



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**Μελέτη της έκφρασης του κυκλικού RNA circCCT3
σε μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος
ασθενών με χρόνια Β-λεμφοκυτταρική λευχαιμία**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΛΕΝΗ ΜΗΝΑ
Α.Μ.: 1113201800110

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΟΝΤΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2023

Η έγκριση της παρούσας διπλωματικής εργασίας από τον Επιβλέποντα Καθηγητή δεν υποδηλώνει απαραίτητως την αποδοχή των απόψεων της συγγραφέως.

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά ακαδημαϊκό έτος 2022-2023 στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.), με επιβλέποντα τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χρήστο Κοντό.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής αυτής εργασίας, κ. Χρήστο Κοντό για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου με την ανάθεση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, το ενδιαφέρον που επέδειξε στην καθοδήγηση μου και για την στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της φετινής χρονιάς.

Επιπλέον οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Χριστίνα Σωτηροπούλου για τις συμβουλές και την υποστήριξη που μου πρόσφερε μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα. Ευχαριστώ οφείλω επίσης και στις υπόλοιπες υποψήφιες διδάκτορες Παρασκευή Καρούση, Μαρία Παπασίρου, και Κατερίνα Κατσαράκη για την βοήθεια τους.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Ασπασία Δημητριάδου, Ιωάννα Ζούπα, Δέσποινα Χατζηχαμπή, Αθανασία Ζώη, Βαγγέλη Στάβαρη, Ευαγγελία Σκλαβενίτη και Μαρίνα Αγαπίου για το ευχάριστο κλίμα και το πνεύμα συνεργασίας. Η καθημερινή παρουσία, συζήτηση και ανταλλαγή απόψεων για διάφορα ζητήματα υπήρξε αξιοσημείωτη κατά την διάρκεια της χρονιάς.

Τέλος, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και στους φίλους μου για την πολύτιμη στήριξη και την συνεχή αγάπη.

Πίνακας Περιεχομένων

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1. Αιμοποίηση.....	1
2. Β-λεμφοκύτταρα	3
3. Ωρίμανση Β-λεμφοκυττάρων	4
4. Αιματολογικές κακοήθειες	5
5. Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	7
5.1. Επιδημιολογία της νόσου	8
5.2. Μορφολογία των κυττάρων	8
5.3. Ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των κυττάρων.....	9
5.4. Διάγνωση της νόσου	10
5.5. Κλινικά συστήματα σταδιοποίησης	11
5.6. Προγνωστικοί δείκτες	13
5.7. Θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου.....	21
6. Βασικά στοιχεία της συρραφής του RNA	25
6.1. Γενικός μηχανισμός συρραφής (cis-συρραφή).....	26
6.2. Παραλλαγές της συρραφής	26
6.3. Εναλλακτική συρραφή.....	27
7. Κυκλικά μόρια RNA (Circular RNAs)	28
7.1. Κατηγοριοποίηση των κυκλικών μορίων RNA.....	29
7.2. Μηχανισμοί βιογένεσης των κυκλικών μορίων RNA	30
7.3. Λειτουργίες των κυκλικών μορίων RNA	34
7.4. Μη κωδικά μόρια RNA και λευχαιμία	39
8. Πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί	44
8.1. Το σύμπλεγμα - μοριακή συνοδός CCT	47

8.2.	Το σύμπλεγμα CCT και καρκίνος	48
8.3.	Η υπομονάδα CCT3 του συμπλέγματος CCT	51
8.4.	Το κυκλικό μόριο CCT3	53
	ΣΚΟΠΟΣ.....	54
	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	55
1.	<i>Βιολογικό υλικό- Δείγματα ασθενών</i>	55
2.	<i>Απομόνωση ολικού RNA (RNA extraction)</i>	55
2.1.	Αρχή της μεθόδου.....	55
2.2.	Συνθήκες πραγματοποίησης απομόνωσης ολικού RNA.....	56
3.	<i>Φασματομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητας του ολικού RNA που έχει απομονωθεί</i>	56
4.	<i>Έλεγχος της ακεραιότητας (integrity) του απομονωθέντος ολικού RNA με ηλεκτροφόρηση</i>	58
5.	<i>Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription-RT)</i>	59
5.1.	Αρχή της μεθόδου	59
5.2.	Συνθήκες πραγματοποίησης τεχνικής αντίστροφης μεταγραφής	61
6.	<i>Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)</i>	62
6.1.	Αρχή της μεθόδου	62
6.2.	Ο ρόλος των συστατικών μιας αντίδρασης PCR	64
6.3.	Συνθήκες πραγματοποίησης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....	65
6.4.	Απόδοση και ειδικότητα μιας αντίδρασης PCR και οι παράγοντες καθορισμού τους.....	66
7.	<i>Επάλλληλη Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Nested PCR)</i>	67
7.1.	Αρχή της μεθόδου	67
7.2.	Συνθήκες πραγματοποίησης επάλληλης Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης	68
8.	<i>Εκκινητές στις αντιδράσεις συμβατικής PCR, και επάλληλης PCR (Nested PCR)</i>	69
8.1.	Κανόνες σχεδιασμού εκκινητών	69
8.2.	Αποκλίνοντες εκκινητές (divergent primers) για επιλεκτική ενίσχυση των circRNA	71

8.3.	Αποκλίνοντες εκκινητές για συμβατική και επάλληλη PCR (Nested PCR) για την εύρεση του circCCT3	72
8.4.	Αντιδράσεις και συνθήκες πραγματοποίησης συμβατικής και επάλληλης PCR (Nested PCR) για την εύρεση του circCCT3	72
9.	Γονίδια αναφοράς – σταθερής έκφρασης (<i>housekeeping genes</i>)	73
10.	Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (<i>quantitative real time polymerase chain reaction, real-time qPCR</i>).....	74
10.1.	Αρχή της μεθόδου	74
10.2.	Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του κυκλικού μορίου RNA circCCT3.....	77
10.3.	Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης real-time PCR	78
11.	Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης	79
11.1.	Αρχή της μεθόδου	79
11.2.	Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων του γονιδίου CCT3	81
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		83
1.	Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	83
2.	Ηλεκτροφορητικά αποτελέσματα από την Nested PCR αντίδραση.....	84
3.	Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης του circCCT3	85
ΣΥΖΗΤΗΣΗ		87
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		92

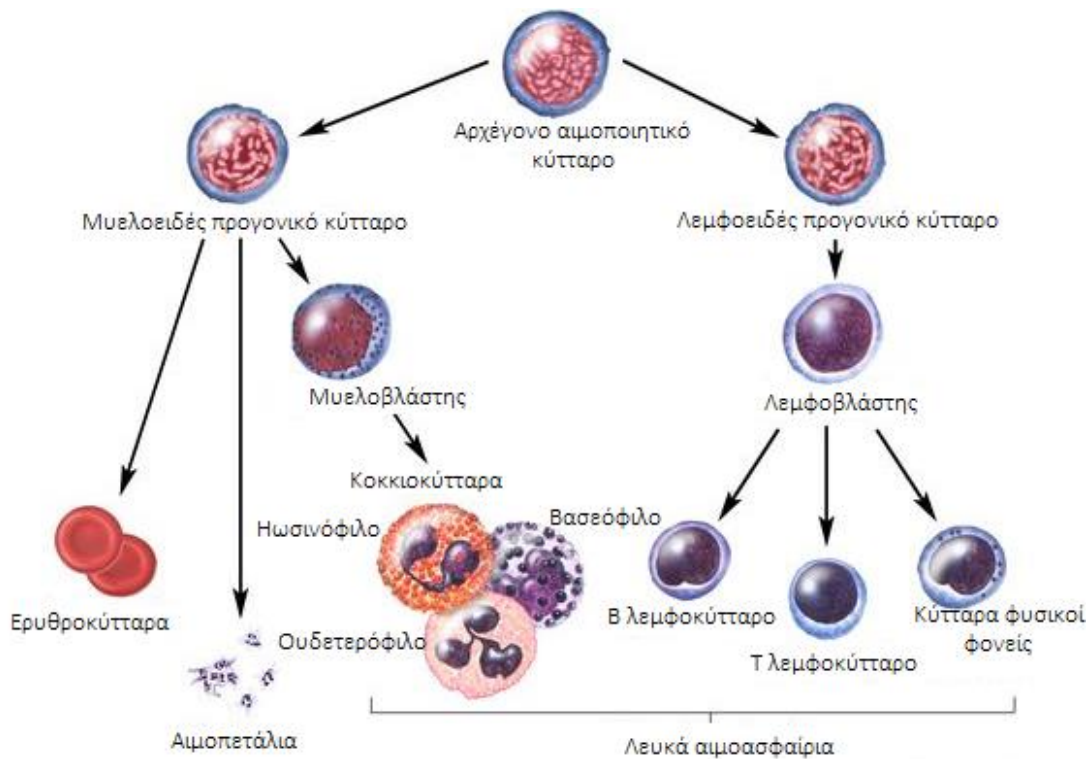
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Αιμοποίηση

Το αιμοποιητικό σύστημα αποτελείται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων, τα οποία είναι εξειδικευμένα για συγκεκριμένες λειτουργίες, όπως για παράδειγμα η μεταφορά οξυγόνου και η άμυνα. Το σύνολο των κυττάρων που συνιστούν το αιμοποιητικό σύστημα προέρχονται από ένα κοινό βλαστικό κύτταρο, το ονομαζόμενο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (hematopoietic stem cell, HSC) μέσω μιας, ιεραρχικής διαδικασίας αυστηρά ρυθμιζόμενης [1]. Πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα εμφανίζονται νωρίς κατά την εμβρυική ζωή στο λεκιθικό σάκο ενώ κατά την 6^η εβδομάδα το ήπαρ καθίσταται το κύριο αιμοποιητικό όργανο καθ' όλη την εμβρυική ζωή. Κατά την πορεία αυτής, προγονικά κύτταρα του ήπατος εγκαθίστανται στο θύμο αδένα, και σε μετέπειτα στάδιο, τα αρχέγονα κύτταρα μεταναστεύουν από το ήπαρ στον μυελό των οστών. Από εδώ και στο εξής ο μυελός αναλαμβάνει την παραγωγή των κυττάρων του αίματος, με αποτέλεσμα μετά την γέννηση να καθίσταται υπό φυσιολογικές συνθήκες το μόνο αιμοποιητικό όργανο [2].

Ο μυελός των οστών είναι ένας σπογγώδης ιστός που εδράζεται μέσα στις κοιλότητες ορισμένων μακρών οστών και αποτελείται από ένα τρισδιάστατο πλέγμα από ινίδια, αγγεία, στρωματικά κύτταρα και μια άμορφη πρωτεϊνούχο εξωκυττάρια ουσία παρέχοντας το κατάλληλο μικροπεριβάλλον για την διατήρηση και τον έλεγχο της διαφοροποίησης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Ειδικότερα, τα βλαστικά κύτταρα εξαρτώνται από τις φυσικές αλληλεπιδράσεις και τους παράγοντες που εκκρίνονται από το πολυκύτταρο αυτό δίκτυο, χωρίς αυτή η επαφή να είναι απόλυτη, δεδομένου ότι τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να επιβιώσουν και να μεταναστεύσουν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος για να αποικίσουν άλλες περιοχές στον οργανισμό. Αν και τα κύτταρα αυτά αποτελούν ένα μικρό ποσοστό του μυελού των οστών, είναι ικανά να παράγουν ένα πλήρες σύνολο κυτταρικών τύπων του αίματος, καθώς επίσης και νέων βλαστικών κυττάρων ώστε να διατηρείται σταθερός ο αριθμός τους. Η ιδιαιτερότητα αυτή οφείλεται στον πολυδύναμο χαρακτήρα τους, καθώς και στην ικανότητα τους για αυτοανανέωση [1].

Κατά τα πρώτα στάδια της αιμοποίησης, ένα αιμοποιητικό βλαστικό κύτταρο μπορεί να δεσμευτεί για εξέλιξη είτε σε μια μυελοειδή είτε σε μια λεμφοειδή σειρά. Έτσι, προκύπτουν τα λεμφοειδή προγονικά κύτταρα (lymphoid progenitor cell) και τα μυελώδη προγονικά κύτταρα (myeloid progenitor cell) τα οποία, σε αντίθεση με τα αρχέγονα, χάνουν την ικανότητα αυτοανανέωσης, και πλέον θεωρούνται ότι ανήκουν σε μια συγκεκριμένη σειρά κυττάρων (Εικόνα 1). Τα προγονικά αυτά κύτταρα είναι ικανά να δημιουργήσουν ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών τύπων λεμφοειδών και μυελοειδών κυττάρων αντίστοιχα. Καθώς διαιρούνται, οι απόγονοι εξειδικεύονται όσον αφορά τον τύπο των κυττάρων που μπορούν να δημιουργήσουν. Έτσι, τα λεμφοειδή προγονικά κύτταρα θα δημιουργήσουν τα Β και Τ-λεμφοκύτταρα που εμπλέκονται στην ανοσοαπόκριση καθώς και τα φυσικά φονικά κύτταρα NK (natural killer cells). Τα μυελοειδή προγονικά κύτταρα με την σειρά τους θα δημιουργήσουν τα ερυθροειδή προγονικά κύτταρα (ερυθροβλάστες) από όπου θα προκύψουν τα ερυθροκύτταρα, τα μεγακαρυοκύτταρα που αποτελούν τους πρόδρομους των αιματοπεταλίων και τέλος τα προγονικά κύτταρα των κοκκιοκυττάρων. Τα τελευταία θα δώσουν γένεση στα ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, μονοκύτταρα, μαστοκύτταρα και δενδριτικά. Ο σχηματισμός κάθε κυτταρικού τύπου αίματος στον μυελό των οστών ελέγχεται ξεχωριστά και σχετίζεται με τις μεταβολές στην έκφραση συγκεκριμένων ρυθμιστών της μεταγραφής με σκοπό να ικανοποιούνται οι μεταβαλλόμενες ανάγκες του οργανισμού [3].



Εικόνα 1: Διαφοροποίηση των κυττάρων του αίματος. (Τροποποιημένη εικόνα από: Blood Cells Differentiation from iPSC - Creative Biolabs).

2. Β-λεμφοκύτταρα

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία η οποία οφείλεται στην συσσώρευση ώριμων Β-λεμφοκυττάρων στο αίμα, στον μυελό των οστών, στους λεμφαδένες και στον σπλήνα. Συνεπώς, στην συγκεκριμένη ενότητα θα δοθεί έμφαση στα κύτταρα αυτά, στα χαρακτηριστικά τους και στην διαδικασία ωρίμανσης τους.

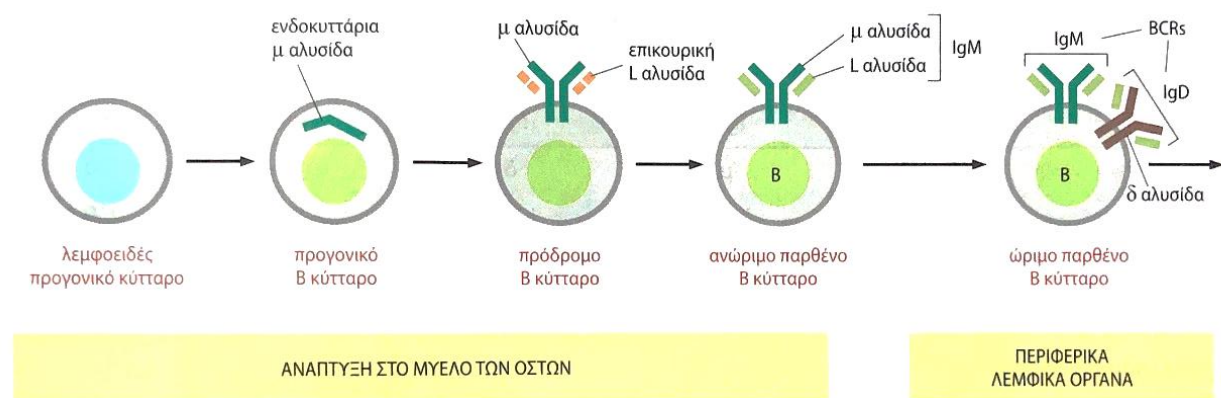
Τα Β-λεμφοκύτταρα όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, ανήκουν στην λεμφοειδή σειρά μαζί με τα Τ και τα φυσικά φονικά κύτταρα αποτελώντας το 20% των κυττάρων της λεμφικής σειράς. Πρόκειται για μικρά κύτταρα μεγέθους 6-8nm, φέρουν μεγάλο στρογγυλό πυρήνα και ελάχιστο κυτταρόπλασμα [2]. Διακρίνονται από τα υπόλοιπα λεμφοκύτταρα καθώς και μεταξύ τους, εξαιτίας της ικανότητάς τους να συνθέτουν και να εκκρίνουν εκατομμύρια αντισώματα, ιδιότητα που τα καθιστά τα κύρια κύτταρα της προσαρμοστικής ανοσίας. Αρχικά, οι πρώτες

ανοσοσφαιρίνες που συνθέτει ένα ανώριμο B-λεμφοκύτταρο εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια του όπου λειτουργούν σαν υποδοχείς για το αντιγόνο. Οι υποδοχείς αυτοί ονομάζονται υποδοχείς των B-κυττάρων (B cell receptors, BCRs) και κάθε B-κύτταρο εκφράζει περίπου 10^5 BCRs στην κυτταρική του μεμβράνη. Επιπλέον, κάθε B είναι γενετικά προγραμματισμένο ώστε να κωδικοποιεί ένα μόνο είδος BCR, με μια μοναδική θέση δέσμευσης του αντιγόνου. Κάθε BCR είναι συνδεδεμένος με διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες όταν το αντιγόνο προσδεθεί στον υποδοχέα ενεργοποιούν ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης με αποτέλεσμα τα ανώριμα ή αλλιώς παρθένα B να πολλαπλασιάζονται και τέλος να διαφοροποιούνται σε κύτταρα μνήμης και δραστικά κύτταρα, τα οποία έπειτα παράγουν και εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες διαλυτών, και όχι πλέον δεσμευμένων στην μεμβράνη αντισωμάτων. Η κυτταρική διαίρεση που επέρχεται μετά την επαφή με το ειδικό αντιγόνο, οδηγεί στον σχηματισμό 2 θυγατρικών κυττάρων με ταυτόσημους BCRs και άρα ταυτόσημη αντιγονική ειδικότητα. Συνεπώς, κάθε κλώνος B-κυττάρων παράγει ένα μόνο είδος BCR [4], [5].

3. Ωρίμανση B-λεμφοκυττάρων

Τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των B-λεμφοκυττάρων χαρακτηρίζονται από τις επιτυχημένες αναδιατάξεις των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών και στην συνέχεια, των γονιδίων της κ ή λ ελαφριάς αλυσίδας, επιτρέποντας στα πρωταρχικά B να εκφράσουν στην επιφάνεια τους IgM και IgD ανοσοσφαιρίνες [6]. Η διαφοροποίηση των B-κυττάρων ουσιαστικά αρχίζει με την έκφραση της ρεκομπινάσης V(D)J της οποίας η δράση είναι απαραίτητη για τον τοπο-ειδικό ανασυνδιασμό ανάμεσα στα ξεχωριστά γονιδιακά τμήματα των βαριών και ελαφριών αλυσίδων. Αρχίζοντας από το λεμφοειδές προγονικό κύτταρο, το οποίο όπως προαναφέρθηκε προέρχεται από ένα αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο, τα πρώτα κύτταρα στην γενεαλογία των B-λεμφοκυττάρων ονομάζονται προγονικά (pro) – B-κύτταρα (Εικόνα 2). Περαιτέρω διαφοροποίηση οδηγεί στην εμφάνιση των πρόδρομων (pre) – B-κυττάρων, τα οποία εκφράζουν στην επιφάνεια τους μ βαριές αλυσίδες που συντέθηκαν στο προηγούμενο στάδιο, όπου σε συνδυασμό με τις επικουρικές ελαφριές που παράγονται στο στάδιο αυτό σχηματίζεται ο υποδοχέας πρόδρομων κυττάρων, Pre-B Receptor. Η σηματοδότηση του υποδοχέα αυτού έχει σαν

αποτέλεσμα τα κύτταρα να συνθέτουν πραγματικές ελαφριές αλυσίδες όπου μαζί με τις μ βαριές σχηματίζουν την ανοσοσφαιρίνη IgM. Πλέον τα κύτταρα ονομάζονται ανώριμα παρθένα B και αφού εκφράσουν στην επιφάνεια τους και την ανοσοσφαιρίνη IgD, μεταβαίνουν στο στάδιο του ώριμου παρθένου B και εγκαταλείπουν τον μυελό των οστών. Έτσι, εξέρχονται στην περιφέρεια και μεταναστεύουν στα περιφερικά (δευτερογενή) λεμφικά όργανα, κυρίως στους λεμφαδένες και στον σπλήνα. Στις θέσεις αυτές, όταν τα ώριμα B συναντήσουν για πρώτη φορά το ειδικό για αυτά αντιγόνο, διεγείρονται με αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται σε κύτταρα μνήμης και δραστικά κύτταρα [4].



Εικόνα 2: Στάδια ανάπτυξης ενός B-κυττάρου. (Πηγή: Alberts, B., Molecular biology of the cell [4]).

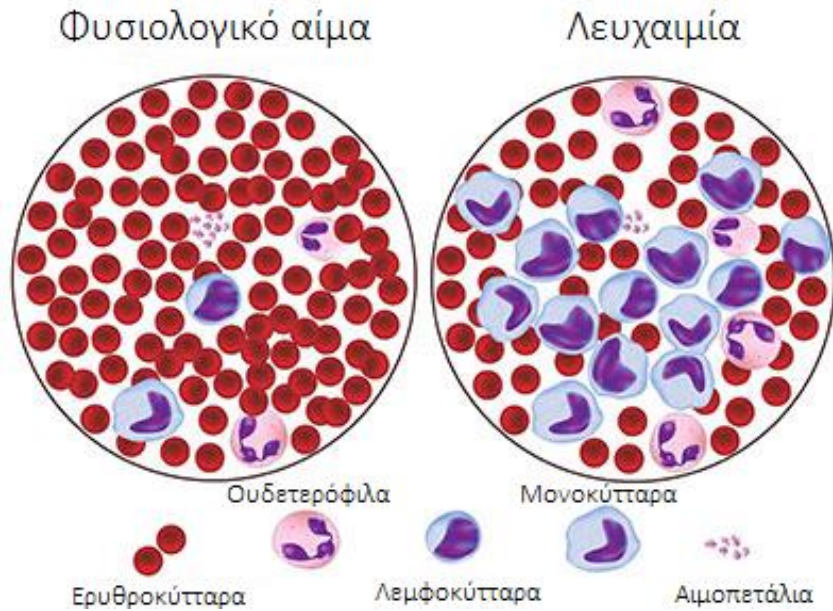
4. Αιματολογικές κακοήθειες

Οι αιματολογικές κακοήθειες, γνωστές και ως αιματολογικοί καρκίνοι ή καρκίνοι του αίματος, είναι μια ομάδα καρκίνων που επηρεάζουν το αίμα, τον μυελό των οστών και το λεμφικό σύστημα. Εμφανίζονται όταν μια ανεξέλεγκτη ανάπτυξη μη φυσιολογικών κυττάρων ξεπερνά την ανάπτυξη των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος, παρεμβαίνοντας στις κανονικές λειτουργίες των κυττάρων αυτών (Εικόνα 3). Έτσι, στις περισσότερες περιπτώσεις, παρατηρείται αναιμία, ανοσοκαταστολή κ.α. Οι αιματολογικές κακοήθειες ταξινομούνται σε λεμφώματα, μυελώματα και λευχαιμίες. Το λέμφωμα είναι ένας καρκίνος που ξεκινά από το λεμφικό σύστημα, το οποίο είναι

υπεύθυνο για την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού, και περιλαμβάνει την ανώμαλη ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι λεμφώματος: το λέμφωμα Hodgkin (HL) και το λέμφωμα μη Hodgkin (NHL). Το μυέλωμα, επίσης γνωστό ως πολλαπλό μυέλωμα, είναι ένας καρκίνος που προσβάλλει τα πλασματοκύτταρα. Ειδικότερα τα μη φυσιολογικά πλασματοκύτταρα συσσωρεύονται στο μυελό των οστών και παρεμβαίνουν στην παραγωγή υγιών κυττάρων του αίματος. Τέλος, η λευχαιμία είναι ένας καρκίνος όπου εμφανίζεται αυξημένος αριθμός λευκοκυττάρων στο αίμα ή/και στον μυελό των οστών.

Οι λευχαιμίες μπορούν να ταξινομηθούν ως οξείες ή χρόνιες με βάση την ταχύτητα του πολλαπλασιασμού των λευκών αιμοσφαιρίων, και σε μυελοειδής ή λεμφοειδής με βάση τα κύτταρα προέλευσης. Διακρίνονται οι εξής κυρίαρχοι υπότυποι: η οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ) και η χρόνια μυελογενής λευχαιμία (ΧΜΛ), που σχετίζονται με τη μυελοειδή γενεαλογία καθώς και η οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΟΛΛ) και η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) οι οποίες σχετίζονται με την λεμφοειδή γενεαλογία. Οι οξείες λευχαιμίες χαρακτηρίζονται από την ξαφνική εκδήλωση και ταχεία εξέλιξη της νόσου ενώ οι χρόνιες λευχαιμίες εμφανίζουν αργή αλλά και λιγότερο επιθετική εξέλιξη. Τα παθολογικά λευκοκύτταρα μπορεί να είναι ώριμα, όπως συμβαίνει στην ΧΛΛ, πρόδρομα ανώριμα κύτταρα όπως στις οξείες λευχαιμίες, ή ακόμη και συνδυασμός των δύο όπως συναντάται στην ΧΜΛ.

Μπορεί να εμφανιστούν σε όλες τις ηλικίες, από την βρεφική μέχρι πολύ μεγάλες ηλικίες, αλλά η κάθε μορφή λευχαιμίας εμφανίζει διαφορετική ηλικιακή κατανομή. Για παράδειγμα, η ΟΛΛ εμφανίζεται κυρίως σε πολύ νεαρές ηλικίες και σπάνια σε ενήλικες, ενώ η ΧΛΛ, η πιο κοινή μορφή λευχαιμίας στο Δυτικό κόσμο, εμφανίζεται σχεδόν αποκλειστικά σε ενήλικες άνω των 40 ετών, με μέση ηλικία διάγνωσης μεγαλύτερη των 70 ετών [7].



Εικόνα 3: Στη λευχαιμία, τα μη φυσιολογικά λευκά αιμοσφαίρια αναπτύσσονται πιο γρήγορα από τα φυσιολογικά κύτταρα, υπερπληθωρίζοντας τον μυελό των οστών και εμποδίζοντας τα φυσιολογικά κύτταρα να λειτουργήσουν σωστά. (Τροποποιημένη εικόνα από: Juliusson, G. and R. Hough, Leukemia [7]).

5. Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (Chronic lymphocytic leukemia, CLL) αποτελεί μια από τις πιο συχνές μορφές λευχαιμίας στους ενήλικες του δυτικού κόσμου. Χαρακτηρίζεται από τον κλωνικό πολλαπλασιασμό και την συνεχή συσσώρευση ώριμων Β-λεμφοκυττάρων στο αίμα, στον μυελό των οστών, στους λεμφαδένες και στον σπλήνα. Για την διάγνωση της νόσου απαιτούνται περισσότερα από $5 \times 10^9/L$ μονοκλωνικά Β-λεμφοκύτταρα, με χαρακτηριστική μορφολογία και ανοσοφαινότυπο της ΧΛΛ στο περιφερικό αίμα, όπως περιγράφεται στις επόμενες ενότητες. Η πλειοψηφία των ασθενών που παρουσιάζουν ΧΛΛ είναι άντρες με μια μέση ηλικία διάγνωσης τα 72 έτη, ενώ μπορεί να εμφανίζεται και σε ασθενείς κάτω των 50 χρόνων σε ποσοστό 10-15% [8]. Η κλινική πορεία των ασθενών με ΧΛΛ είναι ιδιαίτερα ετερογενής, ενώ η καλύτερη κατανόηση των βιολογικών, γενετικών και μοριακών χαρακτηριστικών της νόσου

συνέβαλαν στην καλύτερη εκτίμηση της ετερογένειας αυτής. Ταυτόχρονα, έχει συμβάλει καθοριστικά στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών για καλύτερη αντιμετώπιση της.

5.1. Επιδημιολογία της νόσου

Το ποσοστό εμφάνισης ΧΛΛ ποικίλει μεταξύ των ατόμων σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, με την Ευρώπη και την Αμερική να εμφανίζουν ένα παρόμοιο ποσοστό το οποίο κυμαίνεται μεταξύ 4 με 6 περιπτώσεων ανά 100 000 άτομα ετησίως. Το ποσοστό εμφάνισης της νόσου αυξάνεται δραματικά με την ηλικία, με μια μέση ηλικία διάγνωσης τα 72 έτη, ενώ τις τελευταίες δεκαετίες διαγιγνώσκεται και σε άτομα νεότερης ηλικίας, όπου το 15% των ασθενών είναι 55 χρόνων ή και νεότεροι. Επιπλέον, ο κίνδυνος ανάπτυξης ΧΛΛ είναι περίπου 2 φορές μεγαλύτερος στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες. Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε μια προσπάθεια εντοπισμού των παραγόντων κινδύνου για την εμφάνιση ΧΛΛ χωρίς ωστόσο να έχουν αποκτηθεί ακριβείς αιτιολογικοί παράγοντες. Έχει εξακριβωθεί ότι υπάρχει γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση ΧΛΛ με τον ισχυρότερο παράγοντα κινδύνου να αντιπροσωπεύεται από το οικογενειακό ιστορικό αιματολογικών κακοηθειών. Συγγενής ασθενών που νοσούν με ΧΛΛ εμφανίζουν 2 με 8 φορές αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη της νόσου σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό, ενώ η συμφωνία της νόσου είναι υψηλότερη μεταξύ των μονοζυγωτικών διδύμων παρά μεταξύ των διζυγωτικών. Η ασθένεια είναι πιο σπάνια στον ανατολικό κόσμο (Κίνα, Κορέα και Ιαπωνία) και αυτή η χαμηλότερη επίπτωση διατηρείται στους μετανάστες και τους απογόνους τους. Επιπλέον, μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος έχουν εντοπίσει απλούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (Single-Nucleotide Polymorphisms, SNPs) σε περίπου 30 γενετικούς τόπους αποδεικνύοντας ότι κοινές γενετικές παραλλαγές συμβάλουν στον κληρονομήσιμο χαρακτήρα της νόσου [9],[10].

5.2. Μορφολογία των κυττάρων

Επίχρισμα περιφερικού αίματος δείχνει την παρουσία μεγάλου αριθμού μικρών λεμφοκυττάρων με λιγυστό κυτταρόπλασμα και μεγάλο στρογγυλό πυρήνα. Ειδικότερα, το

κυτταρόπλασμα είναι ομοιογενές και ασθενώς βασεόφιλο, χωρίς κοκκία και η χρωματίνη παρουσιάζεται ιδιαίτερα συσσωρευμένη. Ένα αναγνωρισμένο και τυπικό χαρακτηριστικό της νόσου αποτελεί η παρουσία πυρηνικών σκιών κάτι το οποίο οφείλεται στην ευθραυστότητα της κυτταρικής μεμβράνης, και οι οποίες τείνουν να είναι πιο εμφανείς σε υψηλούς αριθμούς λευκών αιμοσφαιρίων, χωρίς όμως να έχουν κάποια διαγνωστική αξία. Η εύρεση των μορφολογικών αυτών χαρακτηριστικών δεν είναι απόλυτη, καθώς από ασθενή σε ασθενή παρατηρείται μια μορφολογική διακύμανση. Συγκεκριμένα, σε μερικούς ασθενείς το κυτταρόπλασμα των κυττάρων τείνει να είναι σε μεγαλύτερη αναλογία [11], [12]. Επιπλέον, ανάμεσα στα κυκλοφορούντα λεμφοκύτταρα με την χαρακτηριστική μορφολογία μπορούν να βρίσκονται αναμιγμένα και προλεμφοκύτταρα (μεγαλύτερα κύτταρα με εμφανή κεντρικό πυρήνα) σε διάφορες αναλογίες, όμως συνήθως αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 55% των κυττάρων [9]. Η εύρεση προλεμφοκυττάρων πάνω από αυτό το ποσοστό θα ευνοούσε τη διάγνωση της B-προλεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (B-ΠΛΛ) [8], [10].

5.3. Ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των κυττάρων

Τα κύτταρα της ΧΛΛ συνεκφράζουν το επιφανειακό αντιγόνο CD5 με τα αντιγόνα B-κυττάρων CD19, CD20 και CD23. Τα επίπεδα της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης CD20 είναι χαρακτηριστικά χαμηλά σε σύγκριση με τα φυσιολογικά B-κύτταρα. Κάθε κλώνος λευχαιμικών κυττάρων περιορίζεται στην έκφραση είτε κ είτε λ ελαφρών αλυσίδων ανοσοσφαιρίνης. Επιπλέον, εκφράζουν χαμηλά επίπεδα επιφανειακών ανοσοσφαιρινών (στις περισσότερες περιπτώσεις IgM και/ή IgD, σπάνια IgG ή IgA). Μια πρόσφατη, μεγάλη προσπάθεια συσσώρευσης των δεικτών αυτών, επιβεβαίωσε ότι η ύπαρξη των CD19, CD5, CD20, CD23, κ και λ είναι συνήθως επαρκής για την διάγνωση. Η χρήση αυτών είναι απαραίτητη για τη διαφορο-διάγνωση με άλλες λεμφοπολλαπλασιαστικές διαταραχές B-κυττάρων. Για παράδειγμα, η έκφραση του CD5 μπορεί επίσης να παρατηρηθεί στο λέμφωμα κυττάρων μανδύα (Mantle Cell Lymphoma, MCL). Εκτός από το CD5, πρόσφατα το CD20 έχει επίσης αποδειχθεί ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στη διαφορο-διάγνωση μεταξύ της ΧΛΛ και άλλων λεμφοπολλαπλασιαστικών διαταραχών (ιδιαίτερα του MCL), καθώς απουσιάζει στο MCL [8], [9]. Ο ακριβής ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός ενός λευχαιμικού κλώνου πέραν του ότι επιτρέπει την διαφορο-διάγνωση ανάμεσα στην ΧΛΛ και σε

άλλες σχετικές καταστάσεις, επιτρέπει την αναγνώριση δεικτών που σχετίζονται με δυσμενή έκβαση [12].

5.4. Διάγνωση της νόσου

Τις περισσότερες φορές οι ασθενείς που πάσχουν από ΧΛΛ είναι ασυμπτωματικοί, και η αντίληψη ύπαρξης της νόσου επέρχεται μετά από μια γενική εξέταση αίματος που γίνεται για άσχετους σκοπούς όπου παρατηρείται αυξημένος αριθμός λεμφοκυττάρων. Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις η κλινική εικόνα των ασθενών χαρακτηρίζεται από ψηλαφητές λεμφαδενοπάθειες, σπληνομεγαλία και ηπατοσπληνομεγαλία οδηγώντας στην διεξαγωγή εξετάσεων για την εύρεση της αιτίας εμφάνισης των συμπτωμάτων αυτών. Επιπλέον συμπτώματα που μπορεί να συνοδεύουν τους ασθενείς περιλαμβάνουν αδυναμία, απώλεια βάρους, υπερβολική νυχτερινή εφίδρωση, αυξημένη συχνότητα λοιμώξεων ενώ ασθενείς προχωρημένων σταδίων εμφανίζουν κόπωση στην σωματική άσκηση εξαιτίας αναιμίας, και συχνά φαινόμενα αιμορραγίας χάρη στον μειωμένο αριθμό αιμοπεταλίων [9], [10].

Η διάγνωση της ΧΛΛ απαιτεί την παρουσία περισσότερων από $5 \times 10^9/L$ Β-λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα για τουλάχιστον 3 μήνες, με την χαρακτηριστική μορφολογία και ανοσοφαινότυπο όπως αναλύθηκε πιο πάνω. Έτσι, μια γενική εξέταση αίματος και κυτταρομετρία ροής είναι τα 2 κύρια εργαλεία που χρησιμοποιούνται. Παρόλο που για την διάγνωση δεν απαιτείται βιοψία του μυελού των οστών ή λεμφαδένων, συνήθως πραγματοποιείται για κλινικούς κυρίως σκοπούς. Βιοψία μυελού των οστών δείχνει υπερ-κυτταρικότητα λόγω αυξημένου ποσοστού ώριμων λεμφοκυττάρων ενώ παράλληλα εμφανίζει μειωμένο αριθμό μυελοειδών και ερυθροειδών κυττάρων, τα οποία ωστόσο έχουν ωριμάσει φυσιολογικά. Αναφορικά με τους λεμφαδένες, μια βιοψία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε περιπτώσεις μεγεθυσμένων λεμφαδένων, ειδικά όταν υπάρχει υποψία για παρουσία λεμφώματος. Αυτό που παρατηρείται είναι η παρουσία διάσπαρτων κέντρων πολλαπλασιασμού, που εμφανίζονται σαν ψευδοθηλάκια. Οι περιοχές αυτές είναι εμπλουτισμένες με προλεμφοκύτταρα και παραανοσοβλάστες και αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα στους λεμφαδένες των ασθενών με ΧΛΛ ή μικρό

λεμφοκυτταρικό λέμφωμα, καθώς δεν παρατηρούνται σε άλλους τύπους λεμφώματα [10]. Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη προτείνει ότι μπορεί να υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα σε εκτεταμένα και πολύ ενεργά κέντρα πολλαπλασιασμού και σε επιθετική μορφή ΧΛΛ [13].

5.5. Κλινικά συστήματα σταδιοποίησης

Υπάρχουν 2 συστήματα κλινικής σταδιοποίησης ασθενών που νοσούν από ΧΛΛ, το σύστημα Rai και συνεργατών (1975) το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως στην Αμερική και το σύστημα Binet και συνεργατών (1981) που είναι ευρέως γνωστό στην Ευρώπη. Τα συστήματα αυτά ορίζουν το βάρος της νόσου και αποτελούν ένδειξη θεραπείας, καθώς εξαρτώνται πλήρως από μη φυσιολογικά ευρήματα κατά την φυσική εξέταση και ενδείξεις αναιμίας και θρομβοπενίας σε πλήρη αιμοληψία [10], [14].

Η αρχική ταξινόμηση που προτάθηκε το 1975 για το σύστημα Rai, διαφοροποιεί 5 ομάδες σύμφωνα με την σταδιακά μικρότερη συνολική επιβίωση. Αργότερα, το σύστημα αναθεωρήθηκε και πλέον περιλαμβάνει 3 κατηγορίες κινδύνου. Στην κατηγορία χαμηλού κινδύνου αντιστοιχούνται οι ασθενείς σταδίου Rai 0, ακολουθεί η κατηγορία μεσαίου κινδύνου όπου ανήκουν οι ασθενείς σταδίου Rai I και II και τέλος η κατηγορία υψηλού κινδύνου με τους ασθενείς σταδίου Rai III και IV [9].

Πίνακας 1: Σταδιοποίηση ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία βάση του συστήματος Rai

Στάδιο	Κλινικά Χαρακτηριστικά	Μέσο προσδόκιμο ζωής
0	Λεμφοκυττάρωση αίματος και μυελού μόνο, χωρίς αναιμία ή θρομβοπενία	> 150 μήνες
I	Λεμφοκυττάρωση και λεμφαδενοπάθεια, χωρίς αναιμία ή θρομβοπενία	101 μήνες
II	Λεμφοκυττάρωση και σπληνομεγαλία ή/και ηπατομεγαλία, με ή χωρίς λεμφαδενοπάθεια, χωρίς αναιμία ή θρομβοπενία	71 μήνες
III	Λεμφοκυττάρωση και αναιμία(Hb<11g/dl) με ή χωρίς οργανομεγαλία	19 μήνες
IV	Λεμφοκυττάρωση και θρομβοπενία (PLTs<100000/μl) με ή χωρίς οργανομεγαλία	19 μήνες

Το σύστημα Binet ορίζει 3 διαφορετικές κατηγορίες κινδύνου με βάση την ύπαρξη αναιμίας ή θρομβοπενίας, όπως ορίζεται από τις τιμές γενικής εξέτασης αίματος καθώς και τον αριθμό των λεμφικών σημείων που έχουν επηρεαστεί. Σε αυτά περιλαμβάνονται οι αδένες του λαιμού, της βουβωνικής χώρας, των μασχαλιαίων περιοχών, του σπλήνα και του συκωτιού.

Πίνακας 2: Σταδιοποίηση ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία βάση του συστήματος Binet

<i>Στάδιο</i>	<i>Κλινικά Χαρακτηριστικά</i>
A	Μέχρι 2 περιοχές λεμφικού ιστού, χωρίς αναιμία ή θρομβοπενία
B	Περισσότερες από 2 περιοχές λεμφικού ιστού, χωρίς αναιμία ή θρομβοπενία
C	Αναιμία (Hb<10g/dl) ή/και θρομβοπενία (PLTs<100000/μl) ασχέτως του αριθμού λεμφικών ιστών

Όπως αναφέρθηκε, τα συστήματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν ένδειξη για παροχή θεραπείας. Έτσι, οι ασθενείς σταδίου 0 κατά Rai και A κατά Binet θεωρούνται χαμηλού κινδύνου και δε χρήζουν άμεσα θεραπεία, αλλά τίθενται συνήθως σε συστηματική παρακολούθηση. Οι ασθενείς σταδίου I και II κατά Rai και B κατά Binet, είναι ενδιάμεσου κινδύνου και εάν δεν έχουν συμπτώματα, συνήθως είναι σε στενή παρακολούθηση μέχρι να υπάρξει πρόοδος νόσου. Αντίθετα, οι ασθενείς σταδίου III και IV κατά Rai και σταδίου C κατά Binet ορίζονται ως υψηλού κινδύνου και επιβάλλεται η έναρξη κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής [9].

Τα συστήματα αυτά είναι εύκολα στην χρήση, στηρίζονται στην φυσική εξέταση και σε τυπικές εργαστηριακές εξετάσεις για την κλινική ταξινόμηση των ασθενών και επιπλέον, αποτελούν την βάση άλλων προγνωστικών μοντέλων. Εντούτοις, αποτυγχάνουν να προβλέψουν την εξέλιξη της νόσου σε μεμονωμένους ασθενείς, για παράδειγμα, αδυνατούν να διακρίνουν τους ασθενείς σε πρώιμο στάδιο που θα βιώσουν μια επιθετική πορεία της νόσου. Επιπρόσθετα, δεν είναι σε θέση να προβλέψουν την μετατροπή της νόσου σε πιο επιθετική μορφή και το σημαντικότερο δεν ενσωματώνουν νέα ευρήματα σχετικά με την νόσο, όπως έχουν προκύψει με τις τεχνολογίες FISH, και αλληλούχηση νέας γενιάς. Έτσι, έχουν περιορισμένη προγνωστική ισχύ ως προς την ανταπόκριση στην θεραπεία [14], [15].

Καθώς οι τελευταίες τρεις δεκαετίες έχουν δημιουργήσει μια πληθώρα πιθανών δεικτών που παρέχουν προγνωστικές πληροφορίες, ανεξάρτητα από το κλινικό στάδιο του ασθενή, έχει προκύψει η ανάγκη να δημιουργηθεί ένα σύστημα για την μείωση των συντριπτικών και περιττών προγνωστικών πληροφοριών σε μερικές κλινικά σχετικές, βασικές προγνωστικές παραμέτρους. Για τον σκοπό αυτό, σχεδιάστηκε ένας διεθνής προγνωστικός δείκτης, ο CLL-international prognostic index (CLL-IPI) που συνδυάζει κλινικές, ανοσολογικές, ορολογικές, μοριακές και γενετικές πληροφορίες, ώστε να προσφέρει καλύτερη πρόβλεψη σε ασθενείς με ΧΛΛ. Περιλαμβάνει πέντε ευρέως χρησιμοποιούμενες παραμέτρους: την κατάσταση του γονιδίου *TP53* [φυσιολογική/μεταλλαγμένη ή/και *del(17p)*], την κατάσταση μετάλλαξης γονιδίων *IGHV*, την συγκέντρωση β2- μικροσφαιρίνης, το κλινικό στάδιο και τέλος την ηλικία. Ο δείκτης CLL-IPI διαχωρίζει τέσσερις ομάδες κινδύνου με προβλεπόμενη ολική επιβίωση 5 χρόνων: χαμηλού, ενδιάμεσου, υψηλού και πολύ υψηλού κινδύνου όπως φαίνεται στον πιο κάτω πίνακα [8].

Πίνακας 3: Σταδιοποίηση ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία βάση του δείκτη CLL-IPI

<i>Κατηγορία</i>	<i>Συνολική επιβίωση στα 5 χρόνια</i>	<i>Πιθανή κλινική συνέπεια</i>
Χαμηλού κινδύνου	93,2 %	Δεν ενδείκνυται θεραπεία
Μέτριου κινδύνου	79,3 %	Δεν ενδείκνυται θεραπεία, εκτός αν τα συμπτώματα είναι έντονα
Υψηλού κινδύνου	63,3 %	Ενδείκνυται θεραπεία εκτός αν η νόσος είναι ασυμπτωματική
Πολύ υψηλού κινδύνου	23,3 %	Αν χρειάζεται θεραπεία προτιμώνται νέοι παράγοντες ή θεραπεία σε κλινικές δοκιμές αντί χημειοθεραπείας

5.6. Προγνωστικοί δείκτες

Η κλινική πορεία των ασθενών με ΧΛΛ είναι ιδιαίτερα ετερογενής με ορισμένους να παραμένουν χωρίς συμπτώματα και να εμφανίζουν παρατεταμένη επιβίωση, ενώ άλλοι ασθενείς γίνονται γρήγορα συμπτωματικοί και χρήζουν άμεσης θεραπείας μετά την διάγνωση. Η κλινική ετερογένεια της ΧΛΛ αντικατοπτρίζει τις διαφορές στη βιολογία της νόσου. Έτσι, καθίσταται αναγκαία η χρήση προγνωστικών παραγόντων με σκοπό την πρόβλεψη των ασθενών που ανήκουν

στην ομάδα υψηλού κινδύνου και χρειάζονται άμεσα θεραπεία. Οι προγνωστικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό, περιλαμβάνουν ορισμένα κλινικά, γενετικά, μοριακά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κυττάρων της ΧΛΛ και αποτελούν ένα συνδυασμό εύκολα αποκτήσιμων παραδοσιακών παραμέτρων και νέων παραμέτρων που ανιχνεύονται χάρη στην ανάπτυξη τεχνικών μαζικής αλληλούχισης και στην μέθοδο φθορίζων in situ υβριδισμός (FISH) [10], [16].

5.6.1. Προγνωστικοί δείκτες ορού

Ο ορολογικός έλεγχος διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο τόσο στην διάγνωση όσο και στην αξιολόγηση της πρόγνωσης στην ΧΛΛ, αποτελεί μια τυπική μέθοδο ενώ παράλληλα είναι φθηνή. Ο χρόνος διπλασιασμού των λεμφοκυττάρων (LDT), η β2-μικροσφαιρίνη(s-β2M), η κινάση θυμιδίνης(s-TK) και η γαλακτική αφυδρογονάση(LDH) είναι οι πιο κοινοί συμβατικοί δείκτες που μπορούν να αποκτηθούν εύκολα μέσω του ορολογικού ελέγχου [15].

Ο χρόνος διπλασιασμού των λεμφοκυττάρων προσδιορίζεται με τη μέτρηση του αριθμού των μηνών που χρειάζεται ο απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων για να διπλασιαστεί και χρησιμοποιείται σαν προγνωστικός παράγοντας για περισσότερα από 30 χρόνια. $LDT \leq 12$ μήνες προβλέπει κακή πρόγνωση ενώ η $LDT > 12$ μήνες συσχετίζεται με μια μακρά περίοδο επιβίωσης χωρίς ανάγκη για λήψη θεραπείας. Το μειονέκτημα της παραμέτρου αυτής αποτελεί το γεγονός ότι ο αριθμός λεμφοκυττάρων του αίματος είναι ιδιαίτερα μεταβλητός λόγω πολλών μη ειδικών συμβάντων. Επομένως, οι κλινικές αποφάσεις που βασίζονται στον LDT συχνά δεν είναι έγκαιρες ή αξιόπιστες [15], [16].

Τόσο τα επίπεδα της β2-μικροσφαιρίνης όσο και τα επίπεδα κινάσης θυμιδίνης αναφέρθηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου (progression-free survival, PFS) πριν από περισσότερα από 20 χρόνια. Έχει αποδειχτεί ότι αυξημένη δραστηριότητα των 2 πρωτεϊνών προβλέπει δυσμενή έκβαση σε ασθενείς με ΧΛΛ. Τα αυξημένα επίπεδα β2-μικροσφαιρίνης περιλαμβάνονται σήμερα σε διάφορα προγνωστικά μοντέλα. Σχετικά με την κινάση θυμιδίνης, βρέθηκε ότι αυξημένα επίπεδα σχετίζονται με

μικρότερο LDT και μη μεταλλαγμένη κατάσταση *IGHV* γονιδίων υποδεικνύοντας τον υψηλό κίνδυνο των ασθενών που νοσούν [15].

Η γαλακτική αφυδρογονάση του ορού είναι συνήθως αυξημένη σε λεμφοπολλαπλασιαστικές διαταραχές και έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση. Στη ΧΛΛ, όπως και άλλες λεμφοπολλαπλασιαστικές διαταραχές, η LDH έχει βρεθεί ότι είναι προγνωστικά σημαντική και μπορεί επίσης να αντανακλά το πολλαπλασιαστικό φορτίο της νόσου. Επιπλέον, δημοσιευμένα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η LDH ορού μπορεί να προβλέψει την επιβίωση χωρίς εξέλιξη, την επιβίωση χωρίς θεραπεία και τη συνολική επιβίωση σε ασθενείς με ΧΛΛ [17].

5.6.2. Ανοσοφαινοτυπικοί δείκτες

Οι παράμετροι που συζητήθηκαν παραπάνω είναι δείκτες που δεν αντικατοπτρίζουν απαραίτητα κρίσιμες βιολογικές πτυχές των κυττάρων της ΧΛΛ. Τόσο οι τεχνολογικές εξελίξεις όσο και οι γνώσεις για την λευχαιμική κυτταρική συμπεριφορά έχει οδηγήσει σε σημαντική πρόοδο στην ικανότητα δημιουργίας περισσότερης προγνωστικής εικόνας. Οι καλύτερα μελετημένες από αυτές τις νέες προγνωστικές παραμέτρους αναλύονται στην συνέχεια.

Η CD38 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 42 kilodalton, η οποία εκφράζεται σε διάφορα αιμοποιητικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των φυσιολογικών Β-κυττάρων. Το βέλτιστο όριο cutoff, για τον καθορισμό της υπερέκφρασης της CD38 εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενο. Παρόλα αυτά, η μεγάλη πλειοψηφία των μελετών το καθορίζει έως 20-30% [14]. Αποτελεί αναμφίβολα ένα ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για μια δυσμενή κλινική πορεία στη ΧΛΛ [16]. Η υπερέκφραση της CD38 έχει συσχετιστεί με προχωρημένο στάδιο της νόσου, μικρότερη επιβίωση καθώς και με άλλους δυσμενείς παράγοντες όπως υψηλότερα επίπεδα β2-μικροσφαιρίνης και καρυότυπους υψηλού κινδύνου. Επιπλέον, μεγάλη έκφραση του CD38 ($\geq 30\%$) προσδιορίζει ασθενείς με μη μεταλλαγμένα *IGHV* γονίδια [15]. Οι ασθενείς που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση CD38 πέραν του ότι εμφανίζουν πιο επιθετική νόσο, δεν ανταποκρίνονται στην χημειοθεραπεία. Αυτοί οι ασθενείς μπορεί να χρειαστούν θεραπεία σε σύντομο χρονικό διάστημα από την στιγμή της διάγνωσης και δεδομένου των τρέχουσων

θεραπειών, πολύ πιθανό να υποτροπιάσουν. Όπως αναφέρθηκε, το τι θεωρείται θετική τιμή για χρήση ως προγνωστικός δείκτης παραμένει ένα ζήτημα καθώς πρόσφατη εργασία προτείνει ότι πολύ χαμηλά ποσοστά CD38 μπορούν ακόμα να συσχετιστούν με δυσμενή έκβαση στη ΧΛΛ, ενώ υπάρχει επίσης διαμάχη ως προς το εάν το επίπεδο του CD38 για έναν δεδομένο ασθενή θα ποικίλλει με την πάροδο του χρόνου. Αρκετές κλινικές δοκιμές συνεχίζουν να επικυρώνουν τη χρήση του CD38 ως προγνωστικού παράγοντα της ανταπόκρισης στη θεραπεία και της επιβίωσης. Ωστόσο, δεδομένου ότι αυτός ο φαινότυπος ορίζεται εύκολα με κυτταρομετρία ροής, παραμένει μια βιώσιμη και χρήσιμη προγνωστική παράμετρος για την παροχή συμβουλών σε ασθενείς.

Η πρωτεΐνη ZAP-70 είναι μια κινάση τυροσίνης που φυσιολογικά εκφράζεται σε T-λεμφοκύτταρα και φυσικά κύτταρα φονείς κατέχοντας σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση των T-κυττάρων. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι εκφράζεται και σε B-κύτταρα, κατά προτίμηση αλλά όχι αποκλειστικά, σε κλώνους B-κυττάρων με μη μεταλλαγμένα *IGHV* γονίδια. Τα κύτταρα της ΧΛΛ που εκφράζουν την ZAP-70 σχετίζονται με υπερβολική φωσφορυλίωση τυροσίνης γεγονός που καθιστά περισσότερο αποτελεσματική τη μεταβίβαση σήματος μέσω του υποδοχέα B-κυττάρων. Αυτό και άλλα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η παρουσία της ZAP-70 σε κλώνους B-λεμφοκυττάρων αντανακλά την κατάσταση ενεργοποίησης του κλώνου και πιθανών να σχετίζεται με ταχύτερη εξέλιξη της νόσου [16]. Η ανώμαλη έκφρασή της πρωτεΐνης αυτής στα κύτταρα της ΧΛΛ φαίνεται να είναι σταθερή κατά τη διάρκεια της νόσου και η παρουσία της έχει αποδειχθεί ότι προβλέπει δυσμενώς την επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου και την συνολική επιβίωση κατά την αρχική διάγνωση [14], [18]. Ωστόσο η τυποποίηση της ανάλυσης έκφρασης της ZAP-70, αποτελεί δύσκολη διαδικασία κατά την καθημερινή φροντίδα των ασθενών, και γενικά δεν συνιστάται, σε σχέση με τη μετάλλαξη *IGHV* και την ανάλυση FISH [14].

5.6.3. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

Ο φθορισμός ενδιάμεσης φάσης *in situ* υβριδισμός (FISH) επιτρέπει την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA σε πυρήνες κυττάρων μεσόφασης και είναι επί του παρόντος η τυπική προσέγγιση για την ανάλυση γονιδιωματικών ανωμαλιών στη ΧΛΛ [19]. Περίπου το 80% των σθενών εμφανίζουν τουλάχιστον μια από τις ακόλουθες κυτταρογενετικές ανωμαλίες, οι οποίες έχουν αποκτήσει προγνωστική αξία και κατέχουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση και

εξέλιξη της νόσου, καθορίζοντας την έκβαση των ασθενών και τις θεραπευτικές στρατηγικές [20]. Η πιο συχνή ανωμαλία αποτελεί η έλλειψη στην περιοχή 13q14 και συναντάται στο 40%-60% των περιπτώσεων [19]. Γενικά σχετίζεται με ευνοϊκή πρόγνωση, αλλά η κλινική πορεία της νόσου επιταχύνεται σε ασθενείς με μεγάλες ελλείψεις στην περιοχή αυτή που περιλαμβάνουν το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *RBI* [21]. Η επόμενη πιο συχνή χρωμοσωμική ανωμαλία η οποία συναντάται στο 15% των περιπτώσεων είναι η έλλειψη στην περιοχή 11q22-q23. Οι ασθενείς που εμφανίζουν την συγκεκριμένη ανωμαλία, παρουσιάζουν ογκώδεις λεμφαδενοπάθειες και επιθετική κλινική πορεία, με μειωμένη συνολική επιβίωση [16]. Η έλλειψη στην περιοχή αυτή οδηγεί στην απώλεια του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *ATM* και προσδιορίζει μια ομάδα ασθενών με νόσο προχωρημένου σταδίου [19]. Στο 10%-20% των περιπτώσεων οι ασθενείς παρουσιάζουν τρισωμία 12 η οποία έχει συσχετιστεί με μέτριο κίνδυνο, ωστόσο η συνύπαρξη αυτής και μεταλλαγών στο γονίδιο *NOTCH1* συσχετίζεται με κακή επιβίωση. Τέλος, λιγότερο συχνά εντοπίζεται η έλλειψη στην περιοχή 17p13. Η συγκεκριμένη έλλειψη αφορά ολόκληρο τον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17, οδηγώντας στην απώλεια του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *TP53*. Η κατάσταση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα μια πολύ επιθετική κλινική πορεία, αντίσταση στην θεραπεία και σύντομη συνολική επιβίωση. Έτσι οι ασθενείς που φέρουν την ανωμαλία αυτή θεωρούνται ότι έχουν την χειρότερη πρόγνωση [18], [19], [21].

5.6.4. Κατάσταση μετάλλαξης γονιδίων *IGHV*

Η κατάσταση μετάλλαξης των γονιδίων *IGHV* αποτελεί ένα από τους ισχυρότερους προγνωστικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος [19]. Οι ασθενείς με ΧΛΛ χωρίζονται σε 2 υποομάδες ανάλογα με την ύπαρξη ή την απουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο [15]. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού μπορούν να αναγνωριστούν συγκρίνοντας αλληλουχίες DNA των Β-λεμφοκυττάρων της ΧΛΛ με τα αντίστοιχα γονίδια των κυττάρων της βλαστικής σειράς. Διαφορές $\geq 2\%$ αντιστοιχούν σε μεταλλαγμένη *IGHV* κατάσταση [13]. Οι μεταλλαγές συμβαίνουν σε μετέπειτα στάδιο από τον ανασυνδιασμό των κωδικών περιοχών. Αφού τα Β-κύτταρα διεγερθούν από το αντιγόνο σε ένα περιφερικό λεμφικό όργανο, ορισμένα από τα ενεργοποιημένα Β-κύτταρα πολλαπλασιάζονται ταχέως στα λεμφοειδή θυλάκια και σχηματίζουν βλαστικά κέντρα. Στα σημεία αυτά τα Β-λεμφοκύτταρα μεταλλάσσονται και καθώς η διαδικασία συμβαίνει σε

σωματικά κύτταρα, και όχι γεννητικά ονομάζεται σωματική υπερμεταλλαγή. Αντίθετα, η αμετάλλακτη μορφή των γονιδίων, υποδεικνύει ότι τα κύτταρα δεν έχουν περάσει από τα βλαστικά κέντρα των λεμφαδένων. Συνεπώς, η κατάσταση μεταλλαγής των γονιδίων *IGHV* αντανακλά το στάδιο της φυσιολογικής διαφοροποίηση των Β-κυττάρων από το οποίο προέρχονται [10]. Οι ασθενείς με μεταλλαγμένα γονίδια (*IGHV-M CLL*) είναι πιθανό να εμφανίζουν έλλειψη στο χρωμόσωμα 13 η οποία σχετίζεται με ευνοϊκή πρόγνωση. Αντίθετα, οι ασθενείς με μη μεταλλαγμένα γονίδια (*IGHV-UM CLL*) τείνουν να βρίσκονται σε προχωρημένα στάδια της νόσου, να παρουσιάζουν επιθετικότερη πορεία, μικρότερη ύφεση καθώς και την τάση να αποκτούν κυτταρογενετικές ανωμαλίες υψηλού κινδύνου. Επιπλέον, η επιβίωση των ασθενών που ανήκουν στην δεύτερη υποομάδα είναι σημαντικά μικρότερη ανεξάρτητα από το στάδιο της νόσου [19].

5.6.5. Σωματικές μεταλλαγές

Η εφαρμογή τεχνικών μαζικής αλληλούχισης αποκάλυψε την μεγάλη γενετική και επιγενετική ετερογένεια που χαρακτηρίζει τα γονιδιώματα ασθενών με ΧΛΛ. Οι πιο συχνές σωματικές μεταλλαγές αφορούν γονίδια τα οποία εμπλέκονται σε σημαντικά μονοπάτια στα κύτταρα όπως βλάβης DNA και έλεγχος κυτταρικού κύκλου (*TP53, ATM, BIRC3*), επεξεργασίας mRNA (*SF3B1*), μονοπάτι NOTCH (*NOTCH1*) καθώς και γονίδια που σχετίζονται με την φλεγμονή (*MYD88, NFKBIE, BIRC3, TRAF3*) [19], [21].

Η σηματοδότηση Notch είναι ένα εξελικτικά συντηρημένο σύστημα σηματοδότησης που μοιράζονται πολλοί πολυκύτταροι οργανισμοί. Στον άνθρωπο υπάρχουν 4 διαμεμβρανικοί υποδοχείς, όπου ο υποδοχέας 1 κατέχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου. Η σύνδεση προσδέτη – υποδοχέα επάγει αλλαγές στην διαμόρφωση του υποδοχέα οδηγώντας στην απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού τμήματος στον πυρήνα και προκαλώντας την έκφραση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων. Περισσότερο από το 90% των μεταλλάξεων *NOTCH1* αφορούν σχεδόν αποκλειστικά διαγραφές και έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας του ενδοκυτταρικού τμήματος και έτσι την ενίσχυση της σηματοδότησης NOTCH [9], [22], [23]. Οι

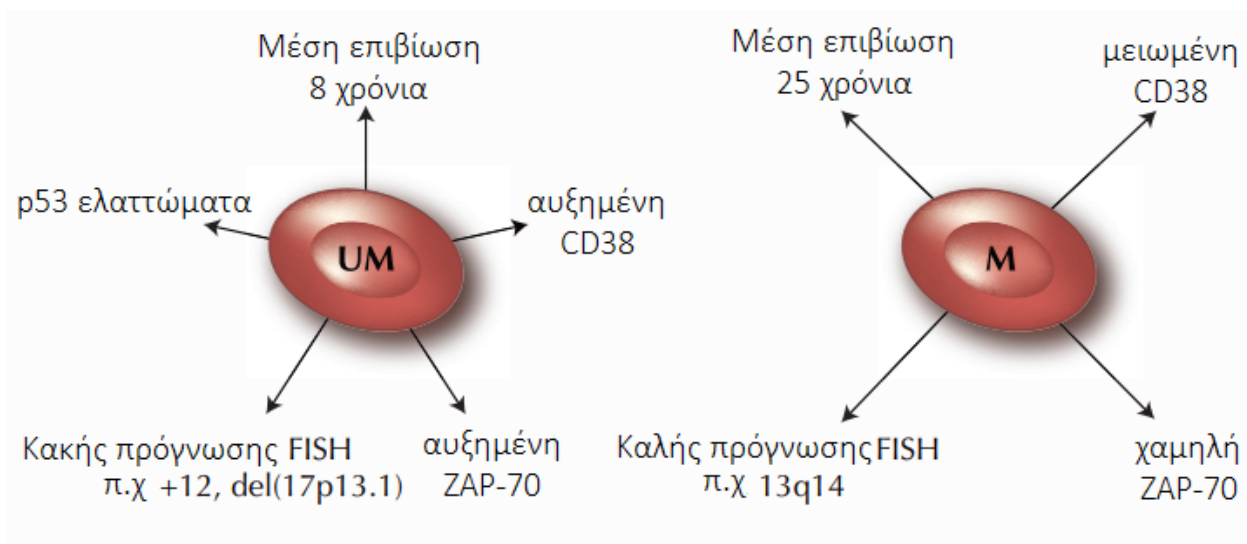
μεταλλάξεις *NOTCH1* παρατηρούνται κατά προτίμηση στους ασθενείς με μη μεταλλαγμένα *IGHV* γονίδια. Αξίζει να σημειωθεί ότι περίπου το 40% των ασθενών με μεταλλάξεις στο γονίδιο *NOTCH1* φιλοξενούν τρισωμία 12, υποδηλώνοντας μια σχέση αυτών των δύο γενετικών εκτροπών με την ανάπτυξη της ΧΛΛ. Επιπλέον, συσχετίζεται συχνά με επιθετική κλινική πορεία, έκφραση ZAP-70, μειωμένη έκφραση CD20 και συνεπώς με αντίσταση μονοκλωνικών αντισωμάτων αντι-CD20, ανθεκτικότητα στην θεραπεία και τέλος αυξημένο κίνδυνο μετασχηματισμού σε διάχυτο λέμφωμα μεγάλων Β-κυττάρων (λεγόμενος μετασχηματισμός Richter) [14], [21].

Μεταλλάξεις συναντώνται επίσης αρκετά συχνά και στο γονίδιο *SF3B1*. Η μετάλλαξη εντοπίζεται στο 5-7% των περιπτώσεων κατά τη διάγνωση, αλλά η συχνότητά της αυξάνεται σε προοδευτικές περιπτώσεις και σε υποτροπή (έως 20%). Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί ένα συστατικό του σωματίου συρραφής, το οποίο ενορχηστρώνει την απομάκρυνση εσωνίων από το πρόδρομο mRNA. Έτσι, οι μεταλλάξεις *SF3B1* έχουν αντίκτυπο στην διαδικασία της εναλλακτικής συρραφής και προκαλούν αλλαγές στο RNA επηρεάζοντας πολλαπλά μονοπάτια, όπως της απόκρισης βλάβης στο DNA, του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της σηματοδότησης NOTCH. Έχουν συσχετιστεί με δυσμενής κλινική πορεία και αρνητική επίδραση στην συνολική επιβίωση. Άλλα συχνά μεταλλαγμένα γονίδια που εμπλέκονται στην επεξεργασία και την συρραφή του RNA έχουν ταυτοποιηθεί (*XPO1*, *RPS15*, *DDX3X*, *ZNF292*, *MED12* και *NXF1*), υποστηρίζοντας τη σημασία αυτής της κυτταρικής διαδικασίας για τη ΧΛΛ [9], [21], [22], [24].

Αναφορικά με τα γονίδια που σχετίζονται με την φλεγμονή, μεταλλάξεις στο μονοπάτι TLR/MYD88 μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό μιας υποομάδας ασθενών με ευνοϊκή έκβαση νόσου [21]. Ο Baliakas και οι συνεργάτες του σε μια έρευνα όπου μελέτησαν 3490 περιπτώσεις ασθενών με ΧΛΛ, απέδειξαν ότι οι μεταλλάξεις *MYD88* εντοπίστηκαν αποκλειστικά σε μεταλλαγμένο *IGHV* υπότυπο. Από την άλλη πλευρά, οι μεταλλάξεις *BIRC3*, συσχετίστηκαν με μη μεταλλαγμένο *IGHV* υπότυπο, Del11q και τρισωμία 12 [14]. Το γονίδιο *BIRC3* εμπλέκεται στην αναστολή της απόπτωσης και στη ρύθμιση του NFκB (πυρηνικός παράγοντας Β). Οι μεταλλάξεις του εν λόγω γονιδίου δημιουργούν κωδικόνια λήξης και σχετίζονται με μια πολύ δυσάρεστη πρόγνωση, παρόμοια με αυτή των ασθενών με μεταλλαγμένο *TP53* [9]. Εντούτοις άλλες μελέτες δεν υποστηρίζουν την προγνωστική σημασία των μεταλλάξεων

BIRC3, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στη χαμηλή συχνότητα των γονιδιακών αυτών μεταλλάξεων [22].

Το *TP53* και το *ATM* είναι γνωστά ογκοκατασταλτικά γονίδια που συνήθως αδρανοποιούνται από γονιδιακές μεταλλάξεις ή χρωμοσωμικές διαγραφές [*del(17p)* και *del(11q)*], αντίστοιχα [24]. Σε αντίθεση με τη σχέση μεταξύ της μετάλλαξης *del(17p)* και *TP53*, η *del(11q)* σπανιότερα εμφανίζεται μαζί με τις μεταλλάξεις *ATM* [22]. Οι μεταλλάξεις *ATM* μπορεί να σχετίζονται με κακή πρόγνωση στη ΧΛΛ, αν και αυτή η συσχέτιση παραμένει αμφιλεγόμενη. Ωστόσο, συσχετίζονται με μη μεταλλαγμένο *IGHV*, έκφραση ZAP-70 και *Del11q*, τα οποία ανεξάρτητα προβλέπουν χειρότερα αποτελέσματα [14]. Οι μεταλλάξεις της *TP53* σχετίζονται με βραχεία επιβίωση καθώς 80-90% των ασθενών με έλλειψη *del17p*, φέρουν και μετάλλαξη *TP53*, προκαλώντας πλήρης λειτουργική αδρανοποίηση της οδού p53. Αυτές οι μεταλλάξεις είναι επίσης πιο συχνές σε περιπτώσεις μη μεταλλαγμένου *IGHV* υπότυπου και προβλέπουν χειρότερη κλινική έκβαση (Εικόνα 4) [9].



Εικόνα 4: Φαίνεται η τάση του μη μεταλλαγμένου κλώνου να σχετίζεται με δυσμενέστερους προγνωστικούς δείκτες όπως αυξημένο CD38 και ZAP-70, και ελαττώματα υψηλού κινδύνου που ανιχνεύονται από υβριδισμό *in situ* φθορισμού (FISH) καθώς και δυσλειτουργία του p53. UM: Μη μεταλλαγμένοι κλώνοι B-κυττάρων, M: μεταλλαγμένων κλώνοι B-κυττάρων. (Τροποποιημένη εικόνα από: Kay, N.E. and T.D. Shanafelt, Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia [16]).

5.7. Θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου

Παρά τις σημαντικές προόδους στη θεραπεία της, η ΧΛΛ παραμένει σε μεγάλο βαθμό ανίατη. Ωστόσο, τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της βιολογίας της νόσου σε διαφορετικά επίπεδα η οποία έχει συμβάλει στην καλύτερη θεραπευτική αντιμετώπιση της [23]. Τα κύρια ζητήματα στη διαχείριση των ασθενών σχετίζονται στο χρονοδιάγραμμα (πότε;) και στην επιλογή (πώς;) της θεραπείας. Οι διεθνείς κατευθυντήριες γραμμές προσδιορίζουν σαφώς ότι η ένδειξη θεραπείας βασίζεται στην παρουσία ενεργού νόσου ενώ ασθενείς που είναι ασυμπτωματικοί και βρίσκονται σε πρώιμο ή ενδιάμεσο στάδιο δεν συνιστάται για θεραπεία εκτός εάν εμφανίσουν συμπτώματα [9].

Τα ακόλουθα σημεία ή/και συμπτώματα ορίζουν την ενεργό νόσο (τουλάχιστον ένα από αυτά): [8], [9]

- Ενδείξεις προοδευτικής ανεπάρκειας του μυελού όπως εκδηλώνεται με την ανάπτυξη ή επιδείνωση της αναιμίας και/ή της θρομβοπενίας. Τα μειωμένα επίπεδα Hb < 10 g/dL ή αριθμός αιμοπεταλίων <100 000/μL γενικά θεωρείται ως ένδειξη για θεραπεία.
- Ογκώδης (δηλαδή, ≥ 6 cm κάτω από το αριστερό περιθώριο) ή προοδευτική ή συμπτωματική σπληνομεγαλία
- Ογκώδεις λεμφαδένες(δηλαδή, ≥ 10 cm στη μεγαλύτερη διάμετρο) ή προοδευτική ή συμπτωματική λεμφαδενοπάθεια
- Προοδευτική λεμφοκυττάρωση με αύξηση $\geq 50\%$ σε διάστημα δύο μηνών ή χρόνος διπλασιασμού των λεμφοκυττάρων (LDT) μικρότερος από 6 μήνες. Παράγοντες που συμβάλλουν στη λεμφοκυττάρωση εκτός της ΧΛΛ (π.χ. λοιμώξεις, στεροειδές χορήγηση) θα πρέπει να αποκλειστούν
- Αυτοάνοσες επιπλοκές συμπεριλαμβανομένης της αναιμίας ή της θρομβοπενίας που δεν οφείλονται στην λήψη κορτικοστεροειδών
- Συμπτώματα που σχετίζονται με τη νόσο, όπως ορίζονται από οποιοδήποτε από τα ακόλουθα

Απώλεια βάρους $\geq 10\%$ τους προηγούμενους 6 μήνες.

Πυρετοί $\geq 100,5^\circ\text{F}$ ή $38,0^\circ\text{C}$ για 2 ή περισσότερες εβδομάδες χωρίς ενδείξεις μόλυνσης.

Νυχτερινές εφιδρώσεις για ≥ 1 μήνα χωρίς ενδείξεις μόλυνσης.

Σημαντική κόπωση

Για τον προσδιορισμό του τύπου θεραπείας που θα ακολουθήσει ένας ασθενής απαιτείται προσεκτική αξιολόγηση παραγόντων όπως το κλινικό στάδιο του ασθενή, τα συμπτώματα που εμφανίζει, η παρουσία άλλων νόσων, η προχωρημένη ηλικία και οι στόχοι της θεραπείας. Επιπλέον, σημαντικότερο ρόλο κατέχει το γενετικό προφίλ του ασθενή [9] καθώς και οι προγνωστικοί δείκτες. Λιγότερο ευνοϊκοί προγνωστικοί δείκτες, όπως η δυσλειτουργία *del(17p)* ή *TP53* δεν οδηγούν σε μακροχρόνιες υφέσεις με την τυπική χημειοανοσοθεραπεία και οι ασθενείς με αυτά τα χαρακτηριστικά της νόσου αντιμετωπίζονται καλύτερα με νέους παράγοντες [25].

Υπάρχουν πολλές διαθέσιμες στρατηγικές για την αντιμετώπιση της ΧΛΛ. Σε αυτές περιλαμβάνονται η αντιμετώπιση με χημειοθεραπεία χρησιμοποιώντας κυτταροστατικούς παράγοντες, όπως αλκυλιωτικούς παράγοντες και ανάλογα πουρίνης, χημειοανοσοθεραπεία, παράγοντες που στοχεύουν το μονοπάτι σηματοδότησης BCR σε κύτταρα ΧΛΛ και στο περιβάλλον τους, καθώς και BCL-2 αναστολείς [10]. Μερικά από τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος αναλύονται στην συνέχεια. Αξίζει να σημειωθεί ότι πολλές νέες θεραπευτικές στρατηγικές δοκιμάζονται και οι ασθενείς μπορούν να λάβουν μέρος στις κλινικές δοκιμές.

5.7.1. Ανοσοχημειοθεραπεία

Τα επιφανειακά μόρια CD19, CD20 και CD52 έχουν διερευνηθεί εκτενώς ως θεραπευτικά μόρια-στόχοι. Το CD19 είναι ένα ειδικό επιφανειακό μόριο της γενεαλογίας Β-κυττάρων που εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι BCR. Η έκφραση του περιορίζεται στη γενεαλογία των Β-κυττάρων και στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και η πλειονότητα των αιμοποιητικών κυττάρων δεν το εκφράζει. Επομένως, το CD19 αντιπροσωπεύει έναν ειδικό θεραπευτικό στόχο για κακοήθειες των Β-κυττάρων. Το CD20 πρόκειται για μια επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται σε ώριμα Β-κύτταρα και η έκφρασή της περιορίζεται σε αυτά. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη απουσιάζει από τα HSCs και την πλειονότητα των αιμοποιητικών κυττάρων. Συνεπώς, μονοκλωνικά αντισώματα κατά του CD20, όπως η ριτουξιμάμπη (*rituximab*), η οφατουμουμάμπη

(ofatumumab) και η ομπινουτουζουμάμπη (obinutuzumab) έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία κακοηθειών που σχετίζονται με ώριμα Β-λεμφοκύτταρα. Τέλος, η αλεμτουζουμάμπη (alemtuzumab) είναι ένα ανασυνδυασμένο, μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του αντιγόνου CD52 το οποίο εκφράζεται σε μια ποικιλία ανθρώπινων λεμφοειδών κακοηθειών και φυσιολογικών λεμφοκυττάρων [21].

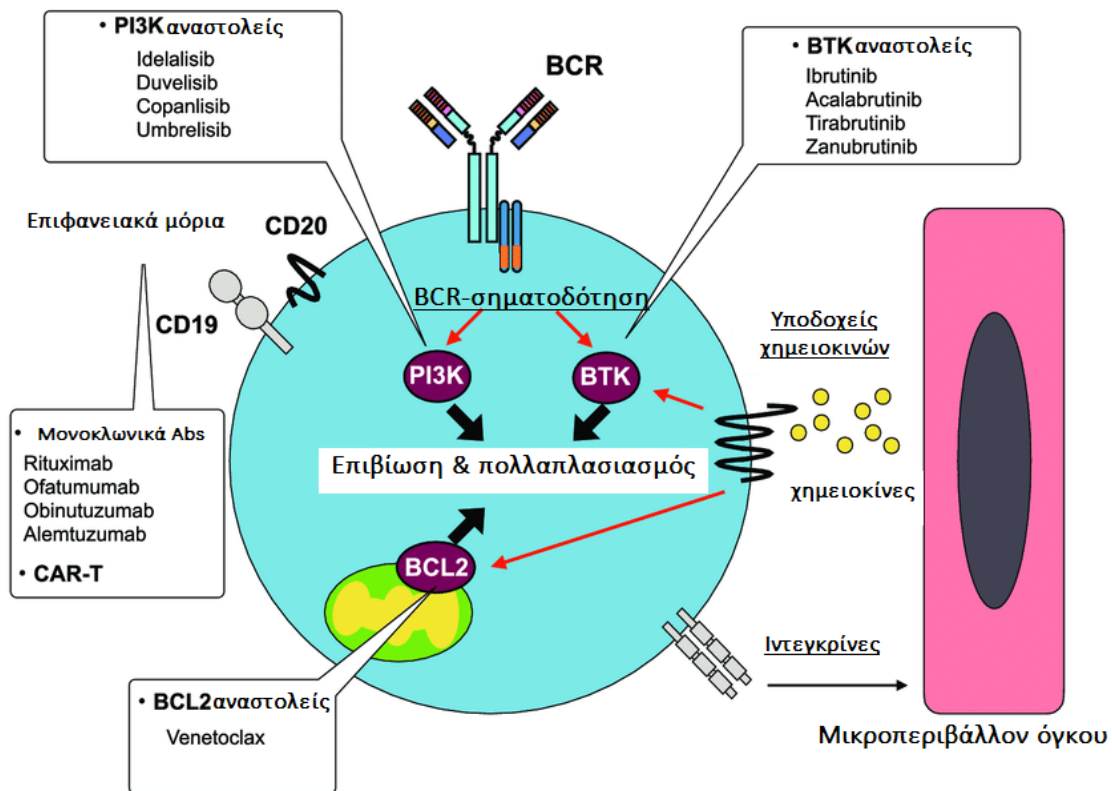
5.7.2. Παράγοντες στόχευσης σηματοδότησης BCR

Ο υποδοχέας των Β-κυττάρων είναι ένα κλειδί για τη μοίρα των Β-κυττάρων και παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των κυττάρων της ΧΛΛ. Συνεχής ή επαναλαμβανόμενη σηματοδότηση BCR υποστηρίζει την επιβίωση των κυττάρων της και το γεγονός αυτό καθιστά την αναστολή της σηματοδότησης BCR μια καινούργια και ισχυρή στρατηγική για την θεραπεία της νόσου. Ο υποδοχέας είναι συνδεδεμένος με ένα δίκτυο κινασών και φωσφατασών που συντονίζουν και ενισχύουν την ενεργοποίηση του. Στόχευση αυτών των κινασών που σχετίζονται με υποδοχείς Β-κυττάρων, ιδιαίτερα της κινάσης BTK ή του PI3K, από ειδικούς αναστολείς έχει επαναστατήσει στη θεραπεία [8], [23].

Η κινάση τυροσίνης Bruton (BTK) εκφράζεται σε κύτταρα όλων των αιμοποιητικών σειρών εκτός από τα Τ-λεμφοκύτταρα και τα πλασματοκύτταρα. Μεταδίδει, διαφοροποιεί και ενισχύει σήματα από μια μεγάλη ποικιλία επιφανειακών μορίων. Οι αναστολείς BTK εμποδίζουν τη σηματοδότηση BCR, επηρεάζοντας έτσι έντονα την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων [23]. Για την αναστολή της κινάσης έχει αναπτυχθεί η μπρουτινίμπη (Ibrutinib), ένα μικρό μόριο αναστολέας το οποίο εμποδίζει την φωσφοριλίωση της κινάσης και συνεπώς την μετάδοση σήματος, προκαλώντας τελικά την απόπτωση των κυττάρων της ΧΛΛ. Άλλη κινάση που σχετίζεται με τον υποδοχέα των Β-κυττάρων και έχει χρησιμοποιηθεί σαν στόχος για την θεραπεία της νόσου αποτελεί η PI3K. Η έκφραση της ισομορφής PI3K δ (PI3K-δ) περιορίζεται σε κύτταρα αιμοποιητικής προέλευσης όπου παίζει βασικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των Β-κυττάρων. Το ιδελαλισίμπ (Idelalisib) είναι ένας ισχυρός και επιλεκτικός αναστολέας της PI3Kδ-ισομορφής, ο οποίος καταστέλλει τη σηματοδότηση BCR και προάγει την απόπτωση σε πρωτοπαθή κύτταρα της ΧΛΛ [8].

5.7.3. BCL-2 αναστολείς

Εκτός από τα νέα φάρμακα που στοχεύουν το μονοπάτι σηματοδότησης BCR όπως αναφέρθηκαν πιο πάνω, ο αναστολέας BCL-2, βενετοκλάξ (venetoclax) έχει επίσης αλλάξει σημαντικά τη θεραπεία της ΧΛΛ. Η πρωτεΐνη BCL-2 εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, απομονώνοντας τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες BAX και BAK και αποτρέποντάς τους να επάγουν την απόπτωση στα κύτταρα. Τα απομονωμένα BAX και BAK μπορούν να απελευθερωθούν από μέλη της οικογένειας με μόνο BH3 επικράτεια τα οποία δεσμεύουν και ανταγωνίζονται τις πρωτεΐνες της οικογένειας BCL-2. Η BCL-2 έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται σε κύτταρα ΧΛΛ, όπου μεσολαβεί στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και έχει συσχετιστεί με αντίσταση στη θεραπεία. Το Venetoclax αποτελεί ένα μικρό μόριο που μιμείται την BH3 δομική επικράτεια καταστέλλοντας τις αντι-αποπτωτικές δράσεις της BCL-2 πρωτεΐνης (Εικόνα 5) [8], [21], [23].



Εικόνα 5: Σύνοψη των νέων φαρμάκων και των μορίων/οδών στόχων τους. Τροποποιημένη εικόνα από: Kikushige, Y., Pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia and the development of novel therapeutic strategies [21]).

6. Βασικά στοιχεία της συρραφής του RNA

Πολλά ευκαριωτικά γονίδια αποτελούνται από τμήματα κωδικοποιητικών αλληλουχιών διαχωριζόμενα μεταξύ τους από τμήματα μη κωδικοποιητικών αλληλουχιών, είναι δηλαδή μωσαϊκά. Αφού πραγματοποιηθεί η μεταγραφή και ο σχηματισμός του RNA μεταγράφου, τα εσώνια απομακρύνονται από το νεοσυντεθειμένο RNA και τα εξώνια συνδέονται μεταξύ τους, για να δημιουργηθεί το ώριμο mRNA του γονιδίου μέσω της διαδικασίας της συρραφής του RNA (RNA Splicing). Στην συνέχεια, εφόσον υποστεί περαιτέρω επεξεργασία το ώριμο mRNA εξάγεται από τον πυρήνα και μεταφράζεται για να παράξει ένα πρωτεϊνικό προϊόν.

Η συρραφή του RNA πραγματοποιείται από ένα μεγάλο σύμπλοκο μορίων RNA και πρωτεϊνών, το σωματίο συρραφής. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από 150 πρωτεΐνες και 5 μικρά μόρια RNA (U1, U2, U4, U5 και U6) γνωστά ως μικρά πυρηνικά RNA (snRNA: small nuclear RNA) όπου καθένα από αυτά δημιουργεί σύμπλοκο με αρκετές πρωτεΐνες σχηματίζοντας μια μικρή πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη (snRNP: small nuclear ribonucleoprotein). Τελικά το σύνολο των snRNPs αποτελεί τον πυρήνα του σωματίου συρραφής [26].

Ο μηχανισμός της συρραφής προϋποθέτει την αναγνώριση τριών τμημάτων του μορίου του πρόδρομου mRNA: τη 5' θέση συρραφής (5' splice site), την θέση σημείου διακλάδωσης (branch point site) που βρίσκεται εντός του εσωνίου, συνήθως κοντά στο 3' άκρο του και την 3' θέση συρραφής (3' splice site). Καθένα από αυτά τα στοιχεία έχει μια συναινετική αλληλουχία νουκλεοτιδίων που είναι παρόμοια σε όλα τα εσώνια και ορίζουν που θα λάβει χώρα η συρραφή. Οι περισσότερο συντηρημένες αλληλουχίες είναι η GU στην 5' θέση συρραφής, η U στην θέση διακλάδωσης και η AG στην 3' θέση συρραφής. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης συρραφής η αναγνώριση των στοιχείων αυτών γίνεται μέσω ζευγαρώματος-βάσεων μεταξύ των snRNPs και των συναινετικών αλληλουχιών RNA στο πρόδρομο mRNA [4].

6.1. Γενικός μηχανισμός συρραφής (cis-συρραφή)

Αρχικά, η 5' θέση συρραφής αναγνωρίζεται από το U1 snRNA και η θέση διακλάδωσης από την BBP (branch point binding protein) και τον βοηθητικό παράγοντα U2AF σχηματίζοντας έτσι το πρώτο E σύμπλοκο. Στην συνέχεια, η U2 snRNP δεσμεύεται στην θέση διακλάδωσης εκτοπίζοντας την BBP. Η συγκεκριμένη διάταξη ονομάζεται σύμπλοκο A. Ακολούθως, τα U4, U6 και U5 snRNP ενώνονται με το σύμπλοκο προκαλώντας μια αναδιάταξη αυτού, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα οι τρεις θέσεις συρραφής να έρχονται σε επαφή και την μετατροπή του συμπλόκου A σε σύμπλοκο B. Στο επόμενο βήμα, το U1 εγκαταλείπει το σύμπλοκο, το U6 το αντικαθιστά στην 5' θέση συρραφής και έπειτα το U4 απελευθερώνεται επιτρέποντας στο U6 να αλληλεπιδράσει με το U2. Αυτή η διάταξη η οποία καλείται σύμπλοκο C παράγει το ενεργό κέντρο και έχει σαν αποτέλεσμα την αντιπαράθεση της 5' θέσης συρραφής και της θέσης διακλάδωσης διευκολύνοντας την πρώτη αντίδραση μετεστεροποίησης. Έτσι, η 2'-OH της A στην θέση διακλάδωσης προσβάλλει τη φωσφορυλομάδα της G στην 5' θέση συρραφής και το ελευθερωμένο 5' άκρο του εσωνίου συνδέεται στην A εντός της θέσης διακλάδωσης. Έπειτα, μια δεύτερη αντίδραση μετεστεροποίησης ανάμεσα στην προσφάτως ελευθερωμένη 3'-OH του εξωνίου και την φωσφορυλομάδα στην 3' θέση συρραφής συνδέει τα 2 εξώνια και ελευθερώνει το μεταξύ τους εσώνιο.

6.2. Παραλλαγές της συρραφής

Παράλληλα υπάρχουν 2 παραλλαγές της μηχανής της συρραφής. Στην πρώτη περίπτωση δύο εξώνια που βρίσκονται σε διαφορετικά μόρια mRNA, και όχι στο ίδιο, μπορούν να συνδεθούν μέσω της trans-συρραφής (trans-splicing). Η παραλλαγή αυτή είναι γενικά σπάνια και χρησιμοποιεί τον ίδιο μηχανισμό του σωματίου συρραφής όπως η φυσιολογική cis-συρραφή, με την μόνη διαφορά ότι εξαιρείται η U1 [26]. Η δεύτερη περίπτωση αναφέρεται στην χρήση μια εναλλακτικής μορφής του σωματίου συρραφής η οποία περιέχει ορισμένα συστατικά κοινά με το κύριο σωματίο αλλά κι άλλα μοναδικά. Το δευτερεύον σωματίο συρραφής (minor spliceosome) αναγνωρίζει σπανίως εμφανιζόμενα εσώνια που έχουν συναινετικές αλληλουχίες διακριτές από

τις αλληλουχίες των περισσότερων εσωνίων όπως αναφέρθηκαν πιο πάνω και αφορά μόνο ανώτερους ευκαριωτικούς οργανισμούς [27].

6.3. Εναλλακτική συρραφή

Τα μετάγραφα πολλών ευκαρυωτικών γονιδίων μπορούν να συρραφτούν με περισσότερους από ένα τρόπους, επιτρέποντας έτσι ένα πρόδρομο mRNA να παράγει πολλά mRNA με διαφορετικούς συνδυασμούς εξωνίων μέσω της διαδικασίας της εναλλακτικής συρραφής. Συνεπώς, από ένα γονίδιο προκύπτει ένα σύνολο διαφορετικών πρωτεϊνών δίνοντας την ευκαιρία στους ευκαριωτικούς οργανισμούς να αυξήσουν το κωδικοποιητικό δυναμικό των γονιδιωμάτων τους. Υποστηρίζεται πως έως 90% των γονιδίων του ανθρώπου υποβάλλονται σε εναλλακτική συρραφή [26].

Οι θέσεις συρραφής χαρακτηρίζονται ως ισχυρές ή ως αδύναμες, ανάλογα με το πόσο αποκλίνουν οι αλληλουχίες τους από τις συναινετικές αλληλουχίες και αυτό το χαρακτηριστικό καθορίζει αποτελεσματικά τις συγγένειες πρόσδεσης για τους παράγοντες συρραφής. Ισχύει ότι οι ισχυρές θέσεις συρραφής οδηγούν σε πλήρη χρήση της θέσης αυτής ενώ, το ποσοστό χρήσης των αδύναμων θέσεων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Οι σχετικές θέσεις των ισχυρών και αδύναμων θέσεων συρραφής δημιουργούν τους διαφορετικούς τρόπους εναλλακτικής συρραφής [27]. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται η παράλειψη εξωνίου, όπου εξώνια μπορεί να παραλειφθούν από το ώριμο μετάγραφο και αποτελεί το πιο διαδεδομένο πρότυπο εναλλακτικής συρραφής σε σπονδυλωτά και ασπόνδυλα. Στα κατώτερα μετόζωα, πιο συχνή είναι η διατήρηση εσωνίου όπου εσώνια μπορούν να διατηρηθούν στο ώριμο μετάγραφο. Επιπλέον, εναλλακτική συρραφή μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση εναλλακτικών εξωνίων. Εξώνια χρησιμοποιούνται σαν εναλλακτικές επιλογές όπου ένα από αυτά μπορεί να συμμετέχει κάθε φορά στην παραγωγή ενός ώριμου mRNA και τέλος υπάρχει και η περίπτωση της επέκτασης ενός εξωνίου, με την επιλογή μιας εναλλακτικής καθοδικής 5' θέσης συρραφής ή ανοδικής 3' θέσης συρραφής [27], [28].

7. Κυκλικά μόρια RNA (Circular RNAs)

Περισσότερο από το 80% του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι μεταγραφικά ενεργό, εντούτοις λιγότερο από το 3% μεταγράφεται σε mRNA το οποίο τελικά θα μεταφραστεί παράγοντας πρωτεΐνες. Τα μη κωδικά μόρια RNA (ncRNAs) αποτελούν μη-μεταφραζόμενα σε πρωτεΐνες μετάγραφα RNA τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε σχετιζόμενα με την μετάφραση RNAs, όπου ανήκουν τα tRNAs και τα rRNAs, τα οποία κατέχουν σημαντικό ρόλο κατά την διαδικασία της μετάφρασης. Τα υπόλοιπα ncRNAs χωρίζονται βάση του μεγέθους τους σε μικρά μη κωδικά (<200 νουκλεοτίδια) και σε μεγάλα μη κωδικά μόρια (> 200 νουκλεοτίδια). Τα μικρά ncRNAs έχουν αναδειχθεί ως βασικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης σε πολλά διαφορετικά κυτταρικά μονοπάτια. Μια πληθώρα κατηγοριών μικρών ρυθμιστικών RNA έχουν ταυτοποιηθεί τα τελευταία χρόνια, με τα miRNAs, τα piRNAs και τα siRNAs να είναι οι πιο διεξοδικά διερευνημένες κατηγορίες. Αναφορικά με τα μεγάλα ncRNAs, ένας ταχέως αυξανόμενος αριθμός lncRNAs έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζουν κρίσιμους ρόλους σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες, όπως ο επιγενετικός έλεγχος της χρωματίνης, η ρύθμιση γονιδίων με συγκεκριμένους υποκινητές, η σταθερότητα του mRNA και η αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα γραμμικά (lncRNA) και τα κυκλικά μη κωδικά μόρια (circRNA) που αποτελούν αντικείμενο μελέτης της εργασίας αυτής [29].

Πρόκειται για μονόκλιωνα κυκλικά μόρια RNA, τα οποία προκύπτουν μέσω της οπίσθιας συρραφής (back-splicing) που καταλύεται από το σωματίο συρραφής. Σε αντίθεση με την κανονική συρραφή η οποία αναλύθηκε πιο πάνω, ο μηχανισμός αυτός απαιτεί μια 5' θέση δότης ενός εσωνίου να προσβάλει μια 3' θέση δέκτη ενός ανοδικού εσωνίου. Έτσι, προκύπτουν δομές που σχηματίζουν ένα ομοιοπολικό κλειστό κύκλο με την συνένωση των 5' και 3' άκρων μέσω ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού. Τα κυκλικά μόρια RNA βρέθηκαν για πρώτη φορά σε RNA ιούς την δεκαετία του 1970, εξαιτίας όμως των χαμηλών επιπέδων έκφρασης τους, θεωρήθηκαν παραπροϊόντα ανώμαλης συρραφής πρόδρομων μορίων mRNA με ελάχιστες λειτουργικές δυνατότητες. Ωστόσο, με την ανάπτυξη της αλληλούχισης RNA καθώς και της βιοπληροφορικής ανάλυσης, ανακαλύφθηκαν χιλιάδες κυκλικά RNA σε όλα τα είδη και το ενδιαφέρον για την μελέτη αυτών από την επιστημονική κοινότητα αυξήθηκε. Καθώς από τα κυκλικά απουσιάζει από το 5' άκρο η καλύπτρα και από το 3' άκρο η ουρά, εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, για αυτό σε αντιπαράθεση με τα γραμμικά μόρια, θεωρούνται

περισσότερο σταθερά [30]. Παρότι οι λειτουργίες των περισσότερων κυκλικών είναι ακόμα άγνωστες, ένας επιλεγμένος αριθμός κυκλικών είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην γονιδιακή έκφραση δεσμεύοντας *microRNAs*, έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν πρωτεΐνες, ενώ μερικά φαίνεται πως μπορούν να μεταφραστούν [31]. Επίσης, ορισμένα *circRNA* μπορούν να εξαχθούν στον εξωκυτταρικό χώρο μέσω εξωσωμάτων, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στη διακυτταρική επικοινωνία. Επί του παρόντος, τα συγκεκριμένα μόρια έχουν αναδειχθεί ως τα πιο ενδιαφέροντα μόρια λόγω της υψηλής αφθονίας και σταθερότητας στα κύτταρα θηλαστικών. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση τους αλλάζει κατά την ανάπτυξη, και κατά την έναρξη και την πρόοδο πολλών ανθρωπίνων ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος, νευρολογικές ασθένειες και καρδιαγγειακές. Επιπλέον, εκφράζονται σε ένα μεγάλο εύρος ιστών, εμφανίζοντας ειδικά μοτίβα έκφρασης για κάθε ιστό και είναι εξελικτικά συντηρημένα σε πολλούς οργανισμούς. Τα χαρακτηριστικά αυτά προσδίδουν στα *circRNA* μεγάλες δυνατότητες να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες για ασθένειες. Συγκεκριμένα, λόγω της εξαιρετικής σταθερότητάς τους και της υψηλής αφθονίας τους σε σωματικά υγρά και σε κυκλοφορούντα εξωκυτταρικά κυστίδια, θεωρούνται ως υποσχόμενοι υποψήφιοι βιοδείκτες για υγρή βιοψία κλινικών δειγμάτων όπως πλήρες αίμα, ορός, σάλιο, ούρα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Επιπλέον, σε σύγκριση με άλλους νέους βιοδείκτες RNA όπως τα *miRNAs* και τα *lincRNAs*, τα *circRNA* έχουν πλεονεκτήματα όπως μεγαλύτερη ημιζωή στο αίμα και καλύτερη διατήρηση μεταξύ των ειδών, τα οποία τα καθιστούν ευνοϊκούς υποψήφιους βιοδείκτες [30], [32], [33].

7.1. Κατηγοριοποίηση των κυκλικών μορίων RNA

Τα κυκλικά RNA χωρίζονται σε 4 κατηγορίες σύμφωνα με την δομή τους και καθεμία δημιουργείται μέσω ενός διακριτού μηχανισμού κυκλοποίησης οι οποίοι θα αναλυθούν στην συνέχεια [34]. Συγκεκριμένα υπάρχουν τα *EcircRNA* (*Exonic circRNA*), τα οποία περιέχουν μόνο αλληλουχίες εξονίων από τα πρόδρομα mRNA και αποτελούν την πιο μελετημένη κατηγορία κυκλικών. Είναι άφθονα μεταξύ των μεταγράφων στα θηλαστικά αντιπροσωπεύοντας περισσότερο από το 80% όλων των κυκλικών RNA [35]. Επιπλέον, υπάρχουν τα *ciRNAs* (*circular intronic RNA*) που περιέχουν μόνο εσωνιακές αλληλουχίες. Συχνά εντοπίζονται στον πυρήνα και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων από τα οποία

προήλθαν. Άλλη κατηγορία κυκλικών αποτελούν τα EICI RNAs (Exonic Intronic circRNA) τα οποία συνίστανται τόσο από αλληλουχίες εξωνίων όσο και από αλληλουχίες εσωνίων. Όπως τα ciRNAs έτσι και τα συγκεκριμένα εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα ρυθμίζοντας την έκφραση των γονιδίων προέλευσης. Τέλος, υπάρχουν και τα κυκλικά που προέρχονται κατά την συρραφή πρόδρομων tRNA, τα tricRNAs (tRNA-intronic circRNA) η βιογένεση των οποίων απαιτεί πολύ διατηρημένα μοτίβα αλληλουχίας tRNA και ένζυμα επεξεργασίας, αν και ο ακριβής μηχανισμός κυκλοποίησης τους είναι ακόμη ασαφής [33], [36].

7.2. Μηχανισμοί βιογένεσης των κυκλικών μορίων RNA

Τα κυκλικά RNA πιστεύεται γενικά ότι προέρχονται από τις ίδιες θέσεις συρραφής οι οποίες συμμετέχουν στην κανονική συρραφή πρόδρομων μορίων mRNA μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται οπίσθια συρραφή όταν το 3' άκρο (donor site) ενός εξωνίου συνδέεται απευθείας με το 5' άκρο (acceptor site) ενός ανοδικού εξωνίου. Το σημείο σύνδεσης των δύο εξωνίων, the back-spliced junction όπως ονομάζεται, αποτελεί μοναδικό χαρακτηριστικό των κυκλικών και κατέχει σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση και ανάλυση της λειτουργίας αυτών [37]. Ο μηχανισμός με τον οποίο το σωματίο συρραφής επιλέγει ορισμένα εξώνια για κυκλοποίηση δεν είναι πλήρως κατανοητός, αλλά απαιτεί τα εσώνια που βρίσκονται πλευρικά των εξωνίων που πρόκειται να κυκλοποιηθούν να έρθουν σε κοντινή απόσταση. Τρεις μηχανισμοί είναι γνωστοί για την επίτευξη του σταδίου αυτού (Εικόνα 6) [32].

Σύμφωνα με τον πρώτο μηχανισμό βιογένεσης, γνωστός ως παράλειψη εξωνίων (exon skipping) ή κυκλοποίηση μέσω «λάσου» (lariat-driven circularization), κατά τη διάρκεια της μεταγραφής ενός pre-mRNA, αυτό διπλώνει μερικώς διευκολύνοντας την επίθεση μίας 5' θέσης δότης ενός ανοδικού ιντρονίου προς μία 3' θέση δέκτη ενός καθοδικού ιντρονίου, οδηγώντας στο σχηματισμό μιας δομής σχήματος «λάσου» που περιέχει τα εξώνια που παραλείφθηκαν (skipped exon). Αυτός ο μηχανισμός έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός κυκλικού στο οποίο τα εσώνια που βρίσκονται στην δομή «λάσου» αποκόπτονται από το σωματίο συρραφής, οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό ενός exonic circular RNA (EcircRNA). Παράλληλα από τα υπόλοιπα εξώνια προκύπτει και ένα γραμμικό μετάγραφο [37], [38].

Ένας δεύτερος μηχανισμός βιογένεσης είναι η κυκλοποίηση μέσω ζευγαρώματος εσωνίων (intron pairing-driven circularization) ή μηχανισμός άμεσης οπισθοσυρραφής (direct back-splicing mechanism). Στην περίπτωση αυτή, η οπίσθια συρραφή προωθείται από την παρουσία αντίστροφων συμπληρωματικών αλληλουχιών (κυρίως Alu αλληλουχίες) εκατέρωθεν κάποιων εξωνίων. Το ζευγάριμα αυτών φέρνει κοντά τις θέσεις δότη και δέκτη με αποτέλεσμα την πραγματοποίηση του μηχανισμού οπισθοσυρραφής [37]. Μεγαλύτερες συμπληρωματικές αλληλουχίες γενικά έχουν ισχυρότερες δυνάμεις ζεύξης RNA και ενισχυμένη βιογένεση κυκλικών από τις μικρότερες αλληλουχίες. Ωστόσο, αλληλουχίες τόσο μικρές όσο 30 νουκλεοτίδια έχουν επίσης την ικανότητα να διεγείρουν την παραγωγή αυτών [39]. Αποτέλεσμα αυτού του τύπου βιοσύνθεσης αποτελεί η δημιουργία Exonic Intronic circRNA (EiCiRNA) στην περίπτωση που τα εσώνια διατηρηθούν, εντούτοις μπορεί να ακολουθήσει αφαίρεση των εσωνίων μέσω συρραφής οπότε να προκύψουν Exonic circular RNA (EcircRNA).

Παράλληλα, είναι δυνατό να σχηματιστούν και κυκλικά που περιέχουν μόνο εσωνιακές αλληλουχίες. Κατά την διάρκεια συρραφής ενός πρόδρομο mRNA απελευθερώνεται ένας εσωνιακός βρόγχος. Αλληλουχίες πλούσιες σε GU στο 5' σημείο συρραφής μερικός συμπληρωματικές σε πλούσιες σε C αλληλουχίες κοντά στο σημείο διακλάδωσης στη 3' θέση συρραφής είναι συνήθως αρκετές, ώστε ένα «λάσο» εσωνίου να αποφύγει την αποικοδόμησή του. Η αφαίρεση του 3' άκρου πέραν από το σημείο διακλάδωσης ή διαφορετικά της ουράς που περισσεύει οδηγεί τελικά στη δημιουργία ενός circular intronic circRNA.

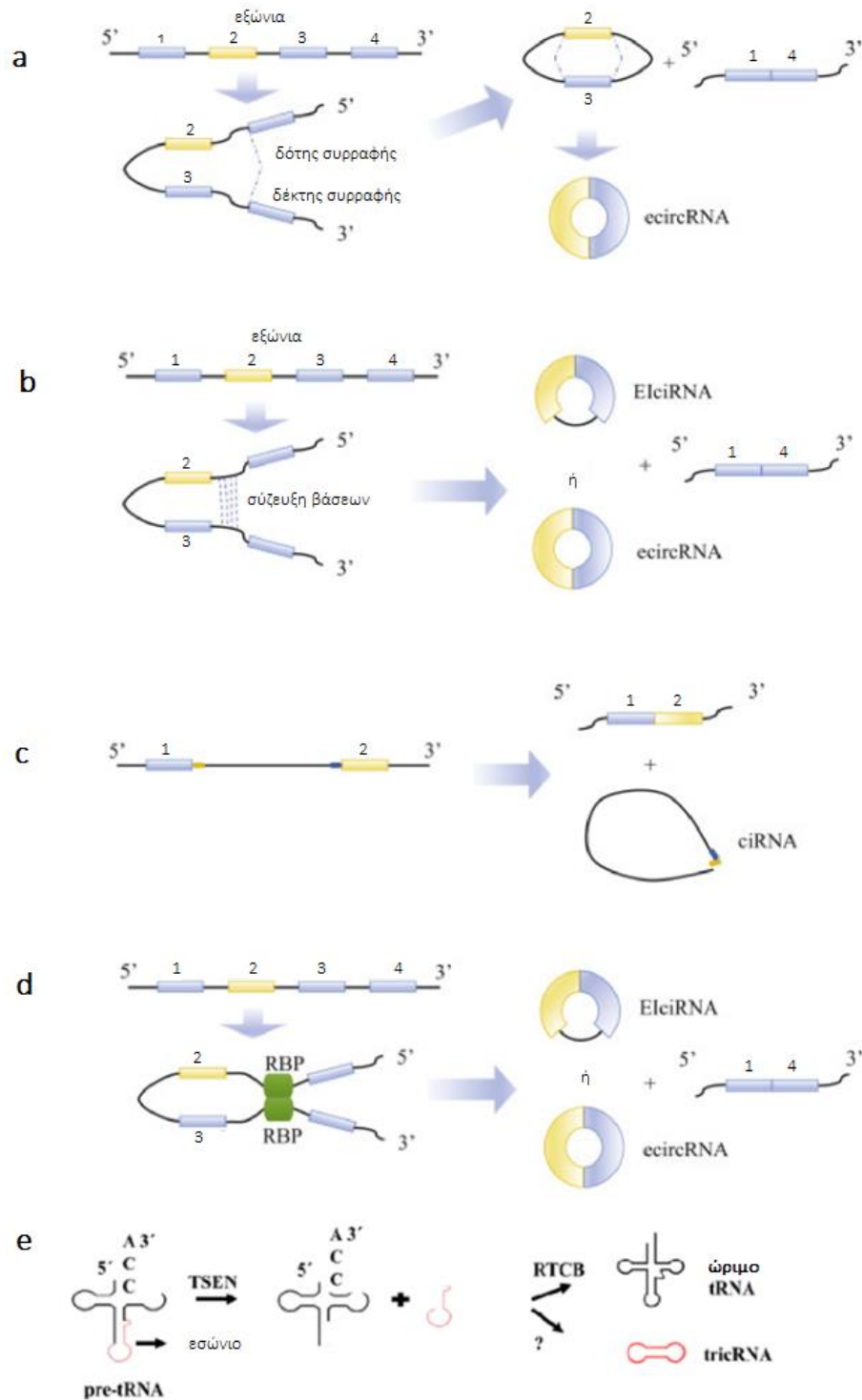
Η παρατήρηση ότι οι πρωτεΐνες με ικανότητα δέσμευσης του RNA (RBPs) είναι ικανές να ρυθμίσουν την βιογένεση κυκλικών RNA οδήγησε στην ανάπτυξη του τρίτου μηχανισμού βιογένεσης ο οποίος ονομάζεται κυκλοποίηση μέσω πρόσδεσης πρωτεϊνών στο RNA (RNA binding proteins (RBPs)-driven circularization). Οι RBPs αναγνωρίζουν και δεσμεύονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες που βρίσκονται στα εσώνια εκατέρωθεν των εξωνίων και μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης ή μέσω του διμερισμού τους, φέρνουν κοντά τις θέσεις συρραφής δότη και δέκτη, με αποτέλεσμα να λαμβάνει χώρα ο μηχανισμός της οπισθοσυρραφής. Με αυτό το τρόπο, προκύπτουν Exonic Intronic circRNA (EiCiRNA), αλλά και Exonic circular RNA (EcircRNA). Μέχρι στιγμής, τρεις παράγοντες έχουν αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν την παραγωγή κυκλικών, μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Αρχικά η RBP Muscleblind (MBL) αποτελεί ένα συντηρημένο ρυθμιστή της συρραφής του RNA η οποία εντοπίστηκε αρχικά στην *Drosophila* [40]. Ειδικότερα, η πρωτεΐνη MBL μπορεί να συνδεθεί και στα εσώνια που πλευρίζουν

το εξώνιο που θα αποτελέσει το circMbl καθώς και σε αρκετές θέσεις δέσμησης στο circMbl, ρυθμίζοντας τη δημιουργία τόσο του γραμμικού μεταγραφου mbl mRNA όσο και του κυκλικού. Άλλο παράδειγμα τέτοιου παράγοντα αποτελεί η QKI (Quaking homolog KH domain RNA-binding protein) όπου συνδέεται με τις εσωνιακές περιοχές, σχηματίζει διμερή διευκολύνοντας το ζευγάρι των συμπληρωματικών αλληλουχιών, οδηγώντας στη κυκλοποίησή τους και τη παραγωγή των circRNA κατά τον επιθηλιακό-μεσεγχυματικό μετασχηματισμό των κυττάρων [39]. Μέχρι τώρα, οι RBPs που περιγράφηκαν δρουν σαν ενεργοποιητές της δημιουργίας κυκλικών ωστόσο, υπάρχει και η αντίθετη περίπτωση. Το ένζυμο ADAR (double-stranded RNA (dsRNA)-specific adenosine deaminase), μια απαμινάση αδενοσίνης μετατρέπει την αδενοσίνη (A) σε ινοσίνη (I) και έχει κομβικό ρόλο στις τροποποιήσεις του RNA (RNA editing). Η μετατροπή αυτή έχει σαν συνέπεια την διάσπαση των δευτεροταγών δομών που σχηματίζονται μεταξύ συμπληρωματικών εσωνιακών περιοχών εκατέρωθεν των εξωνίων. Έτσι μειώνεται ο βαθμός συμπληρωματικότητας και αποτρέπεται ο σχηματισμός κυκλικών [40].

Οι μηχανισμοί που περιγράφηκαν πιο πάνω, απαιτούν ένα πρόδρομο mRNA σαν πρότυπο. Εντούτοις, πρόσφατη μεταγραφική ανάλυση σε μετάζωα έδειξε ότι τα κυκλικά RNA μπορεί να προκύψουν, επίσης, από μεταφορικά RNA (tRNA) (Εικόνα 6, e) [38]. Πιο συγκεκριμένα, η ενδονουκλεάση συρραφής των tna (TSEN) εμπλέκεται στον μηχανισμό αυτό διασπώντας ένα προ-tRNA που περιέχει ένα εσώνιο το οποίο στη συνέχεια συνδέεται για να σχηματίσει έναν κύκλο δημιουργώντας τελικά ένα εσωνιακό κυκλικό RNA (tricRNA). Ο ακριβής μηχανισμός της βιοσύνθεσης και η πιθανή κυτταρική λειτουργία των tricRNA χρειάζονται περαιτέρω διευκρίνιση [35], [36].

Επιπλέον, σε επίπεδο μεμονωμένου γονιδίου, έχει βρεθεί ότι ένας γενετικός τύπος μπορεί να παράγει πολλαπλά circRNA μέσω μηχανισμών που σχετίζονται με την εναλλακτική οπίσθια συρραφή και την εναλλακτική επιλογή θέσεων συρραφής. Η εναλλακτική οπίσθια συρραφή χρησιμοποιεί επιλεκτικά διαφορετικές θέσεις δότη και δέκτη οδηγώντας σε εναλλακτικές επιλογές για την πραγματοποίηση της οπίσθιας συρραφής και τελικά την δημιουργία πολλαπλών κυκλικών από ένα γονιδιακό τόπο. Τέσσερις από τους πέντε διαφορετικούς τρόπους πραγματοποίησης της εναλλακτικής συρραφής που έχουν αναλυθεί πιο πάνω έχουν βρεθεί στα κυκλικά: παράλειψη εξωνίου, διατήρηση εσωνίου, εναλλακτική 5' και 3' θέσης συρραφής [41]. Ωστόσο, η εναλλακτική

οπίσθια συρραφή είναι μια περίπλοκη διαδικασία, στην οποία εμπλέκονται και οι πρωτεΐνες RBPs [38].



Εικόνα 6: Πιθανά μοντέλα βιογένεσης κυκλικών μορίων RNA. Παρουσιάζονται τα πιθανά μοντέλα βιογένεσης των κυκλικών μορίων RNA. Στο a, φαίνεται το μοντέλο παράλειψης εξωνίων (exon skipping) ή κυκλοποίηση μέσω «λάσου» (lariat-driven circularization) όπου το πρόδρομο μόριο mRNA, πριν ξεκινήσει η διαδικασία της συρραφής, διπλώνει, με αποτέλεσμα μια 5' θέση δότης (donor site) ενός ανοδικού εσωνίου να προσβάλλει μια 3' θέση δέκτη (acceptor site) ενός καθοδικού εσωνίου. Έτσι, προκύπτει μια δομή «λάσου» που περιέχει το εξώνιο 2 και 3 και ένα γραμμικό προϊόν αποτελούμενο από τα εναπομείναντα εξώνια 1 και 4. Στην συνέχεια τα εσώνια από το «λάσο» αφαιρούνται για να σχηματιστεί ένα ecircRNA (εξωνικό circRNA). Στο b, παρουσιάζεται το μοντέλο της κυκλοποίησης μέσω ζευγαρώματος εσωνίων (intron pairing-driven circularization) ή μηχανισμός άμεσης οπισθοσυρραφής (direct back-splicing mechanism) όπου η άμεση σύζευξη συμπληρωματικών αλληλουχιών (όπως στοιχεία Alu) εκατέρωθεν εξωνίων σχηματίζει μια κυκλική δομή και ένα γραμμικό προϊόν. Τα εσώνια αφαιρούνται ή διατηρούνται σχηματίζοντας ένα ecircRNA ή ένα EIciRNA (circRNA εξωνίου-ιντρονίου) αντίστοιχα. Στο c, παρατηρείται το μοντέλο μετατροπής ενός εσωνιακού «λάσου» σε ciRNA, μέσω αλληλεπίδρασης των αλληλουχιών GU στο 5' σημείο συρραφής, με τις πλούσιες σε C αλληλουχίες κοντά στο σημείο διακλάδωσης στη 3' θέση συρραφής. Στο d, παρατηρείται το μοντέλο της κυκλοποίησης μέσω πρόσδεσης πρωτεϊνών στο RNA (RNA Binding Protein (RBP)-driven circularization) όπου η αλληλεπίδραση μεταξύ δύο RBP μπορούν να γεφυρώσουν δύο πλευρικά εσώνια και να σχηματίσουν ένα κυκλικό RNA και ένα γραμμικό προϊόν. Στο e, παρατηρείται η ωρίμανση των πρόδρομων σε ώριμα tRNA και η κυκλοποίηση της εσωνιακής του περιοχής (tricRNA) οδηγώντας στον σχηματισμό ενός εσωνιακού κυκλικού RNA (tricRNA). (Τροποποιημένη εικόνα από: Misir, S., N. Wu, and B.B. Yang, Specific expression and functions of circular RNAs [34]).

7.3. Λειτουργίες των κυκλικών μορίων RNA

Τα κυκλικά RNA μπορούν να εξέρχονται από τον πυρήνα και να εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα επιτελώντας και στο σημείο αυτό του κυττάρου τις διάφορες λειτουργίες τους. Αν και οι ακριβείς λειτουργίες τους δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητές, συσσωρευμένα στοιχεία προτείνουν αρκετούς ρόλους για τα κυκλικά μόρια RNA στις κυτταρικές διεργασίες. Επιγραμματικά οι γνωστοί λειτουργικοί μηχανισμοί τους περιλαμβάνουν την δράση τους σαν

σπόγγους για την πρόσδεση συγκεκριμένων μορίων microRNAs (miRNA sponges), την πρόσδεση διαφορετικών πρωτεϊνών και την λειτουργία τους ως ικρίωματα για πρωτεΐνες (protein scaffolds), την μετάφραση τους παράγοντας νέες πρωτεϊνικές ισομορφές και τέλος, την δράση τους στα επίπεδα μεταγραφής και έκφρασης των γονιδίων προέλευσής τους ή άλλων γονιδίων (Εικόνα 7) [34], [42].

Η πιο συχνά περιγραφόμενη λειτουργία των κυκλικών μορίων RNA είναι η δραστηριότητα τους σαν σπόγγοι για microRNAs (miRNA sponges). Ορισμένα circRNA περιέχουν πολλαπλές θέσεις δέσμησης miRNAs εντός της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας. Επομένως, είναι σε θέση να δεσμεύουν τα miRNAs, εμποδίζοντάς τα έτσι να προσδεθούν και εν τέλει να καταστείλουν τους καθορισμένους mRNA στόχους τους. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να λειτουργήσουν σαν ανταγωνιστικά ενδογενή RNA (ceRNA) για την ρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδίου στόχου. Αυτός αποτελεί και ο πιο μελετημένος και αποδεκτός μηχανισμός για τη ρυθμιστική λειτουργία των κυκλικών στην γονιδιακή έκφραση [40]. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να λειτουργήσουν σαν ανταγωνιστικά ενδογενή RNA (ceRNA) για την ρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδίου στόχου. Αυτός αποτελεί και ο πιο μελετημένος και αποδεκτός μηχανισμός για τη ρυθμιστική λειτουργία των κυκλικών στην γονιδιακή έκφραση. Το CDR1as (Cerebellar Degeneration Related Protein 1 antisense) είναι το πιο αντιπροσωπευτικό circRNA με λειτουργία σπόγγου. Εκφράζεται κυρίως σε νευρικά κύτταρα, όπως του νεοφλοιού και του ιπποκάμπου και περιέχει περισσότερες από 70 διατηρημένες θέσεις δέσμησης για το miR-7. Μετά από τις δημοσιεύσεις για το CDR1as το 2013, πολλά άλλα κυκλικά αποδείχθηκε ότι δρουν ως σπόγγοι για miRNAs. Χρησιμοποιώντας εργαλεία βιοπληροφορικής, οι θέσεις δέσμησης miRNA μπορούν να προβλεφθούν εντός της ακολουθίας circRNA. Άλλο παράδειγμα, αποτελεί το κυκλικό μόριο του γονιδίου Sry (Sex Determining Region Y), circ-SRY το οποίο είναι υπεύθυνο για τον προσδιορισμό του φύλου στα θηλαστικά και εκφράζεται συγκεκριμένα στους όρχεις και το οποίο έχει 16 θέσεις δέσμησης για το miR-138 [33]. Αξίζει να σημειωθεί ότι για να συμβεί το φαινόμενο του 'σπόγγου' η αφθονία του κυκλικού μορίου RNA πρέπει να ταιριάζει με την αφθονία του miRNA. Δεν φτάνει μόνο η ύπαρξη θέσεων δέσμησης για miRNA αλλά πρέπει να πληρείται και μια συγκεκριμένη στοιχειομετρική απαίτηση.

Εκτός από την δέσμηση μορίων miRNA, τα κυκλικά μόρια RNA μπορούν επίσης, να δεσμεύσουν επιλεγμένες πρωτεΐνες ρυθμίζοντας έτσι την δραστηριότητα τους καθώς και τον κυτταρικό εντοπισμό τους. Η επίδραση αυτής της πρόσδεσης για την κυτταρική ανάπτυξη ποικίλει

και εξαρτάται από την πρωτεΐνη που δεσμεύεται και από το ρόλο που αυτή επιτελεί [32]. Οι πιο γνωστές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με μόρια RNA είναι οι RBPs και η αλληλεπίδραση με τα circRNA λαμβάνει χώρα μέσω συγκεκριμένων θέσεων δέσμησης που φέρουν τα τελευταία [37]. Η σύνδεση των circRNA με πρωτεΐνες μπορεί να έχει αμφίδρομες επιδράσεις. Οι αλληλεπιδράσεις RNA-πρωτεΐνης έχει αναφερθεί ότι επηρεάζουν την έκφραση και τη λειτουργία των πρωτεϊνών, ενώ ρυθμίζουν επίσης τη σύνθεση και την αποικοδόμηση των κυκλικών μορίων RNA. Για παράδειγμα, το circRNA που προέρχεται από το RNA μετάγραφο που κωδικοποιεί τον παράγοντα συρραφής MBNL1, περιέχει πολλαπλές διατηρημένες θέσεις δέσμησης MBNL1, οι οποίες συνδέονται ισχυρά και ειδικά από αυτήν την πρωτεΐνη. Τα εσώνια που πλαισιώνουν το μοναδικό εξώνιο του MBNL1 περιέχουν επίσης θέσεις δέσμησης MBNL1, οι οποίες υπαγορεύουν τον ρυθμό κυκλοποίησης του εξωνίου με και οι οποίες εξαρτώνται από τα επίπεδα πρωτεΐνης MBNL131. Έτσι, ένα εξελιγμένο σύστημα αρνητικής ανάδρασης ελέγχει τα επίπεδα MBNL1. Όταν τα επίπεδα πρωτεΐνης MBNL1 είναι υψηλά, η παραγωγή του δικού του mRNA μειώνεται προάγοντας την παραγωγή circMBNL1. Στη συνέχεια, αυτό το circRNA μπορεί να εξαλείψει την περίσσεια πρωτεΐνης MBNL1 δεσμεύοντας την [32].

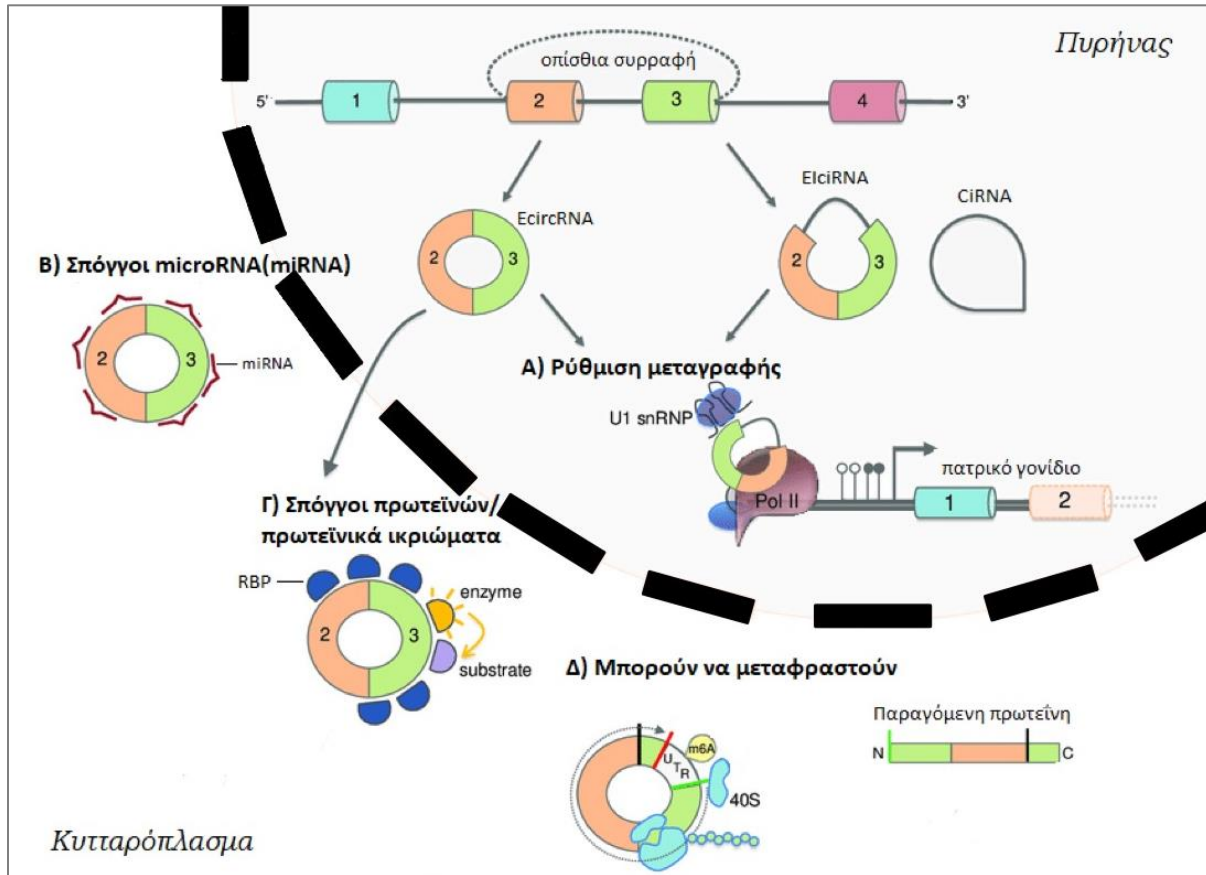
Επιπλέον, μπορούν να λειτουργήσουν σαν ικρίωματα και να διευκολύνουν την αλληλεπίδραση μεταξύ 2 ή περισσότερων πρωτεϊνών. Αυτό παρατηρείται όταν τα κυκλικά μόρια RNA φέρουν θέσεις δέσμησης για ένα ένζυμο και το υπόστρωμα του. Παράδειγμα της περίπτωσης αυτής αποτελεί το circAmotl1 το οποίο μπορεί να προσδένει τις πρωτεΐνες PDK1 (3-phosphoinositide dependent protein kinase 1) και AKT που λέγεται αλλιώς και protein kinase B (PKB). Η PDK1 φωσφορυλιώνει την AKT και η pAKT μετακινείται στον πυρήνα, όπου πιστεύεται ότι έχει προστατευτικό ρόλο για την καρδιά [34].

Εκτός από τις μη κωδικοποιητικές λειτουργίες των circRNA, οι ερευνητές έχουν επίσης διερευνήσει τη δυνατότητα τους να λειτουργούν ως πρότυπο για μετάφραση. Δεδομένου ότι, τα circRNA είναι ως επί το πλείστον κυτοσολικά και προέρχονται από εξώνια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, προέκυψε το ερώτημα εάν θα μπορούσαν να φορτωθούν σε ριβοσώματα και να μεταφραστούν σε πρωτεΐνες. Παρόλο που τα circRNA δεν διαθέτουν την τυπική καλύπτρα στο 5' άκρο και την ουρά στο 3' που απαιτούνται για την έναρξη της μετάφρασης, η μετάφραση μπορεί να προχωρήσει από μια εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος (IRES) [32]. Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι η τροποποίηση N6-μεθυλαδενοσίνης μπορεί να προάγει την έναρξη της μετάφρασης πρωτεϊνών στα ανθρώπινα κύτταρα και ένα μόνο κατάλοιπο N6-μεθυλαδενοσίνης στο circRNA

είναι αρκετό για να οδηγήσει τη μετάφραση [33]. Αν και οι φυσιολογικές λειτουργίες των περισσότερων από αυτές τις πρωτεΐνες δεν έχουν ακόμη εντοπιστεί, είναι πιθανό ότι μοιράζονται ορισμένες από τις λειτουργικές ικανότητες των πρωτεϊνών πλήρους μήκους που κωδικοποιούνται από τις γραμμικές μορφές των μεταγραφών [37]. Ένα από τα πρώτα μόρια κυκλικών μορίων RNA που βρέθηκαν ότι μεταφράζονται είναι το circZNF609. Φέρει το ίδιο κωδικόνιο έναρξης με το γραμμικό mRNA που κωδικοποιεί την πλήρη πρωτεΐνη ZNF609 (Zinc Finger Protein 609), αλλά έχει ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης που σχηματίζεται με την κυκλοποίηση. Άλλο παράδειγμα αποτελεί το circ-β-catenin, που προέρχεται από το γονίδιο της β-κατενίνης CTNNB1 (β-catenin) και κωδικοποιεί ένα μικρότερο πεπτίδιο 370 αμινοξέων [40].

Άλλη λειτουργία των κυκλικών μορίων RNA αποτελεί η ικανότητα τους να ρυθμίζουν την μεταγραφή και την εναλλακτική συρραφή στον πυρήνα. Σε αντίθεση με τα EcircRNA, τα ciRNA και EiciRNA εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα και ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων από τα οποία προέρχονται μέσω διακριτών μηχανισμών. Συγκεκριμένα, τα ciRNAs αλληλεπιδρούν με την RNA πολυμεράση II και με τον τρόπο αυτό ρυθμίζουν την μεταγραφική δραστηριότητα. Αντιθέτως, τα EiciRNAs που περιέχουν και εσωνιακές αλληλουχίες από το γονικό τους γονίδιο όπως για παράδειγμα το circEIF3J και το circPAIP2, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις μικρές πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες U1 (snRNPs) οι οποίες στη συνέχεια συνδέονται με την RNA πολυμεράση II στον υποκινητή των γονικών τους γονιδίων και έτσι ενισχύουν τη γονιδιακή έκφραση [33]. Επιπρόσθετα, στο φυτό Arabidopsis έχει αναφερθεί ότι το CircSEP3 που προέρχεται από το εξώνιο 6 του SEPALLATA3 (SEP3) ρυθμίζει την συρραφή του γραμμικού μεταγράφου του γονιδίου σχηματίζοντας ένα υβρίδιο RNA-DNA με το γονικό DNA. Αυτός ο σχηματισμός circRNA:DNA είχε ως αποτέλεσμα μεταγραφική παύση, που οδηγεί στο σχηματισμό εναλλακτικά συρραμένου SEP3 mRNA με παράλειψη εξωνίου. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι ορισμένα πυρηνικά κυκλικά μόρια RNA μπορούν να

τροποποιήσουν την γονιδιακή έκφραση τόσο σε επίπεδο μεταγραφής όσο και σε επίπεδο συρραφής [31].



Εικόνα 7: Λειτουργίες των κυκλικών μορίων RNA. a) Τα circRNA που εντοπίζονται στον πυρήνα μπορούν να λειτουργήσουν ως ρυθμιστές της μεταγραφής των πατρικών τους γονιδίων αλληλεπιδρώντας με την U1 μικρή πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη (U1 snRNP) και ενισχύοντας τη λειτουργία του συμπλέγματος RNA πολυμεράσης II (Pol II). b) Όταν εξάγονται στο κυτταρόπλασμα, τα circRNA μπορούν να λειτουργήσουν ως σπόγγος για microRNA. c) Επιπλέον μπορούν να δεσμεύσουν επιλεγμένες πρωτεΐνες, κυρίως RBP, αλλά και άλλες πρωτεΐνες λειτουργώντας με τον τρόπο αυτό σαν πρωτεϊνικά ικρίωματα, διευκολύνοντας τελικά τον εντοπισμό των ενζύμων και των υποστρωμάτων τους. Έτσι, είναι σε θέση να ενισχύουν την κινητική της αντίδρασης (κίτρινο βέλος). d) Τέλος, τα circRNA με στοιχεία εσωτερικής θέσης εισόδου ριβοσώματος (IRES) και θέσεις AUG (πράσινη γραμμή) μπορούν να μεταφραστούν (η κόκκινη γραμμή απεικονίζει το κωδικόνιο STOP). Η μετάφραση προάγεται από την παρουσία N6-

μεθυλαδενοσίνης (m6A). Η ισομορφή πρωτεΐνης που παράγεται από τη μετάφραση θα έχει μέρος της κύριας αλληλουχίας κοινό με τη γραμμική κωδικοποιημένη πρωτεΐνη, ενώ το υπόλοιπο πολυπεπίδιο είναι μοναδικό για την ισομορφή που κωδικοποιείται από το circRNA. (Τροποποιημένη εικόνα από: D'Ambra, E., D. Caputo, and M. Morlando, Exploring the Regulatory Role of Circular RNAs in Neurodegenerative Disorders [42]).

7.4. Μη κωδικά μόρια RNA και λευχαιμία

Τόσο τα μικρά όσο και τα μεγάλα ρυθμιστικά μη κωδικά RNAs έχουν ενοχοποιηθεί για πολλές διαφορετικές παθήσεις και πολλούς τύπους καρκίνου. Το 2002, μια πρωτοποριακή μελέτη των Calin και Croce εντόπισε μια σύνδεση μεταξύ των δυσρυθμισμένων miR-15a και miR-16-1 με τη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία [43]. Τα συγκεκριμένα αποτέλεσαν τα πρώτα miRNAs που συνδέθηκαν με τον καρκίνο στον άνθρωπο. Συνήθως εμφανίζουν χαμηλή έκφραση στην ΧΛΛ ως συνέπεια μιας χρωμοσωμικής διαγραφής που εντοπίζεται στο 13q14. Έχει διαπιστωθεί ότι η ΧΛΛ συχνά χαρακτηρίζεται από υψηλή έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-2, όπου η ενεργοποίηση της έκφρασης της συσχετίζεται με την απώλεια των εν λόγω microRNAs. Οι παρατηρήσεις αυτές υποστηρίζονται από το γεγονός ότι τόσο το miR-15a όσο και το miR-16-1 ρυθμίζουν αρνητικά την BCL2 σε μεταγραφικό επίπεδο, επάγοντας την απόπτωση σε λευχαιμικές κυτταρικές σειρές [43], [44].

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες ενότητες, δύο δείκτες επιθετικής μορφής ΧΛΛ περιλαμβάνουν την αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης ZAP-70 και μη μεταλλαγμένη κατάσταση γονιδίων *IGHV*. Οι δείκτες αυτοί έχουν συνδεθεί με υψηλά επίπεδα TCL1, ενός ογκογονιδίου που συνενεργοποιεί την αντι-αποπτωτική ογκοπρωτεΐνη AKT και βοηθά στα ρυθμιστικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην επιβίωση και τον θάνατο των κυττάρων. Έχει αποδειχθεί ότι το miR-29 καθώς και το miR-181 ρυθμίζουν αρνητικά την TCL1. Τα κλινικά δείγματα ΧΛΛ δείχνουν ότι η έκφραση αυτών των miRNAs σχετίζονται αντίστροφα με την έκφραση του TCL1, γεγονός που υποδηλώνει ότι θα μπορούσαν ενδεχομένως να χρησιμεύσουν ως προγνωστικοί δείκτες της εξέλιξης της νόσου. Οι Calin και συνεργάτες κατέδειξαν ότι 13 miRNAs (miR-15a, -195, -221, -23b, -155, -223, -29a, -24, -29b, -146, -16, -16-2 και -29c) θα μπορούσαν να διακρίνουν μεταξύ ασθενών που εκφράζουν ZAP-70 και μη μεταλλαγμένη μορφή *IGHV* και εκείνων που δεν

εκφράζουν ZAP-70 και εμφανίζουν μεταλλάξεις στα *IGHV* γονίδια διακρίνοντας έτσι τους επιθετική μορφή νόσου από την ήπια [45].

Εκτός από τα miRNAs, και άλλες κατηγορίες μη κωδικών μορίων έχουν μελετηθεί στην ΧΛΛ. Ένα γραμμικό μη-κωδικό RNA με σημαντικό λειτουργικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό της ΧΛΛ είναι το MIAT (myocardial infarction associated transcript). Από την ανακάλυψή του, το MIAT βρέθηκε να εκφράζεται ανώμαλα σε διάφορες ασθένειες, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου, η σχιζοφρένεια, το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, οι διαβητικές επιπλοκές, ο ηλικιακός καταρράκτης και οι καρκίνοι. Αυξημένη έκφραση του συγκεκριμένου μορίου έχει ανιχνευθεί σε κυτταρικές σειρές ώριμων Β λευχαιμικών κυττάρων και σε πρωτογενή κύτταρα της ΧΛΛ. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η υψηλή έκφραση του σε μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών σχετίζεται με δυσμενείς προγνωστικούς δείκτες, όπως κυτταρογενετικές ανωμαλίες υψηλού και ενδιάμεσου κινδύνου (del17p, del11q και τρισωμία 12) και μη μεταλλαγμένη κατάσταση *IGHV*, καθώς και με μικρότερη συνολική επιβίωση [46]. Η αυξημένη έκφραση του υποστηρίζει τον κλωνικό πολλαπλασιασμό κακοηθών Β-κυττάρων τα οποία εμφανίζουν φαινότυπο παρθένων Β-κυττάρων, προστατεύοντας από την απόπτωση και, συνεπώς, συμβάλλοντας στην εξέλιξη της νόσου [43], [44].

Αναφορικά με την κατηγορία των κυκλικών μορίων RNA, εκφράζονται σε ένα εύρος πληθυσμών κυττάρων του αίματος, με έκφραση ειδική για τον τύπο του κυττάρου και το στάδιο διαφοροποίησης καθιστώντας τα εν λόγω κυκλικά ως δυνητικούς ρυθμιστές της αιμοποίησης. Μία από τις πρώτες μελέτες που περιέγραψαν τα circRNA στην αιμοποίηση δημοσιεύθηκε το 1998 από τους Caldas και συνεργάτες, στην οποία εισήγαγαν την ωρίμανση του γονιδίου *MLL*, ενός συχνά αναδιαταγμένου γονιδίου σε μια ποικιλία αιματολογικών κακοηθειών, το οποίο εμπλέκεται σε μια πολύπλοκη διαδικασία που έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό circRNA τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε λευχαιμικά κύτταρα. Η έρευνα σχετικά με τα circRNA που σχετίζονται με την αιμοποίηση έχει αυξηθεί ραγδαία από τότε που εμφανίστηκε η τεχνική αλληλούχισης νέας γενιάς (New Generation Sequencing, NGS) και ο κατάλογος αυτών των circRNA έχει επεκταθεί δραματικά [46]. Μεταξύ των διαφορετικών τύπων κυττάρων του αίματος η ποικιλομορφία των circRNA ποικίλλει. Για παράδειγμα, το circ-BACH1 εκφράζεται κατά προτίμηση σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, το circ-FNDC3B σε κύτταρα φυσικούς φονείς (NK), τα circ-MYBL1 και circ-SLFN12L σε T-λεμφοκύτταρα κύτταρα και NK κύτταρα, τα circ-AKT3 και circ CCDC91 σε λεμφοειδή κύτταρα, και το circ BACH1 στα μονοκύτταρα. Παραδόξως, τα circRNA είναι πιο

εμπλουτισμένα σε διεγερμένα κύτταρα, αιμοπετάλια και ερυθρά αιμοσφαίρια από ότι σε άλλα αιμοποιητικά κύτταρα, ωστόσο, οι μηχανισμοί του τρόπου με τον οποίο τα circRNA ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση, την ωρίμανση και τις λειτουργίες των αιμοποιητικών κυττάρων δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί [47].

Τα CircRNA συμμετέχουν ενεργά σε βασικές φυσιολογικές και κυτταρικές διαδικασίες όπως η αυτοανανέωση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση σε αυτούς τους διαφορετικούς τύπους κυττάρων του αίματος. Εκτός από το ρόλο τους στις φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχει σχέση μεταξύ της τροποποιημένης έκφρασης των κυκλικών μορίων και της κακοήθους αιμοποίησης. Αυξημένα στοιχεία δείχνουν ότι τα circRNA μπορεί να εμπλέκονται στο λευχαιμικό μετασχηματισμό κυρίως μέσω της ικανότητας τους να δεσμεύσουν συγκεκριμένα miRNAs και κατά συνέπεια να ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση. Σε πολλές κακοήθεις καταστάσεις τα miRNAs είναι κρίσιμοι ρυθμιστές στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση και στην ενεργοποίηση των μεταγενέστερων σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με τη μετανάστευση, διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό, όπως για παράδειγμα συμβαίνει στην οξεία μυελογενής λευχαιμία. Έτσι, απορυθμισμένη έκφραση των επιπέδων αυτών μπορεί να διαταράξει την φυσιολογική αιμοποίηση και να οδηγήσει σε λευχαιμία. Επιπλέον, τα circRNA είναι σε θέση να επάγουν μετασχηματισμό της λευχαιμίας μέσω της ικανότητας τους να δεσμεύουν πρωτεΐνες με ικανότητα δέσμευσης του RNA (RBPs) είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω των αλληλεπιδράσεων circRNA-miRNA-RBP, δεδομένου ότι οι RBPs εμπλέκονται επίσης σε βιολογικές διεργασίες όπως η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου [46].

Στην συνέχεια, παρουσιάζονται κάποια παραδείγματα circRNA που φαίνεται ότι έχουν σημαντικό ρόλο στους 4 κύριους τύπους λευχαιμίας, με έμφαση στην ΧΛΛ που αποτελεί αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

7.4.1. Κυκλικά μόρια RNA στην οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ)

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ) είναι η πιο συχνή οξεία λευχαιμία στους ενήλικες και χαρακτηρίζεται από την ταχεία ανάπτυξη μη φυσιολογικών και ανώριμων λευκών αιμοσφαιρίων, αναστέλλοντας την παραγωγή φυσιολογικών αιμοποιητικών κυττάρων στο μυελό

των οστών [48]. Ο Wu και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι το επίπεδο έκφρασης του circRNA-DLEU2 σε λευχαιμικά κύτταρα σε ασθενείς με OML είναι σημαντικά υψηλότερο από αυτό των υγιών μαρτύρων. Το circRNA DLEU2 βρέθηκε να συμμετέχει στην ανάπτυξη της OML δεσμεύοντας το miR-496 και ανακουφίζοντας το miR-496 από την αναστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης PRKACB. Έτσι, προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της OML, ενώ παράλληλα προκαλεί την αναστολή της κυτταρικής απόπτωσης. Ομοίως, το circ_0009c910 το οποίο προέρχεται από το δεύτερο και το τρίτο εξώνιο του γονιδίου Mito-fusin-2 (*MFN2*), βρέθηκε σημαντικά αυξημένο σε δείγματα μυελού των οστών. Το circ_0009910 δρα ως σφουγγάρι miRNA για να ρυθμίζει αρνητικά το miR-20a 5p, προάγοντας την ανάπτυξη των κυττάρων και καταστέλλοντας την κυτταρική απόπτωση [49].

7.4.2. Κυκλικά μόρια RNA στην χρόνια μυελογενής λευχαιμία (ΧΜΛ)

Η αυξημένη ή μειωμένη έκφραση των circRNA παίζει σημαντικό ρόλο στην αξιολόγηση της πρόγνωσης, της παθογένειας και της αντοχής στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα της ΧΜΛ [50]. Η ΧΜΛ χαρακτηρίζεται από το γονίδιο σύντηξης BCR-ABL1, το οποίο έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με το circ-BA9.3. Αποκαλύφθηκε από τους Pan και συναργάτες ότι το circBA9.3 θα μπορούσε να διευκολύνει αποτελεσματικά την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων καταστέλλοντας την απόπτωση. Το circBA9.3 εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και αυξάνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης BCR-ABL1. Ως εκ τούτου, το circBA9.3 συνδέθηκε με αυξημένη δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης, η οποία προωθεί την αντίσταση στη θεραπεία με αναστολέα τυροσινικής κινάσης. Επιπλέον, το Hsa_circ_0080145, αποτελεί το πιο διαφορετικά εκφρασμένο circRNA στη ΧΜΛ. Ο Liu και οι συνεργάτες του υπέδειξαν ότι το hsa_circ_0080145 λειτουργεί ως σφουγγάρι για την δέσμευση του miR-29b ευνοώντας τον πολλαπλασιασμό της ΧΜΛ. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι ο hsa_circ_0080145 θα μπορούσε να είναι ένας πολλά υποσχόμενος βιοδείκτης για τη θεραπεία της νόσου [35], [51].

7.4.3. Κυκλικά μόρια RNA στην οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΟΛΛ)

Η οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΟΛΛ) είναι ο πιο συχνός καρκίνος μεταξύ των παιδιών στις ΗΠΑ και η πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο στους νέους. Ο Hu και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι η απορρύθμιση του circPVT1 προώθησε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ανέστειλε την απόπτωση σε λευχαιμικές κυτταρικές σειρές, δρώντας σαν σφουγγάρι και δεσμεύοντας τα miR-125 και let-7, αυξάνοντας τελικά την έκφραση του ογκογονιδίου *MYC* και της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-2. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι το circPVT1 ρυθμίζει τη λειτουργία των μελών της οικογένειας let-7 που λειτουργούν ως καταστολείς όγκου. Εν ολίγοις, παρεμβαίνοντας στη λειτουργία let-7, το circPVT1 προτάθηκε για την προώθηση της λευκογένεσης [48]. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι τα circRNA που προέρχονται από γονίδια που σχετίζονται με την ΟΛΛ και με τη διαφοροποίηση Β-κυττάρων (*JAK2*, *PAX5*, *IKZF1*, *ETV6* και *EBF1*) είναι ευρέως παρόντα σε λευχαιμικά κύτταρα.

7.4.4. Κυκλικά μόρια RNA στην χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ)

Μέχρι σήμερα, τρία κύρια circRNA έχουν μελετηθεί στη ΧΛΛ: circRPL15, circCBFB και circ_0132266. Το CircRPL15 αξιολογήθηκε ως πιθανός βιοδείκτης για τον διαγνωστικό έλεγχο στο πλάσμα ασθενών με ΧΛΛ, ειδικά σε περιπτώσεις χωρίς μετάλλαξη γονιδίων *IGHV*. Το αυξανόμενο εκφρασμένο circRPL15 προτάθηκε ότι δεσμεύει το miR-146b-3p, αυξάνοντας έτσι τα επίπεδα πρωτεΐνης RAF1. Ως τελεστής του πολλαπλασιαστικού μονοπατιού RAS, το RAF1 θα μπορούσε με τη σειρά του να φωσφορυλιώσει και έτσι να ενεργοποιήσει τη σηματοδότηση MAPK (ενεργοποιημένη από μιτογόνο πρωτεΐνη κινάση), προάγοντας την κυτταρική ανάπτυξη. Προς υποστήριξη αυτού του παραδείγματος, η αποσιώπηση του circRPL15 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, μείωσε τη φωσφορυλίωση των μιτογόνων παραγόντων και επιπλέον, μια προηγούμενη μελέτη από τους Wang και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι το RAF1 υπερεκφραζόταν σε περιπτώσεις ΧΛΛ [48].

Σε μια άλλη μελέτη, ο Xia και οι ομάδα του ανέφεραν ότι το circ-CBFB (hsa_circ_0000707) υπερεκφράζεται σημαντικά στη ΧΛΛ σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες.

Επιπλέον, το circ-CBFB ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση των κυττάρων της ΧΛΛ. Η υψηλή έκφραση του εν λόγω κυκλικού αποτελεί ένα ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα. Μηχανιστικά, ενεργεί ως σφουγγάρι για το miR-607 και προκαλεί αυξημένη έκφραση του καταρροϊκού στόχου FZD3, ρυθμίζοντας έτσι την ενεργοποίηση της οδού Wnt/ β -κατενίνης, η οποία έχει θετική σχέση με την εξέλιξη της νόσου. Συνολικά, το σηματοδοτικό μονοπάτι που σχετίζεται με το circ-CBFB παίζει ζωτικό ρόλο στην εξέλιξη των κυττάρων της ΧΛΛ και το καθιστά πιθανό θεραπευτικό στόχο [35], [51].

Αναφορικά με το circ_0132266, ο Wu και οι συνεργάτες του πρότειναν έναν ογκοκατασταλτικό ρόλο για το circ_0132266 βάση της ικανότητας του να δεσμεύει το miR-337-3p σε κυτταρικές σειρές ΧΛΛ. Η PML (πρωτεΐνη προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας), ένας ευρύς ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης και της κυτταρικής βιωσιμότητας, αποτελεί βασικό στόχο του miR-337-3p. Οι συγγραφείς συνέδεσαν τη μείωση των επιπέδων circ_0132266 με τα αυξημένα επίπεδα miR-337-3p και πρότειναν ότι με τη δέσμευση του miR-337-3p, το circ_0132266 μπορεί να είναι κατασταλτικό του όγκου [36], [48], [50].

8. *Πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί*

Προκειμένου να είναι λειτουργικά ενεργή, μια πρωτεΐνη πρέπει να αποκτήσει μια μοναδική τρισδιάστατη διαμόρφωση μέσω μιας περίπλοκης πορείας αναδίπλωσης, η οποία περιγράφεται από την πρωτογενή αλληλουχία αμινοξέων και το τοπικό κυτταρικό περιβάλλον. Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών είναι ζωτικής σημασίας για έναν ζωντανό οργανισμό. Ένα μικρό σφάλμα στη διαδικασία αναδίπλωσης έχει ως αποτέλεσμα μια λανθασμένη τρισδιάστατη δομή, η οποία μπορεί μερικές φορές να είναι θανατηφόρα. Μέσα στο κυτταρικό περιβάλλον ειδικές πρωτεΐνες, γνωστές ως μοριακοί συνοδοί έχουν ως κύρια λειτουργία την διευκόλυνση της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών καθώς, δεν έχουν όλες οι πρωτεΐνες την ικανότητα να αναδιπλωθούν αυθόρμητα. Είναι παρόντες σε όλους τους οργανισμούς, βρίσκονται σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα και έχουν την ικανότητα να διακρίνουν τις ορθά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες από αυτές που δεν έχουν την σωστή διαμόρφωση [52]. Αποτελούν προϊόντα διακριτών, ιδιαίτερα συντηρημένων γονιδιακών οικογενειών και ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες με βάση τις μοριακές τους μάζες, την κυτταρική κατανομή και λειτουργία. Στις κύριες κατηγορίες ανήκουν οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ

(Heat Shock Proteins , HSPs) οι οποίες επάγονται ως απόκριση στο κυτταρικό στρες, συμπεριλαμβανομένου του θερμικού σοκ. Σχηματίζουν υψηλής μοριακής μάζας δακτυλιοειδείς πρωτεϊνικά σύμπλοκα και χωρίζονται περαιτέρω σε οικογένειες με βάση το μοριακό τους βάρος, όπως οι Hsp60, Hsp70, Hsp90 και Hsp100. Επιπλέον, υπάρχει η οικογένεια μοριακών συνοδών που ονομάζονται 'chaperonins' και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τις αλληλουχίες τους είτε στην ομάδα I είτε στην ομάδα είτε στην ομάδα II.

Πρόκειται για μεγάλα σύμπλοκα, με μέγεθος περίπου 1 MDa που ορίζονται από μια δομή που αποτελείται από δύο στοιβαγμένους δακτυλίους των 7-9 υπομονάδων ο καθένας, με ένα θάλαμο αναδίπλωσης πρωτεϊνών στο κέντρο κάθε δακτυλίου. Αυτές οι υπομονάδες μπορεί να είναι πανομοιότυπες ή ομόλογες ανάλογα με το είδος. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από τρεις περιοχές: την ακραία περιοχή, η οποία αναγνωρίζει και δεσμεύει υποστρώματα, την ισημερινή περιοχή, η οποία δεσμεύει ATP και σχηματίζει τις επαφές μεταξύ των δακτυλίων, και μια ενδιάμεση περιοχή, η οποία μεταφέρει πληροφορίες διαμόρφωσης μεταξύ των άλλων δύο. Οι chaperonins της ομάδας I απαντώνται στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και σε οργανίδια προκαρυωτικής προέλευσης. Οι δακτύλιοι τους σχηματίζονται από 7 πανομοιότυπες υπομονάδες και απαιτούν την Hsp10 σαν συμπράγοντα για την λειτουργία τους. Το εκτενώς μελετημένο σύστημα GroEL/ES στα βακτήρια ανήκει σε αυτή την ομάδα. Οι chaperonins που απαντώνται στα αρχαία και στους ευκαρυώτες αποτελούν την ομάδα II και σε αντίθεση με την πρώτη περίπτωση, οι δακτύλιοι τους αποτελούνται από 8 ή 9 υπομονάδες και επιπλέον δεν απαιτούν πρόσθετο συμπράγοντα. Στην ομάδα αυτή ανήκει η κυτοσολική μοριακή συνοδός CCT, η όποια θα αναλυθεί εκτενέστερα στην συνέχεια [53], [54], [55].

Μη διπλωμένα πολυπεπτίδια παράγονται κατά την διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης κατά την σύνθεση των πρωτεϊνών, ενώ οι λανθασμένα διπλωμένες πρωτεΐνες προκύπτουν ως συνέπεια κυτταρικών καταπονήσεων, όπως το θερμικό σοκ, το οξειδωτικό στρες, καθώς και παθολογικές καταστάσεις. Οι μοριακοί συνοδοί βοηθούν στην αναδίπλωση τόσο των μη διπλωμένων όσο και των λανθασμένα διπλωμένων πολυπεπτιδίων μέσω της σταθεροποίησης των ενδιάμεσων προϊόντων αναδίπλωσης, της αποτροπής της λανθασμένης αναδίπλωσης και της αποτροπής της συσσωμάτωσης. Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες που δεν φέρουν την σωστή αναδίπλωση τείνουν να σχηματίζουν συσσωματώματα τα οποία αποτελούν την βάση πολλών ασθενειών. Ορισμένοι μοριακοί συνοδοί είναι σε θέση να παρέχουν προστασία απέναντι στην συσσωμάτωση αποτρέποντας να συμβεί, ενώ άλλα συστήματα συνοδών αντιστρέφουν τη διαδικασία

συσσώρευσης διαλύοντας τα συσσωματώματα και επιστρέφοντας τα ξεδιπλωμένα πολυπεπτίδια στη δεξαμενή των μη φυσικών πρωτεϊνών. Επιπλέον, σε περιπτώσεις όπου μη αναδιπλωμένες και κακώς διπλωμένες πρωτεΐνες δεν μπορούν να διασωθούν μέσω των δράσεων των μοριακών συνοδών που αναφέρθηκαν ως τώρα, λειτουργούν ως πρωτεΐνες στόχευσης για αποικοδόμηση στο ευκαριωτικό πρωτεάσωμα οδηγώντας τελικά στην απομάκρυνση αυτών. Οι πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί έχουν την τάση να είναι πολυδιάστατες, εξυπηρετώντας μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών-υποστρωμάτων, αναγνωρίζοντας εκτεθειμένα υδρόφοβα κατάλοιπα [53].

Η ανώμαλη αναδίπλωση των πρωτεϊνών έχει συνδεθεί με έναν ταχέως διευρυμένο κατάλογο παθολογιών. Σχεδόν σε όλες τις διαταραχές που σχετίζονται με την ανώμαλη αναδίπλωση των πρωτεϊνών, ένα σφάλμα στην αναδίπλωση συμβαίνει είτε εξαιτίας μιας ανεπιθύμητης μετάλλαξης στο πολυπεπτίδιο είτε, σε λίγες περιπτώσεις, εξαιτίας κάποιου λιγότερο γνωστού λόγου. Η επιβλαβής επίδραση της λανθασμένης πρωτεΐνης μπορεί να οφείλεται σε: απώλεια της λειτουργίας, όπως παρατηρείται στην κυστική ίνωση ή σε επιβλαβή αύξηση της λειτουργίας, όπως παρατηρείται σε πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος του Alzheimer, Parkinson και η νόσος του Huntington στις οποίες η κακή αναδίπλωση των πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό επιβλαβών αμυλοειδών. Τα συσσωματώματα πρωτεϊνών μερικές φορές μετατρέπονται σε μια ινώδη δομή που είναι ιδιαίτερα αδιάλυτη. Αυτά ονομάζονται συνήθως αμυλοειδή και η συσσώρευσή τους οδηγεί περιστασιακά σε μια δομή που μοιάζει με πλάκα.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι μεταλλάξεις είναι τόσο σοβαρές ώστε να καθιστούν το γονιδιακό προϊόν βιολογικά ανενεργό, ενώ σε άλλες περιπτώσεις, οι μεταλλάξεις είναι σχετικά μικρές και οι πρωτεΐνες που προκύπτουν παρουσιάζουν μόνο μερική απώλεια της φυσιολογικής δραστηριότητας. Στην τελευταία περίπτωση παρά το γεγονός ότι έχουν μερική βιολογική δραστηριότητα, αυτές οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες δεν παραδίδονται στη σωστή τους θέση, είτε στο εσωτερικό του κυττάρου είτε στον εξωκυττάριο χώρο. Μείωση του ενδοκυττάρου επιπέδου των μοριακών συνοδών έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ανώμαλα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο εσωτερικό του κυττάρου. Επομένως, η τοξικότητα σε διαφορετικές νευροεκφυλιστικές διαταραχές μπορεί να είναι αποτέλεσμα μιας ανισορροπίας μεταξύ της φυσιολογικής ικανότητας των συνοδών και της παραγωγής κακώς διπλωμένων πρωτεϊνών. Αυξημένη έκφραση των συνοδών μπορεί να καταστείλει τη νευροτοξικότητα που προκαλείται από την κακή αναδίπλωση

των πρωτεϊνών, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί θεραπευτικοί παράγοντες [52].

8.1. Το σύμπλεγμα - μοριακή συνοδός CCT

Η πρωτεΐνη μοριακή συνοδός που περιέχει το σύμπλοκο TCP-1 (chaperonin containing TCP1 complex, CCT) επίσης γνωστή ως TRiC, (TCP1 ring complex) αποτελεί την μοριακή συνοδό της ομάδας II στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα υψηλού μοριακού βάρους (950 kDa) το οποίο αποτελείται από δύο πανομοιότυπους στοιβαγμένους δακτυλίους, ο καθένας από τους οποίους περιέχει οκτώ διακριτές πρωτεϊνικές υπομονάδες που κωδικοποιούνται από μεμονωμένα γονίδια [56]. Οι δύο δακτύλιοι σχηματίζουν μια κεντρική κοιλότητα στην οποία οι νεοσυντιθέμενες ή λανθασμένα διπλωμένες πρωτεΐνες μπορούν να απομονωθούν και να διπλωθούν με τρόπο που εξαρτάται από το ATP. Όταν συναρμολογείτε το σύμπλεγμα, κάθε μία από τις οκτώ υπομονάδες της CCT καταλαμβάνει μια συγκεκριμένη θέση μέσα στους δύο δακτυλίους με αποτέλεσμα να σχηματίζεται μια γεωμετρικά καθορισμένη διεπιφάνεια πρόσδεσης υποστρωμάτων [57]. Κάθε υπομονάδα έχει μια ξεχωριστή λειτουργία στη διαδικασία αναδίπλωσης και συνεργάζεται με τις άλλες για να εξασφαλίσει τη σωστή αναδίπλωση και συναρμολόγηση των πρωτεϊνών [52].

Έχει αναφερθεί ότι η CCT αλληλεπιδρά με περίπου το 10% του κυτταροσολικού πρωτεώματος για να υποστηρίξει κυτταρικές διεργασίες όπως αυτές που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό και στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου [58]. Πρωτεΐνες που διπλώνονται από την CCT αναφέρονται συνήθως ως υποστρώματα και πολλά από αυτά τα υποστρώματα δεν μπορούν να διπλωθούν από καμία άλλη συνοδό. Κατά συνέπεια, η λειτουργία της CCT είναι απαραίτητη για την επιβίωση των ευκαρυωτικών κυττάρων. Τα πιο άφθονα υποστρώματα είναι οι κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες ακτίνη και τουμπουλίνη, οι οποίες πρέπει να διπλώνονται από την CCT πριν από το σχηματισμό δομές μικροϊνιδίων και μικροσωληνίσκων [53]. Περαιτέρω υποστρώματα αποτελούν οι πρωτεΐνες με κρίσιμο ρόλο στον κυτταρικό κύκλο CDC20, PLK1, και κυκλίνη E και το σχετιζόμενο με τη σηματοδότηση της G-πρωτεΐνης στοιχείο Gb. Είναι επίσης, απαραίτητη για την αναδίπλωση πολλών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ογκογένεση, όπως η p53, ο ογκοκατασταλτικός παράγοντας Von Hippel-Lindau και η STAT3, καθώς και για την

αναδίπλωση των αναπτυξιακών παραγόντων του αμφιβληστροειδούς, συμπεριλαμβανομένων της transducin α και του PEX7. Ως εκ τούτου, η δυσλειτουργία της CCT συνδέεται στενά με τον καρκίνο καθώς, τα καρκινικά κύτταρα θα μπορούσαν να γίνουν εξαρτώμενα σε μεγάλο βαθμό από την CCT για την παροχή των λειτουργικών, αναδιπλωμένων μορφών πολλών ογκοπρωτεϊνών και βασικών παραγόντων που απαιτούνται για την επιβίωση και την ανάπτυξη [58]. Εκτός από την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, η CCT συμβάλλει στη συναρμολόγηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων, διπλώνοντας πρώτα μία ή περισσότερες υπομονάδες του συμπλόκου-υποστρώματος και στη συνέχεια παρέχοντας μια πλατφόρμα πάνω στην οποία μπορεί να συναρμολογηθεί το σύμπλοκο.

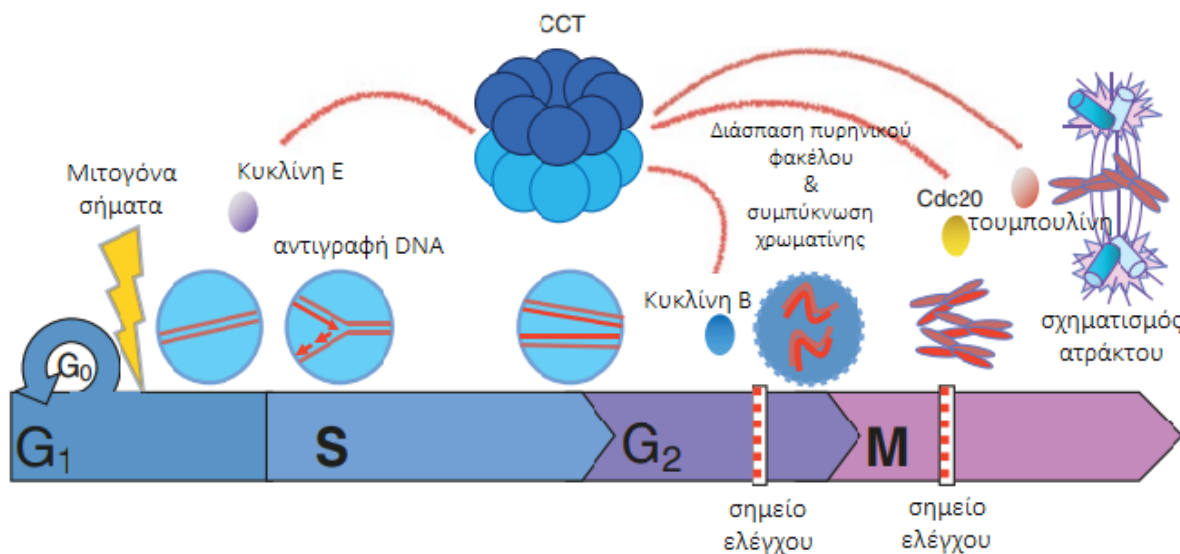
Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι η CCT βοηθά στον έλεγχο της ποιότητας των πρωτεϊνών αλληλεπιδρώντας με προβληματικές ή συσσωματωμένες πρωτεΐνες, ιδίως εκείνες που περιέχουν επιρρεπείς στη συσσωμάτωση αλληλουχίες πολύ-γλουταμίνης, όπως η Huntingtin, και απομονώνει αυτές μέχρι να μπορέσουν να αποικοδομηθούν. Με τον τρόπο αυτό ανήκει στις μοριακές συνοδούς που παρέχουν την πρώτη γραμμή άμυνας σε πολλές νευροεκφυλιστικές διαταραχές, όπως η νόσος του Huntington, η νόσος του Alzheimer και η νόσος του Parkinson καθώς, και οι ασθένειες της πολυγλουταμίνης που όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, χαρακτηρίζονται από μεταβολές διαμόρφωσης των πρωτεϊνών οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την κακή αναδίπλωση, συσσωμάτωση και τον σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων [53].

8.2. Το σύμπλεγμα CCT και καρκίνος

Η CCT έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την ογκογένεση, πιθανώς μέσω της αλληλεπίδρασης της με ογκογόνες πρωτεΐνες-υποστρώματα που τροποποιούν τα καρκινικά κύτταρα. Στην συνέχεια θα δοθεί έμφαση στην σημασία των αλληλεπιδράσεων της CCT που επηρεάζουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες (Εικόνα 8).

Εκτός από την αύξηση των επιπέδων των διαφορετικών υπομονάδων της CCT στα καρκινικά κύτταρα, έχει αποδειχθεί ότι οι υπομονάδες εμφανίζουν αυξημένη έκφραση κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου και τα επίπεδα έκφρασης της συνδέονται με την κυτταρική ανάπτυξη. Παρατηρήθηκε αύξηση της σύνθεσης της τουμπουλίνης κατά τη μετάβαση G1/S, που

πιθανώς συσχετίζεται με την ανάγκη για προετοιμασία για τη συναρμολόγηση της μιτωτικής ατράκτου. Κατά συνέπεια, όταν τα κύτταρα βρίσκονταν στο G₀/G₁, δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ CCT και τουμπουλίνης. Η CCT αλληλεπιδρά επίσης με άλλους οδηγούς της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, όπως οι Cdc20 και Cdh1 οι οποίες είναι σημαντικές για την ενεργοποίηση του APC/C, σύμπλεγμα που προωθεί την ανάφαση κατά τη διάρκεια της φάσης G₁. Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι παίζει ρόλο στο μιτωτικό σύστημα ελέγχου μεσολαβώντας στην απελευθέρωση του cdc20 και προάγοντας την έναρξη της ανάφασης. Η Polo-like κινάση1 (Plk1) είναι σημαντική κατά τη διάρκεια της G₂ φάσης του κυτταρικού κύκλου και αποτελεί πιθανό υπόστρωμα αναδίπλωσης της CCT αφού η μείωση των επιπέδων της CCT έχει ως αποτέλεσμα χαμηλότερα επίπεδα της Plk1, υποδεικνύοντας την ανάγκη της CCT για τη σωστή αναδίπλωση αυτής. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές αποτελούν εξήγηση στο γεγονός ότι η μείωση των επιπέδων της CCT ή ο επηρεασμός της δραστηριότητά της διαταράσσει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου [55].



Εικόνα 8: Ο ρόλος της CCT ως κεντρικός κόμβος στον κυτταρικό κύκλο ελέγχοντας την αναδίπλωση βασικών υποστρωμάτων, όπως η κυκλίνη E, η κυκλίνη B, Cdc20 και η τουμπουλίνη. Οι κυκλίνες E και B συναρμολογούνται με τις Cdk2 και Cdk1 αντίστοιχα για να ρυθμίσουν τις

G1/S και G2/M μεταβάσεις. Η Cdc20 ενεργοποιεί την APC/C για την έναρξη του διαχωρισμού των χρωματοειδών και την είσοδο στην ανάφαση. Η πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού, η τουμπουλίνη, εμπλέκεται στο σχηματισμό της ατράκτου. (Τροποποιημένη εικόνα από: Vallin, J. and J. Grantham, The role of the molecular chaperone CCT in protein folding and mediation of cytoskeleton-associated processes [55]).

Σχετικά με τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, είναι γνωστό ότι η CCT αναδιπλώνει τον άγριο τύπο της πρωτεΐνης p53, ένα μεταγραφικό παράγοντα που μεσολαβεί σε ογκοκατασταλτικές αποκρίσεις. Σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης p53 είναι απαραίτητη για τις δραστηριότητες της και οι σημειακές μεταλλάξεις που προκαλούν αστάθεια της διαμόρφωσης της p53 απαντώνται συχνά σε καρκίνους. Εξάντληση της TCC στα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση λανθασμένα διπλωμένης πρωτεΐνης p53, οδηγώντας σε μειωμένη έκφραση γονιδίων που εξαρτώνται από την p53. Παρόλο που το πιο απλό μοντέλο για την ρόλο της συνοδού CCT είναι η υποβοήθηση της σωστής αναδίπλωσης της νεοσυντιθέμενης p53, είναι επίσης πιθανό ότι η πρόσδεση της στην p53 αποτρέπει τη συσσωμάτωσή της. Μια άλλη ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που αποτελεί υπόστρωμα της CCT για σωστή αναδίπλωση είναι ο μεταγραφικός παράγοντας von Hippel-Lindau (VHL). Απώλεια λειτουργίας της VHL σχετίζεται με έναν αριθμό κληρονομικών και σποραδικών όγκων. Τέλος, αναφέρεται πως συμβάλει στην αναδίπλωση και τη λειτουργία του STAT3, ενός μεταγραφικού παράγοντα για τη μετάδοση των σημάτων πεπτιδικών ορμονών από τους υποδοχείς της εξωκυττάριας μεμβράνης στον πυρήνα, ο οποίος ρυθμίζεται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου και των φλεγμονωδών ασθενειών [55].

Αξίζει στο σημείο αυτό να αναφερθεί μια έρευνα του 2015, η οποία μελετά τον ρόλο της CCT στην οξεία μυελοειδής λευχαιμία (ΟΜΛ). Αναφέρει ότι το σύμπλεγμα CCT αναγνωρίζει την πρωτεΐνη σύντηξης AML1-ETO μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην σύνθεση, αναδίπλωση και δραστικότητα της συγκεκριμένης. Η AML1-ETO είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που προκύπτει ως αποτέλεσμα της χρωμοσωμικής μετάθεσης t(8;21)(q22;q22). Παρεμβαίνει στη φυσιολογική ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων του αίματος και δρα ως παράγοντας μεταγραφής που διαταράσσει τη ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και την ωρίμανση των μυελοειδών κυττάρων. Η διαταραχή αυτή

οδηγεί στη συσσώρευση ανώριμων μυελοειδών κυττάρων στο μυελό των οστών και στην επακόλουθη ανάπτυξη της ΟΜΛ. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης σύντηξης και της μοριακής συνοδούς πραγματοποιείται κυρίως μέσω της δεσμευτικής περιοχής AML1-175 της πρώτης και τις ακραίες περιοχές των υπομονάδων CCT6 και CCT8. Η μελέτη αυτή υποστηρίζει το σύμπλοκο TRiC-AML1-175 θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη θεραπευτικών παραγόντων που στοχεύουν ειδικά τις αλληλεπιδράσεις TRiC-AML1-ETO. Αυτή η πιθανότητα απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης της ρύθμισης του CCT6 και/ή CCT8 σε αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές όπως η KASUMI-1, που χρησιμοποιούνται συνήθως ως πρότυπο σύστημα για AML1-ETO-θετική ΟΜΛ [59].

8.3. Η υπομονάδα CCT3 του συμπλέγματος CCT

Λίγες οριστικές μελέτες ασχολήθηκαν με το ρόλο συγκεκριμένων υπομονάδων στην προώθηση της λειτουργίας της CCT στον καρκίνο. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι τα επίπεδα έκφρασης των διαφόρων υπομονάδων CCT είναι απορυθμισμένα σε διάφορους καρκίνους και πιθανώς συμβάλλουν στην προώθηση της σηματοδότησης υπέρ της επιβίωσης μέσω των μονοπατιών mTOR ή STAT3 μεταξύ άλλων [53]. Για παράδειγμα, οι CCT1 και CCT2 έχει αναφερθεί ότι είναι απαραίτητες για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του καρκίνου του μαστού. Επιπλέον, η CCT8 έχει αναφερθεί ότι απορυθμίζεται σε διάφορους ιστούς όγκων. Στο γλοϊώμα, η υψηλή έκφραση της CCT8 σχετίζεται σημαντικά με μικρότερη συνολική επιβίωση. Η υπομονάδα CCT8 μπορεί να ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και την εισβολή των γλοιοβλαστωμάτων. Ομοίως, η έκφραση της είναι αυξημένη σε δείγματα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, και η απενεργοποίηση αυτής μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό του καρκινώματος. Επίσης, η CCT8 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα του βλαστικού κέντρου και στα προοδευτικά λεμφώματα. Η υψηλή έκφραση της CCT8 σχετίζεται σημαντικά με μικρότερη συνολική επιβίωση σε ασθενείς με διάχυτο λέμφωμα μεγάλων Β-κυττάρων.

Η παρατήρηση ότι συγκεκριμένες υπομονάδες του συμπλόκου συσχετίζονται με διάφορες ασθένειες και ότι εμφανίζουν αυξημένη έκφραση, υποδεικνύει ότι αυτή η αυξημένη έκφραση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως κλινικός δείκτης για τις εν λόγω ασθένειες. Η έκφραση της

υπομονάδας CCT5 μαζί με τα γονίδια *RGS3* και *YKT6* παρατηρείται αυξημένη σε p53-μεταλλαγμένους όγκους του μαστού και σχετίζονται με αντίσταση στη θεραπεία με δοσεταξέλη (docetaxel). Το γεγονός αυτό μπορεί να είναι κλινικά χρήσιμο για τον εντοπισμό του υποσυνόλου των ασθενών με καρκίνο του μαστού που μπορεί ή δεν μπορεί να ωφεληθεί από την συγκεκριμένη θεραπεία. Έχει διαπιστωθεί ότι το CCT5 παρουσιάζει επίσης υψηλότερη έκφραση στον μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης στη διάγνωση του NSCLC σε πρώιμο στάδιο. Επιπλέον, η έκφραση του CCT2 έχει αποδειχθεί ότι είναι αυξημένη στα ούρα ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 στο στάδιο της υπερδιήθησης. Η υπερδιήθηση σε πρώιμο στάδιο διαβητικής νεφροπάθειας μπορεί να ανιχνευθεί με τη μέτρηση της CCT2 στα ούρα, η οποία μπορεί να αποτελέσει έναν νέο και πολύτιμο βιοδείκτη για την κλινική αξιολόγηση [64].

Επίκεντρο στην παρούσα εργασία αποτελεί η υπομονάδα CCT3, η οποία αποτελεί την κύρια υπομονάδα του συμπλέγματος και της οποίας το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1. Επί του παρόντος, υπάρχουν πολλές έρευνες σχετικά με την CCT3 στον καρκίνο του ήπατος, του μαστού, του πνεύμονα και ούτε καθεξής. Για παράδειγμα, μελέτες δείχνουν ότι η CCT3 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση και στην εξέλιξη του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC). Η έκφραση του mRNA και της πρωτεΐνης του γονιδίου *CCT3* στους ιστούς ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC) είναι υψηλότερες σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Σύμφωνα με ανάλυση που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας πληροφορίες από την βάση δεδομένων KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), η CCT3 μπορεί να επηρεάσει την εμφάνιση του καρκινώματος μέσω των μονοπατιών του κυτταρικού κύκλου και της αντιγραφής του DNA. Η υπερέκφραση της CCT3 σχετίζεται με χειρότερη κλινική έκβαση και επιθετικά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, γεγονός που υποδηλώνει κακή πρόγνωση για τους ασθενείς. Επιπλέον, η CCT3 συμβάλει στην ικανότητα εισβολής των κυττάρων γεγονός που υποδεικνύει ότι η έκφραση μπορεί να σχετίζεται με τη μετάσταση στο HCC. Συμπερασματικά, μπορεί να χρησιμεύσει ως δυνητικός θεραπευτικός στόχος και βιοδείκτης στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα [52].

Σχετικά με τις αιματολογικές κακοήθειες, η μελέτη των Qian και συνεργατών περιελάμβανε την ανάλυση 2220 ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα. Διαπίστωσαν ότι η CCT3 υπερεκφράζεται σημαντικά στους υπό μελέτη ασθενείς και ότι η υπερέκφραση της ήταν ένας κακός προγνωστικός δείκτης της επιβίωσης. Τα ευρήματα της έρευνας τους έδειξαν ότι η υψηλή CCT3 μπορεί να

επηρεάσει την εξέλιξη του πολλαπλού μυελώματος μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK-STAT3. Επιπρόσθετα, η έκφραση της CCT3 σχετιζόταν με τη σηματοδοτική οδό Hippo και την οδό WNT, τα οποία σχετίζονται στενά με την καρκινογένεση. Επομένως, η έκφραση του CCT3 μπορεί να επηρεάσει την πρόοδο της νόσου μέσω αυτών των τριών μονοπατιών σηματοδότησης και κυρίως μέσω του πρώτου. Συνεπώς, η υψηλή έκφραση του CCT3 μπορεί να αποτελεί ένα δυνητικό υποψήφιο βιοδείκτη για τη μοριακή διάγνωση και πρόγνωση των ασθενών [60].

8.4. Το κυκλικό μόριο CCT3

Το γραμμικό μετάγραφο του γονιδίου *CCT3* αποτελείται από 15 εξώνια. Μέσω του μηχανισμού οπίσθιας συρραφής τα εξώνια 9 και 10 κυκλοποιούνται και έτσι προκύπτει το εξωνιακό κυκλικό circCCT3. Οι λειτουργίες του συγκεκριμένου κυκλικού μορίου παραμένουν άγνωστες. Ένα νέο δεδομένο που έχει προκύψει αφορά την συμμετοχή του στην εξέλιξη του πολλαπλού μυελώματος μέσω του ρυθμιστικού άξονα miR-610/AKT3 [61].

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της έκφρασης του κυκλικού RNA circCCT3 σε δείγματα ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Η μελέτη αυτή έγινε τόσο σε ποιοτικό όσο και ποσοτικό επίπεδο. Η περιορισμένη γνώση σχετικά με το κυκλικό μόριο circCCT3 στις αιματολογικές κακοήθειες και ειδικότερα στην ΧΛΛ αποτέλεσε έναυσμα για διερεύνηση του μορίου αυτού. Μελέτες έχουν αναδείξει ότι συγκεκριμένες υπομονάδες του συμπλόκου CCT συσχετίζονται με διάφορες ασθένειες και ότι εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης. Επί του παρόντος, έρευνες αναφέρουν την δράση της υπομονάδας CCT3 στον καρκίνο του ήπατος, του μαστού και του πνεύμονα.

Από την άλλη, τα κυκλικά μόρια RNA αποτελούν μια ελκυστική κατηγορία μορίων μελέτης καθώς τα χαρακτηριστικά αυτών, τους προσδίδουν μεγάλες δυνατότητες να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες για ασθένειες. Εκφράζονται σε ένα εύρος πληθυσμών κυττάρων του αίματος, ωστόσο οι μηχανισμοί του τρόπου με τον οποίο τα circRNA ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση, την ωρίμανση και τις λειτουργίες των αιμοποιητικών κυττάρων παραμένουν άγνωστοι. Πολυάριθμα circRNA απορρυθμίζονται και διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου, ενώ ο ρόλος και η ρύθμιση τους στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη μετάσταση και την αντίσταση στη χημειοθεραπεία των λευχαιμικών κυττάρων αναγνωρίζεται σταδιακά. Η κατανόηση του τρόπου δράσης έκφρασης του circCCT3 στην νόσο μπορεί μελλοντικά να προσφέρει σημαντικά στην έγκαιρη διάγνωση της νόσου, στην πρόβλεψη της πορείας ενός ασθενή, στην επιλογή θεραπείας και γενικότερα στην καλύτερη αντιμετώπιση και διαχείριση των ασθενών.

Παράλληλα, στόχος της διπλωματικής αυτής εργασίας ήταν η εξοικείωση του φοιτητή με βασικές τεχνικές της μοριακής βιολογίας και η καλλιέργεια σωστής και ασφαλούς συμπεριφοράς στο χώρο του εργαστηρίου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Βιολογικό υλικό- Δείγματα ασθενών

Για την παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από 10 ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και καλλιιεργήθηκε η κυτταρική σειρά H929 που αποτέλεσε τον θετικό μάρτυρα κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων. Ανάλογα με τις απαιτήσεις της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς σε θρεπτικά, χρησιμοποιήθηκε ο κατάλληλος τύπος θρεπτικού υλικού συγκριμένης σύστασης, κατάλληλη θερμοκρασία επωαστήρα, συνθήκες υγρασίας και περιεκτικότητας σε CO₂.

2. Απομόνωση ολικού RNA (RNA extraction)

2.1. Αρχή της μεθόδου

Για την απομόνωση ολικού RNA από τα δείγματα ασθενών που αναφέρθηκαν προηγουμένως, χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο TRIidty G (PanReac AppliChem – ITW Reagents). Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο είναι έτοιμο προς χρήση για ταυτόχρονη απομόνωση RNA, DNA και πρωτεϊνών από ομογενοποιημένους ιστούς και κύτταρα και στηρίζεται στη μέθοδο του Chomczynski. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην χρήση όξινης φαινόλης και γουανιδινικών αλάτων ως δραστικές ουσίες για την απομόνωση μη αποικοδομημένων νουκλεϊνικών οξέων ενώ έχει δεχθεί κάποιες επιπρόσθετες τροποποιήσεις για την βελτίωση της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων και των πρωτεϊνών. Η ισοθειοκυανική γουανιδίνη είναι ισχυρός αποδιατακτικός παράγοντας, που σε συνδυασμό με τη φαινόλη, προκαλεί την λύση των κυττάρων, την αποδιάταξη των πρωτεϊνών, τον διαχωρισμό τους από το RNA και το DNA καθώς και την προστασία τους από τις RNάσες. Έπειτα από προσθήκη χλωροφορμίου, το RNA καταλήγει στην υπερκείμενη υδατική φάση, το DNA στη μεσόφαση και οι πρωτεΐνες στην υποκείμενη οργανική φάση. Για την απομόνωση RNA, παραλαμβάνεται η ανώτερη υδατική φάση και γίνεται κατακρήμνιση του RNA με ισοπροπανόλη. Η ισοπροπανόλη λειτουργεί σαν παράγοντας αφυδάτωσης και διευκολύνει την συσσώρευση των νουκλεϊκών οξέων με το μειονέκτημα ότι προκαλεί συνκατακρήμνιση πολλών αλάτων, για αυτό πρέπει να ακολουθήσει

καλό ζέπλυμα του ιζήματος με αιθανόλη. Το DNA απομονώνεται από την μεσόφαση με κατακρήμνιση από αιθανόλη και οι πρωτεΐνες από την εναπομείναντα οργανική φάση.

2.2. Συνθήκες πραγματοποίησης απομόνωσης ολικού RNA

Αρχικά, σε κάθε ομογενοποίημα κυττάρων προστίθεται 1 mL αντιδραστηρίου TRIidty G και το μίγμα ομογενοποιείται πιπετάροντας καλά. Ακολουθεί επώαση του μίγματος αυτού σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min έτσι ώστε να γίνει καλύτερος διαχωρισμός των συμπλόκων RNA/πρωτεΐνης και στη συνέχεια προστίθενται 0,2 mL χλωροφορμίου. Κατόπιν, το διάλυμα αναδεύεται καλά και αφήνεται στον πάγκο για 10 min για βελτίωση της ποιότητας του RNA. Ακολούθως, το μίγμα φυγοκεντρείται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4°C στα 12000 g για 15 min με αποτέλεσμα τη δημιουργία των τριών διακριτών φάσεων. Έτσι, η υπερκείμενη υδατική φάση μεταφέρεται σε ένα νέο σωλήνα τύπου Eppendorf όπου προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης (0,5 mL στη συγκεκριμένη απομόνωση) και το διάλυμα αφήνεται σε πάγο για τουλάχιστον 15 min ώστε να κατακρημνιστεί το RNA. Το μίγμα φυγοκεντρείται ξανά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4°C στα 12000 g για 15 min και απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό. Προστίθεται στο ίζημα 1 mL αιθανόλης περιεκτικότητας 75% και έπεται ισχυρή ανάδευση με τη χρήση του vortex για την επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος. Στη συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρωση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4°C στα 7500 g για 5 min και απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό. Τέλος, το απομονωμένο RNA αφήνεται για 5-10 min σε θερμοκρασία δωματίου για να εξατμιστεί η τυχόν αιθανόλη που έχει παραμείνει στο δείγμα και επαναδιαλυτοποιείται σε 20 μ L DEPCνερού (0.1% diethylpyrocarbonate), που είναι ελεύθερο νουκλεασών που θα μπορούσαν να αποικοδομήσουν το RNA. Το απομονωμένο RNA αποθηκεύεται και διατηρείται στους -80°C για μελλοντική χρήση.

3. Φασματομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητας του ολικού RNA που έχει απομονωθεί

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης ή της ποσότητας καθώς και της καθαρότητας των απομονωμένων δειγμάτων RNA ή DNA μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση ενός φασματοφωτομέτρου υπεριώδους-ορατού φωτός. Η μέθοδος αυτή αξιοποιεί την ιδιότητα των νουκλεϊνικών οξέων να απορροφούν υπεριώδες φως με μέγιστο απορρόφησης σε μήκος κύματος 260 nm. Σε διαφορετικά μήκη κύματος εντοπίζεται το μέγιστο απορρόφησης των φαινολικών δακτύλιων των αρωματικών αμινοξέων (280 nm), καθώς και των γουανιδινικών αλάτων και φαινόλης (230 nm) που χρησιμοποιήθηκαν κατά την απομόνωση του RNA. Οι μονάδες απορρόφησης (A260) μπορούν να μετατραπούν σε συγκέντρωση με βάση ορισμένες μέσες σταθερές απορροφητικότητας που έχουν υπολογιστεί. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη χρησιμοποίηση της συγκεκριμένης μεθόδου είναι η συγκέντρωση να κυμαίνεται μεταξύ 5-100 μg/mL. Αν το δείγμα είναι πιο πυκνό πρέπει να αραιωθεί, ενώ, αν είναι πιο αραιό δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί η συγκεκριμένη μέθοδος.

Για σκοπούς ελέγχου της καθαρότητας των απομονωμένων δειγμάτων από άλλες ουσίες, όπως πρωτεΐνες υπολογίζεται ο λόγος της οπτικής απορρόφησης(OD) στα 260 nm προς την οπτική απορρόφηση στα 280 nm (OD260/OD280). Ένα καθαρό διάλυμα DNA έχει λόγο ~1,8, ενώ ένα καθαρό διάλυμα RNA έχει λόγο ~2. Τιμές αυτού του λόγου μεγαλύτερες του 2,0 υποδηλώνουν ότι υπάρχει στο διάλυμα σημαντική ποσότητα DNA ενώ τιμές μικρότερες του 1,8 υποδεικνύουν την παρουσία πρωτεϊνών ή φαινόλης ή άλλων ρύπων που απορροφούν σε μήκος κύματος 280nm.

Ως δευτερεύον μέτρο καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων υπολογίζεται και ο λόγος οπτικής απορρόφησης OD260/OD230 όπου στην περίπτωση αυτή αναμένονται τιμές 2,0-2,2. Τιμές μικρότερες του 2,0 υποδεικνύουν την παρουσία αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν κυρίως κατά την διαδικασία απομόνωσης RNA, όπως γουανιδικά άλατα και φαινόλης που απορροφούν σε μήκος κύματος 230nm.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA και του DNA αξιοποιούνται οι εξής εξισώσεις:

• C_{RNA} (μg/mL) = $A_{260} \cdot 40 \cdot \text{παράγοντας αραιώσεως}$, όπου:

- A_{260} : η τιμή απορρόφησης (O.D.) του δείγματος RNA στα 260 nm
- 40: η τιμή της συγκέντρωσης σε μg/mL του δείγματος RNA που αντιστοιχεί σε τιμή απορρόφησης $A_{260}=1$

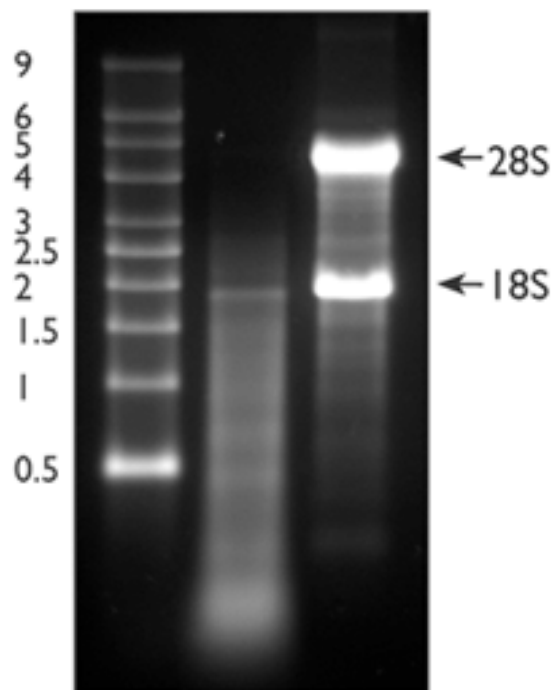
• $C_{DNA} (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = A_{260} * 50 * \text{παράγοντας αραίωσης}$, όπου:

- A_{260} : η απορρόφηση (O.D.) του δείγματος DNA στα 260 nm
- 50: η τιμή της συγκέντρωσης σε $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ του δείγματος DNA που αντιστοιχεί σε τιμή απορρόφησης $A_{260}=1$

Για την πειραματική εκτέλεση αυτής της διαδικασίας 1 μL ολικού απομονωμένου RNA (μη αραιωμένου ή αραιωμένου σε DEPC-H₂O και σε αραίωση συνήθως 1:2) φωτομετρείται στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop. Το μηχάνημα ρυθμιζόμενο κατάλληλα μπορεί να υπολογίσει τις τιμές οπτικής απορρόφησης (O.D.) των παραπάνω λόγων και τη συγκέντρωση του δείγματος.

4. Έλεγχος της ακεραιότητας (*integrity*) του απομονωθέντος ολικού RNA με ηλεκτροφόρηση

Η ακεραιότητα του RNA που απομονώθηκε ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση αυτού σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Εάν πρόκειται για καλής ποιότητας RNA αναμένεται να σχηματιστούν δύο εμφανείς ζώνες όπου η πάνω θα αντιστοιχεί στο 28S rRNA και η κάτω στο 18S rRNA (Εικόνα 9). Σε αντίθετη περίπτωση, η απουσία αυτών των ζωνών σε συνδυασμό με την παρουσία ενός επιχρίσματος, υποδεικνύει ότι το απομονωμένο RNA έχει υποστεί αποικοδόμηση.



Εικόνα 9: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης ενός μάρτυρα(στήλη αριστερά), ενός αποικοδημημένου RNA (μεσαία στήλη) και ενός άθικτου(στήλη δεξιά). (Τροποποιημένη εικόνα από: RNA integrity - Labster Theory).

5. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription-RT)

5.1. Αρχή της μεθόδου

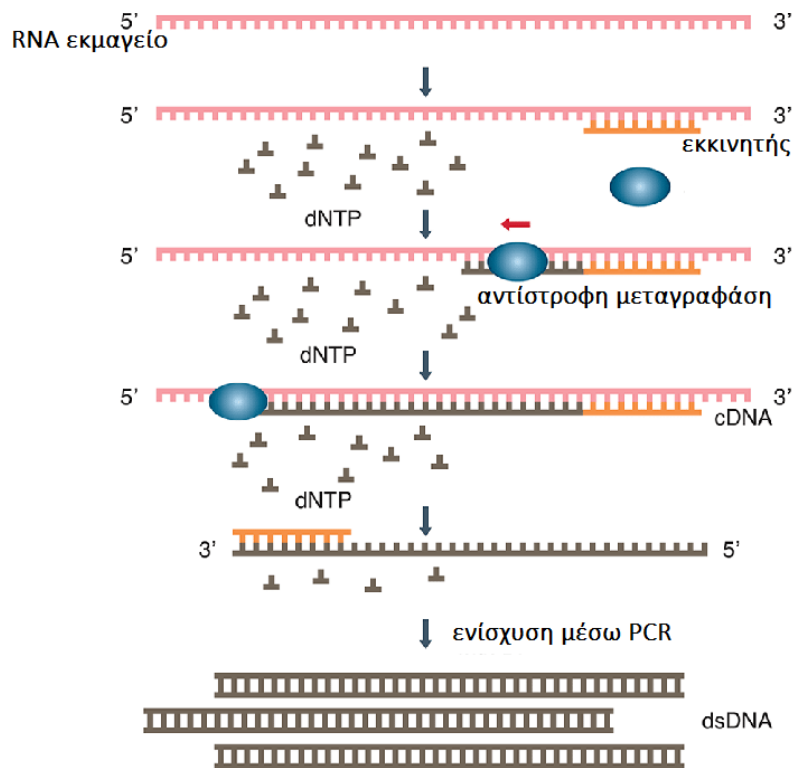
Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιείται *in vivo*, κυρίως σε ρετροϊούς και βασίζεται στην παρουσία ενός εξειδικευμένου ενζύμου, την αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase, RTase) η οποία καταλύει την μεταγραφή μορίων μονόκλωνου RNA (single stranded RNA, ssRNA) σε μονόκλιωνα μόρια συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA).

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης αυτής είναι απαραίτητος ένας εκκινητής (primer) και ένα κατάλληλο ρυθμιστικό διαλύμα (buffer). Η μέθοδος στηρίζεται στην υβριδοποίηση του εκκινητή στο μονόκλινο RNA και ακολούθως στην δράση του ενζύμου για την σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας cDNA βάση του κανόνα συμπληρωματικότητας των βάσεων, ξεκινώντας από το ελεύθερο 3' άκρο του εκκινητή (Εικόνα 10).

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες εκκινητών για μια αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής:

- Οι εκκινητές ολιγομερών δεοξυθυμιδίνης (oligo-dTs), υβριδοποιούνται σε πολύ-A ουρές μέσω της πολύ-T ουράς (περίπου 20 θυμιδίνες) μεταγράφοντας αντίστροφα όλα τα πολυαδενυλιωμένα RNA
- Τα τυχαία εξαμερή (random hexamers) που είναι εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας και επομένως συνδέονται μη ειδικά σε κάθε συμπληρωματικό RNA που υπάρχει στο δείγμα
- Οι ειδικοί εκκινητές (gene specific) που είναι ειδικά σχεδιασμένοι για να προσδένονται σε μια συγκεκριμένη περιοχή μεταγράφων ενός συγκεκριμένου γονιδίου, με αποτέλεσμα να ενισχύονται τα μετάγραφα του γονιδίου αυτού αυξάνοντας έτσι την ειδικότητα του προϊόντος

Οι συνηθέστερες αντίστροφες μεταγραφάσες είναι αυτές που προέρχονται από τους ιούς MMLV (MoloneyMurine Leukemia Virus) και AMV (Avian Myeloblastosis Virus) ενώ υπάρχουν και πιο εξειδικευμένες αντίστροφες μεταγραφάσες, όπως αυτές που είναι θερμοανθεκτικές. Εξαιτίας του χαρακτηριστικού αυτού, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε υψηλότερες θερμοκρασίες για αποδιάταξη δευτεροταγών δομών RNA, όπως στην περίπτωση των tRNAs. Τέλος, στην αντίδραση προστίθεται DTT (Dithiothreitol), για σταθερότητα και ενεργοποίηση συγκεκριμένων ενζύμων καθώς και αναστολέας RNασών (RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor) για να αποτραπεί η αποικοδόμηση του RNA.



Εικόνα 10: Η RT-PCR έχει σαν αποτέλεσμα στην μετατροπή του απομονωμένου ολικού RNA σε cDNA και την περαιτέρω ενίσχυση αυτού. (Τροποποιημένη εικόνα από: Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The RT-PCR... | Download Scientific Diagram)

5.2. Συνθήκες πραγματοποίησης τεχνικής αντίστροφης μεταγραφής

Χρησιμοποιώντας τις τιμές της συγκέντρωσης του ολικού RNA, που προσδιορίστηκαν μέσω της φασματοφωτομετρίας, υπολογίζεται για κάθε δείγμα απομονωμένου ολικού RNA από τα 10 δείγματα ασθενών που αναφέρθηκαν, ο όγκος σε μL που απαιτείται για να υπάρχει σε κάθε αντίδραση ποσότητα 2 μg ολικού RNA.

Σε κάθε σωληνάκι τύπου Eppendorf που θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, σύμφωνα με το πρωτόκολλο πρέπει να υπάρχει 1 μL από random hexamers συγκέντρωσης 50 ng που προκύπτει με αραιώση 1:8 του stock διαλύματος, όγκος (σε μL) που αντιστοιχεί σε 2 μg ολικού RNA, 1 μL dNTPs mix σε συγκέντρωση 10 mM και απιονισμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (RNase-Free -DEPC-H₂O) μέχρι να συμπληρωθεί ο συνολικός όγκος αντίδρασης 12 μL . Βάση αυτού γίνεται ο υπολογισμός των απαραίτητων όγκων για κάθε συστατικό της αντίδρασης και παρασκευή του Master Mix.

Μετά το διαμοιρασμό του Master Mix, τα σωληνάκια θερμαίνονται στο θερμικό κυκλοποιητή (thermal cycler) στους 65°C για 5 min και τοποθετούνται άμεσα σε πάγο. Έπειτα, σε κάθε σωληνάκι προστίθενται 4 μL ρυθμιστικού διαλύματος 5X First-Strand Buffer, 2 μL DTT συγκέντρωσης 0.1 M και 1 μL αναστολέα RNασών RNaseOUT (40 units/ μL) με αποτέλεσμα κάθε σωληνάκι να περιέχει τελικό όγκο 19 μL . Τα δείγματα ακολούθως αναδεύονται και γίνεται επώαση τους στους 37°C για 2 min, με το τέλος της επώασης τοποθετούνται και πάλι στον πάγο. Στην συνέχεια, σε κάθε δείγμα προστίθεται 1 μL (200 units) αντίστροφης μεταγραφάσης MMLV – RT (Moloney Murine Leukemia Virus – RT), και ο τελικός όγκος των 20 μL για κάθε σωληνάκι αναδεύεται με καλό πιπετάρισμα. Ακολουθεί επώαση στους 25°C για 10 min, στάδιο απαραίτητο λόγω χρήσης random hexamers και, έπειτα, επώαση στους 37°C για 50 min. Όλα τα αντιδραστήρια και τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση προέρχονται από την εταιρία Thermo Fisher Scientific. Η αντίδραση ολοκληρώνεται με θέρμανση και αδρανοποίηση του ενζύμου στους 70°C για 15 min. Τέλος, τα δείγματα cDNA που έχουν προκύψει φυλάσσονται στους -80°C για μελλοντική χρήση.

6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

6.1. Αρχή της μεθόδου

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελεί μια αξιόπιστη και εύκολη διαδικασία που επιτρέπει τον ταχύ ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιθυμητών αλληλουχιών, οδηγώντας στην παραγωγή εκατομμυρίων αντιγράφων. Ανακαλύφθηκε το 1983 από τον Kary Banks Mullis στον οποίο απονεμήθηκε βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1993 και έκτοτε θεωρείται ένα από τα πλέον χρήσιμα εργαλεία στο χώρο της Μοριακής Βιολογίας. Βρίσκει εφαρμογές σε πολλά πεδία όπως στη βιοϊατρική έρευνα, στη μοριακή διαγνωστική, στην ιατροδιακαστική και στη βιοτεχνολογία.

Η μέθοδος βασίζεται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους πολυμερισμού του DNA, αξιοποιώντας το ένζυμο DNA – πολυμεράση και 2 ειδικά μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), συμπληρωματικά και αντιπαράλληλης κατεύθυνσης προς τη μια αλυσίδα του υπό μελέτη DNA. Ουσιαστικά, η αλληλουχία στόχος παρέχει το εκμαγείο, βάση του οποίου το ένζυμο θα συνθέσει DNA, ενώ οι εκκινητές παρέχουν το 3' άκρο το οποίο θα επιμηκύνει το ένζυμο, οριοθετώντας το τμήμα DNA που θα πολλαπλασιαστεί. Επιπλέον, για την υλοποίηση της αντίδρασης πέραν από το αρχικό DNA εκμαγείο, την DNA πολυμεράση και το ζεύγος των εκκινητών, απαιτούνται ένα μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), ένα ρυθμιστικό διάλυμα με κατάλληλη συγκέντρωση pH και ιόντων Mg^{2+} και, τέλος, νερό απαλλαγμένο από Νουκλεάσες (RNAσες/DNAσες) (DEPC-H₂O). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμικούς κυκλοποιητές (*thermal cyclers*), που ως χαρακτηριστική ιδιότητά τους έχουν την αυτόματη αυξομείωση της θερμοκρασίας σε επιθυμητά επίπεδα για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα.

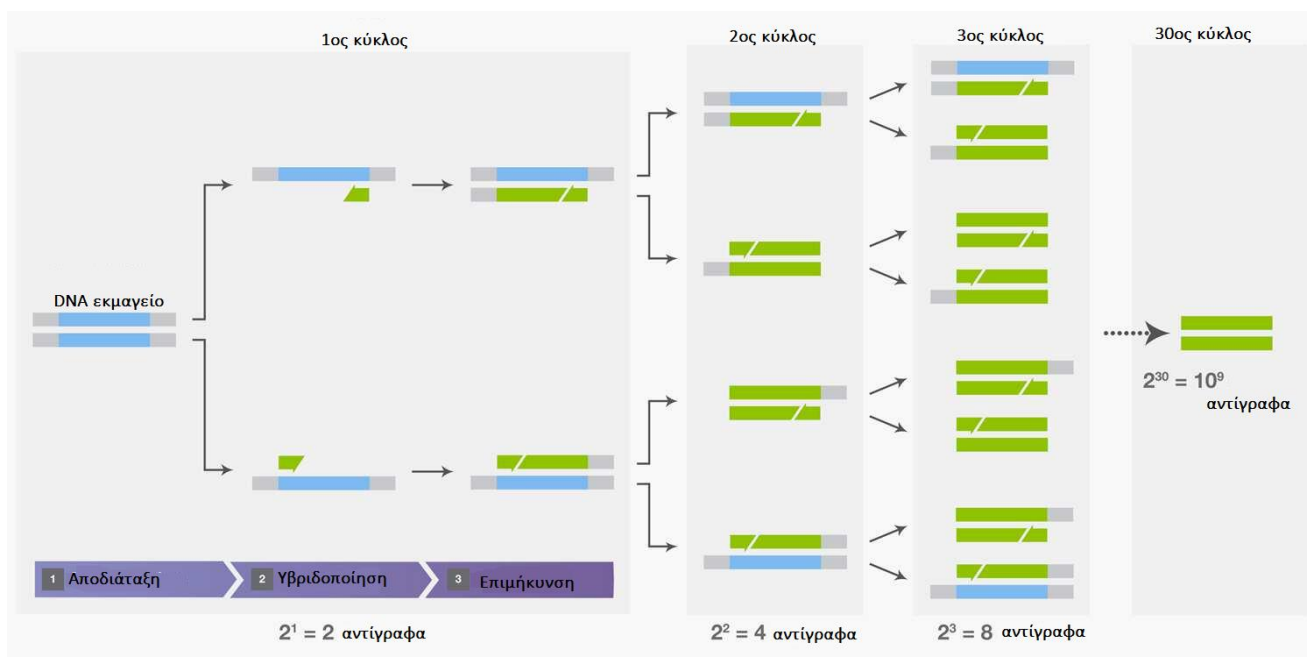
Ο πρώτος κύκλος πολυμερισμού οδηγεί στον σχηματισμό δύο νέων αλυσίδων απροσδιόριστου μήκους που, μαζί με τις μητρικές αλυσίδες συμμετέχουν στους επόμενους κύκλους. Στον δεύτερο κύκλο, η επέκταση των εκκινητών που είναι υβριδοποιημένοι με τις νεοσυνθεθειμένες αλυσίδες του προηγούμενου, έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή 2 αλυσίδων με καθορισμένο μήκος, όπως ορίζεται από την απόσταση ανάμεσα στα 5' άκρα των δύο εκκινητών. Έτσι, με την ολοκλήρωση του σταδίου αυτού έχει συντεθεί DNA που περικλείει επακριβώς την προς ενίσχυση αλληλουχία. Έπειτα, οι επόμενοι κύκλοι παράγουν μόρια DNA επιθυμητού μεγέθους, τα οποία συσσωρεύονται εκθετικά σε κάθε διαδοχικό κύκλο. Στην πραγματικότητα, σε κάθε κύκλο παράγονται και προϊόντα απροσδιόριστου μήκους, τα οποία όμως

συσσωρεύονται με γραμμικό τρόπο με αποτέλεσμα να υπερτερούν συντριπτικά τα επιθυμητά προϊόντα (Εικόνα 11).

Κάθε κύκλος επαναλαμβάνεται 20-40 φορές συνήθως 35, μέχρι να αποκτηθεί ο επιθυμητός αριθμός αντιγράφων της ενισχυόμενης αλληλουχίας DNA. Αναλυτικότερα, κάθε κύκλος αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα:

1. Αποδιάταξη (denaturation) του δίκλωνου εκμαγείου DNA στους 95°C για 30 s και διαχωρισμός των αλυσίδων
2. Επαναδιάταξη (annealing) και υβριδοποίηση (hybridization) των αλυσίδων του DNA εκμαγείου με τους αντίστοιχους εκκινητές στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στους 50°-65° για 30s. Η ακριβής θερμοκρασία στο στάδιο αυτό, Ta (Temperature Annealing), εξαρτάται από τα ειδικά χαρακτηριστικά των εκκινητών και συγκεκριμένα από την θερμοκρασία τήξης (Tm) αυτών. Το στάδιο αυτό είναι καθοριστικό για την ειδικότητα των προϊόντων που θα παραχθούν από την PCR.
3. Επιμήκυνση (extension\elongation) των εκκινητών στους 72°C για 1 min/kb, για τη σύνθεση μιας θυγατρικής συμπληρωματικής αλυσίδας από τη DNA πολυμεράση με τη χρήση των διαθέσιμων στο διάλυμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων.

Πριν την έναρξη των κύκλων ,προηγείται μια ισχυρή αποδιάταξη για 3 min στους 95°C για να διαχωριστούν καλά όλες οι δίκλωνες δομές που τυχόν υπάρχουν και στο τέλος του τελευταίου, γίνεται μια ακόμα τελική επιμήκυνση για 1 min στους 72°C για τη συμπλήρωση των ημιτελών προϊόντων. Τα τελικά προϊόντα της PCR φυλάσσονται στους 4°C



Εικόνα 11: Αναπαράσταση της αρχής μεθόδου της PCR. Φαίνονται τα στάδια που αποτελούν ένα κύκλο της PCR, αποδιάταξη, επαναδιάταξη, επιμήκυνση καθώς και η εκθετική ενίσχυση του DNA στόχου που επέρχεται με τους επαναλαμβανόμενους κύκλους. (Τροποποιημένη εικόνα από: PCR Basics | Thermo Fisher Scientific - GR)

6.2. Ο ρόλος των συστατικών μιας αντίδρασης PCR

1. Το DNA εκμαγείο παρέχει την επιθυμητή αλληλουχία ενίσχυσης, και μπορεί να είναι ολικό χρωμοσωμικό, μιτοχονδριακό, βακτηριακό, πλασμιδιακό ή cDNA. Η ποσότητα που χρησιμοποιείται εξαρτάται από την πολυπλοκότητα του DNA (το βαθμό αντιπροσώπευσης της αλληλουχίας στόχου στο συνολικό) και από το είδος της αντίδρασης (συμβατική ή ποσοτική PCR)
2. Ο πρόσθιος (forward primer) και ο ανάστροφος εκκινητής (reverse primer) υβριδοποιούνται κατά το στάδιο της επαναδιάταξης (annealing) στις αλυσίδες εκμαγεία DNA και παρέχουν το 3' άκρο από όπου ξεκινά η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων από τη DNA πολυμεράση

3. Το μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs mix) παρέχει τα μονομερή που χρειάζονται για τη σύνθεση των νέων μορίων DNA.
4. Η DNA πολυμεράση με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων και με πρότυπο ένα εκμαγείο DNA (template DNA) συνθέτει τις θυγατρικές συμπληρωματικές αλυσίδες DNA επιμηκώνοντας το 3' άκρο των εκκινητών. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη DNA πολυμεράση είναι η Taq polymerase που απομονώθηκε για πρώτη φορά από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus* και για αυτό έχει μέγιστη θερμοκρασία λειτουργίας τους 72°C, μια απαραίτητη ιδιότητα για τη διεξαγωγή της PCR.
5. Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για την δράση της DNA πολυμεράσης, ενώ στο συγκεκριμένο kit αντιδραστηρίων περιέχει και MgCl₂ σε τελική συγκέντρωση 1.5 mM στα 25 μL της αντίδρασης, καθώς τα ιόντα μαγνησίου Mg⁺²⁺ είναι απαραίτητος συμπαράγοντας της DNA πολυμεράσης. Ανάλογα με το είδος της πολυμεράσης, από την εταιρία παραγωγής του ενζύμου, παρέχεται και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.
6. Το DEPC-νερό είναι απιονισμένο και ελεύθερο από μικροοργανισμούς που θα μπορούσαν να προκαλέσουν μολύνσεις, καθώς και από DNases που θα μπορούσαν να αποικοδομήσουν το εκμαγείο DNA (template DNA).

6.3. Συνθήκες πραγματοποίησης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Στις αντιδράσεις Συμβατικής PCR χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια από το “KAPA Taq PCR Kit” της εταιρίας KAPA BIOSYSTEMS. Πρώτο βήμα για την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης PCR αποτελεί η παρασκευή του master mix, το οποίο περιέχει συνολικό όγκο τέτοιον ώστε κάθε σωληνάκι τύπου Eppendorf που θα πραγματοποιηθεί μια αντίδραση PCR, με συνολικό όγκο αντίδρασης τα 25 μL, να περιέχει: 19,4 μL DEPC-νερού, 2,5 μL 10X KAPA Taq Buffer σε τελική συγκέντρωση 1X στα 25 μL της αντίδρασης (τα διαλύματα KAPA Taq Buffer 1X περιέχουν MgCl₂ σε τελική συγκέντρωση 1.5 mM), 0,5 μL 10 mM dNTPs mix σε τελική συγκέντρωση 0,2 mM για το κάθε dNTP, 1 μL 10 μM του πρόσθιου εκκινητή (forward primer, FP) σε τελική συγκέντρωση 0,4 μM, 1 μL 10 μM του ανάστροφου εκκινητή (reverse primer, RP) σε τελική συγκέντρωση 0,4 μM και 0,1 μL 5 U/μL DNA Polymerase σε τελική ποσότητα 0,5 U.

Τα 24,5 μL του master mix μοιράζονται στα σωληνάκια τύπου Eppendorf, και σε κάθε σωλήνα προστίθενται 0,5 μL cDNA από το αντίστοιχο δείγμα ασθενή. Σε κάθε σειρά πειραμάτων χρησιμοποιείται ένα αρνητικό control (negative control), στο οποίο αντί για εκμαγείο DNA (cDNA) προστίθεται ίση ποσότητα νερού. Επιπλέον, χρησιμοποιείται ένα θετικό control, στο οποίο περιέχεται cDNA που δίνει επιβεβαιωμένο θετικό αποτέλεσμα, για σκοπούς επιβεβαίωσης της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων μας. Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης που επιλέγεται στο θερμικό κυκλοποιητή με τα στάδια 2-4 να επαναλαμβάνονται για 25-35 κύκλους περιλαμβάνει:

1. Αρχική αποδιάταξη (initial denaturation) στους 95°C για 3 min
2. Αποδιάταξη (denaturation) στους 95°C για 30s
3. Επαναδιάταξη (annealing) σε θερμοκρασία Ta ξεχωριστή για κάθε ζεύγος εκκινήτων για 30s
4. Επιμήκυνση (extension) στους 72°C για 1 min (1 min/Kb)
5. Τελική επιμήκυνση (final extension) στους 72°C για 1 min (1 min/Kb)
6. Διατήρηση (Hold) του προϊόντος της PCR στους 4°C

6.4. Απόδοση και ειδικότητα μιας αντίδρασης PCR και οι παράγοντες καθορισμού τους

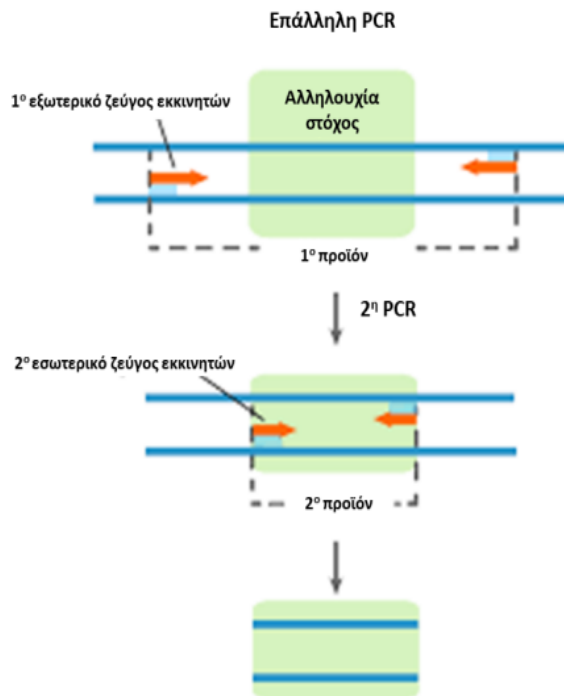
Η επιτυχία μιας αντίδρασης PCR καθορίζεται από την απόδοση και την ειδικότητα. Απόδοση ονομάζεται η παραγωγή σε μεγάλη ποσότητα του επιθυμητού προϊόντος της αντίδρασης. Ειδικότητα ονομάζεται η παραγωγή ενός μόνο συγκεκριμένου προϊόντος κατά την αντίδραση. Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τις παραμέτρους αυτές, αποτελεί η ποσότητα MgCl_2 και συνεπώς η συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου Mg^{+2} . Αρχικά, τα ιόντα μαγνησίου είναι απαραίτητος συμπαράγοντας της DNA πολυμεράσης. Παράλληλα, σχηματίζουν σύμπλοκα με τα dNTPs και βοηθούν την ενσωμάτωσή τους και τέλος, διευκολύνουν τον υβριδισμό εκκινήτη-αλυσίδας εκμαγείου. Συνεπώς, αυξημένη ποσότητα Mg^{+2} οδηγεί σε μείωση της ευαισθησίας και αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης και αντίστροφα. Η άριστη συγκέντρωση που πρέπει να χρησιμοποιείται προσδιορίζεται ξεχωριστά για κάθε αντίδραση. Ένας άλλος πολύ σημαντικός παράγοντας, είναι η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινήτων (Ta, Tannealing). Όσο μεγαλύτερη είναι η Ta τόσο περισσότερο δυσκολεύεται η μη ειδική πρόσδεση των εκκινήτων στην αλυσίδα εκμαγείου και συνεπώς, αυξάνεται η ευαισθησία, αλλά μειώνεται η

απόδοση και αντίστροφα. Η T_a ισούται με την T_m των εκκινητών, όμως, δύναται να είναι μέχρι και 5°C μικρότερη της. Έτσι, το 2 στάδιο της PCR (υβριδοποίηση των εκκινητών) είναι καθοριστικό για την ειδικότητα των προϊόντων που θα παραχθούν από την αντίδραση. Τέλος, σημαντικός παράγοντας καθορισμού της ειδικότητας αποτελεί η σύνθεση και η χρήση κατάλληλων εκκινητών ώστε να ενισχυθεί επιλεκτικά η επιθυμητή αλληλουχία. Για τον σκοπό αυτό έχουν καθιερωθεί ορισμένοι κανόνες όσον αφορά τον σχεδιασμό εκκινητών οι οποίοι θα αναλυθούν στην συνέχεια.

7. Επάλληλη Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (*Nested PCR*)

7.1. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος της Επάλληλης Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (*Nested PCR*) είναι μια τροποποίηση της αντίστοιχης συμβατικής PCR, η οποία στοχεύει στην μείωση μη ειδικών προϊόντων καθώς, και στην αύξηση της ειδικότητας και της ευαισθησίας της αντίδρασης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην χρήση 2 ζευγών εκκινητών. Το πρώτο ζεύγος, χρησιμοποιείται σε μια πρώτη αντίδραση συμβατικής PCR, όπου τα προϊόντα αφού αραιωθούν, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις όπως άλατα, ένζυμα κ.λπ., χρησιμοποιούνται σαν υπόστρωμα σε μια δεύτερη αντίδραση PCR, αξιοποιώντας το δεύτερο ζεύγος εκκινητών (Εικόνα 12). Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής οφείλονται στο γεγονός ότι το δεύτερο ζεύγος στοχεύει σε μια αλληλουχία εσωτερικότερη του προϊόντος που ενισχύθηκε κατά την πρώτη συμβατική PCR με σκοπό την ενίσχυση μιας εσωτερικής περιοχής του πρώτου PCR προϊόντος. Έτσι, το δεύτερο εσωτερικότερο ζευγάρι εκκινητών ενισχύει, μόνο, το αναμενόμενο από την πρώτη αντίδραση προϊόν και όχι παραπροϊόντα. Επιπλέον, με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης για τη λήψη του επιθυμητού προϊόντος και για αυτό η *Nested PCR* χρησιμοποιείται για την ενίσχυση αλληλουχιών που υπάρχουν σε μικρή συγκέντρωση στο αρχικό δείγμα.



Εικόνα 12: Η επάλληλη PCR έχει ένα ζεύγος εξωτερικών και ένα ζεύγος εσωτερικών εκκινητών, για να πολλαπλασιάσουν μία συγκεκριμένη αλληλουχία, με απώτερο σκοπό την αύξηση της ειδικότητας του προϊόντος και τη μείωση των παραπροϊόντων. (Τροποποιημένη εικόνα από: Polymerase Chain Reaction (PCR) – Variations to the System | abm Inc.)

7.2. Συνθήκες πραγματοποίησης επάλληλης Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης

Σε μια Nested PCR ακολουθείται το ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο με την απλή συμβατική PCR με κάποιες τροποποιήσεις. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται προέρχονται επίσης από την εταιρία KAPA BIOSYSTEMS. Η κύρια διαφορά έγκειται στο ότι στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται 1 μL αραιωμένου PCR προϊόντος, το οποίο προέρχεται από την πρώτη συμβατική PCR με αραιώση (1:50) αντί για 0,5 μL . Εξαιτίας αυτού, στα 25 μL της αντίδρασης πλέον, αντιστοιχούν 18,9 μL νερού αντί για 19,4 μL . Τα υπόλοιπα συστατικά για την παρασκευή του master mix προστίθενται στις ίδιες ακριβώς ποσότητες με τη συμβατική PCR, όπως αναφέρθηκε

προηγουμένως. Δηλαδή, σε κάθε σωληνάκι τύπου Eppendorf θα πρέπει να περιέχονται 2,5 μL 10X KAPA Taq Buffer σε τελική συγκέντρωση 1X στα 25 μL της αντίδρασης (τα διαλύματα KAPA Taq Buffer 1X περιέχουν MgCl_2 σε τελική συγκέντρωση 1,5 mM), 0,5 μL 10 mM dNTPs mix σε τελική συγκέντρωση 0,2 mM για το κάθε dNTP, 1 μL 10 μM του πρόσθιου εκκινητή (forward primer, FP) σε τελική συγκέντρωση 0,4 μM , 1 μL 10 μM του ανάστροφου εκκινητή (reverse primer, RP) σε τελική συγκέντρωση 0,4 μM και 0,1 μL 5 U/ μL KAPA Taq DNA Polymerase σε τελική ποσότητα 0,5 U. Τα 24,5 μL του master mix μοιράζονται στα σωληνάκια τύπου Eppendorf, και σε κάθε σωλήνα προστίθενται 1 μL αραιωμένου προϊόντος της πρώτης PCR από το αντίστοιχο δείγμα ασθενή. Εκτός του αρνητικού μάρτυρα του πειράματος αυτού (Negative Template Control 2, NTC 2) , η χρήση του οποίου είναι αναγκαία, αφού πρόκειται για μια νέα αντίδραση PCR, χρησιμοποιείται και ένας αρνητικός μάρτυρας προερχόμενος από το πρώτο πείραμα της συμβατικής PCR (Negative Template Control, NTC 1), ο οποίος περιέχει 1 μL αραιωμένου δείγματος (με αναλογία αντίστοιχη της αραιώσης που έγινε κάθε φορά) από το σωληνάκι της αντίδρασης του αρνητικού μάρτυρα του πρώτου πειράματος. Το θερμικό πρωτόκολλο που επιλέγεται στον θερμικό κυκλοποιητή είναι παρόμοιο και στις δύο αντιδράσεις, με τα στάδια 2-4 να επαναλαμβάνονται για 25-35 κύκλους, και περιλαμβάνει:

1. Αρχική αποδιάταξη (initial denaturation) στους 95°C για 3 min
2. Αποδιάταξη (denaturation) στους 95°C για 30s
3. Επαναδιάταξη (annealing) σε θερμοκρασία Ta ξεχωριστή για κάθε ζεύγος εκκινητών για 30s
4. Επιμήκυνση (extension) στους 72°C για 1 min (1 min/Kb)
5. Τελική επιμήκυνση (final extension) στους 72°C για 1 min (1 min/Kb)
6. Διατήρηση (Hold) του προϊόντος της PCR στους 4°C

8. Εκκινητές στις αντιδράσεις συμβατικής PCR, και επάλληλης PCR (Nested PCR)

8.1. Κανόνες σχεδιασμού εκκινητών

Η επιτυχία μιας αντίδρασης PCR, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον σχεδιασμό ειδικών εκκινητών, οι οποίοι θα πολλαπλασιάσουν αποκλειστικά την επιθυμητή αλληλουχία, εξασφαλίζοντας έτσι την ειδικότητα της αντίδρασης. Για τον λόγο αυτό, ο σχεδιασμός τους πρέπει να ακολουθεί τους εξής κανόνες:

1. Το μήκος τους πρέπει να κυμαίνεται από 16-23 bp. παράγοντας που καθορίζει την θερμοκρασία τήξης (T_m) και κατά συνέπεια τη θερμοκρασία αναδιάταξης (T_a). Μεγαλύτερου μήκους εκκινητές έχουν αρκετά υψηλό σημείο τήξης (T_m) που καθιστά δύσκολη την υβριδοποίησή τους στις αλληλουχίες στόχους στα θερμοκρασιακά εύρη του σταδίου υβριδοποίησης, μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα δέσμευσης. Αντίθετα, μικρότερου μήκους εκκινητές, οδηγούν σε μειωμένη ειδικότητα κατά τον πολλαπλασιασμό του τμήματος DNA, αφού ενδέχεται να συνδεθούν με άλλα τμήματα του DNA
2. Η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (Melting Temperature, T_m): Η θερμοκρασία στην οποία το 50% του εκκινητή βρίσκεται σε μονόκλωνη κατάσταση και το υπόλοιπο 50% βρίσκεται υβριδοποιημένο στις αλυσίδες-εκμαγεία πρέπει να κυμαίνεται στους 57- 63°C. Οι εκκινητές (Forward και Reverse) που θα χρησιμοποιηθούν στην ίδια PCR αντίδραση είναι προτιμότερο να έχουν παραπλήσιο T_m .
3. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών (Annealing Temperature, T_a) πρέπει να ισούται με την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών ($T_a = T_m$), ωστόσο, μπορούν να διαφέρουν μέχρι 5°C ($T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$). Μεγαλύτερες θερμοκρασίες υβριδοποίησης μπορεί να ενισχύσουν τον ειδικό πολλαπλασιασμό, αλλά οδηγούν συχνά σε μειωμένη απόδοση.
4. Το περιεχόμενο GC (GC content) πρέπει να είναι 40-60%, καθώς οι τρεις δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των G και C σταθεροποιούν τις μη ειδικές συνδέσεις μεταξύ μερικώς συμπληρωματικών μορίων, οδηγώντας σε μειωμένη ειδικότητα της αντίδρασης
5. Στις πέντε τελευταίες βάσεις του εκκινητή μπορούν να βρίσκονται το πολύ 3 ζεύγη GCs (GC clamp), ώστε να αποτραπεί η μη ειδική σύνδεση του 3' άκρου του εκκινητή λόγω της σταθερότητας του annealing από όπου ξεκινά την επιμήκυνση η DNA πολυμεράση.

6. Πρέπει να αποφεύγονται μερικώς συμπληρωματικές περιοχές μεταξύ των εκκινητών ώστε να εμποδίζεται η δημιουργία δομών φουρκέτας (hairpins), διμερών εκκινητών (primer dimers) ή διμερών εντός ενός εκκινητή (self-dimers) ή ακόμη και διμερών μεταξύ των εκκινητών (cross-dimers).
7. Είναι αναγκαίο να αποφεύγεται η συμπληρωματικότητα με άλλα υποστρώματα της αντίδρασης, δηλαδή η μη ειδική σύνδεση των εκκινητών σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος.
8. Επαναλήψεις δι-νουκλεοτιδίων ή ίδιας βάσης πρέπει να αποφεύγονται. Ένας μέγιστος αριθμός επαναλήψεων δινουκλεοτιδίων που είναι αποδεκτοί σε ένα ολίγο είναι 4 δινουκλεοτίδια ενώ για επαναλαμβανόμενες βάσεις είναι 4 bp.

Διαδικτυακά εργαλεία όπως το primer-blast εξυπηρετούν στον σωστό σχεδιασμό των εκκινητών. Συγκεκριμένα το λογισμικό αυτό, παρέχει ορισμένες από τις πιο πάνω παραμέτρους, και όχι μόνο, όπως, το μήκος των εκκινητών, το σημείο τήξης τους ($T_m^{\circ}\text{C}$), το % ποσοστό GC και ενδεικτικές τιμές της συμπληρωματικότητας μεταξύ ενός εκκινητή και του 3' άκρου του. Αυτές οι παράμετροι αξιολογούνται κάθε φορά για την επιλογή του καλύτερου εκκινητή για την ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας.

8.2. Αποκλίνοντες εκκινητές (divergent primers) για επιλεκτική ενίσχυση των circRNA

Σε μια αντίδραση PCR με σκοπό την ενίσχυση μιας γραμμικής αλληλουχίας χρησιμοποιούνται παραδοσιακά συγκλίνοντες εκκινητές (convergent primers), οι οποίοι ενισχύουν την περιοχή που βρίσκεται εσωτερικά αυτών. Αντίθετα, για την ενίσχυση μιας αλληλουχίας ενός κυκλικού RNA και την αποφυγή ενίσχυσης των γραμμικών μεταγράφων χρησιμοποιούνται αποκλίνοντες εκκινητές (divergent primers). Στην περίπτωση αυτή, ο πρόσθιος εκκινητής τοποθετείται καθοδικά του ανάστροφου συγκριτικά με την αλληλουχία του γονιδίου και ιδανικά το σημείο έναρξης του ανάστροφου εκκινητή (5' άκρο) να βρίσκεται αμέσως πριν το σημείο έναρξης του πρόσθιου εκκινητή (5' άκρο) χωρίς ενδιάμεσο κενό. Έτσι, αποφεύγεται η ενίσχυση τμημάτων εσωτερικά των εκκινητών και είναι δυνατή η ενίσχυση πιθανών κυκλικών μεταγράφων του γονιδίου. Για το σχεδιασμό τους με τη χρήση του λογισμικού Primer-BLAST μπορούν να βρεθούν ορισμένοι πρόσθιοι και ανάστροφοι εκκινητές ειδικοί για την γονιδιωματική

περιοχή ενδιαφέροντος και να σχηματιστούν έπειτα τα κατάλληλα ζεύγη αποκλινόντων εκκινητών (divergent primers) για τη λήψη κυκλικών μεταγράφων

8.3. Αποκλίνοντες εκκινητές για συμβατική και επάλληλη PCR (Nested PCR) για την εύρεση του circCCT3

Οι ιδιότητες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της έκφρασης του circCCT3 παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 4: Ιδιότητες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του circCCT3

Εκκινητής	Εξώνιο	Τύπος PCR	Αλληλουχία (5'→3')	Μήκος (nt)	Ποσοστό GC (%)	Tm (°C)
circCCT3_F	10	Συμβατική PCR	GCCAATATCACAGCCATCC	19	53	56
circCCT3_R	10	Συμβατική PCR	GCATAAGGTAGTGCTGAGCT	20	50	57
circCCT3_Fin	9 + 10	Επάλληλη PCR	CGCATTGCTAGACTGACATTGA	22	45	57
circCCT3_Rin	9	Επάλληλη PCR	CACATCGGGCTTCAGTTGGA	20	55	60

8.4. Αντιδράσεις και συνθήκες πραγματοποίησης συμβατικής και επάλληλης PCR (Nested PCR) για την εύρεση του circCCT3

Παρουσιάζεται η αντίδραση συμβατικής PCR με αποκλίνοντες εκκινητές (divergent primers) και η επακόλουθη αντίδραση Nested PCR με τη χρήση ζεύγους εσωτερικότερων αποκλινόντων εκκινητών, χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα το προϊόντα της πρώτης PCR αντίδρασης, καθώς και οι συνθήκες που πραγματοποιήθηκε η κάθε μια:

- Στην πρώτη αντίδραση συμβατικής PCR που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών circCCT3_F - circCCT3_R σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=57^\circ\text{C}$ για 20 κύκλους και σε χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}}=30 \text{ sec}$

- Στην δεύτερη αντίδραση, Nested PCR χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών circCCT3_Fin - circCCT3_Rin σε συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών $T_a=59^{\circ}\text{C}$ για 35 κύκλους και σε χρόνο επιμήκυνσης $t_{\text{ext.}}=30 \text{ sec}$, με χρήση ως template το 1/50 αραιωμένο προϊόν της 1^{ης} PCR.

Τα ηλεκτροφορητικά αποτελέσματα αυτών των αντιδράσεων, καθώς και τα αναμενόμενα μήκη σε κάθε περίπτωση, παρουσιάζονται και αναλύονται στην αντίστοιχη ενότητα στα αποτελέσματα.

9. Γονίδια αναφοράς – σταθερής έκφρασης (*housekeeping genes*)

Τα γονίδια αναφοράς αποτελούν μια κατηγορία γονιδίων τα οποία εκφράζονται σταθερά σε όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού ανεξαρτήτως του τύπου ιστού, το στάδιο ανάπτυξης ή την λειτουργία του κυττάρου. Αυτά τα γονίδια εμπλέκονται σε βασικές διεργασίες που είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της κυτταρικής λειτουργίας, όπως η αντιγραφή του DNA, η μεταγραφή, η μετάφραση και ο μεταβολισμός. Παραδείγματα γονιδίων αναφοράς περιλαμβάνουν αυτά που κωδικοποιούν δομικά συστατικά του κυττάρου, όπως η ακτίνη και η τουμπουλίνη, γονίδια που εμπλέκονται στη σύνθεση πρωτεϊνών, όπως γονίδια ριβοσωμικού RNA, και γονίδια που εμπλέκονται στην αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA, όπως η πολυμεράση του DNA και η λιγάση του DNA.

Τα γονίδια αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά καθώς χρησιμοποιούνται συχνά ως γονίδια αναφοράς για την ομαλοποίηση των δεδομένων γονιδιακής έκφρασης. Επιπλέον, δεδομένου ότι εκφράζονται σε σχετικά σταθερά επίπεδα σε διαφορετικούς ιστούς και πειραματικές συνθήκες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βάση σύγκρισης για τον εντοπισμό αλλαγών στην έκφραση άλλων γονιδίων. Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς *GAPDH* το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης που εμπλέκεται στον ενεργειακό μεταβολισμό του κυττάρου.

10. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (*quantitative real time polymerase chain reaction, real-time qPCR*)

10.1. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (*quantitative real time polymerase chain reaction, real-time qPCR*) επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό της επιθυμητής αλληλουχίας DNA και ταυτόχρονα την ανίχνευση του προϊόντος που παράγεται στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης. Βασίζεται στην ανίχνευση του φθορισμού που παράγεται από την πρόσδεση μη ειδικών φθορίζουσων χρωστικών οι οποίες παρεμβάλλονται μεταξύ οποιουδήποτε δίκλωνου DNA (Εικόνα 13) ή σημασμένων ιχνηθετών (*probes*) οι οποίοι είναι εξειδικευμένοι έναντι μίας αλληλουχίας και εκπέμπουν φθορισμό μόνο μετά τον υβριδισμό τους με την συμπληρωματική αλληλουχία.

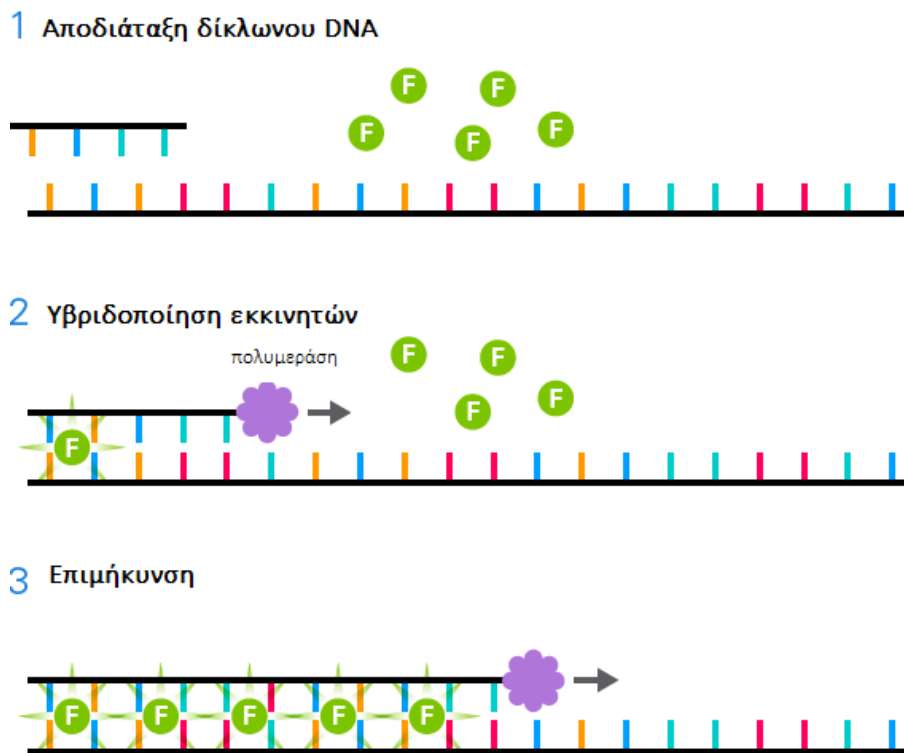
Όπως και στην συμβατική PCR, η αντίδραση πραγματοποιείται σε τρία επαναλαμβανόμενα στάδια, που ονομάζονται κύκλοι της αντίδρασης, και περιλαμβάνουν την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, τον υβριδισμό των εκκινητών στην επιθυμητή αλληλουχία, και την επιμήκυνση των εκκινητών με πολυμερισμό δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Συνήθως οι κύκλοι επαναλαμβάνονται 25-50 φορές. Σε αντίθεση με την συμβατική PCR, αυτή η μέθοδος αποφεύγει την χρήση ηλεκτροφορητικών τεχνικών για να αναπαραστήσει τα αποτελέσματα όλων των δειγμάτων, καθώς αυτά φαίνονται από την καμπύλη ενίσχυσης που δίνει το μηχάνημα της *real-time PCR*. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σε περιπτώσεις, όπου υπάρχουν κάποιες αμφιβολίες αναφορικά την ταυτότητα του προϊόντος.

Κατά την διάρκεια της *real-time PCR* ο φθορισμός μετρείται ανά κύκλο και όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (*amplification plot*). Στα αρχικά στάδια της αντίδρασης, ο φθορισμός από το παραγόμενο προϊόν δεν μπορεί να διακριθεί από το σήμα υποβάθρου του συστήματος. Αυτή η φάση ονομάζεται «φάση υποβάθρου». Καθώς η αντίδραση πραγματοποιείται όλο και περισσότερους κύκλους και το προϊόν της αντίδρασης αυξάνεται, το ειδικό σήμα φθορισμού που εκπέμπεται ξεπερνά το σήμα υποβάθρου της αντίδρασης. Τότε, διακρίνεται η εκθετική φάση όπου τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε περίσσεια και η απόδοση της αντίδρασης είναι η μέγιστη δυνατή με αποτέλεσμα τον διπλασιασμό του προϊόντος. Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται για την ανίχνευση σήματος φθορισμού

μεγαλύτερου από το σήμα του υπόβαθρου, είναι γνωστός ως «οριακός κύκλος» (threshold cycle, CT) και ορίζεται ως η αύξηση του φθορισμού του προϊόντος της PCR πάνω από ένα συγκεκριμένο κατώφλι (threshold). Η τιμή Ct αποτελεί την σημαντικότερη παράμετρο για την ποσοτικοποίηση της μεθόδου. Μετά από έναν αριθμό κύκλων, η εκθετική φάση (exponential growth phase) ακολουθείται από τη γραμμική φάση (linear phase) όπου τα αντιδραστήρια καθίστανται περιοριστικοί παράγοντες με αποτέλεσμα να μειώνεται η απόδοση της αντίδρασης. Τελευταία φάση της αντίδρασης αποτελεί η φάση κορεσμού ή πλατό (plateau) και οφείλεται στη μείωση της καταλυτικής ενεργότητας της DNA πολυμεράσης. Οι διαφορές στις παραγόμενες καμπύλες στη real time PCR οφείλονται στις διαφορές στην αρχική ποσότητα υποστρώματος που έχει προστεθεί στη μοναδιαία αντίδραση. Σε μια αντίδραση με περισσότερο αρχικό υπόστρωμα θα χρειαστούν λιγότεροι κύκλοι για να ξεπεραστεί το σήμα υποβάθρου, σε σχέση με μια αντίδραση με λιγότερο αρχικό υπόστρωμα.

Το σύστημα ανίχνευσής που χρησιμοποιήθηκε είναι βασισμένο στη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I. Πρόκειται για μια μη ειδική φθορίζουσα χρωστική, η οποία έχει την ιδιότητα να προσδένεται σε δίκλιωνα μόρια DNA και τότε να εκπέμπει φθορισμό. Η χρήση φθορίζοντων χρωστικών που δεσμεύονται στο DNA είναι μία από τις ευκολότερες και εύχρηστες προσεγγίσεις της real-time PCR ενώ άλλο πλεονέκτημα αποτελεί το χαμηλό κόστος. Καθώς ο φθορισμός αυτών των χρωστικών αυξάνει δραματικά παρουσία διπλής έλικας DNA, η σύνθεση του DNA μπορεί να παρακολουθηθεί ως μία αύξηση στο φθορίζον σήμα. Συγκεκριμένα, η αύξηση του σήματος φθορισμού, είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται με τη ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Ωστόσο, οι χρωστικές αυτές προσδένονται σε όλους τους τύπους δίκλωνου DNA, επιτρέποντας την ανίχνευση και μη ειδικών PCR προϊόντων. Για τον λόγο αυτό καθίσταται αναγκαία η επιβεβαίωση της ειδικής ενίσχυσης του επιθυμητού προϊόντος μέσω της ανάλυσης καμπύλης τήξεως όπως αναλύεται στην συνέχεια.

Μετά το τέλος της PCR δημιουργείται η «καμπύλη τήξης» (melt curve) η οποία αναπαριστά το φθορισμό σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Για τον σχηματισμό της, αποδιατάσσονται όλα τα προϊόντα αυξάνοντας τη θερμοκρασία διαδοχικά (2 °C σε κάθε βήμα) ξεκινώντας από τους 60 °C και φτάνοντας έως και τους 90°C, μετρώντας τον φθορισμό ταυτόχρονα. Η ανάλυση της καμπύλης τήξης επιτρέπει τον διαχωρισμό του σήματος φθορισμού που οφείλεται στην ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου από το σήμα φθορισμού που οφείλεται σε μη ειδικά προϊόντα καθώς κάθε προϊόν έχει μια χαρακτηριστική θερμοκρασία τήξης που εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας. Έτσι, ένα ειδικό προϊόν θα δώσει μια συγκεκριμένη οξεία κορυφή που θα αντιστοιχεί στο Tm του, σε αντίθεση με τα μη ειδικά προϊόντα που θα δώσουν πολλές κορυφές σε διαφορετικές Tm.



Εικόνα 13: Σχηματική περιγραφή της ενσωμάτωσης SYBR Green I (φθορίζουσας ουσίας) κατά την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. (Τροποποιημένη εικόνα από: One-step RT-qPCR kits).

10.2. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του κυκλικού μορίου RNA circCCT3

Με σκοπό την ποσοτικοποίηση των δεδομένων από μια αντίδραση real-time PCR χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικές μέθοδοι: η μέθοδος της πρότυπης καμπύλης όπου γίνεται απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός και η μέθοδος σύγκρισης των Ct για σχετική ποσοτικοποίηση. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός με τα αποτελέσματα να παρουσιάζουν πόσες φορές αυξημένη ή μειωμένη είναι η έκφραση του γονιδίου στόχου στα υπό μελέτη δείγματα σε σχέση με ένα δείγμα βαθμονομητή.

Απαραίτητα για την ποσοτικοποίηση μίας αντίδρασης real-time PCR, είναι πάντοτε ένα γονίδιο αναφοράς και ένας θετικός μάρτυρας. Τα επίπεδα έκφρασης του κυκλικού μορίου RNA circCCT3 κανονικοποιήθηκαν σύμφωνα με τα επίπεδα έκφρασης mRNA του γονιδίου αναφοράς *GAPDH*. Η κανονικοποίηση ως προς το ενδογενές γονίδιο απαιτείται για τη διόρθωση των πιθανών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων, οι οποίες οφείλονται σε διακυμάνσεις στην αρχική ποσότητα των δειγμάτων, ή σε διαφορές στην απόδοση κατά την σύνθεση του cDNA. Ο θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται καθώς περιέχεται cDNA που δίνει επιβεβαιωμένο θετικό αποτέλεσμα, για σκοπούς επιβεβαίωσης της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων μας. Στην συγκεκριμένη διπλωματική χρησιμοποιήθηκε cDNA από την κυτταρική σειρά H929.

Αριθμητικές πράξεις χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των σχετικών επιπέδων έκφρασης, σε σύγκριση με έναν βαθμονομητή, ο οποίος μπορεί για παράδειγμα να είναι δείγμα ελέγχου (μη επεξεργασμένο). Η ποσότητα του στόχου, κανονικοποιημένη ως προς το ενδογενές γονίδιο αναφοράς και σε σχέση με τον βαθμονομητή, δίνεται στη συνέχεια από την μαθηματική εξίσωση

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

- όπου: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ δείγματος} - \Delta Ct \text{ βαθμονομητή}$
 $\Delta Ct \text{ δείγματος} = Ct \text{ δείγματος, γονιδίου στόχου} - Ct \text{ δείγματος, γονιδίου αναφοράς}$
 $\Delta Ct \text{ βαθμονομητή} = Ct \text{ βαθμονομητή, γονιδίου στόχου} - Ct \text{ βαθμονομητή, γονιδίου αναφοράς}.$

Η εφαρμογή της μεθόδου σύγκρισης των Ct προϋποθέτει ότι η απόδοση της αντίδρασης ενίσχυσης του γονιδίου-στόχου και της αντίδρασης ενίσχυσης του γονιδίου αναφοράς είναι σχεδόν ίδιες. Με την χρήση σειριακών αραιώσεων cDNA από την H929 κυτταρική σειρά σχεδιάστηκε πρότυπη καμπύλη ενισχύοντας τόσο το γονίδιο στόχο όσο και το γονίδιο αναφοράς. Απόδοση της αντίδρασης ενίσχυσης παρόμοια και μεγαλύτερη από 80% επιτρέπει την χρήση της μεθόδου. Σε διαφορετική περίπτωση νέοι εκκινητές μπορούν να σχεδιαστούν με σκοπό την επίτευξη παρόμοιων αποδόσεων ή η ποσοτικοποίηση να πραγματοποιηθεί μέσω της μεθόδου απόλυτης ποσοτικοποίησης.

10.3. Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης real-time PCR

Η αντίδραση της real-time PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή 7500 Real-Time PCR System Fast (Applied Biosystems) χρησιμοποιώντας ως σύστημα ανίχνευσης αυτό της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green. Χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές για το circCCT3, οι ίδιοι με αυτούς που σχεδιάστηκαν για την επάλληλη PCR (Netsed PCR) οι οποίοι αναφέρθηκαν στην αντίστοιχη ενότητα, καθώς και ειδικοί εκκινητές για το γονίδιο αναφοράς GAPDH. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ο πρόσθιος εκκινητής Ex2 REAL F με αλληλουχία ATGGGGAAGGTGAAGGTCG και ο οπίσθιος εκκινητής Ex3 REAL R ο οποίος φέρει αλληλουχία GGGTCATTGATGGCAACAATATC. Πρώτο βήμα για την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης real-time PCR αποτελεί η παρασκευή του master mix, το οποίο περιέχει συνολικό όγκο τέτοιον ώστε κάθε σωληνάκι τύπου Eppendorf, με συνολικό όγκο αντίδρασης τα 10 μ L, να περιέχονται 5 μ L KAPA™ SYBR® FAST qPCR master mix (2X) (Kapa Biosystems Inc., Woburn, MA, USA) και 1 μ L από τον κάθε εκκινητή και 2,5 μ L νερού απαλλαγμένο από νουκλεάσες. Τα 9,5 μ L του master mix μοιράζονται στα σωληνάκια τύπου Eppendorf, και σε κάθε σωλήνα προστίθενται 0,5 μ L αραιωμένου 1:50 cDNA, που έχει προέλθει από το προηγούμενο βήμα της αντίστροφης μεταγραφής cDNA από το αντίστοιχο δείγμα ασθενή. Χρησιμοποιείται ένα αρνητικό control (negative control), στο οποίο αντί για εκμαγείο DNA (cDNA) προστίθεται ίση ποσότητα νερού, έτσι ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει μόλυνση στο Master Mix που χρησιμοποιείται στο πείραμα. Επιπλέον, χρησιμοποιείται ένα θετικό control, στο οποίο περιέχεται cDNA που προήλθε από την κυτταρική σειρά H929 για σκοπούς επιβεβαίωσης της εγκυρότητας

των αποτελεσμάτων μας. Τα 10 μL από κάθε σωληνάκι τύπου Eppendorf μεταφέρθηκαν στα πηγαδάκια (wells) του plate και ακολούθως τοποθετήθηκε στην κατάλληλη υποδοχή του θερμικού κυκλοποιητή. Το θερμικό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε συμπεριελάμβανε, ένα βήμα αποδιάταξης στους 95 °C για 3 λεπτά, στη συνέχεια για 40 κύκλους θέρμανση στους 95 °C για 3 δευτερόλεπτα για την αποδιάταξη των προϊόντων της PCR και θέρμανση στους 60 °C για 30 δευτερόλεπτα, για την υβριδοποίηση των εκκινητών, τον πολυμερισμό αλλά και για την ανίχνευση του φθορισμού.

11. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

11.1. Αρχή της μεθόδου

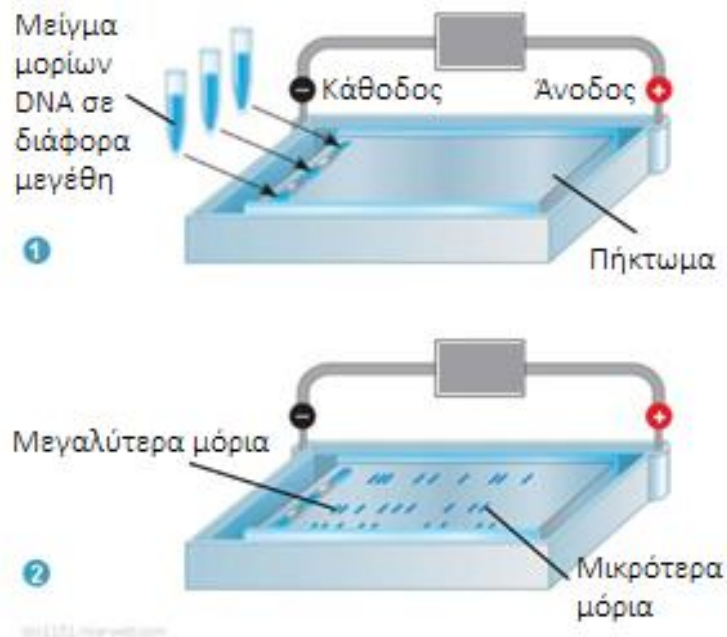
Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί την απλούστερη μέθοδο για διαχωρισμό και οπτικοποίηση νουκλεϊνικών οξέων και πρωτεϊνών που βασίζεται στο μοριακό τους βάρος ή μέγεθος. Τα γραμμικά μόρια DNA διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθος τους όταν υποβάλλονται σε ηλεκτρικό πεδίο μέσω μιας μήτρας πηκτώματος ενός αδρανούς, πορώδους υλικού. Καθώς το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο, όταν υποβάλλεται σε ηλεκτρικό πεδίο, μετακινείται μέσω του πηκτώματος προς τον θετικό πόλο. Τα μικρού μεγέθους κλάσματα DNA μετακινούνται μέσω των πόρων που σχηματίζονται στο πήκτωμα με λιγότερη αντίσταση από τα μεγαλύτερου μεγέθους, με αποτέλεσμα αφού το πήκτωμα ηλεκτροφορηθεί, τα διαφορετικού μεγέθους μόρια διαχωρίζονται γιατί έχουν μετακινηθεί μέσω του πηκτώματος σε διαφορετικές αποστάσεις (Εικόνα 14).

Υπάρχουν 2 εναλλακτικοί τύποι πηκτώματος που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ανάλογα με το είδος του προς ηλεκτροφόρηση μορίου και της διακριτικής ικανότητας που μπορεί να επιτευχθεί. Συγκεκριμένα υπάρχουν τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου τα οποία εμφανίζουν υψηλή ικανότητα διαχωρισμού, διαχωρίζοντας μέχρι και μόρια που διαφέρουν στο μέγεθος κατά 1 βάση, αλλά χρησιμοποιούνται σε περιορισμένο εύρος μεγεθών DNA. Επιπλέον, υπάρχουν και τα πηκτώματα αγαρόζης τα οποία εμφανίζουν μικρότερη διακριτική ικανότητα και κανένα περιορισμό ως προς το μέγεθος των μορίων. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, τα χρησιμοποιούμενα πηκτώματα είναι πηκτώματα αγαρόζης (agarose gels), για αυτό και στο εξής θα αναφερόμαστε σε αυτά.

Τα πηκτώματα αγαρόζης παρασκευάζονται σε συγκεκριμένη εκατοστιαία αναλογία αγαρόζης ανά μάζα, και αποτελούνται από πόρους μέσω των οποίων μετακινούνται τα μόρια. Η συγκέντρωση της αγαρόζης που χρησιμοποιείται είναι αντιστρόφως ανάλογη της διαπερατότητας των πόρων του πηκτώματος, δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση αγαρόζης που χρησιμοποιείται τόσο μικρότερη είναι η διάμετρος των πόρων και αντίστροφα. Αφού ετοιμαστεί, η υγροποιημένη πήκτη χύνεται σε ένα ορθογώνιο σκεύος, στο ένα άκρο του οποίου σχηματίζονται τα πηγαδάκια, και έπειτα, αφού σταθεροποιηθεί το πήκτωμα βυθίζεται σε ηλεκτρικά αγώγιμο, ελαφρά αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα και στα πηγαδάκια προσθέτονται τα δείγματα DNA. Τέλος εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα.

Κατά την ηλεκτροφόρηση των υπό μελέτη δειγμάτων DNA, σε κάθε πήκτωμα ηλεκτροφορείται και ένας μάρτυρας (ladder), που αποτελεί μίγμα τμημάτων DNA γνωστού μήκους που δίνουν χαρακτηριστικό πρότυπο ζωνών έτσι ώστε να μπορούν να διαπιστωθούν τα μήκη των αγνώστων ζωνών. Μια διακριτή ζώνη, αποτελεί ένα πληθυσμό ισομεγεθών μορίων καθώς, όλα τα κλάσματα του ίδιου μεγέθους θα μετακινηθούν περίπου με την ίδια ταχύτητα και συνεπώς θα καλύψουν την ίδια απόσταση από το πηγαδάκι.

Για την απεικόνιση των ζωνών χρησιμοποιείται συνήθως η φθορίζουσα χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide, EtBr) το οποίο προσδένεται στο DNA παρεμβαλλόμενο μεταξύ των διαδοχικά στοιβαγμένων βάσεων. Μετά την απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας, η ουσία αυτή εκπέμπει φθορισμό επιτρέποντας την παρατήρηση των ζωνών στο πήκτωμα κάτω από UV. Το EtBr είναι, όμως, μια δυνητικά μεταλλαξογόνος και καρκινογόνος ουσία και απαιτεί μεγάλη προσοχή στο χειρισμό της. Απαραίτητη επίσης, είναι η ανάμειξη των δειγμάτων με την χρωστική φορτώματος (loading dye) πριν τη φόρτωσή τους στο πήκτωμα. Η χρήση της οφείλεται στο γεγονός ότι περιέχει ουσίες με αυξημένη πυκνότητα που συμπαρασύρουν το δείγμα στο πάτο του πηγαδιού του πηκτώματος και επιπρόσθετα, περιέχει έναν δείκτη που δείχνει το μέτωπο και την πρόοδο της ηλεκτροφόρησης. Γενικά, η ηλεκτροφόρηση είναι ένας εύκολος, γρήγορος και οικονομικός τρόπος διαχωρισμού και απομόνωσης των νουκλεϊκών οξέων που επιτρέπει τον προσδιορισμό των μήκων των αγνώστων ζωνών των δειγμάτων, και με βάση το μήκος τους να αποκτήσουμε μία πρώτη εικόνα για τη δομή του συγκεκριμένου προϊόντος.



Εικόνα 14: 1) Φαίνεται η τοποθέτηση δειγμάτων DNA και loading dye στα πηγαδάκια του πηκτώματος. 2) Τα δείγματα DNA τρέχουν στο πηκτώμα αгарόζης παρουσία ηλεκτρικού πεδίου αρχίζοντας από το θετικό άκρο. Έλκονται ηλεκτροστατικά προς το αρνητικό άκρο όπου τα μικρού μεγέθους κλάσματα DNA μετακινούνται μέσω των πόρων του πηκτώματος με λιγότερη αντίσταση από τα μεγαλύτερου μεγέθους, με αποτέλεσμα αφού το πηκτώμα ηλεκτροφορηθεί, τα διαφορετικού μεγέθους μόρια διαχωρίζονται γιατί έχουν μετακινηθεί μέσω του πηκτώματος σε διαφορετικές αποστάσεις. (Τροποποιημένη εικόνα από: Why is gel electrophoresis used? | Socratic).

11.2. Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων του γονιδίου CCT3

Για την εκτέλεση μιας ηλεκτροφόρησης, αρχικά συναρμολογείτε η βάση τοποθετώντας τα όρια και το κτενάκι για να σχηματιστούν τα πηγαδάκια αφού χυθεί η υγροποιημένη πήκτη. Έπειτα, υπολογίζεται και ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό η κατάλληλη μάζα (σε g) αгарόζης ανάλογα με το μήκος των μορίων που θέλουμε να διαχωριστούν (συνήθως η περιεκτικότητα είναι 1,6-2,0%) και μέτρηση του όγκου ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1X (Tris/Boric acid/EDTA buffer) (σε mL) που θα χρησιμοποιηθεί. Έτσι, μετρείται σε ογκομετρικό κύλινδρο ο όγκος του ρυθμιστικού

διαλύματος TBE 1X, ανάλογα με τη βάση του gel που θα χρησιμοποιηθεί και τοποθετείται μαζί με την αγαρόζη σε ένα ποτήρι ζέσεως. Έπειτα, το ποτήρι ζέσεως καλύπτεται με αλουμινόχαρτο στο οποίο ανοίγονται μικροί πόροι και θερμαίνεται στους 100°C για 2-3 min μέχρι να διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη. Στο επόμενο βήμα, ενώ το δοχείο βρίσκεται υπό συνεχή ήπια ανάδευση προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος EtBr (μL), ώστε αυτό να βρίσκεται σε αναλογία όγκου 1:10000 με το TBE 1X. Το υγρό αυτό διάλυμα ρίχνεται στη βάση του πήκτωματος και αφήνεται να πήξει και να στερεοποιηθεί για 35-45 min. Αφού σταθεροποιηθεί, αφαιρείται προσεκτικά το χτενάκι και το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0.5X μέχρις ότου να καλυφθεί και να βυθιστεί το πήκτωμα και ακολούθως φορτώνονται 10 μL ladder στο πρώτο πηγαδάκι και στα υπόλοιπα, 10 μL δείγματος που έχει παρασκευαστεί ως εξής: 10 μL δείγματος DNA και 2 μL loading dye 6X αναμιγνύονται πάνω σε parafilm. Τέλος, συνδέονται τα ηλεκτρόδια του τροφοδοτικού μηχανήματος στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και το πήκτωμα αφήνεται να τρέξει στα 180 V για περίπου 30 min, μέχρι το μέτωπο της χρωστικής-δείκτη να φτάσει την άκρη του. Η οπτικοποίηση και φωτογράφιση των ζωνών γίνεται σε ειδικά διαμορφωμένο σκοτεινό θάλαμο κάτω από λάμπα εκπομπής UV ακτινοβολίας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Τα δείγματα ασθενών που είχαν προηγουμένως διαγνωστεί με ΧΛΛ και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προέρχονται από 7 άνδρες και 3 γυναίκες. Από την στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε προκύπτει ότι η μέση ηλικία κατά την διάγνωση και τη συλλογή των δειγμάτων ήταν τα 68,20 έτη και κυμαινόταν από 50 έως 80 έτη. Η μέση ολική επιβίωση υπολογίστηκε στους 69,20 μήνες. Βάση τη σταδιοποίηση Binet, 4 ασθενείς (40%) ανήκουν στο στάδιο A, και 6 (60%) στο στάδιο C. Παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση LDH στον ορό σε 4 (40%) ασθενείς, ενώ οι υπόλοιποι 6 (60%) εμφάνισαν φυσιολογικά επίπεδα. Επιπλέον, 3 (30%) περιπτώσεις θεωρήθηκαν θετικές και 7 (70%) αρνητικές για την έκφραση του CD38 καθώς η έκφραση του ήταν >30% και <30% αντίστοιχα. Εντοπίστηκαν ακόμη, μεταλλάξεις στην *IGHV* γονιδιακή περιοχή σε 3 (30%) ασθενείς ενώ στους υπόλοιπους 7 (70%) η περιοχή ήταν μη μεταλλαγμένη. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθώς και κάποια περαιτέρω παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 5 : Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Συνολικός αριθμός ασθενών	10
Φύλο (αρσενικό/ θηλυκό)	7/3
	Διάμεσος(range)
Ηλικία (Χρόνια)	68,20 (50-80)
Ολική επιβίωση (Μήνες)	69,20 (13-120)
Λεμφοκύτταρα	34762,00 (7300-66750)
	Αριθμός ασθενών (%)
Στάδιο Binet	
A	4 (40%)
B	0 (0%)
C	6 (60%)
Στάδιο Rai	
0	1 (10%)
I	1 (10%)
II	2 (20%)

III	0 (0%)
IV	6 (60%)
Στάδιο κινδύνου (Risk)	
Χαμηλού	1 (10%)
Ενδιάμεσου	3 (30%)
Υψηλού	6 (60%)
Συγκέντρωση LDH ορού	
Φυσιολογική	6 (60%)
Παθολογική	4 (40%)
Έκφραση CD38	
Αρνητική	7 (70%)
Θετική	3 (30%)
Μεταλλάξεις IGHV	
Μεταλλαγμένη	3 (30%)
Μη μεταλλαγμένη	7 (70%)
Θεραπεία	
Όχι	5 (50%)
Ναι	5 (50%)

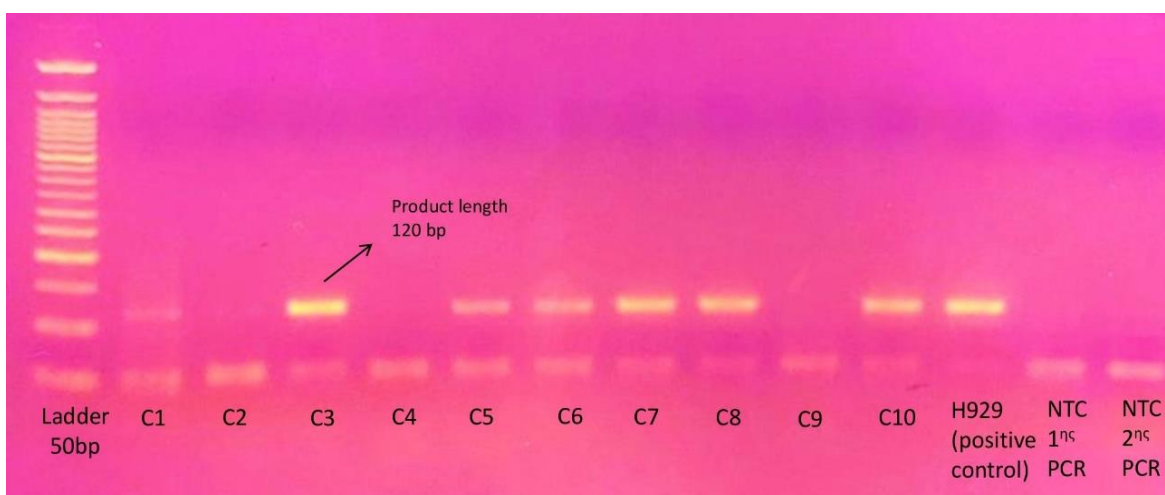
2. Ηλεκτροφορητικά αποτελέσματα από την Nested PCR αντίδραση

Οι αντιδράσεις συμβατικής, επάλληλης και real-time PCR που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα ζεύγη εκκινητών είχαν ως σκοπό μελέτη της έκφρασης του κυκλικού μορίου circCCT3. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε συμβατική PCR σε 10 δείγματα ασθενών με ΧΛΛ τα αποτελέσματα της οποίας δεν παρουσιάζονται καθώς η συγκέντρωση του στο αρχικό δείγμα ήταν πολύ μικρή, για αυτό και δεν ανιχνεύτηκε. Έτσι, τα προϊόντα της αντίδρασης αυτής χρησιμοποιήθηκαν σαν υπόστρωμα, έπειτα από αραίωση για την πραγματοποίηση της Nested PCR, με σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας. Στην συνέχεια, τα ίδια προϊόντα με την ίδια αραίωση χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της real-time PCR, με στόχο την σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης του circCCT3 στα υπό μελέτη δείγματα.

Χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος αποκλιόντων εκκινητών circCCT3_F και circCCT3_R όπου και οι δύο στόχευαν στο εξώνιο 10, για την πρώτη αντίδραση PCR και το ζεύγος circCCT3_Fin και circCCT3_Rout για την δεύτερη αντίδραση PCR. Στην περίπτωση αυτή ο εκκινητής circCCT3_Fin στόχευε στα εξώνια 9 και 10, και ο εκκινητής circCCT3_Rout στο εξώνιο 9. Η

παρουσία ζώνης στα ηλεκτροφορικά αποτελέσματα καταδεικνύει την έκφραση του κυκλικού μορίου, ενώ η απουσία ή παρατήρηση μιας πολύ αχνής ζώνης σχετίζεται με τη μειωμένη έκφραση στο συγκεκριμένο δείγμα, σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα.

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης που προέκυψαν από την Nested PCR (Εικόνα 15). Εντοπίζεται παρουσία ζώνης και συνεπώς του κυκλικού στο επιθυμητό μήκος στην πλειοψηφία των δειγμάτων, σε κάποια η ζώνη εμφανίζεται σε μικρότερη ένταση, σε άλλα δείγματα η ένταση είναι εμφανώς αυξημένη. Εξαιρέση αποτελούν τα δείγματα ασθενών 2, 4 και 9.

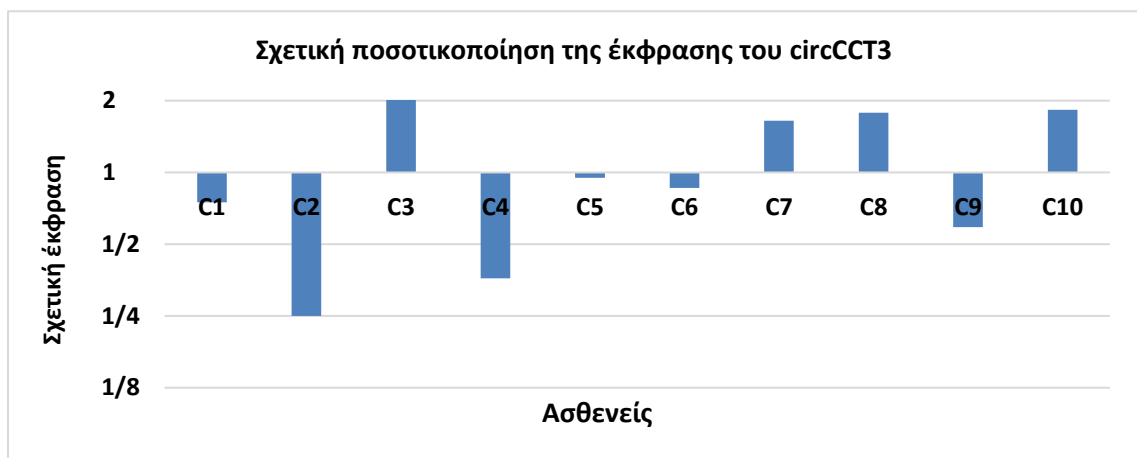


Εικόνα 15: Ηλεκτροφορητικά αποτελέσματα της Nested PCR στα εξώνια 9 και 10 στα 10 δείγματα των υπό μελέτη ασθενών.

3. Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης του *circCCT3*

Έπειτα από επεξεργασία των δεδομένων που αποκτήθηκαν από την αντίδραση real-time PCR με σκοπό την σχετική ποσοτικοποίηση του υπό μελέτη κυκλικού *circCCT3* στα 10 δείγματα ασθενών, προέκυψε το διάγραμμα που παρουσιάζεται πιο κάτω (Εικόνα 16). Από το διάγραμμα μπορούμε να αποκτήσουμε μια εικόνα για το πόσες φορές αυξημένη ή μειωμένη είναι η έκφραση του κυκλικού σε σχέση με ένα δείγμα βαθμονομητή. Το διάγραμμα δείχνει ότι η έκφραση του είναι μειωμένη στα δείγματα 1,2,4,5,6, και 9 με την μεγαλύτερη διαφορά να παρουσιάζεται στο

2 και 4 ενώ στα δείγματα 1,5 και 6 η έκφραση είναι ελάχιστα μειωμένη. Στα υπόλοιπα δείγματα, 3,7,8 και 10 η έκφραση του circCCT3 είναι αυξημένη, με την μέγιστη να εντοπίζεται στο 3 όπου είναι διπλάσια. Η έκφραση του κυκλικού στα δείγματα των ασθενών παρουσιάζεται σε σχέση με την έκφραση του στην κυτταρική σειρά H929, καθώς γνωρίζουμε ότι εμφανίζει έντονη έκφραση στην συγκεκριμένη.



Εικόνα 16: Διάγραμμα σχετικής ποσοτικοποίησης για την έκφραση του κυκλικού circCCT3 χρησιμοποιώντας την μέθοδο σύγκρισης των Ct.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τελευταία, συσσωρευμένα στοιχεία αποκάλυψαν ότι τα μη κωδικά μόρια (ncRNAs) διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων, ρυθμίζοντας την μεταγραφή, τις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις και την μετάφραση. Μπορούν να επηρεάσουν τη διαδικασία του καρκίνου ρυθμίζοντας κρίσιμα σηματοδοτικά μονοπάτια. Τα ncRNAs, μια ομάδα RNA που δεν έχουν λειτουργία κωδικοποίησης πρωτεϊνών, περιέχουν πολλές κατηγορίες. Μεταξύ αυτών, τα microRNA (miRNA), τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNA) και τα κυκλικά RNA (circRNA) εμπλέκονται κυρίως στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση [62], [63]. Τα κυκλικά μόρια RNA αποτελούν ένα πρόσφατο ερευνητικό πεδίο στον τομέα των μη-κωδικών μορίων RNA. Τα CircRNA μπορούν να λειτουργήσουν ως στόχοι miRNA, ρυθμιστές της μεταγραφής, ικρίωματα για πρωτεΐνες, παράγοντες μετάφρασης, ασκώντας πολυάριθμους ρυθμιστικούς ρόλους δεσμεύοντας συγκεκριμένα miRNAs. Τα circRNA παρουσιάζουν υψηλή αφθονία και εξελικτική διατήρηση σε όλα τα είδη και χαρακτηρίζονται από το γεγονός ότι εμφανίζουν έκφραση ειδική για τους ιστούς/κύτταρα. Πολυάριθμα circRNA είναι απορυθμισμένα και κατέχουν ρυθμιστικούς ρόλους στην ανάπτυξη του καρκίνου. Μέσω διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών, μπορούν να συμμετέχουν και να επηρεάζουν διαδικασίες που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την εισβολή, την απόπτωση, την αυτοφαγία και την αντίσταση στα φάρμακα, καθώς και άλλες [64].

Τα τελευταία χρόνια αυξημένα ευρήματα δείχνουν ότι τα circRNA έχουν μεγάλες δυνατότητες να επιτελούν ειδικούς ρυθμιστικούς ρόλους στην έναρξη και την εξέλιξη των ασθενειών, να αποτελέσουν νέους διαγνωστικούς και προγνωστικούς δείκτες και να παρέχουν νέες ενδείξεις για τη θεραπεία των ασθενειών εξαιτίας των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους. Τα circRNA έχουν ανιχνευθεί σε διάφορα σωματικά υγρά, συμπεριλαμβανομένου του ορού, του σάλιου, του πλάσματος και του περιφερικού αίματος, γεγονός που τους δίνει την δυνατότητα να αποτελέσουν ένα μη επεμβατικό βιοδείκτη [65]. Βρέθηκε ότι εκφράζονται ευρέως σε αιματοποιητικά κύτταρα και σε ώριμα κύτταρα του αίματος, με έκφραση που μπορεί να μεταβληθεί κατά τη διαφοροποίηση και μπορεί να είναι ειδική για τον κυτταρικό τύπο, καθιστώντας τα ως πιθανούς ρυθμιστές αιμοποίησης [50].

Στα υγιή κύτταρα, η πρωτεΐνη μοριακή συνοδός CCT διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην πρωτεόσταση μεσολαβώντας στην αναδίπλωση των υποχρωστικών υποστρωμάτων της (συμπεριλαμβανομένων των άφθονων συστατικών του κυτταροσκελετού, της ακτίνης και της τουμπουλίνης) και μιας σειράς πρωτεϊνών χαμηλότερης αφθονίας. Αποτελείτε από 8 διακριτές υπομονάδες, όπου ορισμένες από αυτές έχει αποδειχθεί ότι έχουν λειτουργίες στη μονομερή τους κατάσταση. Επιπλέον, μελέτες αναφέρουν ότι τα επίπεδα έκφρασης των διαφόρων υπομονάδων CCT είναι απορυθμισμένα σε διάφορους καρκίνους και πιθανώς συμβάλλουν στην προώθηση της σηματοδότησης υπέρ της επιβίωσης [52]. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *CCT3* είναι μια πρωτεΐνη μοριακή συνοδός, μέρος του συμπλόκου CCT. Αφού λάβει χώρα ο μηχανισμός οπίσθιας συρραφής, τα εξώνια του γραμμικού μεταγράφου 9 και 10 κυκλοποιούνται με αποτέλεσμα να προκύπτει το κυκλικό circCCT3 η λειτουργία του οποίου είναι άγνωστη.

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία είναι μία κακοήθης διαταραχή που χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και τη συσσώρευση ώριμων Β-λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα, το μυελό των οστών, τους λεμφαδένες και τον σπλήνα. Αποτελεί την πιο συχνή μορφή λευχαιμίας στους ενήλικες του δυτικού κόσμου ενώ η κλινική πορεία της νόσου είναι ιδιαίτερα ετερογενής. Διακρίνεται σε μια επιθετική μορφή που χαρακτηρίζεται από τον άγριο τύπο γονιδίων βαριάς αλυσίδας ανοσοσφαιρίνης (*IGH*) και σε μια ήπια μορφή, η οποία χαρακτηρίζεται από μεταλλαγμένη μορφή των γονιδίων *IGH*. Η κατάσταση μεταλλαγμένης και μη μεταλλαγμένης μορφής των γονιδίων αντανακλά το στάδιο διαφοροποίησης των φυσιολογικών Β-κυττάρων. Τα κύτταρα της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας παρουσιάζουν πολλές σύνθετες γενετικές αλλοιώσεις, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί από τους κλινικούς ιατρούς ως προγνωστικοί βιοδείκτες προκειμένου να προβλεφθούν η επιβίωση και η εξέλιξη της νόσου και να καθοδηγήσουν τις θεραπευτικές αποφάσεις. Οι κυριότερες κυτταρογενετικές ανωμαλίες που απαντώνται στη ΧΛΛ, είναι η διαγραφή του μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος 13 (del(13q)), που οδηγεί στην απώλεια των *DLEU2/MIR15A/MIR16-1* γονιδίων, η οποία ανευρίσκεται σε περισσότερο από το 50% των περιπτώσεων ΧΛΛ και έχει καλή πρόγνωση. Επιπλέον, συχνά εντοπίζεται η τρισωμία 12, που σχετίζεται με ενδιάμεση πρόγνωση με διάμεση συνολική επιβίωση, η διαγραφή του μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος 11 (del(11q)) που οδηγεί σε μια πιο επιθετική νόσο λόγω της απώλειας του γονιδίου *ATM* το οποίο είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και τέλος η διαγραφή του βραχέος βραχίονα του του χρωμοσώματος 17 (del(17p)) με αποτέλεσμα την απώλεια του γονιδίου TP53, κατάσταση που

σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Τουλάχιστον μία από αυτές τις ανωμαλίες μπορεί να βρεθεί σε ποσοστό περίπου 80% των ασθενών. Εκτός από τις χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, οι μελέτες αλληλούχησης έχουν επίσης αποκαλύψει πολυάριθμες επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις στην ΧΛΛ κυρίως στα γονίδια *P53*, *ATM*, *NOTCH1*, *SF3B1* και *BIRC3*. Μια ποικιλία στοχευμένων φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των αναστολέων της σηματοδοτικής οδού BCR, των αντι-CD20 αντισωμάτων και αναστολείς της BCL-2 έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπευτική αντιμετώπιση και έχουν σημαντικά βελτιώσει τη διαχείριση της νόσου. Ωστόσο, παρά τον αυξημένο αριθμό των διαθέσιμων θεραπευτικών εναλλακτικών λύσεων, η χημειοθεραπεία δεν παρέχει επί του παρόντος μια οριστική θεραπεία και εξακολουθούν να απαιτούνται πρόσθετες στρατηγικές. Ο εντοπισμός της λευχαιμίας σε πρώιμο στάδιο είναι ζωτικής σημασίας για την αποτελεσματική διαχείριση της νόσου και οδηγεί σε βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών. Καθώς ο ακριβής μοριακός μηχανισμός που υποδεικνύει την ανάπτυξη της δεν έχει διευκρινιστεί, η ανακάλυψη νέων δεικτών που θα επιτρέπουν έγκαιρη διάγνωση, πρόβλεψη της πορείας της νόσου και θα κατέχουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή θεραπείας με υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία αποτελεί κύριος στόχος.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία με σκοπό την μελέτη της έκφρασης του *circCCT3* στην ΧΛΛ πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA από τα υπό μελέτη δείγματα ασθενών, σύνθεση των συμπληρωματικών τους DNA, με τη μέθοδο της Αντίστροφης Μεταγραφής και χρήση εκκινητών τυχαίων εξαμερών. Ακολούθησε επιλεκτική ενίσχυση του *circCCT3*, μια σειρά πειραμάτων 1ου και 2ου κύκλου Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης και χρήση αποκλίνοντων εκκινητών, και έπειτα ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης του χρησιμοποιώντας την μέθοδο της Ποσοτικής Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Στο τέλος, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση, όπου συσχετίστηκε η έκφραση του *circCCT3* με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΧΛΛ όπως παρουσιάστηκαν στον πίνακα 5 στην αντίστοιχη ενότητα. Τα αποτελέσματα της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε καταδεικνύουν ότι από τους 10 ασθενείς που αποτέλεσαν μέρος αυτής της έρευνας, εκ των οποίων οι 7 ήταν άνδρες και οι 3 γυναίκες, παρατηρήθηκε ότι το κυκλικό *circCCT3* εκφράζεται στην πλειοψηφία αυτών. Συγκεκριμένα τα 7 από τα 10 δείγματα αξιολογούνται ως θετικά για την έκφραση του κυκλικού ενώ σε ποσοτικό επίπεδο, η έκφραση του σημειώνεται αυξημένη σε 4 δείγματα και μειωμένη στα υπόλοιπα 6. Η *real-time PCR* αποτελεί μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο, λόγος για τον οποίο μπορεί να ανιχνεύεται έκφραση του κυκλικού σε όλα τελικά τα δείγματα.. Αξίζει να

σημειωθεί, ότι καθώς από τους 10 ασθενείς από τους οποίους έγινε η συλλογή δειγμάτων απουσιάζει υγιής μάρτυρας, το δείγμα δηλαδή που θα αποτελούσε τον βαθμονομητή, η έκφραση του circCCT3 στα υπό μελέτη δείγματα παρουσιάζεται σε σχέση με την έκφραση του στην κυτταρική σειρά H929 που αποτέλεσε τον θετικό μάρτυρα κατά την πραγματοποίηση της real-time PCR αντίδρασης. Από μέλη της ερευνητικής μας ομάδας, βρέθηκε ότι το circCCT3 εκφράζεται έντονα στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, για αυτό και η επιλογή της ως θετικός μάρτυρας.

Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του κυκλικού circCCT3 και των κλινοπαθολογικών μεταβλητών που μελετήθηκαν. Αυτό υποδεικνύει ότι οι διαφορές στην έκφραση του circCCT3 που παρατηρήθηκε στα δείγματα μπορεί να είναι τυχαία και να μην αντιπροσωπεύει πραγματική συσχέτιση με τα χαρακτηριστικά των ασθενών. Αρχικά, το γεγονός αυτό δεν πρέπει να αποτελεί αποθαρρυντικό παράγοντα για την περαιτέρω μελέτη του circCCT3 στην ΧΛΛ, καθώς η έλλειψη στατιστικής σημαντικότητας δεν σημαίνει απαραίτητα ότι δεν υπάρχει καμία συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών. Απλά δεν μπορεί να αποκληθεί η πιθανότητα ότι η παρατηρούμενη σχέση είναι τυχαία. Επιπλέον, το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να οφείλεται στο μικρό μέγεθος δείγματος. Με τα δεδομένα αυτά το circCCT3 δεν μπορεί να αξιοποιηθεί για την καλύτερη κατανόηση της νόσου. Συνεπώς, η χρήση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων είναι απαραίτητη προκειμένου να εξαχθούν πιο ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με το μοτίβο έκφρασης του circCCT3 στην ΧΛΛ και να διερευνηθεί περαιτέρω η σχέση ανάμεσα στις μεταβλητές. Η κατανόηση της συσχέτισης ανάμεσα στην έκφραση του circCCT3 και των κλινοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών, μπορεί να οδηγήσει στην εύρεση της πιθανής σχέσης των επιπέδων του με την παθογένεια της νόσου ή ακόμη να οδηγήσει μελλοντικά στην κλινική του εφαρμογή σαν ένας βιοδείκτης ο οποίος θα αξιοποιηθεί στην πρόωρη διάγνωση της νόσου, στην πρόγνωση πορείας των ασθενών και στην επιλογή θεραπείας.

Μελλοντικά, σαν μια ενδεχομένη επέκταση της παρούσας ερευνητικής μελέτης θα μπορούσε, όπως ήδη αναφέρθηκε, η έκφραση του κυκλικού να μελετηθεί σε μεγαλύτερο αριθμό λευχαιμικών δειγμάτων, ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει κάποια συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του και στα χαρακτηριστικά των ασθενών ή αν όντως η αυξημένη έκφραση που διαπιστώθηκε από την παρούσα ερευνητική μελέτη οφείλεται στην τύχη, για μεγαλύτερη δηλαδή αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Καλό θα ήταν τα επίπεδα έκφρασης να παρουσιαστούν σε σχέση

με ένα υγιή μάρτυρα, κάτι το οποίο πιθανόν να επιτευχθεί με την χρήση περισσότερων δειγμάτων. Η κατανόηση του τρόπου έκφρασης του circCCT3 και η σχέση της έκφρασης με τα διάφορα κλινοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στην καλύτερη αντιμετώπιση της. Επιπλέον, θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμο να μελετηθεί κατά πόσο το circCCT3 μπορεί να διαθέτει διαγνωστικό και προβλεπτικό χαρακτήρα ή ακόμη αν μπορεί να συνεισφέρει στην πρόβλεψη ανταπόκρισης στην θεραπεία ή την ευαισθησία των ασθενών σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Έτσι, περαιτέρω ερευνητική μελέτη θα χρειαστεί ώστε να εξακριβωθεί ο ρόλος του στην ΧΛΛ και να διερευνηθεί η κλινική του σημασία. Τέλος, η έκφραση του circCCT3 θα μπορούσε να μελετηθεί και σε άλλες μορφές αιματολογικών κακοηθειών καθώς όπως αναφέρεται πιο πάνω, η ποικιλομορφία των circRNA μεταξύ των διαφορετικών τύπων κυττάρων του αίματος ποικίλλει.

Καθώς η κατανόηση των circRNA έχει αυξηθεί, η αντίληψή τους από την επιστημονική κοινότητα τα τελευταία χρόνια έχει αλλάξει δραματικά. Παρόλο που μερικά circRNA έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά, η κατανόησή μας για τα circRNA παραμένει ελλιπής. Εκτός από τις αναγνωρισμένες λειτουργίες τους και τους προτεινόμενους μηχανισμούς βιογένεσης ως τώρα, περαιτέρω μηχανισμοί αναμένουν την ανακάλυψή τους. Επιπλέον, οι μηχανισμοί μεταφοράς και αποικοδόμησης των circRNA είναι ελάχιστα κατανοητοί. Ως εκ τούτου, απομένει πολλή δουλειά να γίνει. Η ανακάλυψη των circRNA έχει αναμφίβολα εμπλουτίσει το περιεχόμενο των ρυθμιστικών δικτύων RNA και έχει προσφέρει νέες προσεγγίσεις για την ανάπτυξη κλινικά μεταφράσιμων διαγνωστικών/γνωστικών βιοδεικτών και θεραπευτικών στόχων στον καρκίνο [64].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pinho, S. and P.S. Frenette, *Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(5): p. 303-320.
2. Poziopoulos Christos, S.S., *Physiology of blood, immune system, metabolism*. Vol. Medical publications Lagos Dimitrios 2017.
3. Seita, J. and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. **2**(6): p. 640-53.
4. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 2018: Utopia
5. Treanor, B., *B-cell receptor: from resting state to activate*. Immunology, 2012. **136**(1): p. 21-7.
6. Eibel, H., et al., *B cell biology: an overview*. Curr Allergy Asthma Rep, 2014. **14**(5): p. 434.
7. Juliusson, G. and R. Hough, *Leukemia*. Prog Tumor Res, 2016. **43**: p. 87-100.
8. Hallek, M., *Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment*. Am J Hematol, 2019. **94**(11): p. 1266-1287.
9. Scarfò, L., A.J. Ferreri, and P. Ghia, *Chronic lymphocytic leukaemia*. Crit Rev Oncol Hematol, 2016. **104**: p. 169-82.
10. Kipps, T.J., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 16096.
11. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group*. J Clin Pathol, 1989. **42**(6): p. 567-84.
12. Matutes, E. and A. Polliack, *Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia*. Rev Clin Exp Hematol, 2000. **4**(1): p. 22-47.
13. Ciccone, M., et al., *Proliferation centers in chronic lymphocytic leukemia: correlation with cytogenetic and clinicobiological features in consecutive patients analyzed on tissue microarrays*. Leukemia, 2012. **26**(3): p. 499-508.
14. Mina, A., et al., *Using prognostic models in CLL to personalize approach to clinical care: Are we there yet?* Blood Rev, 2018. **32**(2): p. 159-166.
15. Yun, X., Y. Zhang, and X. Wang, *Recent progress of prognostic biomarkers and risk scoring systems in chronic lymphocytic leukemia*. Biomark Res, 2020. **8**: p. 40.
16. Kay, N.E. and T.D. Shanafelt, *Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia*. Current Hematologic Malignancy Reports, 2007. **2**(1): p. 49-55.
17. Alzahrani, M., *A case of chronic lymphocytic leukemia with unmutated variable region of the immunoglobulin heavy chain gene with markedly high lactate dehydrogenase responding to ibrutinib*. Journal of Applied Hematology, 2021. **12**: p. 172.
18. Hamblin, T.J., *Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia*. Best Pract Res Clin Haematol, 2007. **20**(3): p. 455-68.
19. Amaya-Chanaga, C.I. and L.Z. Rassenti, *Biomarkers in chronic lymphocytic leukemia: Clinical applications and prognostic markers*. Best Pract Res Clin Haematol, 2016. **29**(1): p. 79-89.
20. Puiggros, A., G. Blanco, and B. Espinet, *Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 435983.
21. Kikushige, Y., *Pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia and the development of novel therapeutic strategies*. J Clin Exp Hematop, 2020. **60**(4): p. 146-158.

22. Lee, J. and Y.L. Wang, *Prognostic and Predictive Molecular Biomarkers in Chronic Lymphocytic Leukemia*. J Mol Diagn, 2020. **22**(9): p. 1114-1125.
23. Ferrer, G. and E. Montserrat, *Critical molecular pathways in CLL therapy*. Mol Med, 2018. **24**(1): p. 9.
24. Lazarian, G., R. Guièze, and C.J. Wu, *Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia*. J Clin Oncol, 2017. **35**(9): p. 984-993.
25. Patel, K. and J.M. Pagel, *Current and future treatment strategies in chronic lymphocytic leukemia*. J Hematol Oncol, 2021. **14**(1): p. 69.
26. Watson, J., *Molecular biology of the gene*. 2018: Utopia.
27. Kornblihtt, A.R., et al., *Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(3): p. 153-65.
28. Wang, Y., et al., *Mechanism of alternative splicing and its regulation*. Biomed Rep, 2015. **3**(2): p. 152-158.
29. Hombach, S. and M. Kretz, *Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning*. Adv Exp Med Biol, 2016. **937**: p. 3-17.
30. Qu, S., et al., *Circular RNA: A new star of noncoding RNAs*. Cancer Lett, 2015. **365**(2): p. 141-8.
31. Chen, L.L., *The biogenesis and emerging roles of circular RNAs*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016. **17**(4): p. 205-11.
32. Aufiero, S., et al., *Circular RNAs open a new chapter in cardiovascular biology*. Nat Rev Cardiol, 2019. **16**(8): p. 503-514.
33. Zhang, Z., T. Yang, and J. Xiao, *Circular RNAs: Promising Biomarkers for Human Diseases*. EBioMedicine, 2018. **34**: p. 267-274.
34. Misir, S., N. Wu, and B.B. Yang, *Specific expression and functions of circular RNAs*. Cell Death Differ, 2022. **29**(3): p. 481-491.
35. Tang, X., et al., *Review on circular RNAs and new insights into their roles in cancer*. Comput Struct Biotechnol J, 2021. **19**: p. 910-928.
36. Papatsirou, M., et al., *Circular RNAs: Emerging Regulators of the Major Signaling Pathways Involved in Cancer Progression*. Cancers (Basel), 2021. **13**(11).
37. Huang, A., et al., *Circular RNA-protein interactions: functions, mechanisms, and identification*. Theranostics, 2020. **10**(8): p. 3503-3517.
38. Artemaki, P.I., A. Scorilas, and C.K. Kontos, *Circular RNAs: A New Piece in the Colorectal Cancer Puzzle*. Cancers (Basel), 2020. **12**(9).
39. Xie, L., et al., *Circular RNAs: A Novel Player in Development and Disease of the Central Nervous System*. Front Cell Neurosci, 2017. **11**: p. 354.
40. Santer, L., C. Bär, and T. Thum, *Circular RNAs: A Novel Class of Functional RNA Molecules with a Therapeutic Perspective*. Mol Ther, 2019. **27**(8): p. 1350-1363.
41. Li, X., L. Yang, and L.L. Chen, *The Biogenesis, Functions, and Challenges of Circular RNAs*. Mol Cell, 2018. **71**(3): p. 428-442.
42. D'Ambra, E., D. Caputo, and M. Morlando, *Exploring the Regulatory Role of Circular RNAs in Neurodegenerative Disorders*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(21).
43. Le, P., et al., *Non-Coding RNAs in Cancer Diagnosis and Therapy: Focus on Lung Cancer*. Cancers (Basel), 2021. **13**(6).
44. Fabris, L., J. Juracek, and G. Calin, *Non-Coding RNAs as Cancer Hallmarks in Chronic Lymphocytic Leukemia*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(18).

45. Heuston, E.F., K.T. Lemon, and R.J. Arceci, *The Beginning of the Road for Non-Coding RNAs in Normal Hematopoiesis and Hematologic Malignancies*. Front Genet, 2011. **2**: p. 94.
46. Rahmati, A., et al., *Circular RNAs: pivotal role in the leukemogenesis and novel indicators for the diagnosis and prognosis of acute myeloid leukemia*. Front Oncol, 2023. **13**: p. 1149187.
47. Guo, S.S., et al., *Tip of the iceberg: roles of circRNAs in hematological malignancies*. Am J Cancer Res, 2020. **10**(2): p. 367-382.
48. Perez de Acha, O., M. Rossi, and M. Gorospe, *Circular RNAs in Blood Malignancies*. Front Mol Biosci, 2020. **7**: p. 109.
49. Fu, L., et al., *Recent progress in study of circRNAs and its role in leukemia*. J Leukoc Biol, 2021. **109**(4): p. 731-739.
50. Deng, W., R. Chao, and S. Zhu, *Emerging roles of circRNAs in leukemia and the clinical prospects: An update*. Immun Inflamm Dis, 2023. **11**(1): p. e725.
51. Ji, T., et al., *The research progress of circular RNAs in hematological malignancies*. Hematology, 2019. **24**(1): p. 727-731.
52. Chaudhuri, T.K. and S. Paul, *Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches*. Febs j, 2006. **273**(7): p. 1331-49.
53. Smith, T.M. and B.M. Willardson, *Mechanistic insights into protein folding by the eukaryotic chaperonin complex CCT*. Biochem Soc Trans, 2022. **50**(5): p. 1403-1414.
54. Boudiaf-Benmammar, C., T. Cresteil, and R. Melki, *The cytosolic chaperonin CCT/TRiC and cancer cell proliferation*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60895.
55. Vallin, J. and J. Grantham, *The role of the molecular chaperone CCT in protein folding and mediation of cytoskeleton-associated processes: implications for cancer cell biology*. Cell Stress Chaperones, 2019. **24**(1): p. 17-27.
56. Liou, A.K. and K.R. Willison, *Elucidation of the subunit orientation in CCT (chaperonin containing TCP1) from the subunit composition of CCT micro-complexes*. Embo j, 1997. **16**(14): p. 4311-6.
57. Grantham, J., *The Molecular Chaperone CCT/TRiC: An Essential Component of Proteostasis and a Potential Modulator of Protein Aggregation*. Front Genet, 2020. **11**: p. 172.
58. Ghozlan, H., et al., *Chaperonin-Containing TCP1 Complex (CCT) Promotes Breast Cancer Growth Through Correlations With Key Cell Cycle Regulators*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 663877.
59. Roh, S.H., et al., *Chaperonin TRiC/CCT Recognizes Fusion Oncoprotein AML1-ETO through Subunit-Specific Interactions*. Biophys J, 2016. **110**(11): p. 2377-2385.
60. Qian, T., et al., *High expression of chaperonin-containing TCP1 subunit 3 may induce dismal prognosis in multiple myeloma*. Pharmacogenomics J, 2020. **20**(4): p. 563-573.
61. Liu, F., et al., *Upregulation of circ_0000142 promotes multiple myeloma progression by adsorbing miR-610 and upregulating AKT3 expression*. J Biochem, 2021. **169**(3): p. 327-336.
62. Zhang, X., et al., *Competing endogenous RNA networks related to prognosis in chronic lymphocytic leukemia: comprehensive analyses and construction of a novel risk score model*. Biomark Res, 2022. **10**(1): p. 75.
63. Singh, V., et al., *Circular RNAs in acute myeloid leukemia*. Mol Cancer, 2021. **20**(1): p. 149.

64. Liu, J., et al., *Emerging Role of Circular RNAs in Cancer*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 663.
65. Mei, M., et al., *Role of circular RNA in hematological malignancies*. Oncol Lett, 2019. **18**(5): p. 4385-4392.

«Μελέτη της έκφρασης του κυκλικού RNA circCCT3 σε μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με χρόνια Β-λεμφοκυτταρική λευχαιμία»

Ελένη Μηνά

Περίληψη

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, αποτελεί την πιο συχνή μορφή λευχαιμίας στους ενήλικες του δυτικού κόσμου και χαρακτηρίζεται από την σταδιακή συσσώρευση ώριμων Β-λεμφοκυττάρων στο αίμα, στον μυελό των οστών και στους λεμφαδένες. Τα κυκλικά μόρια RNA (circRNA) είναι μια νέα κατηγορία ενδογενών μη κωδικών μορίων RNA τα οποία αποτελούν προϊόντα εναλλακτικής συρραφής που προκύπτουν μέσω του μηχανισμού οπίσθιας συρραφής. Επηρεάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες και microRNAs. Όλο και περισσότερο τα circRNA αναγνωρίζονται ως ρυθμιστές των φυσιολογικών και παθολογικών χαρακτηριστικών των κυτταρικών πληθυσμών που προέρχονται από την διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Ειδικότερα, αρκετά circRNA βρέθηκαν να ενισχύουν ή να καταστέλλουν την εξέλιξη του όγκου στις αιματολογικές κακοήθειες όπως οι λευχαιμίες και τα λεμφώματα. Το circCCT3 προάγει την εξέλιξη του πολλαπλού μυελώματος μέσω του ρυθμιστικού άξονα miR-610/AKT3 ωστόσο, ο ρόλος του στην ΧΛΛ παραμένει άγνωστος. Έτσι, αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της έκφρασης του κυκλικού circCCT3 σε δείγματα ασθενών με ΧΛΛ. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από 10 δείγματα ασθενών και αντίστροφη μεταγραφή αυτού με χρήση εκκινητών τυχαίων εξαμερών. Ακολούθησε μια σειρά πειραμάτων 1ου και 2ου κύκλου PCR με χρήση αποκλίνοντων εκκινητών, και έπειτα ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης του circCCT3 με αντιδράσεις real time qPCR αξιοποιώντας τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I. Στο τέλος, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση, όπου συσχετίστηκε η έκφραση του circCCT3 με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Οι διαφορές στην έκφραση που παρατηρήθηκαν στα δείγματα των ασθενών δεν φάνηκε να συσχετίζονται στατιστικώς σημαντικά με τις μεταβλητές που μελετήθηκαν, πιθανώς λόγω του μικρού δείγματος. Η κατανόηση του τρόπου έκφρασης του circCCT3 και της σχέσης ανάμεσα στην έκφραση του με τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στην καλύτερη αντιμετώπιση της νόσου.

“Expression analysis of a circular RNA (circCCT3) in peripheral blood mononuclear cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia”

Eleni Mina

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia is the most common type of leukemia in adults in the western world and is characterized by the progressive accumulation of mature B lymphocytes in peripheral blood, bone marrow and lymph nodes. Circular RNAs (circRNAs) are a new class of endogenous non-coding RNAs that are products of alternative splicing, arise through the back-splicing mechanism. They affect a wide range of biological processes mainly through interaction with proteins and microRNAs. CircRNAs have been increasingly recognized as modulators of physiological and pathological features of hematopoietic stem cell (HSC)-derived populations. In particular, several circRNAs were found to enhance or suppress tumor progression in hematological malignancies such as leukemias and lymphomas. CircCCT3 promotes multiple myeloma progression through the miR-610/AKT3 regulatory axis however, its role in CLL remains unknown. The aim of this thesis was to study the expression levels of circCCT3 in CLL patient samples. For this purpose, RNA isolation from 10 patient samples and reverse transcription of this RNA was performed using random hexamer primers. This was followed by a series of 1st and 2nd cycle PCR experiments using divergent primers, and then quantification of circCCT3 expression by real time qPCR reactions utilizing the fluorescent dye SYBR Green I. Finally, statistical analysis was performed, where circCCT3 expression was correlated with the clinicopathological characteristics of the patients. The differences in expression observed in the patient samples did not seem to correlate statistically significantly with the variables studied, probably due to the small sample size. Understanding how circCCT3 is expressed and the relationship between its expression and the various clinicopathological features of patients may contribute significantly to better management of the disease.