αυξάνεται στην περίπτωση του καρκίνου του προστάτη. Το PSA είναι προϊόν του γονιδίου της καλλιкреΐνης 3 και αποτελεί εγκεκριμένο δείκτη

διάγνωσης. Το γονίδιο της καλλικρεΐνης 2 μετά από εναλλακτικό μάτισμα δίνει το προϊόν hK2 το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά με το PSA για την διαφοροδιάγνωση του καρκίνου του προστάτη από την καλοήγη υπερπλασία του προστάτη. Επίσης, το προϊόν hK2 βοηθά στη διερεύνηση εάν ο καρκίνος είναι περιορισμένος στον προστάτη ή εάν εκτείνεται πέραν των ορίων του προστάτη, σε άλλα όργανα όπως σπερματοδόχους κύστες και ουροδόχο κύστη (132). Άλλη περίπτωση γονιδίου είναι το CD44 το οποίο κωδικοποιεί έναν κυτταρικό υποδοχέα που συμμετέχει σε πολλές λειτουργίες και έχει βρεθεί σε πολλά μεταστατικά καρκινικά κύτταρα. Το εναλλακτικό μετάγραφο CD44v10 φαίνεται να μπορεί να διακρίνει τα μεταστατικά από τα μη μεταστατικά καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος (127). Ένα άλλο εναλλακτικό μετάγραφο του ίδιου γονιδίου, το CD44v6 έχει συσχετισθεί θετικά με προχωρημένα στάδια στον καρκίνο του στομάχου, και μάλιστα, ασθενείς που εκφράζουν το μετάγραφο αυτό εμφανίζουν επιβίωση λιγότερη από 5 χρόνια (128).

Από τα μετάγραφα που μελετήθηκαν (βασικό, 7, 9, 14 και 20) μόνο το βασικό μετάγραφο εμφανίζει συσχέτιση με τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων και τον αριθμό των λεμφοκυττάρων. Η αρνητική συσχέτιση που παρατηρήθηκε είναι αναμενόμενη, καθώς στη ΧΛΛ ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων και των λεμφοκυττάρων είναι αυξημένος ενώ, όπως προέκυψε από την μελέτη, το βασικό μετάγραφο εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στους ασθενείς. Επίσης, κανένα από τα μετάγραφα δεν εμφάνισε σημαντική συσχέτιση με την ηλικία, τα επίπεδα της αννεξίνης (%) και τα επίπεδα του CD38(%). Ωστόσο, παρατηρήθηκε πως η έκφραση κάθε μεταγράφου συσχετίζεται με την έκφραση των υπόλοιπων μεταγράφων. Επιπρόσθετα, η δισδιάστατη ανάλυση και οι πίνακες διπλής εισόδου έδειξαν πως γυναίκες με ΧΛΛ συνδέονται με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 9. Ακόμη, η ανάλυση αυτή έδειξε πως η χαμηλή έκφραση του μεταγράφου 7 συνδέεται με μη φυσιολογικές τιμές LDH στον ορό ασθενών με ΧΛΛ. Από τα υπόλοιπα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική σύνδεση με τα υψηλά ή τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων.

Η ετερογένεια στην περίπτωση του καρκίνου δεν αφορά μόνο το διαφορετικό προφίλ των ατόμων, αλλά και εντός του όγκου τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν και μεταλλάσσονται κατά την εξέλιξη της νόσου. Η ετερογένεια αυτή, υποδηλώνει την ανάγκη για εύρεση νέων βιοδεικτών υψηλής ειδικότητας και ευαισθησίας που να μπορούν να δώσουν στοιχεία για το δυναμικό ανάπτυξης του όγκου ή που να σχετίζονται με την

μετάσταση. Τα τελευταία χρόνια, επιστημονική και ιατρική κοινότητα στρέφονται προς την εξατομικευμένη προσέγγιση. Οι μοριακοί βιοδείκτες συμβάλλουν στην δημιουργία του προφίλ κάθε ασθενούς, με απώτερο σκοπό την καλύτερη θεραπευτική αντιμετώπιση.

Ένας από τους βασικούς σκοπούς αυτής της διπλωματικής εργασίας ήταν η αξιολόγηση των μεταγράφων της RNase κ ως προς την προγνωστική τους αξία. Μετά από τη στατιστική ανάλυση και τις καμπύλες ολικής επιβίωσης προέκυψε πως οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης και οι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων της RNase κ, δεν έχουν ουσιαστική διαφορά στην ολική τους επιβίωση. Επομένως, κανένα από τα μεταγράφα της RNase κ που εξετάστηκαν, δεν παρουσιάζει προγνωστικό ρόλο στην ΧΛΛ. Ωστόσο, στον καρκίνο του προστάτη δεδομένα από καμπύλες επιβίωσης ασθενών που έφεραν την λιγότερο επιθετική μορφή της νόσου, δείχνουν πως όσοι ασθενείς υπερεκφράζουν την RNase κ έχουν μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερου εξέλιξης της νόσου (progression-free survival, PFS), συγκριτικά με τους ασθενείς με τη χαμηλότερη έκφραση της RNase κ (124). Από την άλλη, έχει βρεθεί πως γυναίκες με καρκίνο των ωοθηκών που έχουν αυξημένα επίπεδα RNase κ συνδέονται με μικρότερο διάστημα ολικής επιβίωσης (133).

Στην βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες που υποστηρίζουν πως οι ριβονουκλεάσες διαθέτουν σημαντικό ρόλο στην κλινική αξιολόγηση των ασθενών. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ριβονουκλεάσης που φαίνεται να διαθέτει προγνωστική αξία είναι η Dicer, μέλος της οικογένειας των ριβονουκλεασών III. Σε αρκετούς τύπους καρκίνου, τα χαμηλά επίπεδα Dicer έχουν συσχετιστεί με διεισδυτικότητα, επανεμφάνιση του όγκου και μειωμένη ολική επιβίωση (134). Ειδικότερα, σε μελέτη των επιπέδων έκφρασης του μεταγράφου της Dicer σε ασθενείς με ΧΛΛ, παρατηρήθηκε πως ασθενείς με χαμηλότερη έκφραση του mRNA της Dicer είχαν στατιστικώς σημαντική μειωμένη ολική επιβίωση και μειωμένη επιβίωση χωρίς θεραπεία (treatment-free survival) (135). Ακόμη ένα παράδειγμα ριβονουκλεάσης που εξετάστηκε για την προγνωστική του αξία στον καρκίνο, είναι η αγγειογενίνη. Σε συμπαγείς όγκους έχει βρεθεί σε αυξημένα επίπεδα και συσχετίστηκε με κακή πρόγνωση (108). Τα επίπεδα της μελετήθηκαν και σε αιματολογικές κακοήθειες. Στη μυελογενή λευχαιμία και στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, ασθενείς με αυξημένα επίπεδα αγγειογενίνης στον ορό εμφάνισαν μεγαλύτερη ολική επιβίωση συγκριτικά με τους ασθενείς που είχαν μειωμένη έκφραση αγγειογενίνης. Επιπρόσθετα, τα αυξημένα επίπεδα της αγγειογενίνης στον ορό ασθενών με ΧΛΛ σε πρώιμα στάδια, φαίνεται πως συνδέονται με μεγαλύτερη κατά 5 χρόνια επιβίωση ελεύθερη

εξέλιξης νόσου (progression-free survival) σε σχέση με τους ασθενείς με χαμηλότερα επίπεδα αγγειογενίνης (136).

Από τη μονοπαραγοντική παλινδρόμηση Cox επιβεβαιώθηκε πως τα μετάγραφα δεν διαθέτουν πιθανή προγνωστική αξία στη ΧΛΛ καθώς δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην επιβίωση ανάμεσα σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης και σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων. Επίσης, η αξιολόγηση της πιθανής ανεξάρτητης προγνωστικής αξίας των μεταγράφων μέσω διάφορων πολυπαραγοντικών μοντέλων επιβεβαίωσε πως τα μετάγραφα αυτά δεν διαθέτουν ανεξάρτητο προγνωστικό χαρακτήρα στη νόσο ΧΛΛ.

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκαν μόνο το βασικό μετάγραφο και τα εναλλακτικά μετάγραφα 7, 9, 14, 20. Μελλοντικά, θα μπορούσε να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος των μεταγράφων αυτών σε μεγαλύτερο αριθμό λευχαιμικών δειγμάτων, για μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Επίσης, αξίζει να μελετηθούν και τα υπόλοιπα εναλλακτικά μετάγραφα της RNase κ για την πιθανή εμπλοκή τους στη ΧΛΛ. Επιπλέον, θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμο να μελετηθεί κατά πόσο τα μετάγραφα της RNase κ διαθέτουν προβλεπτικό χαρακτήρα, αν δηλαδή τα μετάγραφα αυτά έχουν την ικανότητα να προβλέψουν την θεραπευτική ανταπόκριση ή την ευαισθησία των ασθενών σε φαρμακευτικά σκευάσματα.

Μελέτη της έκφρασης εναλλακτικών μεταγράφων της RNase κ στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Μαρία Ποταμού

Περίληψη

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία αποτελεί αιματολογική κακοήθεια που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση των Β λεμφοκυττάρων. Η νόσος εξελίσσεται αργά και επηρεάζει κυρίως άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Η παθογένεια της νόσου περιλαμβάνει γενετικές και μοριακές αλλαγές, η παρουσία των οποίων ποικίλλει στους ασθενείς. Οι ριβονουκλεάσες είναι βασικά ένζυμα που συμμετέχουν στον μεταβολισμό του RNA και παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές λειτουργίες των κυττάρων. Μέσα από διάφορες μελέτες υπογραμμίζεται η εμπλοκή των ενζύμων αυτών στην καρκινογένεση και διερευνάται η πιθανή τους χρήση ως προγνωστικοί δείκτες ή ως θεραπευτικοί στόχοι. Η ριβονουκλεάση κ ανήκει στην κατηγορία των ενδοριβονουκλεασών και σε επίπεδο mRNA εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια. Ο βιολογικός της ρόλος παραμένει ακόμη άγνωστος, ωστόσο φαίνεται ότι συμμετέχει στην είσοδο ιών στα κύτταρα του ξενιστή μέσω ενδοκύτωσης. Πρόσφατα, πειράματα αλληλούχησης νέας γενιάς οδήγησαν στην ανακάλυψη οχτώ νέων εναλλακτικών μεταγράφων της ριβονουκλεάσης κ.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη των επιπέδων έκφρασης και η κλινική αξιολόγηση των μεταγράφων της ριβονουκλεάσης κ σε ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Η μελέτη εστιάστηκε στο βασικό μετάγραφο της ριβονουκλεάσης κ και στα εναλλακτικά μετάγραφα 7, 9, 14 και 20. Για τον σκοπό αυτό καλλιεργήθηκαν καρκινικές κυτταρικές σειρές προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στην συνέχεια ως βαθμονομητές στα πειράματα ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time qPCR). Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 84 δείγματα RNA που απομονώθηκαν από τα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος 64 ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και 20 υγιών ατόμων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του cDNA μέσω της αντίστροφης μεταγραφής και ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός των προς μελέτη μεταγράφων της ριβονουκλεάσης κ με αντιδράσεις real time qPCR με την χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green

I. Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων μεταξύ ασθενών και υγιών, για τη συσχέτιση των μεταγράφων με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών καθώς επίσης και ανάλυση ολικής επιβίωσης Kaplan-Meier.

Η στατιστική ανάλυση οδήγησε στην παρατήρηση πως το βασικό μετάγραφο και το εναλλακτικό μετάγραφο 20 της ριβονουκλεάσης κ εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς σε σχέση με τα υγιή άτομα. Αντίθετα το εναλλακτικό μετάγραφο 9 παρουσιάζει στατιστικώς σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς. Για τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων 7 και 14 δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα στα λευχαιμικά και μη λευχαιμικά δείγματα. Οι καμπύλες ROC αποκάλυψαν την πιθανή χρήση του βασικού μεταγράφου και των μεταγράφων 9 και 20 ως βιοδείκτες για την διάκριση του λευχαιμικού από τον μη λευχαιμικό πληθυσμό. Από τη συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία φάνηκε πως το βασικό μετάγραφο εμφανίζει στατιστικώς σημαντική αρνητική συσχέτιση με τον αριθμό των λεμφοκυττάρων και των λευκών αιμοσφαιρίων. Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier έδειξε πως κανένα από τα μετάγραφα της ριβονουκλεάσης κ που μελετήθηκαν δεν εμφανίζει προγνωστική αξία καθώς δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στην ολική επιβίωση ανάμεσα σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης και σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης ενός συγκεκριμένου μεταγράφου.

Συμπερασματικά, από τα μετάγραφα της ριβονουκλεάσης κ που μελετήθηκαν (βασικό, 7, 9,14 ,20) μόνο το βασικό μετάγραφο και τα εναλλακτικά μετάγραφα 9 και 20 μπορούν να συσχετισθούν με τη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Επίσης, κανένα από τα μετάγραφα δεν διαθέτει πιθανή προγνωστική αξία για την ολική επιβίωση των ασθενών. Ωστόσο, χρειάζεται μελέτη των μεταγράφων σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων για τη διεξαγωγή πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Study of RNase κ alternative transcripts expression levels
in chronic lymphocytic leukemia

Maria Potamou

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia is a hematological malignancy characterized by the accumulation of B lymphocytes. It is a type of slow-growing leukemia and mostly affects older people. The pathogenesis of the disease involves various genetic and molecular changes, the presence of which varies in patients. Ribonucleases are essential enzymes involved in RNA metabolism and play important role in many cell functions. Various studies highlight the involvement of these enzymes in carcinogenesis and analyze their possible use as prognostic biomarkers or as therapeutic targets. Ribonuclease κ (kappa) is an endoribonuclease which is expressed in all tissues and at all developmental stages. Its biological role it's still unknown, however it seems to be involved in virus's entry into host-cells via endocytosis. Recently, new generation sequencing experiments have led to the discovery of eight novel RNase κ alternative transcripts.

The aim of this master thesis is the study of the expression levels and clinical evaluation of RNase κ transcripts in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). The research focused on the main transcript and on the alternative transcripts 7, 9, 14 and 20. For this purpose cancer cells lines were cultured in order to be used as calibrators in real time qPCR experiments. A total of 84 RNA samples isolated from peripheral blood mononuclear cells of 64 CLL patients and of 20 healthy individuals. Then, the cDNA was synthesized by reverse transcription. Quantification of the expression levels of RNase κ transcripts was performed by real time qPCR using the fluorescent dye SYBR Green I. Statistical analysis was carried out using SPSS program in order to compare the transcripts' expression levels between CLL patients and healthy individuals and also to correlate the expression levels with the patients' clinicopathological features. In addition, Kaplan-Meier survival analysis was performed.

Statistical analysis showed that the expression levels of the main transcript and transcript 20 were significantly reduced in CLL patients compared to healthy individuals. In contrast,

transcript 9 shows a significant increase in expression levels in patients compared to healthy. Expression levels of transcripts 7 and 14 showed no significant difference between leukemic and non-leukemic population. ROC curves revealed the use of the main transcript and transcripts 9 and 20 as potential biomarkers to distinguish CLL patients from healthy individuals. Correlation analysis between transcripts' expression levels and clinicopathological features of patients with CLL, revealed that the main transcript displays a significant negative correlation with the high white blood cells and lymphocytes count. Kaplan-Meier survival analysis showed that none of the five RNase κ transcripts has any potential prognostic value. That's because there was no significant difference in overall survival between patients with low and patients with high expression levels of a particular transcript.

In conclusion, only the main transcript and alternative transcripts 9 and 20 can be correlated with chronic lymphocytic leukemia. Also, none of the transcripts could be used as prognostic marker in overall survival of CLL patients. However, transcripts need to be studied in larger CLL sample size in order to improve the reliability of the results.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Γεράσιμος Α. Πάγκαλης, «Αιματολογία στη κλινική πράξη», 1^η έκδοση, Εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα, 2003
2. Widmaier, E. P., Raff, H., Strang, K. T., & Vander, A. J. (2008). *Vander's Human physiology: the mechanisms of body function*. Boston: McGraw-Hill Higher Education,.
3. Terese Winslow LLC, Medical and Scientific Illustration [Internet]. [cited 2020 Dec 4]. Available from: <https://www.teresewinslow.com/>
4. Kampen KR. The discovery and early understanding of leukemia. *Leuk Res*. 2012;36(1):6–13.
5. GCO. Global Cancer Observatory. Vol. 593, Malaysia Cancer Statistics. 2019. p. 1–2.
6. Home | Leukaemia Care [Internet]. [cited 2020 Dec 4]. Available from: <https://www.leukaemiacare.org.uk/>
7. Blood Cancer UK | We're here to beat blood cancer [Internet]. [cited 2020 Dec 4]. Available from: <https://bloodcancer.org.uk/>
8. Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(26):6306–15.
9. Munir T. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology*. 2015;20(4):245–6.
10. Boelens J, Lust S, Vanhoecke B, Offner F. Chronic lymphocytic leukaemia. *Anticancer Res*. 2009;29(2):605–15.
11. Idelhema | Ίδρυμα Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρίας [Internet]. [cited 2020 Dec 4]. Available from: <http://idelhema.gr/>
12. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*. 2019;94(11):1266–87.
13. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, et al. Guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*. 1996;87(12):4990–7.
14. Scarfò L, Ferreri AJM, Ghia P. Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;104:169–82.
15. Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2009;10(1):37–50.
16. Hamblin BTJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V.

- Blood. 1999;94(6):1848–54.
17. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1840–7.
 18. Vardi A, Agathangelidis A, Sutton LA, Ghia P, Rosenquist R, Stamatopoulos K. Immunogenetic studies of chronic lymphocytic leukemia: Revelations and speculations about ontogeny and clinical evolution. *Cancer Res*. 2014;74(16):4211–6.
 19. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J, et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2004;200(4):519–25.
 20. Ghiotto F, Fais F, Valetto A, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2004;113(7):1008–16.
 21. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*. 2010;17(1):28–40.
 22. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio M V., Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(39):13944–9.
 23. Stilgenbauer S, Nickolenko J, Wilhelm J, Wolf S, Weitz S, Döhner K, et al. Expressed sequences as candidates for a novel tumor suppressor gene at band 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Oncogene*. 1998;16(14):1891–7.
 24. Elnenaei MO, Hamoudi RA, Swansbury J, Gruszka-Westwood AM, Brito-Babapulle V, Matutes E, et al. Delineation of the minimal region of loss at 13q14 in multiple myeloma. *Genes Chromosom Cancer*. 2003;36(1):99–106.
 25. Dong JT, Boyd JC, Frierson HF. Loss of heterozygosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer. *Prostate*. 2001;49(3):166–71.
 26. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(26 I):1910–6.
 27. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R, et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: Correlation between

- cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol.* 1996;92(2):382–8.
28. Strati P, Abruzzo L V., Wierda WG, O'Brien S, Ferrajoli A, Keating MJ. Second cancers and Richter transformation are the leading causes of death in patients with trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk.* 2015;15(7):420–7.
 29. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, Alder H, Rassenti LZ, Kipps TJ, et al. NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood.* 2012;119(2):329–31.
 30. Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S, Marinelli M, Tavoraro S, Gabrielli S, et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica.* 2012;97(3):437–41.
 31. Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, Fischer K, et al. 11q Deletions Identify a New Subset of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Characterized by Extensive Nodal Involvement and Inferior Prognosis. *Blood.* 1997;89(7):2516–22.
 32. Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: Regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(4):197–210.
 33. Austen B, Skowronska A, Baker C, Powell JE, Gardiner A, Oscier D, et al. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol.* 2007;25(34):5448–57.
 34. Skowronska A, Parker A, Ahmed G, Oldreive C, Davis Z, Richards S, et al. Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom leukemia research fund chronic lymphocytic leukemia 4 trial. *J Clin Oncol.* 2012;30(36):4524–32.
 35. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;119(12):2854–62.
 36. Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: What questions remain to be explored? *Cell Death Differ.* 2006;13(6):1027–36.
 37. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature.*

- 2015;526(7574):525–30.
38. Edelmann J, Holzmann K, Miller F, Winkler D, Bühler A, Zenz T, et al. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood*. 2012;120(24):4783–94.
 39. Byrd JC, Gribben JG, Peterson BL, Grever MR, Lozanski G, Lucas DM, et al. Select high-risk genetic features predict earlier progression following chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab in chronic lymphocytic leukemia: Justification for risk-adapted therapy. *J Clin Oncol*. 2006;24(3):437–43.
 40. Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, et al. p53 Gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*. 1995;85(6):1580–9.
 41. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, Spina V, Fangazio M, Forconi F, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119(2):521–9.
 42. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475(7354):101–5.
 43. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(3):145–62.
 44. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and Other Novel Cancer Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365(26):2497–506.
 45. Rossi D, Brusca A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: Association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*. 2011;118(26):6904–8.
 46. Endo T, Nishio M, Enzler T, Cottam HB, Fukuda T, James DF, et al. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF- κ B pathway. *Blood*. 2007;109(2):703–10.
 47. Bosch F, Dalla-Favera R. Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(11):684–701.
 48. Article CR. Chronic lymphocytic leukemia : from molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies. 2020;105(9):2205–17.
 49. Vinolas N, Reverter JC, Urbano-Ispizua A, Montserrat E, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: An update of its prognostic

- significance. *Blood Cells*. 1987;12(2):457–64.
50. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S, et al. Serum β 2-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma*. 1996;22(5–6):439–47.
 51. Rossi D, Cerri M, Capello D, Deambrogi C, Rossi FM, Zucchetto A, et al. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol*. 2008;142(2):202–15.
 52. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev*. 2008;88(3):841–86.
 53. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002;99(3):1023–9.
 54. Negishi I, Motoyama N, Nakayama KI, Nakayama K, Senju S, Hatakeyama S, et al. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature*. 1995;376(6539):435–8.
 55. Dürig J, Nüchel H, Cremer M, Führer A, Halfmeyer K, Fandrey J, et al. ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2003;17(12):2426–34.
 56. Rosenquist R, Cortese D, Bhoi S, Mansouri L, Gunnarsson R. Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: Where do we stand? *Leuk Lymphoma*. 2013;54(11):2351–64.
 57. Hallek M, Shanafelt TD, Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2018;391(10129):1524–37.
 58. Burger JA, O'Brien S. Evolution of CLL treatment — from chemoimmunotherapy to targeted and individualized therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(8):510–27.
 59. dos Santos RF, Quendera AP, Boavida S, Seixas AF, Arraiano CM, Andrade JM. Major 3'–5' Exoribonucleases in the Metabolism of Coding and Non-coding RNA. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2018;159:101–55.
 60. Gupta Shruti SS and KSS. An Overview on Ribonucleases and their Therapeutic Effects. *Insight Med*. 2016;1(1):1–11.
 61. Fang EF, Ng TB. *Biochimica et Biophysica Acta* Ribonucleases of different origins

- with a wide spectrum of medicinal applications. *BBA - Rev Cancer*. 2011;1815(1):65–74.
62. Mironova N, Vlassov V. Surveillance of tumour development: The relationship between tumour-associated RNAs and ribonucleases. *Front Pharmacol*. 2019;10(September):1–24.
 63. Multiplicity R, Deutscher MP. Minireview. 1993;
 64. Parker R, Song H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol*. 2004;11(2):121–7.
 65. Anderson JSJ, Parker R. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SK12 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J*. 1998;17(5):1497–506.
 66. Brown JT, Bai X, Johnson AW. The yeast antiviral proteins Ski2p, Ski3p, and Ski8p exist as a complex in vivo. *Rna*. 2000;6(3):449–57.
 67. Parker R. RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2012;191(3):671–702.
 68. Łabno A, Tomecki R, Dziembowski A. Cytoplasmic RNA decay pathways - Enzymes and mechanisms. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2016;1863(12):3125–47.
 69. Tomecki R, Dziembowski A. Novel endoribonucleases as central players in various pathways of eukaryotic RNA metabolism. *Rna*. 2010;16(9):1692–724.
 70. Kim WC, Lee CH. The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2009;1796(2):99–113.
 71. Sidrauski C, Walter P. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*. 1997;90(6):1031–9.
 72. Schoenberg DR, Maquat LE. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet*. 2012;13(4):246–59.
 73. Stoecklin G, Mühlemann O. RNA decay mechanisms: Specificity through diversity. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2013;1829(6–7):487–90.
 74. Henras AK, Plisson-Chastang C, O'Donohue MF, Chakraborty A, Gleizes PE. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2015;6(2):225–42.
 75. Houseley J, Tollervey D. The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell*. 2009;136(4):763–76.

76. Megel C, Morelle G, Lalande S, Duchêne AM, Small I, Maréchal-Drouard L. Surveillance and cleavage of eukaryotic tRNAs. *Int J Mol Sci.* 2015;16(1):1873–93.
77. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. Nature01957.Pdf. 2003;425(September):1–5.
78. Lee HH, Wang YN, Hung MC. Functional roles of the human ribonuclease A superfamily in RNA metabolism and membrane receptor biology. *Mol Aspects Med.* 2019;70(March):106–16.
79. Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: Form and function. *J Biol Chem.* 2014;289(25):17406–15.
80. Sorrentino S. The eight human “canonical” ribonucleases: Molecular diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. *FEBS Lett.* 2010;584(11):2194–200.
81. Li X-L, Blackford JA, Hassel BA. RNase L Mediates the Antiviral Effect of Interferon through a Selective Reduction in Viral RNA during Encephalomyocarditis Virus Infection. *J Virol.* 1998;72(4):2752–9.
82. Bisbal C, Silhol M, Laubenthal H, Kaluza T, Carnac G, Milligan L, et al. The 2'-5' Oligoadenylate/RNase L/RNase L Inhibitor Pathway Regulates Both MyoD mRNA Stability and Muscle Cell Differentiation. *Mol Cell Biol.* 2000;20(14):4959–69.
83. Li X, Blackford JA, Judge CS, Liu M, Xiao W, Kalvakolanu D V, et al. RNase-L-dependent Destabilization of Interferon-induced mRNAs. 2000;275(12):8880–8.
84. Malathi K, Dong B, Gale M, Silverman RH. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature.* 2007;448(7155):816–9.
85. Casey G, Neville PJ, Plummer SJ, Xiang Y, Krumroy LM, Klein EA, et al. RNASEL Arg462Gln variant is implicated in up to 13% of prostate cancer cases. *Nat Genet.* 2002;32(4):581–3.
86. Krüger S, Silber AS, Engel C, Görgens H, Mangold E, Pagenstecher C, et al. Arg462Gln sequence variation in the prostate-cancer-susceptibility gene RNASEL and age of onset of hereditary non-polyposis colorectal cancer: A case-control study. *Lancet Oncol.* 2005;6(8):566–72.
87. Bartsch DK, Fendrich V, Slater EP, Sina-Frey M, Rieder H, Greenhalf W, et al. RNASEL germline variants are associated with pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2005;117(5):718–22.
88. Naito T, Yokogawa T, Kim HS, Matsuda A, Sasaki T, Fukushima M, et al. An apoptotic pathway of 3'-Ethylnylcytidine(ECyd) involving the inhibition of RNA

- synthesis mediated by RNase L. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. 2006;(50):103–4.
89. Croft A, Tay KH, Boyd SC, Guo ST, Jiang CC, Lai F, et al. Oncogenic activation of MEK/ERK primes melanoma cells for adaptation to endoplasmic reticulum stress. *J Invest Dermatol*. 2014;134(2):488–97.
 90. Gomez BP, Riggins RB, Shajahan AN, Klimach U, Wang A, Crawford AC, et al. Human X-Box binding protein-1 confers both estrogen independence and antiestrogen resistance in breast cancer cell lines. *FASEB J*. 2007;21(14):4013–27.
 91. Carrasco DR, Sukhdeo K, Protopopova M, Sinha R, Enos M, Carrasco DEE, et al. The Differentiation and Stress Response Factor XBP-1 Drives Multiple Myeloma Pathogenesis. *Cancer Cell*. 2007;11(4):349–60.
 92. Guichard C, Pedruzzi E, Fay M, Marie JC, Braut-Boucher F, Daniel F, et al. Dihydroxyphenylethanol induces apoptosis by activating serine/threonine protein phosphatase PP2A and promotes the endoplasmic reticulum stress response in human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2006;27(9):1812–27.
 93. Kraus M, Malenke E, Gogel J, Müller H, Rückrich T, Overkleeft H, et al. Ritonavir induces endoplasmic reticulum stress and sensitizes sarcoma cells toward bortezomib-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(7):1940–8.
 94. Joung HJ, Liao G, Collins JB, Grissom SF, Jetten AM. Farnesol-induced apoptosis in human lung carcinoma cells is coupled to the endoplasmic reticulum stress response. *Cancer Res*. 2007;67(16):7929–36.
 95. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2820389/pdf/nihms105586.pdf>. *Science* (80-). 2008;321(5897).
 96. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad I Ben, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2012;44(6):694–8.
 97. Sheng J, Xu Z. Three decades of research on angiogenin: A review and perspective. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2016;48(5):399–410.
 98. Shimoyama S, Gansauge F, Gansauge S, Negri G, Oohara T, Beger HG. Increased angiogenin expression in pancreatic cancer is related to cancer aggressiveness. *Cancer Res*. 1996;56(12):2703–6.
 99. Montero S, Guzmán C, Cortés-Funes H, Colomer R. Angiogenin expression and prognosis in primary breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1998;4(9):2161–8.
 100. Chopra V, Dinh T V., Hannigan E V. Circulating serum levels of cytokines and

- angiogenic factors in patients with cervical cancer. *Cancer Invest.* 1998;16(3):152–9.
101. Barton DPJ, Cai A, Wendt K, Young M, Gamero A, De Cesare S. Angiogenic protein expression in advanced epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 1997;3(9):1579–86.
 102. Li D, Bell J, Brown A, Berry CL. The observation of angiogenin and basic fibroblast growth factor gene expression in human colonic adenocarcinomas, gastric adenocarcinomas, and hepatocellular carcinomas. *J Pathol.* 1994;172(2):171–8.
 103. Chopra V, Dinh T V, Hannigan E V. O R I G I N A L P A P E R Vimlarani Chopra ? Tung V. Dinh ? Edward V. Hannigan. 1997;167–72.
 104. Li S, Hu MG, Sun Y, Yoshioka N, Ibaragi S, Sheng J, et al. Angiogenin mediates androgen-stimulated prostate cancer growth and enables castration resistance. *Mol Cancer Res.* 2013;11(10):1203–14.
 105. Bárcena C, Stefanovic M, Tutusaus A, Martinez-Nieto GA, Martinez L, García-Ruiz C, et al. Angiogenin secretion from hepatoma cells activates hepatic stellate cells to amplify a self-sustained cycle promoting liver cancer. *Sci Rep.* 2015;5.
 106. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008;10(12):1470–6.
 107. Jones ML, Ewing CM, Isaacs WB, Getzenberg RH. Prostate cancer-derived angiogenin stimulates the invasion of prostate fibroblasts. *J Cell Mol Med.* 2012;16(1):193–201.
 108. Tello-Montoliu A, Patel J V., Lip GYH. Angiogenin: A review of the pathophysiology and potential clinical applications. *J Thromb Haemost.* 2006;4(9):1864–74.
 109. Musolino C, Alonci A, Bellomo G, Loteta B, Quartarone E, Gangemi D, et al. Levels of soluble angiogenin in chronic myeloid malignancies: Clinical implications. *Eur J Haematol.* 2004;72(6):416–9.
 110. Smolewski P, Witkowska M, Zwolinska M, Cebula-Obrzut B, Majchrzak A, Jeske A, et al. Cytotoxic activity of the amphibian ribonucleases onconase and r-amphinase on tumor cells from B cell lymphoproliferative disorders. *Int J Oncol.* 2014;45(1):419–25.
 111. Turcotte RF, Lavis LD, Raines RT. Onconase cytotoxicity relies on the distribution of its positive charge. *FEBS J.* 2009;276(14):3846–57.

112. Mikulski SM, Viera A, Ardelt W, Menduke H, Shogen K. possessing anti-tumour activity. 1990;237–46.
113. Ita M, Halicka HD, Tanaka T, Kurose A, Ardelt B, Shogen K, et al. Remarkable enhancement of cytotoxicity of onconase and cepharanthine when used in combination on various tumor cell lines. *Cancer Biol Ther*. 2008;7(7):1104–8.
114. Costanzi J, Sidransky D, Navon A, Goldsweig H. Ribonucleases as a novel pro-apoptotic anticancer strategy: Review of the preclinical and clinical data for ranpirnase. *Cancer Invest*. 2005;23(7):643–50.
115. Kian R, Moradi S, Ghorbian S. Role of components of MicroRNA machinery in carcinogenesis. *Exp Oncol*. 2018;40(1):2–9.
116. Economopoulou MAI, Fragoulis EG, Sideris DC. Molecular cloning and characterization of the human RNase κ , an ortholog of Cc RNase. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(19):6389–98.
117. SIDERIS DC, FRAGOULIS EG. Purification and characterization of a ribonuclease specific for poly(U) and poly(C) from the larvae of *Ceratitis capitata*. *Eur J Biochem*. 1987;164(2):309–15.
118. Rampias TN, Fragoulis EG, Sideris DC. Genomic structure and expression analysis of the RNase κ family ortholog gene in the insect *Ceratitis capitata*. *FEBS J*. 2008;275(24):6217–27.
119. Kiritsi MN, Fragoulis EG, Sideris DC. Essential cysteine residues for human RNase κ catalytic activity. *FEBS J*. 2012;279(7):1318–26.
120. Karousis ED, Sideris DC. A subtle alternative splicing event gives rise to a widely expressed human RNase κ isoform. *PLoS One*. 2014;9(5).
121. Hackett BA, Yasunaga A, Panda D, Tartell MA, Hopkins KC, Hensley SE, et al. RNASEK is required for internalization of diverse acid-dependent viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(25):7797–802.
122. Virus IA, Virus D, Perreira JM, Aker AM, Gauthier A, Brass AL, et al. Article RNASEK Is a V-ATPase-Associated Factor Required for Endocytosis and the Replication of Rhinovirus , Article RNASEK Is a V-ATPase-Associated Factor Required for Endocytosis and the Replication of Rhinovirus , Influenza A Virus , and Dengue Virus. *CellReports*. 2015;12(5):850–63.
123. Gkratsou A, Fragoulis E, Sideris D. Effect of Cytostatic Drugs on the mRNA Expression Levels of Ribonuclease κ in Breast and Ovarian Cancer Cells. *Anticancer Agents Med Chem*. 2014;14(3):400–8.

124. Kladi-Skandali A, Mavridis K, Scorilas A, Sideris DC. Expressional profiling and clinical relevance of RNase κ in prostate cancer: a novel indicator of favorable progression-free survival. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018;144(10):2049–57.
125. Urbanski LM, Leclair N, Anczuków O. Alternative-splicing defects in cancer: Splicing regulators and their downstream targets, guiding the way to novel cancer therapeutics. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2018;9(4):1–36.
126. Oltean S, Bates DO. Hallmarks of alternative splicing in cancer. *Oncogene*. 2014;33(46):5311–8.
127. Navaglia F, Fogar P, Greco E, Basso D, Stefani AL, Mazza S, et al. CD44v10: An antimetastatic membrane glycoprotein for pancreatic cancer. *Int J Biol Markers*. 2003;18(2):130–8.
128. Xin Y, Grace A, Gallagher MM, Curran BT, Leader MB, Kay EW. CD44V6 in gastric carcinoma: A marker of tumor progression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2001;9(2):138–42.
129. Adamopoulos PG, Kontos CK, Scorilas A, Sideris DC. Identification of novel alternative transcripts of the human Ribonuclease κ (RNASEK) gene using 3' RACE and high-throughput sequencing approaches. *Genomics*. 2020;112(1):943–51.
130. Kanani P, Shukla YM, Modi AR, Subhash N, Kumar S. Standardization of an efficient protocol for isolation of RNA from *Cuminum cyminum*. *J King Saud Univ - Sci*. 2019;31(4):1202–7.
131. Brinkman BMN. Splice variants as cancer biomarkers. *Clin Biochem*. 2004;37(7):584–94.
132. Haese A, Becker C, Noldus J, Graefen M, Huland E, Huland H, et al. Human glandular kallikrein 2: A potential serum marker for predicting the organ confined versus nonorgan confined growth of prostate cancer. *J Urol*. 2000;163(5):1491–7.
133. Kim Y, Do JH, Bae S, Bae D, Ahn WS. Identification of differentially expressed genes using an annealing control primer system in stage III serous ovarian carcinoma. *BMC Cancer*. 2010;10(1):576.
134. Shan W, Sun C, Zhou B, Guo E, Lu H, Xia M, et al. Role of Dicer as a prognostic predictor for survival in cancer patients: A systematic review with a meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7(45):72672–84.
135. Zhu DX, Fan L, Lu RN, Fang C, Shen WY, Zou ZJ, et al. Downregulated Dicer expression predicts poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Sci*. 2012;103(5):875–81.

136. Molica S, Vitelli G, Levato D, Giannarelli D, Vacca A, Cuneo A, et al. Serum angiogenin is not elevated in patients with early B-cell chronic lymphocytic leukemia but is prognostic factor for disease progression. *Eur J Haematol.* 2004;73(1):36–42.