



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

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΣΤΗΝ
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΗΟΤΤΡ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ
ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ»**

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2022



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

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΣΤΗΝ
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΗΟΤΤΡ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ
ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ»**

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2022

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μελέτη της επίδρασης του γενωμικού DNA στην ανίχνευση του HOTTIP σε δείγματα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

A.M.: 7113062000008

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Μάρκου Αθηνά, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αθηνά Μάρκου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.

Εύη Λιανίδου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.

Μαργαρίτης Αυγέρης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Ε.Κ.Π.Α.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει προσελκύσει η μέθοδος της υγρής βιοψίας, ως μια εναλλακτική, μη επεμβατική προσέγγιση. Η υγρή βιοψία παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης γενετικών και επιγενετικών αλλαγών κατά την εξέλιξη της νόσου, όπως και την παρακολούθηση των ασθενών, μέσω απλών επαναλαμβανόμενων αιμοληψιών σε πραγματικό χρόνο. Κύριες πηγές της υγρής βιοψίας αποτελούν τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, το εξωκυττάριο DNA, το εξωκυττάριο RNA, και τα εξωκυτταρικά κυστίδια. Η ανάλυση του εξωκυτταρίου RNA έχει κυρίως εστιαστεί στη μελέτη των κυκλοφορούντων miRNAs και των μεγάλων μη κωδικών RNA (lncRNAs). Τα lncRNAs έχει αποδειχτεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση σε επιγενετικό, μεταγραφικό αλλά και μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Επίσης, εμπλέκονται στην παθογένεση των όγκων δρώντας είτε ως ογκογονίδια είτε ως ογκοκατασταλτικά γονίδια. Το HOTTIP είναι ένα πολύ καλά μελετημένο lncRNA που έχει βρεθεί ότι δρα ως ογκογονίδιο σε αρκετούς τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του προστάτη.

Στην παρούσα μελέτη αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του γενωμικού DNA στην έκφραση του HOTTIP. Αναπτύχθηκε ευαίσθητη και ειδική μέθοδος πραγματικού χρόνου PCR για την ανίχνευση του HOTTIP και ακολούθως προσδιορίστηκε η έκφραση του HOTTIP σε 41 ζεύγη δειγμάτων - εξωσώματα και κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα - από ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη. Χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που αναγράφονται στην πλειοψηφία των δημοσιευμένων εργασιών, διαπιστώθηκε ότι τα ποσοστά ανίχνευσης του HOTTIP ήταν ιδιαίτερα αυξημένα καθώς δεν είχε ληφθεί υπόψιν τους η επίδραση του γενωμικού DNA. Με την αναπτυχθείσα μέθοδο ανιχνεύθηκε το HOTTIP στο 9,75 % των υπό εξέταση CTCs και στο 2,43 % στα αντίστοιχα εξωσώματα.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Υγρή βιοψία, Μεταστατικός καρκίνος του προστάτη

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: lncRNA, HOTTIP, genomic DNA, CTCs

ABSTRACT

In recent years, the method of liquid biopsy has attracted particular interest, as an alternative, non-invasive approach. Liquid biopsy provides the ability to detect genetic and epigenetic changes during disease progression, as well as to monitor patients, through simple repeated blood sampling in real time. The main sources of liquid biopsy are circulating tumor cells, extracellular DNA, extracellular RNA and extracellular vesicles. The analysis of the extracellular RNA has mainly focused on the study of circulating miRNAs and long non-coding RNAs (lncRNAs). lncRNAs have been shown to play an important role in gene regulation at the epigenetic, transcriptional and post-transcriptional levels. They are also involved in the pathogenesis of tumors by acting either as oncogenes or as tumor suppressor genes. HOTTIP is a very well-studied lncRNA that has been found to act as an oncogene in several types of cancer including prostate cancer.

In the present study, the effect of genomic DNA on the expression of HOTTIP was initially studied. A sensitive and specific real-time PCR method was developed to detect HOTTIP, and the expression of HOTTIP was subsequently determined in 41 pairs of samples - exosomes and circulating cancer cells - from patients with metastatic prostate cancer. By using the primers listed in the majority of the published papers, it was found that the detection rates of HOTTIP were highly elevated as the effect of genomic DNA was not taken into account. With the developed method, HOTTIP was detected in 9.75% of the examined CTCs and 2.43% of the corresponding exosomes.

SUBJECT AREA: Liquid biopsy, Metastatic prostate cancer

KEY WORDS: lncRNA, HOTTIP, genomic DNA, CTCs

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α., στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Κλινική Βιοχημεία - Μοριακή Διαγνωστική», υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας κας Αθηνάς Μάρκου. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Μάρκου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου την εκπόνηση αυτής της πολύ ενδιαφέρουσας διπλωματικής εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να την ευχαριστήσω θερμά για τις συμβουλές, την καθοδήγηση αλλά και τη στήριξη που μου έδωσε καθ'όλη τη διάρκεια της πορείας μου μέσα στο εργαστήριο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την Καθηγήτρια κα. Εύη Λιανίδου για τη δυνατότητα που μου έδωσε να αποτελώ κι εγώ μέλος του εργαστηρίου της για την εκπόνηση της εργασίας μου, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδωσε. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αυγέρη για τον χρόνο και τις σημαντικές παρατηρήσεις ως μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στις μεταδιδακτορικές ερευνήτριες Στρατή Αρετή και Ντζιφά Αλίκη για τις πολύτιμες συμβουλές τους και την καθοδήγηση που μου έδωσαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τις υποψήφιες διδάκτορες Σταυρούλα Σμίλκου και Βικτωρία Τσερπέλη για την πολύτιμη βοήθειά τους σε πειραματικό, αλλά και σε προσωπικό επίπεδο σε όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τις υποψήφιες διδάκτορες Δώρα Λόντρα, Δήμητρα Στεργιοπούλου και Αναστασία Ζαφειριάδου για τις συμβουλές αλλά και το ευχάριστο κλίμα που δημιουργούσαν, καθώς και την Εύη Γκρέκου που η παρουσία της στο εργαστήριο αποτελούσε πάντα μια ευχάριστη νότα. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών, Θοδωρή Μάρρα και Χριστίνα Τσακίρη για την υποστήριξή τους.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου και στους φίλους μου που με στήριξαν ψυχολογικά καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΚΑΡΚΙΝΟΣ	3
1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.2. ΒΑΣΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	4
1.3. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ	9
1.3.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	9
1.3.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	10
1.3.3. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ.....	11
1.3.4. ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΜΑΚΡΙΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ RNA, lncRNAs	17
2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ RNA.....	17
2.2. MICRO-RNAs	18
2.3. ΚΥΚΛΙΚΑ RNA (CIRCULAR RNAs).....	19
2.4. ΜΑΚΡΙΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ RNA (LONG-NON CODING RNAs).....	20
2.4.1. ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ LNCRNAs	22
2.4.2. LNCRNAs ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	23
2.4.3. LNCRNA HOT TIP	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ	27
3.1. ΟΡΙΣΜΟΣ	27
3.2. ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	28
3.3. ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	31
3.3.1. ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ CTCs	33
3.4. ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟ DNA.....	37
3.5. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ	38
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	43

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	47
4.1. ΥΛΙΚΑ.....	47
4.1.1. ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	47
4.1.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	47

4.2. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	48
4.2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ CTCs ΑΠΟ ΤΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΝΟΣΟΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ	48
4.2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ CTCs, ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	51
4.2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ	52
4.2.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΤΑ ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ	54
4.3. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ RNA ΣΤΟ NANODROP	55
4.4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ.....	57
4.4.1. ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ cDNA ΜΕ ΣΤΑΔΙΑ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA	57
4.4.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ cDNA ΧΩΡΙΣ ΕΞΑΛΕΙΨΗ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA	59
4.5. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION - PCR)	59
4.6. REAL TIME PCR – ΠΟΣΟΤΙΚΗ PCR (QUANTITATIVE – qPCR).....	61
4.7. IN SILICO ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	67

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 - ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΟΥ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HOTTIP

5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	69
5.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ cDNA - ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	70
5.3. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ HOTTIP	71
5.3.1. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΕΝΟΙ ΣΕ ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΣΩΝΙΟΥ-ΕΞΩΝΙΟΥ	71
5.3.2. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΜΗ ΣΧΕΔΙΑΣΜΕΝΟΙ ΣΕ ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΣΩΝΙΟΥ-ΕΞΩΝΙΟΥ.	73
5.4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΖΕΥΓΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	75
5.4.1. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΖΕΥΓΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΥΠΟΣΤΕΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΔΕΟΞΥΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ	76
5.4.2. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΖΕΥΓΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΔΥΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ ΣΥΝΘΕΣΗΣ cDNA	77

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HOTTIP ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....

6.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HOTTIP ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	79
6.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HOTTIP ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	80

6.2.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ CTCs	82
6.2.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ.....	84
6.2.3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ CTCs ΚΑΙ ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ.....	84
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	85
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΑΠΟΔΟΣΕΙΣ ΟΡΩΝ.....	87
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	91
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	93
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	95
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	97

***Θεωρητικό
Μέρος***

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

«ΚΑΡΚΙΝΟΣ»

1.1. Εισαγωγή

Το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από τρισεκατομμύρια κύτταρα, όπου καθένα απ' αυτά επιτελεί συγκεκριμένες λειτουργίες. Ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η επιβίωση κάθε κυττάρου σε έναν πολυκύτταρο οργανισμό ρυθμίζονται αυστηρά, ώστε να εξυπηρετούνται οι ανάγκες του οργανισμού με αρμονικό και συντονισμένο τρόπο. Επιπλέον, όταν τα κύτταρα είτε έχουν υποστεί βλάβη ή είναι υπεράριθμα ή εν δυνάμει βλαβερά, εξαλείφονται μέσω της απόπτωσης, ενός μηχανισμού προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Στα καρκινικά κύτταρα παρατηρείται απώλεια αυτών των ρυθμιστικών μηχανισμών και έτσι αυτά **αναπτύσσονται και διαιρούνται ανεξέλεγκτα**, χωρίς να αποπίπτουν. Η μεταφορά των καρκινικών κυττάρων μέσω του κυκλοφορικού ή του λεμφικού συστήματος, ονομάζεται **μετάσταση** και αποτελεί τη βασική αιτία θανάτου από καρκίνο (1, 2).

Η πρώτη καταγεγραμμένη περιγραφή του καρκίνου, βρέθηκε σε έναν αιγυπτιακό πάπυρο (Πάπυρος του Edwin Smith) και χρονολογείται το 3000π.Χ. Η προέλευση της λέξης «καρκίνος» θεωρείται ότι εισήχθηκε από τον Έλληνα γιατρό Ιπποκράτη (460-370 π.Χ.), ο οποίος θεωρείται ο «Πατέρας της Ιατρικής». Θεωρείται ότι το σχήμα των όγκων του θύμιζε καβούρι κι έτσι χρησιμοποίησε τις λέξεις «καρκίνωμα» και «καρκίνος» (που σημαίνει « κάβουρας ») για να τους περιγράψει (1, 3). Αργότερα ο Ρωμαίος γιατρός Celsus (25 π.Χ. - 50 μ.Χ.), μετέφρασε τον ελληνικό όρο στη λατινική λέξη « cancer ». Τέλος, ο όρος «όγκος» πιστώνεται στον Έλληνα γιατρό Γαληνό (130-200 μ.Χ.) (3).

Ο καρκίνος είναι μία γενετική ασθένεια, αφού η δημιουργία των όγκων ξεκινά από μεταλλάξεις σε γονίδια ελέγχου της διαίρεσης και διαφοροποίησης των σωματικών κυττάρων. Τέτοια γονίδια είναι τα **πρωτο-ογκογονίδια** και τα **ογκοκατασταλτικά** γονίδια. Ένας κακοήθης μετασχηματισμός δεν προκαλείται κατά κανόνα από μία μεμονωμένη μετάλλαξη, αλλά βασίζεται στη μετάλλαξη περισσότερων γονιδίων, των οποίων η λανθασμένη ρύθμιση συμβάλλει στην καρκινογένεση. Συγκεκριμένα, στα ογκοκατασταλτικά γονίδια ανήκουν τόσο γονίδια που ελέγχουν τη διαδοχική εξέλιξη μεμονομένων σταδίων του κυτταρικού κύκλου, όσο και γονίδια του συστήματος **επιδιόρθωσης του DNA**, η διαταραχή των οποίων συνδέεται με αυξημένο ρυθμό μετάλλαξης και αυξημένο συνεπώς κίνδυνο κακοήθους μετασχηματισμού (2, 4).

Οι καρκινικοί όγκοι, δηλαδή οι μάζες κυττάρων που δημιουργούνται απ' τον μη φυσιολογικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μπορεί να είναι καλοήθεις ή κακοήθεις. Οι καλοήθεις όγκοι περιορίζονται στην αρχική τους θέση και δεν εξαπλώνονται ούτε εισβάλλουν σε περιβάλλοντες ιστούς όπως ένας κακοήθης. Επιπλέον, όταν αφαιρούνται, συνήθως δεν αναπτύσσονται ξανά. Ωστόσο, οι καλοήθεις όγκοι μπορεί μερικές φορές να είναι αρκετά μεγάλοι, ώστε να προκαλέσουν σοβαρά συμπτώματα ή να είναι απειλητικοί

για τη ζωή (π.χ. στον εγκέφαλο) (2). Τόσο οι καλοήθεις όσο και οι κακοήθεις όγκοι ταξινομούνται σύμφωνα με τον τύπο των κυττάρων από τα οποία προέρχονται σε i) καρκινώματα (όγκοι επιθηλιακών κυττάρων), ii) σαρκώματα (συμπαγείς όγκοι συνδετικού ιστού, των μυών, των οστών και των χόνδρων) και iii) λευχαιμίες (προέρχονται από τα κύτταρα του αίματος) και iv) λεμφώματα (προέρχονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος) (1).

1.2. Βασικά Χαρακτηριστικά του καρκίνου

Ο αλλοιωμένος ενδογενής μεταβολισμός των καρκινικών κυττάρων συνδέεται περίπλοκα με τα κύρια χαρακτηριστικά του καρκίνου. Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου προτάθηκαν από τους **Hanahan και Weinberg**, το 2000. Αναθεωρήθηκαν για πρώτη φορά το 2011 καταλήγοντας σε δέκα βασικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων (από τα έξι που ήταν αρχικά). Τελικά το 2022 προστέθηκαν τέσσερα νέα χαρακτηριστικά, φτάνοντας τελικά στα 14 θεμελιώδη χαρακτηριστικά (5, 6). Οι βασικές αυτές ιδιότητες που μπορεί να αποκτήσει ένα καρκινικό κύτταρο (**Σχήμα 1.1.**), είναι οι εξής:

1. Απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού

Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός αποτελεί το βασικότερο χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. Τα κύτταρα των φυσιολογικών ιστών ελέγχουν την παραγωγή και την απελευθέρωση σημάτων που προάγουν την ανάπτυξη, διασφαλίζοντας έτσι την ομοιόσταση του αριθμού των κυττάρων και συνεπώς τη διατήρηση της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής και λειτουργίας των ιστών. Στα καρκινικά κύτταρα, αυτά τα σήματα απορρυθμίζονται μέσω έκκρισης αυξητικών παραγόντων οι οποίοι δεσμεύονται σε υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και μέσω οδών σηματοδότησης ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη. Η παραγωγή των **αυξητικών παραγόντων** μπορεί να προέρχεται απ' τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα (αυτοκρινής πολλαπλασιαστική διέγερση). Εναλλακτικά, είτε καθίστανται υπερανταποκρινόμενα σε περιοριστικές ποσότητες προσδέματος (π.χ. λόγω δομικών αλλοιώσεων υποδοχέα), είτε ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια, παρακάπτουν την ανάγκη ενεργοποίησης αυτών των οδών μέσω ενεργοποίησης υποδοχέα.

2. Αποφυγή αναστολέων ανάπτυξης

Η αυτοδυναμία σε αυξητικά σήματα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη δράση των **ογκοκατασταλτικών γονιδίων**. Τα κυριότερα ογκοκατασταλτικά γονίδια κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες **RB** (σχετιζόμενες με το ρετινοβλάστωμα) και **TP53**. Η πρωτεΐνη RB ενσωματώνει σήματα από διάφορες εξωκυτταρικές και ενδοκυτταρικές πηγές και, ως απόκριση, διακρίνει εάν ένα κύτταρο πρέπει να προχωρήσει ή όχι σε κυτταρική ανάπτυξη. Το TP53 λαμβάνει ερεθίσματα λόγω στρες ή ανωμαλιών σε ενδοκυτταρικά λειτουργικά συστήματα και μπορεί να σταματήσει την περαιτέρω εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέχρι να επιστρέψει το κύτταρο σε φυσιολογικές συνθήκες.

3. Μη μεταλλαξιγόνες επιγενετικές τροποποιήσεις

Ένας ανεξάρτητος τρόπος επαναπρογραμματισμού του γονιδιώματος που περιλαμβάνει καθαρά επιγενετικά ρυθμιζόμενες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, θα μπορούσε να ονομαστεί «μη μεταλλαξιγόνος επιγενετικός επαναπρογραμματισμός». Πρόκειται για έναν κεντρικό μηχανισμό που μεσολαβεί στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, διαφοροποίηση και οργανογένεση. Στον ενήλικα, για παράδειγμα, η μακροπρόθεσμη μνήμη περιλαμβάνει αλλαγές στην τροποποίηση γονιδίων και ιστόνης, στη δομή της χρωματίνης και στην ενεργοποίηση διακοπών έκφρασης γονιδίων που διατηρούνται σταθερά με την πάροδο του χρόνου. Ανάλογες επιγενετικές αλλοιώσεις μπορούν να συμβάλουν στην απόκτηση χαρακτηριστικών κατά την ανάπτυξη του όγκου.

4. Διαφυγή από το ανοσοποιητικό σύστημα

Ο ρόλος της ελαττωματικής ανοσολογικής παρακολούθησης των όγκων φαίνεται να επικυρώνεται από τις εντυπωσιακές αυξήσεις ορισμένων τύπων καρκίνου σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Ωστόσο, η μεγάλη πλειοψηφία αυτών είναι καρκίνοι που προκαλούνται από ιούς, υποδηλώνοντας ότι μεγάλο μέρος του ελέγχου αυτής της κατηγορίας καρκίνου εξαρτάται κανονικά από τη μείωση του ιικού φορτίου σε μολυσμένα άτομα, εν μέρει μέσω της εξάλειψης των μολυσμένων από τον ιό κυττάρων.

5. Αντίσταση σε σήματα που αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Τα τελομερή προστατεύουν τα άκρα των χρωμοσωμάτων και παίζουν κεντρικό ρόλο στην ικανότητα για απεριόριστο πολλαπλασιασμό. Αποτελούνται από διαδοχικές επαναλήψεις εξανουκλεοτιδίων, οι οποίες βραχύνονται προοδευτικά σε μη αθανатоποιημένα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται σε καλλιέργεια, χάνοντας τελικά την ικανότητα να προστατεύουν τα άκρα των χρωμοσωμικών DNA από συντήξεις από άκρο σε άκρο. Στα καρκινικά κύτταρα αναστέλλεται η φυσικά προκαλούμενη μείωση του μήκους των τελομερών. Η τελομεράση, ένα ένζυμο με δράση DNA πολυμεράσης, το οποίο επεκτείνει τα τελομερή, φαίνεται να υπερεκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα.

6. Επαγόμενη φλεγμονή

Τα φλεγμονώδη κύτταρα μπορούν να απελευθερώσουν χημικές ουσίες, κυρίως αντιδραστικά είδη οξυγόνου, που είναι ενεργά μεταλλαξιγόνα για τα κοντινά καρκινικά κύτταρα, επιταχύνοντας τη γενετική τους εξέλιξη προς καταστάσεις αυξημένης κακοήθειας. Τα καρκινικά κύτταρα προμηθεύονται με βιοδραστικά μόρια όπως κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες και παράγοντες που επάγουν την αγγειογένεση, με αποτέλεσμα να ευνοείται η ανάπτυξή τους, αντί να επιβραδύνεται. Τέλος, η παρατεταμένη έκθεσή τους στο περιβάλλον αυτό τα καθιστά εν τέλει ανθεκτικά στην εξάλειψη από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

7. Πολυμορφικά μικροβιώματα

Το «μικροβίωμα», όπως είναι γνωστό, μπορεί να έχει μεγάλο αντίκτυπο στην υγεία αλλά και στις ασθένειες. Η μεταβλητότητα στο μικροβίωμα μεταξύ των ατόμων σε έναν

πληθυσμό μπορεί να έχει επίδραση στους φαινοτύπους του καρκίνου. Έχει αποδειχτεί πως συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί, κυρίως αλλά όχι αποκλειστικά βακτήρια, μπορεί να έχουν προστατευτικές ή επιβλαβείς επιδράσεις στην ανάπτυξη καρκίνου, την κακοήθη εξέλιξη αλλά και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Ένας μηχανισμός με τον οποίο συγκεκριμένοι πληθυσμοί βακτηρίων μπορεί να προωθήσουν την καρκινογένεση και τη συντήρηση ευνοϊκού περιβάλλοντος για τα νεοπλασματικά κύτταρα χαρακτηρίζεται ως δυσβίωση, μέσω της οποίας βακτήρια και μύκητες του μικροβιώματος προκαλούν χρόνια τοπική φλεγμονή λόγω διαταραχών που προκαλούν στο επιθήλιο, όπως η αποικοδόμηση του βλεννογόνου, αλλά είναι δυνατόν να έχουν και άμεσα τοξική δράση ως προς το γενετικό υλικό μέσω τοξινών που εκκρίνουν.

8. Επαγωγή διεισδυτικότητας στους ιστούς και μετάσταση

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου σε υψηλότερους παθολογικούς βαθμούς κακοήθειας, με τοπική διήθηση και απομακρυσμένες μεταστάσεις, τα αναπτυσσόμενα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν συνήθως αλλαγές στο σχήμα τους καθώς και στην προσκολλητική τους ικανότητα σε άλλα κύτταρα και στον εξωκυττάριο χώρο (ECM). Η πιο καλά χαρακτηρισμένη αλλοίωση είναι η απώλεια της **E-καντερίνης** (βασικό μόριο προσκόλλητης) από τα καρκινικά κύτταρα. Μείωση της έκφρασης της E-καντερίνης ενισχύει τη διήθηση στους ιστούς και τη μετάσταση. Αντίθετα, η **N-καντερίνη** συνδέεται με την κυτταρική μετάσταση. Η διαδικασία της μετάστασης περιγράφεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 3.2.

9. Επαγωγή αγγειογένεσης

Όπως οι φυσιολογικοί ιστοί, έτσι και οι όγκοι απαιτούν την παροχή θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου, καθώς και την ικανότητα να απομακρύνουν τα μεταβολικά απόβλητα και το διοξείδιο του άνθρακα. Αυτές οι ανάγκες καλύπτονται μέσω του νεοαγγειακού συστήματος που δημιουργείται από τη διαδικασία της αγγειογένεσης. Η αγγειογένεση λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, αλλά και στους ενήλικες σε φυσιολογικές διεργασίες, όπως η επούλωση τραυμάτων (παροδικά). Κατά την διάρκεια της εξέλιξης του όγκου ο μηχανισμός της αγγειογένεσης είναι σχεδόν πάντοτε ενεργός. Η πρόκληση της αγγειογένεσης οφείλεται συχνά στην έκκριση παραγόντων από τα καρκινικά κύτταρα που επάγουν τη διαδικασία αυτή όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας A (**VEGF-A**).

10. Κυτταρική γήρανση

Η γήρανση των κυττάρων μπορεί να προκληθεί από μια ποικιλία παραγόντων, όπως είναι για παράδειγμα οι συνθήκες stress λόγω στέρησης θρεπτικών ουσιών, η βλάβη του DNA, η βλάβη σε οργανίδια και οι ανισορροπίες στην κυτταρική σηματοδότηση. Ενώ είχε θεωρηθεί αρχικά ως προστατευτικός μηχανισμός έναντι της νεοπλασίας, εφόσον προκαλεί διακοπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αυξανόμενα στοιχεία αποκαλύπτουν ακριβώς το αντίθετο. Εκτός από τον τερματισμό της κυτταρικής διαίρεσης, η κυτταρική γήρανση προκαλεί αλλαγές στη μορφολογία και στο μεταβολισμό των κυττάρων. Συγκεκριμένα οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός σχετιζόμενου με τη γήρανση εκκριτικού φαινοτύπου

(**SASP** – senescence associated secretory phenotype) που περιλαμβάνει την απελευθέρωση μιας πληθώρας βιοδραστικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των χημειοκινών, κυτταροκινών και πρωτεασών η φύση των οποίων σχετίζεται με τον ιστό προέλευσής τους. Η έκκριση αυτών των ενζύμων μπορεί να τροποποιήσει τον εξωκυττάριο χώρο έτσι ώστε να διευκολύνεται η κυτταρική κινητικότητα και η είσοδος του καρκινικού κυττάρου στην κυκλοφορία, προάγοντας έτσι τη μεταστατική διαδικασία.

11. Γενετική αστάθεια και μεταλλάξεις

Η απόκτηση πολλών από τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από διαδοχικές αλλοιώσεις στο γονιδίωμα των νεοπλασματικών κυττάρων. Η γενετική αστάθεια καλύπτει όλο το φάσμα των ανωμαλιών που έχουν να κάνουν με το γενετικό υλικό και εκτείνεται από τις σημειακές μεταλλάξεις (π.χ. λόγω παρατεταμένης έκθεσης σε μεταλλαξιγόνους παράγοντες) μέχρι τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες που μπορούν να οδηγήσουν στην αποσιώπηση ογκοκατασταλατικών γονιδίων ή στην αύξηση της έκφρασης ογκογονιδίων.

12. Διαφυγή από τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο – απόπτωση

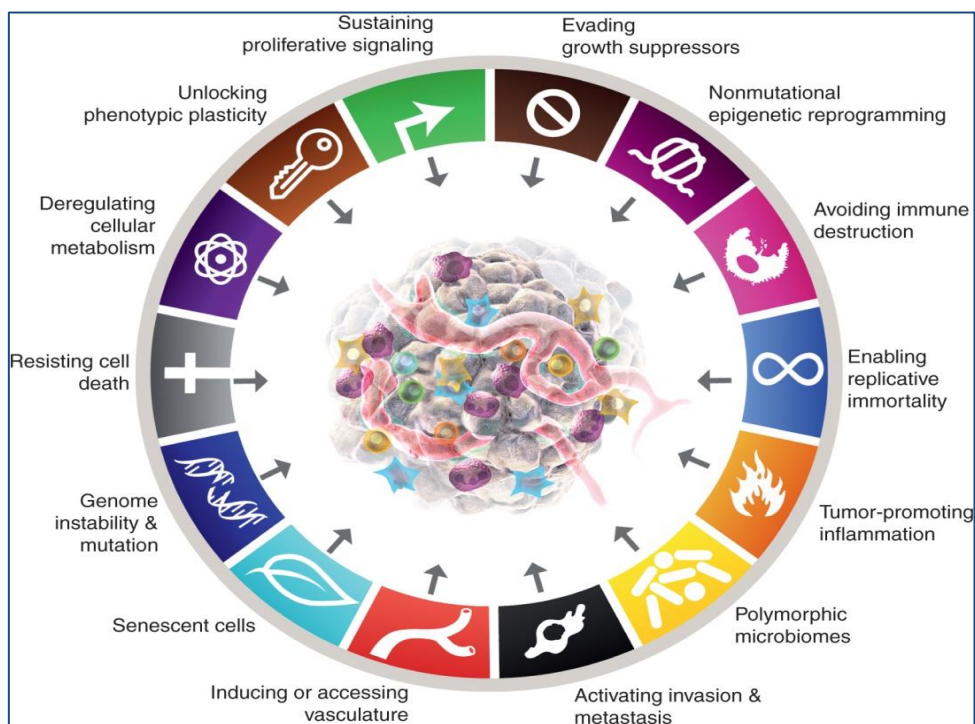
Η απόπτωση πυροδοτείται ως απόκριση σε διάφορες φυσιολογικές πιέσεις που αντιμετωπίζουν τα καρκινικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης ή ως αποτέλεσμα της αντικαρκινικής θεραπείας. Τις τελευταίες δεκαετίες, έχει καθιερωθεί η ιδέα ότι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος μέσω της απόπτωσης χρησιμεύει ως φυσικό εμπόδιο στην ανάπτυξη του καρκίνου. Ωστόσο, σύμφωνα με άλλες έρευνες, η απόπτωση εξασθενεί σε όγκους οι οποίοι επιτυγχάνουν να εξελιχθούν σε καταστάσεις υψηλού βαθμού κακοήθειας και αντοχής στη θεραπεία. Οι ρυθμιστές της απόπτωσης διακρίνονται σε εκείνους που λαμβάνουν και επεξεργάζονται εξωκυτταρικά σήματα προκαλώντας κυτταρικό θάνατο (π.χ. **Fas** / Fas ligand) και σε εκείνους που ανιχνεύουν ενδοκυτταρικά σήματα. Καθεμία απ' αυτές τις κατηγορίες κορυφώνεται με την ενεργοποίηση μιας κανονικά λανθάνουσας πρωτεΐνης (κασπάση 8 και 9, αντίστοιχα), η οποία προχωρά σε έναν καταρράκτη πρωτεόλυσης τελεστών υπεύθυνων για την απόπτωση. Ο έλεγχος αυτής της διαδικασίας γίνεται με την εξισορρόπηση των προ- και αντιαποπτωτικών μελών της οικογένειας των ρυθμιστικών πρωτεϊνών **Bcl-2**, οι οποίοι δρουν σε μεγάλο βαθμό δεσμεύοντας και έτσι καταστέλλοντας δύο προαποπτωτικές πρωτεΐνες πυροδότησης (Bax και Bak) που είναι ενσωματωμένες στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Όταν οι Bax και Bak δεν αναστέλλονται, διαταράσσουν την ακεραιότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και προκαλούν απελευθέρωση προαποπτωτικών πρωτεϊνών σηματοδότησης, η πιο σημαντική από τις οποίες είναι το **κυτόχρωμα c**. Αυτό με τη σειρά του, ενεργοποιεί έναν καταρράκτη κασπασών που δρουν μέσω των πρωτεολυτικών δραστηριοτήτων τους για να επάγουν τις πολλαπλές κυτταρικές αλλαγές που σχετίζονται με το αποπτωτικό πρόγραμμα.

13. Απορρύθμιση κυτταρικού μεταβολισμού

Η πρώτη αλλαγή που σχετίζεται με τον όγκο, ο αλλοιωμένος μεταβολισμός, ανακαλύφθηκε από το νικητή του βραβείου Νόμπελ Otto Warburg τη δεκαετία του 1920. Το «φαινόμενο Warburg» περιγράφει την αύξηση της γλυκόλυσης που διατηρείται ακόμη και σε συνθήκες υψηλής παροχής οξυγόνου («αερόβια γλυκόλυση») και προκαλεί αυξημένη παραγωγή γαλακτικού οξέος. Τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν αυξημένες ποσότητες γλυκόζης ως πηγή άνθρακα για αναβολικές αντιδράσεις. Συνεπώς, ολόκληρος ο μεταβολισμός αναδιοργανώνεται για να αυξήσει τις αναβολικές αντιδράσεις που συνδέονται με την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (7).

14. Φαινοτυπική πλαστικότητα

Το τελικό αποτέλεσμα της κυτταρικής διαφοροποίησης, όπως παρατηρείται και κατά τη διάρκεια της οργανογένεσης, είναι η διακοπή της ανάπτυξης των προγονικών κυττάρων, γεγονός που αποτελεί σαφές εμπόδιο στο συνεχιζόμενο πολλαπλασιασμό που είναι απαραίτητος για τη νεοπλασία. Αυξανόμενες ενδείξεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το ξεκλείδωμα της ικανότητας για φαινοτυπική πλαστικότητα προκειμένου το καρκινικό κύτταρο να αποφύγει την κατάσταση τερματικής διαφοροποίησης (π.χ. είτε μέσω αποδιαφοροποίησης πίσω σε καταστάσεις που μοιάζουν με προγονικά κύτταρα, είτε διατηρώντας τα κύτταρα σε μια μερικώς διαφοροποιημένη κατάσταση, είτε αλλάζοντας εντελώς μονοπάτι διαφοροποίησης αποκτώντας χαρακτηριστικά ειδικά για τον ιστό που όμως δεν είχαν προκαθοριστεί από τα φυσιολογικά κύτταρα προέλευσης τους) είναι ένα κρίσιμο συστατικό της παθογένεσης του καρκίνου.



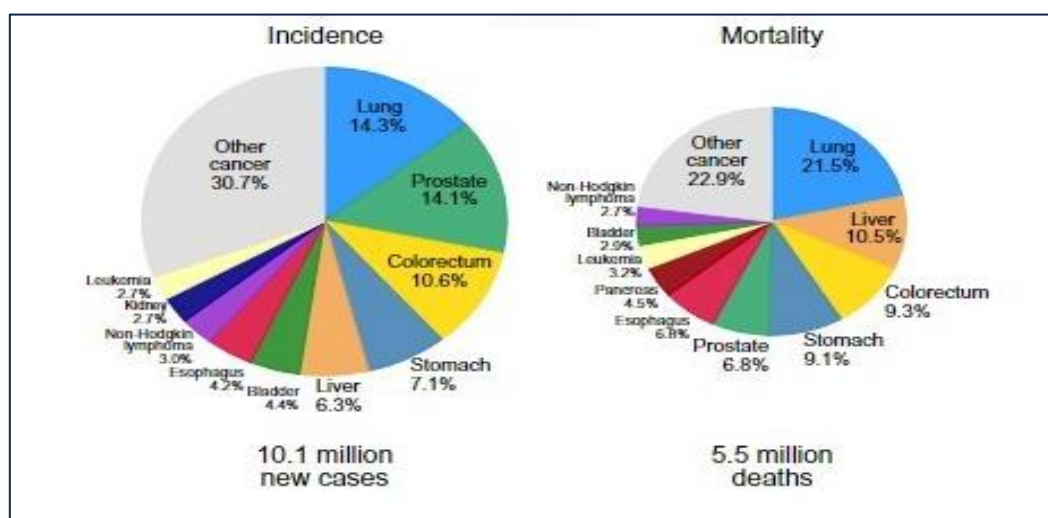
Σχήμα 1.1.: Τα 14 θεμελιώδη χαρακτηριστικά του καρκίνου (6).

1.3. Ο καρκίνος του προστάτη

1.3.1. Επιδημιολογικά στοιχεία

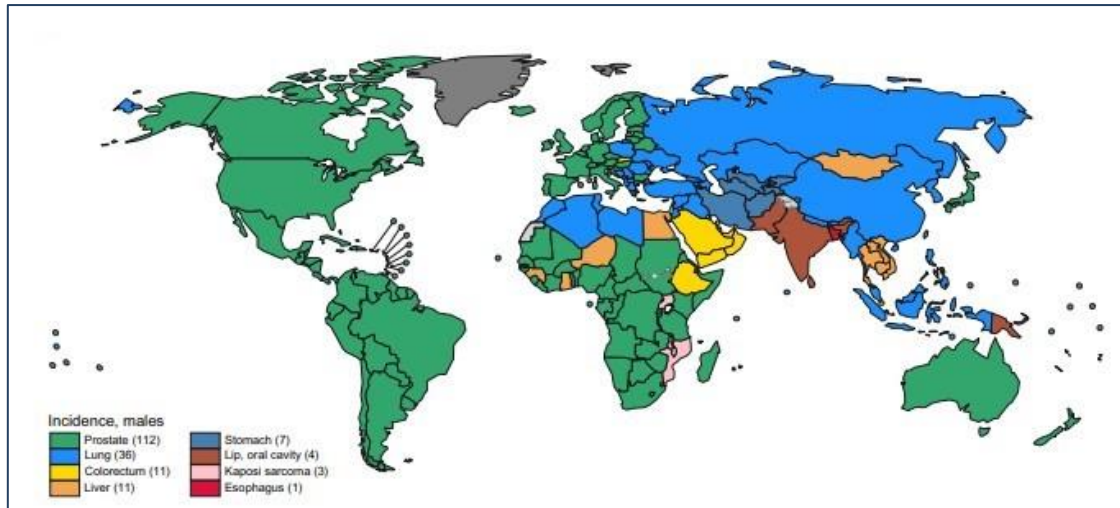
Ο καρκίνος αποτελεί μια πολυπαραγοντική νόσο και παραμένει σημαντικό παγκόσμιο πρόβλημα δημόσιας υγείας. Κατατάσσεται ως η κύρια αιτία θανάτου και σημαντικό εμπόδιο στην αύξηση του προσδόκιμου ζωής σε κάθε χώρα του κόσμου. Η αυξανόμενη προβολή του καρκίνου ως κύρια αιτία θανάτου αντανακλά εν μέρει την έντονη μείωση των ποσοστών θνησιμότητας από εγκεφαλικά επεισόδια και στεφανιαία νόσο, σε σχέση με τον καρκίνο, σε πολλές χώρες (8). Υπολογίζεται ότι 609.360 άνθρωποι στις Η.Π.Α. θα πεθάνουν από καρκίνο το 2022, που αντιστοιχεί σε σχεδόν 1.700 θανάτους την ημέρα. Ο μεγαλύτερος αριθμός θανάτων προέρχεται από καρκίνο του πνεύμονα, του προστάτη και του παχέος εντέρου στους άνδρες, ενώ στις γυναίκες από καρκίνο του πνεύμονα, του μαστού και του παχέος εντέρου (9).

Με περίπου 1,4 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις και 375.000 θανάτους παγκοσμίως, ο **καρκίνος του προστάτη** είναι ο δεύτερος σε συχνότητα καρκίνος και η πέμπτη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες, όπως απεικονίζεται στο **Σχήμα 1.2.**



Σχήμα 1.2.: Συνολικοί αριθμοί περιπτώσεων καρκίνου (αριστερά) και θανάτων από καρκίνο (δεξιά) στους άνδρες το 2020 (8).

Τα υψηλότερα ποσοστά επίπτωσης βρέθηκαν στη Βόρεια και Δυτική Ευρώπη, την Καραϊβική, την Αυστραλία/Νέα Ζηλανδία, Βόρεια Αμερική και Νότια Αφρική, ενώ χαμηλότερα ποσοστά αναφέρονται στην Ασία και τη Βόρεια Αφρική (**Σχήμα 1.3.**). Ωστόσο, τα ποσοστά θνησιμότητας ακολουθούν διαφορετική κατανομή, με τα μεγαλύτερα ποσοστά να αναφέρονται στην Καραϊβική, την υποσαχάρια Αφρική και Μικρονησία/Πολυνησία.



Σχήμα 1.3.: Απεικονίζεται ο πιο συχνά εντοπισμένος καρκίνος σε κάθε χώρα, μεταξύ των ανδρών (με πράσινο χρώμα παρουσιάζονται οι χώρες που ο καρκίνος του προστάτη είναι ο συχνότερα διαγνωσμένος) (8).

Οι διεθνείς διαφορές στις διαγνωστικές πρακτικές του καρκίνου του προστάτη είναι πιθανώς ο μεγαλύτερος παράγοντας στη διακύμανση των ποσοστών εμφάνισης καρκίνου του προστάτη παγκοσμίως. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, τον Καναδά και την Αυστραλία, υπήρξαν ραγδαίες αυξήσεις στα ποσοστά επίπτωσης στα τέλη της δεκαετίας του 1980 και στις αρχές της δεκαετίας του 1990 ως αποτέλεσμα της ευρείας εισαγωγής των ειδικών για τον προστάτη δοκιμή αντιγόνου (PSA), που επιτρέπει την ανίχνευση προκλινικών καρκίνων.

1.3.2. Παράγοντες κινδύνου

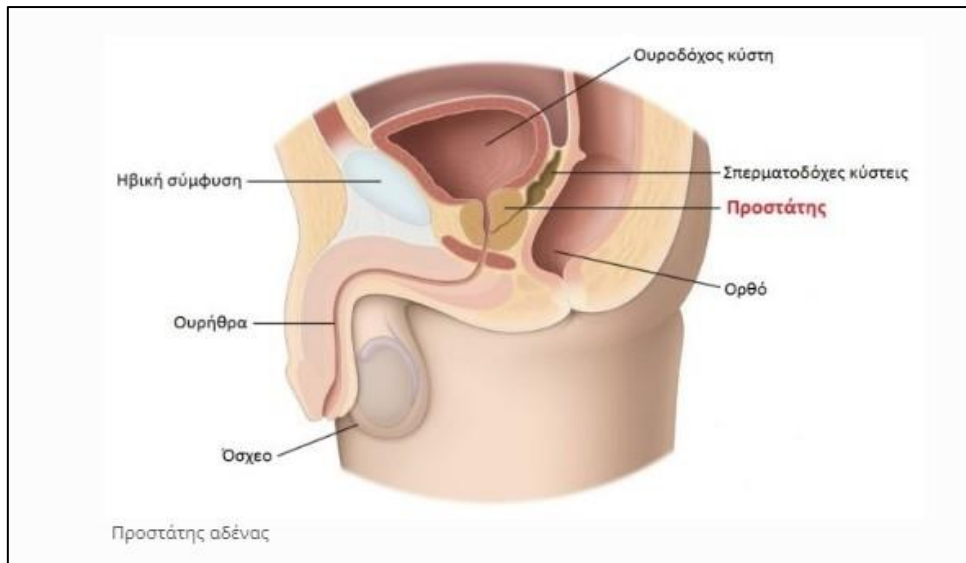
Αν και ο καρκίνος του προστάτη παρουσιάζει μεγάλη επίπτωση σε αρκετές χώρες, λίγα είναι γνωστά για τους παράγοντες κινδύνου. Οι διαπιστωμένοι παράγοντες κινδύνου περιορίζονται στην προχωρημένη ηλικία, στο οικογενειακό ιστορικό αυτής της κακοήθειας και ορισμένες **γενετικές μεταλλάξεις** (π.χ. BRCA1 και BRCA2) και καταστάσεις (σύνδρομο Lynch). Επιπλέον, παράγοντες του τρόπου ζωής και του περιβάλλοντος, όπως το κάπνισμα, το υπερβολικό σωματικό βάρος και ορισμένοι διατροφικοί παράγοντες, πιθανολογείται ότι μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο προχωρημένου καρκίνου του προστάτη. Πιο συγκεκριμένα, οι παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου του προστάτη είναι οι εξής (10,11) :

- **Ηλικία.** Ο καρκίνος του προστάτη σπάνια εμφανίζεται σε άνδρες κάτω των 40 ετών, όμως η πιθανότητα αυτή αυξάνεται σημαντικά μετά την ηλικία των 50 χρόνων. Τέλος, Περισσότερο από 75% των περιπτώσεων του καρκίνου του προστάτη παρουσιάζεται σε άνδρες μεγαλύτερους από 65 ετών.

- **Φυλή ή εθνικότητα.** Ο καρκίνος του προστάτη εμφανίζεται πιο συχνά στους Αφροαμερικανούς άνδρες και σε άνδρες της Καραϊβικής αφρικανικής καταγωγής παρά σε άνδρες άλλων φυλών. Οι λόγοι γι' αυτές τις διαφορές δεν είναι ξεκάθαροι.
- **Οικογενειακό ιστορικό.** Οι περισσότεροι τύποι καρκίνου του προστάτη εμφανίζονται σε άνδρες χωρίς οικογενειακό ιστορικό. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις φαίνεται να παίζει ρόλο κάποιος κληρονομικός ή γενετικός παράγοντας, καθώς η ύπαρξη πατέρα ή αδερφού με καρκίνο του προστάτη υπερδιπλασιάζει τον κίνδυνο εμφάνισης αυτής της ασθένειας σε έναν άνδρα.
- **Διατροφή.** Η πλούσια σε ζωικά λίπη διαίτα και η παχυσαρκία αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη. Οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι τα λίπη αυξάνουν την παραγωγή της τεστοστερόνης, η οποία προάγει την ανάπτυξη των προστατικών καρκινικών κυττάρων. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι οι άνδρες που καταναλώνουν πολύ ασβέστιο (μέσω τροφών ή συμπληρωμάτων) μπορεί να έχουν υψηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του προστάτη.
- **Υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης.** Επειδή σε φυσιολογικές συνθήκες η τεστοστερόνη προωθεί την ανάπτυξη του προστάτη αδένος, άνδρες που έχουν υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης όπως αυτοί που υπογοναδισμό ή άνδρες που λαμβάνουν θεραπεία με τεστοστερόνη είναι πιο επιρρεπείς στην ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη σε σύγκριση με τους άνδρες που έχουν χαμηλότερα επίπεδα τεστοστερόνης. Μακροχρόνια θεραπεία με τεστοστερόνη θα μπορούσε να προκαλέσει υπερτροφία του προστάτη (καλοήγη υπερπλασία του προστάτη).

1.3.3. Ανατομία του προστάτη

Ο προστάτης είναι ένας μικρός εξωκρινής αδένος, που βρίσκεται μόνο στους άνδρες. Το μέγεθος του προστάτη μπορεί να αλλάξει με την πάροδο της ηλικίας. Στους νεότερους άνδρες, είναι περίπου στο μέγεθος ενός καρυδιού, αλλά μπορεί να είναι πολύ μεγαλύτερο σε άνδρες μεγαλύτερης ηλικίας. Βρίσκεται κάτω από την ουροδόχο κύστη (το κοίλο όργανο όπου αποθηκεύονται τα ούρα), μπροστά από το ορθό (το τελικό τμήμα του παχέος εντέρου) και περιβάλλει την αρχική μοίρα της ουρήθρας, όπως απεικονίζεται στο **Σχήμα 1.4**. Πίσω απ' τον προστάτη υπάρχουν αδένες που ονομάζονται σπερματοδόχες κύστεις και παράγουν το μεγαλύτερο μέρος του υγρού για το σπέρμα. Από τον προστάτη αδένος παράγεται ένα υγρό το οποίο, προστιθέμενο στο σπέρμα, εξασφαλίζει τη ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων και συνεπώς βοηθά στην αναπαραγωγή και τη γονιμοποίηση. Επιπλέον, παράγει ένα σημαντικό ένζυμο, το ειδικό προστατικό αντιγόνο (**PSA: Prostate - Specific Antigen**), το οποίο συμμετέχει στη ρευστοποίηση του σπέρματος (12, 13).



Σχήμα 1.4.: Ανατομία του προστάτη αδένος (13).

Σύμφωνα με τον Mc Neal, ο προστάτης μπορεί να χωριστεί δομικά σε διακριτές ζώνες: την περιφερική, την κεντρική και την μεταβατική ζώνη, που καταλαμβάνουν αντίστοιχα το 70%, 25% και 5% του αδενικού στοιχείου (13). Η ζώνη που βρίσκεται εξωτερικά (περιφερική ζώνη), είναι εκεί όπου εμφανίζονται οι περισσότεροι όγκοι του προστάτη (14). Αυτές οι ανατομικά καθορισμένες ζώνες έχουν διαφορετικά προφίλ γονιδιακής έκφρασης και οι βλάβες που προκύπτουν σε διαφορετικές ζώνες δείχνουν διαφορετικές τάσεις για ορισμένες γονιδιωματικές αλλοιώσεις (15). Ο καρκίνος του προστάτη (PCa) ξεκινά όταν τα κύτταρα στον αδένος του προστάτη αρχίζουν να αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα και στους περισσότερους τύπους καρκίνου του προστάτη πρόκειται για αδενοκαρκινώματα (12).

1.3.4. Εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη και θεραπεία

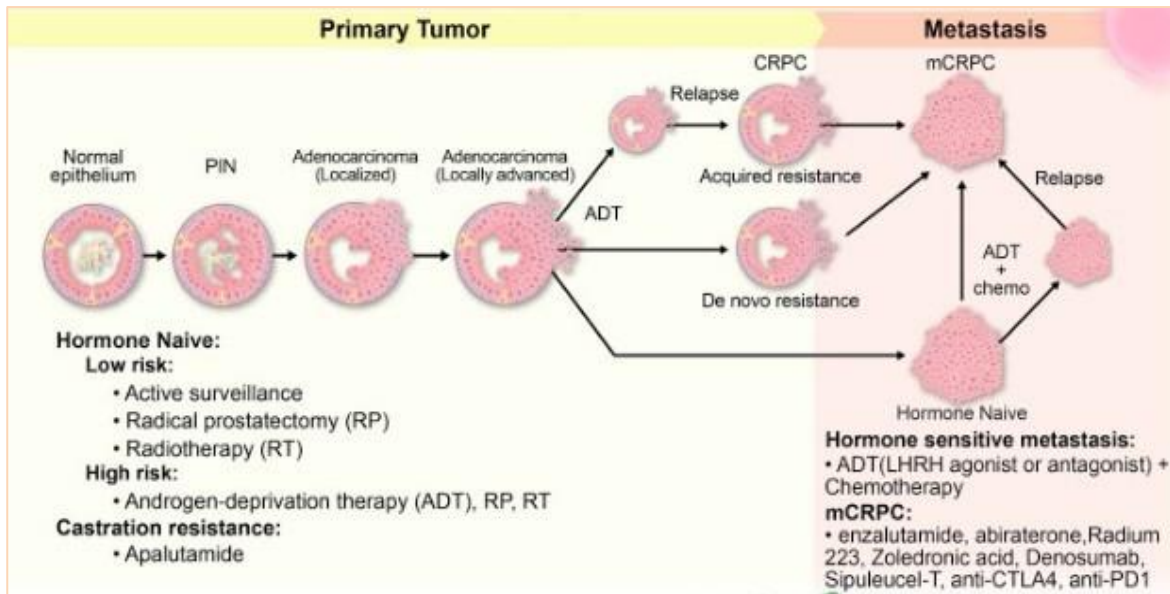
Τα κύτταρα που εκκινούν τον καρκίνο του προστάτη μπορεί να είναι βασικά ή αυλικά (basal or luminal) επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν βλάβες υψηλού βαθμού, όταν υποβάλλονται σε γενετική επεξεργασία (14). Ο κακοήθης μετασχηματισμός του προστάτη ακολουθεί μια διαδικασία πολλών σταδίων, η οποία ξεκινά ως προστατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (**PIN**: Prostatic intraepithelial neoplasia), ακολουθούμενη από εντοπισμένο αδενοκαρκίνωμα του προστάτη και στη συνέχεια προχωρημένο αδενοκαρκίνωμα με τοπική διήθηση, με αποκορύφωμα τον μεταστατικό καρκίνο του προστάτη (**Σχήμα 1.5.**). Η πρώτη θέση στην οποία υπάρχει μετάσταση είναι συνήθως οι λεμφαδένες, δίπλα απ' τους πρωτοπαθείς όγκους, οι οποίοι στη συνέχεια δίνουν μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα, συμπεριλαμβανομένων των οστών, του ήπατος και των πνευμόνων, με τα οστά να είναι το πιο συχνό σημείο μετάστασης. Στην οστική μετάσταση, υπάρχει μια δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ των καρκινικών κυττάρων, των οστεοβλαστών (οστική παραγωγή) και των οστεοκλαστών

(οστική απορρόφηση), η οποία οδηγεί σε έναν «φαύλο κύκλο» σχηματισμού και καταστροφής των οστών, μια διαδικασία που υποστηρίζει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και την ανάπτυξη του όγκου (16).

Η ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του προστάτη (PIN), εκδηλώνεται ως υπερπολλαπλασιασμός των επιθηλιακών κυττάρων του αυλού με μείωση ή απώλεια του βασικού επιθηλίου. Η υψηλού βαθμού PIN σχετίζεται με απώλεια βασικών δεικτών όπως το p63 (Tumor Protein p63- TP63) και οι κυτταροκερατίνες CK5 και CK14 και απόκτηση δεικτών αυλού όπως οι κυτταροκερατίνες CK8 και CK18 και η υπερέκφραση του ενζύμου άλφα-μεθυλοακετύλο-CoA ρακεμάση (alpha-methylacyl-CoA racemase- AMACR), το οποίο σχετίζεται με το αδενοκαρκίνωμα. Επιπλέον, το γονίδιο TMPRSS2 (Transmembrane Serine Protease 2) θεωρείται ότι συμμετέχει στη διαφοροποίηση του αυλού και μια σύντηξη της 5' αμετάφραστης περιοχής του TMPRSS2 με κωδική περιοχή του ERG (ETS Related Gene), ενός ογκογόνου μεταγραφικού παράγοντα, είναι η πιο κοινή χρωμοσωμική ανωμαλία που ανιχνεύεται στον καρκίνο του προστάτη και είναι υπεύθυνη για την ώθηση σε καρκινογένεση σε περισσότερο απ' το 50% των ασθενών (14). Επίσης, η υπερέκφραση ERG σε συνδυασμό με την αδρανοποίηση του PTEN (Phosphatase and tensin homolog), εμφανίζεται σε ασθενείς με PIN που εξελίσσουν αδενοκαρκίνωμα προστάτη (16).

Η ορμονική ανταπόκριση στον καρκίνο του προστάτη αποτελεί ένα βασικό χαρακτηριστικό του, το οποίο αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1941 από τους Huggins και Hodges. Εκείνοι ανέφεραν ότι ο ευνουχισμός (μείωση των επιπέδων ανδρογόνων), οδήγησε σε υποχώρηση του όγκου σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη. Η θεραπεία στέρησης ανδρογόνων (ADT: Androgen Deprivation Therapy) αποτελεί πλέον πρότυπο θεραπείας για τον καρκίνο του προστάτη. Η τρέχουσα ADT περιλαμβάνει χειρουργικό ευνουχισμό (αμφοτερόπλευρη ορχεκτομή) ή φαρμακευτικό, χρησιμοποιώντας αγωνιστές ή ανταγωνιστές της εκλυτικής ωχρινοτρόπου ορμόνης (LHRH: Luteinizing hormone-releasing hormone) με ή χωρίς φάρμακα κατά των ανδρογόνων (αντιανδρογόνα) (16, 17).

Μπορεί όμως να αναπτυχθεί αντίσταση στην ADT, με αποτέλεσμα ορμονοάντοχο καρκίνο του προστάτη (CRPC) ή μεταστατικό CRPC (mCRPC) (16). Οι αλλαγές στη σηματοδότηση του υποδοχέα των ανδρογόνων (AR: Androgen Receptor) προσδίδουν αντίσταση στη θεραπεία στέρησης ανδρογόνων. Επιπλέον, παραλλαγές ματίσματος μεταγραφής AR που ενεργοποιούν συστατικά τον AR, όπως το AR-V7, εκφράζονται επίσης σε ασθενείς με mCRPC. Συλλογικά, μια απώλεια εξάρτησης από τη σηματοδότηση AR εμφανίζεται στο 15-20% των προχωρημένων, ανθεκτικών στη θεραπεία καρκίνων του προστάτη και μπορεί να εκδηλωθεί ως μετατροπή σε νευροενδοκρινικό καρκίνο του προστάτη (NEPC: Neuroendocrine prostate cancer), ο οποίος είναι εξαιρετικά ανθεκτικός στη θεραπεία (13).



Σχήμα 1.5. :Στάδια εξέλιξης καρκίνου του προστάτη και τελικά ανάπτυξη mCRPC (15).

Οι σημαντικότερες γενετικές αλλοιώσεις στοχεύουν σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις μεταστατικού καρκίνου του προστάτη, αλλά και σε μεγάλο αριθμό πρωτοπαθών όγκων του προστάτη, τα μονοπάτια σηματοδότησης AR, PI3K-PTEN, WNT αλλά και επιδιόρθωσης DNA (16). Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας του PTEN συμβαίνουν σε περισσότερο από το 40% όλων των περιπτώσεων mCRPC. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης WNT και η υπερέκφραση του ογκογονιδίου MYC είναι επίσης συχνές, και εμφανίζονται στο 20-30% όλων των περιπτώσεων mCRPC. Τα γονίδια απόκρισης βλάβης στο DNA (DDR DNA damage response genes) διαδραματίζουν επίσης βασικό ρόλο στον καρκίνο του προστάτη. Οι άνδρες με μεταλλάξεις BRCA1 ή BRCA2 βλαστικής σειράς έχουν τρεις έως οκτώ φορές υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη κατά τη διάρκεια της ζωής τους (14).

Όσον αφορά την κλινική ανίχνευση του PCa, το PSA είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος βιοδείκτης. Ωστόσο, αυξημένο PSA εντοπίστηκε επίσης σε φλεγμονώδεις ασθένειες όπως η καλοήθης υπερπλασία του προστάτη (BPH: Benign prostatic hyperplasia). Όμως, παρά την έλλειψη ειδικότητας του PSA, που συνεπάγεται υψηλό ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, παραμένει, σε συνδυασμό με την ψηφιακή ορθική εξέταση (DRE: digital rectal examination), το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο προσυμπτωματικού ελέγχου για τον PCa (18). Επομένως, απαιτείται ανάπτυξη ευαίσθητων και ειδικών βιοδεικτών για τη διάγνωση των ασθενών σε πρώιμο στάδιο και την παρακολούθηση της εξέλιξης του καρκίνου.

Το θεμέλιο της συστηματικής θεραπείας για τον μεταστατικό καρκίνο του προστάτη, είναι η μείωση της κυκλοφορούσας τεστοστερόνης μέσω φαρμακευτικού ή χειρουργικού ευνουχισμού. Μέχρι το 2004, η πρόοδος στη θεραπεία στέρησης ανδρογόνων (ADT) για τον μεταστατικό ορμονοάντοχο καρκίνο του προστάτη (mCRPC) αντιμετώπιστηκε με την

προσθήκη δευτερογενούς ορμονικής χειραγώγησης, συμπεριλαμβανομένων αντιανδρογόνων όπως η βικαλουταμίδη και η νιλουταμίδη, η κετοκοναζόλη και τα κορτικοειδή. Η μιτοξαντρόνη (mitoxantrone) ήταν ο πρώτος θεραπευτικός παράγοντας που εγκρίθηκε για τον mCRPC από τον FDA, με βάση τη βελτιωμένη ανακούφιση, αλλά πλέον έχει αντικατασταθεί σε μεγάλο βαθμό από πιο αποτελεσματικές χημειοθεραπείες, όπως η δοσεταξέλη (docetaxel) (14, 19).

Πέρα απ' τη δοσεταξέλη, η οποία εγκρίθηκε από τον FDA για ασθενείς με mCRPC το 2004, ακολούθησε έγκριση πέντε νέων φαρμάκων ως το 2014, τα οποία είναι τα εξής (17, 20):

- Το Sipuleucel-T (2010)

Πρόκειται για μία κυτταρική ανοσοθεραπεία που αποτελείται από αυτόλογα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί in vitro από μια ανασυνδιασμένη.

- Η καρμπαζιταξέλη (Cabazitaxel - 2010)

Η καρμπαζιταξέλη ανήκει στην οικογένεια των ταξανών. Εγκρίθηκε απ' τον FDA ως θεραπεία δεύτερης γραμμής σε ασθενείς με mCRPC που παρουσίασαν πρόοδο μετά από δοσεταξέλη.

- Η αμπιρατερόνη (Abiraterone -2011)

Η αμπιρατερόνη αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα της σύνθεσης των ανδρογόνων, μπλοκάροντας το κυτόχρωμα CYP17A1, το οποίου η ενζυμική δραστηριότητα χρησιμοποιείται στο προτελευταίο βήμα για την παραγωγή τεστοστερόνης. Συνεπώς, αυτό το φάρμακο αναστέλλει τη βιοσύνθεση των ανδρογόνων στα επινεφρίδια, τους όρχεις και τον ίδιο τον όγκο.

- Η ενζαλουταμίδη (Enzalutamide - 2012)

Η ενζαλουταμίδη αποτελεί ένα αντιανδρογόνο. Δεσμεύεται στον υποδοχέα των ανδρογόνων (AR), παρεμποδίζοντας έτσι την σύνδεση της τεστοστερόνης και της διυδροτεστοστερόνης. Αυτό το φάρμακο εγκρίθηκε από τον FDA το 2012 για mCRPC με εξέλιξη μετά τη δοσεταξέλη. Παρουσιάζει τις ίδιες ενδείξεις με την αμπιρατερόνη, έχοντας παρόμοια επίδραση στη συνολική επιβίωση.

- Το ράδιο-223 (Radium-223 - 2013)

Το Ράδιο- 223 αποτελεί ένα ισότοπο με επιλεκτική δράση στα οστά, μέσω εκπομπής σωματιδίων-άλφα, το οποίο «μιμείται» το ασβέστιο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

«ΜΑΚΡΙΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ RNAs, lncRNAs»

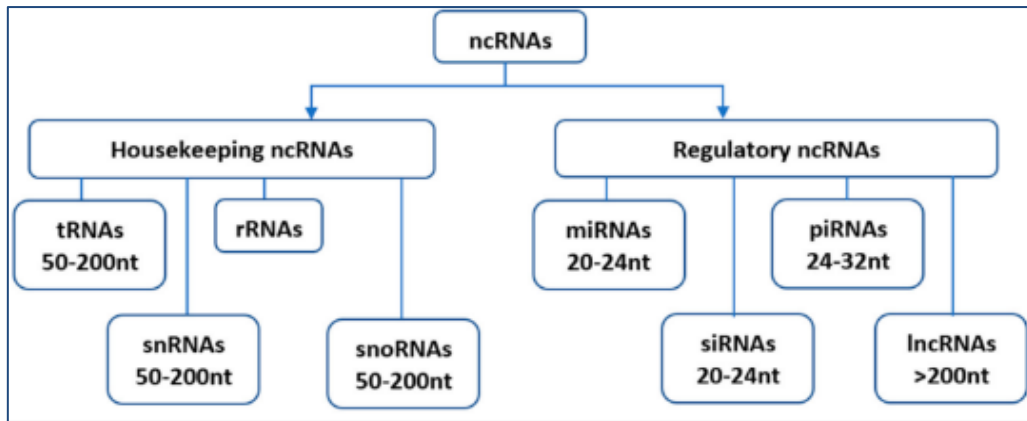
2.1. Εισαγωγή – Μη κωδικά RNAs

Κατά τη διάρκεια του έργου της «Εγκυκλοπαίδειας των στοιχείων του DNA (ENCODE)» και με τη βοήθεια των πρόσφατων εξελίξεων στις τεχνολογίες αλληλούχησης, αποκαλύφθηκε πως ενώ το 70-80% των γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος μεταγράφεται, μόνο ένα πολύ χαμηλό ποσοστό (~ 2%) περιλαμβάνει γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (mRNA), υποδηλώνοντας ότι η πλειονότητα των μεταγράφων RNA είναι μη κωδικά (non coding RNAs – ncRNAs) (21, 22, 23).

Ενώ παλαιότερα είχαν θεωρηθεί ως « junk DNA », επί του παρόντος, και εφόσον πρόκειται για ένα τόσο μεγάλο πληθυσμό ncRNAs, τα αυξανόμενα στοιχεία υποδηλώνουν τον τεράστιο αντίκτυπο που έχουν σε αρκετές βιολογικές διεργασίες. Επιπλέον, η ποσότητα των ncRNAs σε έναν οργανισμό έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με την πολυπλοκότητά του, υποδηλώνοντας μια τεράστια επιρροή των ncRNAs στην ανάπτυξη και οργάνωση ζώων ανώτερης δομής (24).

Τα ncRNA διακρίνονται σε « housekeeping ncRNAs » και ρυθμιστικά RNAs, με βάση τις λειτουργίες τους (**Σχήμα 2.1.**). Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται το μεταφορικό RNA (tRNA), το μικρό πυρηνικό RNA (small nuclear RNA - snRNA), το μικρό RNA του πυρηνίσκου (small nucleolar RNA - snoRNA) και το ριβοσωμικό RNA (rRNA), τα οποία εκφράζονται συνήθως με συστηματικό τρόπο και είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου (22, 23).

Τα ρυθμιστικά ncRNAs ανακαλύφθηκαν τη δεκαετία του 1990 και έχει παρατηρηθεί πως μπορούν να ρυθμίσουν τη γονιδιακή έκφραση σε επιγενετικό, μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο (23, 25, 26). Η εκτίμηση του μήκους των ρυθμιστικών ncRNAs αποτελεί το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο χαρακτηριστικό για την ταξινόμησή τους. Τα 200 νουκλεοτίδια (nt) έχουν οριστεί αυθαίρετα ότι διαχωρίζουν τα μακριά (long non-coding RNAs – lncRNAs) απ' τα βραχέα ncRNA (small non-coding RNAs - sncRNAs) (27, 28). Τα sncRNAs (< 200 nt) περιλαμβάνουν τα microRNAs (miRNAs), μήκους περίπου 21-24 nt, καθώς και άλλες κατηγορίες, όπως τα RNA που αλληλεπιδρούν με piwi (piwi-interacting RNAs - piRNAs) και τα μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (small interfering RNA - siRNAs) (21, 23). Ορισμένα ncRNAs με μεταβλητό μήκος μπορεί να ανήκουν σε δύο ταξινομήσεις ταυτόχρονα, όπως τα κυκλικά RNAs (circRNAs) (26).



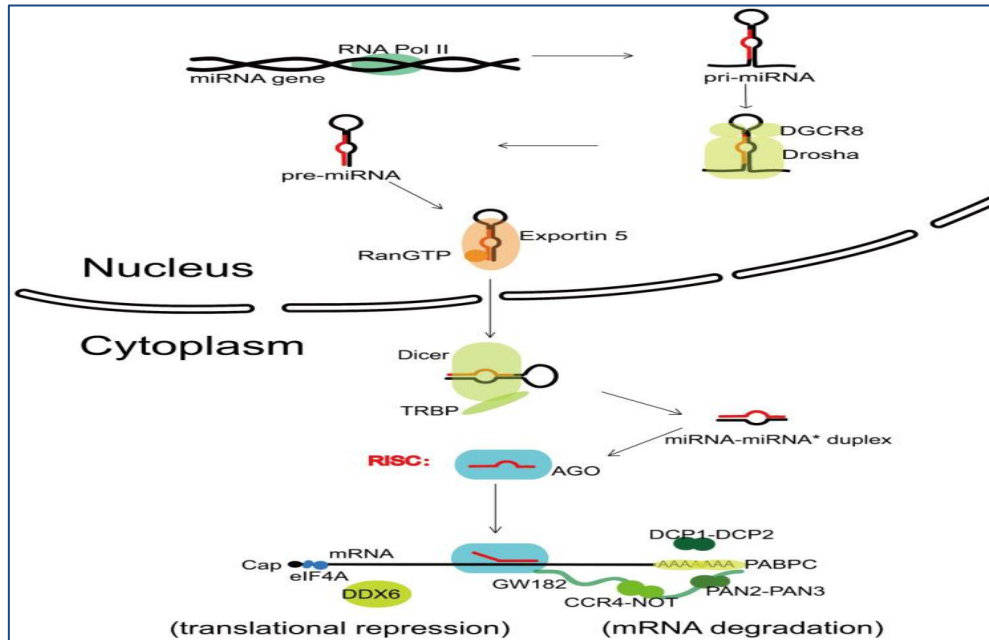
Σχήμα 2.1.: Ταξινόμηση των μη-κωδικών RNAs (ncRNAs) (29).

2.2. micro - RNAs

Τα miRNAs είναι μικρά, εξελικτικά διατηρημένα, ncRNAs μήκους ~ 22 νουκλεοτιδίων. Περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1993 όταν βρέθηκαν στον νηματώδη *Caenorhabditis elegans* και έκτοτε έχουν βρεθεί στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων του ανθρώπου. Τα miRNAs αποτελούν το 1-4% όλων των εκφραζόμενων γονιδίων και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Διαθέτουν την ικανότητα να καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων δεσμεύοντας τα RNA-στόχους τους, κυρίως στην 3' αμετάφραστη περιοχή, με τρόπο ειδικό για την αλληλουχία. Επιπλέον ορισμένα miRNA είναι ικανά να συσσωρεύονται στον πυρήνα όπου επηρεάζουν τη βιογένεση άλλων miRNAs καθώς και άλλων ειδών RNA (24, 30, 31).

Κατά τη βιογένεση, τα miRNAs περνούν από μια διαδικασία πολλών σταδίων, συμπεριλαμβανομένης της μεταγραφής, της πυρηνικής ωρίμανσης, της εξαγωγής και της κυτταροπλασματικής επεξεργασίας, πριν εξελιχθούν σε λειτουργικό RNA (Σχήμα 2.2.). Μεταγραφόμενο από την RNA πολυμεράση II (Pol II), ένα πυρηνικό γονίδιο miRNA παράγει ένα πρόδρομο μόριο με δομή φουρκέτας (καλύπτει την αλληλουχία του ώριμου RNA), 5' κάλυμμα και 3' polyA ουρά, που ονομάζεται «**pri-miRNA**». Αυτό, στη συνέχεια αναγνωρίζεται από ένα πυρηνικό σύμπλεγμα που ονομάζεται μικροεπεξεργαστής, ο οποίος αποτελείται από ένα μόριο Drosha (ένα είδος ενζύμου RNase III) και δύο μόρια του γονιδίου της κρίσιμης περιοχής του συνδρόμου DiGeorge 8 (DGCR8) που αναγνωρίζει το pri-miRNA και κατευθύνει τη διάσπαση από την Drosha. Το νέο πρόδρομο μόριο με δομή φουρκέτας που σχηματίζεται, ονομάζεται «**pre-miRNA**» και μετατοπίζεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα με τη μεσολάβηση Exportin-5 και της τριφωσφορικής γουανωσίνης RAN-GTP. Στο κυτταρόπλασμα, το pre-miRNA αναγνωρίζεται περαιτέρω από το Dicer, μια ενδονουκλεάση RNase III, και συνδέεται με μια πρωτεΐνη συνεργάτη που ονομάζεται TRBP. Με αυτόν τον τρόπο, το pre-miRNA διασπάται κοντά στον τερματικό βρόγχο της φουρκέτας και δημιουργούνται δύο μόρια miRNA-miRNA*. Αυτό το duplex συνδέεται σε μια πρωτεΐνη της οικογένειας Argonaute (Ago) και συναρμολογούν το σύμπλοκο σιγής (miRISC). Το ώριμο miRNA διατηρείται στο

σύμπλεγμα, ενώ ο άλλος κλώνος αποικοδομείται. Η επιλογή του κλώνου που τελικά θα διατηρηθεί, ποικίλλει τόσο χωρικά όσο και χρονικά και εξαρτάται από τις ιδιότητες του προδρόμου ή περαιτέρω παράγοντες επεξεργασίας (24, 31, 32).



Σχήμα 2.2.: Βιογένεση των miRNAs (31).

2.3. Κυκλικά RNA (Circular – RNAs)

Τα **circRNAs** είναι μονόκλιωνα, ομοιοπολικά κλειστά μόρια RNA που είναι εξελικτικά διατηρημένα σε διάφορους οργανισμούς. Λόγω της μοναδικής τους δομής, εμφανίζουν υψηλή σταθερότητα στο κυτταρόπλασμα και μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής σε σχέση με τα γραμμικά RNA, γεγονός που τα καθιστά πιθανούς υποψηφίους για διαγνωστικούς βιοδείκτες και θεραπευτικούς στόχους. Τα κυκλικά RNA παράγονται από πρόδρομο mRNA που μεταγράφεται από την Pol II και προκύπτουν από έναν ιδιαίτερο μηχανισμό οπισθοσυρραφής (**back-splicing**), σχηματίζοντας κλειστές δομές. Η βιογένεσή τους ρυθμίζεται μέσω cis και trans-δρώντων ρυθμιστικών στοιχείων που ελέγχουν τη διαδικασία του ματίσματος.

Ενώ αρχικά, τα circRNA θεωρήθηκαν ως σφάλματα ματίσματος, ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών έχει αποκαλύψει ότι αρκετά circRNA παίζουν σημαντικούς φυσιολογικούς και λειτουργικούς ρόλους σε πολλά στάδια του καταρράκτη ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Επιγραμματικά, οι σημαντικότερες ιδιότητές τους είναι ότι μπορούν να δράσουν σαν «σφουγγάρια» για την πρόσδεση συγκεκριμένων μορίων miRNAs (miRNA sponges), να προσδέσουν μία σειρά από διαφορετικές πρωτεΐνες λειτουργώντας ως δολώματα πρωτεϊνών ή στρατολογητές, να μεταφραστούν παράγοντας νέες πρωτεϊνικές ισομορφές και τέλος να δράσουν ως μετα-μεταγραφικοί ρυθμιστές (π.χ. με τη δέσμευση των miRNAs, μειώνουν την κυτταρική τους διαθεσιμότητα και καταλήγουν στην ανοδική ρύθμιση των mRNA-στόχων τους) (30, 33).

2.4. Μακριά μη κωδικά RNAs (Long non-coding RNAs)

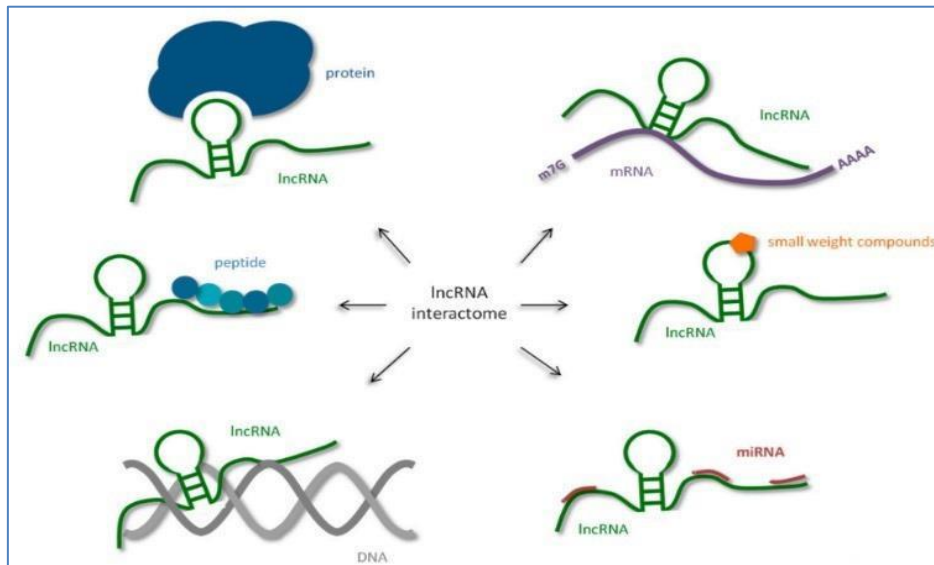
Στατιστικά στοιχεία από το Human GENCODE υποδηλώνουν ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει περισσότερα από 16.000 γονίδια lncRNAs, ενώ άλλες εκτιμήσεις υπερβαίνουν τα 100.000 ανθρώπινα lncRNAs (34). Τα lncRNAs αποτελούν μια ετερογενή ομάδα μορίων RNA τόσο ως προς το μέγεθος, όσο και ως προς τον κυτταρικό εντοπισμό. Συγκεκριμένα το μήκος τους μπορεί να ξεκινάει από μερικές εκατοντάδες και να φτάνει έως και μερικές χιλιάδες νουκλεοτίδια (23). Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι η πλειονότητα των lncRNAs εντοπίζεται στον πυρήνα, όμως μερικά από τα lncRNA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο κυτταρόπλασμα και ορισμένα μπορούν να μεταδοθούν σε γειτονικά κύτταρα ή στον ορό μέσω εξωσωμάτων (35).

Τα lncRNAs μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με τη θέση τους στο γονιδίωμα σε σχέση με γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, σε (i) διαγονιδιακά (intergenic) lncRNAs, όταν βρίσκονται εντός του διαστήματος μεταξύ δύο γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες, (ii) ιντρονικά (intronic) lncRNAs, τα οποία μεταγράφονται εξ ολοκλήρου από εσώνια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, (iii) νοηματικά lncRNAs, όταν επικαλύπτουν ένα ή περισσότερα εξώνια ενός κωδικού γονιδίου, (iv) αντινοσηματικά lncRNAs, (v) αμφίδρομα (bidirectional), που μοιράζονται τον ίδιο προαγωγέα με γονίδια που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη, αλλά μεταγράφονται προς την αντίθετη κατεύθυνση και (vi) ενισχυτικά, τα οποία παράγονται από περιοχές ενισχυτών γονιδίων (24, 35, 36).

Ο όρος « non-coding » αναφέρεται κυρίως στην έλλειψη ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (open reading frames - ORFs) ή/και διατηρημένων κωδικονίων σε μετάγραφο (24). Πολλά γονίδια lncRNAs έχουν δύο ή περισσότερα εξώνια και επιπλέον διαθέτουν χαρακτηριστικά που θυμίζουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, όπως το 5' κάλυμμα (5' cap), το εναλλακτικό μάτισμα και η polyA ουρά (21, 25). Σύμφωνα με τις ρυθμιστικές τους επιδράσεις στις αλληλουχίες DNA, τα lncRNAs θα μπορούσαν να ταξινομηθούν ως cis-lncRNAs (cis-δρώντα lncRNAs) που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων-στόχων που βρίσκονται σε κοντινή απόσταση, και trans-lncRNAs (trans-δρώντα lncRNAs) που ρυθμίζουν απομακρυσμένα γονίδια (26, 35). Επιπροσθέτως, είναι ενδιαφέρον ότι τα lncRNAs δεν είναι πολύ εξελικτικά διατηρημένα, με μόνο το 5-6% των lncRNA να φέρει διατηρημένες αλληλουχίες (37). Παρά την ταξινόμησή τους ως μη κωδικά μόρια, αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένα lncRNA έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύονται σε ριβοσώματα και να κωδικοποιούν μικροπεπτίδια (38).

Έχει αποδειχτεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, αφού διαθέτουν τη **δυνατότητα αλληλεπίδρασης με μόρια DNA, RNA και πρωτεΐνες (Σχήμα 2.3)**. Για παράδειγμα, μπορούν να προκαλούν αλλοστερικές αλλαγές στη δομή πρωτεϊνών, ρυθμίζοντας έτσι την αλληλεπίδρασή τους με άλλα μόρια. Με την πρόσδεσή τους σε θέσεις δέσμευσης άλλων μορίων RNA ή DNA, μπορεί να εμποδίσουν την πρόσδεση αυτών στην αντίστοιχη πρωτεΐνη. Επιπλέον, η πρόσδεσή τους σε μια πρωτεΐνη ίσως να επηρεάσει την τοπολογία της, επιτρέποντας ή εμποδίζοντας την μεταφορά της σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό διαμέρισμα. Τα lncRNAs φαίνεται να συμμετέχουν στη ρύθμιση της δομής και τη λειτουργίας της χρωματίνης και να συμβάλλουν στην

τροποποίηση των ιστονών. Τέλος, συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταγραφής γειτονικών, αλλά και απομακρυσμένων γονιδίων και μπορούν να επηρεάσουν το μάτισμα, τη σταθερότητα και τη μετάφραση του RNA. Μεταξύ των ιδιοτήτων των lncRNAs είναι και η ρύθμιση των πυρηνικών οργανιδίων και η συντήρηση της αρχιτεκτονικής του πυρήνα, καθώς και η εμπλοκή τους στην διαδικασία της κυτταρικής διαφοροποίησης και ανάπτυξης (25, 34, 35).

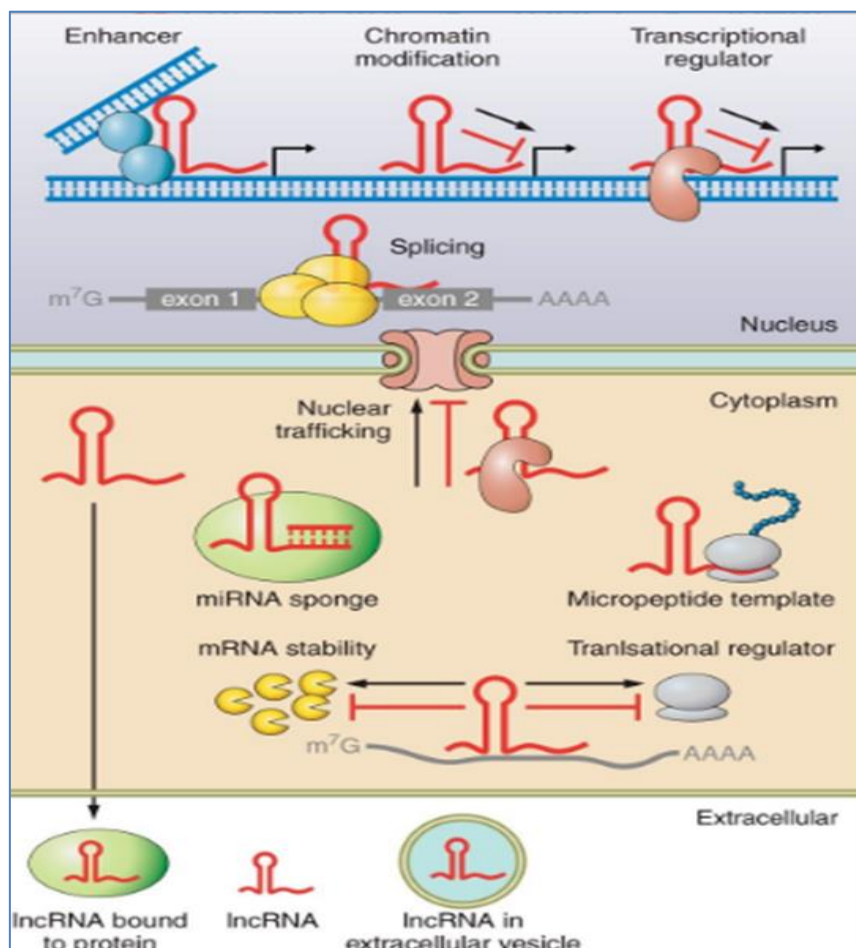


Σχήμα 2.3.: Μόρια με τα οποία μπορεί να αλληλεπιδράσουν τα lncRNAs - Interactome (23).

Πολλά lncRNAs μπορούν να φέρνουν άλλα ρυθμιστικά μόρια (π.χ. mRNAs, miRNAs, DNA) κοντά σε πρωτεΐνες (π.χ. σύμπλοκα τροποποίησης χρωματίνης, παράγοντες μεταγραφής, λιγάσες), δημιουργώντας ένα ετερογενές υπόστρωμα το οποίο φέρνει σε επαφή διαφορετικά μόρια πάνω στη γονιδιωματική αλυσίδα και ενισχύει τις χημικές αλληλεπιδράσεις που είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της κυτταρικής δραστηριότητας. Παρόλα αυτά, πολλά lncRNAs, μπορούν να λειτουργήσουν ως σπόγγι για τα miRNAs (**miRNA sponge**), επηρεάζοντας με αρνητικό τρόπο την έκφραση γονιδίων και ωθώντας στην ανάπτυξη καρκίνου. Μερικά από τα πρώτα lncRNAs που ανακαλύφθηκαν ήταν τα XIST και H19. Αν και αρχικά αναγνωρίστηκαν και χαρακτηρίστηκαν για την αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X και την εμβρυϊκή ανάπτυξη, αντίστοιχα, αυτά τα δύο γονίδια έχει αποδειχτεί πλέον ότι συνδέονται με διάφορους τύπους καρκίνου. Την τελευταία δεκαετία, αυξανόμενες μελέτες έχουν ωθήσει προς το συμπέρασμα ότι το απορρυθμισμένο προφίλ των lncRNAs εμπλέκεται ευρέως στην παθογένεση πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, των μεταβολικών διαταραχών και των καρδιαγγειακών παθήσεων (35, 37). Συγκεκριμένα, η απορρύθμιση των lncRNAs έχει επιπτώσεις σε κυτταρικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η αντίσταση στην απόπτωση, η επαγωγή αγγειογένεσης και η προώθηση της μετάστασης, γεγονός που δείχνει ότι μπορούν να αποτελέσουν πιθανούς βιοδείκτες για τη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου (21).

2.4.1 Βιογένεση lncRNAs

Η βιογένεση των lncRNAs είναι ειδική για τον τύπο και το στάδιο του κυττάρου και λαμβάνει χώρα στον πυρήνα (38). Τα περισσότερα lncRNAs συντίθενται από την RNA πολυμεράση II (Pol II) υπό τον έλεγχο των μεταγραφικών ενεργοποιητών του συμπλέγματος SWI/SNF. Ωστόσο, ορισμένα lncRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση III. Όπως προαναφέρθηκε, διαθέτουν 5'- κάλυμα m⁷G (7 - μέθυλ - γουανοσίνης) και 3'- poly(A) ουρές και θεωρείται ότι μεταγράφονται και επεξεργάζονται παρόμοια με τα mRNAs (23, 34). Σχεδόν όλα τα lncRNAs εμφανίζουν κανονικές θέσεις ματίσματος και μετά από επεξεργασία παράγονται τουλάχιστον δύο ισομορφές, αποτελούμενες συνήθως από δύο εξώνια. Σε αντίθεση με τα mRNAs, τα lncRNAs μπορούν να βρεθούν σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα (Σχήμα 2.4.). Μετά τη βιογένεσή τους και την επεξεργασία τους, τα mRNAs απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα, όπως ισχύει και για αρκετά lncRNAs, ωστόσο το μεγαλύτερο ποσοστό των lncRNAs εντοπίζεται στον πυρήνα όπου στρατολογούνται για την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (24).



Σχήμα 2.4.: Βιογένεση και λειτουργίες των lncRNAs (24).

Ο εντοπισμός των lncRNAs στον πυρήνα, σχετίζεται με το γεγονός ότι τα lncRNAs διαθέτουν ασθενή σήματα ματίσματος σε σχέση με τα mRNAs, κυρίως λόγω της μεγάλης απόστασης μεταξύ της 3' θέσης ματίσματος και του σημείου διακλάδωσης. Ωστόσο, εναλλακτικά σήματα πολυαδενυλίωσης εντός των γονιδίων lncRNAs, μπορεί να ωθήσουν στην παραγωγή ισομορφών με διαφορετικό κυτταρικό εντοπισμό (πυρήνας-κυτταρόπλασμα). Επιπλέον, η απορυθμισμένη με φωσφορυλίωση Pol II μπορεί να μεταγράψει ένα σημαντικό κλάσμα των lncRNAs, οδηγώντας σε προσωρινή συσσώρευση lncRNAs στη χρωματίνη, ακολουθούμενη από ταχεία αποικοδόμησή τους από εξωσώματα. Αυτό πιθανόν να υποδηλώνει ότι τα lncRNAs προκειμένου να συσσωρευτούν σε υψηλά επίπεδα σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων, πρέπει να ξεφύγουν από την πυρηνική επιτήρηση. Τα lncRNAs συχνά περιέχουν ενσωματωμένα μοτίβα αλληλουχίας που μπορούν να στρατολογήσουν ορισμένους πυρηνικούς παράγοντες, οι οποίοι προάγουν τον πυρηνικό εντοπισμό (34).

Ένας μεγάλος αριθμός lncRNAs εξάγονται στο κυτταρόπλασμα. Εκεί, είτε ταξινομούνται σε συγκεκριμένα οργανίδια, είτε συνδέονται με διαφορετικές πρωτεΐνες δέσμευσης RNA (RNA - binding proteins - RBPs), που πιθανόν με αυτόν τον τρόπο ταξινομούνται και σε εξωσώματα (34). Τα κυτταροπλασματικά lncRNAs έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν θερμοδυναμικά σταθερές δομές, αλληλεπιδρώντας άμεσα με άλλα μόρια, όπως miRNA, DNA και πρωτεΐνες. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να λειτουργήσουν ως δολώματα για την παρεμπόδιση μεταγραφικών παραγόντων από τον υποκινητή του γονιδίου στόχου, ως σπόγγοι miRNA για την πρόληψη της αποικοδόμησης του γονιδίου στόχου ή ως ικρίωματα για τη διευκόλυνση της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα δευτερογενή δομικά στοιχεία (π.χ. βρόγχοι, δομές φουρκέτας κ.λ.π) είναι αυτά που καθορίζουν τη λειτουργία τους και όχι η αλληλουχία των νουκλεοτιδικών βάσεων (24, 39).

2.4.2. lncRNAs στον καρκίνο

Το απορρυθμισμένο προφίλ των lncRNA έχει αποδειχτεί ότι εμπλέκεται στην παθογένεση των όγκων, η οποία περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη μετανάστευση, τη διήθηση, την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), την απόπτωση, αλλά και την αντοχή στα φάρμακα (35). Τα lncRNAs, αντιπροσωπεύουν μια ποικιλόμορφη ομάδα RNA η οποία περιλαμβάνει μόρια τα οποία μπορούν να λειτουργήσουν είτε ως ογκοκατασταλτικά μόρια, είτε ως ογκογονίδια (37, 39).

Στην πρώτη κατηγορία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων ανήκει, για παράδειγμα, το lncRNA MEG3. Συμμετέχει στη ρύθμιση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 χωρίς να αποτελεί μεταγραφικό στόχο του και έχει αποδειχτεί πως υπορυθμίζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου (34). Στα ογκοκατασταλτικά γονίδια συγκαταλλέγονται επίσης το GAS-5 και το MALAT1 (39).

Ένα απ' τα πιο αντιπροσωπευτικά και καλά μελετημένα μόρια της κατηγορίας των ογκογόνων lncRNAs είναι το HOTAIR, το οποίο έχει συσχετιστεί με κακή έκβαση στον

καρκίνο του μαστού αλλά και σε άλλους τύπους καρκίνου, πιθανώς με την αύξηση της μετάστασης και της διεισδυτικότητας του όγκου (37). Επιπλέον, το HOTTIP, σε μία πρόσφατη μελέτη αποδείχθηκε ότι λειτούργησε ως ογκογονίδιο στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML) και διαπιστώθηκε πως η αύξησή του στην AML λειτούργησε ως επιγενετικός ρυθμιστής για τη ρύθμιση της μεταγραφής χρωματίνης που σχετίζεται με το αιμοποιητικό γονίδιο (39).

Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι ορισμένα lncRNA μπορεί να χρησιμεύσουν ως πιθανοί στόχοι και βιοδείκτες για τη διάγνωση και την πρόγνωση του καρκίνου (35). Το PCA3 (Prostate Cancer Antigen 3) είναι το πρώτο και μοναδικό ncRNA που έχει λάβει έγκριση από τον FDA ως τεστ βιοδείκτη καρκίνου μέχρι σήμερα. Το PCA3 είναι ένας ειδικός για τον προστάτη δείκτης του οποίου οι προγνωστικές τιμές υπερβαίνουν τις χαρακτηριστικές της δοκιμής ορού PSA. Ο δείκτης αυτός υπερεκφράζεται στον καρκίνο του προστάτη και μπορεί να ανιχνευθεί εύκολα μέσω της μη επεμβατικής συλλογής ούρων (37, 40).

Η ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπειών για τη σίγαση (για τα ογκογονίδια) ή την υπερέκφραση (για τα ογκοκατασταλτικά γονίδια) των ncRNAs, αποτελεί ενεργό πεδίο έρευνας τα τελευταία χρόνια. Η τεχνολογία αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων (antisense oligonucleotides - **ASOs**) έχει εφαρμοστεί για την *in vivo* αναστολή lncRNAs μέσω στοχευμένης αποικοδόμησης από ριβονουκλεάσες (RNAase) (37, 39).

Οι όγκοι, γενικά, αποτελούνται από ετερογενή κύτταρα με ποικίλες κυτταρικές καταστάσεις. Ένας συνδυασμός αλλοιώσεων σε γενετικά, σηματοδοτικά, μεταβολικά και μικροπεριβάλλοντα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του όγκου. Μεταλλάξεις σε βασικά γονίδια όπως τα EGFR, ALK, BRAF, KRAS, TP53 και MYC οδηγούν κυρίως τα ογκογόνα συμβάντα και συνεπώς επηρεάζουν τα πιθανά κλινικά αποτελέσματα. Ωστόσο, αυτές οι πληροφορίες είναι ανεπαρκείς καθώς οι θεραπείες για τον καρκίνο που βασίζονται σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες παρέχουν περιορισμένη θεραπεία, ειδικά για ασθενείς με υποτροπιάζοντα καρκίνο. Καθώς το μη κωδικό γονιδίωμα έχει κερδίσει ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια μεταξύ των ερευνητών λόγω των εκπληκτικών λειτουργιών του, είναι σκόπιμο να εξεταστεί η συμβολή του στην ανάπτυξη καρκίνου. Είναι σημαντικό να αναλυθεί εάν τα lncRNAs μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως κύριοι ρυθμιστές της ογκογένεσης (41).

2.4.3. LncRNA HOTTIP

Το HOTTIP (**HOXA transcript at the distal tip** – μεταγράφημα HOXA στο περιφερικό άκρο) αναγνωρίστηκε αρχικά σε ανατομικά απομακρυσμένους ανθρώπινους ινοβλάστες (π.χ στο χέρι ή στο πόδι) (42). Πρόκειται για ένα lncRNA που ανήκει στην υποκατηγορία των διαγονιδιακών lncRNAs (lincRNAs - long intergenic RNAs) και έχει μήκος 3764 νουκλεοτιδίων. Το γονίδιο του HOTTIP εντοπίζεται στο 5' άκρο του συμπλέγματος homeobox A (HOXA), της χρωμοσωμικής περιοχής 7p15.2. Ο τόπος HOXA αποτελείται από ένα σύμπλεγμα 11 γονιδίων HOX με διαβαθμισμένο μοτίβο

έκφρασης. Λόγω της θέσης του στο γονιδίωμα, μπορεί να ωθεί την ενεργοποίηση πολυάριθμων γονιδίων 5' HOXA μέσω χρωμοσωμικού βρόγχου, ο οποίος φέρνει το HOTTIP δίπλα σε γονίδια HOXA (40, 42, 43, 44).

Το HOTTIP ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Μπορεί να επάγει την τροποποίηση της χρωματίνης για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, ενώ συνδέεται άμεσα με την πρωτεΐνη WDR5 επάγοντας ανοιχτή διαμόρφωση DNA-χρωματίνης και οδηγεί στην στρατολόγηση συμπλόκων WDR5/MLL σε προαγωγείς γονιδίων στον τόπο HOXA (34, 42, 43, 45). Με αυτόν τον τρόπο, οδηγεί στην τριμεθυλίωση του τέταρτου υπολείμματος λυσίνης της ιστόνης 3 (H3K4) και στην ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων HOXA (40, 43, 46). Τα προϊόντα γονιδίου HOX παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου με τα HOXA9 και HOXB13 να είναι τα πιο συχνά μεταβαλλόμενα γονίδια HOX σε συμπαγείς όγκους (47).

Αυτό το lncRNA μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση πολλών τύπων καρκίνου. Συνολικά, θεωρείται ως ογκογόνο lncRNA σχεδόν σε όλα τα είδη καρκίνου, με εξαίρεση το γλοίωμα. Αυτό έχει αποδειχτεί από πολυάριθμες μελέτες που χρησιμοποίησαν δείγματα ιστών ή ορού ασθενών με καρκίνο και μελέτησαν την έκφραση του HOTTIP, το οποίο φάνηκε ότι **υπερεκφράζεται** (-). Μελέτες σε καρκινικές κυτταρικές σειρές έχουν δείξει ότι αποσιώπηση του HOTTIP οδηγεί σε μείωση κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διήθησης και μετανάστευσης των κυττάρων (43). Σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη, DU145 και PC3, η απενεργοποίηση του HOTTIP μείωσε την έκφραση της βιμεντίνης, ενώ αύξησε την έκφραση της E-καντερίνης, υποδηλώνοντας συμμετοχή του HOTTIP στην επιθηλιο-μεσεγγυματική μετάβαση EMT (αναλύεται στο υποκεφάλαιο 3.2.) (44). Σε μία ακόμη μελέτη αποδείχτηκε ότι το TWIST1 (μεταγραφικός παράγοντας που μπορεί να προάγει την μετάσταση του καρκίνου του προστάτη) και το HOXA9 συνυπερεκφράζονται σε όγκους μεταστατικού καρκίνου του προστάτη και η φαρμακολογική αναστολή του HOXA9 θα μπορούσε να μετριάσει τις προ-μεταστατικές συμπεριφορές που προκαλούνται από το TWIST1 (47).

Επιπλέον, το HOTTIP μπορεί να λειτουργήσει και ως «σπόγγος miRNA» και με αυτόν τον τρόπο να εμπλέκεται στη ρύθμιση στόχων που σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου. Ένα τέτοιο παράδειγμα μπορεί να είναι ο άξονας HOTTIP/miR-101/ZEB1 ο οποίος προκαλεί EMT που επάγεται από υποξία σε κακοήθες γλοίωμα. Επιπλέον, ο άξονας HOTTIP/miR-615/IGF-2 αυξάνει την εξέλιξη του νεφρικού καρκινώματος (43, 44). Σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη, έχει αναφερθεί ότι το HOTTIP μπορεί να δράσει ως σπόγγος για το miR-216a-5p, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων (23, 44).

Πέρα από τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο, μπορεί να μεταβάλλει τις αντικαρκινικές επιδράσεις των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, ενισχύοντας την ανοσολογική διαφυγή των καρκινικών κυττάρων. Για παράδειγμα, στον καρκίνο των ωοθηκών, η υπερέκφραση του HOTTIP ενισχύει την

έκφραση της IL-6, οδηγώντας σε αύξηση της έκφραση του PD-L1 στα ουδετερόφιλα με αποτέλεσμα την ανοσοκαταστολή (43).

Συνοπτικά και σύμφωνα με τα παραπάνω ευρήματα, το HOTTIP υπερεκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε πολλούς τύπους καρκίνου σε σύγκριση με καλοήθη δείγματα και θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως δυναμικός βιοδείκτης για την πρόγνωση του καρκίνου.

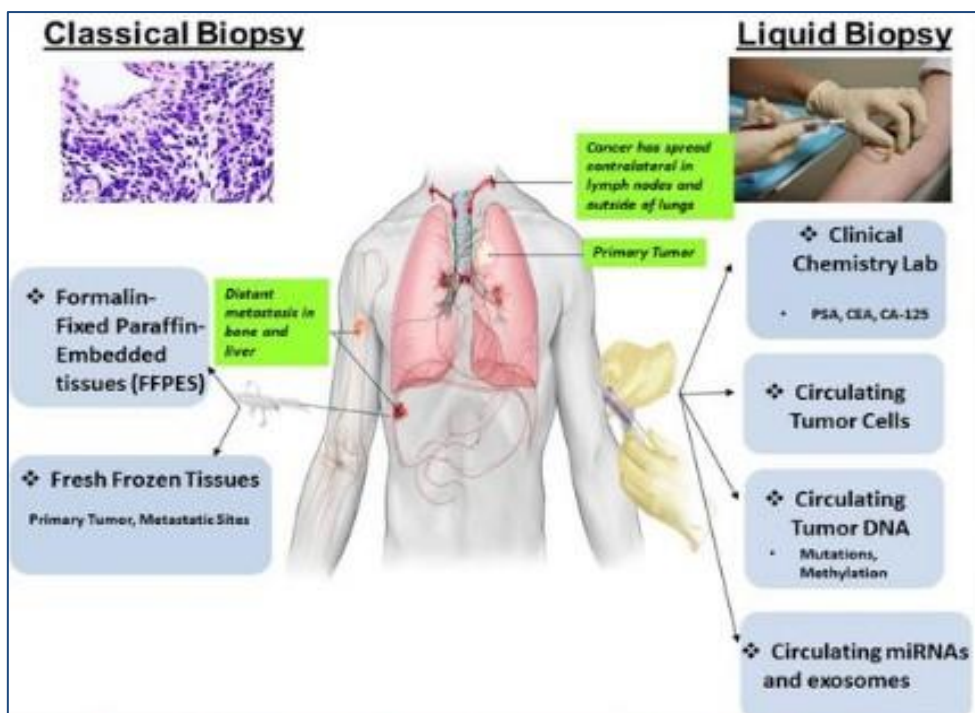
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

«ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ»

3.1. Εισαγωγή

Μέχρι σήμερα, η βιοψία ιστού θεωρείται η καθιερωμένη μέθοδος για τη διάγνωση του καρκίνου. Ωστόσο, η επεμβατική φύση αυτής της διαγνωστικής διαδικασίας αποτελεί μη ελκυστικό χαρακτηριστικό και παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα. Δεδομένης της ετερογένειας εντός του όγκου, τόσο φαινοτυπικής όσο και γενετικής, οι εξαγόμενοι μικροί ιστοί αποτυγχάνουν στην ολοκληρωμένη αντιπροσώπευσή του και την παρακολούθηση της δυναμικής εξέλιξής του (π.χ. μετάσταση). Μια κλασσική βιοψία ιστού θα μπορούσε να χάσει γονιδιωματικές αλλαγές μόλις λίγα εκατοστά μακριά, πιθανώς με επιζήμια επίδραση στις πιθανότητες επιβίωσης ενός ατόμου. Επιπλέον, ειδικά σε περιπτώσεις όπως ο καρκίνος του εγκεφάλου και του πνεύμονα, η διαδικασία λήψης ιστικού παρασκευάσματος μπορεί να είναι επώδυνη και μερικές φορές απειλητική για τη ζωή του ασθενή (64, 65).

Το πρόβλημα της ετερογένειας του όγκου μπορεί να παρακαμφθεί, κατά ένα σημαντικό ποσοστό, με τη χρήση της «υγρής βιοψίας» (liquid biopsy), μίας μη επεμβατικής προσέγγισης για την παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο σε πραγματικό χρόνο. Με την ευρεία έννοια, η «υγρή βιοψία» αναφέρεται στη διαδικασία με την οποία το περιφερικό αίμα ή άλλες σωματικές εκκρίσεις ελέγχονται για καρκινικά κύτταρα (66). Οι προσεγγίσεις υγρής βιοψίας περιλαμβάνουν την απαρίθμηση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (Circulating Tumor Cells, CTCs), την ανάλυση του κυκλοφορούντος DNA που προέρχεται απ' τον όγκο (Circulating Tumor DNA, ctDNA), των κυκλοφορούντων microRNAs (miRNAs) και των εξωκυτταρικών κυστιδίων (Extracellular Vesicles, EVs) που αποβάλλονται από πρωτογενείς όγκους και μεταστατικές θέσεις στο περιφερικό αίμα (67). Συνεπώς, η «υγρή βιοψία» μπορεί να βοηθήσει στη σωστή επιλογή θεραπειών σε ασθενείς με καρκίνο, στην εκτίμηση του κινδύνου ανάπτυξης μετάστασης, στην παρακολούθηση της ανταπόκρισής τους στη θεραπεία ή στην ανάπτυξη μηχανισμών αντίστασης στη θεραπεία. Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.1.), συγκρίνονται συνοπτικά τα δύο διαφορετικά είδη βιοψίας.



Σχήμα 3.1.: Σύγκριση κλασσικής και υγρής βιοψίας (68).

3.2. Μεταστατική διαδικασία

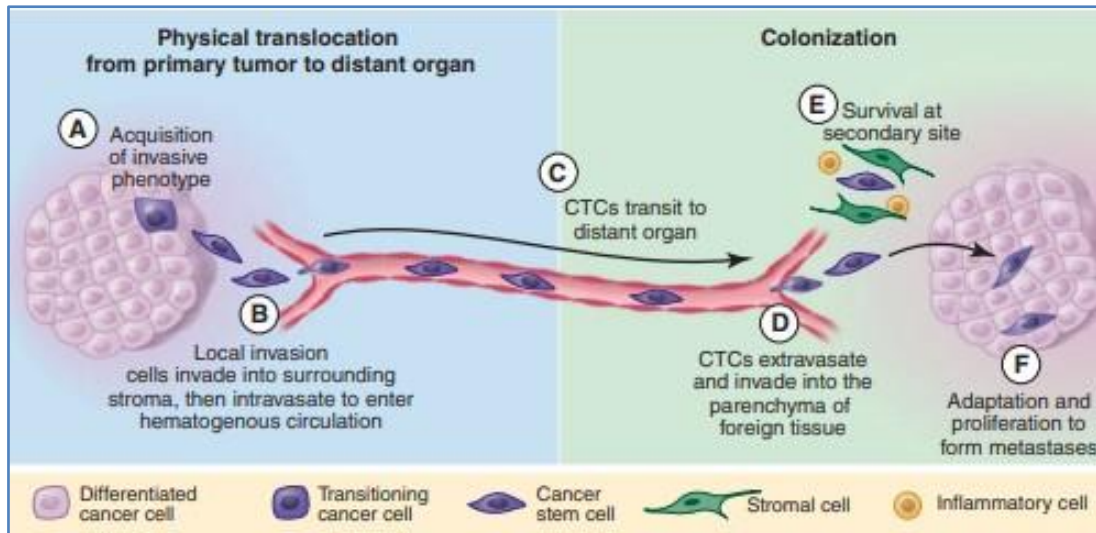
Η μετάσταση είναι υπεύθυνη για το 90% της θνησιμότητας που σχετίζεται με τον καρκίνο, ωστόσο παραμένει μια απ' τις πιο αινιγματικές πτυχές της παθογένεσης της νόσου (69). Πρόκειται για μια πολυδιάστατη διαδικασία που περιλαμβάνει τη διάδοση των καρκινικών κυττάρων από μια πρωτογενή βλάβη σε απομακρυσμένα όργανα (77). Ο πολύπλοκος μεταστατικός καταρράκτης μπορεί να οργανωθεί εννοιολογικά σε δύο φάσεις: (i) τη φυσική μετατόπιση ενός καρκινικού κυττάρου από τον πρωτοπαθή όγκο στο μικροπεριβάλλον ενός απομακρυσμένου ιστού και στη συνέχεια (ii) τον αποικισμό, την ικανότητα δηλαδή του καρκινικού κυττάρου να προσαρμοστεί στο νέο μικροπεριβάλλον και να εξελιχθεί σε μεταστατική βλάβη (69).

Η μετάσταση δεν είναι μια τυχαία διαδικασία. Αυτό το συμπέρασμα διατυπώθηκε για πρώτη φορά από τον Stephen Paget το 1889 όταν δημοσίευσε την υπόθεση των «σπόρων και εδάφους» (“seed and soil hypothesis”) που εξακολουθεί να ισχύει μέχρι και σήμερα. Μέσω αυτής της πρότασης κατάφερε να εξηγήσει το μη τυχαίο μοτίβο της μετάστασης, ότι δηλαδή η μετάσταση εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ επιλεγμένων καρκινικών κυττάρων («σπόροι») και συγκεκριμένου μικροπεριβάλλοντος του οργάνου («έδαφος») (70, 71). Επομένως, το αν θα αναπτυχθεί μετάσταση ή όχι μπορεί να καθοριστεί τόσο από μηχανικούς (ανατομική δομή του αγγειακού συστήματος), όσο και από τοπικούς «εδάφικούς» παράγοντες (71). Ωστόσο, η εξάπλωση στα ανατομικά απομακρυσμένα σημεία φαίνεται να συμβαίνει σχεδόν εξ ολοκλήρου μέσω της διαδικασίας της αιματογενούς διάδοσης (69).

Σε αντίθεση με τους πρωτοπαθείς όγκους, οι οποίοι συχνά μπορούν να θεραπευτούν με τοπική χειρουργική επέμβαση ή ακτινοβολία, η μετάσταση είναι μια συστημική ασθένεια (66). Η ιδέα ότι οι μεταστατικές βλάβες σχηματίζονται από καρκινικά κύτταρα που έχουν διαδοθεί από προχωρημένους πρωτοπαθείς όγκους έχει ουσιαστικά αναθεωρηθεί. Θεωρείται πλέον ότι οι κακοήθεις όγκοι ξεκινούν νωρίς στο δρόμο προς τη μετάσταση (68). Τα καρκινικά κύτταρα που είναι διεισδυτικά και κινητικά μπορούν να εισέλθουν στην κυκλοφορία πολύ πριν από τη διάγνωση του όγκου (72).

Πρόσφατες αναφορές παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η μετάσταση δεν είναι ένας γραμμικός καταρράκτης γεγονότων, αλλά περιλαμβάνει πολλαπλές παράλληλες μερικώς επικαλυπτόμενες διεργασίες, όπως απεικονίζονται στο **Σχήμα 3.2.** (77). Η διάδοση των καρκινικών κυττάρων από έναν πρωτοπαθή όγκο περιλαμβάνει την τοπική διείσδυσή τους στο περιβάλλον παρέγχυμα, την είσοδό τους στο μικροαγγειακό σύστημα της λέμφου και του αίματος (ενδοαγγείωση), την επιβίωση και μετατόπισή τους, σε μεγάλο βαθμό μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, στα μικροαγγεία απομακρυσμένων ιστών, όπου, κατά την παγίδευσή τους, εξαγγειώνονται από την κυκλοφορία και επιβιώνουν στο μικροπεριβάλλον απομακρυσμένων ιστών. Με την απόκτηση συγκεκριμένων λειτουργικών ιδιοτήτων, τελικά προσαρμόζονται στο ξένο μικροπεριβάλλον αυτών των ιστών με τρόπους που διευκολύνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και η προκαταρκτική μικρομεταστατική μάζα αναπτύσσεται σε μακροσκοπικό δευτερογενή όγκο (μακροσκοπική μετάσταση). Αυτή η διαδικασία αναφέρεται επίσης ως **αποικισμός οργάνου στόχου** (69, 73, 77). Η αποτυχία ολοκλήρωσης οποιουδήποτε από τα βήματα μπορεί να αποτρέψει το σχηματισμό δευτερογενών βλαβών (70). Επιπλέον, από τη στιγμή που ένα μεταστατικό κύτταρο σταματήσει σε μια δευτερεύουσα θέση, θα μπορούσε να ξαναρχίσει τον πολλαπλασιασμό του, ακόμη και αφού παραμείνει αδρανές (tumor dormancy) για παρατεταμένες περιόδους (77).

Τα καρκινικά κύτταρα που επιβιώνουν μετά τη διήθηση σε μακρινά όργανα - διεσπαρμένα καρκινικά κύτταρα (**DTCs: Disseminated Tumor Cells**) - μπορούν να υπάρχουν στον μυελό των οστών ασθενών για χρόνια, όμως μόνο οι μισοί περίπου από αυτούς τους ασθενείς αναπτύσσουν εμφανή μετάσταση. Αυτές οι κλινικές παρατηρήσεις υποστηρίζουν ότι ο αποικισμός απομακρυσμένων ιστών από DTCs είναι μια εξαιρετικά αναποτελεσματική διαδικασία, κατά την οποία τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα που μετατοπίζονται επιτυχώς από τον πρωτοπαθή όγκο σε μια δευτερεύουσα θέση υφίστανται απόπτωση εντός 24 ωρών από την εξαγγείωση και μόνο μια μειοψηφία των κυττάρων που επιβιώνουν σχηματίζει μακρο-μεταστάσεις (69, 72). Ενώ σχετικά πολυάριθμα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) ανιχνεύονται στο αίμα ασθενών με καρκίνο, με αναφορές που υποδεικνύουν > 1000 CTCs / mL πλάσματος αίματος, δυσανάλογα λίγες μεταστάσεις είναι κλινικά ανιχνεύσιμες (77). Το αίμα πολλών ασθενών με προχωρημένα πρωτοπαθή καρκινώματα περιέχει κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, η παρουσία CTCs και εξαγγειωμένων DTCs, όπως αυτά στο μυελό των οστών ασθενών με καρκίνο του μαστού, και συσχετίζεται με αυξημένο μεταστατικό φορτίο, επιθετική νόσο και μειωμένο χρόνο υποτροπής (69).



Σχήμα 3.2.: Μεταστατική Διαδικασία (69).

Στη φυσική μετατόπιση των καρκινικών κυττάρων απ' τον πρωτοπαθή όγκο στο μικροπεριβάλλον ενός απομακρυσμένου οργάνου, κρίσιμο ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει ένα βιολογικό πρόγραμμα, η επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (**EMT**: Epithelial-Mesenchymal Transition). Πρόκειται για ένα αναπτυξιακό πρόγραμμα που επιτρέπει στα σταθερά επιθηλιακά κύτταρα να αποκτήσουν την ικανότητα να μεταναστεύουν και να διεισδύουν ως μεμονωμένα κύτταρα. Το πρόγραμμα EMT περιγράφηκε αρχικά ως αναπόσπαστο μέρος της οργανογένεσης στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και αργότερα παρατηρήθηκε σε πολλά συμβάντα παθογένεσης, συμπεριλαμβανομένης της επούλωσης τραυμάτων, της ίνωσης και της μετάστασης καρκίνου (74). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η EMT είναι μια **αναστρέψιμη** φαινοτυπική αλλαγή των καρκινικών κυττάρων και τα κύρια χαρακτηριστικά γνωρίσματά της είναι η απώλεια διακυτταρικής προσκόλλησης και επιθηλιακής πολικότητας και η αύξηση της κινητικότητας και της διήθησης. Η EMT μπορεί να προάγει την ενδοαγγείωση και να συμβάλλει στην επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων, αυξάνοντας την αντίστασή τους στην απόπτωση (72). Μετά την εξαγγείωση των καρκινικών κυττάρων στις μεταστατικές θέσεις, τα καρκινικά κύτταρα υφίστανται μια αντίστροφη διαδικασία, την μεσεγχυματική-επιθηλιακή μετάβαση (**MET**: Mesenchymal to Epithelial Transition) ως ένα βήμα προς την έναρξη της μεταστατικής ανάπτυξης (75). Μέχρι στιγμής, λίγα είναι γνωστά για τους ερεθισμούς που ελέγχουν τη λεπτή ισορροπία μεταξύ του EMT και του MET κατά τη διάρκεια του μεταστατικού καταρράκτη (79).

Προκειμένου να ενεργοποιηθεί το πρόγραμμα EMT, ενεργοποιούνται οι παράγοντες μεταγραφής EMT (EMT-TFs). Οι κύριοι EMT-TF περιλαμβάνουν παράγοντες μεταγραφής της οικογένειας SNAIL, TWIST και ZEB. Οι μορφολογικές αλλαγές συνδυάστηκαν επίσης με αλλαγές στους κλασικούς δείκτες EMT, συμπεριλαμβανομένης της απώλειας έκφρασης της E-καντερίνης και της αυξημένης έκφρασης μεσεγχυματικών γονιδίων όπως η βιμεντίνη και η φιμπρονεκτίνη (74, 76).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι μία σημαντική βιολογική διαδικασία για την ανάπτυξη του καρκίνου είναι η αγγειογένεση. Το 1971, ο Folkman προώθησε την έννοια της «αγγειογένεσης του όγκου», που ορίζεται ως η «δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων» και είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη μάζας όγκου πέραν του 1 mm σε διάμετρο. Η σύνθεση και έκκριση αρκετών προ-αγγειογενετικών παραγόντων, όπως είναι ο ενδοθηλιακός αγγειακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF) και ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (Transforming Growth Factor-TGF), από τα κύτταρα του όγκου και του ξενιστή και η απουσία αντι-αγγειογενετικών παραγόντων παίζουν βασικό ρόλο στη δημιουργία ενός τριχοειδούς δικτύου από τον περιβάλλοντα ιστό ξενιστή. Στη συνέχεια, η τοπική εισβολή στο στρώμα του ξενιστή εμφανίζεται ως συνέπεια της ενισχυμένης έκφρασης μιας σειράς ενζύμων (π.χ. κολλαγενάση) (70).

3.3. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs)

Όπως προαναφέρθηκε, τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (**Circulating Tumor Cells - CTCs**) είναι καρκινικά κύτταρα που έχουν αφαιρεθεί από τον πρωτογενή όγκο, και παρασύρονται από το κυκλοφορικό ή το λεμφικό σύστημα. Περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1869 από τον Thomas Ashworth ο οποίος παρατήρησε «μερικά κύτταρα» στο αίμα ενός ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο, με μορφολογία παρόμοια με αυτή των καρκινικών κυττάρων του πρωτοπαθούς όγκου (78).

Ο χρόνος ημιζωής των CTCs στο αίμα έχει υπολογιστεί ότι είναι μόνο 1,0-2,4 ώρες (81). Λόγω του σύντομου χρόνου ημιζωής και λόγω των σκληρών συνθηκών (π.χ. εξάλειψη απ' το ανοσοποιητικό σύστημα), τα περισσότερα CTCs χάνονται από την κυκλοφορία, κι έτσι μόνο ένας περιορισμένος αριθμός αυτών καταφέρνουν να επιβιώσουν και διεισδύσουν σε μακρινά όργανα (78). Τα κύτταρα στην κυκλοφορία του αίματος είναι πιθανό να υποστούν απόπτωση ή «anoikis» (μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που συμβαίνει σε κύτταρα που εξαρτώνται από την αγκύρωση, όταν αυτά αποσπώνται από τον περιβάλλον εξωκυττάριο χώρο (ECM) (84). Εκτός από τις φυσικές δυνάμεις (π.χ. διατμητικές δυνάμεις, ρευστοποιήσεις), τα CTCs είναι ευάλωτα και σε επιθέσεις από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη διάρκεια του ταξιδιού τους. Για να ξεφύγουν από τη λύση που προκαλείται από T-κύτταρα, τα CTCs μπορούν να εκφράσουν τον PD-L1 στην επιφάνειά τους (81).

Αν και η πλειονότητα των καρκινικών κυττάρων που απομονώνονται απ' το αίμα υπάρχουν ως μεμονωμένα κύτταρα, έχει αναφερθεί ότι μπορεί να δίνουν μεταστάσεις μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και ως πολυκυτταρικές ομάδες - συστάδες CTCs (clusters-CTCs). Τα συμπλέγματα CTCs ορίζονται ως μια ολιγοκλωνική ομάδα δύο ή περισσότερων CTC που συγκρατούνται με σταθερές συνδέσεις κυττάρου-κυττάρου, μαζί με αιμοπετάλια και λεμφοκύτταρα, και ταξιδεύουν μαζί μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (80, 83, 84). Όπως προαναφέρθηκε, τα συμπλέγματα CTCs αντιπροσωπεύουν τη μειοψηφία των CTCs που βρίσκονται στην περιφερική κυκλοφορία, ωστόσο μια μελέτη από τους Aceto et al., απέδειξε πειραματικά ότι το μεταστατικό δυναμικό των συστάδων CTCs είναι 23 έως 50 φορές υψηλότερο απ' ότι ομόλογων μεμονωμένων CTCs (80, 83,

84). Οι βιολογικοί μηχανισμοί πίσω από το σχηματισμό, την επιβίωση, τη διάδοση και την μεταστατική ικανότητα των συμπλεγμάτων CTCs δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Σε αυτά έχει εντοπιστεί υψηλή έκφραση δύο πρωτεϊνών, της κερατίνης 14 (K14) και της πλακοσφαιρίνης, σε σύγκριση με τα μεμονωμένα κύτταρα, οι οποίες θα μπορούσαν να ρυθμίσουν την προσκόλληση κυττάρου-κυττάρου, την προσκόλληση κυττάρου-ECM και την ανοσολογική διαφυγή (80, 83). Η παρουσία και το μέγεθος των συμπλεγμάτων CTCs σχετίζονται με χειρότερη κλινική έκβαση σε σχέση με την παρουσία μονήρων CTCs, σε πολλούς τύπους καρκίνου (83). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί απ' το γεγονός ότι τα συσσωματώματα έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να παγιδευτούν σε μικροαγγεία απ' ότι τα μεμονωμένα CTCs και μπορούν να εξαγγειωθούν πιο εύκολα. Επιπλέον, τα CTCs που περιβάλλονται από αιμοπετάλια προστατεύονται από την ανοσομεσολαβούμενη εξάλειψη των CTCs (81).

Τα CTCs μπορούν να απομονωθούν με μη επεμβατικό τρόπο και να χρησιμοποιηθούν ως «υγρή βιοψία» για την παρακολούθηση των δυναμικών αλλαγών στην εξέλιξη του όγκου ασθενών, σε πραγματικό χρόνο (79, 82, 84). Ωστόσο, η ανίχνευση, η απομόνωση σε βιώσιμη κατάσταση, η απαρίθμηση και ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs μεταξύ της τεράστιας δεξαμενής ογκωδών αιμοσφαιρίων στην κυκλοφορία του αίματος αποτελούν πρόκληση, καθώς αυτά είναι σπάνια και η ποσότητα του διαθέσιμου δείγματος είναι πολύ περιορισμένη (78, 82, 83). Οι νέες τεχνολογίες για την απομόνωση, τον εντοπισμό και την ανάδειξη των CTCs με υψηλή απόδοση, εκμεταλλεύεται τις διαφορετικές φυσικές και βιολογικές ιδιότητες που διαθέτουν τα CTCs σε σχέση με τα κύτταρα του περιφερειακού αίματος (80). Μέσω της γονιδιωματικής και της μεταγραφομικής ανάλυσης (genomics & transcriptomics) ενός κυττάρου, γίνεται όλο και πιο σαφές ότι τα CTCs είναι ετερογενή σε πολλά επίπεδα και ότι μόνο ένα κλάσμα από αυτά είναι ικανό να ξεκινήσει μετάσταση (83). Τα CTCs διατηρούν την ετερογένεια του όγκου και μιμούνται τις ιδιότητες του όγκου, επιτρέποντάς τους να εφαρμοστούν ως θεραπευτικοί στόχοι και κλινικοί βιοδείκτες για την πρόγνωση, τον έλεγχο και τη δυναμική παρακολούθηση της νόσου (80).

Μία πολύ σημαντική ιδιότητα των CTCs είναι ότι μπορούν να υποβληθούν σε επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), η οποία μπορεί να προκαλέσει σημαντική αλλαγή του κυτταρικού φαινότυπου. Κατά τη διάρκεια αυτής της μετάβασης, τα κύτταρα μετατρέπουν τον επιθηλιακό φαινότυπο τους - μερικώς ή πλήρως - σε μεσεγχυματικό. Η αντίστροφη διαδικασία, που ονομάζεται «μεσεγχυματική-επιθηλιακή μετάβαση» (MET), θεωρείται ότι παίζει θεμελιώδη ρόλο αφού τα CTCs έχουν εγκατασταθεί σε μακρινά όργανα και έχουν αρχίσει να σχηματίζουν μεταστάσεις στο νέο μικροπεριβάλλον. Το EMT έχει προταθεί ότι συνδέεται συχνά με την επιθετικότητα του καρκίνου και μπορεί να αυξήσει την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να μεταναστεύσουν. Κατά τη διάρκεια του EMT, η έκφραση επιθηλιακών δεικτών όπως οι κυτταροκερατίνες (CKs) και το μόριο προσκόλλησης επιθηλιακών κυττάρων (EpcAM) μειώνεται, ενώ η έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών όπως η βιμεντίνη αυξάνεται. Απαιτείται όμως βελτιστοποίηση των μεθόδων ανίχνευσης CTC με τη συμπερίληψη δεικτών που δεν καταστέλλονται κατά τη διάρκεια του EMT αλλά που εξακολουθούν να επιτρέπουν στην ανάλυση να διακρίνει τα CTC από τα γύρω αιμοσφαίρια. Για παράδειγμα, η βιμεντίνη εκφράζεται επίσης και στα αιμοσφαίρια και

επομένως πρέπει να συνδυαστεί με έναν μοριακό δείκτη που να προσδιορίζει τα καρκινικά κύτταρα (79). Παρόλα αυτά, το EMT φαίνεται να μην αποτελεί προϋπόθεση για τη διάδοση των καρκινικών κυττάρων, επειδή τα CTCs που εκφράζουν επιθηλιακούς δείκτες (π.χ. EpCAM, CKs), ανιχνεύονται σε πολλούς ασθενείς με κακοήθειες επιθηλίου (π.χ. μαστού, προστάτη, πνεύμονα) (81).

Η ανίχνευση και ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs είναι ένας από τους πιο ενεργούς τομείς της μεταφραστικής έρευνας για τον καρκίνο, με πάνω από 400 κλινικές μελέτες να έχουν συμπεριλάβει τους CTCs ως βιοδείκτη (70). Οι στόχοι της έρευνας για το κλινικό δυναμικό των CTCs περιλαμβάνουν (α) την εκτίμηση του κινδύνου για μεταστατική υποτροπή ή μεταστατική εξέλιξη, (β) τη διαστρωμάτωση των ασθενών και την παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της αποτελεσματικότητας της θεραπείας, (γ) την αναγνώριση θεραπευτικών στόχων και μηχανισμών αντίστασης και (δ) κατανόηση της ανάπτυξης μεταστάσεων σε ασθενείς με καρκίνο (79, 82).

3.3.1. Εμπλουτισμός και ανίχνευση CTCs

Ο προσδιορισμός και ο χαρακτηρισμός των CTC απαιτούν εξαιρετικά ευαίσθητες αναλυτικές μεθοδολογίες που περιλαμβάνουν ένα συνδυασμό διαδικασιών εμπλουτισμού και ανίχνευσης (86). Λόγω της εξαιρετικά μικρής αναλογίας CTCs στο περιφερικό αίμα των ασθενών (περίπου ένα CTC στα 10^6 - 10^7 λευκοκύτταρα), οι αναλύσεις των CTCs ξεκινούν με ένα βήμα εμπλουτισμού που αυξάνει τη συγκέντρωσή τους, επιτρέποντας έτσι την ευκολότερη ανίχνευση και επακόλουθη ανάλυση μεμονωμένων CTCs (78, 81, 89).

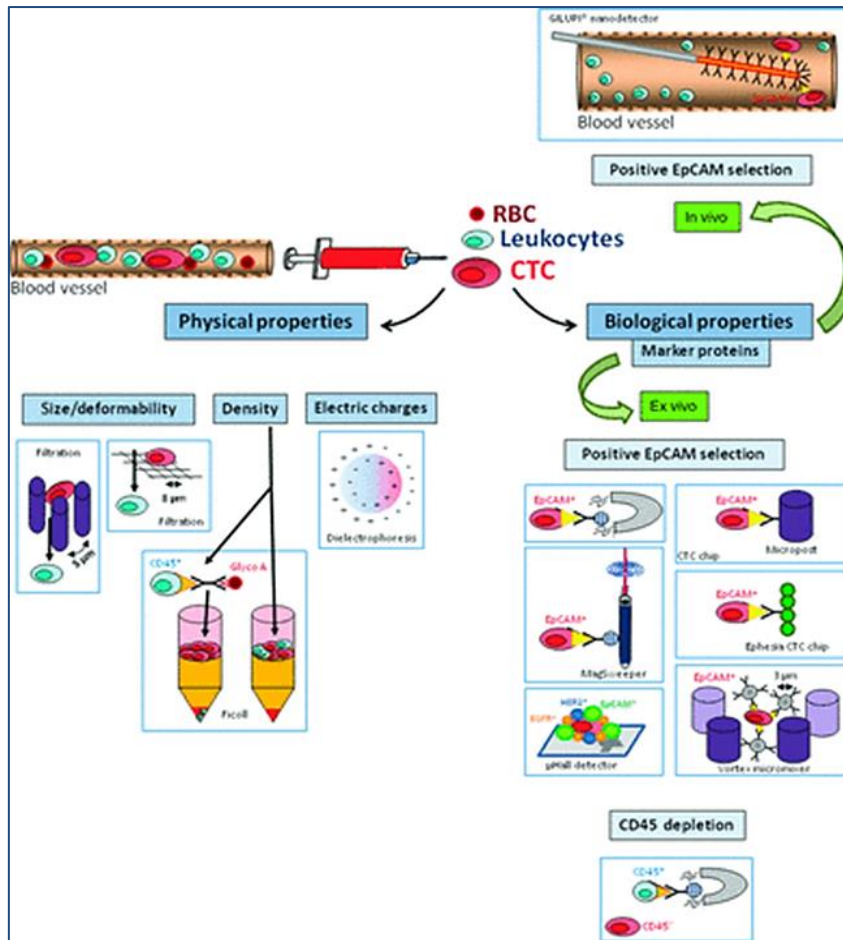
Οι προσεγγίσεις για τον **εμπλουτισμό** των CTCs περιλαμβάνουν πολυάριθμες τεχνολογίες που βασίζονται στις διαφορετικές ιδιότητες των CTCs που τα διακρίνουν από τα περιβάλλοντα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των **φυσικών ιδιοτήτων** (μέγεθος, πυκνότητα, επιφανειακό κυτταρικό φορτίο, ικανότητα παραμόρφωσης) και των **βιολογικών ιδιοτήτων** (έκφραση πρωτεϊνών-δεικτών στην επιφάνεια των κυττάρων, βιωσιμότητα) (79, 87). Στο **σχήμα 3.3**, παρουσιάζονται επιγραμματικά ορισμένες από αυτές τις τεχνικές.

Το πλεονέκτημα των φυσικών ιδιοτήτων είναι ότι επιτρέπουν τον διαχωρισμό CTCs χωρίς σήμανση. Οι μέθοδοι που βασίζονται σε φυσικές ιδιότητες περιλαμβάνουν (1) τη φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας (π.χ. με φικόλη (Ficoll)), (2) τη διήθηση μέσω ειδικών φίλτρων (π.χ. του φίλτρου ISET: Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells), όπου τα CTCs απομονώνονται βάσει μεγέθους, (3) τη χρήση βιοτσιπ μικρορευστοποίησης (π.χ. σύστημα Parsortix) που εκμεταλλεύεται τις μοναδικές διαφορές στο μέγεθος και την παραμόρφωση των καρκινικών κυττάρων (μεγαλύτερα και πιο άκαμπτα από τα κύτταρα του αίματος), (4) την τεχνική διηλεκτροφόρησης (dielectrophoresis DEP) για τον διαχωρισμό των κυττάρων με βάση το ηλεκτρικό φορτίο (τα καρκινικά κύτταρα φέρουν μεγαλύτερο αρνητικά επιφανειακά φορτίο σε σύγκριση με τα λευκά αιμοσφαίρια). Δυστυχώς, αυτές οι τεχνικές παρουσιάζουν ορισμένους περιορισμούς, καθώς οι τρέχουσες

τεχνολογίες στερούνται ειδικότητας λόγω ετερογένειας των κυττάρων (π.χ. μεγάλο εύρος μεγεθών των CTCs (4-30 μm)). (79, 84, 88, 90).

Οι τεχνικές εμπλουτισμού που βασίζονται τις βιολογικές ιδιότητες των CTCs, χρησιμοποιούν ανοσολογικές αντιδράσεις **θετικής και αρνητικής επιλογής**. Για την αρνητική επιλογή χρησιμοποιούνται αντισώματα έναντι του κοινού λευκοκυτταρικού αντιγόνου CD45 (79). Αντίθετα, η διαδικασία θετικού εμπλουτισμού πραγματοποιείται με τη χρήση δεικτών κυτταρικής επιφάνειας όπως το μόριο προσκόλλησης επιθηλιακών κυττάρων (EPCAM), που χρησιμοποιείται επίσης και σε τεχνικές *in vivo* απομόνωσης (85, 87). Μειονέκτημα αυτών των τεχνικών αποτελεί το γεγονός ότι τα CTCs μπορεί να αλλάξουν δυναμικά την έκφραση ενός δεδομένου αντιγόνου υπό ορισμένες συνθήκες, με αποτέλεσμα την υποεκτίμηση του συνολικού πληθυσμού CTCs σε ένα δεδομένο δείγμα (83).

Η *in vivo* τεχνολογία επιτρέπει τον εμπλουτισμό των CTCs απευθείας στη φλέβα του βραχίονα του ασθενούς, μέσω της εισαγωγής ενός νανοανιχνευτή, (GILUPI CellCollector®) με τη χρήση τυπικής βελόνας 20-gauge, γεγονός που επιτρέπει τον εμπλουτισμό των CTCs από περίπου 1,5 L αίματος, κι επομένως μπορεί να είναι κατάλληλη μέθοδος για τη συλλογή μεγαλύτερων ποσοτήτων CTCs. Τα EPCAM θετικά κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα δεσμεύονται *in-vivo* με αντισώματα αντι-EPCAM, τα οποία είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα με τον CellCollector®, ενώ η λειτουργική επιφάνειά του είναι κατασκευασμένη έτσι ώστε να αποτρέπει τη μη ειδική δέσμευση άλλων συστατικών του αίματος (79, 86). Η τεχνολογία αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση CTCs από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, του μαστού, του προστάτη και κεφαλής και τραχήλου (84). Χρησιμοποιήθηκε όμως για πρώτη φορά σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη, όπου ανιχνεύθηκαν μετάγραφα EGFR και PSMA, που σχετίζονται με τον όγκο, στο 42,8% και στο 14,3% αντίστοιχα, των δειγμάτων που αναλύθηκαν (86).



Σχήμα 3.3.: Μέθοδοι για τον εμπλουτισμό CTCs (79).

Το σύστημα **CellSearch®** αποτελεί το καθιερωμένο πρότυπο («Gold Standard») για όλες τις νέες μεθόδους ανίχνευσης CTCs. Εξακολουθεί να είναι το μόνο σύστημα το οποίο εγκριθεί από τον FDA (Food & Drug Administration, USA), για την παρακολούθηση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, του προστάτη και του παχέος εντέρου (79, 85, 86, 87). Πρόκειται για ένα σύστημα ημι-αυτόματο και εξαιρετικά αναπαραγώγιμο, που δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης και απαρίθμησης CTCs επιθηλιακής προέλευσης στο περιφερικό αίμα (7,5 mL σε μεταστατικές περιπτώσεις και 22,5 mL σε πρώιμες περιπτώσεις) μέσω του ανοσομαγνητικού εμπλουτισμού τους με βάση τον δείκτη **EpCAM** (86). Στη συνέχεια, για τον χαρακτηρισμό των κυττάρων, τα CTCs χρωματίζονται περαιτέρω με μονοκλωνικά αντισώματα των κυτταροκερατινών **CK-8**, **CK-18** και **CK-19**, τα οποία είναι ειδικά για τα επιθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, τα κύτταρα χρωματίζονται με μια χρώση για τον εντοπισμό του κοινού λευκοκυτταρικού αντιγόνου **CD45** (αρνητικός δείκτης), ο οποίος προσδιορίζει τυχόν λευκοκύτταρα που μπορεί να έχουν μολύνει το δείγμα, και με μια χρώση DNA που ονομάζεται 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη (4',6-diamidino-2-phenylindole - **DAPI**) η οποία προστίθεται επίσης για να επισημάνει τους πυρήνες τόσο των CTCs όσο και των λευκοκυττάρων, έτσι ώστε να προσδιοριστεί η βιωσιμότητα των κυττάρων. Συνεπώς, μέσω ανάλυσης εικόνας με μικροσκόπιο φθορισμού, τα CTCs ορίζονται ως κύτταρα CK + /CD45 - /DAPI + (79, 86, 87, 90).

Μετά τον εμπλουτισμό των CTCs, ακολουθεί η ανίχνευση και ο μοριακός χαρακτηρισμός τους, που επιτυγχάνονται με τη χρήση διαφόρων μεθοδολογιών, όπως για παράδειγμα με ανοσοφθορισμό ή με ανάλυση νουκλεϊκών οξέων με PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) (81). Η απαρίθμηση των CTCs αποτελεί ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την πρόβλεψη της επιθετικότητας της νόσου και για την παρακολούθηση της θεραπευτικής ανταπόκρισης. Από την άλλη πλευρά, ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs θα μπορούσε να συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση της μεταστατικής διαδικασίας καθώς και της ετερογένειας των όγκων, έτσι ώστε να ενισχύσει την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών (83, 86).

Για την ανίχνευση **βιώσιμων** CTCs, χρησιμοποιείται η λειτουργική δοκιμασία **EPISPOT** (Epithelial ImmunoSPOT), η οποία μπορεί να προστεθεί σε κάθε είδους στάδιο εμπλουτισμού. Η συγκεκριμένη τεχνική ανιχνεύει τα μεμονωμένα επιθηλιακού τύπου CTCs, βάσει πρωτεϊνών που εκκρίνονται απ' αυτά, κατά τη διάρκεια 24-48 ωρών βραχυπρόθεσμης καλλιέργειας. Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε μεμβράνη επικαλυπτόμενη με αντισώματα έναντι ειδικών πρωτεϊνών, τα οποία έπειτα ανιχνεύονται με ένα δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με φθορίζουσα ουσία. Η ανάλυση EPISPOT έχει χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση δειγμάτων αίματος και μυελού των οστών από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, του προστάτη και του παχέος εντέρου (79, 86).

Η ανίχνευση των CTCs με ανάλυση νουκλεϊκών οξέων εκμεταλλεύεται την εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα της PCR. Βασίζεται στην απομόνωση ολικού RNA από βιώσιμα CTCs και ακολουθεί η ενίσχυση ειδικών στόχων με **RT-qPCR**. Μέσω αυτής της τεχνικής, μπορούν να προκύψουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την έκφραση μιας ποικιλίας στόχων. Η RT-qPCR μπορεί να εφαρμοστεί με σχεδιασμό *in silico* (μέσω της χρήσης ειδικών λογισμικών) κατάλληλων εκκινήτων και ανιχνευτών, έχει υψηλή απόδοση, επιτρέπει την αυτοματοποίηση των συστημάτων και μπορεί να υποβληθεί σε εσωτερικό και εξωτερικό έλεγχο ποιότητας. Οι μοριακές μέθοδοι παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως μεγάλη ευελιξία, ειδικά σε πολλαπλές PCR (multiplex PCR), που μειώνει τις απαιτούμενες ποσότητες δειγμάτων, το χρόνο και το κόστος ανάλυσης. Αν και μέσω αυτών των τεχνικών δίνεται η δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μιας ποικιλίας μοριακών δεικτών στα CTCs, υπάρχουν και ορισμένοι περιορισμοί. Ενώ μπορεί να εκτιμηθεί ο αριθμός των μεταγράφων-στόχων, δεν επιτρέπουν την ακριβή εκτίμηση του αριθμού των CTCs που υπάρχουν σε ένα δείγμα (86, 91).

Ένας εμπορικά διαθέσιμο kit για τον προσδιορισμό CTCs με βάση το RNA, το AdnaTest™, χρησιμοποιεί μη ποσοτική RT-PCR για τον εντοπισμό κυττάρων που εκφράζουν μετάγραφα γονιδίων ειδικών για όγκους μετά από ανοσομαγνητική σύλληψη κυττάρων MUC1 + /HER2 + /EpCAM +. Οι περιορισμοί της ανάλυσης προέρχονται από το γεγονός ότι η MUC1 εκφράζεται επίσης σε ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα (79).

3.4. Κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA)

Τμήματα DNA μπορούν να βρεθούν στην κυκλοφορία ως ελεύθερο κυττάρων συστατικό του αίματος (**cfDNA - Cell free DNA**). Το cfDNA αναγνωρίστηκε αρχικά το 1948 από τους Mandel και Metais, όμως παρόλα αυτά μέχρι το 1990 δεν είχε χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ειδικών για όγκο μεταλλάξεων (93, 94). Τα μόρια του cfDNA μπορεί να απελευθερωθούν στο αίμα κατά την απόπτωσης ή τη νέκρωση των κυττάρων. Αφού αποβληθούν στην κυκλοφορία, λόγω έλλειψης προστασίας, τα κυκλοφορούντα DNA μπορεί να αποικοδομηθούν μειώνοντας τη συγκέντρωση στο πλάσμα (μπορεί να απομακρυνθούν απ' την κυκλοφορία του αίματος **μέσα σε μία ώρα απ' την απελευθέρωση**). Στο πλάσμα υγιών ατόμων, βρέθηκε ότι το επίπεδο του cfDNA από τα φυσιολογικά κύτταρα είναι χαμηλό (10-15 ng /mL κατά μέσο όρο). Τα επίπεδα του cfDNA, ωστόσο, αυξάνονται υπό συνθήκες στρες των ιστών, συμπεριλαμβανομένης της άσκησης, της φλεγμονής, της χειρουργικής επέμβασης ή της βλάβης των ιστών (66, 92).

Το κυκλοφορούν καρκινικό DNA (**ctDNA - Circulating tumor DNA**) είναι ουσιαστικά κατακερματισμένο DNA στην κυκλοφορία του αίματος που προέρχεται όμως αποκλειστικά απ' τον όγκο και κωδικοποιεί γονίδια των καρκινικών κυττάρων. Δεν πρόκειται απλά για ένα υποσύνολο του cfDNA, αλλά για ένα μείγμα κατακερματισμένων αλληλόμορφων που προέρχονται από διαφορετικές εναποθέσεις όγκων (67, 92). Τα περισσότερα θραύσματα ctDNA είναι δίκλινα θραύσματα με μήκος 160-200 ζευγών βάσεων. Η ποσότητα του ctDNA που εισέρχεται στο αίμα επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η θέση του όγκου, το μέγεθος, η μετάσταση, η αγγειακή διήθηση, η κατάσταση του όγκου και το στάδιο. Επομένως, η αναλογία του ctDNA στο αίμα ποικίλλει σημαντικά, μεταξύ 0,01% και περισσότερο από 90% (66, 93).

Γενικά, οι ασθενείς με καρκίνο έχουν πολύ υψηλότερα επίπεδα φυσιολογικού κυκλοφορούντος cfDNA σε σχέση με τα υγιή άτομα. Καθώς αυξάνεται το μέγεθος του όγκου, αυξάνεται και ο κυτταρικός κύκλος και επομένως ο αριθμός των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων. Υπό κανονικές φυσιολογικές συνθήκες, τα αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα απομακρύνονται από διεισδυτικά φαγοκύτταρα. Αυτό δεν συμβαίνει αποτελεσματικά εντός του όγκου, οδηγώντας στη συσσώρευση κυτταρικών υπολειμμάτων και στην αναπόφευκτη απελευθέρωσή τους στην κυκλοφορία του αίματος (93).

Στην ογκολογία, η ανίχνευση του ctDNA υπήρξε πρόκληση κυρίως για τρεις λόγους, οι οποίοι περιλαμβάνουν: (i) τη διάκριση του ctDNA από το φυσιολογικό cfDNA, (ii) την παρουσία ορισμένες φορές εξαιρετικά χαμηλών επιπέδων ctDNA και (iii) τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό του αριθμού των μεταλλαγμένων θραυσμάτων σε ένα δείγμα. Η διάκριση του ctDNA από το φυσιολογικό cfDNA υποβοηθάται από το γεγονός ότι το DNA του όγκου ορίζεται από την παρουσία ειδικών για τον καρκίνο μεταλλάξεων που εξασφαλίζουν την εξειδίκευση του ctDNA ως βιοδείκτη (67, 93).

Το κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA) αναδεικνύεται ως ένας πολλά υποσχόμενος βιοδείκτης για την έγκαιρη ανίχνευση μοριακών αλλαγών του όγκου, καθώς ctDNA εκκρίνονται από τον όγκο στην κυκλοφορία του αίματος πριν καν γίνει ορατός και

ανιχνευθούν σημάδια ασθένειας. Επιπλέον, σε αντίθεση με το DNA που εξάγεται από την παραδοσιακή βιοψία ιστού, η οποία αξιολογεί μόνο ένα μικρό τμήμα του όγκου, το ctDNA προσφέρει μια πιο ολοκληρωμένη αναπαράσταση όλων των μεταλλάξεων από ολόκληρο το φορτίο όγκου του ασθενούς (94).

Η ανάλυση ctDNA αποδείχθηκε πρόσφατα ότι είναι πολλά υποσχόμενη για την πρόωμη ανίχνευση του καρκίνου: Το **CancerSEEK** είναι μια πρόσφατα αναπτυγμένη εξέταση αίματος που μπορεί να ανιχνεύσει οκτώ κοινούς τύπους καρκίνου μέσω της ποσοτικοποίησης των επιπέδων πρωτεΐνης της κυκλοφορίας και των μεταλλάξεων στο cfDNA (58). Ορισμένες ακόμη τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των ctDNA περιλαμβάνουν κυρίως την Amplification Refractory Mutation System (ARMS) PCR, την ψηφιακή PCR σταγονιδίων (ddPCR-droplet digital PCR) και την αλληλούχιση νέας γενιάς NGS (Next Generation Sequencing), τα οποία μπορούν να πραγματοποιήσουν ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του ctDNA και ακριβή ανίχνευση ctDNA μέσω ενίσχυσης DNA (66).

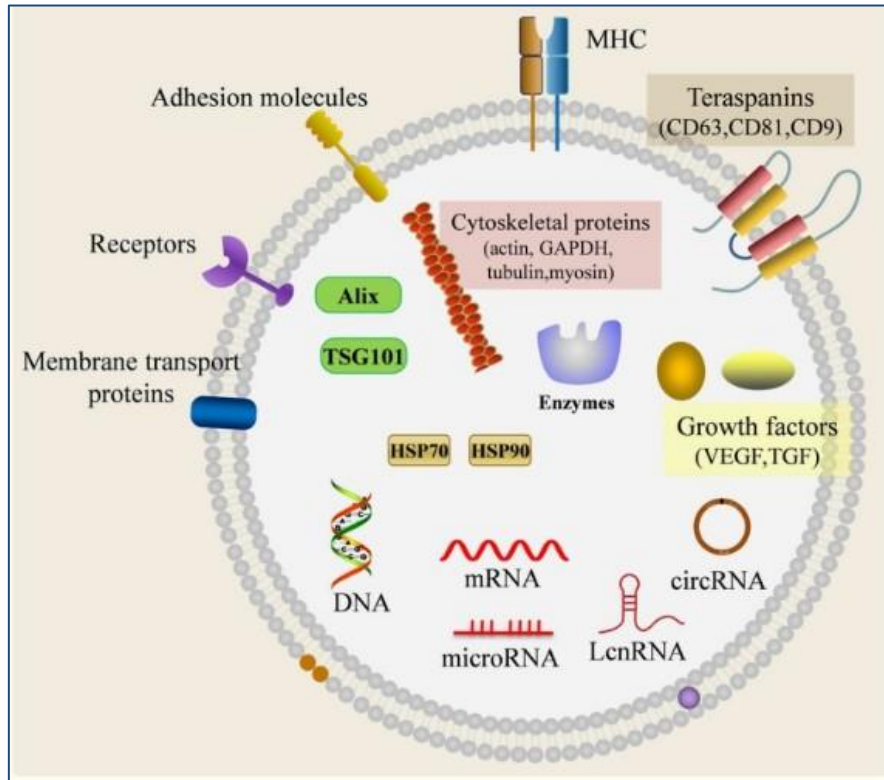
3.5. Εξωσώματα

Τα εξωκυτταρικά κυστίδια (**Extracellular Vesicles- EVs**) εκκρίνονται από όλα τα είδη κυττάρων και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία. Τα EVs καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα κυστιδίων που εκκρίνονται από κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των μικροκυστιδίων, των αποπτωτικών σωμάτων και των εξωσωμάτων (95, 96, 98). Τα εξωσώματα περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1983 κατά την ωρίμανση των δικτυοερυθροκυττάρων, όπου υποδοχείς τρανσφερίνης μεταφέρονταν μέσω ενεργών κυστιδίων, διαμέτρου περίπου 50 nm, στον εξωκυτταρικό χώρο (95, 97, 98).

Πρόκειται για κυστίδια με λιπιδική διπλοστιβάδα και διάμετρο που κυμαίνεται στο εύρος 30-160 nm. Τα εξωσώματα συνεχώς απελευθερώνονται και ανακυκλώνονται από τα κύτταρα. Κατά τη διαδικασία της ενδοκύτωσης, τα εξωσώματα επανεισάγονται στα κύτταρα, όπου ονομάζονται ενδοσωμάτια. Έπειτα πακετάρονται μαζί, δημιουργώντας τα πολυκυστιδιακά σωματίδια (Multivesicular Bodies - **MVBs**). Τα σωματίδια αυτά, τα οποία είναι πλούσια σε χοληστερόλη, τήκονται με την πλασματική μεμβράνη (εξωκύτωση) και απελευθερώνονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον ως εξωσώματα, ενώ εκείνα στα οποία υπάρχει έλλειψη χοληστερόλης, ανακυκλώνονται στα λυσοσώματα. Τα εξωσώματα εκκρίνονται από τα περισσότερα κύτταρα, μεταφέροντας πληροφορίες με τη μορφή του περιεχομένου τους, που περιλαμβάνει πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα, σε άλλα κύτταρα (**Σχήμα 3.4.**) σε όλο το σώμα, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο τόσο σε φυσιολογικές διεργασίες όσο και στην ανάπτυξη ασθενειών (64, 92, 95).

Η απελευθέρωση φέρεται να εξαρτάται από το ενδοκυτταρικό ασβέστιο, τις Rab GTPάσες και τις πρωτεΐνες SNARE. Επίσης, η διαδικασία εξαρτάται και από την τιμή του pH. Σε ορισμένα καρκινικά κύτταρα, η εξωσωμική απελευθέρωση εξαρτάται από την οικογένεια των Rab πρωτεϊνών και συγκεκριμένα από τις Rab11, 27A, 31, οι οποίες είναι σημαντικοί ρυθμιστές της μεμβρανικής διακίνησης. Κύτταρα με μεταλλαγμένες μορφές

αυτών των πρωτεϊνών, απελευθερώνουν λιγότερα εξωσώματα. Ο μεταγραφικός παράγοντας p53, βρέθηκε επίσης να συμμετέχει στην εξωσωμική απελευθέρωση. Ενεργοποίηση του παράγοντα p53, μέσω ακτινοβολίας, έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση υψηλότερων ποσοστών εξωσωμάτων (100).



Σχήμα 3.4.: Μοριακή σύσταση εξωσωμάτων (99).

Τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν τουλάχιστον 10 φορές περισσότερα εξωσώματα από τα φυσιολογικά κύτταρα. Τα εξωσώματα που προέρχονται από όγκο (Tumor Derived Exosomes - **TDEs**) μπορούν να διευκολύνουν την διακυτταρική επικοινωνία μέσω της μεταφοράς αυξητικών παραγόντων, microRNAs και άλλων μικρών μορίων και να συμμετέχουν σε διάφορες καρκινικές διεργασίες, όπως η αναδιαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (Tumor Microenvironment - **TME**), η αγγειογένεση, η μετάσταση και η αντοχή στα φάρμακα (95, 97, 98).

Τα εξωσώματα παρουσιάζουν φυσική αντοχή και μεγάλο χρόνο ημιζωής in vivo, γεγονός που υποδηλώνει την καταλληλότητά τους για τη χρήση τους ως νέοι ευαίσθητοι βιοδείκτες στην υγρή βιοψία (96). Επιπλέον, η παρουσία μεγάλων ποσοτήτων εξωσωμάτων στην κυκλοφορία, η σταθερότητά τους λόγω της διπλοστιβάδας που τα περιβάλλει και το γεγονός ότι εκκρίνονται από ζωντανά κύτταρα (και όχι αποπτωτικά όπως στην περίπτωση των ctDNA) δείχνει ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως καρκινικοί βιοδείκτες (64).

Μια απ' τις κύριες προκλήσεις για την εφαρμογή των εξωσωμάτων στην υγρή βιοψία είναι η απομόνωσή τους με υψηλή απόδοση και καθαρότητα. Μέχρι σήμερα, έχει αναπτυχθεί μια ποικιλία μεθόδων για την απομόνωση των εξωσωμάτων καθώς και για την ανίχνευση εξωσωματικών πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Για τον διαχωρισμό των εξωσωμάτων από τα σωματικά υγρά έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μέθοδοι συμπεριλαμβανομένης της υπερφυγοκέντρωσης και της καθίζησης με βάση πολυμερή και μεμβρανικές πρωτεΐνες όπως οι CD63, CD9 και CD81. Επειδή περιέχουν πρωτεΐνες καθώς και μια σειρά νουκλεϊκών οξέων, τα εξωσώματα χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο ως πηγή για βιοδείκτες καρκίνου (92).

*Σκοπός
της εργασίας*

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το εργαστήριό μας, σε προηγούμενη μελέτη, ανέδειξε την επίδραση του γενωμικού DNA στην ανίχνευση των κυκλοφορούντων lncRNA. Λόγω έλλειψης εξωνίων σε μερικά lncRNAs και της έλλειψης ενός σταδίου απομάκρυνσης του DNA, στις περισσότερες μελέτες που έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα, εγείρονται σοβαρά ερωτήματα σχετικά με την ειδικότητα της ανίχνευσης lncRNA και τη δυνατότητα αναφοράς ψευδών θετικών αποτελεσμάτων. Στην τρέχουσα μελέτη, αρχικά αξιολογήσαμε την επίδραση gDNA στην έκφραση του lncRNA και τη σημασία της συμπερίληψης ενός σταδίου επεξεργασίας με DNase. Ως μοντέλο, επιλέξαμε ένα από τα πιο ευρέως μελετημένα lncRNA στον καρκίνο και συγκεκριμένα το HOTTIP. Επιπλέον, έγινε σύγκριση δύο διαφορετικών ζευγών εκκινήτων, εκ των οποίων το ένα ζεύγος ήταν σχεδιασμένο σε περιοχή συρραφής εσωνίου - εξωνίου (junction) και το άλλο ζεύγος, ενώ αναφερόταν η χρήση του σε πολλές μελέτες στη βιβλιογραφία για το HOTTIP, δεν ήταν σχεδιασμένο σε junction περιοχή. Τα ευρήματά μας έδειξαν ξεκάθαρα ότι τα αποτελέσματα στην έκφραση του HOTTIP επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία μόλυνσης του DNA και ότι το στάδιο θεραπείας με DNase και ο σχεδιασμός ειδικών εκκινήτων είναι απολύτως απαραίτητα για την αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.

Επιπλέον, μελετήθηκε η έκφραση του HOTTIP με τη χρήση RT-PCR σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και εφόσον παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση του γονιδίου του HOTTIP στην κυτταρική σειρά PC3, μεταστατικού καρκίνου του προστάτη, μελετήθηκε περεταίρω η έκφρασή του σε δείγματα κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων και εξωσωμάτων ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη. Τα παραπάνω πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να αξιολογηθεί η χρήση του HOTTIP ως πιθανού βιοδείκτη για τον μεταστατικό καρκίνο του προστάτη.

Πειραματικό Μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

«ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ»

4.1. Υλικά

4.1.1. Κλινικά δείγματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία συλλέχθηκαν 41 δείγματα περιφερικού αίματος από ασθενείς με μεταστατικό ορμονοάντοχο καρκίνο του προστάτη (mCRPC) και 7 δείγματα από υγιείς δότες που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου. Όλοι οι ασθενείς έλαβαν χημειοθεραπεία ή ορμονικούς παράγοντες πριν την ανάλυση. Επιπλέον, όλοι οι ασθενείς υπέγραψαν τη συγκατάθεσή τους για τη συμμετοχή τους στη μελέτη, όπως αυτή εγκρίθηκε από την Εθνική και Επιστημονική Επιτροπή του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «Αρεταίειο».

4.1.2. Κυτταρικές σειρές

Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για τη μελέτη της έκφρασης του HOTTIP, είναι οι ακόλουθες:

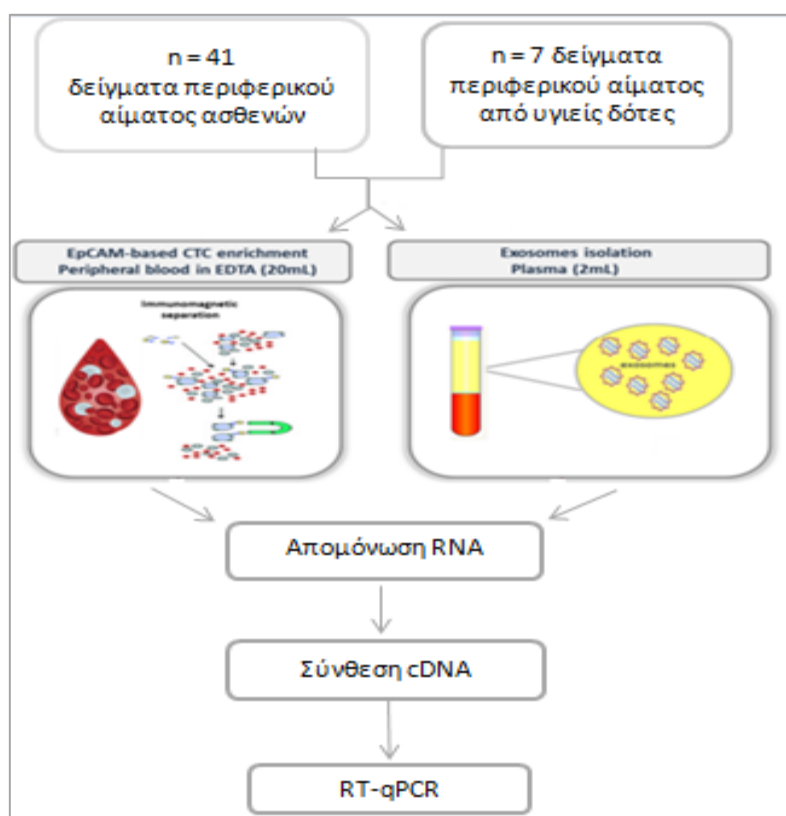
- A549 (κυτταρική σειρά καρκίνου του **πνεύμονα**).
- SKBR3 (επιθηλιακή κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος **μαστού**).
- MDA-MB-231 (επιθηλιακή κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος **μαστού**).
- DU145 (επιθηλιακή κυτταρική σειρά καρκίνου του **προστάτη**).
- PC3 (επιθηλιακή κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος σταδίου IV καρκίνου του **προστάτη**).
- SCC7 (κυτταρική σειρά καρκίνου **κεφαλής και τραχήλου**).

Επιπλέον, προκειμένου να γίνει έλεγχος της σωστής διεξαγωγής και καλής απόδοσης της αντίδρασης RT-qPCR, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω κυτταρικές σειρές ως θετικοί μάρτυρες (positive controls):

- 10^6 κύτταρα MCF-7 (κυτταρική σειρά καρκίνου του **μαστού**).
- 300 ng / μ L PC3 (κυτταρική σειρά καρκίνου του **προστάτη**).

4.2. Προκατεργασία δειγμάτων

Προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση των δειγμάτων από τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος, τα πρώτα 5 mL αίματος απορρίφθηκαν. Το περιφερικό αίμα συλλέχθηκε σε σωληνάρια K₂EDTA (20 mL) (BD Vacutainer, Plymouth, UK). Τα δείγματα αίματος αναμίχθηκαν αμέσως μετά τη συλλογή, αναστρέφοντας ήπια 10 φορές, και στη συνέχεια διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Τα ίδια δείγματα αίματος χρησιμοποιήθηκαν τόσο για ανάλυση CTCs όσο και για ανάλυση εξωσωμάτων. Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία για την απομόνωση CTCs και πλάσματος εντός δύο ωρών.



Σχήμα 4.1.: Διάγραμμα πειραματικού σχεδιασμού επεξεργασίας δειγμάτων.

4.2.1. Απομόνωση CTCs από περιφερικό αίμα με χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα σφαιρίδια EpCAM (Dynabeads™ Epithelial Enrich, Invitrogen) με θετική επιλογή. Τα κύτταρα μπορούν να απομονωθούν απευθείας από το ολικό αίμα ή από το κλάσμα των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, **PBMC**), στα οποία έχει προηγηθεί λύση των ερυθρών κυττάρων με το Red Cell Lysis Buffer (**RCL**).

Κατά τη διάρκεια μιας μικρής περιόδου επώασης τα επιθηλιακά κύτταρα προσδένονται στα σφαιρίδια EpCAM και ακολούθως τα προσδεδεμένα κύτταρα μπορούν να απομονωθούν και να εκπλυθούν με την εφαρμογή μαγνητικού πεδίου. Τα σφαιρίδια EpCAM Epithelial Enrich είναι ομοιόμορφα, παραμαγνητικά σφαιρίδια από πολυστυρένιο (4,5 μm σε διάμετρο), καλυμμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού τύπου IgG1 (mAb Ber-EP4) ειδικό για δύο γλυκοπολυπεπτιδικά μεμβρανικά αντιγόνα του EpCAM (34 kDa και 39 kDa), τα οποία εκφράζονται στους περισσότερους φυσιολογικούς και νεοπλασματικούς ανθρώπινους επιθηλιακούς ιστούς. Τα εμπλουτισμένα κύτταρα είναι βιώσιμα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας σε διάφορες ερευνητικές εφαρμογές, όπως απομόνωση RNA και RT-PCR. Τα μαγνητικά σφαιρίδια είναι αδρανή και δεν παρεμποδίζουν στις ακόλουθες διαδικασίες.

Αντιδραστήρια -Υλικά

- RCL 1× (που περιέχει NH₄Cl, 155 mmol/L, KHCO₃, 10 mmol/L και EDTA, 0,1 mmol/L, pH = 7,3)
- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- EpCAM Beads (Dynabeads Epithelial Enrich Invitrogen) με συγκέντρωση 4 × 10⁸ σφαιρίδια / mL PBS (pH=7,4), το οποίο περιέχει επίσης 0,1% BSA (Bovine Serum Albumin) και 0,02% νατραζίδιο (NaN₃) ως συντηρητικό.
- Διάλυμα έκπλυσης που περιέχει PBS (pH 7,4), 1% FBS, και 0,6% κιτρικό νάτριο).
- Μαγνητική συσκευή διαχωρισμού Dynal (Magnetic Particle Concentrator, MPC)

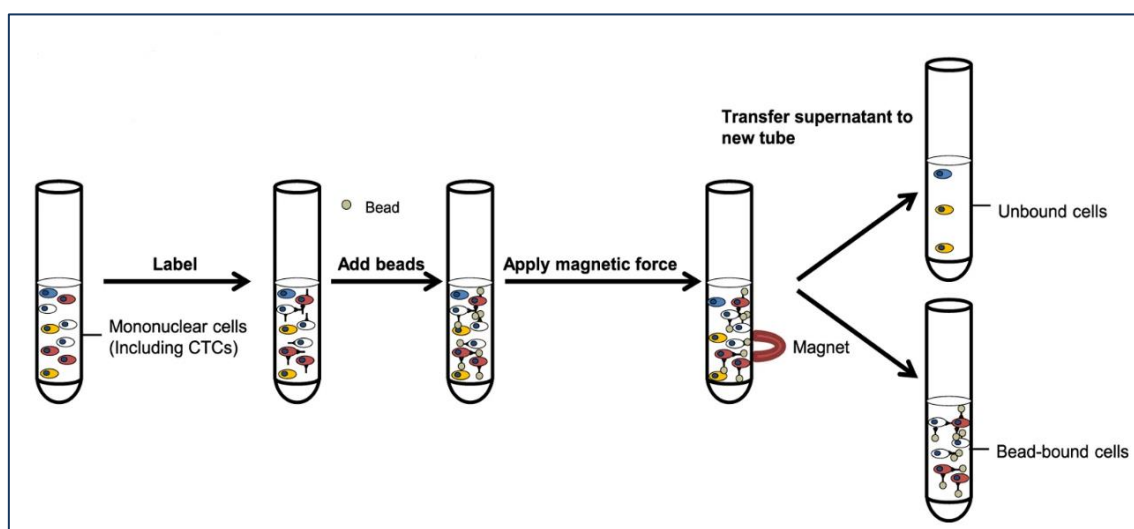
Πειραματική διαδικασία

1. Σε 10 mL δείγματος περιφερικού αίματος προστίθενται 30 mL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων - RCL ώστε να πραγματοποιηθεί λύση των κυττάρων και τα δείγματα επωάζονται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, αναμειγνύοντας περιοδικά με ήπια αναστροφή.
2. Μετά από φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στα 530 × g σε θερμοκρασία δωματίου, το υπερκείμενο αποχύνεται και στη συνέχεια προστίθενται 30 mL διαλύματος RCL.
3. Μετά από δεύτερη φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 530 × g σε θερμοκρασία δωματίου, το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθενται 10 mL διαλύματος RCL. Το μίγμα αφήνεται για 10 λεπτά σε RT ανακινώντας περιοδικά.

Έπειτα, ακολουθεί εμπλουτισμός των CTCs με τη χρήση σφαιριδίων με μονοκλωνικό αντίσωμα BerEP4, έναντι του επιθηλιακού αντιγόνου EpCAM. Πιο συγκεκριμένα:

4. Προστίθενται 25 μL (1×10⁷ σφαιρίδια) από τα σφαιρίδια EpCAM Epithelial Enrich, που είναι αναδιαλυμένα σε διάλυμα έκπλυσης, για κάθε 1 mL εναιωρήματος PBMC και τα δείγματα τοποθετούνται σε περιστροφικό αναδευτήρα για 30 min στους 2-8°C, ώστε να λάβει χώρα η πρόσδεση των καρκινικών κυττάρων στα σφαιρίδια.

5. Τα σωληνάρια τοποθετούνται στο μαγνήτη για 3 min στους 2-8°C, ώστε τα μαγνητικά σφαιρίδια, όπου έχουν προσδεθεί τα κύτταρα, να μετακινηθούν στο τοίχωμα του κάθε σωληναρίου.
6. Αφαιρείται το υπερκείμενο διάλυμα, το οποίο περιέχει τα PBMC προσεκτικά με την πιπέτα χωρίς να διαταραχθεί το αδιάλυτο των μαγνητικών σφαιριδίων (κλάσμα των CTC). Το κλάσμα των PBMC ακολούθως φυγοκεντρείται για 10 min στα 530 × g, ώστε να καθιζάνουν τα κύτταρα.
7. Στο κλάσμα των CTC (EpCAM+) προστίθενται 1 mL διαλύματος έκπλυσης (4°C), αφαιρούνται τα σωληνάρια από το μαγνήτη και αναδιαλύονται τα μαγνητικά σφαιρίδια, που φέρουν τα προσδεμένα επιθηλιακά κύτταρα, με πολλή προσοχή.
8. Τα σωληνάρια επανατοποθετούνται στο μαγνήτη για 3 min, αφαιρείται το υπερκείμενο με προσοχή και προστίθεται εκ νέου 1 mL διαλύματος έκπλυσης (4°C). Τα σωληνάρια αφαιρούνται και πάλι από το μαγνήτη και τα σύμπλοκα κυττάρων – σφαιριδίων αναδιαλύονται με προσοχή με πιπέτα, σε 1 mL διαλύματος έκπλυσης. Το παραπάνω βήμα επαναλαμβάνεται για άλλες 3 φορές, ώστε συνολικά οι εκπλύσεις να είναι 5.
9. Το εναίωρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο μετά την προσθήκη του τελευταίου διαλύματος έκπλυσης και απομακρύνεται το υπερκείμενο.
10. Στο σωληνάριο με τα σύμπλοκα κυττάρων-σφαιριδίων προστίθεται 1mL αντιδραστηρίου TRIzol-LS (Invitrogen, USA) και ακολουθεί ανάδευση με την πιπέτα ώστε να επιτευχθεί πλήρης λύση των κυττάρων.
11. Το σωληνάριο επανατοποθετείται στον μαγνήτη για 3min και αφαιρείται το υπερκείμενο, το οποίο αποχύνεται σε νέο σωληνάριο τύπου Eppendorf
12. Αποθήκευση του δείγματος στους -70°C μέχρι να πραγματοποιηθεί απομόνωση RNA και DNA.



Σχήμα 4.2.: Πορεία απομόνωσης κυκλοφορούντων επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια.

4.2.2. Απομόνωση RNA από CTCs, καρκινικούς ιστούς και κυτταρικές σειρές.

Η απομόνωση υψηλής ποιότητας ολικού RNA από κύτταρα ή ιστούς, πραγματοποιείται με τη χρήση του αντιδραστηρίου **TRIzol-LS** (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA). Πρόκειται για ένα μονοφασικό διάλυμα που περιέχει φαινόλη και ισοθειοκυανική γουανιδίνη (GITC). Η λύση των κυττάρων επιτυγχάνεται με τη βοήθεια της ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, ενός ισχυρού αποδιατακτικού παράγοντα, ο οποίος εκτός αυτού, συμβάλλει και στην απομάκρυνση πρωτεϊνών από τα σύμπλοκά τους με το RNA και ταυτόχρονα αναστέλλει τις ριβονουκλεάσες (RNases) που ελευθερώνονται από οργανίδια όπως ο πυρήνας και τα λυσοσώματα κατά τη λύση των κυττάρων. Η αναστολή αυτή, επιτρέπει την απομόνωση μη αποικοδομημένου RNA. Έπειτα, με προσθήκη χλωροφορμίου και φυγοκέντρηση, το διάλυμα διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις: μία οργανική (φαινόλη, χλωροφόρμιο), μία ενδιάμεση (DNA) και μία υδατική φάση (RNA, ισοθειοκυανική γουανιδίνη).

Αντιδραστήρια

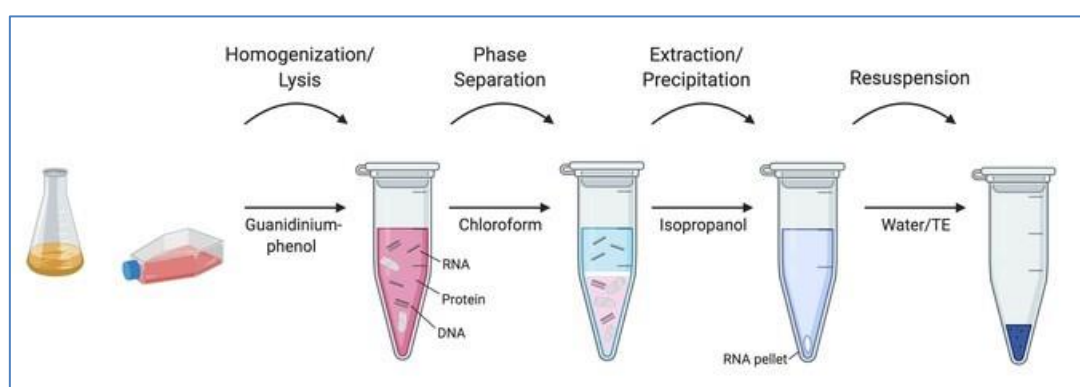
- Αντιδραστήριο TRIzol-LS
- Χλωροφόρμιο (CHCl₃)
- Ισοπροπανόλη
- 75% Αιθανόλη (EtOH)
- RNase-free H₂O

Πειραματική Πορεία

Η πειραματική πορεία απαιτεί δύο εργαστηριακές ημέρες. Πριν ξεκινήσει η διαδικασία θέτουμε τη φυγόκεντρο στους 4 °C.

1. 100 μL κυττάρων που προέρχονται είτε από απομόνωση με Parsortix ή RCL έχουν αναμειχθεί με 1 mL TRIzol και έχουν αποθηκευτεί στους -80 °C .
2. Αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου να ξεπαγώσουν.
3. Αφού ξεπαγώσουν, προστίθενται με αναλογία 1:5, 200 μL χλωροφορμίου (CHCl₃). Το χλωροφόρμιο διαχωρίζει τις φάσεις στην κατώτερη οργανική φάση (κόκκινη), που περιέχει πρωτεΐνες και μικρά κομμάτια DNA, στην ενδιάμεση φάση που περιλαμβάνει μεγαλύτερα κομμάτια DNA και στην ανώτερη διαυγή υδατική φάση που περιέχει αποκλειστικά το RNA.
4. Τα σωληνάρια eppendorfs ανακινούνται ισχυρά με το χέρι και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά.
5. Φυγοκεντρούνται στα 12000 × g για 15 λεπτά στους 2-8 °C.
6. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε άλλο σωληνάριο eppendorf, στο οποίο προστίθενται 500 μL ισοπροπανόλης.
7. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -20 °C μέχρι την επόμενη μέρα (**overnight**).
8. Τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα πραγματοποιείται φυγοκέντρηση αυτών στα 12000 × g για 30 λεπτά.

9. Το υπερκείμενο αποχύνεται από την αντίθετη πλευρά. Το ίζημα εκπλένεται με 1 mL EtOH 75% - αραιωμένη με ddH₂O, έπειτα πραγματοποιείται ήπια ανάδευση και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1200 × g για 10 λεπτά στους 4 °C. Αυτό το βήμα επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά.
10. Το υπερκείμενο αποχύνεται και πραγματοποιείται full speed spin. Το ίζημα αφήνεται σε κενό αέρα για 5-10 λεπτά ώσπου να στεγνώσει τελείως.
11. Γίνεται επαναδιαλυτοποίηση με 11 μL καθαρό H₂O.
12. Τα δείγματα επωάζονται για 3 λεπτά στους 55 °C (για την πλήρη εξάτμιση της EtOH, αφού παρεμποδίζει το φθορισμό) και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο.
13. Μικρή ποσότητα, 1 μL, από τα διαλύματα αυτά, χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του RNA σε φασματοφωτόμετρο.
14. Η υπόλοιπη ποσότητα των διαλυμάτων φυλάσσεται στους -70 °C.



Σχήμα 4.3.: Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων απομόνωσης RNA με χρήση TRIzol

4.2.3. Απομόνωση εξωσωμάτων

Τα εξωσώματα απομονώθηκαν από 2 mL πλάσματος με δέσμευση βασισμένη στη συγγένεια με τη στήλη (exoRNeasy Maxi kit, QIAGEN®, Germany). Η συγκεκριμένη μέθοδος δε διακρίνει τα EVs κατά μέγεθος ή κυτταρική προέλευση και δεν εξαρτάται από την παρουσία ενός συγκεκριμένου επιτόπου. Αντίθετα, χρησιμοποιεί ένα γενικό βιοχημικό χαρακτηριστικό των κυστιδίων για να ανακτήσει ολόκληρο το φάσμα των EVs που υπάρχουν σε ένα δείγμα.

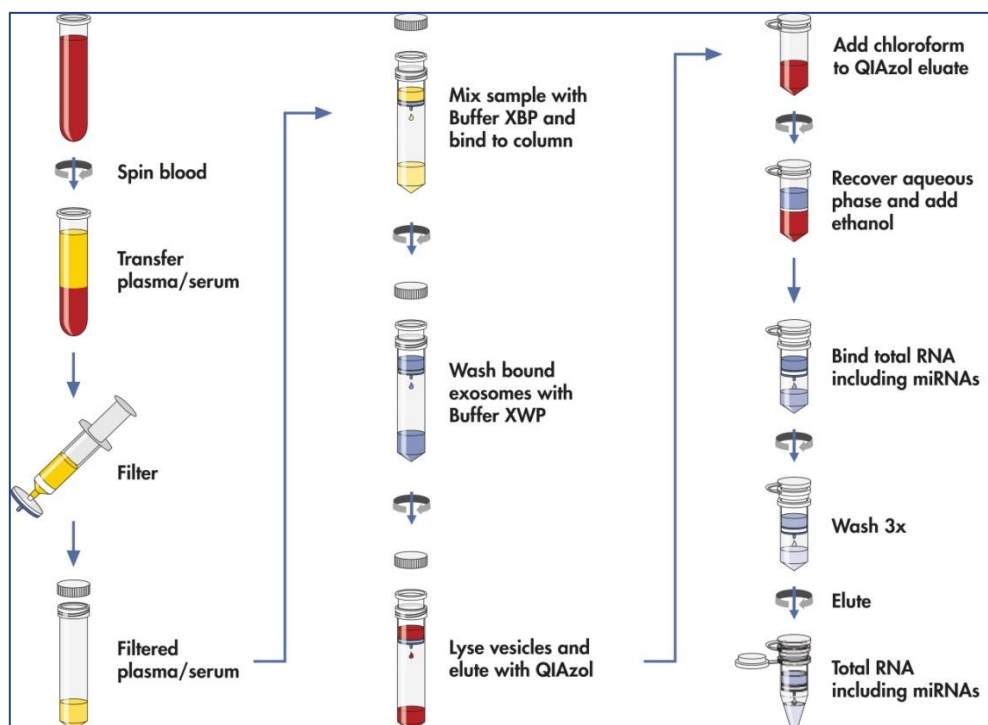
Πειραματική Διαδικασία

Η απομόνωση του πλάσματος από το περιφερικό αίμα πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση στα 530 × g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Έπειτα, τα δείγματα πλάσματος φυγοκεντρώνται ξανά στα 2.000 × g για 10 λεπτά σε RT και αποθηκεύονται στους -80 °C. Τα αποψυγμένα δείγματα πλάσματος φυγοκεντρώνται στα 16.000 × g για 10 λεπτά στους 4 °C ώστε να αφαιρεθούν όλα τα κυτταρικά υπολείμματα (εξαιρούνται σωματίδια μεγαλύτερα από 0,8 μm). Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ανάλυση RNA ειδικά από EVs, είναι απαραίτητο να αφαιρεθούν τα υπολειμματικά

κύτταρα, τα κυτταρικά θραύσματα και τα αποπτωτικά σωματίδια. Διαφορετικά, η ποσότητα του υπολειπόμενου κυτταρικού RNA υπερβαίνει κατά πολύ το cell-free RNA, καθιστώντας έτσι την ανάλυσή του αδύνατη.

1. Το προφιλτραρισμένο δείγμα πλάσματος αναμειγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα XBP σε αναλογία όγκου 1:1 και πραγματοποιείται καλή ανάδευση αναποδογυρίζοντας απαλά το tube 5 φορές.
2. Το μείγμα δείγματος - XBP προστίθεται στη στήλη περιστροφής exoEasy (δέσμευση εξωσωμάτων στη μεμβράνη). Έπειτα από φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα $500 \times g$, απορρίπτεται το υγρό και η στήλη επανατοποθετείται στο tube. (Σε αυτά τα δύο στάδια, σωματίδια όπως μεγαλύτερα συμπλέγματα πρωτεϊνών, που είναι ιδιαίτερα άφθονα στο πλάσμα και στον ορό, απομακρύνονται σε μεγάλο βαθμό).
3. Προστίθενται 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος XWP στη στήλη περιστροφής exoEasy Maxi και το μείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στα $5000 \times g$ ώστε να εκπλυθεί η στήλη και να αφαιρεθεί το υπόλοιπο ρυθμιστικό διάλυμα.
4. Μετά τη φυγοκέντρηση, αφαιρείται προσεκτικά η στήλη περιστροφής exoEasy απ' το σωληνάριο συλλογής και μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο συλλογής - tube.

Ακολουθεί η διαδικασία απομόνωσης του ολικού RNA, όπου τα δεσμευμένα εξωσώματα λύνονται με QIAzol. Στο ακόλουθο διάγραμμα (Σχήμα 4.4.) απεικονίζεται επιγραμματικά η διαδικασία απομόνωσης εξωσωμάτων και του ολικού RNA απ' αυτά.



Σχήμα 4.4.: Σχηματική απεικόνιση πειραματικής πορείας απομόνωσης εξωσωμάτων και ολικού RNA.

4.2.4. Απομόνωση RNA από τα εξωσώματα

Το RNA απομονώθηκε προσθέτοντας αντιδραστήριο **QIAzol** στη στήλη και το προϊόν λύσης συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση. Το ολικό RNA απομονώθηκε χρησιμοποιώντας το exoRNeasy Maxi kit (QIAGEN®). Όλα τα βήματα προετοιμασίας και χειρισμού RNA πραγματοποιήθηκαν σε ειδικούς θαλάμους νηματικής ροής (laminar flow hood), υπό συνθήκες RNase-free.

Ένα συνδυασμένο στάδιο λύσης και έκλουσης με βάση φαινόλη/γουανιδίνη απαιτείται για την απομόνωση του κυστιδικού RNA από τη στήλη και ακολουθεί καθαρισμός ολικού RNA με βάση τη μεμβράνη πυριτίου. Το αντιδραστήριο QIAzol είναι ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και θειοκυανικής γουανιδίνης, σχεδιασμένο να διευκολύνει τη λύση. Αυτό το αντιδραστήριο μετουσιώνει πρωτεϊνικά σύμπλοκα και RNases, και αφαιρεί επίσης το μεγαλύτερο μέρος του υπολειμματικού DNA και πρωτεϊνών από το προϊόν λύσης με οργανική εκχύλιση.

Πειραματική Πορεία

1. Προστίθενται 700 μL QIAzol στη μεμβράνη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα $5000 \times g$. Το διάλυμα μεταφέρεται σε tube των 2 mL, ανακινείται σύντομα και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά (αυτό το βήμα προάγει τη διάσπαση των συμπλεγμάτων νουκλεοπρωτεϊνών).
2. Προστίθενται 90 μL χλωροφορμίου και αφού καλυφθεί καλά το tube, αναδεύεται έντονα για 15 δευτερόλεπτα.
3. Το διάλυμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά και φυγοκεντρείται για 15 λεπτά σε $12.000 \times g$ στους 4°C . Μετά τη φυγοκέντρηση, το δείγμα διαχωρίζεται σε 3 φάσεις: μια ανώτερη, άχρωμη υδατική φάση που περιέχει RNA, μια λεπτή, λευκή ενδιάμεση φάση (DNA) και μια χαμηλότερη, κόκκινη οργανική φάση (πρωτεΐνες). Ο όγκος της υδατικής φάσης πρέπει να είναι περίπου 400 μL .
4. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο tube. Προστίθεται αιθανόλη 100% με αναλογία 1:2 και ακολουθεί καλή ανάδευση. Αυτό το βήμα παρέχει κατάλληλες συνθήκες δέσμευσης για όλα τα μόρια RNA, συμπεριλαμβανομένου του miRNA και άλλων small RNA.
5. Με τη χρήση πιπέτας, μεταφέρονται 700 μL δείγματος, συμπεριλαμβανομένου τυχόν ιζήματος που μπορεί να έχει σχηματιστεί, στη στήλη μέσα σε σωληνάριο συλλογής των 2 mL και το διάλυμα φυγοκεντρείται στα $8000 \times g$ για 15 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα ροής απ' τη στήλη απορρίπτεται και το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται χρησιμοποιώντας την υπόλοιπη ποσότητα δείγματος.
6. Προστίθενται 700 μL Buffer RWT στη στήλη και το διάλυμα φυγοκεντρείται για 15 δευτερόλεπτα στα $8000 \times g$. Απορρίπτεται το διάλυμα ροής.
7. Μεταφέρονται 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος RPE στη στήλη και το διάλυμα φυγοκεντρείται για 15 δευτερόλεπτα στα $8000 \times g$. Απορρίπτεται το διάλυμα ροής.
8. Μεταφέρονται 500 μL διαλύματος RPE στη στήλη και το διάλυμα φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στα $8000 \times g$. Απορρίπτεται το σωληνάριο συλλογής.

9. Η στήλη τοποθετείται σε ένα νέο tube 2 mL και με ανοιχτό καπάκι και φυγοκεντρείται σε πλήρη ταχύτητα για 5 λεπτά προκειμένου να στεγνώσει η μεμβράνη. Το σωληνάριο συλλογής απορρίπτεται. Είναι σημαντικό να στεγνώσει η μεμβράνη της στήλης περιστροφής, επειδή η υπολειμματική αιθανόλη μπορεί να επηρεάσει τις ακόλουθες αντιδράσεις. Η φυγοκέντρωση με τα καπάκια ανοιχτά διασφαλίζει ότι δεν μεταφέρεται αιθανόλη κατά την έκλυση RNA.
10. Η στήλη τοποθετείται σε νέο tube (1,5 mL) και προστίθενται 14 μ L νερού RNase-free απευθείας στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης. Αφού κλείσει απαλά το καπάκι, η στήλη επωάζεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 1 λεπτό σε πλήρη ταχύτητα ώστε να εκλυστεί το RNA.

4.3. Φωτομετρικός προσδιορισμός RNA στο NanoDrop

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του RNA, καθώς και ο έλεγχος της καθαρότητάς του, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του οργάνου Nanodrop® - 1000 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, USA), όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4.1**. Πρόκειται για ένα φασματοφωτόμετρο με ευρύ φάσμα μέτρησης της απορρόφησης (220-750 nm), το οποίο παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης μικρής ποσότητας δείγματος (1 μ L), με υψηλή ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα. Είναι ειδικό για τη μέτρηση νουκλεϊκών οξέων, χωρίς την ανάγκη αραιώσης των δειγμάτων, ακόμα και όταν οι συγκεντρώσεις τους είναι υψηλές (δυνατότητα μέτρησης $50 \times$ μεγαλύτερης συγκέντρωσης από ότι ένα κλασικό φασματοφωτόμετρο). Το όριο ανίχνευσης του οργάνου είναι 2 ng/ μ L.



Εικόνα 4.1. : Φασματοφωτόμετρο NanoDrop-ND-1000.

Το δείγμα συγκρατείται στη θέση μέτρησης μεταξύ των άκρων δύο οπτικών ινών μέσω επιφανειακής τάσης (**Εικόνα 4.2.**), καθιστώντας έτσι τη διαδικασία πολύ πιο γρήγορη

αφού δεν απαιτείται η χρήση κυψελίδας και είναι εύκολος ο καθαρισμός του οργάνου μεταξύ των μετρήσεων. Πηγή ακτινοβολίας του οργάνου είναι μία λυχνία ξένου (Xe).



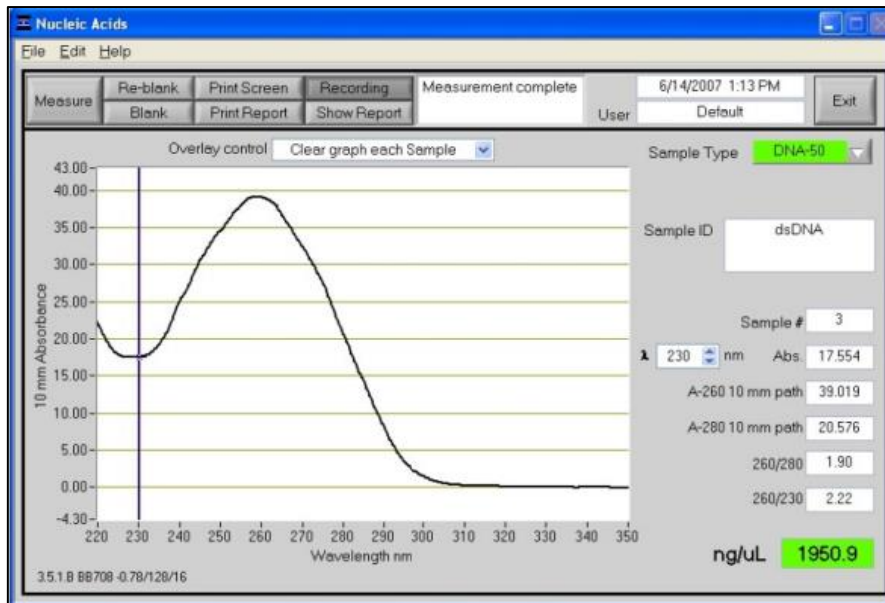
Εικόνα 4.2.: Αριστερά απεικονίζεται ο τρόπος έγχυσης του δείγματος στο φασματοφωτόμετρο και Δεξιά πώς συγκρατείται το δείγμα μέσω δυνάμεων επιφανειακής τάσης.

Η εκτίμηση της καθαρότητας του RNA γίνεται με τον υπολογισμό του λόγου των απορροφήσεων στα 260 nm και στα 280 nm (A_{260} / A_{280}). Στα 260 nm απορροφούν τα νουκλεϊκά οξέα, ενώ στα 280 nm απορροφούν οι πρωτεΐνες. Μία αναλογία A_{260} / A_{280} , ίση περίπου με 2.0 θεωρείται αποδεκτή και υποδηλώνει ένα «καθαρό» RNA. Εάν η αναλογία είναι μικρότερη, τότε αυτό μπορεί να υποδηλώνει την παρουσία προσμίξεων, όπως πρωτεΐνες, φαινόλες ή άλλες ουσίες που απορροφούν ισχυρά κοντά στα 280 nm.

Δευτερεύον μέτρο εκτίμησης της καθαρότητας νουκλεϊκών οξέων αποτελεί ο λόγος των απορροφήσεων στα 260 nm και 230 nm (A_{260} / A_{230}). Η τιμή του είναι συνήθως υψηλότερη από την τιμή της αναλογίας A_{260} / A_{280} και κυμαίνεται περίπου στο εύρος 1,8-2,2. Οι υδρογονάνθρακες και οι φαινόλες είναι κάποια απ' τα μόρια που απορροφούν στα 230 nm. Όταν η αναλογία A_{260} / A_{230} έχει χαμηλή τιμή, πιθανόν να οφείλεται στο αντιδραστήριο του TRIzol που χρησιμοποιείται για την απομόνωση του RNA (φαινολικό διάλυμα που απορροφά στα 230 nm και περίπου στα 270 nm).

Πειραματική Πορεία

- i. Τοποθετείται 1 μL δείγματος στην κατάλληλη θέση του οργάνου, όπως απεικονίζεται στην **εικόνα 4.2**.
- ii. Πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης και η ποσοτικοποίηση του δείγματος.
- iii. Η συγκέντρωση του δείγματος και ο λόγος A_{260} / A_{280} παρουσιάζονται στην οθόνη του υπολογιστή (**Σχήμα 4.5**).
- iv. Η θέση καθαρίζεται με απιονισμένο νερό για την επόμενη μέτρηση.



Σχήμα 4.5.: Τοπικό φάσμα απορρόφησης DNA NanoDrop-1000 (για μέτρηση RNA, στο βελάκι δίπλα απ' το DNA-50, επιλέγουμε RNA-40)

4.4. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Η μετατροπή του RNA σε cDNA (complementary DNA – συμπληρωματικό DNA) πραγματοποιείται μέσω της αντίστροφης μεταγραφής. Η σύνθεση μίας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA επιτυγχάνεται με εκμαγείο ένα μόριο RNA και η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά Kit σύνθεσης cDNA, όπως αυτά περιγράφονται παρακάτω.

4.4.1. Σύνθεση συμπληρωματικού cDNA με στάδια απομάκρυνσης του γενωμικού DNA.

Η επιμόλυνση από γενωμικό DNA (genomic DNA - gDNA) αποτελεί ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα κατά τη διάρκεια της real-time RT-PCR, λόγω της ταυτόχρονης ενίσχυσης gDNA και cDNA. Το συγκεκριμένο Kit αντίστροφης μεταγραφής (**TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser** (Perfect Real Time)) περιλαμβάνει μια αντίδραση εξάλειψης gDNA. Το γενωμικό DNA εξαλείφεται με μεταχείριση για 2 λεπτά στους 42 °C με gDNA Eraser, το οποίο διαθέτει ισχυρή δράση αποικοδόμησης DNA. Στη συνέχεια προστίθεται ένα αντιδραστήριο αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής (RT: Reverse Transcription) που περιλαμβάνει ένα συστατικό το οποίο αναστέλλει πλήρως τη δραστηριότητα αποικοδόμησης του DNA και η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής προχωρά για 15 λεπτά.

Αντιδραστήρια

- gDNA Eraser
- 5 × gDNA Eraser Buffer
- PrimeScript RT Enzyme Mix I (περιέχει αναστολείς ριβονουκλεασών-RNases)
- 5 × PrimeScript Buffer 2 (περιέχει μίγμα dNTPs)
- RT Primer Mix (περιέχει oligo dT εκκινητές και τυχαία εξαμερή)
- RNase free dH₂O

Τα αντιδραστήρια gDNA Eraser και PrimeScript RT Enzyme Mix φυγοκεντρώνονται πριν τη χρήση και το ένζυμο αναδεύεται προσεκτικά με τη χρήση πιπέτας, αφού περιέχει 50 % διάλυμα γλυκερόλης και έχει υψηλό ιξώδες. Τα αντιδραστήρια 5 × gDNA Eraser Buffer και 5 × PrimeScript Buffer 2 αναδεύονται καλά με vortex πριν τη χρήση.

Αντίδραση εξάλειψης γενωμικού DNA

Η προετοιμασία του διαλύματος αντίδρασης γίνεται στον πάγο. Προετοιμάζεται ένα μίγμα - mastermix σε όγκο επαρκή για τον αριθμό των αντιδράσεων, υπολογίζοντας δύο ακόμη. Για κάθε αντίδραση προστίθενται τα αντιδραστήρια όπως αυτά φαίνονται στον Πίνακα 4.1. και έπειτα το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

Πίνακας 4.1.: Συστατικά του μίγματος αντίδρασης εξάλειψης γενωμικού DNA.

Αντιδραστήριο (ανά αντίδραση)	Όγκος (μL)
5× gDNA Eraser Buffer	2,0
gDNA Eraser	1,0
Συνολικό RNA	1,0
RNAase free dH₂O	6,0
Σύνολο	10,0

Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Η προετοιμασία του διαλύματος αντίδρασης γίνεται στον πάγο. Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται τα αντιδραστήρια και οι κατάλληλες ποσότητες αυτών, όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 4.2.: Συστατικά του μίγματος αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής.

Αντιδραστήριο (ανά αντίδραση)	Όγκος (μL)
Διάλυμα αντίδρασης (βήμα 1)	10,0
5× PrimeScript Buffer 2	4,0
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1,0
RT Primer Mix	1,0
RNAase free dH₂O	4,0
Συνολικά	20,0

Στο τέλος, με τη βοήθεια θερμικού κυκλοποιητή (Thermal Cycler), λαμβάνει χώρα η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής στους 37 °C για 15 λεπτά και έπειτα εφαρμόζεται η θερμοκρασία των 85 °C για 5 δευτερόλεπτα, προκειμένου να απενεργοποιηθεί το ένζυμο. Τέλος εφαρμόζεται θερμοκρασία των 4 °C και τα δείγματα του cDNA αποθηκεύονται στους -20 °C.

4.4.2. Σύνθεση συμπληρωματικού cDNA χωρίς εξάλειψη του γενωμικού DNA.

Σχεδιάζοντας εκκινήτες σε περιοχή διασταύρωσης εσωνίου – εξωνίου, είναι δυνατό να αποφύγουμε προβλήματα επιμόλυνσης με gDNA και έτσι το στάδιο εξάλειψης γενωμικού DNA κατά τη σύνθεση cDNA δεν απαιτείται. Αυτό το Kit (**High Capacity RNA – to – cDNA™ Kit - Applied Biosystems**) δεν περιλαμβάνει αντίδραση εξάλειψης γενωμικού DNA. Πρόκειται για ένα αρκετά εύχρηστο Kit που διαθέτει ένα RT Buffer Mix και ένα RT Enzyme Mix (RT: Reverse Transcription), τα οποία αποθηκεύονται στους -20 °C και κατά την έναρξη της διαδικασίας τοποθετούνται στον πάγο. Χρησιμοποιούνται έως 2 µg συνολικού RNA για κάθε αντίδραση 20 µL. Σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα, υπολογίζεται ο όγκος των συστατικών που χρειάζονται για τις απαιτούμενες αντιδράσεις.

Πίνακας 4.3. : Συστατικά του μίγματος αντίδρασης σύνθεσης cDNA.

Συστατικό	Όγκος ανά αντίδραση	
	+ RT reaction	- RT reaction
2×RT Buffer Mix	10 µL	10 µL
20× RT Enzyme Mix	1 µL	-
Δείγμα RNA	Έως 9 µL	Έως 9 µL
Nuclease free H₂O	Έως και 20 µL	Έως και 20 µL
Τελικός όγκος / αντίδραση	20 µL	20 µL

Με τη βοήθεια του θερμικού κυκλοποιητή (Thermal Cycler), η αντίδραση επωάζεται στους 37 °C για 60 λεπτά και σταματάει με θέρμανση στους 95 °C για 5 λεπτά (αναστέλλεται η δράση του ενζύμου) και ύστερα τα δείγματα αφήνονται στους 4 °C για λίγα ακόμη λεπτά. Τα δείγματα cDNA αποθηκεύονται στους -20 °C.

4.5. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR)

Η PCR αποτελεί μια απλή τεχνική in vitro πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων επιθυμητών τμημάτων αρχικού γενετικού υλικού, ώστε να είναι στη συνέχεια δυνατή η μελέτη του. Η αρχική σύλληψη της ιδέας της PCR, έγινε το 1983 από τον βιοχημικό Kary Banks Mullis και βασίζεται στη δράση μίας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq πολυμεράση), η οποία απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Το πλεονέκτημα που παρουσιάζει η συγκεκριμένη DNA πολυμεράση είναι ότι αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη του DNA.

Όπως είναι γνωστό, οι DNA πολυμεράσες είναι ένζυμα κατευθυνόμενα από εκμαγείο και προσθέτουν νουκλεοτίδια στο 3' άκρο μιας πολυνουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Δεν μπορούν να ξεκινήσουν προσθέτοντας νουκλεοτίδια σε ελεύθερο μονόκλωνο εκμαγείο DNA. Για να δράσουν, χρειάζονται εκκινητή με μια ελεύθερη υδροξυλική ομάδα OH-3', ο οποίος να είναι ήδη συνδεδεμένος στο εκμαγείο με ζευγαρωμένες τις βάσεις του.

Με την κατάλληλη επιλογή ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών, επιτυγχάνεται η δράση της DNA πολυμεράσης σε συγκεκριμένη περιοχή του DNA. Οι εκκινητές υβριδοποιούνται εκατέρωθεν της αλληλουχίας-στόχου. Συγκεκριμένα, ο πρόσθιος εκκινητής (forward primer) προσδένεται, με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων, στην αντινοσηματική αλυσίδα (antisense - 3'→5') και ο ανάστροφος εκκινητής (reverse primer) στη νοσηματική αλυσίδα (sense - 5'→3'). Στη συνέχεια η DNA πολυμεράση επεκτείνει τα ελεύθερα 3' άκρα των εκκινητών προσθέτοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs).

Η PCR περιλαμβάνει μια σειρά από αντιδράσεις ενίσχυσης (Amplification Reactions) που εκτελούνται κυκλικά σε ένα τμήμα DNA. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει 3 στάδια (απεικονίζονται στο **σχήμα 4.6.**):

i. Αποδιάταξη δίκλωνων μορίων DNA (Denaturation, 95 °C)

Επιτυγχάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας της αντίδρασης στους 95 °C. Σε αυτό το στάδιο σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των νουκλεοτιδικών βάσεων του DNA και δημιουργούνται δύο μονόκλωνες αλυσίδες.

ii. Υβριδοποίηση εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA (Annealing, 50-60 °C)

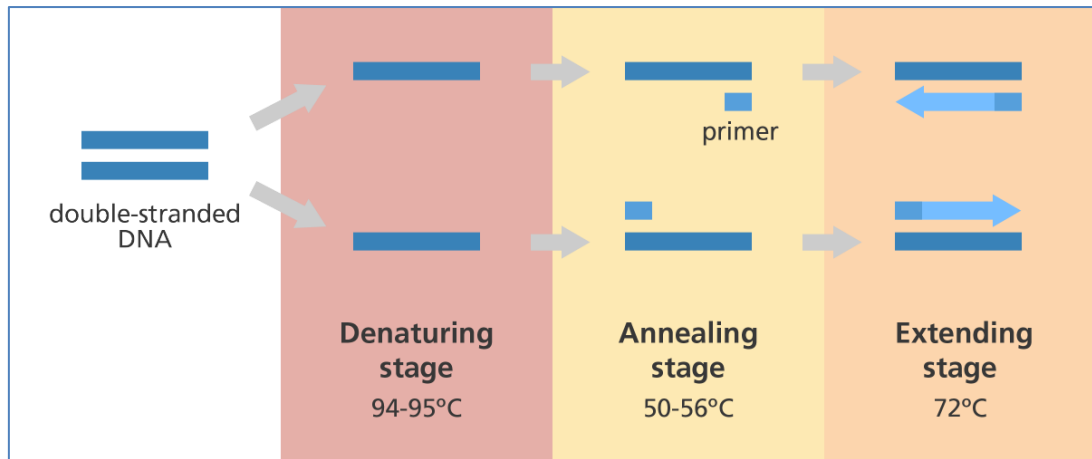
Η πτώση της θερμοκρασίας επιτρέπει στους εκκινητές να προσκολληθούν σε συγκεκριμένη θέση (βάσει του κανόνα συμπληρωματικότητας των βάσεων) στην μονόκλωνη αλυσίδα μέσω δεσμών υδρογόνου. Η ακριβής θερμοκρασία εξαρτάται από τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται. Θεωρητικά για έναν εκκινητή μήκους έως 25 βάσεων δίνεται από τον τύπο:

$$T_m = (A + T) \times 2^\circ\text{C} + (G + C) \times 4^\circ\text{C} \quad (4.4.)$$

Όπου T_m : θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (θερμοκρασία στην οποία το 50% του DNA είναι μονόκλωνο) και A,T,G,C οι νουκλεοτιδικές βάσεις του DNA.

iii. Επιμήκυνση της αλληλουχίας-στόχου (Extension, 72 °C)

Η θερμοκρασία αυξάνεται στη βέλτιστη θερμοκρασία (72 °C) για τη δράση της DNA πολυμεράσης Taq και τη σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου. Η πολυμεράση προσκολλάται στον υβριδοποιημένο εκκινητή και στη συνέχεια προσθέτει δεοξυριβονουκλεοτίδια, που βρίσκονται στο διάλυμα της αντίδρασης, με κατεύθυνση 5'→3'. Ο χρόνος επώασης ποικίλλει ανάλογα με το μήκος της αλληλουχίας DNA που ενισχύεται.



Σχήμα 4.6. : Οι τρεις θερμοκρασιακές φάσεις της PCR: 1. Αποδιάταξη αλυσίδων, 2. Υβριδοποίηση εκκινητών, 3. Επιμήκυνση αλυσίδων.

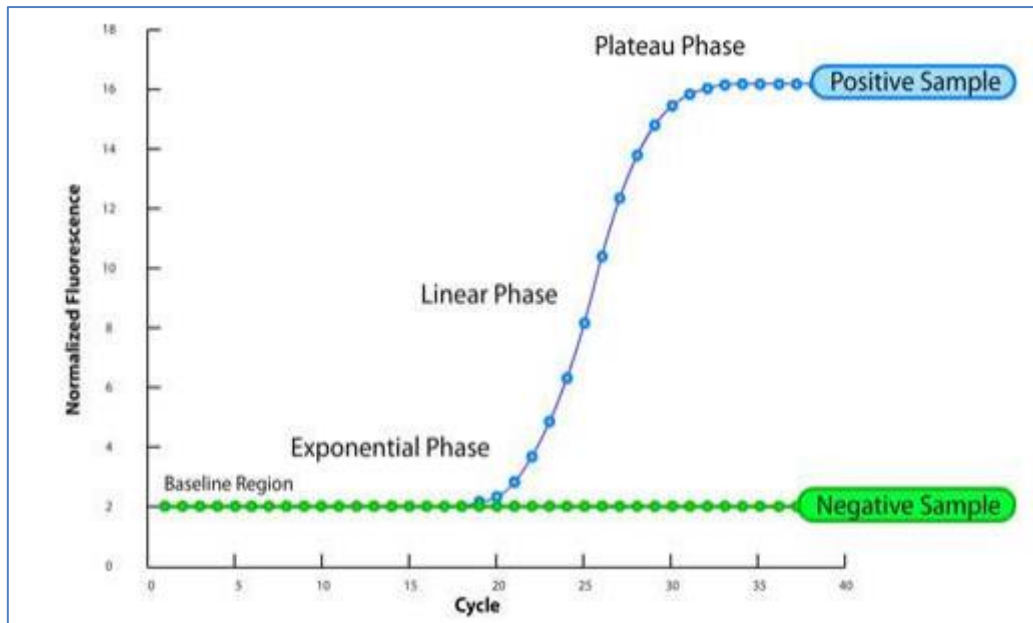
Αυτά τα τρία βήματα που αναφέρθηκαν, επαναλαμβάνονται αρκετές φορές (συνήθως 25-40) κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης PCR. Σε κάθε νέο κύκλο, χρησιμοποιούνται ως εκμαγείο και τα προϊόντα των προηγούμενων κύκλων. Έτσι, ο αριθμός των αντιγράφων αυξάνεται εκθετικά.

4.6. Real Time PCR- Ποσοτική PCR (quantitative-qPCR)

Η qPCR λέγεται αλλιώς και Real Time - PCR, δηλαδή πραγματικού χρόνου, διότι μπορεί να παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο λόγω της φθορίζουσας χρωστικής που συνδέεται με το προϊόν. Η τεχνική βασίζεται στην ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας φθορίζουσας ουσίας αναφοράς και το λαμβανόμενο σήμα φθορισμού αυξάνεται ευθέως ανάλογα με την ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μπορεί να διακριθεί σε τρεις φάσεις, όπως απεικονίζεται στο **Σχήμα 4.7.**:

- Την **εκθετική φάση**, στην οποία τα προϊόντα της PCR συντίθενται με εκθετικό ρυθμό (σε αυτή τη φάση συλλέγονται τα δεδομένα στην real-time PCR). Όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (εκκινητές, dNTPs, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια και σε κάθε κύκλο συσσωρεύεται διπλασιασμένο προϊόν.
- Τη **γραμμική φάση**, όπου ο ρυθμός σύνθεσης επιβραδύνεται, διότι τα συστατικά της αντίδρασης έχουν αρχίσει να καταναλώνονται και
- Στη **φάση κορεσμού** (plateau), όπου δεν παράγονται νέα προϊόντα PCR. Σε αυτή τη φάση γίνεται η μέτρηση στη συμβατική PCR.



Σχήμα 4.7: Διάγραμμα εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τον αριθμό των κύκλων της PCR (εκθετική, γραμμική και φάση κορεσμού)

Όπως γίνεται αντιληπτό απ' τα παραπάνω, βασική διαφορά ανάμεσα στην ποσοτική και την κλασική PCR είναι η φάση της αντίδρασης, στην οποία συλλέγονται τα δεδομένα και εξάγονται τα αποτελέσματα. Αυτή η διαφορά αποτελεί και μειονέκτημα της συμβατικής PCR, αφού δεν παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού και παρακολούθησης των σταδίων της αντίδρασης.

Η σημαντικότερη παράμετρος για την ποσοτικοποίηση στην real-time PCR είναι η τιμή C_p (Crossing point) ή C_q (Quantification Cycle), που αντιστοιχεί στο σημείο στο οποίο η ένταση φθορισμού των προϊόντων της PCR ξεπερνά το σήμα υποβάθρου (Baseline Region). Είναι παράμετρος αντιστρόφως ανάλογη με την ποσότητα του DNA ή cDNA που υπάρχει στο αρχικό δείγμα (μικρότερο C_q συνεπάγεται μεγαλύτερη αρχική ποσότητα DNA του γονιδίου στόχου), αφού όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του γενετικού υλικού στο δείγμα, τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων πολλαπλασιασμού που χρειάζονται για να παραχθεί ικανός αριθμός προϊόντων, ώστε ο φθορισμός του δείγματος να ξεπεράσει το επίπεδο ανίχνευσης.

Σε κάθε αντίδραση real-time PCR χρησιμοποιείται πάντα ένας αρνητικός μάρτυρας (Negative Control - NC) ώστε να εξασφαλίζεται ότι το λαμβανόμενο σήμα φθορισμού δεν οφείλεται σε επιμόλυνση των αντιδραστηρίων από γενωμικό DNA και ένας θετικός μάρτυρας (Positive Control - PC) ώστε να εξασφαλίζεται ότι η αντίδραση της PCR έχει πραγματοποιηθεί σωστά.

Το γονίδιο αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για τη τεχνική αυτή είναι η **β -μικροσφαιρίνη (B2M)**, ένα μόριο που εκφράζεται σταθερά από τα κύτταρα διαφόρων ιστών (house-keeping gene).

Για την πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε χρησιμοποιήθηκε χρωστική φθορισμού dsDNA (**LC Green**). Η συγκεκριμένη χρωστική παρουσιάζει ελάχιστο ή μηδενικό φθορισμό όταν είναι ελεύθερη στο διάλυμα και φθορίζει όταν ενσωματώνεται στη μικρή αύλακα των δίκλωνων μορίων DNA. Μετά την αντίδραση, παράγεται μία καμπύλη τήξης από τη θέρμανση του ενισχυμένου προϊόντος της PCR παρουσία της χρωστικής, κατά την οποία προκύπτουν μεταβολές στα σήματα φθορισμού όταν το προϊόν αποδιατάσσεται (μείωση έντασης φθορισμού). Για τις PCR που αφορούν το γονίδιο αναφοράς, B2M, χρησιμοποιήθηκαν ανιχνευτές **TaqMan probes** που υβριδοποιούνται ειδικά σε συγκεκριμένη αλληλουχία (μεταξύ του πρόσθιου και του ανάστροφου εκκινητή).

Αντιδραστήρια

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στην περίπτωση PCR για το γονίδιο του HOTTIP χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική LC Green και στην περίπτωση του γονιδίου αναφοράς B2M χρησιμοποιήθηκε ο ανιχνευτής TaqMan probe. Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές διαδικασίες αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα. Για την αντίδραση απαιτούνται 9 μL του mastermix και 1 μL cDNA.

Πίνακας 4.4.: Αντιδραστήρια / Συγκεντρώσεις για την παρασκευή των διαλυμάτων mastermix των Real Time PCR.

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση
H ₂ O	
Buffer 5×	
MgCl ₂	25 mM
DNTPs	10 mM
BSA	10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Πρόσθιος εκκινητής (F)	10 μM
Ανάστροφος εκκινητής (R)	10 μM
LC Green	
Probe	3 μM
Taq πολυμεράση	5 U/ μL

Οργανολογία

Για τις αντιδράσεις Real-Time PCR που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκαν τα δύο παρακάτω όργανα Cobas και Light Cycler.

❖ Σύστημα Cobas® 4800 (Roche Diagnostics)

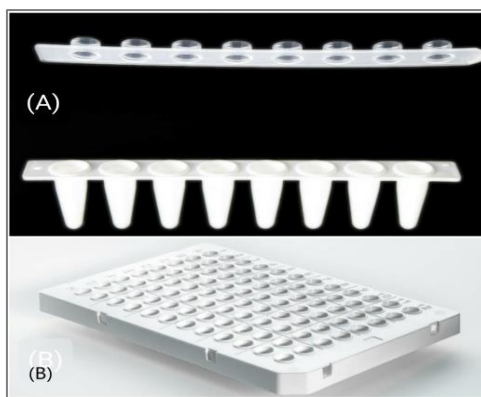
Το σύστημα αυτό αποτελείται από τον αναλυτή Cobas z480 και το LightCycler® 480 λογισμικό πρόγραμμα ανάλυσης, το οποίο ελέγχει τον αναλυτή (εικόνα 4.3.).

Ο αναλυτής Cobas z480 είναι ένας γρήγορος θερμικός κυκλοποιητής, με δυνατότητα ταυτόχρονης ενίσχυσης και ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων - στόχων σε πραγματικό χρόνο μέχρι και 96 δειγμάτων. Υπεύθυνα για τη διατήρηση της θερμικής ομοιογένειας και την ταχεία αυξομείωση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, είναι τα θερμοηλεκτρικά στοιχεία Peltier που διαθέτει ο θερμικός κυκλοποιητής. Το οπτικό σύστημα του αναλυτή διαθέτει πέντε φίλτρα διέγερσης (465 nm, 498 nm, 540 nm, 610 nm, 680 nm) και έξι φίλτρα εκπομπής (510 nm, 580 nm, 610 nm, 645 nm, 670 nm, 700 nm), τα οποία μπορούν να συνδυαστούν ελεύθερα για να επιτρέψουν τη βέλτιστη διέγερση των φθοροφόρων και την ακριβή μέτρηση των εκπεμπόμενων σημάτων φθορισμού. Ο αναλυτής μπορεί να ανιχνεύει διαδοχικά σήματα από μία έως και τέσσερις χρωστικές, γεγονός που καθιστά δυνατή την απόκτηση περισσότερων πληροφοριών από μία μόνο αντίδραση.



Εικόνα 4.3.: Αναλυτής Cobas z480 και η θύρα στην οποία προστίθεται η πλάκα των 96 δειγμάτων (96-well-plate).

Οι αντιδράσεις PCR λαμβάνουν χώρα είτε σε ειδικές πλάκες 96 θέσεων (96-well-plates), όταν διατίθενται πολλά δείγματα για ανάλυση PCR, είτε σε πλαστικά σωληνάρια (Strip PCR Tubes), όπως απεικονίζονται στην **εικόνα 4.4.**, τα οποία τοποθετούνται σε κατάλληλη πλατφόρμα, όταν πρόκειται να πραγματοποιηθεί ανάλυση μικρότερου αριθμού δειγμάτων. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 10 μ L.



Εικόνα 4.4.: (Α) Πλαστικά σωληνάρια (Strip PCR Tubes) που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση PCR στο όργανο Cobas και (Β) η πλάκα 96 δειγμάτων (96-well-plate).

Η παρακολούθηση της αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο γίνεται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή, στον οποίο είναι συνδεδεμένος ο αναλυτής Cobas z480. Τα δεδομένα που συλλέγονται απ' το λογισμικό Light Cycler® 480 μπορούν να αναλυθούν με χρήση αυτόματων αλγορίθμων του λογισμικού, παρέχοντας τη δυνατότητα για απόλυτη και σχετική ποσοτικοποίηση της αντίδρασης αλλά και ανάλυσης καμπυλών τήξης.

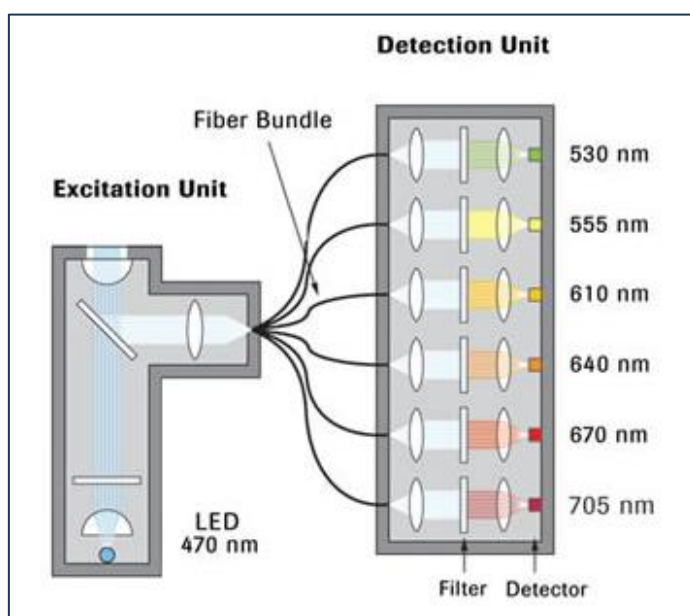
❖ **LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics)**

Στο όργανο αυτό (εικόνα 4.5.), η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται μέσα σε γυάλινα τριχοειδή (capillaries) τα οποία τοποθετούνται σε έναν περιστρεφόμενο δίσκο, ενώ η θέρμανση και η ψύξη επιτυγχάνονται με τη βοήθεια ρεύματος αέρα. Ένας ανεμιστήρας που βρίσκεται εντός του θερμικού θαλάμου εξασφαλίζει αποτελεσματική κυκλοφορία αέρα και ομοιογένεια θερμοκρασίας.



Εικόνα 4.5.: Light Cycler 2.0. και ο περιστρεφόμενος δίσκος με τα γυάλινα τριχοειδή (capillaries).

Το φθορισμόμετρο, όπως φαίνεται στο **σχήμα 4.8.**, αποτελείται από δύο μονάδες που συνδέονται με έναν αγωγό φωτός, τη μονάδα διέγερσης και τη μονάδα ανίχνευσης. Μία μπλε δίοδος **LED** (Light Emission Diode) λειτουργεί ως πηγή ενέργειας για τη **διέγερση** των δειγμάτων, με μέγιστη εκπομπή στα 470 nm. Η ενέργεια που εκπέμπεται από την μπλε δίοδο εστιάζεται στην άκρη των γυάλινων τριχοειδών και διεγείρει τις φθορίζουσες χρωστικές που βρίσκονται εκεί. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, ένας κατάλληλος κινητήρας περιστρέφει κυκλικά το δίσκο με τα δείγματα μέσα στον θερμικό θάλαμο ώστε να τοποθετηθεί το τριχοειδές άκρο ακριβώς στο εστιακό σημείο της φθορισμομετρικής οπτικής. Έπειτα, ο εκπεμπόμενος φθορισμός ανακλάται πίσω στο φθορισμόμετρο με την βοήθεια ενός διχρωματικού καθρέπτη. Ο αγωγός του φωτός κατανέμει το σήμα του εκπεμπόμενου φθορισμού στα 6 διαφορετικά κανάλια ανιχνευτών ανεξάρτητα από το μήκος κύματος.



Σχήμα 4.8.: Απεικόνιση των τμημάτων διέγερσης και ανίχνευσης του φθορισμομέτρου στο όργανο Light Cyclor 2.0

Στη μονάδα ανίχνευσης ο φθορισμός ευθυγραμμίζεται με έναν μη σφαιρικό φακό και ένα ειδικό οπτικό σύστημα φίλτρων, το οποίο είναι υπεύθυνο για τις μετρήσεις εκπομπής φθορισμού στα 530, 555, 610, 640, 670, 705 nm. Ένας δεύτερος μη σφαιρικός φακός μεταφέρει το σήμα από κάθε κανάλι ανίχνευσης σε ένα φωτοϋβρίδιο για την τελική αξιολόγηση. Τα σήματα των φωτοϋβριδίων (photohybrids) αποστέλλονται στο όργανο του LightCyclor 2.0 μέσω μιας τμηματικής αλληλεπίδρασης.

Όπως και στο όργανο Cobas, έτσι και εδώ, η παρακολούθηση της αντίδρασης PCR ενώ αυτή εξελίσσεται, γίνεται μέσω ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο. Ο χρήστης εισάγει τα δεδομένα (αριθμός δειγμάτων, κωδικοί δειγμάτων κ.λ.π.) μέσω πληκτρολογίου και επιλέγει το κατάλληλο πειραματικό πρωτόκολλο με κατάλληλες θερμοκρασίες και χρόνους. Στη συνέχεια, οι πληροφορίες μεταφέρονται στο όργανο.

Καθώς η αντίδραση εξελίσσεται, με τη βοήθεια του υπολογιστή, καταγράφεται η θερμοκρασία και τα λαμβανόμενα σήματα φθορισμού. Τέλος, πραγματοποιείται η επεξεργασία των αποτελεσμάτων μέσω ειδικών προγραμμάτων.

4.7. In silico σχεδιασμός εκκινητών

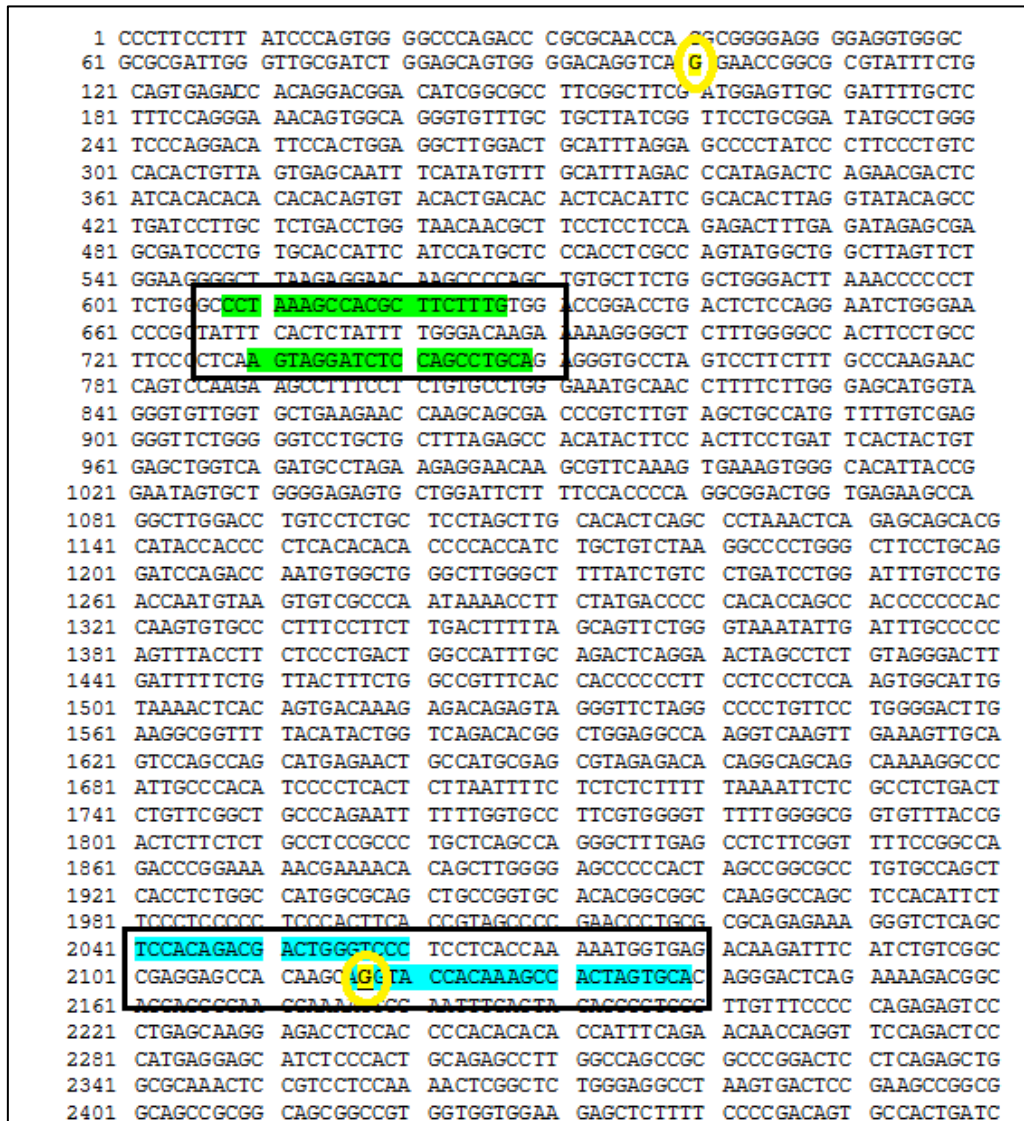
Ως *in silico* μελέτη χαρακτηρίζεται η υπολογιστική μελέτη που πραγματοποιείται προκειμένου να γίνει η επιλογή των βέλτιστων αλληλουχιών ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών, με σκοπό την υψηλή εξειδίκευση της αντίδρασης PCR. Για τον σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα **Primer Premier 5.0** (Premier Biosoft International, USA).

Τα κριτήρια που πρέπει να πληροί γενικά ένα ζεύγος εκκινητών είναι τα εξής:

- Το μέγεθός τους πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 18 – 25 bp.
- Η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (Primer Melting Temperature, T_m) ή θερμοκρασία υβριδισμού (Annealing Temperature) πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 52°C - 60°C, και εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση σε βάσεις των εκκινητών (κυρίως G και C).
- Η διαφορά της θερμοκρασίας τήξης μεταξύ των δύο εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην ίδια αντίδραση PCR πρέπει να είναι το πολύ 2 °C.
- Η περιεκτικότητά τους σε βάσεις GC πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 40-60%, ενώ στο 3' των εκκινητών συνίσταται να αποφεύγεται η επανάληψη των βάσεων G και C.
- Η πιο σημαντική περιοχή για ειδική ενίσχυση είναι το 3' άκρο του εκκινητή, λόγω του ότι η ενίσχυση ξεκινά από την περιοχή αυτή. Γενικά, αυτά τα άκρα πρέπει να μη σχηματίζουν δευτεροταγείς και παλίνδρομες δομές (αποφυγή σχηματισμού φουρκέτας) και να μην περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες.
- Επιπλέον, οι αλληλουχίες των εκκινητών δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους, κυρίως στο 3' άκρο, ώστε να μη σχηματίζονται διμερή εκκινητών.
- Αποφυγή ομολογίας των εκκινητών με άλλες περιοχές πέραν της αλληλουχίας ενδιαφέροντος (υψηλή εξειδίκευση).

Για την ενίσχυση τόσο του γονιδίου αναφοράς (B2M) όσο και του μεταγράφου του γονιδίου HOTTIP, χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές (primers) που σχεδιάστηκαν *in silico* με το πρόγραμμα Primer Premier 5.0. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η ειδικότητα της αλληλουχίας των εκκινητών, διεξήχθη έλεγχος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI, nucleotide BLAST), όπου ελέγχθηκαν πιθανές ομολογίες των εκκινητών ως προς ανεπιθύμητες αλληλουχίες. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με προσοχή, ώστε να αποφεύγεται η υβριδοποίηση σε γενωμικό DNA (σχεδιάστηκαν σε περιοχή σύνδεσης εσωνίου-εξωνίου (junction primers)). Το γονίδιο του HOTTIP διαθέτει δύο junction περιοχές και άρα τρία εξώνια. Επιπλέον, στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε ένα ακόμη ζεύγος εκκινητών λόγω αυξημένης αναφοράς του στη βιβλιογραφία, που όμως δε σχεδιάστηκε σε περιοχή σύνδεσης εσωνίου-εξωνίου (No-junction primers). Στο σχήμα

που ακολουθεί παρουσιάζονται τα δύο ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου του HOTTIP.



Σχήμα 4.9.: Απεικόνιση των δύο ζευγών εκκινητών για την ενίσχυση του HOTTIP. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι 2 junction περιοχές που διαθέτει το γονίδιο. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζονται οι No-junction primers, ενώ με μπλε χρώμα παρουσιάζονται οι junction primers.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

« ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HOTTIP »

5.1. Εισαγωγή

Η παρουσία επιμόλυνσης από γενωμικό DNA (gDNA) σε παρασκευάσματα RNA είναι μια συχνή αιτία παρουσίας ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων σε αναλύσεις έκφρασης, με τη μέθοδο RT-PCR. Μικρές ποσότητες gDNA συνήθως συνεκχυλίζονται με το RNA κατά τη διαδικασία απομόνωσης RNA (όπως περιγράφεται στις ενότητες 4.2.2. και 4.2.4.) και θα μπορούσαν να δώσουν ψευδώς θετικά σήματα.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, αυτό δεν μπορεί να αποφευχθεί, ειδικά όταν δεν υπάρχουν συνδέσεις εξωνίων-ιντρονίων στις αλληλουχίες των lncRNA. Σε μία τέτοια περίπτωση, απαραίτητο είναι το στάδιο μεταχείρισης με δεοξυριβονουκλεάση (DNAase treatment). Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί το ένζυμο DNase I. Πρόκειται για μια μη ειδική ενδονουκλεάση που αποικοδομεί μονόκλωνο, αλλά και δίκλωνο DNA (ssDNA και dsDNA), υδρολύοντας φωσφοδιεστερικούς δεσμούς ανάμεσα στα νουκλεοτίδια. Η αλληλουχία του γονιδίου του HOTTIP διαθέτει τρία εξώνια και δύο ιντρόνια (δύο περιοχές διασταύρωσης εσωνίου και εξωνίου – junction περιοχές) και έτσι μπορεί να γίνει σχεδιασμός εκκινητών σε αυτές τις περιοχές έτσι ώστε να αποφευχθούν προβλήματα επιμόλυνσης από γενωμικό DNA, εκμεταλλευόμενοι τη διαδικασία του ματίσματος (αφαίρεση εσωνίων) και της συρραφής των εξωνίων κατά την ωρίμανση του RNA (101).

Στην παρούσα εργασία, σχεδιάστηκαν *in silico* οι εκκινητές (junction) για το γονίδιο του HOTTIP με τη χρήση του λογισμικού Primer Premier 5.0. σύμφωνα με τα κριτήρια που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 4. Πραγματοποιήθηκαν βελτιστοποιήσεις, προκειμένου να αναπτυχθούν ειδικές δοκιμασίες RT-PCR για τη μελέτη του γονιδίου του HOTTIP. Το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών που σχεδιάστηκε, συγκρίθηκε με ένα ακόμη ζεύγος εκκινητών (no junction primers), του οποίου παρατηρήθηκε αυξημένη χρήση σε πειράματα για τη μελέτη του συγκεκριμένου lncRNA, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

Η ποιότητα όλων των δειγμάτων cDNA ελέγχθηκε με τη μελέτη του γονιδίου αναφοράς B2M (β2- μικροσφαιρίνη) με RT-qPCR. Σε κάθε στάδιο της πειραματικής πορείας συμπεριλήφθηκε, εκτός των δειγμάτων, ένας αρνητικός μάρτυρας (NC) για τον έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης κι ένας θετικός μάρτυρας (PC) για τον έλεγχο της καλής απόδοσης της PCR. Προς αποφυγή επιμολύνσεων στην PCR, κάθε διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε ξεχωριστούς χώρους, χρησιμοποιώντας διαφορετικό εργαστηριακό εξοπλισμό. Η απομόνωση του RNA, η αντίστροφη μεταγραφή και η προετοιμασία των αντιδράσεων της Real-Time PCR πραγματοποιήθηκε σε ειδικούς θαλάμους νηματικής ροής (Laminar- flow hoods).

5.2. Έλεγχος ποιότητας δειγμάτων cDNA – γονίδιο αναφοράς

Προκείμενου να ελεγχθεί η ποιότητα των δειγμάτων cDNA που παράχθηκαν για τη μελέτη του HOTTIP, πραγματοποιήθηκε PCR ελέγχου για το γονίδιο αναφοράς της β2-μικροσφαιρίνης (**B2M**). Πρόκειται για βασικό στοιχείο του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHC I), που υπάρχει σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους εκτός από τα ερυθροκύτταρα. Το συγκεκριμένο γονίδιο έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες γονιδιακής έκφρασης ως γονίδιο αναφοράς. Ανήκει στην ομάδα των «**reference genes**», καθώς παρουσιάζει σχεδόν σταθερή έκφραση στους περισσότερους ιστούς και επιπλέον δεν έχει αναφερθεί η ύπαρξη ψευδογονιδίων. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών και του ιχνηθέτη που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου της B2M, τα συστατικά του μίγματος και οι συνθήκες της qPCR.

Πίνακας 5.1.: Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθέτη TaqMan για το γονίδιο αναφοράς -B2M.

Γονίδιο	Αλληλουχία (5' → 3')	Tm (°C)	Μήκος (bp)
B2M	Πρόσθιος εκκινητής 5'-GCCTGCCGTGTGAACCATGT-3'	63,7	20
	Ανάστροφος εκκινητής 5'-AAATGCGGCATCTTCAAACCTC-3'	63,2	22
	Ιχνηθέτης TaqMan 5'FAM- -CATGATGCTGCTTACATGTCTCGATCCCAC- -BBQ3'	73,4	30

Πίνακας 5.2.: Συνθήκες real-time PCR για το γονίδιο της B2M.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Σήμα Φθορισμού
Αποδιάταξη-Denaturation (Αριθμός κύκλων: 1)	95	2 min	
Ενίσχυση- Amplification (Αριθμός κύκλων: 45)	95	10 sec	
	58	20 sec	
	72	20 sec	√
Ψύξη-Melting (Αριθμός κύκλων: 1)	40	30 sec	

Πίνακας 5.3.: Συστατικά του μίγματος της RT-qPCR για την ενίσχυση του γονιδίου αναφοράς (B2M).

Συστατικά mastermix	Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	4,92	
Buffer 5×	1	1×
MgCl ₂ (25 mM)	1,2	2,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,15	0,2 mM
BSA (10 μg/μL)	0,3	0,15 μg/μL
Forward primer (10 μM)	0,25	0,3 μM
Reverse primer (10 μM)	0,25	0,3 μM
TaqMan probe B2M (3 μM)	0,83	0,25 μM
Taq polymerase (5 U/μL)	0,1	0,05 U/μL
cDNA	1	
Τελική συγκέντρωση	10	

5.3. Βελτιστοποίηση εκκινητών ειδικών για την ενίσχυση του HOTTIP

5.3.1. Εκκινητές σχεδιασμένοι σε περιοχή σύνδεσης εσωνίου-εξωνίου.

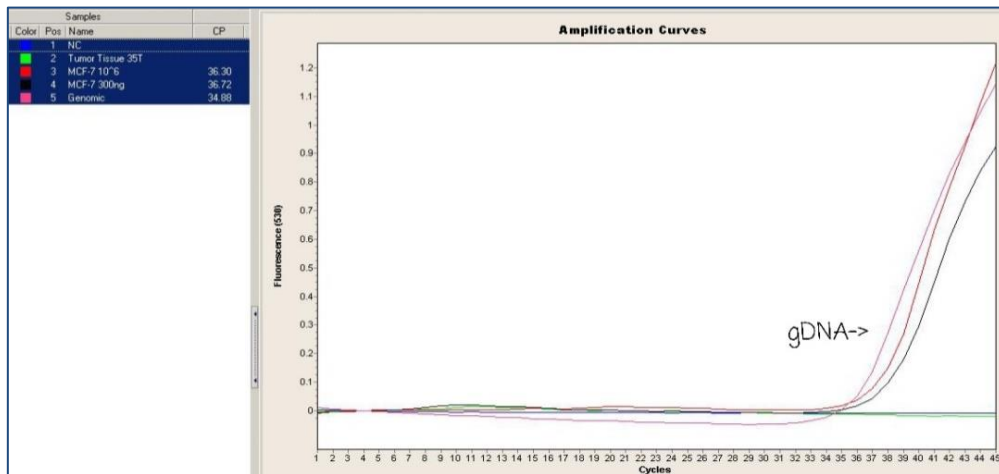
Για την πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε, σχεδιάστηκαν εκκινητές (πρόσθιος και ανάστροφος) για το γονίδιο του HOTTIP σε περιοχή ένωσης εσωνίου-εξωνίου (**junction primers**). Οι αλληλουχίες των εκκινητών, το μεγεθός τους (ζεύγη βάσεων-bp), καθώς και η θερμοκρασία τήξης τους (T_m) αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 5.4.: Αλληλουχίες εκκινητών (σχεδιασμένοι σε junction περιοχή) για το γονίδιο του HOTTIP.

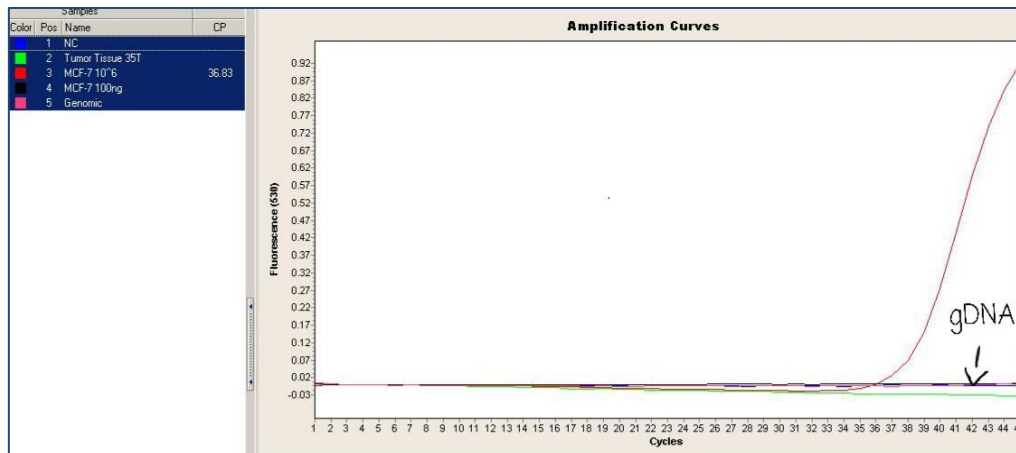
Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία (5' → 3')	Μέγεθος (bp)	T _m (°C)
HOTTIP	Πρόσθιος	TCCACAGACGACTGGGTCCC	20	61,2
	Ανάστροφος	TGCACTAGTGGCTTTGTGGTACCT	24	60,3

Η θερμοκρασία τήξης (T_m) του προϊόντος είναι 86,1 °C και το μήκος του προϊόντος είναι 99 νουκλεοτιδικές βάσεις. Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και τα αντιδραστήρια για τις αναλύσεις PCR αναγράφονται στους παρακάτω πίνακες (5.5. και 5.6.).

Αρχικά, ρυθμίστηκε η θερμοκρασία υβριδοποίησης εκκινητών (T_A : Annealing Temperature) στους 64°C . Όπως φαίνεται όμως στα παρακάτω **σχήματα (5.1. και 5.2.)**, σε αυτή τη θερμοκρασία υπάρχει ταυτόχρονη ενίσχυση γενωμικού DNA, παρεμποδίζοντας έτσι τη σωστή μελέτη της έκφρασης του γονιδίου του HOTTIP. Το πρόβλημα αυτό, της ενίσχυσης gDNA εξαλείφθηκε με τη ρύθμιση της θερμοκρασίας στους 66°C , η οποία και χρησιμοποιήθηκε τελικά στο πειραματικό πρωτόκολλο.



Σχήμα 5.1. : Καμπύλες ενίσχυσης RT-PCR για το γονίδιο του HOTTIP με T_A : 64°C .



Σχήμα 5.2. : Καμπύλες ενίσχυσης RT-PCR για το γονίδιο του HOTTIP με T_A : 66°C .

Σε κάθε ανάλυση έκφρασης με τη μέθοδο της PCR, χρησιμοποιήθηκε ένας αρνητικός μάρτυρας (NC-negative control) που περιείχε όλα τα συστατικά του μίγματος της PCR, όπως αυτά αναφέρονται στον **πίνακα 5.5.** εκτός από την ποσότητα του cDNA, για τον έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και ένας θετικός μάρτυρας (PC-positive control), στον οποίο προστέθηκε $1\ \mu\text{L}$ cDNA από 10^6 κύτταρα MCF-7, για τον έλεγχο της καλής απόδοσης του πειράματος.

Πίνακας 5.5.: Συστατικά του μίγματος της RT-qPCR για την ενίσχυση του HOTTIP με εκκινητές σχεδιασμένους σε περιοχή σύνδεσης εσωνίου-εξωνίου.

Συστατικά mastermix	Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	3,85	
Buffer 5×	2	1×
MgCl ₂ (25 mM)	1,2	3 mM
dNTPs (10 mM)	0,2	0,2 mM
BSA (10 μg/μL)	0,15	0,15 μg/μL
Forward primer (10 μM)	0,25	0,25 μM
Reverse primer (10 μM)	0,25	0,25 μM
LC Green	1	
Taq polymerase (5 U/μL)	0,1	0,05 U/μL
cDNA	1	
Τελικός Όγκος	10	

Πίνακας 5.6.: Συνθήκες real-time PCR για το γονίδιο του HOTTIP με τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν σε περιοχή σύνδεσης εσωνίου-εξωνίου.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Σήμα Φθορισμού
Αποδιάταξη-Denaturation (Αριθμός κύκλων: 1)	95	2 min	
Ενίσχυση-Amplification (Αριθμός κύκλων: 45)	95	10 sec	
	66	20 sec	
	72	20 sec	√
Ψύξη-Melting (Αριθμός κύκλων: 1)	55	10 sec	
	95		
	95	1 min	
	40	30 sec	

Με τους συγκεκριμένους εκκινητές (junction primers), εξετάστηκε η έκφραση του HOTTIP σε ορισμένα δείγματα ιστών μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC), όμως δεν παρατηρήθηκε καμία ενίσχυση του γονιδίου, όπως αναμενόταν από τη βιβλιογραφία. Ενίσχυση του γονιδίου παρατηρήθηκε μόνο στον θετικό μάρτυρα (PC).

5.3.2. Εκκινητές μη σχεδιασμένοι σε περιοχή σύνδεσης εσωνίου-εξωνίου.

Παρατηρήθηκε ότι πολλές έρευνες χρησιμοποιούν κοινούς εκκινητές για τη διεξαγωγή των πειραμάτων μελέτης έκφρασης του HOTTIP, όμως δεν είναι σχεδιασμένοι σε περιοχή σύνδεσης εξωνίου-εσωνίου (**no-junction primers**). Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας

εξετάστηκαν οι συγκεκριμένοι εκκινητές και οι αλληλουχίες τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.7. : Αλληλουχίες εκκινητών (μη σχεδιασμένοι σε junction περιοχή) για το γονίδιο του HOTTIP.

Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία 5'→3'	Μέγεθος (bp)	T _m (°C)
HOTTIP	Πρόσθιος	CCTAAAGCCACGCTTCTTTG	20	58,1
	Ανάστροφος	TGCAGGCTGGAGATCCTACT	20	57,1

Η θερμοκρασία τήξης (T_m) του προϊόντος είναι 88 °C και το μήκος του προϊόντος είναι 142 νουκλεοτιδικές βάσεις. Τα αντιδραστήρια του μίγματος για την διεξαγωγή των PCR και το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου του HOTTIP με τους no-junction εκκινητές, αναγράφονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 5.8.: Συστατικά του μίγματος της RT-qPCR για την ενίσχυση του HOTTIP με εκκινητές που δε σχεδιάστηκαν σε junction περιοχή.

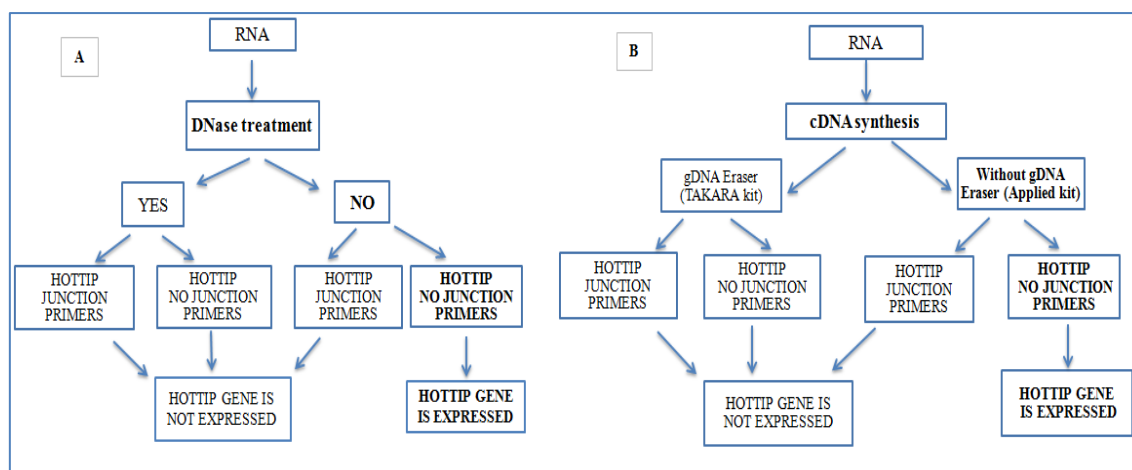
Συστατικά mastermix	Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	3,95	
Buffer 5×	2	1×
MgCl ₂ (25 mM)	1	2,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,2	0,2 mM
BSA (10 μg/μL)	0,15	0,15 μg/μL
Forward primer (10 μM)	0,3	0,3 μM
Reverse primer (10 μM)	0,3	0,3 μM
LC Green	1	
Taq polymerase (5 U/μL)	0,1	0,05 U/μL
cDNA	1	
Τελική συγκέντρωση	10	

Πίνακας 5.9.: Συνθήκες real-time PCR για το γονίδιο του HOTTIP με τους εκκινητές που δε σχεδιάστηκαν junction περιοχή.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Σήμα Φθορισμού
Αποδιάταξη-Denaturation (Αριθμός κύκλων: 1)	95	2 min	
	95	10 sec	
Ενίσχυση- Amplification (Αριθμός κύκλων: 45)	63	20 sec	
	72	20 sec	√
	55	10 sec	
Ψύξη-Melting (Αριθμός κύκλων: 1)	95		
	95	1 min	
	40	30 sec	

5.4. Σύγκριση των δύο ζευγών εκκινητών

Προκειμένου να αξιολογηθούν τα δύο ζεύγη εκκινητών (junction & no-junction primers), μελετήθηκε η έκφραση του HOTTIP σε ζεύγη δειγμάτων που είχαν υποστεί επεξεργασία με DNase αλλά και σε ζεύγη δειγμάτων cDNA που προέκυψαν από δύο διαφορετικές μεθόδους αντίστροφης μεταγραφής. Στο σχήμα που ακολουθεί, παρουσιάζεται συνοπτικά η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε προκειμένου να αξιολογηθούν τα ζεύγη εκκινητών για τη μελέτη της έκφρασης του HOTTIP.

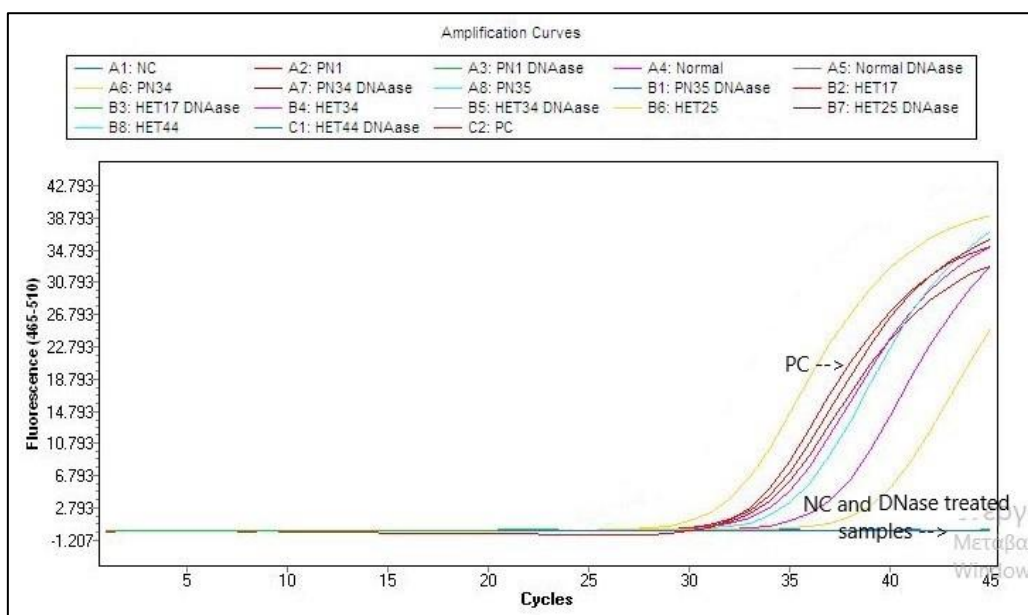


Σχήμα 5.3.: Βήματα της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε ώστε να γίνει η κατάλληλη επιλογή εκκινητών για το γονίδιο του HOTTIP.

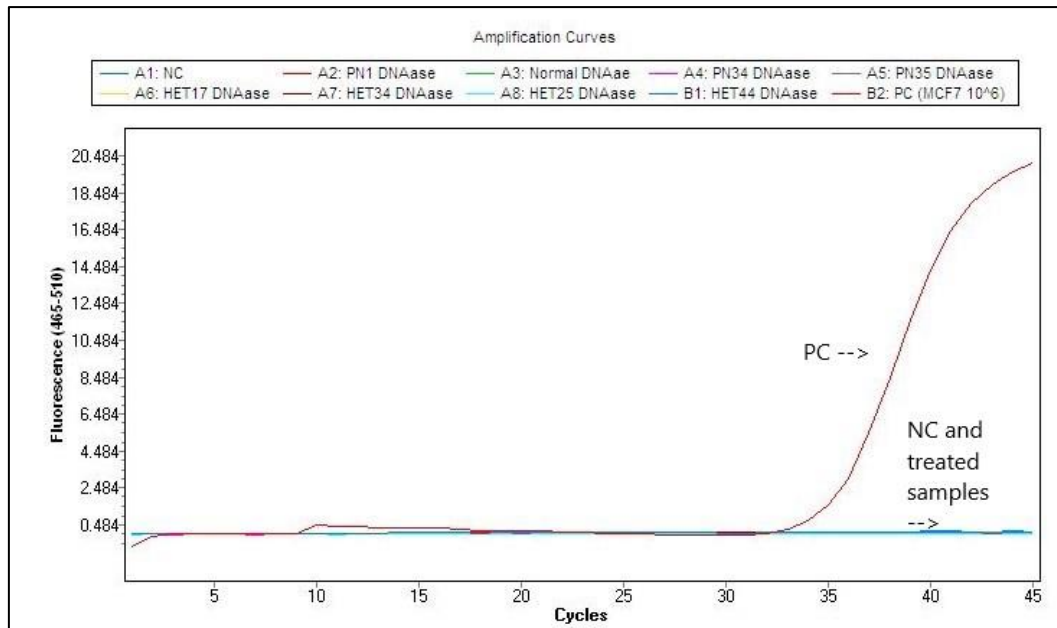
5.4.1. Σύγκριση των δύο ζευγών εκκινητών σε δείγματα που έχουν υποστεί επεξεργασία με δεοξυριβονουκλεάση.

Πραγματοποιήθηκε RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου του HOTTIP και με τα δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών. Χρησιμοποιήθηκαν οκτώ (8) ζεύγη δειγμάτων, εκ των οποίων τα μισά δείγματα είχαν υποστεί επεξεργασία με το ένζυμο DNase I και τα υπόλοιπα όχι. Αρχικά εξετάθηκε η ποιότητά τους, εκτελώντας RT-PCR για το γονίδιο αναφοράς B2M (β₂-μικροσφαιρίνη) και παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός C_q των δειγμάτων που είχαν υποστεί μεταχείριση με DNase είχε μία μικρή διαφορά.

Με τη χρήση των εκκινητών που δεν είναι σχεδιασμένοι σε περιοχή ένωσης εσωνίου-εξωνίου (no-junction primers) παρατηρήθηκε ενίσχυση της έκφρασης του HOTTIP μόνο στα δείγματα που δεν είχαν υποστεί επεξεργασία με DNase (σχήμα 5.4.). Αντίθετα με τη χρήση των εκκινητών που σχεδιάστηκαν σε περιοχή ένωσης εσωνίου-εξωνίου (junction primers), δεν παρατηρήθηκε καμία ενίσχυση. Αυτό το εύρημα πιθανώς δηλώνει ότι η έκφραση του HOTTIP που παρατηρείται στα δείγματα που εξετάστηκαν με τους no-junction εκκινητές, οφείλεται στην παρουσία επιμόλυνσης από γενωμικό DNA (genomic DNA contamination).



Σχήμα 5.4.: Καμπύλες ενίσχυσης RT-PCR για το γονίδιο του HOTTIP σε ζεύγη δειγμάτων που είχαν υποστεί DNase treatment και όχι, με τους no-junction primers.



Σχήμα 5.5.: Καμπύλες ενίσχυσης RT-PCR για το γονίδιο του *HOTTIP* σε ζεύγη δειγμάτων που είχαν υποστεί DNase treatment και όχι, με τους junction primers.

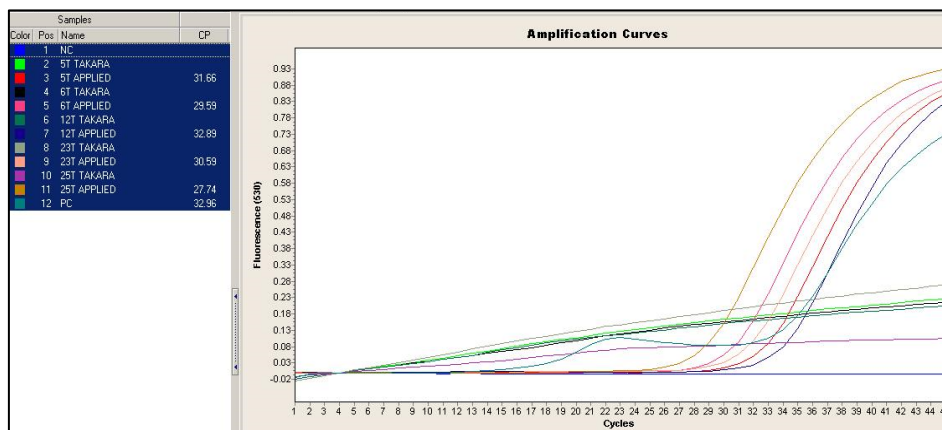
Συνολικά, όπως φαίνεται και στα παραπάνω διαγράμματα, η έκφραση του *HOTTIP* και με τα δύο ζεύγη εκκινητών στα δείγματα που είχαν υποστεί επεξεργασία με DNase ήταν μηδενική. Με τους no-junction εκκινητές παρατηρήθηκε ενίσχυση μόνο στα δείγματα που δεν είχαν υποστεί επεξεργασία, λόγω της παρουσίας επιμόλυνσης από γενωμικό DNA.

5.4.2. Σύγκριση των δύο ζευγών εκκινητών με τον έλεγχο δύο διαφορετικών μεθοδολογιών σύνθεσης cDNA.

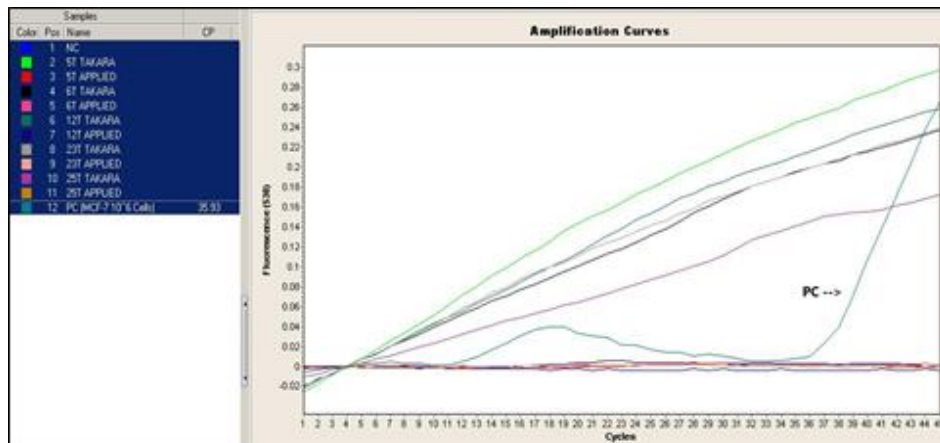
Για την περαιτέρω μελέτη του παραπάνω ευρήματος, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) που στη συνέχεια θα μελετηθεί για την έκφραση του *HOTTIP*. Η μία μέθοδος περιλαμβάνει τα κατάλληλα αντιδραστήρια για την διεξαγωγή της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής (High Capacity RNA-to-cDNA™ Kit - Applied Biosystems), ενώ στην άλλη μέθοδο μία αντίδραση εξάλειψης γενωμικού DNA προηγείται της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής (TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser). Οι πειραματικές πορείες σύνθεσης cDNA περιγράφονται στις ενότητες 4.4.1 και 4.4.2.

Στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε, μετρήθηκε η ποσότητα RNA σε δείγματα ιστών μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC) και εκτιμήθηκε η καθαρότητα των δειγμάτων με τη χρήση του φασματοφωτομέτρου NanoDrop (περιγράφεται στην ενότητα 4.3.), εκ των οποίων πέντε (5) δείγματα ιστών NSCLC τηρούσαν τις προϋποθέσεις για περαιτέρω μελέτη της έκφρασης του γονιδίου του *HOTTIP*. Έπειτα, συντέθηκε cDNA με τις δύο διαφορετικές μεθοδολογίες, χρησιμοποιώντας ίδιας συγκέντρωσης RNA (300 ng/μL) από τα προαναφερθέντα δείγματα.

Παρατηρήθηκε ότι με τη χρήση των εκκινήτων που δε σχεδιάστηκαν σε περιοχή σύνδεσης εσωνίου-εξωνίου (no-junction primers) ενισχύθηκε το γονίδιο του HOTTIP στα δείγματα cDNA που είχαν συντεθεί με τη μέθοδο σύνθεσης της Applied Biosystems, δηλαδή χωρίς τη χρήση της αντίδρασης εξάλειψης γενωμικού DNA, ενώ τα δείγματα cDNA που είχαν προκύψει ακολουθώντας τη μέθοδο του Kit της TAKARA (περιλαμβάνει μια αντίδραση εξάλειψης gDNA) δεν έδωσαν καμία ενίσχυση του HOTTIP. Αντίθετα, με τη χρήση των εκκινήτων που σχεδιάστηκαν σε περιοχή σύνδεσης εσωνίου-εξωνίου, δεν ενισχύθηκε το γονίδιο του HOTTIP σε καμία απ' τις δύο περιπτώσεις.



Σχήμα 5.6.: Καμπύλες ενίσχυσης RT-PCR για το γονίδιο του HOTTIP σε δείγματα cDNA ιστών NSCLC από δύο διαφορετικές μεθοδολογίες (TAKARA vs Applied Biosystems Kit) με τους no-junction primers.



Σχήμα 5.7.: Καμπύλες ενίσχυσης RT-PCR για το γονίδιο του HOTTIP σε δείγματα cDNA ιστών NSCLC από δύο διαφορετικές μεθοδολογίες (TAKARA vs Applied Biosystems Kit) με τους junction primers.

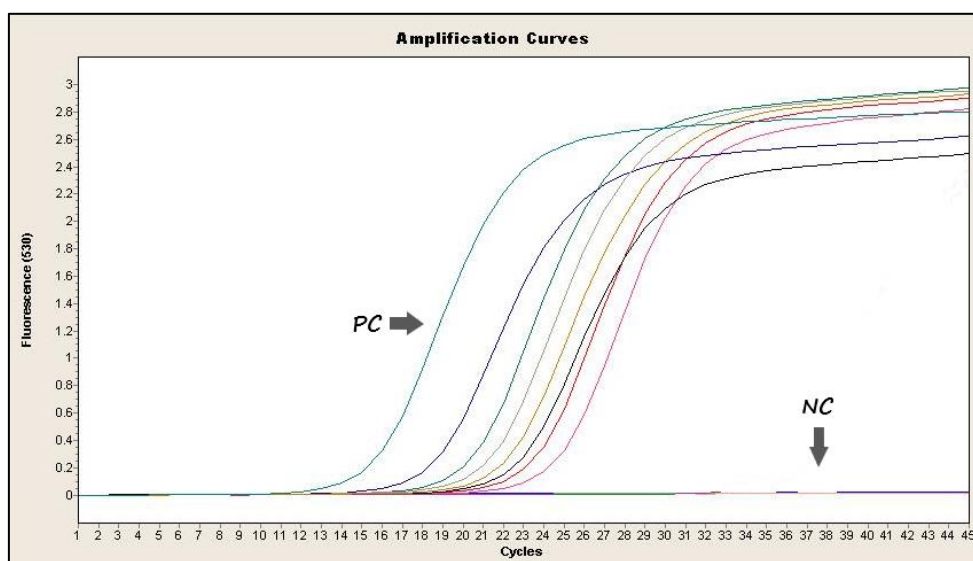
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

« ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HOTTIP »

6.1. Μελέτη της έκφρασης του HOTTIP σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Προκειμένου να γίνει η επιλογή των κλινικών δειγμάτων που θα γίνει αξιολόγηση της έκφρασης του lncRNA HOTTIP, μελετήθηκε η έκφρασή του σε κυτταρικές σειρές που αντιπροσωπεύουν τους πιο συχνά εμφανιζόμενους τύπους καρκίνου (μαστού, πνεύμονα, προστάτη, κεφαλής και τραχήλου). Αυτές αναγράφονται στο κεφάλαιο 4.1.2. και για τη μελέτη τους αναπτύχθηκε ειδικό πρωτόκολλο το οποίο δεν πιάνει γενωμικό DNA.

Με την ανάλυση RT-PCR στο γονίδιο αναφοράς B2M, διαπιστώθηκε η ποιότητα των δειγμάτων (οι ποσότητες των συστατικών της αντίδρασης που απαιτούνται και οι θερμοκρασιακές συνθήκες αναγράφονται στους πίνακες 5.3. και 5.2. αντίστοιχα). Όπως αναμενόταν, υπήρχε θετικό σήμα φθορισμού σε όλες τις κυτταρικές σειρές, αφού η B2M εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα (**Σχήμα 6.1.**).

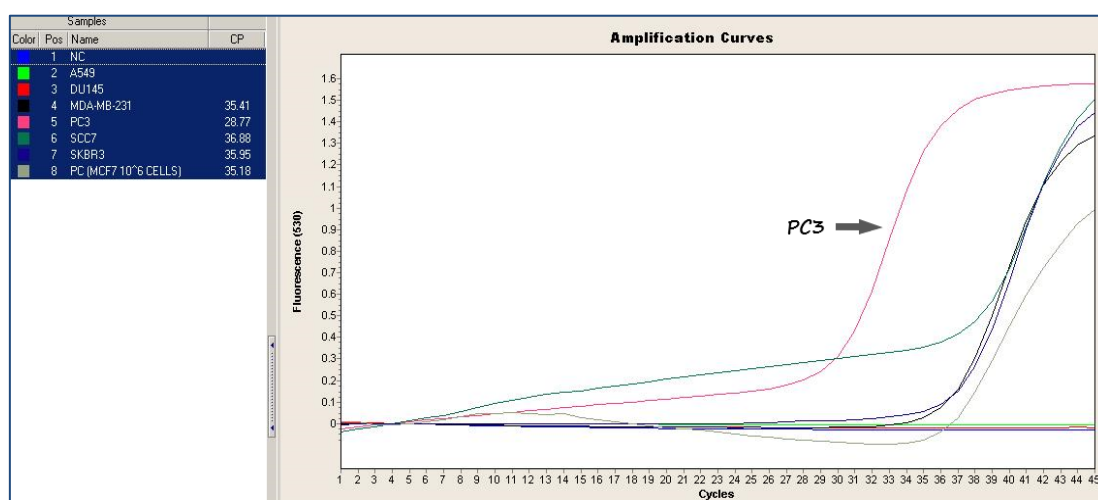


Σχήμα 6.1.: Καμπύλες ενίσχυσης RT-PCR για το γονίδιο αναφοράς B2M σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Συνολικά, μετά από ανάλυση RT-PCR για το γονίδιο του HOTTIP, παρατηρήθηκε πολύ υψηλή έκφραση του lncRNA στην καρκινική κυτταρική σειρά **PC3** (μεταστατικού καρκίνου του προστάτη). Το διάγραμμα φθορισμού που λήφθηκε από την διεξαγωγή της RT-PCR για το lncRNA HOTTIP του κάθε δείγματος, παρατίθενται στο παρακάτω σχήμα και οι χαρακτηριστικοί κύκλοι C_p αναγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 6.1.: Χαρακτηριστικοί κύκλοι Cq για τις καρκινικές κυτταρικές σειρές.

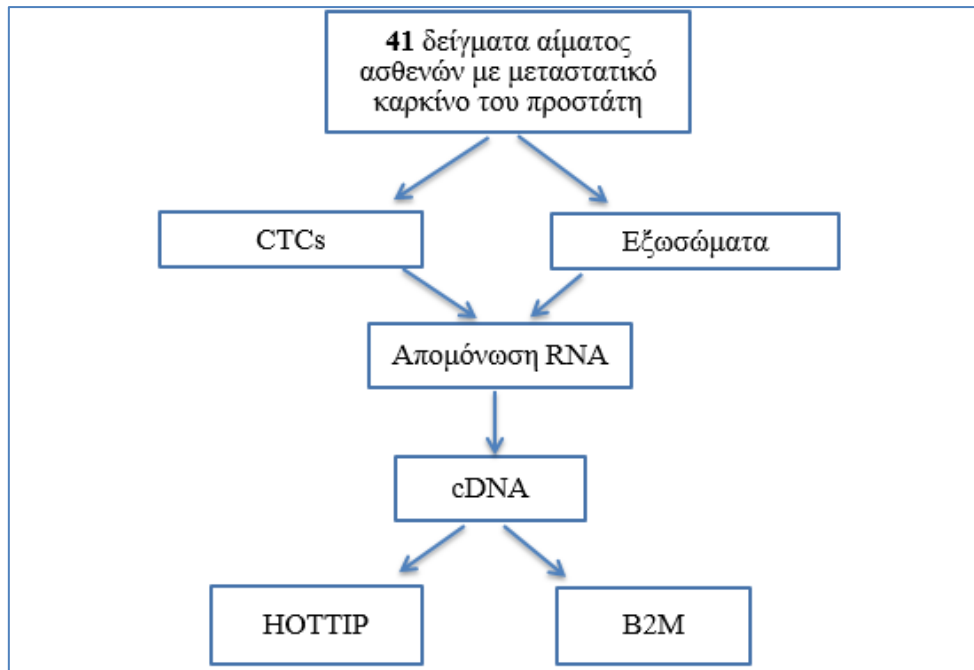
Κυτταρική σειρά	HOTTIP Cq	B2M Cq	ΔCq
A549		22,32	
SKBR3	35,06	20,15	14,91
MDA-MB-231	36,46	23,49	12,97
DU145		21,51	
PC3	28,86	19,17	9,69
SCC7	36,57	17,28	19,29



Σχήμα 6.2.: Χαρακτηριστικό διάγραμμα ενίσχυσης του HOTTIP σε καρκινικές κυτταρικές σειρές – έντονη ενίσχυση στην κυτταρική σειρά καρκίνου του προστάτη PC3.

6.2. Μελέτη της έκφρασης του HOTTIP σε κλινικά δείγματα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη.

Εφόσον παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση του HOTTIP στην κυτταρική σειρά προχωρημένου καρκίνου του προστάτη PC3, κρίθηκε σημαντική η περαιτέρω μελέτη της έκφρασής του και σε δείγματα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη. Για την ανάλυση των δειγμάτων ως προς το HOTTIP χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές σχεδιασμένοι σε περιοχή σύνδεσης εσωνίου-εξωνίου (junction primers). Οι ποσότητες των συστατικών του μίγματος αντίδρασης της RT-PCR και το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο αναγράφονται στους πίνακες 5.5. και 5.6. αντίστοιχα. Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζεται σύντομα η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε.



Σχήμα 6.3.: Πειραματική πορεία για τη μελέτη της έκφρασης του HOTTIP σε κλινικά δείγματα.

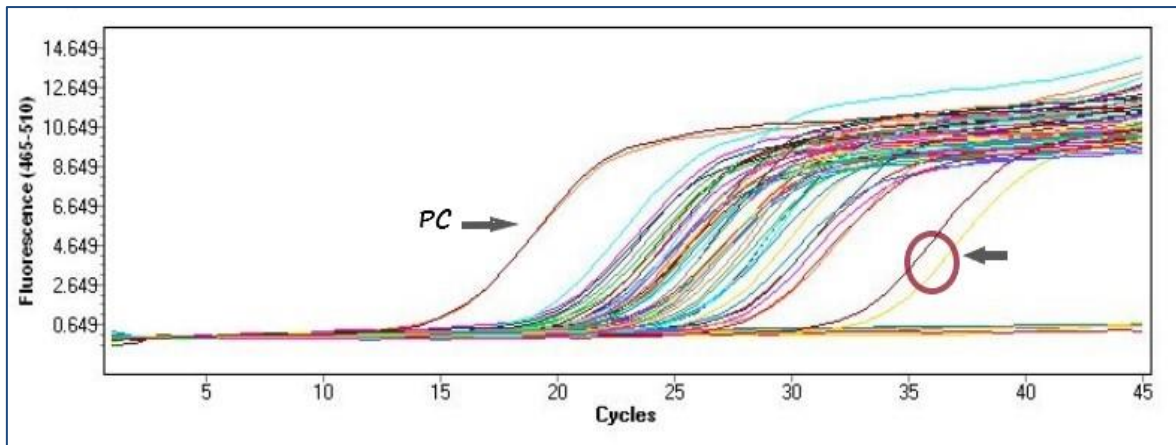
Κλινικά δείγματα

Συλλέχθηκαν 43 ζεύγη δειγμάτων cDNA από κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) και από εξωσώματα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη. Παράλληλα, στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκαν και 10 φυσιολογικά δείγματα.

Έλεγχος ποιότητας

Αρχικά, με ανάλυση RT-qPCR για το γονίδιο αναφοράς B2M, έγινε έλεγχος ποιότητας των δειγμάτων. Όλα τα δείγματα αναμένεται να εκφράζουν το γονίδιο της β2-μικροσφαιρίνης (B2M) εφόσον πρόκειται για «housekeeping gene» και εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα σε όλα τα κύτταρα. Οι ποσότητες των συστατικών του μίγματος αντίδρασης της RT-PCR και το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο αναγράφονται στους πίνακες 5.3. και 5.2. αντίστοιχα.

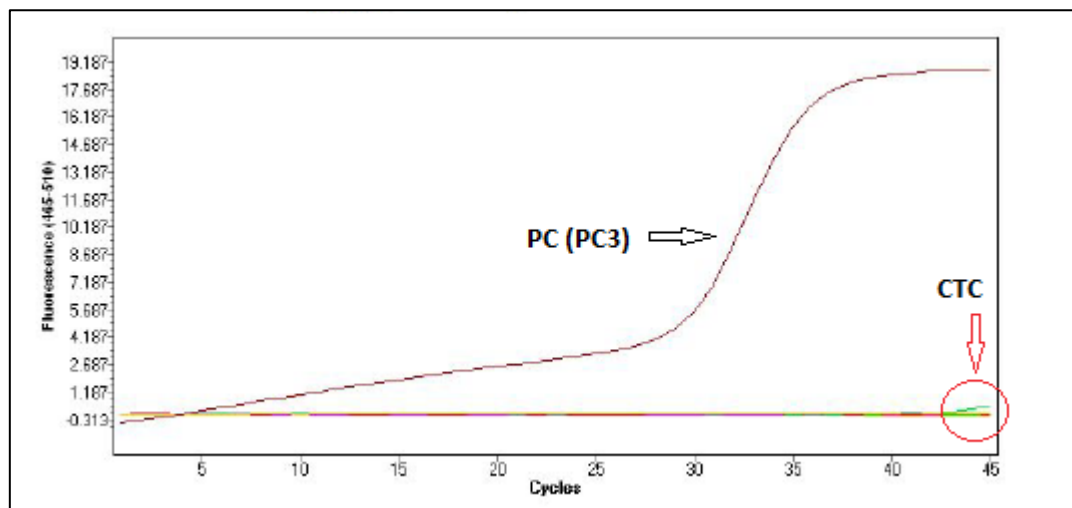
Απ' τη μελέτη αποκλείστηκαν 2 δείγματα ασθενών και 3 φυσιολογικά δείγματα λόγω κακής ποιότητας των δειγμάτων. Τα δείγματα αυτά εξέφραζαν σε χαμηλά επίπεδα το γονίδιο της B2M. Παρακάτω απεικονίζονται χαρακτηριστικό γράφημα των κλινικών δειγμάτων για τα μετάγραφα του γονιδίου αναφοράς (σχήμα 6.4.). Μετά την απόρριψη των συγκεκριμένων δειγμάτων μελετήθηκε η έκφραση του HOTTIP με RT-qPCR σε 41 ζεύγη δειγμάτων ασθενών και σε 7 φυσιολογικά δείγματα. Όσον αφορά τη διαφοροποίηση στην έκφραση της B2M μεταξύ των δειγμάτων, παρατηρήθηκε μια μικρή διαφορά στον αριθμό Cq μεταξύ των δειγμάτων CTCs και εξωσωμάτων, με τα εξωσώματα να εκφράζουν σε λίγο χαμηλότερα επίπεδα το γονίδιο αναφοράς.



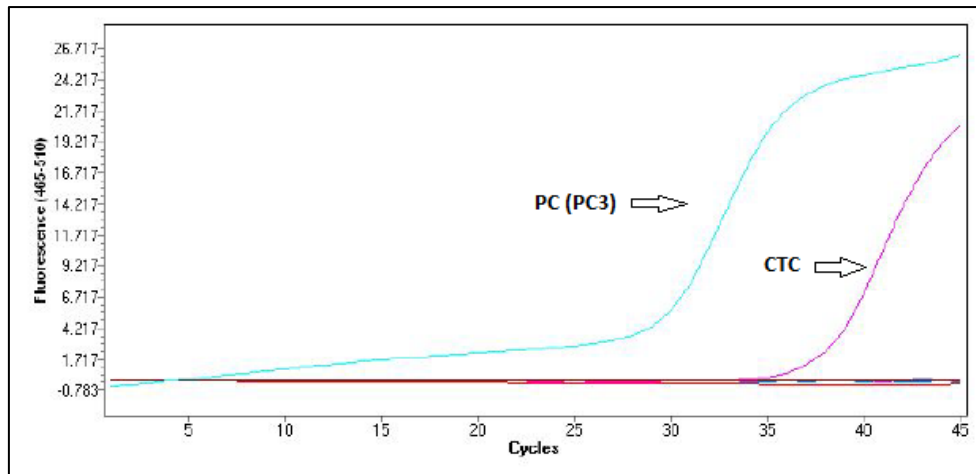
Σχήμα 6.4.: Χαρακτηριστικό διάγραμμα ενίσχυσης του γονιδίου αναφοράς B2M (σε κόκκινο κύκλο είναι δύο δείγματα που απορρίφθηκαν λόγω χαμηλής έκφρασης).

6.2.1. Μελέτη της έκφρασης του HOTTIP σε κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα CTCs.

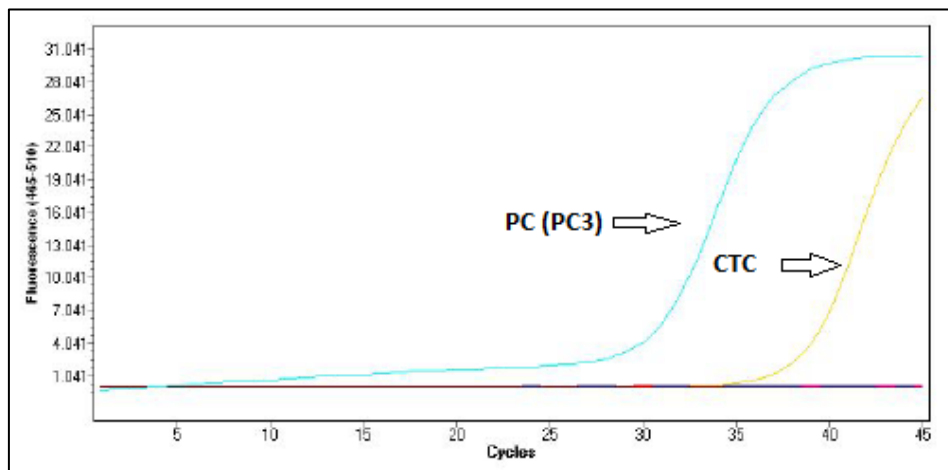
Μετά την εκτέλεση των RT-qPCR στα δείγματα CTCs ασθενών για το γονίδιο του HOTTIP, βρέθηκαν 4 δείγματα CTCs θετικά και παρουσιάζονται στα παρακάτω σχήματα. Σε όλες τις PCR χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας το cDNA της κυτταρικής σειράς PC3. Στο 1^ο δείγμα, όπως γίνεται αντιληπτό, υπάρχει χαμηλότερη έκφραση του γονιδίου του HOTTIP σε σχέση με τα υπόλοιπα τρία καθώς η καμπύλη ενίσχυσης εμφανίζεται με μεγάλο αριθμό Cq.



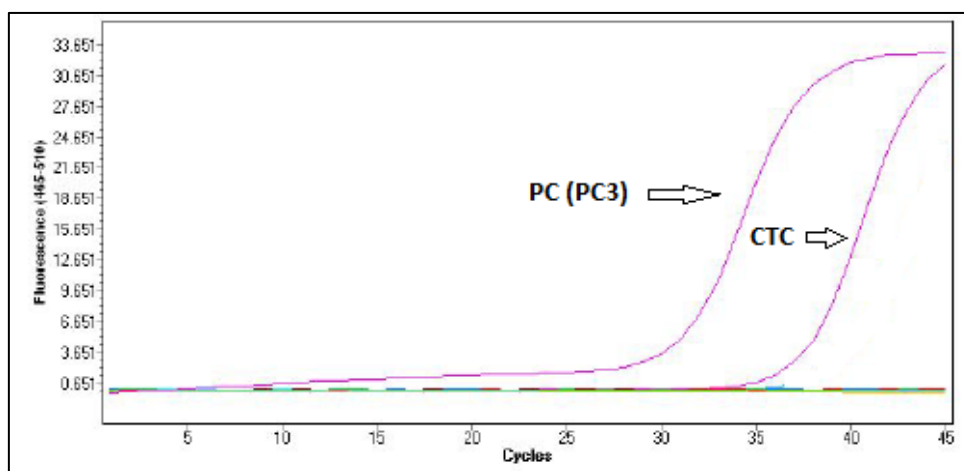
Σχήμα 6.5.: Διάγραμμα ενίσχυσης του γονιδίου του HOTTIP σε δείγματα CTCs (Cq 40.00).



Σχήμα 6.6.: Διάγραμμα ενίσχυσης του γονιδίου του HOTTIP σε δείγματα CTCs (Cq 37,69).



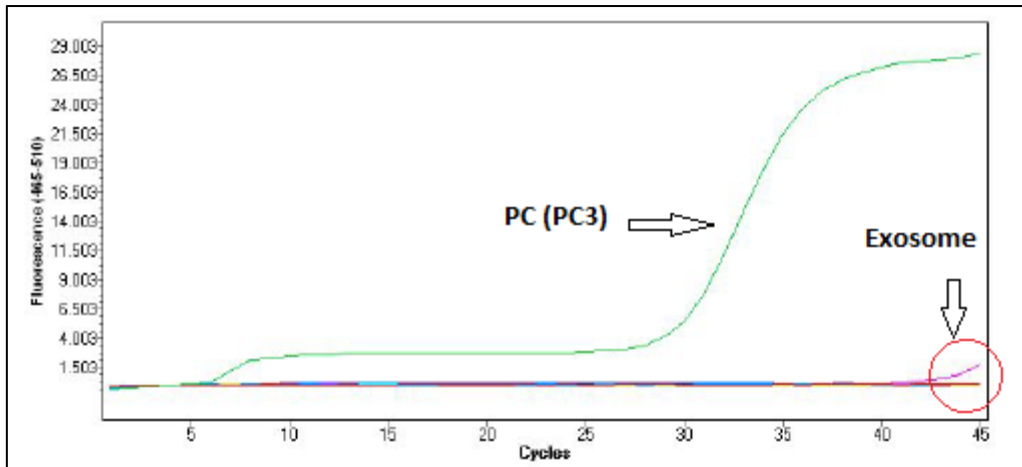
Σχήμα 6.7.: Διάγραμμα ενίσχυσης του γονιδίου του HOTTIP σε δείγματα CTCs (Cq 38,42).



Σχήμα 6.8.: Διάγραμμα ενίσχυσης του γονιδίου του HOTTIP σε δείγματα CTCs (Cq 37,15).

6.2.2. Μελέτη της έκφρασης του HOTTIP σε εξωσώματα.

Μετά την εκτέλεση των RT-qPCR στα δείγματα εξωσωμάτων ασθενών για το γονίδιο του HOTTIP, βρέθηκε 1 δείγμα θετικό και παρουσιάζεται στα παρακάτω σχήμα. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά PC3.



Σχήμα 6.9.: Διάγραμμα ενίσχυσης του γονιδίου του HOTTIP σε δείγματα εξωσωμάτων (Cq 40,00).

6.2.3. Σύγκριση των αποτελεσμάτων έκφρασης του HOTTIP στα CTCs και τα εξωσώματα.

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα από τις RT-qPCR που πραγματοποιήθηκαν για το lncRNA HOTTIP, στα φυσιολογικά δείγματα δε βρέθηκε κανένα θετικό στην έκφραση του γονιδίου. Από τα δείγματα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη βρέθηκαν **4/41 (9,75 %)** θετικά στην έκφραση του lncRNA HOTTIP στα CTCs, ενώ στα εξωσώματα βρέθηκε θετικό **1/41 (2,43 %)**. Το συγκεκριμένο δείγμα από εξωσώματα, δεν βρέθηκε θετικό στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα του ασθενούς. Παρόλα αυτά, τα δείγματα που βρέθηκαν να είναι αρνητικά στην έκφραση του HOTTIP στα CTCs των ασθενών, βρέθηκαν αρνητικά και στα εξωσώματα των ίδιων ασθενών. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τη μελέτη παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα.

	ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ (n = 41)																																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41			
HOTTIP CTCs																																												
HOTTIP Exosomes																																												
B2M																																												

Σχήμα 6.10.: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα έκφρασης των γονιδίων B2M και HOTTIP σε CTCs και εξωσώματα από 41 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη (Με κόκκινο χρώμα: Εκφράζεται και με πράσινο χρώμα: Δεν εκφράζεται).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Έντονο ενδιαφέρον στην έρευνα για τον καρκίνο, έχει προσελκύσει τα τελευταία χρόνια η υγρή βιοψία. Πρόκειται για μία μη επεμβατική και συνεπώς ελκυστική διαδικασία, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση του όγκου σε πραγματικό χρόνο. Σε αντίθεση με την παραδοσιακή βιοψία ιστού, μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με την ετερογένεια του όγκου. Οι προσεγγίσεις υγρής βιοψίας περιλαμβάνουν την απαρίθμηση και τον μοριακό χαρακτηρισμό CTCs, την ανάλυση ctDNA και εξωσωμάτων που αποβάλλονται από πρωτογενείς όγκους και μεταστατικές θέσεις στο περιφερικό αίμα. Παρά τα πολλά πλεονεκτήματα, η υγρή βιοψία δεν έχει ακόμη αξιοποιηθεί στην κλινική πράξη, αφού υπάρχουν ακόμα αρκετές προκλήσεις, όπως για παράδειγμα η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου απομόνωσης CTCs και εξωσωμάτων. Σε προχωρημένο καρκίνο του προστάτη που δίνει συχνά μεταστάσεις στα οστά, είναι δύσκολο να αξιολογηθεί η εξελισσόμενη γονιδιωματική ετερογένεια των σκελετικών μεταστάσεων και η ανάπτυξη βιοδεικτών βασιζόμενη στην υγρή βιοψία μπορεί να προσφέρει μια εναλλακτική προσέγγιση (84, 92).

Τα μη κωδικά RNAs, ενώ αρχικά αποκαλέσθηκαν ως « junk DNA », τώρα έχει θεωρηθεί πως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση, σε επιγενετικό, μεταγραφικό, αλλά και μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Τα μακριά μη κωδικά RNAs αποτελούν μια ετερογενή ομάδα μορίων RNA τόσο ως προς το μέγεθος, όσο και ως προς τον κυτταρικό εντοπισμό και γι αυτό το λόγο μπορούν να καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών. Το απορρυθμισμένο προφίλ των lncRNA έχει αποδειχτεί ότι εμπλέκεται στην παθογένεση των όγκων, η οποία περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη μετανάστευση, τη διήθηση, την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), την απόπτωση, αλλά και την αντοχή στα φάρμακα (31). Συγκεκριμένα το HOTTIP, του οποίου η έκφραση μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, θεωρείται ως ογκογόνο lncRNA, σχεδόν σε όλα τα είδη καρκίνου.

Πρωτού μελετηθεί η έκφραση του HOTTIP σε δείγματα ασθενών, προσδιορίστηκε η επίδραση που μπορεί να έχει η επιμόλυνση από γενωμικό DNA στην έκφραση του γονιδίου. Από τη σύγκριση δύο ζευγών εκκινητών που διέφεραν στην θέση την οποία είχαν σχεδιαστεί, με το ένα ζεύγος να είναι σχεδιασμένο σε περιοχή συρραφής ιντρονίου-εξωνίου (junction) και το άλλο όχι, παρατηρήθηκε ότι με τη χρήση εκκινητών που δεν ήταν σχεδιασμένοι σε junction περιοχή, υπήρχαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα έκφρασης του HOTTIP. Αυτό το εύρημα επιβεβαιώθηκε με τη χρήση δειγμάτων που είχαν υποστεί επεξεργασία με δεοξυριβονουκλεάση, αλλά και με τη χρήση διαφορετικών μεθοδολογιών σύνθεσης cDNA. Συνεπώς, ο σχεδιασμός των εκκινητών με τους οποίους θα μελετηθεί η έκφραση των γονιδίων με τη χρήση της PCR είναι μια διαδικασία που πρέπει να γίνεται προσεκτικά, λαμβάνοντας υπόψιν κατάλληλες προϋποθέσεις, έτσι ώστε να αποφεύγονται προβλήματα επιμόλυνσης gDNA και συνεπώς ψευδώς θετικά αποτελέσματα έκφρασης.

Στη συνέχεια, προκειμένου να αξιολογηθεί ως βιοδείκτης για τον καρκίνο του προστάτη, μελετήθηκε η έκφραση του HOTTIP, με το βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο, σε CTCs και εξωσώματα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη με τη χρήση RT-PCR. Στα φυσιολογικά δείγματα της μελέτης, το γονίδιο του HOTTIP δε φάνηκε να εκφράζεται, ενώ αντίθετα στο 9,75 % των δειγμάτων κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων υπήρξε έκφραση του γονιδίου, όπως και στο 2,43 % των δειγμάτων εξωσωμάτων από ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν την ανάγκη εφαρμογής πιο ειδικών πρωτοκόλλων ανίχνευσης των lncRNAs, ώστε να εξαλειφθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, ενώ απαιτείται περαιτέρω αξιολόγηση του εν λόγω lncRNA σε μεγαλύτερο αριθμό κλινικών δειγμάτων ώστε να αποδειχτεί η σημαντικότητα του ως προγνωστικός ή προβλεπτικός βιοδείκτης στον μεταστατικό καρκίνο του προστάτη.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΠΟΔΟΣΕΙΣ ΟΡΩΝ

Σύντμηση	Απόδοση όρου	
	Ελληνικός όρος	Αγγλικός όρος
ADT	Θεραπεία στέρησης ανδρογόνων	Androgen deprivation therapy
AR	Υποδοχέας ανδρογόνων	Androgen Receptor
bp	Ζεύγη βάσεων	Base pairs
B2M	β ₂ μικροσφαιρίνη	Beta-2-Microglobulin
circRNA	Κυκλικό RNA	Circular RNA
cDNA	Συμπληρωματικό DNA	Complementary DNA
Cp	Σημείο διασταύρωσης	Crossing point
Cq	Κύκλος ποσοτικοποίησης	Quantification cycle
CTCs	Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα	Circulating Tumor Cells
ctDNA	Κυκλοφορούν καρκινικό DNA	Circulating Tumor DNA
cfDNA	Ελεύθερο κυττάρων εξωκυττάριο DNA	Cell-free DNA
CKs	Κυτταροκερατίνες	Cytokeratins
CRPC	Ορμονοάντοχος καρκίνος του προστάτη	Castration Resistant Prostate Cancer
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ	Deoxyribonucleic acid
dH₂O	Απεσταγμένο νερό	Distilled H ₂ O
ddH₂O	Διπλά απεσταγμένο νερό	Double distilled H ₂ O
dsDNA	Διπλής έλικας DNA	Double-stranded DNA
dNTPs	Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια	Deoxynucleotide triphosphates
DTCs	Διεσπαρμένα καρκινικά κύτταρα	Disseminated Tumor Cells
ECM	Εξωκυττάριος χώρος	Extracellular Matrix
EMT	Επιθηλιακή-Μεσεγχυματική Μετάβαση	Epithelial-Mesenchymal Transition
EpCAM	Μόριο προσκόλλησης επιθηλιακών κυττάρων	Epithelial Cellular Adhesion Molecule
EVs	Εξωκυτταρικά κυστίδια	Extracellular vesicles
EGFR	Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα	Epidermal Growth Factor Receptor
EtOH	Αιθανόλη	Ethanol

ENCODE	Εγκυκλοπαίδεια των στοιχείων του DNA	Encyclopedia of DNA Elements
FDA	Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων	Food and Drug Administration
gDNA	Γενωμικό DNA	Genomic DNA
GITC	ισοθειοκυανική γουανιδίνη	Guanidinium isothiocyanate
lncRNA	Μακρύ μη κωδικό RNA	Long non-coding RNA
lincRNA	Μακρύ διαγονιδιακό μη κωδικό RNA	Long intergenic non-coding RNA
LHRH	Εκλυτική Ωχρινοτρόπος Ορμόνη	Luteinizing Hormone-Releasing Hormone
miRNA		microRNAs
MCF-7		Michigan Cancer Foundation-7
MET	Μεσεγχυματική-Επιθηλιακή Μετάβαση	Mesenchymal-Epithelial Transition
mCRPC	Μεταστατικός ορμονοάντοχος καρκίνος του προστάτη	Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer
NSCLC	Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα	Non-small cell lung cancer
ncRNA	Μη κωδικό RNA	Non-coding RNA
piRNA	RNA που αλληλεπιδρά με piwi πρωτεΐνη	Piwi-interacting RNA
PD-L1		Programmed death-ligand 1
PBMCs	Μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PSA	Ειδικό προστατικό αντιγόνο	Prostate-Specific Antigen
PSMA	Ειδικό προστατικό αντιγόνο μεμβράνης	prostate-specific membrane antigen
PCa	Καρκίνος του προστάτη	Prostate Cancer
PIN	Προστατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία	Prostatic Intraepithelial Neoplasia
PTEN	Φωσφατάση ομόλογη της τενσίνης	Phosphatase and Tensin Homolog
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	Polymerase Chain Reaction
qPCR	Ποσοτική PCR	Quantitative PCR
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ	Ribonucleic acid
RT-PCR	PCR αντίστροφης μεταγραφής	Reverse transcription PCR
rRNA	Ριβοσωμικό RNA	Ribosomal RNA
RCL	Διάλυμα λύσης ερυθροκυττάρων	Red Cell Lysis buffer
ssDNA	Μονής έλικας DNA	Single-stranded DNA
snRNA	Μικρό πυρηνικό RNA	Small nuclear RNA

snoRNA	Μικρό RNA πυρηνίσκου	Small nucleolar RNA
siRNA	Μικρό παρεμβαλλόμενο	Small interfering RNA
tRNA	Μεταφορικό RNA	Transfer RNA
TGF	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού	Transforming Growth Factor
TDEs	Εξωσώματα προερχόμενα απ' τον όγκο	Tumor Derived Exosomes
TME	Μικροπεριβάλλον του όγκου	Tumor Microenvironment
TMPS2	Διαμεμβρανική Πρωτεάση Σερίνης 2	Transmembrane Serine Protease 2
T_m	Θερμοκρασία τήξης	Melting Temperature
T_A	Θερμοκρασία υβριδοποίησης	Annealing Temperature
VEGF	Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας	Vascular Endothelial Growth Factor

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1.: Τα 14 θεμελιώδη χαρακτηριστικά του καρκίνου	[8]
Σχήμα 1.2.: Συνολικοί αριθμοί περιπτώσεων καρκίνου (αριστερά) και θανάτων από καρκίνο (δεξιά) στους άνδρες το 2020.....	[9]
Σχήμα 1.3.: Απεικονίζεται ο πιο συχνά εντοπισμένος καρκίνος σε κάθε χώρα, μεταξύ των ανδρών (με πράσινο χρώμα παρουσιάζονται οι χώρες που ο καρκίνος του προστάτη είναι ο συχνότερα διαγνωσμένος).....	[10]
Σχήμα 1.4.: Ανατομία του προστάτη αδένου	[12]
Σχήμα 1.5.: Στάδια εξέλιξης καρκίνου του προστάτη και τελικά ανάπτυξη mCRPC.....	[14]
Σχήμα 2.1.: Ταξινόμηση των μη-κωδικών RNAs (ncRNAs).....	[18]
Σχήμα 2.2.: Βιογένεση των miRNAs.....	[19]
Σχήμα 2.3.: Μόρια με τα οποία μπορεί να αλληλεπιδράσουν τα lncRNAs	[21]
Σχήμα 2.4.: Βιογένεση και λειτουργίες των lncRNAs.....	[22]
Σχήμα 3.1.: Σύγκριση κλασσικής και υγρής βιοψίας	[28]
Σχήμα 3.2.: Μεταστατική Διαδικασία	[30]
Σχήμα 3.3.: Μέθοδοι εμπλουτισμού CTCs.....	[35]
Σχήμα 3.4.: Μοριακή σύσταση εξωσωμάτων	[39]
Σχήμα 4.1. : Διάγραμμα πειραματικού σχεδιασμού επεξεργασίας δειγμάτων.....	[48]
Σχήμα 4.2.: Πορεία απομόνωσης κυκλοφορούντων επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια.....	[50]
Σχήμα 4.3.: Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων απομόνωσης RNA με χρήση αντιδραστηρίου TRIzol.....	[52]
Σχήμα 4.4.: Σχηματική απεικόνιση πειραματικής πορείας απομόνωσης εξωσωμάτων και ολικού RNA.....	[53]
Σχήμα 4.5.: Τυπικό φάσμα απορρόφησης DNA NanoDrop-1000.....	[57]
Σχήμα 4.6.: Οι τρεις θερμοκρασιακές φάσεις της PCR: 1. Αποδιάταξη αλυσίδων, 2. Υβριδοποίηση εκκινητών, 3. Επιμήκυνση αλυσίδων.....	[61]
Σχήμα 4.7.: Διάγραμμα εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τον αριθμό των κύκλων της PCR (εκθετική, γραμμική και φάση κορεσμού).....	[62]
Σχήμα 4.8.: Απεικόνιση των τμημάτων διέγερσης και ανίχνευσης του φθορισμομέτρου στο όργανο Light Cycler 2.0.....	[66]
Σχήμα 4.9.: Απεικόνιση των δύο ζευγών εκκινητών για την ενίσχυση του HOTTIP. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι 2 junction περιοχές που διαθέτει το γονίδιο. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζονται οι No-junction primers, ενώ με μπλε χρώμα παρουσιάζονται οι junction primers.....	[68]

Σχήμα 5.1.: Καμπύλες ενίσχυσης RT-PCR για το γονίδιο του HOTTIP με T _A : 64°C.....	[72]
Σχήμα 5.2.: Καμπύλες ενίσχυσης RT-PCR για το γονίδιο του HOTTIP με T _A : 66°C.....	[72]
Σχήμα 5.3.: Βήματα της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε ώστε να γίνει η κατάλληλη επιλογή εκκινήτων για το γονίδιο του HOTTIP.....	[75]
Σχήμα 5.4.: Καμπύλες ενίσχυσης RT-PCR για το γονίδιο του HOTTIP σε ζεύγη δειγμάτων που είχαν υποστεί DNase treatment και όχι, με τους no-junction primers.....	[76]
Σχήμα 5.5.: Καμπύλες ενίσχυσης RT-PCR για το γονίδιο του HOTTIP σε ζεύγη δειγμάτων που είχαν υποστεί DNase treatment και όχι, με τους junction primers.....	[77]
Σχήμα 5.6.: Καμπύλες ενίσχυσης RT-PCR για το γονίδιο του HOTTIP σε δείγματα cDNA ιστών NSCLC από δύο διαφορετικές μεθοδολογίες (TAKARA vs Applied Biosystems Kit) με τους no-junction primers.....	[78]
Σχήμα 5.7.: Καμπύλες ενίσχυσης RT-PCR για το γονίδιο του HOTTIP σε δείγματα cDNA ιστών NSCLC από δύο διαφορετικές μεθοδολογίες (TAKARA vs Applied Biosystems Kit) με τους junction primers.....	[78]
Σχήμα 6.1.: Καμπύλες ενίσχυσης RT-PCR για το γονίδιο αναφοράς B2M σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.....	[79]
Σχήμα 6.2.: Χαρακτηριστικό διάγραμμα ενίσχυσης του HOTTIP σε καρκινικές κυτταρικές σειρές - έντονη ενίσχυση στην κυτταρική σειρά καρκίνου του προστάτη PC3.....	[80]
Σχήμα 6.3.: Πειραματική πορεία για τη μελέτη της έκφρασης του HOTTIP σε κλινικά δείγματα.....	[81]
Σχήμα 6.4.: Χαρακτηριστικό διάγραμμα ενίσχυσης του γονιδίου αναφοράς B2M (σε κόκκινο κύκλο είναι δύο δείγματα που απορρίφθηκαν λόγω χαμηλής έκφρασης).....	[82]
Σχήμα 6.5.: Διάγραμμα ενίσχυσης του γονιδίου του HOTTIP σε δείγματα CTCs (Cq 40,00).....	[82]
Σχήμα 6.6.: Διάγραμμα ενίσχυσης του γονιδίου του HOTTIP σε δείγματα CTCs (Cq 37,69).....	[83]
Σχήμα 6.7.: Διάγραμμα ενίσχυσης του γονιδίου του HOTTIP σε δείγματα CTCs (Cq 38,42).....	[83]
Σχήμα 6.8.: Διάγραμμα ενίσχυσης του γονιδίου του HOTTIP σε δείγματα CTCs (Cq 37,15).....	[83]
Σχήμα 6.9.: Διάγραμμα ενίσχυσης του γονιδίου του HOTTIP σε δείγματα εξωσωμάτων (Cq 40,00).....	[84]
Σχήμα 6.10.: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα έκφρασης των γονιδίων B2M και HOTTIP σε CTCs και εξωσώματα από 41 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη (Με κόκκινο χρώμα: Εκφράζεται και με πράσινο χρώμα: Δεν εκφράζεται).....	[84]

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 4.1.:** Φασματοφωτόμετρο NanoDrop-ND-1000.....[55]
- Εικόνα 4.2.:** Αριστερά απεικονίζεται ο τρόπος έγχυσης του δείγματος στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop και Δεξιά πώς συγκρατείται το δείγμα μέσω δυνάμεων επιφανειακής τάσης.....[56]
- Εικόνα 4.3.:** Αναλυτής Cobas z480 και η θύρα στην οποία προστίθεται η πλάκα των 96 δειγμάτων (96-well-plate).....[64]
- Εικόνα 4.4.:** (Α) Πλαστικά σωληνάρια (Strip PCR Tubes) που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση PCR στο όργανο Cobas και (Β) η πλάκα 96 δειγμάτων (96-well-plate).....[65]
- Εικόνα 4.5.:** Light Cycler 2.0. και ο περιστρεφόμενος δίσκος με τα γυάλινα τριχοειδή (capillaries).....[65]

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 4.1.: Συστατικά του μίγματος αντίδρασης εξάλειψης γενωμικού DNA (Kit TAKARA).....	[58]
Πίνακας 4.2.: Συστατικά μίγματος αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής (Kit TAKARA).....	[58]
Πίνακας 4.3.: Συστατικά του μίγματος αντίδρασης σύνθεσης cDNA (Kit Applied Biosystems).....	[59]
Πίνακας 4.4.: Αντιδραστήρια / Συγκεντρώσεις για την παρασκευή διαλυμάτων mastermix των Real Time PCR.....	[63]
Πίνακας 5.1.: Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθέτη TaqMan για το γονίδιο αναφοράς-B2M.....	[70]
Πίνακας 5.2.: Συνθήκες real-time PCR για το γονίδιο της B2M.....	[70]
Πίνακας 5.3.: Συστατικά του μίγματος της RT-qPCR για την ενίσχυση του γονιδίου αναφοράς (B2M).....	[71]
Πίνακας 5.4.: Αλληλουχίες εκκινητών (σχεδιασμένοι σε junction περιοχή) για το γονίδιο του HOTTIP.....	[71]
Πίνακας 5.5.: Συστατικά του μίγματος της RT-qPCR για την ενίσχυση του HOTTIP με εκκινητές σχεδιασμένους σε περιοχή σύνδεσης εσωνίου-εξωνίου.....	[73]
Πίνακας 5.6.: Συνθήκες real-time PCR για το γονίδιο του HOTTIP με τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν σε περιοχή σύνδεσης εσωνίου-εξωνίου.....	[73]
Πίνακας 5.7.: Αλληλουχίες εκκινητών (μη σχεδιασμένοι σε junction περιοχή) για το γονίδιο του HOTTIP.....	[74]
Πίνακας 5.8.: Συστατικά του μίγματος της RT-qPCR για την ενίσχυση του HOTTIP με εκκινητές που δε σχεδιάστηκαν σε junction περιοχή.....	[74]
Πίνακας 5.9.: Συνθήκες real-time PCR για το γονίδιο του HOTTIP με τους εκκινητές που δε σχεδιάστηκαν σε junction περιοχή.....	[75]

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman – The cell: A molecular approach, 5th Edition, Academic Publications J Basdra & Co, 2011, ch. 18, pp. 1071-1075.
2. < <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> > (Τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2022)
3. <<https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/history-of-cancer/what-is-cancer.html> > (Τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2022)
4. Detlef Doenecke, Jan Koolman, Georg Fuchs, Wolfgang Gerok- Karlsons Biochemie und Pathobiochemie, Publications Litsas, 2012, ch. 25, pp. 745-760.
5. Douglas Hanahan Robert A Weinberg - Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
6. Douglas Hanahan - Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discov. 2022 Jan;12(1):31-46.
7. Guido Kroemer, Jacques Pouyssegur - Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel Cancer Cell. 2008 Jun;13(6):472-82.
8. Hyuna Sung, Jacques Ferlay, Rebecca L Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, Freddie Bray - Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021 May;71(3):209-249.
9. Rebecca L Siegel, Kimberly D Miller, Hannah E Fuchs, Ahmedin Jemal - Cancer statistics, 2022. CA Cancer J Clin. 2022 Jan;72(1):7-33
10. < <https://poulakis-urology.com/article/pathiseis-prostati-eisagogi/aitia-paragontes-kindinou-tou-karkinou-tou-prostati/> > (Τελευταία επίσκεψη Νοέμβριος 2022)
11. < <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html> > (Τελευταία επίσκεψη Νοέμβριος 2022)
12. < <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about/what-is-prostate-cancer.html> > (Τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2022)
13. < <https://bouzalas.gr/prostatis-adenas/> > (Τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2022)

14. Shahneen Sandhu, Caroline M Moore, Edmund Chiong, Himisha Beltran, Robert G Bristow, Scott G Williams - Prostate cancer. *Lancet* . 2021 Sep 18;398(10305):1075-1090.
15. Michael C Haffner, Wilbert Zwart, Martine P Roudier, Lawrence D True, William G Nelson, Jonathan I Epstein, Angelo M De Marzo, Peter S Nelson, Srinivasan Yegnasubramanian - Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2021 Feb;18(2):79-92.
16. Guocan Wang, Di Zhao, Denise J Spring, Ronald A DePinho - Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev*. 2018 Sep 1;32(17-18):1105-1140.
17. Kazumasa Komura, Christopher J Sweeney, Teruo Inamoto, Naokazu Ibuki, Haruhito Azuma, Philip W Kantoff - Current treatment strategies for advanced prostate cancer. *Int J Urol*. 2018 Mar;25(3):220-231.
18. Vera Constâncio, Daniela Barros-Silva, Carmen Jerónimo, Rui Henrique - Known epigenetic biomarkers for prostate cancer detection and management: exploring the potential of blood-based liquid biopsies. *Expert Rev Mol Diagn*. 2019 May;19(5):367-375.
19. Min Yuen Teo, Dana E Rathkopf, Philip Kantoff - Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annu Rev Med*. 2019 Jan 27;70:479-499.
20. Min Yuen Teo, Dana E Rathkopf, Philip Kantoff - Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annu Rev Med*. 2019 Jan 27;70:479-499.
21. Yiwen Fang, Melissa J Fullwood - Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer Genomics Proteomics Bioinformatics. 2016 Feb;14(1):42-54.
22. Tony Gutschner, Sven Diederichs - The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biol*. 2012 Jun;9(6):703-19.
23. Marek Kazimierczyk, Marta K Kasprowicz, Marta E Kasprzyk, Jan Wrzesinski - Human Long Noncoding RNA Interactome: Detection, Characterization and Function *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 4;21(3):1027.
24. Julia Beermann, Maria-Teresa Piccoli, Janika Viereck, Thomas Thum - Noncoding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches. *Physiol Rev*. 2016 Oct;96(4):1297-325.
25. Sonja Hombach, Markus Kretz - Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. *Adv Exp Med Biol*. 2016;937:3-17.

26. Peijing Zhang, Wenyi Wu, Qi Chen, Ming Chen - Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. *J Integr Bioinform.* 2019 Jul 13;16(3):20190027
27. Alexander F Palazzo, Eugene V Koonin - Functional Long Non-coding RNAs Evolve from Junk Transcripts. *Cell.* 2020 Nov 25;183(5):1151-1161.
28. Georges St Laurent, Claes Wahlestedt, Philipp Kapranov - The Landscape of long noncoding RNA classification. *Trends Genet.* 2015 May;31(5):239-51.
29. Joram Kiriga Waititu , Chunyi Zhang Jun Liu, Huan Wang - Plant Non-Coding RNAs: Origin, Biogenesis, Mode of Action and Their Roles in Abiotic Stress. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 9;21(21):8401.
30. Ajaz A Bhat , Salma N Younes , Syed Shadab Raza, Lubna Zarif, Sabah Nisar, Ikhlak Ahmed, Rashid Mir, Sachin Kumar, Surender K Sharawat, Sheema Hashem, Imadeldin Elfaki, Michal Kulinski, Shilpa Kuttikrishnan, Kirti S Prabhu, Abdul Q Khan, Santosh K Yadav, Wael El-Rifai, Mohammad A Zargar, Hatem Zayed, Mohammad Haris, Shahab Uddin - Role of non-coding RNA networks in leukemia progression, metastasis and drug resistance - *Mol Cancer.* 2020 Mar 12;19(1):57.
31. Boxue He, Zhenyu Zhao, Qidong Cai, Yuqian Zhang, Pengfei Zhang, Shuai Shi, Hui Xie, Xiong Peng, Wei Yin, Yongguang Tao, Xiang Wang - miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer. *Int J Biol Sci.* 2020 Jul 19;16(14):2628-2647.
32. Gracjan Michlewski , Javier F Cáceres - Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA.* 2019 Jan;25(1):1-16.
33. Wei-Yi Zhou, Ze-Rong Cai, Jia Liu, De-Shen Wang, Huai-Qiang Ju, Rui-Hua Xu - Circular RNA: metabolism, functions and interactions with proteins. *Mol Cancer.* 2020 Dec 14;19(1):172.
34. Luisa Statello, Chun-Jie Guo, Ling-Ling Chen, Maite Huarte - Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021 Feb;22(2):96-118.
35. Yujing Chi, Di Wang, Junpei Wang, Weidong Yu, Jichun Yang - Long Non-Coding RNA in the Pathogenesis of Cancers. *Cells.* 2019 Sep 1;8(9):1015.
36. Lina Ma, Vladimir B Bajic, Zhang Zhang - On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol.* 2013 Jun;10(6):925-33.
37. Frank J Slack, Arul M Chinnaiyan - The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell.* 2019 Nov 14;179(5):1033-1055.

38. Huiwen Yan, Pengcheng Bu - Non-coding RNA in cancer. *Essays Biochem.* 2021 Oct 27;65(4):625-639.
39. Swati Dahariya, Indira Paddibhatla, Santosh Kumar, Sanjeev Raghuwanshi, Adithya Palapati, Ravi Kumar Gutti - Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. *Mol Immunol.* 2019 Aug;112:82-92.
40. Joanna Kozłowska, Tomasz Kolenda, Paulina Poter, Joanna Sobocińska, Kacper Guglas, Maciej Stasiak, Renata Bliźniak, Anna Teresiak, Katarzyna Lamperska - Long Intergenic Non-Coding RNAs in HNSCC: From "Junk DNA" to Important Prognostic Factor. *Cancers (Basel).* 2021 Jun 12;13(12):2949.
41. Gaurav Kumar Pandey, Chandrasekhar Kanduri - Long Non-Coding RNAs: Tools for Understanding and Targeting Cancer Pathways. *Cancers (Basel).* 2022 Sep 29;14(19):4760.
42. Yifan Lian, Zeling Cai, Huangbo Gong, Songling Xue, Dongdong Wu, Keming Wang - HOTTIP: a critical oncogenic long non-coding RNA in human cancers. *Mol Biosyst.* 2016 Oct 18;12(11):3247-3253.
43. Soudeh Ghafouri-Fard, Sepideh Dashti, Mohammad Taheri - The HOTTIP (HOXA transcript at the distal tip) lncRNA: Review of oncogenic roles in human. *Biomed Pharmacother.* 2020 Jul;127:110158.
44. Bin Yang, Ge Gao, Zhixin Wang, Daju Sun, Xin Wei, Yanan Ma, Youpeng Ding - Long non-coding RNA HOTTIP promotes prostate cancer cells proliferation and migration by sponging miR-216a-5p. *Biosci Rep.* 2018 Sep 28;38(5):BSR20180566.
45. Yoo Jin Lee, Harim Oh, Eojin Kim, Bokyung Ahn, Jeong Hyeon Lee, Youngseok Lee, Yang Seok Chae, Sung Gu Kang, Chul Hwan Kim - Long noncoding RNA HOTTIP overexpression: A potential prognostic biomarker in prostate cancer. *Pathol Res Pract.* 2019 Nov;215(11):152649.
46. Amin Mahpour, Alan C Mullen - Our emerging understanding of the roles of long non-coding RNAs in normal liver function, disease, and malignancy. *JHEP Rep.* 2020 Sep 3;3(1):100177.
47. Reem Malek, Rajendra P Gajula, Russell D Williams, Belinda Nghiem, Brian W Simons, Katriana Nugent, Hailun Wang, Kekoa Taparra, Ghali Lemtiri-Chlieh, Arum R Yoon, Lawrence True, Steven S An, Theodore L DeWeese, Ashley E Ross, Edward M Schaeffer, Kenneth J Pienta, Paula J Hurley, Colm Morrissey, Phuoc T Tran - TWIST1-WDR5- Hottip Regulates Hoxa9 Chromatin to Facilitate Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Res.* 2017 Jun 15;77(12):3181-3193.

48. Hong Wu, Hong-Yan Wei, Qian-Qian Chen - Long noncoding RNA HOTTIP promotes the metastatic potential of ovarian cancer through the regulation of the miR-615-3p/SMARCE1 pathway. *Kaohsiung J Med Sci.* 2020 Dec;36(12):973-982.
49. Z-S Xiao, H Long, L Zhao, H-X Li, X-N Zhang - LncRNA HOTTIP promotes proliferation and inhibits apoptosis of gastric carcinoma cells via adsorbing miR-615-3p. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020 Jun;24(12):6692-6698
50. Tao Liu , Helei Wang , Haiyao Yu , Miaomiao Bi , Zhenkun Yan , Sen Hong , Shiquan Li - The Long Non-coding RNA HOTTIP Is Highly Expressed in Colorectal Cancer and Enhances Cell Proliferation and Invasion. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2020 Mar 6;19:612-618.
51. Lei Xiong, Yi Tang, Jing Tang, Zhaoyang Liu, Xiaozhou Wang - Downregulation of lncRNA HOTTIP Suppresses the Proliferation, Migration, and Invasion of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma by Regulation of HMGA2-Mediated Wnt/ β -Catenin Pathway. *Cancer Biother Radiopharm.* 2020 Nov;35(9):720-730.
52. Jingyu Wang, Baojun Lv , Yonghui Su, Xiao Wang, Juyuan Bu, Lan Yao - Exosome-Mediated Transfer of lncRNA HOTTIP Promotes Cisplatin Resistance in Gastric Cancer Cells by Regulating HMGA1/miR-218 Axis. *Onco Targets Ther.* 2019 Dec 20;12:11325-11338.
53. Soon Sun Kim, Geum Ok Baek, Ju A Son, Hye Ri Ahn, Moon Kyung Yoon, Hyo Jung Cho, Jung Hwan Yoon, Suk Woo Nam, Jae Youn Cheong , Jung Woo Eun - Early detection of hepatocellular carcinoma via liquid biopsy: panel of small extracellular vesicle-derived long noncoding RNAs identified as markers. *Mol Oncol.* 2021 Oct;15(10):2715-2731.
54. Yoo Jin Lee, Harim Oh , Eojin Kim , Bokyoung Ahn , Jeong Hyeon Lee , Youngseok Lee , Yang Seok Chae, Sung Gu Kang, Chul Hwan Kim - Long noncoding RNA HOTTIP overexpression: A potential prognostic biomarker in prostate cancer. *Pathol Res Pract.* 2019 Nov;215(11):152649.
55. Anquan Shang, Weiwei Wang, Chenzheng Gu, Chen Chen, Bingjie Zeng, Yibao Yang , Ping Ji, Junjun Sun, Junlu Wu, Wenying Lu, Zujun Sun, Dong Li - Long non-coding RNA HOTTIP enhances IL-6 expression to potentiate immune escape of ovarian cancer cells by upregulating the expression of PD-L1 in neutrophils. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Sep 18;38(1):411.
56. Huichuan Jiang, Wei Xiong, Lingxiao Chen, Zhengtong Lv, Changzhao Yang, Yuan Li - Knockdown of the long noncoding RNA HOTTIP inhibits cell proliferation and enhances cell sensitivity to cisplatin by suppressing the Wnt/ β -catenin pathway in prostate cancer. *J Cell Biochem.* 2019 Jun;120(6):8965-8974.

57. W Gao, X-L Wu, D-Z Li, H-D Liu - HOTTIP participates in mammary cancer by promoting cell proliferation via PI3K/AKT pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018 Jul;22(13):4181-4187
58. Feifei Peng , Xiaoli Shi, Yin Meng, Bo Dong, Guangchi Xu, Tingting Hou, Yang Shi, Tao Liu - Long non-coding RNA HOTTIP is upregulated in renal cell carcinoma and regulates cell growth and apoptosis by epigenetically silencing of LATS2. *Biomed Pharmacother.* 2018 Sep;105:1133-1140.
59. Zhiqiang Fu, Changhao Chen, Quanbo Zhou , Yinxue Wang , Yue Zhao , Xiaohui Zhao, Wenzhu Li Shangyou Zheng, Huilin Ye, Lin Wang, Zhanghai He, Qing Lin, Zhihua Li 8, Rufu Chen - LncRNA HOTTIP modulates cancer stem cell properties in human pancreatic cancer by regulating HOXA9 *Cancer Lett.* 2017 Dec 1;410:68-81.
60. Yu Zhang, Jia-Cheng Huang, Kai-Teng Cai, Xi-Bing Yu, You-Rong Chen, Wen-Ya Pan, Ze-Liang He, Jun Lv, Zhen-Bo Feng, Gang Chen - 1. Long non-coding RNA HOTTIP promotes hepatocellular carcinoma tumorigenesis and development: A comprehensive investigation based on bioinformatics, qRT-PCR and meta-analysis of 393 cases *Int J Oncol.* 2017 Dec;51(6):1705-1721
61. Yanqin Sun, Yuanyuan Zhou, Yifeng Bai, Qiongyao Wang, Jiarong Bao, Yingshan Luo, Ying Guo, Linlang Guo - A long non-coding RNA HOTTIP expression is associated with disease progression and predicts outcome in small cell lung cancer patients *Mol Cancer.* 2017 Oct 17;16(1):162.
62. Yanqin Sun, Bingshuang Hu, Qiongyao Wang, Minting Ye, Qianqian Qiu, Yuanyuan Zhou, Fanrui Zeng, Xiaomin Zhang, Ying Guo, Linlang Guo - Long non-coding RNA HOTTIP promotes BCL-2 expression and induces chemoresistance in small cell lung cancer by sponging miR-216a *Cell Death Dis.* 2018 Jan 24;9(2):85.
63. Heng Ye, Kun Liu, Keqing Qian - Overexpression of long noncoding RNA HOTTIP promotes tumor invasion and predicts poor prognosis in gastric cancer. *Onco Targets Ther.* 2016 Apr 7;9:2081-8.
64. Dan Yu , Yixin Li , Maoye Wang , Jianmei Gu , Wenrong Xu , Hui Cai , Xinjian Fang , Xu Zhang - Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. *Mol Cancer.* 2022 Feb 18;21(1):56.
65. Angeliki Panagiotara , Athina Markou, Evi S Lianidou, George P Patrinos, Theodora Katsila - Exosomes: A Cancer Theranostics Road Map. *Public Health Genomics.* 2017;20(2):116-125.

66. Wen Li, Ji-Bin Liu, Li-Kun Hou, Fei Yu, Jie Zhang , Wei Wu, Xiao-Mei Tang, Feng Sun, Hai-Min Lu, Jing Deng, Jie Bai, Juan Li, Chun-Yan Wu, Qin-Lu Lin, Zhong-Wei Lv, Gao-Ren Wang, Geng-Xi Jiang , Yu-Shui Ma, Da Fu - Liquid biopsy in lung cancer: significance in diagnostics, prediction, and treatment monitoring. *Mol Cancer*. 2022 Jan 20;21(1):25.
67. Evi Lianidou - Detection and relevance of epigenetic markers on ctDNA: recent advances and future outlook. *Mol Oncol*. 2021 Jun;15(6):1683-1700.
68. Lianidou E, Hoon D. Circulating Tumor Cells and circulating Tumor DNA. In: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 7th ed. Elsevier B.V; 2017. p. 1111–44.
69. Christine L Chaffer , Robert A Weinberg – A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1559-64.
70. Isaiah J Fidler , Margaret L Kripke - The challenge of targeting metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2015 Dec;34(4):635-41.
71. Isaiah J Fidler - The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):453-8.
72. Joan Massagué , Anna C Obenauf - Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*. 2016 Jan 21;529(7586):298-306.
73. Rabia Zeeshan , Zeeshan Mutahir - Cancer metastasis - tricks of the trade. *Bosn J Basic Med Sci*. 2017 Aug 20;17(3):172-182.
74. Kay T Yeung , Jing Yang - Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. *Mol Oncol*. 2017 Jan;11(1):28-39.
75. Karuna Ganesh , Joan Massagué – Targeting metastatic cancer. *Nat Med*. 2021 Jan;27(1):34-44.
76. Anne C Chiang , Joan Massagué - Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med*. 2008 Dec 25;359(26):2814-23.
77. Yasir Suhail, Margo P Cain, Kiran Vanaja , Paul A Kurywchak , Andre Levchenko, Raghu Kalluri, Kshitiz - Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst*. 2019 Aug 28;9(2):109-127.
78. Danfeng Lin, Lesang Shen, Meng Luo, Kun Zhang, Jinfan Li, Qi Yang, Fangfang Zhu, Dan Zhou, Shu Zheng, Yiding Chen, Jiaojiao Zhou - Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Nov 22;6(1):404.

79. Catherine Alix-Panabières, Klaus Pantel - Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*. 2013 Jan;59(1):110-8.
80. Chang Yang, Bai-Rong Xia, Wei-Lin Jin, Ge Lou - Circulating tumor cells in precision oncology: clinical applications in liquid biopsy and 3D organoid model. *Cancer Cell Int* 2019 Dec 18;19:341.
81. Catherine Alix-Panabières, Sonja Mader, Klaus Pantel - Epithelial-mesenchymal plasticity in circulating tumor cells. *J Mol Med (Berl)*. 2017 Feb;95(2):133-142.
82. Evi S Lianidou, Areti Strati, Athina Markou - Circulating tumor cells as promising novel biomarkers in solid cancers. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2014 Jun;51(3):160-71.
83. Francesc Castro-Giner, Nicola Aceto - Tracking cancer progression: from circulating tumor cells to metastasis. *Genome Med*. 2020 Mar 19;12(1):31.
84. Ajay Balakrishnan, Irene A George, Prashant Kumar - Circulating tumor cells as an emerging tool in cancer therapy. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2020 Jan 1;25(4):606-631.
85. Michail Ignatiadis, Mark Lee, Stefanie S Jeffrey - Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility. *Clin Cancer Res*. 2015 Nov 1;21(21):4786-800.
86. Evi Lianidou , Klaus Pantel - Liquid biopsies. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019 Apr;58(4):219-232.
87. Amelia J Rushton, Georgios Nteliopoulos, Jacqueline A Shaw, R Charles Coombes - A Review of Circulating Tumour Cell Enrichment Technologies. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 26;13(5):970.
88. Sandhya Sharma, Rachel Zhuang , Marisa Long , Mirjana Pavlovic, Yunqing Kang, Azhar Ilyas, Waseem Asghar - Circulating tumor cell isolation, culture, and downstream molecular analysis. *Biotechnol Adv*. 2018 Jul-Aug;36(4):1063-1078.
89. Bin Hong, Youli Zu - Detecting circulating tumor cells: current challenges and new trends. *Theranostics*. 2013 Apr 23;3(6):377-94.
90. Xinchun Li, You Li, Wenqi Shao, Zhong Li , Ren Zhao, Zhenlong Ye - Strategies for enrichment of circulating tumor cells. *Transl Cancer Res*. 2020 Mar;9(3):2012-2025.

91. Evi S Lianidou, Athina Markou - Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clin Chem*. 2011 Sep;57(9):1242-55.
92. Irbaz Bin Riaz, Liang Wang, Manish Kohli - Liquid biopsy approach in the management of prostate cancer. *Transl Res*. 2018 Nov;201:60-70.
93. Luis A Diaz Jr, Alberto Bardelli - Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014 Feb 20;32(6):579-86.
94. Andrea Campos-Carrillo, Jeffrey N Weitzel, Prativa Sahoo, Russell Rockne, Janet V Mokhnatkin, Muhammed Murtaza, Stacy W Gray, Laura Goetz, Ajay Goel, Nicholas Schork, Thomas P Slavin - Circulating tumor DNA as an early cancer detection tool. *Pharmacol Ther*. 2020 Mar; 207:107458.
95. Yingkuan Shao, Yanwei Shen, Ting Chen, Fei Xu, Xuwen Chen, Shu Zheng - The functions and clinical applications of tumor-derived exosomes. *Oncotarget*. 2016 Sep 13;7(37):60736-60751.
96. Zhen Zhao , Jia Fan, Yen-Michael S Hsu, Christopher J Lyon, Bo Ning, Tony Y Hu - Extracellular vesicles as cancer liquid biopsies: from discovery, validation, to clinical application. *Lab Chip*. 2019 Mar 27;19(7):1114-1140.
97. Ladan Mashouri, Hassan Yousefi , Amir Reza Aref , Ali Mohammad Ahadi, Fatemeh Molaei , Suresh K Alahari - Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol Cancer*. 2019 Apr 2;18(1):75.
98. Lin Zhang , Dihua Yu - Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*.
99. Zhen Sun, Li Wang , Lihua Dong , Xiujie Wang - Emerging role of exosome signalling in maintaining cancer stem cell dynamic equilibrium. *J Cell Mol Med* 2018 Aug;22(8):3719-3728.
100. Mohammed H Rashed, Emine Bayraktar , Gouda K Helal, Mohamed F Abd-Ellah, Paola Amero, Arturo Chavez-Reyes, Cristian Rodriguez-Aguayo - Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 2;18(3):538.
101. Athina N Markou, Stavroula Smilkou, Emilia Tsaroucha, Evi Lianidou - The Effect of Genomic DNA Contamination on the Detection of Circulating Long Non-Coding RNAs: The Paradigm of MALAT1. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Jun 25;11(7):1160.

