



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

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΟΡΙΩΝ mRNA ΚΑΙ microRNA ΣΕ CD138+ ΚΥΤΤΑΡΑ
ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΥΣΚΡΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΘΕΡΑΠΕΥΟΝΤΑΙ ΜΕ
ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ**

ΛΙΟΣΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ-ANNA
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2019



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΟΡΙΩΝ mRNA ΚΑΙ microRNA ΣΕ CD138+ ΚΥΤΤΑΡΑ
ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΥΣΚΡΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΘΕΡΑΠΕΥΟΝΤΑΙ ΜΕ
ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ**

ΛΙΟΣΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ-ANNA
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2019



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

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ V

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΟΡΙΩΝ mRNA ΚΑΙ microRNA ΣΕ CD138+ ΚΥΤΤΑΡΑ
ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΥΣΚΡΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΘΕΡΑΠΕΥΟΝΤΑΙ ΜΕ
ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ**

ΛΙΟΣΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ-ANNA
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Δρ. Χρήστος Κοντός, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας,
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ: Δρ. Χρήστος Κοντός, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα
Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Σκορίλας Ανδρέας, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Σίδηρης Διαμάντης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Κοντός Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2019

*Στη μνήμη του πατέρα μου,
Κωνσταντίνου*

*Στη μαμά μου, Βασιλική
Στον αδερφό μου, Γιάννη*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο πλαίσιο του Δ.Π.Μ.Σ. «Κλινική Βιοχημεία- Μοριακή Διαγνωστική», υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Χρήστο Κοντό

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χρήστο Κοντό για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο χώρο του και την εμπιστοσύνη για την ανάθεση της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, αλλά και τη βοήθεια και τις συμβουλές του σε θεωρητικό αλλά και πειραματικό επίπεδο σε όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας. Τον ευχαριστώ, επίσης, για τις ουσιαστικές παρατηρήσεις που μου προσέφερε όσον αφορά τη συγγραφή της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας. Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον Καθηγητή και Διευθυντή του Τομέα κ. Ανδρέα Σκορίλα για τις συμβουλές και τις καίριες παρεμβάσεις του, καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α. κ. Διαμάντη Σίδηρη, για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν για την αξιολόγηση της παρούσας εργασίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Δρ. Μαργαρίτη Αυγέρη του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ, για τη συνεργασία και την καθοδήγησή του σε πειραματικό επίπεδο. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα Μάριο Διαμαντόπουλο και στην υποψήφια διδάκτορα Μαρίλια Παπαδημητρίου, για την αστείρευτη βοήθειά τους σε οτιδήποτε χρειαζόμουν αλλά και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας Ευχαριστώ επίσης την υποψήφια διδάκτορα Αριστίνα Παπανώτα για την άψογη συνεργασία μας και για τη συλλογή των δειγμάτων των ασθενών από τη Θεραπευτική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ και του Γενικού Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα», καθώς και την καταγραφή των κλινικοπαθολογικών δεδομένων. Ένα τεράστιο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη της ερευνητικής μονάδας του κ. Σκορίλα αλλά και του κ. Κοντού για το άριστο κλίμα. Ιδιαίτερα όμως, θέλω να ευχαριστήσω τις συναδέλφους μου, Εύα Καμουζά και Μαριάννα Καλιοράκη για την υπέροχη συνεργασία μας σε όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας αλλά κυρίως για την εμπιστοσύνη, τη συνεχή ενθάρρυνση, τη πολύτιμη βοήθεια καθώς επίσης και για την αγάπη και φυσικά τη στήριξή τους σε όλες τις στιγμές.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου και τους φίλους μου για την αμέριστη κατανόηση και υποστήριξη τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
Αίμα και Μυελός των οστών.....	5
1.2 Αιμοποίηση.....	7
Ανοσοσφαιρίνες.....	8
Δομή και λειτουργία ανοσοσφαιρινών.....	9
Ανασυνδυασμός των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών	10
Πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες.....	11
Πολλαπλό μυέλωμα	12
Μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (MGUS)	20
Έρπον πολλαπλό μυέλωμα (SMM)	21
Μακροσφαιριναιμία Waldenström's.....	22
microRNAs	22
Βιογένεση και Λειτουργίες των microRNAs.....	22
Ρόλος των microRNAs στον καρκίνο.....	25
Πολλαπλό μυέλωμα και microRNAs	27
1.5.4 Τα μόρια miR221 και miR222.....	28
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	32
Βιολογικό υλικό.....	32
Ομογενοποίηση και απομόνωση ολικού RNA	33
Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του απομονωμένου ολικού RNA.....	34
Πολυαδενυλίωση ολικού RNA	36
mRNA.....	36
microRNAs.....	37
Αντίστροφη μεταγραφή των μορίων mRNA και microRNAs για τη σύνθεση μονόκλωνου cDNA (reverse transcription, RT)	40

Αρχή Μεθόδου	40
Αντίστροφη μεταγραφή του mRNA	41
Αντίστροφη μεταγραφή miRNA	42
Αντίστροφη μεταγραφή με τυχαία εξαμερή.....	43
Συμβατική αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR)	44
Αρχή μεθόδου PCR	44
Γονίδια σταθερής έκφρασης (housekeeping genes)	45
2.6.3 Σχεδιασμός και σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές στη συμβατική PCR	47
Συμβατική PCR για το γονίδιο αναφοράς GAPDH	47
Συνθήκες αντίδρασης της συμβατικής PCR για το γονίδιο αναφοράς GAPDH	48
Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (quantitative real-time PCR, qPCR)	49
2.7.1. Αρχή μεθόδου.....	49
2.7.2 Ανίχνευση με το σύστημα SYBR Green I	51
2.7.3. Real-time PCR για το γονίδιο αναφοράς GAPDH.....	53
2.7.4 Real-time PCR για το γονίδιο αναφοράς HPRT1.....	53
Εκκινητές Real-time PCR για τη μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων των γονιδίων-στόχων	54
Εκκινητές Real-time PCR για τη μελέτη της έκφρασης του miR221 και του miR222 με γονίδιο αναφοράς το SNORD48 (RNU48).....	56
2.7.7 Συνθήκες αντίδρασης της ποσοτικής real-time PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA	57
Επάλληλη PCR (Nested PCR)	58
Αρχή Μεθόδου	58
Επάλληλη PCR για το γονίδιο αναφοράς GAPDH.....	59
2.8.3 Εκκινητές για τη μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων των γονιδίων-στόχων με επάλληλη PCR.....	60
2.8.4. Συνθήκες επάλληλης PCR του γονιδίου αναφοράς GAPDH και των γονιδίων-στόχων	62

Μέθοδοι ποσοτικοποίησης της γονιδιακής έκφρασης μέσω της Real Time qPCR αντίδρασης	
63	
Απόλυτη μέθοδος ποσοτικοποίησης	64
Σχετική μέθοδος ποσοτικοποίησης	65
Βιοστατιστική ανάλυση.....	67
2.10.1. Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των miR-221 και miR-222 με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα	68
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	69
Αξιολόγηση της ποιότητας και της συγκέντρωσης του απομονωμένου ολικού RNA απο φυσιολογικά δείγματα (CD138-) και απο δείγματα πολλαπλού μυελώματος (CD138+)	69
Εύρεση βέλτιστης συγκέντρωσης RNA	70
Αντίστροφη μεταγραφή ενός εύρους συγκεντρώσεων RNA απο διαδοχικές αραιώσεις.....	70
Ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς GAPDH για μελέτη έκφρασης mRNA στόχων και κατασκευή πρότυπης καμπύλης	71
Ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων GAPDH και HPRT1 σε εύρος συγκεντρώσεων RNA απο διαδοχικές αραιώσεις.....	73
Ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς <i>SNORD48 (RNU48)</i> για μελέτη έκφρασης miRNA στόχων και κατασκευή πρότυπης καμπύλης	75
Προσδιορισμός της ακριβής μάζας των cDNA μέ τη βοήθεια του Quibit	76
Έλεγχος της έκφρασης mRNA των γονιδίων αναφοράς <i>GAPDH</i> και <i>HPRT1</i>	79
Ενίσχυση του γονιδίου αναφοράς GAPDH με επάλληλη PCR (Nested PCR)	85
Ενίσχυση των γονιδίων στόχων με επάλληλη PCR (Nested PCR)	90
3.7 Ανάλυση της έκφρασης των miR-221 και miR-222 σε δείγματα πολλαπλού μυελώματος μέσω της ποσοτικής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time qPCR).....	93
Στατιστική ανάλυση	97
Περιγραφική στατιστική των μεταβλητών της μελέτης.....	97
Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του miR221 και του miR222 σε δείγματα πολλαπλού μυελώματος.....	101
Αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του miR221 και του miR222 και	

των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα.....	102
Διαχωρισμός των ασθενών με βάση τα επίπεδα έκφρασης του miR221 και του miR222 και σύγκριση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους.....	106
Προσδιορισμός της διαφοροδιαγνωστικής αξίας του επιπέδου έκφρασης του miR221 στο έρπον πολλαπλό μυέλωμα και στο συμπτωματικό πολλαπλό μυέλωμα	107
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	108
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	113

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

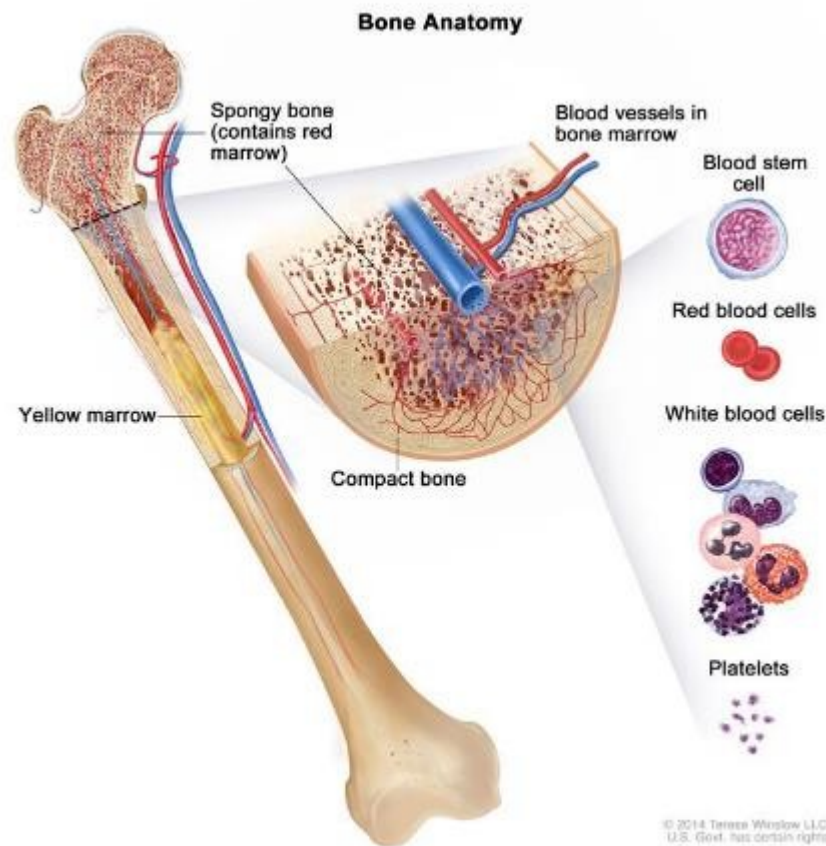
1.1. Αίμα και Μυελός των οστών

Το αίμα είναι ένας παχύρρευστος ιστός σε υγρή κατάσταση, ο οποίος κυκλοφορεί μέσα στα αιμοφόρα αγγεία και είναι ένα μέσο γρήγορης μεταφοράς μορίων ανάμεσα στα όργανα του πολυκύτταρου οργανισμού. Αποτελείται από ένα υγρό συστατικό, το πλάσμα καθώς και τα έμμορφα συστατικά του. Το πλάσμα έχει ξανθοκίτρινο χρώμα λόγω της χολερυθρίνης, περιέχει ένα μεγάλο αριθμό οργανικών ουσιών διαλυτών στο νερό, πρωτεΐνες κατά κύριο λόγο αλλά έχει και θρεπτικές ουσίες. Τα έμμορφα συστατικά διακρίνονται στα ερυθρά αιμοσφαίρια (ερυθροκύτταρα), τα λευκά αιμοσφαίρια (λευκοκύτταρα) και τα αιμοπετάλια (θρομβοκύτταρα) (**Σχήμα 1.1.**). Τα ερυθροκύτταρα είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά του οξυγόνου που προσλαμβάνεται από τους πνεύμονες και του διοξειδίου του άνθρακα που παράγεται από τα κύτταρα και δίνουν στο αίμα το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα του μέσω της αιμοσφαιρίνης που περιέχουν, μιας πρωτεΐνης που ενώνεται με το οξυγόνο μέσω των ατόμων του σιδήρου που περιέχει. Σύμφωνα με αυτό, γίνεται σύνδεση του οξυγόνου με την αιμοσφαιρίνη στους πνεύμονες, όπου εμφανίζεται και μεγάλη συγκέντρωση οξυγόνου, οπότε και δημιουργείται η *οξυαιμοσφαιρίνη*. Έτσι, είναι δυνατή η μεταφορά οξυγόνου στα τριχοειδή αγγεία, εκμεταλλευόμενη την ιδιότητα της οξυαιμοσφαιρίνης του να αποβάλλει εύκολα οξυγόνο. Τα λευκοκύτταρα (WBC), είναι τα κύτταρα του αίματος που είναι υπεύθυνα για την άμυνα του οργανισμού έναντι ξένων ή εαυτών αντιγόνων και τα αιμοπετάλια είναι υπεύθυνα για την πήξη του αίματος. Η παραγωγή των συστατικών αυτών πραγματοποιείται με τη διαδικασία της αιμοποίησης στο μυελό των οστών. Ο ρόλος τους αίματος είναι η μεταφορά O_2 , θρεπτικών ουσιών, θερμότητας κ.α., η απομάκρυνση CO_2 , προϊόντων του μεταβολισμού, τοξικών ουσιών, η διατήρηση της ομοιόστασης και φυσικά η άμυνα του οργανισμού [1].



Σχήμα 1.1. Τα συστατικά του αίματος

Ο μυελός των οστών είναι ο σπογγώδης ιστός που γεμίζει τις κοιλότητες των οστών. Είναι "εργοστάσιο" παραγωγής αιμοσφαιρίων [2]. Ένα οστό αποτελείται από συμπαγή οστά, σπογγώδη οστά και το μυελό των οστών. Ο μυελός των οστών βρίσκεται στο κέντρο των περισσότερων οστών και έχει πολλά αιμοφόρα αγγεία. Χωρίζεται σε ένα αγγειώδες και ένα μη αγγειώδες μέρος. Το αγγειώδες τμήμα, του μυελού περιέχει αγγεία που εφοδιάζουν τον μυελό με θρεπτικά στοιχεία και μεταφέρουν αρχέγονα και ώριμα κύτταρα του αίματος στην κυκλοφορία. Το μη αγγειώδες τμήμα του, αποτελεί το σημείο που πραγματοποιείται η αιμοποίηση και περιλαμβάνει πρόδρομα κύτταρα του αίματος, λιπώδη κύτταρα, λευκά αιμοσφαίρια και δικτυωτό συνδετικό ιστό [3]. Υπάρχουν δύο τύποι μυελού των οστών: κόκκινο και κίτρινο. Ο κόκκινος μυελός περιέχει βλαστοκύτταρα του αίματος που μπορούν να γίνουν ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια ή αιμοπετάλια. Ο κίτρινος μυελός παράγεται κυρίως από λίπος (**Σχήμα 1.2**). Τα λεμφοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών, αλλά ωριμάζουν στο θύμο αδένα και τα περιφερικά λεμφικά όργανα [4]. Εκατομμύρια ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων παράγονται κάθε δευτερόλεπτο. Τα λευκά αιμοσφαίρια ζουν μόνο για λίγες ώρες. Τα αιμοπετάλια ζουν για λίγες ημέρες. Λόγω της τόσο μικρής διάρκειας ζωής των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων δεν μπορούν εύκολα να αντικατασταθούν με μετάγχιση αίματος.

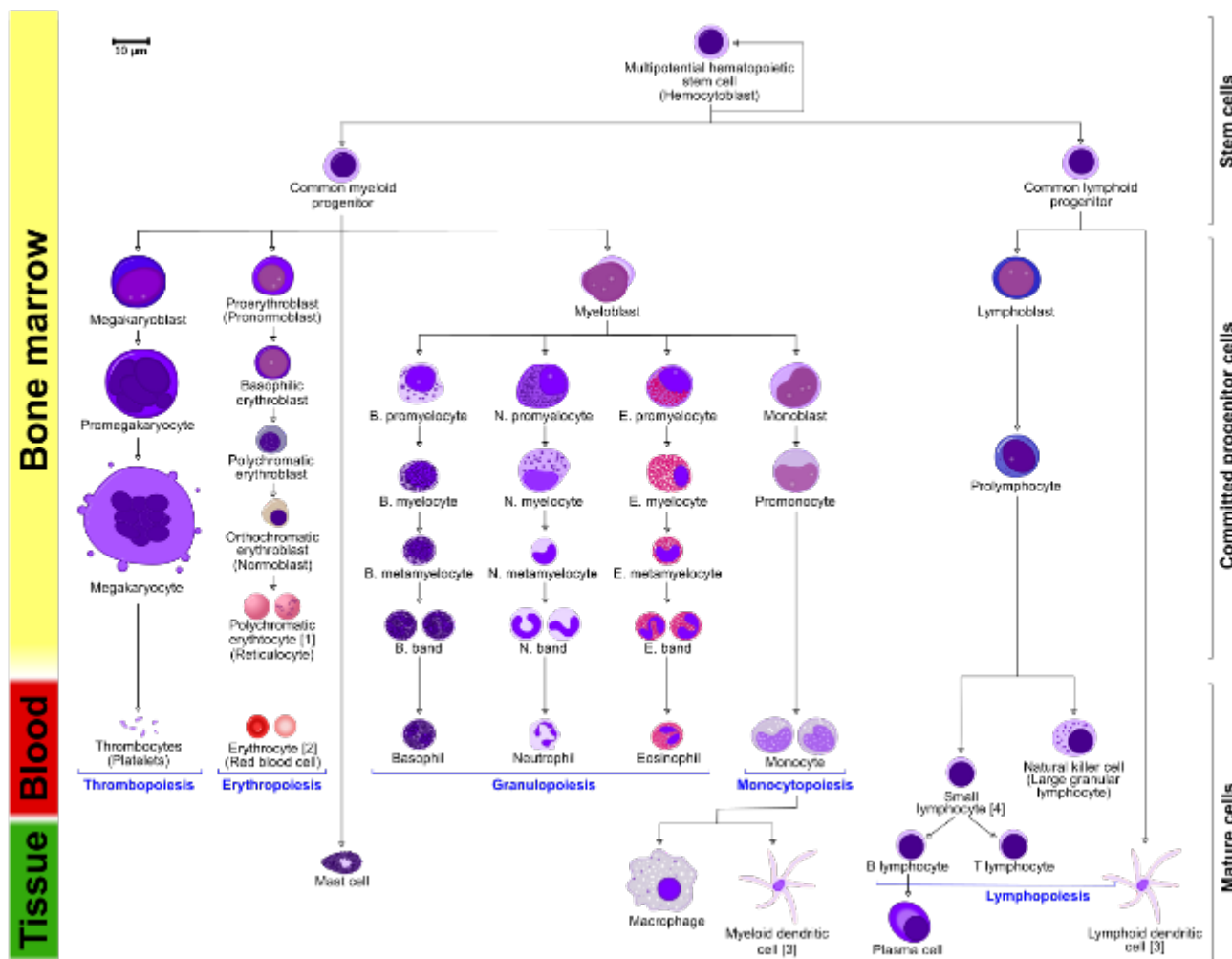


Σχήμα 1.2. Ανατομία του οστού.

1.2 Αιμοποίηση

Αιμοποίηση είναι το σύνολο εκείνων των διεργασιών που απαιτούνται για τον σχηματισμό των κυττάρων του αίματος. Κατά την εμβρυϊκή περίοδο, η αιμοποίηση συντελείται αρχικά σε νησίδες αιμοποιητικών κυττάρων, που εμφανίζονται στο λεκιθικό σάκο του εμβρύου. Αργότερα, από τον 3ο μέχρι τον 6ο μήνα κύησης η αιμοποίηση πραγματοποιείται στο σπλήνα και στο ήπαρ, ενώ ο μυελός των οστών αναλαμβάνει αυτή τη δραστηριότητα με τη γέννηση [4]. Όλα τα κύτταρα του αίματος προέρχονται από τη διαφοροποίηση ενός αρχέγονου πολυδύναμου αιμοποιητικού κυττάρου (multipotential hematopoietic stem cell). Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs) βρίσκονται στο μυελό των οστών και έχουν τη μοναδική ικανότητα να δημιουργούν όλους τους διαφορετικούς τύπους και ιστούς ώριμων κυττάρων του αίματος [5]. Τα HSCs είναι αυτοανανεούμενα κύτταρα όταν διαφοροποιούνται, τουλάχιστον μερικά από τα θυγατρικά τους κύτταρα παραμένουν ως HSCs, έτσι ώστε η δεξαμενή των βλαστικών κυττάρων δεν εξαντλείται. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται ασύμμετρη διαίρεση [6].

Στα αρχικά στάδια της αιμοποίησης, ένα πολυδύναμο κύτταρο HSC μπορεί να ακολουθήσει δύο διαφορετικά μονοπάτια διαφοροποίησης, δίνοντας γένεση είτε σε ένα λεμφοειδές προγονικό κύτταρο (lymphoid progenitor cells, CLP) είτε σε ένα μυελοειδές προγονικό κύτταρο (myeloid-erythroid progenitor cells, CMEP). Τα μυελοειδή και λεμφοειδή προγονικά κύτταρα μπορούν να ακολουθήσουν οποιαδήποτε από τις άλλες οδούς διαφοροποίησης που οδηγούν στην παραγωγή ενός ή περισσότερων συγκεκριμένων τύπων κυττάρων του αίματος, αλλά δεν μπορούν να αυτοανανεωθούν [7]. Για την παραγωγή των ώριμων ερυθροκυττάρων ακολουθείται η διαδικασία της ερυθροποίησης. Τα ερυθροκύτταρα προέρχονται από ένα κύτταρο γνωστό ως προερυθροβλάστη. Στη συνέχεια παράγεται η βασεόφιλη ερυθροβλάστη, η πολυχρωματόφιλη ερυθροβλάστη και η ορθοχρωματική ερυθροβλάστη, η οποία με αποβολή του πυρήνα θα δώσει τα δικτυοερυθροκύτταρα και τα ώριμα ερυθροκύτταρα [8]. Τα λευκοκύτταρα διακρίνονται σε πολυμορφοπύρρηνα κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα) και μονοπύρρηνα άκοκκα κύτταρα που ανήκουν τα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα. Τα πολυμορφοπύρρηνα κοκκιοκύτταρα προέρχονται από το μητρικό κύτταρο μυελοβλάστη, το οποίο διαφοροποιείται σε προμυελοκύτταρο, μυελοκύτταρο και τελικά σε μεταμυελοκύτταρο. Το τελευταίο θα διαφοροποιηθεί σε ουδετερόφιλο, ηωσινόφιλο και βασεόφιλο. Τα μονοπύρρηνα επίσης προέρχονται από το μυελοβλάστη αλλά διαφοροποιείται σε μονοβλάστη και προμονοκύτταρο. Τα πολυμορφοπύρρηνα κοκκιοκύτταρα καθώς και τα μονοκύτταρα προέρχονται από διαφοροποίηση προγονικού κυττάρου της μυελικής σειράς και η τελική διαφοροποίηση γίνεται στο μυελό των οστών. Τα λεμφοκύτταρα προέρχονται από προγονικό κύτταρο της λεμφικής σειράς τη λεμφοβλάστη το οποίο διαφοροποιείται σε πρόλεμφοκύτταρο και στη συνέχεια στα μικρά λεμφοκύτταρα (B- λεμφοκύτταρα και T-λεμφοκύτταρα) και μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα (Natural kill cell , NK cell). Η διαφοροποίηση αυτή γίνεται κυρίως στους λεμφαδένες . Τα B-λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται τελικώς σε πλασματοκύτταρα CD138⁺. Τα αιμοπετάλια (ή θρομβοκύτταρα) είναι μικρά κυτταρικά τμήματα των μεγακαρυοκυττάρων. Προέρχονται από τη μεγακαρυοβλάστη, η οποία εξελίσσεται σε προμεγακαρυοκύτταρο και τελικά σε μεγακαρυοκύτταρο. Από το κυτταρόπλασμα του μεγακαρυοκυττάρου αποσπώνται απύρρηνα τμήματα, τα αιμοπετάλια τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αιμόσταση και την πήξη του αίματος (Σχήμα 1.3.) [1].



Σχήμα 1.3. Παραγωγή ώριμων κυττάρων του αίματος

Ανοσοσφαιρίνες

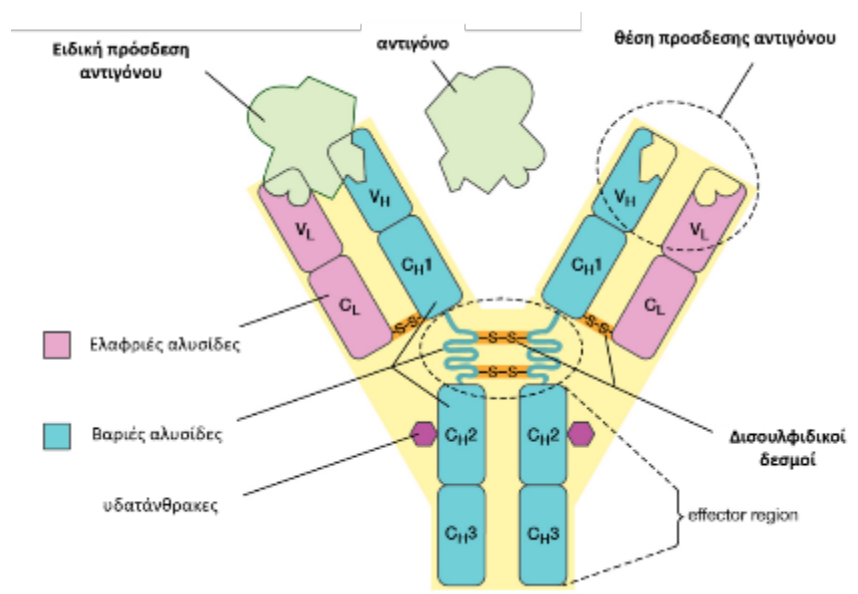
Οι ανοσοσφαιρίνες (Ig) ή αντισώματα (Ab) είναι γλυκοπρωτεΐνες σχήματος Y που παράγονται κυρίως από τα Β-λεμφοκύτταρα (κύτταρα πλάσματος) και χρησιμοποιούνται από το ανοσοποιητικό σύστημα ως απάντηση προς το αντιγόνο για την εξουδετέρωση των παθογόνων όπως τα παθογόνα βακτήρια και οι ιοί [9]. Εντοπίζονται είτε στην επιφάνεια της μεμβράνης τους, ως υποδοχείς για το αντιγόνο, είτε ελεύθερες υπό διαλυτή μορφή στο πλάσμα, παραγόμενες από τα διεγερμένα Β-λεμφοκύτταρα [10]. Η πρόσδεση των αντιγόνων με τις ανοσοσφαιρίνες της κυτταρικής μεμβράνης των Β-λεμφοκυττάρων συνιστά τη φάση αναγνώρισης της χυμικής ανοσιακής απάντησης, η οποία επάγει τον πολλαπλασιασμό των Β-λεμφοκυττάρων και την ωρίμανσή τους σε πλασματοκύτταρα, τα οποία παράγουν ανοσοσφαιρίνες, ενώ η πρόσδεση των ελεύθερων ανοσοσφαιρινών με το αντιγόνο το εξουδετερώνει. Στον ανθρώπινο οργανισμό παράγονται καθημερινά 10^7 Β-κύτταρα, με διαφορετική αντιγονική ειδικότητα.

Δομή και λειτουργία ανοσοσφαιρινών

Κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης αποτελείται από δύο βαριές όμοιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες (Heavy-H), μοριακού βάρους (MB) 55-70 kD η καθεμία, και δύο όμοιες ελαφρές πολυπεπτιδικές αλυσίδες (Light-L), MB 24 kD η καθεμία, οι οποίες συνδέονται σε σχηματισμό σχήματος Y. Είναι γενετικά κωδικοποιημένες σε τρεις θέσεις:

- Τη θέση της βαριάς ανοσοσφαιρίνης (IgH) στο χρωμόσωμα 14, που περιέχει γονιδιακά τμήματα για την βαριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης.
- Τη θέση της κ ανοσοσφαιρίνης (Igk) στο χρωμόσωμα 2, που περιέχει γονιδιακά τμήματα για το τμήμα της ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης.
- Τη θέση της λ ανοσοσφαιρίνης (Igl) στο χρωμόσωμα 22, που περιέχει τα γονιδιακά τμήματα για το υπόλοιπο της ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης.

Το μόριο του αντισώματος έχει δυο διακριτές λειτουργίες. Η πρώτη είναι η ειδική πρόσδεση στους αντιγονικούς επιτόπους που προκαλεί την ανοσιακή απάντηση, ενώ η δεύτερη είναι η επιστράτευση άλλων κυττάρων και μορίων για την καταστροφή του αντιγόνου μετά την πρόσδεση του αντισώματος σε αυτό. Τα αντισώματα και των δύο αλυσίδων αποτελούνται από μία μεταβλητή περιοχή (V variable region), στην οποία προσδέονται διαφορετικά αντιγόνα λόγω της μεγάλης ποικιλότητας των μεταβλητών περιοχών, μια σταθερή περιοχή (C constant region) για την ενεργοποίηση των μηχανισμών ανοσίας, η οποία δεν εμφανίζει ποικιλομορφία και από συνδετικές περιοχές (J, joining) [11]. Οι βαριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών αποτελούνται και από μία άλλη περιοχή ποικιλότητας (D, diverse). Οι βαριές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς και κάθε μία από αυτές συνδέεται με μία από τις ελαφρές με έναν δισουλφιδικό δεσμό [12, 13]. Έτσι σχηματίζεται ένα συμμετρικό H_2L_2 μόριο. (Σχήμα 1.4.)

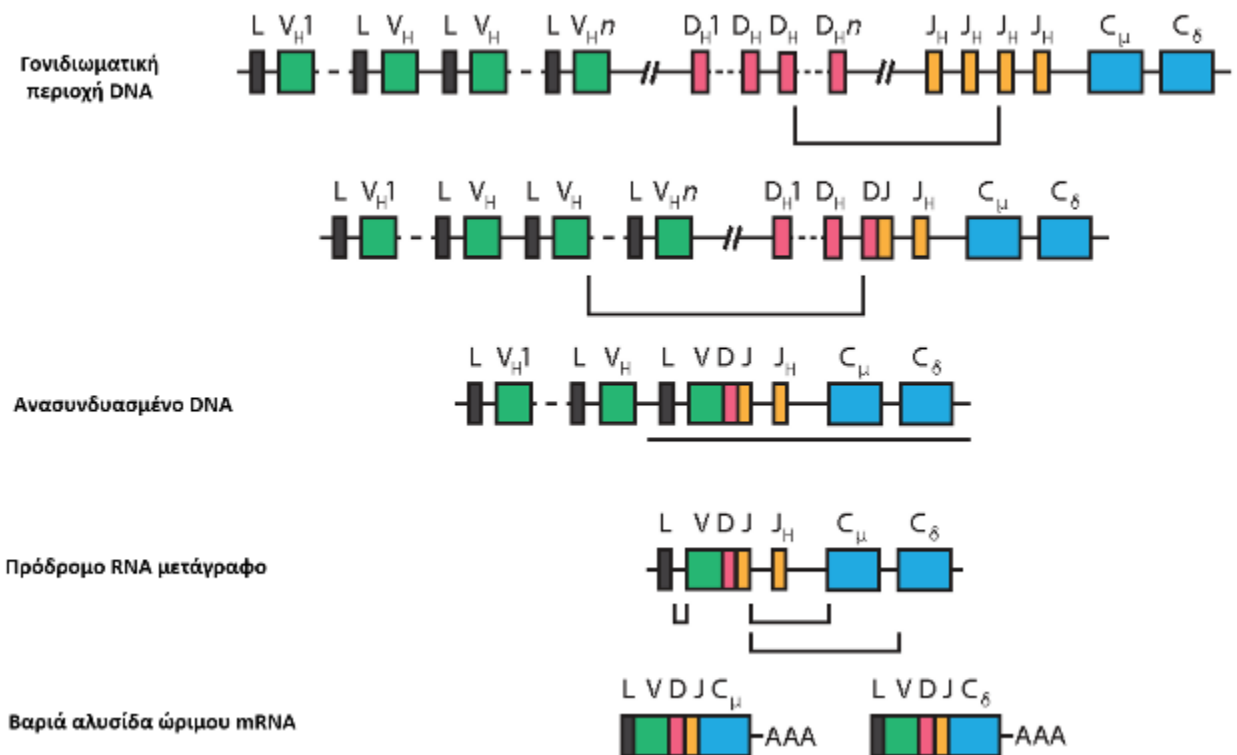


Σχήμα 1.4. Δομή ανοσοσφαιρινών

Οι βαριές αλυσίδες διακρίνονται σε πέντε ισοτύπους γ, α, μ, δ και ε διαφορετικών δομών της σταθερής περιοχής, που καθορίζουν τις πέντε τάξεις των ανοσοσφαιρινών IgG, IgA, IgM, IgD και IgE, καθεμία από τις οποίες καθορίζει διαφορετική λειτουργία του αντισώματος στην ανοσολογική απάντηση [13]. Οι ελαφριές αλυσίδες έχουν δύο ισοτύπους (κ και λ) που διαχωρίζονται λειτουργικά σε μία μεταβλητή (V) και μία σταθερή περιοχή (C) [14].

Ανασυνδυασμός των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών

Η ωρίμανση των φυσιολογικών B λεμφοκυττάρων σε ώριμα πλασματοκύτταρα περιλαμβάνει τον ανασυνδυασμό των γονιδίων Ig με συνακόλουθη σωματική μεταλλαγή των μεταβλητών περιοχών (V). Στο πρώτο στάδιο ανασυνδυασμού ενώνονται δύο γονιδιακά τμήματα της βαριάς αλυσίδας DH και JH και στα δύο χρωμοσώματα 14. Στο δεύτερο στάδιο γίνεται η σύνδεση του VH με το σύμπλοκο DH/JH επί του ενός χρωμοσώματος 14, για το σχηματισμό ενός λειτουργικού γονιδίου που θα παράγει τη μεταβλητή περιοχή των μ και δ ισοτύπων βαριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών. Η μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας της Ig (VH) προέρχεται από τρία ξεχωριστά τμήματα γονιδίων που κωδικοποιούνται από τις αλληλουχίες της μεταβλητής περιοχής (variable, V) (VH) και των περιοχών ποικιλότητας (diversity D) (DH) και σύνδεσης (joining J) (JH) (**Σχήμα 1.5.**). Για την ελαφριά αλυσίδα, η μεταβλητή περιοχή αποτελείται από μεταβλητά τμήματα των γονιδίων κάπα ή λάμδα που συνδέονται με τα τμήματα σύνδεσης (JH). Ο ανασυνδυασμός του γονιδίου V εξαρτάται από τις πρωτεϊνικές υπομονάδες των γονιδίων που ενεργοποιούν το σύμπλοκο της V(D)J ρεκομπινάσης (RAG1, RAG2), η οποία στη συνέχεια αναγνωρίζει και διασπά αλληλουχίες σημάτων ανασυνδυασμού των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών) [15, 16]. Μετά τον ανασυνδυασμό των μεταβλητών περιοχών και μέσα από μία διαδικασία γνωστή ως ισοτυπική μεταστροφή, καθορίζονται οι ισοτυπικές μορφές των βαριών αλυσίδων. Η διαδικασία της μεταγραφής κατά τη διαφοροποίηση του B-λεμφοκυττάρου παράγει το εξόνιο VHDHJH. Ανάλογα με το σημείο που θα γίνει η συρραφή του RNA (RNA splicing) Τα γονίδια Cμ και Cδ βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους, ως εκ τούτου, το εξόνιο μπορεί να ενωθεί συγχρόνως με τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τα Cμ Cδ ή εναλλάξ με το κάθε γονίδιο χωριστά δίνοντας δύο διαφορετικά mRNA τα οποία έχουν το ίδιο VH. Όταν το VH ενώνεται με το Cμ δίνει μια μ βαριά αλυσίδα, ενώ όταν ενώνεται με το Cδ δίνει μια δ βαριά αλυσίδα. Όταν αυτές ενώνονται με μία ελαφριά (L) αλυσίδα κ ή λ, τότε παράγονται ένα μόριο IgM και ένα μόριο IgD αντίστοιχα που φέρονται στη μεμβράνη του κυττάρου [17]. Κατά τη διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων, η βαριά αλυσίδα μ εκφράζεται πρώτη και ακολουθείται από την αλυσίδα δ. Η διαδικασία της αναδιάταξης του VDJ γονιδίου και της μεταστροφής ισοτύπου επιτρέπει σε ένα κλώνο B λεμφοκυττάρων να παράγει αντισώματα διαφορετικών τάξεων βαριάς αλυσίδας κατά του ίδιου αντιγονικού επιτόπου. Η αναδιάταξη των γονιδίων Ig κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των B λεμφοκυττάρων είναι συνεχής, και προκύπτει σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης. Τα γονίδια των βαριών αλυσίδων υφίστανται αναδιάταξη πριν από τα γονίδια των ελαφριών αλυσίδων [18].



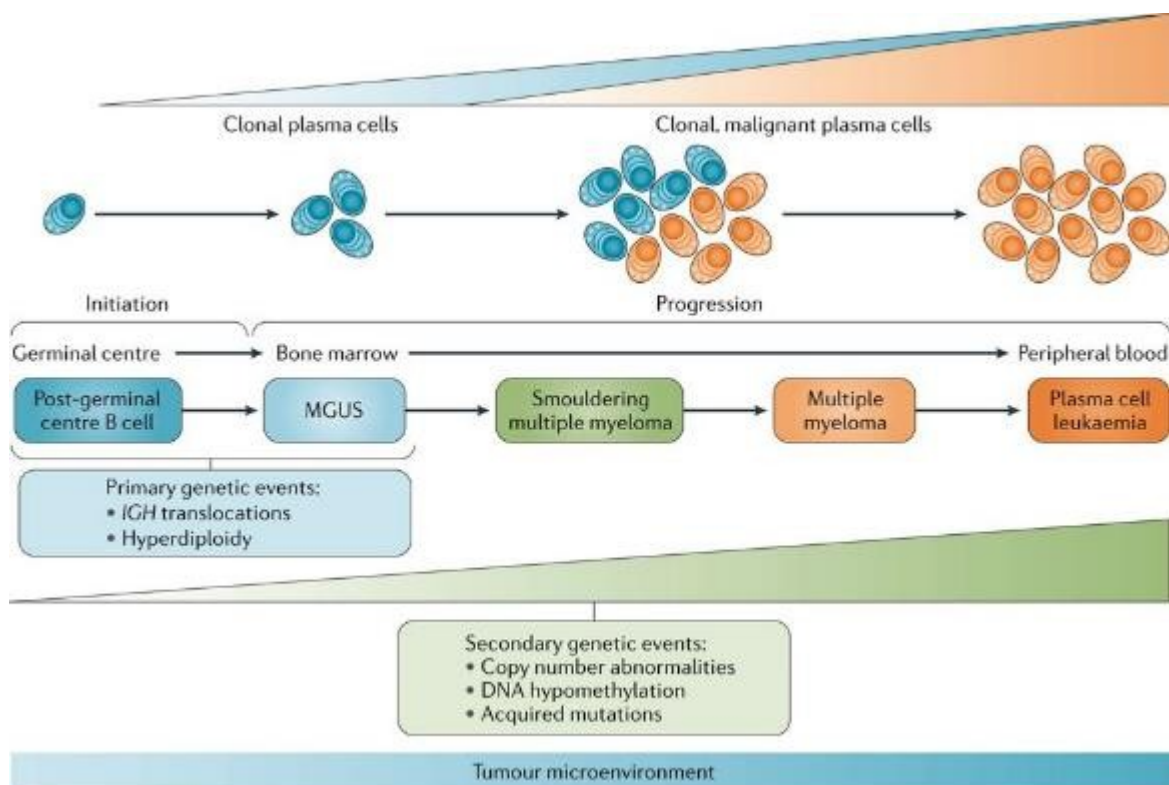
Σχήμα 1.5. Ωριμα mRNA που προέκυψαν από τον VDJR ανασυνδυασμό για τους δύο ισότύπους μ και δ των σταθερών περιοχών των βαριών αλυσίδων

Πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες

Οι πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες (PCD) αποτελούν ένα ευρύ φάσμα αιματολογικών παθήσεων που χαρακτηρίζονται από τον κλωνικό πολλαπλασιασμό και τη συσσώρευση κυττάρων που παράγουν μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες (ολόκληρες ή τμήματα αυτών). Τα κύτταρα έχουν συνήθως μορφολογία πλασματοκυττάρων αλλά μπορεί να έχουν λεμφοκυτταρική ή λεμφοπλασμοκυτταρική μορφολογία. Περιλαμβάνουν το πολλαπλό μυέλωμα (MM), τη μονοκλωνική γαμμαπάθεια απροσδιόριστης σημασίας (MGUS), το «έρπον» μυέλωμα (smoldering MM), τη λευχαιμία από πλασματοκύτταρα (plasma cell leukemia), τη μακροσφαιριναιμία Waldenström's, το σύνδρομο POEMS, τις παθήσεις εκ βαρέων αλύσων (heavy chain diseases), τις παθήσεις εξ ελαφρών αλύσων (light chain diseases), την αμυλοείδωση, το πλασματοκύττωμα και την κρυσφαιριναιμία.

Πολλαπλό μυέλωμα

Το πολλαπλό μυέλωμα ορίζεται ως κακοήθεια των τελικώς διαφοροποιημένων Β-λεμφοκυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος πλασματοκυττάρων και είναι η δεύτερη πιο συνηθισμένη αιματολογική κακοήθεια μετά από λέμφωμα non-Hodgkin [19]. Τα κακοήθη πλασματοκύτταρα (μυελωματικά), κατά κύριο λόγο βρίσκονται στο μυελό των οστών, αλλά μπορούν επίσης να παρατηρηθούν στο περιφερικό αίμα και σε άλλες εξωμυελικές θέσεις, όπως οι μαλακοί ιστοί και όργανα, ειδικότερα σε μεταγενέστερα στάδια της νόσου. Αλληλεπιδρούν με τα στρωματικά κύτταρα με σκοπό την ανάπτυξη και την επιβίωσή τους [20]. Το πολλαπλό μυέλωμα χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των πλασματοκυττάρων του μυελού και στους περισσότερους ασθενείς από την έκκριση μίας μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης (γνωστή ως πρωτεΐνη Μ ή μονοκλωνική πρωτεΐνη IgM), η οποία παράγεται από τα μη φυσιολογικά πλασματοκύτταρα (μυελωματικά) στο αίμα ή τα ούρα. Ωστόσο στο 15-20% των ασθενών, εκκρίνονται μόνο ελεύθερες ελαφριές αλυσίδες της μονοκλωνικής πρωτεΐνης και στο <3% των ασθενών, δεν εκκρίνεται μονοκλωνική πρωτεΐνη [21] [22]. Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου επηρεάζονται από την παρουσία της μονοκλωνικής πρωτεΐνης, τα κακοήθη κύτταρα ή τις κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα κακοήθη κύτταρα και την ύπαρξη ενδείξεων βλάβης των οργάνων όπως η υπερασβεστιαμία, η νεφρική ανεπάρκεια, η αναιμία και η οστική νόσος με λυτικές αλλοιώσεις των οστών ή κατάγματα τα οποία είναι γνωστά ως κριτήρια διάγνωσης CRAB (Calcium, Renal, Anemia, Bone) [23]. Το πολλαπλό μυέλωμα ανήκει σε ένα σύνολο διαταραχών που αναφέρονται ως μονοκλωνικές γαμμαπάθειες. Η ανάπτυξη του μυελώματος εξαρτάται από μία σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων ανάπτυξης, των μορίων πρόσδεσης και άλλων παραγόντων στο μικροπεριβάλλον του κυττάρου [24] και περιλαμβάνει μια διεργασία με διαδοχικά στάδια εξαλλαγής των πλήρως διαφοροποιημένων πλασματοκυττάρων από τη φυσιολογική κατάσταση στην παθολογική κατάσταση της μονοκλωνικής γαμμαπάθειας (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS) και κατ' επέκταση του ΠΜ. Η συνηθέστερη διαταραχή των μονοκλωνικών γαμμαπαθειών είναι η μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (MGUS), η οποία χαρακτηρίζεται από τη διήθηση του μυελού των οστών από τα κλωνικά πλασματοκύτταρα και την έκκριση της μονοκλωνικής πρωτεΐνης. Το MGUS είναι ασυμπτωματικό και προηγείται της ανάπτυξης πολλαπλού μυελώματος, με ή χωρίς ένα προσδιορισμένο παρεμβατικό στάδιο, που αναφέρεται ως έρπων πολλαπλό μυέλωμα (SMM smouldering multiple myeloma) [25-28] (**Σχήμα 1.6.**). Σχεδόν το 15% των ασθενών με MGUS θα προχωρήσει σε πολλαπλό μυέλωμα και το 20% θα προχωρήσει σε πολλαπλό μυέλωμα ή σε συγγενείς καταστάσεις (όπως AL αμυλοείδωση, μακροσφαιριναιμία Waldenström's ή λεμφοπολλαπλασιαστική διαταραχή) πάνω από 25 χρόνια. Στο πρώτο στάδιο τα κύτταρα δε μετασχηματίζονται αλλά καταλήγουν σε απόπτωση και συνεπώς δεν προκαλούνται αλλοιώσεις στα οστά. Ακολουθεί το στάδιο του ενδομυελικού μυελώματος κατά το οποίο τα κύτταρα υπό την διέγερση της δραστηριότητας των οστεοκλαστών μετασχηματίζονται, πολλαπλασιάζονται με μεγάλη ταχύτητα και συσσωρεύονται στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών προκαλώντας οστικές αλλοιώσεις. Η διέγερση των οστεοκλαστών οφείλεται στην επίδραση των παραγόμενων κυτταροκινών [29, 30]. Πιστεύεται ότι ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση των κυττάρων του ΠΜ, η οστεοκλαστική δραστηριότητα και η αγγειογένεση υποστηρίζονται από ένα δίκτυο κυτταροκινών και υποδοχέων των κυτταροκινών όπως IL-6.



Σχήμα 1.6. Τα στάδια μέχρι την εμφάνιση του πολλαπλού μυελώματος, από τις πρόδρομες ασθένειες, όπως η μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (MGUS) και το έρπον πολλαπλό μυέλωμα (SMM) και [31]

Επιδημιολογία

Το πολλαπλό μυέλωμα ευθύνεται για το 1,7% των κακοηθειών και το 10% των αιματολογικών κακοηθειών στις Ηνωμένες Πολιτείες το 2017. Σε παγκόσμιο επίπεδο, η συχνότητα εμφάνισης του ΠΜ ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών φυλών και είναι υψηλότερη στις πιο ανεπτυγμένες χώρες, όπως οι Ηνωμένες Πολιτείες, η δυτική Ευρώπη και η Αυστραλία. Η υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης ανεπτυγμένες χώρες πιθανόν οφείλεται στη διαθεσιμότητα καλύτερων διαγνωστικών τεχνικών, καθώς και της μεγαλύτερης κατανόησης της νόσου σε κλινικό επίπεδο. Η επίπτωση του πολλαπλού μυελώματος είναι 2 έως 3 φορές υψηλότερη στους Αφρο-Αμερικανούς από ό, τι στους Καυκάσιους [32], αλλά είναι χαμηλότερη στον Ασιατικό και τον Ισπανικό πληθυσμό [33].

Η συχνότητα του πολλαπλού μυελώματος αυξάνεται με την ηλικία ιδιαίτερα μετά την ηλικία των 40 ετών και είναι υψηλότερη στους άνδρες [34]. Λιγότερο από το 3% των ασθενών βρέθηκε ότι είναι ηλικίας μικρότερης των 40 ετών [35].

Αιτιολογία

Τα αίτια ανάπτυξης του πολλαπλού μυελώματος είναι άγνωστα. Παρόλα αυτά απο διάφορες μελέτες έχουν αξιολογηθεί πιθανοί περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες κινδύνου για αυτή την ασθένεια. Ανάμεσα στους περιβαλλοντικούς παράγοντες η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία βρέθηκε ότι πιθανόν σχετίζεται με τον κίνδυνο ανάπτυξης του ΠΜ. Σε μία μελέτη που έγινε, η συχνότητα εμφάνισης πολλαπλού μυελώματος αυξήθηκε τρεις φορές μεταξύ των ατόμων που έλαβαν ακτινοβολία $\geq 0,5$ Gy σε σύγκριση με άτομα ελέγχου, για περισσότερα από 20 χρόνια μετά την έκθεση σε ατομικές βόμβες στη Hiroshima και το Nagasaki [36]. Αντιθέτως, μια πιο πρόσφατη ανάλυση των δεδομένων από το 1950 έως το 1987 με 2.778.000 άτομα, έδειξε ότι τα άτομα με έκθεση σε ακτινοβολία < 4 Gy δεν είχαν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης πολλαπλού μυελώματος, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα άτομα. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ένας αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης πολλαπλού μυελώματος μετά από έκθεση σε ατομικές βόμβες έχει λίγα αποδεικτικά στοιχεία [37]. Επιπλέον, μια μεγάλη μετα-ανάλυση στοιχείων από τους αγρότες στις κεντρικές Ηνωμένες Πολιτείες ανέφερε αυξημένο σχετικό κίνδυνο, αλλά εάν ο αυξημένος αυτός κίνδυνος σχετίζεται με την έκθεση σε φυτοφάρμακα, διαλύτες, μολυσματικούς παράγοντες ή άλλους παράγοντες, δεν ήταν δυνατόν να καθοριστεί [38]. Έχουν μελετηθεί και άλλες εκθέσεις στο βενζόλιο, σε χημικά και προϊόντα πετρελαίου, αλλά υπάρχουν ελάχιστα αποδεικτικά στοιχεία για την υποστήριξη αιτιώδους συνάφειας με την ανάπτυξη πολλαπλού μυελώματος [39]. Απο την ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-wide association studies GWAS) έχουν εντοπιστεί πολλοί γενετικοί τόποι που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης του ΠΜ. Επιπλέον οι τόποι αυτοί σχετίζονται με την αυξημένη θνησιμότητα σε διαγνωσμένους ασθενείς. Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετοί πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (single-nucleotide polymorphisms SNPs) οι οποίοι θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση του MYC (η οποία συμβάλλει στην εξέλιξη του πολλαπλού μυελώματος). Επιπλέον σε άλλες αναλύσεις GWAS έχουν εντοπιστεί τόπους που σχετίζονται με κατώτερη επιβίωση (όπως 6p25 και 16p13) σε ασθενείς [40] [41].

Μηχανισμός / Παθοφυσιολογία

Τα πλασματοκύτταρα αναπτύσσονται από τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, τα οποία υπόκεινται σε διάφορα στάδια διαφοροποίησης στο μυελό των οστών και στους λεμφαδένες για την παραγωγή των Β-κυττάρων και τελικά των πλασματοκυττάρων. Στο μυελό των οστών τα ανώριμα Β-κύτταρα υφίστανται V(D)J ανασυνδυασμό για την παραγωγή των διαφορετικών ανοσοσφαιρινών [42]. Τα Β-κύτταρα με το σύμπλεγμα IgH- IgL(Β-κυτταρικοί υποδοχείς) στην επιφάνεια των κυττάρων μεταναστεύουν στους λεμφαδένες ή στη σπλήνα όπου εκεί εκτελούνται διαδικασίες όπως ωρίμανση συγγένειας, σωματικές υπερμεταλλάξεις και ανασυνδυασμοί με σκοπό την παραγωγή αντισωμάτων με υψηλή συγγένεια ως προς ειδικά αντιγόνα με διαφορετικές ιδιότητες (διαφορετικές ανοσοσφαιρίνες). Η θραύση στη διπλή έλικα του DNA απαιτείται για τον ανασυνδυασμό στον γενετικό τόπο της ανοσοσφαιρίνης και τις σωματικές υπερμεταλλάξεις. Παρ'όλα αυτά τα θραύσματα DNA μπορεί να ενωθούν με άλλα θραύσματα του γονιδιώματος οδηγώντας σε μη φυσιολογικές συντήξεις του DNA και χρωμοσωμικές μετατοπίσεις.

Οι περισσότερες από αυτές τις χρωμοσωμικές μετατοπίσεις δεν έχουν σημασία, καθώς αυτά τα κύτταρα δεν παράγουν απογόνους, το οποίο πιθανότατα είναι αποτέλεσμα μιας έλλειψης πλεονεκτήματος ανάπτυξης που προσδίδεται από τη μετατόπιση. Ωστόσο, στις μετατοπίσεις που εμπλέκονται συγκεκριμένα ογκογονίδια δίνεται η δυνατότητα ανάπτυξης των κυττάρων, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις, όπως το MGUS, το SMM και τελικά το πολλαπλό μυέλωμα. Έτσι, οι χρωμοσωμικές μετατοπίσεις είναι ένα πιθανό γεγονός έναρξης των πρώιμων σταδίων του πολλαπλού μυελώματος. Εναλλακτικά η συνύπαρξη των χρωμοσωμικών ανωμαλιών της ανευπλοειδίας με την υπερπλοειδία περιγράφεται ως χαρακτηριστικό εναρκτήριο γεγονός

Διαγνωστικά κριτήρια

Στη διάγνωση του ΠΜ εφαρμόζεται ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός της μονοκλωνικής πρωτεΐνης Μ- πρωτεΐνης που παράγεται από τα νεοπλασματικά κύτταρα. Η Μ-πρωτεΐνη μπορεί να ανιχνευθεί στον ορό ή/και στα ούρα (τυπικά άνω των 3 g/dL) περίπου στο 99% των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα [43]. Η διάγνωση του ΠΜ επαληθεύεται και από το κλάσμα των πλασματοκυττάρων στον μυελό των οστών το οποίο θα πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 10% και να υπάρχουν ενδείξεις βλάβης οργάνου στόχου. Τα κριτήρια διάγνωσης του ΠΜ αναφέρονται ως χαρακτηριστικά CRAB (υπερασβεστιαμία, νεφρική ανεπάρκεια, αναιμία ή λυτικές βλάβες των οστών) τα οποία αποτελούνται από μια ομάδα κλινικών εκδηλώσεων της βλάβης οργάνου στόχου [44]. Η ανίχνευση της μονοκλωνικής πρωτεΐνης γίνεται με ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών του ορού και των ούρων η δε ταυτοποίησή της και ο προσδιορισμός του τύπου των ελαφρών αλυσίδων γίνεται με ανοσοηλεκτροφόρηση ή ανοσοκαθήλωση. Τα συμπτώματα που καθορίζουν τη διάγνωση της νόσου διακρίνονται σε μείζονα και ελάσσονα. Τα μείζονα περιλαμβάνουν το ιστολογικά επιβεβαιωμένο πλασματοκύττωμα μετά από βιοψία οστού, τη διήθηση του μυελού >30% με πλασματοκύτταρα, την παρουσία μονοκλωνικής Ig (IgG>3,5g/dl, IgA>2 g/dl) και παρουσία κ και λ αλυσίδων >1g στα ούρα 24 ώρου εφόσον δεν υπάρχει αμυλοείδωση. Στα ελάσσονα περιλαμβάνονται η διήθηση του μυελού 10-30% πλασματοκύτταρα, η παρουσία μονοκλωνικής Ig στον ορό ή τα ούρα σε πιο χαμηλές τιμές από αυτές που αναφέρονται στα μείζονα συμπτώματα, η παρουσία οστεολύσεων και τα χαμηλά επίπεδα φυσιολογικών ανοσοσφαιρινών, δηλ. IgM < 50mg . IgA<100mg και IgG <600 mg/dL.

Σταδιοποίηση πολλαπλού μυελώματος

Η σταδιοποίηση γίνεται με το σύστημα Durie και Salmon [45] καθώς και με το διεθνές σύστημα ταξινόμησης ISS (International staging system), από τη Διεθνή Ομάδα Μελέτης του Μυελώματος (IMWG) [46]. Το σύστημα σταδιοποίησης Durie και Salmon το οποίο προτάθηκε το 1975 διακρίνει τους ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα σε τρία στάδια I, II, III βασισζόμενο στην παρουσία λυτικών βλαβών από ακτινογραφίες του οστού, στο επίπεδο της αιμοσφαιρίνης, στο ασβέστιο του ορού και στην παρουσία της μονοκλωνικής M- πρωτεΐνης. Επιπλέον η τιμή της κρεατινίνης διαχωρίζει και άλλες δύο υποκατηγορίες A και B με την κρεατινίνη στον ορό να είναι $<2\text{mg/dL}$ ή $\geq 2\text{mg/dL}$ (**Πίνακας 1.1**). Το ISS ταξινομεί τους ασθενείς σε τρία στάδια αλλά με βάση τη β_2 μικροσφαιρίνη και την αλβουμίνη του ορού με ποσοστό επιβίωσης τα 5 έτη για το στάδιο I 82% στάδιο II 62% στάδιο III 40% (**Πίνακας 1.2**). Υπάρχει και το αναθεωρημένο διεθνές σύστημα ταξινόμησης R-ISS (Revised International staging system) το οποίο λαμβάνει υπόψη του τη βιολογία της νόσου (όπως κυτταρογενετικές βλάβες υψηλού κινδύνου ή γαλακτική αφυδρογονάση) και διαχωρίζει και αυτό τρία στάδια της νόσου I, II, III (**Πίνακας 1.3**) [47]

Πίνακας 1.1 Σταδιοποίηση του πολλαπλού μυελώματος με το σύστημα Durie και Salmon

Στάδιο	Προϋποθέσεις	Διάμεση επιβίωση (μήνες)
I	αιμοσφαιρίνη $> 10\text{g/dL}$, ασβέστιο ορού $< 12\text{mg/dL}$, φυσιολογική δομή του οστού, παραπρωτεΐνη M ορού: IgG $< 50\text{ g/L}$ ή IgA $< 30\text{ g/L}$ ή ελαφριές αλυσίδες ούρων $< 4\text{g/24h}$	IA: 69 IB: 22
II	περίπτωση που δεν ταιριάζει με κανένα από τα στάδια I ή III	IIA: 58 IIB: 34
III	αιμοσφαιρίνη $\leq 8,5\text{ g/dL}$, ασβέστιο ορού $\geq 12\text{mg/dL}$. προχωρημένες λυτικές οστικές αλλοιώσεις, παραπρωτεΐνη M ορού: IgG $\geq 70\text{ g/L}$ ή IgA $\geq 50\text{ g/L}$ ή ελαφριές αλυσίδες ούρων $\geq 12\text{g/24h}$	IIIA: 45 IIIB: 24

Πίνακας 1.2. Σταδιοποίηση του πολλαπλού μυελώματος με το σύστημα ISS

Στάδιο	Αλβουμίνη ορού(g/dL)	B2 μικροσφαιρίνη (mg/L)	5ετής επιβίωση(%)
I	$\geq 3,5$	$< 3,5$	82
II	περίπτωση που δεν ταιριάζει με κανένα από τα στάδια I ή III		62
III	Οποιαδήποτε τιμή	$\geq 5,5$	40

Πίνακας 1.3. Αναθεωρημένο Διεθνές Σύστημα σταδιοποίησης του πολλαπλού μυελώματος

Στάδιο	Προϋποθέσεις	Διάμεση επιβίωση (μήνες)
I	Στάδιο I κατα ISS, απουσία κυτταρογενετικών ευρημάτων υψηλού κινδύνου, φυσιολογική γαλακτική αφυδρογονάση (LDH)	62
II	περίπτωση που δεν ταιριάζει με κανένα από τα στάδια I ή III	45
III	Στάδιο III κατα ISS, παρουσία κυτταρογενετικών ευρημάτων υψηλού κινδύνου [t(4;14), t(14;16), del(17p) ή αυξημένη γαλακτική αφυδρογονάση (LDH)	30

Γενετικές αλλαγές

Το πολλαπλό μυέλωμα εμφανίζει κλινική και βιολογική ετερογένεια με διάφορες γενετικές τροποποιήσεις που μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία μυελώματος [48, 49]. Οι χρωμοσωμικές μετατοπίσεις και οι ανευπλοειδίες έχουν θεωρηθεί ότι σχετίζονται με την ανάπτυξη των προδρόμων καταστάσεων και, ενδεχομένως, την ανάπτυξη του πολλαπλού μυελώματος. Αν και δεν υπάρχει συγκεκριμένο γενετικό γεγονός που σηματοδοτεί τη μετάβαση από το MGUS και το SMM σε πολλαπλό μυέλωμα, στους ασθενείς με ορισμένες γενετικές και επιγενετικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένης της μεθυλίωσης του DNA και της έκφρασης του miRNA, υπάρχουν μεγαλύτερες πιθανότητες η νόσος να εξελιχθεί σε πολλαπλό μυέλωμα.

Χρωμοσωμικές ανωμαλίες: Μετατοπίσεις που περιλαμβάνουν το γονιδιακό τόπο IGH που κωδικοποιεί τις βαριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών και ένα σύνολο επαναλαμβανόμενων γονιδίων που συνδέονται με αυτόν όπως το NSD2, το FGFR3 (που κωδικοποιεί τον υποδοχέα 3 του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών) και το CCND1 (που κωδικοποιεί την κυκλίνη D1) αντιπροσωπεύουν μια σημαντική κατηγορία πρωτογενών γεγονότων ταυτοποιημένων στο MGUS, SMM και στο πολλαπλό μυέλωμα [48-50]. Οι μετατοπίσεις αυτές οφείλονται στο μη φυσιολογικό ανασυνδυασμό κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των πλασματοκυττάρων αλλά μπορούν να οφείλονται και σε άλλους μηχανισμούς όπως ο μη φυσιολογικός V(D)J ανασυνδυασμός, που εμπλέκονται σε ένα υποσύνολο των περιπτώσεων [51]. Η αναγνώριση του τόπου που υπάρχει η βλάβη DNA εξηγεί ποια γονίδια ενώνονται με το IGH [52]. Η μετατόπιση t (11, 14), η οποία βρίσκεται στο 14% όλων των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα, έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη έκφραση του CCND1, του οποίου το προϊόν, κυκλίνη D1, είναι σημαντικό για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η μετατόπιση t (4, 14) βρίσκεται στο 11% των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα και οδηγεί σε υπερέκφραση του NSD2 (που οδηγεί σε επιγενετική δυσλειτουργία) και συχνά του FGFR3. Άλλες επαναλαμβανόμενες μετατοπίσεις που εμπλέκουν τον γονιδιακό τόπο IGH περιλαμβάνουν την t(14;16) (με το γονίδιο MAF και βρίσκεται στο 3% των ασθενών), t(14;20) (με το γονίδιο MAFB και βρίσκεται στο 1.5% των ασθενών) και t(6;14) (με το γονίδιο CCND3 σε ποσοστό <1% των ασθενών). Σε δύο ανεξάρτητες μελέτες, η συχνότητα του t (4,14) ήταν 1-3% των ασθενών με MGUS και 11-12% των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα [48-51], ενώ η συχνότητα t (11, 14) ήταν που βρέθηκαν στο 13% των ασθενών με MGUS και το 16% των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα [53] [54]. Ο διάμεσος χρόνος μέχρι την εξέλιξη από SMM σε πολλαπλό μυέλωμα είναι μικρότερος σε ασθενείς με t (4,14) (28 μήνες) από ότι σε ασθενείς με t (11; 14) (55 μήνες) [55], υποδηλώνοντας ότι t (4; 14) μπορεί να είναι πιο επιρρεπής σε υποκείμενη δευτεροβάθμια εκδήλωση που απαιτείται για την εξέλιξη.

Θεραπεία

Η θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος βασίζεται στην χρήση γλυκοκορτικοειδών και κυτταροτοξικών ουσιών. Παρά την πρόοδο, στον τομέα της χημειοθεραπείας, το πολλαπλό μυέλωμα παραμένει μη θεραπεύσιμη νόσος. Νέες θεραπείες, συνεχώς αναπτύσσονται με αποτέλεσμα την καλύτερη ποιότητα, και μακρύτερη επιβίωση των ασθενών. Η αρχική θεραπεία αποτελείται από βορτεζομίμη (αναστολέας πρωτεασώματος), λεναλιδομίδη, δεξαμεθαζόνη (VRd). Σε ασθενείς υψηλού κινδύνου, η καρφιλοζομίμη, η λεναλιδομίδη, η δεξαμεθαζόνη (KRd) αποτελούν εναλλακτική λύση έναντι του VRd. Σε νεο-διαγνωσθέντες ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα, η αρχική θεραπεία δίνεται για περίπου 3-4 κύκλους ακολουθούμενη από μεταμόσχευση αυτόλογων βλαστικών κυττάρων (ASCT) [56]. Οι ασθενείς με σταθερά επίπεδα κινδύνου μπορούν να επιλέξουν την καθυστερημένη ASCT κατά την πρώτη υποτροπή. Μετά από ASCT, συνιστάται η συντήρηση της λεναλιδομίδης σε ασθενείς με συνήθη κίνδυνο, ενώ απαιτείται συντήρηση με βάση το βορτεζομίμη για ασθενείς με ενδιάμεση ή υψηλού κινδύνου ασθένεια. Οι ασθενείς που δεν υποβάλλονται σε μεταμόσχευση υποβάλλονται σε θεραπεία με VRd για περίπου 8-12 κύκλους ακολουθούμενες από λεναλιδομίδη ή λεναλιδομίδη συν δεξαμεθαζόνη. Ασθενείς που δεν είναι κατάλληλοι για αυτόλογη μεταμόσχευση (κακή γενική κατάσταση, ηλικία >70-75 ετών, ή άλλο ιατρικό ιστορικό), προτείνονται για θεραπείες άλλου είδους. Οι περισσότερες χημειοθεραπευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται σήμερα στην καταπολέμηση του πολλαπλού μυελώματος έχουν ως στόχο:

- αύξηση της απόπτωσης και προάγουν τα κύτταρα στην G1 φάση
- αναστολή της συγκόλλησης των κυττάρων στα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών
- μείωση της παραγωγής κυτταροκινών
- αύξηση του κυτταροτοξικού αποτελέσματος των ανοσοποιητικών κυττάρων

Οι περισσότεροι ασθενείς χρειάζονται τριπλή αγωγή σε υποτροπή, ενώ η επιλογή του σχήματος ποικίλει ανάλογα με κάθε διαδοχική υποτροπή. Η επιθετική υποτροπή με εξωμυελική πλασμοκυτοκυττάρωση ή λευχαιμία κυττάρων πλάσματος μπορεί να απαιτεί ανθρακυκλίνη περιλαμβάνοντας συνδυασμό χημειοθεραπείας.[57]

Μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (MGUS)

Η μονοκλωνική γαμμαπάθεια απροσδιόριστης σημασίας (MGUS) είναι η συχνότερη πλασματοκυτταρική δυσκρασία, αποτελεί το 57% όλων των μονοκλωνικών πλασματοκυτταρικών δυσκρασιών και επηρεάζει μέχρι και το 3,2% του πληθυσμού ηλικίας άνω των 50 [43]. Υπάρχει ετερογένεια της νόσου ανάλογα με το φύλο, οι άντρες εμφανίζουν συχνότερα MGUS σε σχέση με τις γυναίκες (4 έναντι 2,7%) [58]. Η MGUS εξελίσσεται σε πολλαπλό μυέλωμα ή άλλες αιματολογικές κακοήθειες με πιθανότητα 1% ετησίως. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία μονοκλωνικής πρωτεΐνης (<3 gr/dL) κλωνικά πλασματοκύτταρα <10% στο μυελό των οστών και δεν υπάρχει ενεργός πλασματοκυτταρική διαταραχή αφού δεν έχουμε συσσώρευση της M- πρωτεΐνης στα ούρα, αναιμία, υπερασβεστιαμία ή νεφρική ανεπάρκεια, λυτικές οστικές αλλοιώσεις, που οφείλονται στην διαδικασία πολλαπλασιασμού των πλασματοκυττάρων (CRAB κριτήρια). [59]. Η MGUS προηγείται της εμφάνισης του πολλαπλού μυελώματος καθώς βρέθηκε η παρουσία της μονοκλωνικής πρωτεΐνης στον ορό για χρόνια πριν τη διάγνωση του μυελώματος περίπου στο 90% των ασθενών [60]. Η εξέλιξη του MGUS σε πολλαπλό μυέλωμα είναι μια αλλαγή που περιλαμβάνει κυτταρογενετικές αλλαγές με κυριότερη τις αντιμεταθέσεις των χρωμοσωμάτων στο 14q32 αλλά και μεταλλάξεις που προωθούν την ογκογένεση [61]. Εκτός των γενετικών αλλαγών στα πλασματοκύτταρα στην εξέλιξη της νόσου συμβάλλουν και αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών. Μέσα σε αυτό το μικροπεριβάλλον στο οποίο υπάρχουν διάφορες κυτταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες και ορμόνες ρυθμίζεται η ομοιοστάση των αιμοποιητικών κυττάρων και αναπτύσσονται όλες τους οι λειτουργίες [62]. Η αυξημένη αγγειογένεση που συμβαίνει με την πρόοδο της νόσου, δεν φαίνεται να συνδέεται με αυξημένη έκφραση κάποιας κυτταροκίνης στα νεοπλασματικά κύτταρα, αλλά μάλλον σε μεταβολή στην ισορροπία προ και αντί- αγγειογενετικών επιρροών. Φαίνεται να υπάρχει μείωση στην αναστολή της αγγειογένεσης με την πρόοδο της νόσου από MGUS σε πολλαπλό μυέλωμα [63].

Η διαφοροποίηση του πολλαπλού μυελώματος από τη νόσο MGUS, βασίζεται στην παρουσία οστικών αλλοιώσεων, υπερασβεστιαμίας και παθολογικών καταγμάτων καθώς και συσσώρευσης των πολυκλωνικών ανοσοσφαιρινών. Η πρόγνωση της κακοήθους μεταλλαγής της MGUS σε πολλαπλό μυέλωμα εξαρτάται από τον τύπο της ανοσοσφαιρίνης όπως ανακαλύφθηκε το 1992 από τον Blade et al, ασθενείς με IgA MGUS, έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εξελιχθούν σε πολλαπλό μυέλωμα από ότι οι ασθενείς με άλλους τύπους ανοσοσφαιρίνης. Επίσης επιβεβαιώθηκε ότι οι ασθενείς με IgM ή IgA είχαν αυξημένη πιθανότητα να εξελιχθούν σε πολλαπλό μυέλωμα (p value = 0.001) σε πρόσφατη μελέτη της Mayo Clinic [27]. Ένας άλλος παράγοντας που έχει προγνωστική αξία για την εξέλιξη σε πολλαπλό μυέλωμα είναι η αυξημένη αγγειογένεση στο μυελό των οστών [64].

Έρπων πολλαπλό μυέλωμα (SMM)

Το έρπων πολλαπλό μυέλωμα ή ασυμπτωματικό πολλαπλό μυέλωμα (SMM) διαγνώσκεται στην ηλικία περίπου των 65 ετών και αποτελούν το 15% των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με συμπτωματικό πολλαπλό μυέλωμα [65]. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία της μονοκλωνικής πρωτεΐνης ≥ 3 gr/dL και κλωνικά πλασματοκύτταρα $\geq 10\%$ στο μυελό των οστών. Οι ασθενείς βρίσκονται σε υψηλότερο επίπεδο νόσου από το MGUS, αλλά χωρίς συμπτώματα ή βλάβες σε όργανα στόχους, δηλαδή δεν παρουσιάζουν κάποιο από τα CRAB κριτήρια όπως αναιμία, νεφρική ανεπάρκεια ή αλλοιώσεις των οστών καθώς και το ποσοστό των μυελωματικών κυττάρων στην περιφέρεια είναι αμελητέο με αποτέλεσμα να διατηρείται χαμηλός ο πλασματοκυτταρικός δείκτης [59]. Γενικά έχει 10% πιθανότητα ετησίως να εξελιχθεί σε πολλαπλό μυέλωμα τα 5 πρώτα χρόνια, 3% από τα 5 στα 10 χρόνια, 1% μετά τα 10 χρόνια και μπορεί να ταξινομηθεί σε χαμηλού ή υψηλού κινδύνου με βάση τη μικρότερη ή μεγαλύτερη πιθανότητα μετάβασης σε ενεργό μυέλωμα [66]. Για την προόδο της νόσου εξετάζονται κάποιοι παράγοντες κινδύνου όπως η τιμή της μονοκλωνικής πρωτεΐνης, το ποσοστό διήθησης του μυελού των οστών από τα παθολογικά πλασματοκύτταρα [67]. Ανάλογα λοιπόν με τους δύο αυτούς παράγοντες οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε τρεις υποκατηγορίες:

- Ομάδα I με μονοκλωνική πρωτεΐνη ≥ 3 gr/dL και διήθηση $\geq 10\%$ είχαν διάμεσο χρόνο μέχρι την εξέλιξη της νόσου 2 χρόνια
- Ομάδα II με μονοκλωνική πρωτεΐνη < 3 gr/dL και διήθηση $\geq 10\%$ είχαν διάμεσο χρόνο μέχρι την εξέλιξη της νόσου 8 χρόνια
- Ομάδα III με μονοκλωνική πρωτεΐνη ≥ 3 gr/dL και διήθηση $< 10\%$ είχαν διάμεσο χρόνο μέχρι την εξέλιξη της νόσου 19 χρόνια

Η πιθανότητα να εμφανίσουν οι ασθενείς ενεργό πολλαπλό μυέλωμα ήταν $>95\%$ τα 2 πρώτα χρόνια από την διάγνωση με SMM με διήθηση $>60\%$ είχαν διάμεσο χρόνο μέχρι την εξέλιξη της νόσου 7 μήνες [68].

Μακροσφαιριναιμία Waldenström's

Η μακροσφαιριναιμία Waldenström's (WM) είναι λεμφοματογενής νόσος των Β κυττάρων, κατατάσσεται κατά το σύστημα σταδιοποίησης των λεμφωμάτων σύμφωνα με τον WHO (Εθνικό οργανισμό υγείας ή world health organization) στην ομάδα των λεμφοπλασματοκυτταρικών λεμφωμάτων (LPL) που χαρακτηρίζεται από λεμφοπλασματοκυτταρική διήθηση του μυελού των οστών και την υπερπαραγωγή μονοκλωνικής IgM που μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη πυκνότητα του αίματος. Στην νόσο αυτή έχουμε κακοήγη μετάλλαξη των Β-κυττάρων και όχι των πλασματοκυττάρων [69]. Η νόσος αρχικά περιγράφηκε από τον Jan Waldenström το 1944. Η μέση ηλικία των ασθενών είναι τα 65 έτη, και στους άντρες εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα από ότι στις γυναίκες (60% των ασθενών είναι άντρες). Ο μέσος όρος επιβίωσης των ασθενών με την νόσο αυτή είναι μεταξύ 5 και 10 ετών. Η νόσος WL, σχετίζεται με τον μυελό των οστών χαρακτηριστικά, δείχνει διάχυτη αύξηση των μικρών Β- λεμφοκυττάρων, πλασματοειδών, λεμφοκυττάρων και των πλασματοκυττάρων. Επίσης υπάρχει αύξηση των μαστικών κυττάρων (mast cells), σε ποσοστό 72% στις βιοψίες μυελού. Με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, η νόσος χαρακτηρίζεται από ανοσοφαινότυπο CD19, CD20, CD22, CD79, FMC7. Η πιο συχνή χρωμοσωμική ανωμαλία στην νόσο WL, είναι η διαγραφή του μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος 6, αλλά ο ρόλος της αλλαγής αυτής στην παθογένεση της νόσου δεν έχει ακόμα ξεκαθαριστεί [70]. Η διάγνωση της νόσου βασίζεται στη μορφολογία των κυττάρων είναι Β μικρά λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα και στην παρουσία μονοκλωνικής πρωτεΐνης IgM. Η διάγνωση αυτή υποστηρίζεται από ανοσοφαινοτυπικές μελέτες με κυτταρομετρία ροής και/ή ανοσοϊστοχημία. Η διάγνωση της μακροσφαιριναιμίας, μπορεί να γίνει ανεξάρτητα με την ποσότητα της μονοκλωνικής IgM, εφόσον έχει αποδεικτεί ότι υπάρχει λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα στο μυελό.

microRNAs

Βιογένεση και Λειτουργίες των microRNAs

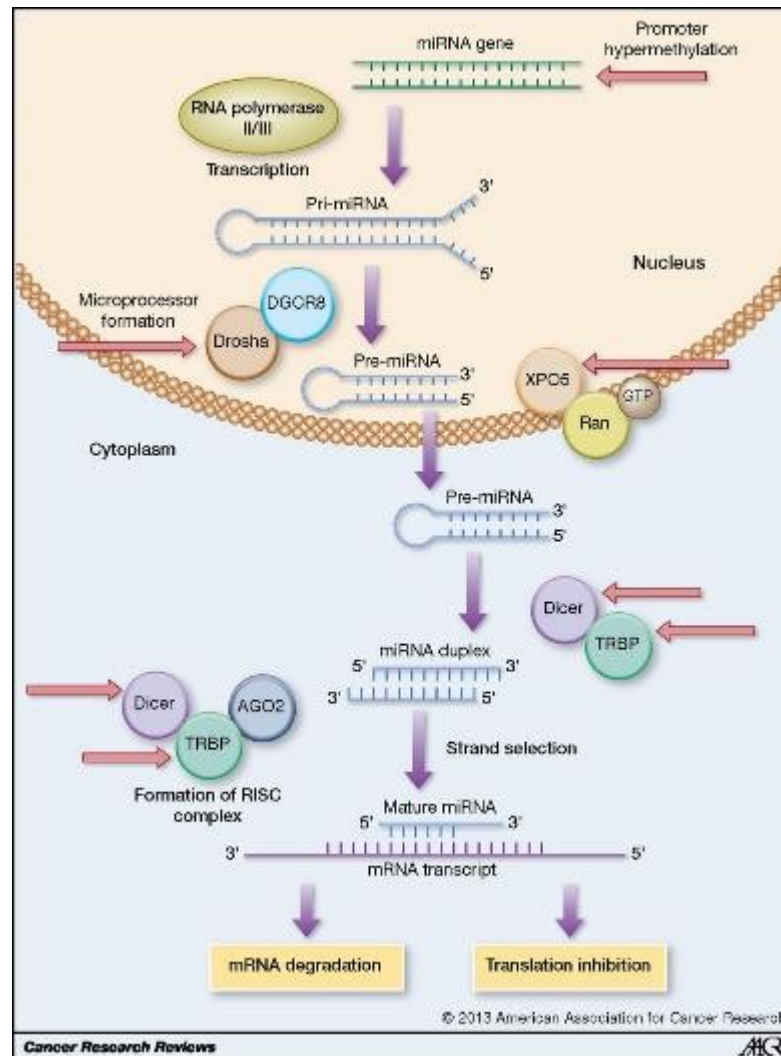
Τα microRNAs (miRNAs) είναι μονόκλινα μικρά και εξελικτικά διατηρημένα μη κωδικά RNAs μήκους 19-25 νουκλεοτιδίων, τα οποία ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο [71]. Ανακαλύφθηκαν το 1993 από τον Victor Ambros et al στον οργανισμό *Caenorhabditis Elegans* (*C. Elegans*) [72]. Τα miRNAs αναστέλλουν την μετάφραση με δέσμευση σε μια μη κωδική περιοχή των των στοχευόμενων αγγελιαφόρων RNAs (mRNAs) που ονομάζεται 3'-αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR). Μέσω της μεταφραστικής καταστολής, ρυθμίζουν την κυτταρική έκφραση και τη διαφοροποίηση [73]. Τα miRNAs lin-4 και let-7 τα οποία είναι εξελικτικά συντηρημένα ήταν τα πρώτα που ανακαλύφθηκαν και εμπλέκονται στην ανάπτυξη του οργανισμού *Caenorhabditis elegans*, δεν κωδικοποιούν κάποια πρωτεΐνη αλλά παράγουν ένα μικρό ρυθμιστικό RNA μήκους 22 νουκλεοτιδίων αντιστοίχως. Αυτό το μικρό ρυθμιστικό RNA αλληλεπιδρά με την 3' αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR) του mRNA του lin-14.

Στην περίπτωση του *lin-4*, προκαλεί την καταστολή της έκφρασής του *lin-14* αλλά στην περίπτωση του *let-7* επίσης ελέγχει τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του *C.elegans* [74]. Τα γονίδια των miRNAs βρίσκονται κατανομημένα στο γονιδίωμα είτε ως συμπλέγματα δύο ή και περισσότερων miRNA γονιδίων (clusters) είτε ως ανεξάρτητες μεταγραφικές μονάδες. Εκτιμάται ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα μπορεί να παράγει περισσότερα από χίλια διαφορετικά miRNAs, τα οποία ρυθμίζουν περίπου το 60% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, ελέγχοντας με τον τρόπο αυτό τη δραστηριότητα και τη λειτουργία βασικών σηματοδοτικών μονοπατιών και κυτταρικών διεργασιών όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και απόκριση στην υποξία. [75]. Επιπλέον διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και σε διάφορες νόσους (με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τον καρκίνο). Όσον αφορά στον καρκίνο, τα miRNAs έχει παρατηρηθεί να δρουν τόσο ως ογκοκατασταλτικά μόρια όσο και ως ογκογονίδια, τα οποία αναστέλλουν και επάγουν-προάγουν την ανάπτυξη όγκου, αντίστοιχα. [76].

Η βιοσύνθεση των miRNAs είναι μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία. Τα γονίδια που κωδικοποιούν για miRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II, σχηματίζοντας δομή φουρκέτας (hairpin structure, HPS), με ένα κάλυμμα στο 5' άκρο και πολυαδενυλιωμένο το 3' άκρο τους με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός πρόδρομου μορίου pri-miRNA [77]. Στη συνέχεια ένα σύμπλοκο που αποτελείται από το ένζυμο Drosha και την πυρηνική πρωτεΐνη DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) διασπά το μόριο αυτό με αποτέλεσμα τη παραγωγή ενός άλλου προδρόμου μορίου, του pre-miRNA το οποίο μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα μέσω της πρωτεΐνης εξπορτίνης 5 [78] (**Σχήμα 1.7.**). Στο κυτταρόπλασμα το pre-miRNA διασπάται περαιτέρω (κόβεται η θηλιά της φουρκέτας) από την ενδονουκλεάση Dicer και με την βοήθεια και του συμπαραγόντα της TRBP (transactivation-response RNA-binding protein), με αποτέλεσμα το σχηματισμό του δίκλωνου μορίου miRNA:miRNA*, το οποίο αποτελείται από το ώριμο miRNA και το συμπληρωματικό μόριο miRNA*. Το ώριμο miRNA ενσωματώνεται σε ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο ονομάζεται RISC (RNA-induced silencing complex, RNA επαγόμενο σύμπλοκο σίγησης), ενώ το μόριο miRNA* συνήθως υφίσταται αποικοδόμηση [79, 80].

Όπως είναι γνωστό τα πιο ώριμα miRNA εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα μαζί με τις τέσσερις καταλυτικές πρωτεΐνες αργοναύτες (AGO), οι οποίες συνεισφέρουν στο ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο RISC. Το ώριμο miRNA μέσω των πρωτεϊνών AGO επιτυγχάνει το ρυθμιστικό του ρόλο καθοδηγώντας το σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex) έναντι των μορίων mRNA-στόχων με αποτέλεσμα την αποαδενυλίωση-αποικοδόμηση ή την αναστολή της μετάφρασης των mRNAs [81]. Η ειδικότητα της τοπικής στόχευσης εμπλέκει αλληλουχίες τόσο του miRNA όσο και του mRNA. Τα νουκλεοτίδια 2–8 του miRNA, που ονομάζονται περιοχή εκβλάστησης (seed region, SR), πρέπει να υβριδοποιούνται συνεχώς σε ένα τέλεια συμπληρωματικό τμήμα του mRNA-στόχου [82]. Οι θέσεις σύνδεσης για την περιοχή SR του miRNA βρίσκονται στην 3'-UTR του mRNA, και η συμπληρωματική αλληλουχία συνήθως επαναλαμβάνεται πολλές φορές μέσα σε αυτή την περιοχή. Το εάν ένα miRNA προωθεί την αποικοδόμηση ή καταστέλλει τη μετάφραση του mRNA-στόχου του εξαρτάται από το βαθμό συμπληρωματικότητας που εμφανίζει το miRNA προς το 3' άκρο του mRNA [83]. Ειδικότερα, ο μηχανισμός σίγησης πιθανόν υπαγορεύεται από τον αριθμό, τον τύπο και τη θέση των αταίριαστων ζευγών βάσεων μεταξύ miRNA και mRNA.

Τα miRNAs καταστέλλουν τη μετάφραση μέσω διαφόρων μηχανισμών είτε στο στάδιο της έναρξης, είτε στο στάδιο της επιμήκυνσης της μετάφρασης, ανάλογα με το πώς μετριάζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ του 5' καλύμματος και της 3' πολυαδενυλιωμένης ουράς του mRNA. Κάθε miRNA μπορεί να στοχεύει παραπάνω από ένα διαφορετικά mRNAs με αποτέλεσμα να επιτυγχάνει την άμεση ή έμμεση ρύθμιση της έκφρασης πολλών πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, ένας τύπος mRNA μπορεί να στοχεύεται από διαφορετικά μόρια miRNA [84].



Σχήμα 1.7. Βιοσύνθεση των miRNAs

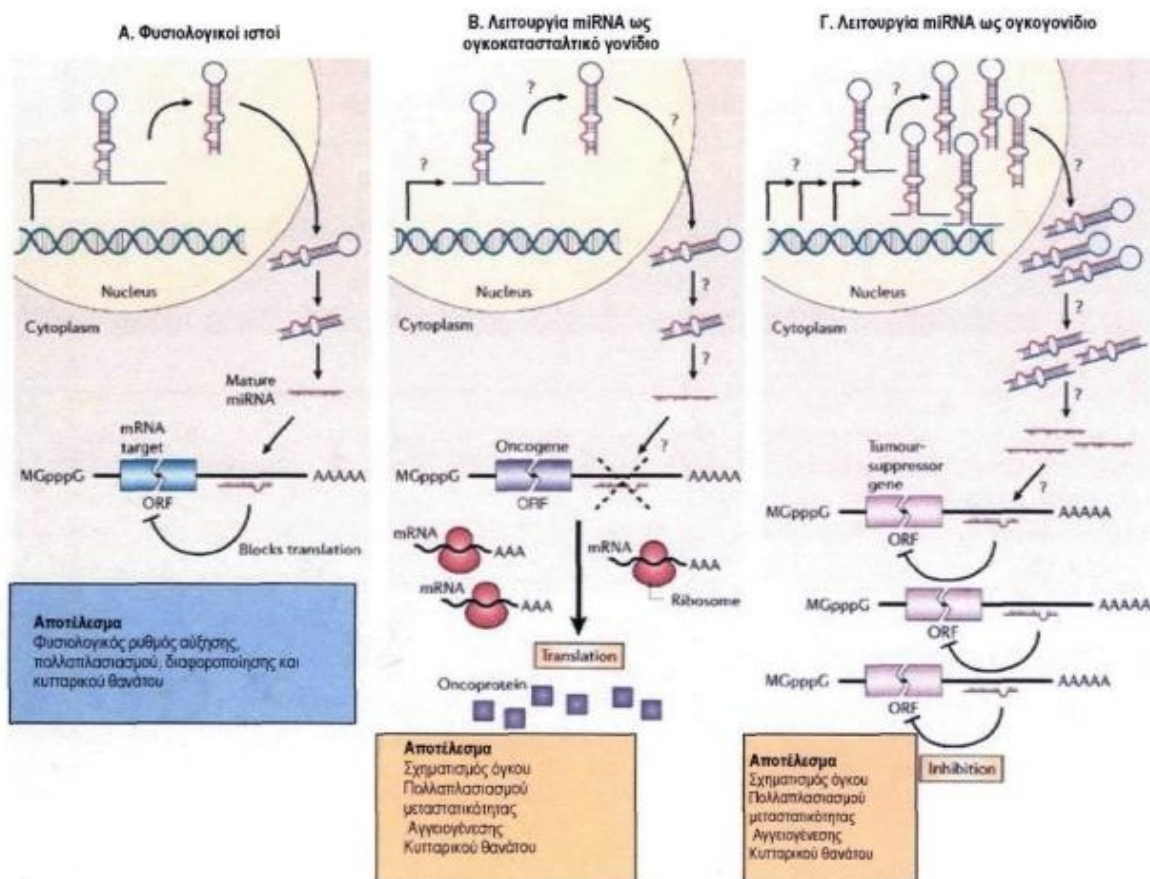
Ρόλος των microRNAs στον καρκίνο

Ο καρκίνος προκαλείται από απορρύθμιση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, η οποία προέρχεται από καταστροφή σε ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια (δηλαδή γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική διαφοροποίηση). Τα περισσότερα ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια μεταφράζονται αρχικά από DNA σε RNA και στη συνέχεια μεταφράζονται σε πρωτεΐνες, προκειμένου να έχουν επίδραση στο κύτταρο. Ωστόσο, πρόσφατα στοιχεία αναιρούν αυτή τη θεμελιώδη αρχή, καθώς αποδεικνύουν ότι μικρά μόρια RNA, που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες δηλαδή τα miRNAs, μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Η πρώτη ένδειξη εμπλοκής των miRNA στις ανθρώπινες νεοπλασίες έγινε καθώς εξετάζονταν μια απαλοιφή της χρωμοσωμικής περιοχής 13q14 στη χρόνια λεμφογενή λευχαιμία (CLL) από τους Calin et al το 2002 [85].

Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το γονίδιο DLEU2 (deleted in lymphocytic leukemia 2), το οποίο κωδικοποιούσε δύο miRNAs τα miR-15a and miR-16-1 που είχαν όπως φάνηκε ογκοκατασταλτικό ρόλο. Αναλυτικότερα, το 65% των περιπτώσεων της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας, αλλά και το 60% των καρκίνων του προστάτη και το 16-40% του πολλαπλού μυελώματος παρουσιάζουν έλλειψη στη χρωμοσωμική περιοχή 13q14. Περαιτέρω έρευνες απέδειξαν την ογκοκατασταλτική ιδιότητα αυτών των miRNAs στη λευχαιμία και σε άλλες νεοπλασίες, ανοίγοντας το δρόμο για την ταυτοποίηση επιπρόσθετων miRNA, που λειτουργούν τόσο ως ογκοκατασταλτικά γονίδια όσο και ως ογκογονίδια (**Σχημα 1.8.**) [86]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα miR-15-a και miR-16-1 λειτουργούν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια, και κατασταλτικές μεταλλάξεις σε αυτά προκαλούν αυξημένη έκφραση του *BCL2*, η οποία προάγει τον πολλαπλασιασμό των B- κυττάρων στη CLL, μια ασθένεια όπου το κύριο χαρακτηριστικό της είναι ο αυξημένος πολλαπλασιασμός των ώριμων B-λεμφοκυττάρων, επάγοντας έτσι τη δημιουργία λευχαιμιών και λεμφωμάτων στα αιμοποιητικά κύτταρα [87]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ογκοκατασταλτικών miRNAs αποτελεί η οικογένεια των let-7. Έχει αποδειχθεί ότι τα μέλη της οικογένειας let-7 ανιχνεύονται συχνά σε μειωμένα επίπεδα στον καρκίνο, οδηγώντας στην υπερέκφραση των πρωτο-ογκογονιδίων *RAS*, *HMG2*, *MYC* και *IMP-1*, τα επίπεδα έκφρασης των οποίων ρυθμίζουν σε φυσιολογικές καταστάσεις. Σε καρκινικές κυτταρικές σειρές από άνθρωπο έχει βρεθεί ότι τα let-7 miRNAs ρυθμίζουν αρνητικά τα *RAS*, καθώς η υπερέκφραση του let-7 οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης Ras [88]. Τα miRNAs είναι δυνατόν να έχουν και δράση ογκογονιδίων όταν εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα (π.χ. miR-17- 92, miR-155, miR-21 κ.λ.π.), προωθούν την ανάπτυξη του καρκίνου ρυθμίζοντας καταρροϊκά διάφορα ογκοκατασταλτικά γονίδια που υπάρχουν φυσιολογικά στα ανθρώπινα κύτταρα. Για παράδειγμα, το miR-155 έχει συνδεθεί με την υπερέκφραση του *myc* και τους καρκίνους των B-κυττάρων [89]. Η οικογένεια miR-17-92 αποτελεί το πιο καλά μελετημένο παράδειγμα αυτής της περίπτωσης. Η οικογένεια miR-17-92 αποτελείται από 14 ομόλογα miRNAs τα οποία κωδικοποιούνται από τρεις ομάδες γονιδίων στα χρωμοσώματα 7, 13 και X. Το κλάσμα των γονιδίων στο χρωμόσωμα 13 υφίσταται γονιδιακή επέκταση σε λεμφώματα με αποτέλεσμα την υπερέκφραση πολλών miRNA της προαναφερθείσας οικογένειας, τα οποία σε ταυτόχρονη δράση με το ογκογονίδιο *MYC* επιταχύνουν

την ανάπτυξη του όγκου, ενώ έχει καταγραφεί ότι η μεταγραφή αυτού του κλάσματος επάγεται από το MYC. Η υπερέκφραση των μελών της οικογένειας miR-17-92 προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση καθώς αναστέλλεται η έκφραση των μορίων στόχων E2F1, p21 και Bim [90, 91]. Συμπερασματικά τα miRNAs μπορούν να δράσουν ογκοκατασταλτικά αναστέλλοντας τη δράση ογκογονιδίων ή ως ογκογονίδια καταστέλλοντας τη δράση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs αποτελεί τον κύριο μηχανισμό πρόκλησης της ογκογόνου δράση τους. Η ενεργοποίηση ογκογόνων μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο MYC που ρυθμίζει την οικογένεια miR-17-92, ο MYCN που ρυθμίζει την έκφραση του miR-221 και του TWIST που ρυθμίζει την έκφραση του miR-10b, αποτελεί ένα κύριο μηχανισμό υπεύθυνο για την απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs στον καρκίνο. Η έκφραση των miRNAs δύναται να ρυθμίζεται και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο καθώς έχουν ανακαλυφθεί πρωτεΐνες (Lin28, Lin28b) οι οποίες αναστέλλουν την ωρίμανση των miRNAs. Οι γονιδιακές ανωμαλίες (απαλοιφές, διπλασιασμοί χρωμοσωμικών περιοχών, σημειακές μεταλλάξεις, μη φυσιολογική μεθυλίωση υποκινητών γονιδίων) που έχουν παρατηρηθεί σε αρκετές νεοπλασίες μπορούν επίσης να επηρεάσουν τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs [90, 92]



Σχήμα 1.8. Πορεία των miRNA ογκογονίδια και ως ογκοκατασταλτικά

Πολλαπλό μυέλωμα και microRNAs

Το πολλαπλό μυέλωμα (MM) χαρακτηρίζεται από τον κακόηθες πολλαπλασιασμό μονοκλωνικών πλασματοκυττάρων στον μυελό των οστών. Όπως έχει προαναφερθεί τα miRNAs μπορούν να έχουν κρίσιμο ρόλο στην πρόοδο πολυάριθμων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλού μυελώματος. Τα miRNAs δρουν τόσο ως ογκογονίδια, όσο και ως ογκοκατασταλτικά γονίδια, ρυθμίζοντας τις οδούς κυτταρικής σηματοδότησης που σχετίζονται με την εξέλιξη του πολλαπλού μυελώματος. Τα απορρυθμισμένα miRNAs στο πολλαπλό μυέλωμα συχνά εξυπηρετούν παρόμοιες λειτουργίες σε παθολογικές διεργασίες όπως τα ογκογονίδια ή τα γονίδια καταστολής όγκων μέσω της ενεργοποίησης μονοπατιών πολλαπλών σηματοδοτήσεων που σχετίζονται με το πολλαπλό μυέλωμα, συμπεριλαμβανομένης της οδού σηματοδοτήσεως του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) [93], της οδού σηματοδοτήσεως της ιντερλευκίνης 6 (IL-6) και του μετασχηματιστή σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής 3 (STAT3) [94], της οδού σηματοδοτήσεως της πρωτεΐνης όγκων p53 (p53) και της οδού σηματοδότησης της PI3K κινάσης και της πρωτεϊνικής κινάσης B (AKT) [95]. Όλο και περισσότερο, τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η έκκριση έκφρασης miRNA αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα και ότι τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα έχουν ξεχωριστά προφίλ έκφρασης miRNA σε σχέση με τα κακοήθη πλασματοκύτταρα.

Ο σημαντικότερος παράγοντας στη παθογένεια του ΠΜ είναι η IL-6, η οποία προάγει τον πολλαπλασιασμό των κακοήθων κυττάρων. Συγκεκριμένα, η ιντερλευκίνη αυτή ευνοεί την αύξηση του φορτίου της νόσου μέσω τόσο αυτοκρινούς, όσο και παρακρινούς δράσης. Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει την ιδιότητα των μυελωματικών κυττάρων να παράγουν και να ανταποκρίνονται *in vitro* στη δράση της IL-6 [96]. Η συνεργική δράση στρωματικών και μυελωματικών κυττάρων με στόχο την έκκριση της IL-6 επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης του παράγοντα NF-κΒ. Αντίστοιχα, έχει δειχθεί ότι η αναστολή της δραστηριότητας του παράγοντα NF-κΒ ελαττώνει την έκκριση της IL-6 [97]. Σε ασθενείς με ΠΜ, τα αυξημένα επίπεδα ορού της IL6 σχετίζονται με υψηλότερο φορτίο νόσου και δυσμενέστερη πρόγνωση [98]. Ο ρόλος της IL-6 στη παθογένεια του ΠΜ έχει διερευνηθεί σε βάθος τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μελέτες, που εξέτασαν μυελωματικά κύτταρα από κυτταρικές σειρές και κύτταρα ασθενών με ΠΜ. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η IL-6 επάγει την επιβίωση και αναστέλλει την απόπτωση μέσω τουλάχιστο τριών κύριων οδών μεταγωγής σημάτων (signal transduction pathways). Ενεργοποιεί τον καταρράκτη των κινασών πρωτεϊνών Ras/Raf/mitogen-activated kinase (MEK)/ extracellular signal-related kinase (ERK), που ευνοεί τον πολλαπλασιασμό του κακοήθους κυττάρου [99]. Η IL-6 ενεργοποιεί το μονοπάτι των Januskinase-2 (JAK-2)/ signal transducers and activators of transcription STAT-3. Οι σηματοδοτικοί αυτοί παράγοντες ευνοούν την επιβίωση, μέσω της επαγωγής της έκφρασης αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως Bcl-XL και Mcl-1 [94]. Η IL-6 ενεργοποιεί την οδό της phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-K)/Akt. Η Akt ρυθμίζει την κυτταρική αύξηση και ελέγχει τον κυτταρικό κύκλο και τον πολλαπλασιασμό μέσω της άμεσης δράσης της στους αναστολείς της CDK και έμμεσης ρύθμισης των επιπέδων των p53 και κυκλίνης D1. Επίσης, η Akt επάγει την επιβίωση, αναστέλλοντας τους προαποπτωτικούς μεταγραφικούς παράγοντες Bad και Forkhead ή επιδρώντας στους παράγοντες p53, NF-κΒ.

1.5.4 Τα μόρια miR221 και miR222

Όλο και περισσότερες ενδείξεις, αποδεικνύουν ότι τα microRNAs εμπλέκονται στην έναρξη, εξέλιξη και μετάσταση του καρκίνου και μπορούν να χρησιμεύσουν ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες για καρκίνους. Μεταξύ των πολλών miRNA που έχουν ήδη αναγνωρισθεί ως ρυθμιστές του νεοπλασματικού μετασχηματισμού, της εισβολής και της μετάστασης, τα miR-221 και miR-222 (miR-221/222) εμφανίστηκαν ως βασικά απορρυθμισμένα miRNAs σε πολλούς καρκίνους, όπως καρκίνοι του γαστρεντερικού, τον καρκίνο του μαστού, καρκίνο του προστάτη, τον καρκίνο του θυρεοειδούς και το γλοίωμα.[100-104]. Τα γονίδια των μορίων miR-221 και miR-222 εντοπίζονται στον ίδιο γενετικό τόπο του χρωμοσώματος X (Xp11.3), όπου σχηματίζουν ένα γονιδιακό σύμπλεγμα (cluster) και κωδικοποιούνται παράλληλα από αυτό. Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι το miR-221/222 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικό εργαλείο για τη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων ή τη ρύθμιση της ευαισθησίας σε αντικαρκινικούς παράγοντες [105-107]. Μεταξύ των απορρυθμισμένων miRNAs στον καρκίνο του ανθρώπου, το miR 221/222 παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον ως δυνητικός στόχος για θεραπευτικές εφαρμογές. Τα miR-221/222 είναι εξαιρετικά ομόλογα miRNA που κωδικοποιούνται σε συνδυασμό με το χρωμόσωμα X, του οποίου η ρύθμιση έχει περιγραφεί σε διάφορους τύπους ανθρώπινων όγκων. Τα miR-221/222 δρουν ως ογκογόνα miRNAs που διευκολύνουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω της καταρροϊκής ρύθμισης του *p27Kip1(p27)* και / ή του *p57Kip2 (p57)* [108, 109]. Το *p27kip1 (p27)* είναι μέλος της οικογένειας του αναστολέα της κινάσης εξαρτώμενης από κυκλίνη (CDKI). Η έκφραση του *p27* ρυθμίζεται από την αναστολή κυττάρων που αλληλεπιδρούν και από ειδικούς αυξητικούς παράγοντες, όπως τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού (TGF) -β. Εκτός από το ρόλο του ως CDKI, το *p27* αναφέρεται ως γονίδιο καταστολής όγκου, ρυθμιστής της αντοχής του φαρμάκου σε συμπαγείς όγκους και προαγωγέας απόπτωσης [110]. Το *p57Kip2(p57)* είναι και αυτο μέλος της οικογένειας του αναστολέα της κινάσης εξαρτώμενης από κυκλίνη (CDKI) και είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [111]. Τα γονίδια αυτά ρυθμίζουν αρνητικά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου από την φάση G1 έως S. Αρκετές αναφορές υποδεικνύουν έναν βασικό ρόλο του miR-221/222 στην ογκογένεση. Στην πραγματικότητα, έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι η αύξηση της έκφρασης miR-221/222 προσδίδει αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από το TRAIL και ενισχύει τον πολλαπλασιασμό και την κυτταρική επιβίωση των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα και του ήπατος μέσω στόχευσης των PTEN και TIMP3 [112]. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι το miR-221/222 ρυθμίζει την ραδιοευαισθησία, την κυτταρική ανάπτυξη και την εισβολή των γαστρικών κυττάρων μέσω της διαμόρφωσης της έκφρασης του PTEN. Πρόσφατα δείχθηκε ότι τα αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια miR-221/222 μειώνουν την ανάπτυξη του όγκου αυξάνοντας την έκφραση πρωτεΐνης *p27Kip1* εντός του όγκου [113]. Συνολικά, όλα αυτά τα συμπεράσματα υποστηρίζουν ότι η σίγαση του miR-221/222 μπορεί να αποτελέσει μια πολύ ελπιδοφόρο θεραπευτική επιλογή που δικαιολογεί περαιτέρω έρευνες σε άλλες κακοήθειες.

Η λειτουργία των miRNA εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Πράγματι για παράδειγμα το miR-222 αναστέλλει την κυτταρική εισβολή του πλακώδους καρκινώματος στη γλώσσα (OTSCC). Η αύξηση της έκφρασης του miR-222 μείωσε την έκφραση της μεταλλοπρωτάσης 1 του πυρήνα (MMP1) και της δισμουτάσης υπεροξειδίου του μαγγανίου (SOD2), οι οποίες αμφότερα εμπλέκονται στην κυτταρική διείσδυση και μετάσταση αυτού του καρκίνου σε κυτταρικές σειρές. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το miR-222 παίζει σημαντικό ρόλο στη διήθηση και μπορεί να αποτελεί ένα καινοτόμο θεραπευτικό στόχο για την κυτταρική εισβολή και τη μετάσταση του πλακώδους καρκινώματος στη γλώσσα (OTSCC) [114]. Μια άλλη μελέτη από τους Felli et al., έδειξε ότι το miR-221/222 αναστέλλει την φυσιολογική ερυθροποίηση και την ανάπτυξη ερυθρολευκαϊκών κυττάρων εν μέρει μέσω της διαμόρφωσης του υποδοχέα Kit. Πράγματι, στην ερυθροποιητική καλλιέργεια προγονικών κυττάρων CD34⁺ αίματος ομφάλιου λώρου, τα επίπεδα miR-221/222 είναι σημαντικά μειωμένα. Στην ερυθροποιητική καλλιέργεια που υποβάλλονται σε εκθετική κυτταρική ανάπτυξη, η χαμηλή έκφραση των miR συνεπάγεται την αύξηση της έκφρασης πρωτεΐνης Kit. Η θεραπεία των προγονικών κυττάρων CD34⁺ με miR-221/222 είναι ικανή να προκαλέσει διαταραχή του πολλαπλασιασμού και αυξημένη διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων [115]. Αυτές οι δύο τελευταίες μελέτες καταδεικνύουν έναν ρόλο καταστολής του όγκου για το miR-221/222 στο OTSCC και τα ερυθροκύτταρα, δείχνοντας και πάλι ότι η λειτουργία του microRNA εξαρτάται αποκλειστικά από τον κυτταρική αλληλεπίδραση και τον τύπο του όγκου.

Απο την άλλη το γονιδιακό σύμπλεγμα miR-221/222 υπερεκφράζεται σε πολλά είδη καρκίνων συμπεριλαμβανομένων και των αιματολογικών κακοηθειών όπως το πολλαπλό μυέλωμα [116]. Έχει αποδειχθεί ότι το miR-221-222 προάγει την ογκογένεση με την καθοδική ρύθμιση της έκφρασης καταστολέων όγκων όπως ο ρυθμιστής προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης p53-ρυθμιστής της απόπτωσης (PUMA) και ο μεσολαβητής κυτταρικού θανάτου (BIM) [117]. Ερευνήθηκε ο ρόλος της οικογένειας miR-221-222 στην ανθεκτικότητα του φαρμάκου στην δεξαμεθαζόνη (Dex) στο πολλαπλό μυέλωμα χρησιμοποιώντας τις ισογονικές κυτταρικές σειρές MM1R και MM1S, οι οποίες αντιπροσωπεύουν μοντέλα αντίστασης και ευαισθησίας αντίστοιχα. Η μέθοδος μικροσυστοιχιών συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (aCGH) αποκάλυψε προσθήκη των περιοχών χρωμοσώματος X στη ζώνη p11.3, όπου το miR-221-222 βρίσκεται σε ανθεκτικά MM1R κύτταρα αλλά όχι σε ευαίσθητα MM1S κύτταρα. Η προσθήκη του αριθμού αντιγράφων DNA στα MM1R κύτταρα συσχετίστηκαν με αυξημένη έκφραση του miR-221-222 και χαμηλή έκφραση του ρυθμιστή της απόπτωσης p53 (PUMA) ως πιθανό προ-αποπτωτικό στόχο. Επιβεβαιώθηκε ότι το mRNA του PUMA ως άμεσος στόχος του miR-221-222 σε κύτταρα MM1S και MM1R τόσο με απώλεια όσο και με προσθήκη λειτουργιών. Επιπλέον, η θεραπεία με miR-221-222 καθιστά τα MM1S κύτταρα ανθεκτικά σε Dex, ενώ το αντι-miR-221-222 αποκαθιστά εν μέρει την ευαισθησία Dex των MM1R κυττάρων. Αυτές οι μελέτες έχουν αποκαλύψει ένα ρόλο για το miR-221-222 στην ανθεκτικότητα στο πολλαπλό μυέλωμα και υποδεικνύουν έναν πιθανό θεραπευτικό ρόλο για τους αναστολείς της δέσμωσης του miR-221-222 με το PUMA mRNA ως μέσο ώστε να ξεπεραστεί το πρόβλημα της ανθεκτικότητας της Dex σε ασθενείς. Η κλινική χρησιμότητα αυτής της προσέγγισης βασίζεται στην ικανότητα του αντινοσηματικού miR-221-222 να αυξήσει την επιβίωση ενώ μειώνει το φορτίο του όγκου και υποστηρίζεται έντονα από την μεταστατική τάση των MM1R κυττάρων σε προκλινικά μοντέλα ξενογενών μοσχευμάτων ποντικού με πολλαπλό μυέλωμα. Επιπλέον, η παρατήρησή μας για

αυξημένα επίπεδα miR-221-222 με μειωμένη έκφραση PUMA σε κύτταρα πολλαπλού μυελώματος από ασθενείς σε υποτροπή έναντι μη θεραπευμένων ελέγχων υποδηλώνει έναν ακόμα ευρύτερο ρόλο για την αντίσταση φαρμάκου στο miR-221-222 και παρέχει ένα σκεπτικό για τη στόχευση miR-221-222 ως μέσο βελτίωσης των αποτελεσμάτων των ασθενών.

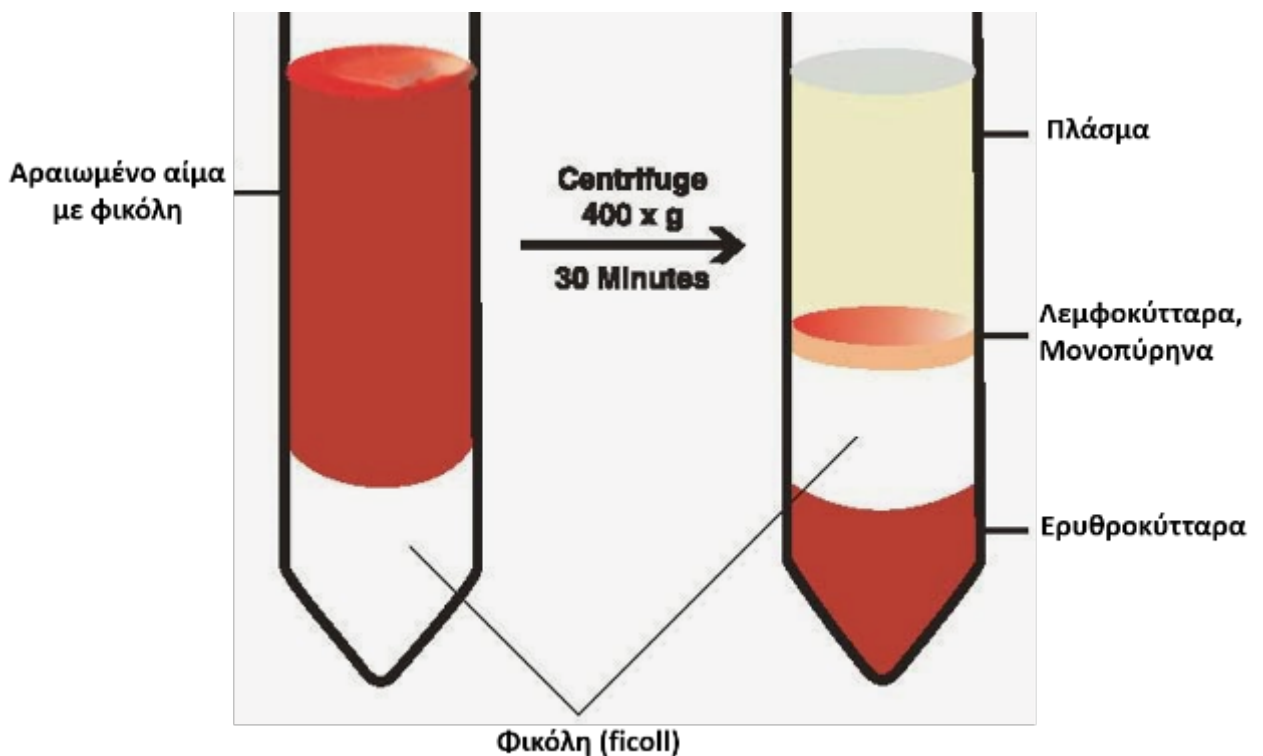
ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το πολλαπλό μυέλωμα ευθύνεται για το 1,7% των κακοηθειών και το 10% των αιματολογικών κακοηθειών και η συχνότητα εμφάνισής του είναι υψηλότερη στις πιο ανεπτυγμένες χώρες. Το πολλαπλό μυέλωμα είναι νόσος των πλασματοκυττάρων, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα με την παραγωγή ανοσοσφαιρινών (αντισώματων). Οι ασθενείς με MGUS προχωρούν σε πολλαπλό μυέλωμα ή άλλους συναφείς κακοήθεις όγκους με ρυθμό 1% ετησίως, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η διάγνωση και η πρόγνωση της εξέλιξης. Από τους ασθενείς με έρπων πολλαπλό μυέλωμα SMM το 10% πιθανότητα ετησίως να εξελιχθεί σε πολλαπλό μυέλωμα τα 5 πρώτα χρόνια, 3% από τα 5 στα 10 χρόνια, 1% μετά τα 10 χρόνια και μπορεί να ταξινομηθεί σε χαμηλού ή υψηλού κινδύνου με βάση τη μικρότερη ή μεγαλύτερη πιθανότητα μετάβασης σε ενεργό μυέλωμα. Για την πρόοδο της νόσου εξετάζονται κάποιοι παράγοντες κινδύνου όπως η τιμή της μονοκλωνικής πρωτεΐνης και το ποσοστό διήθησης του μυελού των οστών από τα παθολογικά πλασματοκύτταρα. Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο την ανάλυση της έκφρασης, μέσω ανάπτυξης ευαίσθητων μεθοδολογιών, τη μελέτη και την κλινική αξιολόγηση, ορισμένων mRNA μορίων αλλά και μη κωδικών γονιδίων microRNA στο πολλαπλό μυέλωμα ως νέων μοριακών βιοδεικτών για τη διάγνωση και πρόγνωση της νόσου, καθώς και την πρόβλεψη της θεραπευτικής ανταπόκρισης των ασθενών. Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε συλλογή και επεξεργασία ενός σημαντικού μεγέθους δειγμάτων CD138+ κυττάρων από ασθενείς με μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρύνιστης σημασίας (MGUS), ασυμπτωματικό πολλαπλό μυέλωμα (SMM) και πολλαπλό μυέλωμα (MM). Αναλύθηκε η έκφραση ορισμένων mRNA μεταγράφων σε δείγματα CD138+ κυττάρων, μέσω της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (real-time qPCR) αλλά και μέσω Nested PCR για να ενισχυθεί η έκφραση αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά. Μελετώντας όμως τα miR221 και miR222 με την ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης τους μέσω χρήσης της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I στο πολλαπλό μυέλωμα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε εκτενής βιοστατιστική ανάλυση για την εκτίμηση της κλινικής αξίας των μελετώμενων βιομορίων και την συσχέτιση των επιπέδων έκφρασής τους με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Βιολογικό υλικό

Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από πλάσμακυττάρων με υποδοχείς CD138⁺ ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα. Για την επιλογή των CD138⁺ κυττάρων από το ολικό αίμα των δοτών έγινε διαχωρισμός των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMC) με τη χρήση του αντιδραστηρίου της φικόλης. Η φικόλη είναι ένας υδρόφιλος πολυσακχαρίτης που διαχωρίζει το αίμα σε στρώματα μετά από φυγοκέντρηση, έχει μικρότερη πυκνότητα από τα ερυθροκύτταρα και τα πολυμορφοπύρηννα τα οποία καθιζάνουν στον πάτο. Αντιθέτως έχει μεγαλύτερη πυκνότητα από τα λεμφοκύτταρα τα οποία μαζεύονται στην ενδιάμεση στιβάδα (Σχήμα 2.1). Τα λεμφοκύτταρα (T cells, B cells, NK cells) συνιστούν την πλειοψηφία του πληθυσμού των PBMCs και ακολουθούνται από τα μονοκύτταρα και ένα μικρό ποσοστό δενδριτικών κυττάρων. Για τον περαιτέρω διαχωρισμό των λεμφοκυττάρων εισάγεται αντίσωμα και με τη βοήθεια μαγνήτη (magnetic beads) διαχωρίζονται τα CD138⁺ από τα CD138⁻. Το σύνολο των δειγμάτων ελήφθησαν από την Θεραπευτική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ και του Γενικού Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα», έπειτα από έντυπη συγκατάθεση, υπογεγραμμένη από τους ασθενείς.



Σχήμα 2.1. Ο διαχωρισμός του αίματος σε στρώματα με το αντιδραστήριο της φικόλης μετά από τη φυγοκέντρηση

Ομογενοποίηση και απομόνωση ολικού RNA

Η σκόνη των ιστοτεμαχίων μεταφέρεται σε Eppendorf 2,0 mL στα οποία προστίθεται 1 ml αντιδραστηρίου TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) για την απομόνωση του RNA. Πρόκειται για ένα όξινο διάλυμα ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, φαινόλης και χλωροφορμίου που επιτρέπει την αποτελεσματική λύση των κυττάρων, αποδιάταξη πρωτεϊνών και προστασία του RNA από τις RNases. Στη συνέχεια το δείγμα υφίσταται έντονη ανάδευση με τη χρήση vortex ώστε να σπάσουν τα συσσωματώματα των κυττάρων με σκοπό να αυξηθεί η επιφάνεια επαφής με το TRI και στο τέλος πιπετάρεται με χρήση αυτόματης πιπέτας για την πλήρη διαλυτοποίηση. Επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για 5 min για τη διάσπαση των συμπλόκων των νουκλεοπρωτεϊνών. Προστίθενται 200 μ L χλωροφορμίου, ακολουθεί έντονη ανάδευση ώστε το δείγμα να γίνει γαλακτώδες, επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min και φυγοκεντρείται στα 13000 rpm για 15 min στους 4°C. Το αποτέλεσμα μετά τη φυγοκέντρηση είναι η δημιουργία τριών διακριτών φάσεων: η ανώτερη υδατική φάση στην οποία βρίσκεται το RNA, η μεσόφαση που περιέχει το DNA και η κατώτερη οργανική φάση που περιέχει τις πρωτεΐνες και λιπίδια (**Σχήμα 2.2.**) Απομονώνεται η υδατική φάση στην οποία προστίθενται 500 μ L ισοπροπανόλης. Το διάλυμα αναδεύεται, επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min και φυγοκεντρείται στα 13000 rpm για 10 min στους 4°C. Εν συνεχεία, απορρίπτεται το υπερκείμενο, προστίθεται στο ίζημα 1 mL αιθανόλης 75%, αναδεύεται με ήπιο vortex ώστε να ξεκολλήσει το ίζημα από τα τοιχώματα και φυγοκεντρείται στα 13000 rpm για 8 min στους 4°C. Τέλος, απομακρύνεται η αιθανόλη, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει αλλά όχι πλήρως και επαναδιαλυτοποιείται σε 10 μ L RSS. Το απομονωμένο ολικό RNA φυλάσσεται σε θερμοκρασία -80°C [118].



Σχήμα 2.2. Ο σχηματισμός των τριών φάσεων μετά απο τη φυγοκέντρηση

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του απομονωμένου ολικού RNA

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ολικού RNA που απομονώθηκε από κύτταρα CD138⁻ και CD138⁺ ήταν διαφορετική. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ολικού RNA από τα CD138⁻ κύτταρα έγινε φασματοφωτομετρικά βασιζόμενοι στην ιδιότητα του RNA να παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης σε μήκος κύματος 260 nm. Συγκεκριμένα, 1 μL απομονωμένου ολικού RNA φωτομετρείται σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm, σε φασματοφωτόμετρο BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis (Shimadzu) (**Σχήμα 2.3**). Η καθαρότητα του απομονωμένου RNA ελέγχεται με τη βοήθεια του λόγου των απορροφήσεων του διαλύματος RNA στα 260 nm και 280 nm, δηλαδή: $\lambda = A_{260}/A_{280}$. Σύμφωνα με με το TRI Reagent[®], το οποίο χρησιμοποιείται για την εκχύλιση του ολικού RNA όταν ο λόγος αυτός είναι ~2 είναι χαρακτηριστικός της καθαρότητας του RNA.



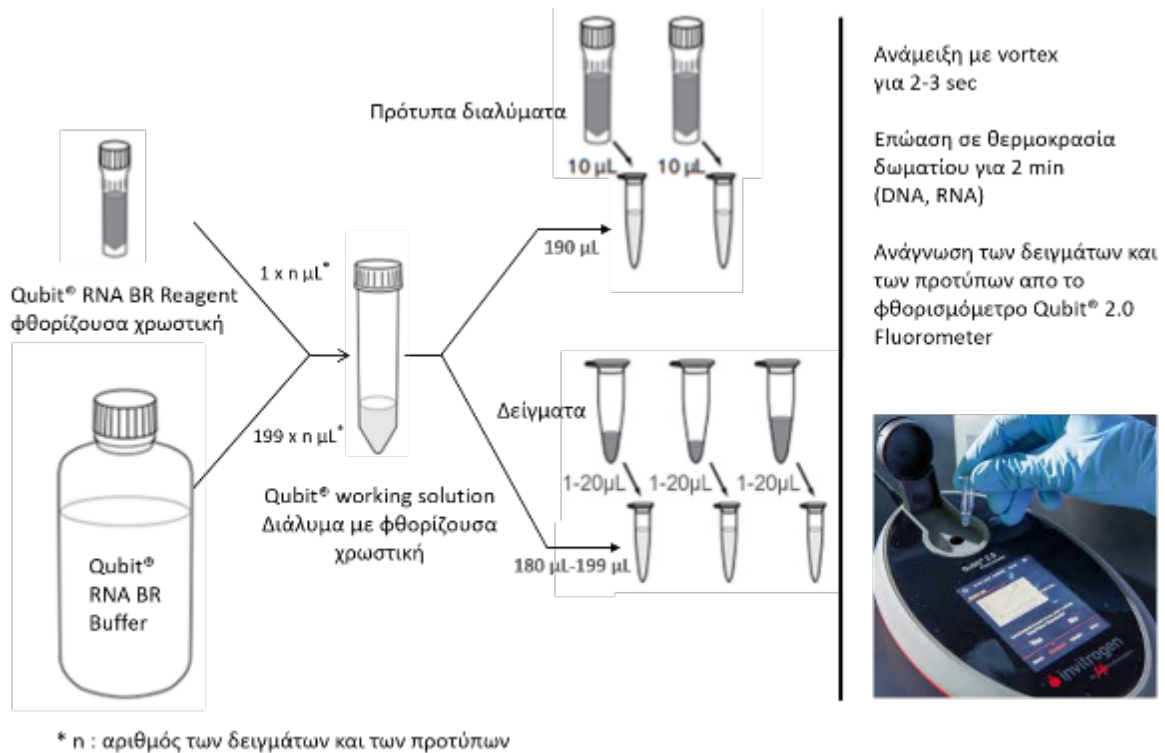
Σχήμα 2.3. Φασματοφωτόμετρο BioSpec-nano Micro-volume υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) το οποίο συνδέεται με υπολογιστή για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του δείγματος (λόγος $\lambda = A_{260}/A_{280}$)

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ολικού RNA από τα CD138⁺ κύτταρα έγινε φθορισμομετρικά. Ο φθορισμός είναι η ιδιότητα που έχουν ορισμένα άτομα ή μόρια, όταν απορροφούν ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος, να εκπέμπουν ακτινοβολία υψηλότερου μήκους κύματος μετά από σύντομο χρονικό διάστημα (<1/100.000 sec), καλούμενο διάρκεια ζωής φθορισμού. Η διαδικασία του φθορισμού ακολουθεί μια αλληλουχία γεγονότων. Αρχικά, με την απορρόφηση της ενέργειας της υπεριώδους ακτινοβολίας, τα ηλεκτρόνια των μορίων της φθορίζουσας ουσίας διεγείρονται και μεταπίπτουν σε εξώτερη στιβάδα. Ακολουθεί η αποδιέγερση των διεγερμένων ηλεκτρονίων με επιστροφή τους σε χαμηλότερη ενεργειακή τροχιά και ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίου μεγαλύτερου μήκους κύματος, ενώ το μόριο επιστρέφει στη βασική του κατάσταση. Έτσι λοιπόν, το φαινόμενο του φθορισμού αναφέρεται στην αποδιέγερση από μια κατάσταση, η οποία συνοδεύεται από εκπομπή φωτονίου. Η φθορισμομετρία χρησιμοποιείται σήμερα πολύ συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό των νουκλεϊκών οξέων στο εργαστήριο γιατί παρουσιάζει τρία βασικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τη φασματομετρία απορρόφησης:

- Είναι πολύ πιο ευαίσθητη μέθοδος, με όρια ανίχνευσης κατά δυο έως τρεις τάξεις μεγέθους χαμηλότερα από αυτά της φασματομετρίας απορρόφησης. Μπορούν να υπολογιστούν δείγματα με αρχικές συγκεντρώσεις από 1ng/μl έως 1μg/μl, παρέχοντας ένα εύρος δοκιμασίας 20-1000ng.
- Στα σύγχρονα φθορισμόμετρα χρησιμοποιούνται φθορίζουσες χρωστικές οι οποίες προσδένονται εκλεκτικά στο μόριο που πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί (RNA) και φθορίζουν μόνο όταν είναι προσδεσμένες σε αυτό. Έτσι, για παράδειγμα, η μέτρηση της συγκέντρωσης ενός δείγματος RNA δεν επηρεάζεται από κατάλοιπα DNA, ενώ στη φασματομετρία απορρόφησης απορροφούν και τα δύο στα 260 nm.
- Οι φθορίζουσες χρωστικές δεν δεσμεύονται στο αποδιαταγμένο RNA, συνεπώς η συγκέντρωση που υπολογίζεται αντανακλά σε μεγαλύτερο βαθμό την πραγματική συγκέντρωση του «λειτουργικού» RNA του δείγματος. Στα πλεονεκτήματα τέτοιων συστημάτων ποσοτικοποίησης νουκλεϊκών οξέων συγκαταλέγεται επίσης και η μικρή αρχική ποσότητα δείγματος που απαιτείται (1-20 μl), όπως και το ότι δεν απαιτείται δείγμα που περιέχει τον διαλύτη (τυφλό) για τον μηδενισμό του συστήματος

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το Qubit® RNA BR Assay Kit για να βρεθεί η συγκέντρωση των δειγμάτων RNA από τα CD138⁺ κύτταρα ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία (**Σχήμα 2.4**):

1. Προετοιμασία του working solution, με αραιώση 1:200 της φθορίζουσας χρωστικής με το Qubit® RNA BR Buffer
2. Για τα δύο πρότυπα διαλύματα χρησιμοποιείται 190 μL από το working solution και 10 μL από τα πρότυπα Qubit® RNA BR Standards με τελικό όγκο 200 μL.
3. Ποσότητα 1 έως 20 μl του δείγματος αραιώνεται με το working solution σε τελικό όγκο 200 μL.
4. Μετά από επώαση 2 min τα δείγματα διαβάζονται από το φθορισμόμετρο και η συγκέντρωση του διαλύματος υπολογίζεται αυτόματα



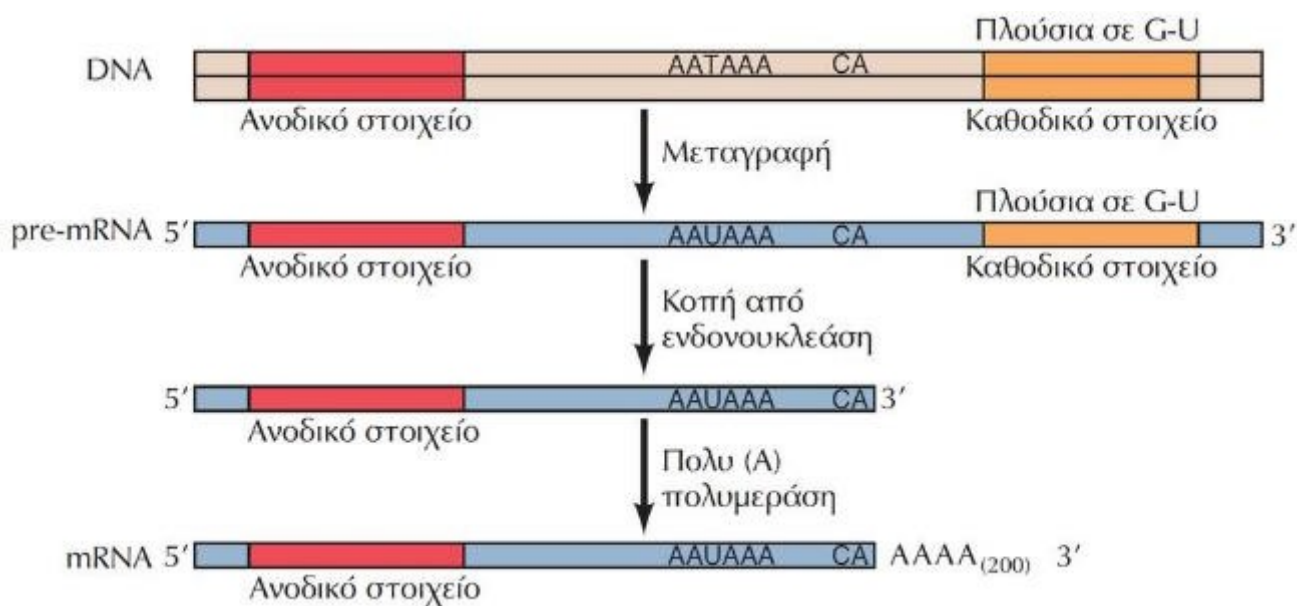
Σχήμα 2.4. Σχηματική αναπαράσταση ποσοτικοποίησης δειγμάτων RNA με χρήση φθορισμόμετρου.

Πολυαδενυλίωση ολικού RNA

mRNA

Η πολυαδενυλίωση είναι μια μετα-μεταγραφική διαδικασία που γίνεται φυσιολογικά στα ωριμα mRNA και έχει σαν στόχο την προστασία του mRNA από αποικοδόμηση ώστε αυτό να φτάσει άθικτο στην περιοχή της πρωτεϊνοσύνθεσης, μεταφέροντας έτσι αυτούσια την πληροφορία του DNA. Η παραγωγή του ευκαρυωτικού mRNA περιλαμβάνει επιπρόσθετα στάδια μετά την μεταγραφή. Και τα δύο άκρα του μεταγράφου τροποποιούνται με την προσθήκη επιπλέον νουκλεοτιδίων. Το 5' άκρο του RNA τροποποιείται αμέσως μετά την εμφάνισή του με την προσθήκη μιας “καλύπτρας”. Η τριφωσφορική ομάδα του αρχικού μεταγράφου αντικαθίσταται από ένα νουκλεοτίδιο που προστίθεται σε αντίθετο προσανατολισμό (3'→5'), “σφραγίζοντας” με αυτόν τον τρόπο το άκρο. Το 3' άκρο τροποποιείται εξαιτίας της προσθήκης μιας σειράς νουκλεοτιδίων αδενυλικού οξέος

(πολυαδενυλικό οξύ ή πολυ(A) ή poly(A)) αμέσως μετά την αποκοπή του (Σχήμα 2.5). Η 3' τερματική αλληλουχία από κατάλοιπα A συχνά περιγράφεται ως ουρά πολυ(A), η οποία υπάρχει κανόνα στα κυτταρικά mRNA. Η αλληλουχία πολυ(A) δεν κωδικοποιείται στο DNA αλλά προστίθεται στο RNA, μέσα στον πυρήνα, μετά την μεταγραφή. Η προσθήκη της πολυ(A) καταλύεται από το ένζυμο πολυ(A) πολυμεράση (poly(A) polymerase), η οποία προσθέτει περίπου 200 κατάλοιπα A στο ελεύθερο 3'-OH άκρο του mRNA. Η αλληλουχία πολυ(A), τόσο του πυρηνικού RNA όσο και του mRNA είναι συνδεδεμένη με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται πολυ(A) συνδεόμενη πρωτεΐνη (PABP, Poly(A)-Binding Protein). Κάποιες από τις επιδράσεις της πολυ(A) στις ιδιότητες του mRNA, όπως η σταθερότητα ή η ικανότητα να προστατεύεται από την αποικοδόμηση, σχετίζονται με την σύνδεση της πολυ(A) με την PABP [119].



Σχήμα 2.5. Ωρίμανση των 3'- άκρων των mRNA

microRNAs

Τα microRNAs φυσιολογικά στερούνται poly(A) ουράς. Ωστόσο, πραγματοποιείται πολυαδενυλίωση των ώριμων μορίων microRNAs, για να προστεθούν κατάλοιπα αδενοσίνης στο 3' άκρο των ώριμων μορίων miRNA, ούτως ώστε να είναι ικανή η πρόσδεση του τροποποιημένου poly(T) εκκινήτη που χρησιμοποιείται στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής που ακολουθεί. Έτσι επιτυγχάνεται αύξηση του μέγθους των συμπληρωματικών μορίων DNA (cDNA) που παράγονται προκειμένου να είναι εφικτή η περαιτέρω ενίσχυσή τους μέσω της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR) (Σχήμα 2.6.) Η αντίδραση της πολυαδενυλίωσης πραγματοποιείται με το ένζυμο, της poly(A) πολυμεράσης (PAP), το οποίο απομονώνεται από το βακτήριο *Escherichia coli* και λειτουργεί προσθέτοντας μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP) στο 3' άκρο των μορίων RNA,

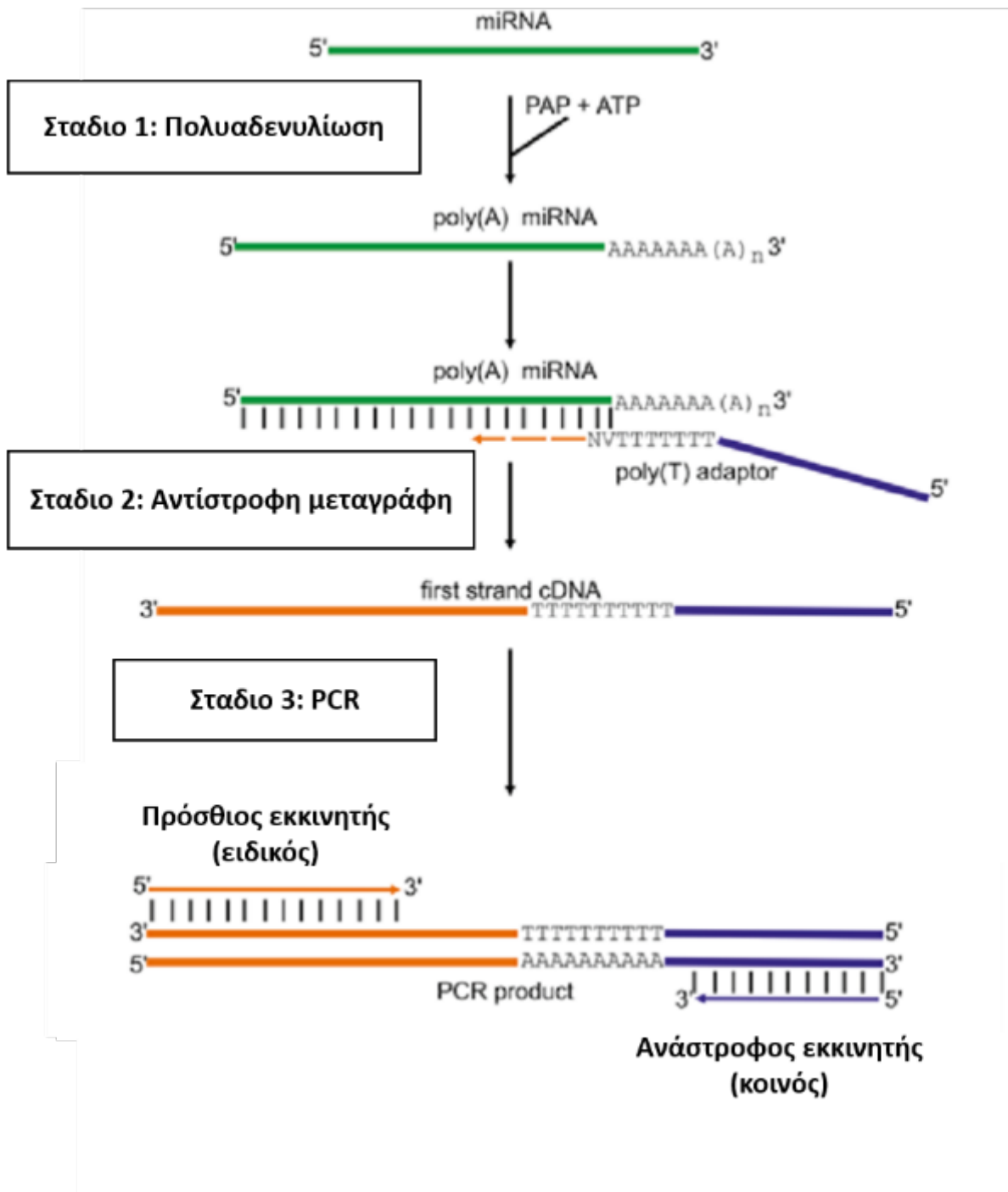
χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και χωρίς να απαιτεί την ύπαρξη κάποιου μορίου εκκινητή.

Για την αντίδραση πολυαδενυλίωσης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω συστατικά με τελικό όγκο 10μL:

- 1 μL απο το ρυθμιστικό διάλυμα 10x Buffer (50 mM Tris-HCl pH = 7,9, 250 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) με τελική συγκέντρωση 1x Buffer
- 0.8 μL ATP(10mM) με τελική συγκέντρωση 0.8 mM
- 0,2 μL E.coli Poly(A) Polymerase (New England Biolabs #M0276) 5Units/μL και τελική συγκέντρωση 1Units
- 1 μL RNA
- 7 μL dH₂O

Οι συνθήκες της αντίδρασης βασίστηκαν στην επώαση σε θερμοκρασιακό κυκλοποιητή, ο οποίος ήταν ο ABI Thermal cycler 9700 (Applied BiosystemsTM, Thermo Fischer Scientific Inc.) με το παρακάτω θερμικό πρωτόκολλο:

1. 37 °C για 60 min
2. 65 °C για 10 min



Σχήμα 2.6. Στάδια παραγωγής PCR προϊόντος από ένα ώριμο miRNA μόριο.

Αντίστροφη μεταγραφή των μορίων mRNA και microRNAs για τη σύνθεση μονόκλωνου cDNA (reverse transcription, RT)

Αρχή Μεθόδου

Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT), δηλαδή η μεταγραφή RNA σε συμπληρωματικό μόριο DNA (complementary DNA, cDNA), βασίζεται στη δράση ενός ιικού ενζύμου, της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase, RTase) και πραγματοποιείται *in vivo* σε ρετροϊούς. Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι μια RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, η οποία δημιουργεί συμπληρωματικά μόρια DNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το RNA. Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής *in vitro*, στα μόρια RNA υβριδοποιούνται μόρια κατάλληλου εκκινητή, στα οποία η RTase προσθέτει τα συμπληρωματικά με το RNA τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια για τη δημιουργία του cDNA. Η χρήση ειδικευμένου, ως προς το μόριο που μας ενδιαφέρει, εκκινητή αυξάνει την ειδικότητα του προϊόντος, δηλαδή καθορίζει ποια RNA μόρια θα μεταγραφούν αντίστροφα σε cDNA αφού εξαλείφεται ενδεχόμενος ανταγωνισμός που θα προέκυπτε από έναν μη εξειδικευμένο εκκινητή (universal). Τρεις διαφορετικές κατηγορίες εκκινητών χρησιμοποιούνται στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής: τα oligομερή δεοξυθυμιδίνης (oligo-dT), τα τυχαία εξαμερή (random hexamers) και ειδικός εκκινητής για συγκεκριμένο γονίδιο στόχο.

Η χρήση των oligονουκλεοτιδίων δεοξυθυμιδίνης βασίζεται στην πολυαδενυλίωση που υφίστανται όλα τα ευκαρυωτικά μόρια mRNA κατά την ωρίμανσή τους. Έτσι, οι εκκινητές αυτοί υβριδοποιούνται στην poly(A) ουρά των ευκαρυωτικών μορίων mRNA, επιτρέποντας έτσι τη δημιουργία μορίων cDNA μόνο από τα μετάγραφα mRNA. Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό για τον περαιτέρω ακριβή προσδιορισμό του αριθμού των μεταγράφων mRNA που εκφράζονται ελάχιστα. Τα τυχαία εξαμερή υβριδοποιούνται χωρίς καμία ειδικότητα στο συνολικό πληθυσμό των μορίων RNA που έχουν εκχυλιστεί προηγουμένως, επιτρέποντας έτσι σε όλα τα μόρια RNA να δράσουν ως εκμαγεία για τον σχηματισμό μορίων cDNA (ανεξαρτήτως πολυ-A ουράς). Μέγιστη ειδικότητα κατά την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικού εκκινητή εξειδικευμένου ως προς την αλληλουχία του γονιδίου που επιθυμούμε να μεταγράψουμε αντίστροφα ώστε να υβριδοποιείται μόνο στα μετάγραφα mRNA που προκύπτουν από τη μεταγραφή του συγκεκριμένου γονιδίου. Σε περιπτώσεις που υπάρχει η επιθυμία αντίστροφης μεταγραφής πολυαδενυλιωμένων μορίων miRNAs, δε χρησιμοποιείται μια απλή αλληλουχία oligo-dT ως εκκινητής, αλλά ένας τροποποιημένος oligo-dT εκκινητής που ονομάζεται oligo-dT-adapter με αλληλουχία: 5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGG-TTTTTTTTTTTTTVN-3', όπου V = G, A, C, και N = G, A, T, C. Ουσιαστικά το 5' άκρο του oligo-dT- adapter περιλαμβάνει ένα oligονουκλεοτιδικό τμήμα μήκους 32 νουκλεοτιδίων, το οποίο ονομάζεται αλληλουχία προσαρμογέας, και τα 12 κατάλοιπα θυμιδίνης που υπάρχουν υβριδοποιούνται με τις αντίστοιχες αδενοσίνες που έχουν προστεθεί κατά την πολυαδενυλίωση στα μόρια miRNAs. Επιπλέον, προκειμένου να αποφευχθεί η τυχαία πρόσδεση του εκκινητή στην poly(A) ουρά, εξαιτίας του τυχαίου αριθμού των αδενοσινών που ενσωματώνονται κατά τη διάρκεια της πολυαδενυλίωσης, ο oligo-dT-adapter φέρει δύο εκφυλισμένα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του. Αυτά έχουν την ικανότητα

να υβριδοποιούνται με περισσότερες από μία αζωτούχες βάσεις. Πιο συγκεκριμένα, το V με όλες εκτός της αδενίνης και το N με οποιαδήποτε από τις τέσσερις βάσεις. Η αδυναμία του νουκλεοτιδίου V να υβριδοποιείται με την αζωτούχο βάση αδενίνη, επιτρέπει την υβριδοποίηση του στο τελευταίο νουκλεοτίδιο του 3' άκρου, πριν την poly(A) ουρά των miRNAs.

Αντίστροφη μεταγραφή του mRNA

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής του mRNA πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια, τα οποία πραγματοποιούνται σε θερμοκρασιακό κυκλοποιητή, ο οποίος ήταν ο ABI Thermal cycler 9700 (Applied Biosystems™, Thermo Fischer Scientific Inc.). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι το RNA που επιθυμείται να μελετηθεί (ως εκμαγείο), τα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές oligo-dT (ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμιδίνης, συμπληρωματικά με την poly-A ουρά των μορίων mRNA), τα dNTPs (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια), το dH₂O (υπερκάθαρο νερό), ένα ρυθμιστικό διάλυμα 5x First Strand Buffer (250 mM Tris-HCl pH=8.3, 375 mM KCl και 15 mM MgCl₂), το ρυθμιστικό διάλυμα διθειοθρεϊτόλης (DTT) το οποίο αποτρέπει την οξείδωση των θειολομάδων και ο αναστολέας ριβονουκλεασών RNase Inhibitor. Η αντίστροφη μεταγραφάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV). Το ένζυμο αυτό είναι μία RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση που έχει την ικανότητα να μετατρέπει το γενετικό υλικό του ιού από τη μορφή του μονόκλωνου RNA σε δίκλωνο DNA, έτσι ώστε να μπορεί να ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό του ξενιστή και να καταφέρει να σχηματίσει το προϊόν. Η M-MLV είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη για την παρασκευή cDNA καθώς και για τη μεταγραφή των RNA μορίων σε συμπληρωματικά μόρια DNA (cDNA) κατά την αντίδραση της RT και παρουσιάζει έλλειψη δραστηριότητας 3'→5' εξωνουκλεάσης.

Για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής στο πρώτο στάδιο χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω συστατικά με τελικό όγκο πρώτου σταδίου 12μL:

- 1μL oligo-dT (100μM)
- 1 μL dNTPs (100mM)
- 1 μL RNA (απο διαφορετικές συγκεντρώσεις 1600ng/μL 800ng/ μL 400ng/ μL 200ng/μL 100ng/μL για να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση που ήταν τα 200ng/μL όπως θα αναλυθεί και παρακάτω)
- 9 μL dH₂O

Οι συνθήκες για το πρώτο στάδιο βασίστηκαν στην επώαση του μίγματος στο θερμικό κυκλοποιητή στους 65 °C για 5 min και στη συνέχεια κατευθείαν στον πάγο στους 0 °C

Για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής στο δεύτερο στάδιο προστέθηκαν τα παρακάτω συστατικά με τελικό όγκο 20 μL :

- 4μL 5xBuffer
- 2 μL DTT 0.1M
- 1 μL RNaseOUT 40 Units/μL
- 1 μL M-MLV 200 Units/μL

Οι συνθήκες για το δεύτερο στάδιο βασίστηκαν στην επώαση του μίγματος στο θερμοκρασιακό κυκλοποιητή

1. 37 °C στους 52 min
2. 70 °C στους 15 min

Αντίστροφη μεταγραφή miRNA

Οι συνθήκες και τα συστατικά της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίστροφη μεταγραφή των πολυαδενυλιωμένων miRNAs διαφέρουν από αυτές που περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο μόνο σε δύο σημεία: Το RNA που χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα είναι πολυαδενυλιωμένο και οι εκκινητές που υβριδοποιούνται είναι oligo-dT-adapter (τροποποιημένοι oligo-dT)

Για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής στο πρώτο στάδιο χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω συστατικά με τελικό όγκο πρώτου σταδίου 12μL:

- 1μL oligo-dT adapter (100μM)
- 1 μL dNTPs (100mM)
- 10 μL πολυαδενυλιωμένου RNA

Οι συνθήκες για το πρώτο στάδιο βασίστηκαν στην επώαση του μίγματος στο θερμικό κυκλοποιητή στους 65 °C για 5 min και στη συνέχεια κατευθείαν στον πάγο στους 0 °C

Για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής στο δεύτερο στάδιο τα συστατικά και οι συνθήκες είναι ίδιες όπως περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο

Μετά το τέλος της αντίστροφης μεταγραφής γίνεται αραίωση των δειγμάτων 1:10

Αντίστροφη μεταγραφή με τυχαία εξαμερή

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής με τυχαία εξαμερή έγινε με το πρωτόκολλο Takara PrimerScript RT Reagent kit. Πραγματοποιήθηκε σε ένα στάδιο, σε θερμοκρασιακό κυκλοποιητή, ο οποίος ήταν ο ABI Thermal cycler 9700 (Applied BiosystemsTM, Thermo Fischer Scientific Inc.). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι το RNA που επιθυμείται να μελετηθεί (ως εκμαγείο), τα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές oligo-dT (ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμιδίνης, συμπληρωματικά με την poly-A ουρά των μορίων mRNA), τα τυχαία εξαμερή (random hexamers) , το dH₂O (υπερκάθαρο νερό), ένα ρυθμιστικό διάλυμα 5x First Strand Buffer (250 mM Tris-HCl pH=8.3, 375 mM KCl και 15 mM MgCl₂). Η αντίστροφη μεταγραφάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η PrimerScript RT enzyme

Για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής στο πρώτο στάδιο χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω συστατικά με τελικό όγκο 10μL:

- 5.5 μL dH₂O
- 2μL 5xBuffer
- 0.5μL PrimerScript RT enzyme
- 0.5μL oligo-dT
- 0.5 μL τυχαία εξαμερή
- 1 μL RNA

Οι συνθήκες της αντίδρασης βασίστηκαν στην επώαση σε θερμοκρασιακό κυκλοποιητή, ο οποίος ήταν ο ABI Thermal cycler 9700 (Applied BiosystemsTM, Thermo Fischer Scientific Inc.) με το παρακάτω θερμικό πρωτόκολλο σε ένα στάδιο:

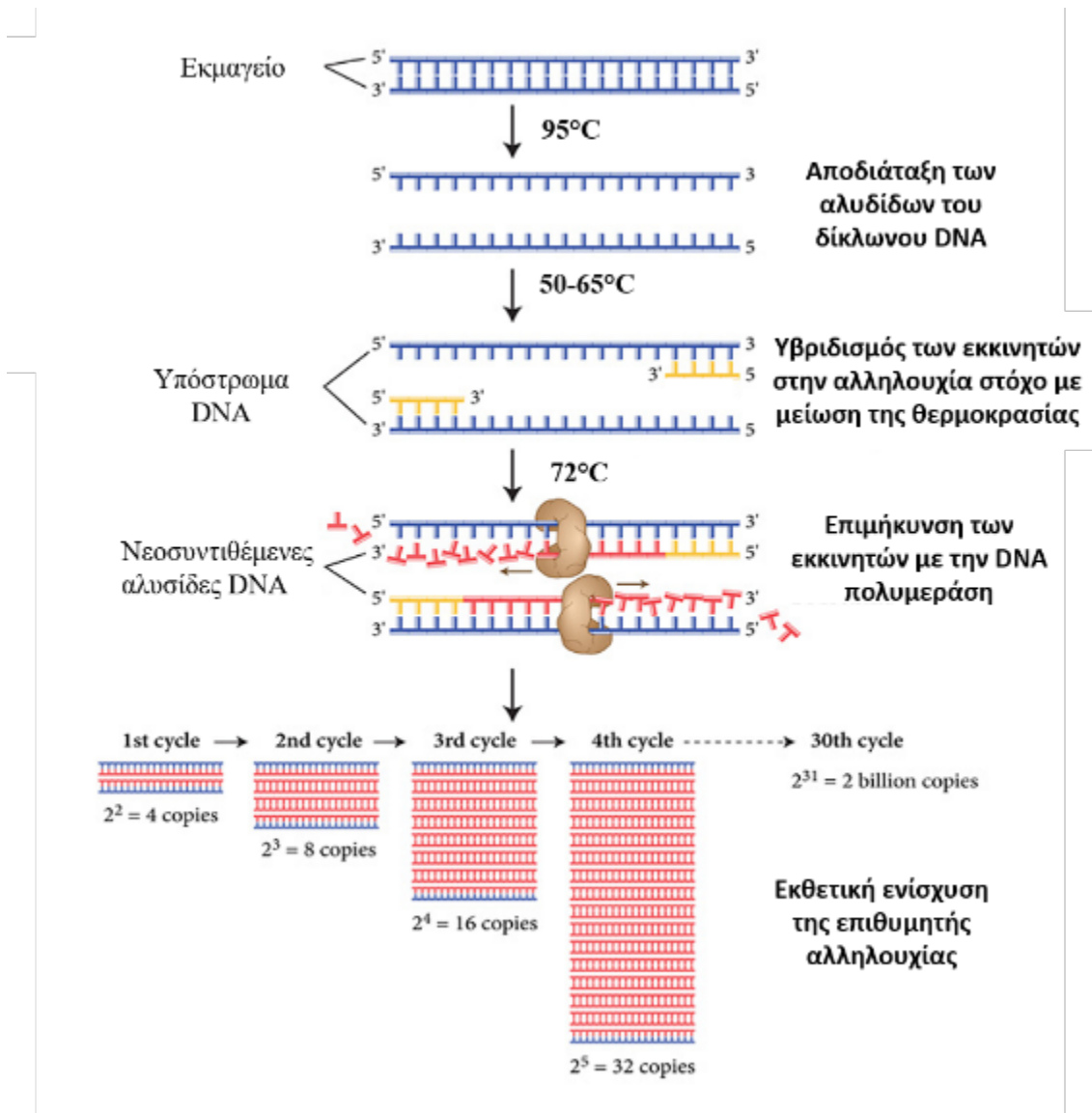
1. 37 °C για 15min
2. 85 °C για 5sec
3. 4 °C ∞

Συμβατική αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR)

Αρχή μεθόδου PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) θα μπορούσε να οριστεί ως μια *in vitro* ενζυμική μέθοδος επιλεκτικής ενίσχυσης αλληλουχιών DNA. Η αλληλουχία αυτή μπορεί να είναι ένα εσωτερικό μικρότερο τμήμα ενός μορίου DNA, είτε για μια αυτόνομη πολυνουκλεοτιδική αλληλουχία DNA. Η PCR αποτελεί, μεταξύ άλλων, βασικό εργαλείο για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης καθώς το cDNA, το οποίο αντιπροσωπεύει τον πληθυσμό των μορίων RNA ενός δείγματος μετά από μια αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα της αντίδρασης. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της PCR είναι η μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα του προσδιορισμού των επιθυμητών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Τα απαραίτητα συστατικά για την ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας είναι η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, δύο ολιγονουκλεοτίδια που κατέχουν το ρόλο των εκκινητών της αντίδρασης και οριοθετούν την επιθυμητή αλληλουχία προς ενίσχυση, το μίγμα των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), και το ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιέχει κατιόντα Mg^{2+} .

Η PCR πραγματοποιείται σε «κύκλους» τριών επαναλαμβανόμενων σταδίων που περιλαμβάνουν την αποδιάταξη των μορίων DNA, τον υβριδισμό των εκκινητών σε συγκεκριμένα σημεία της αλληλουχίας DNA και την επιμήκυνση των εκκινητών μέσω πολυμερισμού. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε ένα θερμοκρασιακό κυκλοποιητή (thermal cycler) που στην ουσία χρησιμοποιείται για να επιτυγχάνεται η αυξομείωση και η ρύθμιση των συγκεκριμένων θερμοκρασιών του κάθε κύκλου της αντίδρασης [120]. Σε πρώτο στάδιο (denaturation), το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται σε θερμοκρασία $95^{\circ}C$ για 2 min προκειμένου να προκληθεί το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA και να προκύψει μονόκλωνο DNA. Στο επόμενο σύντομο στάδιο (annealing), μειώνεται η θερμοκρασία αρκετά στους $50-65^{\circ}C$ ανάλογα με τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών για 30 sec και έτσι επιτρέπεται στους εκκινητές να υβριδοποιηθούν στην επιθυμητή αλληλουχία. Το στάδιο αυτό είναι καθοριστικό για την ειδικότητα των προϊόντων που θα παραχθούν από την PCR. Τέλος, ακολουθεί η προέκταση των αλληλουχιών των εκκινητών (extension) σε θερμοκρασία $72^{\circ}C$ για 1 min, όπου η DNA πολυμεράση προσθέτει εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια dNTPs συμπληρωματικά με προσανατολισμό 5' προς 3', και έτσι το γενετικό υλικό πολλαπλασιάζεται (**Σχήμα 2.7**). Ο αριθμός των κύκλων σε κάθε αντίδραση PCR δε ξεπερνάει τους 40, γιατί το ένζυμο παύει να δουλεύει με σωστούς ρυθμούς και έχει αρχίσει η εξάντληση των αντιδραστηρίων. Επιπλέον, πριν αρχίσουν οι κύκλοι της αντίδρασης, απαιτείται η θερμική ενεργοποίηση της πολυμεράσης (initial denaturation) γι' αυτό εκτίθεται στους $94-95^{\circ}C$ για μερικά λεπτά. Τέλος, όταν τελειώσουν οι κύκλοι της αντίδρασης, τα προϊόντα της PCR διατηρούνται στους $4^{\circ}C$ [121].



Σχήμα 2.7. Στάδια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR

Γονίδια σταθερής έκφρασης (housekeeping genes)

Για να επιτευχθεί η μέγιστη αναλυτική ικανότητα της PCR, αναγκαία κρίνεται η εισαγωγή κατάλληλων μεθόδων κανονικοποίησης αλλά και επικύρωσης των αποτελεσμάτων. Για την αποφυγή παραγόντων, όπως για παράδειγμα διαφορές ανάμεσα στα δείγματα κατά την απομόνωση του RNA καθώς και διαφορές στην απόδοση στην αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής αλλά και της ίδια της PCR, χρησιμοποιούνται ειδικά γονίδια (normalizing genes) για τον καθορισμό των επιπέδων έκφρασης των μορίων στόχων με αποτέλεσμα τη διεξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Τα γονίδια αναφοράς (reference genes) αποτελούν αλληλουχίες διαφορετικές από τις αλληλουχίες-στόχους που χρησιμοποιούνται για τον εσωτερικού ελέγχου της αντίδρασης και την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Ένα γονίδιο για να χρησιμοποιηθεί ως γονίδιο αναφοράς θα πρέπει να πληρεί

ορισμένα σημαντικά κριτήρια. Το πιο σημαντικό από αυτά τα κριτήρια είναι το επίπεδο έκφρασης του να μην επηρεάζεται από διάφορους πειραματικούς παράγοντες. Η σημαντικότερη ομάδα ευκαρυωτικών γονιδίων στην οποία έχουν αναζητηθεί γονίδια αναφοράς είναι η ομάδα των γονιδίων σταθερής έκφρασης "housekeeping genes". Πρόκειται για γονίδια για τη διατήρηση βασικών κυτταρικών λειτουργιών απαραίτητων για την επιβίωση ενός κυττάρου ανεξαρτήτως του ιστού ή του οργανισμού στον οποίο εντοπίζονται. Τα house keeping γονίδια εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού υπό φυσιολογικές συνθήκες και υπό παθο-φυσιολογικές συνθήκες ανεξάρτητα από το είδος του ιστού, το αναπτυξιακό στάδιο, τη φάση του κυτταρικού κύκλου ή από εξωτερικά σήματα. Επιπλέον εξαιτίας της σταθερής έκφρασής τους, χρησιμοποιούνται σε ένα μεγάλο εύρος πειραματικών και υπολογιστικών διαδικασιών ως παράγοντες εσωτερικού ελέγχου όπως στη μελέτη μεταξύ mRNA ενός ή περισσότερων γονιδίων σε διαφορετικά δείγματα καθώς και miRNA αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο σταθερής έκφρασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της ποιότητας και της ποσότητας του cDNA, και συνεπώς του RNA, αλλά και την απόδοση της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής. Τα πιο μελετημένα housekeeping γονίδια που χρησιμοποιούνται σε επίπεδο ρουτίνας σε μελέτες γονιδιακής έκφρασης είναι τα εξής: 1. ACTB (beta-actin), 2. GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), 3. HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1), 4. B2M (beta-2-microglobulin), 5. RPLP1 (ribosomal protein, large, P1), 6. LDHA (lactate dehydrogenase A) και 7. το 18S ριβοσωμικό RNA.

Στην παρούσα μελέτη, για τον έλεγχο ποιότητας των δειγμάτων cDNA που προέκυψαν από την αντίστροφη μεταγραφή των mRNAs, ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε το ανθρώπινο γονίδιο της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης, (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) ένα ένζυμο 37kDa. Επίσης μελετήθηκε και ένα ακόμη γονίδιο αναφοράς που ευθύνεται για την παραγωγή ενός ενζύμου που ονομάζεται φωσφοριβοσυλοτρανσφεράση 1 της υποξανθίνης (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, HPRT1). Ο έλεγχος έκφρασης των ανθρώπινων γονιδίων αναφοράς GAPDH και HPRT1 στα δείγματα cDNAs που μελετήθηκαν, πραγματοποιήθηκε μέσω αντιδράσεων real-time PCR αρχικά, και στη συνέχεια λόγω μη ικανοποιητικού αποτελέσματος κρίθηκε απαραίτητο να πραγματοποιηθεί Nested PCR.

Για τη μελέτη των miRNAs, χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς το *SNORD48* (ή *RNU48*). Οι περιοχές εσωνίων, γονιδίων ριβοσωματικών πρωτεϊνών μπορούν να 'φιλοξενήσουν' μη κωδικοποιημένα μικρά πυρηνισκικά RNAs (snoRNAs), όπως το *SNORD48*, τα οποία παράγονται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας pre-mRNA. Τα snoRNAs αποτελούν μέρος των μικρών σωματιδίων νουκλεοτιδικής ριβονουκλεοπρωτεΐνης (snoRNPs) που εμπλέκονται στην επεξεργασία και την τροποποίηση pre-rRNA.

Σχεδιασμός και σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές στη συμβατική PCR

Η παραγωγή των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές στις αντιδράσεις PCR αποτελεί κομβικό σημείο κατά το σχεδιασμό της τεχνικής. Οι βασικοί κανόνες που ακολουθούνται κατά το σχεδιασμό ενός ζεύγους εκκινητών είναι οι παρακάτω [209, 210]:

- Το μέγεθος τους θα πρέπει να κυμαίνεται από 18 – 25 νουκλεοτίδια, θα πρέπει να έχουν παρόμοια θερμοκρασία τήξης (melting temperature, T_m) και παρόμοια ποσοστά G+C βάσεων (περίπου 45-55%)
- Θα πρέπει να αποφεύγονται διαδοχικές επαναλήψεις των ίδιων νουκλεοτιδίων, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για επαναλήψεις GC κοντά στο 3' άκρο του εκκινητή.
- Τα 3' άκρα των εκκινητών δε θα πρέπει να είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους ούτως ώστε να ελαχιστοποιείται η δημιουργία διμερών εκκινητών.
- Θα πρέπει να ελέγχεται η ειδικότητα της υβριδοποίησης τους (ιδιαίτερα στο 3' άκρο) στη επιθυμητή αλληλουχία μέσω κατάλληλων αλγορίθμων (π.χ. nucleotide BLAST).
- Θα πρέπει να αποφεύγεται η ενίσχυση μορίων γενωμικού DNA που πιθανώς να έχουν απομονωθεί μαζί με το ολικό RNA. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω σχεδιασμού των εκκινητών σε περιοχές συρραφής εξονίων ή/και σε εξώνια που διαχωρίζονται μεταξύ τους από εσώνια μεγάλου μεγέθους (> 1000 νουκλεοτίδια).

Συμβατική PCR για το γονίδιο αναφοράς GAPDH

Στην παρούσα μελέτη ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε το *GAPDH*. Το γονίδιο κωδικοποιεί το ένζυμο αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης. Οι εκκινητές για την ενίσχυση του cDNA που αντιστοιχεί στα mRNA μόρια του *GAPDH* σχεδιάστηκαν με βάση τη δημοσιευμένη αλληλουχία mRNA του γονιδίου (GenBank™ Accession Number = NM_002046.7). Ο πρόσθιος εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό του συγκεκριμένου γονιδίου ήταν συμπληρωματικός με μία αλληλουχία του εξωνίου 2, ενώ ο ανάστροφος με μία αλληλουχία του εξωνίου 4 (**Πίνακας 2.1**). Το PCR προϊόν το οποίο προκύπτει έχει μήκος 223bp.

Πίνακας 2.1. Ιδιότητες εκκινήτων για το γονίδιο του *GAPDH*.

Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος (nt)	Ποσοστό GC (%)	T _m (°C)
GAPDH Ex2F	5'-CCACATCGCTCAGACACCCAT-3'	20	55,0	60,1
GAPDH Ex4R	5'-TGACAAGCTTCCCGTTCTCA-3'	20	50,0	59,2

Συνθήκες αντίδρασης της συμβατικής PCR για το γονίδιο αναφοράς GAPDH

Η έκφραση του γονιδίου της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων υπό μελέτη καθώς παρουσιάζει σταθερή έκφραση χωρίς σημαντικές διακυμάνσεις. Επομένως, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κανονικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων. Η κανονικοποίηση χρησιμοποιείται κυρίως για να επιτευχθεί η διόρθωση των διακυμάνσεων, που ενδεχομένως λαμβάνουν χώρα, στην απόδοση της αντίστροφης μεταγραφής μεταξύ των δειγμάτων.

Αρχικά, έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών PCR για κάθε ένα από τα ζευγάρια των προαναφερθέντων εκκινήτων. Για την ενίσχυση τμημάτων των cDNAs των γονιδίων αυτών χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω συστατικά με τελικό όγκο 25μL:

- 2,5 μL 10xBuffer (100mM Tris-HCl pH = 8,3 στους 25 °C, 15mM (NH₄)₂SO₄, 0,01 % (v/v) Tween 20)
- 0,5 μL 10mM από μείγμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs
- 1 μL Πρόσθιο εκκινήτη (Forward primer) 10mM
- 1 μL Ανάστροφο εκκινήτη (Reverse primer) 10mM
- 0,1 μL DNA πολυμεράση (Taq) polymerase (Kapa Biosystems)
- 0,5 μL cDNA συγκεντρώσεων 100ng και 400ng
- 19,4 μL dH₂O

Οι συνθήκες της αντίδρασης βασίστηκαν στην επώαση σε θερμοκρασιακό κυκλοποιητή, ο οποίος ήταν ο Veriti 96-Well Fast Thermo Cycler (Applied Biosystems™, Thermo Fischer Scientific Inc.) με το παρακάτω θερμικό πρωτόκολλο:

1. 95 °C για 3 min
2. 95 °C για 30 sec
3. Θερμοκρασία αναλόγως του T_m των εκκινητών για 30 sec
4. 72 °C για 1 min
5. 4°C

Όσον αφορά τις επαναλήψεις των βημάτων 1-4, δηλαδή τον αριθμό των κύκλων, έγιναν διάφορες δοκιμές που αναφέρονται στο κεφάλαιο αποτελέσματα.

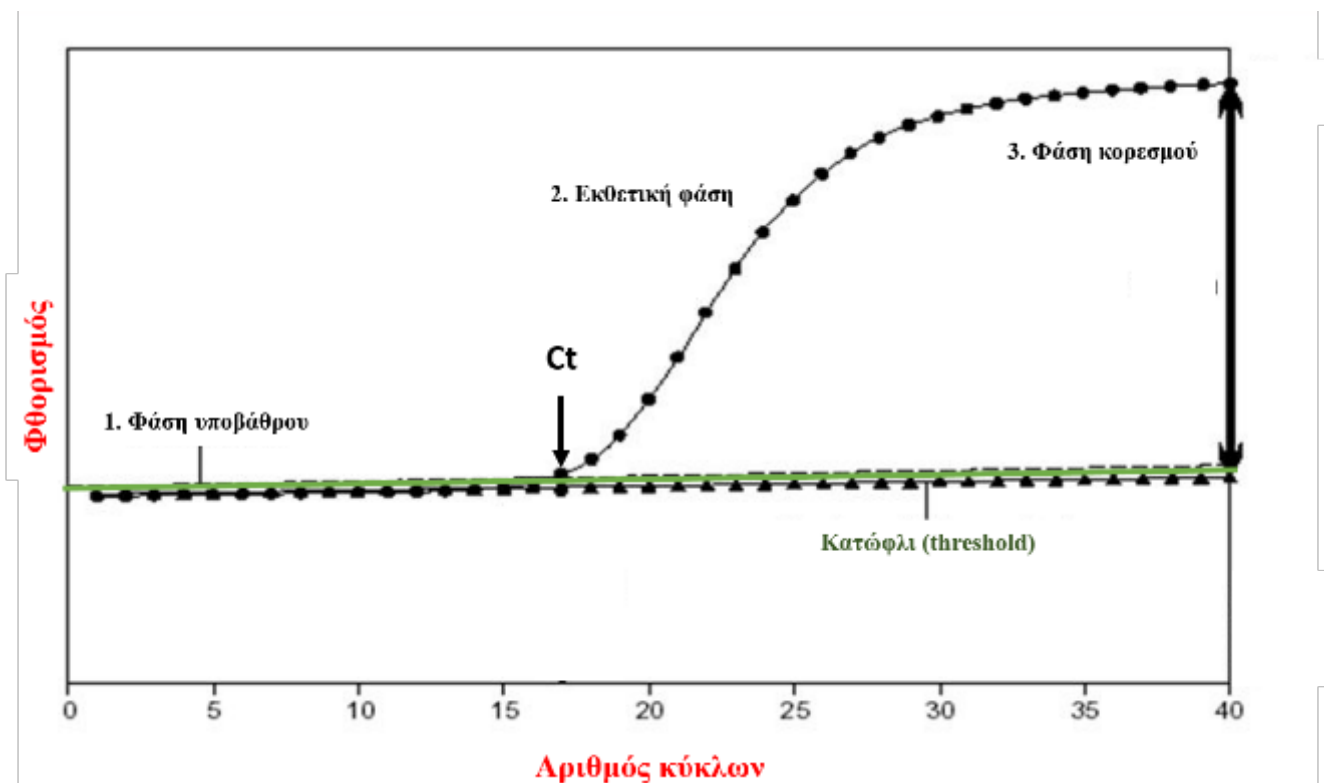
Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (quantitative real-time PCR, qPCR)

Αρχή μεθόδου

Η PCR πραγματικού χρόνου είναι μία ποσοτική αντίδραση PCR κατά την οποία ο πολλαπλασιασμός του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα. Η μέθοδος της real-time PCR βασίζεται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό μιας οριοθετημένης αλληλουχίας DNA μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και παράλληλα στην ιχνηθέτηση των προϊόντων της αντίδρασης με φθορίζοντα μόρια ή σημασμένους ιχνηθέτες με τη μέτρηση του σήματος εκπομπής φθορισμού. Η εκπεμπόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία από τα μόρια αυτά είναι ανάλογη με το ειδικό προϊόν που σχηματίζεται κατά τη φάση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Το σήμα αυτό μετράται μετά από κάθε κύκλο της αντίδρασης, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), συνεπώς είναι εφικτή η γνώση της ποσότητας ανά πάσα στιγμή κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, σε πραγματικό χρόνο [121]

Η αντίδραση της PCR σε πραγματικό χρόνο διακρίνεται σε επιμέρους φάσεις. Οι πρώτοι κύκλοι της αντίδρασης, συνήθως οι κύκλοι 3-15, συνιστούν τη φάση υποβάθρου ή θορύβου (background phase ή baseline). Σε αυτή τη φάση έχει ήδη αρχίσει η παραγωγή σήματος, ωστόσο τα επίπεδα είναι πολύ χαμηλά και δεν ξεχωρίζουν από το σήμα του υποβάθρου. Στην πορεία ακολουθεί η πρώιμη εκθετική φάση (exponential growth phase) ή λογαριθμική φάση (log phase), καθώς η αντίδραση φτάνει σε μεγαλύτερο αριθμό κύκλων δημιουργείται συσσώρευση του προϊόντος της αντίδρασης με αποτέλεσμα το σήμα φθορισμού να ξεπερνά κάποια στιγμή το σήμα υποβάθρου και στη συνέχεια αυξάνει εκθετικά για τους επόμενους κύκλους της αντίδρασης. Στη φάση αυτή, σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια

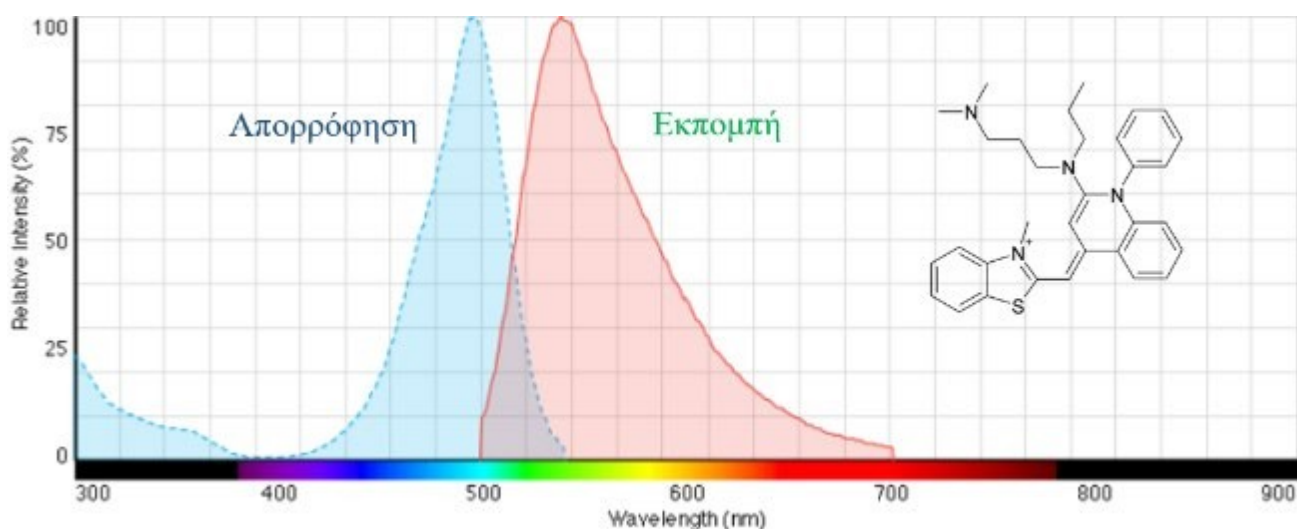
και η απόδοση της αντίδρασης προσεγγίζει το 100%. Ο αριθμός των κύκλων (C_T value) στον οποίο το σήμα φθορισμού γίνεται για πρώτη φορά μεγαλύτερο από το σήμα του υποβάθρου και εισέρχεται στη λογαριθμική φάση είναι γνωστός ως αριθμός κύκλων κατωφλιού (threshold cycle, C_T). Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του προς ενίσχυση υποστρώματος τόσο λιγότεροι κύκλοι απαιτούνται για να ξεχωρίσει ο φθορισμός από το σήμα υποβάθρου, χρησιμοποιώντας ως σημείο αναφοράς ένα προκαθορισμένο κατώφλι φθορισμού (threshold). Η τιμή C_T είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος. Ύστερα από έναν αριθμό κύκλων, η αντίδραση περνάει στη γραμμική φάση (linear phase), καθώς κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Επιπλέον, συμβαίνει και αποικοδόμηση του προϊόντος σε πολύ μικρό βαθμό με αποτέλεσμα να μειώνεται η απόδοση της αντίδρασης. Τέλος, η αντίδραση φτάνει στη στατική φάση ή φάση κορεσμού που ονομάζεται και πλατό (plateau) (Σχήμα 2.8.). Αυτή η φάση δημιουργείται είτε μετά την εξάντληση σημαντικών συστατικών της αντίδρασης, όπως της ποσότητας των εκκινητών και του μίγματος dNTPs είτε από κορεσμό του ενζύμου σε συνδυασμό με μειωμένη ενεργότητα έπειτα από πολλούς κύκλους. Στο σημείο αυτό δεν υπάρχει πια ενίσχυση και όλες οι καμπύλες οι οποίες διαχωρίζονται κατά τη γραμμική φάση, προσεγγίζουν το ίδιο επίπεδο φθορισμού [122].



Σχήμα 2.8. Καμπύλη ενίσχυσης της qPCR

2.7.2 Ανίχνευση με το σύστημα SYBR Green I

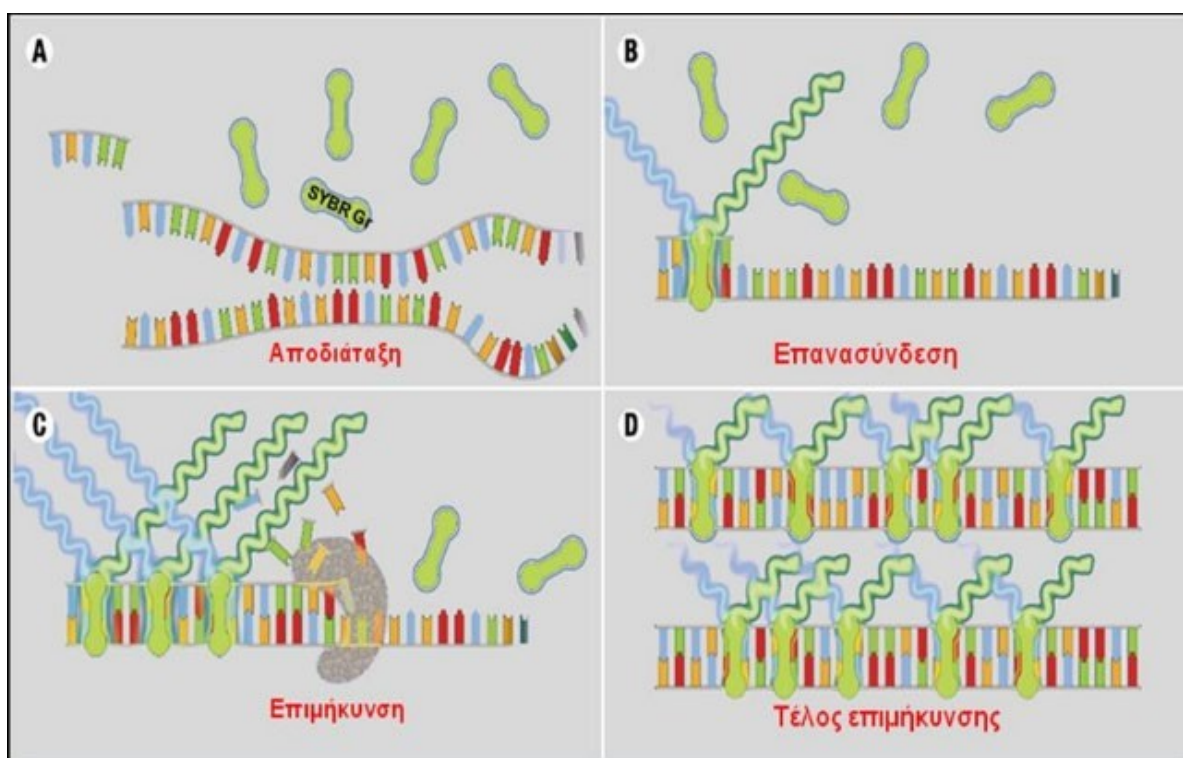
Στην συγκεκριμένη μελέτη η ανίχνευση της ενισχυόμενης DNA ακολουθίας στόχου έγινε με τη χρήση της SYBR green I. Πρόκειται για μία φθορίζουσα χρωστική ένωση που ανήκει στις ασύμμετρες κυανίνες (2- [N-(93-dimethylaminopropyl)-N-(propylamino)-4-[2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3- thiazol-2-yl)-methylidene]-1-phenyl-quinolinium), η οποία διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm απορροφώντας το μπλέ φως και εκπέμπει πράσινο φως στα 520 nm (**Σχήμα 2.9**).



Σχήμα 2.9. Φάσμα εκπομπής και απορρόφησης της SYBR Green I

Η ανίχνευση με SYBR green I κατατάσσεται στην κατηγορία των μη ειδικών σημάτων ανίχνευσης όπου η φθορίζουσα χρωστική συνδέεται μόνο σε δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA), συγκεκριμένα στη μικρή αυλακα του dsDNA και έτσι δεν εμποδίζει τον πολυμερισμό. Σημειώνεται ότι τα μόρια της χρωστικής SYBR Green I δε φθορίζουν, τουλάχιστον σε σημαντικό βαθμό, όταν βρίσκονται ελεύθερα στο διάλυμα της αντίδρασης εξαιτίας αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων των μορίων της χρωστικής. Ωστόσο, η ενσωμάτωσή της στο δίκλωνο DNA κατά τη σύνθεση του έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού όπου η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος (**Σχήμα 2.10**) Η χρήση μη ειδικών συστημάτων ανίχνευσης, όπως στην περίπτωση της SYBR green I παρουσιάζει τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της χρήσης της SYBR green I είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας στόχου, γεγονός που την καθιστά πολύ πιο οικονομική μέθοδο συγκριτικά με τη χρήση ειδικού ανιχνευτή (probe). Ωστόσο τονίζεται ότι αποτελεί ταυτόχρονα και μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο καθώς σε κάθε μόριο DNA που συντίθεται δεσμεύονται πολλά μόρια της φθορίζουσας χρωστικής με αποτέλεσμα την ενίσχυση του σήματος. Αντίθετα, σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η

πρόσδεση της χρωστικής σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση της PCR, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύψουν. Το φαινόμενο αυτό οδηγεί σε λανθασμένη εκτίμηση της ποσότητας της αλληλουχίας στόχου. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο να γίνεται όσον το δυνατόν σωστότερος σχηματισμός εκκινητών, βελτιστοποίηση των συνθηκών αντίδρασης και μετά το πέρας της αντίδρασης απαιτείται περαιτέρω ανάλυση της γραφικής παράστασης της καμπύλης φθορισμού για την διάκριση των επιθυμητών προϊόντων από τα παραπροϊόντα ή τα διμερή των εκκινητών. Αυτό επιτυγχάνεται με ένα επιπλέον θερμικό πρωτόκολλο σταδιακής αποδιάταξης των προϊόντων που σχηματίζονται, ούτως ώστε να κατασκευαστεί η λεγόμενη καμπύλη τήξης (melting curve). Μέσω της καμπύλης τήξης, υπολογίζεται το T_m των εκάστοτε προϊόντων που παράγονται κατά την αντίδραση. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ των ειδικών προϊόντων και των μη ειδικών προϊόντων ή/και των διμερών των εκκινητών που πιθανώς σχηματίζονται κατά την αντίδραση. Πιο συγκεκριμένα, η καμπύλη τήξης κατασκευάζεται, σε πραγματικό χρόνο, καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται βαθμιαία από τους 60 °C έως τους 95 °C και λαμβάνονται παράλληλα επαναλαμβανόμενες μειούμενες τιμές φθορισμού καθώς τα προϊόντα PCR αποδιατάσσονται σταδιακά. Χρησιμοποιώντας την πρώτη αρνητική παράγωγο της καμπύλης φθορισμού-θερμοκρασίας απεικονίζονται γραφικά κορυφές που αντιστοιχούν στα εκάστοτε προϊόντα της αντίδρασης. Τα προϊόντα της PCR με διαφορετικό μήκος νουκλεοτιδίων παρουσιάζουν διακριτές κορυφές καθώς έχουν διαφορετικές θερμοκρασίες τήξης T_m . Επίσης, τα διμερή εκκινητών έχουν μικρότερο μήκος από την επιθυμητή αλληλουχία, εμφανίζουν χαμηλότερη θερμοκρασία τήξης και μπορούν εύκολα να διακριθούν από τα επιθυμητά προϊόντα.



Σχήμα 2.10. Αρχή μεθόδου του συστήματος ανίχνευσης με SYBR Green

2.7.3. Real-time PCR για το γονίδιο αναφοράς GAPDH

Ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε και στην Real-time PCR, το *GAPDH*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης όπως έχει ήδη αναφερθεί. Το γονίδιο *GAPDH* εδράζεται στο χρωμόσωμα 12(p13.31) στον άνθρωπο και περιέχει 10 εξώνια. Οι εκκινητές για την ενίσχυση του cDNA που αντιστοιχεί στα mRNA μόρια του *GAPDH* σχεδιάστηκαν με βάση τη δημοσιευμένη αλληλουχία mRNA του γονιδίου (GenBank™ Accession Number = NM_002046.7). Ο πρόσθιος εκκινητής (*GAPDH Ex2real F*) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 2 και ο ανάστροφος εκκινητής (*GAPDH Ex3real R*) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 3 (**Πίνακας 2.2**). Το προϊόν που παράγεται έχει μήκος 107 bp.

Πίνακας 2.2. Ιδιότητες εκκινητών για το γονίδιο του *GAPDH* για την Real-time PCR.

Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος (nt)	Ποσοστό GC (%)	T _m (°C)
GAPDH Ex2realF	5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3'	19	57,9	59,0
GAPDH Ex3realR	5'-GGGTCATTGATGGCAACAATATC-3'	23	43,5	58,1

2.7.4 Real-time PCR για το γονίδιο αναφοράς HPRT1

Το γονίδιο αυτό τελικά δεν επιλέχθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την real-time PCR. Ωστόσο χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα τα οποία έγιναν για να βρεθεί η ιδανική συγκέντρωση cDNA καθώς και στα δείγματα όπως θα εξηγηθεί και στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων. Το γονίδιο *HPRT1* εδράζεται στο χρωμόσωμα X(q26.2-q26.3) στον άνθρωπο και περιέχει 9 εξώνια. Οι εκκινητές για την ενίσχυση του cDNA που αντιστοιχεί στα mRNA μόρια του *HPRT1* σχεδιάστηκαν με βάση τη δημοσιευμένη αλληλουχία mRNA του γονιδίου (GenBank™ Accession Number = NM_000194.3). Ο πρόσθιος εκκινητής (*Ex2F*) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 2 και ο ανάστροφος (*Ex3R*) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 3 (**Πίνακας 2.3**), οριοθετώντας ένα προϊόν PCR μήκους 151 bp.

Πίνακας 2.3. Ιδιότητες εκκινητών για το γονίδιο του *HPRT1* για την Real-time PCR.

Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος (nt)	Ποσοστό GC (%)	T _m (°C)
HPRT1 Ex2F	5'-TGGAAAGGGTGTTTATTCCTCAT-3'	23	39.13	57,7
HPRT1Ex3R	5'-ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA-3'	22	45.45	60,0

Εκκινητές Real-time PCR για τη μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων των γονιδίων- στόχων.

Με χρήση των λογισμικών Primer Blast, σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές PCR σε πραγματικό χρόνο για την ενίσχυση τμήματος cDNA των διαφορετικών εναλλακτικών μεταγράφων mRNA των γονιδίων-στόχων. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων APAF1, BAK1, BID, BIM, BCL2L12, BOK, BAX, BCLX, MCL1, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7 και KLK8. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον **Πίνακα 2.4**.

Πίνακας 2.4 Ιδιότητες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τα γονίδια-στόχους

Γονίδιο	Όνομα	Αλληλουχία(5'→3')	Μήκος (nt)	Tm (°C)
APAF1	Ex17F	TTCGTGGTCTGCTGATGGTGC	21	64
	Ex19R	ATGTCCTCTGCAATCAGCCACC	22	63
BAK1	Ex3F	GGTCACCTTACCTCTGCAACCT	22	62
	Ex4R	GGTCACCTTACCTCTGCAACCT	22	62
BID	Ex1F	CTGGGCTGGCAAGGGTTCATT	21	64
	Ex2R	TCCGACTCACTCCTGGTTCACA	22	63
BIM	Ex2F	CTTTTGACACAGACAGGAGCCC	22	62
	Ex3R	TGGGCGCATATCTGCAGGTT	20	63
BCL2L12	Ex3F	CCCTCGGCCTTGCTCTCT	18	64
	Ex2/4F	CAACTCCACCTAGGCCAG	19	62
	Ex4R	GGGCCACCAAAGCATAGAAG	20	60
BOK	1a/2F	GCGGGAGAGGTGCGG	15	64
	1b/2F	AGCGGCGGAGGTGC	14	64
	5/2R	CACGTGATGCCAGGC	16	61
	1a/5F	GGCGGGAGAGGCATCA	16	62

	1b/5F	AGCGGCGGAGGCATC	15	63
	In2upF	GCCTCGGGGAATGTCTGTAG	20	61
	6/5R	TGAGGACATCAGTCCATCCGC	21	63
BAX	Ex2F	CCAGCTCTGAGCAGATCATGAAG	23	61
	Ex3R	CAGCTTCTTGGTGGACGCAT	19	62
BCLX	Ex2S/3F	CAGAGCTTTGAACAGGATACTTTTG	25	57
	Ex3R	TGAAGAGTGAGCCCAGCAGA	20	62
MCL1	Ex1LF	CGGTACCTTCGGGAGCAG	18	62
	Ex1a/1bEsF	GAGGGCGACTTTTGGCC	17	61
	Ex2R	CGTCTTCGTTTTTGTATGTCCAGT	23	58
	Ex1F	GACACAAAGCCAATGGGCAGGT	22	64
	Ex3R	ACCAGCTCCTACTCCAGCAACA	22	64
KLK4	Ex2F	CTGTCAGCCGCACACTGTTT	20	61
	Ex3R	AGCGAGCAAGGGTCTGTTGTA	21	62
KLK5	Ex5F	CCGGTGACAAAGCAGGTAGAG	21	61
	Ex6R	GTGAACTTGCAGAGGTTTCGTGTA	23	61
KLK6	Ex4F	TCTGTGGTGGGGTCCTTATCC	21	61
	Ex5R	TAGTCAGGGTGGATCACAGCC	21	61
KLK7	Ex5F	CAGGACTGCACGAAGGTTTACA	22	61
	Ex6R	GTACCTCTGCACACCAACGGT	21	62
KLK8	Ex2/6F	AGCCTGGGCAGGGCG	15	62
	Ex5F	TCCCCAGAAGAAGTGTGAGGA	21	60
	Ex6R	GGATGTGATGCCCTGGAGTG	20	60

Εκκινητές Real-time PCR για τη μελέτη της έκφρασης του miR221 και του miR222 με γονίδιο αναφοράς το SNORD48 (RNU48)

Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του miR-221 και του miR-222 χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανίχνευσης που βασίζεται στη χρωστική SYBR Green. Το μικρό πυρηνισκικό RNA 48 (Small nucleolar RNA 48, SNORD48, RNU48) χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση της έκφρασης του miR-221 και του miR-222, λόγω της σταθερής και αμετάβλητης έκφρασής του σε δείγματα με πολλαπλό μυέλωμα. Για την ενίσχυση των cDNAs που αντιστοιχούν στο miR-221 και στο miR-222 χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός πρόσθιος εκκινητής miR-221 F και ο miR-221 F αντίστοιχα και ο κοινός ανάστροφος εκκινητής (R) ο οποίος υβριδοποιείται στην περιοχή του poly(T) εκκινητή που χρησιμοποιείται στην αντίστροφη μεταγραφή. Για την ενίσχυση των cDNAs που αντιστοιχούν στο μόριο SNORD48 χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός πρόσθιος εκκινητής SNORD48 F και ο κοινός ανάστροφος εκκινητής (R) με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός προϊόντος 105 bp (Πίνακας 2.5)

Πίνακας 2.5: Ιδιότητες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τα γονίδια-στόχους

Όνομα	Αλληλουχία(5'→3')	Μήκος (nt)	Tm (°C)
RNU48	TGATGATGACCCCAGGTA ACTCT	23	60
miR-221	GCTACATTGTCTGCTGGGTTTCA	23	61
miR-222	GAGCTACATCTGGCTACTGGGTAA	24	62
Universal R	GCGAGCACAGAATTAATACGAC	22	57

Συνθήκες αντίδρασης της ποσοτικής real-time PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA

Η αντίδραση της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή 7500 Real-Time PCR System Fast (Applied Biosystems), ο οποίος φέρει κατάλληλη υποδοχή για μικροπλακίδια 96 θέσεων. Ως σύστημα ανίχνευσης επιλέχθηκε αυτό της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green, το οποίο έχει περιγραφεί προηγουμένως.

Αρχικά, έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών ποσοτικής real-time PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA. Για την ποσοτική αντίδραση PCR απαιτούνται τα παρακάτω συστατικά με τελικό όγκο 10μL:

- 5μL *KAPA SYBR FAST qPCR Kit* Master Mix (2X) Universal, στο οποίο προσθέτουμε την παθητική χρωστική ROX (τελική συγκέντρωση 1x) (KAPA Biosystems).
- 1 μL Πρόσθιο εκκινητή 2μM
- 1 μL Ανάστροφο εκκινητή 2μM
- 0,5 μL cDNA
- 2,5 μL dH₂O

Οι συνθήκες της αντίδρασης βασίστηκαν στην επώαση σε θερμοκρασιακό κυκλοποιητή, ο οποίος ήταν ο 7500 Real-Time PCR System Fast (Applied Biosystems), με το παρακάτω θερμικό πρωτόκολλο:

1. 95 °C για 3 min
2. 95 °C για 30 sec
3. 60 °C για 30 sec
4. 40 επαναλήψεις των βημάτων 1-3

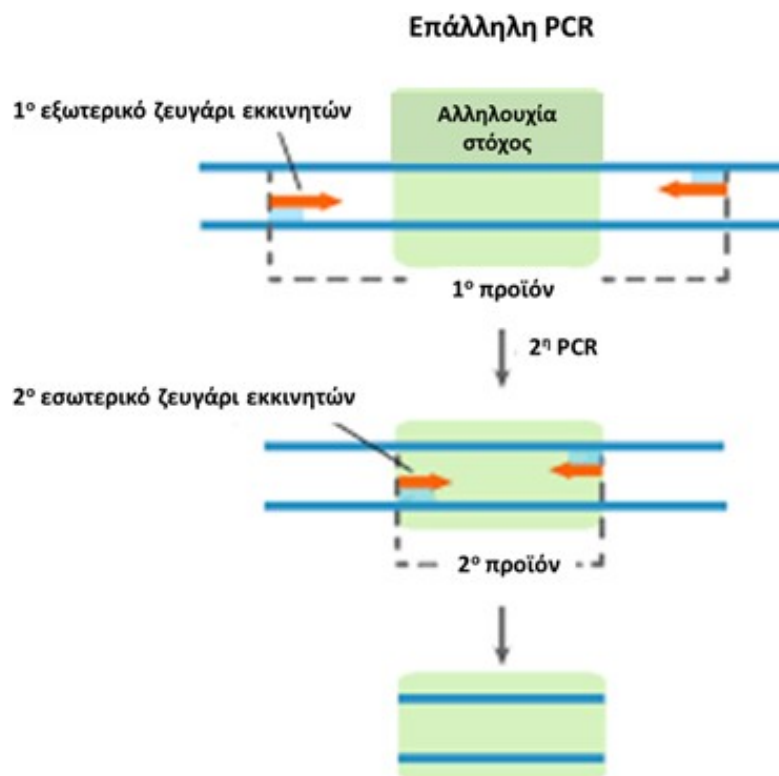
Στη συνέχεια για δημιουργία της καμπύλης τήξης συνεχίστηκε το εξής θερμοκρασιακό πρωτόκολλο:

5. 95 °C για 15 sec
6. 60 °C για 1 min
7. 95 °C για 15 sec

Επάλληλη PCR (Nested PCR)

Αρχή Μεθόδου

Η επάλληλη PCR είναι μία τροποποίηση της συμβατικής PCR, η οποία στοχεύει στη μείωση μη ειδικών προσδέσεων εξαιτίας της ενίσχυσης μη αναμενόμενων θέσεων δέσμευσης των εκκινητών. Μέσω της επάλληλης PCR, επιτυγχάνεται βελτίωση τόσο της ειδικότητας αλλά και της ευαισθησίας της αντίδρασης. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται δύο ζεύγη εκκινητών συνολικά και πραγματοποιούνται δύο διαδοχικές PCR (**Σχήμα 2.11**). Ο σχεδιασμός του πρώτου ζεύγους γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να ενισχύει μια μεγαλύτερη περιοχή του υποστρώματος DNA, μέσα στην οποία εμπεριέχεται εν τέλει το τμήμα εκείνο που πρέπει τελικώς να ενισχυθεί. Μετά το τέλος της πρώτης PCR, το PCR προϊόν που έχει προκύψει αραιώνεται με κατάλληλο τρόπο και χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για τη δεύτερη PCR. Το δεύτερο ζευγάρι εκκινητών αποσκοπεί στην ενίσχυση ενός δεύτερου στόχου εντός του προϊόντος από την πρώτη αντίδραση. Αυτό επιτρέπει ενίσχυση για ένα μικρό αριθμό κύκλων στην πρώτη αντίδραση, περιορίζοντας τα μη-ειδικά προϊόντα. Το δεύτερο εσωτερικότερο ζευγάρι εκκινητών ενισχύει, μόνο, το αναμενόμενο από την πρώτη αντίδραση προϊόν και όχι παραπροϊόντα.



Σχήμα 2.11 Αναπαράσταση τρόπου παραγωγής προϊόντος με την επάλληλη PCR

Επάλληλη PCR για το γονίδιο αναφοράς GAPDH.

Αρχικά, εφαρμόστηκε η μέθοδος αυτή για το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*. Το γονίδιο κωδικοποιεί το ένζυμο αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης. Το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε στην πρώτη PCR ήταν το Ex2F-Ex4R, ώστε να ενισχύει μια μεγαλύτερη περιοχή του υποστρώματος DNA, μέσα στην οποία εμπεριέχεται εν τέλει το τμήμα εκείνο cDNA που πρέπει τελικώς να ενισχυθεί. Τα PCR προϊόντα χρησιμοποιήθηκαν σαν υπόστρωμα για τη δεύτερη PCR. Το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε στη δεύτερη PCR (qPCR) ήταν το Ex2realF-Ex3realR (Πίνακας 2.6), το τμήμα δηλαδή που εμπεριέχεται στη μεγαλύτερη περιοχή του υποστρώματος και που εμπρόκειτο να ενισχυθεί και με αυτό τον τρόπο αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό η ειδικότητα της μεθόδου καθώς και η ποσότητα του αρχικού DNA, το οποίο αποτελεί πλέον τη μήτρα για τη δεύτερη PCR.

Πίνακας 2.6. Ιδιότητες εκκινητών του *GAPDH* στην 1η PCR και τη 2η PCR

Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος (nt)	Ποσοστό GC (%)	T _m (°C)
1ηPCR				
GAPDH Ex2F	5'-CCACATCGCTCAGACACCCAT-3'	20	55	60,1
GAPDH Ex4R	5'-TGACAAGCTTCCCGTTCTCA-3'	20	50	59.2
2ηPCR (qPCR)				
GAPDH Ex2realF	5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3'	19	57,9	59,0
GAPDH Ex3realR	5'-GGGTCATTGATGGCAACAATATC-3'	23	43,5	58,1

2.8.3 Εκκινητές για τη μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων των γονιδίων-στόχων με επάλληλη PCR.

Εξαιτίας της μη ικανοποιητικής ποσότητας υποστρώματος του γονιδίου αναφοράς στα δείγματα, αλλά και των χαμηλών επιπέδων έκφρασης ορισμένων γονιδίων-στόχων γεγονός που ευνοεί την παραγωγή παραπροϊόντων χρησιμοποιήθηκε η επάλληλη PCR. Με χρήση των λογισμικών Primer Blast, σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA των διαφορετικών εναλλακτικών μεταγράφων mRNA των γονιδίων-στόχων. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε με τη μέθοδο της επαλληλης PCR η έκφραση των γονιδίων BAX, BCL2, BCL2L12, BCLX, και BOK. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην πρώτη PCR φαίνονται στον **Πίνακα 2.7**, ενώ τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη δεύτερη PCR φαίνονται στον **Πίνακα 2.8**.

Πίνακας 2.7. Ιδιότητες εκκινητών για την 1η PCR

Γονίδιο	Όνομα	Αλληλουχία(5' → 3')	Μήκος (nt)	Tm (°C)
1η PCR				
BAX	Ex2F	CCAGCTCTGAGCAGATCATGAAG	23	61
	Ex7R	TCTTCTTCCAGATGGTGAGTGAGG	24	61
BCL2	Ex2F	TTTGAGTTCGGTGGGGTCAT	20	60
	Ex3R	TGACTTCACTTGTGGCCAG	20	61
BCL2L12	Ex1F	GGAGACCGCAAGTTGAGTGG	20	62
	Ex5R	TCCGCAGTATGGCTTCCTTC	20	61
BCLX	Ex2F	GGCAGGCGACGAGTTTGA	18	62
	Ex3R	TGAAGAGTGAGCCCAGCAGA	20	62
BOK	1aF	GAGCAGATCCTGAAGCCAGAACT	23	62
	1bF	CGAGGCCGGGGACAC	15	64
	6aR	GGGTGGGGAGGAGGAAGAT	19	63

Πίνακας 2.8. Ιδιότητες εκκινητών για την 2η PCR

Γονίδιο	Όνομα	Αλληλουχία(5'→3')	Μήκος (nt)	Tm (°C)
2η PCR (qPCR)				
BAX	BAXbex4F	TGTCGCCCTTTTCTACTTTGCC	22	61
	BAXbex5R	GGTGAGGAGGCTTGAGGAGTC	21	63
BCL2	Ex2realF	TCGCCCTGTGGATGACTGA	19	62
	Ex3realR	CAGAGACAGCCAGGAGAAATCA	22	60
BCL2L12	Ex2/4F	CAACTCCACCTAGGCCAG	19	62
	Ex4R	GGGCCACCAAAGCATAGAAG	20	60
BCLX	Ex2LrealF	CGTGGAAGCGTAGACAAGGA	21	60
	Ex3R	TGAAGAGTGAGCCCAGCAGA	20	62
BOK	1a/2F	GCGGGAGAGGTGCGG	15	64
	1b/2F	AGCGGCGGAGGTGC	14	64
	5/2R	CACGTGATGCCAGGC	16	61

Συνθήκες επάλληλης PCR του γονιδίου αναφοράς GAPDH και των γονιδίων-στόχων

Αρχικά, έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών PCR για κάθε ένα από τα ζευγάρια των προαναφερθέντων εκκινητών.

Για την ενίσχυση τμημάτων των cDNAs στην 1^η PCR συμβατική χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω συστατικά με τελικό όγκο 25μL:

- 2,5 μL 10xBuffer (100mM Tris-HCl pH = 8,3 στους 25 °C, 15mM (NH₄)₂SO₄, 0,01 % (v/v) Tween 20 με τελική συγκέντρωση Mg 1,5mM)
- 0,5 μL 10mM από μείγμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs
- 1 μL Πρόσθιο εκκινητή (Forward primer) 10mM
- 1 μL Ανάστροφο εκκινητή (Reverse primer) 10mM
- 0,1 μL DNA πολυμεράση (Taq) polymerase (Kapa Biosystems)
- 0,5 μL cDNA συγκεντρώσεων 100ng και 400ng
- 19,4 μL dH₂O

Οι συνθήκες της αντίδρασης βασίστηκαν στην επώαση σε θερμοκρασιακό κυκλοποιητή, ο οποίος ήταν ο Veriti 96-Well Fast Thermo Cycler (Applied Biosystems™, Thermo Fischer Scientific Inc.) με το παρακάτω θερμικό πρωτόκολλο:

1. 95 °C για 3 min
2. 95 °C για 30 sec
3. 60°C για 30 sec με βάση το T_m των εκκινητών
4. 72 °C για 1 min
5. Όσον αφορά τις επαναλήψεις των βημάτων 1-4, δηλαδή τον αριθμό των κύκλων, έγιναν διάφορες δοκιμές με 15 και 20 κύκλους

Για την ενίσχυση τμημάτων των cDNAs στην 2η PCR (qPCR) χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω συστατικά με τελικό όγκο 10μL:

- 5μL *KAPA SYBR FAST qPCR Kit* Master Mix (2X) Universal, στο οποίο προσθέτουμε την παθητική χρωστική ROX (τελική συγκέντρωση 1x) (KAPA Biosystems).
- 1 μL Πρόσθιο εκκινητή 2μM
- 1 μL Ανάστροφο εκκινητή 2μM
- 0,5 μL αραιωμένο PCR προϊόν
- 2,5 μL dH₂O

Οι συνθήκες της αντίδρασης βασίστηκαν στην επώαση σε θερμοκρασιακό κυκλοποιητή, ο οποίος ήταν ο 7500 Real-Time PCR System Fast (Applied Biosystems), με το παρακάτω θερμικό πρωτόκολλο:

1. 95 °C για 3 min
2. 95 °C για 30 sec
3. 60 °C για 30 sec
4. 40 επαναλήψεις των βημάτων 1-3

Στη συνέχεια για δημιουργία της καμπύλης τήξης συνεχίστηκε το εξής θερμοκρασιακό πρωτόκολλο:

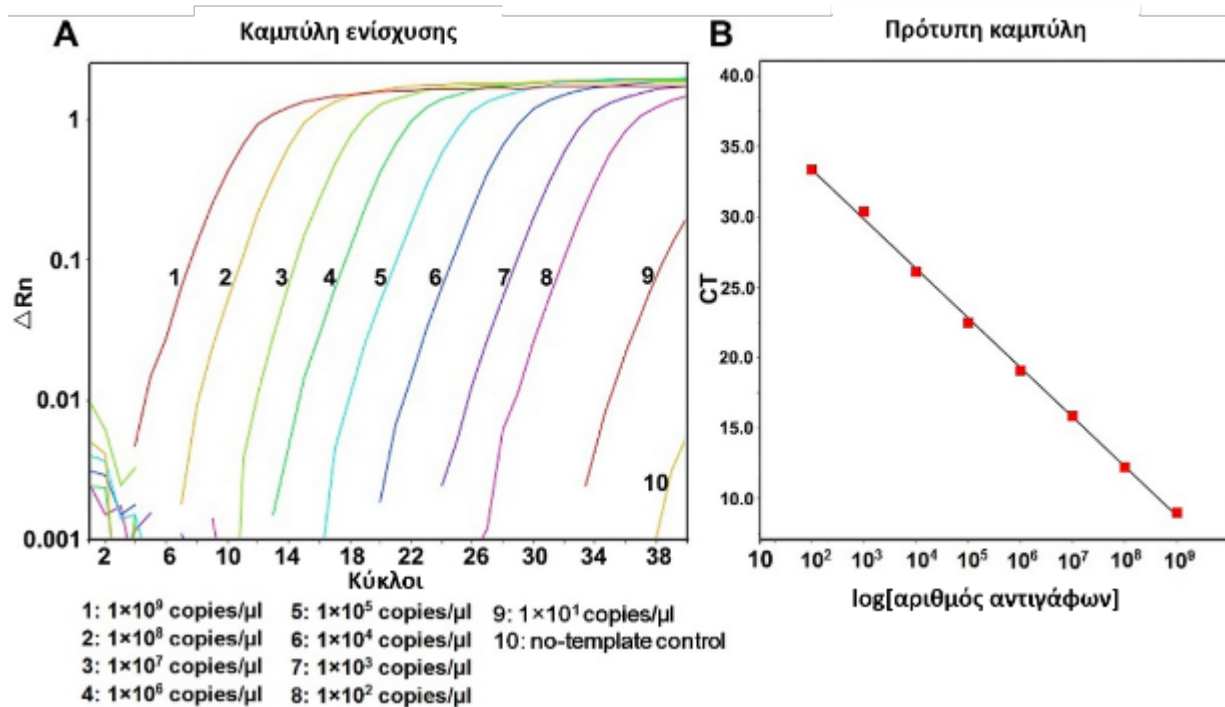
1. 95 °C για 15 sec
2. 60 °C για 1 min
3. 95 °C για 15 sec

Μέθοδοι ποσοτικοποίησης της γονιδιακής έκφρασης μέσω της Real Time qPCR αντίδρασης

Υπάρχουν δύο κύριοι μέθοδοι ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων της qPCR: η απόλυτη και η σχετική μέθοδος ποσοτικοποίησης.

Απόλυτη μέθοδος ποσοτικοποίησης

Με την απόλυτη ποσοτικοποίηση προσδιορίζεται η ποσότητα (ο αρχικός αριθμός αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου) του αγνώστου δείγματος, συνήθως με συσχέτιση του σήματος της PCR με μια πρότυπη καμπύλη (καμπύλη βαθμονόμησης). Η μέθοδος υπολογισμού που χρησιμοποιείται για απόλυτη ποσοτικοποίηση είναι η μέθοδος πρότυπης καμπύλης (Standard curve method). Οι απόλυτες ποσότητες των προτύπων (standards) πρέπει πρώτα να μετρηθούν με κάποιον ανεξάρτητο τρόπο. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης απαιτείται η ύπαρξη ενός προτύπου γνωστής συγκέντρωσης. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις του προτύπου οι οποίες με τη σειρά τους χρησιμεύουν ως πρότυπα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης προκειμένου να προσδιοριστεί η ποσότητα-στόχος του άγνωστου δείγματος. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται με την προσθήκη του λογάριθμου του αριθμού των αντιγράφων των προτύπων κατά μήκος του άξονα x και τις αντίστοιχες τιμές τους C_t κατά μήκος του άξονα y . Η γενική αρχή της μεθόδου είναι η αντιστοίχιση του σήματος φθορισμού που καταγράφεται με τη μορφή του C_t σε αριθμό αντιγράφων μέσω της χρήσης προτύπων καμπυλών. Στη συνέχεια, γνωρίζοντας μόνο το σημείο διασταύρωσης (C_t) ενός άγνωστου δείγματος, μπορούμε να υπολογίζουμε τον αριθμό των αντιγράφων του υπό μελέτη γονιδίου (**Σχήμα 2.12.**) Συνήθως χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερα πρότυπα, που έχουν 1 log διαφορά μεταξύ τους. Η πρότυπη καμπύλη, ιδανικά, πρέπει να καλύπτει όλο το εύρος των συγκεντρώσεων που μπορεί να ανιχνευθούν πειραματικά. Για κάθε γονίδιο κατασκευάζεται διαφορετική πρότυπη καμπύλη, γιατί κάθε αντίδραση PCR – ζεύγους εκκινητών έχει διαφορετική απόδοση. Συνεπώς κάθε αντίδραση ποσοτικής PCR περιλαμβάνει τα δείγματα που πρόκειται να ποσοτικοποιηθούν και τα standards της πρότυπης καμπύλης. Ο αριθμός αντιγράφων του κάθε γονιδίου στο C_t υπολογίζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη.



Σχήμα 2.12. Καμπύλη φθορισμού (ενίσχυσης) και πρότυπη καμπύλη (standard plot) κατά την μέθοδο απόλυτης ποσοτικοποίησης των αντιγράφων ενός γονιδίου

Σχετική μέθοδος ποσοτικοποίησης

Η σχετική ποσοτικοποίηση περιγράφει τη μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου-στόχου (ποσότητα) σε ένα προς εξέταση δείγμα σε σχέση με ένα δείγμα-βαθμονόμο (calibrator sample). Η ποσότητα της επιθυμητής αλληλουχίας-στόχου τόσο στο δείγμα βαθμονομητή όσο και στα δείγματα προς εξέταση, προσδιορίζεται σχετικά με την ποσότητα ενός γονιδίου αναφοράς (endogenous control). Το γονίδιο αναφοράς, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, πρέπει να έχει σταθερή έκφραση σε όλα τα δείγματα. Ως γονίδια αναφοράς, συνήθως χρησιμοποιούνται τα housekeeping γονίδια (housekeeping genes). Το εσωτερικό αυτό πρότυπο ελαχιστοποιεί τις ενδεχόμενες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που οφείλονται είτε στη διαδικασία προετοιμασίας των υπό εξέταση δειγμάτων ή στο χειρισμό τους. Η ακρίβεια της μεθόδου εξαρτάται από την επιλογή ενός κατάλληλου προτύπου αναφοράς καθώς η μεταβλητότητα του προτύπου επηρεάζει τα αποτελέσματα. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων με τη μέθοδο σύγκρισης των CT, $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Comperative CT method, $2^{-\Delta\Delta CT}$).

Δεν απαιτείται η χρήση πρότυπης καμπύλης για τον υπολογισμό των σχετικών αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου-στόχου, γεγονός που αυξάνει τη συνολική αποδοτικότητα γιατί δε χρησιμοποιούνται θέσεις στο μικροπλακίδιο για πρότυπα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων. Όταν χρησιμοποιούμε τη μέθοδο

σύγκρισης των C_T με τη real-time PCR, μπορούμε να κανονικοποιήσουμε ως προς ένα ενδογενές σήμα αναφοράς χρησιμοποιώντας δεδομένα που προκύπτουν κατά τη διάρκεια του πειράματος PCR. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο, όταν έχουμε μια περιορισμένη ποσότητα RNA ή όταν θέλουμε να χειριστούμε ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Η ποσότητα του στόχου, κανονικοποιημένη ως προς έναν ενδογενή μάρτυρα και σε σχέση με έναν βαθμονόμο, υπολογίζεται από τον τύπο: $2^{-\Delta\Delta CT}$. Προϋπόθεση για τη χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου είναι η αποδοτικότητα της ενίσχυσης τόσο στα γονίδια αναφοράς όσο και στα γονίδια στόχους να αγγίζει το 100%. Η σχετική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στόχου και των υπό εξέταση δειγμάτων πραγματοποιείται με τη χρήση των παρακάτω εξισώσεων: Αρχικά πραγματοποιείται κανονικοποίηση των τιμών του C_T του γονιδίου στόχου και του γονιδίου αναφοράς (ref-gene) τόσο για το δείγμα-δοκιμής (test sample) όσο και για το δείγμα-βαθμονομητή (calibrator sample):

$$\Delta C_{T\text{δείγματος}} = C_{T\text{δείγματος, γονιδίου στόχου}} - C_{T\text{δείγματος, γονιδίου αναφοράς}}$$

$$\Delta C_{T\text{βαθμονομητή}} = C_{T\text{βαθμονομητή, γονιδίου στόχου}} - C_{T\text{βαθμονομητή, γονιδίου αναφοράς}}$$

Στη συνέχεια ακολουθεί κανονικοποίηση του ΔC_T του δείγματος-δοκιμής με το ΔC_T του δείγματος-βαθμονομητή:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{δείγματος}} - \Delta C_{T\text{βαθμονομητή}}$$

Τέλος υπολογίζεται η αναλογία έκφρασης με τον εξής τύπο:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{κανονικοποιημένη αναλογία έκφρασης.}$$

Το αποτέλεσμα που προκύπτει από τους παραπάνω υπολογισμούς είναι ο αριθμός των φορών που αυξήθηκε (ή μειώθηκε) το γονίδιο στόχος στο δείγμα-δοκιμής σε σχέση με το δείγμα-βαθμονομητή που στη συνέχεια κανονικοποιείται ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς.

Αυτή η μέθοδος για να χρησιμοποιηθεί πρέπει να πληρούνται δύο προϋποθέσεις:

1. Η απόδοση του γονιδίου-στόχου να είναι παρόμοια με την απόδοση του γονιδίου αναφοράς.
2. Η τιμή της απόδοσης ενίσχυσης του γονιδίου-στόχου να είναι κοντά στο 1.

Η πρώτη προϋπόθεση αξιολογείται μέσω της διακύμανσης του ΔC_T , το οποίο προκύπτει από τις διάφορες αραιώσεις του υποστρώματος. Δηλαδή, για την εφαρμογή της μεθόδου σχετικής ποσοτικοποίησης $2^{-\Delta\Delta C_T}$, πρέπει η απόλυτη τιμή της κλίσης της καμπύλης να είναι όσο γίνεται πιο κοντά στο μηδέν.

Εαν οι αποδόσεις ενίσχυσης του στόχου και του ενδογενή μάρτυρα είναι ...	Τότε ...
< 0,1	Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τον υπολογισμό του ΔΔCT για τη σχετική ποσοτικοποίηση του στόχου
> 0,1	<ul style="list-style-type: none"> • Εκτελούμε το πείραμα αξιολόγησης σε ένα ευρύτερο δυναμικό φάσμα ποσοτήτων υποστρώματος ή σχεδιάζουμε και συνθέτουμε νέους εκκινήτες για να βελτιώσουμε την απόδοση της ενίσχυσης. • Πραγματοποιούμε την ποσοτικοποίηση, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της εξωτερικής πρότυπης καμπύλης

Βιοστατιστική ανάλυση

Πραγματοποιήθηκε εκτεταμένη βιοστατιστική ανάλυση για την εύρεση στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων μεταξύ των επίπεδων έκφρασης των miR-221 και miR-222 με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών οι οποίοι πάσχουν απο πολλαπλό μυέλωμα. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η διαφοροδιαγνωστική αξία των υπό μελέτη μορίων όσον αφορά την ικανότητα διάκρισης μεταξύ των ασθενών που έχουν έρπων πολλαπλό μυέλωμα (SMM) σε σχέση με αυτούς που πάσχουν απο συμπτωματικό πολλαπλό μυέλωμα (MM). Για τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v.25.0 (IBM, Inc).

2.10.1. Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των miR-221 και miR-222 με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα

Τα επίπεδα έκφρασης τόσο των μεταγράφων των miR-221 και miR-222 δεν παρουσίασαν κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικές βιοστατιστικές δοκιμασίες για την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Οι μη παραμετρικές στατιστικές δοκιμασίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωρίς να είναι απαραίτητη η ύπαρξη συγκεκριμένης κατανομής στις υπό μελέτη μεταβλητές και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται στη μέτρηση βιομορίων σε πληθυσμούς βιολογικών δειγμάτων. Σε κάθε περίπτωση, οι διαφορές που ανιχνεύτηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας $p \text{ value} < 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές.

Η στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney U test εφαρμόστηκε για τη μελέτη των διαφορών στην κατανομή των επιπέδων των υπό μελέτη βιομορίων μεταξύ των μεταβλητών των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών όπου εξετάζονται δύο ανεξάρτητες μεταβλητές. Στην περίπτωση της μελέτης της κατανομής των επιπέδων των υπό μελέτη βιομορίων μεταξύ κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών τα οποία είναι διατάξιμα σε 3 μεταβλητές τότε έγινε με το Jonckheere- Terpstra test. Για τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των miR-221 και miR-222 η οποία είναι μια συνεχής μεταβλητή με τις κατηγορικές μεταβλητές των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών, κρίθηκε αναγκαίο, οι μεταβλητές που αντιστοιχούν στην έκφραση των υπό μελέτη μορίων να διχοτομηθούν με βάση τη διάμεσο τιμή. Το τεστ που εφαρμόστηκε για να εξεταστεί αυτή η συσχέτιση είναι το χ^2 (Chi-square test).

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αξιολόγηση της ποιότητας και της συγκέντρωσης του απομονωμένου ολικού RNA από φυσιολογικά δείγματα (CD138-) και από δείγματα πολλαπλού μυελώματος (CD138+)

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του RNA από 130 δείγματα CD138⁺ και CD138⁻ κυττάρων. Στα CD138⁻ δείγματα προστέθηκαν οι ποσότητες των αντιδραστηρίων όπως περιγράφονται παραπάνω (στην παράγραφο 2.2.), ενώ στα δείγματα των CD138⁺ κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν οι μισές ποσότητες των αντιδραστηρίων TRI Reagent BD, ισοπροπανόλης και χλωροφορμίου, λόγω της μικρής αρχικής ποσότητας των κυττάρων που υπήρχαν σε αυτά. Για τα δείγματα από CD138⁻ κύτταρα ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA έγινε με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου Biospec-nano (ενότητα 2.3). Κατά τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό η αναλογία των μετρήσεων στα 260 nm και στα 280 nm (A260/A280) παρέχει μια εκτίμηση της καθαρότητας του RNA ως προς τις προσμίξεις που απορροφούν τη UV. Στην περίπτωση του καθαρού RNA οι τιμές του λόγου A260/A280 κυμαίνονται από 1,7 έως 2. Ωστόσο για τα δείγματα από κύτταρα CD138⁺, τα οποία είχαν πολύ χαμηλή συγκέντρωση RNA, η ποσοτικοποίηση έγινε με τη χρήση του φθορισμομέτρου QubitTM, το οποίο προσέφερε μεγαλύτερη ειδικότητα και ευαισθησία για τα μόρια RNA. Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά μερικά αποτελέσματα φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού ολικού RNA δειγμάτων που λήφθηκαν από CD138⁻ κύτταρα (**Πίνακας 3.1**) και φθορισμομετρικού προσδιορισμού ολικού RNA δειγμάτων που λήφθηκαν από CD138⁺ κύτταρα (**Πίνακας 3.2**).

Πίνακας 3.1. Αποτελέσματα φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού ολικού RNA

Δείγμα (CD138-)	Nucleic Acid Concentration (ng/μL)	OD 260/280	OD 260/230	Final RNA Volume (μL)	Mass RNA (ng)
865-	1.849	2,09	2,09	20	36.974
889-	1.131	2,08	2,11	25	28.284
895-	1.522	2,08	1,82	40	60.892
937-	1.281	1,98	1,87	15	19.209
944-	934	1,97	1,41	29	27.086

Πίνακας 3.2. Αποτελέσματα φθορισμομετρικού προσδιορισμού ολικού RNA.

Δείγμα (CD138+)	Stock concentration (μg/ml)	Final RNA Volume (μl)	Mass RNA (ng)
865+	52	7	361
889+	108	7	756
895+	25	7	178
937+	29	10	294
944+	62	10	622

Εύρεση βέλτιστης συγκέντρωσης RNA

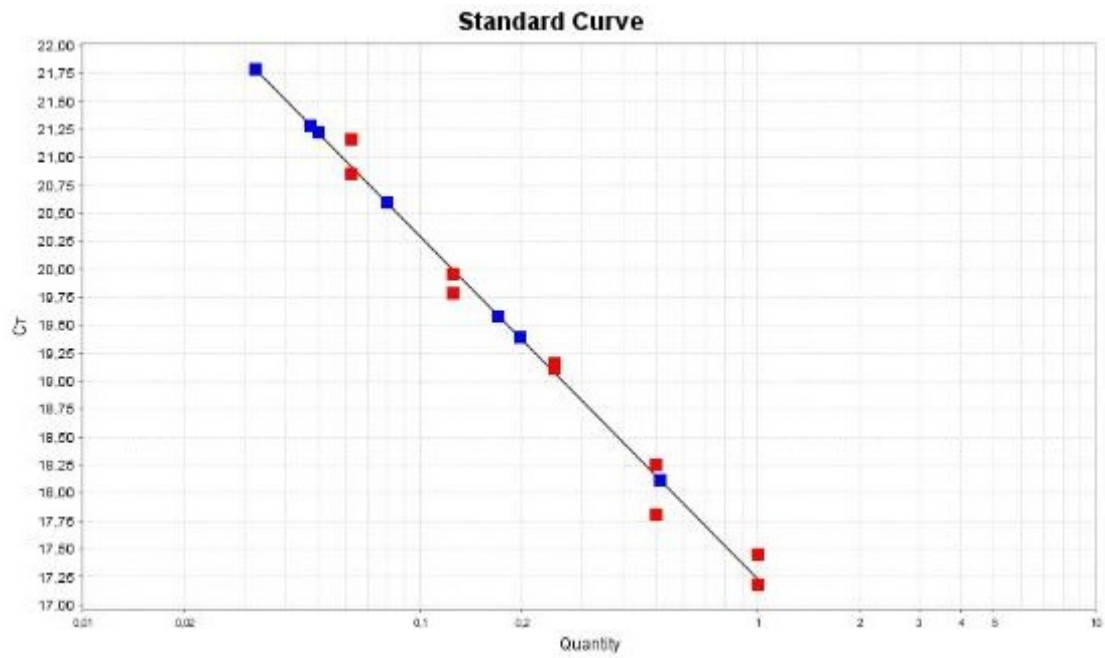
Αντίστροφη μεταγραφή ενός εύρους συγκεντρώσεων RNA απο διαδοχικές αραιώσεις

Λόγω της πολύ χαμηλής συγκέντρωσης RNA στα δείγματα κυττάρων CD138+ δημιουργήθηκε η ανάγκη εύρεσης της βέλτιστης συγκέντρωσης RNA για τη μελέτη της έκφρασης μορίων mRNA. Για το σκοπό αυτό για να μην γίνει σπατάλη του RNA των δειγμάτων των ασθενών χρησιμοποιήθηκε RNA από την κυτταρική σειρά HEK 293. Το RNA αυτό αραιώθηκε 1:10 (1μL RNA και 9 μL H₂O) και μετρήθηκε η συγκέντρωσή του στο φθορισμόμετρο QubitTM, στη συνέχεια η τιμή της συγκέντρωσης του αραιωμένου RNA πολλαπλασιάζεται (x10) για να βρούμε τη συγκέντρωση του πυκνού και να επιτύχουμε εύρος συγκεντρώσεων απο διαδοχικές αραιώσεις (1600ng, 800ng, 400ng, 200ng, 100ng). Η ίδια διαδικασία πραγματοποιείται και για την εύρεση βέλτιστης συγκέντρωσης RNA για τη μελέτη της έκφρασης των miRNA με τη διαφορά στο εύρος συγκεντρώσεων απο τις διαδοχικές αραιώσεις (800ng, 400ng, 200ng, 100ng). Με σκοπό την μελέτη της έκφρασης mRNA, παρασκευάζονται τα συμπληρωματικά τμήματα (cDNA) των συγκεντρώσεων RNA (1600ng, 800ng, 400ng, 200ng, 100ng) με την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής. Επιπλέον γίνονται διαδοχικές αραιώσεις και σε επίπεδο cDNA, απο το πυκνό cDNA συγκέντρωσης 1,6 μg/μL παράγονται τα αραιωμένα cDNA συγκεντρώσεων 0,8 μg/μL 0,4μg/μL 0,2μg/μL 0,1μg/μL. Για τη μελέτη της έκφρασης miRNA προηγείται η πολυαδενυλίωση του RNA (800ng, 400ng, 200ng, 100ng) προηγείται της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής (RT) για την παραγωγή των cDNA. Αυτές οι διαδοχικές αραιώσεις τόσο σε επίπεδο RNA όσο και σε επίπεδο cDNA έχουν ως στόχο την κατασκευή πρότυπης

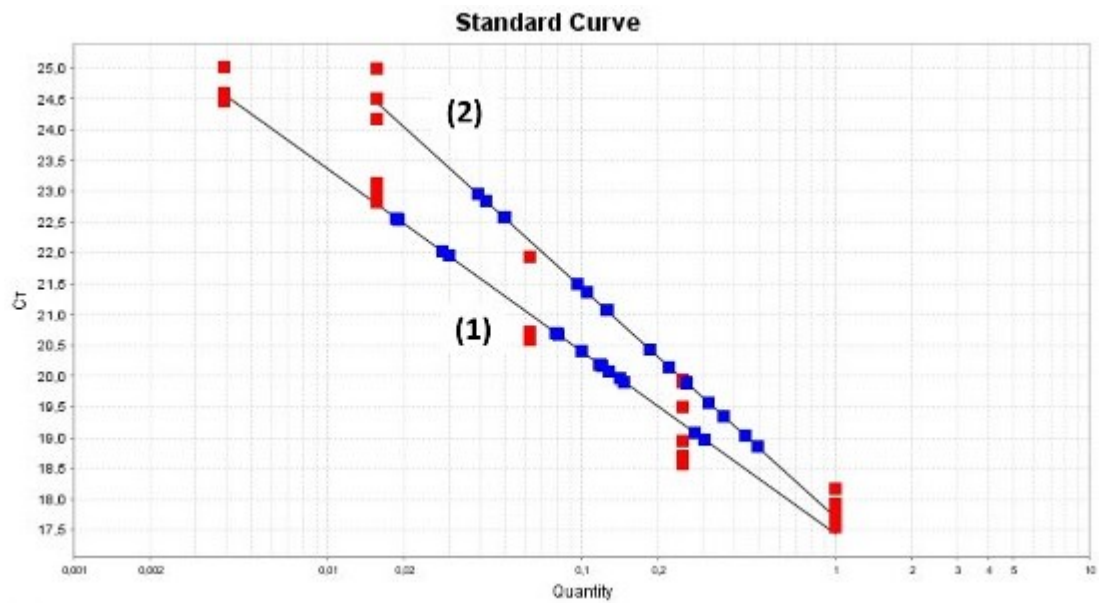
καμπύλης και η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής έγινε δύο φορές για να εξετάσουμε την επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

Ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς GAPDH για μελέτη έκφρασης mRNA στόχων και κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης του *GAPDH* στα δείγματα από τις διαδοχικές αραιώσεις τόσο σε επίπεδο RNA όσο και σε επίπεδο cDNA πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time qPCR μεθοδολογίας). Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκε real-time qPCR μέθοδος για τον ακριβή και ευαίσθητο ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου αναφοράς *GAPDH* σε δείγματα RNA διαφορετικών συγκεντρώσεων. Το ζεύγος εκκινήτων του γονιδίου αναφοράς είναι ο πρόσθιος εκκινήτης *GAPDH* Ex2real F και ο ανάστροφος εκκινήτης *GAPDH* Ex3realR. Δημιουργείται πρότυπη καμπύλη από δείγματα με γνωστή συγκέντρωση, χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερα standards. Συνεπώς κάθε αντίδραση ποσοτικής PCR περιλαμβάνει τα δείγματα που πρόκειται να ποσοτικοποιηθούν και τα standards της πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη μας δίνει τις τιμές R^2 και την απόδοση της αντίδρασης Effi%. Το R^2 είναι ο συντελεστής παλινδρόμησης υπολογιζόμενος από την ευθεία παλινδρόμησης στην πρότυπη καμπύλη. Η τιμή R^2 υποδεικνύει την ευθεία παλινδρόμησης, η οποία προσαρμόζεται καλύτερα μεταξύ των επιμέρους σημείων δεδομένων C_T πάνω στην πρότυπη καμπύλη. Μια τιμή R^2 : 1,00 υποδηλώνει την τέλεια εφαρμογή μεταξύ της ευθείας παλινδρόμησης και των σημείων. Η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης PCR καθορίζεται από την απόδοση της αντίδρασης ενίσχυσης Effi%. Η Effi% υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την κλίση της ευθείας παλινδρόμησης στην πρότυπη καμπύλη. Μια κλίση κοντά στο -3,32 υποδεικνύει βέλτιστη απόδοση 100% ενίσχυσης PCR. Στη περίπτωση των πειραμάτων από την πρότυπη καμπύλη με το γονίδιο αναφοράς που προαναφέρθηκε και τα δείγματα στη real-time qPCR μπαίνουν ως διπλέτες για να δούμε την επαναληψιμότητα καθώς φορτώνονται τα δείγματα και με βάση τη μία αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής προκύπτει τιμή R^2 : 0.983 δηλαδή προσεγγίζει την μονάδα που είναι η ιδανική τιμή. Η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης στην πρότυπη καμπύλη είναι Slope : -3,065 και Eff% : 111,97 (**Σχήμα 3.1.**) Στη περίπτωση των πειραμάτων από την πρότυπη καμπύλη με το γονίδιο αναφοράς που προαναφέρθηκε και τα δείγματα στη real-time qPCR μπαίνουν ως τετραπλέτες για να δούμε την επαναληψιμότητα καθώς φορτώνονται τα δείγματα. Με βάση την πρώτη αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής προκύπτει τιμή R^2 : 0.98 δηλαδή προσεγγίζει την μονάδα που είναι η ιδανική τιμή. Η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης στην πρότυπη καμπύλη είναι Slope : -2,965 και Eff% : 117,393 Με βάση την δεύτερη αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής προκύπτει τιμή R^2 : 0.989 δηλαδή προσεγγίζει την μονάδα που είναι η ιδανική τιμή. Η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης στην πρότυπη καμπύλη είναι Slope : -3,735 και Eff% : 85,247 (**Σχήμα 3.2.**)



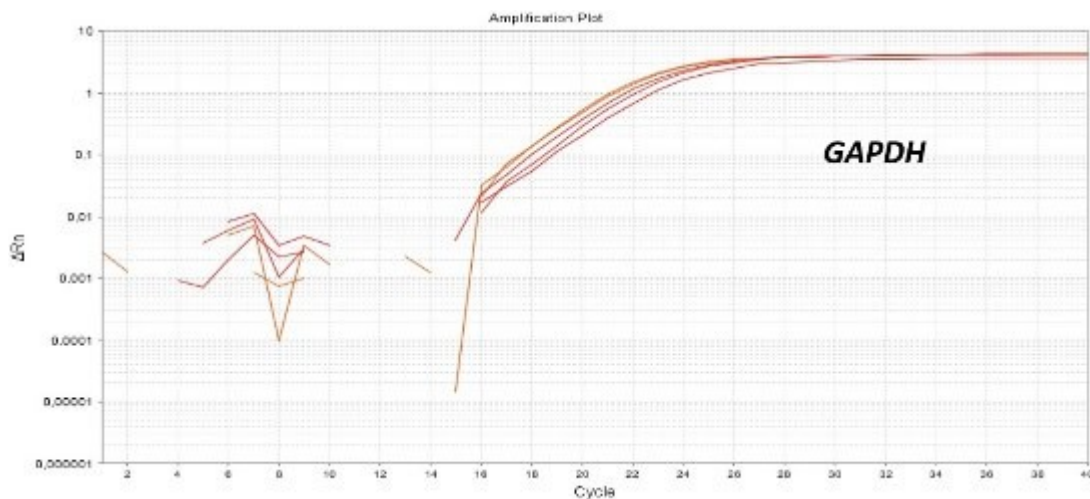
Σχήμα 3.1. Κατανομή των δειγμάτων συγκεντρώσεων που προκύπτουν από τις διαδοχικές αραιώσεις σε επίπεδο RNA (μπλέ σημεία) στην πρότυπη καμπύλη που δημιουργείται από τις διαδοχικές αραιώσεις σε επίπεδο cDNA(κόκκινα σημεία) από την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.



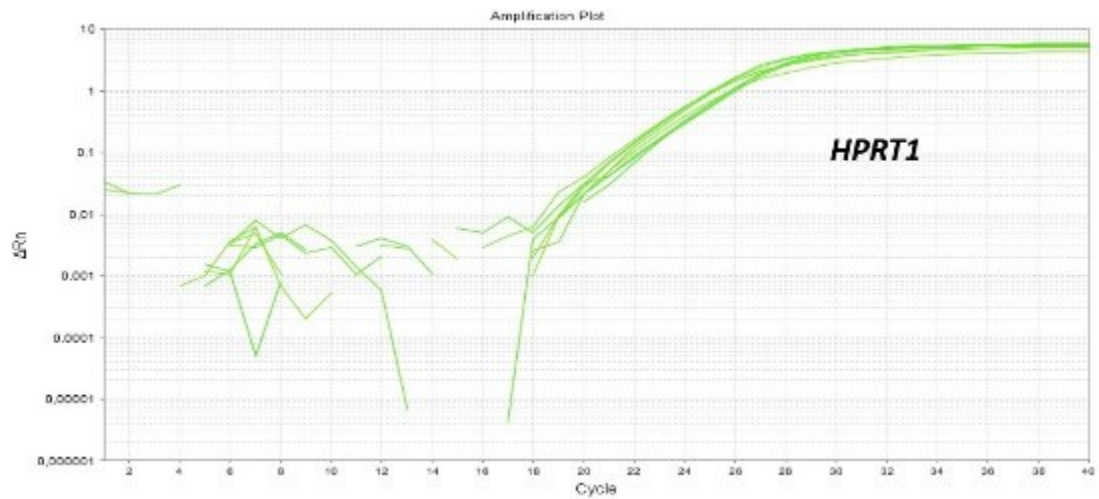
Σχήμα 3.2. Κατανομή των δειγμάτων συγκεντρώσεων που προκύπτουν από τις διαδοχικές αραιώσεις σε επίπεδο RNA (μπλέ σημεία) στην πρότυπη καμπύλη που δημιουργείται από τις διαδοχικές αραιώσεις σε επίπεδο cDNA(κόκκινα σημεία) από την 1η αντίδραση αντίστροφης (1) μεταγραφής και από την 2η αντίδραση αντίστροφης (2)

Ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων GAPDH και HPRT1 σε εύρος συγκεντρώσεων RNA από διαδοχικές αραιώσεις

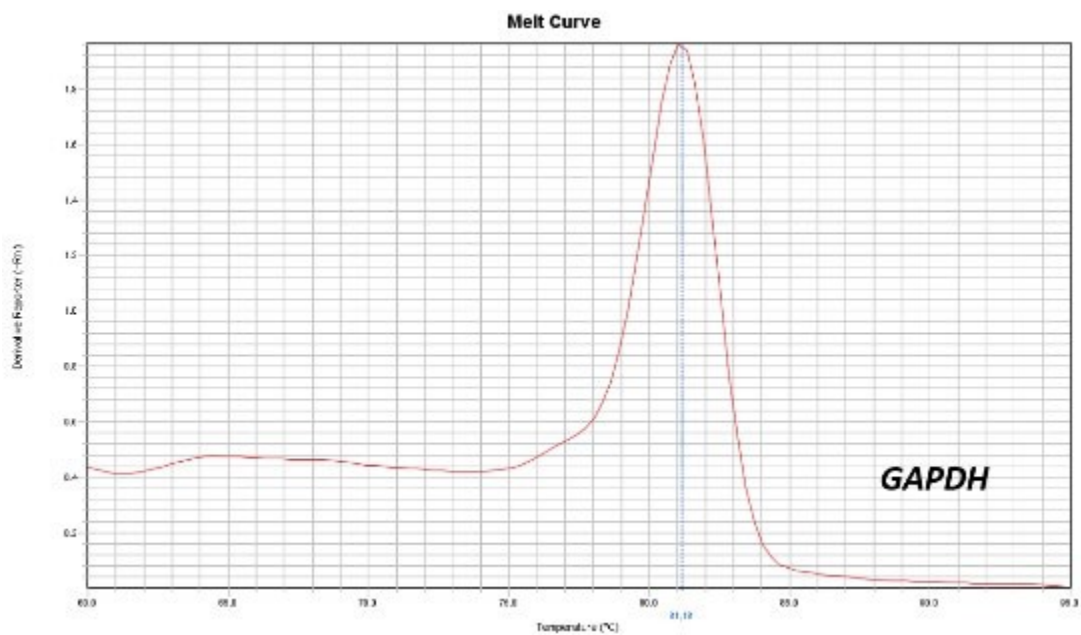
Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των *GAPDH* και *HPRT1* στα δείγματα από τις διαδοχικές αραιώσεις τόσο σε επίπεδο RNA όσο και σε επίπεδο cDNA πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time qPCR μεθοδολογίας). Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκε real-time qPCR μέθοδος για τον ακριβή και ευαίσθητο ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων αναφοράς *GAPDH* (Σχήμα 3.3, Σχήμα 3.5) και *HPRT1* (Σχήμα 3.4, Σχήμα 3.6) σε δείγματα RNA διαφορετικών συγκεντρώσεων. Το ζεύγος εκκινητών του γονιδίου αναφοράς είναι ο πρόσθιος εκκινητής *GAPDH* Ex2real F και ο ανάστροφος εκκινητής *GAPDH* Ex3realR (παράγραφος 2.7.3) και για το *HPRT1* ο πρόσθιος εκκινητής Ex2F και ο ανάστροφος Ex3R (παράγραφος 2.7.4).



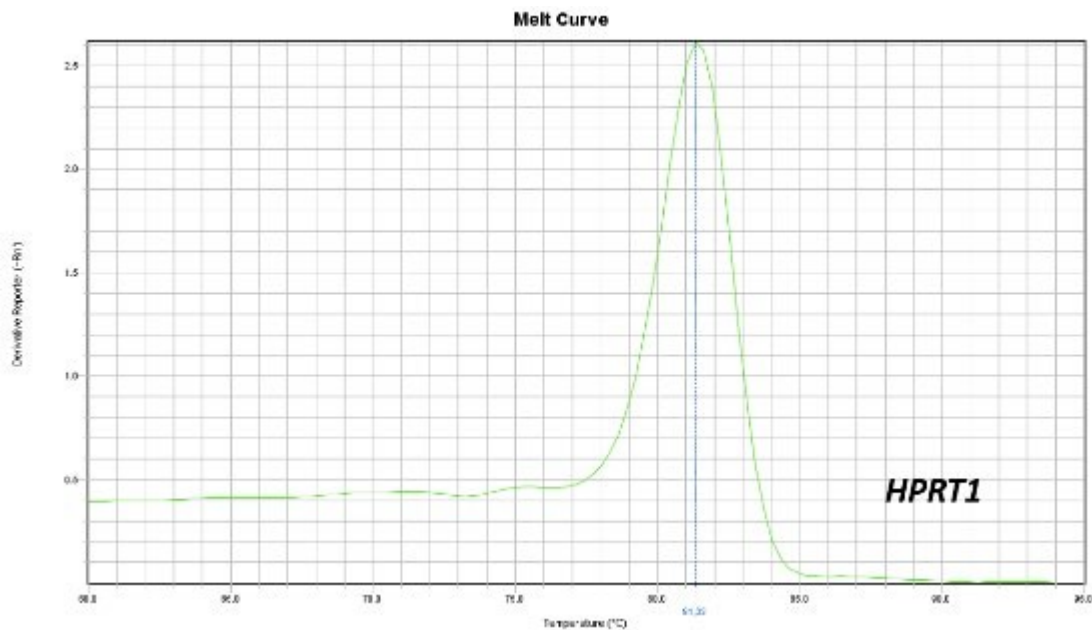
Σχήμα 3.3. Καμπύλες ενίσχυσης real-time qPCR αντίδρασης για το γονίδιο αναφοράς *GAPDH* με cDNA υπόστρωμα που προέκυψε από το RNA της κυτταρικής σειράς HEK 293 .



Σχήμα 3.4. Καμπύλες ενίσχυσης *real-time qPCR* αντίδρασης για το γονίδιο αναφοράς *HPRT1* με *cDNA* υπόστρωμα που προέκυψε από το *RNA* της κυτταρικής σειράς *HEK 293*.



Σχήμα 3.5. Καμπύλες τήξης *real-time qPCR* αντίδρασης για το γονίδιο αναφοράς *GAPDH* (T_m : 81,18) με *cDNA* υπόστρωμα που προέκυψε από το *RNA* της κυτταρικής σειράς *HEK 293*.



Σχήμα 3.6. Καμπύλες τήξης *real-time* qPCR αντίδρασης για το γονίδιο αναφοράς *HPRT1* (T_m : 81,33) με με *cDNA* υπόστρωμα που προέκυψε από το *RNA* της κυτταρικής σειράς *HEK 293*.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν και λαμβάνοντας υπ'οψιν τη χαμηλή συγκέντρωση *RNA* στα δείγματα από τα $CD138^+$ κύτταρα επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 200 ng/μL ως πιο κατάλληλη συγκέντρωση για την μελέτη έκφρασης *mRNA* στόχων στο πολλαπλό μυέλωμα. Ωστόσο, στη συνέχεια στη προσπάθεια πιθανής ανεύρεσης καλύτερου αποτελέσματος, μελετήθηκαν όπως παρουσιάζεται και παρακάτω και οι συγκεντρώσεις των 100ng αλλά και των 400ng.

Ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *SNORD48 (RNU48)* για μελέτη έκφρασης *miRNA* στόχων και κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Κατα τον ίδιο τρόπο όπως στη μελέτη έκφρασης των *mRNA* που αναλύθηκε παραπάνω η μελέτη των επιπέδων έκφρασης του *SNORD48 (RNU48)* στα δείγματα από τις διαδοχικές αραιώσεις τόσο σε επίπεδο *RNA* όσο και σε επίπεδο *cDNA* πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια *real-time* qPCR μεθοδολογίας. Το ζεύγος εκκινητών του γονιδίου αναφοράς *RNU48* Για την ενίσχυση των *cDNAs* που αντιστοιχούν στο μόριο *SNORD48* χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός πρόσθιος εκκινητής *SNORD48 F* και ο κοινός ανάστροφος εκκινητής (*R*) ο οποίος υβριδοποιείται στην περιοχή του poly(T) εκκινητή που χρησιμοποιείται στην αντίστροφη μεταγραφή (παράγραφος 2.7.6). Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν και για τους ίδιους λόγους επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 200 ng/μL ως πιο κατάλληλη συγκέντρωση για την μελέτη έκφρασης *miRNA* στόχων στο πολλαπλό μυέλωμα.

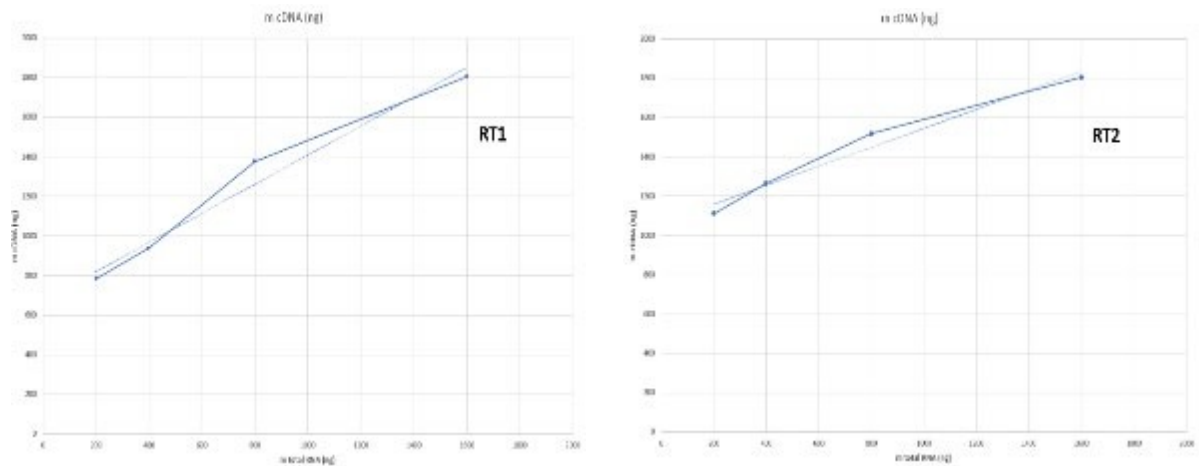
Προσδιορισμός της ακριβούς μάζας των cDNA με τη βοήθεια του Qubit

Σε πρώτο στάδιο από το σύνολο των δειγμάτων RNA από CD138⁺ κύτταρα επιλέχθηκαν 19 δείγματα με μάζα μεγαλύτερη των 7μg, τα οποία είχαν συγκεντρώσεις μεταξύ 500 -1000ng/μL, και αραιώθηκαν (1:2,5 - 1:5) ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 200ng/μL και ο τελικός όγκος κυμαίνεται μεταξύ 2,5 - 5μL. Για τον τελικό όγκο κάθε δείγματος, η ποσότητα του RNA κάθε φορά αποτελούσε το 1 μL, και η υπόλοιπη ποσότητα μέχρι να φτάσει κάθε δείγμα το δικό του τελικό όγκο συμπληρώθηκε με RSS. Η ίδια διαδικασία ακολουθηθηκε και σε επόμενο στάδιο όταν παρουσιάστηκε η ανάγκη μελέτης και άλλων συγκεντρώσεων, για την αραιώση των ίδιων 19 δειγμάτων RNA από CD138⁺ κύτταρα ώστε να προκύψουν εκ νέου δείγματα με συγκεντρώσεις 100ng/μL και 400ng/μL.

Μετά την ολοκλήρωση των αντιδράσεων αντίστροφης μεταγραφής των μορίων mRNA από όπου συντίθενται τα δείγματα cDNA, μετρήθηκε η ακριβής μάζα των cDNA μέσω του Qubit ssDNA Assay Kit. Το ολικό RNA είναι 200ng σε 20μL όπως προκύπτει από την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής δηλαδή η συγκέντρωση είναι < 10ng/μL. Το εύρος των συγκεντρώσεων του Qubit ssDNA Assay είναι μεταξύ 50pg/ μL -200 ng/μL. Το χαμηλότερο όριο της συγκέντρωσης 50pg/ μL απαιτεί 20 μL δείγματος. Κατ'ελάχιστο η συγκέντρωση είναι 0,5 ng/μL και όταν ο όγκος κυμαίνεται μεταξύ 1-2 μL η μάζα είναι > 1ng. Έγιναν μετρήσεις της συγκέντρωσης του cDNA στο Qubit ssDNA από τα RNA κυτταρικών σειρών HEK 293 από 1600ng, 800ng, 400ng, 200ng, 100ng από τις δύο αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιώντας 2μL RNA και υπολογίστηκε η μάζα cDNA (**Πίνακας 3.3**) και των 19 δειγμάτων CD138⁺ από τα οποία χρησιμοποιήθηκε 1μL του RNA από την πρώτη αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής (**Πίνακας 3.4**). Ο σκοπός ήταν να αξιολογηθεί αν αυξανόμενη της συγκέντρωσης του RNA 100ng 200ng, 400ng, 800ng, 1600ng αυξάνεται και η συγκέντρωση του cDNA προϊόντος και στα 19 δείγματα η μάζα του cDNA δεν εμφανίζει σημαντικές διαφορές. (**Σχήμα 3.7**).

Πίνακας 3.3. Αποτελέσματα των τιμών της συγκέντρωσης απο το Qubit και υπολογισμός της μάζας του cDNA.

Δείγμα	Assay concentration (ng/ml)	Μάζα cDNA (ng)	Συγκέντρωση cDNA (ng/μL)
HEK-293 (0.1μg RNA) RT1	488	976	48,8
HEK-293 (0.2μg RNA) RT1	391	782	39,1
HEK-293 (0.4μg RNA) RT1	470	940	47,0
HEK-293 (0.8μg RNA) RT1	687	1374	68,7
HEK-293 (1.6μg RNA) RT1	903	1806	90,3
HEK-293 (0.1μg RNA) RT2	648	1296	64,8
HEK-293 (0.2μg RNA) RT2	555	1110	55,5
HEK-293 (0.4μg RNA) RT2	632	1264	63,2
HEK-293 (0.8μg RNA) RT2	759	1518	75,9
HEK-293 (1.6μg RNA) RT2	902	1804	90,3



Σχήμα 3.7. Γραφική απεικόνιση της μάζας του cDNA σε σχέση με την αύξηση της μάζας του RNA στις δύο αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής (RT1 και RT2) με βάση τις παραπάνω τιμές του Πίνακα, η οποία έγινε στο Excel.

Πίνακας 3.4. Αποτελέσματα των τιμών της συγκέντρωσης από το Qubit και υπολογισμός της μάζας του cDNA.

Δείγμα	Assay concentration (ng/ml)	Μάζα cDNA (ng)	Συγκέντρωση cDNA (ng/μL)
951	239	256	47,8
955	208	832	41,6
990	246	984	49,2
1005	218	872	43,6
1027	234	936	46,8
1033	292	1168	58,4
1069	206	824	41,2
1140	313	1252	62,6
1151	266	1064	53,2
1196	234	936	46,8

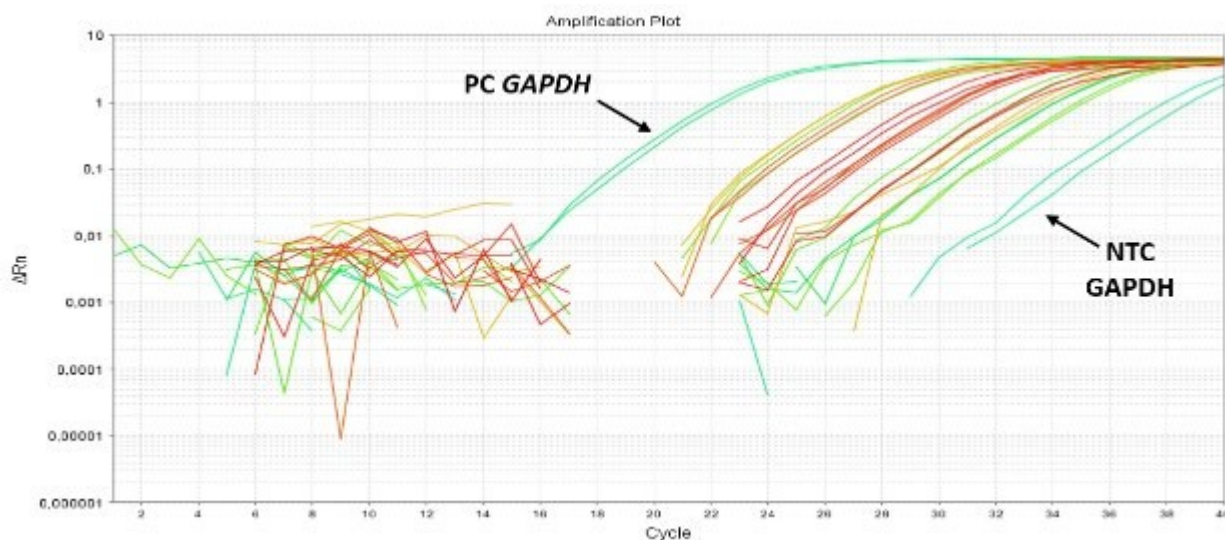
1197	243	972	48,6
1245	200	800	40,0
1247	203	812	40,6
1255	250	1000	50,0
1285	198	792	39,6
1297	263	1052	52,6
1671	383	1532	76,6
1764	239	956	47,8
1592	193	772	38,6

Έλεγχος της έκφρασης mRNA των γονιδίων αναφοράς *GAPDH* και *HPRT1*

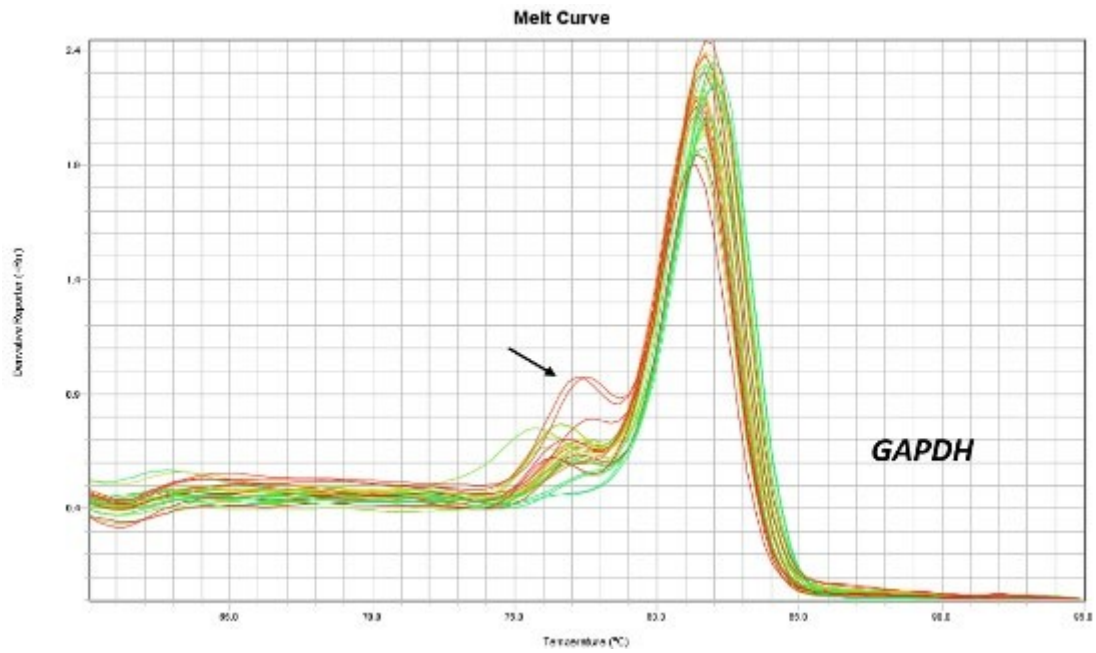
Πριν πραγματοποιηθεί ο έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων στόχων στα υπό μελέτη δείγματα, κρίθηκε απαραίτητος ο έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων αναφοράς *GAPDH* και *HPRT1*. Τα προαναφερθέντα γονίδια αναφοράς χρησιμοποιούνται ευρέως σε μελέτες έκφρασης mRNA, καθώς η έκφραση τους παραμένει αμετάβλητη σε αιματολογικές κακοήθειες όπως το πολλαπλό μυέλωμα [123]. Με τον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων αναφοράς, *GAPDH* και *HPRT1*, επιβεβαιώνεται η επιτυχής απομόνωση του ολικού RNA, η σύνθεση του cDNA μέσω της αντίστροφης μεταγραφής και εκτιμάται εάν υπάρχουν μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων αναφοράς μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων, με σκοπό να λαμβάνονται υπ'οψιν αυτές οι διαφορές στην κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων. Πραγματοποιήθηκε real-time qPCR, με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I, σύμφωνα με τις συνθήκες που έχουν αναφερθεί (2.7.3, 2.7.4, 2.7.8.). Από την καμπύλη ενίσχυσης για το γονίδιο αναφοράς *GAPDH* (**Σχήμα 3.8**) δεν φαίνεται να έχει υψηλή έκφραση, καθώς πρόκειται για γονίδιο σταθερής έκφρασης, που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ποιότητας και της ποσότητας του cDNA, που αντανακλά την ποιότητα του RNA, καθώς και την απόδοση της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής. Με τη real-time PCR, εκτός από την ποσοτική ανάλυση του προϊόντος της PCR, γίνεται και ποιοτική ανάλυση με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve analysis), δεδομένου ότι κάθε προϊόν ανάλογα με το μέγεθος του έχει μια χαρακτηριστική θερμοκρασία τήξης (T_m). Από την καμπύλη τήξης προκύπτει ότι το γονίδιο *GAPDH* έχει διαφορετικά T_m μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων και φαίνεται να υπάρχουν διμερή εκκινητών (**Σχήμα 3.9**).

Τα διμερή εκκινητών αποτελούν υποπροϊόντα της real-time PCR αντίδρασης και όπως υποδηλώνει και η ονομασία τους πρόκειται για μόρια εκκινητών που υβριδοποιούνται μεταξύ τους λόγω της συμπληρωματικότητας των βάσεων. Παρατηρείται μη ικανοποιητική ενίσχυση του γονιδίου αναφοράς *HPRT1* (Σχήμα 3.10). Επιπλέον από την καμπύλη τήξης του γονιδίου *HPRT1* φαίνεται ότι το προϊόν δεν είναι μοναδικό (Σχήμα 3.11).

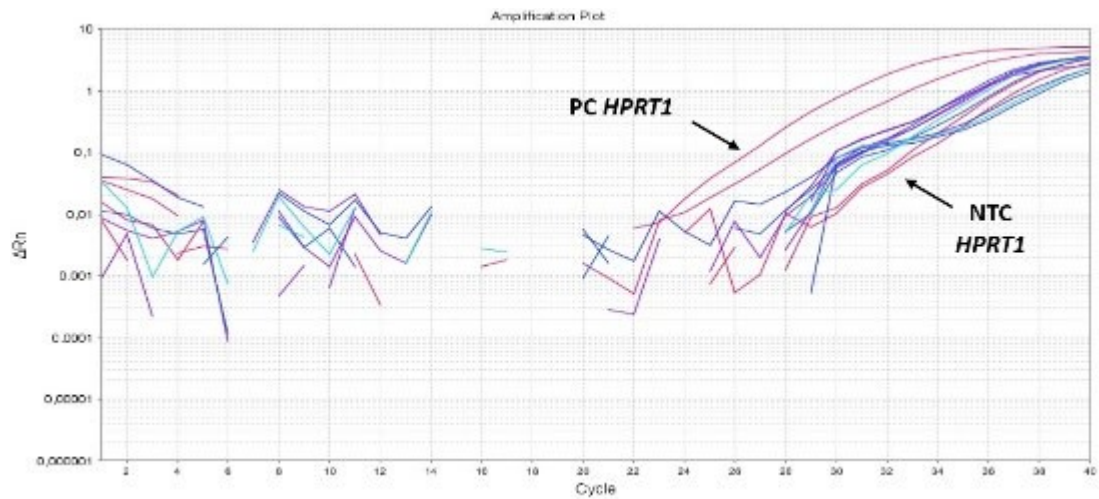
Προκειμένου να διερευνηθεί το πρόβλημα που είχε προκύψει έγινε επανάληψη της αντίστροφης μεταγραφής για τα ίδια δείγματα και επανάληψη του πειράματος της Real-Time qPCR με τα αποτελέσματα να παραμένουν εξίσου μη ικανοποιητικά. Στη συνέχεια επιλέχθηκαν 9 δείγματα όπου πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή με τη χρήση τυχαίων εξαμερών και έγινε real-time PCR με το *GAPDH* και το *HPRT1* (Σχήμα 3.12 Σχήμα 3.13). Στην περίπτωση που έχει κατακερματιστεί το RNA, με τη χρήση των τυχαίων εξαμερών, τα οποία καλύπτουν όλο το μήκος του RNA αυξάνεται η ποσότητα του υποστρώματος και επιτυγχάνεται καλύτερο σήμα στην qPCR. Τελικώς όμως διαπιστώθηκε ότι είχαμε μια χειρότερη εικόνα και δεν είχαμε συγκεκριμένο προϊόν σύμφωνα με τις καμπύλες τήξης των γονιδίων αναφοράς.



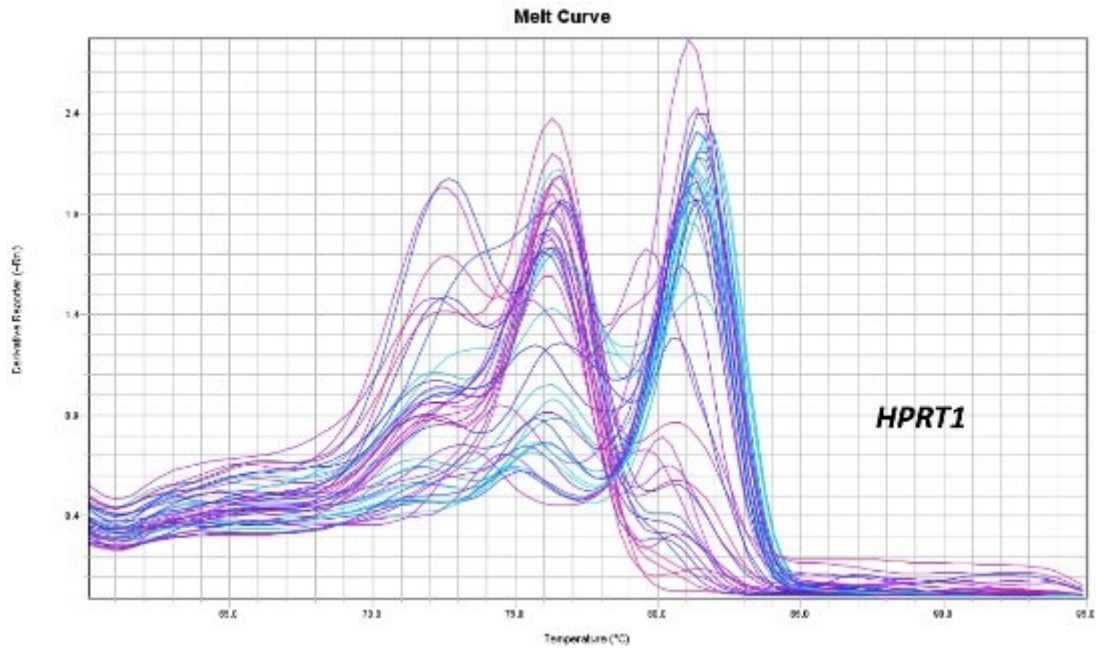
Σχήμα 3.8. Καμπύλη ενίσχυσης real-time qPCR αντίδρασης για το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*, στα 19 δείγματα cDNA (προερχόμενα από *CD138+* κύτταρα) μέσω της μεθόδου qPCR με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής *SYBR Green I*



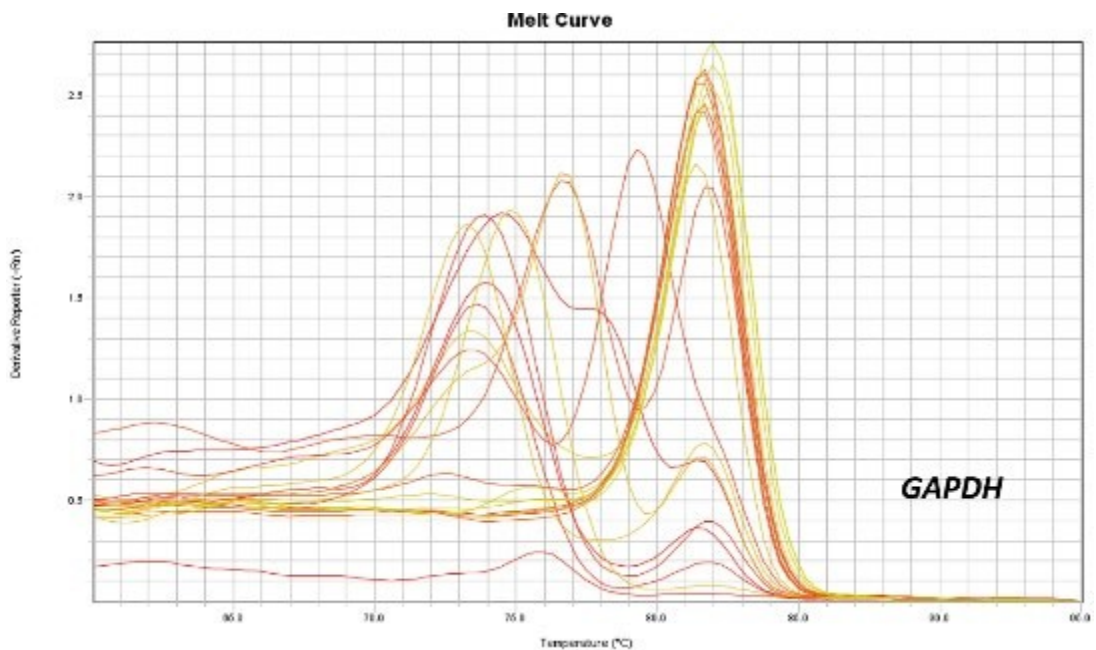
Σχήμα 3.9. Καμπύλη τήξης του γονιδίου αναφοράς *GAPDH*, στα 19 δείγματα *cDNA* (προερχόμενα από *CD138+* κύτταρα) μέσω της μεθόδου *qPCR* με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής *SYBR Green I* και με το βέλος υποδεικνύεται η ύπαρξη διμερών εκκινητών.



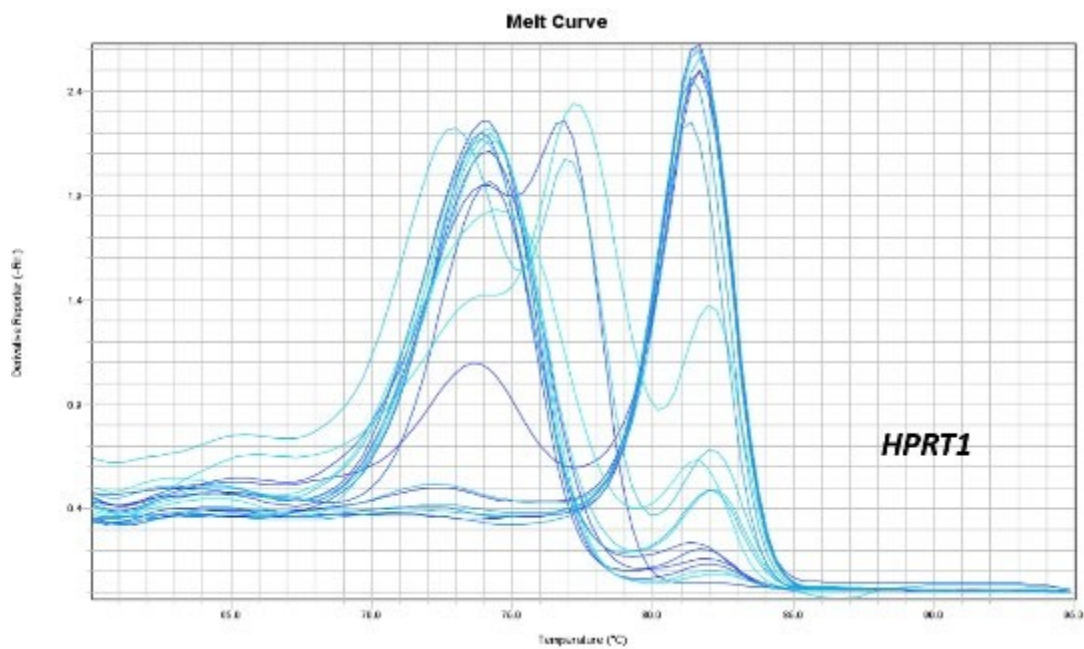
Σχήμα 3.10. Καμπύλη ενίσχυσης *real-time qPCR* αντίδρασης για το γονίδιο αναφοράς *HPRT1*, στα 19 δείγματα *cDNA* (προερχόμενα από *CD138+* κύτταρα) μέσω της μεθόδου *qPCR* με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής *SYBR Green I*



Σχήμα 3.11. Καμπύλη τήξης του γονιδίου αναφοράς *HPRT1*, στα 19 δείγματα *cDNA* (προερχόμενα από *CD138+* κύτταρα) μέσω της μεθόδου *qPCR* με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής *SYBR Green I* και με το βέλος υποδεικνύεται η ύπαρξη διμερών εκκινητών.



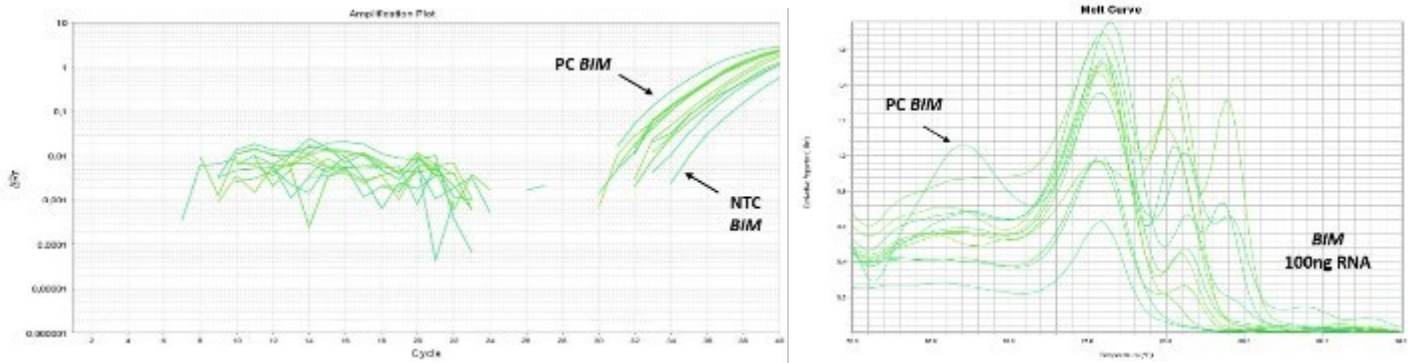
Σχήμα 3.12. Καμπύλη τήξης του γονιδίου αναφοράς *GAPDH*, στα νεοσυντιθέμενα 9 δείγματα *cDNA* (προερχόμενα από *CD138+* κύτταρα) με τη χρήση τυχαίων εξαμερών κατά τη διάρκεια της αντίστροφης μεταγραφής μέσω της μεθόδου *qPCR* με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής *SYBR Green I*



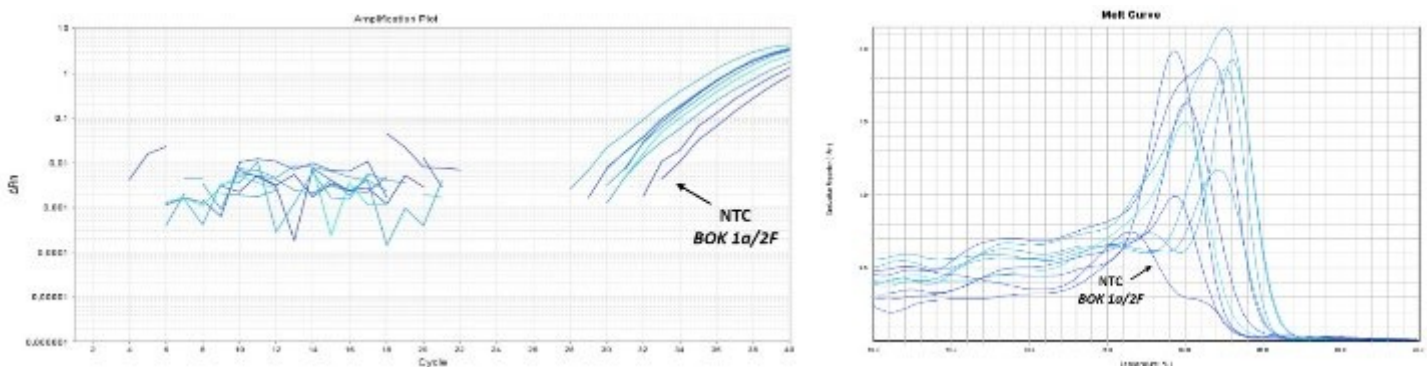
Σχήμα 3.13. Καμπύλη τήξης του γονιδίου αναφοράς *HPRT1*, στα νεοσυντιθέμενα 9 δείγματα *cDNA* (προερχόμενα από *CD138+* κύτταρα) με τη χρήση τυχαίων εξαμερών κατά τη διάρκεια της αντίστροφης μεταγραφής μέσω της μεθόδου *qPCR* με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής *SYBR Green I*

Στη συνέχεια απορρίφθηκε το γονίδιο αναφοράς *HPRT1* σύμφωνα με τα αποτελέσματα που πήραμε από τη *real-time qPCR*. Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα της έκφρασης των γονιδίων αναφοράς, έγιναν αντίστοιχα πειράματα σε γονίδια-στόχους *APAF1*, *BAK1*, *BID*, *BIM*, *BCL2L12*, *BOK*, *BAX*, *BCLX*, *MCL1*, *KLK4*, *KLK5*, *KLK6*, *KLK7*, *KLK7* και *KLK8* (όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.7.5). Σε αυτό το στάδιο η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής για τα ίδια 19 δείγματα έγινε με τελικές συγκεντρώσεις των 100ng/μL και των 400ng/μL, καθώς με αυτό τον τρόπο θα μπορούσε να γίνει έλεγχος για το αν ευθύνονται τυχόν παρεμποδίσεις για τη μη ικανοποιητική ενίσχυση των γονιδίων. Από τα αποτελέσματα της *real-time qPCR* όπου ελέγχθηκαν 4 δείγματα προερχόμενα από *CD138+* κύτταρα, δε προέκυπτε το συμπέρασμα ότι εκφράζονται τα συγκεκριμένα γονίδια στα δείγματα του πολλαπλού μυελώματος καθώς τα επίπεδά τους, στα δείγματα των ασθενών, ήταν πολύ χαμηλά. Ωστόσο, τα γονίδια *BIM* και *BOK* εμφάνιζαν μία ελαφρώς καλύτερη εικόνα σε σχέση με το σύνολο. Για το *BIM* μελετήθηκε το ζεύγος εκκινητών Ex2F-Ex3R τόσο για δείγματα με συγκέντρωση των 100 ng/μL όσο και για των 400 ng/μL και για το *BOK* τα ζεύγη εκκινητών 1a/2F-5/2R και 1b/2F-5/2R τόσο για δείγματα με συγκέντρωση των 100 ng/μL όσο και για των 400 ng/μL. Μετά την *real-time PCR* προκύπτει το συμπέρασμα ότι ναι μεν υπάρχει ελαφρώς καλύτερη εικόνα όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης όπως φαίνεται για το γονίδιο *BIM* και το γονίδιο *BOK* 1a/2F και 5/2R, στα δείγματα με τις συγκεντρώσεις των 100 ng/μL, το οποίο μπορεί πιθανότατα να οφείλεται στη μείωση των παρεμποδίσεων αλλά η πλειοψηφία των δειγμάτων εμφάνιζε

χαμηλά επίπεδα, δηλαδή αυξημένους κύκλους Ct κατά την ανάλυση της qPCR και όπως φαίνεται απο την εικόνα των καμπυλών τήξης δεν υπάρχει μοναδικό προϊόν και η φθορίζουσα χρωστική *SYBR Green I* προσδένεται σε μη ειδικά προϊόντα (Σχήμα 3.14 Σχήμα 3.15).



Σχήμα 3.14. Καμπύλες ενίσχυσης και τήξης του γονιδίου-στόχου *BIM* στα δείγματα *cDNA* (προερχόμενα από *CD139+* κύτταρα) συγκέντρωσης 100 ng/μL μέσω της μεθόδου qPCR με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής *SYBR Green I*



Σχήμα 3.15. Καμπύλες ενίσχυσης και τήξης του γονιδίου-στόχου *BOK 1a/2F* στα δείγματα *cDNA* (προερχόμενα από *CD139+* κύτταρα) συγκέντρωσης 100 ng/μL μέσω της μεθόδου qPCR με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής *SYBR Green I*

Ενίσχυση του γονιδίου αναφοράς GAPDH με επάλληλη PCR (Nested PCR)

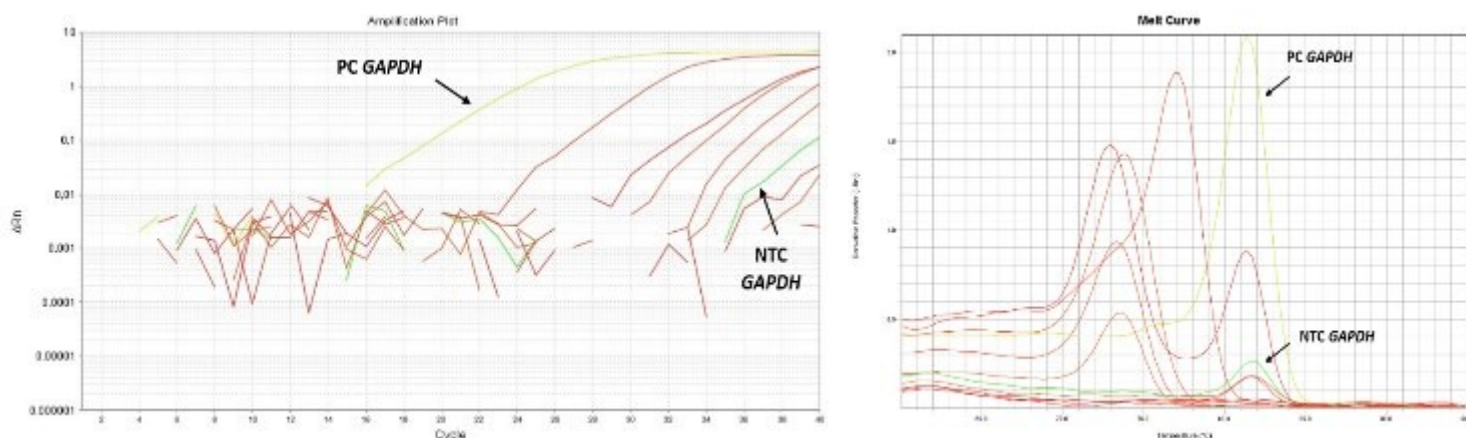
Η μέθοδος της «Nested PCR», λόγω της μεγαλύτερης ειδικότητας και ευαισθησίας, επιτυγχάνει την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς και των επιπέδων έκφρασης ορισμένων γονιδίων-στόχων. Αρχικά, εφαρμόστηκε η μέθοδος αυτή για το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*. Πραγματοποιήθηκαν αρχικά δύο απλές PCR μία για 15 κύκλους αντίδρασης και μία για 20 κύκλους αντίδρασης. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 4 δείγματα (από τα 19 ίδια δείγματα CD138+) συγκέντρωσης 100 ng/μL RNA και τα ίδια 4 δείγματα με συγκέντρωση 200 ng/μL RNA. Το ζεύγος εκκινητών της πρώτης PCR ήταν το Ex2F-Ex4R ώστε να ενισχύει μια μεγαλύτερη περιοχή του υποστρώματος DNA, μέσα στην οποία εμπεριέχεται εν τέλει το τμήμα εκείνο που πρέπει τελικώς να ενισχυθεί. Οι συνθήκες με βάση τις οποίες πραγματοποιήθηκε η πειραματική διαδικασία και το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο περιγράφονται στο υποκεφάλαιο 2.8.4.

Στη συνέχεια τα PCR προϊόντα που προέκυψαν αραιώθηκαν με υπερκάθαρο νερό, σε αραιώση 1:50 (1 μL δείγμα και 49 μL dH₂O) και σε αραιώση 1:200 και χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα για τη δεύτερη PCR. Οι διαφορετικοί κύκλοι αντίδρασης και διαφορετικές αραιώσεις των προϊόντων από τις πρώτες απλές PCR, έχουν ως στόχο να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για την real-time qPCR που ακολουθεί. Το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε στη δεύτερη PCR (qPCR) ήταν το Ex2realF Ex3realR όπως έχει αναφερθεί και στο κεφάλαιο των υλικών. Με αυτό τον τρόπο αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό η ειδικότητα της μεθόδου καθώς η ποσότητα του αρχικού DNA, αποτελεί πλέον τη μήτρα για τη δεύτερη PCR.

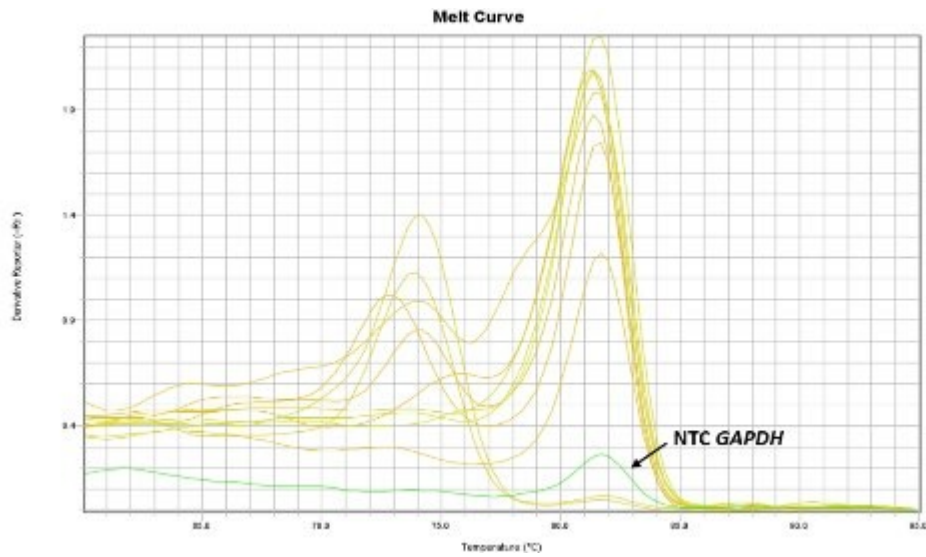
Τα υποστώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν PCR προϊόντα αραιωμένα:

1. 1:50 προερχόμενα από 15 κύκλους στην πρώτη PCR από 4 δείγματα cDNA συγκέντρωσης 100 ng/μL RNA και τα ίδια 4 δείγματα με συγκέντρωση 200 ng/μL (Σχήμα 3.16)
2. 1:200 προερχόμενα από 15 κύκλους στην πρώτη PCR από 4 δείγματα cDNA συγκέντρωσης 100 ng/μL RNA και τα ίδια 4 δείγματα με συγκέντρωση 200 ng/μL (Σχήμα 3.17)
3. 1:50 προερχόμενα από 20 κύκλους στην πρώτη PCR από 4 δείγματα cDNA συγκέντρωσης 100 ng/μL RNA και τα ίδια 4 δείγματα με συγκέντρωση 200 ng/μL (Σχήμα 3.18)
4. 1:200 προερχόμενα από 20 κύκλους στην πρώτη PCR από 4 δείγματα cDNA συγκέντρωσης 100 ng/μL RNA και τα ίδια 4 δείγματα με συγκέντρωση 200 ng/μL (Σχήμα 3.19)

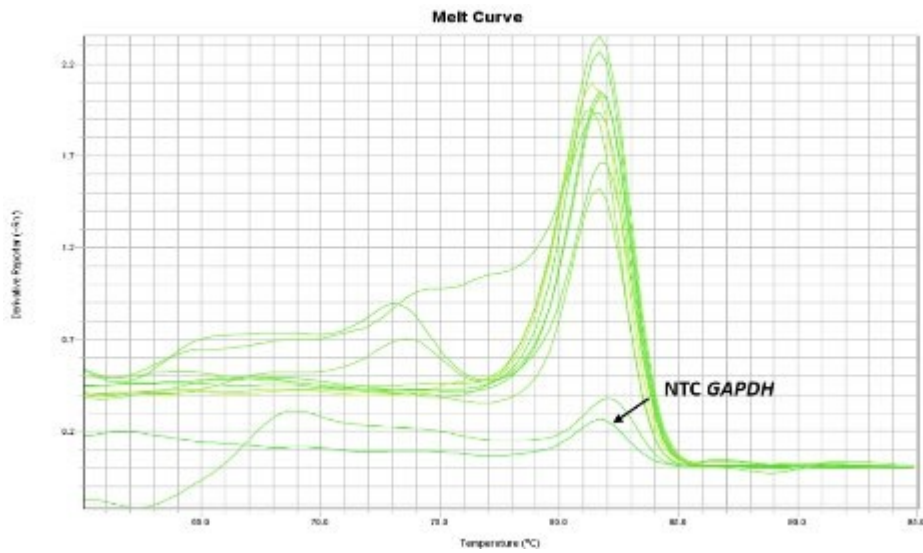
Από τα αποτελέσματα, οι καμπύλες τήξης δεν έδιναν μοναδικό προϊόν όπως φανηκε απο ούτε υψηλή έκφραση του GAPDH και καλύτερη εικόνα προέκυψε όταν είχε γίνει αραιώση 1:200 στα PCR προϊόντα που είχαν ενισχυθεί κατά 20 κύκλους στην πρώτη PCR. Επομένως, εφαρμόστηκε η ίδια ακριβώς μέθοδος και για τα 19 επιλεγμένα δείγματα συγκέντρωσης 100 ng/μL RNA για τα ίδια ζεύγη εκκινήτων σε κάθε στάδιο αντίστοιχα με τις καλύτερες πλέον συνθήκες (20 κύκλοι στη πρώτη PCR, αραιωμένα PCR προϊόντα 1:200) (Σχήμα 3.20 Σχήμα 3.21) αλλά και με τον έλεγχο μιας άλλης αραιώσης 1:100 (20 κύκλοι στη πρώτη PCR, αραιωμένα PCR προϊόντα 1:100) η οποία έδωσε καλά αποτελέσματα στην έκφραση του γονιδίου αναφοράς (Σχήμα 3.22 Σχήμα 3.23). Παρατηρείται η ικανοποιητική ενίσχυση του γονιδίου αναφοράς GAPDH και στα 19 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν. Η καμπύλη στο control της real-time qPCR (NTC PCR) όπως φαίνεται απο τις καμπύλες τήξης και για τις δύο αραιώσεις (Σχήμα 3.21 Σχήμα 3.23), πιθανότατα οφείλεται στην εμφάνιση διμερών, ωστόσο από την καμπύλη τήξης αποκλείεται η περίπτωση επιμόλυνσης και η παρουσία ενίσχυσης μη ειδικών προϊόντων, εκτός των διμερών τα οποία εμφανίζονται σε χαμηλότερη θερμοκρασία τήξης και έτσι ξεχωρίζουν. Οι καμπύλες ενίσχυσης έδωσαν παρόμοιο σχετικά Ct για το μεγαλύτερο πλήθος των δειγμάτων ελέγχου και ήταν κατά πολύ μικρότερο σε σχέση με τα προηγούμενα αποτελέσματα, πριν την εφαρμογή της nested PCR.



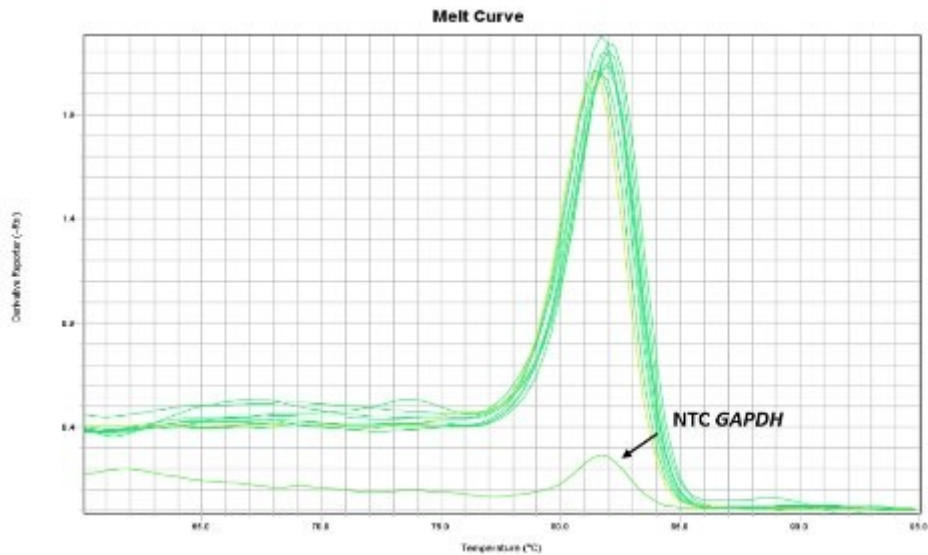
Σχήμα 3.16. Καμπύλες ενίσχυσης και τήξης του γονιδίου αναφοράς GAPDH με υπόστρωμα τα PCR προϊόντα αραιωμένα 1:50 προερχόμενα από 15 κύκλους της μεθόδου qPCR με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I έπειτα από Nested PCR



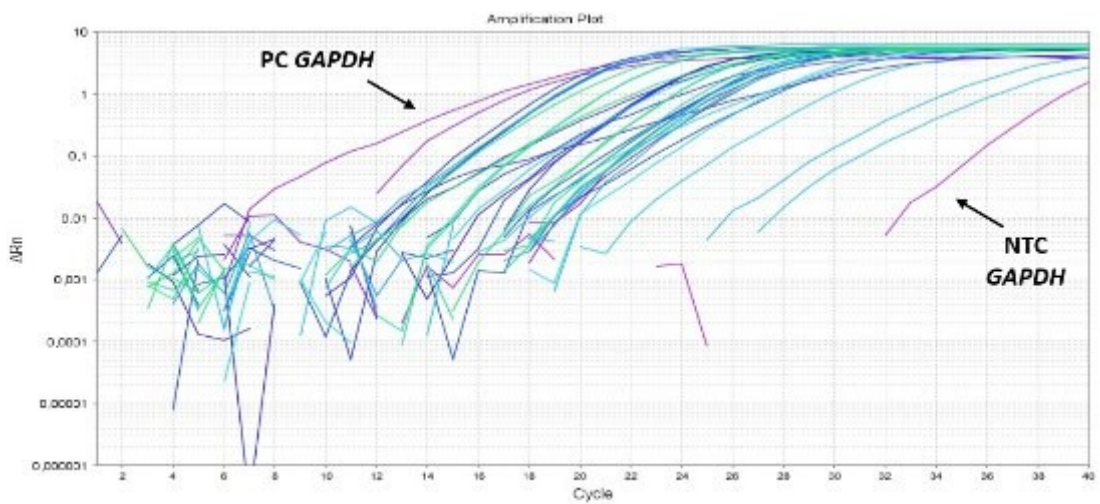
Σχήμα 3.17. Καμπύλη τήξης του γονιδίου αναφοράς *GAPDH* με υπόστρωμα τα PCR προϊόντα αραιωμένα 1:50 προερχόμενα από 20 κύκλους στην πρώτη PCR



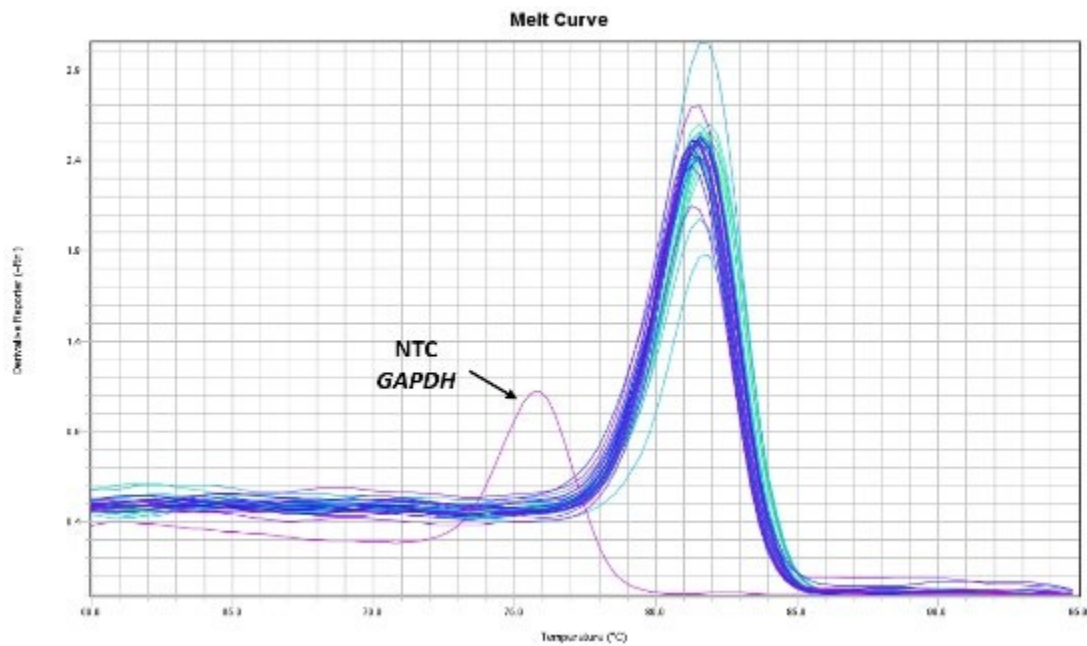
Σχήμα 3.18. Καμπύλη τήξης του γονιδίου αναφοράς *GAPDH* με υπόστρωμα τα PCR προϊόντα αραιωμένα 1:200 προερχόμενα από 15 κύκλους στην πρώτη PCR



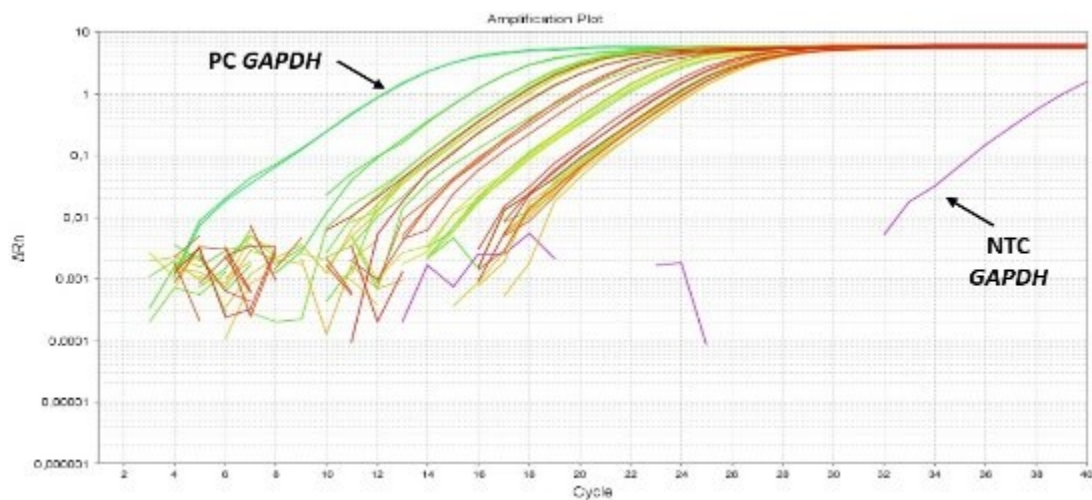
Σχήμα 3.19. Καμπύλη τήξης του γονιδίου αναφοράς *GAPDH* με υπόστρωμα τα PCR προϊόντα αραιωμένα 1:200 προερχόμενα από 15 κύκλους στην πρώτη PCR



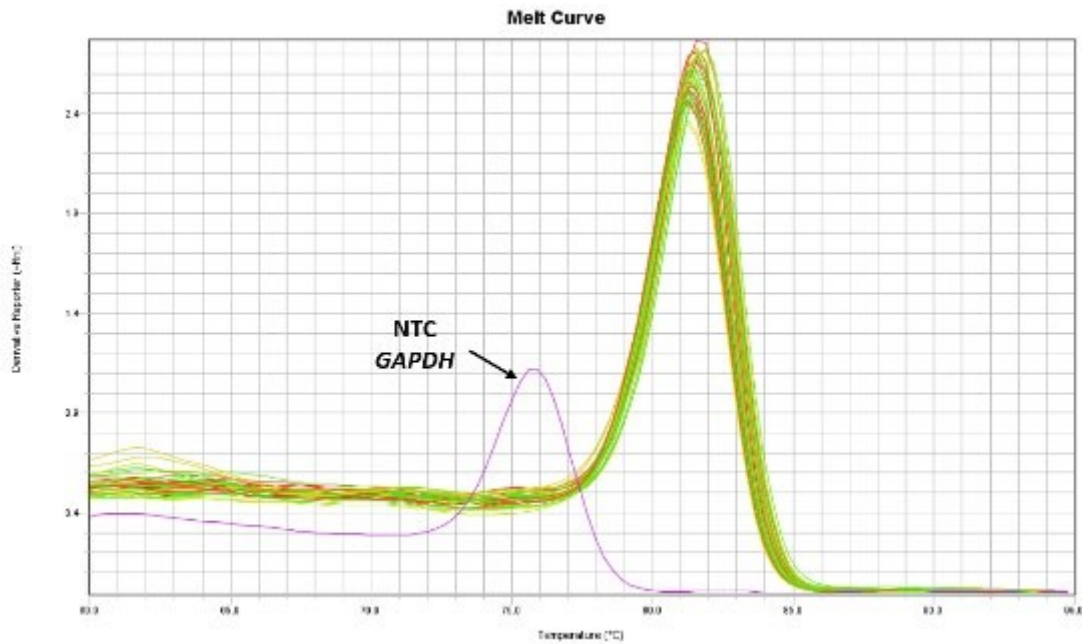
Σχήμα 3.20. Καμπύλες ενίσχυσης του γονιδίου αναφοράς *GAPDH* με υπόστρωμα τα PCR προϊόντα αραιωμένα 1:200 προερχόμενα από 20 κύκλους στην πρώτη PCR σε δείγματα cDNA συγκέντρωσης 100 ng/μL μέσω της μεθόδου qPCR με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I έπειτα από Nested PCR



Σχήμα 3.21. Καμπύλη τήξης του γονιδίου αναφοράς *GAPDH* με υπόστρωμα τα *PCR* προϊόντα αραιωμένα 1:200 προερχόμενα από 20 κύκλους στην πρώτη *PCR* σε δείγματα *cDNA* συγκέντρωσης 100 ng/μL.



Σχήμα 3.22. Καμπύλες ενίσχυσης του γονιδίου αναφοράς *GAPDH* με υπόστρωμα τα *PCR* προϊόντα αραιωμένα 1:100 προερχόμενα από 20 κύκλους στην πρώτη *PCR* σε δείγματα *cDNA* συγκέντρωσης 100 ng/μL μέσω της μεθόδου *qPCR* με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής *SYBR Green I* έπειτα από *Nested PCR*

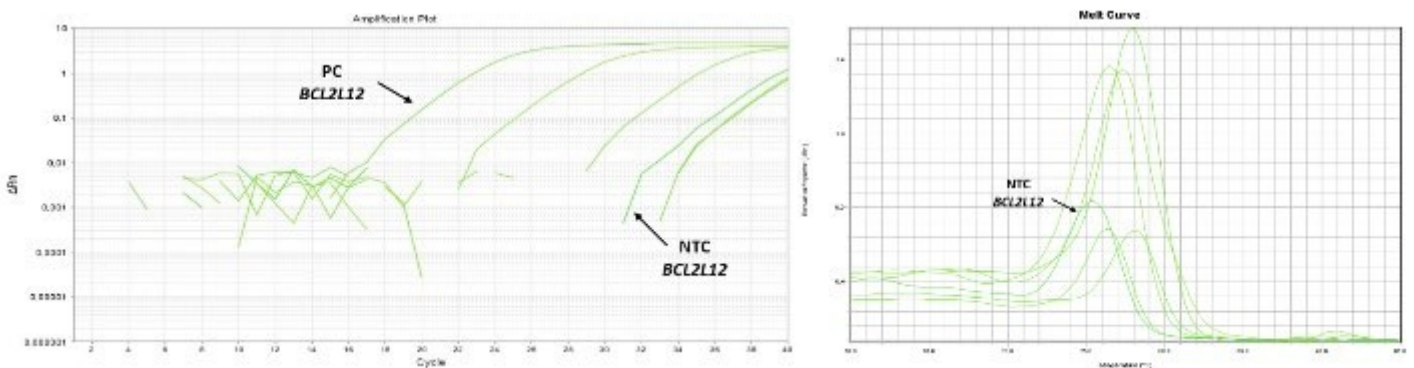


Σχήμα 3.23. Καμπύλη τήξης του γονιδίου αναφοράς *GAPDH* με υπόστρωμα τα PCR προϊόντα αραιωμένα 1:100 προερχόμενα από 20 κύκλους στην πρώτη PCR σε δείγματα cDNA συγκέντρωσης 100 ng/μL.

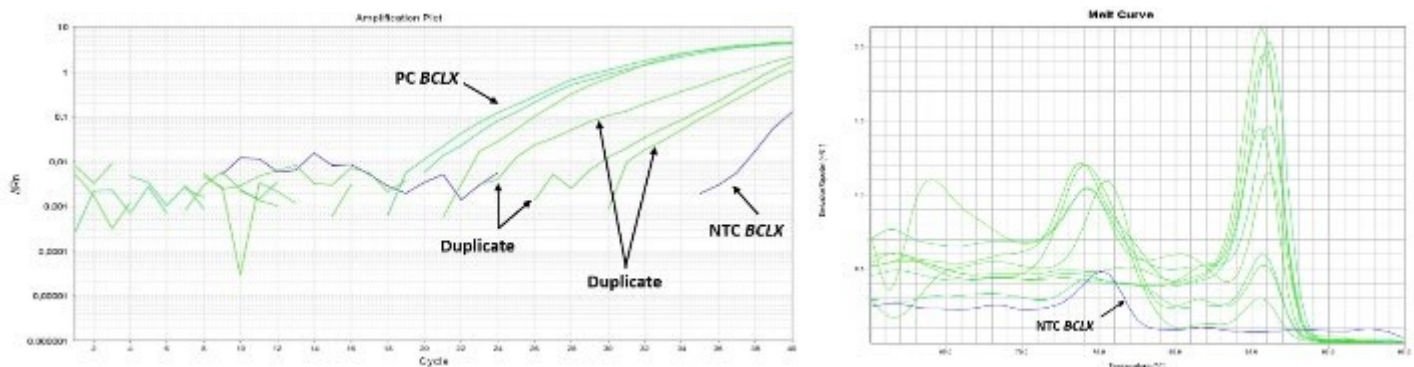
Ενίσχυση των γονιδίων στόχων με επάλληλη PCR (Nested PCR)

Εξετάστηκαν με τον ίδιο τρόπο με τη μέθοδο της Nested PCR σε λίγα δείγματα cDNA συγκέντρωσης 100 ng/μL αρχικά ορισμένα γονίδια-στόχοι, όπως τα *BAX*, *BCL2*, *BCL2L12*, *BCLX*, και *BOK*. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην πρώτη PCR έχουν προαναφερθεί (Πίνακας 2.7 στην παραγραφο 2.8.3.) και στη δεύτερη PCR (Πίνακας 2.8 στην παραγραφο 2.8.4.). Τα PCR προϊόντα τα οποία χρησιμοποιούνται σαν υπόστρωμα για την real time PCR είναι αραιωμένα 1:100 και 1:200 προερχόμενα από 20 κύκλους στην πρώτη PCR. Οι συνθήκες με βάση τις οποίες πραγματοποιήθηκε η πειραματική διαδικασία και το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο περιγράφονται στην παράγραφο 2.8.4. Τα αποτελέσματα για τα γονίδια-στόχους δεν ήταν ικανοποιητικά καθώς εμφάνιζαν ακόμα και με τη χρήση της nested PCR πολύ υψηλά Ct. Ενδεικτικά φαίνεται για το γονίδιο στόχο *BCL2L12* η καμπύλη ενίσχυσης και τήξης από τα PCR προϊόντα τα οποία είναι αραιωμένα 1:100 (παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και όταν είχαμε αραιώση 1:200) (**Σχήμα 3.24**). Ωστόσο, από αυτά καλύτερη εικόνα έδωσαν δύο γονίδια, το *BCLX* και το *BCL2*, επομένως εφαρμόστηκε ξανά όλη η πειραματική διαδικασία της nested PCR με αραιώση των PCR προϊόντων 1:200 προερχόμενα από 20 κύκλους στην πρώτη PCR και για τα 19 δείγματα με συγκέντρωση των 100 ng/μL και αυτή τη φορά στη qPCR τα δείγματα μπήκαν σε διπλέτες. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω για δύο τυχαία δείγματα για το *BCLX* γονίδιο (**Σχήμα 3.25**) και για το γονίδιο *BCL2* (**Σχήμα 3.26**). Όπως φαίνεται στην καμπύλη ενίσχυσης, οι διπλέτες, ενώ θεωρητικά θα έπρεπε να δίνουν ίδιο ακριβώς προϊόν με ίδιο ακριβώς Ct, δεν ισχύει κάτι τέτοιο. Φαίνεται η μεγάλη διαφορά που

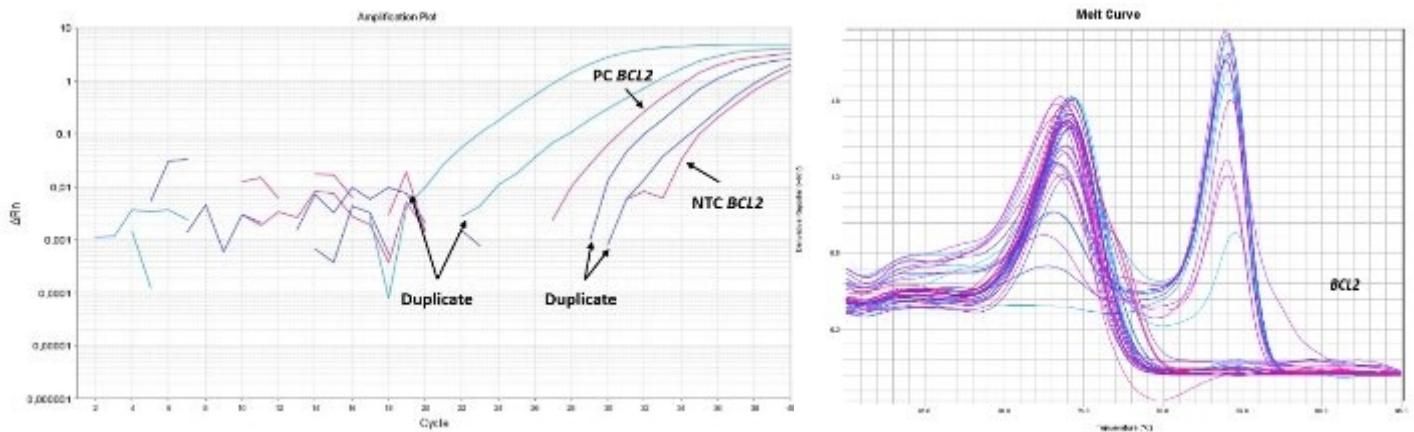
έχουν μεταξύ τους, η οποία υποδηλώνει ότι δε λειτουργεί σωστά, πιθανότατα λόγω χαμηλής έκφρασης αυτών των γονιδίων τελικά. Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε με τις ίδιες ακριβώς συνθήκες αλλά πάλι προέκυψε το ίδιο μη ικανοποιητικό αποτέλεσμα, στο τέλος έγινε αλλαγή της συγκέντρωσης όπου πήραμε cDNA 400 ng/μL για το γονίδιο στόχο *BCL2L12* αλλά και πάλι δεν είχαμε καλά αποτελέσματα αφού με βάση την καμπύλη τήξης δεν έχουμε μοναδικό προϊόν (Σχήμα 3.27). Ενώ δηλαδή, για το γονίδιο αναφοράς λειτούργησε η μέθοδος της nested PCR, για τα γονίδια στόχους δε λειτούργησε καθόλου, γεγονός που οδήγησε στην ανάγκη εύρεσης νέων μορίων στόχων για μελέτη.



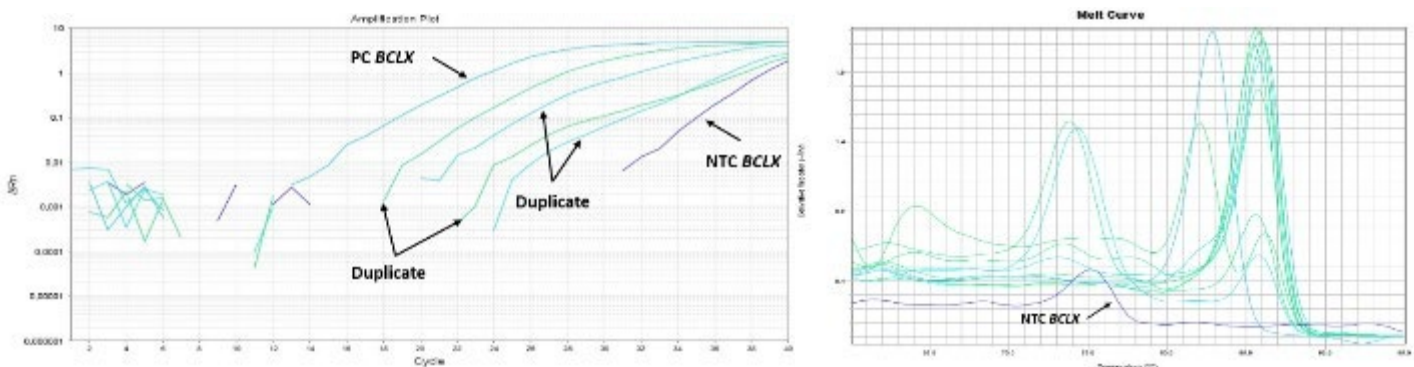
Σχήμα 3.24. Καμπύλες ενίσχυσης και τήξης του γονιδίου στόχου *BCL2L12* με υπόστρωμα τα PCR προϊόντα αραιωμένα 1:100 προερχόμενα από 20 κύκλους της μεθόδου qPCR με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I έπειτα από Nested PCR



Σχήμα 3.25. Καμπύλες ενίσχυσης του γονιδίου στόχου *BCLX* σε δύο τυχαία επιλεγμένα δείγματα καθώς και η καμπύλη τήξης με υπόστρωμα τα PCR προϊόντα αραιωμένα 1:200 προερχόμενα από 20 κύκλους της μεθόδου qPCR σε δείγματα cDNA συγκέντρωσης 100 ng/μL με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I έπειτα από Nested PCR



Σχήμα 3.26. Καμπύλες ενίσχυσης του γονιδίου στόχου *BCL2* σε δύο τυχαία επιλεγμένα δείγματα καθώς και η καμπύλη τήξης με υπόστρωμα τα PCR προϊόντα αραιωμένα 1:200 προερχόμενα από 20 κύκλους της μεθόδου qPCR με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I έπειτα από Nested PCR

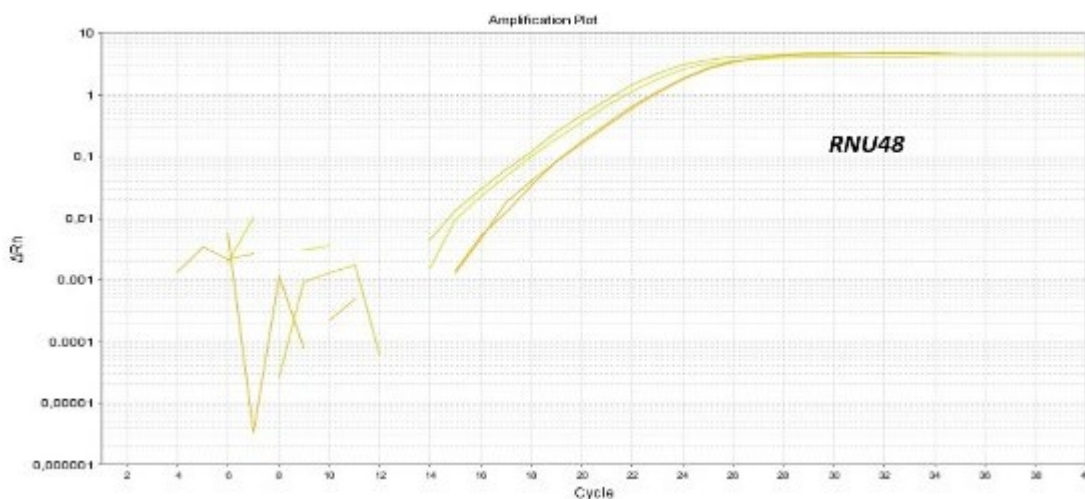


Σχήμα 3.27. Καμπύλες ενίσχυσης του γονιδίου στόχου *BCLX* σε δύο τυχαία επιλεγμένα δείγματα καθώς και η καμπύλη τήξης με υπόστρωμα τα PCR προϊόντα αραιωμένα 1:200 προερχόμενα από 20 κύκλους της μεθόδου qPCR σε δείγματα cDNA συγκέντρωσης 400 ng/μL με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I έπειτα από Nested PCR

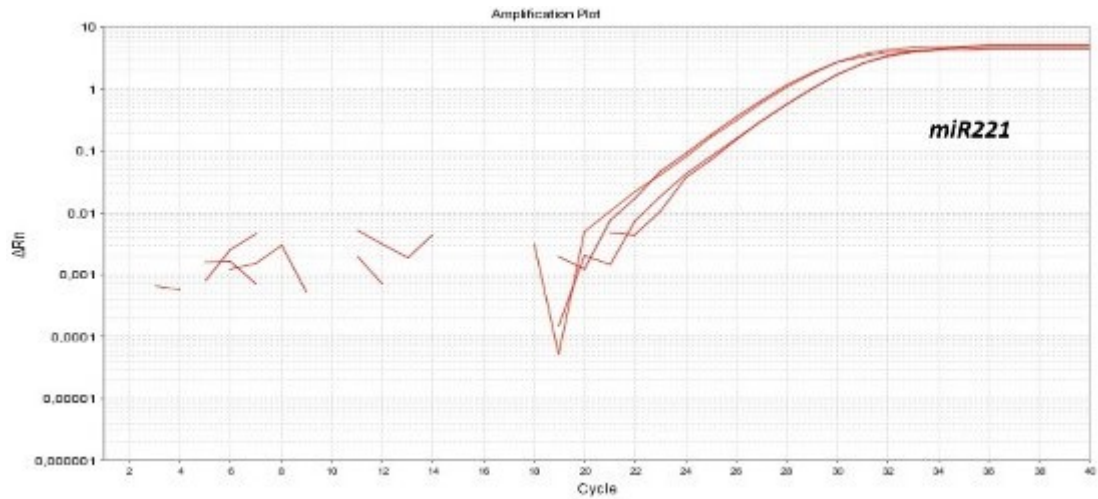
3.7 Ανάλυση της έκφρασης των miR-221 και miR-222 σε δείγματα πολλαπλού μυελώματος μέσω της ποσοτικής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time qPCR)

Η ανάλυση της έκφρασης των miR-221 και miR-222, πραγματοποιήθηκε με χρήση της ποσοτικής αντίδρασης πραγματικού χρόνου (qPCR). Σε πρώτο στάδιο, επιλέχθηκαν συνολικά 60 δείγματα ασθενών και αφότου πραγματοποιήθηκε πολυαδενυλίωση των δειγμάτων αυτών (παράγραφος 2.4), στη συνέχεια ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή. Τελικώς, για την ανίχνευση των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική SYBR Green I και οι συνθήκες της αντίδρασης περιγράφονται στο υποκεφάλαιο 2.7.7. Οι αλληλουχίες των εκκινητών φαίνονται περιγράφονται στο υποκεφάλαιο 2.7.6. .

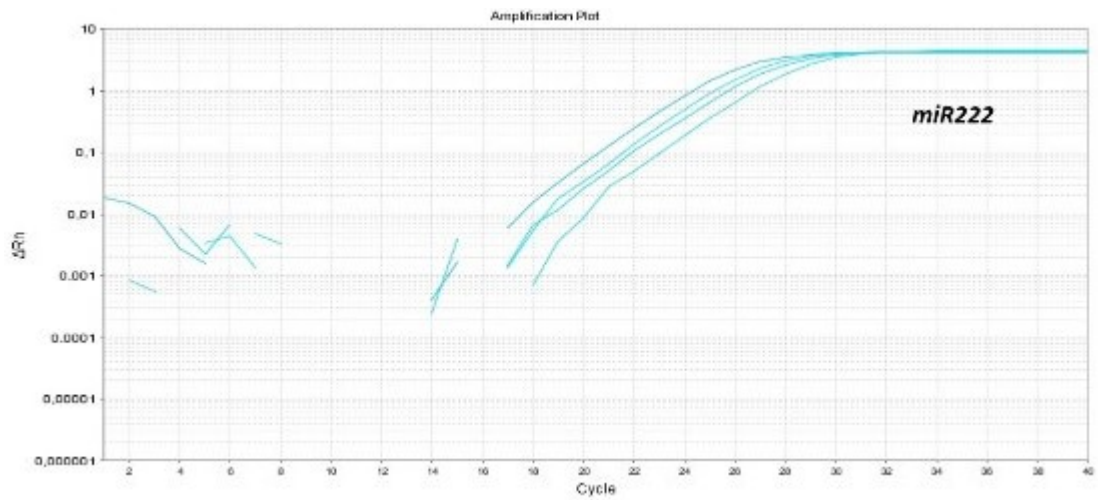
Για την ποσοτικοποίηση των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος $2^{-\Delta\Delta CT}$. Το γονίδιο αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε ήταν το RNU48 (Σχήμα 3.28). Παρακάτω φαίνονται οι καμπύλες ενίσχυσης των miR-221 (Σχήμα 3.29) και miR-222 (Σχήμα 3.30). Κατασκευάζονται επίσης καμπύλες τήξης, οι οποίες ουσιαστικά βοηθούν στην ανίχνευση των διμερών των εκκινητών ή των μη ειδικών προϊόντων. Η ανίχνευση και η διαφοροποίηση αυτή, επιτυγχάνεται μέσω της διαφορετικής θερμοκρασίας T_m , το οποίο οφείλεται στο διαφορετικό μήκος των προϊόντων. Παρακάτω φαίνονται οι καμπύλες τήξης του γονιδίου αναφοράς RNU48 (Σχήμα 3.31) καθώς και των miR-221 (Σχήμα 3.32) και miR-222 (Σχήμα 3.33) σε ξεχωριστά διαγράμματα αντίστοιχα.



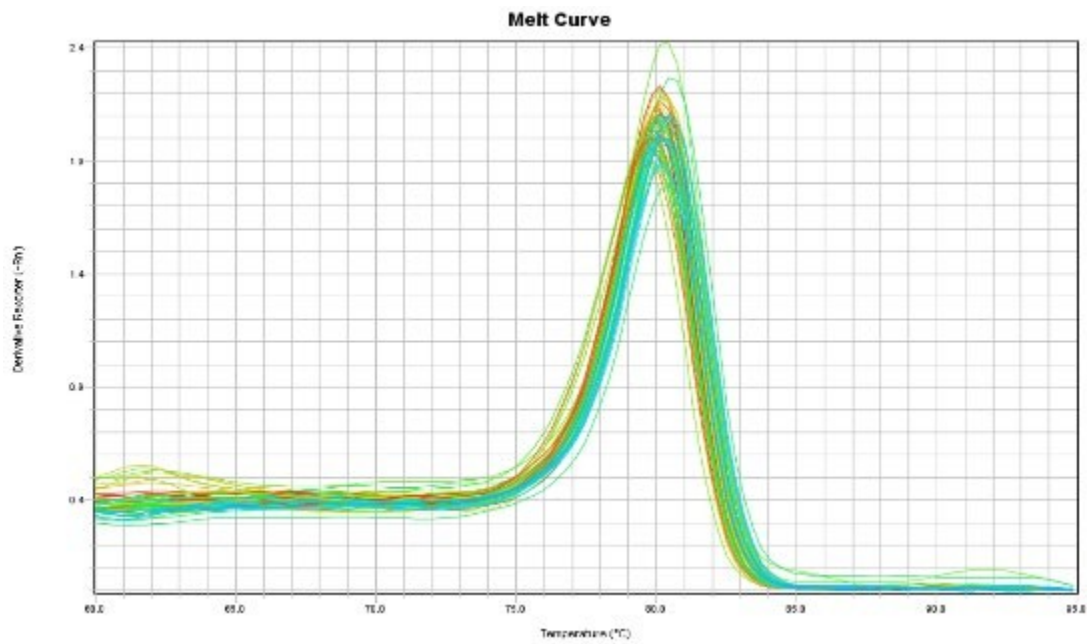
Σχήμα 3.28. Καμπύλη ποσοτικοποίησης του γονιδίου αναφοράς RNU48 σε ορισμένα δείγματα cDNA, μέσω της μεθόδου qPCR με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I



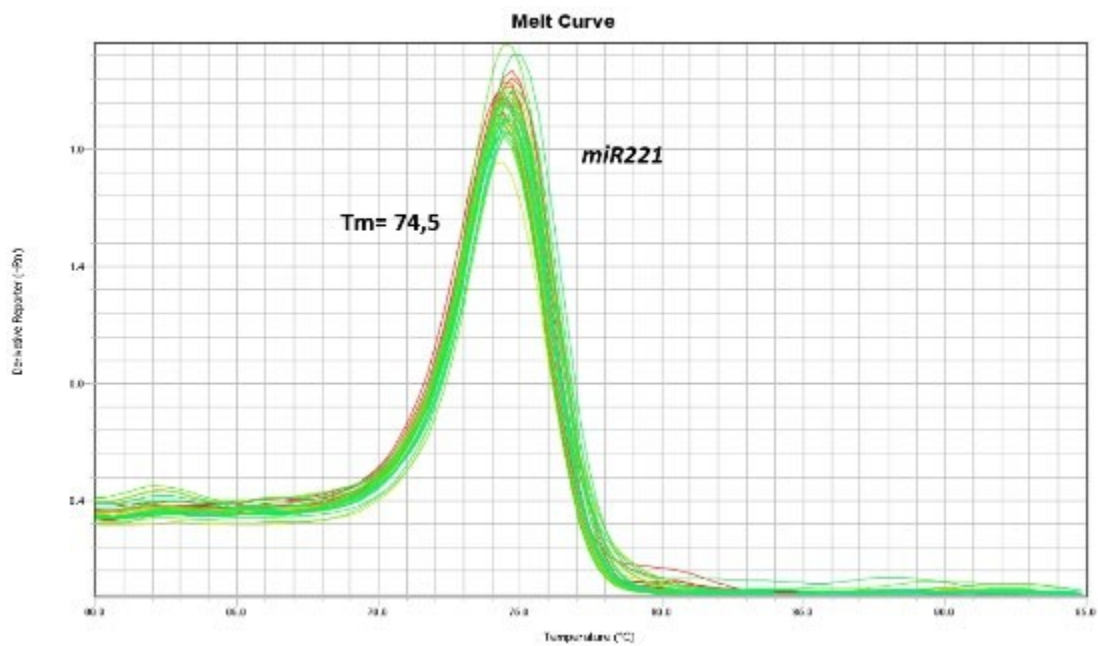
Σχήμα 3.29. Καμπύλη ποσοτικοποίησης του γονιδίου *miR221* σε ορισμένα δείγματα *cDNA*, μέσω της μεθόδου *qPCR* με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής *SYBR Green I*



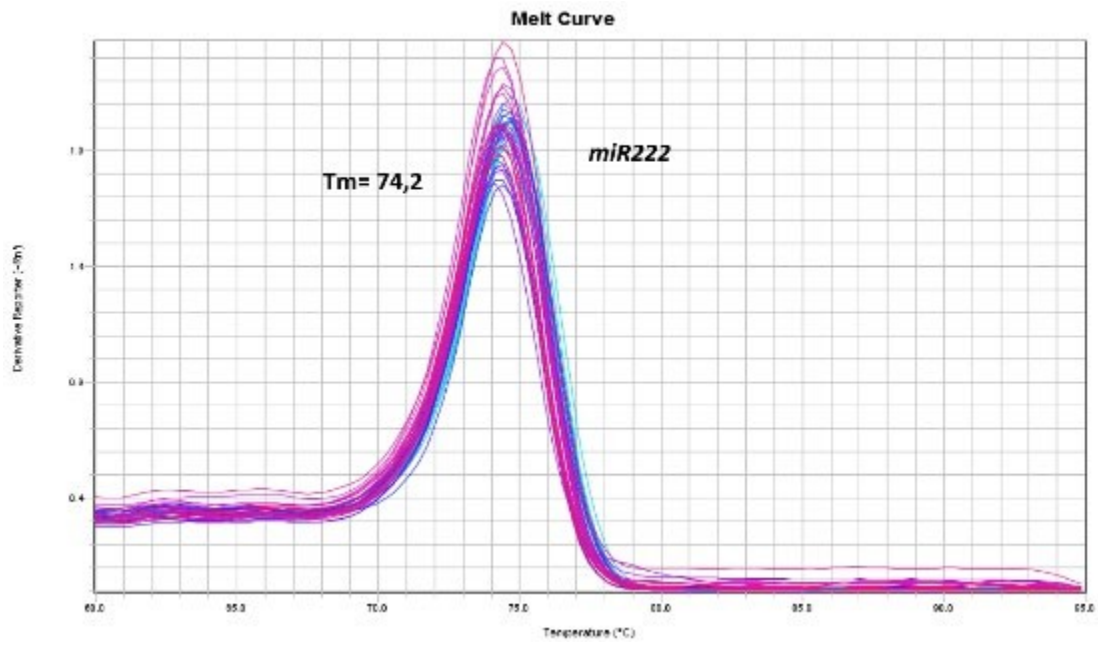
Σχήμα 3.30. Καμπύλη ποσοτικοποίησης του γονιδίου *miR221* σε ορισμένα δείγματα *cDNA*, μέσω της μεθόδου *qPCR* με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής *SYBR Green I*



Σχήμα 3.31. Καμπύλη τήξης του γονιδίου *RNU48* σε ορισμένα δείγματα *cDNA*, μέσω της μεθόδου *qPCR* με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής *SYBR Green I*



Σχήμα 3.32. Καμπύλη τήξης του γονιδίου *miR221* σε ορισμένα δείγματα *cDNA*, μέσω της μεθόδου *qPCR* με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής *SYBR Green I*



Σχήμα 3.33. Καμπύλη τήξης του γονιδίου miR222 σε ορισμένα δείγματα cDNA, μέσω της μεθόδου qPCR με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I

Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 25 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

Περιγραφική στατιστική των μεταβλητών της μελέτης

Πραγματοποιήθηκε περιγραφική στατιστική ανάλυση των αριθμητικών μεταβλητών της μελέτης (συνεχής μεταβλητές) η οποία περιλαμβάνει μεθόδους για την συλλογή και την παρουσίαση των δεδομένων, ώστε να είναι τα δεδομένα ταξινομημένα ανάλογα με το είδος των χαρακτηριστικών που περιγράφουν (μετρούν) (Πίνακας 3.5). Επίσης παρουσιάστηκαν οι κατηγορικές μεταβλητές της μελέτης που περιλαμβάνουν τα διάφορα κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα (Πίνακας 3.6).

Πίνακας 3.5. Περιγραφική στατιστική των υπό μελέτη miR-221 και miR-222 σε δείγματα ασθενών

Μεταβλητή	Εύρος τιμών	Διάμεσος τιμή
Ηλικία	35 – 88	67
Βάρος	38 – 106	73
BSA(επιφάνεια σώματος)	1,29 – 2.073	49
Αιμοσφαιρίνη	8,10 – 15,60	10,7
Λευκά αιμοσφαίρια	2.500 – 19.000	6.745
PMNS	1.000 – 15.200	4.436
Αιμοπετάλια	26 – 481	241
Αλβουμίνη (g/dL)	1,8– 5,0	3,79
Κρεατινίνη	0,41 – 14	1,82
Ουρία	19 – 221	56,6
Ασβέστιο	6,5 – 15,5	9,88
Ουρικό οξύ	2,7 – 14,2	6,60
ALP	29 – 139	67,9
B2 μικροσφαιρίνη	1,66 – 22,1	6,54

LDH (γαλακτική αφυδρογονάση)	99 – 476	201
Ποσοστό βλαστών (%)	15 – 90	59
Serum M-peak (g/dL)	0 – 9,5	3,30
Ολική πρωτεΐνη ουρίας g/24h	0,1 – 2.241	507,2
Πρωτεΐνη Bence-Jones	0 – 1.159	88,4
IgA στον ορό	23 – 6730	686,5
IgG στον ορό	203 – 10.600	3.315,3
IgM στον ορό	17 – 161	28,3
κFLCs (ελαφριά κ αλυσίδα)	1,47 – 15.800	1406
λFLCs (ελαφριά λ αλυσίδα)	1,20 – 11.800	887
Αναλογία FLC	0 – 3.870	301,3

Πίνακας 3.6. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης.

	Αριθμός ασθενών	Ποσοστό (%)
Φύλο		
Γυναίκες	20	33,9
Άνδρες	26	44,1
Διάγνωση		
MGUS	1	1,7
SMM	11	18,6
MM	47	79,7
Αλβουμίνη στον ορό		
< 3,5 g/dL	15	25,4
≥ 3,5 g/dL	31	52,5
Νεφρική Κάθαρση		
Ναι	3	5,1
Όχι	43	72,9
Οστεόλυση		
Ναι	23	39,0
Όχι	20	33,9
β2 μικροσφαιρίνη		
<3,5	16	27,1
3,5 – 5,4	11	18,6
≥ 5,5	19	32,2
LDH		
Φυσιολογική	32	54,2
Ανεβασμένη	14	23,7
Πλασματοκύτταρα στο μυελό των οστών		
<20%	1	1,7
20 – 40%	6	10,2
> 40%	39	66,1
Ελαφριά αλυσίδα		

κ	30	50
λ	15	25
Βαριά αλυσίδα		
καμία	6	10,2
IgA	11	18,6
IgG	28	47,5
IgD	1	1,7
Πρωτεΐνη Bence-Jones στα ούρα		
Ναι	36	61,0
Όχι	6	10,2
FISH del13/ μονοσωμία 13		
Ναι	15	25,4
Όχι	18	30,5
FISH t(4;14)		
Ναι	4	6,8
Όχι	37	62,7
FISH del17p(p53)		
Ναι	7	11,9
Όχι	35	59,3
FISH t(14;16)		
Ναι	1	1,7
Όχι	38	64,4
FISH t(11;14)		
Ναι	6	10,2
Όχι	27	45,8
FISH (add1q21)		
Ναι	18	30,5
Όχι	19	32,2
Κυτταρογενετικός κίνδυνος		
Φυσιολογικός	31	52,5

Υψηλός	8	13,6
ISS σύστημα		
I	12	20,3
II	14	23,7
III	20	33,9
R-ISS σύστημα		
I	8	13,6
II	23	39,0
III	10	16,9
Ανταπόκριση στην επαγωγική θεραπεία		
sCR	1	1,7
CR	2	3,4
VGPR	23	39,0
PR	15	25,4
SD	3	5,1
PD	1	1,7
Ολική Επιβίωση		
Θανόντες	2	3,4
Ζώντες	44	74,6

Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του miR221 και του miR222 σε δείγματα πολλαπλού μυελώματος

Τα επίπεδα έκφρασης του miR221 μετρήθηκαν σε 53 δείγματα με πολλαπλό μυέλωμα και τα επίπεδα έκφρασης του miR222 σε 57 δείγματα ασθενών. Τα χαρακτηριστικά των προαναφερθέντων δειγμάτων όπως η μέση τιμή των μονάδων σχετικής ποσοτικοποίησης (Relative Quantification units, RQ units), η τυπική απόκλιση και το εύρος τιμών για κάθε miRNA καθώς και το 25ο, το 50ο και το 75ο εκατοστημόριο παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.7**. Η έκφραση του miR221 στο πολλαπλό μυέλωμα κυμάνθηκε από το 0 έως 17,650 αντίγραφα με μέση τιμή $1,305 \pm 0,40$ και η έκφραση του miR222 κυμάνθηκε από το 0 έως 34,850 αντίγραφα με μέση τιμή $2,118 \pm 0,670$. Οι στατιστικές δοκιμασίες που εφαρμόστηκαν είναι μη-παραμετρικές αφού η κατανομή των πληθυσμών από τους οποίους έχουν ληφθεί τα δεδομένα δεν είναι ούτε και προσεγγίζει την κανονική κατανομή και δεν εμφανίζει ομοιογενή διασπορά. Οι μη-παραμετρικές δοκιμασίες δεν σχετίζονται με τον έλεγχο ή την εκτίμηση των παραμέτρων κατανομής και δεν εξαρτώνται από την κατανομή του πληθυσμού.

Πίνακας 3.7. Κατανομή των αριθμητικών μεταβλητών της μελέτης σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα

Μεταβλητές	Μέση τιμή (Mean)	Τυπικό σφάλμα (Standard error)	Εύρος	Εκατοστημόρια		
				25ο	50ο (διάμεσος)	75ο
miR-221	1,305	0.40	0 -17,650	0,105	0,29	1,375
miR-222	2,118	0,670	0- 34,850	0,27	0,75	2,190

Αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του miR221 και του miR222 και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα

Πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της πιθανής σχέσης μεταξύ της έκφρασης των miR221 και του miR222 η οποία είναι μια συνεχής μεταβλητή και των διάφορων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα, όπου αντιπροσωπεύουν τις κατηγορικές μεταβλητές όπως παρουσιάστηκαν παραπάνω. Όταν οι κατανομές δεν είναι κανονικές ή ο αριθμός του πληθυσμού είναι μικρός όπως στην περιπτωσή αυτή τα τεστ που χρησιμοποιούνται είναι μη-παραμετρικά. Για τον έλεγχο δύο ανεξάρτητων δειγμάτων εφαρμόστηκε το Mann-Whitney U test ενώ για την σύγκριση ≥ 3 ανεξάρτητων δειγμάτων οι οποίες έχουν διάταξη εφαρμόστηκε Jonckheere- Terpstra test. Για να είναι στατιστικώς σημαντικά τα αποτελέσματα θα πρέπει το p value να είναι στατιστικώς σημαντικό δηλαδή $< 0,005$.

Οστεόλυση

Αρχικά εξετάστηκε η σχέση των επιπέδων έκφρασης του miR221 και του miR222 και της οστεόλυσης. Η οστεόλυση είναι διχότομη και χωρίζεται σε ασθενείς που έχουν ή δεν έχουν και εφαρμόστηκε Mann-Whitney U test. Δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική σχέση μεταξύ της έκφρασης του miR221 και της οστεόλυσης αφού το p value, το οποίο καθορίζει αν το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό ήταν $p= 0.120$. Για την σχέση της έκφρασης του miR222 μπορούμε να πούμε ότι οριακά μπορεί να επηρεάζεται αφού το $p= 0,058$.

Γαλακτική αφυδρογονάση (LDH)

Η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH), είναι επίσης διχότομη (φυσιολογική, ανεβασμένη) και για την σχέση με την έκφραση των γονιδίων εφαρμόστηκε Mann-Whitney U test αλλά δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση αφού με την έκφραση του miR221 το $p=0,174$ και για το miR222 $p=0,147$.

β2 μικροσφαιρίνη (B2M)

Η B2M ανάλογα με τα επίπεδά της χωρίζεται σε 3 στάδια χαμηλό(<3,5) μεσαίο(3,5 – 5,4) και υψηλό ($\geq 5,5$) και για την σχέση με την έκφραση των γονιδίων εφαρμόστηκε Jonckheere- Terpstra test αλλά δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση αφού με την έκφραση του miR221 το $p=0,252$ και για το miR222 $p=0,854$.

Αλβουμίνη στον ορό

Η αλβουμίνη στον ορό ανάλογα με τα επίπεδά της χωρίζεται σε 2 στάδια χαμηλό(<3,5 g/dL) και υψηλό ($\geq 3,5$ g/dL) και για την σχέση με την έκφραση των γονιδίων εφαρμόστηκε Mann-Whitney U test αλλά δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση αφού με την έκφραση του miR221 το $p=0,312$ και για το miR222 $p=0,554$.

ISS σύστημα και R-ISS

Το ISS σύστημα και το R-ISS χωρίζονται σε 3 στάδια (I, II, III) και για την σχέση με την έκφραση των γονιδίων εφαρμόστηκε Jonckheere- Terpstra test αλλά δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση σε κανένα από τα δύο συστήματα αφού στο ISS με την έκφραση του miR221 το $p=0,256$ και για το miR222 $p=0,862$ ενώ στο R-ISS με την έκφραση του miR221 το $p=0,825$ και για το miR222 $p=0,237$.

FISH del13/μονοσωμία 13 και FISH t(4;14)

Η μονοσωμία 13 και FISH t(4;14) είναι διχότομες (ναι, όχι) και για την σχέση με την έκφραση των γονιδίων εφαρμόστηκε Mann-Whitney U test αλλά δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μονοσωμία 13 αφού με την έκφραση του miR221 το $p=0,659$ και για το miR222 $p=0,796$. Ούτε και στη μετάθεση FISH t(4;14) υπάρχει συσχέτιση με την έκφραση του miR221 το $p=0,551$ και για το miR222 $p=0,379$.

Κυτταρογενετικός κίνδυνος

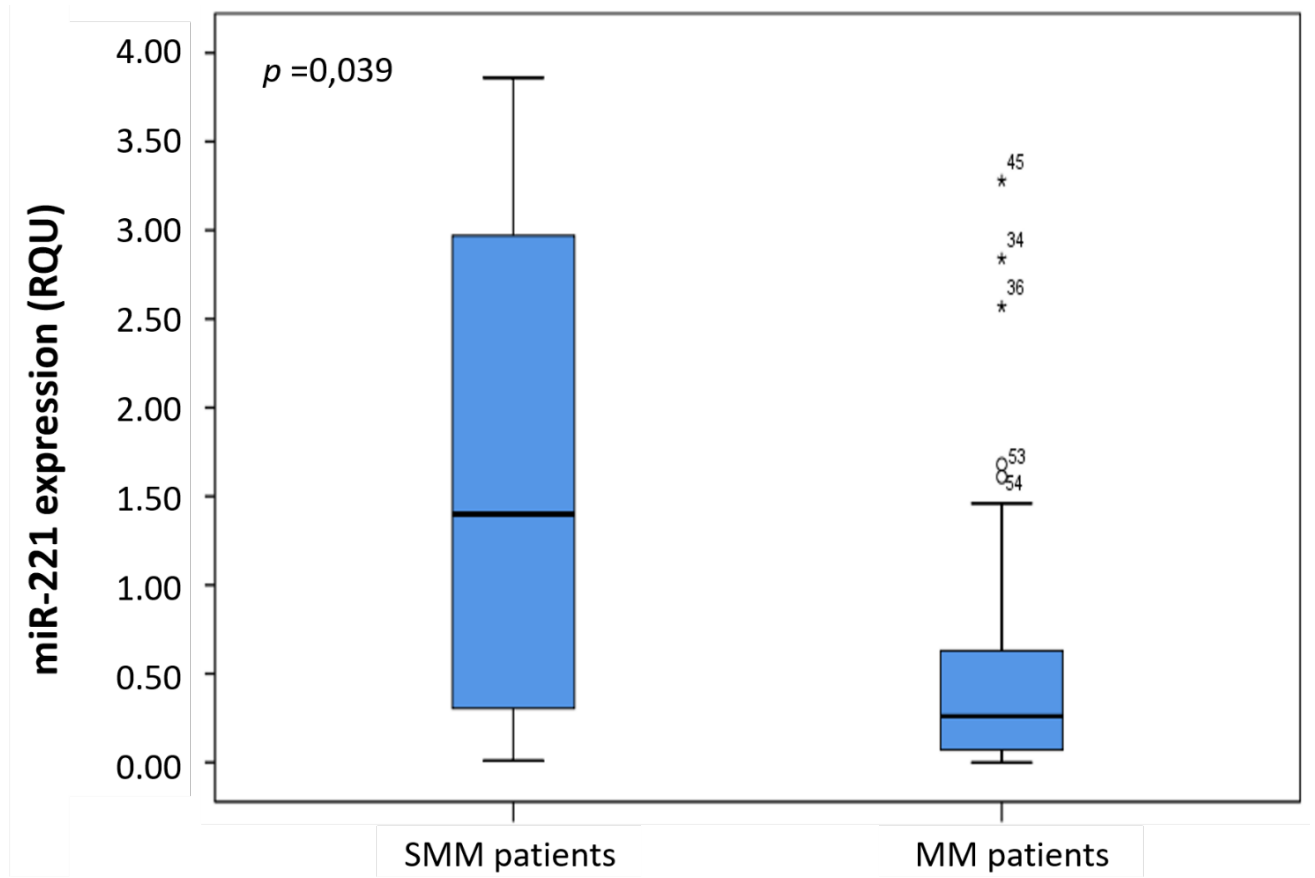
Ο κυτταρογενετικός κίνδυνος χωρίζεται σε 2 καταστάσεις (φυσιολογικός, υψηλός) και για την σχέση με την έκφραση των γονιδίων εφαρμόστηκε Mann-Whitney U test αλλά δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση αφού με την έκφραση του miR221 το $p=0,466$ και για το miR222 $p=0,461$.

Διάγνωση

Η διάγνωση χωρίζεται σε 2 καταστάσεις το έρπον πολλαπλό μυέλωμα (SMM) και το συμπτωματικό πολλαπλό μυέλωμα (MM) και για την σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων εφαρμόστηκε Mann-Whitney U test. Τα επίπεδα έκφρασης του miR221 φαίνεται να σχετίζονται με τη διάγνωση και από τα αποτελέσματα φαίνεται να έχουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του miR221 με γονίδιο αναφοράς το RNU48 στους ασθενείς με SMM (μεγαλύτερη διάμεση τιμή τα Mean Rank= 34,86) σε σχέση με τους ασθενείς με συμπτωματικό πολλαπλό μυέλωμα (MM) (διάμεση τιμή Mean Rank= 24,26) με p value= 0.039 στατιστικά σημαντικό. Από την άλλη τα επίπεδα έκφρασης του miR222 δεν φαίνεται να συσχετίζονται με τη διάγνωση αφού δίνουν $p=0.129$.

Όπως φάνηκε από το Mann-Whitney U test τα επίπεδα έκφρασης του miR221 διαφοροποιούνται ανάλογα με το στάδιο της νόσου δηλαδή σχετίζονται με τη διάγνωση. Από τα αποτελέσματα τα επίπεδα έκφρασης είναι του miR221 είναι υψηλότερα σε ασθενείς με SMM σε σχέση με τους ασθενείς που πάσχουν από MM. Η ισχυρή αρνητική συσχέτιση των επιπέδων του miR-221 με την πρόοδο της νόσου υποδεικνύουν έναν πιθανό ογκοκατασταλτικό ρόλο για το συγκεκριμένο miRNA στο πολλαπλό μυέλωμα, όπου τα επίπεδά του miR221 μειώνονται σημαντικά με την εξέλιξη της νόσου σε συμπτωματικό πολλαπλό μυέλωμα.

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν θηκογράμματα (box plots) για την απεικόνιση της κατανομής των επιπέδων έκφρασης του υπό μελέτη miR221 σε σχέση με τη διάγνωση των ασθενών. Στα θηκογράμματα (**Σχήμα 3.34.**) παριστάνεται η διάμεσος, τα τεταρτημόρια καθώς επίσης και η μέγιστη και ελάχιστη παρατήρηση του δείγματος. Η άνω πλευρά του ορθογώνιου αντιστοιχεί στο 75ο τεταρτημόριο, η κάτω βάση στο 25ο τεταρτημόριο και το ευθύγραμμο τμήμα μέσα στο ορθογώνιο αναπαριστά τη διάμεσο και η θέση της υποδηλώνει εάν οι περισσότερες παρατηρήσεις βρίσκονται στην κάτω ή στην άνω πλευρά.



Σχήμα 3.34. Απεικόνιση της κατανομής των επιπέδων έκφρασης του miR221 σε σχέση με τη διάγνωση, δηλαδή των ασθενών με SMM και των ασθενών με MM με $p = 0.039$.

Διαχωρισμός των ασθενών με βάση τα επίπεδα έκφρασης του miR221 και του miR222 και σύγκριση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους.

Η έκφραση των γονιδίων η οποία είναι μια συνεχής μεταβλητή κατατάχθηκε σε δύο κατηγορίες (θετική ή αρνητική), με βάση τη διάμεσο τιμή (50^ο εκατοστημόριο) η οποία προσδιορίστηκε ως βέλτιστη τιμή λήψης απόφασης (cut-off). Η έκφραση του miR221 κατατάσσεται με βάση τη διάμεσο τιμή 0,29, θετικοί στο miR221 θεωρήθηκαν αυτοί που είχαν τιμή πάνω από 0,29 και αρνητικοί οι υπόλοιποι. Αντίστοιχα η έκφραση του miR222 κατατάσσεται με βάση τη διάμεσο τιμή 0,75, θετικοί στο miR222 θεωρήθηκαν αυτοί που είχαν τιμή πάνω από 0,75 και αρνητικοί οι υπόλοιποι. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση μεταξύ αυτών των κατηγορικών πλέον μεταβλητών και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών με τη χρήση του μη-παραμετρικού test Chi-square (χ^2).

Δεν παρατηρείται συσχέτιση μεταξύ της κατάστασης της έκφρασης των miR221 και του miR222 ως κατηγορικών μεταβλητών με τα παρακάτω κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά:

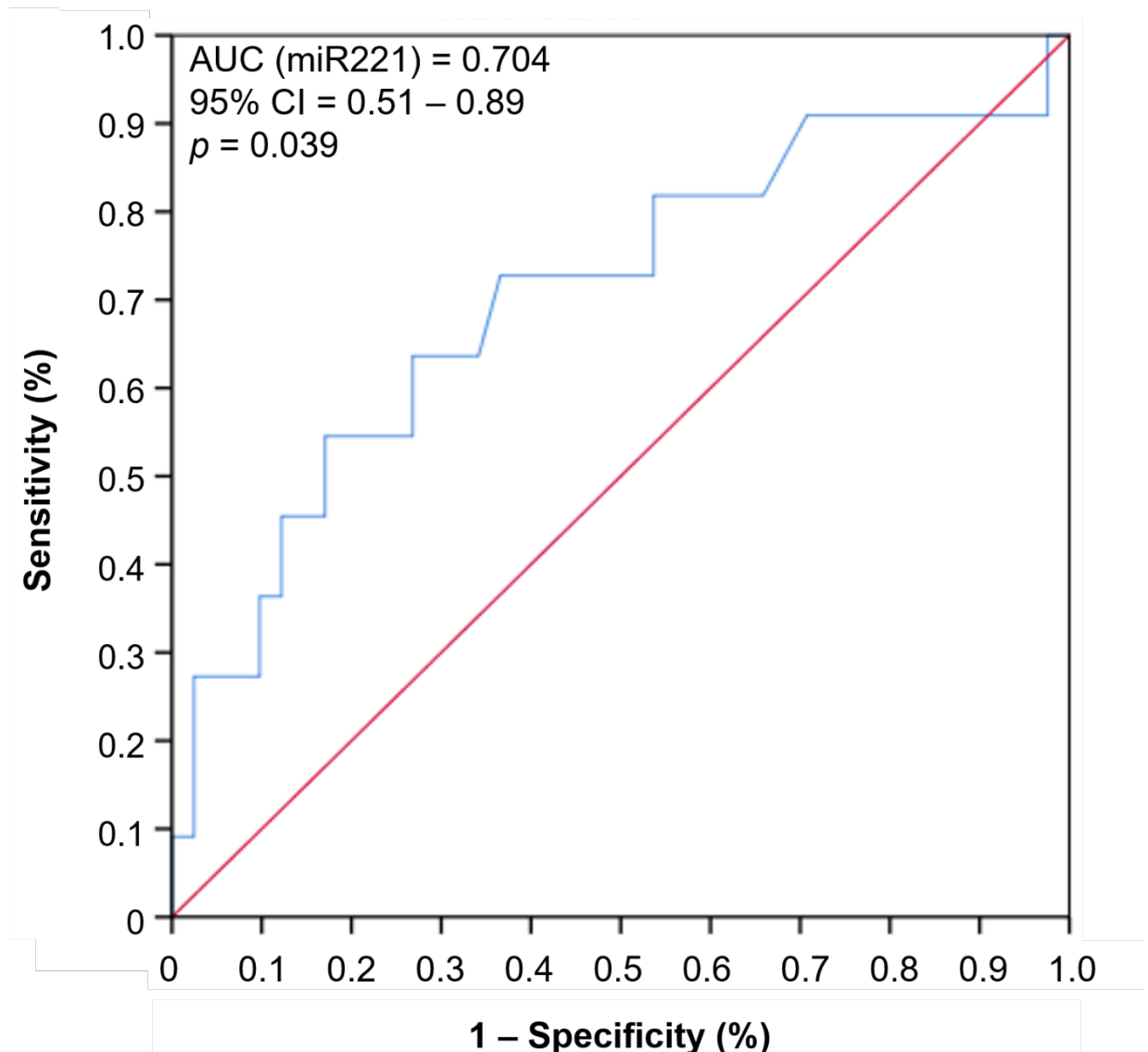
1. **Διάγνωση** για το miR221 $p= 0.173$ για το miR222 $p= 0.096$
2. **Φύλο** για το miR221 $p= 0.525$ για το miR222 $p= 0.359$
3. **Νεφρική κάθαρση** για το miR221 $p= 0.565$ για το miR222 $p= 1,0$
4. **Οστεόλυση** για το miR221 $p= 0.193$
5. **MRI pattern** για το miR221 $p= 0.308$ για το miR222 $p= 0.808$
6. **Πλασματοκύτταρα στο μυελό των οστών** για το miR221 $p= 0,499$ για το miR222 $p= 0,477$
7. **Γαλακτική αφυδρογονάση LDH** για το miR221 $p= 0,505$ για το miR222 $p=0,333$
8. **Ελαφριές αλυσίδες** για το miR221 $p= 0,079$ για το miR222 $p=0,257$
9. **Βαριές αλυσίδες** για το miR221 $p= 0,542$ για το miR222 $p=0,468$

και για τις υπόλοιπες κατηγορικές μεταβλητές δεν βγήκε κατι στατιστικώς σημαντικό.

Αντιθέτως για την διερεύνηση της σχέσης μεταξύ της έκφρασης του miR222, η οποία έχει χωριστεί σαν κατηγορική μεταβλητή με ασθενείς που είναι θετικοί και αρνητικοί ως προς την έκφραση και της οστεόλυσης που είναι επίσης κατηγορική μεταβλητή και είναι διχότομη (ναι, όχι) έχουμε στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα. Παρατηρείται ότι από τους ασθενείς που είναι αρνητικοί το 73,9% έχει οστεόλυση και το 26,1% δεν έχει οστεόλυση, ενώ οι ασθενείς οι οποίοι είναι θετικοί το 33,3% έχει οστεόλυση και το 66,7% δεν έχει οστεόλυση με $p= 0,013 < 0,05$.

Προσδιορισμός της διαφοροδιαγνωστικής αξίας του επιπέδου έκφρασης του miR221 στο έρπων πολλαπλό μυέλωμα και στο συμπτωματικό πολλαπλό μυέλωμα

Λόγω της σημαντικής μείωσης των επιπέδων έκφρασης του miR-221 στο συμπτωματικό πολλαπλό μυέλωμα, σε σχέση με το έρπων πολλαπλό μυέλωμα SMM όπως φάνηκε από το Mann-Whitney U test και στη συνέχεια με την απεικόνιση μέσω των Box plots, πραγματοποιήθηκε εκτενής αξιολόγηση της διαφοροδιαγνωστικής τους αξίας. Αυτή η αξιολόγηση επιτυγχάνεται μέσω της κατασκευής καμπύλης ευαισθησίας-ειδικότητας ROC (**Σχήμα 3.35**). Η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) για το miR221 υπολογίστηκε ίση με 0,704 τυπικό σφάλμα SE = 0.098, διάστημα εμπιστοσύνης 95 % CI = 0,513 – 0,895 και το $p = 0,039 < 0,05$



Σχήμα 3.35. Καμπύλη ευαισθησίας-ειδικότητας ROC για την έκφραση του miR-221

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας είχε ως σκοπό την ανάλυση της έκφρασης και τη μελέτη ορισμένων mRNA μορίων καθώς και των μορίων miR-221 και miR-222 στο πολλαπλό μυέλωμα. Απώτερος στόχος ήταν η κλινική αξιολόγηση των παραπάνω, σχετιζόμενων με το πολλαπλό μυέλωμα, μορίων ως νέων βιοδεικτών για τη διάγνωση και την πρόγνωση του πολλαπλού μυελώματος, καθώς και την πρόβλεψη της θεραπευτικής ανταπόκρισης των ασθενών που φέρουν τη νόσο. Παρ'όλα αυτά τα μόρια mRNA τα οποία εξετάστηκαν δεν εμφάνισαν ικανοποιητική έκφραση στα CD138⁺ κύτταρα ώστε να συσχετιστούν τα μόρια αυτά με το πολλαπλό μυέλωμα. Μόνο η έκφραση των δύο αυτών miRNA φάνηκε να συσχετίζεται με το πολλαπλό μυέλωμα και να δίνει με βάση τη στατιστική ανάλυση κάποια στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία (απομόνωση ολικού RNA) ενός στατιστικά σημαντικού μεγέθους δείγματος πλασματοκυττάρων CD138⁻ και CD138⁺ (n = 130). Απο τα δείγματα αυτά μελετήθηκαν μόνο τα CD138⁺ τα οποία είναι τα παθολογικά. Για να βρεθεί η κατάλληλη συγκέντρωση RNA στη μελέτη μορίων mRNA η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων αναφοράς *GAPDH* και *HPRT1* έγινε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις RNA από κυτταρική σειρά HEK293 1600ng/ μL, 800ng/ μL, 400ng /μL, 200ng /μL, 100ng /μL , μέσω της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time qPCR) με την μεθοδολογία της χρωστικής SYBR Green I ώστε να βρεθεί η βέλτιστη τιμή συγκέντρωσης RNA των δειγμάτων η οποία επιλέχθηκε να είναι τα 200ng/ μL. Επιλέχθηκαν 19 δείγματα CD138⁺ τα οποία είχαν μάζα > 7μg και αραιώθηκαν ώστε η τελική συγκέντρωσή τους να είναι 200ng/ μL. Τα παραπάνω πραγματοποιήθηκαν στα 19 δείγματα CD138⁺ για τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων αναφοράς *GAPDH* και *HPRT1* ώστε να εξετάσουμε εάν υπάρχουν μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων αναφοράς μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων καθώς και να επιβεβαιωθεί ότι η απομόνωση του ολικού RNA και η σύνθεση cDNA ήταν επιτυχής. Απο τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το γονίδιο *GAPDH* δίνει καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με το *HPRT1* όπως φαίνεται απο την καμπύλη ενίσχυσης και την καμπύλη τήξης διότι η ενίσχυση *HPRT1* είναι μη ικανοποιητική και απο την ποιοτική ανάλυση, μέσω της καμπύλης τήξης, φαίνεται οτι ενισχύονται πολλά μη-ειδικά προϊόντα (διαφορετικά Tm) αντι της ενίσχυσης ενός μοναδικού προϊόντος, με μία συγκεκριμένη θερμοκρασία τήξης Tm. Για αυτούς τους λόγους επιλέχθηκε το γονίδιο *GAPDH* ως γονίδιο αναφοράς, όμως και σε αυτό η έκφραση του θα έπρεπε να ήταν υψηλότερη χωρίς την ύπαρξη διμερών εκκινητών στην καμπύλη τήξης. Στη συνέχεια έγινε έλεγχος της έκφρασης ορισμένων μεταγράφων mRNA στο πολλαπλό μυέλωμα. Τα mRNA μόρια γονίδια-στόχοι, τα οποία εξετάστηκαν ήταν *APAF1*, *BAK1*, *BID*, *BIM*, *BCL2L12*, *BOK*, *BAX*, *BCLX*, *MCL1*, *KLK4*, *KLK5*, *KLK6*, *KLK7*, *KLK7* και *KLK8* με τη μέθοδο της real time qPCR με φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I. Ωστόσο τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά αφού δεν φάνηκε να υπάρχει έκφραση των γονιδίων αυτών. Για να

επιτύχουμε την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *GAPDH* και των επιπέδων έκφρασης ορισμένων γονιδίων-στόχων εφαρμόστηκε η μέθοδος της «Nested PCR». Αρχικά, εφαρμόστηκε η μέθοδος αυτή για το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*. Πραγματοποιήθηκαν αρχικά δύο απλές PCR μία για 15 κύκλους αντίδρασης και μία για 20 κύκλους αντίδρασης για συγκεντρώσεις RNA των δειγμάτων 100 ng/μL και 200 ng/μL και τα PCR προϊόντα αραιώθηκαν 1:50 και 1:200. Τα αποτελέσματα ήταν εξίσου καλά για την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *GAPDH* των PCR προϊόντων αραιωμένων 1:200 και 1:100 από 20 κύκλους στην πρώτη PCR σε δείγματα cDNA συγκέντρωσης 100 ng/μL. Αντίθετα η μέθοδος αυτή δεν έδωσε καλά αποτελέσματα για την έκφραση των γονιδίων στόχων *BAX*, *BCL2*, *BCL2L12*, *BCLX*, και *BOK* για τα PCR προϊόντα τα οποία αραιώθηκαν 1:200 από 20 κύκλους στην πρώτη PCR σε δείγματα cDNA συγκέντρωσης 100 ng/μL καθώς φαίνεται απο την καμπύλη ενίσχυσης ότι δεν έχουμε επαναληψιμότητα όταν το ίδιο δείγμα μπαίνει σε διπλές. Επιπλέον απο την καμπύλη τήξης φαίνεται ότι δεν παράγεται μοναδικό προϊόν και φαίνεται να ενισχύονται μη ειδικά προϊόντα. Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι η μέθοδος αυτή δεν λειτούργησε για αυτά τα μόρια-στόχους και έπρεπε να αναζητηθούν νεοι μοριακοί δείκτες.

Οι νέοι μοριακοί βιοδείκτες που αναζητήθηκαν ήταν τα microRNA. Τα microRNAs (miRNAs) έχουν μήκος 21–23 νουκλεοτίδια και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση των βλαστοκυττάρων, καθώς και σε διάφορες νόσους (με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τον καρκίνο). Παρά το γεγονός ότι ποσοστό 3% των γονιδίων του ανθρώπου κωδικοποιεί miRNAs, τα εν λόγω miRNAs ρυθμίζουν περίπου το 30% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Αυτό υποδεικνύει όχι μόνο τη σημασία τους σε ποικίλα ρυθμιστικά μονοπάτια, αλλά και το δυναμικό τους για χειρισμό των λειτουργιών του κυττάρου. Επιπρόσθετα, όσον αφορά στον καρκίνο, τα miRNAs έχει παρατηρηθεί να δρουν τόσο ως ογκοκατασταλτικά μόρια όσο και ως ογκογονίδια, τα οποία αναστέλλουν και επάγουν-προάγουν την ανάπτυξη όγκου, αντίστοιχα. Επομένως, μια δυναμική θεραπευτική χρήση των miRNAs αφορά στη διόρθωση των απορρυθμισμένων επιπέδων μετάφρασης γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται σε μονοπάτια σηματοδότησης στα καρκινικά κύτταρα, και ιδιαίτερα στα καρκινικά βλαστοκύτταρα που πρωτίστως ευθύνονται για την καρκινογένεση και τις μεταστάσεις. Αντίστοιχα για τη μελέτη των μορίων miRNA η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων αναφοράς *SNORD43* (*RNU43*) και *SNORD48* (*RNU48*) έγινε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις RNA απο κυτταρική σειρά HEK293 800ng/μL, 400ng/μL, 200ng/μL, 100ng/μL, μέσω της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time qPCR) με την μεθοδολογία της χρωστικής SYBR Green I ώστε να βρεθεί η βέλτιστη τιμή συγκέντρωσης RNA των δειγμάτων η οποία επιλέχθηκε επίσης να είναι τα 200ng/ μL. Στα 19 αυτά δείγματα CD138⁺ με μάζα > 7μg που όπως προαναφέρθηκε αραιώθηκαν σε τελική συγκέντρωση 200ng/μL, έγινε έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *RNU48* με τη real-time qPCR χρησιμοποιώντας σαν φθορίζουσα χρωστική τη SYBR Green I. Το γονίδιο αναφοράς που επιλέχθηκε είχε

σταθερή έκφραση μεταξύ των δειγμάτων με χαμηλό Ct όπως φάνηκε απο την καμπύλη ποσοτικοποίησης και έδινε μοναδικό προϊόν. Στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση των miR221 και του miR222 σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα στα 19 δείγματα CD138⁺ με τη real-time qPCR χρησιμοποιώντας σαν φθορίζουσα χρωστική τη SYBR Green I. Όσον αφορά την ποσοτικοποίησή τους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος 2^{-ΔΔCt}. Από την ποιοτική ανάλυση με την καμπύλη τήξης φαίνεται ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση και δεν έχουμε ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων και η μέθοδος που αναπτύχθηκε για τη μελέτη των επιπέδων του miR-221 και του miR-222 ήταν επιτυχής.

Τα γονίδια των μορίων miR-221 και miR-222 εντοπίζονται στον ίδιο γενετικό τόπο του χρωμοσώματος X (Xp11.3), όπου σχηματίζουν ένα γονιδιακό σύμπλεγμα (cluster) και κωδικοποιούνται παράλληλα απο αυτό. Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι το miR-221/222 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικό εργαλείο για τη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων ή τη ρύθμιση της ευαισθησίας σε αντικαρκινικούς παράγοντες. Το γονιδιακό σύμπλεγμα miR-221/222 λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας για τα ερυθροκύτταρα, αναστέλοντας την φυσιολογική ερυθροποίηση και την ανάπτυξη ερυθρολευκαϊκών κυττάρων εν μέρει μέσω της αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα Kit. Πράγματι, στην ερυθροποιητική καλλιέργεια προγονικών κυττάρων CD34⁺ αίματος ομφάλιου λώρου, τα επίπεδα miR-221/222 είναι σημαντικά μειωμένα. Στην ερυθροποιητική καλλιέργεια που υποβάλλονται σε εκθετική κυτταρική ανάπτυξη, η χαμηλή έκφραση των miR συνεπάγεται την αύξηση της έκφρασης πρωτεΐνης Kit. Η θεραπεία των προγονικών κυττάρων CD34⁺ με miR-221/222 είναι ικανή να προκαλέσει διαταραχή του πολλαπλασιασμού και αυξημένη διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων. Τα miR-221/222 δρουν και ως ογκογόνα miRNAs που διευκολύνουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω της καταρροϊκής ρύθμισης του *p27Kip1(p27)* και / ή του *p57Kip2(p57)*. Το p27 αναφέρεται ως γονίδιο καταστολής όγκου, ρυθμιστής της αντοχής του φαρμάκου σε συμπαγείς όγκους και προαγωγέας απόπτωσης. Το *p57Kip2(p57)* είναι και αυτο μέλος της οικογένειας του αναστολέα της κινάσης εξαρτώμενης από κυκλίνη (CDKI) και είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμο. Τα γονίδια αυτά ρυθμίζουν αρνητικά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου από την φάση G1 έως S. Αρκετές αναφορές υποδεικνύουν έναν βασικό ρόλο του miR-221/222 στην ογκογένεση. Στην πραγματικότητα, έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι η αύξηση της έκφρασης miR-221/222 προσδίδει αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο. Επίσης πρόσφατα δείχθηκε ότι τα αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια miR-221/222 μειώνουν την ανάπτυξη του όγκου αυξάνοντας την έκφραση πρωτεΐνης p27Kip1 εντός του όγκου. Το γονιδιακό σύμπλεγμα miR-221/222 υπερεκφράζεται σε πολλά είδη καρκίνων συμπεριλαμβανομένων και των αιματολογικών κακοηθειών όπως το πολλαπλό μυέλωμα. Σε μελέτες που συσχετίζουν την έκφραση των miR-221/222 με την οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML) δείχθηκε ότι στην περίπτωση που έχουμε την AML τα επίπεδα έκφρασης του miR-221 ήταν χαμηλά αλλά η έκφραση του miR-222 δεν επηρεαζόταν και δεν είχαμε αντίστοιχα τη μείωση της έκφρασης. Βέβαι το γεγονός ότι ενώ βρίσκονται στο ίδιο γονιδιακό σύμπλεγμα η έκφραση δεν μεταβάλλεται με τον ίδιο τρόπο έχει μείνει αδιευκρίνιστη [124]. Έχει αποδειχθεί ότι το miR-221-222

προάγει την ογκογένεση με την καθοδική ρύθμιση της έκφρασης καταστολέων όγκων όπως ο ρυθμιστής προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης p53-ρυθμιστής της απόπτωσης (PUMA) και ο μεσολαβητής κυτταρικού θανάτου (BIM). Ο ρόλος της οικογένειας miR-221-222 στην ανθεκτικότητα του φαρμάκου της δεξαμεθαζόνης (Dex) στο πολλαπλό μυέλωμα υποδεικνύουν έναν πιθανό θεραπευτικό ρόλο για τους αναστολείς της δέσμευσης του miR-221-222 με το PUMA mRNA ως μέσο ώστε να ξεπεραστεί το πρόβλημα της ανθεκτικότητας της Dex σε ασθενείς. Η κλινική χρησιμότητα αυτής της προσέγγισης βασίζεται στην ικανότητα του αντι-νοσηματικού miR-221-222 να αυξήσει την επιβίωση ενώ μειώνει το φορτίο του όγκου και υποστηρίζεται έντονα από την μεταστατική τάση των κυττάρων αντίστασης σε προκλινικά μοντέλα ξеноγενών μοσχευμάτων ποντικού με πολλαπλό μυέλωμα.

Με την στατιστική ανάλυση έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του miR221 και του miR222 τα οποία βρίσκονται στο ίδιο χρωμοσωμικό σύμπλεγμα, μέσω του προσδιορισμού των συνεχών μεταβλητών της μέσης τιμής και του εύρους της έκφρασης. Επίσης έγινε αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του miR221 και του miR222 και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα. Οι στατιστικές δοκιμασίες που εφαρμόστηκαν είναι μη-παραμετρικές αφού η κατανομή των πληθυσμών από τους οποίους έχουν ληφθεί τα δεδομένα δεν είναι κανονική και δεν εμφανίζει ομοιογενή διασπορά. Για τη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ του επιπέδου έκφρασης του miR221 και της κατηγορικής μεταβλητής της διάγνωσης εφαρμόστηκε Mann-Whitney U test και φάνηκε ότι υπάρχει συσχέτιση η οποία είναι στατιστικώς σημαντική. Συγκεκριμένα τα επίπεδα έκφρασης του miR221 είναι αυξημένα στο στάδιο του ασυμπτωματικού πολλαπλού μυελώματος (SMM) ενώ είναι χαμηλά στο συμπτωματικό πολλαπλό μυέλωμα με το $p=0.039$. Η απεικόνιση αυτής της συσχέτισης έγινε με την κατασκευή Box plot της κατανομής των επιπέδων έκφρασης του miR221 σε σχέση με τη διάγνωση των ασθενών που πάσχουν από πολλαπλό μυέλωμα. Στη συνέχεια, για τη μετατροπή της συνεχούς μεταβλητής των επιπέδων έκφρασης του miR221 και του miR222 σε κατηγορική προσδιορίστηκε ως βέλτιστη τιμή λήψης απόφασης (cut-off) αυτή της διαμέσου (50ο τεταρτημόριο) και με αυτό τον τρόπο χωρίστηκαν οι ασθενείς σε θετικούς και αρνητικούς ανάλογα με τις τιμές έκφρασης των microRNAs. Η σύγκριση μεταξύ της κατηγορικής πλέον μεταβλητής των επιπέδων έκφρασης και των υπόλοιπων κατηγορικών μεταβλητών οι οποίες είναι τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα γίνεται με το Chi-square test χ^2 . Από αυτή τη σύγκριση έχουμε μόνο μια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση που περιλαμβάνει την έκφραση του miR222 σε σχέση με την οστεόλυση $p=0,013$. Παρατηρείται ότι από τους ασθενείς που είναι αρνητικοί το 73,9% έχει οστεόλυση και το 26,1% δεν έχει οστεόλυση, ενώ οι ασθενείς οι οποίοι είναι θετικοί το 33,3% έχει οστεόλυση και το 66,7% δεν έχει οστεόλυση. Αυτό μας δείχνει ότι όταν τα επίπεδα έκφρασης του miR222 είναι χαμηλά οι ασθενείς έχουν μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης οστεόλυσης ενώ όταν είναι υψηλά τα επίπεδα έκφρασης οι ασθενείς έχουν μικρότερο ποσοστό εμφάνισης της οστεόλυσης. Τέλος, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της διαφοροδιαγνωστικής αξίας του επιπέδου έκφρασης του miR221 διότι όπως φάνηκε και από το Mann-

Whitney U test τα επίπεδα έκφρασης του miR221 ήταν πολύ πιο αυξημένα στο στάδιο του SMM σε σχέση με το MM στάδιο. Αυτή η αξιολόγηση επιτυγχάνεται μέσω της κατασκευής καμπύλης ευαισθησίας-ειδικότητας ROC (95 % CI = 0,513 – 0,895 και το $p = 0,039 < 0,05$).

Συμπερασματικά, τα μελετώμενα μόρια αντιπροσωπεύουν πολλά υποσχόμενους μοριακούς δείκτες που θα μπορούσαν να ενισχύσουν τη διαφοροδιάγνωση ανάμεσα στα στάδια της νόσου. Επιπρόσθετα, τα βιομόρια που μελετήθηκαν θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην περισσότερο έγκυρη πρόγνωση της νόσου. Οι ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από έρπων πολλαπλό μύελωμα, αποτελούν το 15% των νεοδιαγνωσθέντων περιπτώσεων με πολλαπλό μύελωμα, οπότε θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι τα επίπεδα έκφρασης του miR221 τα οποία είναι αυξημένα στο έρπων πολλαπλό μύελωμα μπορεί να είναι πιθανός προγνωστικός παράγοντας. Επιπλέον η συσχέτιση της έκφρασης του miR222 με την οστεόλυση είναι σημαντικό αποτέλεσμα. Η οστεόλυση είναι ένα από τα κριτήρια διάγνωσης του πολλαπλού μυελώματος, όταν λοιπόν με βάση τη στατιστική ανάλυση που έγινε αυξάνεται το ποσοστό της οστεόλυσης το οποίο είναι πιθανό να συμβαίνει στο πολλαπλό μύελωμα τα επίπεδα έκφρασης του miR222 είναι χαμηλά, οπότε θα μπορούσαμε να πούμε ότι το miR222 είναι ένας πιθανός ευμενής προγνωστικός δείκτης.

Μελλοντικά πρέπει να επενδύσουμε στην ανακάλυψη προβλεπτικών /προγνωστικών καρκινικών βιοδεικτών, οι οποίοι να μπορούν πρώιμα και αξιόπιστα να καθοδηγήσουν τη θεραπευτική επιλογή. Με αυτόν τον τρόπο, οι ασθενείς με καρκίνο που πρόκειται να ωφεληθούν από ανοσοθεραπευτικές παρεμβάσεις θα μπορούν να επιλέγονται έγκαιρα και να λαμβάνουν την κατάλληλη θεραπεία.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lodish, H., J. Flygare, and S. Chou, *From stem cell to erythroblast: Regulation of red cell production at multiple levels by multiple hormones*. IUBMB Life, 2010. **62**(7): p. 492-496.
2. Rani, P. and A. Meera, *Isolation and immunophenotypic characterization of bone marrow derived stem cells*. International Journal of Pharmaceutical Science Invention, 2014. **3**(4): p. 26-32.
3. Kricun, M.E., *Red-yellow marrow conversion: its effect on the location of some solitary bone lesions*. Skeletal radiology, 1985. **14**(1): p. 10-19.
4. Woolthuis, C.M., G. de Haan, and G. Huls, *Aging of hematopoietic stem cells: Intrinsic changes or micro-environmental effects?* Current Opinion in Immunology, 2011. **23**(4): p. 512-517.
5. Birbrair, A. and P.S. Frenette, *Niche heterogeneity in the bone marrow*. Annals of the new York Academy of Sciences, 2016. **1370**(1): p. 82-96.
6. Morrison, S.J. and J. Kimble, *Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer*. nature, 2006. **441**(7097): p. 1068.
7. Morrison, S.J. and I.L. Weissman, *The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 661-673.
8. Tsiftoglou, A.S., I.S. Vizirianakis, and J. Strouboulis, *Erythropoiesis: Model systems, molecular regulators, and developmental programs*. IUBMB Life, 2009. **61**(8): p. 800-830.
9. Maverakis, E., et al., *Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: a critical review*. Journal of autoimmunity, 2015. **57**: p. 1-13.
10. Litman, G.W., et al., *Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire*. Molecular biology and evolution, 1993. **10**(1): p. 60-72.
11. Kuby, J., *Immunology Fourth Edition—WH Freeman and Company*. New York, 2001.
12. Janeway, C.A., et al., *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Vol. 7. 1996: Current Biology London.
13. Davies, D.R., E.A. Padlan, and S. Sheriff, *Antibody-antigen complexes*. Annual review of biochemistry, 1990. **59**(1): p. 439-473.
14. Porter, R.R., *Structural studies of immunoglobulins*. Science, 1973. **180**(4087): p. 713-716.
15. Agrawal, A. and D.G. Schatz, *RAG1 and RAG2 form a stable postcleavage synaptic complex with DNA containing signal ends in V (D) J recombination*. Cell, 1997. **89**(1): p. 43-53.

16. van Gent, D.C., D.A. Ramsden, and M. Gellert, *The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23 rule in V (D) J recombination*. Cell, 1996. **85**(1): p. 107-113.
17. Schatz, D.G. and P.C. Swanson, *V (D) J recombination: mechanisms of initiation*. Annual review of genetics, 2011. **45**: p. 167-202.
18. Dudley, D.D., et al., *Mechanism and control of V (D) J recombination versus class switch recombination: similarities and differences*, in *Advances in immunology*. 2005, Elsevier. p. 43-112.
19. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2016*. CA: a cancer journal for clinicians, 2016. **66**(1): p. 7-30.
20. Gonsalves, W.I., et al., *Prognostic Significance of Quantifying Circulating Plasma Cells in Multiple Myeloma*. Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia, 2014. **14**: p. S147.
21. Drayson, M., et al., *Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma*. Blood, 2001. **97**(9): p. 2900-2902.
22. Kyle, R.A., et al. *Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma*. in *Mayo Clinic Proceedings*. 2003. Elsevier.
23. Rajkumar, S.V., et al., *International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma*. The lancet oncology, 2014. **15**(12): p. e538-e548.
24. Zheng, C., et al., *Interleukin 6, tumour necrosis factor α , interleukin 1 β and interleukin 1 receptor antagonist promoter or coding gene polymorphisms in multiple myeloma*. British journal of haematology, 2000. **109**(1): p. 39-45.
25. Turesson, I., et al. *Patterns of multiple myeloma during the past 5 decades: stable incidence rates for all age groups in the population but rapidly changing age distribution in the clinic*. in *Mayo Clinic Proceedings*. 2010. Elsevier.
26. Landgren, O., et al., *Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study*. Blood, 2009. **113**(22): p. 5412-5417.
27. Kyle, R.A., et al., *A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance*. New England Journal of Medicine, 2002. **346**(8): p. 564-569.
28. Kyle, R.A., et al., *Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma*. New England Journal of Medicine, 2007. **356**(25): p. 2582-2590.
29. Shapiro-Shelef, M. and K. Calame, *Plasma cell differentiation and multiple myeloma*. Current opinion in immunology, 2004. **16**(2): p. 226-234.

30. Klein, B. and R. Bataille, *Cytokine network in human multiple myeloma*. Hematology/Oncology Clinics, 1992. **6**(2): p. 273-284.
31. Kumar, S.K., et al., *Multiple myeloma*. Nature Reviews Disease Primers, 2017. **3**: p. 17046.
32. Waxman, A.J., et al., *Racial disparities in incidence and outcome in multiple myeloma: a population-based study*. Blood, 2010. **116**(25): p. 5501-5506.
33. Huang, S.Y., et al., *Epidemiology of multiple myeloma in Taiwan: increasing incidence for the past 25 years and higher prevalence of extramedullary myeloma in patients younger than 55 years*. Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, 2007. **110**(4): p. 896-905.
34. Alexander, D.D., et al., *The non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiologic literature*. International journal of cancer, 2007. **120**(S12): p. 1-39.
35. Bladé, J., R.A. Kyle, and P.R. Greipp, *Multiple myeloma in patients younger than 30 years: report of 10 cases and review of the literature*. Archives of internal medicine, 1996. **156**(13): p. 1463-1468.
36. Ichimaru, M., et al., *Multiple Myeloma Among Atomic Bomb Survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1950–76: Relationship to Radiation Dose Absorbed by Marrow*. Journal of the National Cancer Institute, 1982. **69**(2): p. 323-328.
37. Preston, D.L., et al., *Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III: Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987*. Radiation research, 1994. **137**(2s): p. S68-S97.
38. Khuder, S.A. and A.B. Mutgi, *Meta-analyses of multiple myeloma and farming*. American journal of industrial medicine, 1997. **32**(5): p. 510-516.
39. Bergsagel, D.E., et al., *Benzene and multiple myeloma: Appraisal of the scientific evidence*. Blood, 1999. **94**(4): p. 1174-1182.
40. Johnson, D.C., et al., *Genome-wide association study identifies variation at 6q25. 1 associated with survival in multiple myeloma*. Nature communications, 2016. **7**: p. 10290.
41. Ziv, E., et al., *Genome-wide association study identifies variants at 16p13 associated with survival in multiple myeloma patients*. Nature communications, 2015. **6**: p. 7539.
42. González, D., et al., *Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma*. Blood, 2007. **110**(9): p. 3112-3121.

43. Veillon, D.M. and J.D. Cotelingam, *Pathologic studies useful for the diagnosis and monitoring of plasma cell dyscrasias*, in *The Kidney in Plasma Cell Dyscrasias*. 2007, Karger Publishers. p. 25-43.
44. Jagannath, S., *Pathophysiological underpinnings of multiple myeloma progression*. Journal of Managed Care Pharmacy, 2008. **14**(7 Supp A): p. 7-11.
45. Durie, B.G. and S.E. Salmon, *A clinical staging system for multiple myeloma correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival*. Cancer, 1975. **36**(3): p. 842-854.
46. Greipp, P.R., et al., *International staging system for multiple myeloma*. Journal of clinical oncology, 2005. **23**(15): p. 3412-3420.
47. Palumbo, A., et al., *Revised international staging system for multiple myeloma: a report from International Myeloma Working Group*. Journal of clinical oncology, 2015. **33**(26): p. 2863.
48. Morgan, G.J., B.A. Walker, and F.E. Davies, *The genetic architecture of multiple myeloma*. Nature Reviews Cancer, 2012. **12**(5): p. 335.
49. Manier, S., et al., *Cell autonomous and microenvironmental regulation of tumor progression in precursor states of multiple myeloma*. Current opinion in hematology, 2016. **23**(4): p. 426-433.
50. Bergsagel, P.L. and W.M. Kuehl, *Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(26): p. 6333-6338.
51. Walker, B.A., et al., *Mutational spectrum, copy number changes, and outcome: results of a sequencing study of patients with newly diagnosed myeloma*. Journal of clinical oncology, 2015. **33**(33): p. 3911-3920.
52. Hakim, O., et al., *DNA damage defines sites of recurrent chromosomal translocations in B lymphocytes*. Nature, 2012. **484**(7392): p. 69.
53. Avet-Loiseau, H., et al., *14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma*. Cancer Research, 1999. **59**(18): p. 4546-4550.
54. Ross, F.M., et al., *The t (14; 20) is a poor prognostic factor in myeloma but is associated with long-term stable disease in monoclonal gammopathies of undetermined significance*. haematologica, 2010. **95**(7): p. 1221-1225.

55. Rajkumar, S.V., et al., *Impact of primary molecular cytogenetic abnormalities and risk of progression in smoldering multiple myeloma*. *Leukemia*, 2013. **27**(8): p. 1738.
56. Child, J.A., et al., *High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma*. *New England Journal of Medicine*, 2003. **348**(19): p. 1875-1883.
57. Rajkumar, S.V., *Multiple myeloma: 2018 update on diagnosis, risk-stratification, and management*. *American Journal of Hematology*, 2018. **93**(8): p. 1091-1110.
58. Brown, L.M., et al., *Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders*. *Blood*, 2008. **111**(7): p. 3388-3394.
59. Durie, B., *Multiple Myeloma, Cancer of the Bone Marrow: Concise Review of the Disease and Treatment Options. 2015*. International Myeloma Foundation, North Hollywood, CA, 2011.
60. Avet-Loiseau, H., et al., *Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome*. *Blood*, 2007. **109**(8): p. 3489-3495.
61. Dimopoulos, M.A. and E. Terpos, *Multiple myeloma*. *Annals of Oncology*, 2010. **21**(suppl_7): p. vii143-vii150.
62. Podar, K., et al., *The malignant clone and the bone-marrow environment*. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2007. **20**(4): p. 597-612.
63. Kumar, S., et al., *Bone marrow angiogenic ability and expression of angiogenic cytokines in myeloma: evidence favoring loss of marrow angiogenesis inhibitory activity with disease progression*. *Blood*, 2004. **104**(4): p. 1159-1165.
64. Rajkumar, S.V., et al., *Presence of monoclonal free light chains in the serum predicts risk of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance*. *British journal of haematology*, 2004. **127**(3): p. 308-310.
65. Dimopoulos, M.A., et al., *Solitary plasmacytoma of bone and asymptomatic multiple myeloma*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2000. **96**(6): p. 2037-2044.
66. Sjak-Shie, N.N., R.A. Vescio, and J.R. Berenson, *The role of human herpesvirus-8 in the pathogenesis of multiple myeloma*. *Hematology/oncology clinics of North America*, 1999. **13**(6): p. 1159-1167.

67. Group, I.M.W., *Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group*. British journal of haematology, 2003. **121**(5): p. 749-757.
68. Mouloupoulos, L.A., et al., *Diffuse pattern of bone marrow involvement on magnetic resonance imaging is associated with high risk cytogenetics and poor outcome in newly diagnosed, symptomatic patients with multiple myeloma: a single center experience on 228 patients*. American journal of hematology, 2012. **87**(9): p. 861-864.
69. Datta, S.S., et al., *Immunoglobulin M 'Flare' Seen in a Case of Waldenstrom's Macroglobulinemia: Successfully Managed by Therapeutic Plasma Exchange*. Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion, 2016. **32**(1): p. 148-151.
70. Avet-Loiseau, H., et al. *14q32 Translocations discriminate IgM multiple myeloma from Waldenstrom's macroglobulinemia*. in *Seminars in oncology*. 2003. Elsevier.
71. Naidu, S., P. Magee, and M. Garofalo, *MiRNA-based therapeutic intervention of cancer*. Journal of hematology & oncology, 2015. **8**(1): p. 68.
72. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. cell, 1993. **75**(5): p. 843-854.
73. Valencia-Sanchez, M.A., et al., *Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs*. Genes & development, 2006. **20**(5): p. 515-524.
74. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-862.
75. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs—microRNAs with a role in cancer*. Nature reviews cancer, 2006. **6**(4): p. 259.
76. Fu, Y., et al., *Small non-coding transfer RNA-derived RNA fragments (tRFs): their biogenesis, function and implication in human diseases*. Genomics & informatics, 2015. **13**(4): p. 94.
77. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. The EMBO journal, 2004. **23**(20): p. 4051-4060.
78. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. cell, 2009. **136**(2): p. 215-233.

79. Leung, A.K.L. and P. Sharp. *Function and localization of microRNAs in mammalian cells*. in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2006. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
80. Shukla, G.C., J. Singh, and S. Barik, *MicroRNAs: processing, maturation, target recognition and regulatory functions*. *Molecular and cellular pharmacology*, 2011. **3**(3): p. 83.
81. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2014. **15**(8): p. 509-524.
82. Lewis, B.P., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. *Cell*, 2003. **115**(7): p. 787-798.
83. Piedade, I., et al., *1: Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell*. 2004 Jan 23; 116 (2): 281-97. Review. PubMed PMID: 14744438.
84. John, B., C. Sander, and D.S. Marks, *Prediction of human microRNA targets*, in *MicroRNA Protocols*. 2006, Springer. p. 101-113.
85. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**(24): p. 15524-15529.
86. Kent, O. and J. Mendell, *A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes*. *Oncogene*, 2006. **25**(46): p. 6188.
87. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005. **102**(39): p. 13944-13949.
88. Johnson, S.M., et al., *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. *Cell*, 2005. **120**(5): p. 635-647.
89. Metzler, M., et al., *High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2004. **39**(2): p. 167-169.
90. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. *nature*, 2005. **435**(7043): p. 834.
91. O'Donnell, K.A., et al., *c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression*. *Nature*, 2005. **435**(7043): p. 839.
92. Ferracin, M., G.A. Calin, and M. Negrini, *MicroRNAs in cancer (an overview)*, in *MicroRNAs in Cancer Translational Research*. 2011, Springer. p. 1-71.

93. Zhao, J.-J. and R.D. Carrasco, *Crosstalk between microRNA30a/b/c/d/e-5p and the canonical Wnt pathway: implications for multiple myeloma therapy*. *Cancer research*, 2014. **74**(19): p. 5351-5358.
94. Brocke-Heidrich, K., et al., *Interleukin-6–dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family–independent survival pathway closely associated with Stat3 activation*. *Blood*, 2004. **103**(1): p. 242-251.
95. Shen, X., et al., *miRNA-202 in bone marrow stromal cells affects the growth and adhesion of multiple myeloma cells by regulating B cell-activating factor*. *Clinical and experimental medicine*, 2016. **16**(3): p. 307-316.
96. Kawano, M., et al., *Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas*. *Nature*, 1988. **332**(6159): p. 83.
97. Mitsiades, C.S., et al., *Activation of NF- κ B and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications*. *Oncogene*, 2002. **21**(37): p. 5673.
98. Bataille, R., et al., *Serum levels of interleukin 6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias*. *The Journal of clinical investigation*, 1989. **84**(6): p. 2008-2011.
99. Ogata, A., et al., *Blockade of mitogen-activated protein kinase cascade signaling in interleukin 6-independent multiple myeloma cells*. *Clinical Cancer Research*, 1997. **3**(6): p. 1017-1022.
100. Galardi, S., et al., *miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(32): p. 23716-23724.
101. Kneitz, B., et al., *Survival in patients with high-risk prostate cancer is predicted by miR-221, which regulates proliferation, apoptosis, and invasion of prostate cancer cells by inhibiting IRF2 and SOCS3*. *Cancer research*, 2014. **74**(9): p. 2591-2603.
102. Falkenberg, N., et al., *MiR-221/-222 differentiate prognostic groups in advanced breast cancers and influence cell invasion*. *British journal of cancer*, 2013. **109**(10): p. 2714.
103. Quintavalle, C., et al., *miR-221/222 overexpression in human glioblastoma increases invasiveness by targeting the protein phosphate PTP μ* . *Oncogene*, 2012. **31**(7): p. 858.
104. He, H., et al., *The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005. **102**(52): p. 19075-19080.

105. Moshiri, F., et al., *Inhibiting the oncogenic mir-221 by microRNA sponge: toward microRNA-based therapeutics for hepatocellular carcinoma*. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 2014. **7**(1): p. 43.
106. Liu, Y., et al., *Construction of circular miRNA sponges targeting miR-21 or miR-221 and demonstration of their excellent anticancer effects on malignant melanoma cells*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013. **45**(11): p. 2643-2650.
107. Wang, X., et al., *Adenovirus-mediated shRNAs for co-repression of miR-221 and miR-222 expression and function in glioblastoma cells*. *Oncology reports*, 2011. **25**(1): p. 97-105.
108. Frenquelli, M., et al., *MicroRNA and proliferation control in chronic lymphocytic leukemia: functional relationship between miR-221/222 cluster and p27*. *Blood*, 2010. **115**(19): p. 3949-3959.
109. Medina, R., et al., *MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival*. *Cancer research*, 2008. **68**(8): p. 2773-2780.
110. Lloyd, R.V., et al., *p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers*. *The American journal of pathology*, 1999. **154**(2): p. 313-323.
111. Heinen, A., et al., *The cyclin-dependent kinase inhibitor p57kip2 is a negative regulator of Schwann cell differentiation and in vitro myelination*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(25): p. 8748-8753.
112. Garofalo, M., et al., *miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation*. *Cancer cell*, 2009. **16**(6): p. 498-509.
113. Chun-zhi, Z., et al., *MicroRNA-221 and microRNA-222 regulate gastric carcinoma cell proliferation and radioresistance by targeting PTEN*. *BMC cancer*, 2010. **10**(1): p. 367.
114. Liu, X., et al., *MicroRNA-222 regulates cell invasion by targeting matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) in tongue squamous cell carcinoma cell lines*. *Cancer Genomics-Proteomics*, 2009. **6**(3): p. 131-139.
115. Felli, N., et al., *MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005. **102**(50): p. 18081-18086.
116. Lionetti, M., et al., *Identification of microRNA expression patterns and definition of a microRNA/mRNA regulatory network in distinct molecular groups of multiple myeloma*. *Blood*, 2009. **114**(25): p. e20-e26.

117. Terasawa, K., et al., *Sustained activation of ERK1/2 by NGF induces microRNA-221 and 222 in PC12 cells*. The FEBS journal, 2009. **276**(12): p. 3269-3276.
118. Bettscheider, M., C. Murgatroyd, and D. Spengler, *Simultaneous DNA and RNA isolation from brain punches for epigenetics*. BMC research notes, 2011. **4**(1): p. 314.
119. Edwalds-Gilbert, G., K.L. Veraldi, and C. Milcarek, *Alternative poly (A) site selection in complex transcription units: means to an end?* Nucleic acids research, 1997. **25**(13): p. 2547-2561.
120. Lutfalla, G. and G. Uze, [19] *Performing Quantitative Reverse-Transcribed Polymerase Chain Reaction Experiments*. Methods in enzymology, 2006. **410**: p. 386-400.
121. Kubista, M., et al., *The real-time polymerase chain reaction*. Molecular aspects of medicine, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
122. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method*. Nature protocols, 2008. **3**(6): p. 1101.
123. Hossain, M.S., *Validation of internal control genes for quantitative real-time PCR under different experiment conditions in Multiple Myeloma*. Journal of BioScience and Biotechnology, 2018. **7**(2-3): p. 79-90.
124. Choong, M.L., H.H. Yang, and I. McNiece, *MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis*. Experimental hematology, 2007. **35**(4): p. 551-564.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΟΡΙΩΝ mRNA ΚΑΙ microRNA ΣΕ CD138+ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΥΣΚΡΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΘΕΡΑΠΕΥΟΝΤΑΙ ΜΕ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

ΛΙΟΣΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ-ANNA

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΕΚΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες (PCD) αποτελούν ένα ευρύ φάσμα αιματολογικών παθήσεων που χαρακτηρίζονται από την πλασματοκυτταρική διήθηση του μυελού των οστών και τη συσσώρευση κυττάρων που παράγουν μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες. Μερικές από τις ασθένειες που περιλαμβάνουν είναι το πολλαπλό μυέλωμα (MM), η μονοκλωνική γαμμαπάθεια απροσδιόριστης σημασίας (MGUS), το «έρπον» μυέλωμα (SMM) και η μακροσφαιριναιμία Waldenström's. Το πολλαπλό μυέλωμα (MM) υπολογίζεται πως έχει συχνότητα εμφάνισης 1 έως 2 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα, προσβάλλει κυρίως ηλικιωμένα άτομα, και αντιπροσωπεύει το 1% του συνόλου των νεοπλασιών ενώ για τις αιματολογικές νεοπλασίες αντιπροσωπεύει το 10%. Το πολλαπλό μυέλωμα είναι νεοπλασία των Β-κυττάρων και χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των τελικά διαφοροποιημένων πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών. Τα κακοήθη πλασματοκύτταρα παράγουν μία μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη (Μ-πρωτεΐνη ή παραπρωτεΐνη) και προκαλούν διήθηση του μυελού, οστεολύσεις, αναιμία, νεφρική ανεπάρκεια και ευαισθησία σε μικροβιακές μολύνσεις. Η πρόγνωση και η κλινική πορεία των ασθενών με ΠΜ ποικίλει, με χρόνο επιβίωσης από μερικές ημέρες έως και πάνω από 10 χρόνια. Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι το ΠΜ στο ένα τρίτο των ασθενών προκύπτει από προϋπάρχουσα καλοήγη μονοκλωνική γαμμαπάθεια ενώ στους υπόλοιπους παρουσιάζεται παρακάμπτοντας προϋπάρχουσες καταστάσεις και κάποιες φορές με επιθετική εξέλιξη. Λόγω αυτής της ετερογένειας είναι πολύ πιθανό η παθογένεια και η εξέλιξη της νόσου να καθορίζεται από γενετικούς μηχανισμούς μέσω διαφορετικών μονοπατιών. Η κατανόηση επομένως των γενετικών αυτών αλλαγών είναι καθοριστικής σημασίας για την πρόγνωση, κλινική παρακολούθηση και θεραπεία των ασθενών με ΠΜ. Ένα ιδιαίτερα γρήγορα αναπτυσσόμενο πεδίο έρευνας για τον καρκίνο είναι η μελέτη των μικρομοριακών RNAs (miRNAs). Τα miRNAs αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια μικρών μη κωδικών μορίων RNA, τα οποία ρυθμίζουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Πρόσφατα δεδομένα παρουσιάζουν τα miRNAs ως πολλά υποσχόμενους καρκινικούς δείκτες. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάλυση της έκφρασης, μέσω ανάπτυξης ευαίσθητων μεθοδολογιών, η μελέτη και η κλινική αξιολόγηση, ορισμένων mRNA μορίων αλλά και μη κωδικών γονιδίων microRNA στο πολλαπλό μυέλωμα ως νέων μοριακών βιοδεικτών για τη διάγνωση και πρόγνωση της νόσου, καθώς και την πρόβλεψη της θεραπευτικής ανταπόκρισης των ασθενών. Τα microRNAs (miRNAs) έχουν μήκος 21–23 νουκλεοτίδια και

ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση στα ευκαρυωτικά κύτταρα μέσω πρόσδεσης σε μια μη κωδική περιοχή των mRNA-στόχων που ονομάζεται 3'-αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR).

Με αυτόν το μηχανισμό, τα miRNAs ρυθμίζουν την αυτο-ανανέωση, τη διαφοροποίηση και τη διαίρεση των κυττάρων, μέσω της μετα-μεταγραφικής σίγασης των γονιδίων. Τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση είτε αναστέλλοντας τη μετάφραση, είτε προωθώντας την αποδόμηση συγκεκριμένων μεταγράφων RNAs (mRNAs). Παρά το γεγονός ότι ποσοστό 3% των γονιδίων του ανθρώπου κωδικοποιεί miRNAs, τα εν λόγω miRNAs ρυθμίζουν περίπου το 30% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Αυτό υποδεικνύει όχι μόνο τη σημασία τους σε ποικίλα ρυθμιστικά μονοπάτια, αλλά και το δυναμικό τους για χειρισμό των λειτουργιών του κυττάρου. Επιπρόσθετα, όσον αφορά στον καρκίνο, τα miRNAs έχει παρατηρηθεί να δρουν τόσο ως ογκοκατασταλτικά μόρια όσο και ως ογκογονίδια, τα οποία αναστέλλουν και επάγουν-προάγουν την ανάπτυξη όγκου, αντίστοιχα. Επιπλέον, μια συνολική υποέκφραση των miRNAs παρατηρείται σε πολλούς καρκινικούς ιστούς, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς. Επομένως, μια δυναμική θεραπευτική χρήση των miRNAs αφορά στη διόρθωση των απορρυθμισμένων επιπέδων μετάφρασης γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται σε μονοπάτια σηματοδότησης στα καρκινικά κύτταρα, και ιδιαίτερα στα καρκινικά βλαστοκύτταρα που πρωτίστως ευθύνονται για την καρκινογένεση και τις μεταστάσεις. Πραγματοποιήθηκε συλλογή και επεξεργασία ενός σημαντικού μεγέθους δειγμάτων CD138+ κυττάρων από ασθενείς με μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρύνιστης σημασίας (MGUS), ασυμπτωματικό πολλαπλό μυέλωμα (SMM) και πολλαπλό μυέλωμα (MM) . Αφού έγινε απομόνωση του ολικού RNA των δειγμάτων, και η σύνθεση του cDNA με την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής αναλύθηκε η έκφραση mRNA μεταγράφων αρχικά για τα γονίδια αναφοράς *GAPDH* και *HPRT1* καθώς και ορισμένων γονιδίων-στόχων όπως *APAF1*, *BAK1*, *BID*, *BIM*, *BCL2L12*, *BOK*, *BAX*, *BCLX*, *MCL1*, *KLK4*, *KLK5*, *KLK6*, *KLK7* και *KLK8* σε δείγματα CD138+ κυττάρων , μέσω της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (real-time qPCR) αλλά και μέσω της μεθόδου «Nested PCR» για το γονίδιο αναφοράς *GAPDH* και τα *BAX*, *BCL2*, *BCL2L12*, *BCLX*, και *BOK* ώστε να ενισχυθεί η έκφραση αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά. Αυτά τα μη ικανοποιητικά αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στην τεχνική της εκχύλισης του RNA, στην παρουσία αναστολέων και στις διαφορετικές αποδόσεις των αντιδράσεων της αντίστροφης μεταγραφής και PCR μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων ή υπάρχει κάποιο άλλο μόριο όπως η παραπρωτεΐνη M όπου η υπερπαραγωγή της να εμποδίζει την μελέτη της έκφρασης των mRNA μεταγράφων των γονιδίων αυτών. Τα miRNAs, ως ογκογονίδια ή καταστολείς όγκων, ρυθμίζουν τις οδούς σηματοδότησης που σχετίζονται με την εξέλιξη του πολλαπλού μυελώματος. Η ανάλυση της έκφρασης των miR-221 και miR-222, πραγματοποιήθηκε με χρήση της ποσοτικής αντίδρασης πραγματικού χρόνου (real-time qPCR) με γονίδιο αναφοράς το *RNU48* . Για την ανίχνευση των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική SYBR Green I. Η μέθοδος ποσοτικοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν $2^{-\Delta\Delta C_t}$ η μέθοδος αυτή ήταν επιτυχής.

Η διερεύνηση της κλινικής αξίας των μελετώμενων βιομορίων πραγματοποιήθηκε μέσω εκτενούς βιοστατιστικής ανάλυσης. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες μη παραμετρικές στατιστικές δοκιμασίες για την ανάλυση της κατανομής των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα. Για τη διερεύνηση της σχέσης των επιπέδων έκφρασης των miR-221 και miR-222 και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών εφαρμόστηκαν το Mann-Whitney U test και το Jonckheere-Terpstra test . Απο τη διερεύνηση αυτή προέκυψε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση του miR-222 με τη διάγνωση, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης του miR-222 είναι αυξημένα στο έρπων πολλαπλό μυέλωμα σε σχέση με το συμπτωματικό πολλαπλό μυέλωμα και έγινε και απεικόνιση με την καμπύλη ROC. Στη συνέχεια έγινε κατηγοριοποίηση της συνεχούς μεταβλητής των επιπέδων έκφρασης με βάση τη διάμεσο τιμή και διερευνάται επίσης η σχέση των επιπέδων έκφρασης των βιομορίων με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά εφαρμόζοντας το Chi-Square (χ^2) τεστ. Το αποτέλεσμα που προέκυψε και ήταν στατιστικά σημαντικό ήταν η συσχέτιση της έκφρασης του miR-221 με την οστεόλυση. Απο τους ασθενείς που είναι αρνητικοί το 73,9% έχει οστεόλυση και το 26,1% δεν έχει οστεόλυση, ενώ οι ασθενείς οι οποίοι είναι θετικοί το 33,3% έχει οστεόλυση και το 66,7% δεν έχει οστεόλυση με $p=0,013 < 0,05$. Συμπερασματικά όταν έχουμε χαμηλά επίπεδα έκφρασης του miR-221 αυξάνεται το ποσοστό των ασθενών με οστεόλυση ενώ όταν τα επίπεδα έκφρασης είναι υψηλά μειώνεται το ποσοστό των ασθενών με οστεόλυση.

**EXPRESSION STUDY OF mRNA AND microRNA EXPRESSION IN CD138⁺
CELLS OF PATIENTS WITH PLASMA CELL DYSCRASIAS TREATED
WITH TARGETED THERAPIES**

LIOSI AIKATERINI-ANNA

MASTER THESIS

FACULTY OF BIOLOGY, N.K.U.A.

ABSTRACT

Plasmacellular dyscrasias (PCD) are a wide spectrum of hematological diseases characterized by plasmacellular bone marrow infiltration and the accumulation of monoclonal immunoglobulin-producing cells. Such diseases are multiple myeloma (MM), monoclonal gammopathy of indeterminate importance (MGUS), "SMOLDERING" myeloma (SMM) and Waldenström's macroglobulinemia. Multiple myeloma (MM) is estimated to have an incidence of 1 to 2 cases per 100,000 individuals, predominantly elderly, and represents 1% of all tumors and 10% of hematologic tumors. Multiple myeloma is B-cell neoplasia and is characterized by the uncontrolled proliferation of differentiated plasma cells in the bone marrow. Malignant plasma cells produce a monoclonal immunoglobulin (M-protein or paraprotein) and cause marrow infiltration, osteolysis, anemia, renal failure and susceptibility to microbial infections. The prognosis and clinical course of patients with MM varies, with survival time ranging from a few days to more than 10 years. Epidemiological studies have shown that MM in 1/3 of patients derives from pre-existing benign monoclonal gammopathy, while in the rest is bypassed by pre-existing conditions and sometimes aggressive. Due to this heterogeneity, the pathogenesis and evolution of the disease are very likely to be determined by genetic mechanisms through different pathways. Understanding these genetic changes is therefore crucial for the prognosis, clinical follow-up and treatment of patients with MM. One fast-growing field of cancer research is the study of micro molecular RNAs (miRNAs). miRNAs are a large family of small non-coding RNA molecules that regulate basic cellular functions. Recent data presents miRNAs as promising cancer markers. The purpose of this thesis was the expression analysis, through the development of sensitive methodologies, the study and clinical evaluation of certain mRNA molecules and microRNAs in multiple myeloma as new molecular biomarkers for diagnosis and prognosis of the disease, as well as for patients' therapeutic response prediction. MicroRNAs (miRNAs) are 21-23 nucleotides in length and regulate gene expression in eukaryotic cells by binding to a non-coding region of the target mRNA called the 3'-untranslated region (3'-UTR).

By this mechanism, miRNAs regulate self-renewal, differentiation and cell division, through post-transcriptional silencing of genes. miRNAs regulate gene expression either by inhibiting translation or by promoting the degradation of specific RNAs (mRNAs). Although only 3% of human genes encode miRNAs, these miRNAs regulate about 30% of the genes encoding proteins. This indicates not only their importance in a variety of regulatory pathways, but also their potential for manipulating cell functions. In addition, miRNAs have been observed to act both as tumor suppressor molecules and as oncogenes, which inhibit and induce tumor growth, respectively. In addition, a general overexpression of miRNAs is observed in many cancerous tissues, compared to their corresponding normal. Therefore, a dynamic therapeutic use of miRNAs is focused on the downregulation of the expression levels of target genes expression involved in signaling pathways in cancer cells, and in particular in cancer stem cells primarily responsible for carcinogenesis and metastases. A significant size of CD138⁺ cell samples were collected and processed from patients with unambiguous monoclonal gammopathy (MGUS), asymptomatic multiple myeloma (SMM), and multiple myeloma (MM). After isolation of total RNA from the samples, and cDNA synthesis by reverse transcription reaction, the transcript mRNA expression was initially analyzed for the *GAPDH* and *HPRT1* reporter genes as well as certain target genes such as *APAF1*, *BAK1*, *BID*, *BIM*, *BL*, *BCL*, *BOK*, *BAX*, *BCLX*, *MCL1*, *KLK4*, *KLK5*, *KLK6*, *KLK7*, *KLK7* and *KLK8* in CD138⁺ cell samples, using real-time quantitative PCR (real-time qPCR) as well as the 'Nested PCR' method for the *GAPDH* reporter gene. and *BAX*, *BCL2*, *BCL2L12*, *BCLX*, and *BOK* to enhance expression but the results were not satisfactory. These unsatisfactory results may be due to the technique of RNA extraction, the presence of inhibitors and the different yields of reverse transcription and PCR reactions between the different samples, or due to the presence of another molecule such as paraprotein M, the overproduction of which prevents the expression analysis of these mRNA transcripts of these genes. MiRNAs, as oncogenes or tumor suppressors, regulate signaling pathways associated with the development of multiple myeloma. Expression analysis of miR-221 and miR-222 was performed using real-time qPCR. The expression levels were normalized to *RNU48* reporter gene levels. SYBR Green I was used to detect the products. The relative quantification method used was $2^{-\Delta\Delta C_t}$. This method was successful. The clinical value of the studied biomolecules was investigated through extensive biostatistical analysis. In particular, appropriate nonparametric statistical tests were used to analyze the distribution of the expression levels of the under-study molecules in various clinicopathological characteristics of patients with multiple myeloma. Mann-Whitney U test and Jonckheere-Terpstra test were used to investigate the relationship between miR-221 and miR-222 expression levels and clinicopathological characteristics.

This study showed a statistically significant association of miR-222 with the diagnosis, It was observed that expression levels of miR-222 are elevated in smoldering multiple myeloma compared to symptomatic multiple myeloma, and the ROC curve was also plotted. The result, which was statistically significant, was the association of miR-221

expression with osteolysis. Of the patients who were negative, 73.9% had osteolysis, while 26.1% did not. In positive patients 33.3% had osteolysis while 66.7% did not ($p = 0.013$). In conclusion, low expression levels of miR-221 are related to a higher rate of osteolysis, while high expression levels of miR-221 are related to a lower rate of osteolysis.