



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών  
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

*ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ*

**ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΗ ΚΩΔΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA  
(ncRNAs), ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ,  
ΩΣ ΝΕΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ**

ΒΑΣΙΛΕΙΑ-ΜΑΡΙΑ ΨΥΛΛΑΚΗ  
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών  
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

*ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ*

**ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΗ ΚΩΔΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA  
(ncRNAs), ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ,  
ΩΣ ΝΕΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ**

ΒΑΣΙΛΕΙΑ-ΜΑΡΙΑ ΨΥΛΛΑΚΗ  
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών  
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ IV

**ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΗ ΚΩΔΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA  
(ncRNAs), ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ,  
ΩΣ ΝΕΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ**

ΒΑΣΙΛΕΙΑ-ΜΑΡΙΑ ΨΥΛΛΑΚΗ  
ΧΗΜΙΚΟΣ

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ:** Σκορίλας Ανδρέας, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας,  
Ε.Κ.Π.Α.

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

- Σκορίλας Ανδρέας, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.
- Σίδερης Διαμάντης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.
- Κοντός Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2020



## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «Μελέτη και κλινική αξιολόγηση μη κωδικών μορίων RNA (ncRNAs), με χρήση δεδομένων αλληλούχησης επόμενης γενιάς, ως νέοι μοριακοί βιοδείκτες καρκίνου» είναι μέρος του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος «Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική» και πραγματοποιήθηκε το χρονικό διάστημα Οκτωβρίου 2019-Οκτωβρίου 2020, στον τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, του τμήματος Βιολογίας, της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), με επιστημονικό υπεύθυνο τον Καθηγητή κ. Ανδρέα Σκορίλα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Ανδρέα Σκορίλα για την εμπιστοσύνη του και για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο της αλληλούχησης επόμενης γενιάς. Η βοήθειά του, ο χρόνος που αφιέρωσε και η συνεχής καθοδήγησή του συνέβαλαν στην εκπόνηση και ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Διαμάντη Σίδηρη όπως επίσης και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χρήστο Κοντό, τον καθένα ξεχωριστά, για την σημαντική βοήθειά τους μέσω των υποδείξεων τους και τον χρόνο που αφιέρωσαν και συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου και ιδιαίτερα τον Δρ. Παναγιώτη Αδαμόπουλο για τις γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μας και για την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας και τον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη-Ιωάννη Τσιακανίκα για την βοήθειά του, τόσο εργαστηριακά, όσο και με τη βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Ευχαριστώ πολύ τον υποψήφιο διδάκτορα Μάριο Διαμαντόπουλο για τη βοήθειά του και την Ελένη Αδάμ για την άψογη συνεργασία μας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μαργαρίτη Αυγέρη, Κωνσταντίνα Πανουσοπούλου, Μαρία-Αλεξάνδρα Παπαδημητρίου, Τζένη Κρέσπα, Κατερίνα Πιλάλα, Κωνσταντίνα Γεωργούλια, Κωνσταντίνα Μάλλιου και Γεωργία Κουφογεώργου για την άψογη συνεργασία μας όλη αυτήν την χρονιά. Ήταν άψογη η συνεργασία μας και με όλα τα μέλη του εργαστηρίου του Επίκουρου Καθηγητή κ. Χρήστου Κοντού και τους ευχαριστώ όλους θερμά.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κοντινούς μου ανθρώπους, τους γονείς μου, τον αδερφό μου και τους φίλους μου, για το ενδιαφέρον τους και την στήριξή τους όλον αυτόν τον καιρό.

# Πίνακας περιεχομένων

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	3
1.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ .....	3
1.1.1	Τεχνολογία αλληλούχησης πρώτης και δεύτερης γενιάς .....	3
1.1.2	Τεχνολογία αλληλούχησης επόμενης γενιάς .....	4
1.1.3	Τεχνολογία αλληλούχησης τρίτης γενιάς .....	9
1.1.4	Μεθοδολογία αλληλούχησης επόμενης γενιάς .....	10
1.1.5	Βιοπληροφορική ανάλυση .....	11
1.1.6	Αλληλούχηση επόμενης γενιάς στην κλινική πράξη .....	13
1.2	ΜΕΤΑΦΟΡΙΚΟ RNA (TRANSFER RNA, TRNA) .....	14
1.2.1	Μικρά μη κωδικά μόρια RNA .....	17
1.2.2	tRFs και tiRNAs σε διάφορα είδη καρκίνου .....	23
1.3	ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ .....	26
1.3.1	Φυσιολογία γαστρεντερικού συστήματος .....	26
1.3.2	Αιμάτωση γαστρεντερικού συστήματος .....	28
1.3.3	Παχύ έντερο .....	30
1.4	ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ .....	32
1.4.1	Επιδημιολογία .....	33
1.4.2	Σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέος εντέρου και βαθμός διαφοροποίησης του όγκου .....	35
1.4.3	Παράγοντες κινδύνου .....	36
1.4.4	Παθογένεια .....	37
1.4.5	Διάγνωση .....	38
1.4.6	Έλεγχος .....	39
1.4.7	Βιοδείκτες καρκίνου του παχέος εντέρου .....	40
1.4.8	Θεραπεία .....	41
	ΣΚΟΠΟΣ .....	45
2	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ .....	46
2.1	ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ .....	46
2.1.1	Βάση Δεδομένων SRA .....	46
2.1.2	FASTQ αρχείο .....	47
2.1.3	Αλγόριθμος Trim Galore .....	49
2.1.4	FastQC .....	51
2.1.5	Η βάση δεδομένων MINTbase .....	51
2.1.6	Ο αλγόριθμος MINTmap .....	53
2.1.7	Primer-BLAST .....	54
2.2	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ .....	57
2.2.1	Βιολογικό Υλικό .....	57
2.2.2	Ομογενοποίηση δειγμάτων ιστού καρκίνου του παχέος εντέρου .....	58
2.2.3	Απομόνωση RNA .....	58
2.2.4	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός .....	60
2.2.5	Πολυαδενυλίωση .....	62
2.2.6	Αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription, RT) .....	63
2.2.7	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου .....	65
2.2.8	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης .....	74
2.2.9	Στατιστική ανάλυση .....	77
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	80
3.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΗΝ SRA ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ .....	80
3.2	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΓΕΝΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ .....	80
3.3	Έλεγχος ποιότητας πρωτογενών δεδομένων μετά την επεξεργασία τους .....	81
3.4	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ tRFs .....	84
3.5	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ tRFs ΚΑΙ tiRNAs ΣΤΙΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ .....	85
3.6	RT-qPCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ tRF .....	87
3.7	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ .....	90

3.8	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ 3'tRF-GLU <sup>TTC</sup> ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	92
3.9	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ 3'tRF-GLU <sup>TTC</sup> ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	94
3.10	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ 3'tRF-GLU <sup>TTC</sup> ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ .....	94
3.11	ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ 3'tRF-GLU <sup>TTC</sup> ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ, ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗ ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕ ΤΟΝ ΒΑΘΜΟ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ .....	98
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	100
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	107
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	123
	ABSTRACT .....	125

## **Συντομογραφίες**

**aCGP:** Adaptable Constrained GP

**AGO:** Argonaut Proteins

**ATZ:** Anal Transitional Zone

**BCAR3:** Breast Cancer Anti-Estrogen Resistance 3

**ChIP:** Chromatin Immunoprecipitation

**CPSF:** Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor

**CRC:** Colorectal cancer

**CSCs:** Cancer Stem Cells

**CT:** Computerized Tomography

**ctDNA:** Circulating Tumor DNA

**ddNTPs:** dideoxynucleotides triphosphates

**E.Coli:** Escherichia Coli

**EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor

**Gb:** gigabases

**IGF1R:** Insulin-like Growth Factor 1 Receptor

**IPD:** Interpulse Duration

**Kb:** kilobases

**NTP:** nucleoside triphosphate

**PAP:** Polymerase Reaction Buffer

**PI3K:** Phosphoinositide 3-kinase

**RBPs:** RNA Binding Proteins

**RISC:** RNA-induced Silencing Complex

**RRBS:** Reduced Representation Bisulfite Sequencing

**RT:** Reverse Transcription

**S. cerevisiae:** Saccharomyces Cerevisiae

**tRFs:** tRNA-derived RNA fragments

**WGS:** Whole-genome sequencing

**WES:** Whole-exome sequencing

**YBX1:** Y-box binding protein 1





## **1. Εισαγωγή**

### **1.1 Εισαγωγή στην Αλληλούχηση επόμενης γενιάς**

Η αλληλούχηση επόμενης γενιάς είναι μέθοδος παράλληλης αλληλούχησης εκατομμυρίων θραυσμάτων DNA. Σε αντίθεση με την μέθοδο αλληλούχησης πρώτης γενιάς, Sanger, η τεχνολογία NGS δίνει την δυνατότητα μελέτης ολόκληρου γονιδιώματος σε σύντομο χρονικό διάστημα και την ταυτόχρονη στόχευση πολλαπλών στόχων αλληλούχησης [1].

Οι εφαρμογές της αλληλούχησης επόμενης γενιάς συνοψίζονται στο προσδιορισμό του γονιδιώματος οργανισμών, πολυκύτταρων και μονοκύτταρων, την ανίχνευση γενετικών παραλλαγών μεταξύ ατόμων, σύγκριση γενετικών επίκτητων μεταλλαγών μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων του ίδιου ατόμου, αλληλούχηση του συνόλου του μεταγραφώματος (RNA αλληλούχησης, RNA-sequence, RNA-seq), και τον εντοπισμό αλληλουχιών DNA που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες (ChIP-seq) μετά από συνδυασμό της μεθόδου με την μέθοδο ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (chromatin immunoprecipitation, ChIP) [2].

#### **1.1.1 Τεχνολογία αλληλούχησης πρώτης και δεύτερης γενιάς**

Η αρχή των μεθόδων αλληλούχησης έγινε με την μέθοδο Sanger (dideoxy synthesis, SBS) και την μέθοδο Maxam-Gilbert (chemical cleavage). Η μέθοδος Sanger ή αλληλούχηση με χρήση διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) ή μέθοδος τερματισμού της αλυσίδας, χρησιμοποιεί διδεοξυνουκλεοτίδια τα οποία δεν διαθέτουν 3'-OH, με αποτέλεσμα η αντίδραση πολυμερισμού να οδηγείται σε τερματισμό. Τα ddNTPs είναι ραδιενεργά ή φθορίζοντα και μπορούν να είναι ανιχνεύσιμα είτε σε πήκτωμα (gel) ή στα μηχανήματα αλληλούχησης. Η μέθοδος Maxam-Gilbert περιλαμβάνει την μετατροπή των νουκλεοτιδίων του DNA και τη χημική αποκοπή της έλικας σε γειτονικές θέσεις των μετατροπών αυτών και έχει χρησιμοποιηθεί στην μείωση τοξικών παραγόντων. Η τεχνολογία Sanger χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα για αναλύσεις χαμηλού μεγέθους, όπως μία αντίδραση αλληλούχησης με έναν DNA εκκινήτη ή ενός μόνο δείγματος για την επιβεβαίωση πλασμιδιακού προϊόντος ή προϊόντος PCR [3].

Οι ιδιότητες που θέτουν βελτιωμένη την μέθοδο της αλληλούχησης επόμενης γενιάς σε σχέση με παλαιότερες μεθόδους είναι η μαζική και παράλληλη παραγωγή δεδομένων, ο μειωμένος χρόνος ανάλυσης, καθώς και το μειωμένο κόστος

αλληλούχησης ανά μεγαβάση [2].

Η τεχνολογία δεύτερης γενιάς περιλαμβάνει δύο κατηγορίες αλληλούχησης οι οποίες είναι οι *υβριδισμού* και *σύνθεσης* (*Sequencing by synthesis, SBS*). Η αλληλούχηση μέσω υβριδισμού αναπτύχθηκε στην δεκαετία του 1980 και περιλαμβάνει γνωστά DNA ολιγονουκλεοτίδια ακινητοποιημένα σε φίλτρο, τα οποία έχουν υβριδοποιηθεί με σημασμένα DNA κομμάτια προς αλληλούχηση. Έπειτα από πολλαπλές αντιδράσεις υβριδισμού και εκπλύσεις που παρεμβάλλονται, απομονώνονται τα επιθυμητά κομμάτια DNA και απομακρύνονται αυτά τα οποία δεν υβριδοποιήθηκαν, σύμφωνα με τα κομμάτια DNA στο φίλτρο. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την διάγνωση ασθενειών που σχετίζονται με πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου (*Single nucleotide polymorphisms, SNPs*) σε συγκεκριμένα γονίδια ή με χρωμοσωμική ανωμαλία.

Η αλληλούχηση μέσω σύνθεσης (SBS) στηρίζεται στην αρχή μεθόδου της Sanger και πραγματοποιείται, αρχικά με διδεοξυνουκλεοτίδια και μετέπειτα με αντιστρεπτούς παράγοντες (*reversible*) που τερματίζουν την αντίδραση πολυμερισμού οι οποίοι συμμετέχουν στην αντίδραση σύνδεσης του νέου νουκλεοτιδίου και στην απομάκρυνση μορίων. Οι πιο πρόσφατες αντιδράσεις SBS διαφέρουν από την Sanger στο ότι αναλύουν μικρότερες αλληλουχίες, έως 300-500 βάσεις και ότι έχουν υψηλότερο ποσοστό σφάλματος [3].

### **1.1.2 Τεχνολογία αλληλούχησης επόμενης γενιάς**

Στην πλειονότητά τους οι μέθοδοι επόμενης γενιάς χρησιμοποιούν βοθρία (*wells*) ή στερεές επιφάνειες για την πραγματοποίηση της αντίδρασης πολυμερισμού. Τα μόρια DNA για αλληλούχηση πολλαπλασιάζονται μέσω μεθόδων πολλαπλασιασμού (PCR ή “*rolling circle*” πολλαπλασιασμό) και έπειτα οδηγούνται σε πολυμερισμό με σημασμένα νουκλεοτίδια, ο οποίος παρακολουθείται [4].

Το 1998 ο Hyman εισήγαγε την πυροαλληλούχηση (*pyrosequencing*) η οποία χρησιμοποιήθηκε για την αλληλούχηση γονιδιωμάτων οργανισμών όπως του *Mycoplasma genitalium* σε ένα μόνο πείραμα αλληλούχησης [2]. Στην πυροαλληλούχηση, ανιχνεύεται πυροφωσφορικό ως παραπροϊόν της σύνδεσης καινούριου νουκλεοτιδίου στην αλυσίδα DNA. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην σύνδεση θραυσμάτων DNA από 400 έως 700 ζ.β. με εκκινήτες, τα μόρια πολλαπλασιάζονται με PCR σε ένα σφαιρίδιο σε γαλάκτωμα λόγω

συμπληρωματικότητας της αλληλουχίας DNA στο σφαιρίδιο με την αλληλουχία του εκκινητή. Η ιδανική αναλογία αλληλουχίας/σφαιριδίου είναι ένα θραύσμα ανά σφαιρίδιο. Στη συνέχεια διοχετεύονται διαδοχικά καθένα από τα τέσσερα νουκλεοτίδια στη θέση που έχει ακινητοποιηθεί η αλληλουχία και με την σύνδεση του σωστού νουκλεοτιδίου, ανιχνεύεται η αποβολή πυροφωσφορικού μέσω εκπομπής φωτός [4].

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η μεγάλη ταχύτητα ανάλυσης, το χαμηλότερο κόστος σε σχέση με την μέθοδο κατά Sanger, ο μεγάλος όγκος πληροφορίας, μπορεί με ένα πείραμα να διαβαστούν έως 600 μεγαβάσεις, είναι η κατάλληλη μέθοδος για δείγματα περιορισμένης ποσότητας, η δυνατότητα πολλαπλασιασμού των μορίων DNA προς αλληλούχηση με PCR και η υψηλή ακρίβεια η οποία διαθέτει [2].

#### 1.1.2.1 Εισαγωγή στην αλληλούχηση DNA

Δύο βασικές εφαρμογές της αλληλούχησης επόμενης γενιάς είναι η αλληλούχηση όλου του γονιδιώματος ενός ατόμου και όλων των εξονίων, γνωστές ως *Whole-genome sequencing (WGS)* και *Whole-exome sequencing (WES)* αντίστοιχα. Οι δύο αυτές εφαρμογές πλεονεκτούν σε σχέση με τις μεθόδους καρυοτύπησης, τη μεθοδολογία *adaptable constrained GP (aCGP)* και τις μικροσυστοιχίες, γιατί μπορούν να αναλύσουν όλα τα αλληλόμορφα, παρέχουν πληροφορίες και για μονά νουκλεοτίδια, απαλοιφές, μικρές προσθήκες, δομικές παραλλαγές και ετεροζυγωτία. Μειονεκτήματα των μεθοδολογιών είναι ότι δεν είναι εύκολη η ανίχνευση ισορροπημένων και μη χρωμοσωμικών μετατοπίσεων και δεν είναι δυνατή η χρήση τους για περιπτώσεις ανίχνευσης ανευπλοειδίας. Για αυτόν τον σκοπό η μέθοδος αλληλούχησης επόμενης γενιάς συνήθως συνδυάζεται με άλλες μεθόδους, όπως συστοιχίες SNP [2].

#### 1.1.2.2 Εισαγωγή στην αλληλούχηση RNA

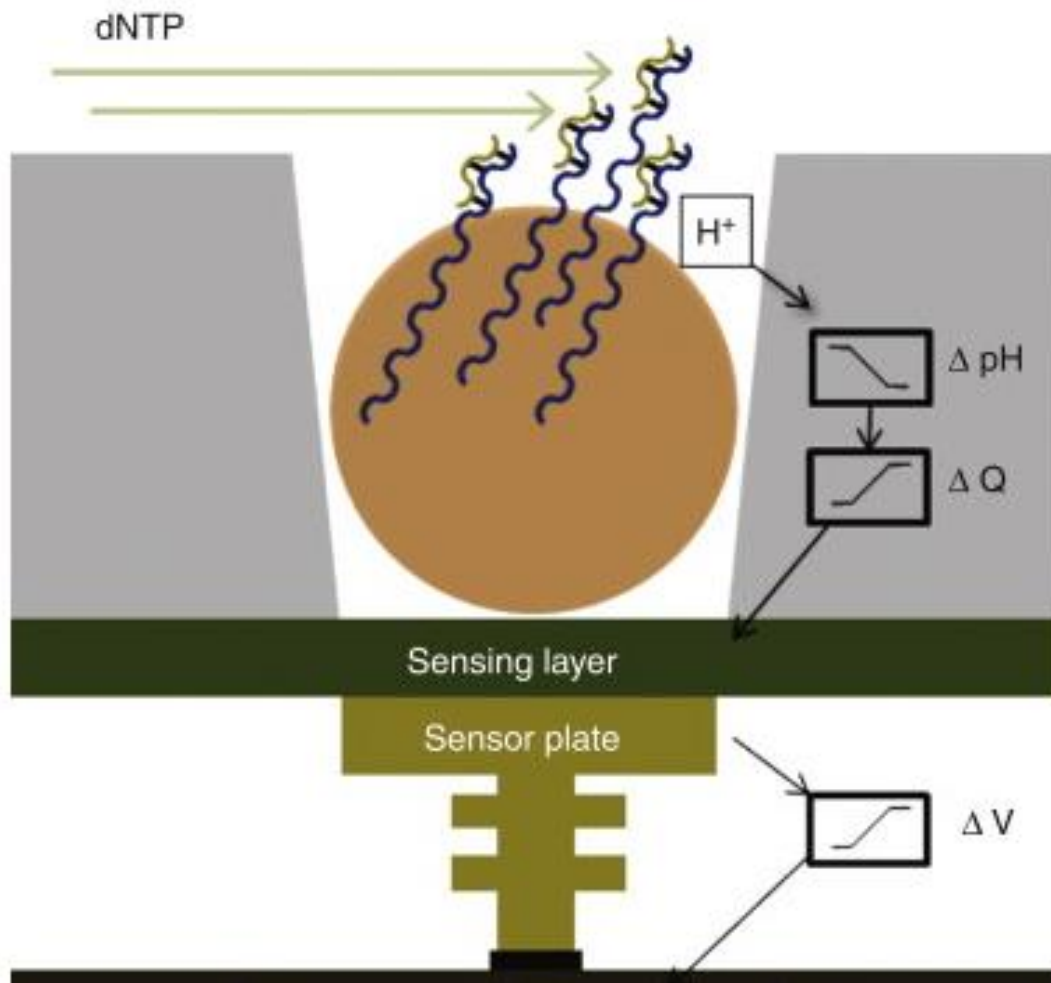
Η αλληλούχηση RNA (*RNA-sequencing, RNA-seq*) είναι μέθοδος αλληλούχησης του συνολικού μεταγραφώματος ενός οργανισμού. Αποτελεί μία εναλλακτική τεχνική των μικροσυστοιχιών, μικρότερου κόστους και μεγαλύτερης ταχύτητας. Το RNA-seq στηρίζεται στην μέτρηση του αριθμού των αναγνώσεων που αντιστοιχούν σε κάθε μετάγραφο, προσδίδοντας μεγαλύτερη αξιοπιστία στην ανίχνευση της γονιδιακής

έκφρασης σε μία ευρείας κλίμακας ανάλυσης.

### *1.1.2.3 Πλατφόρμες Αλληλούχησης Επόμενης Γενιάς*

#### *1.1.2.3.1 Ion Torrent™*

Η Ion Torrent™ ανήκει στην Thermo Fisher Scientific και διαθέτει τρεις πλατφόρμες αλληλούχησης επόμενης γενιάς, οι οποίες είναι οι εξής: Ion Personal Genome (PGM) System, Ion Proton System και Ion S5 system. Η αλληλούχηση γίνεται σε έναν ημιαγωγό (chip), στον οποίο φορτώνεται το δείγμα προς αλληλούχηση και στη συνέχεια τοποθετείται στην πλατφόρμα αλληλούχησης, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Κατά την διάρκεια ενός κύκλου της διαδικασίας, τα τέσσερα νουκλεοτίδια εισάγονται το ένα μετά το άλλο, με ενδιάμεσες εκπλύσεις, ώστε να είναι βέβαιη η απομάκρυνσή τους. Στην περίπτωση που το νουκλεοτίδιο το οποίο εισάγεται, ενσωματώνεται επιτυχώς στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα, πραγματοποιείται η απελευθέρωση ενός  $H^+$ . Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την αλλαγή του pH του διαλύματος, 0,02 pH μονάδες/ βάση. Η αλλαγή αυτή γίνεται αισθητή από ειδικούς ανιχνευτές που εντοπίζονται κάτω από την επιφάνεια του ημιαγωγού. Κατά τον τρόπο αυτό, η αλλαγή του pH μετατρέπεται σε δυναμικό, το οποίο με τη σειρά του μετατρέπεται σε ψηφιακή πληροφορία με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με την πλατφόρμα αλληλούχησης (Εικόνα 1.1). Η δημιουργία αυτού του σήματος διαρκεί τέσσερα δευτερόλεπτα [2, 5].



Εικόνα 1.1 Σχηματική απεικόνιση της μεθοδολογίας αλληλούχησης της Ion Torrent™ [6].

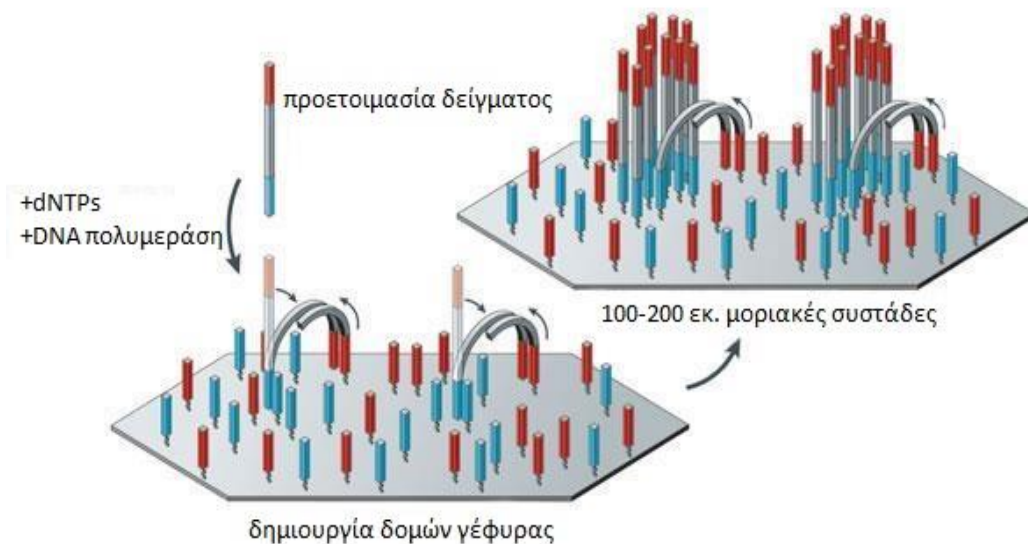
Οι πλατφόρμες Ion Torrent™ καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών όπως η στοχευμένη αλληλούχηση DNA και RNA, η αλληλούχηση του μεταγραφώματος διάφορων οργανισμών, καθώς και η αλληλούχηση περιοχών του DNA που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες, η οποία πραγματοποιείται σε συνδυασμό με την μέθοδο ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (chromatin immunoprecipitation, ChIP-seq) [2, 7].

#### 1.1.2.3.2 Illumina

Η τεχνολογία Illumina αναπτύχθηκε από την Solexa and Lynx Therapeutics και είναι η πιο διαδεδομένη στην αλληλούχηση δεύτερης γενιάς. Η μέθοδος αλληλούχησης της Illumina στηρίζεται στη δημιουργία δομής γέφυρας ή αλλιώς στο “bridge amplification”. Αφού γίνει καθαρισμός και κόψιμο σε τυχαίες θέσεις του δείγματος DNA και επιλογή των κομματιών βάσει του μεγέθους τους, ακολουθεί η δημιουργία δομών γέφυρας. Κατά τη διαδικασία αυτή, θραύσματα DNA τα οποία

έχουν συζευχθεί με ειδικούς προσαρμογείς εισάγονται σε πηγαδάκια όπου και ακινητοποιούνται, πολλαπλασιάζονται, δημιουργούνται συστάδες κομματιών DNA και ανιχνεύονται μέσω φθορισμού. Έπειτα συνδέονται προσαρμογείς στα άκρα των κομματιών DNA και δημιουργείται το εκμαγείο αλληλούχησης. Το διάλυμα των κομματιών της βιβλιοθήκης διοχετεύεται στην στερεή επιφάνεια (flow cell). Εκεί τα κομμάτια DNA συνδέονται μέσω των προσαρμογών με νουκλεοτίδια που είναι ακινητοποιημένα στην στερεή επιφάνεια. Τέλος, με τη βοήθεια DNA πολυμεράσης και την εισαγωγή των τεσσάρων νουκλεοτιδίων ξεκινά η διαδικασία πολλαπλασιασμού πολλαπλών κύκλων [2]. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία συστάδων (clusters) που περιέχουν περίπου χιλιάδες αντίγραφα του κάθε θραύσματος DNA (Εικόνα 1.2).

Σε κάθε επιφάνεια μπορούν να πραγματοποιηθούν εκατομμύρια αντιδράσεις ταυτόχρονα. Η αντίδραση πολλαπλασιασμού γίνεται για παραπάνω από 300 φορές και ο τερματισμός της καθемιάς σηματοδοτείται από τα ίδια τα νουκλεοτίδια. Η ανίχνευση των νουκλεοτιδίων γίνεται μέσω φθορισμού, καθώς τα νουκλεοτίδια είναι τροποποιημένα διαφορετικά για την κάθε βάση, και όταν συνδεθούν στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα φθορίζουν και το σήμα ανιχνεύεται.



Εικόνα 1.2 Δημιουργία συστάδων στην τεχνολογία Illumina.

Η τεχνολογία Illumina υποστηρίζει την αλληλούχηση γονιδιωμάτων, εξωσωμάτων, ολικού RNA, την μεθοδολογία ChIP-seq, καθώς και την ανίχνευση μεθυλιωμένων περιοχών του γονιδιώματος (methylome sequencing). Οι πλατφόρμες αλληλούχησης που ανήκουν στην τεχνολογία Illumina είναι οι: MiniSeq,

MiSeq, NextSeq, HiSeq και NovaSeq.

Τα σημεία που η τεχνολογία της Illumina μειονεκτεί, είναι ο μειωμένος αριθμός κύκλων λόγω μη συγχρονισμού των αντιδράσεων σύνθεσης ενός cluster και την παρεμπόδιση παραγωγής μίας σωστής ακολουθίας. Επίσης, είναι σημαντικό να μην υπερβεί ο όγκος της πληροφορίας το όριο που μπορεί να υποστηρίξει το σύστημα. Κάτι τέτοιο θα επιφέρει λάθη κατά την ανάλυση, με αποτέλεσμα την παραγωγή μη πραγματικών παραλλαγών μίας ακολουθίας και μπορεί να αποφευχθεί με την ελεγχόμενη εισαγωγή ποσότητας DNA για αλληλούχηση.

### 1.1.3 Τεχνολογία αλληλούχησης τρίτης γενιάς

Η αλληλούχηση τρίτης γενιάς ή αλλιώς Single Molecule Real Time (SMRT) παρουσιάστηκε από την Pacific Biosciences (PacBio) και παρέχει τη δυνατότητα αλληλούχησης μεγάλων μορίων DNA και RNA (30-50 kb). Έχουν δημιουργηθεί δύο μοντέλα τρίτης γενιάς, το RSII και το Sequel. Η προετοιμασία του δείγματος περιλαμβάνει την παραγωγή διπλής έλικας κυκλικού DNA με γνωστό προσαρμογέα, συμπληρωματικό στον εκκινητή της αντίδρασης σύνθεσης. Η DNA πολυμεράση συνδέεται με το κομμάτι του DNA που έχει επιλεγεί να αλληλουχηθεί, και το μόριο αυτό συνδέεται στο τέρμα ενός πηγαδιού (zero-mode waveguide, ZMW). Λόγω του σχεδιασμού αυτού του πηγαδιού, το φως που εισέρχεται κατευθύνεται προς το DNA το οποίο συντίθεται. Η κάθε βάση είναι συζευγμένη με διαφορετικό φθοροφόρο, όπου μετά την σύνδεσή της στην αλυσίδα σταματάει να φθορίζει και η διαδικασία σύνθεσης συνεχίζεται.

Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η ανίχνευση επιγενετικών τροποποιήσεων όπως η μεθυλίωση αδερίνης και κυτοσίνης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της μέτρησης του ποσοστού σύνδεσης της κάθε βάσης. Μερικά τροποποιημένα νουκλεοτίδια επηρεάζουν το διάστημα μεταξύ των σημάτων φθορισμού (interpulse duration, IPD) [8-13]. Από την άλλη πλευρά, ένα μειονέκτημα του PacBio SMRT είναι το υψηλό ποσοστό σφάλματος (high error rate).

Η δυνατότητα να περάσει ένα μόριο DNA από μία οπή και να μετρηθεί το δυναμικό του μέσω ενός ανιχνευτή αποτελεί την αρχή μεθόδου των MinION, benchtop GridION και του PromethION που παρουσιάστηκαν από την Oxford Nanopore Technology (ONT) [14-19]. Οι παραπάνω πλατφόρμες περιέχουν θερμοανθεκτικές πολυμερικές επιφάνειες με πόρους (nanopores) πρωτεΐνης όπου



και σημειώνεται η αλλαγή του δυναμικού και μετράται από τον ανιχνευτή. Με μικρό κόστος μπορεί να παραχθεί ένας πολύ μεγάλος όγκος πληροφορίας (έως και χιλιάδες Gb) [20].

Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται για την αλληλούχηση DNA αυτής της γενιάς είναι δύο, οι βιολογικές μεμβράνες και η τεχνολογία των στερεών αισθητήρων (solid-state sensor technology). Οι πόροι των βιολογικών μεμβρανών παράγονται από πρωτεΐνες όπως η α-αιμολυσίνη και η *Mycobacterium smegmatis* πορίνη A (MspA) όταν οι ίδιες κατακαθίσουν σε λιπιδική επιφάνεια. Η ποσότητα του DNA που διαπερνά τους πόρους είναι ανάλογη της δράσης της πρωτεΐνης που προστίθεται, όπως η DNA πολυμεράση (phi29) για την προσθήκη νουκλεοτιδίων. Άλλα μόρια που συμμετέχουν στην διαδικασία αλληλούχησης είναι η DNA ελικάση, η εξωνουκλεάση I και ολιγονουκλεοτίδια. Οι αισθητήρες στην στερεή επιφάνεια χρησιμοποιούν μέταλλα ή κράματα μετάλλων με πόρους για τη διέλευση των μορίων DNA. Το μόριο DNA συνδέεται με την phi29 πολυμεράση και όταν φτάσουν μαζί στην οπή το ένζυμο διευκολύνει το μόριο DNA να διαπεράσει τον πόρο με ευκολία. Κάθε νουκλεοτίδιο έχει συγκεκριμένο ηλεκτρικό σήμα το οποίο ανιχνεύεται ως αλλαγή δυναμικού στην οπή. Όταν ένα μόριο DNA απομακρυνθεί από έναν πόρο, τότε ένα καινούριο είναι έτοιμο να περάσει.

Η τεχνολογία του νανοπόρου (nanopores) έχει χρησιμοποιηθεί στην μεταγονιδιωματική ανάλυση όπως για παράδειγμα στην ανάλυση γένους βακτηρίων, γονιδιωμάτων ιών, την παρακολούθηση του περιβαλλοντικών παραγόντων αλλά και την αναγνώριση τροποποιήσεων των βάσεων που συμβάλει στην έρευνα της επιγενετικής. Επίσης, η τεχνολογία του nanopore προσφέρει άμεση RNA- και PCR-free cDNA αλληλούχηση [3, 21-24].

#### **1.1.4 Μεθοδολογία αλληλούχησης επόμενης γενιάς**

Τα βήματα της πειραματικής διαδικασίας περιλαμβάνουν την απομόνωση του DNA από το δείγμα ενδιαφέροντος, την προετοιμασία της βιβλιοθήκης, τον εμπλουτισμό της αλληλουχίας-στόχου, την αλληλούχηση, τη βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή συμπερασμάτων.

Η προετοιμασία της βιβλιοθήκης είναι η δημιουργία ενός υβριδίου DNA έτοιμο να εισαχθεί στο μηχάνημα αλληλούχησης. Γενικότερα, το δείγμα DNA θραυσματοποιείται σε τυχαία σημεία και στα δύο ελεύθερα άκρα κάθε θραύσματος

συνδέονται ειδικές αλληλουχίες-προσαρμογείς (adaptors). Τα θραύσματα DNA που δημιουργούνται, ονομάζονται *inserts*, τα οποία αναμειγνύονται με PCR εκκινήτες, αλληλουχίες που υβριδοποιούνται ώστε να συνδεθεί το θραύσμα σε στερεή επιφάνεια ή κομμάτια αναγνώρισης για να ξεκινήσει η αλληλούχηση. Επίσης ένα θραύσμα μπορεί να διαθέτει έναν ειδικό barcode έτσι ώστε να είναι δυνατή η ομαδοποίηση των δειγμάτων.

Ο εμπλουτισμός της αλληλουχίας-στόχου μπορεί να γίνει είτε μέσω υβριδισμού με συμπληρωματικές αλληλουχίες ή μέσω PCR. Η επιλογή της μεθόδου γίνεται συνήθως βάσει του ερευνητικού σκοπού του πειράματος, δηλαδή οι συμπληρωματικές αλληλουχίες χρησιμοποιούνται για μεγάλα γονιδιακά κομμάτια ενώ η PCR για μικρότερες περιοχές που ο εμπλουτισμός είναι μεγαλύτερη ανάγκη.

Συνήθως, η αλληλούχηση πραγματοποιείται είτε μέσω της τεχνολογίας Illumina ή Ion Torrent. Εκτός των διαφορών των δύο τεχνολογιών, ένα κοινό είναι το πρώτο βήμα της διαδικασίας, δηλαδή ο πολλαπλασιασμός του DNA-στόχου μετά από ακινητοποίησή του, έτσι ώστε να δώσει ένα ικανοποιητικό σήμα κατά την ανίχνευσή του. Είναι πολύ σημαντικό η συγκέντρωση του στόχου που θα εισαχθεί στο μηχάνημα να είναι εντός ορίων ώστε ένα μόριο DNA να αντιστοιχεί σε ένα σφαιρίδιο ή μία κυψελίδα, στην τεχνολογία Ion Torrent και στην τεχνολογία Illumina, αντίστοιχα.

### **1.1.5 Βιοπληροφορική ανάλυση**

Η βιοπληροφορική ανάλυση και στις δύο τεχνολογίες περιλαμβάνει την απομάκρυνση (demultiplexing) αλληλουχιών προσαρμογέων (adapters και barcodes), ποιοτική ανάλυση, χαρτογράφηση των reads σε ένα γονιδίωμα αναφοράς και αναγνώριση και αναφορά των παραλλαγών (variants). Στην ανάλυση όπου έχουν χρησιμοποιηθεί barcodes γίνεται demultiplexing, όπου όλα τα reads κατηγοριοποιούνται κατά barcode/δείγμα [25]. Οι πρωτογενείς πειραματικές αλληλουχίες (raw sequencing reads) κάθε αρχείου, αποθηκεύονται σε ειδικά αρχεία κειμένου, τα οποία είναι αρχεία τύπου FASTQ. Στο επόμενο βήμα πραγματοποιείται χαρτογράφηση με τη βοήθεια ενός προγράμματος στοίχισης και τη χρήση ενός γονιδιώματος αναφοράς και δημιουργείται το *BAM* αρχείο. Το αρχείο αυτό διαθέτει πληροφορίες σχετικά με τις πειραματικές αλληλουχίες του αρχείου FASTQ, οι οποίες στοιχίστηκαν επιτυχώς στο γονιδίωμα αναφοράς. Αν ένας σημαντικός

αριθμός πειραματικών αλληλουχιών εμφανίσει την ίδια διαφορά με την αλληλουχία αναφοράς, αυτό αποτελεί μία παραλλαγή (variant). Τα διπλά reads (duplicates) απορρίπτονται μόνο στις περιπτώσεις αλληλούχησης ολικού γονιδιώματος ή ανάλυση στοχευμένης αλληλούχησης. Όλες οι παραλλαγές περιέχονται στον «variant call», όπου με ειδικό λογισμικό μπορεί να γίνει η επεξεργασία τους. Η επεξεργασία γίνεται με βάση τόσο τα κριτήρια που έχουν τεθεί, όσο και από τα εργαλεία βιοπληροφορικής. Αν πρόκειται για κλινική χρήση είναι απαραίτητη η επικύρωση όλης της διαδικασίας που ακολουθήθηκε, από την απομόνωση του DNA έως την ανάλυση, ώστε να είναι βέβαιη η επιτυχία τής και η χρήση τής ως ένα έμπιστο εργαλείο κλινικής πράξης.

Η ερμηνεία των παραλλαγών είναι το επόμενο βήμα της ανάλυσης. Όσο ευρύτερο είναι το κομμάτι του γονιδιώματος που αναλύεται, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα να βρεθεί ένα σπάνιο ή σημαντικό variant που είναι άξιο επισήμανσης [26]. Οι αλληλουχίες που διαβάζονται αντιστοιχούνται με ένα γονιδίωμα αναφοράς το οποίο βρίσκεται είτε σε βάσεις δεδομένων, όπως η Ensembl, το NCBI και το UCSC, σε μορφή FASTA. Στην περίπτωση ανάλυσης αλληλουχιών που μεταγράφονται από το DNA, η στοίχιση μπορεί να γίνει είτε με ολικό γονιδίωμα ή με αρχείο FASTA που περιέχει μόνο την αλληλουχία μεταγράφου ενδιαφέροντος. Υπάρχουν αρκετά διαφορετικά προγράμματα στοίχισης, όπως το BWA, το Bowtie2, το SOAP, το MAQ και το Novoalign και δύο μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτόν, οι πίνακες κατακερματισμού (hash tables) και ο μετασχηματισμός Burrows-Wheeler [2].

Τα κριτήρια για τον ορισμό των παραμέτρων ανίχνευσης παραλλαγών παρατίθενται από εξειδικευμένους φορείς. Τα κριτήρια αυτά περιέχουν μικρής συχνότητας αλληλόμορφα του πληθυσμού από βάσεις δεδομένων και επικράτησης μίας παραλλαγής σε έναν ασθενή, έρευνες σχετικές με τη λειτουργία τους, πληροφορίες διαχωρισμού, τον τύπο της μετάλλαξης και το προβλεπόμενο αποτέλεσμα, υπολογιστικά μοντέλα αποτελεσμάτων και παράγοντες κληρονομικότητας [27, 28]. Στις οδηγίες αυτές υπάρχουν περιορισμοί που αφορούν την υποκειμενικότητα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, τη συχνότητα εμφάνισης παραλλαγών στον πληθυσμό που μπορεί να διαφέρει μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών, την τυχαία εμφάνιση παραλλαγών και την επιλογή των γονιδίων που θα μελετηθούν σε σχέση με την κλινική εικόνα [29-33].

Το κόστος της διαδικασίας αλληλούχησης επόμενης γενιάς για κλινικό σκοπό διαμορφώνεται από τον εξοπλισμό που χρησιμοποιείται για την προετοιμασία της βιβλιοθήκης και τη διαδικασία της αλληλούχησης, επίσης, παίζει ρόλο η έκταση του γονιδιώματος που αλληλουχείται και αν υπάρχει δυνατότητα ανάλυσης των δειγμάτων ομαδικά. Η τεχνολογία της αλληλούχησης νέας γενιάς ως ένα κλινικό εργαλείο διαθέτει περιορισμούς, όπως η αναλυτική ευαισθησία στην ανίχνευση μεταλλάξεων, η αδυναμία ερμηνείας σπάνιων μεταλλάξεων, ανίχνευσης δομικών γονιδιακών παραλλαγών και δυσκολία ενσωμάτωσης της νέας πληροφορίας στην ιατρική πράξη.

#### **1.1.6 Αλληλούχηση επόμενης γενιάς στην κλινική πράξη**

Η αλληλούχηση επόμενης γενιάς αποτελεί εργαλείο στη διαγνωστική διαδικασία σε πολλά κλινικά εργαστήρια, τόσο για την ανίχνευση κληρονομούμενων, όσο και επίκτητων μεταλλάξεων [34, 35]. Πιο συγκεκριμένα, βρίσκει εφαρμογή σε μιτοχονδριακές, νεφρικές και νευρολογικές διαταραχές, σε διαταραχές συνδετικού ιστού, καρδιομυοπάθειες, δυσλειτουργίες του ανοσοποιητικού, σύνδρομα ανεπάρκειας του μυελού των οστών, τύφλωση, κώφωση και προδιάθεση για εμφάνιση καρκίνου [36-43]. Το πρώτο βήμα είναι ο έλεγχος ειδικών γονιδίων για την κάθε διαταραχή σε συνδυασμό με την εξέταση του κλινικού φαινοτύπου, ενώ είναι απαραίτητη η χαρτογράφηση όλων των εξωνίων, σε περιπτώσεις όπου το panel γονιδίων δε δίνει επαρκή στοιχεία για την νόσο [44, 45]. Επίσης, το NGS είναι χρήσιμο στον προγεννητικό έλεγχο [46, 47]. Κάθε γονίδιο προς έλεγχο μπορεί να αλληλουχηθεί, είτε ολόκληρο ή σε συγκεκριμένα σημεία του.

Το NGS χρησιμοποιείται στον έλεγχο του αντιγόνου ανθρώπινων λευκοκυττάρων (human leukocyte antigen, HLA). Η ανάλυση αυτή είχε το μειονέκτημα της διάκρισης μεταξύ μειωμένης συχνότητας αλληλομόρφων και υψηλής συχνότητας artifacts [48, 49]. Με την μέθοδο όμως της ομαδοποίησης (stepwise threshold clustering) το NGS μπορεί πλέον να χρησιμοποιηθεί στην κλινική ανάλυση.

Μια πολύ σημαντική εφαρμογή της αλληλούχησης επόμενης γενιάς είναι η αλληλούχηση του ελεύθερου καρκινικού DNA (circulating tumor DNA, ctDNA), γνωστή και ως υγρή βιοψία [46, 50, 51]. Η υγρή βιοψία είναι μέθοδος screening, διάγνωσης, παρακολούθησης της πορείας της ασθένειας και μέσο επιλογής θεραπείας για ασθενείς με καρκίνο.

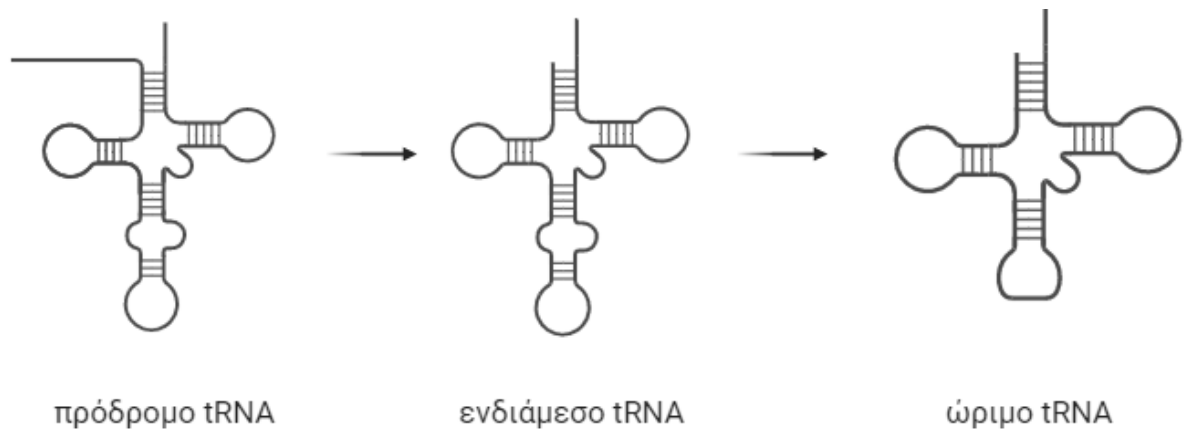
Παρόλο που ο έλεγχος του ctDNA έχει μικρή ευαισθησία στην ανίχνευση μεταλλάξεων σε δείγμα ιστού καρκινικού όγκου, το NGS χρησιμοποιείται ως μία λιγότερο επίπονη διαδικασία σε ασθενείς με μετάσταση [50-52]. Η μέθοδος εμφανίζει τόσο ψευδώς θετικά όσο και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα [53-55].

## 1.2 Μεταφορικό RNA (transfer RNA, tRNA)

Το tRNA<sup>Ala</sup> είναι το πρώτο φυσικό νουκλεϊκό οξύ που αλληλουχήθηκε ποτέ, από τον Holley και την ομάδα του το 1958, οι οποίοι κατάφεραν να καθορίσουν τη σειρά διάταξης των επιμέρους τμημάτων του tRNA που τεμαχίσθηκαν προηγουμένως μέσω των μερικώς επικαλυπτόμενων περιοχών τους σε ζυμομύκητα [56].

Τα μεταφορικά μόρια RNA (transfer RNA, tRNA) συμμετέχουν σε καταλυτικές διαδικασίες στη λειτουργία του οργανισμού, όπως στην μετάφραση, όπου είναι ο συνδετικός κρίκος μεταξύ της πληροφορίας που διαθέτουν τα νουκλεϊκά οξέα και της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών. Ένα μόριο tRNA αναγνωρίζει και συνδέεται, τόσο με το κωδικόνιο του mRNA, όσο και με το αμινοξύ που καθορίζει το συγκεκριμένο κωδικόνιο. Το μήκος τους είναι 70-80 νουκλεοτίδια και οι δευτεροταγής και τριτοταγής δομή τους είναι συντηρημένη.

Ένα μόριο tRNA περνάει από στάδια ωρίμανσης για να καταλήξει στην ώριμη, λειτουργική μορφή του (Εικόνα 1.3). Η διαδικασία ωρίμανσης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ξεκινά στον πυρήνα του κυττάρου με την απομάκρυνση της αλληλουχίας «οδηγού» (leader) από το 5' άκρο μέσω της RNAάσης P του tRNA και ακολούθως της αλληλουχίας «ακόλουθου» (trailer) από το 3' άκρο του, από την tRNάση Z. Στη συνέχεια, απαιτείται η προσθήκη της περιοχής αντίδρασης αμινο-ακυλίωσης, δηλαδή της αλληλουχίας CCA, στο 3' άκρο του μορίου tRNA από το ένζυμο tRNA νουκλεοτιδυλική τρανσφεράση (tRNA nucleotidyl transferase) [57]. Σε αυτό το σημείο το μόριο tRNA εξάγεται στο κυτταρόπλασμα, όπου ή θα παραμείνει, ή θα οδηγηθεί στα μιτοχόνδρια για τη διαδικασία της μετάφρασης [58].



*Εικόνα 1.3 Στάδια ωρίμανσης των μορίων tRNAs [59]*

Ένα ώριμο μόριο tRNA διαθέτει δομή τριφυλλιού (cloverleaf) και αποτελείται από πέντε μέρη: το στέλεχος-δέκτη (acceptor stem) ή αλλιώς βραχίονας υποδοχής αμινοξέος, τον βραχίονα D (D-arm), τον βραχίονα αντικωδικονίου (anticodon arm), τον μεταβλητό βραχίονα (variable loop) και τον ΤΨC βραχίονα (ΤΨC-arm, T-arm) (Εικόνα 1.4) [60]. Ο βραχίονας υποδοχής είναι η θέση πρόσδεσης του αμινοξέος που μεταφέρει το tRNA και προκύπτει από νουκλεοτίδια τα οποία είναι συμπληρωματικά στα 3' και 5' άκρα του tRNA. Ο βραχίονας D περιέχει μία ή περισσότερες διυδροουριδίνες και ο συνολικός αριθμός των βάσεων του διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών μορίων tRNA. Ο βραχίονας αντικωδικονίου έχει δομή βρόγχου και βρίσκεται απέναντι από το στέλεχος-δέκτη. Μεταξύ του βραχίονα αντικωδικονίου και του μεταβλητού βραχίονα, το tRNA δεσμεύει την τριπλέτα του αντικωδικονίου, η οποία είναι συμπληρωματική με την τριπλέτα κωδικονίου του mRNA. Ο μεταβλητός βραχίονας διαθέτει μήκος 4-21 κατάλοιπα και ο ΤΨC βραχίονας διαθέτει την τριπλέτα ΤΨC (όπου Ψ:ψευδοουριδίνη) [56].



Εικόνα 1.4 Δομή μορίου tRNA [59]

Το 1974 μέσω φασματοσκοπίας περίθλασης ακτίνων X βρέθηκε η τρισδιάστατη δομή του μορίου από τους Alexander Rich, Aaron Klug και την ομάδα τους, η οποία σχηματίζει δομή L από την αλληλεπίδραση μεταξύ των βραχιόνων D και T [61]. Για την σταθεροποίηση του μορίου tRNA παρατηρούνται δεσμοί βάσεων κατά Watson-Crick, κατά τον κανόνα της συμπληρωματικότητας, αλλά αυτό μπορεί να μην ισχύει στην περιοχή του στελέχους-δέκτη. Επίσης, ανιχνεύονται δεσμοί υδρογόνου είτε μεταξύ δύο μη συμπληρωματικών βάσεων ή δεσμοί που περιλαμβάνουν την 2'-OH της ριβόζης. Η αλληλουχία υπόκεινται σε μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις με τις πιο συχνές να είναι προσθήκη μεθυλίων, αναγωγή διπλού δεσμού, αλλαγή θέσης σύνδεσης του πυριμιδινικού δακτυλίου με τη ριβόζη, αντικατάσταση ενός ατόμου οξυγόνου από ένα άτομο θείου και την προσθήκη ενός μεγάλου υποκαταστάτη [56]. Οι τροποποιήσεις λαμβάνουν χώρα κυρίως στο βρόγχο του αντικωδικονίου (anticodon loop) και στην κωδικοποιούσα περιοχή (core region), όπου οι βρόγχοι D και T αλληλεπιδρούν και σταθεροποιούν τη δομή του μορίου, όπως αυτή έχει διαμορφωθεί έως τότε. Σε μερικά μόρια tRNA, όπως σε μιτοχονδριακά tRNA, δεν παρατηρείται η δομή τριφυλλίου, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις δεν διαθέτουν D- ή T-βραχίονα και έτσι το τελικό τους μήκος είναι μειωμένο σε σχέση με τα υπόλοιπα μόρια tRNA [62, 63].

### 1.2.1 Μικρά μη κωδικά μόρια RNA

Τα μικρά μη κωδικά μόρια αποτελούνται από microRNAs (miRNAs), μικρά πυρηνικά RNAs (small nuclear RNAs, snRNAs), μικρά πυρηνισκικά RNAs (small nucleolar RNAs, snoRNAs), μικρά συνθετικά RNAs (siRNAs, small interfering RNAs), piwi-interacting RNAs (piRNAs), εξωκυτταρικά RNAs (extracellular RNAs, exRNAs), small Cajal body-specific RNAs (scaRNAs) και τα θραύσματα που προέρχονται από το tRNA (transfer RNA-derived fragments, tRFs).

#### 1.2.1.1 Η ομάδα των microRNAs (miRNAs)

Τα miRNAs είναι μικρά μη κωδικά μόρια RNA με μήκος περίπου 19 έως 25 νουκλεοτίδια που προκαλούν μετα-μεταγραφική αποσιώπηση των γονιδίων-στόχων και βρίσκονται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ένα μόριο miRNA μπορεί να στοχεύσει χιλιάδες mRNAs και να δράσει σε γονίδια προκειμένου να αποτρέψει την έκφρασή τους [64]. Τα miRNA μεταγράφονται είτε από την RNA πολυμεράση II σε ένα γνωστό γονίδιο (ενδογενή miRNA) ή από τον υποκινητή του γνωστού γονιδίου [65].

##### 1.2.1.1.1 Βιογένεση των miRNA

Η πρόδρομη μορφή των miRNAs (primary miRNAs, pri-miRNAs) που είναι συνήθως πολυαδενυλιωμένη, περιέχει μία ή περισσότερες χαρακτηριστικές δομές φουρκέτας, με ένα στέλεχος 30 νουκλεοτιδίων [66]. Η δομή αυτή αναγνωρίζεται από ένα σύμπλοκο που περιέχει την Drosha (RNase III), την DGCR8 και άλλες πρωτεΐνες [67-71]. Η Drosha κόβει 11 βάσεις μακριά από την ένωση με το μονόκλωνο RNA στη δομή φουρκέτας του πρόδρομου miRNA. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται το precursor miRNA (pre-miRNA), το οποίο διαθέτει μια προεξοχή 2 βάσεων στο 3' άκρο και έχει μήκος 60 βάσεις [72]. Η προεξοχή στο 3' άκρο μαζί με το στέλεχος, μήκους 16 νουκλεοτιδίων, αναγνωρίζονται από την εξαπορτίνη-5 (Exportin-5, Exp-5) [73, 74]. Με την βοήθεια της εξαπορτίνη-5 και της τριφωσφορικής γουανιδίνης, το pre-miRNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα [75].

Το pre-miRNA κόβεται στο κυτταρόπλασμα από το σύμπλοκο RNA-induced silencing complex (RISC), όπου η RNAάση III Dicer μετατρέπει το πρώιμο miRNA σε ώριμο, μέσω του 3' άκρου που δημιούργησε η Drosha [76, 77]. Η Dicer δρα σε συνδυασμό με άλλες πρωτεΐνες όπως, πρωτεΐνες από την οικογένεια των AGO



πρωτεϊνών (Argonaute), Immunodeficiency Virus- 1 (HIV-1) Transactivation Response (TAR) RNA-binding protein (TRBP) και άλλες [78-80].

Ένα άλλο μονοπάτι βιογένεσης είναι τα pre-miRNA-like ή αλλιώς *mirtrons* που προκύπτουν από μετάγραφα του mRNA που κόβονται. Σε αυτήν την διαδικασία δεν συμμετέχει η Drosha, αλλά γίνεται τόσο η εξαγωγή τους από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα όπως και το κόψιμο τους από την Dicer, με κάποιες εξαιρέσεις για τα miR-451 [81]. Ο χρόνος ημιζωής των miRNAs μπορεί να είναι από ώρες έως μερικές ημέρες και τα περισσότερα είναι αρκετά σταθερά μόρια [71, 82, 83].

#### 1.2.1.1.2 Ρόλος και λειτουργίες των miRNAs

Τα miRNAs φαίνεται να συμμετέχουν στη ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την κυτταρική διαφοροποίηση, την αγγειογένεση και την ανάπτυξη των καρκινικών βλαστοκυττάρων (cancer stem cells, SCS). Τα miRNAs δρουν είτε με ογκογόνο (oncogenic miRNAs, oncomiRs) είτε με ογκοκατασταλτικό (tumor-suppressive miRNAs) τρόπο. Πιο συγκεκριμένα, μπορούν να καταστείλουν ογκογονίδια που σχετίζονται με κυτταρική ανάπτυξη και μετάσταση ή να επάγουν την μείωση της έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων με αποτέλεσμα την προώθηση μηχανισμών ογκογένεσης.

Ένα πολύ βασικό μονοπάτι που συνδέεται με τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, άρα και με την καρκινογένεση, στο οποίο δρουν τα miRNAs, είναι το μονοπάτι των MAP κινασών. Το μονοπάτι περιλαμβάνει πρωτεΐνες, όπως RAS, RAF και ERK που ρυθμίζονται από μόρια miRNAs. Η RAS πρωτεΐνη ρυθμίζεται από τα ογκοκατασταλτικά let-7, miR-143, miR-18a\* και miR-145 [84-87]. Ένα άλλο βιολογικό μονοπάτι είναι αυτό της κινάσης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 3 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K), το οποίο σχετίζεται με την κυτταρική ανάπτυξη και όταν απορυθμιστούν οι πρωτεΐνες AKT και mTOR που συμμετέχουν σε αυτό, φαίνεται να ενισχύεται η ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Το miR-194 μειώνει την έκφραση της AKT2, ενώ το miR-144 ρυθμίζει αρνητικά τη δράση της mTOR, με αποτέλεσμα την αναστολή του μονοπατιού PI3K και την καρκινογένεση [88, 89].

Αντίθετα, το miR-34a ενισχύει τη δράση της p53 και τα miR-143 και miR-145 δρουν ογκοκατασταλτικά, μέσω της μειωμένης ρύθμισης του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα 1 της ινσουλίνης (insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R)

και παρατηρούνται σε μειωμένα επίπεδα σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου [90]. Επιπρόσθετα, το miR-96 εμφανίζεται υπερεκφρασμένο στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Colorectal Cancer, CRC) και δρα ανασταλτικά στη δράση της p53 πρωτεΐνης [91, 92]. Τα miRNA-21 και miRNA-92a είναι δυνητικοί βιοδείκτες του καρκίνου του παχέος εντέρου. Μέσω του miRNA-92a έγινε επιτυχής διαχωρισμός των ασθενών παχέος εντέρου από τα δείγματα ελέγχου μετά από δειγματοληψία πλάσματος αίματος, ενώ το miRNA-21 καταστέλλει ογκοκατασταλτικά γονίδια και απορρυθμίζει τη φυσιολογική πορεία του κυτταρικού κύκλου [93, 94]. Επίσης το miRNA-552 συμμετέχει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την κλωνοποίηση (clonogenicity) των κυττάρων στον καρκίνο του παχέος εντέρου, όπως συμβαίνει και με την αναστολή του miR-30a [95, 96].

Τα miRNA συμμετέχουν και στην μετάσταση του καρκίνου του παχέος εντέρου (Πίνακας 1.1). Το miR-21 είναι υπερεκφρασμένο στον CRC και απορρυθμίζει την δράση των γονιδίων *PDCD4*, *TIAM1*, *SPRTY* και *PTEN*, επάγοντας την διήθηση και την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων [94, 97-100]. Το miR-224 φαίνεται και αυτό να συμμετέχει στον μηχανισμό μετάστασης μέσω της ρύθμισης του *SMAD4* γονιδίου [101]. Τέλος, η αγγειογένεση αποτελεί βασική προϋπόθεση για την μετάσταση και το miR-27b στοχεύει τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα C (vascular endothelial growth factor C, VEGFC). Το WNT μονοπάτι παρουσιάζεται απορρυθμισμένο στον CRC. Το γονίδιο *APC*, το οποίο υποεκφράζεται στον CRC, αναστέλλει το WNT μονοπάτι μέσω της αναστολής της β-κατενίνης (b-catenin) [102]. Η αναστολή αυτού του γονιδίου συνδέεται με τα υψηλά επίπεδα των miR-135a και miR-135b [103]. Επίσης το miR-320a φαίνεται να στοχεύει την β-κατενίνη, μειώνοντας την ογκογενετική δράση του μονοπατιού.

Η χρόνια φλεγμονή στο κόλον αποτελεί έναν από τους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη CRC. Η ελκώδης κολίτιδα μπορεί να οδηγήσει μέσω ενδιάμεσης δυσπλασίας στον καρκίνο του παχέος εντέρου και τα miRNAs συμμετέχουν σε αυτούς τους μηχανισμούς. Το miR-214 είναι αυξημένο σε περιπτώσεις κολίτιδας, ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα-ενισχυτή της κ-ελαφράς αλυσίδας των ενεργοποιημένων B κυττάρων, προφλεγμονώδη παράγοντα (nuclear factor, κ-light chain enhancer of activated B cells, NF-κB) και αναστέλλει το *PTEN* γονίδιο και την PDZ και LIM υπομονάδα 2 (PDLIM2).

Πίνακας 1.1 MiRNA στον καρκίνο του παχέος εντέρου [104].

miRNA	Ρόλος στον καρκίνο
miR-21	Πολλαπλασιασμός, απόπτωση, διήθηση, μετανάστευση
miR-92a	Πολλαπλασιασμός, διήθηση
miR-96, -135a, -135b	Πολλαπλασιασμός
miR-155	Απόκριση σε βλάβη του DNA
miR-214	Φλεγμονή
miR-224	Μετάσταση

#### 1.2.1.2 Η ομάδα των transfer RNA-derived fragments (tRFs)

Τα tRNA-derived small RNAs (tsRNAs) κατηγοριοποιούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, στα tRNA-derived fragments (tRFs) που έχουν μήκος περίπου 14-30 νουκλεοτίδια και προέρχονται από το ώριμο ή πρόδρομο μεταφορικό RNA (tRNA) και στα tRNA-derived stress-induced RNAs (tiRNAs) με μήκος 29-50 νουκλεοτίδια, τα οποία παράγονται από ειδική διατομή στην περιοχή anticodon loop του ώριμου μορίου tRNA.

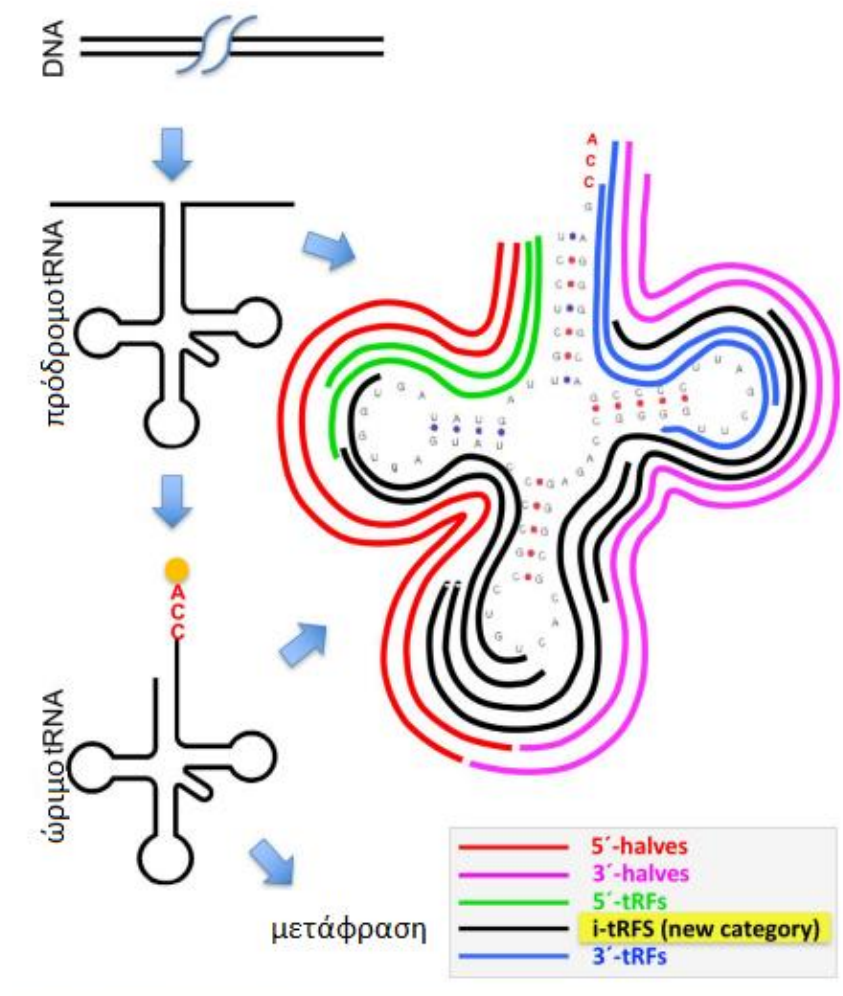
Τα μικρά μόρια tRFs μπορούν να κατηγοριοποιηθούν, ανάλογα με την προέλευσή τους, σε πέντε ομάδες που είναι οι εξής: τα tRF-1, tRF-2, tRF-3, tRF-5 και i-tRF. Τα μόρια tRFs εμφανίζουν ομοιότητες με τα miRNAs και διαθέτουν μία 5'-φωσφορική ομάδα ( $-PO_4^{-3}$ ) και μία 3'-υδροξυλομάδα (-OH). Τα tiRNAs χωρίζονται σε 5' και 3' καθώς περιέχουν το 5' και το 3' άκρο του tRNA, αντίστοιχα. Τα 5'-tiRNAs ξεκινούν από το πέντε ως το τέλος του anticodon loop, ενώ τα 3' ξεκινούν από το anticodon loop και τερματίζουν στο 3' άκρο του tRNA [105].

##### 1.2.1.2.1 Βιογένεση των tRFs

Τα tRF-1 προέρχονται από την διατομή του πρόδρομου tRNA στο 3' άκρο του, από την RNAση Z ή από την ριβονουκλεάση Z2 (ELAC2). Στο 3' άκρο του tRF-1 υπάρχει μία αλληλουχία ουρακίλων (U) [106]. Τα tRF-2 προκύπτουν υπό υποξία από τα tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Gly</sup> και tRNA<sup>Tyr</sup> από την περιοχή anticodon loop,

χωρίς τα 5', 3' άκρα του tRNA. Τα tRF-3 παράγονται από την τομή του ώριμου tRNA στο 3' άκρο του από την αγγειογενίνη, την Dicer ή μέλη της οικογένειας της ριβονουκλεάσης A στον βρόγχο T. Στο 3' άκρο τους περιέχουν την ακολουθία CCA. Τα μόρια tRF-3 χωρίζονται σε tRF-3a και tRF-3b, μήκους 18-22 νουκλεοτιδίων [107]. Τα tRF-5 παράγονται από την Dicer, η οποία κόβει το tRNA στον D βρόγχο και περιλαμβάνουν το 5' άκρο του μορίου. Περιέχουν περίπου 30 νουκλεοτίδια και χωρίζονται σε tRF-5a, b, c. Τέλος τα i-tRFs προκύπτουν από την εσωτερική περιοχή του ώριμου tRNA.

Τα tiRNAs παράγονται με την βοήθεια του ενζύμου αγγειογενίνη (angiogenin, ANG), η οποία διαθέτει μία 5' υδροξυλομάδα. Τα μόρια tiRNA παράγονται σε κατάσταση στρες από τα καρκινικά κύτταρα και σε καταστάσεις υποξίας [108]. Επειδή τα tiRNAs δημιουργούνται από την αγγειογενίνη δε διαθέτουν 5' φωσφορική ομάδα, ενώ τα tRFs έχουν 5' φωσφορική ομάδα και 3' υδροξυλομάδα [107, 108].



Εικόνα 1.5 Βιογένεση των tRFs [109].

#### 1.2.1.2.2 Λειτουργία και δράσεις τα tRFs και tiRNAs

Τα μόρια tRFs και tiRNAs, όπως αποδεικνύεται, συμμετέχουν ως ρυθμιστές στη βιογένεση του rRNA και πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, ο περιορισμός του 3'tsRNA<sup>Leu-CAG</sup> οδηγεί στην απόπτωση τα κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκίνου [110]. Όταν τα καρκινικά κύτταρα συνδεθούν πρωτεΐνες AGO, κάποια από τα tRFs λειτουργούν με τρόπο παρόμοιο των miRNAs και αποσιωπούν την έκφραση γονιδίων. Πλέον, με βάση πρόσφατα επιστημονικά δεδομένα, είναι πιθανόν τα tRFs και τα tiRNAs να ρυθμίζουν την μετάφραση σε διαφορετικά στάδια, ανάλογα με την υποκατηγορία τους ή την κατάσταση του κυττάρου [111].

Επίσης, τόσο τα tRFs όσο και τα tiRNAs ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων όταν συνδέονται με RNA binding proteins (RBPs), οι οποίες παράγονται από μεταλλάξεις και σχετίζονται άμεσα με την εμφάνιση καρκίνου [112]. Πιο συγκεκριμένα, τα tRFs που προκύπτουν από τα tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Gly</sup> εμφανίζονται στον καρκίνο του μαστού να συνδέονται με την Y-box binding protein 1 (YBX1) [113]. Τα συγκεκριμένα tRFs ανταγωνίζονται με ενδογενή μετάγραφα ογκογονιδίων στο ποια τελικά θα συνδεθούν με την YBX1 και όταν τα ενδογενή μετάγραφα συνδεθούν, η YBX1 σταθεροποιείται και επάγει κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Όταν το καρκινικό κύτταρο βρίσκεται υπό συνθήκες στρες, παράγονται περισσότερα tRFs και tiRNAs. Είναι πλέον γνωστό ότι όταν ένα tRF συνδέεται με την YBX1, επάγεται κυτταρικός πολλαπλασιασμός στον καρκίνο του μαστού, ενώ με tiRNA η σύνδεση οδηγεί σε αδρανοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα eIF4G/A και άρα σε αναστολή της μετάφρασης ογκοπρωτεϊνών [114, 115].

Επιπλέον, έχει βρεθεί πως και οι δύο ομάδες, τα tRFs και tiRNAs, ρυθμίζουν τη δράση κινασών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το tRF<sup>Leu-CAG</sup> που ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC), κατά τη φάση G0/G1. Όταν το tRF<sup>Leu-CAG</sup> αναστέλλεται, η έκφραση της Αυτοφακίνης A (AURKA) επίσης αναστέλλεται, με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της διαδικασίας της μίτωσης [116]. Μία σημαντική ακόμη ρύθμιση που εκτελούν αφορά τη σταθερότητα του mRNA, την αντίστροφη μεταγραφή, την μετάφραση και τη βιογένεση των ριβοσωμάτων [117].

Αν απορρυθμιστεί η δράση του tRNA προέλευσης ενός tRF, τότε αλλάζει και δράση του τελευταίου. Η μεταγραφή του tRNA από την RNA πολυμεράση III ρυθμίζεται από πρωτο-ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά και πιο συγκεκριμένα

δρουν στην υπομονάδα Brf1 του TFIII B παράγοντα. Στο θετικό για υποδοχείς οιστρογόνου καρκίνο του μαστού [estrogen receptor (ER)-positive breast cancer] η σχέση μεταξύ του υποδοχέα οιστρογόνων  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) και της Brf1 φαίνεται να επηρεάζει την μεταγραφή του tRNA<sup>Leu</sup> [111, 118].

Το μόριο tiRNA<sup>Leu</sup> αναστέλλει την δράση του ογκογονιδίου *AURKA* και ενδεχομένως επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της ρύθμισης της δράσης του *AURKA* [111]. Έχει βρεθεί ότι η ενεργοποίηση της αγγειογενίνης στον καρκίνο οδηγεί στην παραγωγή tiRNAw, όπως στον ER-θετικό καρκίνο του μαστού, όπου οι ορμόνες του φύλου και οι υποδοχείς τους επηρεάζουν τη δράση της αγγειογενίνης, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή tiRNAs [119].

### 1.2.2 tRFs και tiRNAs σε διάφορα είδη καρκίνου

Μόρια tRFs έχουν ανιχνευθεί σε διάφορα είδη καρκίνου, τόσο σε συχνούς τύπους όσο και σε πιο σπάνια εμφανιζόμενους. Παρακάτω παρατίθενται το είδος του καρκίνου και τα μόρια tRF και tiRNA που εκφράζονται σε αυτούς (Πίνακας 1.2.1).

#### 1.2.2.1 Καρκίνος του πνεύμονα

Τα ts-4521 και ts-3676 είναι υποεκφρασμένα σε δείγματα καρκίνου του πνεύμονα, σε σχέση με φυσιολογικά δείγματα. Επίσης τα ts-46 και ts-47 υπερεκφράζονται σε συνδιασμό με την μείωση της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων στον καρκίνο του πνεύμονα. Τα ts-4521 και ts-3676 αλληλεπιδρούν με τις Ago 1, 2 πρωτεΐνες και το ts-4521 σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και βιολογικά μονοπάτια που οδηγούν στην απόπτωση [116, 120, 121].

#### 1.2.2.2 Καρκίνος του προστάτη

Μετά από ανάλυση των διαφορετικών σταδίων καρκίνου του προστάτη και παρακείμενων δειγμάτων, βρέθηκε ότι είναι διαφορετική η έκφραση των μικρών μη κωδικών μορίων tRFs μεταξύ παρακείμενων ιστών και καρκινικών. Η πλειοψηφία των tRFs που εκφράζονται σε αυξημένα επίπεδα στον καρκίνο του προστάτη είναι tRF-5s, ενώ τα tRF-3s βρέθηκαν να είναι υποεκφρασμένα. Τα tRF που προκύπτουν από τα tRNA<sup>Lys-CCT</sup> και tRNA<sup>Phe-GAA</sup> βρέθηκαν ικανοί μοριακοί βιοδείκτες για την επιβίωση χωρίς υποτροπή [122].

Το tRF-1001 σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων στον καρκίνο του

προστάτη. Έχει βρεθεί από ανάλυση επόμενης γενιάς ότι το μήκος των tRFs διαφέρει σε μεταστατικούς και μη μεταστατικούς καρκίνους και είναι 18 και 27 νουκλεοτίδια αντίστοιχα [123, 124].

#### 1.2.2.3 Καρκίνος του μαστού

Στον θετικό σε ER καρκίνο του μαστού οι υποδοχείς πυροδοτούν την δράση της αγγειογενίνης ως προς το κόψιμο του anticodon loop του ώριμου tRNA. Τα 5'-tiRNA<sup>Asp</sup> και 5'-tiRNA<sup>His</sup> εμφανίζονται υπερεκφρασμένα σε ιστό ή καρκινικά κύτταρα. Το tsRNA-3 είναι υποεκφρασμένο σε κύτταρα καρκίνου του μαστού. Τα tsRNA-6, -48 και -67 είναι υπερεκφρασμένα σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού [121].

Έχει βρεθεί ότι τα tRFs που προκύπτουν από τα tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup> και tRNA<sup>Glu</sup> συνδέονται με την YBX1, αποσταθεροποιούν τα μετάγραφα ογκογονιδίων και ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο [113]. Επίσης ο συνδυασμός tiRNAs και της YBX1 οδηγούν σε αναστολή της μετάφρασης [114].

#### 1.2.2.4 Καρκίνος ωοθηκών

Έχει βρεθεί ότι το breast cancer anti-estrogen resistance 3 (*BCAR3*) mRNA σχετίζεται με τον καρκίνο των ωοθηκών. Μέσω της σύνδεσης του tRF5<sup>Glu</sup> στην 3' αμετάφραστη περιοχή του *BCAR3* μειώνεται η έκφραση του τελευταίου, με αποτέλεσμα το tRF5<sup>Glu</sup> να ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου [125].

#### 1.2.2.5 Β-λέμφωμα

Στο Β-λέμφωμα, το οποίο εμφανίζεται κυρίως σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας και σε ανοσοκατεσταλμένους, ανιχνεύεται ένα tRF με την ονομασία CU1276 που συνδέεται με Ago πρωτεΐνη. Επίσης το CU1276 αναστέλλει την πρωτεΐνη RPA1 που συμβάλλει στην κινητική του DNA, όπως στην γονιδιακή αντιγραφή [126].

#### 1.2.2.6 Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Τα tRFs ts-3676 και ts-4521 βρίσκονται υποεκφρασμένα στην χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Η εκτενέστερη έρευνα με μικροσυστοιχίες έδειξε ότι σχετίζονται περίπου 120 tsRNAs με την νόσο [120]. Επίσης έχουν ανιχνευθεί τα ts-101, ts-53, ts-46 και ts-47 ως υποεκφρασμένα και ιδιαίτερα το ts-46 συμμετέχει στην

ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω της αναστολής του S1P/ceramide μονοπατιού [121, 127].

#### 1.2.2.7 Άλλα είδη καρκίνου

Η συμμετοχή tRFs και tiRNAs βρίσκεται τόσο σε τύπους καρκίνου που εμφανίζονται με μεγάλη συχνότητα όπως αλλά και σε πιο σπάνια εμφάνιση. Στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας βρέθηκε ένα tRF που προκύπτει από το tRNA<sup>Gln</sup> [128, 129], ενώ στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου ανιχνεύτηκαν να είναι απορρυθμισμένα 3 διαφορετικά 5'tiRNAs, σε δείγματα ορού [130]. Στον διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού (clear cell renal cell carcinoma), το 5'tRNA4<sup>Val-AAC</sup> βρέθηκε υποεκφρασμένο σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς [131].

Πίνακας 1.2.1. tRFs και tiRNAs σε τύπους καρκίνου [129].

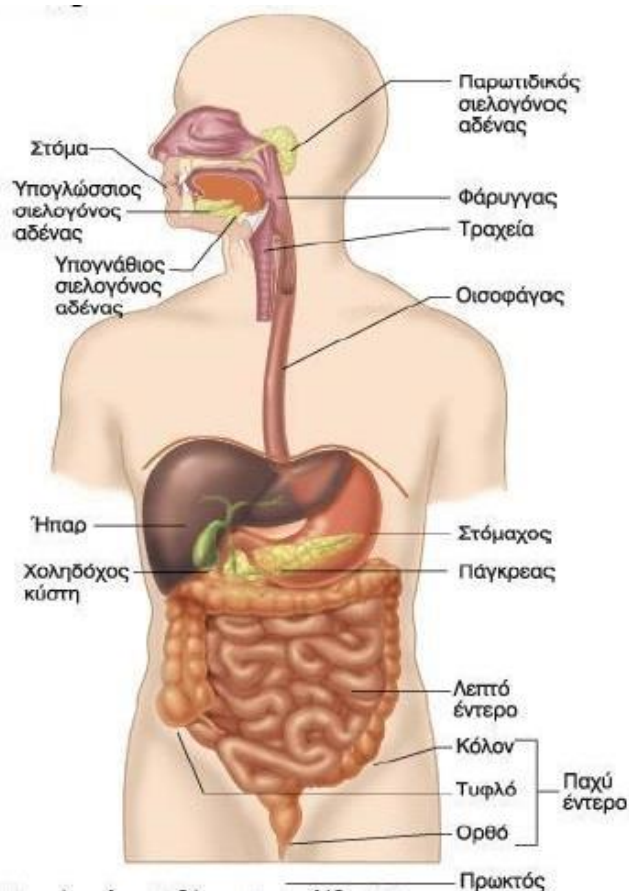
Τύπος καρκίνου	Μόριο tRF/ tiRNA που εκφράζεται
Καρκίνος πνεύμονα	ts-4521, ts-3676, ts-46, ts-47, tRF <sup>Leu-CAG</sup>
Καρκίνος του παχέος εντέρου	tRF/miR-1280
Καρκίνος του προστάτη	tRF <sup>Lys-CCT</sup> , tRF <sup>Phe-GAA</sup> , tRF-1001
Καρκίνος μαστού	5'tiRNA <sup>Asp</sup> , 5'tiRNA <sup>His</sup> , ts-3, ts-6, ts-48, ts-67
Καρκίνος των ωοθηκών	tRF5 <sup>Glu</sup>
Λεμφώματα	CU1276, tRF-3027
Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	ts-3676, ts-4521, ts-46, ts-47, ts-53, ts-101
Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας	5'tRF, tRF(Gln)
Αδενοκαρκίνωμα του νεφρού	5'tRNA4 <sup>Val-AAC</sup>
Καρκίνος κεφαλής και τραχήλου	5'tiRNA <sup>Ala</sup> , 5'tiRNA <sup>Cys</sup> , 5'tiRNA <sup>Tyr</sup>
Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα	chrM.tRNA10-TC, chr12.tRNA8-AlaTGC, chr16.tRNA4-ProAGG, chr1.tRNA58LeuCAA, chr19.tRNA8SeC(e)TCA(SeC(e)TCA, chr19.tRNA4ThrA GT



## 1.3 Γαστρεντερικό σύστημα

### 1.3.1 Φυσιολογία γαστρεντερικού συστήματος

Η διάσπαση της τροφής γίνεται μέσω της γαστρεντερικής οδού με σκοπό την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών από το σώμα και την παραγωγή ενέργειας για τον οργανισμό. Η πέψη γίνεται κυρίως στον στόμαχο και το λεπτό έντερο, όπου οι πρωτεΐνες, τα λιπαρά και οι υδατάνθρακες διασπώνται στα συστατικά τους. Τα μικρότερα μόρια απορροφώνται από το επιθήλιο του λεπτού εντέρου και εισάγονται στην κυκλοφορία του αίματος. Η περίσσεια νερού απορροφάται από το παχύ έντερο, ενώ τα συστατικά που δεν έχουν απορροφηθεί ή είναι προϊόντα από την πέψη και δεν χρησιμοποιήθηκαν, αποβάλλονται μέσω των κοπράνων. Το γαστρεντερικό σύστημα αποτελείται από έναν κοίλο, ινομυώδη σωλήνα που καλύπτεται με βλεννογόνο. Ο γαστρεντερικός σωλήνας ξεκινάει από την στοματική κοιλότητα όπου εισάγεται η τροφή και συνεχίζει στο φάρυγγα, τον οισοφάγο, τον στόμαχο, περνώντας το λεπτό και το παχύ έντερο, καταλήγοντας στον πρωκτό, την πύλη εξόδου της τροφής (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6 Φυσιολογία του Ανθρώπου, 8η έκδοση, Vander J. Arthur, Sherman James, Luciano Dorothy, Τσακόπουλος. 2001

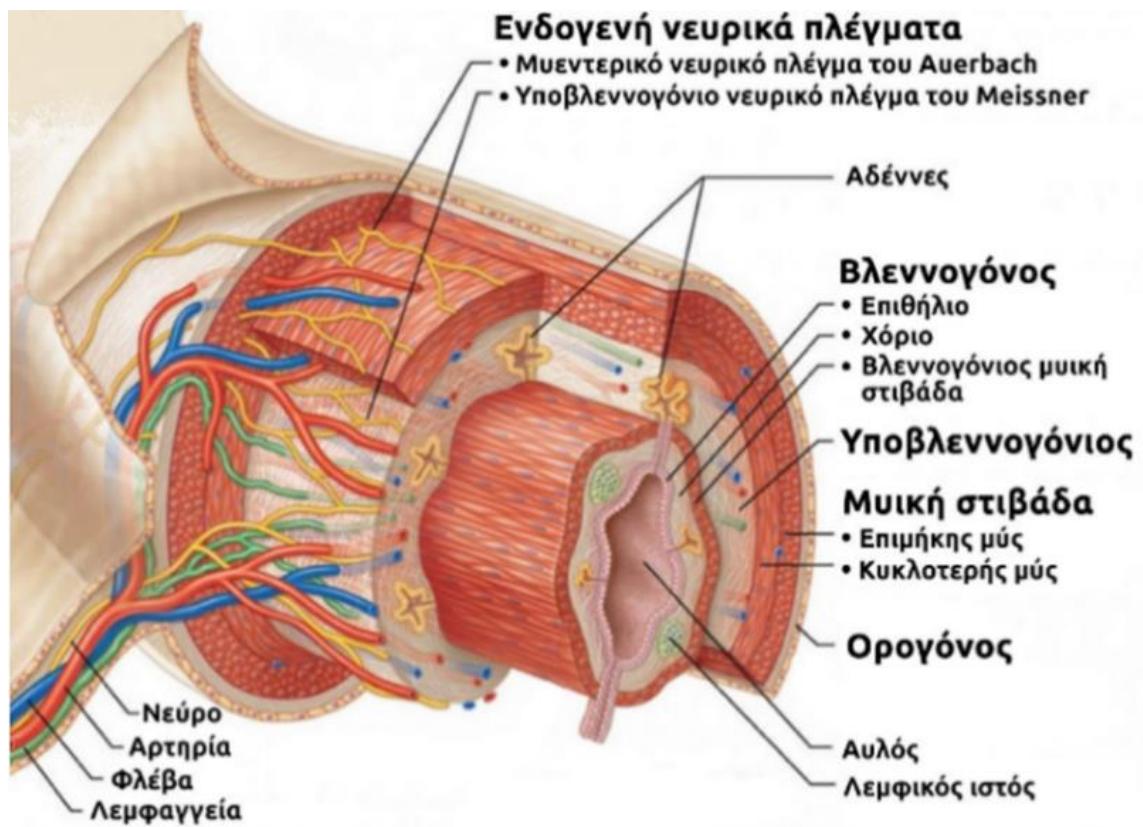
Το σύνολο των κυττάρων του γαστρεντερικού σωλήνα αποτελούν το επιθήλιο και το τοίχωμά του αποτελείται από τέσσερα τμήματα, τον βλεννογόνο χιτώνα, τον υποβλεννογόνο χιτώνα, την εσωτερική μυϊκή στιβάδα και τον ορογόνο υμένα.

Ο βλεννογόνος χιτώνας (*mucosa*) καλύπτει την επιφάνεια που βρίσκεται προς τον αυλό του γαστρεντερικού σωλήνα. Αποτελείται κυρίως από τη βλεννογόνο μεμβράνη η οποία είναι υπεύθυνη για την έκκριση και απορρόφηση των ουσιών. Εκεί βρίσκονται αδένες οι οποίοι απαρτίζονται από εξωκρινή κύτταρα που εκκρίνουν πεπτικούς χυμούς, ενδοκρινή κύτταρα που εκκρίνουν γαστρεντερικές ορμόνες και επιθηλιακά κύτταρα για την απορρόφηση των θρεπτικών προϊόντων της πέψης της τροφής. Επίσης, στο βλεννογόνο υπάρχει η ελασματοειδής ουσία (*lamina propria*), η οποία διαθέτει αιμοφόρα, λεμφικά αγγεία και νευρικές ίνες. Ο βλεννογόνος με τον υποβλεννογόνο χιτώνα συνδέονται μέσω του μυϊκού βλεννογόνου.

Ο υποβλεννογόσιος χιτώνας (*submucosa*), περιβάλλει τον βλεννογόνο και συνίσταται από λίπος, ινώδη συνδετικό ιστό και τα μεγαλύτερα αιμοφόρα αγγεία και νεύρα της υπερκείμενης εξωτερικής μυϊκής στιβάδας, χαρακτηριστικά που προσδίδουν ελαστικότητα στον γαστρεντερικό σωλήνα (Εικόνα 1.7). Εδώ υπάρχει ένα νεύρο που ονομάζεται υποβλεννογόσιο νευρικό πλέγμα ή πλέγμα του Meissner.

Η εξωτερική μυϊκή στιβάδα (*muscularis externa*), που αποτελείται από την κυκλοτερή μυϊκή στιβάδα όπου αποτελείται από λείες μυϊκές ίνες γύρω από τον γαστρεντερικό σωλήνα και την επιμήκη μυϊκή στιβάδα με τις λείες μυϊκές ίνες κατά μήκος τού, δίπλα στον ορογόνο υμένα. Η συστολή των λείων μυϊκών ινών της κυκλοτερούς στιβάδας έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή της διαμέτρου του αυλού του γαστρεντερικού σωλήνα, ενώ η συστολή τους στην εξωτερική επιμήκη μυϊκή στιβάδα μειώνει το μήκος του σωλήνα. Μεταξύ των δύο στιβάδων υπάρχει το μυεντερικό πλέγμα (*myenteric plexus*) ή πλέγμα του Auerbach που σε συνεργασία με το υποβλεννογόσιο πλέγμα ρυθμίζουν τη δράση του εντέρου.

Τέλος, ο ορογόνος υμένας (*serosa*) είναι στιβάδα συνδετικού ιστού που καλύπτει τον γαστρεντερικό σωλήνα και λιπαίνει το περιβάλλον του, ώστε να μην υπάρχει τριβή με τα γύρω όργανα του πεπτικού συστήματος. Σε ένα ποσοστό του ο ορογόνος υμένας διαθέτει το μεσεντέριο ως συνεχές κομμάτι του, το οποίο περιλαμβάνει αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία και νεύρα. Το μεσεντέριο λειτουργεί ως το μέσο σταθεροποίησης των οργάνων του πεπτικού συστήματος, αλλά ταυτόχρονα δίνει την ευελιξία κίνησης του εντέρου.



Εικόνα 1.7 Τοίχωμα γαστρεντερικού σωλήνα [132]

### 1.3.2 Αιμάτωση γαστρεντερικού συστήματος

Η αιμάτωση του γαστρεντερικού συστήματος πραγματοποιείται από τη σπλαχνική κυκλοφορία, χρησιμοποιεί το ένα τέταρτο της συνολικής παραγωγής αίματος και απαρτίζεται από τα αιμοφόρα αγγεία του γαστρεντερικού σωλήνα, του παγκρέατος και του ήπατος. Τα όργανα αυτά αιματώνονται μέσω αρτηριών από την κοιλιακή αορτή. Το αίμα που διαπερνά το σπλήνα, το στομάχο, το πάγκρεας και τα έντερα καταλήγει στο ήπαρ μέσω της πυλαίας φλέβας. Στη συνέχεια, το αίμα διέρχεται από πολλά κολποειδή τριχοειδή και απομακρύνεται μέσω των ηπατικών φλεβών, οι οποίες καταλήγουν στην κάτω κοίλη φλέβα της κυκλοφορίας. Αυτό το μέρος της κυκλοφορίας του αίματος διαθέτει έναν καταλυτικό ρόλο στην απορρόφηση των απαραίτητων συστατικών της τροφής από τον οργανισμό και για την μεταφορά τους στο ήπαρ για την επεξεργασία τους. Εκεί κατακρατούνται τυχόν μικρόβια και απομακρύνονται από τα δικτυοενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών τριχοειδών του ήπατος, έτσι ώστε να μην περάσουν από το γαστρεντερικό σωλήνα στο αίμα και στη συνέχεια στο υπόλοιπο σώμα.

Οι λειτουργίες του οργανισμού για τις οποίες είναι υπεύθυνο το γαστρεντερικό είναι οι λειτουργικές έκκριση, πέψη και απορρόφηση. Οι λειτουργικές κινήσεις πραγματοποιούνται από τα λεία μυϊκά κύτταρα, τον οισοφάγο και το παχύ έντερο. Επίσης, συμμετέχουν σκελετικοί μύες στο στόμα, στον οισοφάγο και στον εξωτερικό πρωκτικό σφιγκτήρα για την επίτευξή τους. Τέλος, οι λείοι μύες του τοιχώματος του σωλήνα διατηρεί σταθερό τον μυϊκό τόνο για τη σταθερότητα της πίεσης στο εσωτερικό του, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται οι προωθητικές κινήσεις και οι κινήσεις ανάμιξης. Οι προωθητικές κινήσεις διακινούν την τροφή στα διάφορα όργανα της πεπτικής οδού με διαφορετική ταχύτητα στο καθένα. Οι κινήσεις ανάμιξης ή αλλιώς τοπικές συστολές, αποσκοπούν στην μίξη της τροφής με τις πεπτικές εκκρίσεις στον στόμαχο, στο λεπτό έντερο και στο εγγύς παχύ έντερο και στην πέψη τους, αλλά και στην απορρόφησή τους από το λεπτό και το εγγύς παχύ έντερο.

Στην έκκριση απελευθερώνονται πεπτικά ένζυμα σε όλο το μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα και οι βλεννογόνοι αδένες καλύπτουν με βλέννα όλα τα μέρη του, από το στόμα μέχρι τον πρωκτό. Η ποσότητα των εκκρίσεων είναι ανάλογη με τις απαιτήσεις της πέψης. Οι πεπτικές εκκρίσεις συνίσταται από νερό, ηλεκτρολύτες και οργανικά μόρια, όπως τα πεπτικά ένζυμα των σιελογόνων αδένων, του στομάχου και του παγκρέατος, τα χολικά άλατα και η χοληστερόλη του ήπατος και η βλέννα από άλλα τμήματα της γαστρεντερικής οδού. Επίσης, είναι πολύ σημαντική η παρουσία ιόντων υδρογόνου που παρέχεται από τον στόμαχο και τα διττανθρακικά ιόντα που προέρχονται από το πάγκρεας. Κατά την πέψη, τα πεπτικά ένζυμα αποικοδομούν τα συστατικά της τροφής σε απλούστερες, απορροφήσιμες ουσίες, καθώς οι υδατάνθρακες, τα λίπη και οι πρωτεΐνες δεν μπορούν να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες στο γαστρεντερικό σωλήνα. Η διαδικασία της πέψης ξεκινά στο στόμα και συνεχίζει στο στόμαχο και το λεπτό έντερο, όπου και γίνεται κατά μεγάλο ποσοστό η απορρόφηση των ουσιών. Η απορρόφηση των συστατικών της τροφής, όπως μονοσακχαρίτες, μικρά πεπτίδια, αμινοξέα, λιπαρά οξέα και μονογλυκερίδια, ηλεκτρολύτες, βιταμίνες από τον αυλό και η εισαγωγή τους στην κυκλοφορία του αίματος γίνεται στο λεπτό έντερο. Η διαδικασία απορρόφησης των συστατικών της τροφής γίνεται μέσω ενεργούς, παθητικής ή διευκολυνόμενης μεταφοράς [133].

### 1.3.3 Παχύ έντερο

#### 1.3.3.1 Ανατομία παχέος εντέρου

Το παχύ έντερο διαθέτει τέσσερα μέρη (μοίρες): το κόλον (colon) (ανιόν, εγκάρσιο, κατιόν και σιγμοειδές), το τυφλό (τυφλό άκρο, cecum), την απόφυση (σκωληκοειδής, appendix) και το απευθυσμένο ή ορθό (rectum) (Εικόνα 1.8). Το μήκος του είναι 1,6 μέτρα και η διάμετρός του γίνεται μικρότερη προς το ορθό, στη λήκυθο.

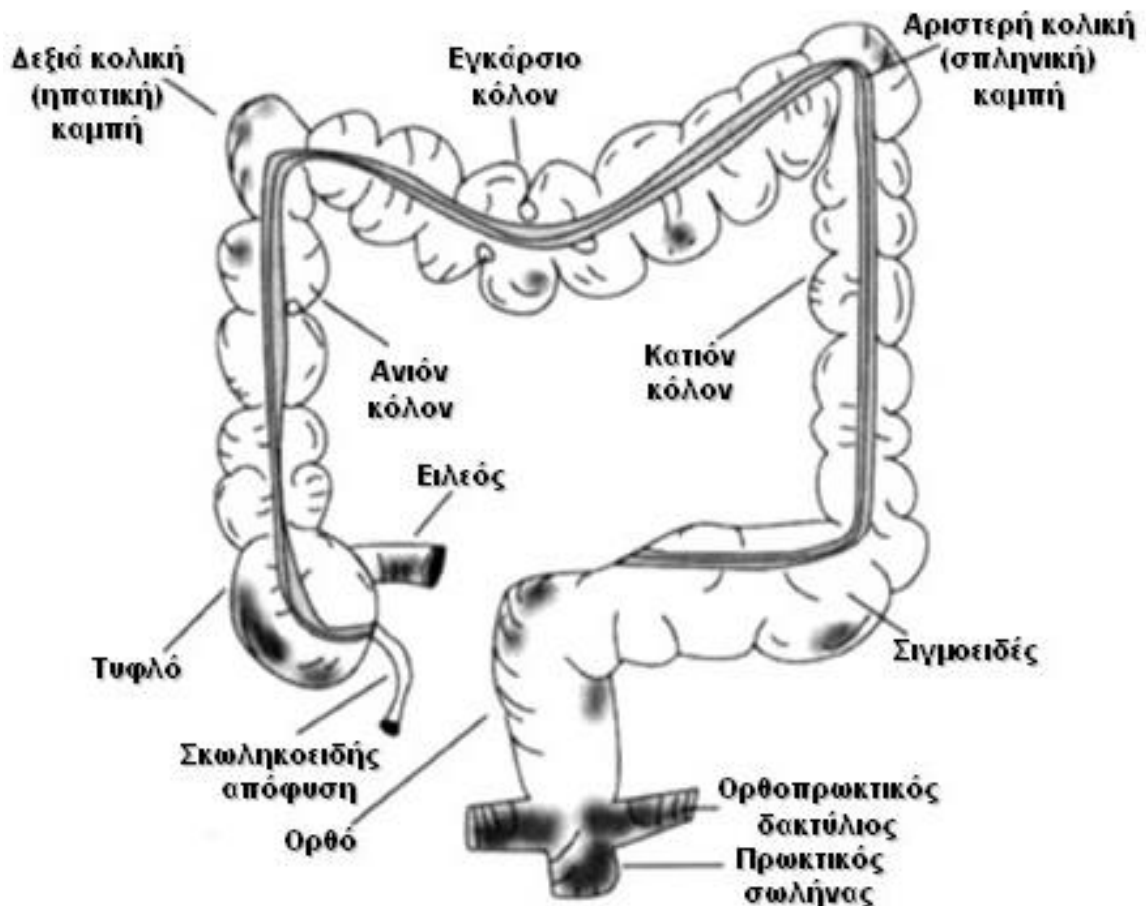
Το ορθό καλύπτεται από την πυελική περιτονία, η οποία περιβάλλει τα εξωπεριτοναϊκά σπλάχνα της πυέλου και έτσι διαμορφώνεται η «ίδια περιτονία του ορθού». Τα άνω αιμορροϊδικά αγγεία, τα λεμφαγγεία, οι λεμφαδένες και τα νεύρα του ορθού περιβάλλονται από κυτταρολιπώδη ιστό και αποτελούν το μεσοορθό. Μεταξύ της περιτονίας του ορθού και της τοιχωματικής πυελικής περιτονίας που καλύπτει το ιερό οστόν (περιτονία του Waldayer), ένας χαλαρός συνδετικός ιστός ακινητοποιεί το ορθό. Σε ύψος 7-9 εκ. από τον πρωκτό, το περιτόναιο ανακάμπτει στην ουροδόχο κύστη στον άνδρα (ευθυκυστική περιτοναϊκή ανάκαμψη) και στη μήτρα στη γυναίκα (ευθυμητρική περιτοναϊκή ανάκαμψη) και έτσι το ορθό χωρίζεται σε ενδοπεριτοναϊκή και εξωπεριτοναϊκή μοίρα.

Από τη συγχώνευση των δύο πετάλων του περιτοναίου του ευθυκυστικού κολπώματος στην εμβρυϊκή ζωή προκύπτει η περιτονοπερινεϊκή περιτονία, η οποία βρίσκεται στην πρόσθια επιφάνεια του εξωπεριτοναϊκού τμήματος του ορθού. Η περιτονία στους άνδρες ονομάζεται περιτονία του Denonvillier, ενώ στις γυναίκες ορθοκολπικό διάφραγμα. Από τη λήκυθο του ορθού, την ένωση ορθού και πρωκτού, έως το κάτω πρωκτικό στόμιο ή δακτύλιο, εκτείνεται ο πρωκτικός σωλήνας που έχει μήκος 3-4 εκ..

Ο έσω σφιγκτήρας χωρίζεται μέσω του επιμήκη μυ από τον εκούσιο έξω σφιγκτήρα. Ο έξω σφιγκτήρας διαθέτει τρεις μοίρες: την υποδόρια, την επιπολή και την εν τω βάθει. Ο έσω σφιγκτήρας έχει μήκος 25-40mm και πάχος 5mm και είναι η συνέχεια του κυκλοτερούς μυός. Οι μυϊκές ίνες του ηβοορθικού συνενώνονται με τις ίνες της ηβικής σύμφυσης και της θυροειδούς περιτονίας (ηβοκοκκυγικός μυς) ή την ισχιακή άκανθα (λαγονοκοκκυγικός μυς).

Στον πρωκτικό σωλήνα ενώνονται 8-14 επιμήκεις πρωκτικές στήλες ή στήλες του Morgagni, σχηματίζοντας τις πρωκτικές βαλβίδες (οδοντωτή γραμμή, dentate line). Στις κρύπτες που διαμορφώνονται εκβάλλουν οι πρωκτικοί αδένες που είναι

σημαντικοί για τη δημιουργία των περιεδρικών αποστημάτων. Το επιθήλιο του πρωκτού απαρτίζεται από τρεις ζώνες, την έξω που συνεχίζεται προς τα άνω (Pecten) με παχύτερο πλακώδες επιθήλιο, την μέση, η οποία εκτείνεται γύρω και πάνω από τις πρωκτικές βαλβίδες (πρωκτική μεταβατική ζώνη ή ATZ, Anal Transitional Zone) και την έσω που είναι ένα μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο και διαθέτει μικρούς σωληνώδεις εντερικούς αδένες.



Εικόνα 1.8 Ανατομία παχέος εντέρου, [134].

### 1.3.3.2 Αιμάτωση παχέος εντέρου

Η αιμάτωση του παχέος εντέρου γίνεται από την άνω μεσεντέριο (ΑΜΑ), την κάτω μεσεντέριο και τις έσω λαγόνιες αρτηρίες. Η ΑΜΑ διακλαδίζεται στις ειλεοκολική τη δεξιά (πρώτος κλάδος της ΑΜΑ) και την μέση κολική. Η κάτω μεσεντέριος αρτηρία (ΚΜΑ) παρέχει αίμα στο παχύ έντερο από το αριστερό 1/3 του εγκάρσιου με την αριστερή κολική, τις σιγμοειδικές και την άνω αιμορροϊδική. Οι έσω λαγόνιες αρτηρίες αιματώνουν τις μέσες και κάτω αιμορροϊδικές αρτηρίες. Μεταξύ της

τελευταίας σιγμοειδούς και της άνω αιμορροϊδικής δεν υπάρχουν αναστομοτικοί κλάδοι. Αυτό ονομάζεται κρίσιμο σημείο του Sudeck. Το αναστομωτικό τόξο της επιχειλίου αρτηρίας του Drummond διαμορφώνεται μεταξύ των κολικών αρτηριών, ενώ μεταξύ της μέσης και αριστερής κολικής σχηματίζεται το αναστομωτικό τόξο του Riolan. Η αιμάτωση του ορθού και του πρωκτικού σωλήνα πραγματοποιείται από την άνω αιμορροϊδική (κλάδο της κάτω μεσεντερίου), την μέση και κάτω αιμορροϊδική (κλάδοι της έσω αιδοϊκής) και την μέση ιερά αρτηρία (κλάδο της αορτής).

#### *1.3.3.3 Νεύρωση του παχέος εντέρου*

Η νεύρωση του παχέος εντέρου πραγματοποιείται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα. Οι ίνες του σχηματίζουν δύο πλέγματα στο τοίχωμα του εντέρου, το μυεντερικό του Auerbach και το υποβλεννογόνο του Meissner. Η παρασυμπαθητική νεύρωση του παχέος εντέρου γίνεται μέσω ινών του πνευμονογαστρικού νεύρου μέχρι την αριστερή κολική καμπή και μέσω ινών εκ του ιερού παρασυμπαθητικού πυρήνα στο υπόλοιπο μέρος του. Η συμπαθητική νεύρωση γίνεται μέσω ινών του πλέγματος της άνω και κάτω μεσεντερίας αρτηρίας και του πυελικού πλέγματος. Το ζωικό νευρικό σύστημα με το αιδοϊκό νεύρο, κλάδο του ιερού πλέγματος, νευρώνουν τον έξω σφιγκτήρα του πρωκτού και το βλεννογόνο του, κάτω από την οδοντωτή γραμμή [135].

### **1.4 Καρκίνος του παχέος εντέρου**

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (colorectal cancer, CRC) είναι ο τέταρτος πιο θανατηφόρος τύπος καρκίνου, έπειτα από τον καρκίνο του πνεύμονα, του ήπατος και του στομάχου. Υπολογίζεται ότι είναι η αιτία θανάτου για περίπου 700.000 ασθενείς κάθε χρόνο. Η εμφάνισή του φαίνεται να συνδέεται άμεσα με τη διατροφή, η οποία τα τελευταία χρόνια έχει αλλάξει αρκετά ανά τον κόσμο, με ανάλογη αύξηση στα κρούσματα του τύπου αυτού [136]. Από το 2000 παρατηρείται μείωση της θνητότητας που προκαλεί ο καρκίνος του παχέος εντέρου, καθώς ο κλινικός έλεγχος έχει ενταχθεί στη ρουτίνα ενός κλινικού εργαστηρίου και η φαρμακευτική αγωγή είναι επαρκής για την αντιμετώπισή του σε πολλές περιπτώσεις. Τα στοιχεία αυτά απευθύνονται σε άτομα από 55 χρόνων και πάνω, καθώς για μικρότερες ηλικίες φαίνεται να είναι μεγαλύτερη η αύξηση των περιστατικών και δυσμενής η αντιμετώπισή τους [137].

### 1.4.1 Επιδημιολογία

Η ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι αργή και δεν εμφανίζει νωρίς συμπτώματα, μόνο αν το μέγεθος του όγκου είναι τόσο μεγάλο, ώστε να προκαλεί κάποια δυσλειτουργία στον οργανισμό, όπως κράμπες, πόνο στην κοιλιά ή παρουσία αίματος στα κόπρανα [138]. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου συχνά είναι η εξέλιξη ενός πολύποδα, μία προεξοχή στον εντερικό αυλό που διαμορφώνεται από τη συσσώρευση μη φυσιολογικών κυττάρων [139]. Αν τα διαιρούμενα κύτταρα του πολύποδα υποπέσουν σε γενετικές αλλαγές, τότε μπορούν να διηθήσουν το εντερικό τοίχωμα και να διασπαρούν σε λεμφαδένες και σε άλλες μεταστατικές περιοχές [139]. Η εξαλλαγή ενός πολύποδα σε καρκινικό όγκο δεν είναι απόλυτη, αλλά αν αυτό συμβεί, χρειάζονται μερικά χρόνια [140].

Οι πολύποδες χωρίζονται ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων τους που αναγνωρίζεται με ιστολογική εξέταση σε αδενώματα, οδοντωτούς, φλεγμονώδεις και υπερπλαστικούς πολύποδες, ενώ ανάλογα με το σχήμα τους μπορεί να είναι έμμοιχοι, άμοιχοι ή επίπεδοι. Οι πολύποδες που εξελίσσονται σε κακοήθεια είναι δύο κατηγοριών: τα αδενώματα και οι οδοντωτοί επίπεδοι πολύποδες (*sessile serrated polyps, SSP*), ενώ οι φλεγμονώδεις και οι υπερπλαστικοί δεν εξελίσσονται σε καρκίνο.

Τα αδενώματα χωρίζονται σε σωληνοειδή (*tubular*), μικτά-σωληνολαχνωτά (*tubulovillious*) και λαχνωτά (*villious*). Τα μικτά και λαχνωτά αδενώματα έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα για εξέλιξη σε καρκίνο του παχέος εντέρου. Οι οδοντωτοί πολύποδες είναι επίπεδοι και διαθέτουν οδοντωτούς αδένες. Η κατηγορία των SSPs περιέχουν άμοιχα οδοντωτά αδενώματα, τυπικά οδοντωτά αδενώματα και μικτούς πολύποδες που συνδέονται με την ανάπτυξη καρκίνου [141, 142]. Έχει καταγραφεί ότι το 60-70% των περιπτώσεων CRC προκύπτει από αδενώματα, ενώ μόνο το 25-35% από SSPs [143, 144].

Η μετάβαση του καλοήθους πολύποδα σε καρκινικό όγκο γίνεται σταδιακά μέσω της αύξησης του μεγέθους του, της επίδρασης γενετικών τροποποιήσεων και έχει την εικόνα μίας κυτταρολογικής και ιστολογικής δυσπλασίας [138, 145]. Αν αυτοί οι πολύποδες δεν αφαιρεθούν, τότε μπορεί αυτό να οδηγήσει σε καρκινογένεση, διήθηση των τοιχωμάτων του κόλον, του πρωκτού και των γειτονικών ιστών, την εξάπλωση του σε λεμφαδένες και την κυκλοφορία των καρκινικών κυττάρων που μπορεί να οδηγήσει στην εξάπλωση του καρκίνου και σε άλλα όργανα [138, 146].



Αν αφαιρεθεί ο πολύποδας σε αυτό το στάδιο ανάπτυξης, τότε διακόπτεται το μονοπάτι του αδενώματος-καρκινώματος, άρα μειώνεται ο κίνδυνος για εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου.

Ιστολογικά, για την εξαλλαγή του πολύποδα σε καρκίνο, συμβαίνουν αλλαγές σε γενετικό και επιγενετικό επίπεδο. Υπάρχουν δύο βιολογικά μονοπάτια που επηρεάζουν τη φύση του πολύποδα. Πιο αναλυτικά, το ένα μονοπάτι συνδέεται με την ανάπτυξη των αδενωμάτων, ενώ το άλλο με τα SSPs ως μορφή δυσπλασίας. Η ύπαρξη αδενωμάτων παρατηρείται στο 65-70% των σποραδικών CRCs και είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης μεταλλάξεων.

Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί ο χρωμοσωμικός διαχωρισμός κατά την κυτταρική διαίρεση που επηρεάζεται όταν στο γονίδιο *APC* σημειώνονται μεταλλάξεις. Έπειτα γίνονται μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο *KRAS* που έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στην κυτταρική ανάπτυξη, στη διαφοροποίηση, στην κινητικότητα και στην επιβίωση. Αυτές οι αλλαγές στο γονίδιο *KRAS* με την πάροδο του χρόνου μπορούν να προκαλέσουν απώλεια της δράσης του γονιδίου *TP53*, το οποίο ρυθμίζει την μεταγραφή και την απόπτωση, με αποτέλεσμα να μπορεί να εμπλέκεται σε καρκινογένεση [147]. Οι επίπεδοι οδοντωτοί πολύποδες προέρχονται από μεταλλάξεις στο *BRAF* γονίδιο που ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη και την απώλεια της απόπτωσης [142, 148-150]. Πιο σπάνια παρατηρούνται και σε αυτήν την κατηγορία νεοπλασμάτων μεταλλάξεις στο *KRAS* [148, 149].

Επίσης στους SSPs παρατηρείται υπερμεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων *BMP3* και *NDRG4* [151, 152]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγραφής και της λειτουργίας των γονιδίων αυτών. Τέλος, ένα φαινόμενο που συμβαίνει στον CRC είναι η μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability, MSI), η οποία παρατηρείται λόγω ανωμαλιών στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA. Η μικροδορυφορική αστάθεια είναι η ανεξέλεγκτη αντιγραφή αλληλουχιών DNA και δημιουργία μικρών, μη κωδικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Αυτό παρατηρείται τόσο σε αδενώματα όσο και σε επίπεδους, οδοντωτούς πολύποδες, συνδέεται με εκ γενετής αλλά και σποραδικές μεταλλάξεις λόγω μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *MLH1* και σχετίζεται με το πρότυπο μεθυλίωσης των νησίδων CpG (CpG island methylator phenotype) [142, 148, 149, 153].

#### 1.4.2 Σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέος εντέρου και βαθμός διαφοροποίησης του όγκου

Τα στάδια του καρκίνου του παχέος εντέρου διαμορφώνονται ανάλογα με την θέση στην οποία υπάρχει ο όγκος και σε τι έκταση έχει διασπαρθεί, αν αυτό συμβαίνει. Σύμφωνα με την Αμερικανική Μικτή Επιτροπή για τον Καρκίνο (American Joint Committee on Cancer) οι τρεις παράγοντες που ενδιαφέρουν τον γιατρό για τον χαρακτηρισμό του όγκου είναι:

1. ο αρχικός καρκινικός όγκος (primary tumor, T): σχετίζεται με το μέγεθος του όγκου και την θέση του, αν δηλαδή υπάρχει στο τοίχωμα του κόλον ή στην γύρω περιοχή,
2. οι τοπικοί λεμφαδένες (regional lymph nodes, N): αν εντοπίζονται καρκινικά κύτταρα σε γειτονικούς λεμφαδένες και
3. οι μεταστάσεις (distant metastases, M): αν έχει διασπαρθεί ο καρκίνος σε άλλα μέρη του σώματος, όπως οι πνεύμονες ή το ήπαρ.

Όταν έχουν προσδιορισθεί οι παραπάνω παράγοντες, γίνεται συνδυασμός αυτών με έναν αριθμό που αντιπροσωπεύει την εξάπλωση του όγκου στα τοιχώματα του κόλον. Έτσι, σύμφωνα με το American Cancer Society, τα στάδια του παχέος εντέρου διαμορφώνονται ως εξής:

Πίνακας 1.3 Θέση καρκινικών κυττάρων ανά στάδιο της νόσου.

Στάδιο νόσου	Θέση
0	Βλεννογόνος, εσωτερικό τοίχωμα του κόλον ( <i>in situ</i> καρκίνωμα)
1	Υποβλεννογόνος
2	<b>2A.</b> Εξωτερικό τοίχωμα του κόλον
	<b>2B.</b> Εξωτερικό τοίχωμα του κόλον και σπλαχνικό περιτόναιο
	<b>2C.</b> Παρακείμενα όργανα ή δομές
3	<b>3A.</b> Παρακείμενοι λεμφαδένες
	<b>3B.</b> Σπλαχνικό περιτόναιο και σε 1-3 λεμφαδένες ή εξωτερικό τμήμα του κόλον και σε >4 λεμφαδένες
	<b>3C.</b> >4 λεμφαδένες
4	<b>4A.</b> Ήπαρ ή πνεύμονες
	<b>4B.</b> Σε δύο απομακρυσμένα σημεία, ήπαρ και πνεύμονες

Εκτός από την σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέος εντέρου, γίνεται ο προσδιορισμός της διαφοροποίησης του όγκου, κατά τον οποίο αξιολογείται η εικόνα των κυττάρων του όγκου σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα που εντοπίζονται στην ορθοκολική επιφάνεια. Ο καρκινικός όγκος μπορεί να ανήκει σε μία από τους τέσσερις βαθμούς διαφοροποίησης (grades) και διακρίνονται σε χαμηλού (low grade, I,II grades) και υψηλού βαθμού (high grade, III,IV grades). Στο στάδιο I τα κύτταρα του καρκινικού όγκου φαίνονται περίπου όπως αυτά του φυσιολογικού ορθοκολικού ιστού, στο στάδιο IV τα κύτταρα διαφέρουν κατά πολύ από τα φυσιολογικά, ενώ τα στάδια II, III είναι σε ενδιάμεση κατάσταση [154].

Οι περιπτώσεις του κληρονομικού τύπου καρκίνου είναι το 5-10% του συνολικού αριθμού περιπτώσεων και έχουν την μορφή συνδρόμων, όπως κληρονομικός μη-πολυποειδής καρκίνος του παχέος εντέρου (hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC) ή οικογενής αδενωματούδης πολυποδίαση (familial adenomatous polyposis, FAP) [155-157]. Το σύνδρομο FAP είναι μία αυτοσωμική επικρατής ασθένεια, στην οποία το 80% των ασθενών έχουν μετάλλαξη στο γονίδιο *APC* (adenomatous polyposis coli), ενώ σε μερικούς ασθενείς υπάρχει μετάλλαξη στο γονίδιο *MHY* [158, 159]. Οι ασθενείς εμφανίζουν αδενώματα του παχέος εντέρου που αν δεν αφαιρεθούν, οδηγούνται σε καρκίνο του παχέος εντέρου μέχρι την ηλικία των 40. Το σύνδρομο HNPCC είναι αυτοσωμικό, επικρατές και εμφανίζεται λόγω μετάλλαξης mismatch. Σε αυτό το σύνδρομο παρουσιάζονται όγκοι με την ιδιότητα μικροδορυφορικής αστάθειας. Η διάγνωση είναι δύσκολη, καθώς δεν υπάρχει ένας τυπικός φαινότυπος που να χαρακτηρίζει την ασθένεια. Οι ασθενείς με HNPCC ενδέχεται να εμφανίσουν καρκίνο του παχέος εντέρου μέχρι την ηλικία των 44 χρόνων [160].

#### **1.4.3 Παράγοντες κινδύνου**

Οι παράγοντες κινδύνου για τον σποραδικό καρκίνο είναι το κάπνισμα, η διατροφή, ειδικά οι υψηλές ποσότητες κατανάλωσης αλκοόλ και κόκκινου κρέατος με ταυτόχρονη τη μειωμένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, φυτικών ινών και ασβεστίου. Πολύ σημαντικό ρόλο παίζει ταυτόχρονα με την διατροφή η σωματική άσκηση [161]. Επίσης, παράγοντες όπως η κληρονομικότητα, ασθένειες όπως η χρόνια φλεγμονώδη εντερική νόσος ή ο διαβήτης τύπου II ή ιστορικό με ακτινοβολήση στην περιοχή της λεκάνης ή στην κοιλιακή χώρα λόγω προηγούμενου

καρκίνου, μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου [162-166].

#### 1.4.4 Παθογένεια

Η παθογένεια του καρκίνου του παχέος εντέρου ξεκινά από την ακολουθία αδενώματος καρκινώματος. Τα γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι τα *APC*, *catenin-beta 1 (CTNNB1)*, *KRAS*, *BRAF*, *SMAD4*, *transforming-growth factor receptor 2 (TGFR2)*, *TP53*, *phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 2-kinase catalytic subunit-alpha (PIK3CA)*, *AT-rich interactive domain 1A (ARID1A)*, *sex-determining region Y (SRY)*, *box 9 (SOX9)*, *family with sequence similarity 123B (FAM123B, αλλιώς AMER1)*, *ERBB2*, το οποίο επάγει ογκογένεση μέσω βιολογικών μονοπατιών, όπως αυτό της Wnt-β-κατενίνης (Wnt-β-catenin), του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGF (epidermal growth factor), της πρωτεϊνικής κινάσης MAPK, της φωσφατιδυλινοσιπόλης 3-κινάσης (phosphatidylinositol 3-kinase, *PI3K*) και του αυξητικού παράγοντα μετατροπής-β (transforming growth factor beta, *TGF-β*). Επίσης, επηρεάζονται γονίδια που ρυθμίζουν την επιδιόρθωση του DNA και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου [167, 168].

Υπάρχουν δύο βιολογικά μονοπάτια που συνδέονται με την παθογένεια του καρκίνου του παχέος εντέρου. Το πρώτο είναι το μονοπάτι των γονιδίων «φρουρών» (gatekeepers' pathway) και το δεύτερο είναι το μονοπάτι των γονιδίων «φροντιστών» (caretakers' pathway) [169]. Τα γονίδια gatekeepers είναι ρυθμιστικά γονίδια της ανάπτυξης και είναι υπεύθυνα για το 85% των σποραδικών περιπτώσεων του καρκίνου του παχέος εντέρου και του συνδρόμου FAP. Στο μονοπάτι αυτό γίνεται μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *APC*. Άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια που εμπλέκονται είναι τα *DCC*, *DPC4/SMAD4*, *TP53* και *nm32*, ενώ ογκογονίδια όπως τα *KRAS*, *C-MYC*, *C-NEU*, *C-ERB2*, *C-SRC* εμπλέκονται και αυτά στην ανάπτυξη καρκίνου [170]. Στο μονοπάτι των caretaker τα γονίδια υπόκεινται σε μεταλλάξεις ή επιγενετικές αλλαγές. Το σύνδρομο HNPCC είναι η κληρονομική μορφή της ασθένειας του καρκίνου του παχέος εντέρου, κάτι που εμφανίζεται στο 15% των σποραδικών περιπτώσεων. Στα γονίδια *TGFβRII*, *IGF2R* και *BAX* εμφανίζονται μεταλλάξεις σε αυτό το μονοπάτι [155, 171, 172]. Άλλα βιολογικά μονοπάτια είναι το μονοπάτι της οδοντωτής νεοπλασίας (serrated

pathway), το μονοπάτι της καρκινογένεσης των επίπεδων μη πολυποδιακών νεοπλασμάτων (flat and depressed colorectal neoplasms) και της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (inflammatory bowel disease, IBD) [172-174].

Επίσης, επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως μεθυλίωση του DNA, έλλειψη του εντυπώματος, ακετυλίωση των ιστονών, μεταλλαγές γονιδίων όπως στο γονίδιο της 2-κυκλοοξυγενάσης και του υποδοχέα ενεργοποίησης του πολλαπλασιασμού του υπεροξειδισώματος, όπως και τα γονίδια των φωσφατασών της τυροσινάσης και του υποδοχέα της ακτιβίνης τύπου II (activin type 2), συνδέονται με την εμφάνιση του καρκίνου του παχέος εντέρου [171, 175-179] [180]. Ένα παράδειγμα επιγενετικής αλλαγής είναι η DNA μεθυλίωση στις νησίδες CpG. Τέτοιες περιοχές υπάρχουν συνήθως στο 5' άκρο των γονιδίων. Η υπερμεθυλίωση των CpG περιοχών στους υποκινητές των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, καθώς και η υπομεθυλίωση των επαναλαμβανόμενων γενετικών στοιχείων που οδηγεί σε γονιδιακή αστάθεια ή ενεργοποίηση των ογκογονιδίων, μπορεί να οδηγήσουν σε ογκογένεση [181].

Στην πιο συνηθισμένη μορφή του καρκίνου του παχέος εντέρου η καρκινογένεση ξεκινάει με την ανάπτυξη πολυπόδων στην κρύπτη, όπου οδηγεί στην εμφάνιση αδενώματος, μεγέθους μικρότερου από 1 cm. Στη συνέχεια, το αδένωμα αναπτύσσεται σε >1 cm, ώστε να καταλήξει σε καρκίνο του παχέος εντέρου. Η συγκεκριμένη διαδικασία διαρκεί 10 έως 15 χρόνια, αλλά διαφέρει ο ρυθμός της ανάπτυξης σε κάποιες περιπτώσεις, όπως το σύνδρομο Lynch [182]. Το γεγονός ότι η ιστολογική εικόνα δείχνει ομοιογένεια μεταξύ των συμβατικών αδενωμάτων αλλά το βιολογικό τους υλικό παρουσιάζει ετερογένεια, εξηγεί την ανάπτυξη του καρκίνου μόνο σε μερικές περιπτώσεις. Οι πολύποδες που οδηγούν σε καρκίνο μπορεί να είναι σωληνοειδής αδενωματώδεις, λαχνωτοί αδενωματώδεις (~25%) και επίπεδοι οδοντωτοί (5-10%) [183-185]. Οι τελευταίοι χωρίζονται σε υπερπλαστικούς (30%), επίπεδα οδοντωτά αδενώματα (3,9%), κλασσικά οδοντωτά αδενώματα (0,7%) και στους μικτούς πολύποδες (0,7%) [186]. Οι οδοντωτοί πολύποδες είναι η ενδιάμεση κατάσταση μεταξύ υπερπλαστικών πολυπόδων και αδενοκαρκινώματος.

#### **1.4.5 Διάγνωση**

Η διάγνωση μπορεί να γίνει είτε μέσω εμφάνισης συμπτωμάτων ή μετά από έλεγχο των παραγόντων που επηρεάζονται από την παρουσία του καρκίνου στον

οργανισμό. Στα συμπτώματα περιλαμβάνονται αίμα στα κόπρανα, κοιλιακό άλγος και αλλαγή στη συχνότητα ούρησης ή την σύσταση των ούρων. Επίσης παρατηρείται κούραση και συμπτώματα παρόμοια με αυτά της αναιμίας όπως ωχρότητα του δέρματος, αδυναμία στην αναπνοή και απώλεια βάρους [187]. Οι τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια για τη διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι η κολonosκόπηση, αλλά και άλλες ενδοσκοπικές μέθοδοι, όπως ενδοσκόπηση υψηλής ανάλυσης λευκού φωτός, χρώμο-ενδοσκόπηση, μεγεθυντική ενδοσκόπηση, απεικόνιση στενού φάσματος, ενδοσκόπηση αυτοφθορισμού και ενδομικροσκοπία [188, 189]

#### **1.4.6 Έλεγχος**

Ο έλεγχος για τον καρκίνο του παχέος εντέρου έχει συμβάλει στην πτώση του ποσοστού θνησιμότητας. Είναι εύκολο να γίνει έλεγχος σε αυτόν τον τύπο καρκίνου καθώς έχει υψηλή συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό, έχει ένα βραχύ προκλινικό στάδιο, το αρχικό στάδιο με την εμφάνιση αδενώματος καρκίνου είναι ανιχνεύσιμο και μπορεί να θεραπευθεί και τέλος η αντιμετώπιση ενός περιστατικού σε αρχικό στάδιο μπορεί να αποτρέψει την κατάληξη σε θάνατο [190].

Ο έλεγχος περιλαμβάνει μία σειρά εξετάσεων και εφόσον αυτές βγουν θετικές, ο ασθενής οδηγείται σε κολonosκόπηση [191]. Οι εξετάσεις που γίνονται είναι η λανθάνουσα αιμορραγία κοπράνων, η ευέλικτη σιγμοειδοσκόπηση, η εικονική κολonosκόπηση κλύσματος βαρίου και η κολonosκόπηση [192]. Η πιο συχνή εξέταση από τις παραπάνω είναι η κολonosκόπηση, καθώς είναι η μόνη μέθοδος που συμβάλει σημαντικά στη διάγνωση της νόσου. Αυτό συμβαίνει διότι, διαθέτει υψηλή ευαισθησία λόγω χρήσης νέων τεχνολογιών, όπως η μεγεθυντική ενδοσκόπηση και η χρωμο-ενδοσκόπηση και δίνει τη δυνατότητα του προσδιορισμού της τοποθεσίας του όγκου [187, 193, 194]. Βρέθηκε ότι μέσω της κολonosκόπησης μειώθηκε ο κίνδυνος για εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου κατά 80%, όπως και το ποσοστό θνησιμότητας που σχετίζεται με αυτήν την μορφή καρκίνου [195, 196]. Στην κολonosκόπηση γίνεται ιστοπαθολογική εξέταση όπου λαμβάνεται βιοψία από περιοχές που έχουν βλάβη. Κατά την ιστοπαθολογική εξέταση προσδιορίζεται τόσο ο ιστολογικός τύπος βλάβης, όσο και το στάδιο και ο βαθμός διήθησης κακοηθών ορθοκολικών πολυπόδων.

Ο ιστολογικός τύπος της βλάβης αναφέρεται στον τύπο των κυττάρων και

χαρακτηρίζεται αδενοκαρκίνωμα, καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων, αδενοπλακώδες καρκίνωμα, αδιαφοροποίητο καρκίνωμα και μυελώδες καρκίνωμα. Το στάδιο (grades 1-4) χαρακτηρίζει τον βαθμό διαφοροποίησης των καρκινικών σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Τέλος, ο βαθμός διήθησης κακοηθών ορθοκολικών πολύποδων, αναφέρεται στο βάθος του ιστού που έχει εισβάλλει ο πολύποδας. Οι πολύποδες χωρίζονται σε έμμισχους με τέσσερα επίπεδα διήθησης και άμισχους με τρία επίπεδα διήθησης. Στην πρώτη περίπτωση, οι πολύποδες ενώνονται μέσω ενός μίσχου με το τοίχωμα του εντέρου, ενώ στη δεύτερη απουσιάζει ο μίσχος.

Άλλες ενδείξεις επιθετικής μορφής της νόσου είναι η παρουσία καρκινικών κυττάρων στα όρια του πολύποδα που αφαιρέθηκε, η προσβολή αγγείων και λεμφαγγείων από τον καρκίνο και η υψηλού βαθμού κακοήθεια [197]. Οι υπόλοιπες μέθοδοι δεν συμβάλλουν τόσο στην πρόληψη του καρκίνου, όμως δεν είναι τόσο επεμβατικές όσο η κολονοσκόπηση. Τέτοιες μέθοδοι είναι η ενδοσκόπηση και η σιγμοειδοσκόπηση. Μέσω της ενδοσκόπησης μπορεί να γίνει διάγνωση και είναι εμφανής η ύπαρξη νεοπλασίας ή όχι στο παχύ έντερο. Τα αδενώματα σε αυτήν την περιοχή μπορούν να ανιχνευθούν μέσω ενδοσκόπησης, αξονικής κολονογραφίας (CT) ή ενδοσκόπησης με κάψουλα (αλλιώς ενδοσκοπική κάψουλα) [198-200]. Η αξονική κολονογραφία περιλαμβάνει την χρήση μικρής δόσης CT σάρωσης, έτσι ώστε να οπτικοποιήσει το εσωτερικό του κόλον. Έχει υψηλή ευαισθησία (96%), αρκετά κοντά σε αυτήν της κολονοσκόπησης [200]. Στην ενδοσκόπηση με κάψουλα ο εξεταζόμενος καταπίνει μία ασύρματη κάψουλα που δίνει την εικόνα της πορείας της στη γαστρεντερική οδό. Βρίσκει εφαρμογή στην διάγνωση αδενωμάτων και του ορθοκολικού καρκίνου [199, 201-203]. Η σιγμοειδοσκόπηση είναι μία ακόμη εναλλακτική μέθοδος οπτικοποίησης για την περιοχή του πρωκτού και του κατώτερου κόλον. Έχει δειχθεί ότι έχουν μειωθεί τα περιστατικά της ασθένειας κατά 33% και της σχετικής θνησιμότητας κατά 38-59%, μετά από διάγνωση με σιγμοειδοσκόπηση [204-206].

#### **1.4.7 Βιοδείκτες καρκίνου του παχέος εντέρου**

Οι βιοδείκτες που έχουν βρεθεί έως τώρα είναι η απώλεια του εντυπώματος του αυξητικού παράγοντα II της ινσουλίνης (insulin-like growth factor II gene) και συμβάλει στην πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου [207]. Επίσης η

πρωτεΐνη που ομοιάζει με τον αυξητικό παράγοντα Ι της ινσουλίνης (insulin-like growth factor I, IGF1) φαίνεται να είναι ένας πολλά υποσχόμενος βιοδείκτης για τον καρκίνο του παχέος εντέρου [208]. Το γονίδιο *SEPT9*, που ανήκει στην ομάδα των GTPασών, αποτελεί έναν βιοδείκτη του καρκίνου του παχέος εντέρου λόγω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του. Ο έλεγχος του βαθμού υπερμεθυλίωσης του *SEPT9* μπορεί να διαχωρίσει την νεοπλασία από το φυσιολογικό βλεννογόνο με 85-90% ειδικότητα και 50-70% ευαισθησία [209]. Για περιπτώσεις προχωρημένου αδενώματος στο κόλον σημειώνεται 10% ανίχνευσή του μέσω της μεθυλίωσης του *SEPT9*. Βιοδείκτες που εξετάζονται είναι το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (carcinoembryonic antigen, *CEA*), τα καρκινικά αντιγόνα 19-9, 195 και 242 (cancer antigen, *CA*) στον ορό του αίματος, στο ολικό αίμα ή στα ούρα καθώς και οι μεταλλάξεις στο αδενωματικό πολυποσιακό καρκίνωμα (adenomatous polyposis carcinoma, *APC*) και στο *KRAS* ογκογονίδιο, στο οποίο προσδιορίζονται μεταλλάξεις. Με μικρότερη σημαντικότητα είναι η προσταγλανδίνη E2 (prostaglandin E2), το P53 και το ειδικό πολυπεπτιδικό αντιγόνο των ιστών (tissue polypeptide specific antigen, *TPS*) [210]. Κάποιοι πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες είναι μεταλλάξεις στο *KRAS*, ανωμαλίες στην οικογένεια *NDRG4* (N-myc downstream-regulated gene, *NDRG4*), μεθυλίωση του γονιδίου της μορφογενετικής πρωτεΐνης οστού 3 (bone morphogenetic protein 3, *BMP3*), ύπαρξη ακτίνης-β ( $\beta$ -actin). Τέλος, υπό μελέτη βρίσκονται το κυκλοφορούν καρκινικό mRNA, συγκεκριμένα miRNAs και η ομάδα των κυτοκερατινών [211].

#### 1.4.8 Θεραπεία

Για τη θεραπεία του μη μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου προτείνεται η χειρουργική αφαίρεσή του [212, 213]. Οι παράγοντες που επηρεάζουν το αποτέλεσμα είναι η διαδικασία του χειρουργείου, ο προ-εγχειρητικός έλεγχος και η θεραπεία που θα επιλεγεί μετά την ολοκλήρωση του χειρουργείου. Σε προχωρημένου σταδίου καρκίνο προτείνεται χημειοθεραπεία και ραδιοθεραπεία, έτσι ώστε να μειωθεί το φορτίο του όγκου ή/ και το στάδιό του [213, 214].

Κατά τον προ-εγχειρητικό έλεγχο πρέπει να ληφθεί υπόψιν η ηλικία, η φυσική κατάσταση, το στάδιο του όγκου, ο τύπος της εγχείρησης και η εξέλιξη της ασθένειας στον ασθενή πριν την εγχείρηση και η φροντίδα μετά από αυτή. Σύμφωνα με τα στοιχεία επιβίωσης, μετά την εγχείρηση τα ηλικιωμένα άτομα εμφανίζουν



ετερογένεια, συνεπώς η ηλικία δεν μπορεί να θεωρηθεί μόνη της αξιόπιστο κριτήριο για την επέμβαση του ασθενή [215-217]. Πριν από την αφαίρεση του όγκου, είναι απαραίτητο να υπάρχει μία ολοκληρωμένη εικόνα της περιοχής που θα χειρουργηθεί μέσω CT κολονογραφίας ή μία ενδοσκόπηση μέσα σε διάστημα τριών μηνών από την πραγματοποίηση της εγχείρησης [218]. Επίσης, θα πρέπει πριν την εγχείρηση να ελεγχθεί ο ασθενής για τυχόν μεταστάσεις στους πνεύμονες ή στο συκώτι [219]. Για τους νεότερους ασθενείς που διαθέτουν οικογενειακό ιστορικό με καρκίνο του παχέος εντέρου, συστήνεται ο γενετικός έλεγχος [220].

Τα κριτήρια που θέτουν απαγορευτική την εγχείρηση είναι η παχυσαρκία, άλλες εγχειρήσεις στην κοιλιακή χώρα και το προχωρημένο στάδιο της ασθένειας [212, 213]. Αν στα όρια του όγκου που αφαιρέθηκε δεν υπάρχουν καρκινικά κύτταρα, τότε το χειρουργείο ήταν επιτυχημένο [221]. Επιπλέον, η αφαίρεση των λεμφαδένων, με όριο τους 12 λεμφαδένες, είναι μία ένδειξη για την επαρκή αφαίρεση της περιοχής που έχει βλάβη. Οι λεμφαδένες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για προγνωστικούς σκοπούς.

Μετά την αφαίρεση των αδενωματοδών πολυπόδων ή του καρκίνου του παχέος εντέρου, υπάρχει κίνδυνος εμφάνισης νεοπλασματικών αλλοιώσεων λόγω βιολογικών παραγόντων ή λόγω του τρόπου ζωής και για αυτόν τον λόγο οι ασθενείς θα πρέπει να βρίσκονται υπό την εποπτεία του γιατρού τους [222]. Οι οδηγίες που δίνονται στους ασθενείς που έχουν αφαιρέσει κακοήθεις όγκους είναι, εκτός από τη συνεχή παρακολούθηση από τον γιατρό τους, η εκτέλεση κολonosκόπησης εντός 3-6 μηνών, αν αυτή δεν έγινε πριν το χειρουργείο. Στην αντίθετη περίπτωση η κολonosκόπηση πρέπει να γίνει εντός ενός έτους και εάν είναι αρνητική τότε μπορεί να γίνει ο επόμενος έλεγχος μεταξύ των επόμενων 3-5 χρόνων. Σε περιπτώσεις αδενώματος υψηλού κινδύνου οι ασθενείς πρέπει να παρακολουθούνται για τρία χρόνια, σύμφωνα με οδηγίες των *US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer (USMSTF)* και *European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE)*, ενώ στην Μεγάλη Βρετανία προτείνουν τον επεμβατικό έλεγχο στα τρία χρόνια και δεν βασίζονται στην ιστολογική εικόνα. Στα μειωμένου κινδύνου αδενώματα διαφέρουν οι οδηγίες ανά τον κόσμο. Στην Μεγάλη Βρετανία δεν προτείνουν κάποια οδηγία. Η ESGE θεωρεί απαραίτητο τον έλεγχο κάθε δέκα χρόνια ενώ η USMSTF προτείνει μία πιο συχνή εξέταση, 5-10 χρόνια, ανάλογα με το περιστατικό.

Για τις περιπτώσεις μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου υπάρχουν

στοιχεία αύξησης της επιβίωσης των ασθενών τα τελευταία δύο χρόνια. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε χορήγηση χημειοθεραπευτικών, όπως οξαλιπλατίνη ή ιρινοτεκάνη. Η χημειοθεραπεία σε αυτά τα περιστατικά περιλαμβάνει τον συνδυασμό των 5-φλουοροουρακίλη, λευκοβορίνη μαζί με την οξαλιπλατίνη ή την ιρινοτεκάνη. Σε σχέση με την χορήγηση μόνο ενός παράγοντα χημειοθεραπείας, οι πολυπαραγοντικοί φαίνεται να έχουν καλύτερο αποτέλεσμα στον περιορισμό του όγκου [223].

Οι πιο στοχευμένες θεραπείες περιλαμβάνουν μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον του EGFR, μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον του VEGF-A και πρωτεΐνες που στοχεύουν αυξητικούς παράγοντες της αγγειογένεσης. Ο EGFR όταν υπερεκφράζεται φαίνεται να συνδέεται με τον υψηλό κίνδυνο μετάστασης όπου συμβαίνει στο 80% των περιπτώσεων των μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου. Τα μονοκλωνικά αντισώματα καταφέρνουν να εμποδίσουν την δράση του υποδοχέα είτε μέσω της αναστολής του διμερισμού του ή λόγω αγκύστρωσής τους στην θέση πρόσδεσης του ATP στην επικράτεια της κινάσης της τυροσίνης.

Ένας άλλος στόχος δράσης των χημειοθεραπευτικών είναι η δράση της οικογένειας των Ras GTPασών, καθώς το *KRAS* γονίδιο εμφανίζει μετάλλαξη εμφανίζεται στο 1/2 των περιπτώσεων του καρκίνου του παχέος εντέρου, κυρίως στα κωδικόνια 12 και 13. Η μετάλλαξη καθιστά την Ras GTPάση υπερ-δραστική, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση βιολογικών μονοπατιών ογκογένεσης στο εσωτερικό του κυττάρου. Έχει παρατηρηθεί ανθεκτικότητα στην θεραπεία με αντισώματα εναντίων του EGFR όταν υπάρχει μετάλλαξη στο *KRAS* καθώς και στο *NRAS*, συνεπώς τα συγκεκριμένα γονίδια πρέπει να ελέγχονται πριν θεραπεία μέσω των ειδικών αντισωμάτων κατά της δράσης του EGFR, και πιο συγκεκριμένα να γίνεται έλεγχος στα εξόνια τους 2,3 και 4 (κωδικόνια 12, 13, 59, 61, 117 και 146 και 12, 13, 59, 61 και 117, αντίστοιχα) [224].

Η γλυκοπρωτεΐνη VEGF-A απαιτείται για τον σχηματισμό των ειδικών αγγειακών δικτύων που δημιουργεί ο όγκος. Η γλυκοπρωτεΐνη προάγει τον πολλαπλασιασμό και την μετακίνηση των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και την αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων. Οι ενώσεις που δρουν εναντίων του VEGF επιδιορθώνουν την βλάβη που έχει δημιουργηθεί στο αγγειακό σύστημα [225]. Σε ασθενείς που είναι συμπτωματικοί ή έχουν μία επιθετική μετάσταση, προτείνεται η χημειοθεραπεία σε συνδυασμό με αναστολείς ώστε να περιοριστεί η ανάπτυξη του

όγκου. Πιο συγκεκριμένα, αν ο ασθενής έχει μεταστατικό όγκο *KRAS* wild-type, τότε ακολουθεί διπλή χημειοθεραπεία και EGFR-ειδικούς αναστολείς, καθώς οι *KRAS* wild-type ασθενείς αποκτούν ανθεκτικότητα στους αναστολείς του EGFR. Αν ανταποκρίνεται η ασθένεια στη θεραπεία ή είναι σταθερή για 4 έως 6 μήνες, τότε η δραστηριότητα της θεραπείας πρέπει να μειωθεί [226].

Θεραπείες πρώτης γραμμής, όπως οι παραπάνω, οι οποίες είναι υψηλότερης δραστηριότητας, έχουν ως αποτέλεσμα ένα μεγάλο διάστημα επιβίωσης σε ασθενείς με *RAS* wild-type, σε σχέση με πιο ήπιους συνδυασμούς [223]. Σε επόμενη φάση, η θεραπευτική αγωγή αλλάζει από αυτήν της πρώτης γραμμής και μπορεί να είναι το bevacizumab ή το aflibercept. Αν ο όγκος είναι *RAS* wild-type, τότε υπάρχουν οι εναλλακτικές λύσεις των cetuximab ή panitumumab, εφόσον δεν έχουν χρησιμοποιηθεί προηγουμένως [227]. Σε περιπτώσεις όπου έχουν δοκιμαστεί όλες οι διαθέσιμες θεραπείες, το regorafenib είναι ένας αναστολέας κινασών όπου φαίνεται να είναι δραστήσιος [228].

Έπειτα από την θεραπεία ο ασθενής ενδέχεται να εμφανίσει πόνο στην κοιλιά, απώλεια αίματος και αναιμία, κόπωση και απώλεια βάρους. Επίσης η επίδραση της θεραπείας στον οργανισμό μπορεί να επιφέρει απώλεια των θρεπτικών συστατικών των τροφών και αδυναμία για φυσική άσκηση [229]. Όπως μετά από κάθε εγχείρηση, έτσι και σε αυτή την περίπτωση μπορούν να υπάρχουν επιπλοκές μετά την ολοκλήρωσή της, όπως διαρροή στην αναστόμωση μετά την απομάκρυνση του όγκου, αδυναμία επούλωσης της πληγής ή δημιουργία προεξοχής σε αυτήν. Δεν υπάρχει διαφορά σε αυτό το κομμάτι μεταξύ ανοιχτής ή λαπαροσκοπικής χειρουργικής διαδικασίας [230].

## Σκοπός

Η τεχνολογία αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS) αποτελεί ένα πρόσφατο, πολλά υποσχόμενο εργαλείο έρευνας. Βρίσκει εφαρμογή στην μελέτη ολόκληρων γονιδιωμάτων και μεταγραφωμάτων οργανισμών, στην μελέτη έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, στην ταυτοποίηση μεταλλαγών στο γονιδίωμα, καθώς και στον εντοπισμό αλληλουχιών/μορίων που διαθέτουν ιδιότητες βιοδείκτη σε διάφορες ανθρώπινες ασθένειες, όπως ο καρκίνος. Αυτό θα βοηθήσει στην αποτελεσματικότερη θεραπεία της νόσου και τελικά στην αντιμετώπισή της. Μόρια τα οποία έχουν βρεθεί ότι εκφράζονται σε τύπους καρκίνου είναι τα μικρά μη κωδικά tRFs, τα οποία φαίνεται να εμπλέκονται και στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αυξάνεται συνεχώς τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω του καθημερινού τρόπου ζωής. Έχει υψηλά επίπεδα θανάτων και δεν έχει βρεθεί ακόμη ο βέλτιστος τρόπος πρόγνωσης και αντιμετώπισής του. Η εύρεση μοριακών βιοδεικτών που θα προλαμβάνουν ή θα αντιμετωπίζουν άμεσα την εξέλιξη της νόσου αποτελεί μία ανάγκη για την ερευνητική κοινότητα.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση νέων μοριακών βιοδεικτών για τον καρκίνο του παχέος εντέρου και πιο συγκεκριμένα η αξιολόγηση της προγνωστικής αξίας τους σε ασθενείς. Αφού εντοπίστηκε ένα μόριο-στόχος προς μελέτη βάσει της υψηλής και μαζικής του έκφρασης στον καρκίνο του παχέος εντέρου, έγινε απομόνωση του RNA από καρκινικούς ιστούς παχέος εντέρου και παρακείμενους φυσιολογικούς. Στην συνέχεια παράχθηκε cDNA των δειγμάτων με αντίστροφη μεταγραφή, πραγματοποιήθηκε qPCR με χρωστική SYBR Green I και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης του μελετώμενου μορίου tRF υφίστανται επεξεργασία σε αλγόριθμους βιοπληροφορικής ώστε να βγουν συμπεράσματα σχετικά με την προγνωστική αξία του μορίου. Μελετήθηκε τόσο η πιθανότητα υποτροπής τους όσο και η ολική επιβίωση σε σχέση με φυσιολογικά δείγματα μέσω της έκφρασης του μορίου 3' tiRNA<sup>Glu</sup><sup>TTC</sup>. Επίσης έγινε προσπάθεια για την εύρεση της βέλτιστης μεθοδολογίας αξιολόγησης των επιπέδων έκφρασης του μελετώμενου μορίου, τόσο μέσω της βιοπληροφορικής ανάλυσης, αλλά και μέσω εργαστηριακών και πειραματικών μεθόδων.

## **2 Υλικά & Μέθοδοι**

### **2.1 Εργαλεία Βιοπληροφορικής Ανάλυσης**

Στην ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης επόμενης γενιάς περιλαμβάνονται αλγόριθμοι βιοπληροφορικής, κυρίως λόγω του μεγάλου όγκου πληροφορίας η οποία παράγεται στο τέλος της μεθόδου. Επίσης τα αποτελέσματα καταχωρούνται σε βάσεις δεδομένων όπως η Sequence Read Archive (SRA) για την αξιοποίησή τους σε μελλοντικά πειράματα αλληλούχησης επόμενης γενιάς. Χρησιμοποιούνται αλγόριθμοι για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, την απομάκρυνση αλληλουχιών και την σύγκριση του προφίλ έκφρασης των μελετώμενων μορίων μεταξύ των ομάδων των δειγμάτων, όπως μεταξύ ασθενών και υγιών. Επίσης χρησιμοποιούνται αλγόριθμοι για την στοίχιση των αναγνώσεων σε ένα γονιδίωμα αναφοράς.

#### **2.1.1 Βάση Δεδομένων SRA**

Στην ανάλυση αρχικά γίνεται αναζήτηση των αποτελεσμάτων πειραμάτων αλληλούχησης επόμενης γενιάς που υπάρχουν καταχωρημένα σε βάσεις δεδομένων. Η βάση δεδομένων SRA παρέχει τέτοιου είδους δεδομένα, με σκοπό την ανάλυση τους από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες για την εξαγωγή διαφορετικών συμπερασμάτων. Η βάση περιέχει NGS δεδομένα γονιδιωματικής, μέτα-γονιδιωματικής και περιβαλλοντικής έρευνας. Δίνονται όλες οι λεπτομέρειες του πειράματος, όπως η πλατφόρμα αλληλούχησης που χρησιμοποιήθηκε, ο οργανισμός στον οποίο έγιναν τα πειράματα, το εργαστήριο, το μέγεθος του αρχείου και ο αριθμός των πειραμάτων που έγιναν (Εικόνα 2.1).

Για να γίνει η επιλογή του κατάλληλου αρχείου πρέπει να δοθεί προσοχή στις παραμέτρους της πλατφόρμας που χρησιμοποιήθηκαν, στην πηγή δεδομένων, στον οργανισμό που έγιναν τα πειράματα και στην μεθοδολογία (π.χ. miRNA-seq, ncRNA-seq). Το αρχείο που παρέχεται είναι σε μορφή FASTQ και μπορεί να ληφθεί με την βοήθεια του εργαλείου SRA Toolkit, το οποίο είναι διαθέσιμο από την ιστοσελίδα της SRA.

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

SRA SRA Search Help

Advanced

COVID-19 is an emerging, rapidly evolving situation.  
 Get the latest public health information from CDC: <https://www.coronavirus.gov>.  
 Get the latest research from NIH: <https://www.nih.gov/coronavirus>.  
 Find NCBI SARS-CoV-2 literature, sequence, and clinical content: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sars-cov-2/>.

**SRA - Now available on the cloud**

Sequence Read Archive (SRA) data, available through multiple cloud providers and NCBI servers, is the largest publicly available repository of high throughput sequencing data. The archive accepts data from all branches of life as well as metagenomic and environmental surveys. SRA stores raw sequencing data and alignment information to enhance reproducibility and facilitate new discoveries through data analysis.

**Announcement**  
 NIH Request for Information (RFI) on [SRA data format changes and plans](#).

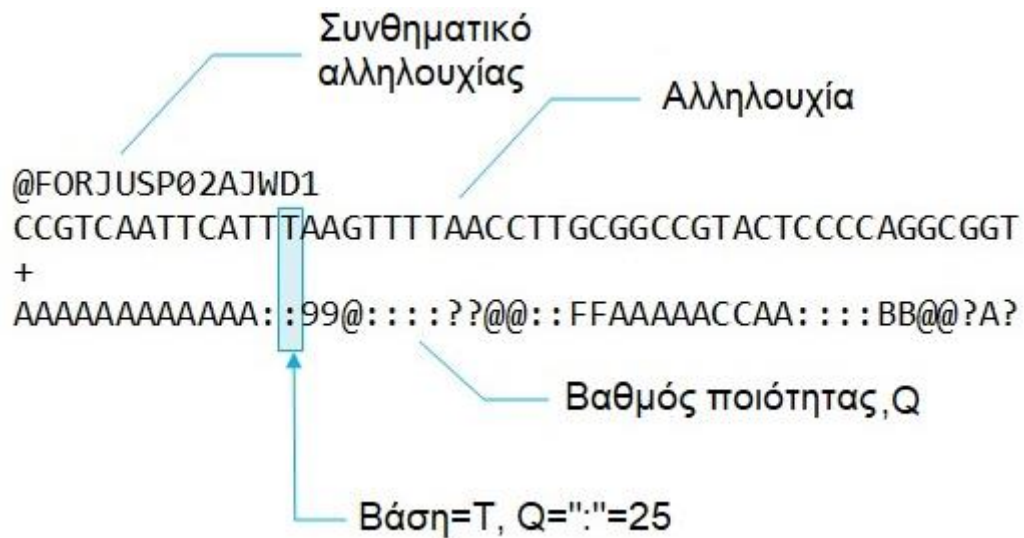
Getting Started	Tools and Software	Related Resources
<a href="#">How to Submit</a>	<a href="#">Download SRA Toolkit</a>	<a href="#">Submission Portal</a>
<a href="#">How to search and download</a>	<a href="#">SRA Toolkit Documentation</a>	<a href="#">Trace Archive</a>
<a href="#">How to use SRA in the cloud</a>	<a href="#">SRA-BLAST</a>	<a href="#">dbGaP Home</a>
<a href="#">Submit to SRA</a>	<a href="#">SRA Run Browser</a>	<a href="#">BioProject</a>

Εικόνα 2.1 Η βάση δεδομένων Sequence Read Archive.

### 2.1.2 FASTQ αρχείο

Μετά το τέλος κάθε αντίδρασης αλληλούχησης επόμενης γενιάς παράγεται ένα αρχείο FASTQ, το οποίο περιέχει τα πρωτογενή δεδομένα της αντίδρασης σε συγκεκριμένη μορφολογία και δομή. Ένα FASTQ αρχείο περιλαμβάνει τέσσερις γραμμές, στις οποίες καταγράφονται η αλληλουχία της ανάγνωσης (read) και ο βαθμός ποιότητας για κάθε βάση, δηλαδή η πιθανότητα λάθους ανάγνωσης μίας βάσης.

Πιο συγκεκριμένα η πρώτη γραμμή ξεκινάει με το σύμβολο @ και ακολουθεί το συνθηματικό της πειραματικής αλληλουχίας. Η γραμμή αυτή μπορεί να περιλαμβάνει πληροφορίες για το μήκος της αλληλουχίας και για το μηχάνημα που έγινε η αλληλούχηση. Στη δεύτερη γραμμή καταγράφεται η αλληλουχία των βάσεων της ανάγνωσης με κεφαλαία γράμματα (A ,G ,T ,C). Στην τρίτη γραμμή εμφανίζεται το σύμβολο «+» και τέλος στην τέταρτη γραμμή περιλαμβάνονται οι βαθμοί ποιότητας για τις καταγεγραμμένες βάσεις, ίσος αριθμός με τον αριθμό βάσεων της αλληλουχίας της δεύτερης γραμμής (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2 Δομή και μορφολογία του αρχείου FASTQ.

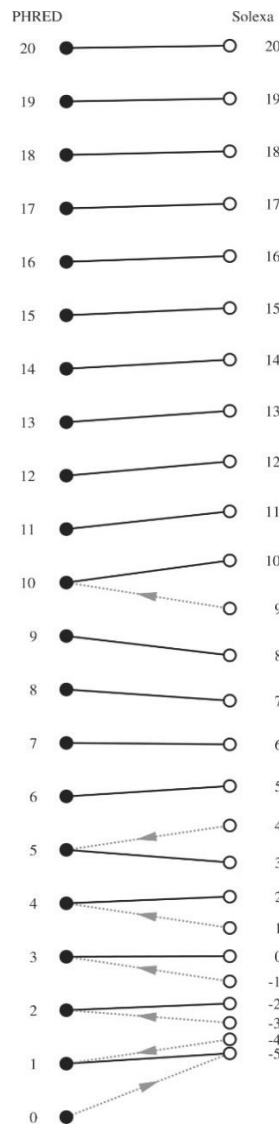
Ο βαθμός ποιότητας (quality score) διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών μορφών αρχείων FASTQ, ανάλογα με την πλατφόρμα αλληλούχησης [2]. Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται είναι δύο. Το πρώτο που δημιουργήθηκε ήταν της Sanger ή Phred σύστημα και το δεύτερο είναι της Solexa.

Το σύστημα Phred ήταν το πρώτο που δημιουργήθηκε και ακολουθεί τέσσερα βήματα ελέγχου για να οδηγήσει στο βαθμό ποιότητας της αλληλουχίας:

1. τοποθέτηση των αναμενόμενων κορυφών (predicted peaks). Μέσω της μεθόδου Fourier προβλέπεται τόσο η ιδανική θέση της κορυφής, όσο και ο σωστός αριθμός των βάσεων σε σημεία που υπάρχει θόρυβος ή συμπτώξεις.
2. Ανίχνευση των κορυφών των αλληλουχιών του δείγματος.
3. Σύγκριση μεταξύ των αναμενόμενων και των ανιχνεύσιμων κορυφών. Σε αυτό το στάδιο απορρίπτονται κάποιες κορυφές ή διαχωρίζονται. Εδώ διαμορφώνεται η αλληλουχία των βάσεων.
4. Έλεγχος των μη επικαλυμμένων κορυφών (unmatched). Αν μία κορυφή που αντιστοιχεί σε ανιχνεύσιμη βάση δεν έχει στοιχηθεί με κάποια προβλεπόμενη κορυφή στο τρίτο στάδιο, τώρα εισάγεται ως βάση της αλληλουχίας, αν αυτό είναι εφικτό [231].

Ο βαθμός ποιότητας δίνεται από τον τύπο:  $q_{Phred} = -10 * \log_{10}(p)$ , όπου  $p$  = η πιθανότητα σφάλματος για την βάση. Έτσι, αν μία βάση έχει πιθανότητα λάθους  $1/1000$ , τότε έχει βαθμό ποιότητας,  $q = 30$ . Ο υψηλός βαθμός ποιότητας αντιστοιχεί σε χαμηλή πιθανότητα σφάλματος και αντίστροφα [232].

Στο σύστημα υπολογισμού ποιότητας της Solexa, το οποίο παρουσιάστηκε το 2004, ο βαθμός ποιότητας υπολογίζεται από τον τύπο:  $q_{Solexa} = -10 \log_{10} \frac{p}{1-p}$ . Σε σχέση με το Phred, η Solexa δίνει τη δυνατότητα για πλήρη έλεγχο της πληροφορίας της ανάλυσης, ακόμη και για βάσεις χαμηλής ποιότητας. Μεταξύ τους διαφέρουν στις χαμηλές τιμές του βαθμού ποιότητας, ενώ στις υψηλές φαίνεται να υπάρχει συμφωνία (Εικόνα 2.3) [233].



Εικόνα 2.3 Σύγκριση Phred-Solexa [233].

### 2.1.3 Αλγόριθμος Trim Galore

Στην πλατφόρμα Illumina είναι απαραίτητη η απομάκρυνση των αλληλουχιών των προσαρμογέων (adapters) πριν τη χρήση του τελικού αρχείου σε αλγόριθμο στοίχισης. Ο αλγόριθμος Trim Galore! αναπτύχθηκε από τον Felix Krueger, στο ινστιτούτο *Babraham* και είναι σχεδιασμένος για την απομάκρυνση τέτοιων



αλληλουχιών και την πραγματοποίηση ελέγχου ποιότητας των αρχείων FASTQ, σύμφωνα με το ορισμένο Phred, σε περιβάλλον Linux.

Ο αλγόριθμος μπορεί να απομακρύνει την αλληλουχία των 13 βάσεων «AGATCGGAAGAGC» του προσαρμογέα της πλατφόρμας Illumina από το 3' άκρο της ανάγνωσης, αλλά και οποιαδήποτε αλληλουχία προσαρμογέα οριστεί από το χρήστη. Επίσης, είναι δυνατή η απομάκρυνση δύο βάσεων που έχουν προστεθεί τεχνητά κατά την δημιουργία βιβλιοθήκης. Αν κατά τη διαδικασία απομάκρυνσης η ανάγνωση είναι μικρότερη ή μεγαλύτερη σε μήκος από την επιθυμητή, τότε υπάρχει η δυνατότητα διαγραφής της. Επιπρόσθετα, το Phred και τα κριτήρια για την απαλοιφή των προσαρμογέων μπορούν να γίνουν χειροκίνητα. Υπάρχει η δυνατότητα μέσω του αλγορίθμου να δημιουργηθούν συμπιεσμένα ή μη αρχεία [234]. Η χρήση του αλγορίθμου γίνεται σε περιβάλλον Linux, μετά από την εγκατάσταση των προγραμμάτων FastQC και του Cutadapt.

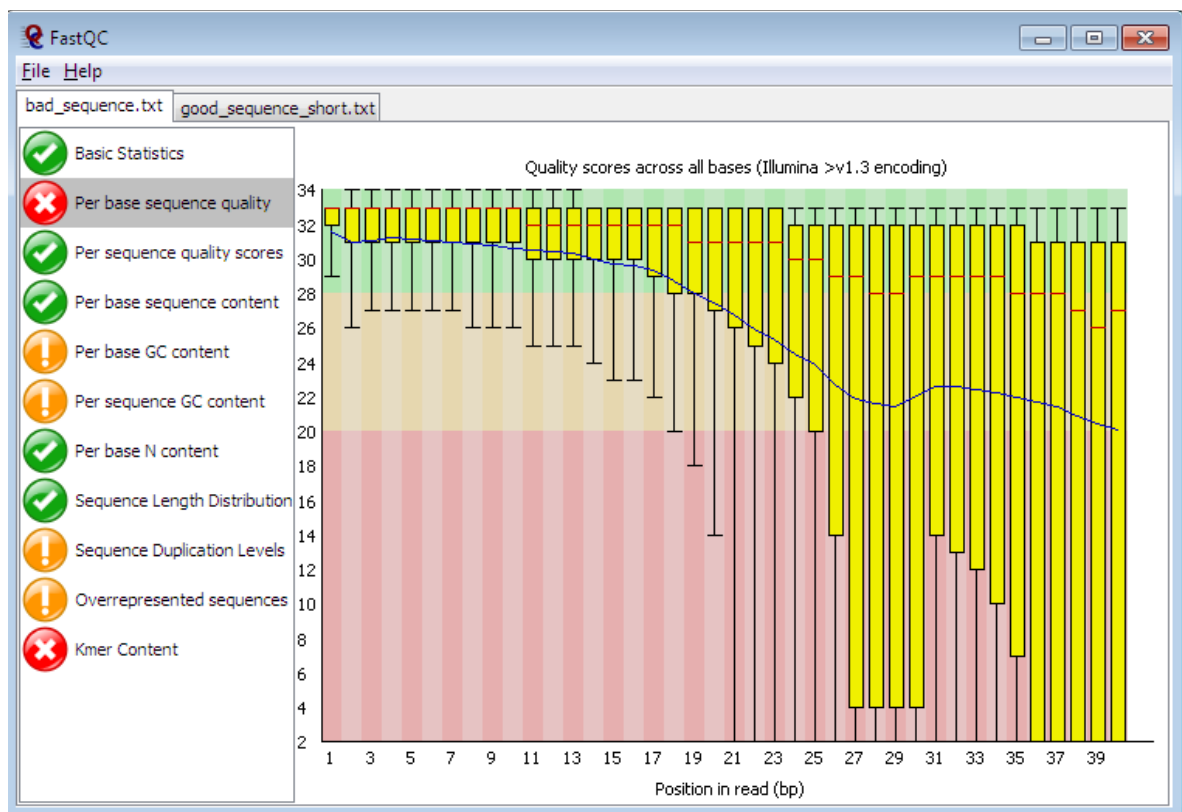
Πιο συγκεκριμένα οι παράμετροι που μπορούν να οριστούν για τη χρήση του Trim Galore είναι:

- **-q/--quality <INT>**: ορίζεται το Phred score και ο αλγόριθμος απομακρύνει τις αναγνώσεις με βαθμό ποιότητας κάτω από το επιλεγμένο όριο.
- **--illumina**: φιλτράρονται οι αναγνώσεις και απορρίπτεται η αλληλουχία του γενικού (universal) προσαρμογέα για τις πλατφόρμες Illumina «AGATCGGAAGAGC».
- **--nextera**: απομακρύνεται ο προσαρμογέας *Nextera* «CTGTCTCTTATA».
- **--small\_rna**: απομακρύνεται ο προσαρμογέας *Illumina Small RNA 3' Adapter* «TGGAA<sup>TTC</sup>TCGG», σε πειράματα RNA-seq.
- **-a/--adapter <STRING>**: ο όρος STRING υποδεικνύει την αλληλουχία του προσαρμογέα που θα αναγνωρίσει ο αλγόριθμος έτσι ώστε να την απομακρύνει.
- **--max\_length <INT>**: ορίζεται ο μέγιστος αριθμός βάσεων της κάθε ανάγνωσης. Κάθε ανάγνωση που υπερβαίνει αυτό το όριο απομακρύνεται από το τελικό αρχείο.
- **--length <INT>**: αντιστοιχεί στον ελάχιστο αριθμό βάσεων των αναγνώσεων και κάθε ανάγνωση που διαθέτει λιγότερες βάσεις απομακρύνεται.
- **--trim-n**: απομακρύνονται οι μη προσδιορισμένες βάσεις (N) από τα άκρα της ανάγνωσης.

- **--max\_n COUNT:** απομακρύνονται οι αναγνώσεις που περιλαμβάνουν N αριθμό βάσεων, μεγαλύτερο του cut-off που προσδιορίζονται στο πεδίο COUNT.

#### 2.1.4 FastQC

Το εργαλείο FastQC αποσκοπεί στον έλεγχο των δεδομένων (raw data) που προκύπτουν από πειράματα αλληλούχησης επόμενης γενιάς, έτσι ώστε να εισαχθούν στην ανάλυσή τους, χωρίς σφάλματα και είναι διαθέσιμο στο διαδίκτυο (Εικόνα 2.4). Πιο συγκεκριμένα, εισάγοντας ένα αρχείο BAM, SAM ή FASTQ, το FastQC μπορεί να επιβεβαιώσει την ποιότητά τους, εντοπίζοντας πιθανά λάθη στην αλληλουχία, στο βαθμό ποιότητας, στις βάσεις N, στη συχνότητα των GC, στις διπλασιασμένες καταγραφές και στο μήκος των αλληλουχιών. Η μορφή παρουσίασης των δεδομένων είναι γραφήματα και πίνακες και η εξαγωγή των αποτελεσμάτων γίνεται σε μορφή HTML-προσωρινού αρχείου [235].



Εικόνα 2.4 Περιβάλλον εργασίας FastQC.

#### 2.1.5 Η βάση δεδομένων MINTbase

Η βάση δεδομένων MINTbase περιέχει δεδομένα σχετικά με tRFs που έχουν

προκύψει είτε από πυρηνικά ή από μιτοχονδριακά tRNAs. Οι πληροφορίες χωρίζονται σε τέσσερις πυλώνες και παρατίθενται πληροφορίες σχετικά με την αλληλουχία του tRF, την έκφρασή του, την προέλευσή του και τη γενωμική πληροφορία που συνδέεται.

Πιο συγκεκριμένα, η αλληλουχία των tRFs δίνει το μήκος και τις βάσεις που την αποτελούν, η έκφραση τους παραθέτει το είδος του ιστού όπου εκφράζονται και την ασθένεια με την οποία συνδέονται, αν συμβαίνει αυτό. Παρουσιάζεται το ώριμο tRNA προέλευσης του tRF μορίου, το αντικωδικόνιο του και η τοποθεσία προέλευσης στους βρόχους D, T ή στον βρόγχο αντικωδικονίου του tRNA προέλευσης και η γενωμική πληροφορία ισοδυναμεί με την ταυτότητα του αντικωδικονίου, το χρωμόσωμα, την αλυσίδα και τις συντεταγμένες που ανήκει στο γενετικό υλικό. Η πληροφορία που δίνεται βασίζεται στην ομαδοποίηση των tRF μορίων σύμφωνα με το αντικωδικόνιο και όχι με την ίδια την αλληλουχία τους.

MINTbase v2.0 : a framework for the interactive exploration of mitochondrial and nuclear tRNA fragments

The screenshot shows the MINTbase v2.0 web interface. At the top, there is a navigation bar with buttons for 'Data upload', 'Downloads', 'Publications', 'Help', and 'Tweet'. Below this is a status bar displaying '6,009,622 requests', '04/04/2019 stats: 28,824 expressed tRFs | 12,023 datasets | 125,285 genomic instances'. The main interface is divided into a sidebar on the left and a main search area. The sidebar has a 'Genomic loci' section with a list of options: 'RNA molecule', 'tRNA alignment', 'Expression', and 'Summary'. The main search area includes a 'Genome:' dropdown set to 'Homo Sapiens (hg19/GRCh37)', a 'Minimum RPM value:' dropdown set to '1', and 'reset' and 'submit' buttons. Below these are search filters: 'Type(s):' with a list including 'All', '5'-half', '5'-tRF', 'i-tRF', '3'-tRF', and '3'-half'; 'Anticodon(s):' with a list including 'All', 'Ala (A)', 'Arg (R)', 'Asn (N)', 'Asp (D)', 'Cys (C)', 'Gln (Q)', 'AlaAGC (n)', 'AlaCGC (n)', 'AlaTGC (n)', 'AlaTGC (mt)', 'AlaTGC (mt-la)', and 'ArgACG (n)'. There are also search boxes for 'Search by tissue keyword:', 'Search by tRNA name:', 'Search by tRF sequence:', and 'Search by tRF label:', each with a placeholder 'hover over the i-icon for an example'. At the bottom, there are dropdowns for 'Chrom:', 'Strand:', and 'Start-End:'.

Εικόνα 2.5 Περιβάλλον εργασίας MINTbase.

Σχετικά με την προβολή των αποτελεσμάτων tRFs υπάρχουν πέντε επιλογές για το χρήστη:

1. ο γενετικός τόπος (Genomic loci): αυτή η επιλογή δίνει στο χρήστη την δυνατότητα να συγκρίνει μεταξύ τους tRFs που εμφανίζουν ομοιότητες σε γονιδιακό επίπεδο ή σε επίπεδο τοποθεσίας προέλευσης. Η επιλογή αυτή διαθέτει μεγάλη λεπτομέρεια.
2. Το RNA μόριο (RNA molecule): παρέχει πληροφορίες σχετικά με το θραύσμα tRF όπως την αλληλουχία τού, την κατηγορία που ανήκει, τα αμινοξέα/ αντικωδικόνιο που σχετίζεται, σύμφωνα με το tRNA προέλευσης, αν έχει εκφραστεί σε κάποιο ιστό και μία ονομασία με την οποία αναγνωρίζεται στα πειράματα RNA-seq.
3. tRNA στοίχιση (tRNA alignment): αντιστοιχίζει το θραύσμα tRF με τη

δευτεροταγή δομή του tRNA. Εμφανίζονται πληροφορίες σχετικά με τη σχέση του tRF με την τοποθέτηση στο tRNA όπου τους βρόγχους D-, T- και anticodon εμφανίζονται με διαφορετικά χρώματα και συγκρίνονται με το γονίδιο προέλευσής τους.

4. έκφραση (Expression): σχετίζεται με την έκφραση του θραύσματος σε διάφορους ιστούς και κυτταρικούς τύπους. Έτσι στο *MINTbase* ο χρήστης μπορεί να βρει δεδομένα από πειράματα αλληλούχησης συνοδευόμενα από την *PubMed* ταυτότητα της δημοσίευσης, τον τύπο ιστού ή κυττάρου και πληροφορίες σχετικά με την βάση δεδομένων που βρίσκονται.
5. σύνοψη (Summary): δίνονται πληροφορίες για το είδος και τη γονιδιακή προέλευση, έτσι ώστε να ξεκινήσει μία έρευνα γύρω από ένα tRF, τόσο γονιδιακά αλλά και μοριακά (Εικόνα 2.5) [236].

Το *MINTbase* δίνει τη δυνατότητα καταχώρησης των αποτελεσμάτων της πειραματικής έρευνας για τα tRFs, έτσι ώστε να είναι ένα δυναμικό εργαλείο που εξελίσσεται και εμπλουτίζει το περιεχόμενο που παρέχει στο κοινό συνεχώς.

#### **2.1.6 Ο αλγόριθμος MINTmap**

Το εργαλείο *MINTmap* προσδιορίζει το προφίλ έκφρασης των μορίων tRFs σε αρχεία FASTQ, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσφέρει σύγκριση των προφίλ έκφρασης των tRFs υγιών και ασθενών και στη δημιουργία μιας λίστας των πιο υποσχόμενων tRFs μορίων ως βιοδείκτες. Ο αλγόριθμος απαιτεί τη γνώση των γλωσσών προγραμματισμού Perl και Java και ομαδοποιεί τα μόρια tRFs σύμφωνα με την ταυτότητά τους, τη δομή τους, την αλληλουχία τους, τη γενωμική τους τοπολογία κ.ά. Ως αποτελέσματα της αναζήτησης μπορεί να εμφανισθούν είτε ως μόρια tRFs που προέρχονται από πυρηνικά, μιτοχονδριακά tRNA ή και τα δύο ταυτόχρονα (Εικόνα 2.6).

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της λειτουργίας του αλγόριθμου είναι η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, η αναγνώριση θραυσμάτων αμφισβητούμενης προέλευσης και η εύκολη πρόσβαση και χρήση των δεδομένων σε αναλύσεις άλλων χρηστών. Προσφέρει γρήγορη ανάλυση σε έως 100 εκατομμύρια αναγνώσεις Illumina, οι οποίες είναι κατάλληλα επεξεργασμένες, απαλλαγμένες από προσαρμογείς. Επίσης συμβάλλει στην αναγνώριση και αναφορά της αφθονίας των tRFs. Τα αρχεία εξόδου (output) που παράγονται είναι ένα αρχείο κειμένου και ένα

αρχείο HTML φακέλου.

MINTbase Unique ID (sequence derived)	tRF sequence	tRF type(s)	Unnormalized read counts	RPM read counts (using all counts from this file[125831] in denominator)	RPM read counts (using read count o input file from -f parameter[1046805 in denominator)
tRF-34-RKSLQ673FJIYEP	GGGGGGTATAGCTCAGTGGTAGAGCATTGACTG	5'-half	207	1645.06	197.74
tRF-33-XRK4W02F9IY9V	TGCCCCCATGTCTAACAACATGGCTTTCTCACC	3'-tRF	207	1645.06	197.74
tRF-34-I8W47W1R7HFEE2	ATTGGTCGTGGTTGTAGTCCGTGCGAGAATACCA	3'-tRF	198	1573.54	189.15
tRF-36-86J8WPMN1E8Y7ZD	TCCCACATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTGGTTTTTC	5'-tRF	187	1486.12	178.64
tRF-34-BS5EOB3ZY61DE2	AACCGGAGATGAAAACCTTTTCCAAGGACACCA	3'-tRF	183	1454.33	174.82
tRF-28-Q1Q89P9L84DF	GCGCCGCTGGTGTAGTGGTATCATGCAA	5'-tRF	179	1422.54	171.00

Εικόνα 2.6 Σχηματική απεικόνιση αποτελέσματος του αλγορίθμου MINTmap.

Τα tRNAs που χρησιμοποιούνται ως μόρια αναφοράς είναι 640 tRNA αλληλουχίες όπου τα 508 υπάρχουν, ενώ τα 102 είναι ψευδο-tRNAs, τα 22 γνωστά μιτοχονδριακά tRNAs που προέρχονται από τον άνθρωπο και 8 tRNAs που προέρχονται από γονιδιακούς τόπους που είναι αντίγραφα των: tRNA<sup>Trp</sup>TCA, tRNA<sup>Lys</sup>TTT, tRNA<sup>Gln</sup>TTG, tRNA<sup>Ala</sup>TGC (x2), tRNA<sup>Asn</sup>GTT, tRNA<sup>Ser</sup>TGA, and tRNA<sup>Glu</sup>TTC [109].

### 2.1.7 Primer-BLAST

Έπειτα από τη σύγκριση των προφίλ έκφρασης των ασθενών σε σχέση με αυτό των υγείων, έγινε ο σχεδιασμός των εκκινητών της πειραματικής διαδικασίας μέσω του προγράμματος *Primer-BLAST*. Το συγκεκριμένο εργαλείο χρησιμοποιείται τόσο για το σχεδιασμό νέων ειδικών εκκινητών, σύμφωνα με την αλληλουχία-στόχο και τη θέση ενός εσονίου/εξονίου, αλλά και για τον έλεγχο της ειδικότητας ήδη σχεδιασμένων μορίων-εκκινητών. Επιπλέον, ο αλγόριθμος επιτρέπει την απαλοιφή πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphism, SNPs) στους εκκινητές.

Οι επιλογές που διαθέτει ο χρήστης για την αναζήτηση των εκκινητών είναι δύο, είτε μπορεί να εισάγει την αλληλουχία-υπόστρωμα για την οποία αναζητά εκκινητές και να προσδιορίσει το μήκος που επιθυμεί να έχουν ή μέσω της παράθεσης των δικών του αλληλουχιών-εκκινητών να εξετάσει την ποιότητά τους σε ένα υπόστρωμα. Στην δεύτερη επιλογή ο χρήστης πρέπει να προσδιορίσει τα επιτρεπτά όρια για το μέγεθος του PCR προϊόντος και τα όρια της τιμής  $T_m$  των εκκινητών. Επίσης είναι απαιτούμενη η επιλογή των αλληλουχιών αναφοράς (RefSeq mRNA, RefSeq representative genomes, genomes for selected organisms κ.ά.), του

μελετώμενου οργανισμού και του μέγιστου ορίου μήκους της αλληλουχίας-στόχου. Το Primer-BLAST περιέχει αλληλουχίες αναφοράς RefSeq mRNA και RefSeq genome που περιέχουν 226 και 7.546 οργανισμούς, αντίστοιχα [237].

Τα κριτήρια επιλογής του κατάλληλου εκκινήτη είναι τα εξής:

1. το μέγεθός του να κυμαίνεται από 18 έως 25 βάσεις. Αν είναι μικρότερος από 18 βάσεις υπάρχει η πιθανότητα μη ειδικής δράσης τούς, ενώ αν είναι μεγαλύτερος από 25 βάσεις υπάρχει η πιθανότητα δημιουργίας δευτερογενών δομών,
2. η θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) να είναι μεταξύ  $55^{\circ}\text{C}$ - $62^{\circ}\text{C}$ , η οποία εξαρτάται από την περιεκτικότητα της αλληλουχίας σε γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C) και το μέγεθος της αλληλουχίας. Η διαφορά των  $T_m$  των εκκινήτων πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 3 μονάδων ( $\Delta T_m = \pm 3$ ).
3. το ποσοστό των βάσεων G και C να είναι 40%-60%,
4. οι τρεις τελευταίες βάσεις να μην είναι G,C, έστω η μία να είναι αδενίνη (A) ή θυμίνη (T),
5. Να ισχύει για την θερμοκρασία υβριδοποίησης  $T_a = T_m - 5$
6. η συμπληρωματικότητα εντός της αλληλουχίας του εκκινήτη (self-complementarity) να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη, ιδανικά να είναι κοντά στο μηδέν, έτσι ώστε να μην αναδιπλωθεί το μόριο και δημιουργηθεί δομή φουρκέτας
7. αποφυγή επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, π.χ. ATATATA.. ή AGCGCG..
8. και αποφυγή συμπληρωματικότητας με άλλα υποστρώματα, ο έλεγχος για αυτό γίνεται μέσω του BLAST (Εικόνα 2.7). Με την επιλογή «Get Primers» εμφανίζεται το ζεύγος των εκκινήτων της αναζήτησης σε νέα σελίδα.

PCR Template [Reset page](#) [Save search parameters](#) [Retrieve recent results](#)

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) [Clear](#) Range

From To  
 Forward primer   [Clear](#)  
 Reverse primer

Or, upload FASTA file

---

**Primer Parameters**

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand)  [Clear](#)  
 Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand)  [Clear](#)

PCR product size Min Max

# of primers to return

Primer melting temperatures (T<sub>m</sub>) Min Opt Max Max T<sub>m</sub> difference

---

**Exon/intron selection** A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span

Exon junction match Exon at 5' side Exon at 3' side  
   
Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction

Intron inclusion  Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range Min Max

---

**Primer Pair Specificity Checking Parameters**

Specificity check  Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Database

Organism   
Enter an organism name, taxonomy id or select from the suggestion list as you type  
[Add more organisms](#)

Exclusion (optional)  Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix)  Exclude uncultured/environmental sample sequences

Entrez query (optional)

Primer specificity stringency Primer must have at least  total mismatches to unintended targets, including at least  mismatches within the last  bps at the 3' end.  
 Ignore targets that have  or more mismatches to the primer.

Misprimed product size deviation

Splice variant handling  Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

---

**Get Primers**  Show results in a new window  Use new graphic view

[Advanced parameters](#)

Εικόνα 2.7 Περιβάλλον εργασίας του Primer-BLAST.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία η βάση αλληλουχιών αναφοράς που επιλέχθηκε είναι η RefSeq mRNA για τον ανθρώπινο οργανισμό (*Homo sapiens*). Ο ανάστροφος εκκινητής (reverse) που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο «5' GGGTGTGATAGGTGGCACGG 3'», ενώ ο πρόσθιος εκκινητής που σχεδιάστηκε ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί με τον ανάστροφο είναι ο «5'

GTAGTCCGTGCGAGAATACCA 3'», (Εικόνα 2.8).

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTAGTCCGTGCGAGAATACCA	21	59.60	52.38	6.00	0.00
Reverse primer	GGGTGTGATAGGTGGCACGG	20	62.87	65.00	5.00	1.00

Εικόνα 2.8 Το αποτέλεσμα αναζήτησης του ζεύγους εκκινητών της πειραματικής διαδικασίας στο Primer-BLAST.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.1) δίνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR:

Πίνακας 2.1 Αλληλουχίες εκκινητών

Όνομασία εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή(5'→3')
RNU48 (Forward)	TGATGATGACCCCAGGTAACCTCT
3' tiRNAGlu <sup>TTC</sup> (Forward)	GTAGTCCGTGCGAGAATACCA
PAP (Reverse)	GCGAGCACAGAATTAATACGAC

## 2.2 Πειραματική Διαδικασία

### 2.2.1 Βιολογικό Υλικό

Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας αξιοποιήθηκαν συνολικά 113 δείγματα RNA από πρωτογενείς όγκους παχέος εντέρου, ενώ απομονώθηκε επίσης RNA από 10 ακόμη ιστούς. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στην Δ' χειρουργική κλινική του πανεπιστημιακού νοσοκομείου «Αττικόν» τα προηγούμενα έτη (2000-2010) υπό τον καθηγητή Ιορδάνη Παπαδόπουλου και τους συνεργάτες του. Η έρευνα εγκρίθηκε από το επιστημονικό συμβούλιο-επιτροπή Βιοηθικής του ίδιου νοσοκομείου. Η κατασκευή λεπτομερούς βάσης καταγραφής κλινικοπαθολογικών δεδομένων των ασθενών καθώς και της μετεγχειρητικής πορείας τους (follow-up) πραγματοποιήθηκαν στο νοσοκομείο «Αττικόν» υπό τον καθηγητή Ιορδάνη Παπαδόπουλο και του συνεργάτες του.

Τα δείγματα ιστού τοποθετήθηκαν σε 1ml αποδιατακτικού αντιδραστηρίου RNAlater(QIAGEN® Mainz, Germany) και αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά SW-620. Η κυτταρική σειρά SW-620 προέρχεται από μεταστατικό καρκίνο στους λεμφαδένες ανθρώπινου οργανισμού και ο καρκίνος προέλευσης είναι ο ορθοκολικός καρκίνος [238].



### **2.2.2 Ομογενοποίηση δειγμάτων ιστού καρκίνου του παχέος εντέρου**

Ξεκινώντας την επεξεργασία των δειγμάτων ιστού, πρέπει να ομογενοποιηθεί το υλικό που περιέχουν. Κατά την ομογενοποίηση του δείγματος, ασκείται δύναμη στα κύτταρα του ιστού έτσι ώστε η κυτταρική μεμβράνη να σπάσει και τελικά να απελευθερωθεί το βιολογικό υλικό που περιέχεται στο εσωτερικό του. Έπειτα, το υλικό ή υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία, ώστε να απομονωθούν τα μόρια προς μελέτη, είτε αποθηκεύεται για μελλοντική επεξεργασία. Η διαδικασία ομογενοποίησης είναι αρκετά γρήγορη και εύκολη, με ελάχιστο απαραίτητο εξοπλισμό.

Αρχικά το ιστοτεμάχιο αποψύχεται και διατηρείται σε υγρό άζωτο. Ο κονιορτοποιητής BioPulverizer (BioSpec Products Inc., Bartlesville, OK, USA) καθαρίζεται καλά, αποστειρώνεται με αιθανόλη και στη συνέχεια τοποθετείται μέσα σε αυτόν ένα κομμάτι, περίπου 5 mg, του ιστού. Ο ιστός κονιορτοποιείται, μεταφέρεται άμεσα σε καινούριο φιαλίδιο τύπου Eppendorf των 2ml και προστίθεται 1ml αντιδραστηρίου TRIzol. Το μείγμα αναδεύεται αρχικά με τη βοήθεια πιπέτας και στη συνέχεια με πιο έντονη ανάδευση, ώστε να σπάσουν οι κυτταρικές μεμβράνες. Στη συνέχεια γίνεται επώασή του σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για 5 λεπτά, ώστε να διαχωριστούν τα νουκλεϊκά σύμπλοκα στα επιμέρους μόριά τους. Αν ο ιστός δεν έχει διαλυθεί γίνεται φυγοκέντρηση 12.000\*g, για 10 λεπτά, στους 4°C και μεταφορά του υλικού σε νέο φιαλίδιο τύπου Eppendorf των 2 ml. Η διατήρηση του ομογενοποιημένου δείγματος γίνεται στους -80°C, εντός του TRIzol, για μελλοντική χρήση (εντός 5 ημερών), διαφορετικά μπορεί να επεξεργασθεί απευθείας.

### **2.2.3 Απομόνωση RNA**

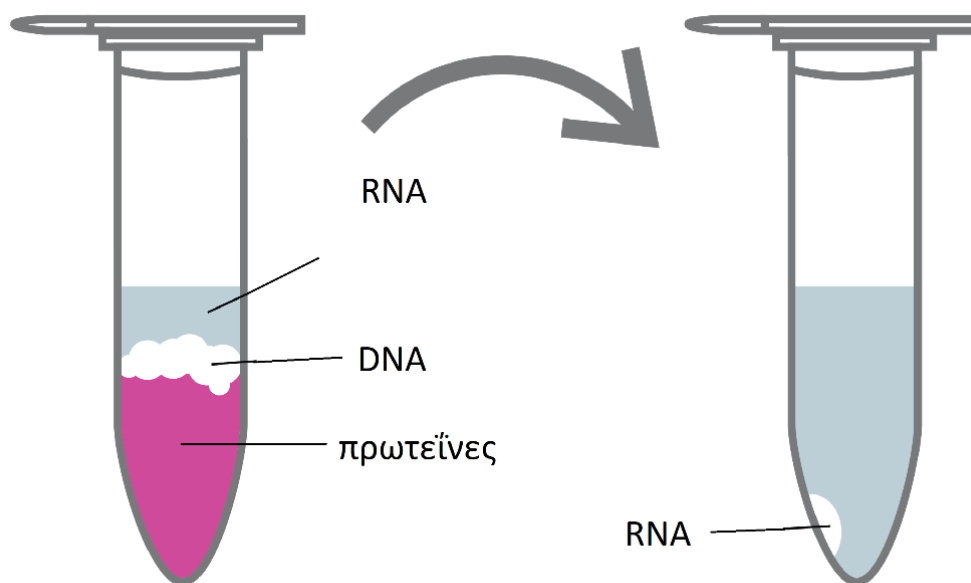
Το επόμενο βήμα στην επεξεργασία του υλικού προς μελέτη είναι η απομόνωση του επιθυμητού μορίου από το σύνολο των βιολογικών μορίων που περιέχονται στα κύτταρα. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία το μόριο-στόχος είναι το RNA. Ο διαχωρισμός των φάσεων γίνεται μέσω του αντιδραστηρίου TRIzol™ (Invitrogen).

Το TRIzol ή αλλιώς ισοθειοκυανική γουανιδίνη, αποτελεί αντιδραστήριο ταυτόχρονης ή ξεχωριστής απομόνωσης RNA, DNA και πρωτεϊνών από ολικό, απομονωμένο βιολογικό υλικό κυττάρων. Εξυπηρετεί στη λύση των κυττάρων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε δείγματα ιστού, κυττάρων ή ορού, σε ποσότητες 50-100mg έως  $\geq 1$  g σε ιστό και  $5 \cdot 10^6$  έως  $>10^7$  σε κύτταρα. Τα δείγματα προς

επεξεργασία προέρχονται από τον ανθρώπινο ή από ζωικό, φυτικό ή βακτηριακό οργανισμό. [239].

Πρώτο βήμα στη διαδικασία της απομόνωσης είναι το μίγμα TRIzol και βιολογικού υλικού να αποψυχθεί σταδιακά σε πάγο, από τους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Στη συνέχεια, προστίθενται σε αυτό 200  $\mu\text{l}$  χλωροφόρμιου (Scharlau Chemie S.A., Spain) και είναι εμφανής ο διαχωρισμός του σε τρεις φάσεις, υδατική, μεσαία και οργανική. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μία έντονη ανάδευση με το χέρι. Τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία, σε θερμοκρασία δωματίου, για 15 λεπτά και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα  $13.000 \times g$ , για 15 λεπτά, στους  $4^{\circ}\text{C}$ .

Σε αυτό το στάδιο γίνεται ο διαχωρισμός των φάσεων όπου η υδατική φάση περιέχει το RNA, η μεσαία φάση το DNA και η οργανική τις πρωτεΐνες (Εικόνα 2.9). Η υδατική φάση η οποία περιέχει το RNA μεταφέρεται σε φιαλίδιο τύπου Eppendorf 1,5 ml με τέτοιο τρόπο ώστε να μη διαταραχθούν οι υπόλοιπες δύο φάσεις. Η μεσαία και η οργανική φάση που περιέχουν το DNA και τις πρωτεΐνες, αντίστοιχα, αποθηκεύονται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Στη συνέχεια προστίθενται 500  $\mu\text{l}$  ισοπροπανόλης σε κάθε δείγμα προς καθίζηση του RNA και σχηματισμό του RNA pellet. Πραγματοποιείται ισχυρή ανάδευση στα δείγματα για 5-10 δευτερόλεπτα και έπειτα ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση στα  $13.000 \text{ RCF}$  για 8 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$  και το υπερκείμενο απορρίπτεται ώστε να παραμείνει μόνο το RNA ως pellet. Στο φιαλίδιο τύπου Eppendorf που περιέχεται το RNA pellet προστίθεται 1ml αιθανόλης 75%, έτσι ώστε το ίζημα να διαλυτοποιηθεί. Πραγματοποιείται έντονη ανάδευση και ακολούθως φυγοκέντρηση στα  $9.000 \times g$  για 8 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Το υπερκείμενο που παράγεται, απομακρύνεται και το ίζημα που περιέχει το RNA παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 λεπτά έτσι ώστε αν εξατμισθεί πλήρως η αιθανόλη. Τέλος, προστίθεται το αντιδραστήριο RNA Storage Solution (RSS, 1.0 κιτρικό νάτριο, pH 6,4, Ambion Inc., Carlsbad, CA, USA) και το δείγμα φυλάσσεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .



Εικόνα 2.9 Διαχωρισμός φάσεων με χρήση TRIzol, Απομόνωση RNA με χλωροφόρμιο [240].

#### 2.2.4 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός

Για την εκτίμηση της ποιότητας του RNA που απομονώθηκε σε προηγούμενο στάδιο, αλλά και για τον έλεγχο καθαρότητάς του, γίνεται φασματοφωτομετρική μέτρηση. Η φασματοφωτομετρία είναι μέθοδος μέτρησης συγκέντρωσης χημικών ουσιών που στηρίζεται στην απορρόφηση ακτινοβολίας. Το φως διαπερνά μέσω ενός πρίσματος, φράγματος ή φίλτρου, δηλαδή ενός μονοχρωμάτορα, και επιλέγεται έτσι ένα μήκος κύματος. Το μήκος κύματος είναι συγκεκριμένο για το κάθε μόριο που μελετάται και ανάλογο της απορρόφησής του. Το μονοχρωματικό φως (ισχύς=  $P_0$ ) διαπερνά το δείγμα και εξέρχεται με ισχύ ( $P$ ), μικρότερη της αρχικής ( $P \leq P_0$ ), καθώς μέρος του φωτός μπορεί να απορροφηθεί από το δείγμα. Η απορρόφηση δίνεται από τον τύπο:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = -\log T, \text{ όπου } T = \text{διαπερατότητα} \text{ (2.1) [241].}$$

Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε είναι το BioSpec-nano (Shimadzu) (Εικόνα 2.10). Το μηχάνημα έχει τη δυνατότητα μέτρησης της συγκέντρωσης DNA, RNA και πρωτεϊνών σε δείγματα συγκέντρωσης 30 έως 3000 ng/μl, διαθέτει αυτόματο καθαρισμό της επιφάνειας τοποθέτησης του δείγματος και είναι εύκολο τόσο στην ανάλυση όσο και στο χειρισμό του λογισμικού του. Η διαδικασία ανάλυσης είναι σύντομη και απαιτείται μόνο μία σταγόνα δείγματος 1μl ή 2μl, ανάλογα με την πυκνότητα του δείγματος [242].

Η μέτρηση απορρόφησης γίνεται στα 260 nm και στα 280 nm και τα αποτελέσματα συγκέντρωσης και καθαρότητας του δείγματος δίνονται ως λόγοι απορροφήσεων  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$  και  $\frac{A_{260}}{A_{230}}$  και εμφανίζονται στον υπολογιστή που συνδέεται με το φασματοφωτόμετρο. Η πηγή φωτός είναι μία λυχνία ξένου και οι οπτικές ίνες που διαθέτει το σύστημα συγκράτησης καθορίζουν αυτόματα την απόσταση μεταξύ τους.

Δεδομένου ότι το RNA έχει μέγιστο απορρόφησης στα 260 nm και οι πρωτεΐνες στα 280nm, ισχύει ότι αν ο λόγος  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$  κυμαίνεται από 1,8-2,2 τότε το δείγμα αποτελείται από καθαρό DNA, αν ο λόγος  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$  είναι μεγαλύτερος από 2,2 τότε υπάρχει πρόσμιξη RNA ενώ, αν ο λόγος  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$  είναι μικρότερος από 1,8 υποδηλώνει την ύπαρξη πρωτεϊνών ή φαινόλης στο δείγμα.

Επίσης στην μέτρηση απορρόφησης  $\frac{A_{260}}{A_{230}}$  ισχύει ότι αν ο λόγος απορροφήσεων είναι μεγαλύτερος του 2,2, τότε το δείγμα αποτελείται μόνο από νουκλεϊκά οξέα, ενώ αν ο λόγος είναι μειωμένος οφείλεται στην απορρόφηση πρωτεϊνών, ουρίας, αλάτων, φαινόλης και υδατανθράκων στα 230 nm [243].



Εικόνα 2.10 Φασματοφωτόμετρο Biospec-nano Shimadzu [244].

### 2.2.5 Πολυαδενυλίωση

Η πολυαδενυλίωση πραγματοποιείται μετα-μεταγραφικά από την πολύ(A) πολυμεράση στους προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η δράση της πολυμεράσης σχετίζεται με την ενίσχυση του RNA με μια ουρά καταλοίπων αδενίνης στο 3' άκρο του μορίου. Η ουρά αδενινών έγινε γνωστή αρχικά για τη σταθερότητα που προσέδιδε στο mRNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και για το βασικό της ρόλο στην μετάφραση [245]. Αργότερα ανιχνεύθηκε στους προκαρυωτικούς οργανισμούς μέσω της δράσης της πολύ(A) πολυμεράσης I (PAP I) στον οργανισμό *Escherichia coli* [246].

Αυτό που συμβαίνει στους οργανισμούς είναι η προσθήκη ουράς αδενινών στο πρόδρομο μόριο mRNA έτσι ώστε να παραχθεί ένα σταθερό, ώριμο mRNA, να απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα μέσω των πυρηνικών πόρων, να φτάσει στα ριβοσώματα και να ξεκινήσει η μετάφραση. Συνεπώς η πολυαδενυλίωση είναι μια διαδικασία εξασφάλισης της σταθερότητας του μορίου mRNA για την επιτυχή μετάφρασή του σε πρωτεΐνες [247].

Το μήκος της πολύ(A) ουράς για τους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι περίπου 250 βάσεις ενώ στον *S.cerevisiae* είναι μόνο 60. Όταν η 3' αμετάφραστη περιοχή κοπεί, ξεκινάει η πολυαδενυλίωση από την πολύ(A) πολυμεράση. Το ένζυμο διαθέτει τρεις επικράτειες γύρω από το ενεργό κέντρο.

Για να είναι επιτυχής η διαδικασία στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι απαραίτητη η παρουσία παραγόντων (PABPN1, CPF) τόσο για την αποφυγή αποδέσμευσης της πολύ(A) ουράς από το ένζυμο, αλλά και για τον έλεγχο της προσθήκης βάσεων στο mRNA. Κάθε μόριο PABPN1 προσθέτει 12-15 κατάλοιπα αδενίνης και όταν έχει συνδεθεί ένας επιθυμητός αριθμός μορίων προσθήκης, ειδικοί παράγοντες αποσύνδεσης σηματοδοτούν την αποσύνδεση της πολύ(A) πολυμεράσης από τον παράγοντα πολυαδενυλίωσης (cleavage and polyadenylation specificity factor, CPSF) [248].

Η poly(A) ουρά απουσιάζει από τα μόρια miRNAs και tRFs και προστίθεται πριν από την αντίστροφη μεταγραφή, καθώς είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του προσαρμογέα poly (T) στο επόμενο βήμα.

Το πρώτο βήμα στην πολυαδενυλίωση είναι η δημιουργία μίγματος RNA και νερού. Ο υπολογισμός των όγκων RNA και H<sub>2</sub>O (DNase/RNase free) γίνεται με βάση την συγκέντρωση που μετρήθηκε στο προηγούμενο βήμα, έτσι ώστε ο τελικός

όγκος του μείγματος RNA και H<sub>2</sub>O να είναι 8 μl, με συγκεκριμένη αναλογία RNA: H<sub>2</sub>O (μείγμα 1). Στη συνέχεια δημιουργείται mix (μείγμα 2) με τα: E.Coli Poly(A) Polymerase Reaction Buffer (PAP, 10x, New England Biolabs Inc., Massachusetts, USA), Τριφωσφορική αδενοσίνη (Adenosine triphosphate, ATP, 10 mM, New England Biolabs Inc., Massachusetts, USA) και E. Coli Poly(A) Polymerase (5 U/μl, New England Biolabs Inc., Massachusetts, USA) (Πίνακας 2-1).

Για την μοναδιαία αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν:

*Πίνακας 2.2 Μοναδιαία αντίδραση πολυαδενυλίωσης.*

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Όγκος (μl)</b>
PAP Buffer (10x)	1
ATP (10 mM)	0,8
Πολυμεράση E.Coli (5 U/μl)	0,2

Προστίθενται 2μl από το μείγμα 2 στο μείγμα 1 με τελικό όγκο 10 μl. Τέλος, τα δείγματα τοποθετούνται στον κυκλοποιητή Veriti™ (Applied Biosystems) με το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. 37° C για 60 min
2. 65° C για 10 min
3. 4° C για ∞

### **2.2.6 Αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription, RT)**

Η αντίστροφη μεταγραφή παρατηρείται στους ρετροϊούς, όπου το γενετικό τους υλικό μεταγράφεται αντίστροφα, ώστε να δημιουργηθεί δίκλωνο μόριο DNA, μία διαδικασία που πραγματοποιείται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση [249]. Το ένζυμο υπάρχει στους ιούς avian myeloblastosis virus (AMV) ή Moloney murine leukemia virus (MMLV ή MMuLV). Το AMV ένζυμο απομονώνεται από τον AMV ενώ το MMLV από την υπερπαραγωγή κυττάρων E.coli που περιέχουν το κλωνοποιημένο γονίδιο. Το προϊόν που παράγεται από την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής ονομάζεται complementary DNA (cDNA).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι είτε oligo(dT), τυχαία εξαμερή ή εκκινητές συγκεκριμένης αλληλουχίας. Ο oligo(dT) προσδένεται στην poly(A) ουρά του mRNA και έτσι η σύνθεση του cDNA γίνεται στο 3' άκρο ενός mRNA [250]. Στην

παρούσα διπλωματική εργασία ο oligo(dT) εκκινητής είναι ο 5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGTTTTTTTTTTTTVN -3'.

Η διαδικασία αντίστροφης μεταγραφής περιλαμβάνει την παραγωγή διαλύματος του εκκινητή-προσαρμογέα poly(T) adapter primer (100 μM) (Invitrogen™, California,USA) και H<sub>2</sub>O (DNase/RNase free) με αραίωση 1:10. Για την μοναδιαία αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 0,5 μl προσαρμογέα και 1,5 μl H<sub>2</sub>O (μείγμα 3). Από το μείγμα 3 προστίθενται 2 μl στο μείγμα 1 με τελικό όγκο 12 μl. Τα δείγματα τοποθετούνται στον κυκλοποιητή (Applied Biosystems Verity™ Thermal Cycler) σύμφωνα με το πρωτόκολλο:

1. 65° C για 5 min και
2. 4° C για ∞.

Στη συνέχεια δημιουργείται δεύτερο mix για την ολοκλήρωση της αντίστροφης μεταγραφής που περιέχει μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων [dATP (10 mM), dGTP (10 mM), dCTP (10 mM), dTTP (10 mM) σε 10mM Tris-HCl (pH 7,5)] (Invitrogen™, California,USA), RT-Buffer 5X First-Strand Buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>] (Invitrogen™, California,USA), p,p'-Δίχλωροδιφαινυλοτριχλωροαιθάνιο (p,p'-Dichloro-diphenyl-trichloroethane, DTT) (0,1 M) (Invitrogen™, California,USA) το οποίο αποδυναμώνει τη δευτεροταγή δομή του RNA και καταστρέφει τους δισουλφιδικούς δεσμούς, το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφής M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/μl) (Invitrogen™, California,USA) και RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/μl) (Invitrogen™, California,USA). Το τελευταίο αντιδραστήριο δρα κατασταλτικά στην αποικοδόμηση του RNA (μείγμα 4) (Πίνακας 2-2).

*Πίνακας 2.3 Μοναδιαία αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής*

<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Όγκος (μl)</b>
DTT (0,1 M)	2
RT-Buffer (5x)	4
dNTPs	1
RNase OUT (40 U/μl)	1
M-MLV (200 μl)	1

Προστίθενται 8 μl από το μείγμα 4 στο μείγμα 1, πραγματοποιείται ανάδευση και τοποθετείται το μείγμα στο θερμικό κυκλοποιητή στους 37°C για 60 min και στους 70° C για 15 min. Τέλος τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C.

### **2.2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου**

Η μέθοδος βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR), την οποία εισήγαγε ο Kary Mullis τη δεκαετία του 1980. Η μέθοδος βρίσκει εφαρμογή στην παραγωγή κλώνων του γενετικού υλικού έως και δισεκατομμύρια φορές, έτσι ώστε να ανιχνευθεί ένα μόριο-στόχος μικρής ποσότητας. Η αντιγραφή του DNA γίνεται μέσω της δράσης πολυμερασών, με τη συμμετοχή μικρών μονόκλωνων αλληλουχιών που ονομάζονται εκκινητές.

Ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση παραγωγής κλώνων είναι η Taq DNA πολυμεράση και η Pfu DNA πολυμεράση. Και τα δύο αυτά ένζυμα χρησιμοποιούνται λόγω της ιδιότητας που έχουν να παράγουν αλυσίδες DNA με εκμαγείο ένα μόριο DNA, με τη βοήθεια μορίων-εκκινητών της αντίδρασης. Επίσης, η θερμοανθεκτικότητα τους είναι σημαντικό χαρακτηριστικό, καθώς ο διαχωρισμός του δίκλωνου DNA σε μονόκλωνο πραγματοποιείται σε πολύ υψηλή θερμοκρασία, στους 95°C.

Η μέθοδος της PCR μπορεί να είναι ποσοτική ή ποιοτική. Στην ποσοτική μέθοδο γίνεται είτε ειδικός ή μη-ειδικός τρόπος ποσοτικοποίησης του προϊόντος. Αυτό βρίσκει εφαρμογή κυρίως στην ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, την ανίχνευση παθογόνων και την ποσοτικοποίηση του mRNA. Η ποιοτική ανάλυση χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις αναγνώρισης ιϊκού υπότυπου ή βακτηριακού είδους. Στην ποσοτική ανάλυση, η ανίχνευση γίνεται είτε μέσω ειδικής ή μη ειδικής τεχνικής. Στην μη ειδική τεχνική γίνεται ανίχνευση ενός στόχου κάθε φορά, ενώ στην ειδική δεν υπάρχει αυτός ο περιορισμός και είναι εύκολη η ανίχνευση πάνω από έναν στόχο σε κάθε αντίδραση.

Έπειτα από το διαχωρισμό των αλυσίδων, η DNA πολυμεράση ξεκινάει τον πολυμερισμό της μονόκλωνης αλυσίδας DNA-εκμαγείο. Το ένζυμο προσθέτει συμπληρωματικά νουκλεοτίδια προς το εκμαγείο, ξεκινώντας από τον εκκινητή, ο οποίος είναι συμπληρωματικός με την αλυσίδα-στόχο. Η διαδικασία διαχωρισμού των αλυσίδων και πολυμερισμού με σκοπό τον πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας-στόχου συνεχίζεται για πολλούς κύκλους. Ανάλογα με την αποτελεσματικότητα της



αντίδρασης, αυξάνεται και ο αριθμός των ειδικών αντιγράφων που δημιουργούνται στο τέλος κάθε κύκλου.

Η εξέλιξη της qPCR συνδυάζει την υψηλή ευαισθησία της κλασσικής μεθόδου με την άμεση παρακολούθηση των προϊόντων, προσδίδοντας ακρίβεια στη διαδικασία. Υπάρχει αναλογία μεταξύ της ποσότητας του στόχου και της έναρξης της καταγραφής σήματος φθορισμού. Επίσης, το σημείο στο οποίο διαχωρίζονται οι δύο αλυσίδες του προϊόντος είναι χαρακτηριστικό για το μόριο και σχετίζεται με το μήκος του και την νουκλεοτιδική του αλληλουχία.

Μέσω της qPCR είναι δυνατή η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της ακολουθίας-στόχου, ακόμη κι αν υπάρχει σε μικρή ποσότητα. Αυτό το χαρακτηριστικό καθιστά την μέθοδο άκρως απαραίτητη, καθώς η PCR δεν το διαθέτει άρα δεν μπορεί να ποσοτικοποιήσει το αρχικό DNA, δηλαδή δεν μπορούν να σχετιστούν η αρχική ποσότητα DNA με την ποσότητα του προϊόντος. Κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει στην qPCR, καθώς από πολύ νωρίς στη διαδικασία είναι δυνατή η ανάλυση ποσότητας του DNA.

Η qPCR εφαρμόζεται στη μελέτη αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης και της απόκρισης του κυττάρου σε ερεθίσματα, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγή στα επίπεδα πρωτεϊνών και της λειτουργίας του. Επίσης, χρησιμοποιείται στην κλινική διαγνωστική, τόσο στην ποσοτικοποίηση βακτηριακού φορτίου, όσο και στην παρακολούθηση της εξέλιξης μιας νόσου (π.χ. καρκίνος).

Υπάρχουν διαφορετικές ονομασίες για την qPCR. Η Real-Time PCR αναφέρεται στην δυνατότητα παρακολούθησης του πολλαπλασιασμού του DNA όσο αυτός πραγματοποιείται. Με αυτόν τον τρόπο η μέθοδος βοηθάει το χειριστή να αποφασίσει σχετικά με την ποσότητα του υλικού που ξεκινάει η αντίδραση, έτσι ώστε να ολοκληρωθεί με επιτυχία και με τις επιθυμητές ποσότητες προϊόντος. Ο όρος ποσοτική qPCR συνδέεται με την χρήση ηλεκτροφόρησης για την ποσοτικοποίηση του αρχικού δείγματος DNA. Ο όρος ποσοτική φθορίζουσα PCR (quantitative fluorescent PCR) αναφέρεται στο φθορίζον μόριο, όπως συμβαίνει και σε κάθε κατηγορία qPCR.

Στην περίπτωση που προηγείται αντίστροφη μεταγραφή, η μέθοδος καλείται αντίστροφη μεταγραφή qPCR (reverse transcription qPCR, RT-qPCR). Μέσω του συνδυασμού αντίστροφης μεταγραφής με qPCR δίνεται η δυνατότητα να αναλυθούν και μόρια RNA. Η ονομασία που χρησιμοποιείται ευρέως για την μεθοδολογία είναι

είτε «ποσοτική» ή «πραγματικού χρόνου PCR». Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην αντίστροφη μεταγραφή είναι αντίστοιχα με αυτά των ρετροϊών, όπως του ιού της ηπατίτιδας C, με σκοπό την δημιουργία DNA με εκμαγείο RNA του ιού. Η RT-PCR βρίσκει χρήση στην ανάλυση της γονιδιακής ρύθμισης και αν συνδυαστεί με μικροσυστοιχίες, στην επαλήθευση των αποτελεσμάτων τους. Επίσης, είναι δυνατή η ανίχνευση ακόμη και μικρών αλλαγών στην ρύθμιση γονιδίων.

Τα πλεονεκτήματά της μεθόδου είναι αρκετά σε σχέση με αντίστοιχες μεθόδους ποσοτικοποίησης μορίων. Τα πιο σημαντικά είναι το μεγάλο εύρος ανίχνευσης, η υψηλή ευαισθησία, η αναπαραγωγικότητα, ο σύντομος χρόνος ανάλυσης και η μικρή πιθανότητα προσμίξεων. Η ευαισθησία της ανάλυσης είναι αρκετά μεγάλη, ανιχνεύοντας ακόμη και ένα αντίγραφο σε μία αντίδραση και έτσι είναι δυνατή η ανάλυση δειγμάτων μικρής ποσότητας, όπως βιοψίες.

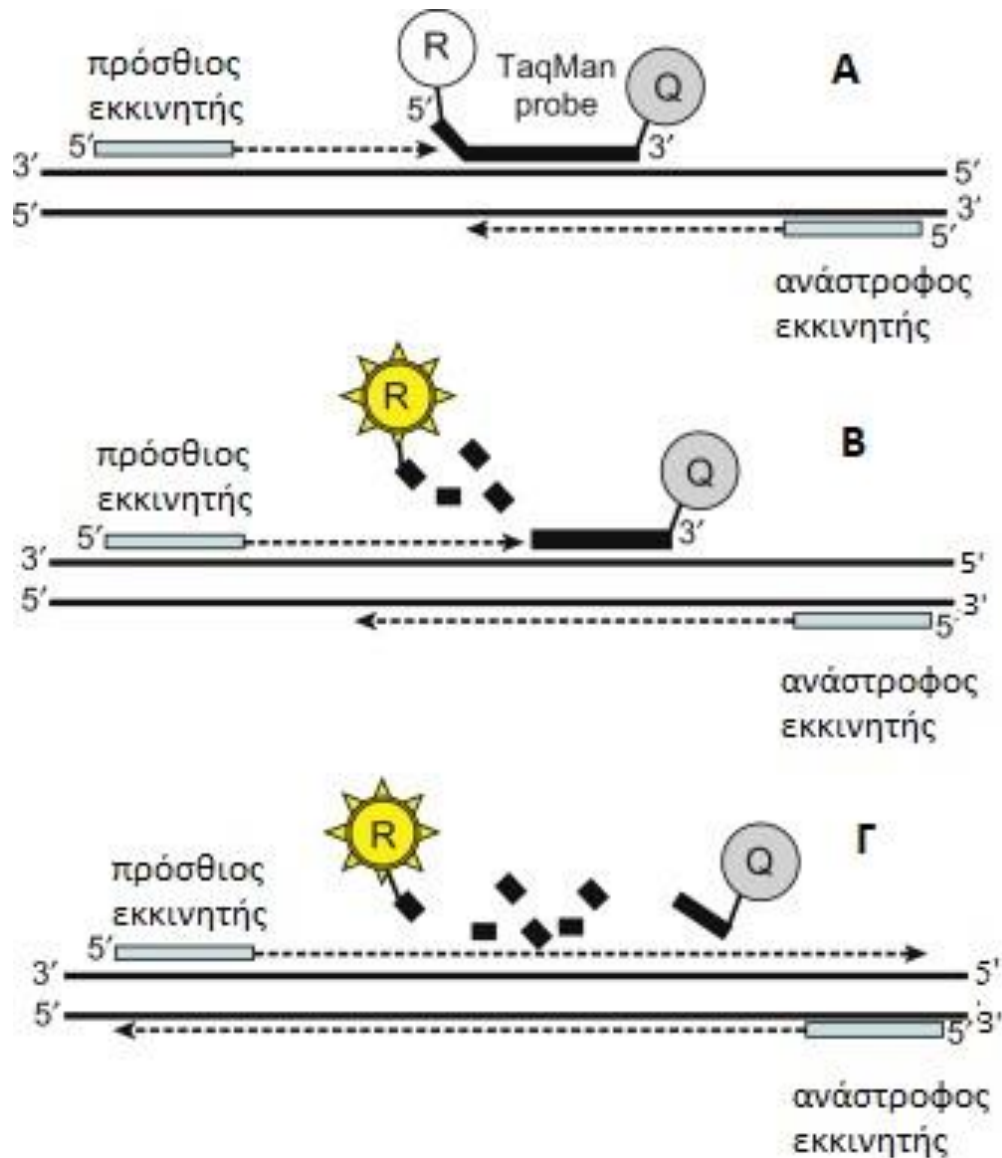
Από την άλλη πλευρά διαθέτει μειονεκτήματα, όπως η πρόσμιξη και παρεμβολή ενώσεων που υπάρχουν στα βιολογικά δείγματα και έτσι χρησιμοποιούνται στην αντίδραση πολυμερισμού ένζυμα τα οποία είναι ειδικά για τις συνθήκες του κάθε δείγματος. Επίσης, τα δείγματα RNA είναι γνωστό ότι είναι ασταθή σε σχέση με το DNA, άρα θα πρέπει ο χειρισμός τους να γίνει με μεγαλύτερη προσοχή και σε ειδικές συνθήκες. Ο ανθρώπινος παράγοντας παίζει σημαντικό ρόλο στην επιλογή των βημάτων του πειράματος, στην ανάλυση των αποτελεσμάτων και τέλος στην καταγραφή συμπερασμάτων.

Οι εφαρμογές που καλύπτει η qPCR είναι η ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης, η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των DNA μικροσυστοιχιών και η ποσοτικοποίηση βακτηρίων, ιών και μυκήτων. Επιπλέον, είναι δυνατή η ανίχνευση μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών και η ανακάλυψη νέων βιοδεικτών για τη διάγνωση. Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των DNA μικροσυστοιχιών βρίσκει εφαρμογή στη διερεύνηση συγκεκριμένων γονιδίων με την τεχνική των μικροσυστοιχιών λόγω της υψηλής ευαισθησίας της. Η ανίχνευση μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών γίνεται μέσω της ανάλυσης της καμπύλης της αντίδρασης. Στην περίπτωση που υπάρχει κάποια μετάλλαξη, τότε ο ιχνηθέτης θα συζευχθεί ασθενώς και θα αποδεσμευθεί σε μικρότερη θερμοκρασία [251].

Η qPCR είναι μία μέθοδος φθορισμού και χρησιμοποιεί μόρια-φθοροφόρα, τα οποία εκπέμπουν σήμα ανάλογο με την ποσότητα του DNA στο οποίο έχουν προσδεθεί, σε κάθε κύκλο της PCR. Η παρακολούθηση του πολλαπλασιασμού του

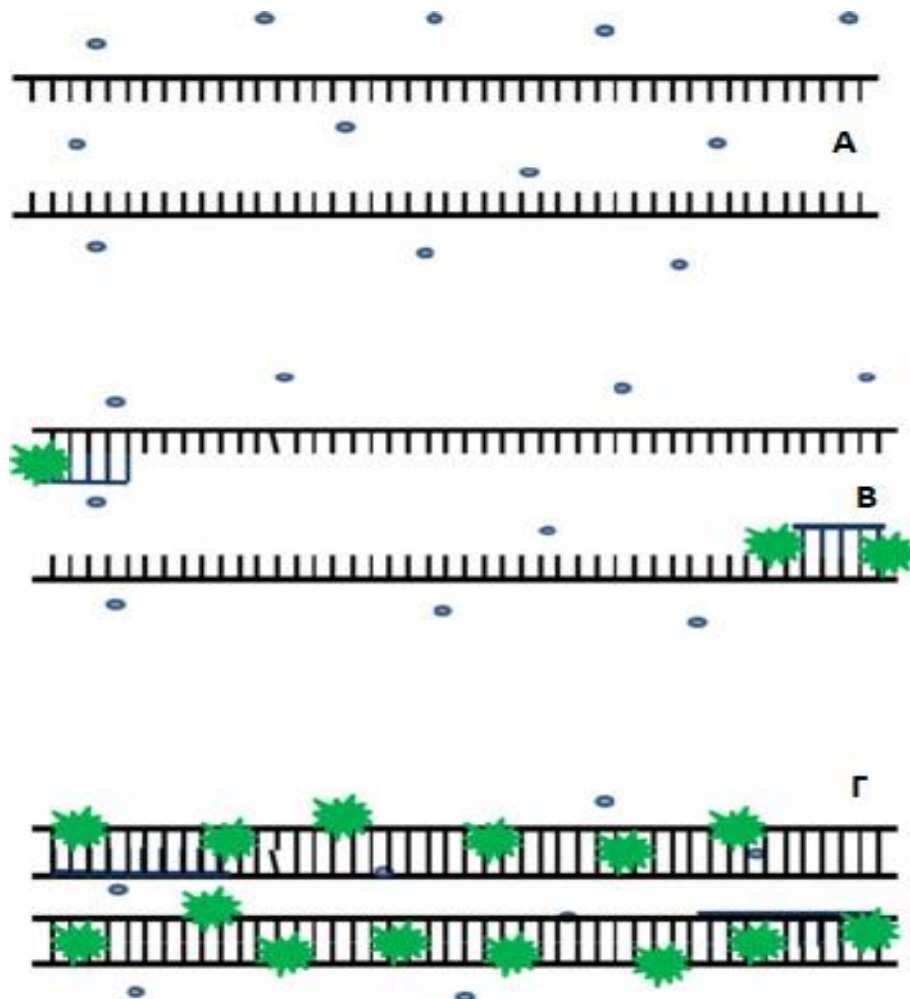
DNA γίνεται μέσω μη-ειδικών χρωστικών όπως το βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium bromide, EtBr) ή η χρωστική SYBR green I, ιχνηθέτες υδρόλυσης ή υβριδισμού όπως οι ιχνηθέτες TaqMan, μοριακοί φάροι, sunrise και scorpio εκκινητές και πεπτίδια νουκλεϊκών οξέων (peptide nucleic acid, PNA). Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι είναι οι ιχνηθέτες υδρόλυσης TaqMan και SYBR green I [251]. Η κάθε κατηγορία από αυτούς παράγει σήμα με διαφορετικό τρόπο, όμως όλες με σκοπό τον φθορισμό που θα παραχθεί από τον πολλαπλασιασμό του μορίου DNA.

Οι ιχνηθέτες υδρόλυσης, όπως οι εκκινητές TaqMan (5'→3' υδρολύμενος ιχνηθέτης) προσδένονται ειδικά στην αλληλουχία στόχο και αποτελούνται από ένα φθοροφόρο (reporter) στο 5' άκρο του μορίου του ιχνηθέτη και ένα μόριο καταστολής φθορισμού (quencher) στο 3' άκρο τού. Η επιλογή τους εξαρτάται από το θερμικό κυκλοποιητή, το είδος της PCR και τα φάσματα διέγερσης, εκπομπής και απορρόφησης. Ο φθορισμός του μορίου καταστέλλεται από την παρουσία του καταστολέα καθώς ο καταστολέας απορροφά το σήμα του φθοροφόρου. Όταν διαχωρισθεί μέσω υδρόλυσης το φθοροφόρο μόριο από τον καταστολέα του, παράγεται σήμα φθορισμού από τον ιχνηθέτη (Εικόνα 2.11) [252].



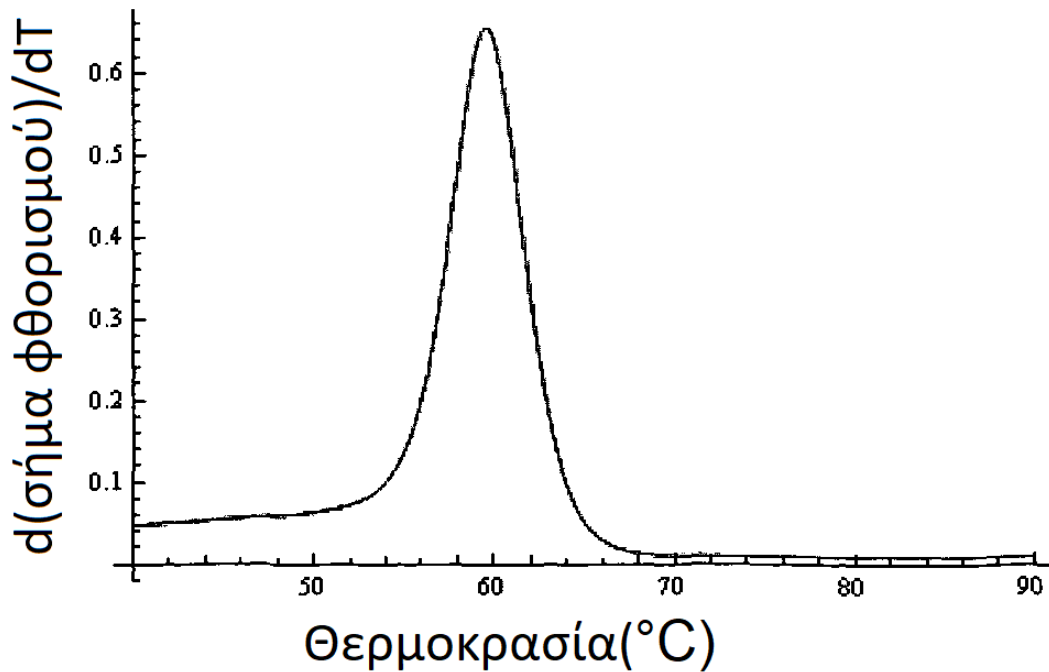
Εικόνα 2.11 Αντίδραση TaqMan, A: πολυμερισμός, B: αποικοδόμηση και απελευθέρωση του φθοροφόρου(R), Γ: τερματισμός πολυμερισμού, [253].

Η SYBR green I που προσδένεται στην μικρή αύλακα της διπλής έλικας DNA-στόχο και είναι απαραίτητη η παρουσία ενός ζεύγους εκκινητών. Η χρωστική εκπέμπει στα 520 nm και ο φθορισμός της ουσίας αυξάνεται αναλογικά με την ποσότητα του DNA, καθώς όσο περισσότερη προσδεθεί σε αυτό, τόσο μεγαλύτερο σήμα φθορισμού θα μετρηθεί (Εικόνα 2.12).



Εικόνα 2.12 SYBR Green I, A: αποδιάταξη, B: επέκταση εκκινητών, Γ: πολυμερισμός [254].

Η ειδικότητα της μεθόδου δημιουργεί αμφιβολία για την μέθοδο, όμως από την καμπύλη διαχωρισμού του προϊόντος προκύπτει το σημείο τήξεως, ένδειξη μοναδικού προϊόντος της αντίδρασης. Σε αυτήν την ανάλυση είναι δυνατή η ανάδειξη περισσότερων από μία αλληλουχίες, οι οποίες έχουν πολλαπλασιαστεί. Η παρουσία ενός και μόνο προϊόντος, αλλά και η ποιότητά του μπορεί να δειχθεί από την παρατήρηση της καμπύλης τήξεως (melt curve), καθώς τα προϊόντα της αντίδρασης παρουσιάζονται ως καμπύλες τήξης. Στο τέλος της αντίδρασης, όταν η χρωστική SYBR Green I απομακρυνθεί από το δίκλωνο DNA και η θερμοκρασία ευνοεί την αποδιάταξη του δίκλωνου προϊόντος, σχηματίζεται μια καμπύλη που σχετίζει το σήμα του φθορισμού με την θερμοκρασία. Η θερμοκρασία της αποδιάταξης των αλυσίδων του DNA ( $T_m = \text{melting temperature}$ ) σχετίζεται με το μήκος της αλυσίδας που ενισχύεται. Αν το προϊόν είναι μοναδικό, τότε η καμπύλη είναι οξεία, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.13.

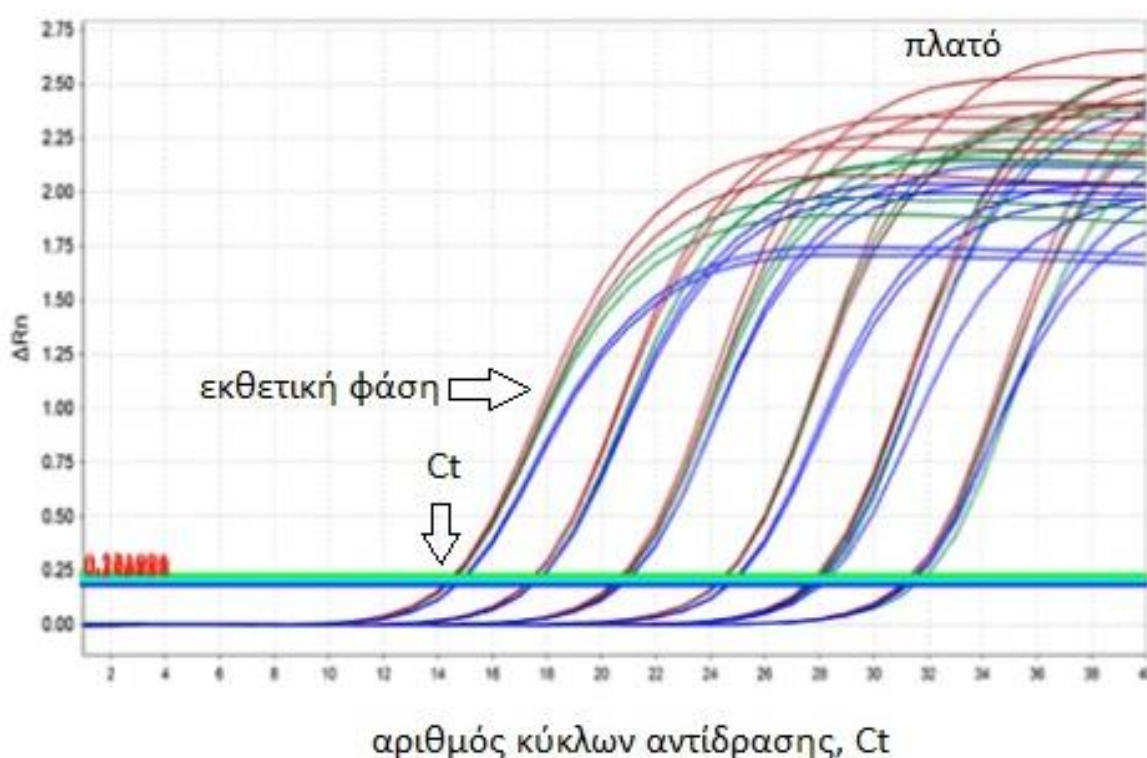


Εικόνα 2.13 Καμπύλη τήξης, qPCR [255].

Η τεχνολογία στην οποία στηρίζεται η ανίχνευση του φθορισμού, απαιτεί την πηγή φωτός, ώστε να γίνει η διέγερση και τη δυνατότητα ανίχνευσης συγκεκριμένου μήκους κύματος εκπομπής. Υπάρχουν τρεις τρόποι για την πραγματοποίηση της διέγερσης: μέσω λάμπας, διόδων (light-emitting diode-LED) ή laser. Τα μηχανήματα που διαθέτουν λάμπα, διαθέτουν και φίλτρα τα οποία περιορίζουν το μήκος κύματος σε συγκεκριμένες τιμές. Για τη δημιουργία δεδομένων, το μηχάνημα διαθέτει φωτοανιχνευτές, ως κάμερα ή φωτο-μετατροπείς. Είναι δυνατή η παράλληλη ανίχνευση διαφορετικών μηκών κύματος σε μία αντίδραση, λόγω της ύπαρξης των ειδικών φίλτρων.

Βασικό μέρος του εξοπλισμού είναι ο θερμικός κυκλοποιητής στον οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση της PCR. Ο κυκλοποιητής έχει την ικανότητα να διατηρεί τη θερμοκρασία σταθερή σε όλα τα δείγματα, σημαντική παράμετρος για την επιτυχή αντίδραση PCR. Η θερμαντική πλάκα που διαθέτουν, ο θερμός αέρας ή ο συνδυασμός των δύο, έχουν σαν αποτέλεσμα την διατήρηση υψηλής θερμοκρασίας που έχει σαν αποτέλεσμα την αντίδραση πολλαπλών πολλαπλασιασμών. Για την ολοκλήρωση της διάταξης χρειάζεται τόσο ο κατάλληλος υπολογιστής όσο και το ειδικό λογισμικό, η χρήση πλατφόρμας για την απεικόνιση των καμπυλών ποσοτικοποίησης (amplification plot) και τήξης (melt curve).

Η καμπύλη ποσοτικοποίησης αντιπροσωπεύει την αύξηση του σήματος φθορισμού του φθοροφόρου (y άξονας) σε συνάρτηση με τους κύκλους της αντίδρασης PCR (x άξονας). Η γραμμή αναφοράς (baseline) υπολογίζεται βάσει του θορύβου των πρώτων κύκλων, δηλαδή όταν δεν υπάρχει ανιχνεύσιμο PCR προϊόν. Το κατώφλι (threshold) αντιπροσωπεύει το σήμα φθορισμού που δεν προκύπτει από θόρυβο. Υπολογίζεται είτε χειροκίνητα ή αυτόματα από τη γραμμή αναφοράς προσθέτοντας την τυπική απόκλισή της. Τέλος, το Ct είναι ο κύκλος όπου αυξάνεται το σήμα του φθοροφόρου, πάνω από την γραμμή αναφοράς. Όταν το Ct είναι υψηλό τότε η έκφραση του γονιδίου είναι χαμηλή και το αντίθετο. Η τιμή σχετίζεται με την ποσότητα του DNA και με το κατώφλι (Εικόνα 2.14).



Εικόνα 2.14 Καμπύλη ποσοτικοποίησης, qPCR [256].

Τα συστατικά του MasterMix της αντίδρασης είναι η χρωστική ROX και το χλωριούχο μαγνήσιο ( $MgCl_2$ ). Το  $MgCl_2$  δρα καταλυτικά στην δράση της Taq πολυμεράσης και η ποσότητά του είναι ανάλογη της ποσότητας του ενζύμου.

Ένα εμπόδιο στην ανάλυση της PCR είναι η σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ αναλύσεων. Για αυτόν τον σκοπό γίνεται κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Οι πιο συχνοί τρόποι κανονικοποίησης είναι μέσω μέτρησης του αριθμού των κυττάρων, μέσω της ολικής μάζας RNA, μέσω ενός ή περισσότερων γονιδίων σταθερής έκφρασης και μέσω εσωτερικού ή εξωτερικού προτύπου. Η μέτρηση των

κυττάρων μπορεί να γίνει σε δείγματα κυτταροκαλλιέργειας και αίματος. Οι δύο πιο διαδεδομένες μέθοδοι κανονικοποίησης είναι η σχετική ποσοτικοποίηση και η απόλυτη. Στην παρούσα διαδικασία ακολουθήθηκε η σχετική ποσοτικοποίηση.

Στη σχετική ποσοτικοποίηση το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου υπολογίζεται από το ποσοστό μεταξύ της ποσότητας του γονιδίου στόχου και ενός γονιδίου αναφοράς που υπάρχει σε όλα τα δείγματα. Το γονίδιο αναφοράς πρέπει να εκφράζεται σταθερά μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών συνθηκών ή μεταξύ των διαφορετικών ιστών [257]. Για την ποσοτικοποίηση των νέων μικρών, μη κωδικών μορίων είναι απαραίτητη η ανάλυση ενός γνωστού, ήδη ποσοτικοποιημένου γονιδίου αναφοράς, έτσι ώστε να συγκριθεί η συγκέντρωσή του με του αγνώστου.

Το γονίδιο σταθερής έκφρασης που μετρήθηκε στην παρούσα πειραματική διαδικασία είναι το *SNORD48*, αλλιώς *RNU48* ή *U48* (Genbank® ID: NR\_002745.1). Το μικρό αυτό μη κωδικό μόριο RNA έχει μήκος περίπου 70 νουκλεοτίδια. Το *RNU48* ανήκει στην ομάδα των μικρών πυρηνισκικών μορίων, στην κλάση των C/D box όπου περιλαμβάνονται συντηρημένες αλληλουχίες, γνωστά ως C box (αλληλουχία UGAUGA) και D box (CUGA) που βρίσκονται στα 5' και 3' άκρα του μορίου RNA, αντίστοιχα. Οι συντηρημένες αυτές αλληλουχίες δρουν ως παράγοντες σταθερότητας, βιογένεσης, υποκυτταρικού εντοπισμού και λειτουργίας και ως θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνών. Η λειτουργία αυτής της κλάσης είναι η συμμετοχή τους σε μηχανισμούς μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και συγκεκριμένα στη 2'-Ο-μεθυλίωση της ριβόζης των rRNA, tRNAs, snRNAs, ίσως και mRNAs [258]. Μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μπορεί να ανιχνευθεί η έκφραση miRNAs-στόχων σε σχέση με σταθερά εκφρασμένων γονιδίων αναφοράς, όπως είναι γνωστά γονίδια αναφοράς ή εσωτερικά πρότυπα [259].

Η απόλυτη ποσοτικοποίηση αντιστοιχεί σε μία καμπύλη αναφοράς γνωστού αριθμού αντιγράφων και το μόριο αναφοράς που αναλύεται, πρέπει να πολλαπλασιαστεί με τους ίδιους εκκινητές και με την ίδια απόδοση με το μόριο-στόχο. Η σχετική ποσοτικοποίηση περιλαμβάνει την χρήση ενός δείγματος-βαθμονομητή (calibrator). Η μέθοδος ποσοτικοποίησης  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  είναι αρκετά απλή και συγκρίνει τα Ct του γονιδίου αναφοράς και του γονιδίου στόχου. Για το  $\Delta Ct$  ισχύει:

$$\Delta Ct = Ct(\text{στόχου}) - Ct(\text{γονιδίου αναφοράς}), (2.2)$$



Η  $\Delta\Delta Ct$  δίνεται από την διαφορά των  $\Delta Ct$  του βαθμονομητή και του δείγματος σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct)_{calibrator} - (\Delta Ct)_{δείγματος}, \text{ όπου } \Delta Ct = \text{εξίσωση (2.2)}, (2.3)$$

Στην παρούσα διπλωματική πραγματοποιήθηκε qPCR με την επίδραση της χρωστικής SYBR Green I και ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο για 40 κύκλους αντίδρασης:

- 3 min, 95 °C
- 30 sec, 60 °C
- 15 sec, 95 °C
- 1 min, 60 °C
- 15 sec, 95 °C
- 15 sec, 60 °C

### 2.2.8 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης είναι μέθοδος διαχωρισμού ιόντων υπό την επιρροή ηλεκτρικού πεδίου. Ξεκίνησε να χρησιμοποιείται το 1964, αφού βρέθηκε ότι η κινητικότητα των κινούμενων μορίων είναι ανεξάρτητη του μεγέθους τους όταν είναι μεγαλύτερα από 400 ζεύγη βάσεων (base pairs, bp) και διαφοροποιείται ανάλογα με το ιοντικό φορτίο τους. [260]. Πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έδειξαν ότι η κινητικότητα που διαμορφώνεται στο πήκτωμα αγαρόζης μπορεί να αντιστοιχηθεί στο μοριακό βάρος του κινούμενου μορίου, ενώ στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης ήταν δύσκολη η ίδια αντιστοίχιση λόγω ανώμαλης κίνησης των μορίων DNA. Αργότερα βρέθηκε ότι η ελικοειδής δομή του DNA, η οποία δίνει κυρτή διαμόρφωση στο μόριο, απαιτούσε μεγαλύτερη διάμετρο πόρων, ώστε αυτό να μετακινηθεί κατά μήκος του πηκτώματος [260, 261].

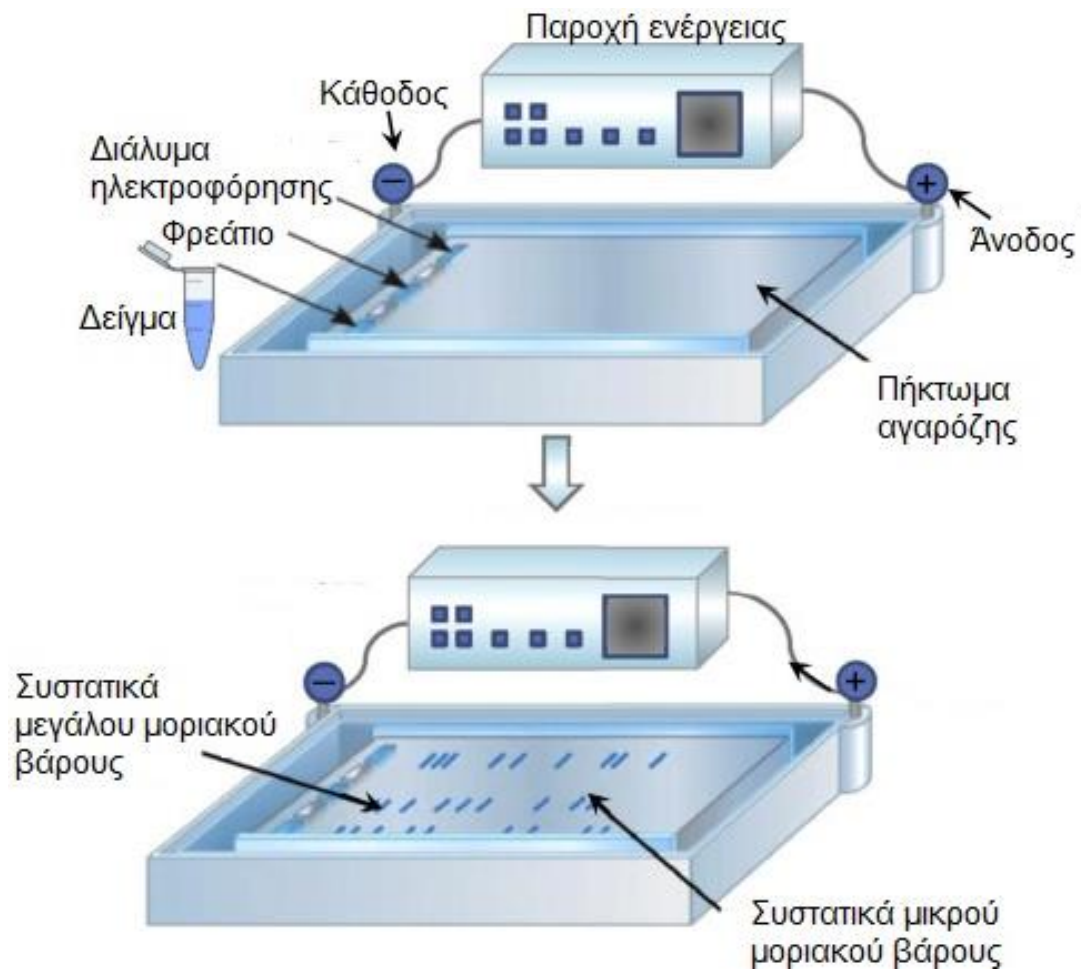
Το σύστημα ηλεκτροφόρησης αποτελείται από δύο ηλεκτρόδια αντίθετου φορτίου, το ένα αποτελεί την άνοδο (θετικό φορτίο) και το άλλο την κάθοδο (αρνητικό φορτίο), και παρεμβάλλεται ένας ηλεκτρολύτης. Ο διαχωρισμός των μορίων προέρχεται από την διαφοροποίηση στην ταχύτητα ( $u$ ), αποτέλεσμα της κινητικότητας ( $m$ ) των μορίων και της ισχύος του πεδίου ( $E$ ) που βρίσκονται (Εικόνα 2.15).

Η κινητικότητα των μορίων σχετίζεται με το μέγεθος, το σχήμα, το φορτίο και την θερμοκρασία που επικρατεί κατά τον διαχωρισμό. Ισχύει ότι:

$$u = m * E, (2.4)$$

Επίσης είναι σημαντικές οι παράμετροι της ηλεκτροφόρησης όπως η τάση, η ένταση του ρεύματος, καθώς και η ιονική ισχύς, το pH, το ιξώδες και το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης.

Τα υλικά παρασκευής του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι η αγαρόζη ή η πολυακρυλαμίδη. Η αγαρόζη είναι ένα πολυμερές των β-D-γαλακτόζη και 3,6-α-L-γαλακτόζη που προέρχεται από το άγαρ, προϊόν κόκκινων θαλάσσιων φυκιών. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε θειϊκές και καρβοξυλικές ομάδες, έχει υψηλή ηλεκτροενδωσμωση. Το πήκτωμα αγαρόζης είναι κατάλληλο για τον διαχωρισμό μεγάλων μορίων, ακτίνας μεγέθους 5-10nm, όπως αντισώματα, λιποπρωτεΐνες, κάποιες πρωτεΐνες μεμβρανών, νουκλεϊκά οξέα και ιοί.



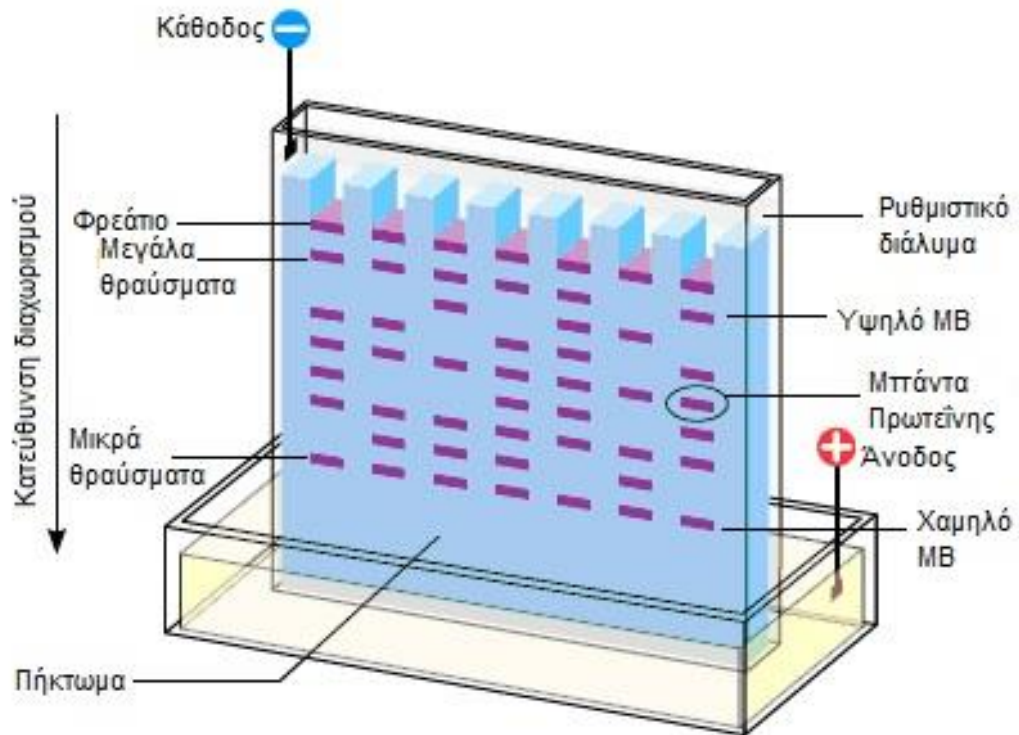
Εικόνα 2.15 Διάταξη ηλεκτροφόρησης πηκτώματος αγαρόζης.

Η περιεκτικότητα του πηκτώματος αγαρόζης (0,5-2% w/v) σε αγαρόζη καθορίζεται από το μέγεθος των μορίων που διαχωρίζονται, έτσι ώστε να

διαμορφωθούν οι κατάλληλοι πόροι που θα διαπεράσουν τα μόρια. Η παρασκευή του πηκτώματος περιλαμβάνει το ζύγισμα της κατάλληλης ποσότητας αгарόζης, εισαγωγή ρυθμιστικού διαλύματος, βρασμό του μείγματος αгарόζης-ρυθμιστικού διαλύματος (TAE: 40mM Tris-acetate, ή TBE: 45mM Tris-borate, 1mM EDTA) για την πλήρη διάλυσή του και εισαγωγή βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide, EtBr) [262]. Έπειτα, το διάλυμα διοχετεύεται σε ειδικό δοχείο για την ηλεκτροφόρηση, όπου έχει ήδη τοποθετηθεί ένα πλαστικό εξάρτημα που βοηθάει στην διαμόρφωση φρεατίων. Αφού αφήνεται να κρυώσει, το πήκτωμα είναι έτοιμο για να μεταφερθεί στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων, προστίθεται στο κάθε δείγμα ειδική χρωστική φόρτωσης σε συγκέντρωση 6X, τα συστατικά αναμειγνύονται και εισάγονται στα διαμορφωμένα φρεάτια του πηκτώματος. Τα ηλεκτρόδια συνδέονται με τη συσκευή ηλεκτροφόρησης, ρυθμίζεται η επιθυμητή τάση και με το πέρας της διαδικασίας το πήκτωμα αгарόζης τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας για την παρατήρηση των διαχωρισμένων μορίων.

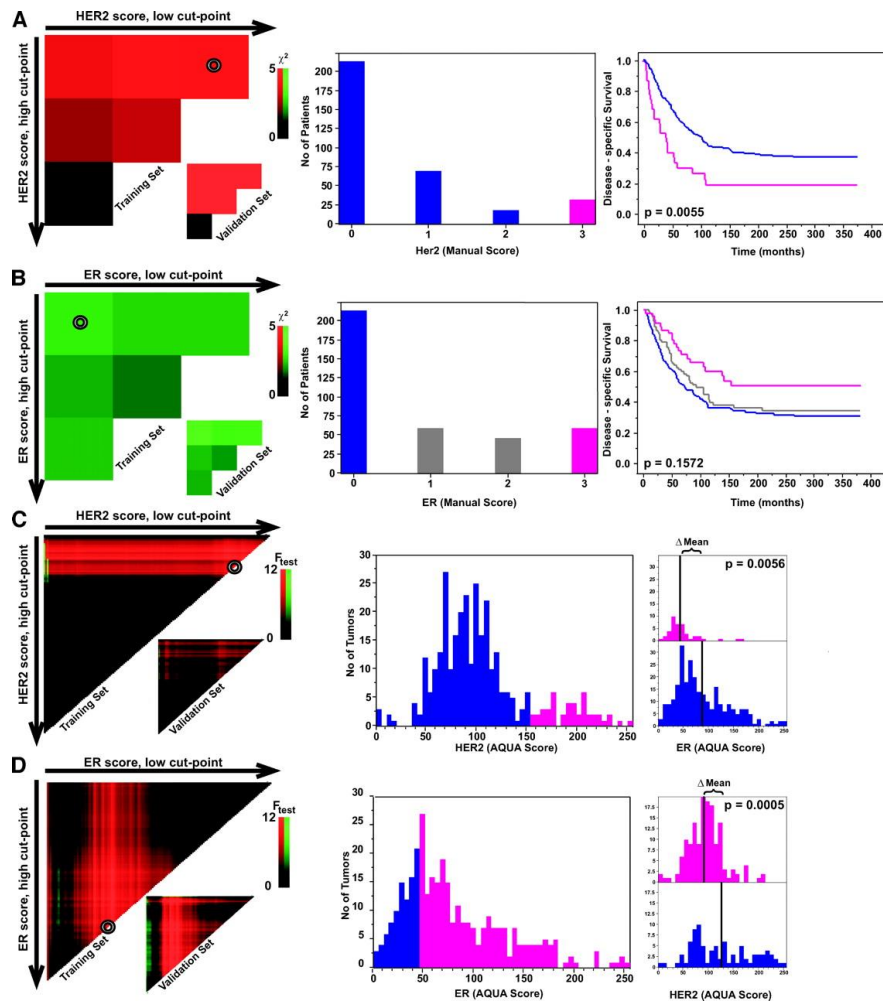
Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης από την άλλη πλευρά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση πρωτεϊνών με μοριακό βάρος μικρότερο των 500.000 Da. Ο πολυμερισμός των μονομερών του ακρυλαμιδίου με την παρουσία θειικού αμμωνίου ή της ριβοφλαβίνης και του N,N'-μεθυλεν-δισακρυλαμίδιο, δίνουν το αποτέλεσμα ενός πηκτώματος μεγάλης αντοχής και εύκολου στην χρήση (Εικόνα 2.16) [263].



Εικόνα 2.16 Διάταξη ηλεκτροφόρησης πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.

### 2.2.9 Στατιστική ανάλυση

Για τον ορισμό του σημείου λήψης απόφασης (cut-off) της έκφρασης του μορίου 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος X-tile. Αφού τα δεδομένα διαμορφώνονται κατάλληλα ως αρχείο κειμένου, εισάγονται στον αλγόριθμο και υφίστανται επεξεργασία. Έτσι δημιουργείται ένα διάγραμμα τριγωνικού πλέγματος, το οποίο περιλαμβάνει πολλές διαφορετικές τιμές cut-off. Επίσης παρουσιάζεται ένα ιστόγραμμα και η αντίστοιχη καμπύλη Kaplan-Meier για κάθε τιμή, μέσω της περιήγησης του κέρσορα στο διάγραμμα του πλέγματος (Εικόνα 2.17) [264]. Η τιμή του cut-off στην παρούσα ανάλυση είναι η  $R_q = 3,920$ . Τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε αρνητικά ή θετικά σε σχέση με την έκφραση του μορίου, ανάλογα με το αν είναι μικρότερη ή μεγαλύτερη η τιμή τους από το cutoff, αντίστοιχα.



Εικόνα 2.17 Περιβάλλον εργασίας στο x-tile [264].

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω μη παραμετρικών στατιστικών δοκιμασιών, καθώς η κατανομή των επιπέδων έκφρασης του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> είναι μη κανονική. Για τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών πραγματοποιήθηκαν μη παραμετρικές δοκιμασίες.

Μέσω της δοκιμασίας *Wilcoxon* (*Wilcoxon signed-rank test*) έγινε η σύγκριση των επιπέδων του μορίου στα ζεύγη των δειγμάτων, φυσιολογικών και καρκινικών δειγμάτων, ενώ μέσω της δοκιμασίας *Jonckheere-Terpstra* έγινε ο διαχωρισμός των ασθενών σε ομάδες, ανάλογα με τον βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης. Για τη συσχέτιση του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> με τον βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης, την διήθηση του όγκου, την κατάσταση των λεμφαδένων, τις απομακρυσμένες μεταστάσεις και την TNM σταδιοποίηση χρησιμοποιήθηκε η κατανομή  $\chi^2$  (*chi-square distribution*).

Έπειτα, δημιουργήθηκαν μοντέλα μονομεταβλητής παλινδρόμησης αναλογικού

κινδύνου κατά Cox και ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier, καθώς και καμπύλες επιβίωσης ελεύθερης νόσου (disease free survival, DFS) και ολικής επιβίωσης (overall survival, OS), έτσι ώστε να βγουν συμπεράσματα τόσο για την σχέση μεταξύ των δεικτών πρόγνωσης όσο και του σχετικού κινδύνου εμφάνισης υποτροπής ή θανάτου των ασθενών.

Μέσω της μονομεταβλητής ανάλυσης παλινδρόμησης υπολογίζεται η σχετική πιθανότητα εμφάνισης του υπό μελέτη καταληκτικού γεγονότος (event), δηλαδή ο συντελεστής σχετικού κίνδυνου (Hazard Ratio, HR). Στην παρούσα μελέτη το υπό μελέτη καταληκτικό γεγονός μπορεί να είναι είτε ο θάνατος των ασθενών ή η υποτροπή και η εξέλιξη της νόσου. Η σύγκριση των καμπυλών έγινε μέσω της στατιστικής δοκιμασίας log rank (Mantel-Cox) και το στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ορίζεται ως τιμή πιθανότητας μικρότερη του 0,05 ( $p\text{-value}=0,05$ ).

### 3 Αποτελέσματα

#### 3.1 Πειραματικά δεδομένα από την SRA βάση δεδομένων

Η συλλογή των πειραματικών δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη έγινε από τη βάση δεδομένων SRA, με σκοπό την εισαγωγή τους σε αλγόριθμους και την επεξεργασία τους. Αρχικά, γίνεται επιλογή των παραμέτρων των πρωτογενών αρχείων FASTQ που συλλέγονται. Τα δεδομένα από NGS πειράματα σε ανθρώπινο οργανισμό, προέρχονται από miRNA-seq στρατηγική, σε πλατφόρμα Illumina και είναι από δείγματα όγκου ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου. Παρακάτω παρατίθενται τα πειραματικά δεδομένα που συλλέχθηκαν από την SRA βάση:

*Πίνακας 3.1 Στοιχεία ασθενών των πειραμάτων που συλλέχθηκαν από την βάση δεδομένων SRA*

Κωδικός πειράματος SRA	Ηλικία ασθενή	Τοπολογία	Στάδιο
SRR8512581	55	Ορθό	IIIB
SRR8512582	62	Κόλον	IIA
SRR8512583	44	Κόλον	IIIB
SRR8512584	62	Κόλον	I
SRR8512585	59	Ορθό	IIA
SRR8512586	55	ορθό	IIIC

#### 3.2 Επεξεργασία των πρωτογενών δεδομένων

Ο ποιοτικός έλεγχος των δεδομένων μπορεί να γίνει με το εργαλείο Trim Galore. Ως αλληλουχία του εκκινητή που θα αφαιρεθεί από το Trim Galore ορίζεται ο “TGGAA<sup>TTC</sup>TCGG”, ο οποίος είναι και ο γενικευμένος εκκινητής για την πλατφόρμα Illumina, για μικρά RNA μόρια (Illumina Small RNA 3' Adapter) (Εικόνα 3.1).

Η εντολή για την επεξεργασία του αρχείου είναι η ακόλουθη:

```
$ trim_galore --small_rna --length 16 --max_length 40 --max_n 1 SmallRNA.FASTQ.
```

Με την παραπάνω εντολή, μετά το πέρας της διαδικασίας το αρχείο θα έχει απαλλαγεί από αλληλουχίες μεγαλύτερες των 40 βάσεων και μικρότερες των 16 καθώς και από τις βάσεις N, οι οποίες ενδέχεται να περιέχονται στην αλληλουχία.

```

SUMMARISING RUN PARAMETERS
=====
Input filename: SRR8512583.fastq
Trimming mode: single-end
Trim Galore version: 0.4.4_dev
Cutadapt version: 1.15
Quality Phred score cutoff: 20 → ελάχιστη τιμή ποιότητας καταγραφής
Quality encoding type selected: ASCII+33
Adapter sequence: 'TGGAATTC' ( ) → αλληλουχία προσαρμογέα
Maximum trimming error rate: 0.1 (default)
Minimum required adapter overlap (stringency): 1 bp
Minimum required sequence length before a sequence gets removed: 16 bp → ελάχιστο επιτρεπτό
Maximum tolerated read length after trimming (for smallRNA trimming): 40 bp → μήκος αλληλουχίας
Removing Ns from the start and end of reads
Running FastQC on the data once trimming has completed

Writing final adapter and quality trimmed output to SRR8512583_trimmed.fq

>>> Now performing quality (cutoff 20) and adapter trimming in a single pass for the adapter sequence: 'TGGAATTC' from file SRR8512583.fastq <<<
10000000 sequences processed
This is cutadapt 1.15 with Python 3.6.8
Command line parameters: -f fastq -e 0.1 -q 20 -O 1 --trim-n -a TGGAATTC SRR8512583.fastq
Running on 1 core
Trimming 1 adapter with at most 10.0% errors in single-end mode ...
Finished in 279.06 s (19 us/read; 3.11 M reads/minute).

=== Summary ===

Total reads processed:          14,465,533
Reads with adapters:           14,112,208 (97.6%)
Reads written (passing filters): 14,465,533 (100.0%)

Total basepairs processed:    737,742,183 bp
Quality-trimmed:              102,468 bp (0.0%)
Total written (filtered):     326,307,444 bp (44.2%)

=== Adapter 1 ===

Sequence: TGGAATTC; Type: regular 3'; Length: 8; Trimmed: 14112208 times.

No. of allowed errors:
0-8 bp: 0

Bases preceding removed adapters:
A: 29.3%
C: 22.3%
G: 12.1%
T: 36.3%
none/other: 0.0%

```

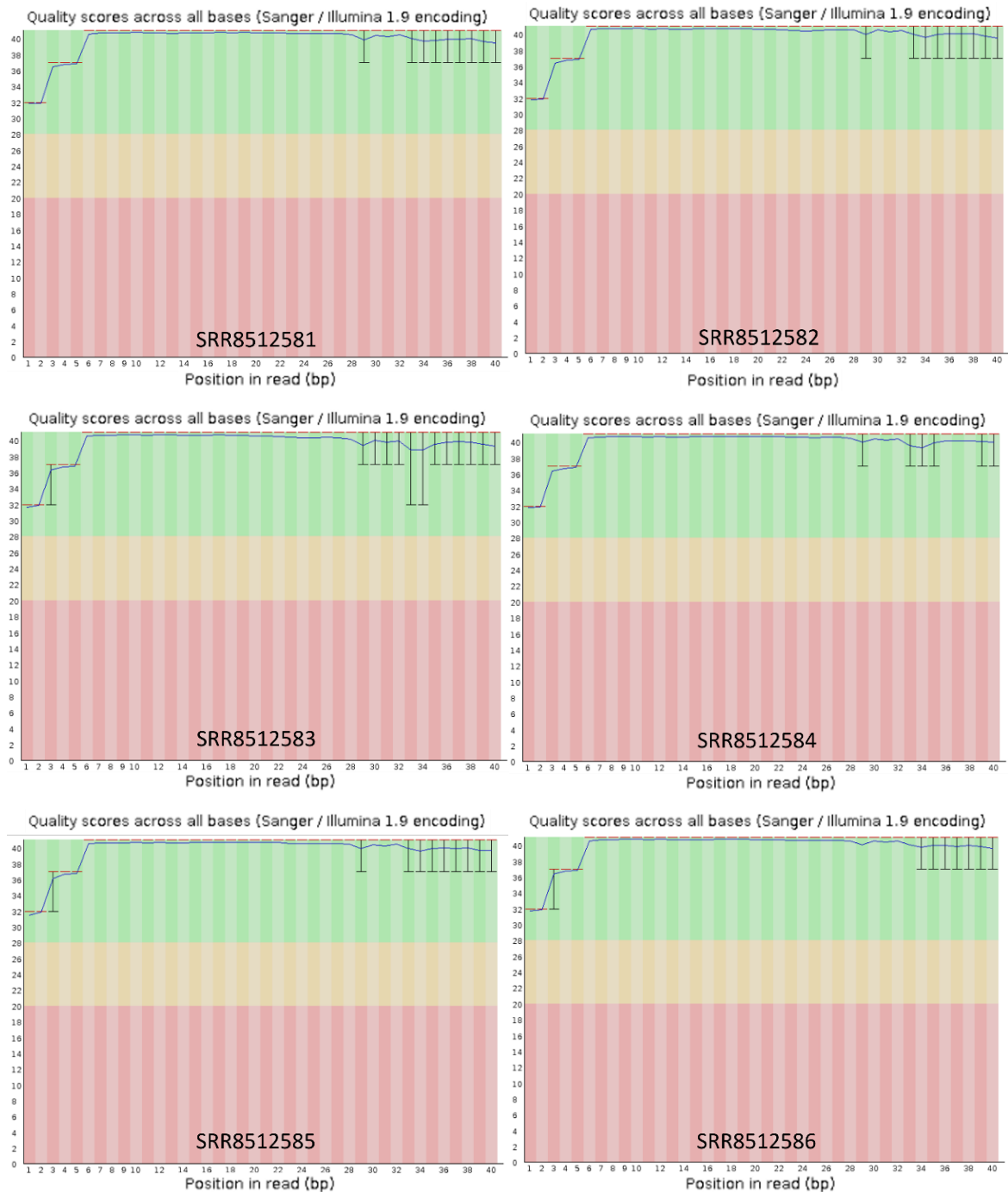
Εικόνα 3.1 Αποτελέσματα αλγορίθμου TrimGalore.

### 3.3 Έλεγχος ποιότητας πρωτογενών δεδομένων μετά την επεξεργασία τους

Η οπτικοποίηση του ελέγχου ποιότητας των πρωτογενών δεδομένων και των δεδομένων που έχουν υποστεί επεξεργασία, γίνεται μέσω γραφημάτων που παρέχει το εργαλείο FastQC. Παρακάτω παρουσιάζονται γραφήματα, τα οποία περιέχουν τις παραμέτρους: μέση ποιότητα ανά βάση (per base sequence quality), μέση ποιότητα κάθε καταγραφής (per sequence quality score) και κατανομή του μήκους των καταγραφών (sequence length distribution).

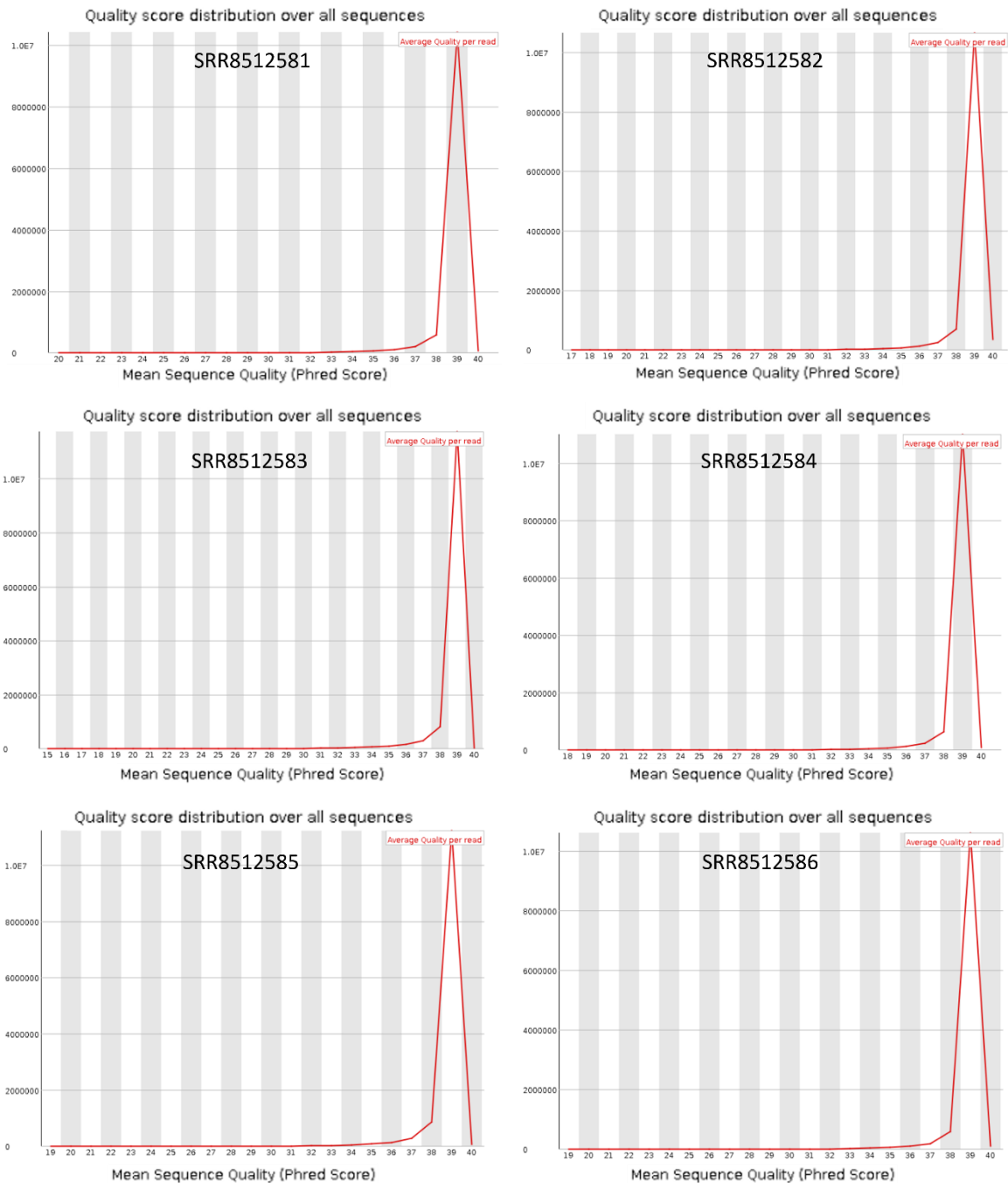
Αρχικά, στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 3.2) παρουσιάζεται η μέση ποιότητα των βάσεων της αλληλουχίας, δηλαδή ο βαθμός βεβαιότητας για την σωστή καταγραφή τους. Στον άξονα y βρίσκεται η ποιότητα αλληλούχησης της κάθε βάσης ενώ στον x η θέση της βάσης. Τα τρία χρώματα του γραφήματος αντιστοιχούν στις βάσεις με υψηλή τιμή ποιότητας(πράσινο), με βαθμό ποιότητας 30-40, με μέτρια τιμή (πορτοκαλί), 20-30 βαθμούς και με χαμηλό βαθμό ποιότητας (κόκκινο), 0-20 βαθμούς. Στην παρούσα ανάλυση τα αποτελέσματα βρίσκονται στο εύρος του πράσινου χρώματος, άρα έχουν υψηλό βαθμό ποιότητας με πιθανότητα λάθους ανάγνωσης 1 στις 1000 βάσεις.





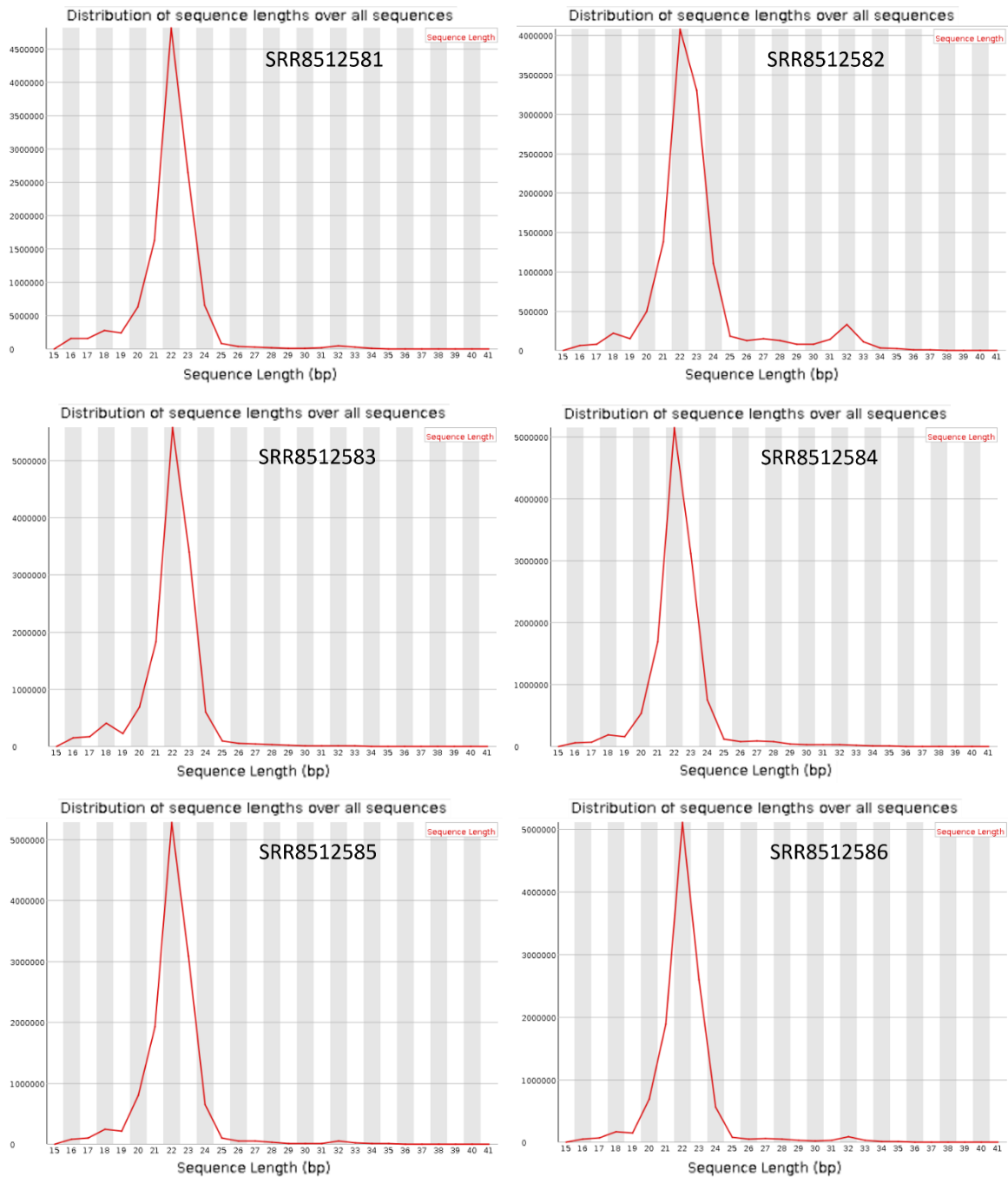
Εικόνα 3.2 Μέση ποιότητα βάσεων των αλληλουχιών από τα δεδομένων NGS για καρκίνο παχέος εντέρου και ορθού.

Στις επόμενες εικόνες παρατίθεται η μέση ποιότητα ανά καταγραφή. Στον άξονα y αντιστοιχεί ο αριθμός ποιότητας κάθε καταγραφής και στον άξονα x το Phred score που αντιστοιχεί σε κάθε καταγραφή. Οι καταγραφές εδώ έχουν quality score πάνω από 30, συγκεκριμένα έχουν 38-40 (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3 Μέση ποιότητα ανά καταγραφή των αλληλουχιών από τα δεδομένων NGS για καρκίνο παχέος εντέρου και ορθού.

Τέλος, απεικονίζεται η κατανομή του μήκους των καταγραφών κάθε πειράματος. Στον άξονα y αντιστοιχεί ο αριθμός των καταγραφών και στον άξονα x το μήκος της καθεμίας από αυτές (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4 Η κατανομή του μήκους των καταγραφών του κάθε πειράματος από τα δεδομένα NGS για καρκίνο παχέος εντέρου και ορθού.

### 3.4 Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός των tRFs

Έπειτα από την επεξεργασία των αρχείων FASTQ, τα αρχεία εισάγονται στον αλγόριθμο MINTmap, ώστε να στοιχηθούν οι αλληλουχίες των tRFs στο γενωμικό χώρο των tRNAs, αλλά ταυτόχρονα και σε άλλη θέση του γονιδιώματος. Η πληροφορία αυτή αξιοποιείται έτσι ώστε να επιλεγούν μόνο τα tRFs που προέρχονται από το γενωμικό χώρο των tRNAs.

Μετά την ανάλυση των αρχείων στον αλγόριθμο MINTmap και αλγόριθμους πληροφορικής που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο, επιλέχθηκε ένα μόριο tRF βάσει της υψηλής συχνότητας ανίχνευσής του και του καθολικού προφίλ έκφρασης του.

Από την αναζήτηση του μελετώμενου μορίου tRF στην βάση δεδομένων MINTbase, δίνονται οι πληροφορίες ότι είναι ένα μιτοχονδριακό 3' tRF και βρίσκεται στο tRNA space αποκλειστικά. Επίσης η ίδια αλληλουχία βρίσκεται και στο χρωμόσωμα 5. Έχει μήκος 34 βάσεις, το αντικωδικόνιό του είναι το «<sup>TTC</sup>» το αμινοξύ που φέρει είναι το γλουταμινικό και έτσι το πλήρες όνομά του είναι το 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> (Εικόνα 3.5).

Type	MINTbase Unique ID (sequence derived)	MINTbase Alternative IDs (GRCh37 assembly-derived)	Unique tRNA name	tRNA number	Amino acid and anticodon	Chromosome	Chromosome strand	Chromosome start position	Intronic coordinates start (global)	Intronic coordinate end (global)	Chromosome end position	Start position relative to start of mature tRNA	End position relative to start of mature tRNA	Spans exon-exon?
3'-tRF	tRF-34-18W47W1R7H	trnaMT_GluTTC_MT_	trnaMT_GluTTC_MT_	trnaMT	GluTTC	MT	-	14674-3	-	-	14704	39	72	no
3'-tRF	tRF-34-18W47W1R7H	trnlookalike8_GluTTC	trnlookalike8_GluTTC	trnlookalike8	GluTTC	5	-	93905172-3	-	-	93905202	39	72	no

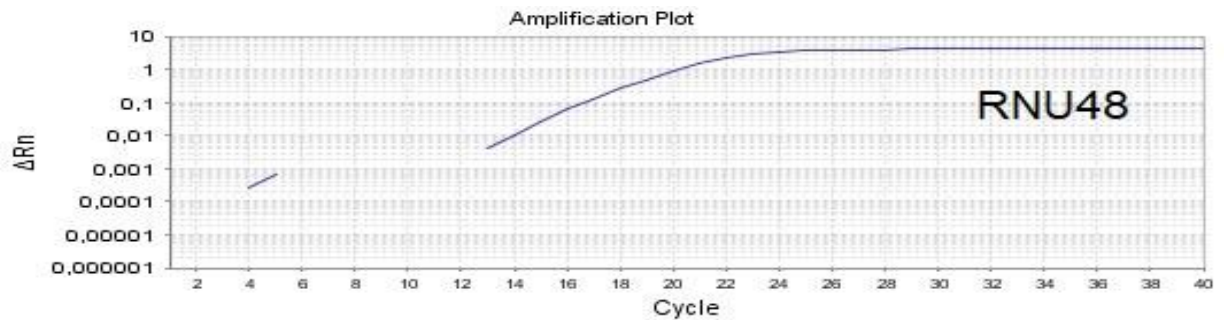
Fragment sequence	# Distinct amino acids	Amino acids containing the sequence	# Distinct anticodons	Anticodons containing the sequence	# Total genomic instances in known tRNA space	# Instances in true nuclear tRNAs	# Instances in true MT tRNAs	# Instances in tRNA lookalikes in nucleus	# Instances in nuclear pseudo tRNAs	# Instances in MT pseudo tRNAs	Fragment length	D-loop overlap?	Anticodon-loop overlap?	Anticodon-triplet overlap?	T-loop overlap?	Exclusively within tRNA genes?	Expressed (# of datasets)?	Maximum RPM
	1	Glu	1	GluTTC	2	0	1	1	0	0	34	no	no	no	full	yes	Yes (384)	5143.705
	1	Glu	1	GluTTC	2	0	1	1	0	0	34	no	no	no	full	yes	Yes (384)	5143.705

Εικόνα 3.5 Αποτελέσματα αναζήτησης για το 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> στο MINTbase.

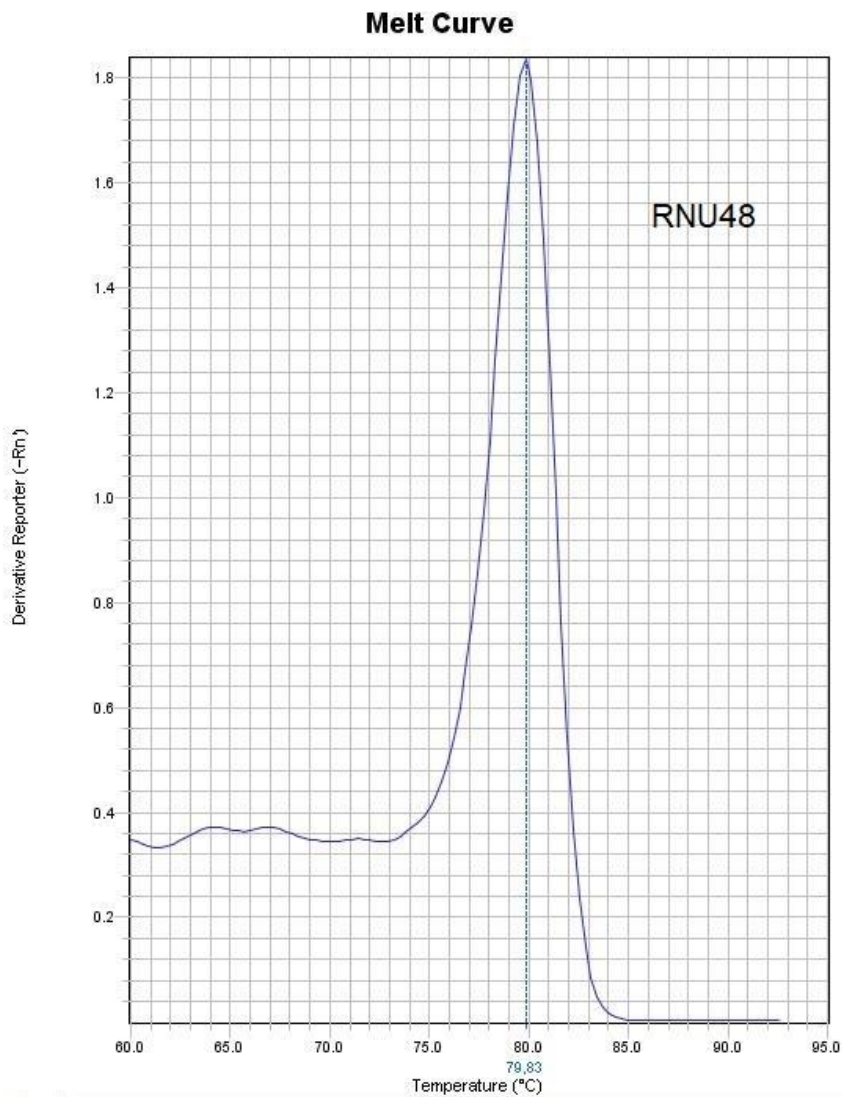
### 3.5 Ανίχνευση των tRFs και tiRNAs στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου

Πριν από την ανίχνευση και των προσδιορισμό των υπό μελέτη μορίων tRFs σε ανθρώπινα ιστολογικά δείγματα είναι απαραίτητη η ανίχνευσή τους σε κυτταρικές σειρές, αλλά και η ποσοτική τους ανάλυση με τη μέθοδο της real-time PCR. Με αυτήν την μέτρηση επιβεβαιώνεται η ύπαρξη του μορίου tRF σε αντίστοιχες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου: DLD-1, HT-29, CaCo-2, RKO, Colo-205, SW-620 και HCT-116 στις οποίες μελετήθηκε η έκφραση του 3'tRF-

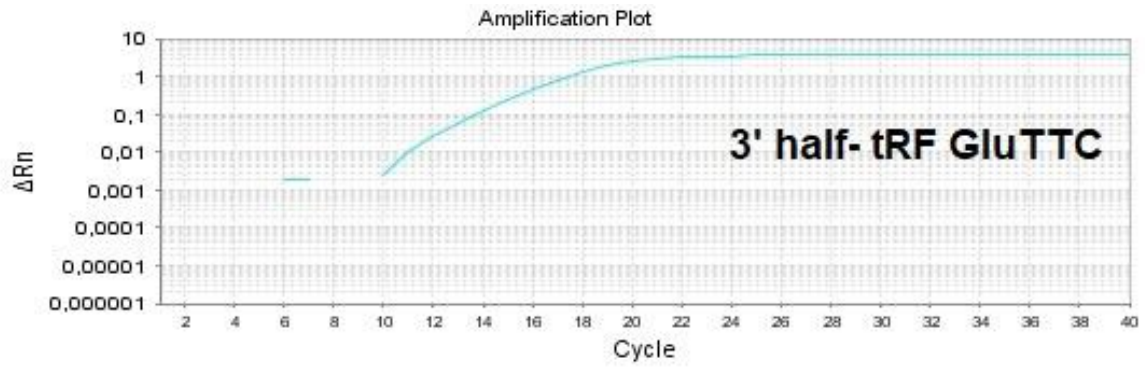
Glu<sup>TTC</sup> αλλά και η έκφραση του γονιδίου αναφοράς *RNU48*. Παρακάτω παρατίθενται οι καμπύλες ενίσχυσης και τήξης του *RNU48* και του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> στην κυτταρική σειρά SW-620, αντίστοιχα (Εικόνες 3.6-3.9).



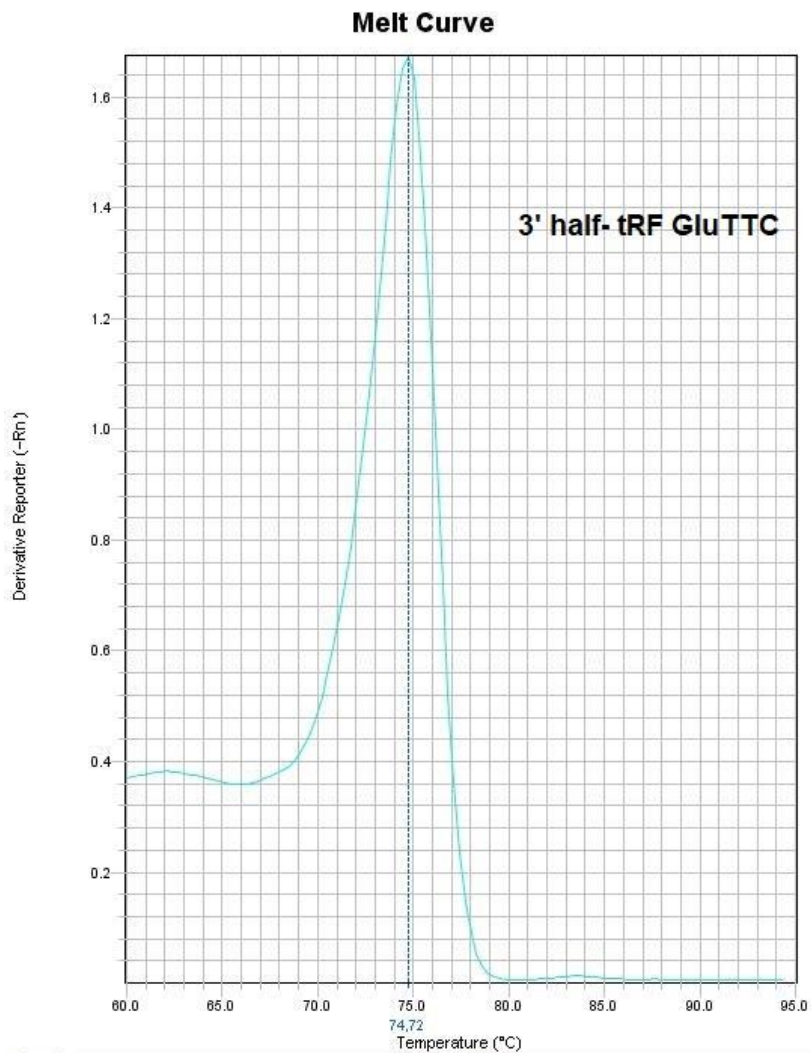
Εικόνα 3.6 Καμπύλη ενίσχυσης του *RNU48* στην κυτταρική σειρά SW-620.



Εικόνα 3.7 Καμπύλη τήξης του *RNU48* στην κυτταρική σειρά SW-620.



Εικόνα 3.8 Καμπύλη ενίσχυσης του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> στην κυτταρική σειρά SW-620.



Εικόνα 3.9 Καμπύλη τήξης του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> στην κυτταρική σειρά SW-620.

### 3.6 RT-qPCR για την ανίχνευση των μορίων tRF

Στο επόμενο βήμα ελέγχεται η έκφραση του υπό μελέτη μορίου, 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup>, σε δείγματα καρκινικού ιστού παχέος εντέρου. Ο αριθμός των δειγμάτων είναι 113. Ως

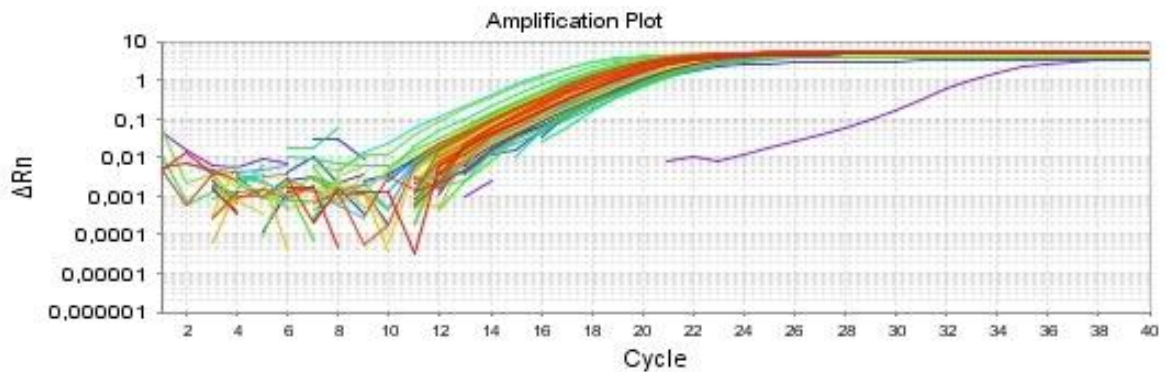
γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *RNU48* και ως θετικός μάρτυρας της αντίδρασης και βαθμονομητής ορίστηκε η κυτταρική σειρά SW-620. Παρακάτω παρατίθενται τα στοιχεία των ασθενών (Πίνακας 3-2):

Πίνακας 3.2 Στοιχεία ασθενών της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

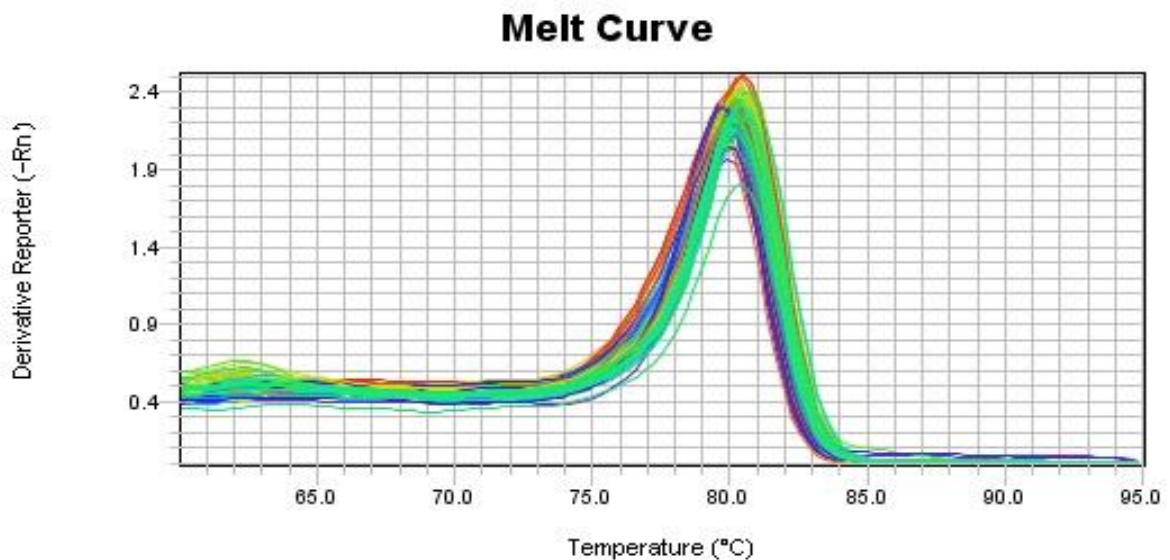
Στοιχεία		Αριθμός Ασθενών	(%)
Φύλο	Άρρεν	58	51,3
	Θήλυ	55	48,7
Εντοπισμός όγκου	Παχύ έντερο	74	65,5
	Ορθό	39	34,5
Βαθμός διαφοροποίησης	I	12	10,6
	II	83	73,5
	III	18	15,9
T (διήθηση όγκου)	T1	3	2,7
	T2	13	11,5
	T3	71	62,8
	T4	26	23
N (τοπικές λεμφαδενικές μεταστάσεις)	N0	67	59,3
	N1	23	20,4
	N2	23	20,4
M (απομακρυσμένες μεταστάσεις)	M0	98	86,7
	M1	15	13,3
TNM σταδιοποίηση	I	14	12,4
	II	51	45,1
	III	33	29,2
	IV	15	13,3
Ραδιοθεραπεία	Ναι	22	19,5
	Όχι	91	80,5
Χημειοθεραπεία	Ναι	62	54,9
	Όχι	51	45,1

Η πρώτη αντίδραση που πραγματοποιήθηκε είναι για το γονίδιο αναφοράς *RNU48*. Επειδή η έκφρασή του είναι σταθερή και αναμένεται να ανιχνευτεί στα υπό μελέτη δείγματα, χρησιμοποιείται ώστε αν ένα δείγμα δεν το εκφράζει ικανοποιητικά, αποκλείεται από την μελέτη. Στη συνέχεια μελετάται η έκφραση του υπό μελέτη

μορίου 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> στα δείγματα των ασθενών τα οποία εκφράζουν το γονίδιο αναφοράς. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται η καμπύλη ενίσχυσης και η καμπύλη τήξης των αντιδράσεων qPCR για το RNU48 (Εικόνες 3.10, 3.11).

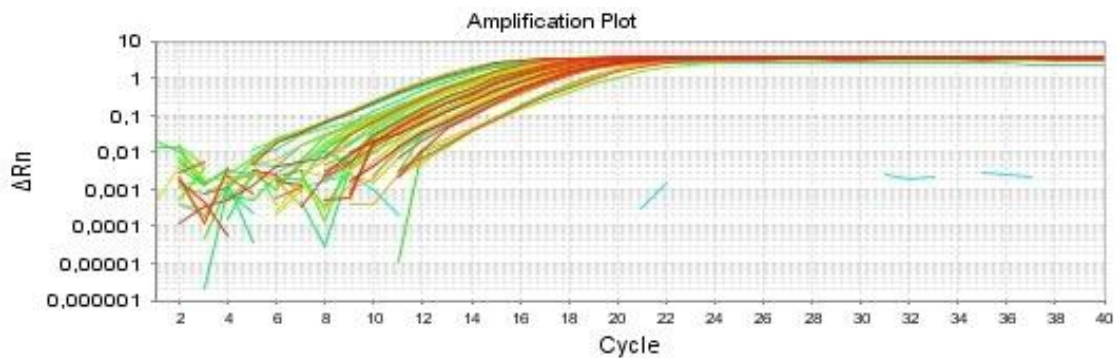


Εικόνα 3.10 Καμπύλη ενίσχυσης δειγμάτων για το RNU48.



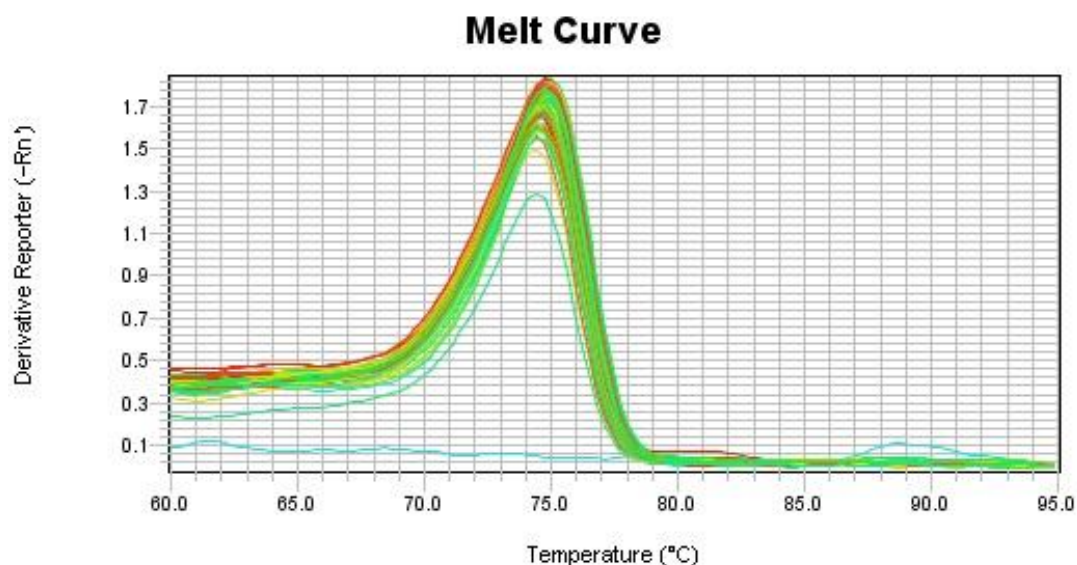
Εικόνα 3.11 Καμπύλη τήξης δειγμάτων για το RNU48.

Τέλος, παρατίθενται οι καμπύλες ενίσχυσης και τήξης των δειγμάτων για το μόριο 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> (Εικόνες 3.12, 3.13).



Εικόνα 3.12 Καμπύλη ενίσχυσης δειγμάτων για το 3' tiRNAGlu<sup>TTC</sup>.





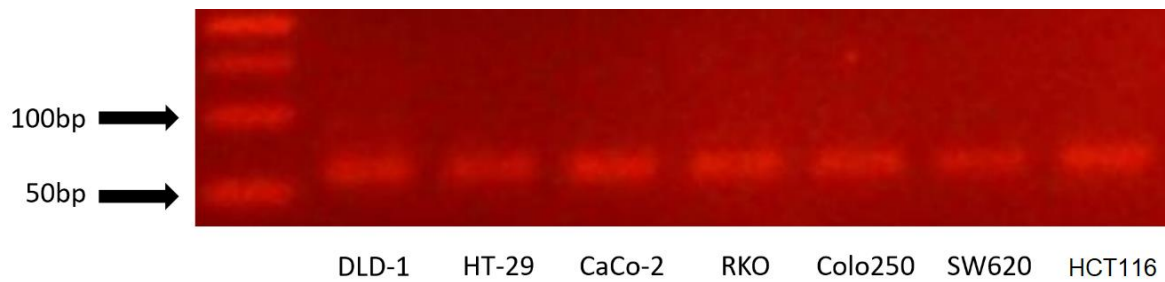
Εικόνα 3.13 Καμπύλη τήξης δειγμάτων για το 3' tiRNAGlu<sup>TTC</sup>.

### 3.7 Ηλεκτροφόρηση

Για την επιβεβαίωση της ύπαρξης μοναδικού προϊόντος της αντίδρασης qPCR και ανίχνευση του μορίου tRF-στόχου, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Στο πρώτο πηγαδάκι (well) του πηκτώματος έχει τοποθετηθεί ο δείκτης μοριακών βαρών (ladder).

Μετά από την ηλεκτροφόρηση επτά καρκινικών σειρών φαίνεται ότι η έκφραση του υπό μελέτη μορίου 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> είναι σταθερή σε καθεμία από αυτές (Εικόνα 3.14). Το ίδιο παρατηρείται και στα δείγματα των ασθενών, σε μήκος 50-100 ζ.β, ενδεικτικά φαίνονται επτά καρκινικά δείγματα παρακάτω (Εικόνα 3.15).

Το μήκος του προϊόντος της qPCR που αναμένεται είναι 67 βάσεις συνολικά, το οποίο συμφωνεί με την εικόνα του gel, καθώς η ζώνη που αντιστοιχεί στο 3'tRF Glu<sup>TTC</sup> βρίσκεται μεταξύ των 50-100ζ.β.. Η ηλεκτροφόρηση έγινε ενδεικτικά σε κάποια από τα δείγματα ασθενών και φαίνονται παρακάτω μαζί με την ηλεκτροφόρηση των αντίστοιχων προϊόντων PCR σε κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου.

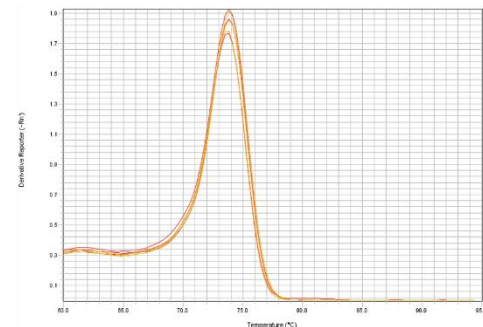
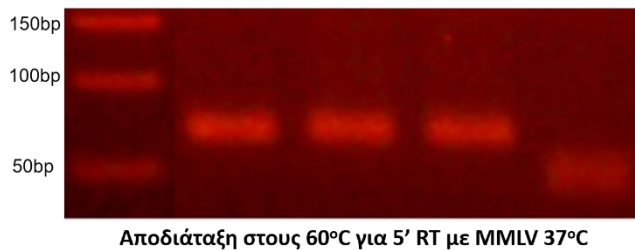
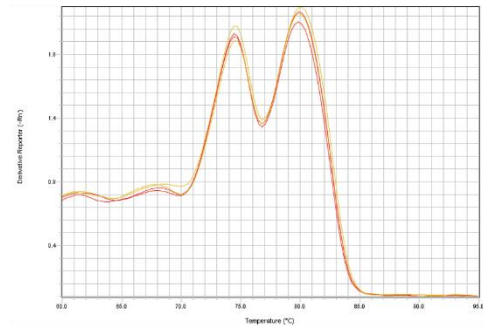
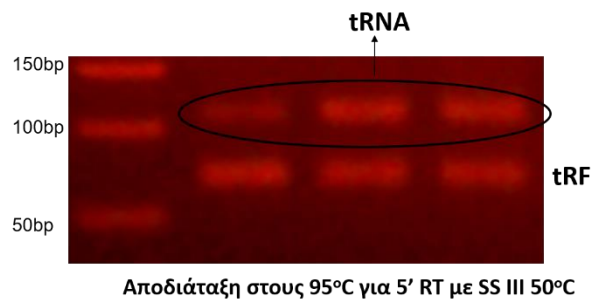


Εικόνα 3.14 Πήκτωμα αγαρόζης που αντιστοιχεί στην έκφραση του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> σε κυτταρικές σειρές.



Εικόνα 3.15 Πήκτωμα αγαρόζης που αντιστοιχεί στην έκφραση του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> σε καρκινικά δείγματα.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις της πολυαδενυλίωσης και αντίστροφης μεταγραφής για τα δείγματα ολικού RNA και η ενίσχυση μέσω ειδικών εκκινητών με qPCR. Η αποδιάταξη των μορίων RNA γίνεται στους 60°C για 5 λεπτά και το ένζυμο MMLV συνθέτει τα μόρια cDNA στους 37°C. Στην αντίστοιχη αντίδραση με το ένζυμο SuperScript III (SS III) η σύνθεση cDNA μορίων γίνεται στους 50°C και η αποδιάταξη στους 95°C. Στην πρώτη αντίδραση τα μόρια RNA με μεγαλύτερο μέγεθος δεν έχουν αποδιαταχθεί πλήρως άρα παράγεται μοναδικό προϊόν, όπως φαίνεται στην καμπύλη τήξης και μία ζώνη ηλεκτροφόρησης, η οποία αντιστοιχεί σε μόριο tRF. Στην δεύτερη αντίδραση φαίνεται να υπάρχει δεύτερο προϊόν που αντιστοιχεί σε tRNA μόριο, μεγαλύτερου μήκους από αυτό του tRF μορίου. Αυτό συμβαίνει γιατί η αντίδραση γίνεται σε μεγαλύτερη θερμοκρασία, τα μόρια tRNA αποδιατάσσονται και αυτά όπως και τα μόρια tRF. Η εικόνα της καμπύλης τήξης είναι μία καμπύλη με δύο κορυφές, μία για το μόριο tRNA και μία ξεχωριστή για το μόριο tRF. Στην ηλεκτροφόρηση υπάρχουν δύο ζώνες, μία για κάθε κατηγορία μορίων RNA (Εικόνα 3.16).



Εικόνα 3.16 Πήκτωμα αγαρόζης και καμπύλες τήξης του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> και του πρόδρομου μορίου του.

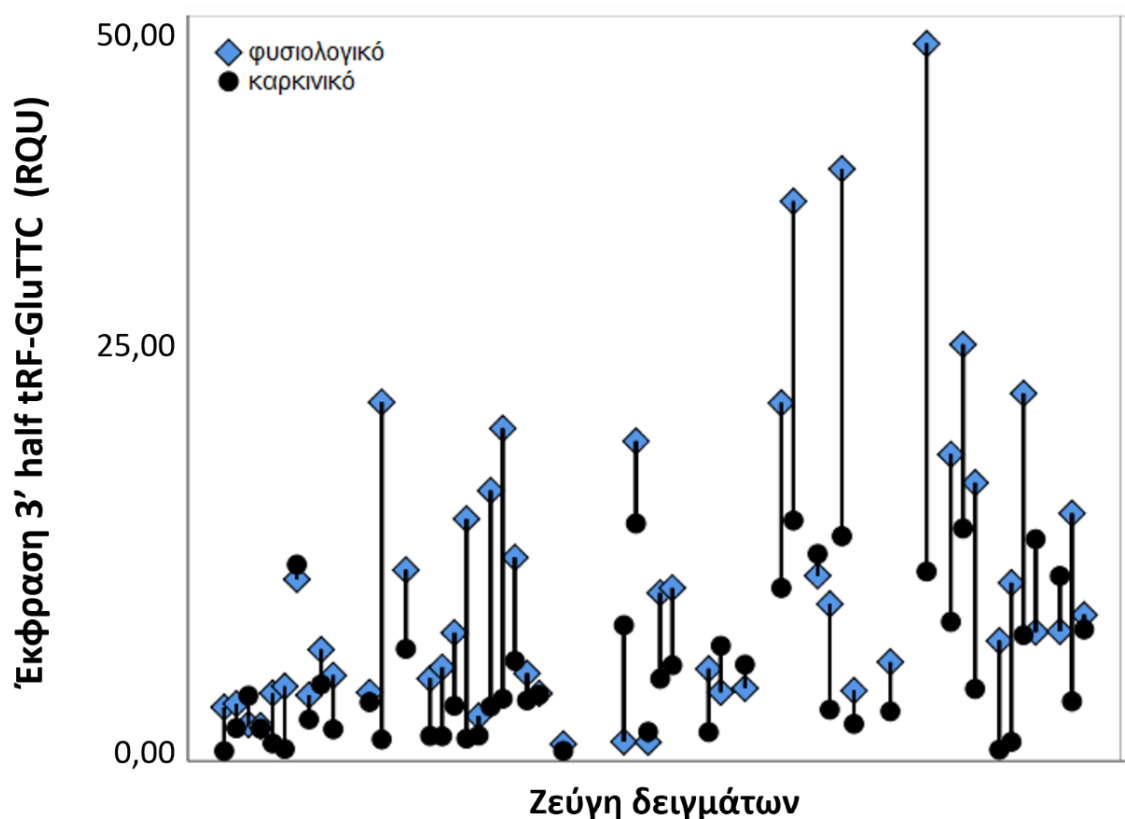
### 3.8 Ποσοτικός προσδιορισμός και κλινική αξία της έκφρασης του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> στον καρκίνο παχέος εντέρου

Η παρούσα μελέτη έκφρασης του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> περιλαμβάνει ένα σύνολο 113 δειγμάτων ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου. Από τους 50 ασθενείς από το σύνολο των 113, συλλέχθηκε και παρακείμενος φυσιολογικός ιστός. Τα καρκινικά δείγματα διαφέρουν στα επίπεδα έκφρασης του μελετώμενου μορίου από τα μη καρκινικά καθώς τα πρώτα έχουν 0,67 – 16,13 RQU (μέσος όρος= 5,23 ± 0,37) ενώ τα μη καρκινικά έχουν 0 – 148,53 (μέσος όρος= 14,62± 2,87). Έτσι φαίνεται η υποέκφραση του μορίου στους καρκινικούς ιστούς. Η ηλικία των ασθενών κυμαίνεται από 37 έως τα 93 έτη (μέση τιμή= 67,5± 0,9 έτη) και το μέγεθος του όγκου από 0,8 έως 132,0 cm<sup>2</sup> (μέση τιμή= 21,2±1,5 cm<sup>2</sup>) (Πίνακας 3.3).

Όπως φαίνεται στο παρακάτω γράφημα, το υπό μελέτη μόριο 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> υποεκφράζεται στα καρκινικά δείγματα σε σύγκριση με τα παρακείμενα φυσιολογικά. 41 δείγματα των ζευγών δειγμάτων ιστού (82%) εμφανίζουν υποέκφραση του μελετούμενου μορίου tRF και 9 υπερέκφραση (18%) (Εικόνα 3.17).

Πίνακας 3.3 Επίπεδα έκφρασης 3' tRF-Glu<sup>TTC</sup> στις μεταβλητές ύπαρξη ή όχι όγκου, ηλικία και μέγεθος όγκου.

Μεταβλητή/ Επίπεδα 3' tRF-Glu <sup>TTC</sup> (RQU)	Μέση τιμή ± S.E	Διακύμανση	Εκατοστημόρια		
			25°	50° (διάμεσος)	75°
Καρκινικά δείγματα (n=113)	5,23 ± 0,37	0,67 – 16,13	2,26	4,11	6,54
Μη καρκινικά δείγματα (n=50)	14,62 ± 2,87	0 – 148,53	4,60	8,66	18,13
<b>Ηλικία ασθενή (έτη)</b>	66,61 ± 1,06	37,0 – 93,0	59,0	68,0	75,0
<b>Μέγεθος όγκου (cm<sup>2</sup>)</b>	21,61 ± 1,75	0,8– 132,0	10,0	15,8	28,15



Εικόνα 3.17 Η έκφραση του 3' tRF-Glu<sup>TTC</sup> ως προς την έκφραση του RNU48 σε 50 ζεύγη καρκινικών και παρακαείμενων φυσιολογικών ιστολογικών δειγμάτων παχέος εντέρου.

### **3.9 Αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> και των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου**

Μετά από την ανάλυση των δειγμάτων στον αλγόριθμο x-tile και τον ορισμό της τιμής cut-off τα δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν σε θετικά και αρνητικά. Αν η έκφραση του μορίου 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> ενός δείγματος είναι μεγαλύτερη από την τιμή cut-off, το δείγμα χαρακτηρίζεται ως θετικό, αντίστοιχα για το αρνητικό δείγμα που έχει μικρότερη τιμή έκφρασης. Έτσι, 55 δείγματα (48.7%) χαρακτηρίζονται αρνητικά, ενώ 58 είναι θετικά (51.3%) σε σχέση με την έκφραση του μελετώμενου μορίου tRF.

### **3.10 Αξιολόγηση της σχέσης των επιπέδων έκφρασης του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> σε σχέση με το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου**

Έπειτα από τον διαχωρισμό των ασθενών σε αρνητικούς και θετικούς, συνολικά 113 ασθενείς, μόνο οι 98 συνέχισαν στην ανάλυση. Η μονομεταβλητή ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox φανερώνει τη βέλτιστη συσχέτιση μεταξύ ειδικότητας και ευαισθησίας και συσχετίζει τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους με την επιβίωση των ασθενών.

Μέσω τις μονομεταβλητής ανάλυσης δεν φαίνεται το μόριο 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> να αποτελεί προγνωστικός δείκτης καθώς δεν έχει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σχετικά με την επιβίωση ελεύθερης νόσου (DFS), συγκρίνοντας δείγματα καρκινικών και παρακαίμενων φυσιολογικών ιστών ( $p=0,142$ ). Επίσης φαίνεται ότι οι ασθενείς οι οποίοι έχουν όγκο στο ορθό έχουν διπλάσια πιθανότητα υποτροπής σε σχέση με τους ασθενείς που έχουν καρκινικό όγκο στο παχύ έντερο (σχετικός κίνδυνος= 1,98, 95%CI=1.13-3.85,  $p=0,018$ ) (Πίνακας 3.4).

Σχετικά με την ολική επιβίωση (OS), οι θετικοί ασθενείς είχαν μικρότερο διάστημα ολικής επιβίωσης συγκριτικά με τους αρνητικούς ασθενείς (σχετικός κίνδυνος=1,74, 95%CI = 1,09-3,00,  $p= 0,032$ ). Επιπρόσθετα, οι ασθενείς στους οποίους ο καρκινικός όγκος εντοπίζεται στο ορθό έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου σε σχέση με αυτούς στους οποίους εντοπίζεται στο παχύ έντερο (σχετικός κίνδυνος=1,78, 95%CI = 1,06-3,03,  $p= 0,032$ ) (Πίνακας 3.5).

Πίνακας 3.4 Έκφραση 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> και DFS σε δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου.

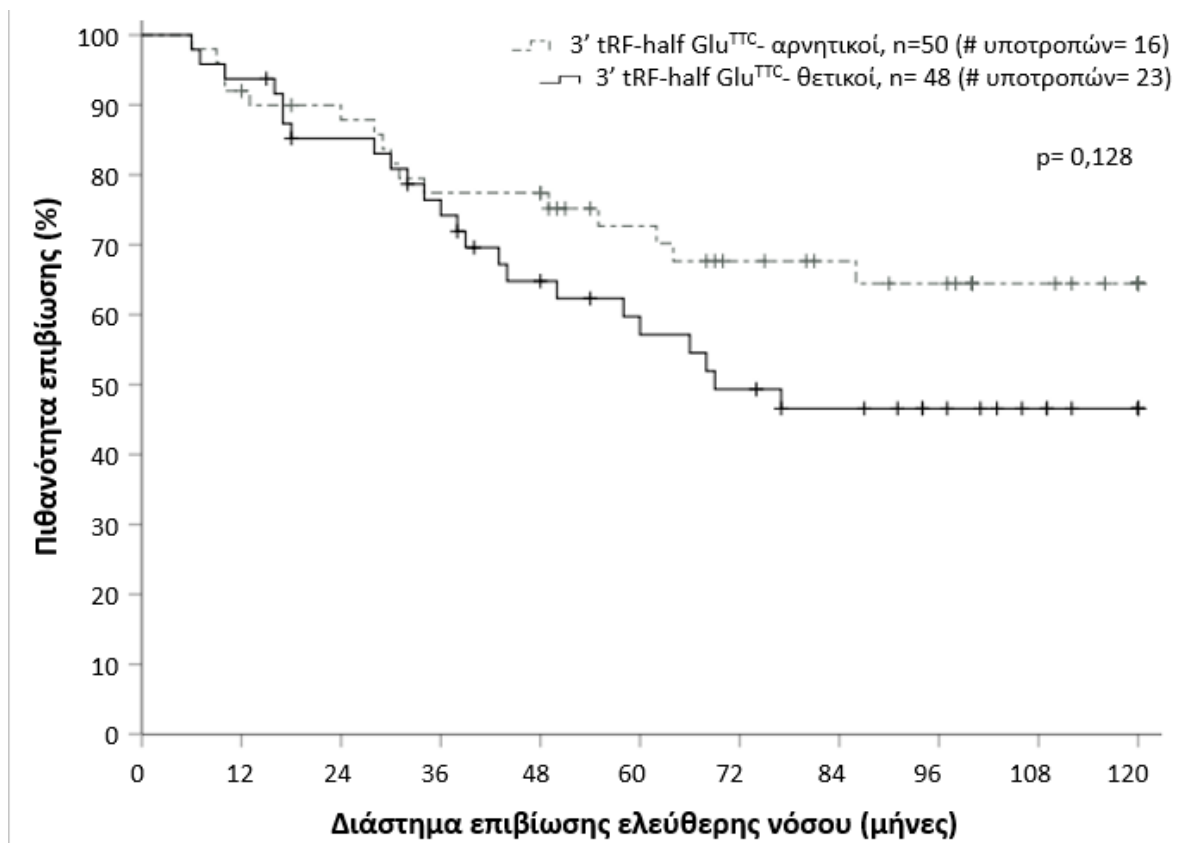
Μεταβλητή	DFS-Μονομεταβλητή ανάλυση (n=98)				
	HR	95% CI	P value	95% Bootstrap BCa CI	Bootstrap P value
<b>3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> κατάσταση έκφρασης</b>					
Αρνητικοί (n=50)	1.00				
Θετικοί (n=48)	1.63	0.86 – 3.09	0.133	0.84 – 3.90	0.142
<b>Εντοπισμός όγκου</b>					
Κόλον (n=66)	1.00				
Ορθό (n=32)	1.98	1.12 – 3.51	0.019	1.13 – 3.85	0.018
<b>Βαθμός διαφοροποίησης</b>			0.40		
I (n=11)	1.00				
II (n=74)	1.18	0.42 – 3.33	0.75	0.50 – 5.25	0.73
III (n=13)	1.85	0.58 – 5.90	0.30	0.59 – 9.84	0.27
<b>TNM Σταδιοποίηση</b>			0.004		
I (n=14)	1.00				
II (n=51)	5.59	0.75 – 41.71	0.093	1.11 – 26,970	0.076
III (n=33)	11.97	1.63 – 88.14	0.015	2.22 – 82,872	0.031

Πίνακας 3.5 Έκφραση 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> και OS σε δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου.

Μεταβλητή	OS-Μονομεταβλητή ανάλυση (n=113)				
	HR	95% CI	<i>P</i> value	95% Bootstrap BCa CI	Bootstrap <i>P</i> value
<b>3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> κατάσταση έκφρασης</b>					
Αρνητικοί (n=55)	1.00				
Θετικοί (n=58)	1.74	1.03 – 2.90	0.038	1.09 – 3.00	0.032
<b>Εντοπισμός όγκου</b>					
Κόλον (n=74)	1.00				
Ορθό (n=39)	1.78	1.06 – 2.96	0.028	1.06 – 3.03	0.032
<b>Βαθμός διαφοροποίησης</b>			0.024		
I (n=12)	1.00				
II (n=83)	0.91	0.35 – 1.75	0.56	0.23 – 3.67	0.54
III (n=18)	1.54	0.75 – 4.76	0.18	0.40 – 12.1	0.20
<b>TNM Σταδιοποίηση</b>			<0.001		
I (n=14)	1.00				
II (n=51)	1.47	0.50 – 4.30	0.48	0.41 – 21,163	0.52
III (n=33)	3.60	1.23 – 10.50	0.019	0.97 – 44,356	0.038
IV (n=15)	30.58	9.10 – 102.69	<0.001	6.69 – 729,416	0.001

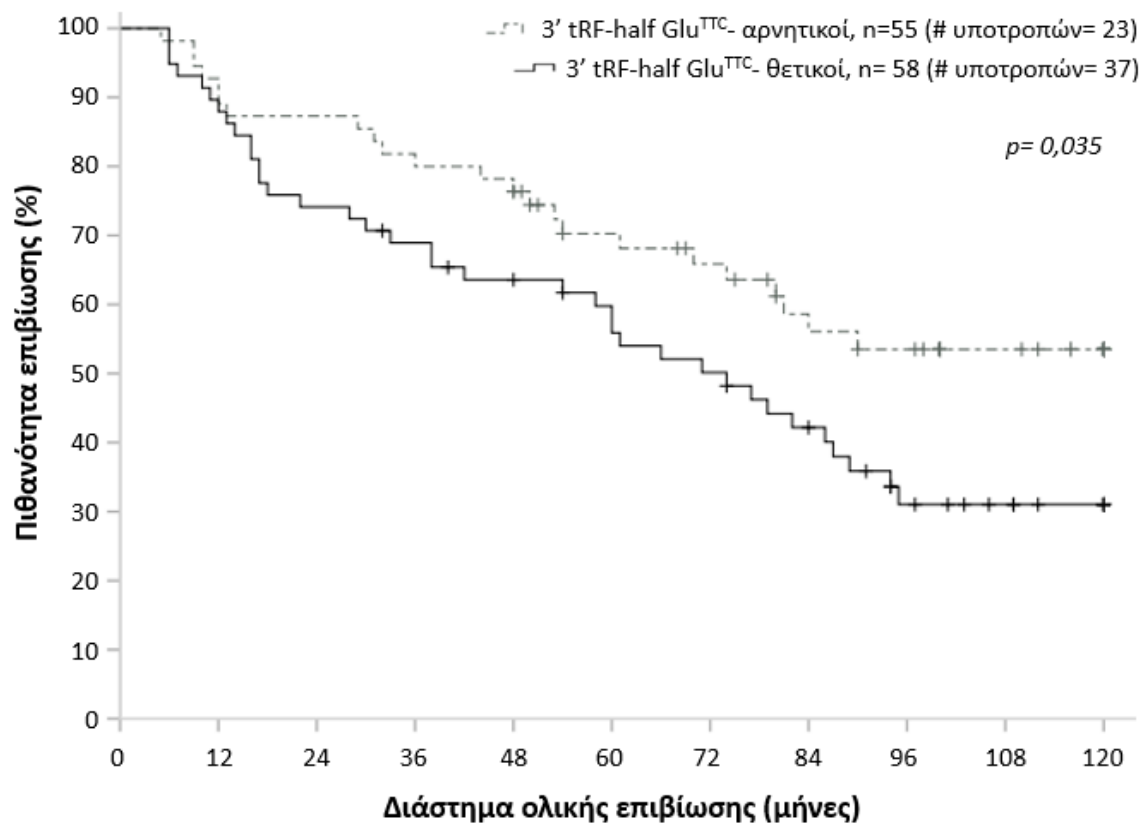
Στην ανάλυση Kaplan-Meier έγινε έλεγχος της προγνωστικής αξίας του υπό μελέτη μορίου σε σχέση με την ελεύθερη νόσου επιβίωση και την ολική επιβίωση. Από τα αποτελέσματα αυτή της ανάλυσης δεν φαίνεται κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στο διάστημα ελεύθερης νόσου μεταξύ των ασθενών οι οποίοι είναι θετικοί και σε αυτούς που είναι αρνητικοί για την έκφραση του μορίου 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> (p-value= 0,128) (Εικόνα 3.18).

Σχετικά με το διάστημα ολικής επιβίωσης παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική διαφορά στις δύο κατηγορίες ασθενών ( $p= 0,035$ ), καθώς καταγράφεται μεγαλύτερο διάστημα ολικής επιβίωσης για τους θετικούς ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου (Εικόνα 3.19). Συμπερασματικά, η υψηλή έκφραση του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> συνδέεται με την μείωση της ολικής επιβίωσης των ασθενών.



Εικόνα 3.18 Καμπύλη Kaplan-Meier σχετικά με την ελεύθερη νόσου επιβίωση ασθενών ως προς την έκφραση του 3' tRF-Glu<sup>TTC</sup> στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

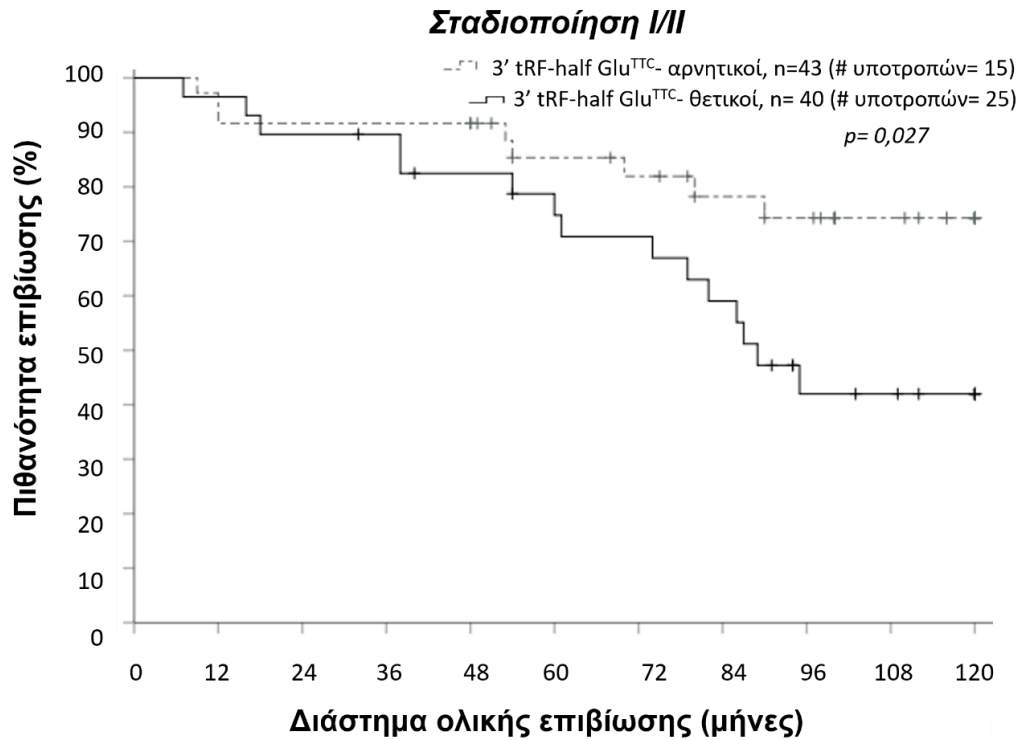




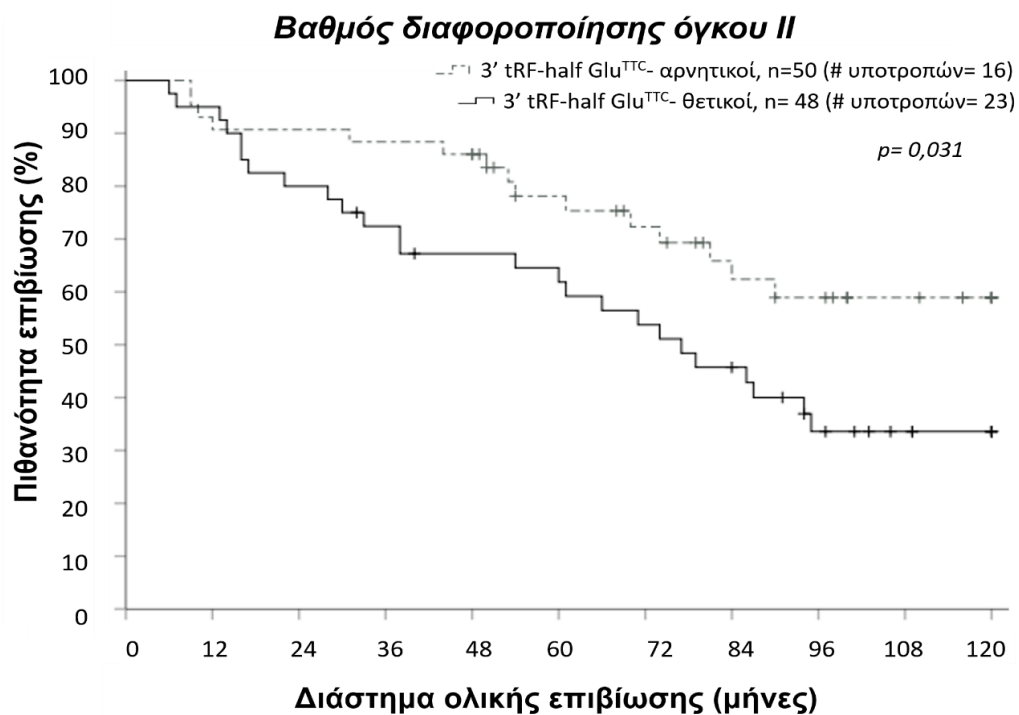
Εικόνα 3.19 Καμπύλη Kaplan-Meier σχετικά με την ολική επιβίωση ασθενών ως προς την έκφραση του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

### 3.11 Προγνωστική αξία του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο, σε σχέση με τη σταδιοποίηση και με τον βαθμό διαφοροποίησης της νόσου

Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan Meier σε σχέση με την σταδιοποίηση της νόσου έδειξε ότι στα στάδια I/II υπάρχει σημαντική διαφορά στην ολική επιβίωση των θετικών ασθενών σε σχέση με τους αρνητικούς ( $p= 0,027$ ) με τους πρώτους να έχουν μικρότερο διάστημα (Εικόνα 3.20). Επίσης για τον βαθμό διαφοροποίησης II (grade II) του ορθοκολικού όγκου στους θετικούς ασθενείς για την έκφραση του μορίου υπό μελέτη, βρέθηκε ότι έχουν μικρότερο διάστημα ολικής επιβίωσης ( $p= 0,031$ ) (Εικόνα 3.21).



Εικόνα 3.20 Καμπύλη Kaplan-Meier σχετικά με το διάστημα ολικής επιβίωσης για την έκφραση του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου σε σχέση με το στάδιο I/II της νόσου.



Εικόνα 3.21 Καμπύλη Kaplan-Meier σχετικά με το διάστημα ολικής επιβίωσης για την έκφραση του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου σε σχέση με το βαθμό διαφοροποίησης II της νόσου

## 4 Συζήτηση

Η αρχή της αλληλούχησης του γονιδιώματος ενός οργανισμού τοποθετείται χρονικά το 1995 με την ανάλυση δύο γονιδιωμάτων προερχόμενων από τα βακτηριακά είδη *Haemophilus influenzae* και *Mycoplasma genitalium*, επιταχύνοντας την εξέλιξη της γονιδιωματικής και των μεθόδων αλληλούχησης [265, 266]. Στη συνέχεια ακολούθησε η αλληλούχηση του γονιδιώματος πιο περίπλοκων οργανισμών συμπεριλαμβανομένου και του ευκαρυωτικού οργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* [267, 268].

Αρχικά, το μεγάλο κόστος της αλληλούχησης εμπόδιζε την ευρεία εφαρμογή της από αρκετά εργαστήρια. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να διερευνηθούν τρόποι και να αναπτυχθούν τεχνολογίες που θα διευκόλυναν την πρόσβαση των εργαστηρίων σε εφαρμογές της αλληλούχησης, οδηγώντας στην ανάπτυξη της αλληλούχησης επόμενης γενιάς. Μέχρι το 2004 που εμφανίσθηκε το NGS, είχε αλληλουχηθεί το γονιδίωμα 192 βακτηριακών οργανισμών, ενώ από το 2005 χαρτογραφήθηκαν και έχουν καταχωρηθεί δημόσια άλλα 1566. Η νέα μέθοδος προσέφερε με μικρότερο κόστος μία ικανοποιητική ποιότητα ανάλυσης του γονιδιώματος των οργανισμών στόχων [269]. Πλέον είναι καταχωρημένο ένα πλήθος αλληλουχημένων γονιδιωμάτων-αναφοράς διαφόρων οργανισμών σε δημόσιες, διαδικτυακές βάσεις δεδομένων [270, 271].

Η συνεισφορά του NGS στην ιατρική πράξη είναι πολυδιάστατη από την αλληλούχηση π.χ. των γενετικών μεταλλάξεων στο *M.tuberculosis*, ένα βακτήριο το οποίο προκαλεί την φυματίωση και παρουσιάζει έντονη μεταλλαξιμότητα, δυσκολεύοντας την αποτελεσματική θεραπεία του μέχρι την χαρτογράφηση κρίσιμων μεταλλαγών σε ανθρώπινες κακοήθειες και τη συσχέτισή τους με καινοτόμες θεραπείες [272].

Μία από τις πιο σημαντικές εφαρμογές του NGS είναι αυτή της αλληλούχησης RNA (RNA-seq), όπου γίνεται εφικτή η αλληλούχηση του συνόλου ή μέρους του μεταγραφώματος αφού πρώτα προηγηθεί η μετατροπή του σε cDNA. Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να παρέχει μια ποσοτική εκτίμηση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της καταγραφής των επιπέδων των μετάγραφων [273]. Εφαρμόζεται συχνά στην ανάλυση της έκφρασης, τόσο ολόκληρου το μεταγραφώματος, αλλά και πιο συγκεκριμένα, περιοχών που σχετίζονται με βιολογικούς μηχανισμούς, σε κύτταρα και ιστούς, που σχετίζονται με παθολογικές

καταστάσεις. Με την επιλογή της στρατηγικής RNA-seq είναι εφικτή η ανίχνευση μικρών μορίων τα οποία είναι δυνητικοί μοριακοί βιοδείκτες σοβαρών νοσημάτων όπως ο καρκίνος.

Τα βήματα για την προετοιμασία του δείγματος είναι η θραυσματοποίηση του mRNA, ο εμπλουτισμός, η σύνθεση του cDNA και η επιλογή των θραυσμάτων σύμφωνα με το μέγεθός τους. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του RNA-seq αποτελεί μια πολυσταδιακή διαδικασία που απαιτεί εξειδικευμένες γνώσεις για να πραγματοποιηθεί σωστά, καθώς σε περίπτωση λάθους στην επεξεργασία των αναγνώσεων (reads) μπορεί να επηρεαστεί η ταυτοποίηση, ποσοτικοποίηση των μετάγραφων και αναγνώριση των γονιδίων [274].

Η εύρεση μοριακών βιοδεικτών κρίνεται απαραίτητη καθώς για τις περισσότερες μορφές καρκίνου καθώς είναι ιδιαίτερα δύσκολη η έγκαιρη διάγνωση, η μεταθεραπευτική παρακολούθηση και η επιλογή θεραπείας. Το NGS δίνει αυτήν την δυνατότητα μέσω της υψηλής ευαισθησίας, της υψηλής ταχύτητας και της δυνατότητας ταυτόχρονης ανάλυσης δειγμάτων, παρέχοντας τα απαραίτητα δεδομένα για τη διενέργεια συγκριτικών μελετών και την εύρεση των πλέον υποσχόμενων μοριακών βιοδεικτών.

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι μία μορφή καρκίνου με υψηλά επίπεδα θνησιμότητας, τα οποία αναμένεται να αυξηθούν τα επόμενα 15 χρόνια [275]. Οι παράγοντες κινδύνου σχετίζονται με τον τρόπο ζωής και πιο συγκεκριμένα με τις διατροφικές συνήθειες, την σωματική άσκηση, το κάπνισμα και την παχυσαρκία. Επίσης εμφανίζει σποραδικότητα αλλά και κληρονομική τάση. Έχουν βρεθεί νέες θεραπευτικές πρακτικές για την αντιμετώπιση της πρώιμης μορφής αλλά και τον μεταστατικό καρκίνο, οι οποίες περιλαμβάνουν τη λαπαροσκοπική χειρουργική επέμβαση για το πρώιμο στάδιο καρκίνου, τη χημειοθεραπεία ή/και ραδιοθεραπεία για τον καρκίνο του ορθού και μορφές του μεταστατικού καρκίνου [276]. Παρόλα αυτά η εξέλιξη στην θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου δεν αντικατοπτρίζεται σε σημαντική αύξηση του προσδόκιμου ζωής των ασθενών.

Η γενετική πληροφορία του DNA μεταγράφεται σε RNA και μεταφράζεται σε πρωτεΐνες, σύμφωνα με το κεντρικό δόγμα της βιολογίας. Το RNA αφού μεταγραφεί στον πυρήνα του κυττάρου, οδηγείται στο κυτταρόπλασμα όπου πραγματοποιείται η μετάφραση. Το mRNA είναι ο οδηγός της μετάφρασης, καθώς αυτό θα καθορίσει την αλληλουχία των αμινοξέων του πρωτεϊνικού προϊόντος, για αυτό και ονομάζεται

κωδικό RNA. Εκτός από το κωδικό RNA, βρέθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του RNA του κυττάρου δεν μεταφράζεται σε πρωτεΐνες αλλά μπορεί να διαθέτει ρυθμιστικό ρόλο σε βασικά βιολογικά μονοπάτια τα οποία εμπλέκονται σε παθολογικές καταστάσεις. Τα μόρια αυτά χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με το μήκος τους, σε μεγάλα μη-κωδικά (long non-coding) RNA μόρια (lncRNAs) με μήκος μεγαλύτερο των 200 νουκλεοτιδίων και μικρά μη-κωδικά (small non-coding) RNA μόρια (snRNAs) για μικρότερα των 200 νουκλεοτιδίων. Η τελευταία κατηγορία περιλαμβάνει τα miRNA, siRNA, piRNA, snoRNA, snRNA και tRFs [277].

Το lin-4 είναι το πρώτο μικρό μη-κωδικό ρυθμιστικό RNA (miRNA) που βρέθηκε το 1993, στον οργανισμό μοντέλο *Caenorhabditis elegans* και εμπλέκεται στη ρύθμιση καθοριστικών βιολογικών μονοπατιών [278]. Μία επιπρόσθετη κατηγορία μικρών μη-κωδικών RNA, τα siRNAs, τα οποία προέρχονται από εξωτερικούς παράγοντες όπως ιούς και πλέον είναι γνωστή και η ενδογενής παραγωγή τους σε φυτά και ζώα. Τα piRNAs αποτελούν μια επιπλέον ομάδα μικρών μη-κωδικών RNA είναι υπεύθυνα για την ακεραιότητα των γαμετών και την γονιμότητα παράλληλα τα piRNAs συμμετέχουν στην διαμόρφωση της ετεροχρωματίνης και την αποσιώπηση των μεταθετών στοιχείων (transposons) αλλά και σε άλλες, μη προσδιορισμένες ακόμη λειτουργίες [279].

Στο εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών έχει μελετηθεί η κλινική αξία ως προγνωστικοί μοριακοί βιοδείκτες πολλών miRNA σε καρκινικά δείγματα ιστού παχέος εντέρου καθώς και σε παρακείμενα μη-καρκινικά δείγματα εντερικού βλεννογόνου. Για παράδειγμα η ανάλυση έκφρασης του miR-224 στα καρκινικά δείγματα παχέος εντέρου είναι υψηλότερη σε σχέση με τα παρακείμενα, μη-καρκινικά. Επίσης, οι ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου εμφανίζουν συντομότερα υποτροπή της νόσου και παρουσιάζουν μειωμένη ολική επιβίωση, γεγονός που καθιστά το μόριο ως ένα πιθανό δυσμενή προγνωστικός δείκτη για την νόσο [280]. Ο ίδιος έλεγχος έγινε για το μικρό μη κωδικό miR-16 και το miR-28-5p για τα οποία βρέθηκε ότι μπορούν να αποτελέσουν ανεξάρτητους προγνωστικούς δείκτες για τον καρκίνο του παχέος εντέρου [281, 282]. Ομοίως μελετήθηκαν και τα μόρια miR-15a-5p [283], miR-24-3p [284], miR-96 [285], miR-34a [286] και miR-182 [287] και παρατηρήθηκε η αυξημένη έκφρασή τους στους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου αλλά και η

προγνωστική στη συγκεκριμένη κακοήθεια.

Ανάμεσα σε πολλές άλλες κατηγορίες μικρών ρυθμιστικών μορίων RNA παρουσιάστηκαν τα tRFs, θραύσματα του tRNA τα οποία συνήθως χωρίζονται σε μικρά tRFs (small tRFs), 20 νουκλεοτίδια περίπου σε μήκος και μεγαλύτερα, τα tRNA halves τα οποία είναι 35 περίπου νουκλεοτίδια και διαθέτουν έναν ρόλο ζωτικής σημασίας για τα κύτταρα.

Τα tRFs συμμετέχουν στη ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών σε μοριακό επίπεδο, ελέγχοντας την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στα παραπάνω μονοπάτια. Πιο συγκεκριμένα, δημιουργούν σύμπλοκα με τις Ago πρωτεΐνες και πρωτεΐνες της οικογένειας riwi, μιμούμενα την δράση των miRNAs και των siRNAs [120, 126]. Μπορούν να δράσουν είτε ως ογκοκατασταλτικά μόρια, ανταγωνιζόμενα τα ογκογενετικά μετάγραφα, αποσταθεροποιώντας τα ή αναστέλλοντας την μετάφρασή τους [129]. Επίσης βρέθηκε ότι παίζουν ρόλο στην ρύθμιση της βιογένεσης των ριβοσωμάτων, της αποτελεσματικότητας της μετάφρασης, του κυτταρικού κύκλου, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης [107, 117].

Τα tRFs χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες και τα halves σε δύο, σύμφωνα με την τοπολογία του tRNA (ώριμου ή πρώιμου) από την οποία προέρχονται. Για την παραγωγή tRNA-halves με μήκος περίπου 35 νουκλεοτίδια είναι υπεύθυνη η αγγειογενίνη, ενώ για τα μικρότερου μήκους tRFs η ενδονουκλεάση Dicer ή η RNase Z [288, 289]. Η δράση των tRFs συνοψίζεται σε αλληλεπίδραση με της Ago πρωτεΐνες και αποσιώπηση γονιδίων και άμυνα κατά ιών (HIV-PBS tRF) και άλλες ακόμη δράσεις [290]. Το HIV-PBS tRF, το οποίο είναι ένα tRF-5, συνδέεται με την Ago 2 και προκαλείται την RNA διατομή συμπληρωματικών αλληλουχιών [290]. Μόρια tRF, που ανήκουν στην κατηγορία των tRF-3, συνδέονται με τις Ago 3 και 4 και οδηγούν στην αναστολή της διαδικασίας της μετάφρασης [289]. Επίσης η ίδια κατηγορία tRF προκαλεί την αποσιώπηση γονιδίων τόσο σε επίπεδο RNA, όσο και σε πρωτεΐνης [291]. Η κατηγορία των tRF-1 συνδέονται στις Ago 3 και 4 έτσι ώστε να ενσωματωθούν στο σύμπλοκο RISC [289, 292].

Κάθε μόριο tRNA προέρχεται από την ωρίμανση του πρόδρομου tRNA (pre-tRNA) από την RNA πολυμεράση III, η οποία απομακρύνει τις περιοχές 5' και 3' από τα δύο άκρα του μορίου. Έπειτα προστίθεται η ακολουθία CCA στο 3' άκρο, η οποία είναι χαρακτηριστικό στοιχείο των tRF-3, ενώ η ομάδα των tRF-1 είναι μέρος

του πρόδρομου tRNA [293].

Διάφορα tRF έχουν βρεθεί να αποτελούν μοριακούς βιοδείκτες για τα ανθρώπινα νεοπλάσματα. Το tRF-Leu<sup>CAG</sup> είναι ένα μόριο το οποίο είναι υπερεκφρασμένο σε ιστολογικά δείγματα ασθενών καθώς και ορού με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Βρέθηκε επίσης ότι τα μόρια tRNA-Leu και tRNA-Val είχαν και αυτά υψηλή έκφραση, 37% και 26%, αντίστοιχα. Μετά από εκτενέστερη έρευνα σε 30 καρκινικά δείγματα ήταν εμφανής η υπερέκφραση των μορίων tRNA-Leu<sup>CAG</sup> [116]. Το tiRNA-Leu<sup>CAG</sup> με μήκος 34 νουκλεοτίδια και το σημείο κοπής του είναι στον βρόγχο του αντικωδικονίου. Φαίνεται να συμμετέχει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων στην φάση G0/G1 [294]. Επίσης ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου της πρωτεΐνης AURKA και ενδέχεται να οδηγήσει σε αλλαγή της πορείας σηματοδοτικών μονοπατιών σε συνέργεια με άλλα μόρια [116, 295].

Στον καρκίνο του μαστού τα tRFs που προκύπτουν από τα tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup> και tRNA<sup>Gly</sup> ανταγωνιζόμενα τα ενδογενή μετάγραφα ογκογονιδίων συνδέονται με την πρωτεΐνη Y-box binding protein 1 (YBX1) και την απενεργοποιούν οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Η YBX1 φυσιολογικά επάγει σταθερότητα των μεταγράφων πρώτο-ογκογονιδίων και επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Τα μόρια tiRNAs προερχόμενα από tRNA που μεταφέρουν γλουταμινικό οξύ, όπως είναι και το μόριο μελέτης, 3' tiRNA-Glu<sup>TTC</sup>, έχουν βρεθεί ότι εκφράζονται σε τύπους καρκίνου. Ένα παράδειγμα είναι το tRF-5 Glu, το οποίο εκφράζεται σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού. Το συγκεκριμένο μόριο φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του mRNA του γονιδίου BRCA3, το οποίο εκφράζεται στον καρκίνο του μαστού και επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επίσης, βρέθηκε ότι το tRF-5 Glu έχει και άλλους στόχους, όπως ο υποδοχέας 2 της απολιποπρωτεΐνης E (APOER2) [125]. Τα μόρια tRF5-Glu<sup>CTC</sup> και tiRNA5-Glu<sup>TTC</sup> υπερεκφράζονται στον καρκίνο του παγκρέατος, ανάμεσα σε πολλά άλλα μόρια tRF [296].

Η έκφραση του μορίου 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> δεν έχει μελετηθεί για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, υπάρχει όμως σχετική μελέτη για τον καρκίνο του στομάχου [297]. Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η μελέτη των επιπέδων έκφρασης του συγκεκριμένου μορίου ως δυνητικό μοριακό βιοδείκτη στον ορθοκολικό καρκίνο και

η αξιολόγησή του ως εργαλείο αξιόπιστης πρόγνωσης.

Μέσω της βάσης δεδομένων SRA επιλέχθηκε μία σειρά πειραμάτων τεχνολογίας NGS σε πλατφόρμα Illumina, όπου μελετήθηκε η έκφραση μικρών, μη-κωδικών μορίων RNA, σε δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου. Μετά την βιοπληροφορική ανάλυση των πειραμάτων επιλέχθηκε το μόριο tRF ενδιαφέροντος. Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιλέχθηκε το 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup>, μετά από προσδιορισμό του προφίλ έκφρασής των tRF.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν 113 δείγματα καρκινικού ιστού και 55 παρακείμενα, φυσιολογικά δείγματα από ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν, και το ολικό RNA τους απομονώθηκε και συντέθηκε cDNA με την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής, αφού πρώτα έγινε ο έλεγχος ποιότητας αλλά και ποσότητας του RNA. Ο έλεγχος της έκφρασης του μελετώμενου μορίου 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> έγινε μέσω qPCR και η εκτίμηση της ποσότητας του επιθυμητού στόχου έγινε με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης ενώ τα αποτελέσματα αναλύθηκαν και συσχετίστηκαν με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών μέσω προηγμένων πακέτων βιοστατιστικής ανάλυσης.

Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η προγνωστική αξία του μορίου ενώ συσχετίστηκε η έκφρασή του με την επιβίωση και τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση επιβίωσης με καμπύλες Kaplan-Meier τόσο για την ελευθέρας νόσου επιβίωση (disease-free survival, DFS), όσο και για την ολική επιβίωση των ασθενών (overall survival, OS). Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι οι ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, οι οποίοι παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup>, έχουν υψηλότερη πιθανότητα να παρουσιάσουν καταληκτικό γεγονός σε σχέση με εκείνους που το υποεκφράζουν, σε σχέση με την τιμή του cut-off που έχει ορισθεί ( $p=0,035$ ).

Επίσης έγινε ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox για την επιβεβαίωση των παραπάνω παρατηρήσεων και τον έλεγχο της προγνωστικής αξίας του μελετώμενου μορίου tRF. Η μονομεταβλητή ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox για την ολική επιβίωση (OS) έδειξε ότι οι ασθενείς των οποίων ο όγκος υπερεκφράζει το 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> διαθέτουν αυξημένο κίνδυνο να παρουσιάσουν μικρότερη ολική επιβίωση ( $p=0,032$ , σχετικός κίνδυνος= 1,74, 95% διάστημα εμπιστοσύνης= 1,09-



3,00).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση επιβίωσης με καμπύλες Kaplan-Meier χρησιμοποιώντας υποομάδες του αρχικού πληθυσμού των ασθενών βάσει των σημαντικότερων κλινικοπαθολογικών παραγόντων,. Παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με ενδιάμεσο βαθμό διαφοροποίησης (grade II) της νόσου, οι οποίοι εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup>, έχουν μικρότερη ολική επιβίωση σε σχέση με τους αρνητικούς ασθενείς ( $p= 0,031$ ). Επίσης, οι ασθενείς αρχικού σταδίου, στους οποίους το μελετώμενο μόριο εκφράζεται σημαντικά, έχουν και εκείνοι μικρότερο διάστημα ολικής επιβίωσης από τους ασθενείς μειωμένης έκφρασης του ίδιου tRF ( $p= 0,027$ ).

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτει το συμπέρασμα ότι το μόριο 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> αποτελεί έναν δυσμενή προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Η εύρεση μοριακών βιοδεικτών θα βοηθήσει στην εφαρμογή εξατομικευμένων θεραπευτικών παρεμβάσεων, καθώς η πιθανότητα υποτροπής είναι ένας παράγοντας που θα καθορίσει και την αντιμετώπιση της νόσου. Το μόριο 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> ενδέχεται να αποτελεί έναν τέτοιο μοριακό, προγνωστικό βιοδείκτη για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Ιδιαίτερα οι ασθενείς ενδιάμεσης διαφοροποίησης όγκου, που αποτελούν μια κλινική πρόκληση, αναμένεται να ευνοηθούν ιδιαίτερα από τον εντοπισμό τέτοιων βιοδεικτών. Όπως είναι γνωστό ο καθορισμός του βαθμού διαφοροποίησης του όγκου γίνεται βάσει της μικροσκοπικής παρατήρησης από τον ιστοπαθολόγο. Η εισαγωγή αντικειμενικών κριτηρίων που μπορούν να διαχωρίσουν επιπλέον βάσει εκτίμησης κινδύνου τους ασθενείς είναι αναγκαία πληροφορία για τον κλινικό γιατρό, ώστε να παρέχει κάθε φορά τη καταλληλότερη θεραπευτική αντιμετώπιση.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μία πρώτη διερεύνηση του ρόλου του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Η περαιτέρω έρευνα του μορίου καθώς και η διεξαγωγή επαναληπτικών πειραμάτων της ίδιας διαδικασίας που ακολουθήθηκε στην παρούσα έρευνα είναι απαραίτητες για την επαλήθευση και εξακρίβωση της προγνωστικής αξίας του 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> σε αυτόν τον τύπο καρκίνου.

## Βιβλιογραφία

1. J.Hsiao, S., *Sources of error in molecular diagnostic analyses*, in *Accurate Results in the Clinical Laboratory: A Guide to Error Detection and Correction*, J.L.S. Amitava Dasgupta, Editor. 2019. p. 337-347.
2. Jonathan, P., *Bioinformatics and Functional Genomics*. 2009: Wiley-Blackwell.
3. Slatko, B.E., A.F. Gardner, and F.M. Ausubel, *Overview of Next-Generation Sequencing Technologies*. *Curr Protoc Mol Biol*, 2018. **122**(1): p. e59.
4. Ronaghi, M., et al., *Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release*. *Anal Biochem*, 1996. **242**(1): p. 84-9.
5. Rothberg, J.M., et al., *An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing*. *Nature*, 2011. **475**(7356): p. 348-52.
6. Fengqi Chang, G.L.L., Cindy J.Liu, Marilyn M.Li, *Clinical Genomics. Somatic Diseases (Cancer): Amplification-Based Next-Generation Sequencing*. 2015.
7. Furey, T.S., *ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions*. *Nat Rev Genet*, 2012. **13**(12): p. 840-52.
8. Fang, G., et al., *Genome-wide mapping of methylated adenine residues in pathogenic Escherichia coli using single-molecule real-time sequencing*. *Nat Biotechnol*, 2012. **30**(12): p. 1232-9.
9. Flusberg, B.A., et al., *Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing*. *Nat Methods*, 2010. **7**(6): p. 461-5.
10. Murray, I.A., et al., *The methylomes of six bacteria*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(22): p. 11450-62.
11. Rhoads, A. and K.F. Au, *PacBio Sequencing and Its Applications*. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2015. **13**(5): p. 278-89.
12. Vilfan, I.D., et al., *Analysis of RNA base modification and structural rearrangement by single-molecule real-time detection of reverse transcription*. *J Nanobiotechnology*, 2013. **11**: p. 8.
13. Zhang, W., et al., *Short communication: Single molecule, real-time sequencing technology revealed species- and strain-specific methylation patterns of 2 Lactobacillus strains*. *J Dairy Sci*, 2015. **98**(5): p. 3020-4.
14. Benner, S., et al., *Sequence-specific detection of individual DNA polymerase complexes in real time using a nanopore*. *Nat Nanotechnol*, 2007. **2**(11): p. 718-24.
15. Branton, D., et al., *The potential and challenges of nanopore sequencing*. *Nat Biotechnol*, 2008. **26**(10): p. 1146-53.
16. Cherf, G.M., et al., *Automated forward and reverse ratcheting of DNA in a nanopore at 5-A precision*. *Nat Biotechnol*, 2012. **30**(4): p. 344-8.
17. Hornblower, B., et al., *Single-molecule analysis of DNA-protein complexes using nanopores*. *Nat Methods*, 2007. **4**(4): p. 315-7.
18. Kasianowicz, J.J., et al., *Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(24): p. 13770-3.
19. Zewen Liu , Y.W., Tao Deng, and Qi Chen, *Solid-State Nanopore-Based DNA Sequencing Technology*. *Journal of Nanomaterials*, 2016.
20. Greninger, A.L., et al., *Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis*. *Genome Med*, 2015. **7**: p. 99.

21. Loman, N. *How a small backpack for fast genomic sequencing is helping combat Ebola*. 2015; Available from: <https://theconversation.com/how-a-small-backpack-for-fast-genomic-sequencing-is-helping-combat-ebola-41863>.
22. Cao, M.D., et al., *Streaming algorithms for identification of pathogens and antibiotic resistance potential from real-time MinION(TM) sequencing*. Gigascience, 2016. **5**(1): p. 32.
23. Ammar, R., et al., *Long read nanopore sequencing for detection of HLA and CYP2D6 variants and haplotypes*. F1000Res, 2015. **4**: p. 17.
24. Maximilian Schmidt, A.V., Alexandra Wormit, Alisandra Denton, Anthony Bolger, Marie E. Bolger, Saleh Alseekh, Janina Maß, Christian Pfaff, Ulrich Schurr, Alisdair R. Fernie, Dani Zamir, Björn Usadel, *Sequencing the gigabase plant genome of the wild tomato species Solanum pennellii using Oxford Nanopore single molecule sequencing*. Plant Cell, 2016: p. 2336–2348.
25. Tu, J., et al., *Pair-barcode high-throughput sequencing for large-scale multiplexed sample analysis*. BMC Genomics, 2012. **13**: p. 43.
26. Roychowdhury, S., et al., *Personalized oncology through integrative high-throughput sequencing: a pilot study*. Sci Transl Med, 2011. **3**(111): p. 111ra121.
27. Richards, S., et al., *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. Genet Med, 2015. **17**(5): p. 405-24.
28. Duzkale, H., et al., *A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants*. Clin Genet, 2013. **84**(5): p. 453-63.
29. Amendola, L.M., et al., *Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium*. Am J Hum Genet, 2016. **98**(6): p. 1067-1076.
30. Lek, M., et al., *Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans*. Nature, 2016. **536**(7616): p. 285-91.
31. Matthijs, G., et al., *Guidelines for diagnostic next-generation sequencing*. Eur J Hum Genet, 2016. **24**(10): p. 1515.
32. Blackburn, H.L., et al., *Management of Incidental Findings in the Era of Next-generation Sequencing*. Curr Genomics, 2015. **16**(3): p. 159-74.
33. Bejar, R., *Implications of molecular genetic diversity in myelodysplastic syndromes*. Curr Opin Hematol, 2017. **24**(2): p. 73-78.
34. Pagon, R.A., *GeneTests: an online genetic information resource for health care providers*. J Med Libr Assoc, 2006. **94**(3): p. 343-8.
35. Platt, J., R. Cox, and G.M. Enns, *Points to consider in the clinical use of NGS panels for mitochondrial disease: an analysis of gene inclusion and consent forms*. J Genet Couns, 2014. **23**(4): p. 594-603.
36. Audo, I., et al., *Development and application of a next-generation-sequencing (NGS) approach to detect known and novel gene defects underlying retinal diseases*. Orphanet J Rare Dis, 2012. **7**: p. 8.
37. Nijman, I.J., et al., *Targeted next-generation sequencing: a novel diagnostic tool for primary immunodeficiencies*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(2): p. 529-34.

38. Giti Esmail Nia, M.F., Robert Royer, Kooroush Dehghan, Hossein Najmabadi, Mohammad R. Akbari, *Profiling Fanconi anemia gene mutations among Iranian patients*. 2016.
39. Artuso, R., et al., *Advances in Alport syndrome diagnosis using next-generation sequencing*. Eur J Hum Genet, 2012. **20**(1): p. 50-7.
40. Weerakkody, R.A., et al., *Targeted next-generation sequencing makes new molecular diagnoses and expands genotype-phenotype relationship in Ehlers-Danlos syndrome*. Genet Med, 2016. **18**(11): p. 1119-1127.
41. Yo-Tsen Liu, Y.-C.L., Bing-Wen Soong, *What We Have Learned From the Next-Generation Sequencing: Contributions to the Genetic Diagnoses and Understanding of Pathomechanisms of Neurodegenerative Diseases*. Journal of Neurogenetics, 2015. **29**(2-3): p. 103-112.
42. Voelkerding, K.V., S. Dames, and J.D. Durtschi, *Next generation sequencing for clinical diagnostics-principles and application to targeted resequencing for hypertrophic cardiomyopathy: a paper from the 2009 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology*. J Mol Diagn, 2010. **12**(5): p. 539-51.
43. Sarah De Keulenaer, J.H., Steve Lefever, Jean-Pierre Renard, Joachim De Schrijver, Hendrik Van de Voorde and M.A.T., Filip Van Nieuwerburgh, Daisy Flamez, Filip Pattyn, Bieke Scharlaken, Dieter Deforce, Sofie Bekaert, Wim Van Criekinge, Jo Vandesompele, Guy Van Camp and Paul Coucke, *Molecular diagnostics for congenital hearing loss including 15 deafness genes using a next generation sequencing platform*. BMC Medical Genomics 2012.
44. Sawyer, S.L., et al., *Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: time to address gaps in care*. Clin Genet, 2016. **89**(3): p. 275-84.
45. Yang, Y., et al., *Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders*. N Engl J Med, 2013. **369**(16): p. 1502-11.
46. McCullough, R.M., et al., *Non-invasive prenatal chromosomal aneuploidy testing--clinical experience: 100,000 clinical samples*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e109173.
47. Lefkowitz, R.B., et al., *Clinical validation of a noninvasive prenatal test for genomewide detection of fetal copy number variants*. Am J Obstet Gynecol, 2016. **215**(2): p. 227 e1-227 e16.
48. Stutz, W.E. and D.I. Bolnick, *Stepwise threshold clustering: a new method for genotyping MHC loci using next-generation sequencing technology*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e100587.
49. Weimer, E.T., et al., *Performance Characteristics and Validation of Next-Generation Sequencing for Human Leucocyte Antigen Typing*. J Mol Diagn, 2016. **18**(5): p. 668-675.
50. Thompson, J.C., et al., *Detection of Therapeutically Targetable Driver and Resistance Mutations in Lung Cancer Patients by Next-Generation Sequencing of Cell-Free Circulating Tumor DNA*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(23): p. 5772-5782.
51. Richard B. Lanman, S.A.M., Oliver A. Zill, Dragan Sebisano, Rene Lopez, Sibel Blau, Eric A. Collisson, Stephen G. Divers, Dave S.B. Hoon, E. Scott Kopetz, Jeeyun Lee, Petros G. Nikolinakos, Arthur M. Baca, Bahram G. Kermani, Helmy Eltoukhy, Amir Ali Talasaz, *Analytical and Clinical*

- Validation of a Digital Sequencing Panel for Quantitative, Highly Accurate Evaluation of Cell-Free Circulating Tumor DNA.* Plos One, 2015.
52. Li, Z., et al., *Insufficiency of peripheral blood as a substitute tissue for detecting EGFR mutations in lung cancer: a meta-analysis.* Target Oncol, 2014. **9**(4): p. 381-8.
  53. Leary, R.J., et al., *Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing.* Sci Transl Med, 2012. **4**(162): p. 162ra154.
  54. Fernandez-Cuesta, L., et al., *Identification of Circulating Tumor DNA for the Early Detection of Small-cell Lung Cancer.* EBioMedicine, 2016. **10**: p. 117-23.
  55. Chan, K.C., et al., *Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing.* Clin Chem, 2013. **59**(1): p. 211-24.
  56. Tropp, B.E., *Βασικές Αρχές Μοριακής Βιολογίας.* Vol. 16. 2014: Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε. 951.
  57. Betat, H., C. Rammelt, and M. Morl, *tRNA nucleotidyltransferases: ancient catalysts with an unusual mechanism of polymerization.* Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(9): p. 1447-63.
  58. Jessica L. Spears, M.A.T.R., Paul J. Sample, Juan D. Alfonzo, *tRNA Biogenesis and Processing*, in *RNA Metabolism in Trypanosomes.* 2012, Springer: Berlin, Heidelberg. p. 99-121.
  59. [https://biorender.com/.](https://biorender.com/)
  60. Sprinzl, M. and F. Cramer, *The -C-C-A end of tRNA and its role in protein biosynthesis.* Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1979. **22**: p. 1-69.
  61. Kim, S.H., et al., *Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA.* Science, 1974. **185**(4149): p. 435-40.
  62. Wolstenholme, D.R., et al., *Bizarre tRNAs inferred from DNA sequences of mitochondrial genomes of nematode worms.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(5): p. 1324-8.
  63. Lorenz, C., C.E. Lunse, and M. Morl, *tRNA Modifications: Impact on Structure and Thermal Adaptation.* Biomolecules, 2017. **7**(2).
  64. Lu, T.X. and M.E. Rothenberg, *MicroRNA.* J Allergy Clin Immunol, 2018. **141**(4): p. 1202-1207.
  65. Gulyaeva, L.F. and N.E. Kushlinskiy, *Regulatory mechanisms of microRNA expression.* J Transl Med, 2016. **14**(1): p. 143.
  66. Zeng, Y. and B.R. Cullen, *Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences.* J Biol Chem, 2005. **280**(30): p. 27595-603.
  67. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex.* Nature, 2004. **432**(7014): p. 231-5.
  68. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs.* Nature, 2004. **432**(7014): p. 235-40.
  69. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing.* Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
  70. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing.* Genes Dev, 2004. **18**(24): p. 3016-27.
  71. Starega-Roslan, J., et al., *The role of the precursor structure in the biogenesis of microRNA.* Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(17): p. 2859-71.

72. Zeng, Y. and B.R. Cullen, *Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(16): p. 4776-85.
73. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
74. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. Genes Dev, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
75. Okada, C., et al., *A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1275-9.
76. Warf, M.B., W.E. Johnson, and B.L. Bass, *Improved annotation of C. elegans microRNAs by deep sequencing reveals structures associated with processing by Drosha and Dicer*. RNA, 2011. **17**(4): p. 563-77.
77. Emily Bernstein, A.A.C., Scott M. Hammond and G.J. Hannon, *Role for a Bidentate Ribonuclease in the Initiation Step of RNA Interference*. 2001.
78. Lee, Y., et al., *The role of PACT in the RNA silencing pathway*. EMBO J, 2006. **25**(3): p. 522-32.
79. Gregory, R.I., et al., *Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing*. Cell, 2005. **123**(4): p. 631-40.
80. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 740-4.
81. Chung, W.J., et al., *Computational and experimental identification of mirtrons in Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans*. Genome Res, 2011. **21**(2): p. 286-300.
82. Witkos, T.M., E. Koscianska, and W.J. Krzyzosiak, *Practical Aspects of microRNA Target Prediction*. Curr Mol Med, 2011. **11**(2): p. 93-109.
83. Guo, H., et al., *Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 835-40.
84. Johnson, S.M., et al., *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. Cell, 2005. **120**(5): p. 635-47.
85. Tsang, W.P. and T.T. Kwok, *The miR-18a\* microRNA functions as a potential tumor suppressor by targeting on K-Ras*. Carcinogenesis, 2009. **30**(6): p. 953-9.
86. Chen, X., et al., *Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis*. Oncogene, 2009. **28**(10): p. 1385-92.
87. Yin, Y., et al., *Downregulation of miR-145 associated with cancer progression and VEGF transcriptional activation by targeting N-RAS and IRS1*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1829**(2): p. 239-47.
88. Zhao, H.J., et al., *MiR-194 deregulation contributes to colorectal carcinogenesis via targeting AKT2 pathway*. Theranostics, 2014. **4**(12): p. 1193-208.
89. Iwaya, T., et al., *Downregulation of miR-144 is associated with colorectal cancer progression via activation of mTOR signaling pathway*. Carcinogenesis, 2012. **33**(12): p. 2391-7.
90. Su, J., et al., *MiR-143 and MiR-145 regulate IGF1R to suppress cell proliferation in colorectal cancer*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e114420.
91. Gao, F. and W. Wang, *MicroRNA-96 promotes the proliferation of colorectal cancer cells and targets tumor protein p53 inducible nuclear protein 1, forkhead box protein O1 (FOXO1) and FOXO3a*. Mol Med Rep, 2015. **11**(2): p. 1200-6.

92. Yamakuchi, M., M. Ferlito, and C.J. Lowenstein, *miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13421-6.
93. Ren, A., et al., *Detection of miRNA as non-invasive biomarkers of colorectal cancer*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(2): p. 2810-23.
94. Asangani, I.A., et al., *MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer*. Oncogene, 2008. **27**(15): p. 2128-36.
95. Wang, J., et al., *MicroRNA-552 enhances metastatic capacity of colorectal cancer cells by targeting a disintegrin and metalloprotease 28*. Oncotarget, 2016. **7**(43): p. 70194-70210.
96. Wu, S., F. Wu, and Z. Jiang, *Identification of hub genes, key miRNAs and potential molecular mechanisms of colorectal cancer*. Oncol Rep, 2017. **38**(4): p. 2043-2050.
97. Cottonham, C.L., S. Kaneko, and L. Xu, *miR-21 and miR-31 converge on TIAM1 to regulate migration and invasion of colon carcinoma cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(46): p. 35293-302.
98. Sayed, D., et al., *MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(8): p. 3272-82.
99. Xiong, B., et al., *MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells*. Int J Oncol, 2013. **42**(1): p. 219-28.
100. de Krijger, I., et al., *MicroRNAs in colorectal cancer metastasis*. J Pathol, 2011. **224**(4): p. 438-47.
101. Ling, H., et al., *The clinical and biological significance of MIR-224 expression in colorectal cancer metastasis*. Gut, 2016. **65**(6): p. 977-989.
102. de Sousa, E.M., et al., *Targeting Wnt signaling in colon cancer stem cells*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(4): p. 647-53.
103. Nagel, R., et al., *Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(14): p. 5795-802.
104. Thomas, J., et al., *MicroRNAs: Clinical Relevance in Colorectal Cancer*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(12): p. 28063-76.
105. Li, S. and G.F. Hu, *Emerging role of angiogenin in stress response and cell survival under adverse conditions*. J Cell Physiol, 2012. **227**(7): p. 2822-6.
106. Liao, J.Y., et al., *Deep sequencing of human nuclear and cytoplasmic small RNAs reveals an unexpectedly complex subcellular distribution of miRNAs and tRNA 3' trailers*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10563.
107. Kumar, P., C. Kuscu, and A. Dutta, *Biogenesis and Function of Transfer RNA-Related Fragments (tRFs)*. Trends Biochem Sci, 2016. **41**(8): p. 679-689.
108. Yamasaki, S., et al., *Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression*. J Cell Biol, 2009. **185**(1): p. 35-42.
109. Loher, P., A.G. Telonis, and I. Rigoutsos, *MINTmap: fast and exhaustive profiling of nuclear and mitochondrial tRNA fragments from short RNA-seq data*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 41184.
110. Kim, H.K., et al., *A transfer-RNA-derived small RNA regulates ribosome biogenesis*. Nature, 2017. **552**(7683): p. 57-62.

111. Huang, S.Q., et al., *The dysregulation of tRNAs and tRNA derivatives in cancer*. J Exp Clin Cancer Res, 2018. **37**(1): p. 101.
112. Castello, A., et al., *Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins*. Cell, 2012. **149**(6): p. 1393-406.
113. Goodarzi, H., et al., *Endogenous tRNA-Derived Fragments Suppress Breast Cancer Progression via YBX1 Displacement*. Cell, 2015. **161**(4): p. 790-802.
114. Ivanov, P., et al., *Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation*. Mol Cell, 2011. **43**(4): p. 613-23.
115. Cherie Blenkiron, D.G.H., Sandra Fitzgerald<sup>1</sup> and C.G.P. , Annette Lasham, *Links between the Oncoprotein YB-1 and Small NonCoding RNAs in Breast Cancer*. Plos, 2013.
116. Shao, Y., et al., *tRF-Leu-CAG promotes cell proliferation and cell cycle in non-small cell lung cancer*. Chem Biol Drug Des, 2017. **90**(5): p. 730-738.
117. Li, S., Z. Xu, and J. Sheng, *tRNA-Derived Small RNA: A Novel Regulatory Small Non-Coding RNA*. Genes (Basel), 2018. **9**(5).
118. Fang, Z., et al., *Role of Brf1 interaction with ERalpha, and significance of its overexpression, in human breast cancer*. Mol Oncol, 2017. **11**(12): p. 1752-1767.
119. Honda, S., et al., *Sex hormone-dependent tRNA halves enhance cell proliferation in breast and prostate cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(29): p. E3816-25.
120. Pekarsky, Y., et al., *Dysregulation of a family of short noncoding RNAs, tsRNAs, in human cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(18): p. 5071-6.
121. Balatti, V., et al., *tsRNA signatures in cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(30): p. 8071-8076.
122. Olvedy, M., et al., *A comprehensive repertoire of tRNA-derived fragments in prostate cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(17): p. 24766-77.
123. Khattar, E., et al., *Telomerase reverse transcriptase promotes cancer cell proliferation by augmenting tRNA expression*. J Clin Invest, 2016. **126**(10): p. 4045-4060.
124. Martens-Uzunova, E.S., et al., *Diagnostic and prognostic signatures from the small non-coding RNA transcriptome in prostate cancer*. Oncogene, 2012. **31**(8): p. 978-91.
125. Zhou, K., et al., *A tRNA fragment, tRF5-Glu, regulates BCAR3 expression and proliferation in ovarian cancer cells*. Oncotarget, 2017. **8**(56): p. 95377-95391.
126. Roy L. Mautea, C.S., Pavel Sumazina, Antony Holmesa, Andrea Califanoa, Katia Bassoa, and Riccardo Dalla-Favera, *tRNA derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage response and is down-regulated in B cell lymphoma* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013: p. 1404-1409.
127. Pyne, N.J., et al., *Sphingosine 1-phosphate and cancer*. Adv Biol Regul, 2018. **68**: p. 97-106.
128. Sobala, A. and G. Hutvagner, *Small RNAs derived from the 5' end of tRNA can inhibit protein translation in human cells*. RNA Biol, 2013. **10**(4): p. 553-63.
129. Zhu, L., et al., *tRNA-derived fragments and tRNA halves: The new players in cancers*. Cancer Lett, 2019. **452**: p. 31-37.



130. Victoria Martinez, B., et al., *Circulating small non-coding RNA signature in head and neck squamous cell carcinoma*. *Oncotarget*, 2015. **6**(22): p. 19246-63.
131. Nientiedt, M., et al., *Identification of aberrant tRNA-halves expression patterns in clear cell renal cell carcinoma*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 37158.
132. <https://www.kekos.gr/2014/05/31/endoskopiki-therapeia-tis-achalias/>. (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2020)
133. John E. Hall, G.C.A., *Textbook of Medical Physiology*. Vol. 2. 1996.
134. David E. Beck, S.D.W., Janice F. Rafferty, *Principles and Practice of Surgery for the Colon, Rectum, and Anus*. 2018.
135. Μιχαλόπουλος, Α., *Ανατομία και φυσιολογία του παχέος εντέρου και του πρωκτού*, in *Χειρουργικές παθήσεις του παχέος εντέρου και πρωκτού*. 2015, UNIVERSITY STUDIO PRESS. p. 300.
136. Brody, H., *Colorectal Cancer*. *Nature*, 2015.
137. *Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Program. SEER\*Stat Database: Mortality-All COD, Aggregated With State, Total US (1969-2014)*. 2017: National Cancer Institute, Division of Cancer Control and Population Sciences, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch, Bethesda.
138. Frank, S.A., in *Dynamics of Cancer: Incidence, Inheritance, and Evolution*. 2007: Princeton (NJ).
139. Society, A.C., *Colorectal Cancer Facts & Figures*.
140. Stracci, F., M. Zorzi, and G. Grazzini, *Colorectal cancer screening: tests, strategies, and perspectives*. *Front Public Health*, 2014. **2**: p. 210.
141. Conteduca, V., et al., *Precancerous colorectal lesions (Review)*. *Int J Oncol*, 2013. **43**(4): p. 973-84.
142. Yamane, L., et al., *Serrated pathway in colorectal carcinogenesis*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(10): p. 2634-40.
143. East, J.E., M. Vieth, and D.K. Rex, *Serrated lesions in colorectal cancer screening: detection, resection, pathology and surveillance*. *Gut*, 2015. **64**(6): p. 991-1000.
144. Snover, D.C., *Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma*. *Hum Pathol*, 2011. **42**(1): p. 1-10.
145. Lochhead, P., et al., *Progress and opportunities in molecular pathological epidemiology of colorectal premalignant lesions*. *Am J Gastroenterol*, 2014. **109**(8): p. 1205-14.
146. Nagy, J.A., et al., *Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know?* *Br J Cancer*, 2009. **100**(6): p. 865-9.
147. Pino, M.S. and D.C. Chung, *The chromosomal instability pathway in colon cancer*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(6): p. 2059-72.
148. Bateman, A.C., *Pathology of serrated colorectal lesions*. *J Clin Pathol*, 2014. **67**(10): p. 865-74.
149. Kang, G.H., *Four molecular subtypes of colorectal cancer and their precursor lesions*. *Arch Pathol Lab Med*, 2011. **135**(6): p. 698-703.
150. Kambara, T., et al., *BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum*. *Gut*, 2004. **53**(8): p. 1137-44.
151. Loh, K., et al., *Bone morphogenic protein 3 inactivation is an early and frequent event in colorectal cancer development*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2008. **47**(6): p. 449-60.

152. Melotte, V., et al., *N-Myc downstream-regulated gene 4 (NDRG4): a candidate tumor suppressor gene and potential biomarker for colorectal cancer*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(13): p. 916-27.
153. Boland, C.R. and A. Goel, *Microsatellite instability in colorectal cancer*. Gastroenterology, 2010. **138**(6): p. 2073-2087 e3.
154. <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>. (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2020)
155. Lynch, H.T. and A. de la Chapelle, *Hereditary colorectal cancer*. N Engl J Med, 2003. **348**(10): p. 919-32.
156. R J Mitchell, D.B., H Campbell, M E M Porteous, A H Wyllie, C C Bird, and M G Dunlop, *Accuracy of reporting of family history of colorectal cancer*. Gut, 2004. **53**(2): p. 291–295.
157. Elizabeth E Half , R.S.B., *Clinical Management of Hereditary Colorectal Cancer Syndromes*. Curr Opin Gastroenterol., 2004. **20**(1).
158. Oliver M. Sieber, B.S., Lara Lipton, M.B., B.S., Michael Crabtree, M.B., B.S., Karl Heinimann, Ph.D., Paulo Fidalgo, M.D., Robin K.S. Phillips, M.D., Marie-Luise Bisgaard, M.D., Torben F. Orntoft, M.D., Lauri A. Aaltonen, Ph.D., Shirley V. Hodgson, D.M., Huw J.W. Thomas, Ph.D., and Ian P.M. Tomlinson, Ph.D., *Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH*. The New England Journal of Medicine, 2003.
159. Tiziana Venesio, S.M., Francesca Cattaneo, Arrigo Arrigoni, Mauro Risio, Guglielmina N. Ranzani, *High frequency of MYH gene mutations in a subset of patients with familial adenomatous polyposis*. Gastroenterology, 2004. **126**.
160. Grady, W.M., *Genetic testing for high-risk colon cancer patients*. Gastroenterology, 2003. **124**(6): p. 1574-94.
161. Islami, F., et al., *Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(1): p. 31-54.
162. Giglia, M.D. and D.I. Chu, *Familial Colorectal Cancer: Understanding the Alphabet Soup*. Clin Colon Rectal Surg, 2016. **29**(3): p. 185-95.
163. László Herszényi, L.B., Pál Miheller, Zsolt Tulassay, *Colorectal Cancer in Patients With Inflammatory Bowel Disease: The True Impact of the Risk*. 2014.
164. Peeters, P.J., et al., *The risk of colorectal cancer in patients with type 2 diabetes: associations with treatment stage and obesity*. Diabetes Care, 2015. **38**(3): p. 495-502.
165. Reulen, R.C., et al., *Long-term risks of subsequent primary neoplasms among survivors of childhood cancer*. JAMA, 2011. **305**(22): p. 2311-9.
166. Tara O Henderson, K.C.O., John Whitton, Wendy Leisenring, Joseph Neglia, Anna Meadows, Catherine Crotty, David T Rubin, Lisa Diller, Peter Inskip, Susan A Smith, Marilyn Stovall, Louis S Constine, Sue Hammond, Greg T Armstrong, Leslie L Robison, Paul C Nathan, *Secondary gastrointestinal cancer in childhood cancer survivors: a cohort study*. Annal of Internal Medicine, 2012.
167. Brennan, C.W., et al., *The somatic genomic landscape of glioblastoma*. Cell, 2013. **155**(2): p. 462-77.
168. Grady, W.M. and C.C. Pritchard, *Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer*. Toxicol Pathol, 2014. **42**(1): p. 124-39.

169. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Gatekeepers and caretakers*. Nature, 1997. **386**(6627): p. 761, 763.
170. Calvert, P.M. and H. Frucht, *The genetics of colorectal cancer*. Ann Intern Med, 2002. **137**(7): p. 603-12.
171. Lynch, J.P. and T.C. Hoops, *The genetic pathogenesis of colorectal cancer*. Hematol Oncol Clin North Am, 2002. **16**(4): p. 775-810.
172. Jass, J.R., et al., *Emerging concepts in colorectal neoplasia*. Gastroenterology, 2002. **123**(3): p. 862-76.
173. Krok, K.L. and G.R. Lichtenstein, *Colorectal cancer in inflammatory bowel disease*. Curr Opin Gastroenterol, 2004. **20**(1): p. 43-8.
174. Soetikno, R.M., et al., *Flat and depressed colorectal neoplasms*. Curr Opin Gastroenterol, 2003. **19**(1): p. 69-75.
175. Kondo, Y. and J.P. Issa, *Epigenetic changes in colorectal cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2004. **23**(1-2): p. 29-39.
176. Rao, M., et al., *Role of cyclooxygenase-2 in the angiogenesis of colorectal cancer*. Int J Colorectal Dis, 2004. **19**(1): p. 1-11.
177. Harman, F.S., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-delta attenuates colon carcinogenesis*. Nat Med, 2004. **10**(5): p. 481-3.
178. Wang, Z., et al., *Mutational analysis of the tyrosine phosphatome in colorectal cancers*. Science, 2004. **304**(5674): p. 1164-6.
179. Jung, B., et al., *Loss of activin receptor type 2 protein expression in microsatellite unstable colon cancers*. Gastroenterology, 2004. **126**(3): p. 654-9.
180. Wolf, A.M.D., et al., *Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(4): p. 250-281.
181. Worthley, D.L., et al., *DNA methylation within the normal colorectal mucosa is associated with pathway-specific predisposition to cancer*. Oncogene, 2010. **29**(11): p. 1653-62.
182. Jones, S., et al., *Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4283-8.
183. Goldstein, N.S., *Serrated pathway and APC (conventional)-type colorectal polyps: molecular-morphologic correlations, genetic pathways, and implications for classification*. Am J Clin Pathol, 2006. **125**(1): p. 146-53.
184. Jass, J.R., *Hyperplastic polyps and colorectal cancer: is there a link?* Clin Gastroenterol Hepatol, 2004. **2**(1): p. 1-8.
185. Bettington, M., et al., *The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges*. Histopathology, 2013. **62**(3): p. 367-86.
186. Rex, D.K., et al., *Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel*. Am J Gastroenterol, 2012. **107**(9): p. 1315-29; quiz 1314, 1330.
187. Valori, R., et al., *European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition--Quality assurance in endoscopy in colorectal cancer screening and diagnosis*. Endoscopy, 2012. **44 Suppl 3**: p. SE88-105.
188. Weitz, J., et al., *Colorectal cancer*. Lancet, 2005. **365**(9454): p. 153-65.
189. Kuipers, E.J., et al., *Colorectal cancer*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15065.
190. Kuipers, E.J., *Colorectal cancer: screening-one small step for mankind, one giant leap for man*. Nat Rev Clin Oncol, 2014. **11**(1): p. 5-6.

191. Schreuders, E.H., et al., *Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes*. Gut, 2015. **64**(10): p. 1637-49.
192. Kahi, C.J. and D.K. Rex, *Current and future trends in colorectal cancer screening*. Cancer Metastasis Rev, 2004. **23**(1-2): p. 137-44.
193. Hurlstone, D.P., et al., *Detecting diminutive colorectal lesions at colonoscopy: a randomised controlled trial of pan-colonic versus targeted chromoscopy*. Gut, 2004. **53**(3): p. 376-80.
194. Kiesslich, R., et al., *Methylene blue-aided chromoendoscopy for the detection of intraepithelial neoplasia and colon cancer in ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2003. **124**(4): p. 880-8.
195. Singh, H., et al., *The reduction in colorectal cancer mortality after colonoscopy varies by site of the cancer*. Gastroenterology, 2010. **139**(4): p. 1128-37.
196. Brenner, H., C. Stock, and M. Hoffmeister, *Effect of screening sigmoidoscopy and screening colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies*. BMJ, 2014. **348**: p. g2467.
197. Πληροφορίες βασισμένες στις κατευθυντήριες οδηγίες κλινικής πρακτικής της ESMO, E.O.E. (Esmo), Editor. 2016.
198. Zauber, A.G., et al., *Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths*. N Engl J Med, 2012. **366**(8): p. 687-96.
199. Spada, C., et al., *Second-generation colon capsule endoscopy compared with colonoscopy*. Gastrointest Endosc, 2011. **74**(3): p. 581-589 e1.
200. Pickhardt, P.J., et al., *Colorectal cancer: CT colonography and colonoscopy for detection--systematic review and meta-analysis*. Radiology, 2011. **259**(2): p. 393-405.
201. Van Gossum, A., et al., *Capsule endoscopy versus colonoscopy for the detection of polyps and cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(3): p. 264-70.
202. Spada, C., et al., *Meta-analysis shows colon capsule endoscopy is effective in detecting colorectal polyps*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2010. **8**(6): p. 516-22.
203. Spada, C., et al., *Colon capsule endoscopy: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline*. Endoscopy, 2012. **44**(5): p. 527-36.
204. Hoff, G., et al., *Risk of colorectal cancer seven years after flexible sigmoidoscopy screening: randomised controlled trial*. BMJ, 2009. **338**: p. b1846.
205. Atkin, W.S., et al., *Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial*. Lancet, 2010. **375**(9726): p. 1624-33.
206. Segnan, N., et al., *Once-only sigmoidoscopy in colorectal cancer screening: follow-up findings of the Italian Randomized Controlled Trial--SCORE*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(17): p. 1310-22.
207. Cruz-Correa, M., et al., *Loss of imprinting of insulin growth factor II gene: a potential heritable biomarker for colon neoplasia predisposition*. Gastroenterology, 2004. **126**(4): p. 964-70.
208. Renehan, A.G., et al., *Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis*. Lancet, 2004. **363**(9418): p. 1346-53.

209. Grutzmann, R., et al., *Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay*. PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3759.
210. Σκορίλας, Α., *Αρχές Κλινικής Χημείας και Μοριακής Διαγνωστικής*. 2009, Αθήνα, Ελλάδα: Εκδόσεις Συμμετρία.
211. Bosch, L.J., et al., *Molecular tests for colorectal cancer screening*. Clin Colorectal Cancer, 2011. **10**(1): p. 8-23.
212. van de Velde, C.J., et al., *EURECCA colorectal: multidisciplinary management: European consensus conference colon & rectum*. Eur J Cancer, 2014. **50**(1): p. 1 e1-1 e34.
213. van de Velde, C.J., et al., *Experts reviews of the multidisciplinary consensus conference colon and rectal cancer 2012: science, opinions and experiences from the experts of surgery*. Eur J Surg Oncol, 2014. **40**(4): p. 454-68.
214. Breugom, A.J., et al., *Quality assurance in the treatment of colorectal cancer: the EURECCA initiative*. Ann Oncol, 2014. **25**(8): p. 1485-92.
215. Gooiker, G.A., et al., *Risk factors for excess mortality in the first year after curative surgery for colorectal cancer*. Ann Surg Oncol, 2012. **19**(8): p. 2428-34.
216. van den Broek, C.B., et al., *The survival gap between middle-aged and elderly colon cancer patients. Time trends in treatment and survival*. Eur J Surg Oncol, 2011. **37**(10): p. 904-12.
217. Dekker, J.W., et al., *Cause of death the first year after curative colorectal cancer surgery; a prolonged impact of the surgery in elderly colorectal cancer patients*. Eur J Surg Oncol, 2014. **40**(11): p. 1481-7.
218. Mulder, S.A., et al., *Prevalence and prognosis of synchronous colorectal cancer: a Dutch population-based study*. Cancer Epidemiol, 2011. **35**(5): p. 442-7.
219. Tudyka, V., et al., *EURECCA consensus conference highlights about colon & rectal cancer multidisciplinary management: the radiology experts review*. Eur J Surg Oncol, 2014. **40**(4): p. 469-75.
220. Taylor, F.G., et al., *Preoperative magnetic resonance imaging assessment of circumferential resection margin predicts disease-free survival and local recurrence: 5-year follow-up results of the MERCURY study*. J Clin Oncol, 2014. **32**(1): p. 34-43.
221. Quirke, P., et al., *Effect of the plane of surgery achieved on local recurrence in patients with operable rectal cancer: a prospective study using data from the MRC CR07 and NCIC-CTG CO16 randomised clinical trial*. Lancet, 2009. **373**(9666): p. 821-8.
222. van Heijningen, E.M., et al., *Features of adenoma and colonoscopy associated with recurrent colorectal neoplasia based on a large community-based study*. Gastroenterology, 2013. **144**(7): p. 1410-8.
223. Van Cutsem, E., et al., *Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2014. **25 Suppl 3**: p. iii1-9.
224. Van Cutsem, E., et al., *ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer*. Ann Oncol, 2016. **27**(8): p. 1386-422.

225. Willett, C.G., et al., *Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer*. Nat Med, 2004. **10**(2): p. 145-7.
226. Simkens, L.H., M. Koopman, and C.J. Punt, *Optimal duration of systemic treatment in metastatic colorectal cancer*. Curr Opin Oncol, 2014. **26**(4): p. 448-53.
227. Kubicka, S., et al., *Bevacizumab plus chemotherapy continued beyond first progression in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with bevacizumab plus chemotherapy: ML18147 study KRAS subgroup findings*. Ann Oncol, 2013. **24**(9): p. 2342-9.
228. Grothey, A., et al., *Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial*. Lancet, 2013. **381**(9863): p. 303-12.
229. Smith, J.J. and M.R. Weiser, *Outcomes in non-metastatic colorectal cancer*. J Surg Oncol, 2014. **110**(5): p. 518-26.
230. van Roon, A.H., et al., *Random comparison of repeated faecal immunochemical testing at different intervals for population-based colorectal cancer screening*. Gut, 2013. **62**(3): p. 409-15.
231. Ewing, B., et al., *Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment*. Genome Res, 1998. **8**(3): p. 175-85.
232. Ewing, B. and P. Green, *Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities*. Genome Res, 1998. **8**(3): p. 186-94.
233. Cock, P.J., et al., *The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(6): p. 1767-71.
234. [https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/). (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2020)
235. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2020)
236. Pliatsika, V., et al., *MINTbase: a framework for the interactive exploration of mitochondrial and nuclear tRNA fragments*. Bioinformatics, 2016. **32**(16): p. 2481-9.
237. Ye, J., et al., *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. BMC Bioinformatics, 2012. **13**: p. 134.
238. [https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo\\_country=gr](https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=gr). (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2020)
239. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15596026>. (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2020)
240. <https://www.zymoresearch.com/pages/what-is-trizol>. (τελευταία επίσκεψη Ιούνιος 2020)
241. C., H.D., *Βασικές αρχές φασματοφωτομετρίας*, in *Ποσοτική Χημική Ανάλυση* 2011. p. 433-458.
242. [https://www.shimadzu.com/an/molecular\\_spectro/uv/spc/bionano/features.html](https://www.shimadzu.com/an/molecular_spectro/uv/spc/bionano/features.html). (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2020)
243. Clark, J., *Πειραματική Βιοχημεία*. Vol. 6. 1992, Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
244. [https://www.shimadzu.com/an/molecular\\_spectro/uv/spc/bionano.html](https://www.shimadzu.com/an/molecular_spectro/uv/spc/bionano.html). (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2020)

245. Cao, G.J. and N. Sarkar, *Poly(A) RNA in Escherichia coli: nucleotide sequence at the junction of the lpp transcript and the polyadenylate moiety*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(16): p. 7546-50.
246. August, J.T., P.J. Ortiz, and J. Hurwitz, *Ribonucleic acid-dependent ribonucleotide incorporation. I. Purification and properties of the enzyme*. J Biol Chem, 1962. **237**: p. 3786-93.
247. Stewart, M., *Polyadenylation and nuclear export of mRNAs*. J Biol Chem, 2019. **294**(9): p. 2977-2987.
248. Casanal, A., et al., *Architecture of eukaryotic mRNA 3'-end processing machinery*. Science, 2017. **358**(6366): p. 1056-1059.
249. Mougel, M., L. Houzet, and J.L. Darlix, *When is it time for reverse transcription to start and go?* Retrovirology, 2009. **6**: p. 24.
250. Tzertzinis, G., S. Tabor, and N.M. Nichols, *RNA-dependent DNA polymerases*. Curr Protoc Mol Biol, 2008. **Chapter 3**: p. Unit3 7.
251. Valasek, M.A. and J.J. Repa, *The power of real-time PCR*. Adv Physiol Educ, 2005. **29**(3): p. 151-9.
252. Ι.Δ. Κυριαζής, Μ.Ε.Κ., Κ. Πουλάς, Γ.Π. Πατρinός, *Μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό μικροοργανισμών*. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής, 2014.
253. Butler, J.M., *DNA Quantitation*, in *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. 2012. p. 49-67.
254. Botes, M., M. de Kwaadsteniet, and T.E. Cloete, *Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water*. Anal Bioanal Chem, 2013. **405**(1): p. 91-108.
255. KURNIK RONALD T, T.T., *Determination of single peak melting temperature by PCR analogy and double sigmoid equation*, in *European Patent Office*. 2010.
256. Γεωργίου, Σ., *Μελέτη της επίδρασης της αυξητικής ορμόνης στο λευκό μυ και στο ήπαρ της σπιπούρας (Sparus aurata L.) in Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας*. 2010, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ: Λάρισα.
257. Vandesompele, J., *qPCR guide*.
258. Galardi, S., et al., *Purified box C/D snoRNPs are able to reproduce site-specific 2'-O-methylation of target RNA in vitro*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(19): p. 6663-8.
259. Gee, H.E., et al., *The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis*. Br J Cancer, 2011. **104**(7): p. 1168-77.
260. Davidson, B.M.O.P.B.N., *Electrophoresis of the nucleic acids*. Biopolymers, 1964. **2**(3): p. 245-257.
261. Hyeon-Sook Koo, H.-M.W.D.M.C., *DNA bending at adenine· thymine tracts*. Nature, 1986. **320**: p. 501-506.
262. Lee, P.Y., et al., *Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments*. J Vis Exp, 2012(62).
263. R J Fritsch, I.K., *Electrophoresis*. Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. 1993.
264. Camp, R.L., M. Dolled-Filhart, and D.L. Rimm, *X-tile: a new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(21): p. 7252-9.

265. Fleischmann, R.D., et al., *Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd.* Science, 1995. **269**(5223): p. 496-512.
266. Fraser, C.M., et al., *The minimal gene complement of Mycoplasma genitalium.* Science, 1995. **270**(5235): p. 397-403.
267. Blattner, F.R., et al., *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12.* Science, 1997. **277**(5331): p. 1453-62.
268. Goffeau, A., *[The yeast genome]*. Pathol Biol (Paris), 1998. **46**(2): p. 96-7.
269. Metzker, M.L., *Sequencing technologies - the next generation.* Nat Rev Genet, 2010. **11**(1): p. 31-46.
270. Flicek, P. and E. Birney, *Sense from sequence reads: methods for alignment and assembly.* Nat Methods, 2009. **6**(11 Suppl): p. S6-S12.
271. Pop, M., *Genome assembly reborn: recent computational challenges.* Brief Bioinform, 2009. **10**(4): p. 354-66.
272. Koenig, R., *Tuberculosis. Few mutations divide some drug-resistant TB strains.* Science, 2007. **318**(5852): p. 901-2.
273. Westermann, A.J., S.A. Gorski, and J. Vogel, *Dual RNA-seq of pathogen and host.* Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(9): p. 618-30.
274. Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder, *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics.* Nat Rev Genet, 2009. **10**(1): p. 57-63.
275. Kuipers, E.J., T. Rosch, and M. Bretthauer, *Colorectal cancer screening--optimizing current strategies and new directions.* Nat Rev Clin Oncol, 2013. **10**(3): p. 130-42.
276. Papamichael, D., et al., *Treatment of colorectal cancer in older patients: International Society of Geriatric Oncology (SIOG) consensus recommendations 2013.* Ann Oncol, 2015. **26**(3): p. 463-76.
277. Diamantopoulos, M.A., P. Tsiakanikas, and A. Scorilas, *Non-coding RNAs: the riddle of the transcriptome and their perspectives in cancer.* Ann Transl Med, 2018. **6**(12): p. 241.
278. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.* Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
279. Morozova, O. and M.A. Marra, *Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics.* Genomics, 2008. **92**(5): p. 255-64.
280. Adamopoulos, P.G., et al., *miR-224 overexpression is a strong and independent prognosticator of short-term relapse and poor overall survival in colorectal adenocarcinoma.* Int J Oncol, 2015. **46**(2): p. 849-59.
281. Diamantopoulos, M.A., et al., *Upregulated miR-16 expression is an independent indicator of relapse and poor overall survival of colorectal adenocarcinoma patients.* Clin Chem Lab Med, 2017. **55**(5): p. 737-747.
282. Tsiakanikas, P., et al., *High microRNA-28-5p expression in colorectal adenocarcinoma predicts short-term relapse of node-negative patients and poor overall survival of patients with non-metastatic disease.* Clin Chem Lab Med, 2018. **56**(6): p. 990-1000.
283. Kontos, C.K., et al., *miR-15a-5p, A Novel Prognostic Biomarker, Predicting Recurrent Colorectal Adenocarcinoma.* Mol Diagn Ther, 2017. **21**(4): p. 453-464.
284. Kerimis, D., et al., *Elevated expression of miR-24-3p is a potentially adverse prognostic factor in colorectal adenocarcinoma.* Clin Biochem, 2017. **50**(6): p. 285-292.



285. Rapti, S.M., et al., *High miR-96 levels in colorectal adenocarcinoma predict poor prognosis, particularly in patients without distant metastasis at the time of initial diagnosis*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(9): p. 11815-11824.
286. Rapti, S.M., et al., *miR-34a overexpression predicts poor prognostic outcome in colorectal adenocarcinoma, independently of clinicopathological factors with established prognostic value*. *Clin Biochem*, 2017. **50**(16-17): p. 918-924.
287. Rapti, S.M., et al., *Enhanced miR-182 transcription is a predictor of poor overall survival in colorectal adenocarcinoma patients*. *Clin Chem Lab Med*, 2014. **52**(8): p. 1217-27.
288. Buhler, M., et al., *TRAMP-mediated RNA surveillance prevents spurious entry of RNAs into the Schizosaccharomyces pombe siRNA pathway*. *Nat Struct Mol Biol*, 2008. **15**(10): p. 1015-23.
289. Haussecker, D., et al., *Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing*. *RNA*, 2010. **16**(4): p. 673-95.
290. Yeung, M.L., et al., *Pyrosequencing of small non-coding RNAs in HIV-1 infected cells: evidence for the processing of a viral-cellular double-stranded RNA hybrid*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(19): p. 6575-86.
291. Li, Z., et al., *Extensive terminal and asymmetric processing of small RNAs from rRNAs, snoRNAs, snRNAs, and tRNAs*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(14): p. 6787-99.
292. Sun, C., et al., *Roles of tRNA-derived fragments in human cancers*. *Cancer Letters*, 2018. **414**: p. 16-25.
293. Lee, Y.S., et al., *A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs)*. *Genes Dev*, 2009. **23**(22): p. 2639-49.
294. Pederson, T., *Regulatory RNAs derived from transfer RNA? RNA*, 2010. **16**(10): p. 1865-9.
295. Ma, Z.L., et al., *Tanshinones suppress AURKA through up-regulation of miR-32 expression in non-small cell lung cancer*. *Oncotarget*, 2015. **6**(24): p. 20111-20.
296. Jin, L., C. Zhu, and X. Qin, *Expression profile of tRNA-derived fragments in pancreatic cancer*. *Oncol Lett*, 2019. **18**(3): p. 3104-3114.
297. Zhu, L., et al., *Using tRNA halves as novel biomarkers for the diagnosis of gastric cancer*. *Cancer Biomark*, 2019. **25**(2): p. 169-176.



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών  
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΗ ΚΩΔΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNAs (ncRNAs)  
ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΕΠΟΜΕΝΗ ΓΕΝΙΑΣ, ΩΣ ΝΕΟΙ  
ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΨΥΛΛΑΚΗ ΒΑΣΙΛΕΙΑ ΜΑΡΙΑ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΚΠΑ

### Περίληψη

Η αλληλούχηση επόμενης γενιάς είναι μία πρόσφατη μέθοδος ανάλυσης του γονιδιώματος που συμβάλλει στην ανακάλυψη άγνωστων μέχρι τώρα περιοχών του. Η μέθοδος είναι χρήσιμη στην πρόγνωση, διάγνωση και στην θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών όπως ο καρκίνος. Είναι ανάγκη η εύρεση μοριακών βιοδεικτών πρόγνωσης για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, καθώς αποτελεί την τέταρτη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο. Αιτίες εμφάνισης του είναι οι διατροφικές συνήθειες, το κάπνισμα και η μειωμένη σωματική άσκηση. Τα μικρά, μη κωδικά θραύσματα μεταφορικού RNA, tRFs είναι μέρος της άγνωστης μέχρι πρόσφατα πληροφορίας που βρέθηκε και συνεχίζεται να ερευνάται με την βοήθεια του NGS. Τα tRFs ρυθμίζουν γονίδια σχετικά με την εμφάνιση σοβαρών ασθενειών, όπως και ο καρκίνος. Μετά από την βιοπληροφορική ανάλυση που έγινε σε πειράματα NGS που είναι καταχωρημένα στην βάση δεδομένων SRA, επιλέχθηκε προς περαιτέρω μελέτη το μικρό μη κωδικό μόριο 3'tRF-Glu<sup>TT<sup>C</sup></sup>, καθώς η έκφρασή του στους καρκινικούς ιστούς παρουσιάστηκε ικανοποιητική αλλά και καθολική σε όλα τα πειράματα. Στην παρούσα μελέτη περιλαμβάνονται 113 καρκινικά και 50 παρακείμενα μη-καρκινικά δείγματα ιστοτεμάχια παχέος εντέρου. Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν, απομονώθηκε το ολικό RNA, μετρήθηκε η συγκέντρωσή του μέσω φασματοφωτομετρίας και ακολούθησε η πολυαδενυλίωση και αντίστροφη

μεταγραφή του σε cDNA. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η ποσοτική ανάλυση μέσω qPCR και αναλύθηκαν τα αποτελέσματα με βιοστατιστική ανάλυση. Στην qPCR χρησιμοποιήθηκε η μη ειδική χρωστική SYBR Green I, ως γονίδιο αναφοράς το *SNORD48* και ως βαθμονομητής μεταξύ των πειραμάτων qPCR ήταν η καρκινική σειρά παχέος εντέρου SW-620. Η επιβεβαίωση της ύπαρξης μοναδικού προϊόντος έγινε με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η έκφραση του υπό μελέτη 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> είναι μικρότερη στα καρκινικά δείγματα σε σχέση με τον μη-καρκινικό παρακείμενο ιστό. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καταληκτικού γεγονότος και μικρότερη ολική επιβίωση. Παρόμοιο μοτίβο παρουσιάζεται και για τους ασθενείς σταδίου I/II καθώς και για εκείνους με ενδιάμεσης διαφοροποίησης αδενοκαρκινώματα. Συμπερασματικά, το μόριο 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> μπορεί να αποτελέσει ένα πολλά υποσχόμενο δυσμενή προγνωστικό βιοδείκτη στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου και του ορθού.



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών  
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

INVESTIGATION AND CLINICAL EVALUATION OF SMALL NON-CODING  
RNAs(ncRNAs), AS NEW MOLECULAR CANCER BIOMARKERS, USING NEXT  
GENERATION SEQUENCING DATA

MASTER THESIS  
PSYLLAKI VASILEIA MARIA  
DEPARTMENT OF BIOLOGY, NKUA

**Abstract**

Next generation sequencing is a recent method for sequencing of the genome and reveals uninvestigated parts of it. This analysis is useful for prognosis, diagnosis and therapy of diseases such as cancer. Colorectal cancer is the fourth deadliest type of cancer and the establishment of colorectal cancer biomarkers is vital. Small non-coding RNA molecules, such as tRFs, have been investigated by NGS technology and there is a constant interest on them. tRFs derived from pre-mature or mature tRNA molecule and they regulate expression of genes related to cancer and other pathological states. In the present study NGS experiments for colorectal cancer that are registered in the SRA database were analyzed bioinformatically. After this analysis, we examined 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> expression levels in 113 colorectal cancer samples and 50 adjacent non-cancerous counterparts, due to their significant expression in SRA experiments. After the measurement of RNA concentration of the colorectal cancer samples, polyadenylation by the enzyme E. coli and reverse transcription by the reverse transcriptase M-MLV took place. The expression analysis of 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> was carried out using an in-house developed qPCR methodology based on SYBR green chemistry. SYBR green is a non-specific

fluorescent dye. The reference gene in qPCR was *SNORD48* and colorectal cancer cell line SW-620 was the calibrator between different qPCR experiments. The confirmation about the unique product of qPCR was taken place by electrophoresis in agarose gel. 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> expression levels were found significantly lower in cancer than normal tissue samples, after the biostatistical analysis of the 50 sample pairs. Also, patients with elevated 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> expression levels demonstrated significantly lower overall survival. The same trend was observed in stage I/II as well as grade II patients. In summary, 3'tRF-Glu<sup>TTC</sup> molecule may be a candidate adverse biomarker in prognosis of colorectal adenocarcinoma.