



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

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Ν. ΚΑΒΑΝΤΖΑΣ ΚΑΘ. ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ: ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ
ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΗΣ
ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ (ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ
ΘΕΡΑΠΕΙΑ)»

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΠΜΣ

ΣΤ. ΘΕΟΧΑΡΗΣ ΚΑΘ. ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ο ρόλος των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA
(ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου.**

Όνομο: Βασιλική Ταξιαρχούλα Σ. Αγιασσύτη

Αρ. μητρώου: 7450222200001

Ιδιότητα: Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια-Βιοϊατρική Επιστήμων-Τεχνολόγος
Ιατρικών Εργαστηρίων

Επιβλέπων ΜΔΕ: Αδαμόπουλος Παναγιώτης

ΑΘΗΝΑ 2024

Ο ρόλος των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη

«Νεοπλασματική Νόσος στον Άνθρωπο:

Έρευνα και Κλινικοπαθολογοανατομική Προσέγγιση στα Πλαίσια της Εξατομικευμένης Ιατρικής (Διάγνωση και Στοχευμένη Θεραπεία)»

που απονέμει η Ιατρική Σχολή του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

‘Ο ρόλος των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου.’

Όν/μο: Βασιλική-Ταξιαρχούλα Σ. Αγιασώτη

Αρ. μητρώου: 7450222200001

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
ΑΔΑΜΟΠΟΥΛΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)	ΜΕΤΑΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ	
ΚΑΡΑΜΟΥΖΗΣ ΜΙΧΑΗΛ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ	
ΣΑΡΑΝΤΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ	ΜΕΤΑΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ	

Περίληψη (Ελληνικά)

Η παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζει τον ρόλο των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου. Αναφέρεται η σημασία τους στην ανάπτυξη, ετερογένεια και την εξέλιξη του καρκίνου. Σημαντικό αποτελεί ο ρόλος που διαδραματίζουν όσο αναφορά τον ρόλο τους στην θεραπεία των όγκων. Τα ecDNAs πρόκειται για κυκλικά μόρια DNA, με άνιση κατανομή σε θυγατρικά κύτταρα. Εντοπίζονται κυρίως σε καρκινικά κύτταρα, ενισχύουν την έκφραση ογκογονιδίων και συμβάλλουν στην χρωμοσωμική αστάθεια.

Μέσα από ανάλυση εργαστηριακών μεθόδων ανίχνευσης και απομόνωσης ecDNAs, μπορούν να ανευρεθούν και να χαρακτηριστούν. Πρόκειται για μόρια που μπορούν να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες, με πιθανές εφαρμογές στην εξατομικευμένη ιατρική.

Στην παρούσα εργασία αναφέρεται μια μέθοδος ανίχνευσης και απομόνωσης ecDNAs καθώς και η βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων, που παρακολουθήθηκε στα πλαίσια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας στο εργαστήριο του τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, του τμήματος βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Λέξεις κλειδιά: ecDNAs, εξωχρωμοσωμικό DNA, καρκίνος, βιοδείκτες, αντίσταση θεραπειών

Περίληψη (αγγλικά)

This study examines the role of extrachromosomal DNA (ecDNAs) in cancer pathophysiology. It highlights their significance in cancer development, heterogeneity and cancer progression. A crucial aspect is their role in tumor treatment. EcDNAs are circular DNA molecules, with unequal distribution in daughter cells. They are found in cancer cells, enhance oncogene expression and contribute to the chromosomal instability.

Through the analysis of laboratory methods for detecting and isolating ecDNAs, these molecules can be identified and characterized. They have potential role as biomarkers, with possible application in personalized medicine.

This study presents a method for the detection and isolation of ecDNAs, as well as the bioinformatics analysis of the results, which was developed as part of the thesis, conducted in the laboratory of Department of Biochemistry and Molecular Biology, Department of Biology of the National and Kapodistrian University of Athens.

Key words: ecDNAs, extrachromosomal DNA, Cancer, biomarkers, therapy resistance

Ευχαριστίες/ Αφιερώσεις

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Μεταδιδακτορικό ερευνητή του τμήματος Βιολογίας, του τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Δρ. Αδαμόπουλο Παναγιώτη και εισηγητή του θέματος της διπλωματικής εργασίας, για τις γνώσεις που έλαβα στο πλαίσιο της φοίτησης μου στο ΠΜΣ και για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του, ως προς το εργαστηριακό και ακαδημαϊκό επίπεδο, όπου συνέβαλε καθοριστικά στην εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, τον Μεταδιδακτορικό ερευνητή του τμήματος Βιολογίας, του τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Δρ. Τσιακανίκα Παναγιώτη, για τις γνώσεις που έλαβα και για την καθοδήγηση σε ερευνητικό και εργαστηριακό επίπεδο, που συνέβαλε στην εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας και στην εκπαίδευση μου σε μοριακές τεχνικές.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Κλινικής Βιοχημείας και Διευθυντή του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Δρ. Ανδρέα Σκορίλα, που με δέχτηκε στο ερευνητικό του εργαστήριο και είχα την ευκαιρία να εκπονήσω αυτό το θέμα διπλωματικής εργασίας και να εκπαιδευτώ σε νέες μεθόδους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Καραμούζη Μιχαήλ και τον Μεταδιδακτορικό ερευνητή Σαράντη Παναγιώτη, για την συμβολή τους στην διπλωματική εργασία ως μέλη της τριμελούς επιτροπής και τον χρόνο που διέθεσαν για την αξιολόγηση της.

Τέλος, θα ήθελα να δώσω ξεχωριστές ευχαριστίες στην οικογένεια μου, για την πολύτιμη στήριξη τους στο δύσκολο έργο μου, της μητρότητας και παράλληλης ολοκλήρωσης της ακαδημαϊκής μου καριέρας.

Περιεχόμενα

1.	Εισαγωγή	11
1.1.	Ανακάλυψη των ecDNAs	12
1.2.	Δομή του ecDNA	14
1.3.	Πολλαπλασιασμός ecDNA	17
1.4.	Μηχανισμοί βιογένεσης μορίων ecDNAs	19
1.4.1.	Θρυμματισμός χρωμοσώματος	20
1.4.2.	Θραύση και επανασύνδεση άκρων χρωμοσωμάτων	21
1.4.3.	Κύκλοι θραύσης-σύντηξης γέφυρας	22
1.4.4.	Στασιμότητα διχάλας με εναλλαγή προτύπου	23
1.5.	Μεταγραφική ρύθμιση ecDNA	24
1.5.1.	Το ecDNA προωθεί την έκφραση ογκογονιδίων με προσβασιμότητα στην χρωματίνη και αύξηση του αριθμού αντιγράφων τους.	25
1.5.2.	Κυκλοποίηση γραμμικού DNA σε ecDNA με γεινίαση τοπικών ή απομακρυσμένων ενισχυτών με ογκογονίδια	28
1.5.3.	Αλληλεπίδραση του ecDNA με το χρωμοσωμικό DNA και ρύθμιση χρωμοσωμικών ογκογονιδίων.	30
1.5.4.	Συσσωματώματα ecDNAs για ρύθμιση ογκογονιδίων τους.	31
1.5.5.	Χρήση του ecDNA για ανασυνδιασμό του χρωμοσωμικού DNA.	33
2.	EcDNAs και καρκίνος	34
2.1.	ecDNA και γλοιοβλάστωμα	36
2.2.	EcDNA και αδενοκαρκίνωμα στομάχου	37
2.3.	EcDNA και καρκίνος παχέος εντέρου	37
2.4.	EcDNA και καρκίνος ωοθηκών	37
2.5.	EcDNA και HPV σχετιζόμενος καρκίνος στοματοφάρυγγα	38
2.6.	EcDNA και νευροβλάστωμα	38
2.7.	EcDNA και ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του υποφάρυγγα	39
2.8.	EcDNA και μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα	39
2.9.	EcDNA και αδενοκαρκίνωμα οισοφάγου σχετιζόμενο με οισοφάγο Barrett	39
2.10.	EcDNAs και καρκίνος προστάτη	39
2.11.	EcDNA και καρκίνος μαστού	39
2.12.	EcDNA και HPV σχετιζόμενος καρκίνος τραχήλου μήτρας	40
3.	Ογκογόνες λειτουργίες των ecDNAs	40

4.	Ο ρόλος των ecDNAs στη θεραπεία του καρκίνου	41
4.1.	EcDNAs ως διαγνωστικοί βιοδείκτες	42
4.2.	EcDNAs ως προγνωστικοί βιοδείκτες.....	43
4.3.	Αντίσταση σε θεραπείες.....	43
4.4.	Θεραπευτικοί στόχοι.....	44
5.	Μέθοδοι ανίχνευσης μορίων ecDNAs.....	45
5.1.	Ανίχνευση με τεχνικές αλληλούχησης	46
5.1.1.	Next - Generation Sequencing (NGS)	46
5.1.2.	Αλληλουχία Τρίτης Γενιάς - TGS	47
5.1.3.	Αναγνώριση ecDNA από δεδομένα αλληλούχησης.....	47
5.1.4.	Αλληλούχηση ενός κυττάρου.....	48
5.2.	Ανίχνευση με τεχνικές οπτικοποίησης	49
5.3.	Ανίχνευση με εργαλεία CRISPR	50
5.4.	Ταξινόμηση δείγματος ως θετικό (+) για ecDNAs.....	51
6.	Ανάλυση εργαστηριακής ανίχνευσης και απομόνωσης ecDNAs	51
6.1.	Υλικά	51
6.2.	Μέθοδοι εργαστηριακής ανίχνευσης και απομόνωσης ecDNAs	52
6.2.1.	Λύση κυττάρων	52
6.2.2.	Χρωματογραφία στήλης	52
6.2.3.	Αφαίρεση γραμμικού DNA.....	52
6.2.4.	Καθαρισμός δείγματος DNA με παραμαγνητικά σφαιρίδια	52
6.2.5.	Αφαίρεση κυκλικού μιτοχονδριακού DNA- Χρήση Cas-9	53
6.2.6.	Ποσοτικοποίηση του δείγματος με φθοροσιμετρία.....	53
6.2.7.	Ποσοτική Real Time PCR.....	54
6.2.8.	Next - Generation Sequencing (NGS)	54
6.2.9.	Βιοπληροφορική Ανάλυση δεδομένων από NGS	54
7.	Βάσεις δεδομένων για μόρια ecDNAs	56
7.1.	EccDNA Atlas	56
7.2.	EccDNAdb	56
8.	Συζήτηση.....	56
	ΟΡΟΛΟΓΙΑ	58
	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ	59
	Bibliography	61

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: Ιστορική αναδρομή μελετών για την ανακάλυψη εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (Li, et al., 2022).....	14
Εικόνα 2: Χάρτης απεικόνισης των εξωχρωμοσωμικών DNAs (ecDNAs). Ένας γραμμικός χάρτης είναι εύκολος να μελετηθεί σε περίπτωση μιας απλής δομής των ecDNAs, όπως αυτή του <i>EGFR</i> σε κύτταρα GBM39, σε αντίθεση με πιο περίπλοκα μόρια ecDNAs, όπως στην περίπτωση <i>MYC</i> σε κύτταρα COLO320DM, όπου καλύτερα είναι ένας κυκλικός χάρτης. Ο κυκλικός χάρτης βοηθά στην κατανόηση των τάξεων και των προσανατολισμών των αναδιαταγμένων τμημάτων. (Wu , et al., 2022)	16
Εικόνα 3: Κατηγοριοποίηση μορίων ecDNAs με βάση την αλληλουχία που περιέχουν. (Ludi , et al., 2022)	17
Εικόνα 4: Διαχωρισμός ecDNAs και των γραμμικών χρωμοσωμάτων κατά την κυτταρική διαίρεση. Γίνεται ανομοιόμορφη κατανομή στα θυγατρικά κύτταρα των ecDNAs, λόγω της έλλειψης κεντρομεριδίων. (Zhu, et al., 2022)	18
Εικόνα 5: Ταχεία συσσώρευση μορίων ecDNAs και άνιση κατανομή τους σε θυγατρικά κύτταρα σε κάθε μιτωτική διαίρεση. (Noer, et al., 2022).....	18
Εικόνα 6: Κυτταρικός κύκλος μορίων ecDNAs. (Yi, et al., 2022).....	19
Εικόνα 7: Τρόποι δημιουργίας μορίων ecDNAs. A) Chromothripsis, B) Θραύση και επανασύνδεση, C) breakage-fusion-bridge (BFB) cycles, D) fork stalling and template switching. (Dong, et al., 2023)	20
Εικόνα 8: Μηχανισμός βιογένεσης ecDNAs, θρυμματισμός DNA. Δημιουργία κλασμάτων από τον θρυμματισμό του DNA και επανένωση και κυκλοποίηση τους σε μόρια ecDNA. (Li, et al., 2022).....	21
Εικόνα 9: Μηχανισμός βιογένεσης ecDNAs, θραύση και σύνδεση άκρων χρωμοσωμάτων. (Li, et al., 2022)	22
Εικόνα 10: Μηχανισμός βιογένεσης ecDNAs, Κύκλοι θραύσης-σύντηξης γέφυρας. (Li, et al., 2022).....	23
Εικόνα 11: Μηχανισμός βιογένεσης μορίων ecDNAs, Στασιμότητα δικάλας με εναλλαγή προτύπου. (Li, et al., 2022)	24
Εικόνα 12: Ρόλος του ecDNA στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη του καρκίνου: A) προώθηση της έκφρασης ογκογονιδίων με προσβασιμότητα στην χρωματίνη και αύξηση του αριθμού αντιγράφων τους, B) κυκλοποίηση γραμμικού DNA σε ecDNA με γειτνίαση τοπικών ενισχυτών ή C) απομακρυσμένων ενισχυτών, με ογκογονίδια και αυξημένη έκφραση τους, D) αλληλεπίδραση του ecDNA με το χρωμοσωμικό DNA και ρύθμιση χρωμοσωμικών ογκογονιδίων, E) συσσωματώματα ecDNAs για ενίσχυση ογκογονιδίων τους και F) χρήση του ecDNA για ανασυνδιασμό του χρωμοσωμικού DNA. (Dong, et al., 2023)	25
Εικόνα 13: Μικρή συμπύκνωση χρωματίνης στα νουκλεοσωμάτια των ecDNAs, σε αντίθεση με το γραμμικό DNA. Λόγω αυτής της οργάνωσης, η χρωματίνη είναι πιο προσιτή σε μεταγραφικούς παράγοντες, κάτι το οποίο παρατηρείται και από τις κορυφές κατά τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των ecDNAs. (Yi, et al., 2022)	28
Εικόνα 14: Έκφραση ογκογονιδίων μέσω τοπικών και απομακρυσμένων ενισχυτών έπειτα από κυκλοποίηση γραμμικού DNA σε μόρια ecDNAs. (Wu , et al., 2022)....	29
Εικόνα 15: Η κυκλοποίηση γραμμικού DNA σε ecDNA έχει ως αποτέλεσμα τον επαναπροσανατολισμό των στοιχείων της χρωματίνης και επιτρέπει την ενίσχυση ογκογονιδίων τοπικών αλλά και απομακρυσμένων ενισχυτών.	30
Εικόνα 16: Αλληλεπίδραση ecDNA και χρωμοσωμικού DNA. (Li, et al., 2022).....	31
Εικόνα 17: Συσσωματώματα ecDNAs και μεταξύ τους αλληλεπίδραση. (Li, et al., 2022)	32

Εικόνα 18: Συσσωματώματα ecDNAs. Μόρια ecDNAs σχηματίζουν συσσωματώματα και δημιουργούν έναν μεταγραφικό κόμβο, με αποτέλεσμα την ενίσχυση των ογκογονιδίων. (Zhu, et al., 2022)	33
Εικόνα 19: Ενσωμάτωση ecDNA στο γονιδίωμα. Μπορεί να προκαλέσει μείωση έκφρασης γονιδίου (πάνω εικόνα) ή να ενισχύσει την έκφραση ενός ογκογονιδίου (κάτω εικόνα). (Li, et al., 2022)	34
Εικόνα 20: Συχνότητα εμφάνισης ecDNAs σε διάφορους τύπους καρκίνου. (Yi, et al., 2022)	35
Εικόνα 21: Τα μόρια ecDNAs παίζουν ρόλο στην εξέλιξη του όγκου σε διάφορους τύπους καρκίνων. (Li, et al., 2022)	36
Εικόνα 22: Το ογκογονίδιο MYCN ενχωματώνεται σε ecDNA και στη συνέχεια τμήμα του ecDNA ενσωματώνεται στο γονίδιο DCLK1 του χρωμοσώματος 13, προκαλώντας την καταστολή του. (Koche, et al., 2020)	38
Εικόνα 23: Το ecDNA θα μπορούσε να ανιχνευθεί σε υγρή βιοψία. (Khatami, et al., 2018)	42
Εικόνα 24: Μέθοδοι ανίχνευσης ecDNA A) Μέθοδοι ταυτοποίησης, B) Μέθοδοι αλληλούχησης, C) Κατευθύνσεις για το ecDNA. (Zhao, et al., 2023).....	46
Εικόνα 25: Αναδόμηση με μέθοδο Amplicon Architect (Bafna & Mischel, 2022).....	48
Εικόνα 26: Βιοπληροφορική ανάλυση με Circle-Map σε κυτταροκαλλιέργεια καρκινικής σειράς PC3.....	56

Περιεχόμενα Πινάκων

Ο ρόλος των εξωχρωσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

Πίνακας 1: Γονίδια που εμφανίζουν ενίσχυση από ecDNAs. (Wei, et al., 2020; Pecorino, et al., 2022; Karami Fath, et al., 2021)	26
Πίνακας 2: Τα πιο συχνά ογκογονίδια, που ανευρίσκονται και ενισχύονται από ecDNAs. (Pecorino, et al., 2022)	27
Πίνακας 3: Γονίδια που ανευρίσκονται στα ecDNAs σε διάφορους τύπους καρκίνου. (Wang, et al., 2021)	40

1. Εισαγωγή

Η εξέλιξη των καρκινικών κυττάρων και η ετερογένεια ενός όγκου, αποτελούν καίριο πρόβλημα για τη θεραπεία του καρκίνου. Το εξωχρωμοσωμικό DNA (ecDNA) είναι ένα κυκλικό μόριο DNA, πυρηνικό, μη πλασμιδικό, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την ετερογένεια του καρκίνου, καθώς επίσης και στη θεραπευτική αντίσταση. (Dong, et al., 2023; Li, et al., 2022; Noer, et al., 2022) Έχει βρεθεί σε ευκαρυωτικά κύτταρα, κύτταρα ζυμομυκήτων, στην *Drosophila melanogaster*, στο *C. elegans*, σε ποντίκια, σε χάμστερ και στον άνθρωπο. (Ludi , et al., 2022; Li, et al., 2022; Xing, et al., 2021) Παρά το γεγονός ότι ανακαλύφθηκε πριν από 50 έτη, δεν είναι ακόμα πλήρως χαρακτηρισμένο. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να γίνει πλήρη ανάλυση για το ρόλο του στην παθοφυσιολογία του καρκίνου, καθώς και αν η διάγνωση του βελτιώνει τις τρέχουσες θεραπείες. (Li, et al., 2022; Wu , et al., 2022)

Στα καρκινικά κύτταρα μπορούν να απελευθερωθούν τμήματα DNA και ρυθμιστικά στοιχεία από τα φυσιολογικά ζεύγη ομόλογων χρωμοσωμάτων, να μετακινηθούν και να σχηματίσουν κυκλικά, μόρια ecDNA. (Wu , et al., 2022) Το ecDNA αναγνωρίστηκε ως ο κύριος φορέας ενισχυμένων ογκογονιδίων, όπου εντοπίζεται σε ποσοστό έως 14% των νέων διαγνώσεων καρκίνων. (Yi, et al., 2022) Δεν διαθέτει κεντρομερές και έτσι κληρονομείται με μη Μενδελικό τρόπο κατά την μίτωση. Η παρουσία πολλαπλών αντιγράφων ογκογονιδίων, στα καρκινικά κύτταρα, τα βοηθά στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη αντοχής σε φάρμακα και ενισχύει την ογκοκυτταρική ετερογένεια. Σε διάφορες μελέτες που έχουν γίνει, το ecDNA απαντάται κυρίως σε καρκινικά κύτταρα και σπάνια σε φυσιολογικούς ιστούς. Έχει συσχετιστεί με πιο επιθετικές μορφές κακοήθειας, του σημαντικού λειτουργικού ρόλου που διαθέτει ιδιαίτερα στη ρύθμιση της μεταγραφής αλλά και στην αύξηση των αντιγράφων ογκοσχετιζόμενων γονιδίων, με συνέπεια την ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου, (Dong, et al., 2023; Wu , et al., 2022) Τα ecDNAs μπορούν να αξιοποιηθούν ως πιθανοί νέοι βιοδείκτες για παρακολούθηση θεραπείας και έγκαιρης ανίχνευσης. (Li, et al., 2022)

1.1. Ανακάλυψη των ecDNAs

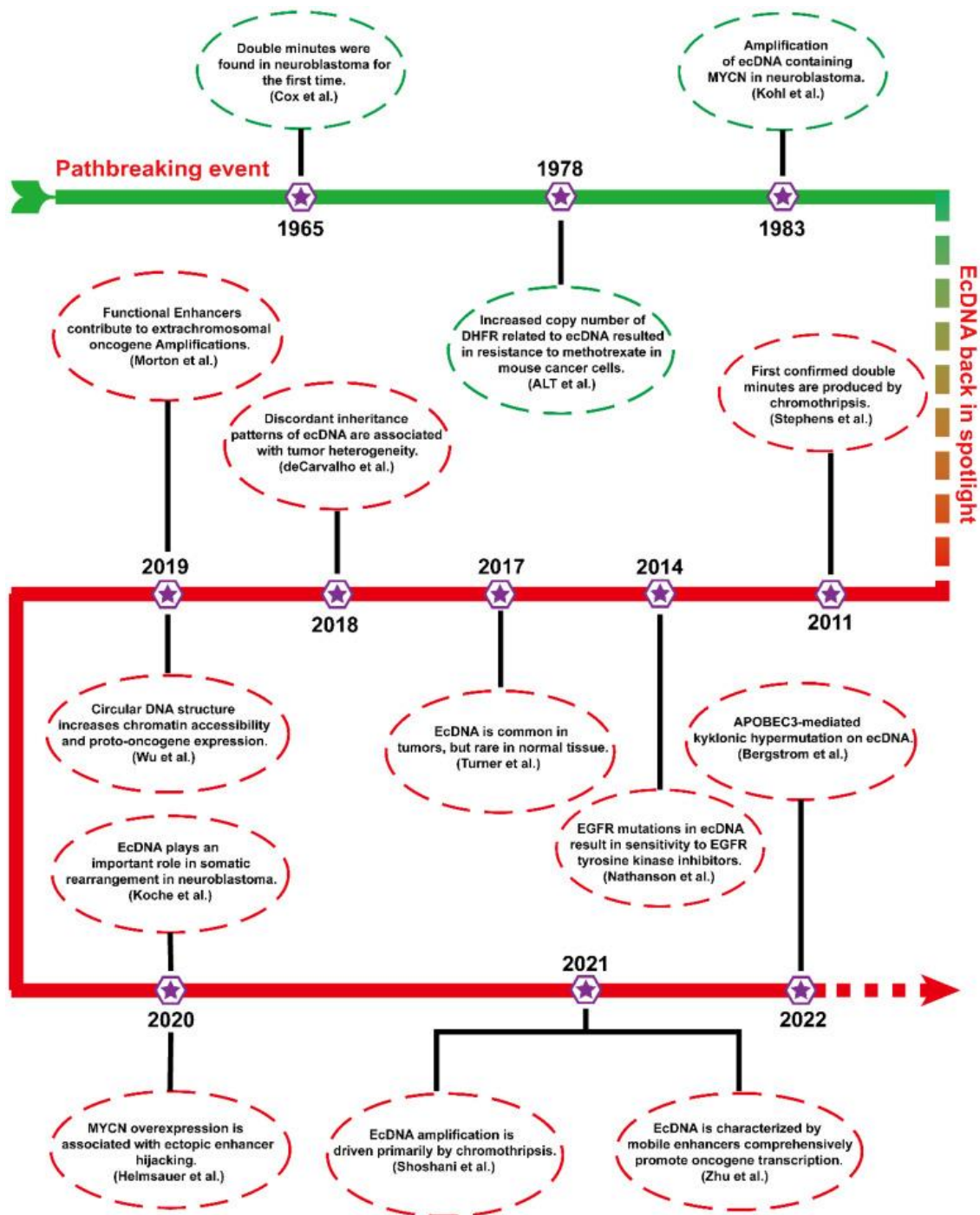
Το ecDNA έχει χαρακτηριστεί με πολλούς διαφορετικούς τρόπους από τη δεκαετία του '60. (Noer, et al., 2022) Η πρώτη αναφορά σχετικά με τα ecDNAs έγινε το 1965, όπου ανακαλύφθηκαν σε νευροβλάστωμα και σε βρογχικό καρκίνωμα. (Tsiakanikas, et al., 2024; Li, et al., 2022) Αρχικά του αποδόθηκαν διαφορετικά ονόματα όπως «Διπλά θραύσματα χρωμοσώματος» (double fragments of chromosome), «Διπλά λεπτά χρωμοσώματα» (double minutes chromosomes (DM), «μικροσκοπικά μόρια χρωματίνης» (minute chromatin bodies), καθώς επίσης και «βοηθητική χρωματίνη» (accessory chromatin). Από τότε βρέθηκε ότι ανιχνεύονται κυρίως σε καρκινικά κύτταρα, ότι το μέγεθος τους ποικίλει, ότι υπόκεινται σε τυχαίο διαχωρισμό και όχι με βάση το Μενδελικό πρότυπο και ότι πρόκειται για κυκλικά μόρια με μορφή δακτυλίου. (Wu , et al., 2022; Li, et al., 2022) Το 1978 παρατήρησαν ότι τα DM χρωμοσώματα δεν είχαν κεντρομερίδιο και κατά την μίτωση, δεν διαχωρίζονταν οι αδελφές χρωματίδες από την μιτωτική άτρακτο, γεγονός που οδηγούσε στην συγκέντρωση στην μια μεριά του πόλου. (Levan & Levan, 1978) Οι Levan και Levan κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το ecDNA δεν προσανατολίζεται με παρόμοιο τρόπο με τα χρωμοσώματα. (Bafna & Mischel, 2022) Από εκεί και μετά χρησιμοποιήθηκε ο όρος εξωχρωμοσωμικό DNA (ecDNAs) για να περιγραφούν. (Wu , et al., 2022)

Τη δεκαετία του 80' η ομάδα Schimke ανακάλυψε μια αύξηση του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου διυδροφολικής αναγωγής (DHFR) από τα ecDNAs, που οδηγούσε σε αντίσταση στη μεθοτρεξάτη σε καρκινικές κυτταρικές σειρές προερχόμενες από ποντίκια. (Ludi , et al., 2022; Kaufman , et al., 1979) Το 1983, έπειτα από καλλιέργεια ανθρωπίνων νευροβλαστωμάτων, ερευνητές οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι τα ecDNAs προκαλούσαν νέα ενισχυμένα ογκογονίδια στο νευροβλάστωμα, τα *N-myc*. (Kohl, et al., 1983) Μια άλλη έρευνα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα γονίδια αυτά υπάρχουν σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές HL-60 και COLO320. (Von Hoff, et al., 1988)

Αν και είχε ανακαλυφθεί εδώ και 50 χρόνια, οι μελέτες ήταν πολύ λίγες για να βρεθεί η ακριβής συσχέτιση του με την καρκινογένεση. Με την ανακάλυψη

Ο ρόλος των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου νέων μοριακών τεχνικών, όπως η αλληλούχηση ολόκληρου γονιδιώματος (whole genome sequencing, WGS), άνοιξε ο δρόμος για περαιτέρω μελέτη του. (Wu , et al., 2022)

Το 2011 ανακαλύφθηκε ο σχηματισμός του ecDNA με τον μηχανισμό θρυμματισμού χρωμοσώματος, μέσω της τεχνολογίας αλληλούχησης νέας γενιάς. Το 2014, ανακαλύφθηκε ότι μεταλλάξεις στο EGFRvIII βρέθηκαν μόνο σε ecDNAs μόρια. Το 2017 βρέθηκε ότι τα μόρια ecDNAs, μπορούν να ανιχνευθούν στο 50% των ανθρώπινων όγκων, ενώ είναι εξαιρετικά σπάνια σε μη καρκινικά κύτταρα. (Li, et al., 2022) Στη συνέχεια έγινε μελέτη για τα ecDNAs σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα με πάνελ καρκινικών κυττάρων NCI60 και σε συνδυασμό με WGS. Πιο συγκεκριμένα, μελέτη του 2011, είχε αναφερθεί ότι τα ecDNAs βρίσκονται στο γονιδίωμα σε καρκινικά κύτταρα σε ποσοστό 1,4%, όμως πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι υπάρχουν σε ποσοστό 40% σε ογκοκυτταρικές σειρές και κοντα στο 90% σε καρκινικές σειρές εγκεφάλου. (Wu , et al., 2022; Fan, et al., 2011) Η διαφορά πιθανόν να σχετίζεται με τη μορφή του ecDNA που στην περίπτωση της μελέτης των Fan, et al., μελετήθηκαν μόνο δίκλινα ecDNAs, σε σχέση με τη νεότερη μελέτη που επεξεργάστηκαν και μονόκλινα ecDNAs. (Fan, et al., 2011) Το 2018 ανακαλύφθηκε ο ανομοιόμορφος τρόπος διαχωρισμού των ecDNAs, καθώς δε διαθέτουν κεντρομερίδιο και δεν μεταφέρονται ισάξια στις επόμενες γενιές κυττάρων. Το 2019 βρέθηκαν ενισχυτές ογκογονιδίων και διαπιστώθηκε ότι είχαν υψηλά επίπεδα έκφρασης, με τη βοήθεια της κυκλικής τους δομής που δίνει εύκολη πρόσβαση στη χρωματίνη. Μελέτες από το 2020 ως το 2022, βρήκαν ότι τα ecDNAs είναι ικανά για αναδιατάξεις στο νευροβλάστωμα, καθώς και η ύπαρξη του γονιδίου *MYCN* προσδίδει ενίσχυση του όγκου. Επιπλέον βρέθηκε με μεθόδους αλληλούχησης ότι ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα οφειλόταν από αυτά τα μόρια. (Li, et al., 2022)



Εικόνα 1: Ιστορική αναδρομή μελετών για την ανακάλυψη εξωχρωσωμικών μορίων DNA (Li, et al., 2022)

1.2. Δομή του ecDNA

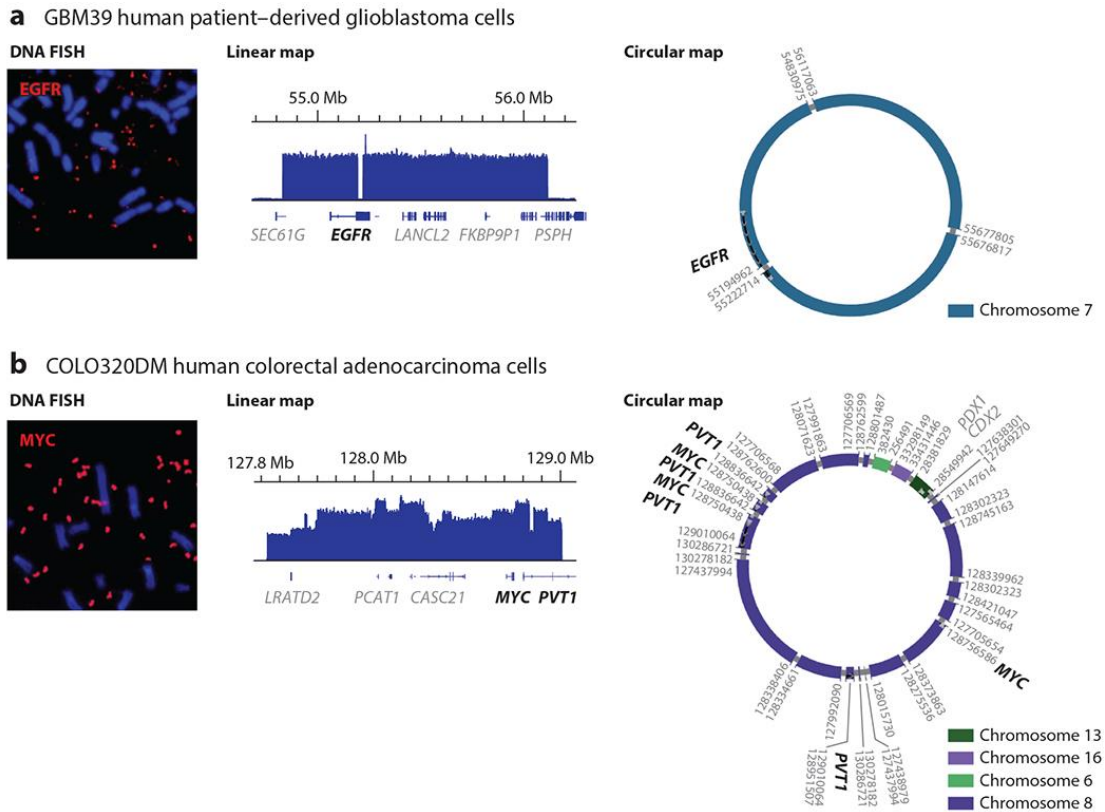
Το ευκαρυωτικό γενωμικό DNA συσκευάζεται σε 23 ζεύγη γραμμικών χρωσωμάτων. (Noer, et al., 2022) Με διάφορους μηχανισμούς που θα συζητηθούν παρακάτω, τμήμα γενωμικού DNA διαχωρίζεται από τα χρωμοσώματα και σχηματίζει μόρια (μόρια ecDNAs) διάφορου μεγέθους. Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 1 ως 4Mb, (Madren, et al., 2023; Li, et al., 2022) με τα περισσότερα να κυμαίνονται στα 1000 bp. (Ludi, et al., 2022) Το

μέγεθος τους είναι τόσο μεγάλο, που μπορούν να συμπεριλάβουν και ολόκληρα γονίδια, καθώς και θέσεις έναρξης αντιγραφής για την αυτοαντιγραφή τους. (Wu, et al., 2023)

Τα ecDNAs αποτελούν μία από τις υποκατηγορίες των κυκλικών eccDNAs και την πρώτη που ανακαλύφθηκε σε ευκαρυωτικά κύτταρα, με τις υπόλοιπες να αποτελούν τα microDNAs, τους τελομερικούς κύκλους (t-Circle/ c-Circle) και τα μικρά κυκλικά DNA πολυδιασποράς (spcDNAs). (Tsiakanikas, et al., 2024; Arrey, et al., 2022) Δεν θα πρέπει να συγχαιούνται τα ecDNAs με τα eccDNAs, καθώς έχουν διαφορές μεταξύ τους. Τα ecDNAs αυτοαναπαράγονται και έχουν ανευρεθεί μόνο σε καρκινικά κύτταρα. Περιλαμβάνουν ογκογονίδια, γονίδια ανθεκτικότητας σε φάρμακα, ενισχυτές ογκογονιδίων και ρυθμιστικές αλληλουχίες, άλλα γονίδια που προσδίδουν πλεονεκτήματα σε αυτά και μπορούν να περιλαμβάνουν μεταλλάξεις. Αντίθετα τα eccDNAs, δεν είναι γνωστός ο τρόπος αντιγραφής τους. Συνήθως δεν περιλαμβάνουν ενισχύσεις γονιδίων, περιέχουν μεγάλο μέρος γονιδιώματος, ενώ δεν περιέχουν ρυθμιστικές αλληλουχίες. Δεν είναι γνωστό αν φέρουν μεταλλάξεις και μπορούν να ανευρεθούν σε αρκετές κυτταρικές σειρές καθώς και σε υγιή κύτταρα. (Hung, et al., 2022)

Το 1980, αρκετές μελέτες χαρακτήρισαν το ecDNA ως ένα κυκλικό μόριο που αποτελούνταν από χρωμοσωμικές ίνες περιελιγμένες σε νουκλεοσώματα, με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Το ecDNA θεωρήθηκε ως κυκλικό μόριο καθώς δεν βρέθηκαν ελεύθερα άκρα και αντιγράφεται αυτόνομα. (Dong, et al., 2023; Wu, et al., 2022; Madren, et al., 2023) Επιπλέον βρέθηκε ότι τα ecDNAs στερούνται κεντρομερών και τελομεριδίων, με αποτέλεσμα τα θυγατρικά κύτταρα να μην έχουν ισάριθμα αντίγραφα αυτών των μορίων. (Li, et al., 2022) (Tsiakanikas, et al., 2024) Το 2019 ανακαλύφθηκε ότι το ecDNA είναι λιγότερο συμπυκνός και πιο προσιτό από το γενωμικό DNA, με αποτέλεσμα να υπάρχει αυξημένη έκφραση των γονιδίων του ecDNA. (Wu, et al., 2019) (Wu, et al., 2022) Λόγω της λιγότερης συμπυκνούς δομής, το ecDNA είναι πιο εύκολα προσβάσιμο για μεταγραφή και το μόριο φέρει ακετυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη 27 (H3K27ac). (Karami Fath, et al., 2022) Δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί αν το ecDNA είναι καλά οργανωμένο σε ένα καρκινικό κύτταρο, όμως με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης και της τρισδιάστατης μικροσκοπίας επιβεβαιώθηκε το κυκλικό σχήμα των ecDNAs. Αυτή η επιβεβαίωση βοήθησε στη χαρτογράφηση των ecDNAs. (Wu, et al., 2022) Επίσης, μελέτες ανάλυσης της δομής του, επιβεβαίωσαν ότι το ecDNA εξελίσσεται συνεχώς μέσω σύντηξης, αναδιάταξης και συχνών μεταλλάξεων, και έτσι αυξάνεται η ποικιλομορφία του μορίου. (Ludi, et al., 2022)

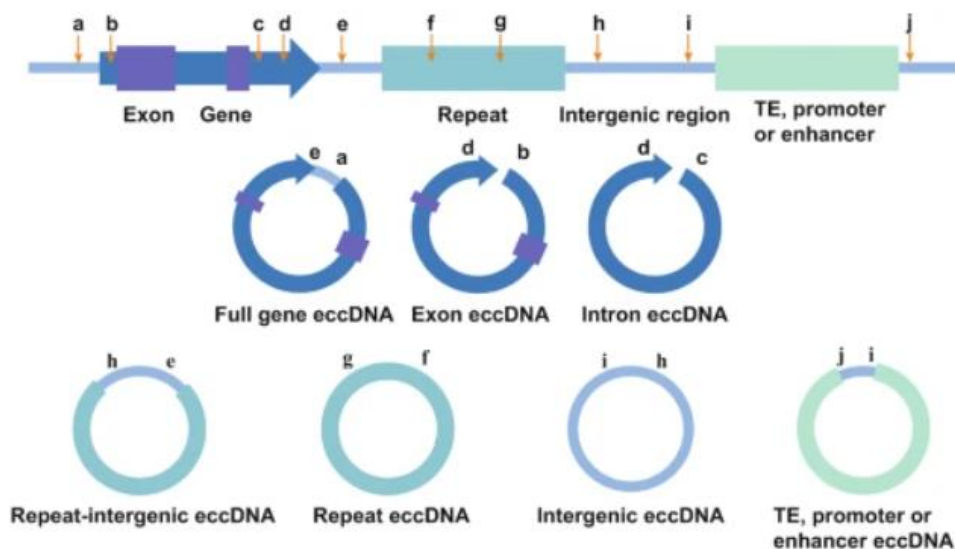
Ο ρόλος των εξωχρωσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου



Εικόνα 2: Χάρτης απεικόνισης των εξωχρωσωμικών DNAs (ecDNAs). Ένας γραμμικός χάρτης είναι εύκολος να μελετηθεί σε περίπτωση μιας απλής δομής των ecDNAs, όπως αυτή του *EGFR* σε κύτταρα GBM39, σε αντίθεση με πιο περίπλοκα μόρια ecDNAs, όπως στην περίπτωση *MYC* σε κύτταρα COLO320DM, όπου καλύτερα είναι ένας κυκλικός χάρτης. Ο κυκλικός χάρτης βοηθά στην κατανόηση των τάξεων και των προσανατολισμών των αναδιαταγμένων τμημάτων. (Wu , et al., 2022)

Ανάλογα με την προέλευση του περιεχομένου τμήματος DNA, τα ecDNAs μπορούν να χωριστούν σε τύπους όπως: ecDNAs πλήρους γονιδίου, ecDNAs εξωνίου, ecDNAs ιντρονίου, ecDNAs επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, ecDNA διαγονιδιακό, επαναλαμβανόμενο διαγονιδιακό ecDNA και TE ecDNAs. (Ludi , et al., 2022)

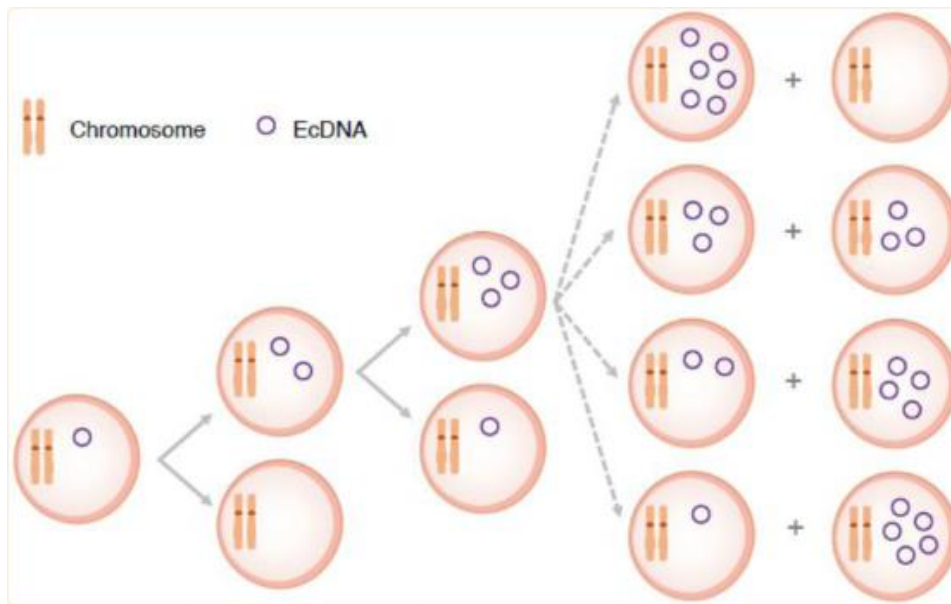
Ο ρόλος των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου



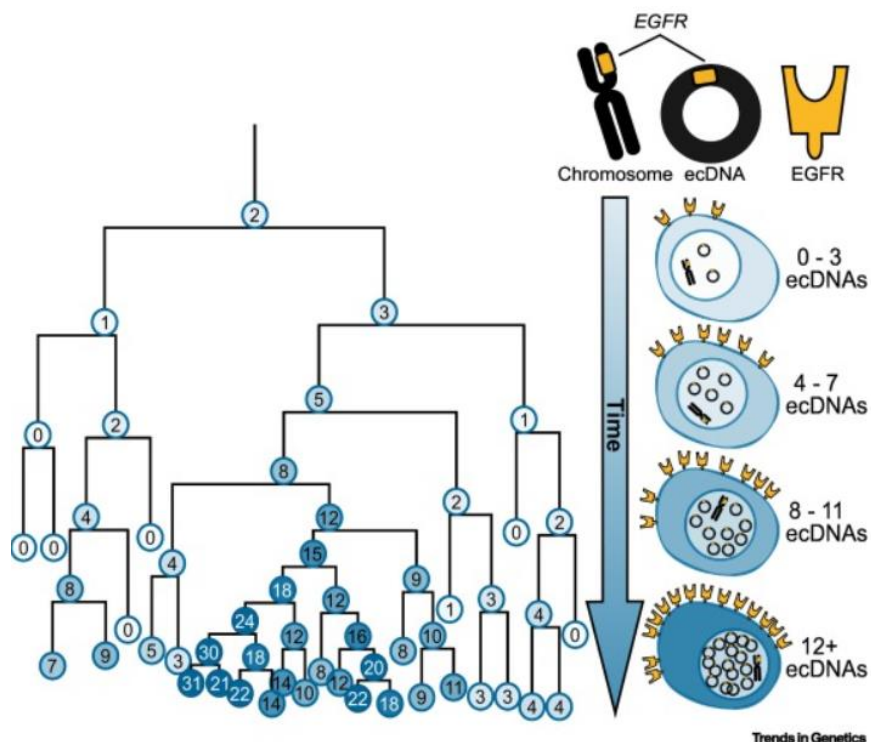
Εικόνα 3: Κατηγοριοποίηση μορίων ecDNAs με βάση την αλληλουχία που περιέχουν. (Ludi , et al., 2022)

1.3.Πολλαπλασιασμός ecDNA

Όπως προαναφέρθηκε, τα ecDNAs αποτελούν κυκλικά μόρια με απουσία κεντρομερούς και αντιγράφονται ανεξάρτητα από τα χρωμοσώματα. (Li, et al., 2022; Ludi , et al., 2022) Τα γραμμικά χρωμοσώματα αντιγράφονται και κατά την μίτωση, διαχωρίζονται οι αδελφές χρωματίδες στους δυο πόλους με τη βοήθεια των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου. Η ένωση των μικροσωληνίσκων με τα χρωμοσώματα γίνεται στα κεντρομερή. Έτσι εξασφαλίζεται η ισοκατανομή του γενετικού υλικού. Στην περίπτωση όμως των ecDNAs, ο αριθμός τους ποικίλει από κύτταρο σε κύτταρο, καθώς δεν υπάρχουν κεντρομερή και δε γίνεται ισοκατανομή τους στην μιτωτική διαίρεση, στους απογόνους. (Yi, et al., 2022) Τα ecDNAs είτε κολλούσαν πάνω στα χρωμοσώματα, είτε συγκεντρώνονταν περιφερειακά του κυττάρου, αντί να συνδεθούν με την άτρακτο. (Bafna & Mischel, 2022) Η κατανομή τους στα θυγατρικά κύτταρα είναι αρκετά μεταβλητή και τυχαία. Αυτή η μεταβλητή κατανομή μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση ογκογονιδίων στα κύτταρα και ταχεία εξέλιξη του όγκου. (Noer, et al., 2022) Ο ανομοιόμορφος διαχωρισμός τους προσδίδει ογκογονικό δυναμικό στα καρκινικά κύτταρα. (deCarvalho, et al., 2018; Zhu, et al., 2021) Αυτό το χαρακτηριστικό προσδίδει θεραπευτική αντίσταση στον όγκο. (Hung, et al., 2022) Η ταχεία διακύμανση στα επίπεδα του ecDNA συμβάλλει στην εξέλιξη του όγκου. (Zhu, et al., 2021)



Εικόνα 4: Διαχωρισμός ecDNAs και των γραμμικών χρωμοσωμάτων κατά την κυτταρική διαίρεση. Γίνεται ανομοιόμορφη κατανομή στα θυγατρικά κύτταρα των ecDNAs, λόγω της έλλειψης κεντρομεριδίων. (Zhu, et al., 2022)

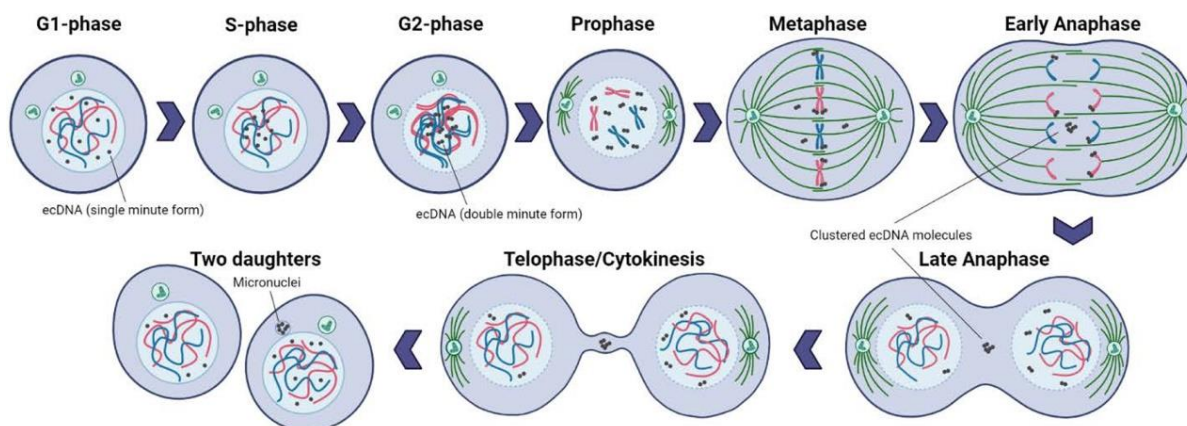


Εικόνα 5: Ταχεία συσσώρευση μορίων ecDNAs και άνιση κατανομή τους σε θυγατρικά κύτταρα σε κάθε μιτωτική διαίρεση. (Noer, et al., 2022)

Στα κύτταρα υπάρχουν μηχανισμοί που διασφαλίζουν την κατανομή των ecDNAs στα θυγατρικά κύτταρα. Στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου υπάρχουν μονόκλωνα μόρια των ecDNAs. Στη φάση S διπλασιάζονται και

Ο ρόλος των εξωχρωσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

δημιουργούνται δίκλινα μόρια ecDNAs. Κατά τη φάση της διαίρεσης, τα ecDNAs κολλάνε στις τελομεριδικές αλληλουχίες των χρωμοσωμάτων και διαιρούνται άνισα στα θυγατρικά κύτταρα. Στην ανάφαση ξεκινούν να διαχωρίζονται οι αδερφές χρωματίδες. Όσα ecDNAs δεν είχαν συνδεθεί στα τελομερίδια των χρωμοσωμάτων ομαδοποιούνται στο κέντρο, δε διαχωρίζονται στα 2 θυγατρικά κύτταρα, αλλά μετακινούνται σε ένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα σχηματίζοντας έναν μικροπυρήνα. (Yi, et al., 2022)

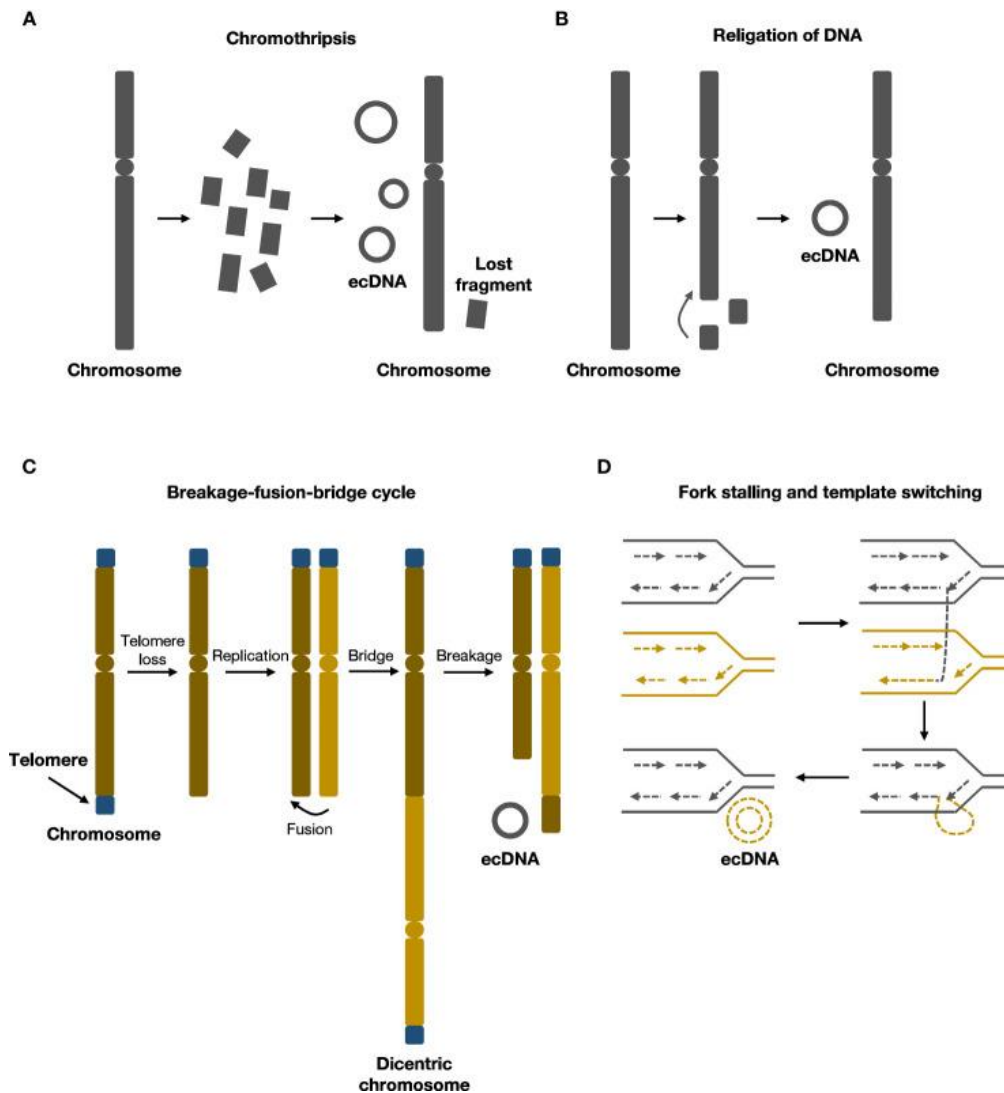


Εικόνα 6: Κυτταρικός κύκλος μορίων ecDNAs. (Yi, et al., 2022)

Σε πειράματά τους, οι Barker, *et. al*, κατάφεραν να αποδείξουν ότι το ecDNA ήταν ικανό για αυτόνομη αναπαραγωγή, ανεξάρτητα από το χρωμοσωμικό DNA. (Bafna & Mischel, 2022)

1.4. Μηχανισμοί βιογένεσης μορίων ecDNAs

Υπάρχουν πολλά μοντέλα για το πως σχηματίζεται το ecDNA στα κύτταρα. Μελέτες έχουν δείξει τη συσχέτιση της χρωμοσωμικής αστάθειας και του σχηματισμού του ecDNA. Το ecDNA μπορεί να σχηματιστεί, έπειτα από θραύση του χρωμοσώματος σε μικρά κλάσματα και επανένωσή τους σε ένα κυκλικό μόριο ecDNA και ένα μικρότερο γενωμικό χρωμόσωμα (chromothripsis - θρυμματισμός DNA). Ένας άλλος τρόπος δημιουργίας του είναι διπλή θραύση του χρωμοσώματος και επανασύνδεση, δημιουργώντας ένα χρωμοσωμικό έλλειμμα και με δημιουργία αυτού του τμήματος σε μόριο ecDNA. Δύο επιπλέον τρόποι αποτελούν οι κύκλοι θραύσης-σύντηξης γέφυρας (breakage-fusion-bridge (BFB) cycles) και η στασιμότητα διχάλας με εναλλαγή προτύπου (fork stalling and template switching) (Dong, et al., 2023; Kraft, et al., 2024)

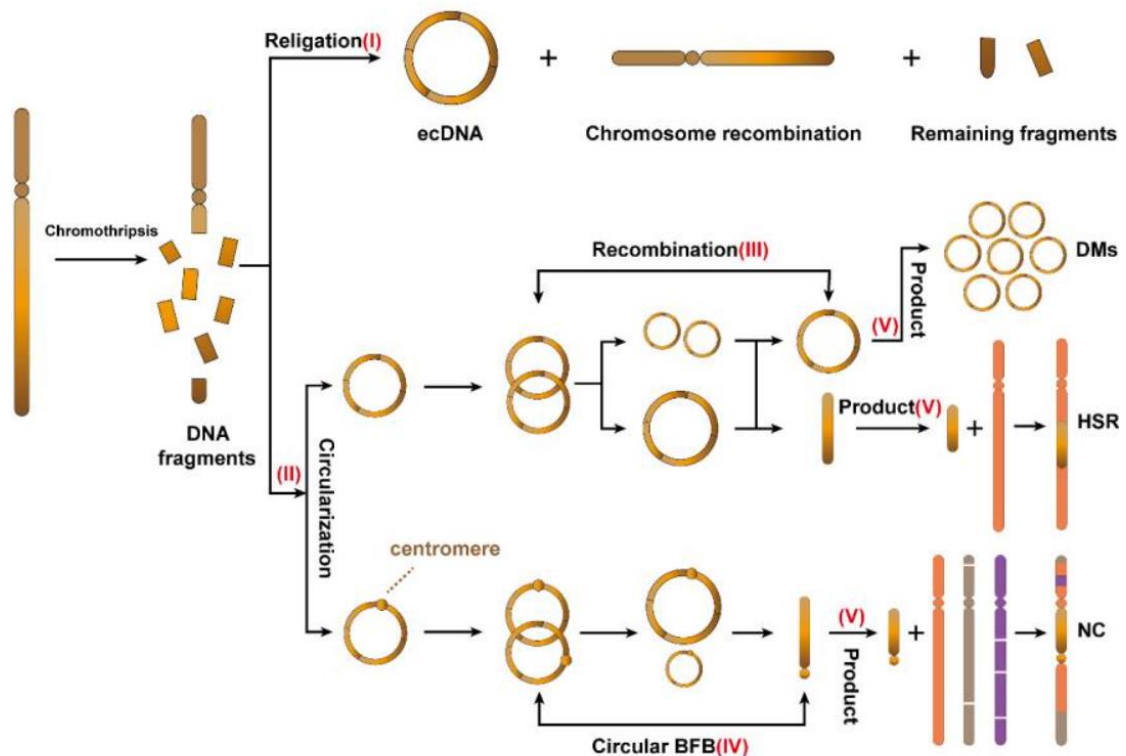


Εικόνα 7: Τρόποι δημιουργίας μορίων ecDNAs. A) Chromothripsis, B) Θραύση και επανασύνδεση, C) breakage-fusion-bridge (BFB) cycles, D) fork stalling and template switching. (Dong, et al., 2023)

1.4.1. Θρυμματισμός χρωμοσώματος

Ο θρυμματισμός των χρωμοσωμάτων αποτελεί την κυριότερη μέθοδο δημιουργίας των ecDNAs, αν και έχει επιβεβαιωθεί μόνο στο 36% των περιπτώσεων. Κατά την μέθοδο αυτή, δημιουργούνται δεκάδες ως εκατοντάδες θραύσματα DNA διαφόρων μεγεθών, από μόνο ένα χρωμόσωμα και τυχαίες αναδιατάξεις των θραυσμάτων αυτών κατά την επιδιόρθωση, προς σχηματισμό μικρών κυκλικών μορίων ecDNAs. (Li, et al., 2022; Noer, et al., 2022; Zhu, et al., 2022) Έχουν βρεθεί από 4 ως 49 διαφορετικές αναδιατάξεις που μπορούν να συμβούν. (Zhu, et al., 2022) Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να αναδιαμορφώσει το γονιδίωμα ενός καρκινικού κυττάρου και να προκαλέσει ενίσχυση ογκογονιδίων και αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. (Li, et al., 2022; Ilic, et al., 2022) Αυτή η μέθοδος σχηματισμού ecDNAs, έχει βρεθεί σε κυτταρικές σειρές λεμφώματος σε ποσοστό 6,3%, με τμήματα ως και 3 χρωμοσωμάτων να συγχωνεύονται σε ένα ecDNA, ενώ σε κυτταρικές

σειρές νευροβλαστώματος έχει βρεθεί σε ποσοστό 2,8%. (Dong, et al., 2023; Zhu, et al., 2022) Επιπλέον, έχει βρεθεί σε ολιγοδενδρογλοίωμα, σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα οισοφάγου, σε καρκίνο παγκρέατος, σε καρκίνο προστάτη, σε μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα και σε παιδιατρικό μυελοβλάστωμα. (Ludi , et al., 2022; Wang, et al., 2021) Τα ecDNAs που έχουν δημιουργηθεί με αυτόν τον τρόπο, περιέχουν ογκογονίδια που προσφέρουν πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού του μορίου. (Dong, et al., 2023)



Εικόνα 8: Μηχανισμός βιογένεσης ecDNAs, θρυμματισμός DNA. Δημιουργία κλασμάτων από τον θρυμματισμό του DNA και επανένωση και κυκλοποίηση τους σε μόρια ecDNA. (Li, et al., 2022)

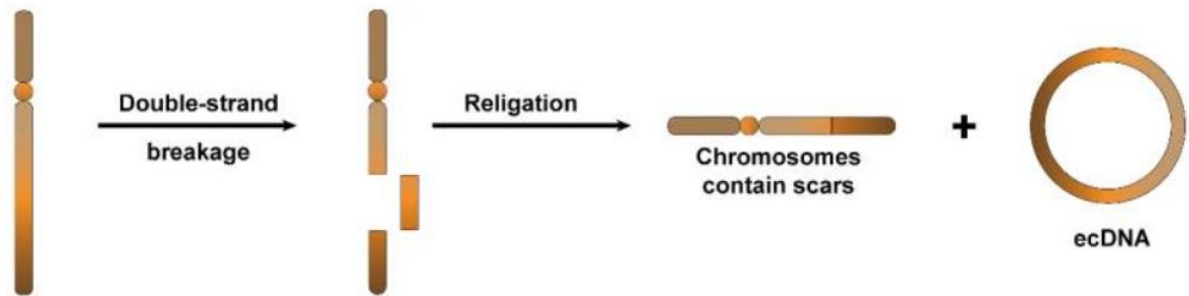
Έπειτα από τον θρυμματισμό των χρωμοσωμάτων, το θραύσμα που δεν περιέχει το κεντρομερές του χρωμοσώματος ενισχύεται, ανασυνδιάζεται και κυκλοποιείται. Στη συνέχεια παράγονται είτε μεγάλα κυκλικά μόρια, είτε γραμμικά μόρια. Σε επόμενο στάδιο διαίρεσης δημιουργούνται κι άλλα μόρια ecDNAs και γραμμικές ομοιογενείς περιοχές χρώσης (HSRs-homogeneous staining regions). Τα θραύσματα που περιέχουν το κεντρομερές του χρωμοσώματος, υφίστανται επαναλαμβανόμενους κύκλους θραύσης-σύντηξης γέφυρας (θα αναλυθεί στη συνέχεια), δημιουργώντας ένα γραμμικό μόριο που αποτελεί ένα νέο χρωμόσωμα (NC-neochromosome). (Li, et al., 2022; Ilic, et al., 2022)

1.4.2. Θραύση και επανασύνδεση άκρων χρωμοσωμάτων

Έπειτα από θραύση χρωμοσωμάτων, το τμήμα που κόβεται και λείπει από το χρωμόσωμα, δημιουργεί ένα κυκλικό μόριο ecDNA. Ωστόσο, θα πρέπει να

Ο ρόλος των εξωχρωσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

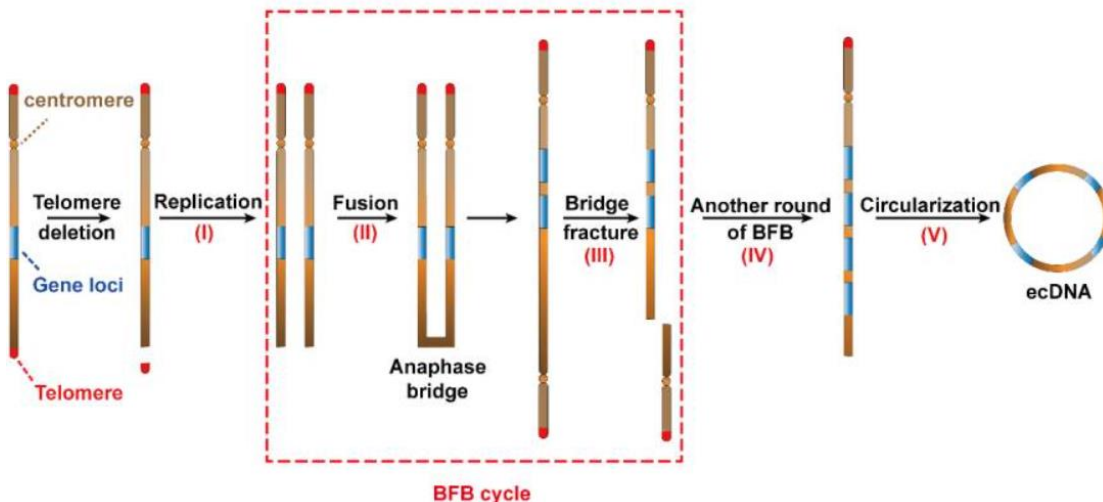
γίνουν περισσότερες μελέτες για να εξακριβωθεί αυτός ο μηχανισμός. Μια μελέτη έδειξε ότι το έλλειμμα του γονιδίου *MYC* στο γονιδίωμα ασθενών με λευχαιμία, συνέπεσε με την ύπαρξή του ecDNA. (Dong, et al., 2023)



Εικόνα 9: Μηχανισμός βιογένεσης ecDNAs, θραύση και σύνδεση άκρων χρωμοσωμάτων. (Li, et al., 2022)

1.4.3. Κύκλοι θραύσης-σύντηξης γέφυρας

Αναφέρθηκε πρώτη φορά από την Barbara McClintock τη δεκαετία του '30. (Ludi, et al., 2022; Liao, et al., 2020) Ο κύκλος θραύσης-σύντηξης (BFB) είναι βασικός μηχανισμός που προάγει τη γονιδιακή ενίσχυση και παρέχει αστάθεια στο γονιδίωμα. (Zhu, et al., 2022; Tsiakanikas, et al., 2024) Ο κύκλος ξεκινά με θραύση των τελομερών ενός χρωμοσώματος, αντιγραφή του χρωμοσώματος και στη συνέχεια, σύντηξη των δύο χρωμοσωμάτων στο σημείο θραύσης των τελομερών με σχηματισμό μιας γέφυρας στο στάδιο της ανάφασης του κυτταρικού κύκλου. Το χρωμόσωμα που φτιάχνεται είναι δίκεντρικό, αποτελείται δηλαδή, από δύο κεντρομερή. Στη συνέχεια η γέφυρα υφίσταται θραύση και ανασυνδυασμό. Η θραύση είναι τυχαία και οι πολλοί επαναλαμβανόμενοι κύκλοι μπορούν να δημιουργήσουν πολλαπλές γονιδιωματικές εκτροπές με χρωμοσωμικές και εξωχρωμοσωμικές ενισχύσεις, όπως τα κυκλικά μόρια ecDNAs. (Zhu, et al., 2022; Liao, et al., 2020) *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι αυτός ο μηχανισμός σχετίζεται με αντοχή στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. (Li, et al., 2022; Dong, et al., 2023) Ο BFB θα μπορούσε να οδηγήσει σε αστάθεια του γονιδιώματος και γονιδιακή ενίσχυση. (Bafna & Mischel, 2022; Dehkordi, et al., 2023)

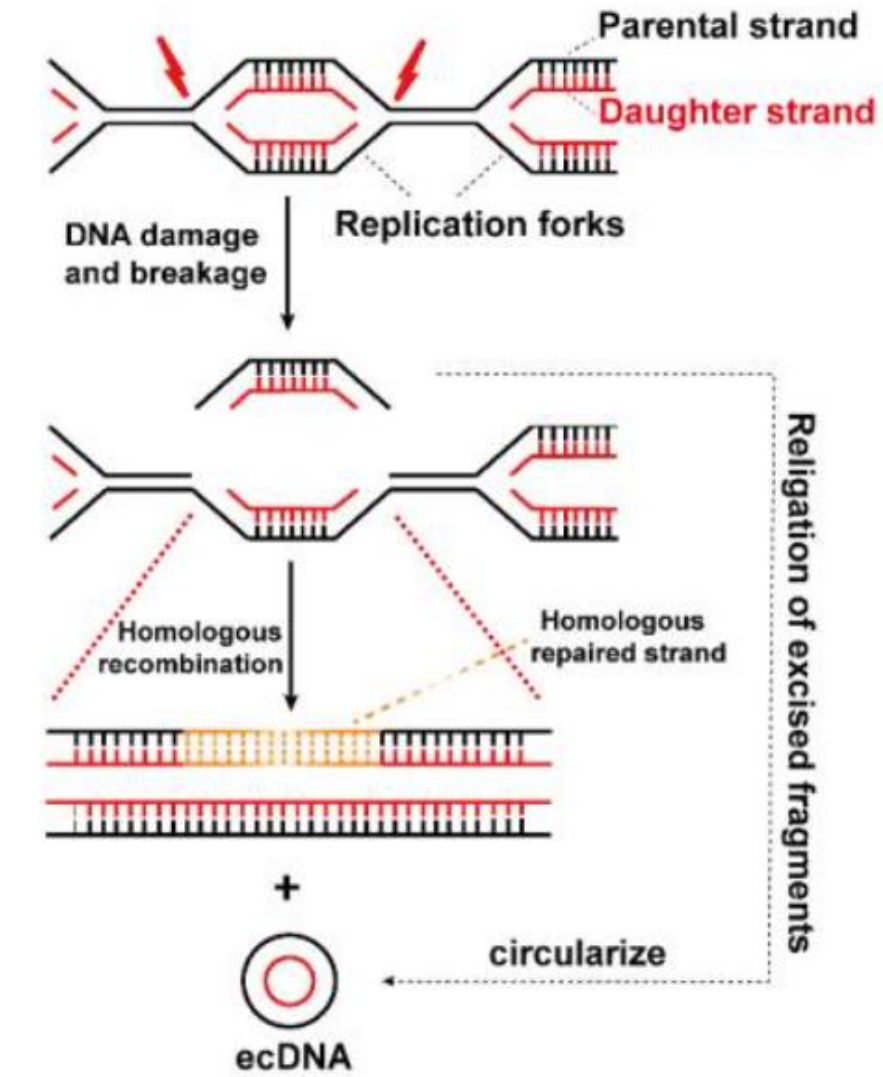


Εικόνα 10: Μηχανισμός βιογένεσης ecDNAs, Κύκλοι θραύσης-σύντηξης γέφυρας. (Li, et al., 2022)

Σε πειράματά τους οι Umbreit, *et al.*, χρησιμοποίησαν την τεχνική CRISPR/Cas9, για να απομακρύνουν τα τελομερή στο χρωμόσωμα 4 και να παρατηρήσουν τον σχηματισμό του BFB. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα καταστροφικές συνέπειες για το κύτταρο. (Bafna & Mischel, 2022) Ο HER2 (+) καρκίνος μαστού εμφανίζουν αυτού του τύπου σχηματισμού ecDNAs. (Dehkordi, et al., 2023)

1.4.4. Στασιμότητα διχάλας με εναλλαγή προτύπου

Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής σε περίπτωση λάθους σταματά η διαδικασία και η διχάλα αντιγραφής μένει στάσιμη. Ο νεοσυντιθέμενος κλώνος με το λάθος διασπάται, κυκλοποιείται και σχηματίζει ecDNAs, ενώ το χρωμόσωμα επιδιορθώνει τη βλάβη με ομόλογο ανασυνδιασμό, με πρότυπο το ομόλογο χρωμόσωμα. (Dong, et al., 2023; Li, et al., 2022)

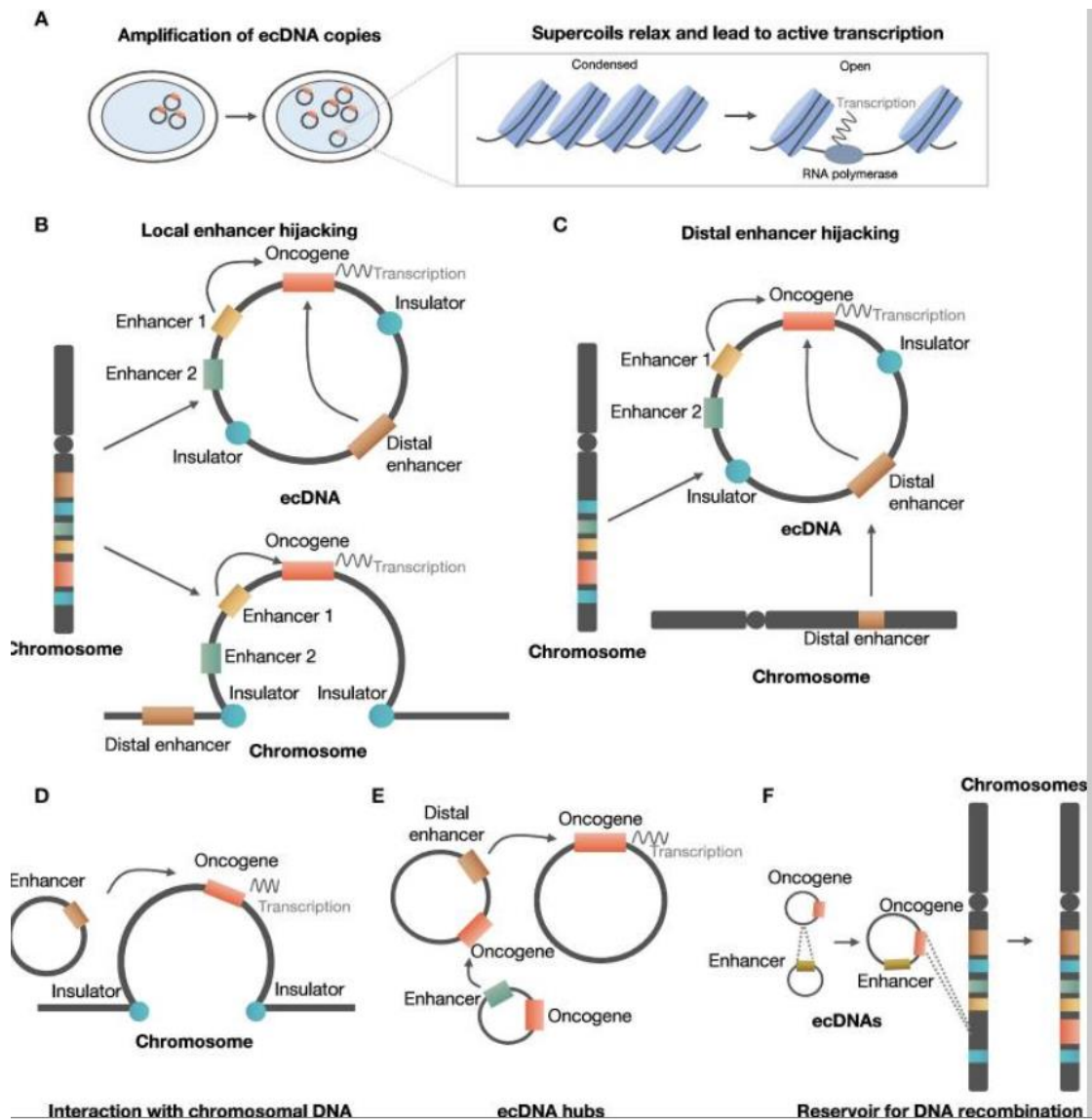


Εικόνα 11: Μηχανισμός βιογένεσης μορίων ecDNAs, Στασιμότητα διχάλας με εναλλαγή προτύπου. (Li, et al., 2022)

1.5. Μεταγραφική ρύθμιση ecDNA

Το ecDNA παίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη μιας κακοήθειας, με δείγματα ecDNA(+) να φέρουν υψηλότερο μεταλλακτικό φορτίο. Τρόποι με τους οποίους το επιτυγχάνει αυτό αποτελούν: α. προώθηση της έκφρασης ογκογονιδίων με προσβασιμότητα στη χρωματίνη και αύξηση του αριθμού αντιγράφων τους, β. κυκλοποίηση γραμμικού DNA σε ecDNA με γειτνίαση τοπικών ενισχυτών ή απομακρυσμένων ενισχυτών, γ. με ογκογονίδια και αυξημένη έκφραση τους, δ. αλληλεπίδραση του ecDNA με το χρωμοσωμικό DNA και ρύθμιση χρωμοσωμικών ογκογονιδίων, ε. συσσωματώματα ecDNAs για ενίσχυση ογκογονιδίων τους και στ. χρήση του ecDNA για ανασυνδυασμό του χρωμοσωμικού DNA. (Dong, et al., 2023; Lin, et al., 2023)

Ο ρόλος των εξωχρωσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου



Εικόνα 12: Ρόλος του ecDNA στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη του καρκίνου: A) προώθηση της έκφρασης ογκογονιδίων με προσβασιμότητα στην χρωματίνη και αύξηση του αριθμού αντιγράφων τους, B) κυκλοποίηση γραμμικού DNA σε ecDNA με γειτνίαση τοπικών ενισχυτών ή C) απομακρυσμένων ενισχυτών, με ογκογονίδια και αυξημένη έκφραση τους, D) αλληλεπίδραση του ecDNA με το χρωμοσωμικό DNA και ρύθμιση χρωμοσωμικών ογκογονιδίων, E) συσσωματώματα ecDNAs για ενίσχυση ογκογονιδίων τους και F) χρήση του ecDNA για ανασυνδιασμό του χρωμοσωμικού DNA. (Dong, et al., 2023)

1.5.1. Το ecDNA προωθεί την έκφραση ογκογονιδίων με προσβασιμότητα στην χρωματίνη και αύξηση του αριθμού αντιγράφων τους.

Τα μόρια ecDNAs μπορούν να αυξήσουν την έκφραση των ογκογονιδίων και τον αριθμό αντιγράφων τους, με πρόσβαση στη χρωματίνη. Η ενίσχυση της έκφρασης των ογκογονιδίων βρέθηκε σε πολλούς τύπους καρκίνων. (Dong, et al., 2023; Lin, et al., 2023) Η ενίσχυση των ογκογονιδίων από τα ecDNAs,

προκαλεί μια αυξημένη επιθετικότητα σε διάφορες μορφές καρκίνου, σε σχέση με μορφές καρκίνου που δεν τα διαθέτουν. Τα πιο συχνά ενισχυμένα ογκογονίδια σε ecDNAs είναι *MDM2*, *MYC*, *EGFR*, *CDK4*, *ERBB2*, *SOX2*, *TERT*, *CCND1*, *E2F3*, *PDGFRA*, *MET* και *CCNE1*. (Zhu, et al., 2022; Wei, et al., 2020) Επιπλέον υπάρχει ενίσχυση και σε ομάδες γονιδίων, όπως *PIK3CA-SOX2* και *CDK4-MDM2*. (Wei, et al., 2020) Αναλύσεις με WGS και με χρήση βιβλιοθηκών έδειξαν υψηλή συχνότητα ενίσχυσης ογκογονιδίων σε καρκίνους του νευρικού συστήματος. (Kim, et al., 2020) Σε μια μελέτη που έγινε σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα παρατηρήθηκε ότι τα μόρια ecDNAs φέρουν αρκετά ογκογονίδια, μερικά από τα οποία ήταν το *MYCN*, *MET*, *EGFR*, *PIK3CA*, *SOX2*, *CDK4*. Σε μια άλλη μελέτη σε κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ανακάλυψαν ότι σε ποσοστό περίπου 86% η ενίσχυση ογκογονιδίων σχετιζόταν με το ecDNA. (Dong, et al., 2023) Σε μια μελέτη που έγινε από τους Wu, et al., χρησιμοποιήθηκαν τα ATAC-seq (προσδιορισμός προσβασιμότητας με χρήση αλληλουχίας υψηλής απόδοσης (high-throughput sequencing) και ATAC-seq (προσδιορισμός προσβασιμότητας με οπτικοποίηση), για να ελέγξουν την προσβασιμότητα των ecDNAs στη χρωματίνη. Αυτό αποκάλυψε ότι σε όλα τα στάδια του κυτταρικού κύκλου, υπήρχε αυξημένος αριθμός κορυφών ATAC-seq στο χρωμοσωμικό DNA και αυξημένη έκφραση ογκογονιδίων. (Wu, et al., 2019) Πράγματι, σε έλεγχο γλοιοβλαστωμάτων και γλοιωμάτων βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα ATAC-seq, με προσδιορισμό εκατοντάδων μορίων ecDNAs. (Kumata, et al., 2020)

Πίνακας 1: Γονίδια που εμφανίζουν ενίσχυση από ecDNAs. (Wei, et al., 2020; Pecorino, et al., 2022; Karami Fath, et al., 2021)

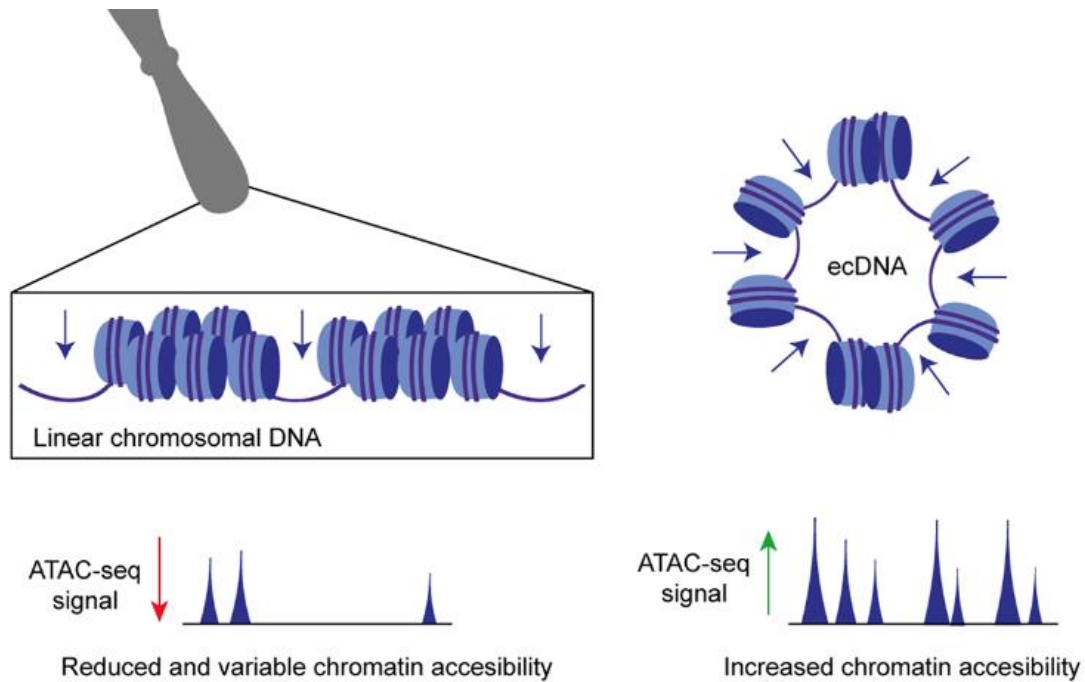
Γονίδια που ενισχύονται από ecDNAs	
AKT1	MDM2
ATM	MDR1
CAD	MET
CCND1	MLL
CCND2	MMP2
CCND3	MRPS17
CCNE1	MYC
CDK4	MYCL
CDK4-MDM2	MYCN
CDK6	NEDD9
CyclinD2	PDGFRA
DCLK1	PIK3CA-SOX2
DHFR	PTR1
E2F3	PVT1
EGFR	RAB3B
EIFSA2	REL
ERBB2	SEPT14
FGFR1	SOX2

GBAs	TERT
KRAS	VOPP1
LANCL2	ZNF713

Η ενίσχυση του ecDNA οδηγεί σε υψηλότερο αριθμό μεταγράφων ογκογονιδίων σε σύγκριση με το γραμμικό DNA. (Kim, et al., 2020) Η ικανότητα απόκτησης τόσο μεγάλων αριθμών αντιγράφων, μπορεί να σχετίζεται με τον άνισο διαχωρισμό στη μιτωτική διαίρεση του ecDNA. (Wu, et al., 2022) Επίσης, ένας λόγος μπορεί να είναι η διαφορά της οργάνωσης της χρωματίνης μεταξύ γενωμικού DNA και του ecDNA. Στα γραμμικά χρωμοσώματα υπάρχει περιελιγμένο το DNA γύρω από νουκλεοσώματα και εμποδίζεται αυστηρά η πρόσβαση μεταγραφικών παραγόντων, σε αντίθεση με τη μικρή συμπύκνωση των νουκλεοσωμάτων στα ecDNAs, όπου τα μόρια γίνονται πιο προσιτά σε μεταγραφικούς παράγοντες. Αυτού του είδους οι αλλαγές είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση κακοήθειας. (Yi, et al., 2022; Li, et al., 2022) Οι Chen *et al.*, παρατήρησαν ότι η χρωματίνη των ecDNAs είναι κατά 2 φορές πιο εύκολα προσβάσιμη σε μεταγραφικούς παράγοντες. Επίσης, έδειξαν ότι 62% των γονιδίων που έχουν ενσωματωθεί σε ecDNAs είναι πιο προσβάσιμα από την αντίστοιχη θέση τους στο γραμμικό DNA. (Yi, et al., 2022) Με τη χρήση της τεχνολογίας RNA-seq σε συνδυασμό με αναλύσεις πολυμορφισμών νουκλεοτιδίων, ανιχνεύθηκαν ecDNAs, και διαπιστώθηκε ότι μπορούν να κατευθύνουν τη μεταγραφή γονιδίων. (Wu, et al., 2023)

Πίνακας 2: Τα πιο συχνά ογκογονίδια, που ανευρίσκονται και ενισχύονται από ecDNAs. (Pecorino, et al., 2022)

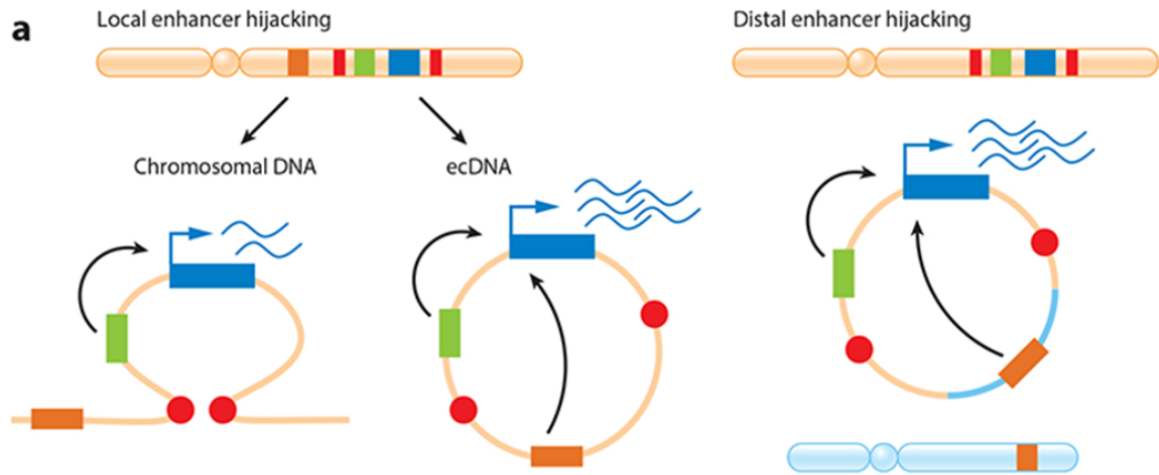
Όνομα γονιδίου	Συχνότητα εμφάνισης σε ecDNAs
CDK4	62.1
MDM2	59.7
AKT1	47.1
E2F3	40.7
NEDD9	39.5
EGFR	39.1
MYCL	38.1
PDGFRA	37.5
SOX2	36.4
TERT	32.9
MYC	26.6
ERBB2	25.5



Εικόνα 13: Μικρή συμύκνωση χρωματίνης στα νουκλεοσωμάτια των ecDNAs, σε αντίθεση με το γραμμικό DNA. Λόγω αυτής της οργάνωσης, η χρωματίνη είναι πιο προσιτή σε μεταγραφικούς παράγοντες, κάτι το οποίο παρατηρείται και από τις κορυφές κατά τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των ecDNAs. (Yi, et al., 2022)

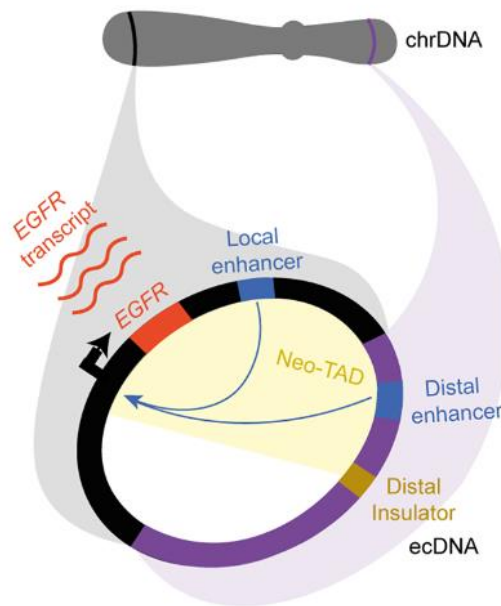
1.5.2. Κυκλοποίηση γραμμικού DNA σε ecDNA με γεινίαση τοπικών ή απομακρυσμένων ενισχυτών με ογκογονίδια

Το ecDNA έχει την ικανότητα, αφού κυκλοποιηθεί, να επαναπροσανατολίσει τη χρωματίνη και να προωθήσει την έκφραση ογκογονιδίων, μέσω επαφής με τοπικούς ή απομακρυσμένους ενισχυτές. (Yi, et al., 2022) Στην περίπτωση του τοπικού ενισχυτή στο χρωμόσωμα, μπορεί να κυκλοποιηθεί ο ενισχυτής με ένα ογκογονίδιο σε ecDNA από ένα γραμμικό χρωμόσωμα και να ευνοηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ του ενισχυτή και του ογκογονιδίου. Για παράδειγμα, σε δείγματα γλοιοβλαστώματος ανιχνεύθηκαν σε μόρια ecDNA, το ογκογονίδιο *EGFR* μαζί με δύο ανοδικούς ενισχυτές. (Wu, et al., 2022; Dong, et al., 2023; Li, et al., 2022) Αυτή η λειτουργία του ecDNA μπορεί επίσης να ανιχνευθεί και σε δείγματα νευροβλαστώματος που περιέχουν το ογκογονίδιο *MYCN*. (Wu, et al., 2022; Robert & Crasta, 2022)



Εικόνα 14: Έκφραση ογκογονιδίων μέσω τοπικών και απομακρυσμένων ενισχυτών έπειτα από κυκλοποίηση γραμμικού DNA σε μόρια ecDNAs. (Wu , et al., 2022)

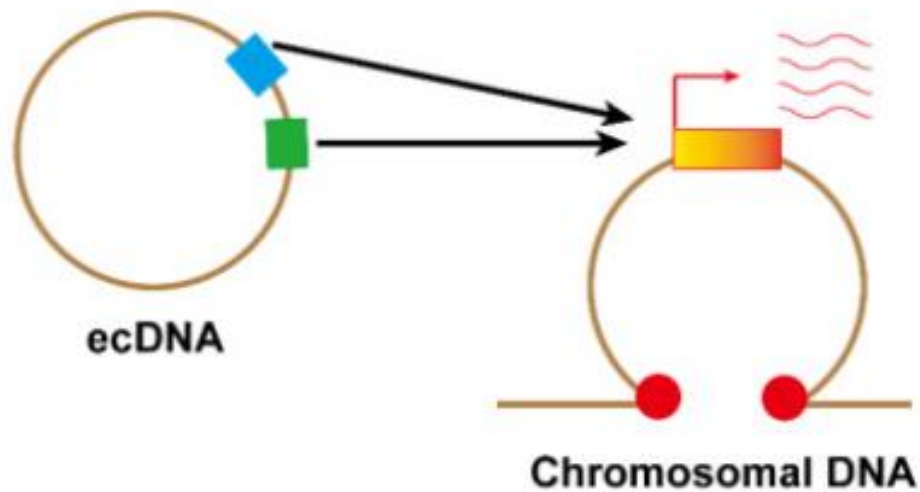
Έρευνα που έγινε σε διάφορους τύπους καρκίνου, έδειξε ότι ποσοστό 70% των ενισχυμένων ογκογονιδίων έγινε έπειτα από δημιουργία μορίων ecDNAs με ογκογονίδια και με απομακρυσμένους ενισχυτές σ' αυτά. Οι απομακρυσμένοι ενισχυτές και το ογκογονίδιο στο ίδιο ή άλλο χρωμόσωμα υφίστανται κυκλοποίηση και σχηματίζεται ecDNA. (Wu , et al., 2022; Dong, et al., 2023; Li, et al., 2022) Στο νευροβλάστωμα, η ενίσχυση ογκογονιδίων γίνεται συνήθως εξωχρωσωμικά. (Yi, et al., 2022) Σε ανάλυση κυτταρικών σειρών νευροβλαστώματος βρέθηκε ότι το ογκογονίδιο *MYCN* ενισχύθηκε ταυτόχρονα με έναν απομακρυσμένο ενισχυτή, τον ε4 και πως αυτός ο ενισχυτής, αλληλεπιδρά με το ογκογονίδιο και ενισχύει την έκφρασή του. (Dong, et al., 2023) Αυτή η λειτουργία ανιχνεύεται κυρίως σε περιπτώσεις νευροβλαστώματος και σχετίζεται με χειρότερη κλινικά πρόγνωση. (Wu , et al., 2022)



Εικόνα 15: Η κυκλοποίηση γραμμικού DNA σε ecDNA έχει ως αποτέλεσμα τον επαναπροσανατολισμό των στοιχείων της χρωματίνης και επιτρέπει την ενίσχυση ογκογονιδίων τοπικών αλλά και απομακρυσμένων ενισχυτών.

1.5.3. Αλληλεπίδραση του ecDNA με το χρωμοσωμικό DNA και ρύθμιση χρωμοσωμικών ογκογονιδίων.

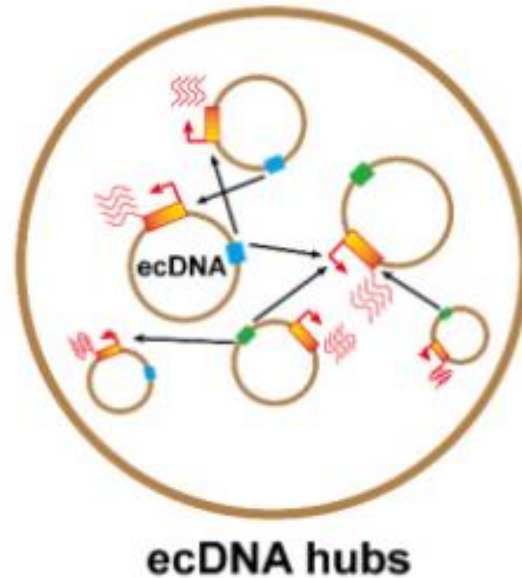
Το ecDNA μπορεί να αλληλεπιδράσει με το χρωμοσωμικό DNA και να σχηματίσει έναν κόμβο ικανό να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων. Το ecDNA μπορεί να δράσει ως ένα κινητό στοιχείο για την ενίσχυση της μεταγραφής του χρωμοσωμικού DNA και να υπάρχει αυξημένη μεταγραφική έκφραση. (Yi, et al., 2022; Dong, et al., 2023) Τα μόρια ecDNAs περιέχουν μεγάλο αριθμό ενισχυτών, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τα χρωμοσώματα. (Li, et al., 2022) Τα ecDNAs ως κινητοί ενισχυτές μπορούν να εμφανίσουν ετερογένεια σε όγκους. (Yi, et al., 2022) Αυτές οι θέσεις αλληλεπιδράσεων είναι συγκεκριμένες και περιλαμβάνουν ακετυλίωση της ιστόνης H3K27. (Hung, et al., 2022) Μελέτες σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστωμάτων ανέδειξαν αυτού του τύπου τα μόρια ecDNAs. (Dong, et al., 2023) Η εντόπιση αυτών των αλληλεπιδράσεων παρατηρήθηκε από τους Zhu, et al., μέσω προσδιορισμού αλληλουχίας με τεχνικές όπως ChIA- Drop και ChIA-PET. (Ludi, et al., 2022)



Εικόνα 16: Αλληλεπίδραση ecDNA και χρωμοσωμικού DNA. (Li, et al., 2022)

1.5.4. Συσσωματώματα ecDNAs για ρύθμιση ογκογονιδίων τους.

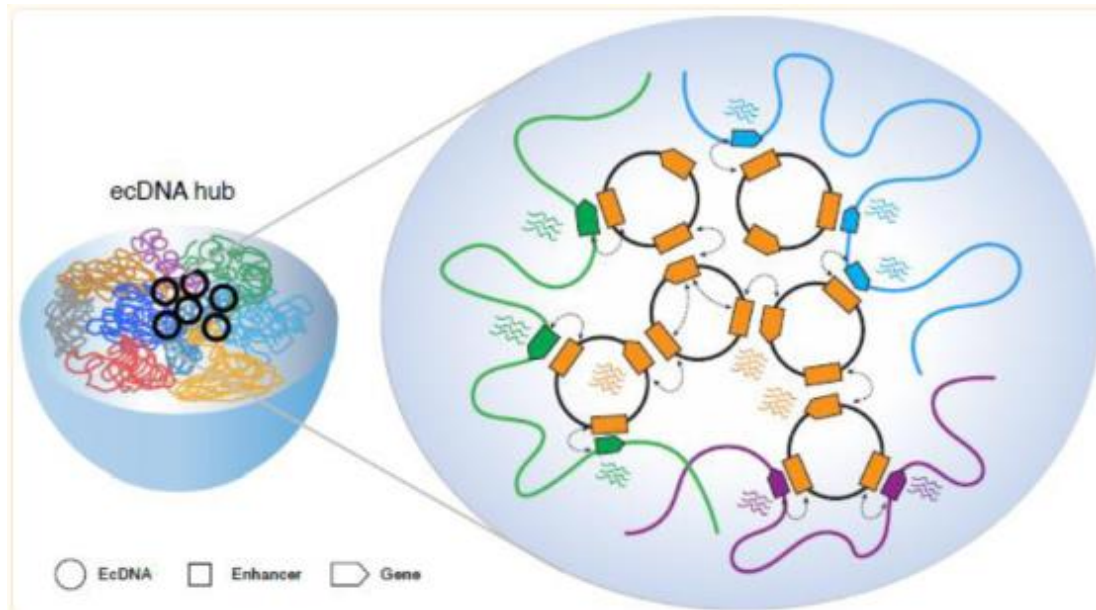
Μόρια ecDNAs στο πυρήνα του κυττάρου μπορούν να έρθουν σε επαφή μεταξύ τους και να ρυθμίσουν την έκφραση ογκογονιδίων που περιέχουν, σχηματίζοντας κόμβους ecDNAs. (Li, et al., 2022; Dong, et al., 2023) Κόμβοι ecDNAs δε σχηματίζονται σε όλα τα κύτταρα. (Yi, et al., 2022) Μια πρόσφατη μελέτη των Hung, et al., έδειξε ότι 10 με 100 μόρια ecDNAs εντός του πυρήνα μπορούν να δημιουργήσουν συσσωματώματα. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά χρωμοσώματα, στα οποία η ενίσχυση και η ρύθμισή τους γίνεται από αλληλουχίες που βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα, στα ecDNAs αυτό μπορεί να επιτευχθεί και από άλλα μόρια ecDNAs, όπου βρίσκονται στο συσσωμάτωμα. (Hung, et al., 2022; Robert & Crasta, 2022) Η δημιουργία αυτών των συσσωματωμάτων ευνοεί την μεταγραφική δραστηριότητα και την υπερέκφραση των ογκογονιδίων, όπως του ογκογονιδίου *MYC*. (Hung, et al., 2021; Yi, et al., 2022)



Εικόνα 17: Συσσωματώματα ecDNAs και μεταξύ τους αλληλεπίδραση. (Li, et al., 2022)

Κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, ο πυρήνας των κυττάρων είναι καλά οργανωμένος στο χώρο και υπάρχει συγκέντρωση μεταγραφικών περιοχών και RNA πολυμεράσης II (RNAPII). Τα συσσωματώματα ecDNAs καθώς και μεμονωμένα ecDNAs συνδέονται πιο επιλεκτικά με την RNAPII από το γραμμικό DNA, γεγονός που δηλώνει για ποιο λόγο τα ecDNAs είναι πλούσια σε συσσωματώματα. Όταν γίνεται αναστολή της RNAPII δεν παρατηρείται διατάραξη των συσσωματωμάτων. Τα καρκινικά κύτταρα που διαθέτουν συσσωματώματα ecDNAs, μεταγράφουν αυξημένα επίπεδα ενός ογκογονιδίου, σε σύγκριση με καρκινικά κύτταρα που διαθέτουν μεμονωμένα ecDNAs. Τα συσσωματώματα αυτά παίζουν ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση των ογκογονιδίων και επηρεάζουν την εξέλιξη ενός τύπου καρκίνου. (Yi, et al., 2022)

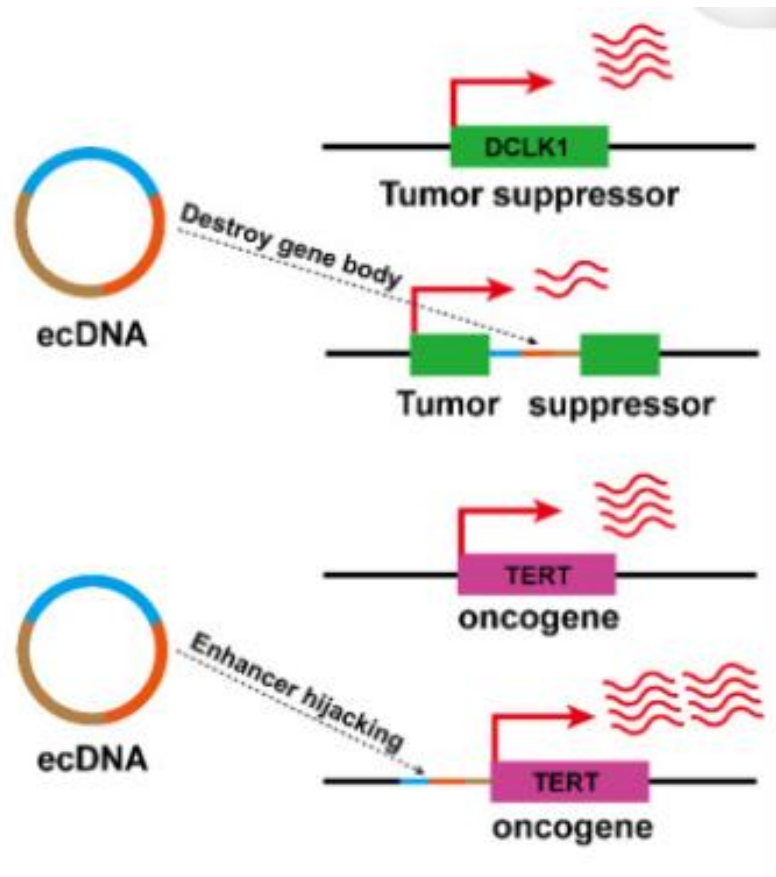
Σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου έχει παρατηρηθεί ενίσχυση του ογκογονιδίου *MYC*, από συσσωματώματα ecDNAs. Αυτά τα συσσωματώματα αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη BRD4 και προωθούν την υπερέκφραση του *MYC*. Με αναστολή του BRD4 από τον αναστολέα BET JQ1, υπάρχει μείωση της έκφρασης του *MYC* από τα συσσωματώματα των ecDNAs. (Ludi, et al., 2022; Wu, et al., 2023) Οι πρωτεΐνες BET είναι σημαντικές για την ομαδοποίηση των ecDNAs. (Robert & Crasta, 2022)



Εικόνα 18: Συσσωματώματα ecDNAs. Μόρια ecDNAs σχηματίζουν συσσωματώματα και δημιουργούν έναν μεταγραφικό κόμβο, με αποτέλεσμα την ενίσχυση των ογκογονιδίων. (Zhu, et al., 2022)

1.5.5. Χρήση του ecDNA για ανασυνδιασμό του χρωμοσωμικού DNA.

Άλλη μια σημαντική λειτουργία των ecDNAs είναι η χρήση τους για ανασυνδιασμό του γραμμικού μορίου DNA. Τα ecDNAs δημιουργούνται από εκτομή και κυκλοποίηση από το γραμμικό τμήμα DNA, καθώς επίσης και από εκτομή τμημάτων από άλλα μόρια ecDNAs και δημιουργία νέων. Όμως το ecDNA μπορεί να συντηχθεί ξανά με το γραμμικό μόριο DNA, δημιουργώντας έτσι αναδιατάξεις μέσα στο χρωμόσωμα. Τα θραύσματα ecDNAs που ενσωματώνονται, διαταράσσουν την ακεραιότητα του γονιδιώματος και ευνοούν την έκφραση του ογκογονιδίου στη θέση ενσωμάτωσης. (Li, et al., 2022) Έχει βρεθεί ότι με ενσωμάτωση ecDNA γίνεται αναδιαμόρφωση χρωμοσωμάτων, σε κύτταρα νευροβλαστώματος. Αυτό το φαινόμενο συσχετίστηκε με κλινικά κακή πρόγνωση. Σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστωμάτων βρέθηκαν τμήματα ογκογονιδίων *EGFRvIII*, όπου είχαν ενσωματωθεί από το ecDNA στο γονιδίωμα. (Dong, et al., 2023) Επίσης με επανένταξη θραυσμάτων ecDNA στο γονιδίωμα, έχει βρεθεί ότι γίνεται διατάραξη της ακεραιότητας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *DCLK1* προκαλώντας μείωση της έκφρασής του, καθώς επίσης και να ενισχυθεί η έκφραση του *TERT* στο νευροβλάστωμα (Εικόνα 19). (Li, et al., 2022) Σε αυτήν την επανένταξη στο γονιδίωμα μπορεί να κατευθυνθεί το ecDNA έπειτα από κυτταρικό stress, από φαρμακευτική αγωγή και από θραύση της δίκλωνης έλικας του DNA. Επιπλέον, τα μόρια ecDNAs μπορούν να σχηματίσουν συσσωματώματα και στη συνέχεια να συντηχθούν με το γονιδίωμα. (Wu, et al., 2022)

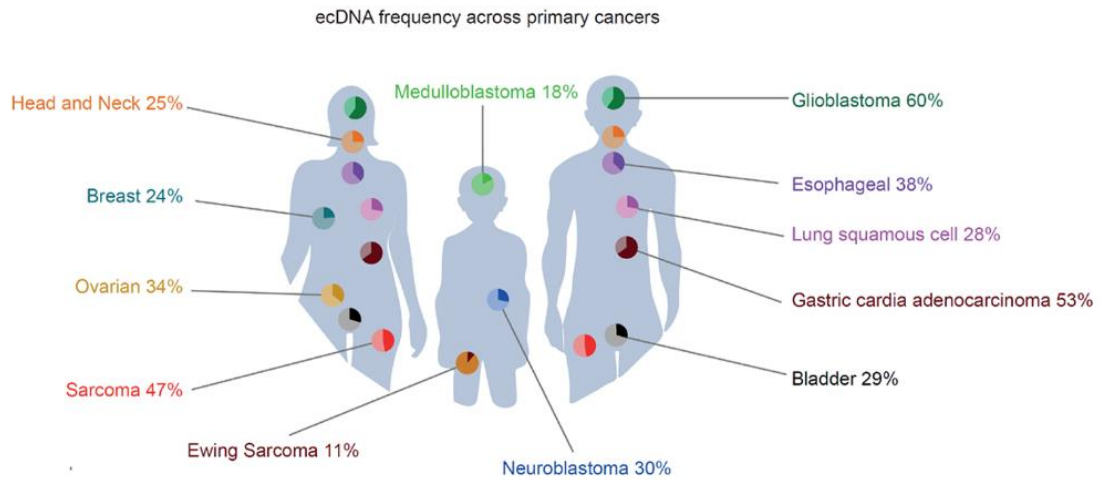


Εικόνα 19: Ενσωμάτωση ecDNA στο γονιδίωμα. Μπορεί να προκαλέσει μείωση έκφρασης γονιδίου (πάνω εικόνα) ή να ενισχύσει την έκφραση ενός ογκογονιδίου (κάτω εικόνα). (Li, et al., 2022)

2. EcDNAs και καρκίνος

Η πρώτη ανακάλυψη των ecDNAs σε καρκινικά κύτταρα έγινε σε όγκους νευροβλαστώματος, αργότερα όμως, ανακαλύφθηκε ότι τα μόρια ecDNAs έχουν βρεθεί σε αρκετούς τύπους καρκίνων και παίζουν ρόλο στην εξέλιξη του όγκου. (Li, et al., 2022; Yi, et al., 2022) Ο ρόλος τους στην εξέλιξη της ογκογένεσης έχει μελετηθεί και *in vitro* και *in vivo*. (Karami Fath, et al., 2021;

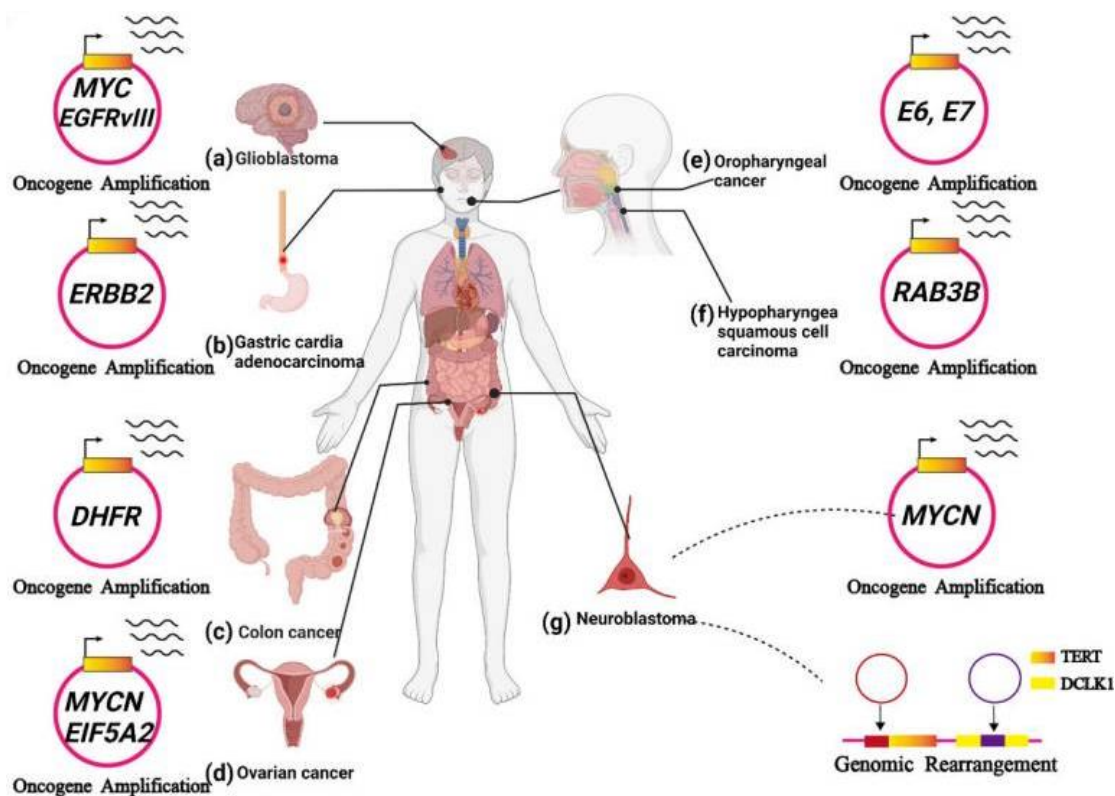
Gu, et al., 2020)



Εικόνα 20: Συχνότητα εμφάνισης ecDNAs σε διάφορους τύπους καρκίνου. (Yi, et al., 2022)

Η ύπαρξη των ecDNAs σχετίζεται με γονιδιωματική αστάθεια, κακή πρόγνωση και έκβαση της νόσου, καθώς και με αντίσταση στη θεραπεία. (Zhu, et al., 2022; Behrouzi, et al., 2024) Πρόσφατες μελέτες έχουν συχδέσει τα ecDNAs με μειωμένη 5ετή επιβίωση και με αυξημένη πιθανότητα μεταστάσεων. (Wang, et al., 2021) Υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης ecDNAs εμφανίζεται στο νευροβλάστωμα. Τουλάχιστον 70 γονίδια, όπως *EGFR*, *MYC*, *MYCN*, *DHFR*, *MDM2*, *CCND2* έχει πιστοποιηθεί ότι ενισχύονται από μόρια ecDNAs, αλλά γνωρίζουμε ελάχιστα για τη δράση τους. (Yi, et al., 2022; Jin, et al., 2012) Από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, βρέθηκε να είναι συχνά στο 50% των πρωτοπαθών όγκων. (Zhu, et al., 2021; Zhu, et al., 2022) Έχει ανευρεθεί σε αρκετούς τύπους καρκίνου, όπως: εγκέφαλο, στοματική κοιλότητα, τράχηλο, οισοφάγο, πνεύμονες, μαστούς, ήπαρ, στομάχο, πάγκρεας, οστά, νεφρό, παχύ έντερο, ουροδόχο κύστη, τράχηλο της μήτρας, μήτρα, ωθήκες, προστάτη, δέρμα, μερικά από τα οποία περιγράφονται παρακάτω. (eccDNA Atlas, n.d.; Wei, et al., 2020)

Ο ρόλος των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου



Εικόνα 21: Τα μόρια ecDNAs παίζουν ρόλο στην εξέλιξη του όγκου σε διάφορους τύπους καρκίνων. (Li, et al., 2022)

2.1. ecDNA και γλοιοβλάστωμα

Το γλοιοβλάστωμα (GBM) αποτελεί τον πιο κοινό και επιθετικό τύπο όγκου εγκεφάλου, με συχνές υποτροπές, παρά τις θεραπείες που χορηγούνται. (Zhou, et al., 2017; Nathanson, et al., 2014) Μόρια ecDNAs έχουν εντοπιστεί στο 10-40% των GBMs. Η ομάδα των deCarvalho *et al.* ανέδειξε την συσχέτιση των ecDNAs με την εξέλιξη του GBM. (deCarvalho, et al., 2018; Que, et al., 2023) Έχει παρατηρηθεί ενίσχυση σε ογκογονίδια όπως *EGFR*, *MYC*, *PDGFRA*, *MET*, *CDK6*, *ERBB2* και στο χρωμόσωμα 12p στα *CDK4* και *MDM2*. (Li, et al., 2022; deCarvalho, et al., 2018; Shiras & Mondal, 2021; Purshouse, et al., 2022) Στο γλοιοβλάστωμα παρατηρείται ενίσχυση του γονιδίου του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (*EGFR*), σε ποσοστό ως και 40%. Ενίσχυση του γονιδίου *EGFR* μέσω των ecDNAs αποδίδει ετερογένεια στον όγκο και ραδιοανθεκτικότητα, με ικανότητα επιβίωσης στη θεραπεία. (Zhou, et al., 2017; Vogt, et al., 2004) Ο *EGFR* μεταλλάσσεται συχνά και σχηματίζει μια ογκογόνο μορφή, την *EGFRvIII*. Αυτή η μετάλλαξη ωστόσο, είναι ευαίσθητη σε αναστολείς τυροσινικής κινάσης (TKIs). Τα ecDNAs καταφέρνουν να εξαλείψουν την μεταλλαγμένη μορφή του *EGFR*, να την ενσωματώσουν, και να προκαλέσουν ανθεκτικότητα στους αναστολείς TKIs. (Nathanson, et al., 2014) Το γονίδιο *MMP2* (matrix metalloproteinase 2-μητρική μεταλλοπρωτεϊνάση 2), υπερεκφράζεται σε GBM και προάγει την εισβολή του όγκου. Κύτταρα με χαμηλή έκφραση *MMP2* και μόρια ecDNAs

Ο ρόλος των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

που κωδικοποιούν *EGFR*, έχουν υψηλό μεταστατικό δυναμικό *in vitro* και *in vivo*. (Zhou, et al., 2017)

2.2. EcDNA και αδενοκαρκίνωμα στομάχου

Η εστιακή ενίσχυση ογκογονιδίων του αδενοκαρκινώματος στομάχου παίζει ρόλο στην εξέλιξη του και σχετίζεται με κακή πρόγνωση. (Li, et al., 2022) Η ερευνητική ομάδα των Zhao *et al.*, ανακάλυψε συσσωματώματα ecDNAs σε δείγματα ασθενών με αυτόν τον τύπο όγκου καθώς επίσης και ενισχυμένα ογκογονίδια, όπως *ERBB2*, *EGFR* και *CCNE1*. (Zhao, et al., 2021) Ασθενείς θετικοί στο ογκογονίδιο *ERBB2*, έχουν χειρότερη πρόγνωση, από τους αρνητικούς ασθενείς. Ενισχύσεις *ERBB2* που προέρχονται από ecDNAs, μπορούν να χρησιμεύουν ως ευνοϊκός προγνωστικός βιοδείκτης. (Li, et al., 2022)

2.3. EcDNA και καρκίνος παχέος εντέρου

Η μεθοτρεξάτη (Methotrexate-MTX) είναι αναστολέας της *DHFR* και παίζει αντικαρκινικό ρόλο σε διάφορους τύπους καρκίνου. Ωστόσο, ο καρκίνος του παχέος εντέρου εμφανίζει αντίσταση στην MTX, λόγω ενίσχυσης του ογκογονιδίου *DHFR*, από τα ecDNAs. (Singer, et al., 2000; Wang, et al., 2021) Σε ασθενείς που λάμβαναν θεραπεία με μεθοτρεξάτη παρατηρήθηκε αύξηση της ενίσχυσης του *DHFR*, ενώ όταν σταμάτησαν τη θεραπεία υπήρχε μείωση αυτής της ενίσχυσης. Σε πειραματικές μελέτες που έγιναν, όταν τα καρκινικά κύτταρα χάνουν τα ecDNAs τους, τότε χάνεται και η αντίσταση στη MTX. (Li, et al., 2022; Gu, et al., 2020) Σε μελέτες των Cai *et al.*, όταν έγινε σίγαση του γονιδίου *BRCA1* με ομόλογο ανασυνδυασμό, παρατηρήθηκε ότι η αντοχή στην MTX μειώθηκε στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Επομένως, ίσως αποτελεί έναν πιθανό στόχο για τη μείωση ενίσχυσης ογκογονιδίων από τα μόρια ecDNAs. (Cai, et al., 2019)

2.4. EcDNA και καρκίνος ωοθηκών

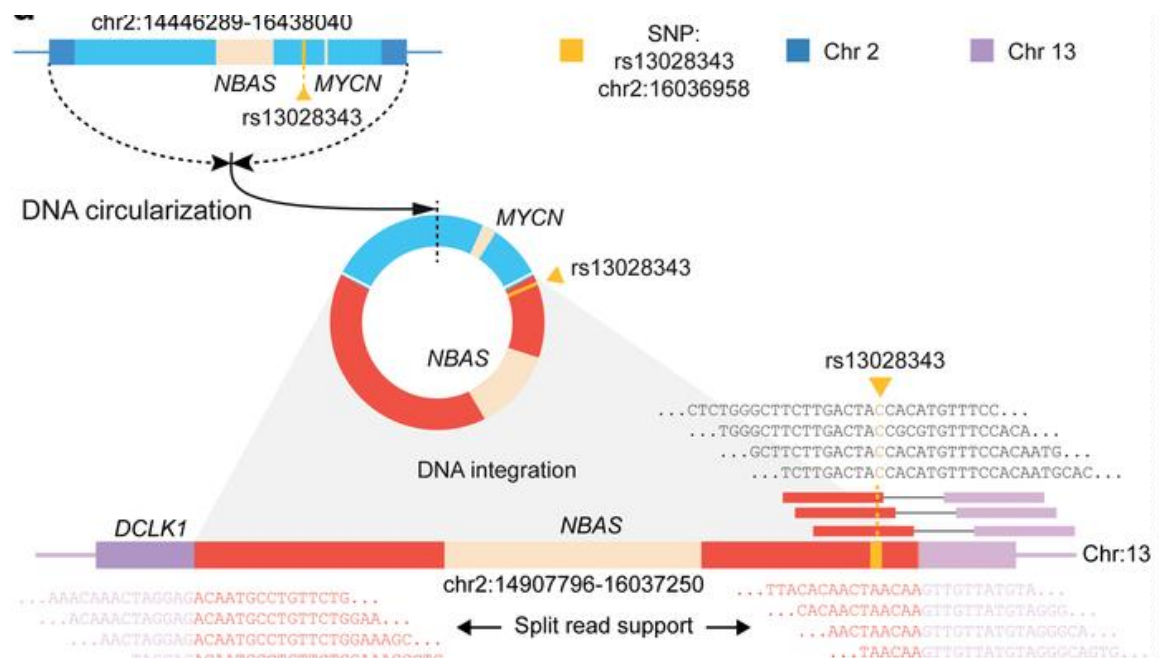
Τα ecDNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο των ωοθηκών, ωστόσο πρέπει να γίνουν περισσότερες μελέτες. Οι μη κωδικές περιοχές των ecDNAs, μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένη έκφραση ογκογονιδίων στον καρκίνο των ωοθηκών. Αυτό, ίσως, θα μπορούσε να αποτελέσει ένα νέο θεραπευτικό στόχο. (Li, et al., 2022) Ένα ecDNA που ανιχνεύτηκε σε καρκινικά κύτταρα, μήκους 682 kb, περιείχε τα ογκογονίδια *MYCN* και *EIF5A2* καθώς και μη κωδικό DNA. Ενισχυμένα ογκογονίδια έχουν συσχετιστεί με αυξημένη ανάπτυξη και επιβίωση του όγκου. (Jin, et al., 2012) Σε μια κλινική μελέτη που οργάνωσαν οι Raymond *et al.*, αξιολόγησαν τη δράση της χαμηλής συγκέντρωσης υδροξυουρίας για τη μείωση του αριθμού των ecDNAs, που περιέχουν ενισχυμένα ογκογονίδια. Κατάφεραν να συσχετίσουν αυτήν την υπόθεση, όμως δεν προκλήθηκε στη συνέχεια συρρίκνωση του όγκου. (Raymond, et al., 2001)

2.5. EcDNA και HPV σχετιζόμενος καρκίνος στοματοφάρυγγα

Ερευνητές είχαν θεωρήσει ότι ο σχηματισμός ενός υβριδικού ecDNA με μέρος του ιού HPV (Human Papilloma Virus- Ιός ανθρωπίνων θηλωμάτων) και μέρος των ανθρωπινών χρωμοσωμάτων θα μπορούσε να προκαλέσει ενίσχυση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 του ιού. (Li, et al., 2022; Pang, et al., 2021) Οι Pang *et al.*, ανακάλυψαν ότι υπάρχουν ecDNAs σε όλους τους τύπους καρκίνου στοματοφάρυγγα που σχετίζονται με τον HPV. (Pang, et al., 2021) Το υβριδικό ecDNA αποτελεί αποκλειστικό χαρακτηριστικό αυτού του τύπου καρκίνου, και προκαλεί εξέλιξη του όγκου ακόμα και υπό την επίδραση θεραπειών. (Li, et al., 2022)

2.6. EcDNA και νευροβλάστωμα

Στο νευροβλάστωμα έγινε η πρώτη ανακάλυψη των μορίων ecDNAs, τα οποία περιλάμβαναν και προκαλούσαν ενίσχυση στο ογκογονίδιο *MYCN*. Ασθενείς με μόρια ecDNAs που ενίσχυαν το ογκογονίδιο *MYCN*, είχαν χειρότερη πρόγνωση από αυτούς που δεν εμφάνιζαν ecDNAs. (Koche, et al., 2020; Wang, et al., 2021) Τα ecDNAs μπορούν να προκαλέσουν ογκογόνο αναδιάταξη στο γονιδίωμα, με αποτέλεσμα την ανώμαλη έκφραση γονιδίων και μεταλλαξιγένεση. (Li, et al., 2022; Wu, et al., 2023) Με ενσωμάτωση θραύσματος ecDNA στο γονίδιο *DCLK1* στο χρωμόσωμα 13, προκλήθηκε καταστολή αυτού του γονιδίου. Η χαμηλή έκφραση του *DCLK1* συσχετίστηκε με κακή πρόγνωση σε ασθενείς με νευροβλάστωμα. (Koche, et al., 2020; Wang, et al., 2021)



Εικόνα 22: Το ογκογονίδιο *MYCN* ενχρωματώνεται σε ecDNA και στη συνέχεια τμήμα του ecDNA ενσωματώνεται στο γονίδιο *DCLK1* του χρωμοσώματος 13, προκαλώντας την καταστολή του. (Koche, et al., 2020)

2.7. EcDNA και ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του υποφάρυγγα

Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του υποφάρυγγα έχει κακή πρόγνωση με πενταετές ποσοστό επιβίωσης μικρότερο από 50% και περίπου το 80% των ασθενών διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο. Έχει βρεθεί ότι μόρια ecDNAs προκαλούν αντοχή σε κάποιες μορφές θεραπείας. Έχει βρεθεί το γονίδιο *PTR1* να συμπεριλαμβάνεται μέσα σε ecDNA και να προκαλεί αντίσταση στην MTX. Επιπλέον έχει βρεθεί να προκαλείται αντίσταση στη σισπλατίνη μέσω μορίων ecDNAs, που περιέχουν το γονίδιο *RAB3B*, της οικογένειας RAS. (Lin, et al., 2022)

2.8. EcDNA και μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα

Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC) είναι ένας επιθετικός νευροενδοκρινικός καρκίνος. Ο SCLC αποτελεί έναν από τους πιο θανατηφόρους καρκίνους στον άνθρωπο, με συχνότητα εμφάνισης έως και 35.000 ασθενών το έτος στις ΗΠΑ. (Pai Coudhuri, et al., 2024) Είναι ένας από τους πρώτους καρκίνους που ανακαλύφθηκε το ecDNA και ο μηχανισμός του θρυμματισμού χρωμοσώματος. Τα γονίδια που παρατηρήθηκαν να έχουν ενισχυθεί από τα ecDNAs είναι τα *MYCN*, *MYC*, *MYCL* και εστιακές ενισχύσεις παρατηρήθηκαν στα *FGFR1* και *KRAS*. (Pongor, 2023; Behrouzi, et al., 2024) Στην καρκινική κυτταρική σειρά NCI-H460, τα ογκογονίδια *MYC* και *PVT1* βρίσκονται σε πολλά αντίγραφα σε ecDNAs. (Zhu, et al., 2022)

2.9. EcDNA και αδενοκαρκίνωμα οισοφάγου σχετιζόμενο με οισοφάγο Barrett

Το αδενοκαρκίνωμα οισοφάγου σχετιζόμενο με οισοφάγο Barrett, πρόκειται για μια θανατηφόρο μορφή καρκίνου που επηρεάζει το 1,6% του πληθυσμού στην Αμερική. (Luebeck, et al., 2023) Έχει παρατηρηθεί μια αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης ecDNAs στην εξέλιξη του αδενοκαρκινώματος οισοφάγου που σχετίζεται κατά 43% με οισοφάγο Barrett, το οποίο δείχνει ότι συμβαίνει σχηματισμός ecDNA κατά την εξέλιξη της νόσου. (Wu, et al., 2023; Luebeck, et al., 2023) Σε πιο προχωρημένο στάδιο της νόσου παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός ecDNA και δομική πολυπλοκότητα (Luebeck, et al., 2023)

2.10. EcDNAs και καρκίνος προστάτη

Τα ecDNAs έχουν παρατηρηθεί συχνά σε καρκινικά κύτταρα προστάτη από κυτταρική σειρά PC-3. (Zhu, et al., 2021; Zivanovic, et al., 2023) Σε μελέτες των Zivanovic A., et al., παρατήρησαν ότι 15% των περιπτώσεων μεταστατικού καρκίνου του προστάτη που εξέταζαν, είχαν ενίσχυση των γονιδίων του υποδοχέα ανδρογόνου (AR) μέσω ecDNAs. (Zivanovic, et al., 2023)

2.11. EcDNA και καρκίνος μαστού

Η ενίσχυση ογκογονιδίων στον καρκίνο του μαστού είναι καίριας σημασίας για την ογκογένεση. (Yuan, et al., 2024) Στον HER2+ καρκίνο μαστού έχουν συχνά ανιχνευτεί οι αναδιατάξεις BFB. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ενίσχυση

Ο ρόλος των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

των ογκογονιδίων *MYC* και *CCND1*. (Bafna & Mischel, 2022; Yuan, et al., 2024)

2.12. EcDNA και HPV σχετιζόμενος καρκίνος τραχήλου μήτρας

Ο ιός HPV (Human Papilloma Virus) με την είσοδο του σε κύτταρα του τραχήλου της μήτρας προκαλεί χρωμοσωμική αστάθεια, με ενσωμάτωση του γενετικού του υλικού στα κύτταρα του ξενιστή. Η ανάλυση δειγμάτων με θετικό HPV16/18 έδειξε αναδιατάξεις σχετιζόμενες και με τον ιό αλλά και ανθρώπινες. Οι ερευνητές κατάφεραν να ταυτοποιήσουν παρουσία ecDNAs στο 50% του συνόλου των δειγμάτων. Ο σχηματισμός των ecDNAs θα μπορούσε να θεωρηθεί επιπλέον λόγος για γονιδιακή αστάθεια. (Bafna & Mischel, 2022)

Πίνακας 3: Γονίδια που ανευρίσκονται στα ecDNAs σε διάφορους τύπους καρκίνου. (Wang, et al., 2021)

Καρκίνοι	Γονίδια στο ecDNA
Γλοιοβλάστωμα	MYC, EGFR, PDGFRa, ERBB2, CDK4, MDM2, MET, CDK6, MMP2
Καρκίνος παχέος εντέρου	DHFR, c-MYC
Νευροβλάστωμα	MYCN, DCLK1
Καρκίνος τραχήλου μήτρας	DHFR
Καρκίνος ωοθηκών	MYCN, EIF5AR, CA125
Καρκίνος Μαστού	DHFR, HER2, MYC, CCND1
Λευχαιμία	c-MYC
Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα στόματος	MDR1
Αδενοκαρκίνωμα στομάχου	ERBB2, EGFR, CCNE1
Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα υποφάρυγγα	RAB3B, PTR1
Καρκίνος Πνεύμονα	MYCN, MYC, MUCL, FGFR1, KRAS, PVT1

3. Ογκογόνες λειτουργίες των ecDNAs

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τον ρόλο των ecDNAs στον καρκίνο, σχετικά με την κυτταρική ανάπτυξη, την μετάσταση, την αυτοφαγία, την ετερογένεια του όγκου, την επιδιόρθωση βλαβών, την ανταπόκριση στις θεραπείες και την κλινική έκβαση της νόσου. (Wang, et al., 2021; Kim, et al., 2020; Ermakov, et al., 2013)

Το ecDNA μπορεί να θεωρηθεί ως εστία ενίσχυσης ογκογονιδίων. Η γονιδιακή ενίσχυση είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό κακοήθειας. Με την ενίσχυση αυξάνεται ο αριθμός αντιγράφων των ογκογονιδίων και η ετερογένεια του όγκου, οδηγώντας σε χρωμοσωμική ενίσχυση. (Hong, et al., 2021) Η εμφάνιση των ecDNAs σε καρκινικά κύτταρα, έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα αντιγραφής του DNA και καταστολή της διήθησης των

ανοσοκυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση επιθετικού φαινότυπου, με πιθανή εμφάνιση μεταστατικών όγκων. (Wang, et al., 2021; Kim, et al., 2020) Ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο έχουν αυξημένα επίπεδα ecDNAs, σε σχέση με ασθενείς χωρίς μεταστάσεις. (Xu, et al., 2018; Wang, et al., 2021) Η άνιση κατανομή των ecDNAs κατά την κυτταρική διαίρεση και η ενίσχυση ογκογονιδίων, δίνουν την δυνατότητα στα καρκινικά κύτταρα να προσαρμόζονται εύκολα στο περιβάλλον του όγκου. (deCarvalho, et al., 2018; Wang, et al., 2021) Τα ecDNAs χρησιμοποιούνται από τα καρκινικά κύτταρα ως αγγελιοφόρα μόρια και μεταδίδουν στο μικροπεριβάλλον γύρω από τον όγκο, ογκογόνες πληροφορίες. (Sadoska, et al., 2015) Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου επιβεβαιώθηκε ότι η εμφάνιση ecDNAs σχετίζεται με χειρότερη επιβίωση των ασθενών. (Spindler, et al., 2017)

Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι τα ecDNAs έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν τους υποδοχείς TLR, συγκεκριμένα τον TLR9, οδηγώντας σε αναστολή της απόπτωσης. Μελέτες σε ασθενείς με καρκίνο εντέρου έδειξαν προαγωγή της αυτοφαγίας, με επιβίωση καρκινικών κυττάρων και αντίσταση στη χημειοθεραπεία. (Anunobi R., et al., 2018)

Το ecDNA δημιουργεί ετερογένεια στους όγκους, ενισχύοντας την χρωμοσωμική αστάθεια. Με τον τυχαίο διαχωρισμό των ecDNAs στα θυγατρικά κύτταρα κατά την κυτταρική διαίρεση, τα θυγατρικά κύτταρα διαφέρουν μεταξύ τους. Πολλοί τύποι καρκίνων, όπως ο καρκίνος μαστού, ο παγκρέατος και το μυελοβλάστωμα, έχουν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα ecDNAs, στην πρωτογενή και μεταστατική εστία. (Zhao, et al., 2023; Turner, et al., 2017; Kobayashi & Tan, 2023)

Με το πέρασ της ηλικίας του ανθρώπου, μειώνεται η λειτουργία του μηχανισμού επιδιόρθωσης βλαβών και η πιθανότητα ογκογένεσης είναι αυξημένη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση βλαβών και αυξημένης πιθανότητας θραύσης κλώνων, με σημαντική αύξηση των ecDNAs. (Zhao, et al., 2023)

4. Ο ρόλος των ecDNAs στη θεραπεία του καρκίνου

Τα ecDNAs μπορούν να προκαλέσουν ενισχύσεις ογκογονιδίων και να προκαλέσουν χειρότερη έκβαση της νόσου. Η ενίσχυση των ecDNAs συμβαίνει συχνά σε διάφορους τύπους καρκίνων, αλλά όχι τόσο συχνά στους αιματολογικούς καρκίνους. Στους αιματολογικούς καρκίνους έχουν αναφερθεί περιορισμένα δεδομένα όσα αναφορά την οξεία μυελογενή λευχαιμία σχετιζόμενα με τα ογκογονία *MYC* και *MLL*. (Zhang, et al., 2024) Η αυξανόμενη εμφάνιση των ecDNAs σε αρκετούς τύπους καρκίνου αναδεικνύει τη δυνατότητά τους για ανάπτυξη νέων στρατηγικών διάγνωσης και θεραπείας. Η στοχευμένη αποσίωπηση των ecDNAs, ίσως θα ήταν ένας

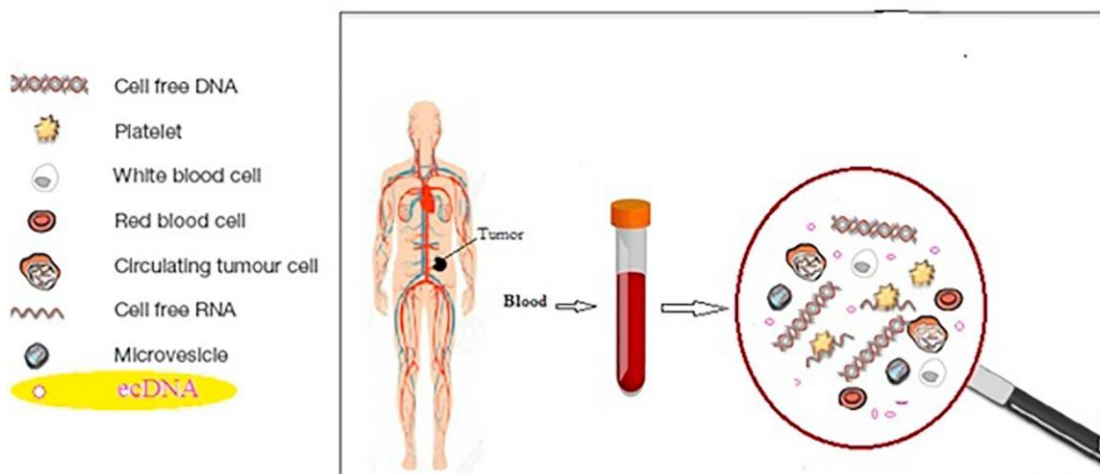
Ο ρόλος των εξωχρωσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

αποτελεσματικός θεραπευτικός στόχος. Όμως ακόμα υπάρχουν ελάχιστες θεραπείες που στοχεύουν τα ecDNAs. (Li, et al., 2022; Wu, et al., 2023; Bafna & Mischel, 2022)

4.1. EcDNAs ως διαγνωστικοί βιοδείκτες

Τα ecDNAs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μη επεμβατικός βιοδείκτης για πρώιμη διάγνωση, ανίχνευση και πρόγνωση της νόσου. (Wu, et al., 2023) Αν και η βιοψία ενός καρκινικού όγκου και η περαιτέρω σταδιοποίηση παίζει κύριο ρόλο σε πολλές διαγνώσεις, πρόκειται για μια επεμβατική μέθοδο στον ασθενή, κάποιες φορές δύσκολο να χρησιμοποιηθεί ή και να αναπαραχθεί σαν αποτέλεσμα. Η υγρή βιοψία είναι πιο εύκολη στη χρήση και ανευρίσκονται κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (circulating tumor cells-CTCs) και εξωκυτταρικά κυστίδια (extracellular vesicles-EVs). Μελέτες έχουν δείξει ότι κυκλικό DNA μπορεί να περάσει πιο εύκολα την μεμβράνη ενός κυττάρου, απ' ότι ένα γραμμικό μόριο DNA, και πως το εξωχρωσωμικό DNA μπορεί να απελευθερωθεί στην κυκλοφορία από *in situ* όγκους. (Dong, et al., 2023; Xing, et al., 2021) Το ecDNA θα μπορούσε να ανιχνευθεί με υγρή βιοψία, μέσω της χρήσης Circa-seq. (Wu, et al., 2023; Wei, et al., 2020; Khatami, et al., 2018) Παραδείγματα καρκίνων όπου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί το ecDNA ως προγνωστικός βιοδείκτης αποτελούν ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας, ο καρκίνος ωοθηκών και ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα. (Wang, et al., 2021)

Μικρές ποσότητες ecDNAs έχουν ανιχνευθεί στο πλάσμα και στον ορό ασθενών με καρκίνο καθώς επίσης και σε ποντίκια. Σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα έχει βρεθεί ότι εβδομάδες μετά το χειρουργείο για αφαίρεση όγκου, εμφανίζουν μείωση στα επίπεδα ecDNAs στο πλάσμα. (Noer, et al., 2022) Συγκεκριμένα στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα έχουν βρεθεί μόρια ecDNAs, που θα μπορούσαν να είναι πολλά υποσχόμενοι δείκτες για έγκαιρη διάγνωση. (Dong, et al., 2023)



Εικόνα 23: Το ecDNA θα μπορούσε να ανιχνευθεί σε υγρή βιοψία. (Khatami, et al., 2018)

4.2. EcDNAs ως προγνωστικοί βιοδείκτες

Το ecDNA μπορεί να αξιοποιηθεί ως πολύτιμο εργαλείο για την παρακολούθηση του όγκου και για την πρόγνωση εξέλιξης του όγκου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως τα ecDNAs μπορούν να ενισχύσουν την έκφραση ογκογονιδίων, (Dong, et al., 2023) ενώ σχετίζονται με αυξημένο μεταστατικό δυναμικό και εξάπλωση του όγκου σε λεμφαδένες. (Zhu, et al., 2022)

Η παρουσία μορίων ecDNAs σε ορισμένους καρκίνους έχει συσχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση και επιβίωση. (Ludi , et al., 2022; Noer, et al., 2022) Σε μελέτη 3212 καρκινοπαθών, με 29 διαφορετικούς τύπους καρκίνου, βρέθηκε ότι οι ασθενείς με ενισχύσεις από ecDNAs είχαν χειρότερη 5ετή επιβίωση, από αυτούς στους οποίους δεν ανιχνεύτηκαν τα κυκλικά μόρια DNA. (Zhu, et al., 2022) Ασθενείς με γλοιοβλάστωμα έχουν χειρότερη πρόγνωση, αν ανιχνευθεί ecDNA. (Dong, et al., 2023) Στο αδενοκαρκίνωμα του στομάχου, η ενίσχυση των ογκογονιδίων *EGFR* και *ERBB2* από μόρια ecDNAs, σχετίζεται με χειρότερη και καλύτερη πρόγνωση αντίστοιχα, και έτσι μπορούν τα ecDNAs να δράσουν ως προγνωστικοί δείκτες. Στο υψηλού βαθμού ορώδες καρκίνωμα ωοθηκών (HGSOC), η εύρεση μορίων ecDNAs συσχετίστηκε με χειρότερη πρόγνωση. (Zhao, et al., 2021) Σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, με ενίσχυση ογκογονιδίων από ecDNAs, παρατηρήθηκε μικρότερη επιβίωση σε σχέση με ασθενείς χωρίς αυτήν την ενίσχυση. (Wu, et al., 2023)

Επιπλέον, η ύπαρξη ecDNAs συσχετίστηκε με μειωμένη ανοσολογική απόκριση του οργανισμού. Τα ecDNAs έχουν την ικανότητα να διαφεύγουν του ανοσοποιητικού συστήματος και να σχετίζονται με μειωμένη επιβίωση του ασθενούς. (Ludi , et al., 2022)

4.3. Αντίσταση σε θεραπείες

Ο αυξημένος αριθμός αντιγράφων από ενίσχυση ογκογονιδίων αποτελεί σημαντικό παράγοντα που οδηγεί σε αντίσταση έναντι θεραπευτικών παραγόντων. (Dong, et al., 2023) Οι Nathanson DA, *et al.*, έδειξαν ότι ογκογονίδια που περιέχονται μέσα σε ecDNAs, προσδίδουν ανθεκτικότητα σε στοχευμένες θεραπείες. (Qui, et al., 2020) Επιπλέον, έχει αναφερθεί η δημιουργία επιπλέον μορίων ecDNAs, έπειτα από θεραπευτική αγωγή ή υποτροπή της νόσου. (Hung, et al., 2023) Αναλύσεις με αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος έδειξαν ότι αντοχή σε θεραπείες μπορεί να προκύψει μέσω δημιουργίας μορίων ecDNAs με θρυμματισμό DNA. Σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, με μετάλλαξη V600E στο *BRAF*, βρέθηκε ότι ανέπτυξαν αντοχή στην βεμουραφενίμπη, ύστερα από θρυμματισμό του DNA και δημιουργία μορίων ecDNA. (Shoshani, et al., 2021; Al-Rawi & Bakhout, 2022)

Ενίσχυση του ογκογονιδίου *DHFR* από ecDNAs, σχετίζεται με αντίσταση στη μεθοτρεξάτη σε *in vitro* μελέτες και σε κυτταρικές σειρές S-180 ποντικού. Αντίσταση στη σισπλατίνη θα μπορούσε να προκληθεί από ενίσχυση του

Ο ρόλος των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

ογκογονιδίου *RAB3B* με ecDNA, σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα υποφάρυγγα. (Dong, et al., 2023) Αντίσταση στο φάρμακο Erlotinib παρατηρείται σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα, που αναπτύσσουν αντίσταση του υποδοχέα EGFR που στοχεύει το φάρμακο αυτό. (Wu, et al., 2023; Wang, et al., 2021)

Η συνεχής θεραπεία με MTX, αναστολέα του ενζύμου DHFR, έχει κίνδυνο να εμφανιστεί κλωνική επιλογή κυττάρων με εξωχρωμοσωμικά μόρια με ενίσχυση του DHFR. Αυτό φέρει σαν αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να αποκτούν ανοχή στην MTX. (Bafna & Mischel, 2022; Liao, et al., 2020)

4.4. Θεραπευτικοί στόχοι

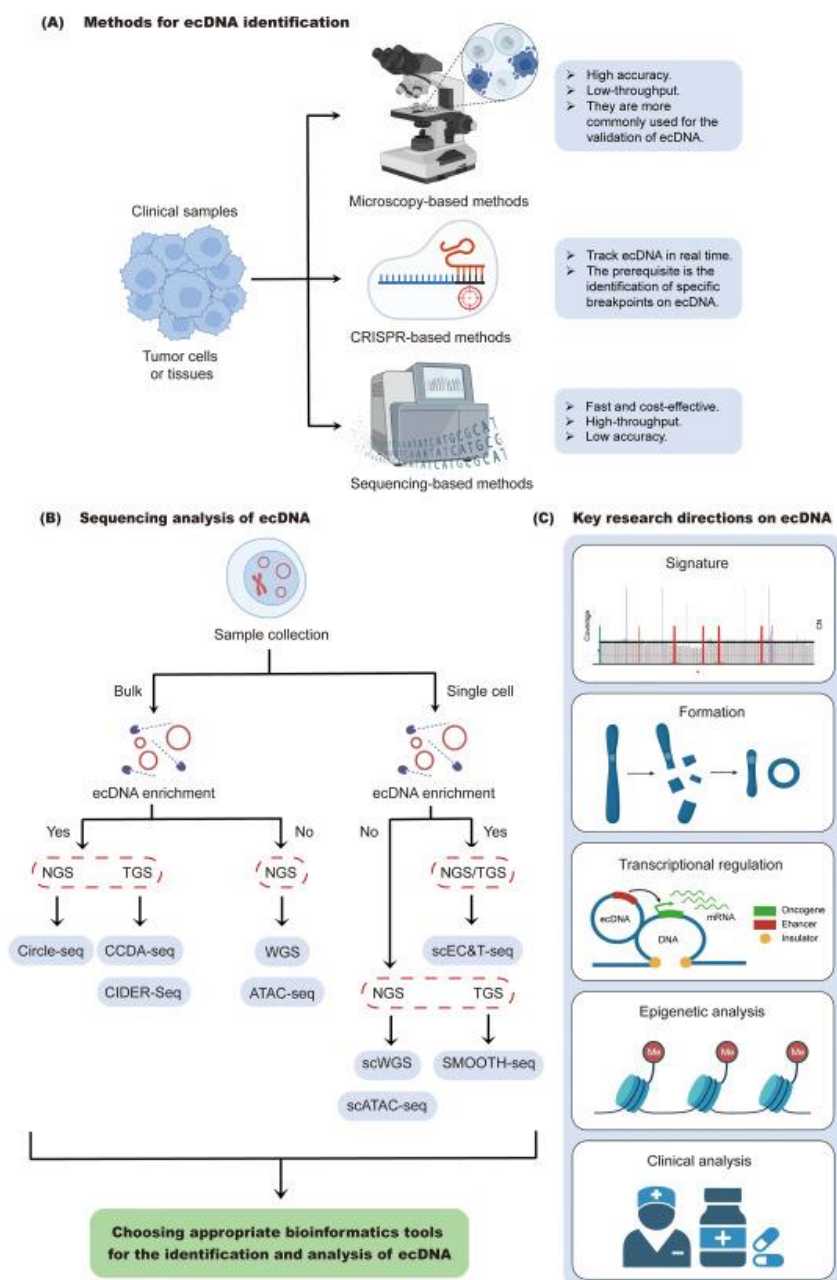
Η στόχευση του ecDNA, λόγω της ενίσχυσης ογκογονιδίων, της κακής πρόγνωσης και την αντίστασης σε θεραπείες, θα μπορούσε να βοηθήσει στην εύρεση νέων θεραπειών. (Dong, et al., 2023) Οι θεραπείες κατά των ecDNAs στοχεύουν στον αποκλεισμό του ecDNA και όχι στο ογκογόνο προϊόν του. (Yi, et al., 2022) Μελέτες έχουν δείξει ότι μπορεί να μειωθεί η ποσότητα μορίων ecDNA με ειδική φαρμακευτική αγωγή και ακτινοβολία. (Gu, et al., 2020) Σε μια μελέτη που έγινε σε ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, τους δόθηκε θεραπεία από του στόματος με υδροξουρία, ενός αναστολέα της αντιγραφής, με αποτέλεσμα τη μείωση της ποσότητας ecDNAs. Αυτό, ίσως αποτελέσει στόχο για την καθυστέρηση εξέλιξης του καρκίνου. Επιπλέον, σε κάποιες μορφές καρκίνου, για παράδειγμα παχέος εντέρου, που φέρουν μόρια ecDNAs με γονίδια *MYC* και *MDR1*, έχει παρατηρηθεί μείωσή τους, με χρήση ιονίζουσας ακτινοβολίας, ωστόσο η στόχευση ενισχυμένων ογκογονιδίων με ecDNAs, όπως τα *MYC* καθώς και των *TERT* και *MCL1* είναι αρκετά δύσκολη. (Yi, et al., 2022; Noer, et al., 2022; Zhu, et al., 2022)

Οι αναστολείς PARP μπορούν να στοχεύσουν την επανένταξη των ecDNAs στο γονιδίωμα. Αυτό όμως μπορεί να επιφέρει αστάθεια στο γονιδίωμα ή να προκαλέσει νέες γενετικές μεταλλάξεις. Αυτοί οι αναστολείς θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματική θεραπεία, μαζί με άλλη κυτταροτοξική θεραπεία, όμως θα πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπόψιν οι πιθανές παρενέργειες. Ένας ακόμα θεραπευτικός στόχος θα μπορούσε να αποτελέσει η στόχευση των συσσωματωμάτων των ecDNAs με BET αναστολείς, οι οποίοι θα διαχώριζαν τα μόρια του συσσωματώματος και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για βελτίωση του θεραπευτικού σχήματος. (Dong, et al., 2023; Bafna & Mischel, 2022)

Η ακτινοθεραπεία μπορεί να προκαλέσει απώλεια των ecDNAs, και να εξαλείψει γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε θεραπείες. (Zhu, et al., 2022) Οι Yu *et al.*, βρήκαν ότι η γεμισαμπίνη είναι αποτελεσματική για απώλεια των ecDNAs από κυτταρική σειρά ωοθηκών UASS-1598. (Bafna & Mischel, 2022)

5. Μέθοδοι ανίχνευσης μορίων ecDNAs

Η ανίχνευση των μορίων ecDNAs αποτελεί πρόκληση, λόγω του μικρού αριθμού τους και της απομόνωσης τους από τα καρκινικά κύτταρα. Υπάρχουν τρεις μέθοδοι ανίχνευσης τους: η προσέγγιση με αλληλούχηση, με μέσα οπτικοποίησης και με μεθόδους CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). (Zhao, et al., 2023) Η αλληλούχηση στηρίζεται στη τεχνολογία της αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS) και στη χρήση βιβλιοθηκών, ενώ οι τεχνικές οπτικοποίησης περιλαμβάνουν μικροσκοπικές απεικονίσεις. (Tsiakanikas, et al., 2024) Κάθε τεχνική διαθέτει μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα, και η χρήση της εξαρτάται από τον ερευνητικό στόχο. (Zhao, et al., 2023)



Εικόνα 24: Μέθοδοι ανίχνευσης ecDNA A) Μέθοδοι ταυτοποίησης, B) Μέθοδοι αλληλούχησης, C) Κατευθύνσεις για το ecDNA. (Zhao, et al., 2023)

5.1. Ανίχνευση με τεχνικές αλληλούχησης

Με την πρόοδο της τεχνολογίας, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές αλληλούχησης για την ανίχνευση γονιδιωμάτων, καθώς και τεχνικές που χρησιμοποιούν τα δεδομένα των τεχνικών αλληλούχησης για ανίχνευση μορίων. Οι τεχνικές αλληλούχησης αυτές χαρακτηρίζονται από υψηλή ακρίβεια και απόδοση. (Hung, et al., 2022; Wu, et al., 2023)

5.1.1. Next - Generation Sequencing (NGS)

Με την εφαρμογή WGS λαμβάνονται γονιδιωματικές πληροφορίες με υψηλή απόδοση. Μπορεί σε πραγματικό χρόνο να βρεθούν ecDNAs σε δείγματα κυττάρων και ιστών. Ακολουθούνται 4 βήματα για την ανεύρεση των μορίων αυτών. Στην αρχή πραγματοποιείται η τεχνική και συλλέγονται στοιχεία για την αλληλουχία. Τα δεδομένα αυτά στοιχίζονται και συγκρίνονται με ένα γονιδίωμα αναφοράς, χρησιμοποιώντας λογισμικά όπως BWA και Bowtie2. Στη συνέχεια τα επεξεργασμένα αρχεία, μπορούν να διαβαστούν με εργαλεία ανάλυσης, όπως το Amplicon Architect και το Circle-Map, τα οποία περιγράφονται παρακάτω. (Zhao, et al., 2023)

Το ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput sequencing) είναι μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανάγνωση των ecDNAs σε κύτταρα και ιστούς. Μπορεί να αναγνωρίσει μόρια που έχουν υποστεί μερική ενίσχυση ή που δεν έχουν ακόμα εκτεταμένες αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων. Σε σύγκριση με το WGS, αναγνωρίζεται μικρότερος αριθμός μορίων και είναι απαραίτητη η διασταύρωση του αποτελέσματος. (Zhao, et al., 2023) Αυτή η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για την οπτικοποίηση της προσβασιμότητας του ecDNA στη μεταφασική χρωματίνη. (Wang, et al., 2021)

Το Circle-seq σχεδιάστηκε για την ανίχνευση μορίων ecDNAs σε ζυμομύκητες, αλλά χρησιμοποιείται αποτελεσματικά και σε ανθρώπινα κύτταρα. Η μέθοδος εκμεταλλεύεται τις διαφορές του χρωμοσωμικού και του εξωχρωμοσωμικού DNA. (Zhao, et al., 2023) Αρχικά διαχωρίζεται το DNA από άλλα συστατικά του κυττάρου με αλκαλική επεξεργασία. Στη συνέχεια, με δράση του εξωνουκλεασών, π.χ. του ενζύμου DNAase, ή με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, διαχωρίζονται τα ecDNAs από το γενωμικό και το μιτοχονδριακό DNA με πέψη. Το ecDNA ενισχύεται με PCR και ακολουθεί η κατασκευή της βιβλιοθήκης και η τεχνική της αλληλούχησης. (Dong, et al., 2023; Tsiakanikas, et al., 2024) Αυτή η μέθοδος μπορεί να έχει υψηλότερη απόδοση από την WGS και υψηλή ευαισθησία. Με συνδυασμό και των δύο τεχνικών, έχει ανιχνευθεί το υψηλά ενισχυμένο ογκογονίδιο *MYCN* στο νευροβλάστωμα. Το Circle-seq χρειάζεται να ανιχνεύει ανέπαφο το μόριο

Ο ρόλος των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

ecDNA, κάτι που αποτελεί πρόκληση σε περίπτωση μεγάλων μορίων ecDNAs και έπειτα από πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. (Zhao, et al., 2023; Qui, et al., 2020)

5.1.2. Αλληλουχία Τρίτης Γενιάς - TGS

Με την αλληλούχηση της τρίτης γενιάς (Third generation sequencing-TGS), συμπεριλαμβανομένων και των Single-Molecule sequencing in Real Time (SMRT) και Nanopore, έχει βελτιωθεί το μήκος ανάγνωσης της αλληλουχίας, διευκολύνοντας την ανασυγκρότηση εκτεταμένων γενωμικών αλληλουχιών. (Zhao, et al., 2023)

Το CIDER-Seq επιτρέπει την ανίχνευση κυκλικών μορίων χωρίς να χρειάζεται ενίσχυση. (Zhao, et al., 2023) Το CCDA-seq χρησιμοποιείται για την παρατήρηση ποικιλομορφίας των μορίων ecDNAs. Αυτή η μέθοδος αποκάλυψε διακριτά την χρωματίνη από τα μόρια ecDNAs. Το CCDA-seq προσφέρει πληροφορίες για τους μηχανισμούς ρύθμισης του ecDNA. (Wu, et al., 2023) Αναπτύχθηκε με βάση τη μέθοδο TGS και γίνεται χρήση N6-methyladenosine methyltransferase EcoGII.

Το nanoNOMe-Seq, το SMAC-seq και το Fiber-seq μπορούν να ανιχνεύουν ταυτόχρονα με την αλληλούχηση και την μεθυλίωση των μορίων DNA, χρησιμοποιούνται σε επίπεδο επιγενετικής, ωστόσο δεν έχουν αναφερθεί για ανίχνευση ecDNAs. (Wu, et al., 2023)

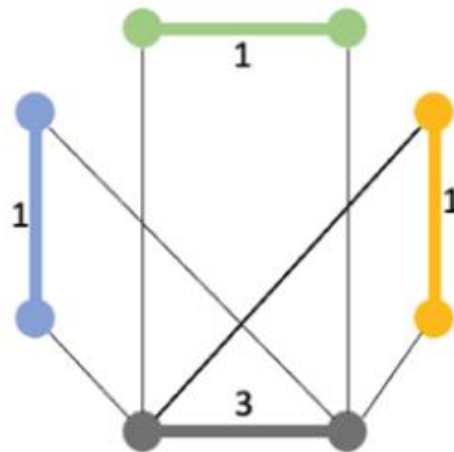
5.1.3. Αναγνώριση ecDNA από δεδομένα αλληλούχησης.

Η τεχνική του Circle finder, στο οποίο γίνεται χρήση του ενζύμου εξωνουκλεάση εξαρτώμενης από ATP (5'-τριφωσφορική αδενοσίνη) για να αφαιρεθεί το γραμμικό DNA. (Dong, et al., 2023) Χρησιμοποιεί δεδομένα NGS και μπορεί να αναλύσει τα θραύσματα ecDNAs σε δεδομένα ATAC-seq. (Wu, et al., 2023)

Το Circle-Map αναπτύχθηκε αποκλειστικά για την ανίχνευση κυκλικού DNA, σε δεδομένα που προέρχονται από αλληλούχηση γονιδιώματος. (Dong, et al., 2023) Χρησιμοποιεί αναγνώσεις αλληλουχιών και μπορεί να αναγνωρίσει γονιδιωματικές αναδιατάξεις, που υποδηλώνουν την ύπαρξη κυκλικών δομών DNA. Ωστόσο, μπορεί να χάσει πολλές από αυτές τις δομές, επειδή τα τμήματα που έχουν ευθυγραμμιστεί είναι είτε πολύ μικρά (κάτω από 100 kb), είτε η αλληλουχία δεν μπορεί να ευθυγραμμιστεί. Αυτές οι ευθυγραμμίσεις ονομάζονται soft-clipping. Το Circle-Map ανασυνθέτει έτσι έναν χάρτη με αναγραφόμενα τα σημεία θραύσης κυκλικού DNA. (Wu, et al., 2023) (Wang, et al., 2024)

Το Amplicon Architect κατασκευάστηκε για να αναδομεί τα μόρια ecDNAs από δεδομένα WGS. (Dong, et al., 2023) (Wang, et al., 2024) Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ανασύσταση πλήρων κυκλικών μορίων, από τα

δεδομένα αλληλούχησης. (Zhu, et al., 2022) Διαθέτει ένα μοντέλο Amplicon, καθώς και έναν αλγόριθμο για την ανακατασκευή δομών. (Wu, et al., 2023) Η μέθοδος αυτή, διερευνά τα σημεία διακοπής και δημιουργεί ένα γράφημα. (Bafna & Mischel, 2022) Στη περίπτωση όπου το γράφημα περιέχει διπλότυπα τμήματα, μπορεί να δημιουργήσει διαφορετικές πιθανές ανακατασκευές. (Jiang, et al., 2023) Το μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το μικρό μήκος ανάγνωσης των δεδομένων αλληλουχίας. (Lin, et al., 2023)



Amplicon Graph

Εικόνα 25: Αναδόμηση με μέθοδο Amplicon Architect (Bafna & Mischel, 2022)

Το ECCsplorer είναι πληροφορικό σύστημα για αυτόματη ανίχνευση μορίων ecDNAs από δεδομένα αλληλούχησης. Αρχικά ευθυγραμμίζει αλληλουχίες με γονιδίωμα αναφοράς και αναγνωρίζει τις μεταλλαγμένες αλληλουχίες. Γίνεται σύγκριση με δείγμα ελέγχου. Αυτή η τεχνική έχει πλεονέκτημα, έναντι του Circle-Map και του Amplicon Architect, καθώς παρουσιάζει καλύτερα τα αποτελέσματα. (Wu, et al., 2023)

Το CReSIL είναι εργαλείο βιοπληροφορικής (Construction-based Rolling-circle amplification for ecDNA Sequence Identification and Location) που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ανάλυση των ecDNAs. Έχει υψηλή ακρίβεια και απόδοση. Η μέθοδος έχει το μειονέκτημα ότι δεν μπορεί να ανιχνεύσει μόρια ecDNAs, εκτός του γονιδιώματος αναφοράς. (Wu, et al., 2023)

5.1.4. Αλληλούχηση ενός κυττάρου

Το ecDNA έχει την ικανότητα να κατανέμεται άνισα στα θυγατρικά κύτταρα. Λόγω αυτού αναπτύχθηκαν τεχνικές που αλληλουχούν μόνο ένα κύτταρο, και

αναγνωρίζονται μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την μελέτη της κυτταρικής ανάπτυξης σε σύγκριση με τις αλληλουχίες μαζικού ελέγχου. (Zhao, et al., 2023) (Jiang, et al., 2023)

Η SMOOTH-seq βασίζεται στην TGS και έχει την ικανότητα να αλληλουχεί ένα κύτταρο σε πραγματικό χρόνο. Στην συνέχεια γίνεται επιβεβαίωση με PCR και μέθοδο Sanger . Η scEC&T-seq και scCircle-seq αλληλουχούν και αυτές σε ένα κύτταρο, όλα τα κυκλικά μόρια που διαθέτουν, χωρίς περιορισμό στο μέγεθος . Οι scEC&T-seq και scCircle-seq στηρίζονται στη μέθοδο NGS και είναι πιο εύκολα εφαρμόσιμες από την SMOOTH-seq. (Jiang, et al., 2023; Zhao, et al., 2023) Η scEC&T-seq πλεονεκτεί έναντι του SMOOTH-seq, γιατί ανιχνεύονται και μόρια mRNA εντός του ίδιου κυττάρου. Έτσι δίνεται η δυνατότητα να αλληλουχείται παράλληλα ecDNA και mRNA σε ένα καρκινικό κύτταρο. (Zhao, et al., 2023) Οι Fan *et al.*, απέδειξαν την αποτελεσματική ανίχνευση ecDNA με την μέθοδο SMOOTH-seq, εντοπίζοντας 125 μόρια. Οι Chen *et al.*, κατάφεραν να απομονώσουν ecDNAs από 156 κύτταρα. (Jiang, et al., 2023)

5.2. Ανίχνευση με τεχνικές οπτικοποίησης

Τα ecDNAs μπορούν να οπτικοποιηθούν με τη μέθοδο FISH, που επισημαίνει τμήματα DNA με φθορισμό. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να ανιχνευθούν οι ενισχύσεις γονιδίων. Για τον φθορισμό χρησιμοποιείται η φθορίζουσα χρωστική DAPI (4,6- διαμιδινο-2- φαινυλινδόλη), για να σημειωθεί το ecDNA. Κατά τη μετάφραση, μπορούν να διακριθούν τα εξωχρωμοσωμικά μόρια DNA από το χρωμοσωμικό DNA. (Dong, et al., 2023; Qui, et al., 2020) Ωστόσο, με την χρώση DAPI, δε μπορούν να ανιχνευθούν μικρά μόρια ecDNAs, με αποτέλεσμα να έχει μικρή απόδοση σαν τεχνική. (Bafna & Mischel, 2022) Οι Hung *et al.*, με την τεχνική FISH κατάφεραν να επισημάνουν ecDNAs με ογκογονίδια σε καρκινικές σειρές σε διάφορους τύπους καρκίνου. (Hung, et al., 2021) Αυτή η τεχνική επιτρέπει τον διαχωρισμό των σημάτων από το γραμμικό και το εξωχρωμοσωμικό DNA, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση ογκογονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε θεραπείες. Ωστόσο, αυτή η τεχνική έχει χαμηλή απόδοση. (Hung, et al., 2022; Zhao, et al., 2023) Εκτός από την μικροσκοπία φθορισμού, έχουν χρησιμοποιηθεί και εστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ (laser scanning confocal microscopy) και μικροσκόπιο δομημένου Φωτισμού (Structured Illumination Microscopy - SIM). (Zhao, et al., 2023)

Επιπλέον έχουν χρησιμοποιηθεί και ηλεκτρονική μικροσκοπία για την ανίχνευση των ecDNAs, λόγω της εξαιρετικά υψηλής ανάλυσης. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης (transmission electron microscopy - TEM), η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (scanning electron microscopy - SEM). Επιπλέον έχει γίνει χρήση ηλεκτρονικού και οπτικού μικροσκοπίου, όπως η Συσχετιστική Μικροσκοπία Φωτός και Ηλεκτρονίου. (Correlative Light and Electron Microscopy- CLEM).

Ο ρόλος των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

Οι μέθοδοι της μικροσκοπίας είναι αποτελεσματικοί αλλά συχνά το κόστος διεξαγωγής αρκετά υψηλό. (Zhao, et al., 2023)

Για την ανάλυση εικόνας των μορίων ecDNAs με τις μεθόδους φθορισμού, υπάρχουν τα λογισμικά ECdetect και ecSEg. Το Ecdetect είναι ημι-αυτοματοποιημένο λογισμικό ανάλυσης εικόνας και χρησιμοποιεί δύο απεικονίσεις από την χρωστική DAPI, για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των ecDNAs. (Turner, et al., 2017; Tsiakanikas, et al., 2024) Αναγνωρίζονται τα κύρια στοιχεία στην εικόνα, με το ecDNA να καλύπτει μέγεθος 3 ως 75 εικονοστοιχείων. Το ECdetect ανιχνεύει με ακριβεία τα εξωχρωμοσωμικά DNA, ωστόσο δεν μπορεί να τα διαφοροποιήσει αυτόματα (Tsiakanikas, et al., 2024; Dong, et al., 2023) Το ecSEg αντίθετως, μπορεί να τα διαχωρίσει αυτόματα, και να διακρίνει τη θέση της ενίσχυσης ογκογονιδίου. Έχει αποδειχθεί ότι το ecSEg έχει μεγαλύτερη απόδοση από το Ecdetect (82% και 50%, αντίστοιχα). (Tsiakanikas, et al., 2024) Οι Yi *et al.*, εντόπισαν συσσωματώματα ecDNAs με την μέθοδο ecTag. (Yi, et al., 2022) Τα ecDNAs που είναι κυκλικά διαθέτουν ένα σημείο διακοπής, προερχόμενο από το χρωμόσωμα. Αυτό το σημείο ανιχνεύεται από το ecTag, με τη βοήθεια ειδικών RNA ανιχνευτών για το σημείο διακοπής. (Yi, et al., 2022)

5.3. Ανίχνευση με εργαλεία CRISPR

Το CRISPR πρόκειται για μια μέθοδο γονιδιακής τροποποίησης, που στηρίζεται στο ένζυμο Cas9 και στοχεύουν στην ακριβή επεξεργασία του γονιδιώματος. Το Cas9 δημιουργεί δίκλωνη εντομή στο DNA ενός κυττάρου. Το ένζυμο αυτό δεν έχει εξειδίκευση για συγκεκριμένη αλληλουχία, αλλά χρησιμοποιεί έναν RNA οδηγό (sgRNA) για να αναγνωρίσει αλληλουχίες. (Yi, et al., 2022; Alberts, et al., 2021) Οι ερευνητές χρησιμοποιούν αυτή τη μέθοδο για να στοχεύουν επιθυμητές αλληλουχίες γονιδίων, οι οποίες ανευρίσκονται μέσα σε μόρια ecDNAs και το σημαίνουν με φθορίζουσες χρωστικές. Στη συνέχεια, γίνεται οπτικοποίησή τους, με την μέθοδο οπτικοποίησης που βασίζεται σε CRISPR, το ecTag. Με το ecTag έχει παρατηρηθεί η κίνηση των ecDNAs σε ζωντανά κύτταρα σε πραγματικό χρόνο, και πως δεν κατανέμονται ισάριθμα στα θυγατρικά κύτταρα. (Yi, et al., 2022; Zhao, et al., 2023) Οι Verhaak, *et al.*, χρησιμοποιώντας αυτή τη τεχνική κατάφεραν να ανιχνεύσουν τα συσσωματώματα των ecDNAs και ότι όσα καρκινικά κύτταρα είχαν αυτά τα συσσωματώματα χαρακτηρίζονταν από υψηλότερα επίπεδα των ογκογονιδίων. Το μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι, πρέπει να υπάρχουν συγκεκριμένες αλληλουχίες στο ecDNA για αναγνώριση. (Zhao, et al., 2023)

Η CRISPR-CATCH είναι μέθοδος οπτικοποίησης που βασίζεται σε CRISPR, η οποία επιτρέπει την μελέτη των ecDNAs χωρίς να απαιτείται αντιγραφή ή αποκοπή, διατηρώντας τα μοριακά χαρακτηριστικά του μορίου και επιτρέποντας τη χρήση των μορίων για μελέτη με την αλληλούχηση μέσω νανοπόρων. (Dong, et al., 2023) (Tsiakanikas, et al., 2024) Οι Hung, *et al.*,

έδειξαν ότι η τεχνική CRISPR-CATCH μπορεί να δώσει πληροφορίες για την δομή και την ποικιλομορφία των ecDNAs, καθώς επίσης και την προέλευση των τμημάτων τους. (Hung, et al., 2022) Μπορεί να ανιχνεύσει ecDNAs από καρκινικά κύτταρα ή από ιστούς. Η μέθοδος αυτή συνιστάται να είναι συμπληρωματική σε FISH και WGS. (Zhao, et al., 2023) Αυτή η μέθοδος έχει το πλεονέκτημα να συγκρίνει ταυτόχρονα γενετικές και επιγενετικές αλλαγές τόσο στο χρωμοσωμικό DNA, όπως και στα ecDNAs. (Pecorino, et al., 2022)

Η CRISPR- FISHer είναι μέθοδος υβριδισμού με βάση την τεχνολογία CRISPR. Μπορεί να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία σε πραγματικό χρόνο και να απεικονίσει ecDNAs σε ζωντανά κύτταρα. (Zhao, et al., 2023)

5.4. Ταξινόμηση δείγματος ως θετικό (+) για ecDNAs

Για να είναι αξιόπιστο το αποτέλεσμα και η αξιολόγηση ενός καρκινικού κυττάρου θετικού (+) σε μόρια ecDNAs, θα πρέπει να έχει γίνει δειγματοληψία μεγάλου αριθμού κυττάρων (20-200). Η ταξινόμηση ως θετικό δείγμα είναι λίγο αυθαίρετες και περιλαμβάνουν >2 ecDNA ανά κύτταρο, είτε 1 ecDNA για κάθε 2 κύτταρα, με τουλάχιστον δείγμα 20 κυττάρων. (Bafna & Mischel, 2022)

6. Ανάλυση εργαστηριακής ανίχνευσης και απομόνωσης ecDNAs

Τα εξωχρωμοσωμικά DNAs μπορούν να σχηματιστούν από οποιοδήποτε χρωμόσωμα και αποτελούν μέθοδο ποικιλομορφίας κυττάρων. Τα ecDNAs ανιχνεύονται συχνά σε καρκινικά κύτταρα καθώς και σε επιπλέον παθολογικές καταστάσεις. Παρακάτω θα περιγράψω μια τεχνική ανίχνευσης αυτών των μορίων από καρκινικά κύτταρα, που πραγματοποιείται στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, στο τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το πρωτόκολλο εφαρμόζεται σε ευκαρυωτικά, προκαρυωτικά ή και σε κύτταρα από κυτταροκαλλιέργειες. Αποτελείται από πέντε κύρια βήματα: λύση κυττάρων, χρωματογραφία στήλης, απομάκρυνση γραμμικού DNA, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction-PCR) και αλληλούχηση. (Moller, 2020)

6.1. Υλικά

Πραγματοποιήθηκε εργαστηριακή εκπαίδευση στο εργαστήριο του τομέα βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας. Χρησιμοποιήθηκαν πρωτόκολλα για λύση κυττάρων, καθαρισμό από γραμμικό και κυκλικό μιτοχονδριακό DNA. Αρχικά χρησιμοποιείται η πρωτεΐνη Cas9 μαζί με ειδικές αλληλουχίες, ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες-οδηγητές (guide RNA), για να μετατραπεί το δίκλωνο μιτοχονδριακό DNA σε μονόκλωνο. Στη συνέχεια ακολουθεί πέψη των γραμμικών τμημάτων DNA (χρωμοσωμικού και μιτοχονδριακού), με χρήση εξωνουκλεάσης. Ο έλεγχος για την επιτυχημένη απομάκρυνση τόσο του γραμμικού γενωμικού, όσο και του κυκλικού μιτοχονδριακού DNA έγινε μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR)

αξιοποιώντας τη χημεία SYBR green I. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία NGS για την χαρτογράφηση των μορίων ecDNA και η χρήση του λογισμικού Circle-Map για την βιοπληροφορική ανάλυση.

6.2. Μέθοδοι εργαστηριακής ανίχνευσης και απομόνωσης ecDNAs

6.2.1. Λύση κυττάρων

Δείγμα κυττάρων τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα και προσθέεται πρωτεΐνάση K, για να γίνει διάλυση των μεμβρανών. Το σωληνάριο επωάζεται στους 50 °C με ανάδευση 700 γύρων/λεπτό και γίνεται επώαση για 16-24 ώρες. Την επόμενη μέρα γίνεται έλεγχος για το αν έχει ομογενοποιηθεί το μίγμα. Αν δεν έχει γίνει ομογενοποίηση γίνεται προσθήκη κι άλλης πρωτεΐνάσης K και επαναλαμβάνεται η διαδικασία για 1-2 μέρες. Μετά την ομογενοποίηση του μίγματος, γίνεται προσθήκη RNase για να αποδομηθούν τα μόρια RNA. Σε περίπτωση που δεν αφαιρεθούν τα μόρια RNA, θα χάνεται η απόδοση της μεθόδου για την ανίχνευση του ecDNA. (Moller, 2020)

6.2.2. Χρωματογραφία στήλης

Μετά την λύση των κυττάρων, το δείγμα φυγοκεντρείται. Στο εναιώρημα υπάρχουν τα νουκλεϊκά οξέα (DNA και RNA) και στο ίζημα όλα τα υπόλοιπα συστατικά ενός κυττάρου (π.χ. πρωτεΐνες, οργανίδια). Αφού συλλεχθεί το εναιώρημα, περνάει από στήλη χρωματογραφίας. Στη στήλη δεσμεύεται το DNA και μετά από συνεχείς πλύσεις για να αφαιρεθεί οποιοδήποτε άλλο μόριο που πιθανόν είχε απομείνει, τότε ακολουθεί η έκλουση του DNA από την στήλη, με προθερμασμένο διάλυμα έκλουσης στους 65°C. (Moller, 2020)

6.2.3. Αφαίρεση γραμμικού DNA

Για την απομάκρυνση του γραμμικού DNA και συλλογή κυκλικού DNA, γίνεται χρήση της μεθόδου Circle-seq, που χρησιμοποιεί πέψη με το ένζυμο εξωνουκλεάση. Το ένζυμο είναι μη ειδικό για την αλληλουχία DNA που θα κοπεί. Απαιτεί να υπάρχουν 5' και 3' ελεύθερα άκρα στο γραμμικό δίκλωνο DNA και το κόβει σε νουκλεοτίδια και το αποδομεί. Η αντίδραση μπορεί να διαρκέσει ως μια εβδομάδα. Καθημερινά γίνεται προσθήκη μορίων ATP. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση, η εξωνουκλεάση απενεργοποιείται με αύξηση της θερμοκρασίας. Η εξωνουκλεάση βρίσκει μόνο ελεύθερα άκρα για να δράσει, γι' αυτό δεν αποδομούνται τα κυκλικά μόρια DNA, όπως το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) και τα ecDNAs (Moller, 2020) (Yi, et al., 2022)

6.2.4. Καθαρισμός δείγματος DNA με παραμαγνητικά σφαιρίδια

Για να καθαριστεί το δείγμα από προσμίξεις και να συλλεχθεί μόνο το κυκλικό DNA (mtDNA και τα ecDNAs), χρησιμοποιούνται παραμαγνητικά σφαιρίδια. Γίνεται προσθήκη διπλάσιου όγκου σφαιριδίων από το μίγμα, μέσα στο μίγμα, για να δεσμευτεί πάνω στα σφαιρίδια το σύνολο του κυκλικού DNA. Απαιτούνται 5 λεπτά να γίνει δέσμευση του DNA από τα σφαιρίδια, ενώ στη

συνέχεια το δείγμα τοποθετείται στον μαγνήτη. Το DNA δεσμεύεται από τα σφαιρίδια και δημιουργούνται συσσωματώματα με την βοήθεια του μαγνήτη. Γίνονται τρεις πλύσεις με αιθανόλη. Κάθε φορά αφαιρείται το υπερκείμενο. (Moller, 2020)

Στη συνέχεια, προσθέεται στο δείγμα προθερμένο διάλυμα Tris - HCl στους 50°C, για να γίνει έκλυση του DNA από τα σφαιρίδια. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές και κάθε φορά συλλέγεται το εναιώρημα. Το δείγμα που συλλέχθηκε φυγοκεντρείται υπο κενό, σε φυγόκεντρο speedvac, θέλωντας να μειωθεί ο όγκος του δείγματος και να εξατμιστεί η αιθανόλη που έχει απομείνει μέσα. Η αιθανόλη δεν πρέπει να αφαιρείται τελείως στις πλύσεις για να μην στεγνώνουν τα σφαιρίδια και να γίνεται πιο εύκολα η επαναδιαλυτοποίηση. (Moller, 2020)

6.2.5. Αφαίρεση κυκλικού μιτοχονδριακού DNA- Χρήση Cas-9

Για να μελετήσουμε τα ecDNAs, πρέπει να αφαιρεθεί και το μιτοχονδριακό DNA. Η εξωνουκλεάση δεν μπορεί να αποδομήσει τα κυκλικά μόρια DNA, όπως στην περίπτωση μας το mtDNA, καθώς αναγνωρίζει και συνδέεται μόνο με άκρα γραμμικού DNA. Γι' αυτό είναι αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί άλλος τρόπος αποδόμησης του mtDNA. (Moller, 2020)

Με τη βοήθεια του ενζύμου Cas9 δημιουργείται μια δίκλωνη εντομή στο mtDNA. Σε αντίθεση με τα περιοριστικά ένζυμα, η Cas9 δεν κόβει σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Για να κόψει το επιθυμητό σημείο, η Cas9 χρησιμοποιεί guide RNA, για να αναγνωρίσει και να συνδεθεί με μια συμπληρωματική αλληλουχία. (Alberts, et al., 2021) Γίνεται προ-επώαση στους 37 °C, στα υλικά της αντίδρασης και μετά προσθέεται μέσα σε σωληνάριο το δείγμα και ποσότητα του DNA. Στη συνέχεια επωάζεται για 2 ώρες για να μετατραπεί το mtDNA σε γραμμικό και μετά προσθέεται εξωνουκλεάση, για να αποδομηθούν τα γραμμικά μόρια mtDNA, που έχουν δημιουργηθεί. (Biolabs, 2014)

Στη συνέχεια ακολουθεί η ίδια διαδικασία για την απομάκρυνση του μιτοχονδριακού DNA, που χρησιμοποιήθηκε για το γραμμικό, για να συλλεχθεί το ecDNA. (βλ. ενότητα 6.2.4)

6.2.6. Ποσοτικοποίηση του δείγματος με φθοροσιμετρία

Αφού έχει αφαιρεθεί γραμμικό και μιτοχονδριακό DNA, πρέπει να γίνει μια πρώτη εκτίμηση της τελικής ποσότητας που συγκεντρώνεται. Η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων, μπορεί να γίνει με φθοροσίμετρο Qubit. Τα μόρια ecDNAs είναι πολύ μικρά σε μέγεθος και στον φθορισμό δεν ανευρίσκεται καθόλου σήμα. Σε περίπτωση που βρεθεί σήμα φθορισμού, πρέπει να εξακριβωθεί τι δεν έχει πάει καλά στην αφαίρεση του γενετικού υλικού.

6.2.7. Ποσοτική Real Time PCR

Η PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR) επιτρέπει την γρήγορη και ακριβή ποσοτικοποίηση του γενετικού υλικού. Χρησιμοποιούνται δυο στόχοι για έλεγχο, ο ένας αντιστοιχεί σε μία περιοχή γενωμικού DNA και ο δεύτερος σε mtDNA, για να ελεγχθεί κατά πόσο έχουν απομακρυνθεί από το δείγμα. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, ένα κατώφλι σήμα φθορίζουσας χρωστικής καθορίζει από πιο σημείο και μετά μπορεί να γίνει σύγκριση και ποσοτικοποίηση του γενωμικού DNA και το mtDNA που έχει απομείνει και δεν έχει αποδομηθεί. Η χρωστική που χρησιμοποιείται είναι η SYBR Green, η οποία είναι ευαίσθητη σε παραπάνω από 10 αντίγραφα, και προσδένεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA υπάρχει. (Γρηγοράκη, 2017)

6.2.8. Next - Generation Sequencing (NGS)

Η εφαρμογή της τεχνολογίας NGS κατηγοριοποιείται σε βήματα. Πρώτο βήμα αποτελεί η κατασκευή της βιβλιοθήκης που απαρτίζεται από συγκεκριμένα βήματα. Αρχικά, γίνεται κατακερματισμός του γενετικού υλικού που έχει απομονωθεί με τις προηγούμενες τεχνικές. Το εκμάγειο DNA διασπάται σε πολλά τμήματα, με μηχανικές μεθόδους ή ενζυμική πέψη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται υβριδοποίηση ειδικών προσαρμογέων (adaptors). Επιπλέον, μπορεί να γίνει ενίσχυση των θραυσμάτων με χρήση PCR, προκειμένου να δημιουργηθούν συγκεκριμένα amplicons. Αυτά τα τμήματα DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία γονιδιωματικών βιβλιοθηκών και για την αναγνώριση αυτών των τμημάτων σε δείγματα ασθενών. Έπειτα γίνεται ο διαχωρισμός τους σε μέγεθος με τη χρήση παραμαγνητικών σφαιριδίων, είτε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. (Καλτσούλα, 2021)

Η αλληλούχηση σε NGS πραγματοποιείται με την χρήση μιας πλατφόρμας αλληλούχησης, όπως για παράδειγμα της Illumina, με χρήση flow cells ή της Ion Torrent, με χρήση sequencing chips. Ο στόχος και των 2 είναι ίδιος, δηλαδή η ταυτόχρονη παράλληλη αλληλούχηση όλων των θραυσμάτων DNA. Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από την αλληλούχηση, αναλύονται σε λογισμικά βιοπληροφορικής. (Καλτσούλα, 2021)

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε ανάλυση για ecDNAs σε δεδομένα NGS από την ανθρώπινη καρκινική σειρά PC3 (καρκίνος προστάτη). Πιο συγκεκριμένα, έγινε λήψη του πειράματος με κωδικό SRR27236351 από τη βάση δεδομένων Sequence Read Archive (National Library of Medicine, NCBI), το οποίο δημιουργήθηκε με χρήση της Illumina NovaSeq 6000. Για την ανάλυση των δεδομένων, έγινε χρήση του λογισμικού Circle-Map. (National Library of Medicine, 2023)

6.2.9. Βιοπληροφορική Ανάλυση δεδομένων από NGS

Οι πληροφορίες αλληλούχησης που λάβαμε από την μέθοδο NGS συγκρίνονται με μια αλληλουχία αναφοράς ανθρώπινου γονιδιώματος-

Ο ρόλος των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

GRCh38. Με την σύγκριση μπορούν να ανιχνευθούν τυχόν μεταλλάξεις σε στοχευμένες αλληλουχίες.

Τα δεδομένα που συλλέγονται από το NGS συγκεντρώνονται σε ένα αρχείο FASTQ και συγκρίνονται με ένα αρχείο αναφοράς FASTA του ανθρώπινου γονιδιώματος. Πιο συγκεκριμένα, ο αλγόριθμος Burrows-Wheeler aligner (BWA) χρησιμοποιήθηκε για να στοιχίσει τα δεδομένα από το αρχείο FASTQ, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός αρχείου τύπου SAM. Έπειτα, αυτό το αρχείο χρησιμοποιείται από τον αλγόριθμο Circle-Map, για ανίχνευση των ecDNAs. Μέσω του Circle-Map, δημιουργείται ένα αρχείο BAM, το οποίο περιέχει πληροφορίες στοιχίσης για τα υπάρχοντα ecDNAs ενώ παράλληλα δίνει τη δυνατότητα οπτικοποίησης των αποτελεσμάτων στοιχίσης μέσω της παραγωγής ενός αρχείου BED.

Στο αρχείο BED εμφανίζονται στήλες με συγκεκριμένη μορφολογία. Η 1^η στήλη υποδεικνύει το χρωμόσωμα. Οι 2^η και 3^η στήλη αναφέρουν τις ακριβείς συντεταγμένες θέσης στο γονιδίωμα, με βάση το GRCh38, όπου αρχίζει και τελειώνει το μόριο. Στην 4^η στήλη - Discordants εμφανίζονται τα τμήματα του προς μελέτη δείγματος, που έχουν παραλλαγές στην ανάγνωση βάσεων με μια ασυνήθιστη ευθυγράμμιση, από το γονιδίωμα αναφοράς, υποστηρίζοντας την ύπαρξη κυκλικών DNA. Στην 5^η στήλη - Split reads εμφανίζεται ο αριθμός των διασπασμένων αναγνώσεων του υλικού και δείχνουν τα 2 σημεία θραύσης του κυκλικού μορίου, δείχνοντας την ακριβή θέση του μορίου. Αν υπάρχει μεγάλη διαφορά στα Split reads και στα Discordants, το αποτέλεσμα πρέπει να εξεταστεί προσεκτικά γιατί μπορεί να υπάρχει ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. Ο αριθμός των Split reads είναι πιο αξιόπιστος δείκτης για την ταυτοποίηση ενός κυκλικού DNA. Στην 6^η στήλη βγαίνει συνδυασμός σε score των στηλών 4 και 5 και αξιολογείται η ποιότητα του τμήματος που έχει ανιχνευθεί, η ευθυγράμμιση των τμημάτων, το μήκος και ο αριθμός των split reads. Ένα καλό score θεωρείται από 50-200, >200 score το κυκλικό DNA είναι υψηλής ποιότητας. Score 10-50 πρέπει να αξιολογείται με προσοχή. (iprada, 2020)

Παρακάτω στην εικόνα φαίνεται ο τρόπος απεικόνισης και ένα μέρος των αποτελεσμάτων από την βιοπληροφορική ανάλυση με το Circle-Map σε κυτταροκαλλιέργεια καρκινικής σειράς PC3. Όπως φαίνεται στην εικόνα, οι πρώτες 2 γραμμές απεικονίζουν ένα καλής ποιότητας αποτέλεσμα με Circle Score >200. Η 3η γραμμή με circle score 26 πρέπει να αξιολογηθεί με προσοχή. Απ' την 4η γραμμή και κάτω τα αποτελέσματα δεν είναι ποιοτικά για κάποιο συμπέρασμα.

Ο ρόλος των εξωχρωσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Chromosome	Start coordinate	End coordinate	Discordants	Split reads	Circle score	Mean coverage	Standard deviation	Coverage increase in the start coordinate	Coverage increase in the end coordinate	Coverage continuity
2	NC_000015.10	41729943	41730405	0	121	2990,11	94839,84	71691,34	0,99	0,99	0,00
3	NC_000002.12	191453376	191453730	0	18	569,49	1908,86	538,09	0,96	0,98	0,00
4	NC_000010.11	95581541	95582037	0	1	26	47070,02	34285,91	1,00	1,00	0,00
5	NC_000001.11	21485074	21852261	8	0	0	3,20	25,63		0,70	0,65
6	NC_000001.11	36228138	36361106	4	0	0	388,09	7573,02	0,29	0,31	0,63
7	NC_000001.11	124984099	125647202	21	0	0	0,33	4,75	0,33		0,94
8	NC_000001.11	1291	6228942	16	0	0	2,56	74,40		0,52	0,79
9	NC_000001.11	1855	2157793	6	0	0	3,03	36,30		0,40	0,74
10	NC_000001.11	7448	1331391	6	0	0	2,57	29,26		0,33	0,81
11	NC_000001.11	9833	2163535	8	0	0	3,04	36,33		0,44	0,74
12	NC_000001.11	15500	2302033	8	0	0	3,25	39,66	0,41	0,37	0,74
13	NC_000001.11	28054	3139712	4	0	0	2,82	34,45		0,40	0,75
14	NC_000001.11	37222	1203280	16	0	0	2,59	30,38		0,17	0,82
15	NC_000001.11	37411	6211391	9	0	0	2,56	74,71		0,13	0,79

Εικόνα 26: Βιοπληροφορική ανάλυση με λογισμικό Circle-Map σε κυτταροκαλλιέργεια καρκινικής σειράς PC3.

7. Βάσεις δεδομένων για μόρια ecDNAs

7.1. EccDNA Atlas

Μέσα σε αυτήν την βάση δεδομένων ενσωματώνονται δεδομένα των ecDNAs. Υπάρχουν καταγεγραμμένα περίπου 630.000 είδη ecDNAs, 8221 είδη ecDNAs (έχουν καταχωρηθεί χειροκίνητα), και 1105 μέσω Amplicon Architect από δεδομένα WGS, από 66 ασθενείς, 57 ιστούς και 319 κυτταρικές σειρές. Μέσα αναφέρονται ογκογονίδια, γονιδιακή έκφραση, ανάλυση ενισχύσεων. Σε αντίθεση με άλλες βάσεις δεδομένων υπάρχει δυνατότητα διαχωρισμού των ecDNA και eccDNA. (Zhao, et al., 2023) (eccDNA Atlas, n.d.)

7.2. EccDNAdb

Η EccDNAdb περιέχει πληροφορίες για 1270 ecDNA που προέρχονται από 57 τύπους καρκίνου, που έχουν συλλεχθεί με WGS, από το ανθρώπινο είδος. Μέσα αναφέρονται ενισχύσεις, κλινικά χαρακτηριστικά, προσβασιμότητα στη χρωματίνη. Αποτελεί εύκολο τρόπο κατανόησης της πληροφορίας του κάθε μορίου (Zhao, et al., 2023)

8. Συζήτηση

Με την παρούσα εργασία υπογραμμίζεται η καθοριστική συμβολή των ecDNAs στην καρκινογένεση και στην δυναμική εξέλιξη των όγκων. Η κατανόηση της δομής, λειτουργίας και των μηχανισμών βιογένεσης, καθώς και η δυναμική εξέλιξη των όγκων προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες για τη βελτίωση νέων θεραπευτικών επιλογών. Με τη χρήση σύγχρονων τεχνολογιών και μεθόδων, όπως η αλληλούχηση γονιδιώματος, τα ecDNAs μπορούν να συμβάλλουν σημαντικά στην ανάπτυξη στοχευμένων και εξατομικευμένων θεραπειών στην ογκολογία. Ωστόσο, το εγχείρημα της απομόνωσης των ecDNAs είναι αρκετά δύσκολο, καθώς απαιτείται η

Ο ρόλος των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

αφαίρεση ολόκληρου του γενωμικού υλικού, που ποσοστιάα είναι τεράστιος ο όγκος σε σχέση με των ecDNAs.

ΟΡΟΛΟΓΙΑ

Accessory chromatin	Βοηθητική Χρωματίνη
Chromothripsis	Θρυμματισμός χρωμοσώματος
Circulating tumor cells	Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα
Double fragments of chromosome	Διπλά θραύσματα χρωμοσώματος
Double minutes chromosomes	Διπλά μικρά θραύσματα
ecDNAs	Έξωχρωμοσωμικό DNA
Extracellular vesicles	Εξωκυτταρικά κυστίδια
Fork stalling and template switching	Στασιμότητα διχάλας με εναλλαγή προτύπου
Homogeneous staining regions (HSRs)	Ομοιογενείς περιοχές χρώσης
Laser scanning confocal microscopy	Εστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ
Matrix metalloproteinase 2 (MMP2)	Μητρική μεταλλοπρωτεϊνάση 2
Minute chromatin bodies	Μικροσκοπικά μόρια χρωματίνης
Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs)	Αναστολείς Τυροσινικής Κινάσης
Whole Genome Sequencing	Αλληλούχηση Ολόκληρου Γονιδιώματος
Breakage-fusion-bridge (BFB) cycles	Κύκλοι θραύσης-σύντηξης γέφυρας
High-throughput sequencing	Αλληλουχία υψηλής απόδοσης

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ

ATAC-see	Assay for transposase Accessible Chromatin with visualization	Προσδιορισμός προσβασιμότητας με οπτικοποίηση
ATAC-seq	Assay for transposase Accessible Chromatin with High throuput sequencing	Προσδιορισμός προσβασιμότητας με χρήση αλληλουχίας υψηλής απόδοσης
ATP		5-τριφωσφορική αδενοσίνη
BFB	Breakage Fusion bridge	Κύκλοι Θραύσης σύντηξης γέφυρας
BWA	Burrows-Wheeler aligner	
CLEM	Correlative Light and Electron Microscopy	Συσχετιστική Μικροσκοπία Φωτός και Ηλεκτρονίου.
CResIL	Construction-based Rolling circle amplification for ecDNAsequence identification and location	
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	
CTCs	Circulating tumor cells	Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα
DHFR	Dihydrofolate reductase	Διυδροφολική Αναγωγή
DM	Double Minutes Chromosomes	Διπλά λεπτά Χρωμοσώματα
EcDNAs	Extra-chromosomal DNA	Εξωχρωμοσωμικό DNA
EVs	Extracellular vesicles	εξωκυτταρικά κυστίδια
GBM	Glioblastoma	Γλοιοβλάστωμα
HGSOC	High- grade serous ovarian carcinoma	Υψηλού βαθμού ορώδες καρκίνωμα
HPV	Human Papilloma Virus	Ιός ανθρωπίνων θηλωμάτων
HSRs	Homogeneous staining regions	Ομοιογενείς περιοχές χρώσης
MMP2	Matrix metalloproteinase 2	Μητρική μεταλλοπρωτεϊνάση 2
MtDNA	Mitochondrial DNA	Μιτοχονδριακό DNA
MTX	Methotrexate	Μεθοτρεξάτη
NC	Neochromosomes	Νέο χρωμόσωμα
NGS	Next - Generation Sequencing	Αλληλούχηση επόμενης γενιάς

PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
RNAPII	RNA polymerase II	RNA πολυμεράση II
RT-PCR	Real Time PCR	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου
SCLC	Small-cell lung cancer	Μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα
SEM	Scanning electron microscopy	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης
SIM	Structured Illumination Microscopy	Structured Illumination Microscopy
SMRT	Single-Molecule sequencing in Real Time	
SpcDNA	Small Polydisperse Circular DNA	Μικρά κυκλικά DNA πολυδιασποράς
t-Circle/ c-circle	Telomeric Circle	Τελομερικοί Κύκλοι
TEM	transmission electron microscopy	Ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης
TGS	Third generation sequencing	Αλληλούχηση τρίτης γενιάς
TKIs	Tyrosine Kinase Inhibitors	Αναστολείς Τυροσινικής Κινάσης
WGS	Whole Genome Sequencing	Αλληλούχηση Ολόκληρου Γονιδιώματος

Bibliography

Alberts, . B. et al., 2021. Κεφάλαιο 10- Αναλύοντας τη δομή και τη λειτουργία των κυττάρων. In: *Βασικές αρχές Κυτταρικής Βιολογίας*. s.l.:Broken Hill Publishers, pp. 431-432.

Al-Rawi, D. & Bakhoun, S., 2022. Chromosomal instability as a source of genomic plasticity. *Current opinion in genetics & development*, Volume 74, p. 101913.

Anunobi R., B. B. et al., 2018. Extracellular DNA promotes colorectal tumor cell survival after cytotoxic chemotherapy. *he Journal of surgical research*, Volume 226, pp. 181-191.

Arrey, G., Keating, S. & Regenberg, B., 2022. A unifying model for extrachromosomal circular DNA load in eukaryotic cells. *Seminars in cell & developmental biology*, pp. 40-50128.

Bafna, V. & Mischel, P. S., 2022. Extrachromosomal DNA in Cancer. *Annual review of genomics and human genetics*, Volume 23, pp. 29-52.

Behrouzi, R. et al., 2024. Cell-free and extrachromosomal DNA profiling of small cell lung cancer.. *Trends in molecular medicine*, S1471-4914(24), pp. 00218-1.

Biolabs, N. E., 2014. *In vitro digestion of DNA with Cas9 Nuclease, S. pyogenes (M0386)*, New England: New England Biolabs.

Cai, M. et al., 2019. Inhibiting homologous recombination decreases extrachromosomal amplification but has no effect on intrachromosomal amplification in methotrexate-resistant colon cancer cells.. *International journal of cancer*, 5(144), pp. 1037-1048.

deCarvalho, A. et al., 2018. Discordant inheritance of chromosomal and extrachromosomal DNA elements contributes to dynamic disease evolution in glioblastoma. *Nature Genetics*, 5(50), pp. 708-717.

Dehkordi, S. et al., 2023. Breakage fusion bridge cycles drive high oncogene copy number, but not intratumoral genetic heterogeneity or rapid cancer genome change. *bioRxiv : the preprint server for biology*.

Dong, Y. et al., 2023. Extrachromosomal DNA (ecDNA) in cancer: mechanisms, functions, and clinical implications.. *Frontiers in oncology*, 28 June.Issue 13.

eccDNA Atlas, n.d. s.l.: s.n.

Ermakov, A. V. et al., 2013. Oxidized Extracellular DNA as a Stress Signal in Human Cells. *Oxidative Medicine and cellular Longevity*, 2013(1).

Fan, Y. et al., 2011. Frequency of double minute chromosomes and combined cytogenetic abnormalities and their characteristics. *Journal of applied genetics*, February, 52(1), pp. 53-59.

Ο ρόλος των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

Gu, X. et al., 2020. Novel insights into extrachromosomal DNA: redefining the onco-drivers of tumor progression. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 39(1), p. 215.

Hong, J., Zheng, S. & Jiang, D., 2021. The contributions of extrachromosomal DNA elements in neoplasm progression. *American journal of cancer research*, 11(6), pp. 2417-2429.

Hung, K. et al., 2023. Coordinated inheritance of extrachromosomal DNA species in human cancer cells. *Preprint. bioRxiv.*

Hung, K. L. et al., 2022. Targeted profiling of human extrachromosomal DNA by CRISPR-CATCH. *Nature genetics*, 54(11), pp. 1746-1754.

Hung, K. L., S., M. P. & Chang, H. Y., 2022. Gene regulation on extrachromosomal DNA. *Nature structural & molecular biology*, 29(8), pp. 736-744.

Hung, K. et al., 2021. ecDNA hubs drive cooperative intermolecular oncogene expression. *Nature*, 7890(600), pp. 731-736.

Ilic, M., Zaalberg, I. C., Raaijmakers, J. A. & Medema, R. H., 2022. Life of double minutes: generation, maintenance, and elimination. *Chromosoma*, 131(3), pp. 107-125.

iprada, 2020. *iprada/ Circle-Map Circle Map Realign output files*. [Online] Available at: <https://github.com/iprada/Circle-Map/wiki/Circle-Map-Realign-output-files>
[Accessed 17 July 2020].

Jiang, R., Yang, M., Zhang, S. & Huang, M., 2023. Advances in sequencing-based studies of microDNA and ecDNA: Databases, identification methods, and integration with single-cell analysis.. *Computational and structural biotechnology journal*, Volume 21, pp. 3073-3080.

Jin, Y. et al., 2012. Novel Functional MAR Elements of Double Minute Chromosomes in Human Ovarian Cells Capable of Enhancing Gene Expression. *PloS one*, 2(7), p. e30419.

Karami Fath, M. et al., 2021. Extra chromosomal DNA in different cancers: Individual genome with important biological functions. *Critical reviews in oncology/hematology*, Volume 166, p. 103477.

Karami Fath, M. et al., 2022. Revisiting characteristics of oncogenic extrachromosomal DNA as mobile enhancers on neuroblastoma and glioma cancers. *Cancer cell international*, 22(1), p. 200.

Kaufman, R., Brown, P. & Schimke, R., 1979. Amplified dihydrofolate reductase genes in unstably methotrexate-resistant cells are associated with double minute chromosomes.. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(11), pp. 5669-5673.

Ο ρόλος των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

Khatami, F., Larijani, B. & Tavangar, S. M., 2018. The presence of tumor extrachromosomal circular DNA (ecDNA) as a component of liquid biopsy in blood. *Medical hypotheses*, Volume 114, pp. 5-7.

Kim, H. et al., 2020. Extrachromosomal DNA is associated with oncogene amplification and poor outcome across multiple cancers. *Nature genetics*, 17 August, 9(52), pp. 891-897.

Kobayashi, L. & Tan, A. C., 2023. Unraveling the Impact of Intratumoral Heterogeneity on EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in EGFR-Mutated NSCLC. *International journal of molecular sciences*, 24(4), p. 4126.

Koche, R. P. et al., 2020. Extrachromosomal circular DNA drives oncogenic genome remodeling in neuroblastoma. *Nature genetics*, 1(52), pp. 29-34.

Kohl, N. E. et al., 1983. Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas.. *Cell*, 35(2), pp. 359-367.

Kraft, K. et al., 2024. Enhancer activation from transposable elements in extrachromosomal DNA. *bioRxiv : the preprint server for biology*.

Kumata, P. et al., 2020. ATAC-seq identifies thousands of extrachromosomal circular DNA in cancer and cell lines. *Science Advances*, 15 May.

Levan, A. & Levan, G., 1978. Have double minutes functioning centromeres?. 1(88), pp. 81-92.

Liao, Z. et al., 2020. Classification of extrachromosomal circular DNA with a focus on the role of extrachromosomal DNA (ecDNA) in tumor heterogeneity and progression.. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1874(1), p. 188392.

Lin, C. et al., 2022. Encoding gene RAB3B exists in linear chromosomal and circular extrachromosomal DNA and contributes to cisplatin resistance of hypopharyngeal squamous cell carcinoma via inducing autophagy. *Cell death & disease*, 2(13), p. 171.

Lin, D. et al., 2023. MGA-seq: robust identification of extrachromosomal DNA and genetic variants using multiple genetic abnormality sequencing. *Genome Biol*, 24(1), p. 247.

Lin, M. S. et al., 2023. Transcriptional immune suppression and upregulation of double stranded DNA damage and repair repertoires in ecDNA-containing tumors. *Preprint. bioRxiv*..

Li, Z., Wang, B., Liang, H. & Han L., 2022. Pioneering insights of extrachromosomal DNA (ecDNA) generation, action and its implications for cancer therapy. *International Journal of Biological Sciences*, June, 18(10), pp. 4006-4025.

Ludi , Y. et al., 2022. Extrachromosomal circular DNA: biogenesis, structure, functions and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, october.

Ο ρόλος των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

Luebeck, J. et al., 2023. Extrachromosomal DNA in the cancerous transformation of Barrett's oesophagus.. *Nature*, 616(7958), pp. 798-805.

Madren, J. et al., 2023. A Standardized Protocol for Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy (SEM) to Visualize Extrachromosomal DNA (ecDNA). *BioRxiv*, August.

Moller, H. D., 2020. Circle-Seq: Isolation and Sequencing of Chromosome-Derived Circular DNA Elements in Cells. In: K. Hanada, ed. *DNA electrophoresis*. Japan: Humana Press, pp. 165-181.

Nathanson, D. A. et al., 2014. Targeted Therapy Resistance Mediated by Dynamic Regulation of Extrachromosomal Mutant EGFR DNA. *Science*, 6166(343), pp. 72-76.

National Library of Medicine, N., 2023. *SRX22914831 : PC3-CircleSeq*, s.l.: s.n.

Noer, J. et al., 2022. Extrachromosomal circular DNA in cancer: history, current knowledge, and methods.. *Trends in genetics : TIG*, 7(38), pp. 766-781.

Pai Coudhuri, S. et al., 2024. Acquired Cross-Resistance in Small Cell Lung Cancer due to Extrachromosomal DNA Amplification of MYC Paralogs. *Cancer Discov*, 14(5), pp. 804-827.

Pang, J. et al., 2021. Extrachromosomal DNA in HPV-Mediated Oropharyngeal Cancer Drives Diverse Oncogene Transcription.. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 27(24), pp. 6772-6786.

Pang, J. et al., 2021. Extrachromosomal DNA in HPV-Mediated Oropharyngeal Cancer Drives Diverse Oncogene Transcription. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 24(87), pp. 6772-6786.

Pecorino, L., Verhaak, R. & Henssen, A. M. P. (., 2022. Extrachromosomal DNA (ecDNA): an origin of tumor heterogeneity, genomic remodeling, and drug resistance.. *Biochemical Society transactions*, 50(6), pp. 1911-1920.

Pongor, L. S. S. C. W. R. L. W. D. R. C. E. T. N. F. G. D. P. Z. Y. B. S. H. N. V. N. G. J. G. R. Z. Y. N. S. V. R. S. L. G. C. C. J. M., 2023. Extrachromosomal DNA Amplification Contributes to Small Cell Lung Cancer Heterogeneity and Is Associated with Worse Outcomes. *Cancer discovery*, 13(4), pp. 928-949.

Purshouse, K. et al., 2022. Oncogene expression from extrachromosomal DNA is driven by copy number amplification and does not require spatial clustering in glioblastoma stem cells.. *eLife*, Volume 11.

Que, Z. et al., 2023. Dihydroartemisinin inhibits EMT of glioma via gene BASP1 in extrachromosomal DNA. *Biochemical and biophysical research communications*, Volume 675, pp. 130-138.

Qui, H., Shao, Z. Y., Wen, X. & Zhang, L., 2020. New insights of extrachromosomal DNA in tumorigenesis and therapeutic resistance of cancer.. *American journal of cancer research*, 10(12), pp. 4056-4065.

Ο ρόλος των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

Raymond, E. et al., 2001. Effects of hydroxyurea on extrachromosomal DNA in patients with advanced ovarian carcinomas.. *Clinical cancer research*, 6(7), pp. 1171-1180.

Robert, M. & Crasta, K., 2022. Breaking the vicious circle: Extrachromosomal circular DNA as an emerging player in tumour evolution. *Seminars in cell & developmental biology*, Volume 123, pp. 140-150.

Sadoska, L., Santos, C., Kalnina, Z. & Line, A., 2015. Biodistribution, Uptake and Effects Caused by Cancer-Derived Extracellular Vesicles. *Journal of circulating biomarkers*, 4(2).

Shiras, A. & Mondal, A., 2021. Extrachromosomal DNA: Redefining the pathogenesis of glioblastoma. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1876(1), p. 188551.

Shoshani, O. et al., 2021. Chromothripsis drives the evolution of gene amplification in cancer.. *Nature*, 7848(591), pp. 137-141.

Singer, M. J. et al., 2000. Amplification of the human dihydrofolate reductase gene via double minutes is initiated by chromosome breaks.. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 14(97), pp. 7921-7926.

Spindler, K.-L. et al., 2017. Cell-Free DNA in Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The oncologist*, 22(9), pp. 1049-1055.

Tsiakanikas, P. et al., 2024. Beyond the Chromosome: Recent Developments in Decoding the Significance of Extrachromosomal Circular DNA (eccDNA) in Human Malignancies. *Life*, 14(8).

Turner, K. et al., 2017. Extrachromosomal oncogene amplification drives tumour evolution and genetic heterogeneity. *Nature*, 543(7643), pp. 122-125.

Vogt, N. et al., 2004. Molecular structure of double-minute chromosomes bearing amplified copies of the epidermal growth factor receptor gene in gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 31(101), pp. 11368-11373.

Von Hoff, D. D. et al., 1988. Amplified human MYC oncogenes localized to replicating submicroscopic circular DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(13), pp. 4804-4808.

Wang, S. et al., 2024. Machine learning-based extrachromosomal DNA identification in large-scale cohorts reveals its clinical implications in cancer.. *Nature communications*, 15(1), p. 1515.

Wang, T., Zhang, H., Zhou, Y. & Shi, J., 2021. Extrachromosomal circular DNA: a new potential role in cancer progression. *Journal of translational medicine*, 19(1), p. 257.

Ο ρόλος των εξωχρωμοσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

Wang, Y., Huang, R., Zheng, G. & Shen, J., 2021. Small ring has big potential: insights into extrachromosomal DNA in cancer. *Cancer cell international*, 21(1), p. 236.

Wei, J. et al., 2020. The biogenesis and roles of extrachromosomal oncogene involved in carcinogenesis and evolution. *American journal of cancer research*, 10(11), pp. 3532-3550.

Wu, S., Bafna, V., Chang, H. & Mischel, P., 2022. Extrachromosomal DNA: An Emerging Hallmark in Human Cancer. *Annual review of pathology*, Volume 17, pp. 367-386.

Wu, S. et al., 2023. Extrachromosomal DNA (ecDNA): Unveiling its role in cancer progression and implications for early detection. *Heliyon*, 9(11), p. e21327.

Wu, S. et al., 2019. Circular ecDNA promotes accessible chromatin and high oncogene expression. *Nature*, November, 575(7784), pp. 699-703.

Xing, J. et al., 2021. Progress on the role of extrachromosomal DNA in tumor pathogenesis and evolution. *Clinical genetics*, 99(4), pp. 503-512.

Xu, K. et al., 2018. Structure and evolution of double minutes in diagnosis and relapse brain tumors. *Acta Neuropathol*, pp. 123-137.

Yi, E., Chamorro Gonzalez, R., Henssen, A. G. & Verhaak, R. G., 2022. Extrachromosomal DNA amplifications in cancer. *Nature reviews. Genetics*, 12(23), pp. 761-771.

Yi, E. et al., 2022. Live-Cell Imaging Shows Uneven Segregation of Extrachromosomal DNA Elements and Transcriptionally Active Extrachromosomal DNA Hubs in Cancer. *Cancer Discovery*, 12(2), pp. 468-483.

Yuan, X. Q. et al., 2024. Decoding the genomic enigma: Approaches to studying extrachromosomal circular DNA. *Heliyon*, 10(17), p. e36659.

Zhang, H. et al., 2024. Characterization and integrated analysis of extrachromosomal DNA amplification in hematological malignancies. *Neoplasia*, Volume 56.

Zhao, L., Jiang, Y., Lei, X. & Yang, X., 2023. Amazing roles of extrachromosomal DNA in cancer progression. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1878(1).

Zhao, X., Zhao, H. & Guo, Z., 2023. Methods, bioinformatics tools and databases in ecDNA research: An overview. *Computers in biology and medicine*, Volume 167, p. 107680.

Zhao, X. et al., 2021. Focal amplifications are associated with chromothripsis events and diverse prognoses in gastric cardia adenocarcinoma. 1(12), p. 6489.

Zhou, Y.-H. et al., 2017. The role of EGFR double minutes in modulating the response of malignant gliomas to radiotherapy. *Oncotarget*, 46(8), pp. 80853-80868.

Ο ρόλος των εξωχρωσωμικών μορίων DNA (ecDNAs) στην παθοφυσιολογία του καρκίνου

Zhu, Y., Gong, L. & Wei, C.-L., 2022. Guilt by association: EcDNA as a mobile transactivator in cancer.. *Trends in cancer*, 8(9), pp. 747-758.

Zhu, Y. et al., 2021. Oncogenic extrachromosomal DNA functions as mobile enhancers to globally amplify chromosomal transcription.. *Cancer cell*, 39(5), pp. 694-707.

Zivanovic, A. et al., 2023. Co-evolution of AR gene copy number and structural complexity in endocrine therapy resistant prostate cancer. *NAR cancer*, 5(3), p. zcad045.

Γρηγοράκη, Θ., 2017. *Μελέτη του ρόλου του γονιδίου TPL2 στην παθογένεια της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης*. Αθήνα: s.n.

Καλτσούλα, Α., 2021. *Αλληλούχιση νέας γενιάς NGS (next generation sequencing): Εφαρμογές στην ογκολογία και στην εξατομικευμένη θεραπεία ασθενών με καρκίνο*. Πάτρα: Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο.